

**UNIVERSITE KASDI MERBAH - OUARGLA**  
**Faculté des Mathématiques et des Sciences de la Matière**  
**Département de Chimie**

*Année : 2014-2015*



*N° d'enregistrement : ..../..../..../..../*

**THESE**

**Pour l'obtention du diplôme de Doctorat ès sciences**  
**En Chimie**

**Extraction et analyse de la composition chimique**  
**de plantes sahariennes d'intérêt médicinal**

**Présentée et soutenue publiquement**

**Par**

**BOUZIANE Mebarka**

**Le 14/05/2015**

**Devant le jury composé de :**

<b>SAIDI Mokhtar</b>	<b>Professeur U.K.M. Ouargla</b>	<b>Président</b>
<b>YOUSFI Mohamed</b>	<b>Professeur ENS Laghouat</b>	<b>Examineur</b>
<b>LAHRECH Mokhtar Boualem</b>	<b>Professeur Univ. Z.A. Djelfa</b>	<b>Examineur</b>
<b>DENDOUGUI Hocine</b>	<b>Professeur U.K.M. Ouargla</b>	<b>Examineur</b>
<b>AUDRAN Gérard</b>	<b>Professeur Univ. Aix-Marseille</b>	<b>Examineur</b>
<b>HADJ MAHAMMED Mahfoud</b>	<b>Professeur U.K.M. Ouargla</b>	<b>Rapporteur</b>

# الأهـلـاء

أهـدي هـذا العـمل:  
إلى الذين وصّى الله بهما احسانا  
والديّ الكريمين  
وإلى الذين تقرّ بهم الأعين  
زوجي و ابنتي العزيزين  
وإلى الذين تشدّ بهم الآزار  
إخواني و أخواتي  
وأهلي الأوفياء

## Remerciements

*Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience pour faire aboutir ce travail.*

*J'adresse mes plus sincères remerciements au Professeur **HADJ-MAHAMMED Mahfoud**, directeur du laboratoire Biogéochimie des Milieux Désertiques à l'université Kasdi Merbah Ouargla, directeur de cette thèse, et à Monsieur **BADJAH-HADJ-AHMED A. Yacine**, Professeur à l'université du ROI SAOUD de Ryadh (Arabie Saoudite), pour m'avoir guidé durant la préparation de ma thèse de doctorat. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma reconnaissance.*

*Je tiens à exprimer ma reconnaissance au Professeur **Gérard AUDRAN**, Professeur à l'institut de Chimie Radicalaire de l'université d'Aix-Marseille pour avoir accepté de co-diriger mon travail, et pour son accueil dans son laboratoire.*

*Je remercie Monsieur **SAIDI Mokhtar**, Professeur à l'université Kasdi Merbah Ouargla pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury de cette thèse.*

*Mes remerciements vont également à Messieurs : **YOUSFI Mohamed**,*

***DENDOUGUI Hocine** et **LAHRECH Mokhtar Boualem**, professeurs à l'ENS Laghouat, à l'université K.M.Ouargla et à l'université Z.A.Djelfa, respectivement, pour avoir accepté d'examiner ce travail en faisant partie du jury.*

*Un remerciement spécial pour Monsieur **Maurice Santelli**, Professeur émérite à l'ICR de l'université d'Aix Marseille pour ses précieux encouragements et pour m'avoir facilité mon intégration au sein de l'équipe.*

*Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Mme **OUGHLISSI (née DEHAK) Karima**, Maître de conférences A à l'université K.M. Ouargla, et encore une fois à Mr **H. Dendougui** pour leur aide inappréciable dans la finalisation de ce travail. .*

*Je ne saurais oublier de remercier mes collègues du laboratoire BGCMD à l'université d'Ouargla ainsi que les membres de l'équipe SREP-M à l'ICR à l'université d'Aix-Marseille pour leur soutien et le climat familial dont ils ont su créer. Je leur exprime mon respect et ma profonde sympathie.*

*Je remercie également tous les enseignants, étudiants et travailleurs de l'université d'Ouargla et ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à ma formation pédagogique et scientifique.*

*Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont à toute ma famille qui a contribué par sa patience et ses encouragements sans relâche afin que je puisse mener à terme ce travail.*

*Merci à tous...*

## Résumé:

Ce travail fait partie d'un programme de recherche qui porte sur l'étude phytochimique des plantes médicinales du Sahara algérien réputées pour leur richesse en métabolites secondaires et leurs vertus thérapeutiques.

Les recherches menées autour de cette thèse rentrent dans ce cadre et s'intéressent particulièrement à l'étude phytochimique des deux espèces *Brocchia cinerea* (Vis.) et *Matricaria pubescens* (Desf.) qui sont très utilisées en médecine traditionnelle dans les régions sahariennes.

L'objectif de ce travail concerne la caractérisation structurale des molécules isolées à partir de ces deux plantes. Pour cela, diverses méthodes d'extraction telles que l'hydrodistillation et la macération ont été utilisées. Une variété de techniques chromatographiques: colonne chromatographique, CCM, CCM préparatifs et HPLC, ont permis la purification de certaines substances constitutives.

L'investigation phytochimique de l'extrait chloroformique de *Brocchia cinerea* (Vis.) a abouti à l'identification de six lactones sesquiterpéniques, trois germacranolides, deux guaianolides et un eudesmanolide. L'élucidation de ces dernières structures a été établie au moyen de méthodes spectrales de pointe (MS, IR, RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C, DEPT, COSY, HSQC, HMBC, NOESY, DRX et VCD).

Les huiles essentielles des deux plantes, analysées par GC-FID et GC-MS sur colonne apolaire (HP1) et polaire (Innowax), quand à elles se sont montrées très riches en composés terpéniques dont les constituants majoritaires sont: la thujone (47.72 - 55.4 %), le camphre (10.54 - 11.28 %) et le santolinatriène (5.8-8.00 %) pour *Cotula cinerea* (Vis.) et l'herniarine (16.92 %) dans le cas de *Matricaria pubescens* (Desf.).

L'estimation de la teneur en polyphénols et en flavonoïdes d'une variété d'extraits obtenus des deux plantes a montré une richesse en métabolites secondaires.

Par ailleurs, l'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode DPPH, à travers les extraits précédents, a dévoilé des pouvoirs de piégeage du radical DPPH' variables, dont les plus puissants sont enregistrés pour *Matricaria pubescens* (Desf.) : pour l'extrait d'AcOEt et 95.81% et pour l'extrait de BuOH (supérieurs à 90%).

## **Abstract:**

This work is part of a research program that focuses on the phytochemical study of medicinal plants in the Algerian Sahara, which are known for their richness in secondary metabolites and their therapeutic properties.

The research through this thesis concerns this framework and is particularly interested in the phytochemical study of two species *Brocchia cinerea* (Vis.) and *Matricaria pubescens* (Desf.) which are widely used in traditional medicine in the Saharian regions.

The aim of this study is the structural characterization of isolated constituents from these two plants. For that various extraction methods such as hydrodistillation, maceration were used and a variety of chromatographic techniques: CC, CCM and HPLC have been very useful for the purification of constituents.

The phytochemical investigation of *Brocchia cinerea* chloroformic extract resulted in the isolation of six sesquiterpene lactones, the structures of three germacranolids, two guaianolids and one eudesmanolide were established by spectral methods (MS, IR, NMR<sup>1</sup>H, NMR<sup>13</sup>C, DEPT, COSY, HSQC, HMBC, NOESY, XRD and VCD).

While, it's essential oil analyzed by GC-MS was very rich in terpenic compounds, the main constituents were: thujone (47.72 - 55.4%), camphor (10.54 - 11.28%) and santolinatriene (5.8-8.00%).

The study of *Matricaria pubescens* volatile composition analyzed by GC-FID and GC-MS on apolar column (HP1) and polar one (Innowax) identified a varied composition in which the herniarin (16.92%) was the main compound.

Moreover, the evaluation of the antioxidant activity by DPPH method for the two studied plants through a variety of their extracts, showed the strongest PI% (more than 90%) for *Matricaria pubescens* AcOEt and butanolic extracts.

## الملخص :

هذا العمل هو جزء من برنامج البحوث التي تركز على دراسة النباتات الطبية في الصحراء الجزائرية، والتي هي معروفة بثرائها بمنتجات الأيض الثانوي وخصائصها العلاجية. بحث هذه الأطروحة ينسجم مع هذا الإطار ويهتم بشكل خاص بدراسة النوعين النباتيين: *Brocchia cinerea* (Vis.) et *Matricaria pubescens* (Desf.) . وكلاهما يستخدم على نطاق واسع في الطب التقليدي في المناطق الصحراوية. الهدف من هذه الدراسة هو تشخيص صيغ المركبات المعزولة من هاتين النباتيتين. ولأجل ذلك استعملت أساليب استحلاص مختلفة مثل التقطير البخار، و النقع في المذيبات العضوية ومجموعة متنوعة من تقنيات الفصل الكروماتوغرافي: العمود الكروماتوغرافي، كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة والكروماتوغرافيا ذات الكفاءة العالية والتي كانت جد ضرورية في فصل وعزل وتنقية المركبات الكيميائية.

إن دراسة المستخلص الكلوروفورمي ل: *Brocchia cinerea* (Vis.) أسفرت عن تحديد البنى الجزيئية لسنة سسكوتربينات لاكتونية: ثلاثة من نوع germacranolides اثنان من نوع guaianolides و eudesmanolide. وقد استلزم ذلك استعمال الطرق الطيفية:

MS, IR, RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C, DEPT, COSY, HSQC, HMBC, NOESY, DRX et VCD)

في حين أظهر تحليل زيتها العطري بواسطة GC-MS, GC-FID على نوعين من الأعمدة (HP1) و (Innowax) أنها غنية جدا بالمركبات التربينية حيث كانت المكونات الرئيسية كمايلي: thujone (47.72 - 55.4 % ) ، (10.54 - 11.28 %) camphre و santolinatriène (5.8-8.00 %). أما دراسة التركيبة الكيميائية للزيت العطري لنبات *Matricaria pubescens* (Desf.) باستعمال نفس الطرق التحليلية فقد أظهرت تنوعا كبيرا وكان المركب الأساسي هو herniarine (16.92 %).

تقييم النشاط المضاد للأكسدة باستخدام طريقة DPPH لمستخلصات متنوعة لكننا النباتيين أظهر أن مستخلص خلاص الخل و المستخلص البوتانولي للأجزاء الهوائية لنبات *Matricaria pubescens* (Desf.) لهما قدرة تثبيط عالية والتي قدرت باكبر من : 90% .

## Liste des tableaux

<b>Tableau I-1</b>	Classification systématique de <i>Brocchia cinerea</i> (Vis.).	6
<b>Tableau I-2</b>	Métabolites secondaires isolés de <i>Brocchia cinerea</i> (Vis.).	9
<b>Tableau I-3</b>	Classification systématique de <i>Matricaria pubescens</i> (Desf.).	11
<b>Tableau II-III-1</b>	Quelques caractéristiques des huiles essentielles analysées.	38
<b>Tableau II-III-2</b>	Résultats d'analyse de HE1 et HE2 par CG-FID.	41
<b>Tableau II-III-3</b>	Pourcentages des constituants majoritaires de quelques espèces de la tribu Anthemideae.	44
<b>Tableau II-III-4</b>	Résultats d'analyse de HE1 par GC-MS.	47
<b>Tableau II-III-5</b>	Résultats d'analyse de l'huile essentielle de <i>M. pubescens</i> par GC-FID.	51
<b>Tableau II-III-6</b>	Résultats d'analyse de HEM par GC-MS.	58
<b>Tableau III-I-1</b>	Structures de quelques Lactones sesquiterpéniques de la tribu Anthemideae.	65
<b>Tableau III-I-2</b>	Quelques structures de SQL de <i>Brocchia cinerea</i> .	71
<b>Tableau III-II-1</b>	Résultats de fractionnement de l'extrait chloroformique.	84
<b>Tableau III-III-1</b>	Valeurs des déplacements chimiques RMN <sup>1</sup> H et corrélations: HSQC, COSY, HMBC et NOESY (600 MHz) RMN <sup>13</sup> C (150 MHz) du composé I dans CDCl <sub>3</sub> à 300°K.	104
<b>Tableau III-III-2</b>	Valeurs des déplacements chimiques RMN <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, COSY, HMBC (300 MHz) du composé II dans CDCl <sub>3</sub> à 300°K.	111
<b>Tableau III-III-3</b>	Valeurs des déplacements chimiques RMN <sup>1</sup> H et corrélations : HSQC, COSY, HMBC et NOESY (300 MHz), RMN <sup>13</sup> C (75 MHz) du composé III dans CDCl <sub>3</sub> à 330°K.	120
<b>Tableau III-III-4</b>	Valeurs des déplacements chimiques RMN <sup>1</sup> H et corrélations : HSQC, COSY, HMBC et NOESY (600 MHz), RMN <sup>13</sup> C (150 MHz) du composé IV dans CDCl <sub>3</sub> à 300°K.	126
<b>Tableau III-III-5</b>	Valeurs des déplacements chimiques RMN <sup>1</sup> H et corrélations : HSQC, COSY, HMBC et NOESY (600 MHz) RMN <sup>13</sup> C (150 MHz) dans CDCl <sub>3</sub> . du composé V à 300° K.	133
<b>Tableau III-III-6</b>	Valeurs des déplacements chimiques RMN <sup>1</sup> H et corrélations : HSQC, COSY, HMBC et NOESY (300MHz), RMN <sup>13</sup> C (75MHz) du composé VI dans le DMSO-d <sub>6</sub> à 330K.	140
<b>Tableau III-III-7</b>	Valeurs des déplacements chimiques RMN <sup>1</sup> H et corrélations : HSQC, COSY, HMBC et NOESY (600 MHz) RMN <sup>13</sup> C (150MHz) du composé VII Dans CDCl <sub>3</sub> à 300°K.	148
<b>Tableau IV-I-1</b>	Quelques classes des polyphénols.	150
<b>Tableau IV-I-2</b>	Activités biologiques de quelques composés phénoliques.	153
<b>Tableau IV-III-1</b>	Rendements des différentes extractions.	163



## Liste des figures

<b>Figure I-1</b>	Régions septentrionales de l'Algérie.	3
<b>Figure I-2</b>	Photo de la plante <i>Brocchia cinerea</i> (Vis.).	6
<b>Figure I-3</b>	Répartition géographique de la plante dans le nord Africain.	7
<b>Figure I-4</b>	Photo de la plante <i>Matricaria pubescens</i> (Desf.).	10
<b>Figure II-I-1</b>	Différents cellules végétales sécrétrices d'huiles essentielles.	16
<b>Figure II-I-2</b>	Exemples de quelques structures terpéniques et aromatiques présentent dans les huiles essentielles.	19
<b>Figure II-I-3-1</b>	Schéma de formation de l'acide mévalonique.	20
<b>Figure II-I-3-2</b>	Schéma d'isomérisation de l'IPP.	20
<b>Figure II-I-3-3</b>	Schéma de condensation de motifs isopréniques.	21
<b>Figure II-I-4-1</b>	Formation de quelques monoterpènes acycliques.	22
<b>Figure II-I-4-2</b>	Formation de monoterpènes cycliques (exemple Limonène).	23
<b>Figure II-I-4-3</b>	Formation de monoterpènes bicycliques (exemple $\alpha$ et $\beta$ -pinène)	23
<b>Figure II-I-5-1</b>	Schéma de biosynthèse des sesquiterpènes acycliques.	25
<b>Figure II-I-5-2</b>	Schéma de biosynthèse des sesquiterpènes cycliques.	26
<b>Figure II-I-6</b>	Schéma de biosynthèse de l'IPP et le DMAPP précurseurs des isoprénoïdes <i>via</i> le glycéraldéhyde 3-phosphate (D-GAP).	27
<b>Figure II-II-1</b>	Montages d'hydrodistillation utilisés.	35
<b>Figure II-III-1</b>	Représentation graphique des taux des rendements en huiles essentielles.	39
<b>Figure II-III-2</b>	Présence de familles chimiques dans l'huile essentielle (HE1).	45
<b>Figure II-III-3</b>	Chromatogramme obtenu par GC-MS pour HE1.	46
<b>Figure II-III-4</b>	Présence des familles chimiques dans l'huile essentielle (HEM).	52
<b>Figure II-III-5</b>	Chromatogramme obtenu pour HEM par GC-MS/EI sur Innowax.	53
<b>Figure II-III-6</b>	Chromatogramme obtenu pour HEM par GC-MS/EI sur HP1.	54
<b>Figure III-I-1</b>	Schéma proposé pour la biosynthèse de C-6 et C-8 lactones sesquiterpènes.	57
<b>Figure III-I-2-1</b>	Squelettes de base des SQL de la tribu Anthemideae.	59
<b>Figure III-I-2-2</b>	Squelettes de base des SQL de la tribu Anthemideae.	59
<b>Figure III-I-2-3</b>	Squelettes de base des SQL de la tribu Anthemideae.	60
<b>Figure III-I-2-4-1</b>	Autres arrangements des SQL de la tribu Anthemideae.	60
<b>Figure III-I-2-4-2</b>	Autres arrangements des SQL de la tribu Anthemideae.	61
<b>Figure III-I-3</b>	Relations biogénétiques entre les dérivés du germacranolide.	62
<b>Figure III-I-4-1</b>	Distribution des lactones sesquiterpéniques présentes dans les tribus des Asteraceae.	63
<b>Figure III-I-4-2</b>	Distribution des guaianolides présents dans les tribus des Asteraceae	64
<b>Figure III-I-4-3</b>	Distribution des pseudoguaianolides présents dans les tribus des Asteraceae.	64
<b>Figure III-I-5</b>	Lactones sesquiterpènes de <i>Cotula hispidula</i> .	70
<b>Figure III-I-6</b>	Lactones sesquiterpènes de <i>Cotula Coronopifolia</i> .	70
<b>Figure III-I-7</b>	Structure du groupement $\alpha$ -méthylène $\gamma$ -lactone.	72
<b>Figure III-I-8</b>	Réaction d'addition type Michael.	72
<b>Figure III-I-9</b>	Les SQL investiguées dans l'étude dans l'étude [212].	74

<b>Figure III-I-10</b>	Série des guaianolides et leurs dérivés, testés dans l'étude [213].	74
<b>Figure III-I-11</b>	les lactones sesquiterpéniques testées dans l'étude [214].	75
<b>Figure III-I-12</b>	Structure des composés I et II, cités dans l'étude [215].	76
<b>Figure III-I-13</b>	Les guaianolides les plus actifs testés dans l'étude [216].	77
<b>Figure III-I-14</b>	Structures des SQL étudiées et présentant $IC_{50} = 5\mu M$ dans l'étude [217].	77
<b>Figure III-I-15</b>	Structures lactoniques citées dans l'étude [218].	78
<b>Figure III-I-16</b>	Structures chimiques des composés testés dans l'étude [219].	79
<b>Figure III-I-17</b>	Structures chimiques de Psilostachyin (I) et Peruvine (II) [220].	79
<b>Figure III-I-18</b>	Lactones sesquiterpènes étudiées dans la référence [221].	80
<b>Figure III-II-1-</b>	Protocole suivi pour l'extraction des lactones sesquiterpéniques.	83
<b>Figure III-III-1</b>	Chromatogramme du produit II.	105
<b>Figure III-III-2</b>	Structure du produit II.	112
<b>Figure IV-I-1</b>	Exemples de structure d'acides hydroxybenzoïques.	151
<b>Figure IV-I-2</b>	Exemples de structure d'acides hydroxycinnamiques.	151
<b>Figure IV-I-3</b>	Structure de base des flavonoïdes.	151
<b>Figure IV-I-4</b>	Exemples de structure des tanins.	152
<b>Figure IV-I-5</b>	Mécanisme d'action des antioxydants phénoliques.	155
<b>Figure IV-I-6</b>	piégeage des radicaux libres par le noyau B.	155
<b>Figure IV-I-7</b>	Sites de chélation des flavonoïdes.	156
<b>Figure IV-II-1</b>	Protocole d'extraction des extraits (I, II, III et VIII).	158
<b>Figure IV-II-2</b>	Protocole d'extraction de l'extrait IV.	159
<b>Figure IV-II-3</b>	La réaction entre le radical libre DPPH <sup>•</sup> et l'antioxydant.	161
<b>Figure IV-III-1</b>	Représentation graphique des taux de rendements des extractions.	164
<b>Figure IV-III-2</b>	Représentation graphique des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes.	166
<b>Figure IV-III-3</b>	Représentation graphique de pouvoir d'inhibition et les concentrations des extraits testés.	168
<b>Figure IV-III-4</b>	Représentation graphique des $CE_{50}$ calculées.	170

## *Liste des organigrammes*

<b>Organigramme III-II-1</b>	Purification de la fraction Hept/AcoEt: 70/30.	85
<b>Organigramme III-II-2</b>	Purification de la sous-fraction M3.	86
<b>Organigramme III-II-3</b>	Purification de la sous-fraction MM5.	87
<b>Organigramme III-II-4</b>	Purification par HPLC de la sous-fraction MMM4.	87
<b>Organigramme III-II-5</b>	Purification de la sous-fraction MM2''.	88
<b>Organigramme III-II-6</b>	Purification de la sous-fraction M6.	89
<b>Organigramme III-II-7</b>	Purification de la sous-fraction 50/50(1).	90
<b>Organigramme III-II-8</b>	Purification de la sous-fraction (B2).	91
<b>Organigramme III-II-9</b>	Purification des fractions: (A51+ A52+ A53).	91
<b>Organigramme III-II-10</b>	Purification de la fraction Gr4.	92
<b>Organigramme III-II-11</b>	purification des sous-fractions (Gr4A+Gr4B+Gr4C).	93
<b>Organigramme III-II-12</b>	Purification des sous-fractions: Gr4A'+Gr4B'+Gr4C'.	94
<b>Organigramme III-II-13</b>	Purification des fractions (A55+A56+A57+A58).Obtenues par la phase Hept/AcOEt : 30/70.	95
<b>Organigramme III-II-14</b>	Suite de purification des fractions (A55+A56+A57+A58) obtenues par la phase Hept/AcOEt : 30/70.	96

## Liste des spectres

<b>Spectre n° 1</b>	DeptQ 135 du composé I.	98
<b>Spectre n° 2</b>	RMN HSQC (H-H) du composé I.	98
<b>Spectre n° 3</b>	RMN <sup>1</sup> H du composé I.	99
<b>Spectre n° 4</b>	RMN COSY du produit I.	100
<b>Spectre n° 5</b>	RMN HMBC du produit I.	101
<b>Spectre n° 6</b>	RMN NOESY du produit I.	103
<b>Spectre n° 7</b>	RMN <sup>13</sup> C du composé II.	106
<b>Spectre n° 8</b>	DeptQ 135 du composé II.	107
<b>Spectre n° 9</b>	RMN HSQC du composé II.	107
<b>Spectre n° 10</b>	RMN <sup>1</sup> H du composé II.	108
<b>Spectre n° 11</b>	RMN COSY du produit II.	109
<b>Spectre n° 12</b>	RMN HMBC du produit II.	110
<b>Spectre n° 13</b>	RMN <sup>13</sup> C du composé III.	114
<b>Spectre n° 14</b>	DeptQ 135 du composé III.	114
<b>Spectre n° 15</b>	RMN HSQC du composé III.	115
<b>Spectre n° 16</b>	RMN <sup>1</sup> H du composé III.	116
<b>Spectre n° 17</b>	RMN COSY du produit III.	117
<b>Spectre n° 18</b>	RMN HMBC du produit III.	117
<b>Spectre n° 19</b>	RMN NOESY du composé III.	118
<b>Spectre n° 20</b>	Dept 135 du composé IV.	121
<b>Spectre n° 21</b>	RMN HSQC du composé IV.	122
<b>Spectre n° 22</b>	RMN <sup>1</sup> H du composé IV.	123
<b>Spectre n° 23</b>	RMN COSY du produit IV.	124
<b>Spectre n° 24</b>	RMN HMBC du produit IV.	124
<b>Spectre n° 25</b>	RMN NOESY du composé IV.	125
<b>Spectre n° 26</b>	DeptQ 135 du composé V.	127
<b>Spectre n° 27</b>	RMN HSQC du composé V.	128
<b>Spectre n° 28</b>	RMN <sup>1</sup> H du composé V.	129
<b>Spectre n° 29</b>	RMN COSY du produit V.	129
<b>Spectre n° 30</b>	RMN HMBC du produit V.	130
<b>Spectre n° 31</b>	RMN NOESY du composé V.	132
<b>Spectre n° 32</b>	RMN <sup>13</sup> C du composé VI.	134
<b>Spectre n° 33</b>	DeptQ 135 du composé VI.	135
<b>Spectre n° 34</b>	RMN HSQC du composé VI.	135
<b>Spectre n° 35</b>	RMN <sup>1</sup> H du composé VI.	136
<b>Spectre n° 36</b>	RMN COSY du produit VI.	137
<b>Spectre n° 37</b>	RMN HMBC du produit VI.	137
<b>Spectre n° 38</b>	RMN NOESY du composé VI.	139

<b>Spectre n° 39</b>	DeptQ 135 du composé VII.	142
<b>Spectre n° 40</b>	RMN HSQC du composé VII.	142
<b>Spectre n° 41</b>	RMN <sup>1</sup> H du composé VII.	143
<b>Spectre n° 42</b>	RMN COSY du produit VII.	144
<b>Spectre n° 43</b>	RMN HMBC du produit VII.	144
<b>Spectre n° 44</b>	RMN NOESY du composé VII.	147

## *Abréviations*

<b>IPP</b>	Isopentényl pyrophosphate
<b>DMPP</b>	Diméthylallyl pyrophosphate
<b>GC-FID</b>	Gaz chromatography/Flamme Ionisation Detector
<b>GC/MS</b>	Gaz chromatography/ Mass Spectroscopy
<b>SM</b>	Specre de Masse
<b>Ir</b>	Indice de rétention
<b>TIC</b>	Total Ion Chromatogramm
<b>MIC</b>	Minimal Inhibitrice Concentration
<b>AML</b>	Leucémie Myéloïde Aiguë
<b>SCC</b>	Cellules Souches du Cancer
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Facteur de transcription
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentration Inhibitrice à 50%
<b>DCM</b>	Dichlorométhane
<b>DAD</b>	Détecteur à barrette de Diode
<b>CD</b>	Circular Dichroïsme
<b>RMN</b>	Résonance Magnétique Nucléaire
<b><i>J</i> (Hz)</b>	Constante de couplage (hertz)
<b>Dept</b>	Distortionless Enhancement by Polarisation Transfert
<b>HMBC</b>	Heteronuclear Multiple Bonding Connectivity
<b>COSY</b>	Corrélation Spectroscopy
<b>HSQC</b>	Heteronuclear Simple Quantum Correlation
<b>DRX</b>	Diffraction des rayons X
<b>VCD</b>	Vibrational Circular Dichroïsme
<b>EC<sub>50</sub></b>	Effective concentration à 50%

# Sommaire

INTRODUCTION .....	01
--------------------	----

## CHAPITRE I: Description des plantes étudiées

I-1- Introduction.....	03
I-2- Particularité de l'écosystème saharien.....	03
I-2-1- Position géographique et conditions climatiques.....	03
I-2-2- La flore saharienne.....	04
I-3- Sur la base de quoi nous avons choisi nos plantes ?.....	04
I-4- La famille des Asteraceae .....	05
I-5- L'espèce <i>Brocchia cinerea</i> (Vis.).....	06
I-5-1- Description botanique de la plante.....	06
I-5-2- Classification systématique.....	06
I-5-3- Répartition géographique de l'espèce.....	07
I-5-4- Médecine traditionnelle et connaissances locales.....	07
I-5-5- Travaux antérieurs sur la plante <i>Brocchia cinerea</i> (Vis.).....	08
I-5-5-1-Du point de vue composition chimique .....	08
I-5-5-2-Du point de vue potentiel biologique.....	09
I-6- L'espèce <i>Matricaria pubescens</i> (Desf.).....	10
I-6-1- Description botanique de la plante.....	10
I-6-2- Classification systématique.....	11
I-6-3-Répartition géographique de l'espèce.....	11
I-6-4-Médecine traditionnelle et connaissances locales.....	11
I-6-5- Travaux antérieurs sur la plante <i>Matricaria pubescens</i> (Desf.).....	12
I-6-5-1-Du point de vue composition chimique.....	12
I-6-5-2-Du point de vue composition biologique.....	13

## CHAPITRE II: Caractérisation des Huiles Essentielles des plantes étudiées.

### Partie I : Généralités sur les huiles essentielles.

II-I-1- Définition des huiles essentielles.....	14
II-I-2- Localisation et lieu de synthèse des huiles essentielles dans les plantes.....	14
II-I-3- Composition chimique des huiles essentielles.....	16
II-I-4- Biosynthèse de l'unité isoprène .....	20
II-I-4- 1- Par voie mévalonique .....	20

II-I-4-1-1-Monoterpènes acycliques et cycliques.....	22
II-I-4-1-2-Les sesquiterpènes acycliques et cycliques .....	24
II-I-4- 2- Autre voie de biosynthèse.....	27
II-I-5- Autres composants des huiles essentielles.....	28
II-I-6- Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles .....	29
II-I-7- Propriétés physico-chimiques .....	29
II-I-8-Procédés d'extraction des huiles essentielles.....	30
II-I-8-1-Hydrodistillation.....	30
II-I-8-2-L'entraînement à la vapeur d'eau.....	31
II-I-8-3-Hydrodiffusion.....	31
II-9- Intérêts des huiles essentielles .....	31

## **Partie II : Méthodes et matériel**

II-II-1- Introduction.....	33
II-II-2- Collecte du matériel végétale .....	33
II-II-3- Extraction des huiles essentielles (HE) des deux plantes .....	34
II-II-3-1- Protocole d' hydrodistillation.....	34
II-II-4- Analyses chromatographiques des Huiles essentielles.....	36
II-II-4-1- Analyse de HE1 et HE2 ( <i>Brocchia cinerea</i> Vis.).....	36
II-II-4-1-1- Analyse GC-FID.....	36
II-II-4-1-2- Analyse GC-MS.....	36
II-II-4-2-Analyse de HEM ( <i>Matricaria pubescens</i> Desf.).....	37

## **Partie III : Résultats et discussion**

II-III-1- Détermination du rendement et de quelques caractéristiques physiques...	38
II-III-2- Résultats des analyses chromatographiques.....	40
II-III-2-1-Résultats des analyses chromatographiques de HE1 et HE2 .....	40
II-III-2-2-Résultats des analyses chromatographiques de HEM .....	51

Chapitre III : Identification de Lactones sesquiterpéniques de *Brocchia cinerea*.

## **Partie I : Synthèse bibliographique**

III-I-1-Généralités sur les lactones sesquiterpéniques .....	55
III-I-2-Caractéristiques des lactones sesquiterpéniques.....	55
III-I-3- Biogenèse des lactones sesquiterpéniques.....	56
III-I-4- Place des lactones sesquiterpéniques dans la famille des Asteraceae.....	63
III-I-5- Les lactones sesquiterpéniques isolées dans la tribu Anthemideae.....	64
III-I-6- Les lactones sesquiterpéniques identifiés dans le même genre .....	70
III-I-7-Les lactones sesquiterpènes dans la même espèce .....	71



III-I-8- Intérêts thérapeutiques et biologiques des lactones sesquiterpéniques.....	72
III-I-9- Rôle des lactones sesquiterpéniques dans la plante.....	81

## **Partie II : Méthodes et Matériels**

III-II-1- Extraction des lactones sesquiterpéniques de <i>Brocchia cinerea</i> (Vis.).....	82
III-II-2- Séparation et purification des lactones sesquiterpéniques.....	84
III-II-2-1- Fractionnement de l'extrait chloroformique.....	84
III-II-2-2- Purifications de quelques fractions.....	85

## **Partie III : Résultats et discussion**

III-III-I-Elucidation structurale des composés purifiés.....	97
III-III-I-1-Elucidation structurale du composé I .....	97
III-III-I-2-Elucidation structurale du composé II.....	105
III-III-I-3-Elucidation structurale du composé III.....	113
III-III-I-4-Elucidation structurale du composé IV .....	121
III-III-I-5-Elucidation structurale du composé V .....	127
III-III-I-6-Elucidation structurale du composé VI .....	134
III-III-I-7-Elucidation structurale du composé VII .....	141

## **Chapitre IV : Teneurs en polyphénols et activité antioxydante**

### **Partie I : Généralités**

IV-I-1-Introduction.....	149
IV-I-2- Catégories et structures des composés phénoliques.....	150
IV-I-2-1- Les acides phénoliques.....	150
IV-I-2-1-1- les hydrobenzoïques .....	150
IV-I-2-1-2- les hydroxycinnamiques .....	151
IV-I-2-2- Les flavonoïdes.....	151
IV-I-2-3-Polyphénols complexes : les tanins .....	152
IV-I-3- Intérêts et propriétés biologiques des composés phénoliques .....	152
IV-I-4- L'activité antioxydante .....	153
IV-I-4-1- Phénomène d'oxydation dans les aliments .....	153
IV-I-4-2- Les espèces réactives oxygénées et le stress oxydant.....	154
IV-I-4-3-Classification des antioxydants.....	154
IV-I-4-4-Mécanismes de l'activité antioxydante des polyphénols .....	155
IV-I-4-4-1-Piégeage des radicaux libres .....	155
IV-I-4-4-2-Chélation des ions métalliques .....	156

## **Partie II : Méthodes et matériels**

IV-II-1- Matériel végétal utilisé .....	157
IV-II-2- Préparation des extraits.....	159
IV-II-3-Evaluation de l'efficacité des antioxydants .....	160
IV-II-3-1-Dosage des polyphénols totaux .....	160
IV-II-3-1-1-Principe .....	160
IV-II-3-1-2-Procédure expérimentale .....	160
IV-II-3-2-Dosage des flavonoïdes.....	160
IV-II-3-1-1-Principe .....	160
IV-II-3-1-2-Procédure expérimentale .....	161
IV-II-3-3- Evaluation de l'activité antiradicalaire par la méthode DPPH.....	161
IV-II-3-3-1-Principe .....	161
IV-II-3-3-2-Procédure expérimentale .....	162

## **Partie II : Résultats et discussion**

IV-III-1- Calcul des rendements des extraits préparés .....	163
IV-III-2- IV-III-2-Estimation des composés phénoliques .....	165
IV-III-2- 1- Dosage des phénols totaux et des flavonoïdes .....	165
IV-III-3- Evaluation de l'activité antioxydant par le test DPPH.....	167
IV-III-4-Détermination de la concentration effective $CE_{50}$ .....	170
<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>172</b>

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

# Introduction

---

Depuis les temps les plus reculés, l'homme a trouvé dans la nature et particulièrement, chez les plantes des solutions à ses problèmes quotidiens : de santé, lutte contre les prédateurs, conservation de la nourriture, etc.

Au fil des années, il a pu rassembler des connaissances importantes sur certaines plantes, basées sur des observations et des pratiques traditionnelles.

La découverte des produits synthétiques tels que les antibiotiques, les antioxydants, insecticides ...etc, a provoqué le déclin de la thérapie à base de plantes et l'a reléguée à un rang secondaire, cependant, la résistance des micro-organismes pathogènes à de tels médicaments ou encore les effets nocifs de tels conservateurs ont obligé les scientifiques de différentes disciplines à faire recours aux plantes médicinales et aromatiques pour découvrir des alternatifs naturels bioactifs.

L'immensité du territoire Algérien, sa situation géographique particulière et par conséquent, des conditions climatiques très variées, ont permis l'apparition de plusieurs types de flore, entre autres la flore saharienne qui est caractérisée par des plantes spontanées très appréciées et très répandues en médecine traditionnelle dans ces régions. Néanmoins, leur connaissance et leurs utilisations restent au niveau de certaines tribus sahariennes.

Notre contribution dans la valorisation de ces plantes, porte sur l'étude phytochimique de deux espèces entre elles, *Brocchia cinerea* (Vis.) et *Matricaria pubescens* (Desf.) connues, pour leurs applications, dans tout le Sahara algérien. Cependant, leurs compositions chimiques, notamment en métabolites secondaires, restent encore méconnues.

La complexité et la diversité des produits de ce métabolisme rend la tâche de leur caractérisation très difficile, mais possible grâce aux progrès scientifiques réalisés dans le domaine des techniques d'analyse.

Dans cette optique, deux groupes de ces produits sont visés par notre investigation. Les terpenoïdes représentent le principal groupe, en effet, nous avons opté pour déterminer la composition des huiles essentielles des deux espèces, leurs fractions les plus riches en ces substances, ainsi que leur constitution en lactones sesquiterpéniques. Alors que, l'étude quantitative menée sur les polyphénols, désignant le second groupe, a servi pour l'évaluation de l'activité antioxydante des deux plantes.

- Dans le premier chapitre de ce manuscrit, sera cité des particularités de l'écosystème saharien, des descriptions des deux plantes étudiées, leurs classifications systématiques, des connaissances locales relatives à ces plantes et leur utilisation en médecine traditionnelle et enfin sera reporté les travaux scientifiques antérieurs sur ces deux espèces.
- Le second chapitre est consacré à la caractérisation des huiles essentielles des plantes étudiées, il comportera trois parties. Dans la première sera reporté des généralités sur les huiles essentielles, la deuxième représentera les méthodes expérimentales suivies

pour l'obtention et l'analyse des huiles essentielles des deux plantes et dans la troisième partie sera présenté les résultats obtenus ainsi que leur discussion.

- Le troisième chapitre concerne l'identification de lactones sesquiterpéniques dans la plante *Brocchia cinerea*, comme précédemment, il est partagé en trois parties. La première rassemblera des informations bibliographiques sur les lactones sesquiterpéniques, dans la deuxième sera détaillé le protocole d'extraction, ainsi que le processus de fractionnement et de purification et dans la dernière partie sera décrite la méthodologie de la caractérisation des composés.
- Le dernier chapitre s'intéresse aux teneurs en polyphénols et à l'évaluation de l'activité antioxydante des plantes étudiées. Une synthèse bibliographique concernant les polyphénols et l'activité antioxydante sera représentée dans une partie, dans une autre les étapes expérimentales suivies par les résultats et leur discussion seront cités dans la troisième.

# CHAPITRE I

## Description des plantes étudiées

---

**I-1-Introduction:**

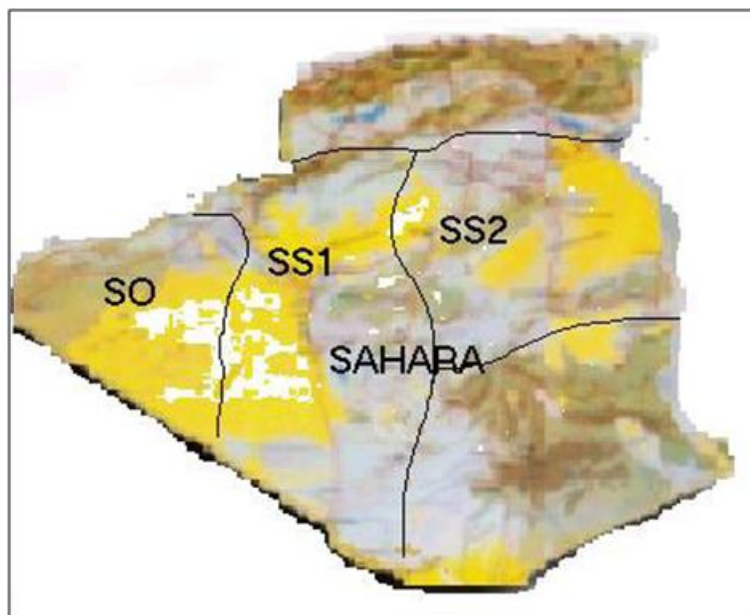
Durant ces deux dernières décennies, l'homme a pris conscience des dangers qui guettent la planète en matière de préservation des milieux naturels et de sauvegarde de l'environnement.

L'Algérie qui occupe une place stratégique de par sa position géographique en Afrique et dans le bassin méditerranéen, offre une variété d'écosystèmes : écosystèmes forestiers, écosystèmes steppiques et écosystème saharien, qui lui confèrent une exceptionnelle richesse phytogénétique [1, 2].

**I-2-Particularité de l'écosystème saharien:**

**I-2-1-Position géographique et conditions climatiques:**

La majorité du territoire national représentée par le Sahara algérien, est citée parmi les zones arides du monde où les conditions climatiques sont très contraignantes à la survie spontanée des espèces vivantes.



*SS1 : Secteur occidental du Sahara septentrional.*

*SS2 : Secteur oriental du Sahara septentrional.*

*SO : Secteur du Sahara occidental.*

**Figure I-1 : régions septentrionales de l'Algérie [3].**

Néanmoins, cet écosystème reste un milieu vivant pourvu d'un couvert végétal particulier, dont des plantes sauvages, d'un grand intérêt à plusieurs niveaux, ont pu survivre. Ces dernières ont pu s'adapter aux chaleurs fortes, pluviométries faibles voire rares, pauvreté du sol en éléments nutritifs,....[4]

D'ailleurs, cette adaptation est traduite par son pouvoir à synthétiser des métabolites secondaires qui, en plus de leurs rôles diversifiés dans l'organisme de ces plantes, rendent ces dernières, très intéressantes du point de vue composition chimique.

### **I-2-2-La flore saharienne :**

La flore saharienne apparaît comme très pauvre si l'on compare le petit nombre d'espèces qui habitent ce désert à l'énormité de la surface qu'il couvre [5]. Par contre, on a signalé que le nombre de genre est relativement élevé, car il est fréquent qu'un genre soit représenté par une seule espèce [4].

Sur la base de la flore de Quezel et Santa (1962-1963) dans « la nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales » [6], le dénombrement de Zeraia [7], confirmé par le rapport national sur l'état des ressources phytogénétiques, préparé par l'INRA en 2006 en collaboration avec la FAO [1, 8], a abouti à 289 espèces assez rares, 647 rares, 640 très rares, 35 rarissimes et 168 endémiques. Alors que l'analyse de (S. Benhouhou & al.) [2], leur a permis la réalisation d'une matrice des taxons de l'écosystème saharien avec 668 taxons dont 147 endémiques.

D'après le même rapport national préparé par l'INRA, la flore saharienne se caractérise par la prédominance des 3 grandes familles : Gramineae, Fabaceae, Asteraceae. Elles représentent à elles seules 35 à 40% de la flore du Sahara.

### **I-3-Sur la base de quoi nous avons choisi nos deux plantes ?**

La particularité de l'écosystème saharien a permis à la flore de ces régions d'être très spécifique que cela soit au niveau de rareté voir même endémisme avec un champ d'études taxonomique très intéressant, ou bien au niveau de leurs utilisations en médecine traditionnelle ceci traduit sûrement leur richesse en produits naturels d'intérêts pharmacologiques avec un potentiel biologique appréciable, ce qui oriente les scientifiques et les chercheurs vers des horizons pluridisciplinaires : phytochimiques, biologiques, agro-alimentaires, etc.



*Brocchia cinerea* (Vis.) et *Maricaria pubescens* (Desf.), deux Asteraceae appartenant à cette flore ont été choisies pour notre étude, cette sélection s'est basé sur l'ensemble cité précédemment ainsi que :

- La prospection auprès les habitants locaux des régions de Ghardaia, Ouargla, Touggourt et l'Oued aussi les herboristes, sur l'utilisation de ces plantes en médecine traditionnelle et dans leur vie quotidienne.
- L'abondance relative des deux plantes dans ces régions après la saison des pluies.
- Le peu de travaux de recherche trouvé sur les deux plantes.
- La richesse des deux plantes en métabolites secondaires dont certains sont mis en évidence à travers des travaux expérimentaux préliminaires réalisés au niveau de notre laboratoire [9, 10].

#### **I-4-La famille des Asteraceae:**

Les Asteraceae avec environ 25 000 espèces est considérée l'une des plus grandes familles dans le règne végétal. Plus de 5 000 espèces ont fait l'objet d'études phytochimiques dont environ 7 000 constituants ont été isolés et identifiés, cette famille est certainement la plus étudiée [11].

Ces composés appartiennent à différentes classes chimiques, mais parmi ceux qui sont considérés caractéristiques pour les Asteraceae, nous citons : les polyacétylènes [12, 13] les flavonoïdes [14-15] et les lactones sesquiterpéniques, d'après (F. C. Seaman) [16] les Asteraceae ont une tendance particulière pour l'accumulation de ce dernier type de substances [16-18].

Ces principaux constituants chimiques des Asteraceae expliquent la diversité de leurs activités pharmacologiques [19].

I-5-L'espèce *Brocchia cinerea* (Vis.)

## I-5-1-Description botanique de la plante

Figure I-2 : photo de la plante *Brocchia cinerea* (Vis.)

*Brocchia cinerea* (Vis.) (Fig. I-2) est à feuilles laineuses blanchâtres, épaisses, divisées dans leurs parties supérieures en trois à cinq dents obtus. Tiges de 10 à 40 cm, couchées puis redressées, capitules de 6 à 10 mm de diamètre, à involucre laineux à fleurs ; toutes tubuleuses, brunes en boutons puis jaunes d'or lorsqu'elles s'ouvrent. Très connue dans tout le Sahara, notamment dans les sols un peu sablonneux [5].

Cette espèce apparaît juste après les pluies; elle fait donc partie du couvert végétal dit « l'âcheb ».

## I-5-2-Classification systématique [5]:

Tableau I-1 : classification systématique de *Brocchia cinerea* (Vis.).

<b>Embranchement</b>	<b>Spermaphyta</b>
<b>S/embranchement</b>	<b>Angiospermes</b>
<b>Classe</b>	<b>Dicotylédones</b>
<b>Ordre</b>	<b>Asterales</b>
<b>Famille</b>	<b>Asteraceae</b>
<b>Tribu</b>	<b>Anthemideae</b>
<b>Genre</b>	<b><i>Brocchia</i> (syn: <i>Cotula</i>)</b>
<b>Espèce</b>	<b><i>Brocchia cinerea</i> Vis.</b>

### I-5-3-Répartition géographique de l'espèce :

L'espèce *Brocchia cinerea* (Vis.) est très rencontrée dans tout le Sahara, elle pousse dans les ergs et les sols peu ensablés, c'est une espèce saharo-arabique plus fréquente au Sahara septentrional qu'au Sahara central. On la voit au niveau des points d'eau [20, 21] Dans la région de Ouargla, elle est retrouvée à Oued Zouzfana, Oued M'zab, Bamendil, où elle est connue sous le nom de chouihia (ou parfois chihia) [22].

*Brocchia cinerea* (Vis.) est aussi connue dans les régions sahariennes du Maroc [23,24] et d'Égypte [25, 26]. La carte sur la figure I-3 montre la répartition de cette espèce dans les pays du nord d'Afrique [27].

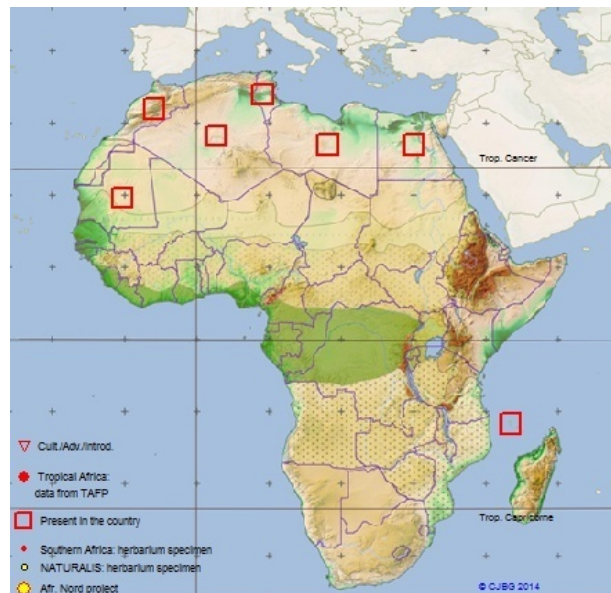


Figure I-3 : répartition géographique de la plante dans le nord Africain [27].

### I-5-4- Médecine traditionnelle et connaissances locales:

Les populations des régions sahariennes entre autres la région de Ouargla et ses environs utilisent *Brocchia cinerea* (Vis.) pour plusieurs fins thérapeutiques à savoir:

- La décoction des feuilles et des capitules servent comme une tisane contre les coliques et maux de ventre.
- Une préparation constituée de la plante fraîche, légèrement concassée, seule ou avec d'autres plantes avec un faible volume d'eau est conseillée en cas d'insolation, maux de tête et de fièvre.

- Le décocté est employé dans les cas de toux, de refroidissement et d'infections broncho-pulmonaires aussi pour les céphalées.
- Des informations signalent son utilisation en cas de dysménorrhée.

*Brocchia cinerea* (Vis.) possède une grande popularité dans le Sahara septentrional et central. En faite, en plus de son utilisation pour des fins thérapeutiques ou alimentaires (condiment), les habitants de ces régions l'utilisent pour préparer une infusion aromatique très agréable qui remplace le thé et son emploi pour aromatiser le café est connu. C'est aussi un bon pâturage qui communique, au lait une saveur agréable [20, 29].

#### **I-5-5-Travaux antérieurs sur l'espèce *Brocchia cinerea* (Vis.):**

##### **I-V-5-1-Du point de vue composition chimique :**

Le rattachement de *Brocchia cinerea* à la famille des Asteraceae et plus particulièrement à la tribu des Anthemideae, une des tribus les plus étudiées [12], lui confère une composition chimique appréciable dont les plus caractéristiques sont les flavonoïdes, les lactones sesquiterpéniques et les polyacétylènes [29].

Cette espèce en tant que plante aromatique renferme une huile essentielle très odorante. Deux études ont ciblé sa composition volatile; une réalisée sur l'espèce Egyptienne [30] et l'autre sur l'espèce Marocaine [31].

Le tableau I-2 résume les travaux phytochimiques antérieurs réalisés sur *Brocchia cinerea* ainsi que les composés chimiques isolés de cette espèce.

Tableau I-2 : métabolites secondaires isolées de *Brocchia cinerea* (Vis.)

Origine/ Parties utilisées.	Composés isolés	Réf.
Egypte/parties aériennes	kaempféritine, quercétrine, et kaempférol. Luteoline, 7-glucosyl luteoline, 7-diglucosyl luteoline, 7-glucosyl quercétine, 3,6,7-triméthyl quercétagétine, 7-O- $\beta$ -D-di-glucoside luteoline, 6-hydroxy-7-O- $\beta$ -D-glucosid luteoline, apigénine 7-O- $\alpha$ -L-rhamnoside. 3-O- $\beta$ -D-glucoside quercétine, 3-O- $\beta$ -D-galactoside, 7-O- $\beta$ -D-glucoside, quercétine, 5,3',4'-trihydroxy 3,6,7-triméthoxyflavone.	[32] [33]
Algérie/ Parties aériennes	Apigénine, 7-glucosyl apigénine, 6-hydroxy luteoline, pedalitine (6-hydroxy-7-méthoxy luteoline), isokaempferide (3-méthyl kaempférol), 3-méthyl quercétine, 7-glucosyl-3-méthyl quercétine, 3,6-diméthyl quercétagétine, 3-glucosyl isorhamnétine, 7-di-glucosyl-3,6-diméthyl quercétagétine, 7-glucosyl luteoline / tatrudin A	[34] [35]
Egypte /racines	farnochrol, acétyldrimartol A, acétyldrimartol B, scopofarnol, drimartol A, pectachol.	[36]
Egypte/ parties aériennes	13 lactones sesquiterpéniques (les structures sont présentées dans le chapitre III)	[37]
Egypte	5 lactones sesquiterpéniques (les structures sont présentées dans le chapitre III)	[38]

#### I-V-5-2-Du point de vue potentiel biologique:

La richesse de l'espèce en métabolites secondaires et sa large utilisation en médecine traditionnelle, laissent penser à un potentiel biologique très intéressant pour cette plante.

En effet, différents extraits (n-butanol, éther diéthylique, l'acétate d'éthyle et du chloroforme) issus de *Brocchia cinerea* (Vis.) Marocaine ont été investigués, l'extrait alcoolique et celui de l'acétate ont montré une activité antibactérienne importante vis-à-vis des différents micro-organismes testés [39], ce qui est en concordance avec une étude réalisée sur cette espèce originaire d'El-oued (Algérie) [40]. D'autres investigations marocaines ont attribué à la plante des activités biologiques très intéressantes, citons entre autres: l'activité analgésique, fébrifuge, molluscicide et l'activité larvicide [41-45]

L'activité antifongique de *Brocchia cinerea* (Vis.) a été évaluée dans l'étude [31] dont l'huile essentielle a présenté des MIC (concentration inhibitrice minimale) variant entre 3.2 et 4.7 mg/ml.

I-6-L'espèce *Matricaria pubescens* (Desf.) :

I-6-1-Description botanique de la plante :



**Figure I-4: photo de la plante *Matricaria pubescens* (Desf.)**

*Matricaria pubescens* (Desf.) est une petite plante annuelle, de 10 à 20 cm de haut, atteignant rarement 40 cm. Avec de nombreuses tiges couchées, qui se redressent. Les fines tiges vertes foncées sont que très peu ramifiées. Les feuilles profondément découpées, chaque lobe se terminant par une pointe blanche, sont légèrement charnues et ont entre 10 et 20 mm de long. Les fleurs tubulaires jaunes sont groupées en têtes hémisphériques discoïdes. Les hampes florales sont environ de 5 à 8 mm de diamètre et sont fixées aux extrémités des tiges. Les fruits sont des akènes avec une aigrette.

La plante entière a un parfum très agréable. La floraison a lieu au printemps dans le nord du Sahara algérien, et à tout moment après la pluie dans le Sahara central algérien [46, 47]

## I-6-2-Classification systématique :

Tableau I-3: classification systématique de *Matricaria pubescens* (Desf.) [46].

Embranchement	Spermaphyta
S/embranchement	Angiospermes
Classe	Monocotylédones
Ordre	Asterale
Famille	Asteraceae
Tribu	Anthemideae
Genre	<i>Matricaria</i>
Espèce	<i>Matricaria pubescens</i> (Desf.)

## I-6-3-Répartition géographique de l'espèce:

*Matricaria pubescens* (Desf.) Appelée aussi camomille du Sahara, son nom vernaculaire est « Garetoufa » ou encore « Ouazouaza ». C'est une espèce endémique nord-africaine, elle est largement distribuée dans tout le Sahara algérien. Au Sahara Occident, Maroc, Tunisie et la Libye. Elle est rencontrée dans les dépressions argilo sableuses et les lits d'oued [22,48]

## I-6-4-Médecine traditionnelle et connaissances locales:

*Matricaria pubescens* (Desf.) appartient à la flore spontanée saharienne, elle est très appréciée par les habitants des régions sahariennes, l'espèce est très connue pour ses nombreuses vertus thérapeutiques, ces derniers sont mis à profit par les habitants des régions sahariennes où elle pousse en abondance. [49]. Ils l'utilisent dans la plupart du temps sous forme de décoction, par voie orale ou locale, aussi mélangée au beurre local « d'han » pour traiter les maladies suivantes [20, 28]:

- Maladies du système ostéo-articulaire et des muscles:  
rhumatisme, courbatures, refroidissements, douleurs articulaires.
- Maladies de l'appareil génital féminin:  
dysménorrhée.
- Maladies broncho-pulmonaires:

toux (Comme expectorant et béchique). Asthme.

- Maladies du nourrisson et du jeune enfant:  
syndrome d'éruption dentaire. Rougeole. Antiseptique oculaire.
- Maladies de la peau et des tissus sous cutanées:  
dermatoses, urticaire.

Les utilisations de *Matricaria pubescens* (Desf.) ne semblent pas être limitées, cette espèce occupe une place de prestige dans la cuisine saharienne, en fait, la poudre végétale issue de ses parties aériennes, soigneusement sélectionnées et séchées est ajoutée à la soupe locale « l'hsa », elle lui donne une odeur agréable. Les habitants de ces régions se servent également de ces parties comme filtre, à travers lequel ils font passer le beurre de chèvres fondu ce qui lui transmet un arôme agréable et aide à le mieux conserver [20, 28].

Economiquement, La plante entière est recueillie fraîche au printemps, et commercialisée à grande échelle dans les marchés de plusieurs oasis (Ouargla, Béchar, El Goléa et Djanet..).

#### **I-6-5-Travaux antérieurs sur l'espèce *Matricaria pubescens* (Desf.):**

##### **I-6-5-1-Du point de vue composition chimique:**

Des travaux de recherche réalisés sur l'espèce *Matricaria pubescens* (Desf.) ont permis d'isoler des flavonoïdes, amides, coumarine et terpènes, ainsi que certaines activités biologiques.

L'investigation des parties aériennes de *Matricaria pubescens* originaire de « Ghardaia » a permis d'obtenir une huile essentielle caractérisée par la présence de l'isochrysanthemoate d'éthyle (26.5%), spathulenol (19.4%),  $\alpha$ -cadinol (12.9%) et geranylisovalerate (8.2%), cette huile a révélé un effet analgésique [50]. Une autre étude effectuée sur l'huile essentielle des parties aériennes fraîches de l'espèce collectée de la même région a mené aux composés majoritaires suivants: Spathulenol (0.1%-19.4%),  $\alpha$ -bisabolol oxide B (0.1%-7.0%),  $\alpha$ -bisabolol (5.2%-56.9%) and  $\alpha$ -bisabolol oxide A (10.2%-53.6%) [51].

Deux autres travaux de recherche ont mis en évidence la présence de thienylhexadien-isobutylamide, décadien-isobutylamide, Herniarine [52], Apigénine, Lutéoline, Quercétine, 7-O-glucoside Apigénine, 7-O-glucoside Luteolin, 3-O-glucoside Quercétine, Herniarine, 3,4-dehydroherniarine et (2E, 4E)-6-(2-thienyl)-2,4-hexadien-isobutylamide [53].



**I-6-5-2-Du point de vue potentiel biologique :**

Dans une étude intéressée à la conservation et de valorisation de la flore tunisienne [54], *Matricaria pubescens* a été citée parmi les espèces aromatiques et médicinales de cette flore.

Des extraits aqueux et alcoolique, bruts, issus des parties aériennes de la plante de la région de Bechar ont montré une activité antibactérienne variable [55].

Après avoir confirmé la richesse de *M. pubescens* en différents groupes de métabolites secondaires à travers des tests phytochimiques préliminaires, l'activité anti-listérienne de son huile essentielle et d'autres extraits a été vérifiée et des résultats encourageants ont été obtenus, en effet, la MIC de l'huile essentielle a été évaluée à 2.0 mg/ml, celles des extraits méthnolique et éthanolique ont été respectivement, de 1.0 et 0.5 mg/ml [56].

Récemment apparue, une investigation biologique a signalé une activité cytotoxique très intéressante pour les trois extrais obtenus de *M. pubescens* par (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, meOH et l'eau) dont les pourcentages d'inhibition des cellules cancéreuses testées ont été respectivement, de 94%, 29% et 17% [57].

## CHAPITRE II

# Caractérisation des Huiles Essentielles des plantes étudiées

---

## **Partie I : généralités sur les huiles essentielles**

### **II-I-1-Définition des huiles essentielles :**

Une huile essentielle (HE) est un mélange très complexe de substances chimiques, liquide à température ambiante, la volatilité de ses composants lui confère souvent un parfum très odorant. Les composés constitutifs se forment dans un grand nombre de plantes comme produits du métabolisme secondaire.

Officiellement: « une huile essentielle est définie comme le produit obtenu par hydrodistillation, distillation à la vapeur ou par distillation à sec d'une plante ou de certaines parties de celle-ci ou par procédés mécaniques appropriés sans chauffage à partir de l'épicarpe des citrus. L'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques.» [58,59].

Les huiles essentielles ont, à toute époque, occupé une place importante dans la vie quotidienne de l'homme qui les utilisait autant pour se parfumer, aromatiser la nourriture ou même se soigner.

### **II-I-2-Localisation et lieu de synthèse des huiles essentielles dans les plantes :**

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs : il y aurait, selon Lawrence [60], 17 500 espèces aromatiques. Les genres capables d'élaborer les constituants qui composent les huiles essentielles sont réparties dans un nombre limité de familles, par exemple : Rutaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Apiaceae, Myrtaceae, Lauraceae, Zingiberaceae, Piperaceae, etc [61].

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux :

- Les Fleurs (Rose, lavande)
- Les feuilles (Eucalyptus, menthe poivrée)
- Les racines (Angélique, valériane)
- Les rhizomes (curcuma, gingembre)
- L'écorce (Cannelle)
- Les semences (Anis vert, fenouil).

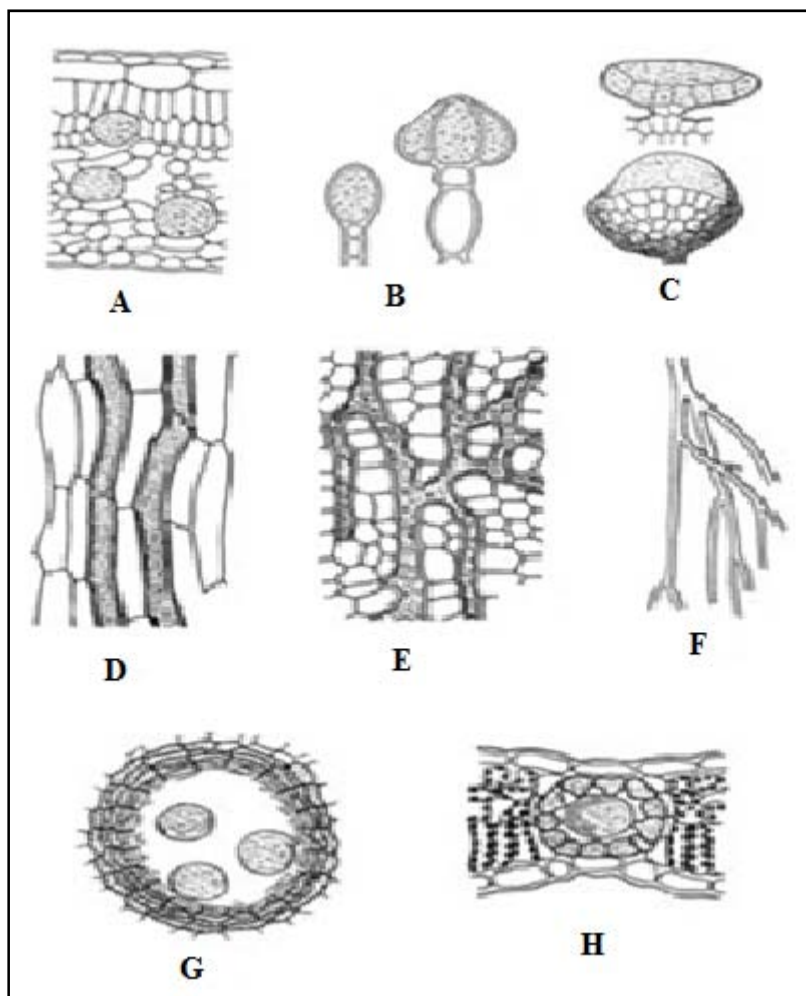
Même dans les résines (Encens, benjoin).

Chez une même espèce, il est possible d'obtenir des huiles essentielles de compositions chimiques très différentes. Ainsi, dans le cas de *Citrus aurantium* L. ssp : Rutaceae, l'expression à froid du péricarpe frais du fruit, fournit une essence riche en limonène. L'hydrodistillation de la fleur produit "l'essence de Néroli" riche en linalol, farnésol et nérolidol et l'hydrodistillation de la feuille, des ramilles et des petits fruits conduit à "l'essence de petit grain bigaradier" caractérisée par l'acétate de linalyle et le linalol. La composition de ces trois huiles essentielles est différente.

Aussi, les HE dans le cas de la cannelle (*Cinnamomum zeylanicum* Blume.) diffèrent en fonction de l'organe producteur. En fait, les feuilles donnent une huile riche en eugénol, les écorces fournissent un extrait où l'aldéhyde cinnamique est majoritaire, tandis que le camphre prédomine dans l'essence des racines. [61,62]

Les huiles essentielles sont produites dans des cellules glandulaires spécialisées, souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante. Elles sont alors stockées dans des cellules à huiles essentielles des Lauraceae ou des Zingiberaceae (*Peumus boldus*), poils sécréteurs des Lamiaceae (*Origanum vulgare*) [63], poches sécrétrices des Myrtaceae ou des Rutaceae (*Citrus reticulata*), canaux sécréteurs des Apiaceae ou des Asteraceae (*Tragopogon pratensis*).

Sur le site de stockage, les gouttelettes d'huile essentielle sont entourées de membranes spéciales. En raison de leur caractère lipophile et donc de leur perméabilité extrêmement réduite vis-à-vis des gaz, ces membranes limitent fortement l'évaporation des huiles essentielles ainsi que leur oxydation à l'air. [61,64-66]



**Figure II-I-1 : différentes cellules végétales sécrétrices d'huiles essentielles. [67]**

*(A) cellules sécrétrices-(B, C) poils sécréteurs-(D, E, F) canaux sécréteurs-(G, H) poches sécrétrices.*

### II-I-3-Composition chimique des huiles essentielles:

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes et variables pouvant contenir plus d'une centaine de composés différents [68]. Ces constituants chimiques appartiennent, majoritairement, à deux catégories [68,69]:

- ❖ Les terpènes ou plus généralement terpenoïdes, (pour la grande majorité d'entre elles).
- ❖ Les composés aromatiques dérivés du phénylpropane, (beaucoup moins fréquents).

Les terpènes forment un groupe de produits naturels très répandus dans le règne végétal et d'un intérêt chimique considérable. Bien que de structures très diverses, les terpènes ont une particularité structurale très importante qui est la présence, dans leur

squelette, d'une unité isoprénique à 5 atomes de carbone  $(C_5H_8)_n$  reconnue par Wallach dès 1887 cité dans la référence bibliographique [70].

Ils sont formés à partir d'isopentényl pyrophosphate désigné sous le nom d'isoprène actif [71] qui réagit avec une molécule starter: diméthylallyl pyrophosphate, géranyl pyrophosphate ou encore géranyl géranyl pyrophosphate, etc. De ce fait, une classification rationnelle, basée sur le nombre (n) qu'ils renferment, est possible.

Sur ces squelettes de base est souvent présent un ou plusieurs sites fonctionnels semblables ou différents. La majorité des sites fonctionnels sont des sites oxygénés, pour quelques groupes fonctionnels azotés ou soufrés, d'où le nom « isoprénoïdes ». [72,73]

Ainsi, on distingue une variété de structures, selon:

❖ le nombre d'atomes de carbone qui les constitue :

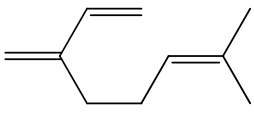
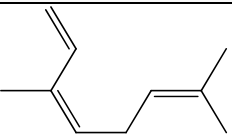
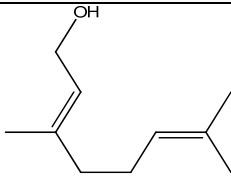
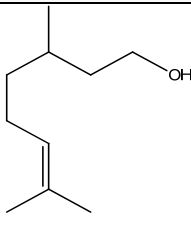
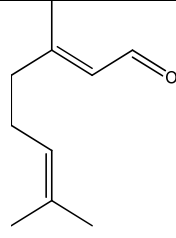
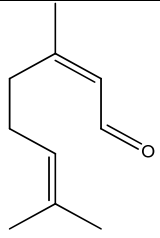
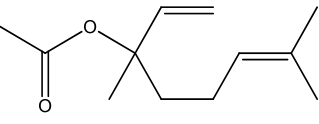
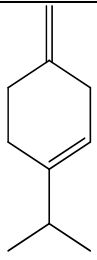
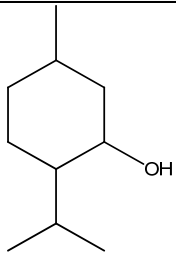
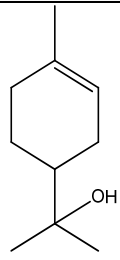
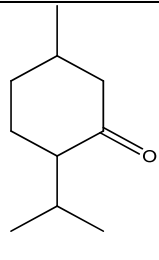
- n = 1 : les hémiterpènes ( $C_5$ ).
- n = 2 : les monoterpènes ( $C_{10}$ ).
- n = 3 : les sesquiterpènes ( $C_{15}$ ).
- n = 4 : les diterpènes ( $C_{20}$ ).
- n = 5 : les sesterpènes ( $C_{25}$ ).
- n = 6 : les triterpènes ( $C_{30}$ ).
- n = 8 : les tetraterpènes ( $C_{40}$ ).
- les Polyterpènes.

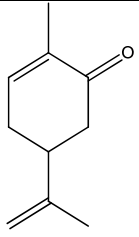
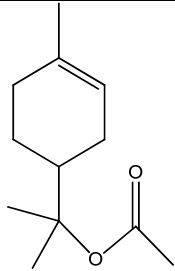
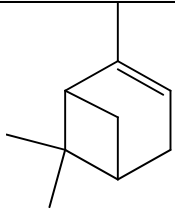
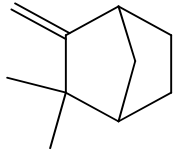
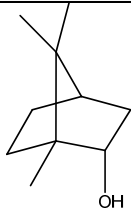
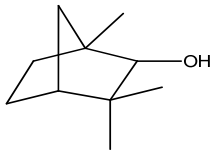
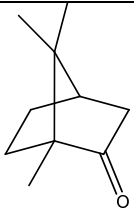
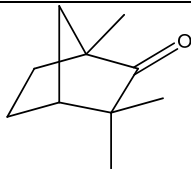
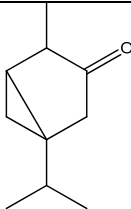
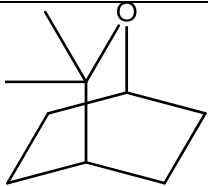
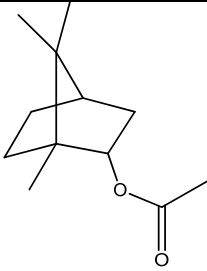
❖ L'arrangement, linéaire ou cyclique.

❖ La nature des groupes fonctionnels:

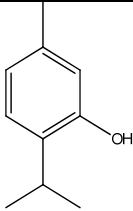
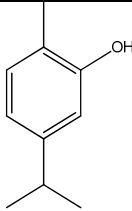
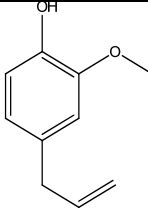
- Hydrocarbures terpéniques :  $R_1-HC=CH-R_2$ .
- Alcools terpéniques :  $R-OH$ .
- Cétones terpéniques :  $R_1-CO-R_2$ .
- Aldéhydes terpéniques:  $R-CHO$ .
- Esters :  $R_1-COO-R_2$ .
- Phénols :  $C_6H_6-OH$  ;
- Ethers:  $R_1-O-R_2$ .

La diversité des structures terpéniques naturelles, environ 55 000 structures connues jusqu'à 2007 [74], rend difficile toute tentative de généralisation. La figure II-I-2 regroupe quelques exemples:

Acycliques			
			
Myrcène	(Z) β-ocimène	Géraniol	Citronellol
			
Géranial	Néral	Acétate de linalyle	
Mono-cycliques			
			
β-terpinène	Menthol	α-terpinéol	Menthone

			
Carvone		acétate d' $\alpha$ -terpinyle	
<b>Bi-cycliques</b>			
			
$\alpha$ - pinène	Camphène	Bornéol	Fenchol
			
Camphre	Fenchone	Thujone	1,8-cinéole
			



Acétate d'isobornyle		
<b>Phénols</b>		
		
Thymol	Carvacrol	Eugénol

**Figure II-I-2 : exemples de quelques structures terpéniques et aromatiques présentés dans les huiles essentielles.**

## II-I-4-Biosynthèse de l'unité isoprène :

### II-I-4-1-par voie mévalonique [75-82]:

Les terpènes sont les produits d'un enchaînement de leur unité de base l'isoprène. La voie métabolique proposée pour leur biosynthèse est celle du mévalonate, élucidée par Nes et Mckean en 1977 (cité dans la référence [76]).

Elle débute de l'acétyl-CoA jusqu'à l'isoprène actif (activé par ATP), par l'intermédiaire de l'acide mévalonique (MVA). En effet, deux molécules d'acétyl-CoA réagissent ensemble en donnant naissance à l'acétoacétyl-CoA, par la condensation d'une troisième unité d'acétyl-CoA. Il se forme un composé en C6 (hydroxy-méthylglutaryl-CoA), qui, par réduction en alcool de sa fonction carboxyle combinée au CoA, donne l'acide mévalonique (MVA) fig. II-I-3-1.

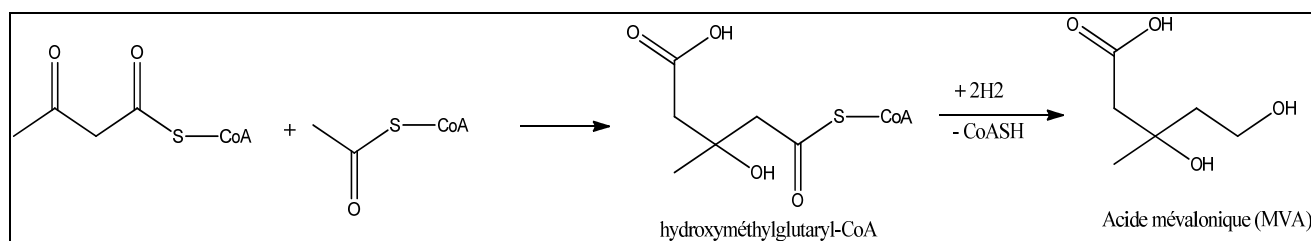


Figure II-I-3-1 : schéma de formation de l'acide mévalonique.

La formation de l'unité isoprène se fait d'abord par phosphorylation des 2 groupes alcool de l'acide mévalonique (grâce à l'ATP) puis il y a élimination d'eau avec formation d'une double liaison C=C, après la décarboxylation, l'ensemble mène au 3-méthylbut-3-énylpyrophosphate (IPP).

L'isomérisation de ce dernier composé par l'intermédiaire d'une enzyme ayant un groupement S-H, conduit à l'isomère DMAPP (Fig. II-I-3-2).

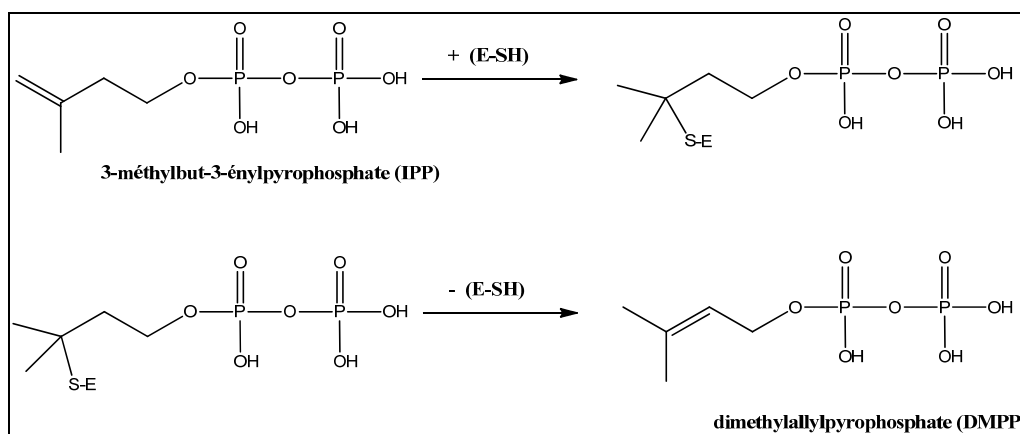


Figure II-I-3-2 : schéma d'isomérisation de l'IPP.

Comme précédemment cité, l'unité de base dans la biosynthèse des différentes structures terpéniques est en réalité l'IPP et son isomère le DMAPP. Ces deux composés sont associés par des isoprényltransférases en géranyl pyrophosphate (précurseur des monoterpènes), en farnésyl pyrophosphate (précurseur des sesquiterpènes et des triterpènes) et en geranyl-geranyl pyrophosphate (précurseur des diterpènes et des tétraterpènes). Le schéma dans la figure II-I-3-3 suivant regroupe ces différentes condensations.

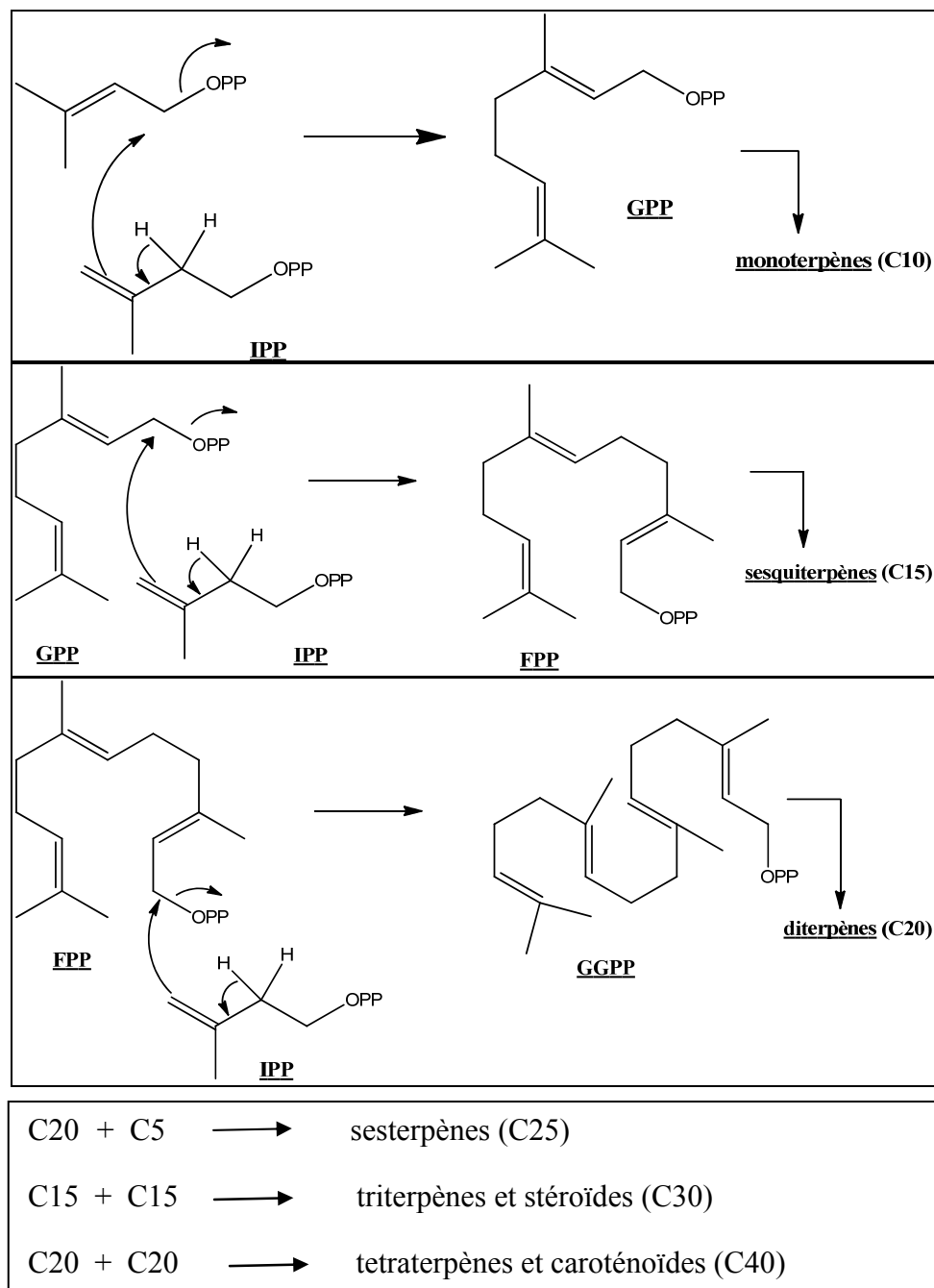


Figure II-I-3-3 : schéma de condensation de motifs isopréniques [79].

Des modifications secondaires auront lieu au niveau des squelettes de base produits de la condensation des motifs isopréniques, conduisant à des noyaux de différents types, eux-mêmes à l'origine des différentes classes de terpénoïdes.

Dans ce qui suit, nous allons détailler avec des exemples les étapes de formation de quelques monoterpènes et sesquiterpènes, acycliques et cycliques.

#### II-I-4-1-1-Monoterpènes acycliques et cycliques :

L'élimination du groupe pyrophosphate du géranyl pyrophosphate (GPP) mène, à travers le carbocation actif, à la formation de monoterpènes acycliques.

Des réarrangements et oxydations supplémentaires conduisent à des composés monoterpéniques hydrocarbures et/ou fonctionnalisés, la figure II-I-4-1 reproduit quelques exemples.

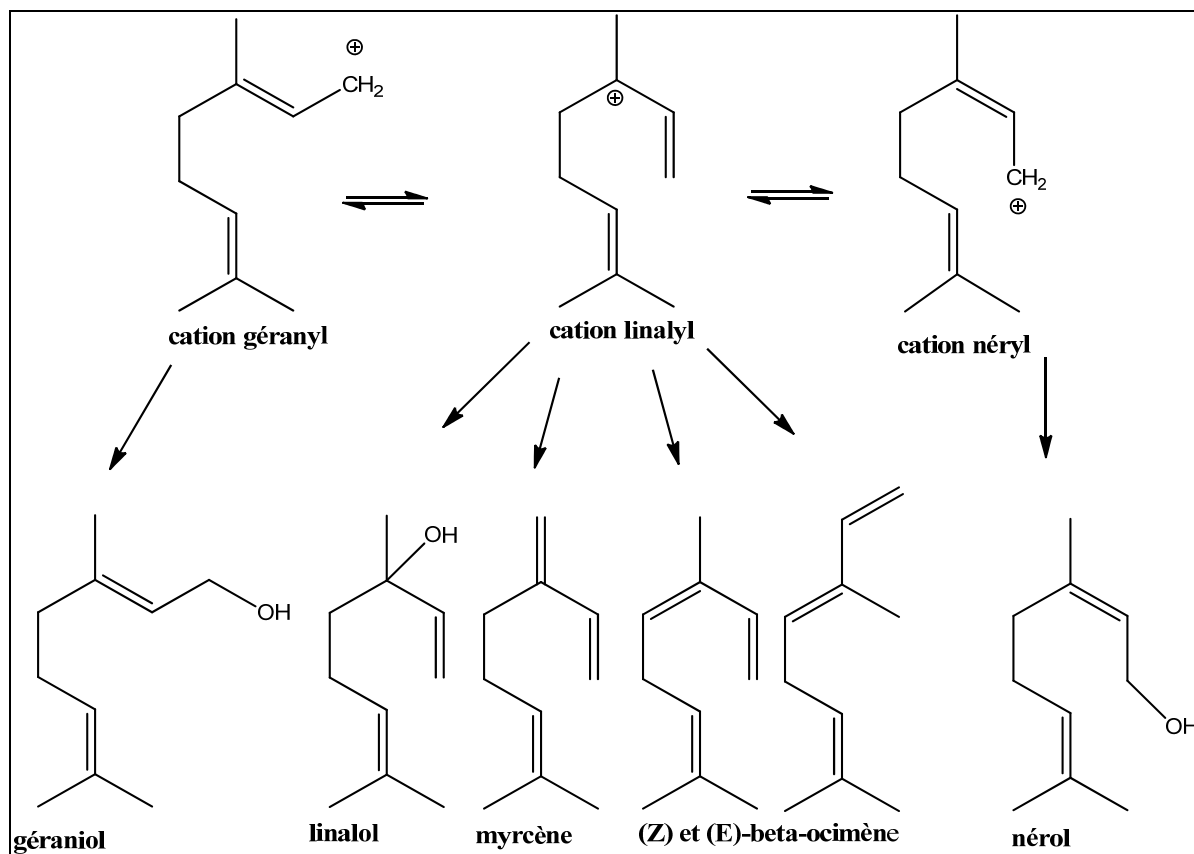


Figure II-I-4-1 : formation de quelques monoterpènes acycliques [80, 81].

En plus de ces formes linéaires, des réarrangements peuvent avoir lieu de manière à former des cycles. La cyclisation implique le passage par un carbocation terpényle cyclique qui devient le précurseur de la plupart des composés terpéniques cycliques.

Les plus communs ont un cycle à six carbones. La figure II-I-4-2 représente l'exemple du limonène formé à partir du gényryl pyrophosphate (GPP).

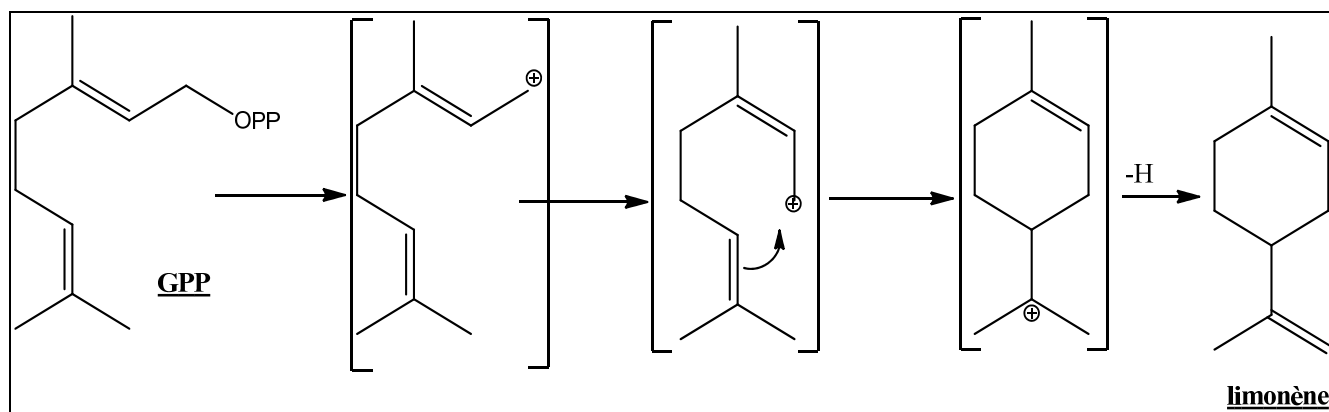


Figure II-I-4-2: formation de monoterpènes cycliques (exemple : limonène) [82].

Le GPP peut également engendrer une séquence de deux réactions de cyclisation pour donner des monoterpènes bicycliques, comme le montre la figure II-I-4-3.

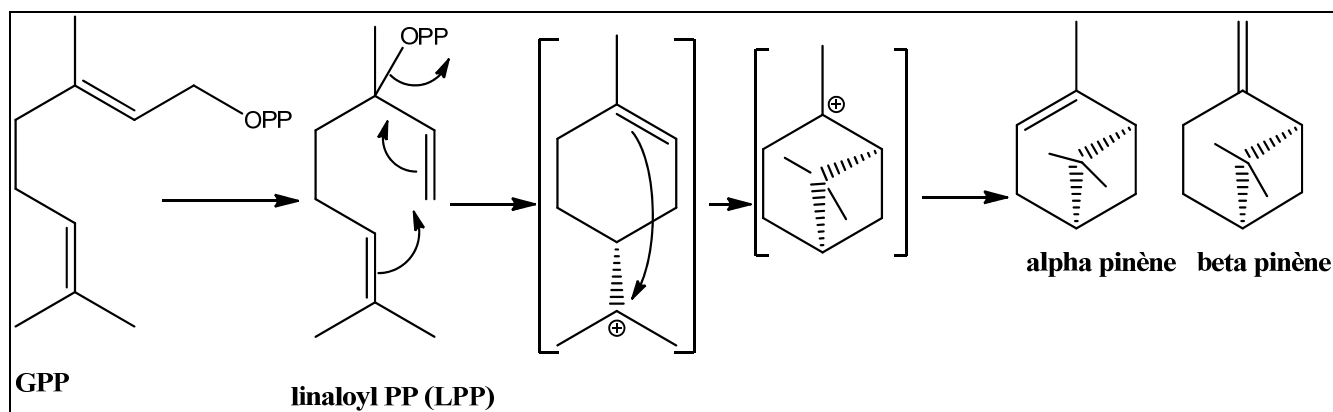


Figure II-I-4-3: formation de monoterpènes bicycliques (exemples :  $\alpha$  et  $\beta$  pinène) [82].

**II-I-4-1-2-Les sesquiterpènes acycliques et cycliques :**

Le farnésyle pyrophosphate (FPP) est à l'origine de formation des sesquiterpènes. En effet, un nombre très important de structures sesquiterpéniques (cycliques et acycliques, hydrocarbures et fonctionnalisés) est rencontré suite aux nombreuses possibilités de modifications secondaires qui peuvent se produire au niveau de leur précurseur (FPP), parmi lesquelles nous citons:

- l'hydratation du groupement (OPP), dans ses différents arrangements, mène aux sesquiterpènes alcools et par la suite aux esters correspondants (farnésol, nérolidol et leurs esters,...).
- La perte de ce même groupement conduit à des carbocations très actifs qui produisent après élimination de ( $H^+$ ) des sesquiterpènes acycliques sous plusieurs formes isomériques relatives à celles du premier précurseur (FPP). La figure II-I-5-1 représente quelques structures sesquiterpéniques.

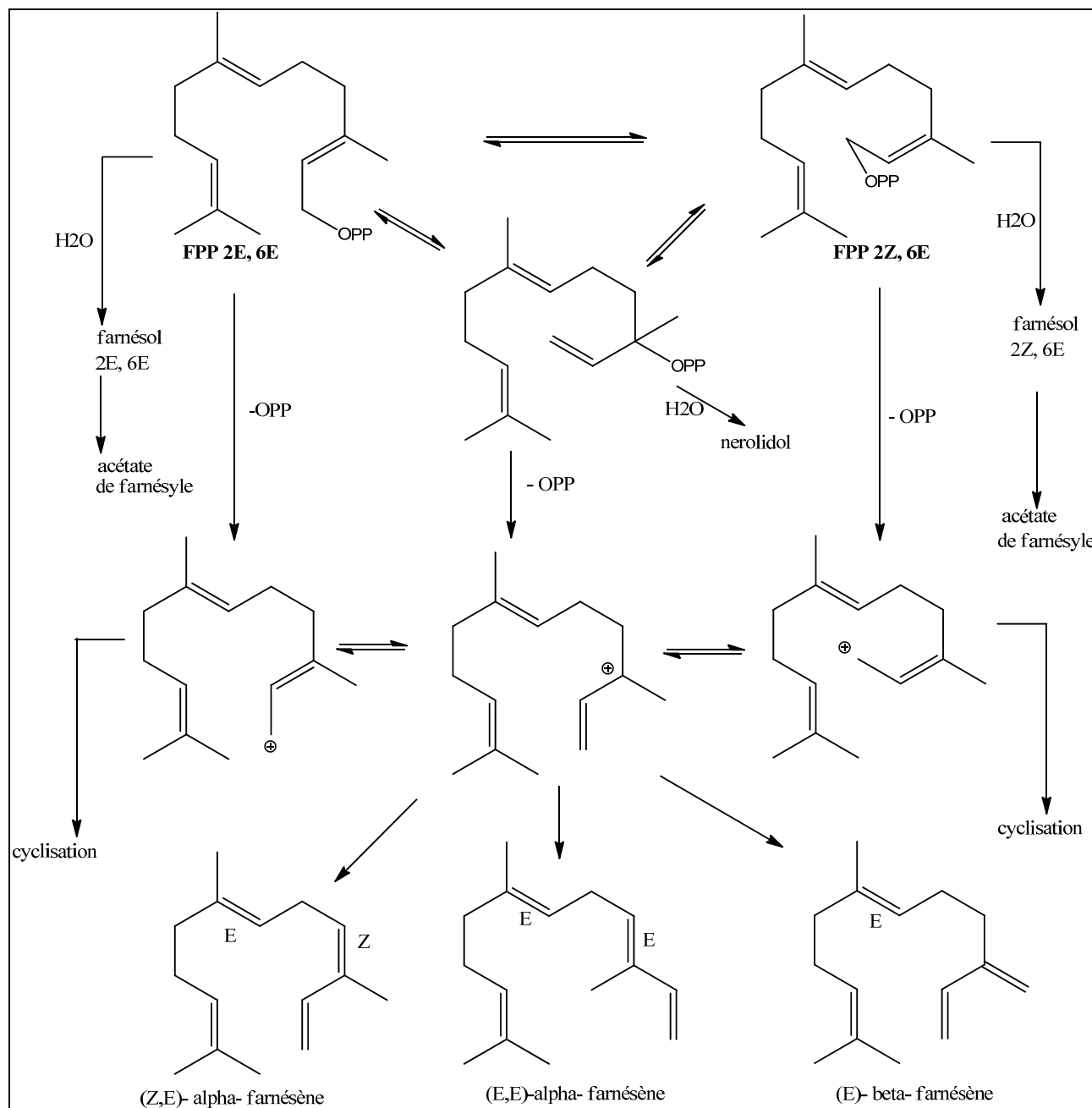


Figure II-I-5-1: schéma de biosynthèse des sesquiterpènes acycliques. [80], Mann J., (1987), secondary metabolism, 2nd Ed., Oxford, Clarendon Press. Cité dans [81]

Des sesquiterpènes cycliques (à 6, 10 chaînons,..) peuvent avoir lieu aussi, à travers le carbocation terpénique formé après l'élimination du (OPP) à partir (FPP). Des exemples d'une classe de ces composés (hydrocarbures) sont montrés sur la figure II-I-5-2.

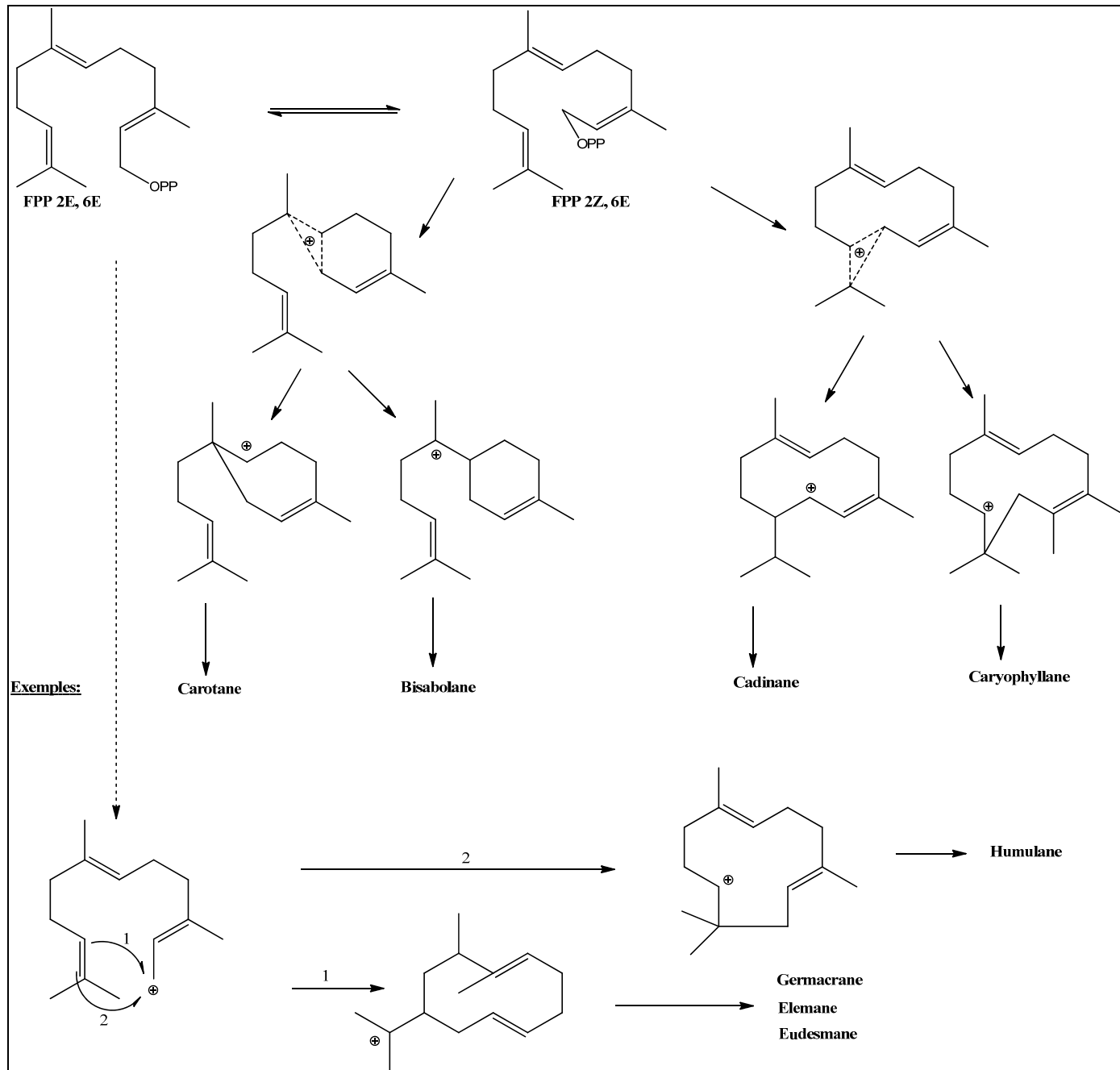


Figure II-I-5-2 : schéma de biosynthèse des sesquiterpènes cycliques. [80], Mann J., (1987), secondary metabolism, 2nd Ed., Oxford, Clarendon Press. Cité dans [81]

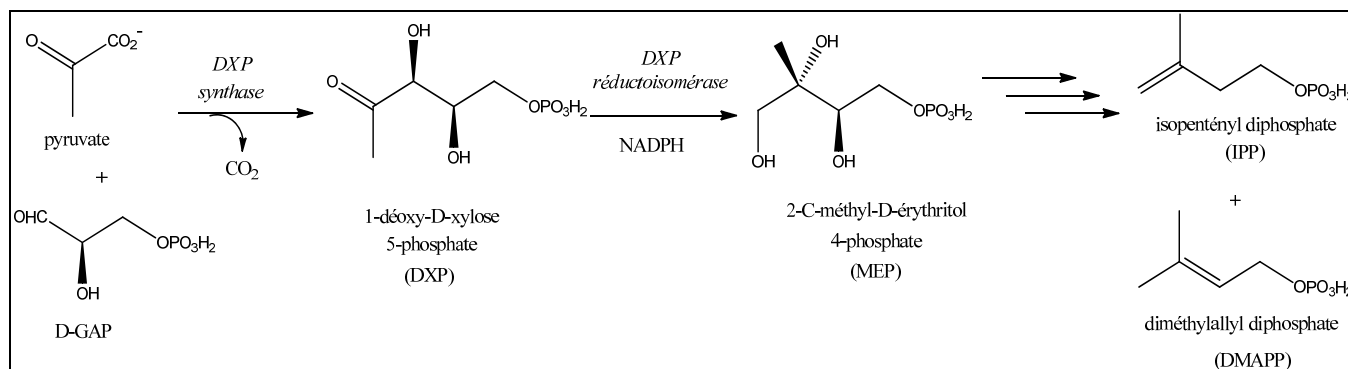


## II-I-4-2-Autre voie de biosynthèse:

La formation de l'isopent-3-ényl pyrophosphate (IPP) en tant que précurseur des terpénoïdes par la voie biosynthétique impliquant l'acide mévalonique (MAV) a été souvent entravée par la négligeable incorporation de mévalonate marqué au  $^{13}\text{C}$  dans les terpènes en particulier dans les végétaux. [81, 83]

Les travaux de recherche ne cessent de proposer d'autres voies de biosynthèse pour l'IPP, des explications satisfaisantes ont été avancées pour rendre compte de cela. Elles nous conduisent à considérer que la voie du mévalonate est utilisée moins fréquemment dans la biosynthèse des terpénoïdes que la voie du non-mévalonate par l'intermédiaire de (1-déoxyxylulose 5-phosphate) [83].

M. Rohmer et al. [84, 85], et autres [86-88] ont expliqué les étapes de ce processus. Ils ont montré, en utilisant des incubations de bactéries en présence d'acétate et de glucose (marqués au  $^{13}\text{C}$ ), que l'IPP provient du métabolisme du glucose. En effet, il est proposé que le précurseur de cette unité, le 2-méthyl-D-érythritol 4-P (MEP) est formé à partir du 1-déoxy-D-xylulose 5-P (DXP) via un réarrangement intramoléculaire suivi par un processus de réduction où des enzymes spécialisées interviennent pour aboutir à la fin aux IPP et DMAPP. La figure II-I-6 résume ces différentes étapes.



**Figure II-I-6 : schéma de biosynthèse de l'IPP et le DMAPP précurseurs des isoprénoïdes via le glycéraldéhyde 3-phosphate (D-GAP) [89,90].**

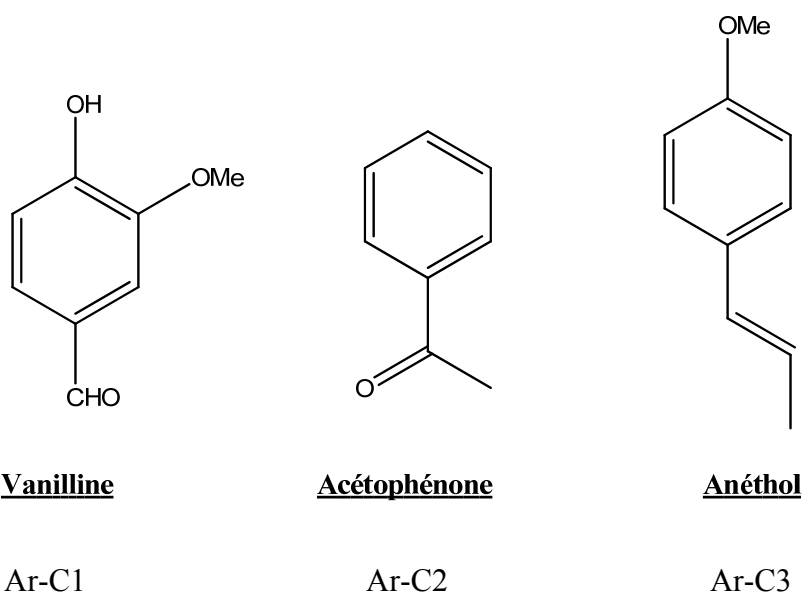
D'autres substances chimiques différentes des terpènes sont également présentes dans les huiles essentielles mais en quantité faible. En raison de leur grande diversité, nous nous abstenons de développer les voies de biosynthèse. Dans ce qui suit, nous allons nous limiter à citer quelques exemples.

**II-I-5-Autres composants des huiles essentielles :**

Les composés aromatiques dérivés du phénylpropane forment une autre classe de produits volatiles rencontrés dans la composition des huiles essentielles.

Généralement, il s'agit de composés aromatiques Ar-C1, Ar-C2 et Ar-C3, fonctionnalisés, tels que: la vanilline, l'eugénole, l'anéthole, l'estragole, et bien d'autres.

Parfois caractéristiques de certaines huiles essentielles, telles que le clou de girofle (eugénole), la vanille (vanilline), la cannelle (cinnamaldéhyde), le basilic (eugénole, méthylchavicol,...), anis, fenouil, etc [61,80].



**Figure II-I-7 : Exemples de structures de composés dérivés du phénylpropane.**

Les huiles essentielles peuvent renfermer divers composés aliphatiques, généralement de faible masse moléculaire, entraînés lors de l'hydrodistillation. Ils peuvent être des carbures, acides, alcools, aldéhydes (octanal, décanal ...), acides gras, esters, lactones, produits azotés ou soufrés.

Enfin, il existe un nombre non négligeable de composés volatiles issus de la dégradation, de terpènes non volatiles. C'est le cas par exemple des ionones qui proviennent de l'auto-oxydation des carotènes et d'acides gras, les petites molécules odorantes, comme par exemple le (3Z)-hexén-1-ol ou le décanal, qui sont obtenues à partir des acides linoléique [61].

**II-I-6-Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles :**

Etant formées de mélanges généralement complexes, les huiles essentielles présentent une très grande variabilité, tant au niveau de leur composition, qu'au plan du rendement des plantes d'origine [91-93]. Cette variabilité peut s'expliquer par différents facteurs que nous pouvons regrouper en deux catégories :

- ❖ Facteurs intrinsèques, liés à l'espèce, au type de clone, à l'organe concerné, à l'interaction avec l'environnement (type de sol ou climat, ...) et au degré de maturité du végétal concerné, voire au moment de la récolte au cours de la journée.
- ❖ facteurs extrinsèques, en lien avec la méthode d'extraction, les conditions de stockage du matériel végétal avant son exploitation et de l'huile essentielle après son obtention.

**II-I-7-Propriétés physico-chimiques :**

En ce qui concerne les propriétés physico-chimiques, les huiles essentielles forment un groupe très homogène [61]. Dont les principales caractéristiques sont [94-97] :

- liquides à température ambiante.
- n'ont pas le toucher gras et onctueux des huiles fixes.
- volatiles et rarement colorées.
- une densité faible pour les huiles essentielles à forte teneur en monoterpènes.
- un indice de réfraction variant essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé, cependant une teneur élevée en dérivés oxygénés produira l'effet inverse.
- solubles dans les alcools, à titre alcoolométrique élevé et dans la plupart des solvants organiques mais peu solubles dans l'eau.
- douées d'un pouvoir rotatoire puisqu'elles sont formées principalement de composés asymétriques.
- très altérables, sensibles à l'oxydation et ont tendance à se polymériser donnant lieu à la formation de produits résineux.

**II-I-8-Procédés d'extraction des huiles essentielles :**

La particularité des huiles essentielles (HE), que ce soit au niveau de leurs quantités très faibles dans les plantes ou bien de la fragilité des substances qui les constituent [98], rend leur obtention une opération très délicate. De ce fait, les techniques d'extraction doivent répondre aux exigences demandées et apporter des performances qualitatives et quantitatives satisfaisantes [99,101]. Le domaine d'utilisation de ces huiles oriente à faire un choix entre cette variété de procédés, mais aussi la disponibilité du matériel expérimental nécessaire qui nous oblige parfois à faire le choix.

Dans ce contexte, les travaux de recherche ne cessent de développer de nouvelles méthodes [102-107], mais celles qui reposent sur le phénomène d'entraînement des substances volatiles grâce à la vapeur d'eau sont les plus utilisées, à savoir : l'entraînement à la vapeur d'eau, l'hydrodistillation et l'hydrodiffusion. Afin d'illustrer certaines confusions, ces différentes méthodes seront présentées dans les paragraphes suivants.

Leur principe se base sur la distillation des mélanges binaires non miscibles. En effet, la formation d'un mélange azéotropique permet aux deux constituants de ce mélange d'être entraînés simultanément à une température inférieure à 100°C à pression atmosphérique.

En conséquence, les produits aromatiques sont entraînés par la vapeur d'eau sans subir d'altérations majeures.

**II-I-8-1-Hydrodistillation:**

Il s'agit de la méthode la plus simple et la plus anciennement employée pour extraire les huiles essentielles. Le procédé consiste à immerger le matériel végétal dans un récipient rempli d'une quantité adéquate d'eau. Le tout est ensuite porté à l'ébullition.

La chaleur permet l'éclatement des cellules végétales et la libération des molécules odorantes qui y sont contenues. L'HE forme avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique. Puis, les vapeurs sont condensées au moyen d'un réfrigérant. Dans un autre récipient de collecte, l'huile essentielle se sépare de l'eau par différence de densité. Lorsque les densités des deux phases sont proches, on peut observer une émulsion.

Au laboratoire, le Clevenger est le système utilisé pour ce type d'extraction, ou bien un montage modifié peut lui remplacer dans le cas échéant.

Cette méthode est simple dans son principe et ne nécessite pas un appareillage coûteux. Cependant, à cause de l'eau, de l'acidité, de la température du milieu, il peut se produire des réactions d'hydrolyse.

#### **II-I-8-2-Entraînement à la vapeur d'eau:**

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'un des procédés officiels pour l'obtention des huiles essentielles. Dans ce système d'extraction, le matériel végétal est soumis à l'action d'un courant de vapeur sans le mettre en contact direct avec de l'eau. Les vapeurs saturées en composés volatiles, ainsi obtenues, sont ensuite véhiculées vers le condenseur avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique qui constitue l'huile essentielle. La distillation par entraînement à la vapeur d'eau apporte une amélioration certaine de la qualité des produits obtenus en minimisant les altérations hydrolytiques.

#### **II-I-8-3-Hydrodiffusion:**

Cette méthode d'extraction est une variante de l'entraînement à la vapeur d'eau, relativement récente. C'est un procédé qui consiste à injecter de la vapeur d'eau du haut vers le bas, à pression réduite, soit l'inverse de la distillation classique. Cette technique utilise l'action osmotique de la vapeur d'eau et met à profit la pesanteur pour évacuer et condenser le mélange eau / HE dispersé dans la charge végétale.

L'avantage de cette technique est traduit par l'amélioration quantitative de l'huile récoltée, l'économie du temps, de vapeur et d'énergie. Cependant, l'huile essentielle obtenue avec ce procédé contient des composés non volatiles [108, 109].

#### **II-I-9-Intérêts des huiles essentielles :**

Une synthèse bibliographique a rapporté que la FAO, en 1995, a estimé le nombre des huiles essentielles connues à presque 3 000, mais seulement 10% parmi elles sont exploitées à l'échelle commerciale dans les domaines de cosmétologie, alimentaire et les industries pharmaceutiques [110].

Ainsi, les huiles essentielles sont connues pour être douées de propriétés antiseptiques, antivirales, antifongiques et antimicrobiennes. Plusieurs travaux de recherche ont prouvé leurs propriétés antitoxiques, antivenimeuses, anti-oxydantes et antiparasitaires. Plus récemment, on leur reconnaît également des propriétés anticancéreuses [68,111-115].

L'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique et les possibles effets synergiques entre ses constituants. Sa valeur tient à son intégralité de ses constituants et non seulement à ses composés majoritaires [112].

Le pouvoir antioxydant de quelques huiles essentielles est développé comme substitut dans la conservation alimentaire. Ce sont surtout les phénols et les polyphénols qui sont responsables de ce pouvoir [97,113, 114]. Dans cette optique, les études du Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation ont montré que l'incorporation des huiles essentielles directement dans les aliments (viandes hachées, légumes hachés, purées de fruit, yaourts...) ou l'application par vaporisation en surface de l'aliment (morceaux de viande, poulet, fruits et légumes entiers...) contribuent à préserver l'aliment des phénomènes d'oxydation [115]. Et dans le même domaine les HE ont été généralement reconnus comme sûrs par la « US. Food and Drug Administration » [110].

Actuellement, l'utilisation de produits synthétiques pour lutter contre les insectes et les arthropodes soulève plusieurs préoccupations liées à l'environnement et à la santé humaine. Les huiles essentielles présentent une alternative, de produits naturels [116] qui possèdent une bonne efficacité et sont respectueux de l'environnement. Elles ont été largement testées et leurs activités répulsives ont été démontrées [117-121].

## Partie II : méthodes et matériel

### II-II-1-Introduction :

Malgré les progrès considérables développés ces dernières années dans le domaine de la chimie analytique, l'analyse des huiles essentielles demeure un challenge.

Une étude caractéristique d'une huile essentielle libérée par une plante commence par l'extraction des constituants aromatiques volatiles suivie par l'analyse de l'extrait et à la fin le traitement des résultats pour identifier et/ou quantifier ces composés. Dans d'autres cas, selon la nature d'étude, des fractionnements de cette huile peuvent être mis en œuvre.

### II-II-2- Collecte du matériel végétal :

Le matériel végétal de *Brocchia cinerea* (Vis.) a été récolté au printemps, en stade de floraison, dans les environs de la ville de Ouargla (Algérie), à 10-20 Km au Nord-Est de la ville. Alors que celui de *Matricaria pubescens* (Desf.) a été apporté de Still à 40Km de la ville de Megheir (Biskra) au printemps.

La reconnaissance botanique du matériel végétal des deux plantes a été faite par Mr Oulad belkheir botaniste de la faculté de biologie à l'université de Ouargla et Dr K. Maiza de l'hôpital Pierre et Marie Curie d'Alger. Un échantillon de référence a été déposé au niveau de l'herbarium de notre laboratoire BioGéoChimie à l'université de Ouargla.

Une fois que le matériel végétal des deux plantes est collecté au début de matinée, d'autres herbes et de la terre ont été nettoyés voici comment on a procédé pour le préparer : après son séchage, à l'ombre dans un endroit aéré, les parties aériennes (feuilles, fleurs et tiges) de :

- *Brocchia cinerea* (Vis.) ont été broyées à l'aide d'un broyeur mécanique (diamètre du tamis: 4mm), la poudre végétale ainsi obtenue a servi pour l'extraction.
- *Matricaria pubescens* (Desf.) ont été concassées manuellement sous forme de petits fragments, la poudre végétale ainsi obtenue a servi pour l'extraction.

**II-II-3-Extraction des huiles essentielles (HE) des deux plantes :**

Dans notre cas, un montage d'hydrodistillation de type Clevenger a été utilisé pour extraire l'huile essentielle de *Matricaria pubescens* (Desf), et un autre modifié pour extraire l'huile essentielle de *Brocchia cinerea* (Vis.)

Ce mode d'extraction est parmi les méthodes les plus simples et les plus utilisées pour extraire les huiles essentielles (HE). Il permet de les séparer à l'état pur mais aussi de fournir de meilleurs rendements.

**II-II-3-1-Protocole d' hydrodistillation :**

L'hydrodistillation a été accomplie dans le cas de *Brocchia cinerea* (Vis.) à l'aide d'un dispositif de type Clevenger modifié : figure II-II-1 (A). En effet, une quantité de la poudre végétale (100g) a été introduit avec de l'eau distillée dans un ballon qui a été relié au reste du dispositif. Portée au chauffage, la matrice végétale a été hydrodistillée pendant 3 heures. [122]

Afin de rassembler une quantité suffisante de l'huile essentielle, l'opération a été répétée plusieurs fois, sous les mêmes conditions opératoires.

A la fin de chaque hydrodistillation, une huile essentielle (HE1) est récupérée à l'état pur, après la décantation de l'hydrolat et la séparation de la phase aqueuse inférieure. Le volume de HE1 a été lu directement sur l'éprouvette de récupération.

Après son séchage sur MgSO<sub>4</sub>, (HE1) a été conservée dans un pilulier brun hermétiquement fermé à 4°C jusqu'à son analyse.

D'autres extractions sont faites de la même façon, sous les mêmes conditions expérimentales, seule l'huile essentielle dans ces cas a été récupérée de l'hydrolat, à la fin de chaque hydrodistillation, par une extraction liquide-liquide au moyen du n-hexane. Les extraits hexaniques réunis ont été par la suite évaporés au rot-à-vapeur, sous pression réduite à la température ambiante, l'huile essentielle (HE2) ainsi obtenue a été conservée de la même manière que la précédente.

Dans le cas de *Matricaria pubescens* (Desf.), de la même façon que la précédente, à chaque fois, 100 g du matériel végétal concassé ont été introduits dans le ballon avec une quantité suffisante d'eau distillée pour être relié au dispositif Clevenger figure II-II-1 (B). La distillation a été effectuée avec un recyclage communément appelé cohobage tel que décrit dans la Pharmacopée Européenne. [122]



La lecture du volume de l'huile essentielle, nageant au dessus de l'hydrolat, se fait directement sur le tube gradué récapitulatif de la vapeur condensée.

A cause de la faible quantité de cette huile, nous étions obligés de la récupérer avec du dichlorométhane qui a été éliminé par la suite au rot-à-vapeur à pression réduite à la température ambiante pour obtenir à la fin (HEM), qui a été conservée dans un pilulier brun hermétiquement fermé à 4°C jusqu'à son utilisation.

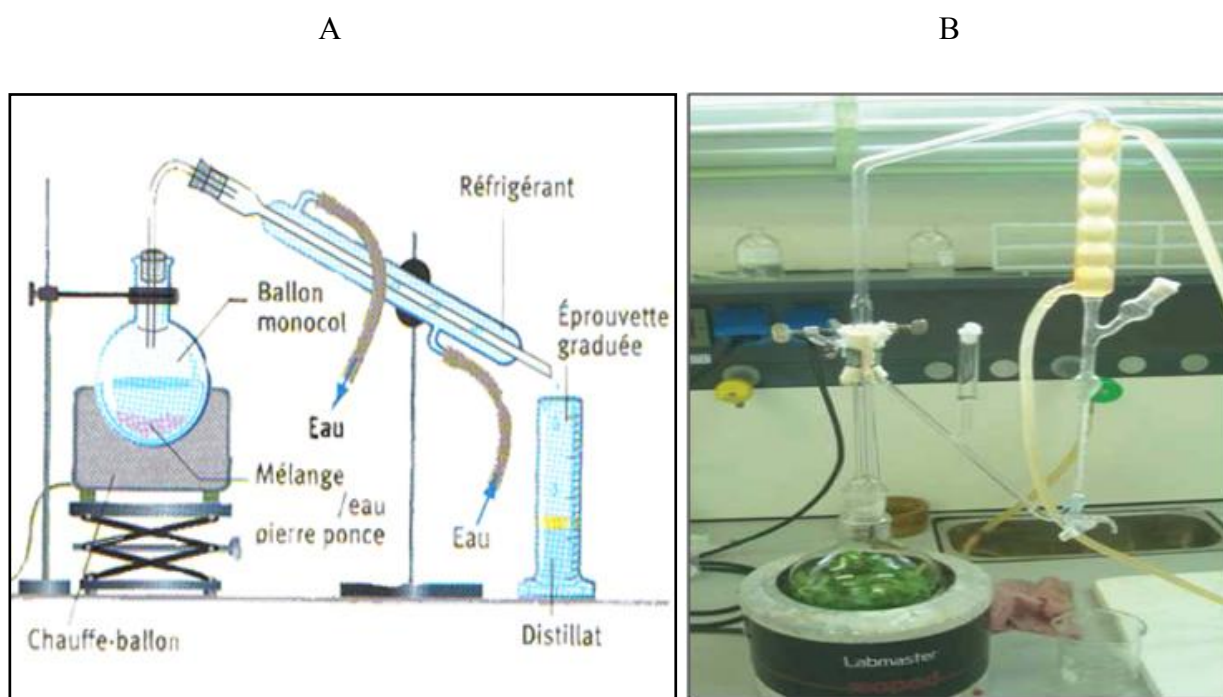


Figure II-II-1 : montages d'hydrodistillation utilisés.

**II-II-4-Analyses chromatographiques des huiles essentielles :****II-II-4-1-Analyse de HE1 et HE2 (*Brocchia cinerea* Vis.) :**

Dans un premier temps, HE1 et HE2 ont été analysées par GC-FID sur deux colonnes capillaires de polarités différentes : HP1 apolaire et Innowax polaire. HE1 est aussi chromatographiée par GC-MS sur une colonne capillaire apolaire type DB5.

**II-II-4-1-1-Analyse GC-FID**

Les analyses GC-FID des deux échantillons HE1 et HE2 ont été faites au moyen d'un chromatographe Agilent HP5975 Série C, équipé dans un premier temps d'une colonne capillaire type HP1 avec une phase stationnaire apolaire (50 m\* DI 200 µm, épaisseur de la phase stationnaire 0.33µm), puis remplacée par une autre polaire Innowax (L 50 m\* DI 200 µm, épaisseur de la phase stationnaire 0.5 µm). Les constituants des deux échantillons ont été élués par l'hélium à un débit de 1.3 cm<sup>3</sup>/min sous un gradient de température qui a débuté par une température de 80 °C maintenue pendant 8 min. Le chauffage a atteint 200 °C par une rampe de 2°C/min et finalement un autre palier pour arriver jusqu'à 285 °C par 10°C/min. Les températures de l'injecteur et du détecteur ont été programmées respectivement à 250 °C et 300 °C.

**II-II-4-1-2-Analyse GC-MS**

L'huile essentielle (HE1) a été analysée au moyen d'un système GC-MS Agilent HP6890 équipé d'un détecteur de masse sélectif en mode d'ionisation impact électronique. Les constituants de l'huile essentielle brute ont été séparés sur une colonne capillaire type DB5 avec une phase stationnaire apolaire (30 m\*250 µm, épaisseur de la phase stationnaire 0.25 µm), la sortie de la colonne est introduite directement dans la source du système spectromètre de masse (MS) à travers une interface. La température du four a été programmée comme suivant: la température initiale 45 °C a été maintenue pendant 8 min puis, elle a été élevée jusqu'à 250 °C par une montée de 2 °C/min, cette température a été gardée fixe durant 14 min. Le gaz éluant a été l'hélium à un débit de 0.5cm<sup>3</sup>.min<sup>-1</sup> avec un rapport split de (1 :80). Quand à l'injecteur et le détecteur, ils ont été programmés à la même température, à 250 °C.

L'ionisation par impact électronique, des différents solutés élués du chromatographe, a été faite à une énergie de 70 eV. Les résultats de fragmentations, ainsi obtenus, ont été enregistrés sur cet intervalle [29-550] de (m/z).

**II-II-4-2-Analyse de HEM (*Matricaria pubescens* Desf.)**

L'échantillon HEM a été analysé d'après la norme NF-T-75-401 relative à l'analyse des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse.

L'analyse par chromatographie gazeuse avec détection FID a été effectuée sur 2 colonnes, une apolaire (HP1) et une polaire (Innowax).

L'analyse par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse/EI a été effectuée sur 2 colonnes, une apolaire (HP1) et une polaire (Innowax).

Conditions opératoires :

- Cas de HP1 : sous un gradient de température qui a débuté par une température de 80 °C maintenue pendant 8 min. Le chauffage a atteint 220 °C par une rampe de 2 °C/min et finalement un autre palier pour arriver jusqu'à 295 °C par 10 °C/min ; cette dernière a été maintenue pendant 25 min. Les températures de l'injecteur et du détecteur ont été programmées respectivement à 250 °C et 300 °C.
- Cas de Innowax : la programmation de température du four a commencé par 60 °C pour arriver à 245 °C par une progression de 2 °C/min, laquelle a été maintenue durant 35 °C. Les températures de l'injecteur et du détecteur ont été programmées respectivement à 250 °C et 300 °C.

Les temps de rétention de la série des n-alcanes (C5-C31) injectés dans le chromatograph, juste après l'analyse des échantillons, sous les mêmes conditions chromatographiques, nous ont permis de calculer les indices de rétention (Ir) pour les composés détectés selon la méthode universelle de Van Den Dool [123].

Initialement, les composés détectés ont été identifiés par comparaison de leurs indices de rétention calculés avec ceux reportés dans la littérature [124-130], par la suite ces identifications ont été confirmées par dépouillement de leurs spectres de masse enregistrés et leur confrontation avec les données spectrales de substances standards citées dans les banques de données: Wiley07, NIST05 fournies avec le logiciel de traitement et la bibliothèque des arômes au niveau de CNRS en France.

### Partie III : résultats et discussion

#### II-III-1-Détermination du rendement et de quelques caractéristiques physiques :

Les rendements relatifs aux échantillons HE1, HE2 obtenus de *Brocchia cinerea* (Vis.) et HEM obtenu de *Matricaria pubescens* (Desf.) ont été calculés selon la formule (1) ci-dessous. Les propriétés physico-chimique telles que : le pouvoir rotatoire, l'indice de réfraction, la densité, l'indice d'acide et l'indice d'ester, constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité de l'huile essentielle. Faute de quantité, seulement les trois premières caractéristiques des huiles essentielles analysées ont été déterminées selon les normes de l'association française de normalisation (Afnor, 1989).

Les résultats obtenus avec d'autres propriétés organoleptiques de ces échantillons sont reportés sur le tableau II-III-1.

$$R\% = \frac{m'(g)*100}{m(g)} \dots\dots(1)$$

m': masse de l'huile essentielle (g).

m: masse du matériel végétal sec (g).

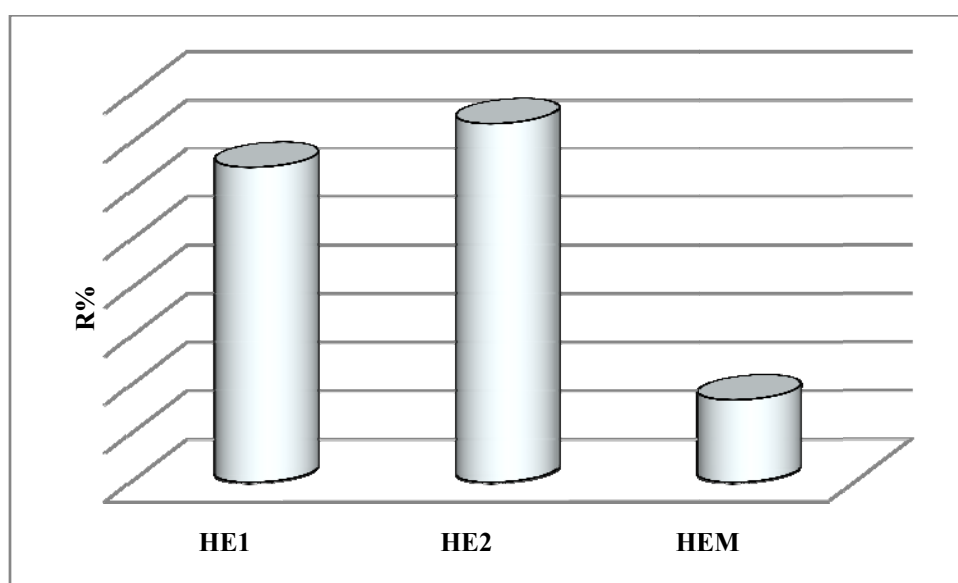
**Tableau II-III-1 : Quelques caractéristiques des huiles essentielles analysées.**

	HE1	HE2	HEM
<b>Aspect</b>	Liquide mobile	Liquide mobile	Liquide mobile
<b>Couleur</b>	Jaune	Jaune	Jaune
<b>Odeur</b>	Camphré, intense	Camphré, intense	Forte, agréable
<b>Rendement %(m/m)</b>	0.65 m/m	0.74m/m	0.17 m/m
<b>Densité</b>	0.864	--	0.565
<b>Indice de réfraction</b>	1.4610	--	1.5850
<b>Pouvoir rotatoire (<math>\alpha^\circ</math>)</b>	+115	--	+106

Il est à noter que le rendement de HE2 a été supérieur à celui de HE1, cela peut être expliqué par l'efficacité du n-hexane à extraire l'huile essentielle de son hydrolat après une

hydrodistillation. En même temps, cela confirme qu'il y a une perte en quantité plus ou moins importante (le cas de HE1) lors d'une simple décantation de l'hydrolat. Ceci peut être expliqué par la dissolution partielle de l'huile dans la phase aqueuse et son adhésion sur les parois du récipient de collecte.

Ce résultat nous amène à réaliser une hydrodistillation puis une extraction liq-liq aux solvants organiques adéquats pour avoir les meilleurs rendements en huiles essentielles. L'utilisation des huiles essentielles dans des domaines spécifiques tels que les préparations pharmaceutiques, agro-alimentaires et biologiques, où elles doivent répondre à des exigences de normalisation, empêche parfois cette opération.



**Figure II-III-1 : représentation graphique des taux des rendements en huiles essentielles.**

Le rendement en HE1 obtenu dans ce travail est comparable à celui obtenu pour *B.cinerea* dans l'étude [31] mais plus élevé que celui reporté pour *B. cinerea* collectée en Egypte [30]. Ce rendement peut être considéré comme assez bon, lorsque l'on compare, soit à des espèces de la famille des Asteraceae, soit à des plantes aromatiques comme le montre les exemples suivants :

- les rendements des Asteraceae citées dans l'étude [131] qui variaient de traces jusqu'à 0.2%.
- les cinq Artemisias suivantes : *Art. absinthium*, *Art. biennis*, *Art. dracunculus*, *Art. longifolia* et *Art. ludoviciana*, ont fait l'objet de l'étude [132] leurs rendements en HE sont compris entre (0,3 % et 0,5 %).

Et parmi les espèces exploitées à l'échelle industrielle pour produire les huiles essentielles :

- le géranium Rosat (*Pelargonium graveolens* L.) qui produit des HE de l'ordre de 0.08% à 0.25% [122].
- la menthe poivrée (*Mentha piperita*) dont les rendements varient de 0,5-1% [132].

Tandis que *M. pubescens* de la région de Still a révélé ne contenir beaucoup moins d'HE que *B. cinerea*, avec un rendement égal à 0.17%. Celui-ci est encore plus faible que le taux calculé pour la même espèce récoltée de la région de Bechar, estimé par Makhloufi et al à 0.8%.

En tout cas, le pourcentage de HEM est compris dans l'intervalle de la production des plantes en huiles essentielles, comme mentionné ci-dessus, il est même très proche du rendement calculé pour l'espèce *Matricaria perforate* évalué à (0.2%) [131].

Généralement, plusieurs facteurs influencent le rendement en huiles essentielles (HE) d'un matériel végétal. Une étude faite sur des huiles essentielles (50 échantillons) isolées des parties aériennes d'*Artemisia herba-alba* [133] a signalé la variabilité des rendements en HE en fonction de l'emplacement géographique, la saison et le stade de récolte, les conditions de séchage, la méthode d'extraction.

### **II-III-2-Résultats des analyses chromatographiques :**

#### **II-III-2-1-Résultats des analyses chromatographiques de HE1 et HE2 :**

Les résultats obtenus des analyses chromatographiques par GC-FID réalisées sur les deux échantillons HE1 et HE2 sont reportés dans le tableau II-III-2.

Tableau II-III-2: résultats d'analyse de HE1 et HE2 par CG-FID.

Composés identifiés	Ir( exp.) Wax	Ir (réf.) Wax [124-130]	Ir( exp.) HP1	Ir (réf.) HP1 [124-130]	%HE /HP1	%HE2 /HP1
Hexanal	--	--	--	--	0.02	0.02
Cis hex-3-en-1-ol	--	--	831	859	0.08	0.08
Cis salvène	892	892	842	856	0.06	0.03
<b>Santolinatriène</b>	1030	1011	903	908	<b>8.00</b>	<b>5.8</b>
Tricyclène	1016	1003	909	927	0.07	0.04
$\alpha$ -Thujène	1030	1021	924	930	0.63	0.18
Benzaldehyde	1743	1495	929	936	0.04	0.02
$\alpha$ -pinène	1030	1024	932	932	1.21	0.66
Camphène	1075	1066	945	947	1.67	1
Isopropylméthylbenzène	1134	--	946	1026	0.16	0.15
Sabinène	1127	1120	966	973	0.38	2.36
$\beta$ -pinène	1116	1110	972	976	0.54	0.39
Myrcène	1162	1159	981	986	0.12	0.26
$\alpha$ -Phellandrène	1185	1164	997	1005	0.09	0.06
Isoamyl isobutyrate	--	--	1002	1000	0.02	0.01
$\alpha$ -terpinène	1190	1179	1011	1015	0.14	tr
<i>p</i> -cymène	1274	1269	1013	1026	1.20	0.54
Limonène	1206	1201	1023	1025	0.27	0.25
<b>1,8-cineole</b>	1220	1209	1023	1030	<b>6.37</b>	<b>5.9</b>
$\gamma$ -terpinène	1250	1243	1049	1053	0.71	0.12
Trans thujanol 4	1464	1459	1054	1068	0.77	0.23
Terpinolène	1280	1281	1080	1088	0.15	0.04
Cis thujanol 4	--	--	1086	1078	0.62	0.22
$\alpha$ -thujone	1431	1422	1088	1102	0.63	0.54
<b><math>\beta</math>-thujone</b>	1457	1442	1104	1114	<b>47.72</b>	<b>55.4</b>
Cis <i>p</i> -menth-2-en-1-ol	--	--	1110	1122	0.10	0.07
<b>Camphre</b>	1528	1514	1125	1126	<b>10.54</b>	<b>11.28</b>
Inconnu sur HP1	1767	--	1140	--	1.86	1.53
Borneol	1695	1698	1150	1166	0.48	0.25

Lavandulol	1667	1677	1150	1181	0.18	0.18
<b>Terpinen-4-ol</b>	1602	1596	1164	1177	<b>2.77</b>	<b>2.18</b>
$\alpha$ -terpineol	1692	1694	1173	1189	0.74	0.7
Cuminaldehyde	--	--	1212	1224	0.07	0.02
Cis3-hexénylisovalérate	--	--	1216	1243	0.30	0.34
<b>Acétate de lyratyl</b>	1642	--	1254	--	<b>4.17</b>	<b>2.96</b>
Acétate de Bornyl	1585	1575	1270	1289	0.78	0.46
Acétate de Lavandulyle	1620	1617	1270	1272	0.09	0.09
Carvacrol	--	--	1276	1299	0.08	0.02
Acétate de néryl	--	--	1342	1362	0.04	0.04
Acétate de geranyl	--	--	1357	1382	0.07	0.05
Cis jasmine	--	--	1366	1393	0.19	0.43
Trans- $\beta$ -farnesene	--	--	1447	1457	0.12	tr
Spathuléol	--	--	1565	1574	0.05	0.06
Oxide de caryophyllène	--	--	1576	1577	0.03	0.03
Cis-méthyl jasmonate	--	--	1608	1626	0.03	0.04
Inconnu sur Innowax	1505	--	--	--	1.94	1.66
Total					96.37	96.77

*Ir( exp) Wax* : indice de rétention calculé sur la colonne Innowax. *Ir( exp) HPI* : indice de rétention calculé sur la colonne HPI. *Ir réf (Wax)*: indice de rétention de référence sur colonne polaire. *Ir réf (HPI)*: indice de rétention de référence sur colonne apolaire. *%HE/HPI*: pourcentages des constituants de HE1. *%HE2/HPI*: pourcentages des constituants de HE2.

D'après les résultats d'identification reproduits sur le tableau (GC-FID), les échantillons ont présenté une grande ressemblance dans leurs compositions chimiques à l'exception de l' $\alpha$ -terpinène et le trans- $\beta$ -farnesène qui sont présents seulement dans HE1.  $\beta$ -thujone (47.72%), camphre (10.54%), santolinatriène (8.00%) eucalyptol (6.37%), acétate de lyratyl (4.17%) et terpinèn-4-ol (2.77%), ont été détectés en tant que composés majoritaires.



Aussi, d'après le même tableau, il est à noter que les pourcentages relatifs à la majorité des constituants sont plus élevés dans l'échantillon HE1 que dans HE2, pendant que les deux substances majoritaires sont plus concentrées dans HE2, leur contribution dans HE2 et HE1 sont respectivement: 55.4% - 47.72% pour la  $\beta$ -thujone et 11.28% - 10.54% pour le camphre.

Cette distinction quantitative peut être révélatrice de l'influence de la méthode d'extraction et/ou les étapes suivies dans une même technique sur la composition chimique d'huile essentielle.

Il y a une certaine ressemblance dans la composition chimique de notre HE avec celles des HE originaires d'Egypte [30] et du Maroc [31].

Dans cette étude, il a été constaté que la thujone constitue le composé majoritaire, comme celle réalisée au Maroc [31] avec des différences de pourcentages relatifs, suivie dans notre cas par le camphre qui ne présente dans l'huile de *Brocchia cinerea* marocaine qu'un modeste pourcentage. Alors que l'analyse faite sur l'huile obtenue en Egypte [30] a dévoilé totalement l'inverse où le camphre est la substance prédominante suivie par la thujone.

L'apparition de l'acétate de cis-verbényl avec une quantité importante dans le travail de L. Bouzidi et al [31] a différencié *Brocchia cinerea* du Maroc de celles poussant en Algérie ou en Egypte.

Les dissemblances notées sur la composition chimique de l'huile essentielle de *Brocchia cinerea* dans notre travail avec celles dans la littérature, que cela soit au niveau qualitatif ou bien quantitatif, peuvent être attribuées à plusieurs facteurs, parmi les quels nous citons: l'origine géographique du matériel végétal [134], son état physique (sec ou frais) à l'instant de son utilisation et/ou la diversité génétique de l'espèce.

La composition majoritaire de notre HE caractérisée par la thujone, le camphre, le santolinatriène, l'eucalyptol, l'acétate de le lyratyl et le terpinen-4-ol a confié à *B.cinerea* de l'Algérie un chemotype au  $\beta$ -thujone, semblable à celle du Maroc [31].

Le pourcentage de présence de l'isomère  $\alpha$ -thujone dans les trois études [30,31, 135], ne dépasse pas 0.6%, ce qui exclut la toxicité de l'huile essentielle de cette plante quelque soit son origine, car cet isomère est très connu par sa toxicité [136] et ses effets convulsifs, quoi que son utilisation à des doses bien limitées est autorisée car il est aussi connu par ses activités biologiques, en l'occurrence, il est antibactérien, emménagogue [136, 137]. Il faut donc intégrer la notion de la dualité « efficacité-toxicité » car toute substance active est potentiellement toxique, tout dépend de la dose unitaire, la dose journalière, la voie d'administration et l'état du patient [38].

Des espèces appartenant à la même tribu Anthemideae, citées à titre indicatif dans le tableau II-III-3 ci-dessous, montrent leur ressemblance avec l'espèce étudiée (*B. cinerea*) en ce qui concerne la teneur en constituants majoritaires cités.

L'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* à chemotype marqué par une co-dominance des quatre composants majoritaires: le 1,8-cinéole, le camphre et les thujones ( $\alpha$  et  $\beta$ ) déterminé dans l'étude [138], semble être très proche que la notre, avec des différences de % présence. Cette ressemblance dans la composition chimique explique peut être l'appellation de cette espèce par « Chihia » dans la région saharienne.

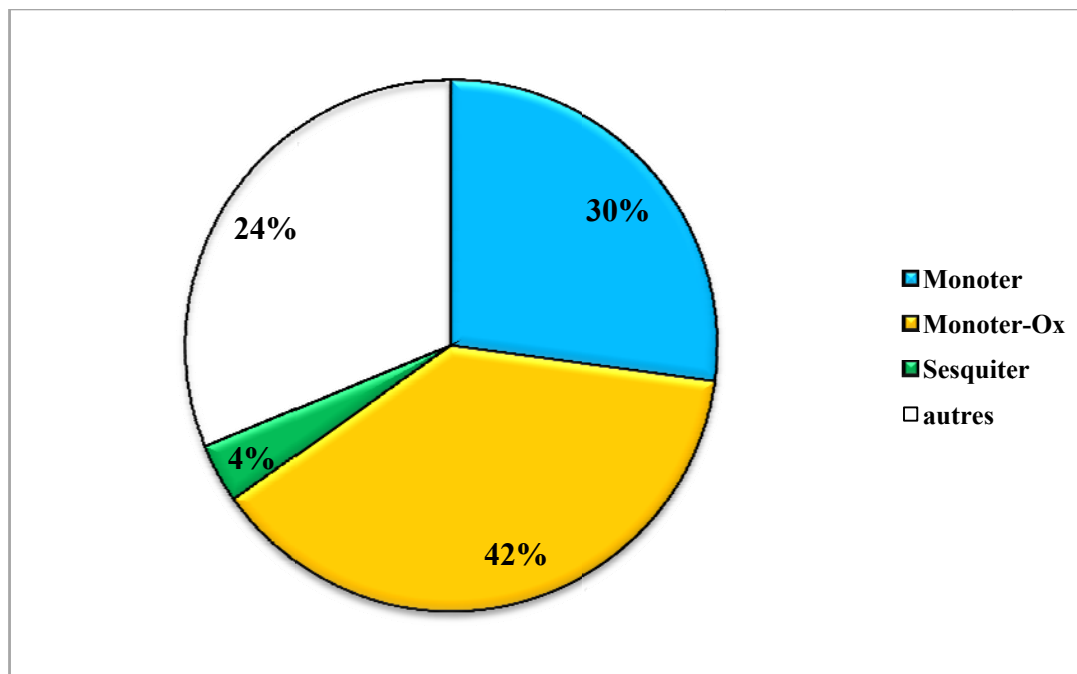
**Tableau II-III-3 : pourcentages des constituants majoritaires de quelques espèces de la tribu Anthemideae.**

	% $\alpha$ -thujone	% $\beta$ -thujone	% camphre	% eucalyptol	Réf.
<i>Artemisia mesatlantica</i>	1.38	56.33	4.17	2.63	[131]
<i>Art. herba-alba</i> Asso	tr - 29,5	tr- 44,5	tr- 36,6	1,5- 17,6	[138]
<i>Art. herba alba</i>	1-27	1-27	0.1-25	5-50	[139]
<i>Tanacetum argyrophyllum</i>	52-63	5-4	3-2	11-4	[139]
<i>Art. umbelliformis</i>	68	18	--	2	[139]
<i>Achellia sintenish</i>	--	--	14.8	12.9	[140]

De ce fait, on peut préciser que l'huile essentielle de *Brocchia cinerea* (Vis.) d'Algérie est marquée par la présence des principales substances suivantes à pourcentage décroissant: la thujone, le camphre, le santolinatrienne et l'eucalyptol.

La famille des Asteraceae est caractérisée par son polymorphisme chimique. Cette chemio-variété peut se présenter d'un peuplement à l'autre ou même d'un individu à l'autre et peut être due à plusieurs facteurs: extrinsèques comme l'ensoleillement, la nature et les composants du sol, la température, etc. Elle est également due aux facteurs intrinsèques tels que le patrimoine génétique des individus. (Cas des Artemisias) [132, 141-144].

La figure II-III-2 nous informe que plus de 90% de l'huile essentielle de *Brocchia cinerea* est approximativement constituée de 30% d'hydrocarbures monoterpéniques, 42% monoterpènes oxygénés, 4% de sesquiterpènes oxygénés et enfin le reste des autres composés qui ont été évalués à 24%.



*Monoter* : hydrocarbures monoterpéniques, *Monoter-ox* : monoterpènes oxygénés, *sesquiter* : sesquiterpènes, *autres* : autres composés.

**Figure II-III-2: présence de familles chimiques dans l'huile essentielle (HE1).**

Généralement, les composés majoritaires déterminent les propriétés biologiques d'une huile essentielle [133,145]. Ainsi, la grande teneur de HE1 en composés terpéniques oxygénés peut justifier l'utilisation de *B. cinerea* en médecine traditionnelle. En l'occurrence, la présence distinguée du camphre et d'eucalyptol, très connus pour leurs propriétés anti-inflammatoires, antimicrobiennes, antiseptiques et même anticancéreuses [146-148], en plus de leur utilisation réputée dans certaines préparations pharmaceutiques [149], peut être expliquée le traitement des maladies broncho-pulmonaires par cette plante dans les régions sahariennes, et aussi ses bio-activités citées dans des travaux antérieurs [39-45].

Vu le manque de données dans la littérature sur eux, deux constituants ont été détectés par FID mais, ils n'ont pas pu être identifiés ; ils avaient les indices de rétention (Ir) suivants: 1505 et 1767 sur Innowax, le dernier a été élué aussi sur HP1 où il avait un Ir égal à 1140.

En raison de sa grande sensibilité, GC-MS a été très utile dans l'analyse qualitative de notre huile essentielle. Plus de cinquante pics ont été détectés sur le chromatogramme (figure II-III-3), parmi lesquels nous avons pu identifier trente deux composés.

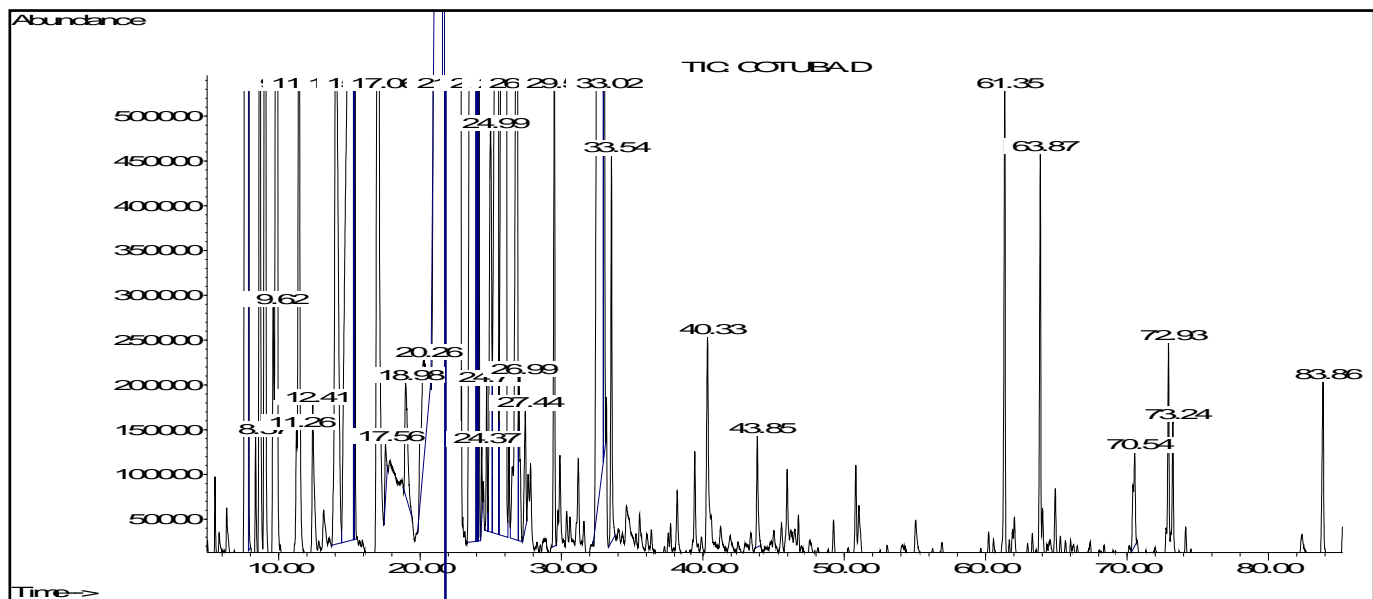


Figure II-III-3: Chromatogramme obtenu par GC-MS pour HE1.

Le tableau II-III-4 reporte leurs spectres de masse expérimentaux comparés avec ceux des standards correspondants.

Tableau II-III-4: résultats d'analyse de HE1 par GC-MS.

Composés identifiés	tr (min)	SM (exp.)	SM (réf.)
Hexanal	4.24	44(100), 56(79), 41(60), 43(55), 29(35), 27(33), 72(15)	44(100), 56(82), 41(66), 43(53), 29(38), 27(33), 72(19)
Cis-Salvène	5.5	41(100), 67(98), 81(96), 68(80), 69(60), 55(50), 39(45), 109(40)	41(100), 67(72), 81(64), 55(38), 109(22), 95(10), 124(1)
Acétate d'isoamyl	6.33	43(100), 70(45), 55(42), 41(20), 42(18), 32(12), 61(10)	43(100), 55(43), 73(38), 41(37), 42(33), 61(27)
Santolinatrienne	7.88	93(100), 121(80), 79(70), 91(50), 77(47), 67(40), 105(32), 41(25)	93(100), 41(72), 79(70), 121(55), 77(51), 67(49), 53(34)
Tricyclène	8.36	93(100), 79(32), 91(30), 79(32), 92(30), 77(30), 41(29) 121(25), 136(20), 39(20)	93(100), 91(31), 92(27), 79(25), 41(24), 39(22), 77(22), 121(20).
$\alpha$ -thujène	8.68	93(100), 91(60), 77(47), 92(43), 79(15), 136(15), 41(10)	93(100), 77(23), 91(21), 92(20), 41(15) 39(14), 79(10), 121(5)
$\alpha$ - Pinène	9.08	93(100), 91(35), 92(32), 77(29), 79(25), 121(19), 41(15), 39(10)	93(100), 92(35), 91(32), 77(29), 79(23), 41(20), 39(19), 121(14)
Camphène	9.91	93(100), 121(75), 79(40), 91(37), 67(35), 107(32), 77(30), 41(20) 39(18), 136(15)	93(100), 121(58), 79(40), 91(37), 39(34), 41(32), 67(29), 77(28)
4-méthylène-1-(1-méthyléthyl)bicyclo[3,1,0] Hexane.	11.26	93(100), 77(50), 91(50), 41(40), 57(39), 79(40), 39(30), 136(15)	93(100), 41(61), 69(35), 39(32), 91(31), 77(28), 79(27), 27(21)
$\beta$ -Pinène	11.45	93(100), 69(40), 41(39), 79(37), 77(36), 91(36), 121(18), 136(15)	93(100), 41(61), 69(35), 39(32), 91(31), 77(28), 79(27), 27(21)

$\alpha$ - Phéllandréne	13.19	93(100), 91(60), 77(55), 92(40),136(30), 41(25), 32(22), 39(20), 57(18), 79(18), 85(15)	93(100), 91(33), 77(31), 91(25), 136(16), 41(14), 39(11), 27(10)
Eucalyptol	15.30	43(100), 81(98), 108(90), 154(85), 111(80), 139(75), 71(70), 84(68), 93(65), 55(50)	43(100), 93(55), 81(55), 71(47), 69(40), 84(38), 68(38), 108(36)
$\gamma$ -terpinène	17.06	93(100), 91(50), 77(35), 136(35), 121(30), 43(20), 39(10)	93(100), 91(33), 77(32), 136(29), 121(27), 39(23), 43(23), 27(23)
$\alpha$ - Thujone	21.48	110(100), 81(95), 95(80), 67(60), 69(57), 68(55), 109(55), 41(48)	110 (100), 81(88), 95(70), 67(68), 68(58), 41(58), 69(53), 109(43)
8-méthylène-3-oxatricyclo[5,2,0,0(2,4)] Nonane	22.88	79(100), 91(95), 96(75), 77(73), 39(55), 109(55), 81(50),41(50),69(53),93(45)	79(100), 92(83), 39(69), 91(62), 77(57), 41(50), 27(47), 93(41)
Camphre	23.92	95(100), 81(82), 108(45), 69(40), 152(42), 55(35), 41(38)	95(100), 41(73), 81(74), 108(39), 69(39), 55(38), 27(35), 39(34)
Bornéol	24.99	95(100), 41(20), 110(22), 55(12), 67(11), 139(10), 121(8), 93(9)	95(100), 41(18), 110(16), 93(12), 55(11), 67(10), 139(10), 121(9)
$\alpha$ -Thujénal	26.29	79(100), 77(40), 107(35), 105(30), 108(18), 106(17), 91(17), 41(15), 43(14)	79(100), 107(51), 77(33), 105(29), 108(29), 106(28), 41(17), 43(16)
<i>p</i> -Cymén-8-ol	26.53	43(100), 135(85), 91(27), 67(20),39(15),41(17),79(18), 55(12), 82(9), 105(7)	43(100), 135(52), 91(21), 39(9),
<i>p</i> -menth-1-én-8-ol	26.89	59(100), 93(60), 121(49), 136(45), 81(33), 43(31), 67(20)	59(10), 93(60), 121(49), 136(45), 81(33), 43(31), 67(16) , 92(17)
Trans-Pipéritol	27.82	84(100), 83(40), 41(35),	84(100), 41(27), 83(27),

		139(32), 55(25), 91(20), 79(20), 67(15)	136(26), 93(25), 43(22), 55(20), 77(18), 69(17), 67(8)
Cis-3-hexenylisovalérate	29.5	82(100), 67(99), 57(98), 41(35), 85(32), 55(20), 54(9)	82(100), 67(77), 57(73), 85(55), 41(48), 55(27), 43(22), 29(22)
Acétate de lyratyl	32.91	119(100), 43(67), 91(50), 93(47), 79(45), 77(38), 105(35), 134(22)	119(100), 43(67), 134(47), 93(42), 91(41), 79(34), 105(26), 77(22)
Acétate de bornyl	33.02	95(100), 43(58), 93(48), 121(45), 136(40), 41(20), 80(18), 55(18)	95(100), 43(76), 93(45), 136(39), 121(34), 41(27), 80(17), 55(15)
Acétate de lavandulyl	33.53	69(100), 43(85), 93(75), 41(65), 68(45), 91(25), 121(23), 67(20), 136(10)	69(100), 43(74), 93(73), 41(50), 68(46), 121(24), 67(20), 136(12)
Carvacrol	34.04	135(100), 150(35), 91(38), 43(48), 32(45), 79(28), 77(25), 107(19), 115(18), 136(10)	135(100), 150(31), 91(13), 136(10), 77(7), 107(7), 117(6), 115(5)
Acétate de neryl	38.19	69(100), 43(67), 41(65), 3(45), 68(40), 67(27), 121(25), 80(19)	69(100), 41(67), 43(45), 68(37), 93(35), 67(18), 80(13), 121(11)
Acétate de geranyl	39.43	69(100), 43(65), 41(62), 68(45), 93(24), 121(18), 138(14), 67(20)	69(100), 43(65), 41(63), 68(49), 93(24), 136(22), 121(14), 67(13)
Cis jasmone	40.33	79(100), 91(75), 110(75), 164(68), 55(65), 149(62), 41(61), 93(60), 77(60), 122(58), 135(58)	79(100), 91(98), 39(97), 77(64), 164(60), 91(58), 93(54), 53(50), 55(49), 110(45), 149(42), 135(40), 122(40)
Spathuléol	50.82	43(100), 41(63), 91(62), 119(57), 205(50), 93(48), 105(48), 159(38)	43(100), 41(63), 205(61), 119(57), 91(50), 93(48), 159(43), 105(40)
Oxide de caryophyllène	51.04	43(100), 41(97), 79(82),	43(100), 41(97), 79(82),

		93(70), 91(54), 69(45), 55(42), 109(35), 121(25), 135(10)	93(70), 91(54), 69(45), 55(42), 109(35), 121(25), 135(10)
Méthyljasmonate	55.05	83(100), 41(58), 151(40), 67(40), 95(40), 55(43), 93(35), 109(38)	83(100), 41(53), 151(46), 67(33), 95(32), 55(29), 93(28), 109(28)

*MS(exp): spectre de masse expérimental. MS(réfé): spectre de masse de référence.*

Vingt-quatre parmi eux étant déjà détectés par l'analyse GC-FID et les autres sont identifiés, à notre connaissance, pour la première fois dans la composition chimique de cette plante.

En observant l'allure du chromatogramme (TIC) figure II-III-3, on remarque qu'il y a un pic très large dans l'intervalle du temps de rétention (tr) des deux isomères de la thujone. Cependant, l'identification de l' $\alpha$ -thujone seule nous a laissé supposer que l'autre isomère est masqué par celui-là, par conséquent, le calcul de (Ir) s'est basé sur le (tr) du début de ce pic. Un résultat pareil est rencontré dans l'étude [150] où la séparation, des pics chevauchés, a nécessité des analyses très ciblées.

Il est aussi important de noter que vingt-et-un autres constituants de HE1 ont été également détectés par cette analyse, certains entre eux ont marqué une présence appréciable (figure II-III-3) mais comme leur identification a été très difficile, nous avons préféré les laisser inconnus.



## II-III-2-2-Résultats des analyses chromatographiques de HEM :

En ce qui concerne HEM, son analyse par GC- FID a permis de caractériser 82 composés représentant 81.34% de l'ensemble de sa composition chimique. La majorité d'entre eux ont été détectés sur les deux types de colonnes. A titre indicatif nous citons les résultats d'identification regroupés dans le tableau II-III-5.

**Tableau II-III-5 : résultats des analyses de l'huile essentielle de *M. pubescens* par GC-FID.**

Composés identifiés	Ir(exp.) HP1	Ir(réf.) HP1 [124-130]	Ir(exp.) wax	Ir(réf.) Wax [124-130]	%HEM
Hexanal	786	801	1095	1084	1.32
Furfural	803	828	1477	1455	0.29
Trans hex-2-enal	823	846	1237	1192	0.57
Cis hex-3-énol	832	850	1389	1351	0.20
$\alpha$ -thujène	924	930	1035	1021	tr
Camphène	945	947	1079	1066	tr
Oct-1-en-3-one	950	972	1315	1323	0.33
Acide hexanoïque	957	967	1843	1863	0.19
Thiophene-2- carboxaldéhyde	960	995	1711	--	1.22
$\alpha$ -phellandrène	1000	1005	1177	1164	tr
Décane	1000	1000	--	--	tr
Benzyl alcool	1007	1041	1882	1870	tr
$\delta$ -3-carène	1007	1009	1156	1148	tr
Acétophénone	1034	1041	1673	1645	tr
Trans $\beta$ -ocimène	1037	1038	1252	1243	tr
3E, 5E-Octadien-2-one	1041	1057	1536	1521	tr
$\gamma$ - terpinène	1049	1053	1252	1243	tr
Total					81.34%

**Ir( exp) Wax** : indice de rétention calculé sur la colonne Innowax. **Ir( exp) HP1** : indice de rétention calculé sur la colonne HP1. **Ir réf (Wax)**: indice de rétention de référence sur colonne polaire. **Ir réf (HP1)**: indice de rétention sur colonne apolaire. **% HEM** : pourcentage des constituants.

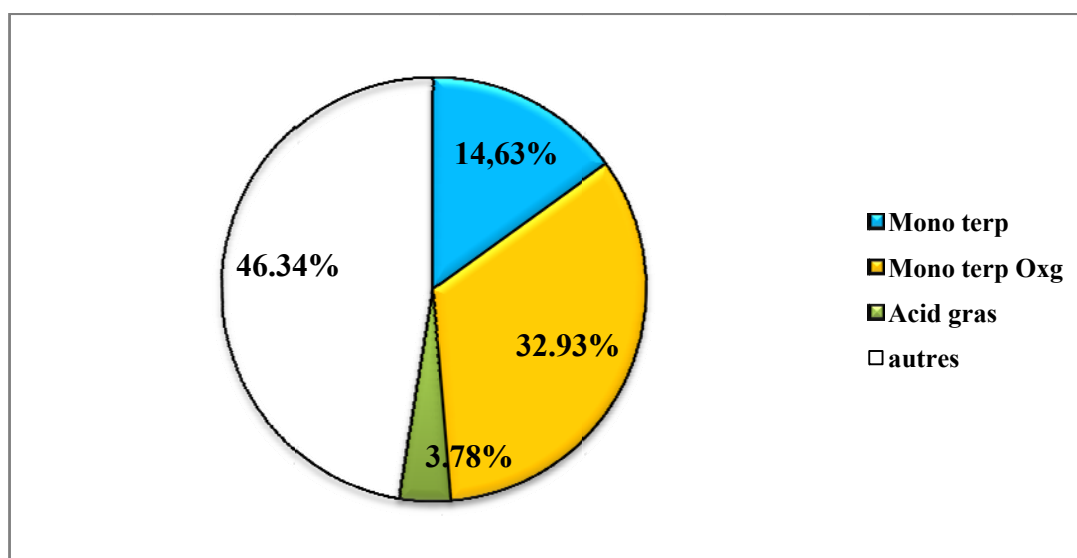
Les pourcentages relatifs aux produits identifiés dans HEM varient entre traces ( $\leq 0.2\%$ ) et 16.92%, dont certains ont marqué une présence plus ou moins importantes, parmi lesquels on cite : spathulenol (4.83%), elemicine (3.51%),

Cette même analyse a révélé aussi que HEM est distinguée par les principaux composés majoritaires suivants : l'herniarine (16.92%), une coumarine déjà caractérisée dans un extrait de dichloromathane de *Matricaria pubescens* (Desf.) [52,53].

Tandis que l'étude réalisée sur la même espèce récoltée de Ghardaia [50] a démontré que son huile essentielle est formée majoritairement de l'ester éthylique de l'isochrysanthémique (26.5%), spathuléol (19.4%),  $\alpha$ -cadinol (12.9%) et géranylisovalérate (8.2%).

Également, la composition chimique de HEM semble être différente de celle obtenue pour l'huile essentielle d'une autre espèce du même genre « *Matricaria perforata* » d'Estonia [131] caractérisée par la présence de son produit majoritaire (Z,Z)-Matricaria ester avec 77.9%.

Bien que 81.34% de la totalité de l'huile essentielle de *M. pubescens* (HEM) aient été identifiés, l'histogramme sur la figure II-III-4 montre que seulement la moitié presque qui a été attribuée aux groupes suivants : 14.63% hydrocarbures monoterpéniques, 32.93% monoterpènes oxygénés et 3.78% acides aliphatiques ; le pourcentage des autres produits restant évalué à 46.34% représente différentes classes chimiques, citons entre autres : les sesquiterpènes oxygénés, composés aromatiques, coumarine etc.



*Mono terp* : hydrocarbures monoterpéniques, *Mono terp- Oxyg* : monoterpènes oxygénés,  
*autres* : autres composés.

Figure II-III-4: présence des familles chimiques dans l'huile essentielle (HEM).

La dominance des composés terpéniques oxygénés avec 32.93% est aussi remarquée sur la composition de cette huile (HEM). Malgré que les composés majoritaires ne soient pas parmi eux, cela n'empêche pas que tous les constituants actifs d'un extrait naturel, quelque soit leur classe chimique, agissent en synergie et offrent la potentialité bioactive et les effets thérapeutiques à la plante qui les produit comme c'est le cas des deux plantes *M. pubescens* et *B. cinerea*.

En ce qui concerne l'analyse de HEM par GC-MS, elle a été effectuée sur deux colonnes de polarité différente : Innowax polaire et HP1 apolaire. Deux chromatogrammes (TIC) ont été produits figurant respectivement sur la figure II-III-5 et la figure II-III-6.

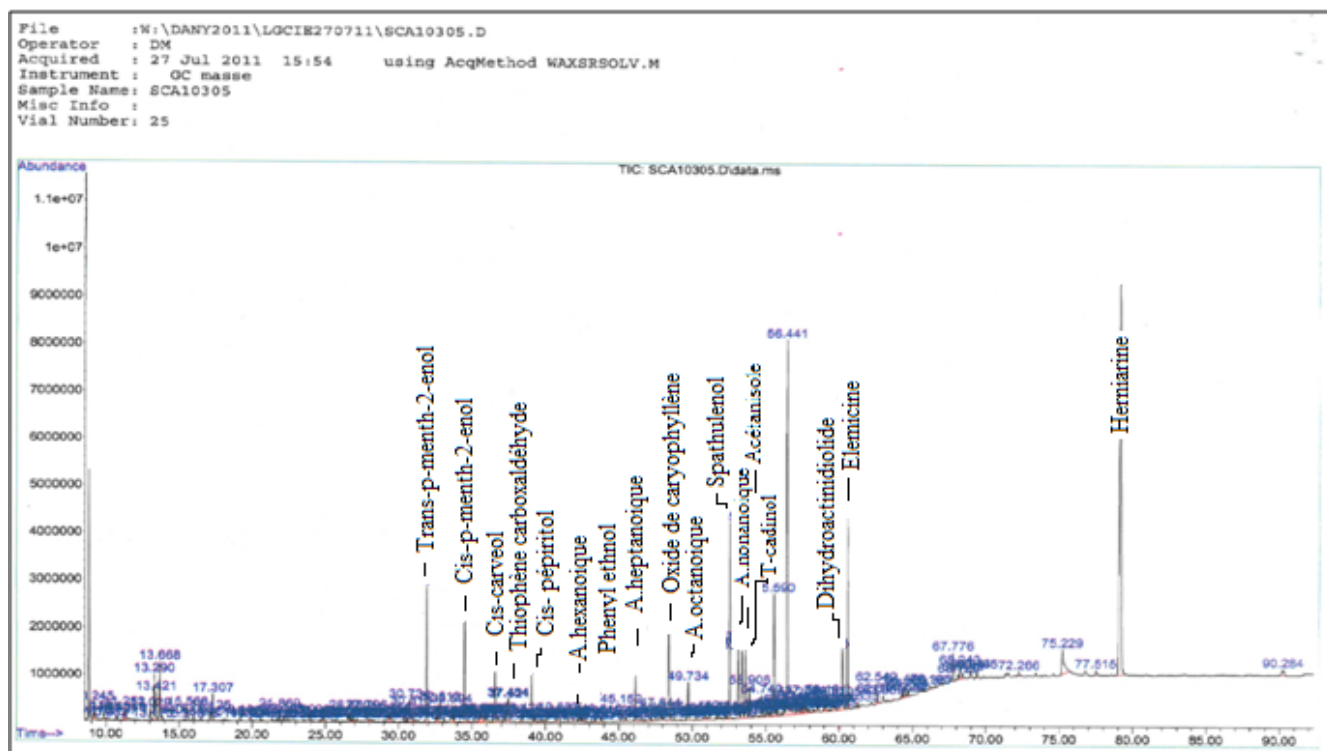


Figure II-III-5 : chromatogramme obtenu pour HEM par GC-MS/EI sur Innowax.

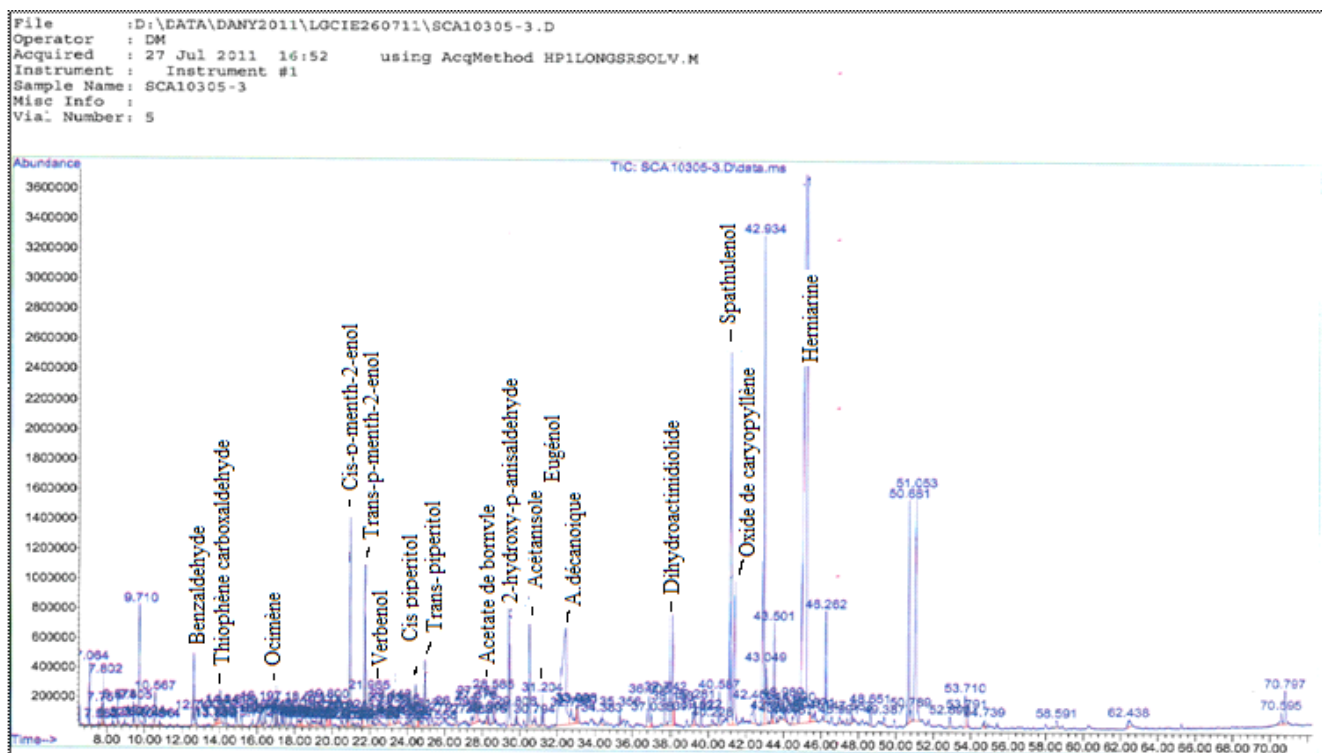


Figure II-III-6 : chromatogramme obtenu pour HEM par GC-MS/EI sur HP1.

La GC-MS a été aussi très essentielle pour l'analyse qualitative de l'huile essentielle de *Matricaria pubescens* (HEM). En effet, deux cents produits ont été repérés en utilisant la colonne Innowax et cent vingt sept dans le cas de la colonne HP1.

Par analogie, les mêmes méthodes d'identification (Ir, MS), comme dans le cas de l'huile de *B. cinerea*, ont été utilisées pour le traitement des données du nombre important de composés détectés dans HEM, quoique dans ce cas, la caractérisation ait été confortée par l'analyse de cet échantillon sur une deuxième colonne polaire (Innowax). Par conséquent, quarante huit composés ont été identifiés sur les deux colonnes, confirmant ainsi leur présence dans HEM. Certains, Parmi eux, ont été attribués à leurs pics sur les deux chromatogrammes : figure II-III-5, figure II-III-6.

## CHAPITRE III

### Identification de Lactones sesquiterpéniques dans *Brocchia cinerea* (Vis.)

---

## **Partie I : synthèse bibliographique**

### **III-I-1-Généralités sur les lactones sesquiterpènes:**

Les lactones sesquiterpéniques (SQL) constituent un groupe large et très diversifié de composés phytochimiques biologiquement actifs. Dans les anciens traités de matière médicale, elles étaient appelées « principes amers ». Elles ont une distribution botanique éparpillée; elles ont été identifiées dans: les Apiaceae, Euphorbiaceae, Lauraceae, Rutaceae etc, et très majoritairement dans les Asteraceae. Elles sont considérées caractéristiques de cette dernière [18, 151,152].

Les différences dans les quantités et les structures chimiques des lactones sesquiterpéniques dans plusieurs genres et espèces de cette famille ont fait l'objet de plusieurs travaux scientifiques, notamment les études pharmacologiques et chimiotaxonomiques [153-155].

Comme on l'a précédemment souligné, la tribu Anthemideae est l'une des meilleures tribus d'Asteraceae chimiquement étudiée [12,156]. D'après Greger (1977), cité dans la même référence bibliographique, les lactones sesquiterpénique, les polyactylènes et les flavonoïdes sont les trois principales catégories d'intérêt pour les systématiciens dans cette famille botanique.

Dans cette partie, nous représenterons quelques généralités sur les lactones sesquiterpéniques, particulièrement les mécanismes de biogenèse et les propriétés biologiques.

### **III-I-2-Caractéristiques des lactones sesquiterpènes:**

Les lactones sesquiterpéniques représentent une classe très intéressante de terpénoïdes, elles sont formées à partir de la condensation de trois unités isoprènes, tête-queue-tête, pour produire leur squelette de base à 15 atomes de carbone ; ce dernier subissant des transformations ultérieures: cyclisation et oxydation donnant lieu à une cis ou trans-fusion lactonique, d'où l'ajout du suffixe « olide » au nom du squelette sesquiterpénique indiquant ainsi le caractère lactonique.

Les squelettes sesquiterpéniques C<sub>15</sub>H<sub>24</sub> sont très variés, particulièrement lorsqu'ils sont fonctionnalisés. Des structures acycliques, cycliques, mono, bi et tricycliques ont été caractérisées, les monocycliques sont les plus fréquents. Mais ceux dérivant du squelette de

germacrane sont les plus connus lorsque le sesquiterpène porte une fonction lactone, environ 5 000 structures sont caractérisées [155, 157].

### **III-I-3-Biogenèse des lactones sesquiterpènes:**

Les lactones sesquiterpéniques sont issues de la cyclisation d'un précurseur terpène, le farnésylpyrophosphate (FPP) qui donne le (+)-germacrène A; la chaîne latérale de celui là passe par plusieurs étapes d'oxydation, à savoir : hydroxylation au germacra-1(10), 4, 11(13)-trièn-12-ol qui sera oxydé en germacra-1(10), 4, 11(13)-trièn-12-al et une oxydation supplémentaire conduit à l'acide germacra-1(10), 4, 11(13)-trièn-12-oïque. La probabilité d'hydroxylation de l'acide germacrène en position C-6 ou C-8 et la perte ultérieure d'eau conduisent respectivement, à la cyclisation lactone entre C6-C12 ou C8-C12. Sur le schéma III-I-1, nous observons que le germacranolide représente le groupe biogénétiquement à l'origine de toutes les lactones sesquiterpéniques [155, 158-161].

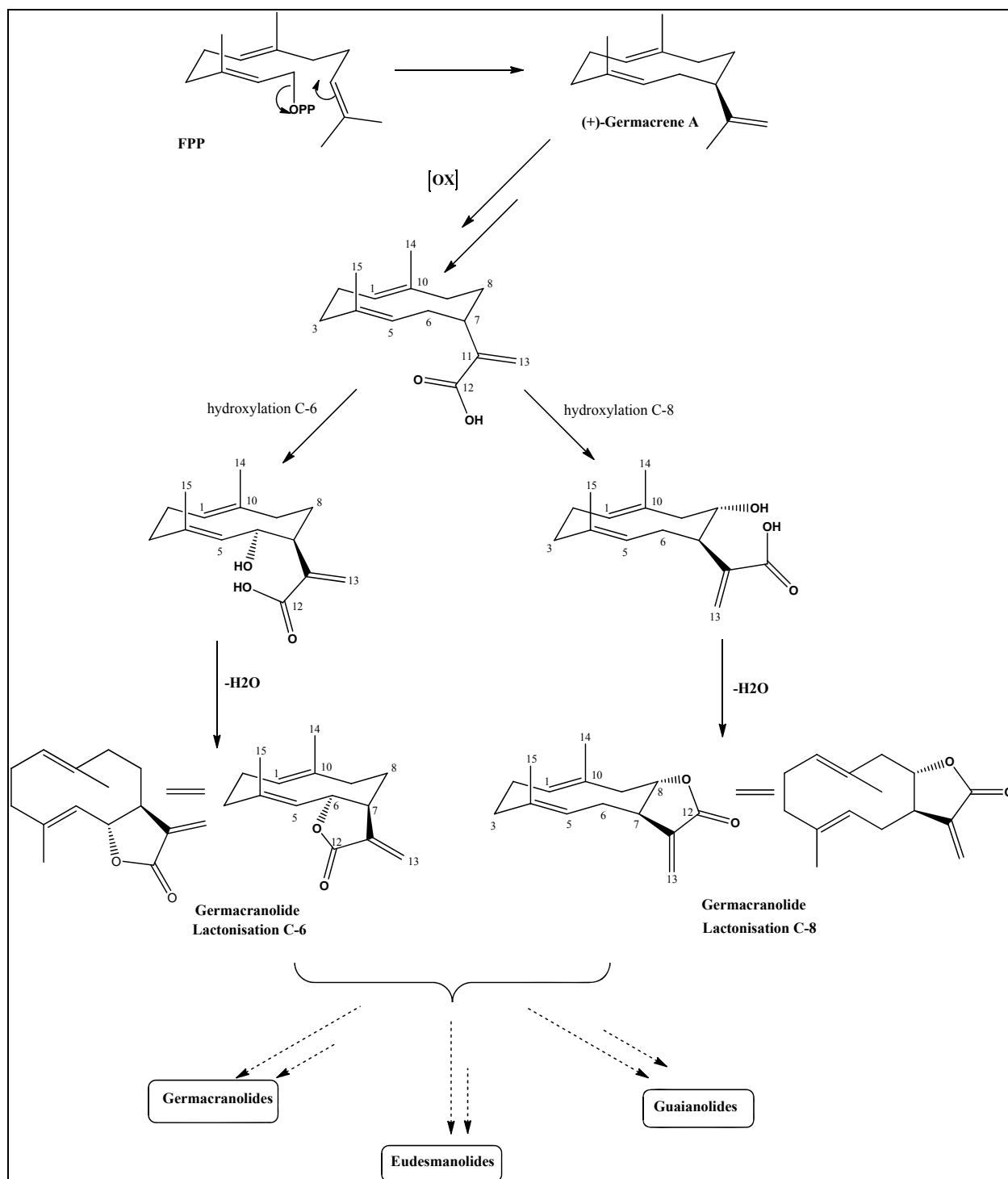


Figure III-I-1 : schéma proposé pour la biosynthèse de C-6 et C-8 lactones sesquiterpènes [16,162].



Sur le schéma, nous observons, comme cité ci-dessus, que le germacranolide représente le groupe biogénétiquement à l'origine de toutes les structures des lactones sesquiterpéniques. En effet, l'élémanolide et ses dérivés seront les produits des réarrangements de Cope induits par la chaleur. Et la protonation induit des cyclisations qui conduisent aux guaianolides et aux eudesmanolides, etc.

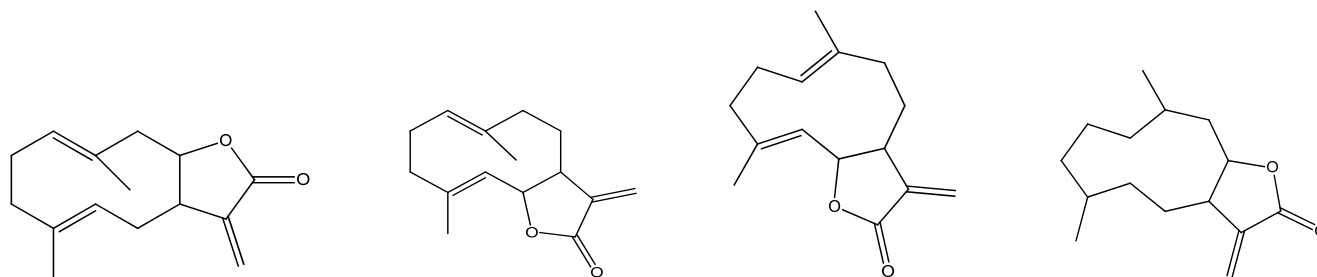
Des enzymes spécialisées (synthase, cyclase, oxydase,..) sont impliquées dans les différentes étapes de la biosynthèse de ces classes [163]. Les voies biosynthétiques proposées n'expliquent pas à quelle étape s'effectue l'oxydation et la formation du noyau  $\gamma$ -lactone [164].

Préliminairement, le classement en fonction de leur structure de base serait de placer la plupart de ces métabolites secondaires (SQL) dans l'un des 4 sous-groupes : germacranolides (structures monocycliques à 10 chaînons), guaianolides et pseudoguaianolides (des composés bicycliques 5/7) et eudesmanolides (structures bicycliques 6/6).

Les modifications structurales secondaires sont nombreuses et portent :

- Sur le cycle lactonique, en général de type  $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -lactone et dans tous les cas (sauf chez les lactones issues des briophytes) le proton en C7 est en position  $\alpha$  autrement dit la liaison C7-C11 est placée en  $\beta$ . Elle peut être cis 6, 12 ; cis 8, 12; trans 6, 12 ou trans 8, 12- olide.
- Sur le squelette carbonique, en effet, l'incorporation de groupes hydroxyles ou groupes hydroxyles estérifiés et des noyaux époxy sont communs. Quelques lactones sesquiterpéniques se présentent sous forme glycosidique et certains contiennent des halogènes ou du soufre [154].
- Sur les instaurations qui peuvent être réduites ou oxydées [155].

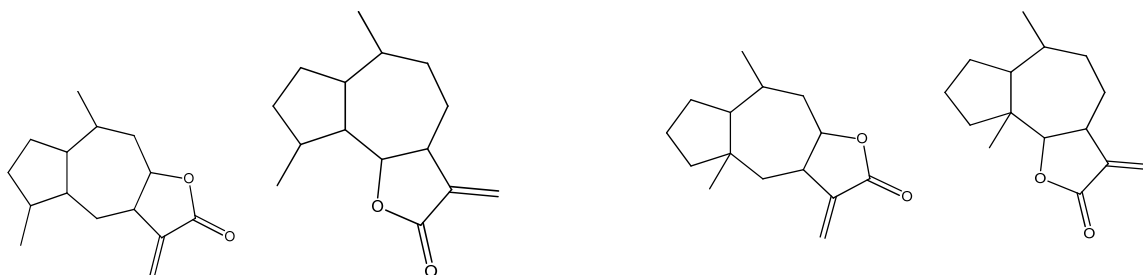
Des arrangements du squelette de base des différentes classes de SQL sont présentés dans les pages 64, 65, 66 :



**Germacranolides**

**Figure III-I-2-1: squelettes de base des SQL de la tribu Anthemideae.**

- Les guaianolides sont les produits d'une cyclisation entre C1-C5 pour présenter une structure de base bicyclique [5,3,0].
- La migration du méthyle C15 donne lieu à l'apparition d'une autre sous-classe connue sous le nom de pseudo-guaianolides. Ces derniers peuvent subir, par la suite, des modifications supplémentaires qui mèneront à des pseudo-guaianolides modifiés.

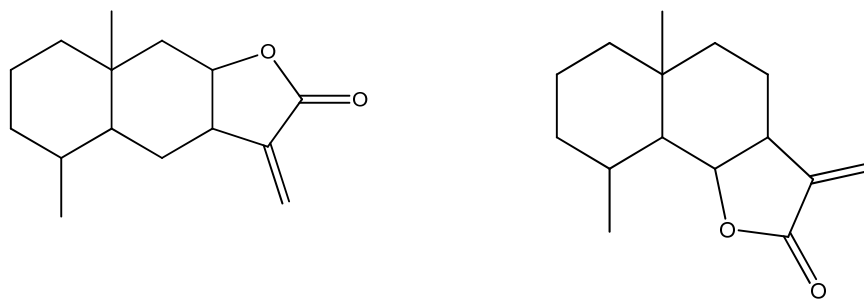


**Guaianolides**

**Pseudo-guaianolides**

**Figure III-I-2-2: squelettes de base des SQL de la tribu Anthemideae.**

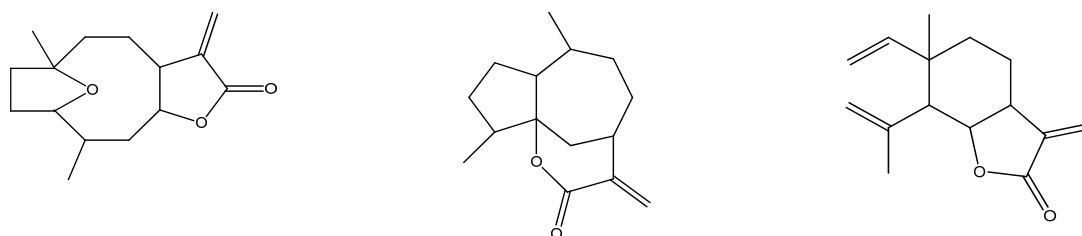
- Les eudesmanolides se forment lorsque la trans cyclisation entre C5 et C10 mène au squelette bicyclique [4,4,0].
- La migration de méthyle C14 produit des eremphanolides qui se ramifient après d'autres modifications à d'autres sous-classes.



**Eudesmanolides**

**Figure III-I-2-3: squelettes de base des SQL de la tribu Anthemideae.**

Cependant, les lactones sesquiterpéniques présentent d'autres arrangements tels que:



**Heliangolides**

**Hypocretenolides**

**Elemanolides**

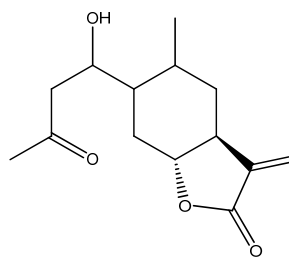
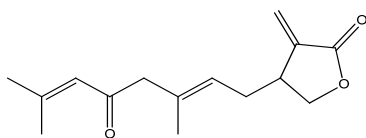
**Figure III-I-2-4-1: autres arrangements des SQL de la tribu Anthemideae.**

Notons que les structures déjà isolées de la tribu Anthemideae, de la famille des Asteraceae, peuvent se présenter sous d'autres types de squelettes en plus aux 4 premiers sous-groupes, tels que :



**Cadinanolides**

**Chrynocranolides**



**Farnésyl-lactones**

**Seco-ambrosanolides**

**Figure III-I-2-4-2: autres arrangements des SQL de la tribu Anthemideae.**

Le schéma sur la figure III-I-3 regroupe les relations biogénétiques possibles entre ces différentes classes et sous-classes.

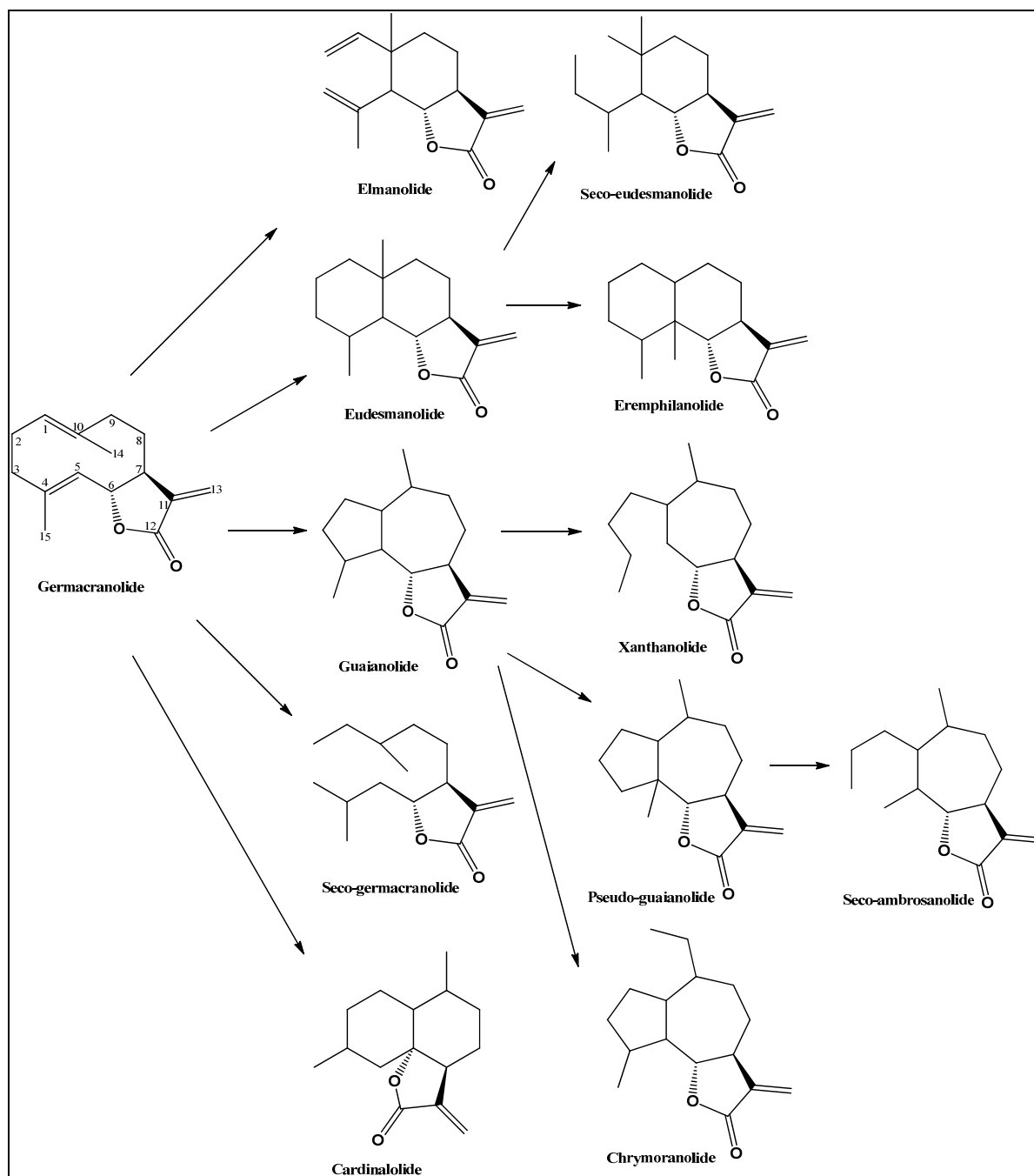


Figure III-I-3: relations biogénétiques entre les dérivés du germacranolide [165-167].

### III-I-4-Place des lactones sesquiterpènes dans la famille des Asteraceae:

L'isolation et l'établissement de leurs structures remontent à plus d'un siècle. En effet, l' $\alpha$ -santonine a été isolé pour la première fois en 1930 [168].

Depuis les années 70, avec le développement des techniques d'analyse, le nombre de structures élucidées n'a cessé d'augmenter [157, 169, 170].

Une grande majorité des lactones sesquiterpéniques se produit dans les membres de la famille des Asteraceae, ces lactones constituent un groupe très important de substances naturelles dans cette famille [155]; en fait, des études montrent que plus de 90% des lactones sesquiterpéniques ont été isolées de cette famille.

Ces terpénoïdes se produisent également dans d'autres familles d'angiospermes et non angiospermes. Peu de composés de ce type ont été isolés à partir de champignons. La plupart des lactones sesquiterpéniques des Asteraceae a été isolée principalement à partir des feuilles et des sommités fleuries des plantes (parties aériennes).

Généralement, les racines ne les contiennent pas, mais dans certaines espèces, de très petites quantités peuvent être présentes dans les racines ou les écorces de racines, comme celles isolées de *Michelia compressa* [171], Helenin d'*Inula helenium* [172] et laurenobiolide de *Laurus nobilis* [173].

Le schéma présenté dans l'étude de C. Zdero et al [11] illustre la distribution des différents types de ces substances dans les diverses tribus de cette grande famille, voir les figures III-I-4-1, III-I-4-2, III-I-4-3 suivantes :

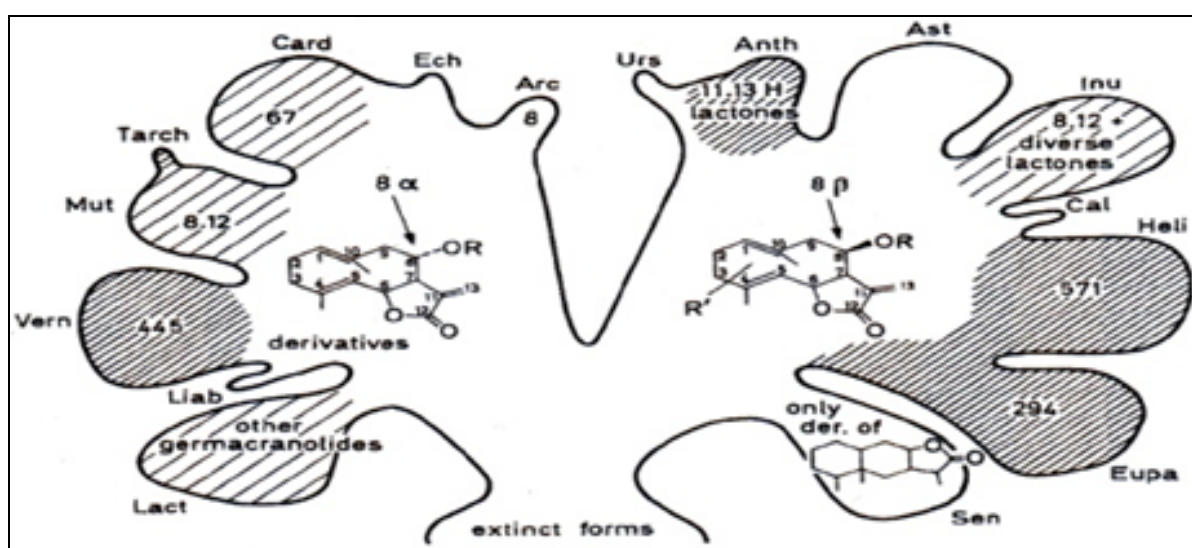


Figure III-I-4-1 : distribution des lactones sesquiterpéniques présentes dans les tribus des Asteraceae.

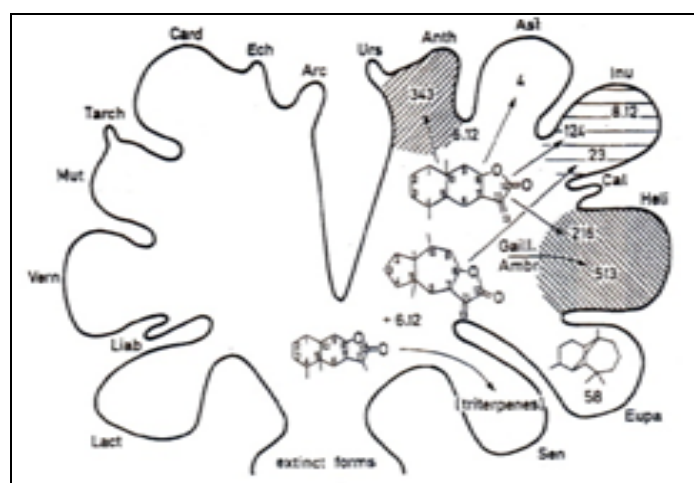
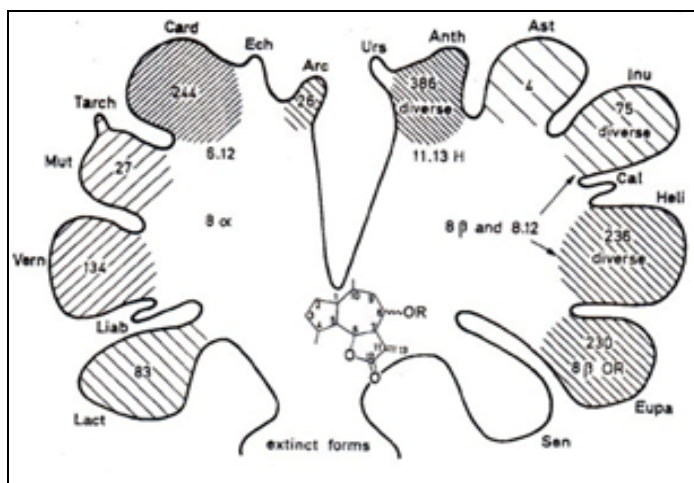


Figure III-I-4-2: distribution des guaianolides présents dans les tribus des Asteraceae.

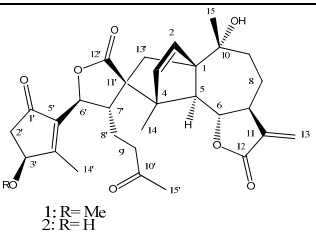
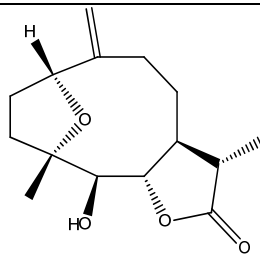
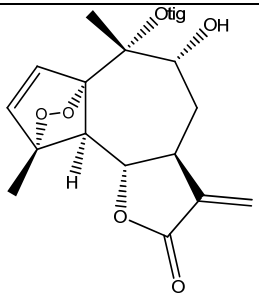
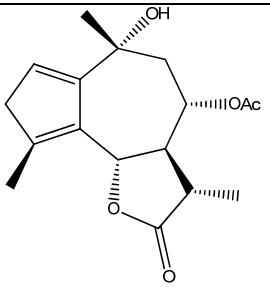
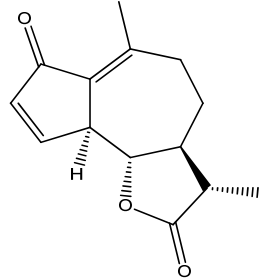
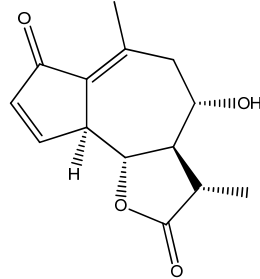
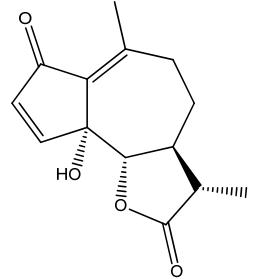
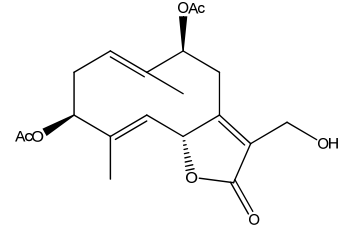
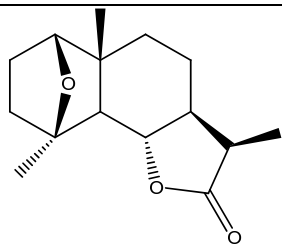
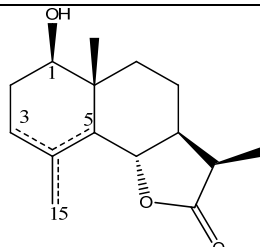
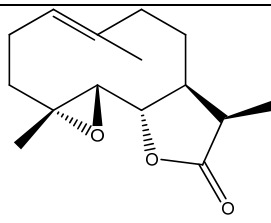
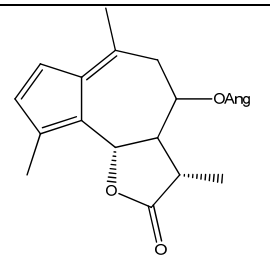
Figure III-I-4-3: distribution des pseudo-guaianolides présents dans les tribus des Asteraceae.

Abréviations: Lact: *Lactuceae*, Liab: *Liabeae*, Vern: *Vernonieae*, Mut: *Mutisieae*, Tarch: *Tarehnanthinae*, Card: *Cardueae*, Ech: *Echinopsidinae*, Arc: *Arctoteae*, Urs: *Ursinieae*, Anth: *Anthemideae*, Ast: *Astereae*, Inu: *Inuleae*, Cal: *Calenduleae*, Heli: *Heliantheae*, Eupa: *Eupatorieae*, Sen: *Senecioneae*.

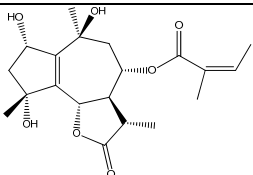
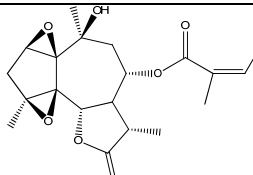
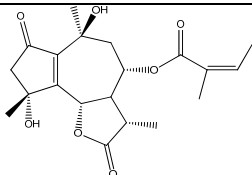
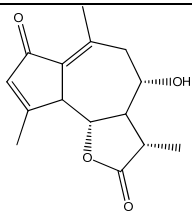
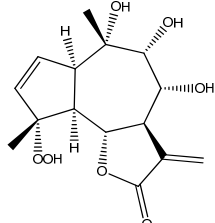
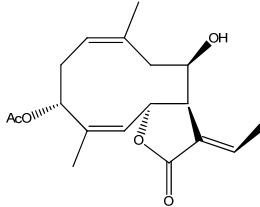
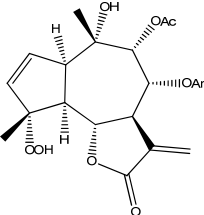
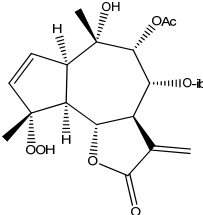
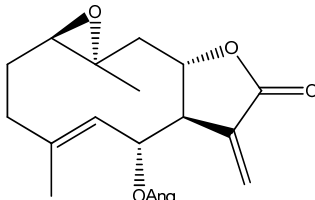
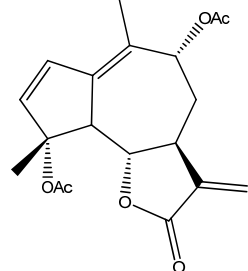
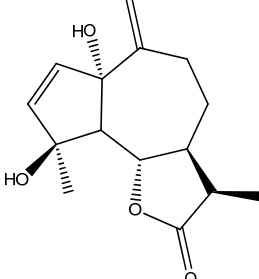
### III-I-5- Les lactones sesquiterpènes dans la tribu Anthemideae :

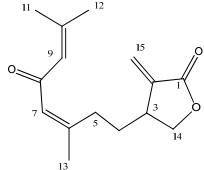
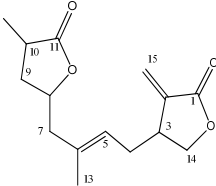
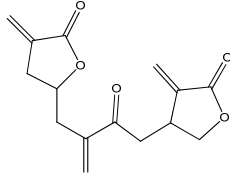
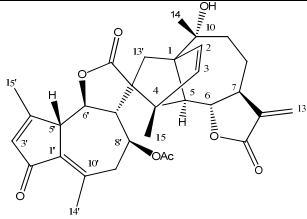
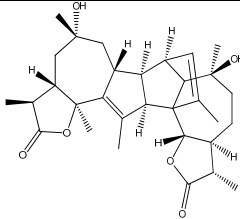
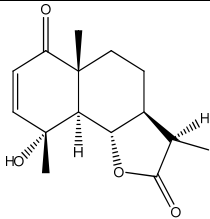
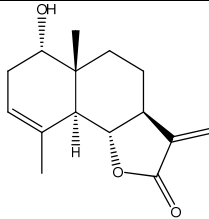
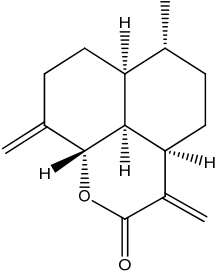
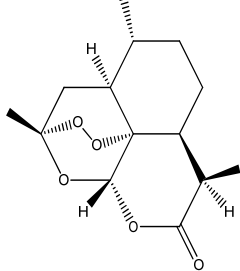
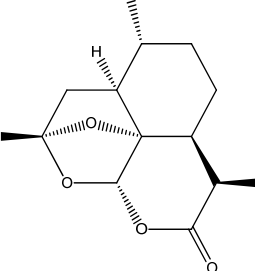
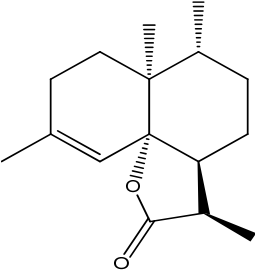
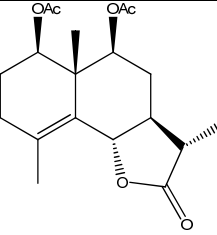
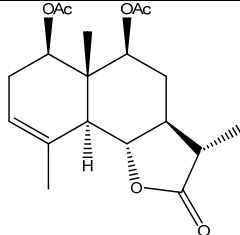
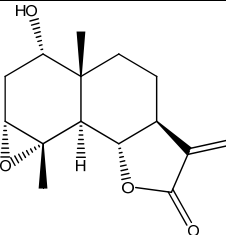
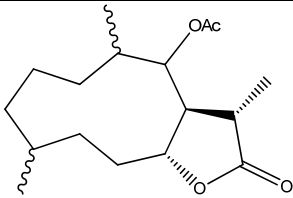
Les travaux sur les SQL en tant que métabolites secondaires, largement répandus, sont loin d'être dénombrés, notamment dans la famille des Asteraceae. La synthèse bibliographique réalisée par C. Zdero et F. Bohlmann [11] a rapporté que l'Anthemideae qui fait partie de ses tribus, est l'une des plus exploitée dans ce domaine. En effet, ils ont recensé un nombre très intéressant de travaux réalisés sur les différentes classes de SQL tout en précisant les pourcentages de ces études lorsque la substitution varie à travers ces structures de base. Ils ont cité 270 rapports sur les germacranolides, 386 études sur les guaianolides et les pseudo-guaianolides et 343 rapports sur les Elemanolides et les Eudesmanolides. Quelques structures de ces produits sont illustrées dans le tableau III-I-1.

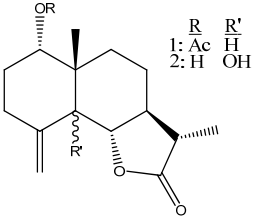
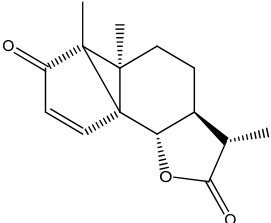
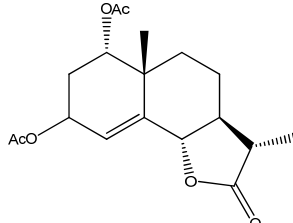
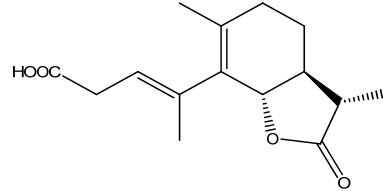
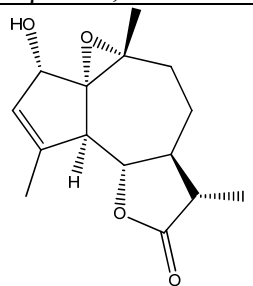
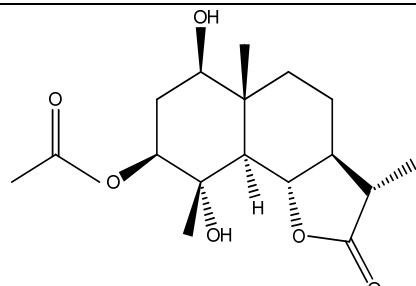
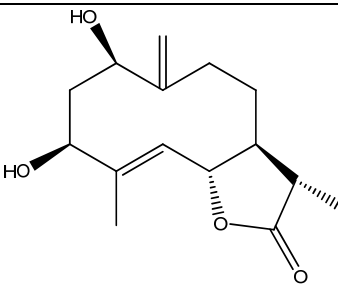
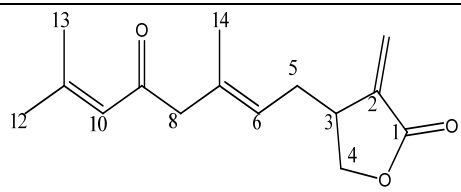
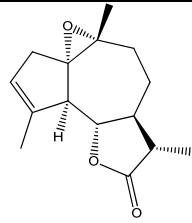
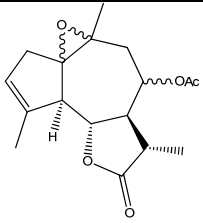
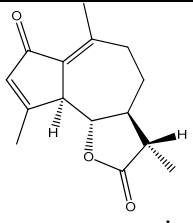
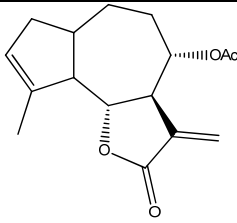
Tableau III-I-1: Structures de quelques lactones sesquiterpéniques de la tribu Anthemideae.

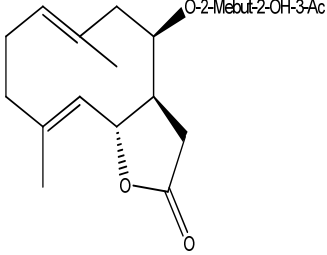
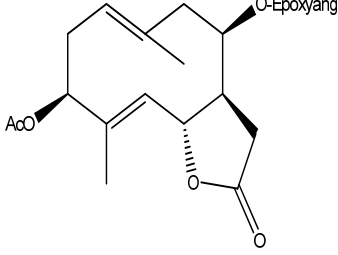
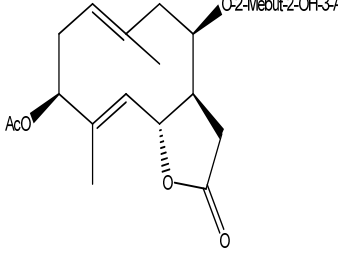
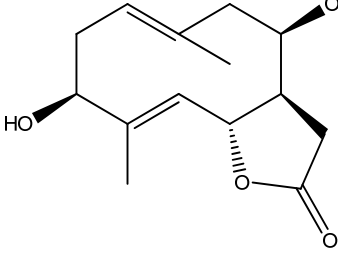
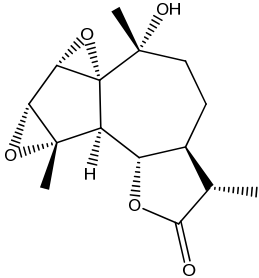
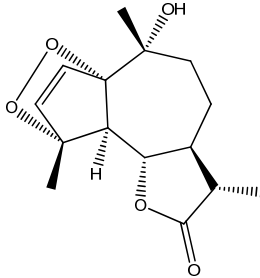
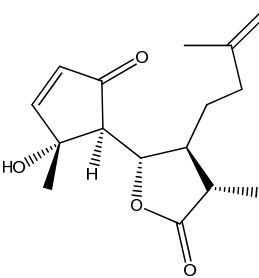
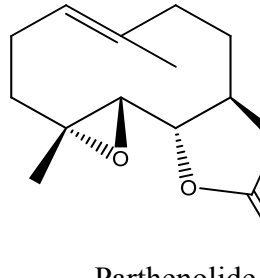
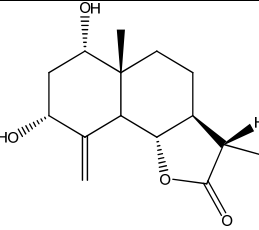
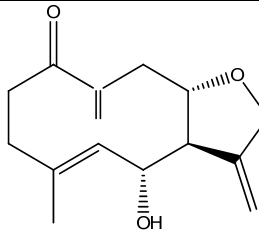
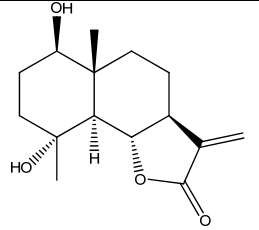
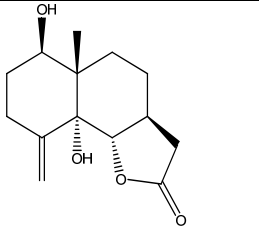
Genre	Espèce	Structure et nom				Réf.
Achillea	<i>A. millefolium</i>					[174] [175] [176] [177]
		1: Achillinin B 2: Achillinin C	Achillifolin	$\alpha$ -peroxyachifolide	Achillicin	
		<i>A. santolina</i>				
	Leucodin		deacetyl-matricarin	5-hydroxyleucodin	3,9-diacetoxy, 13-hydroxy- 1(10),4,7(11)-germacatrien-12,6olide.	
	<i>A. collina</i>					
		11- <i>epi</i> -gallicin	1: $\Delta^{3,4}$ 11 $\alpha$ , 13-dihydro-Santamarin 2: $\Delta^{4,5}$ 11- <i>epi</i> -artésin. 3: $\Delta^{4,15}$ 11 $\alpha$ ,13-i-hydroreynosin.	11 $\alpha$ , 13- dihydroparthenolide	8 $\alpha$ -angeloyloxytannunolide	



	<i>A. asiatica</i>	 <p>8<math>\alpha</math>-angeloxy-2<math>\alpha</math>,4<math>\alpha</math>,10<math>\beta</math>-trihydroxy-6<math>\beta</math>H,7<math>\alpha</math>H,11<math>\beta</math>H-1(5)-guaian-12,6<math>\alpha</math>-olide</p>	 <p>8<math>\alpha</math>-angeloxy-1<math>\beta</math>,2<math>\beta</math>:4<math>\beta</math>,5<math>\beta</math>-diepoxy-10<math>\beta</math>-hydroxy-6<math>\beta</math>H,7<math>\alpha</math>H,11<math>\beta</math>H-12,6<math>\alpha</math>-guaianolide</p>	 <p>8<math>\alpha</math>-angeloxy-4<math>\alpha</math>,10<math>\beta</math>-dihydroxy-2-oxo-6<math>\beta</math>H,7<math>\alpha</math>H,11<math>\beta</math>H-1(5)-guaian-12,6<math>\alpha</math>-olide</p>	 <p>8-desacetyl-matricarin</p>	[182]
<i>Anthemis</i>	<i>A. cretica</i> L.ssp	 <p>Anthemolide B</p>	 <p>Costunolide, cis,cis-11,13-dihydro-3<math>\alpha</math>-acetoxy-8<math>\beta</math>-hydroxy</p>	 <p>8-O-angeloyl-9-O-acetylanthemolide B</p>	 <p>8-O-isobutyl-9-O-acetylanthemolide B</p>	[183] [184]
	<i>A. rumelica</i> (Velen.) Stoj. & Acht.	 <p>6<math>\alpha</math>-angeloyl, 1<math>\beta</math>, 10<math>\alpha</math>-epoxygermacra-4-en-12, 8<math>\alpha</math>-olide</p>	 <p>4<math>\alpha</math>,9<math>\alpha</math>-diacetoxyguaia-2,1(10), 11(13)-trien-12,6<math>\alpha</math>-olide</p>	 <p>1<math>\alpha</math>,4<math>\beta</math>-dihydroxy-11<math>\alpha</math>H-guaia-2,10(14)-dien-12,6<math>\alpha</math>-olide</p>	[185]	

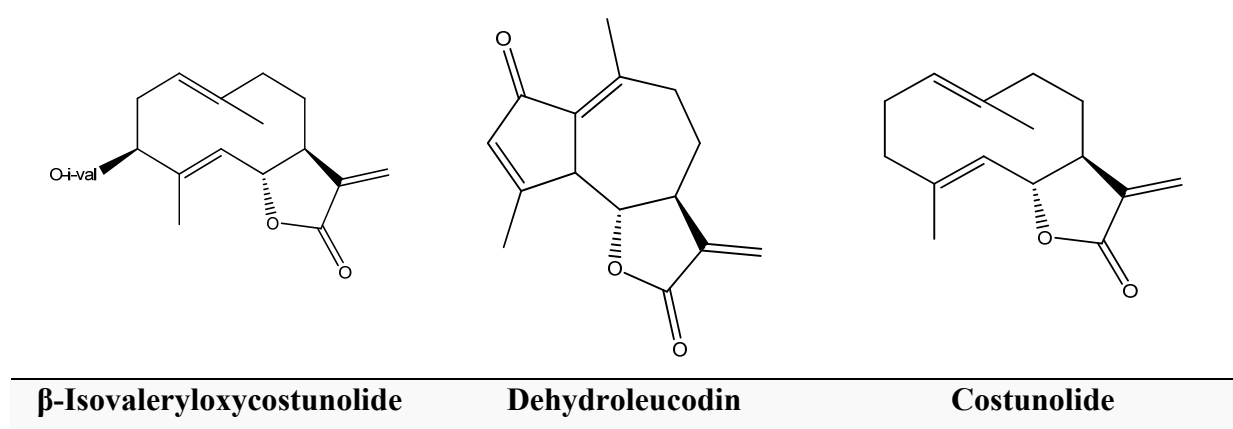
<p><i>Artemisia</i></p>	<p><i>Artemisia cotula</i></p>  <p>6,7 (Z)-dehydro-5,6-dihydroanthecotuloide</p>	 <p>Antheinduroside A</p>	 <p>Antheinduroside B</p>	<p>[186]</p>	
	 <p>Artanomaloide</p>	 <p>Absinthin</p>	 <p>Tauremisin</p>	 <p>Douglanine</p>	<p>[187] [188] [189] [190]</p>
<p><i>Artemisia</i></p>	<p><i>A. annua</i> L.</p>  <p>Annulid</p>	 <p>Artemisinin</p>	 <p>Dehydroxyartemisinin</p>	 <p>Dihydro-epideoxyarteannuin</p>	<p>[191] [192] [193] [194]</p>
	<p><i>A. herba-alba</i> Assou</p>  <p>1<math>\beta</math>,9<math>\beta</math>-diacetoxyeudesm-4-en-</p>	 <p>1<math>\beta</math>,9<math>\beta</math>-diacetoxyeudesm-3-en-</p>	 <p>Herbalbin</p>	 <p>Tetrahydroherbolide (3)</p>	<p>[195] [196] [197]</p>

<i>Matricaria</i>	<i>Art. hugueti</i> L.	<p>6<math>\beta</math>,11<math>\beta</math>H-12,6-olide (2)</p>  <p>1: 1<math>\alpha</math>-Acetoxyeudesm-4(15)-en-5<math>\alpha</math>,6<math>\beta</math>,11<math>\beta</math>H-12,6-olide 2: 1<math>\beta</math>,5<math>\beta</math>-dihydroxyeudesm-4(15)-en-6<math>\beta</math>,11<math>\beta</math>H-12,6-olide</p>	<p>5<math>\alpha</math>,6<math>\beta</math>,11<math>\beta</math>H-12,6-olide (1)</p>  <p>Lumisantonin</p>	 <p>1<math>\alpha</math>,3<math>\beta</math>-diacetoxyeudesm-4-en-6<math>\beta</math>,11<math>\beta</math>H-12,6-olide</p>	 <p>(E)-1,10-secoeudesma-3,5(10)-dien-6<math>\beta</math>,11<math>\beta</math>H-12,6-olide-1-oïc acid</p>	[198]
	<i>M. canomilla</i> L.	 <p>1<math>\alpha</math>,10<math>\alpha</math>-epoxy-2<math>\alpha</math>-hydroxy-(5<math>\alpha</math>,6<math>\beta</math>,7<math>\alpha</math>,11<math>\beta</math>H)-guai-3-en-12,6<math>\alpha</math>-olide. (2<math>\alpha</math>-hydroxyarborescin)</p>	 <p>3<math>\beta</math>-acetoxy-1<math>\beta</math>,4<math>\alpha</math>-dihydroxy-(5<math>\alpha</math>,6<math>\beta</math>,7<math>\alpha</math>,11<math>\beta</math>H)-eudesman-12,6<math>\alpha</math>-olide. (Matricolone)</p>	 <p>1<math>\beta</math>,3<math>\beta</math>-dihydroxy-(6<math>\beta</math>,7<math>\alpha</math>,11<math>\beta</math>H)-germacra-4,10(14)-dièn-12,6<math>\alpha</math>-olide. (dihydridoridentin)</p>	 <p>Anthecotuloide</p>	[199] [200]
		<i>M. globifera</i>	 <p>Arborescin</p>	 <p>Globicin</p>	 <p>Desacetoxymatricarin</p>	<p style="text-align: center;"><i>M. suffruticosa</i> L.</p>  <p>Zuubergenin</p>

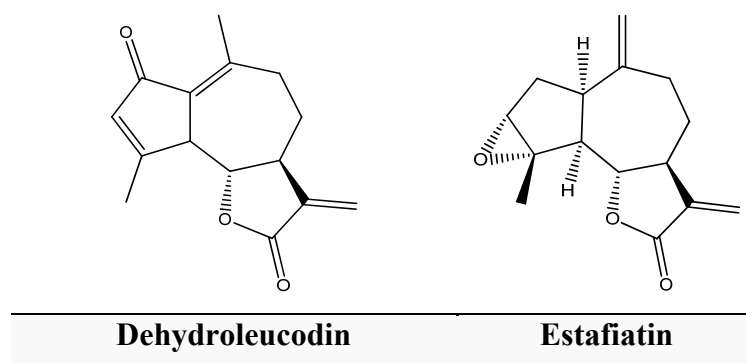
<b>Ursinia</b>	<i>U. anthemoides</i> N.E.Br & Ga					[190]		
		Ursinolide B,3-desacetoxy	Ursinolide A	Ursinolide B	Ursinolide C			
		<b>Tanacetum</b>	<i>T. parthenium</i> L. Shultz-Bip.					[201]
				Canine	Tanapathine- $\alpha$ -peroxyde	Seco-tanapartholide A	Parthenolide	
<i>T. balsamita</i> L.	<i>T. chiliophyllum</i>			<i>T. vulgare</i> L.	<i>T. vulgare</i> L.	[190]		
								
	Erivanin	Tamirin	Arbusculin, 1 $\beta$ -hydroxyl	Tanacetin				

## III-I-6-Les lactones sesquiterpènes identifiés dans le même genre :

A notre connaissance, les travaux publiés sont très rares, ce que nous avons pu trouver sur ce sujet concerne seulement les investigations phytochimiques de F. Bohlmann et C. Zdero [202,16] sur 10 espèces du genre *Cotula* qui ont dévoilé seulement *Cotula hispida* qui contient dans ses feuilles des SQL. En effet, ils ont caractérisé 03 lactones sesquiterpéniques: une appartient à la classe des guaianolides : dehydroleucodin et deux autres ont été des germacranolides  $\beta$ -isovaleryloxycostunolide et costunolide. Les structures correspondantes sont indiquées sur la figure III-I-5:

Figure III-I-5 : lactones sesquiterpènes de *Cotula hispida*.

Par ailleurs, deux SQL de type guaianolide de l'espèce *Cotula coronopifolia* ont été mentionnées, il s'agit de l'estafiatin et de le dehydroleucodin [16, 203], dont les structures sont représentées sur la figure III-I-6:

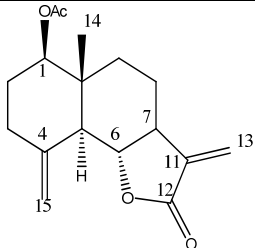
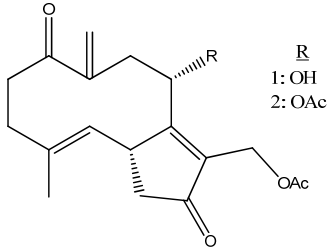
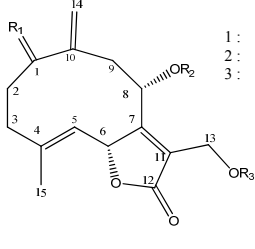
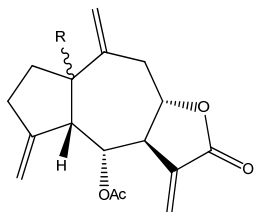
Figure III-I-6 : lactones sesquiterpènes de *Cotula Coronopifolia*.

III-I-7-Les lactones sesquiterpènes dans la même espèce :

Comme il est mentionné précédemment, dans le chapitre I, seulement deux investigations phytochimiques [37, 38] ont ciblé les SQL *Brocchia cinerea* (Vis.) d'origine Egyptienne.

Dans cette partie, quelques structures chimiques des produits identifiés de l'espèce sont représentées sur le tableau III-I-2 ci-dessous.

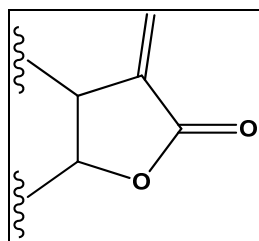
Tableau III-I-2 : quelques structures de SQL de *Brocchia cinerea*.

Structure	Nom
	Reynosin acetate
 <p style="margin-left: 20px;">R 1: OH 2: OAc</p>	<p>1: 13-acetoxy-8-hydroxy-7,11-dehydro-11,13-dihydroanhydroverlotrin.</p> <p>2: 8<math>\alpha</math>,13-diacetoxy-7,11-dehydro-11,13-dihydroanhydroverlotrin.</p>
 <p style="margin-left: 20px;">R<sub>1</sub>      R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> 1: <math>\alpha</math>-OH    Ac 2: <math>\beta</math>-OH    Ac 3: O         H</p>	<p>1 : 8<math>\alpha</math>,13-diacetoxy-1<math>\alpha</math>-hydroxygermacra-4,7(11),10(14)-trien-6<math>\alpha</math>,12-olide</p> <p>2 : 8<math>\alpha</math>,13-diacetoxy-1<math>\beta</math>-hydroxygermacra-4,7(11),10(14)-trien-6<math>\alpha</math>,12-olide</p> <p>3 : 8<math>\alpha</math>,13-dihydroxy-1-oxo-germacra-4,7(11),10(14)-trien-6<math>\alpha</math>,12-olide</p>
 <p style="margin-left: 20px;">R<sub>1</sub>      R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> 1: <math>\beta</math>-OH    Ac 2: <math>\beta</math>-OOH   Ac 3: A-OH    H</p>	<p>1 : 6<math>\alpha</math>-acetoxy-1<math>\beta</math>-hydroxyguaia-4(15),10(14),11(13)-trien-8<math>\alpha</math>,12-olide.</p> <p>2 : 6<math>\alpha</math>-acetoxy-1<math>\beta</math>-hydroxyperoxy-guaia-4(15),10(14),11(13)-trien-8<math>\alpha</math>,12-olide.</p> <p>3 : 6<math>\alpha</math>-acetoxy-1<math>\alpha</math>-hydroxyguaia-4(15),10(14),11(13)-trien-8<math>\alpha</math>,12-olide.</p>

**III-I-8-Intérêts thérapeutiques et biologiques des lactones sesquiterpènes:**

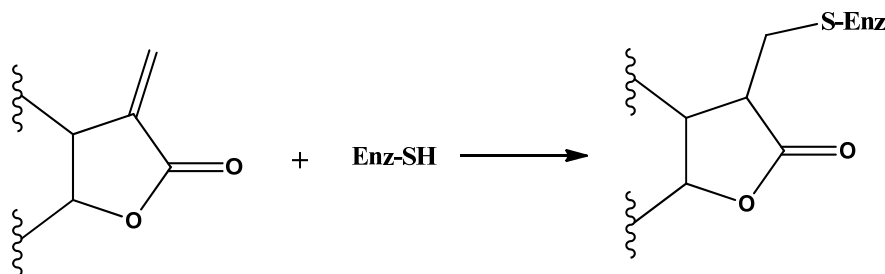
Les lactones sesquiterpéniques (SQL) sont décrites comme des composés actifs de plusieurs plantes médicinales utilisées dans la médecine traditionnelle et sont connues pour posséder une grande variété d'activités biologiques et pharmacologiques, en tant que des antimicrobiens, antifongiques, cytotoxiques, anti-tumorales, anti-inflammatoire,... et ainsi que des allergènes potentiels [204-207].

Les SQL possèdent des structures chimiques très particulières, compte tenu de l'enchaînement  $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -lactones (fig. III-I-7), cyclopenténones  $\alpha$ - $\beta$ -insaturés, esters conjugués et/ou la présence fréquente des époxydes dans leurs squelettes. Ces caractéristiques structurales distinguées leurs confèrent des possibilités de bioréactivité très intéressantes [204,208]. D'où un potentiel biologique et pharmacologique très utile. [209-211]



**Figure III-I-7: structure du groupement  $\alpha$ -méthylène  $\gamma$ -lactone.**

Ces groupes structuraux réagissent avec des nucléophiles biologiques, en particulier la L-cystéine ou bien des groupes thiol contenant des enzymes (Enz-SH) par une addition de type Michael (alkylation irréversible) comme le montre le schéma montré sur la figure III-I-8 ci-dessous:



**Figure III-I-8: réaction d'addition type Michael.**

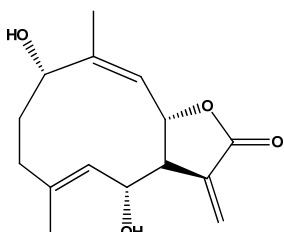
Par conséquent, les groupes thiol, tels que les résidus de la cystéine en protéines, semblent être les cibles principales des SQL, inhibant de ce fait un grand nombre de fonctions cellulaires qui dirigent les cellules dans l'apoptose.

Non seulement le nombre d'alkylation de ces éléments structuraux détermine et/ou évalue les différences d'activité au sein des SQL individuelles, mais aussi d'autres facteurs tels que le caractère lipophile, la stéréochimie et l'environnement chimique ou le sulfhydryle cible qui peuvent influencer l'activité de ces composés [207-211].

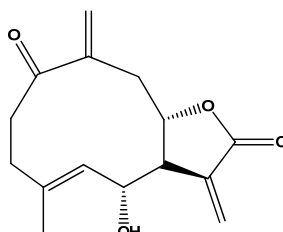
La nature reste toujours généreuse et les travaux phytochimiques ne cessent de découvrir de nouvelles structures des SQL isolées de plantes à travers le monde. En parallèle, d'autres recherches se sont plus focalisées sur l'étude des propriétés pharmacologiques et biologiques de ces composés, en essayant de trouver des alternatives médicamenteuses (anti-biotiques, antifongiques,...) pour faire face à la résistance de nombreux microorganismes pathogènes et/ou des remèdes à des maladies rebelles telles que le cancer, les maladies inflammatoires, etc.

Des études faites dans ce domaine ont donné de bons résultats et ont montré que les SQL renferment un potentiel thérapeutique prometteur pour l'application in vivo. Dans cette partie, nous citerons quelques exemples sur des SQL bioactives :

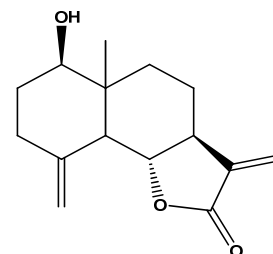
Argimiro Rivero et al [212] ont étudié l'effet cytotoxique de 4 SQL naturelles connues, à savoir : tatrudin A, tamirin, reynosin, ineupatrolide A et une 5<sup>ème</sup> synthétisée (fig. III-I-9): tatrudin A diacétate sur les cellules cancéreuses de la leucémie myéloïde HL-60 et U937, la tatrudin A diacétate et ineupatrolide A, ont été les plus cytotoxiques avec inhibition de la croissance provoquée par l'induction de l'apoptose.



Tatrudin A

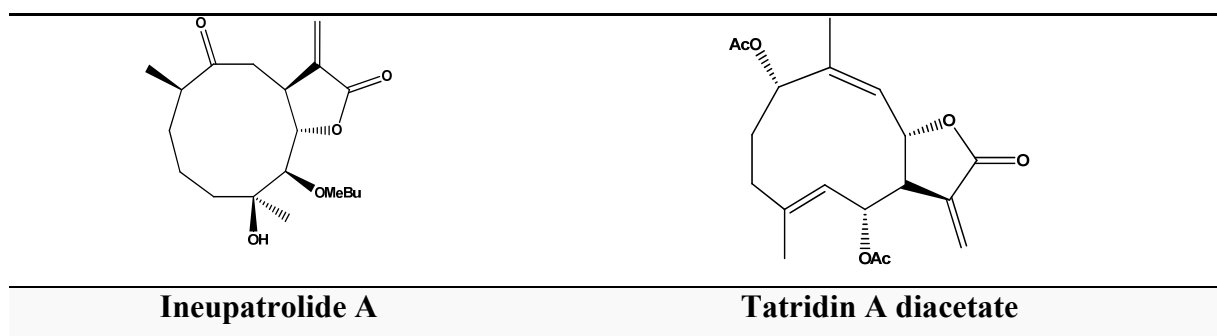


Tamirin



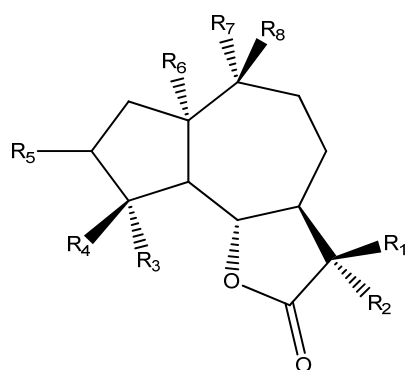
Reynosin





**Figure III-I-9 : les SQL étudiées dans la référence [212].**

Afin de découvrir des agents qui inhibent sélectivement les cellules souches du cancer (SCC) (cas de la leucémie myéloïde aiguë (LMA)), une équipe chinoise a travaillé sur une série de lactones sesquiterpéniques guaianolide (GSQL) et leurs dérivés (fig.III-I-10). Les résultats obtenus ont indiqué que les GSQL représentent une vaste source d'agents chimiques qui inhibe sélectivement la leucémie myéloïde aiguë (AML) des cellules souches et progénitrices et que les GSQL sont potentiellement très utiles pour explorer des approches anti-SCC [213].



$R_1, R_2 =$  double liaison ou

$R_1=H, R_2= -CH_2NMe_2$

$R_3, R_4 =$  double liaison

ou bien

$R_3 = OH, \text{ ou } OCH_3, R_4 = CH_3$

$R_6 = H, R_7, R_8 =$  double liaison ou

$R_6 = H, R_7 = OH \text{ ou } OCH_3$  ou

$R_6, R_8 =$  double liaison,  $R_7 = CH_3$

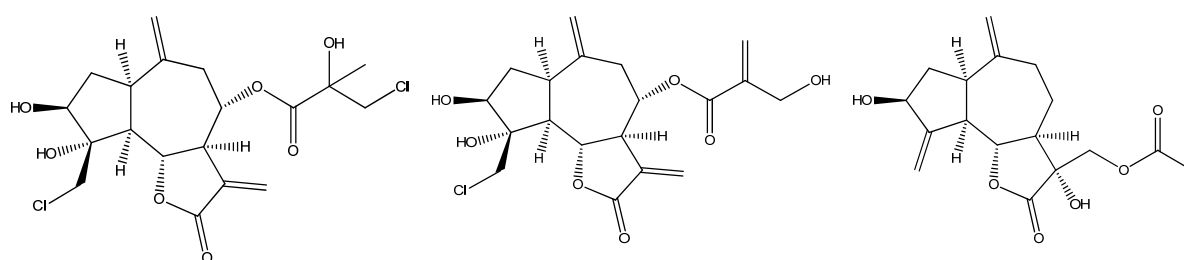
$R_5 = H, \text{ ou } R_3, R_5 =$  double liaison

**Figure III-I-10 : série des guaianolides et leurs dérivés, testés dans l'étude [213].**

L'investigation phytochimique et microbiologique [214] a démontré que les trois SQL isolées de la plante *Centaurea solstitialis* (L. ssp) : chlorohyssopifolin A, chlorojanerin et 13-acetyl solstitialin A (fig.III-I-11) ont été testées pour leurs activités antimicrobiennes, antifongique et antiviral. Les trois composés étaient bioactifs mais le 13-acetyl solstitialin A a

été le plus puissant en montrant une activité antibactérienne remarquable vis-à-vis *E. faecalis* à une concentration de 1 µg/ml, et une activité antivirale vis-à-vis DNA virus HSV-1, étant aussi puissant que le composé de référence acyclovir à des concentrations maximales et minimales de 16 - <0.00006 µg/ml.

Dans cette même étude, ces trois guaianolides ont été inactifs vis-à-vis RNA virus PIV.



Chlorohyssopifolin A

Chlorojanerin

13-acétyl solstitialin A

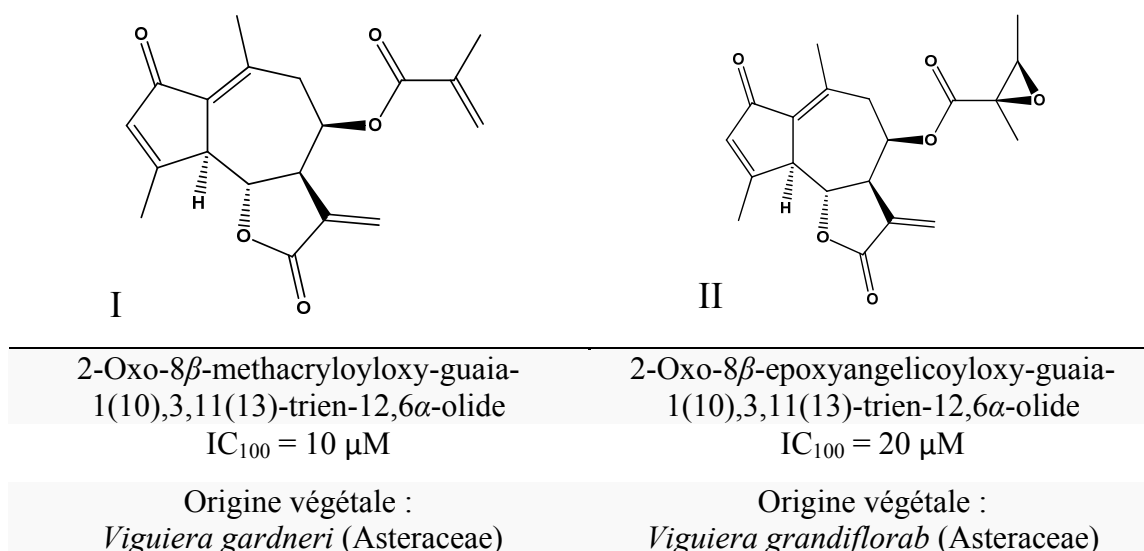
**Figure III-I-11 : les lactones sesquiterpéniques testées dans l'étude [214].**

Les auteurs du travail publié [69] ont fait leur étude sur 103 lactones sesquiterpéniques différentes représentant 6 groupes structuraux, à savoir : (44 germacranolides), (16, heliangolides), (22 guaianolides), (9 pseudoguaianolides), (2 hypocretenolides), (10 eudesmanolides), pour leurs propriétés inhibitrices du facteur de transcription NF- $\kappa$ B et les valeurs IC<sub>100</sub> résultantes.

A la lumière de ces résultats, certains des SQL étudiées ont été proposés pour servir à la conception de nouveaux médicaments anti-inflammatoires.

Les chercheurs ont recommandé ceci : lorsque l'on décide de faire la synthèse d'un inhibiteur du facteur de transcription NF- $\kappa$ B dérivé d'une structure d'un sesquiterpénoïde, il est plus facile de proposer la synthèse d'un guaianolide similaire à I ou II (voir structures sur figure III-I-12) que la synthèse d'un germacranolide ou d'un furanoheliangolide.

Le composé doit posséder deux groupes carbonyle :  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturé et un substituant acyle à proximité du groupe méthylène exocyclique.



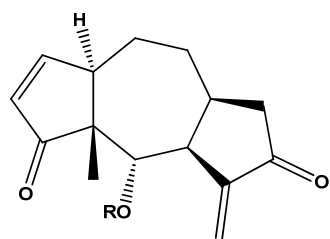
**Figure III-I-12: structures des composés I et II cités dans l'étude [215].**

Toutefois, il est très peu probable de séparer les effets thérapeutiques recherchés à partir des effets secondaires indésirables tels que la cytotoxicité. Ceci est également valable pour l'allergénicité.

Pour éviter ce problème, ce type de composé pourrait être soit appliqué seulement à l'extérieur ou bien il pourrait être conçu comme un pro-médicament qui serait libéré à l'endroit de l'inflammation pour le traitement de maladies inflammatoires chroniques.

Une étude a vérifié l'activité antiparasitaire et cytotoxique de 40 SQL de différentes classes (pseudo-gaianolides, xanthanolides, xanthanolides modifiés, eudesmanolides et germacranolides) isolées presque tous d'espèces d'*Asteraceae*. En effet, ces lactones ont été testées vis-à-vis *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmaniadonovani* et *Plasmodium falciparu* [216].

Les résultats obtenus ont révélé des activités appréciables, à titre d'exemple l'Helenalin (1) et ses esters (fig. III-I-13). Ils ont été très efficaces dans tous les tests, notamment ceux contre *Trypanosoma.brucei* (qui est à la cause de la maladie « East African sleeping sickness » à une IC<sub>50</sub> variant entre 0.05-0.1 μM.

R

1 : H

2 : Ac

3 : ibu

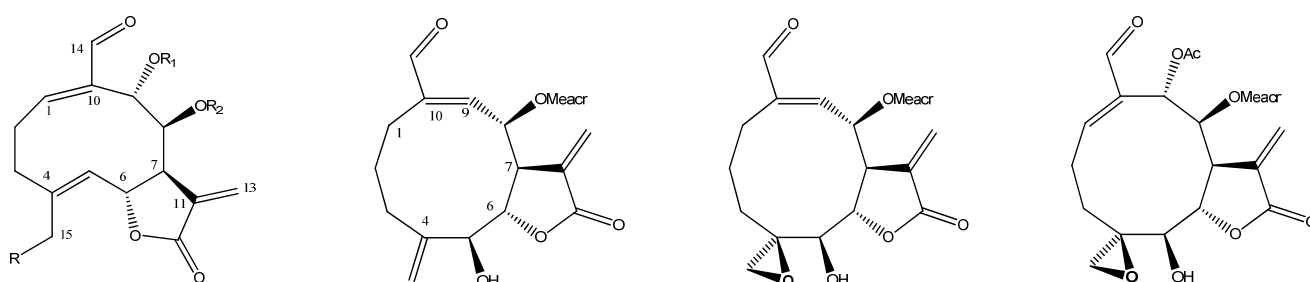
4 : i-val

	IC <sub>50</sub> , $\mu$ M (1)	IC <sub>50</sub> , $\mu$ M (2)	IC <sub>50</sub> , $\mu$ M (3)	IC <sub>50</sub> , $\mu$ M (4)
<i>T. brucei rhodes.</i> ( <i>Tbr</i> )	0.052	0.063	0.105	0.116
<i>T. cruzi</i> ( <i>Tcr</i> )	0.695	0.538	1.568	2.478
<i>L. donovani</i> ( <i>Ldon</i> )	n.t.	0.446	0.837	0.871
<i>P. falciparum</i> ( <i>Pfc</i> )	n.t.	0.329	0.700	0.822
Cytotoxicity( <i>L6</i> )	0.992	0.809	1.030	1.298

Figure III-I-13 : les guaianolides les plus actifs cités dans l'étude [216].

La reinvestigation phytochimique des parties aériennes de *Milleria quinqueflora* originaire de Costa Rica a produit 13 germacranolides dont 3 étaient nouveaux [217] (voir les structures sur figure III-I-14):

Les 13 composés sont étudiés pour leur capacité anti-inflammatoire. En outre, avec l'effet de substitution et la corrélation de l'inhibition du facteur NF- $\kappa$ B avec le caractère lipophile de ces composés (Log P coefficient de partage), les auteurs ont conclu que tous les SQL isolées possèdent une activité anti-inflammatoire très élevée à des concentrations très faibles (5-10 $\mu$ M), mais il est peu probable que la lipophilie des substances testées ait une influence significative sur l'activité inhibitrice du NF- $\kappa$ B.



<u>R</u>	<u>R</u> <sub>1</sub>	<u>R</u> <sub>2</sub>	Meacr : methacryloyl	$\Delta^{9,10}$	Meacr : methacryloyl
1 H	Meacr	H		1 E	
2 OAc	Meacr	H		2 Z	
3 OAc	H	Meacr			

Figure III-I-14 : structures des SQL étudiées et présentant IC<sub>50</sub> = 5 $\mu$ M dans l'étude [217].

L'étude phytochimique [218] réalisée sur six espèces *Centaurea* (Asteraceae) originaires d'Espagne et du Maroc, une Résine Costus commerciale obtenue des racines de *Saussura lappa Clarke*. (Asteraceae) et les parties aériennes de *Lychnophora trichocarpa Sprng.* (Asteraceae) a abouti à l'isolement des dix SQL, reproduit sur la figure III-I-15, dont (3) et (4) ont montré une activité antifongique notable ( $EC_{50} = 6\mu\text{g/ml}$ ), alors que (1), (2), (5), (6), les plus fonctionnalisés, étaient assez efficaces. A.F. Barrero et al ont concluent que plus la lactone sesquiterpénique est moins polaire plus son activité antifongique est appréciable. La lipophilité de la molécule facilite sa pénétration dans les parois cellulaires des microorganismes fongiques.

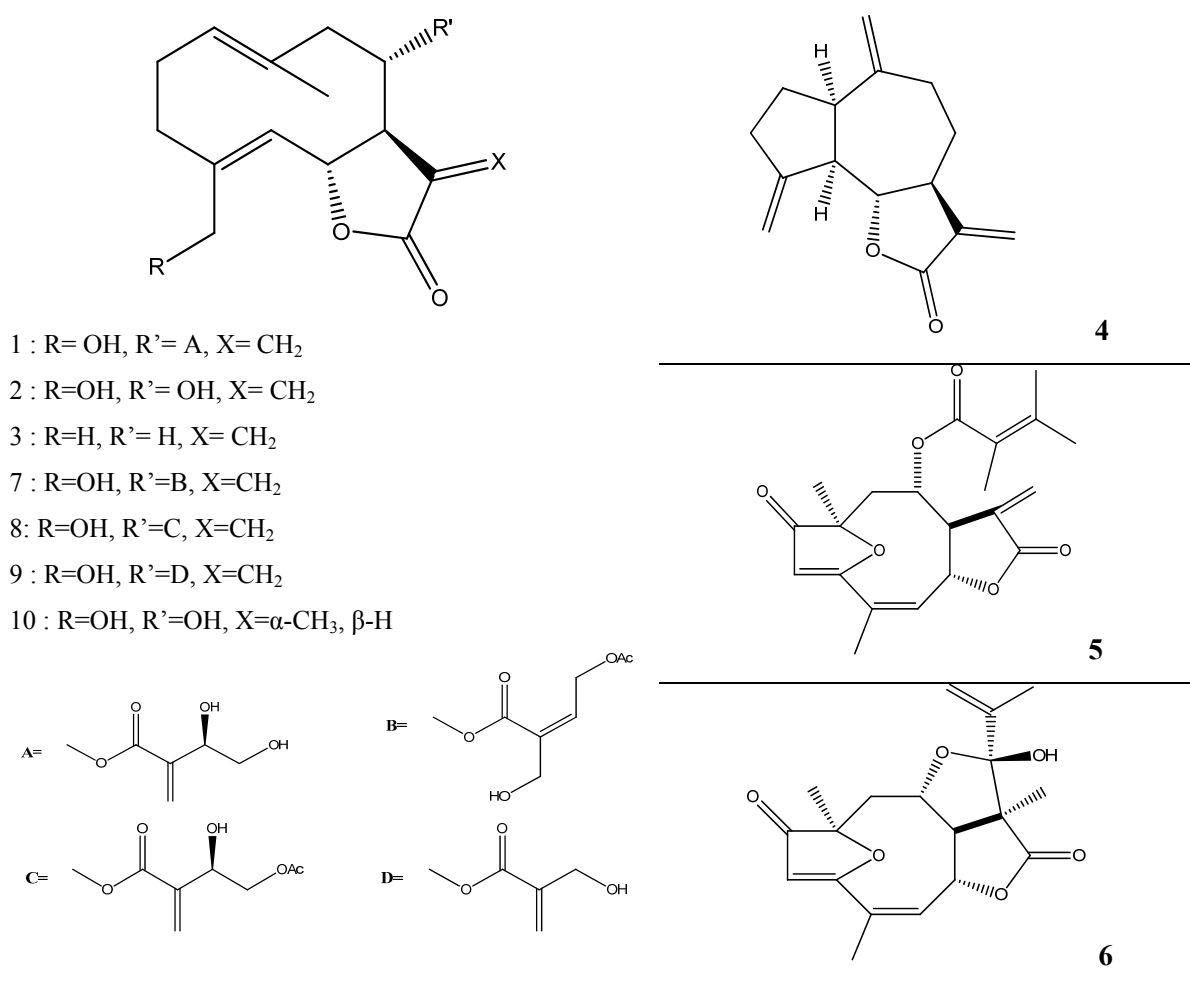
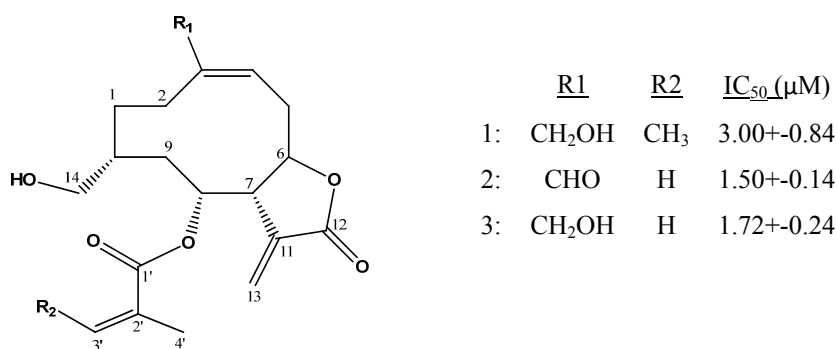


Figure III-I-15 : structures lactoniques citées dans l'étude [218].

Une autre Asteraceae (*Wallastonia biflora*) a été le sujet de l'étude phytochimique chinoise [219]. L'extrait chloroformique de cette plante a offert, en plus d'autres composés, 3 nouvelles lactones sesquiterpéniques 1, 2, 3 représentées sur la figure III-I-16.

La cytotoxicité de ces molécules vis-à-vis des cellules humaines hepatoma BEL-7402 a été évaluée par le test Sulforhodamine B (SRB), décrit dans la publication, les trois composés ont présenté une activité inhibitrice significative contre la croissance du carcinome hépatocellulaire in vitro.



**Figure III-I-16 : structures chimiques des composés testés dans l'étude [219].**

Le fractionnement bioguidé de l'extrait (dichlorométhane/méthanol 1:1) de l'Asteraceae *Ambrosia tenuifolia* (Sprengel.) a permis à Valeria P. Sülsen et al [220] l'isolement de deux lactones sesquiterpéniques: «Psilostachyin» et «Peruvin» dont les structure sont représentées sur la figure III-I-17.

Les deux composés testés in vitro contre les épimastigotes de *Trypanosoma cruzi* ont révélé une activité trypanocide remarquable avec des valeurs de (CI<sub>50</sub>) de moins de 2 μg / ml. « Psilostachyin » a exercé une activité in vitro significative contre les formes trypomastigotes de *Trypanosoma cruzi* (IC<sub>50</sub> : 0,76 μg / ml) et a été choisie pour les tests in vivo.

Les souris traitées par «Psilostachyin» avaient une survie de 100% et les valeurs de parasitémie étaient plus faibles que chez les souris témoins. Les deux composés ont également été testés vis-à-vis des promastigotes de *Leishmania* (sp.): « psilostachyin » et « peruvin » avaient des activités leishmanicides importantes, leurs (IC<sub>50</sub>) étaient respectivement : 0,12 μg / ml et 0,39 μg / ml.

Les résultats de ce travail de recherche suggèrent que les deux SQL pourraient être considérées comme des candidats potentiels pour le développement de nouveaux agents anti-protozoaires contre la maladie de Chagas et la leishmaniose.

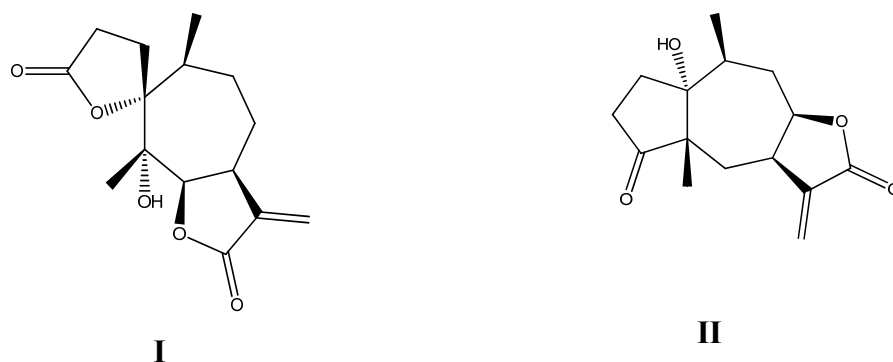


Figure III-I-17 : structures chimiques de Psilostachyin (I) et Peruvine (II) [220].

Vu les résultats qu'ils ont obtenus, H. Li et al ont suggéré que les trois sesquiterpènes lactones qu'ils ont étudiés (fig.III-I-18) peuvent agir en synergie avec d'autres composés antiviraux pour le traitement de l'infection par le virus hépatite B (VHB) [221].

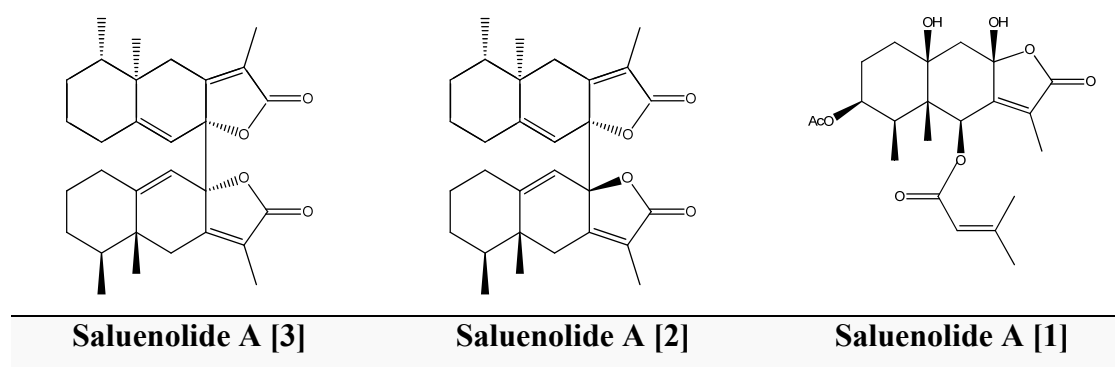


Figure III-I-18: les lactones sesquiterpènes étudiées dans la référence [221].

Par rapport à ce qui est cité sur la bioactivité des SQL, ces substances sont aussi accusées d'être des allergènes responsables de dermatites de contact. De nombreux travaux cliniques dans le domaine de dermatologie, se focalisent sur leurs études. Parmi les recherches effectuées, celle réalisée sur 7 420 malades pendant quatre ans [222], dont les auteurs ont souligné que le mélange, constitué de trois SQL testées, a présenté des effets variables sur les patients selon leur âge, sexe, organe malade. Une autre étude [223] a confirmé les actions allergisantes des SQL sur des sujets plus jeunes.

**III-I-9-Rôle des lactones sesquiterpènes dans la plante:**

L'interférence qui s'établit entre plantes voisines est attribuée principalement à des effets de compétition pour les ressources environnementales : eau, lumière et substances nutritives. Ainsi de nombreuses espèces végétales synthétisent des molécules capables d'inhiber la germination et la croissance des plantes poussant dans leur voisinage. Aussi, faute de mobilité, les plantes ont du s'adapter aux attaques prédatrices d'autres organismes tels que les insectes, les champignons et les bactéries, cela par des mécanismes chimiques de défense pouvant avoir plusieurs fonctions. Ils peuvent être insecticides, anti-microbiens ou bien herbicides [224-226].

Les lactones sesquiterpènes comme tous les autres métabolites secondaires ne sont pas produits par les plantes pour les bienfaits des humains, mais plutôt pour leur fonction dans la plante.

Ces composés sont essentiels à la croissance saine de la plante et représentent une grande partie de leur défense à des dommages plus ou moins graves [227,229].

Elles sont principalement rencontrées dans les feuilles et les sommités fleuries de plantes, parfois disponibles, Comme mentionné au début du chapitre, dans une gamme de types de cellules, aussi elles peuvent être détenues dans les organes de stockage tels que les trichomes [229, 231].

De tels composés agissent comme des phytoalexines, molécules protectrices contre l'attaque microbienne, anti-appétants, à cause de leur goût amer, pour dissuader les herbivores et inversement comme appâts des prédateurs de ravageurs. Les SQL sont des substances allélochimiques: libérées dans la rhizosphère, elles agissent dans la communication plante-plante, par exemple, les graines dormantes de l'orobanche (plante parasite) qui déclenchent la germination lorsqu'elles détectent des SQL délivrées par des hôtes compatibles, le tournesol afin d'augmenter ses chances de succès et de reproduction. Il réduit la concurrence dans son environnement local. En effet, plusieurs de ses SQL empêchent la croissance des concurrents en bloquant la germination de plantes des autres familles telles que *Hordeum vulgare* et *Triticum aestivum*. [229,232, 233].



## Partie II: méthodes et matériels

### III-II-1-Extraction des lactones sesquiterpéniques de *Brocchia cinerea* (Vis.):

La poudre végétale issue de la plante entière, préparée de la même manière décrite dans le chapitre II, a été soumise à une extraction à froid avec le chloroforme ( $\text{CHCl}_3$ ) en suivant plusieurs étapes. En effet, 1Kg de cette poudre a subi dans un premier lieu une macération, à froid, au chloroforme 4l pendant 24h, cette opération a été répétée trois fois.

Les évaporations à sec, des différents extraits, ont été déroulées sous des conditions de température très douces; par la suite, l'extrait brut ainsi obtenu a été solubilisé dans de l'éthanol, les particules non solubles ont été séparées par filtration.

Afin de précipiter la chlorophylle, les cires et la matière grasse, une solution aqueuse à 4% d'acétate de plomb a été ajoutée à l'extrait éthanolique. Laissé au repos pendant une nuit à 4°C, une masse molle importante s'est formée.

Après la filtration et par la suite l'évaporation de l'éthanol de la solution précédente, la phase aqueuse ainsi obtenue a subi une dernière extraction liquide-liquide avec le chloroforme pour obtenir une solution d'une couleur marron claire.

L'évaporation du solvant, toujours à une température inférieure à 40°C, a permis d'avoir une masse de 7.5 g/Kg d'extrait marron sombre très visqueux.

La figure III-II résume les étapes suivies pour obtenir l'extrait brut des lactones sesquiterpéniques de *Brocchia cinerea* (Vis.)

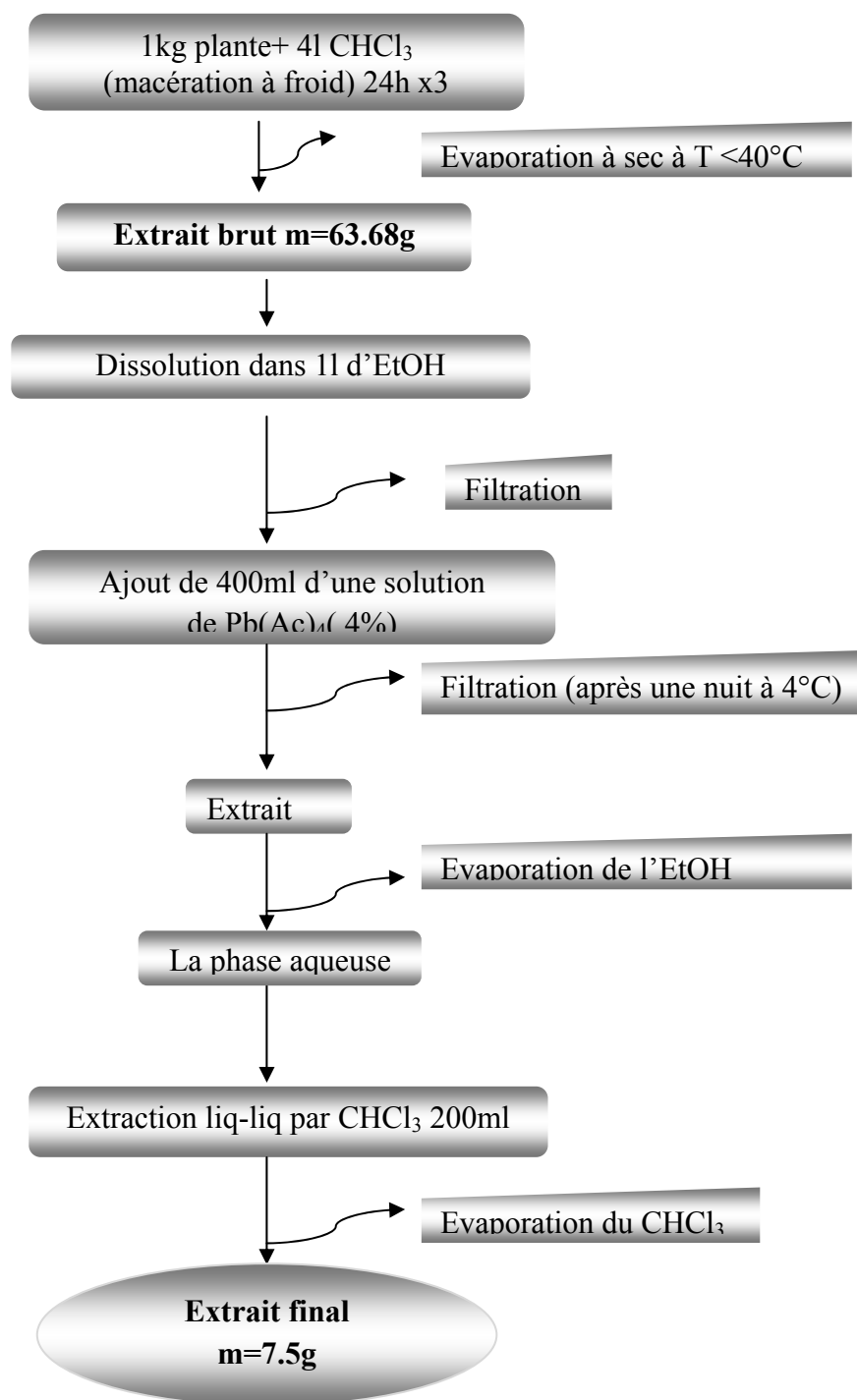


Figure III-II-1 : protocole suivi pour l'extraction des lactones sesquiterpéniques.

**III-II-2-Séparation et purification des lactones sesquiterpéniques:****III-II-2-1-Fractionnement de l'extrait chloroformique:**

14g de l'extrait chloroformique ont été adsorbés sur une quantité de phase stationnaire correspondant presque à 2 fois sa masse puis introduit à la tête d'une colonne ouverte ( $\phi=5\text{cm}$ ,  $L=75\text{cm}$ ) contenant le gel de silice (60-200  $\mu\text{m}$ ) en tant que phase stationnaire avec comme gradient d'élution : heptane/AcOEt à différentes proportions. Au début, des fractions de 100-150ml ont été recueillies jusqu'à 60% en heptane, par la suite, des fractions de volume plus important de 400-600ml ont été collectées, pour obtenir à la fin 358 fractions.

**Tableau III-II-1 : résultats de fractionnement de l'extrait chloroformique.**

Gradient d'élution Hept/AcOEt	Fractions recueillies	Regroupement	Observation
100/0	1-156	A0-A27	Mélange non traité
90/10	158-185	A28	Mélange non traité
85/15	186-218	A29-A30	Mélange non traité
80/20	219-262	A32-A38	Mélange non traité
75/25	263-277	A39-A40	Mélange non traité
<b>70/30</b>	<b>278-308</b>	<b>A41-A45</b>	<b>Mélange traité</b>
60/40	309-318	A46-A48	Mélange non traité
<b>50/50</b>	<b>319-320</b>	<b>A49-A50</b>	<b>Mélange traité</b>
<b>40/60</b>	<b>321-324</b>	<b>A51-A54</b>	<b>Mélange traité</b>
<b>30/70</b>	<b>325-329</b>	<b>A55-A59</b>	<b>Mélange traité</b>
20/80	330-339	A60-A69	Mélange non traité
10/90	340-349	A70-A79	Mélange non traité
0/100	350-353	A80-A83	Mélange non traité
AcOEt/MeOH	354-358	A84-A87	Mélange non traité

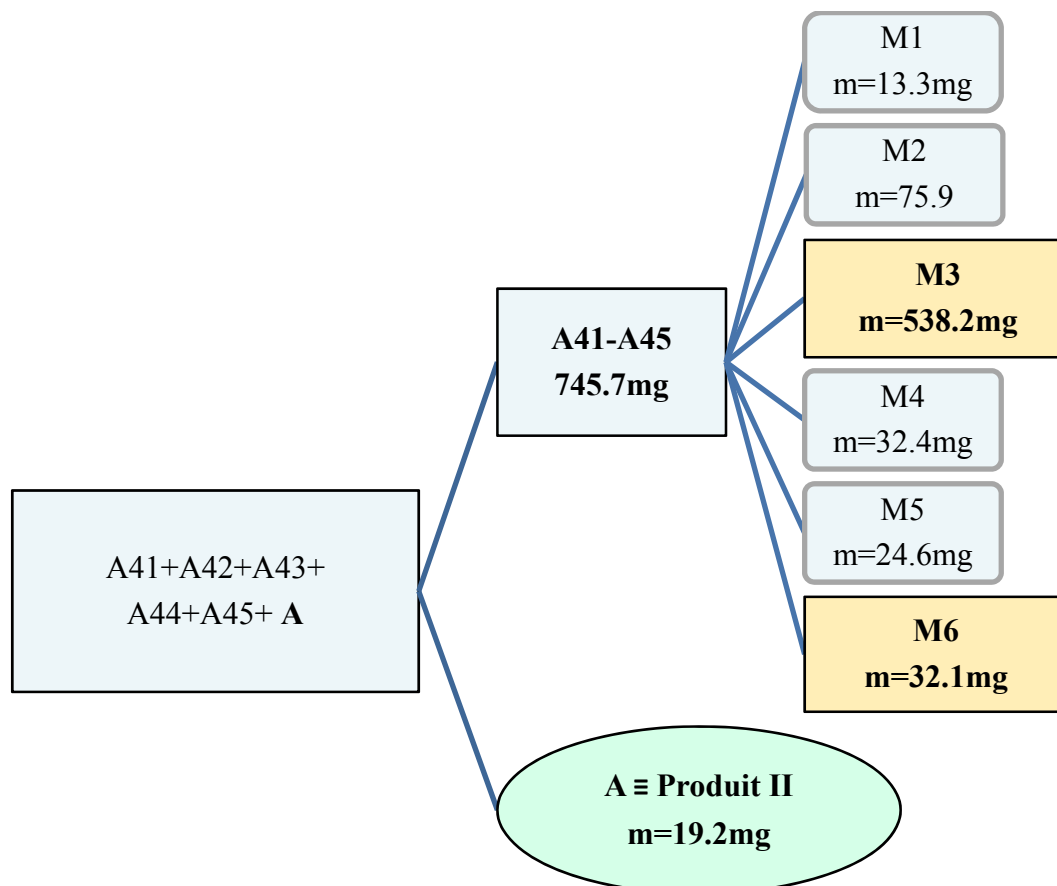
### III-II-2-2-Purification de quelques fractions:

Le diagnostic des 358 fractions obtenues, par CCM avec plusieurs systèmes d'éluion, nous a permis de faire un premier regroupement.

En se basant sur la simplicité de la composition chimique de ces groupements et/ou l'importance de leurs masses, seulement celles qui sont marquées sur le tableau III-II-1 sont concernées par la présente étude.

#### III-II-2-2-1-Purification des fractions obtenues par Hept/AcOEt (70/30):

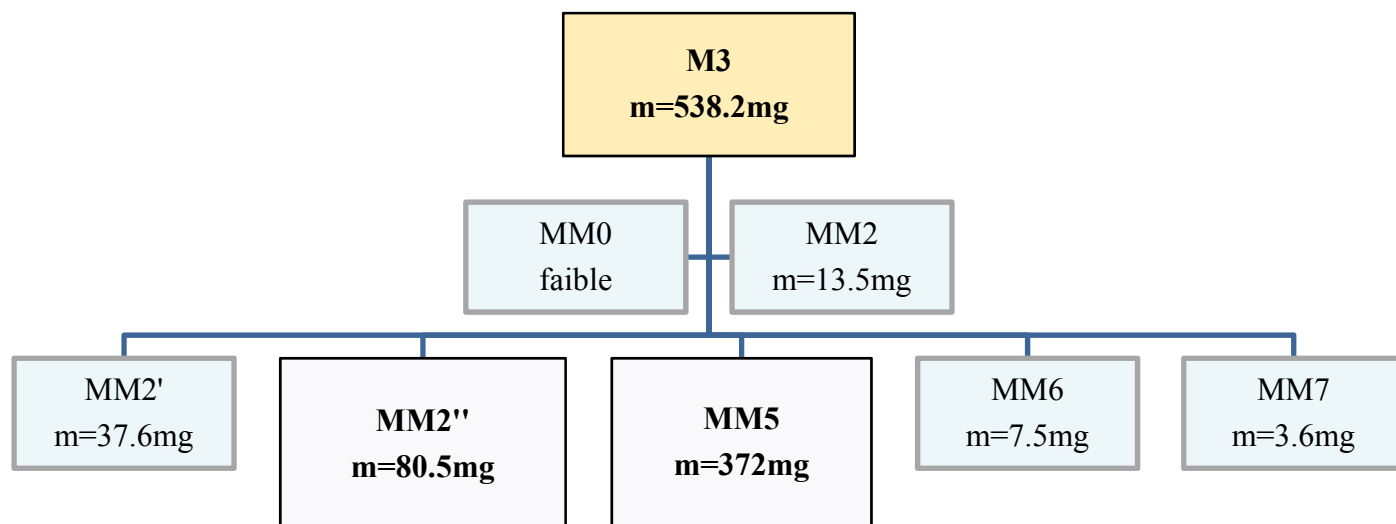
Le fractionnement de l'extrait brut par le système d'éluion (heptane/AcOEt : 70/ 30) a fournit 31 fractions. En se basant sur leur profil CCM, elles ont été rassemblées en ces sous-fractions : A41, A42, A43, A44, A45 en plus à une masse cristallisée « A ». L'analyse de ces sous-fractions par CCM doublement éluée, en utilisant le système de solvant : Etp/AcOEt (5/5) nous a guidés à leur regroupement et à leur refractionnement à nouveau sur une colonne de silice avec le système Etp/AcOEt pour obtenir 6 sous-fractions M1-M6, à l'exception de la fraction A qui a été un produit pur cristallisé. L'organigramme III-II-1 résume ces étapes:



L'organigramme III-II-1 : purification de la fraction Hept/AcOEt: 70/30.

### III-II-2-2-Purification de la sous-fraction M3

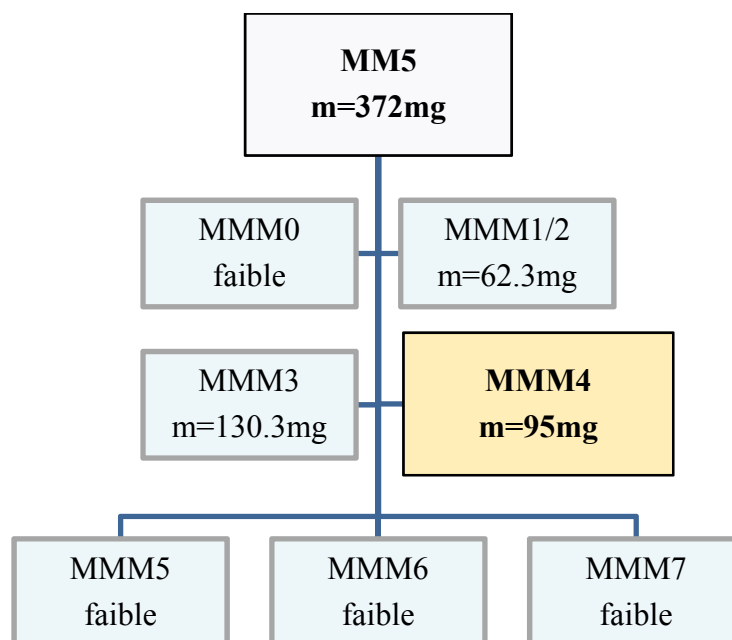
M3 (538.2mg) a été fractionnée sur une colonne de silice par le système de solvant composé de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH; selon l'organigramme III-II-2. Des sous-fractions ont été négligées à cause de leur complexité et/ou leurs faibles poids.



L'organigramme III-II-2 : purification de la sous-fraction M3.

### III-II-2-2-3-Purification de la sous-fraction MM5 :

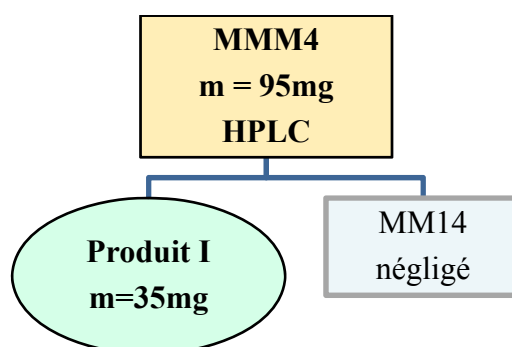
La sous-fraction MM5 dont la masse égale à 372 mg a été purifiée sur une colonne de silice en utilisant le même gradient d'élution constitué de DCM/MeOH. Parmi les sous-fractions collectées, comme le montre le diagramme III-II-3, celle qui a semblé la plus pure a été MMM4, mais son spectre RMN (<sup>1</sup>H) a montré qu'elle doit être soumise à une méthode de purification plus performante.



L'organigramme III-II-3 : purification de la sous-fraction MM5.

#### III-II-2-2-4-Purification de la sous-fraction MMM4 par HPLC :

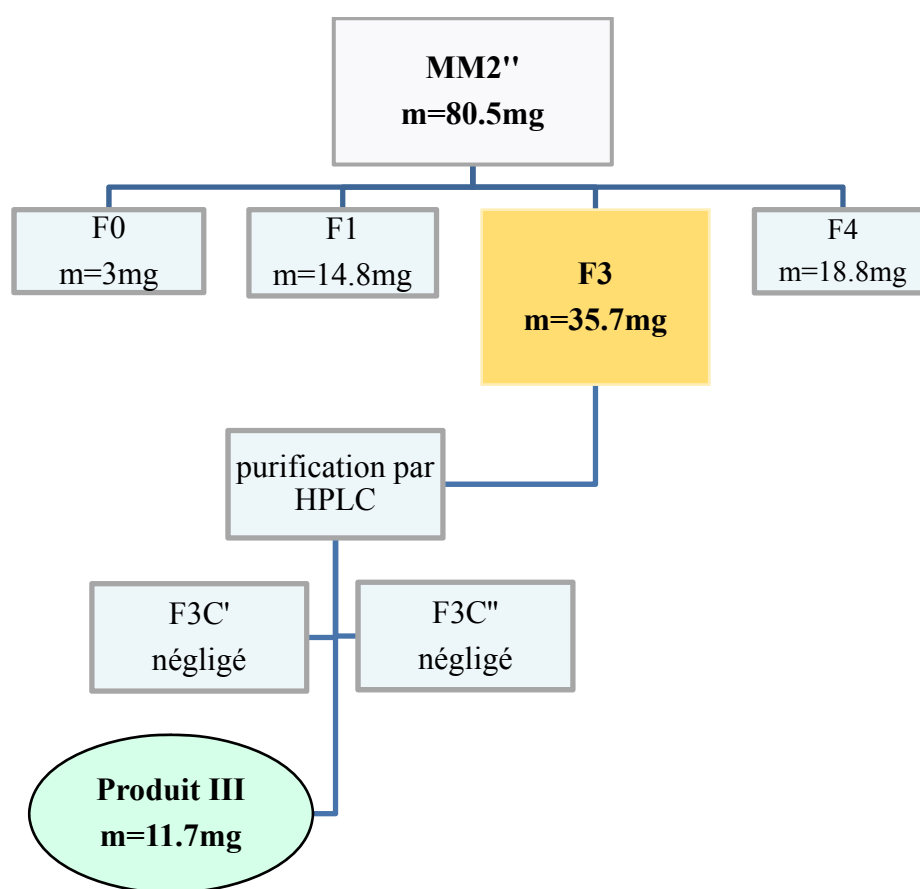
La sous- fraction concernée qui pesait 95mg a été soumise à une séparation par HPLC sous les conditions suivantes : colonnes: Chiralpak IA, Chiralpak IC, Chiralpak ID, éluent: heptane / EtOH (50/50), détecteurs: DAD et polarimètre, par le système d'élution composé de (Heptane/EtOH: 50/50) à un débit 1ml/min. Le produit I est ainsi obtenu (organigramme III-II-4).



L'organigramme III-II-4 : purification par HPLC de la sous-fraction MMM4.

**III-II-2-2-5-Purification de la sous-fraction MM2'' :**

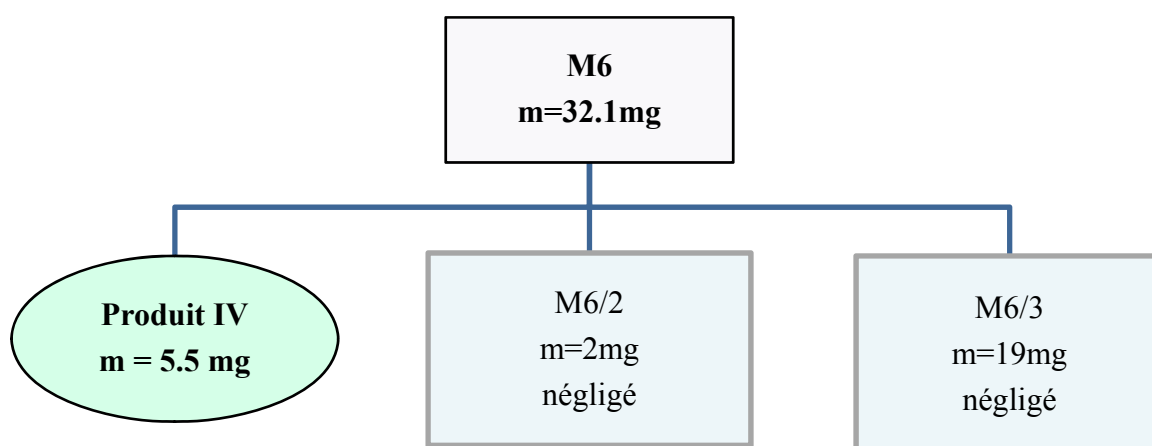
La sous-fraction MM2'' (80.5mg) purifiée sur colonne de silice avec comme phase mobile DCM/MeOH de 0% jusqu'à 2%, a mené à une nouvelle sous fraction F3, mais une purification plus ultime s'est avérée nécessaire. En effet, elle a été soumise à une purification supplémentaire par HPLC sous les conditions chromatographiques suivantes : colonnes: Chiralpak IA, Chiralpak IC, Chiralpak ID, éluent: heptane / EtOH (50/50), détecteurs: DAD et polarimètre, par le système d'éluion composé de (Heptane/EtOH: 50/50) à un débit 1ml/min, qui a donné le produit III. L'organigramme III-II-5 récapitule les étapes suivies.



**L'organigramme III-II-5 : purification de la sous-fraction MM2''.**

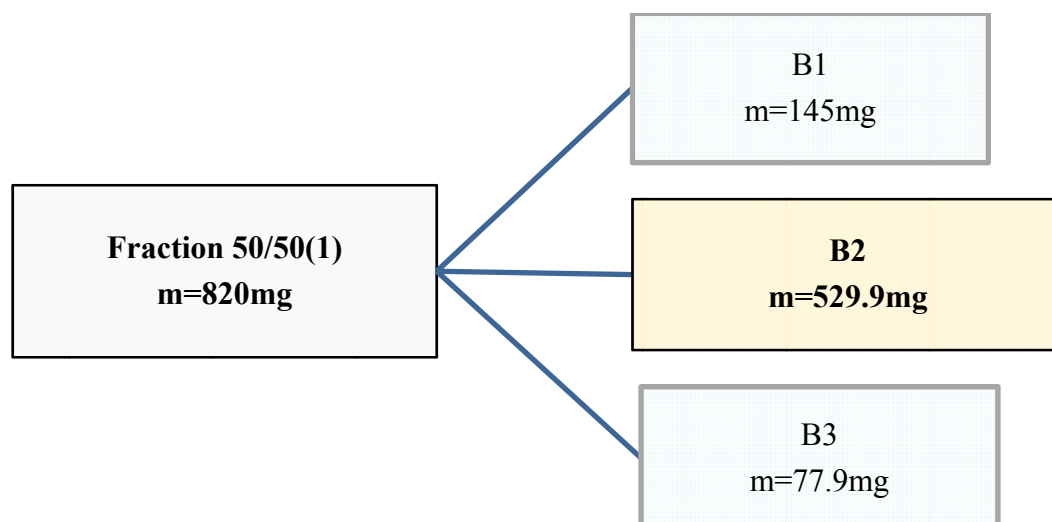
**III-II-2-2-6-Purification de la sous-fraction M6 :**

Revenons au début, la sous-fraction M6 a été obtenue après la séparation des fractions regroupées du système 70/30 heptane-AcOEt de la 1<sup>ère</sup> séparation. Elle a été soumise à une autre purification sur colonne de gel de silice en utilisant toujours le mélange DCM/MeOH à polarité croissante. Le produit IV a été obtenu avec une masse de 5.5mg. Ces étapes de purification sont schématisées sur l'organigramme III-II-6.

**L'organigramme III-II-6 : purification de la sous-fraction M6.****III-II-2-2-7-Purification de la fraction Hept/AcOEt : 50/50 (1) :**

Le premier système de solvant Hept/AcOEt à 50/50 a permis d'obtenir deux fractions, après regroupement des sous-fractions. La première 50/50 (1) a pesé 820 mg, cette masse a subi une nouvelle séparation sur colonne de gel de silice avec le système Etp/AcOEt de 0% à 50% en AcOEt. Après le diagnostic par CCM, les fractions obtenues sont réunies en 14 sous-fractions. Testées par CCM pour la 2<sup>ème</sup> fois par un autre système de solvant DCM/MeOH (9/1), les fractions précédentes ont été regroupées selon leur profil chromatographique comme l'indique l'organigramme III-II-7. Le groupement (B2) a été purifié par la suite.

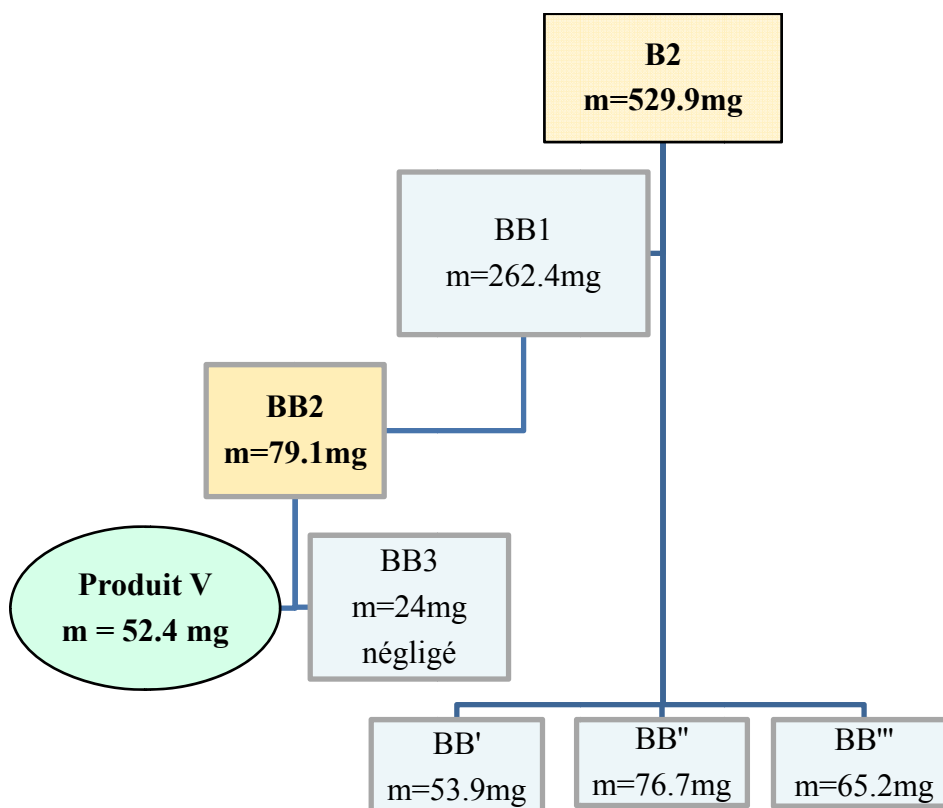




L'organigramme III-II-7 : purification de la sous-fraction 50/50(1).

#### III-II-2-2-8-Purification de la sous-fraction (B2) :

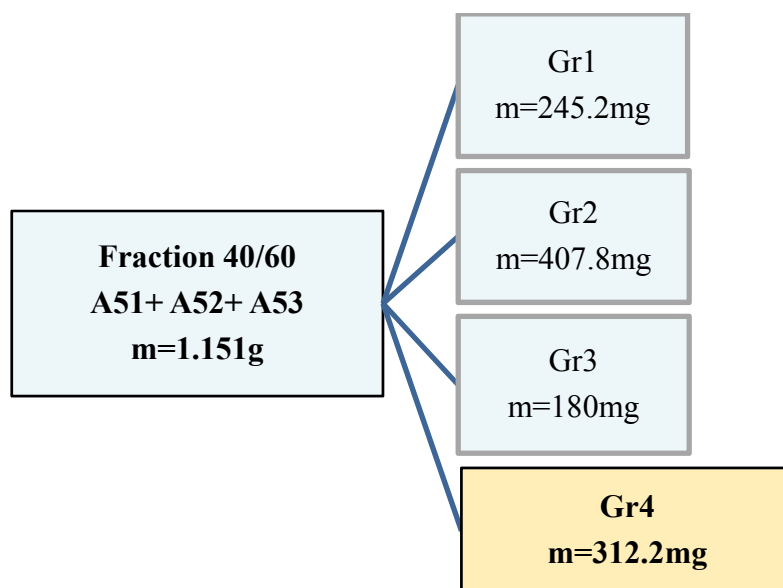
La masse des deux fractions réunies B2 (529.9 mg) a été soumise à un nouveau fractionnement sur colonne de silice par l'éluant DCM/MeOH de polarité croissante. Les sous-fractions sont indiquées sur l'organigramme III-II-8. BB1 a été purifiée sous les mêmes conditions chromatographiques pour donner le produit V.



L'organigramme III-II-8 : purification de la sous-fraction (B2).

#### III-II-2-2-9-Purification de la fraction Hept/AcOEt : 40/60 :

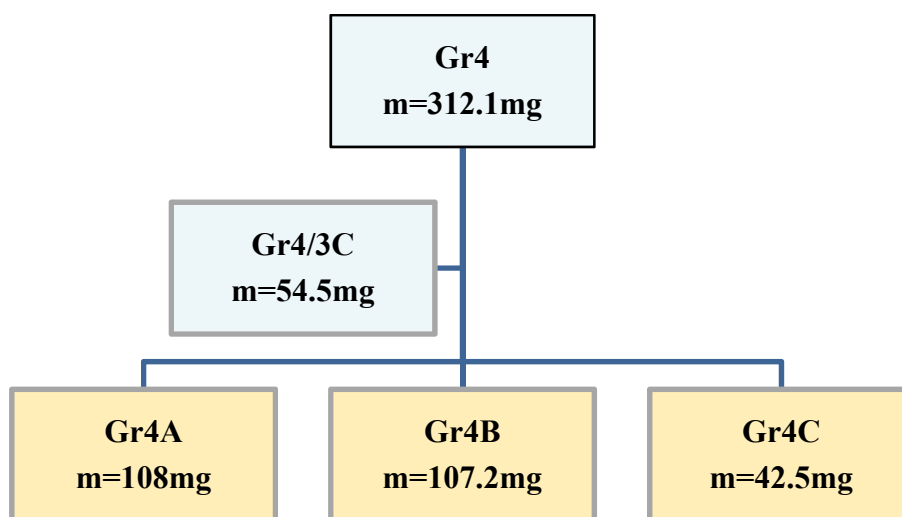
Vu la complexité de la composition des fractions obtenues du système d'éluion Hept/AcOEt : 40/60, et la difficulté d'obtenir des masses importantes, en cas de refractionnement et de purification de chacune séparément, nous avons choisi de rassembler celles qui +/- se ressemblent. En effet, trois parmi elles: A51, A52, A53 ont été rassemblées pour avoir une masse de 1151 mg qui a été refractionnée sur une colonne de gel de silice en utilisant le gradient d'éluion composé de DCM/MeOH. Les résultats de cette opération sont schématisés sur l'organigramme III-II-9.



L'organigramme III-II-9 : purification des fractions: (A51+ A52+ A53).

#### III-II-2-2-10-Purification de la sous-fraction Gr4 :

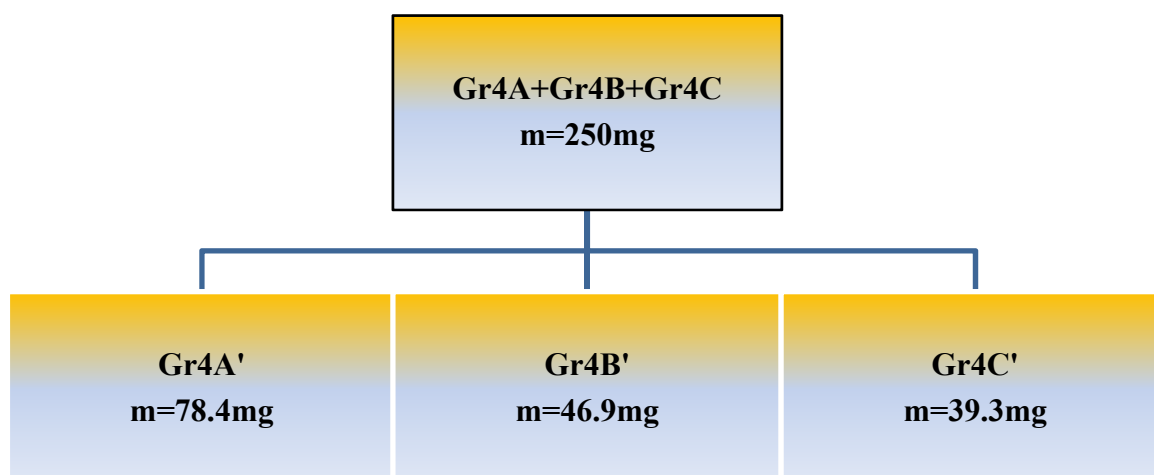
La simplicité relative de sa composition et sa masse assez importante, nous ont orientés à la purification de cette fraction (Gr4). Sa masse (312.2 mg) a été déposée sur la tête d'une colonne de silice et ses constituants ont été élués par le gradient DCM/MeOH en polarité croissante de 0%-3.5%, les fractions isolées sont reportées sur l'organigramme III-II-10. La CCM a montré la pureté relative des sous-fractions A, B, C mais leurs spectres RMN ( $^1\text{H}$ ) ont montré qu'elles nécessitaient des purifications supplémentaires.



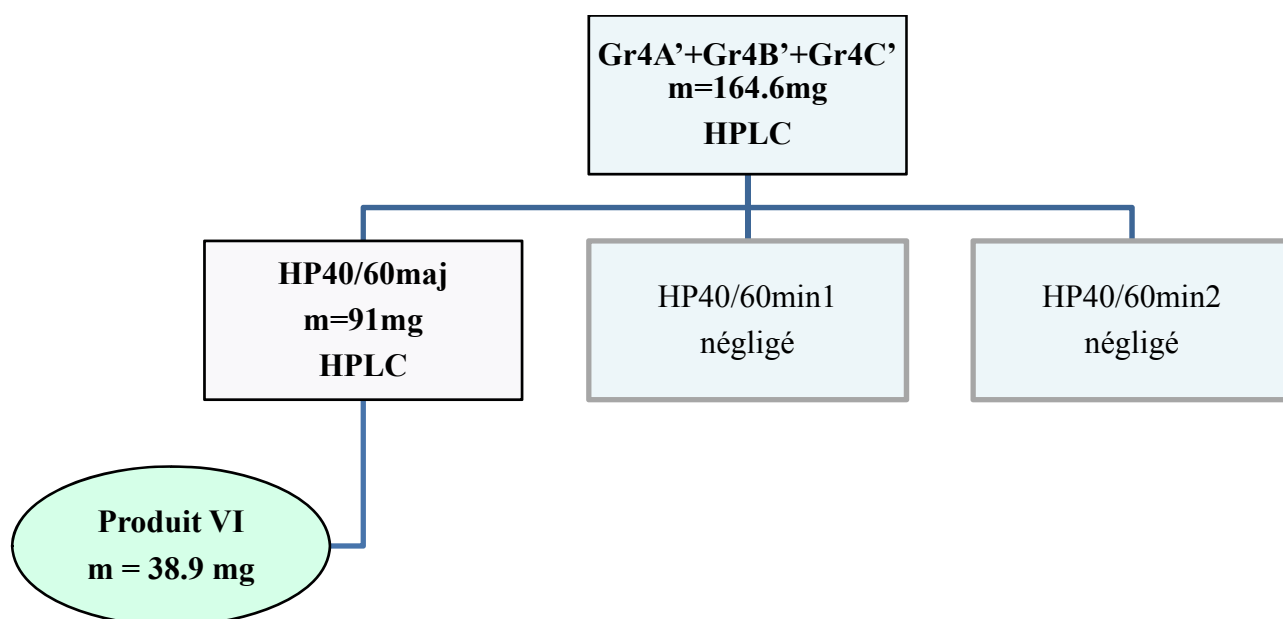
L'organigramme III-II-10 : purification de la fraction Gr4.

**III-II-2-2-11-purification des sous-fractions (Gr4A+Gr4B+Gr4C) :**

Les trois sous-fractions (Gr4A+Gr4B+Gr4C) réunies ont été soumises à une autre purification sur une colonne ouverte de silice, avec le même éluant utilisé précédemment (DCM/MeOH), les tests CCM de gel de silice avec double élution par la phase mobile DCM/MeOH dans les proportions (95/5), ont permis de regrouper les fractions collectées en trois nouvelles sous-fractions **Gr4A'**, **Gr4B'**, **Gr4C'** qui, à leur tour, n'étaient pas pures. Voir le diagramme III-II-11.

**L'organigramme III-II-11: purification des sous-fractions (Gr4A+Gr4B+Gr4C).****III-II-2-2-12-purification des trois sous-fractions réunies (Gr4A'+Gr4B'+Gr4C') :**

La séparation des fractions réunies (**Gr4A'+Gr4B'+Gr4C'**) a été très difficile par l'emploi des techniques chromatographiques ordinaires. C'est pour cela que nous les avons purifié par HPLC en utilisant les conditions suivantes: colonne: chiralpak ID, éluant: heptane / EtOH: 50/50, débit: 1ml/min, détecteurs: DAD+ CD à 254nm. Cette méthode a fourni un produit majoritaire (91 mg) avec deux autres fractions complexes. La vérification par RMN ( $^1\text{H}$ ) de la pureté du produit majoritaire a révélé qu'il n'était pas pur. Une purification encore une fois de ce produit (mélange) par HPLC sous les mêmes conditions chromatographiques a mené au produit VI, le diagramme III-II-12 mentionne le résumé de ces étapes.

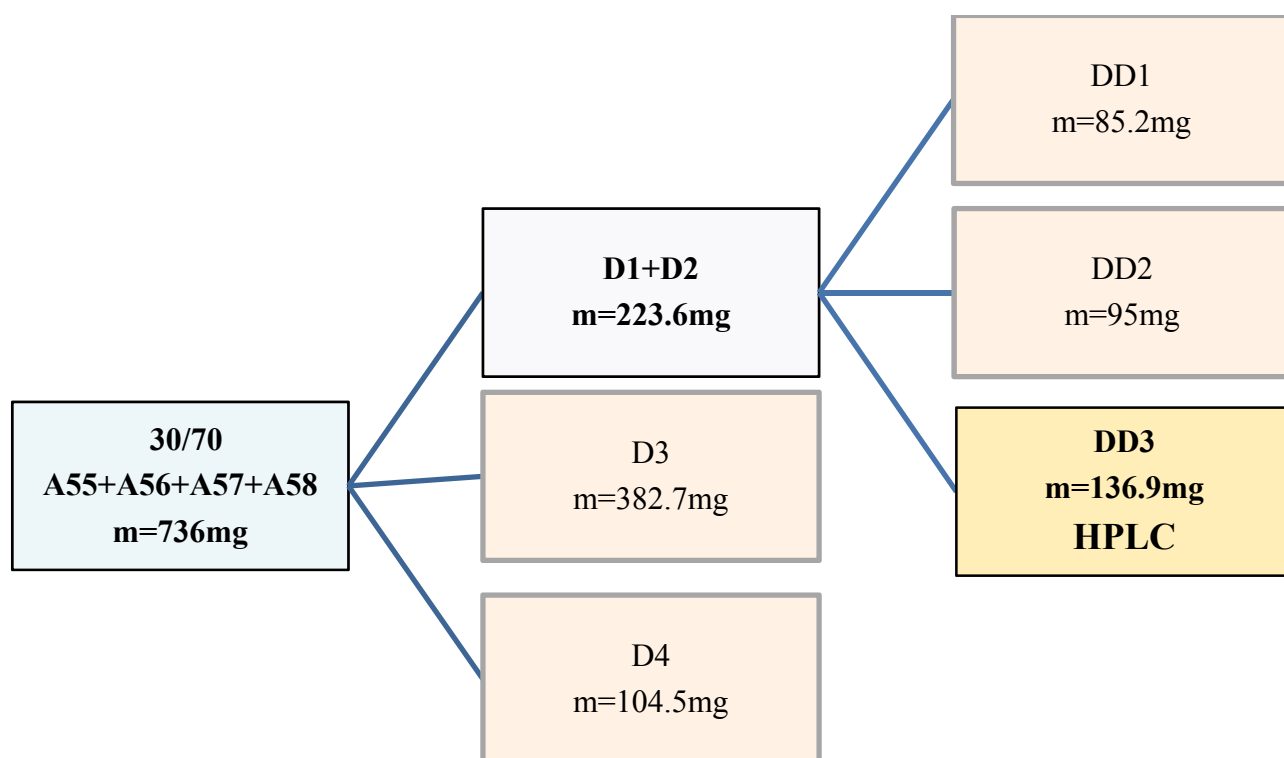


L'organigramme III-II-12 : purification des sous-fractions: Gr4A'+Gr4B'+Gr4C'.

#### III-II-2-2-13-Purification de la fraction Hept/AcOEt: 30/70 :

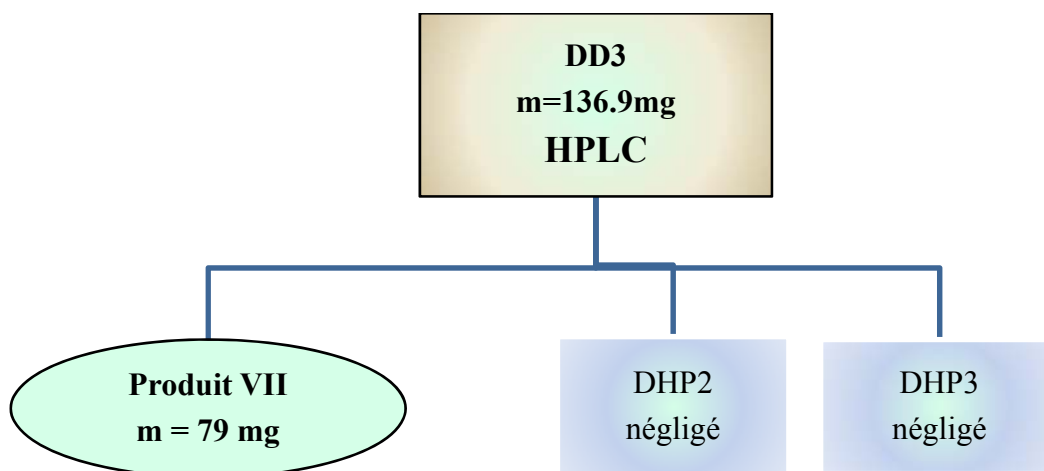
Quatre fractions assez complexes sont obtenues par l'éluant Hept/AcOEt (30/70), afin de purifier au moins le produit majoritaire, elles ont été mélangées (m=736 mg). Pour les séparer à nouveau sur colonne de silice mais cette fois par un autre gradient d'éluant: DCM/MeOH, choisi après des tests CCM avec différentes phases mobiles.

Cette nouvelle séparation a conduit à plusieurs fractions, les plus importantes sont regroupées selon l'organigramme III-II-13. Deux d'entre elles sont réunies (D1+ D2) dont m=223.6 mg, ont subi des purifications supplémentaires.



**L'organigramme III-II-13 : purification des fractions (A55+A56+A57+A58) obtenues par la phase Hept/AcOEt : 30/70.**

Les deux fractions rassemblées (D1+D2) dont  $m=223.6\text{ mg}$ , ont été soumises à leur tour à une purification supplémentaire en suivant les mêmes étapes. La sous-fraction DD3 de masse globale  $m=136.9\text{ mg}$ , a été l'objet d'une purification par HPLC sous les conditions chromatographiques suivantes: colonne: chiralpak ID, éluant: heptane/EtOH: 50/50, débit: 1ml/min, détecteurs: DAD+ CD à 254nm. Cette dernière purification a mené à trois nouvelles sous-fractions, représentées sur le diagramme III-II-14, deux d'entre elles ont été minoritaires, très complexes, le produit VII a été récupéré majoritairement dans la troisième.



L'organigramme III-II-14 : suite de purification des fractions (A55+A56+A57+A58) obtenues par Hept/AcOEt : 30/70

## Partie III : résultats et discussion

### III-III-I-Elucidation structurale des composés purifiés:

#### III-III-I-1-Elucidation structurale du composé I :

L'examen du spectre infrarouge du produit I a révélé la présence d'une fonction hydroxyle à  $3459.9\text{ cm}^{-1}$ , des bandes à  $1775.9$ ,  $1135.5$ ,  $1028.4\text{ cm}^{-1}$  caractéristiques du groupe ( $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -lactone) et à  $1745.9\text{ cm}^{-1}$  un carbonyle d'ester, et les bandes à  $1664.6$  et  $896.9\text{ cm}^{-1}$  pour les insaturations [234-237].

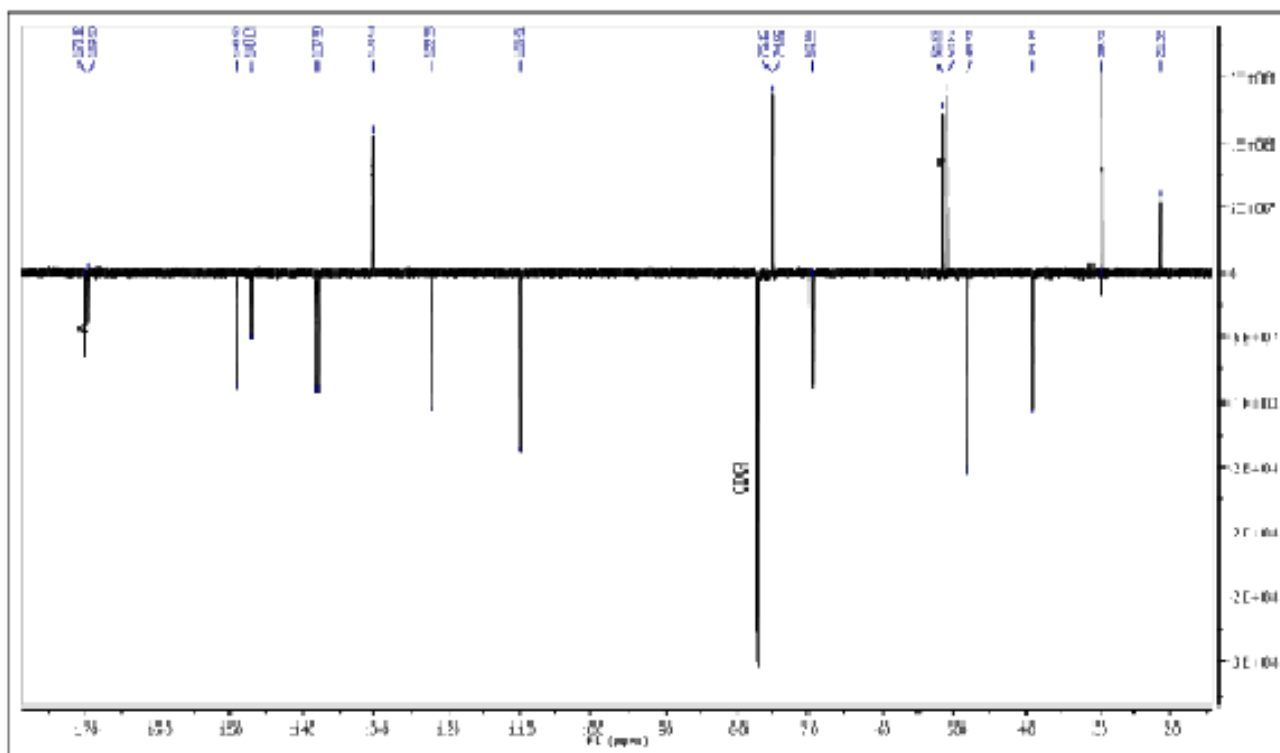
Les spectres de masse obtenus après ionisation électrospray en mode positif et en mode négatif de l'échantillon I présentent plusieurs signaux indiquant de la présence en solution d'un composé de masse molaire  $304\text{ Da}$  :

Les spectres deptQ 135 (spectre n° 1) et HSQC (spectre n° 2) ont montré la présence de:

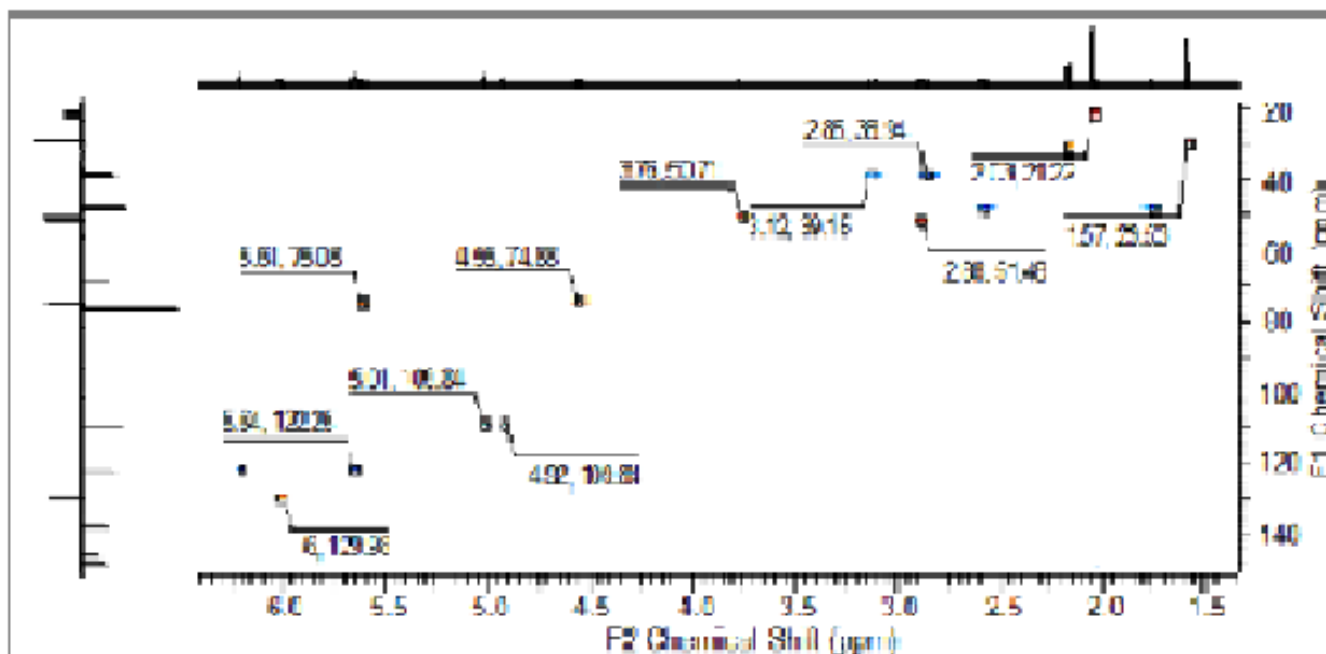
- Deux carbones primaires relativement déblindés.
- Quatre carbones secondaires dont deux sont éthyléniques, les deux autres sont de type  $\text{sp}^3$ .
- Cinq carbones tertiaires dont un éthylénique, les quatre restants sont de type  $\text{sp}^3$ , deux parmi eux sont relativement déblindés à cause de leurs rattachements à des oxygènes.
- Six carbones quaternaires dont deux de type carbonyle, trois de type éthylénique à et le dernier étant de type  $\text{sp}^3$  oxygéné.

17 carbones sont dénombrés pour ce produit.





Spectre n° 1 : deptQ 135 du composé I.

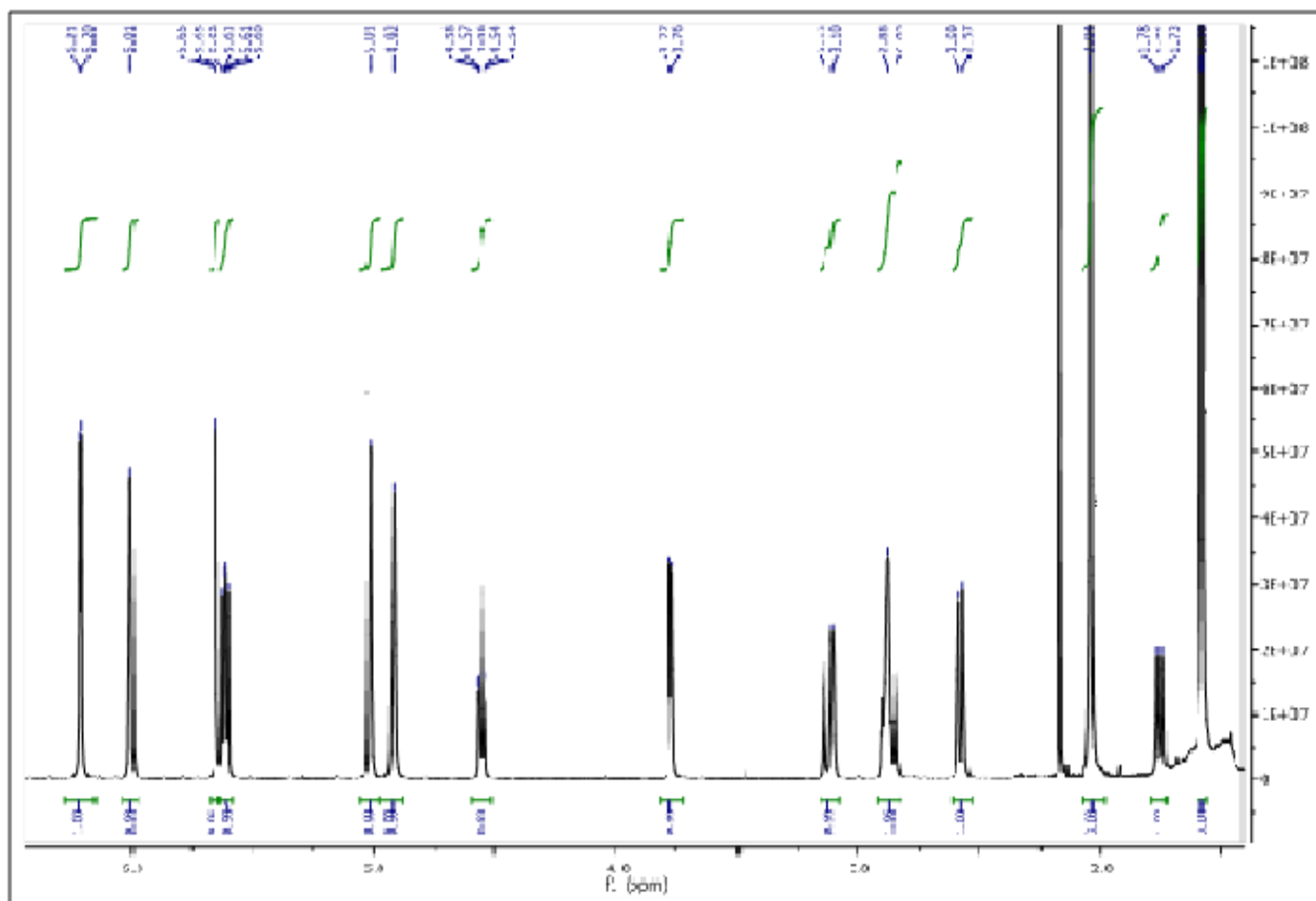


Spectre n°2 : RMN HSQC du composé I.

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  (spectre n° 3) et HSQC (spectre n° 2) mettent en évidence la présence de :

- Deux signaux correspondant à deux méthyles soit six protons.
- Quatre groupements méthylènes, les deux premiers de type  $\text{sp}^3$ , les deux autres apparaissent dans la région des éthyléniques sous forme de deux paires de doublets, soit dans l'ensemble 8 protons.
- Les signaux des cinq méthines dont un est éthylénique, deux autres liées à des atomes d'oxygènes et deux autres derniers, correspondants en tout à cinq protons.

On compte en plus un proton pour celui du l'hydroxyle ce qui nous fait la somme de vingt protons (tableau n° III-III-1).



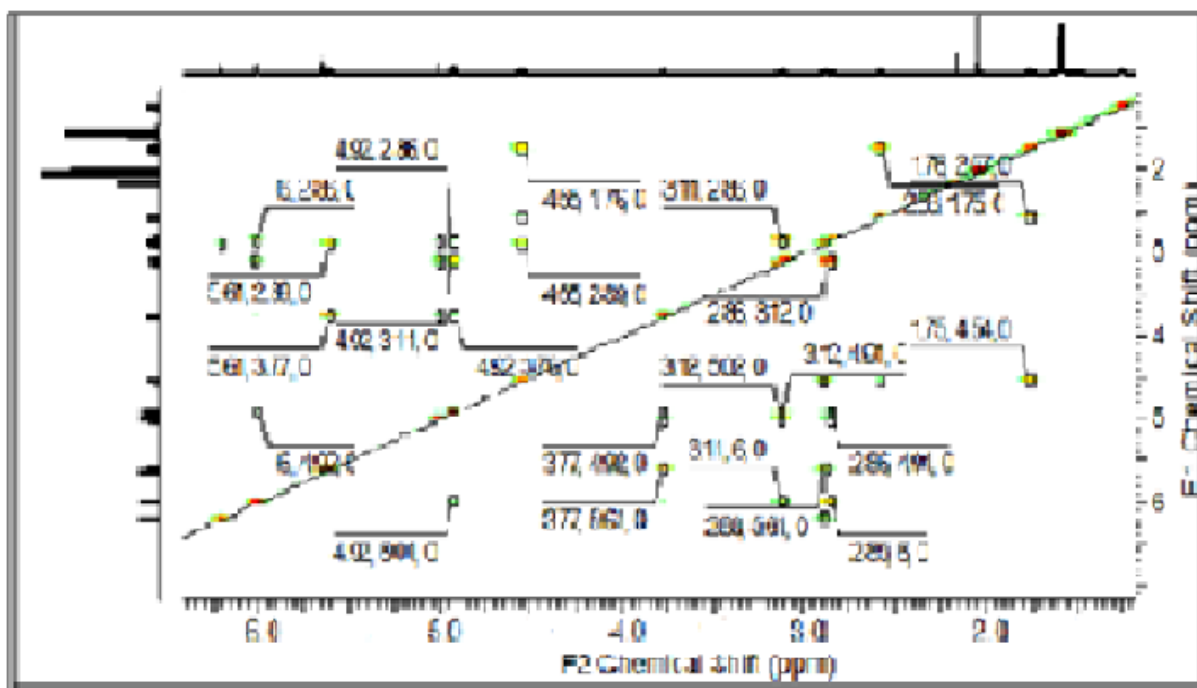
Spectre n° 3: RMN  $^1\text{H}$  du composé I.

Lorsque l'on soustrait de cette valeur la masse de 17 carbones et celle des 20 protons, il en résulte la masse de 5 oxygènes, ce qui nous ramène à la formule brute  $C_{17}H_{20}O_5$ .

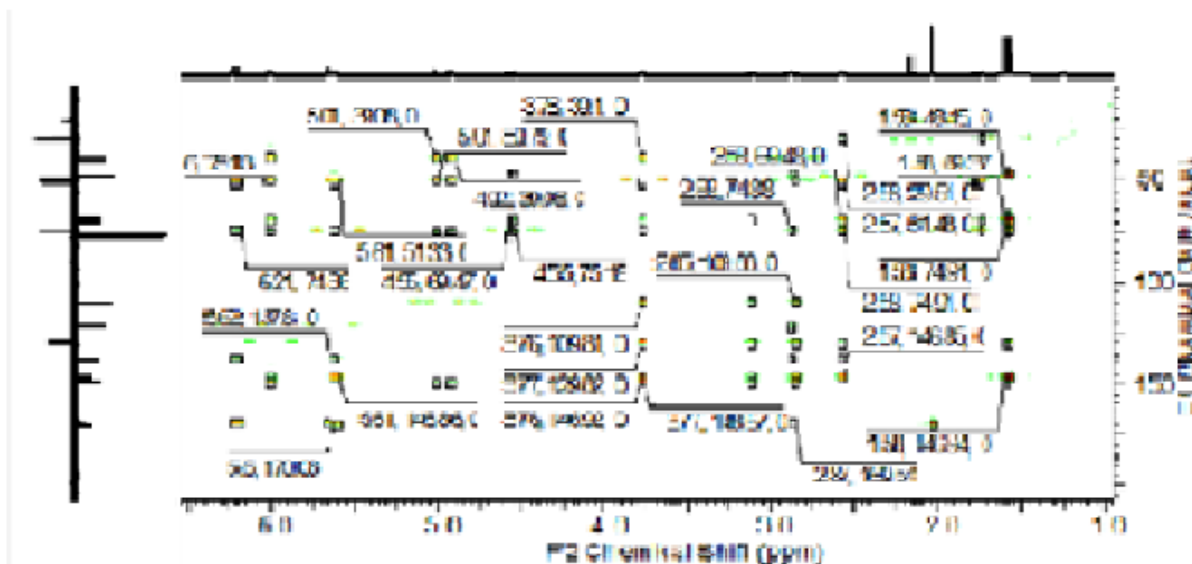
D'après les informations spectroscopiques et spectrales recueillies sur ce produit, on peut lui proposer la structure d'une lactone sesquiterpénique montrant un degré d'insaturation égale à huit, dont deux correspondent aux fonctions carbonyles ( $C=O$ : lactone,  $C=O$ : ester), trois pour les trois doubles liaisons et un pour le cycle lactonique. Les deux degrés qui restent suggèrent un squelette carbonique à deux cycles. Trois possibilités se présentent à savoir: guaianolide, pseudo-guaianolide et eudesmanolide.

La présence du signal d'un méthyle quaternaire à (1.57 ppm) éloigne la probabilité des deux derniers squelettes dont les signaux de leurs méthyles angulaires apparaissent, respectivement à ( $\approx 1$ ppm) et à ( $< 1$ ppm). Donc, il reste celle d'un guaianolide [34, 234-236].

Pour confirmer l'identification de ce composé, les corrélations COSY (H-H) et HMBC (C-H) longue distances ont été analysées.



Spectre n° 4 : RMN COSY du produit I.



Spectre n° 5 : RMN HMBC du produit I.

Les corrélations apparues sur le spectre COSY (spectre n° 4), reportées sur le tableau n° III-III-1, ont permis l'emplacement des différents protons sur le squelette de base du composé.

Les corrélations observées entre le proton à 2.89 ppm avec, d'une part, le carbone éthylénique à 137.9 ppm et, d'autre part, avec celui à 122.2 ppm et complété avec celui à 169.6 ppm (C=O) confirment l'attachement du bout  $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -lactone sur le carbone C-7 confirmé par les corrélations H-H COSY.

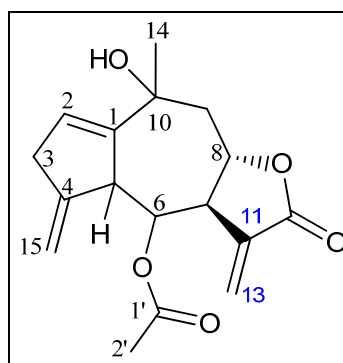
D'après le spectre RMN  $^1\text{H}$  (n° 3), les deux signaux déblindés à 2.89 ppm (m) et à 4.56 ppm (ddd) qui ont été attribués respectivement à H-7 et H-8 sont considérés caractéristiques pour la structure du type 8,12-guaianolide. La valeur de  $J_{\text{H-7, H-8}} = 11.7$  Hz indique que la fusion lactonique est de type trans [34].

D'après le spectre COSY (spectre n° 4), les deux protons éthylénique corrélient d'un côté avec les deux protons portés sur le même carbone et d'un autre avec le proton à (3.76 ppm). D'après le spectre HMBC (spectre n° 5), les deux premiers protons montrent des corrélations avec le carbone éthylénique et avec les deux autres carbones; ces constatations prouvent que la double liaison est exocyclique.

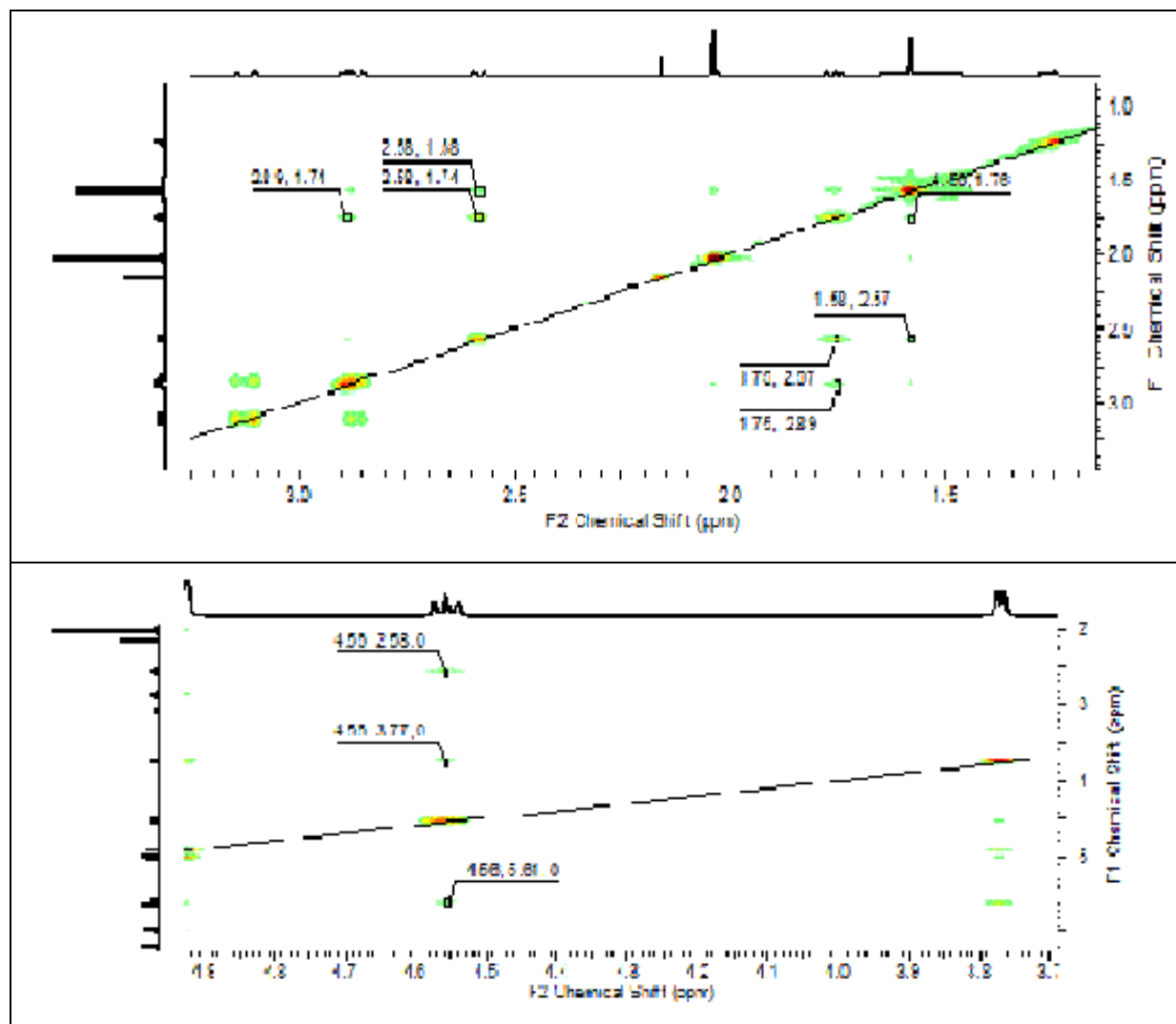
A part le carbone lié à l'hydroxyle, quatre autres carbones oxygénés sont dénombrés sur le tableau n° III-III-1, il s'agit de ceux des carbonyles. Les deux autres carbones sont attachés aux oxygènes saturés de ces esters.

Le déplacement vers les champs faibles, du méthyle à 21.4 ppm et la corrélation observée pour ses protons à 2.03 ppm avec le carbone à 170.2 ppm indiquent son attachement à ce dernier carbone pour former le radical acétyle (la deuxième fonction ester).

Les informations collectées sur ce produit ont permis d'établir la structure suivante :



La structure de ce composé renferme cinq carbones asymétriques à savoir C-5, C-6, C-7, C-8, C-10, l'examen du spectre NOESY (n° 6) a permis de compléter les caractéristiques de cette structure.



Spectre n° 6 : RMN NOESY du produit I.

Si on admet que le H-7 est en position  $\alpha$ , l'absence de corrélations NOESY entre lui et le H-8 confirme la fusion lactonique trans et met ce dernier proton en position  $\beta$ . Les corrélations de H-8 avec les protons H-6, H-5, H-9a et le les placent du même côté du plan de la molécule que lui, en position  $\beta$ . Alors que les corrélations du Me-14 avec H-7 l'orientent vers la position  $\alpha$  du plan, par conséquence, l'hydroxyle sur C-10 et l'acétyle ont une orientation  $\alpha$  avec le H-9b.

Les informations collectées sur ce produit ont permet d'établir la structure ci-dessous. qui représente : 6 $\alpha$ -acetoxy-10 $\beta$ -hydroxyguaia-1, 4(15), 11(13)-trien-8 $\alpha$ ,12-olide. [37]

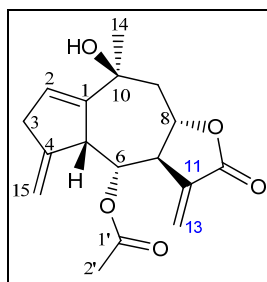
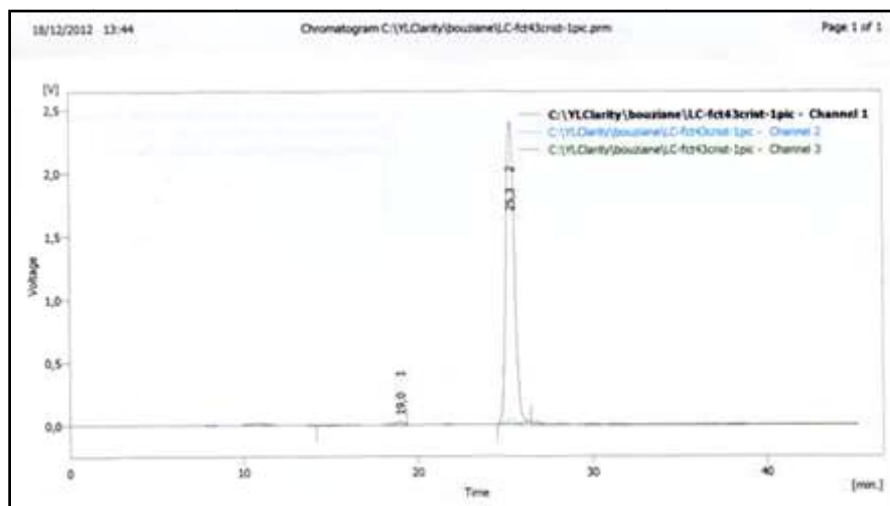


Tableau n° III-III-1 : valeurs des déplacements chimiques RMN  $^1\text{H}$  et séquences: HSQC, COSY, HMBC et NOESY (600 MHz) RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz) du composé I dans  $\text{CDCl}_3$  à 300°K.

$\delta^1\text{H}$ (ppm), multiplicité, $J$ (Hz)	COSY (H-H)	HMBC (H-C)	NOESY
---	---	---	---
6.01 brs		C-5, C-10, C-1, C-4	--
3.12 brdd (20.5, 1.8)		C10,C15, C2,C4,C1	--
2.85 brdd (20.5, 2.3)		C2,C5,C15,C1,C4	--
--	---	---	---
3.76 d (6.4)		C3,C7,C6,C15, C2,C1,C4	
5.61 dd (8.2, 6.4)		C7,C8,C11,C1,C12	
2.89 m		C9,C8,C13,C11,C12	
4.56 ddd (11.6, 9.5,2.3)		C-9, C-10, C-6	
2.58 dd (13.5, 2.3)		C14,C7,C10,C8,,C1	
1.76 dd (12.8, 11.7)		C-14, C-7, C-10, C8	
--	---	---	---
--	---	---	---
--	---	---	---
6.21 d (3.5)		C-7, C-8, C-11, C12	
5.65 d (2.9)		---	
1.57 s	-	C9,C10,C8,C2,C1	
5.01 brs		C-3, C-5, C-6, C-4	--
4.92 brs		C-3, C-5, C-6, C-4	--
--	---	---	--
2.03 s	-	C-1', C-6	

**III-III-I-2-Elucidation structurale du composé II:**

Pendant l'évaporation de sa fraction, le produit II s'est cristallisé. Son analyse par CCM lui a montré une seule tache de coloration verte olive, après la révélation par l'analaldehyde. Par la suite, son analyse par HPLC-DAD (figure III-III-1) a confirmé sa pureté.



**Figure III-III-1 : chromatogramme obtenu par HPLC-DAD pour le produit II.**

L'analyse du produit II par spectroscopie infrarouge a montré les bandes caractéristiques d'une fonction hydroxyle non associée à  $3463.9\text{ cm}^{-1}$ , d'une (C=O d'ester) à  $1716.5\text{ cm}^{-1}$ , du groupement ( $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -lactone) :  $1778.2$ ,  $1145.6$  et  $1116.7\text{ cm}^{-1}$  et celles de double liaison exocyclique à  $3095.5$ ,  $1652.9$  et  $893.0\text{ cm}^{-1}$  [234-237].

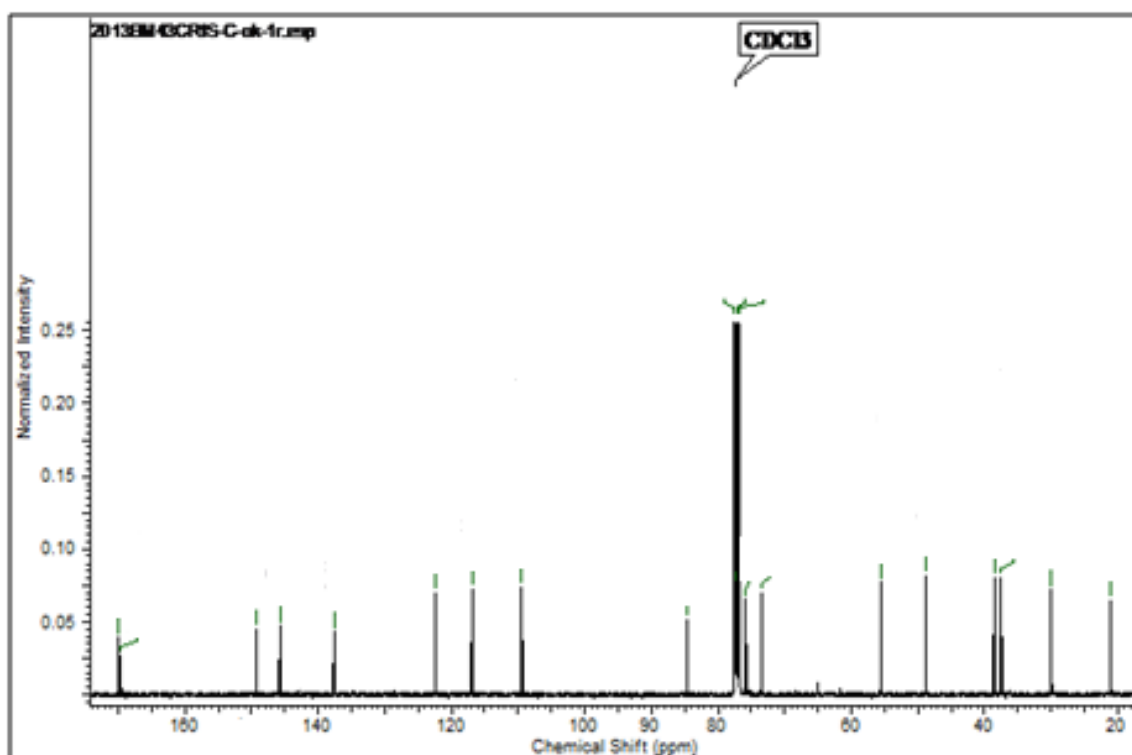
Par ailleurs, son analyse par spectrométrie de masse en mode d'ionisation électrospray, en mode positif, a présenté plusieurs signaux diagnostiques de la présence en solution d'un composé de masse molaire 304 Da :



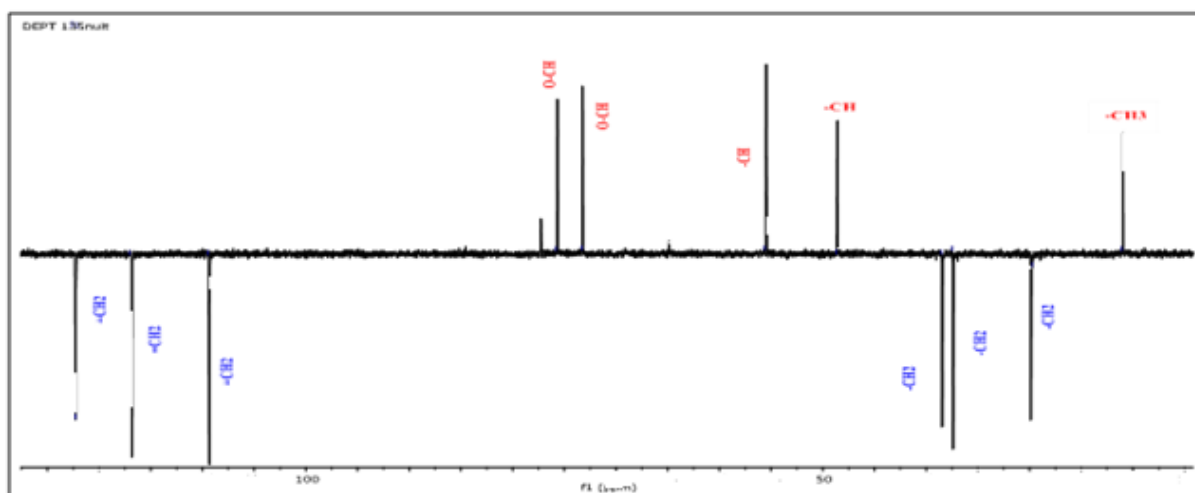
Les spectres RMN  $^{13}\text{C}$  (n° 7), deptQ 135 (n° 8) et HSQC (n° 9) mettent en évidence la présence de :

- Un seule carbone primaire légèrement déblindé.
- Six carbones secondaires, trois parmi eux sont éthyléniques.  
les trois autres sont hybridés  $\text{sp}^3$ .
- Quatre carbones tertiaires de type  $\text{sp}^3$  dont deux sont déplacés vers des champs faibles à cause de leur attachement à des oxygènes, et les deux autres.
- Six carbones quaternaires dont deux de type carbonyle.

Les carbones dénombrés font la somme de 17 atomes.



**Spectre n° 7: RMN  $^{13}\text{C}$  du composé II.**

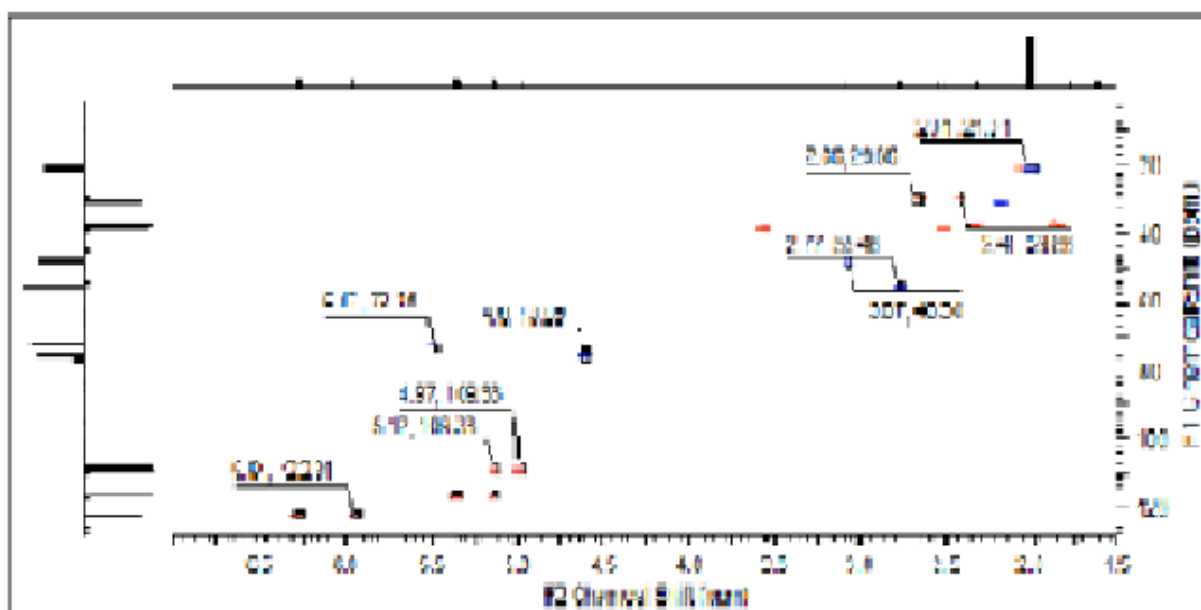


Spectre n° 8: dept 135 du composé II.

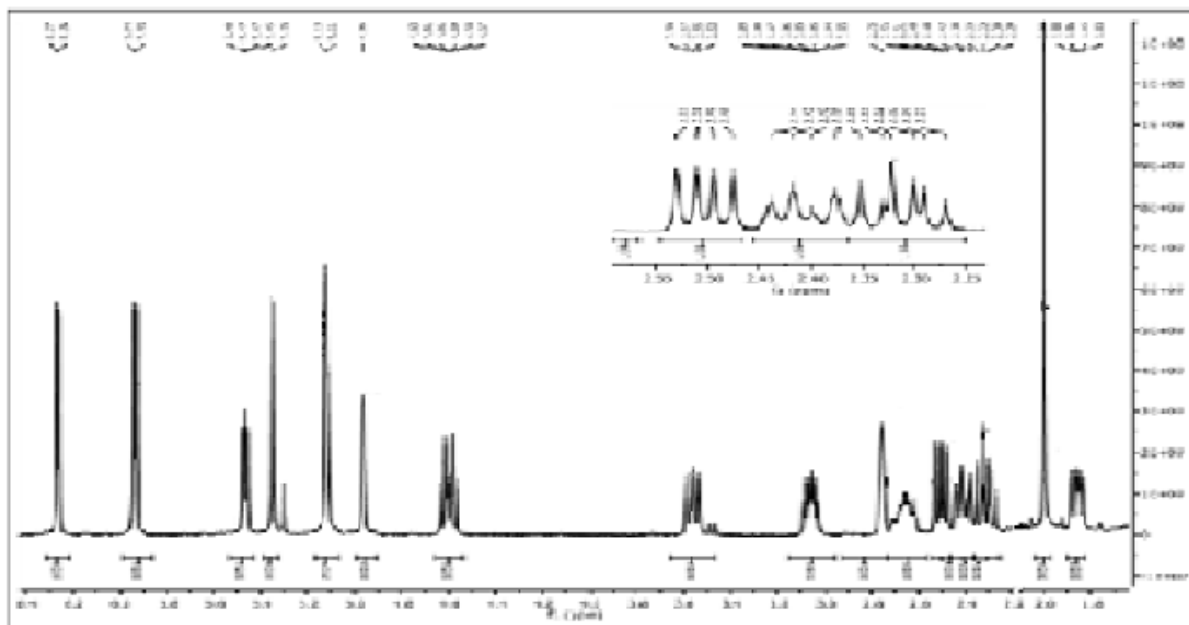
Les spectres RMN  $^1\text{H}$  (spectre n° 10) et HSQC (spectre n° 9) ont montré la présence de :

- Un groupement méthyle relativement déblindé, soit trois protons.
- Six groupements méthylènes, trois d'entre eux hybridés  $\text{sp}^3$ , trois autres sont éthyléniques, soit pour la somme de 12 protons.
- Quatre groupements méthines dont deux sont liés à des oxygènes, faisant en tout quatre protons.

On dénombre en plus un proton de l'hydroxyle ce qui fait la somme de vingt protons (tableau n° III-III-2).



Spectre n° 9: RMN HSQC du produit II.

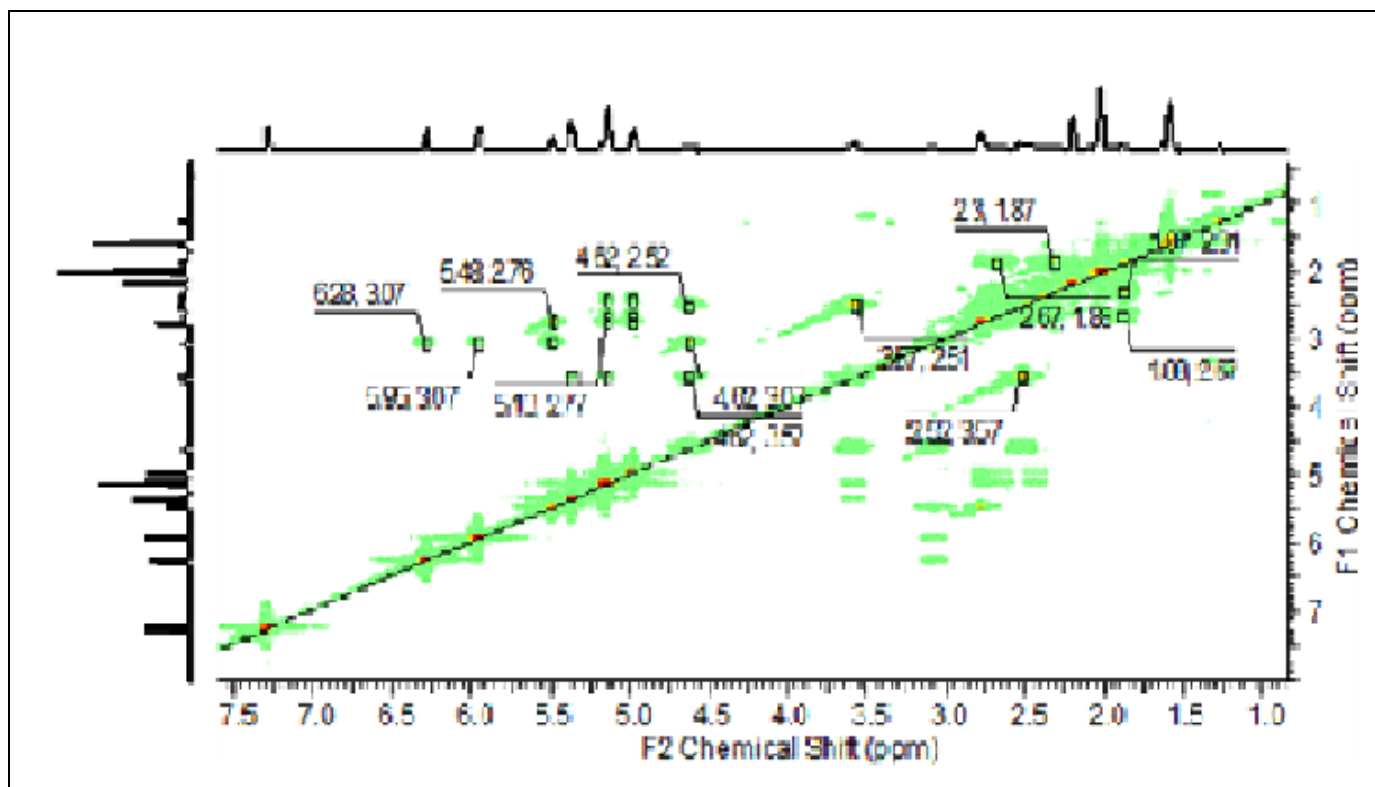


### Spectre n° 10: RMN $^1\text{H}$ du composé II.

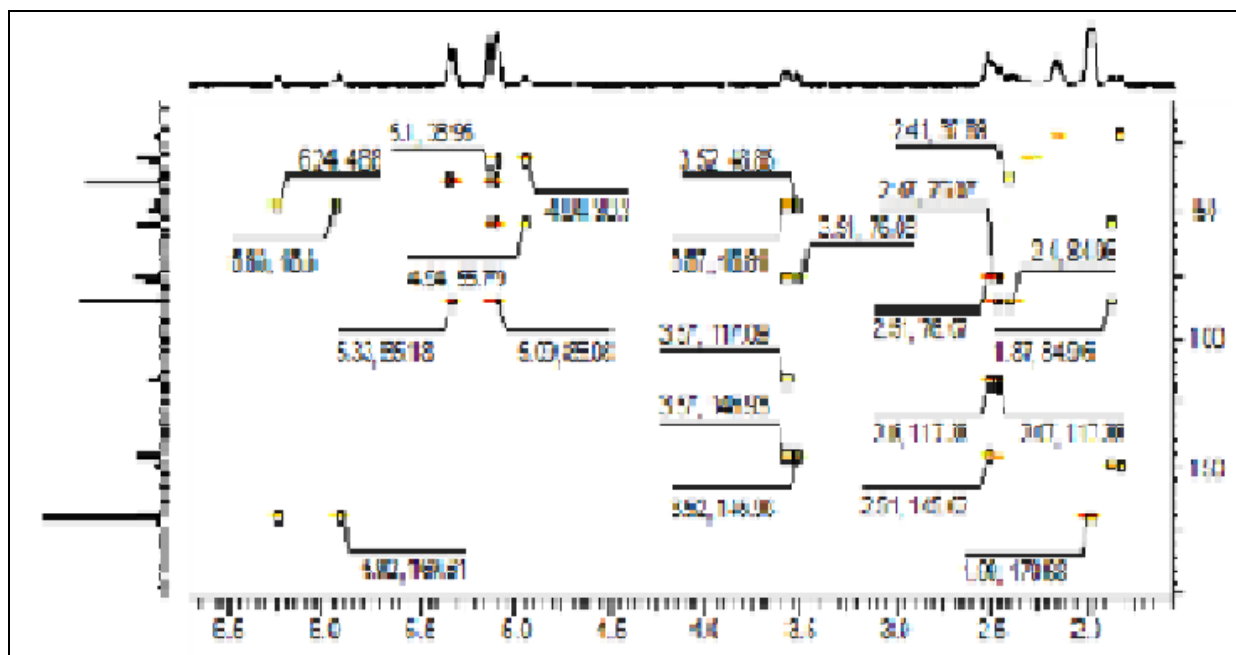
En se basant sur les données collectées sur ce composé, jusqu'à ce stade, la formule brute d'une lactone sesquiterpénique ( $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_5$ ) peut lui être attribuée. L'examen de son degré d'insaturation qui vaut à huit avec les déplacements des différents types de carbones, permet de proposer une structure bicyclique pour cette lactone sesquiterpène.

La présence du groupement ( $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -lactone) est confirmée par l'apparition d'une paire de doublets dans les champs faibles, sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  n° 10 (5.94ppm, d, 3.3 Hz) et (6.26ppm, d, 3.5 Hz), et aussi par l'observation, dans la partie déblindée sur le même spectre, du signal attribué au proton lactonique à 4.61ppm (dt) et celui à 2.76 ppm (br d), indiquant ainsi qu'il s'agit d'une structure 8, 12-guaianolide, en outre, la valeur de  $J_{\text{H-7}, \text{H-8}}=11.0$  Hz oriente vers une trans fusion lactonique.

Pour confirmer l'identification de ce composé, les corrélations COSY (H-H) et HMBC (C-H) longue distances ont été analysées.



Spectre n° 11: RMN COSY du produit II.

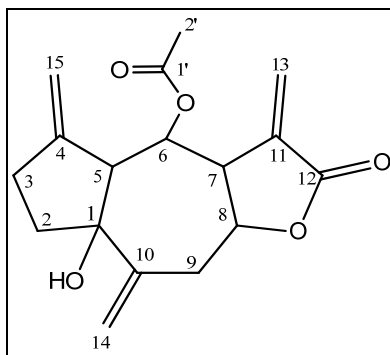


Spectre n° 12: RMN HMBC du produit II.

**Tableau n° III-III-2 : valeurs des déplacements chimiques RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C et séquences HMBC, COSY (300 MHz) du composé II dans CDCl<sub>3</sub> à 300°K.**

δ <sup>1</sup> H (ppm), multiplicité, J (Hz)	HMBC H-C	COSY H-H
--	---	
1.87 ddd (1.7, 8.5, 12.5)	C-1, C-10	
2.32 dt (12.0, 8.5)	C-3	
2.41 dd (16.3, 8.8)	C-1, C-2, C-4	
2.66 m	--	
--	--	
3.07 ddt (9.3, 6.3, 3.3)	C-5	
5.47 dd (5.9, 4.1)	C-2, C-9	
2.76 br d		
4.61 dt(11.0, 8.0)	C-7, C-9	
2.51 dd (14.3, 7.7)	C-8, C-13	
3.57 ddt(14.3, 8.5, 1.7)	C-5, C-8, C-13	
--	---	
--	---	
--	---	
5.94 d (3.3)	C-5, 12	
6.26 d (3.5)	C-5, C-12	
5.12 br s	C-1, C-9	
5.35 s	C-1, C-2	
4.97 q (1.2)	C-3, C-7	
5.10 t (2.0)	C-3, C-2, C-1, C7	
--	---	
2.01 s	C-1'	

Une analyse par diffraction des rayons x (DRX) du produit II a permis de compléter ses caractéristiques. Une analyse complémentaire plus pointée « VCD : Vibrational Circular Dichroism » a permis de déterminer sa configuration absolue.



**Figure III-III-2 : structure du composé II.**

### **III-III-I-3-Elucidation structurale du composé III :**

Le spectre IR enregistré pour ce composé a présenté les bandes d'absorption suivantes: 3467.2  $\text{cm}^{-1}$  relative à la fonction (OH) et celles caractérisant le groupe lactonique : 1756.9, 1138.5, 1066.7  $\text{cm}^{-1}$ , 1656.1 avec 893.9  $\text{cm}^{-1}$  représentant la double liaison exocyclique [234-237].

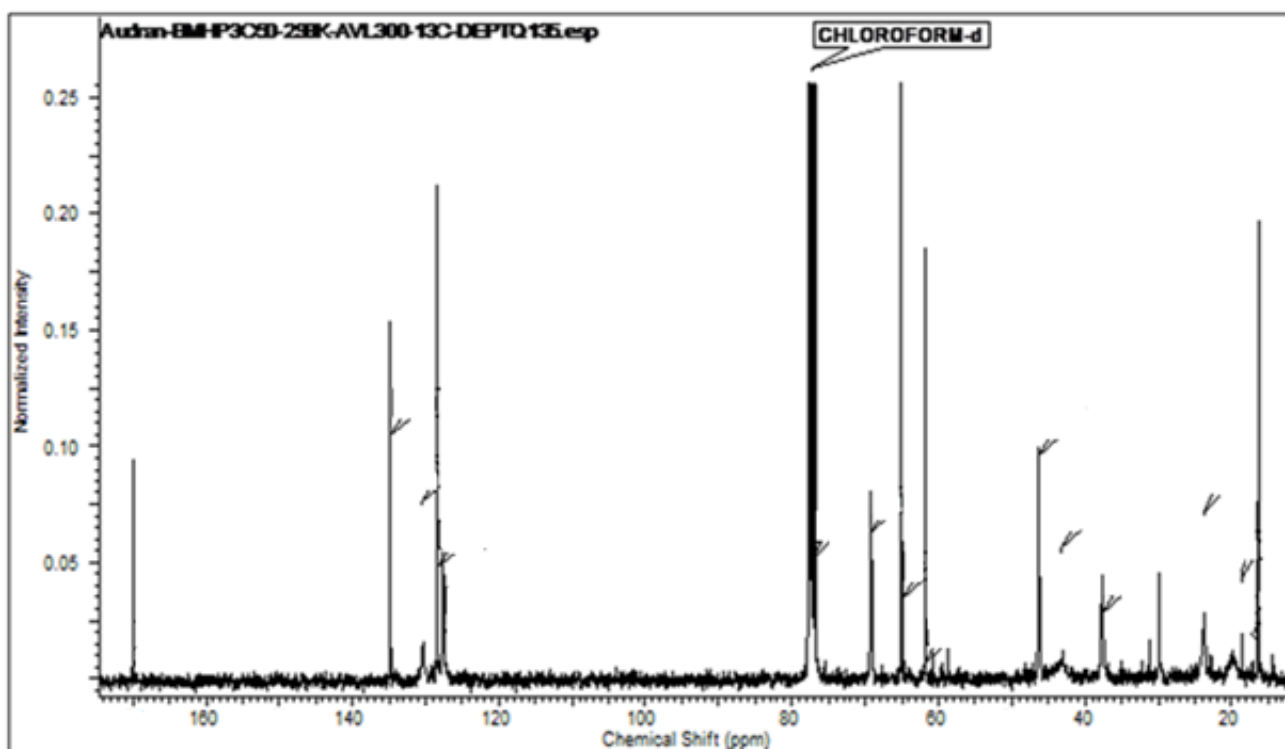
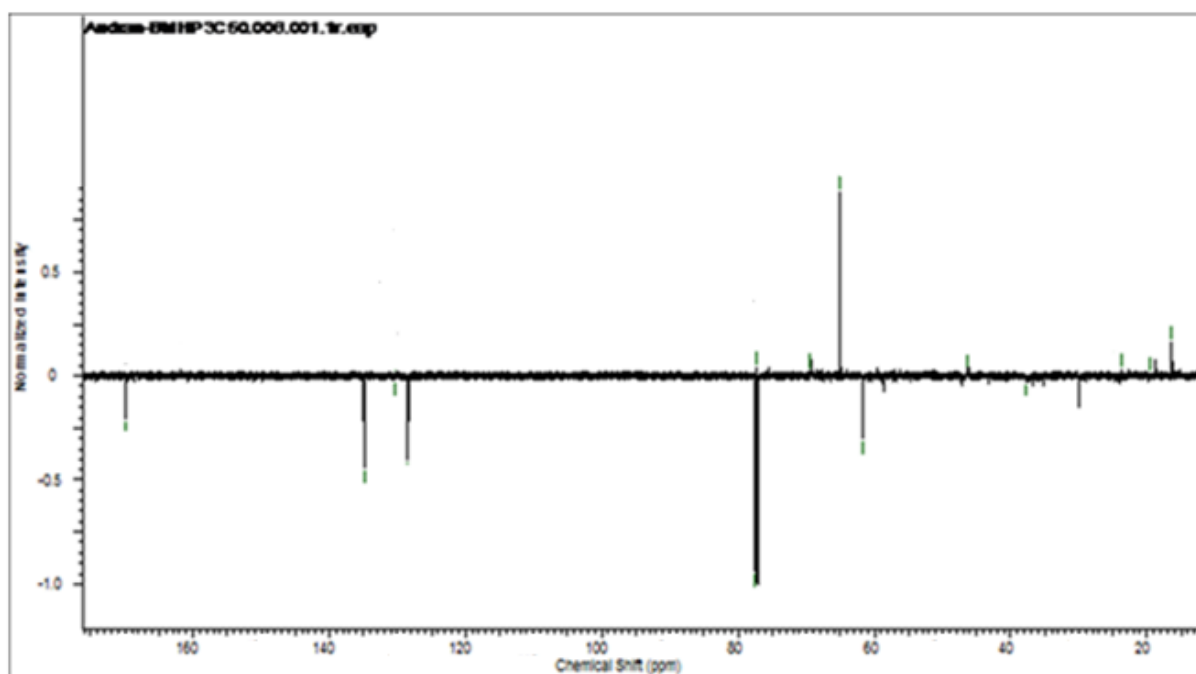
Par ailleurs, le spectre de masse obtenu après ionisation électrospray en mode positif de l'échantillon III présente plusieurs signaux diagnostiques de la présence en solution d'un composé de masse molaire 264 Da.

Les résultats des analyses RMN représentés respectivement sur les spectres RMN  $^{13}\text{C}$  (spectre n°13), deptQ 135 (spectre n°14) et HSQC (spectre n°15), mettent en évidence la présence de:

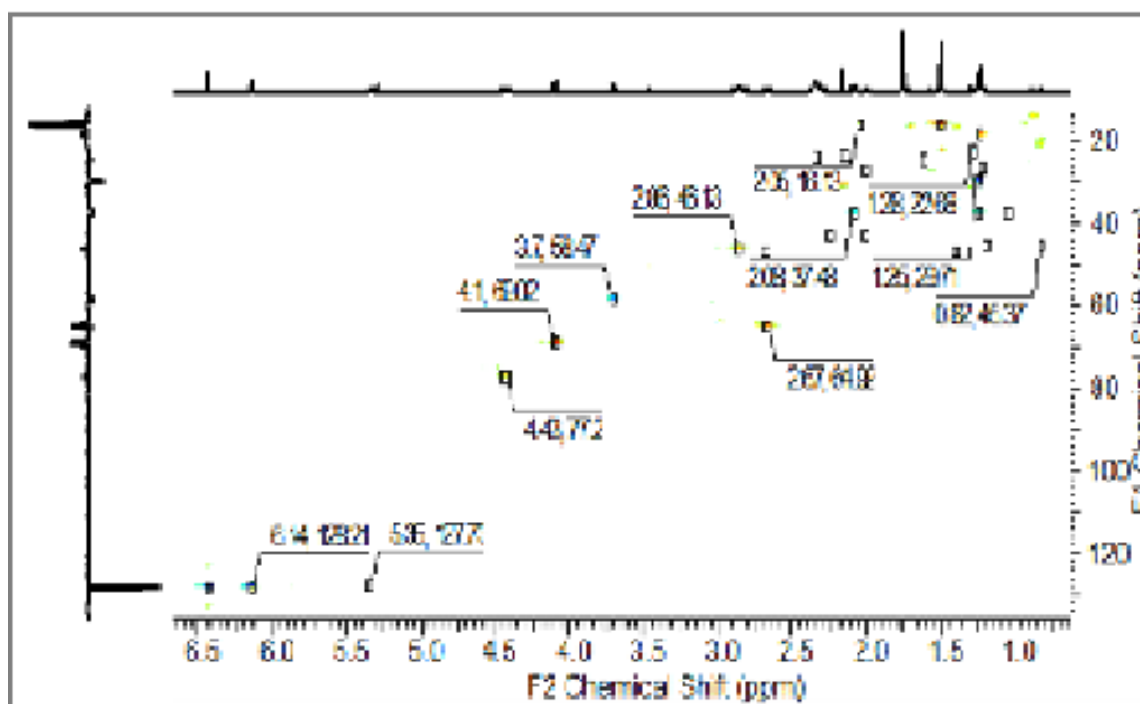
- Deux carbones primaires dans la région des champs forts.
- Quatre carbones secondaires dont un est oléfinique, les trois autres sont de type  $\text{sp}^3$ .
- Cinq carbones tertiaires, un est éthylénique, quatre de type  $\text{sp}^3$  trois parmi eux sont oxygénés. Plus un dernier.
- Quatre carbones quaternaires, deux éthyléniques, un attaché à un oxygène et celui du carbonyle.

On dénombre 15 carbones pour ce produit.



Spectre n° 13: RMN  $^{13}\text{C}$  du composé III.

Spectre n° 14: deptQ 135 du composé III.

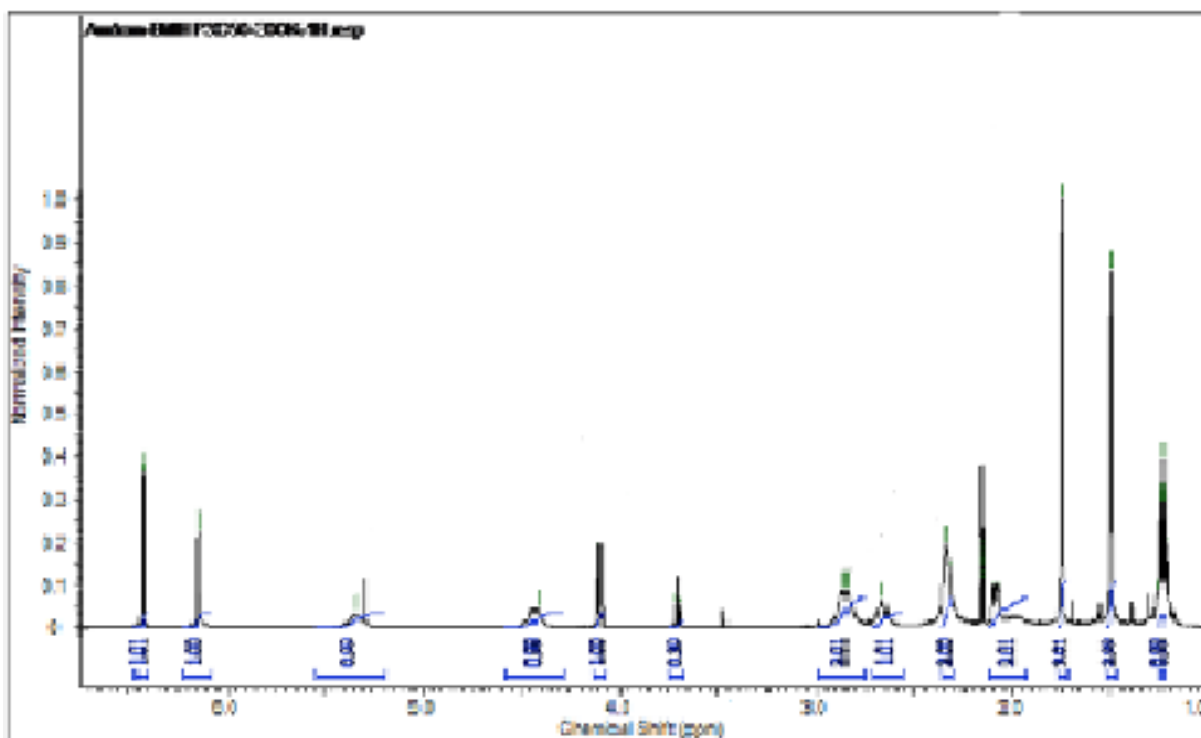


Spectre n° 15: RMN HSQC du composé III.

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  (spectre n°16) et HSQC (spectre n°15) ont dévoilé la présence de :

- Deux méthyles ( $\text{CH}_3$ ) soit six protons.
- Quatre méthylènes ( $\text{CH}_2$ ), un seul d'entre eux est de type  $\text{sp}^2$ , les trois autres sont saturés relativement blindés. Soit la somme de 8 protons.
- Cinq méthines ( $\text{CH}$ ), un est éthylénique, trois sont oxygénés et un autre dernier. Ce qui fait la somme de cinq protons.

Un proton en plus pour celui de l'hydroxyle ce qui fait un total de vingt protons leurs caractéristiques sont cités dans le tableau n° III-III-3.



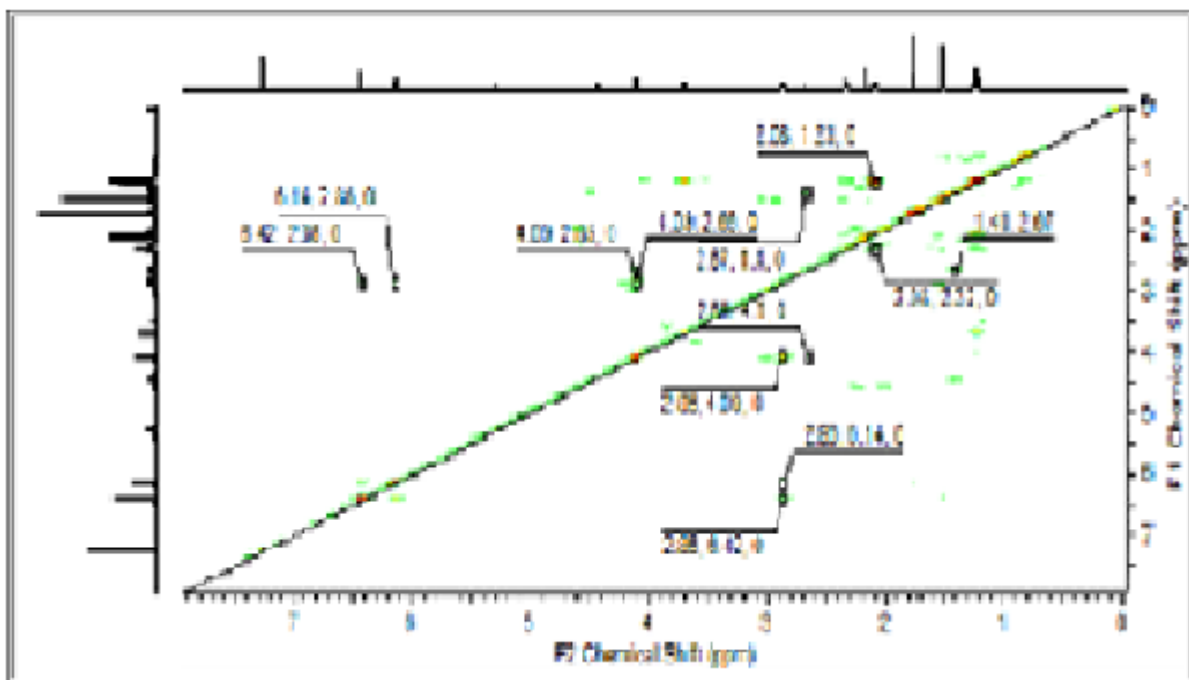
Spectre n° 16: RMN  $^1\text{H}$  du composé III.

Les données rassemblées à ce stade laissent proposer la formule brute  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_4$  pour ce composé.

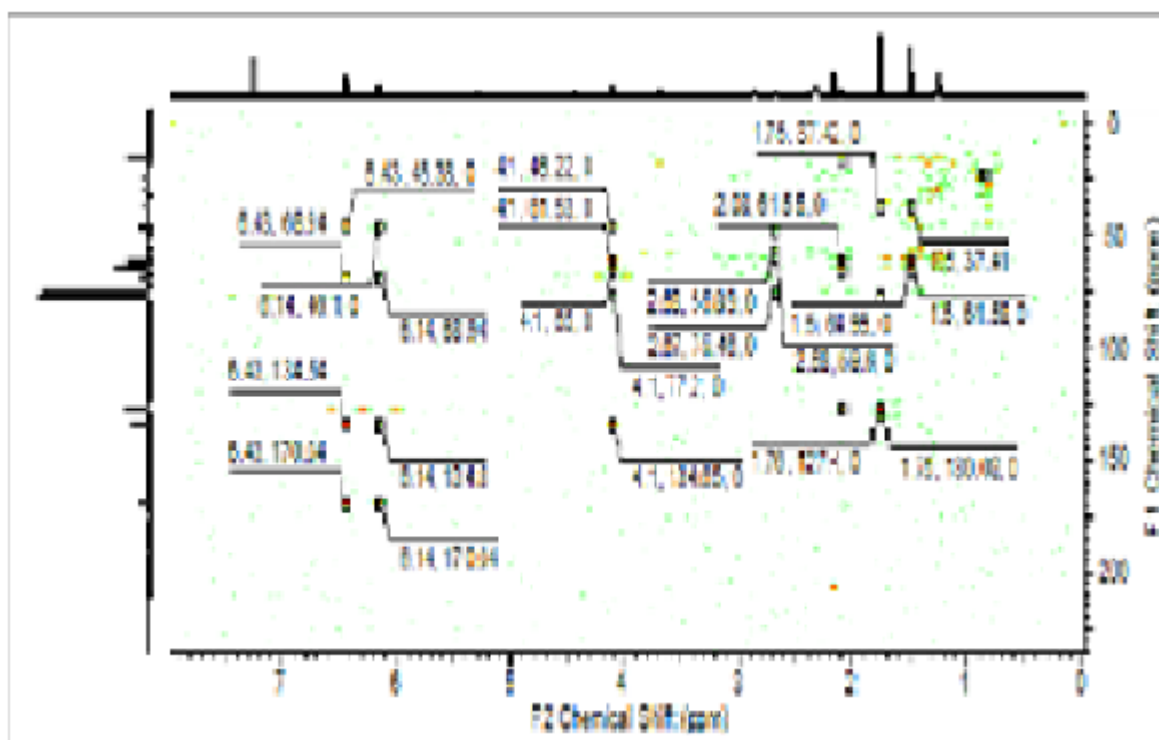
Conformément à la littérature [238], des données spectrales supplémentaires tirées de l'analyse RMN  $^1\text{H}$ , les déplacements du proton à (2.67 ppm ; 1H br d) et de ceux à (1.51 ppm ; 3H s) vers des champs plus forts, reportées sur le tableau n° III-III-3, informent sur la présence d'un époxyde.

En conséquence, et après attribution des différentes insaturations, comme vu ci-dessus, on peut conclure que la formule brute proposée correspond à 4,5-époxygermacranolides [238]. En outre, la résolution médiocre de son spectre RMN  $^1\text{H}$  reflète la flexibilité du grand cycle à 10 chaînons [235].

D'après le spectre RMN  $^1\text{H}$ , l'observation de la paire des signaux à 6.43 ppm (dd, 1H, 2.8, 1.1 Hz) et 6.14 ppm (dd, 1H, 2.2, 1.1) indique la présence du groupement caractéristique  $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -lactone.



Spectre 17 : RMN COSY du produit III.



Spectre 18 : RMN HMBC du produit III.

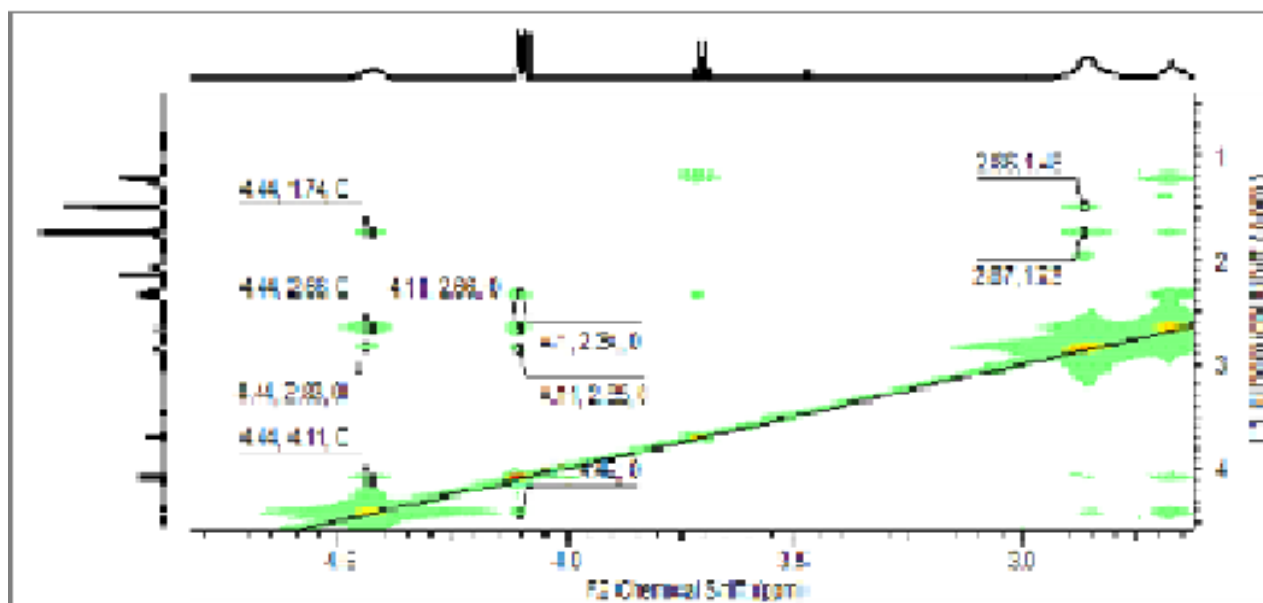
Les séquences COSY (spectre n° 17) et HMBC (spectre n° 18) ont permis de tirer les conclusions suivantes:

Les deux protons de ce méthylène (C-13) corrélient avec le carbone quaternaire à 135.0 ppm et corrélient d'un côté avec le carbone carbonyle lactonique (confirmant sa position  $\alpha$  par rapport à la C=O lactone) et d'un autre côté ils corrélient avec le carbone (C-7), précisant ainsi son attachement à ce carbone, témoignée par les corrélations H-H COSY entre H-7 et H-13. La fusion lactonique se fera soit avec le carbone oxygéné (C-6) ou bien avec le carbone aussi oxygéné (C-8). Vu les déplacements chimiques et les couplages constatés, nous affirmons que la lactone se ferme en C-8, les corrélations détectées sur le spectre COSY (n° 17) et les données spectrales reportées sur le tableau n° III-III-3 affirment que cette fermeture est faite d'une façon trans ( $J_{H7-H8} = 11.7$  Hz).

Les deux protons blindés à (2.84, 2.00 ppm) montrent des corrélations avec le H-8 et celui-ci présente à son tour une corrélation avec le proton blindé à 2.00 ppm, indiquant ainsi leur voisinage direct.

De ce constat, on peut déduire aussi que le groupement (OH) est porté sur le carbone à 69.4 ppm qui ne peut être que le C-6.

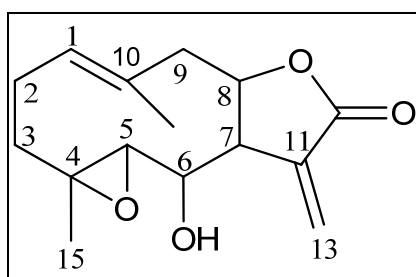
Les corrélations longues distances H-C (HMBC n°18) qui associent le signal des 3H à 1.51 ppm aux signaux des carbones à 37.3et 65.1 ppm, permettent de placer ce méthyle en position C-15.



Spectre n° 19: RMN NOESY du produit III.

La structure chimique du produit III renferme cinq carbones asymétriques, il s'agit de C4, C5, C6, C7 et C8, en admettant que le H-7 est en position  $\alpha$ , les corrélations qu'ils montrent sur le spectre NOESY (n° 19) avec les H-15 orientent le méthyle vers  $\alpha$  aussi. La position de H-7 en position  $\alpha$  implique que H-8 est en position  $\beta$ .

L'ensemble des informations réunies des différentes séquences mène à la structure :



**Tableau n° III-III-3 : valeurs des déplacements chimiques RMN <sup>1</sup>H et séquences : HSQC, COSY, HMBC et NOESY (300 MHz), RMN <sup>13</sup>C (75 MHz) du composé III dans CDCl<sub>3</sub> à 330°K.**

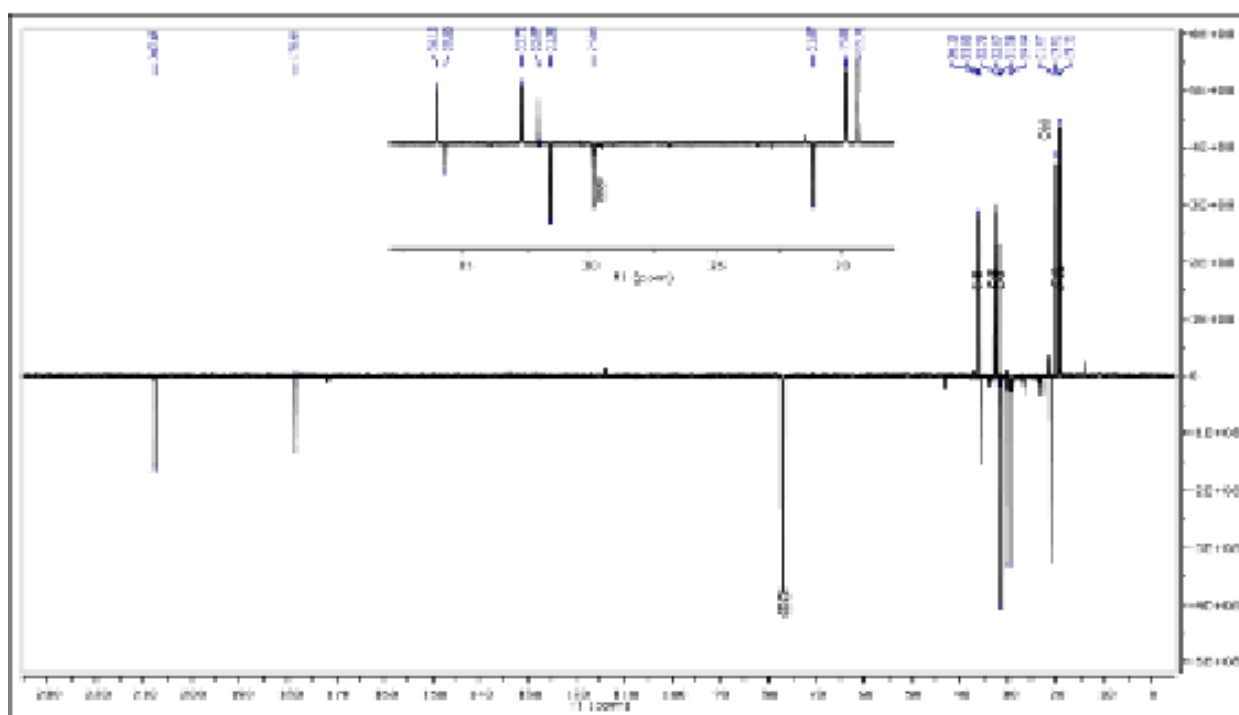
δ <sup>1</sup> H (ppm), multiplicité, J (Hz)	COSY	HMBC	NOESY
5.36 brt (7.9)		C-2, C-5, C10	H-1
2.34 m 2.28 m		--	H-1
2.08 ddd (13.0 ; 5.1 ; 2.6) 1.26 ddd (14.1 ; 8.4 ; 5.5)	--	--	--
-	--	--	--
2.67 brd (3.3)		C-4, C-6	H-1,
4.10 dd (10.8 ; 3.3)		C-5, C-7	
2.88 m	--	C-6, C8	H-1,
4.42 dt (11.7 ; 4.0)		C7,C9,C10,C11	
2.84 brdd (13.4 ; 4.0) 2.00 brdd (13.4 ; 11.7).		--	H-15, H-3b,
-	--	--	
-	--	--	
-	--	--	
6.43 dd (2.8 ; 1.1) 6.14 dd (2.2 ; 1.1)		C-7, C-11	
1.76 d (0.7)		--	
1.51 s	--	C-3, C-4	

**III-III-I-4-Elucidation structurale du produit IV :**

Les spectres de masse obtenus après ionisation électrospray en mode positif et en mode négatif de l'échantillon IV présentent plusieurs signaux diagnostiques de la présence en solution d'un composé de masse molaire 184 Da.

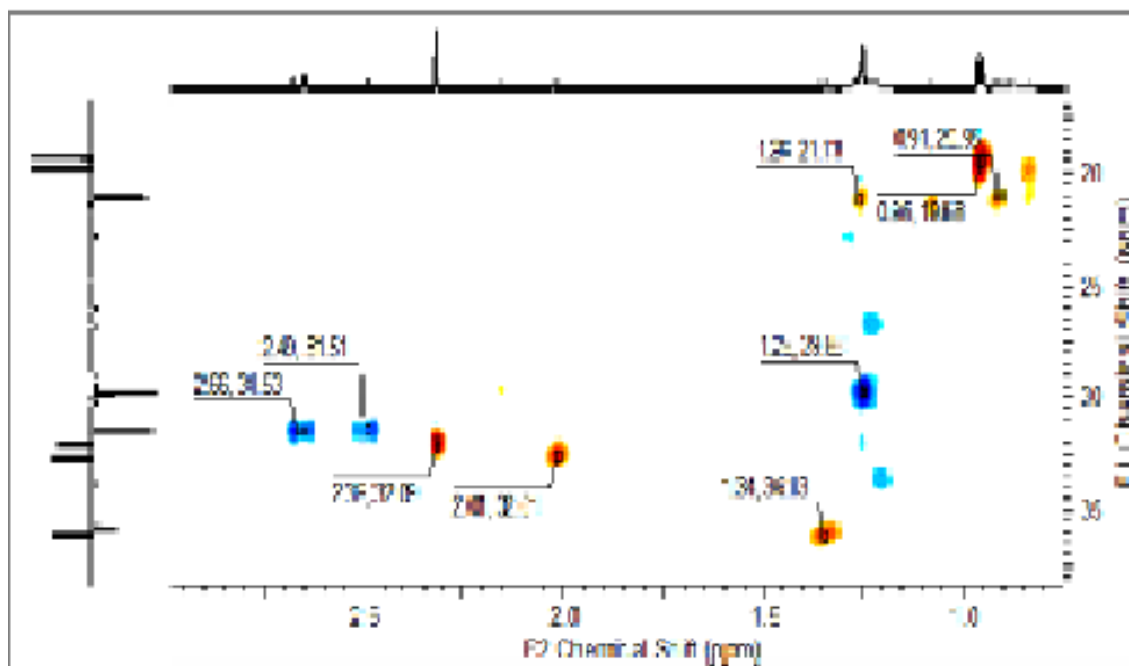
Le spectre deptQ 135 (spectre n° 20) et HSQC (spectre n° 21) montrent la présence des types de carbones suivants:

- Trois carbones primaires.
- Deux carbones secondaires de type  $sp^3$ , un d'entre eux résonne dans la région des champs forts l'autre est déplacé un peu vers la région des champs plus faibles.
- Deux carbones tertiaires.
- Trois carbones quaternaires, deux parmi eux sont de type carbonyle, le dernier étant hybridé  $sp^2$  résonne à 35.8 ppm.



**Spectre n° 20: deptQ 135 du composé IV.**



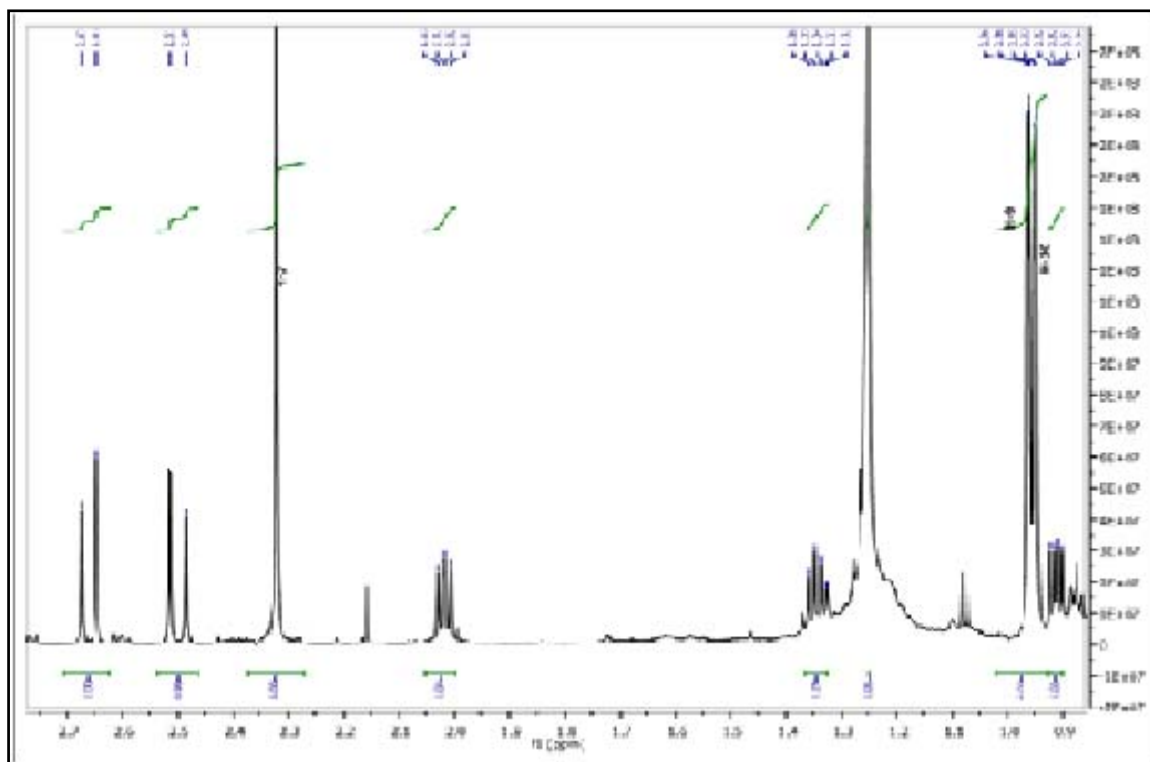


Spectre n° 21: RMN HSQC du composé IV.

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  (spectre n° 22) et HSQC (spectre n° 21) mettent en évidence la présence de :

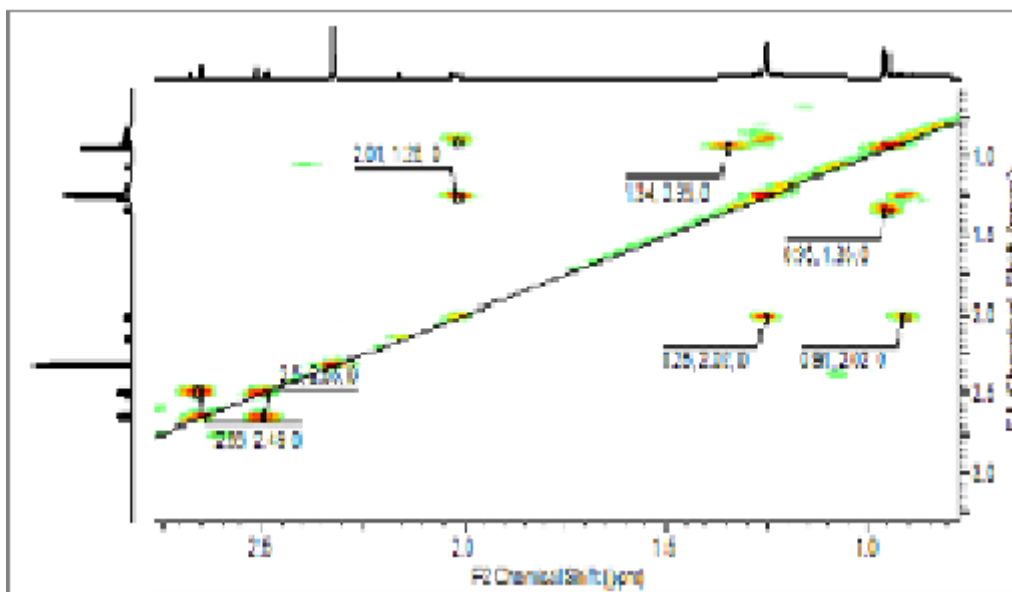
- Trois groupements méthyles, soit pour neuf protons.
- Deux groupements méthylènes hybridés  $\text{sp}^3$ , soit pour la somme de 4 protons.
- Deux groupements méthines de type  $\text{sp}^3$  faisant en tout deux protons.

On compte un proton supplémentaire, celui de l'acide ce qui fait un total de 16 protons.

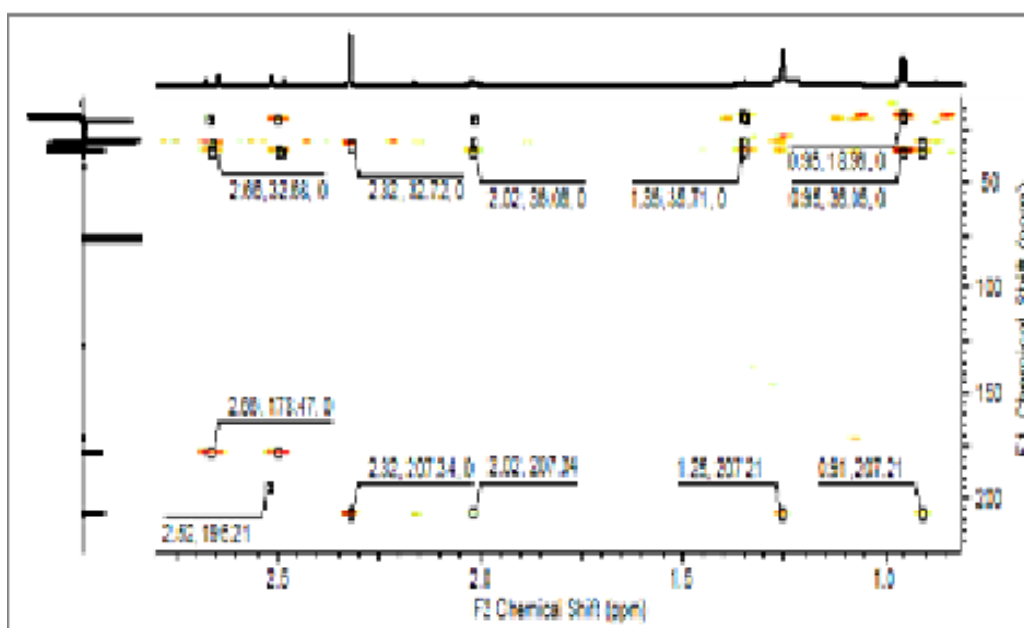


Spectre n° 22: RMN  $^1\text{H}$  du composé IV.

De ce fait, la masse obtenue pour ce composé est la somme des masses de (15C, 20H et 3O). La formule brute proposée est donc :  $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_3$  possédant 3 degrés d'insaturation dont deux sont attribuées aux deux fonctions (C=O). L'absence de signaux éthyléniques sur les spectres RMN  $^1\text{H}$  (n° 22) et dept 135 (n° 20) éloigne la possibilité d'une double liaison, donc le degré d'insaturation est celui d'un petit cycle soit à 4 chaînons ou à 3 chaînons.



Spectre 23 : RMN COSY du produit IV.



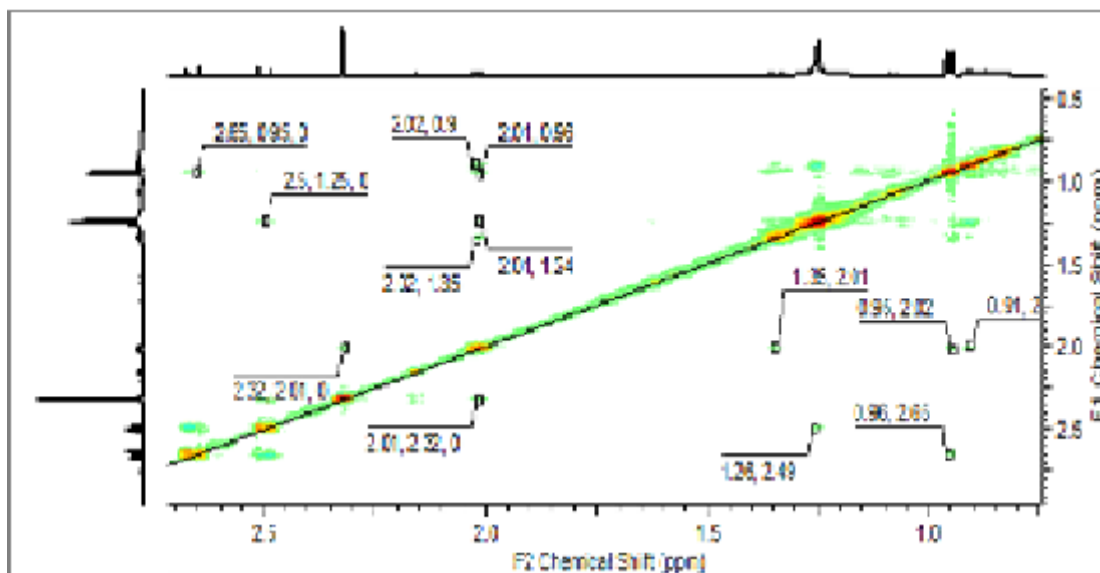
Spectre 24 : RMN HMBC du produit IV.

Le spectre COSY (n° 23) montre des corrélations entre le proton à (2.02, dd, 7.7, 5.5 Hz) et ceux portés par le même carbone à (1.26) et (0.91), indiquant ainsi leur voisinage direct (-CH-CH<sub>2</sub>). Alors que les corrélations observées sur le même spectre entre le proton à (1.33) avec d'un côté les protons du méthyle à (0.95ppm) et d'un autre avec ceux du méthyle à (0.96ppm) et inversement, représentent la présence d'un groupement isopropyle (-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) bloqué de rotation au niveau son méthine, confirmé par ses signaux caractéristiques sur le même spectre RMN <sup>1</sup>H.

Le spectre HMBC (n° 24) présente les corrélations des protons du dernier méthyle à (2.32, s) relativement déblindé avec les carbones à 207.5 ppm (C=O) et avec celui à 32.7 ppm, du premier fragment, ce qui conduit à la portion (-CH-CO-CH<sub>3</sub>).

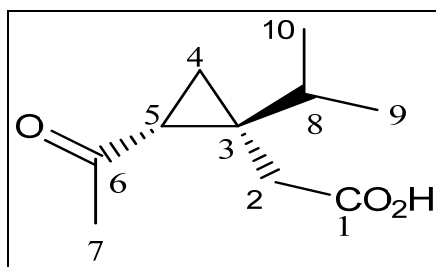
La corrélation de ces deux protons entre eux (spectre COSY n° 23) renseigne sur l'empêchement de rotation aussi autour de la liaison entre le carbone qui les porte avec son voisin à 35.8 ppm.

L'ensemble de ces constatations oriente vers la seule possibilité de formation d'un cycle à 3 chaînons entre le carbone quaternaire à 35.8 ppm porteur, d'une part, de l'isopropyle et d'autre part, le portion acide (-CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>H), avec les deux carbones du premier fragment (-CH-CH<sub>2</sub>). L'examen du spectre NOESY spectre (n° 25) a permis d'établir la stéréochimie des sites chiraux.



Spectre n° 25: RMN NOESY du produit IV.

Les données spectrales rassemblées pour ce composé orientent vers la structure ci-dessous, correspondant au Seco-thujène, déjà isolé de cette plante, [37,38].



**Tableau n° III-III-4 : valeurs des déplacements chimiques RMN <sup>1</sup>H et séquences : HSQC, COSY, HMBC et NOESY (600 MHz), RMN <sup>13</sup>C (150 MHz) du composé IV dans CDCl<sub>3</sub> à 300°K.**

$\delta^1\text{H}$ (ppm), multiplicité, $J$ (Hz)	COSY	HMBC	NOESY
--			
2.50 d (16.5)	H-2a	C-4,C-3,C-8,C-1	H-4b
2.66 d (16.5)	H-2b	C-9,C-5,C-3,C-1	H-4a
--			
0.91 dd (7.7, 4.4)	H-8, H-5	C-2,C-5,C-8,C-6	H-5,H-2
1.26 dd (6.6, 4.8)	H-5	C-10,C-9,C-6	H-2
2.02 dd (7.7, 5.5)	H-4b, H-4a	C-9,C-2,C-8,C-6	H-4a,H-4b,H-8,H-7
--			
2.32 s		C-5,C-6	H-5
1.33 spt (7.0)	H-4a,	C-9,C-10,C-2,C-3	H-5
0.96 d (6.6)			
0.95 d (7.0)			

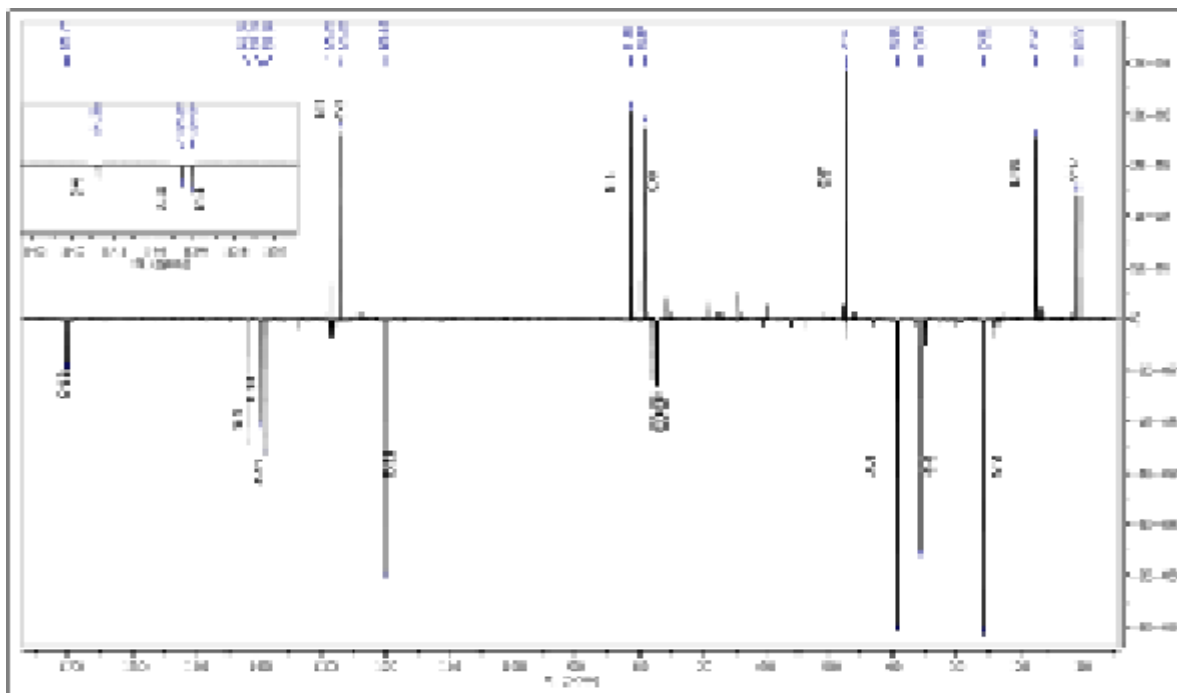
## III-III-I-5-Elucidation structurale du produit V:

L'examen du spectre infrarouge du produit V a révélé la présence d'une fonction hydroxyle à  $3427.1\text{ cm}^{-1}$ , des bandes à  $1757.3$ ,  $1140.8$ ,  $1060.3\text{ cm}^{-1}$  caractéristiques du groupement  $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -lactone, et les bandes à  $3030.5$ ,  $1662.8$  et  $867.6\text{ cm}^{-1}$  relatives à une double liaison disubstituée [234-237].

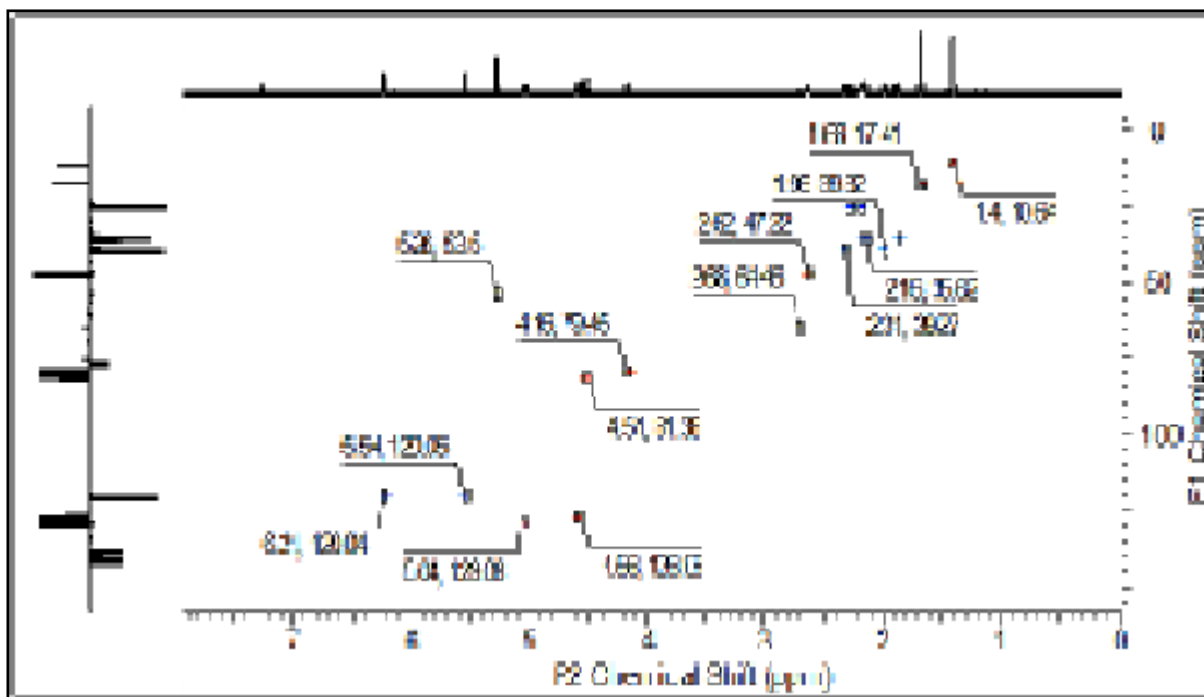
Par ailleurs, les spectres de masse obtenus après ionisation électrospray en mode positif et négatif de l'échantillon V présentent plusieurs signaux diagnostiques de la présence en solution d'un composé de masse molaire 248 Da,

Les spectres deptQ (spectre n° 26), et HSQC (spectre n° 27) révèlent clairement la présence de 15 carbones dont les types sont comme suit:

- Deux carbones primaires (Cp).
- Cinq carbones secondaires (Cs) dont deux sont éthyléniques, 2 autres oxygénés et un 5<sup>ème</sup>.
- Quatre méthylènes dont l'un est éthylénique.
- Quatre carbones quaternaires (Cq) dont l'un est de type carbonyle et les 3 autres de type ( $\text{sp}^2$ ).



Spectre n° 26: deptQ 135 du composé V.



Spectre n° 27: RMN HSQC du composé V.

Les spectres RMN du proton (spectre n° 28) et HSQC (spectre n° 27) nous oriente vers la présence de :

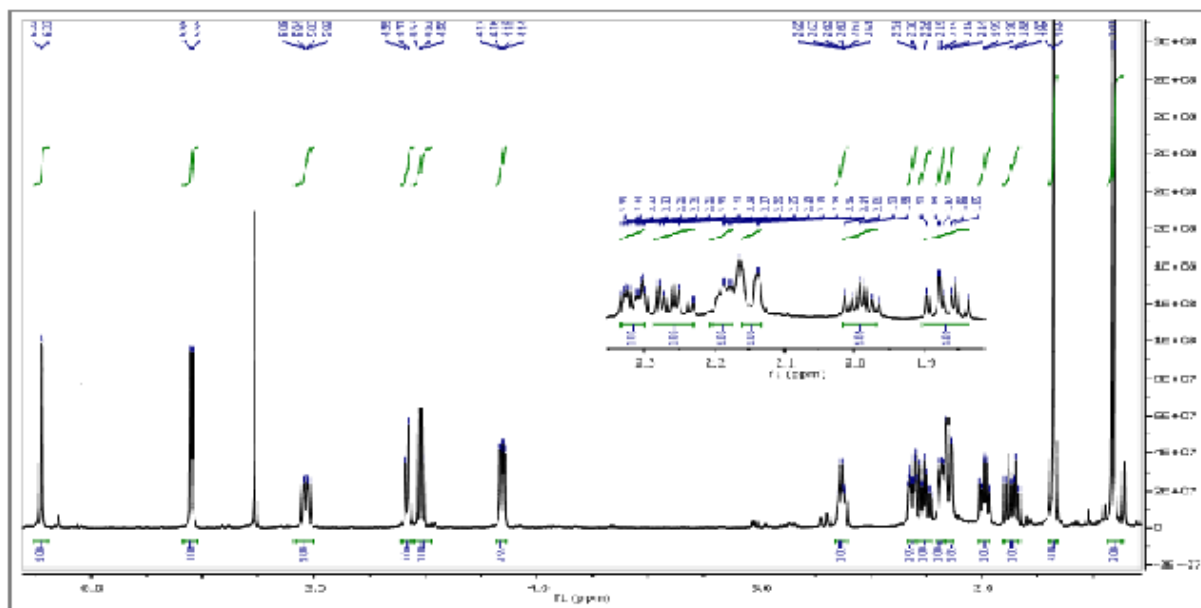
- 2 signaux intégrant chacun pour 3H, attribuables à deux méthyles.
- Les signaux des protons relatifs aux trois (CH<sub>2</sub>) saturés.
- Les signaux des protons du seul (CH<sub>2</sub>) éthyléniques, soit en tout 8 (H).

Concernant les méthines (CH), nous relevons :

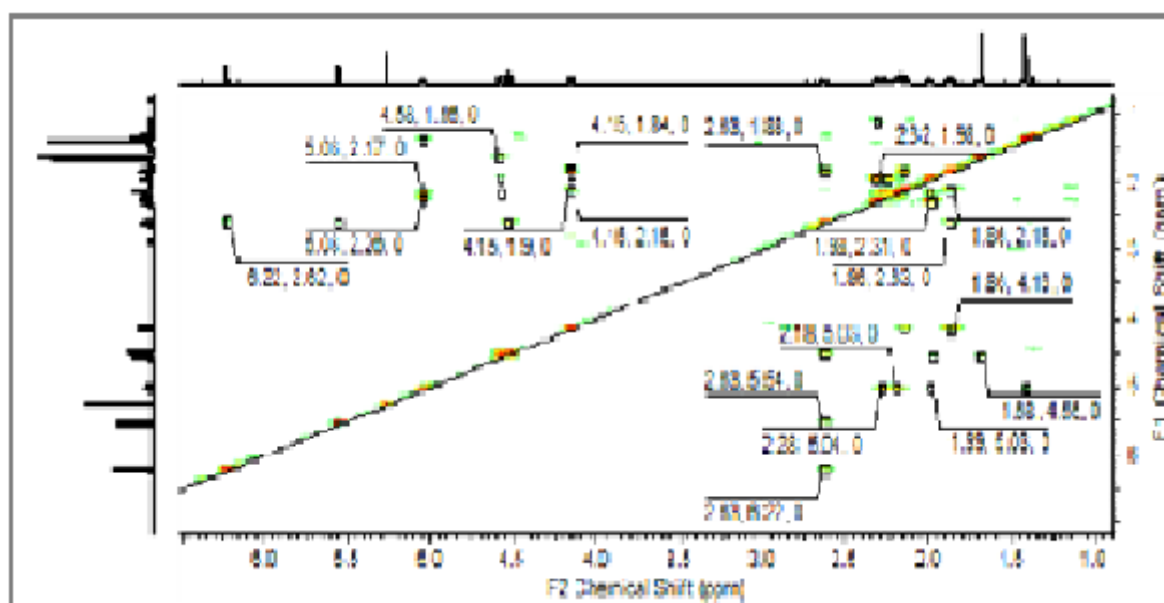
- Trois parmi eux sont saturés (sp<sup>3</sup>) dont deux sont oxygénés plus le proton du troisième.
- Les protons des deux méthines oléfiniques.

On dénombre en plus un proton du groupe (OH), ce qui nous fait un total de 20 protons enregistrés sur le tableau n° III-III-5.

Ceci nous laisse suggérer un nombre d'atomes d'oxygène égal à 3 (après soustraction de la masse de 15C et 20H). La formule brute proposée est donc : **C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>**.

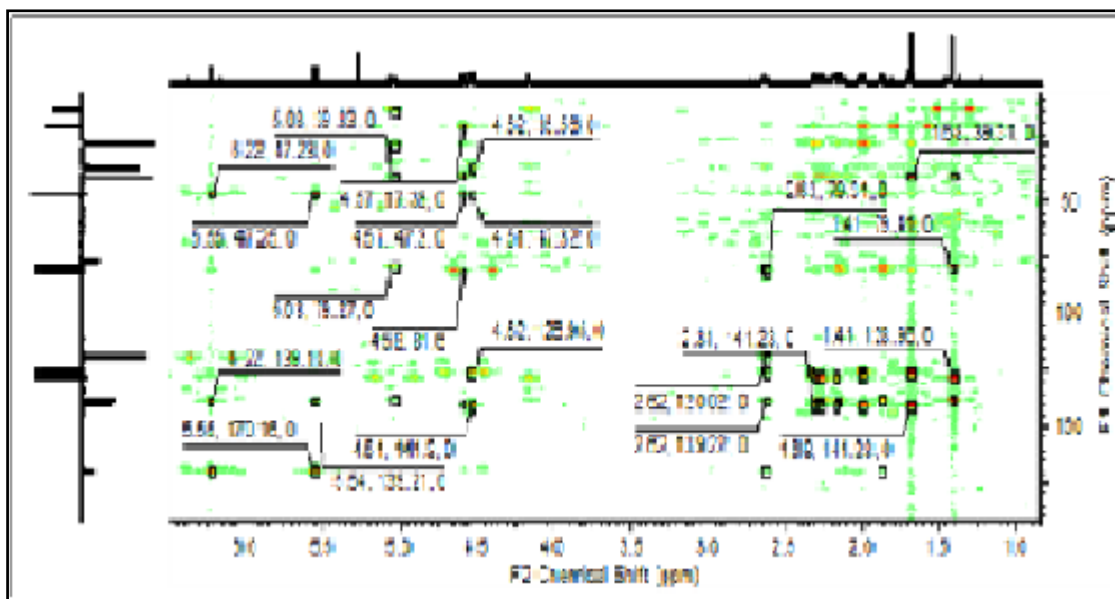
Spectre n° 28: RMN  $^1\text{H}$  du composé V.

A ce stade, nous pouvons déduire que le composé en question est de type lactone sesquiterpénique. Nous notons que ces composés sont caractéristiques pour les Asteraceae. D'après les informations spectrales que nous avons pu déduire, pour une formule brute  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_3$  le nombre d'insaturation est égale à 6, lorsque l'on enlève 3 pour les 3 doubles liaisons et une pour la fonction (C=O), il reste 2 degrés d'insaturation : un pour le cycle lactonique et celui qui reste ne peut présenter que la structure monocyclique.



Spectre 29 : RMN COSY du produit V.





**Spectre 30 : RMN HMBC du produit V.**

L'examen du spectre de corrélation COSY (spectre n° 29) prouve en plus des corrélations attendues vu le spectre HMBC (n° 30) que tous les noyaux de carbones sont attachés entre eux et il n'y a que ceux des deux méthyles et un éthylénique (=CH<sub>2</sub> exocyclique), ce qui exclue les probabilités de structure de xanthanolide et celle d'élemanolide.

Il reste le cycle d'un germacranolide qui est très fréquent dans les Asteraceae, notamment dans la tribu des Anthemideae.

Les corrélations H-H COSEY reportées sur le tableau n° III-III-5 ci-dessous, nous ont permis de positionner les divers protons sur le cycle à 10 chaînons et sur le cycle lactonique.

Pour confirmer l'identification, les données RMN <sup>1</sup>H, les données dept 135 et les corrélations longues distances HMBC ont été examinées et reportées sur le même tableau.

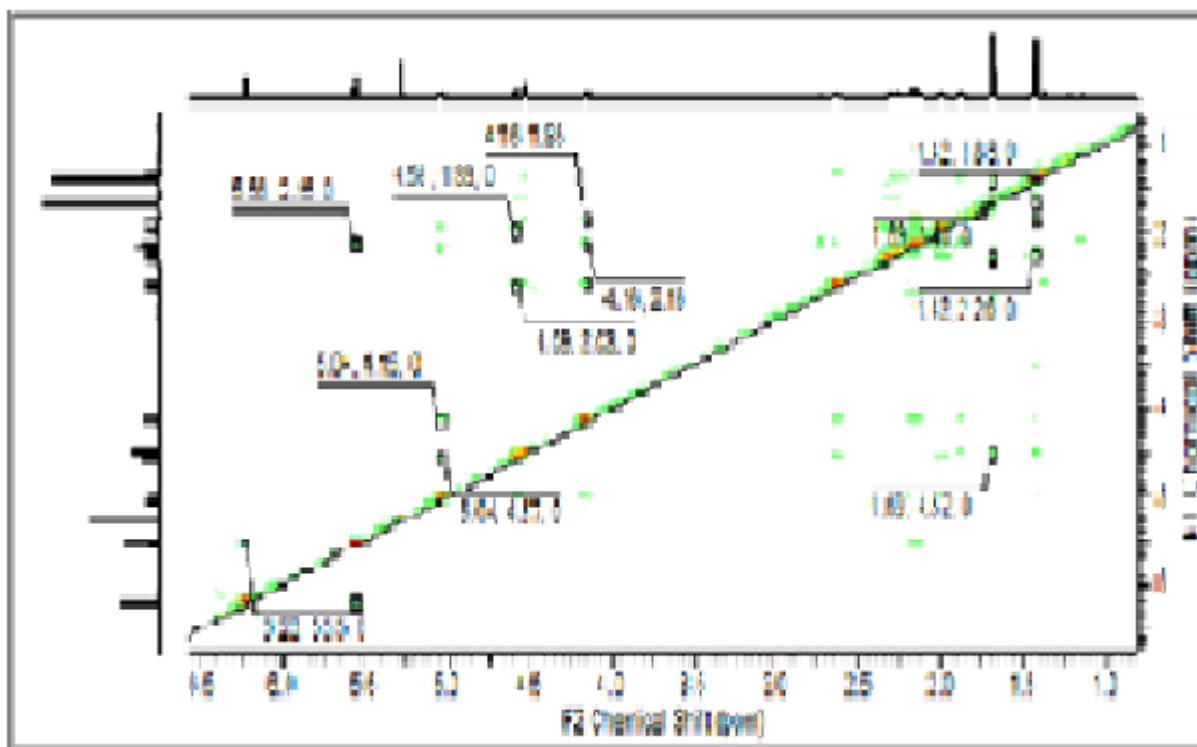
Les corrélations observées entre les signaux des protons oléfiniques à (6.22, d, 3.3Hz), et à (5.55, d, 3.3 Hz) avec le carbone éthylénique d'une part, d'autre part ces protons corrélient également avec le carbone du carbonyle, ce qui indique la position exocyclique de ce méthylène en position α sur le cycle lactonique, c'est l'exo α-méthylène-γ-lactone le fragment caractéristique de ce type de composés attaché à C-7.

D'après le spectre COSY (n° 29) et spectre HMBC (n° 30) le H à 2.63 ppm corrèle avec, d'une part, le proton à (4.58 ppm) et d'autre part, avec celui à (1.87 ppm). Le déblindage du premier (4.58 ppm), à cause de son voisinage avec un oxygène, indique que la fusion lactonique est faite sur son carbone à 81.5 ppm. Les constantes de couplage caractérisent la fermeture transannulaire, donc le composé est de type 6, 12-germacranolide.

Les corrélations observées sur le spectre COSY (n° 29) entre H-8 a et b avec le proton déblindé à 4.15 ppm, porté par le dernier carbone oxygéné, orientent vers le positionnement de l'hydroxyle sur le C-9.

Les trois protons du méthyle à 1.41 ppm corrélient, d'un côté, avec le C-9 et, de l'autre, avec les carbones (Cq) et (129.0ppm). Le proton à 5.04ppm corrèle avec le carbone du méthyle; ceci nous oriente vers la déduction qu'une des deux doubles liaisons est entre C-1 et C-10. Les corrélations H-H COSY supplémentaires de ce proton oléfinique avec deux protons (2.26, 2.19 ppm) portés par le même carbone et encore celles H-C longues distances (HMBC) le Me-14 sur le C-10.

Concernant la deuxième double liaison, elle est localisée entre C-4 et C-5 grâce aux corrélations HMBC observées sur le spectre n° 30, d'une part, celles entre les protons du méthyle à 1.66 ppm et les carbones éthyléniques et, d'autre part, celles entre le proton à 4.58 ppm avec le carbone du méthyle C-15. Les corrélations supplémentaires du proton éthylénique avec C-6, C-7 et aussi celles des protons méthyliques avec C-3 et C-2, positionnent ce méthyle (Me-15) sur le C-4.



### Spectre n° 31: RMN NOESY du produit V.

Les corrélations spatiales déduites du spectre NOESY n° 31 reportées sur le tableau n° III-III-5 montrent que les protons : H-9, H-8b, H-7, H-3b et H-2a ont une orientation  $\alpha$ .

Les données spectroscopiques rassemblées sur ce produit à la structure suivante :

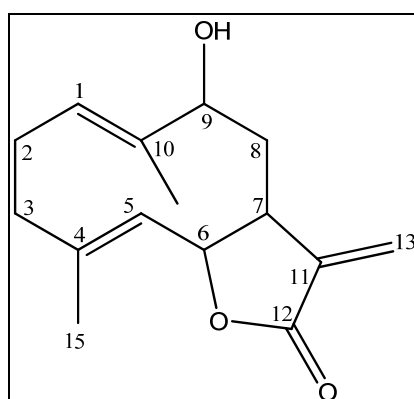


Tableau n° III-III-5 : valeurs des déplacements chimiques RMN <sup>1</sup>H et séquences : HSQC, COSY, HMBC et NOESY (600 MHz) RMN <sup>13</sup>C (150 MHz) dans CDCl<sub>3</sub> du composé V à 300° K.

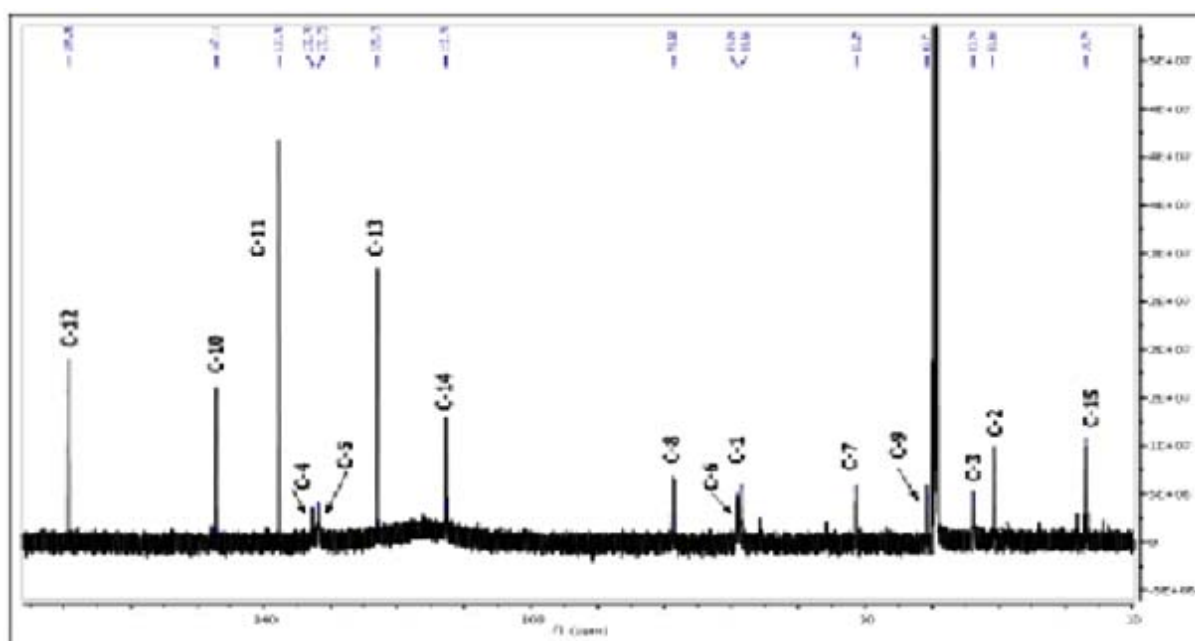
δ <sup>1</sup> H (ppm),multiplicite, J (Hz)	COSY	HMBC	NOESY
5.04 dd (11.7, 3.7)		C-9, C-3, C-10, C-14, C-2	H-9
2.25 td (12.5, 4.8) 2.19 m		C-1, C-4, C-10, C-3	H-14
2.31 ddd (11.7, 4.7, 2.6) 1.98 td (11.7, 5.5)		C-5, C-4, C-1, C2,C15 C-5, C-1, C-4, C2,C15	H-15
--	----	---	--
4.58 d (10.3)		C-3, C-7, C-6, C-4	
4.52 dd (9.5, 8.8)		C-8, C-7, C-5, C-4	
2.63 dtd (10.5, 8.8, 3.3, 1.5)		C-9, C-6, C-12, C-11	--
2.15 ddd (14.7, 2.6, 1.5) 1.87 dt (14.7, 10.5)		C-7, C-9, C-1, C-10 C11, C-10,C12,C9,C7	
4.15 dd (10.6, 2.6)		C14,C8,C1,C10,C7	
--	---	---	--
--	---	---	--
--	---	---	--
5.55 d (3.3) 6.22 d (3.3)		C-7, C-12, C-11, C-6 C-7, C-6, C-12, C-11	H13
1.41 s		C-3, C-9, C-1, C-10	
1.66 d (1.4)		C-3, C-5, C-4, C6,C2	H3, H6

**III-III-I-6-Elucidation structurale du composé VI :**

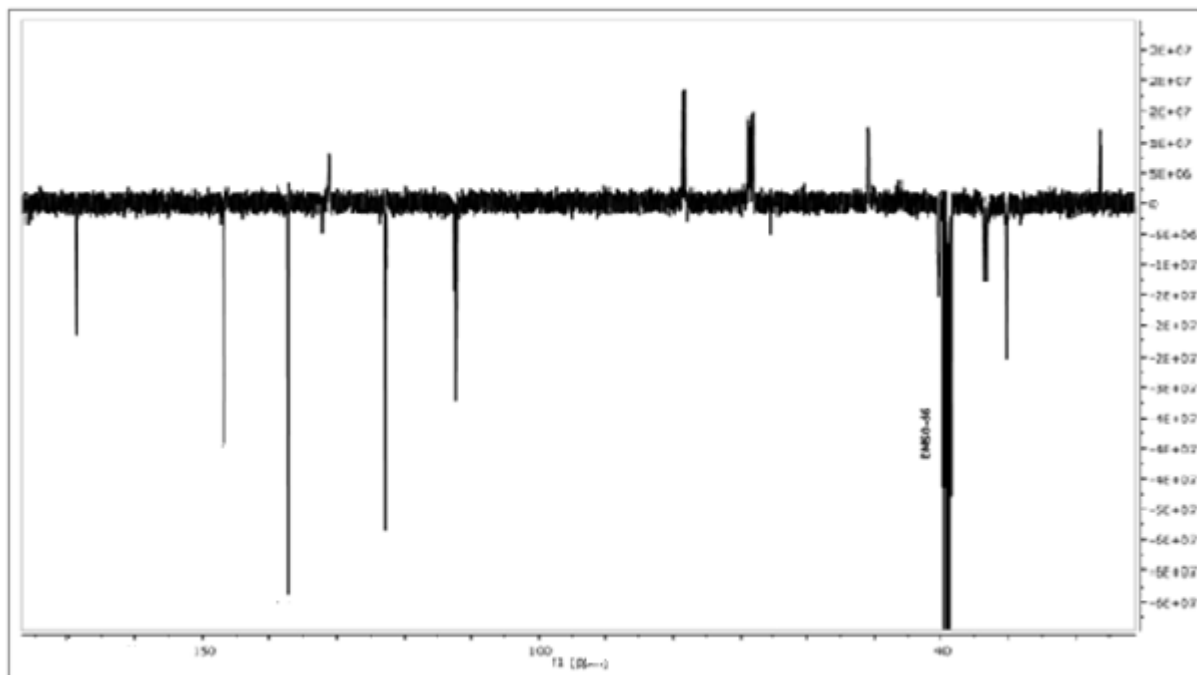
L'analyse par spectrométrie de masse de l'échantillon VI a produit un spectre de masse obtenu après ionisation électrospray en mode positif qui présente plusieurs signaux diagnostiques de la présence en solution d'un composé de masse molaire 264 Da:

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (spectre n° 32), dept 135 (spectre n° 33) et HSQC (spectre n° 34) met en évidence la présence de:

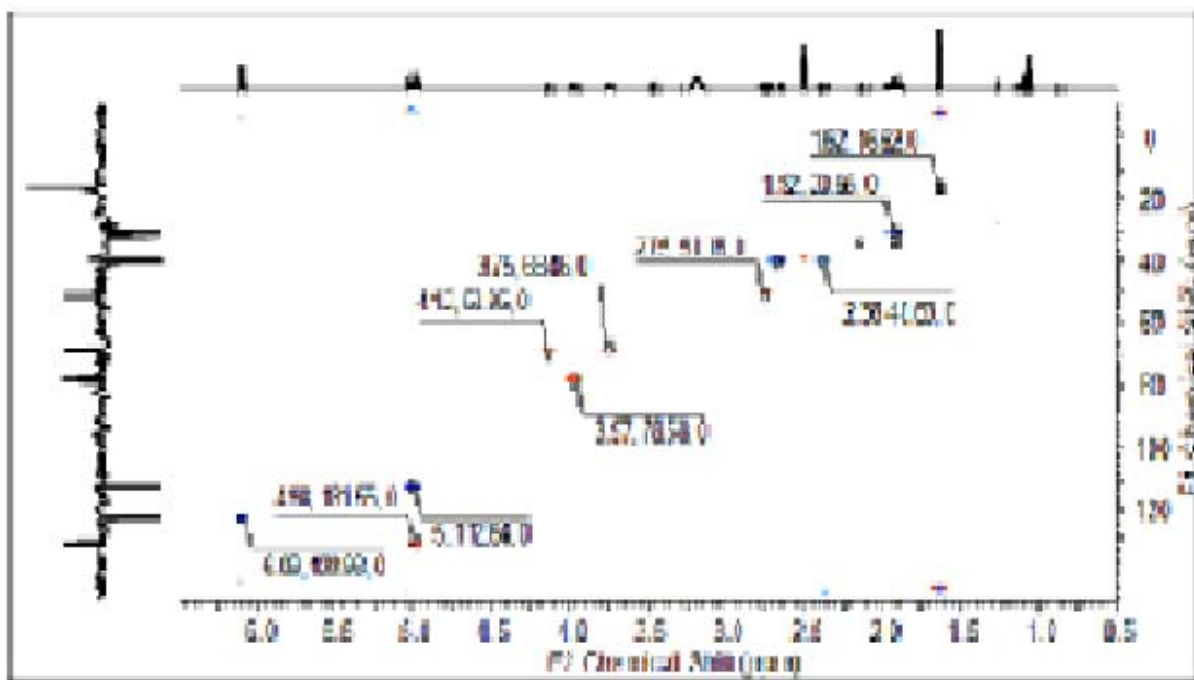
- Un carbone primaire dans la région des champs forts.
- Cinq carbones secondaires, deux éthyléniques et trois de type  $\text{sp}^3$ .
- Cinq carbones tertiaires dont un est éthylénique, trois de type  $\text{sp}^3$  liés à des oxygènes apparaissant dans la région des champs faibles, le carbone restant aussi de type  $\text{sp}^3$ .
- Quatre carbones quaternaires, trois parmi eux sont, le dernier étant de type carbonyle.



Spectre n° 32: RMN  $^{13}\text{C}$  du composé VI à 330°K.



Spectre n° 33: deptQ 135 du composé VI à 330°K.

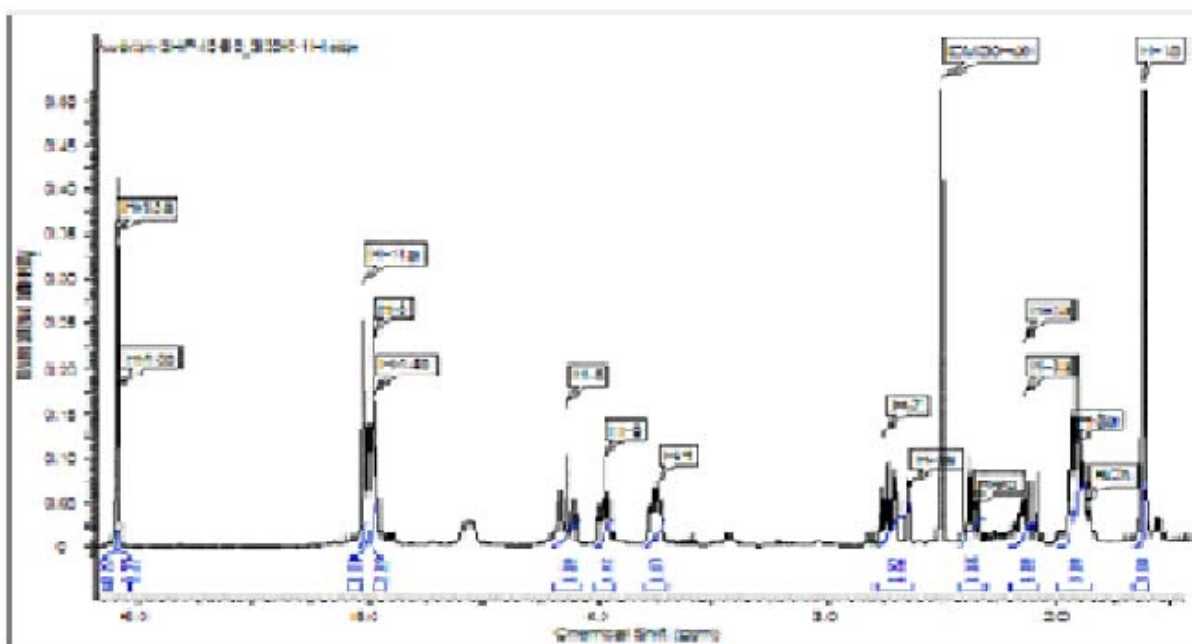


Spectre n° 34: RMN HSQC du composé VI à 330°k.

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  (spectre n°35) et HSQC (spectre n° 34) mettent en évidence la présence de :

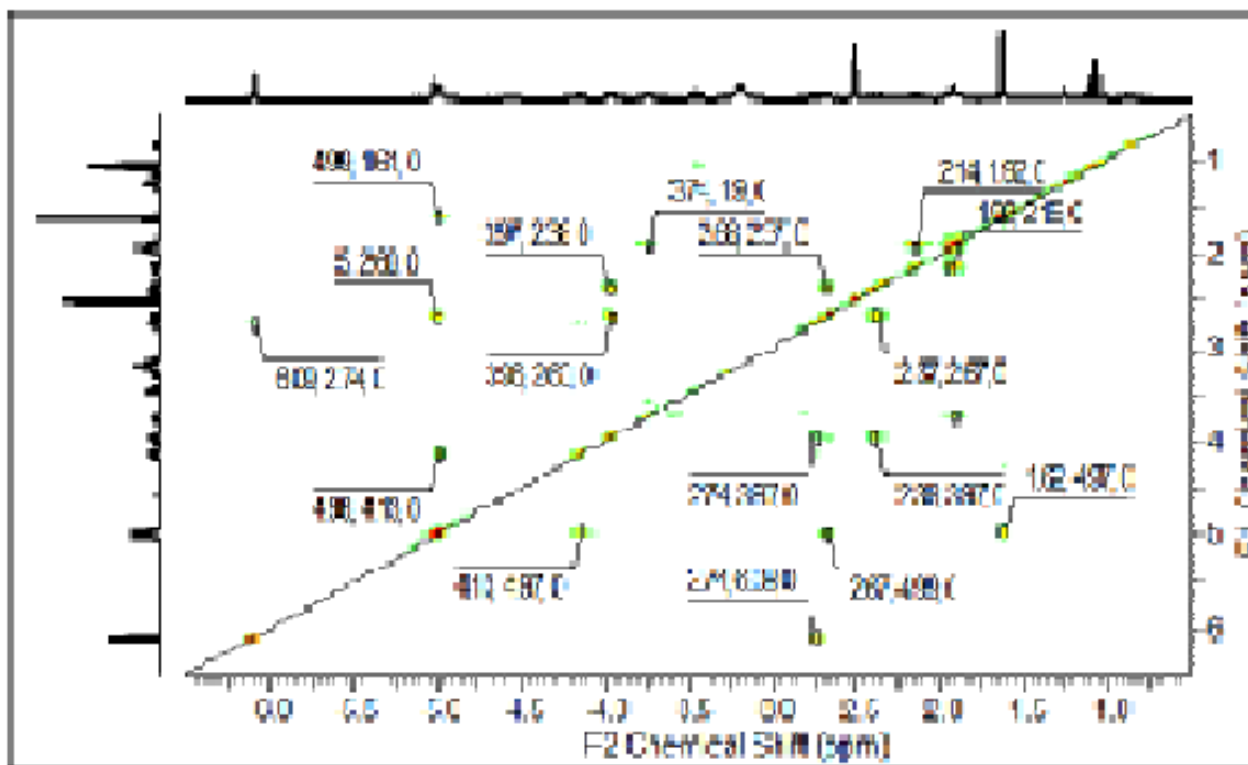
- Un groupement méthyle, soit trois protons.
- Cinq groupements méthylènes, trois d'entre eux hybridés  $\text{sp}^3$ , deux autres sont éthyléniques, soit pour la somme de 10 protons.
- Cinq groupements méthines dont un éthylénique, trois autres liées à des carbones oxygénés, le dernier. faisant en tout cinq protons.

On dénombre en plus deux protons des deux hydroxyles ce qui fait la somme de vingt protons (tableau n° III-III-6).

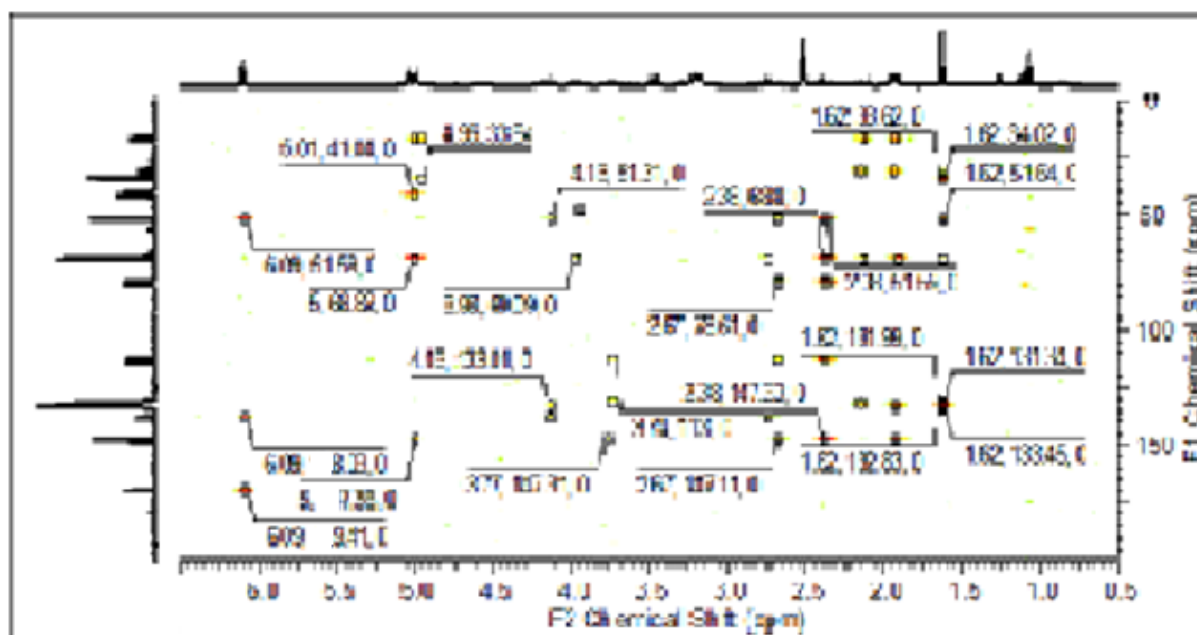


**Spectre n° 35: RMN  $^1\text{H}$  du composé VI à 330°k.**

En se basant sur les informations collectées, ce composé représente probablement la structure d'une lactone sesquiterpénique avec un degré d'insaturation égale à six, ce chiffre traduit les trois double liaisons déduites à partir des six carbones éthyléniques (spectres RMN  $^{13}\text{C}$ , deptQ 135, RMN  $^1\text{H}$ ), la liaison  $\text{C}=\text{O}$  lactonique, le cycle lactonique et enfin un cycle de la structure de base. Vu les déplacements et les constantes de couplages enregistrées sur le tableau n° III-III-6, le squelette le plus probable dans ce cas est celui du germacranolide.



Spectre n° 36: RMN COSY du produit VI à 330°k.



Spectre n° 37: RMN HMBC du produit VI à 330°k.

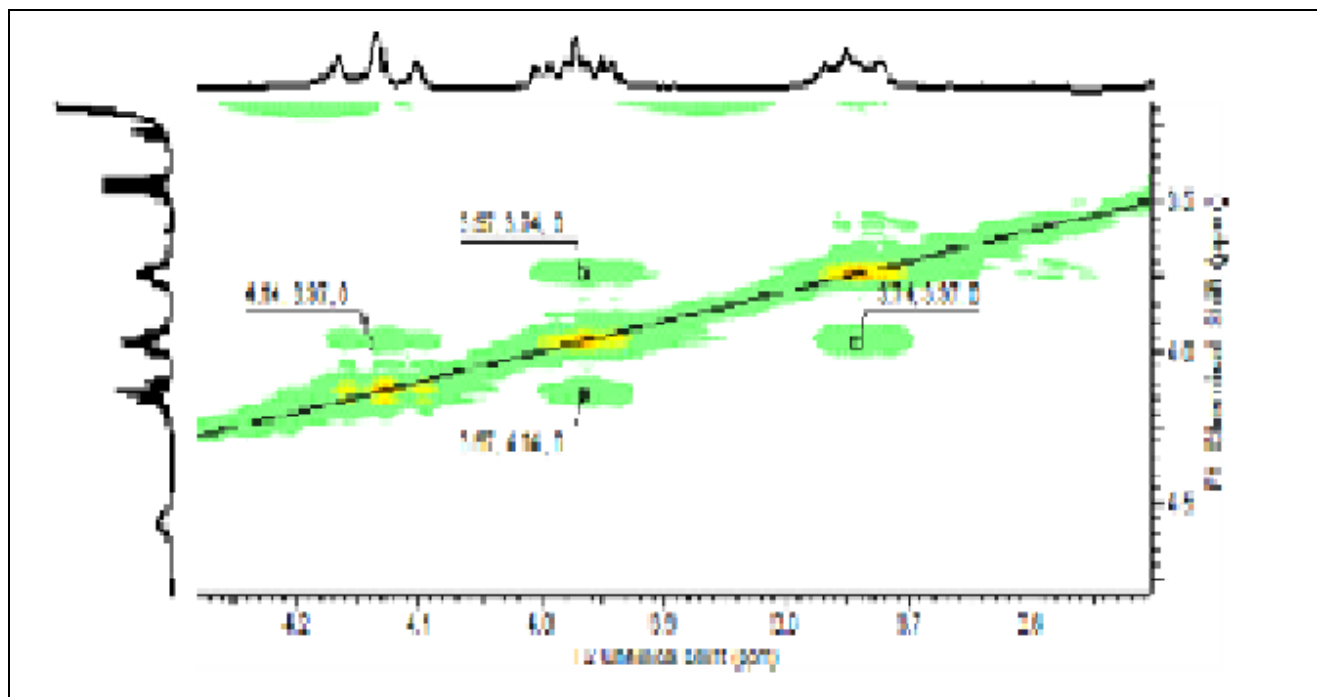


La présence du fragment caractéristique exo- $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -lactone est argumentée par la détection sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  (spectre n° 35) des signaux à 6.10 et à 6.09 ppm confirmé par les corrélations longues distances H-C (spectre HMBC n° 37) de ces deux protons avec les carbones.

Le proton porté par ce dernier carbone montre à son tour (spectre HMBC n° 37) des corrélations avec les carbones à 137.8 et 169.3 ppm; ceci confirme la position de la fonction lactonique sur le carbone (C-7), la fermeture du cycle lactone qui est faite sur le carbone (C-8) et non pas sur le carbone (C-6), est justifié par le déplacement du (C-8) vers des champs plus faibles, indiquant le voisinage de ce carbone à un atome d'oxygène.

Le spectre COSY n°36 montre que les deux protons éthyléniques corrélient avec les protons à 2.68 et à 2.38 ppm portés par le même carbone et celui de HMBC (n° 37) qui présente leurs corrélations, ce qui mène à déduire que la double liaison est exocyclique entre C10-C14.

Le proton à 4.13 ppm, qui corrèle, comme précédemment cité, avec H-7, présente des corrélations supplémentaires à son tour avec le proton du méthine et aussi avec les carbones de la double liaison, ce qui conduit à placer cette liaison entre C4-C5, et le méthyle en position 15.



Spectre n° 38: RMN NOESY du produit VI à 330°k.

Les quatre carbones asymétriques contenus dans la structure de ce composé sont: C-1, C-6, C-7 et C-8. Si on admet la position  $\alpha$  pour le H-7, le H-8 va être en position  $\beta$ , les corrélations NOESY (spectre n° 38) observées pour H-8 avec H-1 et H-6 orientent ces derniers vers la même position que lui et par conséquent, les hydroxyles vont être du côté  $\alpha$  du plan de la molécule.

L'ensemble des informations réunies pour ce produit oriente vers la structure :

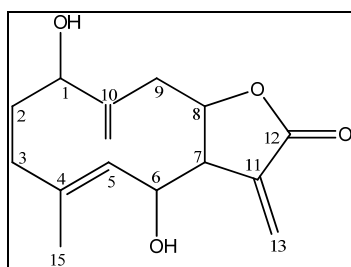


Tableau n° III-III-6: valeurs des déplacements chimiques RMN <sup>1</sup>H et séquences : HSQC, COSY, HMBC et NOESY (300MHz), RMN <sup>13</sup>C (75MHz) du composé VI dans le DMSO-d<sub>6</sub> à 330K.

δ <sup>1</sup> H (ppm), multiplicité, J (Hz)	COSY	HMBC	NOESY
3.75 ; brdd (8.6 ; 5.7)		C9,C14,C10	H-5,
2.15 ; m 1.90 ; m		C15,C 4 C15,C1,C10	-
2.14 ; m 1.93 ; m		C15,C 2,C 6,C1,C 4 C15,C2,C6,C1,C4	-
-			-
4.99 ; brd (9.9)			
4.13 ; brt (9.7)		C7,C4,C5,C11	H-13,
2.74 ; ddt (9.5 ; 6.8 ; 2.9)		C6,C11	
3.97 ; ddd (9.3 ; 6.8 ; 2.9)		C6	H-6,
2.68 ; ddd (13.9 ; 2.6 ; 1.8) 2.38 ; dd (13.9 ; 9.2)		C8,C7,C14,C10 C7,C1,C8,C14a,C10	-
-	-	-	-
-	-	-	-
-	-	-	-
6.10 ; m 6.09 ; m		C7,C11,C12	H-6
5.03 ; brqt (1.6) 4.98 ; brqt (1.6)		C9,C1,C10	-
1.62 ; d (1.1)		C2,C3,C6,C5,C4	-

**III-III-I-7-Elucidation structurale du composé VII :**

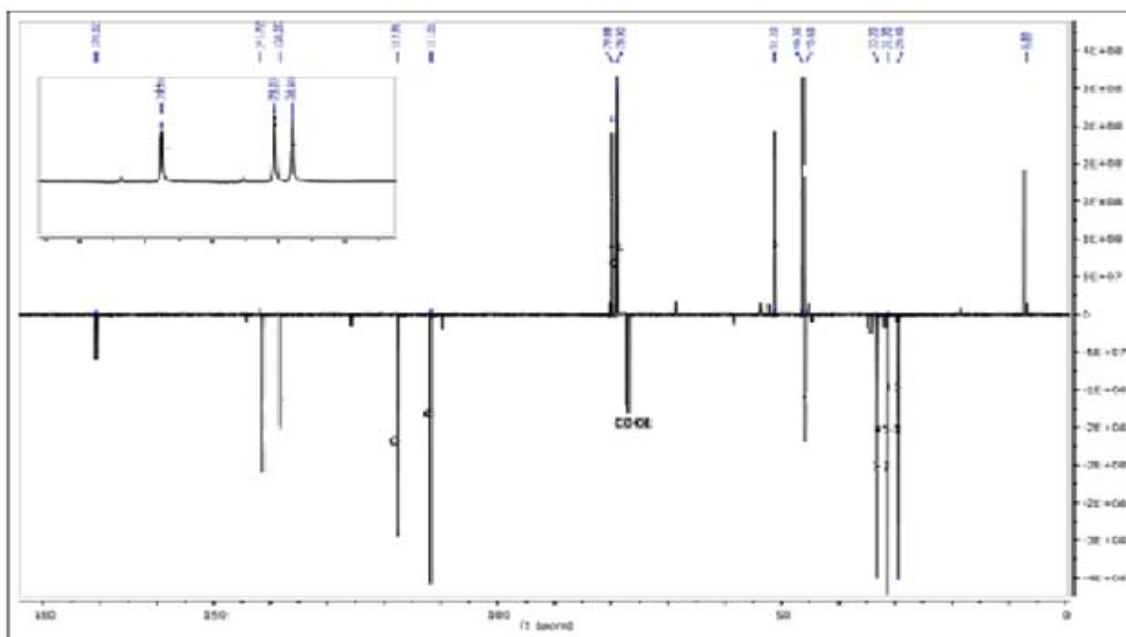
Le spectre IR enregistré pour ce produit a présenté les bandes suivantes: une à  $3346.0\text{ cm}^{-1}$  correspondant à un hydroxyle, d'autres à  $1762.3$ ,  $1177.3$  et  $1051.7\text{ cm}^{-1}$ , caractérisant le groupement ( $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -lactone). Tandis que, celles à  $1652.2$ ,  $816.5\text{ cm}^{-1}$  indiquent la présence d'insaturations (double bande exocyclique) [234-237].

Les spectres de masse obtenus après ionisation électrospray en mode positif et en mode négatif de l'échantillon VII ont présenté plusieurs signaux diagnostiques de la présence en solution d'un composé de masse molaire 264 Da:

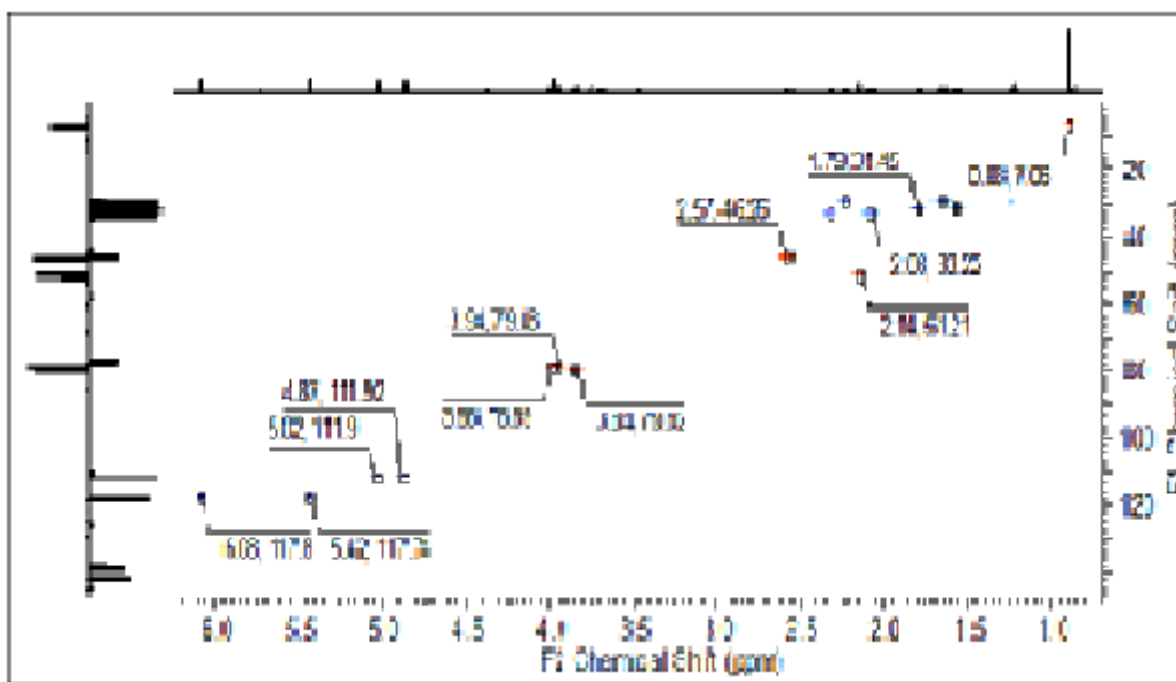
Les spectres deptQ 135 (n° 39) et HSQC (n° 40) révèlent la présence des types de carbones suivants:

- Un carbone primaire ( $sp^3$ ) dans la région des champs très forts.
- Cinq carbones secondaires dont deux sont éthyléniques, les trois autres sont de type  $sp^3$ .
- Cinq carbones tertiaires de type  $sp^3$ , trois parmi eux sont oxygénés, et les deux autres.
- Quatre carbones quaternaires dont deux de type éthylénique, un seul de type carbonyle et un dernier étant de type  $sp^3$ .

On compte 15 carbones pour ce produit.



Spectre n° 39: deptQ 135 du composé VII à 300°K.

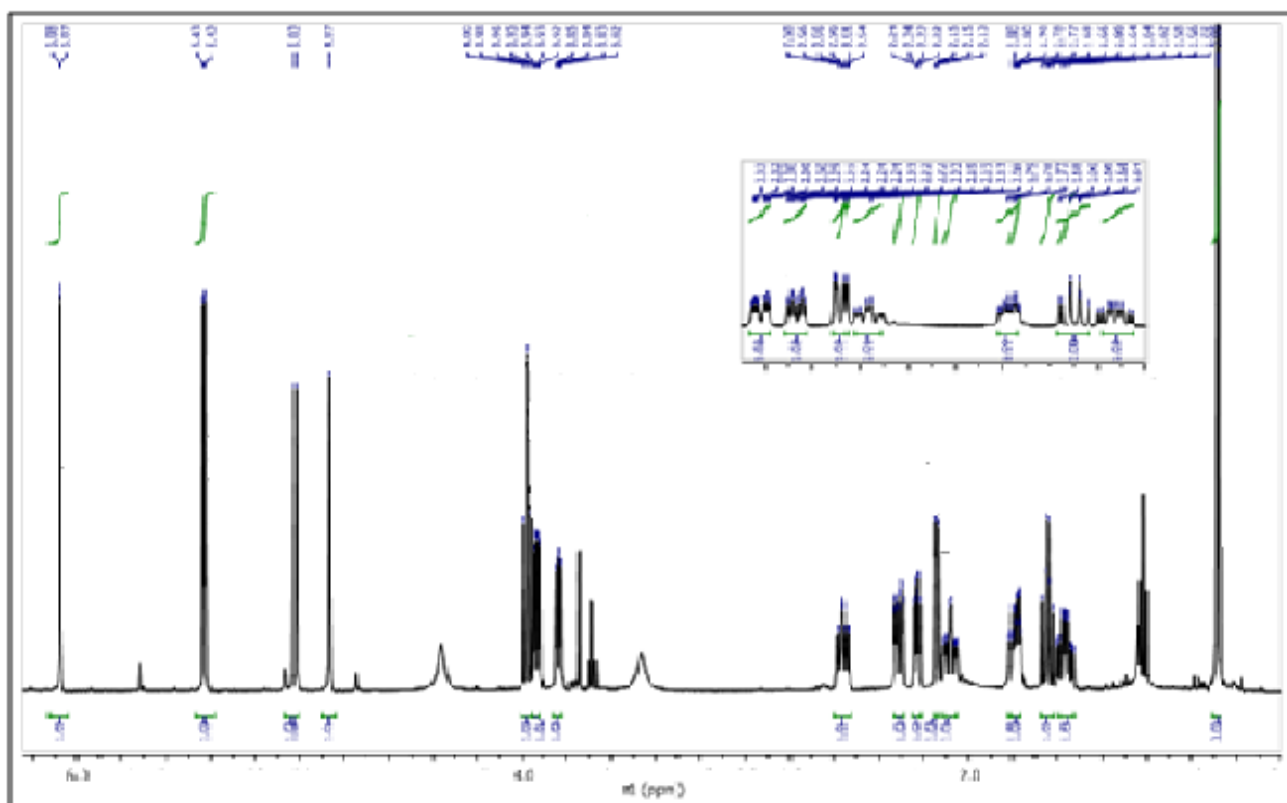


Spectre n° 40: RMN HSQC du composé VII.

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  (spectre n° 41) et HSQC (spectre n° 40) mettent en évidence la présence de :

- Un méthyle ( $\text{CH}_3$ ) soit trois protons.
- Cinq méthylènes ( $\text{CH}_2$ ), deux d'entre eux sont de type  $\text{sp}^2$  portés deux par deux par deux carbones, les trois autres sont saturés relativement blindés, soit dans l'ensemble 10 protons.
- Cinq méthines ( $\text{CH}$ ), trois oxygénés et deux autres. faisant en tout cinq protons.

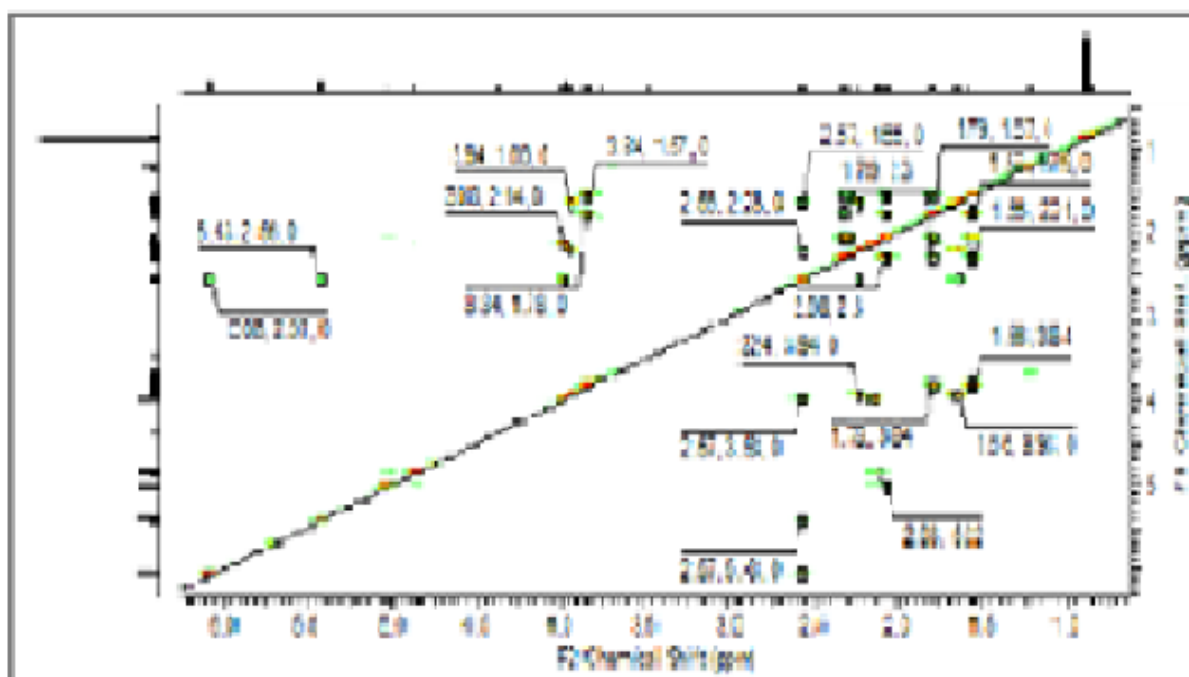
On compte en plus deux protons pour ceux des deux hydroxyles ce qui fait un totale de vingt protons. Leurs caractéristiques sont citées dans le tableau n° III-III-7.



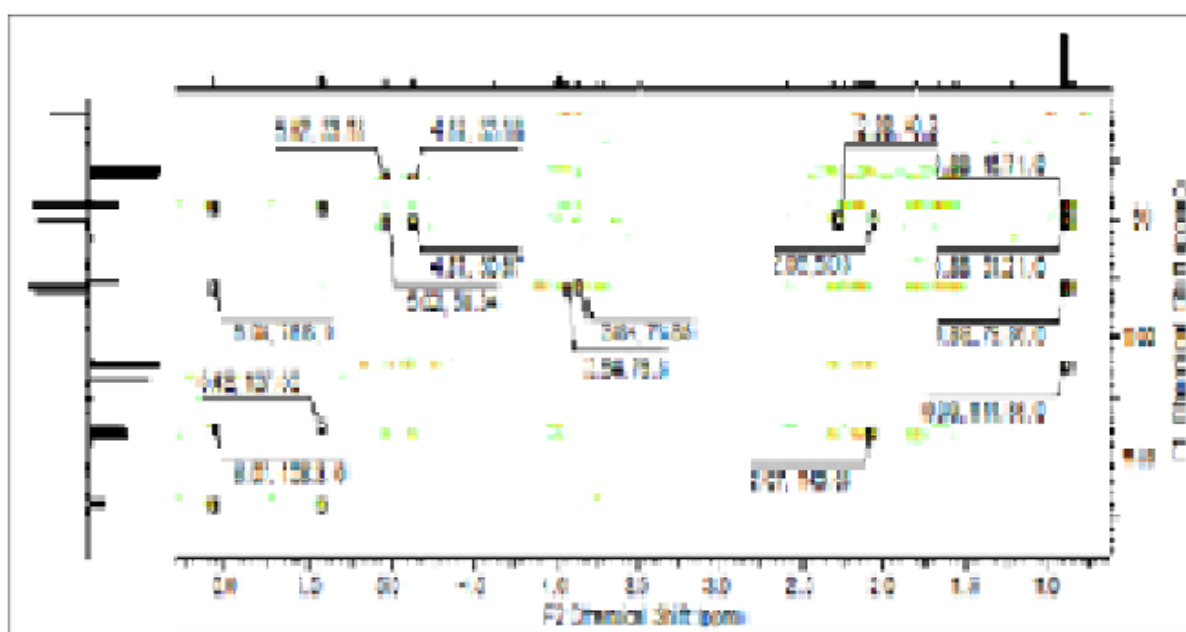
Spectre n° 41: RMN  $^1\text{H}$  du composé VII à 300°K.

En soustrayant de cette masse les 15 carbones et les 20 hydrogènes (dénombrés sur le tableau n° III-III-7), il reste la masse de quatre atomes d'oxygène ce qui conduit à la formule brute  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_4$  d'un sesquiterpène fonctionnalisé.

A ce stade on peut proposer la structure d'une lactone sesquiterpénique pour ce composé montrant un nombre d'insaturation équivalent à six, en enlevant de ce chiffre les insaturations déduites du spectre deptQ 135 et celui du RMN proton, c.à.d deux doubles liaisons, une fonction (C=O) en plus le cycle lactonique. Ceci converge vers une structure de base bicyclique, qui ne peut être que celle d'un eudesmanolide confirmé par le déplacement de son méthyle angulaire caractéristique égale à 0.88 ppm.



Spectre 42 : RMN COSY du produit VII.



Spectre 43 : RMN HMBC du produit VII.

Les données des expériences de corrélation  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (spectre n° 42), corrélation directe  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (spectre n° 40) et de corrélation indirecte  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC (spectre n° 42) permettent d'identifier les caractéristiques de ce squelette :

- Par analogie aux composés précédents, on a déduit que le C-7 est le porteur du fragment  $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -lactone.

Comme la fusion lactonique se fait, généralement, sur l'un des deux voisins du C-7, dans le cas de ce composé, la possibilité de fermeture est faite sur le carbone à 78.9 ppm et non pas sur celui à 29.5 ppm, son déplacement l'indique, (détectés à partir des corrélations observées sur les spectres ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC). Afin d'attribuer la position C-6 ou bien C-8 au carbone à 78.9 ppm, nous avons pu enregistrer les constatations suivantes:

- Le proton à 2.14 ppm présente lui aussi des corrélations avec celui à 3.98 ppm indiquant ainsi le voisinage directe de leurs carbones, mais ses corrélations avec les mêmes carbones quaternaires mènent à ce que ces deux carbones soient les voisins du carbone C-5.

Un autre résultat est dévoilé à partir de ces constatations ; il montre que le C-5 avec celui porteur du Méthyle angulaire constituent les têtes du pont entre les deux cycles de la structure de base, c.à.d (C-5 et C-10), cette déduction est confortée par les corrélations supplémentaires du H-5 avec le carbone du méthyle.

Ce qui permet de conclure que ce composé est de type 6,12- eudesmanolide. La valeur de  $J_{\text{H-6, H-7}} = 11.0$  Hz indique la transfusion lactonique.

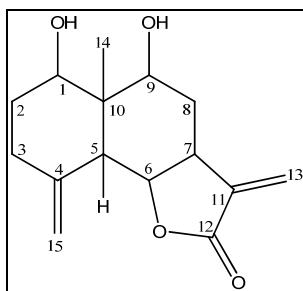


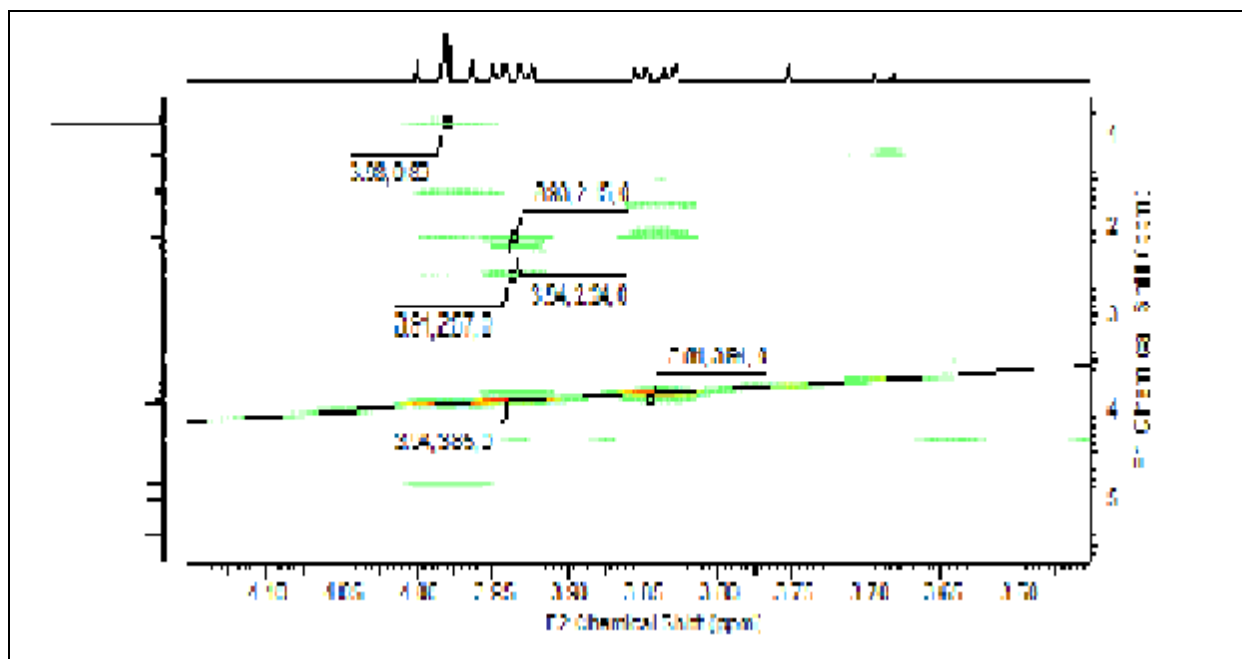
Par analogie, on peut confirmer la position exocyclique de la dernière double liaison entre le carbone quaternaire oléfinique porteur des deux protons à (5.02, 4.87 ppm) qui corrélient avec leurs deux voisins les plus proches (C-5) et à 33.3 ppm. Les couplages observés sur le spectre COSY (spectre n° 42) consolident ces conclusions, d'un côté entre le proton à 5.02 ppm et celui à 2.05 ppm et, d'un autre, entre le proton à 2.14 ppm et celui à 4.87 ppm.

- Deux carbones tertiaires portant les protons déblindés à 3.93 ppm et à 3.84 ppm indiquant la présence de deux fonctions alcooliques. Les corrélations H-H COSEY du proton à 3.93 ppm avec les deux H-8, positionnent le premier hydroxyle sur le C-9.

Les corrélations du proton à 2.05 ppm de la deuxième paire avec l'éthylénique à 5.02 ppm témoignent ce résultat et les corrélations H-C longues distances (reportées sur le tableau n° III-III-7) le confirment.

L'ensemble de ces informations conduit à la structure représentée ci-dessous, pour laquelle l'analyse NOESY spectre (n° 44) a déterminé les emplacements des substituants de ses centres chiraux.





Spectre n° 44: RMN NOESY du produit VII.

La structure du composé VII comporte six carbones asymétriques. Il s'agit de C1, C5, C6, C7 et C9, C10 ; admettant que le H-7 est position  $\alpha$ , sur le spectre NOESY n° 44 ce proton présente des corrélations avec les protons: H-9.

L'ensemble de ces constatations nous mène au produit représenté par la structure :

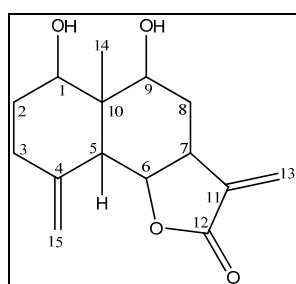


Tableau n° III-III-7 : valeurs des déplacements chimiques RMN <sup>1</sup>H et corrélations : HSQC, COSY, HMBC et NOESY (600 MHz) RMN <sup>13</sup>C (150MHz) du composé VII dans CDCl<sub>3</sub> à 300°K.

δ <sup>1</sup> H (ppm), multiplicité, J (Hz)	COSY	HMBC	NOESY
3.84 dd (11.4, 4.8)		C2,C10,C14,C5	H-9
1.78 dt (12.5, 5.0, 2.0)		C3,C10,C4, C1	
1.57 tdd (13.2, 11.7,5.1)		C-3, C-6, C-1	
2.31 ddd (13.9, 4.8, 2.2)		C-5, C-2, C-1	H-15b
2.08 brtd (13.8, 5.1)		C-1, C-2, C-5	
--	---		
2.14 brd (11.0)		C6,C1,C14,C10	
3.98 t (11.0)		C10,C7,C14,C8	H-14
2.56 tddd (11.0,3.7,3.3,2.9)		C-6, C-9, C-11	
2.23 ddd (12.8, 4.7, 3.7)		C10,C7,C5, C6	
1.65 td (12.5, 11.0)		C10,C7,C6,C9,C11	
3.93 dd (10.8, 4.6)		C-6, C-1	
--	---	---	---
--	---	---	---
--	---	---	---
5.42 d (3.3)		C-12, C-7, C-11	
6.07 d (2.9)		C12, C11,C6,C7	H-13a
0.88 s	---	C10, C5,C-6, C-1	
5.02 brs		C-3, C-5	H-3a,
4.87 brs		C-3, C-5	H-14,

# CHAPITRE IV

## Teneurs en polyphénols et activité antioxydante

---

## **Partie I : généralités**

### **IV-I-1-Introduction :**

Depuis plusieurs années, de nombreux travaux ont été consacrés à la recherche d'antioxydants naturels [246-248], non toxiques et puissantes, capables d'agir contre le processus d'oxydation *in vitro* et/ou *in vivo* et de remplacer les composés synthétiques, dont la sécurité est discutable [249-251].

Désormais, de nouvelles sources végétales sont recherchées et l'étude de l'activité antioxydante des plantes est devenue une sorte de mode ces dernières décennies [247, 248, 252].

En raison des changements socio-économiques et culturels des consommateurs et des industriels au cours du temps, le milieu scientifique a été bouleversé, celui-ci a donc souhaité approfondir cet axe de recherche.

Diverses spécialités scientifiques sont impliquées et les travaux de recherche ont été développés pour l'extraction, l'identification, la quantification et la valorisation de la potentialité bioactive des substances naturelles et/ou les extraits qui les contiennent [247, 248, 253-255].

Les composés phénoliques, en possédant une structure chimique idéale pour des activités anti-radicalaires, se sont avérés être plus antioxydants *in vitro* que les vitamines E et C [256].

La variation du nombre de groupes hydroxyles phénoliques et leur position, conduisent, d'un côté, à des catégories de polyphénols très diversifiées telles que : les acides phénoliques, les flavonoïdes, etc, et d'un autre, à une variation de leur capacité antioxydante. Etant des constituants de nos aliments (légumes, fruits, herbes et épices) [257-260], les polyphénols pourraient contribuer de manière significative à l'effet protecteur *in vivo* [261]. Dans ce contexte, des informations bibliographiques par rapport à ce type de composés ainsi qu'aux antioxydants seront présentées dans ce qui suit:

**IV-I-2-Catégories et structures des composés phénoliques :**

Structuralement, les composés phénoliques comprennent un noyau aromatique, qui possède au moins un substituant hydroxylé. Ce dernier conduit les composés phénoliques simples à se polymériser pour obtenir des phénols complexes ou polymérisés ; malgré la grande diversité structurale ce groupe est connu sous le nom : Polyphénols.

Les polyphénols constituent une famille de métabolites secondaires, largement répandue dans le règne végétal caractéristique de la famille des Asteraceae.

Les polyphénols sont classés principalement selon leur structure de base, en conséquence, deux catégories sont distinguées : les composés phénoliques simples et les phénoliques complexes [61]. Ces composés peuvent être groupés dans plusieurs classes comme le montre le tableau IV-I-1.

**Tableau IV-I-1 : quelques classes des polyphénols.**

Catégorie	Classe	Structure
Simple	Phénols simples	$C_6$
	Acide hydroxybenzoïque	$C_6-C_1$
	Acide hydroxycinnamique	$C_6-C_3$
	Flavonoides, isoflavonoides	$C_6-C_3-C_6$
	Lignanes, néolignanes	$(C_6-C_3)_2$
	Biflavonoides	$(C_6-C_3-C_6)_2$
Complexe	Tannins condensés	$(C_6-C_3-C_6)_n$

Les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins sont considérés parmi les principaux groupes des polyphénols [61, 256, 262, 263]. Quelques structures de ces groupes sont présentées à titre d'exemples :

**IV-I-2-1-Les acides phénoliques :**

Ils sont représentés par les hydroxybenzoïques et les hydroxycinnamiques.

**IV-I-2-1-1-Les acides hydroxybenzoïques :**

Ce sont les plus simples des composés polyphénoliques, leur structure de base est  $C_6-C_1$ . Ils sont présents dans les végétaux aussi bien sous forme libre que sous forme glycosylée.

La figure IV-I-1 représente quelques exemples :

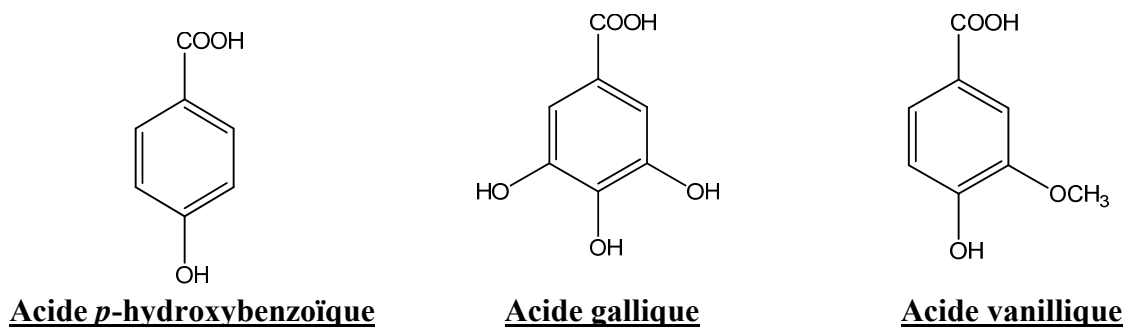


Figure IV-I-1: exemples de structure d'acides hydroxybenzoïques.

#### IV-I-2-1-2-Les acides hydroxycinnamiques :

Ces molécules possèdent un cycle aromatique avec 3 carbones en plus C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>. A titre d'exemple, nous citons : l'acide *p*-coumarique, l'acide caféique, l'acide férulique, et l'acide sinapique. Les structures des deux premiers sont représentées sur la figure IV-I-2.



Figure IV-I-2: exemples de structure d'acides hydroxycinnamiques.

#### IV-I-2-2-Les flavonoïdes :

Une catégorie très importante des composés polyphénoliques, dont la structure est à 15 atomes de carbones arrangés comme suit : C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (fig. IV-I-3).

Les substitutions varient au sein de la molécule et donnent les différentes sous classes des flavonoïdes, à savoir: Les flavonols, flavones, flavanones, isovlavones et autres [61, 256].

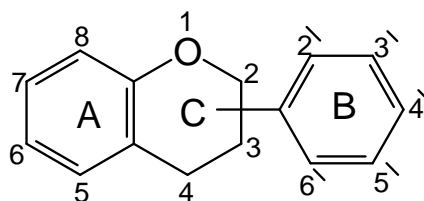


Figure IV-I-3 : structure de base des flavonoïdes.

## IV-I-2-3-Polyphénols complexes :

## Les tanins :

Ils représentent une classe très importante de polyphénols de plantes, ils ont certaines propriétés spécifiques telle que la précipitation des protéines, d'où leur capacité de tannage des peaux, structurellement, ils sont divisés en tanins hydrolysables et tanins condensés [18-21]. Un exemple de chaque groupe est représenté sur la figure IV-I-4.

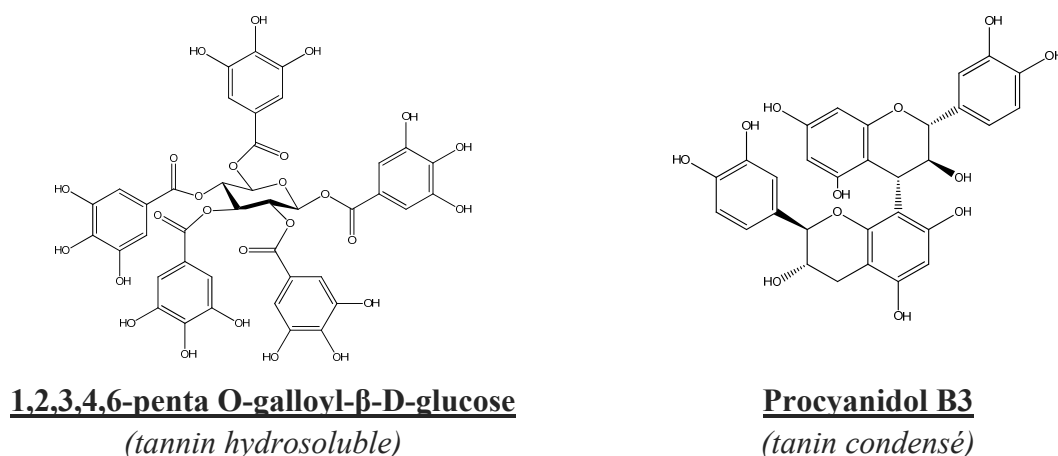


Figure IV-I-4 : exemples de structure des tanins.

## IV-I-3-Intérêts et propriétés biologiques des composés phénoliques :

Les polyphénols ont suscité l'intérêt scientifique depuis plusieurs décennies. D'abord, ils ont un rôle essentiel dans le métabolisme des végétaux. Leur rôle consiste à contrôler la croissance et le développement des plantes, en interagissant avec les hormones végétales spécialisées. Certains d'entre eux jouent le rôle de phytoalexines comme les isoflavonols qui permettent de lutter contre les infections causées par les champignons, ou par les bactéries.

Ensuite, ils sont impliqués dans plusieurs domaines de notre vie quotidienne, tels que : les industries agro-alimentaires, pharmaceutiques, cosmétologie etc.

Les polyphénols sont doués d'un large éventail d'activités biologiques. Ils constituent une importante famille d'antioxydants naturels [263-269].

Le tableau IV-I-2 ci-dessous regroupe quelques bioactivités attribuées aux polyphénols [270-273].



Tableau IV-I-2: activités biologiques de quelques composés phénoliques.

Composés phénoliques		Activité biologique
<b>phénols</b>	Eugénol	Antiseptique, analgésiques antioxydante
	Gingérol	
<b>Acide Phénols</b>	Acide cafeique	Antibactérienne
	Acide Salicylique	Antifongique, antioxydante.
<b>Flavonoïdes</b>	Lutéoline	Antitumorale, anti-inflammatoire, antioxydante, antiallergique, antiulcéreuse, antivirale, antimicrobienne, diurétique...
	Catéchine	
	Hespéridine	
	Quercétine	
	Naringénine	
<b>Tanins</b>	Tanin gallique	Effet stabilisant sur le collagène, antioxydante, antidiarrhéique, effet antiseptique,..
	Proanthocyanidine	

#### IV-I-4-L'activité antioxydante :

##### IV-I-4-1-Phénomène d'oxydation dans les aliments :

L'auto-oxydation (oxydation non enzymatique par O<sub>2</sub>) est l'un des principaux phénomènes de dégradation des lipides poly-insaturés présents dans divers produits alimentaires tels que les huiles végétales et leurs dérivés (margarines). La réaction se réalise par l'intermédiaire d'un mécanisme radicalaire, catalysé par la lumière, la chaleur et/ou des substances produisant des radicaux libres ; elle conduit à la formation de produits lipidiques oxydés (hydroperoxydes, aldéhydes, époxydes,..) toxiques. De plus, les interactions de ces derniers produits avec d'autres ingrédients alimentaires tels que les vitamines, protéines et autres lipides, détériorent les propriétés organoleptiques des aliments [274, 275].

L'addition d'antioxydants capables de réagir avec les radicaux hydroperoxydes lipidiques, aux préparations alimentaires, est l'une des méthodes suivies dans les industries agro-alimentaires pour empêcher les évolutions oxydatives des lipides [274-278].

**IV-I-4-2-Les espèces réactives oxygénées et le stress oxydant :**

Dans le cadre de nombreux phénomènes biologiques, des espèces radicalaires très instables et très réactives sont produites d'une manière continue au sein de notre organisme, par exemple, lors de la respiration cellulaire, l'oxygène moléculaire se transforme en diverses substances oxygénées, communément appelées espèces réactives oxygénées (Reactive Oxygen Species : ROS) ; même d'autres facteurs environnementaux (radiations : X, UV, pollution, tabagisme,..) participent à leur production. Ces entités chimiques sont susceptibles de participer à l'endommagement des molécules biologiques telles les lipides, l'ADN, ..

Dans certaines situations, la surproduction dépasse nos défenses antioxydantes (les enzymes spécialisées) et entraîne un déséquilibre entre la production et la destruction (neutralisation) de ces espèces. C'est le stress oxydant [279-281].

Pour établir l'équilibre à nouveau, l'approvisionnement en urgence d'antioxydants supplémentaires est très nécessaire. Cela peut se faire facilement par une alimentation très riche en ces substances (polyphénols, vitamines,..).

**IV-I-4-3-Classification des antioxydants [274,282] :**

Une des classifications adoptées pour les antioxydants est celle basée sur leur mode d'action. En effet, les antioxydants peuvent agir à deux stades:

- Stade de formation des radicaux libres, cette action est préventive car ces substances vont diminuer la vitesse d'initiation d'oxydation, ils ne transforment pas les radicaux libres en structures plus stables. On trouvera différentes classes de molécules comme les agents chélateurs de métaux pro-oxydant, des piègeurs de la molécule d'oxygène, inhibiteurs des enzymes pro-oxydative ainsi que des enzymes antioxydantes et destructives des hydroperoxydes. Les antioxydants de cette classe sont nommés secondaires ou bien type II.
- Stade de propagation des radicaux libres : ce sont des antioxydants du type I, ayant la capacité de neutraliser les radicaux libres déjà formés. Ils sont désignés aussi antioxydants primaires. Généralement, ce sont des composés phénoliques (AH) capables de donner un atome d'hydrogène au radical libre et de le convertir en un composé stable non radicalaire.

## IV-I-4-4-Mécanismes de l'activité antioxydante des polyphénols :

Les polyphénols contribuent à l'inhibition des entités réactives oxygénées ROS, à travers plusieurs modes d'action. Dans notre étude nous allons nous limiter à présenter deux parmi eux :

## IV-I-4-4-1-Piégeage des radicaux libres :

Les antioxydants de type phénolique réagissent selon un mécanisme radicalaire [par Sherwin]. A cause de leur faible potentiel redox  $E = 0.56-0.7$  V, les polyphénols Ar-OH cèdent formellement un radical hydrogène au profit des radicaux libres tels que les peroxydes, hydroperoxyl et les piègent ainsi [282, 283].

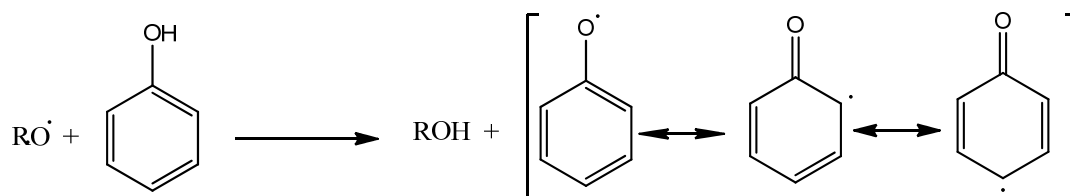


Figure IV-I-5 : mécanisme d'action des antioxydants phénoliques [282].

Le radical phénoxy produit est stabilisé par résonance. Comme il peut, dans certains cas réagir avec un autre radical pour former une *ortho*-quinone plus stable.

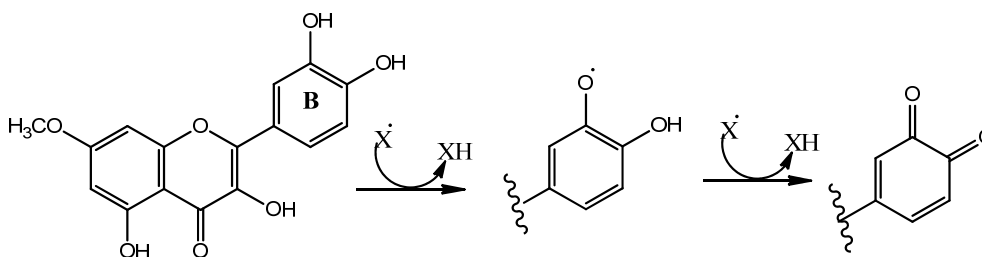
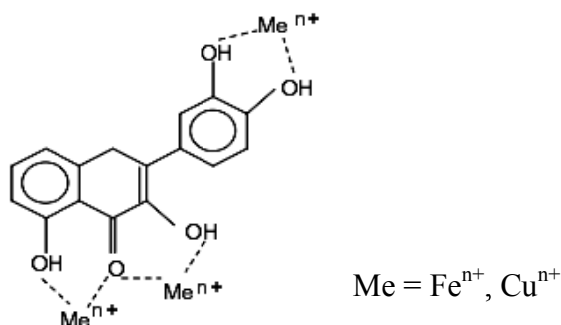


Figure IV-I-6 : piégeage des radicaux libres par le noyau B [283].

**IV-I-4-4-2-Chélation des ions métalliques :**

La présence de certains ions métalliques tels que ceux du fer et du cuivre, est indispensable pour de nombreuses fonctions physiologiques dans nos organisme. Cependant, leur auto-oxydation favorise la formation des espèces réactives oxygénées, comme ils peuvent donner naissance à des radicaux hydroxyles très réactifs par réduction de  $H_2O_2$  (réaction de Fenton) [284].

Les polyphénols et, plus particulièrement, les flavonoïdes sont considérés comme de bons chélateurs de ces ions. Leur structure est favorable pour la formation de complexes métalliques stables, au niveau de leurs sites appropriés [285, 286]. A titre exemple le cas de la quercétine est représenté ci-dessous (figure IV-I-7).



**Figure IV-I-7 : sites de chélation des flavonoïdes.**

Globalement, plusieurs facteurs peuvent intervenir pour déterminer l'efficacité d'un antioxydant tels que : le potentiel redox, les éléments structuraux (nature, nombre et positions des substituants), le pH du milieu, la vitesse de réduction, ...[287, 288].

## Partie II : méthodes et matériels

### IV-II-1-Matériel végétal utilisé

Le matériel végétal des deux plantes a été préparé comme préalablement cité dans le chapitre II, plus une quantité supplémentaire de *Matricaria pubescens* (Desf.) qui a été broyée à l'aide d'un broyeur mécanique ; les poudres végétales ainsi obtenues ont servi pour la préparation des différents extraits.

### IV-II-2-Préparation des extraits :

Cette étape consiste à préparer différents extraits, en utilisant une variété de solvants organiques, seuls ou mélangés avec de l'eau. Les extraits utilisés dans cette partie de notre travail sont préparés selon les méthodes citées ci-dessous.

A partir de la plante *Matricaria pubescens* (Desf.) :

- a- **Extrait I** : macération de la poudre végétale dans une solution hydroalcoolique (méthanol/eau) à chaud. Cette opération a été répétée trois fois.
- b- **Extrait II** : préparation d'un extrait méthanolique pareil à celui décrit dans (a), suivie d'une extraction liquide-liquide au moyen de l'acétate d'éthyle.
- c- **Extrait III** : extraction liquide-liquide par le n-Butanol de la phase aqueuse restante de (b).
- d- **Extrait IV** : macération du matériel végétal broyé dans le mélange acétone/eau [289].
- e- **Extrait V** : macération de la poudre végétale dans de l'eau chaude durant 1h.
- f- **Extrait VI** : préparé selon la méthode suivie dans (chapitre III : partie II).
- g- **Extrait VII** : (HEM) déjà préparé dans (chapitre II : partie II).

A partir de la plante *Brocchia cinerea* (Vis.) :

- h- **Extrait VIII** : extrait méthanolique préparé selon la méthode suivie dans (a).
- i- **Extrait IX** : extrait préparé dans (chapitre III partie II).
- j- **Extrait X** : (HE1) déjà préparé dans (chapitre II : partie II).

Comme certaines de ces méthodes sont exposées dans les chapitres précédents, nous allons nous limiter à détailler seulement les autres protocoles dont les étapes suivies sont résumées sur les figures IV-II-1 et IV-II-2:

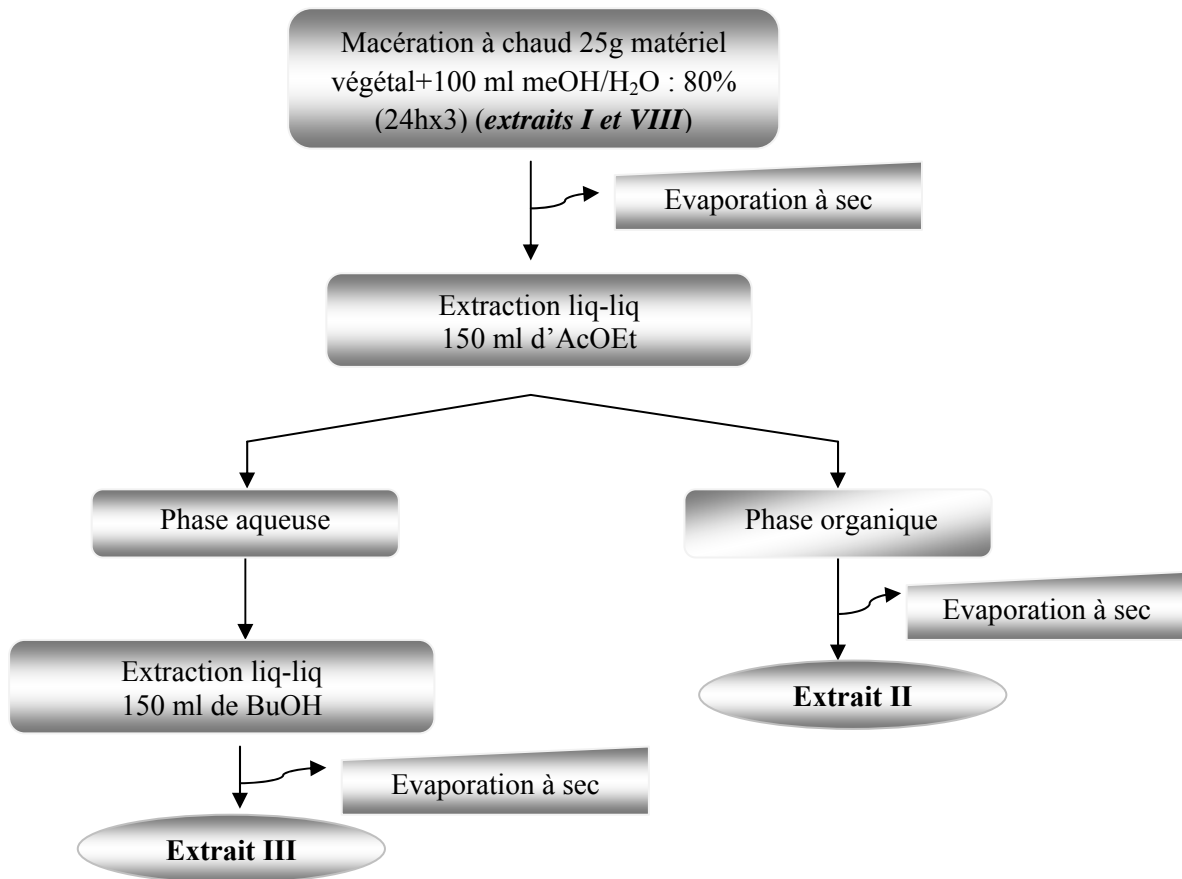


Figure IV-II-1 : protocole d'extraction des extraits (I, II, III et VIII).

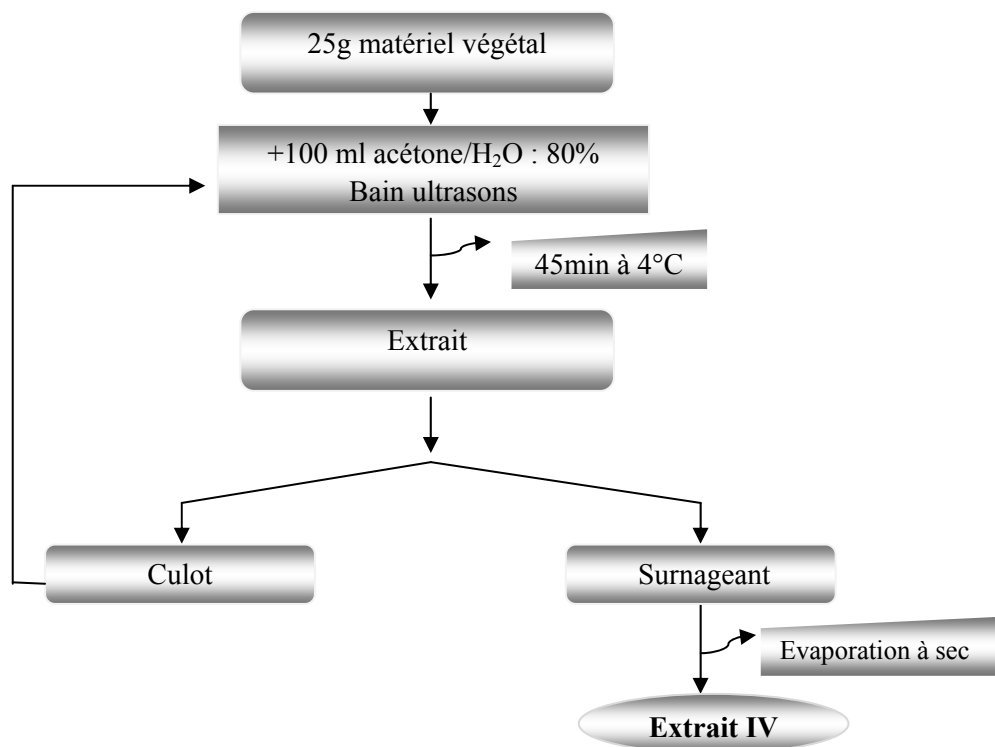


Figure IV-II-2 : protocole d'extraction de l'extrait IV.

#### IV-II-3-Evaluation de l'efficacité des antioxydants :

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, avec des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, il n'y a pas une méthode universelle par laquelle l'activité antioxydante peut être mesurée quantitativement d'une façon bien précise. Le plus souvent, il faut combiner les réponses de tests différents et complémentaires pour avoir une indication sur la capacité antioxydante d'un échantillon.

Dans l'étude présente, deux méthodes ont été utilisées pour estimer l'activité antioxydante des extraits préparés. La première consiste à quantifier le contenu phénolique et flavonique des extraits, antérieurement décrits, en utilisant le réactif Folin-Ciocalteu. Alors que la deuxième mesure le pouvoir des extraits testés, à inhiber les radicaux libres en utilisant le radical stable (2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyl) couramment appelé le radical DPPH<sup>•</sup>. Le test est largement utilisé au niveau des extraits hydrophiles très riches en composés phénoliques [290,291].

**IV-II-3-1-Dosage des polyphénols totaux :**

Les teneurs des végétaux en polyphénols sont extrêmement variables d'une espèce à une autre. Plusieurs méthodes analytiques peuvent être utilisées pour la quantification des polyphénols totaux. L'estimation de ces métabolites secondaires par le réactif Folin–Ciocalteu est la plus répandue [292, 293].

**IV-II-3-1-1-Principe :**

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué par une méthode adaptée par Singleton et Ross (en 1965) avec le réactif de Folin–Ciocalteu [289-295]. Le réactif est formé d'acide phosphotungestique  $H_3PW_{12}O_{40}$  et d'acide phosphomolybdique  $H_3PMo_{12}O_4$ , qui sont réduits lors de l'oxydation des phénols en oxydes bleus de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_3$ ), ce qui nous aide à doser les phénols dans le visible à une longueur d'onde de l'ordre de 760 nm [292, 293].

**IV-II-3-1-2-Procédure expérimentale :**

Une gamme d'étalonnage d'acide gallique de 10 solutions a été préparée à partir d'une solution mère à (100 $\mu$ g/ml). A chacune d'elle il a été ajouté le réactif Folin-Ciocalteu, après 10 min, une solution de  $Na_2CO_3$  a été ajoutée, les mélanges ainsi obtenus, ont été maintenus à l'obscurité pendant 60 min à température ambiante.

Les lectures de la densité optique à 760 nm, des solutions ainsi préparées ont permis de tracer la courbe d'étalonnage de l'acide gallique. L'analyse quantitative des phénols totaux dans nos extraits a été réalisée par la même procédure. Toutes les mesures sont répétées 3 fois [294,295].

**IV-II-3-2-Dosage des flavonoïdes :****IV-II-3-2-1-Principe :**

La capacité des flavonoïdes de former des complexes colorés avec certains métaux a été exploitée pour développer un test afin de les quantifier; le trichlorure d'aluminium est utilisé pour ce test. Les complexes produits sont de couleur jaune, ils absorbent dans le visible à 415 nm [292,295].



#### IV-II-3-2-2-Procédure expérimentale

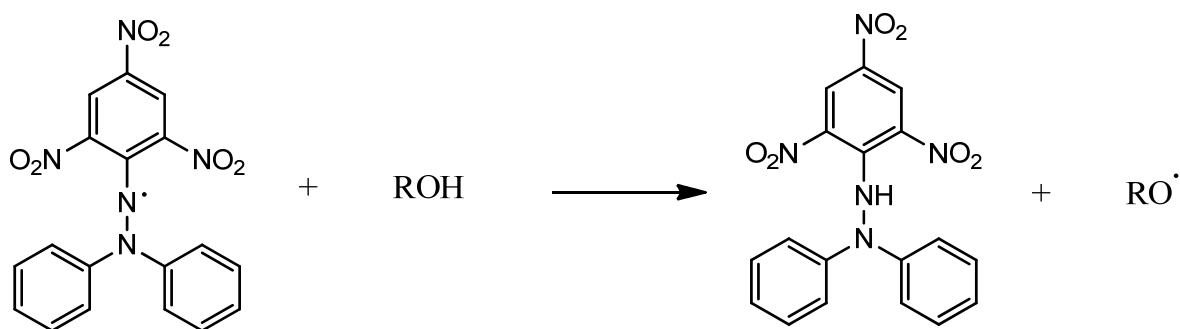
Des volumes égaux de l'extrait et une solution  $\text{AlCl}_3$  (2%) sont mélangés. L'absorbance est mesurée à 415 nm, après incubation à température ambiante pendant 40 min.

Dans les mêmes conditions et de la même façon sont mesurées les absorbances de la série des solutions standards de quercétine préparées à partir d'une solution mère de concentration égale à 0,1 mg/ml. Toutes les manipulations sont répétées 3 fois.

#### IV-II-3-3-Evaluation de l'activité antiradicalaire

##### IV-II-3-2-1- Principe

L'utilisation du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle est très répandue dans l'étude de l'activité antioxydante des composés phénoliques [47-51]. Il est accessible, relativement stable à température ambiante comme il peut absorber à 517nm, L'évaluation de l'efficacité d'un antioxydant se fait facilement en mesurant par un spectrophotomètre UV-Vis la diminution de la coloration violette, due à l'inhibition des radicaux DPPH $\cdot$ .



**Figure IV-II-3 : La réaction entre le radical libre DPPH $\cdot$  et l'antioxydant.**

Le test de capacité de piégeage des radicaux « 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl : (DPPH $\cdot$ ) » est l'une des approches appliquées pour l'évaluation de l'activité antioxydante d'un échantillon. Elle est basée sur la détermination de cette capacité envers ce radical commercial stable [293, 294], exprimée en pourcentage du pouvoir d'inhibition (%PI) donné par la relation :

$$\%PI = [(A_{\text{cont}} - A_{\text{écht}}) * 100] / A_{\text{cont}} \dots \dots \dots (2)$$

Où :  $A_{\text{cont}}$ : Absorbance de control (solution de DPPH $\cdot$  seul).

$A_{\text{écht}}$ : Absorbance de l'échantillon avec DPPH $\cdot$ .

Comme il n'existe pas de mesure absolue de la capacité antioxydante d'un composé, les résultats sont souvent portés par rapport à un standard, tel que l'acide ascorbique. [295-297]

**IV-II-3-2-2-Procédure expérimentale:**

Une prise de 3.9 ml d'une solution DPPH<sup>•</sup> ( $6.10^{-5}$  M) préparée dans le méthanol absolu est ajoutée à 0.1 ml d'extrait à concentration fixée (après plusieurs essais préliminaires). Les absorbances des mélanges sont mesurées à 517 nm après incubation des différentes solutions pendant 30 minutes à l'obscurité [293,297]. L'acide ascorbique en tant que référence a été utilisé pour la préparation de la gamme d'étalonnage.

Le pourcentage de piégeage du radical DPPH<sup>•</sup>, est calculé selon l'équation (2) précédente.

Chaque test est répété trois fois et les résultats ont été présentés par la moyenne des trois essais.

### Partie III : résultats et discussion

Les parties aériennes des deux plantes, *Brocchia cinerea* (Vis.) et *Matricaria pubescens* (Desf.) ont été soumises à différents types d'extraction, les composés phénoliques ont été les plus ciblés par ces méthodes dans les extraits I, II, III, IV, V et VIII. Elles sont basées sur la macération de la poudre végétale à chaud ou à froid avec des mélange de solvants de différentes polarités: méthanol/eau, acétone/eau, AcOEt, BuOH et afin de se rapprocher plus aux préparations traditionnelles, nous avons utilisé seulement de l'eau chaude pour l'obtention de l'extrait (V).

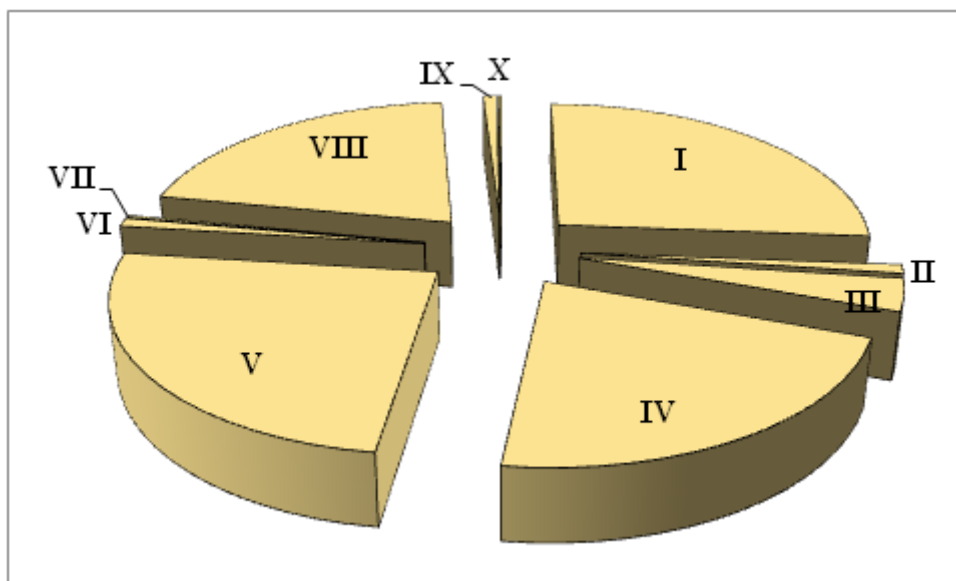
#### IV-III-1-Calcul des rendements des extraits préparés :

Généralement, plusieurs facteurs influencent les rendements des extractions aux solvants organiques, à titre d'exemples nous citons : la température, le solvant d'extraction, la taille des particules et le coefficient de diffusion de solvant.

Le tableau IV-III-1 regroupe les rendements calculés pour les extraits préparés.

**Tableau IV-III-1: solvants d'extraction et rendements des extraits.**

Extrait	Solvant
I	meOH/eau
II	AcOEt
III	BuOH
IV	Acétone/eau
V	Eau
VI	--
VII	CHCl <sub>3</sub>
VIII	meOH/ eau
IX	CHCl <sub>3</sub>
X	--



**Figure IV-III-1 : représentation graphique des taux de rendements des extractions.**

Des rendements variables sont obtenus pour les différents extraits préparés (figure IV-III-1), chez *Matricaria pubesens* le rendement le plus élevé est obtenu par le mélange hydroalcoolique (23,22%) suivi du rendement réalisé par de l'eau (21,98%), et la valeur la plus faible est celle présentée pour le mélange hydrocétonique (19,07 %). Pareillement, l'extrait hydroalcoolique de *Brocchia cinerea* a été le plus rentable, parmi ses autres extraits, avec un taux de rendement égal à (18.51%)

Il est à constater que le mélange hydroalcoolique (80% MeOH) a été très efficace et a entraîné une masse importante de la composition chimique polaire, entre autres les polyphénols, dans le cas des deux plantes. Néanmoins, la teneur de *B. cinerea* (Vis.) en ces produits est inférieure à celle calculée pour *M. pubescens* (Desf.).

Bien que l'eau soit très polaire, la valeur de rendement de son extrait (V) a été légèrement moins faible par rapport à celle de l'extrait (I). Ce résultat traduit la nécessité d'addition d'un solvant organique à l'eau pour extraire le maximum de produits phénoliques, du moins au plus polaire.

Les autres extraits ont été, relativement, moins rentables par rapport aux précédents, cela est peut être du à la sélectivité des solvants utilisés, particulièrement après l'utilisation du mélange meOH/eau comme dans le cas de (l'extrait II) où l'AcOEt entraîne majoritairement les phénols moins polaires (ex : flavonoides mono-glycosylés), ou dans le cas de (l'extrait III) où le BuOH extrait la grande portion des polyphénols plus polaires (ex : des flavonoides glycosylés) [61].

Globalement, la récupération des polyphénols à partir de matières végétales est influencée par leur solubilité dans le solvant d'extraction, la nature de solvant, le degré de polymérisation de phénols, l'interaction des phénols avec d'autres constituants du matériel végétal et la formation de complexes insolubles. Les différences dans la polarité (et donc l'extractibilité) peuvent expliquer les différences notées sur les résultats des rendements. En outre, la polarité du solvant joue un rôle clé dans l'augmentation de la solubilité polyphénols. Par conséquent, il est difficile de mettre au point un procédé standard d'extraction adapté à l'extraction de tous les phénols d'origine végétale.

Généralement, les solvants les moins polaires sont considérés comme appropriés pour les phénols lipophiles [298, 300].

### **IV-III-2-Estimation des teneurs en composés phénoliques**

#### **IV-III-2-1-Dosage des phénols totaux et des flavonoïdes :**

La spectrophotométrie UV-Vis nous a permis de quantifier le taux des polyphénols présents dans les extraits préparés.

La courbe d'étalonnage établit à l'aide de différentes concentrations de l'acide gallique à partir d'une solution mère 100 µg/ml a permis d'estimer les teneurs en composés phénoliques, elles ont été alors calculées à partir de la courbe d'étalonnage et exprimées en mg Equivalent Acide Gallique par 100g de matériel végétal sec (mg EAG/100g plante).

En ce qui concerne les contenus en flavonoïdes, ils ont été évalués par la méthode d'AlCl<sub>3</sub>. Pareillement, la spectrophotométrie UV-Vis a permis le dosage des flavonoïdes qui peuvent être présents dans ces deux plantes. Pour cet effet, une courbe d'étalonnage est tracée en utilisant différentes concentrations de la quercétine en tant que standard et la teneur est exprimée en mg Equivalent de quercétine par 100g de matériel végétal sec (mg EQ/100g plante). Ces résultats sont illustrés sur la figure IV-III-1.

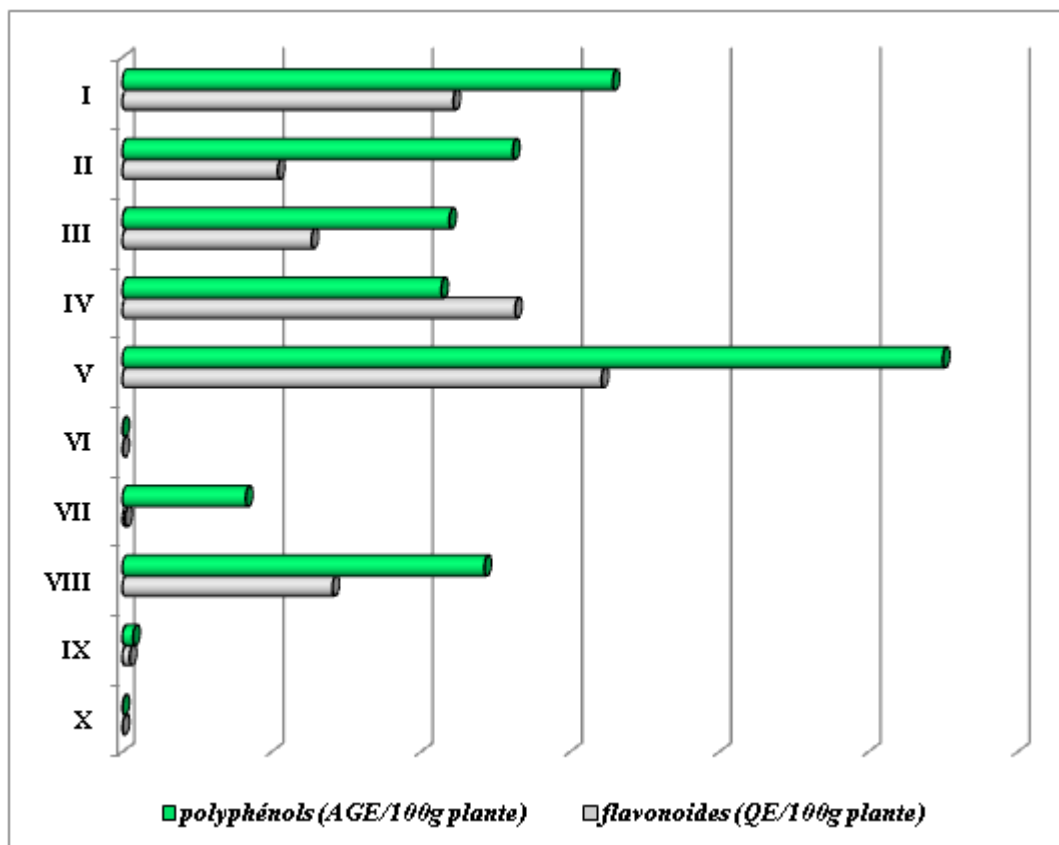


Figure IV-III-2 : représentation graphique des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes.

La figure IV-III-2 montre la variabilité des teneurs en polyphénols totaux (PhT) et en flavonoïdes (FT), dans les extraits testés, elles diffèrent d'un extrait à un autre. La plus grande teneur de *M. pubescens* en (PhT) est reflétée par la valeur de l'extrait aqueux estimée à 1009.5 (mgEAG/100g plante) suivi de l'extrait hydrométhanolique avec 657.1 mgEAG/100g plante.

D'après les quantités des (PhT) calculées pour (II) et (III), on remarque que l'AcOEt a entraîné une bonne quantité de son extrait méthanolique, elle a été estimée à 523.2 mg EAG/100g plante, la quantité restante a été extraite par le BuOH : 438 mgEAG/100g plante. La somme des deux dernières teneurs est clairement supérieure à la quantité des (PhT) de leur extrait méthanolique ; d'autres substances constitutives supplémentaires telles que les protéines, sucres, pigments, ..., ont été probablement extraites par les deux solvants utilisés. Elles ont la capacité de réduire les composants du réactif Folin-Ciocalteu [292, 293].

Le contenu des extraits testés dans cette étude témoigne bien sur la richesse de *M. pubescens* en composés phénoliques et en flavonoïdes, d'ailleurs cela a été attendu car des études phytochimiques réalisées sur ce genre et plus spécialement sur cette espèce ont dévoilé sa

richesse en composés phénoliques parmi les quels des coumarines et des flavonoïdes ont été caractérisés [52, 53].

La teneur en flavonoïdes (FT) est en corrélation avec celle en polyphénols (PhT) pour chaque extrait, sauf pour l'extrait IV (hydroacétonique), dont l'inversion des taux (PhT : 427.2 et FT : 526.3 mgEAG/100g plante, peut être expliquée par la non-sélectivité de la réaction du chlorure d'aluminium. En effet, beaucoup de produits chimiques peuvent réagir de la même façon que les flavonoïdes.

Dans le cas des extraits chloroformiques, le solvant n'a pu extraire que de faibles taux de polyphénols ; des résultats semblables ont été obtenus dans l'étude [301]. Sauf pour la valeur 165.2 mg EAG/100g plante en (PhT) qui a été repérée comme la plus importante teneur dans l'extrait (VII).

L'étude quantitative de l'extrait méthanolique de *B. cinerea* a été en faveur des études qualitatives déjà réalisées [32-35]. La teneur de cet extrait en (PhT) a été estimé à 485 mgEAG/100g plante et en (FT) à 281.4 mgEAG/100g plante.

Globalement, les résultats obtenus dans notre travail, notamment ceux des extraits méthanoliques, se rapprochent significativement avec ceux publiés dans d'autres études [290, 294, 299-302].

Finalement, Il est à noter qu'aucune teneur en ces composés n'a été enregistrée pour les deux huiles essentielles testées (VI et X).

La confrontation des résultats des teneurs en flavonoïdes à celles en composés phénoliques des deux plantes, notamment dans les extraits V, II et III, indique la prédominance des acides phénoliques tels que les acides hydrobenzoïques et hydrocinnamiques ainsi que leurs dérivés tels que les tanins hydrolysables [263-265, 303].

#### **IV-III-3-Evaluation de l'activité antioxydant par le test DPPH:**

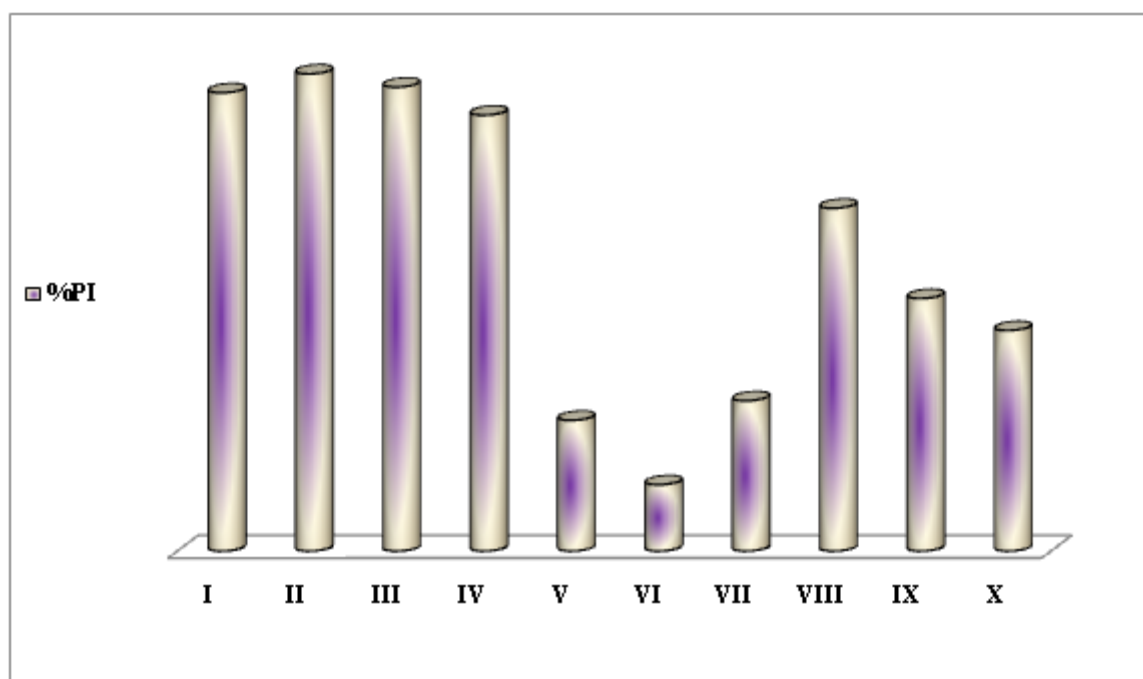
En cherchant de nouvelles bio-ressources pour lutter contre la surproduction néfaste des radicaux libres, les extraits préparés dans la présente étude ont été testés pour évaluer leur capacité à réduire le radical synthétique DPPH<sup>\*</sup>.

Le suivi spectroscopique du changement de sa couleur violette vers le jaune indique son inhibition et permet l'estimation de l'activité anti-radicalaire de nos extraits exprimée en (%IP).

En essayant d'appliquer les critères d'utilisation des antioxydants cités dans la littérature [248, 249, 274, 276, 277], les premiers tests ont été effectués à des concentrations fixées.

Certaines ont répondu positivement, comme dans le cas des extraits II et III, qui ont révélé des puissances d'inhibition remarquables : supérieur à 90 % pour les deux extraits d'AcOEt et celui au BuOH. Mais pour les autres, il a été nécessaire de chercher les concentrations auxquelles ces échantillons auront un %PI significatif, en respectant les limites de concentrations permises.

Après plusieurs essais, les concentrations ont été déterminées et les principaux résultats du pouvoir d'inhibition de nos deux plantes sont résumés sur la figure (IV-III-2).



**Figure IV-III-3 : Représentation graphique du pouvoir d'inhibition.**

L'extrait hydroacétonique (IV) a été très efficace vis-à-vis des radicaux DPPH<sup>•</sup>, on lui a enregistré un %PI > à 85%.

Pareillement, l'extrait hydrométhanolique (I) a présenté un pouvoir antiradicalaire très appréciable vis-à-vis du radical DPPH<sup>•</sup>, évalué à (+) de 90%, mais à une concentration plus importante. Bien que, la méthode d'extraction n'est pas la même, une étude réalisée à Béchar [304] a reporté presque le même %PI pour l'extrait méthanolique estimé à 92.11%.



En les comparants avec les précédents, les deux extraits V et VII n'ont pas été aussi efficace, leurs PI% ont été respectivement, 27.01% et 31.04% mais cela n'empêche pas de les considérer comme de bons antioxydants en réduisant de tels pourcentages de radicaux libres à de telles concentrations.

Le dernier extrait (V) de *M. pubescens* a montré une faible activité antioxydante reflétée par le %PI évalué à 13.7% avec la concentration de 10 mg/ml. Inversement à notre résultat, [304] a signalé que l'huile essentielle de *M. pubescens* de Béchar a fait preuve d'un %IP égal à 74.06% plus important que le nôtre.

En ce qui concerne les extraits représentatifs de la plante *B. cinerea*, la solution préparée de l'extrait VIII a inhibé 70.8% de radicaux DPPH et celle préparée de l'extrait IX, avec la même concentration, a révélé une capacité antioxydante estimée à 52.16%, alors que le %IP de son huile essentielle a été évalué à 45.55%. Ces valeurs sont assez appréciables, notamment celle de l'extrait méthanolique. Globalement, elles prévoient un potentiel antioxydant très important pour la plante.

D'ordre général, les %PI calculés pour les extraits étudiés ont reflété les teneurs estimées dans ces derniers en composé polyphénoliques et plus particulièrement en substances flavoniques. Mais certains extraits ont fait des exceptions, comme dans le cas de l'extrait aqueux (V) qui a montré la plus grande teneur en polyphénols 1009.5 mgAGE/100g plante et une teneur très importante en flavonoïdes 642.1 mgAGE/100g plante. Mais son %PI dans le test DPPH a été le plus faible parmi tous les extraits de *M. pubescens*. Ce constat confirme la présence de produits non phénoliques dans les extraits et qui réagissent positivement avec le réactif Folin-Ciocalteu et  $AlCl_3$ .

Alors que les résultats des deux huiles essentielles (VI, X) et les deux extraits chloroformiques (VII, IX), nous ont permis de conclure que des produits qui ne font pas partie des polyphénols peuvent être potentiellement antioxydants.

Globalement les résultats du test DPPH ont démontré que les extraits préparés des deux plantes étudiées, sont doués d'un pouvoir antiradicalaire important qui est en relation directe avec leurs contenus appréciables en polyphénols et de flavonoïdes. Ainsi,

*Matricaria pubescens* (Desf.) et *Brocchia cinerea* (Vis.) peuvent être exploitées comme une source naturelle d'antioxydants facilement accessible.

#### IV-III-4-Détermination de la concentration effective $CE_{50}$ :

La concentration de l'antioxydant influence directement l'estimation de son efficacité. Pour s'affranchir de l'effet de la concentration, la réactivité est souvent estimée par la concentration effective ( $CE_{50}$ ) de l'antioxydant, qui correspond à la réduction de 50% de radicaux DPPH<sup>\*</sup>. La capacité antioxydante d'un composé est d'autant plus élevée que sa  $CE_{50}$  est petite [296].

En se basant sur leurs %PI enregistrés à des faibles concentrations, les extraits I, II, III ont été sélectionnés pour accomplir la recherche de leurs concentrations effectives  $CE_{50}$ .

En effet, des dilutions de ces extraits ont été effectuées à partir des concentrations signalées précédemment.

Les différentes solutions des trois séries ont été soumises au test DPPH, selon la même procédure expérimentale utilisée initialement, avec trois répétitions pour chacune d'entre elles.

Les  $CE_{50}$  ont été déduites graphiquement à partir des courbes correspondantes :

$$f(\text{Concentration}) = \%PI.$$

La figure IV-III-4 représente les résultats obtenus.

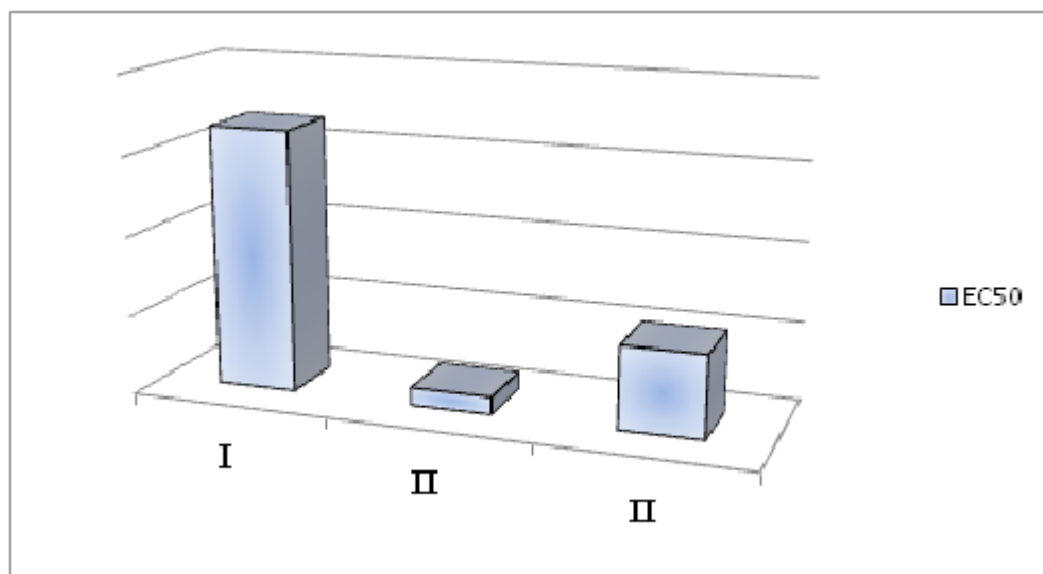


Figure IV-III-4 : Représentation graphique des  $CE_{50}$ .

D'après cette figure, les valeurs de  $CE_{50}$  enregistrées pour les trois extraits (I, II, III), reflètent directement les estimations calculées pour eux en polyphénols totaux, notamment celles en flavonoïdes.

Des travaux de recherche sur différentes plantes médicinales et différents végétaux [291, 301, 305-310], ont signalé des  $CE_{50}$  relativement proches de nos valeurs. A titre d'exemple, l'étude de M. A. Ebrahimzadeh et al [301], réalisée sur des extraits méthanoliques de l'espèce *Ornithogalum sintenisii* L, a conduit à des  $CE_{50}$  équivalentes à 368 et 669  $\mu\text{g/ml}$ .

Par comparaison, nous avons constaté que la  $CE_{50}$  de l'extrait III est au voisinage de celles citées dans la littérature pour différentes classes de flavonoïdes. A titre d'exemples, la valeur de  $CE_{50}$  calculée pour l'apigénine est de 427.7  $\mu\text{g/ml}$ , celle du myricétine est de 438.6  $\mu\text{g/ml}$  [290] et parmi les glycosylés nous citons l'apigénin-7-glucoside qui a présenté une valeur de 387.26  $\mu\text{g/ml}$  [305, 306]. Quant à l'extrait (I), il s'est montré plus efficace vis-à-vis des radicaux DPPH $\cdot$ , en présentant une  $CE_{50}$  beaucoup plus faible que les exemples cités ci-dessus.

Cependant, la confrontation de nos trois  $CE_{50}$  avec les  $CE_{50}$  d'antioxydants de référence, tels que l'acide ascorbique (3.43-8.4  $\mu\text{g/ml}$ ), la quercétine (2.1-5.25  $\mu\text{g/ml}$ ), la rutine (34.67  $\mu\text{g/ml}$ ), trolox (3.38  $\mu\text{g/ml}$ ) ou le BHA (53.96  $\mu\text{g/ml}$ ) et le BHT (14.87  $\mu\text{g/ml}$ ) [301, 305, 307], les montre très efficaces en tant que mélanges, contenant sûrement des molécules antioxydantes autant puissantes que ces standards. Elles méritent d'être isolées, caractérisées et utilisées comme une source naturelle d'antioxydants.

# Conclusion générale

---

À l'issue de la présente étude phytochimique de certaines plantes à caractère médicinale de la flore Algérienne, *Brocchia cinerea* (Vis.) et *Matricaria pubescens* (Desf.), nous avons partiellement établi la composition chimique des huiles essentielles des deux plantes en mettant en évidence leurs chemotypes, ainsi que l'élucidation structurale des substances de types lactones sesquiterpéniques.

Comme tout travail dans le domaine de la phytochimie, notre principal objectif est la recherche de nouveaux produits naturels potentiellement bioactifs.

L'utilisation des techniques de séparation chromatographiques et d'analyse spectroscopiques, de pointe, telles que GC-MS, HPLC-DAD, RMN mono et bidimensionnelle  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , deptQ 135, HSQC, COSY, HMBC, NOESY, DRX, et VCD, nous ont permis d'identifier :

- 44 composés représentant 96.77% de la composition chimique de l'huile essentielle de *Brocchia cinerea* (Vis.) et par conséquent, son chemotype caractérisé par la thujone (55.4 %), le camphre (11.28 %) et le santolinatriène (8.00 %).
- 85 produits représentant 81.34% de la constitution de l'huile essentielle de *Matricaria pubescens* (Desf.) dont l'herniarine avec 16.92% représente le constituant majoritaire.
- les structures chimiques de six lactones sesquiterpéniques dans l'extrait chloroformique de *Brocchia cinerea* (Vis.) deux de type guaianolide, trois germacranolides et un eudesmanolide, en plus à un septième produit (Seco-thujène).

Par ailleurs, la recherche de l'activité antioxydante chez les deux plantes a été réalisée par le test DPPH qui a permis d'évaluer l'activité antiradicalaire d'une variété d'extraits issus des deux espèces étudiées. Tous les extraits ont été actifs mais les résultats les plus notables sont enregistrés pour:

- Les extraits de *M. pubescens* obtenus par le méthanol/eau, l'acétate d'éthyle, le butanol, qui ont montré des PI% supérieur à 90%.
  
- Les extraits de *B. cinerea* obtenus par le méthanol/eau et le chloroforme qui ont montré des PI% moins puissants, supérieur à 52.16%.

Notons que les pourcentages d'inhibition (PI%) du radical DPPH<sup>\*</sup> ont été, pour la majorité des extraits, en concordance avec les taux de teneurs en polyphénols et en flavonoïdes estimés dans cette étude.

Bien que notre travail ait contribué à élucider la composition chimique des deux Asteraceae étudiées, il reste beaucoup à découvrir car leur richesse en métabolites secondaires à potentiel bioactif est toujours prometteuse. D'autres travaux complémentaires phytochimiques et biologiques vont sûrement enrichir notre connaissance sur ces plantes pour mieux les exploiter.

# Références Bibliographiques

---

## Références bibliographique

- [1]. Deuxième rapport national sur l'état des ressources phytogénétiques, Juin 2006, INRAA.
- [2]. S. Benhouhou, A. N. Benghanem., Flore et végétation du Sahara algérien : synthèse et perspectives de recherche, colloques Sahara, IMBE, 28-29 Nov 2013, Aix en Provence, Marseille.
- [3]. M. Bouheroum., « Etude phytochimique des plantes médicinales algériennes : *Rhantherium adpressum* et *Ononis angustissima* », 2007, thèse de Doctorat, Univ Mentouri, Constantine.
- [4]. A. Chehma, I. Bouzegag, Y. Chehma., 2008, *Fourrages*, 194, 253-256.
- [5]. P. Ozenda., « Flore et végétation du Sahara », 1983, 2<sup>ème</sup> éd, CNRS., Paris, pp. 622.
- [6]. P. Quezel, S. Santa., « Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales », 1963, Vol. 2, CNRS, Paris.
- [7]. L. Zeraïa., « Protection de la flore. Liste et localisation des espèces assez rares, rares et rarissimes ». 1983. Station Centrale de Recherche en Ecologie Forestière, Alger, Algérie.
- [8]. A. Abdelguerfi, M. Abdelguerfi-Laouar., 2004, Cahiers Options Méditerranéennes, 62, 29-41.
- [9]. M. Bouziane., « Caractérisation structurale de quelques molécules organiques dans la plante : *Cotula cinerea* de la région de Ouargla », 2002, mémoire de magister, Univ Ouargla.
- [10]. B. Zaarour., « Etude phytochimique de quelques extraits obtenus de la plante *Matricaria pubescens* et évaluation de leur activité antioxydante.», 2012, PFE, Univ. Ouargla.
- [11]. C. Zdero, F. Bohlmann., 1990, *Plant Syst. Evol.*, 171, 1-14.
- [12]. P. Christensen., 1992, *Phytochem.*, 31(1), 7-49.
- [13]. P. Christensen, J. Lam., 1991, *Phytochem.*, 30(8), 2453-2476.
- [14]. C. A. Williams, J. Greenham, J. B. Harborne., 2001, *Biochem. Syst. Ecol.*, 29(9), 929-945.
- [15]. V.P. Emerenciano, J.S.L.T. Milit, C.C. Campos, P. Romoff, M.A.C. Kapland, M. Zambond, A.J.C. Branta., 2001, *Biochem. Syst. Ecol.*, 29, 947-957.
- [16]. F. C. Seaman., 1982, *The Botanical Review*, 48(2), 121-594.
- [17]. V. D. E. P. Emerencuno, Z. S. Ferreira, M. A. C. Kaplan, O. Goitlieb., 1987, *Phytochem.*, 26(12), 3103-3131.
- [18]. J. D. Staneva, M. N. Todorova, L. N. Evstatieva., 2008, *Phytochem.*, 69(3), 607-618.
- [19]. J. Bruneton., « Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales », 2<sup>ème</sup> éd., Lavoisier, Paris, 1993.
- [20]. K. Maiza., Pharmacopée traditionnelle saharienne Sahara Algérien », thèse de Doctorat en sciences médicales, Univ. Ben Youcef Benkhedda, Alger.
- [21]. V. Hammiche, K. Maiza., 2006, *J. Ethnoph.*, 105(3), 358-67.
- [22]. M. D. Ould El Hadj, Hadj-Mahammed M., H. Zabeirou., 2004, *Revue Rivista, Italiana Eppos.*, 37, 17-25.
- [23]. L. EL Mansouri, A. Ennabili, D. Bousta., 2011, *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 10 (1), 30-45
- [24]. L. El Rhaffari, Zaid A., Pratique de la phytothérapie dans le sud-est du Maroc(Tafilalet). Un savoir empirique pour une pharmacopée rénovée, 2002, éd. IRD, Montpellier.
- [25]. Description de l'Egypte : Recueil des observations des recherches qui ont été faites pendant l'expédition de l'armée française, 2<sup>ème</sup> éd., Tome 19, Paris, pp. 364, numérisé par Google : consulté 02/06/2014.
- [26]. M. Younis Haggag., 1997, *Cahier des options méditerranéennes*, 23, 45-55.
- [27]. <http://www.ville-ge.ch/musinfo/bd/cjb/africa>. consulté 2014.
- [28]. K. Maiza, V. Hammiche., Pharmacopée traditionnelle Saharienne : Sahara septentrional, 24-27 mars 1993, Actes du 2<sup>ème</sup> Colloque Européen d'Ethnopharmacologie de la 11<sup>ème</sup> Conférence internationale d'Ethnomédecine, Heidelberg, 169-171.



- [29]. C. Oberprieler, S. Himmelreich, R. Vogt., 2007, *Willdenowia*, 37: 89-114.
- [30]. G. Fournier., *Planta Med*, 1989, 55(6), 580.
- [31]. L. El Bouzidi, L. Abbad, K. Fattarsi, L. Hassani, D. N. Leach, M. Markouk., 2011, *Nat. Prod. Com.*, 6(10), 1491-1494.
- [32]. G.H. Mahran, M. Ahmed, S. M. Ansary., 1976, *Bull.Fac.Pharm. (Cairo Univ.)*., 14, 237.
- [33]. A. A. Ahmed., 1987, *J.Nat.Prod.*, 50(3), 519-20.
- [34]. H. Dendougui., « Etude des produits du métabolisme secondaire flavonoïdique et terpénique de quelques plantes des dayas du Sahara Algérien », 2002, thèse de Doctorat, Univ. Mentouri, Constantine
- [35]. H. Dendougui.H., S. Seghir, M. Jay, F. Benayache, S. Benayache., 2012, *Int. J. Med. Arom. Plants.*, 2(4), 589-595.
- [36]. H. Greger, O. Hofer., 1985, *phytochem.*, 24(1), 85-88.
- [37]. J. Jakupovic, M. Abdel Aal, F. Eid, F. Bohlmann, S. El-Dahmy, T. Sarg., 1988, *Phytochem.*, 27(7), 2219-2224.
- [38]. M.A. Metwally, S. El-Dahmy, J. Jakupovic, F. Bohlmann, A.M. Dawidar, S.A. Metwally., 1985, *phytochem.*, 25(1), 255-257.
- [39]. M. Markouk, A. Redwane, H. B. Lazrek, M. Jana, A. Benjama., 1999, *Fitoth.*, 70, 314-316.
- [40]. D. Bensizerara, T. Menasria, M. Melouka, L. Cheriet, H. Chenchouni, 2013, *JJBS*, 6(4), 266-271.
- [41]. M.Markouk, H. B. Lazrek, M.Jana., *Fitoth. Res.*, 1999, 13(3), 229-230.
- [42]. M. Larhsini, M. Markouk, J. T. Jaouhari, K. Bekkouche, H. B. Lazrek, M. Jana., 1999, *Thérapie*, 54(6),759-761.
- [43]. A. Radwane, M. Markouk, H. B. Lazrek, H. Amarouch, M. Jana., 1998, *Ann. Pharm. Fr*, 56(6), 274-276.
- [44]. M. Markouk, A. Radwane, H. B. Lazrek., 1997, *Phytochem.*, 55, 86.
- [45]. A.Chouikh, B. Mayache, M. C.Maazi, Y. Hadeif, A. Chefrour., 2015, *J. App. Pharm. Sci.*, 5(3), 29-34.
- [46]. [http://arctos.database.museum/name/Matricaria pubescens](http://arctos.database.museum/name/Matricaria%20pubescens), 05/06/2015
- [47]. N. Bounaga, S. A. Brac de la perrière., « Ressources phytogénétiques du Sahara », 1988, *Ann. Ins. Agro. El-Harach, Alger*, 12(1), T. 1.
- [48]. S. Benhouhou., « A guide to medicinal plants in North Africa » 2005, éd. IUCN Centre for Mediterranean Cooperation. Malaga, Spain. 7-8.
- [49]. A. Chehma., « Catalogue des plantes spontanées du Sahara septentrional algérien. », 2006, éd. Dar El Houda: Laboratoire de protections des écosystèmes en zones arides et semi arides, univ. Ouargla.
- [50]. N. Boutaghane, A. Kabouche, R. Touzani, Y.A. Touzani, A. El-Azzouny, C. Bruneau, Z. Kabouche., 2011, *Nat. Prod. Com.*, 6 (2), 251-252
- [51]. W. Tadrent, A. Kabouche, R. Touzani et Z. Kabouche, 2014, *J. Mater. Environ. Sci.* 5 (xxx) in press.
- [52]. H. Greger, O. Hofer., 1984, *Phytochem.*, 23(5), 1173-1174.
- [53]. O. Gherboudj, N. Benkiki, E. Seguin, F. Tillequin, et Z. Kabouche., 2012, *Chem. Nat. Comp.*, 48 (3), 470-471.
- [54]. R. Chemli., 1997, *CIHEAM-Option Méditerranéenne*, 119-125.
- [55]. A. Makhloufi, A. Moussaoui1 et H.A. Lazouni, 2012, *J. Med. Plants Res.*, 6(16), 3124-3128.
- [56]. A Makhloufi, A Bouyahyaoui, N Seddiki, L Benlarbi, L Mebarki, A Boulanouar., 2014, *Inter. J. of Phytoth.*, 4(2), 95-100.
- [57]. K. Maiza, A. Longeon, V. Hammiche, M. Guyot, F. Benabdesselam-Maiza., 2014, *Life Sci. Leaflets*, 52, 52-56.

- [58]. P. Rubiolo, B. Sgorbini, E. Liberto, C. Cordero and C. Bicchi., 2010, *Flav. Frag. J.*, 25, 282–290.
- [59]. Association Française de Normalisation, Recueil de normes Françaises “Huiles essentielles”, 1986, AFNOR, Paris. AFNOR NF T 75-006.
- [60]. B.M. Lawrence., *Essential oils*, 1995, Allured publishing corporation, Carol Stream.
- [61]. <http://fr.wikipedia.org/wiki/Eugenol>
- [62]. J. L. Guignard., *Abrégé de botanique*, 1983, Masson 5<sup>ème</sup> éd, Paris, p. 259.
- [63]. P.Svoboda k., 2003, *Int. J. Arom.*, 13 (4), 196-202.
- [64]. R. Anton et A. Lobstein., *Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles*, 2005, Tec & Doc, Paris, 522.
- [65]. T. H. Mulder-Kruger, R. Verpoorte, A. Baerheim Svendsen et J. J. C. Scheffer., 1998, *Plant Cell, Tissue and Orga Culture*, 13, 85-154.
- [66]. Y. Gounaris, 2010, *Flav. Frag. J.*, 25, 367–386.
- [67]. [http://www.plantes-botanique.org/biologie\\_03\\_0\\_les-tissus-vegetaux](http://www.plantes-botanique.org/biologie_03_0_les-tissus-vegetaux). Consulté le 1/03/2014.
- [68]. M. G. Miguel., 2010, *Molécules*, 15, 9252-9287.
- [69]. P. Belaiche, *L’aromatogramme. Traité de phytothérapie et d’aromathérapie*. 1979. éd, M.S.A., Paris. Tome 1, p : 204.
- [70]. A. Lamarti., A. Badoc., G. Deffieux. , J.-P. Carde., 1994, *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 133, 79 – 99.
- [71]. L. Ruzicka, A. Eschenmoser et H. Heusser., 1953, *Experientia*, 9, 357-367.
- [72]. P. Maihebiau., *La nouvelle aromathérapie: biochimie aromatique et influence psychosensorielle des odeurs*. 1994, Lausanne. P. 635.
- [73]. [www.Wikipedia.com](http://www.Wikipedia.com)
- [74]. T. J. Maimone, P. Baran., 2007, *Nat. Chem. Biology*, 3(7), 396-407.
- [75]. D. V. Banthorpe, B. V. Chariwood et M. J. O. Francis, 1972 *Chem. Rev.*, 72, 2.
- [76]. M. Malecky « *Métabolisme Des Terpénoïdes Chez Les Caprins* » thèse doctorat, Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l’Environnement (AgroParisTech).
- [77]. P. M. Dewick., 1991, *Nat. Prod. Rep.*, 8, 441.
- [78]. P. M. Dewick., 1997, *Nat. Prod. Rep.*, 14, 111.
- [79]. <http://www.scripps.edu/baran/images/grpmtgpdf/>
- [80]. P. M. Dewick., « *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*», 2002, 2<sup>ème</sup> éd, Wiley.
- [81]. G. Figueredo., « *Étude chimique et statistique de la composition d’huiles essentielles d’origans (Lamiaceae) cultivés issus de graines d’origine méditerranéenne* », 2007, thèse doctorat, Univ. Blaise Pascal, France.
- [82]. [www.wikipedia.org/wiki/Limonène](http://www.wikipedia.org/wiki/Limonène).
- [83]. P. M. Dewick., 2002, *Nat. Prod. Rep.*, 16, 181-222.
- [84]. M. Rohmer, M. Knani, P. Simonin, B. Sutter et H. Sahn., 1993, *Biochem.J.*, 295, 517.
- [85]. M. Rohmer., 1997, *Sc. chimiques*, 59, 17-21.
- [86]. W. Eisenreich, S. Sagner, M. H. Zenk et A. Bacher, 1997, *Tetra. Letters*, 38, 3889-3892.
- [87]. D. Arigoni, W. Eisenreich, C. Latzel, S. Sagner, T. Radykewicz, M. H. Zenk, et A Bacher., 1999, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 96, 1309–1314.
- [88]. N. Campos, M. Rodriguez-Concepcion, S. Sauret-Gueto, F. Gallego, L.M. Lois et A. Boronat., 2001, *Biochem. J.*, 353, 59-67.
- [89]. S. Takahashi, T. Kuzuyama, H. Watanabe, H. Seto., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 9879–9884.
- [90]. Y. Matsue, H. Mizuno, T. Tomita, T. Asami, M. Nishiyama et T. Kuzuyama., 2010, *J. Antibiotics*, 63, 583–588.

- [91]. M. Brada, M. Bezzina, M. Marlier, A. Carlier et G. Lognay., 2007, *Base*, 11(1), 3-7.
- [92]. S. Zrira, F. EL Khirani et B. Benjilali., 1994, *Actes Inst. Agr. Vet.* (Maroc), 14 (1), 5-9.
- [93]. S. Merghache, M. Hamza et B. Tabti., 2009, *Afrique Science*, 5(1) 67-81.
- [94]. <http://biogassendi.perso.sfr.fr/huilessentielles5.htm>. Consulté le 23/02/2014
- [95]. L. Duval., 2012, thèse doctorat, UFR de médecine et de pharmacie de Rouen, France .
- [96]. J. Kaloustian., F. Hadji-Minaglou., « La connaissance des huiles essentielles qualilogie et aromathérapie » livre numérique : google, éd: springer science & Business, 2013, p : 30
- [97]. Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (afssaps)., Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles, 2008. Sur le site : <http://www.ansm.sante.fr/> consulté juin 2014.
- [98]. A. Koedam, J. J. C. Scheffer, and A. B. Svendsen., 1979, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 168, 106-111.
- [99]. P. Rubiolo, B. Sgorbini, E. Liberto, C. Cordero et C. Bicchi, 2010, *flav. Frag. J.*, 25(5), 282-290, 2010.
- [100]. H. Richard., *Épices et Aromates*. Tech. & Doc. Lavoisier. 1992. Paris. p.339
- [101]. F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, M. Idaomar., 2008, *Food Chem. Tox.*, 46, 446-475.
- [102]. L. Lagunez Rivera, « Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffée par induction thermomagnétique directe ». 2006, thèse doctorat, Institut national polytechnique de Toulouse, France.
- [103]. E.Ghasemi, Y.Yamini, N. Bahramifar, F. Sefidkon., 2007, *J. Food. Eng*, 79 (1), 306-311.
- [104]. B. Bayramoglu, S. Sahin, G. Sumnu., 2008, *J. Food. Eng*, 88(4), 535-540.
- [105]. M.E. Lucchesi, F.Chemat, J.Smadja., 2004, *J. Chromatgr. A*, 1043, 323-327.
- [106]. M.E. Lucchesi, J. Smadja, S.Bradshaw, W. Louw, F. Chemat., 2007, *J. Food Engineer*, 79, 1079-1086.
- [107]. F. Chemat, M.E. Lucchesi, J. Smadja, L. Favretto, G. Colnaghi, F. Visinoni., 2006, *Anal. Chim. Acta*, 555,157-160.
- [108]. M. Piochon, «Étude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne: Composition Chimique, Activités Pharmacologiques Et Hémi-Synthèse. 2008, thèse doctorat, univ. Qubec.
- [109]. N.S. Kim, D.S. Lee. 2002, *J. Chromatgr. A.*, 982, 31.
- [110]. L. S. Nerio, J. Olivero-Verbel, E. Stashenko, 2010, *Bioresource Tech.*, 101, 372-378.
- [111]. M. Valnet., 2005, *J. Food Microb.*, 85, 73-81.
- [112]. S.C. Chao, D.G. Young et G.J. Oberg., 2000, *J.E.O.R.*, 12, 639-649.
- [113]. S. Burt., 2004, *Int. J. Food Microb.*, 94, 223-253.
- [114]. M. Lahlou., 2004, *Phytoth. Res.*, 18, 435-448.
- [115]. S. Caillet, M. Lacroix., « Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire », 2007, INRS-Institut Armand-Frappier, (*RESALA*).
- [116]. T.M. Katz, J.H. Miller, A. A. Hebert., 2008, *J. Am. Acad. Dermato.*, 58(5), 865-71.
- [117]. B. Adorjan, G. Buchbauer., 2010, *Flav. Frag. J.*, 25, 407-426.
- [118]. S. Rajkumar, S1 and Jebanesan, 2005, *Trop. Biomed.*, 22(2), 139-142.
- [119]. S. Rajkumar, A. Jebanesan., 2007, *Trop. Biomed*, 24(2), 71-5.
- [120]. D. B. Josef, R.M. Piriya., 2001, *Res. J. Med. Plant*, 5(4), 432-442.
- [121]. A. Manimaran, M. M. J. J. Cruz, C. Muthu, S. Vincent, S. Ignacimuthu., 2013, *J. Agr. Tech.*, 9(4): 845-854.
- [122]. M. N. Boukhatem, M. S. Hamaidi, F. Saidi, Y. Hakim., 2010, *Revue Nat. Tech.*, 3, 37-45.
- [123]. H. Van Den Dool., P. Dec. Kratz., 1963, *J. Chromatgr.*, II, 463-471.
- [124]. R. P. Adams., Identification of essential oil components by gaz chromatography/mass

spectroscopy. Academic press, New York, Appendix I, Alphabetical Listing of Compounds on DB-5.

- [125]. [http://www.alluredbooks.com/sample\\_pages/adams\\_partbappend.pdf](http://www.alluredbooks.com/sample_pages/adams_partbappend.pdf)
- [126]. [http://www.flavornet.org/f\\_kovats.html/](http://www.flavornet.org/f_kovats.html/)
- [127]. <http://www.pherobase.com/database/kovats>
- [128]. K.L. Goodner., 2008, *LWT*, 41, 951–958.
- [129]. <http://www.VCF-online.nl/index.cfm>
- [130]. N. W. Davies., 1990, *J. Chromatgr.*, 503, I-24.
- [131]. A. Raal, H. Kaur, A. Orav, E. Arak, T. Kailas et M. Müürisepp., 2011, *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences*, 60, 1, 55-63.
- [132]. H. K. Bencheqroun, M. Ghanmi, B. Satrani, A. Aafi et A. Chaouch., 2012, *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 81, 4-21.
- [133]. M. J. Abad, L. M. Bedoya, L. Apaza et P. Bermejo., 2012, *Molécules*, 17, 2542-2566.
- [134]. M. K. Hassanzadeh, S. A. Emami, J. Asili et Z. T.Najaran., 2011, *J.E.O.R.*, 23, 2011.
- [135]. M. Bouziane, Y. H. A. Badjah, M. Hadj-Mahammed., 2013, *Asian J. Chem.*, 25(7), 3917-3921.
- [136]. K. M. Hold, N. S. Sirisoma, T. Ikeda, T. Narahashi, et J. E. Casida., 2000, *PNAS*, 97(8), 3826-3831.
- [137]. C. Hilan, R. Sfeir, D. Jawish, S. Aitour., 2006, *Leb. Sc. J.*, 7(2), 13-22.
- [138]. H. Mighri, A. Akrouit et M. Neffati., 2012, *Revue des Régions Arides*, 27 (1), 61-78.
- [139]. J. A. Teixeira da Silva., 2004, *African J. Biotech.*, 3 (12), 706-720.
- [140]. A.Sökmen, G. Vandar-Ünlü, M. Polissiou, D. Daferera, M. Sökmen, E. Dönmez., 2003, *Phytoth.. Res*, 7, 1005-1010.
- [141]. A. E.-H. H. Mohamed, M. A. El-Sayed, M. E. Hegazy, S. E. Helaly1, A. M. Esmail et N. S. Mohamed., 2010, *Rec. Nat. Prod*, 4(1), 1-25.
- [142]. D. Lopes-Lutz, D. S. Alviano, C. S. Alviano, P. P. Kolodziejczyk., 2008, *Phytochem.*, 69, 1732-1738.
- [143]. R.Belhatab, L.Amor, J.G.Barroso, L.G.Pedro, A.C.Figueiredo., 2012, *Arab. J.Chem.*, in press.
- [144]. A. Akrouit., 2004, *Cahiers Options Méditerranéennes*, 62, 289-292.
- [145]. Vinesh Kumar, Devendra Tyagi., 2013, *J. Phar. Phytochem.*, 2 (3), 159-163.
- [146]. U.R. Juergens,U.Dethlefsenw ,G. Steinkampz , A.Gillissen, R.Repcesz , H.Vetter., 2003, *Respiratory Med.*, 97, 250-256.
- [147]. L. Jirovetz, G. Buchbauer, Z. Denkova, A. Stoyanova, I. Murgov, E. Schmidt, M. Geissler., 2005, *Scientia Pharmaceutica*, 73, 27–39.
- [148]. U.R. Juergens, T. Engelen, K. Rucké, M. Stöber, A. Gillissen, H. Vetter., 2004, *Pulmonary Pharm. Therap.*, 17(5), 281-287.
- [149]. Dictionnaire Vidal et Additifs (CBTF) OVP ED. 1993.
- [150]. J. Emmert, G. Sartor, F. Sporer et J. Gummersbach., 2004, *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 9, 352-356.
- [151]. F. C. Seaman, V. A. Funk, 1983, *Taxon*, 32(1): 1-27.
- [152]. V. DE P. Emerencuno, Z. S. Ferreira, M. A. C. Kaplan, O. R. Goitlieb., 1987, *Phytochem.*, 26 (12), 3103-31.
- [153]. D. Haturvedi, 2011, *Opportunity, Chall. Scop. Nat. Prod. Med. Chem.* 313-334.
- [154]. A. Pickman, 1986, *Biochem Syst Eco.*, 14(3), 255-281.
- [155]. M. Bruno, S. Bancheva, S. Rosselli, A. Maggio., 2013, *Phytochem.*, 95:19-93.
- [156]. T. A. Geisman, M. A. Irwin, “[pac.iupac.org/publications/pac/21/2/0167/pdf/](http://pac.iupac.org/publications/pac/21/2/0167/pdf/)”, 167-180.
- [157]. F. de F. Favero, R. Grando, F. R. Nonato, I. M. Sousa, N. C. Queiroz, G. B. Longato, R. R. T. Zafred, J. E. Carvalho, H. M. Spindola, M. A. Foglio., 2014, *Complementary and Alternative*

*Medicine*, 14, 266-277.

- [158]. S. Zhang, Y. K. Won, C. N. Ong, H. M. Shen., 2005, *Curr. Med. Chem. Anti-Canc. Agents*, 5, 239-249.
- [159]. I. L. Acebey Castellon., « Caractérisation de terpènes antileishmaniens isolés par bioguidage d'une plante bolivienne *Hedyosmum angustifolium* (Ruiz & Pavon) Solms », 2007, thèse doctorat, Univ Toulouse, France.
- [160]. J-W. De Kraker, M. C. R. Franssen, M. C. F. Dalm, A. De Groot, H. J. Bouwmeester., 2001, *Plant Physiology*, 125, 1930–1940.
- [161]. J-W. De Kraker, M. C. R. Franssen, A. De Groot, W. A. König, H. J. Bouwmeester., 1998, *Plant Physiol*, 117, 1381–1392.
- [162]. B. Menina, C. Comino, E. Portis, A. Moglia, K. Cankar, H. J. Bouwmeester, S. Lanterina, J. Beekwilder., 2012, *plant sc.*, 190, 1– 8.
- [163]. K. H. Teoh, D. R. Polichuk, D. W. Reed, G. Nowak, P. S. Covello., 2006, *FEBS Letters*, 580, 1411–1416.
- [164]. A. M. Ramirez, N. Saillard, T. Yang, M. C. R. Franssen, H. J. Bouwmeester., 2013, *PLoS ONE*, 8(5): e65030.
- [165]. E. Rodriguez, G. H. N. Towers, J. C. Mitchell., 1976, *Phytochem.*, 15, 1573-1580.
- [166]. J-W. De Kraker., “The Biosynthesis of Sesquiterpene Lactones in Chicory (*Cichorium intybus* L.) Roots”, 2002, thèse doctorat, univ. Wageningen.
- [167]. <http://www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/sesqlactone/sesqlactone.html>.
- [168]. H. Alilou., «Etude phytochimique et antifongique de deux plantes du Sud du Maroc : *Asteriscus graveolens* subsp. *Odorus* (Schousb.) Greuter et *Asteriscus imbricatus* (Cav.) DC. », 2012, univ. Agadir, Maroc.
- [169]. B. Fraga., 1998, *Nat. Prod. Rep.*, 15, 73-92.
- [170]. J.B. Harborne, F.A. Tomasbarberan, Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids, 1991, éd. Proceedings of the Phytochemical Society of Europe, 31, 385.
- [171]. U. Jacobsson, V. Kumar, S. Saminathan., 1995, *Phytochem.*, 39(4), 839-843.
- [172]. T. Konishi, Y. Shimada, T. Nagao, H. Okarf, T. Konoshima., 2002, *Biol. Pharm. Bull.*, 25(10), 1370-1372.
- [173]. H. Tada, K. Takeda., 1971, *J. Chem. Soc. D*, 1391-1392.
- [174]. Y. Li, M-C. Zhu, M-L. Zhang, Y-F. Wangd, M. Dong, Q-W. Shi, C.-H. Huo, F. Sauriol, H. Kiyota, Y-C Gu, B. Cong., 2012, *Tetra. Letters*, 53, 2601-2603.
- [175]. A. Ulubelen, S. Öksüz, A. Schuster., 1990, *Phytochem.*, 29(12), 3948-3949.
- [176]. R. Floran, N. Shahbaz., S. Johannes., 2004, *J. Trad. Med.*, 21, 113-119.
- [177]. C. Banh-nhu, E. Gacs-Baitz, I. Radics, J. Tamas, V. Petri., 1979, *Phytochem.*, 18, 331-332.
- [178]. B. A. Balboul, A. A. ahmed, H. Otsuka, M. Bando, M. Kido, Y. Takeda., 1997, *Phytochem.*, 46(6), 1045-1049.
- [179]. M. Todorova, A. Trendafilova , B. Mikhova, A. Vitkova , H. Duddeck , 2007, *Phytochem.*, 68, 1722-1730.
- [180]. A. M. Galal, A-R. S. Ibrahim, J. S. Mossa, F. S. El-Ferally., 1999, *Phytochem.*, 51, 761-765.
- [181]. A. Trendafilova , M. Todorova , B. Mikhova, A. Vitkova , H. Duddeck., 2006, *Phytochem.*, 67, 764-770.
- [182]. S. Glasla, D. Gunbiligb, S. Narantuyab, I. Wenera, J. Jurenitscha., 2001, *J. Chromatogr. A*, 936, 193-200.
- [183]. V. Vajs, V. Bulatovic, K. Fodulovic-Savikin, N. Menkovic, S. Macura, N. Juranic, S. Milosavljevic., 1999, *Phytochem.*, 50, 287-291.
- [184]. A. Karioti, H. Skaltsa, A. Linden, R. Perozzo, R. Bun, D. Tasdemir., 2007, *J. Org. Chem.*, 72 (21), 8103-8106.
- [185]. M. Todorova, A. Trendafilova, K. Danova, D. Dimitrov., 2011, *Biochem. Syst. Ecol.*, 39, 868-

871.

- [186]. J. D. Staneva, M. N. Todorova, L. N. Evstatieva., 2005, *Biochem. Syst. Ecol.*, 33, 97-102.
- [187]. J. Jakupovic, Z-L. Chen and F. Bohlmann., 1987, *Phytochem.*, Vol. 26(10), 2771-2179.
- [188]. J. Beauhaire, J.L. Fourrey, M. Vuilhorgne., *Tetra. Letters*, 21, 3191-3194.
- [189]. R. G. Kelsey and F. Shafizadeh., 1979, *Phytochem.*, 18, 1591-1611.
- [190]. S. Matsueda, T. A. Geissman., 1967, *Tetra. Letters*, 8(23), 2159–2162
- [191]. G. D. Brown, 1993, *Phytochem.*, 32(2), 391-393.
- [192]. <http://fr.wikipedia.org/wiki/Art%C3%A9misinine>.
- [193]. R. S. Bhakuni, D. C. Jain, R. P. Sharma, S. Kumar., 2001, *Curr. Sc.*, 80(1), 36-48.
- [194]. M. A. Foglio., 2002, *planta Med.*, 68, 515-518.
- [195]. L. Messai, M-E. F. Hegazy, A. A. Ahmed, A. Kalla, B. Djaballah, S. Ohta., 2008, *Phytochem. Letters*, 1(2), 85-88.
- [196]. D. Boriki, 1996, *phytochem.*, 43, 1, 309-311.
- [197]. R. Segal, S. Sokoloff, B. Haran, D. V. Zaitschek, D. Lichtenbbrg, 1977, *Phytochem.*, 16, 1237-1241.
- [198]. J. A. Marco, J. F. Sanz-Cervera, J. M. Pareja, F. Sancenon, J. Valles-Xiraut, 1994, *Phytochem.*, 37(2), 4774-885.
- [199]. L. Zaiter, M. Bouheroum, S. Benayache, F. Benayache, F. Leon, I. Brouard, J. Quintana, F. Estevez, J. Bermejo., 2007, *Biochem. Sys. Ecol.*, 35, 533-538.
- [200]. H. Yamazaki, M. Miyakado, T. J. Mabry., 1982, *J. Nat. Prod.*, 4 (4): 508-508
- [201]. F. Bohlmann, C. Zdero., 1982, *Phytochem.*, 21(10), 2543-2549.
- [202]. F. Bohlmann, C. Zdero., 1979, *Phytochem.*, 18, 336- 337.
- [203]. F. S. Viesca, I. Romo, 1963, *Tetrahedron*, 19, 1285.
- [204]. A. Picman, “Analytical and Biological studies of sesquiterpene lactones” 1981, univ of British Columbia.
- [205]. E. Rodriguez, G. H. N. Towers J. C. Mitchell., 1976, *Phytochem.*, 15, 1573-1580.
- [206]. V. Saroglou, A. Karioti, A. Rancic, K. Dimas, C. Koukoulitsa, M. Zervou, H. Skaltsa., 2010, *J. Nat. Prod.* 73, 242–246
- [207]. W. A. Shah., 2014, *Inter. J. Res. Pharmacy. Chem. (IJRPC)* , 4(2), 217-221.
- [208]. J. B. Harborne., “Terpenoids: Lower”, *Encyclopedia of Life Sciences*, 2001, 1-7.
- [209]. A. Ghantous, H. G-Muhtasib, H. Vuorela, N. A. Saliba, N. Darwiche., 2010, *Drug Discovery Today*, 15(15-16).
- [210]. M. T. Scotti, M. B. Fernandes, M. J. P. Ferreira, V. P. Emerenciano., 2007, *Bioorganic & Med. Chem.*, 15, 2927-2934
- [211]. H. M. R. Hoffmann, J. R. Angew., 1985, *Chem. Ini. Ed. Engl.* 24, 94-110.
- [212]. A. Rivero, J. Quintana, J. L. Eiroaa, M. Lopeza, J. Triana, J. Bermejo, F. Estevez., 2003, *Euro. J. Pharmacol.*, 482, 77-84.
- [213]. Q. Zhang, Y. Lu, Y. Ding, J. Zhai, Q. Ji, W. Ma, M. Yang, H. Fan, J. Long, Z. Tong, Y. Shi, Y. Jia, B. Han, W. Zhang, C. Qiu, X. Ma, Q. Li, Q. Shi, H. Zhang, D. Li, J. Zhang, J. Lin, L-Y. Li, Y. Gao, Y. Chen., 2012, *J. Med. Chem.*, 55, 8757-8769.
- [214]. B. Öçelik, I. Gürbüz, T. Karaoglu, E. Yesilada., 2009, *Microbio. Res.*, 164, 545-552.
- [215]. B. Siedle, A. J. Garcia-Pineros, R. Murillo, J. Schulte-Monting, V. Castro, P. Rungeler, C. A. Klaas, F. B. Da Costa, W. Kisiel, I. Merfort., 2004, *J. Med. Chem.*, 47, 6042-6054.
- [216]. T. J. Schmidt, A. M. M. Nour, S. A. Khalid, M. Kaiser, R. Brun., 2009, *Molécules*, 14, 2062-2076.
- [217]. V. Castro, P. Rungeler, R. Murillo, E. Hernandez, G. Mora, H.L. Pahl, I. Merfort., 2000, *phytochem.*, 53, 257-263.

- [218]. A.F. Barrero, J.E. Enrique Oltra, M.Alvarez, D.S. Raslan, D. A. Saude, M. Akssira., 2000, *Fitoth.*, 71, 60-64.
- [219]. W. Chen, W. Tang, R. Zhang, L. Lou, W. Zhao., 2007, *J. Nat. Prod.*, 70 (4), 567-570.
- [220]. P. Sulsen, F. M. Frank, S. I. Cazorla, C. A. Anesini, E. L. Malchiodi, B. Freixa, R. Vila, L. V. Muschietti, V. S. Martino., 2008, *Antimicrob. Agents Chemoth.*, 52(7), 2415-2419.
- [221]. H. Li, C. Zhou, L. Zhou, Z. Chen, L. Yang, H. Bai, X. Wu, H. Peng, Y. Zhao, 2005, *Antiviral Chem. Chemoth.*, 16, 277-282.
- [222]. J. S. Ross, H. D. P. Menagé, J. L. M. Hawk, I. R. White., 1993, *Contact Dermatitis*, 29(2), 84-87.
- [223]. E. Paulsen, A.Otkjær, K. E. Andersen., 2008, *Contact Dermatitis*, 59(1), 1-6.
- [224]. F. A. Macias, J. C. G. Galindo, D. Castellano, R.Velasco., 1999, *J. Agric. Food Chem.*, 47 (10), 4407-4414.
- [225]. F. A. Macas, J. C. G. Galindo, D. Castellano, R. F. Velasco., 2000, *J. Agric. Food Chem.*, 48 (11), 5288-5296.
- [226]. F. M. Raupp, O. Spring., 2013, *J. Agr. Food Chem.*, 61 (44), 10481-10487.
- [227]. H. J. Bouwmeester, C. Roux, J. A. Lopez-Raez, G. Bécard., 2007, *Tends in Plant Science*, 12(5), 224-230.
- [228]. S. R. Ambrosio, Y.OKI, V. C. G. Heleno, J. S. Chaves, P. G. B. D. Nascimento, J. E. Lichston., 2008, *Phytochem.*, 69(10), 2052-2060
- [229]. H. J. Bouwneester, R. Matusova, S. Zhongkui, M. H. Beale., 2003, *Current Opinion in Plant Biology*, 6(4), 358-364.
- [230]. J. C. Gopfert, N. Heil, J. Conrad, O. Spring, 2005, *Plant Biol.*, 7, 148-155.
- [231]. C. Zidom., 2008, *Phytochem.*, 69(12), 2270-96.
- [232]. M. Chadwick, H. Trewin, F. Gawthrop, C. Wagstaff., 2013, *Int. J. Mol. Sci.*, 14, 12780-12805.
- [233]. F. D. F. Favero, R. Grando, F. R. Nonato, I. M. Sousa, N. C. Queiroz, G. B. Longato, R. RT. Zafred, J. E Carvalho, H M. Spindola1, M. A. Foglio, 2014, *Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 14, 266-277.
- [234]. E. D-Olmo, J. M. M. D-Corral, J. L. López, M. Gordaliza, A. S-Feliciano, 2010, *Avances en Química*, 5(2), 123-129.
- [235]. D. J. Brecknell, R. M. Carman., 1979, *Aust. J. Chem.*, 32, 2455-71.
- [236]. KADshazin, YBGatilov, MAdekenev., 1995, *Chem. Nat. Comp.*, 31(1),63.
- [237]. L. P. Nikonova, G. K. Nikonov., 1976, *Chem. Nat. Comp.*, 12(6), 666-668.
- [238]. F. Bohlmann, J. Jakupovic, M. Ahmed, A. Schuster., 1983, *Phytochem.*, 22(7), 1623- 1636.
- [239]. F. Shafizadeh, N. R. Bhadane., 1973, *Phytochem.*, 12, 857-862.
- [240]. F. Bohlmann, P. K. Mahanta, J. Jukupovic, R. Rastogi, A. A. Natu., 1978, *Phytochem.*, 17(7), 1165-1172.
- [241]. W. Kiesiel., 1978, *Phytochem.*, 17, 1059-1060.
- [242]. F. Bohlmann, C. Zdero., 1980, *Phytochem.*, 19, 587-591.
- [243]. J. F. Ciccio, J. Calzada., 1981, *Phytochem*, 20, 517.
- [244]. M. Konstantinopoulou, A. Karioti, S. Skaltsas, H. Skaltsas., 2003, *J. Nat. Prod.*, 66(5), 699-702.
- [245]. F. Bohlmann, N. Ates, M. Grenz., 1982, *Phytochem.*, 21(5), 1166-1168.
- [246]. J. Pokrnu., 1991, *Trends in Food Sc. Tech.*, 2, 223-227.
- [247]. M. Siddiq, S. Roidoung, D. S. Sogi, K. D. Dolan., 2013, *Food Chem.*, 136 (2), 803-806.
- [248]. D. Krishnaiah, R. sarbatly, R. Nithyanandam., 2011, *Food Bioprod. Process.*, 89 (3), 217-233.
- [249]. R.Haigh., 1986, *EEC approach, Food Chem. Tox.*, 24 (10-11), 1031-1034.
- [250]. D. Pattono, L.M. Battaglini, A. Barberio, L.De Castelli, A. Valiani, G.Varisco, M. L. Catassa,

- P. Davit, M. Pazzi, T. Civera., 2009, *Food Chem.*, 115(1), 285-289.
- [251]. M. Carochi, I. C. F. R. Ferreira., 2013, *Food Chem. Tox.*, 51, 15-25.
- [252]. T. Albshi, J. A. John, A. S. Al-Khalifa, F. Shahidi., 2013, *J. Func. Foods*, 5 (2), 590-600.
- [253]. S.J.Lee, K. Umamo, T. Shibamoto, K. G. Lee., 2005, *Food Chem.*, 91, 131-137.
- [254]. O. Fadel, K. El Kirat, S. Morandat., 2011, *Biochim. Biophys. Acta* 1808, 2973-2980.
- [255]. S-A., Yang, S-K. Jeon, E-J. Lee, C-H. Shim, I-S. Lee., 2010, *Nat. Prod. Res.*, 24 (2), 140-151.
- [256]. C. A. Rice-Evans, N. J. Miller, G. Paganga., 1997, *Trends in plant science*, 2 (4), 152-159.
- [257]. N. Andarwulan, R. Batari, D. A. Sandrasari, B. Bolling, H. Wijaya, 2010, *Food Chem.*, 121, 1231-1235.
- [258]. K. Zhou, L. Yu., 2006, *LWT-Food Sc. Tech.*, 39(10), 1155-1162.
- [259]. W. Song, C. M. Derito, M. K. Liu, X. He, M. Dong, R. H. Liu, 2010, *J. Agric. Food Chem.*, 58, 6621-6629.
- [260]. H. Boeing, A. Bechthold, A. Bub, S. Ellinger, D. Haller, A. Kroke, E. L-Bonnet, M. J. Muller, H. Oberitter, M. Schulze, P. Stehle, B. Watzl., 2012, *Eur. J. Nutr.*, 51, 637-663.
- [261]. A. H. Lo, Y. C. Liang, S. Y. Lin-Shiau, C. T. Ho, J. K. Lin., 2002, *Carcinogenesis*, 23 (6), 983-991.
- [262]. M. Skerget, P. Kotnik, M. Hadolin, A. R. Hras, M. Simoncic, Z. Knez., 2005, *Food Chem.*, 89, 191-198.
- [263]. <http://pharmask.tn/PharmaskSynchro/pharmacognosie/chapitre-8-les-tanins.pdf>
- [264]. R. Jarrige, E. Grenet, C. Demarquilly, J.-M. Besle., Nutrition des ruminants domestiques : ingestion et dégestion, INRA éd, chap II, p.57. sur le site : [www.Googlebooks.fr/books](http://www.Googlebooks.fr/books). Consulté le 03 /10/ 2014.
- [265]. T. De Bruyne, L. Pieters, H. Deelstra, A. Vietinck., 1999, *Biochem. Sys. Ecol.* 27(4), 445-459.
- [267]. D. M. Pereira, P. Valentão, J. A. Pereira, P. B. Andrade, 2009, *Molécules*, 14, 2202-2211
- [268]. T.P. T. Cushnie, A. J. Lamb, 2005, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 26, 343-356.
- [269]. Y. Chen, Y. C. Chen., 2013, *Food Chem.*, 138 (4), 2099-2127.
- [270]. H. Y. Young, Y. L. Luo, H. Y. Cheng, W. C. Hsieh, J. C. Liao, W. H. Peng., 2005, *J. Ethnophar*, 96(1-2), 207-210.
- [271]. T. Y. Lee, K. C. Lee, S. Y. Chen, H. H. Chang., 2009, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 382(1), 134-139.
- [272]. K. Pramod, S. H. Ansari, J. Ali., 2010, *Nat. Prod. Commun.*, 5(12), 1999-2006.
- [273]. K. E. Heim, A. R. Tagliaferro, D. J. Bobilya., 2002, *The J. Nut. Biochem.*, 13(10), 572-584.
- [274]. [http://biochim-agro.univ-lille1.fr/lipides/co/Cours\\_C\\_3\\_b\\_2.html](http://biochim-agro.univ-lille1.fr/lipides/co/Cours_C_3_b_2.html)
- [275]. S. Achat., « polyphénols de l'alimentation : Extraction, pouvoir antioxydant et interaction avec des ions métalliques », 2013, thèse de Doctorat, Univ A. Mira, Bedjaia.
- [276]. M. Azizkhani, P. Zandi., 2009, *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 3 (1), 59-62.
- [277]. T. Oladimeji, A. Kennedy, O. Ejeta, O. Ehigiator, F. Nwakamma E. Gerald., 2013, *Int. J. App. Sc. Tech.*, 3 (5), 107-115.
- [278]. H. S. Nahm, H. R. Juliani, J. E. Simon., 2012, *Journal of Medicinally Active Plants*, 1 (2), 69-74.
- [279]. M. G.-Albert, D. B.-Rousselot, Z. Abedinzadeh, D. Jore., Nov-Dec 2003, *Actualité chimique*, 91-96.
- [280]. K. Apel, H. Hirt., 2004, *Annu. Rev. Plant Biol*, 55:373-399.
- [281]. M. P. Murph. Y., 2009, *Biochem. J.*, 417, 1-13,
- [282]. E. R. Sherwin., 1976, *J. Am. Oil Chemists Society*, 53 (6), 430-436.
- [283]. S.V. Jovanovic, S. Steenken, M. Tosic, B. Marjanovic, M.G. Simic., 1994, *J. American Chem. Soc.*, 116: 4846-485.



- [284]. G. Cohen, P. M. Sinet., 1982, *FEBS Letters*, 138 (2), 258-260.
- [285]. F. Marc, A. Davin, L D-Benbrahim, C. Ferrand, M. Baccaunaud, P.Fritsch., 2004, *Med./Sci.*, 20, 458-63.
- [286]. M. Ferralia, C. Signorinia, B. Caciottia, L. Sugherinia, L. Ciccolia, D. Giachettib, M. Comporta, 1997, *FEBS Letters*, 416, 123-129.
- [287]. M. T. Fernandez, M. L. Mira, M. H. Florencio, K. R. Jennings., 2002, *J. Inorg. Biochem.*, 92 (2), 105-111.
- [288]. L. Mira, MT. Fernandez, M. Santos, R. Rocha, M. H. Florencio, K. R. Jennings., 2002, *Free Rad. Res.*, 36(11), 199-208.
- [289]. N. Boizot, J-P. Charpentier., 2006, *Chaier des thechniques de l'INRA*, N° spécial.
- [290]. Naciye Erkan, Sevgi Akgonen, Secil Ovat, Gizem Goksel, Erol Ayranci., 2011, *Food Res. Int.*, 44, 3013-3020.
- [291]. M. Raghavendra, A. M. Reddy, P. R. YAdav, A. S. Raju, L. Sivakumar., 2013, *Asian, J. Phar. Clinical res.*, 6(3).
- [292]. V. L. Singleton, R. Orthofer, R. M. L. Raventos., 1999, *Methods Enzymology*, 299, 152-178.
- [293]. D. Huang, B. Ou, R. L. Prior., 2005, *J. Agric. Food Chem.*, 53, 1841-1856.
- [294]. N. Chaieb, J. L. González, M. López-Mesas, M. Bouslama, M. Valiente., 2011, *Food Res. Int.*, 44, 970-977.
- [295]. E. Tsantili, K. Konstantinidis, M.V. Christopoulos, P.A. Roussos., 2011, *Scientia Horticulturae*, 129, 694-701.
- [296]. C. Popovici, I. Saykova, B. Tylkowski, 2009, *Revue de génie industriel*, 4, 25-39.
- [297]. K. Thaiponga, U. Boonprakoba, K. Crosbyb, L. C-Zevallosc, D. H. Byrnc., 2006, *J. Food Comp. Analy.*, 19, 669-675.
- [298]. M. Alothman, A. Rajeev, A. Karim., 2009, *Food Chem.*, 115 785-788.
- [299]. F. Medini, H. Fellah, R. Ksouri, C. Abdelly., 2014, *J. Taibah Univ. Sci.*, 8, 216-224.
- [300]. H-B. Li, C-C. Wong, K-W. Cheng, F. Chen., 2008, *LWT-Food Sci. Tech.*, 41(3), 385-390.
- [301]. M. A. Ebrahimzadeh, S. M. Nabavi, S. F. Nabavi, B. Eslami., 2010, *Trop. J. Phar. Res.*, 9 (2): 141-148.
- [302]. K. Thaiponga, U. Boonprakoba, K. Crosbyb, L. C-Zevallosc, D. H. Byrnc, 2006, *J. Food Comp. Analy.*, 19, 669-675.
- [303]. A. Djeridane, M. Yosfi, B. Nedjmi, D. Boutassouna, P. Stocker, N. Vidal., 2006, *Food Chem.*, 97, 654-660.
- [304]. Makhloufi A., «Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de deux plantes édicinales poussant à l'état spontané dans la région de Bechar (*M. pubescens* (Desf.) et *R. officinalis* L) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru », thèse doctorat, Univ. Aboubaker Belkaid.
- [305]. I.M.C. Brighente, M. Dias, L.G. Verdi, M.G. Pizzolatti, 2007, *Phar. Biology.*, 45( 2), 156-161.
- [306]. M. Okawa, J. Kinjo, T. Nohara, M. Ono., 2001, *Biol. Pharm. Bull.*, 24(10) 1202-1205.
- [307]. P. Sithisarn, W. Gritsanapan., 2005, *J. Pharm. Sci.*, 32(1-2), 31-35.
- [308]. O.S. Nimmi, DR. P. George., 2012, *Int. J. Pharm. Sci.*, 4, Suppl. 3.
- [309]. A. Phrutivorapongkul, K. Kiattisin, P. Jantrawut, S. Chansakaow, S. Vejabhikul, P. Leelapornpisid., 2013, *Pak. J. Pharm. Sci.*, 26(6), 1071-1076.
- [310]. Z. Chen, R. Bertin, G. Frolidi., 2013, *Food Chem.*, 138, 414-420.