

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DES FRERES MENTOURI-CONSTANTINE 1
FACULTE DES SCIENCES EXACTES
DEPARTEMENT DE CHIMIE

N° d'ordre: 66/DS/2022

Série: 06/CH/2022

THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences
Spécialité : Chimie organique
Option Phytochimie

Par

CHAOUCHE Massika

Thème

**Etude phytochimique et biologique de l'espèce *Thymus
munbyanus* subsp. *ciliatus* (Desf.) Greuter & Burdet**

Devant le jury:

Pr. SEGHIRI Ramdane	Université des Frères Mentouri, Constantine1	Président
Pr. BOUREGHDA Ahcène	Université des Frères Mentouri, Constantine1	Rapporteur
Pr. BENAÏSSA Ouahiba	Université Mostefa Ben Boulaïd, Batna 2	Examinatrice
M.C.A LEFAHAL Mostefa	Université Salah Boubnider, Constantine 3	Examineur

Soutenu le 15/09/2022

Remerciements

Avant tout, je remercie le bon **DIEU** « **ALLAH** » de m'avoir donné le courage, la santé, la patience et la volonté afin de réaliser et d'achever ce travail.

Les travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés entre l'unité de recherche: Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques (VARENBIOMOL), Faculté des Sciences Exactes, Université des Frères Mentouri, Constantine1, sous la direction du Professeur **Ahcène BOUREGHDA** et le laboratoire de phytochimie, Faculté des Sciences, Université de Çankırı Karatekin, Turquie, sous la direction du Professeur **Ibrahim DEMİRTAŞ**.

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse Monsieur **Ahcène BOUREGHDA**, Professeur à l'université des Frères Mentouri, Constantine1, pour sa disponibilité, ses conseils et son suivi tout au long de mes années de recherche qui ont permis de mener à terme ce travail. Je lui assure le témoignage de ma profonde.

Je remercie tout particulièrement et j'exprime toute ma gratitude à mon co-directeur de thèse Monsieur **Ibrahim DEMİRTAŞ**, Professeur à l'université de Çankırı Karatekin, Turquie, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, pour m'avoir fait confiance et m'avoir permis de réaliser ce travail dans de meilleures conditions tout en me laissant une grande liberté, ainsi que pour son aide malgré ses multiples occupations.

Je remercie spécialement Monsieur **Tevfik OZEN**, Docteur à l'université Ondokuz Mayıs Samsun, Turquie, pour son contribution efficace et son aide précieuse dans la partie biologique.

J'exprime toute ma reconnaissance à Monsieur **Ramdane SEGHIRI**, Professeur à l'université des Frères Mentouri, Constantine1, pour sa disponibilité, sa gentillesse, son aide, ses conseils précieux et pour le grand honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury de soutenance.

Mes vifs remerciements vont également à Madame **Ouahiba BENAÏSSA**, Professeur à l'université de Mostefa Ben Boulaïd, Batna2, pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant de juger ce travail.

Je tiens également à remercier Monsieur **Mostefa LEFAHAL**, Maître de conférences à Salah Boubnider, Constantine3 de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'examiner ce travail.

Mes remerciements les plus sincères vont aux professeurs, Monsieur **Samir BENAYACHE** et Madame **Fadila BENAYACHE** de l'université de Constantine, pour les conseils qu'ils m'ont prodigués et leur aide précieuse durant mes années de recherche.

Mes remerciements les plus sincères vont également au Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique Algérien qui m'a permis, en tant qu'enseignant-chercheur, de bénéficier une bourse dans le cadre du Programme National Exceptionnel (P.N.E) à l'Université de Çankırı Karatekin, Turquie .

Enfin, je remercie tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail et plus particulièrement **Feryal BENAYACHE**, **Hanane AISSAOUI**, **Lamia BENNIYOU**, **Naouel TEBBOUB** et **Hichem HAZMOUNE**.

Liste des abréviations

E	Extrait
F	Fraction
g	Gramme
m	Masse
mg	Milligramme
Kg	Kilogramme
mn	Minute
T	Température
°C	Degrés celsius
%	Pourcentage
M	Masse molaire
nm	Nanomètre
µm	Micromètre
µg	Microgramme
µl	Microlitre
ml	Millilitre
mm	Millimètre
mM	Millimolaire
min	Minute
v/v	Volume/volume
T_R	Temps de rétention
APG	Angiosperm Phylogeny Group
AcOEt	Acétate d'éthyle
MeOH	Méthanol
CH₃OH	Méthanol
CHCl₃	Chloroforme
BuOH	Butanol
H₂O	Eau distillée
UV	Ultra-violet
CCM	Chromatographie sur couche mince
GC/MS	Chromatographie gazeuse couplé à la spectrométrie de masse

HPLC	Chromatographie liquide haute performance
MS	Spectrométrie de masse
TOF	(<i>Time Of Flight</i>) Analyseur à temps de vol
TOF-MS	Spectromètre de masse à temps de vol
HPLC-TOF/MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse munie d'un analyseur à temps de vol
C18	Silice greffée
LC	Chromatographie en phase Liquide
ESI	Ionisation par électrospray
ESI-MS	Spectrométrie de masse à ionisation électrospray
ppm	Partie par million
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
Acétone-d6	Acétone deutérée
MeOH-d4	Méthanol deutéré
DMSO-d6	Diméthylsulfoxyde deutéré
RMN 1D	Résonance Magnétique Nucléaire monodimensionnelle
RMN 2D	Résonance Magnétique Nucléaire bidimensionnelle
¹³C	Carbone 13
¹H	Proton
RMN ¹H	Résonance magnétique nucléaire du proton
RMN ¹³C	Résonance magnétique nucléaire du carbone
DEPT	Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer
COSY	Correlated spectroscopy
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
δ_c	Déplacement chimique du carbone
Hz	Hertz
MHz	Mégahertz
δ (ppm)	Déplacement chimique exprimé en ppm
δ_H	Déplacement chimique du proton
m/z	Rapport masse sur charge atomique
uma	Unité de masse atomique
J	Constante de couplage
λ	Longueur d'onde

d	Doublet
t	Triplet
S	Singulet
q	Quadruplet
Sl	Singulet large
dl	Doublet large
NH₃	Ammoniac
DPPH[•]	Radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
Mo	Molybdène
PPM	Phosphomolybdate
BHT	Butylhydroxytoluène.
BHA	Butylhydroxyanisole
Abs	Absorbance
I(%)	Pourcentage d'inhibition.

Liste des figures

Chapitre I

- Figure I.1:** Carte de répartition géographique de la famille des Lamiacées.....4
Figure I.2: Les différentes classes de favonoïdes isolées du genre *Thymus*.....5

Chapitre II

- Figure II.1:** *Thymus munbyanus* subsp. *ciliatus* (Desf.) Greuter & Burdet.....37
Figure II.2: Organigramme d'extraction du *T. munbyanus* subsp. *ciliatus*.....38
Figure II.3 : Schéma récapitulatif de la séparation de l'extrait AcOEt.....43
Figure II.4 : Schéma récapitulatif de la séparation de l'extrait *n*-BuOH.....45

Chapitre III

- Figure III.1:** Profils chromatographiques des extraits de *T. munbyanus* subsp. *ciliatus* analysés par HPLC-TOF/MS en mode négatif48
Figure III.2: Structure du composé A1.....52
Figure III.3: Spectre RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) du composé A1.....53
Figure III.3a: Spectre RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) étalé de 10 à 20,5 ppm du composé A1.....53
Figure III.3b: Spectre RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) étalé de 21 à 50,5 ppm du composé A1.....54
Figure III.3c: Spectre RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) étalé de 55 à 142 ppm du composé A1.....54
Figure III.4: Spectre DEPT (150 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) du composé A1.....55
Figure III.4a: Spectre DEPT (150 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) étalé de 12 à 20,5 ppm du composé A1.....55
Figure III.4b: Spectre DEPT (150 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) étalé de 20,5 à 142 ppm du composé A1.....56
Figure III.5: Spectre RMN ¹H (600 MHz, DMSO-d₆, δppm) du composé A1.....56
Figure III.5a: Spectre RMN ¹H (600 MHz, DMSO-d₆, δppm) étalé de 0,6 à 2,4 ppm du composé A1.....57
Figure III.5b: Spectre RMN ¹H (600 MHz, DMSO-d₆, δppm) étalé de 0,58 à 0,96 ppm du composé A1.....58

Figure III.5c: Spectre RMN ^1H (600 MHz, DMSO-d ₆ , δ ppm) étalé de 2,8 à 5,4 ppm du composé A1.....	60
Figure III.6: Spectre RMN 2D HSQC (600 MHz, DMSO-d ₆ , δ ppm) du composé A1.....	60
Figure III.6a: Spectre RMN 2D HSQC (600 MHz, DMSO-d ₆ , δ ppm) étalé (^1H : 0,5-1,9 ppm; ^{13}C : 7-31 ppm)du composé A1.....	61
Figure III.6b: Spectre RMN 2D HSQC (600 MHz, DMSO-d ₆ , δ ppm) étalé (^1H : 2,1-5,5 ppm; ^{13}C : 48-126 ppm) du composé A1.....	61
Figure III.6c: Spectre RMN 2D HSQC (600 MHz, DMSO-d ₆ , δ ppm) étalé (^1H : 0,5-2,6 ppm; ^{13}C : 31-59 ppm) du composé A1.....	62
Figure III.7: Spectre RMN 2D HMBC (600 MHz, DMSO-d ₆ , δ ppm) du composé A1.....	62
Figure III.7a: Spectre RMN 2D HMBC (600 MHz, DMSO-d ₆ , δ ppm) étalé (^1H : 2,0-5,7 ppm; ^{13}C : 5-145 ppm) du composé A1.....	63
Figure III.7b: Spectre RMN 2D HMBC (600 MHz, DMSO-d ₆ , δ ppm) étalé (^1H : 0,35-1,00 ppm ; ^{13}C : 5-160 ppm) du composé A1.....	63
Figure III.7c: Spectre RMN 2D HMBC (600 MHz, DMSO-d ₆ , δ ppm) étalé (^1H : 1,00-1,70 ppm; ^{13}C : 5-68 ppm) du composé A1.....	64
Figure III.8: Spectre RMN 2D COSY (600 MHz, DMSO-d ₆ , δ ppm) du composé A1.....	64
Figure III.8a: Spectre RMN 2D COSY (600 MHz, DMSO-d ₆ , δ ppm) étalé du composé A1.....	65
Figure III.9: Chromatogramme d'identification du produit A1 dans l'extrait ACOEt par HPLC-TOF/MS en mode négatif	66
Figure III.10: Structure du composé A2.....	66
Figure III.11: Spectre de RMN ^{13}C (150 MHz, acétone-d ₆ , δ ppm) du composé A2.....	67
Figure III.12: Spectre de RMN DEPT(150 MHz, acétone-d ₆ , δ ppm) du composé A2	68
Figure III.13: Spectre RMN ^1H (600 MHz, acétone-d ₆ , δ ppm) du composé A2	69
Figure III.13a: Spectre RMN ^1H (600 MHz, acétone-d ₆ , δ ppm) étalé de 6,90 à 7,95 ppm du composé A2.....	69
Figure III.14: Spectre HSQC (600 MHz, acétone-d ₆ , δ ppm) du composé A2.....	70
Figure III.14a: Spectre HSQC (600 MHz, acétone-d ₆ , δ ppm) étalé (^1H : 6,3-8,8 ppm; ^{13}C : 108-141 ppm) du composé A2.....	70
Figure III.15: Spectre RMN 2D COSY (600 MHz, acétone-d ₆ , δ ppm) du composé A2.....	71
Figure III.16: Spectre RMN 2D HMBC (600 MHz, acétone-d ₆ , δ ppm) du composé A2....	72
Figure III.16a: Spectre RMN 2D HMBC (600 MHz, acétone-d ₆ , δ ppm) étalé (^1H : 6,4-8,1 ppm; ^{13}C : 109-190 ppm) ppm du composé A2	72

Figure III.17: Chromatogramme d'identification du produit A3 dans l'extrait ACOEt par HPLC-TOF/MS en mode négatif	73
Figure III.18: Structure du composé A3.....	73
Figure III.19: Spectre de masse ESI-MS du composé A3.....	74
Figure III.20: Spectre RMN ¹ H (600 MHz, MeOH-d ₄ , δ ppm) du composé A3.....	75
Figure III.20a: Spectre RMN ¹ H (600 MHz, MeOH-d ₄ , δ ppm) étalé de 2,5 à 8,0 ppm du composé A3.....	75
Figure III.20b: Spectre RMN ¹ H (600 MHz, MeOH-d ₄ , δ ppm) étalé de 6,4 à 8,8 ppm du composé A3.....	76
Figure III.21: Spectre RMN 2D COSY (600 MHz, MeOH-d ₄ , δ ppm) du composé A3.....	76
Figure III.22: Spectre RMN 2D HSQC (600 MHz, MeOH-d ₄ , δ ppm) du composé A3.....	77
Figure III.23: Spectre RMN 2D HMBC (600 MHz, MeOH-d ₄ , δ ppm) du composé A3.....	78
Figure III.24: Chromatogramme d'identification du produit A3 dans l'extrait ACOEt par HPLC-TOF/MS en mode négatif	79
Figure III.25: Structure du composé A4.....	79
Figure III.26: Spectre de masse ESI-MS du composé A4.....	80
Figure III.27: Spectre de RMN ¹³ C (600 MHz, acétone-d ₆ , δ ppm) du composé A4.....	80
Figure III.28: Spectre de RMN DEPT(600 MHz, acétone-d ₆ , δ ppm) du composé A4.....	81
Figure III.29: Spectre RMN ¹ H (600 MHz, acétone-d ₆ , δ ppm) du composé A4.....	82
Figure III.29a: Spectre RMN ¹ H (600 MHz, acétone-d ₆ , δ ppm) étalé de 6,70 à 7,85 ppm du composé A4.....	82
Figure III.30: Spectre RMN 2D COSY (600 MHz, acétone-d ₆ , δ ppm) du composé A4.....	82
Figure III.31: Spectre HSQC (600 MHz, acétone-d ₆ , δ ppm) du composé A4.....	83
Figure III.32: Spectre RMN 2D HMBC (600 MHz, acétone-d ₆ , δ ppm) du composé A4....	84
Figure III.33: Chromatogramme d'identification du produit A4 dans l'extrait ACOEt par HPLC-TOF/MS en mode négatif	85
Figure III.34: Structure du composé A5.....	85
Figure III.35: Spectre de masse ESI-MS du composé A5.....	86
Figure III.36: Spectre RMN ¹ H (600 MHz, acétone-d ₆ , δ ppm) du composé A5....	87
Figure III.37: Spectre HSQC (600 MHz, acétone-d ₆ , δ ppm) du composé A5.....	87
Figure III.38: Spectre RMN 2D COSY (600 MHz, acétone-d ₆ , δ ppm) du composé A5.....	88
Figure III.39: Spectre de RMN ¹³ C (600 MHz, acétone-d ₆ , δ ppm) du composé A5.....	88
Figure III.40: Spectre RMN 2D HMBC (600 MHz, acétone-d ₆ , δ ppm) du composé A5....	89

Figure III.41: Structure du composé A6.....	90
Figure III.42: Spectre de masse ESI-MS du composé A6.....	90
Figure III.43: Spectre RMN ¹ H (600 MHz, acétone-d6, δ ppm) du composé A6.....	91
Figure III.43a: Spectre RMN ¹ H (600 MHz, acétone-d6, δ ppm) étalé de 6,1 à 7,7 ppm du composé A6.....	91
Figure III.43b: Spectre RMN ¹ H (600 MHz, acétone-d6, δ ppm) étalé de 1,0 à 4,3 ppm du composé A6.....	92
Figure III.44: Spectre RMN 2D COSY (600 MHz, acétone-d6, δ ppm) du composé A6.....	92
Figure III.45: Spectre HSQC (600 MHz, acétone-d6, δ ppm) du composé A6.....	93
Figure III.46: Spectre de RMN ¹³ C (150 MHz, acétone-d6, δ ppm) du composé A6.....	94
Figure III.46a: Spectre RMN ¹³ C (150 MHz, acétone-d6, δ ppm) étalé de 112 à 150 ppm du composé A6.....	94
Figure III.47: Spectre DEPT(150 MHz, acétone-d6, δ ppm) du composé A6.....	95
Figure III.47a: Spectre DEPT (150 MHz, acétone-d6, δ ppm) étalé de 114 à 116 ppm du composé A6	95
Figure III.48: Spectre RMN 2D HMBC (600 MHz, acétone-d6, δ ppm) du composé A6.....	96
Figure III.48a: Spectre RMN 2D HMBC (600 MHz, acétone-d6, δ ppm) étalé (¹ H: 5,4-8,6 ppm; ¹³ C: 75-200 ppm) du composé A6.....	96
Figure III.49: Chromatogramme d'identification du produit A6 dans l'extrait ACOEt par HPLC-TOF/MS en mode négatif	97
Figure III.50: Structure du composé A7.....	97
Figure III.51: Spectre de masse ESI-MS du composé A7.....	98
Figure III.52: Spectre de RMN ¹³ C (150 MHz, acétone-d6, δ ppm) du composé A7.....	98
Figure III.52a: Spectre RMN ¹³ C (150 MHz, acétone-d6, δ ppm) étalé de 113 à 150 ppm du composé A7.....	99
Figure III.53: Spectre DEPT(150 MHz, acétone-d6, δ ppm) du composé A7.....	99
Figure III.53a: Spectre DEPT(150 MHz, acétone-d6, δ ppm) étalé de 114 à 149 ppm du composé A7.....	100
Figure III.54: Spectre RMN ¹ H (600 MHz, acétone-d6, δ ppm) du composé A7.....	101
Figure III.54a: Spectre RMN ¹ H (600 MHz, acétone-d6, δ ppm) étalé de 6,2 à 7,6 ppm du composé A7.....	101
Figure III.55: Spectre RMN 2D COSY (600 MHz, acétone-d6, δ ppm) du composé A7...	102
Figure III.56: Spectre HSQC (600 MHz, acétone-d6, δ ppm) du composé A7.....	102

Figure III.57: Spectre RMN 2D HMBC (600 MHz, acétone-d ₆ , δ ppm) du composé A7...	103
Figure III.58: Chromatogramme d'identification du produit A7 dans l'extrait ACOEt par HPLC-TOF/MS en mode négatif	104
Figure III.59: Structure du composé A8.....	104
Figure III.60: Spectre de masse ESI-MS du composé A8.....	105
Figure III.61: Spectre RMN ¹ H (600 MHz, acétone-d ₆ , δ ppm) du composé A8.....	105
Figure III.61a: Spectre RMN ¹ H (600 MHz, acétone-d ₆ , δ ppm) étalé de 6,9 à 9,9 ppm du composé A8.....	106
Figure III.62: Spectre RMN 2D COSY (600 MHz, acétone-d ₆ , δ ppm) du composé A8...	106
Figure III.63: Spectre HSQC (600 MHz, acétone-d ₆ , δ ppm) du composé A8.....	107
Figure III.64: Spectre de RMN ¹³ C (150MHz, acétone-d ₆ , δ ppm) du composé A8.....	108
Figure III.65: Spectre RMN 2D HMBC (600 MHz, acétone-d ₆ , δ ppm) du composé A8...	109
Figure III.65a: Spectre RMN 2D HMBC (600 MHz, acétone-d ₆ , δ ppm) étalé (¹ H: 6,2-10,8 ppm; ¹³ C: 100-205 ppm) du composé A8.....	109
Figure III.66: Structure du composé A9.....	110
Figure III.67: Spectre de masse ESI-MS du composé A9.....	110
Figure III.68: Spectre RMN ¹ H (600 MHz, MeOH-d ₄ , δppm) du composé A9.....	111
Figure III.68a: Spectre RMN ¹ H (600 MHz, MeOH-d ₄ , δppm) étalé de 2,0 à 8,2 ppm du composé A9.....	112
Figure III.68b: Spectre RMN ¹ H (600 MHz, MeOH-d ₄ , δppm) étalé de 6,20 à 7,50 ppm du composé A9.....	112
Figure III.69: Spectre RMN 2D HSQC (600 MHz, MeOH-d ₄ , δ ppm) du composé A9....	113
Figure III.70: Spectre RMN 2D COSY (600 MHz, MeOH-d ₄ , δ ppm) du composé A9....	113
Figure III.71: Spectre RMN 2D HMBC (600 MHz, MeOH-d ₄ , δ ppm) du composé A9....	114
Figure III.72: Chromatogramme d'identification du produit A9 dans l'extrait ACOEt par HPLC-TOF/MS en mode négatif	115
Figure III.73: Structure du composé A10.....	115
Figure III.74: Spectre RMN ¹ H (600 MHz, acétone-d ₆ , δ ppm) du composé A10.....	116
Figure III.75: Spectre HSQC (600 MHz, acétone-d ₆ , δ ppm) du composé A10.....	116
Figure III.76: Spectre RMN ¹³ C (150 MHz, acétone-d ₆ , δ ppm) du composé A10.....	117
Figure III.77: Spectre DEPT(150 MHz, acétone-d ₆ , δ ppm) du composé A10.....	117
Figure III.78: Spectre RMN 2D COSY (600 MHz, acétone-d ₆ , δ ppm) du composé A10..	118
Figure III.79: Spectre RMN 2D HMBC (600 MHz, acétone-d ₆ , δ ppm) du composé A10.	118

Figure III.80: Chromatogramme d'identification du produit A10 dans l'extrait ACOEt par HPLC-TOF/MS en mode négatif	119
Figure III.81: Structure du composé A11.....	119
Figure III.82: Spectre de masse ESI-MS du composé A11.....	119
Figure III.83: Spectre RMN ¹ H (600 MHz, acétone-d ₆ , δ ppm) du composé A11.....	121
Figure III.83a: Spectre RMN ¹ H (600 MHz, acétone-d ₆ , δ ppm) étalé de 5,2 à 7,2 ppm du composé A11.....	121
Figure III.83b: Spectre RMN ¹ H (600 MHz, acétone-d ₆ , δ ppm) étalé de 2,55 à 3,25 ppm du composé A11.....	122
Figure III.84: Spectre RMN 2D HSQC (600 MHz, acétone-d ₆ , δ ppm) du composé A11..	122
Figure III.85: Spectre RMN 2D COSY (600 MHz, acétone-d ₆ , δ ppm) du composé A11..	123
Figure III.86: Spectre de RMN ¹³ C (150 MHz, acétone-d ₆ , δ ppm) du composé A11.....	123
Figure III.87: Spectre RMN 2D HMBC (600 MHz, acétone-d ₆ , δ ppm) du composé A11..	124
Figure III.88: Chromatogramme d'identification du produit A11 dans l'extrait ACOEt par HPLC-TOF/MS en mode négatif	125
Figure III.89: Structure du composé A12.....	126
Figure III.90: Spectre de masse ESI-MS du composé A12.....	126
Figure III.91: Spectre RMN ¹ H (600 MHz, acétone-d ₆ , δ ppm) du composé A12.....	127
Figure III.91a: Spectre RMN ¹ H (600 MHz, acétone-d ₆ , δ ppm) étalé de 6,2 à 7,6 ppm du composé A12.....	127
Figure III.92: Spectre RMN 2D COSY (600 MHz, acétone-d ₆ , δ ppm) du composé A12..	128
Figure III.93: Spectre HSQC (600 MHz, acétone-d ₆ , δ ppm) du composé A12.....	128
Figure III.94: Spectre RMN 2D HMBC (600 MHz, acétone-d ₆ , δ ppm) du composé A12..	129
Figure III.95: Chromatogramme d'identification du produit A12 dans l'extrait ACOEt par HPLC-TOF/MS en mode négatif	130
Figure III.96: Structure du composé A13.....	131
Figure III.97: Spectre de masse ESI-MS du composé A13.....	131
Figure III.98: Spectre de RMN ¹³ C (150 MHz, MeOH-d ₄ , δppm) du composé A13.....	132
Figure III.99: Spectre RMN ¹ H (600 MHz, MeOH-d ₄ , δppm) du composé A13.....	133
Figure III.99a: Spectre RMN ¹ H (600 MHz, MeOH-d ₄ , δppm) étalé de 6,4 à 7,8 ppm du composé A13.....	133
Figure III.100: Spectre RMN 2D HSQC (600 MHz, MeOH-d ₄ , δ ppm) du composé A13..	134
Figure III.101: Spectre RMN 2D COSY (600 MHz, MeOH-d ₄ , δ ppm) du composé A13..	134

Figure III.102: Spectre RMN 2D HMBC (600 MHz, MeOH-d ₄ , δ ppm) du composé A13..	135
Figure III.103: Chromatogramme d'identification du produit A13 dans l'extrait ACOEt par HPLC-TOF/MS en mode négatif	136
Figure III.104: Structure du composé A14.....	136
Figure III.105: Spectre RMN ¹³ C (150 MHz, MeOH-d ₄ , δ ppm) du composé A14.....	137
Figure III.106: Spectre DEPT (150 MHz, MeOH-d ₄ , δ ppm) du composé A14.....	137
Figure III.107: Spectre RMN ¹ H (600 MHz, MeOH-d ₄ , δ ppm) du composé A14.....	138
Figure III.108: Spectre RMN 2D HSQC (600 MHz, MeOH-d ₄ , δ ppm) du composé A14.	138
Figure III.109: Spectre RMN 2D HMBC (600 MHz, MeOH-d ₄ , δ ppm) du composé A14..	139
Figure III.110: Spectre RMN 2D COSY (600 MHz, MeOH-d ₄ , δ ppm) du composé A14.	139
Figure III.111: Chromatogramme d'identification du produit A14 dans l'extrait ACOEt par HPLC-TOF/MS en mode négatif	140
Figure III.112: Structure du composé B1.....	140
Figure III.113: Spectre RMN ¹³ C (150 MHz, MeOH-d ₄ , δ ppm) du composé B1.....	141
Figure III.113a: Spectre RMN ¹³ C (150 MHz, MeOH-d ₄ , δ ppm) étalé de 112 à 131 ppm du composé B1.....	141
Figure III.113b: Spectre RMN ¹³ C (150 MHz, MeOH-d ₄ , δ ppm) étalé de 140 à 150 ppm du composé B1.....	142
Figure III.114: Spectre DEPT (150 MHz, MeOH-d ₄ , δ ppm) du composé B1.....	142
Figure III.114a: Spectre DEPT (150 MHz, MeOH-d ₄ , δ ppm) étalé de 113 à 149 ppm du composé B1.....	143
Figure III.115: Spectre RMN ¹ H (600 MHz, MeOH-d ₄ , δ ppm) du composé B1.....	144
Figure III.115a: Spectre RMN ¹ H (600 MHz, MeOH-d ₄ , δ ppm) étalé de 6,1 à 7,6 ppm du composé B1.....	145
Figure III.116: Spectre RMN 2D HSQC (600 MHz, MeOH-d ₄ , δ ppm) du composé B1...	145
Figure III.117: Spectre RMN 2D COSY (600 MHz, MeOH-d ₄ , δ ppm) du composé B1...	146
Figure III.118: Spectre RMN 2D HMBC (600 MHz, MeOH-d ₄ , δ ppm) du composé B1....	147
Figure III.119: Structure du composé B2.....	148
Figure III.120: Spectre RMN ¹³ C (150 MHz, DMSO-d ₆ , δ ppm) du composé B2.....	149
Figure III.120a: Spectre RMN ¹³ C (150 MHz, DMSO-d ₆ , δ ppm) étalé de 55 à 138 ppm du composé B2.....	150
Figure III.120b: Spectre RMN ¹³ C (150 MHz, DMSO-d ₆ , δ ppm) étalé de 147 à 179 ppm du composé B2.....	150

Figure III.121: Spectre DEPT(150 MHz, DMSO-d ₆ , δ ppm) du composé B2.....	151
Figure III.121a: Spectre DEPT(150 MHz, DMSO-d ₆ , δ ppm) étalé de 146 à 179 ppm du composé B.....	151
Figure III.122: Spectre RMN ¹ H (600 MHz, DMSO-d ₆ , δppm) du composé B2.....	153
Figure III.122a: Spectre RMN ¹ H (600 MHz DMSO-d ₆ , δppm) étalé de 6,80 à 8,05 ppm du composé B2.....	154
Figure III.122b: Spectre RMN ¹ H (600 MHz DMSO-d ₆ , δppm) étalé de 5,40 à 6,50 ppm du composé B2.....	154
Figure III.122c: Spectre RMN ¹ H (600 MHz, DMSO-d ₆ , δppm) étalé de 3,24 à 3,70 ppm du composé B2.....	155
Figure III.123: Spectre RMN 2D HSQC (600 MHz, DMSO-d ₆ , δ ppm) du composé B2..	155
Figure III.123a: Spectre RMN 2D HSQC (600 MHz, DMSO-d ₆ , δ ppm) étalé (¹ H: 2,00-8,5 ppm; ¹³ C: 10-160 ppm) du composé B2.....	156
Figure III.124: Spectre RMN 2D COSY (600 MHz, DMSO-d ₆ , δ ppm) du composé B2..	156
Figure III.125: Spectre RMN 2D HMBC (600 MHz, DMSO-d ₆ , δ ppm) du composé B2..	158
Figure III.126: Chromatogramme d'identification du produit B2 dans l'extrait <i>n</i> -BuOH par HPLC-TOF/MS en mode négatif.....	159

Chapitre IV

Figure IV.1: Les extraits et les produits purs testés.....	166
Figure IV.2: Réaction de test DPPH.....	167
Figure IV.3: Activité antioxydante totale des composés et d'extraits de <i>T. munbyanus</i> subsp. <i>ciliatus</i>	169
Figure IV.4: L'effet scavenger du radical DPPH des composés et d'extraits de <i>T. munbyanus</i> subsp. <i>ciliatus</i>	171
Figure IV.5: Réaction de réduction du radical libre par un composé phénolique.....	172
Figure IV.6: Réaction de piégeage de radical libre (DPPH•) avec le composé A7.....	173
Figure IV.7: Réaction de piégeage de radical libre (DPPH•) avec le composé A8.....	173
Figure IV.8: Réaction de piégeage de radical libre (DPPH•) avec le composé A12.....	173

Liste des tableaux

Chapitre I

Tableau I.1 : Les flavonoïdes isolés du genre <i>Thymus</i>	6
Tableau I.2: Les composés phénoliques isolés du genre <i>Thymus</i>	15
Tableau I.3: Les monoterpènes isolés de <i>Thymus vulgaris</i>	20
Tableau I.4: Les triterpènes isolés du genre <i>Thymus</i>	21
Tableau I.5: Les stérols isolés du genre <i>Thymus</i>	23
Tableau I.6: Autres composés isolés du genre <i>Thymus</i>	24
Tableau I.7: Activités biologiques d'espèces du genre <i>Thymus</i>	25

Chapitre II

Tableau II.1 : Rendements des extraits.....	38
Tableau II.2: Programme de la phase mobile A et B	39
Tableau II.3: Résultats du fractionnement par chromatographie sur colonne de l'extrait d'acétate d'éthyle de <i>T. munbyanus</i> subsp. <i>ciliatus</i>	40
Tableau II.4: Résultats de la séparation de la fraction F10 sur colonne de Sephadex.....	41
Tableau II.5: Résultats de la séparation de la fraction F15 sur colonne de Sephadex.....	42
Tableau II.6: Résultats du fractionnement par chromatographie sur colonne de l'extrait <i>n</i> -butanol de <i>T. munbyanus</i> subsp. <i>ciliatus</i>	44

Chapitre III

Tableau III.1: Composés identifiés dans les extraits de <i>T. munbyanus</i> subsp. <i>ciliatus</i> par HPLC-TOF/MS.....	49
Tableau III.2: Les structures des composés identifiés dans les extraits de <i>T. munbyanus</i> subsp. <i>ciliatus</i> par HPLC-TOF/MS.....	50
Tableau III.3: Données du spectre RMN ¹³ C et RMN ¹ H du produit A1 dans DMSO-d ₆	65
Tableau III.4: Données du spectre RMN ¹³ C et RMN ¹ H du produit A2 dans acétone-d ₆ ...	73
Tableau III.5: Données du spectre RMN ¹³ C et RMN ¹ H du produit A3 dans MeOH-d ₄	78
Tableau III.6 : L'ensemble des données relatives aux spectres RMN- ¹ H et ¹³ C du composé A4 dans acétone-d ₆	84
Tableau III.7 : Données spectrales RMN ¹ H et ¹³ C du composé A5 dans acétone-d ₆	89

Tableau III.8 : Déplacements chimiques en RMN ^{13}C et RMN ^1H du composé A6 dans acétone- d_6	97
Tableau III.9 : Données spectroscopique RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé A7 dans acétone- d_6	104
Tableau III.10 : Les données spectrales de RMN du composé A8 dans acétone- d_6	109
Tableau III.11 : Les données spectrales RMN du composé A9 dans MeOH- d_4	114
Tableau III.12 : Déplacement chimiques RMN du composé A10 dans acétone- d_6	118
Tableau III.13 : Données spectrales de RMN du composé A11 dans acétone- d_6	125
Tableau III.14 : Déplacements chimiques en RMN ^{13}C et RMN ^1H du composé A12 dans acétone- d_6	130
Tableau III.15 : Déplacements chimiques en RMN ^{13}C et RMN ^1H du composé A13 enregistré dans MeOH- d_4	135
Tableau III.16 : Déplacements chimiques en RMN ^{13}C et RMN ^1H du composé A14 enregistré dans MeOH- d_4	140
Tableau III.17 : Déplacements chimiques en RMN ^{13}C et RMN ^1H du composé B1 enregistré dans MeOH- d_4	148
Tableau III.18 : Déplacements chimiques en RMN ^{13}C et RMN ^1H du composé B2 enregistré dans DMSO- d_6	158

Table des matières

Introduction générale	1
Références bibliographiques	3

CHAPITRE I: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. La famille des Lamiaceae	4
I.1.1. Généralités sur la famille des lamiacées	4
I.2. Genre <i>Thymus</i>	4
I.2.1. Présentation botanique et géographique du genre <i>Thymus</i>	4
I.2.2. Utilisation en médecine traditionnelle du genre <i>Thymus</i>	5
I.2.3. Principaux métabolites secondaires du genre <i>Thymus</i>	5
I.2.3.1. Les composés phénoliques.....	5
I.2.3.1.A. Flavonoïdes.....	5
I.2.3.1.B. Non flavonoïdes	15
I.2.3.2. Les terpènes.....	19
I.2.3.3. Les stérols.....	23
I.2.3.4. Autres composés.....	23
I.2.4. Activités biologiques de différentes espèces du genre <i>Thymus</i>	24
I.3. Conclusion.....	26
Références bibliographiques.....	27

CHAPITRE II: PARTIE EXPERIMENTALE

Etude phytochimique de l'espèce *Thymus munbyanus subsp.ciliatus* (Desf.) Greuter & Burdet

II.1. Choix du matériel végétal.....	36
II.2. Place dans la systématique.....	36
II.3. Description botanique	36
II.4. Répartition géographique.....	37
II.5. Matériel végétal.....	37
II.6. Protocole expérimental d'extraction.....	37
II.7. Analyse qualitative et quantitative des extraits.....	39
II.8. Séparation et purification.....	39

II.8.1. Séparation et purification des composés de l'extrait acétate d'éthyle.....	39
II.8.2. Séparation et purification des composés de l'extrait <i>n</i> -butanol.....	43
Références bibliographiques.....	46

CHAPITRE III: DISCUSSION DES RESULTATS

III.1. Résultat de l'analyse par HPLC-TOF/MS	48
III.2. Elucidation structurale des composés isolé.....	52
III.2.1. Identification structurale des produits isolés de la phase AcOEt	52
III.2.1.1. Elucidation structurale du composé A1 (ATC1D).....	52
III.2.1.2. Elucidation structurale du composé A2 (ATC2b-1a).....	66
III.2.1.3. Elucidation structurale du composé A3 (ATC-3c-3a)	73
III.2.1.4. Elucidation structurale du composé A4 (ATC2d2a).....	79
III.2.1.5. Elucidation structurale du composé A5 (ATC2d2d).....	85
III.2.1.6. Elucidation structurale du composé A6 (ATC3c3b).....	90
III.2.1.7. Elucidation structurale du composé A7 (ATC3c5b1).....	97
III.2.1.8. Elucidation structurale du composé A8 (ATC2d3a).....	104
III.2.1.9. Elucidation structurale du composé A9 (ATC3C10A).....	110
III.2.1.10. Elucidation structurale du composé A10 (ATC2d27).....	115
III.2.1.11. Elucidation structurale du composé A11 (ATC10).....	119
III.2.1.12. Elucidation structurale du composé A12 (ATC10C).....	126
III.2.1.13. Elucidation structurale du composé A13 (ATC9E).....	131
III.2.1.14. Elucidation structurale du composé A14 (ATC2b2f1).....	136
III.2.2. Identification structurale des produits isolés de l'extrait <i>n</i> -BuOH	140
III.2.2.1. Elucidation structurale du composé B1.....	140
III.2.2.2. Elucidation structurale du composé B2.....	148
III.2.3. Conclusion.....	159
Références bibliographiques.....	161

Chapitre IV: Activités biologiques

IV.1. Activité antioxydante totale au phosphomolybdate d'ammonium.....	166
IV.1.1. Principe.....	166
IV.1.2. Le mode opératoire.....	167
IV.2. Piégeage du radical libre DPPH.....	167
III.2. 1. Principe.....	167

III.2. 2. Le mode opératoire.....	168
IV.3. Résultats et discussions.....	168
IV.3.1. Activité antioxydante totale au phosphomolybdate d'ammonium.....	168
IV.3.2. Piégeage du radical libre DPPH.....	170
IV.4. Conclusion.....	174
Références bibliographiques.....	175
Conclusion générale.....	178

Introduction générale

Introduction générale

Depuis toujours, les hommes ont utilisé leur environnement et en particulier les plantes, qui forment des sources riches en produits naturels pour soigner diverses maladies [1, 2]. Les premières traces connues des modes de préparation et d'indications dont les vertus bénéfiques ont été transmises de génération en génération pour finalement élaborer ce que nous appelons la médecine traditionnelle [3].

Cependant, l'usage des plantes médicinales peut apporter directement des réponses à certains problèmes de santé, mais avant de pouvoir recommander l'usage de telle ou telle plante pour une maladie, il est nécessaire de valider l'usage traditionnel qui en est fait. En d'autres termes, il convient d'évaluer scientifiquement l'activité pharmacologique de la plante médicinale retenue, et appréciée si celle-ci confirme sa réputation. De plus, il est impératif de vérifier également l'absence de toxicité des plantes employées [4].

Dans ce contexte, une grande partie de l'intérêt des recherches actuelles porte sur l'étude des métabolites secondaires qui constituent souvent des principes actifs des plantes médicinales et l'évaluation de la valeur thérapeutique de ces métabolites sur laquelle l'industrie pharmaceutique s'appuie largement pour le développement de nouveaux médicaments [5, 6].

Dans le cadre de la recherche de molécules ou activités biologiques nouvelles d'origine végétale, il est donc préférable de ne pas baser le choix des plantes à étudier sur le seul hasard, mais de le circonscrire selon divers critères. Le plus utilisé est celui de leur emploi en médecine traditionnelle ou populaire qui valorise l'expérience accumulée par les Autochtones dans le monde entier, y compris dans les pays occidentaux. Une autre possibilité est de considérer l'écosystème dans lequel se développent les espèces végétales [7].

L'Algérie, pays connu pour sa biodiversité, dispose d'une flore particulièrement riche et variée, compte environ 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques [8]. Ce potentiel floristique constitué de plantes médicinales, toxiques et condimentaires, est peu exploré du point de vue phytochimique et pharmacologique. À cet effet, il constitue à notre avis, une source non négligeable de recherche de substances naturelles.

Notre travail porte sur l'étude d'une plante algérienne appartenant à la famille des lamiacées: *Thymus munbyanus* subsp. *ciliatus*. Il s'articule selon deux axes principaux: le premier est l'identification structurale et le deuxième est l'étude des activités biologiques liées aux molécules isolées. La sélection de cette espèce s'explique par la richesse des plantes du genre *Thymus* en métabolites secondaires qui constituent souvent des principes actifs.

Ce travail sera présenté comme suit :

- ✓ Dans un premier chapitre, nous présenterons une recherche bibliographique sur les connaissances botaniques et phytochimiques du genre *Thymus* ainsi que quelques intérêts thérapeutiques des espèces de ce genre.
- ✓ Le second chapitre sera consacré au travail personnel:
 - Un aperçu botanique sur la plante.
 - Extraction, séparation et purification des composés obtenus.
 - Analyse qualitative et quantitative des extraits par HPLC-TOF/MS.
- ✓ L'interprétation des résultats et la détermination structurale des composés isolés de l'espèce *Thymus munbyanus* subsp. *ciliatus* seront détaillées dans le troisième chapitre.
- ✓ Le dernier chapitre, sera réservé à des tests biologiques in vitro sur les extraits et certains composés isolés de notre plante.
- ✓ À la fin, une conclusion générale qui portera sur une lecture attentive des différents résultats obtenus.

Références bibliographiques

1. Tabuti, J.R.S., Lye, K.A., Dhillon, S.S., (2003). Traditional herbal drugs of Bulamogi, Uganda: plants, use and administration. *Journal of Ethnopharmacology*, 88, 19-44.
2. Lee, K.H., (2004). Current developments in the discovery and design of new drug candidates from plant natural product leads. *Journal of Natural Products*, 67, 273-283.
3. Adjanohoun, E.J., Ake Assi, L., Floret, J.J., Guinko, S., Koumaé, M., Ahyi, A.M.R., Raynal, J., (1981). Médecine traditionnelle et pharmacopée, contribution aux études ethnobotaniques et floristiques du Mali. ACCT, Paris, pp 291.
4. Tyler, V.E., (1999). Phytomedicines: Back to the Future. *Journal of Natural Products*, 62, 1589-1592.
5. Karmakar, I., Dolai, N., Saha, P., Sarkar, N., Bala, A., Kanti, P., (2011). Scavenging activity of *Curcuma caesia* rhizome against reactive oxygen and nitrogen species. *Orient Pharmacology Experimental medicine*, 11, 221–228.
6. Butler, M.S., (2004). The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. *Journal of Natural Products*, 67, 2141-2153.
7. Waridel, P., (2003). Investigation phytochimique des plantes aquatiques *Potamogeton pectinatus* L., *P. lucens* L., *P. perfoliatus* L. et *P. crispus* L. (Potamogetonaceae). Thèse de doctorat, Lausanne, 3p.
8. Gaussen, H., Leroy, J. F., Ozenda, P., (1982). Précis de botanique, végétaux supérieurs, 2^{ème} Ed : Paris.

Chapitre I

Revue bibliographique

I.1. La famille des lamiacées

I.1.1. Généralités sur la famille des lamiacées

Les lamiacées constituent une importante famille de plantes angiospermes dicotylédones herbacées ou légèrement ligneuses et comprennent de 6900 à 7200 espèces réparties en 233 à 263 genres [1, 2] qui se répartissent sur tout le globe (figure I.1) [3]. C'est une famille très importante dans la flore algérienne représentée par 28 genres et 146 espèces [4, 5] avec 8 genres et 12 espèces dans toute le Sahara [6].

Cette famille est l'une des familles les plus utilisées comme source mondiale d'épice et d'extrait à forte pouvoir antimicrobien, antifongique, anti-inflammatoire et antioxydant [7, 8]. Un très grand nombre de genres de la famille des lamiacées sont des source riches en terpénoïdes, iridoïdes glycosylés et composés phénoliques [9].

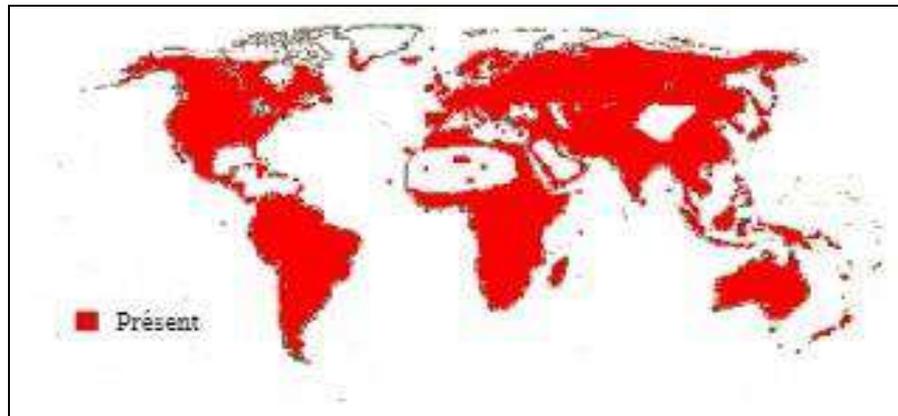


Figure I.1: Carte de répartition géographique de la famille des Lamiacées [3]

I.2. Genre *Thymus*

I.2.1. Présentation botanique et géographique du genre *Thymus*

Les plantes du genre *Thymus* sont sous-ligneuses, odorantes, avec des feuilles contractées, calice tubuleux à deux lèvres, la lèvre supérieure à trois dents, l'inférieure à deux, ciliées dentées [5].

Le genre *Thymus* est l'un des genres les plus diversifiés de la famille des lamiacées [9]. Il existe près de 400 espèces de thym réparties entre l'Europe, l'Asie de l'ouest et la Méditerranée. C'est un genre très répandu dans le nord-ouest africain (Maroc, Algérie, Tunisie et Libye), il pousse également sur les montagnes d'Ethiopie et d'Arabie du sud-ouest en passant par la péninsule du Sinaï en Egypte. On peut le trouver également en Sibérie et même en Himalaya [10, 11]. Plusieurs auteurs rapportent que la région de Méditerranée peut être décrite comme le centre de ce genre [12-14].

I.2.2. Utilisation en médecine traditionnelle du genre *Thymus*

Les plantes du genre *Thymus* sont utilisées en médecine traditionnelle pour leurs propriétés biologiques et pharmacologiques [15]. Les feuilles et les fleurs de ce genre sont largement utilisées pour leurs propriétés: tonique, antiseptique, antitussif, carminatif [16, 17], expectorant, stomachique, antispasmodique, anthelminthique et diurétique [18, 19]. Il est aussi utilisé comme condiment [20, 21].

I.2.3. Principaux métabolites secondaires du genre *Thymus*

Un grand nombre d'espèces de *Thymus* ont fait, à ce jour, l'objet d'études chimiques sur les huiles essentielles. Le thymol et le carvacrol sont les principaux composés phénoliques trouvés dans les huiles essentielles de ce genre [22-26], ainsi que le p-cymène [27], le 1,8-cinéole, le linalol [28], bornéol [29, 30], et camphre [31, 32].

De plus, il existe des études phytochimiques portant sur l'isolement et l'identification des métabolites secondaires dans ce genre, particulièrement les composés phénoliques qui présentent une grande diversité de structures, divisées en flavonoïdes et non flavonoïdes et en quantités moindres les terpénoïdes.

I.2.3.1. Les composés phénoliques

I.2.3.1.A. Flavonoïdes

Une étude bibliographique présentant les différentes classes de flavonoïdes isolés dans les espèces du genre *Thymus* a montré une nette domination des composés de type flavones (figure I.2).

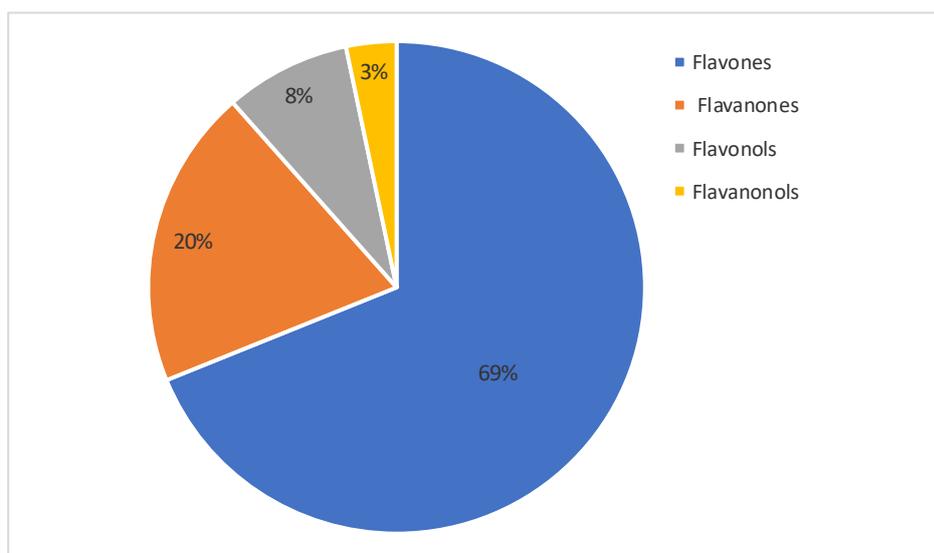


Figure I.2: Les différentes classes de favonoïdes isolées du genre *Thymus*

Le tableau I.1 rassemble les flavonoïdes isolés et identifiés chez les espèces du genre *Thymus*.

Tableau I.1: Les flavonoïdes isolés du genre *Thymus*

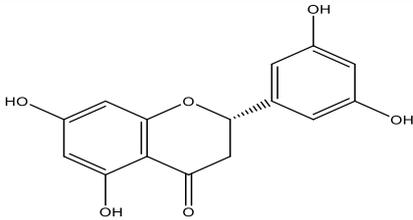
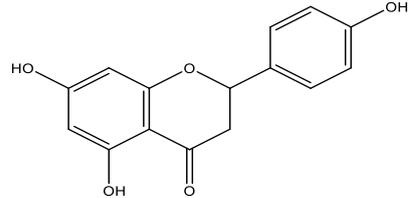
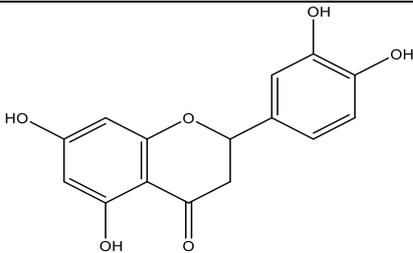
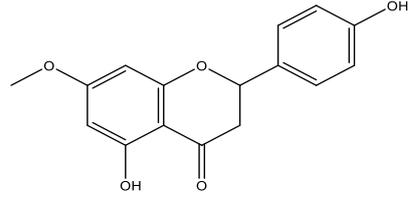
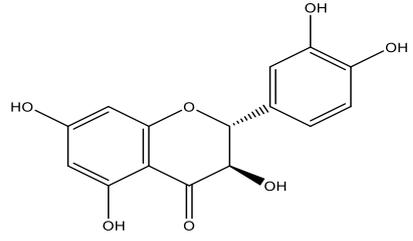
Flavonoïdes	Espèces	Structures	Références
(2S)-5,7,3',5'- tétrahydroxyflavanone	<i>T. quinquecostatus</i> var. <i>japonica</i>		[33]
Naringénine	<i>T. praecox</i> subsp. <i>grossheimi</i>		[34]
	<i>T. herba barona</i>		[35]
	<i>T. sibthorpii</i>		[36]
Eriodictyol	<i>T. praecox</i> subsp. <i>grossheimi</i>		[34]
	<i>T. herba barona</i>		[35]
	<i>T. sibthorpii</i>		[36]
	<i>T. vulgaris</i> L.		[37]
	<i>T. broussonetii</i> Boiss.		[38]
Sakuranétine	<i>T. mastichina</i>		[39]
Stérubine			
Taxifoline	<i>T. quinquecostatus</i> var. <i>japonica</i>		[33]

Tableau I.1 : Les flavonoïdes isolés du genre *Thymus* (suite)

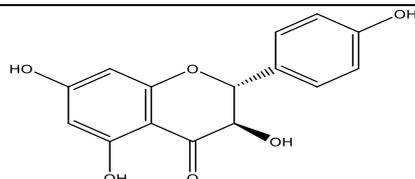
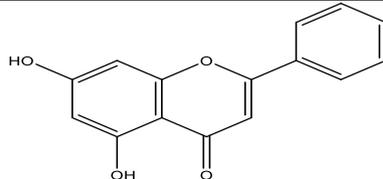
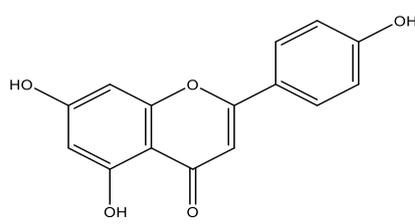
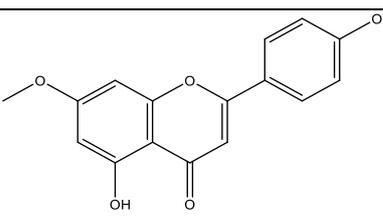
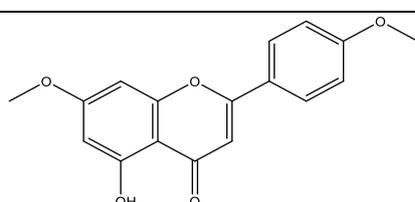
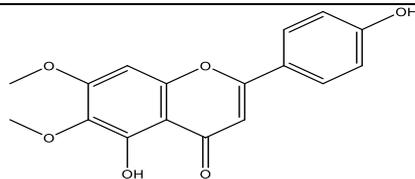
Flavonoïdes	Espèces	Structures	Références
Aromadendrine	<i>T. quinquecostatus</i> var. <i>japonica</i>		[33]
	<i>T. gobicus</i>		[40]
Chrysin	<i>T. saturoides</i>		[41]
Apigénine	<i>T. praecox</i> subsp. <i>grossheimii</i>		[34]
	<i>T. herba barona</i>		[35]
	<i>T. sibthorpii</i>		[36]
	<i>T. gobicus</i>		[40]
	<i>T. saturoides</i>		[41]
	<i>T. numidicus</i> Poiret.		[42]
	<i>T. numidicus</i> Poiret.		[43]
<i>T. hirtus</i>	[44]		
Genkwanine	<i>T. herba barona</i>		[35]
	<i>T. sibthorpii</i>		[36]
	<i>T. vulgaris</i> L.		[45]
5-hydroxy-7,4'-diméthoxyflavone	<i>T. vulgaris</i> L.		[45]
Cirsimaritine	<i>T. numidicus</i> Poiret.		[42]
	<i>T. vulgaris</i> L.		[45]

Tableau I.1 : Les flavonoïdes isolés du genre *Thymus* (suite)

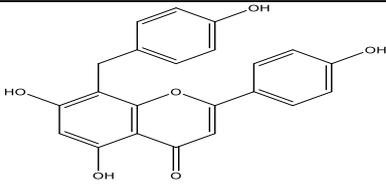
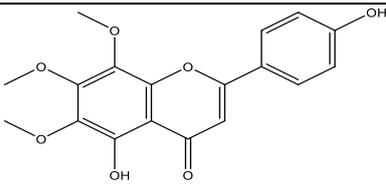
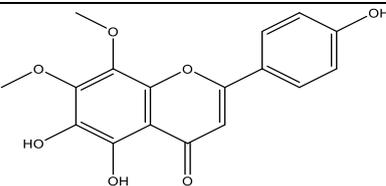
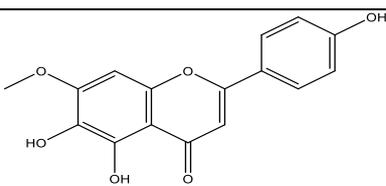
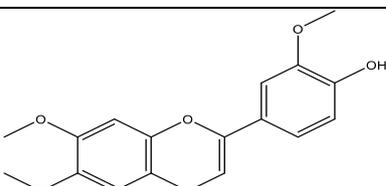
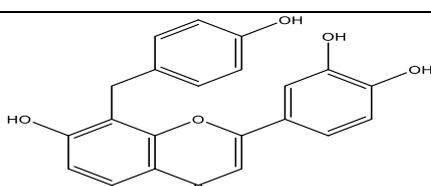
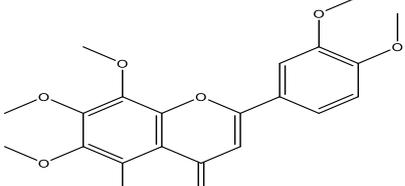
Flavonoïdes	Espèces	Structures	Références
8-C- <i>p</i> -hydroxybenzylapigénine	<i>T. hirtus</i>		[44]
Xanthomicrol	<i>T. herba barona</i>		[35]
	<i>T. numidicus</i> Poiret.		[43]
	<i>T. vulgaris</i> L.		[45]
Thymusine	<i>T. herba barona</i>		[35]
Sorbifoline			
Cirsilinéol	<i>T. herba barona</i>		[35]
	<i>T. numidicus</i> Poiret.		[42]
	<i>T. vulgaris</i> L.		[45]
8-C- <i>p</i> -hydroxybenzyl lutéoline	<i>T. hirtus</i>		[44]
Nobilétine	<i>T. saturoides</i>		[41]

Tableau I.1 : Les flavonoïdes isolés du genre *Thymus* (suite)

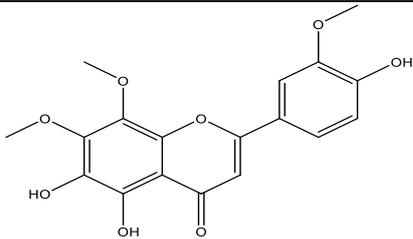
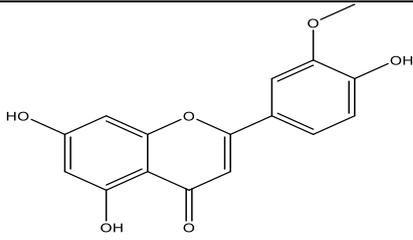
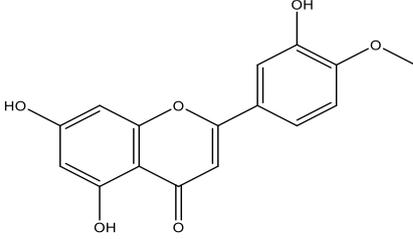
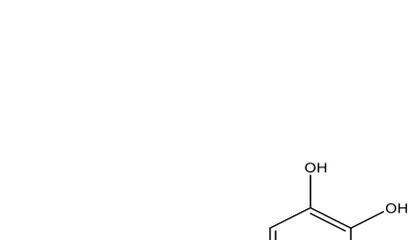
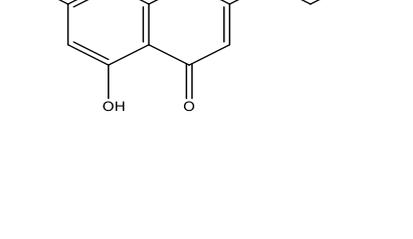
Flavonoïdes	Espèces	Structures	Références
Thymonine	<i>T. broussonetii</i> Boiss.		[38]
Chrysoériol	<i>T. praecox</i> subsp. <i>grossheimii</i>		[34]
	<i>T. gobicus</i>		[40]
Diosmétine	<i>T. hirtus</i>		[44]
Lutéoline	<i>T. praecox</i> subsp. <i>grossheimii</i>		[34]
	<i>T. herba barona</i>		[35]
	<i>T. broussonetii</i> Boiss.		[38]
	<i>T. saturoides</i>		[41]
	<i>T. numidicus</i> Poiret.		[42, 43]
	<i>T. hirtus</i>		[44]
	<i>T. sipyleus</i> subsp. <i>sipyleus</i> var. <i>sipyleus</i>		[46]
Sideritoflavone	<i>T. herba barona</i>		[35]
	<i>T. numidicus</i> Poiret.		[43]

Tableau I.1 : Les flavonoïdes isolés du genre *Thymus* (suite)

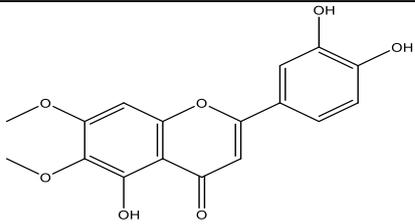
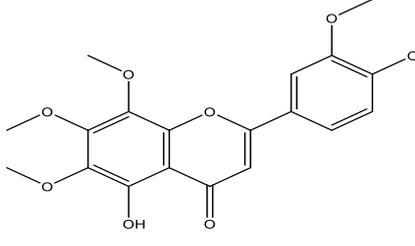
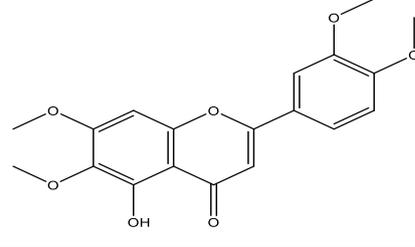
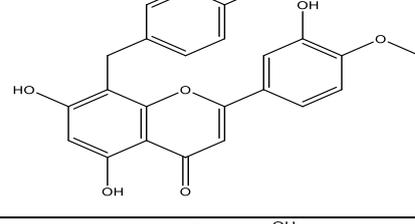
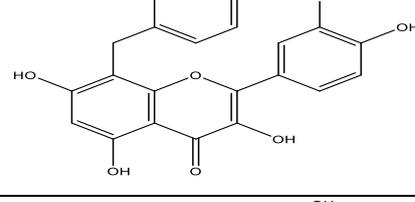
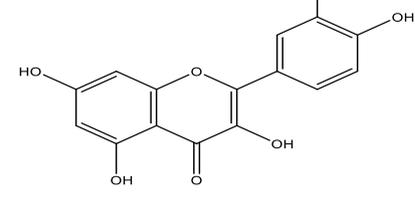
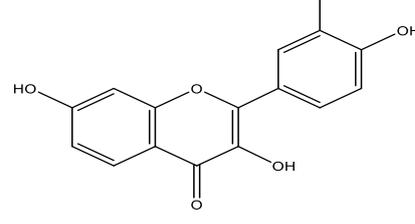
Flavonoïdes	Espèces	Structures	Références
Cirsiliol	<i>T. herba barona</i>		[35]
8- méthoxycirsilinéol	<i>T. herba barona</i>		[35]
	<i>T. saturoides</i>		[41]
	<i>T. vulgaris</i> L.		[45]
5-desméthylsinensetine	<i>T. numidicus</i> Poiret.		[43]
8-C- <i>p</i> -hydroxybenzyldiosmétine	<i>T. hirtus</i>		[44]
8-C- <i>p</i> -hydroxybenzylquercétine			
Quercétine	<i>T. saturoides</i>		[41]
Fiséatine			

Tableau I.1 : Les flavonoïdes isolés du genre *Thymus* (suite)

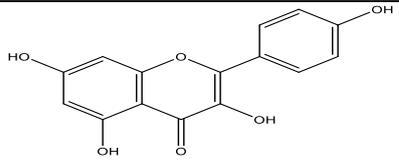
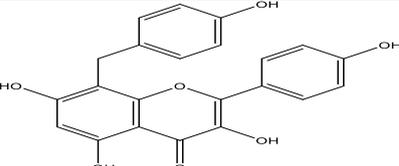
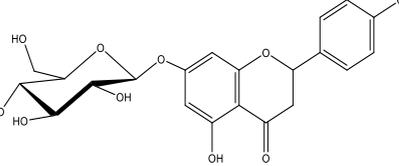
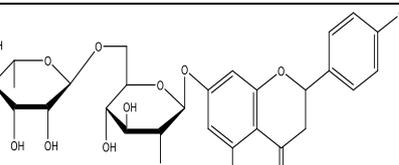
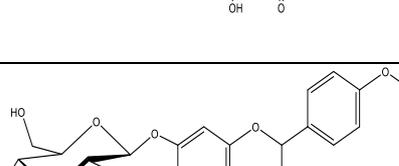
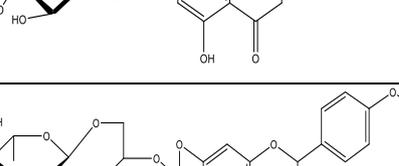
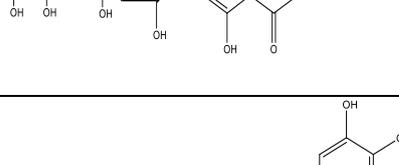
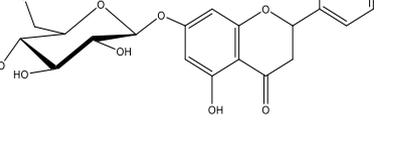
Flavonoïdes	Espèces	Structures	Références
Kaempférol	<i>T. Saturoides</i>		[41]
8-C- <i>p</i> -hydroxybenzylkaempférol	<i>T. hirtus</i>		[44]
Prunine	<i>T. baicalensis</i> <i>T. sibiricus</i>		[47]
Narirutine			
Isosakuranine			
Didymine			
Pyracanthoside	<i>T. sibthorpii</i>		[36]
	<i>T. broussonetii</i> Boiss.		[38]
	<i>T. baicalensis</i>		[47]
	<i>T. sibiricus</i>		[47]
Eriocitrine	<i>T. baicalensis</i>		[47]
	<i>T. sibiricus</i>		[47]
	<i>T. vulgaris</i> L.		[48]

Tableau I.1 : Les flavonoïdes isolés du genre *Thymus* (suite)

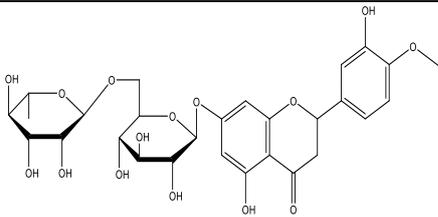
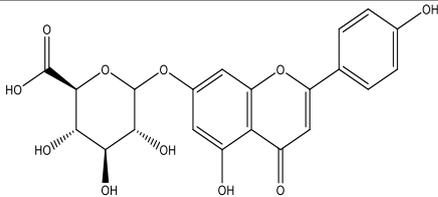
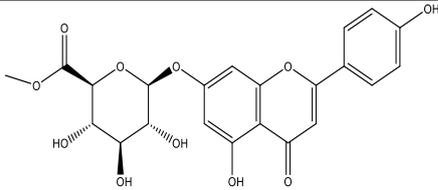
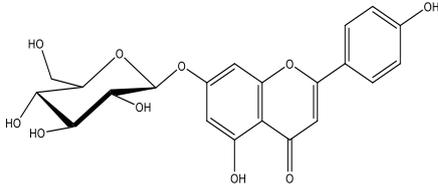
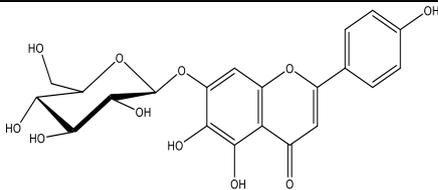
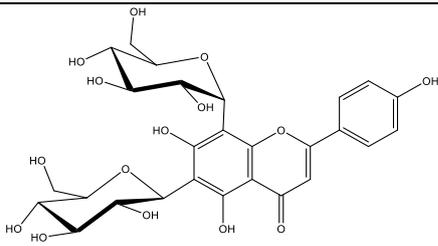
Flavonoïdes	Espèces	Structures	Références
Hespéridine	<i>T. vulgaris</i> L.		[48]
Apigénine 7-O-glucuronide	<i>T. gobicus</i>		[40]
	<i>T. numidicus</i> Poiret.		[42]
	<i>T. baicalensis</i> <i>T. sibiricus</i>		[47]
	<i>T. citriodorus</i>		[49]
Apigénine 7-O-méthylglucuronide	<i>T. gobicus</i>		[40]
Cosmosiine	<i>T. praecox</i> subsp. <i>grossheimi</i>		[34]
	<i>T. baicalensis</i> <i>T. sibiricus</i>		[47]
	<i>T. alternans</i>		[50]
Scutellareine 7-O-glucopyranoside	<i>T. mastichina</i>		[39]
Vicénine-2	<i>T. vulgaris</i> L.		[48]

Tableau I.1 : Les flavonoïdes isolés du genre *Thymus* (suite)

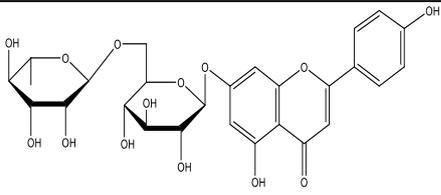
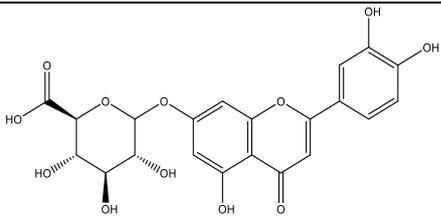
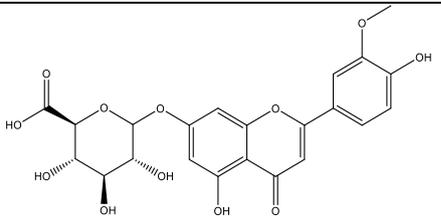
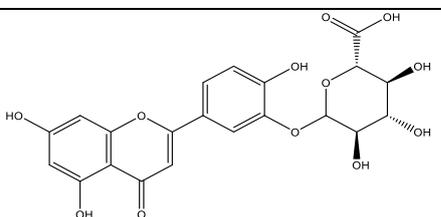
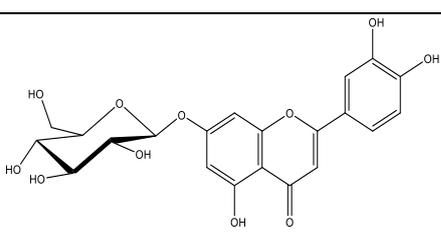
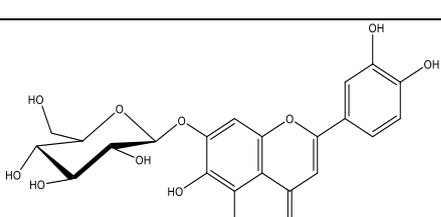
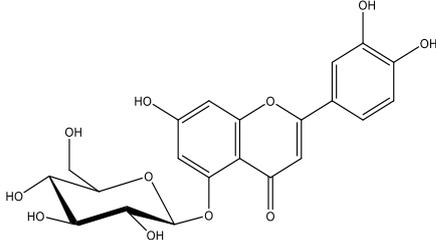
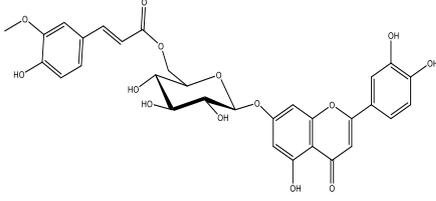
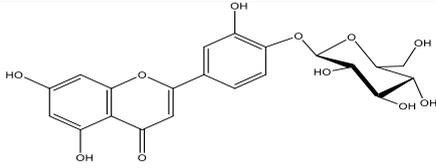
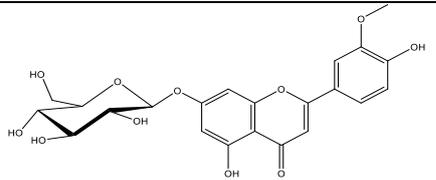
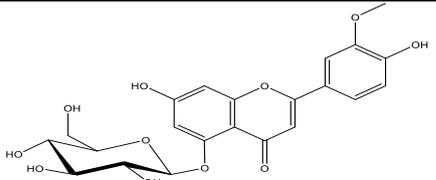
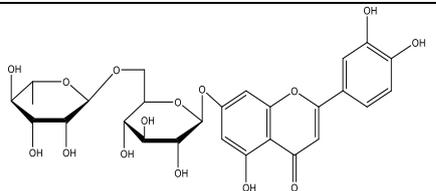
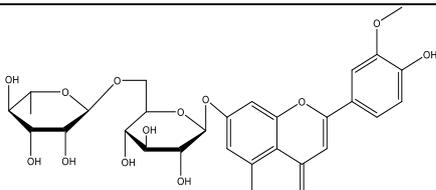
Flavonoïdes	Espèces	Structures	Références
Isorhoifoline	<i>T. baicalensis</i> <i>T. sibiricus</i>		[47]
	<i>T. vulgaris</i> L.		[48]
Lutéoline 7-O-glucuronide	<i>T. sipyleus</i> subsp. <i>sipyleus</i> var. <i>sipyleus</i>		[46]
	<i>T. baicalensis</i> <i>T. sibiricus</i>		[47]
	<i>T. citriodorus</i>		[49]
Chrysoériol 7-O-glucuronide	<i>T. baicalensis</i> <i>T. sibiricus</i>		[47]
Lutéoline 3'-O-glucuronide	<i>T. broussonetii</i> Boiss.		[38]
Cynaroside	<i>T. broussonetii</i> Boiss.		[38]
	<i>T. numidicus</i> Poiret.		[42]
	<i>T. baicalensis</i> <i>T. sibiricus</i>		[47]
	<i>T. vulgaris</i> L.		[48]
Lutéoline 6-hydroxy 7-O-glucopyranoside	<i>T. mastichina</i>		[39]

Tableau I.1 : Les flavonoïdes isolés du genre *Thymus* (suite)

Flavonoïdes	Espèces	Structures	Références
Lutéoline 5-O-glucopyranoside	<i>T. sipyleus</i> subsp. <i>sipyleus</i> var. <i>sipyleus</i>		[46]
	<i>T. citriodorus</i>		[49]
	<i>T. praecox</i> subsp. <i>grossheimii</i> var. <i>grossheimii</i>		[51]
Lutéoline 7-O-(6''-feruloyl)-glucopyranoside	<i>T. sipyleus</i> subsp. <i>sipyleus</i> var. <i>sipyleus</i>		[46]
Lutéoline 4'-O-glucopyranoside	<i>T. alternans</i>		[50]
Chrysoeriol 7-O-glucopyranoside	<i>T. citriodorus</i>		[49]
	<i>T. alternans</i>		[50]
Chrysoeriol 5-O-glucopyranoside	<i>T. alternans</i>		[50]
Scolimoside	<i>T. baicalensis</i> <i>T. sibiricus</i>		[47]
Chrysoeriol 7-O-rutinoside			

I.2.3.1.B. Non flavonoïdes

Divers travaux phytochimiques effectués sur le genre *Thymus* ont montré la présence de phénols simples, d'acides phénoliques et leurs dérivés estérifiés et glycosylés ainsi que d'autres polyphénols. Le tableau I.2 mentionne les composés phénoliques isolés et identifiés chez le genre *Thymus*.

Tableau I.2: Les composés phénoliques isolés du genre *Thymus*

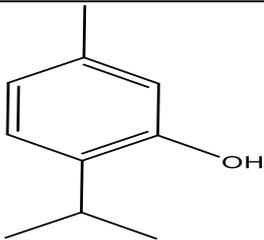
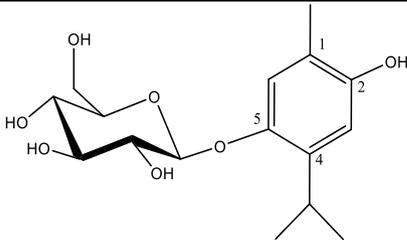
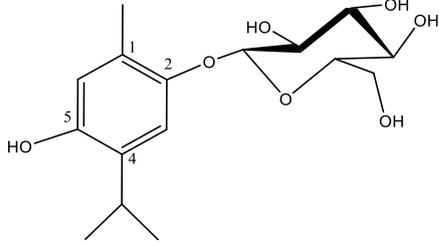
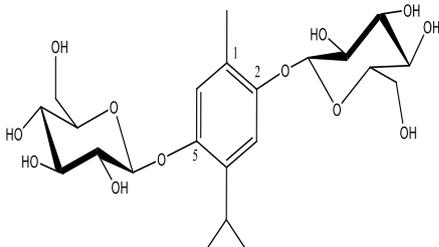
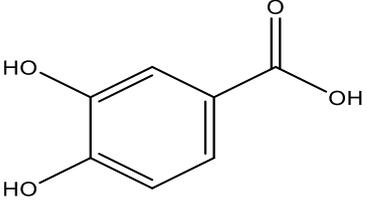
Composés isolés	Sources	Structures	Références
Thymol	<i>T. vulgaris</i> L.		[52]
5-β-D-glucopyranosylthymoquinol	<i>T. vulgaris</i> L.		[53, 54]
2-β-D-glucopyranosylthymoquinol			
Thymoquinol 2,5-O-diglucopyranoside	<i>T. praecox</i> subsp. <i>grossheimii</i> var. <i>grossheimii</i>		[51]
Acide protocatéchique	<i>T. quinquecostatus</i> var. <i>Japonica</i>		[33]

Tableau I.2: Les composés phénoliques isolés du genre *Thymus* (suite)

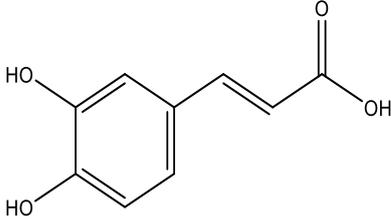
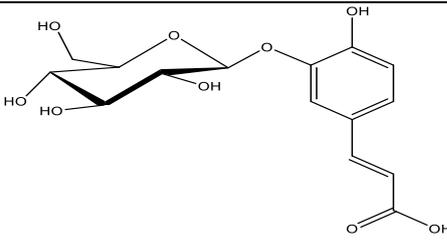
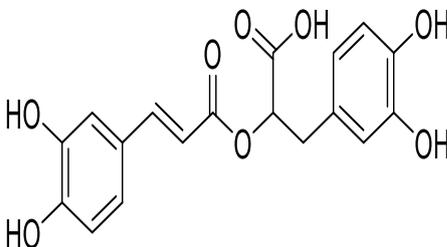
Composés isolés	Sources	Structures	Références
Acide caféique	<i>T. quinquecostatus</i> var. <i>Japonica</i>		[33]
	<i>T. baicalensis</i> <i>T. sibiricus</i>		[47]
	<i>T. serpyllum</i>		[55]
Acide O-glucocaféique	<i>T. alternans</i>		[50]
Acide rosmarinique	<i>T. quinquecostatus</i> var. <i>Japonica</i>		[33]
	<i>T. praecox</i> subsp. <i>grossheimii</i>		[34]
	<i>T. sibthorpii</i>		[36]
	<i>T. mastichina</i>		[39]
	<i>T. gobicus</i>		[40]
	<i>T. sipyleus</i> subsp. <i>sipyleus</i> var. <i>sipyleus</i>		[46]
	<i>T. baicalensis</i> <i>T. sibiricus</i>		[47]
	<i>T. citriodorus</i>		[49]
	<i>T. alternans</i>		[50]
	<i>T. praecox</i> subsp. <i>grossheimii</i> var. <i>grossheimii</i>		[51]
	<i>T. serpyllum</i>		[55]

Tableau I.2: Les composés phénoliques isolés du genre *Thymus* (suite)

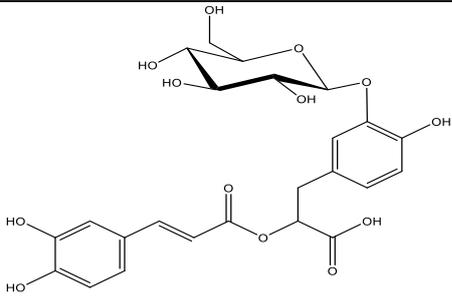
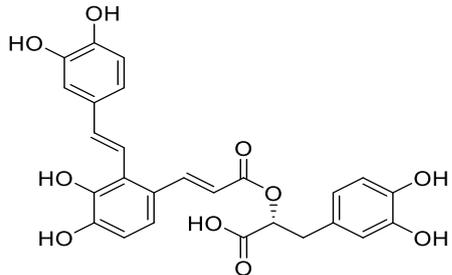
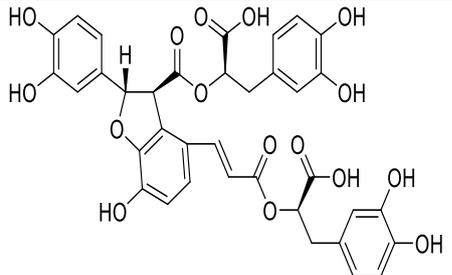
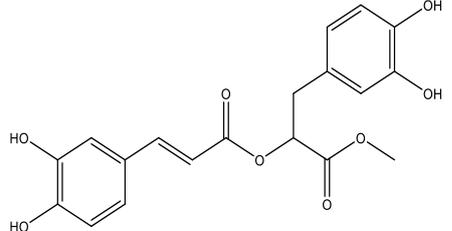
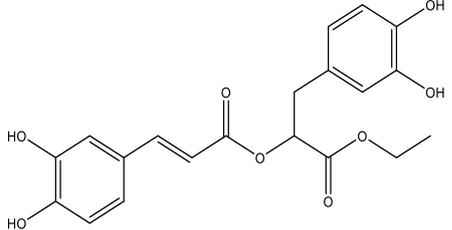
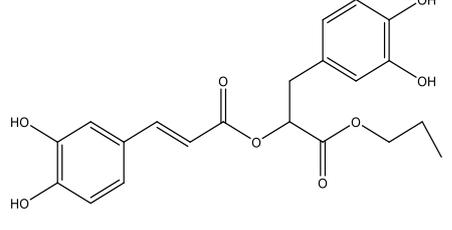
Composés isolés	Sources	Structures	Références
Acide rosmarinique 3'-O-glucopyranoside	<i>T. alternans</i>		[50]
Acide salvianolique A	<i>T. baicalensis</i>		[47]
Acide salvianolique B	<i>T. sibiricus</i>		
Rosmarinate de méthyle	<i>T. sibthorpii</i>		[36]
	<i>T. praecox</i> subsp. <i>grossheimii</i> var. <i>grossheimii</i>		[51]
	<i>T. serpyllum</i>		[55]
Rosmarinate d'éthyle	<i>T. praecox</i> subsp. <i>grossheimii</i> var. <i>grossheimii</i>		[51]
Rosmarinate de propyle	<i>T. serpyllum</i>		[55]

Tableau I.2: Les composés phénoliques isolés du genre *Thymus* (suite)

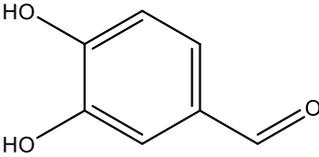
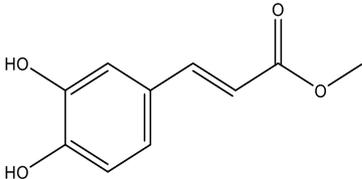
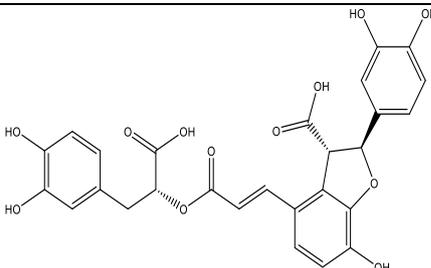
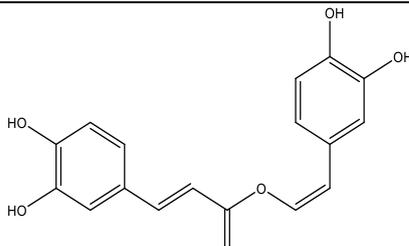
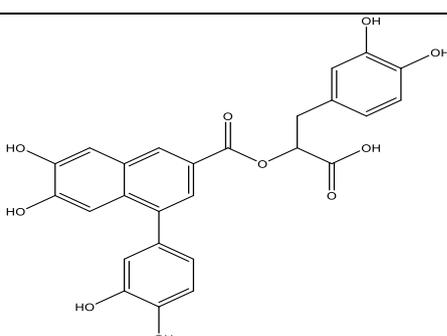
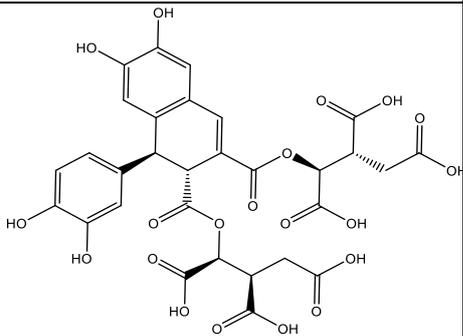
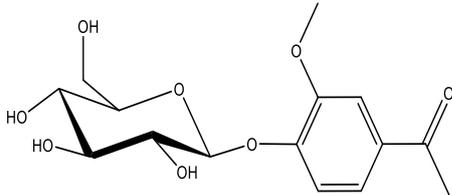
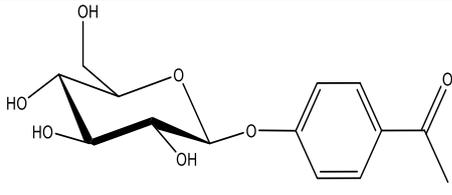
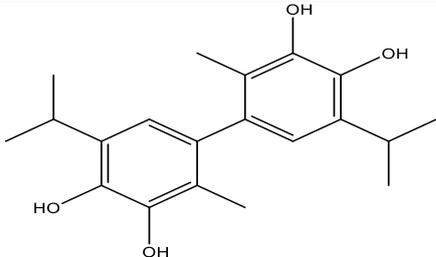
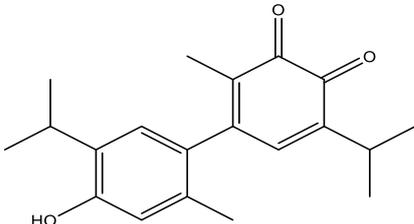
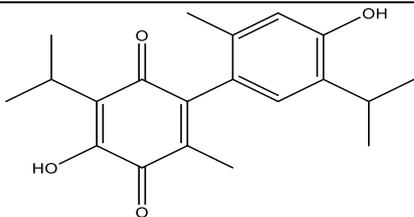
Composés isolés	Sources	Structures	Références
Aldéhyde protocatéchique	<i>T. quinquecostatus</i> var. <i>Japonica</i>		[33]
Caféate de méthyle	<i>T. sibthorpii</i>		[36]
Acide lithospermique	<i>T. gobicus</i>		[40]
Nepetoidin B			
Globoidnan A	<i>T. praecox</i> subsp. <i>grossheimii</i>		[34]
Sevanol	<i>T. armeniacus</i>		[56]

Tableau I.2: Les composés phénoliques isolés du genre *Thymus* (suite)

Composés isolés	Sources	Structures	Références
Androsin	<i>T. vulgaris</i> L.		[57]
Piceine			
3,4,3',4'-tetrahydroxy-5,5'-diisopropyl-2,2'-dimethylbiphenyl	<i>T. vulgaris</i> L.		[37 , 52]
4'-hydroxy-5,5'-diisopropyl-2,2'-dimethylbiphenyl-3,4-dione	<i>T. vulgaris</i> L.		[58]
4,4'-dihydroxy-5,5'-diisopropyl-2,2'-dimethylbiphenyl-3,6-dione			

I.2.3.2. Les terpènes

Les composés terpéniques ont été peu décrits dans le genre *Thymus*. Onze monoterpènes ont été isolés de l'extrait méthanolique des parties aériennes (fleurs+feuilles) de l'espèce *Thymus vulgaris* dont neuf sont des monoterpènes glycosylés [53, 54]. Le tableau ci-dessous représente les monoterpènes isolés de l'espèce *Thymus vulgaris*.

Tableau I.3: Les monoterpènes isolés de *Thymus vulgaris*

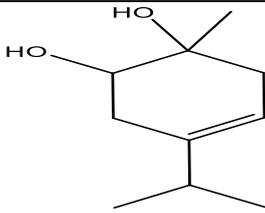
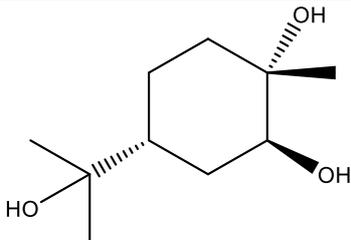
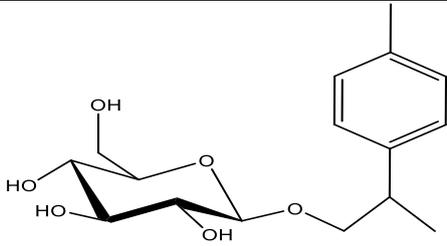
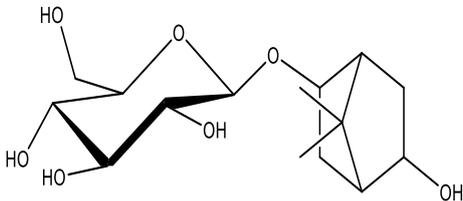
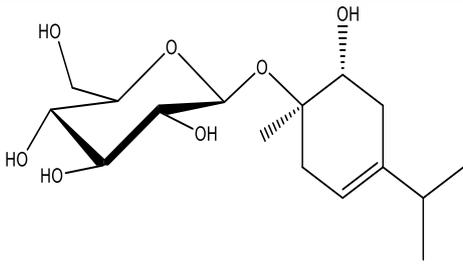
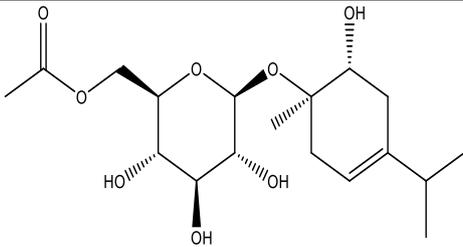
Composés isolés	Structures	Références
<i>p</i> -menth-4(5)-ène-1,2-diol		[54]
(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)- <i>p</i> -menthane-1,2,8-triol		
<i>p</i> -cymen-9-yl-β-D-glucopyranoside		[53]
Angelicoidenol-2-O-β-D-glucopyranoside		[53 , 54]
(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)- <i>p</i> -menth-4(5)-ène-1,2-diol 1-O-β -D-glucopyranoside		[54]
(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)- <i>p</i> -menth-4(5)-ène-1,2-diol 1-O-β -D-(6-O-acetyl)-glucopyranoside		

Tableau I.3: Les monoterpènes isolés de *Thymus vulgaris* (suite)

Composés isolés	Structures	Références
(1R,2R)- <i>p</i> -menth-4(5)-ène-1,2-diol 1-O-β-D-(2-O-acetyl)-glucopyranoside		[54]
Thymuside A		
(1R,2R)- <i>p</i> -menth-3-ène-1,2-diol 1-O-β-D-glucopyranoside		
Borneol β-D-glucopyranoside		[54]
Vicodiol 2-O-β-D-glucopyranoside		

De plus, des triterpènes pentacycliques ont été aussi trouvés dans certaines espèces du genre *Thymus* et sont présentés dans le tableau I.4.

Tableau I.4: Les triterpènes isolés du genre *Thymus*

Composés isolés	Sources	Structures	Références
3α-hydroxy-urs-12,15-diène	<i>T. alternans</i>		[50]

Tableau I.4: Les triterpènes isolés du genre *Thymus* (suite)

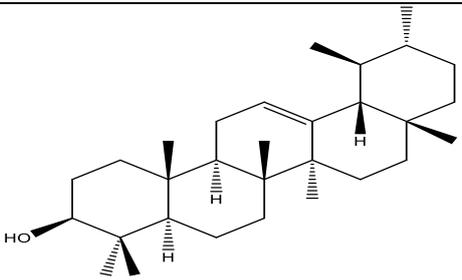
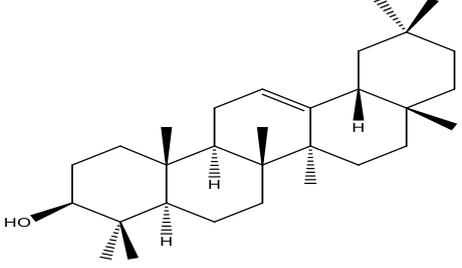
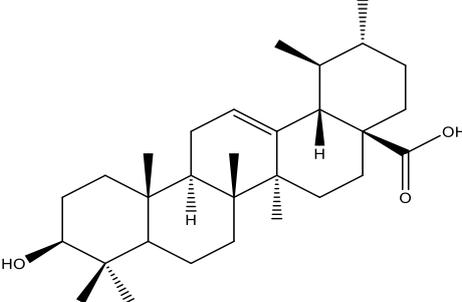
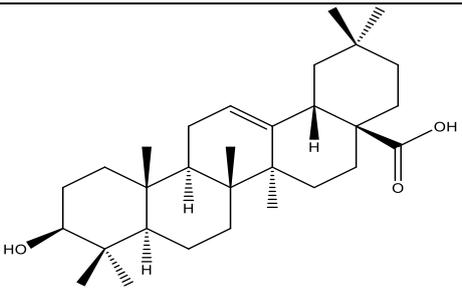
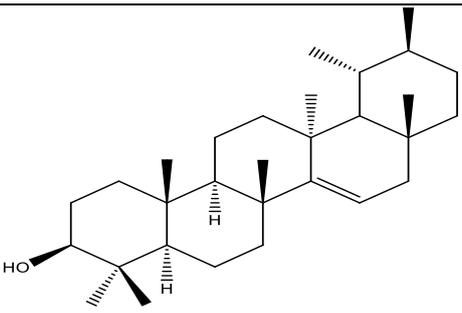
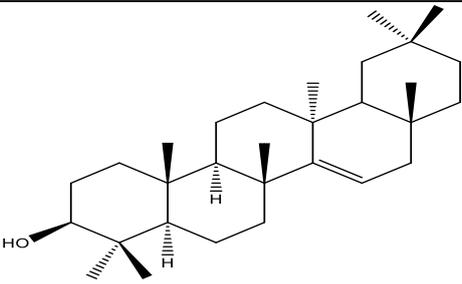
Composés isolés	Sources	Structures	Références
α -amyrine	<i>T. alternans</i>		[50]
β -amyrine			
Acide ursolique	<i>T. mastichina</i>		[39]
	<i>T. sipyleus</i> subsp. <i>sipyleus</i> var. <i>sipyleus</i>		[46]
	<i>T. praecox</i> subsp. <i>grossheimii</i> var. <i>grossheimii</i>		[51]
	<i>T. serpyllum</i>		[59]
	<i>T. vulgaris</i> L.		[60]
Acide oléanique	<i>T. mastichina</i>		[39]
	<i>T. alternans</i>		[50]
	<i>T. praecox</i> subsp. <i>grossheimii</i> var. <i>grossheimii</i>		[51]
	<i>T. serpyllum</i>		[59]
Isoursenol	<i>T. alternans</i>		[50]

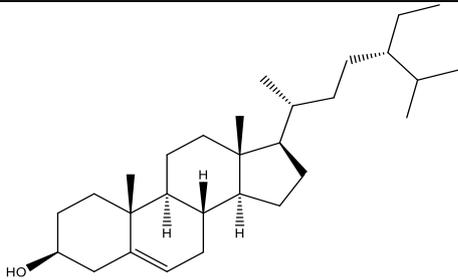
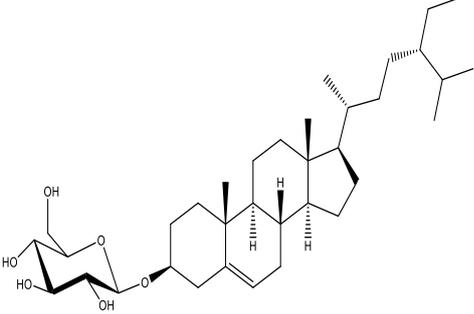
Tableau I.4: Les triterpènes isolés du genre *Thymus* (suite)

Composés isolés	Sources	Structures	Références
Epitaraxerol	<i>T. alternans</i>		[50]

I.2.3.3. Les stérols

Les stérols sont aussi présents dans le genre *Thymus*. Deux composés ont été isolés et identifiés, soit le β -sitostérol [39] et le 3-O- β -D-glucopyranosyl-sitosterol [59] et sont présentés dans le tableau I.5.

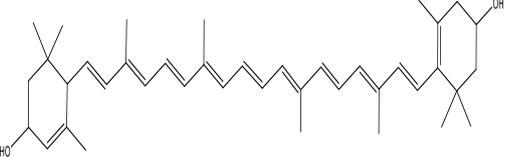
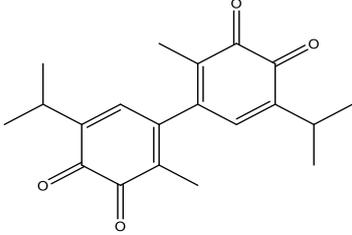
Tableau I.5: Les stérols isolés du genre *Thymus*

Composés isolés	Sources	Structures	Références
β -Sitostérol	<i>T. mastichina</i>		[39]
3-O- β -glucopyranosyl β -sitostérol	<i>T. serpyllum</i>		[59]

I.2.3.4. Autres composés

D'autres composés ont été également isolés des plantes : *T. mastichina*, *T. serpyllum* et *T. vulgaris* L. et sont présentés dans le tableau ci-après.

Tableau I.6: Autres composés isolés du genre *Thymus*

Composés isolés	Sources	Structures	Références
Lutéine	<i>T. mastichina</i>		[39]
5,5'-diisopropyl-2,2'-dimethylbiphenyl-3,4,3', 4'-tetraone	<i>T. vulgaris</i> L.		[58]
Acide 33-cétopentatriacontanoïque	<i>T. serpyllum</i>		[59]
27-cétotriacontanol			

De cette étude bibliographique sur la chimie du genre *Thymus*, on en conclut que l'espèce *Thymus munbyanus* subsp. *ciliatus* que nous avons sélectionnée, n'a pas été chimiquement étudiée.

I.2.4. Activités biologiques de différentes espèces du genre *Thymus*

La recherche bibliographique menée sur les espèces du genre *Thymus* montre qu'elles ont des propriétés thérapeutiques intéressantes. Ces propriétés sont en rapport avec la composition chimique [46, 48].

De nombreux travaux scientifiques ont montré que le genre *Thymus* possède un effet antioxydant dû à la présence des acides phénoliques et des flavonoïdes qui ont un énorme pouvoir antioxydant [36, 42, 48].

Des études biologiques sur les extraits et les produits isolés des *Thymus* ont révélé plusieurs activités biologiques in-vivo et in-vitro, telles que l'activité antiproliférative [34], cytotoxique [39], ainsi que l'activité anti-inflammatoire [56]. De plus, il a été reporté que certaines espèces de ce genre possèdent un effet antibactérien [55] et aussi antidiabétique [40].

Les différentes activités biologiques des extraits obtenus à partir des parties aériennes d'espèces du genre *Thymus* sont résumées sur le tableau I.7.

Tableau I.7: Activites biologiques d'espèces du genre *Thymus*

Espèces	Origines	Activités	Références	
<i>T. zygis</i>	Portugal	Antioxydante	[61]	
<i>T. lotocephalus</i> wild			[68]	
<i>T. herba-barona</i>			[74]	
<i>T. pseudolanuginosus</i>				
<i>T. caespititius</i>				
<i>T. fragrantissimus</i>				[91]
<i>T. daenensis</i> Celak	Iran	Antioxydante	[62]	
<i>T. vulgaris</i> L.			[62, 64]	
<i>T. vulgaris</i> L.	Kalamazoo	Antioxydante	[48]	
	Lituanie		[63]	
	Serbie		[65]	
	Algérie		[75]	
	Egypte		[90]	
<i>T. sipyleus</i> subsp. <i>sipyleus</i> var. <i>sipyleus</i>	Turquie	Antioxydante	[46]	
<i>T. sipyleus</i> Boiss.			[66]	
<i>T. sipyleus</i> Boiss. subsp. <i>rosulans</i> (Borbas) Jalas			[71]	
<i>T. argaeus</i>			[81]	
<i>T. numidicus</i> Poiret	Algérie	Antioxydante	[42]	
<i>T. fontanesii</i>			[67]	
<i>T. ciliatus</i> (Desf.) Benth.			[73]	
<i>T. algeriensis</i> Bioss & Reut			[77]	
<i>T. lanceolatus</i>			[79]	
<i>T. sibthorpii</i> Bentham	Grèce	Antioxydante	[36]	
<i>T. broussonettii</i> Boiss.	Maroc		[38]	
<i>T. armeniacus</i>	Arménie		[56]	
<i>T. capitatus</i>	Tunisie		[69]	
<i>T. pannonicus</i> All.	Serbie		[70]	
<i>T. sipyleus</i> Boiss. Subsp. <i>Rosulans</i> (Borbas) Jalas	Turquie		[71]	
<i>T. longicaulis</i> C. Presl	Italie		[72]	
<i>T. schimperi</i> Ronniger	Éthiopie		[80]	
<i>T. quinquecostatus</i> Celak	Corée		[82]	
<i>T. herba-barona</i>	Portugal		Anti-inflammatoire	[74]
<i>T. pseudolanuginosus</i>				
<i>T. caespititius</i>				
<i>T. fragrantissimus</i>		[91]		

Tableau I.7: Activités biologiques d'espèces du genre *Thymus* (suite)

Espèces	Origines	Activités	Références
<i>T. sipyleus</i> Boiss. Subsp. <i>Rosulans</i> (Borbas) Jalas	Turquie	Antibactérienne	[71]
<i>T. praecox</i> subsp. <i>grossheimii</i> var. <i>grossheimii</i>			[83]
<i>T. fallax</i>			[87]
<i>T. vulgaris</i> L.	Algérie	Antibactérienne	[75]
	Egypte		[84]
	Iran		[86]
	Oman		[88]
<i>T. capitatus</i>	Jordanie		[76]
<i>T. algeriensis</i> Bioss & Reut	Algérie	Antibactérienne	[77, 85]
<i>T. ciliatus</i> (Desf.) Benth.			[73]
<i>T. schimperi</i> Ronniger	Éthiopie	Antidiabétique	[80]
<i>T. argaeus</i>	Turquie		[81]
<i>T. quinquecostatus</i> Celak	Corée		[82]
<i>T. praecox</i> subsp. <i>grossheimii</i> (Ronniger) Jalas	Turquie	Antiproliférative	[34]
<i>T. alternans</i>	Slovaquie		[50]
<i>T. pannonicus</i> All.	Serbie		[70]
<i>T. schimperi</i> Ronniger	Éthiopie		[78]
<i>T. mastichina</i>	Portugal	Cytotoxique	[39]
<i>T. pannonicus</i> All.	Serbie		[70]
<i>T. vulgaris</i> L.	Oman		[88]
	Iran		[89]
	Egypte		[90]

On constate que l'espèce *Thymus munbyanus* subsp. *ciliatus* a fait l'objet d'une seule étude biologique [73].

I.3. Conclusion

L'étude bibliographique réalisée sur le genre *Thymus* a montré que les parties aériennes des espèces de ce genre possèdent pratiquement le même profil de diversité structurale des métabolites secondaires particulièrement les flavonoïdes et les acides phénoliques qui sont bien connus pour leur grande importance en activités biologiques notamment l'activité antioxydante.

Références bibliographiques

1. Heywood, V.H., Brummitt, R.k., Culham, A., Seberg, O., (2007). Flowering plant families of the world. Royal Botanic Gardens, Kew.
2. Braüchler, C., Meimberg, H., Heubl, G., (2010). Molecular phylogeny of Menthinae (Lamiaceae, Nepetoideae, Menthae) -Taxonomy, biogeography and conflicts. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55, 501-523.
3. Stevens, P.F., (2017). Angiosperm Phylogeny Website, Version 14.
4. Quezel, P., Santa, S., (1962). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome I, C.N.R.S, Paris, France.
5. Quezel, P., Santa, S., (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome II, C.N.R.S, Paris, France.
6. Ozenda, P., (1991). Flore et végétation du Sahara 2^{ème} édition, C.N.R.S, Paris, France, pp 662.
7. Gherman, C., Culea, M., Cozar, O., (2000). Comparative analysis of some active principles of herb plants by GC/MS. *Talanta*, 53, 253-262.
8. Hilan, C., Sfeir, R., Jawich, D., Aitour, S., (2006). Huiles essentielles de certaines plantes médicinales libanaises de la famille des Lamiaceae. *Lebanese Science Journal*, 7, 13-22.
9. Naghibi, F., Mosaddegh, M., Motamed, S.M., Ghorbani, A., (2005). Labiatae Family in folk Medicine in Iran: from Ethnobotany to Pharmacology. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2, 63-79.
10. Dob, T., Dahmane, D., Benabdelkader, T., Chelghoum, C., (2006). Studies on the essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. *The International Journal of Aromatherapy*, 16, 95-100.
11. Salhi, A., Bouyanzer, A., El Mounsi, I., Bendaha, H., Hamdani, I., El Ouariachi, E., Chetouani, A., Chahboun, N., Hammouti, B., Desjobert, J.M., Costa, J., (2016). Chemical composition, antioxidant and anticorrosive activities of *Thymus Algeriensis*. *Journal of Materials and Environmental Science*, 7, 3949-3960.
12. Cronquist, A., (1988). The Evolution and Classification of Flowering Plants. New York Botanical Garden, New York.

13. Heywood, V.H., (1998). Flowering plant families of the world. Oxford University Press, Oxford.
14. Stahl-Biskup, E., Saez, F., (2002). Thyme: The Genus *Thymus*. Taylor and Francis, London.
15. Fecka, I., Turek, S., (2008). Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from Lamiaceae: thyme, wild thyme and sweet marjoram by chromatographic techniques. *Food Chemistry*, 108, 1039-1053.
16. Zargari, A., (1990). Medicinal plants. Tehran University Press, Tehran.
17. Goetz, P., Ghedira, K., (2012). Phytothérapie anti-infectieuse. Springer-Verlag France, Paris.
18. Barnes, J., Anderson, L.A., Phillipson, J.D., (2007). Herbal Medicines, third edition. Pharmaceutical press, London, pp 575.
19. Bellakhdar, J., (1997). La pharmacopée marocaine traditionnelle. Médecine arabe ancienne et savoirs populaires. Ibis Press, Paris.
20. Bremness, L., (2005). Plantes aromatiques et médicinales. Edition Larousse, Paris.
21. Sijelmassi, A., (1996). Les plantes médicinales du Maroc. Édition le Fennec, Casablanca, Maroc.
22. Tepe, B., Sökmen, M., Akpulat, H.A., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmen, A., (2005). Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* and *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans*. *Journal of Food Engineering*, 66, 447-454.
23. Bousmaha-Marroki, L., Atik-Bekkara, F., Tomi, F., Casanova, J., (2007). Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. ssp. *eu-ciliatus* Maire from Algeria. *Journal of Essential Oil Research*, 19, 490-493.
24. Alaoui Jamali C., El Bouzidi L., Bekkouche K., Hassani L., Markouk M., Wohlmuth H., Leach D., Abbad A., (2012). Chemical Composition and Antioxidant and Anticandidal Activities of Essential Oils from Different Wild Moroccan *Thymus* Species. *Chemistry & Biodiversity*, 9, 1188-1196.

25. Ghorab, H., Kabouche, A., Kabouche, Z., (2014). Comparative compositions of essential oils of *Thymus* growing in various soils and climates of North Africa. *Journal of Materials and Environmental Science*, 298-303.
26. Nikolic, M., Glamoclija, J., Ferreira, I.C.F.R., Calhelha, R.C., Fernandes, A., Markovic, T., Markovic, D., Giweli, A., Sokovic, M., (2014). Chemical Composition, Antimicrobial, Antioxidant and Antitumor Activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Industrial Crops and Products*, 52: 183-90.
27. Karoui, I.J., Msaada, K., Abderrabba, M., Marzouk, B., (2016). Bioactive Compounds and Antioxidant Activities of Thyme-Enriched Refined Corn Oil. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 18, 79-91.
28. Dob, T., Dahmane, D., Benabdelkader, T., Chelghoum, C., (2006). Studies on the essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. *The International Journal of Aromatherapy*, 16, 95-100.
29. Bazer, K.H.C., Ozek, T., Tumen, G., (1992). Essential Oils of *Thymus cariensis* and *Thymus haussknechtii*, Two Endemic Species in Turkey. *Journal of Essential Oil Research*, 4, 659-661.
30. Lemrhari, A., Zouhair, R., El Kahkahi, R., Elidrissi, M., Amchrouk, A., Elhourri, M., (2016). Chemical Composition and Differentiation of Essential Oils of Morocco's Different Varieties of Thyme. *Global Journal of Pure and Applied Chemistry Research*, 4, 30-35.
31. Megdiche-Ksouri, W., Saada, M., Soumaya, B., Snoussi, M., Zaouali, Y., Ksouri, R., (2015). Potential use of wild *Thymus algeriensis* and *Thymus capitatus* as source of antioxidant and antimicrobial agents. *Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology*, 23, 1046-1056.
32. Belmalha, S., El Idrissi, M., Amechrouq, A., Echchgadda, G., (2015). Chemical Characterization of Some Species of Moroccan Middle Atlas Thyme. *Global Journal of Pure and Applied Chemistry Research*, 3, 43-52.
33. Lee, I.C., Bae, J.S., Kim, T., Kwon, O.J., Kim, T.H., (2011). Polyphenolic Constituents from the Aerial Parts of *Thymus quinquecostatus* var. *japonica* Collected on Ulleung Island. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 54, 811-816.

34. Erenler, R., Sen, O., Yildiz, I., Aydin, A., (2016). Antiproliferative Activities of Chemical Constituents Isolated from *Thymus praecox* subsp. *grossheimii* (Ronniger) Jalas. *Records of Natural Products*, 10, 766-770.
35. Corticchiato, M., Bernardini, A., Costa, J., Bayet, C., Saunois, A., Voirin, B., (1995). Free flavonoid aglycones from *Thymus herba barona* and its monoterpenoid chemotypes. *Phytochemistry*, 40, 115-120.
36. Kontogiorgis, C., Ntella, M., Mpompou, L., Karallaki, F., Athanasios, P., Hadjipavlou-Litina, D., Lazari, D., (2016). Study of the antioxidant activity of *Thymus sibthorpii* Bentham (Lamiaceae). *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 1-6.
37. Haraguchi, H., Saito, T., Ishikawa, H., Date, H., Kataoka, S., Tamura, Y., Mizutani, K., (1996). Antiperoxidative Components in *Thymus vulgaris*. *Planta Medica*, 62, 217-221.
38. Ismaili, H., Sosa, S., Brkic, D., Fkih-Tetouani, S., Ilidrissi, A., Touati, D., Aquino, R.P., Tubaro, A., (2002). Topical anti-inflammatory activity of extracts and compounds from *Thymus broussonettii*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 54, 1137-1140.
39. Gordo, J., Máximo, P., Cabrita, E., Lourenço, A., Oliva, A., Almeida, J., Filipe, M., Cruz, P., Barcia, R., Santos, M., Cruz, H., (2012). *Thymus mastichina*: Chemical Constituents and their Anti-cancer Activity. *Natural Product Communications*, 7, 1491-1494.
40. Odonbayar, B., Murata, T., Matsumoto, N., Batkhuu, J., Sasaki, K., (2016). Chemical constituents of aerial parts of *Thymus gobicus* and their cholinesterase inhibitory activities. *Mongolian Journal of Chemistry*, 17, 14-17.
41. Brahmi, Z., Niwa, H., Yamasato, M., Shigeto, S., Kusakari, Y., Sugaya, K., Onose, J.I., ABE, N., (2011). Effective Cytochrome P450 (CYP) Inhibitor Isolated from Thyme (*Thymus saturoides*) Purchased from a Japanese Market. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 75, 2237-2239.
42. Benayache, F., Bouregghda, A., Ameddah, S., Marchioni, E., Benayache, F., Benayache, S., (2014). Flavonoids from *Thymus numidicus* Poiret. *Der Pharmacia Lettre*, 6, 50-54.
43. Benkiniouar, R., Touil, A., Zaidi, F., Rhouati, S., Chosson, E., Seguin, E., Comte, G., Bellver, F., (2010). Isolation and identification of five free flavonoid aglycones from *Thymus numidicus*. *Journal de la Société Algérienne de Chimie*, 20, 11-15.
44. Merghem, R., Jay, M., Viricel, M.R., Bayet, C., Voirin, B., (1995). Five 8-C-Benzylated Flavonoids From *Thymus Hirtus* (Labiatae). *Phytochemistry*, 38, 637-640.

45. Miura, K., Nakatani, N., (1989). Antioxidative Activity of Flavonoids from Thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Agricultural and Biological Chemistry*, 53, 3043-3045.
46. Özgen, U., Mavi, A., Terzi, Z., Kazaz, C., Aşçi, A., Kaya, Y., Seçen, H., (2011). Relationship Between Chemical Structure and Antioxidant Activity of Luteolin and Its Glycosides Isolated from *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *Sipyleus*. *Records of Natural Products*, 5, 12-21.
47. Chirikova, N.K., Olennikov, D.N., (2018). Phenolic compounds from Siberian species *Thymus baicalensis* and *T. Sibiricus*. *Chemistry of Natural Compounds*, 54, 486-489.
48. Wang, M., Li, J., Ho, G.S., Peng, X., Ho, C.T., (1998). Isolation and Identification of Antioxidative Flavonoid Glycosides from Thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Journal of Food Lipids*, 5, 313-321.
49. Pereira, O.R., Peres, A. M., Silva, A. M. S., Domingues, M. R. M., and S. M. Cardoso, S. M. (2013). Simultaneous characterization and quantification of phenolic compounds in *Thymus x citriodorus* using a validated HPLC–UV and ESI–MS combined method. *Food Research International*, 54, 1773-1780.
50. Dall'Acqua, S., Peron, G., Ferrari, S., Gandin, V., Bramucci, M., Quassinti, L., Martonfi, P., Maggi, F., (2017). Phytochemical investigations and antiproliferative secondary metabolites from *Thymus alternans* growing in Slovakia. *Pharmaceutical Biology*, 55, 1162-1170.
51. Sevindik, H.G., Ozgen, U., Atila, A., Ozturk, E.H., Kazaz, C., Duman, H., (2015). Phytochemical Studies and Quantitative HPLC Analysis of Rosmarinic Acid and Luteolin 5-O-β-D-Glucopyranoside on *Thymus praecox* subsp. *grossheimii* var. *grossheimii*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 63, 720-725.
52. Okazaki, K., Kawazoe, K., Takaishi, Y., (2002). Human Platelet Aggregation Inhibitors from Thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Phytotherapy Research*, 16, 398-399.
53. Takeuchi, H., Lu, Z.G., Fujita, T., (2004). New monoterpene glucoside from the aerial parts of thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 687, 1131-1134.
54. Kitajima, J., Ishikawa, T., Urabe, A., Satoh, M., (2004). Monoterpenoids and their glycosides from the leaf of thyme. *Phytochemistry*, 657, 3279-3287.

55. Aziz, S., Irshad, M., Habib, U.R., (2014). Isolation of a new antibacterial polyphenol from *Thymus serpyllum*. *Chemistry of Natural Compounds*, 49, 877-880.
56. Dubinnyi, M.A., Osmakov, D.I., Koshelev, S.G., Kozlov, S.A., Andreev, Y.A., Zakaryan, N.A., Dyachenko, I.A., Bondarenko, D.A., Arseniev, A.S., Grishin, E.V., (2012). Lignan from Thyme Possesses Inhibitory Effect on ASIC3 Channel Current. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 32993-33000.
57. Wang, M., Kikuzaki, H., Lin, C.C., Kahyaoglu, A., Huang, M.T., Nakatani, N., Ho, C.T., (1999). Acetophenone Glycosides from Thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1911-1914.
58. Nakatani, N., Miura K., Inagaki, T., (1989). Structure of New Deodorant Biphenyl Compounds from Thyme (*Thymus vulgaris* L.) and Their Activity Against Methyl Mercaptan. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53, 1375-1381.
59. Aziz, S., Habib, U.R., (2008). Studies on the Chemical Constituents of *Thymus serpyllum*. *Turkish Journal of Chemistry*, 32, 605-614.
60. Shimada, A., Inagaki, M., (2014). Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Activity of Ursolic Acid Isolated from *Thymus vulgaris* L. *Food Science and Technology Research*, 20, 711-714.
61. Soarey, J.R., Dinis, T.C.P., Cunha, A.P., Almeida, L.M., (1997). Antioxidant Activities of Some Extracts of *Thymus zygis*. *Free Radical Research*, 26, 469-478.
62. Bistgani, Z.E., Hashemi, M., DaCosta, M., Craker, L., Maggi, F., Morshedloo, M.R., (2019). Effect of salinity stress on the physiological characteristics, phenolic compounds and antioxidant activity of *Thymus vulgaris* L. and *Thymus daenensis* Celak. *Industrial Crops and Products*, 135, 311-320.
63. Dapkevicius, A., Van Beek, T.A., Lelyveld, G.P., Van Veldhuizen, A., De Groot, A., Linssen, J.P.H., Venskutonis, R., (2002). Isolation and Structure Elucidation of Radical Scavengers from *Thymus vulgaris* Leaves. *Journal of Natural Products*, 65, 892-896.
64. Eghdami, A., Eizadi, M., Sadegh, F., (2013). Polyphenolic content and antioxidant activity of hydroalcoholic and alcoholic extract of *Thymus vulgaris*. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*, 3, 94-101.
65. Gavaric, N., Kladar, N., Misan, A., Nikolic, A., Samojlik, I., Mimica-Dukic, N., Bozin, B., (2015). Postdistillation waste material of thyme (*Thymus vulgaris* L., Lamiaceae) as a

- potential source of biologically active compounds. *Industrial Crops and Products*, 74, 457-464.
66. Gökbulut, A., (2015). Validated RP-HPLC Method for Quantification of Phenolic Compounds in Methanol Extracts of Aerial Parts and Roots of *Thymus sipyleus* and Evaluation of Antioxidant Potential. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 14, 1871-1877.
67. Nabet, N., Gilbert-López, B., Madani, K., Herrero, M., Ibáñez, E., Mendiola, J.A., (2019). Optimization of microwave-assisted extraction recovery of bioactive compounds from *Origanum glandulosum* and *Thymus fontanesii*. *Industrial Crops and Products*, 129, 395-404.
68. Costa, P., Goncalves, S., Valentao, P., Andrade, P.B., Coelho, N., Romano, A., (2012). *Thymus lotocephalus* wild plants and in vitro cultures produce different profiles of phenolic compounds with antioxidant activity. *Food Chemistry*, 135, 1253-1260.
69. Karoui, I.J., Bettaieb, I., Msaada, k., Hammami, M., Brahim Marzouk, B., (2012). Research on the phenolic compounds and antioxidant activities of Tunisian *Thymus capitatus*. *Journal of Functional Foods*, 4, 661-669.
70. Cebovic, T., Arsenijevic, J., Drobac, M., Zivkovic, j., Sostaric, I., Maksimovic, Z., (2018). Potential use of deodorised water extracts: polyphenol-rich extract of *Thymus pannonicus* All. as a chemopreventive agent. *Journal of Food Science and Technology*, 55, 560-567.
71. Ustuner, O., Anlas, C., Bakirel, T., Ustun-Alkan, F., Sigirci, B.D., Ak, S., Akpulat, H.A., Donmez, C., Koca-Caliskan, U., (2019). In Vitro Evaluation of Antioxidant, Anti-Inflammatory, Antimicrobial and Wound Healing Potential of *Thymus Sipyleus* Boiss. Subsp. *Rosulans* (Borbas) *Jalas. Molecules*, 24, 3353.
72. Galasso, S., Pacifico, S., Kretschmer, N., Pan, S.P., Marciano, S., Piccolella, S., Monaco, P., Bauer, R., (2014). Influence of seasonal variation on *Thymus longicaulis* C. Presl chemical composition and its antioxidant and anti-inflammatory properties. *Phytochemistry*, 107, 80-90.
73. Gaamoune, S., Nouioua, W., Khaled, A., Ouffroukh, A., (2015). Antioxidant and antimicrobial activities of flavonoids extracted from *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. *Der Pharmacia Lettre*, 7, 358-363.

74. Afonso, A.F., Pereira, O.R., Neto, R.T., Silva, A.M. S., Cardoso, S.M., (2017). Health-Promoting Effects of *Thymus herba-barona*, *Thymus pseudolanuginosus*, and *Thymus caespititius* Decoctions. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 1879.
75. Zeghad, N., Merghem, R., (2009). Antioxidant and antibacterial activities of *Thymus vulgaris* L. *Medicinal and Aromatic Plant Research Journal*, 1, 5-11.
76. Qaralleh, H.N., Abboud, M.M., Khleifat, K.M., Tarawneh, K.A., Althunibat, O.Y., (2013). Antibacterial activity in vitro of *Thymus capitatus* from Jordan. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22, 247-251.
77. Righi, N., Boumerfeg, S., Fernandes, P.A.R., Deghima, A., Baali, F., Coelho, E., Cardoso, S.M., Coimbra, M.A., Baghiani, A., (2020). *Thymus algeriensis* Bioss & Reut: Relationship of phenolic compounds composition with in vitro/in vivo antioxidant and antibacterial activity. *Food Research International*, 136, 109500.
78. Desta, K.T., Kim, G.S., Abd-El Aty, A. M., Raha, S., Kim, M.B., Jeong, J.H., Mohamad, W., Hacımüftüoğlu, A., Chul Shin, H., Han Shim, J., Chul Shin, S., (2017). Flavone polyphenols dominate in *Thymus schimperi* Ronniger: LC-ESI-MS/MS characterization and study of anti-proliferative effects of plant extract on AGS and HepG2 cancer cells. *Journal of Chromatography B*, 1053, 1-8.
79. Caprioli, G., Maggi, F., Bendif, H., Miara, M.D., Cinque, B., Lizzi, A.R., Brisdelli, F., Celenza, G., (2018). *Thymus lanceolatus* ethanolic extract protects human cells from t-BHP induced oxidative damage. *Food-Function*, 9, 3665-3672.
80. Dessalegn, E., Bultosa, G., Haki, G.D., Rupasinghe, H.P.V., (2015). Antioxidant and α -amylase inhibition activities in vitro of various solvent extracts of *Thymus schimperi* Ronniger. *Journal of Medicinal Plants Research*, 9, 515-524.
81. Zengin, G., Atasagun, B., Aumeeruddy, M.Z., Saleem, H., Mollica, A., Bahadori, M.B., Mahomoodally, M.F., (2019). Phenolic profiling and in vitro biological properties of two Lamiaceae species (*Salvia modesta* and *Thymus argaeus*): A comprehensive evaluation. *Industrial Crops and Products*, 128, 308-314.
82. Hyun, T.A., Kim, H.C., Kim, J.S., (2014). Antioxidant and antidiabetic activity of *Thymus quinquecostatus* Celak. *Industrial Crops and Products*, 52, 611-616.

83. Ozkan, O., Metiner, K., Kart, A., Ozkaya, S., (2016). Determination of antibacterial activities of different *Thymus praecox* subsp. *grossheimii* var. *grossheimii* extracts. *Indian Journal of Animal Research*, 50, 85-88.
84. Mohsen Abu El -Ela, S., Eman Abdullah, M.A., Ahmed Abdel Aziz, A., Marwa Ragab H., (2020). Antimicrobial activity of *Thymus vulgaris* L. and associated endophytes extracts. *Egyptian Journal of Experimental Biology (Botany)*, 16, 141-147.
85. Messaoudi, M., Benreguieg, M., Merah, M., Messaoudi, Z.A., (2019). Antibacterial effects of *Thymus algeriensis* extracts on some pathogenic bacteria. *Acta Scientiarum - Biological Sciences*, 41, 48548.
86. Mohsenipour, Z., Hassanshahian, M., (2015). The inhibitory effect of *Thymus vulgaris* extracts on the planktonic form and biofilm structures of six human pathogenic bacteria. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 5, 309-318.
87. Ozturk, S., Sezai Ercisli, S., (2005). Broad-Spectrum antibacterial properties of *Thymus fallax*. *Pharmaceutical Biology*, 43, 609-613.
88. Al-Balushi, A.H., Aljabri, M., Akhtar, M.S., Said, S., Weli, A., Al-Riyami, Q., AlAbri, A., (2013). Antibacterial and cytotoxic activities of *Thymus vulgaris* leaves grown in Oman, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 4, 4253-4257.
89. Amirghofran, Z., Karimi, M.H., (2001). Cytotoxic activity of *Thymus vulgaris*, *Achillea millefolium* and *Thuja orientalis* on different growing cell lines. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran*, 15, 149-154.
90. Eman Abdullah, M.A., Ahmed Abdel Aziz, A., Mohsen Abo El -Ela, S., Ragab, M.H., (2018). Antioxidant activity and cytotoxicity of extracts of *Thymus vulgaris* L. and their associated endophytic fungi. *Egyptian Journal of Experimental Biology (Botany)*, 14, 107-116.
91. Silva, A.M., Felix, L.M., Teixeira, I., Martins-Gomes, C., Schafer, J., Souto, E.B., Santo, D.J., Bunzel, M., Nunes, F.M., (2021). Orange thyme: Phytochemical profiling, in vitro bioactivities of extracts and potential health benefits. *Food Chemistry: X*, 12, 100171.

CHAPITRE II

PARTIE EXPERIMENTALE

Etude phytochimique de l'espèce *Thymus munbyanus* subsp. *ciliatus* (Desf.) Greuter & Burdet

II.1. Choix du matériel végétal

La sélection de cette plante a été basée sur plusieurs critères, parmi lesquels:

- L'endémisme de la plante au Nord d'Afrique [1-4].
- L'utilisation en médecine traditionnelle [3, 5].
- Aucune investigation phytochimique n'a été abordée sauf quelques travaux effectués par GC/MS sur les composés volatils [6, 7] ainsi que l'activité antioxydante des extraits [8].
- Les activités biologiques attribuées aux plantes de la famille des Lamiacées [9, 10].

II.2. Place dans la systématique

La place de l'espèce *Thymus munbyanus* subsp. *ciliatus* dans la systématique, est présentée selon la classification APG III (2009) [11]:

- Règne Plantae
- Clade Angiospermes
- Clade Dicotylédones vraies
- Clade Asteridées
- Clade Lamiidées
- Ordre Lamiales
- Famille Lamiaceae
- Genre *Thymus*
- Espèce *Thymus munbyanus*
- Sous-Espèce *Thymus munbyanus* subsp. *ciliatus*
- Nom botanique *Thymus munbyanus* subsp. *ciliatus* (Desf.) Greuter & Burdet

Synonyme: *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth.

Noms vernaculaires: Djertil [1, 12], Zater [13] ou Ziitra [14].

II.3. Description botanique

Thymus munbyanus subsp. *ciliatus* (Desf.) Greuter & Burdet appartenant à la famille des Lamiacées, est une plante aromatique qui se trouve à l'état spontané, sous l'aspect d'un arbrisseau de petite taille, mais pouvant former des touffes bien étalées sur le sol; feuilles florales différentes des feuilles caulinaires, en général fortement dilatées à leur portion

inférieure; épis florifères larges de 16-20 mm; fleurs grandes, à corolle longuement exserte. La période de floraison est limitée entre avril et juillet. Rencontrée dans Broussailles, matorrals, sur substrats calcaires et siliceux et sols rocailloux [15] (Figure II.1).



Figure II.1 : *Thymus munbyanus* subsp. *ciliatus* (Desf.) Greuter & Burdet

II.4. Répartition géographique

Espèce endémique en Algérie et en Maroc [1, 2].

II.5. Matériel végétal

Les parties aériennes de *Thymus munbyanus* subsp. *ciliatus* ont été récoltées au mois de Mai 2013 dans la région de setif. la plante a été identifié par Dr Nouioua Wafa (Département de biologie, Université de Sétif). Un échantillon (TC/123/05-13) a été déposé à l'Unité de recherche VARENBIOMOL, Université des Frères Mentouri, Constantine. Après séchage dans un endroit sec à l'abri des rayons solaires, les différents organes des parties aériennes du matériel végétal ont été coupées en petits morceaux et pesées (9500 g).

II.6. Protocole expérimental d'extraction

La quantité de matériel végétal obtenue est mise à macérer dans un mélange hydroalcoolique (méthanol /eau ; 80 : 20 ; v/v) pendant 72 heures. Après filtration, le marc est ré-extrait encore trois fois dans les mêmes conditions. Les filtrats sont réunis puis concentrés sous pression réduite à une température n'excédant pas 37° C. Après reprise par de l'eau distillée légèrement chauffée, la solution est mise au repos pendant une nuit (décantation des résines et quelques pigments chlorophylliens). Après filtration, La phase aqueuse obtenue a subi des extractions successives de type liquide-liquide par les solvants organiques suivants: le chloroforme, l'acétate d'éthyle et en dernier le *n*-butanol. Les trois phases organiques récupérées sont concentrées sous pression réduite à sec pour conduire aux extraits suivants: 17,7 g d'extrait

chloroforme, 33 g d'extrait acétate d'éthyle et 59,2 g d'extrait *n*-butanol. Le protocole d'extraction est présenté dans la figure II.2.

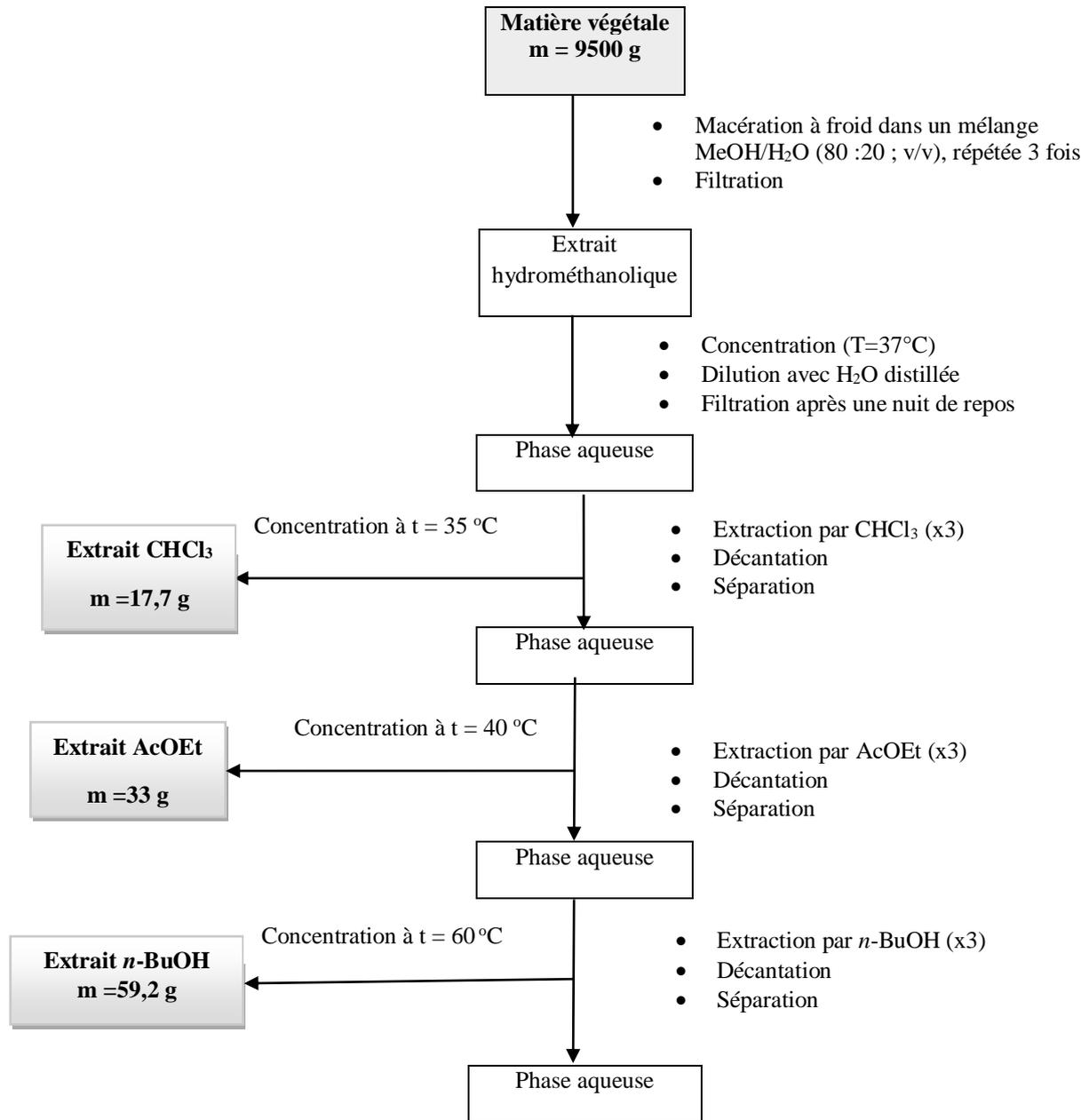


Figure II.2: Organigramme d'extraction du *T. munbyanus subsp. ciliatus*

Les rendements des extraits obtenus sont donnés dans le tableau II.1.

Tableau II.1 : Rendements des extraits

Matière végétale	Extrait	Masse (g)	Rendement (%)
9500 g	Chloroforme	17,7	0,19
	Acétate d'éthyle	33	0,35
	<i>n</i> -butanol	59,2	0,62

II.7. Analyse qualitative et quantitative des extraits

Les extraits CHCl₃, AcOEt et *n*-BuOH ont été analysés par HPLC-TOF/MS, afin de comparer leurs profils chromatographiques avec ceux des standards et d'obtenir une information sur la quantité et la nature chimique des composés phénoliques présents.

➤ Préparation des échantillons

Pour l'analyse HPLC-TOF/MS, les extraits (200 ppm) ont été dissous dans le méthanol à température ambiante, puis filtrés à travers un filtre à membrane en polytétrafluoroéthylène (0,45 µm) [16].

➤ Conditions opératoires

Les conditions opératoires de la HPLC sont comme suit:

- ✓ Agilent Technologie 1260 Infinity LC, 6210 TOF-MS
- ✓ Volume d'injection: 10 µl
- ✓ Température de la colonne: 35 °C
- ✓ Modèle de la colonne: ZORBAX SB-C18 4,6x100 mm, 3,5 µm
- ✓ Débit: 0,6 ml /min
- ✓ Ionisation: Dual-ESI
- ✓ La température de l'azote: 325°C
- ✓ Débit de gaz: 10 ml / min
- ✓ Tension de Fragmenteur : 175 V
- ✓ Phase mobile: cette phase est constituée de deux solvants:
 - Solvant A : Eau ultra-pure acidifiée avec de l'acide formique à 0,1%
 - Solvant B : Acétonitrile

Le tableau II.2 résume le programme d'élution de la colonne.

Tableau II.2: Programme de la phase mobile A et B

Temps (min)	H ₂ O avec 0,1 % d'acide formique	Acétonitrile %
0-1	90%	10%
1-20	50%	50%
20-23	20%	80%
23-30	10%	90%

II.8. Séparation et purification

II.8.1. Séparation et purification des composés de l'extrait d'acétate d'éthyle

Après plusieurs tests chromatographiques (CCM, CC) réalisés sur l'extrait d'acétate d'éthyle, environ 32 g sont déposés sur une colonne de séphadex LH-20 éluee par le système

isocratique $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{Hexane}$ (7/2/1). Les fractions obtenues sont regroupées suivant la similitude de leur chromatogramme sur couches minces de gel de silice sur support aluminium dont les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm) puis révélées avec l'acide sulfurique et chauffées à 100 °C pendant 3 mn, donnant ainsi 26 fractions. La progression de cette colonne est rassemblée dans le tableau II-3.

Tableau II.3: Résultats du fractionnement par chromatographie sur colonne de l'extrait d'acétate d'éthyle de *T. munbyanus* subsp. *ciliatus*

Fractions	Poids (mg)	Observations
F1	38,92	Graisses
F2	99,1	Mélange complexe
F3	553,8	Mélange complexe
F4	278,9	Mélange complexe
F5	19,81	Mélange+ précipité (faible quantité)
F6	161,42	Mélange
F7	149,54	Mélange
F8	35,73	Mélange + chlorophylle
F9	155	Poudre blanche + chlorophylle
F10	2500	Mélange traité
F11	145	Mélange traité
F12	124,18	Mélange traité
F13	21,16	Mélange + cristaux (faible quantité)
F14	345	Mélange traité
F15	3120	Mélange traité
F16	90,5	Mélange
F17	1035	Mélange
F18	1640	Mélange
F19	1900.1	Mélange
F20	680,6	Mélange
F21	15,89	Mélange + poudre blanche (faible quantité)
F22	215,3	Mélange
F23	3304	Mélange complexe
F24	3800	Mélange complexe
F25	3957	Mélange complexe
F26	5210	Traînée

Seules les fractions les moins complexes ont été étudiées.

❖ Etude de la fraction F9

La fraction F9 (155 mg) se présente sous forme d'une poudre blanche, mêlée à la chlorophylle, a été lavée plusieurs fois par quelques ml d'éther diéthylique pour éliminer la chlorophylle puis purifiée par plusieurs lavages successifs avec l'acétone pour donner le produit pur **ATC1D** de masse 15 mg . Ce produit est reporté dans ce travail comme étant le composé **A1**.

❖ Etude de la fraction F10

La fraction F10 (2,5 g) a subi une séparation sur une colonne de Séphadex LH-20 éluée par

le système isocratique $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{hexane}$ (7/2/1) pour donner 9 sous fractions.

Les résultats de cette colonne sont regroupés dans le tableau II.4.

Tableau II.4: Résultats de la séparation de la fraction F10 sur colonne de Sephadex.

Sous fraction	Masse (mg)	Observations
F10-1	14,9	Mélange plusieurs produits
F10-2	13,5	Mélange plusieurs produits
F10-3	128,5	Mélange complexe
F10-4	138	Mélange séparable
F10-5	201	Mélange séparable
F10-6	357,5	Mélange complexe
F10-7	286,2	Mélange séparable
F10-8	376	Mélange complexe
F10-9	535,5	Mélange complexe

- La sous fraction F10-4 (138 mg) a subi une chromatographie sur plaques préparatives de gel de silice avec le système d'élution toluène/AcOEt/acide formique (10:6:1) conduisant ainsi à l'isolement du composé **ATC2b-1a** dont le poids est de 3,1 mg. Ce produit a été reporté comme étant le composé **A2**.
- La sous fraction F10-5 (201 mg) a donnée le produit **ATC-3c-3a** (composé **A3**) (2,4 mg) à l'état pur après une chromatographie sur CCM de gel de silice éluée par le système de solvants toluène/AcOEt/ acide formique (10:6:1).
- Le traitement de la sous-fraction F10-7 (286,2 mg) sur des plaques CCM de gel de silice élué par le système toluène/AcOEt/acide formique (10:6:1) et visualisé sous la lampe UV (365 nm) a conduit à la séparation de deux produits : **ATC2d2a** de masse 5,5 mg et **ATC2d2d** de masse 2,7 mg que nous notons **A4** et **A5** respectivement.

❖ Etude de la fraction F11

La fraction F11 d'une masse de 145 mg a permis d'obtenir les composé **ATC3c3b** (1,7mg) par une CCM de gel de silice dans le système d'élution toluène /AcOEt / acide formique (10:4:1). Ce produit a été reporté comme étant le composé **A6**.

❖ Etude de la fraction F12

La fraction F12 d'une masse de 124,18 mg a subi une séparation sur plaques préparatives de gel de silice éluées par le système toluène/AcOEt/acide formique (10:4:1), qui a mené au produit **ATC3c5b1** de masse 7,3 mg que nous notons **A7**.

❖ Etude de la fraction F14

La fraction F14 de masse 345 mg a été soumise à la chromatographie sur plaques préparatives de gel de silice éluées par le système toluène /AcOEt/ acide formique dont les proportions

10:4:1. Après plusieurs purifications, trois produits purs ont été obtenus: **ATC2d3a (A8)** de masse 5,5 mg, **ATC3C10A (A9)** de masse 1,7 mg et **ATC2d27 (A10)** de masse 20 mg.

❖ Etude de la fraction F15

La fraction F15 de masse 3,12 g a été chromatographiée sur une colonne de Sephadex LH-20 éluee par le système chloroforme / méthanol (7/3). 7 sous fractions ont été obtenues.

Les résultats de cette colonne sont regroupés dans le tableau II.5.

Tableau II.5: Résultats de la séparation de la fraction F15 sur colonne de Sephadex.

Sous fraction	Masse (mg)	Observations
F15-1	96,5	Mélange complexe
F15-2	219,9	Mélange complexe
F15-3	255,3	Mélange séparable
F15-4	461	Mélange complexe
F15-5	230,9	Mélange séparable
F15-6	728,2	Mélange complexe
F15-7	882	Mélange complexe

La troisième sous fraction F15-3 d'une masse de 255,3 mg a été l'objet de plusieurs purifications sur CCM et colonne de sephadex LH-20, éluees par les systèmes toluène/AcOEt/ acide formique (10:2:1) et le méthanol 100% respectivement, donnant les composés **ATC10** (3,2 mg) et **ATC10C** (1,3 mg). Les deux produits ont été reportés comme étant **A11 et A12** respectivement.

La sous fraction F15-5 (230,9 mg) a subi une chromatographie sur plaques préparatives de gel de silice avec le système d'élution toluène/AcOEt/acide formique (10:2:1) a donné les deux produits **ATC9E** (3,4 mg) et **ATC2b2f1** (9,1 mg). Ces deux produits ont été reportés comme étant **A13 et A14** respectivement.

En résumé, l'étude phytochimique de l'extrait acétate d'éthyle de *Thymus munbyanus* subsp. *ciliatus* a permis l'obtention de quatorze produits purs (figure II.3).

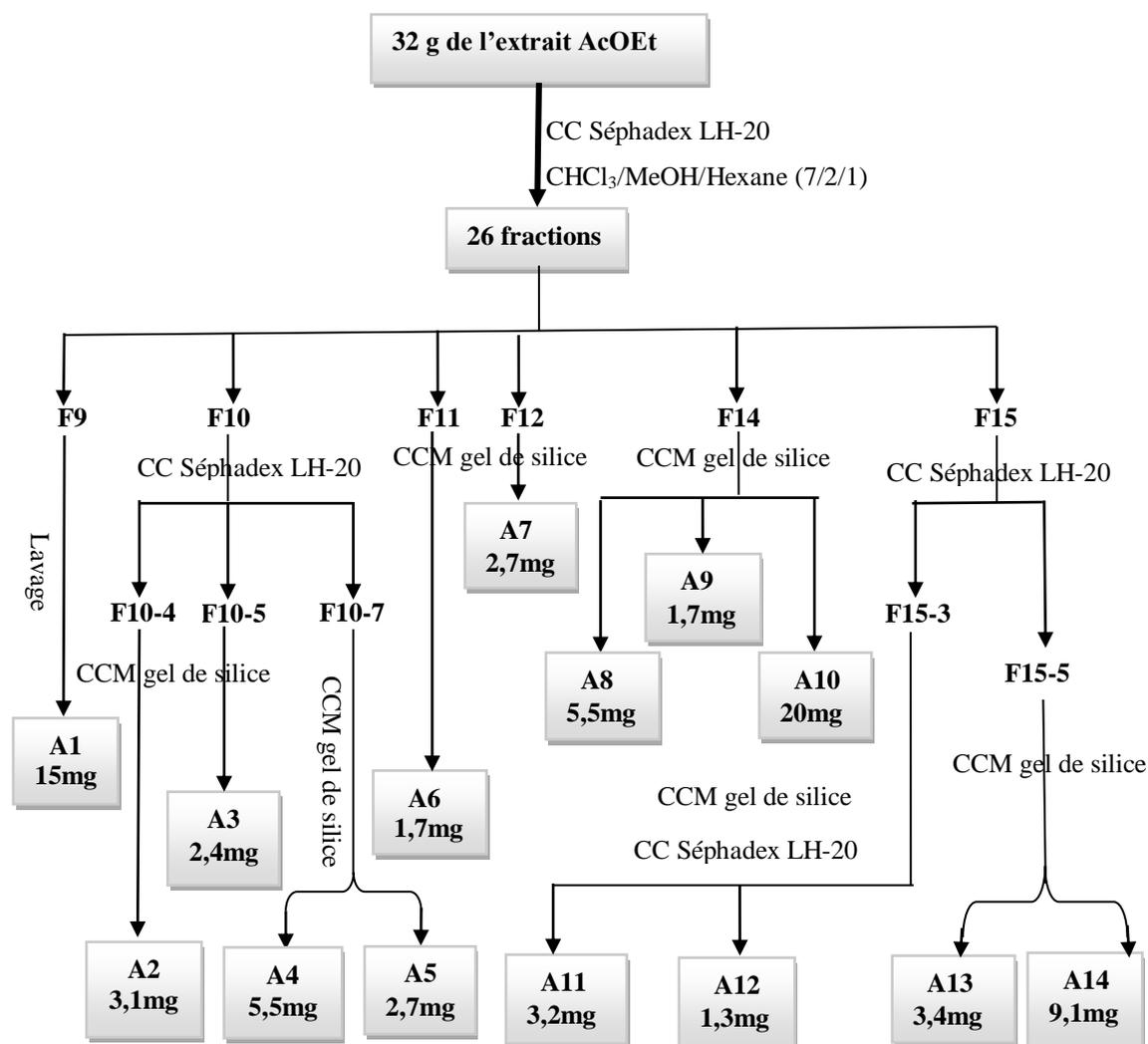


Figure II.3 : Schéma récapitulatif de la séparation de l'extrait AcOEt

II.8.2. Séparation et purification des composés de l'extrait *n*-butanol

L'extrait butanolique (10g) dissout dans le méthanol, est mélangé à une petite quantité de polyamide, l'ensemble est séché sous vide, puis pulvérisé jusqu'à l'obtention d'une poudre homogène. Cette poudre est déposée sur colonne de polyamide SC6, préparée dans le Toluène. L'éluion est réalisée par un gradient de polarité du système toluène/méthanol avec comme solvant de base le toluène.

Les fractions de colonne obtenues ont subi des tests sur différents supports chromatographiques dans différents systèmes d'éluant, cela a permis de regrouper les fractions identiques vu la similarité de leur profil chromatographique, ce suivi a permis l'obtention de 21 fractions.

Tableau II.6: Résultats du fractionnement par chromatographie sur colonne de l'extrait *n*-butanol de *T. munbyanus* subsp. *ciliatus*

Système d'élution %		Pots	Nom de la fraction	Poids (mg)	Observations
Toluène	CH ₃ OH				
100	0	1-15	F1	Traces	/
95	5	16-25	F2	180,8	Mélange complexe
90	10	26-37	F3	217,4	Mélange complexe
85	15	38-41	F4	101,2	Mélange
80	20	42-53	F5	370	Mélange traité
75	25	53-58	F6	76,3	Mélange traité
75	25	59-69	F7	328,1	Mélange
75	25	70-87	F8	445,9	Mélange
70	30	88-99	F9	329,7	Mélange
70	30	100-104	F10	73,8	Mélange
65	45	105-112	F11	380	Mélange
60	40	113-119	F12	225	Mélange
60	40	120-131	F13	332	Mélange complexe
50	50	132-145	F14	122,2	Mélange
50	50	146-158	F15	465,9	Mélange complexe
45	55	159-166	F16	423	Mélange complexe
40	60	167-172	F17	237	Mélange complexe
30	70	173-186	F18	428	Mélange complexe
20	80	187-190	F19	537	Trainée
10	90	191-201	F20	868,6	Trainée
0	100	202-225	F21	2786,9	Trainée

La fraction F5 de masse 370 mg a été rechromatographiée sur une colonne de Sephadex LH-20 éluée par le système CHCl₃/MeOH (6/4) en mode isocratique pour donner dix sous fractions. La septième sous fraction (61,2 mg), moins complexe et plus abondante que les autres, a été chromatographiée sur plaques de gel de silice éluées par le système EtOAc/MeOH/H₂O (18:1:1) pour donner le composé **B1** (11 mg) à l'état pur.

La fraction F6 (76,3 mg) contient un seul produit majoritaire donne, après purification sur une colonne de sephadex LH-20 éluée par le Méthanol, le composé **B2** (17 mg) à l'état pur.

En résumé, l'étude phytochimique de l'extrait *n*-BuOH de *T. munbyanus* subsp. *ciliatus* a permis l'obtention de deux produits purs (figure II.4).

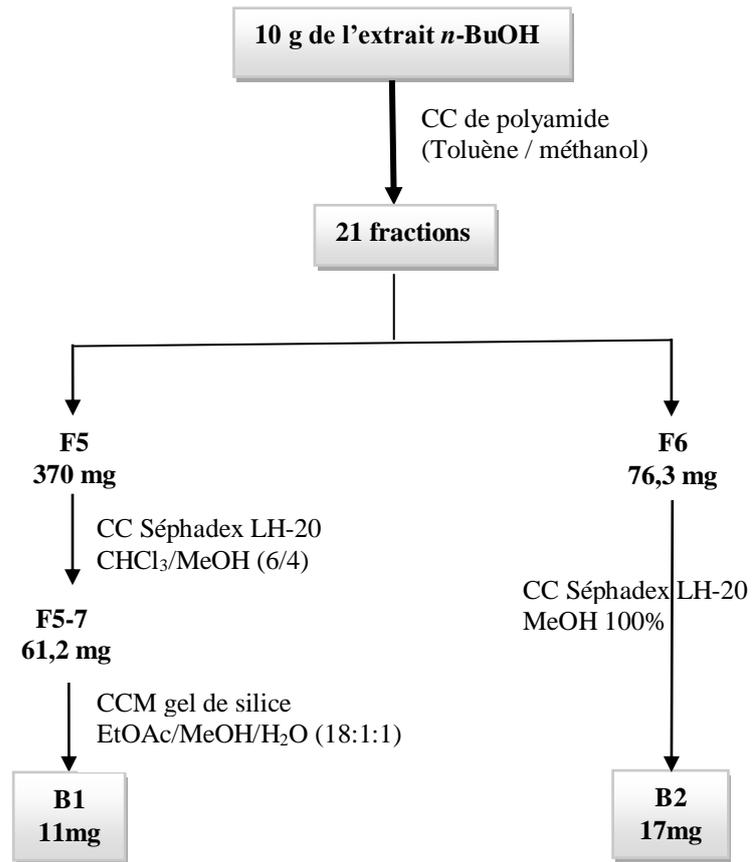


Figure II.4 : Schéma récapitulatif de la séparation de l'extrait *n*-BuOH

Références bibliographiques

1. Quezel, P., Santa, S., (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome II, C.N.R.S, Paris, France, pp 806.
2. Dobignard, A., Chatelain, C., (2012). Index synonymique de la Flore d'Afrique du Nord. Genève, Switzerland: Conservatoire et Jardin Botaniques . Tome 4, pp 356.
3. Boughani, A., Sadki, N., Médail, F., Nedjraoui, D., Salamani, M., (2009). Analyse floristique et phytogéographique d'une région de l'Atlas saharien constantinois, les gorges du Ghouffi (Algérie) . *Acta Botanica Gallica*, 156, 399-414.
4. Aouadj, S.A., Nasrallah, Y., Hasnaoui, O., (2020). Ecological characterization and evaluation of the floristic potential of the forest of Doui Thabet (Saida - Western Algeria) in the context of the restoration. *The Ecology, Environment and Conservation*, 26, 266-278.
5. Yabrir, B., Belhassan, A., Lakhlifi, T., Salgado, M.G., Bouachrine, M., Munoz, C.P., Gerli, C.L., Ramirez, T.R., (2021). Minor composition compounds of Algerian herbal medicines as inhibitors of Sars-Cov-2 main protease: molecular docking and admet properties prediction. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 66.
6. Kabouche, A., Ghannadi, A., Kabouche, Z., (2009). *Thymus ciliatus*-the highest thymol containing essential oil of the genus. *Natural Product Communications*, 4, 1251-1252.
7. Ghorab, H., Kabouche, A., Kabouche, Z., (2014). Comparative compositions of essential oils of *Thymus* growing in various soils and climates of North Africa. *Journal of Materials and Environmental Science*, 5, 298-303.
8. Sofiane, G., Wafa, N., Abbas, K., Amar, O., (2015). Antioxidant and antimicrobial activities of flavonoids extracted from *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. *Der Pharmacia Lettre*, 7, 358-363.
9. Cocan, I., Alexa, E., Danciu, C., Radulov, I., Galuscan, A., Obistioiu, D., Morvay, A.A., Sumalan, R.M., Poiana, M.A., Pop, G., Dehelean, C.A., (2018). Phytochemical screening and biological activity of Lamiaceae family plant extracts. *Experimental and therapeutic medicine*, 15, 1863-1870.
10. Generali, M.I., Skroza, D., Ljubenkova, I., Simat, V., Smole, M.S., Katalinic, V., (2014). In vitro Antioxidant and Antibacterial Activity of Lamiaceae Phenolic Extracts: A Correlation Study. *Food Technology and Biotechnology*, 52, 119-127.

11. Dupont, F., Guignard, J.L., (2012). Abrégés de pharmacie. Botanique: les familles de plantes. 15^{eme} édition.
12. Trabut, L.C., (1935). Flore du nord de l'Afrique: Répertoire des noms indigènes des plantes spontanées, cultivées et utilisées dans le nord de l'Afrique. (Collection du centenaire de l'Algérie).
13. Lapie, G., (2010). Flore forestière de l'Algérie, Tunisie, Maroc et Midi de la France. Paris, pp282.
14. Baba Aïssa F., (1990). Les plantes médicinales en Algérie: Identification, description, principes actifs, propriétés et usage traditionnel de plantes communes en Algérie, pp173.
15. Benabid, A., (2000). Flore et écosystemes du Maroc. Evaluation et préservation de la biodiversité. Paris: Editions Ibis Press, pp160.
16. Abay, G., Altun, M., Koldaş, S., Tufekci, A.R., Demirtas, I., (2015). Determination of antiproliferative activities of volatile contents and HPLC profiles of *Dicranum scoparium* (Dicranaceae, Bryophyta). *Combinatorial Chemistry and High Throughput*, 18, 453-463.

CHAPITRE III

DISCUSSION DES RESULTATS

III.1. Résultat de l'analyse par HPLC-TOF/MS

Les trois extraits de *Thymus munbyanus* subsp. *ciliatus* CHCl₃, AcOEt et *n*-BuOH obtenus par l'extraction à froid dans le système hydroalcoolique MeOH/H₂O (v : v ; 80/20) ont été analysés par la méthode HPLC-TOF/MS en mode négatif, afin de comparer leurs profils chromatographiques et d'obtenir des informations sur la nature et la quantité des composés phénoliques présents. Les chromatogrammes donnant les profils des extraits sont présentés dans la figure III.1.

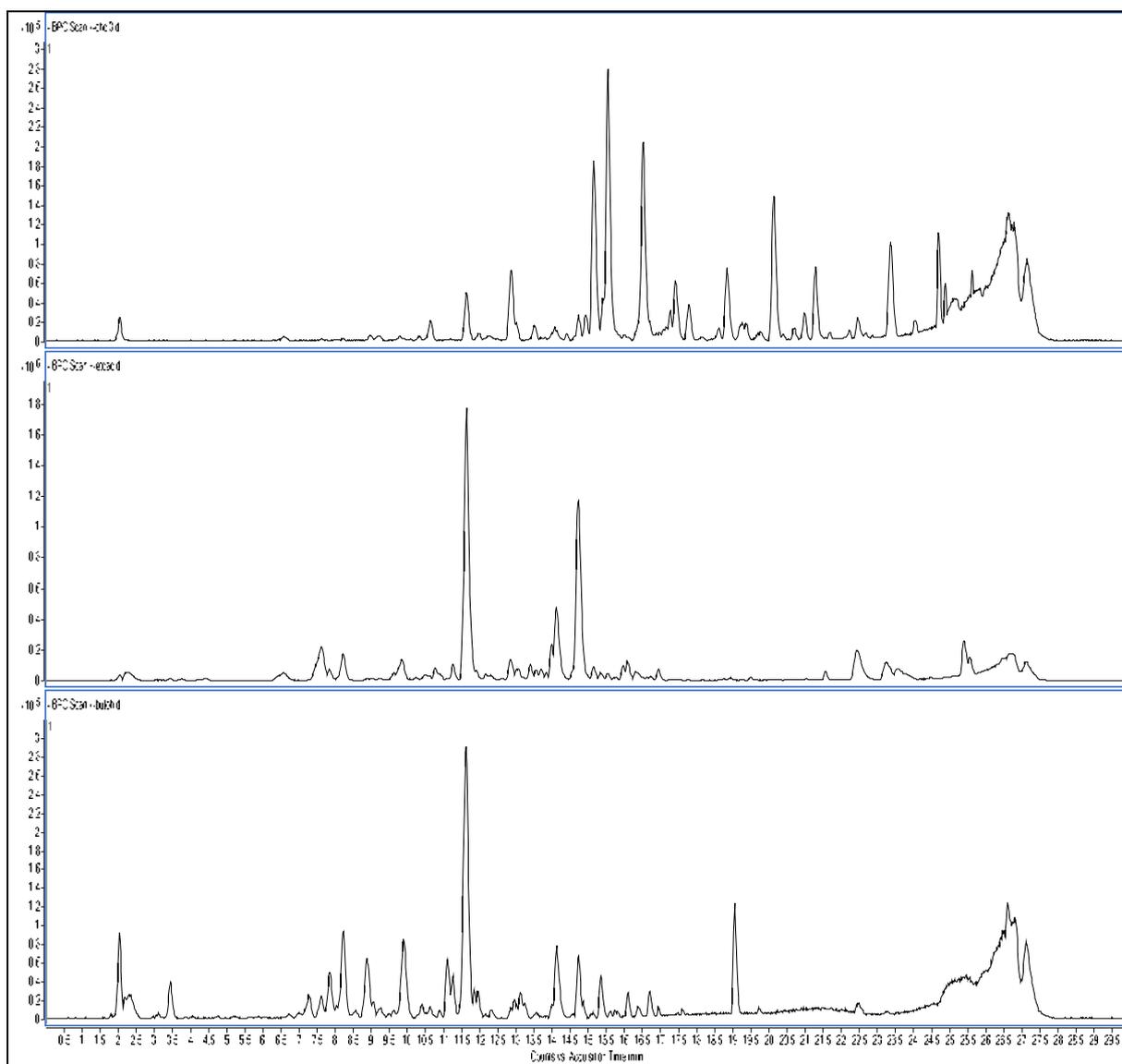


Figure III.1: Profils chromatographiques des extraits de *T. munbyanus* subsp. *ciliatus* analysés par HPLC-TOF/MS en mode négatif

L'identification de divers composés phénoliques des extraits, principalement les acides phénoliques et les flavonoïdes, ainsi d'autres composés polaires, a été effectuée par la comparaison de leurs temps de rétention et leurs masses avec les 29 standards utilisés. Le

tableau III.1 rassemble les résultats de l'analyse par HPLC-TOF/MS des extraits de *T. munbyanus* subsp. *ciliatus*.

Tableau III.1: Les composés identifiés dans les extraits de *T. munbyanus* subsp. *ciliatus* par HPLC-TOF/MS

N°	Composés identifiés	Formule	Masse calculée	Extrait CHCl ₃	Extrait AcOEt	Extrait <i>n</i> -BuOH
1	Acide fumarique	C ₄ H ₄ O ₄	116,01	nd	0,44	9,07
2	Acide gentisique	C ₇ H ₆ O ₄	154,03	0,14	3,82	0,72
3	Acide chlorogénique	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354,10	0,09	0,73	2,14
4	Acide 4- hydroxybenzoïque	C ₇ H ₆ O ₃	138,03	1,04	21,03	0,91
5	Acide protocatéchique	C ₇ H ₆ O ₄	154,03	nd	0,78	1,06
6	Acide caféique	C ₉ H ₈ O ₄	180,04	0,11	24,96	0,50
7	Acide vanillique	C ₈ H ₈ O ₄	168,04	0,26	1,62	0,39
8	Acide syringique	C ₉ H ₁₀ O ₅	198,05	0,99	3,55	1,25
9	Rutine	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610,15	nd	0,11	1,00
10	4-hydroxybenzaldehyde	C ₇ H ₆ O ₂	122,04	0,02	tr	tr
11	Polydatine	C ₂₀ H ₂₂ O ₈	390,39	tr	0,90	tr
12	Scutellarine	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	462,08	0,39	0,64	40,29
13	Quercétine-3-β-D-glucoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464,10	tr	17,14	5,52
14	Naringine	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	580,18	1,09	1,50	2,12
15	Diosmine	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	608,17	0,65	2,45	2,35
16	Taxifoline	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	304,06	tr	0,12	tr
17	Neohespéridine	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	610,19	tr	0,06	tr
18	Baicaline	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	446,08	tr	tr	15,58
19	Acide <i>p</i> -coumarique	C ₉ H ₈ O ₃	164,05	tr	0,13	tr
20	Morine	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302,04	0,23	2,36	0,70
21	Acide salicylique	C ₇ H ₆ O ₃	138,03	tr	0,33	tr
22	Quercétine	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302,04	tr	1,48	tr
23	Acide cinnamique	C ₉ H ₈ O ₂	148,05	0,32	0,30	0,51
24	Apigénine	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270,05	0,05	4,05	tr
25	Naringénine	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	272,07	tr	0,29	tr
26	Kaempférol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286,05	tr	1,13	tr
27	Diosmétine	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	300,06	tr	4,37	nd
28	Eupatorine	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	344,32	0,32	tr	tr
29	Wogonine	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284,07	0,90	tr	nd

nd : non détecté

tr: trace

Comme le montre le tableau ci-dessus, les extraits analysés comportent un mélange complexe des métabolites secondaires. Ces constituants appartiennent généralement à deux groupes chimiques importants, à savoir, les acides phénoliques et les flavonoïdes connus pour leurs activités antioxydantes. Ces composés présents en très faible quantité dans l'extrait chloroformique (apolaire). En ce qui concerne les phases polaires, l'extrait AcOEt est plus riche en composés polaires que l'extrait *n*-BuOH.

Dans l'extrait AcOEt, l'acide caféique, l'acide 4-hydroxybenzoïque et la quercétine-3- β -D-glucoside montrent des teneurs importantes 24,96; 21,03 et 17,14 mg/kg plante respectivement mais avec des faibles quantités dans l'extrait *n*-BuOH. Alors que la scutellarine, la baicaline et l'acide fumarique ayant les taux les plus élevés dans l'extrait *n*-butanol 40,29; 15,58 et 09,07 mg/kg plante respectivement. Le tableau III.2 rassemble les structures des composés identifiés dans les extraits de *T. munbyanus* subsp. *ciliatus* par HPLC-TOF/MS.

Tableau III.2: Les structures des composés identifiés dans les extraits de *T. munbyanus* subsp. *ciliatus* par HPLC-TOF/MS

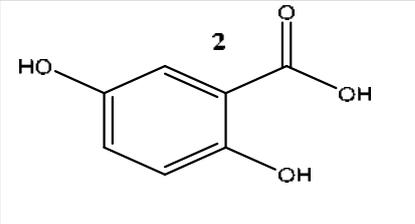
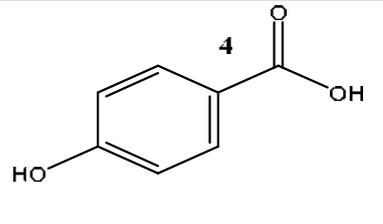
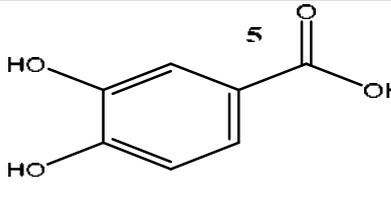
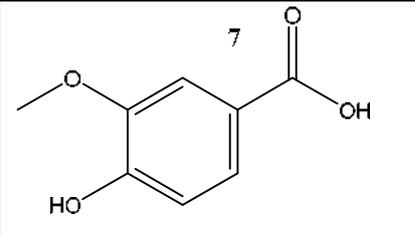
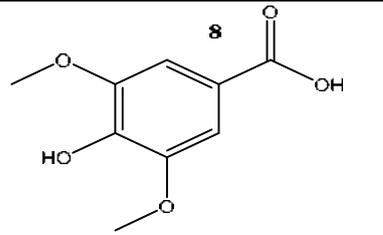
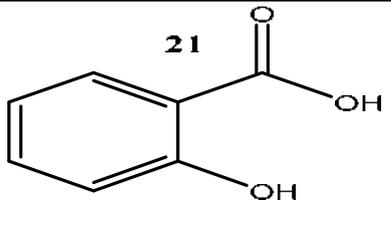
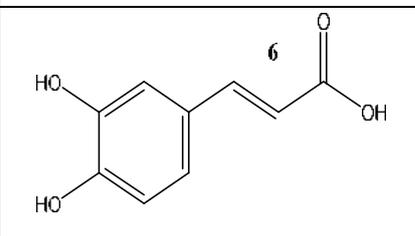
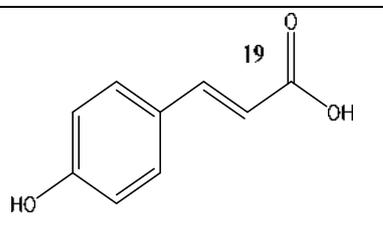
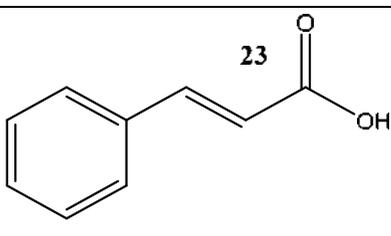
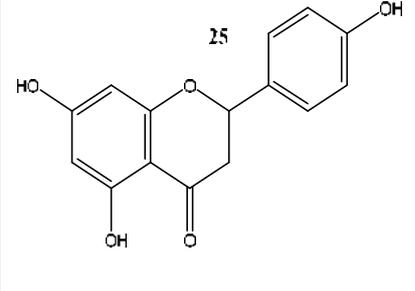
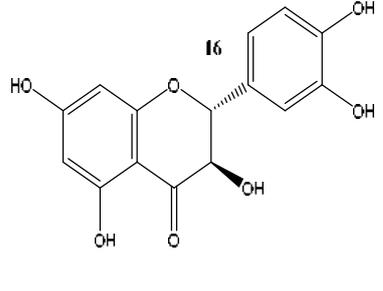
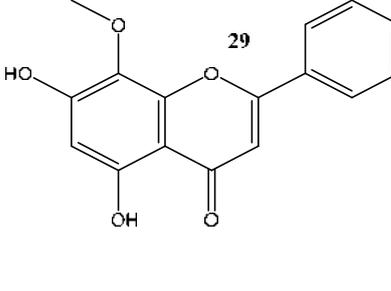
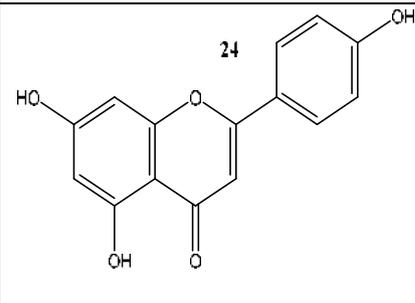
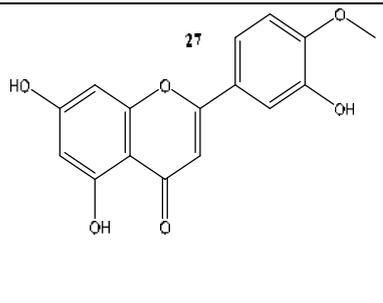
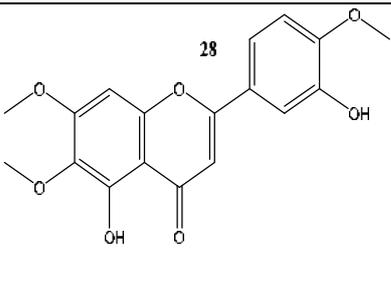
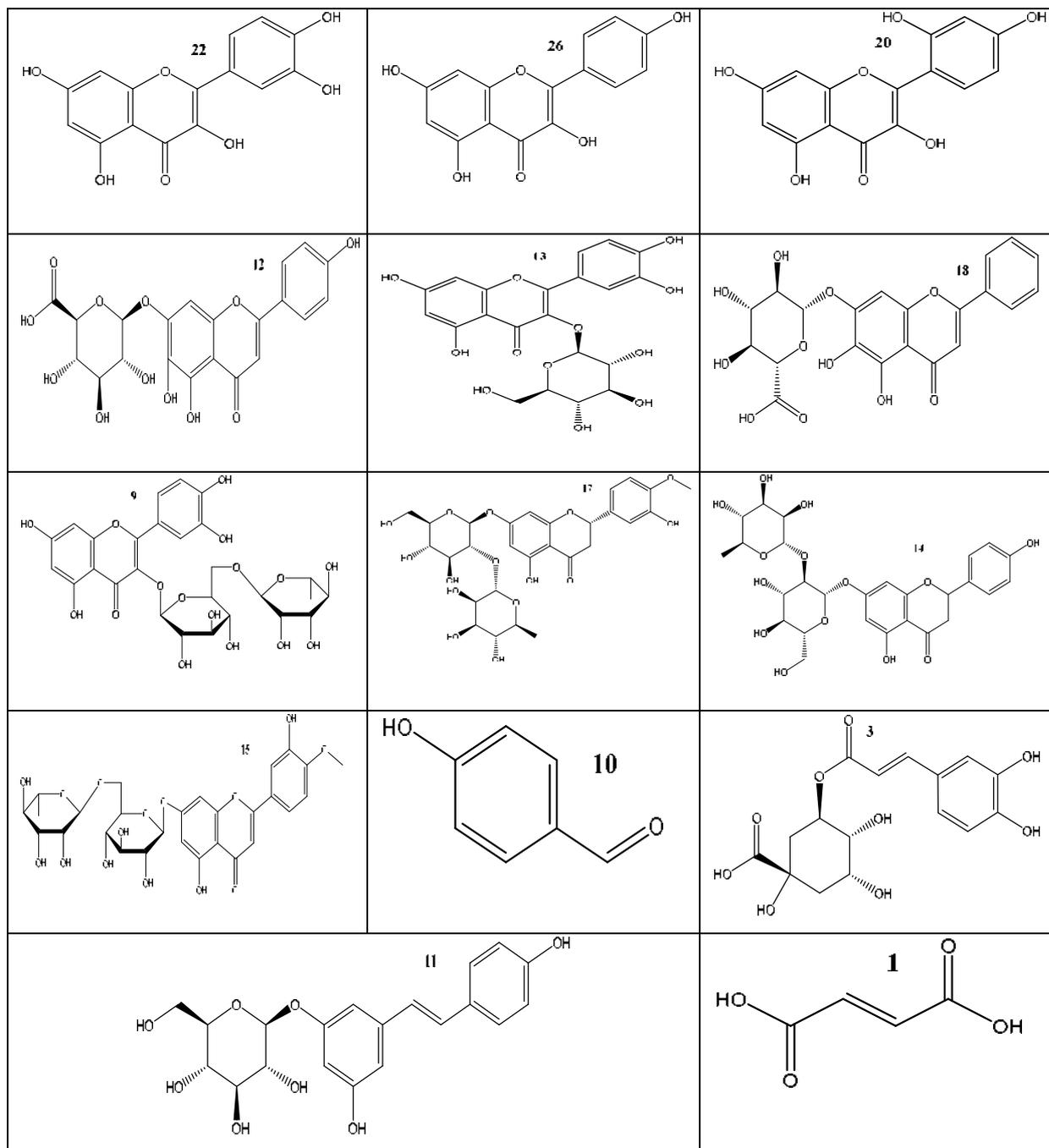
		
		
		
		
		

Tableau III.2: Les structures des composés identifiés dans les extraits de *T. munbyanus* subsp. *ciliatus* par HPLC-TOF/MS (suite)



En conclusion, cette étude a révélé l'espèce *T. munbyanus* subsp. *ciliatus*, comme étant une source d'une grande richesse en composés appartenant à la classe des polyphénoliques en général et en particulier aux flavonoïdes et acides phénoliques et comme nous l'avons mentionné précédemment dans la partie revue bibliographique, sont des métabolites secondaires caractéristiques du genre *Thymus*.

III.2. Elucidation structurale des composés isolés

Les produits isolés ont été identifiés par les méthodes d'analyse spectroscopiques particulièrement, RMN 1D du proton et du carbone, RMN 2D (COSY, HSQC, HMBC), ESI-MS et par comparaison avec les données de la littérature.

III.2.1. Identification structurale des produits isolés de la phase AcOEt

III.2.1.1. Elucidation structurale du composé A1 (ATC1D)

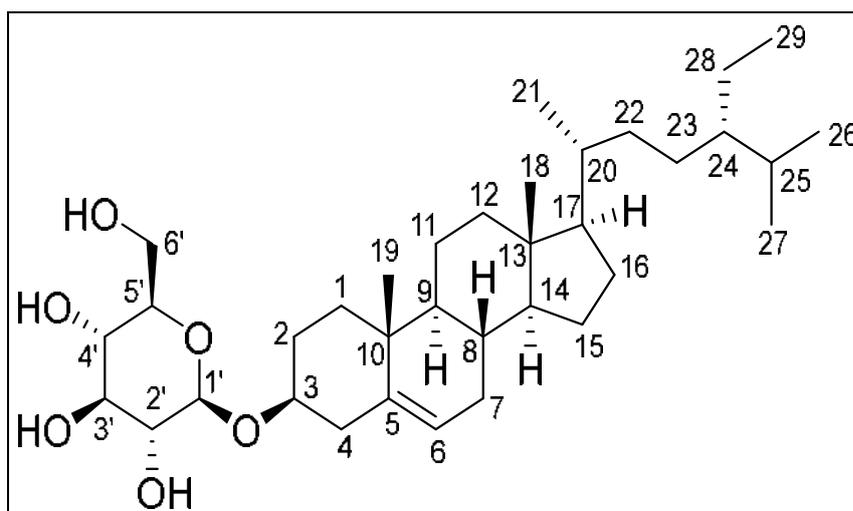


Figure III.2: Structure du composé A1

L'aspect du composé A1 est une poudre blanche, n'absorbe pas sous la lumière UV (254-366 nm) et sa coloration sur plaque CCM de gel de silice sous des vapeurs de l'acide sulfurique est rose foncé.

L'examen du spectre RMN ^{13}C (figure III.3) ainsi que ces spectres étalés (figures III.3a, III.3b et III.3c) indique la présence de 35 atomes de carbone et les séquences DEPT (figures III.4, III.4a et III.4b) de ce composé montrent :

- Trois carbones quaternaires dont un éthylénique à δ_c 140,90 ppm.
- 14 groupements CH dont un éthylénique à δ_c 121,64 ppm.
- 12 groupements CH_2 dont un oxygéné à δ_c 61,56 ppm.
- Six groupements CH_3 .

Ces informations orientent vers une structure de type stérol.

En outre, les valeurs des déplacements chimiques des deux carbones éthyléniques, le premier correspondant à un CH à δ_c 121,64 ppm et le second à un atome de carbone quaternaire à δ_c 140,90 ppm et vu l'absence d'autre carbone éthylénique sur ces spectres, cela suppose que ces

deux atomes de carbone délimitent la même double liaison. Les valeurs de leur déplacement chimique sont caractéristiques des positions C-5 (140,90 ppm) et C-6 (121,64 ppm) d'un stérol.

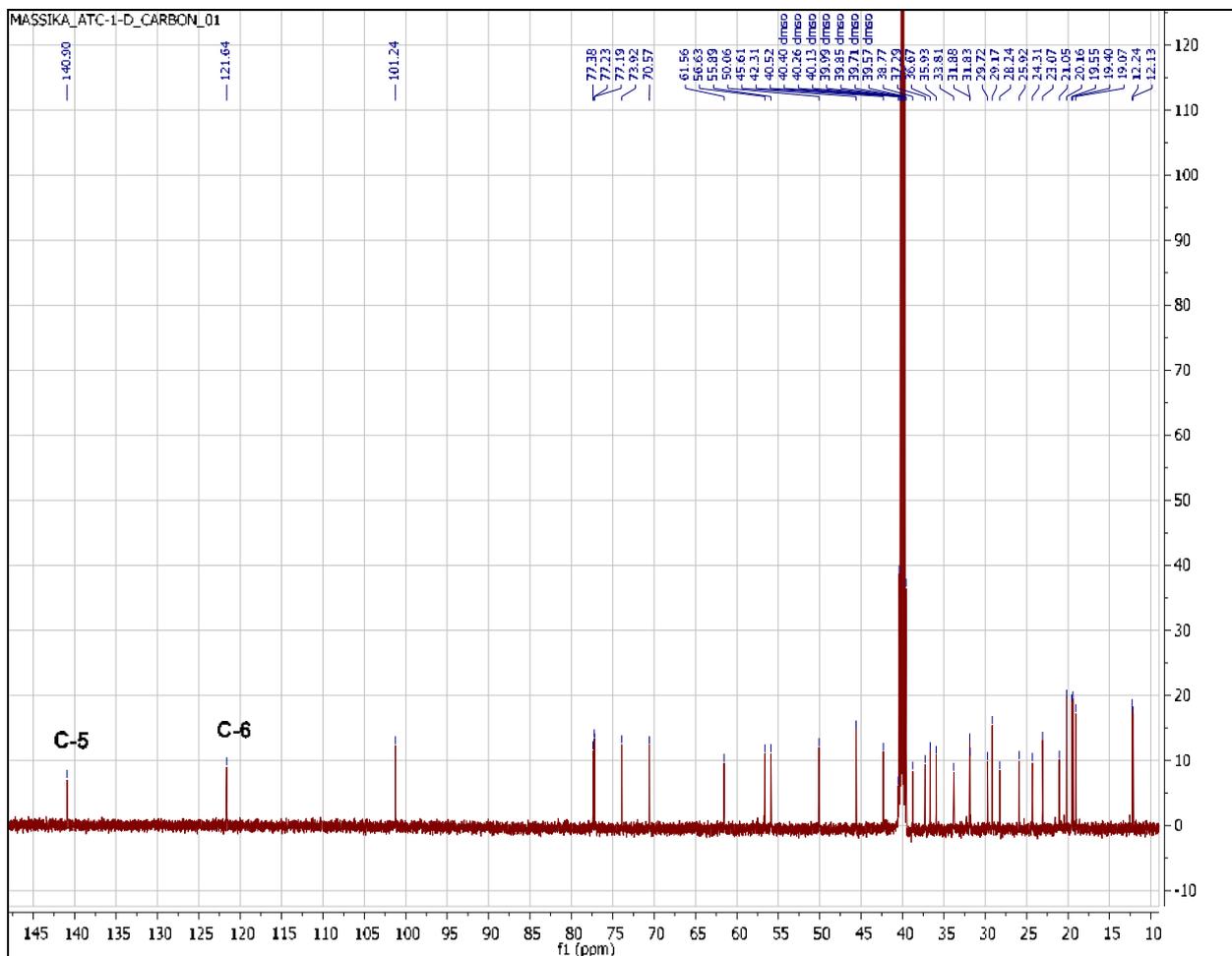


Figure III.3: Spectre RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) du composé A1

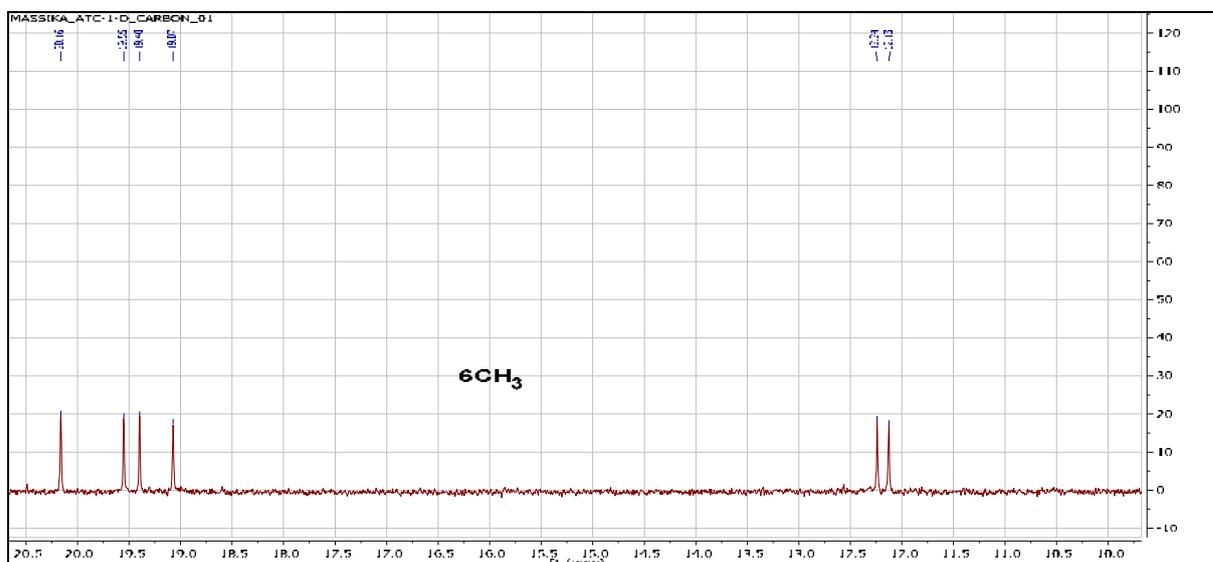
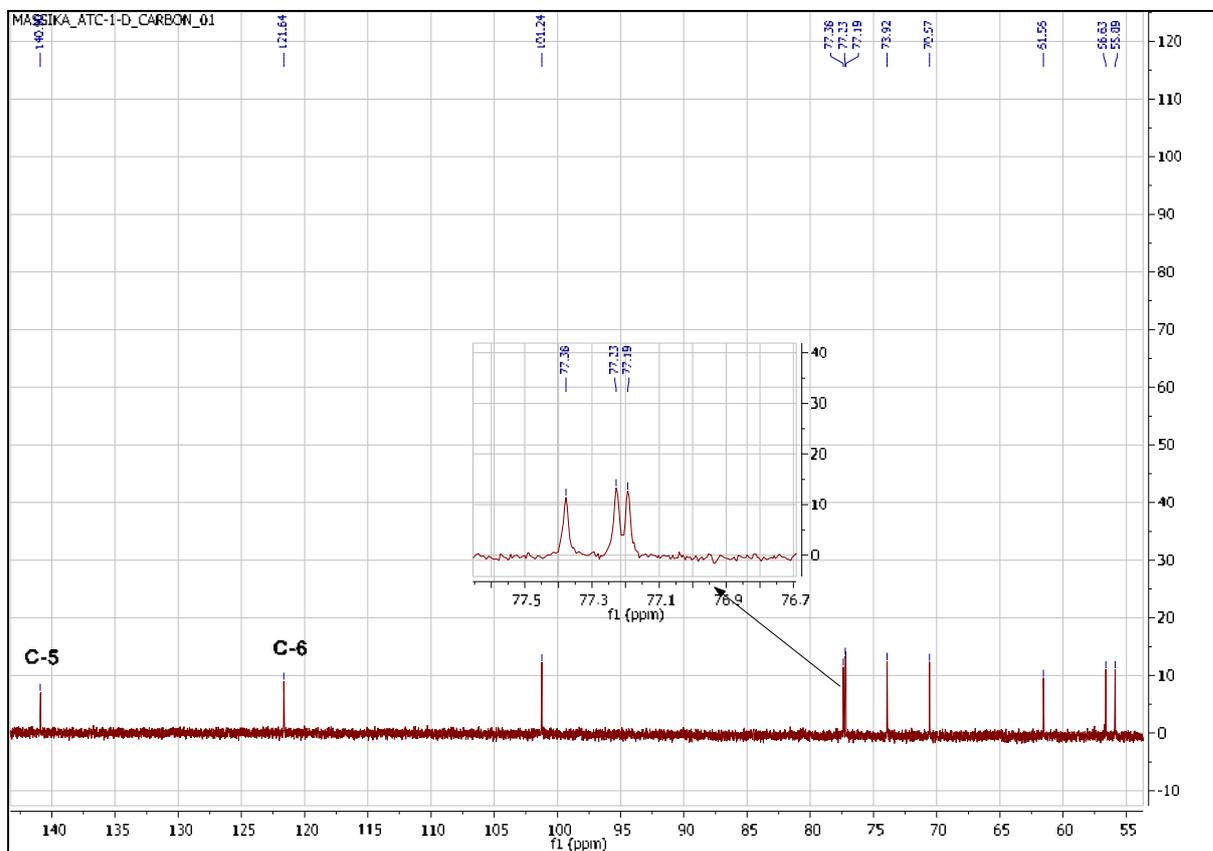
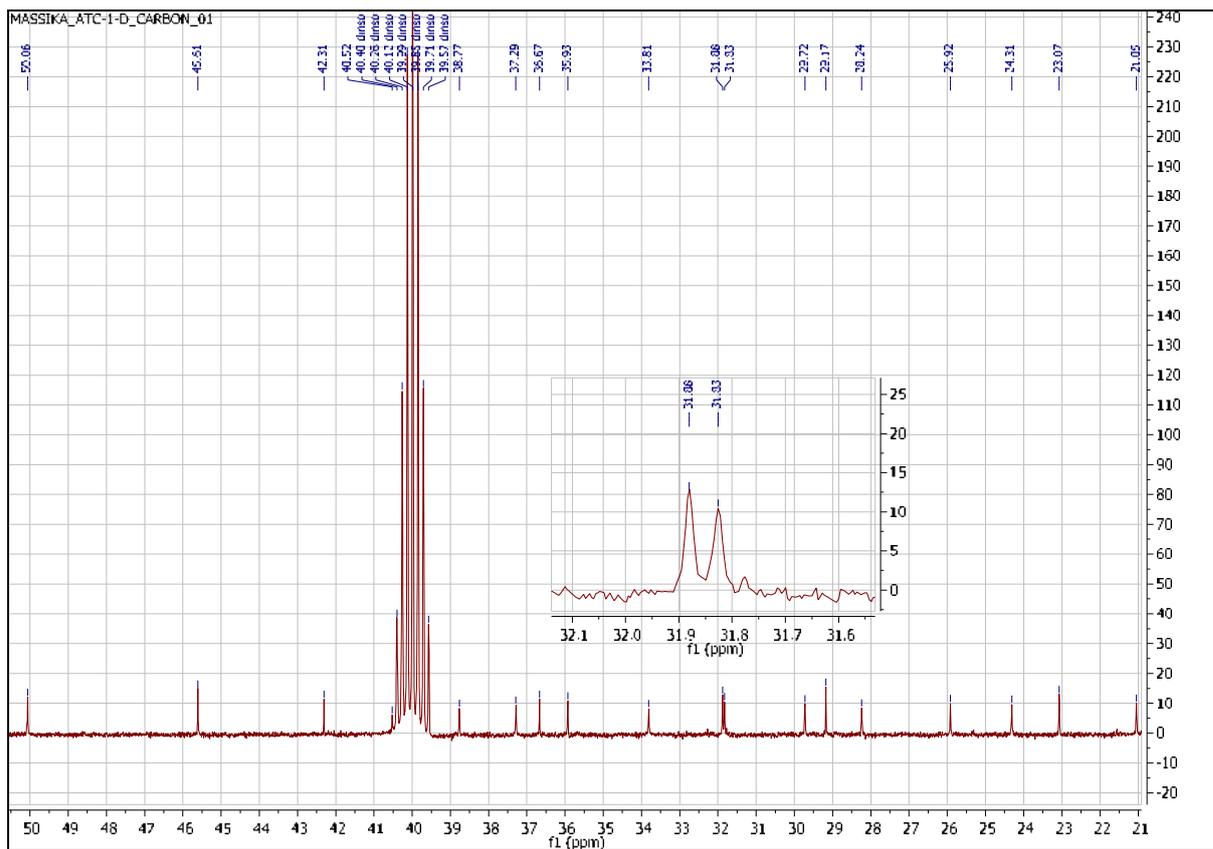


Figure III.3a: Spectre RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) étalé de 10 à 20,5 ppm du composé A1



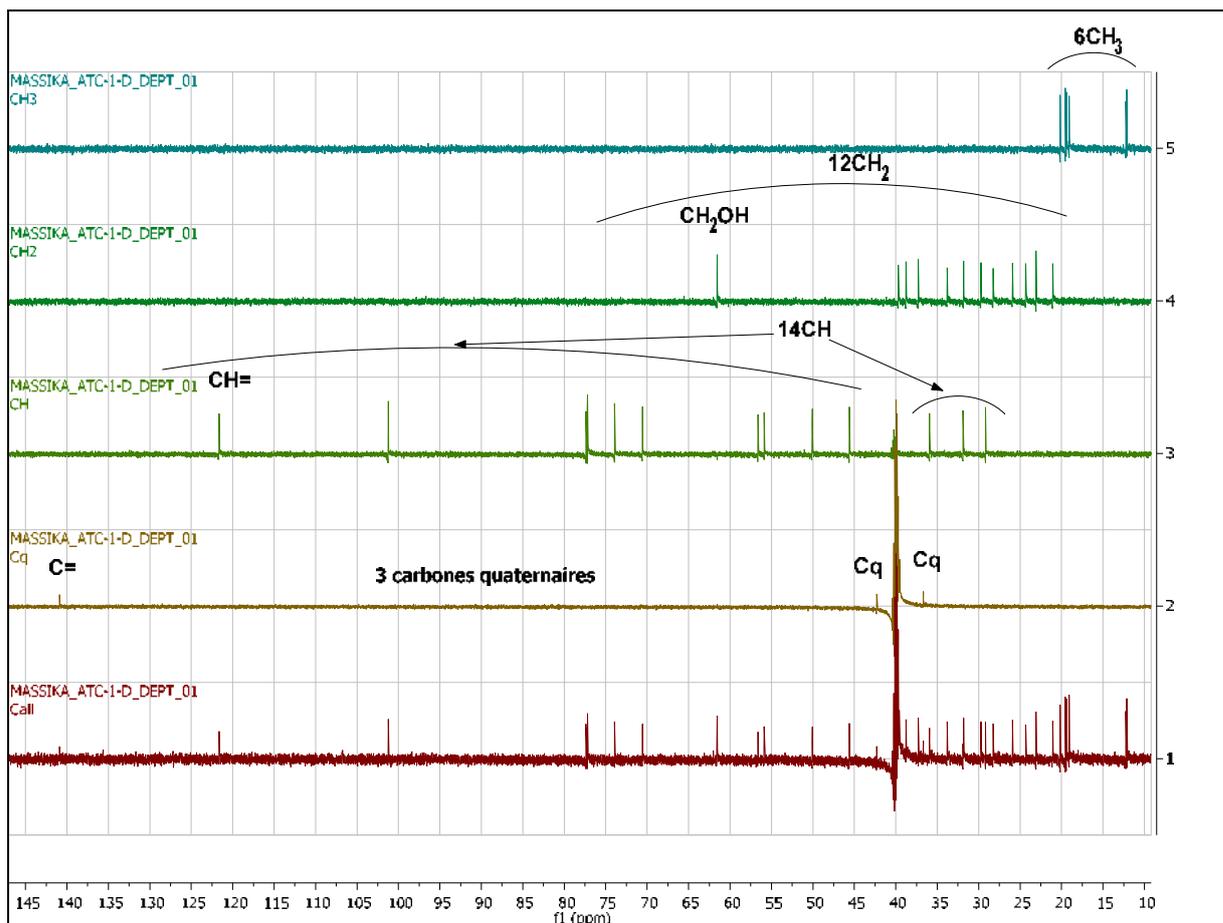


Figure III.4: Spectre DEPT (150 MHz, DMSO-d6, δ ppm) du composé A1

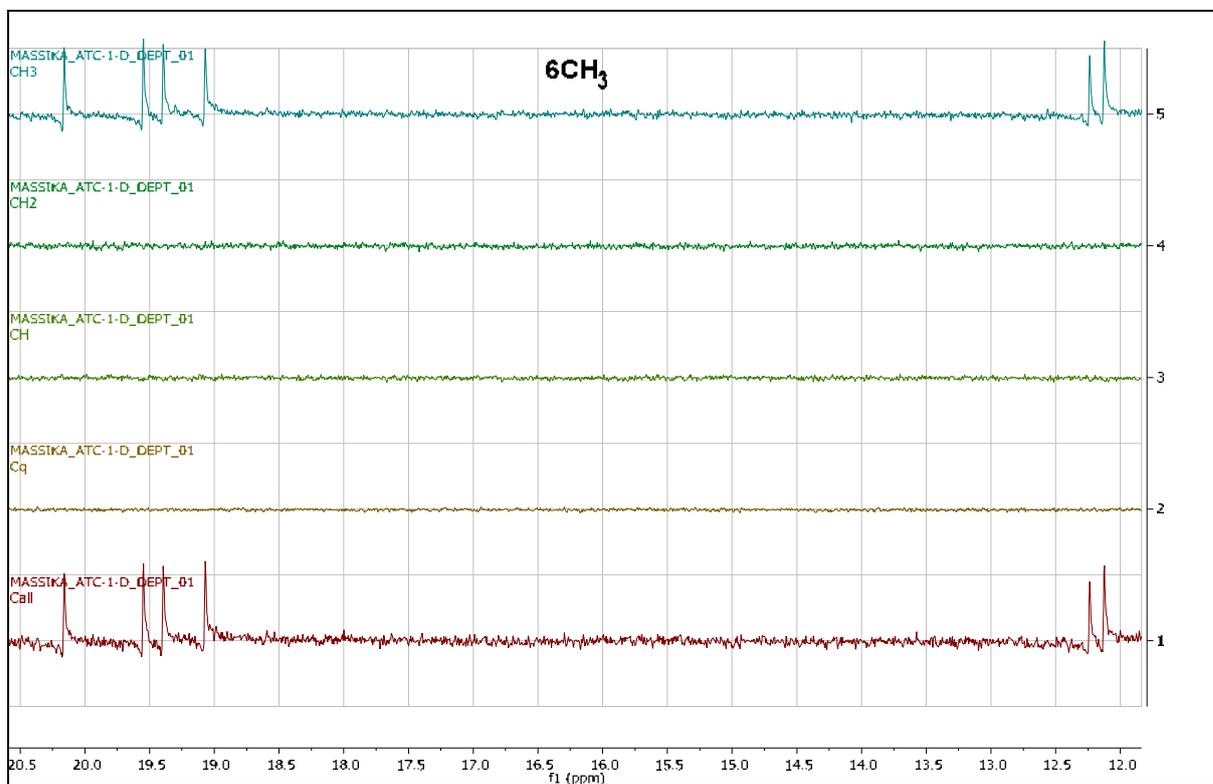


Figure III.4a: Spectre DEPT (150 MHz, DMSO-d6, δ ppm) étalé de 12 à 20,5 ppm du composé A1

- L'ensemble des signaux résonant à champ fort entre δ_H 0,63-2,33 ppm (figure III.5a), indiquant la présence des groupements méthyles, méthylènes et méthynes d'un stérol.

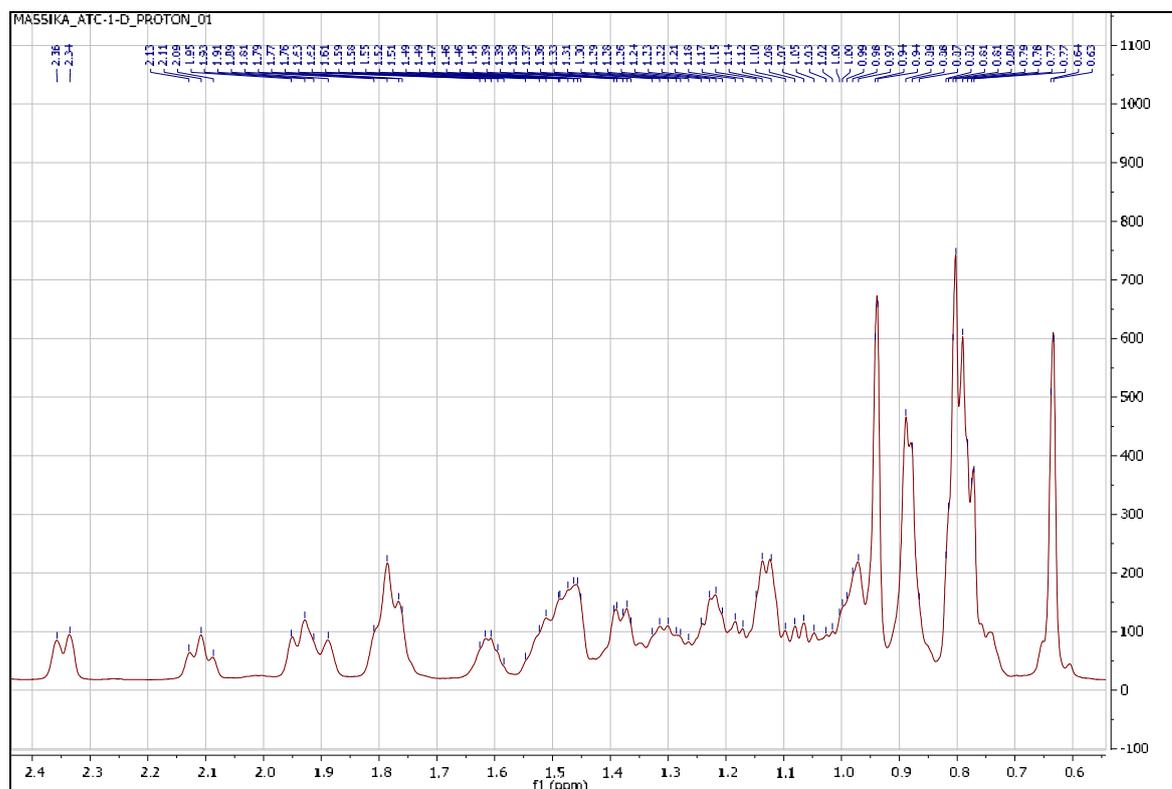


Figure III.5a: Spectre RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) étalé de 0,6 à 2,4 ppm du composé **A1**

En effet, ce même spectre montre également, dans l'intervalle 0,68-0,95 ppm (figure III.5b), la présence de :

- ✓ Deux singulets résonant à champ fort δ_H 0,63 ppm et δ_H 0,94 ppm, s'intégrant pour trois protons chacun, correspondant respectivement aux deux groupements méthyliques CH_3 -18 et CH_3 -19. Les carbones correspondants à ces deux derniers groupements méthyliques sont attribués par analyse du spectre HSQC (figure III.6 et III.6a) à δ_C 12,13 ppm et 19,55 ppm.
- ✓ Un multiplet s'intégrant pour neuf protons (deux doublet et un triplet superposés) résonant à δ_H 0,77 ppm, δ_H 0,79 ppm et δ_H 0,80 ppm correspondant aux trois groupements méthyliques suivants: CH_3 -26, CH_3 -27 et CH_3 -29. Leurs carbones correspondants sont également localisés grâce à l'analyse du spectre HSQC à δ_C 20,16 ppm; 19,40 ppm et 12,24 ppm respectivement.
- ✓ Un doublet à δ_H 0,88 ppm ($J = 6,77$ Hz) d'intégration 3H attribuable au groupement méthyle: CH_3 -21. le spectre HSQC montre une corrélation des protons du groupement méthyle précédemment cité et le carbone à δ_C 19,07 ppm.

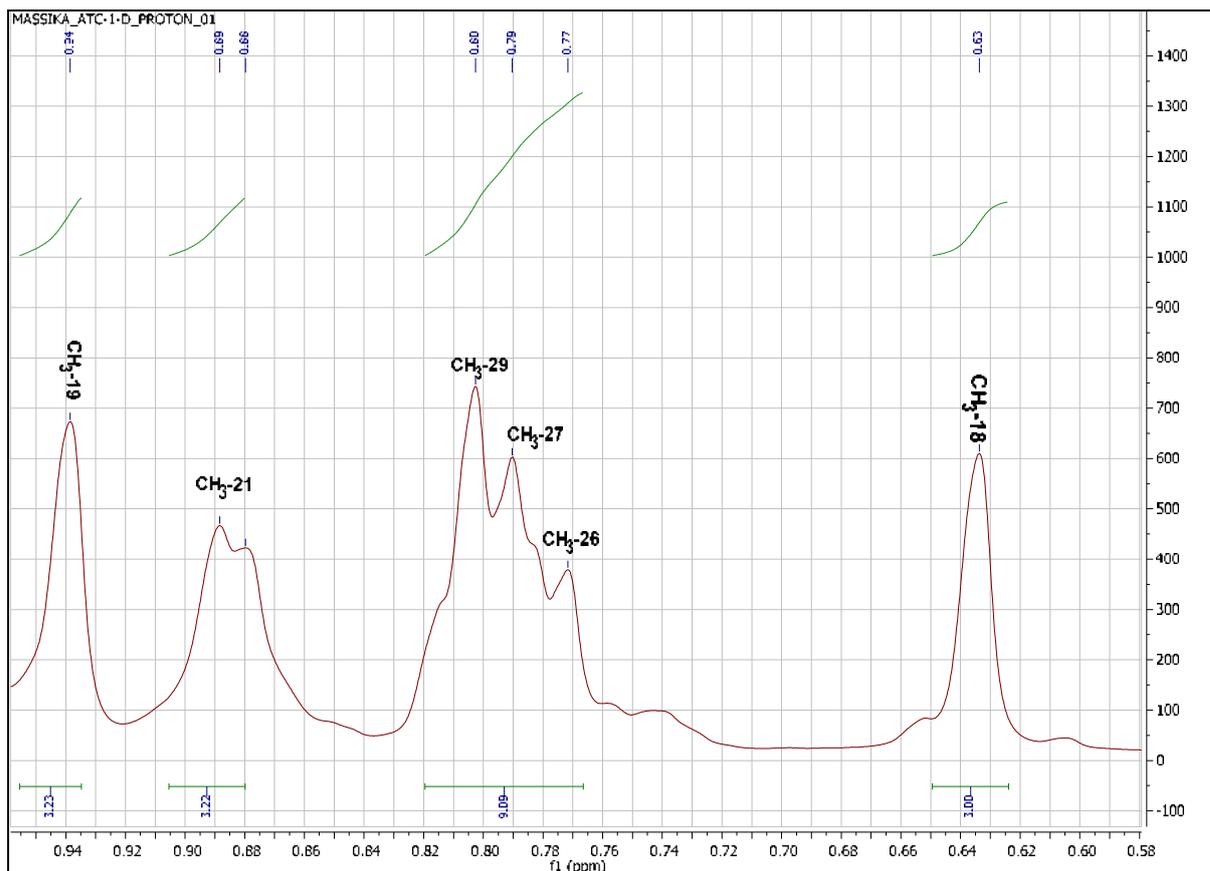


Figure III.5b: Spectre RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) étalé de 0,58 à 0,96 ppm du composé A1

- En plus de ces signaux, le spectre RMN ^1H (figure III.5c) montre:
 - ✓ Un multiplet à δ_{H} 3,44 ppm caractéristique d'un proton porté par un carbone oxygéné typique du proton H-3 d'un stérol. Ce dernier montre une tache de corrélation avec le carbone à δ_{C} 77,37 ppm sur le spectre HSQC (figure III.6b).
 - ✓ Un singulet large d'intégration 1H à δ_{H} 5,31 ppm indiquant la présence d'un proton éthylénique connu avec la numérotation H-6. Celui-ci corrèle sur le spectre HSQC (figure III.6b) avec le carbone à δ_{C} 121,64 ppm caractéristique du carbone C6 d'un stérol.

Ces observations confirment la nature stéroïdienne de ce composé.

L'analyse des spectres RMN du composé A1 met en évidence un aglycone stéroïdique qui présente des analogies avec le β -sitostérol, substitué en position 3 comme le suggère le déblindage du carbone C-3 [1].

- D'autre part, l'analyse du spectre RMN ^1H (figure III.5c), montre la présence des signaux caractéristiques d'un hexose:
 - ✓ Un signal à δ_{H} 4,20 ppm d'intégration 1H sous forme d'un doublet ($J = 7,90$ Hz) corrèle sur le spectre HSQC (figure III.6b) avec le carbone à δ_{C} 101,24 ppm caractéristique du proton anomérique d'un hexose. Les valeurs des déplacements chimiques du proton et du

carbone indiquent une jonction O-hexose. Le couplage sur le spectre HMBC (figure III.7 et III.7a) entre le proton anomérique H-1' et le C-3 de la génine indique que celui-ci porte le sucre. Par ailleurs, la constante de couplage du proton anomérique $J = 7,90$ Hz indique une configuration β de la liaison osidique.

- ✓ Deux multiplets d'intégration 1H chacun à δ_H 3,39 ppm et à δ_H 3,63 ppm, corrélient sur le spectre HSQC avec le même atome de carbone à δ_C 61,56 ppm, caractéristique du groupement CH₂-6' de l'hexose.
 - ✓ Quatre signaux d'intégration 1H chacun sous forme de multiplet à δ_H 2,88 ppm, δ_H 3,00 ppm, δ_H 3,05 ppm et δ_H 3,10 ppm, corrélient sur le spectre HSQC aux signaux situés à δ_C 73,92 ppm, δ_C 70,57 ppm, δ_C 77,19 ppm et δ_C 77,23 ppm respectivement.
- Par ailleurs, le spectre COSY (¹H-¹H) (figure III.8) montre une tache de corrélation entre le H-1' à δ_H 4,20 ppm et un multiplet à δ_H 2,88 ppm qui ne peut être que le H-2'.

L'attribution des autres signaux osidique est réalisée à l'aide des données obtenues du spectre HMBC ainsi que ces spectres étalés et la comparaison avec les données de la littérature [2]:

- ✓ Le proton H-2' (δ_H 2,88 ppm), localisé par l'analyse du spectre HSQC à δ_C 73,92 ppm corrélie sur le spectre HMBC avec deux carbones à δ_C 101,24 ppm et δ_C 77,23 ppm attribuable respectivement à C-1' et C-3'.
- ✓ Le proton H-3' (δ_H 3,10 ; δ_C 77,23) montre des taches de corrélation sur le spectre HMBC avec les carbones à δ_C 73,92 ppm et δ_C 70,57 ppm attribuable respectivement à C-2' et C-4'.
- ✓ Les deux protons géminés résonnant à 3,39 ppm et à 3,63 ppm du groupement CH₂-6' corrélient sur le spectre HMBC avec deux carbones à δ_C 70,57 ppm et δ_C 77,19 ppm attribuable respectivement à C-4' et C-5'.
- ✓ Le proton H-5' (δ_H 3,05 ppm), localisé par l'analyse du spectre HSQC à δ_C 77,19 ppm corrélie sur le spectre HMBC avec les carbones C-3' et C-4'.

Ces résultats sont en bon accord avec l'expérience COSY, (figure III.8a), qui montre des crêtes de corrélations entre ces protons.

En plus, sur les mêmes spectres de RMN¹H et COSY H-H, on peut identifier les OH de l'unité osidique : OH-2' (4,82ppm), OH-3' (4,85ppm), OH-4' (4,84ppm) et OH-6' (4,39ppm). Une comparaison de ces résultats avec celles de la littérature [2] a permis d'identifier l'entité osidique comme étant le O- β -glucose.

Une analyse complète des spectres RMN mono et bidimensionnels a permis de compléter les attributions des protons et des carbones restants de la molécule.

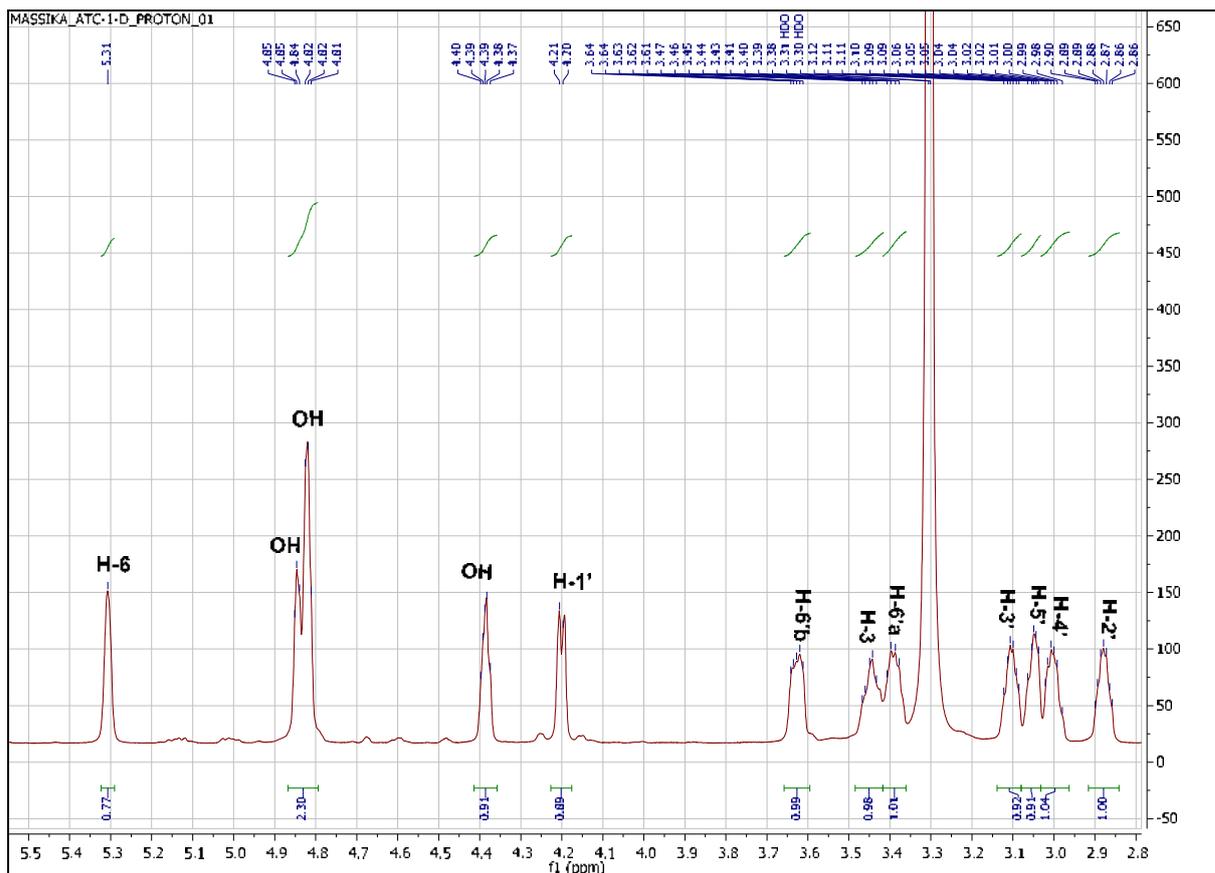


Figure III.5c: Spectre RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) étalé de 2,8 à 5,4 ppm du composé A1

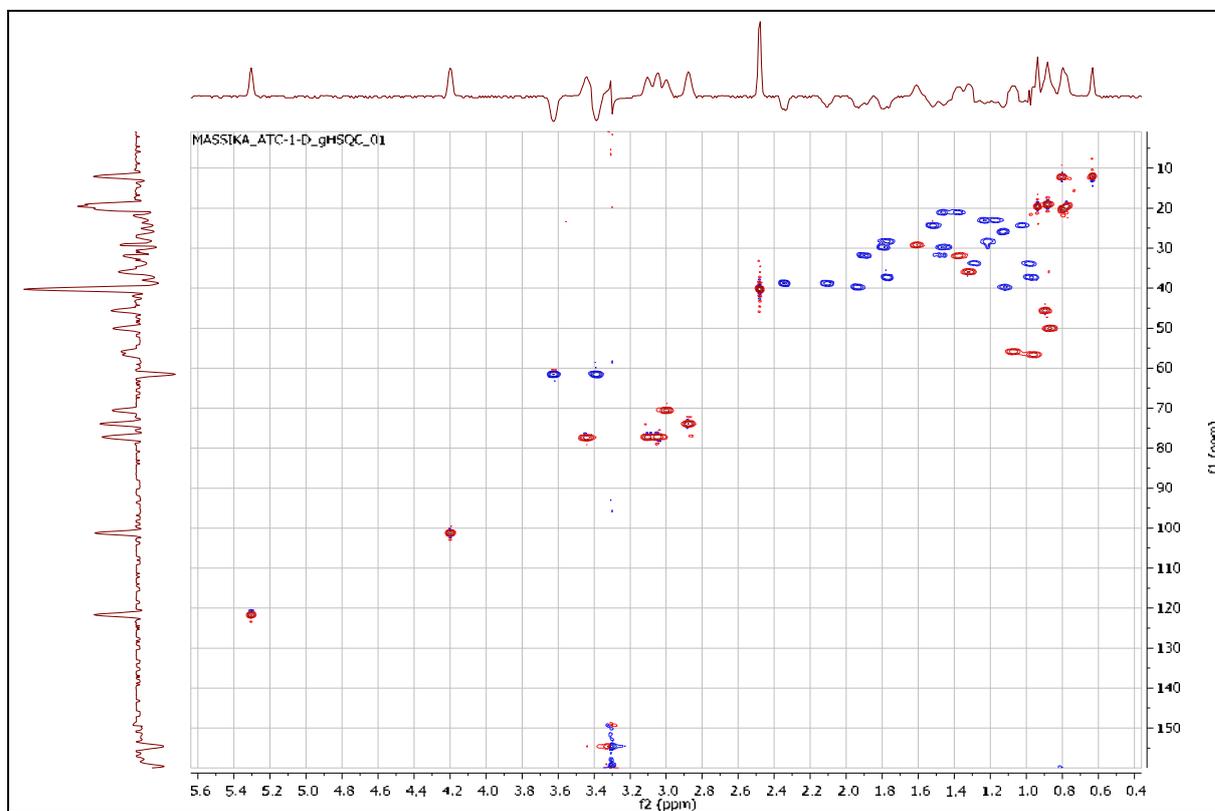


Figure III.6: Spectre RMN 2D HSQC (600 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé A1

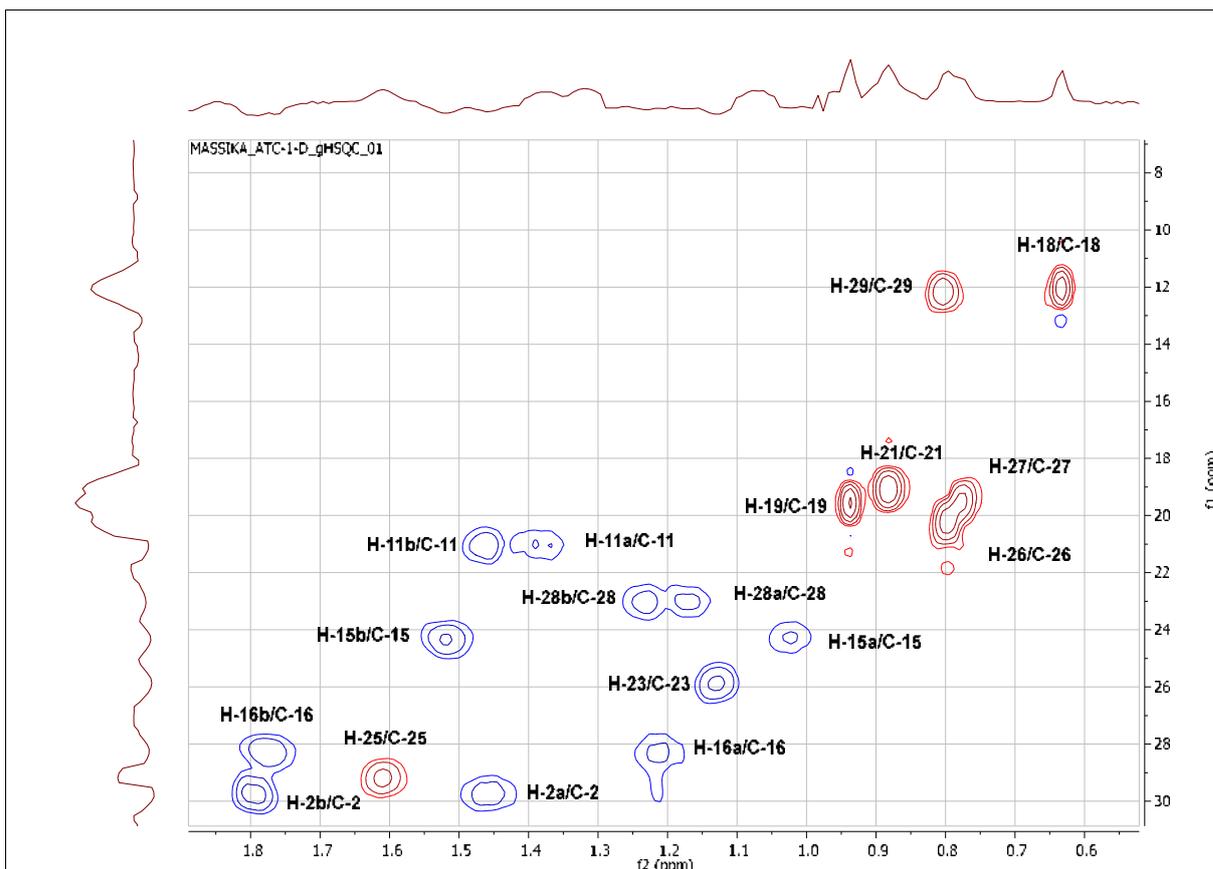


Figure III.6a: Spectre RMN 2D HSQC (600 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) étalé (^1H : 0,5-1,9 ppm; ^{13}C : 7-31 ppm) du composé A1

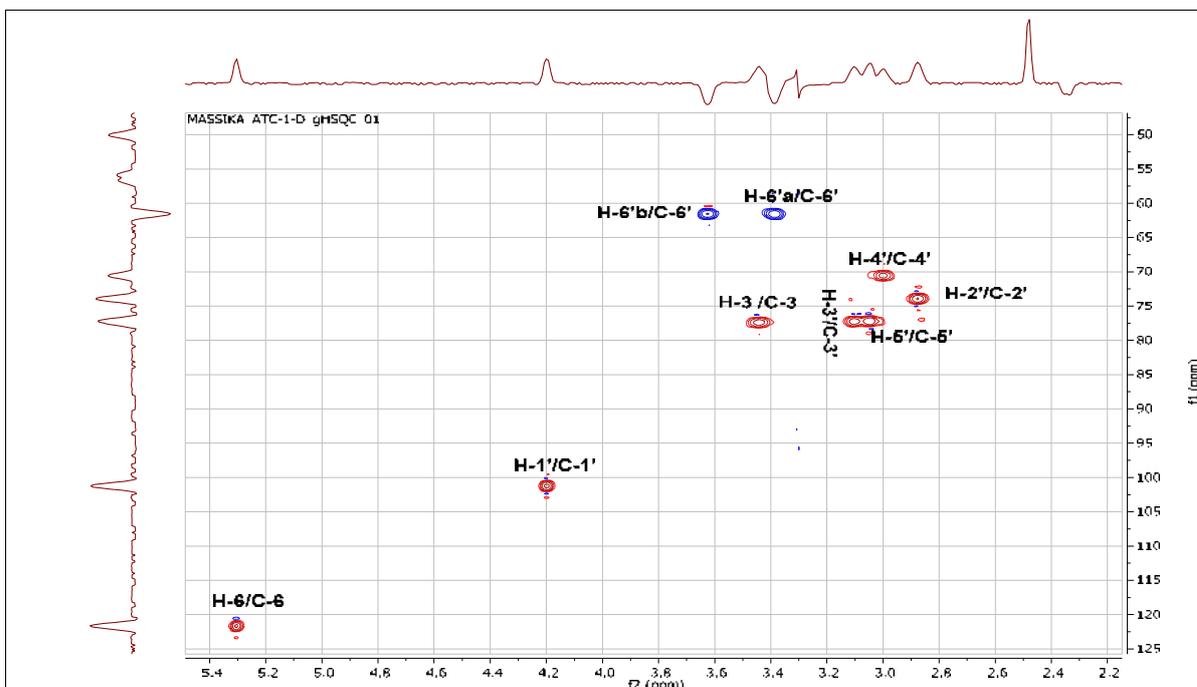


Figure III.6b: Spectre RMN 2D HSQC (600 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) étalé (^1H : 2,1-5,5 ppm; ^{13}C : 48-126 ppm) du composé A1

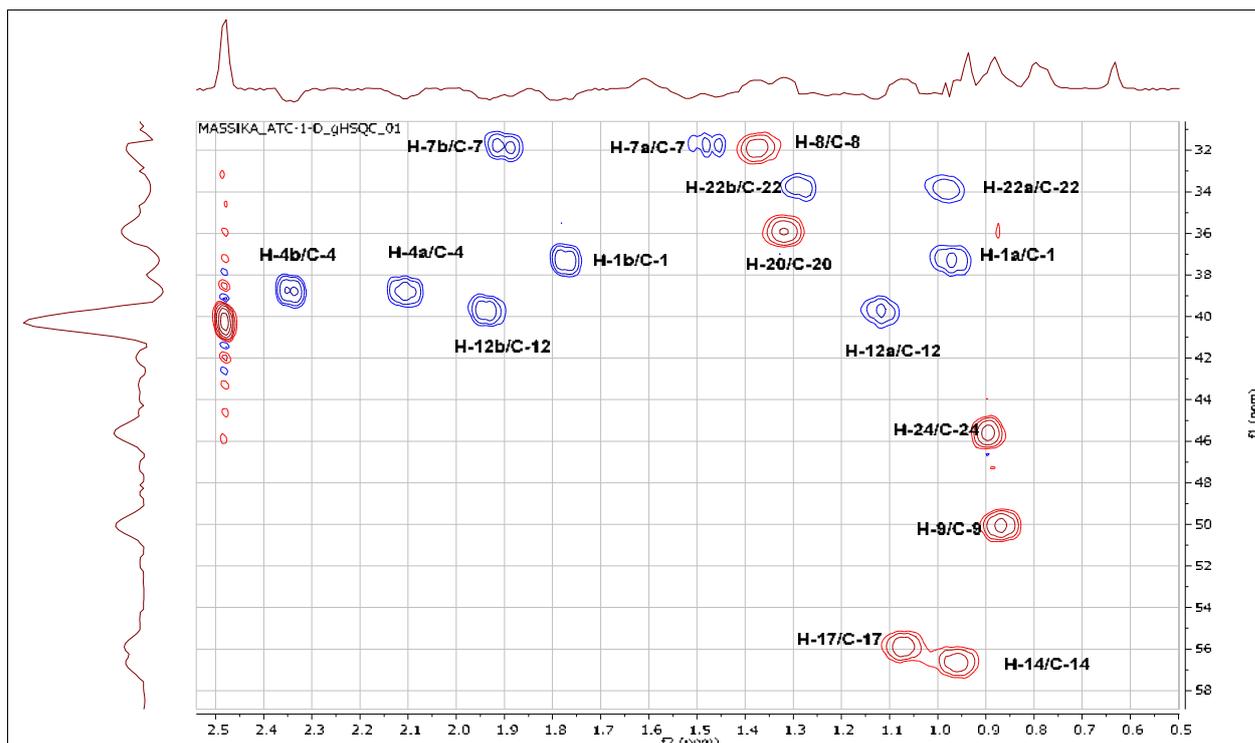


Figure III.6c: Spectre RMN 2D HSQC (600 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) étalé (¹H: 0,5-2,6 ppm; ¹³C: 31-59 ppm) du composé A1

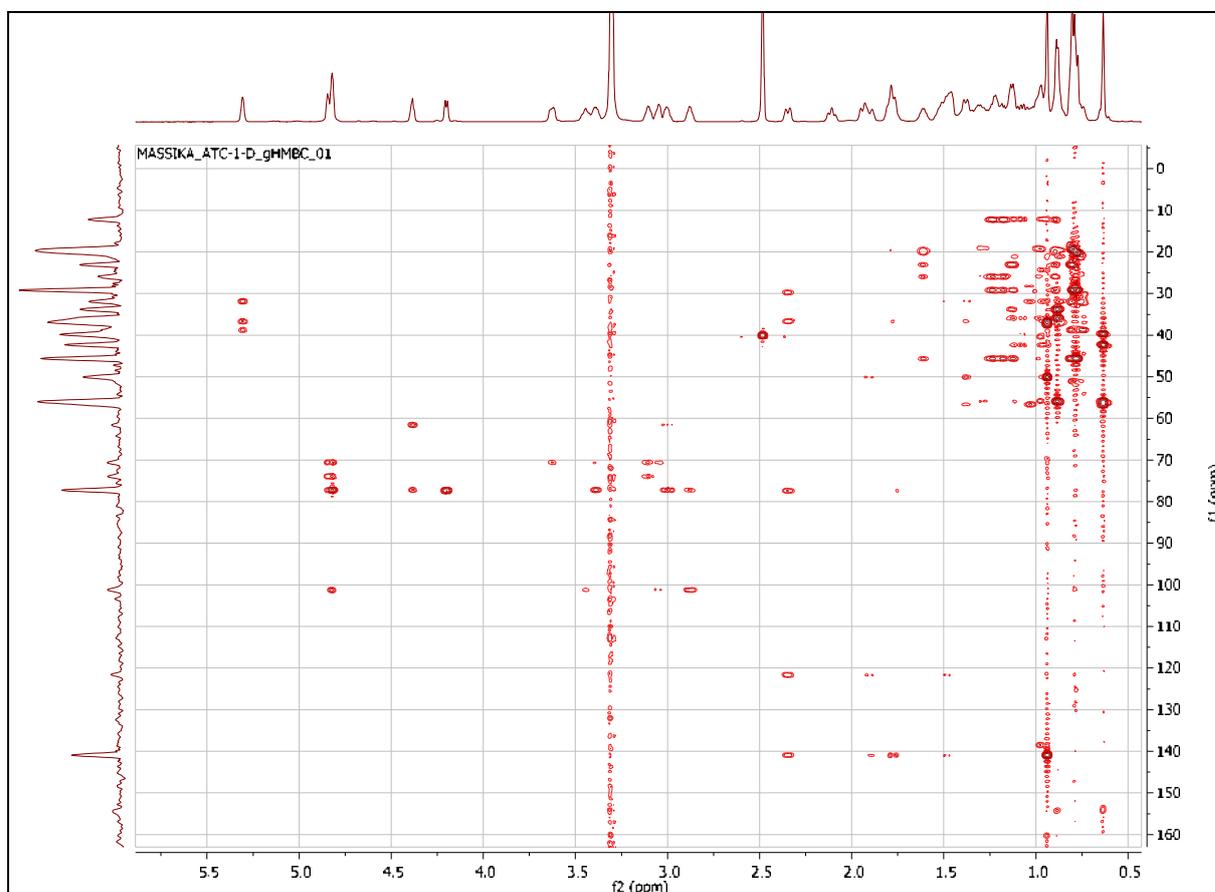


Figure III.7: Spectre RMN 2D HMBC (600 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) du composé A1

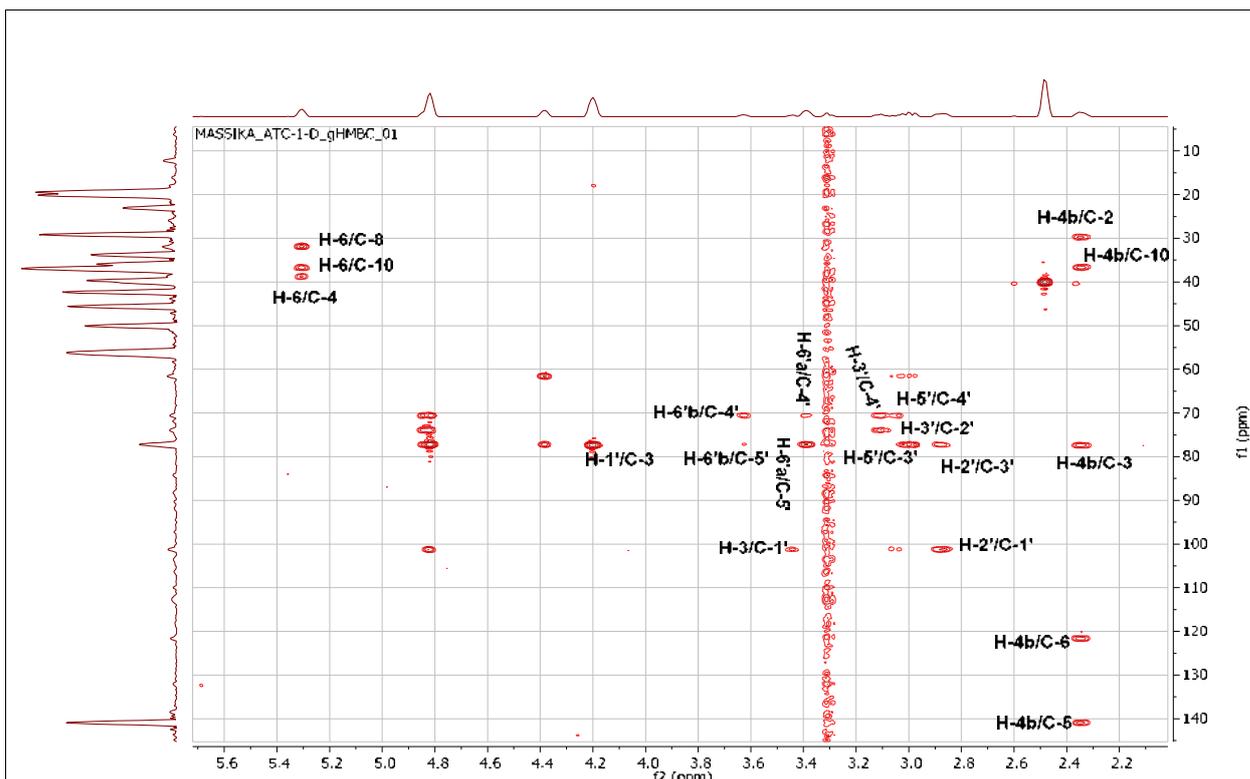


Figure III.7a: Spectre RMN 2D HMBC (600 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) étalé (¹H: 2,0-5,7 ppm; ¹³C: 5-145 ppm) du composé A1

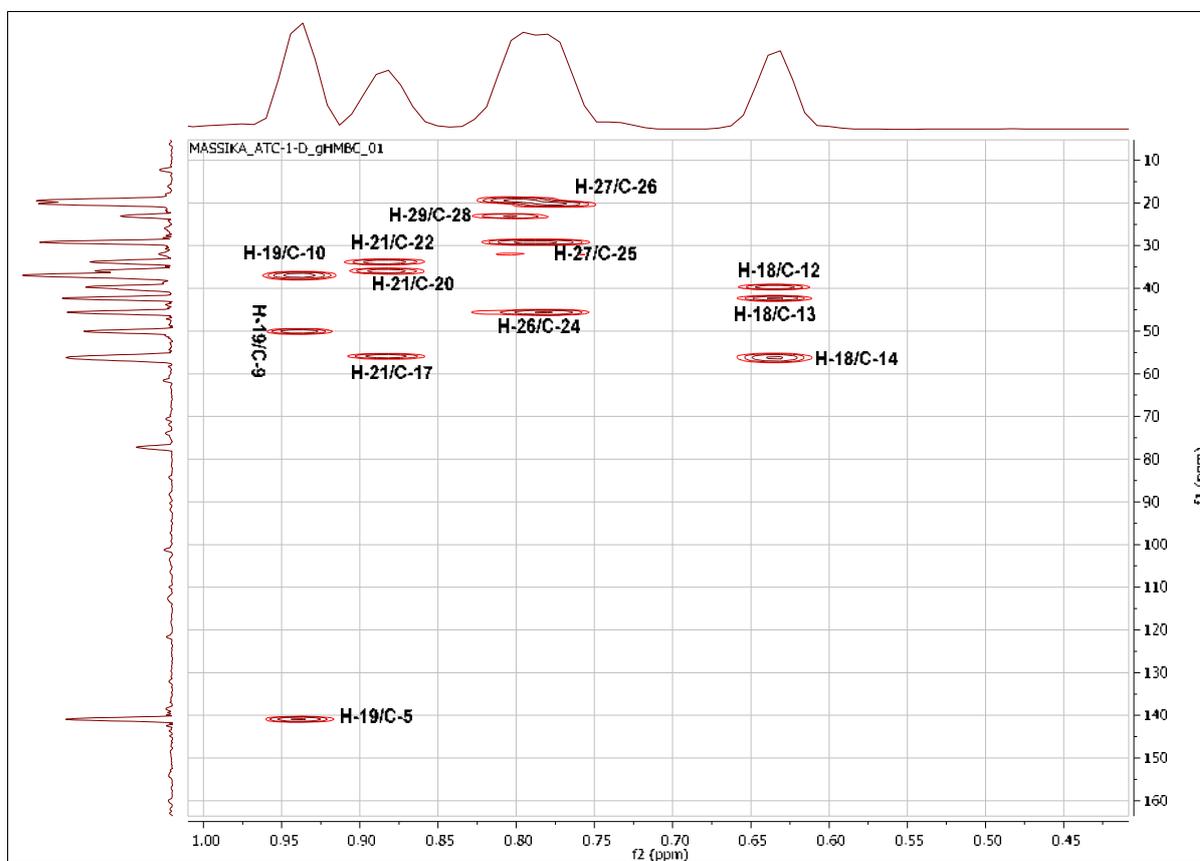


Figure III.7b: Spectre RMN 2D HMBC (600 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) étalé (¹H: 0,35-1,00 ppm ; ¹³C: 5-160 ppm) du composé A1

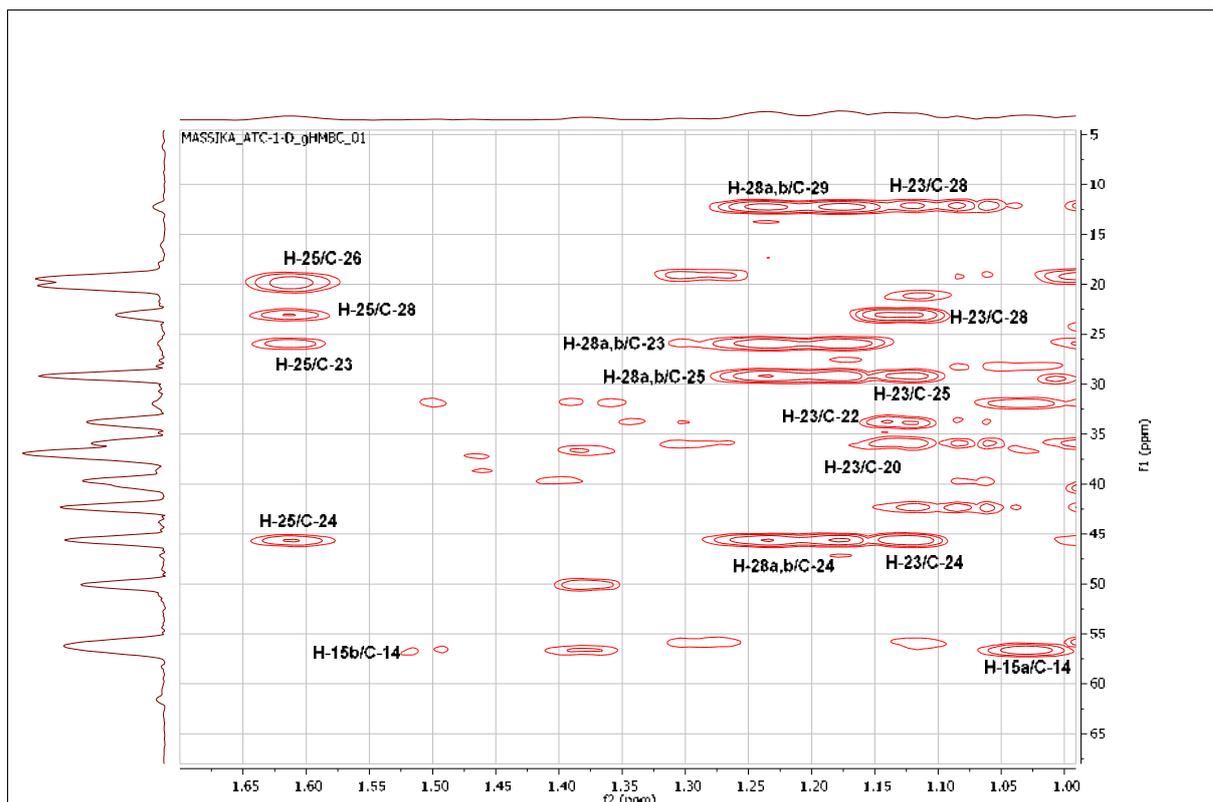


Figure III.7c: Spectre RMN 2D HMBC (600 MHz, DMSO-d6, δ ppm) étalé (^1H : 1,00-1,70 ppm; ^{13}C : 5-68 ppm) du composé A1

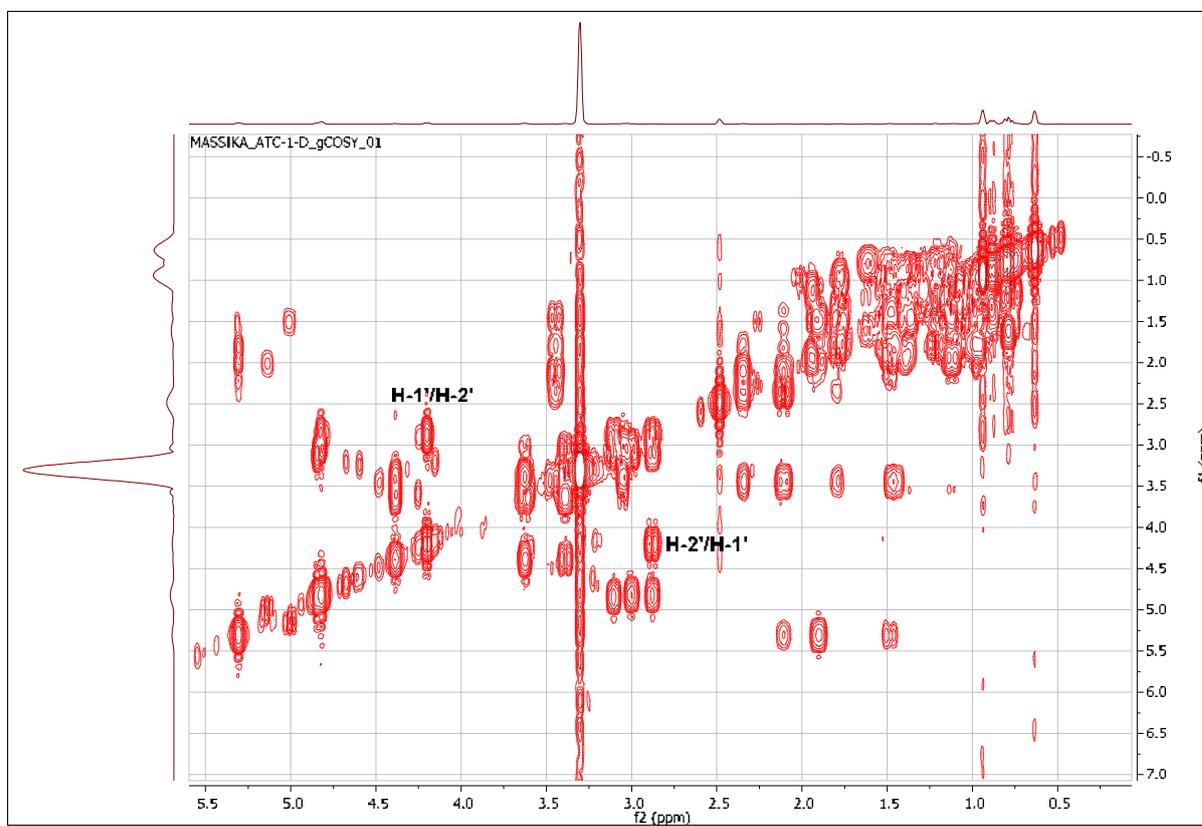


Figure III.8: Spectre RMN 2D COSY (600 MHz, DMSO-d6, δ ppm) du composé A1

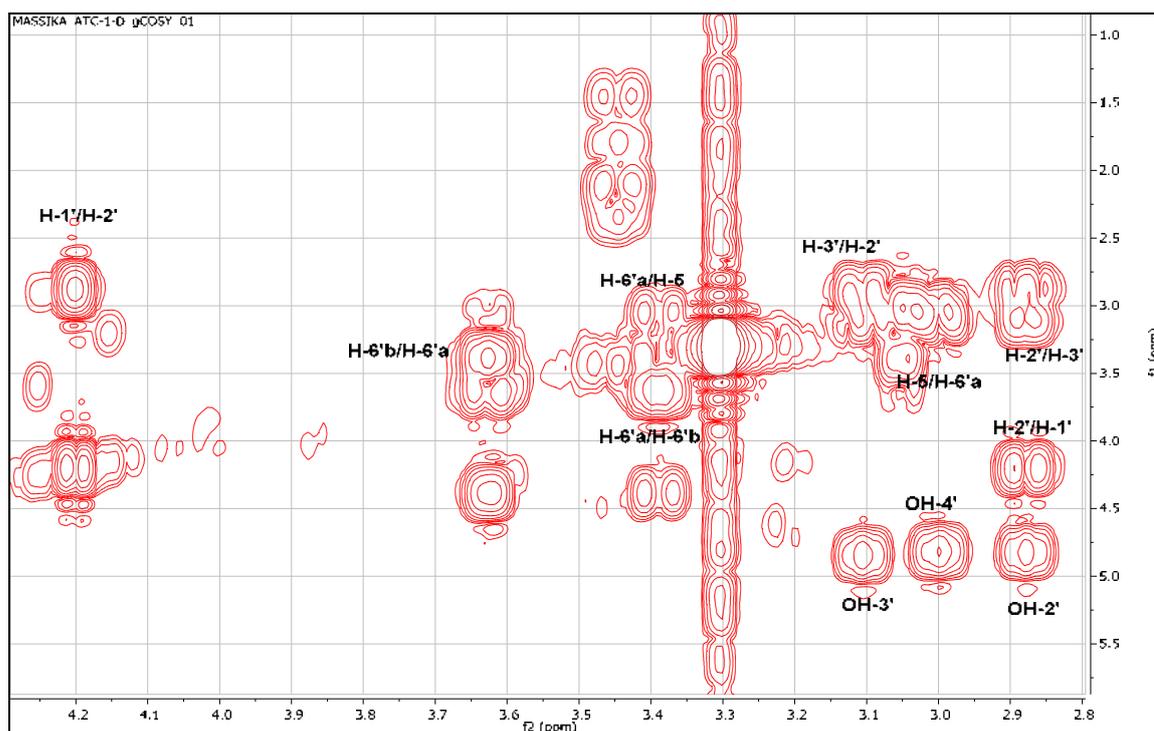


Figure III.8a: Spectre RMN 2D COSY (600 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) étalé du composé A1

Le tableau III.3 suivant présente les données de spectre RMN ¹³C et RMN ¹H du produit A1 dans DMSO-d₆.

Tableau III.3: Données du spectre RMN ¹³C et RMN ¹H du produit A1 dans DMSO-d₆

Position	DEPT	δ _c (ppm)	δ _H (ppm, multiplicité, <i>J</i> en Hz)
1	CH ₂	37,29	0,97-1,77
2	CH ₂	29,72	1,46 -1,81
3	CH	77,37	3,44 (1H ; <i>m</i>)
4	CH ₂	38,77	2,11 - 2,34
5	C	140,90	/
6	CH	121,64	5,31(1H ; <i>S</i>)
7	CH ₂	31,83	1,49 -1,91
8	CH	31,88	1,37
9	CH	50,06	0,87
10	C	36,67	/
11	CH ₂	21,05	1,38 -1,47
12	CH ₂	39,68	1,12 -1,93
13	C	42,31	/
14	CH	56,63	0,97
15	CH ₂	24,31	1,02 -1,52
16	CH ₂	28,24	1,21 -1,79
17	CH	55,89	1,07
18	CH ₃	12,13	0,63 (3H ; <i>S</i>)
19	CH ₃	19,55	0,94 (3H ; <i>S</i>)
20	CH	35,93	1,33
21	CH ₃	19,07	0,88 (3H ; <i>d</i> ; 6,77)
22	CH ₂	33,81	0,98 -1,30
23	CH ₂	25,92	1,14
24	CH	45,61	0,89
25	CH	29,17	1,61
26	CH ₃	20,16	0,77 (3H ; <i>m</i>)

Tableau III.3: Données du spectre RMN ^{13}C et RMN ^1H du produit **A1** dans DMSO- d_6 (suite)

27	CH_3	19,40	0,79 (3H ; <i>m</i>)
28	CH_2	23,07	1,17 -1,23
29	CH_3	12,24	0,80 (3H ; <i>m</i>)
Glucose	/	/	/
1'	CH	101,24	4,20 (1H ; <i>d</i> ; 7,90)
2'	CH	73,92	2,88 (1H ; <i>m</i>)
3'	CH	77,23	3,10 (1H ; <i>m</i>)
4'	CH	70,57	3,00 (1H ; <i>m</i>)
5'	CH	77,19	3,05 (1H ; <i>m</i>)
6'	CH_2	61,56	3,39 (1H ; <i>m</i>) -3,63 (1H ; <i>m</i>)
OH-2'	/	/	4,82
OH-3'	/	/	4,85
OH-4'	/	/	4,84
OH-6'	/	/	4,39

L'ensemble de ces données, et la comparaison avec les données de la littérature [3, 4], ont permis d'identifier sans ambiguïté le composé **A1** comme étant le **β -sitostérol-3-O- β -D-glucoside** plus communément appelé **daucostérol**. De nombreuses études biologiques ont été réalisées sur ce composé montrant qu'il possède également des propriétés anti-inflammatoire [5] et anti-mutagénique [6]. La détection du composé **A1** dans l'extrait ACOEt par HPLC-TOF/MS en mode négatif est présentée dans le chromatogramme ci-après (figure III.9).

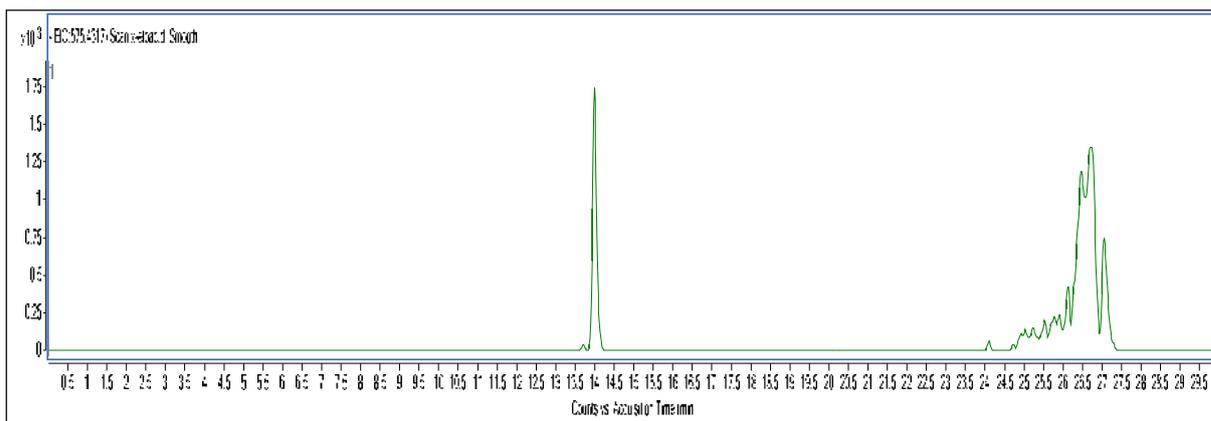


Figure III.9: Chromatogramme d'identification du produit **A1** dans l'extrait ACOEt par HPLC-TOF/MS en mode négatif

III.2.1.2. Elucidation structurale du composé **A2** (ATC2b-1a)

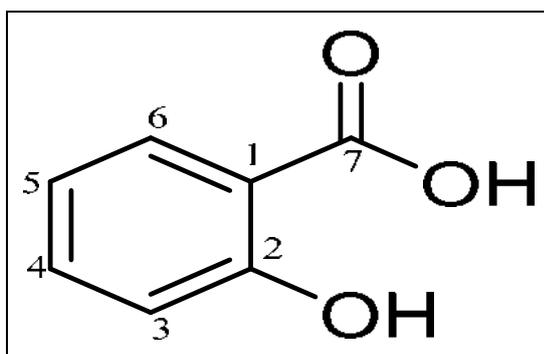


Figure III.10: Structure du composé **A2**

Le composé A2 a été isolé sous la forme d'une poudre blanche, soluble dans l'acétone et donne une fluorescence bleue sous lampe de Wood ($\lambda = 365 \text{ nm}$).

L'analyse simultanée des spectres RMN ^{13}C (figure III.11) et DEPT (figure III.12) de ce composé indique la présence de 7 atomes de carbone dont:

- Un carbone quaternaire à δ_{C} 171,71 ppm, dont la valeur du déplacement chimique indique qu'il s'agit d'un carbonyle d'une fonction acide.
- Un carbone aromatique quaternaire à δ_{C} 161,97 ppm. D'après la valeur de son déplacement chimique, il est clair qu'il est oxygéné.
- Un autre carbone aromatique quaternaire à δ_{C} 112,44 ppm.
- Quatre méthines aromatiques résonant à δ_{C} 117,06 ; 119,00 ; 130,37 et 135,73 ppm.

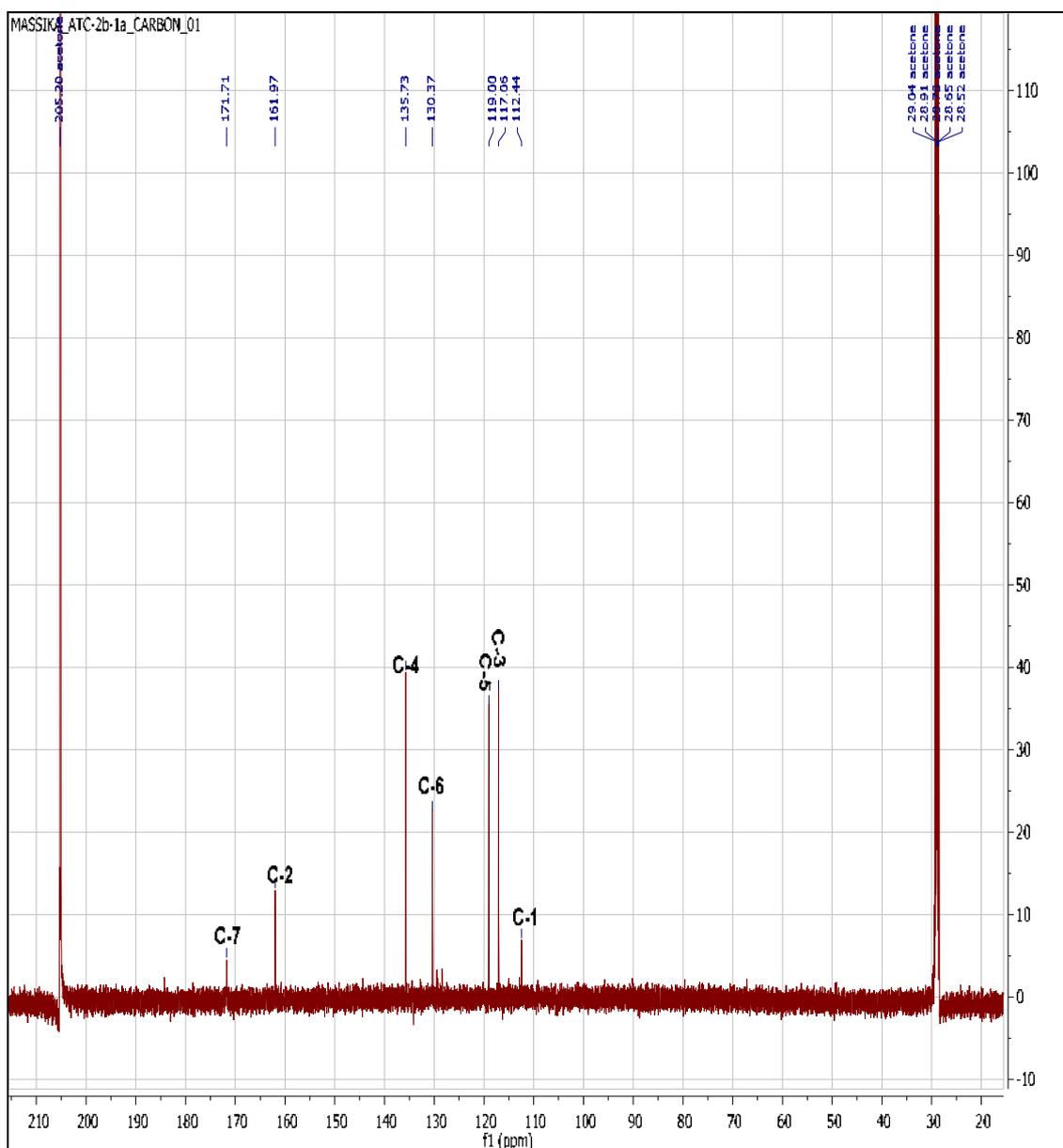


Figure III.11: Spectre RMN ^{13}C (150 MHz, acétone- d_6 , δ ppm) du composé A2

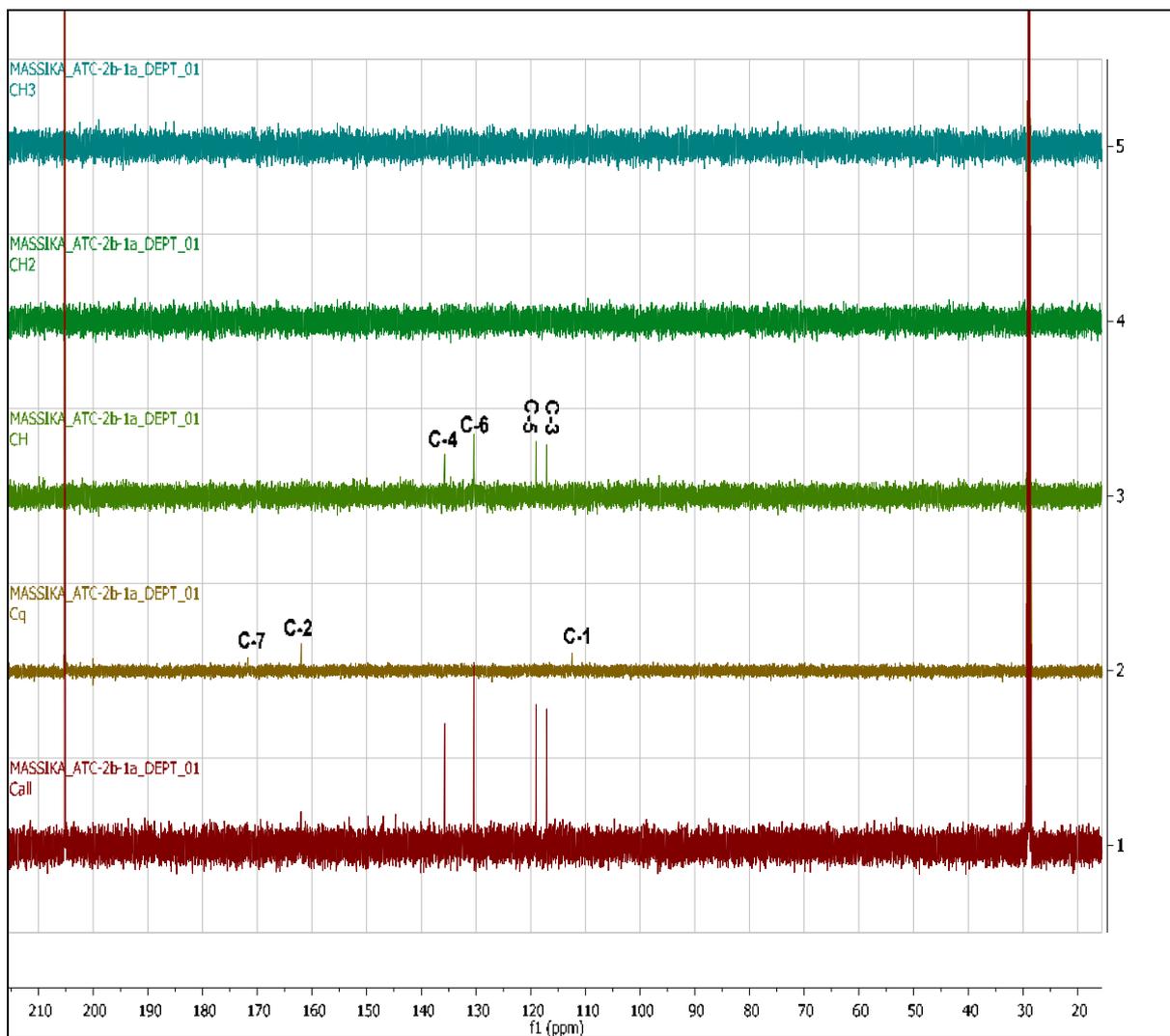


Figure III.12: Spectre DEPT(150 MHz, acétone-d6, δ ppm) du composé A2

Le spectre RMN ^1H (figures III.13 et III.13a) de ce composé indique quatre types de protons différents dans la région aromatique attestant de la présence d'un noyau aromatique bisubstitué en position 1 et 2. De ce fait:

- Un doublet large d'intégration 1H à δ_{H} 7,90 ppm ($J = 7,90$ Hz) relatif au proton H-6, corrèle sur le spectre HSQC (figure III.14 et III.14a) avec le carbone à δ_{C} 130,37 ppm.
- Un large triplet d'intégration 1H à δ_{H} 7,52 ppm ($J = 8,01$ Hz) attribuable à H-4, corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_{C} 135,73 ppm.
- Un signal à δ_{H} 6,95-6,94 ppm, d'intégration 2H attribuable à H-3 et H-5. Ce signal correspond en fait à deux signaux superposés l'un d'eux sous forme d'un doublet large caractérisant H-3 et l'autre sous forme d'un large triplet caractérisant H-5. Le spectre RMN de corrélations hétéronucléaires à courtes distances HSQC indique que les protons localisés à δ_{H} 6,95 ppm et δ_{H} 6,94 ppm corrèlent aux signaux situés à δ_{C} 117,06 ppm et δ_{C} 119,00 ppm respectivement.

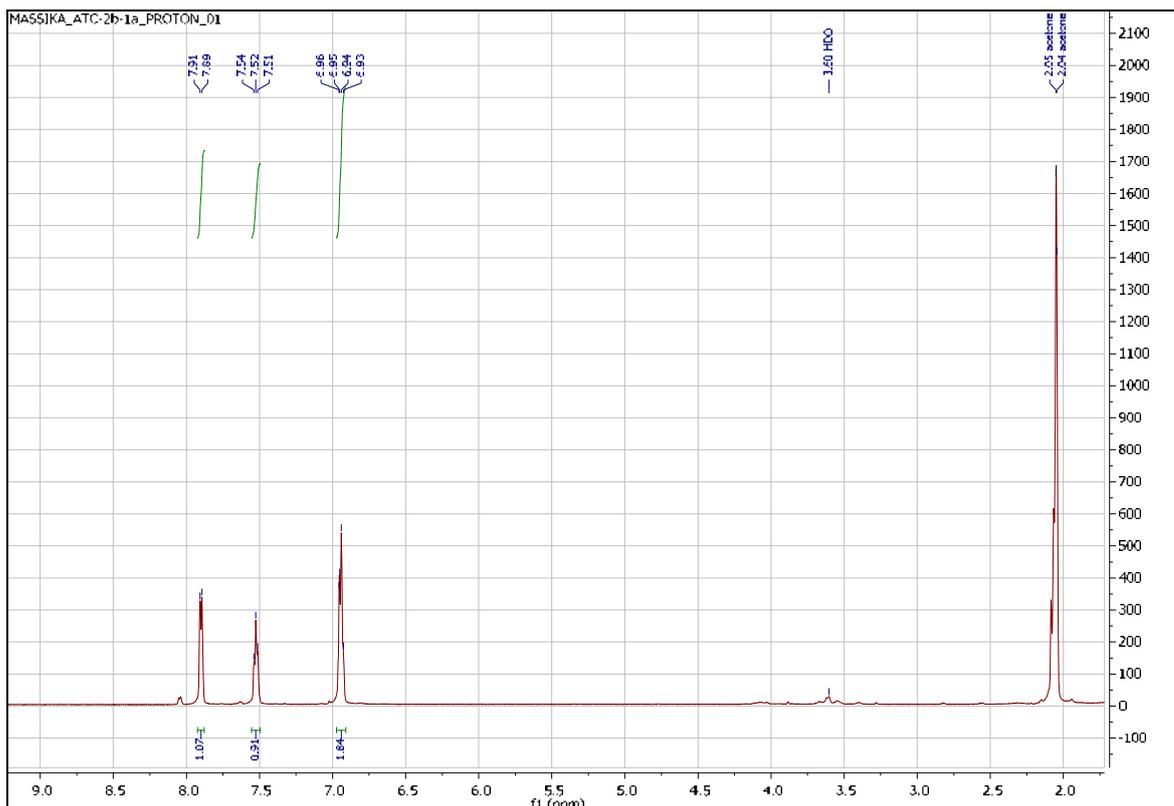


Figure III.13: Spectre RMN ^1H (600 MHz, acétone-d₆, δ ppm) du composé A2

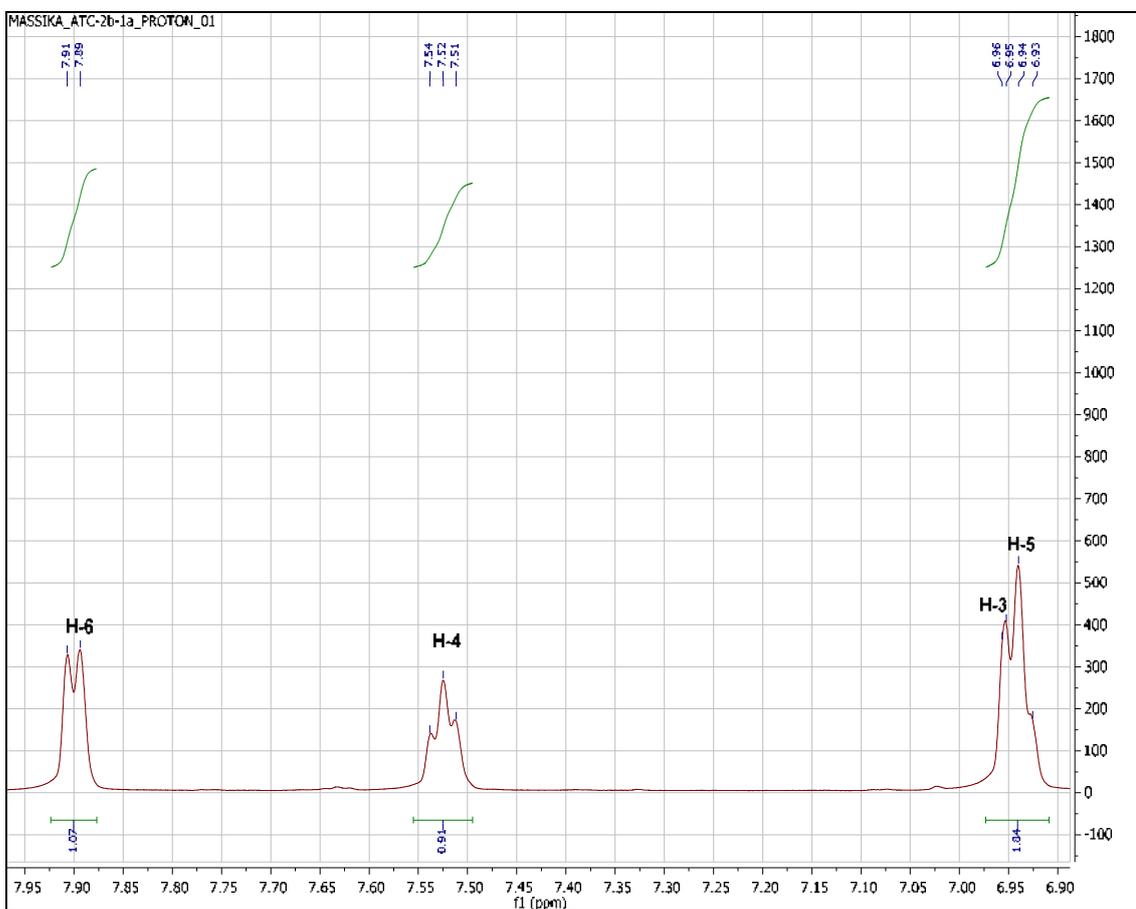


Figure III.13a: Spectre RMN ^1H (600 MHz, acétone-d₆, δ ppm) étalé de 6,90 à 7,95 ppm du composé A2

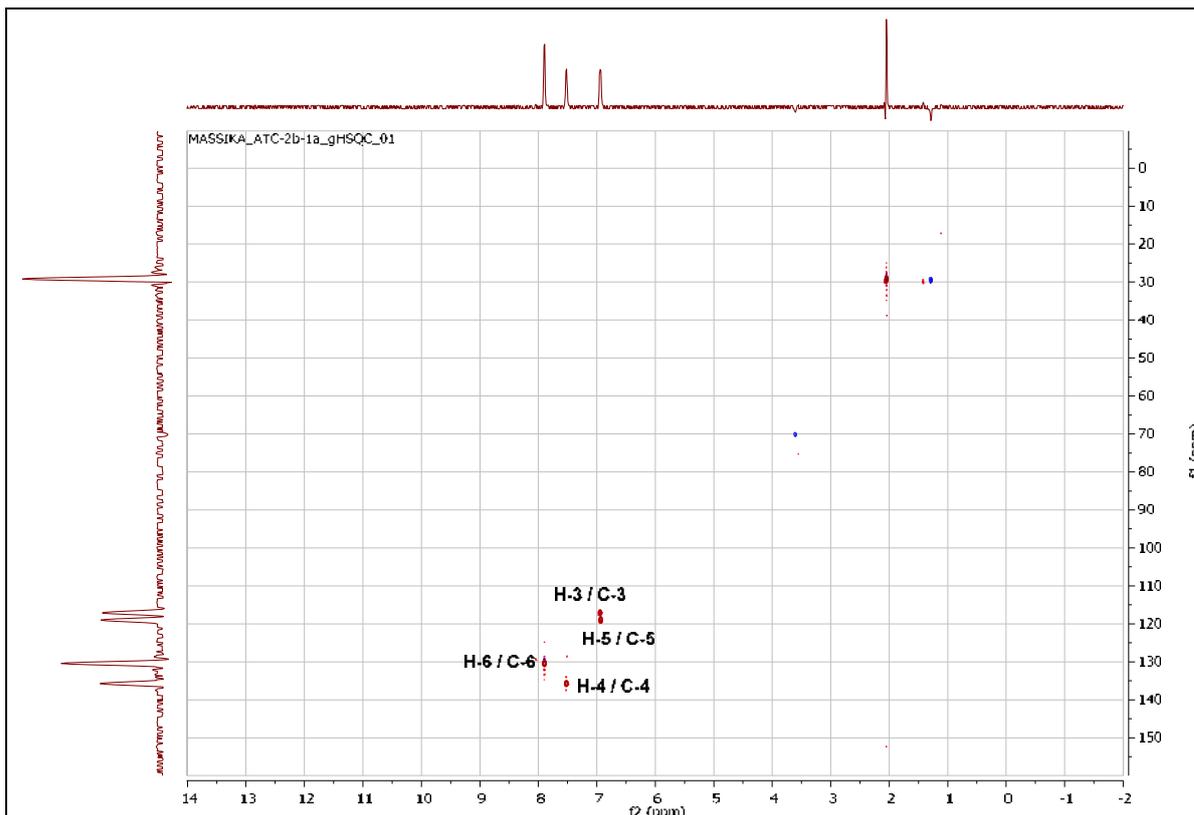


Figure III.14: Spectre HSQC (600 MHz, acétone-d6, δ ppm) du composé A2

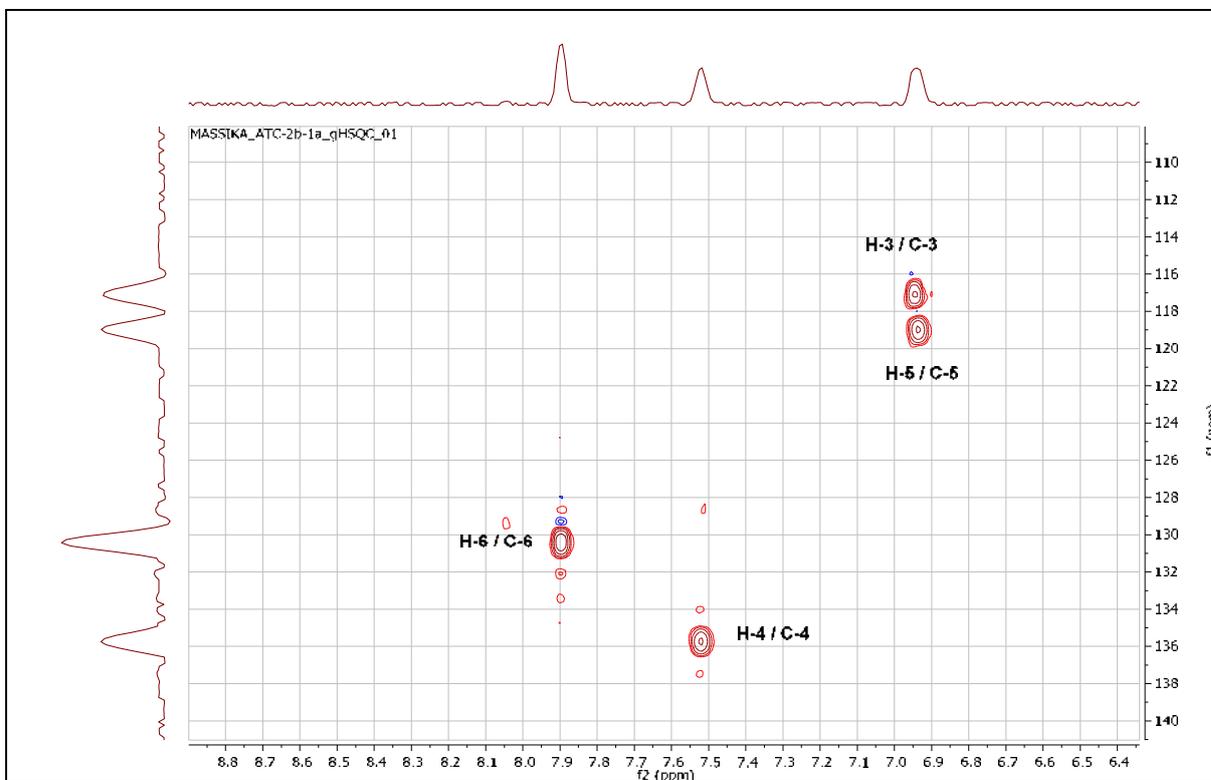


Figure III.14a: Spectre HSQC (600 MHz, acétone-d6, δ ppm) étalé (^1H : 6,3-8,8 ppm; ^{13}C : 108-141 ppm) du composé A2

L'attribution des déplacements chimiques des protons aromatiques est corroborée par les expériences homonucléaire COSY (figure III-15) et hétéronucléaire HMBC (figure III-16 et III-16a).

En COSY, le proton H-6 à δ_H 7,90 ppm est corrélé avec le proton H-5 situé à δ_H 6,94 ppm et le proton H-4 résonnant à δ_H 7,52 ppm est corrélé avec le proton H-3 situé à δ_H 6,95 ppm.

Le spectre HMBC montre les corrélations 1H - ^{13}C à longue distance entre le proton H-5 et les carbones apparaissent à δ_c 117,06 ppm (C-3) et 112,44 ppm attribuable à C-1.

De plus, ce spectre a montré une corrélation entre le proton H-4 et les carbones résonnants à δ_c 130,37 ppm (C-6) et 161,97 ppm attribuable à C-2.

Cette expérience a montré aussi des crêtes des corrélations entre le proton H-6 et les carbones situés à δ_c 135,73 ppm (C-4) ; 161,97 ppm (C-2) et 171,71 ppm qui ne peut être attribuer qu'au carbone C-7. De plus, le proton H-3 est corrélé avec le carbone localisé à δ_c 119,00 ppm (C-5).

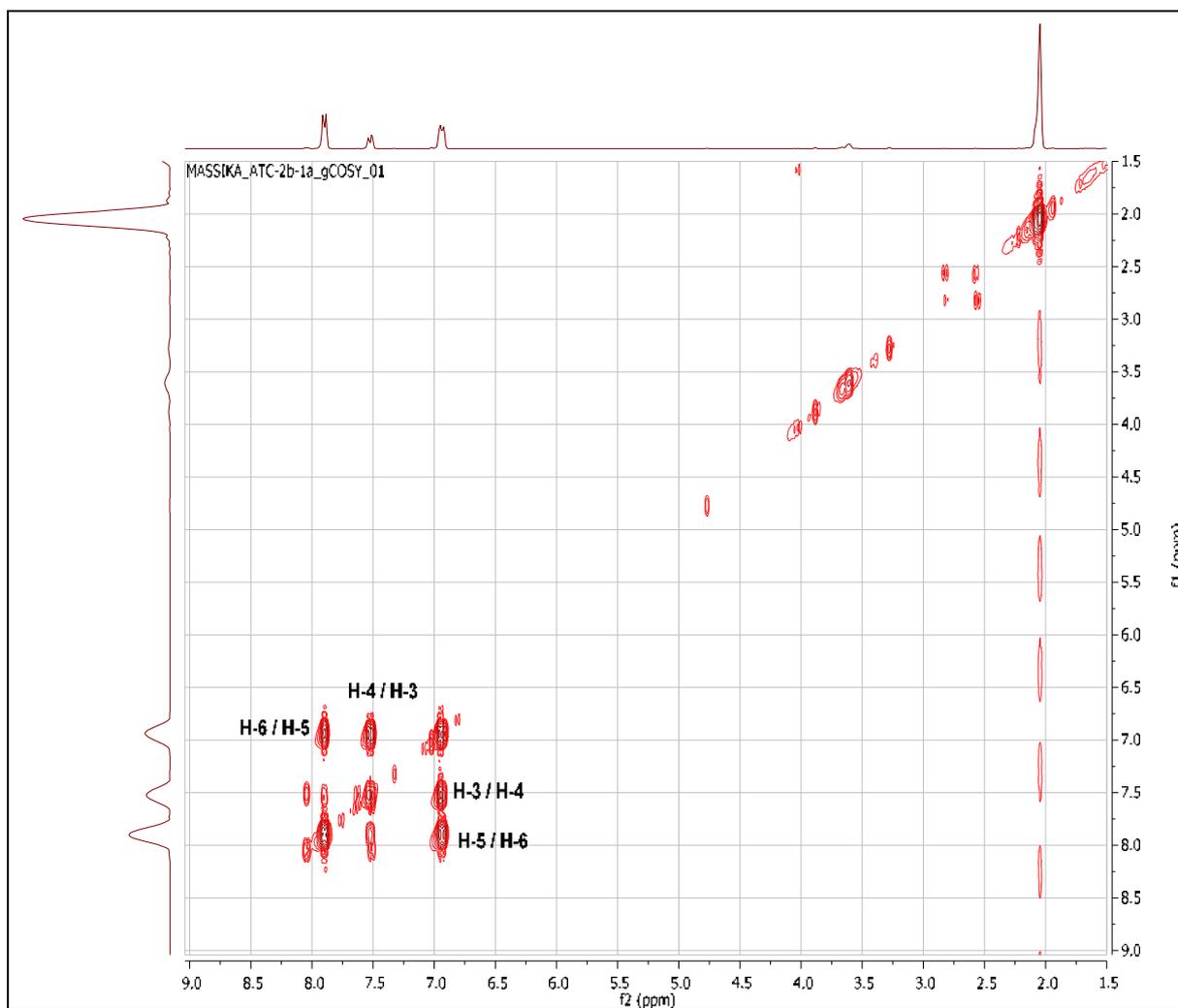


Figure III.15: Spectre RMN 2D COSY (600 MHz, acétone-d₆, δ ppm) du composé A2

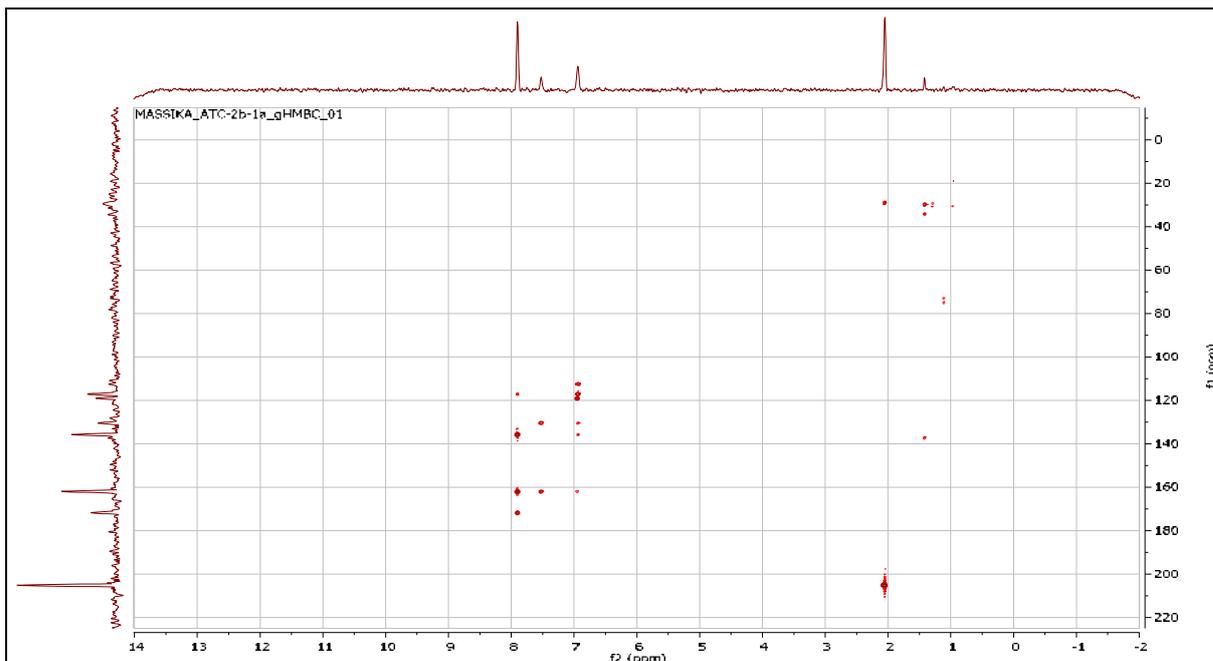


Figure III.16: Spectre RMN 2D HMBC (600 MHz, acétone-d6, δ ppm) du composé A2

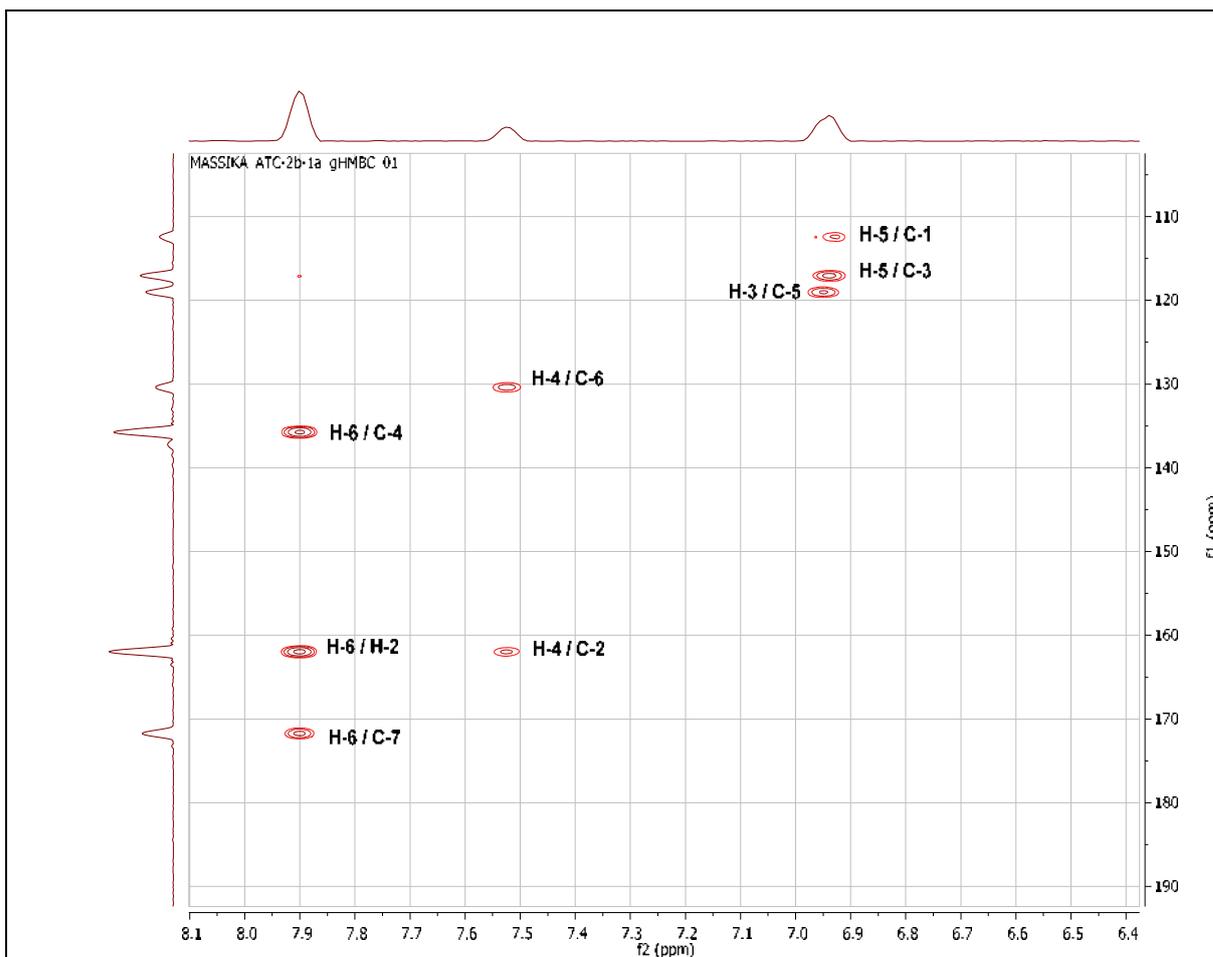


Figure III.16a: Spectre RMN 2D HMBC (600 MHz, acétone-d6, δ ppm) étalé (^1H : 6,4-8,1 ppm; ^{13}C : 109-190 ppm) du composé A2

Les valeurs des déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C du produit A2 sont regroupées dans le tableau III.4.

Tableau III.4: Données du spectre RMN ^{13}C et RMN ^1H du produit A2 dans acétone- d_6

Position	δ_c (ppm)	δ_H (ppm, multiplicité, J en Hz)
1	112,44	/
2	161,97	/
3	117,06	6,95 (1H; <i>m</i>)
4	135,73	7,52 (1H; <i>tl</i> ; 8,01)
5	119,00	6,94 (1H; <i>m</i>)
6	130,37	7,90 (1H; <i>dl</i> ; 7,90)
7	171,71	/

Ces données sont identiques à celles indiquées dans la littérature pour l'**acide 2-hydroxybenzoïque**, généralement appelé **acide salicylique** [7]. Ses propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires ont également été démontrées [8]. L'identification de ce produit dans phase ACOEt par HPLC-TOF/MS en mode négatif est présentée dans le chromatogramme ci-après (figure III.17).

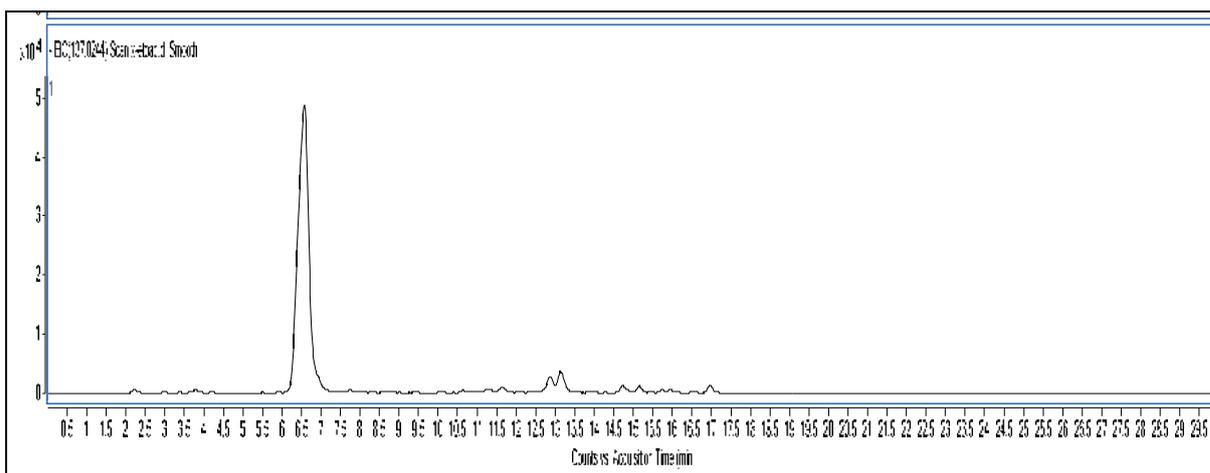


Figure III.17: Chromatogramme d'identification du produit A2 dans l'extrait ACOEt par HPLC-TOF/MS en mode négatif

III.2.1.3. Elucidation structurale du composé A3 (ATC-3c-3a)

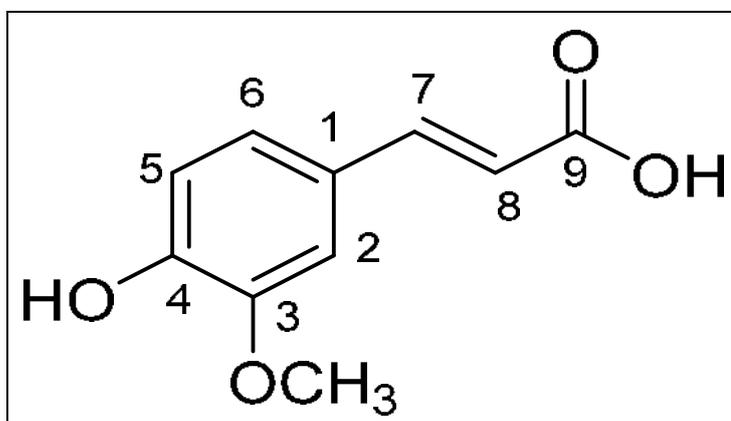


Figure III.18: Structure du composé A3

Le composé A3 se présente sous forme de cristaux jaune pâle, soluble dans le méthanol.

L'analyse du spectre de masse ESI-MS de ce composé (figure III.19) en mode négatif montre un pic d'ion pseudo-moléculaire à $m/z = 193,11$ $[M-H]^-$, ce qui indique une masse moléculaire de 194 uma conformément à la formule brute $C_{10}H_{10}O_4$ avec un degré d'insaturation de 6.

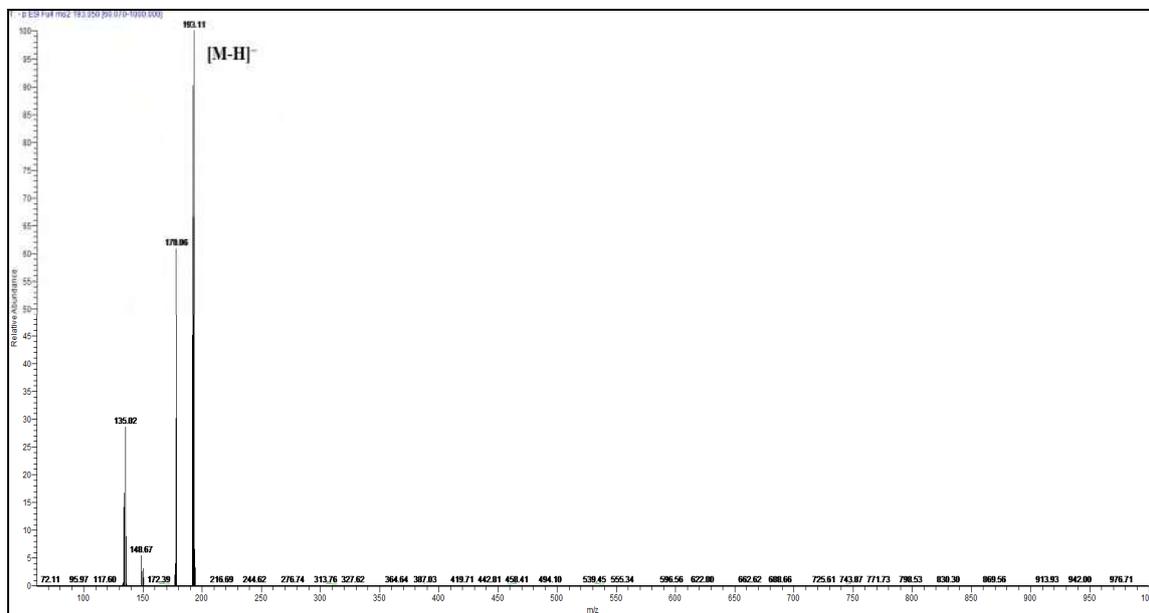


Figure III.19: Spectre de masse ESI-MS en mode négatif du composé A3

L'analyse des spectres RMN¹H (figure III.20, III.20a et III.20b) et COSY (figure III.21) permet de faire les attributions suivantes:

- Un doublet d'intégration 1H à δ_H 7,31 ppm ($J = 15,61$ Hz) attribuables à un CH éthylénique voisin d'un autre CH éthylénique en position trans dont le signal apparaît sous forme d'un doublet à δ_H 6,33 ppm ($J = 15,81$ Hz). Ces deux protons sont attribués aux H-7 et H-8 respectivement. Cette information est confirmée par l'expérience COSY, où ils présentent entre eux des crêtes de corrélations.

Trois signaux caractéristiques d'un noyau aromatique trisubstitué en position 1, 3 et 4:

- Un singulet large d'intégration 1H à δ_H 7,11 ppm attribuable à H-2.
- Un doublet large d'intégration 1H à δ_H 6,97 ppm ($J = 8,2$ Hz) attribuable à H-6.
- Un doublet d'intégration 1H à δ_H 6,76 ppm ($J = 8,0$ Hz) attribuable à H-5.

Ces résultats sont en bon accord avec la mesure de l'expérience COSY, où elle montre des corrélations entre les protons H-6 à δ_H 6,97 ppm et H-5 à δ_H 6,76 ppm.

Parmi les trois substituants, un méthoxy dont le signal apparaît à δ_H 3,88 ppm sous forme d'un singulet d'intégration 3H.

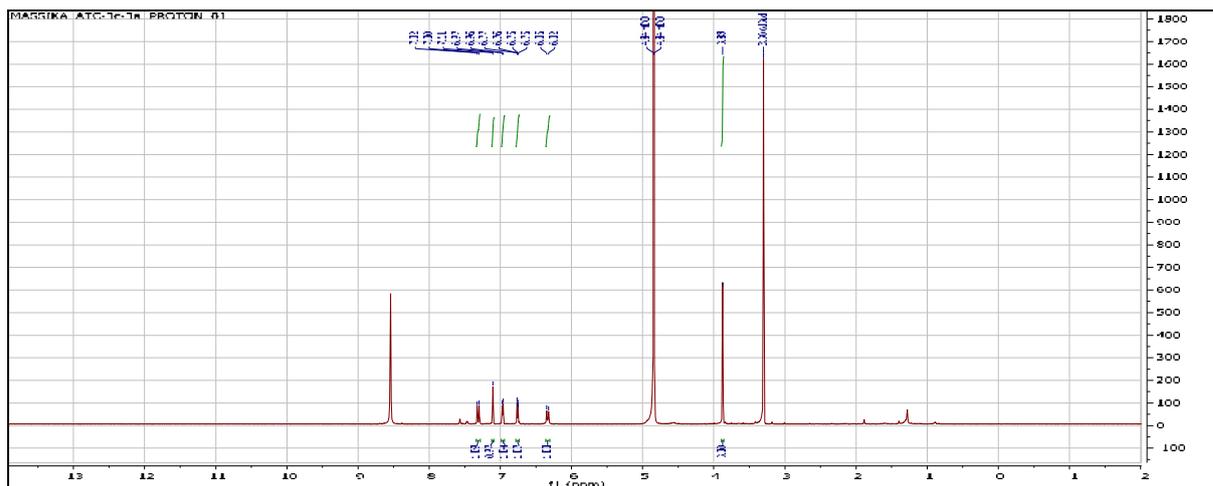


Figure III.20: Spectre RMN ^1H (600 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé A3

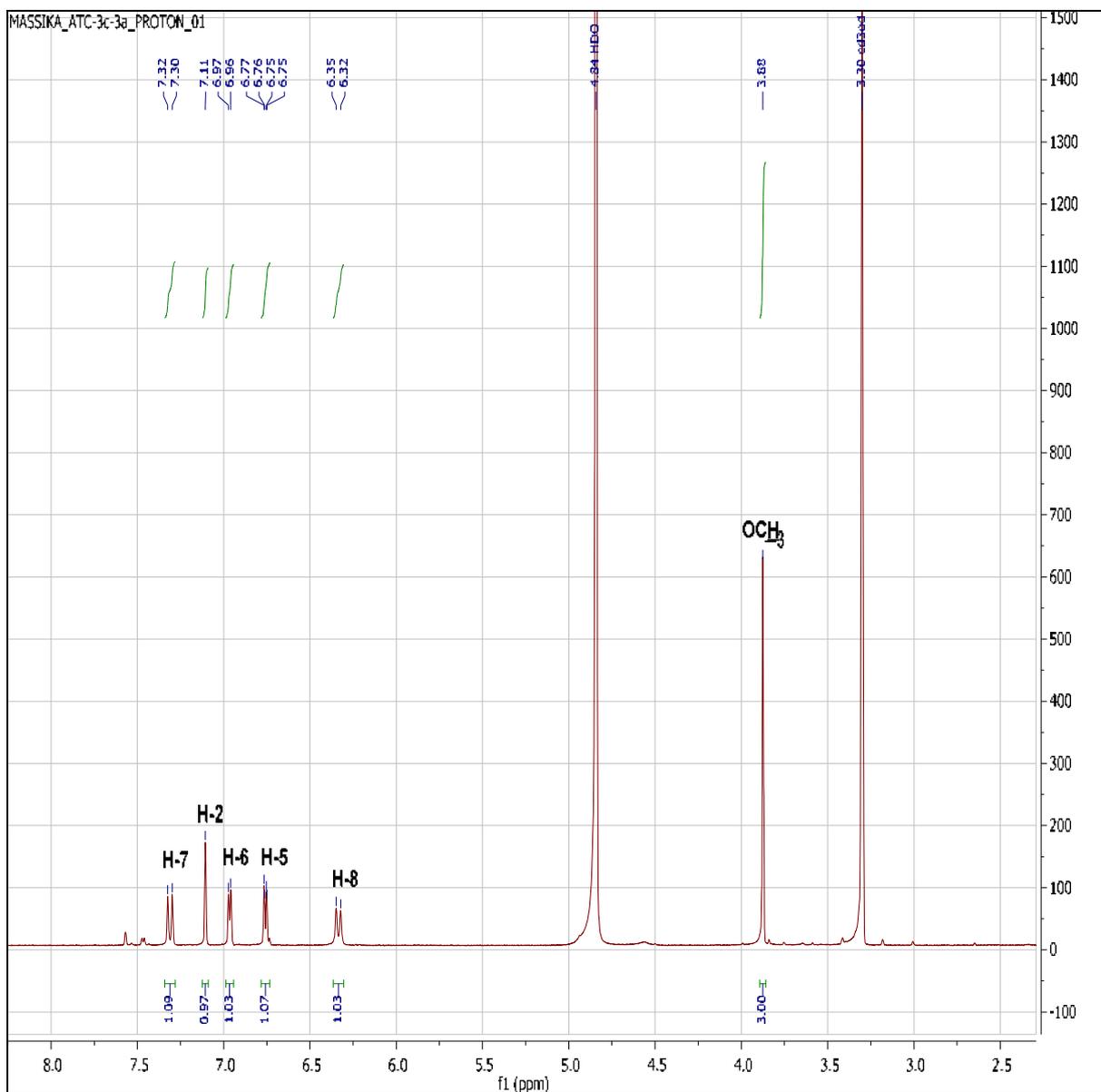


Figure III.20a: Spectre RMN ^1H (600 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) étalé de 2,5 à 8,0 ppm du composé A3

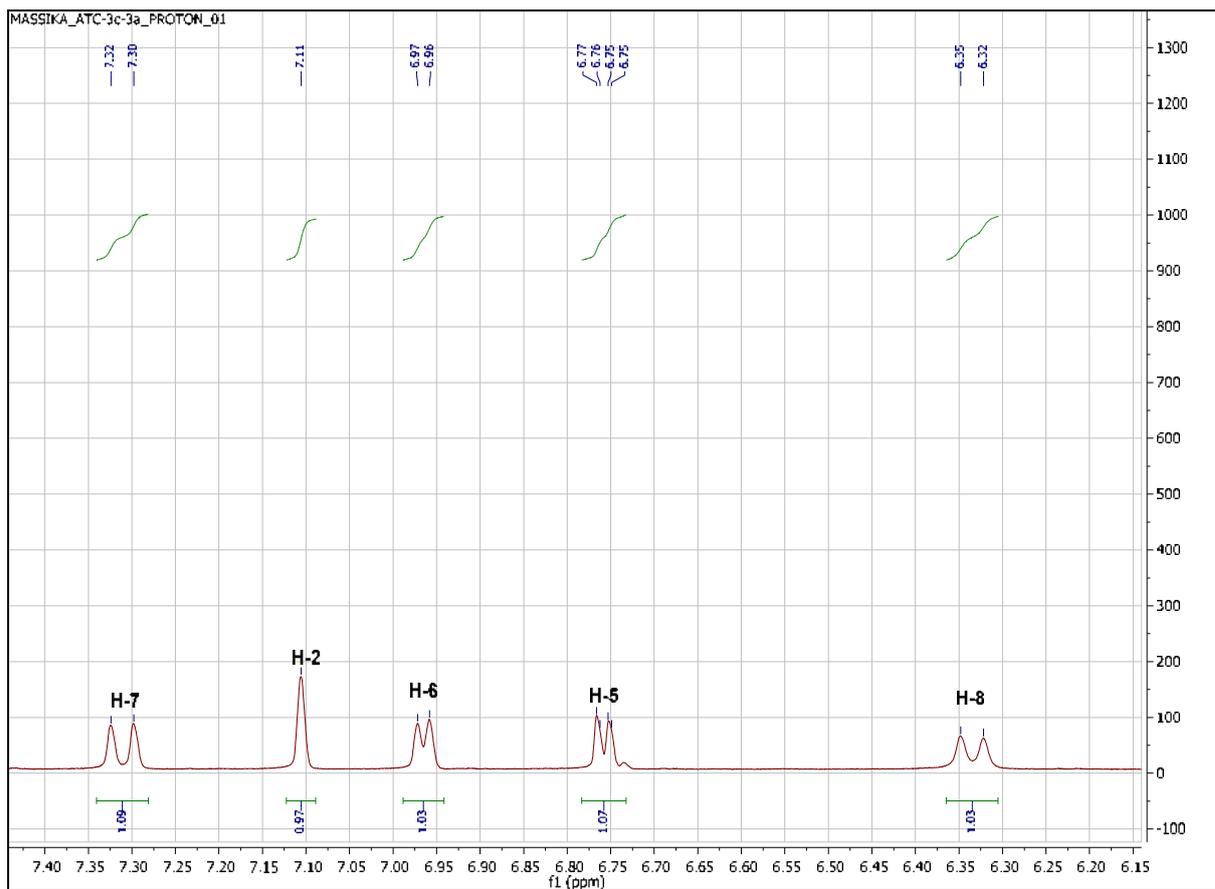


Figure III.20b: Spectre RMN ^1H (600 MHz, MeOH-d₄, δ ppm) étalé de 6,4 à 8,8 ppm du composé A3

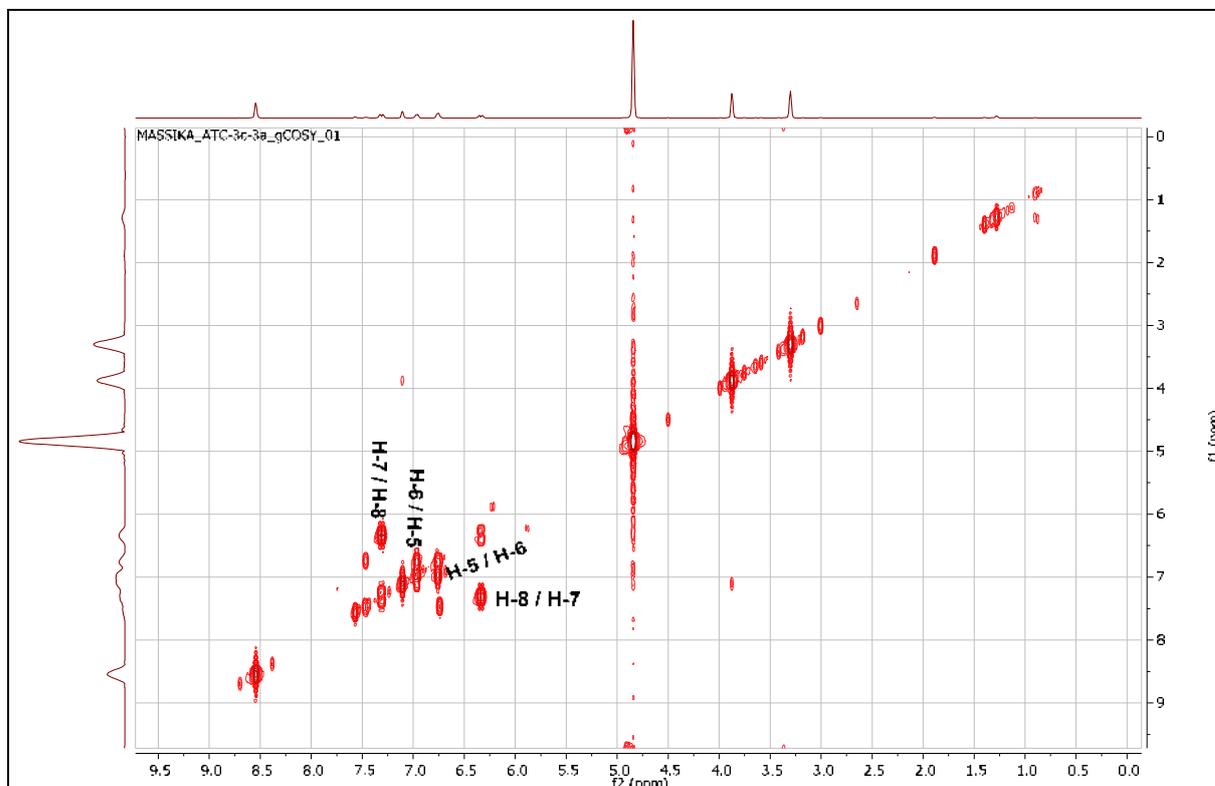


Figure III.21: Spectre RMN 2D COSY (600 MHz, MeOH-d₄, δ ppm) du composé A3

La mesure du spectre de corrélations hétéronucléaires HSQC (figure III.22) a conduit à l'établissement des connections géminales ^1H - ^{13}C -RMN du composé A3. Il a pu être démontré que les protons localisés à δ_{H} 7,31 ppm, δ_{H} 7,11 ppm, δ_{H} 6,97 ppm, δ_{H} 6,76 ppm et δ_{H} 6,33 ppm étaient attachés aux carbones respectivement situés à δ_{C} 139,88 ppm, δ_{C} 109,81 ppm, δ_{C} 121,26 ppm, δ_{C} 114,84 ppm et δ_{C} 122,06 ppm et que les protons du groupement méthoxyle étaient attachés au carbone situé à δ_{C} 54,93 ppm.

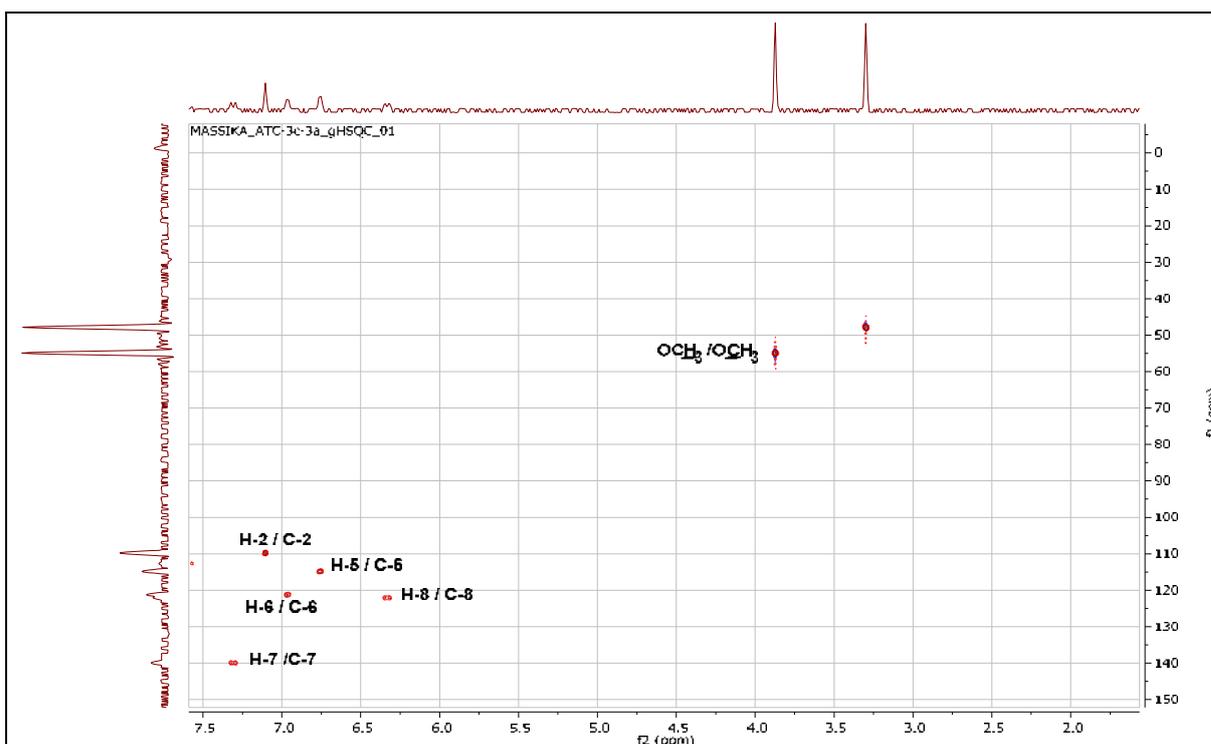


Figure III.22: Spectre RMN 2D HSQC (600 MHz, MeOH-d₄, δ ppm) du composé A3

La mesure du spectre de corrélations hétéronucléaires observées à longue distance HMBC (figure III.23) révèle bien que le proton H-8 et le proton H-5 corrélient en 3J avec un carbone quaternaire résonant à δ_{C} 127,68 ppm, ne pouvant être que le carbone C-1. le proton H-5 corréle aussi en 3J avec un carbone résonant à δ_{C} 147,75 ppm attribuable à C-3.

Le spectre HMBC a montré la corrélation entre les protons résonant à δ_{H} 3,88 ppm et le carbone C-3 situé à δ_{C} 147,75 ppm suggérant l'attachement du groupement méthoxyle en position 3.

De plus, l'expérience HMBC montre des corrélations en 2J et 3J dont:

- Le proton H-2 corréle avec les carbones C-6 (δ_{C} 121,26 ppm), C-7 (δ_{C} 139,88 ppm) et C-3 (δ_{C} 147,75 ppm).
- Le proton H-7 corréle avec les carbones C-2 (δ_{C} 109,81 ppm) et C-6 (δ_{C} 121,26 ppm).

- Le proton H-6 corrèle avec le carbone C-2 à δ_C 109,81 ppm et le carbone résonant à δ_C 147,54 ppm attribuable à C-4.

L'atome de carbone restant à δ_C 174,61ppm est attribuable à C-9 grâce à sa corrélation avec le proton H-7.

L'ensemble de ces corrélations corrobore parfaitement les attributions établies.

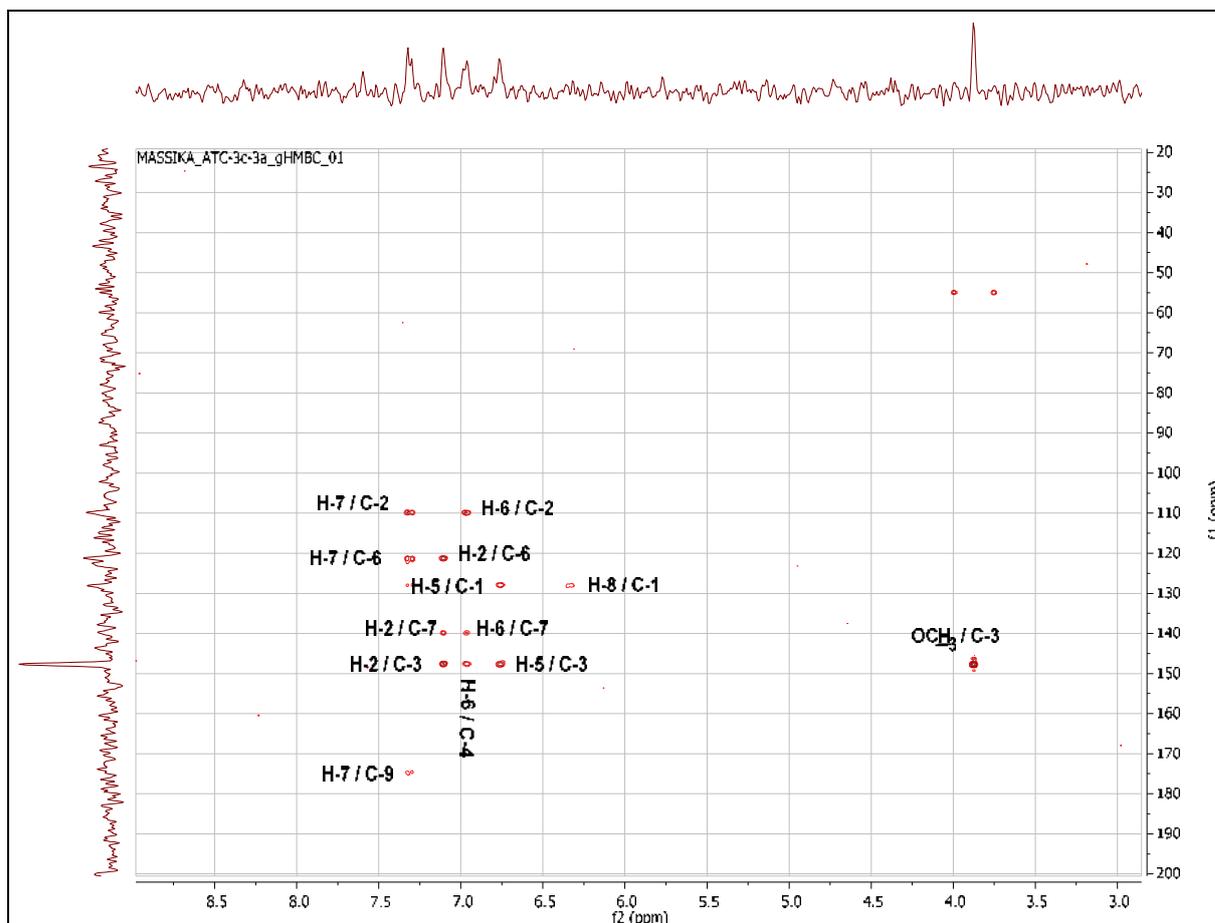


Figure III.23: Spectre RMN 2D HMBC (600 MHz, MeOH-d4, δ ppm) du composé A3

Le tableau III.5 rassemble les données spectroscopiques RMN ^1H et ^{13}C du composé A3.

Tableau III.5: Données du spectre RMN ^{13}C et RMN ^1H du produit A3 dans MeOH-d4

Position	δ_C (ppm)	δ_H (ppm, multiplicité, J en Hz)
1	127,68	/
2	109,81	7,11 (1H; <i>SI</i>)
3	147,75	/
4	147,54	/
5	114,84	6,76 (1H; <i>d</i> ; 8,0)
6	121,26	6,97 (1H; <i>dl</i> ; 8,2)
7	139,88	7,31 (1H; <i>d</i> ; 15,61)
8	122,06	6,33 (1H; <i>d</i> ; 15,81)
9	174,61	/
OCH ₃	54,93	3,88 (3H; <i>S</i>)

Ces caractéristiques spectrales comparées aux données de la littérature [9], mènent au composé **acide 4-hydroxy-3-méthoxycinnamique** connu sous le nom d'**acide férulique**.

L'acide férulique est un acide phénolique qui possède des propriétés antioxydantes [10].

L'identification du produit A3 dans phase ACOEt par HPLC-TOF/MS en mode négatif est présentée dans la figure III.24.

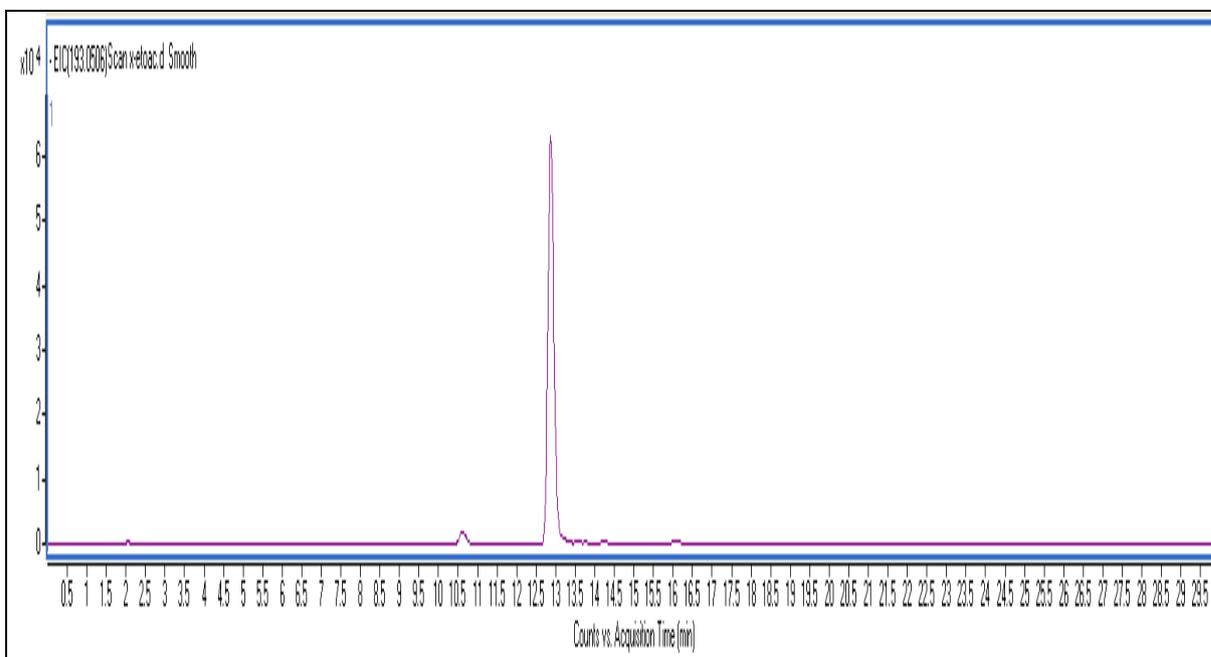


Figure III.24: Chromatogramme d'identification du produit A3 dans l'extrait ACOEt par HPLC-TOF/MS en mode négatif

III.2.1.4. Elucidation structurale du composé A4 (ATC2d2a)

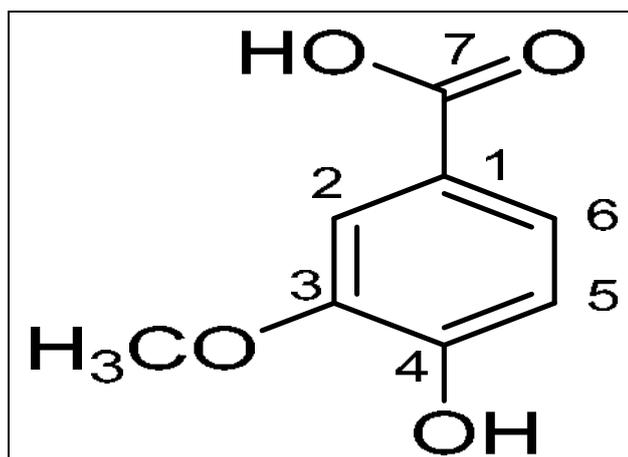


Figure III.25: Structure du composé A4

Le spectre de masse ESI-MS du composé A4 obtenu sous forme d'une poudre blanche amorphe, montre en mode négatif (figure III.26) un pic d'ion pseudo-moléculaire à $m/z=167,07$ $[M-H]^-$ correspondant à une masse moléculaire de 168 uma, indiquant une formule brute $C_8H_8O_4$, soit une molécule renfermant 5 insaturations.

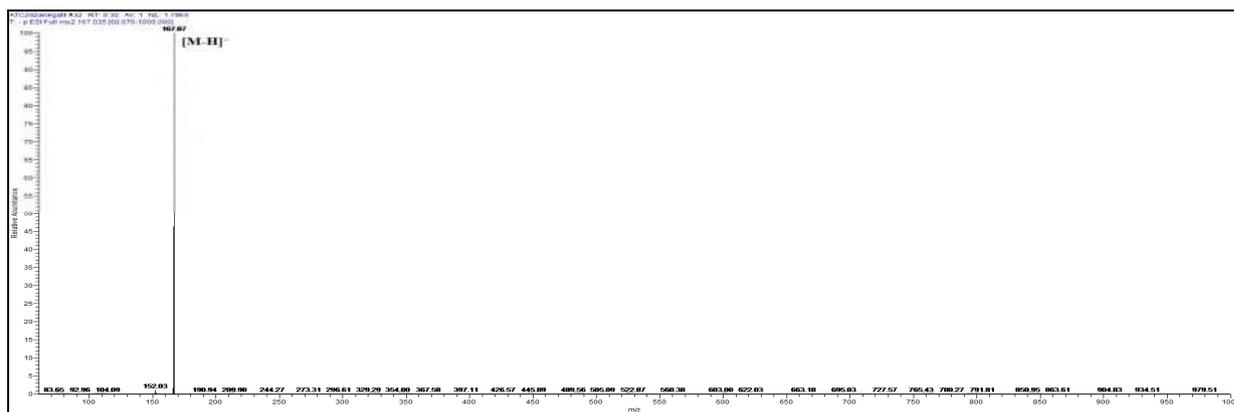


Figure III.26: Spectre de masse ESI-MS en mode négatif du composé A4

Un total de 8 carbones peut être compté sur le spectre de RMN ^{13}C (figure III.27) et le spectre DEPT (figure III.28) permet de les répartir comme suit:

- Un carbone quaternaire à δ_{C} 166,59 ppm, dont la valeur du déplacement chimique indique qu'il s'agit d'un carbonyle d'une fonction acide.
- Deux carbones quaternaires aromatiques oxygénés dont un à δ_{C} 151,07 ppm et l'autre à δ_{C} 147,11 ppm.
- Un carbone quaternaire non oxygéné à δ_{C} 122,11 ppm
- Trois carbones méthines à δ_{C} 123,91 ; 114,57 et 112,55 ppm.
- Un CH_3 dont le déplacement chimique est à δ_{C} 55,39 ppm indique la présence d'un groupement méthoxyle.

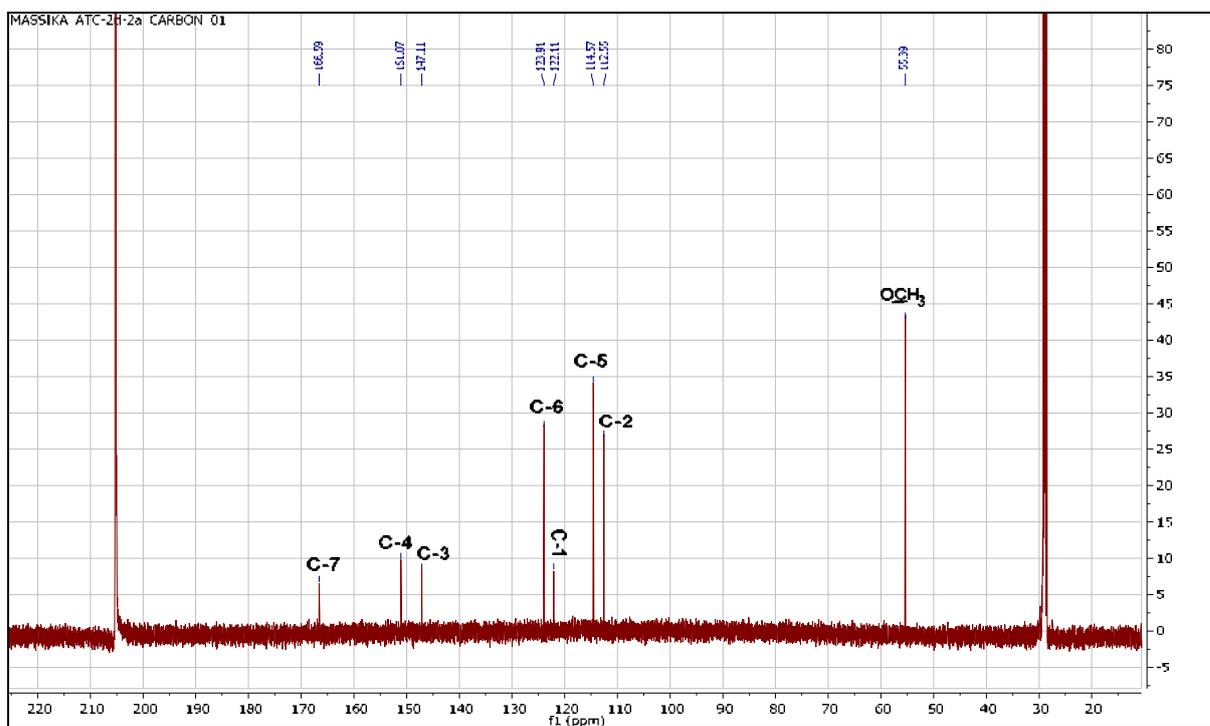


Figure III.27: Spectre RMN ^{13}C (150 MHz, acétone- d_6 , δ ppm) du composé A4

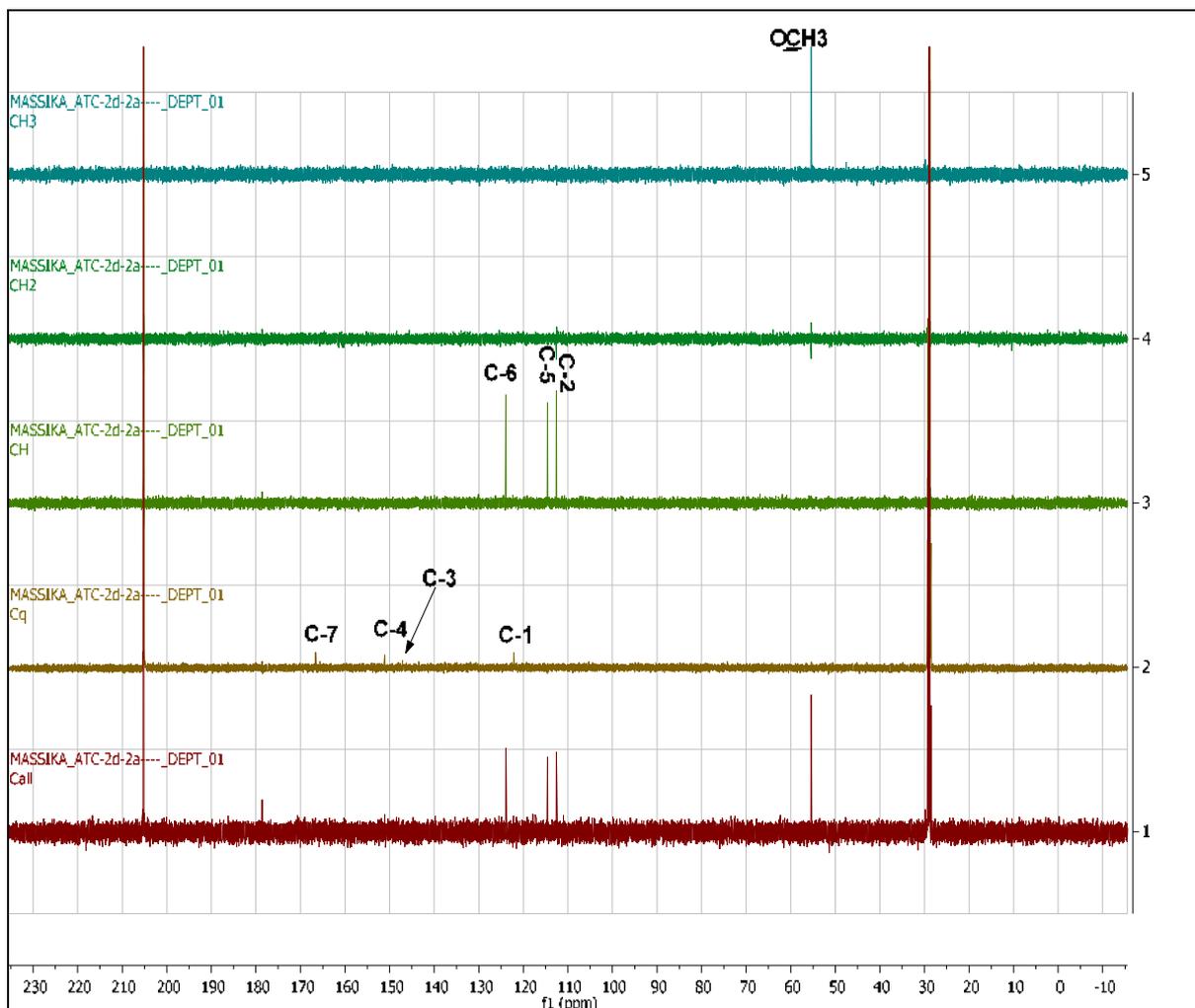


Figure III.28: Spectre DEPT (150 MHz, acétone-d₆, δ ppm) du composé A4

L'étude du spectre RMN ^1H (figure III.29 et III.29a) de ce composé a permis de mettre en évidence dans la région aromatique la présence de 3 protons résonant à δ_{H} 7,59 ; 7,56 et 6,90 ppm sous forme d'un doublet large ($J = 8,2$ Hz), d'un singulet large et d'un doublet ($J = 8,2$ Hz) respectivement. Ces constantes de couplage sont en faveur d'un noyau aromatique tri-substitué dans les positions 1, 3 et 4. De ce fait:

- Le premier signal est attribuable à H-6.
- Le second est attribuable à H-2.
- Le 3ème est attribuable à H-5.

Ces résultats sont en bon accord avec la mesure de l'expérience COSY, (figure III.30), où elle montre des corrélations entre les protons H-6 à δ_{H} 7,59 ppm et H-5 à δ_{H} 6,90 ppm.

Le spectre RMN ^1H montre aussi un signal d'intégration 3H à δ_{H} 3,90 ppm attribuable à un groupement méthoxyle .

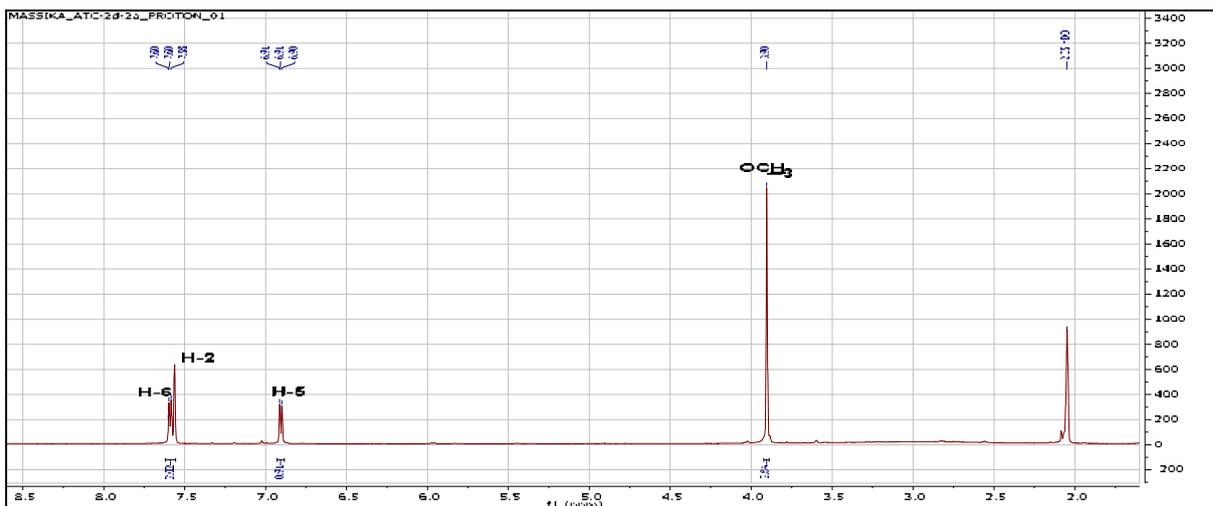


Figure III.29: Spectre RMN ^1H (600 MHz, acétone- d_6 , δ ppm) du composé A4

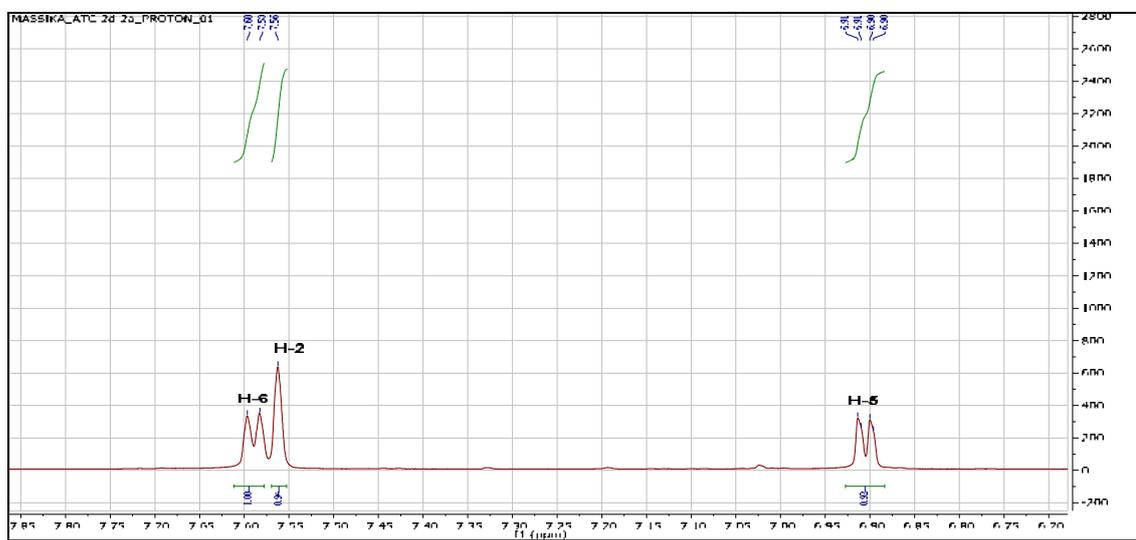


Figure III.29a: Spectre RMN ^1H (600 MHz, acétone- d_6 , δ ppm) étalé de 6,70 à 7,85 ppm du composé A4

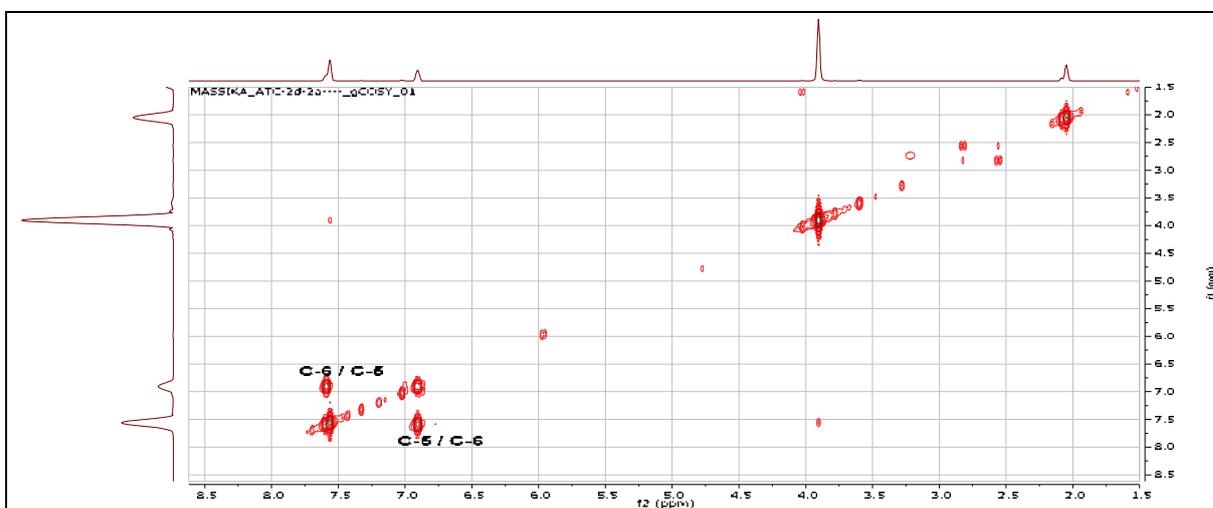


Figure III.30: Spectre RMN 2D COSY (600 MHz, acétone- d_6 , δ ppm) du composé A4

La mesure du spectre de corrélations hétéronucléaires HSQC (figure III.31) a conduit à l'établissement des connections géminales ^1H - ^{13}C -RMN du composé A4. Il a pu être démontré que les protons localisés à δ_{H} 7,59 ppm, δ_{H} 7,56 ppm et δ_{H} 6,90 ppm étaient attachés aux carbones respectivement situés à δ_{C} 123,91 ppm, δ_{C} 112,55 ppm et δ_{C} 114,57 ppm et que les protons du groupement méthoxyle étaient attachés au carbone situé à δ_{C} 55,39 ppm.

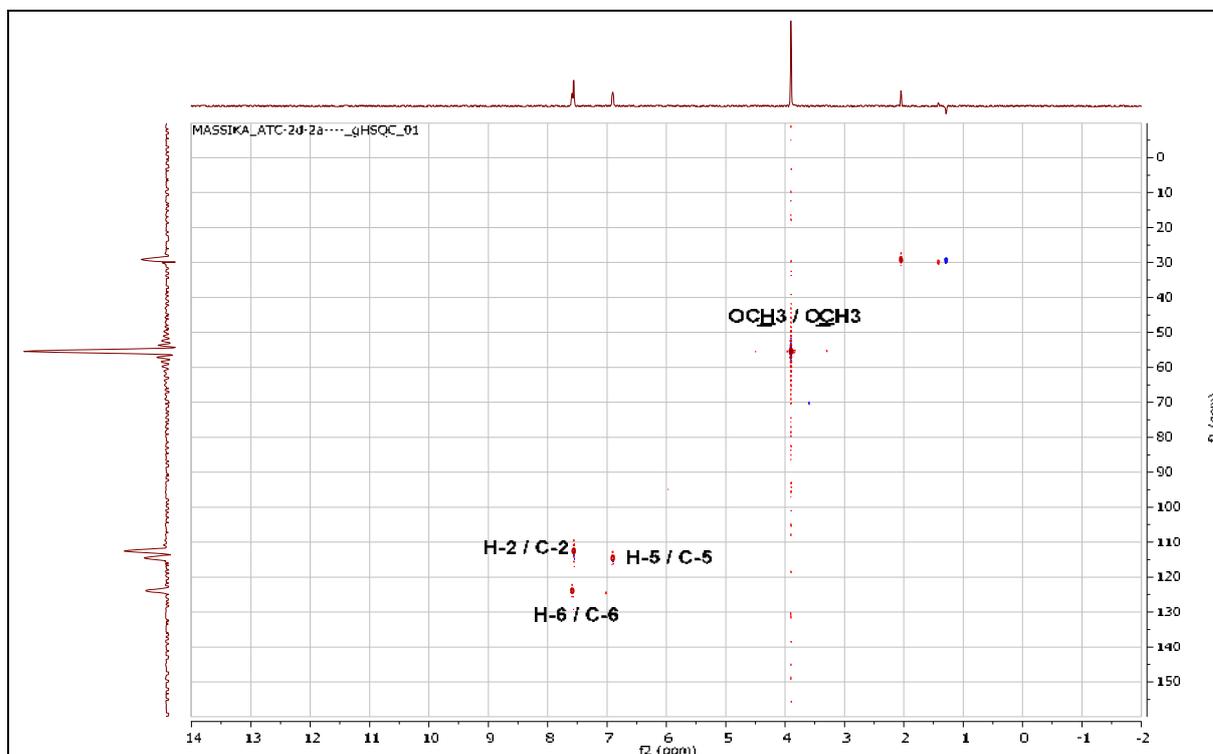


Figure III.31: Spectre HSQC (600 MHz, acétone-d₆, δ ppm) du composé A4

La mesure du spectre de corrélations hétéronucléaires observées à longue distance HMBC (figure III.32) a montré la corrélation entre les protons résonant à δ_{H} 3,90 ppm et le carbone situé à δ_{C} 147,11 ppm attribuable à C-3 suggérant l'attachement du groupement méthoxyle en position 3.

Le carbone localisé à δ_{C} 166,59 ppm est attribuable à C-7 grâce à sa corrélation avec les protons H-6 et H-2, confirmant l'attachement du groupement méthoxyle en position 3.

Le spectre HMBC révèle bien que le proton H-5 et le proton H-2 corrélient avec un carbone quaternaire résonant à δ_{C} 122,11, ne pouvant être que le carbone C-1.

Toujours sur le spectre HMBC, Les protons H-6, H-2 et H-5 montrent trois tâches de corrélation avec le même atome de carbone situé à δ_{C} 151,07 ppm qui ne peut être attribuer qu'au carbone C-4.

L'ensemble de ces corrélations corrobore parfaitement les attributions établies.

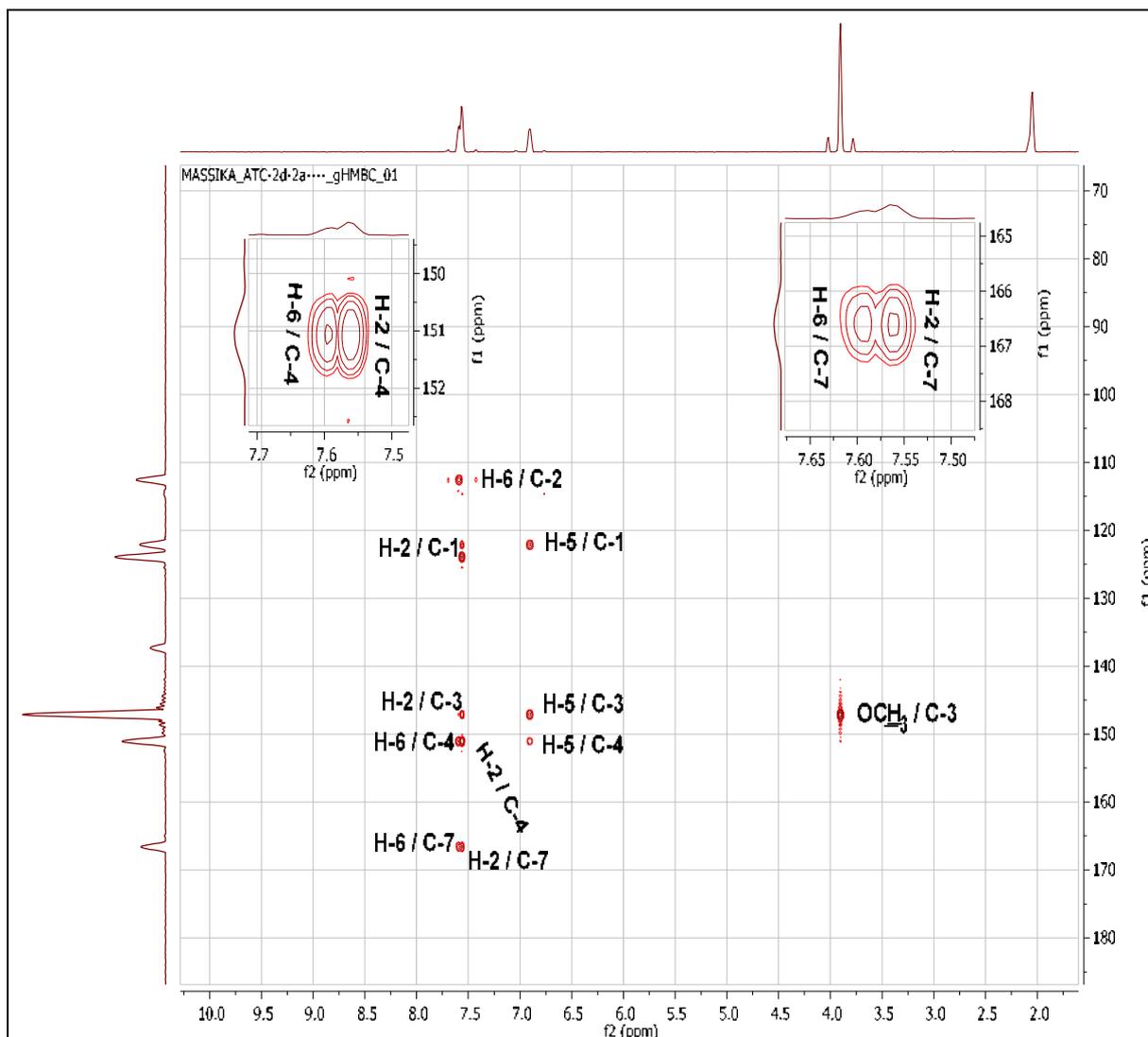


Figure III.32: Spectre RMN 2D HMBC (600 MHz, acétone-d₆, δ ppm) du composé A4

Les données relatives aux spectres RMN-¹H et ¹³C de ce composé sont reportées dans le tableau III.6.

Tableau III.6 : L'ensemble des données relatives aux spectres RMN-¹H et ¹³C du composé A4 dans acétone-d₆

Position	δ _C (ppm)	δ _H (ppm, multiplicité, <i>J</i> en Hz)
1	122,11	/
2	112,55	7,56 (1H; <i>Sl</i>)
3	147,11	/
4	151,07	/
5	114,57	6,90 (1H; <i>d</i> ; 8,2)
6	123,91	7,59 (1H; <i>dl</i> ; 8,2)
7	166,59	/
OCH ₃	55,39	3,90 (3H; <i>S</i>)

Sur la base de ces données spectrales et par comparaison avec les données de la littérature [11], le composé A4 est identifié comme étant l'**acide 4-hydroxy-3-methoxybenzoïque** connu sous le nom d'**acide vanillique**. Cet acide possède un effet antidiabétique [12]

L'identification de ce produit dans phase ACOEt par HPLC-TOF/MS en mode négatif est présentée dans le chromatogramme ci-après (figure III.33).

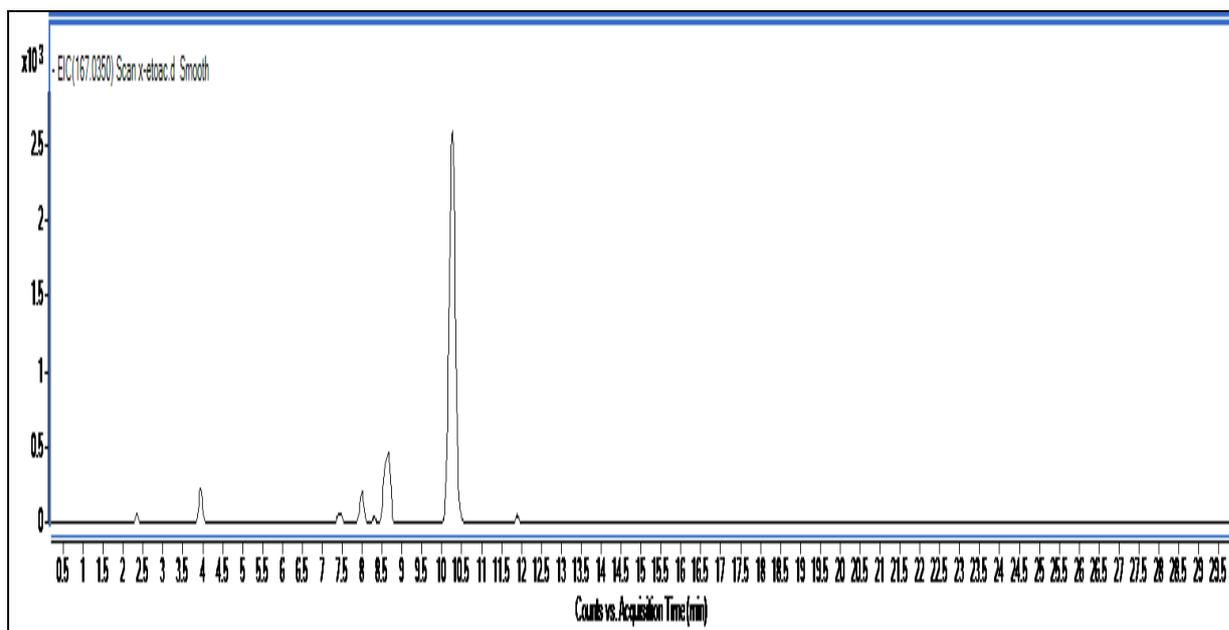


Figure III.33: Chromatogramme d'identification du produit A4 dans l'extrait ACOEt par HPLC-TOF/MS en mode négatif

III.2.1.5. Elucidation structurale du composé A5 (ATC2d2d)

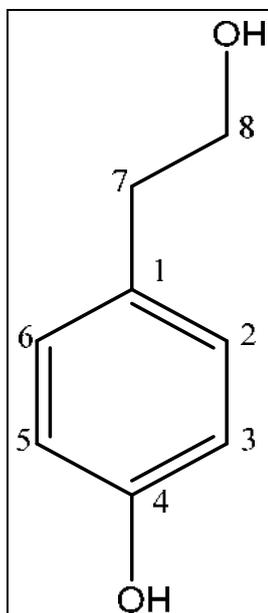


Figure III.34: Structure du composé A5

Le spectre de masse ESI-MS du composé A5 obtenu sous forme des cristaux jaune pâle, montre en modes négatif (figure III.35) un pic d'ion pseudo-moléculaire à $m/z = 137,05$ $[M-H]^-$, soit une masse moléculaire égale à 138 uma correspondant à la formule brute $C_8H_{10}O_2$ avec 4 insaturations.

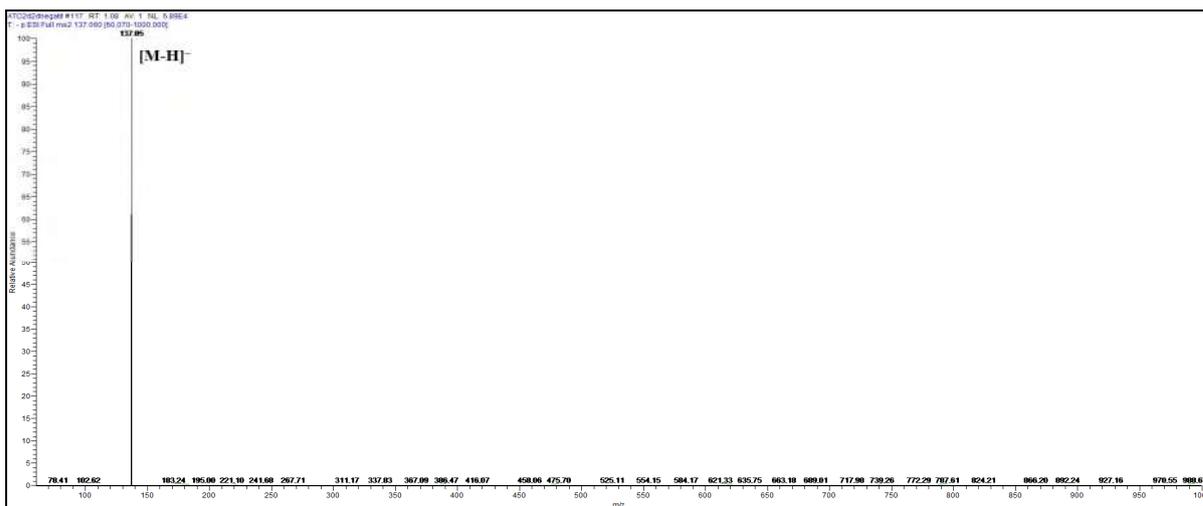


Figure III.35: Spectre de masse ESI-MS en mode négatif du composé A5

L'examen des spectres de RMN de ce composé, donnent des signaux orientant vers l'existence d'une région aromatique et une région aliphatique. En effet, l'étude simultanée des spectres RMN proton (figure III.36), HSQC (figure III.37) et COSY (figure III.38) permet de tirer les indications suivantes:

- Dans la région aromatique:
 - Un doublet ($J = 8,0$ Hz) d'intégration 2H à δ_H 7,04 ppm corrèle sur le spectre HSQC avec le signal à δ_C 129,77 ppm attribuable à H-2 (C-2) et H-6 (C-6).
 - Un doublet ($J = 8,0$ Hz) d'intégration 2H à δ_H 6,73 ppm corrèle sur le spectre HSQC avec le signal à δ_C 114,95 ppm attribuable à H-3 (C-3) et H-5 (C-5).

Les valeurs des déplacements chimiques ainsi que celles des constantes de couplage orientent vers la présence d'un noyau aromatique para-substitué. Ces résultats sont en bon accord avec l'expérience COSY, qui montre des crêtes de corrélation entre ces protons.

- Dans la région aliphatique:
 - Un multiplet d'intégration 2H à δ_H 3,67 ppm. Ce signal montre, sur le spectre HSQC, une tache de corrélation avec le signal à δ_C 63,35 ppm. Les valeurs des déplacements chimiques des protons et de leur carbone indiquent clairement qu'il s'agit d'un CH_2 oxygéné donc attribuable à CH_2 -8.
 - Un triplet ($J = 7,28$ Hz) d'intégration 2H à δ_H 2,69 ppm montre une tache de corrélation sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_C 38,59 ppm. vu les valeurs de leurs déplacement chimique, ce proton ne peut être que benzylique et de ce fait, ce CH_2 est porté par le cycle aromatique, permettant ainsi son attribution à CH_2 -7.

La mesure de l'expérience COSY représente des crêtes de corrélation entre les protons de ces deux groupements (CH_2 -8 et CH_2 -7) indique qu'ils sont reliés.

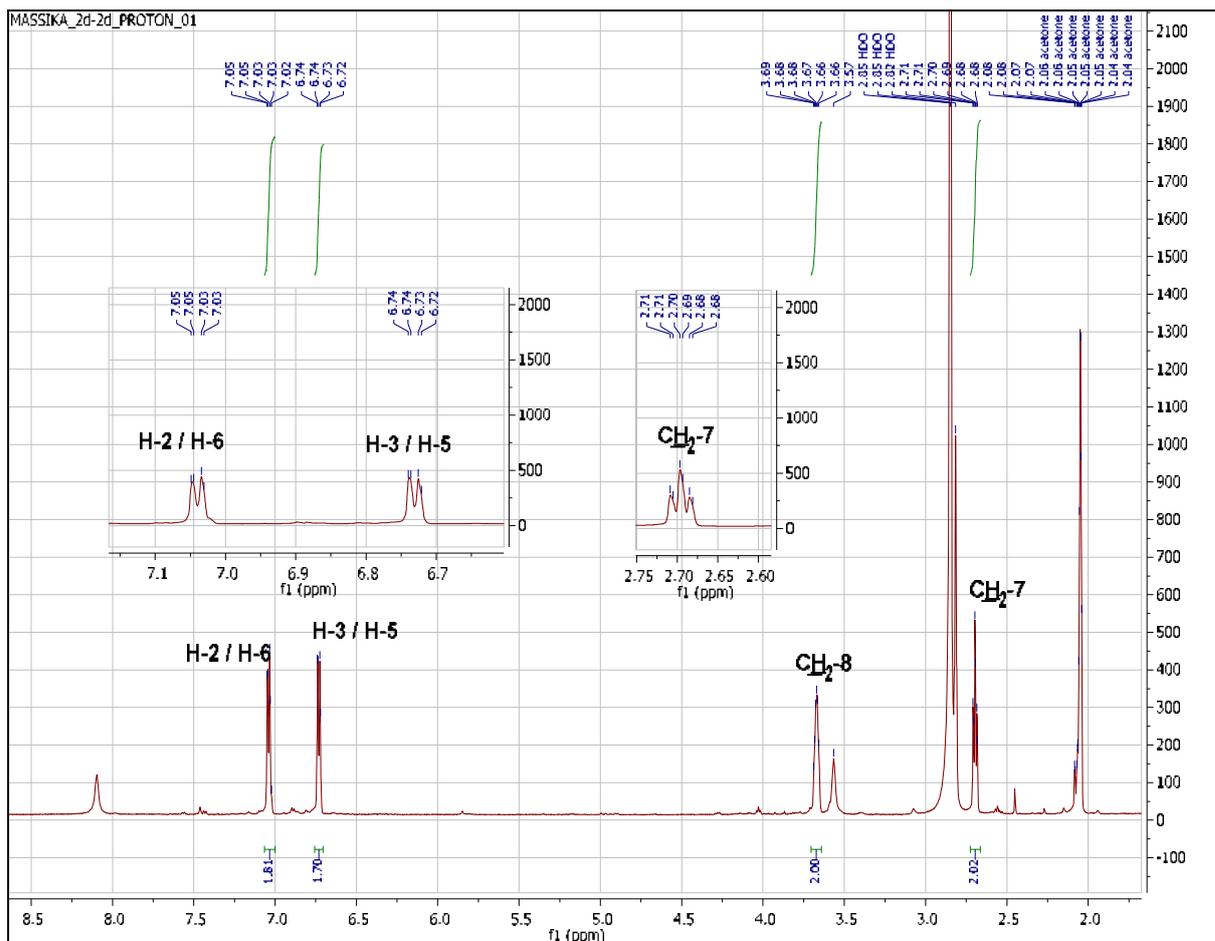


Figure III.36: Spectre RMN ¹H (600 MHz, acétone-d₆, δ ppm) du composé A5

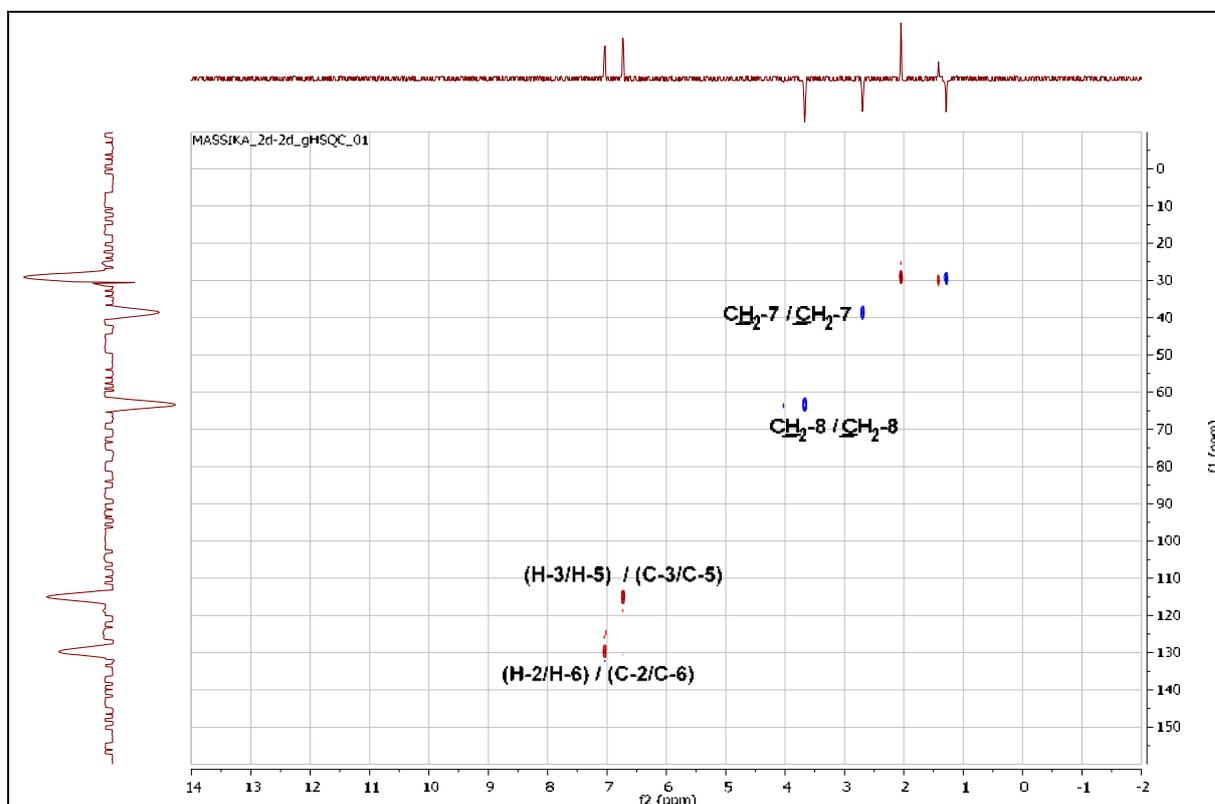


Figure III.37: Spectre HSQC (600 MHz, acétone-d₆, δ ppm) du composé A5

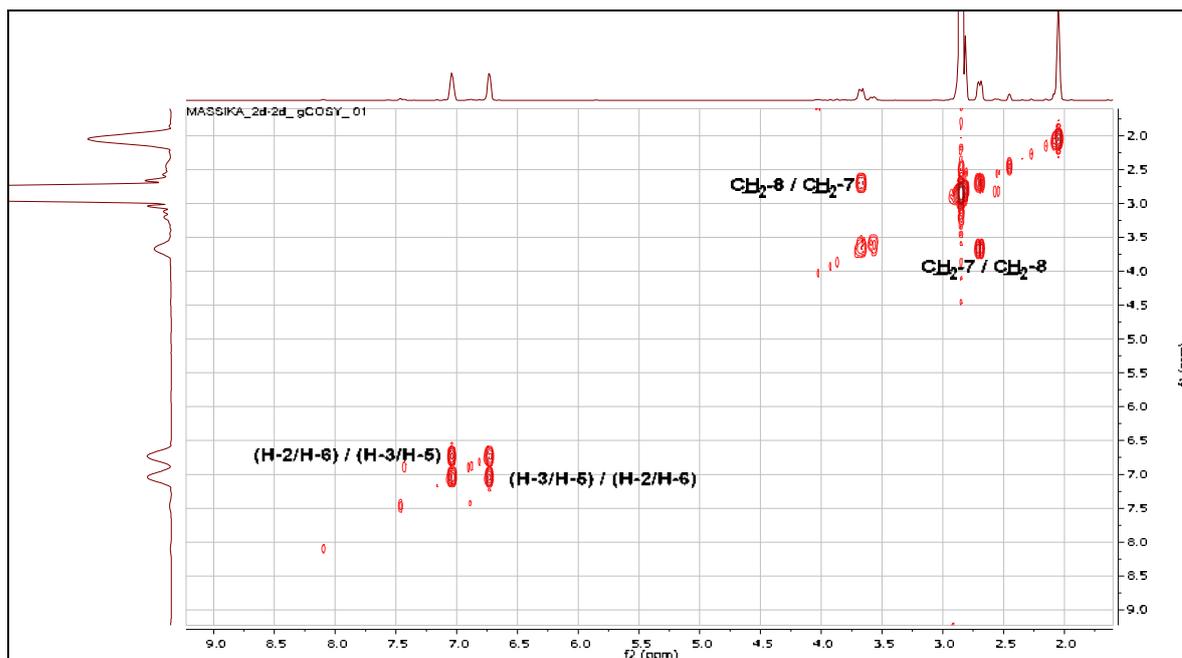


Figure III.38: Spectre RMN 2D COSY (600 MHz, acétone-d₆, δ ppm) du composé A5

L'examen du spectre RMN ¹³C (figure III.39) confirme ces résultats et montre la présence de deux autres signaux dont:

- Un carbone quaternaire aromatique portant un groupement hydroxyle à δ_C 155,63 ppm attribuable à C-4.
- le second carbone quaternaire aromatique à δ_C 130,10 ppm ne pouvant être que le C-1.

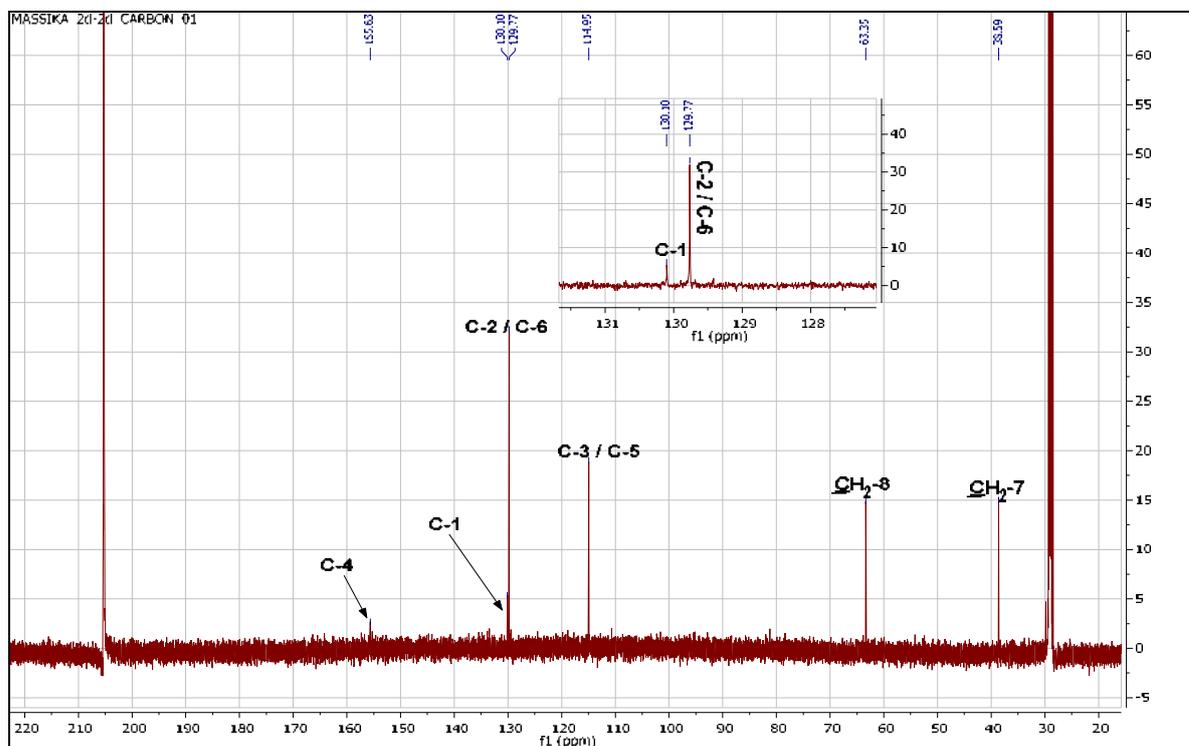


Figure III.39: Spectre RMN ¹³C (150 MHz, acétone-d₆, δ ppm) du composé A5

Sur le spectre HMBC (figure III.40), les deux protons H-3 et H-5 corrélient avec deux carbones quaternaires aromatiques (C-1 et C-4) identifiés précédemment.

Les protons du groupement CH₂ résonant à δ_H 2,69 ppm montrent des corrélations sur le spectre HMBC avec le carbone du deuxième groupement CH₂ à δ_C 63,35 ppm et d'autre part avec le carbone quaternaire aromatique C-1 résonant à δ_C 130,10 ppm.

Toujours sur le même spectre, les deux protons H-2 et H-6 montrent des corrélations avec les carbones localisés à δ_C 38,59 ppm (CH₂-7), à δ_C 130,10 ppm (C-1) et à δ_C 155,63 ppm (C-4). Ceci est en accord avec les résultats fournis par les expériences MS et RMN.

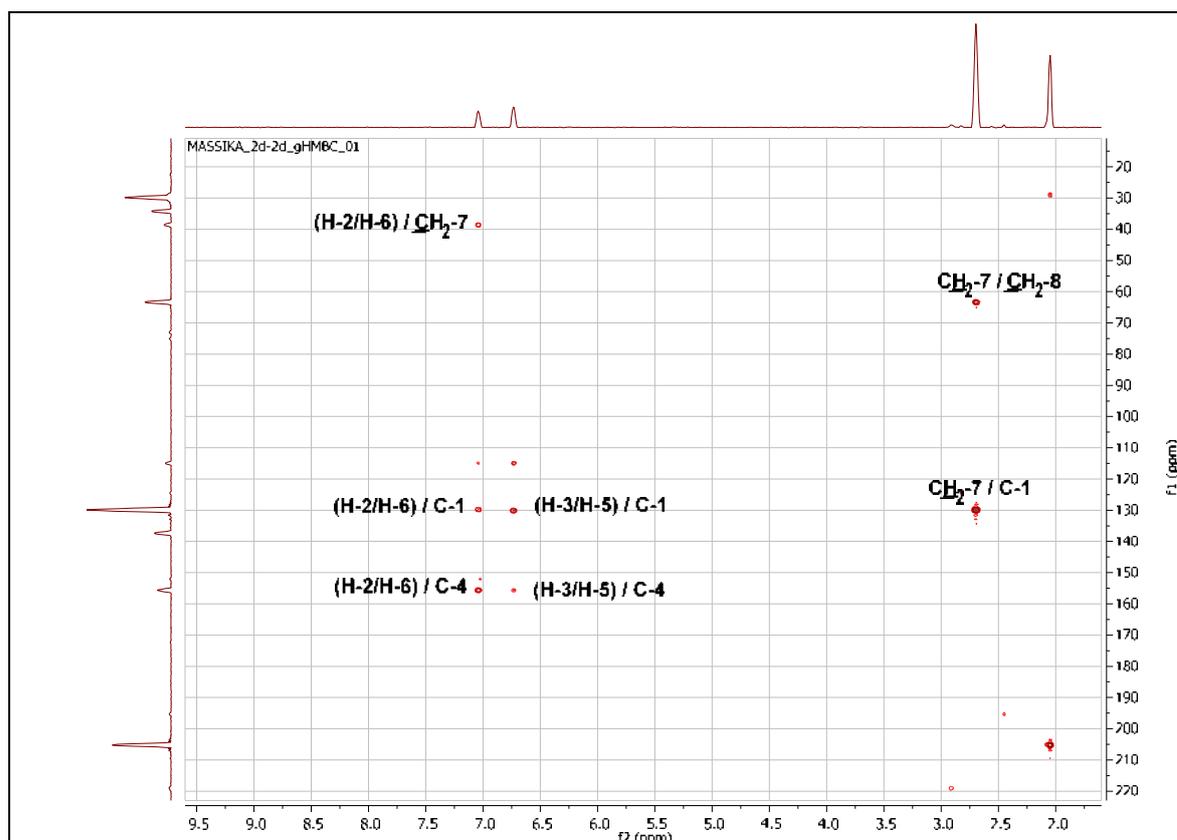


Figure III.40: Spectre RMN 2D HMBC (600 MHz, acétone-d₆, δ ppm) du composé A5

Les déplacements chimiques relatifs aux atomes d'hydrogène et aux atomes de carbone sont rassemblés dans le tableau III.7.

Tableau III.7. Données spectrales RMN ¹H et ¹³C du composé A5 dans acétone-d₆

Position	δ_C (ppm)	δ_H (ppm, multiplicité, <i>J</i> en Hz)
1	130,10	/
2	129,77	7,04 (2H; <i>d</i> ; 8,0)
3	114,95	6,73 (2H; <i>d</i> ; 8,0)
4	155,63	/
5	114,95	6,73 (2H; <i>d</i> ; 8,0)
6	129,77	7,04 (2H; <i>d</i> ; 8,0)
7	38,59	2,69 (2H; <i>t</i> ; 7,28)
8	63,35	3,67 (2H; <i>m</i>)

L'ensemble de ces données spectrales et par comparaison avec les données de la littérature [13] montre qu'il s'agit d'un **4-hydroxyphényléthanol** ou **para-hydroxyphényléthanol** connu sous le nom **tyrosol**.

Le tyrosol est une molécule anti-oxydante [14] qui possède une activité inhibitrice de collagénase (MMP-9) [15].

III.2.1.6. Elucidation structurale du composé A6 (ATC3c3b)

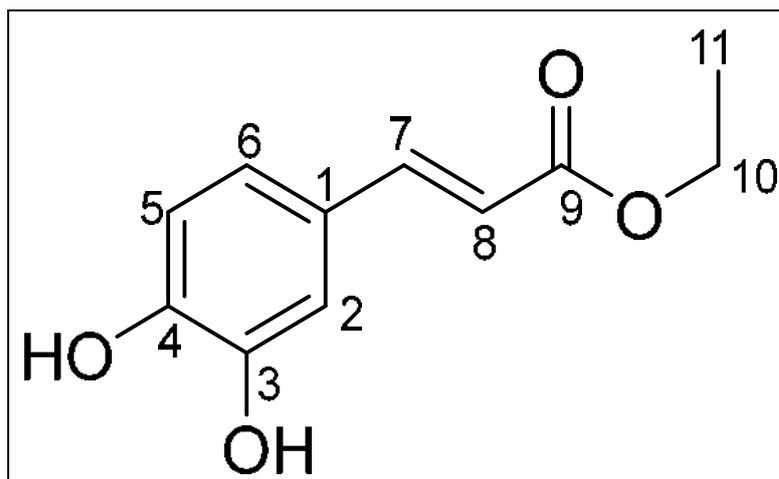


Figure III.41: Structure du composé A6

Le spectre de masse ESI-MS du composé A6 obtenu sous forme de poudre jaune pâle, montre en mode négatif (figure III.42) un pic d'ion pseudo-moléculaire à $m/z = 207,03$ $[M-H]^-$, correspondant à une masse moléculaire de 208 uma et une formule brute $C_{11}H_{12}O_4$.

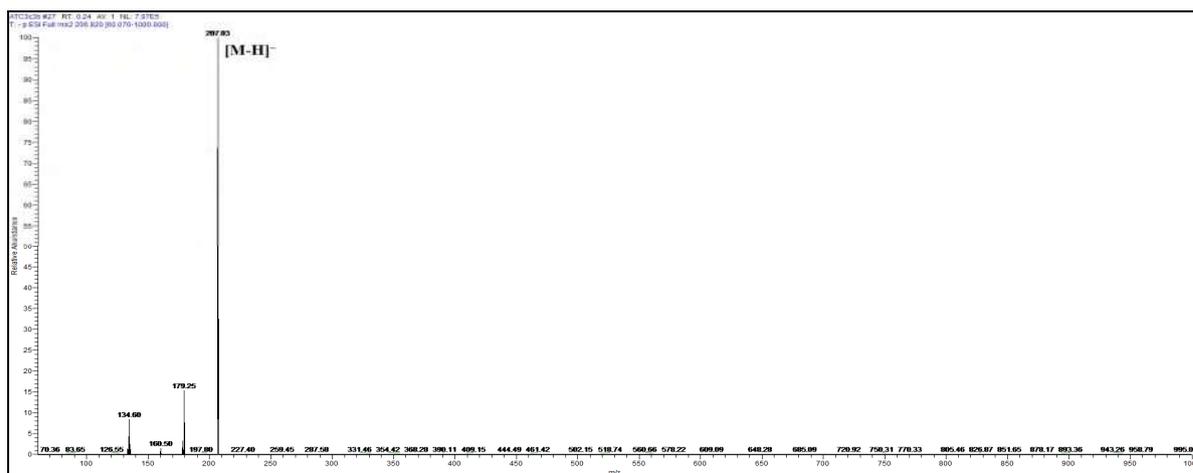


Figure III.42: Spectre de masse ESI-MS en mode négatif du composé A6

Le spectre de RMN 1H (figure III.43, III.43a et III.43b) montre un système ABX aromatique formé par les signaux à $[\delta_H 6,85$ ppm (1H, *d*, $J = 8,2$ Hz, H-5), $\delta_H 7,02$ ppm (1H, *dl*, $J = 8,2$

Hz, H-6) et δ_H 7,14 ppm (1H, *sl*, H-2)] correspondant à un noyau aromatique 1,3,4-trisubstitué. Ce spectre montre aussi la présence de deux protons trans oléfiniques à δ_H 7,52 ppm (1H, *d*, $J = 15,9$ Hz, H-7) et δ_H 6,26 ppm (1H, *d*, $J = 15,9$ Hz, H-8). Deux signaux à δ_H 4,17 ppm (2H, *q*, $J=7,25$ Hz) et à δ_H 1,27 ppm (3H, *t*, $J = 7,25$ Hz) sont attribués respectivement aux protons H-10 et H-11.

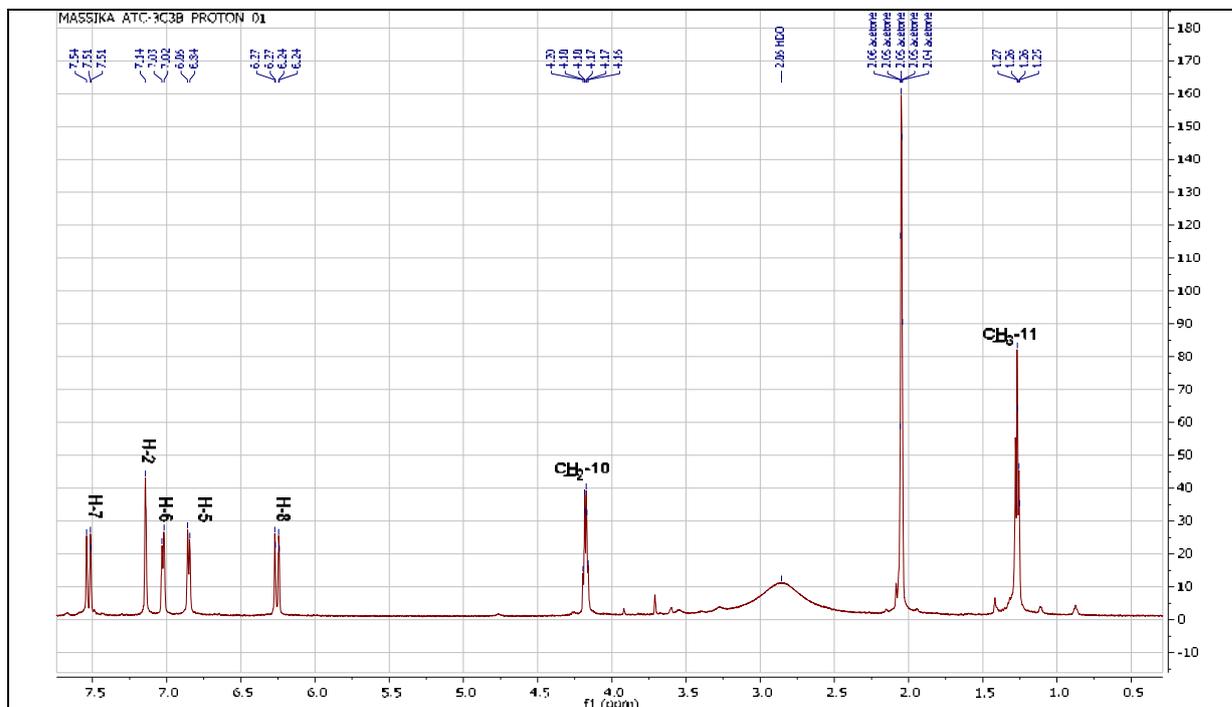


Figure III.43: Spectre RMN ^1H (600 MHz, acétone- d_6 , δ ppm) du composé A6

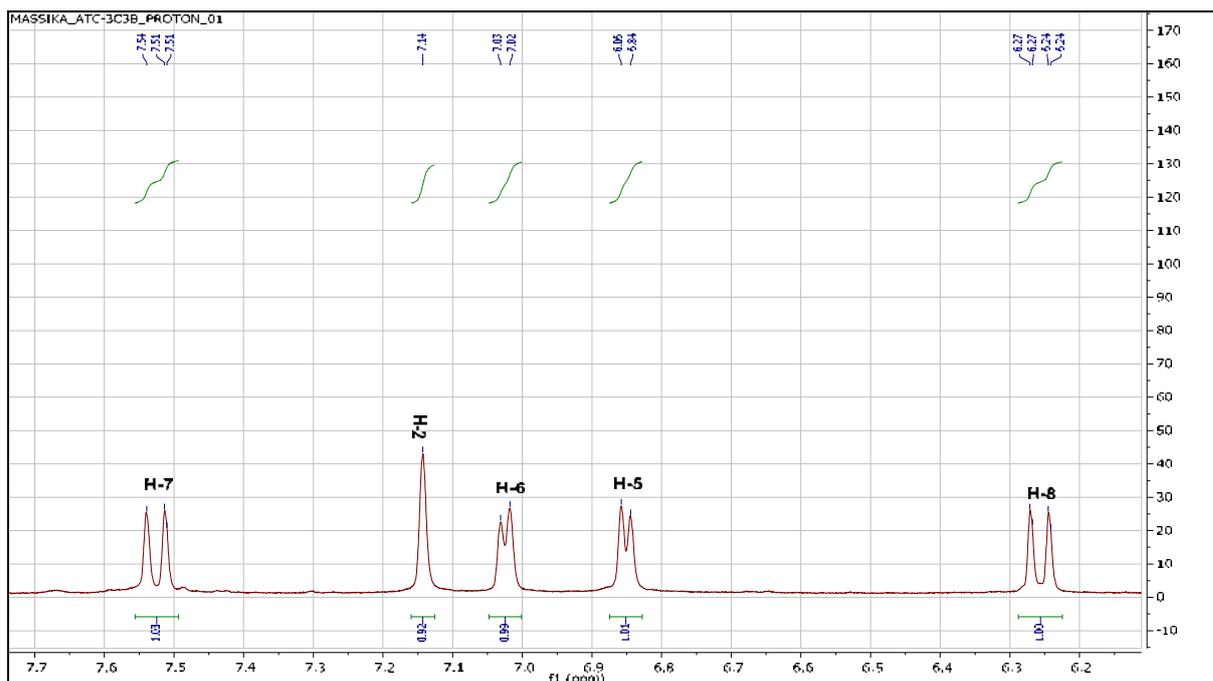


Figure III.43a: Spectre RMN ^1H (600 MHz, acétone- d_6 , δ ppm) étalé de 6,1 à 7,7 ppm du composé A6

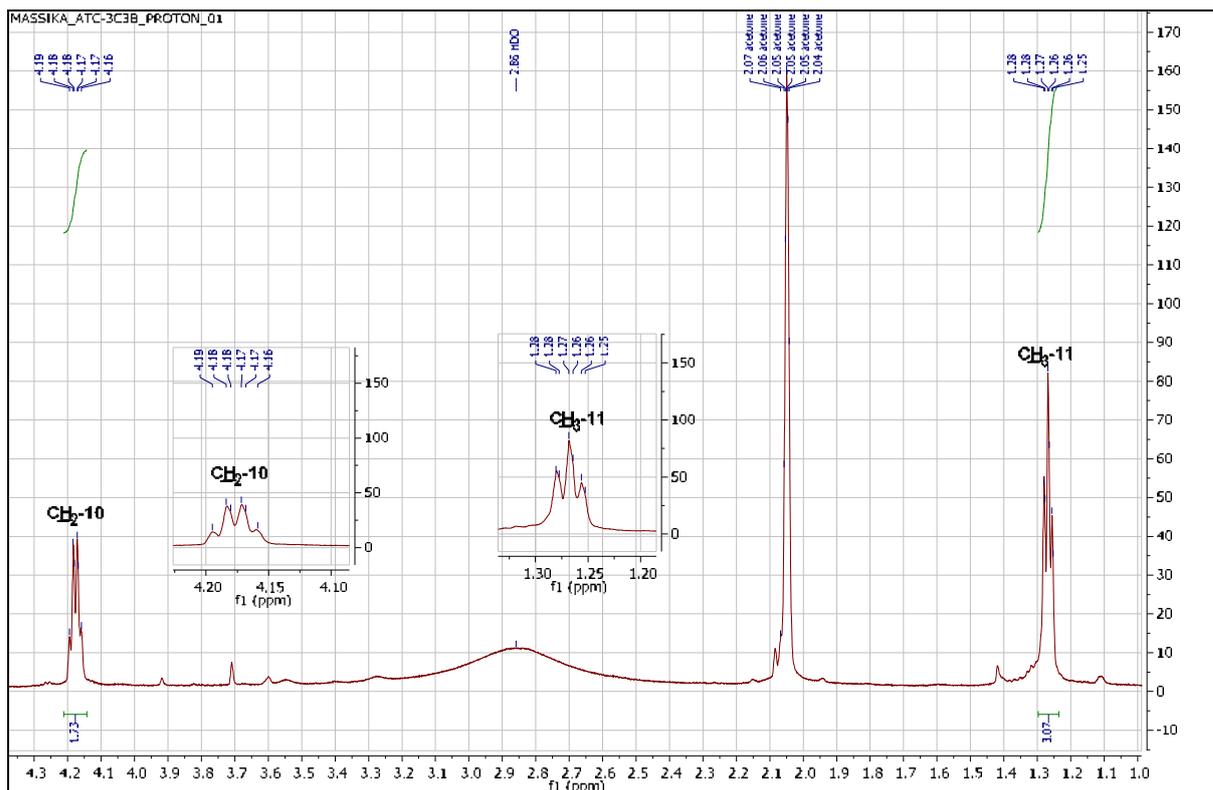


Figure III.43b: Spectre RMN ^1H (600 MHz, acétone- d_6 , δ ppm) étalé de 1,0 à 4,3 ppm du composé A6

Ces résultats sont en bon accord avec la mesure de l'expérience COSY, (figure III.44), où elle montre des corrélations entre les protons H-7 à δ_{H} 7,52 ppm et H-8 à δ_{H} 6,26 ppm ainsi entre H-6 à δ_{H} 7,02 ppm et H-5 à δ_{H} 6,85 ppm et aussi entre H-10 à δ_{H} 4,17 ppm et H-11 à δ_{H} 1,27 ppm.

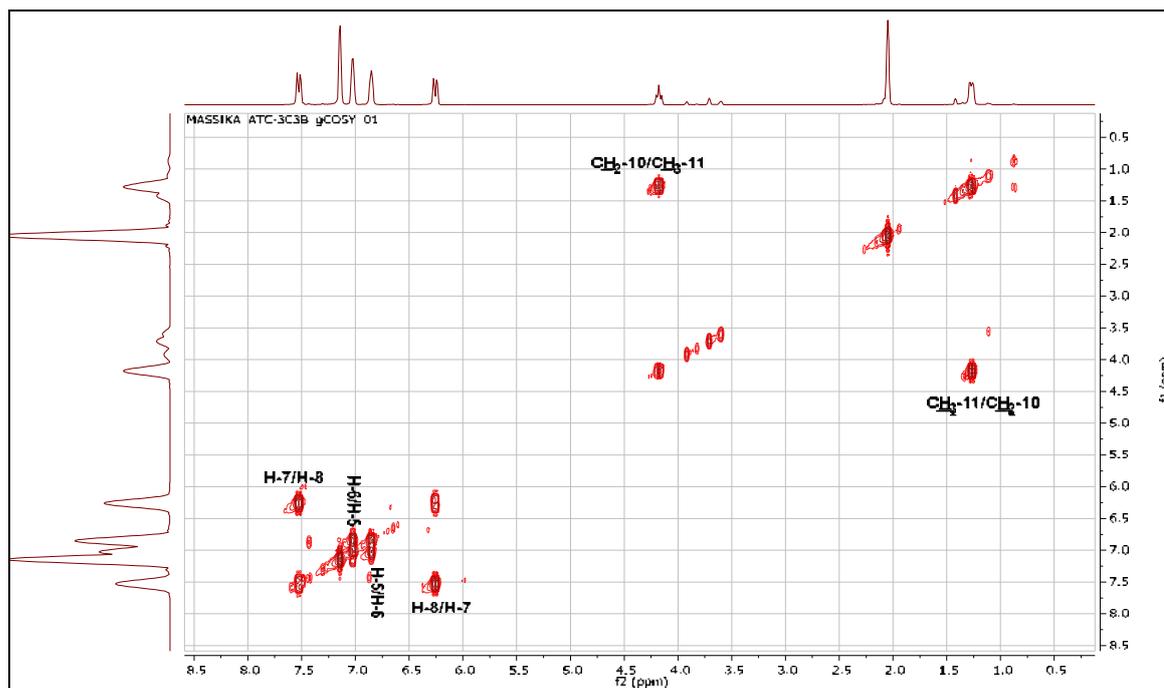


Figure III.44: Spectre RMN 2D COSY (600 MHz, acétone- d_6 , δ ppm) du composé A6

Le spectre de corrélations hétéronucléaires HSQC du composé A6 (figure III.45) a montré des corrélations RMN ^1H - ^{13}C entre les protons résonant à δ_{H} 6,26 ppm; δ_{H} 6,85 ppm ; δ_{H} 7,02 ppm; δ_{H} 7,14 ppm; δ_{H} 7,52 ppm et les carbones respectivement situés à δ_{C} 114,66 ppm; δ_{C} 115,46 ppm; δ_{C} 121,53 ppm; δ_{C} 114,16 ppm et à δ_{C} 144,67 ppm, ainsi entre les protons apparaissant vers δ_{H} 1,27 ppm; δ_{H} 4,17 ppm et les carbones localisés à δ_{C} 13,75 ppm et à δ_{C} 59,52 ppm respectivement.

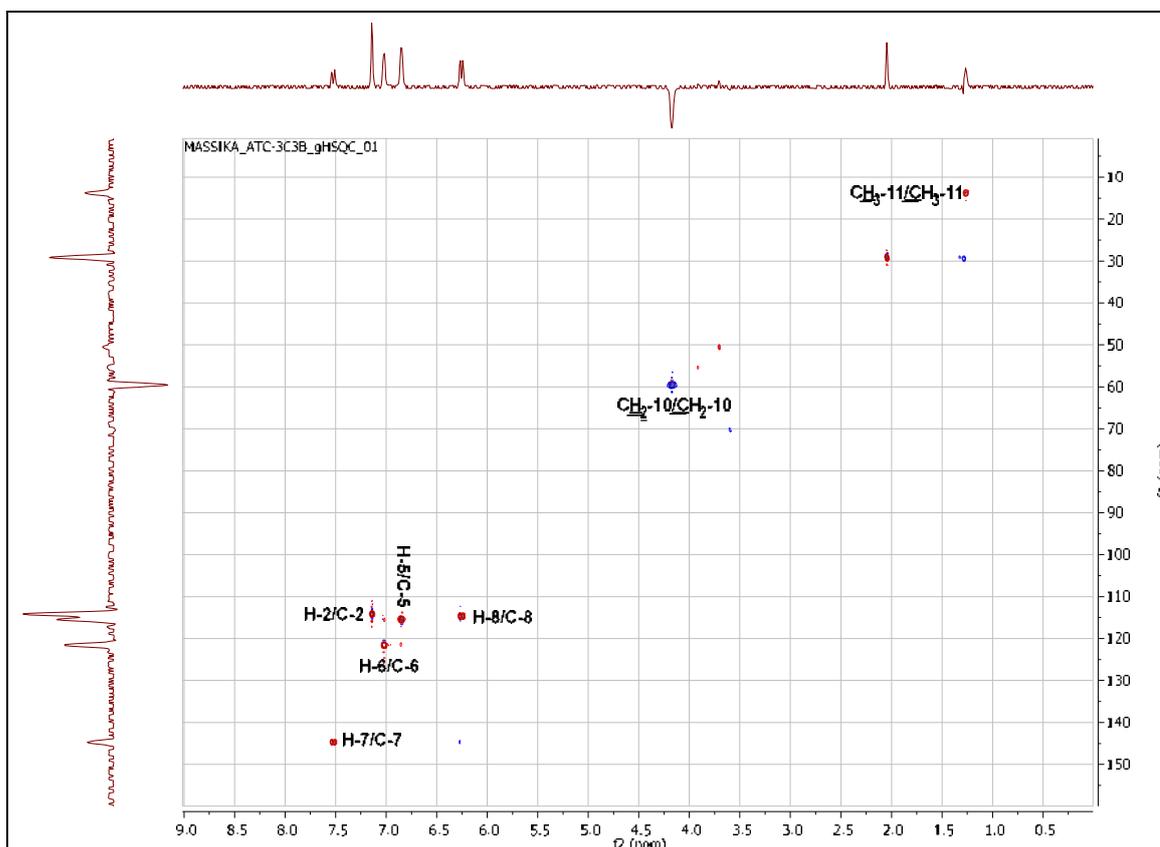


Figure III.45: Spectre HSQC (600 MHz, acétone-d₆, δ ppm) du composé A6

Le spectre RMN ^{13}C (figure III.46 et III.46a), indique 11 carbones. Ceci est en accord avec les résultats fournis par l'expérience MS. Le spectre DEPT (figure III.47 et III.47a), a fournit plus d'indications. Il montre:

- un carbonyle à δ_{C} 166,47 ppm.
- trois signaux à [δ_{C} 126,51 ppm, 145,59 ppm et 148,18 ppm], correspondant à des carbones quaternaires.
- trois signaux à [δ_{C} 114,16 ppm (C-2), 115,46 ppm (C-5) et 121,53 ppm (C-6)], correspondant à des carbones tertiaires, confirment la présence du noyau aromatique trisubstitué.
- deux groupements CH éthyléniques à δ_{C} 114,66 ppm (C-8) et δ_{C} 144,67 ppm (C-7).

- un groupement CH₃ à δ_C 13,75 ppm (C-11).
- un carbone secondaire à δ_C 59,52 ppm (C-10). Le déplacement chimique de ce dernier signal à δ_C 59,52 ppm suggère que ce carbone est attaché à un oxygène.

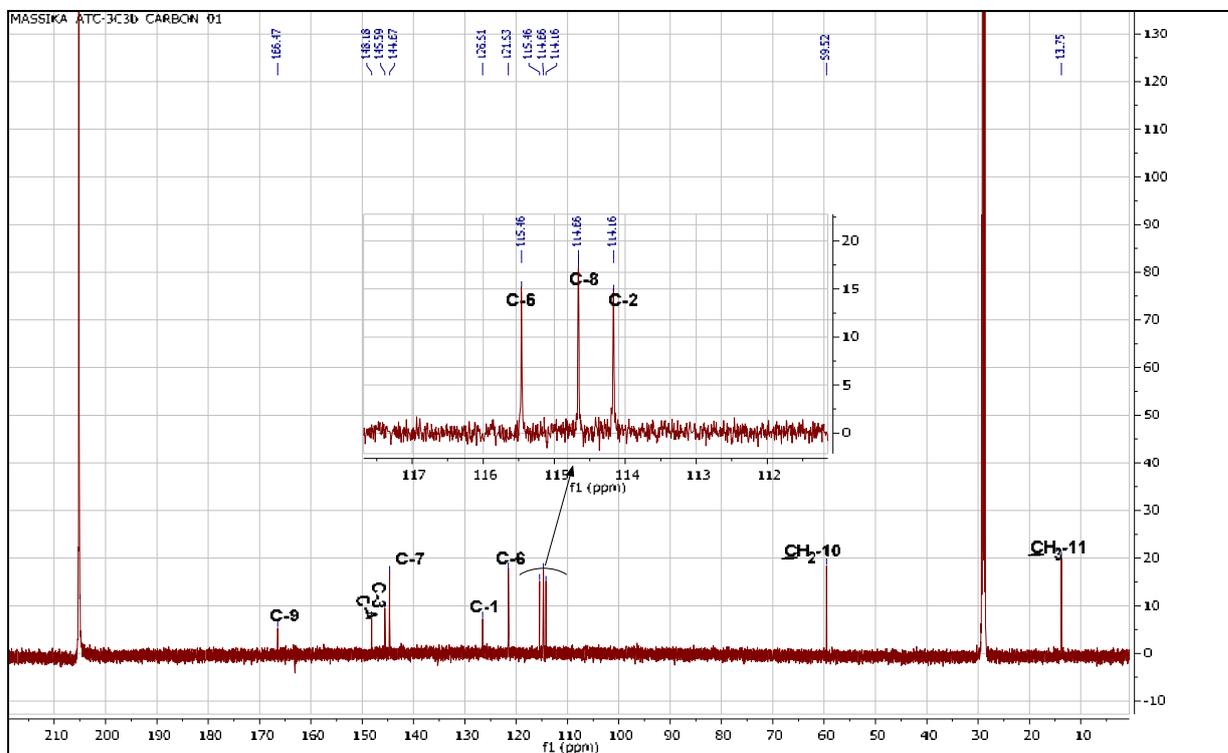


Figure III.46: Spectre RMN ¹³C (150 MHz, acétone-d₆, δ ppm) du composé A6

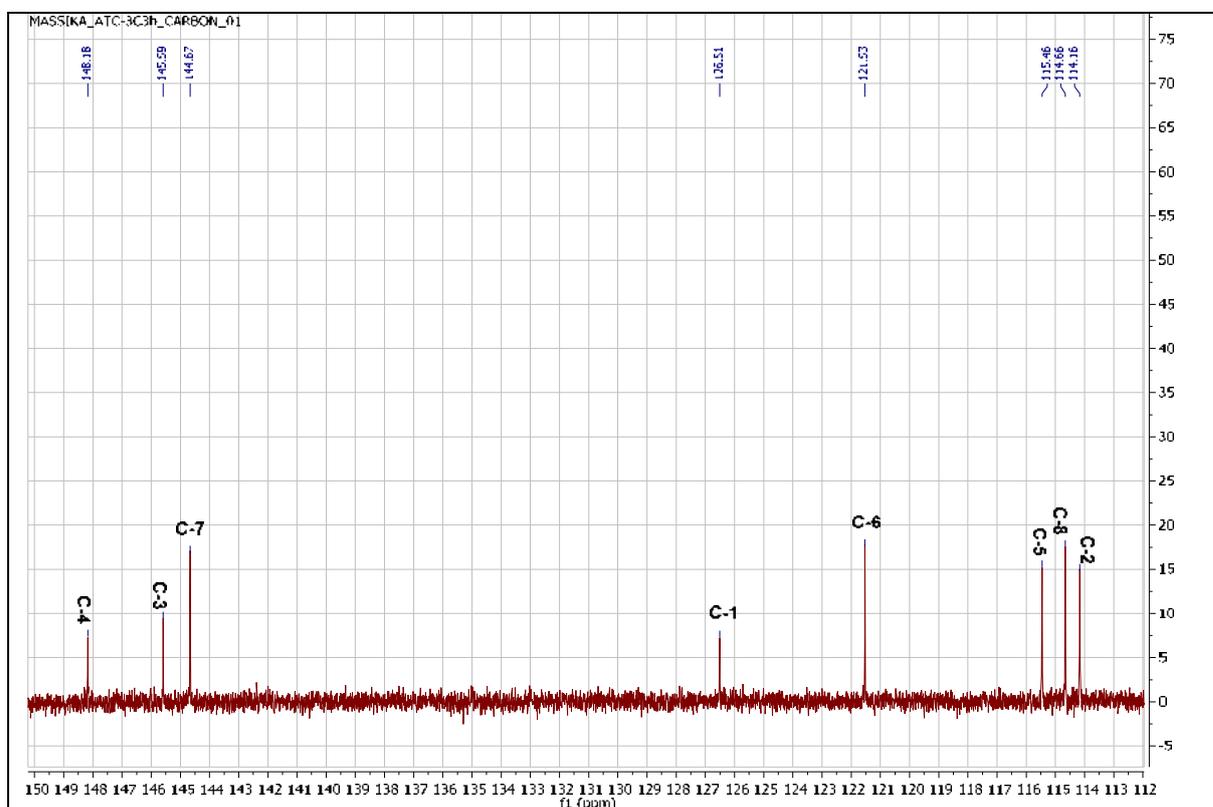


Figure III.46a: Spectre RMN ¹³C (150 MHz, acétone-d₆, δ ppm) étalé de 112 à 150 ppm du composé A6

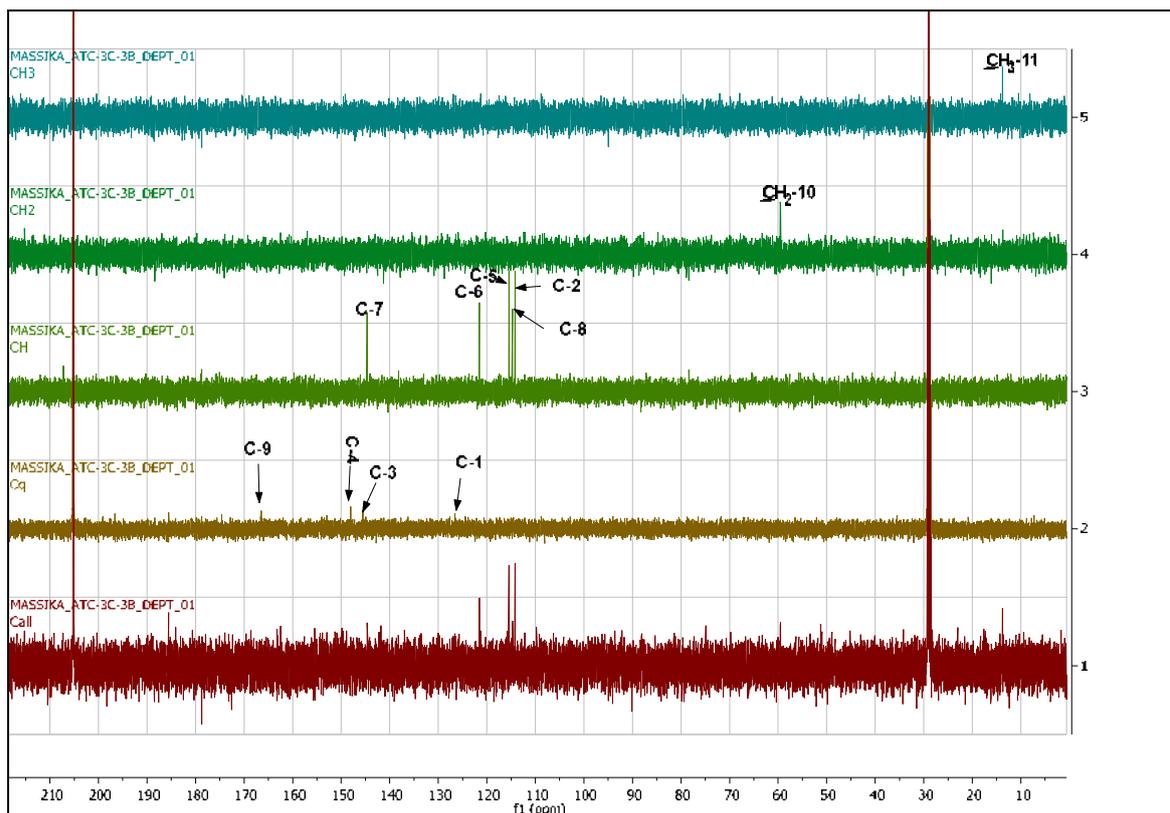


Figure III.47: Spectre DEPT (150 MHz, acétone-d₆, δ ppm) du composé A6

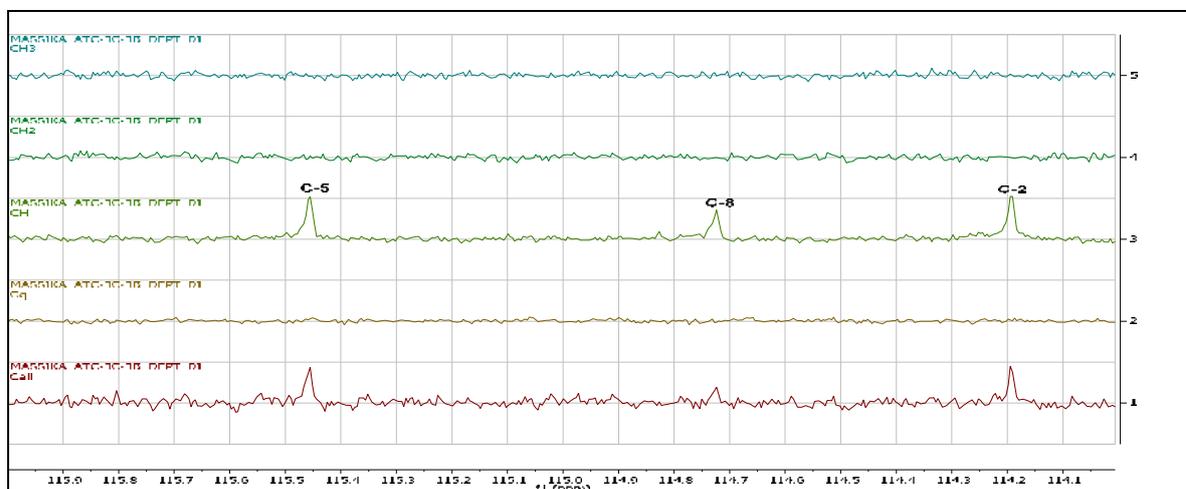


Figure III.47a: Spectre DEPT (150 MHz, acétone-d₆, δ ppm) étalé de 114 à 116 ppm du composé A6

Les attributions des atomes de carbone restant ont été complétées par l'étude des spectres de corrélation hétéronucléaire à longue distance HMBC (figure III.48 et III.48a).

- Trois taches de corrélation entre H-7, H-8 et les protons du groupement CH₂-10 et un atome de carbone résonant à δ_c 166,47 ppm attribuable à C-9.
- Trois taches de corrélation entre H-2, H-5 et H-6 et un atome de carbone résonant à δ_c 148,18 ppm attribuable à C-4.

- Une tache de corrélation entre H-5 et un atome de carbone résonant à δ_C 145,59 ppm qui ne peut être que le C-3.
- Trois taches de corrélation entre H-5, H-7 et H-8 et un atome de carbone résonant à δ_C 126,51 ppm attribuable à C-1.

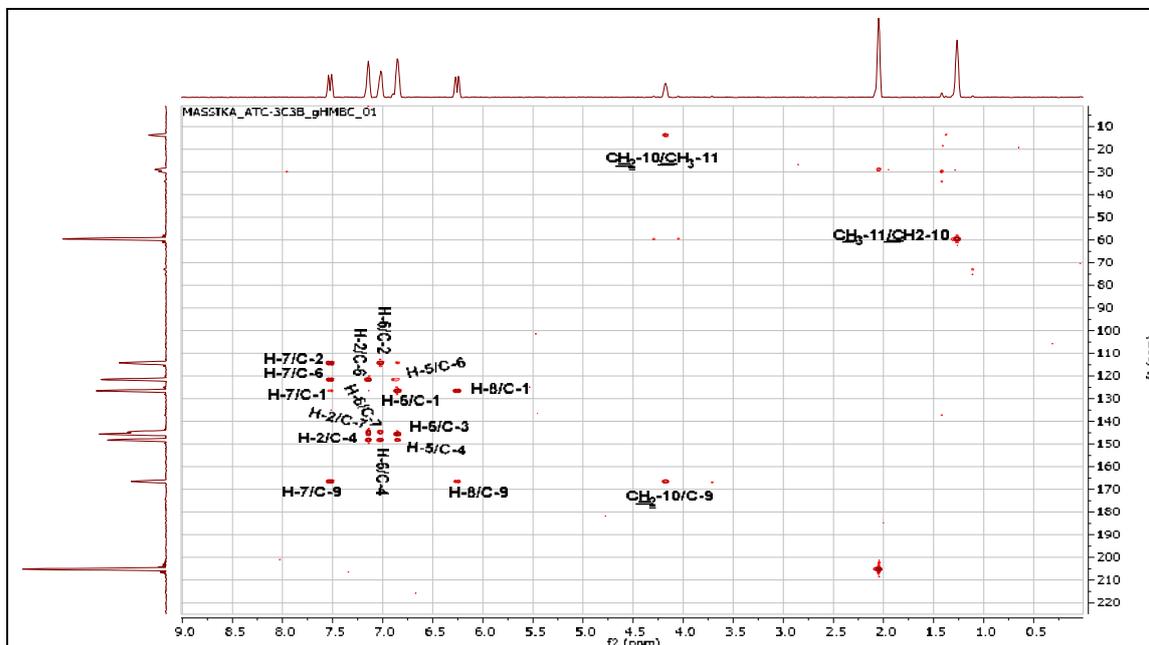


Figure III.48: Spectre RMN 2D HMBC (600 MHz, acétone-d₆, δ ppm) du composé A6

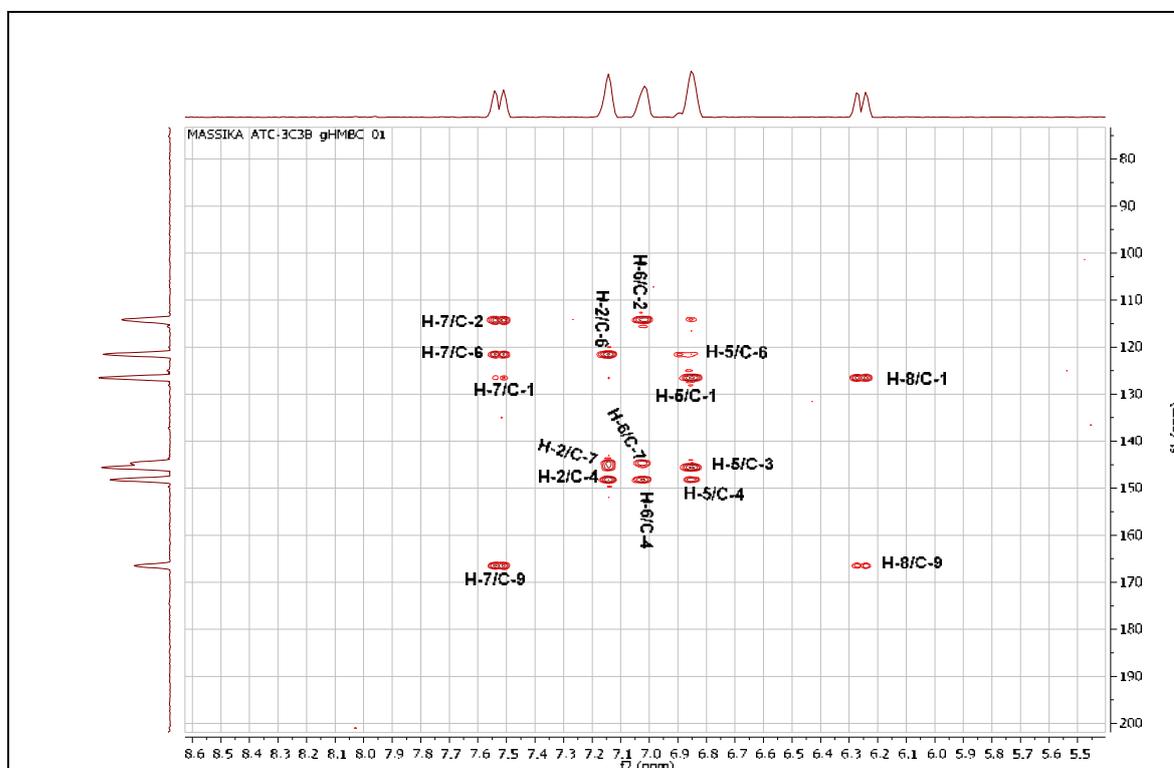


Figure III.48a: Spectre RMN 2D HMBC (600 MHz, acétone-d₆, δ ppm) étalé (^1H : 5,4-8,6 ppm; ^{13}C : 75-200 ppm) du composé A6

L'ensemble des données de spectroscopie RMN du composé A6 sont reportées dans le tableau III.8.

Tableau III.8 : Déplacements chimiques en RMN ^{13}C et RMN ^1H du composé A6 dans acétone- d_6

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm, multiplicité, J en Hz)
1	126,51	/
2	114,16	7,14 (1H; <i>SI</i>)
3	145,59	/
4	148,18	/
5	115,46	6,85 (1H; <i>d</i> ; 8,2)
6	121,53	7,02 (1H; <i>dl</i> ; 8,2)
7	144,67	7,52 (1H; <i>d</i> ; 15,9)
8	114,66	6,26 (1H; <i>d</i> ; 15,9)
9	166,47	/
10	59,52	4,17 (2H; <i>q</i> ; 7,25)
11	13,75	1,27 (3H; <i>t</i> ; 7,25)

Par comparaison avec les données de la littérature [16, 17], la structure du composé A6 correspond à un ester de l'acide caféique: **le cafféate d'éthyle** ou **ester éthylique d'acide caféique**. Cette molécule possède un effet antidiabétique [18] et anti-inflammatoire [19].

Le chromatogramme ci-dessous représente l'identification du produit A6 dans l'extrait ACOEt par HPLC-TOF/MS en mode négatif.

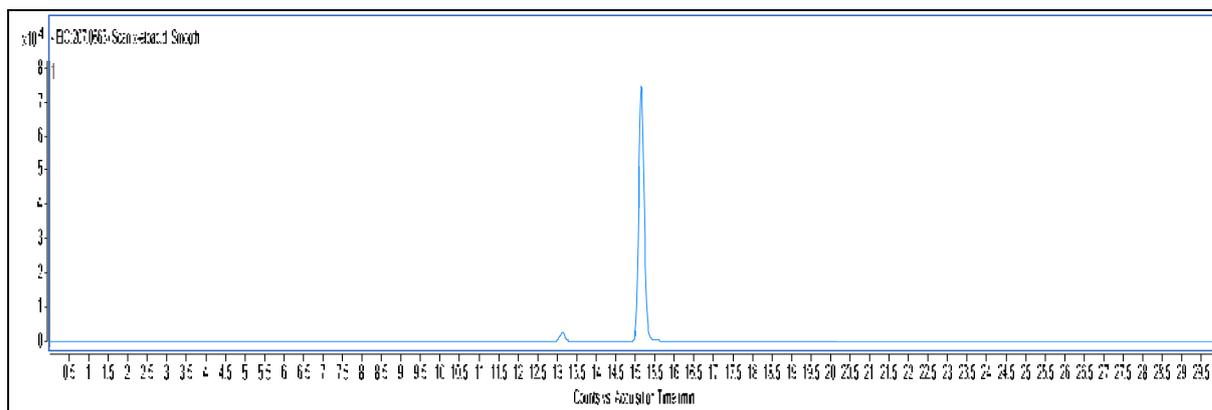


Figure III.49: Chromatogramme d'identification du produit A6 dans l'extrait ACOEt par HPLC-TOF/MS en mode négatif

III.2.1.7. Elucidation structurale du composé A7 (ATC3c5b1)

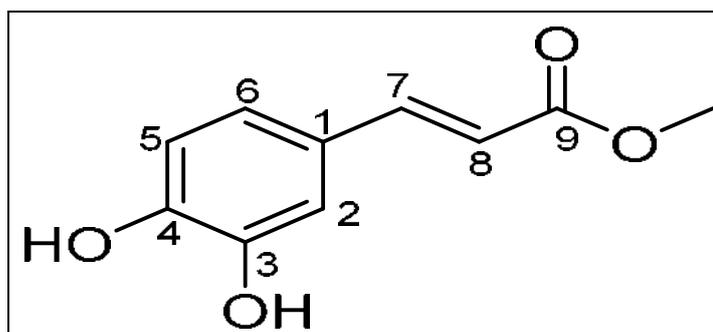


Figure III.50: Structure du composé A7

Le composé A7 se présente sous forme de cristaux jaune pâle, a une masse de 194 uma comme l'atteste, sur le spectre EI-MS en mode négatif (figure III.51), la présence de l'ion à m/z 193,60 $[M-H]^-$. Les spectres de RMN ^{13}C (figure III.52 et III.52a) et de DEPT 135 (figure III.53 et III.53a) indiquent la présence de 10 atomes de carbone parmi lesquels trois méthines aromatiques à $[\delta_C$ 114,24 ppm, 115,45 ppm et 121,61ppm], quatre atomes de carbone quaternaires à $[\delta_C$ 126,65 ppm, 145,43 ppm, 147,90 ppm et 166,91 ppm], deux groupements CH éthyléniques à δ_C 114,39 ppm et δ_C 144,81ppm et un groupement méthoxyle à δ_C 55,57 ppm. L'ensemble de ces données permet d'attribuer à ce composé la formule moléculaire brute $C_{10}H_{10}O_4$ avec un nombre d'insaturation égal à 6.

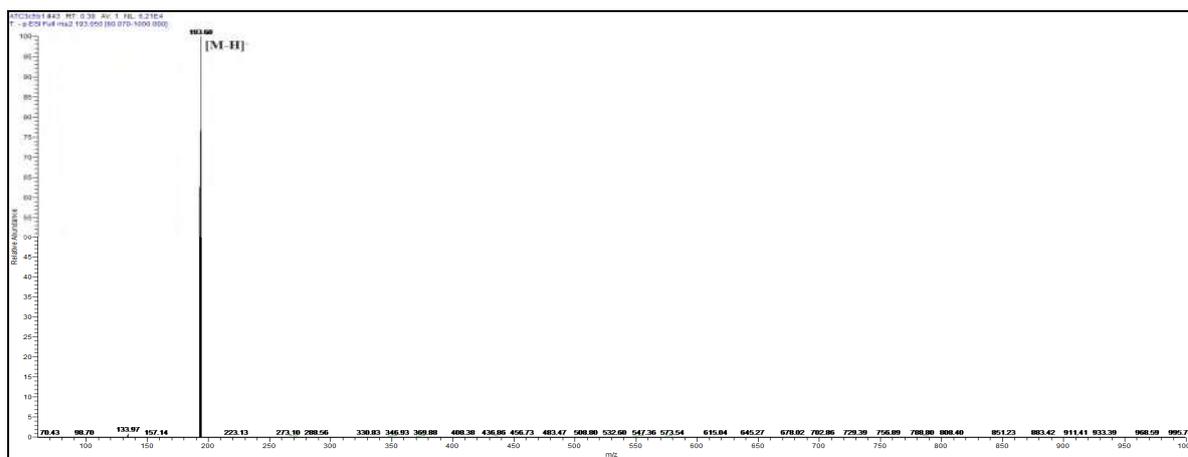


Figure III.51: Spectre de masse ESI-MS en mode négatif du composé A7

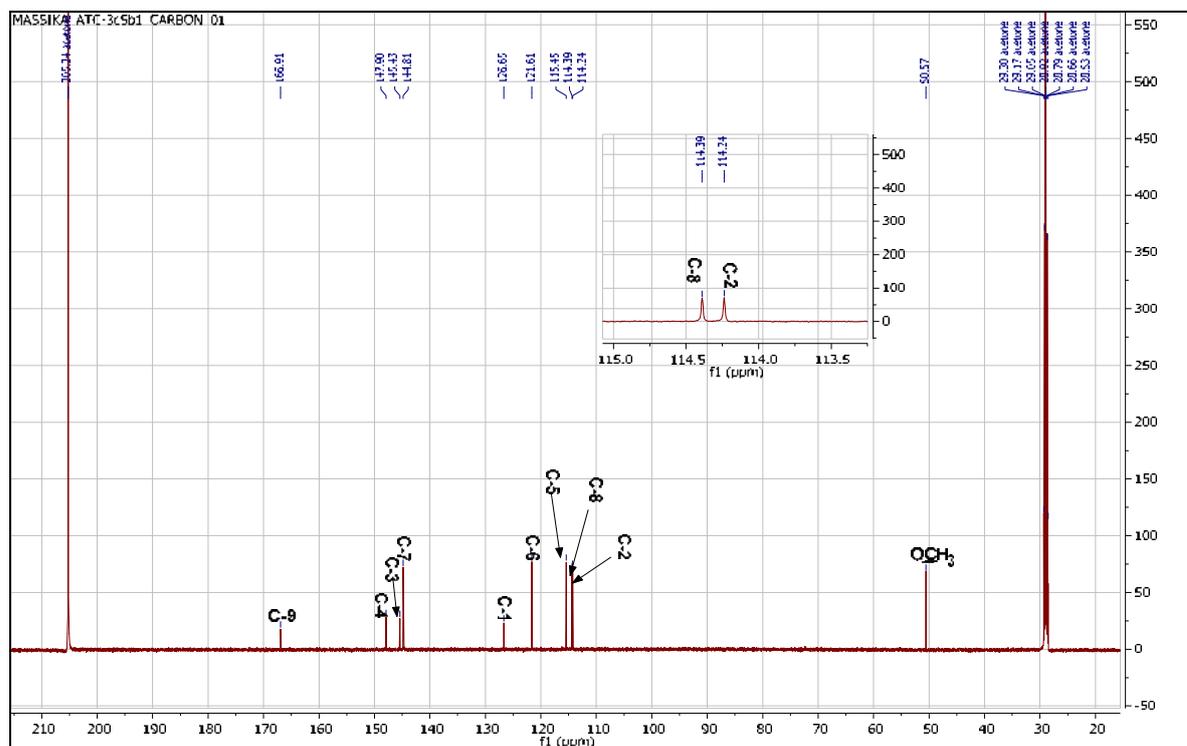


Figure III.52: Spectre RMN ^{13}C (150 MHz, acétone- d_6 , δ ppm) du composé A7

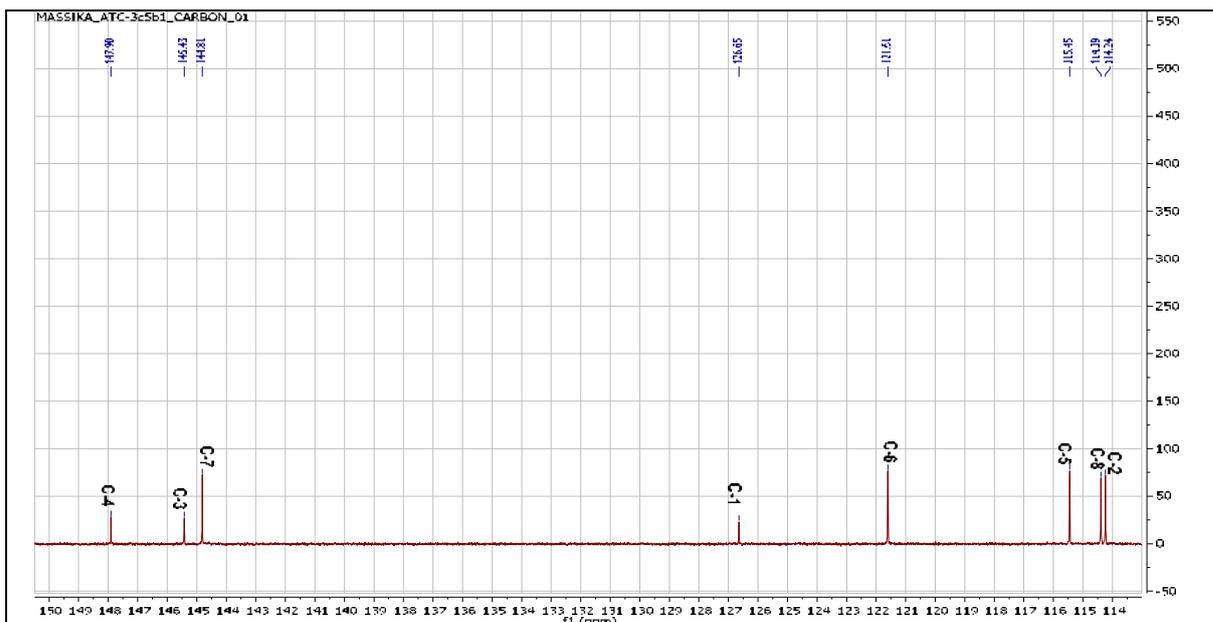


Figure III.52a: Spectre RMN ^{13}C (150 MHz, acétone- d_6 , δ ppm) étalé de 113 à 150 ppm du composé A7

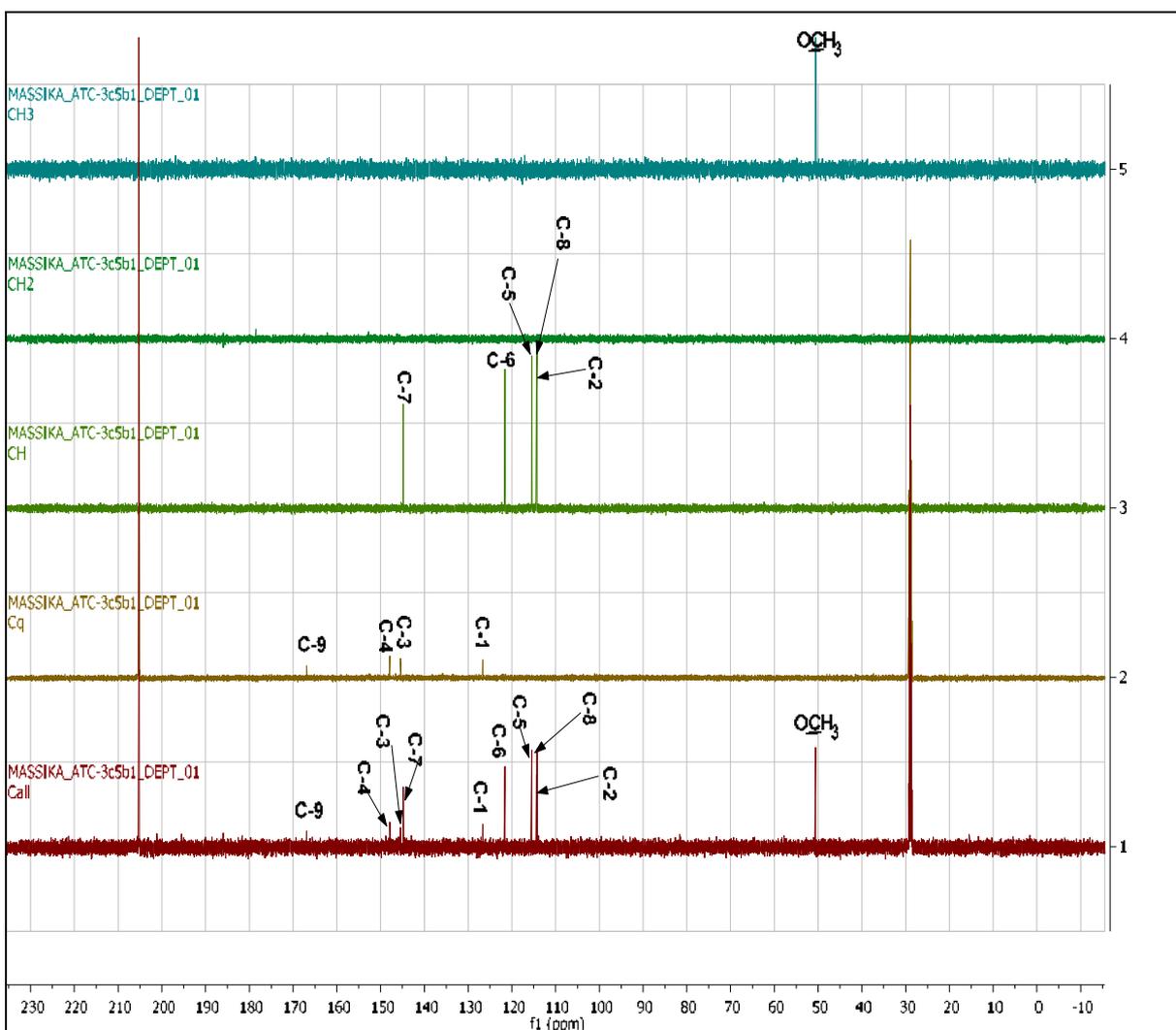


Figure III.53: Spectre DEPT(150 MHz, acétone- d_6 , δ ppm) du composé A7

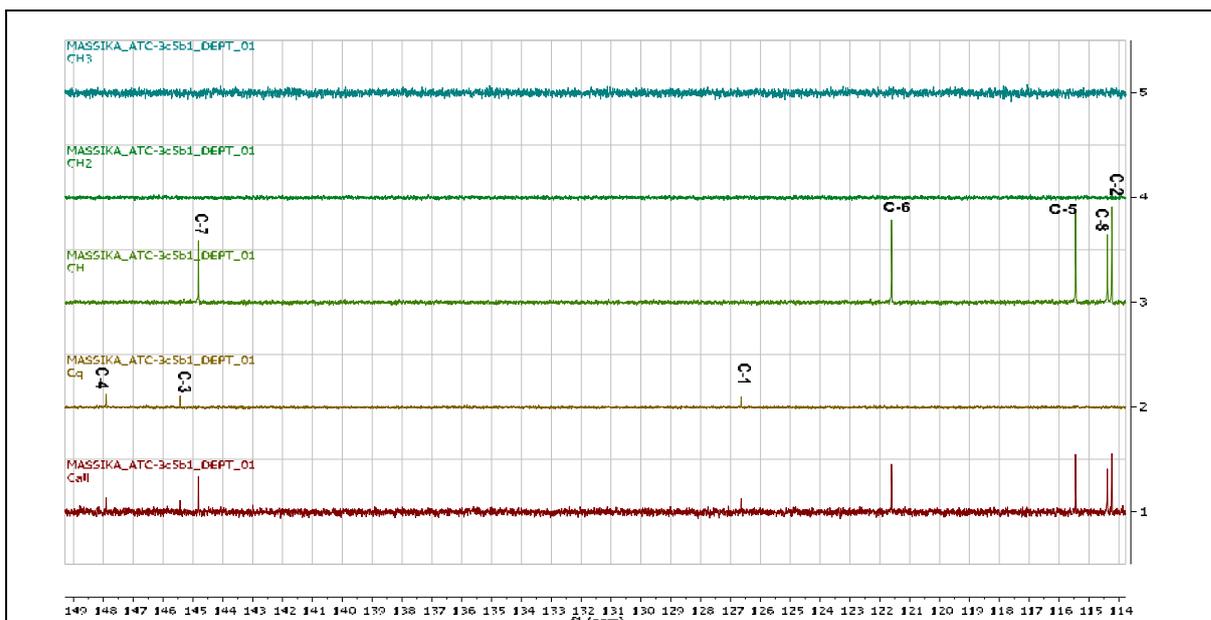


Figure III.53a: Spectre DEPT(150 MHz, acétone-d₆, δ ppm) étalé de 114 à 149 ppm du composé A7

Le spectre RMN monodimensionnel du proton (figure III.54 et III.54a) indique la présence de deux protons éthyléniques résonant à δ_H 6,28 ppm (*d*, $J= 15,9$ Hz, H-8) et à δ_H 7,53 ppm (*d*, $J= 15,9$ Hz, H-7). La constante de couplage de 15,9 Hz est caractéristique de deux protons trans d'une double liaison de configuration E. Ce spectre montre aussi la présence de trois protons dans la zone des aromatiques à δ_H 6,86 ppm (*d*, $J= 8,2$ Hz, H-5); 7,04 ppm (*dl*, $J= 8,2$ Hz, H-6); 7,15 ppm (*Sl*, H-2)] correspondant à un cycle benzénique trisubstitué aux positions 1, 3 et 4. Un singulet à δ_H 3,71 ppm (3H) caractéristique d'un groupement méthoxyle.

L'attribution des déplacements chimiques des protons est corroborée par l'expérience homonucléaire COSY (figure III.55), qui montre bien que le proton H-6 à δ_H 7,04 ppm est corrélé avec le proton H-5 situé à δ_H 6,86 ppm, ainsi que le proton H-7 à δ_H 7,53 ppm est corrélé avec le proton H-8 résonant δ_H 6,28 ppm.

La mesure du spectre de corrélations hétéronucléaires HSQC (figure III.56) a conduit à l'établissement des connections géminales 1H - ^{13}C -RMN du composé A7. Il a pu être démontré que les protons aromatiques localisés à δ_H 7,15 ppm, δ_H 7,04 ppm et δ_H 6,86 ppm, corrént avec les carbones tertiaires respectivement situés à δ_C 114,24 ppm, δ_C 121,61 ppm et δ_C 115,45 ppm. Sur le même spectre, les deux protons oléfiniques situés à δ_H 6,28 et δ_H 7,53 ppm donnent des corrélations avec les carbones respectivement situés à δ_C 114,39 ppm et δ_C 144,81 ppm. De plus, le spectre RMN de corrélations hétéronucléaires à courte distance HSQC donne une valeur de déplacement de δ_C 50,57 ppm pour les protons du groupement méthoxyle.

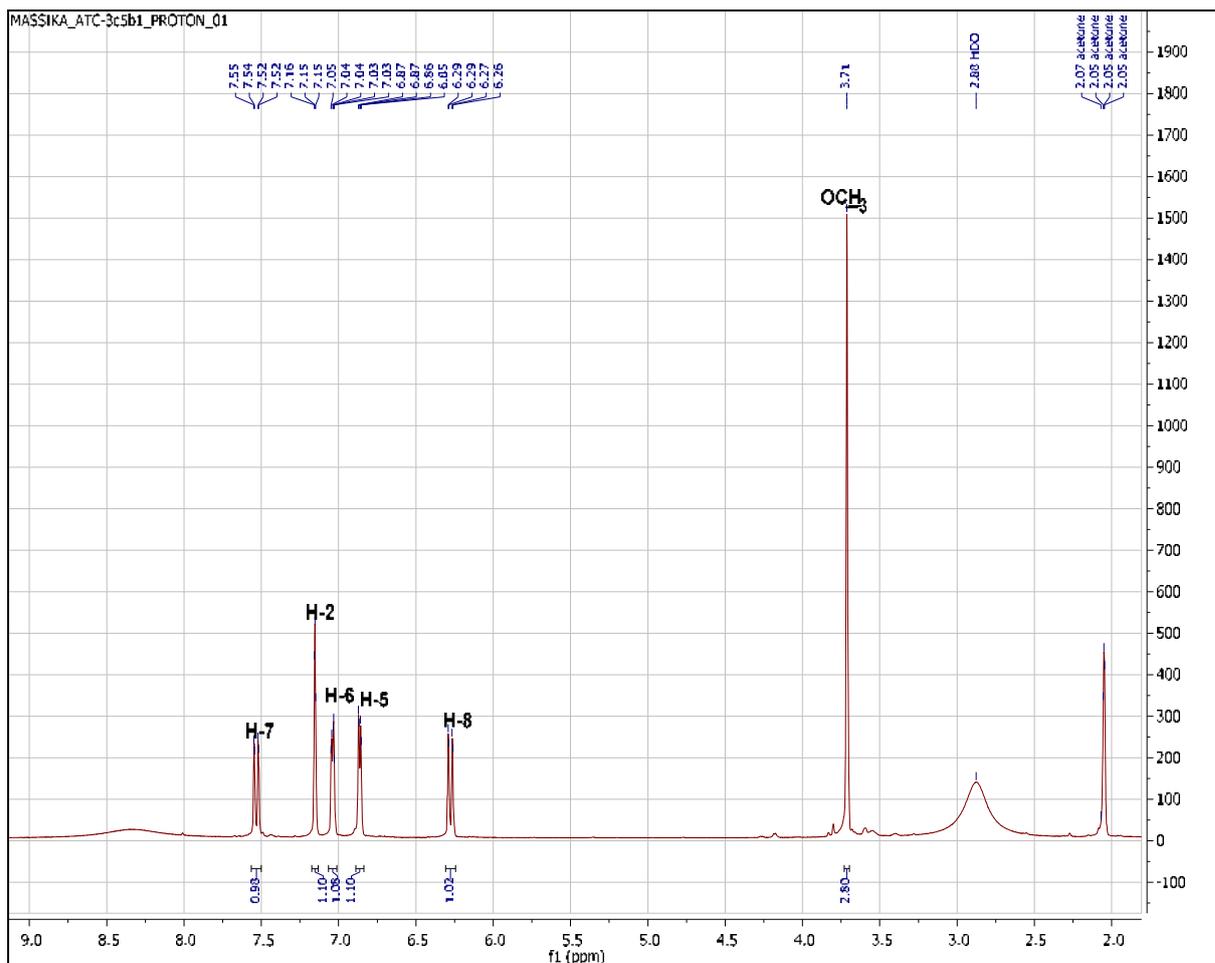


Figure III.54: Spectre RMN ^1H (600 MHz, acétone- d_6 , δ ppm) du composé A7

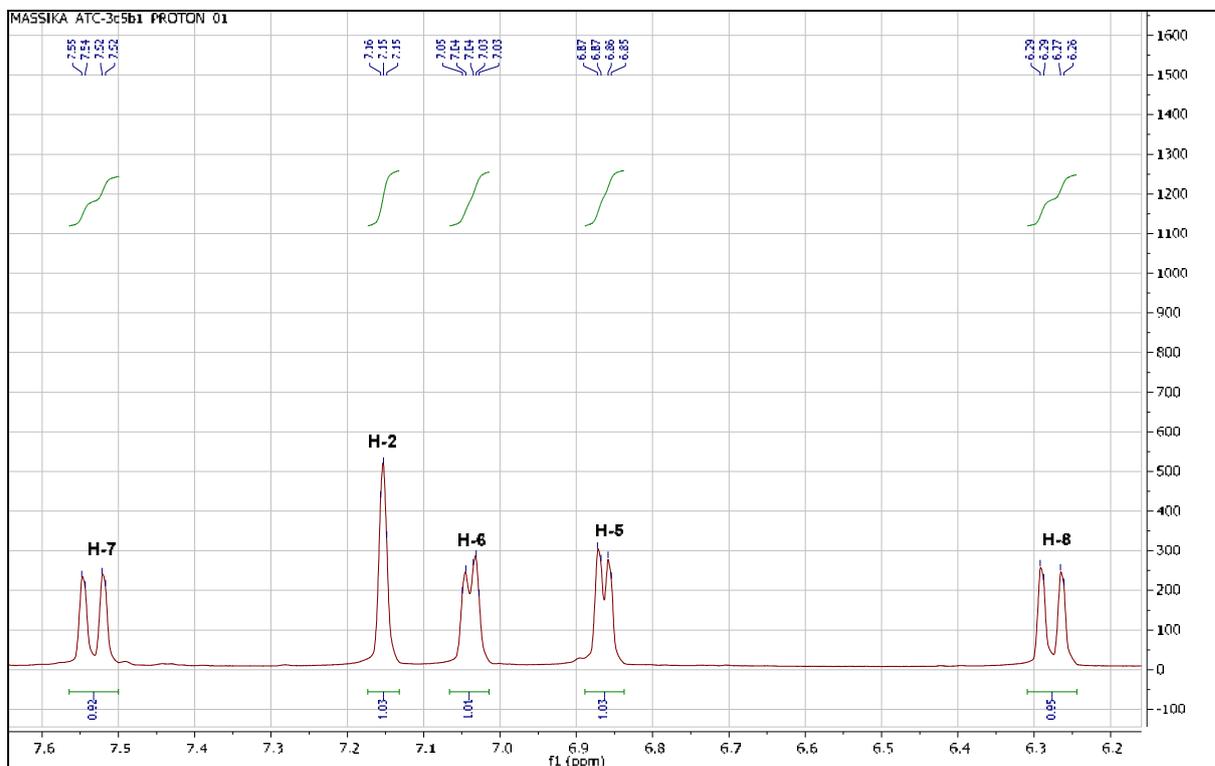


Figure III.54a: Spectre RMN ^1H (600 MHz, acétone- d_6 , δ ppm) étalé de 6,2 à 7,6 ppm du composé A7

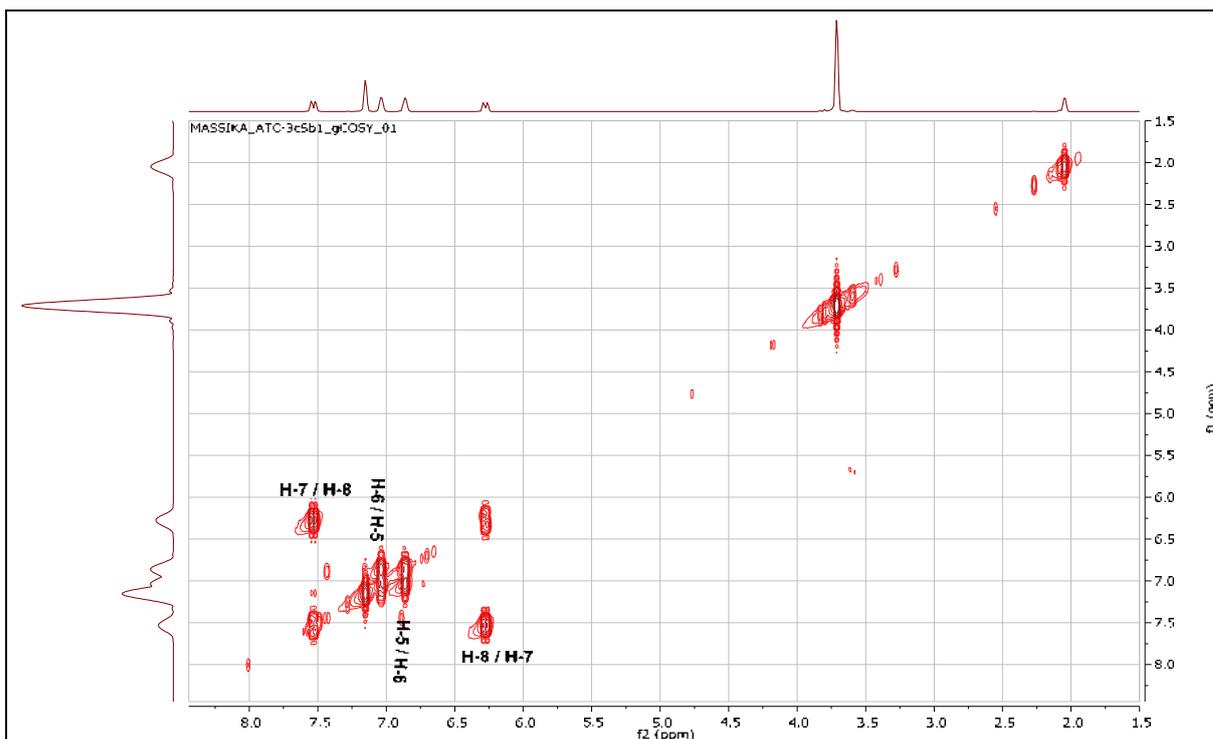


Figure III.55: Spectre RMN 2D COSY (600 MHz, acétone-d₆, δ ppm) du composé A7

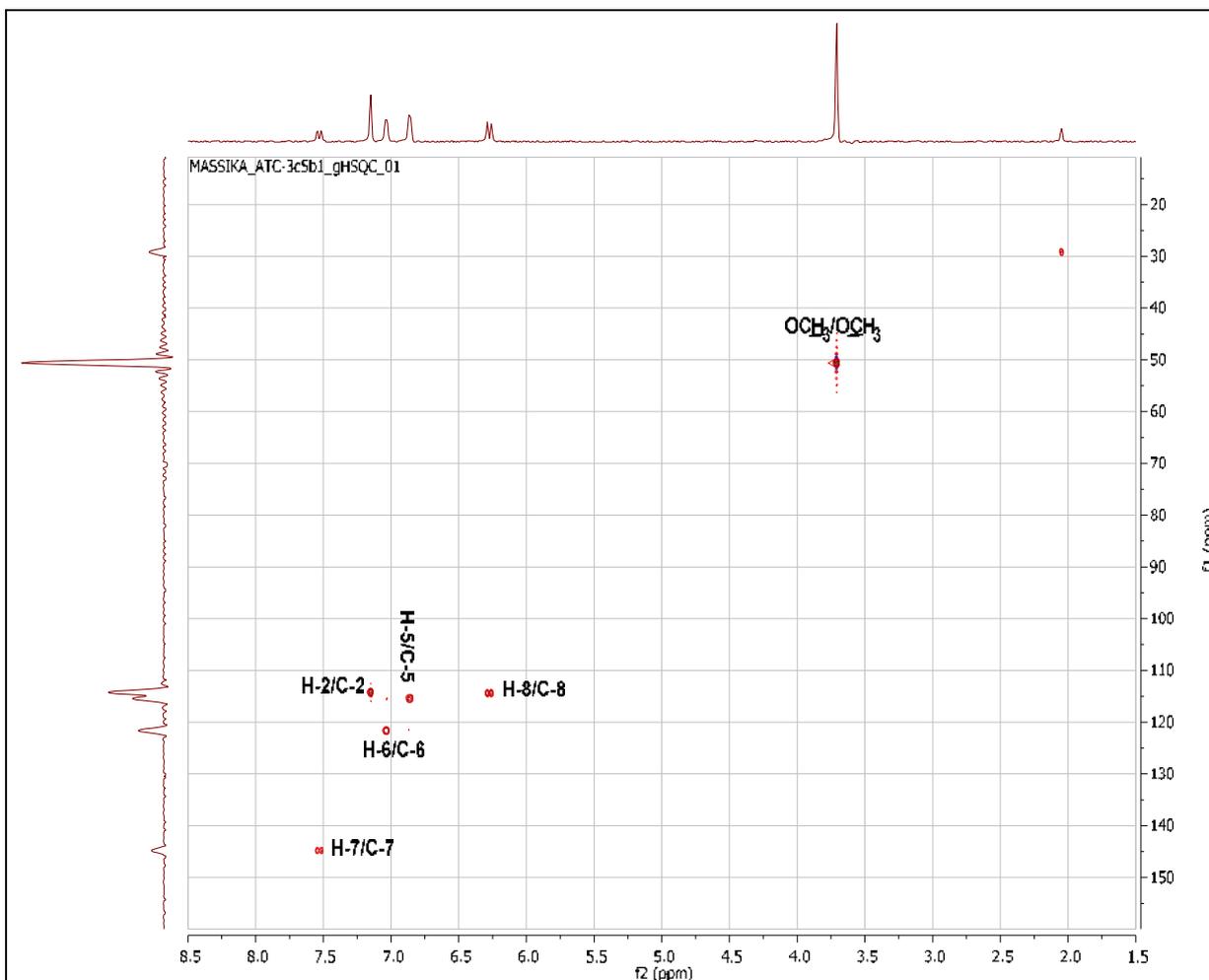


Figure III.56: Spectre HSQC (600 MHz, acétone-d₆, δ ppm) du composé A7

Une étude de spectre de l'expérience HMBC (figure III.57) permet d'attribuer les carbones quaternaires restants:

- Trois taches de corrélation entre H-7, H-8 et les protons du groupement méthoxyle et un atome de carbone quaternaire résonant à δ_C 166,91 ppm qui ne peut être attribuer qu'au carbone C-9.
- Trois taches de corrélation entre H-5, H-7 et H-8 et un atome de carbone quaternaire résonant à δ_C 126,65 ppm, ne pouvant être que le carbone C-1.
- Trois taches de corrélation entre H-2, H-5 et H-6 et un atome de carbone résonant à δ_C 147,90 ppm attribuable à C-4.
- Une tache de corrélation entre H-5 et un atome de carbone résonant à δ_C 145,43 ppm qui ne peut être que le C-3.

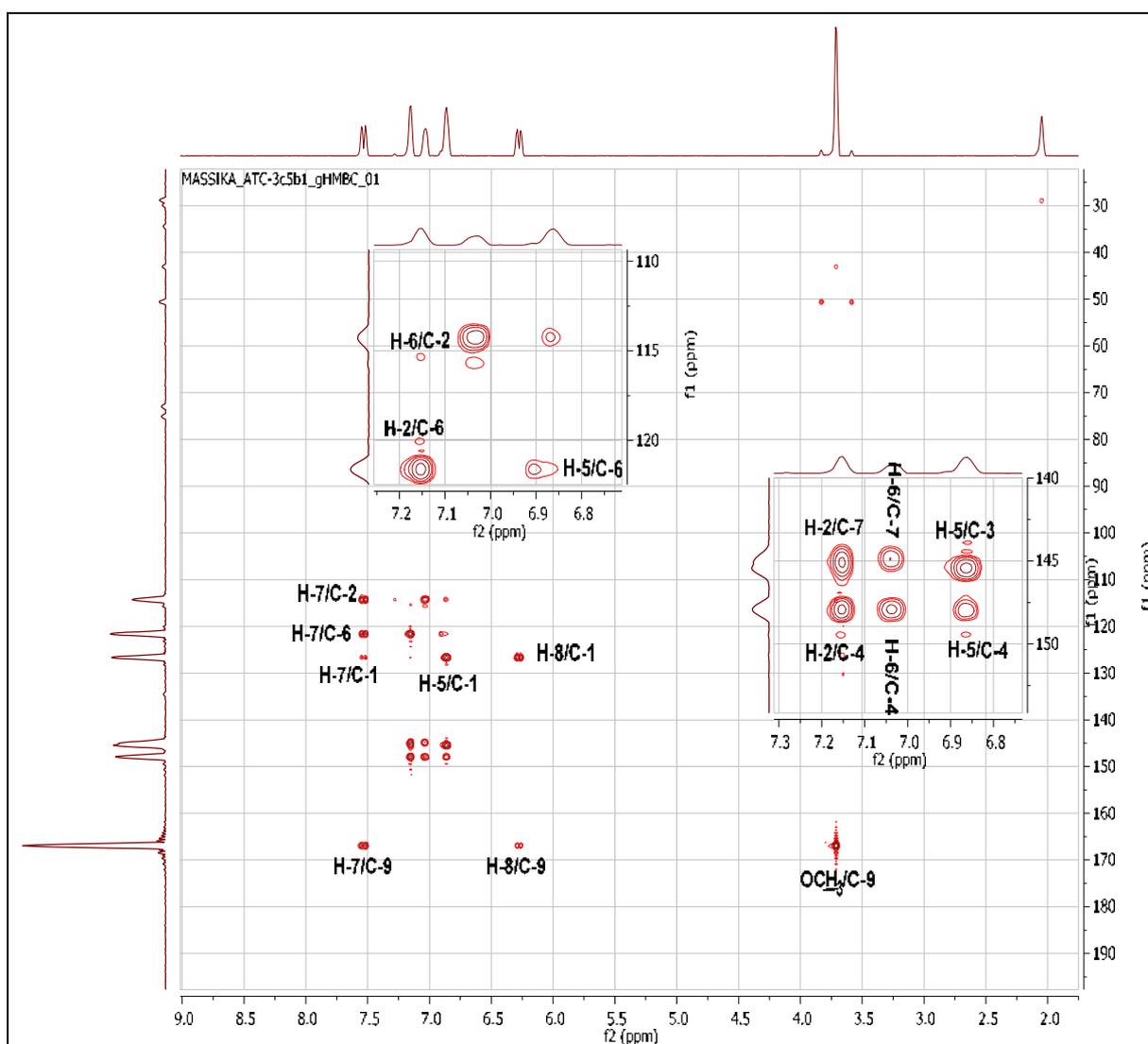


Figure III.57: Spectre RMN 2D HMBC (600 MHz, acétone-d₆, δ ppm) du composé A7

Les données spectroscopiques RMN¹H et RMN¹³C sont rassemblées dans le tableau III.8.

Tableau III.9 : Données spectroscopique RMN ¹H et RMN ¹³C du composé A7 dans acétone-d₆

Position	δ _C (ppm)	δ _H (ppm, multiplicité, <i>J</i> en Hz)
1	126,65	/
2	114,24	7,15 (1H; <i>SI</i>)
3	145,43	/
4	147,90	/
5	115,45	6,86 (1H; <i>d</i> ; 8,2)
6	121,61	7,04 (1H; <i>d</i> ; 8,2)
7	144,81	7,53 (1H; <i>d</i> ; 15,9)
8	114,39	6,28 (1H; <i>d</i> ; 15,9)
9	166,91	/
OCH ₃	50,57	3,71 (3H; <i>S</i>)

En comparant les données avec la littérature [17], le composé A7 a été identifié comme étant **le cafféate de méthyle** ou **ester méthylique de l'acide caféique**. Des activités antidiabétiques [18] et anti-inflammatoires [20] de ce composé ont été décrites dans la littérature.

Le chromatogramme d'identification du produit A7 dans l'extrait ACOEt par HPLC-TOF/MS en mode négatif est présenté dans la figure III.58.

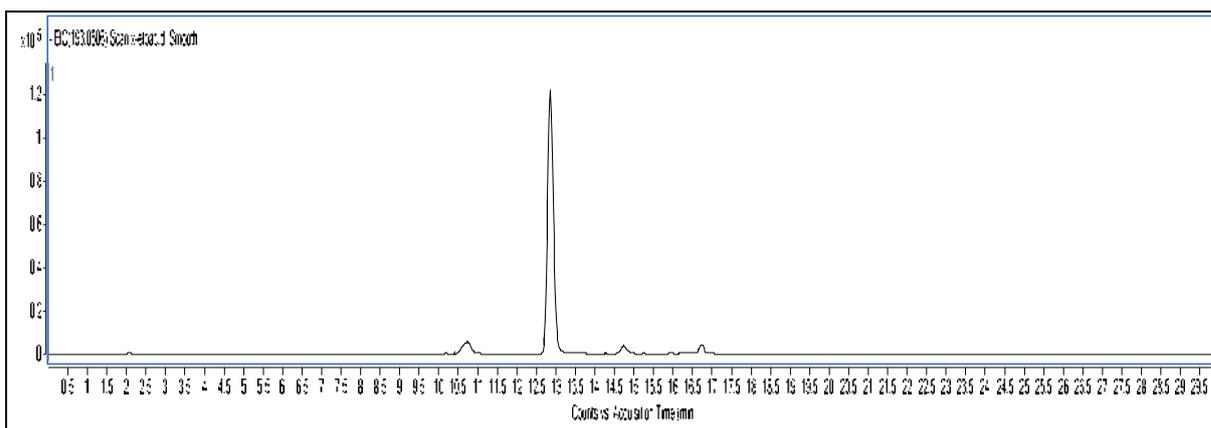


Figure III.58: Chromatogramme d'identification du produit A7 dans l'extrait ACOEt par HPLC-TOF/MS en mode négatif

III.2.1.8. Elucidation structurale du composé A8 (ATC2d3a)

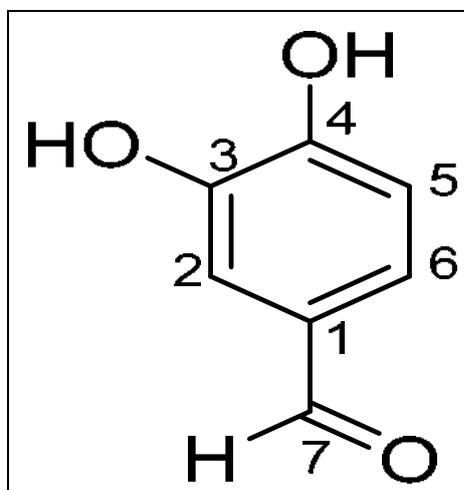


Figure III.59: Structure du composé A8

Le composé A8 a été isolé sous forme d'aiguilles de couleur jaune pâle.

Le spectre de masse ESI-MS de ce composé (figure III.60) en mode négatif présente un pic d'ion pseudo-moléculaire à $m/z = 137,89$ $[M-H]^-$ qui suggère une masse moléculaire de 138 uma correspondant à la formule brute $C_7H_6O_3$ avec un degré d'insaturation de 5.

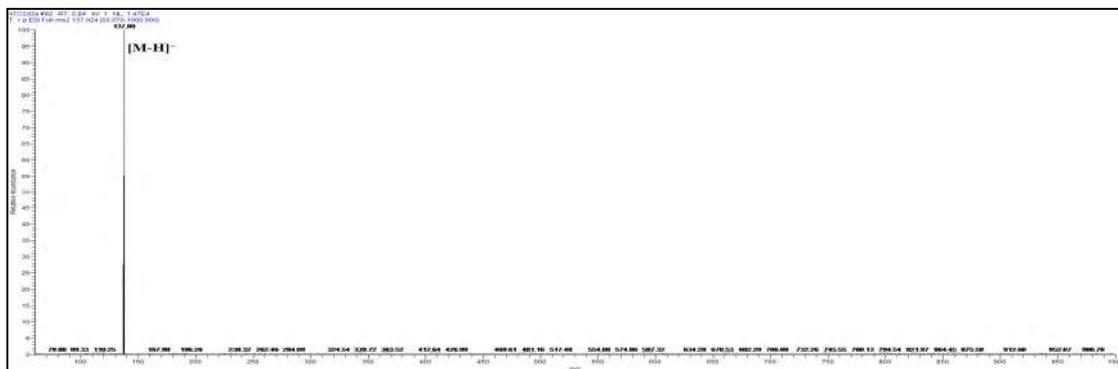


Figure III.60: Spectre de masse ESI-MS en mode négatif du composé A8

L'étude du spectre RMN 1H (figure III.61 et III.61a) de ce composé a permis de mettre en évidence dans la région aromatique la présence de trois protons différents :

le signal à δ_H 7,36-7,34 ppm, d'intégration 2H attribuable à H-2 et H-6. Ce signal correspond en fait à deux signaux superposés l'un deux sous forme d'un singulet large à δ_H 7,36 ppm caractérisant H-2 et l'autre sous forme d'un doublet large à δ_H 7,34 ppm ($J = 8,0$ Hz) caractérisant H-6. Par ailleurs, le signal sous forme de doublet ($J = 8,0$ Hz) qui apparaît à δ_H 7,00 ppm, est attribuable à H-5. Ces constantes de couplage sont en faveur d'un noyau aromatique tri-substitué dans les positions 1, 3 et 4. Ces résultats sont confirmés par la mesure du spectre COSY, (figure III.62), où l'on observe des crêtes de corrélation entre le proton situé à δ_H 7,00 ppm et celui résonnant 7,34 ppm.

Ce spectre montre également un signal très déblindé sous forme d'un singulet à δ_H 9,78 ppm d'intégration 1H caractéristique d'un groupement aldéhyde.

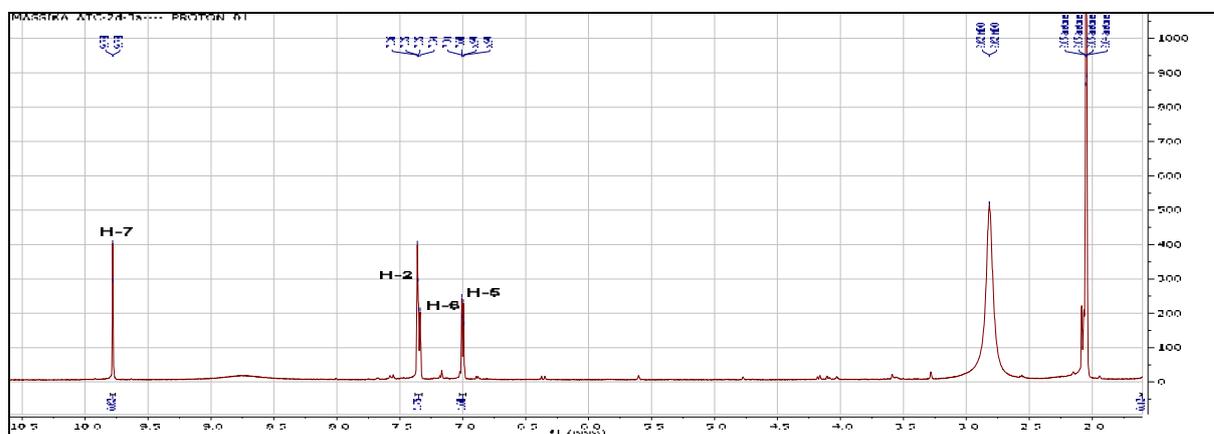


Figure III.61: Spectre RMN 1H (600 MHz, acétone- d_6 , δ ppm) du composé A8

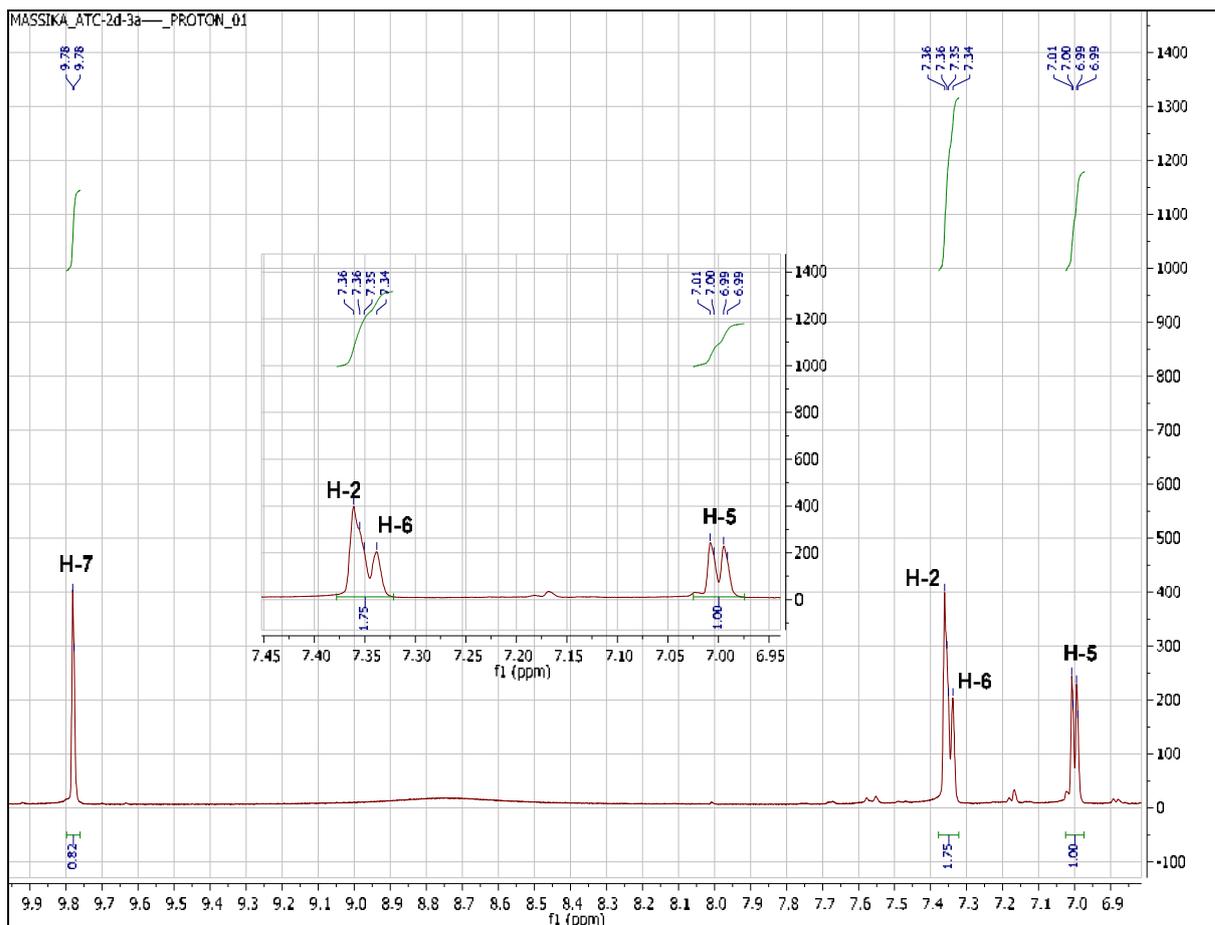


Figure III.61a: Spectre RMN ^1H (600 MHz, acétone- d_6 , δ ppm) étalé de 6,9 à 9,9 ppm du composé A8

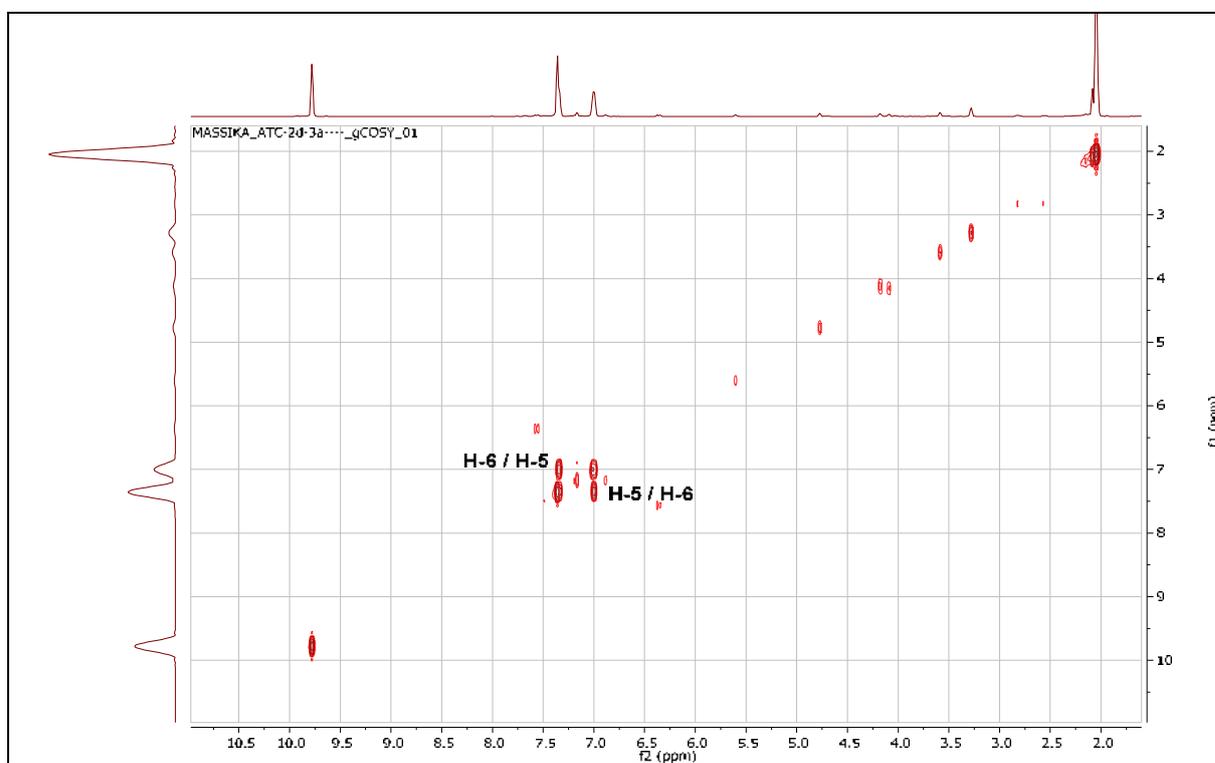


Figure III.62: Spectre RMN 2D COSY (600 MHz, acétone- d_6 , δ ppm) du composé A8

L'étude du spectre relatif à l'expérience HSQC (figure III.63) montre que :

- Le proton H-2 résonnant à δ_H 7,36 ppm corrèle avec le carbone C-2 résonnant à δ_C 114,24 ppm.
- Le proton H-6 résonnant à δ_H 7,34 ppm corrèle avec le carbone à δ_C 124,51 ppm attribuable à C-6.
- Le proton H-5 résonnant à δ_H 7,00 ppm corrèle avec le carbone C-5 résonnant à δ_C 115,23 ppm.

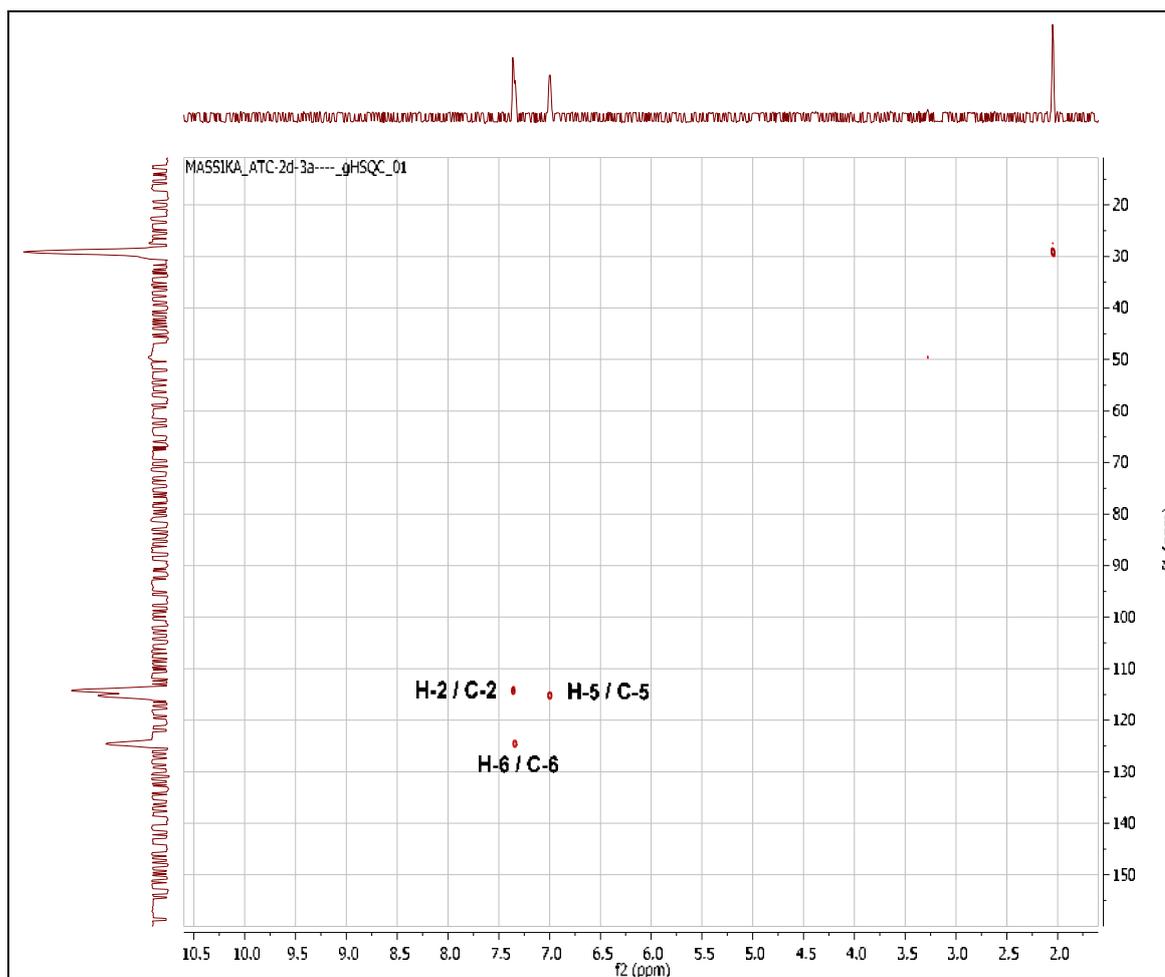


Figure III.63: Spectre HSQC (600 MHz, acétone-d₆, δ ppm) du composé A8

L'examen du spectre RMN ^{13}C (figure III.64) confirme toutes ces hypothèses et montre aussi la présence de trois carbones quaternaires aromatiques dont :

- Un carbone quaternaire aromatique à δ_C 130,09 ppm.
- Deux carbones quaternaires aromatiques oxygénés dont un à δ_C 151,43 ppm et l'autre à δ_C 145,56 ppm.

Cette expérience a montré aussi la présence d'un carbone très déblindé résonnant à δ_C 190,16 ppm caractéristique au carbonyle de la fonction aldéhyde attribuable à C-7.

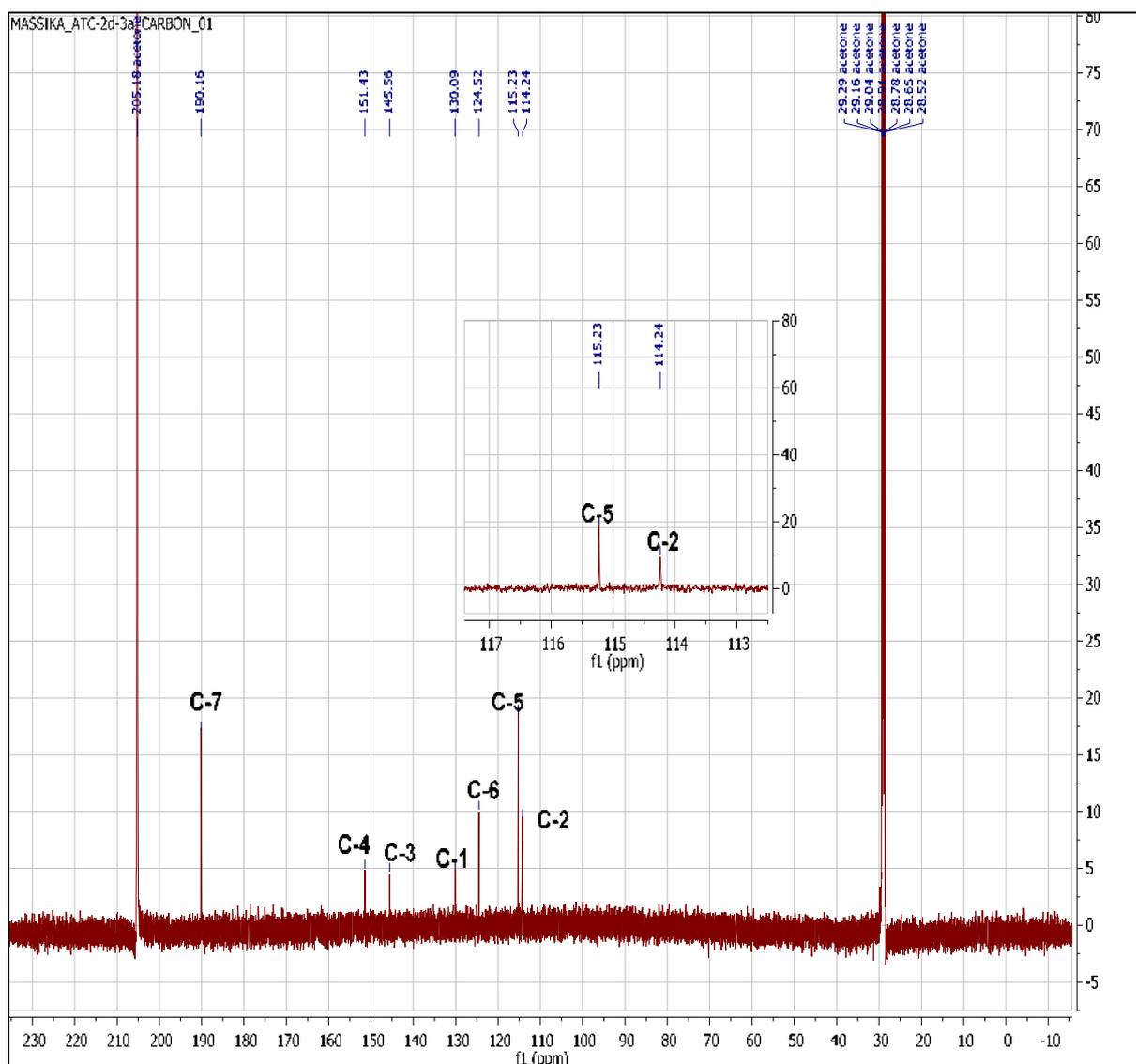


Figure III.64: Spectre RMN ^{13}C (150 MHz, acétone- d_6 , δ ppm) du composé A8

Les attributions des carbones restants ont été complétées par l'étude du spectre de corrélation hétéronucléaire à longue distance HMBC (figure III.65 et III.65a).

- Les protons H-2 et H-5 montrent:
 - ✓ Deux taches de corrélation avec le même atome de carbone situé à δ_{C} 151,43 ppm qui ne peut être attribuer qu'au carbone C-4.
 - ✓ Deux taches de corrélation avec un atome de carbone localisé à δ_{C} 145,56 ppm attribuable à C-3.
- Deux taches de corrélation entre les protons H-7 (le proton de la fonction aldéhyde) et H-5 et un atome de carbone à δ_{C} 130,09 ppm qui ne peut être que le C-1.

Les autres corrélations observées sur le spectre HMBC confirment l'attribution des déplacements chimiques des protons de la molécule.

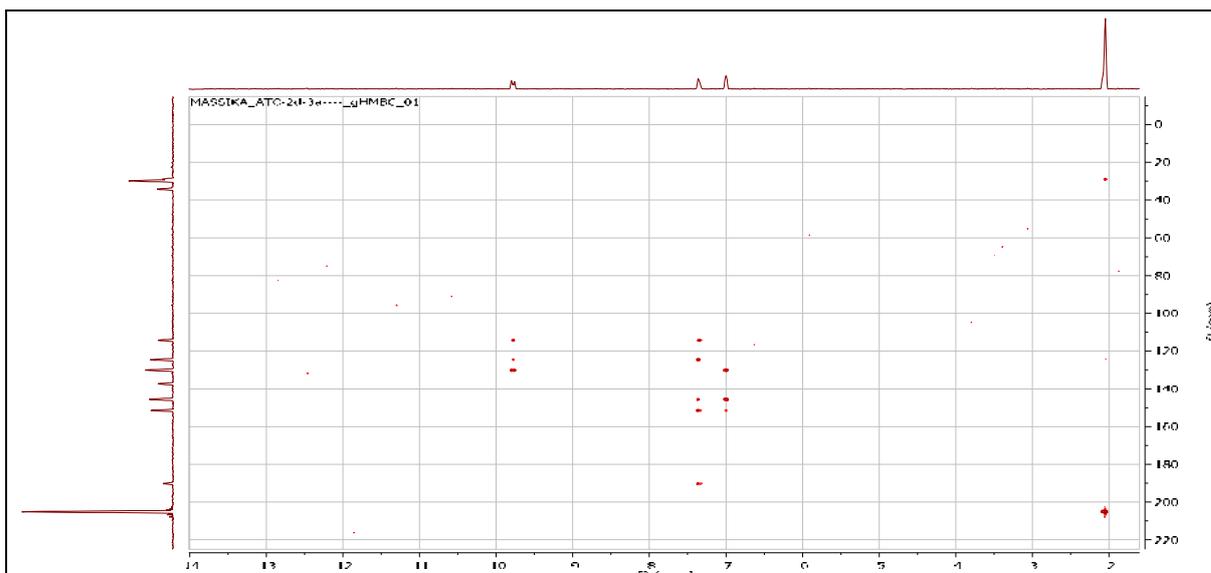


Figure III.65: Spectre RMN 2D HMBC (600 MHz, acétone-d₆, δ ppm) du composé A8

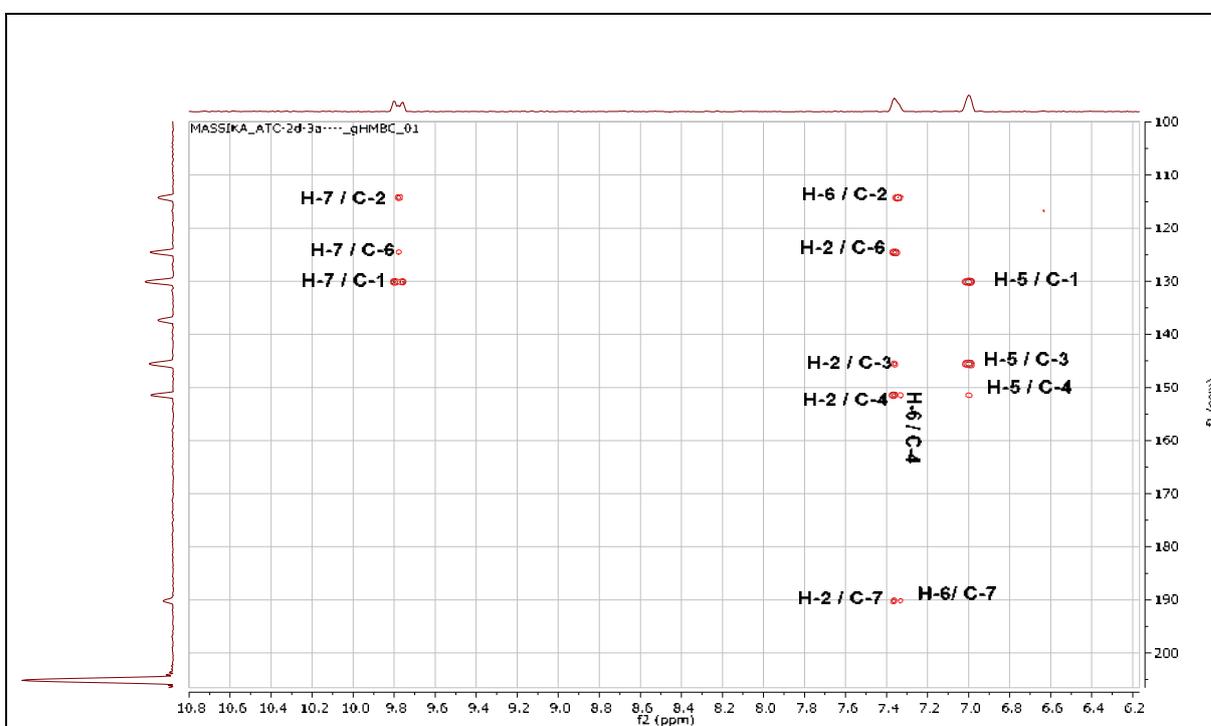


Figure III.65a: Spectre RMN 2D HMBC (600 MHz, acétone-d₆, δ ppm) étalé (¹H: 6,2-10,8 ppm; ¹³C: 100-205 ppm) du composé A8

Le tableau III.10 regroupe les attributions des différents signaux en RMN ¹³C et ¹H du composé A8 dans acétone-d₆.

Tableau III.10: Les données spectrales de RMN du composé A8 dans acétone-d₆.

Position	δ _C (ppm)	δ _H (ppm, multiplicité, J en Hz)
1	130,09	/
2	114,24	7,36 (1H; <i>Sl</i>)
3	145,56	/
4	151,43	/
5	115,23	7,00 (1H; <i>d</i> ; 8,0)
6	124,51	7,34 (1H; <i>dl</i> ; 8,0)
7	190,16	/

En comparant ces données avec celles de la littérature [21], le composé A8 est identifié comme étant l'aldéhyde protocatéchique ou 3,4-dihydroxybenzaldéhyde. Cette molécule présente des propriétés anti-athérosclérose [22], des effets antioxydants, anti-inflammatoires [23] et des propriétés antiprolifératives [24].

III.2.1.9. Elucidation structurale du composé A9 (ATC3C10A)

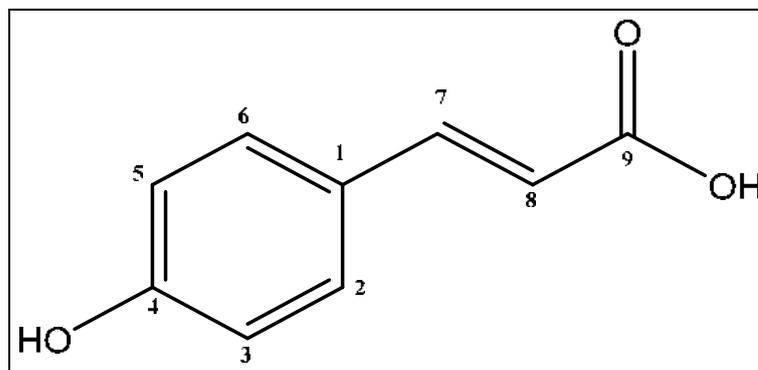


Figure III.66: Structure du composé A9

Le composé A9 se présente sous la forme de poudre jaune pâle, soluble dans le méthanol. Le spectre de masse ESI-MS du composé A9 (figure III.67) enregistré en mode négatif, indique la présence d'un pic d'ion pseudo-moléculaire à $m/z = 163,01$ $[M-H]^-$ correspondant à une masse moléculaire de 164 uma permettant de déduire la formule brute $C_9H_8O_3$ qui comporte 6 insaturations.

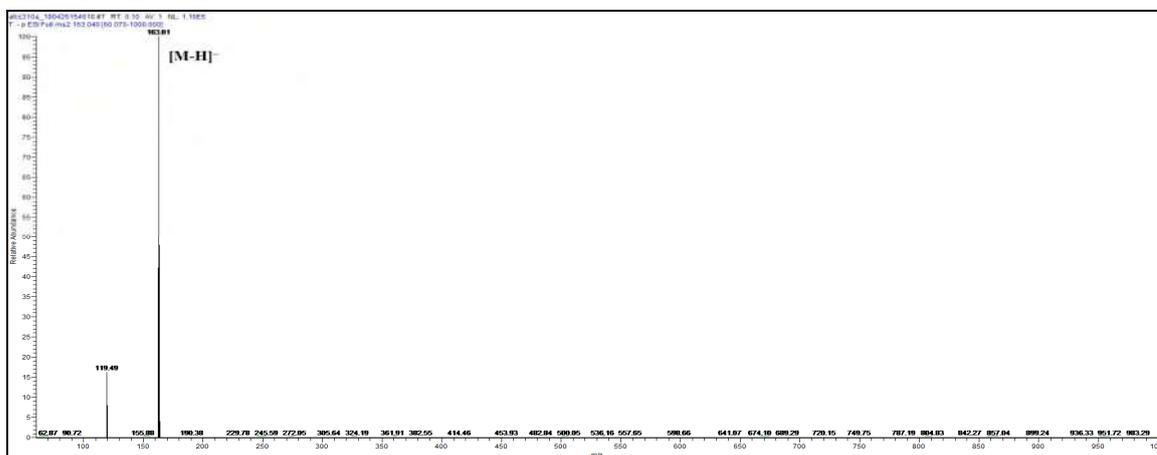


Figure III.67: Spectre de masse ESI-MS en mode négatif du composé A9

L'examen simultané des spectres RMN¹H (figure III.68, III.68a et III.68b), HSQC (figure III.69) et COSY (figure III.70) de ce composé permet de relever, dans cette molécule la présence de:

- un doublet ($J = 8,18$ Hz) d'intégration 2H à δ_H 7,35 ppm corrélant sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_C 128,61 ppm.

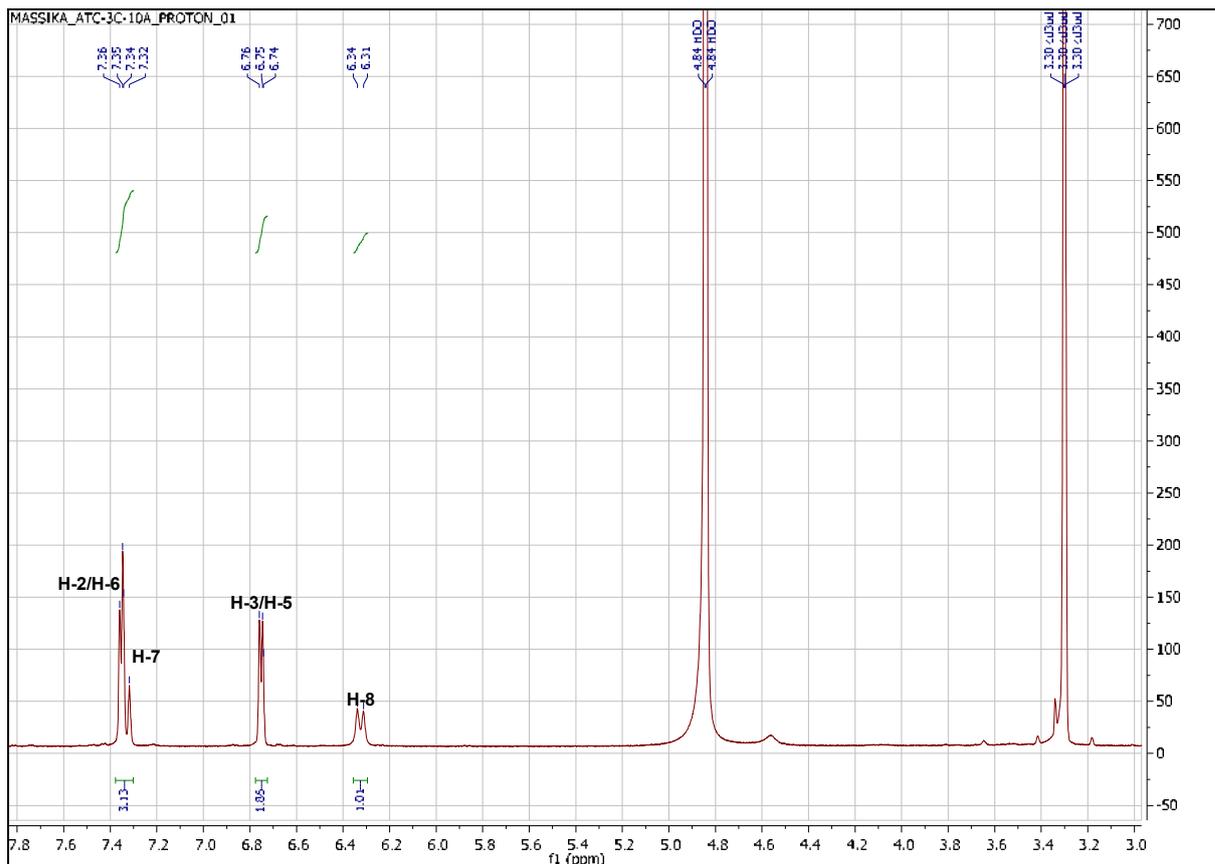


Figure III.68a: Spectre RMN ^1H (600 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) étalé de 2,0 à 8,2 ppm du composé A9

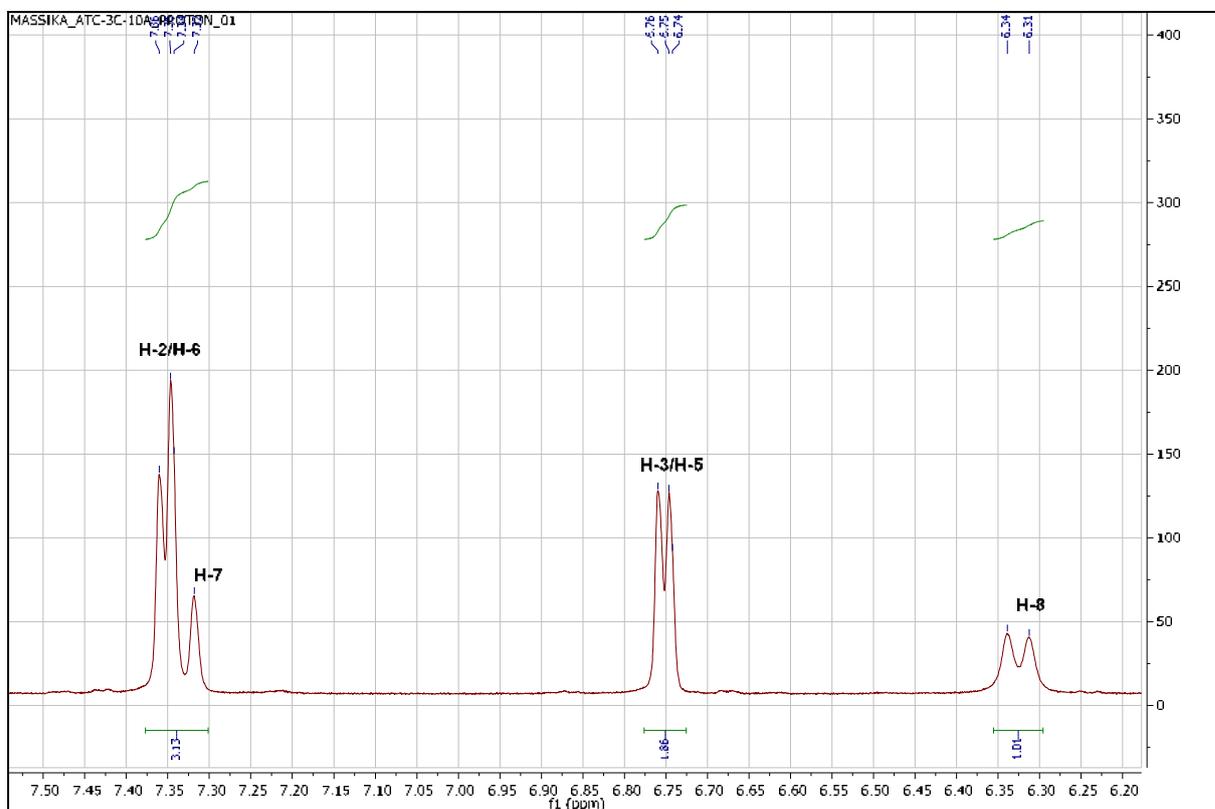


Figure III.68b: Spectre RMN ^1H (600 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) étalé de 6,20 à 7,50 ppm du composé A9

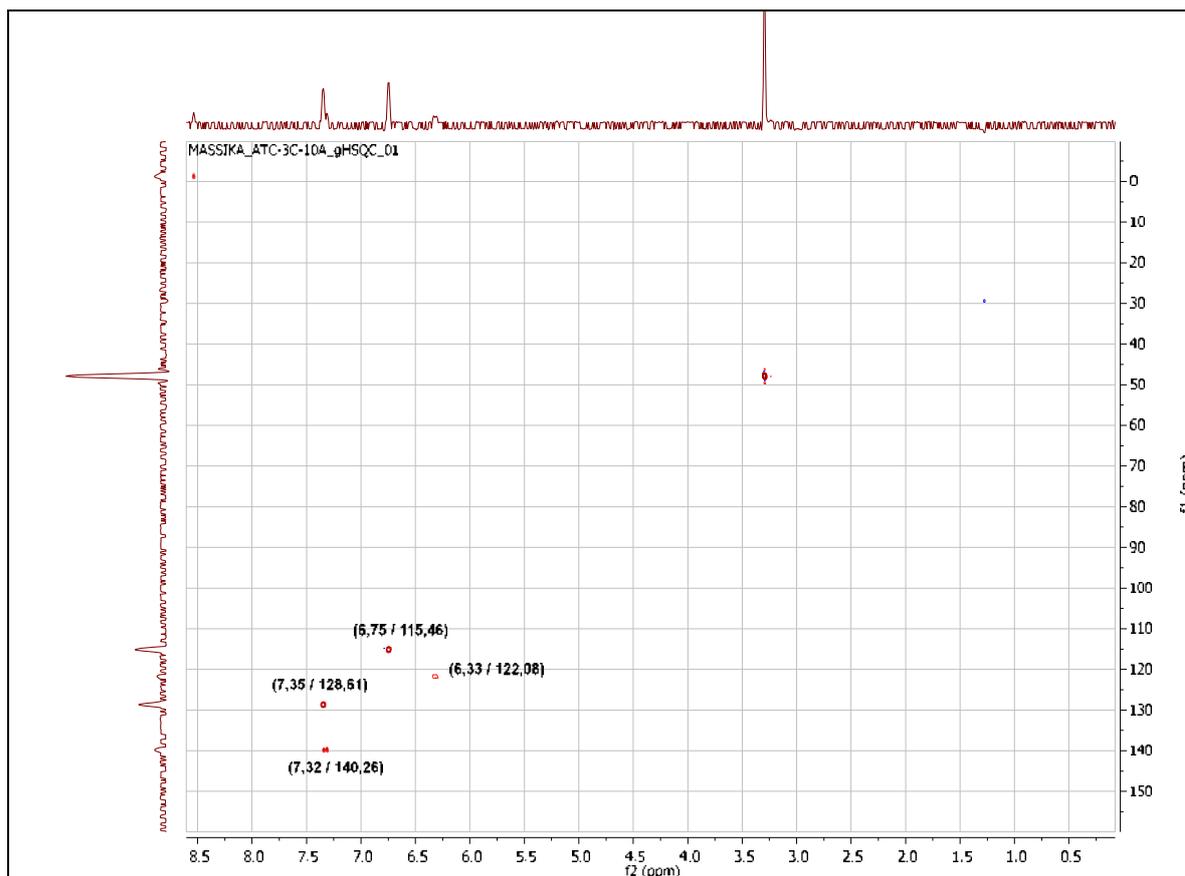


Figure III.69: Spectre RMN 2D HSQC (600 MHz, MeOH-d4, δ ppm) du composé A9

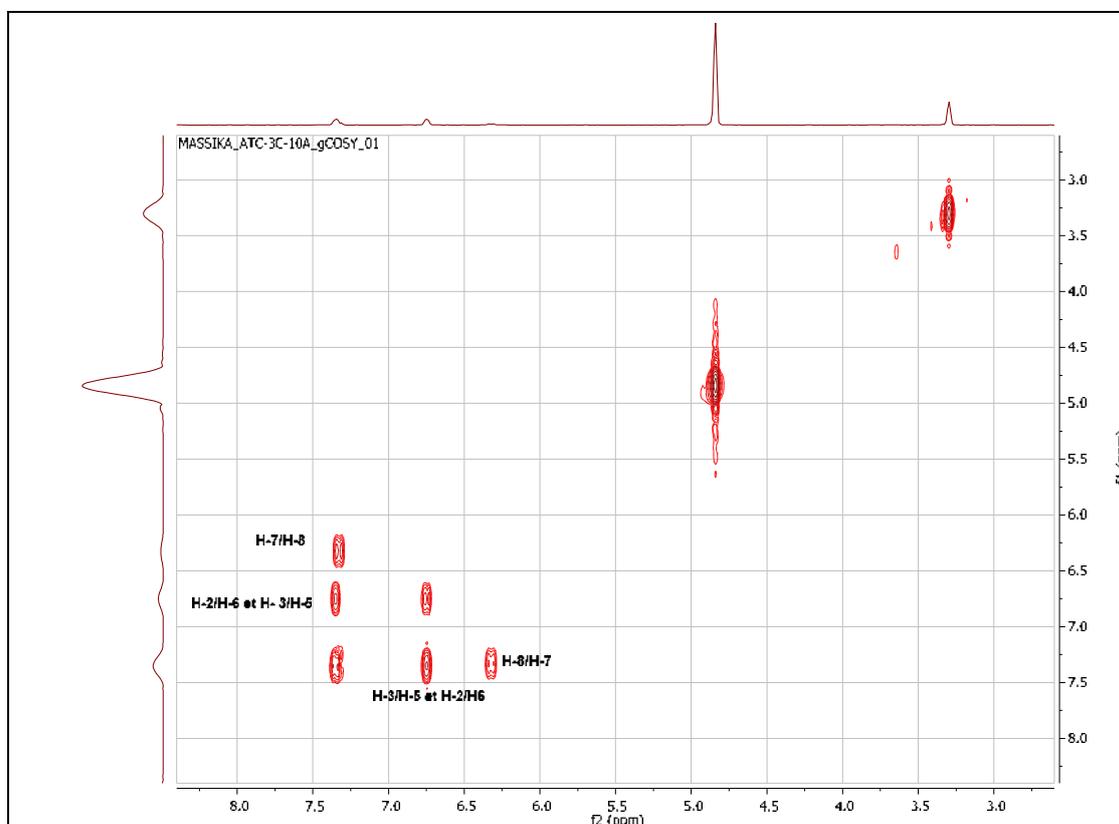


Figure III.70: Spectre RMN 2D COSY (600 MHz, MeOH-d4, δ ppm) du composé A9

Les attributions des différents pics sont confirmées par les corrélations longues distances de l'expérience HMBC (figure III.71). Cette expérience a permis de mettre en évidence des sommets de corrélation entre le proton résonnant à δ_H 7,35 ppm (H-2/H-6) et les carbones situés à δ_C 158,31 ppm (C-4) et 140,26 ppm (C-7), ainsi entre les protons résonnants à δ_H 7,32 ppm (H-7) et 6,75 ppm (H-3/H-5); et les carbones respectivement situés à δ_C 128,61 ppm (C-2/C-6) et 127,31 ppm (C-1).

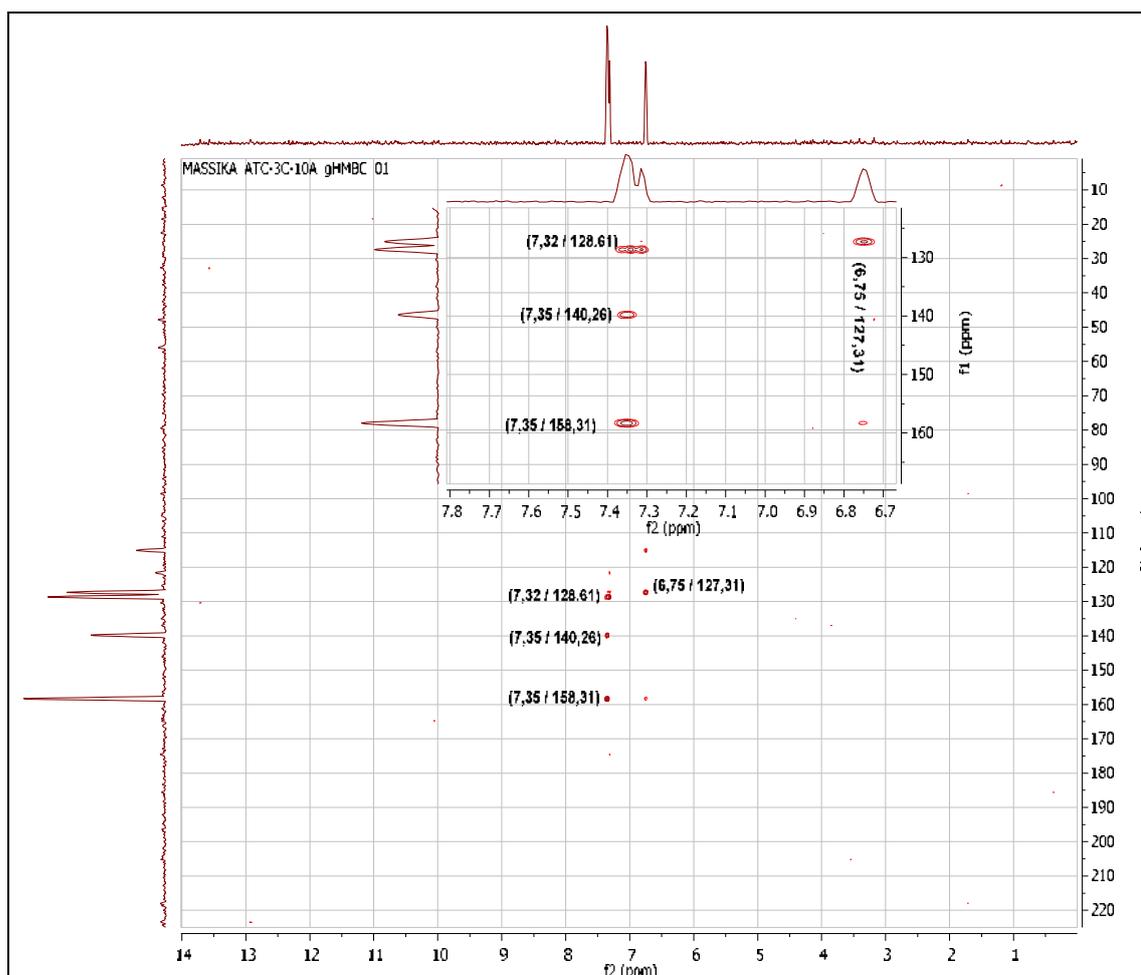


Figure III.71: Spectre RMN 2D HMBC (600 MHz, MeOH-d₄, δ ppm) du composé A9

Le tableau III.11 résume les données spectroscopiques RMN du composé A9.

Tableau III.11 : Les données spectrales RMN du composé A9 dans MeOH-d₄

Position	δ_C (ppm)	δ_H (ppm, multiplicité, J en Hz)
1	127,31	/
2	128,61	7,35 (1H; d ; 8,18)
3	115,46	6,75 (1H; d ; 8,18)
4	158,31	/
5	115,46	6,75 (1H; d ; 8,18)
6	128,61	7,35 (1H; d ; 8,18)
7	140,26	7,32 (1H; d ; 15,79)
8	122,08	6,33 (1H; d ; 15,79)

Sur la base de l'ensemble de ces données spectrales et par comparaison avec les données de la littérature [25], le composé A9 est identifié comme étant l'**acide para-coumarique**, également connu sous le nom **acide parahydroxycinnamique**. Ce composé est connu pour son activité antioxydante [26], antidiabétique et antihyperlipidémique [27].

La figure III.72 représente chromatogramme d'identification du produit A9 dans l'extrait ACOEt par HPLC-TOF/MS en mode négatif.

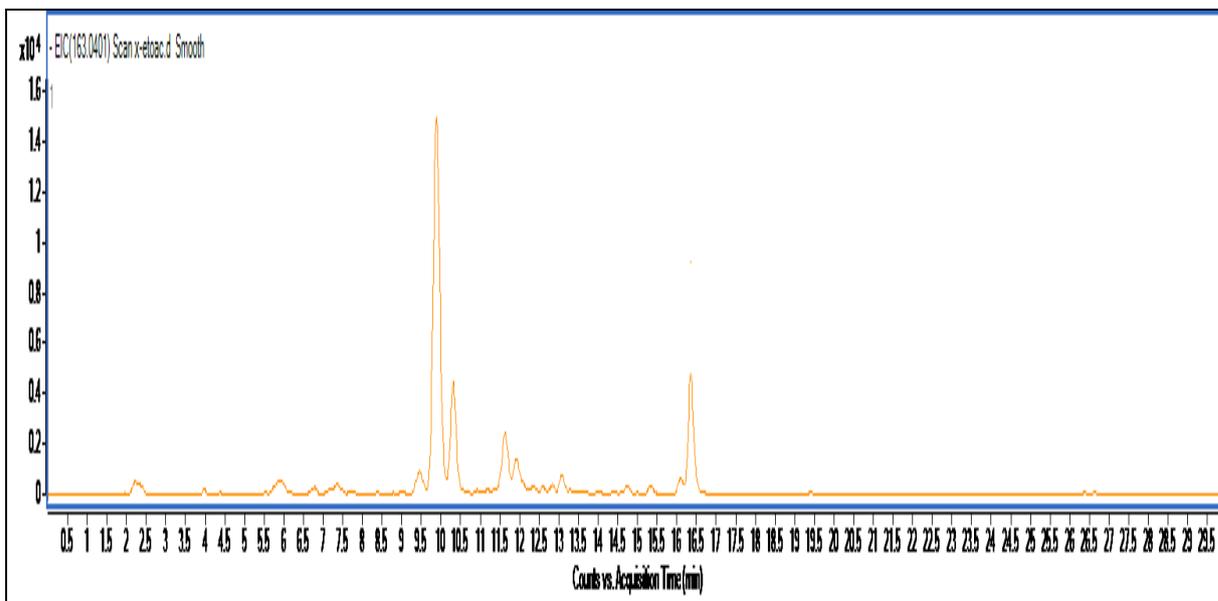


Figure III.72: Chromatogramme d'identification du produit A9 dans l'extrait ACOEt par HPLC-TOF/MS en mode négatif

III.2.1.10. Elucidation structurale du composé A10 (ATC2d27)

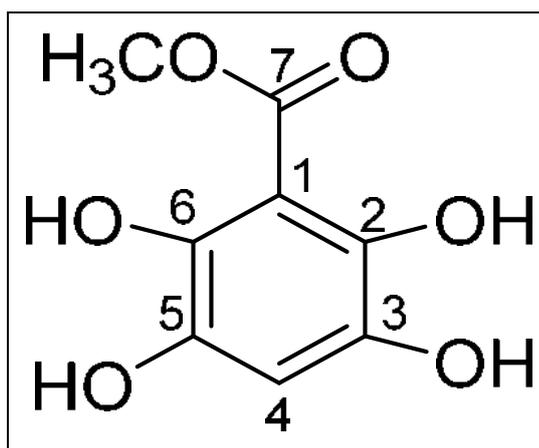


Figure III.73: Structure du composé A10

Le composé A10 se présente sous forme d'une poudre amorphe blanche. Son spectre RMN ^1H (figure III.74) du composé A10 met en évidence la présence d'un seul proton aromatique à δ_{H} 7,33 ppm apparaît sous forme d'un singulet d'intégration 1H attribuable à H-4. De plus, un singulet à δ_{H} 3,88 ppm intégrant pour 3H indiquant la présence d'un méthoxyle.

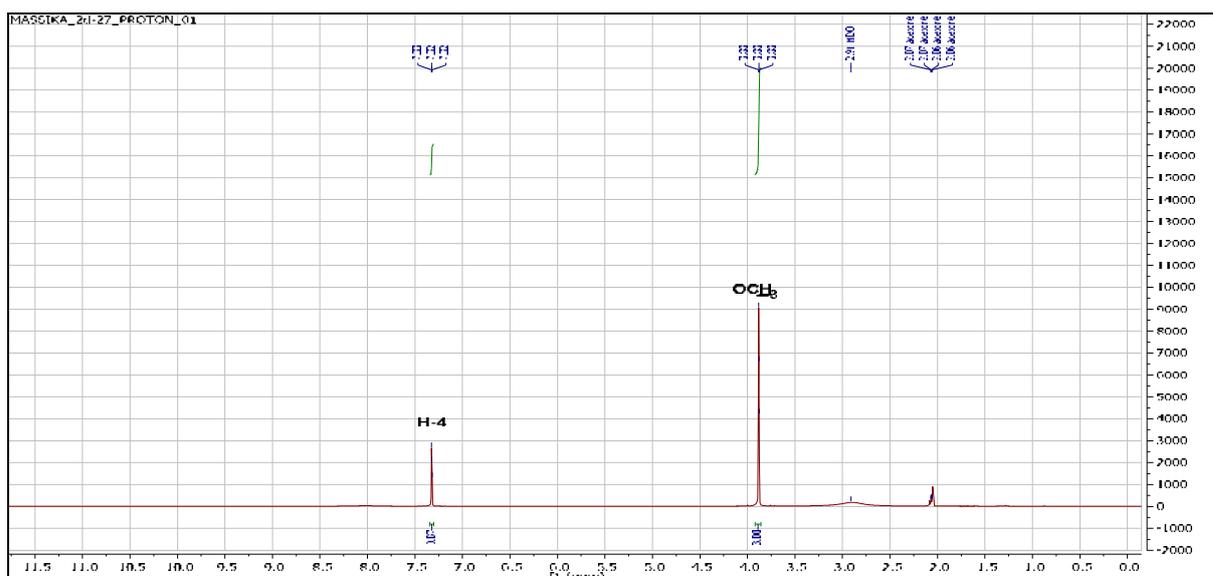


Figure III.74: Spectre RMN ^1H (600 MHz, acétone- d_6 , δ ppm) du composé A10

La mesure du spectre de corrélations hétéronucléaires HSQC (figure III.75), a conduit à l'établissement des connexions géminales ^1H - ^{13}C -RMN du composé A10. Il a pu être démontré que le proton aromatique localisé à δ_{H} 7,32 ppm était attaché au carbone aromatique situé à δ_{C} 107,23 ppm et que les protons du groupement méthoxyle étaient attachés au carbone situé à δ_{C} 55,74 ppm.

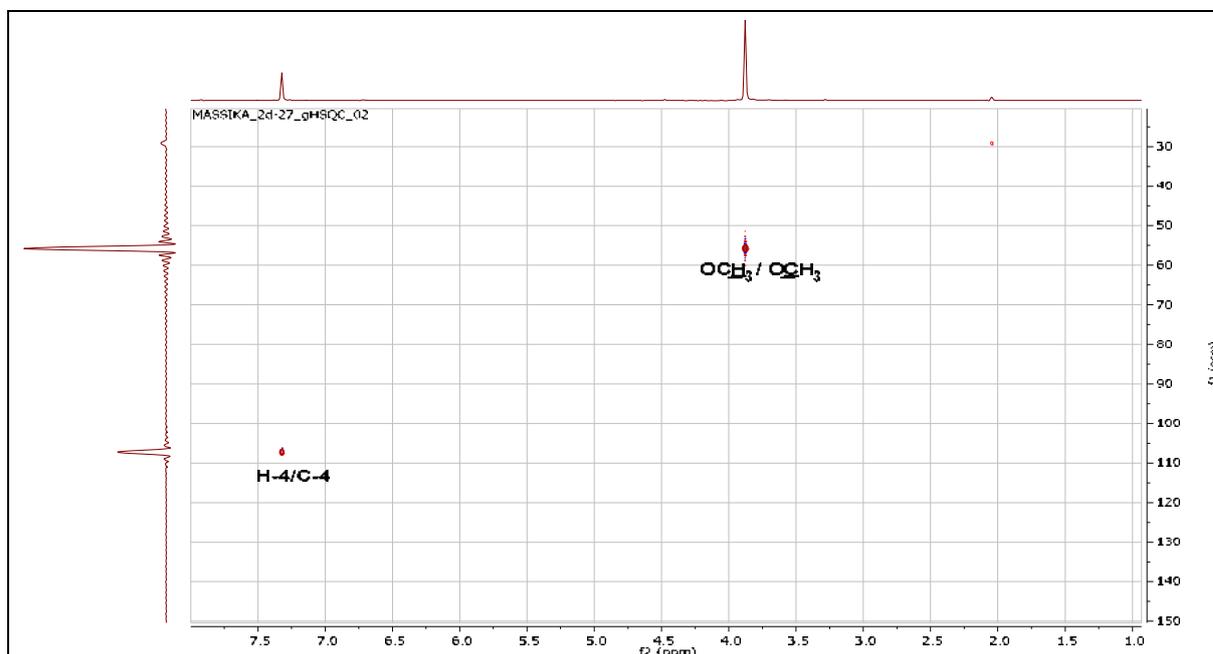


Figure III.75: Spectre HSQC (600 MHz, acétone- d_6 , δ ppm) du composé A10

L'analyse simultanée des spectres RMN ^{13}C (figure III.76) et DEPT (figure III.77) de ce composé, permet de visualiser la présence d'un carbonyle à δ_{C} 166,59 ppm et un méthoxy à δ_{C} 55,74 ppm. Cette expérience a montré aussi que le noyau aromatique est composé par trois carbones quaternaires à δ_{C} 120,58 ppm, δ_{C} 140,65 ppm, δ_{C} 147,43 ppm et un méthine à δ_{C}

107,23 ppm (C-4). La non-correspondance entre le nombre total de carbones et de protons trouvés dans les spectres de RMN suggère une symétrie dans la molécule, dont deux carbones aromatiques quaternaires équivalents à δ_C 140,65 ppm et deux autres à δ_C 147,43 ppm, attribuables à C-3/C-5 et C-2/C-6 respectivement. Les valeurs des déplacements chimiques de ces carbones indiquent qu'ils sont oxygénés. Ces résultats sont justifiés par l'absence de corrélation sur le spectre COSY (figure III.78).

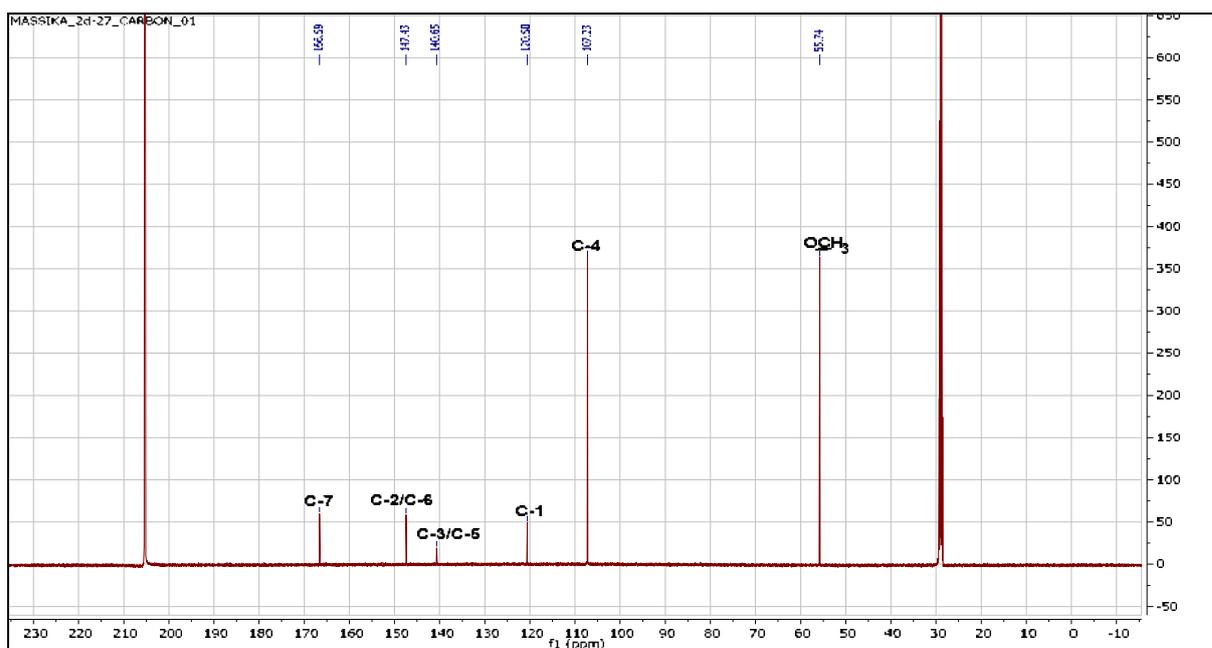


Figure III.76: Spectre RMN ^{13}C (150 MHz, acétone- d_6 , δ ppm) du composé A10

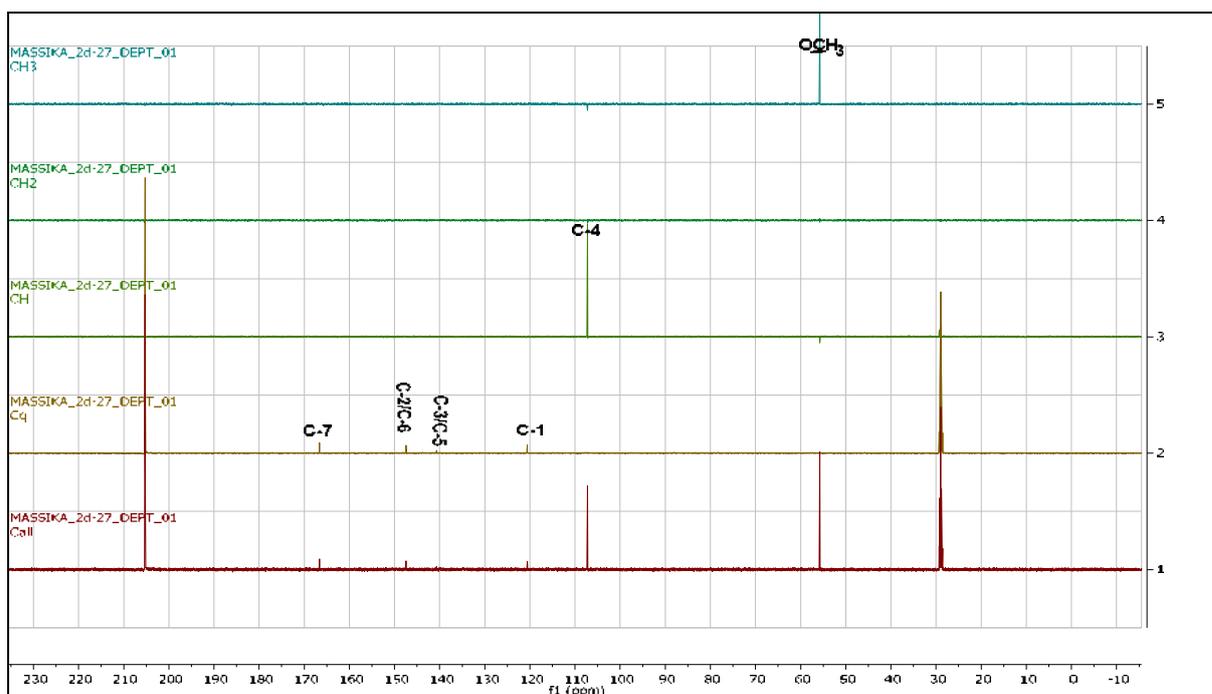


Figure III.77: Spectre DEPT (150 MHz, acétone- d_6 , δ ppm) du composé A10

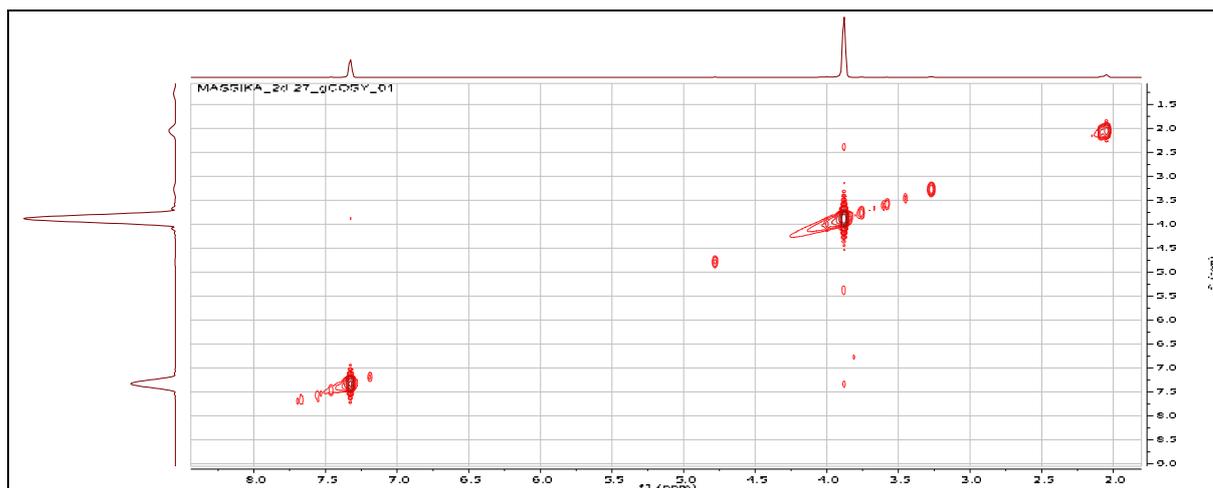


Figure III.78: Spectre RMN 2D COSY (600 MHz, acétone-d₆, δ ppm) du composé A10

Les corrélations HMBC (figure III.79) entre le proton attribué à H-4 et les carbones C-3/C-5 et C-2/C-6 corroborent très bien les attributions établies. L'atome de carbone restant à δ_C 120,58 ppm est attribuable à C-1.

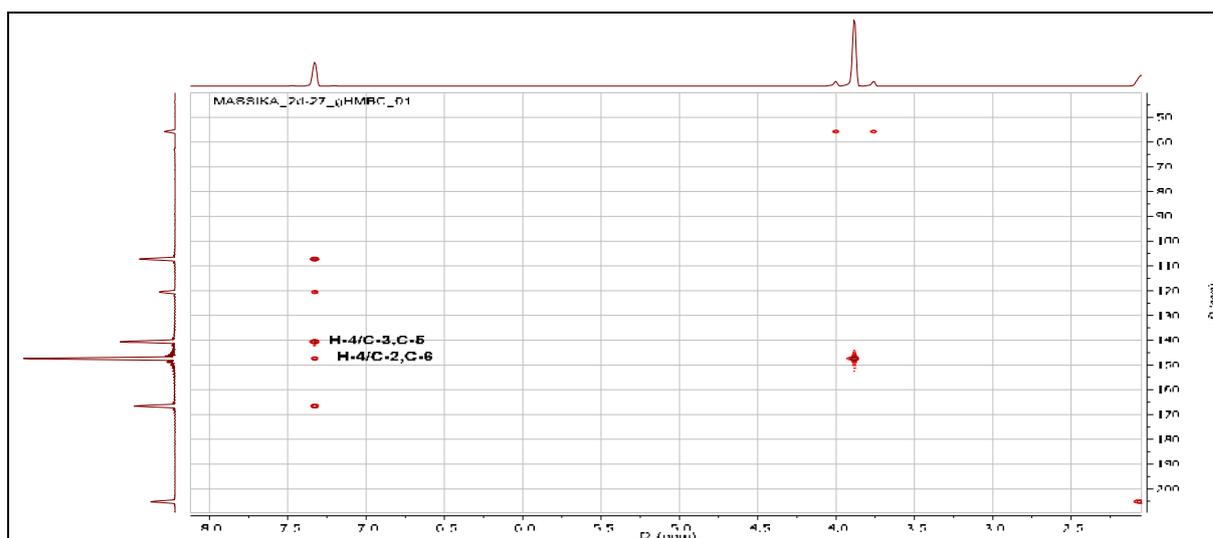


Figure III.79: Spectre RMN 2D HMBC (600 MHz, acétone-d₆, δ ppm) du composé A10

Le tableau III.12 regroupe les attributions des différents signaux en RMN du composé A10.

Tableau III.12 : Déplacement chimiques RMN du composé A10 dans acétone-d₆

Position	δ_C (ppm)	δ_H (ppm, multiplicité, J en Hz)
1	120,58	/
2	147,43	/
3	140,65	/
4	107,23	7,33 (1H; S)
5	140,65	/
6	147,43	/
7	166,59	/
OCH ₃	55,74	3,88 (3H; S)

L'ensemble de ces données est favorable à l'identification de la structure du composé A10 comme étant le **2,3,5,6-tétrahydroxybenzoate de méthyle**. Cette structure n'a jamais été

signalée dans la littérature. La figure III.80 représente le chromatogramme d'identification de ce produit dans l'extrait ACOEt par HPLC-TOF/MS en mode négatif.

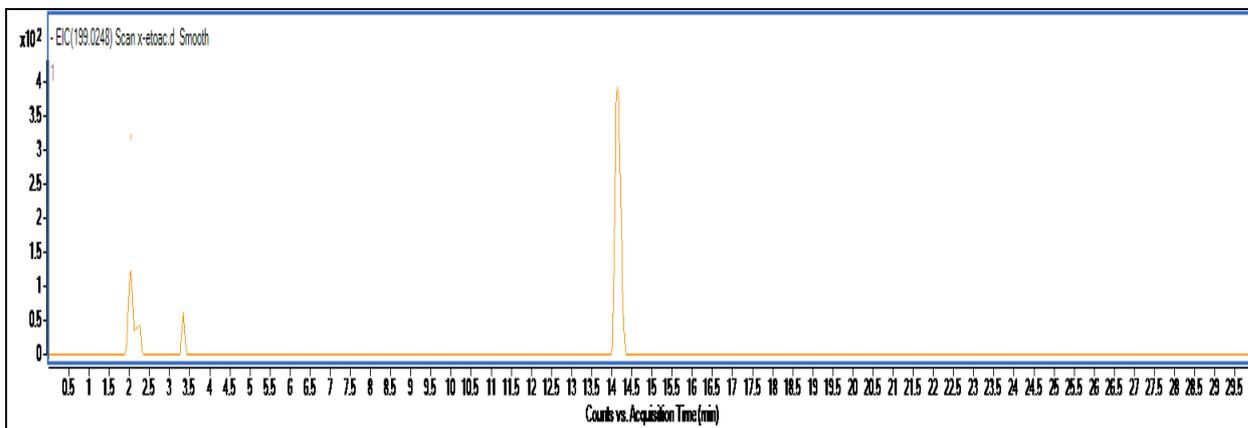


Figure III.80: Chromatogramme d'identification du produit **A10** dans l'extrait ACOEt par HPLC-TOF/MS en mode négatif

III.2.1.11. Elucidation structurale du composé **A11** (**ATC10**)

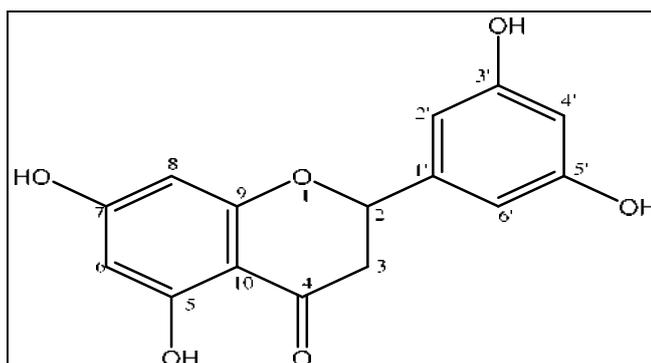


Figure III.81: Structure du composé **A11**

Le composé **A11** se présente sous forme de poudre jaune, soluble dans l'acetone.

Le spectre de masse ESI-MS de ce composé (figure III.82) montre un ion en mode négatif de m/z 287,16 $[M-H]^-$ indiquant que la molécule possède la formule brute $C_{15}H_{12}O_6$ et une masse de 288 uma.

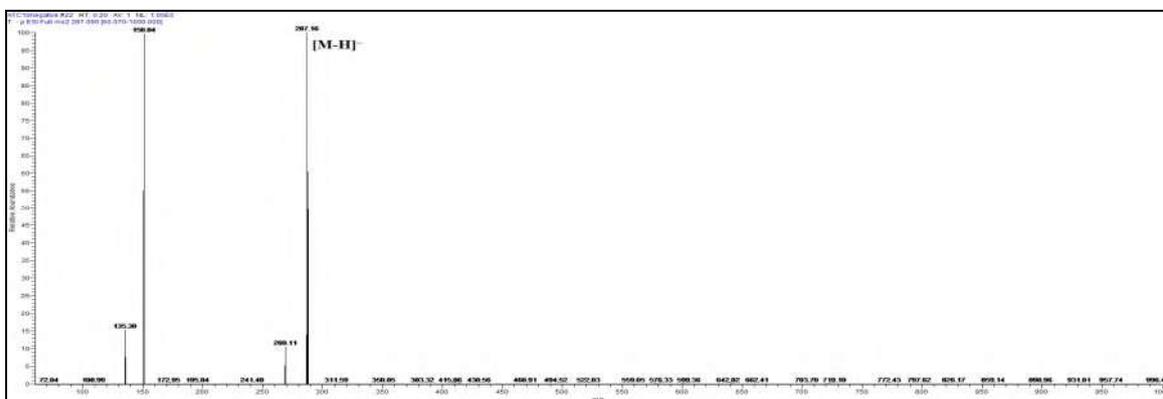


Figure III.82: Spectre de masse ESI-MS du composé **A11**

L'analyse du spectre RMN ^1H , réalisé dans l'acetone (figure III.83, III.83a et III.83b) montre:

- Un doublet large d'intégration 1H à δ_{H} 5,39 ppm ($J= 12,62$ Hz), corrèle sur le spectre HSQC (figure III.84) avec le carbone à δ_{C} 79,05 ppm.
- Un groupement CH_2 dont les protons sont magnétiquement non équivalents et fortement couplés, le premier à δ_{H} 3,13 ppm résonnant sous forme d'un large triplet ($J=17,06$ et 12,81 Hz), et le second à δ_{H} 2,72 sous forme d'un doublet large ($J=17,15$ Hz) montrant une tache de corrélation sur le spectre HSQC avec le même atome carbone à δ_{C} 42,66 ppm.

Les déplacements chimiques des groupements CH et CH_2 sont identiques aux déplacements des carbones en position C-2 et C-3 d'une flavanone [28, 29].

L'examen du spectre relatif à l'expérience COSY (figure III.85) montre:

- ✓ Une tache de corrélation entre les deux protons H-3a et H-3b confirmant le couplage géminial.
- ✓ Deux taches de corrélations des protons H-3a et H-3b avec le noyau à δ_{H} 5,39 ppm qui correspond au proton H-2 confirment les couplages vicinaux.

De plus, le spectre RMN du ^1H indique la présence d'un singulet d'intensité 1H à δ_{H} 12,17 ppm caractéristique d'un proton d'un groupement phénol (5-OH).

L'analyse de la région aromatique du spectre RMN du ^1H montre:

- Un signal à δ_{H} 5,95-5,94 ppm, d'intégration 2H correspond en fait à deux signaux superposés attribuable à H-8 et H-6 indiquant ainsi que le noyau A est substitué en 7 et en 5. Le spectre RMN de corrélations hétéronucléaires à courtes distances HSQC indique que les protons localisés à δ_{H} 5,95 et δ_{H} 5,94 ppm corrélerent aux signaux situés à δ_{C} 94,96 et δ_{C} 95,89 ppm respectivement.
- Un singulet d'intégration 1H à δ_{H} 7,03 ppm attribuable à H-4', corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_{C} 113,82 ppm.
- Un singulet large d'intégration 2H à δ_{H} 6,87 ppm attribuable à H-2' et H-6', montre sur le spectre HSQC deux taches de corrélations avec deux carbones à δ_{C} 118,31 et δ_{C} 115,11 ppm.

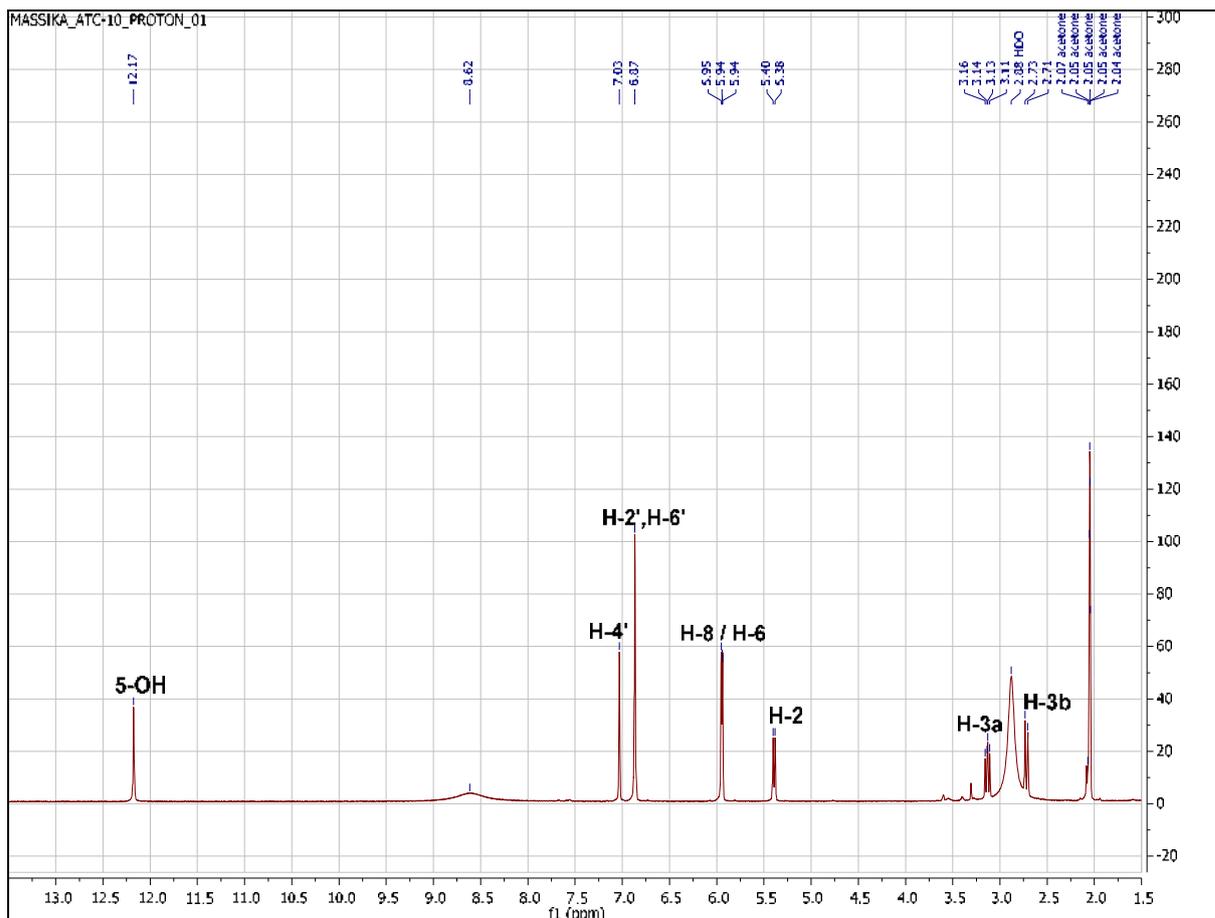


Figure III.83: Spectre RMN ^1H (600 MHz, acétone- d_6 , δ ppm) du composé A11

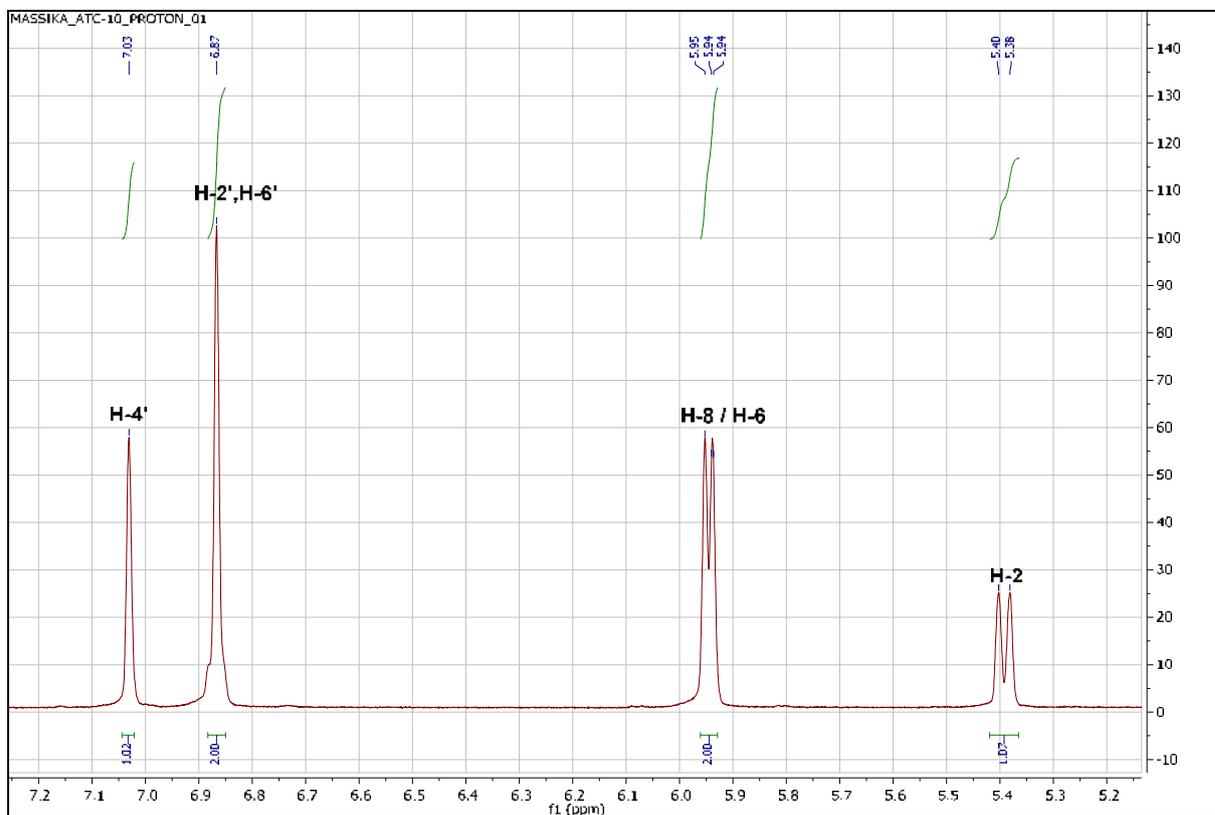


Figure III.83a: Spectre RMN ^1H (600 MHz, acétone- d_6 , δ ppm) étalé de 5,2 à 7,2 ppm du composé A11

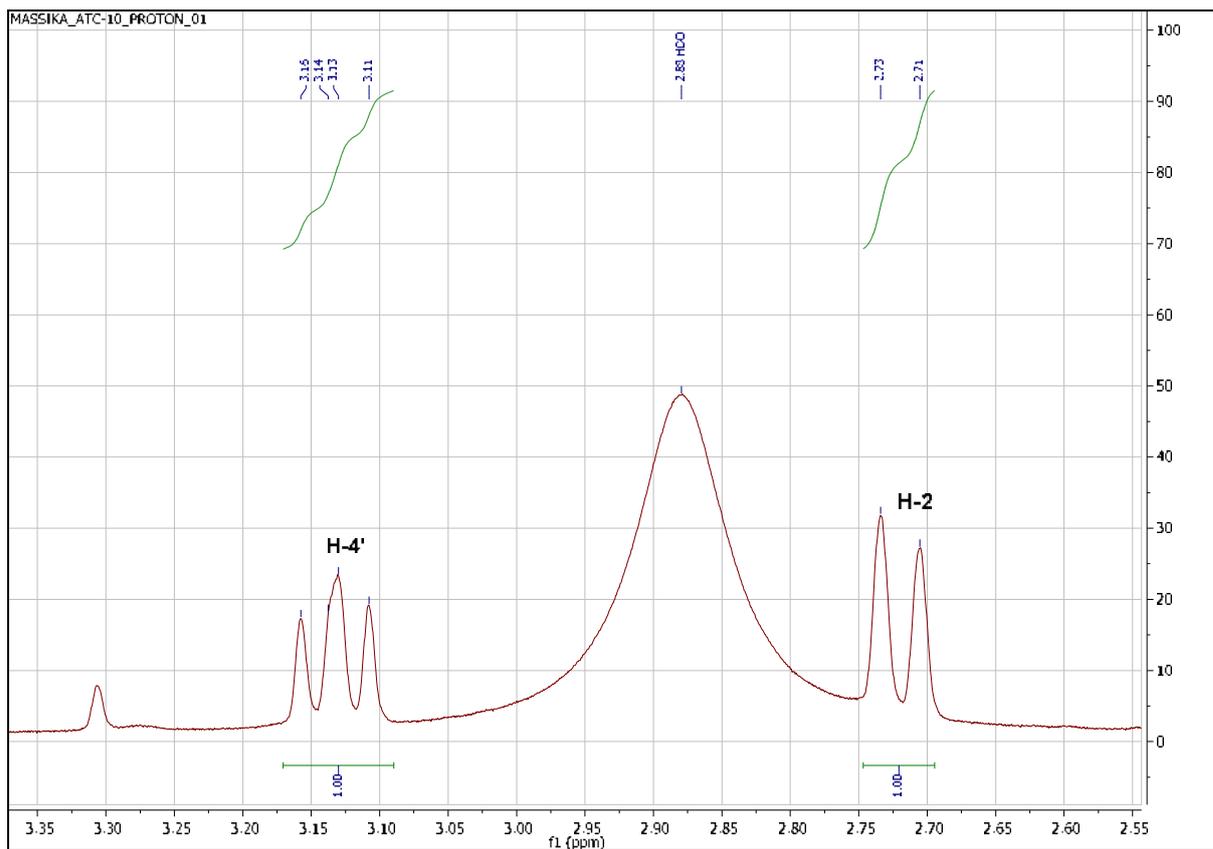


Figure III.83b: Spectre RMN ^1H (600 MHz, acétone- d_6 , δ ppm) étalé de 2,55 à 3,25 ppm du composé A11

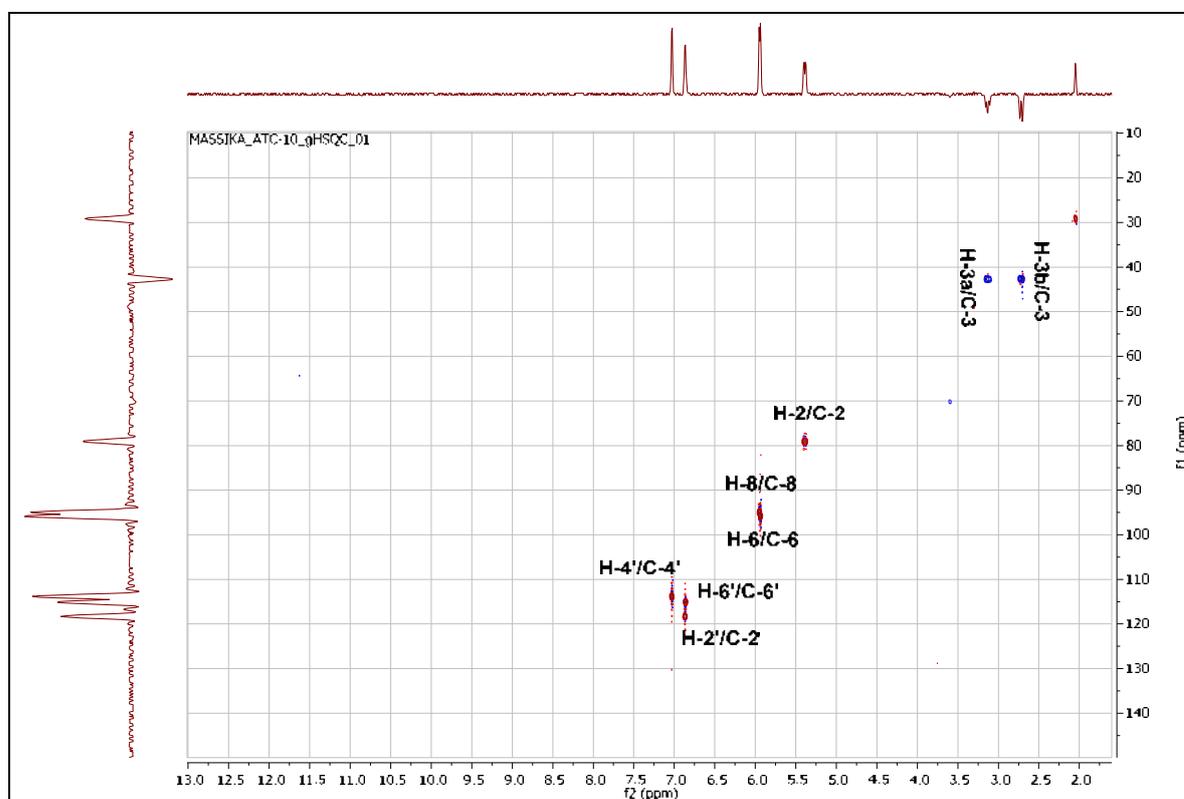


Figure III.84: Spectre RMN 2D HSQC (600 MHz, acétone- d_6 , δ ppm) du composé A11

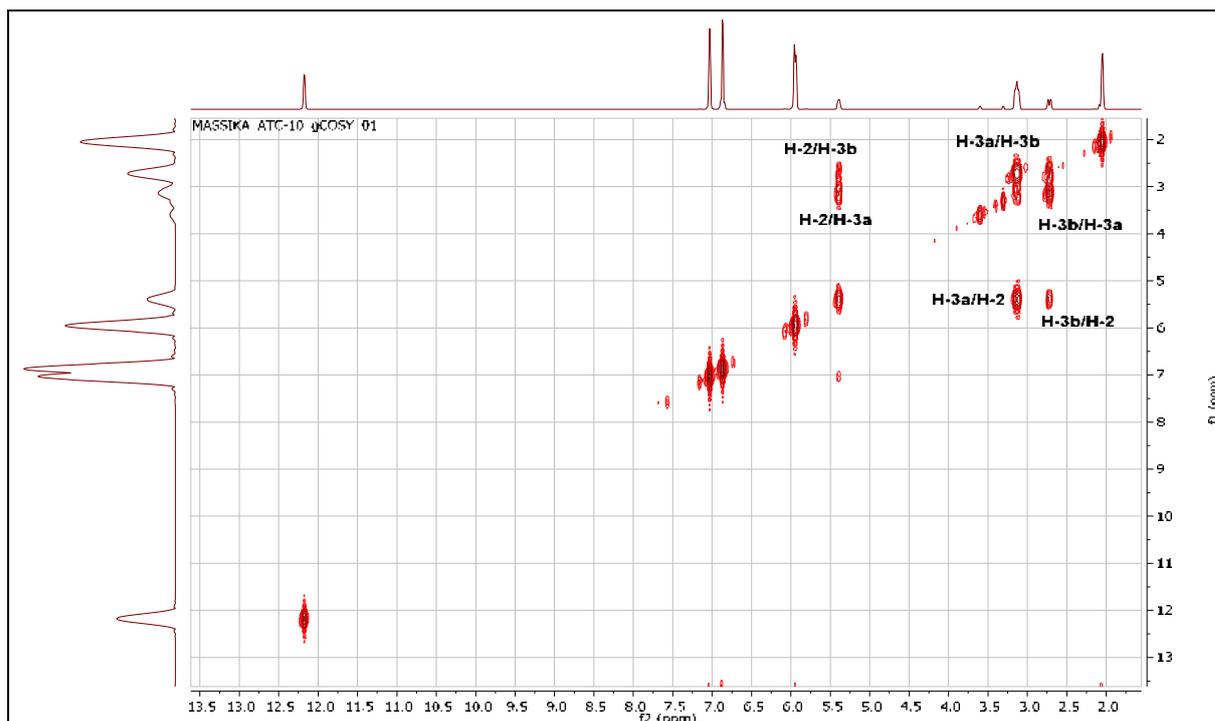


Figure III.85: Spectre RMN 2D COSY (600 MHz, acétone-d₆, δ ppm) du composé A11

L'examen du spectre RMN ¹³C (figure III.86) confirme ces résultats et montre la présence d'autres signaux dont:

- Un carbone de groupement carbonyle à δ_C 196,26 ppm attribuable à C-4.
- Quatre carbones quaternaires oxygénés à δ_C (166,55; 164,37; 145,49 et 145,12) ppm.
- Trois carbones quaternaires non oxygénés à δ_C (163,43; 130,67 et 102,28) ppm.

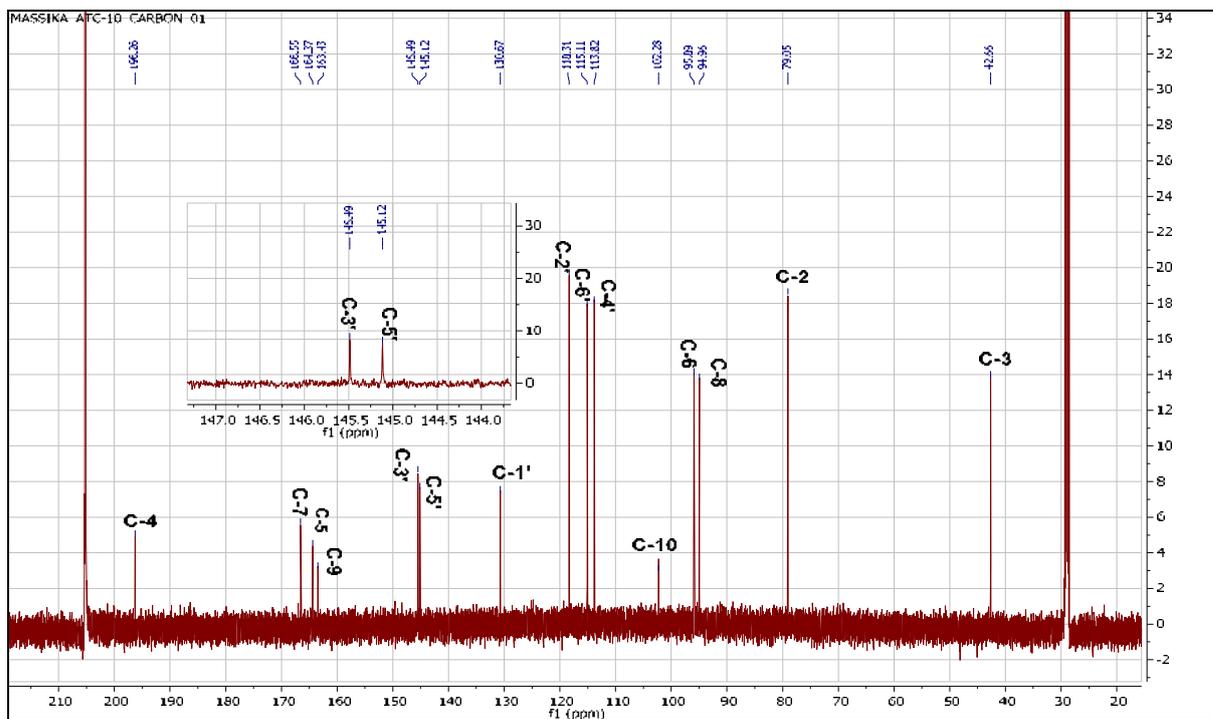


Figure III.86: Spectre RMN ¹³C (150 MHz, acétone-d₆, δ ppm) du composé A11

Les attributions des carbones restants ont été complétées par l'étude du spectre de corrélation hétéronucléaire à longue distance HMBC (figure III.87) ainsi que le spectre carbone 13 qui montrent:

- Deux taches de corrélation entre le H-3a et H-3b et le carbone du carbonyle à δ_C 196,26 ppm qui correspond à C-4.
- Les protons H-2', H-6' et H-3a montrent deux taches de corrélation avec le même atome de carbone à δ_C 130,67 ppm attribuable à C-1'.
- Les deux protons H-8 et 5-OH montrent deux taches de corrélation avec le carbone quaternaire C-10 à δ_C 102,28 ppm.
- Deux taches de corrélation entre le proton du groupement hydroxyle en C-5 et le H-6 et un atome de carbone oxygéné à δ_C 164,37 ppm qui est attribuable à C-5.
- Le carbone à δ_C 145,49 ppm est attribuable à C-3' grâce à sa corrélation avec le proton H-4'.
- Deux taches de corrélation entre le H-8 et deux atomes de carbone, le premier à δ_C 166,55 ppm et le deuxième à δ_C 163,43 ppm sont donc attribuables à C-7 et C-9 respectivement.
- L'atome de carbone restant à δ_C 145,12 ppm est attribuable à C-5' grâce à sa corrélation avec le proton H-6'.

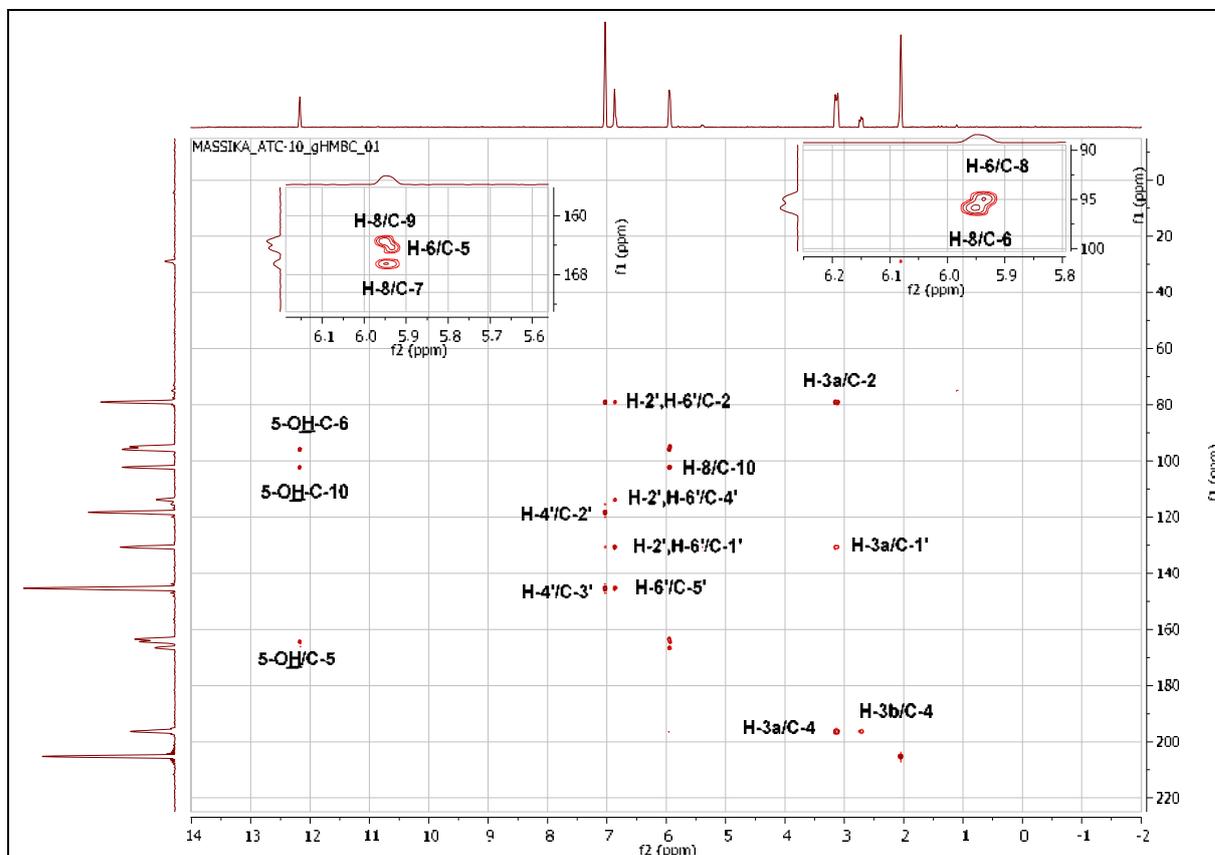


Figure III.87: Spectre RMN 2D HMBC (600 MHz, acétone-d₆, δ ppm) du composé A11

Les données de RMN de cette molécule reportées dans le tableau III.13 sont en parfait accord avec celles de la littérature [30].

Tableau III.13 : Données spectrales de RMN du composé A11 dans acétone-d6

Position	δ_C (ppm)	δ_H (ppm, multiplicité, J en Hz)
2	79,05	5,39 (1H; <i>dl</i> ; 12,62)
3	42,66	3,13 (1H; <i>lr</i> ; 17,06 ; 12,81) 2,72 (1H; <i>dl</i> ; 17,15)
4	196,26	/
5	164,37	12,17 (1H; <i>S</i>)
6	95,89	5,94 (1H; <i>m</i>)
7	166,54	/
8	94,96	5,95 (1H; <i>m</i>)
9	163,43	/
10	102,28	/
1'	130,67	/
2'	118,31	6,87 (1H; <i>Sl</i>)
3'	145,49	/
4'	113,82	7,03 (1H; <i>S</i>)
5'	145,12	/
6'	115,11	6,87 (1H; <i>Sl</i>)

Ces résultats et les données de la littérature montrent que le composé A11 correspond effectivement au **3',5,5',7-tétrahydroxyflavanone** [30]. Cette molécule possède un effet anti-oxydant [31]. L'identification de ce produit dans phase ACOEt par HPLC-TOF/MS en mode négatif est présentée dans le chromatogramme ci-après (figure III.87).

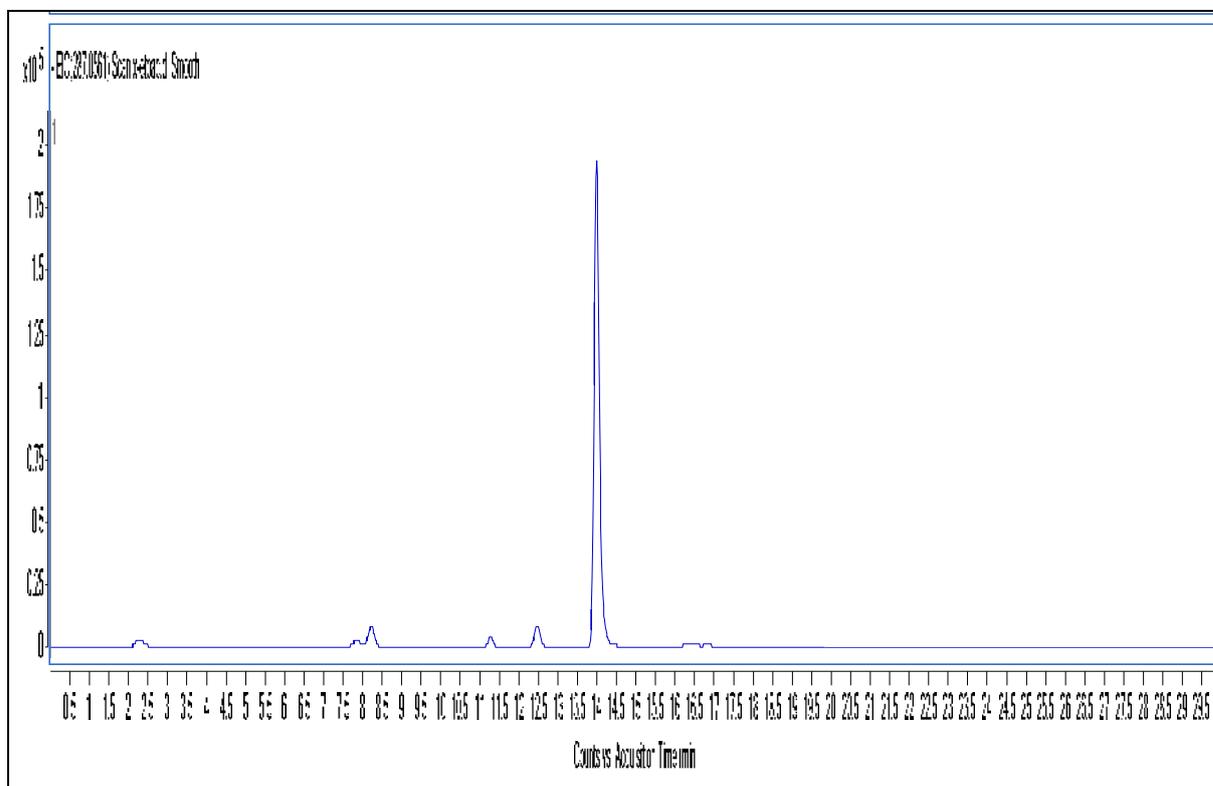


Figure III.88: Chromatogramme d'identification du produit A11 dans l'extrait ACOEt par HPLC-TOF/MS

III.2.1.12. Elucidation structurale du composé A12 (ATC10C)

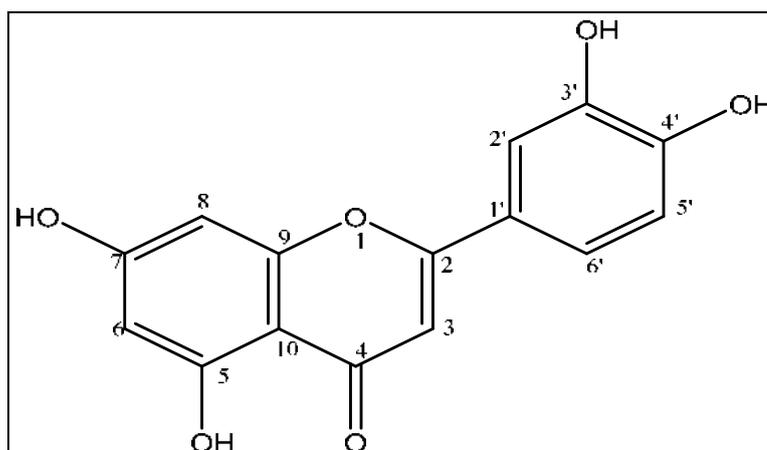


Figure III.89: Structure du composé A12

Le composé A12 se présente sous forme d'une poudre jaune soluble dans l'acétone. sa fluorescence violette sous lumière de Wood ($\lambda = 365 \text{ nm}$) et jaune après exposition à la vapeur de l'ammoniaque, laissant envisager une structure de type flavonoïde.

Le spectre de masse ESI-MS du composé A12 (figure III.90) enregistré en mode négatif, montre un ion pseudo-moléculaire à $m/z = 285,07$ $[M-H]^-$ qui suggère une masse moléculaire de 286 uma de formule brute $C_{15}H_{10}O_6$ avec un degré d'insaturation de 11.

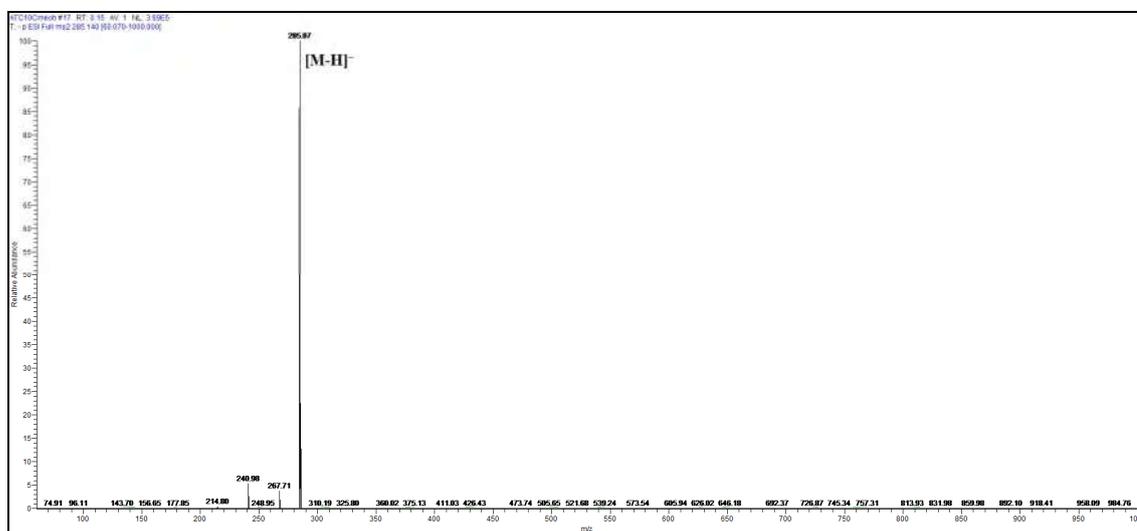


Figure III.90: Spectre de masse ESI-MS en mode négatif du composé A12

L'examen du spectre RMN¹H (figure III.91 et III.91a) montre:

- Un singulet large d'intégration 1H à δ_H 7,50 ppm attribuable à H-2'.
- Un doublet large d'intégration 1H à δ_H 7,47 ppm ($J = 7,48 \text{ Hz}$) attribuable à H-6'.
- Un doublet d'intégration 1H à δ_H 7,00 ppm ($J = 7,72 \text{ Hz}$) attribuable à H-5'. Sur le spectre COSY (figure III.92), ce même proton H-5' corrèle avec le proton H-6'.

L'ensemble de ces trois signaux confirme l'hydroxylation des positions 3' et 4' du noyau B.

- Deux signaux sous forme de deux singlets large d'intégration 1H chacun, le premier à δ_H 6,53 ppm et le second à δ_H 6,25 ppm attribuables à H-8 et H-6 respectivement, confirmant ainsi l'hydroxylation des positions 5 et 7 du noyau A.
- Un singlet d'intégration 1H à δ_H 13,02 ppm confirme la présence d'un OH libre en position 5.
- Un singlet à δ_H 6,58 ppm d'intégration 1H attribuable à H-3, ce qui suggère la structure d'une flavone.

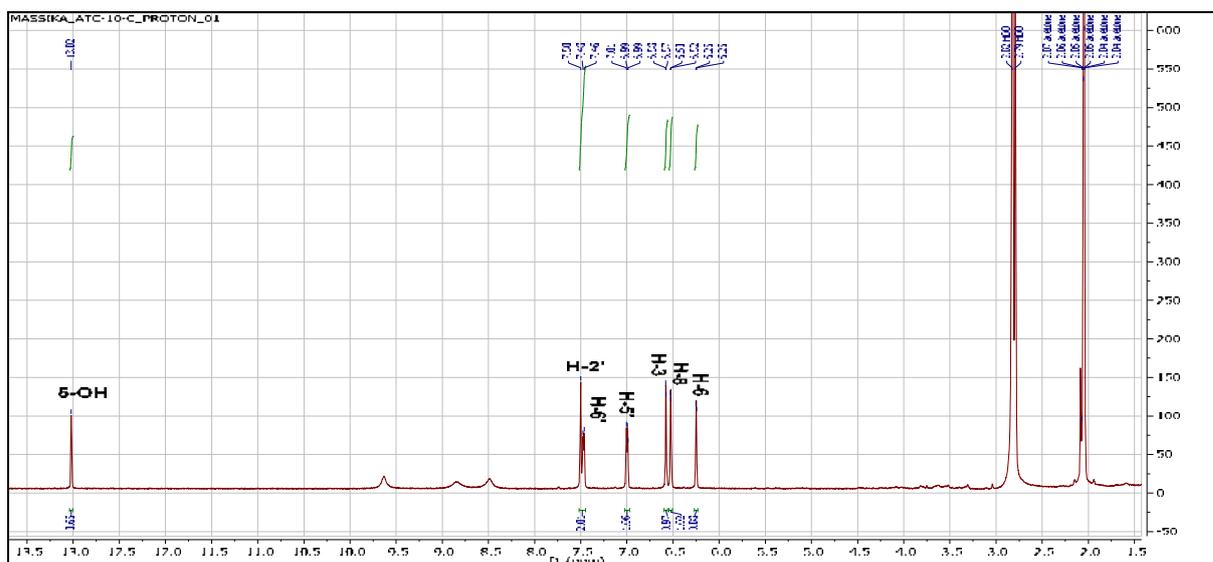


Figure III.91: Spectre RMN ^1H (600 MHz, acétone- d_6 , δ ppm) du composé A12

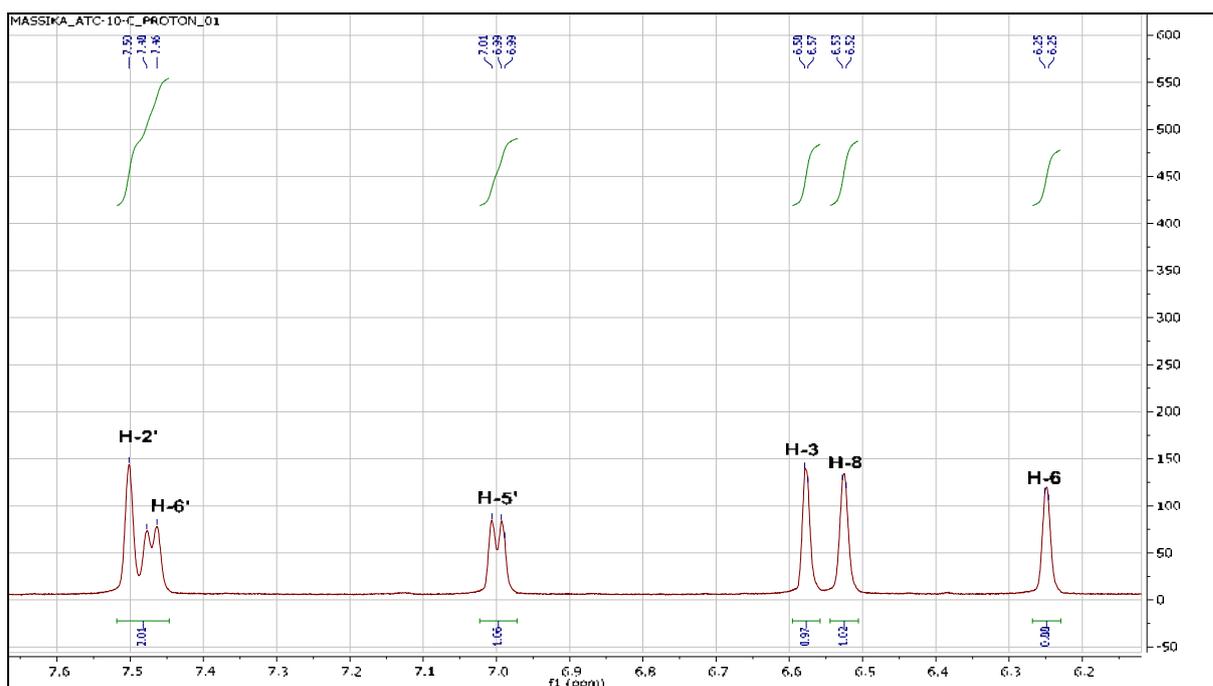


Figure III.91a: Spectre RMN ^1H (600 MHz, acétone- d_6 , δ ppm) étalé de 6,2 à 7,6 ppm du composé A12



Figure III.92: Spectre RMN 2D COSY (600 MHz, acétone-d₆, δ ppm) du composé A12

La mesure du spectre de corrélations hétéronucléaires HSQC (figure III.93) a conduit à l'établissement des connections géminales ¹H-¹³C-RMN du composé A12. Il a ainsi pu être démontré que les protons aromatiques H-6', H-5', H-2', H-3, H-6 et H-8 étaient attachés aux carbones tertiaires respectivement situés à δ_c 119,26; 116,56; 113,59; 103,25; 98,80 et 93,84 ppm attribuables aux C-6', C-5', C-2', C-3, C-6 et C-8.

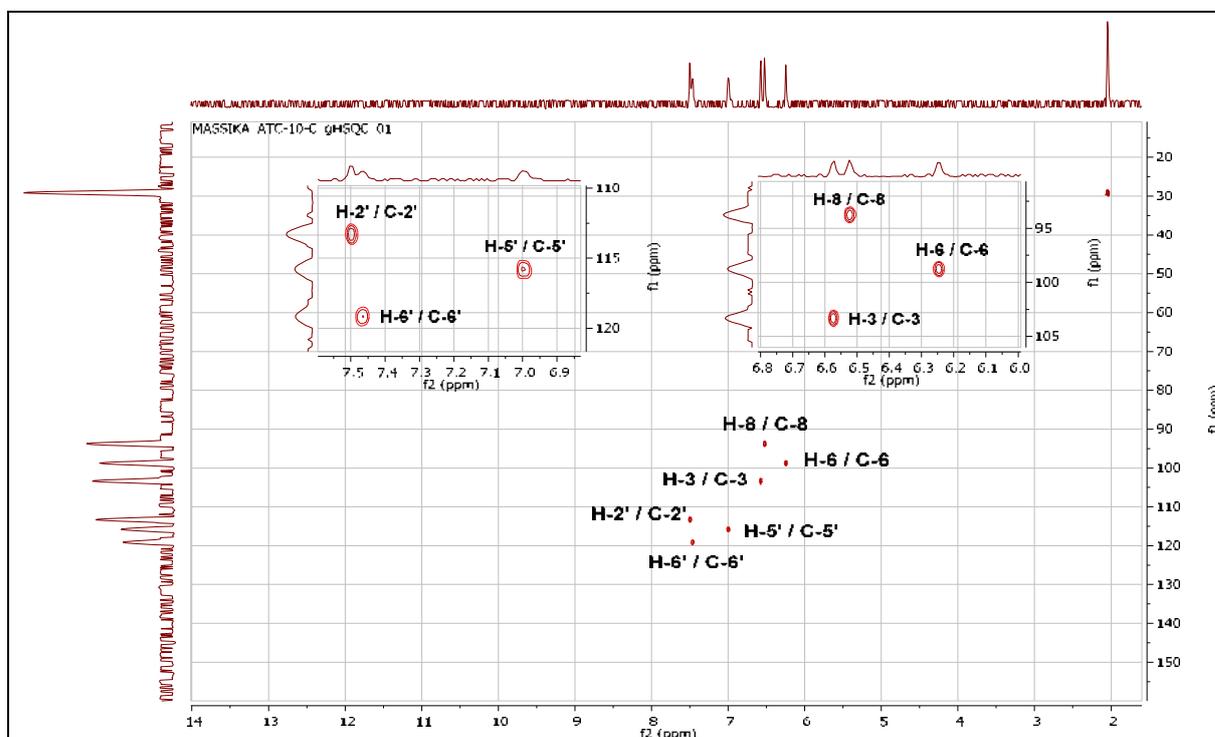


Figure III.93: Spectre HSQC (600 MHz, acétone-d₆, δ ppm) du composé A12

L'examen du spectre de l'expérience HMBC (figure III.94) permet d'attribuer les carbones quaternaires restants en comparaison avec ceux décrits dans la littérature [32].

- Deux taches de corrélation entre les protons H-2' et H-5' et les deux carbones quaternaires oxygénés à δ_C 145,56 et 148,29 ppm attribuables à C-3' et C-4' successivement.
- une tache de corrélation entre le proton H-3 et le carbone à δ_C 181,16 ppm attribuable à C-4.
- Les deux protons H-5' et H-3 montrent deux tâches de corrélation avec le carbone quaternaire C-1' à δ_C 122,91 ppm.
- Le carbone oxygéné à δ_C 104,46 ppm montre quatre tâches de corrélation avec les protons H-3, H-6, H-8 et 5-OH. Vu son comportement et sa valeur de déplacement chimique, ce carbone correspond à C-10.
- Les protons H-2', H-6' et H-3 montrent trois tâches de corrélation avec le même atome de carbone situé à δ_C 164,21 ppm qui ne peut être attribuer qu'au carbone C-2.
- Les deux protons H-6 et H-8 montrent deux tâches de corrélation avec un atome de carbone localisé à δ_C 164,03 ppm attribuable à C-7.
- Le carbone à δ_C 157,88 ppm est attribuable à C-9 grâce à sa corrélation avec le proton H-8 et la valeur de son déplacement chimique.
- Enfin le carbone à 162,41 ppm, corrélant avec le H-6 et le H du OH en C-5, ne peut être attribué qu'au carbone C-5.

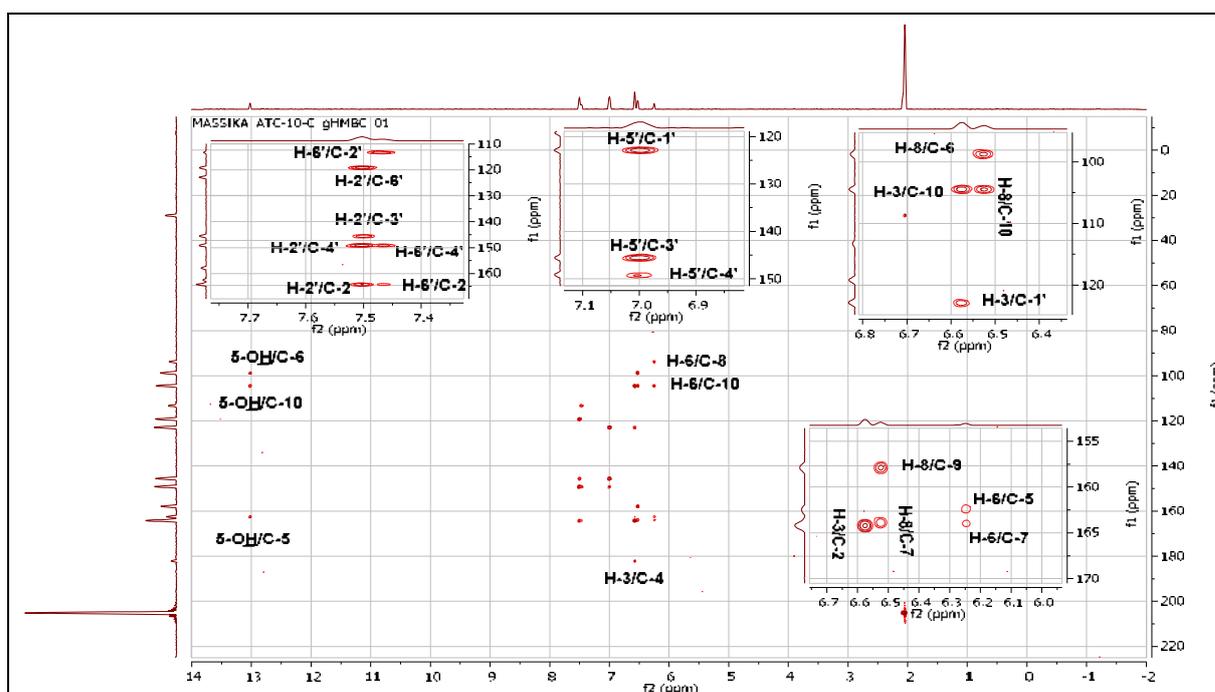


Figure III.94: Spectre RMN 2D HMBC (600 MHz, acétone-d₆, δ ppm) du composé A12

Les déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé sont rassemblés dans le tableau III. 14 ci-après.

Tableau III.14 : Déplacements chimiques en RMN ^{13}C et RMN ^1H du composé **A12** dans acétone- d_6

Position	δ_c (ppm)	δ_H (ppm, multiplicité, J en Hz)
2	164,21	/
3	103,25	6,58 (1H ; <i>S</i>)
4	181,16	/
5	162,41	13,02 (1H ; <i>SI</i>)
6	98,80	6,25 (1H ; <i>SI</i>)
7	164,03	/
8	93,84	6,53 (1H ; <i>SI</i>)
9	157,88	/
10	104,46	/
1'	122,91	/
2'	113,59	7,50 (1H ; <i>SI</i>)
3'	145,56	/
4'	148,29	/
5'	116,56	7,00 (1H ; <i>d</i> ; 7,72)
6'	119,26	7,47 (1H ; <i>dl</i> ; 7,48)

Les résultats des analyses décrites ci-dessus indiquent que le composé **A12** est le **5, 7, 3', 4'-tetrahydroxyflavone** ou **lutéoline**. De nombreuses propriétés biologiques ont été attribuées à lutéoline notamment un effet antioxydant, anti-inflammatoire et anti-allergique [33].

Le chromatogramme d'identification du produit **A12** dans l'extrait ACOEt par HPLC-TOF/MS en mode négatif est représenté dans la figure III.95.

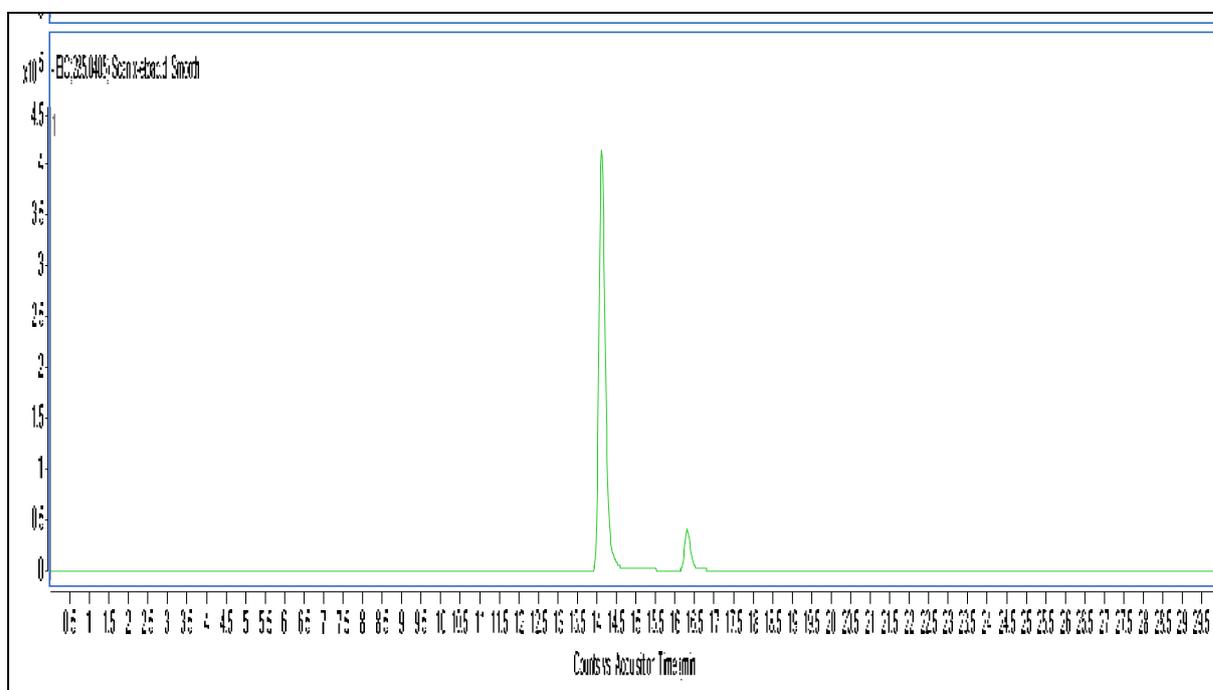


Figure III.95: Chromatogramme d'identification du produit **A12** dans l'extrait ACOEt par HPLC-TOF/MS en mode négatif

III.2.1.13. Elucidation structurale du composé A13 (ATC9E)

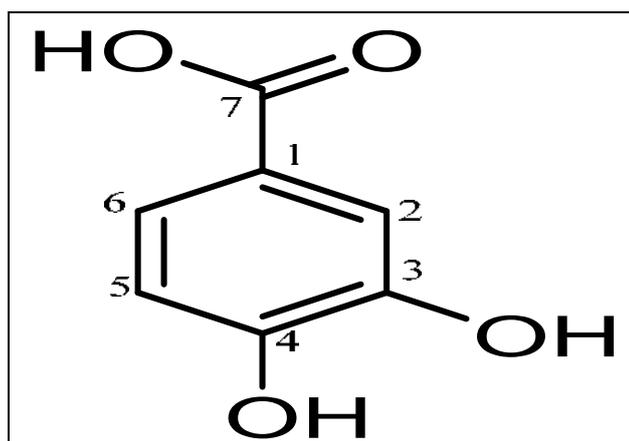


Figure III.96: Structure du composé A13

Le composé A13 obtenu sous forme d'une poudre blanche amorphe, soluble dans le MeOH et donne une fluorescence bleue sous lampe de Wood ($\lambda = 365 \text{ nm}$), suggérant une structure d'un acide phénolique.

Le spectre de masse ESI-MS du composé A13 (figure III.97) enregistré en mode négatif, indique la présence d'un pic d'ion pseudo-moléculaire à $m/z = 153,01$ $[M-H]^-$ correspondant à une masse moléculaire de 154 uma et une formule brute en $C_7H_6O_4$ avec 5 insaturations.

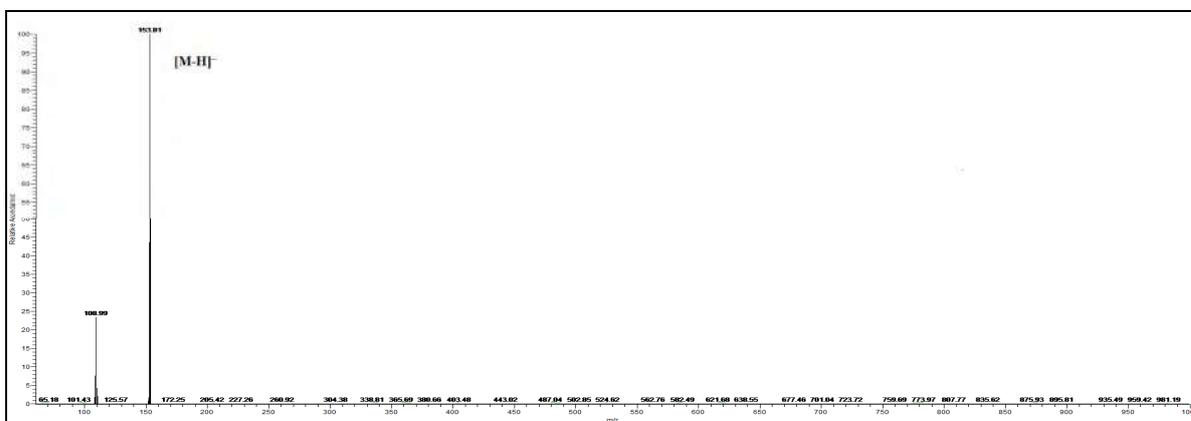


Figure III.97: Spectre de masse ESI-MS en mode négatif du composé A13

L'examen du spectre RMN¹³C (figure III.98) et la comparaison avec les données de la littérature [34] confirme la présence de 7 atomes de carbone dont:

- Un pic à δ_C 168,89 ppm correspond au carbone quaternaire d'un carbonyle caractéristique d'une fonction acide.
- Deux carbones quaternaires oxygénés à δ_C 143,86 ppm et δ_C 147,50 ppm.
- Un carbone quaternaire non oxygéné à δ_C 129,03 ppm.
- Trois carbones méthines à δ_C 113,77 ; 116,37 et 121,57 ppm.

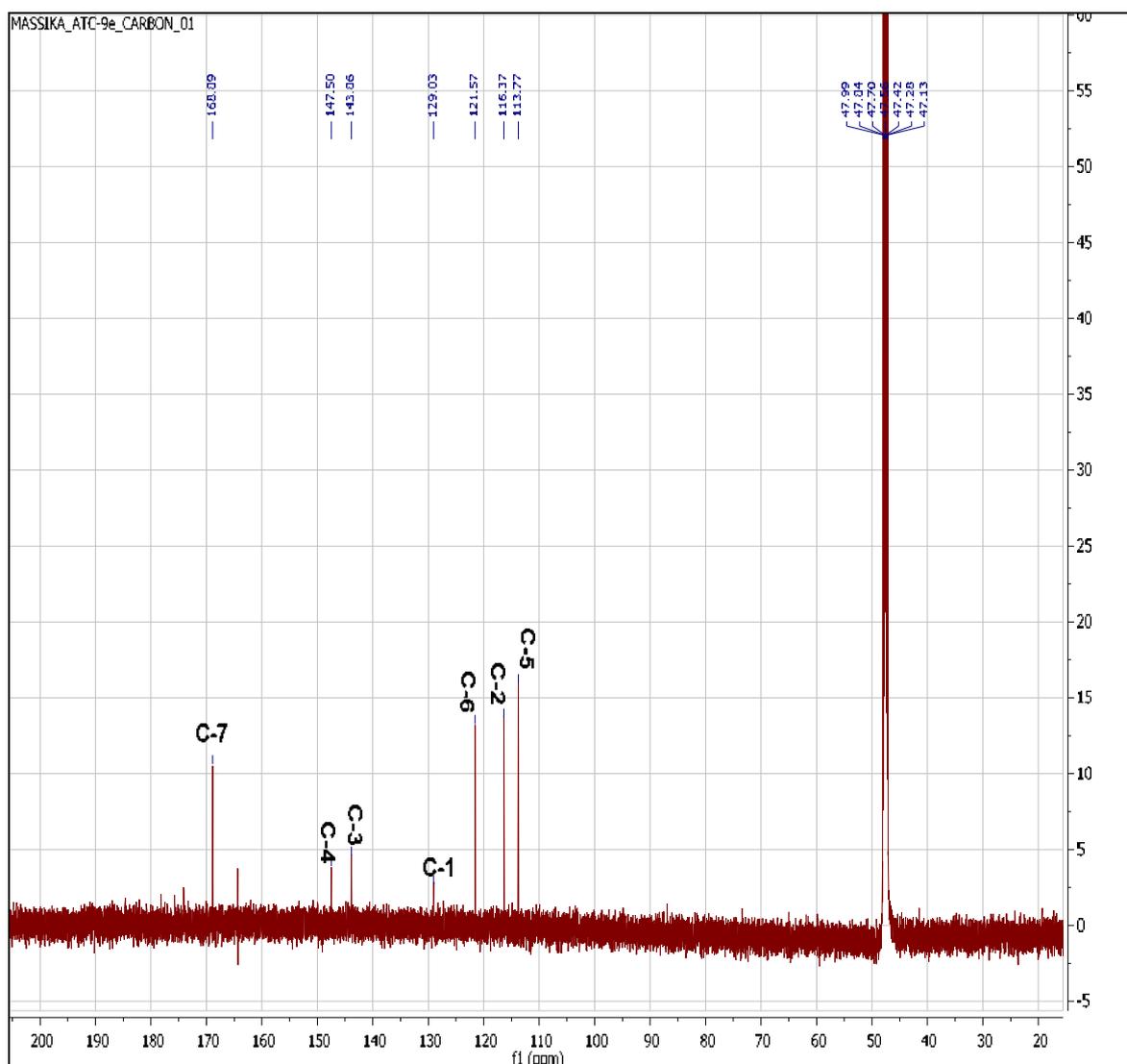


Figure III.98: Spectre de RMN ^{13}C (150 MHz, MeOH-d₄, δ ppm) du composé A13

L'examen simultané des spectres RMN¹H (figure III.99 et III.99a), HSQC (figure III.100) et COSY (figure III.101) de ce composé montre qu'il s'agit d'un composé aromatique substitué en position 1, 3 et 4, caractérisé par:

- Un doublet d'intégration 1H à δ_{H} 6,70 ppm ($J = 8,20$ Hz) attribuable à H-5, corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_{C} 113,77 ppm.
- Un doublet large à δ_{H} 7,35 ppm d'intégration 1H ($J = 8,20$ Hz) attribuable à H-6, corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_{C} 121,57 ppm.
- Un singulet large à δ_{H} 7,41 ppm d'intégration 1H attribuable à H-2, corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_{C} 116,37 ppm.

Ces résultats sont confirmés par la mesure du spectre COSY, où l'on observe des crêtes de corrélation entre le proton situé à δ_{H} 6,70 ppm (H-5) et celui résonnant à δ_{H} 7,35 ppm (H-6).

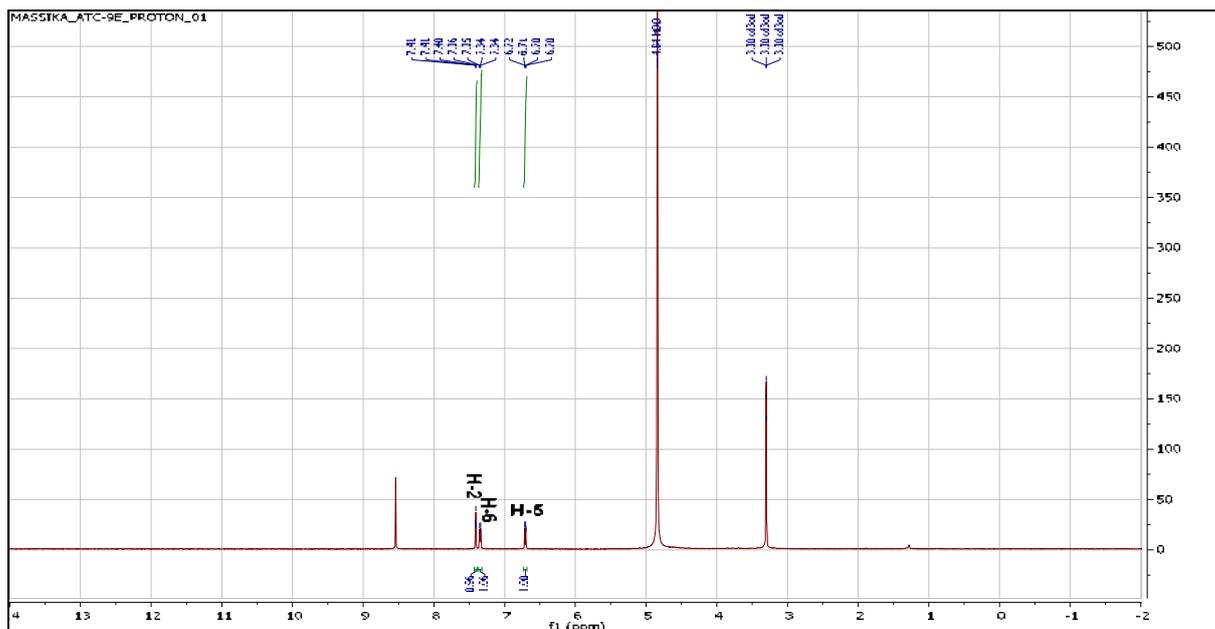


Figure III.99: Spectre RMN ^1H (600 MHz, MeOH-d₄, δ ppm) du composé A13

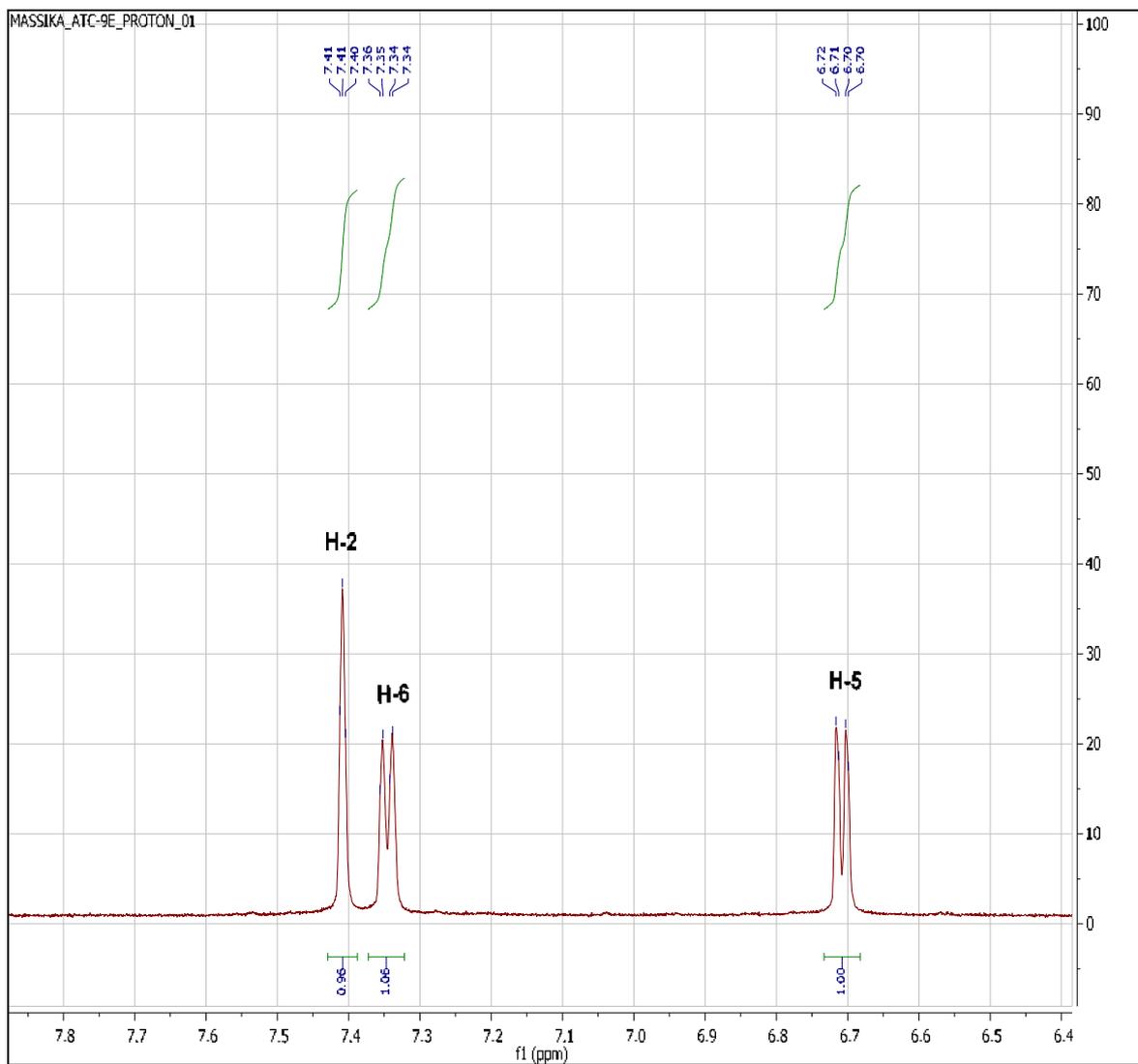


Figure III.99a: Spectre RMN ^1H (600 MHz, MeOH-d₄, δ ppm) étalé de 6,4 à 7,8 ppm du composé A13

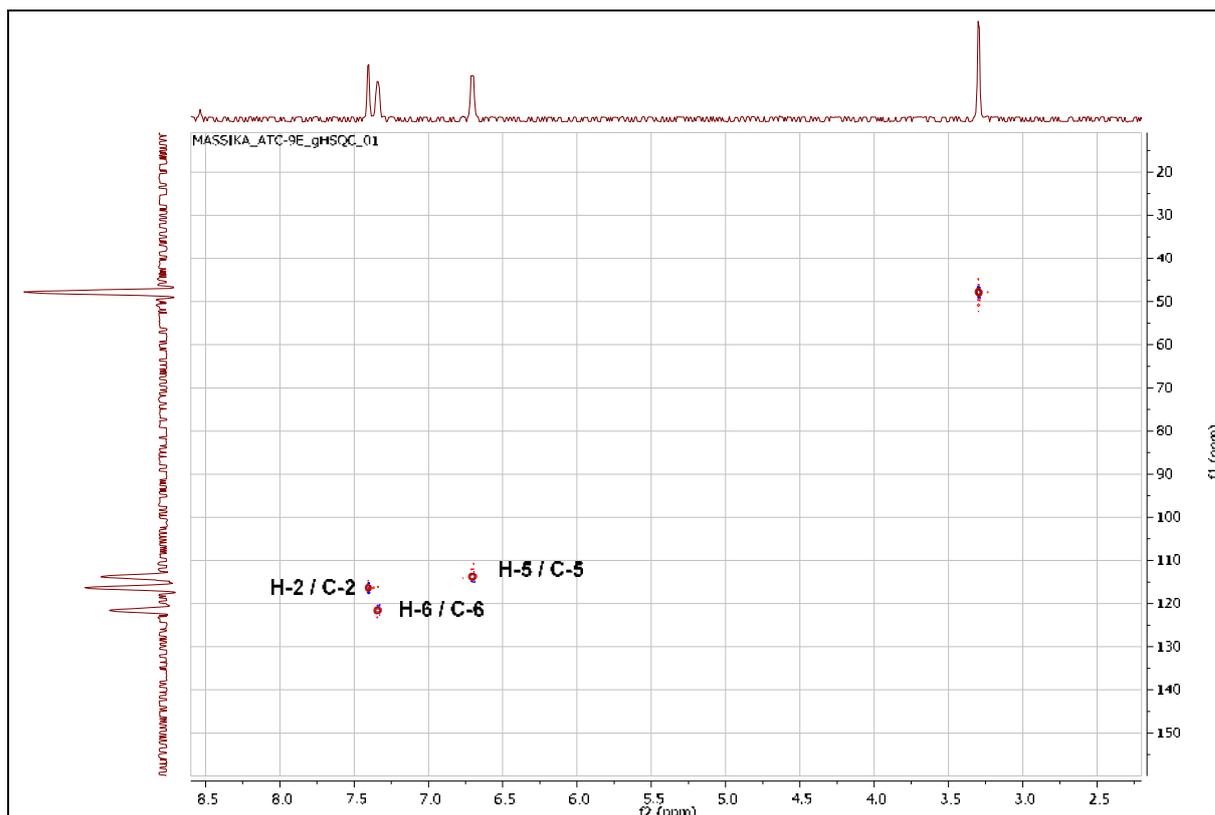


Figure III.100: Spectre RMN 2D HSQC (600 MHz, MeOH-d₄, δ ppm) du composé A13

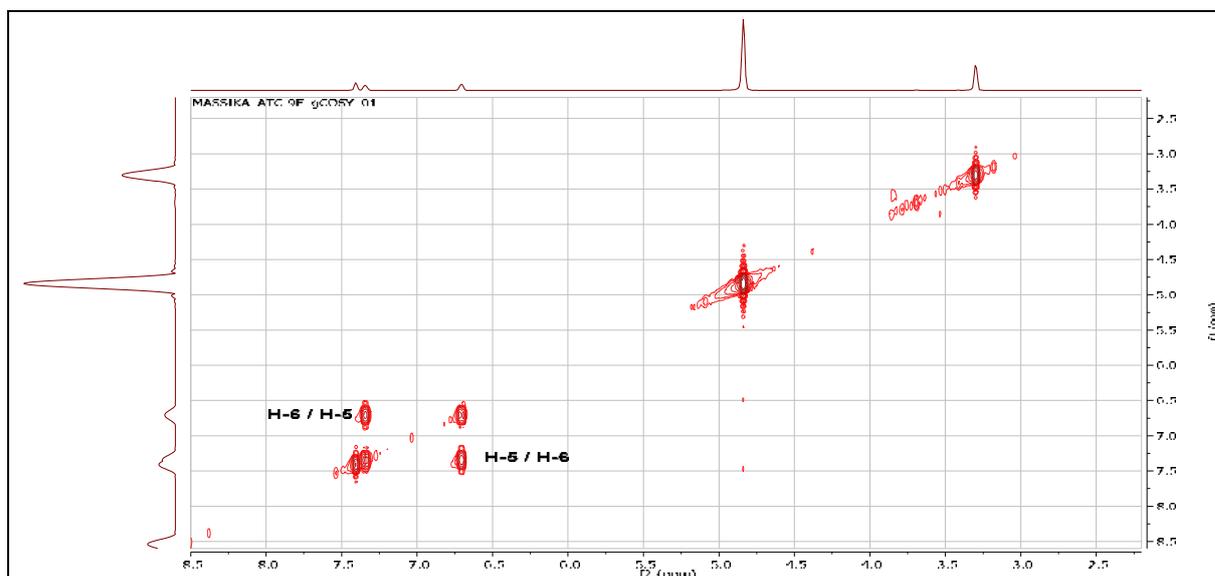


Figure III.101: Spectre RMN 2D COSY (600 MHz, MeOH-d₄, δ ppm) du composé A13

La mesure du spectre de corrélations hétéronucléaires observées à longue distance HMBC (figure III.102) a montré une corrélation entre le proton H-2 résonant à δ_{H} 7,41 ppm et les carbones C-6, C-3 et C-4 situés à δ_{C} 121,57; 143,86 et 147,50 ppm respectivement.

Cette expérience a ainsi montré des crêtes des corrélations entre le proton H-6 résonnant δ_{C} 7,35 ppm et les carbones C-2 et C-4 qui apparaît à δ_{C} 116,37 ppm et 147,50 ppm respectivement.

Toujours sur le spectre HMBC, le proton H-5 résonant à δ_H 6,70 ppm montre des taches de corrélation avec les carbones C-1, C-3 et C-4 situés à δ_C 129,03 ; 143,86 et 147,50 ppm respectivement.

L'ensemble de ces corrélations corrobore parfaitement les attributions établies.

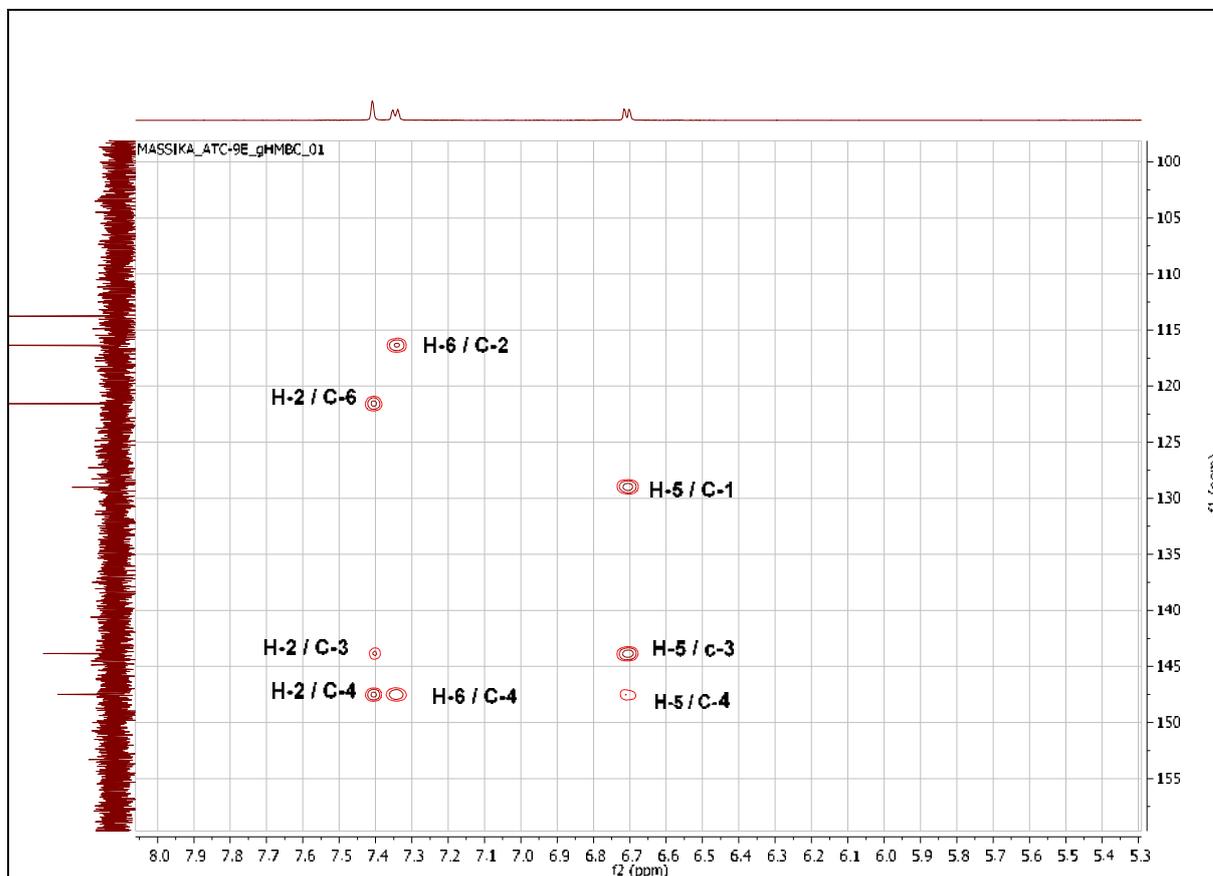


Figure III.102: Spectre RMN 2D HMBC (600 MHz, MeOH-d₄, δ ppm) du composé A13

Le tableau III.15 résume tous les déplacements chimiques des protons et carbones de cette molécule.

Tableau III.15 : Déplacements chimiques en RMN ¹³C et RMN ¹H du composé A13 enregistré dans MeOH-d₄

Position	δ_C (ppm)	δ_H (ppm, multiplicité, <i>J</i> en Hz)
1	129,03	/
2	116,37	7,41 (1H; <i>Sl</i>)
3	143,86	/
4	147,50	/
5	113,77	6,70 (1H; <i>d</i> ; 8,20)
6	121,57	7,35 (1H; <i>dl</i> ; 8,20)
7	168,89	/

La combinaison de l'ensemble de ces données mène à la structure de l'acide **3, 4-dihydroxy benzoïque** connue sous le nom l'acide **protocatéchique** [35]. Cette molécule possède des propriétés anti-inflammatoire, antioxydante, antibactérienne, anti-âge, anti-tumorale, anti-âge, anti hyperglycémique, anti-asthmatique et antiulcéreuse [36]. L'identification de ce produit

dans phase ACOEt par HPLC-TOF/MS en mode négatif est présentée dans le chromatogramme ci-après (figure III.103).

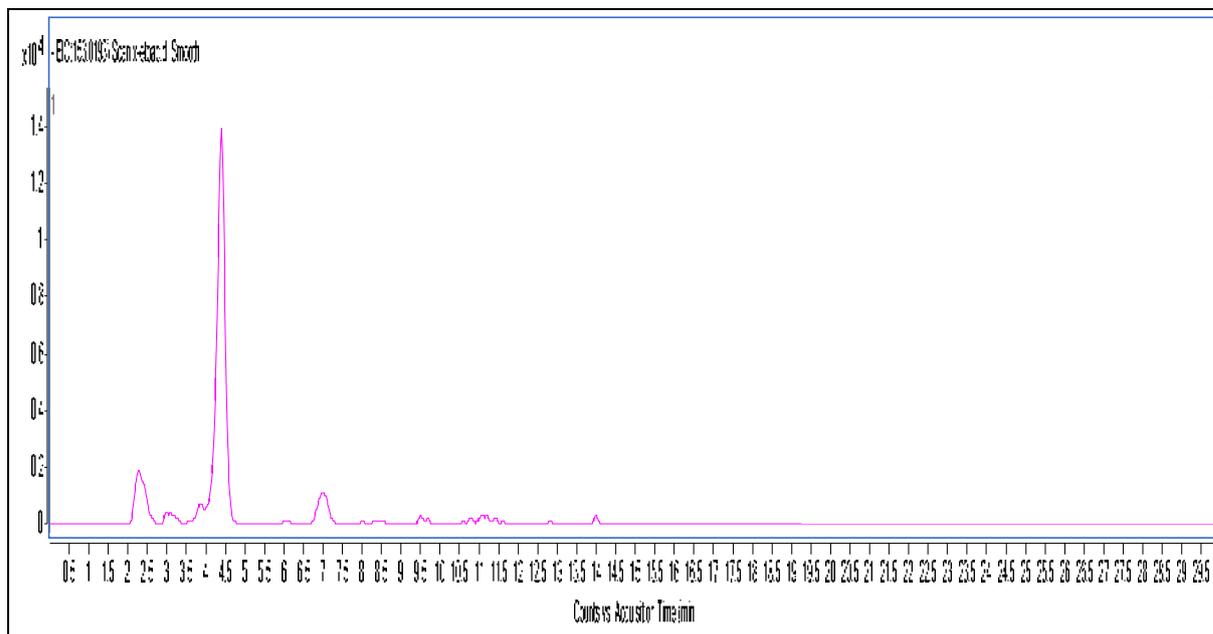


Figure III.103: Chromatogramme d'identification du produit A13 dans l'extrait ACOEt par HPLC-TOF/MS en mode négatif

III.2.1.14. Identification du composé A14 (ATC2b2f1)

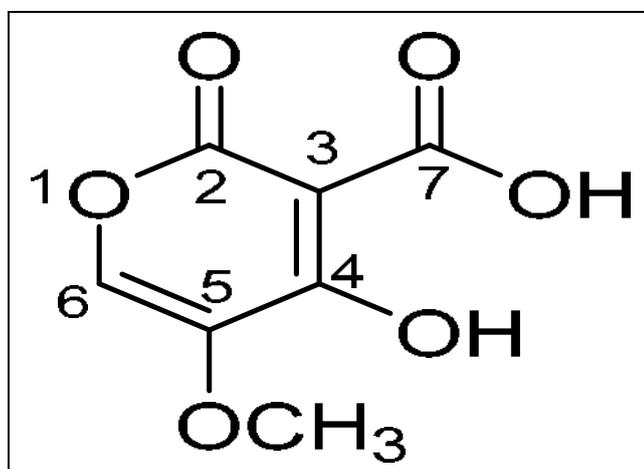


Figure III.104: Structure du composé A14

Un total de 7 carbones sur le spectre de RMN ^{13}C (figure III.105) et L'analyse du spectre DEPT (figure III.106) a fournit plus d'indications:

- Deux groupements carbonyles à δ_{C} 173,89 ppm et δ_{C} 168,98 ppm.
- Trois carbones éthyléniques quaternaires à δ_{C} 146,91 ppm, δ_{C} 137,54 ppm et δ_{C} 128,12 ppm.
- Un CH éthylénique à δ_{C} 106,53 ppm.
- Un groupement méthoxyle à δ_{C} 55,22 ppm.

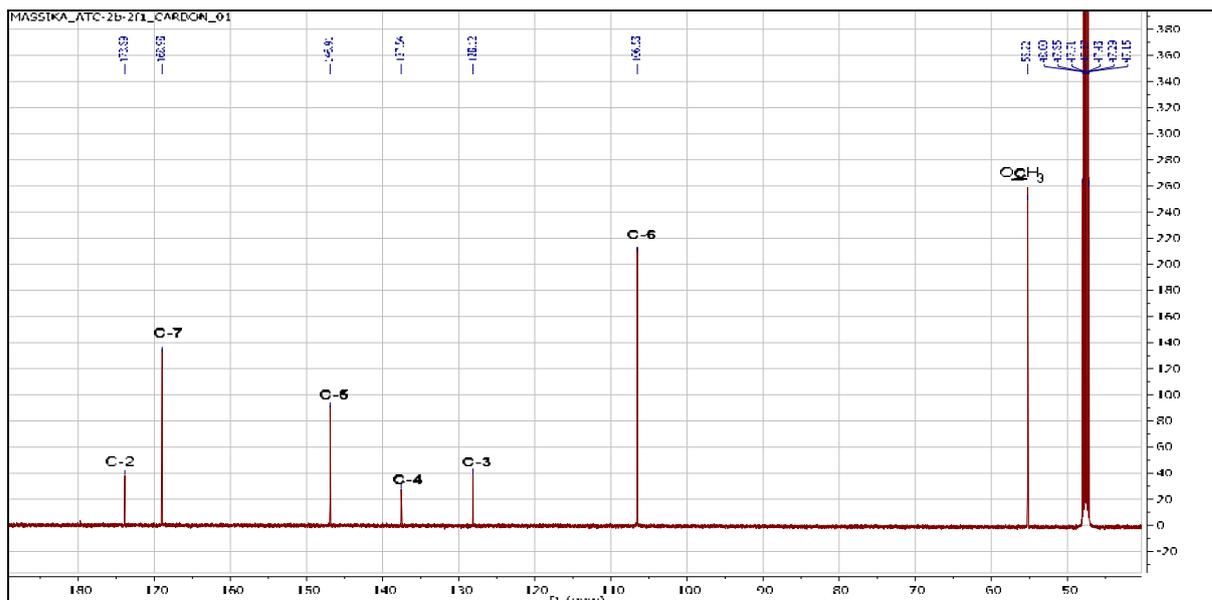


Figure III.105: Spectre RMN ^{13}C (150 MHz, MeOH-d₄, δ ppm) du composé A14

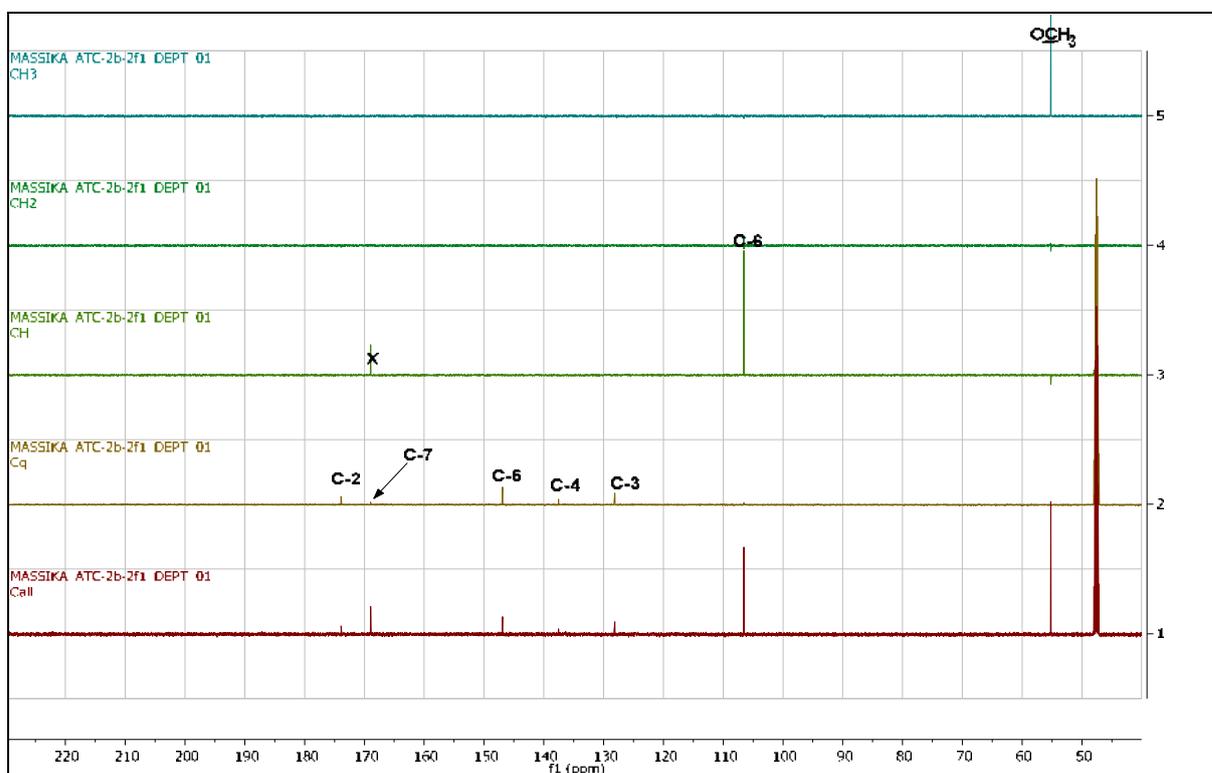


Figure III.106: Spectre DEPT (150 MHz, MeOH-d₄, δ ppm) du composé A14

L'analyse simultanée des spectres RMN¹H (figure III.107) et HSQC (figure III.108) permet de relever dans cette molécule la présence de:

- Un groupement méthoxyle à δ_{H} 3,87 ppm caractérisé par un signal de trois protons sous forme d'un singulet, corrélant sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_{C} 55,22 ppm.
- Un seul signal déblindé à δ_{H} 7,32 ppm d'intégration 1H sous forme d'un singulet, corrélant sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_{C} 106,53 ppm, attribuable à H-6.

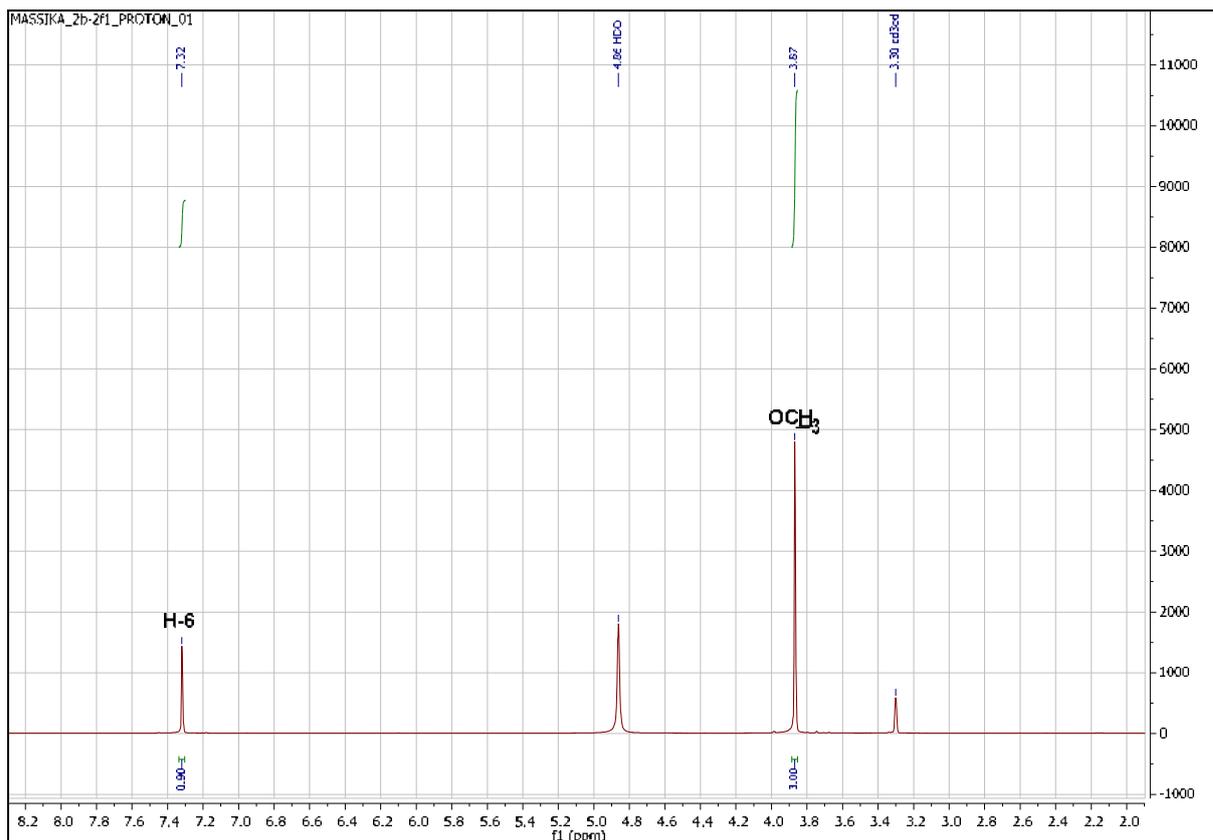


Figure III.107: Spectre RMN ^1H (600 MHz, MeOH-d₄, δ ppm) du composé A14

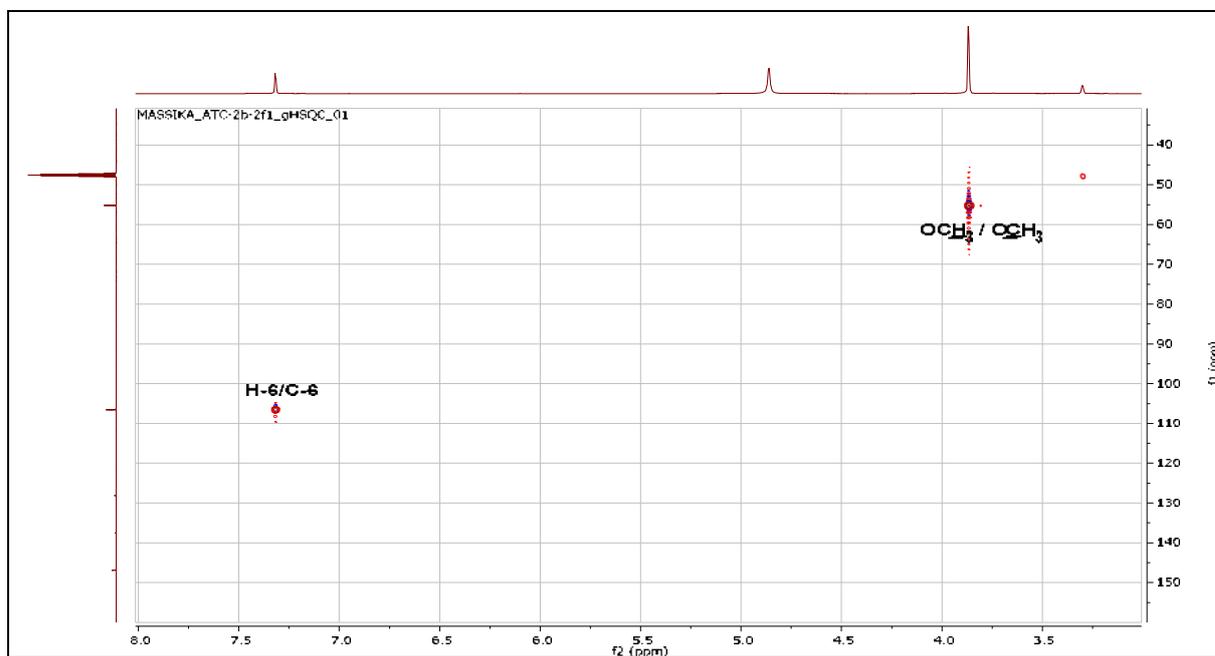


Figure III.108: Spectre RMN 2D HSQC (600 MHz, MeOH-d₄, δ ppm) du composé A14

La mesure du spectre de corrélations hétéronucléaires observées à longue distance HMBC (figure III.109) a montré la corrélation entre les protons résonant à δ_{H} 3,87 ppm et le carbone situé à δ_{C} 146.91 ppm (C-5) suggérant l'attachement du groupement méthoxyle en position 5. Sur le même spectre, Le proton attribué à H-6 montre trois taches de corrélation:

- La première en 2J confirme le C-5 à δ_C 146.91 ppm
- La deuxième en 3J avec un atome de carbone à δ_C 137,54 ppm qui ne peut être attribué qu'au C-4.
- La troisième en 3J avec le carbone du carbonyle à δ_C 173,89 ppm (C-2) qui correspond au fonction ester du cycle pyrone.
- L' atome de carbone restant à δ_C 128,12 ppm est attribuable à C-3.

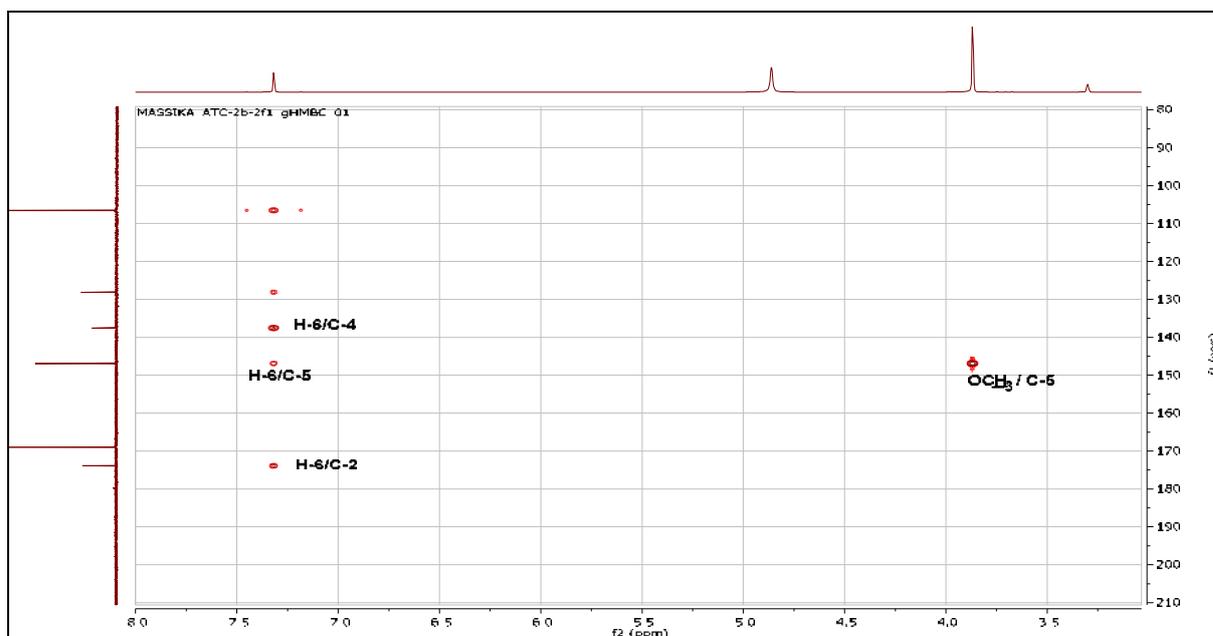


Figure III.109: Spectre RMN 2D HMBC (600 MHz, MeOH-d₄, δ ppm) du composé A14

Ces résultats sont en bon accord avec la mesure de l'expérience COSY (Figure III.110), qui montre l'absence de couplage.

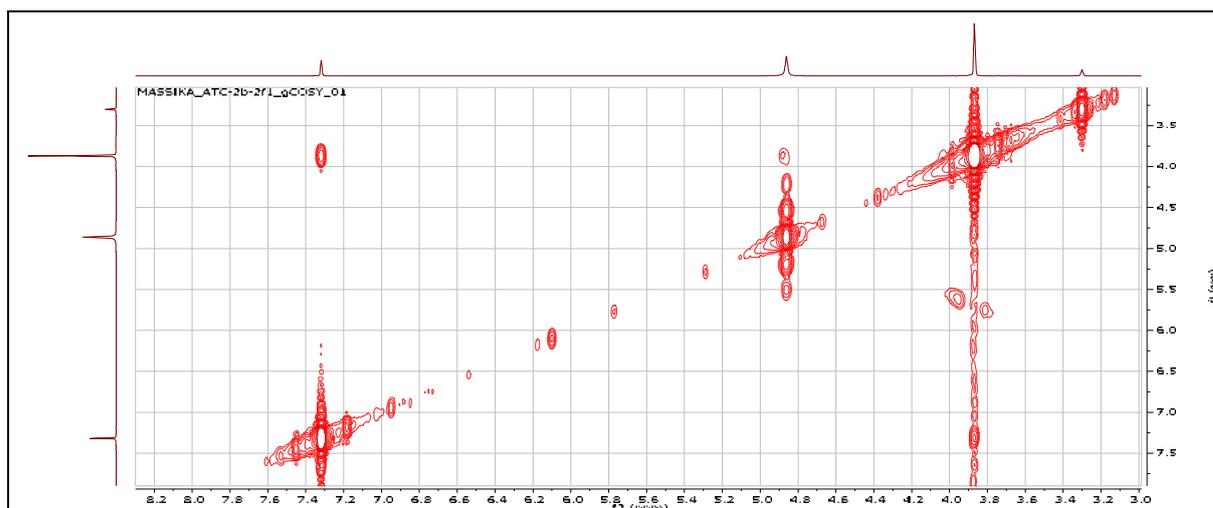


Figure III.110: Spectre RMN 2D COSY (600 MHz, MeOH-d₄, δ ppm) du composé A14

Les valeurs des déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé sont représentées dans le tableau III.16 ci-dessous.

Tableau III.16 : Déplacements chimiques en RMN ^{13}C et RMN ^1H du composé **A14** enregistré dans MeOH- d_4

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm, multiplicité, J en Hz)
2	173,89	/
3	128,12	/
4	137,54	/
5	146,91	/
6	106,53	(1H ; S)
7	168,98	/
OCH ₃	55,22	3,87 (3H ; S)

la structure du composé **A14** a été élucidée comme étant **acide 4-hydroxy-5-méthoxy-2-oxo-2H-pyran-3-carboxylique**. En effet, sa présence n'a jamais été signalée dans la littérature.

La détection du composé **A14** dans l'extrait ACOEt par HPLC-TOF/MS en mode négatif est présentée dans le chromatogramme ci-après (figure III.111).

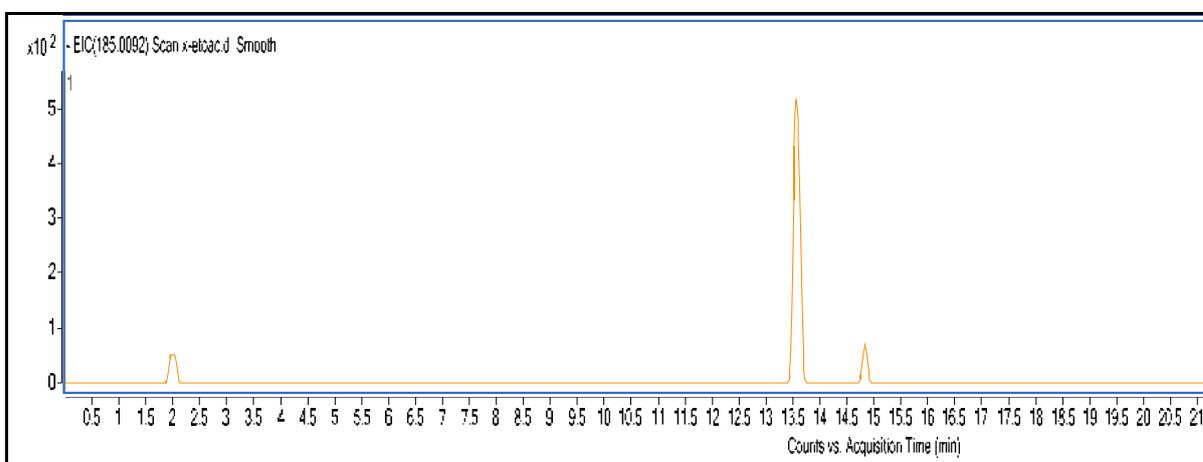


Figure III.111: Chromatogramme d'identification du produit **A14** dans l'extrait ACOEt par HPLC-TOF/MS en mode négatif

III.2.2. Identification structurale des produits isolés de l'extrait *n*-BuOH

III.2.2.1. Elucidation structurale du composé **B1**

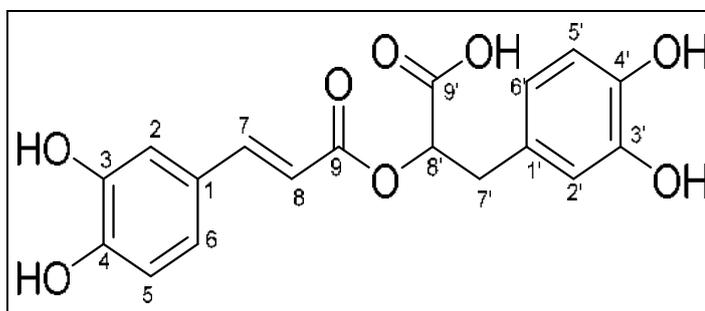


Figure III.112: Structure du composé **B1**

Le spectre RMN ^{13}C (figures III.113, III.113a et III.113b) du composé **B1** obtenu sous forme d'une poudre jaune, met en évidence la présence de 18 atomes de carbone et les séquences DEPT (figure III.114 et III.114a) de ce composé montrent:

- Deux groupements carbonyles à δ_C 167,72 et 176,28 ppm.
- Un groupement CH_2 à δ_C 37,42 ppm.
- Un groupement CH oxygéné à δ_C 76,40 ppm.
- Deux carbones quaternaires non oxygénés à δ_C (126,59 ; 129,85) ppm.
- Quatre carbones quaternaires oxygénés δ_C (143,32; 144,48; 145,27; 147,90) ppm.
- Huit groupements CH éthyléniques à δ_C (113,76; 114,30; 114,80; 115,07; 116,11; 120,35; 121,44; 145,18) ppm.

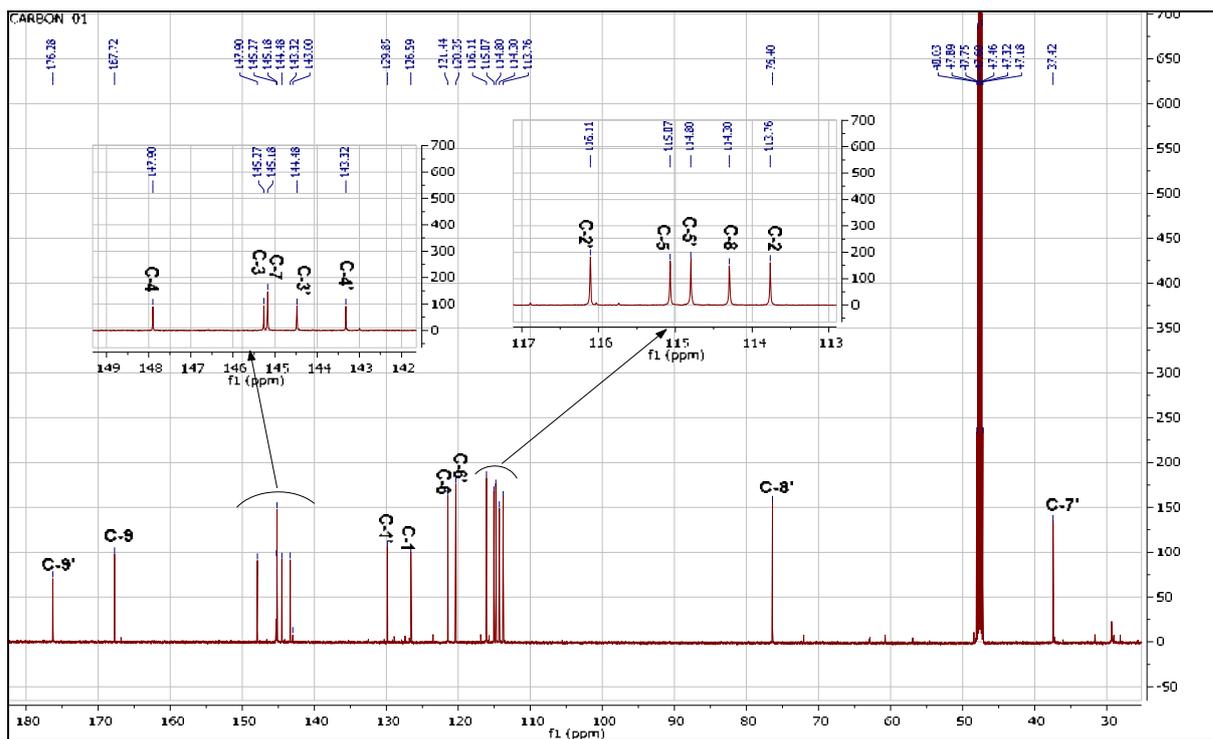


Figure III.113: Spectre RMN ^{13}C (150 MHz, MeOH-d₄, δ ppm) du composé **B1**

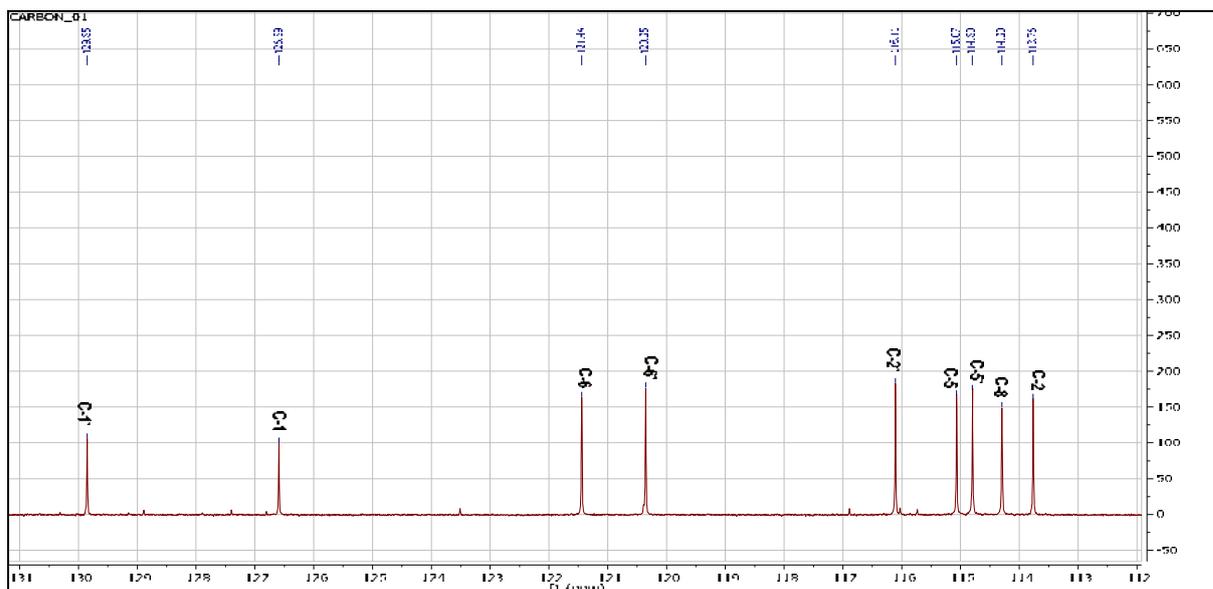


Figure III.113a: Spectre RMN ^{13}C (150 MHz, MeOH-d₄, δ ppm) étalé de 112 à 131 ppm du composé **B1**

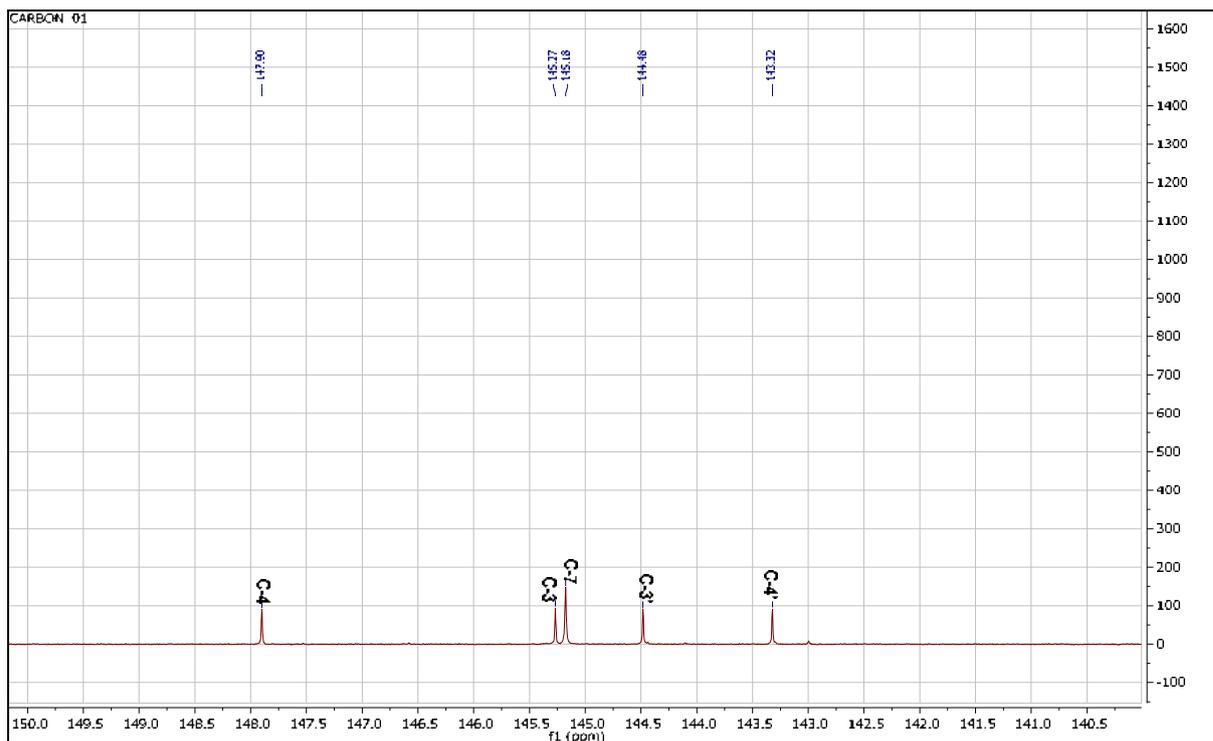


Figure III.113b: Spectre RMN ^{13}C (150 MHz, MeOH-d₄, δ ppm) étalé de 140 à 150 ppm du composé **B1**

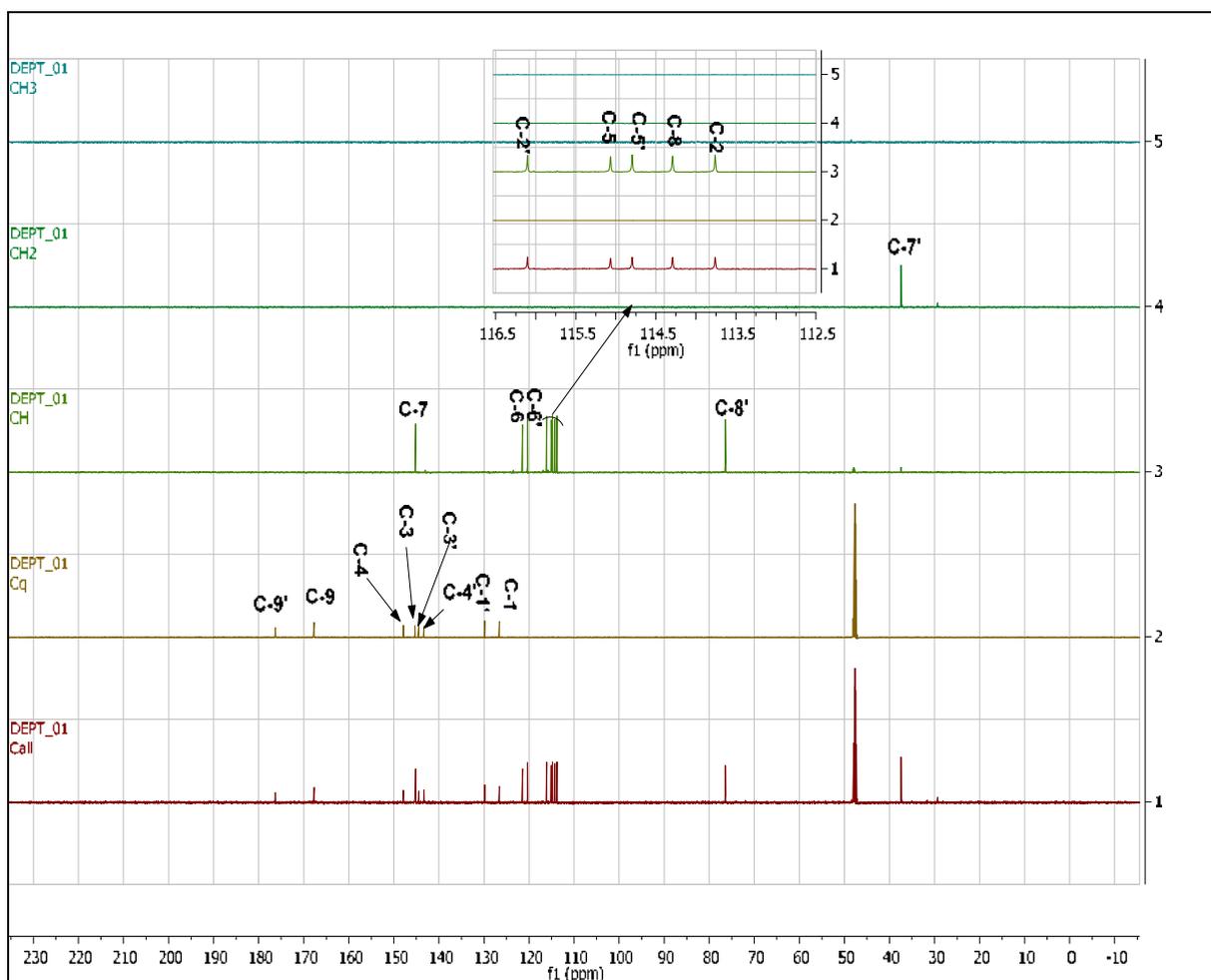


Figure III.114: Spectre DEPT (150 MHz, MeOH-d₄, δ ppm) du composé **B1**

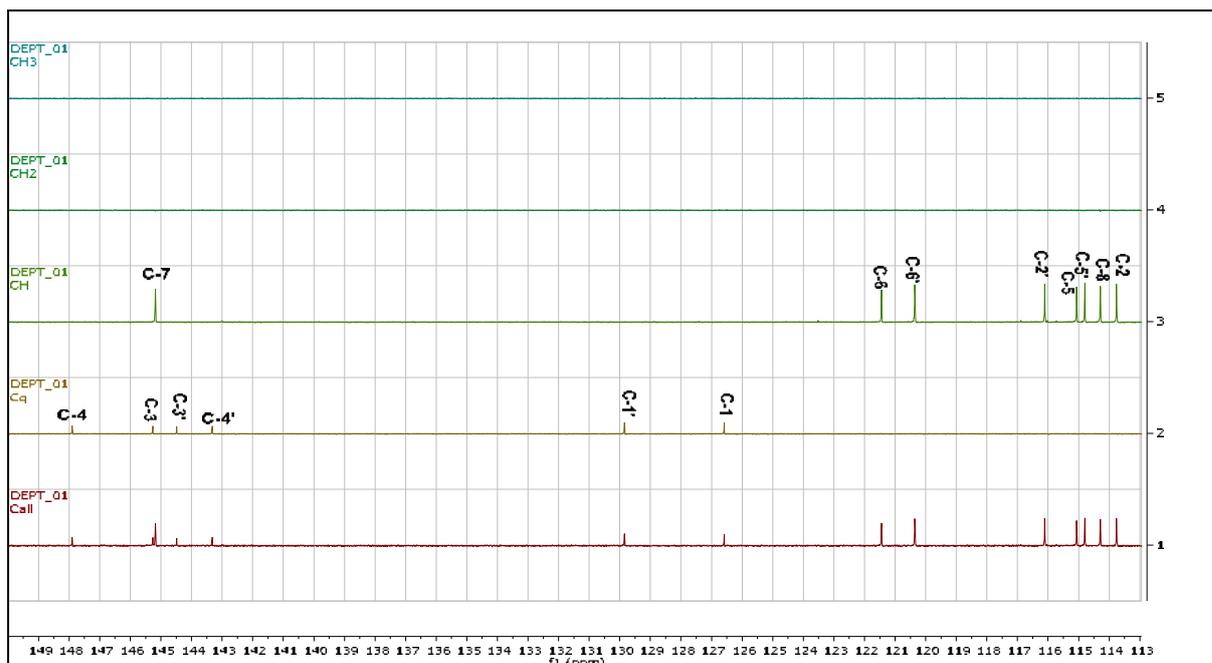


Figure III.114a: Spectre DEPT (150 MHz, MeOH-d₄, δppm) étalé de 113 à 149 ppm du composé **B1**

L'examen simultané des spectres RMN ¹H (figures III.115 et III.115a), HSQC (figure III.116) et COSY (figure III.117) du composé B1 permet de tirer les indications suivantes:

- Un singulet large à δ_H 7,02 ppm d'intégration 1H corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_C 113,76 ppm, attribuables à H-2 et C-2 respectivement.
- Un doublet large à δ_H 6,90 ppm d'intégration 1H ($J = 8,20$ Hz) corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_C 121,44 ppm, attribuables à H-6 et C-6 respectivement.
- Un signal à δ_H 6,77-6,76 ppm, d'intégration 2H attribuable à H-2' et H-5 respectivement. Ce signal correspond à deux doublets superposés. Le spectre RMN de corrélations hétéronucléaires à courtes distances HSQC indique que les protons localisés à δ_H 6,77 et δ_H 6,76 ppm corrèlent aux signaux situés à δ_C 116,11 et δ_C 115,07 ppm respectivement.
- Un doublet à δ_H 6,67 ppm d'intégration 1H ($J = 8,20$ Hz) corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_C 114,80 ppm, attribuables à H-5' et C-5' respectivement.
- Un doublet large à δ_H 6,63 ppm d'intégration 1H ($J = 8,20$ Hz) corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_C 120,35 ppm, attribuables à H-6' et C-6' respectivement.

Ces constatations permettent de confirmer la présence de deux systèmes ABX correspondants à deux cycles aromatiques 1, 3, 4-trisubstitués.

- Deux signaux résonant chacun sous forme de doublet ($J = 15,90$ Hz) à 7,50 et 6,26 ppm de deux protons oléfiniques de configuration trans, attribuables à H-7 et H-8 respectivement. Cette information est confirmée par l'expérience COSY, où ils présentent entre eux des crêtes de corrélations.

Les carbones correspondants à ces deux derniers protons sont attribués par analyse du spectre HSQC à δ_C 145,18 ppm (C-7) et 114,30 ppm (C-8).

- Un signal à δ_H 5,09 ppm d'intégration 1H sous forme d'un doublet de doublet ($J = 9,77$; 3,25 Hz) corrélant sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_C 76,40 ppm. D'après les valeurs des déplacements chimiques du proton et du carbone, ce dernier ne peut être qu'oxygéné donc attribuable à H-8'.
- Un doublet de doublet à δ_H 3,10 ppm d'intégration 1H ($J = 14,38$; 3,32 Hz) corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_C 37,42 ppm. Ce même carbone montre une tache de corrélation avec un signal à δ_H 2,94 ppm, apparaît sur le spectre proton sous forme d'un doublet de doublet ($J = 14,26$; 9,91 Hz) d'intégration 1H. Ces observations indiquent que ces 2H sont magnétiquement non équivalents entre eux et sont donc attribuables à H-7'a et H-7'b.

Les protons du groupement CH_2 à δ_H 3,10 ppm et δ_H 2,94 ppm corrélient sur le spectre COSY avec le proton du groupement CH oxygéné à δ_H 5,09 ppm, Cette information indique qu'ils sont reliés .

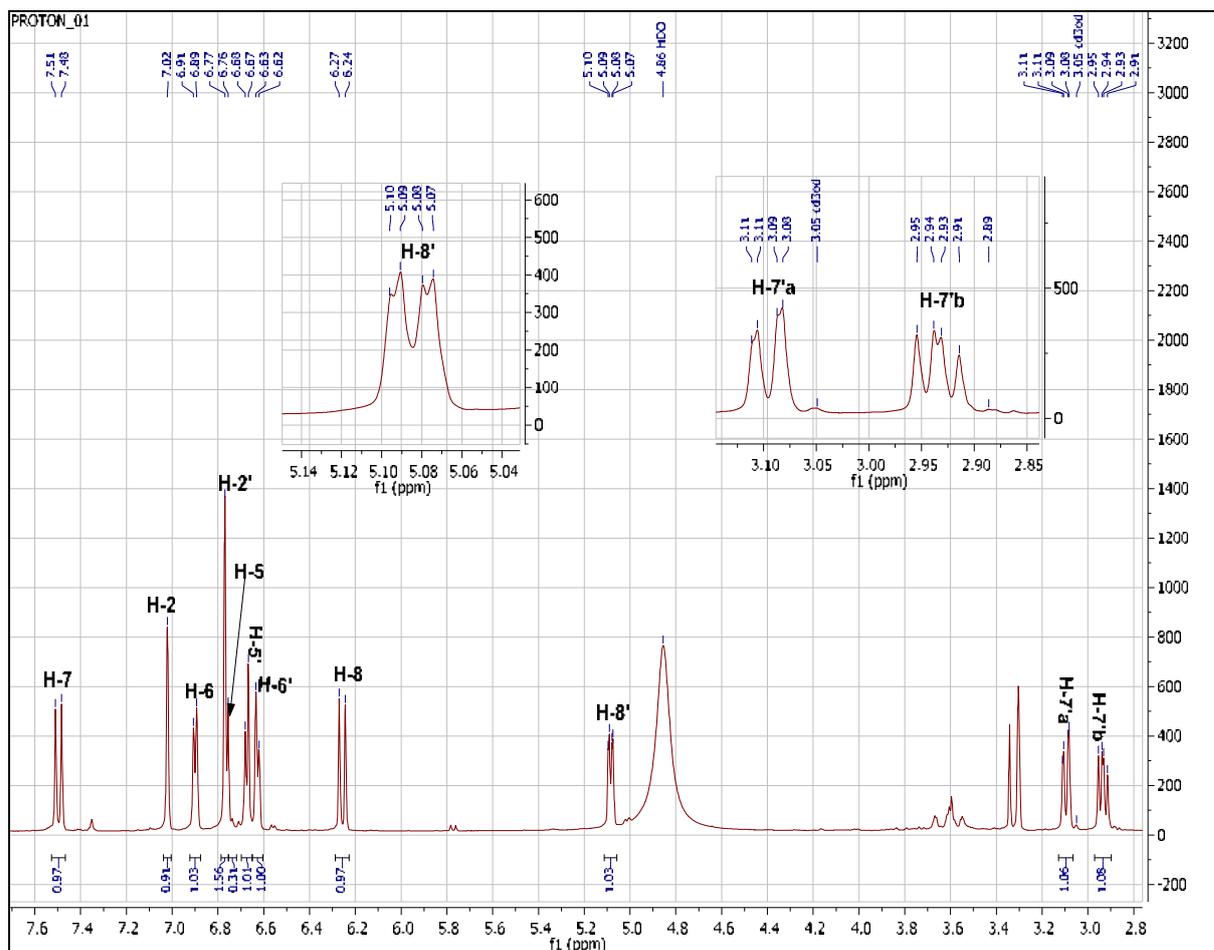


Figure III.115: Spectre RMN 1H (600 MHz, MeOH-d₄, δ ppm) du composé B1

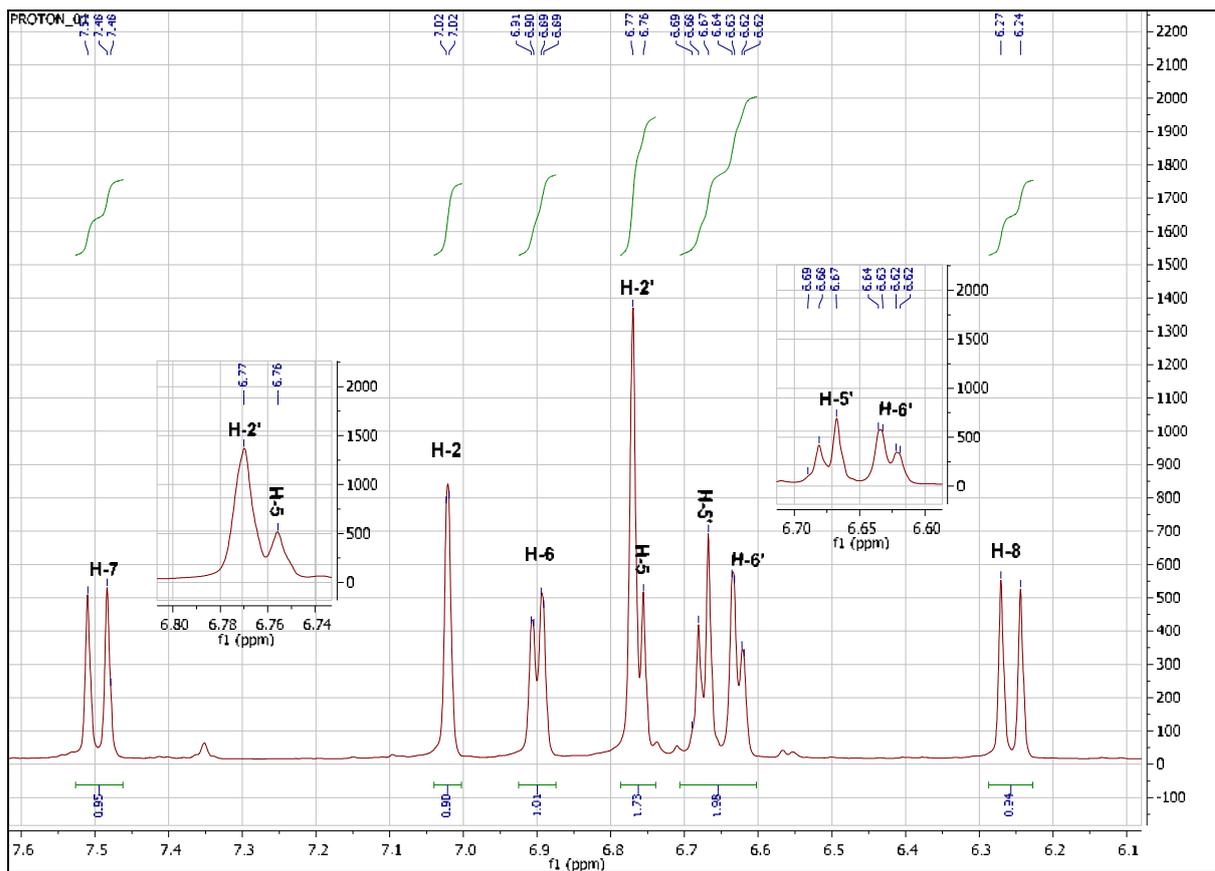


Figure III.115a: Spectre RMN ^1H (600 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) étalé de 6,1 à 7,6 ppm du composé B1

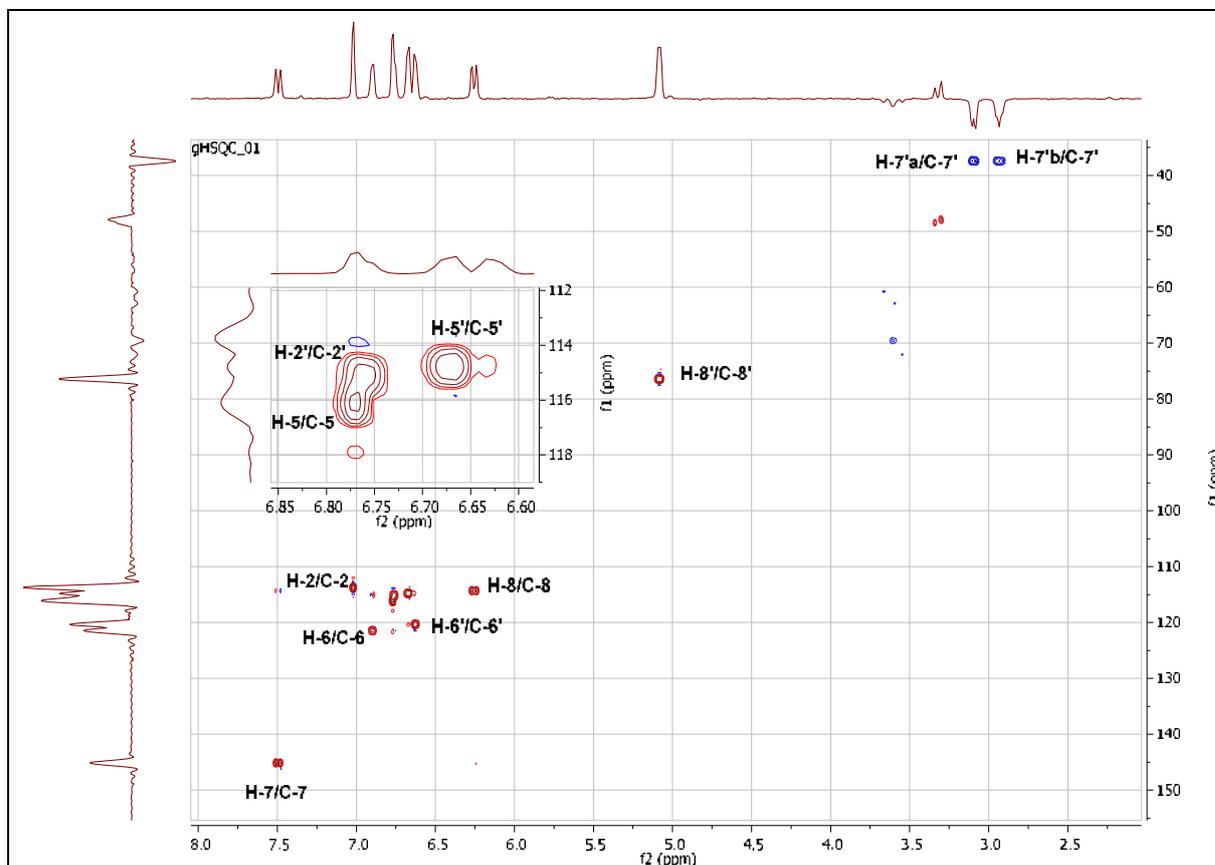


Figure III.116: Spectre RMN 2D HSQC (600 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé B1

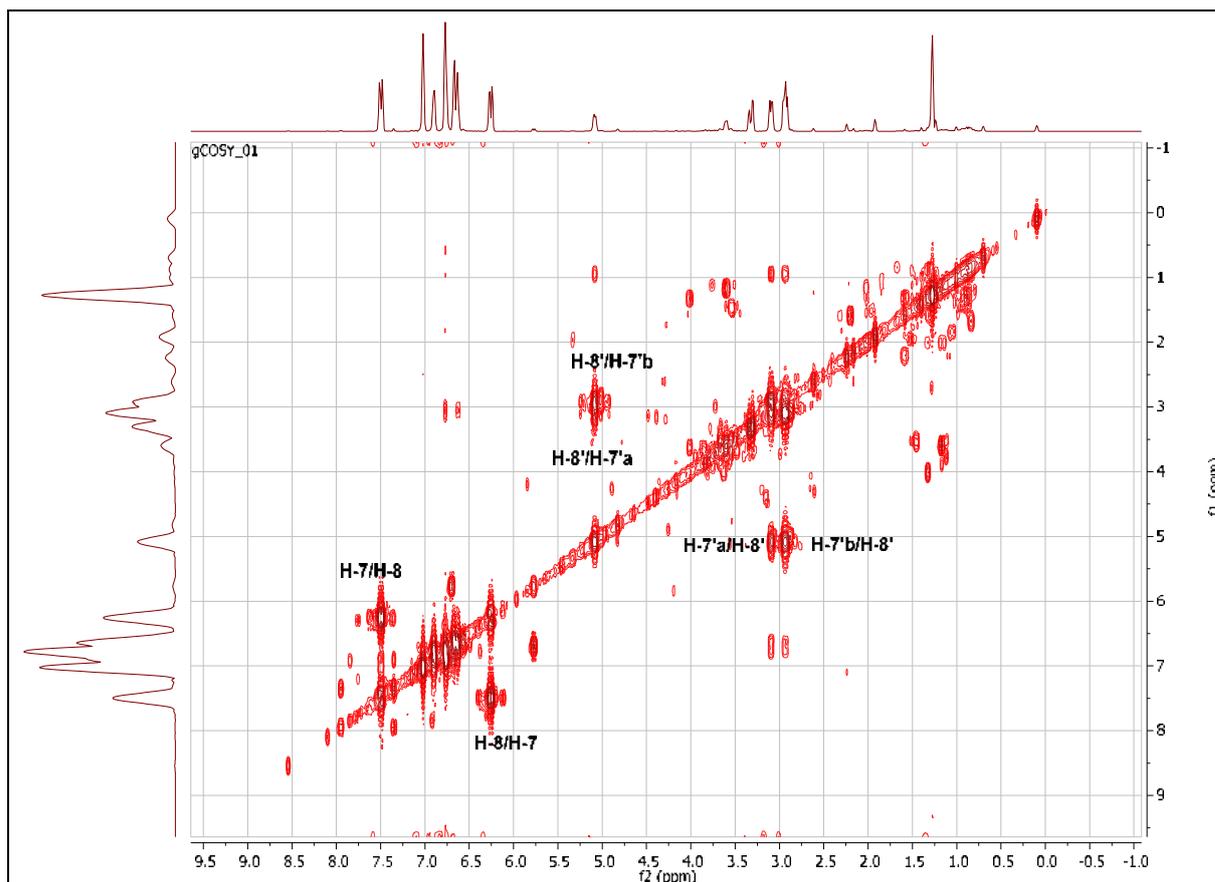


Figure III.117: Spectre RMN 2D COSY (600 MHz, MeOH-d₄, δ ppm) du composé B1

Les attributions des carbones restants ont été complétées par l'étude du spectre de corrélation hétéronucléaire à longue distance HMBC (figure III.118).

- Deux taches de corrélation entre H-2 et H-5 et un atome de carbone quaternaire oxygéné résonant à δ_C 145,27 ppm attribuable à C-3.
- Les protons H-2, H-5 et H-6 corrélient avec un carbone quaternaire à δ_C 147,90 ppm, permettant ainsi son attribution à C-4.
- Deux taches de corrélation entre H-5 et H-8 et un atome de carbone résonant à δ_C 126,59 ppm attribuable à C-1.
- Des corrélations en 3J observées sur le spectre HMBC entre le proton éthylénique à δ_H 7,50 (H-7) et les atomes de carbone à δ_C 113,76 (C-2) et 121,44 (C-6) et en 2J avec le carbone quaternaire résonant à δ_C 126,59 (C-1). Ces corrélations confirment la position de ce groupement éthylénique sur le carbone C-1 du noyau aromatique.
- Les protons H-7 et H-8 montrent deux taches de corrélation avec le même atome de carbone à δ_C 167,72 ppm qui ne peut être attribué qu'au carbone C-9.
- Une tache de corrélation entre H-5' et un atome de carbone quaternaire oxygéné à δ_C 144,48 ppm qui ne peut être que le C-3'.

- Trois taches de corrélation entre le H-2', H-5' et le H-6' et un atome de carbone quaternaire oxygéné à δ_C 143,32 ppm qui est attribuable à C-4'.
- Deux taches de corrélation entre le H-5' et H-8' et un atome de carbone à δ_C 129,85 ppm attribuable à C-1'.
- Le spectre HMBC montre des couplages en 3J entre les protons du groupement CH₂ (δ_H 3,10 ppm et δ_H 2,94 ppm) et les carbones résonant à δ_C 116,11 (C-2') et 120,35 (C-6') et en 2J avec le carbone quaternaire résonant à δ_C 129,85 (C-1'). Ces observations indiquent l'attachement du groupement CH₂ au noyau aromatique par le carbone C-1'.
- Des corrélations entre les protons du groupement CH₂-7' et H-8' et le carbone du carbonyle à δ_C 176,28 ppm, permettant ainsi son attribution à C-9'.

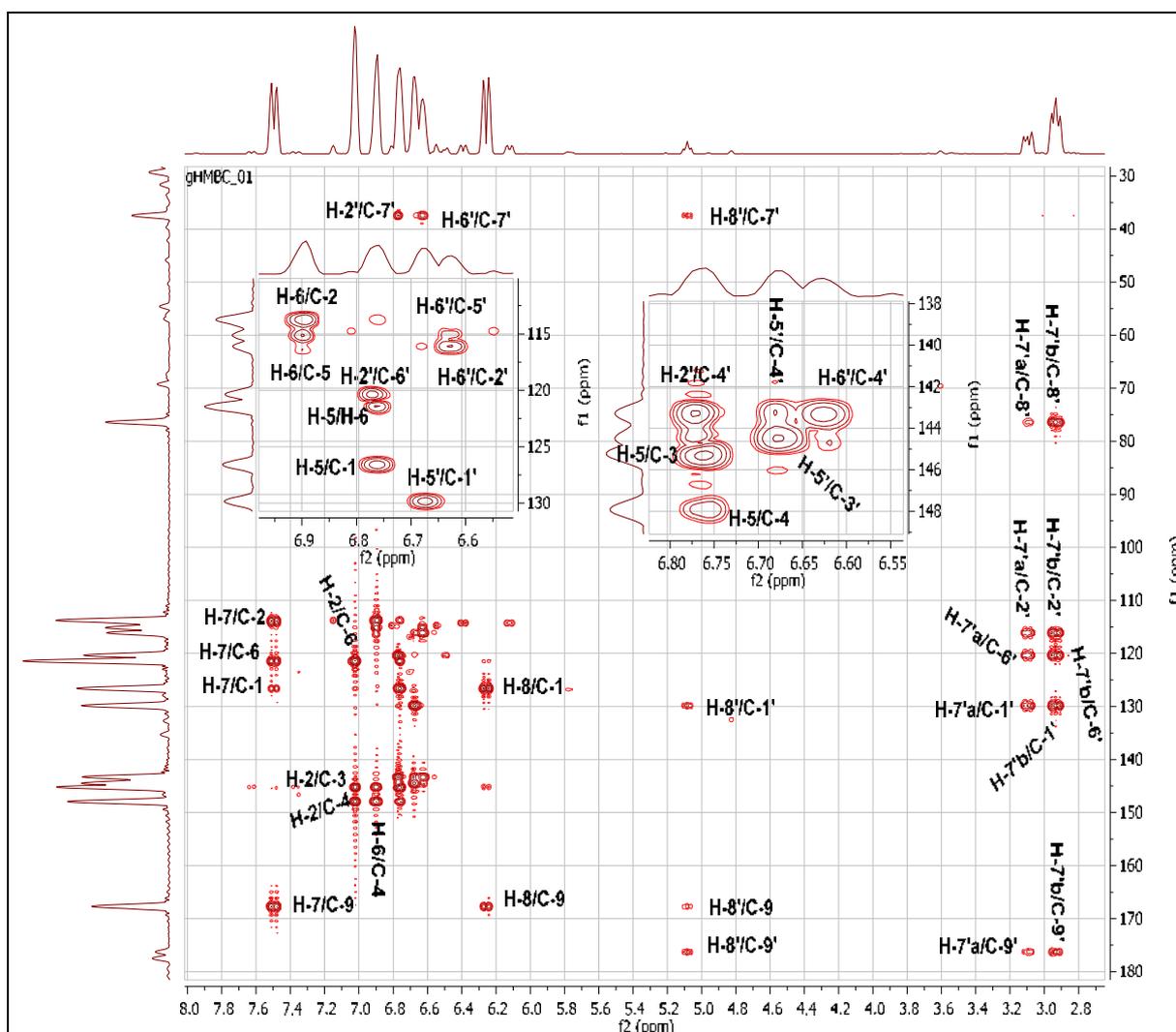


Figure III.118: Spectre RMN 2D HMBC (600 MHz, MeOH-d₄, δ ppm) du composé **B1**

Le tableau III.17 englobe tous les déplacements chimiques des protons et carbones du composé **B1**.

Tableau III.17 : Déplacements chimiques en RMN ^{13}C et RMN ^1H du composé B1 enregistré dans MeOH-d4

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm, multiplicité, J en Hz)
1	126,59	/
2	113,76	7,02 (1H; <i>Sl</i>)
3	145,27	/
4	147,90	/
5	115,07	6,76 (1H; <i>m</i>)
6	121,44	6,90 (1H ; <i>dl</i> ; 8,20)
7	145,18	7,50 (1H ; <i>d</i> ; 15,90)
8	114,30	6,26 (1H ; <i>d</i> ; 15,90)
9	167,72	/
1'	129,85	/
2'	116,11	6,77 (1H ; <i>m</i>)
3'	144,48	/
4'	143,32	/
5'	114,80	6,67 (1H ; <i>d</i> ; 8,20)
6'	120,35	6,63 (1H ; <i>dl</i> ; 8,20)
7'	37,42	2,94 (1H ; <i>dd</i> ; 14,26 ; 9,91) 3,10 (1H ; <i>dd</i> ; 14,38 ; 3,32)
8'	76,40	5,09 (1H ; <i>dd</i> ; 9,77 ; 3,25)
9'	176,28	/

La comparaison des données spectrales du composé B1 avec celles de la littérature [37] confirme l'identité de celui-ci comme étant **l'acide rosmarinique**. Il a été isolé pour la première fois à l'état pur par deux chimistes italiens, Scarpati et Oriente en 1958. Son nom vient du nom de la plante à partir de laquelle il a été isolé, le romarin (*Rosmarinus officinalis*) [38]. De nombreuses propriétés biologiques ont été attribuées à l'acide rosmarinique notamment un effet antioxydant [39].

III.2.2.2. Elucidation structurale du composé B2

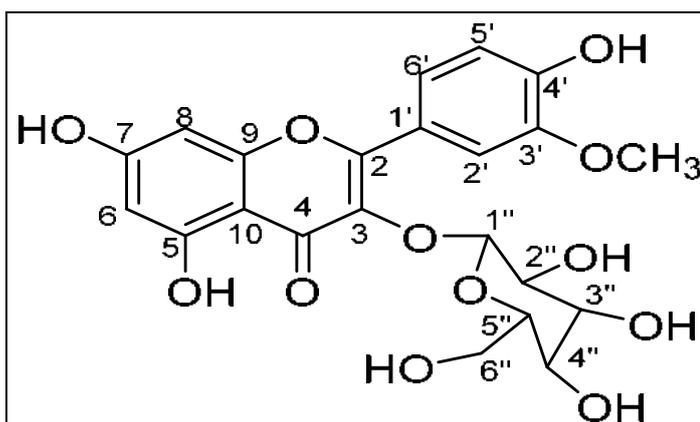


Figure III.119: Structure du composé B2

Le composé B2 a été isolé sous forme d'une poudre jaune. Son fluorescence noire violette sous lumière de Wood à 365 nm, réagit avec le réactif de NH_3 en affichant une coloration jaune, laissant envisager une structure de type flavonoïde.

Les données des spectres RMN de ce composé orientent vers une structure du type flavonoïde glycosylé. En effet, l'analyse simultanée des spectres RMN ^{13}C (figures III.120, III.120a et III.120b) et DEPT (figures III.121 et III.121a) montre la présence de vingt deux atomes de carbone dont:

- Un signal à δ_{C} 56,43 ppm relatif au groupement méthoxyle.
- Un groupement CH_2 à δ_{C} 60,76 ppm.
- Cinq CH aromatiques : δ_{C} 122,31 ppm, δ_{C} 115,58 ppm, δ_{C} 113,98 ppm, δ_{C} 99,18 ppm et δ_{C} 94,14 ppm.
- Cinq CH oxygénés: δ_{C} 102,05 ppm, δ_{C} 76,38 ppm, δ_{C} 73,54 ppm, δ_{C} 71,70 ppm et δ_{C} 68,39 ppm. Les valeurs des déplacements chimique sont caractéristiques des CH oxygénés d'une entité osidique [2].
- Dix carbones quaternaires dont un pic à δ_{C} 177,83 ppm caractéristique d'un groupement carbonyle, ce qui permet l'identification du carbone 4 du cycle C et un signal à δ_{C} 133,56 ppm caractéristique du carbone 3 d'un flavonol substitué en cette position [40].

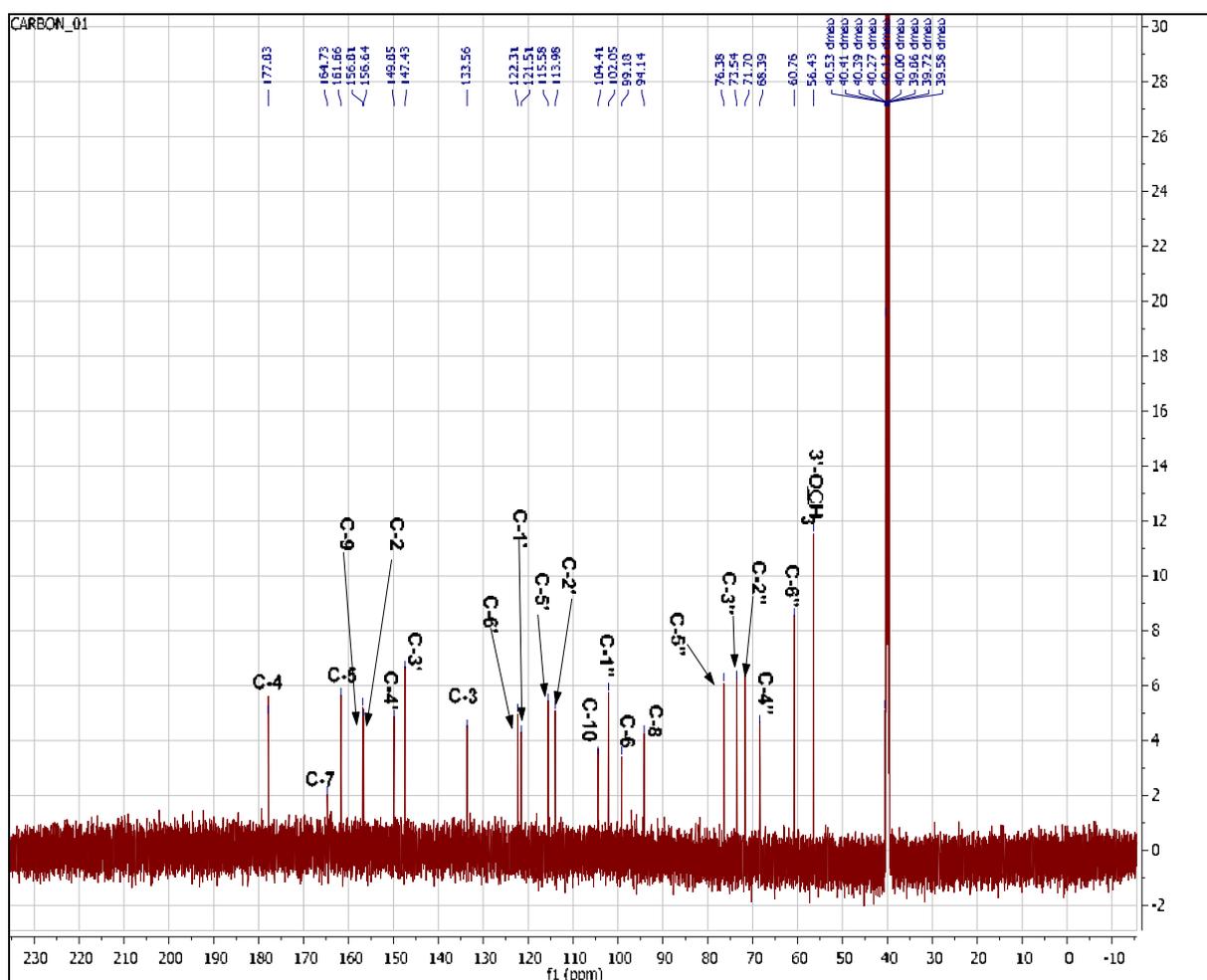


Figure III.120: Spectre RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO- d_6 , δ_{ppm}) du composé B2

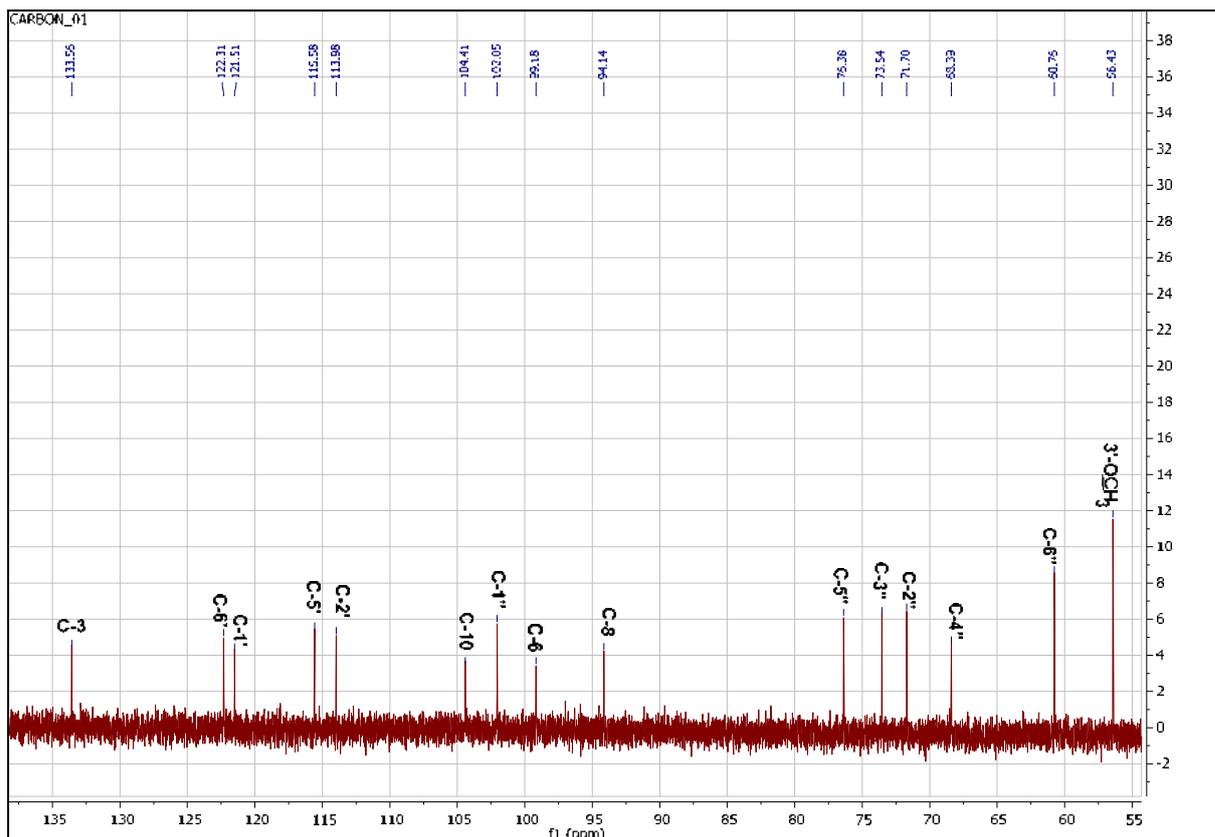


Figure III.120a: Spectre RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-d₆, δppm) étalé de 55 à 138 ppm du composé **B2**

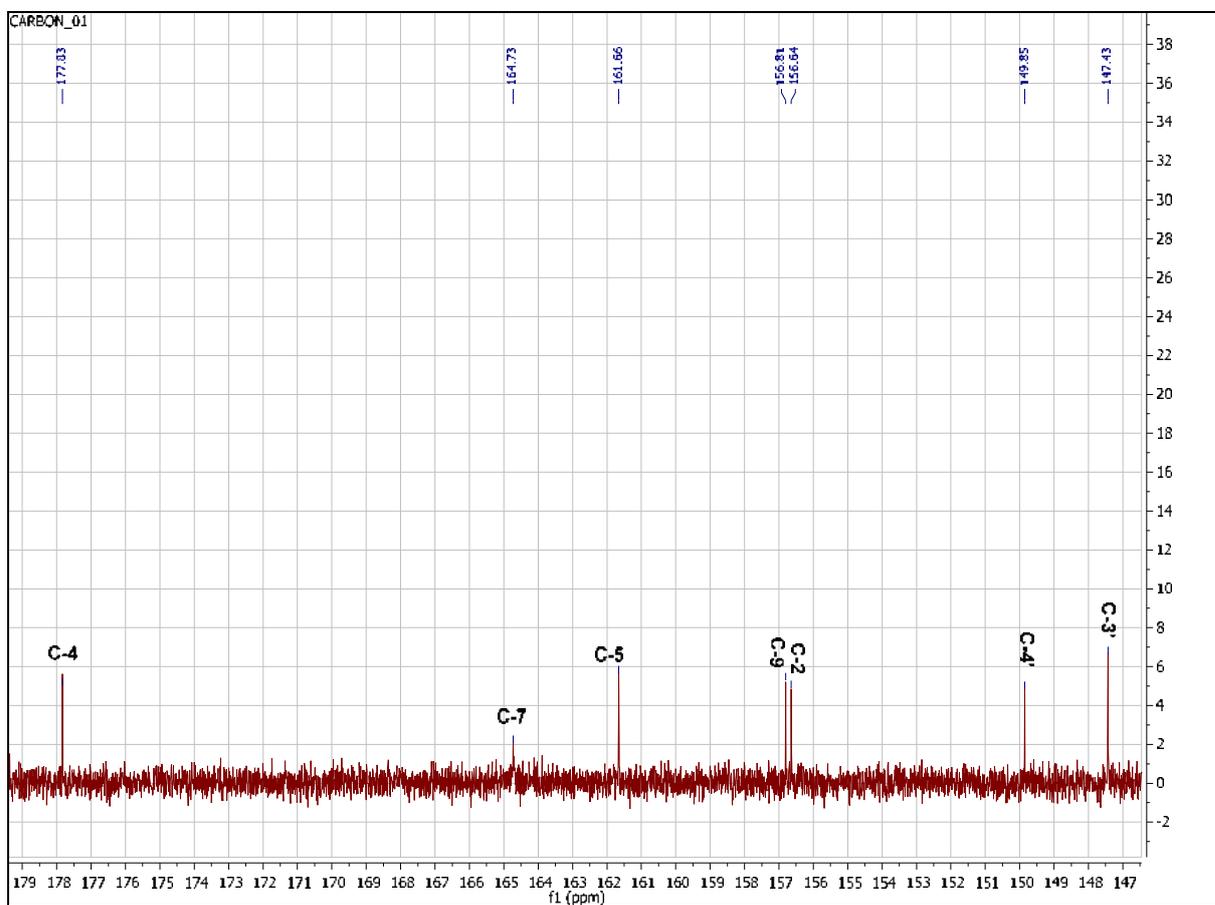


Figure III.120b: Spectre RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-d₆, δppm) étalé de 147 à 179 ppm du composé **B2**

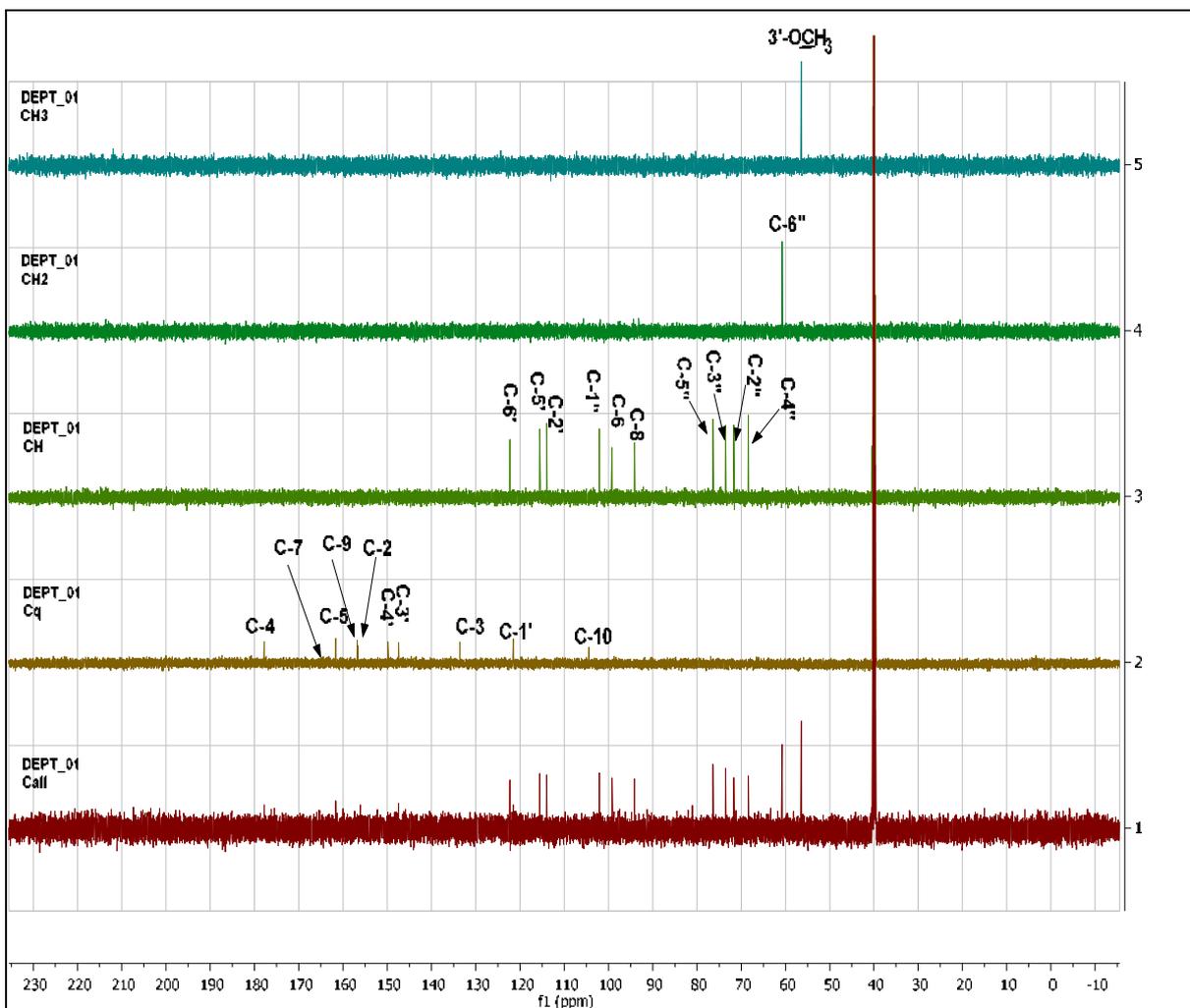


Figure III.121: Spectre DEPT(150 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) du composé **B2**

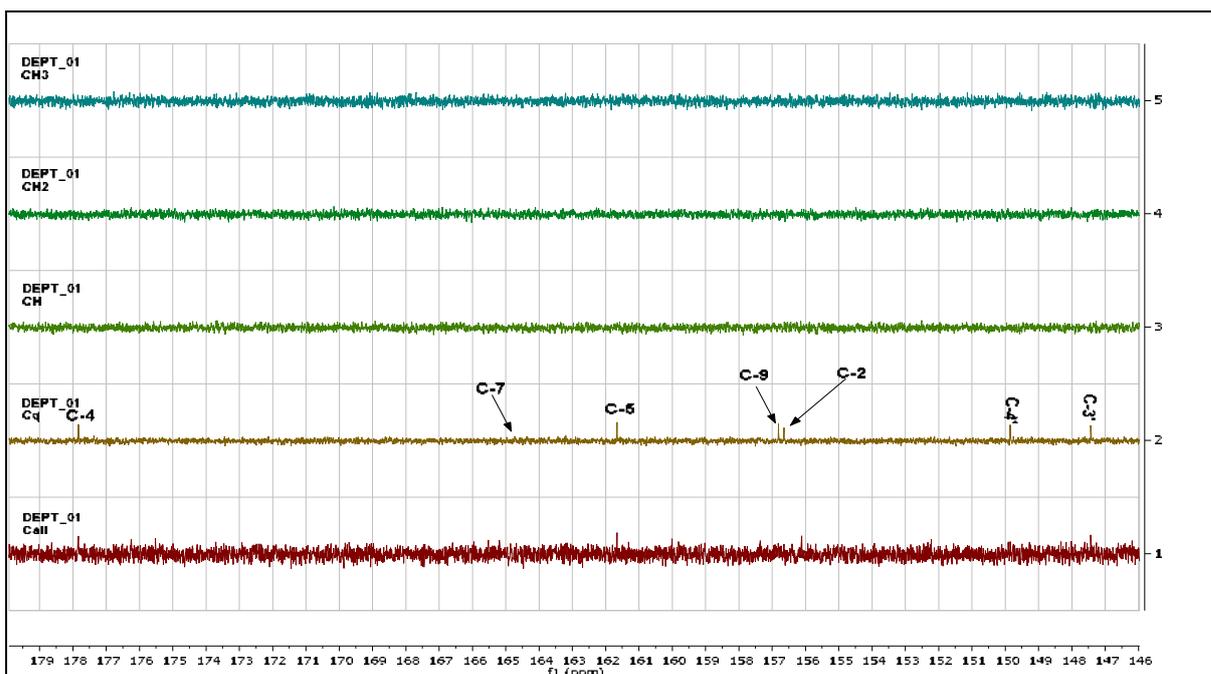


Figure III.121a: Spectre DEPT(150 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) étalé de 146 à 179 ppm du composé **B2**

L'étude simultanée des spectres RMN proton (figures III.122, III.122a, III.122b et III.122c), HSQC (figure III.123 et III.123a) et COSY (figure III.124) permet de tirer les indications suivantes:

- Un doublet d'intégration 1H à δ_H 8,00 ppm avec une constante de couplage $J = 2,07$ Hz, indicateur d'un couplage méta attribuable à H-2' du noyau B d'un flavonoïde, corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_C 113,98 ppm.
- Un doublet dédoublé d'intégration 1H à δ_H 7,49 ppm ($J = 8,48$ Hz ; $J = 2,09$ Hz), indicateur d'un couplage à la fois en ortho et en méta attribuable à H-6' du noyau B d'un flavonoïde, corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_C 122,31 ppm.
- Un doublet d'intégration 1H à δ_H 6,88 ppm ($J = 8,36$ Hz), indicateur d'un couplage ortho attribuable à H-5' du noyau B d'un flavonoïde, corrélant sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_C 115,58 ppm.

La présence de ces trois signaux est en faveur d'un cycle B substitué en positions 3' et 4'. Ces résultats sont confirmés par la mesure du spectre COSY, où l'on observe des crêtes de corrélation entre le proton situé à δ_H 7,49 ppm (H-6') et celui résonnant 6,88 ppm (H-5').

- Deux doublets d'intégration 1H chacun, le premier à δ_H 6,42 ppm ($J = 2,04$ Hz) et le second à δ_H 6,19 ppm ($J = 2,04$ Hz) attribuables à H-8 et H-6 respectivement. Le couplage méta des deux protons du noyau A confirme la substitution dans les positions 5 et 7. Le spectre RMN de corrélations hétéronucléaires à courtes distances HSQC indique que les protons localisés à δ_H 6,42 et δ_H 6,19 ppm corrélerent aux signaux situés à δ_C 94,14 et δ_C 99,18 ppm respectivement.
- un singulet d'intégration 1H à δ_H 12,59 ppm, ne présente aucune tache de corrélation sur le spectre HSQC confirme la présence d'un groupement hydroxyle en position 5 du cycle A.
- Un singulet d'intégration 3H à δ_H 3,83 ppm corrélant sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_C 56,43 ppm indique la présence d'un groupement méthoxyle dans la molécule.

D'autre part, des signaux caractéristiques d'un hexose:

- Un doublet à δ_H 5,49 ppm, d'intégration 1H avec une constante de couplage de 7,73 Hz, attribuable au proton anomérique (H-1'') d'un sucre lié à l'aglycone par une jonction de type C-O de configuration β . Ce proton corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone C-1'' résonnant à δ_C 102,05 ppm.
- Un ensemble de signaux d'intégration totale 6H dans l'intervalle 3,34–3,66 ppm attribuables aux protons du sucre.

- ✓ Une tache de corrélation sur le spectre COSY (^1H - ^1H) entre le H-1'' à $\delta = 5,49$ ppm et un signal à δ_{H} 3,56 ppm sous forme d'un triplet dédoublé ($J = 8,77 ; 4,06$ Hz) qui ne peut être que le H-2''. Ce proton (H-2'') corréle sur le spectre HSQC avec son carbone à δ_{C} 71,70 ppm.
- ✓ Deux signaux d'intégration 1H chacun, le premier partiellement recouvert par le signal du solvant à δ_{H} 3,34 ppm sous forme d'un doublet ($J = 4,45$ Hz) et le second à δ_{H} 3,47 ppm sous forme d'un doublet dédoublé ($J = 9,22 ; 4,30$ Hz), corrélent sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_{C} 60,76 ppm, caractéristique du groupement CH_2 -6'' de l'hexose.
- ✓ Un multiplet à δ_{H} 3,37 ppm d'intégration 1H partiellement recouvert par un signal sous forme d'un multiplet d'intégration 1H centré à δ_{H} 3,40 ppm attribuables à H-5'' et H-3'' respectivement, portés par les carbones C-5'' à δ_{C} 76,38 ppm et C-3'' à δ_{C} 73,54 ppm sur le spectre HSQC.
- ✓ Un signal à δ_{H} 3,66 ppm d'intégration 1H sous forme d'un doublet large ($J = 3,38$ Hz) attribuable à H-4'', lié au carbone C-4'' résonnant à δ_{C} 68,39 ppm d'après le spectre HSQC. Cette identification est confirmée par la mesure du spectre COSY, où elle montre une corrélation entre les protons H-4'' à δ_{H} 3,66 ppm et H-3'' à δ_{H} 3,40 ppm. Ces informations indiquent qu'il s'agit d'un glucose de configuration β .

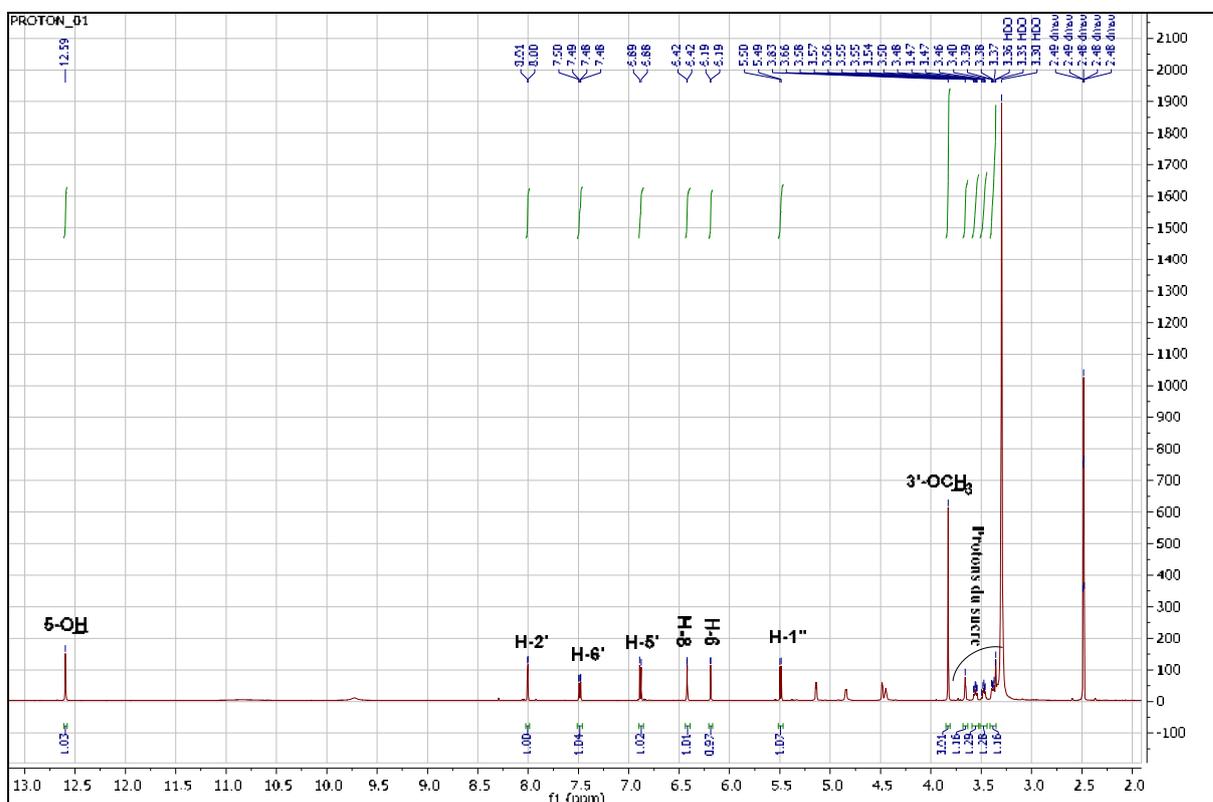


Figure III.122: Spectre RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé B2

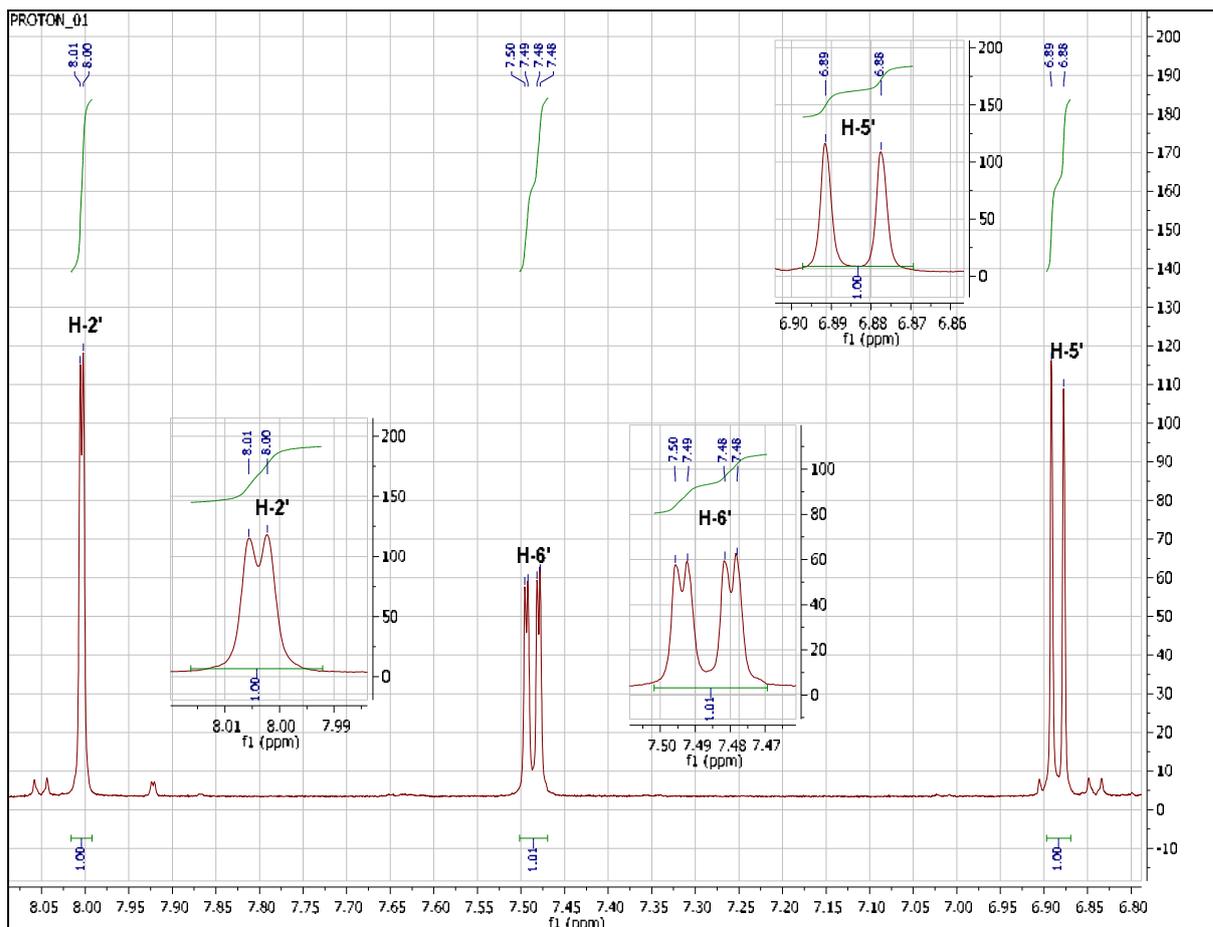


Figure III.122a: Spectre RMN ^1H (600 MHz DMSO- d_6 , δ ppm) étalé de 6,80 à 8,05 ppm du composé **B2**

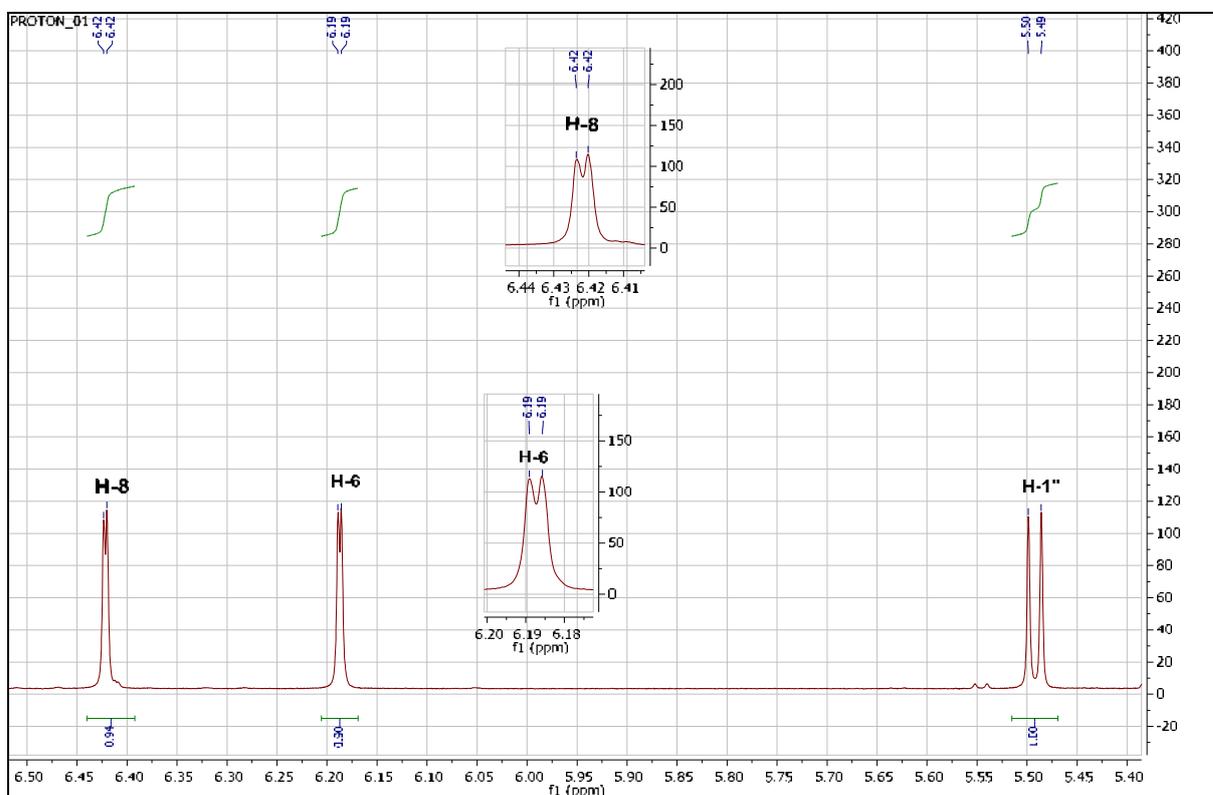


Figure III.122b: Spectre RMN ^1H (600 MHz DMSO- d_6 , δ ppm) étalé de 5,40 à 6,50 ppm du composé **B2**

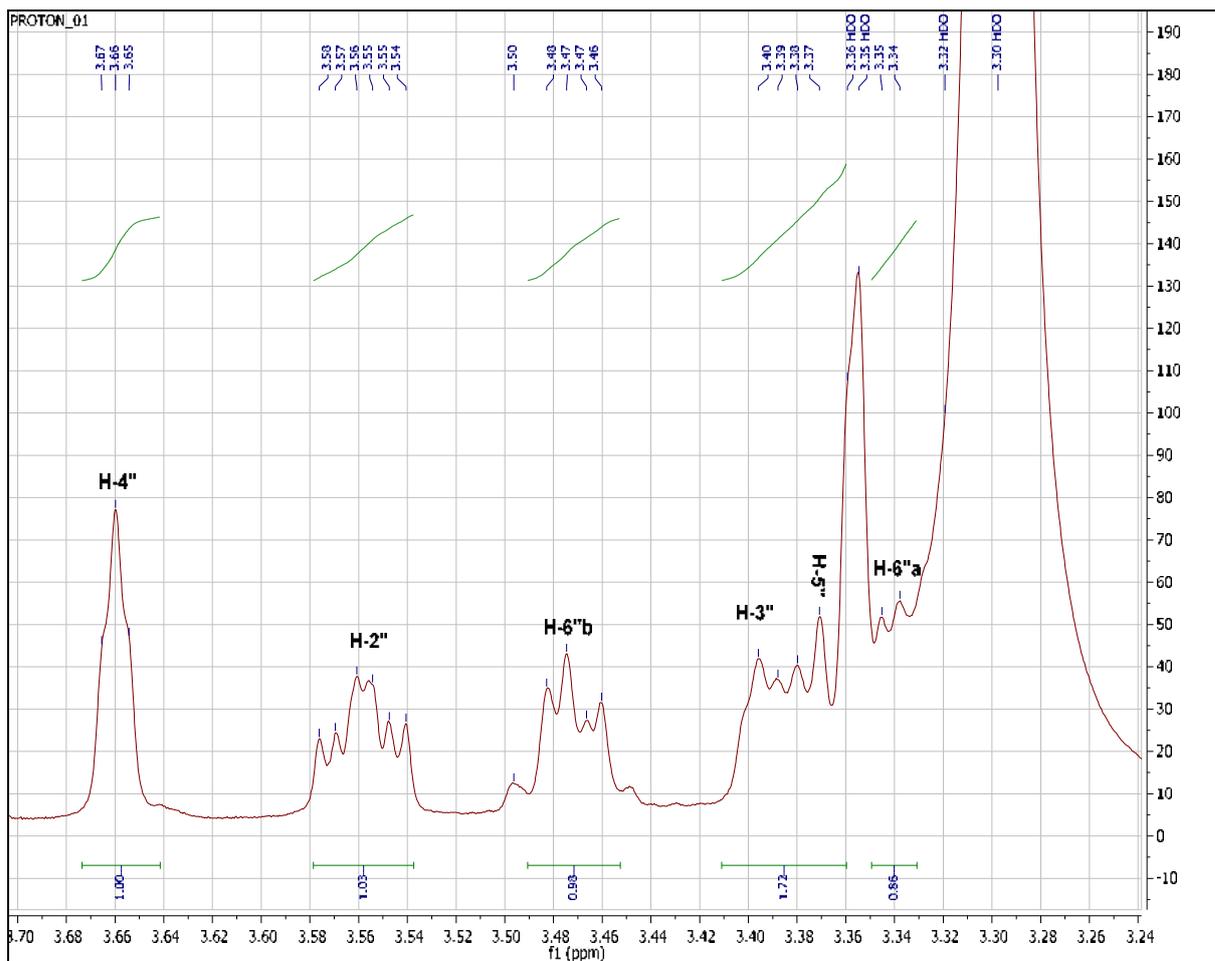


Figure III.122c: Spectre RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) étalé de 3,24 à 3,70 ppm du composé **B2**

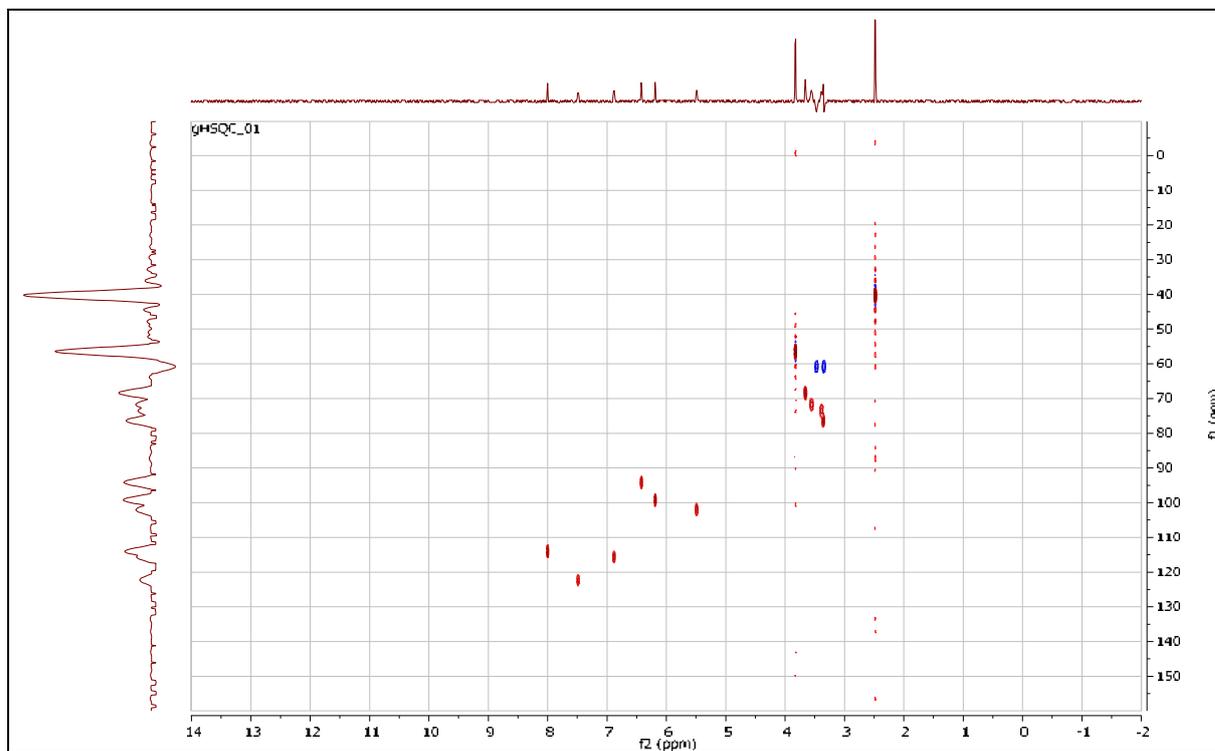


Figure III.123: Spectre RMN 2D HSQC (600 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé **B2**

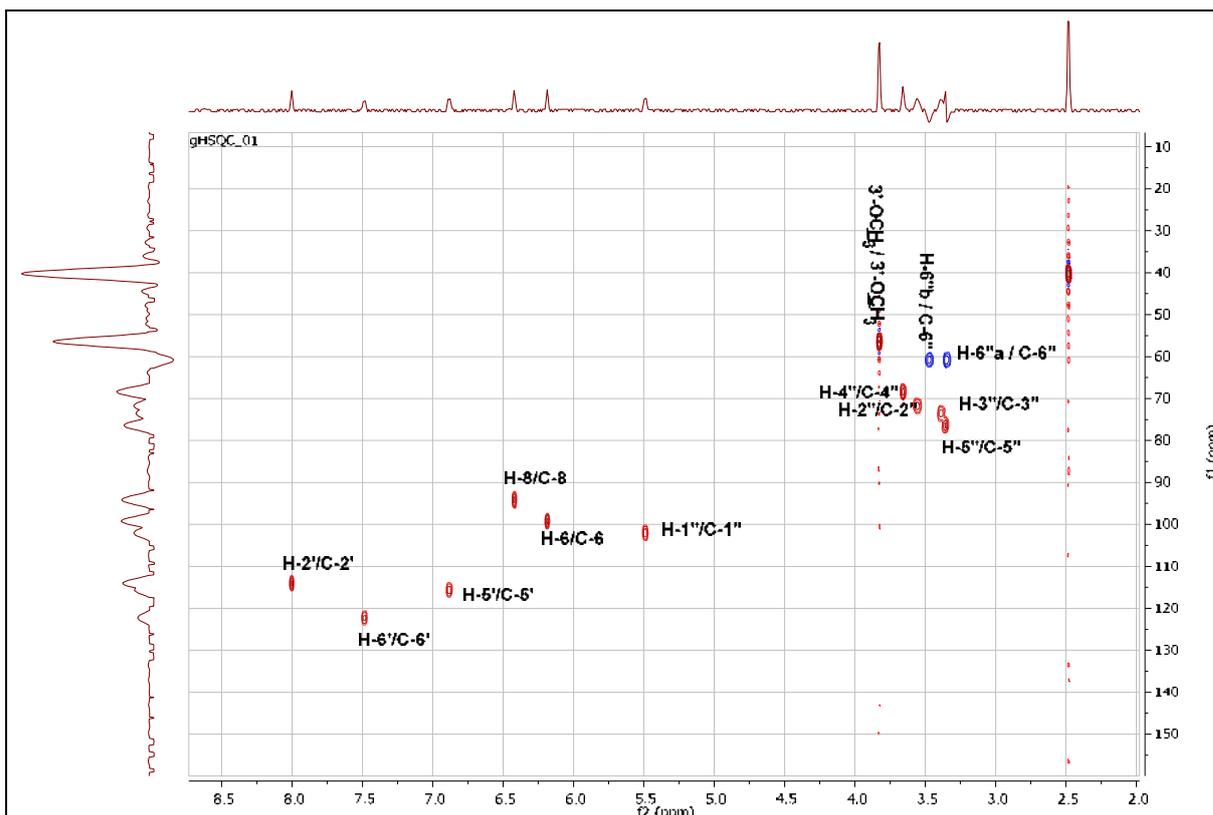


Figure III.123a: Spectre RMN 2D HSQC (600 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) étalé (¹H: 2,00-8,5 ppm; ¹³C: 10-160 ppm) du composé **B2**



Figure III.124: Spectre RMN 2D COSY (600 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) du composé **B2**

L'étude du spectre relatif à l'expérience HMBC (figure III.125) mettent en évidence les corrélations proton-carbone à longue distance, permettant de tirer les indications suivantes:

- Le signal à δ_H 5,49 ppm (H-1") de proton anomérique du glucose est corrélé avec le signal à δ_C 133,56 ppm caractérisant le C-3 de l'aglycone, indiquant que la position 3 est glycosylée.
- Les deux protons H-2' et H-5' montrent deux tâches de corrélation avec un atome de carbone localisé à δ_C 147,43 ppm attribuable au carbone C-3' du cycle B. Ce même atome de carbone corrèle avec les protons du méthoxyle à δ_H 3,83 ppm, ce qui impose la substitution de cet atome de carbone par ce groupement méthoxyle .

De plus, Le spectre HMBC permet d'attribuer les carbones quaternaires restants:

- Le carbone oxygéné à δ_C 104,41 ppm montre trois tâches de corrélation avec les protons H-8, H-6 et 5-OH , attribuable au carbone C-10.
- Deux taches de corrélation entre le proton du groupement hydroxyle en C-5 et le H-6 et un atome de carbone oxygéné à δ_C 161,66 ppm qui ne peut être attribuer qu'à C-5.
- Les deux protons H-6 et H-8 montrent une tache de corrélation avec le carbone quaternaire aromatique oxygéné résonant à δ_C 164,73 ppm attribuable à C-7.
- Les deux protons H-2' et H-6' montrent une tache de corrélation avec le carbone quaternaire aromatique oxygéné résonant à δ_C 149,85 ppm qui correspond à C-4'.
- L'atome de carbone à δ_C 156,81 ppm est attribuable à C-9 grâce à sa corrélation avec le proton H-8.
- Une tache de corrélation entre le H-2' et un atome de carbone à δ_C 156,64 ppm qui ne peut être que le C-2.
- Le proton H-5' montre une tâche de corrélation avec le carbone quaternaire C-1' à δ_C 121,51 ppm.

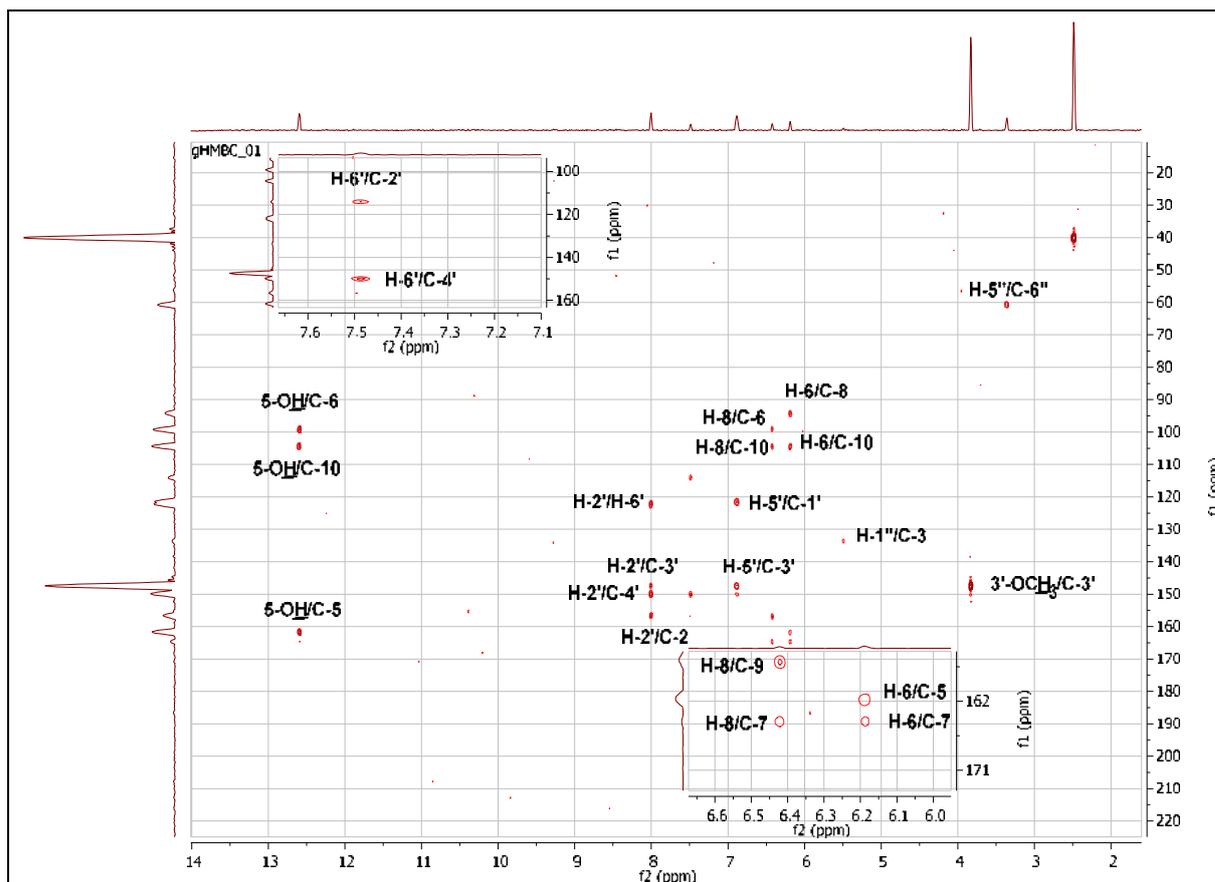


Figure III.125: Spectre RMN 2D HMBC (600 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) du composé **B2**

Le tableau III.18 ci-dessous illustre les déplacements chimiques en RMN du composé **B2**.

Tableau III.18 : Déplacements chimiques en RMN ¹³C et RMN ¹H du composé **B2** enregistré dans DMSO-d₆

Position	δ _C (ppm)	δ _H (ppm, multiplicité, <i>J</i> en Hz)
2	156,64	/
3	133,56	/
4	177,83	/
5	161,66	12,59 (1H ; <i>S</i>)
6	99,18	6,19 (1H ; <i>d</i> ; 2,04)
7	164,73	/
8	94,14	6,42 (1H ; <i>d</i> ; 2,04)
9	156,81	/
10	104,41	/
1'	121,51	/
2'	113,98	8,00 (1H ; <i>d</i> ; 2,07)
3'	147,43	/
4'	149,85	/
5'	115,58	6,88 (1H ; <i>d</i> ; 8,36)
6'	122,31	7,49 (1H ; <i>dd</i> ; 8,48 ; 2,09)
OCH ₃	56,43	
Glucose	/	/
1''	102,05	5,49 (1H ; <i>d</i> ; 7,73)
2''	71,70	3,56 (1H ; <i>td</i> ; 8,77 ; 4,06)
3''	73,54	3,40 (1H ; <i>m</i>)
4''	68,39	3,66 (1H ; <i>dl</i> ; 3,38)
5''	76,38	3,37 (1H ; <i>m</i>)
6''	60,76	3,34 (1H ; <i>d</i> ; 4,45) 3,47(1H ; <i>dd</i> ; 9,22 ; 4,30)

L'ensemble de ces informations comparées avec celles de la littérature [41] est en complet accord avec la structure de **5, 7, 4'-trihydroxy-3'-methoxy-3-O-glucosylflavone**. Ce composé est connu sous le nom **isorhamnétine 3-O-glucoside** ou bien **cacticine**. Biologiquement, l'isorhamnétine 3-O-glucoside est caractérisée par ses effets antioxydant et antiprolifératif [42]. La détection du composé B2 dans l'extrait *n*-BuOH par HPLC-TOF/MS en mode négatif est présentée dans le chromatogramme ci-après (figure III.126).

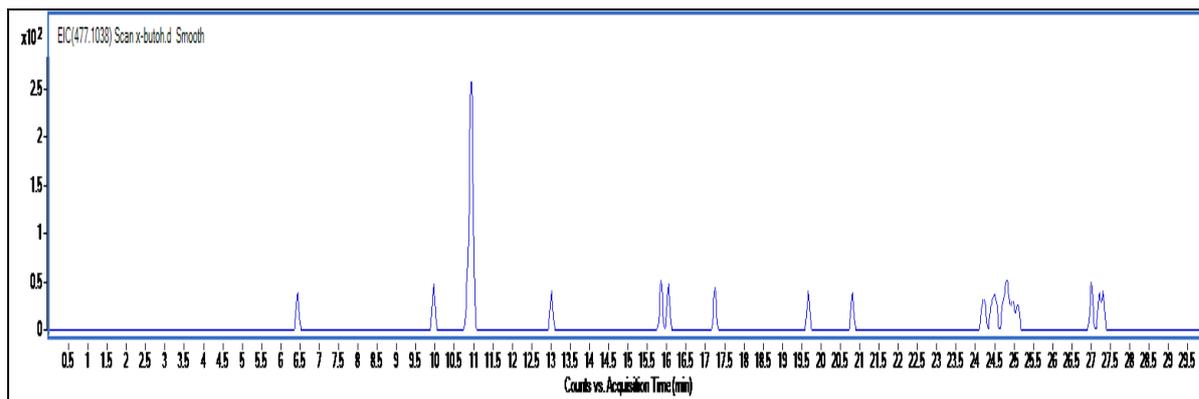


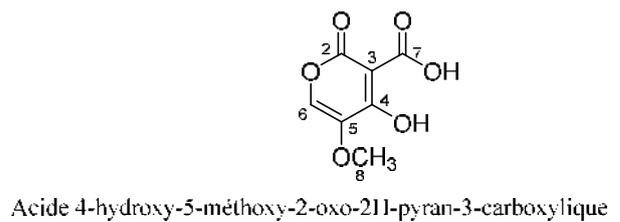
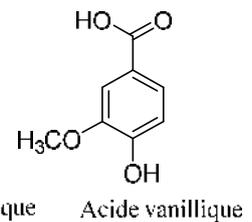
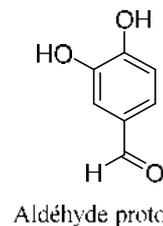
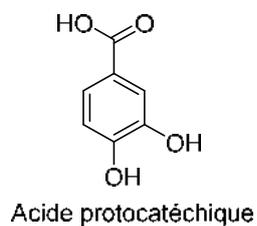
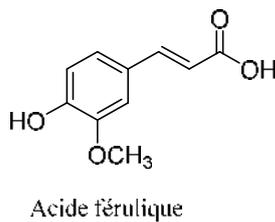
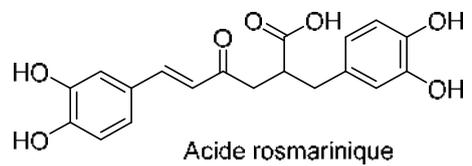
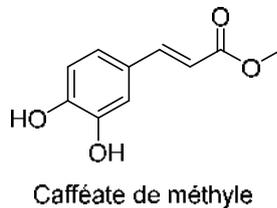
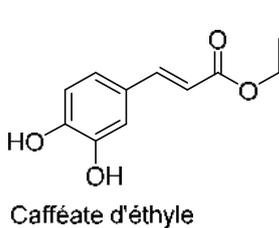
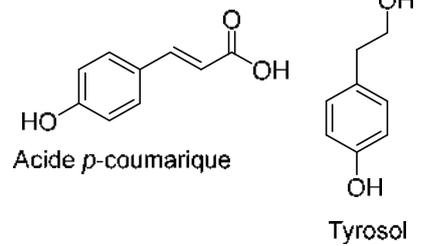
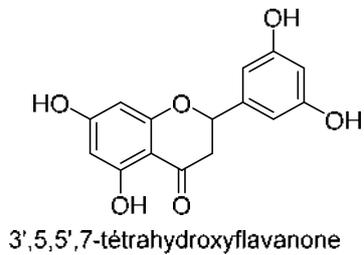
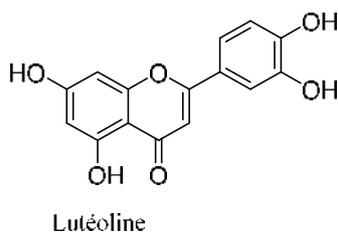
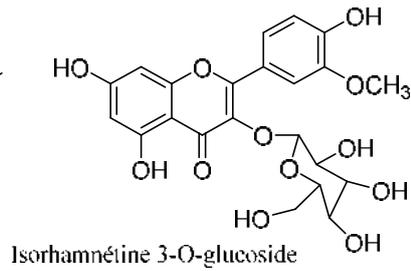
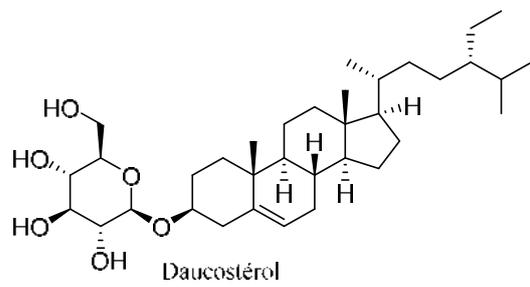
Figure III.126: Chromatogramme d'identification du produit **B2** dans l'extrait *n*-BuOH par HPLC-TOF/MS en mode négatif

III.2.3. Conclusion

L'étude phytochimique portée sur les extraits acétate d'éthyle et butanolique des parties aériennes de *Thymus munbyanus* subsp. *ciliatus* a conduit à l'isolement et l'identification de:

- ✚ **1 stérol:** β -sitostérol-3-O- β -D-glucoside (Daucostérol).
- ✚ **3 flavonoïdes:** 3',5,5',7-tétrahydroxyflavanone; lutéoline et isorhamnétine 3-O-glucoside.
- ✚ **6 acides phénoliques:** acide salicylique; acide férulique; acide vanillique; l'acide paracoumarique; acide protocatéchique et acide rosmarinique.
- ✚ **5 dérivés phénoliques:** tyrosol; aldéhyde protocatéchique; cafféate d'éthyle; cafféate de méthyle et 2,3,5,6-tétrahydroxybenzoate de méthyle (Nouvelle molécule).
- ✚ **1 dérivé de la pyran-2-one:** acide 4-hydroxy-5-méthoxy-2-oxo-2H-pyran-3-carboxylique (Nouvelle molécule).

Tous les produits isolés et déterminés sont décrits pour la première fois dans cette espèce.



Références bibliographiques

1. Lee, S.L., Han, S., Kim, H.M., Lee, J.M., Mok, S.Y., Lee, S.H. (2011). Isolation and Identification of Phytochemical Constituents from *Taraxacum coreanum*. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 54, 73-78.
2. Agrawal, K.P., (1992). NMR-Spectroscopy in the Structural Elucidation of Oligosaccharides and Glycosides. *Phytochemistry*, 31, 3307-3330.
3. Khatun, M., Billah, M., Quader, M.A., (2012). Sterols and Sterol Glucoside from *Phyllanthus* Species. *Journal of Science*, 60, 5-10.
4. Duc, L.V., Thanh, T.B., Hoang, H.V., Manh, T.N., (2016). Phytochemical and anti-inflammatory effect from the leaf of *Sanchezia speciosa* Leonard growing in Vietnam. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 8, 309-315.
5. Choi, J.N., Choi, Y.H., Lee, J.M., Noh, I.C., Park, J.W., Choi, W.S., Choi, J.H., (2012). Anti-inflammatory effects of β -sitosterol- β -D-glucoside from *Trachelospermum jasminoides* (Apocynaceae) in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 murine macrophages. *Natural Product Research*, 26, 2340-2343.
6. Park, K.Y., Jung, K.O., Rhee, S.H., Choi, Y.H., (2003). Antimutagenic effects of *doenjang* (Korean fermented soypaste) and its active compounds. *Mutation Research*, 523-524, 43-53.
7. Nur Hakimah, A., Fatimah, S., Rohaya, A., (2016). Chemical Constituents of Malaysian *U. cordata* var. *ferruginea* and Their in Vitro α -Glucosidase Inhibitory Activities. *Molecules*, 21, 525-536.
8. Randjelović, P., Veljković, S., Stojiljković, N., Sokolović, D., Ilić, I., Laketić, D., Randjelović, D., Randjelović, N., (2015). The Beneficial Biological Properties of Salicylic Acid. *Acta facultatis medicae Naissensis*, 32, 259-265.
9. Rho, T., Yoon, K. D., (2017). Chemical Constituents of *Nelumbo nucifera* Seeds. *Natural Product Sciences*, 23, 253-257.
10. Pulido, R., Bravo, L., Calixto, F.S., (2000). Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols As Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3396-3402.

11. Lee, J.M., Lee, D.G., Lee, K.H., Cho, S.H., Nam, K-W., Lee, S., (2013). Isolation and identification of phytochemical constituents from the fruits of *Acanthopanax senticosus*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 7, 294-301.
12. Khairnar, S., Pawar, S., Patil, V., Rudrapal, M., (2020). Effect of Vanillic Acid in Streptozotocin Induced Diabetic Neuropathy. *Asian Journal of Biological and Life Sciences*, 9, 306-312.
13. Guzman-Lopez, O., Trigos, A., Fernandez. F.J., De Jesus Yanez-Morales. M., Saucedo-Castaneda. G., (2007). Tyrosol and tryptophol produced by *Ceratocystis adiposa*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, 1473-1477.
14. Vlachogianni, I.C., Fragopoulou, E., Kostakis, I.K., Antonopoulou, S. (2015). In vitro assessment of antioxidant activity of tyrosol, resveratrol and their acetylated derivatives. *Food Chemistry*, 177, 165–173.
15. Nakbi, A., Dabbou, S., Champion, S., Fouchier, F., Mehri, S., Attia, N., Leger, C., Hammami, M. (2011). Modulation of the superoxide anion production and MMP-9 expression in PMA stimulated THP-1 cells by olive oil minor components: Tyrosol and hydroxytyrosol. *Food Research International*, 44, 575–581.
16. da Silva, L. A. L., Faqueti, L. G., Reginatto, F. H., dos Santos, A. D. C., Barison, A., Biavatti, M. W. (2015). Phytochemical analysis of *Vernonanthura tweedieana* and a validated UPLC-PDA method for the quantification of eriodictyol. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25, 375-381.
17. Xiang, M., Su, H., Hu, J., Yan, Y., (2011). Isolation, identification and determination of methyl caffeate, ethyl caffeate and other phenolic compounds from *Polygonum amplexicaule* var. *sinense*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5, 1685-1691.
18. Eid, H.M., Thong, F., Nachar, A., Haddad, P.S., (2017). Caffeic acid methyl and ethyl esters exert potential antidiabetic effects on glucose and lipid metabolism in cultured murine insulin-sensitive cells through mechanisms implicating activation of AMPK. *Pharmaceutical Biology*, 55, 2026-2034.
19. Chiang, Y.M., Lo, C.P., Chen, Y.P., Wang, S.Y., Yang, N.S., Kuo, Y.H., Shyur, L.F., (2005). Ethyl caffeate suppresses NF- κ B activation and its downstream inflammatory mediators, iNOS, COX-2, and PGE₂ in vitro or in mouse skin. *British Journal of Pharmacology*, 146, 352-363.

20. Shin, K.M., Kim, I.T., Park, Y.M., Ha, J., Jong-Won Choi, J.W., Park, H.J., Lee, Y.S., Lee, K.T., (2004). Anti-inflammatory effect of caffeic acid methyl ester and its mode of action through the inhibition of prostaglandin E2, nitric oxide and tumor necrosis factor- α production. *Biochemical Pharmacology* ,68, 2327-2336.
21. Amen, Y. M., Marzouk, A. M., Zaghloul, M. G., Afifi, M. S., (2013). Bioactive compounds from *Tipuana tipu* growing in Egypt. *Journal of American Science*, 9, 334-339.
22. Zhou, Z., Liu, Y., Miao, A.D., Wang, S.Q., (2005). Protocatechuic aldehyde suppresses TNF α -induced ICAM-1 and VCAM-1 expression in human umbilical vein endothelial cells. *European Journal of Pharmacology*, 513, 1-8.
23. Chang, Z.Q., Gebru, E., Lee, S.P., Rhee, M.H., Kim, J.C., Cheng, H., Park, S.C., (2011). In vitro antioxidant and anti-inflammatory activities of protocatechualdehyde isolated from *phellinus gilvus*. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 57, 118-122.
24. Choi, J., Jiang, X., Jeong, J.B., Lee, S.H., (2014). Anticancer Activity of Protocatechualdehyde in Human Breast Cancer Cells. *Journal of Medicinal Food*. 17, 842-848.
25. Chi-Ren, L., Yueh-Hsiung, K., Yu-Ling, Ho., Ching-Ying, W., Chang-Syun, Y., Cheng-Wen, L., Yuan-Shiun, C., (2014). Studies on Cytotoxic Constituents from the Leaves of *Elaeagnus oldhamii Maxim.* in Non-Small Cell Lung Cancer AA549 Cells. *Molecules*, 19, 9515-9534.
26. Kiliç, I., Yeşiloğlu, Y., (2013). Spectroscopic studies on the antioxidant activity of p-coumaric acid. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 115, 719-724.
27. Amalan, V., Vijayakumar, N., Indumathi, D., Ramakrishnan, A., (2016). Antidiabetic and antihyperlipidemic activity of p-coumaric acid in diabetic rats, role of pancreatic GLUT 2: In vivo approach. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 84, 230-236.
28. Mabry, T. J., Markham, K. R., Thomas, M., (1970). The systematic identification of flavonoids. Chapter VIII :the Determination and Interpretation of NMR Spectra of Flavonoids, pp267.
29. Esposito F., Sanna C., Del Vecchio C., Cannas V., Venditti A., Corona A., Bianco A., Serrilli AM., Guarcini L., Parolin C., Ballero M., Tramontano E., (2013). *Hypericum*

- hircinum* L. components as new single-molecule inhibitors of both HIV-1 reverse transcriptase-associated DNA polymerase and ribonuclease H activities. *Pathogens and Disease*, 68,116-124.
30. Zheng Z.P., Cheng K., Chao J., Wu J., Wang M., (2008). Tyrosinase inhibitors from paper mulberry (*Broussonetia papyrifera*). *Food Chemistry*, 106, 529-535.
31. Fazilatun, N., Zhari, I., Nornisah, M., Mas Rosemal, H.M.H., (2004). Free radical-scavenging activity of organic extracts and of pure flavonoids of *Blumea balsamifera* DC leaves. *Food Chemistry*, 88, 243-252.
32. Liu, H., Mou ,Y., Zhao, J., Wang, J., Zhou, L., Wang, M., Wang, D., Han, J., Yu, Z., Yang, F., (2010). Flavonoids from *Halostachys caspica* and Their Antimicrobial and Antioxidant Activities. *Molecules* , 15, 7933-7945.
33. Seelinger, G., Merfort, I., Schempp, C.M., (2008). Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-allergic activities of luteolin. *Planta Medica*, 74, 1667-1677.
34. An, L.J., Guan, S., Shi, G.F., Bao, Y.M., Duan, Y.L., Jiang, B., (2006). Protocatechuic acid from *Alpinia oxyphylla* against MPP⁺-induced neurotoxicity in PC12 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 436-443.
35. Lee, I.C., Bae, J.S., Kim, T., Kwon, O.J., Kim,T.H., (2011). Polyphenolic Constituents from the Aerial Parts of *Thymus quinquecostatus* var. *japonica* Collected on Ulleung Island. *journal of the korean society for applied biological chemistry*, 54, 811-816.
36. Abida, K., Rehana, R., Nighat, F., Sadaf, M., Sadullah, M., Khan, S., Nyla, J., Ghulam, M., (2015). Pharmacological Activities of Protocatechuic Acid. *Acta Poloniae Pharmaceutica- Drug Research*, 72, 643-650.
37. Sevindik, H. G., Ozgen, U., Atila, A., Ozturk Er, H., Kazaz, C., Duman, H., (2015). Phytochemical Studies and Quantitative HPLC Analysis of Rosmarinic Acid and Luteolin 5-O- β -D-Glucopyranoside on *Thymus praecox* subsp. *grossheimii* var. *grossheimii*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 63, 720-725.
38. Petersen, M., Simmonds, M.S.J., (2003). Rosmarinic acid, *Phytochemistry*, 62, 121-125.
39. Popov, A.M., Osipov, A.N., Korepanova, E.A., Krivoshapko, O.N., Artyukov, A.A., (2013). Study of Antioxidant and Membrane Activity of Rosmarinic Acid Using Different Model Systems. *Biophysics*, 58, 607-615.

40. Agrawal, P.K., (1989). Carbon-13 NMR of flavonoids. Elsevier Science Publishers BV, pp150.
41. Lee, Y.S., Lee, S., Lee, H.S., Kim, B.K., Ohuchi, K., Shin, K.H., (2005). Inhibitory effects of isorhamnetin3-O- β -D-glucoside from *Salicornia herbacea* on rat Lens aldose reductase and sorbitol accumulation in streptozotocin-induced diabetic rat tissues. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28, 916-918.
42. Hadj Salem, H., Chevalot, I., Harscoat-Schiavo,C., Paris, C., Fick, M., Humeau, C., (2011). Biological activities of flavonoids from *Nitraria retusa* (Forssk.) Asch. and their acylated derivatives. *Food Chemistry*, 124, 486-494.

Chapitre IV

Activités biologiques

De nombreuses méthodes sont utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante in vitro des extraits et/ou des composés purs. Ces méthodes sont basées sur la coloration ou la décoloration d'un réactif dans le milieu réactionnel. Dans notre étude, l'activité antioxydante des extraits et des produits purs a été testée par deux méthodes à savoir, la détermination de l'activité antioxydante totale et le piégeage du radical libre DPPH.

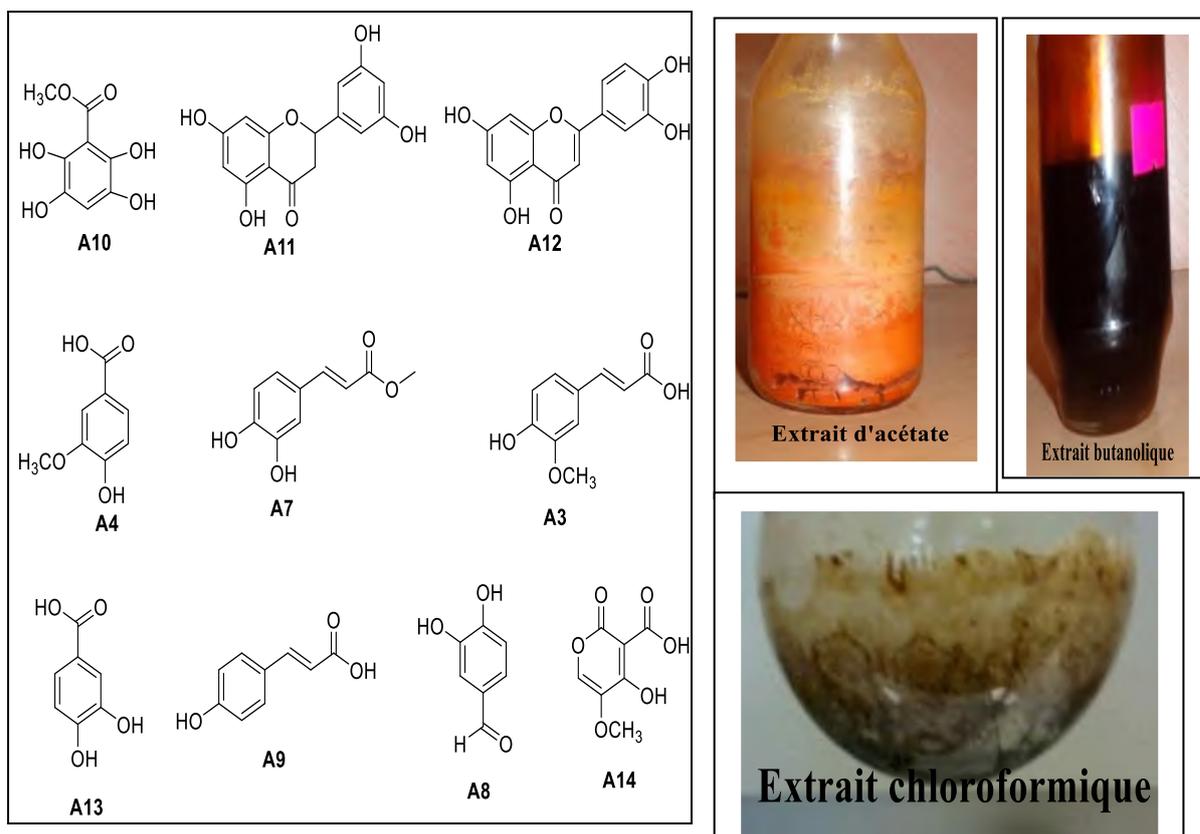


Figure IV.1: Les extraits et les produits purs testés

IV.1. Activité antioxydante totale au phosphomolybdate d'ammonium

La capacité antioxydante totale est largement utilisée comme paramètre pour tester les aliments et les composants bioactifs. Cette méthode est définie comme la capacité d'un composé pour inhiber la dégradation oxydante comme de la peroxydation des lipides [1].

IV.1.1. Principe

La capacité antioxydante totale des extraits et des composés purs a été déterminée par le test au phosphomolybdate d'ammonium en utilisant la méthode décrite par Prieto et *al.* (1999) [2]. Ce test est basé sur la réduction de molybdate Mo (VI) en molybdate Mo (V) en présence des substances antioxydantes et la formation d'un complexe verdâtre phosphate-Molybdate (V) à un pH acide. Au cours de ce test, l'hydrogène et l'électron sont transférés du composé

réducteur (agent antioxydant) vers le complexe oxydant (PPM). Ce transfert dépend du potentiel redox, du pH du milieu et de la structure du composé antioxydant [3-6].

IV.1.2. Le mode opératoire

Un volume de 300 μ l d'échantillon à différentes concentrations est mélangé avec 3 ml de solution du réactif au phosphomolybdate (0,6 M acide sulfurique, 28 mM de phosphate de sodium et 4 mM de molybdate d'ammonium). Les tubes sont vissés et incubés dans un bain Marie à 95°C pendant 90 min. Après refroidissement à température ambiante, l'absorbance des solutions est mesurée à 695 nm contre le blanc qui contient 3 ml de la solution du réactif et 0,3 ml de même solvant utilisé pour l'échantillon et il est incubé dans les mêmes conditions que les échantillons. Le BHT et BHA ont été utilisés comme standards antioxydants dont les absorbances ont été mesurées dans les mêmes conditions que les échantillons.

IV.2. Piégeage du radical libre DPPH

Le DPPH a été l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité des composés phénoliques [7, 8].

IV.2. 1. Principe

Le DPPH est un radical libre, stable, qui possède une bande d'absorbance à 517 nm, employé pour évaluer l'activité antioxydante des composés purs ou de mélange complexe. Ce test est recommandé pour des composés contenant les groupes -SH, -NH et -OH [9]. Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil. Ce dernier de couleur violette, qui vire au jaune, en présence de capteurs de radicaux libres, et se réduit en 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine [8].

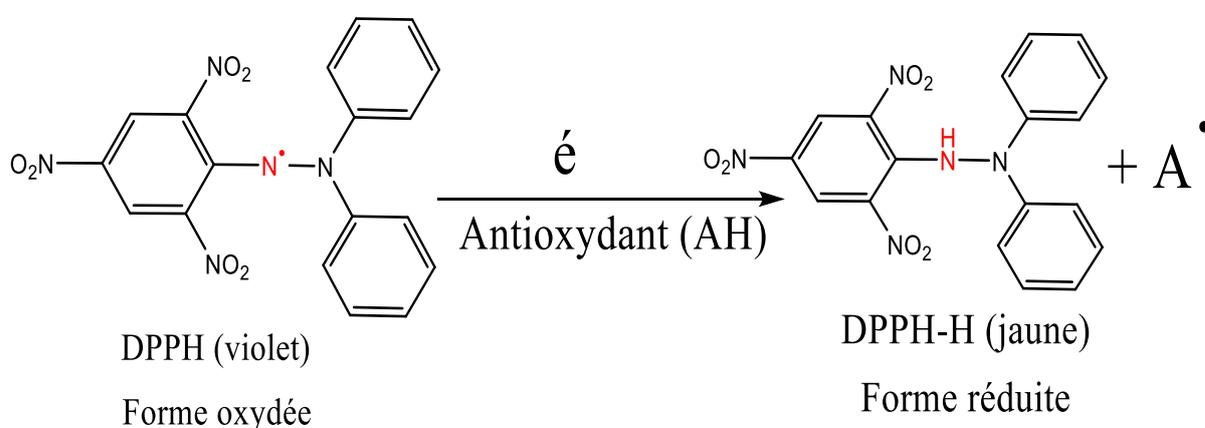


Figure IV.2: Réaction de test DPPH

IV.2. 2. Le mode opératoire

Dans ce travail, le protocole décrit par Blois (1958) a été adopté [7]. Brièvement, un volume de 1,5 ml d'échantillon à différentes concentrations a été incubé avec un volume de 0,5 ml d'une solution méthanolique de DPPH. Le contrôle négatif est préparé en mélangeant 1,5 ml de méthanol avec 0,5 ml d'une solution méthanolique de DPPH. Après une période d'incubation de 30 minutes à l'obscurité à température ambiante, les absorbances à 517 nm ont été enregistrées.

Le BHT et BHA ont été utilisés comme standards antioxydants dont les absorbances ont été mesurées dans les mêmes conditions que les échantillons. Une forte diminution de l'absorbance du mélange réactionnel indique une activité significative de piégeage des radicaux libres du composé testé [10].

Les mesures de l'absorbance du DPPH de différents échantillons permettent de déterminer le pourcentage d'inhibition en appliquant l'équation suivante :

$$I(\%) = ((\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon}) / \text{Abs contrôle}) \times 100$$

Où : I(%) : Pourcentage d'inhibition.

Abs contrôle : absorbance de contrôle négatif.

Abs échantillon : absorbance d'extrait ou de composé ou de la référence.

IV.3. Résultats et discussions

IV.3.1. Activité antioxydante totale au phosphomolybdate d'ammonium

Le test de molybdate-phosphate mesure la capacité antioxydante d'un extrait par l'estimation du degré de réduction du Mo (VI) en Mo (V), il donne une estimation directe de la capacité de réduction des antioxydants [11]. De nombreux produits naturels y compris les phénols et les flavonoïdes, peuvent provoquer cette réduction [12].

La figure ci-dessous illustre les résultats obtenus pour le test du pouvoir antioxydant au phosphomolybdate d'ammonium des trois extraits (E CHCl₃, E AcOEt et E *n*-BuOH) de l'espèce *Thymus munbyanus* subsp. *ciliatus*, des composés purs (A3, A4, A7, A8, A9, A10, A11, A12, A13 et A14) isolés de l'extrait acétate d'éthyle et les deux standards (BHA et BHT). L'activité antioxydante totale des échantillons a été mesurée et exprimée sous forme de valeurs d'absorbance (Figure IV.3).

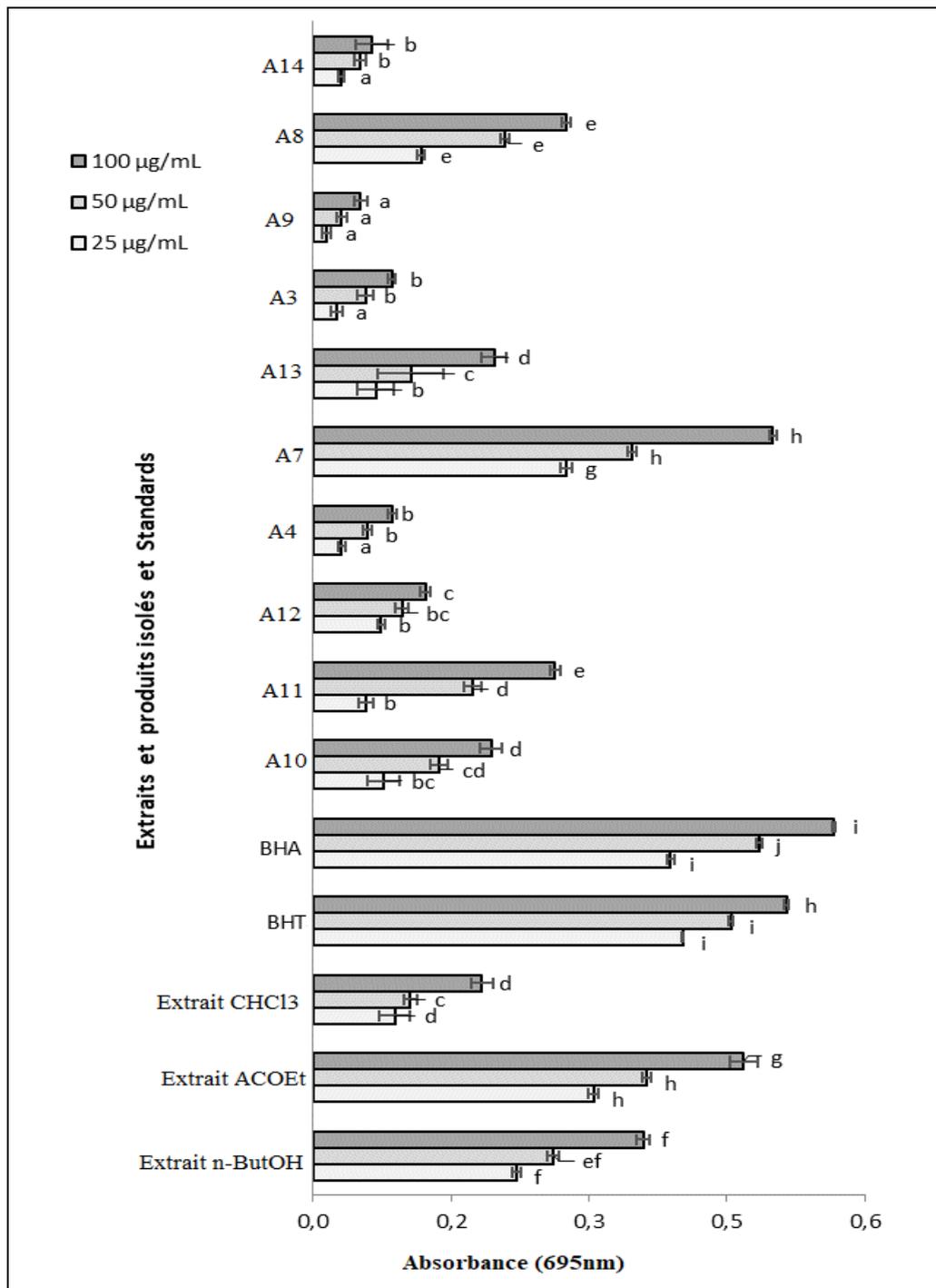


Figure IV.3: Activité antioxydante totale des composés et d'extraits de *T. munbyanus* subsp. *ciliatus*

Les données expérimentales obtenues par ce test (Figure IV.3) montrent que l'absorbance des extraits et des composés purs est augmenté avec l'élévation de la concentration et l'efficacité des échantillons à réduire Mo^{+6} à Mo^{+5} est variable. Plus la valeur de l'absorbance obtenue est importante, plus le composé antioxydant testé est efficace [13].

Les résultats de cette activité des trois extraits étudiés (CHCl_3 , AcOEt et *n*-BuOH) indiquent que l'extrait acétate d'éthyle présente une excellente activité antioxydante qui est proche à celles des deux standards BHA et BHT, suivi de l'extrait *n*-butanolique excepté l'extrait chloroformique qui est moins actif. Ces résultats sont logiques car les polyphénols sont plus abondants dans les extraits polaires [12].

Des études antérieures ont confirmé que les extraits les plus riches en polyphénols sont les plus actifs [6, 14].

Concernant la capacité antioxydante totale des produits (A3, A4, A7, A8, A9, A10, A11, A12, A13 et A14) isolés de l'extrait acétate d'éthyle et selon les résultats obtenus (Figure IV.3), Le pouvoir réducteur le plus important a été noté pour le produit A7 comparativement aux autres produits mais il est très proche aux standards utilisés, tandis que les produits A8 et A11 ont montré un effet réducteur moyen, et le produit A9 a donné une réponse très faible dans ce dosage. Après l'analyse des résultats, on peut dire que l'activité antioxydant totale dépend non seulement de la concentration mais aussi aux structures chimiques des molécules bioactives et à la position et au du degré d'hydroxylation [15, 16].

L'investigation des banques de données scientifiques, n'a relevé aucune étude portant sur l'activité antioxydante totale par le test au phosphomolybdate d'ammonium des extraits de l'espèce *Thymus munbyanus* subsp. *ciliatus* ainsi que les produits isolés.

En conclusion, Il a été observé que l'extrait d'acétate d'éthyle et le composé A7 présentent des activités similaires à 25, 50 et 100 $\mu\text{g/ml}$ par rapport au BHA et au BHT, $p < 0,05$.

IV.3.2. Piégeage du radical libre DPPH

L'activité anti-radicalaire est estimée en utilisant le radical 2,2-phényl-1-picrylhydrazyl (DPPH $^{\bullet}$), un radical stable de couleur violette ayant une absorbance maximale à 517 nm qui se réduit en une molécule non radicalaire stable qui est le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine de couleur jaune. Cette réduction est le résultat de la fixation d'un atome d'hydrogène ou un électron de l'extrait de la plante ou de composé isolé sur la molécule de DPPH $^{\bullet}$, ce qui engendre la diminution de l'absorbance à 517 nm.

Les résultats de l'activité antiradicalaire par l'effet scavenger du radical DPPH des extraits et des composés isolés ainsi que les molécules de références BHA et BHT, sont représentés par les pourcentages d'inhibition pour chaque concentration (Figure IV.4).

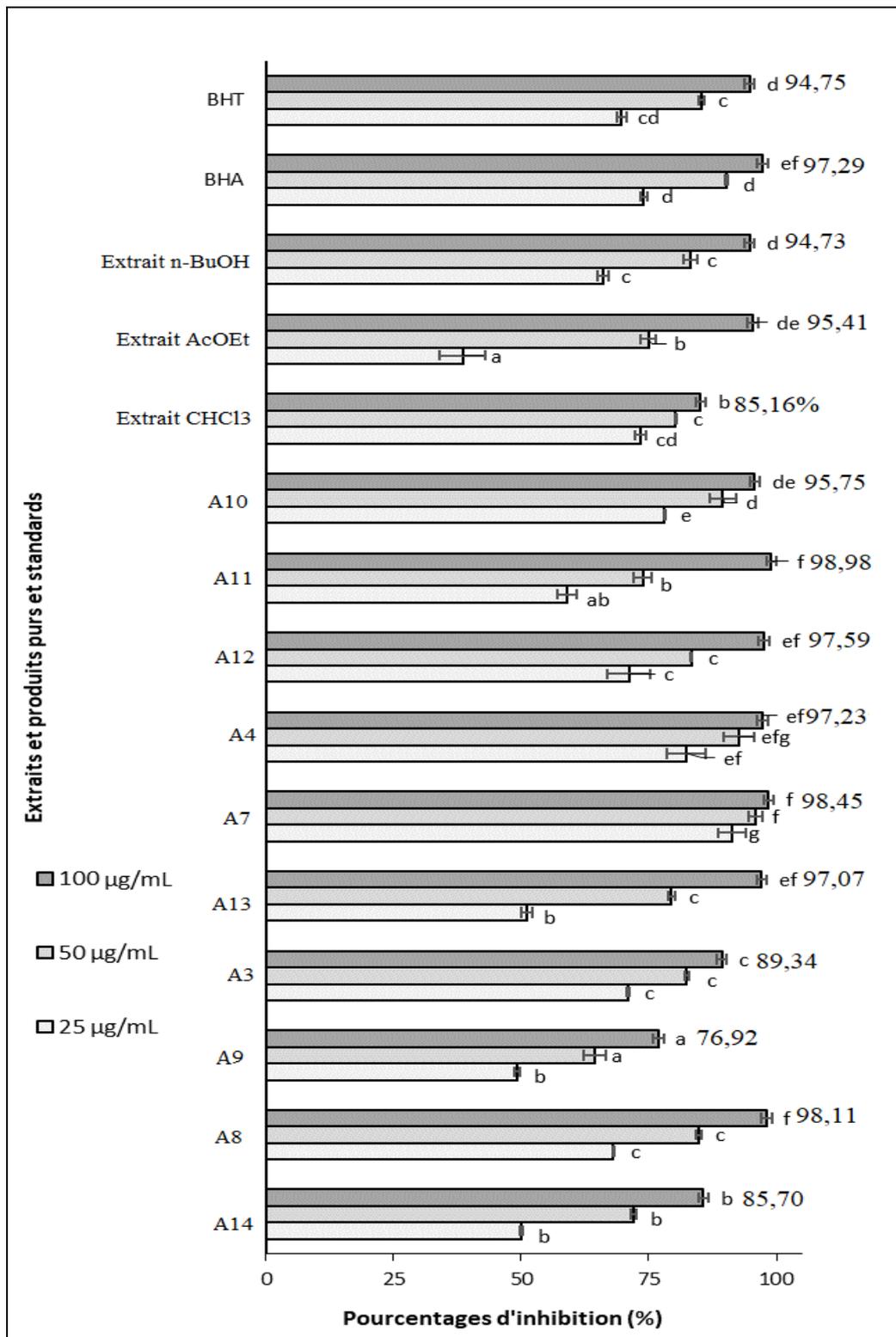


Figure IV.4: L'effet scavenger du radical DPPH des composés et d'extraits de *T. munbyanus* subsp. *ciliatus*

Tous les extraits et les composés étudiés ont réagi positivement au test anti-radicalaire avec le DPPH mais à différents degrés. La lecture de ces résultats montre que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente significativement ($p < 0,05$) avec l'augmentation de la concentration.

Les résultats obtenus des extraits montrent que les phases AcOEt et *n*-BuOH possèdent une activité anti-radicalaire intéressante comparativement aux standards BHA et BHT, dont l'extrait AcOEt présente un pourcentage d'inhibition de 95,41% à concentration de 100 µg/ml. Alors que l'extrait *n*-BuOH à la même concentration, présente un pourcentage d'inhibition de 94,73%. Ces résultats témoignent que ces deux extraits capables d'agir à faible dose. Ceci peut s'expliquer par la présence de composés polyphénoliques dans ces phases. Cette activité est un peu moins marquée pour la phase CHCl₃. Les résultats obtenus rejoignent les publications déjà reportées dans le genre.

Les produits A4, A7, A8, A11, A12 et A13 présentent un pouvoir anti-radicalaire excellent avec des pourcentages d'inhibition élevés de 97,23% ; 98,45% ; 98,11% ; 98,98% ; 97,59 % et 97,07% respectivement à la concentration 100 µg/ml, par rapport aux standards utilisés BHA (97,29%) et BHT (94,75%).

Les composés phénoliques sont des antioxydants du premier type capables de stopper la réaction autocatalytique en réduisant le radical DPPH et en formant un radical plus stable par conjugaison (Figure IV.5) [17].

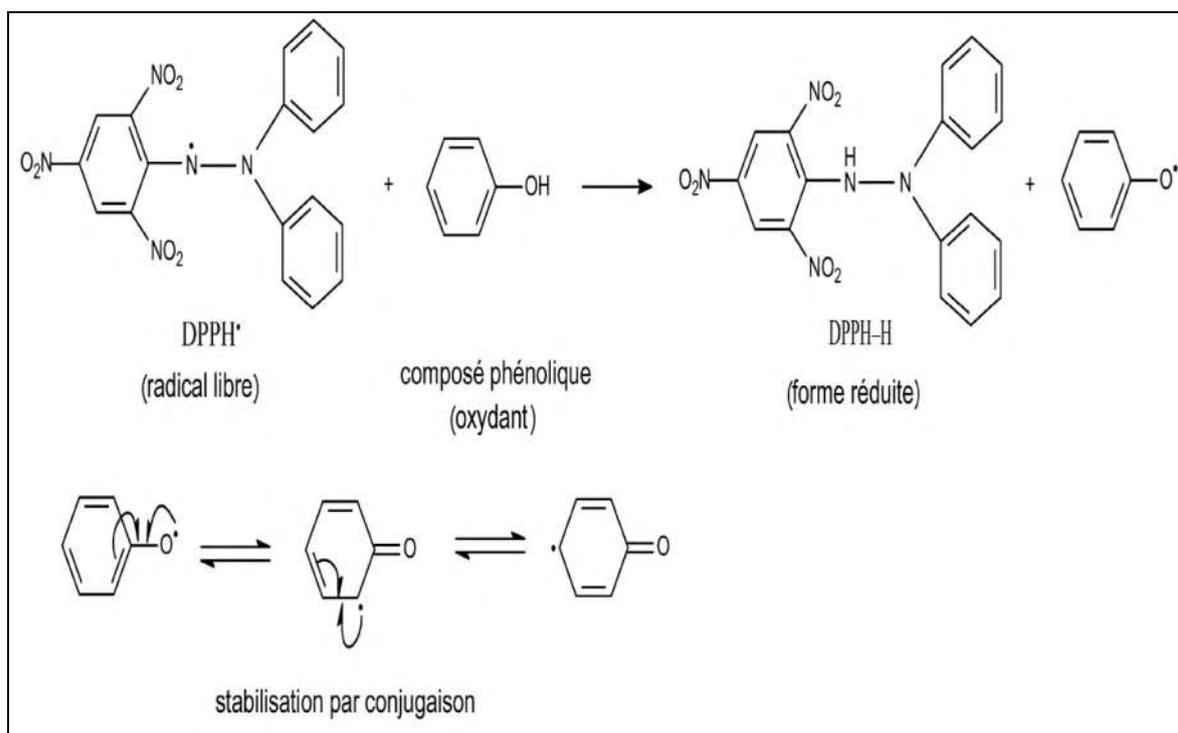


Figure IV.5 : Réaction de réduction du radical libre (DPPH•) par un composé phénolique

Les figures IV.6, IV.7 et IV.8 représentent les réactions de réduction du radical libre (DPPH•) par les composés A7, A8 et A12 respectivement.

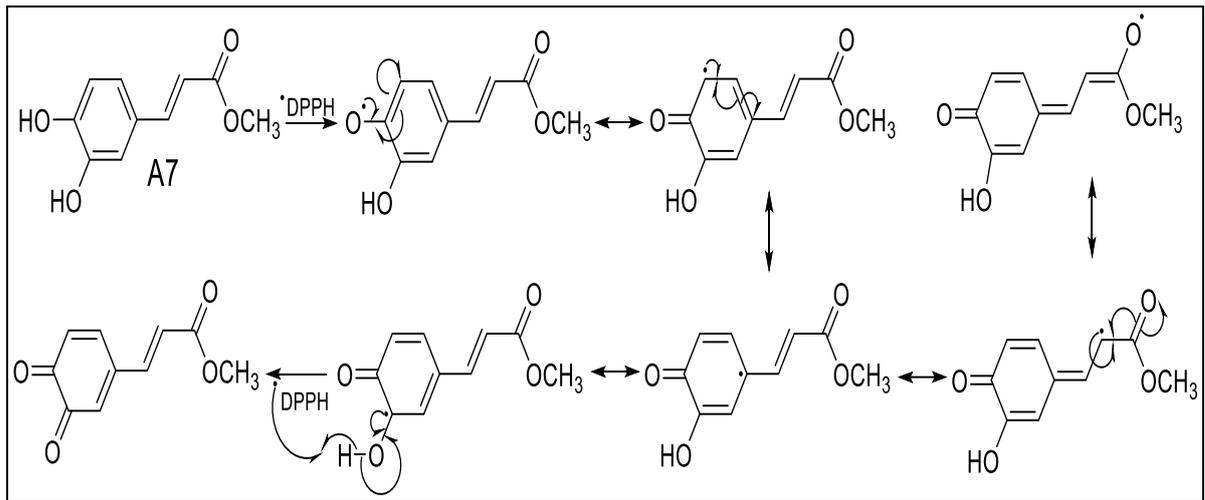


Figure IV.6: Réaction de piégeage de radical libre (DPPH•) avec le composé A7

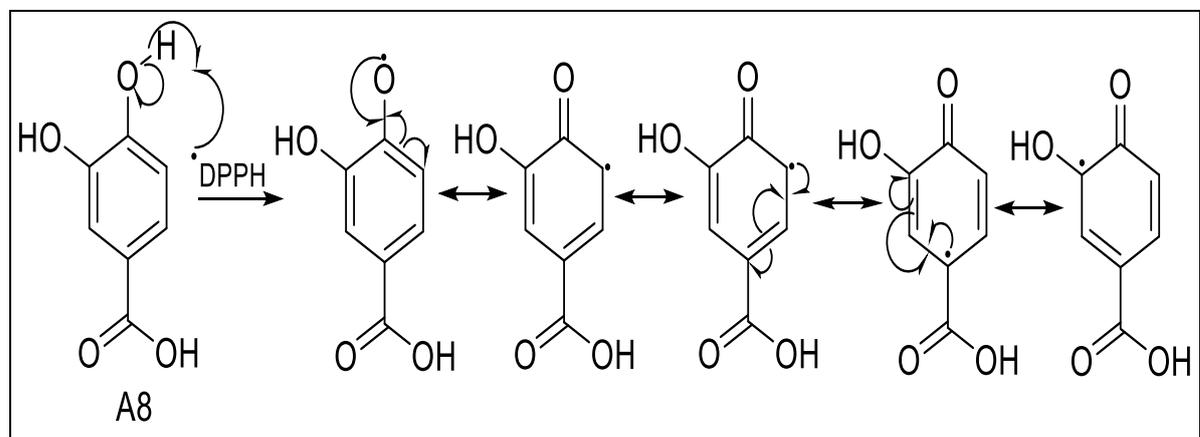


Figure IV.7: Réaction de piégeage de radical libre (DPPH•) avec le composé A8

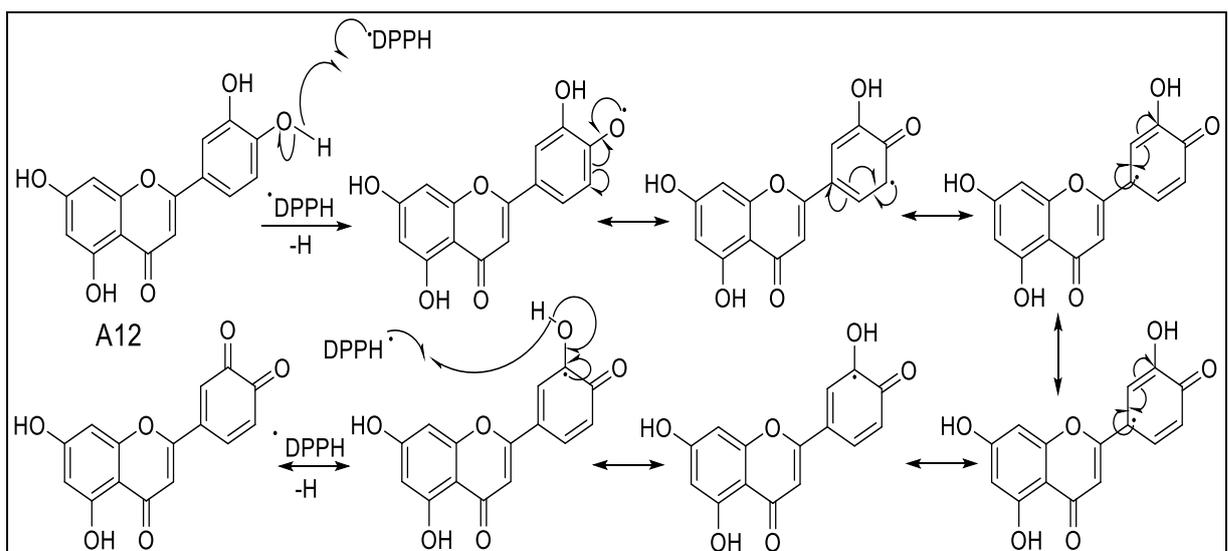


Figure IV.8: Réaction de piégeage de radical libre (DPPH•) avec le composé A12

Dans l'ensemble, les molécules purifiées ne sont pas plus actives que l'extrait acétate d'éthyle. Il existe donc une synergie entre les différentes molécules de l'extrait qui contribue à augmenter leur potentiel antioxydant lorsqu'elles peuvent agir ensemble [18].

Très peu de travaux ont été réalisés sur l'étude des propriétés antioxydantes des extraits de la plante choisie. D'après nos connaissances et à ce jour-là, un seul article reporte l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique de *Thymus munbyanus* subsp. *ciliatus* [19]. D'autre part, des activités antioxydantes des molécules A3, A7, A8, A9, A11, A12 et A13 ont été décrites dans la littérature [20-26].

IV.4. Conclusion

D'après les résultats obtenus, la variation du pouvoir antioxydant des différents extraits pourrait s'expliquer par leur richesse différentielle en polyphénols et plus particulièrement de la nature des composés. Les molécules les plus intéressantes étaient les molécules qui possédaient des fonctions *ortho*-dihydroxylées.

Selon Rice-Evans et *al.* (1997), l'augmentation de l'efficacité antioxydante retourne à la structure, la qualité et la concentration des composées phénoliques, et ses quantités dans les tissus des plantes.

En ce qui concerne l'usage traditionnel de la plante, les activités constatées semblent insuffisantes pour la considérée comme une source d'antioxydant naturel. D'autres essais pourraient donc être menés à l'avenir.

Références bibliographiques

1. İlhami G. Antioxidant activity of food constituents: an overview (2012). *Arch Toxicol*, 86, 345-391.
2. Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M., (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269, 337-341.
3. Alam, M.N., Bristi, N.J., Rafiquzzaman, M., (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21,143-152.
4. Aliyu, A.B., Ibrahim, M.A., Ibrahim, H., Musa, A.M., Lawal, A.Y., Oshanimi, J.A., Usman, M., Abdulkadir, I.E., Oyewale, A.O., Amupitan J.O., (2012). Free radical scavenging and total antioxidant capacity of methanol extract of *Ethulia conyzoides* growing in Nigeria. *Romanian Biotechnological Letters*, 17, 7458-7465.
5. Muanda, F., Koné, D., Dicko, A., Soulimani, R., Younos, C., (2011). Phytochemical composition and antioxidant capacity of three malian medicinal Plant Parts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 9.
6. Agbo, M.O., Uzor, P.F., Akazie-Nneji, U.N., Eze-Odurukwe, C.U., Ogbatue, U.B, Mbaoji, E.C., (2015). Antioxidant, Total Phenolic and Flavonoid Content of Selected Nigerian Medicinal Plants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14, 35-41.
7. Blois, M.S., 1958. Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature* 181, 1199-1200.
8. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C.,(1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28, 25-30.
9. Molyneux, P., (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarın Journal of Science and Technology*, 26, 211-219.
10. Es-Safi, N. E., (2012). Plant Polyphenols : Extraction , Structural, in: Rao, V. (Ed.), *Phytochemicals as Nutraceuticals - Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health*. InTech, pp12.
11. Phatak, R. S., Hendre ,A. S., (2014). Total antioxidant capacity (TAC) of fresh leaves of *Kalanchoe pinnata*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2 , 32-35.

12. Ahmed D., Khan M. M., Saeed R., (2015). Comparative analysis of phenolics, flavonoids, and antioxidant and antibacterial potential of methanolic, hexanic and aqueous extracts from *Adiantum caudatum* leaves. *Antioxidants*, 4, 394-409.
13. Ozen, O., MACIT, M., Toka, M., (2018). Screening and Evaluation of Antioxidant Activities of Selected Naphthalene Compounds. *Jurnal Sains Kesihatan Malaysia*, 16, 45-55.
14. Aliyu, A.B., Ibrahim, M.A., Musa, A.M., Bulus, T., Oyewale, A.O., (2011). Phenolics content and antioxidant capacity of extracts and fractions of *Verninia blumeoides* (Asteraceae). *International Journal of Biological Chemistry*, 5, 352-359.
15. Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., et Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine*, 20, 933-956.
16. Balasundram, N., Sundram, K., Samman,S., (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99, 191-203.
17. Rolland, Y. (2004). Antioxydants naturels végétaux. *Oilseeds, fats Crops and Lipids*, 11, 419-424.
18. Gourguillon, L., (2017). Etude de deux halophytes, *Armeria maritima* (Mill.)Willd. et *Helichrysum stoechas* (L.) Moench: exploration phytochimique, approche biotechnologique et valorisation dermo-cosmétique. *Thèse de docteur en pharmacognosie de l'université de Strasbourg*, 177p.
19. Gaamoune, S., Nouioua, W., Khaled, A., Ouffroukh, A., (2015). Antioxidant and antimicrobial activities of flavonoids extracted from *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. *Der Pharmacia Lettre*, 7, 358-363.
20. Pulido, R., Bravo, L., Calixto, F.S., (2000). Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols As Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3396-3402.
21. Galani, E., Chatzidaki, M. D., Fokas, D., Xenakis, A., Roussis, I. G., (2022). Antioxidant Activity of Methyl Caffeate-Enriched Olive Oils: From Extra Virgin Olive Oil to Extra Virgin Olive Oil-Based Microemulsions. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2100249.

22. Chang, Z.Q., Gebru, E., Lee, S.P., Rhee, M.H., Kim, J.C., Cheng, H., Park, S.C., (2011). In vitro antioxidant and anti-inflammatory activities of protocathechualdehyde isolated from *phellinus gilvus*. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 57, 118-122.
23. Kiliç, I., Yeşiloğlu, Y., (2013). Spectroscopic studies on the antioxidant activity of p-coumaric acid. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 115, 719-724.
24. Fazilatun, N., Zhari, I., Nornisah, M., Mas Rosemal, H.M.H., (2004). Free radical-scavenging activity of organic extracts and of pure flavonoids of *Blumea balsamifera* DC leaves. *Food Chemistry*, 88, 243-252.
25. Seelinger, G., Merfort, I., Schempp, C.M., (2008). Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-allergic activities of luteolin. *Planta Medica*, 74, 1667-1677.
26. Abida, K., Rehana, R., Nighat, F., Sadaf, M., Sadullah, M., Khan, S., Nyla, J., Ghulam, M., (2015). Pharmacological Activities of Protocatechuic Acid. *Acta Poloniae Pharmaceutica- Drug Research*, 72, 643-650.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Conclusion générale

Conclusion générale

A l'issue de ce travail de recherche qui a porté sur une modeste participation à la valorisation phytochimique et biologique d'une plante médicinale de la flore algérienne: *Thymus munbyanus* subsp. *ciliatus* (Desf.) Greuter & Burdet appartenant à la famille Lamiaceae, des composés naturels ont été isolés et identifiés et une relation structure-activité a été également démontrée.

L'investigation phytochimique des parties aériennes de l'espèce *Thymus munbyanus* subsp. *ciliatus* (Desf.) Greuter & Burdet a conduit à l'isolement de 16 produits naturels appartenant à différentes classes chimiques dont 2 composés originaux et 14 composés connus.

La détermination structurale a été réalisée par les méthodes spectroscopiques de RMN mono et bidimensionnelle (^1H , ^{13}C , COSY H-H, HSQC et HMBC) et ESI-MS ainsi que par comparaison avec les données de la littérature.

✚ **14** composés obtenus de la phase AcOEt:

- **1 stérol**: β -sitostérol-3-O- β -D-glucoside.
- **2 flavonoïdes**: 3',5,5',7-tétrahydroxyflavanone et lutéoline.
- **5 acides phénoliques**: acide salicylique; acide férulique; acide vanillique; l'acide para-coumarique et acide protocatéchique.
- **5 dérivés phénoliques**: tyrosol; aldéhyde protocatéchique; cafféate d'éthyle; cafféate de méthyle et 2,3,5,6-tétrahydroxybenzoate de méthyle (Nouvelle molécule).
- **1 dérivé de la pyran-2-one**: acide 4-hydroxy-5-méthoxy-2-oxo-2H-pyran-3-carboxylique (Nouvelle molécule).

✚ **2** composés obtenus de la phase *n*-BuOH:

- **1 flavonoïde**: isorhamnétine 3-O-glucoside.
- **1 acide phénolique**: acide rosmarinique.

Tous les produits cités sont isolés pour la première fois dans l'espèce *Thymus munbyanus* subsp. *ciliatus*.

La détermination et la quantification de divers composés phénoliques des extraits de l'espèce *Thymus munbyanus* subsp. *ciliatus* ont été réalisés par HPLC-TOF/MS. Le résultat de cette analyse a révélé la présence de 9 acides phénoliques, 16 flavonoïdes, 3 dérivés phénoliques et un acide organique.

L'activité antioxydante des molécules isolées et des extraits a été évaluée par deux méthodes différentes: test au phosphomolybdate d'ammonium et le piégeage du radical libre DPPH.

Conclusion générale

L'extrait acétate d'éthyle et le produit A7 montrent un puissant pouvoir réducteur vis-à-vis de l'ion molybdène par transfert d'électrons. Alors que l'ensemble des extraits et les produits étudiés révèlent des propriétés antioxydantes intéressantes vis-à-vis du radical DPPH par donation de protons. Le BHA et le BHT ont été utilisés comme antioxydants standards.

Les résultats obtenus indiquent que *Thymus munbyanus* subsp. *ciliatus* serait une source alternative prometteuse des composés phénoliques antioxydants naturels. D'autres travaux de recherche doivent être réalisés afin d'isoler de nouvelles molécules et l'évaluation d'autres activités biologiques.

Résumé

Ce travail est consacré à l'étude phytochimique, la détermination structurale et l'évaluation biologique de substances naturelles isolées d'une espèce de la famille lamiacées: *Thymus munbyanus* subsp. *ciliatus* (Desf.) Greuter & Burdet. Cette étude a permis d'isoler et d'identifier 16 composés dont 2 correspondent à de nouvelles structures.

Les structures moléculaires des composés isolés ont été élucidées principalement par l'utilisation des techniques de RMN 1D et 2D (^1H , ^{13}C , COSY H-H, HSQC et HMBC), ESI-MS et par comparaison avec les données de la littérature. Il s'agit d'1 stérol, 3 flavonoïdes, 6 acides phénoliques, 5 dérivés phénoliques et 1 dérivé de la pyran-2-one.

La détermination et la quantification des composés phénoliques des extraits de l'espèce *Thymus munbyanus* subsp. *ciliatus* ont été réalisés par HPLC-TOF/MS. Le résultat de cette analyse a révélé la présence de 29 composés en quantités variables.

L'extrait acétate d'éthyle et le produit A7 montrent un puissant pouvoir réducteur vis-à-vis de l'ion molybdène par transfert d'électrons. Alors que l'ensemble des extraits et les produits étudiés révèlent des propriétés antioxydantes intéressantes vis-à-vis du radical DPPH par donation de protons. Le BHA et le BHT ont été utilisés comme antioxydants standards.

Mots clés : Lamiacées, *Thymus*, HPLC-TOF/MS, Activité antioxydante, RMN 1D et 2D

Abstract

This work is devoted to the phytochemical study; structural determination and biological evaluation of natural substances isolated from a species of the Lamiaceae family: *Thymus munbyanus* subsp. *ciliatus* (Desf.) Greuter & Burdet. This study made it possible to isolate and identify 16 compounds, 2 of which correspond to new structures.

The molecular structures of the isolated compounds were elucidated mainly by the use of 1D and 2D NMR techniques (^1H , ^{13}C , COSY H-H, HSQC and HMBC), ESI-MS and by comparison with literature data. These are 1 sterol, 3 flavonoids, 6 phenolic acids, 5 phenolic derivatives and 1 pyran-2-one derivative.

The determination and quantification of phenolic compounds in extracts of the species *Thymus munbyanus* subsp. *ciliatus* were performed by HPLC-TOF/MS. The result of this analysis revealed the presence of 29 compounds in varying amounts.

The ethyl acetate extract and product A7 show a powerful reductive power vis-à-vis the molybdenum ion by electron transfer. While all the extracts and products studied reveal interesting antioxidant properties vis-à-vis the radical DPPH by proton donation. BHA and BHT have been used as standard antioxidants.

Keywords: Lamiaceae, *Thymus*, HPLC-TOF/MS, Antioxidant activity, 1D and 2D NMR

المخلص

خصص هذا العمل للدراسة الفيتوكيميائية، التعيين البنوي والتقييم البيولوجي للمركبات الطبيعية المفصولة من نبتة

Thymus munbyanus subsp. *ciliatus* (Desf.) Greuter & Burdet. : Lamiaceae العائلة

وقد سمحت لنا هذه الدراسة بفصل ستة عشر مركبا، اثنان منها جديدة.

تم تحديد بنية كل المركبات بالاستعانة بطرق التحليل الطيفي وبشكل بارز مطيافية الرنين المغناطيسي بجميع أنواعها

وإستعمال مطيافية الكتلة، والمقارنة مع المعطيات المراجع: ^{13}C , ^1H , COSY H-H, HSQC, HMBC

تتمثل هذه المركبات في:

6 acides phénoliques

3 flavonoïdes

1 stérol

1 dérivé de la pyran-2-one

5 dérivés phénoliques

تحديد و تقدير المركبات الفينولية في مستخلصات *Thymus munbyanus* subsp. *ciliatus* تم بواسطة HPLC-TOF/MS

أظهرت نتائج هذا التحليل وجود 29 مركبًا بكميات متفاوتة .

أظهر مستخلص أسيتات الإيثيل و A7 قوة تخفيض قوية مقابل أيون الموليبيدينوم عن طريق نقل الإلكترونات.

في حين أن جميع المستخلصات والمنتجات التي تمت دراستها تكشف عن خصائص مضادة للأكسدة مثيرة للاهتمام ضد

جذور DPPH

تم استخدام BHT و BHA كمضادات أكسدة قياسية

الكلمات المفتاحية: Lamiaceae، *Thymus*، HPLC-TOF/MS، NMR 1D و 2D، فعالية بيولوجية