

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

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

N° d'ordre : 88/D3C/2018

N° de série : 14/Ch/2018

THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme du Doctorat 3^{ème} cycle (LMD)

Spécialité : Chimie pharmaceutique

Option : Analyse physicochimique, contrôle de la qualité et synthèse de substance
bioactives

Par

M^{me} BELAABED Soumia Ep Khalfaoui

**Etude chimique et biologique des espèces *Calligonum
azel* et *Calligonum comosum* (Polygonaceae) et une
espèce du genre *Thymus* (Lamiaceae)**

Devant le jury

BOUHEROUM Mohamed	Pr. Université des frères Mentouri, Constantine	Président
BEGHIDJA Noureddine	Pr. Université des frères Mentouri, Constantine	Directeur de thèse
BOUDJERDA Azzedine	Pr. Université Mohamed Seddik Ben Yahia, Jijel	Examineur
DENDOUGUI Hocine	Pr. Université Kasdi Merbah, Ouargla	Examineur

Juillet 2018

REMERCIEMENT

Ce travail a été réalisé au sein du groupe de phytochimie affilié à l'unité de recherche VARENBIOMOL de la faculté des sciences exactes, Université des frères Mentouri Constantine, sous la direction de Professeur **Beghidja Noureddine**, directeur de cette thèse. Je tiens à exprimer mes sincères remerciements, pour m'avoir guidé pendant toutes ces années ainsi que pour sa gentillesse, sa disponibilité et la qualité de ses conseils.

J'aimerais également exprimer ma gratitude à Professeur **De Tommasi Nunziatina**, co-directeur de cette thèse, professeur de l'université de Salerno, Italie, de m'avoir accueilli dans son laboratoire de recherche et de m'avoir donné l'opportunité de me former en phytochimie avec des appareils modernes, de la confiance qu'elle m'a accordée et aussi pour son encadrement, sa sympathie, sa rigueur scientifique, ses conseils et ses encouragements, grâce à qui j'ai acquis une bonne formation.

J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur le Professeur **Benayache Samir** de l'université des frères Mentouri Constantine, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et donner la vie à ce projet de thèse de doctorat, pour ces nombreux conseils et suggestions tant scientifiques que techniques.

Je remercie aussi les membres de jury, Monsieur le Professeur **Bouheroum Mouhamed** de l'université des frères Mentouri Constantine, d'avoir accepté de présider le jury de ce travail. Monsieur le Professeur **Boudjerda Azzedine** de l'Université Mohamed Seddik Ben Yahia, Jijel, ainsi que Monsieur le Professeur **Dendougui Hocine** professeur de l'université Kasdi Merbah d'Ouargla, qui m'ont honorés en acceptant de faire partie du jury de ma thèse.

Mes remerciements s'adressent également à Madame **Benayache Fadila**, professeur de l'université de frères Mentouri Constantine, pour son aide, ses compétences scientifiques et ses conseils.

Khalfaoui Ayoub, doctorant à l'unité de recherche VARENBIOMOL de l'université des frères Mentouri Constantine, mais également, un ami et un mari, qui a largement contribué à la mise en forme de mon travail. Merci pour votre compréhension le soutien, les encouragements, vous aviez toujours été présent pour recadrer mon travail dans la bonne direction et ceci été fondamental dans la bonne réalisation de cette thèse. Soyez assurées de ma profonde gratitude.

J'aimerais également citer ici les personnes dont la collaboration a été essentielle pour plusieurs aspects de ce travail. Je remercie en particulier Docteur **Cotugno Roberta** et Docteur **Marzzoco Stefania** de l'université de Salerno, Italie, qui ont réalisées les tests des activités antioxydante et anti-inflammatoire des produits purs isolés sans oublier Professeur **Marinella De Leo** de l'université de Pise, Italie.

Je tiens à remercier Docteurs **Snoussi Mejdj** et **Naoumi Emira** de l'université de Monastir, Tunisie, pour la réalisation des différents tests biologiques sur les extraits organiques des plantes étudiées.

Un grand merci à Docteur **Nicola Malafrente** de l'université de Salerno, Italie, pour sa patience pendant mon travail, pour l'aide technique et scientifique. Mes vifs remerciements vont à mon collègue Docteur **Massimiliano Dambola** pour son aide et son soutien durant mon séjour à Salerno.

Mes remerciements s'adressent aussi aux membres du laboratoire de Salerno du département de pharmacie en Italie : **Anna Maria, Stefano, Antonia Vassalo, Giovanni, Luisa, Luca, Giovanna** et **Vanessa** pour l'attention régulière qu'ils m'ont témoignée sans réserve en m'intégrant dès les premiers instants dans leur environnement.

Mes remerciements les plus profonds vont à mes amies, tout particulièrement à **Sarah**, qui a toujours été à mes côtés dans les moments les plus délicats, merci à **Aicha, Sihem, Houria, Khawla, Hanene, Hanane, Wided, Nawel, Nesrine, Amina, Nihed, Randa, Imene, Redouan**, pour leur soutien moral sans faille et pour les bons moments passés ensemble en Italie et aussi à l'unité de recherche VARENBIOMOL en Algérie.

A la fin, je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont soutenu d'une façon ou d'une autre, de près ou de loin, tout au long de mon parcours scientifique.

DEDICACE

A mon très cher mari **Ayoub**, en signe d'amour et de gratitude pour m'avoir supporté malgré la distance, soutenu et surtout compris en permanence, pour ses sacrifices, ses encouragements, sa fidélité et sa gentillesse. Sans lui, je ne saurais pu progresser et en arriver à l'achèvement de ce travail.

A mon très chère petit enfant, **Fady** qui m'a porté le bonheur.

A mes très chers parents **Brahim & Zoubeida**, sans eux je ne suis pas pu être ce que je suis, en reconnaissance de leurs sacrifices immenses leurs amours et leurs encouragements durant toutes mes études et mes recherches, et surtout leur disponibilité de garder mon enfant durant toute ces deux dernières années.

A mes deux sœurs **Amel** et **Sara** que j'aime énormément, merci pour votre soutien moral et votre patience sans frontières

A mon frères **Mourad** et sa femme **Houda**, Mon amour **Miral** et mes deux anges **Aline** et **Bassem**

A mon beau père **Mahfoud** et ma belle mère **Badiaa** pour leurs gentillesse et leurs soutiens.

A mes beaux frères **Houdeifa** pour ses encouragements, **Assil**, ma belle sœur **Ikhlas**, mon beaux frère **Loukmane** et ma chère **Imene** ainsi qu'à ma fille **Lamar**

A tous ceux qui me sont chers.

Soumia

Liste des Tableaux

Tableau I.1.	Sources alimentaires de quelques flavonoïdes	20
Tableau II.1.	Les flavonoïdes isolés de la famille des Polygonacées	32
Tableau II.2.	Les acides phénoliques isolés de la famille des Polygonacées	41
Tableau II.3.	Composés isolés du genre <i>Calligonum</i>	46
Tableau III.1.	Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait acétate d'éthyle de <i>C. azel</i>	67
Tableau III.2.	Les produits isolés de la sous fraction CAP/2/12-10	69
Tableau III.3.	Les produits isolés de la sous fraction CAP/2/12-15	69
Tableau III.4.	Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait CHCl ₃ / MeOH (90:10, v/v) de <i>C. azel</i>	70
Tableau III.5.	Les produits isolés de la sous fraction CAP/3/10	71
Tableau III.6.	Les produits isolés de la sous fraction CAP/3/7	73
Tableau III.7.	Les produits isolés de la sous fraction CAP/3/8	74
Tableau III.8.	Masse et rendement d'extraction des extraits de <i>Calligonum comosum</i>	76
Tableau III.9.	Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait acétate d'éthyle de <i>C. comosum</i>	79
Tableau III.10.	Les produits isolés de la sous fraction CCP/2/9	80
Tableau III.11.	Les produits isolés de la sous fraction CCP/2/14	82
Tableau III.12.	Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de Sephadex de l'extrait <i>n</i> -butanol de <i>Calligonum comosum</i>	83
Tableau III.13.	Les produits isolés de la sous fraction CCP/3/5+6	84
Tableau III.14.	Les produits isolés de la sous fraction CCP/3/9	85
Tableau III.15.	Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait Chloroforme de <i>C. comosum</i>	86
Tableau III.16.	Les produits isolés de la sous fraction CCP/8/9	88
Tableau III.17.	Les produits isolés de la sous fraction CCP/8/14	89
Tableau III.18.	Les produits isolés de la sous fraction CCP/8/15	90
Tableau IV.1.	Résultats du screening chimique	103
Tableau IV.2.	Données de la spectrométrie RMN ¹ H et ¹³ C (MeOH- <i>d</i> ₄ , 400 MHz) du composé 150-21N	115
Tableau IV.3.	Données de la spectrométrie RMN ¹ H et ¹³ C (MeOH- <i>d</i> ₄ , 400 MHz) du composé CAP-122.....	120
Tableau IV.4.	Données de la spectrométrie RMN ¹ H (MeOH- <i>d</i> ₄ , 400 MHz) du composé CAP/4/4	122
Tableau IV.5.	Données de la spectroscopie RMN ¹ H et ¹³ C (MeOH- <i>d</i> ₄ , 500 MHz) du composé CAP/4/6	126
Tableau IV.6.	Données de la spectroscopie RMN ¹ H et ¹³ C (600 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄) du composé CAP/4/7	130
Tableau IV.7.	Données de la spectroscopie RMN ¹ H et ¹³ C (600 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄) du composé CAP/4/20	137
Tableau IV.8.	Données de la spectroscopie RMN ¹ H et ¹³ C (600 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄) du	

	composé CAP/5/14	143
Tableau IV.9.	Données de la spectroscopie RMN ¹ H et ¹³ C (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CAP/5/6	148
Tableau IV.10.	Données de la spectroscopie RMN ¹ H et ¹³ C (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CAP/5/3	153
Tableau IV.11.	Données de la série spectrale UV (λ_{\max} , nm) du composé CCP/9/12	156
Tableau IV.12.	Données du spectre de RMN ¹ H et ¹³ C (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CCP/9/12	162
Tableau IV.13.	Données de la spectroscopie RMN ¹ H (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CCP/10/11	165
Tableau IV.14.	Données de la spectroscopie RMN ¹ H et ¹³ C du composé CCP/6/3 (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4)	170
Tableau IV.15.	Données de la spectroscopie RMN ¹ H et ¹³ C (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CCP/12/8	176
Tableau IV.16.	Données de la spectroscopie RMN ¹ H et ¹³ C (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CCP/4/14	186
Tableau IV.17.	Données de la spectroscopie RMN ¹ H et ¹³ C (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CCP/11/12	191
Tableau IV.18.	Pouvoir d'inhibition IC ₅₀ des extraits de <i>C. azel</i>	193
Tableau IV.19.	Pouvoir d'inhibition IC ₅₀ des extraits de <i>C. comosum</i>	194
Tableau IV.20.	Pouvoir d'inhibition IC ₅₀ des extraits de <i>C. azel</i>	196
Tableau IV.21.	Pouvoir d'inhibition IC ₅₀ des extraits de <i>C. comosum</i>	197
Tableau IV.22.	Pouvoir d'inhibition IC ₅₀ des extraits de <i>C. azel</i>	199
Tableau IV.23.	Pouvoir d'inhibition IC ₅₀ des extraits de <i>C. comosum</i>	200
Tableau IV.24.	Résultats de l'activité antibactérienne des trois extraits de <i>C. azel</i>	202
Tableau IV.25.	Résultats de l'activité antibactérienne des trois extraits de <i>C. comosum</i>	205
Tableau IV.26.	Résultats de l'activité antifongique des trois extraits des espèces <i>C. azel</i> et <i>C. comosum</i>	207
Tableau IV.27.	Les produits purs isolés de l'espèce <i>C. azel</i>	211
Tableau IV.28.	Les produits purs isolés de l'espèce <i>C. comosum</i>	212
Tableau V.1.	Composition de l'huile essentielle des parties aériennes fraîches de <i>Thymus ciliatus</i>	226
Tableau V.2.	Activité antibactérienne de l'huile essentielle de <i>Thymus ciliatus</i>	229

Liste des Figures

Figure I.1.	Métabolisme des phénylpropanoïdes conduisant aux principaux groupes de Composés phénoliques	9
Figure I.2.	Quelques exemples des acides hydroxybenzoïques	11
Figure I.3.	Quelques exemples des acides hydroxycinnamiques	12
Figure I.4.	Exemple de formes combinées des acides hydroxycinnamiques	13
Figure I.5.	Squelette de base des flavonoïdes	13
Figure I.6.	Structure chimique des flavonoïdes	14
Figure I.7.	La biosynthèse des flavonoïdes	15
Figure I.8.	Les différentes familles des flavonoïdes	16
Figure I.9.	Exemples des structures chimiques des flavonoles	17
Figure I.10.	Exemple de structure chimique des flavonoles (3, 5, trihydroxyflavonol = dihydroflavonol)	18
Figure I.11.	Exemples des structures chimiques des flavane-3-ol	18
Figure I.12.	Numérotation du squelette chalcone	19
Figure I.13.	Exemples de structures de chalcones et dihydrochalcones glycosylées ou alkylées	19
Figure II.1.	Les stéroïdes isolés de la famille des <i>Polygonacées</i>	44
Figure II.2.	Les espèces <i>Calligonum azel</i> et <i>Calligonum comosum</i> (Respectivement)	45
Figure III.1.	L'espèce <i>Calligonum azel</i>	57
Figure III.2.	1 ^{er} protocole d'extraction de l'espèce <i>Calligonum Azel</i>	64
Figure III.3.	2 ^{ème} protocole d'extraction de l'espèce <i>Calligonum azel</i>	65
Figure III.4.	Plaque CCM de la sous fraction CAP/2/12-10 élué dans CHCl ₃ /Acétone (60:40, v/v) après révélation avec l'anysdaldehyde	68
Figure III.5.	Plaque CCM de la fraction CAP/2/12-15 dans le système d'élution CHCl ₃ /Acétone (60:40, v/v).....	69
Figure.III.6.	Chromatogramme CLHP de la fraction CAP/3/10.....	71
Figure.III.7.	Chromatogramme CLHP de la fraction CAP/3/7.....	72
Figure.III.8.	Chromatogramme CLHP de la fraction CAP/3/8	74
Figure III.9.	L'espèce <i>Calligonum comosum</i>	75
Figure III.10.	Protocole de l'extraction de l'espèce <i>Calligonum comosum</i>	77
Figure.III.11.	Chromatogramme CLHP de la fraction CCP/2/9.....	80
Figure.III.12.	Chromatogramme CLHP de la fraction CCP/2/14.....	81
Figure.III.13.	Chromatogramme CLHP de la fraction CCP/3/5+6.....	84
Figure.III.14.	Chromatogramme CLHP de la fraction CCP/8/9.....	87
Figure.III.15.	Chromatogramme CLHP de la fraction CCP/8/14.....	89
Figure.III.16.	Chromatogramme CLHP de la fraction CCP/8/15.....	90
Figure.III.17.	Mécanisme d'action du DPPH.....	92
Figure.III.18.	Génération du radical cation de l'ABTS.....	92
Figure III.19.	Principe de la méthode de diffusion sur disque.....	97
Figure IV.1.	Spectre Infrarouge du composé 150-21N	104
Figure IV.2.	Spectre de masse HR-ESIMS (+) du composé 150-21N	105

Figure IV.3.	Spectre RMN ¹ H (400 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé 150-21N	106
Figure IV.4.	Spectre RMN ¹ H (400 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé 150-21N, étalement [2 à 5 ppm]	107
Figure IV.5.	Spectre RMN ¹ H (400 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé 150-21N, étalement [6 à 8 ppm]	107
Figure IV.6.	Spectre RMN ¹³ C (400 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé 150-21N	108
Figure IV.7.	Spectre RMN ¹³ C (400 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé 150-21N, étalement [60 à 100 ppm]	109
Figure IV.8.	Spectre RMN ¹³ C (400 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé 150-21N, étalement [110 à 160 ppm]	109
Figure IV.9.	Spectre DEPT 135° (400 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé 150-21N	110
Figure IV.10.	Spectre DEPT 90° (400 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé 150-21N	110
Figure IV.11.	Spectre COSY (400 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé 150-21N	111
Figure IV.12.	Spectre HSQC (400 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé 150-21N	112
Figure IV.13.	Spectre HMBC (400 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé 150-21N	113
Figure IV.14.	Les corrélations HMBC du composé 150-21N	113
Figure IV.15.	Spectre ROESY (400 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé 150-21N	114
Figure IV.16.	La structure de la Catéchine	115
Figure IV.17.	Spectre RMN ¹ H (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CAP-122	117
Figure IV.18.	Spectre HSQC (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CAP-122	118
Figure IV.19.	Les corrélations HMBC du composé CAP-122	119
Figure IV.20.	Spectre HMBC (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CAP-122	119
Figure IV.21.	La structure de la Taxifoline.....	120
Figure IV.22.	Spectre de masse ESI-MS du composé CAP/4/4	121
Figure IV.23.	Spectre RMN ¹ H (400 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CAP/4/4	122
Figure IV.24.	La structure de l'Acide Protocatéchique	123
Figure IV.25.	Spectre de masse ESI-MS (+) du composé CAP/4/6	124
Figure IV.26.	Spectre RMN ¹ H (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CAP/4/6	125
Figure IV.27.	Spectre RMN ¹³ C (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CAP/4/6	125
Figure IV.28.	Spectre HMBC (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CAP/4/6	126
Figure IV.29.	La structure du Méthyle gallate	127
Figure IV.30.	Spectre RMN ¹ H (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CAP/4/7	128
Figure IV.31.	Spectre HSQC (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CAP/4/7	129
Figure IV.32.	Spectre HMBC (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CAP/4/7	130
Figure IV.33.	La structure de l'Acide caféique	131
Figure IV.34.	Spectre RMN ¹ H (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CAP/4/20	132
Figure IV.35.	Spectre COSY (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CAP/4/20	133
Figure IV.36.	Spectre COSY (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CAP/4/20 étalement (3.00 à 4.20 ppm)	134
Figure IV.37.	Spectre HSQC (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CAP/4/20	135
Figure IV.38.	Les corrélations HMBC du composé CAP/4/20	136
Figure IV.39.	Spectre HMBC (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CAP/4/20	136
Figure IV.40.	La structure de 4, 2', 4', 6'-tetrahydroxy-dihydrochalcone-2'- β- D-glucopyranoside	137
Figure IV.41.	Spectre de masse HR-ESIMS (-) du composé CAP/5/14	138

Figure IV.42.	Spectre RMN ¹ H (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CAP/5/14	139
Figure IV.43.	Spectre COSY (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CAP/5/14	140
Figure IV.44.	Spectre HSQC (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CAP/5/14	141
Figure IV.45.	Les corrélations HMBC du composé CAP/5/14	142
Figure IV.46.	Spectre HMBC (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CAP/5/14	142
Figure IV.47.	La structure de l'Acide 5-(<i>p</i> -hydroxy-phenyl)-pent-2-en	143
Figure IV.48.	Spectre de masse HR-ESIMS (-) du composé CAP/5/6	144
Figure IV.49.	Spectre RMN ¹ H (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CAP/5/6	145
Figure IV.50.	Spectre COSY (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CAP/5/6	146
Figure IV.51.	Spectre HSQC (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CAP/5/6	147
Figure IV.52.	Spectre HMBC (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CAP/5/6	148
Figure IV.53.	La structure de l'Acide 5-(<i>p</i> -hydroxy-phenyl)-3-hydroxy-pentanoïque	149
Figure IV.54.	Spectre de masse HR-ESIMS (-) du composé CAP/5/3	150
Figure IV.55.	Spectre RMN ¹ H (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CAP/5/3	151
Figure IV.56.	Spectre HSQC (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CAP/5/3	152
Figure IV.57.	Spectre HMBC (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CAP/5/3	153
Figure IV.58.	La structure de l'Acide- α , β -diamino (-4-hydroxy benzene) butanoïque	154
Figure IV.59.	Spectres d'absorption Ultraviolette du composé CCP/9/12 dans le MeOH et en présence de NaOH + HCl	155
Figure IV.60.	Spectres d'absorption Ultraviolette du composé CCP/9/12 dans le MeOH et en présence d'AlCl ₃ et HCl	155
Figure IV.61.	Spectres d'absorption Ultraviolette du composé CCP/9/12 dans le MeOH et en présence de NaOAc	156
Figure IV.62.	Structure partielle du composé CCP/9/12	156
Figure IV.63.	Spectre RMN ¹ H (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CCP/9/12	158
Figure IV.64.	Spectre HSQC (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CCP/9/12	159
Figure IV.65.	Spectre HSQC (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CCP/9/12, étalement (3.10 - 3.90 ppm)	160
Figure IV.66.	Spectre HMBC (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CCP/9/12	161
Figure IV.67.	La structure de Nicotiflorine	163
Figure IV.68.	Spectre RMN ¹ H (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CCP/10/11	164
Figure IV.69.	La structure de l'Acide <i>p</i> - coumarique	165
Figure IV.70.	Spectre RMN ¹ H (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CCP/6/3	166
Figure IV.71.	Spectre HSQC (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CCP/6/3	167
Figure IV.72.	Spectre HMBC (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CCP/6/3	168
Figure IV.73.	Spectre COSY (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CCP/6/3	169
Figure IV.74.	La structure de l'isoquercétine	170
Figure IV.75.	Les fragments du composé CCP/12/8	172
Figure IV.76.	Spectre RMN ¹ H (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CCP/12/8	172
Figure IV.77.	Spectre COSY (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CCP/12/8	173
Figure IV.78.	Liaison des fragments B et D du composé CCP/12/8	174
Figure IV.79.	Liaison des fragments A et C du composé CCP/12/8	174
Figure IV.80.	Les corrélations HMBC du composé CCP/12/8.....	175
Figure IV.81.	Spectre HMBC (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CCP/12/8	175

Figure IV.82.	Spectre HSQC (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CCP/12/8	176
Figure IV.83.	La structure de Tamgermanetin	177
Figure IV.84.	Spectre RMN ¹ H (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CCP/9/7	178
Figure IV.85.	Spectre HSQC (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CCP/9/7	179
Figure IV.86.	Spectre COSY (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CCP/9/7	180
Figure IV.87.	La structure de Rutine	181
Figure IV.88.	Spectre RMN ¹ H (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CCP/4/14.....	182
Figure IV.89.	Spectre COSY (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CCP/4/14	183
Figure IV.90.	Spectre HSQC (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CCP/4/14	184
Figure IV.91.	Les corrélations HMBC du composé CCP/4/14	185
Figure IV.92.	Spectre HMBC (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CCP/4/14	186
Figure IV.93.	La structure de l'Epigallocatechine-3-O-gallate	187
Figure IV.94.	Spectre RMN ¹ H (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CCP/11/12	189
Figure IV.95.	Spectre HMBC (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CCP/11/12	190
Figure IV.96.	Spectre HSQC (600 MHz, MeOH- <i>d</i> 4) du composé CCP/11/12	190
Figure IV.97.	La structure de l'acide éthyle ester protocatachique	191
Figure IV.98.	Courbe représentant de l'activité anti radicalaire DPPH des extraits de <i>C. azel</i>	192
Figure IV.99.	Courbe représentant l'activité anti-radicalaire DPPH des extraits de <i>C. comosum</i>	194
Figure IV.100.	Pourcentage de l'activité Anti-oxydante (scavenger) DPPH des différents extraits de <i>C. azel</i> et <i>C. comosum</i>	195
Figure IV.101.	Courbe représentant l'activité anti-radicalaire ABTS ⁺ des extraits de <i>C. azel</i>	196
Figure IV.102.	Courbe représentant l'activité anti radicalaire ABTS ⁺ des extraits de <i>C. comosum</i>	197
Figure IV.103.	Pourcentage de l'activité Antioxydante ABTS ⁺ des différents extraits de <i>C. azel</i> et <i>C. comosum</i>	198
Figure IV.104.	Courbe représentant l'activité anti radicalaire FRAP des extraits de <i>C. azel</i>	198
Figure IV.105.	Courbe représentant l'activité anti-radicalaire FRAP des extraits de <i>C. comosum</i>	199
Figure IV.106.	Pourcentage de l'activité Antioxydante FRAP des différents extraits de <i>C. azel</i> et <i>C. comosum</i>	200
Figure IV.107.	Effet des composés CCP/11/12, CAP/5/3, CCP/12/8, CAP/5/6 et CAP/5/14 (100-12,5 µM) sur NO.....	208
Figure IV.108.	Effet des composés CCP/11/12, CAP/5/3, CCP/12/8, CAP/5/6 et CAP/5/14 (100-12,5 µM) sur la production de ROS.....	209
Figure IV.109.	Le potentiel antioxydant in-cells des composés CAP/5/14 et CCP/11/12.....	210
Figure V.1.	L'espèce <i>Thymus ciliatus</i>	223
Figure V.2.	Structure des composés majoritaires de l'huile essentielle de <i>Thymus ciliatus</i>	226
Figure V.3.	Profil chromatographique de l'huile essentielle de <i>Thymus ciliatus</i>	227

Liste des abréviations

<i>n</i>-BuOH	: <i>n</i> -Butanol.
AcOEt	: Acétate d'éthyle.
CHCl₃	: Chloroforme.
MeOH	: Méthanol.
EtOH	: Ethanol.
CH₃COCH₃	: Acétone.
SbCl₃	: Antimoine trichlorure.
BAW	: Butanol / Acide citrique / Water.
HCl	: Acide Chlorhydrique.
NH₄OH	: Hydroxyde d'ammonium.
FeCl₃	: Chlorure de fer (III)
MeOH-<i>d</i>₄	: Méthanol deutéré.
LC	: Chromatographie en phase Liquide.
CLHP	: Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance.
tr	: Temps de rétention.
CCM (TLC)	: Chromatographie sur Couche Mince (Thin Layer Chromatography).
CC	: Chromatographie sur Colonne.
H₂O	: Eau.
OH	: Hydroxyle.
SM	: Spectroscopie de Masse.
ESI	: Ionisation par électrospray.
HR-MS	: Spectrométrie de Masse Haute Résolution.
RMN ¹H	: Résonance Magnétique Nucléaire du proton.
RMN ¹³C	: Résonance Magnétique Nucléaire du Carbone.
IR	: Infrarouge.
UV	: Ultra-Violet.
DEPT	: Distortionless Enhancement by Polarization Transfert.
COSY	: Correlated Spectroscopy.
ROESY	: Rotating-frame Overhauser Spectroscopy.
HSQC	: Heteronuclear Single Quantum Correlation.
HMBC	: Heteronuclear Multiple Bonding Connectivity.
δ (ppm)	: Déplacement chimique en partie par million.
δ_H	: Déplacement chimique du proton.
δ_C	: Déplacement chimique du carbone.
<i>J</i>(Hz)	: Constante de couplage exprimée en Hertz.
<i>s</i>	: Singulet.
<i>d</i>	: Doublet.
<i>dd</i>	: Doublet de doublet.
<i>t</i>	: Triplet.
<i>q</i>	: Quadruplet.

<i>m</i>	: Multiplet.
m.	: Multiplicité.
<i>m/z</i>	: Masse / charge électrique.
ABTS	: Sel d'ammonium de l'acide 2, 2'- azino bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique).
FRAP	: Ferric Reducing/Antioxidant Power.
IC₅₀	: Concentration de l'inhibiteur causant 50% d'inhibition
°C	: Température en degrés Celsius.
h	: Heure.
M	: Masse.
Kg	: Kilogramme.
g	: Gramme.
mg	: Milligramme.
µg	: Microgramme.
mm	: Millimètre.
nm	: Nanomètre.
µm	: Micromètre
Hz	: Hertz.
MHz	: Méga Hertz.
min	: Minute.
ml	: Millilitre.
µl	: Microlitre
%	: Pourcentage.
V	: Volume.
pH	: Picohenry (potentiel de l'hydrogène).
DPPH	: 1,1-Diphényl-2-PicrylHydrazyle.
BHT	: Hydroxytoluène butylé.
BHA	: Hydroxyanisole butylé.
ZI	: Zone d'inhibition.
CMB	: Concentration Minimale Bactéricide.
CMI	: Concentration Minimale Inhibitrice.
DS	: Ecart type.
CAP1	: Extrait Chloroforme du <i>C. azel</i> .
CAP2	: Extrait Acétate d'éthyle du <i>C. azel</i> .
CAP3	: Extrait Méthanol du <i>C. azel</i> .
CCP1	: Extrait Chloroforme du <i>C. comosum</i> .
CCP2	: Extrait Acétate d'éthyle du <i>C. comosum</i> .
CCP3	: Extrait Méthanol du <i>C. comosum</i> .
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute medium.
FCS	: Sérum de veau fœtal.
CO₂	: Dioxyde de carbone.
SDS	: Dodécylsulfate de Sodium.
DO	: Densité optique.
NO	: Oxyde nitrique.
DCFH-DA	: Diacétate de 2',7'-dichlorofluorescéine.

BHT	: Hydroxutoluene Butylé.
DAHP	: 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate.
EPSP	: 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate.
PAL	: Phénylalanine Ammoniac Lyase.
MH	: Mueller Hinton.
H₂O₂	: Peroxyde d'Hydrogène.
NaCl	: Chlorure de Sodium.
mM	: millimolaire.
μM	: Micromolaire.
λ (nm)	: Longueur d'onde en nanomètre.

Sommaire

Introduction générale.....	1
Référence	4

Chapitre I : Les composés phénoliques

I.1. Introduction.....	5
I.2. Les composés phénoliques	6
I.2.1. Définition.....	6
I.2.2. Biosynthèse des polyphénols.....	7
❖ Voie de l'acide shikimique	7
❖ Voie de l'acétate / malonate.....	9
I.2.3. Classification des polyphénols	10
I.2.3.1. Les acides phénoliques.....	10
❖ Les acides hydrobenzoïques.....	11
❖ Les acides hydroxycinnamiques.....	11
I.2.3.2. Les flavonoïdes.....	13
I.2.3.2.a. La biosynthèse des flavonoïdes.....	14
I.2.3.2.b. Classification.....	16
❖ Flavonoles	17
❖ Dihydroflavonoles	17
❖ Flavan-3-oles ou flavanoles	18
❖ Les chalcones et les dihydrochalcones	19
I.2.3.2.c. Distribution des flavonoïdes dans les plantes.....	20
I.2.4. Polyphénols dans les plantes : Localisation et intérêt.....	21
I.2.5. Intérêts thérapeutiques des polyphénols.....	21
I.2.5.1. Polyphénols et cancer	22
I.2.5.2. Polyphénols et maladies cardiovasculaires.....	23
I.2.5.3. Polyphénols et inflammation	23
I.2.5.4. Polyphénols et maladies neurodégénératives	24
Références	25

Chapitre II : Synthèse bibliographique de *C. azel* et *C. comosum*

II.1. Introduction.....	30
II.2. Aspect botanique de la famille des Polygonacées.....	30
II.2.1. Description de la famille des polygonacées.....	30
II.2.2. Description botanique.....	31
II.2.3. Utilisation économique	31
II.2.4. Les travaux antérieurs de la famille des polygonacées.....	31
II.2.4.1. Les flavonoïdes	32
II.2.4.2. Les acides phenoliques.....	40
II.2.4.3. Les steroids.....	43
II.3. Aspect botanique du genre <i>Calligonum</i>	44
II.3.1. Description du genre.....	44
II.3.2. Place dans la systématique.....	45
II.3.3. Classification phylogénétique	46
II.3.4. Travaux antérieurs du genre <i>Calligonum</i>	46
II.3.5. Intérêts biologiques du genre <i>Calligonum</i>	52
Références.....	53

Chapitre III : Travaux personnels : Etude Phytochimique et Biologique

III.1. Etude phytochimique de l'espèce <i>Calligonum Azel</i>	56
III.1.1. Description botanique de l'espèce.....	56
III.1.2. Place dans la systématique.....	56
• Classification phylogénétique	57
III.1.3. Etude bibliographique.....	57
III.1.4. Matériel végétal	57
III.1.5. Screening chimique.....	58
III.1.5.1. L'extrait éthéré.....	58
III.1.5.1.1. Caractérisatques de quelques constituants dans l'extrait éthéré.....	58
• Identification des huiles volatiles.....	58
• Identification des stérols et triterpènes.....	58

• Identification des caroténoïdes.....	59
• Identification des alcaloïdes à l'état de base (réactions de précipitation).....	59
• Identification des coumarines.....	59
• Identification des flavones aglycones.....	59
• Recherche de stéroïdes ou de dérivés terpéniques.....	60
• Identification des anthracénosides.....	60
• Identification des flavonosides (flavones glycosides).....	60
III.1.5.2. L'extrait alcoolique.....	60
III.1.5.2.1. Caractéristiques de quelques constituants dans l'extrait alcoolique.....	61
• Identification des tannins.....	61
• Identification des alcaloïdes.....	61
• Identification des alcaloïdes, bases quaternaires et les amines oxydées (réactions de précipitation).....	62
III.1.5.3. La solution aqueuse	62
• Identification des alcaloïdes	62
• Recherche des saponines (saponosides).....	62
III.1.6. Extraction de l'espèce <i>C. azel</i>	63
III.1.6.1. Méthode 1.....	63
III.1.6.2. Méthode 2	64
III.1.7. Contrôle chromatographique des extraits de <i>C. azel</i>	66
III.1.7.1. Séparation de l'extrait acétate d'éthyle sur colonne	66
III.1.7.1.a. Séparation et purification de la fraction CAP/2/12.....	68
• Etude de la fraction CAP/2/12.....	68
III.1.7.2. Séparation de l'extrait CHCl ₃ /MeOH (90:10, v/v) sur colonne	70
• Etude de la fraction CAP/3/10.....	71
• Etude de la fraction CAP/3/7.....	72
• Etude de la fraction CAP/3/8.....	73
III.2. Etude phytochimique de l'espèce <i>Calligonum Comosum</i>	74
III.2.1. Description botanique de l'espèce.....	74
III.2.2. Place dans la systématique.....	75
• Classification phytogénétique	75
III.2.3. Etude bibliographique.....	75
III.2.4. Matériel végétal.....	76

III.2.5. L'extraction de l'espèce <i>Calligonum comosum</i>	76
III.2.6. Contrôle chromatographique des extraits de <i>C. comosum</i>	78
III.2.7.1.a. Séparation de l'extrait acétate d'éthyle sur colonne.....	78
III.2.7.1.b. Séparation et purification des fractions de <i>C. comosum</i> par CLHP	79
• Etude de la fraction CCP/2/9.....	80
• Etude de la fraction CCP/2/14.....	81
III.2.7.1.c. Séparation de l'extrait <i>n</i> -Butanol sur colonne.....	82
III.2.7.1.d. Purification des fractions de l'extrait <i>n</i> -Butanol.....	83
• Etude de la fraction CCP/3/5+6.....	83
• Etude de la fraction CCP/3/9.....	85
III.2.7.1.c. Séparation de l'extrait Chloroforme sur colonne	85
III.2.7.1.e. Purification des fractions de l'extrait Chloroforme.....	87
• Etude de la fraction CCP/8/9.....	87
• Etude de la fraction CCP/8/14.....	88
• Etude de la fraction CCP/8/15.....	89
III.3. Etude des activités biologiques des espèces étudiées.....	91
III.3.1. Etude des activités anti-oxydantes	91
III.3.1.1. Evaluation de l'activité antioxydante par trois tests DPPH, ABTS et FRAP.....	91
III.3.1.1.a. Principe du test DPPH.....	91
III.3.1.1.b. Principe du test ABTS.....	92
III.3.1.1.c. Principe du test FRAP.....	93
III.3.1.2. Méthodes utilisées	93
III.3.1.2.a. Test DPPH.....	93
III.3.1.2.b. Test ABTS	94
III.3.1.2.c. Test FRAP.....	94
III.3.2. Etude de l'activité antimicrobienne et antifongique.....	95
III.3.2.1. Définitions.....	95
III.3.2.1.a. Les bactéries.....	95
III.3.2.1.b. Microorganismes testés.....	96
III.3.2.1.c. Diffusion sur gélose « aromatoigramme ».....	96
III.3.3. Activité anti-inflammatoire et antioxydante.....	97
III.3.3.1. Etude de l'activité anti-inflammatoire	98
III.3.3.1.a. Cultures cellulaires.....	98

III.3.3.1.b. méthode du test anti-inflammatoire	98
III.3.3.1.c. Mesure de libération de NO	99
III.3.3.2. Etude de l'activité antioxydante de quelques produits isolés	99
III.3.3.2.a. Mesure de ROS intracellulaires.....	99
Références.....	101

Chapitre IV : Résultats et discussions

IV.1. Screening chimique	103
IV.2. Caractérisation chimique et élucidation structurale des produits de <i>C. Azel</i>	104
IV.2.1. Elucidation structurale du composé 150-21N.....	104
IV.2.2. Elucidation structurale du composé CAP-122.....	116
IV.2.3. Elucidation structurale du composé CAP/4/4.....	121
IV.2.4. Elucidation structurale du composé CAP/4/6.....	123
IV.2.5. Elucidation structurale du composé CAP/4/7.....	127
IV.2.6. Elucidation structurale du composé CAP/4/20.....	131
IV.2.7. Elucidation structurale du composé CAP/5/14 (Nouveau produit).....	138
IV.2.8. Elucidation structurale du composé CAP/5/6.....	143
IV.2.9. Elucidation structurale du composé CAP/5/3.....	149
IV.3. Caractérisation chimique et élucidation structurale des produits de <i>C. comosum</i> ...	154
IV.3.1. Elucidation structurale du composé CCP/9/12.....	154
IV.3.2. Elucidation structurale du composé CCP/10/11.....	164
IV.3.3. Elucidation structurale du composé CCP/6/3.....	165
IV.3.4. Elucidation structurale du composé CCP/12/8.....	171
IV.3.5. Elucidation structurale du composé CCP/9/7.....	177
IV.3.6. Elucidation structurale du composé CCP/4/14.....	181
IV.3.7. Elucidation structurale du composé CCP/11/12.....	188
IV.4. Activité biologique.....	192
IV.4.1. Activité antioxydante.....	192
IV.4.1.1. Test DPPH	192
• <i>Calligonum azel</i>	192
• <i>Calligonum comosum</i>	193
IV.4.1.2. Test ABTS.....	195

• <i>Calligonum azel</i>	195
• <i>Calligonum comosum</i>	196
IV.4.1.3. Test FRAP.....	198
• <i>Calligonum azel</i>	198
• <i>Calligonum comosum</i>	199
IV.4.2. Activité antibactérienne.....	201
• <i>Calligonum azel</i>	201
• <i>Calligonum comosum</i>	204
IV.4.3. Activité antifongique.....	206
IV.4.4. Activité anti-inflammatoire.....	208
IV.4.5. Activité antioxydante de quelques produits isolés.....	209
IV.5. Conclusion.....	210
• <i>Calligonum azel</i>	210
• <i>Calligonum comosum</i>	212
Référence.....	214

Chapitre V : Composition chimique et activité biologique de l'huile essentielle de *Thymus ciliatus*

V.1. Introduction.....	216
V.2. Origine des huiles essentielles.....	216
V.3. Composition chimique.....	217
V.4. Méthodes d'extraction des huiles essentielles	217
V.5. Aspect botanique de la famille des Lamiacées.....	218
V.5.1. Description de la famille des Lamiacées	218
V.5.2. Description botanique de la famille.....	218
V.6. Aspect botanique du genre <i>Thymus</i>	219
V.6.1. Description du genre	219
V.6.2. Description botanique du genre	219
V.6.3. Place dans la systématique.....	220
V.7. Répartition géographique	220
V.7.1 Dans le monde	220

V.7.2. En Algérie.....	220
V.8. Huile essentielle du thym	221
V.9. Travaux antérieurs.....	221
V.10. Activités biologiques	221
V.11. Composition chimique	221
V.12. Etude chimique de l'huile essentielle de <i>Thymus ciliatus</i>	222
V.12.1. Description botanique de l'espèce	222
V.12.2. Place dans la systématique	222
V.12.3. Matériel végétal.....	223
V.12.4. L'hydrodistillation des l'huiles essentielles	223
V.12.5. Méthode d'extraction.....	223
V.12.6. Identification et analyses chromatographiques des huiles essentielles.....	224
❖ Analyse GC	224
❖ Analyse GC/MS.....	224
V.12.7. Identification des composants.....	225
V.12.8. Analyse comparative de la composition d'huiles essentielles de <i>Thymus ciliatus</i>	225
V.12.9. Activité antibactérienne.....	228
V.12.9.1. Microorganismes testés.....	228
V.12.9.2. La méthode des disques.....	228
V.12.9.3. Résultats et discussions.....	228
Référence.....	230
Conclusion générale.....	237
Résumé	240
ملخص	241
Abstract	242

INTRODUCTION GENERALE

Les plantes sont depuis toujours une source essentielle de médicaments. Aujourd'hui encore une majorité de la population mondiale, plus particulièrement dans les pays en voie de développement, se soigne uniquement avec des remèdes traditionnels à base de plantes. De l'aspirine au Taxol, l'industrie pharmaceutique moderne elle-même s'appuie encore largement sur la diversité des métabolites secondaires végétaux pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologiques inédites. Cette source semble inépuisable puisque seule une petite partie des 400'000 espèces végétales connues ont été investiguées sur les plans phytochimique et pharmacologique, et que chaque espèce peut contenir jusqu'à plusieurs milliers de constituants différents [1].

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 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.

La majorité des populations ont recours à des plantes médicinales pour se soigner, par manque d'accès aux médicaments prescrits par la médecine moderne mais aussi parce que ces plantes ont souvent une réelle efficacité. Aujourd'hui, le savoir des praticiens est de moins en moins transmis et tend à disparaître. C'est pour cela que l'ethnobotanique et l'ethnopharmacologie s'emploient à recenser, partout dans le monde, des plantes réputées actives et dont il appartient à la recherche moderne de préciser les propriétés et valider les usages [2]. La recherche de nouvelles molécules doit être entreprise au sein de la biodiversité végétale en se servant de données ethnopharmacologiques. Cette approche permet de sélectionner des plantes potentiellement actives et d'augmenter significativement le nombre de découvertes de nouveaux actifs [3].

Dans ce but, l'investigation des plantes représente un potentiel inestimable pour la découverte de nouvelles substances ou de nouveaux "lead compounds", si l'on considère que chacune de ces plantes peut contenir des centaines, voire des milliers de métabolites secondaires [4].

Ces derniers ont démontré un large spectre d'activités biologiques. Parmi ces différents types de substances naturelles, les huiles essentielles des plantes aromatiques et médicinales ont reçu une attention particulière comme agents naturels à grand potentiel pour la conservation des aliments. En outre, les huiles essentielles se sont avérées avoir divers effets pharmacologiques: comme antispasmodique, carminative, hépatoprotecteur, antiviraux, anticancéreux [5-6] et antioxydants [7]. En outre, l'activité antibactérienne des huiles essentielles est en relation directe avec la composition et la concentration en composés volatils, le type de microorganismes cibles, les conditions et les méthodes de traitement [8].

L'Algérie, pays connu par ces ressources naturelles, dispose d'une flore singulièrement riche et variée. On compte environ 3000 espèces de plantes dont 15% endémique et appartenant à plusieurs familles botaniques [9].

La sélection des plantes étudiées est basée principalement sur leur endémisme il s'agit de *Calligonum comosum* et *Calligonum azel*, de la famille des Polygonacées; cette dernière n'a jamais fait l'objet d'une étude auparavant, et l'huile essentielle de l'espèce *Thymus ciliatus* de la famille des Lamiacées

Le but de cette étude consiste à renforcer la connaissance phytochimique de ces extraits de plantes et qui vise à démontrer la richesse de nos deux espèces *Calligonum azel* et *Calligonum comosum*, en métabolites secondaires et à déterminer leurs propriétés biologiques, et vise à démontrer la composition chimique et l'activité biologique de l'huiles essentielles issus des parties aériennes de *Thymus ciliatus*. Pour cela, notre étude englobe un aspect d'ordre phytochimique basé principalement sur l'extraction et la quantification des composés phénoliques et l'hydrodistillation de l'huile essentielle. Il porte également sur le diagnostic et la séparation des principaux métabolites par l'utilisation des différentes techniques chromatographiques.

Pour ce faire, nous avons structuré notre travail comme suit :

- Le premier volet abordera une synthèse bibliographique portant sur les métabolites secondaires notamment les composés phénoliques, les acides phénoliques, les flavonoïdes et les chalcones. Cette étude inclura la définition et la classification de ces derniers, leur biosynthèse ainsi que leur activité biologique.

- Le deuxième volet concerne l'étude bibliographique des espèces *Calligonum azel* et *Calligonum comosum*.
- Le troisième volet est consacré aux travaux phytochimiques personnels. Cette partie décrit l'isolement, la purification et la caractérisation structurale ainsi que les techniques chromatographiques et spectroscopiques utilisées à cet effet. Nous présentons également dans ce chapitre les techniques des différents tests biologique effectués.
- Le quatrième volet de ce travail présent l'identification des produits isolés ainsi que la discussion des résultats obtenus, il comprend également les résultats des tests biologiques sur les extraits et quelques produits isolés de ces espèces.
- Dans le dernier volet nous présentons l'analyse de l'huile essentielle de *Thymus ciliatus* ainsi que l'activité antibactérienne de cette dernière.

Référence

- [1] Hostettmann, K., potterat, O., wolfender, J., (1998). The potential of higher plants as a source of new drugs. *chimia* 52, 10-17.
- [2] Pelt, J., M., (2001). Les nouveaux actifs naturels. Ed., Marabout, Paris.
- [3] Stanic, G., Petricic, J., Todoric, A., Blazevic, N., (1988). Sterols in roots of *Mirabilis jalapa* L. *Acta pharmaceutica Jugoslavica*. 38 255-257.
- [4] Hostettmann, K., Marston, A., (2002). Twenty years of research into medicinal plants: results and perspectives. *Phytochemistry reviews* 1: 275-285
- [5] Gaussen, H., Leroy, H., F., (1982). Précis de botanique, végétaux supérieurs, 2^{ème} Ed. 426.
- [5] Bowles, E., J., (2004). The chemistry of aromatherapeutic oils. 3rd Ed. Crows Nest, NSW: Allen et Unwin Academic
- [6] Lahlou, M., (2004). Essential oils and fragrance compounds: bioactivity and mechanisms of action. *Flavour .Fragr. J* .19, 159–165
- [7] Viuda Martos, M., Mohamady, M., A., Fernández L., J., Abd ElRazik, K., A., Omer, E., A., Pérez Alvarez, J., A., Sendra, E., (2011). In vitro antioxidant and antibacterial activities of essentials oils obtained from Egyptian aromatic plants. *Food Control*. 22: 1715-1722.
- [8] Baydar, H., Sagdic, O., Ozkan, G., Karadogan, T., (2004). Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control*. 15, 169–172.
- [9] Gaussen, H., Leroy, H., F., (1982). Précis de botanique, végétaux supérieurs, 2^{ème} Ed. 426.

CHAPITRE I

Les Composés Phénoliques

I.1. Introduction

Les métabolites secondaires sont des molécules ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante. Ils y jouent différents rôles, dont celui de moyen de défense contre les agressions externes. Cependant, ils ne sont pas toujours nécessaires à la survie de la plante. Les produits du métabolisme secondaire sont en très grand nombre, plus de 200.000 structures définies [1], et sont d'une variété structurale extraordinaire. Ces molécules marquent de manière originale, une espèce, une famille ou un genre de plante et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique. Parmi eux : les composés phénoliques, les terpénoïdes et les alcaloïdes. Ces composés se trouvent dans toutes les parties des plantes mais ils sont distribués selon leurs rôles défensifs. Cette distribution varie d'une espèce à l'autre dont nous nous sommes intéressés au genre *Calligonum* de la famille des Polygonacées [2].

Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches basées sur les cultures *in vivo* et *in vitro* de tissus végétaux. Ceci est notamment le cas des polyphénols végétaux qui sont largement utilisés en thérapeutique comme vasculo-protecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et anti-radicalaires [3].

Nous connaissons actuellement plus de 250000 espèces végétales. Celles-ci produisent un large éventail de substances chimiques de structures variées. Parmi elles, on distingue classiquement les métabolites primaires et les métabolites secondaires [4].

Les métabolites primaires sont des produits issus directement des photo-assimilats (sucres simples, acides aminés, protéines, acides nucléiques et organiques), qui participent à la structure de la cellule végétale ainsi qu'à son fonctionnement de base [4]. Ils sont souvent produits en grande quantité mais présentent une valeur ajoutée relativement basse. Ces métabolites sont aussi définis comme des molécules qui se trouvent dans toutes les cellules végétales et, nécessaires à leur croissance et à leur développement [5].

Par opposition, les métabolites secondaires ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse mais sont synthétisés à partir des métabolites primaires et résultent de réactions chimiques ultérieures. Leurs rôles dans la physiologie de la plante ne sont pas encore tous élucidés. Ces composés sont limités à certaines espèces de végétaux et sont importants pour la survie et la valeur adaptative des espèces qui les synthétisent [6].

D'une façon générale, le rôle du métabolite secondaire est en lien avec sa localisation au sein de la plante [7]. Par exemple, les furanocoumarines sont des substances antimicrobiennes (phyto-alexines) jouant un rôle de défense contre les bactéries ou les champignons [8].

Beaucoup de métabolites se comportent comme des signaux chimiques que la plante utilise pour s'adapter aux changements défavorables de l'environnement [9]. D'autres ont pour rôle la défense de la plante contre les herbivores, les pathogènes, les parasites ou l'inhibition de la germination et la croissance des plantes concurrentes [10]. Certains assurent une protection contre les radiations solaires, lorsque d'autres favorisent la dispersion du pollen et des graines grâce à la couleur ou au parfum des fleurs.

I.2. Les composés phénoliques

I.2.1. Définition

Les polyphénols sont des métabolites secondaires synthétisés par les végétaux pour se défendre contre les agressions environnementales [11]. Il s'agit des dérivés non azotés connus par une grande variété structurale dont environ 8000 composés ont été identifiés [12]. Ils ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles qui peuvent être libres ou engagées [13].

La nature et la fonction des composés phénoliques s'accumulant dans les plantes sont variables. Ils présentent des propriétés antimicrobiennes; ce sont des phytoalexines. Ces composés de défense regroupent différentes classes de composés tels que les iso-flavonoïdes prénylés, les stilbènes, les coumarines, les flavonols ou encore les auronés. D'autres composés ont des fonctions dans la signalisation comme l'acide salicylique, molécule signal dans les mécanismes de résistance. La blessure et l'attaque par des herbivores induisent la synthèse de l'acide chlorogénique ou d'esters phénoliques liés aux parois cellulaires, ces composés pouvant agir directement en tant que molécules de défense ou servir de précurseurs à la synthèse de la lignine, de la subérine et autres barrières polyphénoliques. Par ailleurs, la quantité d'anthocyanines augmente fortement après un stress au froid ou un stress nutritionnel [14].

Les polyphénols sont caractérisés par la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction :

ether, ester, hétéroside [15]. Ils sont communément subdivisés en acides phénoliques (dérivés de l'acide benzoïque ou dérivés de l'acide cinnamique), coumarines, stilbènes, flavonoïdes, lignanes, lignines, tanins [16].

D'un point de vue appliqué, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve chez les plantes médicinales, alliées à leur difficulté de production. Chez l'homme, ces molécules traces jouent un rôle important en agissant directement sur la qualité nutritionnelle des fruits et légumes, les boissons (vin rouge, thé, café, jus de fruits), les céréales, les graines oléagineuses et les légumes secs et leur impact sur la santé des consommateurs (effet antioxydant, effet protecteur contre l'apparition de certains cancers...). Les fruits et les légumes contribuent environ pour moitié à notre apport en polyphénols, les boissons telles que jus de fruits et surtout café et thé [17].

I.2.2. Biosynthèse des polyphénols

Les composés phénoliques sont issus par deux grandes voies métaboliques : la voie de l'acide shikimique et la voie de l'acétate / malonate.

❖ Voie de l'acide shikimique

La voie de l'acide shikimique **figure [I.1.]** est la voie la plus importante pour la biosynthèse des composés aromatiques dans les plantes et les micro-organismes, y compris les acides aminés aromatiques : la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane. Ce sont des métabolites primaires qui servent de précurseurs pour de nombreux de produits naturels (secondaire) tels que les flavonoïdes, les acides phénoliques, les coumarines, les alcaloïdes [18]. Les deux substrats phosphoenolpyruvate et l'érythrose-4-phosphate sont des précurseurs qui dérivent respectivement de la glycolyse et de la voie des pentoses phosphate. Ils sont condensés pour former le 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate (DAHP). Cette réaction est catalysée par l'enzyme DAHP synthase (2-dehydro-deoxyarabinoheptulosonate-7-phosphate synthase). La série des réactions enzymatiques conduit respectivement à la formation de : l'acide 3-déhydroquinique par l'enzyme 3- déhydroquinase synthase ; l'acide 3-déhydroshikimique par l'enzyme 3-déhydroquinase déhydratase et finalement l'acide shikimique par l'enzyme shikimate déshydrogénase. L'acide shikimique est encore converti en shikimate 3-phosphate par l'enzyme shikimate kinase, et plus tard en 5-

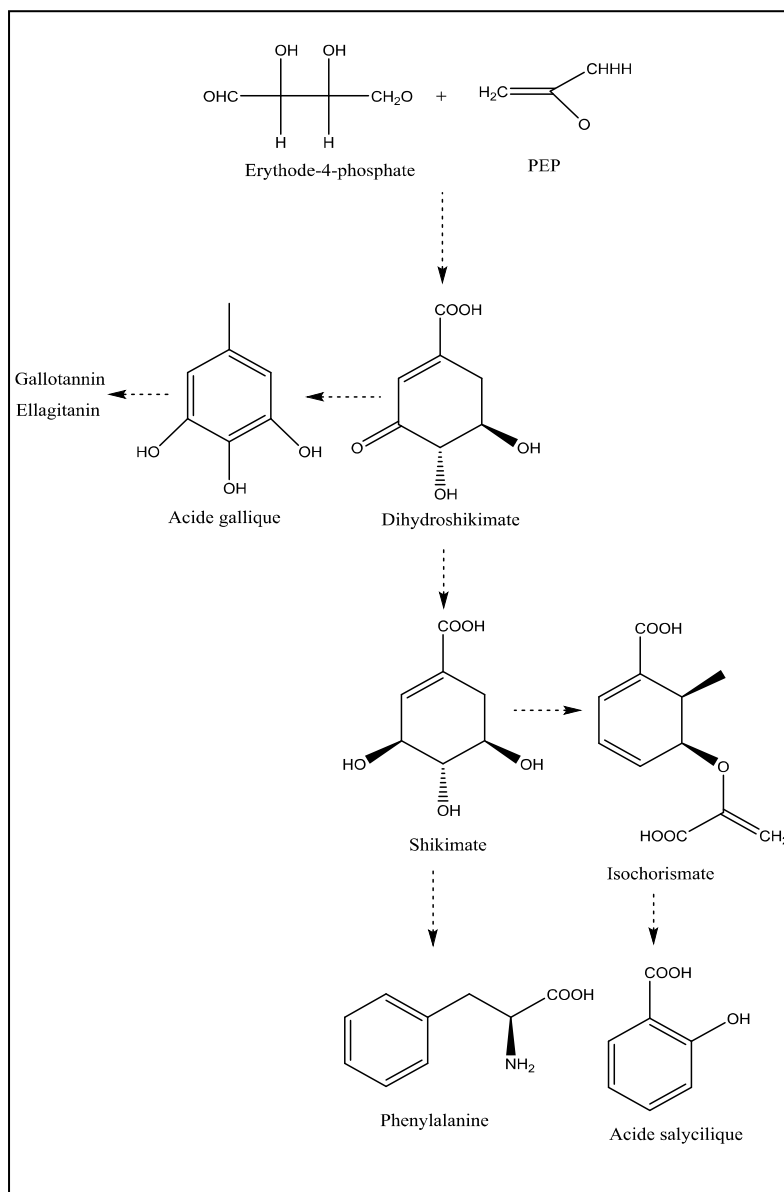
enolpyruvylshikimate 3-phosphate (EPSP) par l'enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase, EPSP est alors converti en acide chorismique par la chorismate synthase. L'acide chorismique est à un point de branchement pour la biosynthèse des acides aminés aromatiques: le tryptophane, la phénylalanine et la tyrosine. La phénylalanine et la tyrosine sont des précurseurs d'une importante classe des composés phénoliques ; les phénylpropanoïdes, aussi bien que plusieurs d'autres classes des composés phénoliques. Ceci exige la conversion de l'acide chorismique en acide préphénique, catalysée par la chorismate mutase et en acide arogénique catalysé par le préphénate aminotransférase. L'enzyme arogénate déshydrogénase convertit l'acide arogénique en phénylalanine, tandis que l'enzyme arogénate déshydrogénase génère la tyrosine **figure [I.1]** [19].

La désamination de la phénylalanine grâce à l'action de la Phénylalanine Ammoniac Lyase (PAL) conduit à l'acide t-cinnamique, le premier phénylpropane formé. La PAL est l'enzyme constituant le point de branchement entre le métabolisme primaire du shikimate et le métabolisme secondaire des phénylpropanoïdes. L'acide t-cinnamique est ensuite transformé en acide coumarique puis en 4-coumaroyl-coenzyme A, respectivement par l'action des enzymes cinnamate-4-hydroxylase (C₄H) et CoA-ligase (4CL). Cette étape conduit directement à la voie du phénylpropanoïde conduisant à la synthèse des différents composés phénoliques **figure [I.1]** [20]. Une grande diversité caractérise ces phénylpropanoïdes spécifiques du règne végétal. Le squelette carboné subit, de manière régio-spécifique, des réactions d'hydroxylation, de méthylation, de glycosylation, d'acylation, de prénylation ou encore de sulfatation. Ces réactions biochimiques sont catalysées par des enzymes spécialisées appartenant à des familles multigéniques telles que les mono-oxygénases, les méthyltransférases, les glucosyltransférases ou encore les acyltransférases.

Cette variabilité structurale reflète la multitude des activités et des fonctions biologiques de ces composés. Ceci implique une régulation fine des étapes enzymatiques intervenant dans cette voie métabolique, que ce soit au cours du développement de la plante ou en réponse à divers stimulus environnementaux. La régulation du métabolisme des phénylpropanoïdes et de la voie de l'acide shikimique est coordonnée, afin de mieux contrôler le flux de carbone injecté dans la voie des phénylpropanoïdes, par l'intermédiaire de la PAL [14].

❖ Voie de l'acétate / malonate

La glycolyse et la β -oxydation aboutissent à la formation de l'acétyl CoA donnant le malonate. C'est à travers cette voie que s'effectue la cyclisation des chaînes polycétoniques, obtenue par condensation répétée d'unités « Acétate » qui se fait par carboxylation de l'acétyl-CoA. Cette réaction est catalysée par l'enzyme acétyl-CoA carboxylase [21].



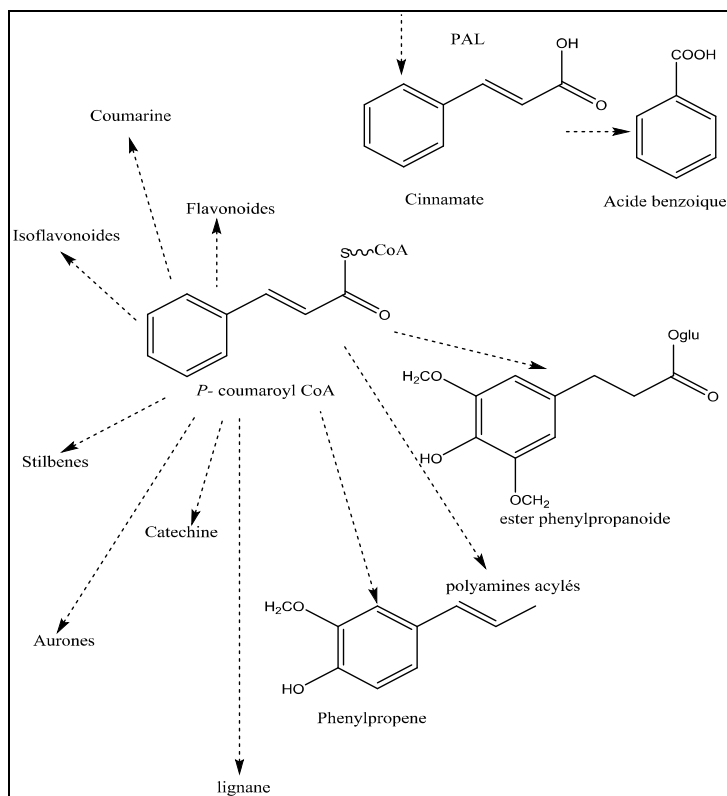


Figure I.1. Métabolisme des phénylpropanoïdes conduisant aux principaux groupes des Composés phénoliques.

I.2.3. Classification des polyphénols

Selon (Corona, 2011) Les polyphénols peuvent se regrouper en deux grands groupes : **Les non flavonoïdes** dont les principaux composés sont : les acides phénoliques [14] et **les flavonoïdes** [22].

I.2.3.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques font partie des formes les plus simples des composés phénoliques. Un acide-phénol (ou acide phénolique) est un composé organique possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique.

On distingue deux classes appartenant à cette sous-famille. Les dérivés d'acide benzoïque et les dérivés d'acide cinnamique [23].

❖ Les acides hydro-benzoïques

Les acides hydrox-benzoïques dérivent tous par hydroxylation de l'acide benzoïque, constitués d'un squelette à sept carbones (C6-C1) [23]. Ils sont particulièrement représentés chez les Gymnospermes et les Angiospermes d'où ils sont souvent libérés après hydrolyse alcaline du matériel végétal [24].

Ils existent fréquemment sous forme d'esters ou de glycosides, à l'exemple de l'acide salicylique dont le glycoside ou les esters méthyliques ou glycosylés représentent vraisemblablement des formes de stockage ou de circulation dans la plante **figure [I.2]** [13].

Les acides hydrox-benzoïques sont à la base de structures complexes comme les tanins hydrolysables présents dans les mangues, et les fruits rouges comme les fraises, les framboises ou encore les mûres [25].

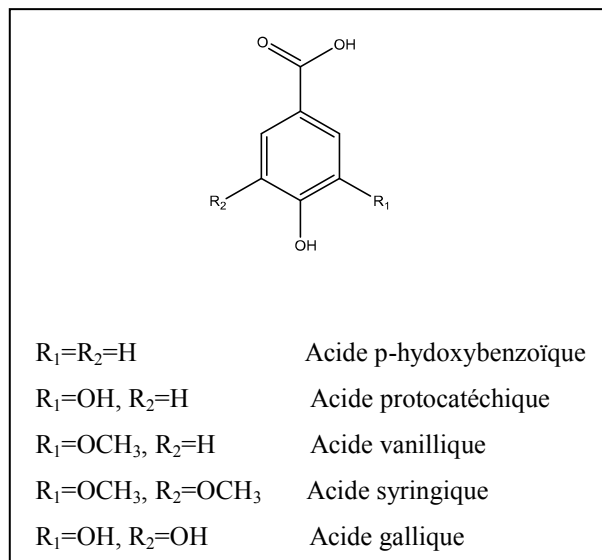


Figure I.2. Quelques exemples des acides hydroxybenzoïques.

❖ Les acides hydroxycinnamiques

Les acides hydroxycinnamiques représentent une classe très importante dont la structure de base C6-C3 dérive de celle de l'acide cinnamique, Le degré d'hydroxylation du cycle benzénique et son éventuelle modification par des réactions secondaires sont un des éléments importants de la réactivité chimique de ces molécules [24]. De plus, l'existence d'une double liaison dans la chaîne latérale conduit à deux séries isomères (*cis* ou *Z* et *trans* ou *E*) dont les propriétés biologiques peuvent être différentes [26]. Les formes *trans* sont cependant

naturellement prépondérantes et il est possible que les formes *cis* ne correspondent qu'à des artéfacts d'extraction [13].

Les molécules de base de la série hydroxycinnamique sont l'acide *p*-coumarique (et ses isomères *o*- et *m*-coumariques) et les acides caféique, férulique et sinapique **figure [I.3.]**. L'ensemble est souvent rapporté sous le vocable commun de «phénylpropanoïdes». Ces acides sont rarement présents à l'état libre et existent généralement sous forme d'esters ou de glycosides [24, 27]. Parmi les acides hydroxycinnamiques, l'acide caféique a une répartition quasi universelle chez les végétaux où il est souvent présent sous forme d'acide chlorogénique (ester 5-caféoylquinique), par exemple dans la pomme ou le café. On le retrouve également sous forme d'acide caféoyltartrique dans le raisin, d'acide caféoylshikimique dans la datte, d'acide caféoylmalique dans le radis, de caféoylglucose, de caféoylputrescine **figure [I.4.]** [27].

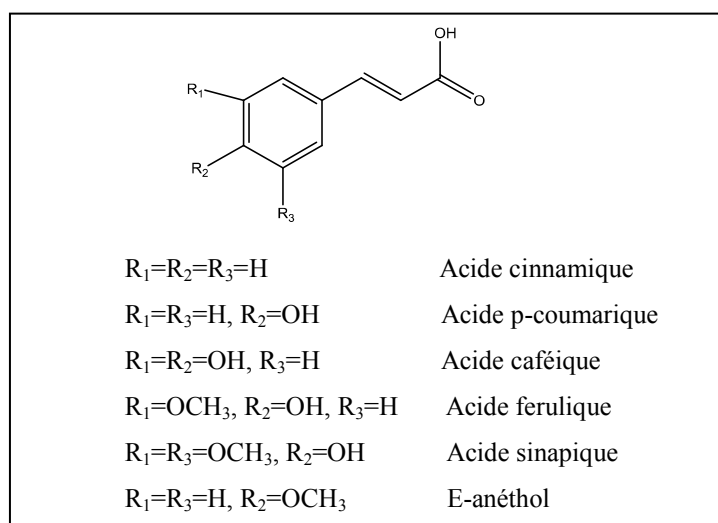


Figure I.3. Quelques exemples des acides hydroxycinnamiques

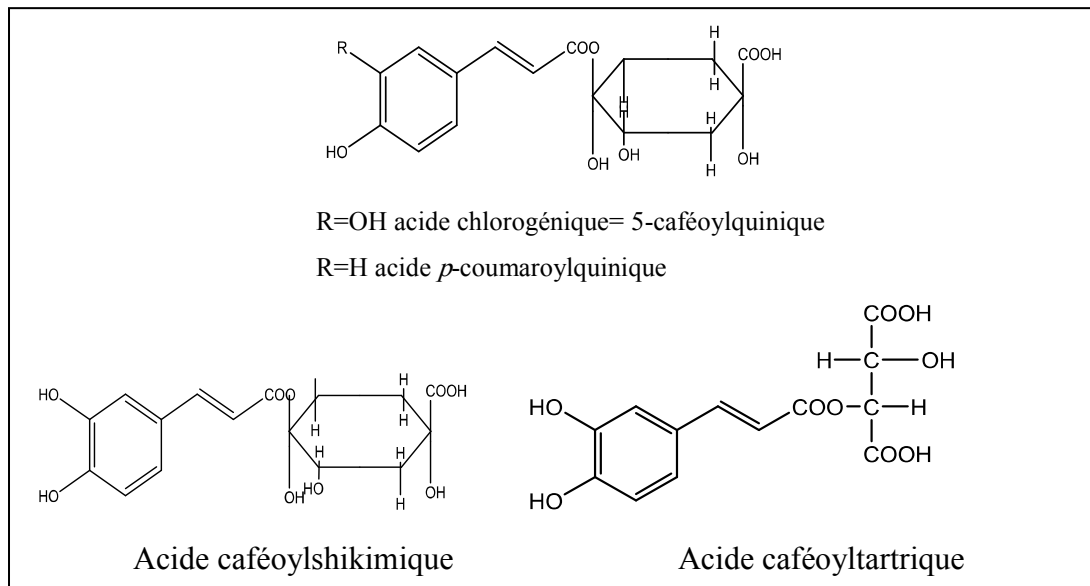


Figure I.4. Exemples des formes combinées des acides hydroxycinnamiques.

I.2.3.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux [34]. Tous les flavonoïdes possèdent la même structure de base (C6-C3-C6), ils contiennent quinze atomes de carbone dans leur structure de base: deux cycles aromatiques A et B à six atomes de carbone **figure [I.5.]** liés avec une unité de trois atomes de carbone qui peut ou non être une partie d'un troisième cycle C [35] comme le montre la figure suivante :

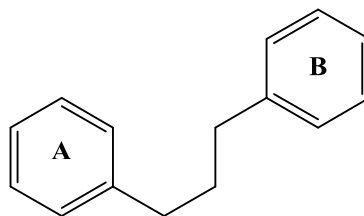


Figure I.5. Squelette de base des flavonoïdes

Ce sont des piègeurs efficaces des radicaux libres les plus prooxydants particulièrement impliqués dans la prooxydation lipidique [36].

De plus ils ont une activité chélatrice des métaux tels que le cuivre et le fer, qui à l'état libre peuvent être à l'origine de la production des radicaux libres par la réaction de fenton et d'Haber –Weiss [26].

La variation du degré d'oxydation de la chaîne carbonée C3 (formant, en général un hétérocycle C, par condensation avec un OH phénolique du noyau (A) détermine les propriétés et la classification utile en sous-groupes ou famille dont les membres peuvent porter des substituants différents au niveau du noyau B [37]. Le noyau B est relié à l'hétérocycle C dans les positions 2, 3 ou 4 comme le montre la **figure [I.6.]**:

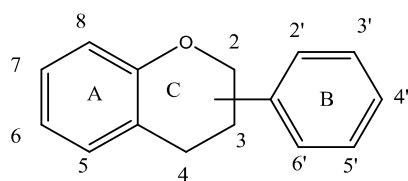


Figure I.6. Structure chimique des flavonoïdes

I.2.3.2.a. La biosynthèse des flavonoïdes

L'étape clé de la formation des flavonoïdes est la condensation de trois molécules de malonyl-CoA avec un ester du coenzyme A et d'un acide hydroxycinnamique, en règle générale le 4 coumaroyl-CoA, pour obtenir la 4, 2, 4', 6'-tetrahydroxychalcone (réaction catalysée par la chalcone synthase). Dans les conditions physiologiques normales, cette chalcone tend à s'isomériser en flavanone sous l'action de la chalcone isomérase qui induit une fermeture stéréospécifique du cycle conduisant à la seule (2S)-flavanone. Cette chalcone peut également se cycliser en aurone. Il est le précurseur de toutes les classes de flavonoïdes comme le montre la **figure [I.7.]** [15].

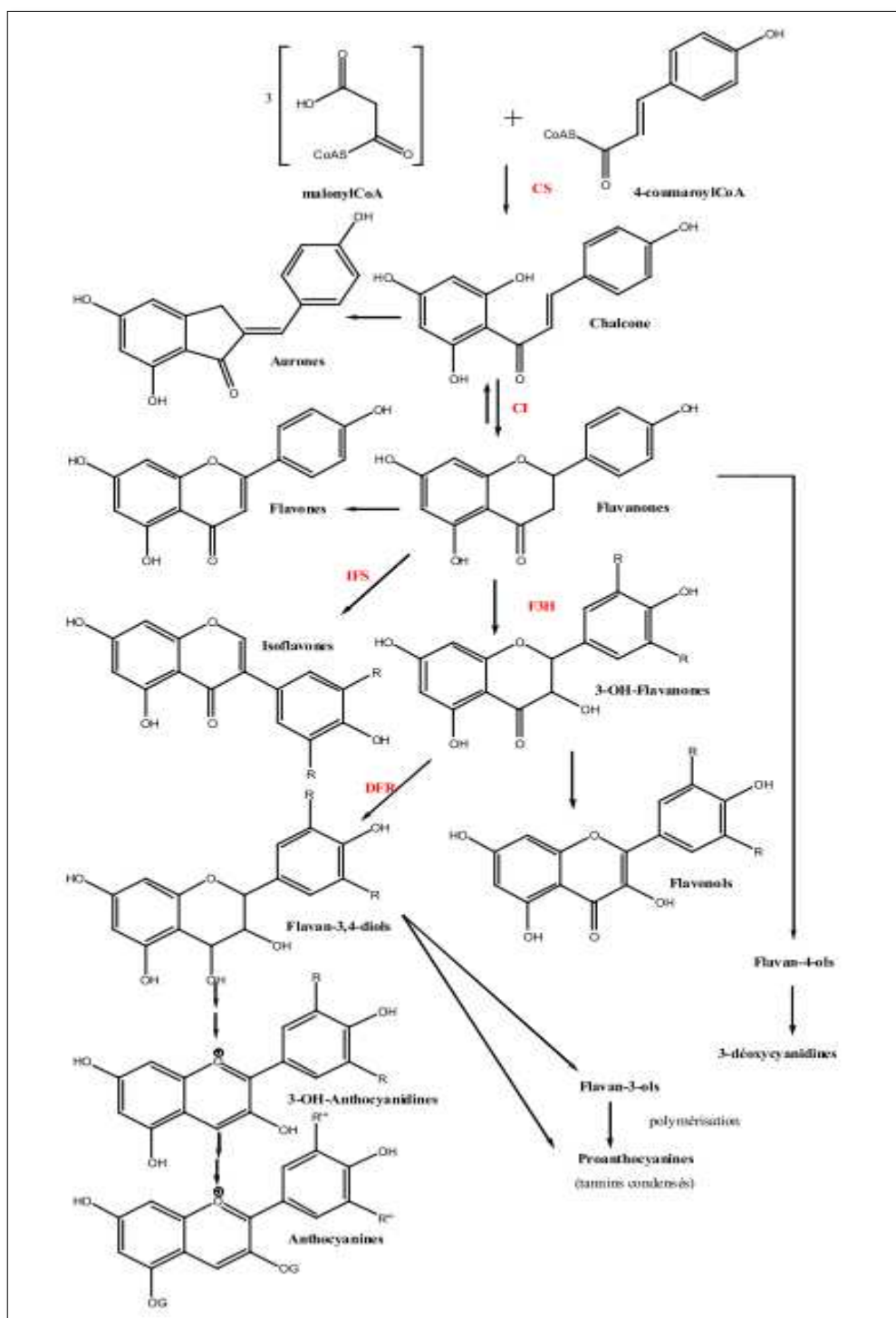


Figure I.7. La biosynthèse des flavonoïdes.

CS : Chalcone Synthase ; CI : Chalcone Isomérase ; F3H : Flavanone 3-hydroxylase ; IFS : Isoflavone Synthase ; DRF : Dihydroflavonol Reductase ; FS : Flavonol Synthase ; AS : Anthocyanin Synthase. R=-H, -OH ou -OCH₃ et OG= -O-sucre [38].

D'après Vederas et *al.* 2000 [39], la biosynthèse des chalcones C-méthylés s'expliquerait par la présence d'une méthylchalcone synthase qui catalyserait la réaction de condensation entre un méthylmalonyl CoA et le 4-coumaroyl-CoA pour donner la chalcone méthylée correspondante qui par suite des réactions présentées dans la **figure [I.7.]**, conduirait aux autres flavonoïdes C-méthylés. L'existence d'une telle enzyme constitue un des thèmes de recherche de Schröder et al. [40].

I.2.3.2.b. Classification des flavonoïdes

Les flavonoïdes existent sous différentes classes et ceci en fonction du degré d'oxydation du noyau pyranique central, lequel peut-être ouvert et recyclisé en un motif furanique (dihydrofuranone). Ils se répartissent en plusieurs familles de composés comme le montre la **figure [I.8.]** [15]:

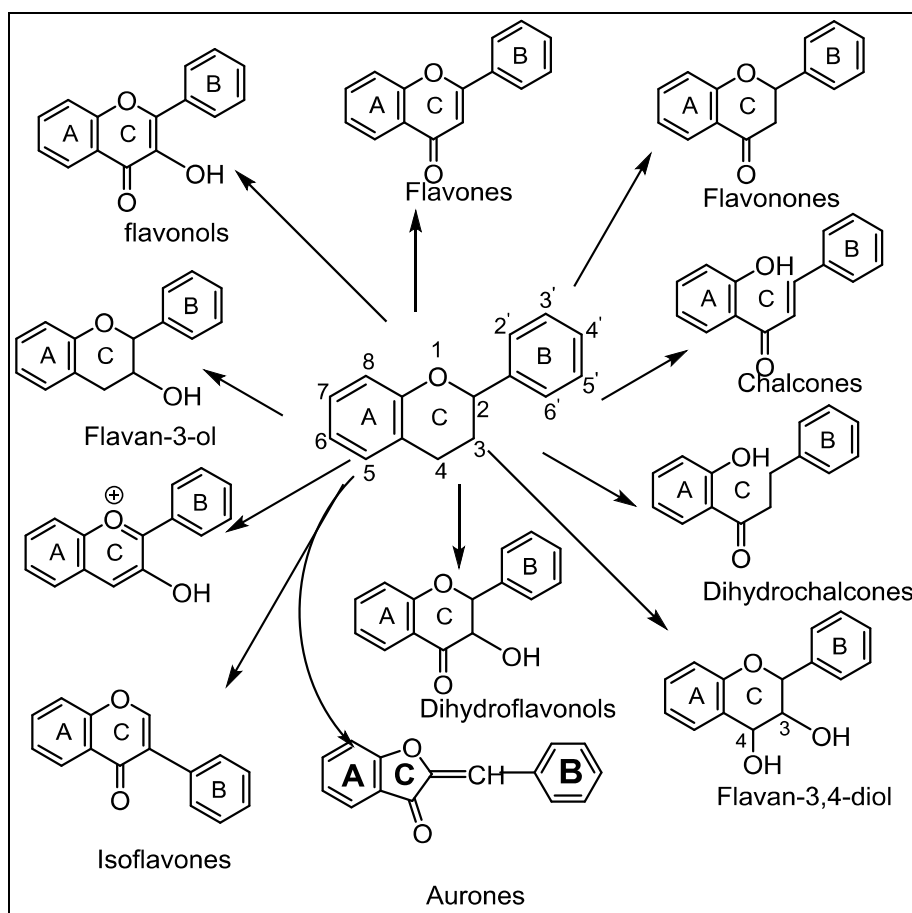


Figure I.8. Les différentes familles des flavonoïdes

D'une façon générale, les flavonoïdes peuvent être hydroxylés en position 3, 5, 7, 3', 4', 5' et / ou 6' (suivant la numérotation présentée pour les flavones, **figure [1.8.]**). Un ou plusieurs de ces groupes hydroxyles sont fréquemment méthylés, acétylés, prénylés ou sulfatés. Dans les plantes, les flavonoïdes peuvent être présents sous forme C- ou O-glycosylés. Les formes libres, sans sucres attachés sont appelés les génines ou aglycones [15].

Les « flavonoïdes minoritaires » sont représentés par les chalcones, les dihydrochalcones, les aurones, les flavanones, les dihydroflavonols et les anthocyanidols (structures encadrées dans la **figure [1.8.]** [41].

❖ Flavonoles

Les flavonoles sont caractérisés par la présence d'une double liaison en position 2-3 et d'un groupement hydroxyle en C3 **figure [1.9.]**. Elles sont les flavonoïdes les plus répandus dans le règne végétal, leur couleur varie du blanc au jaune, elles sont essentiellement représentées par la quercétine, le kaempférol et la myricétine. Les flavonols qui s'accumulent dans les tissus végétaux sont presque toujours sous la forme conjugués glycosylés [42].

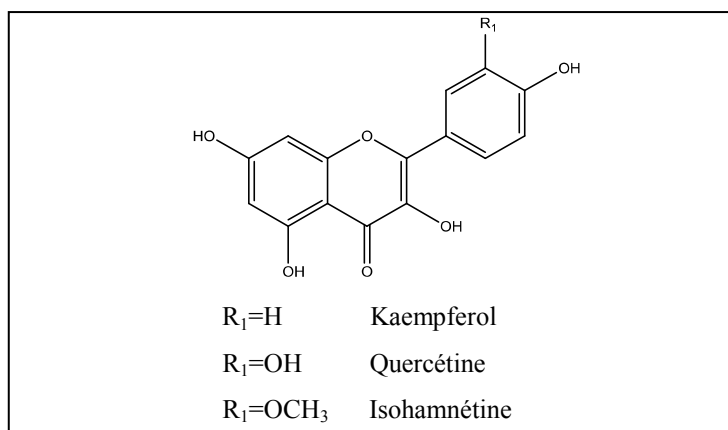


Figure I.9. Exemples des structures chimiques des flavonoles.

❖ Dihydroflavonoles

Ces molécules sont caractérisées par l'absence de la double liaison C2 -C3 et par la présence d'un centre chiral en position 2 **figure [1.10.]**. Les variations structurales sont de même nature que celles décrites pour les flavones et les flavonoles. Elles sont synthétisées à

partir des chalcones, Il semblerait que seuls les stéréo-isomères 2S sont biologiquement actifs. Cette classe des flavonoïdes semble un peu moins fréquente que son homologue insaturé rassemblant les flavones et flavonoles [43].

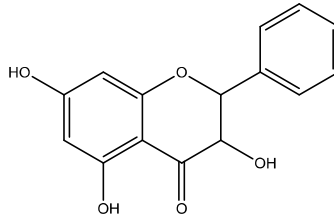


Figure I.10. Exemple de structure chimique des flavonoles (3, 5, 7-trihydroxyflavonol = dihydroflavonol)

❖ Flavan-3-oles ou flavanols

Ces molécules sont toujours hydroxylées en C3 et se caractérisent par l'absence du groupe carboxyle en C4 **figure [I.11.]**. Elles sont souvent à l'origine des polymères flavoniques appelés proanthocyanidols ou tannins condensés. Les flavan-3-ols sont très abondant dans les fruits comme les abricots, les cerises, les raisins,... etc [42]. Les flavanols sont largement répandus dans les fruits et légumes, mais la source la plus riche de flavanols au sein de l'alimentation humaine est certainement le thé. Ce dernier contient principalement de la (-)-épicatéchine, de la (-)-épigallocatechin-3-*O*-gallate et de la (-)-épigallocatechine [44].

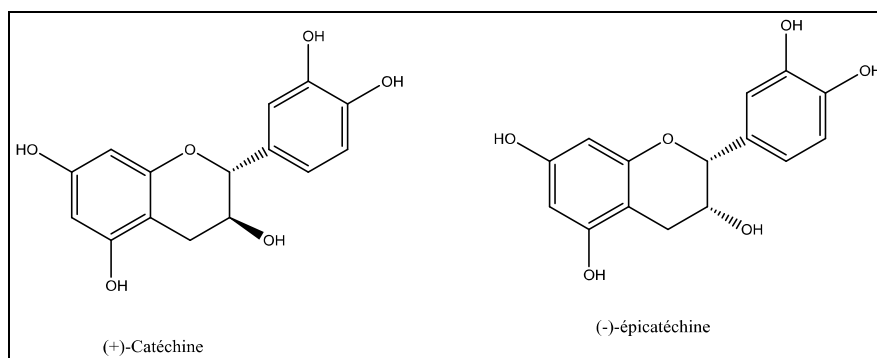


Figure I.11. Exemples des structures chimiques des flavane-3-ol.

❖ Les chalcones et les dihydrochalcones

Les chalcones et par défaut les dihydrochalcones sont uniques au sein de la famille des flavonoïdes. Dépourvus du cycle C central, les deux cycles A et B sont reliés par une chaîne tricarbonée cétonique α, β insaturée (saturée dans le cas des dihydrochalcones). Les cycles A et B sont équivalents aux cycles A et B des autres flavonoïdes mais leurs numérotations sont inversées **figure [I.12.]**.

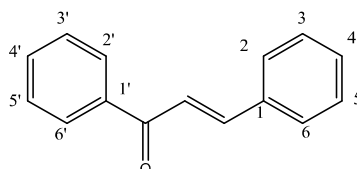


Figure I.12. Numérotation du squelette chalcone

La présence d'une double liaison conjuguée confère aux chalcones une couleur jaune. En conséquence, les dihydrochalcones sont généralement incolores. La configuration de la double liaison est généralement E dans les chalcones naturelles [41]. Ces composés sont rarement substitués sur le cycle B.

De manière équivalente aux autres flavonoïdes, les positions 2', 4' et 6' du cycle A peuvent être hydroxylées ou méthoxylées. Des dérivés glycosylés existent mais essentiellement O-glycosylés (une seule chalcone C-glycosylée : 3'-glucosylisolibiquiritigénine isolée de *Cladrastis platycarpa* (Fabaceae) [45]). Il existe de nombreux composés C-alkylés avec des substituants méthyles, prényles ou géranyles **figure [I.13.]** [41]. Les flavonoïdes C-alkylés sont présents au niveau de la cuticule foliaire et cela concerne surtout les plantes des régions arides ou semi-arides, souvent pourvues de structures sécrétrices comme les Piperaceae [15].

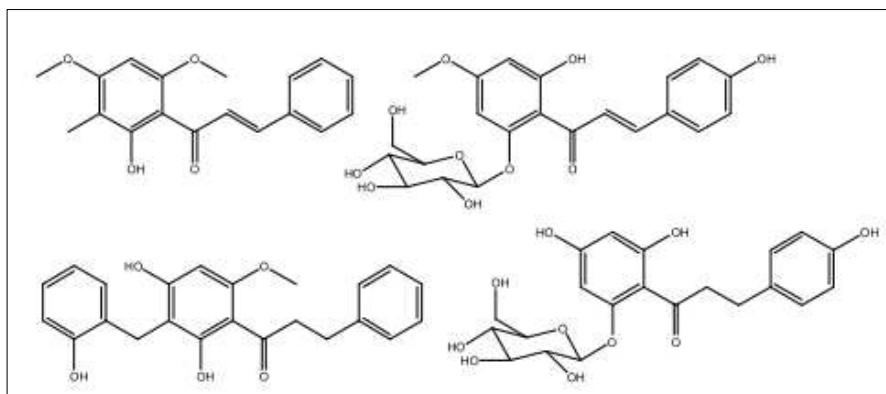


Figure I.13. Exemples des structures de chalcones et dihydrochalcones glycosylées ou alkylées.

I.2.3.2.c. Distribution des flavonoïdes dans les plantes

Les flavonoïdes sont largement rencontrés dans le règne végétal. Ils sont cependant rares chez les végétaux inférieurs. Par contre, on les trouve en abondance dans les familles suivantes : Polygonacées, Apiécées, Rutacées, Astéracées, Composées, Légumineuses.

De plus, leur localisation au sein de la plante est caractéristique. En effet, les flavonoïdes se répartissent volontiers dans les organes aériens jeunes (jeunes feuilles, boutons floraux) où ils sont localisés dans les tissus superficiels (assise palissadique). Ils se répartissent aussi volontiers dans les racines [14].

La distribution des différentes familles de flavonoïdes dans le règne végétal a été évaluée par plusieurs auteurs **tableau [I.1.]**.

<i>Flavonoïdes</i>	<i>Sources alimentaires</i>
Flavan-3-ols	
catéchine	Thé vert, thé noir, pomme
épicatéchine	Thé vert, thé noir
Flavonols	
quercétine	Oignon, pomme, olive, tomate
myricétine	Canneberge, vin rouge
kaempférol	Radis, brocoli, thé noir
Flavones	
chryisine	Peau des fruits
apigénine	Persil, thym, romarin, céleri
lutéoline	Persil, céleri
Flavonones	
naringénine	Fruits des genres citrus
Anthocyanidol	
cyanidol	Cassis, myrtille
apigénidol	Framboise, fraise
Isoflavones	
genisteine-7-glucoside	soja
daidzeine-7-glucoside	soja

Tableau I.1. Sources alimentaires de quelques flavonoïdes.

I.2.4. Polyphénols dans les plantes : Localisation et intérêt

A l'échelle de la cellule, les composés phénoliques sont principalement répartis dans deux compartiments : les vacuoles et la paroi. Dans les vacuoles, les polyphénols sont conjugués, avec des sucres ou des acides organiques, ce qui permet d'augmenter leur solubilité et de limiter leur toxicité pour la cellule. Au niveau de la paroi, on trouve surtout de la lignine et des flavonoïdes liés aux structures pariétales. Les composés phénoliques sont synthétisés dans le cytosol. Une partie des enzymes impliquées dans la biosynthèse des phénylpropanoïdes est liée aux membranes du réticulum endoplasmique, où elles sont organisées en métabolons [46].

Au niveau tissulaire, la localisation des polyphénols est liée à leur rôle dans la plante et peut être très caractéristique. Au sein même des feuilles la répartition des composés est variable, par exemple les anthocyanes et les flavonoïdes sont majoritairement présents dans l'épiderme. Au niveau de la plante entière, il faut noter que certains composés ne sont accumulés que dans des organes bien définis. Chez la pomme par exemple, les composés phénoliques interviennent au niveau de la coloration de la peau via les anthocyanes, et dans la qualité organoleptique de la chair, notamment pour l'amertume ou l'astringence [46].

Les composés phénoliques jouent un rôle important dans le métabolisme de la plante mais aussi peuvent réagir dans les interactions des plantes avec leur environnement biologique et physique (relations avec les bactéries, les champignons, les insectes, résistance aux UV). Toutes les catégories de composés phénoliques sont impliquées dans les mécanismes de résistance [47]. Ils assurent la communication entre cellules, entre végétaux, entre végétaux et animaux [48].

I.2.5. Intérêts thérapeutiques des polyphénols

La principale caractéristique des polyphénols c'est qu'ils sont des agents antioxydants très puissants. En effet, ils sont capables de piéger les radicaux libres et d'activer les autres antioxydants présents dans le corps. Cette même activité antioxydante permet aux polyphénols de réguler les radicaux libres bon-mauvais, comme l'oxyde nitrique qui favorise une bonne circulation sanguine, coordonne l'activité du système immunitaire avec celle du cerveau et module la communication entre les cellules de ce dernier [21]. L'activité antioxydante des polyphénols peut s'exercer sur les transporteurs des lipides du sang et tout particulièrement sur le « mauvais » transporteur du cholestérol (les LDL ou les lipoprotéines

de faible densité). Les polyphénols empêchent ainsi la formation des LDL oxydés, formation qui rend place lors d'états pathologiques variés caractérisés par un stress oxydatif [49]. Ils aident à combattre l'inflammation et réduisent la fragilité des capillaires, ils réduisent les effets du diabète et protègent la peau contre les rayons ultraviolets en diminuant les dommages causés par les rayons solaires [50]. De nombreuses études épidémiologiques montrent qu'une alimentation riche en polyphénols diminue le risque des maladies chroniques [51], dont les plus importantes sont citées ci-dessous.

I.2.5.1. Polyphénols et cancer

Parmi les propriétés biologiques intéressantes des polyphénols, la prévention du cancer. En effet, un certain nombre de recherches menées *in vitro* et *in vivo* ont montré que les polyphénols pourraient être utilisés comme des agents de prévention des différentes maladies cancéreuses [52]. De nombreuses études ont montré que trois types de cancers (sein, prostate et digestif) peuvent être fortement influencés par l'alimentation notamment l'apport en lipides et en antioxydants et que l'huile d'argon pourrait grâce à sa teneur en polyphénols, contribuer à la prévention de certains cancers tels que le cancer de la prostate [53]. Des recherches plus récentes ont décrit les activités anti-cancérogènes de la curcumine, le resvératrol et l'épigallocatechine-3-gallate (EGCG) pour le traitement du cancer du col [54].

Les effets inhibiteurs du thé vert et noir dans le traitement du cancer ont largement été étudiés. Les polyphénols du thé de type flavan-3-ol sont des composés bioactifs puissants qui interfèrent avec l'initiation, le développement et la progression du cancer par des processus critiques [55-56]. Ils ont la capacité d'interrompre ou inverser le processus de cancérogenèse en agissant sur les molécules de réseau de signalisation intracellulaires impliquées dans l'initiation et / ou la promotion d'un cancer pour arrêter ou inverser la phase de progression du cancer. Les polyphénols peuvent également déclencher l'apoptose dans les cellules cancéreuses à travers la modulation d'un certain nombre d'éléments principaux en signal cellulaire [57].

I.2.7.2. Polyphénols et maladies cardiovasculaires

Diverses études épidémiologiques ont montrés qu'il existe une corrélation inverse entre la consommation d'aliments riches en polyphénols et le risque de développement des maladies cardiovasculaires [58, 59]. Au niveau des artères, ces molécules préviennent l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL) évitant ainsi l'athérosclérose (épaississement des artères qui contribue à réduire le flux sanguins et peut conduire à l'asphyxie des tissus irrigués). Les polyphénols inhibent aussi l'agrégation plaquettaire impliquée dans le phénomène de thrombose, qui induit l'occlusion des artères. Ainsi en prévenant l'athérosclérose et les risques de thrombose, ces composés limitent les risques d'infarctus du myocarde [21]. Selon des études épidémiologiques, un plus grand apport des flavonoïdes tirés des fruits et des légumes s'associe à une diminution du risque d'apparition de maladie cardiovasculaire. Les mécanismes expliquant cette observation ne sont pas clairs, mais d'après les données probantes, les flavonoïdes exerceraient leurs effets par la diminution des facteurs de risque cardiovasculaire. D'après de récentes données probantes, certains polyphénols sous forme purifiée, y compris le resvératrol, la berbérine et la naringénine, ont des effets bénéfiques sur la dyslipidémie chez les modèles humains ou animaux. Un traitement à la naringénine atténuait l'athérosclérose en corrigeant la dyslipidémie [60].

I.2.5.3. Polyphénols et inflammation

L'inflammation est la réponse principale de l'organisme à une agression est précisément régulée afin de limiter les atteintes possibles des structures de l'organisme. Cependant, une régulation inappropriée de ce phénomène peut conduire à un état inflammatoire chronique. La plupart des pathologies chroniques possèdent une composante inflammatoire. C'est le cas de l'obésité, du diabète de type II, des maladies cardiovasculaires et du cancer. Les différentes études menées sur les effets protecteurs des polyphénols dans ces contextes pathologiques ont montré que ceux-ci diminuaient les marqueurs de l'inflammation et agissaient sur de nombreuses cibles moléculaires au centre des voies de signalisation de l'inflammation. De nombreuses études ont pu montrer que les polyphénols et leurs métabolites agissaient également comme des modulateurs des voies de signalisation de l'inflammation. Les études menées chez l'homme sain ont montré que le suivi d'un régime riche en fruits et légumes était

inversement corrélé aux marqueurs de l'inflammation dans le plasma, et que la consommation d'anthocyanes était associée à la diminution du taux de cytokines circulantes [61].

Des recherches récentes ont démontré que les flavonoïdes, notamment les flavonols, peuvent prévenir de la douleur musculaire en accélérant la réparation des tissus au niveau moléculaire. De manière spécifique, ils inhibent l'enzyme NOS responsable de la synthèse de l'oxyde nitrique, qui est déclencheur chimique de l'inflammation. D'autres études, affirment l'action inhibitrice de ces flavonoïdes, plus particulièrement la lutéolin, l'apigénine, catéchine sur la cyclo-oxygénase enzyme synthétiques des molécules impliquées fortement dans le processus inflammatoire [62].

I.2.5.4. Polyphénols et maladies neurodégénératives

Les maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer représentent un problème croissant lié aux pathologies du vieillissement cérébral, principalement car il ya une augmentation de la prévalence de la maladie d'Alzheimer à la fois et la maladie de Parkinson avec l'âge. Ceux-ci et d'autres maladies neuro-dégénératives semblent être déclenchées par des événements multifactoriels dont la neuro-inflammation, une augmentation du stress oxydatif, de fer et / ou une déplétion des antioxydants endogènes. Par ailleurs, l'apport alimentaire régulière d'aliments riches en flavonoïdes et / ou de boissons a été associée à une réduction de 50% du risque de démence, une préservation des performances cognitives avec l'âge, un retard dans l'apparition de la maladie d'Alzheimer et une réduction du risque de développer la maladie de Parkinson. Les flavonoïdes peuvent agir pour protéger le cerveau dans un certain nombre de façons, y compris par la protection des neurones vulnérables, le renforcement de la fonction neuronale existantes ou en stimulant la régénération neuronale [63]. De nombreuses études d'intervention alimentaire menées chez l'homme ou chez l'animal avec des aliments ou boissons issus du raisin, du thé ou de baies comme les myrtilles ont montré une amélioration de la mémoire et de la cognition. Il semblerait cependant que les seules propriétés antioxydantes des flavonoïdes contenus dans ces aliments ne soient pas suffisantes pour expliquer leurs effets bénéfiques au niveau cérébral, d'autant que la concentration de composés retrouvés à ce niveau est relativement faible. Il a ainsi été suggéré que les polyphénols puissent agir en protégeant les neurones vulnérables, en stimulant le fonctionnement neuronal et le flux sanguin ainsi qu'en favorisant la neurogenèse [61].

Références

- [1] Hartmann, T., (2007). From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism, Review. *Phytochemistry*, 68, 2831–2846.
- [2] Bruno, M., Maggio, A., Paternostro, M., P., Rosselli, S., Arnold, N., A., Herz, W., (2001). Sesquiterpene lactones and other constituents from three cardueae from cyprus. *Biochemical systematic and ecology*, 29, 433-435.
- [3] Amas, G., (1997). Food and Agricultural Research Council, Réduit, Mauritius.
- [4] Hopkins, W., G., (2003). *Physiologie végétale*. Université des Sciences et Technologie de Lille. Edition de boeck. p 99 - 120
- [5] Raven, J., A., Kubler, J., I., Beardall, J., (2000). Put out the light, and then put out the light. *J Mar Biol Assoc UK* 80:1–25
- [6] Croteau, R., Kutcahn, T., M., Lewis, N., G., (2000) Natural products. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (Buchanan, B., Gruissem, W. and Jones, R., eds). Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists, pp. 1250–1318.
- [7] Pathak, M., A., Daniels, F., Fitzpatrick, T., B., (1962). The presently known distribution of furocoumarins (psoralens) in plants. *J: Invest. Dermatol.* 39:225-240.
- [8] Zobel, A., M., Brown, S., A., (1988). Determination of furanocoumarins on the leaf surface of *Ruta graveolens* with an improved extraction technique. *J. Nat. Prod.* 51:941-946.
- [9] Chadhary, S., K., Ceska, O., Warrington, P., J., Ashwood-Smith, M., J., (1985). Increased furocoumarin content of celery during storage. *J. Agr. Food. Chem.*, 33 (6):1153-1157.
- [10] Baskin, J., M., Ludlow, C., J., Harris, T., M., Wolf, F., T., (1967). Psoralen, an inhibitor in the seeds of *Psoralea subacaulis* (Leguminosae). *Phytochemistry* 6:1209-1213.
- [11] Buchanan, T., W., Lutz, K., Mirzazade, S., Specht, K., Shah, N., J., Zilles, K., Jancke, L., (2000). Recognition of emotional prosody and verbal components of spoken language: An fMRI study. *Cognitive Brain Research*, 9: 227-238.
- [12] WaksmundzkaHajnos, M., Sherma, J., (2011). High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical science. *Chromatographic Science Series*, 477-478.
- [13] Macheix, J., (2005). *Les composés phénoliques des végétaux*. PPUR presses polytechniques.

- [14] Hoffmann, L., (2003). Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes; analyse de l'interaction de la caféoyl-coenzyme A 3-O-méthyltransférase (CCoAOMT) avec son substrat et caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle acyltransférase, l'Hydroxycinnamoyl-CoA: shikimate / quinate hydroxycinnamoyl Transférase (HCT). Thèse de Doctorat : Université de Louis Pasteur-Strasbourg I.
- [15] Bruneton, J., (1999). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Edition Technique et documentation, p233.
- [16] Cheynier, V., (2005). Polyphenols in foods are more complex than often thought¹⁻³. Am. J. Clin. Nutr. 81 (suppl), 223S-229S.
- [17] Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T., C., (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. Pharmacology Review, 52: 673-839.
- [18] Ghasemzadeh, A., Ghasemzadeh, N., (2011). Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. Journal of Medicinal Plants Research 5 (31), 6697-6703.
- [19] Wilfred, V., Nicholson, R., L., (2008). Phenolic Compound Biochemistry. Springer Edition, p 82.
- [20] Attaur, R., (2003). Studies in natural products chemistry, volume 28, Bioactive natural products (Part I). Edition Elsevier Science B. V., p 652.
- [21] Akroum, S., (2010). Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels. Thèse de Doctorat : Université Mentouri de Constantine-Algérie.
- [22] Pincemail, J., Degrune, F., Voussure, S., Malherbe, C., Paquot, N., Defraigne, J., O., (2007). Effet d'une alimentation riche en fruits et légumes sur les taux plasmatiques en antioxydants et des marqueurs des dommages oxydatifs. Nutrition clinique et métabolisme 21, 66-75.
- [23] Sarni-Manchado, P., Cheynier, V., (2006). Les polyphénols en agroalimentaire, Lavoisier, Editions Tec & Doc, 03.
- [24] Jeun, J., M., Annie, F., Chrystian, J., L., (2005). les composés phénoliques des végétaux, 203-204.
- [25] Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Jimenez, L., (2004). Polyphenols, Food sources and bioavailability. American Journal of Clinical Nutrition, 79, 727-747.
- [26] Boubekri, C., (2014). Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques. Thèse de Doctorat:

- Université Mohamed Khider – Biskra.
- [27] Lu, Y., (1997). Yeap Foo L. Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace. *Food Chemistry*; 59 (2): p187-194
- [28] Cole, M., M., (1986). *The savannas: biogeography and geobotany*. Academic Press, London. 438 pages. ISBN 0-12-179520-9
- [29] Psotova, J., Lasovsky, J., (2003). Metal chelating properties, Electrochemical Behavior, Scavenging and cytoprotective Activities of six Natural phenolics, *Biomed. Paper*, 147(2),147-153.
- [30] Hale, A., L., (2003). Screening Potato, Genotypes for antioxidants Activity, identification of the responsible compounds, and Differentiating Russet Norkotah Strains Using Aflp and microsatellite Marker analysis. Office of Graduate Studies of Texas A and M University.
- [31] Didry, N., Pinkas, M., Torck, M., (1982). Sur la composition chimique et l'activité antibactérienne des feuilles de diverse espèce de *grindelia*, *Pl. Med. Phytother.* XVI: 7 –15.
- [32] Ravn, H., Andary, C., Kovacs, G., Molgaard, P., (1984). Caffeic acid esters as in vitro inhibitors of plant pathogenic bacteria and fungi, *Biochem. Syst. Ecol*, 17, 175-184.
- [33] Hayase, F., Kato, M., (1984). Antioxidant compounds of sweet potatoes, *J. Nutri. Sci, Vitaminol*, 30, 37 - 46.
- [34] Ghedira, K., (2005). Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytotherapie* 3(4), 162-169.
- [35] Tapas, A., R., Sakarkar, D., M., Kakde, R., B., (2008). Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 7 (3), 1089-1099.
- [36] Bouhadjra, K., (2011). Etude de l'effet des antioxydants naturels et de synthèse sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge. Thèse de magister: Université moloude mammeri, Tizi-Ouzou.
- [37] Guignard, J., (1974). *Abrégé de biochimie à l'usage des étudiants en pharmacie*. 165.
- [38] Shirley, B., W., (1996). Flavonoid biosynthesis: a new function for an old pathway. *Trends in Plant Science* 1(11), 377-382.
- [39] Vederas, J., C., Leeper, F., J., (2000). Biosynthesis: Aromatic Polyketides, Isoprenoids, Alkaloids. *Plant science* 1, 377-382.
- [40] Schröder, J., Raiber, S., Berger, T., Schmidt, A., Schmidt, J., Soares-Sello, A., M.,

- Bardshiri, E., Strack, D., Simpson, T., J., Veit, M., (1998). Plant polyketide synthases: a chalcone synthase-type enzyme which performs a condensation reaction with methylmalonyl-CoA in the biosynthesis of C-methylated chalcones. *Biochemistry* 37, 8417-8425.
- [41] Harborne, J., B., (1993). *The flavonoids: advances in research since 1986*. Chapman & Hall / CRC, London.
- [42] Fraga, C., G., (2009). *Plant phenolics and human health: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology*. John Wiley & Sons Edition, pp 5-13.
- [43] Fowler, Z., L., Koffas, M., A., G., (2009). Biosynthesis and biotechnological production of flavanones: current state and perspectives. *Appl. Microbio. & Biotech.* 83:799–808.
- [44] Del Rio, D., Stalmach, A., Calani, L., Crozier, A., (2010). Bioavailability of coffee chlorogenic acids and green tea flavan-3-ols. *Nutrients* 2, 820-833.
- [45] Ohashi, H., Immamura, H., (1977). A C-glucosyl-chalcone from the wood of *Cladrastis platycarpa*. *Phytochemistry* 16, 1106-1107.
- [46] Bénard, C., (2009). *Etude de l'impact de la nutrition azotée et des conditions de culture sur le contenu en polyphénols chez la tomate*. Thèse de Doctorat: Université de Nancy.
- [47] Dicko, M., H., Gruppen, H., Traoré, A., S., Voragen, A., G., J., Van Berkel, W., J., H., (2006). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of sorghum for food use. *Biotechnology and Molecular Biology Review* 1 (1), 21-38.
- [48] Robert, D., Catesson, A., M., (2000). *Biologie végétale: caractéristiques et stratégie évolutives des plantes. Organisation végétative*. Wolters Kluwer France Edition, Volume2, p 320.
- [49] Descheemaeker, K., (2003). *Nutri-et Phytothérapie : Developpements Recents*. Edition Garant, page 12, 46.
- [50] Spiller, G., Spiller, M., (2007). *Tout savoir sur les fibres*. Editions le mieux-etre, p27.
- [51] Nève, J., (2002). Nutrition et stress oxydant: Modulation de l'apport alimentaire en anti-oxydants. Optimization of dietary intake of anti-oxidants. *Nutrition Clinique et métabolisme* 16, 292–300.
- [52] Stagos, D., Amoutzias, G., D., Matakos, A., Spyrou, A., Tsatsakis, A.M, Kouretas, D., (2012). Chemoprevention of liver cancer by plant polyphenols. *Food and Chemical Toxicology* 50, 2155–2170.

- [53] Bennani, H., Fiet, J., Adlouni, A., (2009). Impact de l'huile d'argan sur le cancer de la prostate : étude de l'effet antiprolifératif des polyphénols. *Revue Francophone des Laboratoires*, 416, 23-26.
- [54] Di Domenico, F., Foppoli, C., Coccia, R., Perluigi, M., (2012). Antioxidants in cervical cancer: Chemopreventive and chemotherapeutic effects of polyphenols. *Biochimica et Biophysica Acta* 1822, 737–747.
- [55] Lambert, J., D., Elias, R., J., (2010). The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: A role in cancer prevention. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 501, 65–72.
- [56] Yang, C., S., Li, G., Yang, Z., Guan, F., Chen, A., Ju, J., (2013). Cancer prevention by tocopherols and tea polyphenols. *Cancer Letters* 334, 79–85.
- [57] Link, A., Balaguer, F., Goel, A., (2010). Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: Promising role for epigenetics. *Biochemical Pharmacology* 80, 1771-1792.
- [58] Visioli, F., Borsani, L., Galli, C., (2000). Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of Phytochemicals. *Cardiovascular Research* 47, 419–425.
- [59] Arts, I., C., Hollman, P., C., (2005). Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 81(suppl), 317S–325S.
- [60] Mulvihill, E., E., Huff, M., W., (2010). Antiatherogenic properties of flavonoids: Implications for cardiovascular health. *Can. J. Cardiol.* 26 (Suppl A), 17A-21A
- [61] Lenoir, L., (2011). Effet protecteur des polyphénols de la verveine odorante dans un modèle d'inflammation colique chez le rat. Thèse de Doctorat: Université D'Auvergne.
- [62] Scalbert, A., Canach, C., Morand, C., Rémésy, C., (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45, 287-306.
- [63] Vauzour, D., Rodriguez-Mateos, A., Corona, G., Oruna-Concha, M., J., Spencer, J., P., E., (2010). Polyphenols and human health: Prevention of disease and mechanisms of action. *Nutrients* 2, 1106-1131.

CHAPITRE II

Synthèse bibliographique de

C.azel et C.comosum

II.1. Introduction

La phytochimie ou chimie des végétaux est la science qui étudie la structure, le métabolisme et la fonction ainsi que les méthodes d'analyse, de purification et d'extraction des substances naturelles issues des plantes. Elle est indissociable d'autres disciplines telles que la pharmacognosie traitant des matières premières et des substances à potentialité médicamenteuse d'origine biologique. Ces substances sont toutefois utiles aux plantes elles-mêmes et aux consommateurs de la chaîne alimentaire pour diverses raisons. De nos jours, nous comprenons de plus en plus, que les principes actifs des plantes médicinales sont souvent liés aux produits des métabolites secondaires. Leurs propriétés sont actuellement pour un bon nombre reconnue et répertorié, et donc mises à profit, dans le cadre des médecines traditionnelles et également dans la médecine allopathique moderne [1].

La valorisation des plantes aromatiques et médicinales algériennes est devenue indispensable. Le Sahara, le plus vaste et le plus chaud des déserts du monde, possède dans sa partie Nord, le Sahara septentrional, une végétation diffuse et clairsemée [2]. L'état de la flore spontanée dans cette zone ainsi que les relations entre l'homme et les espèces végétales, méritent une attention particulière.

Aujourd'hui, on estime que les principes actifs provenant des végétaux représentent environ 25% des médicaments prescrits, Soit un total de 120 composés d'origine naturelle provenant de 90 plantes différentes. Sur les milliers d'espèces de plantes à usage thérapeutique répertoriées en Algérie, très peu sont celles qui ont été valorisées sur le plan phytochimique [3].

II.2. Aspect botanique de la famille des Polygonacées

II.2.1. Description de la famille des polygonacées

Cette famille regroupe 43 genres et 1100 espèces dans le monde entier. Les principaux genres sont *Calligonum* (35 connues et 27 décrites), représenté par espèces, *Eriogonum* (240 espèces), *Rumex* (200 espèces), *Polygonum* (150 espèces), *Persicaria* (150 espèces) et *Coccoloba* (120 espèces) [4].

Les genres herbacés se retrouvent surtout dans les régions tempérées de l'hémisphère Nord alors que les ligneux ont plutôt une distribution tropicale [5].

II.2.2. Description botanique

Les Polygonacées peuvent être des plantes herbacées annuelles ou vivaces, arbustives ou grimpantes, elles sont sans latex [6]. Ce sont des plantes facilement reconnaissables par leurs gaines ou ochréas qui entourent la tige au-dessus des nœuds. Ce sont les stipules soudées entre elles qui forment l'ochréa et qui assurent la protection des bourgeons [7].

Les feuilles sont généralement alternes, isolées, simples et entières. On retrouve parfois des traces de plis persistant sur le limbe [5].

Les fleurs sont généralement hermaphrodites, mais il existe des fleurs unisexuées, actinomorphes, elles sont de couleur blanche à rouge [4].

Les filets sont libres ou légèrement soudés. Les grains de pollen sont tricolporés ou polyporés [4].

II.2.3. Utilisation économique

La famille des Polygonacées est anciennement connue pour ses propriétés médicinales et pharmacologiques et utilisée comme remède en médecine traditionnelle [8]. Au sein de cette famille, certaines espèces sont cultivées pour l'alimentation : *Fagopyrum esculentum* (sarrasin) pour ses graines, *Coccoloba uvifera* (raisinier) pour ses fruits et *Rheum hybridum* (rhubarbe) pour ses pétioles. Quelques genres sont cultivés pour l'ornement, tels que *Antigonon* et *Polygonum*. *Fallopia japonica* (renouée du Japon) et ses hybrides sont des exotiques envahissantes agressives et transformatrices en Europe occidentale [9]. Pour toutes ces raisons, nous nous sommes intéressées au genre *Calligonum*.

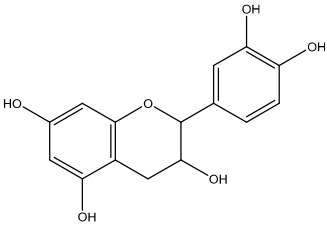
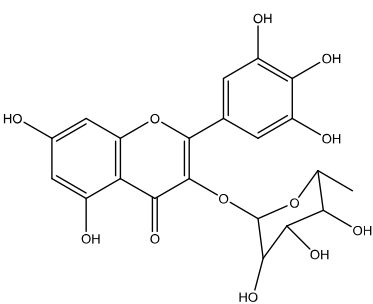
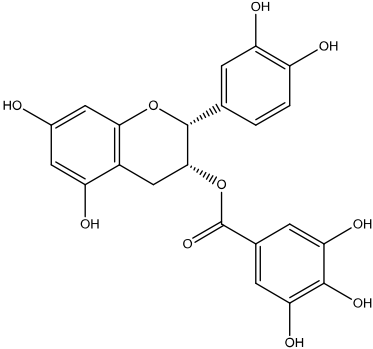
II.2.4. Les travaux antérieurs de la famille des polygonacées

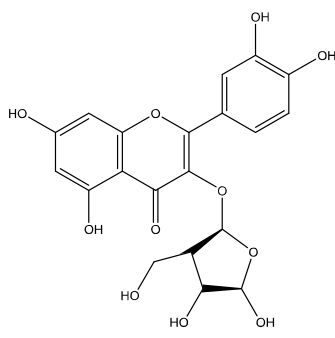
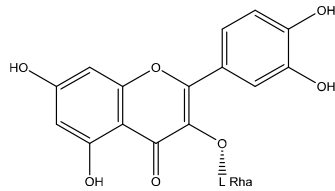
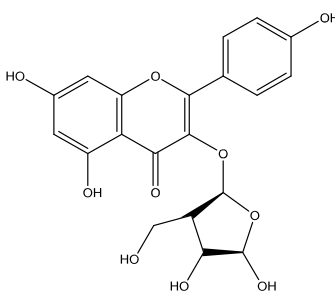
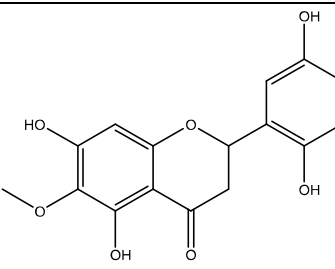
Du point de vue chimique, cette famille a fait l'objet d'intenses investigations dans le but d'isoler différents types de composés. Parmi les genres qui sont en cause, on cite : *Fagopyrum dibotrys*, *Fagopyrum esculentum*, *Fagopyrum tataricum*, *Rumex vesicarius*. Ces études ont permis d'isoler un grand nombre de métabolites secondaires tels que les acides phénoliques et les flavonoïdes.

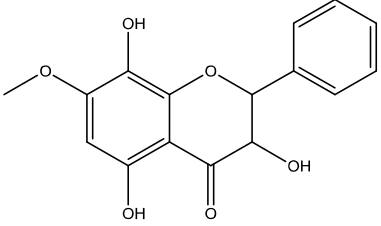
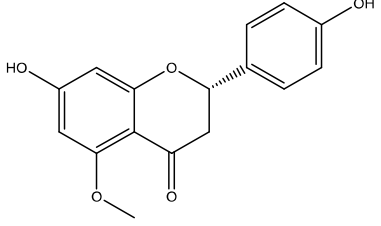
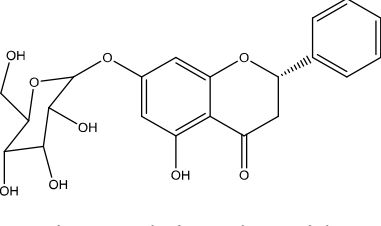
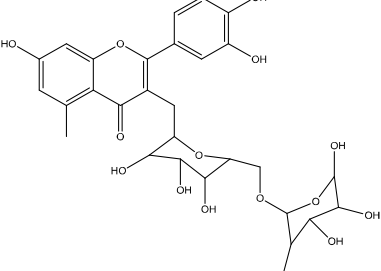
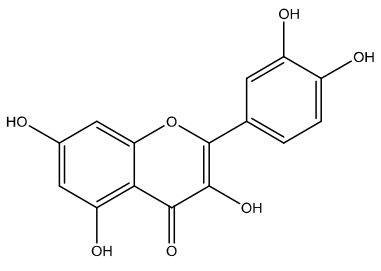
II.2.4.1. Les flavonoïdes

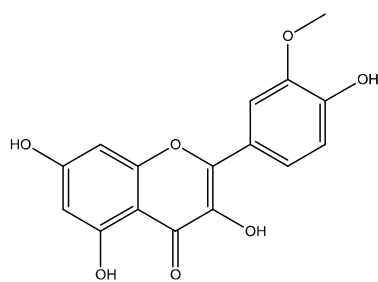
Les flavonoïdes sont des composés phénoliques très connus dans ce genre et jouent un rôle important dans le système de défense comme antioxydants.

Les différents flavonoïdes qui sont isolés de plusieurs espèces de la famille des Polygonacées sont rassemblés dans le **Tableau [II.1.]** :

Espèces	Structure et dénomination	Référence
<i>Polygonum aviculare</i>	 <p>Catéchine</p>	[10]
	 <p>Myricitrine</p>	[10]
	 <p>epicatechine-3-<i>O</i>-gallate</p>	[10]

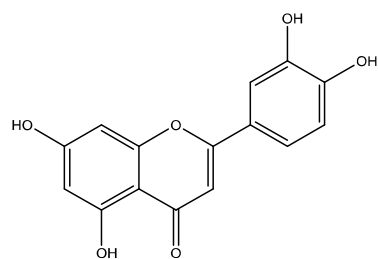
	 <p style="text-align: center;">Avicularine</p>	[10]
	 <p style="text-align: center;">Quercitrine</p>	[10]
	 <p style="text-align: center;">Juglanine</p>	[10]
<i>Polygonum barbatum</i>	 <p style="text-align: center;">5, 7, 2', 5'-tetrahydroxy-6- méthoxyflavanone</p>	[11]

	 <p>7-Methoxy-3, 5, 8-trihydroxyflavanone</p>	[11]
<i>Echiochilon fruticosum</i>	 <p>Naringenin -5-methyl ether</p>	[12]
	 <p>Pinocembrine glycoside</p>	[12]
<i>Fagopyrum dibotrys</i>	 <p>Rutine</p>	[13]
	 <p>Quercetine</p>	[13]



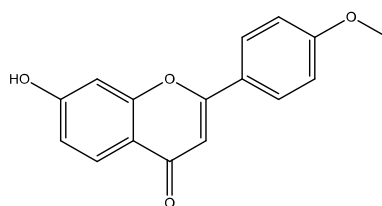
Isorhamnetine

[14]



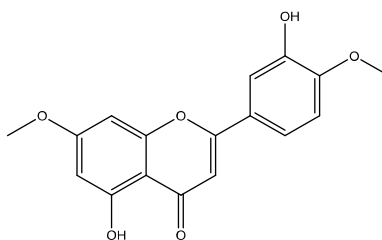
Luteoline

[14]



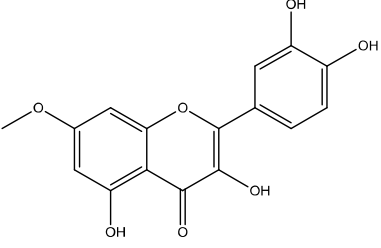
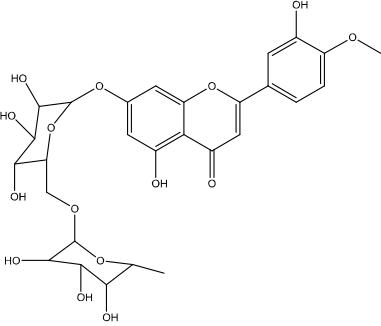
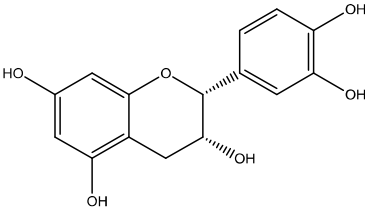
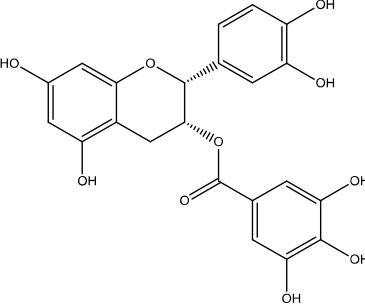
Pratol

[14]

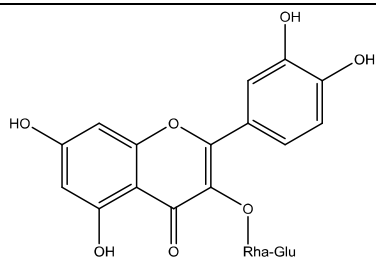


Luteoline-7, 4'-dimethyl ether

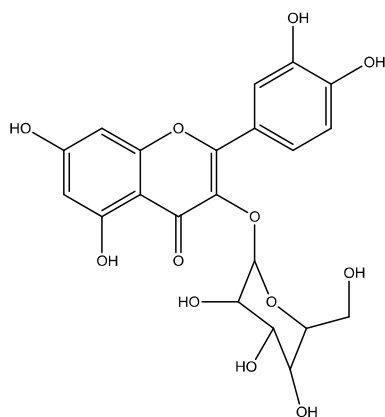
[14]

	 <p>Rhamnetine</p>	<p>[14]</p>
	 <p>Hesperidia</p>	<p>[14]</p>
	 <p>(-)- Epicatechine</p>	<p>[14]</p>
	 <p>Epicatechine-3-O-gallate</p>	<p>[14]</p>

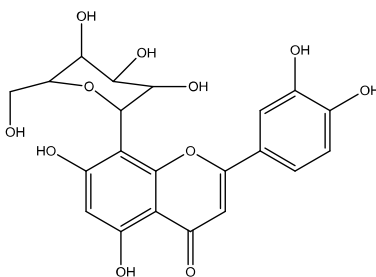
*Fagopyrum
esculentum*



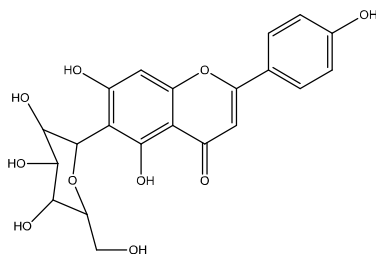
Quercetine-3-rhamnoglucoside



Hyperoside

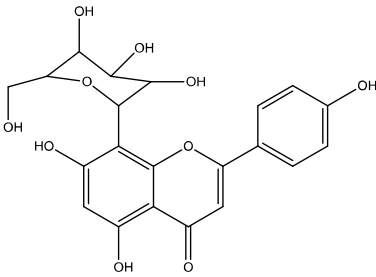
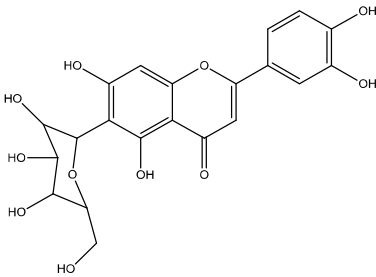
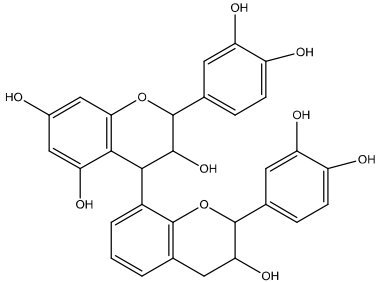
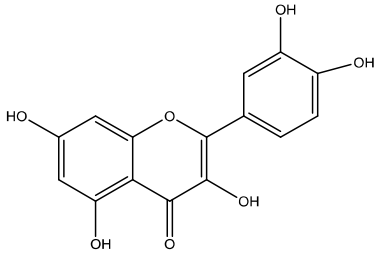


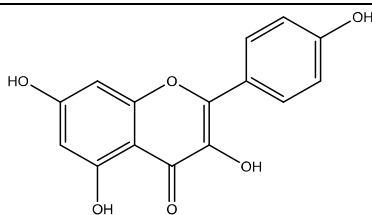
Orientine



Isovitexine

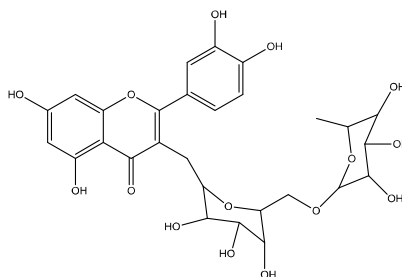
[15-16-17]

	 <p>Vitexine</p>	
	 <p>Isoorientine</p>	
<i>Fagopyrum cymosum</i>	 <p>5, 7, 3', 4'-tetrahydroxyflavan-3-ol = dimerique procyanidine</p>	[14]
<i>Fagopyrum tataricum</i> (L)	 <p>Quercetine</p>	[18]

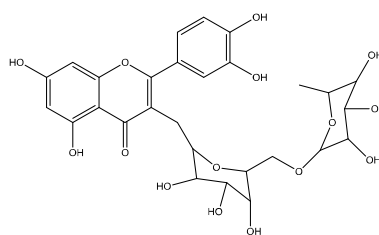


[18]

Kaempferol

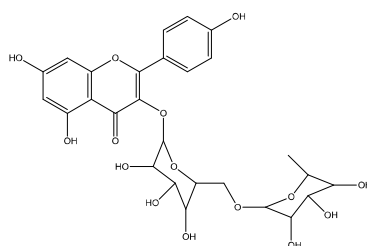


[18]

quercetine 3-O-rutinoside-3'-O- β -
glucopyranoside

[18]

Rutine



[18]

kaempferol 3-rutinoside

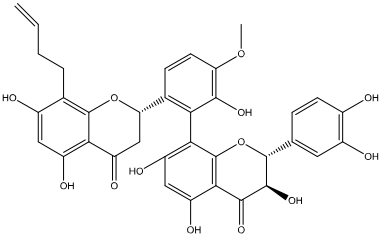
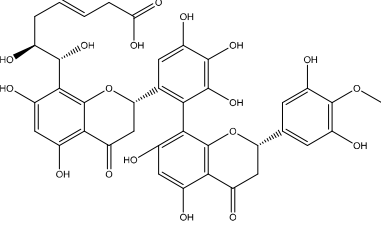
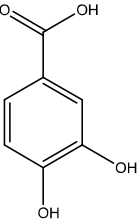
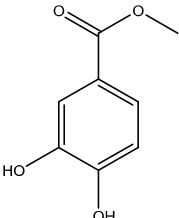
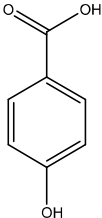
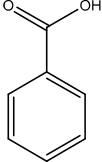
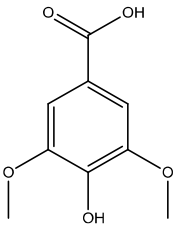
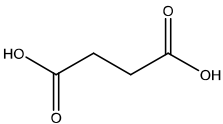
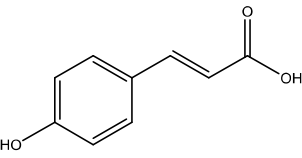
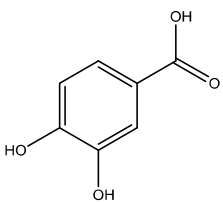
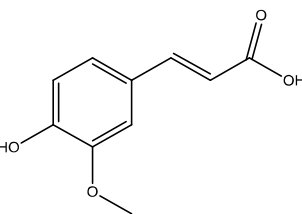
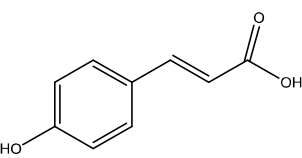
<p><i>Rumex vesicarius</i> L</p>	 <p>(2a,3a-trans)-3a(β),5a,7a,3'a,4'a-pentahydroxyflavanolyl-(8a → 2')-5,7,3'-trihydroxy-4'-methoxy-8-n-but-3''-enyl-flavanone</p>	<p>[19]</p>
	 <p>5,7,3',4',5'-pentahydroxy-8-(cis-1''α,2''β-dihydroxyhept-4''-enyl-7i''-oic acid)-flavanoyl-(2' → 8a)-5a,7a,3'a,5'a-tetrahydroxy-4ia-methoxyflavanone</p>	<p>[19]</p>

Tableau II.1. Les flavonoïdes isolés de la famille des Polygonacées.

II.2.4.2. Les acides phénoliques

Les phénols ont des fonctions biologiques importantes (défense biochimique contre les microbes et champignons chez les végétaux notamment) chez certaines espèces. Les principaux phénols pour les différentes espèces de la famille des polygonacées sont cités dans le **Tableau [II.2.]** :

Espèces	Structure et dénomination	Références
<i>Fagopyrum dibotrys</i>	 <p>Acide protocatechuique</p>	[14]
	 <p>Acide -methyl ester- Protocatechuique</p>	[14]
	 <p>Acide p- Hydroxy benzoïque</p>	[14]
	 <p>acide Benzoïque</p>	[14]

	 <p>Acide syringique</p>	[14]
	 <p>Acide succinique</p>	[14]
<i>Fagopyrum esculentum</i>	 <p>Acide -<i>p</i> coumarique</p>	[14]
	 <p>Acide protocatechuique</p>	[14]
	 <p>Acide ferulique</p>	[14]
	 <p>Este-<i>trans-p</i>-hydroxy cinnamique methyl</p>	[14]

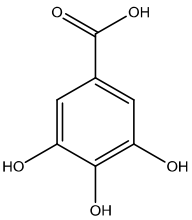
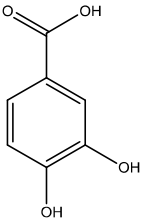
<i>Fagopyrum dibotrys</i>	 <p>Acide gallique</p>	[20]
	 <p>Acide-3, 4-dihydroxybenzoïque</p>	[20]

Tableau II.2. Les acides phénoliques isolés de la famille des Polygonacées

II.2.4.3. Les stéroïdes

Les stéroïdes sont des métabolites d'origine terpénique distribués entièrement dans le règne végétal et animal. Nous n'allons citer dans ce chapitre que quelques exemples de stérols qui sont isolés [14] **Figure [II.1.]**.

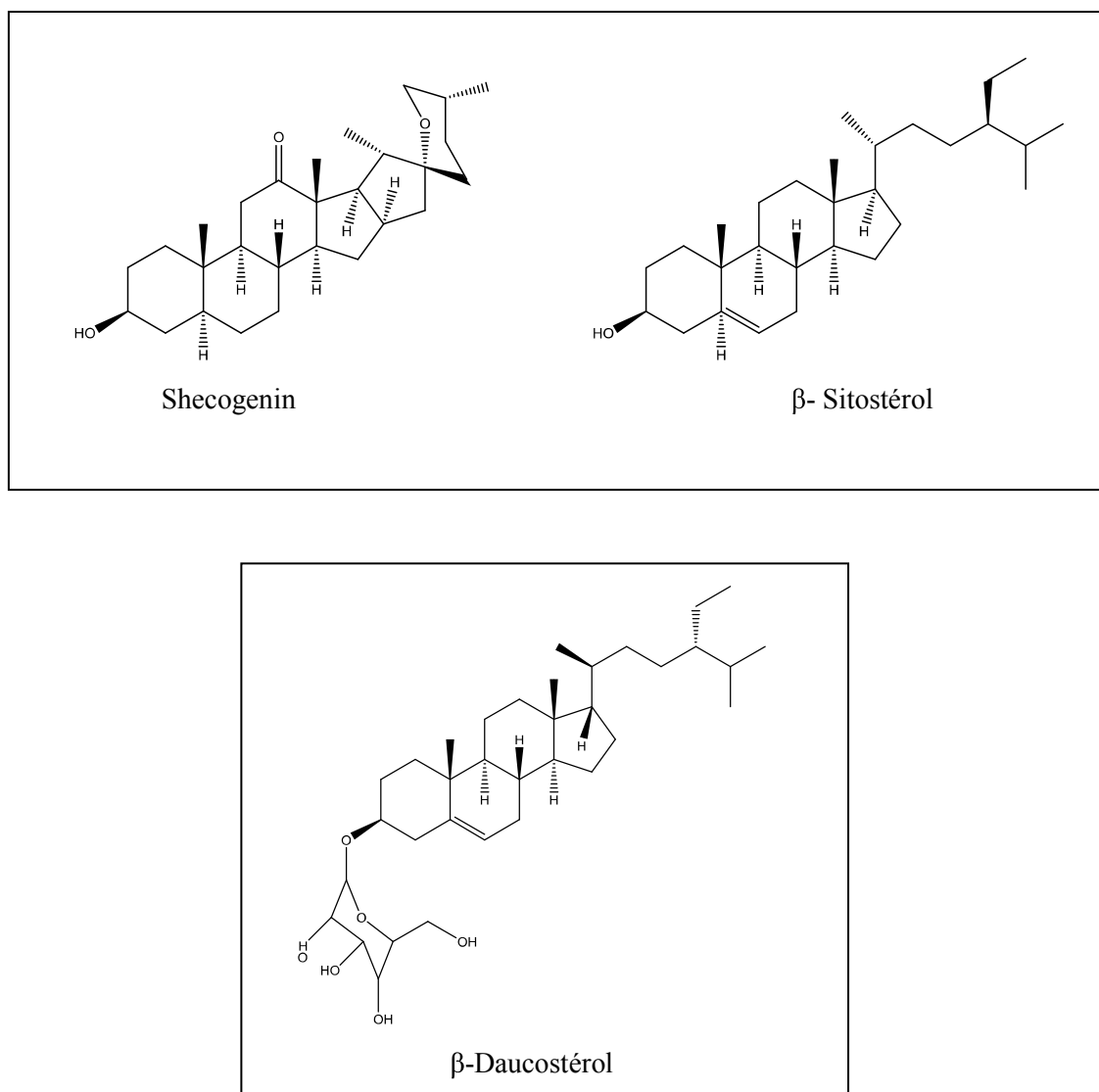


Figure II.1. Les stéroïdes isolés de la famille des Polygonacées

II.3. Aspect botanique du genre *Calligonum*

II.3.1. Description du genre

Le genre *Calligonum* appartient à la famille des Polygonacées. Il comprend environ 80 espèces réparties tout au long de l'Afrique du Nord, Europe du Sud et en Asie occidentale [21]. Il présente un grand intérêt écologique en zone saharienne, et utilisé dans la médecine traditionnelle algérienne [22], il est connu pour son alimentation [23].

Il s'agit d'arbustes ou de sous-arbrisseaux caducs, très ramifiés, aux feuilles opposées, simples et entières, linéaires à scaliformes, sessiles ou subsessiles, avec une ochréa membraneuse,

parfois soudée à la base foliaire. Les fleurs, actinomorphes et bisexuées, sont groupées en fascicules axillaires. Elles se composent de 5 tépales libres et persistants, de 12-18 étamines aux filets connés à la base, et d'un ovaire supère et tetracarpellé. Les fruits sont des achènes trigones [4] **Figure [II.2.]**.



Figure II.2. Les espèces *Calligonum azel* et *Calligonum comosum* (Respectivement)

II.3.2. Place dans la systématique : [4]

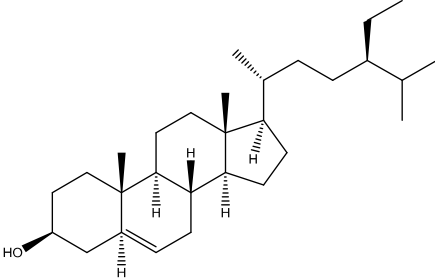
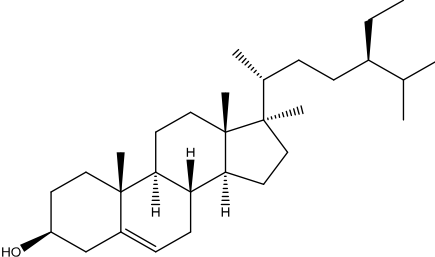
Règne	→	Plantae
Sous-règne	→	Tracheobionta
Embranchement	→	Spermaphytes
Sous-embranchement	→	Angiospermes
Classe	→	Dicotylédones
Sous-classe	→	Caryophyllidae
Ordre	→	Polygonales
Famille	→	Polygonaceae
Genre	→	<i>Calligonum</i>
Espèce	→	<i>azel</i>
	↘	<i>comosum</i>

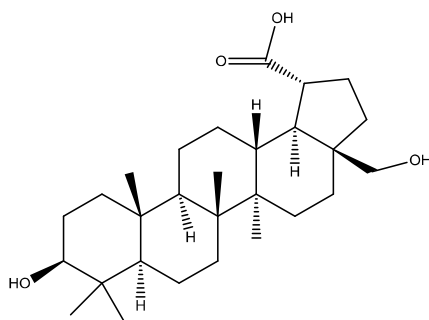
II.3.3. Classification phylogénétique [4]

Super ordre	→	Caryophyllanae
Ordre	→	Caryophyllales
Famille	→	Polygonaceae
Espèce	→	<i>azel</i>
	→	<i>comosum</i>

II.3.4. Travaux antérieurs du genre *Calligonum*

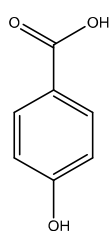
Peu d'études phytochimiques effectuées sur ce genre ont permis d'établir un profil chimique. On rencontre fréquemment les flavonoïdes, les stéroïdes, les acides phénolique dans les parties aériennes. Les flavonoïdes sont des composés phénoliques très connus dans ce genre et jouent un rôle important dans le système de défense comme antioxydants. Les différents composés qui sont isolés de plusieurs espèces du genre *Calligonum* sont rassemblés dans le **Tableau [II.3.]** :

Espèces	Structure et dénomination	Référence
<i>Calligonum comosum</i>	 <p>β-Sitostérol</p>	[26]
	 <p>Stigmastérol</p>	[26]

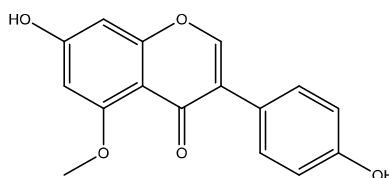


Betuline

[26]

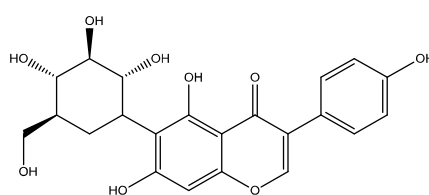
Acide-*p*-hydroxy benzoïque

[26]



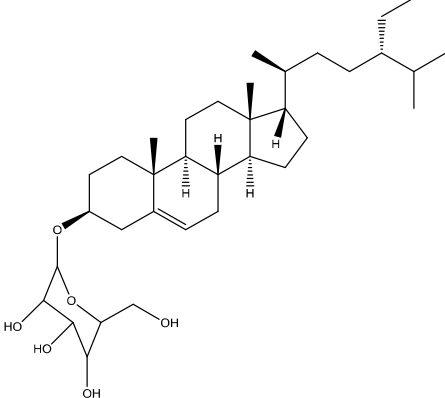
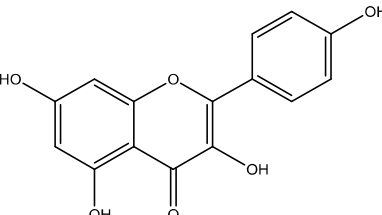
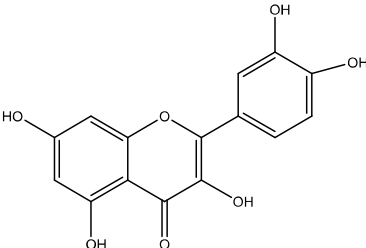
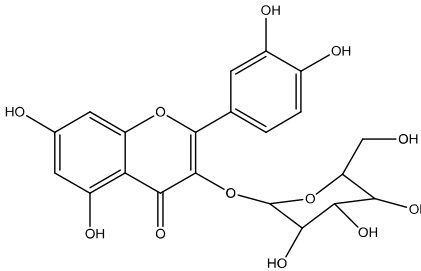
Isoprunein

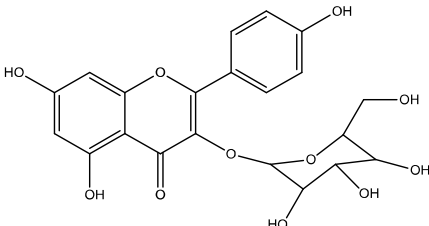
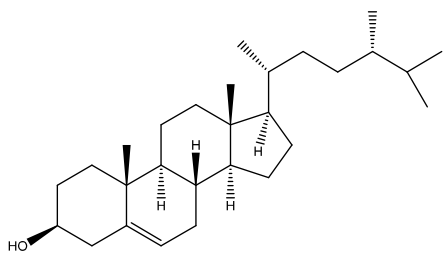
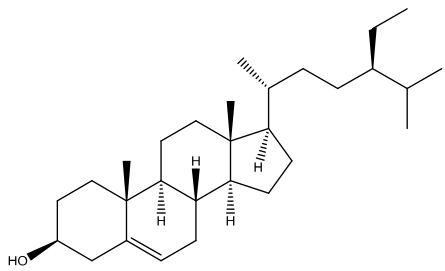
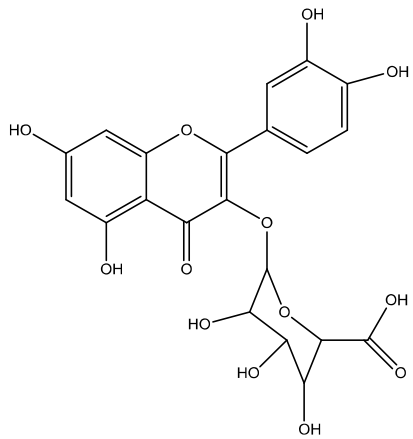
[26]

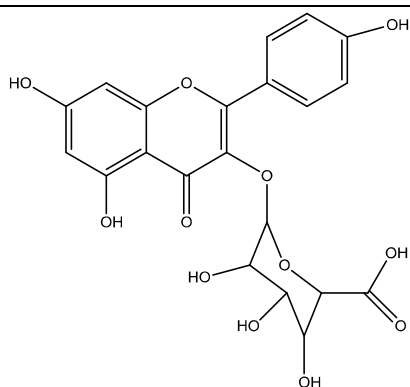


Genistein 6-C-glucoside

[26]

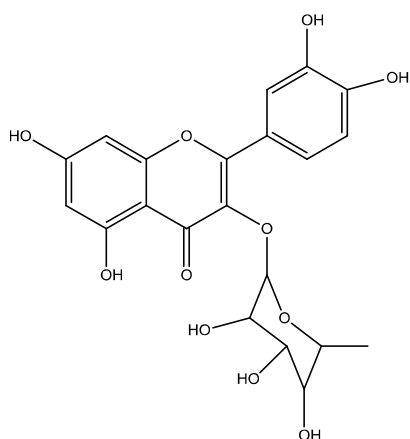
	 <p>β-Sitostérol glucoside</p>	[26]
	 <p>Kaempferol</p>	[26]
	 <p>Quercetine</p>	[26]
	 <p>Quercetine-3-O-β-D-glucoside (isoquercitrine)</p>	[26]

	 <p>kaempferol-3-O-β-D-glucuronide</p>	[26]
<i>Calligonum polygonoides</i>	 <p>Campesterol</p>  <p>Stigmasterol</p>	[27] [31]
	 <p>Quercetine-3-O-glucuronide</p>	[31]

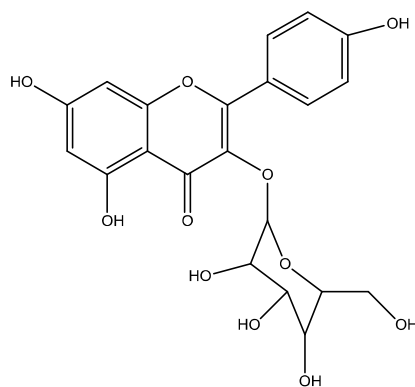


[31]

Kaempferol-3-O-glucuronide



[31]

Quercetine-3-O- α -rhamnopyranoside

[31]

Astragaline

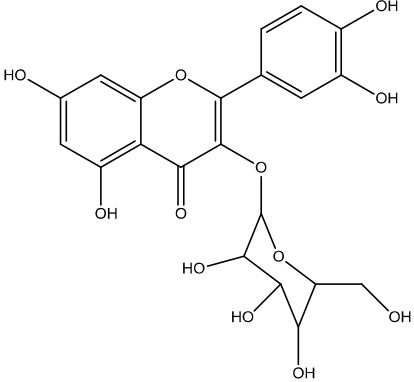
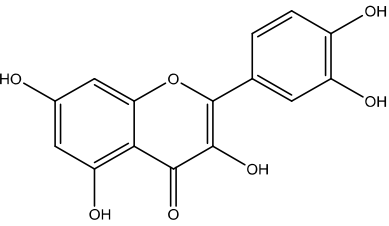
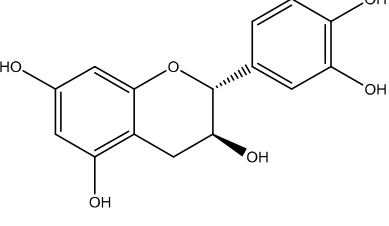
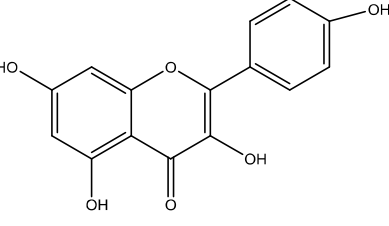
	 <p>Quercetin-3-O-glucopyranoside</p>	[31]
	 <p>Taxifoline</p>	[31]
	 <p>(+)-Catéchine</p>	[31]
	 <p>Kaempferol</p>	[31]

Tableau II.3. Composés isolés du genre *Calligonum*.

II.3.5. Intérêts biologiques du genre *Calligonum*

Le genre *Calligonum* est connu pour ses activités anti inflammatoire, antibactérienne, antifongique et antiulcer [28].

En Egypte, *Calligonum poligonoides* est traditionnellement utilisée pour le traitement des maux d'estomac et des maux de dents en mâchant les parties aériennes. La décoction de racine est utilisée pour les plaies de gomme [29]. Les fleurs fraîches de la plante sont utilisées comme nourriture en raison de la teneur élevée en sucre et en composants azotés. Les fleurs de *C. poligonoides* sont aussi utiles contre la toux, l'asthme et le rhume. Le jus de pousse est appliqué sur les yeux comme antidote à la piqûre de scorpion, une décoction de racines mélangée à du catechu est utilisée comme gargarisme pour la gomme douloureuse et le latex est utilisé pour traiter l'eczéma, guérir les morsures de chiens enragés et provoquer l'avortement. L'extrait méthanolique de *C. polygonoides* a montré une forte toxicité dans le test de létalité saumure-crevette [22].

Les parties aériennes de la plante ont montré une activité protectrice contre le stress oxydatif induit par l'halopéridol [30], anti-ostéoporotique [31], anti-ulcère et anti-inflammatoire [28], hypoglycémique [32], la cytotoxicité et les activités antioxydantes [8]. Les fruits de la plante présentaient une activité antihelmentique [33]. Une activité antimicrobienne a été rapportée pour différentes parties de la plante [34].

Les graines de *C. leuocladum* sont utilisées pour le traitement de la syphilis et des rhumatismes et les feuilles aident à promouvoir une vésicule biliaire saine. *C. leuocladum* est également utilisé pour ses tanins en teinture ainsi comme plante alimentaire [35].

Références

- [1] Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier E., (2001). Production of plant secondary metabolites, a historical perspective; *Plant Science*, 161: 839 -851.
- [2] Ozenda, P., (1991). Flore de sahara (3^o édition mise à jour et augmentée) Paris, Editions du CNRS. 662 pages. + Cartes. UNESCO., (1960). Les Plantes Médicinales des Régions Arides. Recherches sur les Zones Arides, Paris. 99 pages.
- [3] Potterat, O., (1997). Antioxidants and free radical scavengers of natural origin, *Current organic chemistry*, 1, 415-440.
- [4] Jud, W., S., Campbell, C., S., Kellogg, E., A., Stevens, P., (2002). Botanique systématique, une perspective phylogénétique, 1^{ère} éd., Paris: De Boeck Supérieur.
- [5] Spichiger, R., Savolainen, V., Figeat, M., Seanmonod, D., (2002). Botanique systématique des plantes à fleurs : une approche phylogénétique des Angiospermes des régions tempérées et tropicales. 2^{ème} Ed, Presses polytechniques et universitaires romandes. Lausanne.
- [6] Blamey, M., Grey-Wilson, C., (2003). La flore d'Europe occidentale, Flammarion., Paris.
- [7] Fournier, P., (2000). Les quatre flores de France., Nouveau tirage, Dunod., Paris.
- [8] Badria, F., A., Ameen, M., Akl, M., R., (2007). Evaluation of cytotoxic compounds from *calligonum comosum* L. growing in Egypt, *Z Naturforsch C.*, 62(9-10): 656-60.
- [9] Fabian, B., (2014). Formation en biologie végétale, Lauréat du Fonds Wernaers (FNRS)
- [10] Hyeji, S., Hayeon, C., Byoungduck, P., Ki Yong, L., (2016). Identification of Antioxidative Constituents from *Polygonum aviculare* using LC-MS Coupled with DPPH Assay. *Natural Product Sciences* 22(1): 64-69.
- [11] Queen, R., S., X., Arockiasamy, P., Kanmani, R., Charles, A., Alex, Ramani, V., (2011). Isolation and characterization of flavanone compounds from the leaf extract of *Polygonum barbatum*, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, J. Chem. Pharm. Res., 3(2):762-764
- [12] Hammami, S., Ben Jannet, H., Bergaoui, A., Ciavatta, L., Cimino, G., Mighri, Z., (2004). Isolation and Structure Elucidation of a Flavanone, a Flavanone Glycoside and Vomifoliol from *Echiochilon Fruticosum* Growing in Tunisia, *Molecules*, 9 (7), 602-608; doi:10.3390/90700602
- [13] Imai, K., Furuya, K., (1951). Phytochemical component of *Fagopyrum cymosum*.

- Journal of the pharmaceutical society of japan, 71: 263- 266.
- [14] Muhammad, W., Muhammad, S., A., Muhammad, U., (2015). Genus *Fagopyrum*. phytochemical and ethnopharmacological review, Indian Research Journal of Pharmacy and Science, 4- 1-14; Journal home page: <https://www.irjps.in>
- [15] Tian, L., Xu, L., Yang, S., L., (1997). Studies on chemical composition of *Fagopyrum cymosum*(Trev.) Meisn. Chin. J. Chin. Mater. Med., 12: 743-745.
- [16] Wang, K., J., Zhang, Y., J., Yang, C., R., (2005). Antioxidant phenolic constituents from *Fagopyrum dibotrys*. J. Ethnopharmacol., 2: 259-264.
- [17] Wu, H., Z., Zhou, J., Y., Pan, H., L., (2008). Study on chemical constituents of *Fagopyrum dibotrys* (D.Don) Hara. Chin. Hosp. Pharm. J., 21:1829-1831.
- [18] Jiang, S., Liu, Q., Xie, Y., Zeng, H., Zhang, L., Jiang, X., Chen, X., (2014). Separation of five flavonoids from tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn) grains via off line two dimensional high speed counter current chromatography. Food Chemistry.
- [19] Saddiqui, A., W., Ali, M., Naquvi K., J., Husain, S., S., (2015). New Aliphatic Ester, *B*-Sitosterol Diglucoside and vesicaria biflavones from the seeds of *Rumex vesicarius*, Natural drugs, ISSN 0001-6837 Polish Pharmaceutical Society
- [20] Zhang, W., J., Li, X., C., Liu, Y., Q., Yao, R., C., Nonaka, G., I., Yang, C., R., (1994). Phenolic constituents from *Fagopyrum dibotrys*. Acta botanica yunnanica, 4: 354-356.
- [21] Bewal, S., Sharma, S., K., Parida, A., Shivam, S., Rao, S.R., Kumar, A., (2009). Utilization of RAPD marker to analyze natural genetic variation in *Calligonum polygonoides* L. A. key stone species of Thar Desert. International Journal of Integrative Biology, 5, 148–151.
- [22] Samejo, M., Q., Memon, S., Bhangar, M., I., Khan, K., M., (2012). Chemical composition of essential oil from *Calligonum polygonoides* Linn. Nat Prod Res.
- [23] Dawidar, Abdel-Aziz, M., Abdel-Mogib, M., El-Sherbiny, Ibrahim, M., Saeed, Ali A., (2012). Terpenes, steroids and shikimates in *Calligonum Comosum* L , Mansoura Journal of Chemistry Volume 39 Journal - ISSN:1687-506
- [24] Toaima, S., M., Radwan, M., M., Asaad, A., M., El-Sebakhy, N., A., (2007). Cytotoxic isoflavones from *Calligonum comosum*, Bulletin of the Faculty of Pharmacy (Cairo University), 1110-0931
- [25] El-Sayyad, S., Wagner, H., (1978). A phytochemical study of *Calligonum comosum*. henry, Planta Medica Volume 33, Journal - ISSN:0032-0943

- [26] Muhammad, Q., Samejo, S., Memona, Muhammad., Iqbal, B., Khalid, M., K., (2013). Isolation and characterization of steroids from *Calligonum Polygonoides* journal of pharmacy research 6-346-349
- [27] Ahmed, H., Moawada, A., Owisa, A., AbouZid, S., Ahmed, O., (2016). Flavonoids of *Calligonum polygonoides* and their cytotoxicity, pharmaceutical biology, Vol. 54, N°. 10, 2119–2126
- [28] Liu, X., M., Zakaria, M., N., M., Islam, M., W., Radhakrishnan, R., Ismail, A., Chen, H., B., Chan, K., Al-Attas, A., (2001). Anti-inflammatory and anti-ulcer activity of *Calligonum comosum* in rats. *Fitoterapia*, 72, 487–491.
- [29] Zouari, S., Dhief, A., Aschi-Smiti, S., (2012). Chemical composition of essential oils of *Calligonum comosum* cultivated at the South-Eastern of Tunisia: a comparative study between flowering and fructification stages. *J Essent Oil Bear Pl.* 15:320–327.
- [30] Abdel-Sattar, E., A., Mouneir, S., M., Asaad, G., F., Abdallah, H., M., (2014). Protective effect of *Calligonum comosum* on haloperidol- induced oxidative stress in rat. *Toxicol Ind Health.* 30:147–153.
- [31] Sabry, L., Sattar, M., A., Amin, H., A., Sattar, E., A., (2013). Antiosteoporotic effect of some herbal extracts versus alendronate on an animal model of osteoporosis. *Life Sci J.* 10:177–187.
- [32] El-Hawary, Z., Kholief, T., (1990). Biochemical studies on some hypoglycemic agents (II) effect of *Calligonum comosum* extract. *Arch Pharm Res.* 13:113–116.
- [33] Degheidy, N., S., Sharaf, E., M., Fathi, S., M., (2013). Field evaluation of anthelmintic efficacy of *Calligonum comosum* against fasciolosis in sheep at Taif, KSA. *Global Veterinaria.* 11:377–384.
- [34] Riadh, H., Imen, F., Abdelmajid, Z., Sinda, F., (2011). Detection and extraction of anti-Listerial compounds from *Calligonum comosum*, a medicinal plant from arid regions of Tunisia. *Afr J Tradit Complement Altern Med J Compl Med.* 8:322–327.
- [35] Dadabaeva, O., (1972). Dictionary of Scientific and Local Plants Found in Northern Tajikistan; Maorif: Dushanbe, p 130.

CHAPITRE III

Travaux Personnels : Etude Phytochimique et biologique

III.1. Etude phytochimique de l'espèce *Calligonum azel*

III.1.1. Description botanique de l'espèce

Calligonum azel est un arbre endémique des Ergs de la partie est du Sahara septentrional, jusqu'au Tassili N'Ajjer. Il peut atteindre 2 à 6 mètres de haut, mais peut, suite aux agressions humaines ou animales, prendre l'allure d'un arbuste. Reconnaissable par ses fleurs blanches petites et son fruit de 1 à 2 cm, ayant en coupe transversale la forme d'un quadrilatère, portant deux rangées de poils sur chaque angle et d'autres poils irrégulièrement disposés sur les faces. C'est une espèce qui présente un grand intérêt écologique en zone saharienne: elle est fixatrice de sable mobile et donc susceptible d'aider à la lutte contre la désertification et l'érosion éolienne, amélioration de la teneur du sol en matière organique, accroissement de la productivité biologique du milieu, ... etc, *Calligonum azel* offre l'un des meilleurs exemples de résistance à la sécheresse par la perte, en période de stress hydrique estival, en plus de ses feuilles, d'une partie de ses rameaux. Son cycle biologique se caractérise par une phase de croissance végétative très brève. *Calligonum azel*, espèce caractéristique des grandes dunes du Sahara, est connue par son aptitude au drageonnement et c'est essentiellement cette particularité qui lui permet d'assurer une pérennité [1].

III.1.2. Place dans la systématique [2]

Règne	⇒	Plantae
Sous-règne	⇒	Tracheobionta
Embranchement	⇒	Spermaphytes
Sous-embranchement	⇒	Angiospermes
Classe	⇒	Dicotylédones
Sous-classe	⇒	Caryophyllidae
Ordre	⇒	Polygonales
Famille	⇒	Polygonaceae
Genre	⇒	<i>Calligonum</i>
Espèce	⇒	<i>azel</i>

- **Classification phytogénétique [2]**

Super ordre	⇒	Caryophyllanae
Ordre	⇒	Caryophyllales
Famille	⇒	Polygonaceae
Genre	⇒	<i>Calligonum</i>
Espèce	⇒	<i>azel</i>

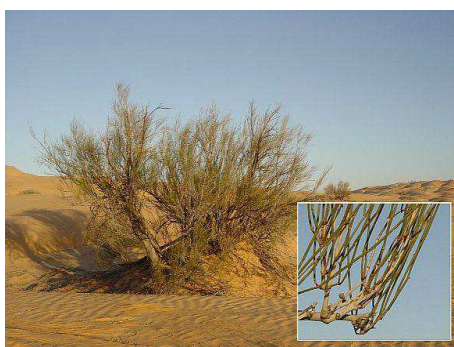


Figure III.1. L'espèce *Calligonum azel*

III.1.3. Etude bibliographique

La recherche bibliographique que nous avons menée sur l'espèce endémique *Calligonum azel* a montré que cette plante n'a fait l'objet d'aucune étude phytochimique auparavant, ce qui nous a encouragés à entamer cette étude.

III.1.4. Matériel végétal

La plante a été récoltée au mois de Mai de l'année 2011, de la région de Bechar (sud-ouest d'Algérie), après séchage dans un endroit sec et aéré à l'abri des rayons solaires. La détermination botanique a été réalisée par le Professeur Mohamed Kaabache (Département des sciences de la nature et de la vie, Université Ferhat Abbas, Sétif, Algérie). Un spécimen (N° 121CA) a été déposé au niveau de l'herbier de l'unité de recherche VARENBIOMOL de l'Université des Frères Mentouri de Constantine.

III.1.5. Screening chimique

C'est un ensemble des méthodes et techniques de préparation et d'analyse des substances organiques naturelles de la plante. Le but final de l'étude des plantes médicinales est souvent d'isoler un ou plusieurs constituants responsables de l'activité particulière de la plante. De ce point de vue, les techniques générales de screening phytochimique peuvent être d'un grand secours. Ces techniques permettent de déceler, la présence des produits appartenant à des classes de composés physiologiquement actifs ; notamment, les huiles essentielles, les stérols et triterpènes, les caroténoïdes, les alcaloïdes, les coumarines, les flavones aglycones, les stéroïdes, les anthracénosides, les flavones glycosides, les tannins, les amines oxydées et les saponosides. Le nombre de ces classes est important et il ne peut être vérifié la présence de chacune qu'avec le screening chimique. Il faut choisir les classes reconnues comme les plus actives mais aussi les plus faciles à détecter compte tenu des ressources techniques disponibles [12].

III.1.5.1. L'extrait étheré (Ether diéthylique)

Une quantité de poudre végétale (45g) est extraite avec l'éther di-éthylique dans un appareil à Soxhlet. Les solutions étherées sont combinées, filtrées et concentrées à 40-50 ml.

III.1.5.1.1. Caractéristiques de quelques constituants dans l'extrait étheré (Ether diéthylique).

➤ Identification des huiles essentielles

10 ml de l'extrait étheré de la plante est placé dans un erlen et évaporé à sec. Le résidu obtenu est dissous dans des petites quantités d'alcool par des éluions répétés puis une partie de la solution alcoolique est évaporée à sec.

Un odorât plaisant indique la présence des huiles essentielles.

➤ Identification des stérols et triterpènes

10 ml de l'extrait étheré est séché à sec. Le résidu obtenu est dissous dans l'anhydride acétique (0.5 ml) puis dans le chloroforme (0.5 ml). La solution obtenue est transférée dans un tube à essai sec en utilisant une pipette. Au fond du tube à essai, nous avons incorporé 2 ml d'acide sulfurique (Réaction de Liebermann-Bouchard).

L'apparition d'un anneau rouge-brunâtre ou violet dans la zone de contact des deux phases et d'une coloration verte ou violette de la couche surnageante indique la présence des stéroïdes et triterpènes.

➤ Identification des caroténoïdes

L'extrait éthéré (10 ml) est évaporé à sec, au résidu obtenu une solution saturée de l'antimoine trichlorure (SbCl_3) dans CHCl_3 (2 à 3 gouttes) est ajoutée (Réaction de Carr Price). Puis une solution de H_2SO_4 concentrée est ajoutée goutte à goutte.

La présence des caroténoïdes est confirmée par l'apparition d'une coloration bleue.

➤ Identification des alcaloïdes (Réactions de précipitation)

L'identification est faite sur le résidu obtenu par évaporation de 10 ml de la solution éthérée. Le résidu est dissous dans 1.5 ml d'une solution d'acide chlorhydrique (HCl) à 2%.

La solution obtenue est divisée en trois tubes à essai :

- 1^{er} tube : 0.5 ml d'une solution aqueuse acide comme référence.
- 2^{ème} tube : Nous avons ajoutés 3 gouttes du réactif de Bertrand à 0.5 ml de la solution aqueuse acide.
- 3^{ème} tube : Nous avons ajoutés 3 gouttes du réactif de Mayer à 0.5 ml de la solution.

L'apparition d'un précipité rouge ou blanc jaunâtre respectivement témoigne la présence des alcaloïdes.

➤ Identification des coumarines

3 ml de l'extrait éthéré est évaporé à sec. Le résidu obtenu a été dissout dans 2 ml d'eau chaude. Puis on a partagée la solution obtenue dans deux tubes. Au contenu du premier tube, nous avons ajoutés 0.5 ml d'une solution d'hydroxyde d'ammonium NH_4OH (10%). La solution obtenue a été examinée sous la lumière de Wood (UV).

L'observation d'une fluorescence intense sous UV 366 nm dans le 2^{ème} tube indique la présence des coumarines.

➤ Identification des flavones aglycones

3 ml de l'extrait éthéré est évaporé à sec. Le résidu est dissous dans 1 à 2 ml du méthanol (50 °C) à chaud. Quelques gouttes d'une solution du magnésium métallique dans une solution d' HCl concentré ont été ajoutées à la solution précédente.

Le développement d'une coloration rouge cerise ou violacée et d'une teinte brune rouge indique respectivement la présence de leucoanthocyanes et de catéchols.

➤ **Recherche de stéroïdes ou de dérivés terpéniques**

Nous avons placés dans un verre de montre 1 ml de l'extrait étheré puis évapore à sec. L'anhydride acétique (2 gouttes) est ajoute au résidu obtenu dans l'un des verres de montres et de l'acide sulfurique au 2ème verres de montres.

La présence de stéroïdes est confirmée si la solution vire au vert et la présence des dérivés terpéniques est confirmée par l'apparition d'une coloration bleue.

➤ **Identification des anthracénosides**

4 ml de l'extrait étheré est concentré à moitié, puis 2 ml d'une solution de NH_4OH (25%) ont été ajoutés au résidu sous agitation.

Leur présence est révélée par une coloration rouge intense.

➤ **Identification des flavonosides (flavones glycosides)**

5 ml de l'extrait étheré est évaporé à sec. Le résidu obtenu est dissous dans 2 ml du méthanol (50%) en chauffant. Une solution de quelques gouttes du magnésium métallique et d'acide chlorhydrique concentré est ajoutée à la solution précédente.

L'apparition d'une coloration rose-orangé indique la présence des flavones glycosides

III.1.5.2. L'extrait alcoolique

Une quantité de poudre végétale (45 g) est extraite avec l'éthanol (alcool à 70-80%) dans un appareil à Soxhlet ou par plusieurs extractions successives (aucun résidu dans la dernière extraction après évaporation de l'éthanol). Les solutions étherées sont combinées, filtrées et concentrées à 40-50 ml.

Cette solution peu contenir des produits hydrophiles notamment :

- Polyphénols (tannins, ...etc)
- Les alcaloïdes à l'état de sels.
- Glycosides polyphénoliques (anthracénosides, coumarines, flavonoïdes).
- Glycosides stérols (cardiotoniques, saponosides).
- Triterpènes glycosides.
- Anthocyanosides.

Le mac ou la poudre épuisée obtenue après l'extraction avec l'éther ou tout autre solvant apolaire (ou plante séché), est extrait par reflux avec l'alcool. La solution est concentrée à 50 ml. Cette solution contient les produits hydrophiles comme : Polyphénols (tannins, ...etc); Composés réducteurs; les alcaloïdes à l'état de sels; glycosides polyphénoliques (anthracénosides, coumarines, flavonosides); glycosides stérols (cardiotoniques, saponosides); triterpènes glycosides; Anthocyanosides.

Les constituants, chimiquement actifs des extraits peuvent être identifiés par des réactions spécifiques dans la solution alcoolique ou aqueuse.

III.1.5.2.1. Caractéristiques de quelques constituants dans l'extrait alcoolique

➤ Identification des tannins

1 ml de l'extrait alcoolique est dilué avec de l'eau (2 ml). À la solution obtenue on a ajouté 1 ml de FeCl_3 dilué à 1% (jaune claire).

La présence des tannins galliques ou catéchiques se traduit par le développement d'une coloration verdâtre ou bleue noirâtre, respectivement.

➤ Identification des alcaloïdes

20 ml de l'extrait alcoolique est transféré dans une capsule et évaporé au bain-marie ou dans un bain de sable. Au résidu contenant les alcaloïdes sous forme de sels de quelques acides organiques (les alcaloïdes maintenant deviennent des sels des acides minéraux), nous avons ajoutés 10 ml d'une solution d'acide chlorhydrique (10%), ensuite nous avons ajoutés le NH_4OH en solution ($\text{pH} = 8 - 9, 10\%$) à la solution aqueuse et par conséquent les alcaloïdes se précipitent sous forme de base, puis nous l'avons extrait avec un solvant apolaire Chloroforme. La solution extraite avec du chloroforme est évaporée à sec dans une capsule. Le résidu obtenu est dissous dans une solution d'acide chlorhydrique (1.5 ml, 2%). La solution acide, contenant les alcaloïdes sous forme de sels, est divisée dans deux tubes à essai :

- Le 1^{er} tube est une référence.
- Au 2^{ème} tube, nous avons ajouté 3 gouttes du réactif de Mayer.

L'apparition d'un précipité rouge ou blanc jaunâtre respectivement témoigne la présence des alcaloïdes.

➤ **Identification des alcaloïdes, bases quaternaires et les amines oxydées (réactions de précipitation)**

A l'extrait alcoolique, nous avons ajoutés 8 ml d'une solution d'acide chlorhydrique (10%), sous agitation, en chauffant avec une tige en verre. Après refroidissement, nous avons ajoutés 0.5 g de chlorure de sodium sous agitation. Nous avons filtrés la solution sur papier, lavés avec une solution d'acide chlorhydrique (10%, 3 ml). L'extrait aqueux acide est traité par le réactif de Mayer.

L'apparition d'un précipité rouge ou blanc jaunâtre respectivement témoigne la présence des alcaloïdes.

III.1.5.3. La solution aqueuse

Après l'extraction avec l'éther et l'alcool, le produit végétal est séché puis extrait avec l'eau tiède dans un erlen conique pendant 20 minutes. Le filtrat est concentré à un volume de 50 ml. L'eau peut extraire les constituants hydrosolubles comme : glucides; glycosides (hétérosides); alcaloïdes à l'état de sels.

➤ **Identification des alcaloïdes**

15 ml de l'extrait aqueux sont rendus basiques avec une solution de NH_4OH (pH = 8 - 9) et extrait avec un solvant polaire (EtOH) en suivant les mêmes techniques décrites dans le test de précipitation réalisé dans la partie indiquée ci-dessus (extrait alcoolique).

➤ **Recherche des saponosides**

1 ml de l'extrait aqueux est placé dans un tube à essai de 150 mm de hauteur.

- **Méthode 1** : nous avons notés la hauteur de mousse en centimètre H1, d'une part immédiatement après une vigoureuse agitation, d'autre part après 10 minutes de repos H2. La seconde lecture donne une indication de l'abondance des saponosides.
- **Méthode 2** : nous avons agités 2 ml d'une solution diluée (1:1) dans un tube à essai de 1 cm de diamètre pendant 15 min.

La présence des saponines est confirmée avec un indice de mousse supérieur à 100, ce dernier est calculé selon la formule suivante :

$$I = \text{hauteur de mousse (cm) dans le Xème tube} \times 5 / 0.0x$$

III.1.6. Extraction de l'espèce *C. azel*

III.1.6.1. Méthode 1

La plante broyée est pesée. Deux kilogrammes ($m = 2.129 \text{ Kg}$) de la poudre obtenue est mise à macérer pendant 48 heures dans un mélange Méthanol / H_2O (70:30, v/v). Cette opération est répétée trois fois avec un renouvellement du solvant.

Après filtration, concentration à une température n'excédant pas 35°C , cet extrait contenant toujours de MeOH, on ajoute l' H_2O distillée à raison de 400 ml pour 1 kg de matière sèche.

Le filtrat obtenu subit une série d'extraction liquide-liquide par des solvants non miscibles à l'eau et de polarité croissante ; d'abord par l'éther de pétrole qui élimine la chlorophylle et les lipides, puis par le chloroforme qui extrait les produits peu polaires et aussi avec l'acétate d'éthyle, et enfin par le n-butanol qui entraîne les composés polaires et la majorité des hétérosides.

Les phases organiques sont séchées sur Na_2SO_4 , filtrées et évaporées à sec. Ainsi, il a été récupéré 0.4 g de l'extrait éther de pétrole, 0.5 g de l'extrait chloroforme et 14 g de l'extrait acétate d'éthyle et 80g de l'extrait *n*-butanol ; l'ensemble de ces opérations d'extraction est résumé dans la **figure [III.2.]**:

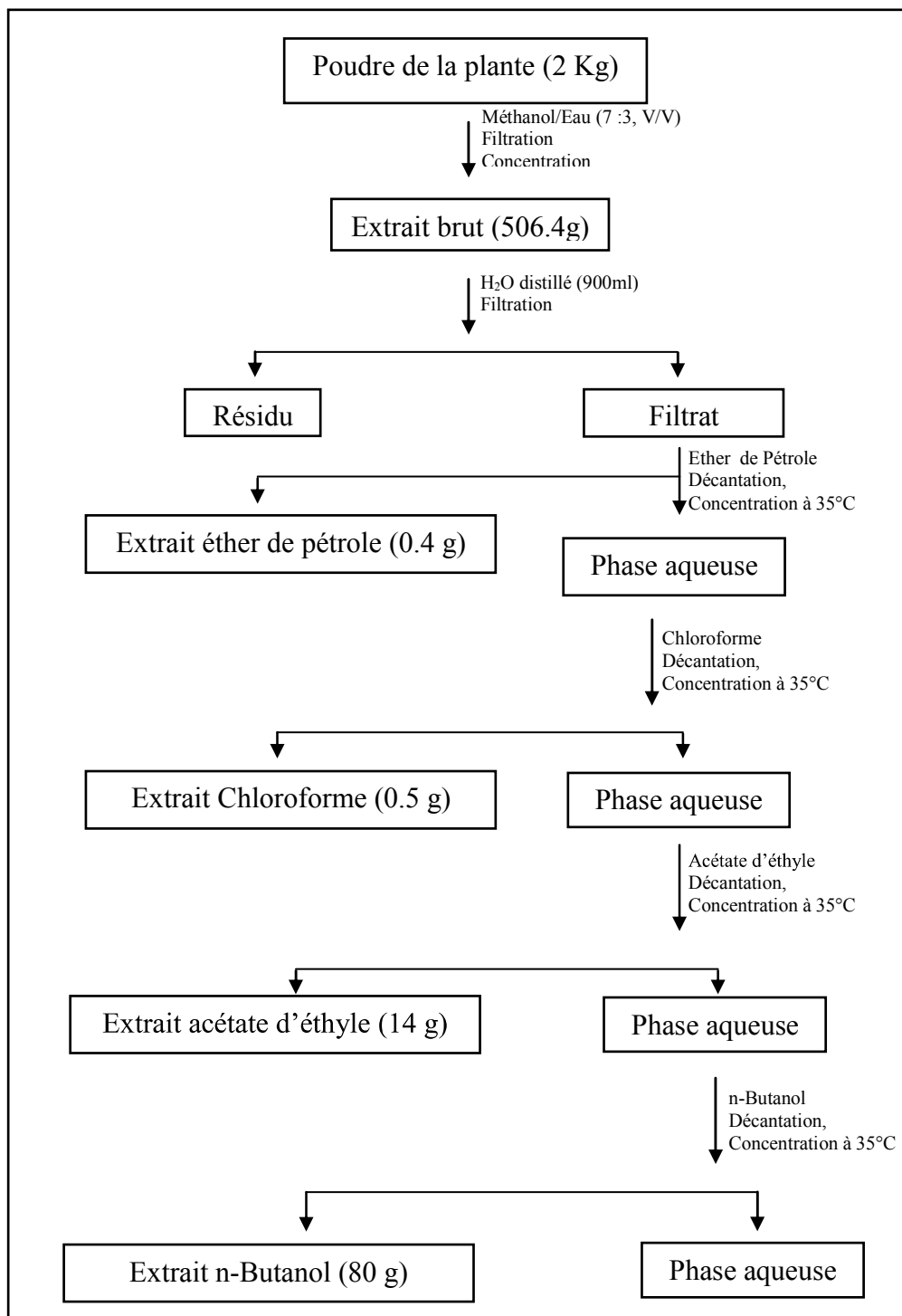


Figure III.2. 1^{er} protocole d'extraction de l'espèce *Calligonum Azel*.

III.1.6.2. Méthode 2

Le matériel végétal séché à l'air à l'abri des rayons solaires et de l'humidité, d'un poids total de 1.200 kg de l'espèce *Calligonum azel* est pulvérisé. La totalité de la plante est mise à

macérer séparément dans l'éther de pétrole trois fois pendant 24 heures. Les mélanges sont ensuite filtrés et concentrés à sec, donnant ainsi 3.200 g d'extrait éther de pétrole. Les marcs sont ensuite extraits par le chloroforme 3 fois pendant 48 heures. Après filtration et évaporation du solvant, 0.800 g d'extrait chloroforme ont été obtenus. Les marcs récupérés sont de nouveau mis à macérer dans Chloroforme / Méthanol (90:10, v/v) 3 fois pendant 48 heures. Après filtration et évaporation totale du solvant, 8 g de l'extrait méthanol total sont obtenus. Les marcs récupérés sont de nouveau mis à macérer dans le méthanol 3 fois pendant 48 heures. Après filtration et évaporation totale du solvant, 45 g de l'extrait méthanol total sont obtenus. Le protocole d'extraction est illustré dans la **figure [III.3]** :

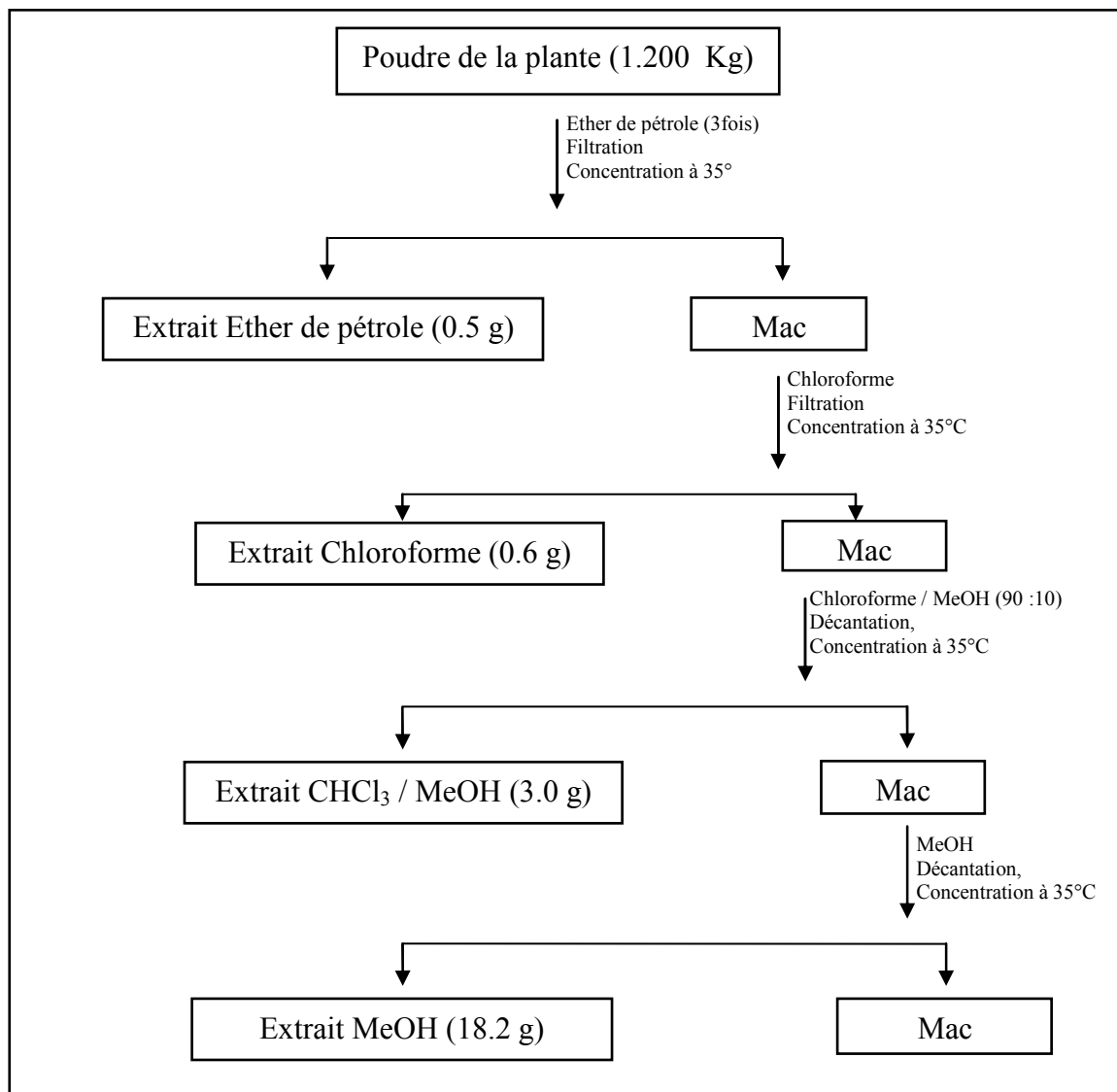


Figure III.3. 2^{ème} protocole d'extraction de l'espèce *Calligonum azel*.

III.1.7. Contrôle chromatographique des extraits de *C. azel*

La faible quantité de l'extrait d'éther de pétrole et de l'extrait chloroforme ainsi que la couleur rouge de ces deux extraits sous UV (254-365 nm), indiquent la présence abondante de chlorophylle. Ceci nous a incités à renoncer à l'étude de ces deux extraits.

Les différents tests chromatographiques sur l'extrait acétate d'éthyle et l'extrait *n*-butanol montrent que l'extrait acétate d'éthyle est le plus riche en composés.

III.1.7.1. Séparation de l'extrait acétate d'éthyle sur colonne

La séparation sur colonne a débuté par une recherche sur plaques analytiques de gel de silice 60, du meilleur système d'élution. Plusieurs systèmes de solvants ont été essayés sur l'extrait brut de la phase acétate d'éthyle en utilisant des plaques analytiques recouvertes de gel de silice 60 F254. La meilleure séparation a été obtenue avec un système: CHCl₃ / Acétone dans les proportions (80:20, v/v). Cette analyse confirme la richesse en composés phénoliques en montrant sous lumière de Wood des spots de couleur jaunes, bleus et noir-violet.

Sur la base des résultats de ces tests, nous avons opté pour l'étude de la composante chimique de l'extrait acétate d'éthyle d'où 12g ont été dissout dans le méthanol et mélangée avec du gel de silice et évaporée à sec, en donnant une poudre solide qui est déposée sur une colonne de gel de silice (type 60, 230-400 mesh, Merck) préparée dans le chloroforme. L'élution a été réalisé avec un gradient d'acétone.

Le suivi de la composition des fractions est effectué par chromatographie sur couche mince (CCM) de gel de silice sur support aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière UV visible (254 et 365 nm), puis révélées avec le Ce(SO₄)₂ / H₂SO₄ et chauffées pendant 3 min à 100°C. Les lots de même composition sont rassemblés dans le tableau suivant ; On aura alors 21 fractions qui ont été testés sur plaque CCM dans les systèmes : CHCl₃ / MeOH / H₂O (80:18:2, v/v/v) et BAW (60:15:25, v/v/v) et réunies dans le **tableau [III.1.]**:

Lots des fractions	N° des fractions	CHCl ₃ (%)	Acétone (%)	MeOH (%)	Poids (mg)
1-7	CAP/2/1	100	0	0	66
8-13	CAP/2/2	95	5	0	108.9
14-20	CAP/2/3	90	10	0	72
21-27	CAP/2/4	85	15	0	120
28-31	CAP/2/5	83	27	0	116.7
32-59	CAP/2/6	80	20	0	72.5
60-68	CAP/2/7	78	22	0	77.3
69-78	CAP/2/8	76	24	0	82.8
79-121	CAP/2/9	70	30	0	55
122-132	CAP/2/10	68	32	0	832.8
138-149	CAP/2/11	64	36	0	1215.3
150-158	CAP/2/12	60	40	0	1511.6
159-167	CAP/2/13	55	45	0	849.3
168-175	CAP/2/14	50	50	0	286
176-181	CAP/2/15	45	55	0	209
182-186	CAP/2/16	40	60	0	60
187-188	CAP/2/17	35	65	0	102.2
189-192	CAP/2/18	30	70	0	449.3
193-204	CAP/2/19	25	75	0	150.2
205-218	CAP/2/20	0	100	0	420.1
219-240	CAP/2/21	0	0	100	2600

Tableau III.1. Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait Acétate d'éthyle de l'espèce *C. azel*.

Parmi les fractions obtenues, on a choisi la séparation de la fraction CAP/2/12. Ce choix est établi par rapport à son poids et richesse en métabolites secondaires.

III.1.7.1.a. Séparation et purification de la fraction CAP/2/12

❖ Etude de la fraction CAP/2/12

La quantité de cette fraction est grande donc on n'a pas pu la séparer sur plaque, il faut la séparer sur colonne de gel de silice (type 60, 230-400 mesh, Merck). La séparation sur colonne a débuté par la recherche de meilleur système d'élution sur plaque analytique. La meilleure séparation est obtenue par le système Chloroforme / Acétone (60:40, v/v).

Sur la base des résultats de ces tests, nous avons opté pour l'étude de la composante chimique de la fraction CAP/2/12 (m = 1511.6 mg) d'où 1,200 g ont été déposés sur une colonne de gel de silice préparée dans le chloroforme. L'élution a été faite avec du chloroforme avec un gradient d'acétone.

Le suivi de la composition des sous fractions est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière UV visible (254 et 365 nm), Les pots de même composition sont rassemblés. On aura alors 180 sous fractions.

- ❖ La sous fraction CAP/2/12-10 (m = 95.6 mg) a subi un test sur plaque analytique avec comme système d'élution CHCl₃/Acétone de proportion (60:40, v/v) qui montre quatre taches dont un est majoritaire et se colore en noire-violette sous lumière de Wood et devient de couleur orange après la révélation avec l'anisaldéhyde. Alors la sous fraction CAP/2/12-10 a subi une deuxième séparation sur plaque préparative de gel de silice avec le même système d'élution pour donner le produit **1 (CAP/2/12-10N)** avec une masse m = 0.9 mg

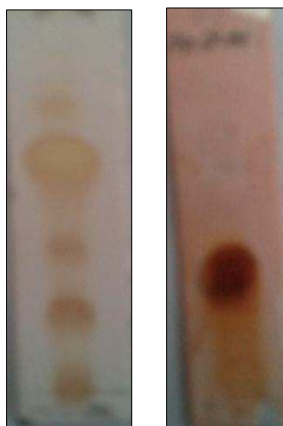


Figure III.4. Plaque CCM de la sous fraction CAP/2/12-10 élué dans CHCl₃/Acétone (60:40, v/v) après révélation avec l'anisaldéhyde

Produits isolés de la CAP/2/12-10	Observations
CAP/2/12-10N	Noir sous UV 365nm, pur
CAP/2/12-10J	Jaune sous UV, à purifier
CAP/2/12-10V	A identifier
CAP/2/12-10R	Transparent sous UV, réagit après certain temps à l'air libre.

Tableau III.2. Les produits isolés de la sous fraction CAP/2/12-10

- La sous fraction CAP/2/12-15 a subi un test sur plaque analytique avec comme système d'élution CHCl_3 /Acétone de proportion (60:40, v/v) qui montre six (6) taches **figure [III.5.]**, mais de faible quantité. Alors la sous fraction CAP/2/12-15 a subi une deuxième séparation sur plaque préparative de gel de silice avec le même système d'élution. Le tableau suivant résume tous les produits précédant.



Figure III.5. Plaque CCM de la fraction CAP/2/12-15 dans le système d'élution CHCl_3 /Acétone (60:40, v/v)

Produits isolés de la CAP/2/12-15	Observations
CAP/2/12-15 N ₁	Noir sous UV 256nm
CAP/2/12-15 N ₂	Noir sous UV 256nm
CAP/2/12-15 N ₃	Subit une autre séparation sur plaque CCM pour purification, noir sous UV
CAP/2/12-15J	Jaune sous UV, par le temps il dégrade
CAP/2/12-15B	Bleu fluorescent sous UV
CAP/2/12-15V	Vert sous UV, juste au dessus de dépôt

Tableau III.3. Les produits isolés de la sous fraction CAP/2/12-15

III.1.7.2. Séparation de l'extrait CHCl₃ / MeOH (90:10, v/v) sur colonne

Environ 2.600 g de cette phase est dissous dans un minimum de méthanol, la solution est introduite à l'aide d'une pipette sur une colonne confectionnée avec une quantité de Sephadex LH-20 préparée dans le méthanol. L'élution a été réalisée avec du méthanol.

Un fractionnement tous les 10 ml (10ml / min) a été effectué. Les fractions recueillies sont regroupées suivant la similitude de leur profil chromatographique sur TLC, les plaques sont visualisées sous lampe UV (254 et 365 nm) puis révélées avec un révélateur à base d'acide sulfurique et chauffées à 100°C pendant 3 minutes. Les résultats obtenus sont regroupés dans le **tableau [III.4.]** :

Lots de fractions	N° de fraction	Poids (mg)
6-8	CAP/3/1	97.1
9-10	CAP/3/2	120.8
11-13	CAP/3/3	80.2
14-15	CAP/3/4	20.3
16-18	CAP/3/5	17.6
19-21	CAP/3/6	130.5
22-24	CAP/3/7	257
25-28	CAP/3/8	115
29-30	CAP/3/9	79.4
31-33	CAP/3/10	189
34-35	CAP/3/11	93.4
36-37	CAP/3/12	64.9
38-41	CAP/3/13	78.9
42-49	CAP/3/14	61.3
50-62	CAP/3/15	69.1
63-66	CAP/3/16	38.9
67-78	CAP/3/17	29.7
79-83	CAP/3/18	18.7

Tableau III.4. Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait CHCl₃ / MeOH (90:10, v/v) de l'espèce *C. azel*.

❖ Etude de la fraction CAP/3/10

Nous avons procédé une séparation de CCP/3/10 par CLHP dans les conditions chromatographiques suivantes :

- Colonne et injecteur : Shimadzu C18 μ -phenomenex (25 cm x 10 mm, 10 μ m d'eau, 2.0 ml. min⁻¹) (Phase inverse).
- Détecteur : Shimadzu RID-10A.
- Pompe : Shimadzu LC-8A.
- Débit : 2 ml / min.
- Le volume injecté : 100 μ l.
- La concentration de la fraction : 100 mg/ml (dans le MeOH).
- Nombre d'injection : 6
- Masse de la fraction : 189 mg
- Le temps de l'injection : 36 min
- Phase mobile : MeOH / H₂O (35:65, v/v)

Le chromatogramme est représenté dans la **figure [III.6.]**:

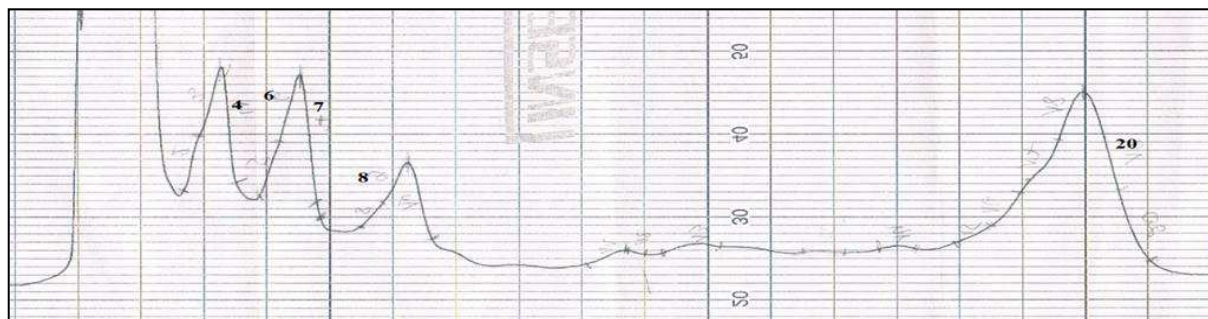


Figure III.6. Chromatogramme CLHP de la fraction CAP/3/10

Les résultats obtenus sont regroupés dans le **tableau [III.5.]**

Produits	Temps de rétention (min)	Poids (mg)
CAP/4/4	6.1	0.8
CAP/4/6	8	1.0
CAP/4/7	8.7	0.5
CAP/4/8	10.7	1.6
CAP/4/20	34.2	1.5

Tableau III.5. Les produits isolés de la sous fraction CAP/3/10

Cette séparation nous a permis d'obtenir quatre (4) produits purs CAP/4/4, CAP/4/6, CAP/4/7 et CAP/4/20.

❖ Etude de la fraction CAP/3/7

La fraction CAP/3/7 a été soumise à une séparation sur CLHP dans les conditions chromatographiques suivantes :

- Colonne et injecteur : Shimadzu C18 μ -phenomenex (25 cm x 10 mm, 10 μ m d'eau, 2.0 ml. min⁻¹) (Phase inverse).
- Détecteur : Shimadzu RID-10A.
- Pompe : Shimadzu LC-8A.
- Débit : 2 ml / min.
- Le volume injecté : 100 μ l.
- La concentration de la fraction : 100 mg/ml (dans le MeOH).
- Nombre d'injection : 5
- Masse de la fraction : 257 mg
- Le temps de l'injection : 36 min
- Phase mobile : MeOH / H₂O (35:65, v/v)

Le chromatogramme obtenu est représenté dans la **figure [III.7.]**:

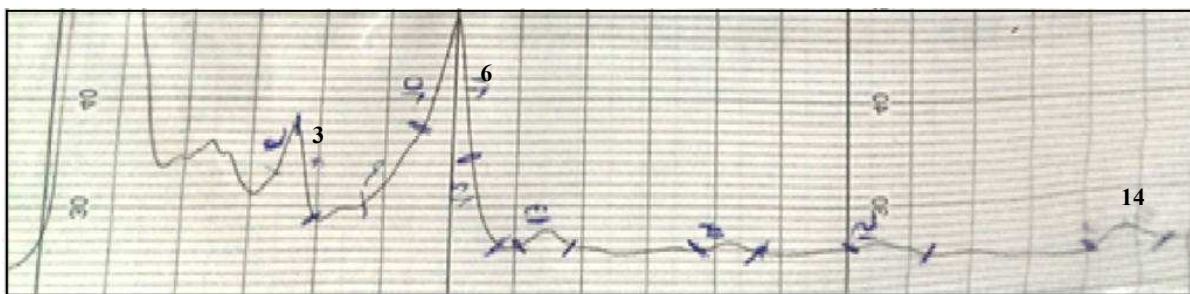


Figure.III.7. Chromatogramme CLHP de la fraction CAP/3/7

Les résultats obtenus sont regroupés dans le **tableau [III.6.]** :

Produits	Temps de rétention (min)	Poids (mg)
CAP/5/3	7.2	1.1
CAP/5/6	12	0.9
CAP/5/14	32.2	1.4

Tableau III.6. Les produits isolés de la sous fraction CAP/3/7.

Cette séparation nous a permis d'obtenir trois (3) produits purs **CAP/5/3**, **CAP/5/6** et **CAP/5/14**.

❖ Etude de la fraction CAP/3/8

La fraction CAP/3/8 a subi une séparation sur CLHP dans les conditions chromatographiques suivantes :

- Colonne et injecteur : Shimadzu C8 μ -phenomenex (25 cm x 10 mm, 10 μ m d'eau, 2.0 ml. min⁻¹) (Phase inverse).
- Détecteur : Shimadzu RID-10A.
- Pompe : Shimadzu LC-8A.
- Débit : 2 ml/min.
- Le volume injecté : 100 μ l.
- La concentration de la fraction : 100 mg/ml (dans le MeOH).
- Nombre d'injection : 5
- Masse de la fraction : 115 mg
- Le temps de l'injection : 34 min
- Phase mobile : MeOH / H₂O (20:80, v/v)

Le chromatogramme est représenté dans la **figure [III.8.]**

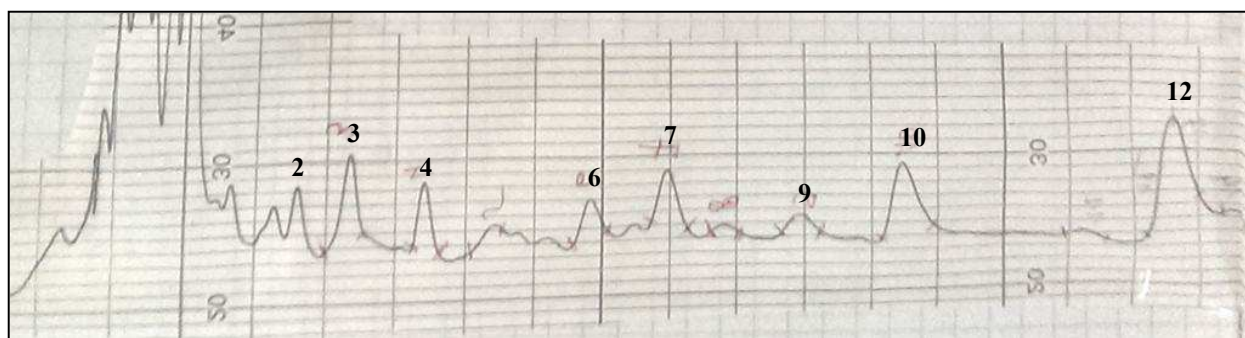


Figure III.8. Chromatogramme CLHP de la fraction CAP/3/8

Les résultats obtenus sont regroupés dans le **tableau [III.7]**

Produits	Temps de rétention (min)	Poids (mg)
CAP/6/2	6.9	1.2
CAP/6/3	8.1	0.9
CAP/6/4	10.8	0.4
CAP/6/6	15.1	0.2
CAP/6/7	17.2	0.3
CAP/6/9	21.3	0.6
CAP/6/10	24.4	0.9
CAP/6/12	32.7	1.1

Tableau III.7. Les produits isolés de la sous fraction CAP/3/8

Cette séparation nous a permis d'obtenir un seul (1) produit pur **CAP/6/2**.

III.2. Etude phytochimique de l'espèce *Calligonum comosum*

III.2.1. Description botanique de l'espèce

C'est une plante arbuste à branches rameuses et flexibles, sans tronc. Fleurs blanches petites, fruit de 1 à 2 cm portant des poils. Le fruit à en coupe une forme de croix. Plante excellent fixateur de dunes, une butte se forme au cours des années, sous la butte se trouvent les branches de la plante, et leur taille et nombre est impressionnant [1].

III.2.2. Place dans la systématique [2]

Règne	⇒	Plantae
Sous-règne	⇒	Tracheobionta
Embranchement	⇒	Spermaphytes
Sous-embranchement	⇒	Angiospermes
Classe	⇒	Dicotylédones
Sous-classe	⇒	Caryophyllidae
Ordre	⇒	Polygonales
Famille	⇒	Polygonaceae
Genre	⇒	<i>Calligonum</i>
Espèce	⇒	<i>comosum</i>

Classification phytogénétique : [2]

Super ordre	⇒	Caryophyllanae
Ordre	⇒	Caryophyllales
Famille	⇒	polygonaceae
Espèce	⇒	<i>comosum</i>



Figure III.9. L'espèce *Calligonum comosum*.

III.2.3. Etude bibliographique

La recherche bibliographique que nous avons menée a montré qu'une seule étude a été menée sur *Calligonum comosum*. Cette investigation a montré que cette plante est riche aux composés phénoliques [3], ce qui nous a donné une motivation pour la concrétisation de ce travail.

III.2.4. Matériel végétal

La plante *Calligonum Comosum* a été récoltée durant le mois d'Avril 2012 à Bechar. La plante a été séchée pendant plusieurs jours à l'ombre et pesée. La détermination botanique a été réalisée par le professeur Kaabache Mohamed (Département des sciences de la nature et de la vie, Université Ferhat Abbas, Sétif). Un spécimen (N° 122CC) a été déposé au niveau de l'herbier de l'unité de recherche VARENBIOMOL de l'Université des Frères Mentouri de Constantine.

III.2.5. L'extraction de l'espèce *Calligonum comosum*

L'étude phytochimique de *Calligonum comosum* est réalisée sur les parties aériennes. Les tiges préalablement séchées et coupées en petits morceaux. La quantité du matériel végétal obtenue (2,016 Kg) a subi une macération dans un mélange hydro-alcoolique (Méthanol / H₂O, 80:20, v/v) pendant 72 heures. Le premier extrait récupéré est concentré sous pression réduite à une température modérée (environ 35°C). La macération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant de 24 à 48 heures.

Les trois extraits hydro-alcooliques récupérés sont réunis et concentrés. A la solution obtenue, on ajoute de l'eau distillée (à raison de 400 ml d'eau distillée pour 1 kg de matière sèche). La solution ainsi obtenue est laissée au repos à froid pendant une nuit pour décantation. Cette dernière permet le dépôt de la chlorophylle, des cires, du sable, ... etc

Après filtration on obtient une solution aqueuse. Cette phase aqueuse subit une extraction de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par l'éther de pétrole, puis le chloroforme, puis l'acétate d'éthyle et en dernier le *n*-butanol.

Les trois dernières phases organiques sont concentrées à sec sous pression réduite, pesées et les rendements sont donnés dans le **tableau [III.8.]**. Le protocole d'extraction est résumé dans la **figure [III.10.]** :

Extraits	Masse (g)	Rendement (%)
Ether de Pétrole	3.1	0.15
Chloroforme	0.4	0.01
Acétate d'éthyle	18.2	0.90
<i>n</i> -Butanol	52.3	2.59

Tableau III.8. Masse et rendement d'extraction des extraits de *Calligonum comosum*

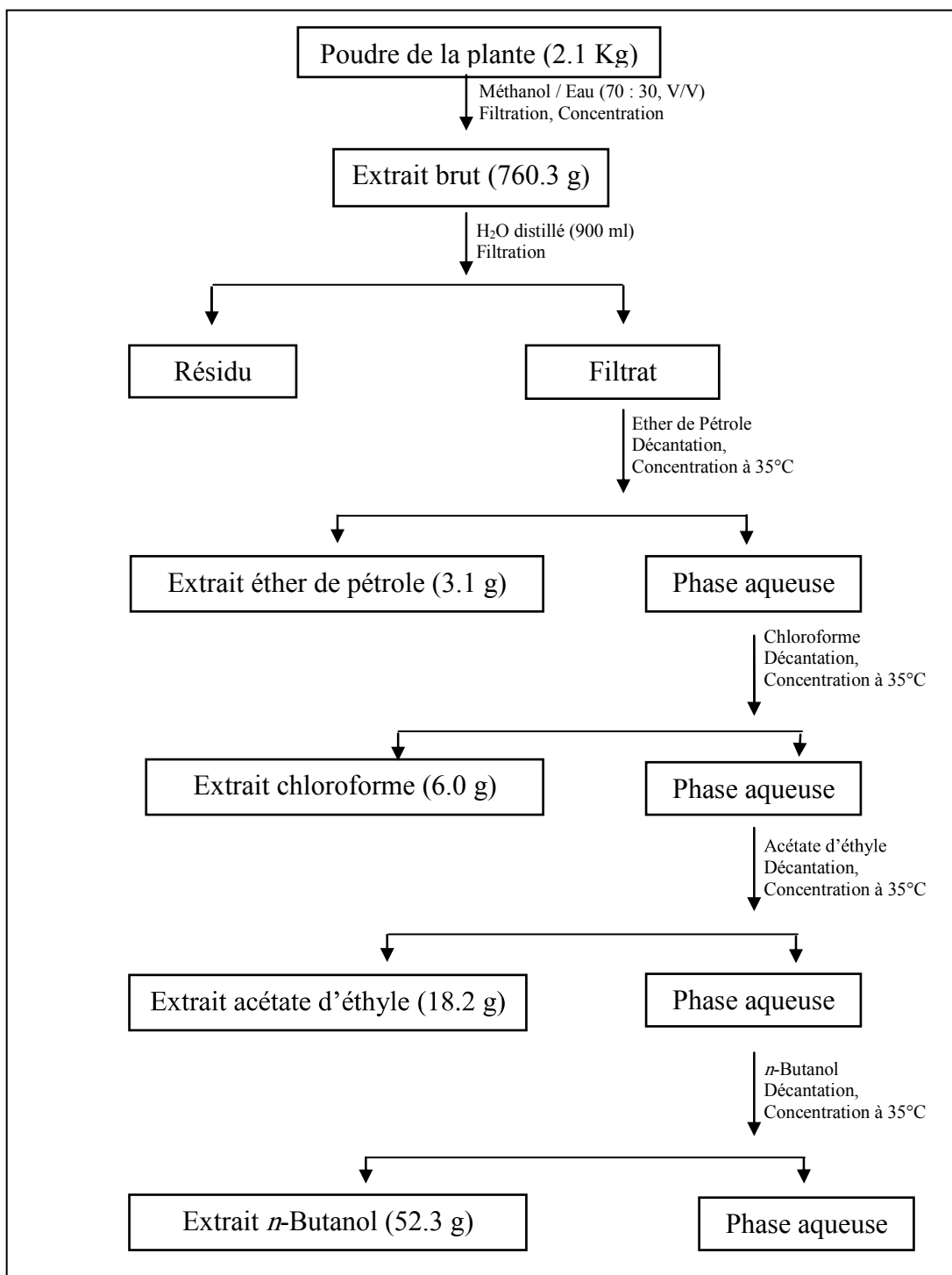


Figure III.10. Protocole d'extraction de l'espèce *Calligonum comosum*.

II.2.6. Contrôle chromatographique des extraits de *C. comosum*

II.2.6.1.a. Séparation de l'extrait acétate d'éthyle sur colonne

Des tests chromatographiques sur couche mince (CCM) de gel de silice ont été réalisés sur une feuille d'Aluminium, ces derniers nous a permis de sélectionner le meilleur système de séparation : $\text{CHCl}_3 / \text{CH}_3\text{COCH}_3$ (80:20, v/v).

Sur la base des résultats de ces tests, nous avons opté pour l'étude de la composante chimique de l'extrait acétate d'éthyle d'où 12 g ont été a été dissoute dans le méthanol et mélangée avec du gel de silice et évaporée à sec, en donnant une poudre solide qui est déposée sur une colonne de gel de silice (type 60, 230-400 mesh, Merck) préparée dans le chloroforme. L'élution a été réalisé avec un gradient d'acétone avec les gradients d'élutions : $\text{CHCl}_3 / \text{CH}_3\text{COCH}_3$ (100:0 à 0:100, v/v) et $\text{CH}_3\text{COCH}_3 / \text{MeOH}$ (100:0; 50:50; 0: 100, v/v). 105 pots de 100 ml ont été collectés. L'analyse par CCM de ces fractions avec visualisation par des lampes UV (254 et 366 nm) puis révélation avec l'anis aldéhyde suivie par un chauffage à 100 °C, permet d'obtenir 22 fractions (Tableau II.9). Ces dernières sont éluées par le système $\text{CHCl}_3 / \text{MeOH} / \text{H}_2\text{O}$ (80:18:2, v/v/v) et BAW (60:15:25, v/v/v). Les résultats obtenus sont regroupés dans le **tableau [III.9.]**:

Lots des fractions	N° de la fraction	CHCl ₃ (%)	CH ₃ COCH ₃ (%)	MeOH (%)	Poids (mg)
1	CCP/2/1	100	0	0	3934.8
2	CCP/2/2	98	2	0	95
3-4	CCP/2/3	96	4	0	57
5-19	CCP/2/4	94	6	0	79
20-23	CCP/2/5	90	10	0	83.4
24-29	CCP/2/6	80	20	0	87
30-33	CCP/2/7	76	24	0	511.5
34-37	CCP/2/8	70	30	0	899
38	CCP/2/9	66	34	0	1100.8
39	CCP/2/10	62	38	0	1042.3
40-44	CCP/2/11	60	40	0	786
45-49	CCP/2/12	55	45	0	174.7
50	CCP/2/13	50	50	0	197.9
51-54	CCP/2/14	45	55	0	556.8
55-59	CCP/2/15	30	70	0	282
60-69	CCP/2/16	25	75	0	361.5
70-79	CCP/2/17	15	85	0	756.8
80-89	CCP/2/18	10	90	0	923.4
90-93	CCP/2/19	5	95	0	1071.5
94-96	CCP/2/20	0	100	0	351.7
97-100	CCP/2/21	0	50	50	504.1
101-105	CCP/2/22	0	0	100	237.3

Tableau III.9. Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait Acétate d'éthyle de *C. comosum*.

III.2.6.1.b. Séparation et purification des fractions de *C. comosum* par CLHP

Toutes les fractions obtenues sont des mélanges plus ou moins complexes. Pour cette raison, nous avons étudié seulement sept fractions, les fractions CCP/2/9, CCP/2/14, CCP/3/5+6, CCP/3/9, CCP/8/9, CCP/8/14 et la fraction CCP/8/15

❖ Etude de la fraction CCP/2/9

La fraction CCP/2/9 a été soumise à une chromatographie par CLHP en utilisant les conditions chromatographiques suivantes :

- Colonne et injecteur : Shimadzu C8 μ -phenomenex (25 cm x 10 mm, 10 μ m d'eau, 2.0 ml. min⁻¹) (Phase inverse).
- Détecteur : Shimadzu RID-10A.
- Pompe : Shimadzu LC-8A.
- Débit : 2 ml / min.
- Le volume injecté : 100 μ l.
- La concentration de la fraction : 100 mg/ml (dans le MeOH).
- Nombre d'injection : 7
- Masse de la fraction : 556.8 mg
- Le temps de l'injection : 38 min
- Phase mobile : MeOH / H₂O (48:52, v/v)

Le chromatogramme est représenté dans la **figure [III.11.]**:

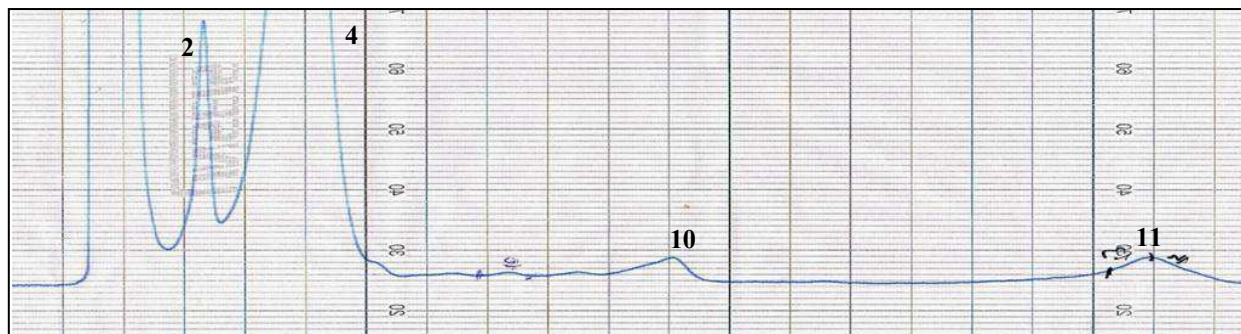


Figure III.11. Chromatogramme CLHP de la fraction CCP/2/9

Les résultats obtenus sont reportés sur le **tableau [III.10.]**.

Produits	Temps de rétention (min)	Poids (mg)
CCP/7/2	3.1	0.2
CCP/7/4	5.9	1.6
CCP/7/10	18	1.0
CCP/7/11	31	0.9

Tableau III.10. Les produits isolés de la sous fraction CCP/2/9

Cette séparation nous a permis d'obtenir un (1) produit pur CCP/7/4.

❖ Etude de la fraction CCP/2/14

La fraction CCP/2/14 a été soumise à une chromatographie par CLHP en utilisant les conditions chromatographiques suivantes :

- Colonne et injecteur : Shimadzu C8 μ -phenomenex (25 cm x 10 mm, 10 μ m d'eau, 2.0 ml. min⁻¹) (Phase inverse).
- Détecteur : Shimadzu RID-10A.
- Pompe : Shimadzu LC-8A.
- Débit : 2 ml / min.
- Le volume injecté : 100 μ l.
- La concentration de la fraction : 100 mg/ml (dans le MeOH).
- Nombre d'injection : 7
- Masse de la fraction : 556.8 mg
- Le temps de l'injection : 48 min
- Phase mobile : MeOH / H₂O (30:70, v/v)

Le chromatogramme est représenté dans la **figure [III.12.]**:

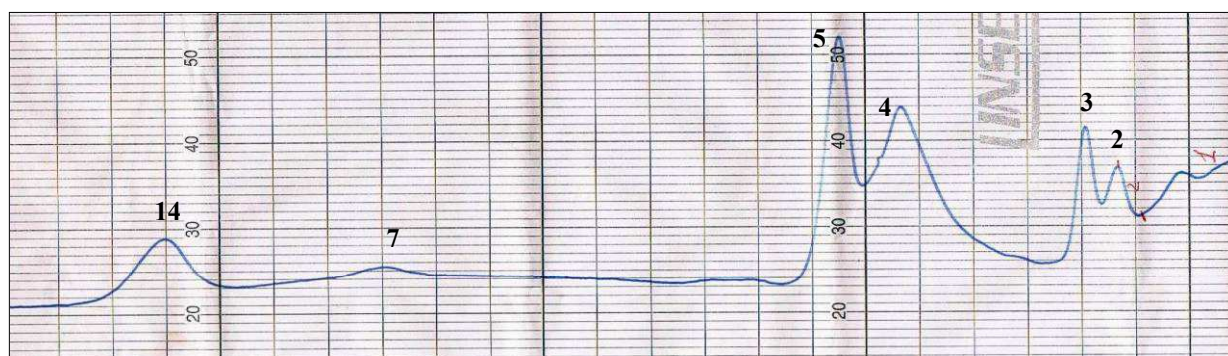


Figure III.12. Chromatogramme CLHP de la fraction CCP/2/14

Les résultats sont reportés sur le **tableau [III.11.]**:

Produits	Temps de rétention (min)	Poids (mg)
CCP/4/2	8	0.2
CCP/4/3	9.2	0.3
CCP/4/4	16.8	0.4
CCP/4/5	18.3	0.7
CCP/4/7	34.7	0.9
CCP/4/14	42.3	1.0

Tableau III.11. Les produits isolés de la sous fraction **CCP/2/14**

Cette séparation nous a permis d'obtenir un (2) produits purs **CCP/4/14** et **CCP/4/15**

II.2.6.1.c. Séparation de l'extrait *n*-Butanol sur colonne

2.500 g de l'extrait *n*-butanol ont été fractionnés par chromatographie sur colonne de Sephadex LH20. L'élution a été réalisée avec le méthanol. Des fractions de 10 ml / 10min sont recueillies, leur suivi est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice. L'examen de plaques CCM est réalisé sous lumière UV à 254 nm et à 365 nm avec élution dans les systèmes CH₃Cl / MeOH / H₂O (80:18:2, v/v/v) et BAW (60:15:25, v/v/v) puis révélation avec le Ce(SO₄)₂ / H₂SO₄ et chauffées pendant 3 min à 100°C. Les fractions de compositions similaires sont rassemblées et évaporées. 17 fractions ont été ainsi obtenues. Les résultats de cette colonne sont rassemblés dans le **tableau [III.12.]**.

Lots des fractions	N° de fraction	Poids (mg)
1-10	CCP/3/1	10.2
11-12	CCP/3/2	9.9
13-18	CCP/3/3	12.6
19-22	CCP/3/4	19.4
23-24	CCP/3/5	54.6
25-28	CCP/3/6	55.9
29-31	CCP/3/7	19.2
32-33	CCP/3/8	10.2
34-38	CCP/3/9	113.1
39-41	CCP/3/10	40.9
42-51	CCP/3/11	36.9
52-54	CCP/3/12	15.8
55	CCP/3/13	6.4
56-63	CCP/3/14	33.7
64-72	CCP/3/15	39.7
73-113	CCP/3/16	45.9
114-120	CCP/3/17	65.8

Tableau III.12. Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de Sephadex de L'extrait *n*-butanol de *Calligonum comosum*

II.2.6.1.d. Purification des fractions de l'extrait *n*-Butanol

Le poids important et la simplicité des fractions CCP/3/5+6 et CCP/3/9 nous a permis d'étudier ces deux fractions jusqu'à la détermination structurale de principaux composés isolés.

❖ Etude de la fraction CCP/3/5+6

La fraction CCP/3/5+6 a été soumise à une chromatographie par CLHP en utilisant les conditions chromatographiques suivantes :

- Colonne et injecteur : Shimadzu C8 μ -phenomenex (25 cm x 10 mm, 10 μ m d'eau, 2.0 ml. min⁻¹) (Phase inverse).
- Détecteur : Shimadzu RID-10A.
- Pompe : Shimadzu LC-8A.
- Débit : 2 ml / min.
- Le volume injecté : 100 μ l.
- La concentration de la fraction : 100 mg/ml (dans le MeOH).
- Nombre d'injection : 5
- Masse de la fraction : 110.5 mg
- Le temps de l'injection : 44 min
- Phase mobile : MeOH / H₂O (40:60, v/v)

Le chromatogramme obtenu est représenté dans la **figure [III.13.]**:

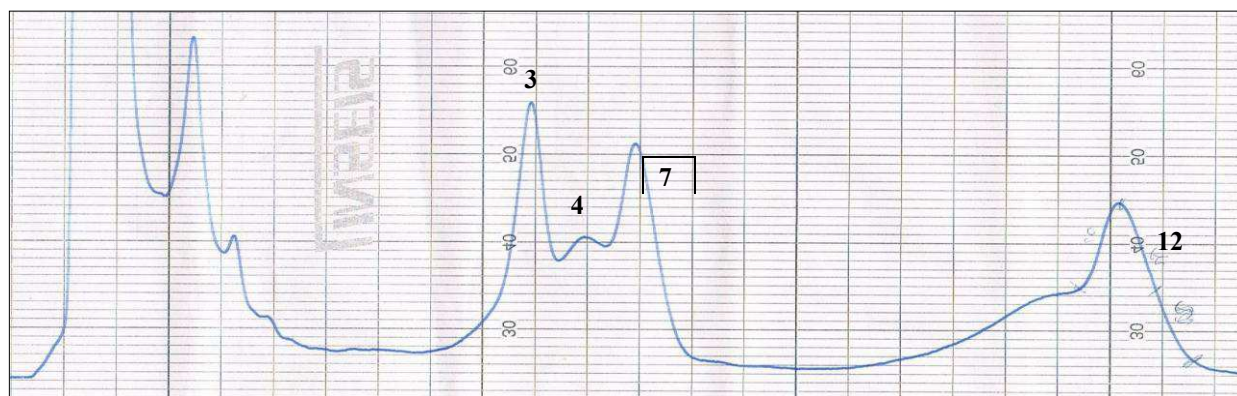


Figure III.13. Chromatogramme CLHP de la fraction CCP/3/5+6

Les résultats sont reportés sur le **tableau [III.13.]** :

Produits	Temps de rétention (min)	Poids (mg)
CCP/9/3	17.1	0.9
CCP/9/4	19.8	0.6
CCP/9/7	21.9	1.1
CCP/9/12	40.4	1.6

Tableau III.13. Les produits isolés de la sous fraction CCP/3/5+6

Cette séparation nous a permis d'obtenir trois (3) produits purs **CCP/9/3**, **CCP/9/7** et **CCP/9/12**.

❖ Etude de la fraction **CCP/3/9**

Afin de séparer les différents pics de cette fraction nous avons utilisé les conditions chromatographiques suivantes :

- Colonne et injecteur : Shimadzu C8 μ -phenomenex (25 cm x 10 mm, 10 μ m d'eau, 2.0 ml. min⁻¹) (Phase inverse).
- Détecteur : Shimadzu RID-10A.
- Pompe : Shimadzu LC-8A.
- Débit : 2 ml / min.
- Le volume injecté : 100 μ l.
- La concentration de la fraction : 100 mg/ml (dans le MeOH).
- Nombre d'injection : 5
- Masse de la fraction : 113.1 mg
- Le temps de l'injection : 82 min
- Phase mobile : MeOH / H₂O (35:65, v/v)

Les résultats obtenus sont regroupés dans le **tableau [III.14.]**

Produits	Temps de rétention (min)	Poids (mg)
CCP/6/3	43	1.2
CCP/6/4	78	0.4

Tableau III.14. Les produits isolés de la sous fraction **CCP/3/9**

Cette séparation nous a permis d'obtenir un (1) produit pur **CCP/6/3**.

III.2.6.1.c. Séparation de l'extrait Chloroforme sur colonne

L'extrait Chloroforme (2.500 g) dissout dans le méthanol et déposée sur la colonne de gel de silice, préparée dans le chloroforme. La masse de gel de silice utilisée est de 125 g. L'élution a été effectuée par le chloroforme enrichi progressivement avec méthanol. Les fractions obtenus sont regroupées suivant la similitude de leurs profils chromatographique sur

des plaques CCM, qui après développement dans des cuves en verre avec des systèmes approprié, ont été visualisées sous lampe UV à 254 et 365 nm, puis révélées et chauffées pendant 1 min à 100 °C, les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau [III.15.]**.

Lots des fractions	CHCl ₃	MeOH	N° de fraction	Poids (mg)
1-11	100	0	CCP/8/1	88.5
12-18	100	0	CCP/8/2	59.6
19-24	100	0	CCP/8/3	18.0
25-28	100	0	CCP/8/4	13.6
29-33	100	0	CCP/8/5	16.2
34-36	100	0	CCP/8/6	43.3
37-38	100	0	CCP/8/7	160.5
39-46	100	0	CCP/8/8	430.8
47-56	99	1	CCP/8/9	188.4
57-59	98	2	CCP/8/10	14.3
60-63	98	2	CCP/8/11	17.0
64-77	98	2	CCP/8/12	5.5
78-85	98	2	CCP/8/13	79.2
86-95	98	2	CCP/8/14	230.3
96-101	97	3	CCP/8/15	214.2
102-110	97	3	CCP/8/16	103.2
111-129	95	5	CCP/8/17	73.9
130-138	80	20	CCP/8/18	31.6
139-145	70	30	CCP/8/19	96.4
146-156	50	50	CCP/8/20	98.4
157-159	30	70	CCP/8/21	21.6
160-165	0	100	CCP/8/22	59.8

Tableau III.15. Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait Chloroforme de *C. comosum*

II.2.6.1.e. Purification des fractions de l'extrait Chloroforme

La richesse de l'extrait et la difficulté de certaines séparations surtout par la présence de la chlorophylle, nous avons eu recours à divers systèmes chromatographiques. Pour les fractions étudiées, nous avons utilisé CLHP.

❖ Etude de la fraction CCP/8/9

La fraction CCP/8/9 a été chromatographiée par CLHP dans les conditions suivantes :

- Colonne et injecteur : Shimadzu C18 μ -phenomenex (25 cm x 10 mm, 10 μ m d'eau, 2.0 ml. min⁻¹) (Phase inverse).
- Détecteur : Shimadzu RID-10A.
- Pompe : Shimadzu LC-8A.
- Débit : 2 ml / min.
- Le volume injecté : 100 μ l.
- La concentration de la fraction : 100 mg/ml (dans le MeOH).
- Nombre d'injection : 5
- Masse de la fraction : 188.4 mg
- Le temps de l'injection : 16 min
- Phase mobile : MeOH / H₂O (62:38, v/v)

Le chromatogramme obtenue est représenté dans la **figure [III.14.]**:

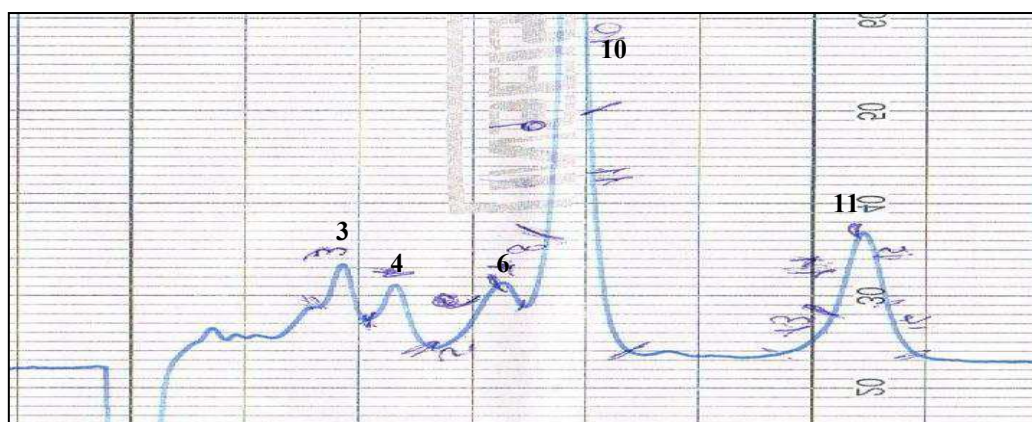


Figure III.14. Chromatogramme CLHP de la fraction CCP/8/9

Les résultats sont regroupés dans le **tableau [III.16.]** :

Produits	Temps de rétention (min)	Poids (mg)
CCP/10/3	5.4	0.8
CCP/10/4	6.3	0.4
CCP/10/6	8.3	0.9
CCP/10/10	9.8	0.5
CCP/10/11	14.3	1.5 (pur)

Tableau III.16. Les produits isolés de la sous fraction **CCP/8/9**

Cette séparation nous a permis d'obtenir un (1) produit pur **CCP/10/11**.

❖ Etude de la fraction CCP/8/14

Nous avons procédé une séparation de CCP/8/14 par CLHP dans les conditions chromatographiques suivantes :

- Colonne et injecteur : Shimadzu C18 μ -phenomenex (25 cm x 10 mm, 10 μ m d'eau, 2.0 ml min⁻¹) (Phase inverse).
- Détecteur : Shimadzu RID-10A.
- Pompe : Shimadzu LC-8A.
- Débit : 2 ml / min.
- Le volume injecté : 100 μ l.
- La concentration de la fraction : 100 mg/ml (dans le MeOH).
- Nombre d'injection : 5
- Masse de la fraction : 230.3 mg
- Le temps de l'injection : 36 min
- Phase mobile : MeOH / H₂O (45:55, v/v)

Le chromatogramme est représenté dans la **figure [III.15.]**:

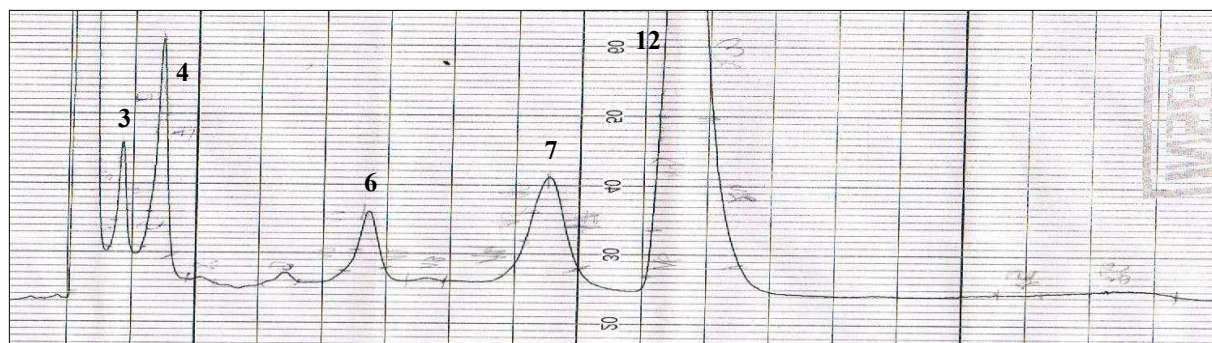


Figure III.15. Chromatogramme CLHP de la fraction **CCP/8/14**

Les résultats sont regroupés dans le **tableau [III.17.]**:

Produits	Temps de rétention (min)	Poids (mg)
CCP/11/3	1.1	0.9
CCP/11/4	3	0.8
CCP/11/6	9.1	1.6
CCP/11/7	14.3	1.7
CCP/11/12	18	1.8
CCP/11/16	31	1.9

Tableau III.17. Les produits isolés de la sous fraction **CCP/8/14**

Cette séparation nous a permis d'obtenir un (01) produit pur **CCP/11/12**.

❖ Etude de la fraction CCP/8/15

La fraction CCP/8/15 a été soumise à une chromatographie par CLHP dans les conditions suivantes :

- Colonne et injecteur : Shimadzu C18 μ -phenomenex (25 cm x 10 mm, 10 μ m d'eau, 2.0 ml. min⁻¹) (Phase inverse).
- Détecteur : Shimadzu RID-10A.
- Pompe : Shimadzu LC-8A.
- Débit : 2 ml / min.
- Le volume injecté : 100 μ l.

- La concentration de la fraction : 100 mg/ml (dans le MeOH).
- Nombre d'injection : 5
- Masse de la fraction : 188.4 mg
- Le temps de l'injection : 58 min
- Phase mobile : MeOH / H₂O (40:60, v/v)

Le chromatogramme est représenté dans la **figure [III.16.]**:

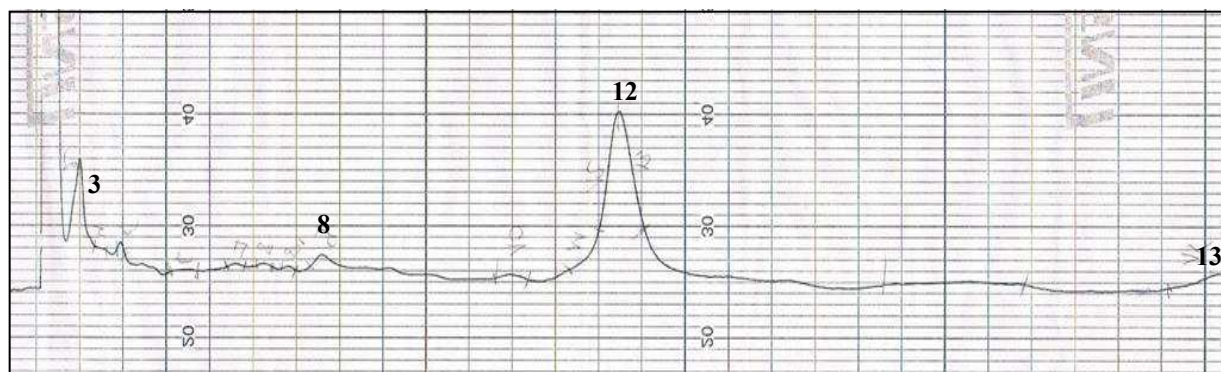


Figure III.16. Chromatogramme CLHP de la fraction **CCP/8/15**

Les résultats sont regroupés dans le **tableau [III.18.]**:

produits	Temps de rétention (min)	Poids (mg)
CCP/12/3	1.3	0.9
CCP/12/8	12.5	0.9
CCP/12/12	26	1.6
CCP/12/13	52.3	1.7

Tableau III.18. Les produits isolés de la sous fraction **CCP/8/15**

Cette séparation nous a permis d'obtenir un (1) produit pur **CCP/12/8**.

III.3. Etude des activités biologiques des espèces étudiées

III.3.1. Etude des activités anti-oxydantes

L'utilisation d'antioxydants est nécessaire dans les industries cosmétiques, agroalimentaires en tant que conservateurs des corps gras. Or, dans l'oxydation d'un corps gras, en contact avec l'oxygène de l'air, ou inclus dans une membrane biologique, intervient un type particulier d'intermédiaires à courte durée de vie, les radicaux libres, qu'il convient de neutraliser pour assurer sa protection. C'est pourquoi les substances anti-oxydantes sont souvent anti-radicalaires [3]. Les radicaux libres sont également produits dans notre organisme sous l'action de facteurs déclenchant externes (UV, fumées de combustion, solvants, ...), mais également dans le cadre de phénomènes biologiques importants, comme respiration cellulaire. La production permanente de ces molécules réactives dans notre corps est généralement contrôlée par l'action de systèmes enzymatiques ou d'antioxydants. Lorsque cet équilibre précaire est rompu en faveur des radicaux libres, il se produit un stress oxydatif. Par les dommages ainsi causés à nos cellules, ces différents mécanismes semblent jouer un rôle prépondérant dans les phénomènes du vieillissement et engendrer des pathologies telles que des cancers et de troubles neuro-dégénératifs. L'apport exogène d'antioxydants pourrait donc ralentir, voire prévenir, ces désordres physiologiques [4].

III.3.1.1. Evaluation de l'activité antioxydante par trois tests DPPH, ABTS et FRAP

L'évaluation de l'activité anti-oxydante peut se réaliser selon plusieurs méthodes. Au cours de cette étude nous avons choisi d'évaluer l'activité antioxydante par trois tests : le test DPPH, le test ABTS et le test FRAP.

III.3.1.1.a. Principe du test DPPH

L'activité anti radicalaire est mesurée par la dégradation du **DPPH** (2,2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl), qui est un radical synthétique présentant une intense coloration violette. La couche électronique de ce radical est saturée en contact d'antioxydants, ce qui explique la disparition de sa coloration. Cette décoloration explique le pouvoir de l'extrait de la plante à piéger ce radical, qu'on peut détecter par un spectrophotomètre UV.

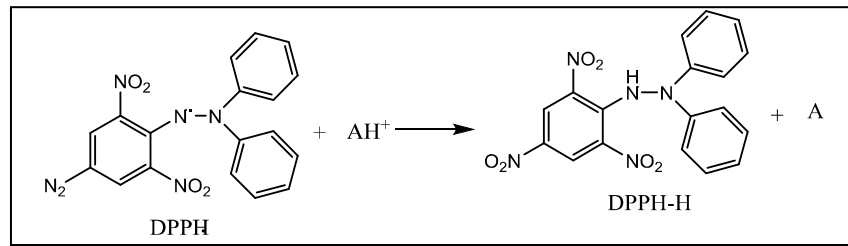


Figure III.17. Mécanisme d'action du DPPH.

III.3.1.1.b. Principe du test ABTS

Ce test est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique ABTS⁺ (sel d'ammonium de l'acide 2, 2'- Azino Bis-(3-éthylbenzoThiazoline-6-Sulfonique)) de coloration bleu verdâtre. Ce radical cationique est formé suite à l'oxydation de l'ABTS initialement incolore avec les différents composés comme le phosphate de potassium (KH₂PO₄) et le 2,2'-azo-bis (2-amidino-propane) dihydro-chloride (AAPH). Ainsi, la réaction se déroule en deux étapes : au cours de la première étape le radical ABTS⁺ est formé par arrachement d'un électron (e⁻) à un atome d'azote de l'ABTS. La deuxième se déroule en présence de Trolox (ou d'antioxydant donneur de H), le radical d'azote concerné piège un H, conduisant à l'ABTSH⁺, ce qui entraîne la décoloration de la solution

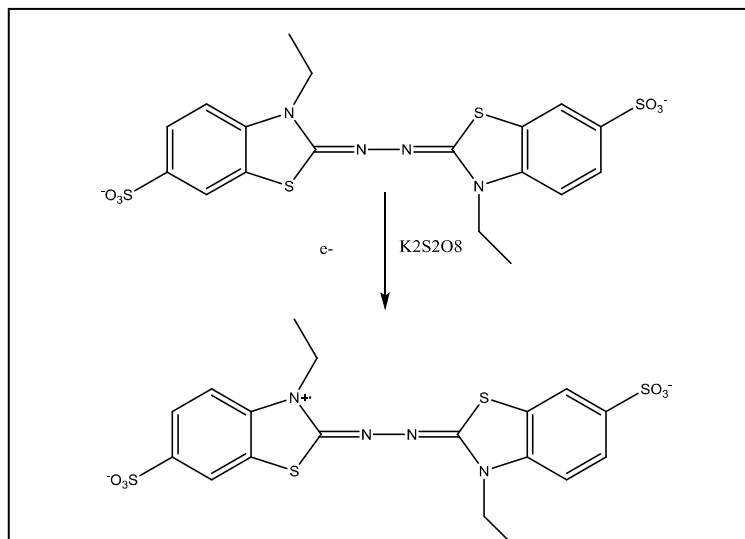


Figure III.18. Génération du radical cation de l'ABTS

III.3.1.1.c. Principe du test FRAP

L'essai de **FRAP** (**F**erric **R**educing/**A**ntioxidant **P**ower) a été réalisé selon la méthode décrite par (Benzie et Strain, 1996) [5]. Cette méthode mesure le pouvoir réducteur des antioxydants présents dans un mélange par leur capacité de réduire le tripyridyl-triazine ferrique (Fe^{3+} -TPTZ) en ferreux (Fe^{2+} -TPTZ) à pH acide.

III.3.1.2. Méthodes utilisées

III.3.1.2.a. Test DPPH

L'estimation de cette activité anti-radicalaire est mesurée selon la méthode de (Tepe et al. 2005) [6]. Un aliquote de 90 μL de l'extrait à différentes concentrations, est mélangé avec 810 μL d'une solution de DPPH. Après agitation vigoureuse du mélange, il est conservé au repos pendant 30 min à l'obscurité. L'absorbance est mesurée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre-UV visible, en se référant à un témoin sans extrait. L'activité anti-radicalaire est estimée en pourcentage d'inhibition grâce à la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = [(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{E}}) / A_{\text{DPPH}}] \times 100.$$

A_{E} : absorbance de l'extrait.

A_{DPPH} : absorbance du témoin.

En modifiant les concentrations des extraits et en calculant les pourcentages d'inhibition, on va établir une courbe de régression linéaire qui relie les différentes concentrations et les pourcentages d'inhibition. A partir de cet abaque, on détermine l' IC_{50} qui correspond à la concentration de l'échantillon qui entraîne 50% d'inhibition. Notons que l'activité antioxydante est inversement proportionnelle à la valeur de l' IC_{50} . Ainsi, l'échantillon qui présente l' IC_{50} la plus faible est celui qui présente l'activité anti-radicalaire la plus importante. Le **BHT** (**H**ydroxy **T**oluène **B**utylé) a été utilisé comme standard.

III.3.1.2.b. Test ABTS

La méthode utilisée est celle décrite par (Re et al. 1999) [7]. Ainsi, Une solution mère de 7 mmol/L de solution aqueuse d'acide 2,2-azino-bis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique (ABTS) a été préparée. Les cations radicalaires ABTS (ABTS⁺) Ont été produits par la réaction de la solution mère d'ABTS avec 2,45 mmol/l de K₂S₂O₈. Le mélange a été laissé au repos pendant 15 heures dans l'obscurité à température ambiante. La solution a été diluée avec de l'éthanol pour obtenir une absorbance de $0,7 \pm 0,02$ unité à 734 nm. Les échantillons ont été dissous séparément dans de l'éthanol pour donner les concentrations suivantes: 0,125, 0,25, 0,5, 1 et 2 mg/ml. Afin de mesurer l'activité antioxydante FSLE, 10 µl de chaque échantillon ont été ajoutés à 990 µL d'ABTS⁺ dilué à différentes concentrations. L'absorbance a été lue après 20 min. L'effet antioxydant de chaque échantillon a été exprimé en pourcentage d'inhibition (%). Le pourcentage de balayage ABTS⁺ a été calculé comme suit:

$$\% \text{ inhibition} = ((A_{\text{ABTS}} - A_{\text{E}}) / A_{\text{ABTS}}) \times 100$$

A_{E} : absorbance de l'extrait.

A_{ABTS} : absorbance du témoin.

La concentration de FSLE fournissant 50% de l'activité de piégeage des radicaux (EC50) a été calculée à partir du graphique du pourcentage d'activité de piégeage des radicaux par rapport à la concentration d'extrait de feuilles et le Trolox a été utilisé comme standard. Les résultats représentent les moyennes de trois expériences différentes.

III.3.1.2.c. Test FRAP

Une solution fraîche du réactif FRAP a été préparé quotidiennement en mélangeant 10 volumes de tampon acétate 300 mM, pH 3,6, avec 1 volume de TPTZ 10 mM (2, 4, 6-tri (2-pyridyl) -s- triazine) dans de l'acide chlorhydrique 40 mM. et avec 1 volume de chlorure de 20 mM ferric (FeCl). Une courbe standard a été préparée en utilisant diverses concentrations de sulfate ferreux. Toutes les solutions ont été utilisées le jour de la préparation. 100 µl de solutions d'échantillon et 300 µl d'eau dés ionisée ont été ajoutés à 3 ml de réactif FRAP fraîchement préparé. Le mélange réactionnel a été incubé pendant 30 minutes à 37°C dans un

bain d'eau, puis l'absorbance des échantillons a été mesurée à 593 nm. Une lecture à blanc en utilisant un tampon **BHA (Hydroxy Anisole Butylé)** a également été prise. La différence entre l'absorbance de l'échantillon et l'absorbance du blanc a été déterminée et utilisée pour calculer la valeur FRAP [5].

Dans ce test, la capacité réduite des extraits de plantes testés a été calculée en référence au signal de réaction donné par une solution de Fe (II). Les valeurs de FRAP ont été exprimées en mmol Fe (II) / g d'échantillon. Toutes les mesures ont été effectuées en trois exemplaires.

Le paramètre **EC1 (Concentration Equivalente 1)** des extraits et standard a été calculée à 4 et 30 minutes. L'EC1 est défini comme la concentration de l'antioxydant qui donne une réduction du TPTZ équivalente à 1 mM du $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, c'est la concentration de l'antioxydant donnant une augmentation dans l'absorbance à 593 nm équivalente à la valeur théorique de l'absorbance donnée par une concentration de 1 mM du FeSO_4 déterminée par l'équation de régression correspondante.

III.3.2. Etude de l'activité antimicrobienne et antifongique

Cette étude est réalisée au niveau de l'Institut Supérieur de Biotechnologie de Monastir, Université de Monastir-Tunisie et en collaboration avec le Laboratoire de Traitement et Valorisation des Rejets Hydriques (Centre de Recherches et de Technologie des Eaux; Technopole de Borj Cédria-tunisie); L'activité antibactérienne des extraits a été déterminée par la méthode de diffusion sur gélose.

III.3.2.1. Définitions

III.3.2.1.a. Les bactéries

Les bactéries sont des organismes vivants qui ne sont constitués que d'une seule cellule: on dit qu'ils sont unicellulaires. Dotés d'une membrane cellulaire et d'un matériel génétique (ADN), les bactéries sont capables d'assumer les fonctions élémentaires propres au vivant : se reproduire, transmettre l'information génétique, mais aussi tirer matière et énergie de l'environnement. Elles possèdent une certaine autonomie et un métabolisme propre [8].

Les bactéries nocives peuvent être combattues par les antibiotiques. Ce sont souvent des molécules synthétiques qui vont détruire ou bloquer la croissance des bactéries. Ils agissent de

manière spécifique sur celles-ci, en bloquant la synthèse de la paroi de la cellule ou en inhibant leur métabolisme. L'avantage de ce traitement est qu'il est suffisamment sélectif pour ne viser que les bactéries : il n'aura donc aucun impact (sauf exception) sur les cellules du patient traité [9].

III.3.2.1.b. Microorganismes testés

Dans cette étude, nous avons utilisés plusieurs bactéries à Gram positif et à Gram négatif communément associées à des infections humaines ou associées à des cas de toxi-infections alimentaires par ces bactéries (*Salmonella typhimurium* ATCC 1408; *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802; *Listeria monocytogenes* ATCC 19115; *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Bacillus cereus* ATCC 11778; *Salmonella typhimurium* DT 104; *Staphylococcus epidermidis* CIP 106510). Nous avons aussi utilisé quatre levures du genre *Candida* fréquemment associées à des cas de mycoses humaines (*Candida albicans* ATCC 2019; *Candida tropicalis* 06-085; *Candida krusei* ATCC 6258; *Candida parapsilosis* ATCC 22019).

III.3.2.1.c. Diffusion sur gélose « aromatoگرامme »

La détermination de l'activité antibactérienne et antifongique des différents extraits organiques Chloroforme, Acétate d'éthyle et Méthanol des deux espèces *Calligonum azel* et *Calligonum comosum* a été réalisée selon la méthode adoptée par (Snooussi et al. 2016) [10] et (Noumi et al. 2010) [11]. Les différentes bactéries testées ont été enrichies dans du bouillon MH (Mueller Hinton) et incubées à 37°C pendant 24 heures. Les levures du genre *Candida* ont-elles aussi été incubées à 37°C dans du bouillon Sabouraud pendant 24 à 48 heures. La densité cellulaire des bactéries a été ajustée à 10^8 UFC/ml correspondant à une densité optique de l'ordre de (0,1) à une longueur d'onde 600nm. La concentration en cellules fongiques a été estimée à (0,38) mesurée à une longueur d'onde 540 nm (correspondant à 10^8 UFC/ml). Des boites de forme carrée en polystyrène (12cmx12cm) contenant les milieux gélosés Mueller Hinton et Sabouraud chloramphénicol ont été inondées par les suspensions microbiennes en utilisant la méthode d'écouvillonnage recommandées par la Société Française de Microbiologie (EUCAST-SFM, 2017). Ces boites ont été placées à 37°C pendant 15 minutes avant le dépôt des disques.

Les différents extraits secs des deux espèces ont été ré-suspendus dans le solvant d'extraction, et une solution mère de départ a été préparée à une concentration finale de l'ordre de 150 mg/ml.

Par la suite les disques en papier Whatman (diamètre 6 mm, Biolife Italie) ont été imprégnés par 20 microlitres des différentes solutions mères préparées (3 mg/disque) sont déposés à la surface de gélose puis les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 heures. La lecture se fait par la mesure des diamètres des zones d'inhibition (exprimés en mm). Chaque diamètre est représenté par la moyenne de trois mesures.

Des disques imprégnés d'ampicilline sont utilisés (10 mg/ml) comme témoins positifs dans les tests de l'activité antibactérienne. L'amphotéricine B (1 mg/ml) est utilisée comme témoin positif dans les tests de l'activité antifongique.

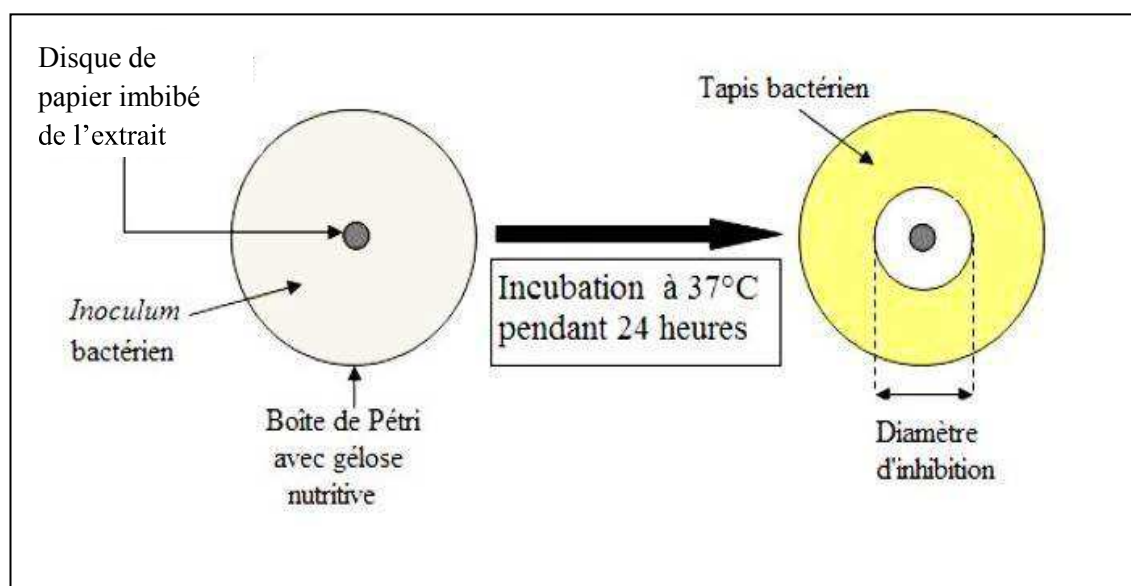


Figure.III.19. Principe de la méthode de diffusion sur disque.

III.3.3. Activité anti-inflammatoire et antioxydante

Dans le cadre de notre étude phytochimique sur les deux plantes médicinales *Calligonum azel* et *Calligonum comosum*, nous avons mené également à leur éventuelle activité antiproliférative contre les monocytes / macrophages murins (J774.A1) sur certains produits purs isolés.

Les composés les plus abondants, le acide ethyl ester protocatachuique (CCP/11/12), acide- α,β -diamino (-4-hydroxy benzene) butanoïque (CAP/5/3), la tamgermanetin (CCP/12/8), l'acide 5- (p-hydroxy-phényl) -3-hydroxy-pentanoïque (CAP/5/6) et acide 5-(p-hydroxy-phenyl)-pent-2-en (CAP/5/14 : nouveau composé), ont été testés pour évaluer leurs activités antioxydantes et anti-inflammatoire sur les cellules J774A.1 et Jurkat.

III.3.3.1. Etude de l'activité anti-inflammatoire

III.3.3.1.a. Cultures cellulaires

Des lignées cellulaires J774A.1 (monocytes macrophages murins) et Jurkat (leucémies à cellules T) ont été obtenues auprès de l'American Type Cell Culture (ATCC) (Rockville, MD, USA). Les cellules ont été maintenues dans du DMEM (J774A.1) ou du RPMI 1640 (Jurkat), additionné de 10% de sérum de veau fœtal (FCS), de 25 mM (acide 4- (2-hydroxyéthyl) -1-pipérazine-éthanesulfonique (HEPES), glutamine 2 mM. , 100 ug / ml de pénicilline et 100 mg / ml de streptomycine à 37 °C dans une atmosphère de 5% de CO₂. Les macrophages J774A.1 ont été étalés dans des plaques à 96 puits (5,0 x 10⁴) pour 3- (4,5-diméthylthiazol-2yl) essai au bromure de -2,5-phényl-2H-tétrazolium (MTT) ou dans des plaques à 24 puits (3,0 x 10⁵) pour la production de NO et de ROS et laissé adhérer pendant 4h, après quoi le milieu a été remplacé par du milieu frais pur ou contenant dilutions en série des composés testés (100-12,5 μ M) pendant 24, 48 et 72h pour le test MTT, ou pendant 1h puis co-exposition à une concentration finale de LPS (1 μ g / mL) pendant 24h supplémentaires pour la libération de NO ou pendant 1h, puis co-exposition à une concentration finale de H₂O₂ (1 mM) pendant 1h pour la détection de ROS.

III.3.3.1.b. méthode du test anti-inflammatoire

Des macrophages J774A.1 (5 x 10⁴ / puits) ont été placés sur des plaques à 96 puits et laissés à adhérer pendant 4h. Par la suite, le milieu a été remplacé par un milieu frais seul ou contenant des dilutions en série des composés (100-12,5 μ M) ensuite les cellules ont été incubées pendant 24, 48 et 72h. La viabilité cellulaire a été évaluée par un test MTT comme indiqué précédemment [12]. Brièvement, 25 μ l de MTT (5 mg / ml) ont été ajoutés et les cellules ont été incubées pendant 3 heures supplémentaires. Ensuite, les cellules ont été lysées et les cristaux bleu foncé solubilisés avec 100 μ L d'une solution contenant 50% (mL/L) de N,

N-diméthylformamide, 20% (mL/L) de dodécylsulfate de sodium (SDS) avec un pH ajusté de 4,5. La densité optique (DO) de chaque puits a été mesurée avec un spectrophotomètre à microplaques Titertek (Dasit, Cornaredo, Milan, Italie), équipé d'un filtre de 620 nm. La viabilité des cellules en réponse au traitement a été calculée comme suit:

$$\% \text{ de cellules mortes} = 100 - (\text{DO traité} / \text{contrôle OD}) \times 100.$$

III.3.3.1.c. Mesure de libération de NO

La génération de NO a été mesurée en nitrite (NO^{2-}), indice de NO libéré par les cellules, dans le milieu de culture des macrophages J774A.1 24h après stimulation par LPS par réaction de Griess [13].

100 μl de milieu de culture cellulaire ont été mélangés avec 100 μl de réactif de Griess, des volumes égaux de 1% (v:v) de sulfanilamide dans 5% (v:v) d'acide phosphorique et 0,1% (v:v) de naphthyléthylènediamine-chlorure d'hydrogène, incubé à température ambiante pendant 10 minutes, puis l'absorbance a été mesurée à 550 nm dans un lecteur de microplaques Titertek. La quantité de NO^{2-} dans les échantillons mesurés est exprimée en concentration de μM , qui a été calculée par une courbe standard de NO^{2-} sodium.

III.3.3.2. Etude de l'activité antioxydante de quelques produits isolés

III.3.3.2.a. Mesure de ROS intracellulaires

L'évaluation de la concentration en peroxydes intracellulaires a été réalisée selon (Rothe G et Valet G. 1996) [14] avec quelques modifications. Dans les détails, les cellules Jurkat ont été recueillies par centrifugation et mises en suspension dans le RPMI contenant 5% de FBS à une densité de 5×10^5 cellules / ml. La concentration de FBS a été abaissée à 2% pour augmenter le taux d'absorption des composés et des réactifs dans un temps d'incubation court (1 h) choisi pour l'essai. Les suspensions cellulaires ont été incubées avec des concentrations croissantes de composés à 37°C. Pour chaque échantillon, des éprouvettes en double ont été préparées. Après 30 minutes d'incubation, on ajoute du BHT (concentration finale 550 μM) ou un volume égal de véhicule. Ceci nous a permis de surveiller l'effet du composé acide 5-(*p*-hydroxy-phenyl)-pent-2-en sur l'élévation de peroxyde induite par BHT ou les niveaux basaux de peroxydes, respectivement. Au cours des 15 dernières minutes d'incubation, les

cellules ont été chargées avec du diacétate de 2',7'-dichlorofluorescéine (DCFH-DA) avec une concentration finale de 8 mM. Les éprouvettes ont été doucement mélangées plusieurs fois le long de la période d'incubation (1 h). La suspension de cellules a ensuite été lavée, remise en suspension dans un volume égal de milieu et 10 000 événements ont été analysés pour la fluorescence DCF par cytofluorimétrie (instrument BD FACSCalibur™, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). La fluorescence verte du DCF a été analysée dans le canal FL1 (lexc 488 nm, lem 1535 nm). Avant l'analyse cytofluorimétrique, une aliquote de chaque échantillon a été prélevée pour évaluer la viabilité cellulaire par un test d'exclusion au bleu de Tripan.

Références

- [1] <http://www.naturevivante.org/>; date de consultation : 12/02/2013
- [2] Judd, W., Campbell, C., Kellogg, E., Stevens, P., (2002). Botanique systématique, une perspective phylogénétique, De Boeck Université, Paris.
- [3] Helme, J., P., Chazan, J., B., Perrin, J., L., (1999). Les antioxydants In Actifs et additifs en cosmétologie 2eme édition, p. 210-220, Paris.
- [4] Ferrari, J., (2002). Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des Thymelaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles : *Gnidia involucrata Steud. ex A. Rich.*, Faculté des sciences de l'Université de Lausanne, Thèse de doctorat, 215 p
- [5] Benzie, I., Strain, J., (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power: The FRAP Assay". Analytical Biochemistry, 239, 70-76.
- [6] Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., Polissiou, M., (2005). Antimicrobial and antioxidant activities of essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa Miller* (Lamiaceae). Food Chem. 90, 333-340.
- [7] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., (1999). Antioxidant activity applying an important ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic. Biol. Med. 26, 1231-1237.
- [8] Nauciel, C., Vildé, J., L., (2005). Bactériologie médicale, 2^{ème} Ed. Masson. Paris. pp: 5-10
- [9] Elghozi, J., L., Duval, D., (1992). Pharmacologie 2^{ème} Ed : Médecine Flammarion. Paris. P 289.
- [10] Snoussi, M., Dehmani, A., Noumi, E., Flamini, G., Papetti, A., (2016). Chemical composition and antibiofilm activity of *Petroselinum crispum* and *Ocimum basilicum* essential oils against *Vibrio* spp. Strains. Microb Pathog; 90:13-21. doi: 10.1016
- [11] Noumi, A., Snoussi, M., Trabelsi, N., Ksouri, R., Hamdaoui, G., Bouslama, L., Bakhrouf, A., (2012). Antioxidant activities and reversed phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC) identification of polyphenols in the ethyl acetate extract of Tunisian *Juglans regia* L. treated barks. Journal of Medicinal Plants Research Vol. 6(8), pp. 1468-1475
- [12] Dal Piaz, F., Vera Saltos, M., B., Franceschelli, S., Forte, G., Marzocco, S.,

- Tuccinardi, T., Poli, G., Nejad Ebrahimi, S., Hamburger, M., De Tommasi, N., Braca, A., (2016) Drug Affinity Responsive Target Stability (DARTS) identifies laurifolioside as a new clathrin heavy chain modulator. *Journal of Natural Products*, *79*, 2681-2692.
- [13] Marzocco, S., Adesso, S., Alilou, M., Stuppner, H., Schwaiger, S., (2017). Anti-inflammatory and anti-oxidant potential of the root extract and constituents of *Doronicum austriacum*. *Molecules*, *22*, pi: E1003.
- [14] Rothe, G., Valet, G., (1996). Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2', 7'-dichlorofluorescein. *Journal of Leukocyte Biology*, *47*, 440-448.

CHAPITRE IV

Résultats et Discussions

IV.1. Screening chimique

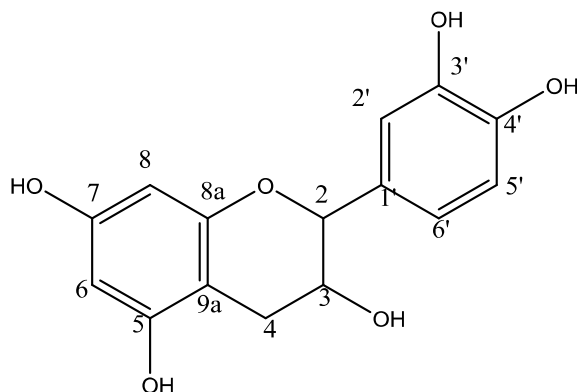
Le **tableau [IV.1.]** montre les observations et les résultats obtenus du screening chimique réalisés sur *C.azel*

Identifications	Observations	Résultats
Extrait étheré		
Huiles volatiles	Une odeur caractéristique et plaisante.	+++
Stérols et triterpènes	A la surface des deux liquides nous avons remarqué l'apparition d'un anneau de couleur violette ce qui indique la présence des stérols et des terpènes, alors que la solution devient verte ce qui indique la présence de la chlorophylle.	+
Caroténoïdes	une solution légèrement bleue.	+++
Alcaloïdes à l'état de bases	l'apparition d'un précipité blanc jaunâtre.	+
Coumarines	A366 : aucune fluorescence n'est observée.	+
Stéroïdes ou dérivés terpéniques	Au bout d'un certain temps, la solution traitée uniquement par une solution d'anhydride acétique vire au vert ce qui indique la présence des stérols, alors que la solution traitée par une solution concentrée d'acide sulfurique seule vire au bleu ce qui confirme la présence des caroténoïdes.	+
Flavones aglycones	Aucune coloration n'a été observée.	-
Anthracénosides	L'apparition d'une couleur rouge cerise.	+
Flavonosides	L'apparition d'une coloration orange.	+
Extrait alcoolique		
Tannins	La solution obtenue vire vers le bleu noirâtre.	+++
Alcaloïdes sous forme de sels	L'apparition d'un précipité légèrement blanc jaunâtre	+
Alcaloïdes, bases quaternaires et les amines oxydées	L'absence d'un précipité.	-
Extrait aqueux		
Alcaloïdes à l'état de sels	Aucun précipité n'est apparu.	+
Saponines	L'absence de la mousse.	-

Tableau IV.1. Résultats du screening chimique

IV.2. Caractérisation chimique et élucidation structurale des produits isolés de l'espèce *C. Azel*

IV.2.1. Elucidation structurale du composé 150-21N



Le spectre IR de ce composé montre des bandes d'absorption à 3402.2 cm^{-1} correspondant à la présence des groupements hydroxyle.

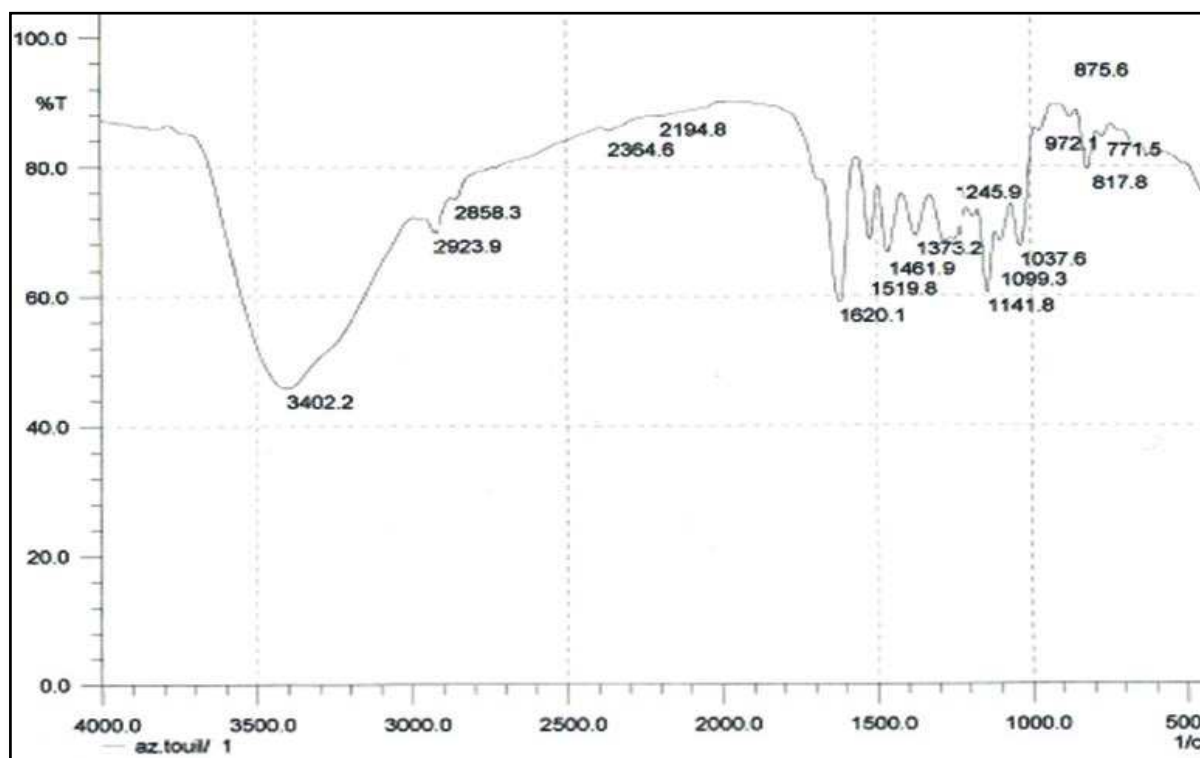


Figure IV.1. Spectre Infrarouge (IR) du composé 150-21N.

Le spectre de masse HR-ESIMS enregistré en mode positif, présente un pic d'ion pseudo moléculaire à $m/z = 313$ $[M+Na]^+$, correspondant à une masse moléculaire de 290 uma et une formule brute en $C_{15}H_{14}O_6$ avec 9 insaturations.

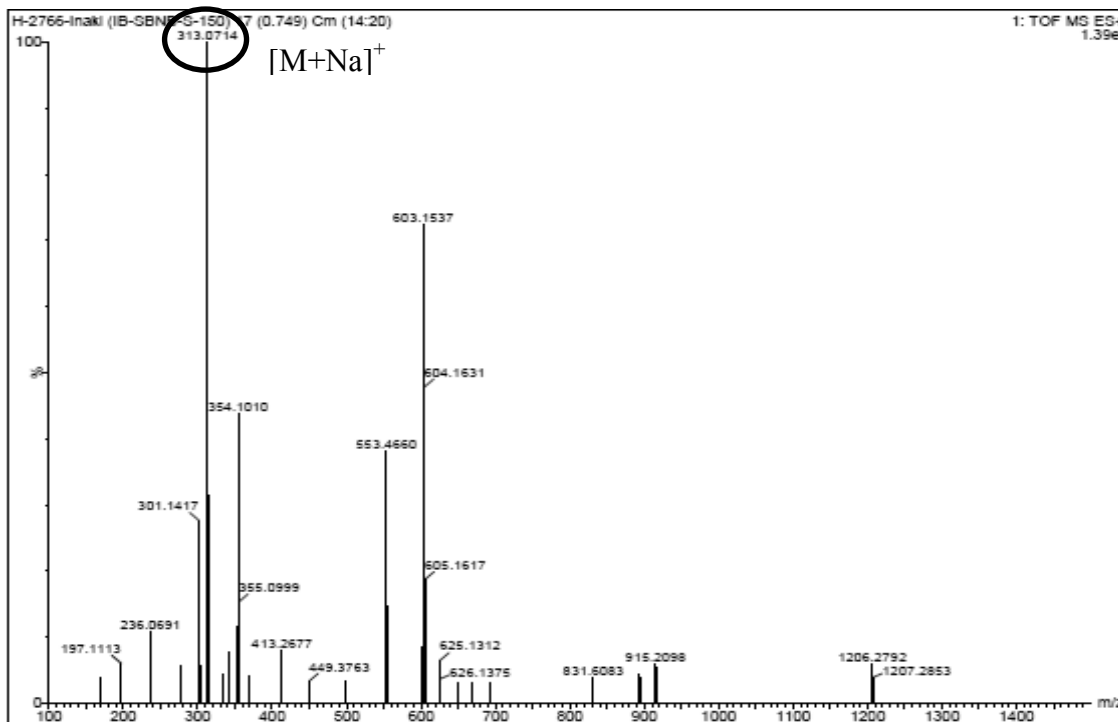


Figure IV.2. Spectre de masse HR-ESIMS (+) du composé **150-21N**.

Le spectre RMN 1H (400 MHz) de ce composé **150-21N** ; **figure [IV.3.]** ; enregistré dans le $MeOH-d_4$ montre la présence de :

- Un signal sous forme d'un doublet de doublet (dd) d'intégration 1H à $\delta_H = 2.54$ ppm avec une constante de couplage $J = 12.8$ et 6.7 Hz (un couplage géminal et *ortho*) attribué à H-4b.
- Un signal sous forme d'un doublet de doublet (dd) d'intégration 1H à $\delta_H = 2.92$ ppm avec une constante de couplage $J = 12.8 - 4.3$ Hz (un couplage géminal et *ortho*) attribué à H-4a.
- Un autre signal sous forme de doublet de doublet de doublet (ddd) et également d'intégration 1H à $\delta_H = 4.00$ ppm et une constante de couplage $J = 6.7; 6.2$ et 4.3 Hz attribué à H-3.
- le signal sous forme de doublet (d) avec une constante de couplage $J = 6.2$ Hz; un couplage *ortho*) qui apparait à $\delta_H = 4.58$ ppm, avec une intégration 1H attribué à H-2.

- Le signal à $\delta_{\text{H}} = 5,89$ ppm, d'intégration 1H sous forme de doublet (*d*) ($J = 1,8$ Hz ; couplage *mé*ta) attribuable à H-8.
- Un signal sous forme d'un doublet (*d*) d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 6,04$ ppm avec une constante de couplage $J = 1,8$ Hz (un couplage *mé*ta) attribué à H-6.
- Le signal à $\delta_{\text{H}} = 6,77$ ppm ; d'intégration 1H sous forme d'un doublet de doublet (*dd*) avec une constante de couplage ($J = 6,84$ Hz ; un couplage *ortho* et $J = 1,52$ Hz; un couplage *mé*ta) attribuable à H-6'.
- Le signal à $\delta_{\text{H}} = 6,81$ ppm; d'intégration 1H sous forme d'un doublet (*d*) avec un constant de couplage ($J = 6,48$ Hz ; un couplage *ortho*) attribuable à H-5'. Ce ci confirme l'hydroxylation des positions 3' et 4' du cycle B.
- Le signal à $\delta = 6,91$ ppm, d'intégration 1H sous forme d'un doublet (*d*) avec un constant de couplage ($J = 1,48$ Hz ; un couplage *mé*ta) correspondant au proton H-2'.

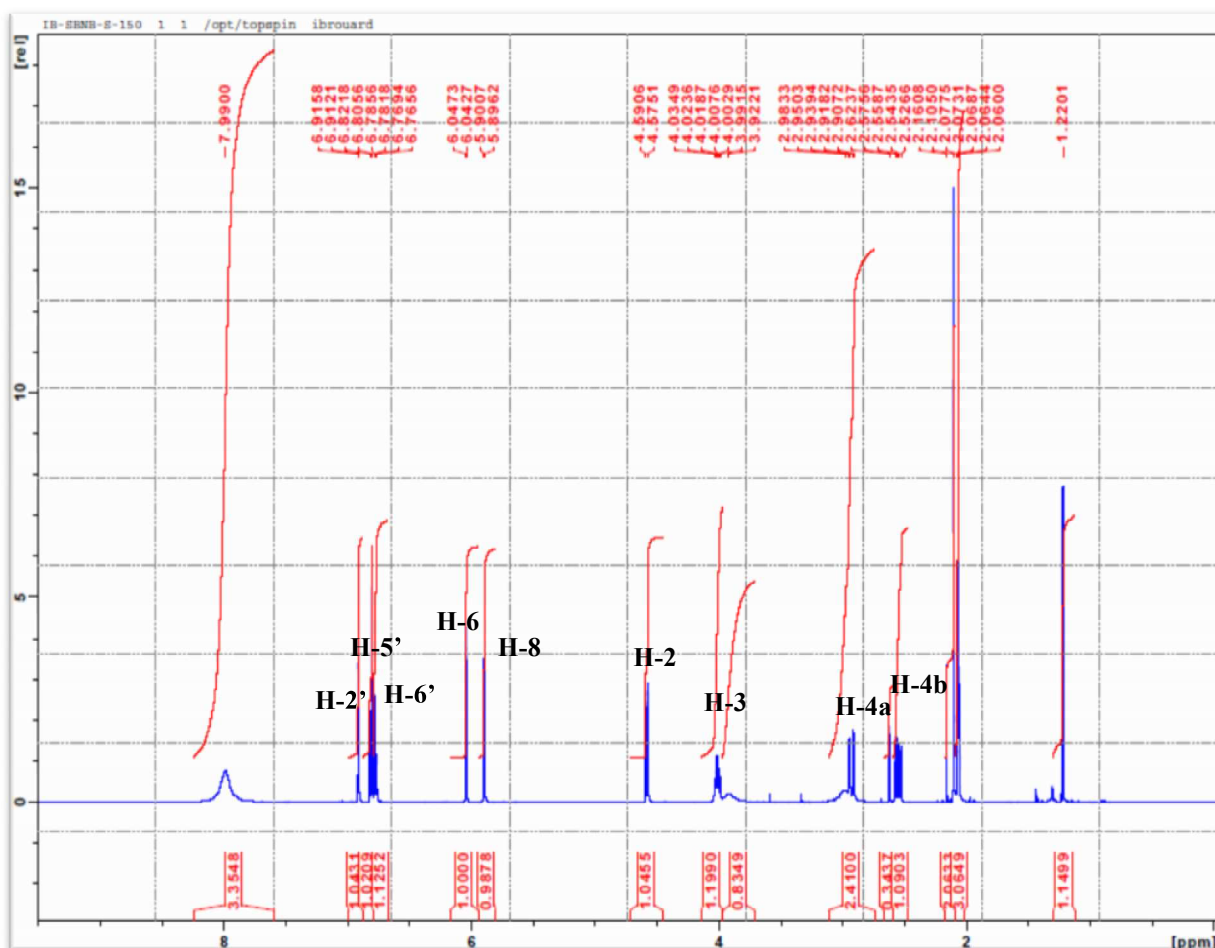


Figure IV.3. Spectre RMN ¹H (400 MHz, MeOH-*d*₄) du composé 150-21N.

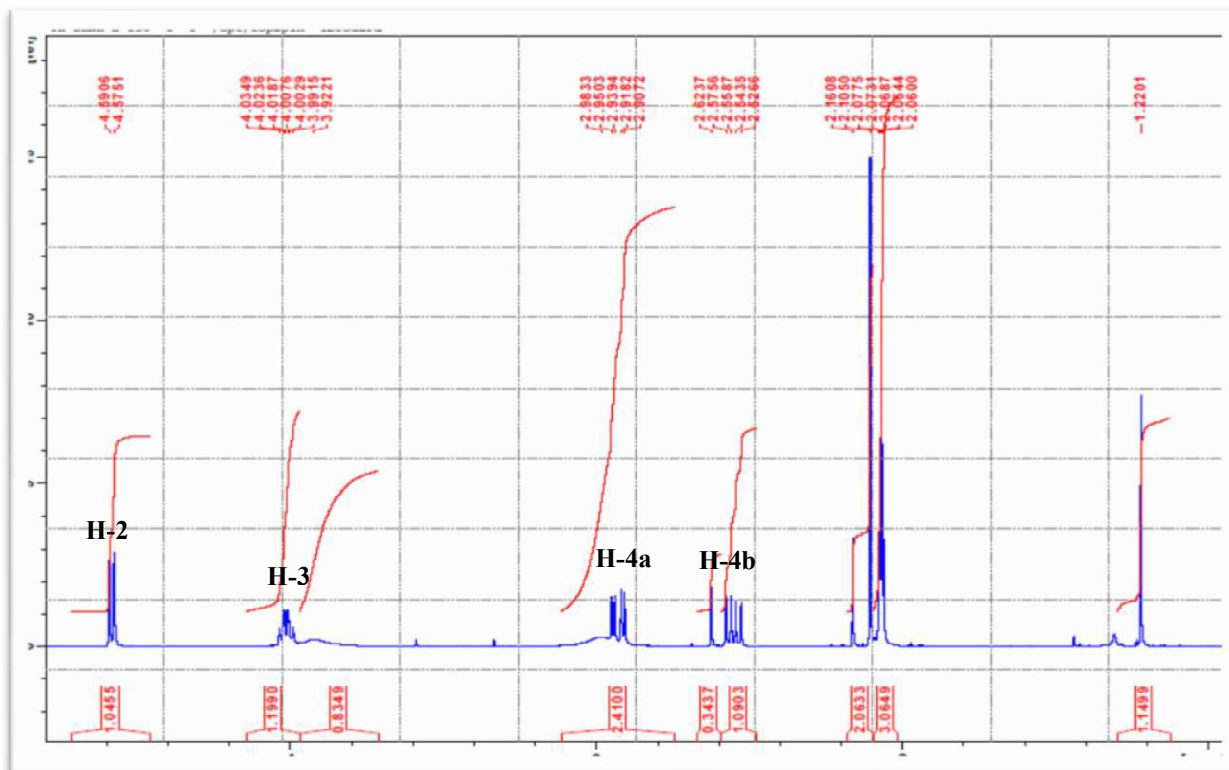


Figure IV.4. Spectre RMN ¹H (400 MHz, MeOH-*d*₄) du composé 150-21N, étalement [2 à 5 ppm].

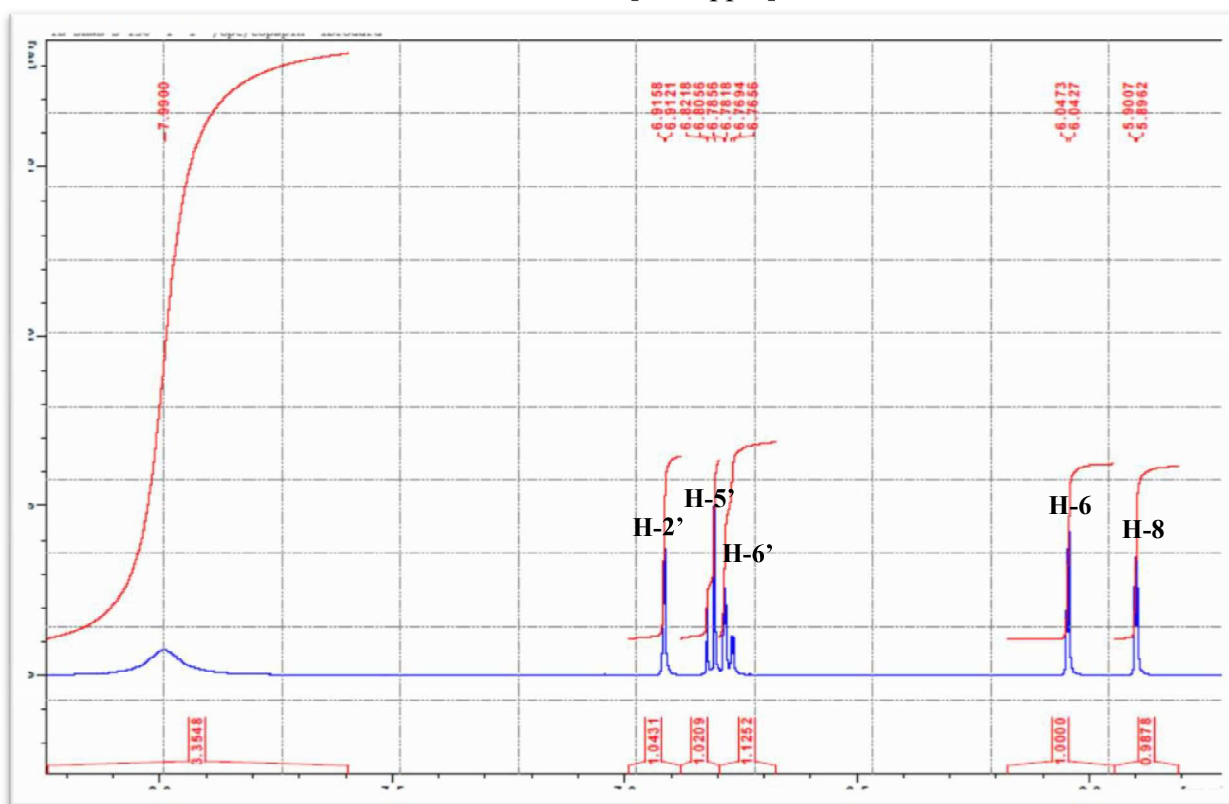


Figure IV.5. Spectre RMN ¹H (400 MHz, MeOH-*d*₄) du composé 150-21N, étalement [6 à 8 ppm].

Le spectre RMN ^{13}C montre que nous avons 15 pics qui signifient qu'on a 15 atomes de carbones. Selon l'expérience DEPT 90° , nous avons 7 pics qui signifient qu'on a 7 (CH). Selon l'expérience DEPT 135° nous avons un pic qui signifie qu'on a un (CH_2), et les autres pics sont des carbones quaternaires.

L'étude des spectres RMN ^{13}C et les séquences DEPT 90° et 135° et ses étalement de ce composé montre la présence de trois atomes de carbone sp^3 : le premier correspondant a un CH_2 à $\delta_{\text{C}} = 28,8$ ppm, le second correspondant a un CH oxygéné à $\delta_{\text{C}} = 68,3$ ppm et le dernier correspondant a un CH à $\delta_{\text{C}} = 82,7$ ppm. Nous avons aussi sept (7) atomes de carbones éthyléniques sp^2 correspondant a des C quaternaires : quatre (4) carbones quaternaires oxygénés à $\delta_{\text{C}} = 145,6$; $145,7$; $157,1$ et $157,7$ ppm et les trois (3) autres carbones à $\delta_{\text{C}} = 100,6$; $156,9$; $132,2$ ppm. La présence de cinq (5) carbones éthyléniques sp^2 correspondants à des CH à $\delta_{\text{H}} = 95,4$; $96,1$; $115,2$; $115,7$; $120,0$ ppm.

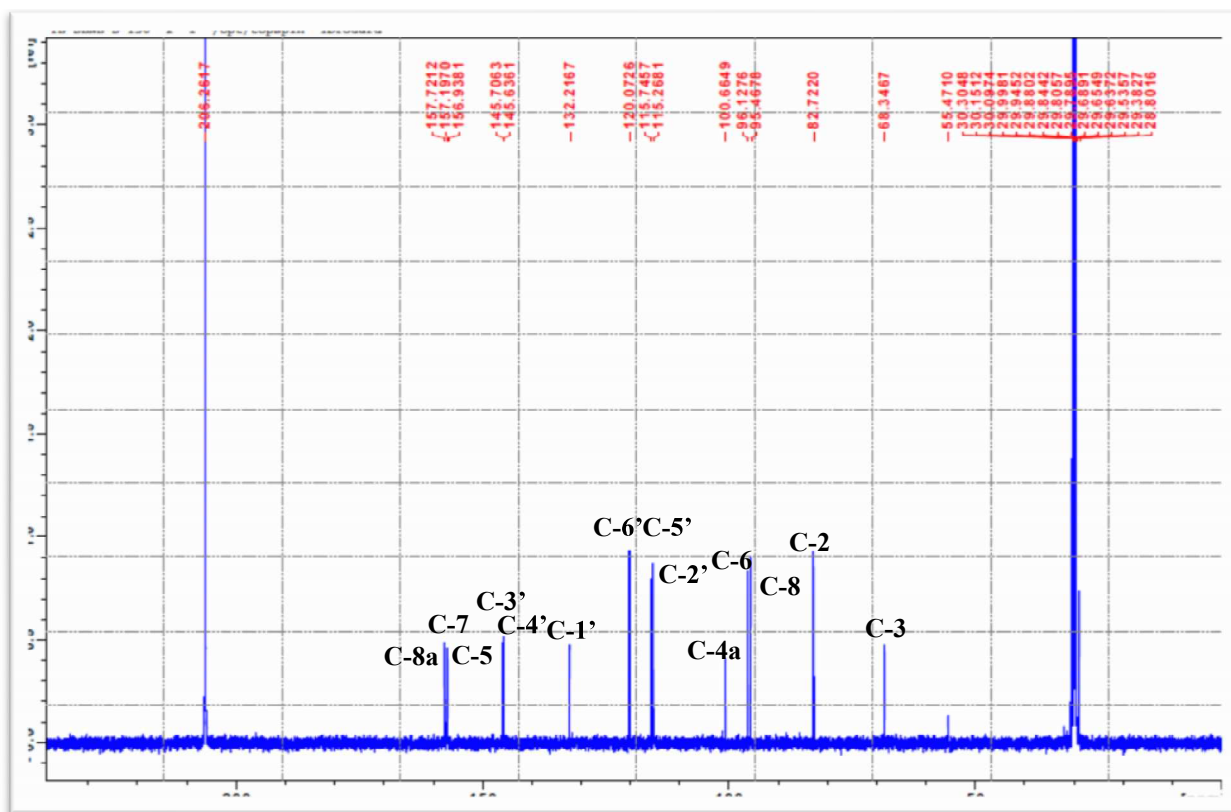


Figure IV.6. Spectre RMN ^{13}C (400 MHz, MeOH- d_4) du composé 150-21N

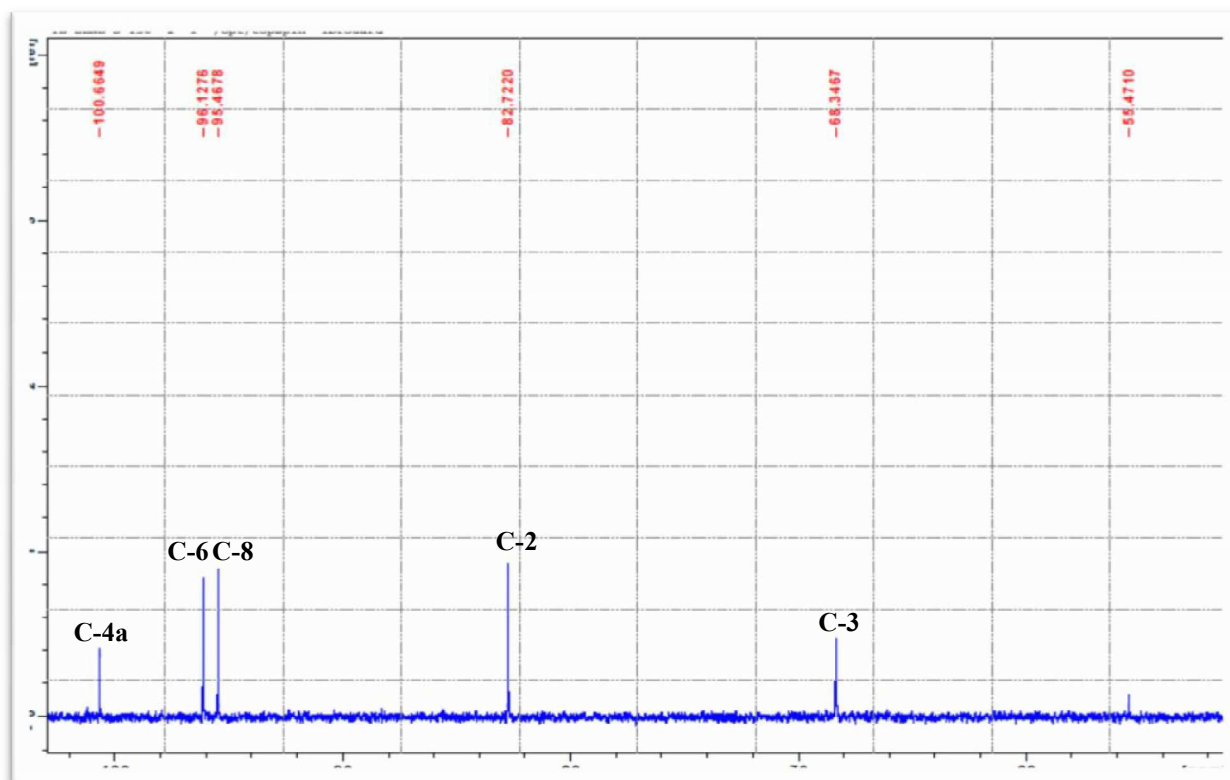


Figure IV.7. Spectre RMN ^{13}C (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) du composé **150-21N**, étalement [60 à 100 ppm].

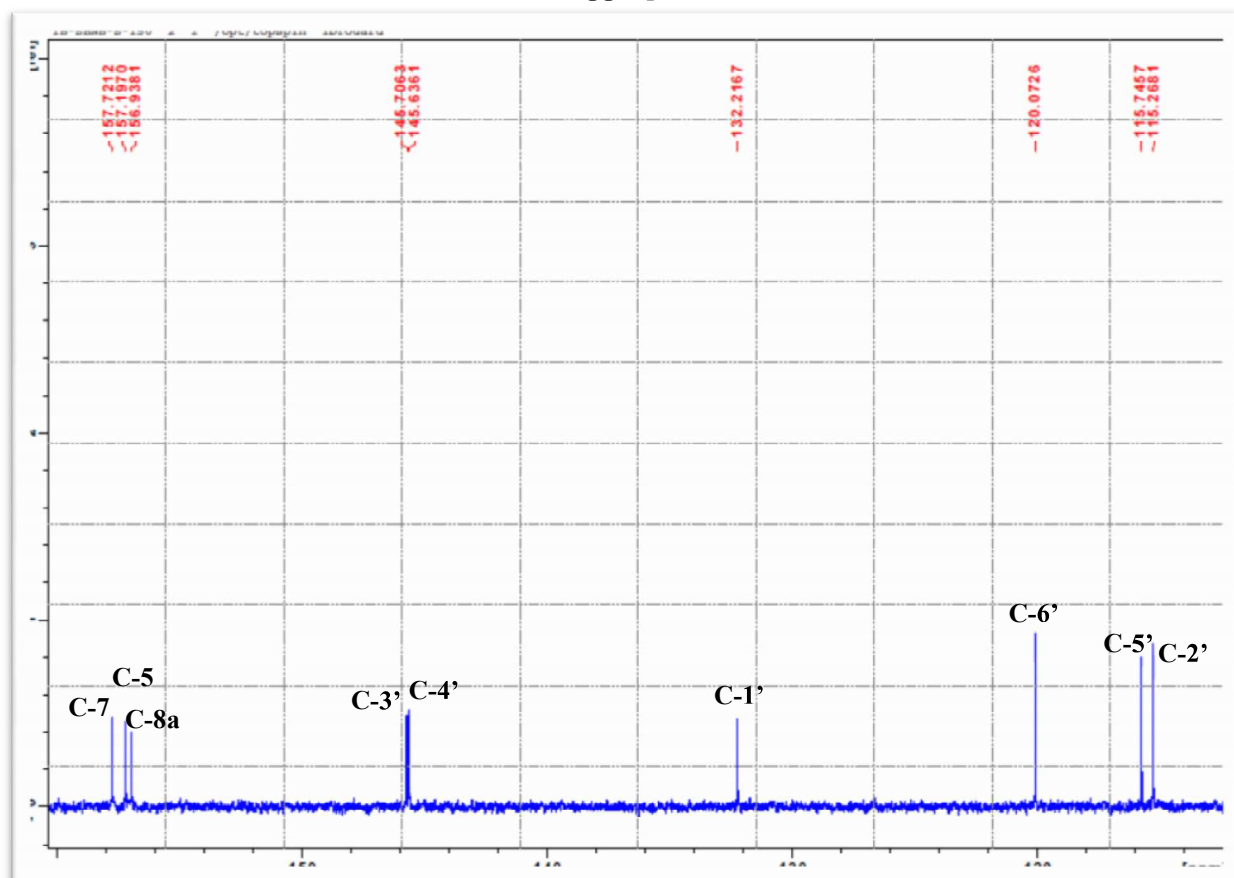


Figure IV.8. Spectre RMN ^{13}C (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) du composé **150-21N**, étalement [110 à 160 ppm].

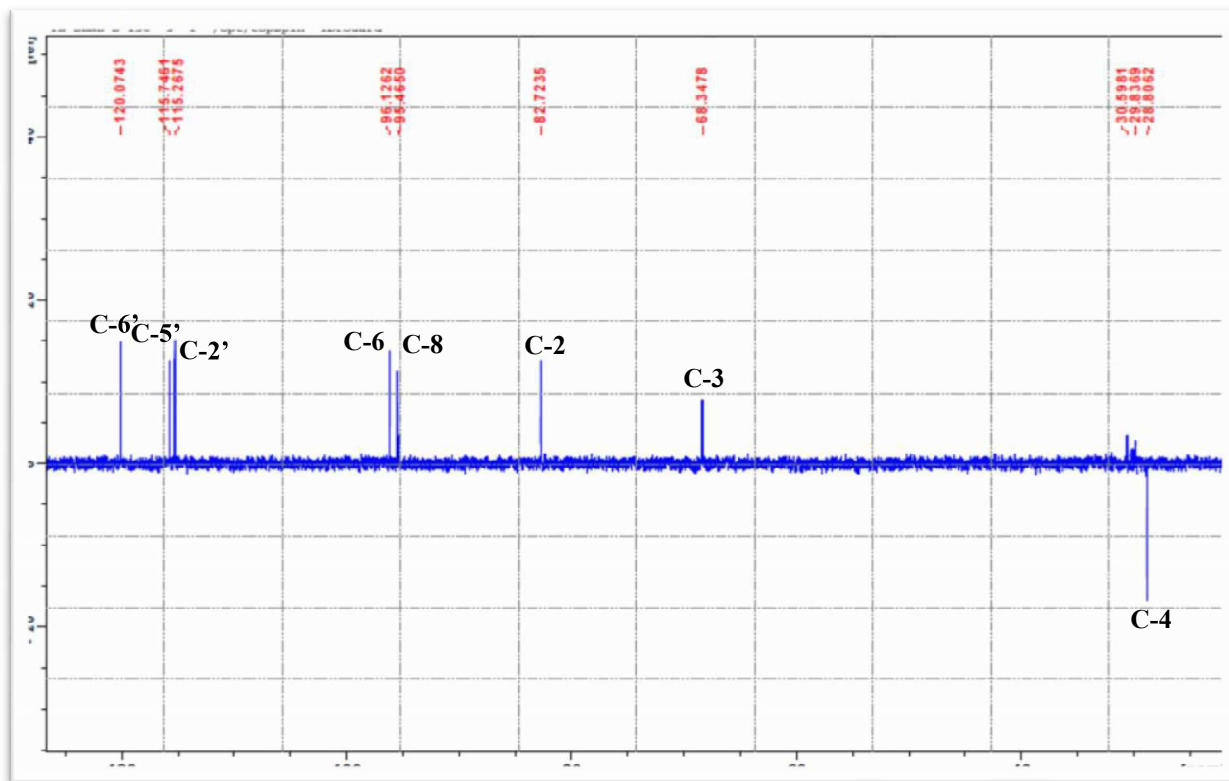


Figure IV.9. Spectre DEPT 135° (400 MHz, MeOH-*d*₄) du composé 150-21N

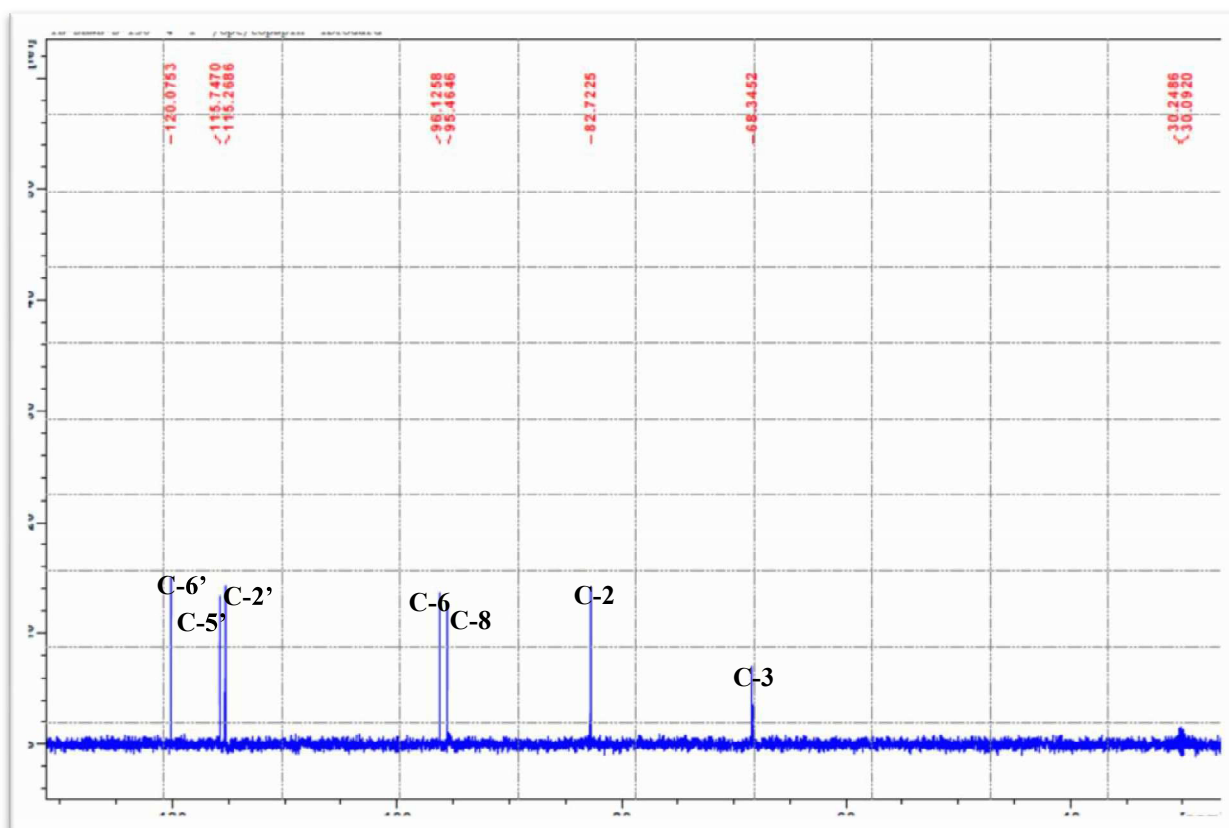


Figure IV.10. Spectre DEPT 90° (400 MHz, MeOH-*d*₄) du composé 150-21N

L'expérience COSY ; **figure [IV.11.]** ; permet d'observer les corrélations suivantes :

- Le proton H-4a et le proton H-4b résonant sous forme de doublet de doublet (*dd*) à $\delta_H = 2,92$ ppm, les deux protons corrélient avec un signal multiplet (*m*) à $\delta_H = 4,00$ ppm correspondant au proton H-3, ce dernier donnant une tache de corrélation avec le proton H-2 résonant à $\delta_H = 4,58$ ppm.
- Le proton H-6' et le proton H-5' résonant sous forme d'un doublet (*d*) à $\delta_H = 6,81$ ppm.

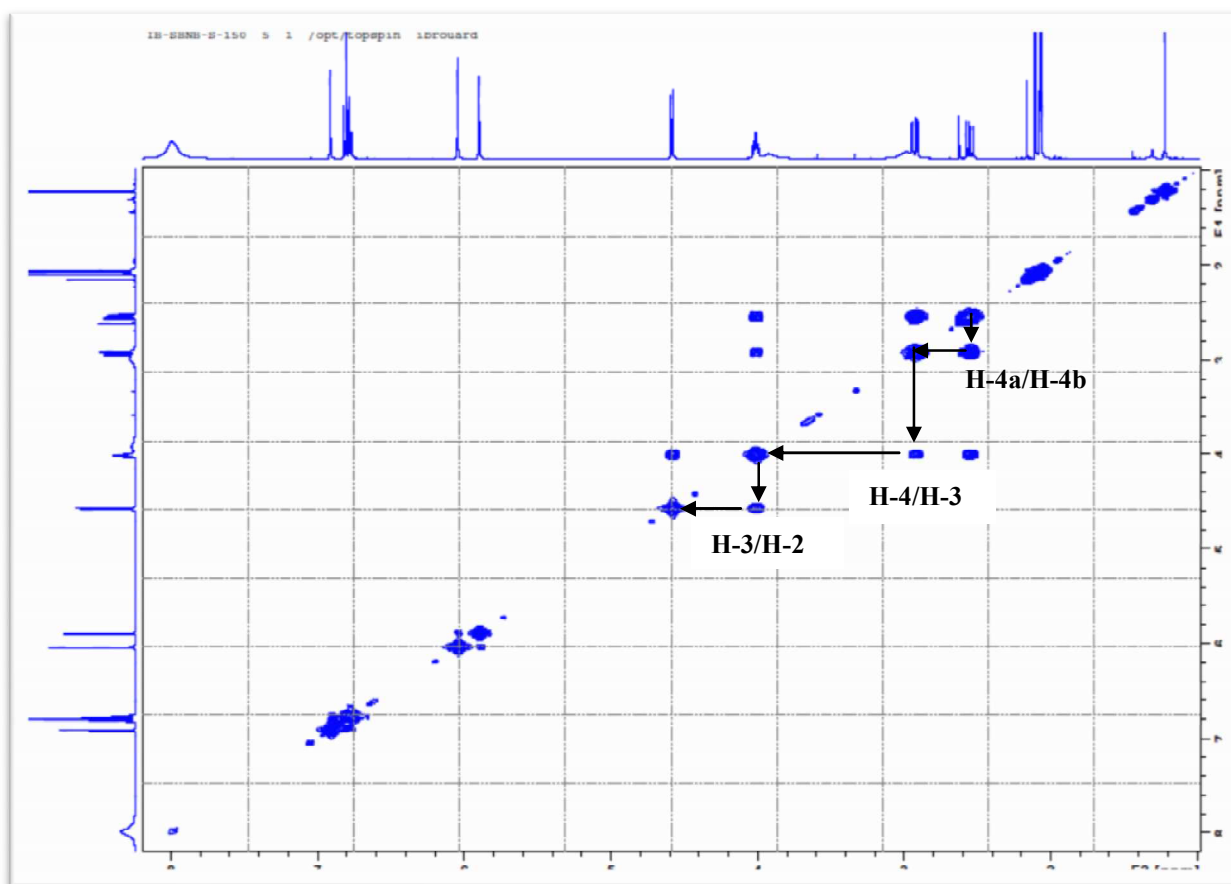


Figure IV.11. Spectre COSY (400 MHz, MeOH-*d*₄) du composé **150-21N**

L'expérience de corrélation direct proton-carbone ou HSQC ; **figure [IV.12.]** ; montre des couplages entre :

- Les deux protons H-4a, H-4b et son carbone C-4 résonant à $\delta_C = 28,8$ ppm.
- Le proton H-3 et son carbone C-3 résonant à $\delta_C = 68,3$ ppm.
- Le proton H-2 et son carbone C-2 résonant à $\delta_C = 82,7$ ppm.
- Le proton H-8 et son carbone C-8 résonant à $\delta_C = 95,4$ ppm.
- Le proton H-6 et son carbone C-6 résonant à $\delta_C = 96,1$ ppm.

- Le proton H-2' et son carbone C-2' résonant à $\delta_C = 115,2$ ppm.
- Le proton H-5' et son carbone C-5' résonant à $\delta_C = 115,7$ ppm.
- Le proton H-6' et son carbone C-6' résonant à $\delta_C = 120,0$ ppm.

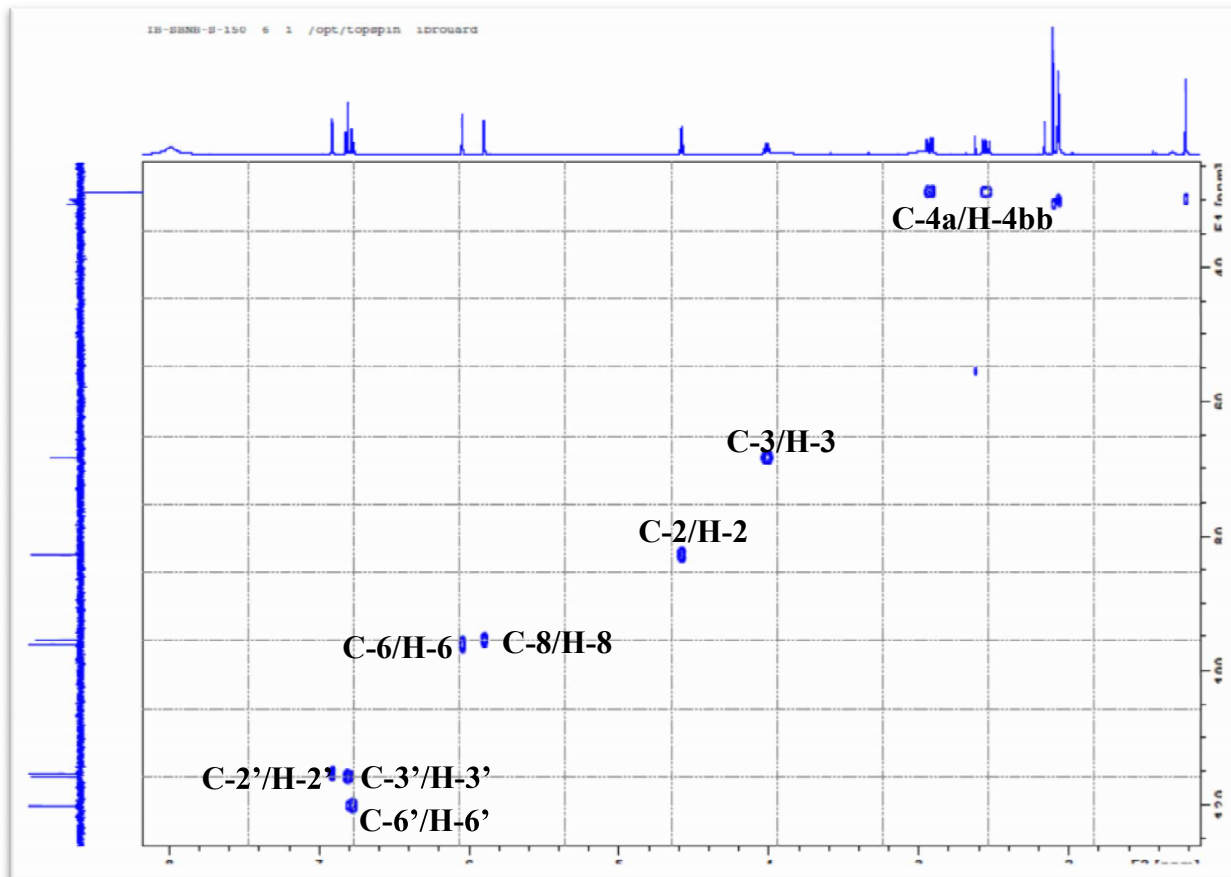


Figure IV.12. Spectre HSQC (400 MHz, MeOH-*d*4) du composé 150-21N

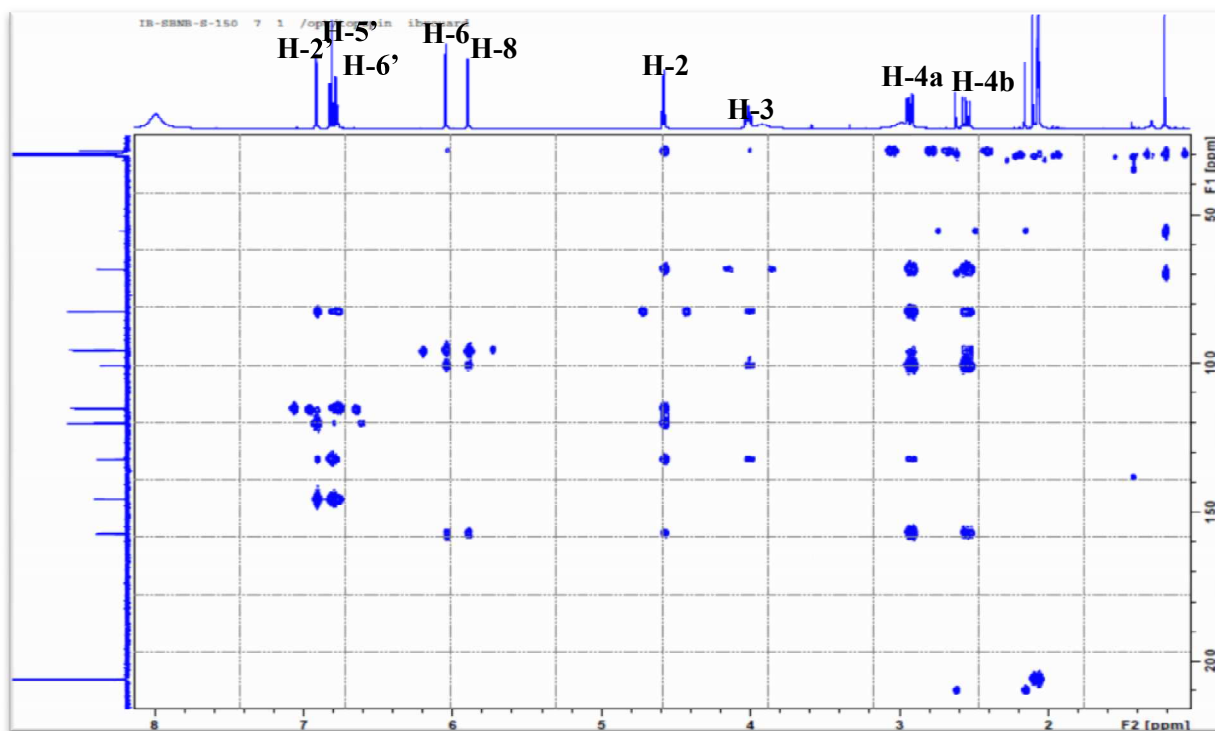


Figure IV.13. Spectre HMBC (400 MHz, MeOH-*d*₄) du composé 150-21N

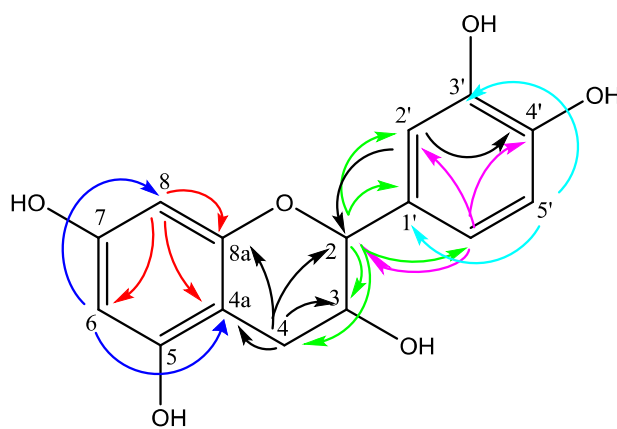


Figure IV.14. Les corrélations HMBC du composé 150-21N

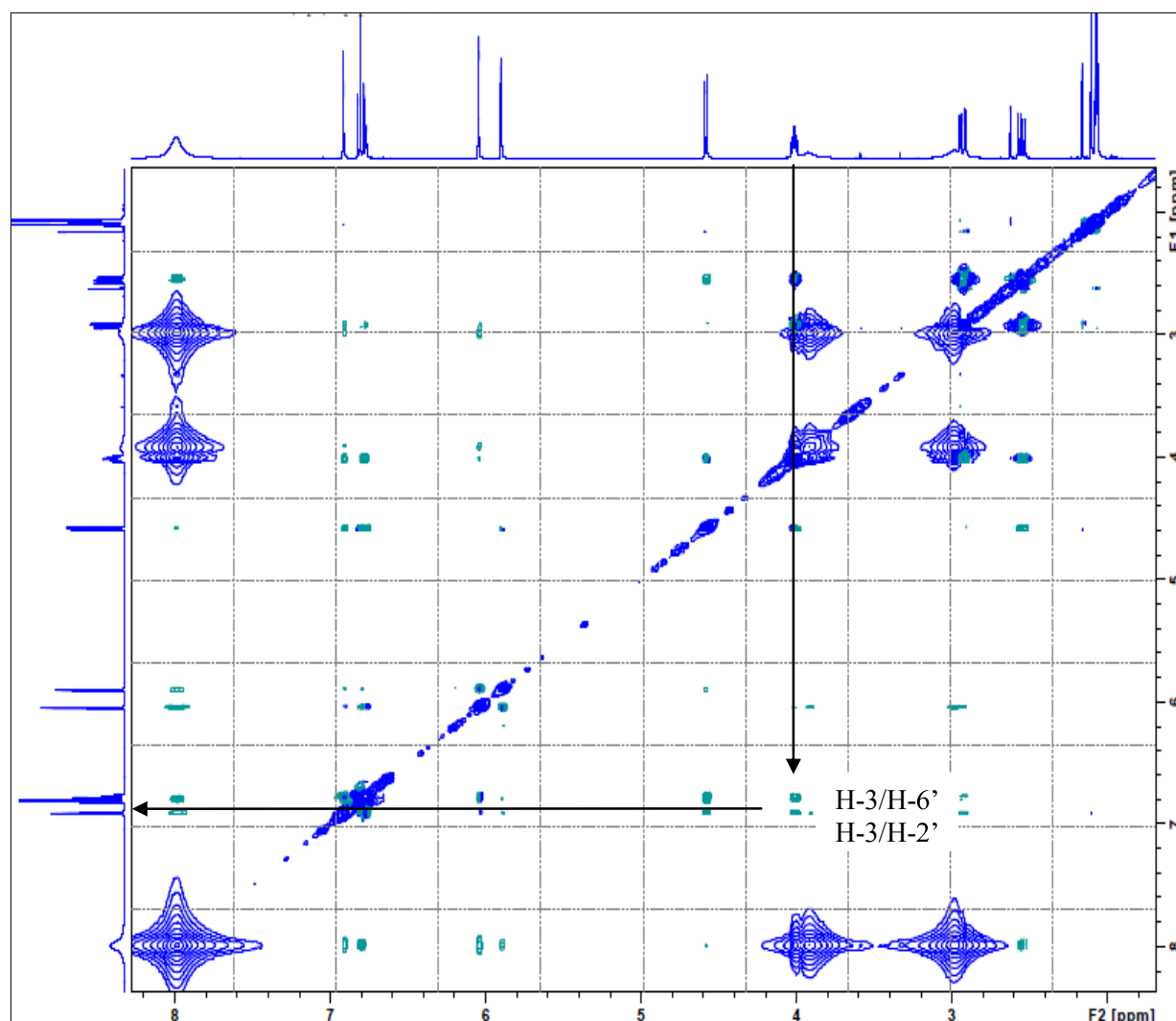


Figure IV.15. Spectre ROESY (400 MHz, MeOH-*d*4) du composé **150-21N**

La configuration absolue du carbone C_2 est toujours α selon la biogénétique qui impose une orientation α du cycle B. Pour la configuration du carbone C_3 , nous avons : $^3J_{3,2} = 6,2$ Hz ; $^3J_{3,4} = 4,36$ Hz et $^3J_{3,4'} = 6,76$ Hz. Nous avons aussi selon le spectre ROESY la présence de deux taches qui représentent la corrélation entre le H-3 et H-6' et entre le H-3 et H-2' donc les trois protons sont dans le même espace, alors nous concluons que le C_3 est représenté selon la configuration β .

Les résultats des études des spectres RMN 1H et ^{13}C sont reportés dans le **tableau [IV.2.]**

Positions	RMN ^1H δ (ppm), <i>m</i> , <i>J</i> (Hz)	RMN ^{13}C δ (ppm)
1	-	-
2	4.58 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6.2 Hz)	82.7
3	4.0 (1H, <i>m</i>)	68.3
4a	2.92 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 12.8 - 4.3 Hz)	28.8
4b	2.54 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 12,8 - 6,7 Hz)	
5	-	157.1
6	6.04 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 1.8 Hz)	96.1
7		157.7
8	5.89 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 1.8 Hz)	95.4
8a	-	156.9
9a	-	100.6
1'	-	132.2
2'	6.91 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 1.48 Hz)	115.2
3'	-	145.7
4'	-	145.6
5'	6.81 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6.4 Hz)	115.7
6'	6.77 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 6.4 - 1.5 Hz)	120.0

Tableau IV.2. Données de la spectrométrie RMN ^1H et ^{13}C (MeOH-*d*₄, 400 MHz) du composé **150-21N**

L'ensemble des données de RMN- ^1H , RMN- ^{13}C , COSY, ROESY, DEPT, HSQC et HMBC et en comparaison avec celle de la littérature [1] mènent à la structure finale du composé **150-21N** qui est le **(2R, 3S)-2-(3',4'-dihydroxyphenyl) chroman-3, 5, 7-triol (Catéchine)** ; figure [IV.16].

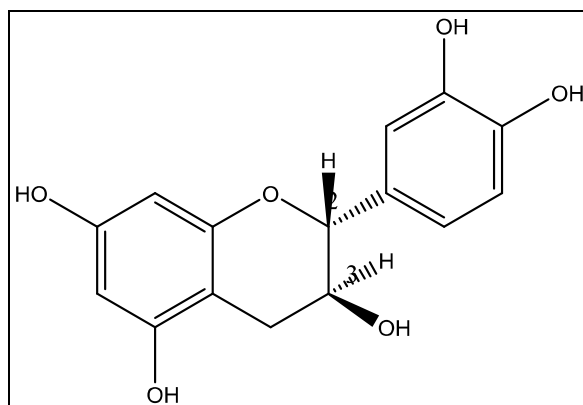
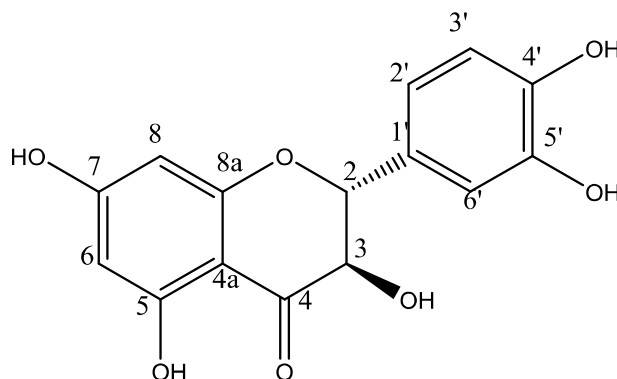


Figure IV.16. La structure de la **Catéchine**

IV.2.2. Elucidation structurale du composé CAP-122



Le spectre RMN ^1H et HSQC **figure [IV.17.]** et **figure [IV.18]** montre qu'il s'agit d'un flavonoïde de type dihydroflavanol et conduit à la distinction entre les protons des cycles A et B. En effet :

- Un doublet (*d*) d'intégration 1 H à $\delta_{\text{H}} = 4,94$ ppm ($J = 11,6$ Hz) attribuable au proton H-2.
- Un doublet (*d*) d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 4,52$ ppm ($J = 11,6$ Hz) attribuable au proton H-3. La valeur élevée de la constante de couplage $J = 11,4$ Hz, confirme une configuration *trans* des protons vicinaux H-2 et H-3.
- Un singulet (*s*) d'intégration 1H, à $\delta_{\text{H}} = 7.0$ ppm attribuable à H-6'.
- Un doublet (*d*) d'intégration 1H, à $\delta_{\text{H}} = 6,88$ ppm ($J = 8,5$ Hz) attribuable à H-2'.
- Un doublet (*d*) d'intégration 1H, à $\delta_{\text{H}} = 6,83$ ppm ($J = 8,0$ Hz) attribuable à H-3'.
- Un singulet (*s*) d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 5,90$ ppm attribuable à H-6 / H-8.

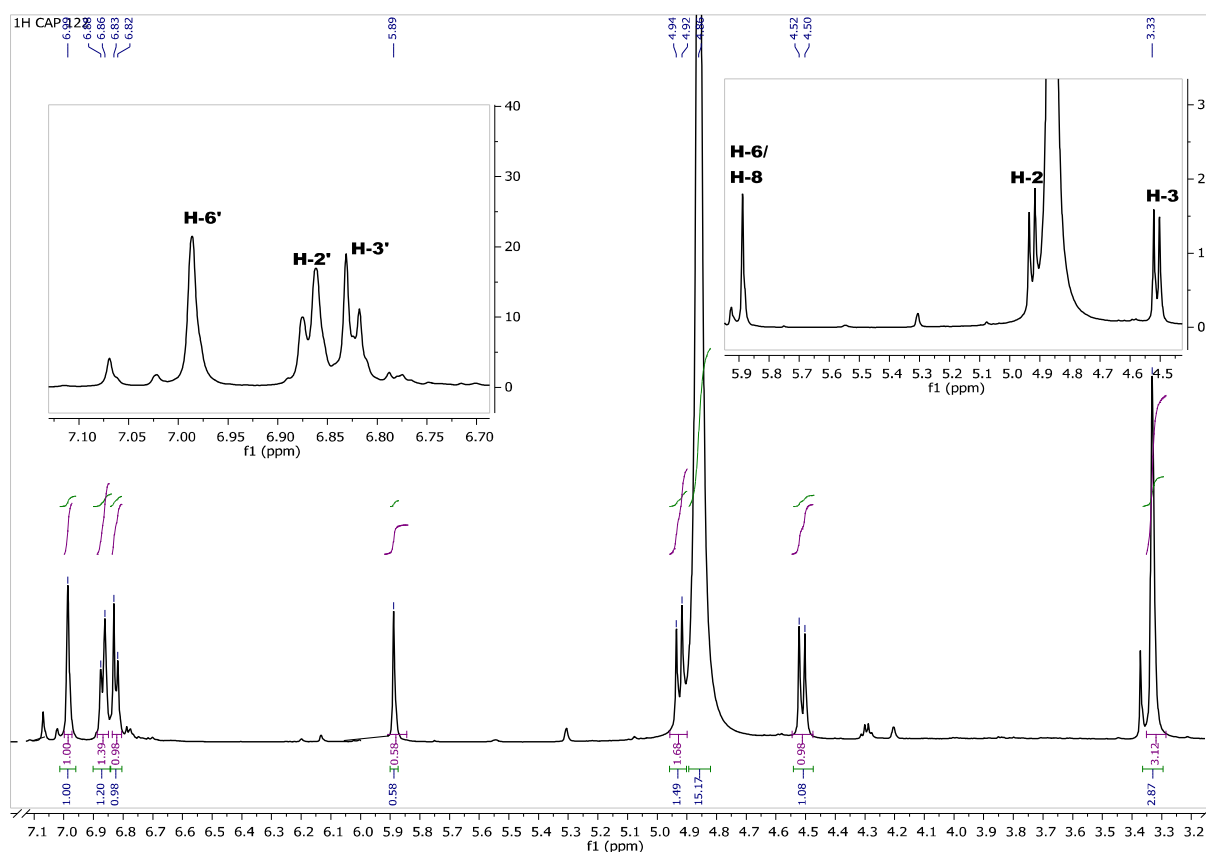


Figure IV.17. Spectre RMN ^1H (600 MHz, MeOH- d_4) du composé CAP-122

L'analyse du spectre relatif à l'expérience HSQC ; **figure [IV.18.]** ; permet l'attribution des signaux des protons aux atomes de carbone correspondants comme suit :

- La corrélation du proton H-6' avec le carbone C-6' montre que ce dernier a un déplacement chimique $\delta_{\text{C}} = 116.0$ ppm.
- La corrélation du proton H-2' avec le carbone C-2' montre que ce dernier a un déplacement chimique $\delta_{\text{C}} = 120.7$ ppm.
- La corrélation du proton H-3' avec le carbone C-3' montre que ce dernier a un déplacement chimique $\delta_{\text{C}} = 116.0$ ppm.
- La corrélation du proton H-6, H-8 avec le carbone C-6, C-8 montre que ce dernier a un déplacement chimique $\delta_{\text{C}} = 96.2$ ppm.
- La corrélation du proton H-2 avec le carbone C-2 montre que ce dernier a un déplacement chimique $\delta_{\text{C}} = 85.0$ ppm.
- La corrélation du proton H-3 avec le carbone C-3 montre que ce dernier a un déplacement chimique $\delta_{\text{C}} = 73.7$ ppm.

Cela permet de déduire que chacun des cycles A et B sont di substitués.

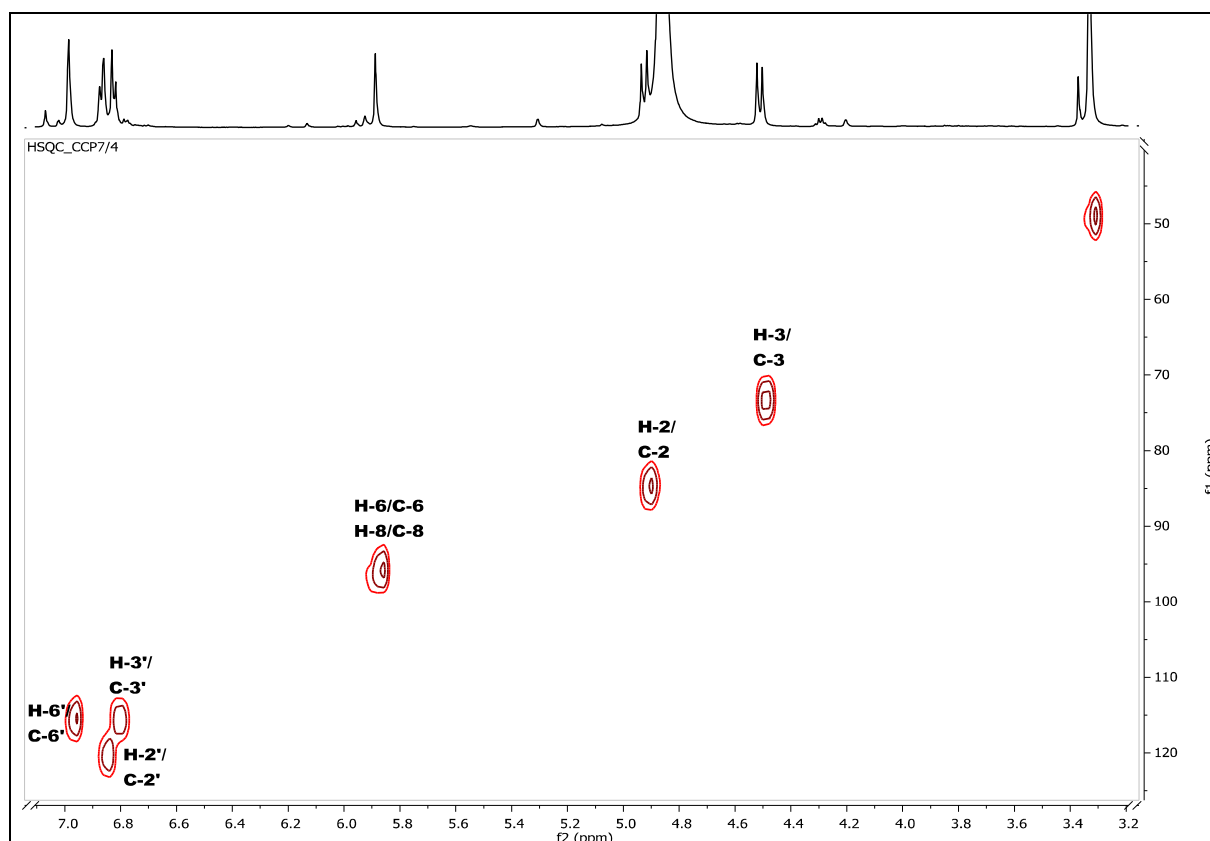


Figure IV.18. Spectre HSQC (600 MHz, MeOH-*d*4) du composé CAP-122

L'analyse du spectre relatif à l'expérience HMBC ; figure [IV.20.] ; permet de tirer les indications suivantes :

- Trois taches de corrélations entre le proton H-3 et les carbones à $\delta_C = 85.0, 130.1$ et 198.3 ppm attribuable aux carbones C-2, C-1', C-4, respectivement.
- Cinq taches de corrélations entre le proton H-2 et les carbones à $\delta_C = 73.7, 116.0, 120.7, 130.1$ et 198.3 ppm attribuable aux carbone C-3, C-6' et C-2', C-1' et C-4, respectivement.
- Quatre taches de corrélations entre les protons H-8 / H-6 et les carbones à $\delta_C = 97.3, 101.8, 168.6$ et 169.8 ppm attribuable eux carbone C-8a, C-4a, C-5 et C-7 respectivement.
- Deux taches de corrélations entre le proton H-3' et les carbones à $\delta_C = 130.1$ et 146.7 ppm attribuable eux carbone C-1', C-5', respectivement.
- Trois taches de corrélations entre le proton H-2' et les carbones à $\delta_C = 85.0, 116.0$ et 147.8 ppm attribuable eux carbone C-2, C-6' et C-4', respectivement.

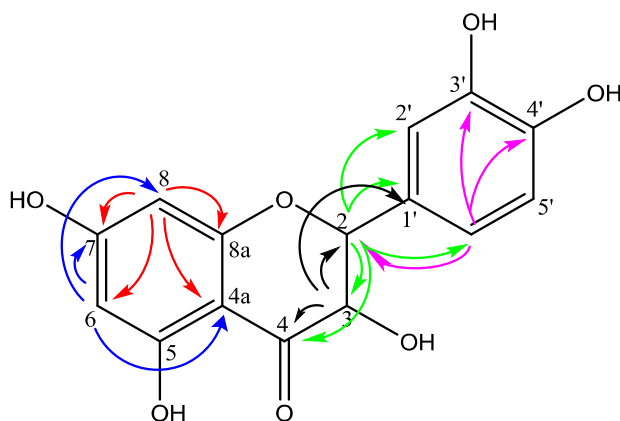
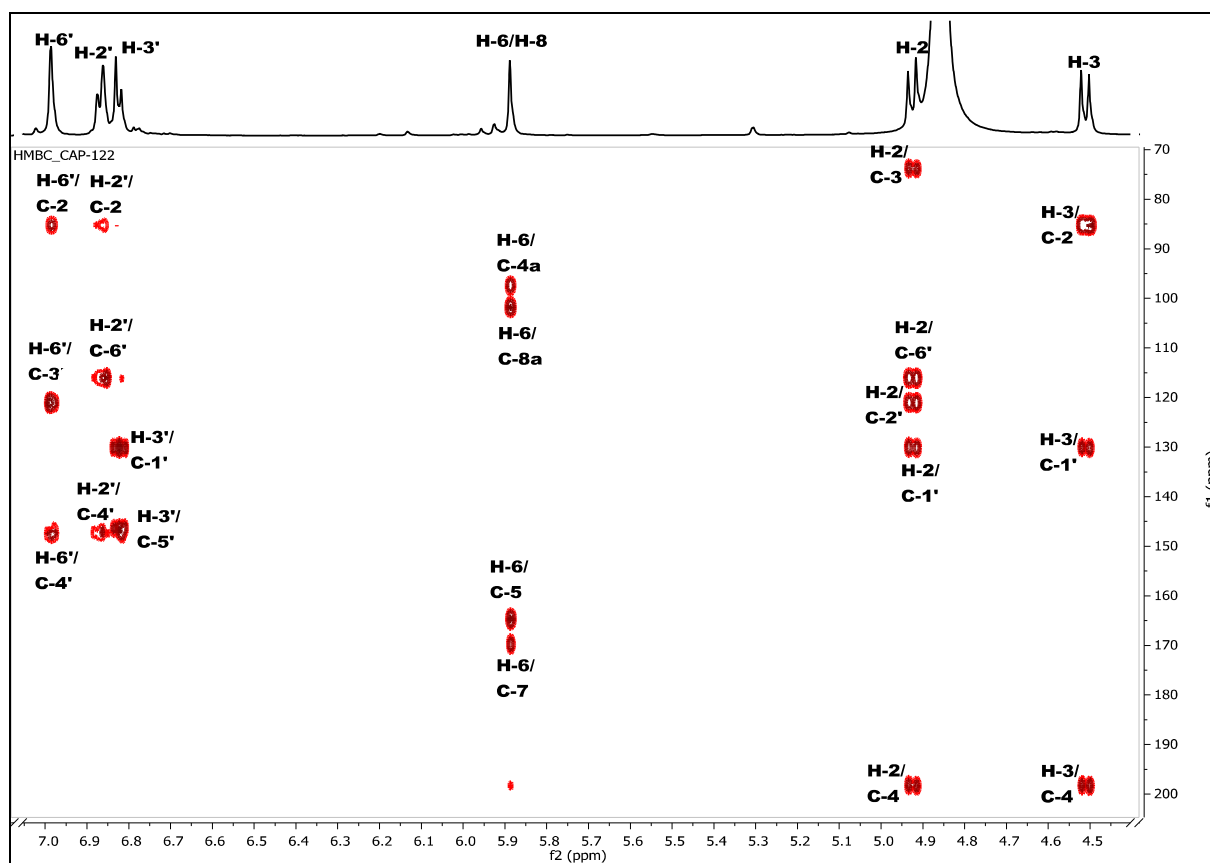


Figure IV.19. Les corrélations HMBC du composé CAP-122

Figure IV.20. Spectre HMBC (600 MHz, MeOH-*d*4) du composé CAP-122

Positions	RMN ^1H δ (ppm), <i>m</i> , <i>J</i> (Hz)	RMN ^{13}C δ (ppm)
2	4.94 (<i>d</i> , <i>J</i> = 11.4 Hz, 1H)	85.0
3	4.52 (<i>d</i> , <i>J</i> = 11.0 Hz, 1H)	73.7
4	-	198.3
4a	-	101.8
5	-	168.6
6 / 8	5.90 (<i>s</i> , 1H)	96.2
7	-	169.8
8a	-	97.3
1'	-	130.1
2'	6.88 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8.5 Hz, 1H)	120.7
3'	6.83 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H)	116.0
4'	-	147.8
5'	-	146.7
6'	7.00 (<i>s</i> , 1H)	116.0

Tableau IV.3. Données de la spectrométrie RMN ^1H et ^{13}C (MeOH-*d*₄, 400 MHz) du composé **CAP 122**

Ces données mènent à un dihydroflavanol (3-hydroxyflavanone ou flavanonol). La stéréochimie de la position C-2 est déterminée (2R) grâce à la biogenèse des dihydroflavonols qui impose une orientation au cycle B; celle de la position C-3 est déterminée (3R) grâce à la valeur de la constante de couplage (11,6 Hz) entre H-2 / H-3 qui signifie une disposition *trans* de ces deux noyaux [2-3], Ce composé est donc la **(2R, 3R)-dihydroquercetine**. Il est connu sous le nom de **Taxifoline** ; figure [IV.21].

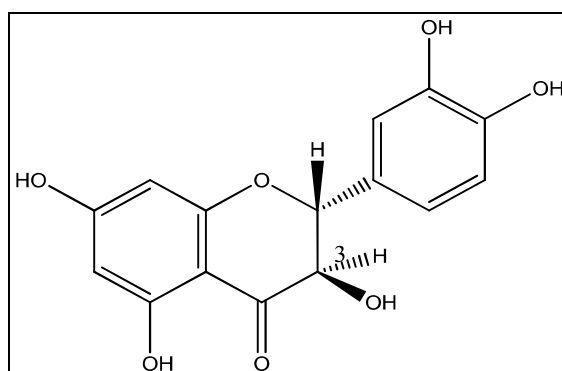
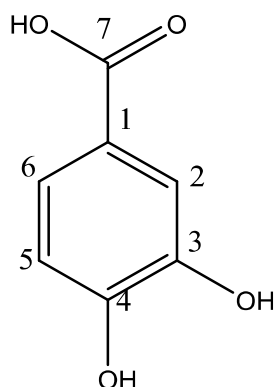


Figure IV.21. La structure de la **Taxifoline**

IV.2.3. Elucidation structurale du composé CAP/4/4



Le spectre de masse ESI-MS ; **figure [IV.22.]** ; enregistré en mode négatif de ce composé indique la présence d'un pic d'ion pseudo moléculaire à $m/z = 153,0$ $[M-H]^-$ correspondant à une masse moléculaire de 154 uma et une formule brute en $C_7H_6O_4$ avec 5 insaturations.

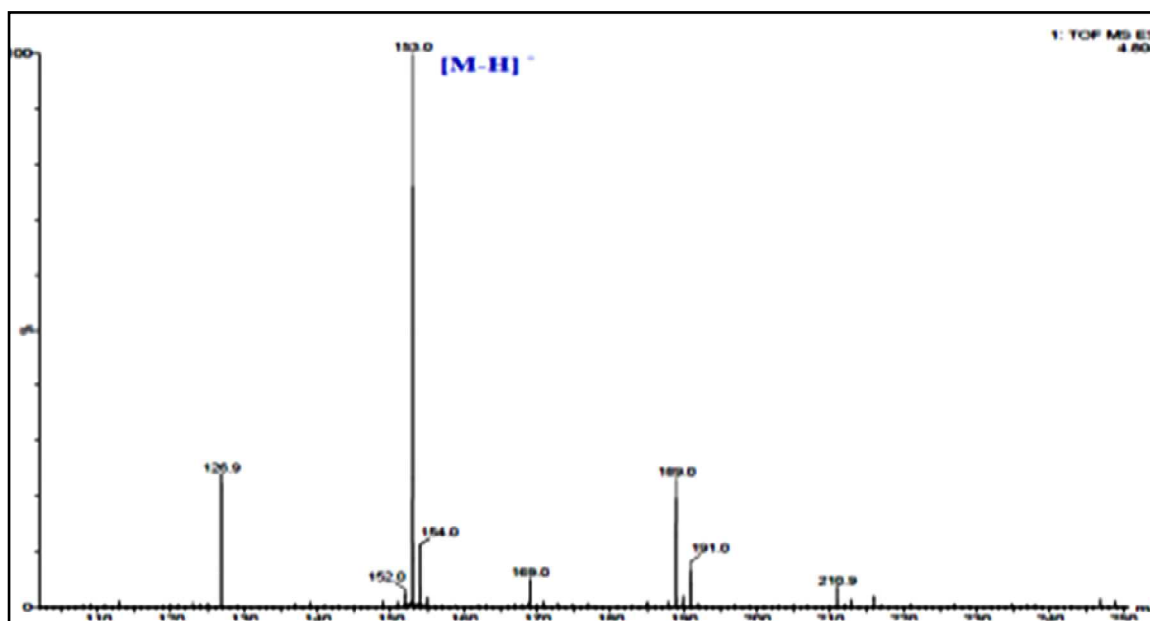


Figure IV.22. Spectre de masse ESI-MS du composé CAP/4/4

Ce qui est remarquable sur le spectre RMN 1H ; **figure [IV.23.]** ; de ce composé, est l'absence de la symétrie au niveau du noyau aromatique. Il révèle la présence d'un système de spins de type ABX où les protons sont localisés à $\delta_H = 7,10$ ppm ($d, J = 1,9$ Hz, H-2), $\delta_H = 7.16$ ppm ($dd, J = 8,2, 1.9$ Hz, H-6) et 6.48 ppm ($d, J = 8,2$ Hz, H-5).

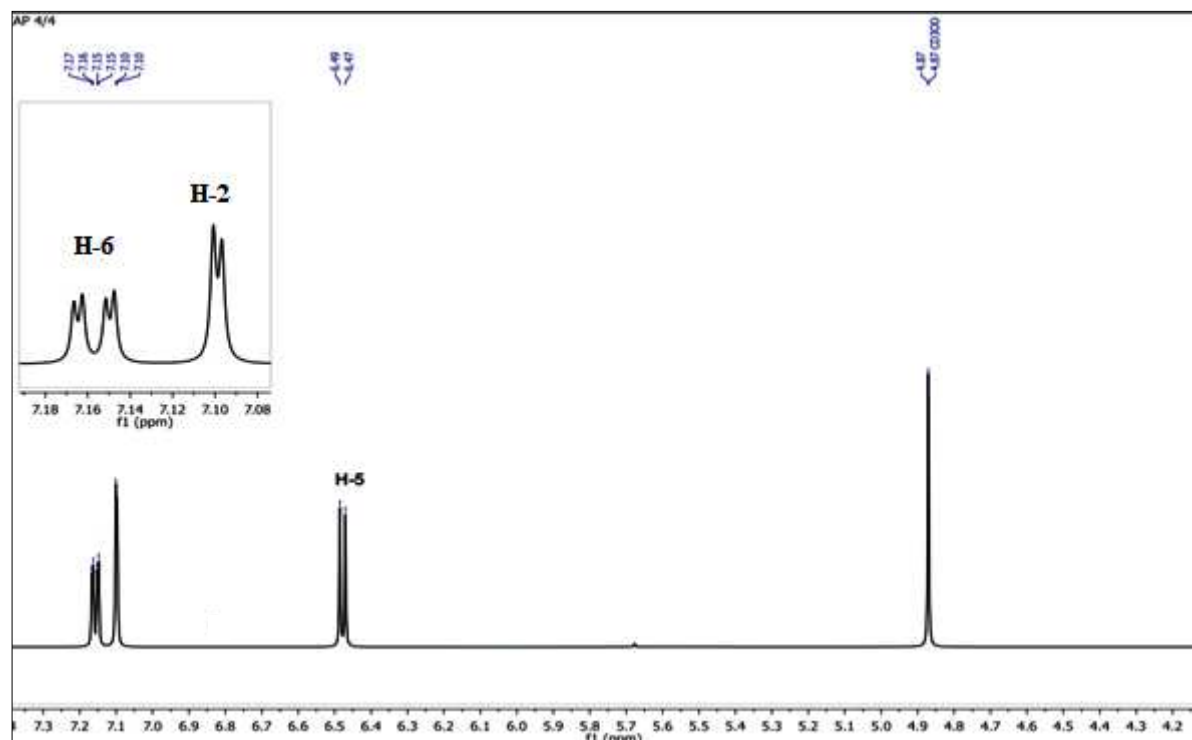


Figure IV.23. Spectre RMN ^1H (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) du composé CAP/4/4

Positions	RMN ^1H δ (ppm), m , J (Hz)
1	-
2	7.10 (1H, d , $J = 1.9$ Hz)
3	-
4	-
5	6.48 (1H, d , $J = 8.2$ Hz)
6	7.16 (1H, dd , $J = 8.2-1.9$ Hz)
7	-

Tableau IV.4. Données de la spectrométrie RMN ^1H ($\text{MeOH-}d_4$, 400 MHz) du composé CAP/4/4

Les déplacements chimiques de ce noyau 1, 3, 4- trisubstitué sont déterminés par comparaison avec les données de la littérature [4]. Ceci conduit à identifier le composé CAP/4/4 comme étant : l'Acide Protocatéchique ; figure [IV.24].

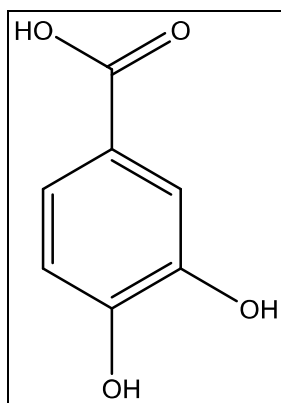
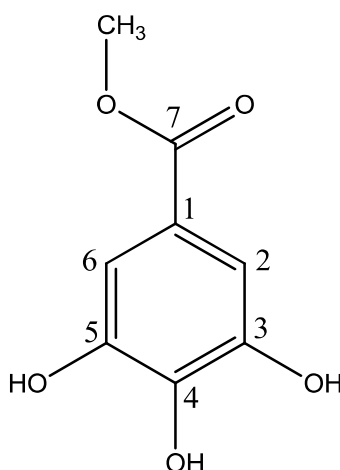


Figure IV.24. La structure de l'Acide Protocatéchuïque.

IV.2.4. Elucidation structurale du composé CAP/4/6



Le spectre de masse ESI-MS ; **figure [IV.25.]** ; du composé **CAP/4/6** présente un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 207,1 [M+Na]^+$, soit une masse moléculaire égale à 184 uma correspondant à une formule brute en **C₈H₈O₅**.

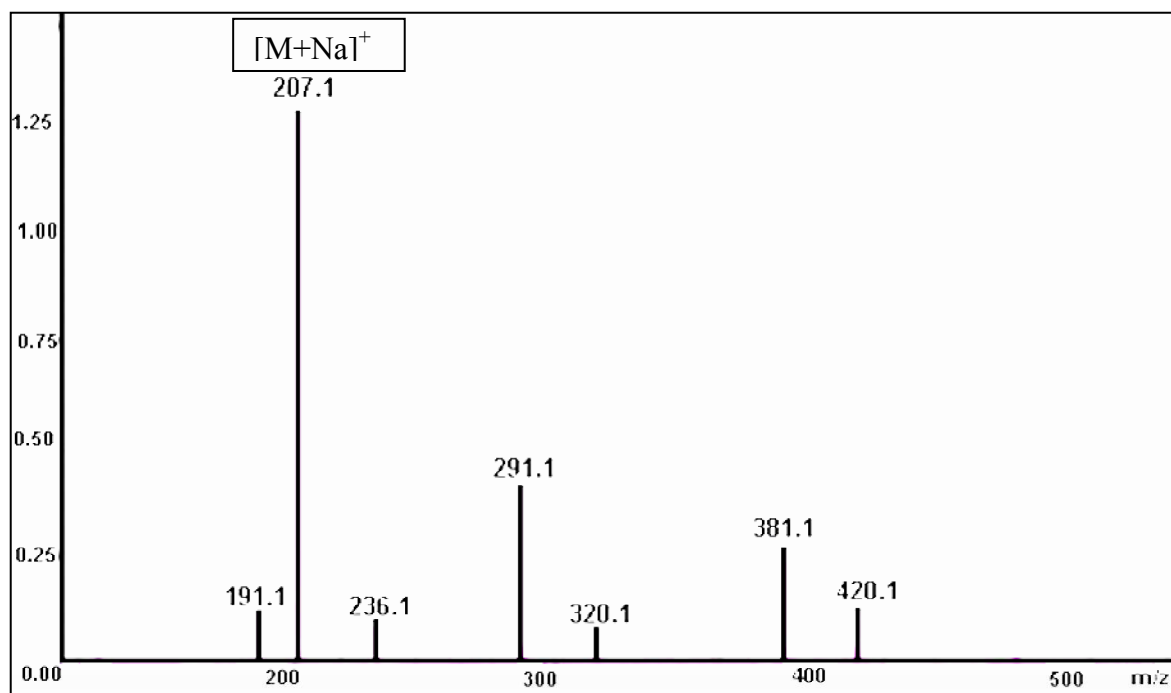


Figure IV.25. Spectre de masse ESI-MS (+) du composé CAP/4/6

Le nombre et la nature des protons et carbones observés sur les spectres RMN ^1H et ^{13}C de ce composé, traduisent clairement sa nature phénolique. En effet, le spectre RMN ^1H ; **figure [IV.26.]** ; révèle l'existence de deux signaux singulets résonant à $\delta_{\text{H}} = 3,85$ ppm et $\delta_{\text{H}} = 7,08$ ppm d'intégration 3H pour le signal blindé et 2H pour le signal déblindé. Ces données témoignent la présence d'un groupement méthoxyle et deux protons aromatiques symétriques.

Par ailleurs, le spectre RMN ^{13}C ; **figure [IV.27.]** ; donne plus d'informations sur la structure de ce composé en montrant les signaux correspondant à un groupement OCH_3 à $\delta_{\text{C}} = 51,6$ ppm, deux groupements CH à $\delta_{\text{C}} = 109,4$ ppm et cinq carbones quaternaires, parmi eux : trois oxygénés à $\delta_{\text{C}} = 138$ et $147,5$ ppm et un carbonyle à $\delta_{\text{C}} = 167,6$ ppm.

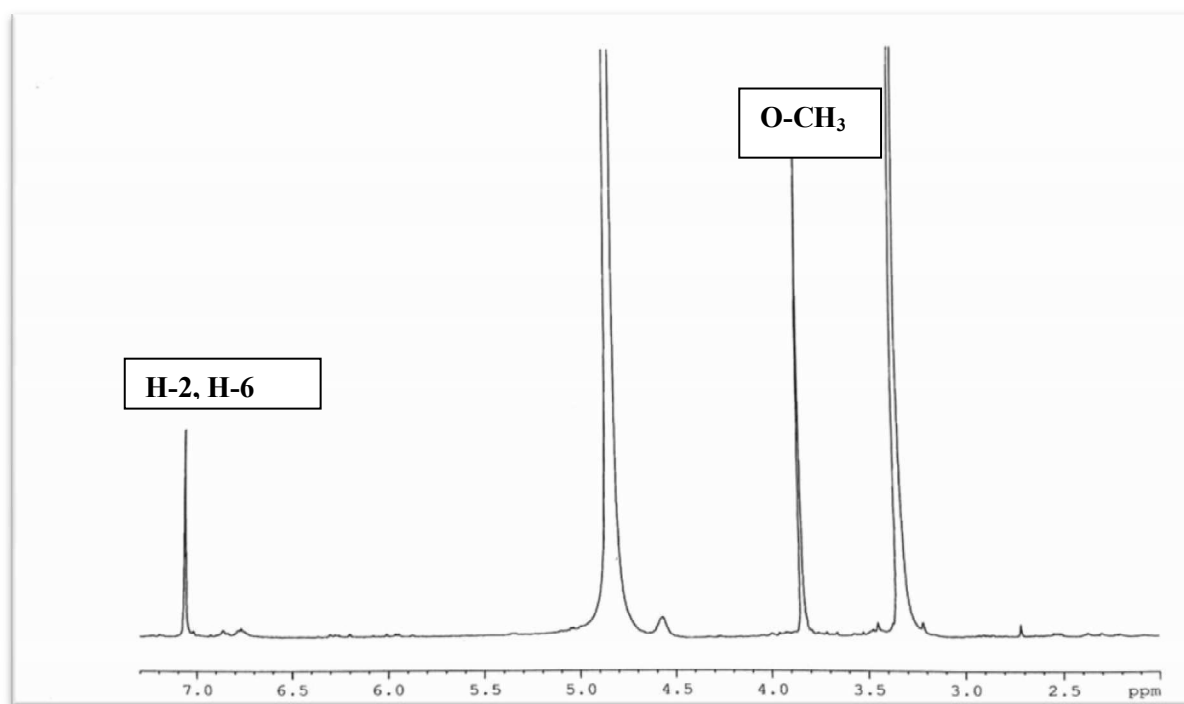


Figure IV.26. Spectre RMN ^1H (600 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) du composé CAP/4/6

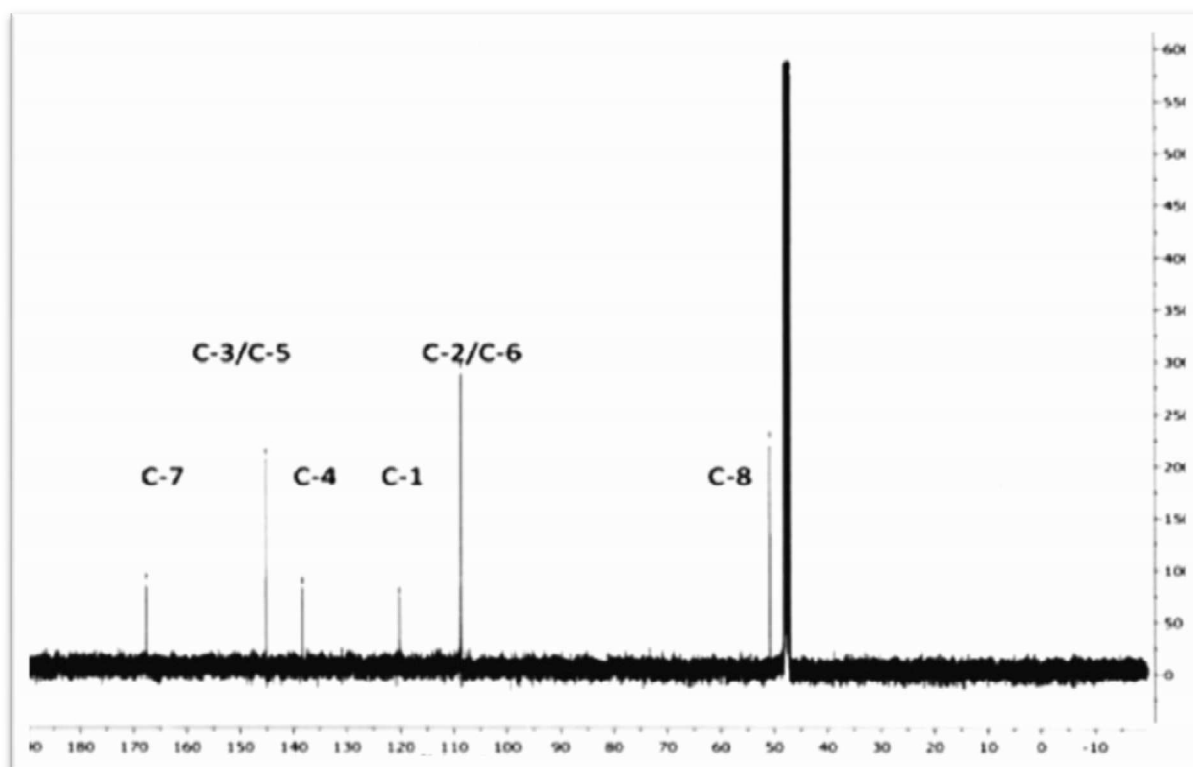


Figure IV.27. Spectre RMN ^{13}C (600 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) du composé CAP/4/6

L'étude du spectre relatif à l'expérience HMBC ; **figure [IV.28.]** ; permet de tirer les indications suivantes :

- Le proton H-2 / H-6 montre cinq tâches de corrélation avec les atomes de carbone à $\delta_C = 108.4$, ppm, $\delta_C = 120.5$ ppm, $\delta_C = 147.5$ ppm, $\delta_C = 138.0$ ppm et, $\delta_C = 167.6$ ppm attribuables aux carbones C-2/C-6, C-1, C-3/C-5, C-4 et C-7, respectivement
- Les protons du groupement méthoxyle corrélient avec le carbone C-7 à $\delta_C = 167.6$ ppm porteur de la fonction carbonyle ester.
- L'absence d'autres corrélations avec les carbones C-3, C-4 et C-5 confirme la présence des groupements hydroxyles libres dans ces positions.

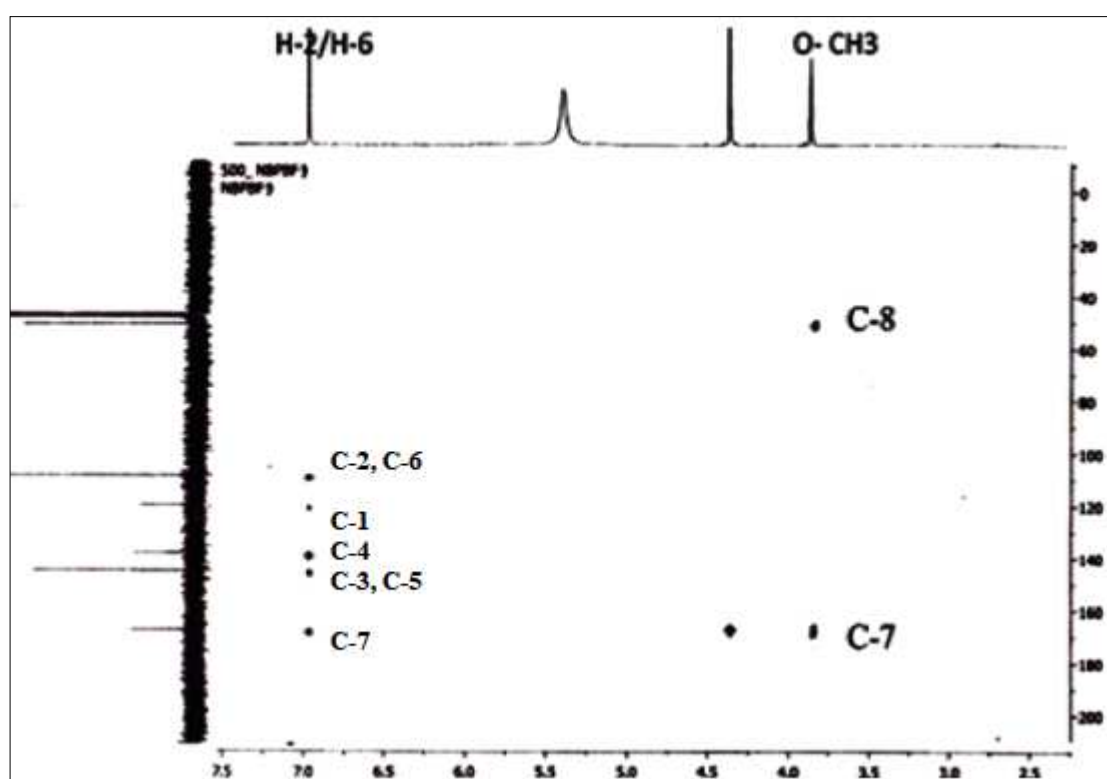


Figure IV.28. Spectre HMBC (600 MHz, MeOH-*d*4) du composé CAP/4/6

Positions	RMN ^1H δ (ppm), <i>m</i> , <i>J</i> (Hz)	RMN ^{13}C δ (ppm)
1	-	120.5
2 / 6	7.08 (<i>s</i> , 1H)	109.4
3 / 5	-	147.5
4	-	138
7	-	167.6
O-CH ₃	3.85 (<i>s</i> , 3H)	51.6

Tableau IV.5. Données de la spectroscopie RMN ^1H et ^{13}C (600 MHz, MeOH-*d*4) du composé CAP/4/6

Toutes ces données spectrales et la comparaison avec celles de la littérature [5] permettent d'identifier le composé CAP/4/6 à un dérivé méthylé de l'acide gallique connu sous le nom **Méthyle gallate** ; figure [IV.29].

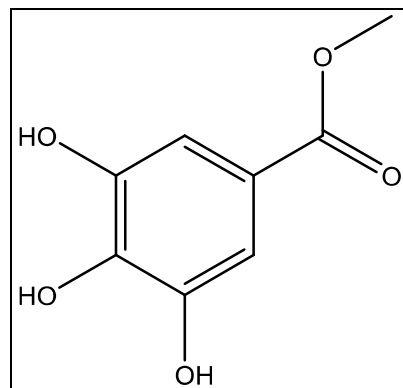
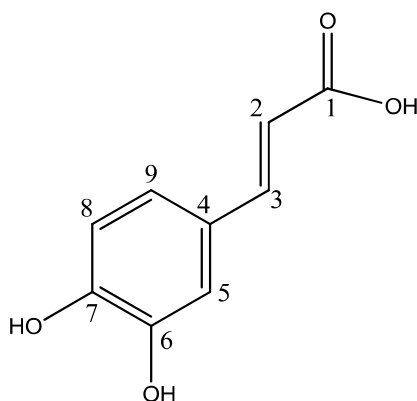


Figure IV.29. La structure du **Méthyle gallate**

IV.2.5. Elucidation structurale du composé CAP/4/7



L'examen du spectre RMN ^1H ; **figure [IV.30.]** ; montre qu'il s'agit d'un composé aromatique dont le cycle benzénique est caractérisé par :

- Deux doublets à $\delta_{\text{H}} = 7.34$ ppm et $\delta_{\text{H}} = 8.65$ ppm ayant la même constante de couplage $J = 15.9$ Hz attribuable à des protons vicinaux d'une double liaison, La valeur de constante de couplage indique la configuration *trans* de ces protons.
- Un doublet à $\delta_{\text{H}} = 7.90$ ppm qui ne peut être attribué qu'au proton H-8 car la valeur de la constante de couplage $J = 8,2$ Hz indique la présence d'un proton en *ortho*.

- Un doublet de doublet à $\delta_{\text{H}} = 8.03$ ppm $J = 8,2-1,9$ Hz attribuable au proton H-9.
- Un doublet à $\delta_{\text{H}} = 8.14$ ppm donnant un couplage *mé*ta avec $J = 1,9$ Hz attribuable au proton H-5.

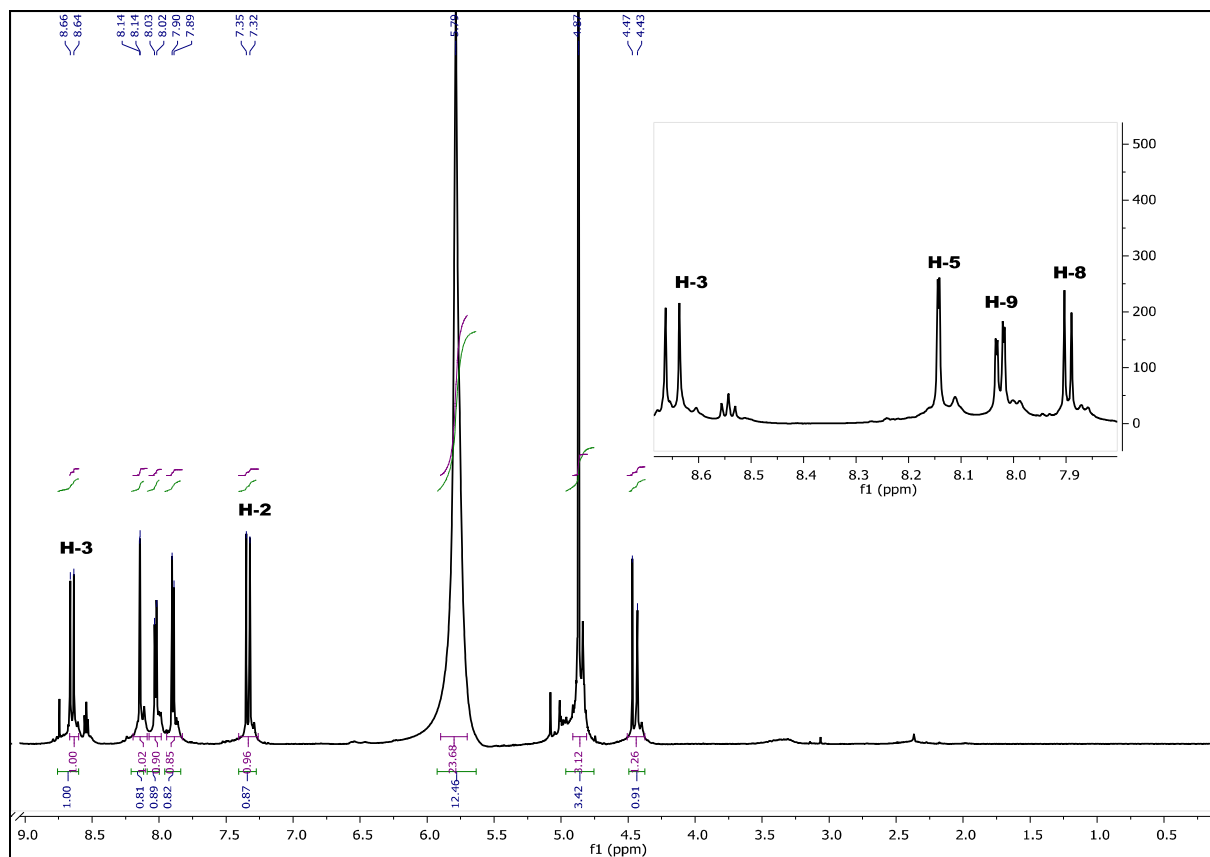


Figure IV.30. Spectre RMN ^1H (600 MHz, MeOH- d_4) du composé CAP/4/7

L'analyse du spectre relatif à l'expérience HSQC ; **figure [IV.31.]** ; permet l'attribution des signaux des protons aux atomes de carbone correspondants ainsi :

- Le H-2 permet l'attribution du signal à $\delta_{\text{C}} = 111.5$ ppm à l'atome de carbone C-2.
- Le H-3 permet l'attribution du signal à $\delta_{\text{C}} = 143.6$ ppm à l'atome de carbone C-3.
- Le H-5 permet l'attribution du signal à $\delta_{\text{C}} = 111.8$ ppm à l'atome de carbone C-5.
- Le H-8 permet l'attribution du signal à $\delta_{\text{C}} = 111.9$ ppm à l'atome de carbone C-8.
- Le H-9 permet l'attribution du signal à $\delta_{\text{C}} = 119.6$ ppm à l'atome de carbone C-9.

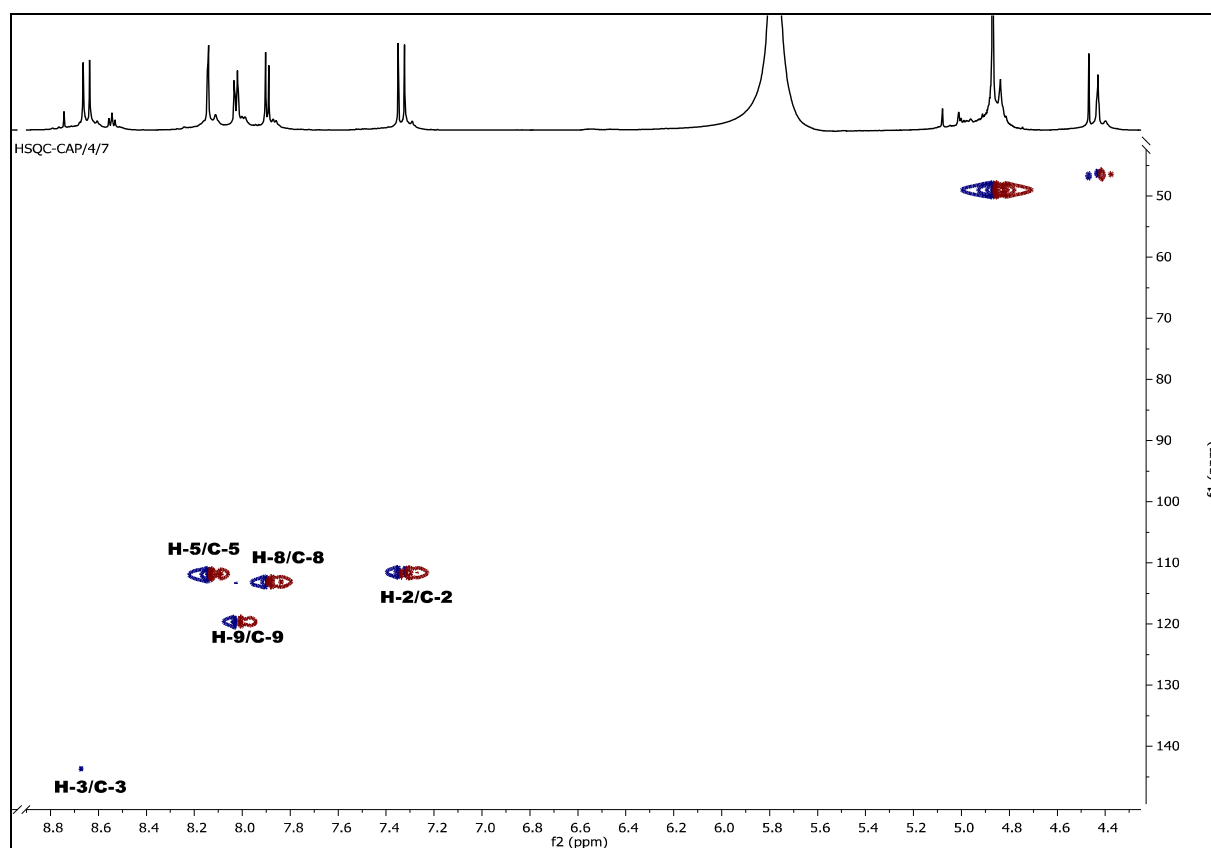


Figure IV.31. Spectre HSQC (600 MHz, MeOH-*d*4) du composé CAP/4/7

L'élucidation structurale en HMBC ; figure [IV.32.] ; de ce composé montre :

- Deux taches de corrélations entre le proton H-2 $\delta_H = 7.34$ ppm et les carbones à $\delta_C = 124.3$ et 166.5 ppm attribuable aux carbones C-4 et C-1, respectivement.
- Quatre taches de corrélations entre le proton H-8 $\delta_H = 7.90$ ppm et les carbones à $\delta_C = 119.6$, 124.3 , 143.2 et 145.7 ppm attribuable aux carbones C-9, C-4, C-6 et C-7, respectivement.
- Trois taches de corrélations entre le proton H-9 $\delta_H = 8.03$ ppm et les carbones à $\delta_C = 111.8$, 143.6 et 145.6 ppm attribuable aux carbones C-5, C-3 et C-7, respectivement.
- Deux taches de corrélations entre le proton H-5 $\delta_H = 8.14$ ppm et les carbones à $\delta_C = 119.6$ et 145.7 ppm attribuable aux carbones C-9 et C-7, respectivement.
- Quatre taches de corrélations entre le proton H-3 $\delta_H = 8.65$ ppm et les carbones à $\delta_C = 111.8$, 119.6 , 124.3 et 166.5 ppm attribuable aux carbones C-5, C-9, C-4 et C-1, respectivement.

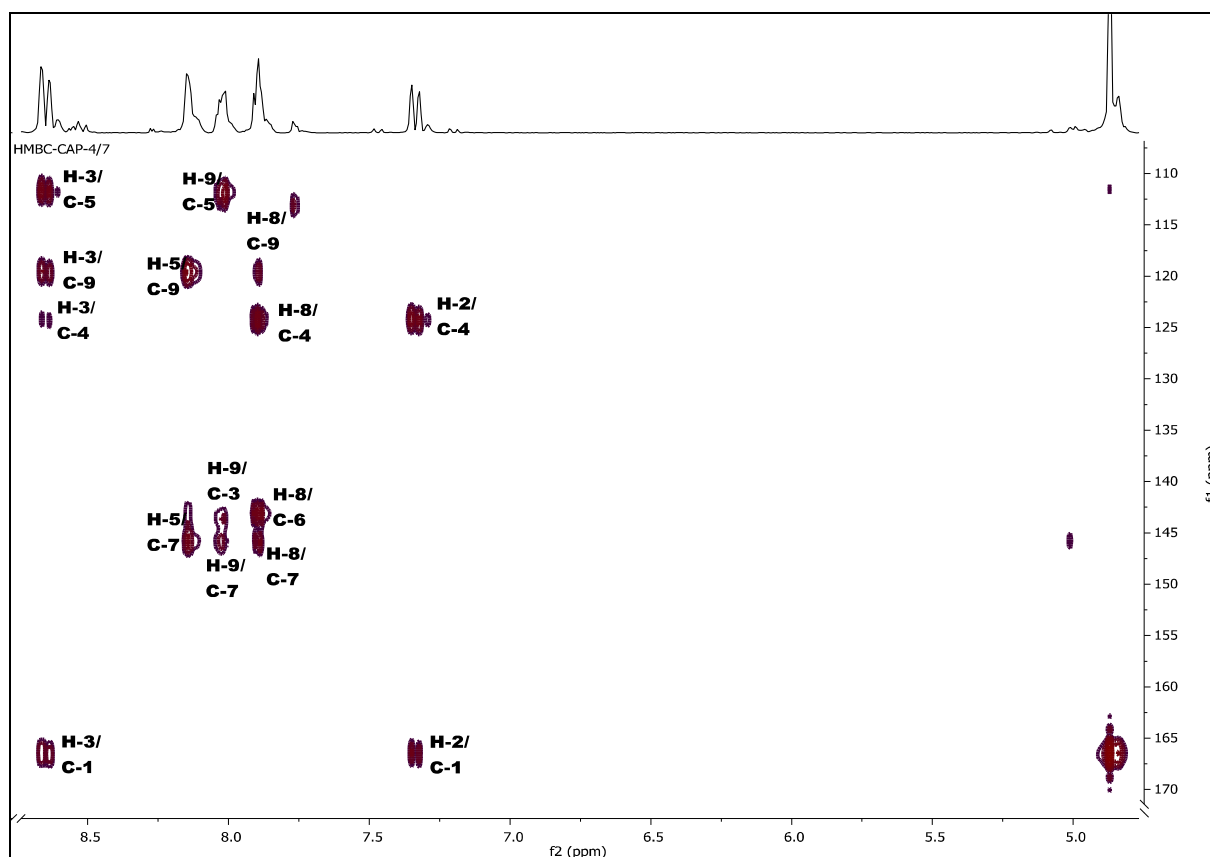


Figure IV.32. Spectre HMBC (600 MHz, MeOH-*d*4) du composé CAP/4/7

Positions	RMN ^1H δ (ppm), <i>m</i> , <i>J</i> (Hz)	RMN ^{13}C δ (ppm), <i>m</i> , <i>J</i> (Hz)
1	-	166.5
2	7.34 (<i>d</i> , <i>J</i> = 15.9 Hz, 1H)	111.5
3	8.65 (<i>d</i> , <i>J</i> = 15.9 Hz, 1H)	143.6
4	-	124.3
5	8.14 (<i>d</i> , <i>J</i> = 1.9 Hz, 1H)	111.8
6	-	143.2
7	-	145.7
8	6.90 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8.2 Hz, 1H)	111.9
9	8.03 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8.2-1.9 Hz, 1H)	119.6

Tableau IV.6. Données de la spectroscopie RMN ^1H et ^{13}C (600 MHz, MeOH-*d*4) du composé CAP/4/7

L'ensemble des données de RMN ^1H , ^{13}C , HSQC et HMBC orientent vers le composé Acide caféique ; figure [IV.33].

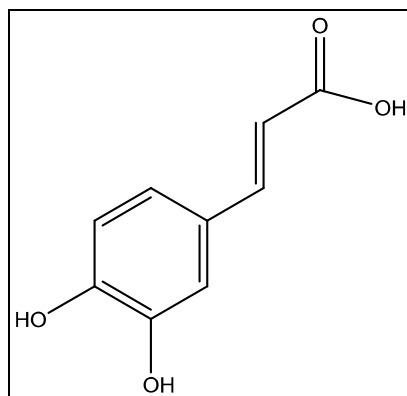
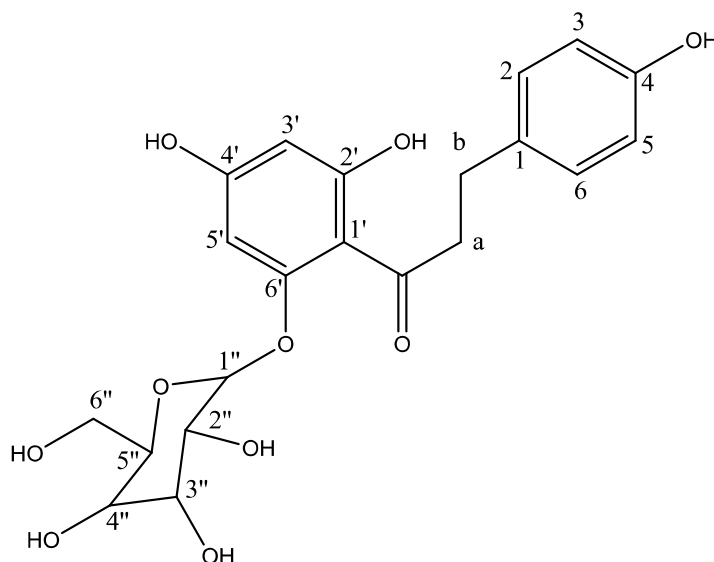


Figure IV.33. La structure de l'Acide caféique

IV.2.6. Elucidation structurale du composé CAP/4/20



L'analyse du spectre RMN ^1H ; **figure [IV.34.]** ; donne les indications suivantes :

- Un signal sous forme d'un multiplet (*m*) d'intégration 2H à $\delta_{\text{H}} = 3.48$ ppm attribuable à H- α_1 et H- α_2 , un des caractéristiques des chalcones.
- Un signal sous forme d'un triplet (*t*, 6.6 Hz) à $\delta_{\text{H}} = 2.92$ ppm attribuable à H- β_1 et H- β_2 , ce qui confirme qu'on a une structure de chalcone.
- Un signal sous forme d'un doublet (*d*) d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 7.11$ ppm ($J = 7,9$ Hz) attribuable au proton aromatique du cycle B attribuable aux protons H-6 et H-2.

- Un signal sous forme d'un doublet (*d*) d'intégration 1H à $\delta_H = 6,73$ ppm ($J = 7,8$ Hz) attribuable au proton aromatique du cycle B : H-3 et H-5. Ce qui confirme une substitution du noyau B en position 4.
- Un signal sous forme d'un singulet (*s*) à $\delta_H = 6,22$ ppm attribuable à H-5'.
- Un signal sous forme d'un singulet (*s*) à $\delta_H = 5,99$ ppm attribuable à H-3'.

Ces signaux confirment une substitution du noyau A en 2', 4', 1' et 6'.

- Un signal sous forme d'un doublet (*d*) d'intégration 1H à $\delta_H = 5,08$ ppm ($J = 6,9$ Hz) caractérisant le proton anomérique d'un sucre et qui montre un couplage *mé*ta H-6', ainsi que les autres signaux de ce sucre entre $\delta_H = 3,70 - 3,95$ ppm.

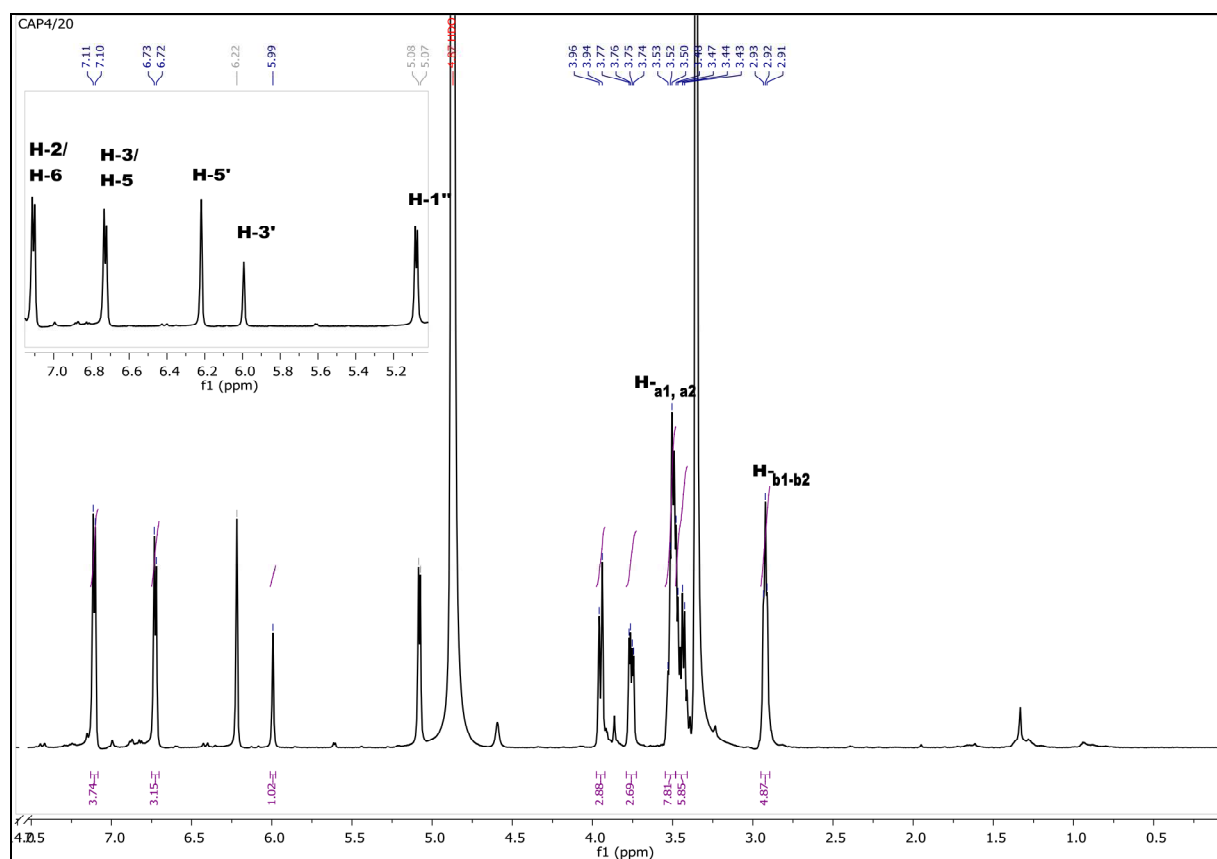


Figure IV.34. Spectre RMN ^1H (600 MHz, MeOH-*d*₄) du composé CAP/4/20

Le spectre ^1H - ^1H COSY et son étalement **figure [IV.35.]** et **figure [IV.36.]** donne les indications suivantes:

- Le proton H-2 résonant à $\delta_H = 7,11$ ppm en corrélation avec le proton H-3 à $\delta_H = 6.73$ ppm ce qui confirme leurs couplage *mé*ta.
- Le proton H-6 résonant à $\delta_H = 7,11$ ppm en corrélation avec le proton H-5 à $\delta_H = 6.73$ ppm, ce qui confirme leurs couplage *meta* donc une substitution du noyau B en C-4.
- Une tache de corrélation entre le H-1'' à $\delta_H = 5.08$ ppm (proton anomérique) du sucre avec un proton à $\delta_H = 3.52$ ppm qui ne peut être que le H-2'' avec une constante de couplage $J = 8.0$ Hz
- Une tache de corrélation entre le H-2'' à $\delta_H = 3.52$ ppm avec un proton à $\delta_H = 3.49$ ppm qui ne peut être que le H-3''.
- Une tache de corrélation entre le H-3'' à $\delta_H = 3.49$ ppm avec un proton à $\delta_H = 3.40$ ppm qui ne peut être que le H-4''.
- Une tache de corrélations entre H-4'' et un proton résonant à $\delta_H = 3.45$ ppm attribuable à H-5''.

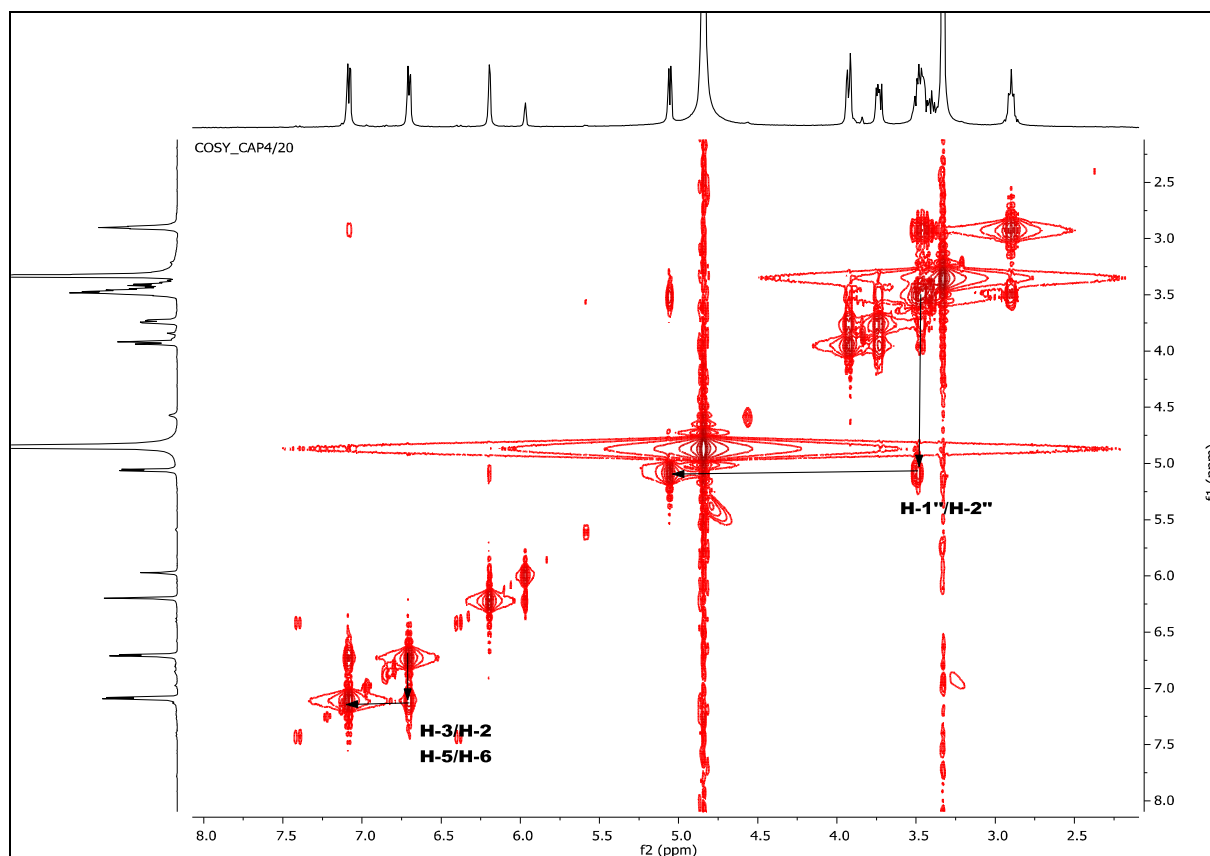


Figure IV.35. Spectre COSY (600 MHz, MeOH-*d*4) du composé CAP/4/20

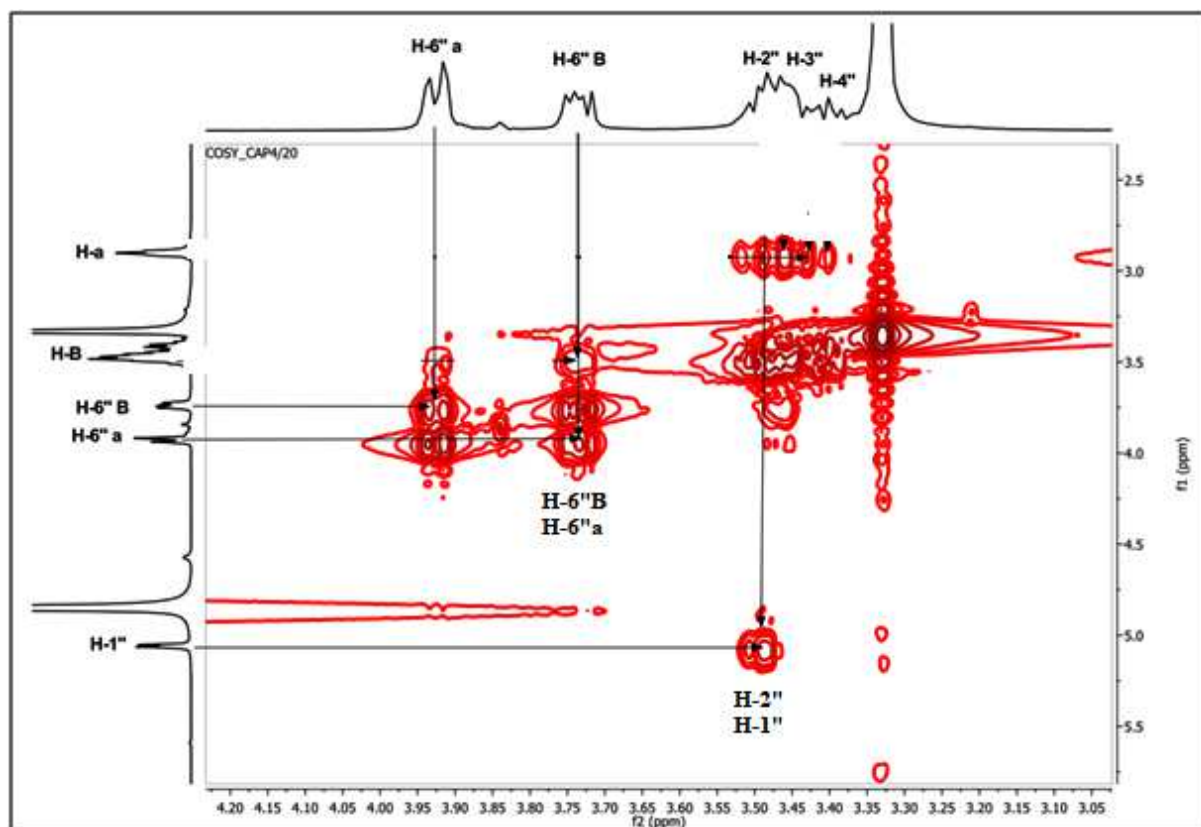


Figure IV.36. Spectre COSY (600 MHz, MeOH-*d*₄) du composé **CAP/4/20**
Étalement (3.00 à 4.20 ppm)

L'analyse du spectre relatif à l'expérience HSQC ; **figure [IV.37.]** ; permet l'attribution des signaux des protons aux atomes de carbone correspondants ainsi :

- Le H-6 et H-2 permet l'attribution du signal à $\delta_C = 130.4$ ppm à l'atome de carbone C-6 et C-2 respectivement.
- Le H-3 et H-5 permet l'attribution du signal à $\delta_C = 116,8$ ppm à l'atome de carbone C-3 et C-5 respectivement.
- Le H-5' permet l'attribution du signal à $\delta_C = 95,5$ ppm à l'atome de carbone C-5'.
- Le H-3' permet l'attribution du signal à $\delta_C = 98,5$ ppm à l'atome de carbone C-3'.
- Le H-1'' permet l'attribution du signal à $\delta_C = 102.0$ ppm à l'atome de carbone C-1''.
- Le H- α permet l'attribution du signal à $\delta_C = 47.3$ ppm à l'atome de carbone C- α .
- Le H- β permet l'attribution du signal à $\delta_C = 30.9$ ppm à l'atome de carbone C- β .

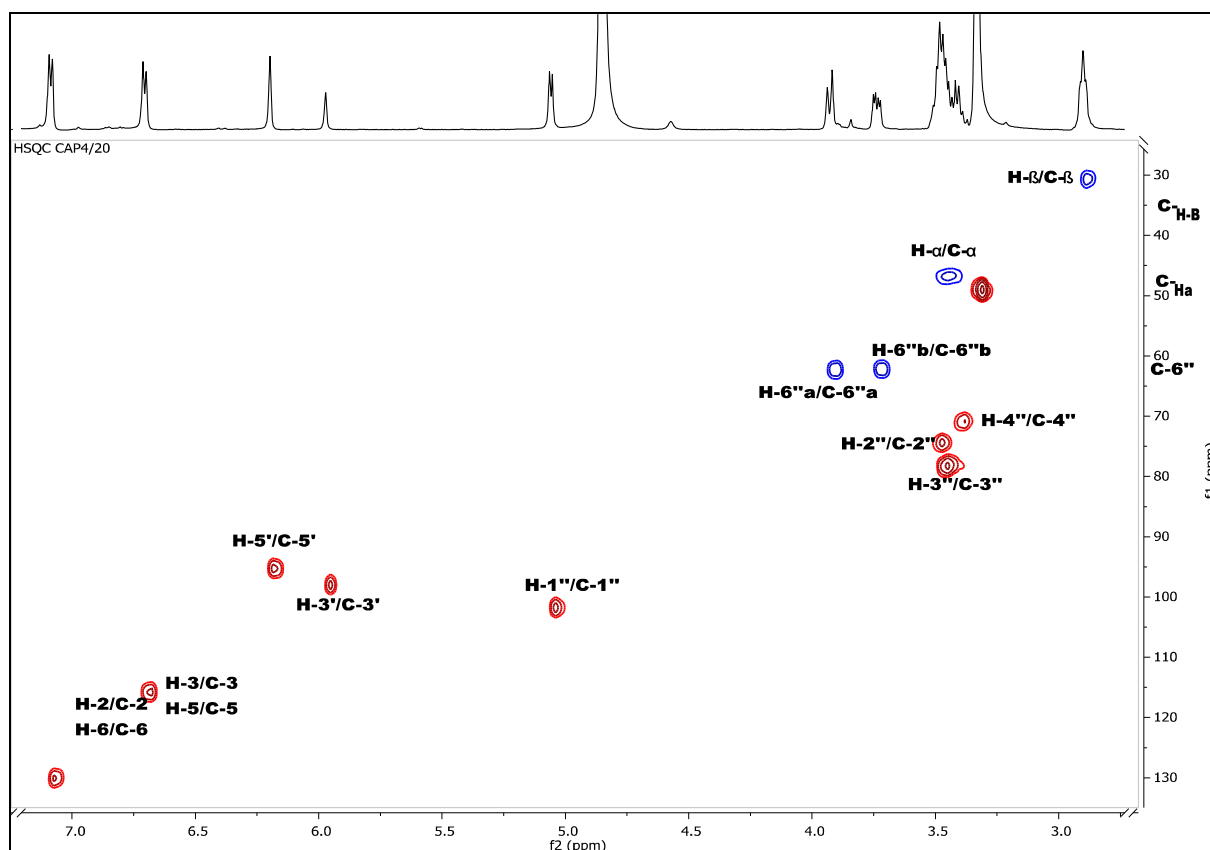


Figure IV.37. Spectre HSQC (600 MHz, MeOH-*d*4) du composé CAP/4/20

L'examen de spectre HMBC ; **figure [IV.38.]** ; nous a permis l'attribution des carbones quaternaires notamment :

- Une tache de corrélation à $\delta_C = 206.0$ ppm caractéristique du carbone (C=O) de cétone conjugué de la chalcone grâce à sa corrélation avec H- α et H- β
- Une tache de corrélation à $\delta_C = 166.6$ ppm attribué à C-4' grâce à sa corrélation avec H-5'.
- Un tache de corrélation à $\delta_C = 168.0$ ppm attribué à C-2' grâce à sa corrélation avec H-3'.
- Un tache de corrélation à $\delta_C = 134.6$ ppm attribué à C-1 grâce à sa corrélation avec H- α .
- Un tache de corrélation à $\delta_C = 156.5$ ppm attribué à C-4 grâce à sa corrélation avec H-3, H-5, H-6 et H-2.
- Un tache de corrélation à $\delta_C = 106.8$ ppm attribué à C-1' grâce à sa corrélation avec H-5' et H-3'.

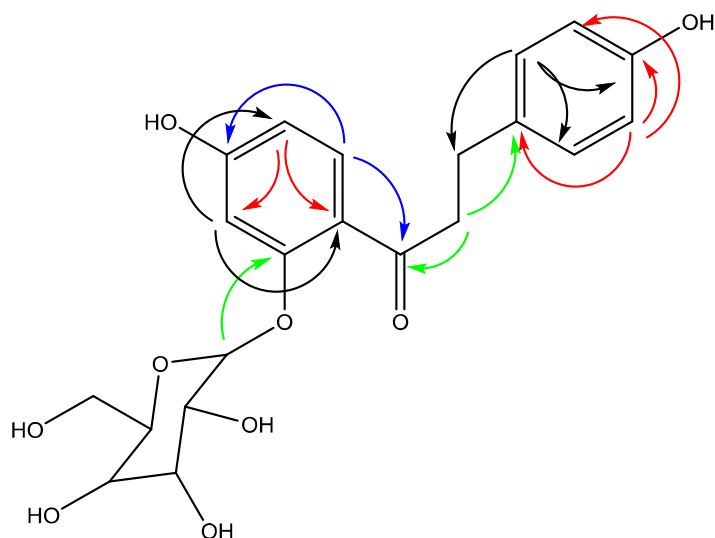


Figure IV.38. Les corrélations HMBC du composé CAP/4/20

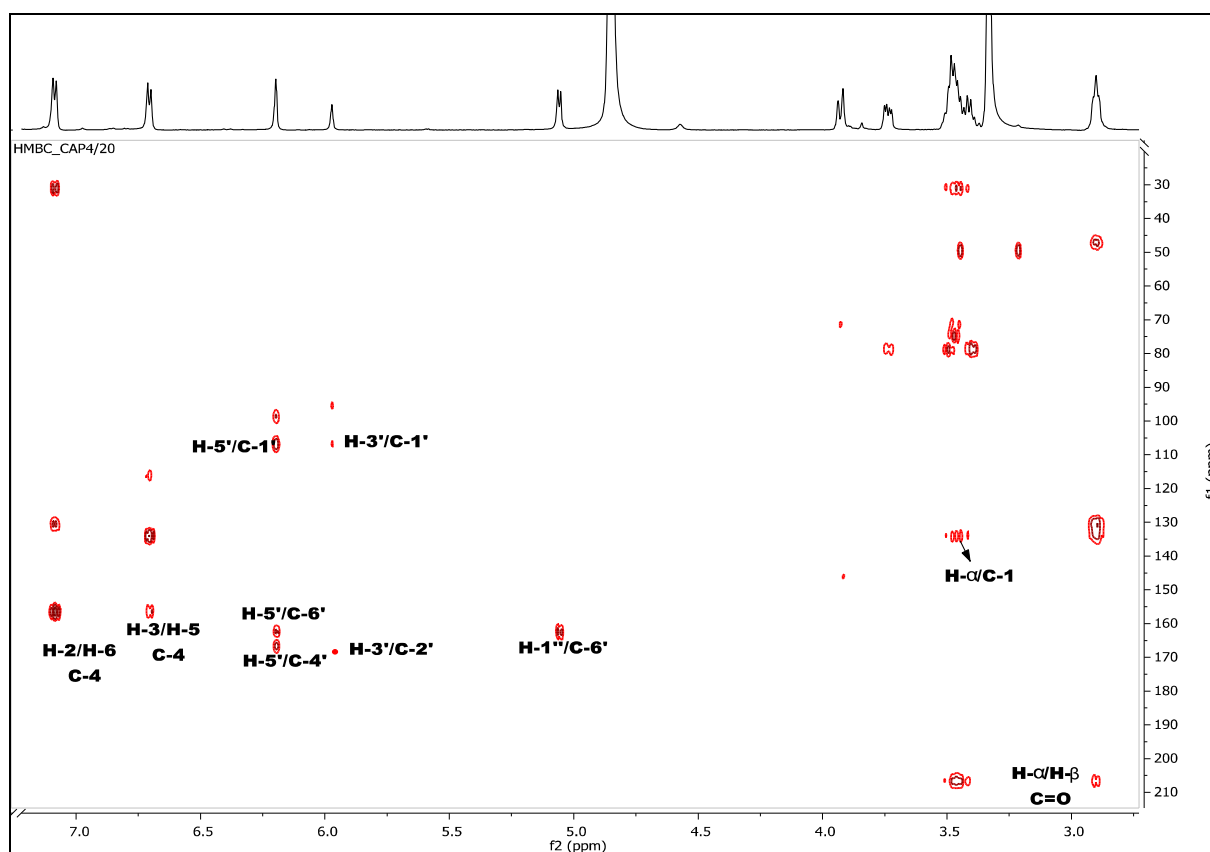


Figure IV.39. Spectre HMBC (600 MHz, MeOH-*d*₄) du composé CAP/4/20

Positions	RMN ^1H δ (ppm), <i>m</i> , <i>J</i> (Hz)	RMN ^{13}C δ (ppm)
C=O	-	206.5
CH ₂ - α	3.48 (<i>m</i> , 2H)	47.1
CH ₂ - β	2.92 (<i>t</i> , 6.6 Hz, 1H)	31.0
1		134.6
2/6	7.11 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7.9 Hz, 1H)	130.4
3/5	6.73 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7.9 Hz, 1H)	116.1
4	-	156.5
1'	-	106.8
2'	-	168.0
3'	5.99 (<i>s</i> , 1H)	98.3
4'	-	166.6
5'	6.22 (<i>s</i> , 1H)	95.6
6'	-	162.3
1''	5.08 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6.9 Hz, 1H)	102.1
2''	3.52 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H)	74.7
3''	3.49 (<i>dq</i> , <i>J</i> = 40.8, 8.9, 7.7 Hz, 1H)	78.5
4''	3.40 (<i>dq</i> , <i>J</i> = 40.8, 8.9, 7.7 Hz, 1H)	71.2
5''	3.45 (<i>s</i> , 1H)	95.6
6'' a	3.74 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 12.1, 5.4 Hz, 1H)	62.6
6'' b	3.93 (<i>d</i> , <i>J</i> = 11.8 Hz, 1H)	

Tableau IV.7. Données de la spectroscopie RMN ^1H et ^{13}C (600 MHz, MeOH-*d*4) du composé CAP/4/20

Ces éléments convergent vers la structure de 4, 2',4',6'-tetrahydroxy chalcone-2'- β - D-glucopyranoside ; figure [IV.40.].

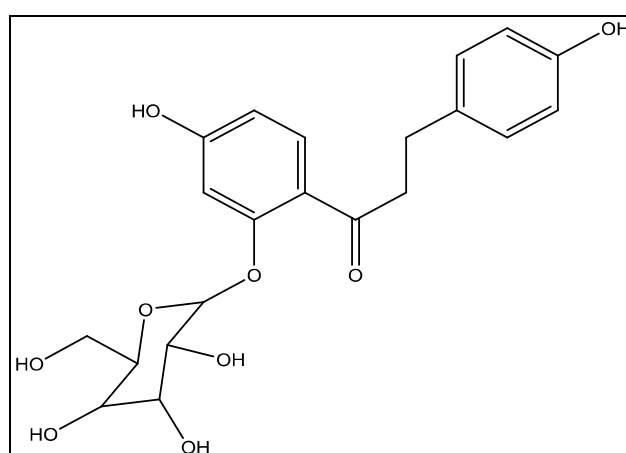
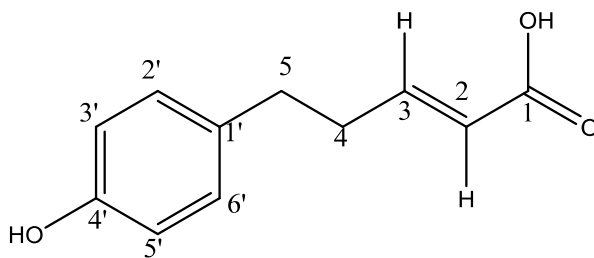


Figure IV.40. La structure de 4, 2',4',6'-tetrahydroxy chalcone-2'- β - D-glucopyranoside.

IV.2.7. Elucidation structurale du composé CAP/5/14 (Nouveau produit)



Le spectre de masse HR-ESIMS (-) du composé **CAP/5/14** ; figure [IV.41.] ; a donné un pic $[M-H]^-$ à $m/z = 191.0711$ (calculé; $C_{11}H_{11}O_3$, 191.0708) correspondant à la formule $C_{11}H_{12}O_3$.

Un ion à $m/z = 147$ correspondant à $[M-45]^+$ indiquant la présence de groupement $-COOH$. Comme il s'agit d'un composé aromatique donc entre le groupement $-COOH$ et le noyau aromatique il doit y avoir des atomes de carbones.

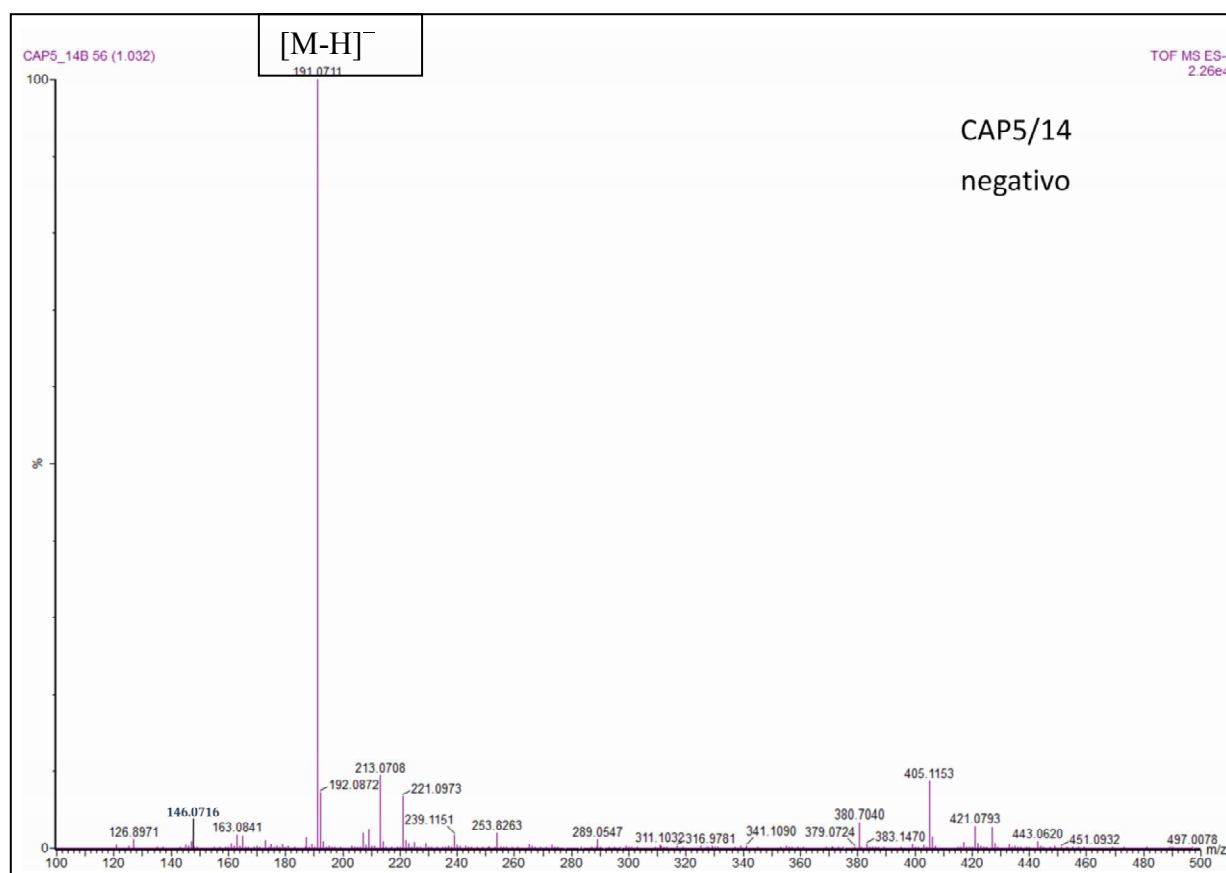


Figure IV.41. Spectre de masse HR-ESIMS (-) du composé **CAP/5/14**

L'examen du spectre RMN ^1H ; **Figure [IV.42.]** ; de ce composé, montre vers les champs faibles des signaux caractéristiques d'un dérivé d'acide phénolique dont le noyau aromatique est *para*-substitué notamment:

- A $\delta_{\text{H}} = 5.78$ ppm (*d*, $J = 15.60$ Hz) et $\delta_{\text{H}} = 6.93$ ppm (*dt*, $J = 14.6 - 6.9$ Hz), un système AB d'intégration 1H caractéristiques de protons de la double liaison, de configuration *trans*. Ces protons sont attribuables par conséquent aux protons H-2 et H-3, respectivement de ce dérivé d'acide phénolique. Ceci est d'ailleurs vérifié sur le spectre COSY ; **figure [IV.43.]** ; qui montre une corrélation nette entre ces deux noyaux.
- Deux systèmes de doublets d'intégration 2H chacun caractérisant le noyau aromatique *para*-substitué à $\delta_{\text{H}} = 7,02$ ppm ($J = 8.2$ Hz) attribuable à H-2' / H-6' et $\delta_{\text{H}} = 6,72$ ppm ($J = 8.2$ Hz) attribuable à H-3' / H-5'.

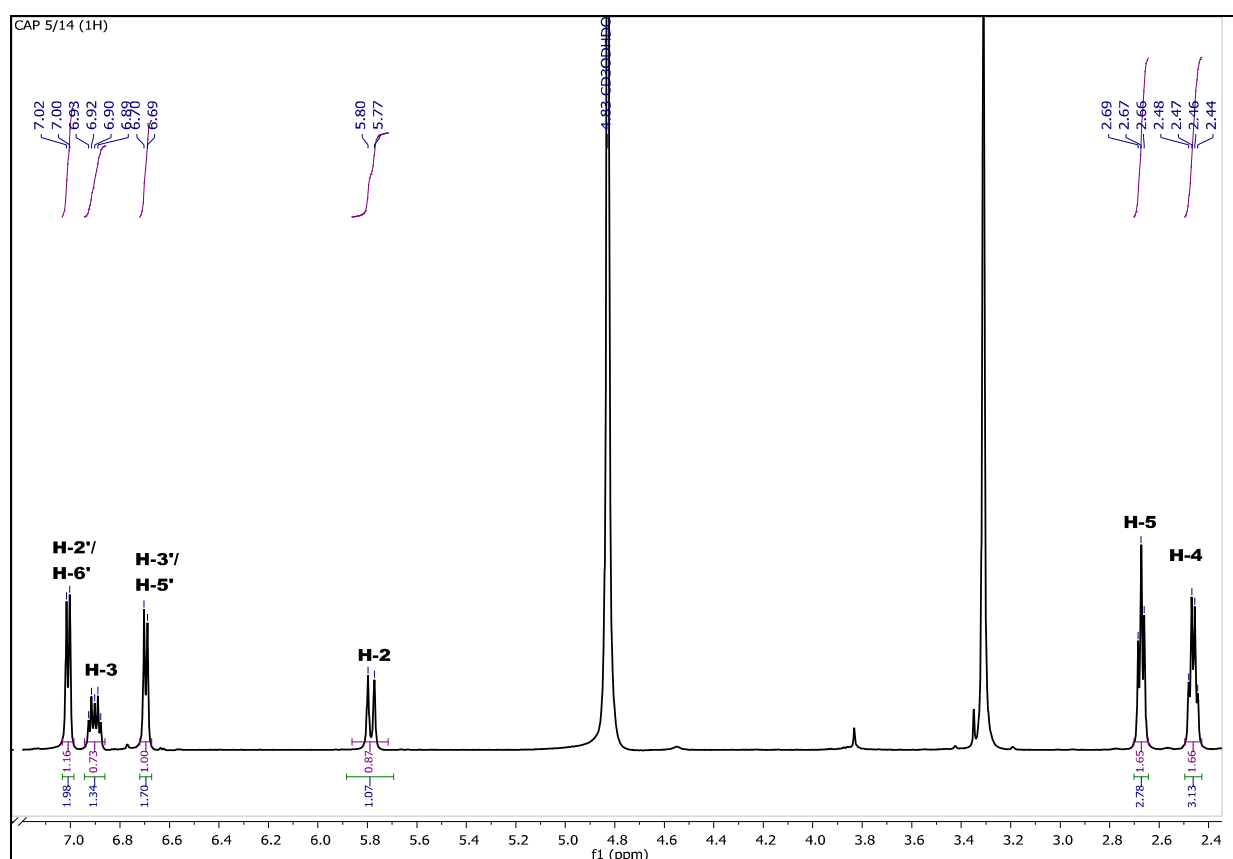


Figure IV.42. Spectre RMN ^1H (600 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) du composé CAP/5/14

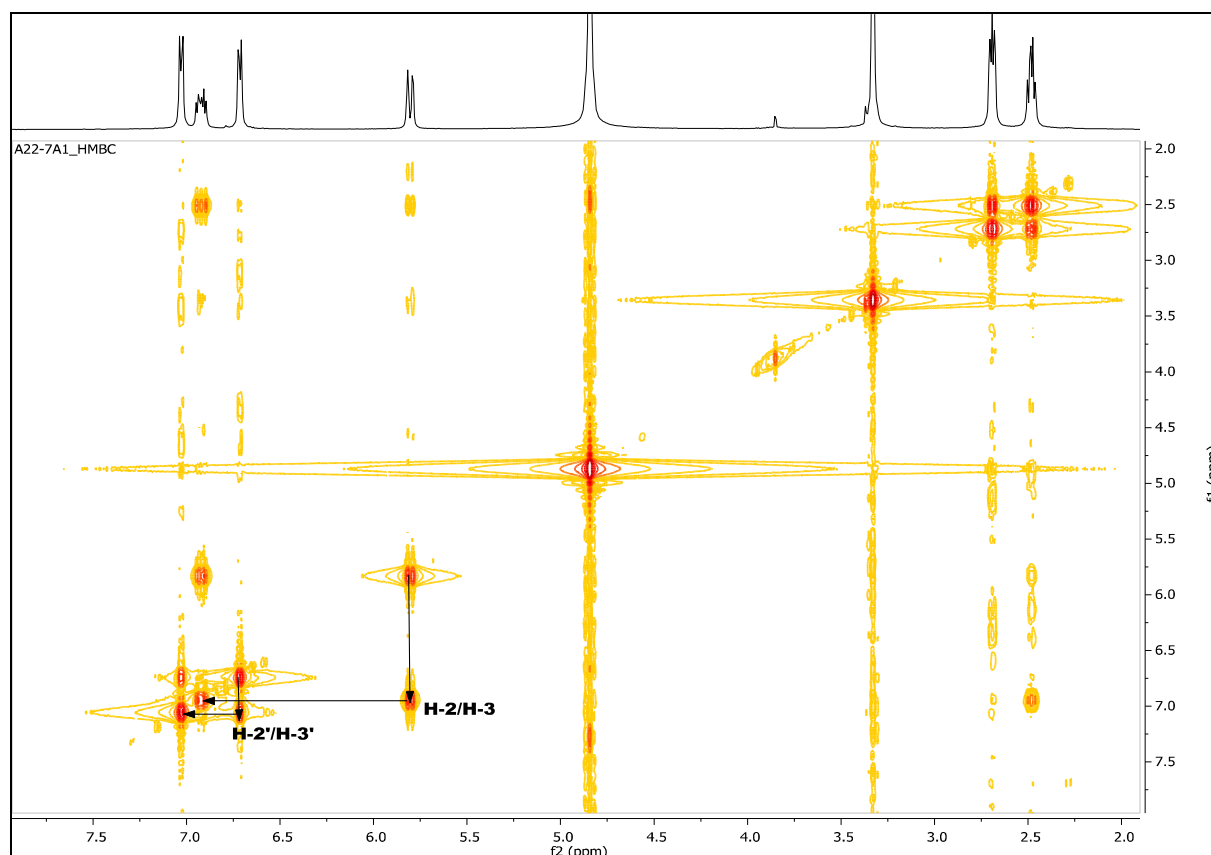


Figure IV.43. Spectre COSY (600 MHz, MeOH-*d*4) du composé CAP/5/14

L'analyse du spectre relatif à l'expérience HSQC ; **figure [IV.44.]** ; permet l'attribution des signaux des protons aux atomes de carbone correspondants comme suit :

- La corrélation du proton H-2' / H-6' avec le carbone C-2' / C-6' montre que ce dernier a un déplacement chimique $\delta_C = 129.0$ ppm.
- La corrélation du proton H-3' / H-5' avec le carbone C-3' / C-5' montre que ce dernier a un déplacement chimique $\delta_C = 114.7$ ppm.
- La corrélation du proton H-3 avec le carbone C-3 montre que ce dernier a un déplacement chimique $\delta_C = 147.7$ ppm.
- La corrélation du proton H-2 avec le carbone C-2 montre que ce dernier a un déplacement chimique $\delta_C = 122.7$ ppm.
- La corrélation du proton H-5 avec le carbone C-5 montre que ce dernier a un déplacement chimique $\delta_C = 33.8$ ppm.
- La corrélation du proton H-4 avec le carbone C-4 montre que ce dernier a un déplacement chimique $\delta_C = 34.4$ ppm.

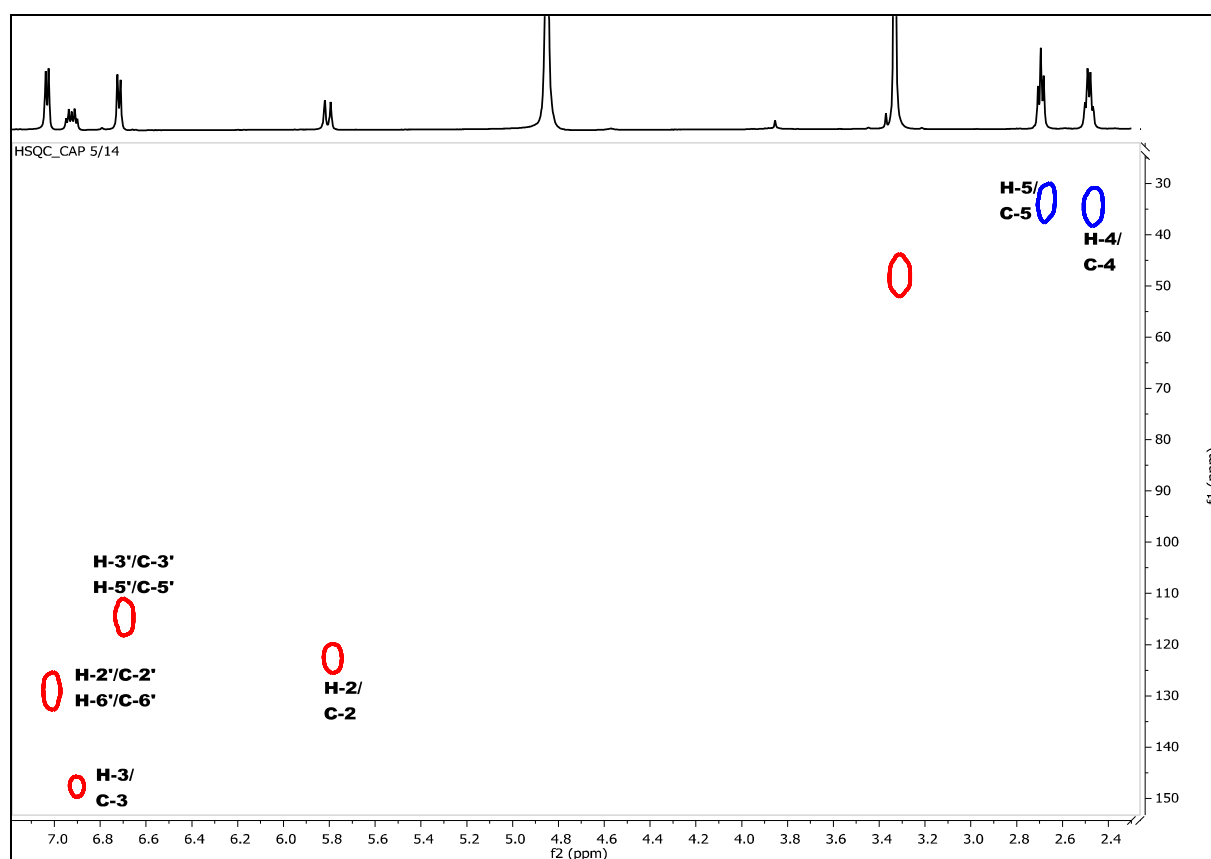


Figure IV.44. Spectre HSQC (600 MHz, MeOH-*d*4) du composé CAP/5/14

L'analyse du spectre relatif à l'expérience HMBC ; **figure [IV.46.]** ; permet de tirer les indications suivantes :

- Quatre taches de corrélations entre le proton H-2' et les carbones à $\delta_H = 33.8$ ppm, $\delta_H = 114.7$ ppm, $\delta_H = 129.0$ ppm et $\delta_H = 156.0$ ppm, attribuable aux carbones C-5, C-3', C-2' et C-4', respectivement, ce qui confirme que le cycle benzylique est lié à un CH₂ (C-5).
- Trois taches de corrélations entre le proton H-3' et les carbones à $\delta_H = 114.7$ ppm, $\delta_H = 131.8$ ppm et $\delta_H = 156.0$ ppm, attribuable aux carbones C-3', C-1' et C-4', respectivement.
- Trois taches de corrélations entre le proton H-5 et les carbones à $\delta_H = 34.4$ ppm, $\delta_H = 129.0$ ppm et $\delta_H = 147.7$ ppm, attribuable aux carbones C-4, C-2' et C-3, respectivement, ce qui confirme la liaison entre le CH₂ (C-5) et le groupement CH₂-CH (C-4 et C-3).

- Trois taches de corrélations entre le proton H-4 et les carbones à $\delta_H = 33.8$ ppm, $\delta_H = 129.0$ ppm et $\delta_H = 147.7$ ppm, attribuable aux carbones C-5, C-2' et C-3, respectivement.
- Trois taches de corrélations entre le proton H-3 et les carbones à $\delta_H = 33.8$ ppm, $\delta_H = 122.7$ ppm et $\delta_H = 169.9$ ppm, attribuable aux carbones C-5, C-2 et C-1, respectivement.
- Deux taches de corrélations entre le proton H-2 et les carbones à $\delta_H = 34.4$ ppm et $\delta_H = 169.9$ ppm, attribuable aux carbones C-4 et C-1, respectivement.

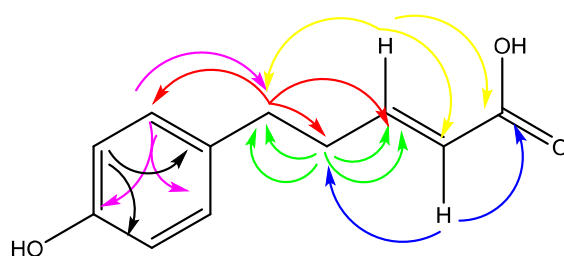


Figure IV.45. Les corrélations HMBC du composé CAP/5/14

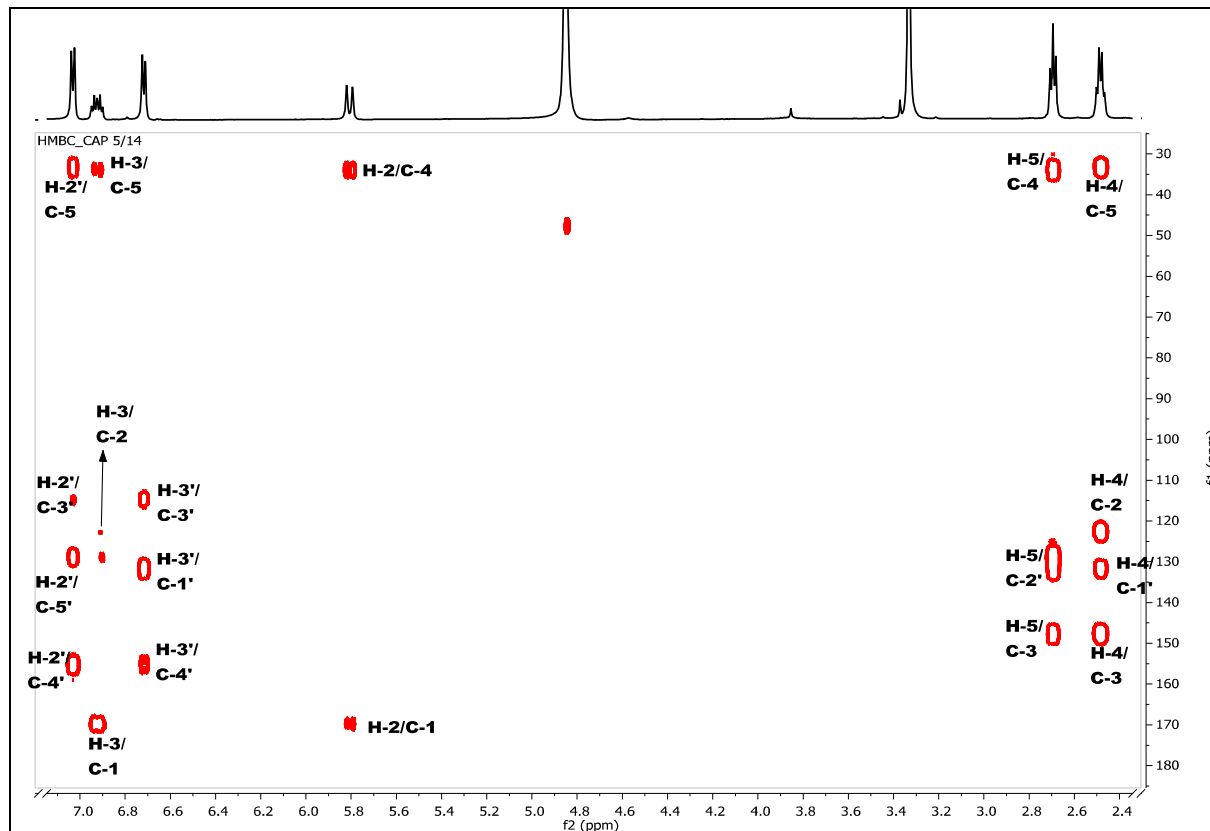


Figure IV.46. Spectre HMBC (600 MHz, MeOH-*d*4) du composé CAP/5/14

Positions	RMN ¹ H δ (ppm), <i>m</i> , <i>J</i> (Hz)	RMN ¹³ C δ (ppm)
1	-	169.9
2	5.81 (<i>d</i> , <i>J</i> = 15.6 Hz, 2H)	122.7
3	6.94 (<i>dt</i> , <i>J</i> = 14.6-6.9 Hz, 1H)	147.7
4	2.50 (<i>q</i> , <i>J</i> = 7.1 Hz, 1H)	34.4
5	2.71 (<i>t</i> , <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H)	33.8
1'	-	131.8
2'	7.04 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8.2 Hz, 1H)	129.0
3'	6.73 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8.2 Hz, 1H)	114.7
4'	-	156.0
5'	6.73 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8.2 Hz, 1H)	114.7
6'	7.04 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8.2 Hz, 1H)	129.0

Tableau IV.8. Données de la spectroscopie RMN ¹H et ¹³C (600 MHz, MeOH-*d*4) du composé CAP/5/14

Ces données suggèrent que cette molécule est un Acide 5-(*p*-hydroxy-phenyl)-pent-2-en ; figure [IV.47].

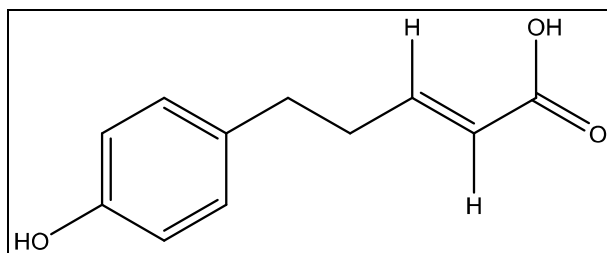
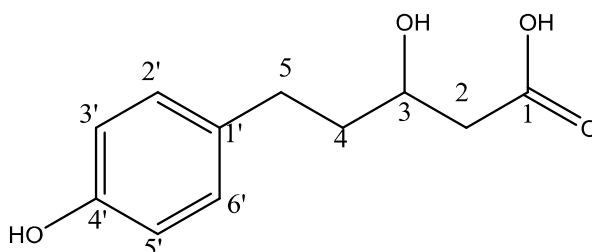


Figure IV.47. La structure de l'Acide 5-(*p*-hydroxy-phenyl)-pent-2-en

IV.2.8. Elucidation structurale du composé CAP/5/6



Le spectre de masse HR-ESIMS (-) du composé CAP/5/6 ; figure [IV.48.] ; a donné un pic [M-H]⁻ à *m/z* = 209.0621 (calculé; C₁₁ H₁₃ O₄, 209.08138) correspondant à la formule C₁₁ H₁₄ O₄ avec 5 insaturations.

Un ion à $m/z = 191$ correspondant à $[M-18]^+$ indiquant la perte d'un H_2O et Un ion à $m/z = 165$ correspondant à $[M-45]^+$ indiquant la perte d'un $COOH$.

Comme il s'agit d'un composé aromatique donc entre le groupement $-COOH$ et le noyau aromatique il doit y avoir des atomes de carbones.

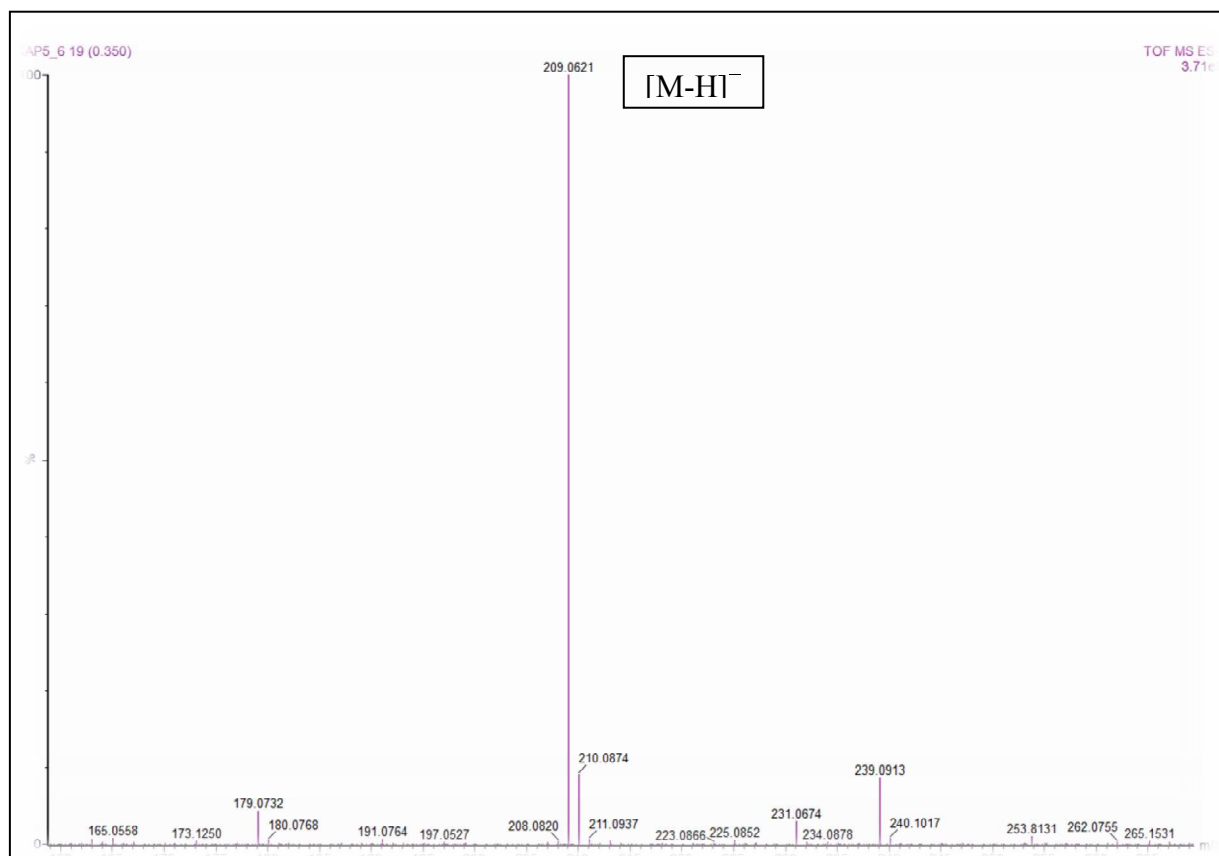


Figure IV.48. Spectre de masse HR-ESIMS (-) du composé CAP/5/6

L'examen du spectre RMN 1H et COSY ; **figure [IV.49.]** et **figure [IV.50.]** ; de ce composé, montre vers les champs faibles des signaux caractéristiques d'un dérivé d'acide phénolique dont le noyau aromatique est *para*-substitué notamment:

- A $\delta_H = 7.01$ ppm (d , $J = 8.3$ Hz, 2H) et $\delta_H = 6.69$ ppm (d , $J = 8.3$ Hz, 2H), un système AB d'intégration 2H, caractérisant le noyau aromatique *para*-substitué attribuable à H-2'/H-6' et H-3'/H-5', respectivement. Ceci est d'ailleurs vérifié sur le spectre COSY ; **figure [IV.38.]** ; qui montre une corrélation nette entre ces deux noyaux.
- A $\delta_H = 3.97$ ppm (dt , $J = 9.1, 4.8$ Hz, 1H), caractérisant un carbone carbinol attribué au proton H-3.

- A $\delta_H = 2.67$ ppm (*m*, 1H) et $\delta_H = 2.56$ ppm (*dt*, $J = 13.8, 8.2$ Hz, 1H) caractérisant un CH_2 attribué au proton H-5 α , 5 β . Ceci est confirmé par le spectre COSY, qui montre une corrélation nette entre H-5 et H-4.
- A $\delta_H = 2.45$ ppm (*m*, 1H) et $\delta_H = 2.38$ ppm (*dd*, $J = 15.1, 8.2$ Hz, 1H) caractérisant un CH_2 attribué au proton H-2 α , 2 β . Après vérification sur le spectre COSY, qui montre une corrélation entre H-2 et H-3.
- A $\delta_H = 1.73$ ppm (*dt*, $J = 14.2, 8.0$ Hz, 2H), caractérisant un CH_2 attribué au proton H-4, avec une corrélation nette sur le spectre COSY avec le proton H-3.

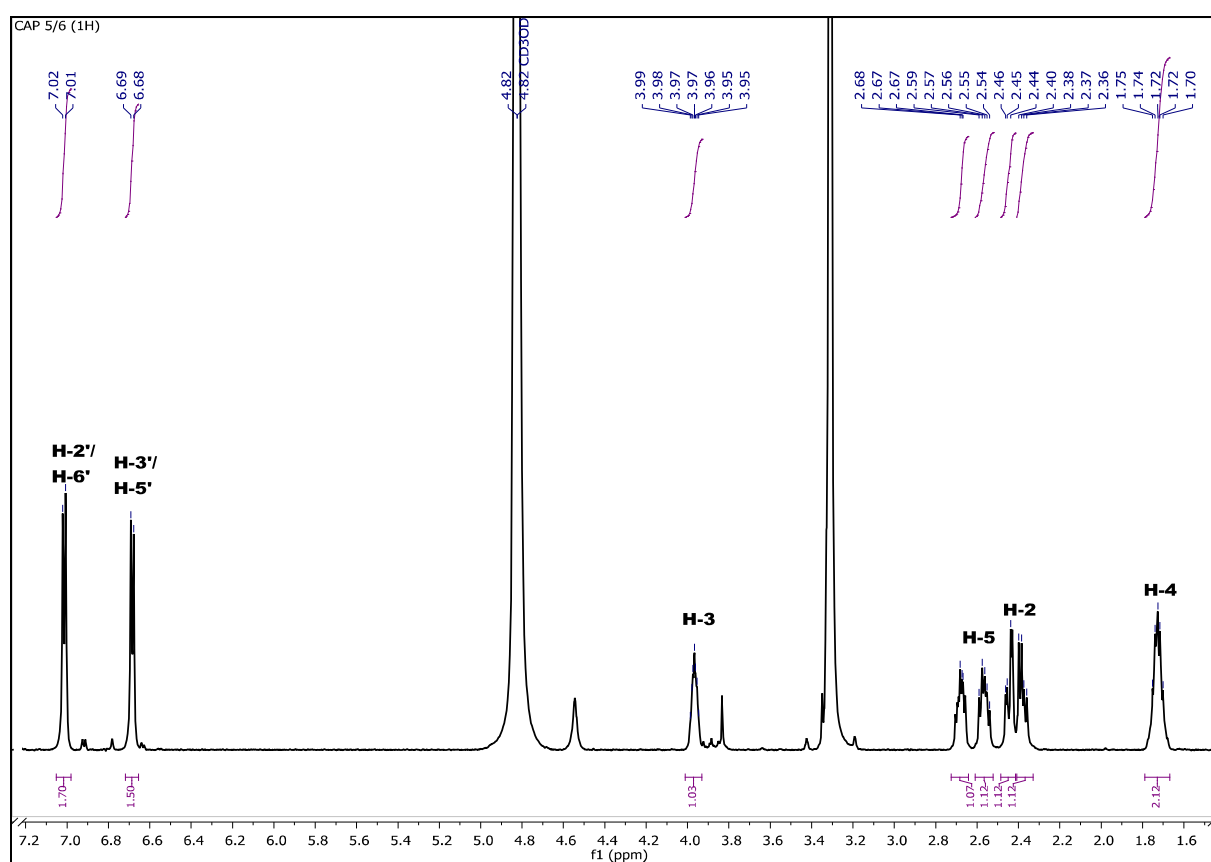


Figure IV.49. Spectre RMN ^1H (600 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) du composé CAP 5/6

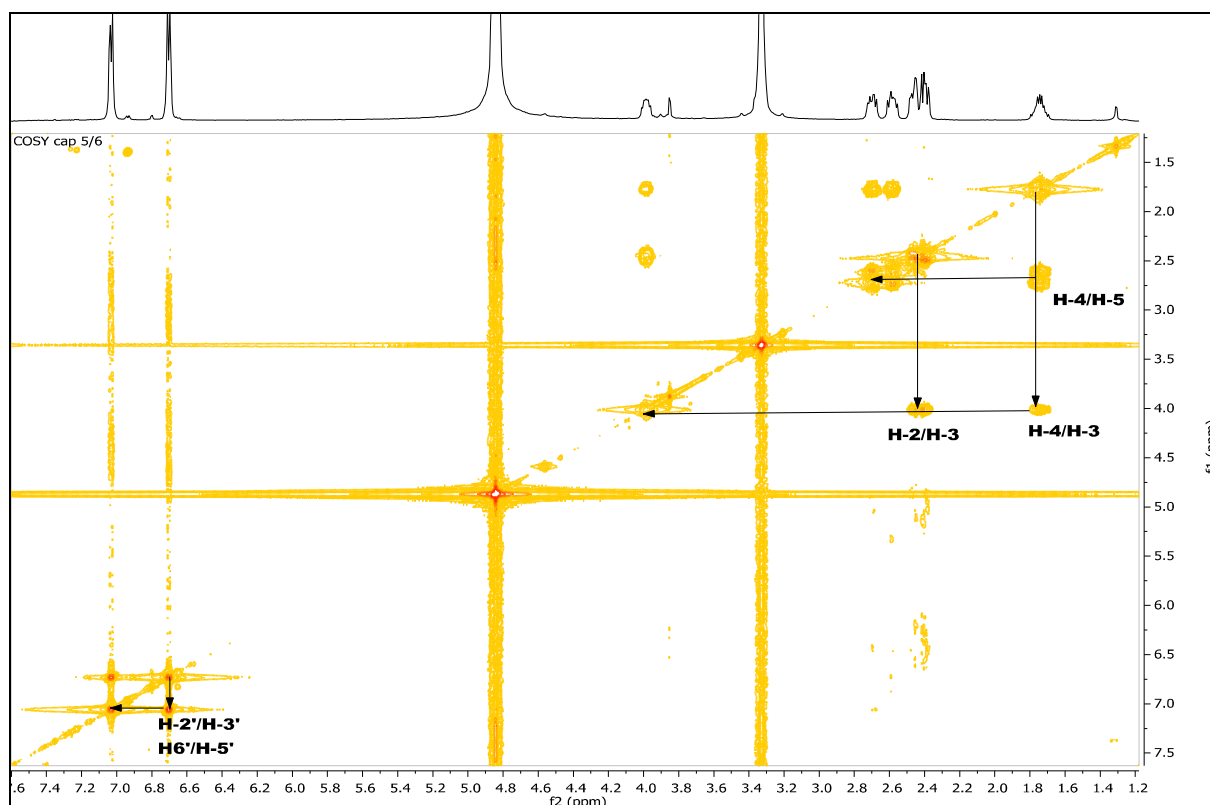


Figure IV.50. Spectre COSY (600 MHz, MeOH-*d*4) du composé CAP/5/6

L'analyse du spectre relatif à l'expérience HSQC ; **figure [IV.51.]** ; permet l'attribution des signaux des protons aux atomes de carbone correspondants comme suit :

- La corrélation du proton H-2' / H-6' avec le carbone C-2' / C-6' montre que ce dernier a un déplacement chimique $\delta_C = 130.0$ ppm.
- La corrélation du proton H-3' / H-5' avec le carbone C-3' / C-5' montre que ce dernier a un déplacement chimique $\delta_C = 115.8$ ppm.
- La corrélation du proton H-3 avec le carbone C-3 montre que ce dernier a un déplacement chimique $\delta_C = 68.5$ ppm caractérisant un carbone voisin d'un atome d'oxygène.
- La corrélation du proton H-5 α , 5 β avec le carbone C-5 montre que ce dernier a un déplacement chimique $\delta_C = 31.7$ ppm.
- La corrélation du proton H-2 avec le carbone C-2 montre que ce dernier a un déplacement chimique $\delta_C = 43.5$ ppm.
- La corrélation du proton H-4 avec le carbone C-4 montre que ce dernier a un déplacement chimique $\delta_C = 39.9$ ppm.

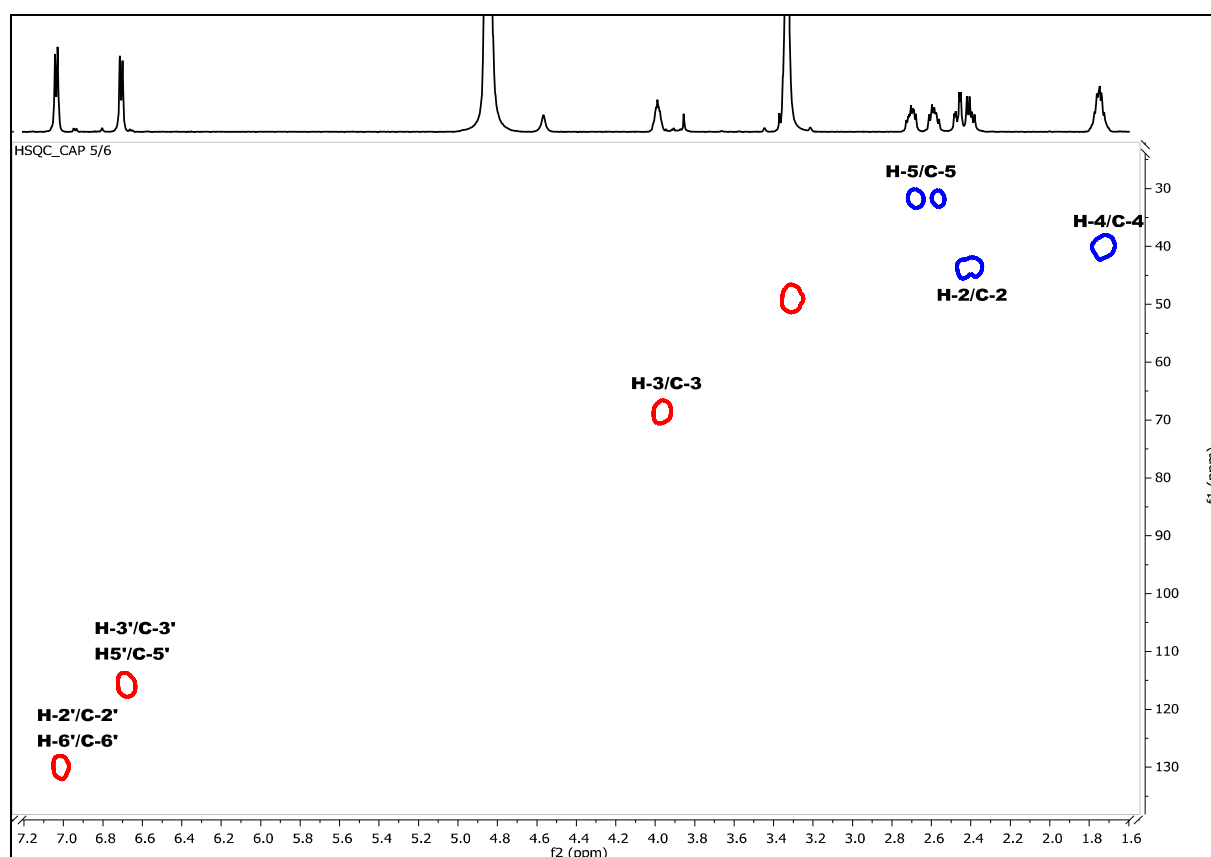


Figure IV.51. Spectre HSQC (600 MHz, MeOH-*d*4) du composé CAP/5/6

L'élucidation structurale du spectre HMBC ; **figure [IV.52.]** ; de ce composé montre :

- Quatre taches de corrélations entre le proton H-2' à $\delta_H = 7.01$ ppm et les carbones à $\delta_C = 31.7$ ppm, $\delta_C = 115.8$ ppm, $\delta_C = 130.0$ ppm et $\delta_C = 154.9$ ppm attribuable aux carbone C-5, C-3', C-6' et C-4', respectivement.
- Trois taches de corrélations entre le proton H-3' à $\delta_H = 6.69$ ppm et les carbones à $\delta_C = 115.8$ ppm, $\delta_C = 133.9$ et $\delta_C = 154.9$ ppm attribuable aux carbone C-3', C-1' et C-4', respectivement.
- Quatre taches de corrélations entre le proton H-3 à $\delta_H = 3.9$ ppm et les carbones à $\delta_C = 31.7$ ppm, $\delta_C = 39.9$ ppm, $\delta_C = 43.8$ ppm et $\delta_C = 175.1$ ppm attribuable aux carbone C-5, C-4, C-2 et C-1, respectivement.
- Quatre taches de corrélations entre le proton H-5 à $\delta_H = 2.56 - 2.67$ ppm et les carbones à $\delta_C = 39.9$ ppm, $\delta_C = 68.5$ ppm, $\delta_C = 130.0$ ppm et $\delta_C = 133.9$ ppm attribuable aux carbone C-4, C-3, C-2' et C-1', respectivement.

- Trois taches de corrélations entre le proton H-2 à $\delta_H = 2.38 - 2.45$ ppm et les carbones à $\delta_C = 39.9$ ppm, $\delta_C = 68.5$ et $\delta_C = 175.1$ ppm attribuable aux carbones C-4, C-3 et C-1, respectivement.
- Quatre taches de corrélations entre le proton H-4 à $\delta_H = 1.73$ ppm et les carbones à $\delta_C = 31.7$ ppm, $\delta_C = 43.8$ ppm, $\delta_C = 68.5$ ppm et $\delta_C = 133.9$ ppm attribuable aux carbones C-5, C-2, C-3 et C-1', respectivement.

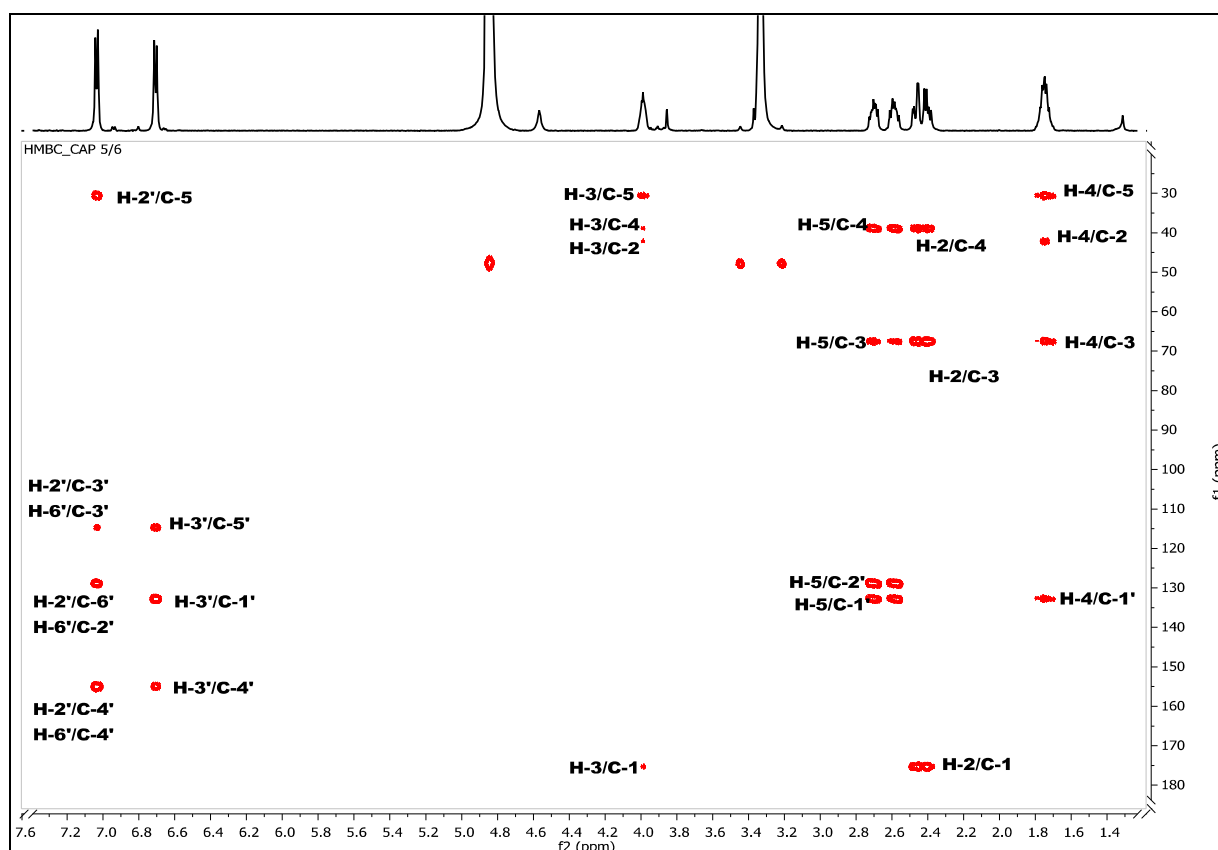


Figure IV.52. Spectre HMBC (600 MHz, MeOH-*d*₄) du composé CAP/5/6

Positions	RMN ¹ H δ (ppm), <i>m</i> , <i>J</i> (Hz)	RMN ¹³ C δ (ppm)
1	-	175.1
2	2.38 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 15.1 - 8.2 Hz, 1H) 2.45 (<i>m</i> , 2H)	43.8
3	3.97 (<i>dt</i> , <i>J</i> = 9.1 - 4.8 Hz, 1H)	68.5
4	1.73 (<i>dt</i> , <i>J</i> = 14.2 - 8.0 Hz, 2H)	39.9
5	2.56 (<i>dt</i> , <i>J</i> = 13.8 - 8.2 Hz, 1H) 2.67 (<i>m</i> , 1H)	31.7
1'	-	133.9
2'	7.01 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8.3 Hz, 1H)	130.0
3'	6.69 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8.3 Hz, 1H)	115.8
4'	-	154.9

5'	6.69 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8.3 Hz, 1H)	114.7
6'	7.01 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8.3 Hz, 1H)	129.0

Tableau IV.9. Données de la spectroscopie RMN ^1H et ^{13}C (600 MHz, MeOH-*d*4) du composé **CAP/5/6**

L'ensemble des données RMN ^1H , COSY, HSQC, HMBC et HR-ESIMS (-) mènent à la structure finale du composé **CAP/5/6** qui est l'**Acide 5-(*p*-hydroxy-phenyl)-3-hydroxy-pentanoïque** ; figure [IV.53.].

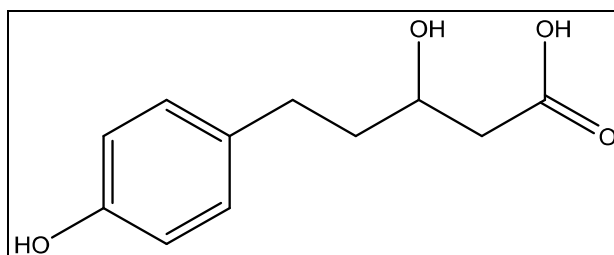
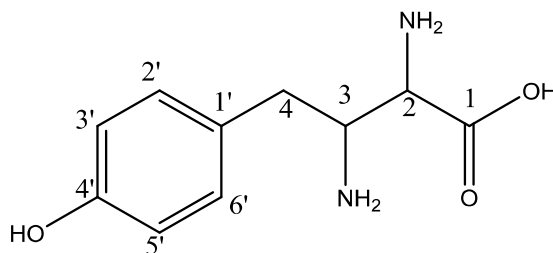


Figure IV.53. La structure de l'**Acide 5-(*p*-hydroxy-phenyl)-3-hydroxy-pentanoïque**

IV.2.9. Elucidation structurale du composé **CAP/5/3**



Le spectre de masse ; **figure [IV.54.]** ; enregistré en mode HR-ESI MS du composé **CAP/5/3** montre un pic $[\text{M}-\text{H}]^-$ à $m/z = 209.1494$ (calculé; $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{O}_3\text{N}_2$, 209.2218) correspondant à la formule $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_3\text{N}_2$. Un ion à $m/z = 164$ correspondant à $[\text{M}-45]^+$ indiquant la perte d'un COOH .

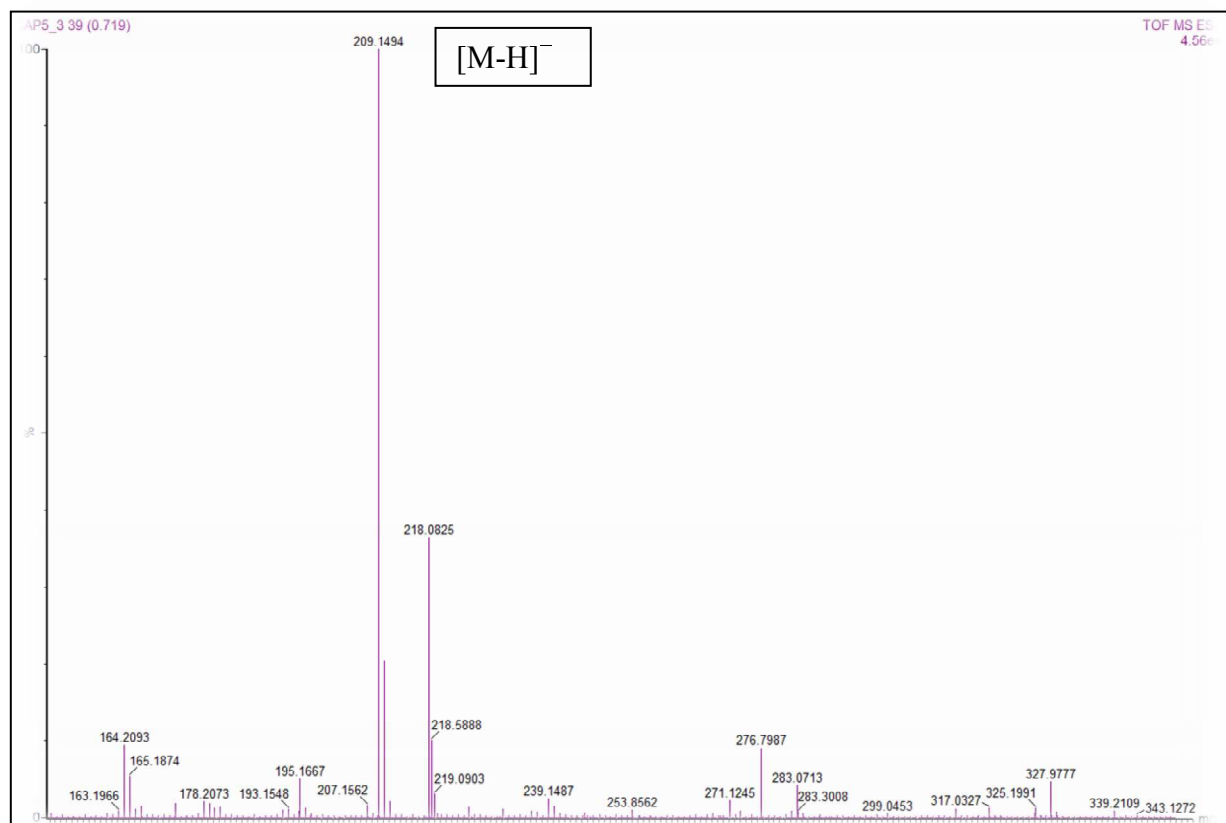


Figure IV.54. Spectre de masse HR-ESIMS (-) du composé CAP/5/3

L'analyse du spectre RMN ^1H ; **figure [IV.55.]** ; montre:

- Deux signaux sous forme d'un doublet (*d*) d'intégration 2H de chaque à $\delta_{\text{H}} = 7.03$ ppm et $\delta_{\text{H}} = 6.70$ ppm avec une constante de couplage $J = 8.2$ Hz, un système AB caractérisant le noyau aromatique *para*-substitué attribuable à H-2'/H-6' et H-3'/H-5', respectivement.
- A $\delta_{\text{H}} = 3.68$ ppm (*t*, $J = 7.1$ Hz, 1H), attribué au proton H-3.
- A $\delta_{\text{H}} = 3.53$ ppm (*s*, 1H), attribué au proton H-2.
- A $\delta_{\text{H}} = 2.71$ ppm (*t*, $J = 7.1$ Hz, 1H), attribué au proton H-4.

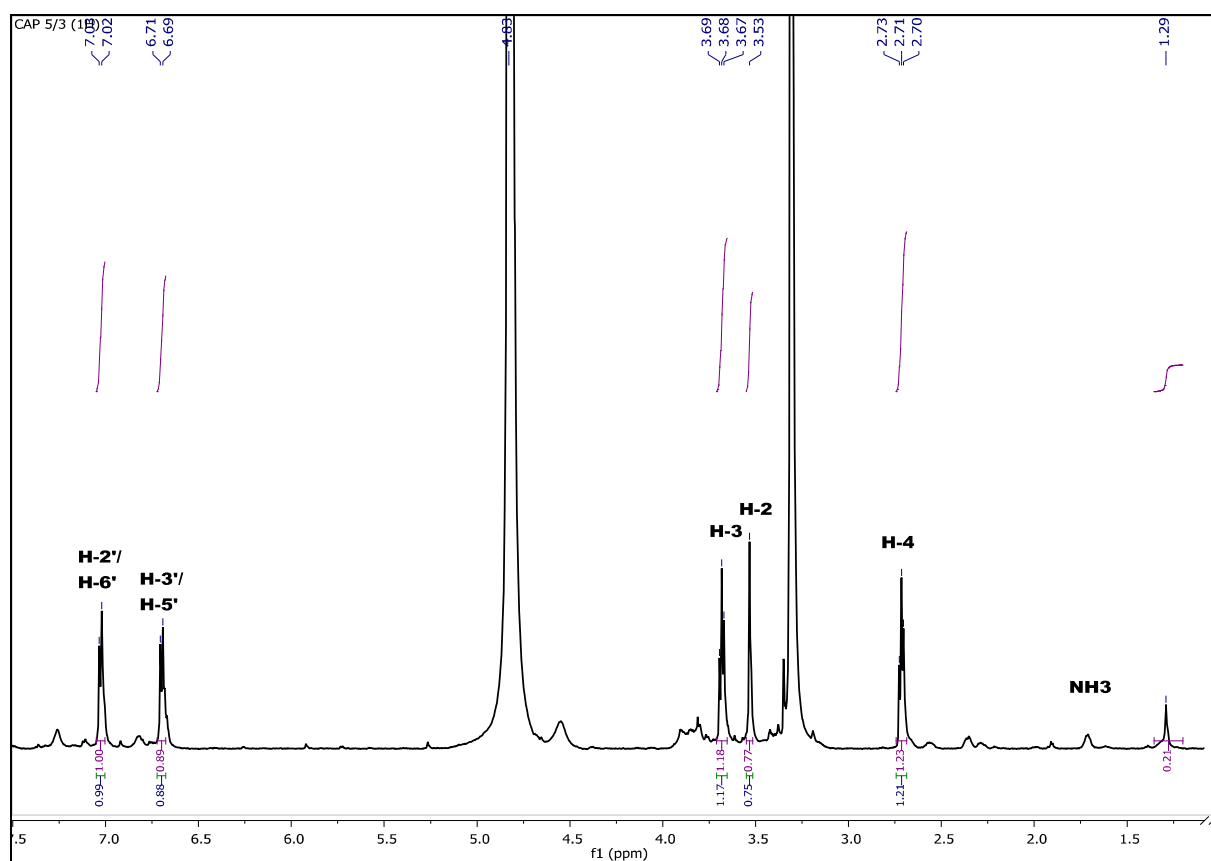


Figure IV.55. Spectre RMN ^1H (600 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) du composé CAP/5/3

L'examen du spectre de l'expérience HSQC ; **figure [IV.56.]** ; permet de localiser les noyaux C-2'/C-6', C-3'/C-5', C-3, C-2 et C-4 à $\delta_{\text{C}} = 129.35$; 114.62; 63.25; 62.55 et 38.21 ppm, respectivement.

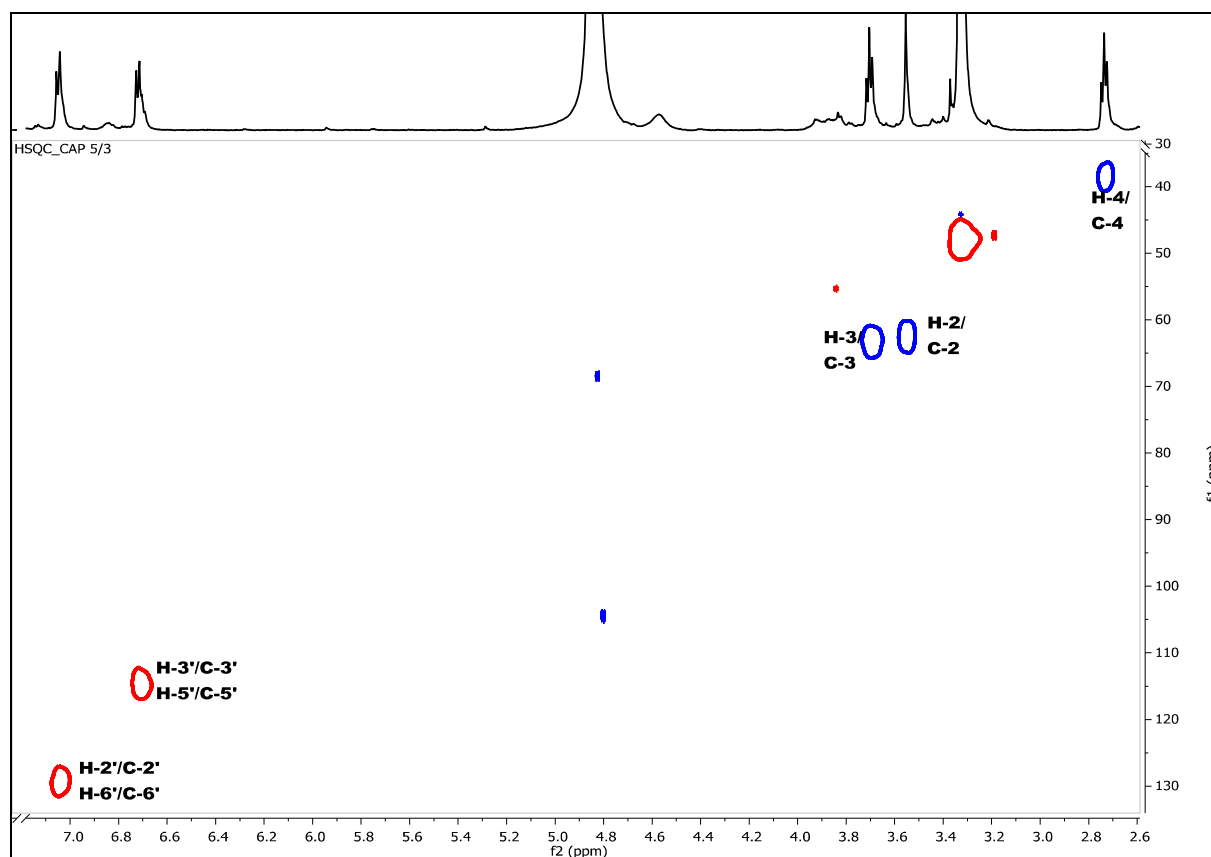


Figure IV.56. Spectre HSQC (600 MHz, MeOH-*d*4) du composé CAP/5/3

Les attributions des carbones restants ont été complétées par l'étude du spectre de HMBC enregistrés dans le méthanol ; **figure [IV.57.]**:

- Trois taches de corrélation entre le H-2' / H-6' et les carbones à $\delta_H = 38.2$, 129.9 et 155.6 ppm attribuable à C-4, C-1' et C-4', respectivement.
- Trois taches de corrélation entre le H-3' / H-5' et les carbones à $\delta_H = 114.6$, 129.9 et 155.6 ppm qui ne peut être que le C-3', C-1' et C-4', respectivement.
- Deux taches de corrélation entre le H-3 et les carbones à $\delta_H = 38.2$ et 129.9 ppm qui sont le C-4 et C-1', respectivement.
- Deux taches de corrélation entre le H-4 et les carbones à $\delta_H = 63.2$ et 129.3 ppm attribuable à C-4 et C-1', respectivement.

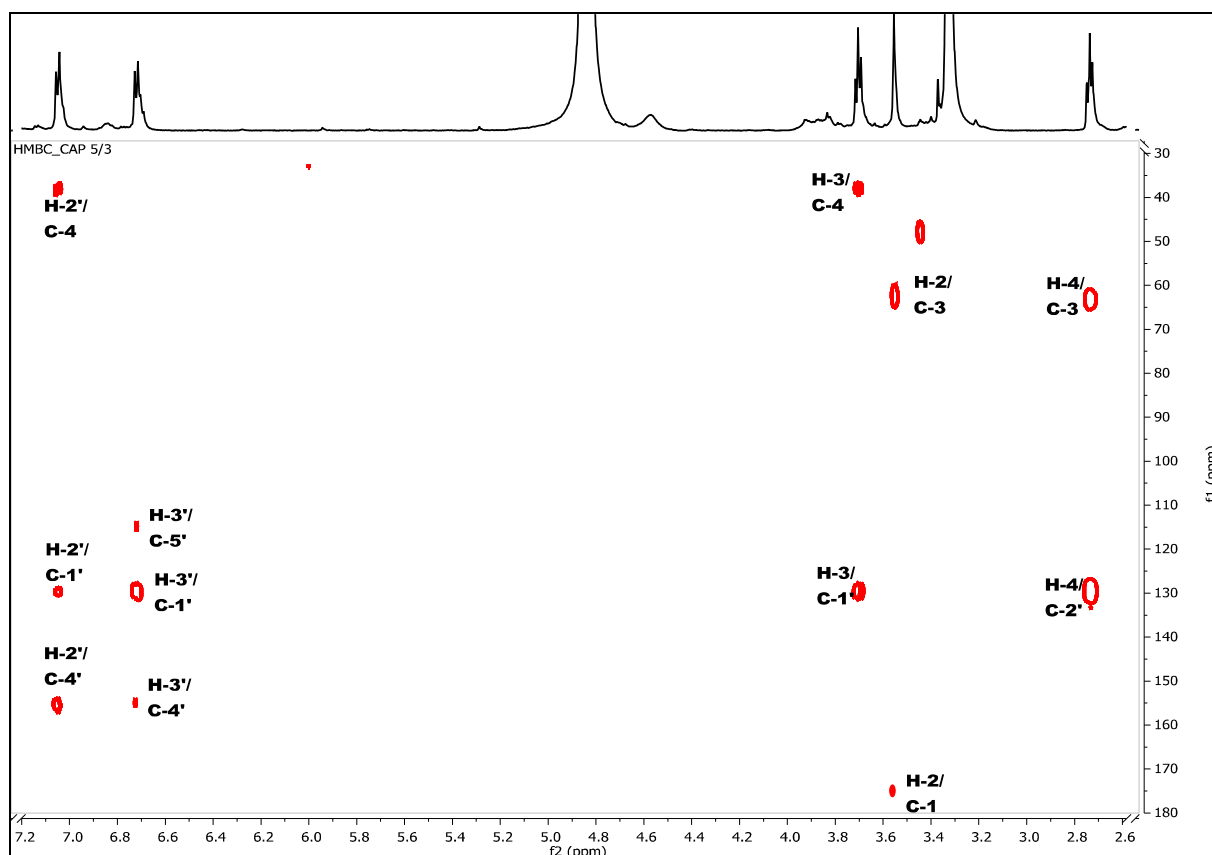


Figure IV.57. Spectre HMBC (600 MHz, MeOH-*d*4) du composé CAP/5/3

Positions	RMN ^1H δ (ppm), <i>m</i> , <i>J</i> (Hz)	RMN ^{13}C δ (ppm)
1	-	175.1
2	3.53 (<i>s</i> , 1H)	62.5
3	3.68 (<i>t</i> , <i>J</i> = 7.1 Hz, 1H)	63.2
4	2.71 (<i>t</i> , <i>J</i> = 7.1 Hz, 1H)	38.2
1'	-	129.9
2'	7.03 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8.2 Hz, 1H)	129.3
3'	6.70 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8.2 Hz, 1H)	114.6
4'	-	155.6
5'	6.70 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8.2 Hz, 1H)	114.0
6'	7.03 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8.2 Hz, 1H)	129.3

Tableau IV.10. Données de la spectroscopie RMN ^1H et ^{13}C (600 MHz, MeOH-*d*4) du composé CAP/5/3

L'ensemble des données de HR-ESIMS (-), RMN ^1H , HSQC, HMBC et en comparaison avec la littérature mènent à la structure finale du composé CAP/5/3 qui est : l'Acide- α , β -diamino 4-(*p*-hydroxy phenyl) butanoïque ; figure [IV.58].

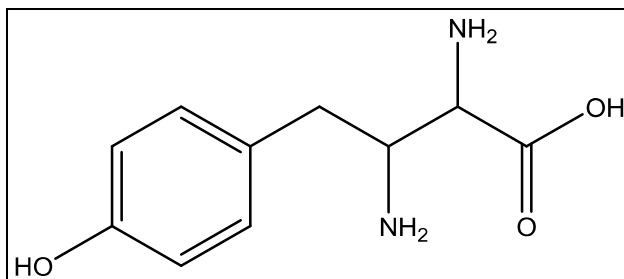
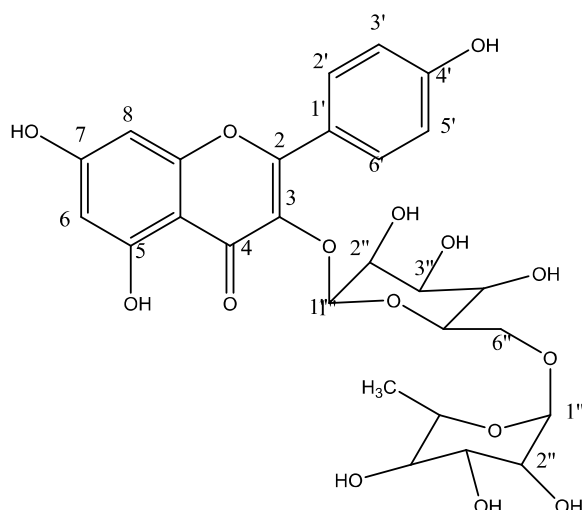


Figure IV.58. La structure de l'Acide- α , β -diamino (-4-hydroxy benzene) butanoïque.

IV.3. Caractérisation chimique et élucidation structurale des produits de *C. comosum*.

IV.3.1. Elucidation structurale du composé CCP/9/12



Les données de la série spectrale UV ; **tableau [IV.10.]**, **figure [IV.59.]**, **figure [IV.60.]**, **figure [IV.61.]** ; donnent les indications suivantes :

- les deux bandes caractéristiques des flavonoïdes. La bande II à $\lambda_{\max} = 267$ nm et la bande I à $\lambda_{\max} = 351$ nm, confirme la nature flavone ou flavonol 3-OR de cette molécule.
- L'addition du réactif NaOH ; **figure [IV.59.]** ; conduit à un déplacement bathochrome (+53 nm) de la bande I avec un effet hyperchrome (augmentation de l'intensité),

indiquant que la position 4' est occupée par un OH libre, de plus l'apparition d'une nouvelle bande à $\lambda_{\text{max}} = 327 \text{ nm}$ oriente vers la présence d'un OH libre en position 7.

- Le spectre réenregistré après 5 minutes ; **figure [IV.59.]** ; reste stable, ce qui indique vu la présence du OH en position 4', que la position 3 comporte soit un H, soit un OR.
- La comparaison des spectres enregistrés dans le méthanol en présence d' AlCl_3 ; **figure [IV.60.]** ; et en présence d' $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$, ne montre aucun changement notable (pas de déplacement hypsochrome de la bande I) ce qui suppose l'absence de système ortho dihydroxyle sur le noyau B.
- Comparé au spectre enregistré dans le méthanol, le spectre enregistré en présence d' $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ montre un déplacement bathochrome de +45 nm de la bande I. Cette observation oriente vers un OH libre en position 5.
- Le spectre enregistré dans le méthanol en présence de NaOAc ; **figure [IV.61.]** ; montre un déplacement bathochrome de +13 nm de la bande II confirmant ainsi la présence du OH libre en position 7.

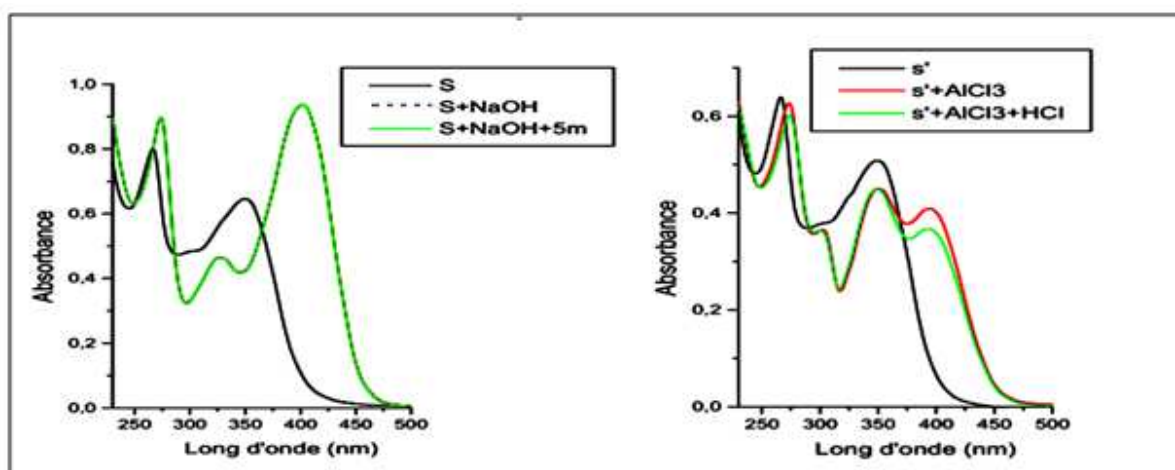


Figure IV.59. Spectres d'absorption Ultraviolette du composé CCP/9/12 dans le MeOH et en présence de NaOH + 5min

Figure IV.60. Spectres d'absorption Ultraviolette du composé CCP/9/12 dans MeOH et en présence de AlCl_3 et HCl

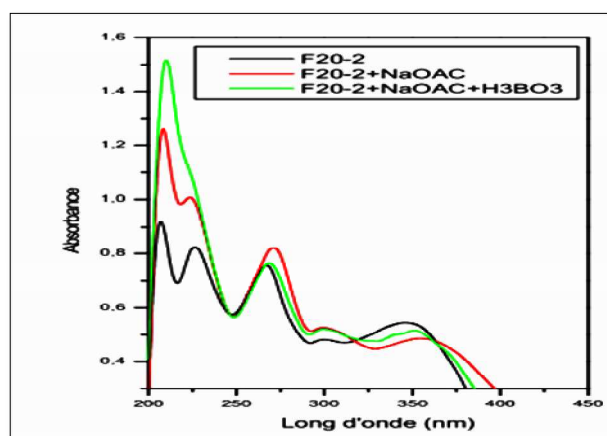


Figure IV.61. Spectres d'absorption Ultraviolette du composé CCP/9/12 dans le MeOH et en présence de NaOAc.

Les résultats de la série spectrale UV-Vis du composé CCP/9/12 rassemblés dans le tableau [IV.11.], permettent à ce stade de proposer la structure partielle reportée dans la figure [IV.62.]

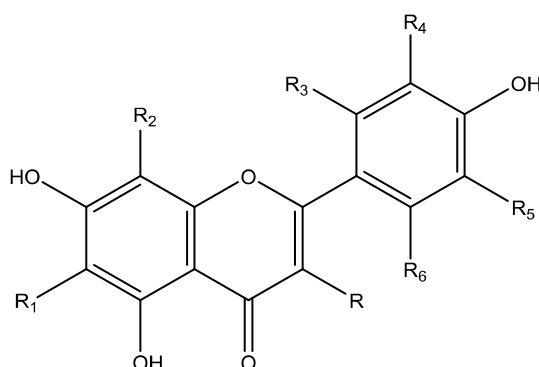


Figure IV.62. Structure partielle du composé CCP/9/12

Réactifs	Bande I (nm)	Bande II (nm)	Autres bandes	Observations
MeOH	351	267	-	Flavanone ou flavonol 3-OR
NaOH	402	274	327	4'-OH 7-OH
NaOH après 5 min	402	274	327	Pas de OH en C-3
NaOAc	360	272	299	7-OH
NaOAc + H ₃ BO ₃	350	271	299	Absence de système ortho di-OH
AlCl ₃	350	273	397	5-OH
AlCl ₃ + HCl	350	273	327	Absence de système ortho di-OH

Tableau IV.11. Données de la série spectrale UV (λ_{\max} , nm) du composé CCP/9/12

L'examen du spectre de RMN ^1H ; **figure [IV.63.]** ; enregistré dans le MeOH- d_4 , montre la présence de:

- Deux doublets d'intégration 2H chacun, formant un système AM à $\delta_{\text{H}} = 8,06$ et $\delta_{\text{H}} = 6,89$ ppm, $J = 8,4$ Hz caractéristiques des protons H-6', H-2' et H-5', H-3', respectivement, du noyau B *para* substitué d'un flavonoïde.
- Deux singulet formant un système AB à $\delta_{\text{H}} = 6,37$ et $\delta_{\text{H}} = 6,19$ ppm attribuable aux protons H-8 et H-6, respectivement, du noyau A d'un flavonoïde.
- Un doublet à $\delta_{\text{H}} = 5,11$ ppm, $J = 7,2$ Hz, attribuable au proton anomérique d'un sucre relié à l'aglycone par un pont oxygène vu la valeur de son déplacement chimique. La valeur de la constante de couplage de ce proton anomérique en faveur d'une interaction 1-2 diaxiale entre ce proton anomérique et le proton en C-2 du sucre, indique que le carbone anomérique de cette entité sucre admet une configuration β et exclut la possibilité que cette entité soit attribué à un mannose ou à un rhamnose.
- Un singulet à $\delta_{\text{H}} = 4,52$ ppm caractéristiques du proton anomérique
- Un doublet à $\delta_{\text{H}} = 1,13$ ppm ($J = 6,2$ Hz) attribuable à CH_3 -6''' d'un groupement rhamnosyle de configuration α .
- Un ensemble de multiplets dans l'intervalle 3,3 – 3,9 ppm attribuables par conséquent, aux autres protons des deux glycosyles.

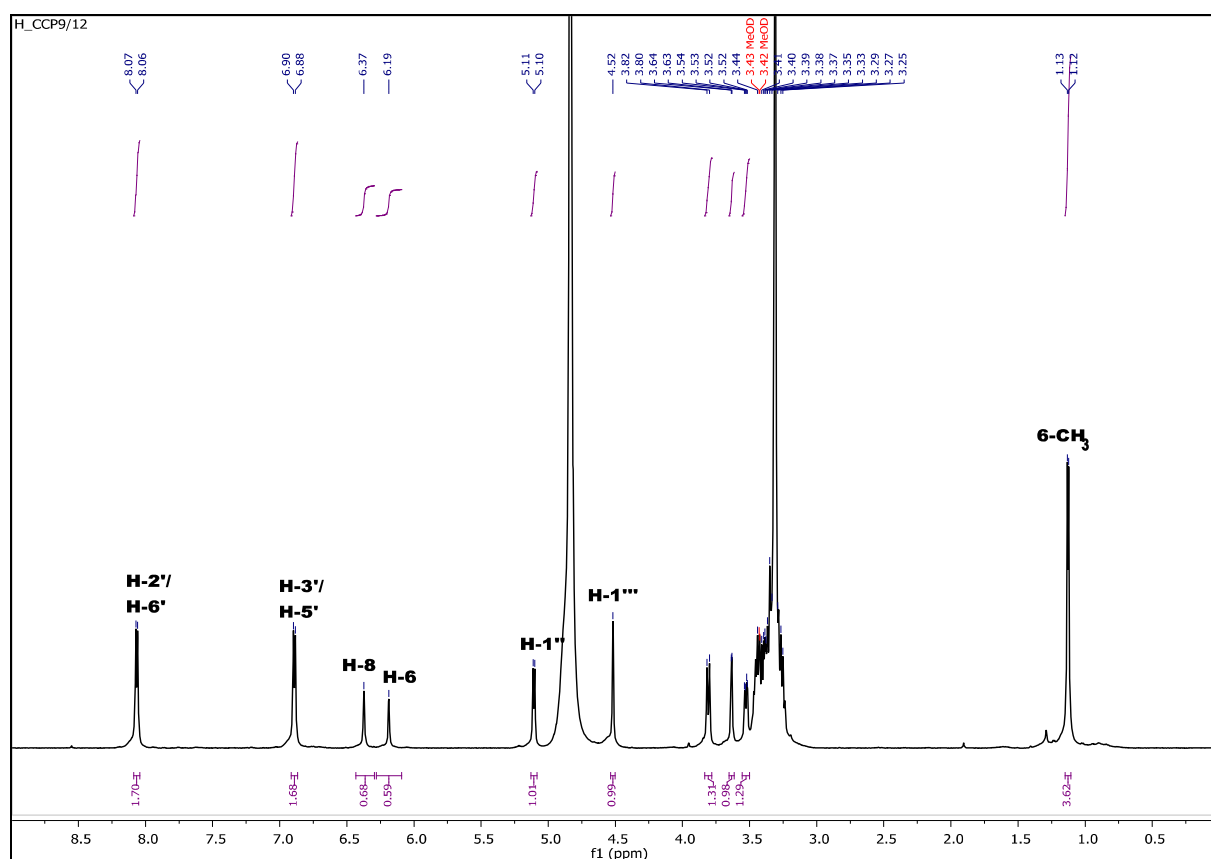


Figure IV.63. Spectre RMN ^1H (600 MHz, MeOH- d_4) du composé CCP/9/12

L'analyse du spectre relatif à l'expérience HSQC ; **figure [IV.64.]** ; permet l'attribution des signaux des protons aux atomes de carbone correspondants ainsi :

- Le H-2' / H-6' permet l'attribution du signal à $\delta_{\text{C}} = 131.9$ ppm à l'atome de carbone C-2'/C-6'.
- Le H-3' / H-5' permet l'attribution du signal à $\delta_{\text{C}} = 115.7$ ppm à l'atome de carbone C-3'/C-5'.
- Le H-8 permet l'attribution du signal à $\delta_{\text{C}} = 94.7$ ppm à l'atome de carbone C-8.
- Le H-6 permet l'attribution du signal à $\delta_{\text{C}} = 100.1$ ppm à l'atome de carbone C-6.
- Le H-1'' permet l'attribution du signal à $\delta_{\text{C}} = 104.2$ ppm à l'atome de carbone C-1''.
- Le H-1''' permet l'attribution du signal à $\delta_{\text{C}} = 101.9$ ppm à l'atome de carbone C-1'''.
- Le H-6'' permet l'attribution du signal à $\delta_{\text{C}} = 68.3$ ppm à l'atome de carbone C-6''.
- Le H-6''' permet l'attribution du signal à $\delta_{\text{C}} = 71.4$ ppm à l'atome de carbone C-6'''.
- Le H-4'' permet l'attribution du signal à $\delta_{\text{C}} = 72.1$ ppm à l'atome de carbone C-4''.
- Le H-3'' permet l'attribution du signal à $\delta_{\text{C}} = 77.6$ ppm à l'atome de carbone C-3''.

- Le H-5'' permet l'attribution du signal à $\delta_C = 77.3$ ppm à l'atome de carbone C-5''.
- Le H-3'' permet l'attribution du signal à $\delta_C = 76.9$ ppm à l'atome de carbone C-3''.
- Le H-3''' permet l'attribution du signal à $\delta_C = 76.5$ ppm à l'atome de carbone C-3'''.
- Le H-5''' permet l'attribution du signal à $\delta_C = 68.2$ ppm à l'atome de carbone C-5'''.
- Le H-4''' permet l'attribution du signal à $\delta_C = 72.0$ ppm à l'atome de carbone C-4'''.
- Le H-2''' permet l'attribution du signal à $\delta_C = 72.7$ ppm à l'atome de carbone C-2'''.
- Le H-2'' permet l'attribution du signal à $\delta_C = 73.3$ ppm à l'atome de carbone C-2''.

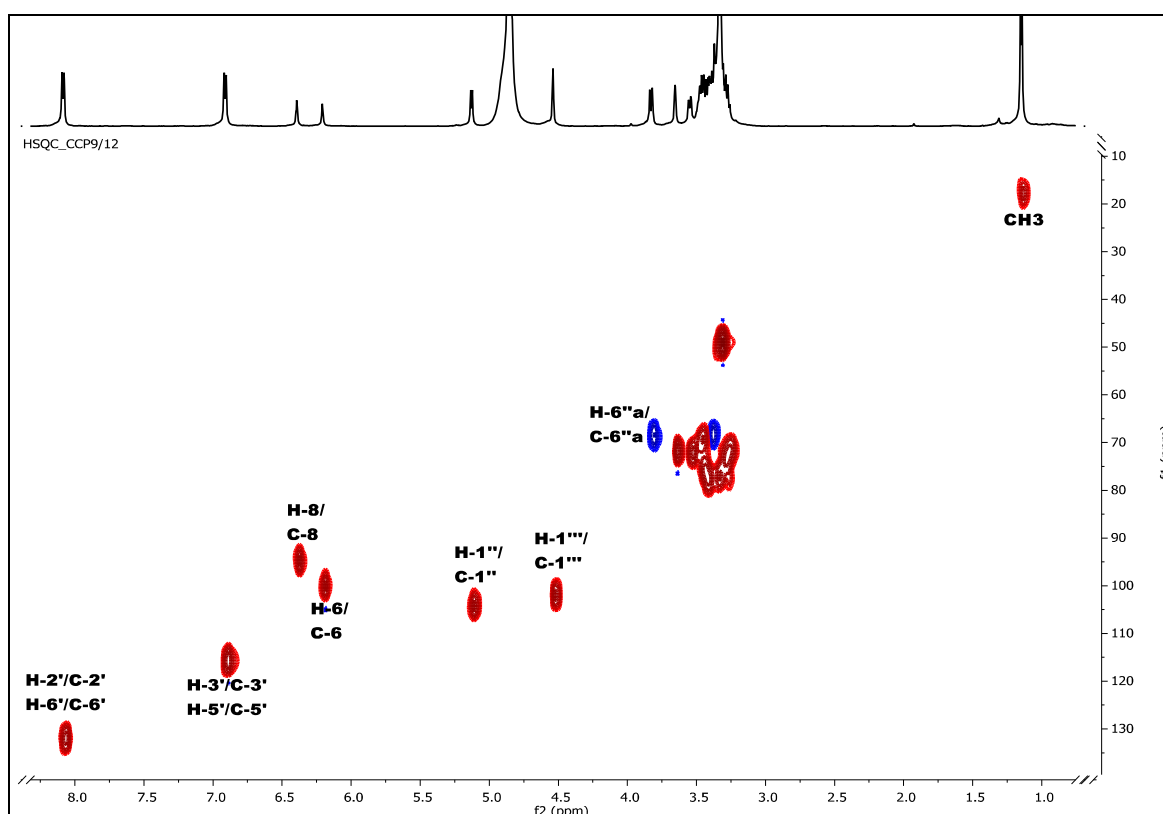


Figure IV.64. Spectre HSQC (600 MHz, MeOH-*d*4) du composé CCP9/12

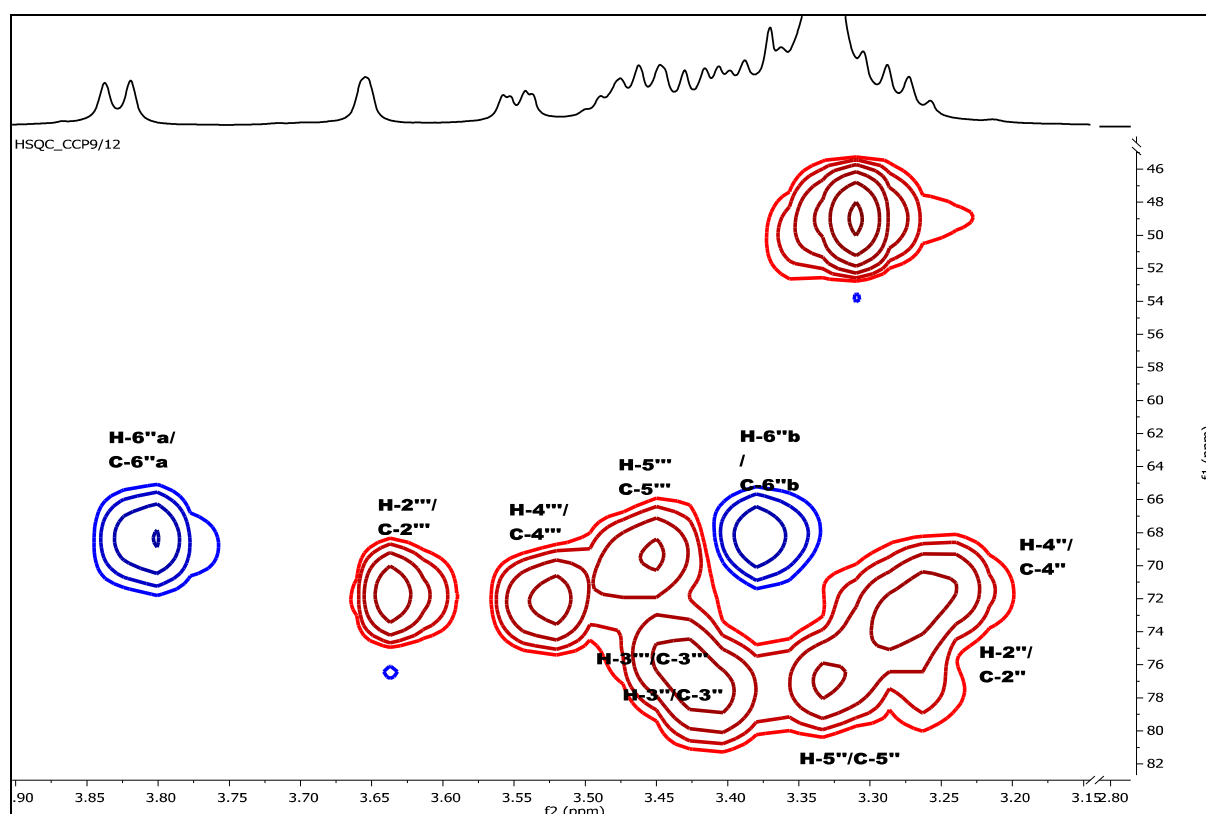


Figure IV.65. Spectre HSQC (600 MHz, MeOH-*d*4) du composé CCP9/12, étalement (3.10 - 3.90 ppm)

L'élucidation structurale du spectre HMBC ; **figure [IV.66.]** ; de ce composé montre :

- Deux taches de corrélations entre le proton H-2' / H-6' à $\delta_H = 8.06$ ppm et les carbones à $\delta_C = 160.2$ ppm et $\delta_C = 130.0$ ppm attribuable aux carbone C-4' et C-2 respectivement.
- Deux taches de corrélations entre le proton H-3' / H-5' $\delta_H = 6.89$ ppm et les carbones à $\delta_C = 116.2$ et 160.2 ppm attribuable aux carbone C-1' et C-4', respectivement.
- Deux taches de corrélations entre le proton H-8 $\delta_H = 6.37$ ppm et les carbones à $\delta_C = 100.1$ et 158.8 ppm attribuable aux carbone C-6 et C-7, respectivement.
- Deux taches de corrélations entre le proton H-6 à $\delta_H = 6.19$ ppm et les carbones à $\delta_C = 94.7$ et 106.0 ppm attribuable aux carbone C-8 et C-4a, respectivement.
- Une taches de corrélations entre le proton H-1'' à $\delta_H = 5.11$ ppm et le carbone à $\delta_C = 135.5$ ppm attribuable aux carbone C-3.
- Une taches de corrélations entre le proton H-1''' à $\delta_H = 4.52$ ppm et le carbone à $\delta_C = 68.4$ ppm attribuable aux carbone C-6 ''.

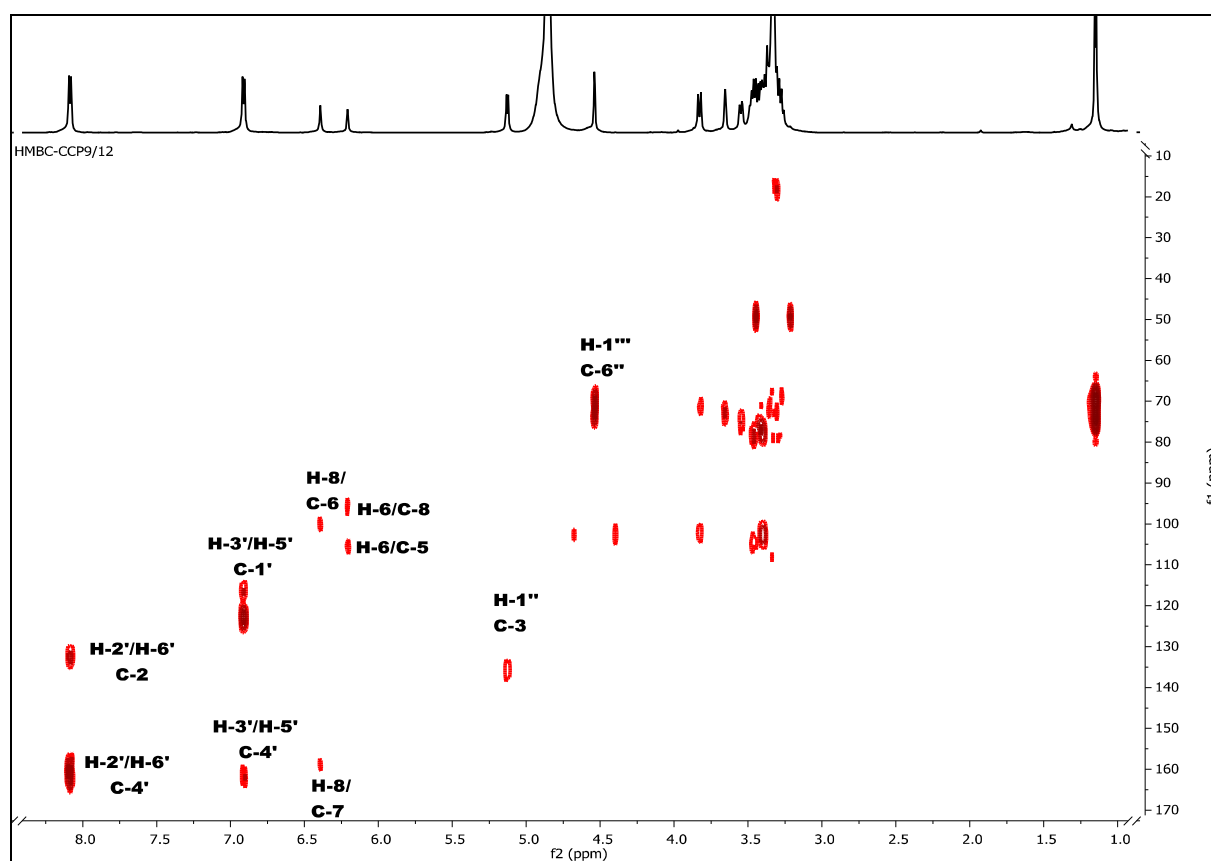


Figure IV.66. Spectre HMBC (600 MHz, MeOH-*d*₄) du composé CCP9/12

Positions	RMN ¹ H δ (ppm), <i>m</i> , <i>J</i> (Hz)	RMN ¹³ C δ (ppm)
1	-	-
2	-	130.0
3	-	135.5
4	-	178.1
4a	-	106.0
5	-	159.7
6	6.19 (<i>s</i> , 1H)	100.5
7	-	158.8
8	6.37 (<i>s</i> , 1H)	95.7
1'	-	116.2
2'/6'	8.06 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8.4 Hz, 2H)	131.9
3'/5'	6.89 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8.4 Hz, 2H)	115.7
4'	-	160.2
1''	5.11 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H)	104.2
2''	3.28 (<i>m</i> , 1H)	73.3
3''	3.41 (<i>m</i> , 1H)	77.6
4''	3.27 (<i>m</i> , 1H)	72.1
5''	3.33 (<i>m</i> , 1H)	76.9
6''	3.81 - 3.38 (<i>m</i> , 2H)	68.4
1'''	4.52 (<i>s</i> , 1H)	101.9
2'''	3.64 (<i>m</i> , 1H)	71.7
3'''	3.43 (<i>m</i> , 1H)	76.5
4'''	3.52 (<i>m</i> , 1H)	72.0
5'''	3.38 (<i>m</i> , 1H)	68.2
6'''	1.13 (<i>s</i> , 3H)	71.4

Tableau IV.12. Données du spectre de RMN ¹H (600 MHz, MeOH-*d*4) du composé CCP/9/12

L'ensemble de ces données reporté dans le **tableau [IV.12.]**, montrent que dans la structure partielle précédemment signalée ; **figure [IV.62.]** ; dont R₁ = R₂ = R₃ = R₄ = R₅ = R₆ = H et que R est soit un groupement rhamnoglucosyle soit un groupement rhamnogalactosyle.

Pour trouver la nature exacte du 2^{ème} sucre et confirmer la position en C-3 du groupement dioside, nous avons procédé à l'hydrolyse acide de ce composé. En effet, après chauffage de l'échantillon à 100°C en présence de HCl, la solution refroidie est extraite par de l'acétate d'éthyle. Après séchage au sulfate de Sodium anhydre et filtration, la phase organique concentrée et déposée sur une plaque recouverte de polyamide, montre une fluorescence jaune sous lumière de Wood. Cette observation oriente vers une structure de type flavonol de l'aglycone et par conséquent confirme la position du groupement dioside en C-3. La phase aqueuse est également concentrée sous vide et co-chromatographiée sur une plaque de gel de

silice Merck F₂₅₄ éluée par le système Acétone-Eau (90:10, v/v) avec des sucres de référence. Après révélation et chauffage, cette plaque montre clairement la présence du glucose et du rhamnose.

Le fait que les deux sucres se soient détachés de l'aglycone et se soient séparés confirme que l'aglycone est relié au substituant sucre par un pont oxygène d'une part et qu'ils sont reliés entre eux également par le biais d'un atome d'oxygène.

La jonction entre le glucose et le rhamnose est en faveur du type 1 (rhamnose) \Rightarrow 6 (glucose) suite aux valeurs des déplacements chimiques des deux protons anomériques. Cette observation mène à un groupement rutinosyle.

Toutes ces observations mènent à la structure du **kaempferol 3-O-rhamnopyranosyl-(1/6)-b-D-glucopyranoside (Kaempférol-3-O-rutinoside)** connue sous le nom de **Nicotiflorine** figure [IV.67.].

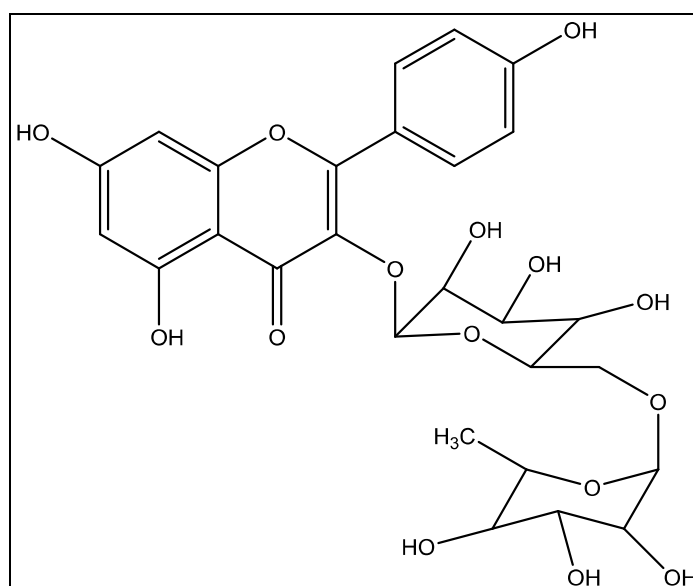
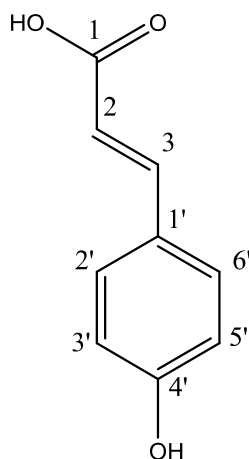


Figure IV.67. La structure de **Nicotiflorine**

IV.3.2. Elucidation structurale du composé CCP/10/11



Le spectre RMN ^1H ; **figure [IV.68.]** ; montre la présence d'un noyau aromatique *para* substitué, En effet, les quatre protons aromatiques présentent :

- Un système AB à $\delta_{\text{H}} = 7,46$ ppm ($d, J = 8,7$ Hz) d'intégration 2H attribuable à H-2'/H-6' et à $\delta_{\text{H}} = 6,82$ ppm ($d, J = 8,7$ Hz) d'intégration 2H attribuable à H-3'/H-5'.
- Un système AX à $\delta_{\text{H}} = 7,61$ ppm et $\delta_{\text{H}} = 6,31$ ppm d'intégration 1H ($J = 16,2$ Hz) montre un couplage vicinal éthylénique *trans* (CH=CH).

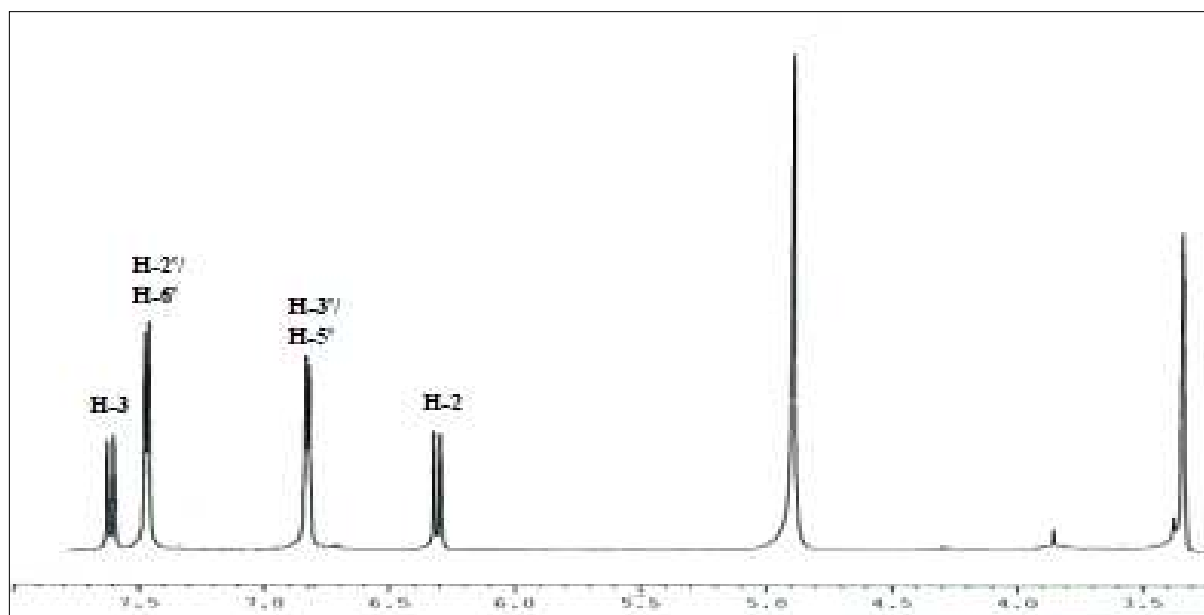


Figure IV.68. Spectre RMN ^1H (600 MHz, MeOH- d_4) du composé CCP/10/11

Positions	RMN ^1H δ (ppm), m , J (Hz)
1	-
2	6.31 (d , $J = 16.2$ Hz, 1H)
3	7.61 (d , $J = 16.2$ Hz, 1H)
1'	-
2'/6'	7.46 (d , $J = 8.7$ Hz, 2H)
3'/5'	6.82 (d , $J = 8.7$ Hz, 2H)
4'	-

Tableau IV.13. Données de la spectroscopie RMN ^1H (600 MHz, MeOH- d_4) du composé CCP/10/11

Sur la base de l'ensemble de ces données et en comparaison avec la littérature [6], le composé CCP/10/11 est identifié comme étant l'Acide *p*-coumarique ; figure [IV.69].

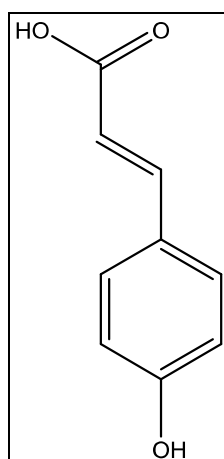
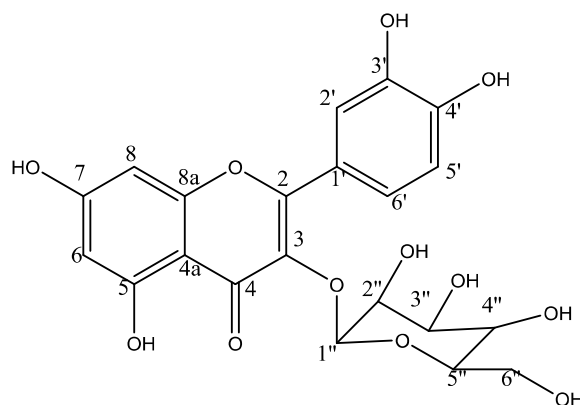


Figure IV.69. La structure de l'Acide *p*-coumarique

IV.3.3. Elucidation structurale du composé CCP/6/3



L'examen du spectre RMN ^1H ; **figure [IV.70.]** ; montre la présence d'un ensemble des signaux caractéristiques un squelette flavonique reconnaissable par :

- Le spectre présente des signaux caractéristiques de protons aromatiques. Les protons à $\delta_{\text{H}} = 6.18\text{ppm}$ (d , $J = 2.1$ Hz) et $\delta_{\text{H}} = 6.35$ ppm (d , $J = 2.1$ Hz) couplent en système AB caractéristiques du cycle A des flavonoïdes (H-6 et H-8). La constante de couplage ($J = 2.1$ Hz) indique la position méta de ces protons l'un par rapport à l'autre.
- Deux doublet à $\delta_{\text{H}} = 7.71$ et 6.87 ppm d'intégration 1H et $J = 2.2$ Hz et $J = 8.4$ Hz correspondant aux protons H-2'et H-5', respectivement.
- Un doublet de doublet à $\delta_{\text{H}} = 7.59$ ppm d'intégration 1H et $J = 8.4$ et $J = 2.2$ Hz attribuable aux protons H-6'.
- un signal sous forme d'un singulet à $\delta_{\text{H}} = 5.21$ ppm, assigné au proton anomérique H-1'' ($J = 7.7$ Hz) d'un glucose suggère que ce sucre est sous la forme de β -glucose, ainsi que les autres signaux entre $\delta_{\text{H}} = 3.35$ ppm et $\delta_{\text{H}} = 3.75$ ppm.

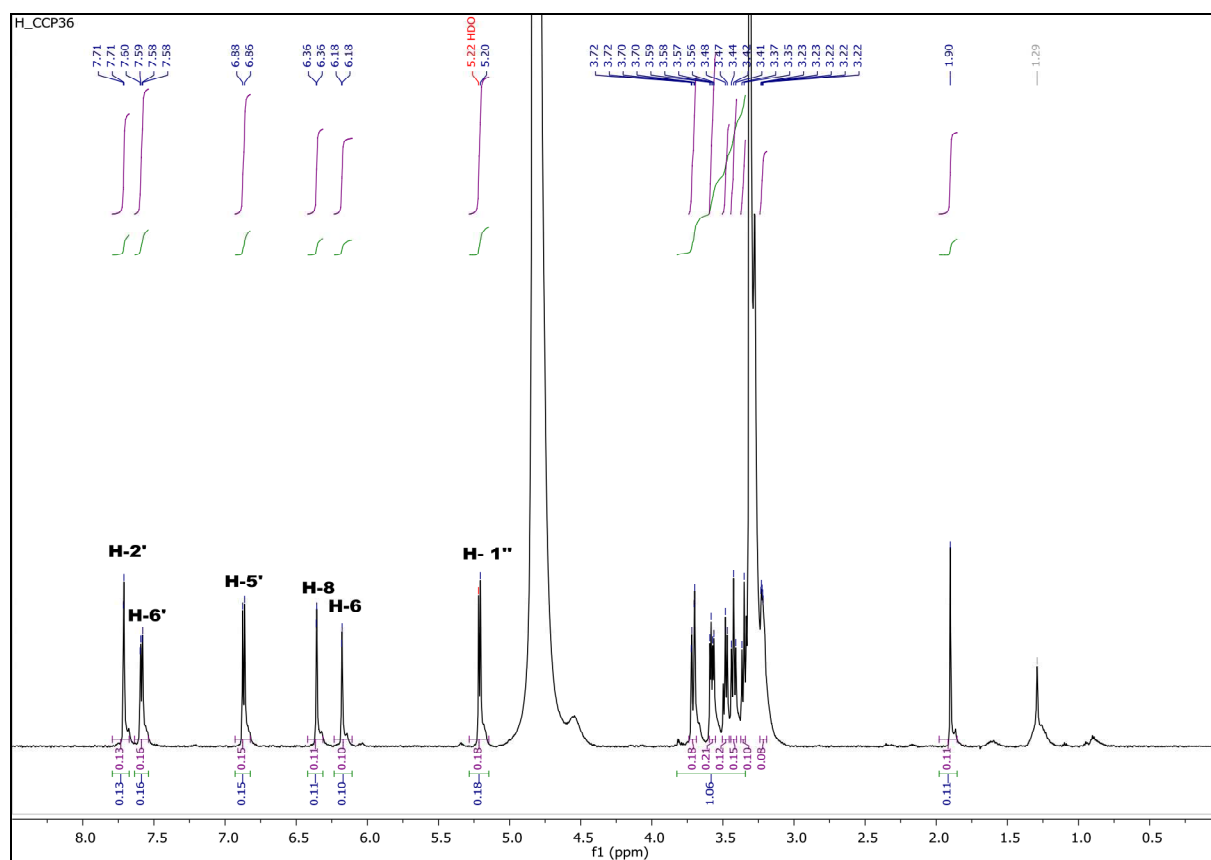


Figure IV.70. Spectre RMN ^1H (600 MHz, MeOH- d_4) du composé CCP/6/3

L'analyse du spectre relatif à l'expérience HSQC ; **figure [IV.71.]** ; permet l'attribution des signaux des protons aux atomes de carbone correspondants ainsi :

- Le H-2' permet l'attribution du signal à $\delta_C = 116.9$ ppm à l'atome de carbone C-2'.
- Le H-6' permet l'attribution du signal à $\delta_C = 122.7$ ppm à l'atome de carbone C-6'.
- Le H-5' permet l'attribution du signal à $\delta_C = 116.8$ ppm à l'atome de carbone C-5'.
- Le H-8 permet l'attribution du signal à $\delta_C = 94.6$ ppm à l'atome de carbone C-8.
- Le H-6 permet l'attribution du signal à $\delta_C = 100.2$ ppm à l'atome de carbone C-6.
- Le H-1'' permet l'attribution du signal à $\delta_C = 104.1$ ppm à l'atome de carbone C-1''.
- La présence de l'unité sucre est confirmée par :
- Deux signaux d'intégration 1H pour chacun, attribuables à H-6''a, H-6''b à $\delta_H = 3.71$ ppm (*dd*, $J = 11,9, 2.4$ Hz) et $\delta_H = 3.57$ ppm (*dd*, $J = 11.9, 5.4$ Hz), respectivement.
- Une série des signaux résonnant dans l'intervalle [$\delta_H = 3,35 - 3,50$ ppm] attribuables aux protons 2'', 3'', 4'', 5'' du sucre, localisés aux carbones $\delta_C = 77.7$; 78.2 ; 71,0 et 75.6 ppm, respectivement.

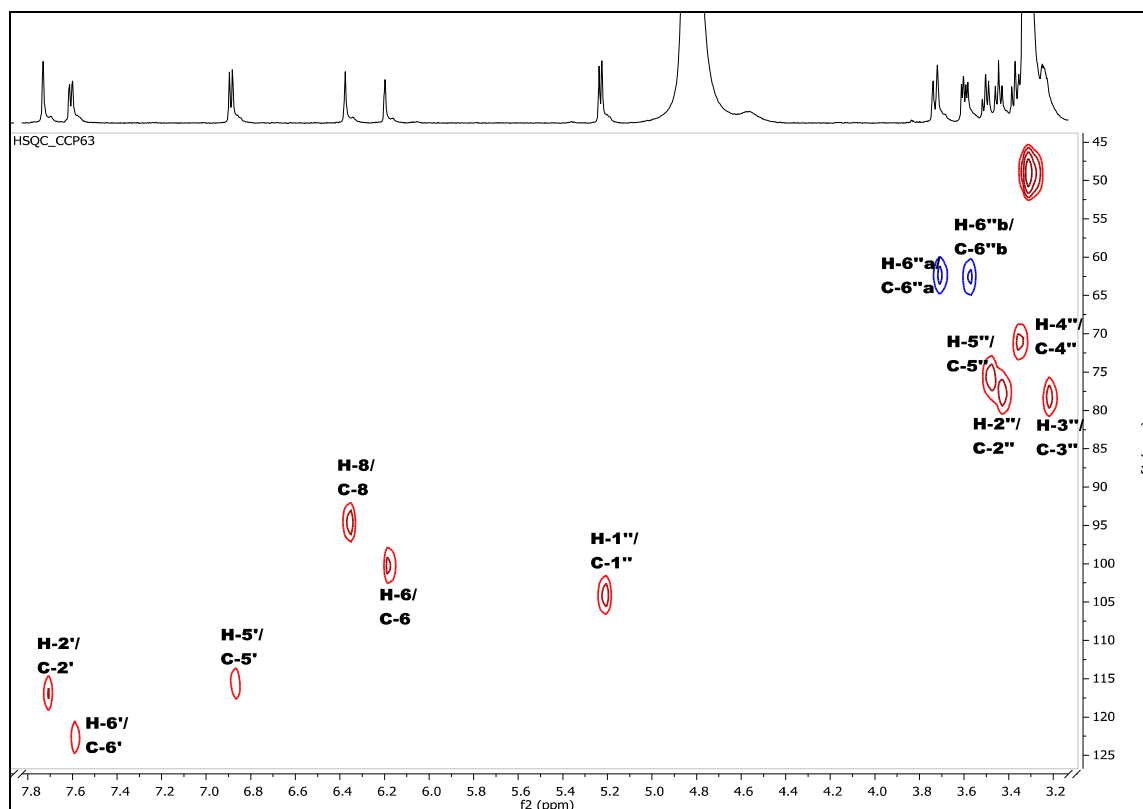


Figure IV.71. Spectre HSQC (600 MHz, MeOH-*d*4) du composé CCP/6/3

Ces données indiquent qu'il s'agit d'un quercetine glucosylé.

L'ensemble de l'enchaînement est prouvé par l'expérience HMBC ; **figure [IV.72.]** ; qui montre :

- Une tache de corrélation entre le proton anomérique H-1'' et le carbone à $\delta_C = 135,7$ ppm attribuable à C-3 de l'aglycone, confirme la substitution de ce dernier par le glucose.
- Trois taches de corrélation entre le proton H-6 et les carbones à $\delta_C = 94,5, 105,1, 162,1$ ppm attribuable à C-8, C-4a et C-5, respectivement.
- Quatre taches de corrélation entre le proton H-8 et les carbones à $\delta_C = 100,2, 105,1, 158,5, 168,2$ ppm attribuable à C-6, C-4a, C-8a et C-7, respectivement.
- Quatre taches de corrélation entre le proton H-2' et les carbones à $\delta_C = 123,1, 145,9, 150,1, 159,2$ ppm attribuable à C-6', C-3', C-4' et C-2, respectivement.
- Trois taches de corrélation entre le proton H-5' et les carbones à $\delta_C = 121,6, 145,9, 150,1$ ppm attribuable à C-1', C-3' et C-4', respectivement.
- Deux taches de corrélation entre le proton H-6' et les carbones à $\delta_C = 117,7$ et $150,1$ ppm attribuable à C-2' et C-4', respectivement.

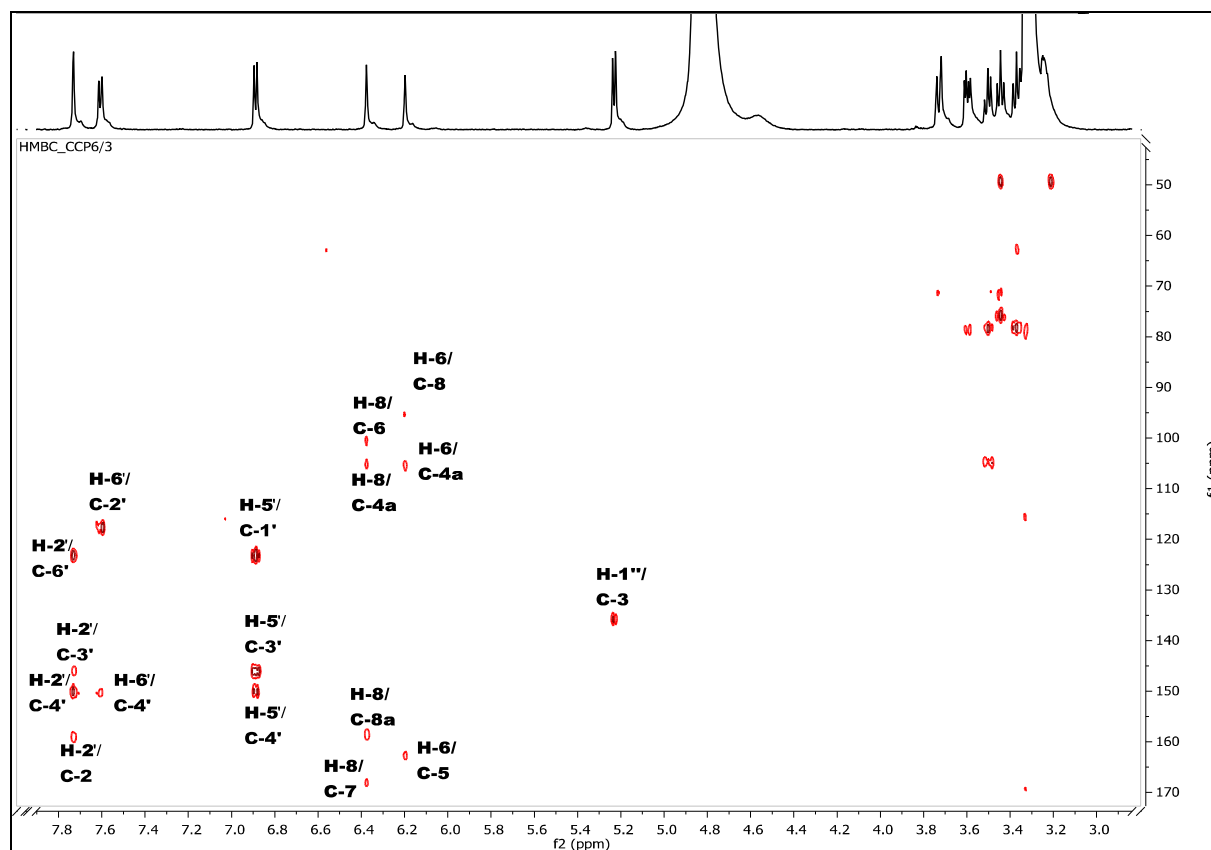


Figure IV.72. Spectre HMBC (600 MHz, MeOH-*d*4) du composé CCP/6/3.

L'enchaînement de cette molécule est confirmé par l'utilisation combinée des mesures sur les expériences HMBC ; figure [IV.72.] et COSY figure [IV.73].

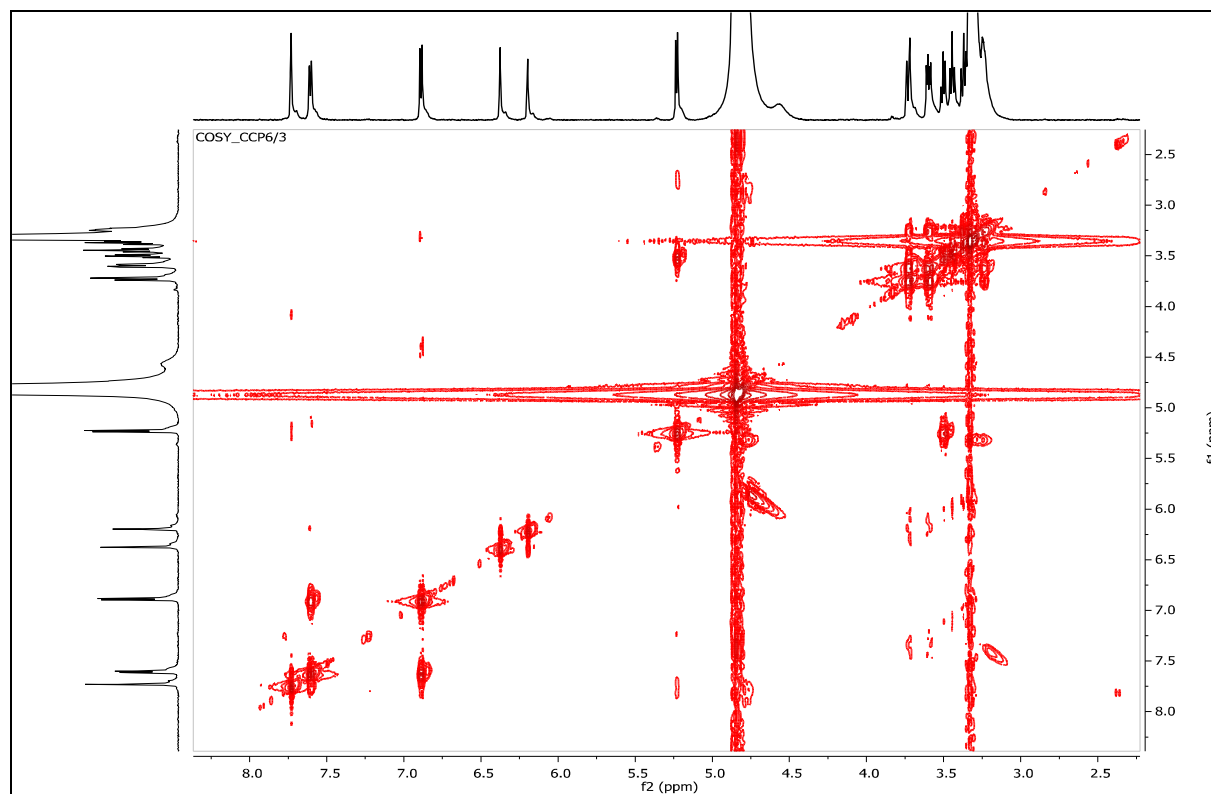


Figure IV.73. Spectre COSY (600 MHz, MeOH-*d*4) du composé CCP/6/3

Positions	RMN ^{13}C δ (ppm)	RMN ^1H δ (ppm), <i>m</i> , <i>J</i> (Hz)
2	159.2	-
3	136.2	-
4	171.1	-
4a	105.1	-
5	162.1	-
6	100.2	6.18 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2.1 Hz, 1H)
7	168.2	-
8	94.5	6.35 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2.1Hz, 1H)
8a	157.0	-
1'	121.6	-
2'	116.9	7.71 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2.2Hz, 1H)
3'	145.9	-
4'	150.1	-
5'	116.8	6.87 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8.4Hz, 1H)
6'	122.7	7.59 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8.4, 2.2, Hz, 1H)
1''	104.1	5.21 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7.7 Hz, 1H)
2''	77.7	3.43 (<i>t</i> , <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H)
3''	78.2	3.22 (<i>dt</i> , <i>J</i> = 4.3, 2.1 Hz, 1H)
4''	71.0	3.35 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9.4 Hz, 1H)
5''	75.6	3.48 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H)
6''	62.5	3.71 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 11.9, 2.4 Hz, 1H) 3.57 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 11.9, 5.4 Hz, 1H)

Tableau IV.14. Données de la spectroscopie RMN ^1H et ^{13}C (600 MHz, MeOH-*d*4) du composé **CCP/6/3**

Les données spectrales obtenues confirment la structure du composé **CCP/6/3** comme étant la : **Quéricétine-3-O- β -Glucopyranoside (isoquercétine)** ; figure [IV.74.].

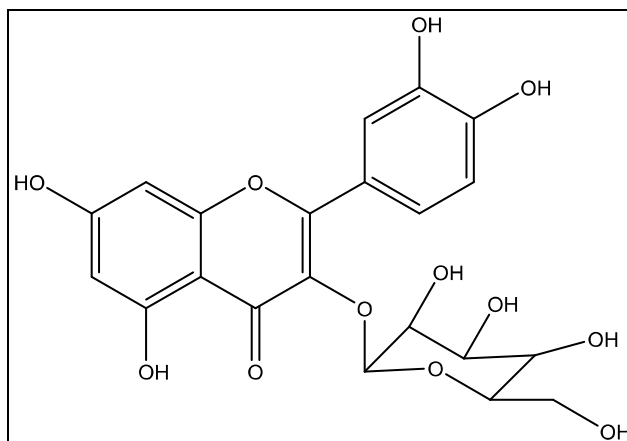
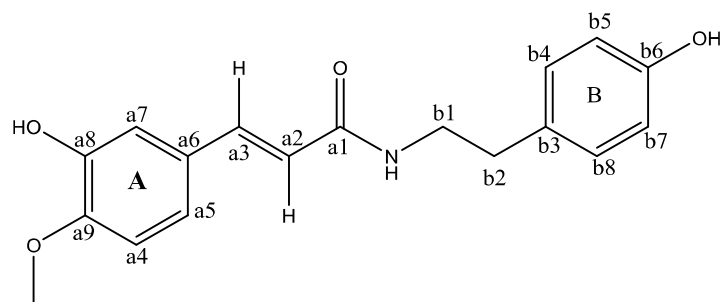


Figure IV.74. La structure de l'isoquercétine.

IV.3.4. Elucidation structurale du composé CCP/12/8



L'examen du spectre RMN ^1H ; **figure [IV.76.]** montre:

De nombreux pics entre $\delta_{\text{H}} = 6.3 - 7.4$ ppm, ce qui laisse présager la présence de plusieurs noyaux aromatiques dans la molécule. Le spectre présente des déplacements chimiques compatibles avec ceux observés pour un système ABX substituée. Dans l'ensemble nous avons 10 insaturations.

- D'une part un singulet (*s*) à $\delta_{\text{H}} = 3.88$ ppm d'un (O-CH₃).
- $\delta_{\text{H}} = 7.10$ ppm (*s*, 1H) et $\delta_{\text{H}} = 6.72$ ppm (*d*, $J = 7$ Hz, 1H) et $\delta_{\text{H}} = 7.03$ ppm (*dd*, $J = 8.2$ Hz, $J = 1.6$ Hz, 1H) attribuable respectivement aux protons H-5a, H-8a et H-9a, témoignant ainsi deux substitution en 6a et 7a (Fragment A).
- D'autre part on observe un doublet (*d*) d'intégration 2H à $\delta_{\text{H}} = 6.78$ ppm ($J = 7.4$ Hz) correspondant aux protons (H-5b / H-7b).
- Un doublet (*d*) à $\delta_{\text{H}} = 7.06$ ppm ($J = 8$ Hz) correspondant aux protons (H-4b / H-8b) d'un noyau aromatique para di-substitué (fragment B).
- Deux doublets (*d*) à $\delta_{\text{H}} = 6.39$ ppm, H α (*d*, $J = 15.7$ Hz) et à $\delta_{\text{H}} = 7.43$ ppm, H β (*d*, $J = 15.6$ Hz) indiquant la présence de deux protons vicinaux d'une double liaison de configuration *trans*. Leurs déplacements chimiques déblindé pourraient être dus à une conjugaison de la double liaison avec un carbonyle (Fragment C).
- La présence de deux triplet (*t*) à $\delta_{\text{H}} = 2.76$ ppm et $\delta_{\text{H}} = 3.48$ ppm ($J = 7.4$ Hz, 2H) attribuable à deux CH₂, le déplacement chimique déblindé indique l'attachement du groupement a une fonction amide. (Fragment D).
- L'absence d'autres signaux dans ce spectre permet d'attribuer des hydroxyles aux positions 6a et 6b.

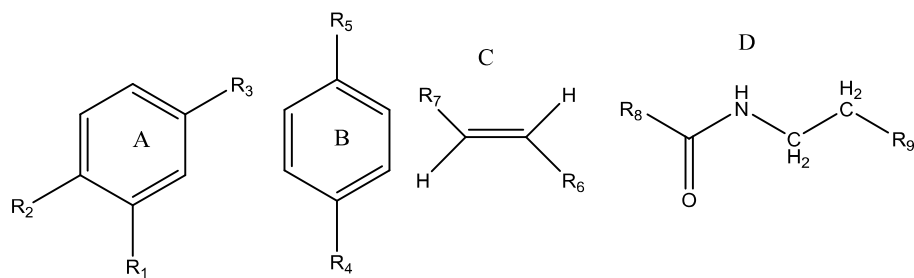
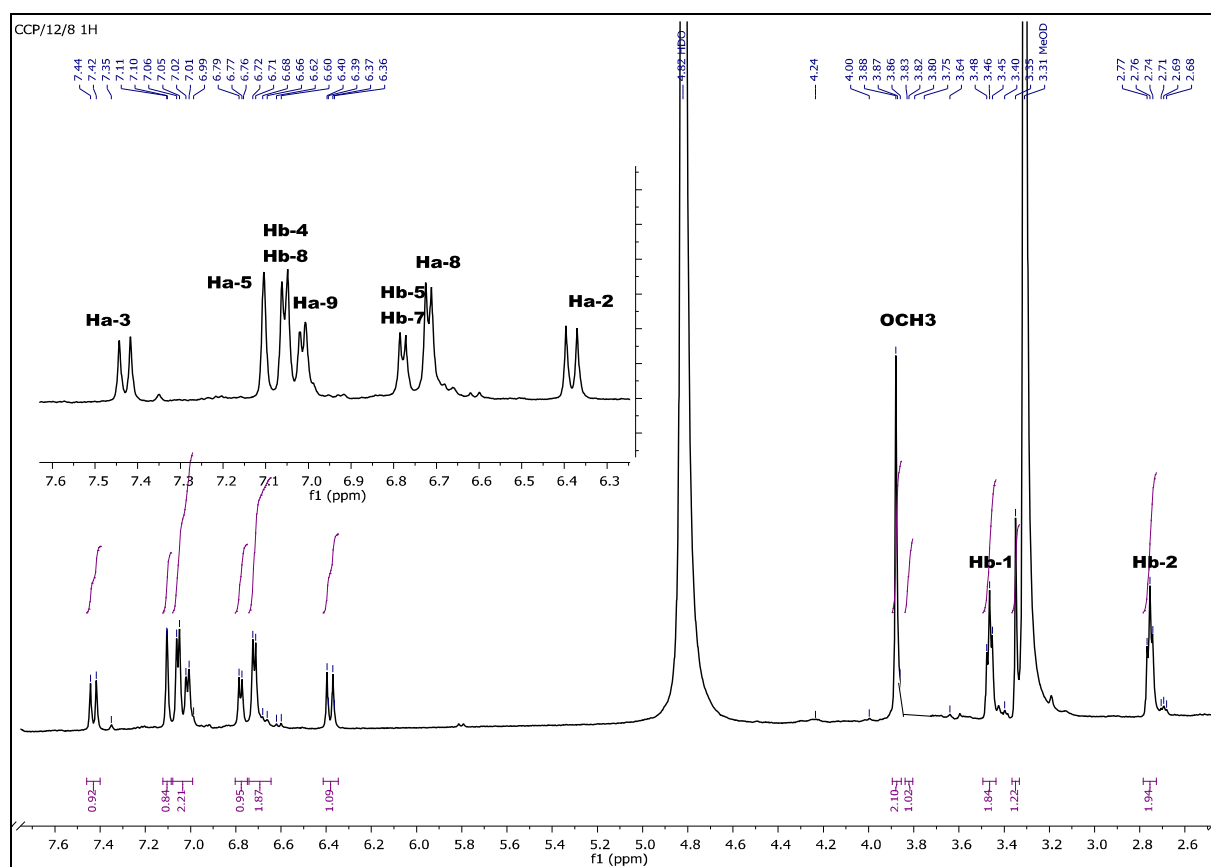


Figure IV.75. Les fragments du composé CCP/12/8

Figure IV.76. Spectre RMN ^1H (600 MHz, MeOH- d_4) du composé CCP/12/8

L'examen du spectre COSY (1H-1H) ; **figure [IV.77.]** ; révèle :

- Une tache de corrélation entre les deux triplets à $\delta_{\text{H}} = 2.76$ ppm et $\delta_{\text{H}} = 3.48$ ppm attribuable à un groupement de deux CH_2 .

- les deux signaux à $\delta_H = 7.43$ ppm ($J=15.6$ Hz) et $\delta_H = 6.39$ ppm ($J=15.7$ Hz), qui présentent entre eux un couplage, apparaissent sous forme de deux doublets intégrant chacun un proton éthylénique de configuration E.
- Une tache de corrélation entre les protons à $\delta_H = 7.06$ ppm ($J=8$ Hz) et $\delta_H = 6.78$ ppm ($J=7.4$ Hz) ce qui confirme le couplage *ortho* ainsi leur attribution et donc une substitution du noyau B en 6 et 3.
- Une tache de corrélation entre le proton $\delta_H = 7.03$ ppm et $\delta_H = 7.10$ ppm ce dernier corrèle avec le proton à $\delta_H = 6.72$ ppm qui caractérise un système ABX.

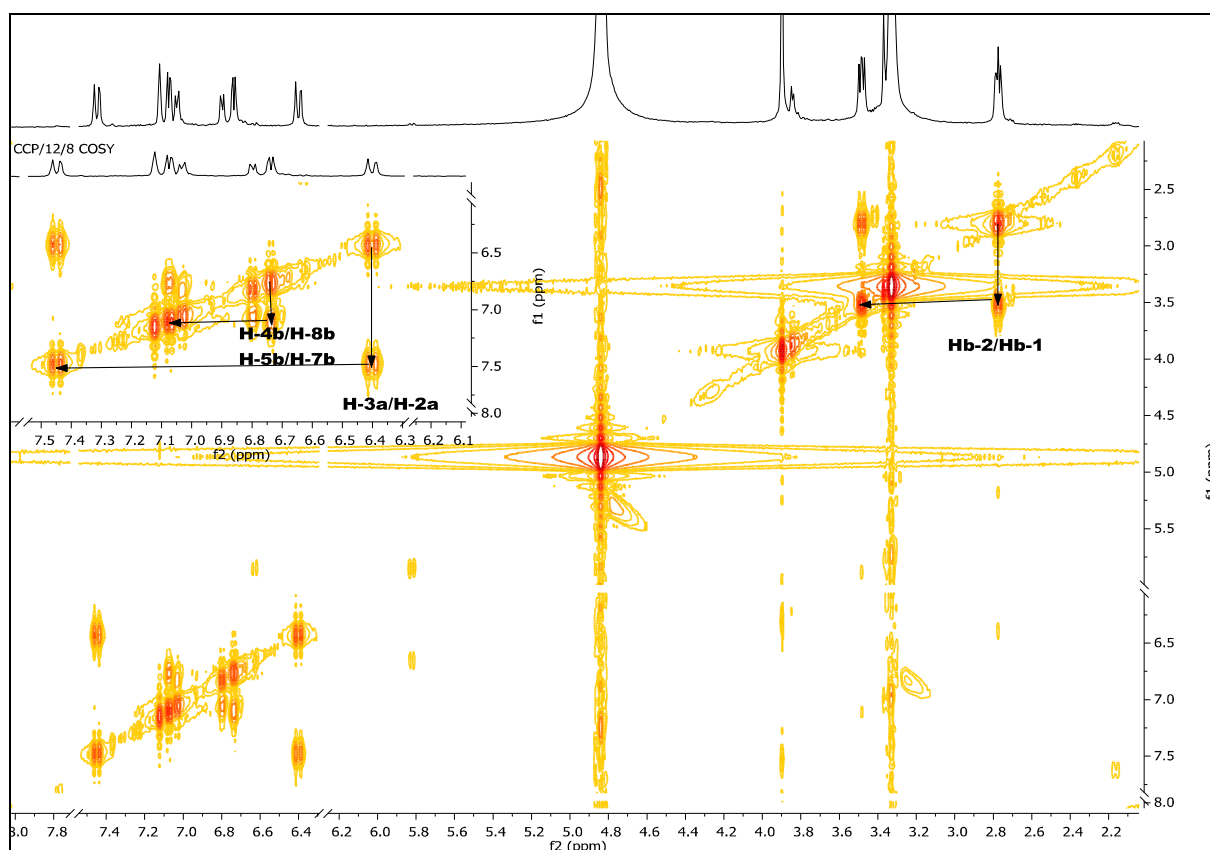


Figure IV.77. Spectre COSY (600 MHz, MeOH-*d*4) du composé CCP/12/8

L'expérience de corrélation hétéro nucléaire à longue distance HMBC ; **figure [IV.80.]** ; montre :

- une tache de corrélation entre CH_2 à $\delta_H = 3.48$ ppm avec les carbones Cb-3 à $\delta_C = 131.4$ ppm, Ca-1 à $\delta_C = 169.38$ ppm et Cb-2 à $\delta_C = 35.5$ ppm, et l'autre CH_2 à $\delta_H = 2.76$ ppm corrélé avec les carbones Cb-3 à $\delta_C = 131.4$ ppm et Cb-1 à $\delta_C = 42.6$ ppm indiquant que le groupement $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ est attaché à la position Cb-3, et cela permet de lier le fragment D au fragment B.

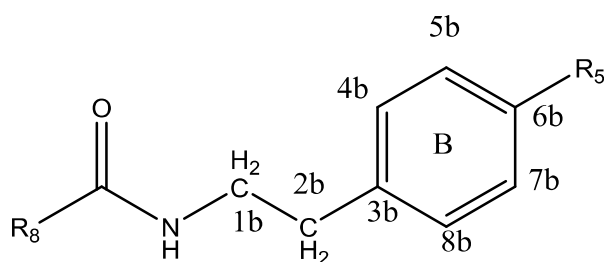


Figure IV.78. Liaison des fragments B et D du composé CCP/12/8.

En effet le spectre HMBC ; **figure [IV.81.]** ; montre :

- Une tache de corrélation correspond au doublet à $\delta_H = 7.44$ ppm attribué à H-a3 et aux signaux à $\delta_C = 111.1$ ppm, $\delta_C = 118.0$ ppm, $\delta_C = 123.1$ ppm, et $\delta_C = 169.3$ ppm, attribués aux carbones Ca-5, Ca-2, Ca-9 et Ca-1, respectivement.
- Une tache de corrélation correspondant au doublet à $\delta_H = 6.39$ ppm attribuable à H-a2, avec les signaux à $\delta_C = 169.3$ ppm et $\delta_C = 127.9$ ppm attribuable aux carbones Ca-1 et Ca-4, respectivement.
- Deux taches de corrélations correspondantes aux protons H-a2, H-a3 couplés au carbone quaternaire résonnant à un champ faible à $\delta_C = 169.3$ ppm, indiquant qu'il s'agit d'un carbone de carbonyle cela permet de lier le fragment A au fragment C.
- Une tache de corrélation correspond au multiplet à $\delta_H = 7.10$ ppm attribué à Ha-5 et aux signaux à $\delta_C = 123.5$ ppm, $\delta_C = 142.3$ ppm et $\delta_C = 150.6$ ppm attribués aux carbones Ca-9, Ca-6 et Ca-7, respectivement.
- Une tache de corrélation correspond au doublet à $\delta_H = 6.78$ ppm attribué à Hb-5 et aux signaux à $\delta_C = 130.4$ ppm et $\delta_C = 157.4$ ppm attribués aux carbones Cb-4 et Cb-6, respectivement.

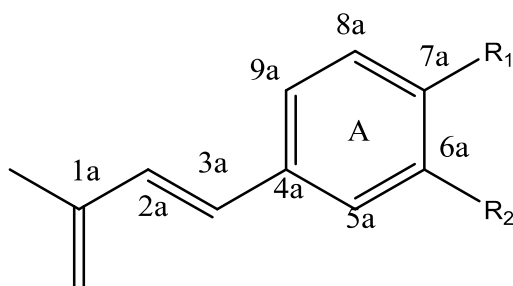


Figure IV.79. Liaison des fragments A et C du composé CCP/12/8

- Une tache de corrélation entre les protons à $\delta_H = 3.48$ ppm et $\delta_H = 6.39$ ppm et le carbone à $\delta_C = 169.38$ ppm, ce qui peut déterminer la structure finale de ce composé.

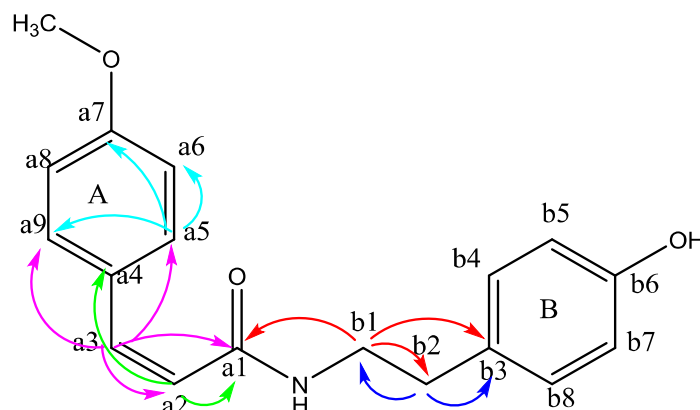


Figure IV.80. Les corrélations HMBC du composé CCP/12/8

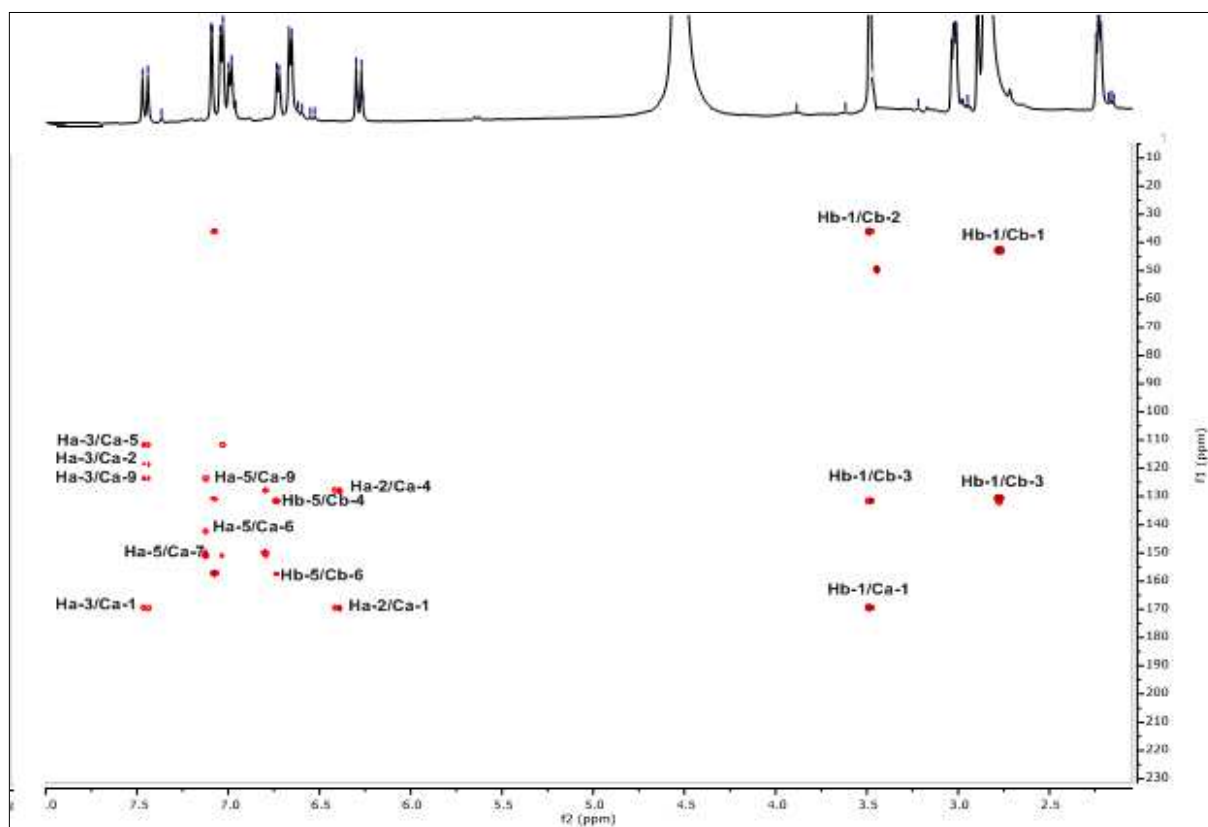


Figure IV.81. Spectre HMBC (600 MHz, MeOH-*d*4) du composé CCP/12/8.

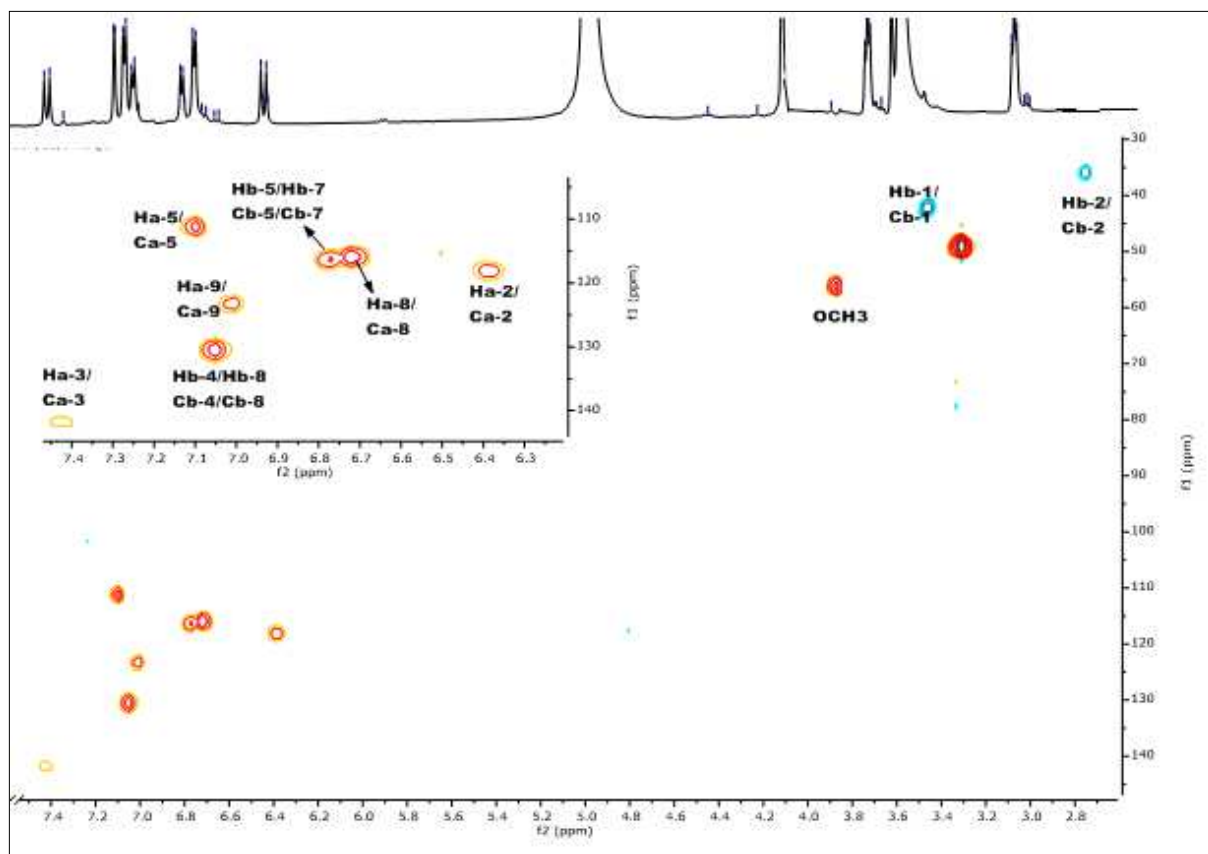


Figure IV.82. Spectre HSQC (600 MHz, MeOH-*d*4) du composé CCP/12/8.

Positions	RMN ^{13}C δ (ppm)	RMN ^1H δ (ppm), <i>m</i> , <i>J</i> (Hz)
a1	169.3	-
a2	118.0	6.39 (<i>d</i> , <i>J</i> = 15.7 Hz)
a3	141.6	7.43 (<i>d</i> , <i>J</i> = 15.6 Hz)
a4	127.9	-
a5	111.1	7.10 (<i>s</i>)
a6	142.3	-
a7	150.6	-
O-CH3	56.1	3.88 (<i>s</i> , 3H)
a8	115.8	6.72 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7 Hz)
a9	123.1	7.03 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8.2, 2.4 Hz)
b1	42.2	3.48 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7.4 Hz)
b2	35.5	2.76 (<i>t</i> , <i>J</i> = 7.4 Hz)
b3	131.4	-
b4/b8	130.4	7.06 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8 Hz)
b5/b7	116.2	6.78 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7.4 Hz)
b6	157.4	-

Tableau IV.15. Données de la spectroscopie RMN ^1H et ^{13}C (600 MHz, MeOH-*d*4) du composé CCP/12/8

Les données spectrales obtenues confirment la structure du composé CCP/12/8 comme étant : **N-trans-3-hydroxy-4-methoxy cinnamoyltyramine** ; figure [IV.83].

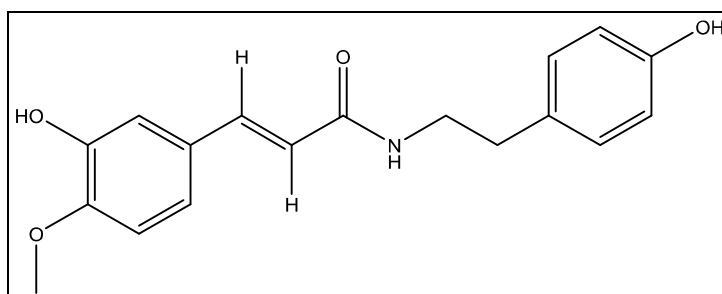
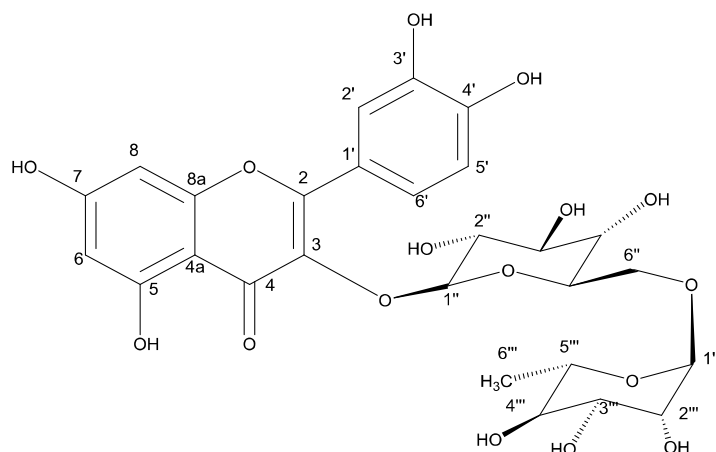


Figure IV.83. La structure de Tamgermanetin

IV.3.5. Elucidation structurale du composé CCP/9/7



Les données RMN ^1H de ce composé suggèrent son appartenance à la classe des flavonoïdes où il est observé sur le spectre RMN ^1H ; figure [IV.84.] ; quatre signaux doublets (*d*) et un autre sous forme de doublet de doublets (*dd*), d'intégration 1H chacun, dans la zone des protons aromatiques. Aussi, un nombre important de signaux dans la zone des protons osidiques est détecté.

L'assignement des protons aromatiques à leurs carbones sur le spectre HSQC ; figure [IV.85.] ; conduit à la distinction entre les protons des cycles A et B.

- Deux doublets (*d*) résonant à $\delta_H = 6,16$ ppm qui correspond au carbone à $\delta_C = 100,8$ ppm et $\delta_H = 6,34$ ppm qui correspond au carbone à $\delta_C = 95,0$ ppm et qui possèdent une constante de couplage $J = 2,2$ Hz traduisant un couplage *ortho*, sont attribués aux protons du cycle A (H-6 / H-8), respectivement.
- Les signaux restant ; **figure [IV.84.]** ; indiquent la présence d'un cycle B de type 1, 3, 4-trisubstitué suite aux multiplicités et valeurs des constantes de couplage dont le signal sortant à $\delta_H = 7,66$ ppm (*d*, $J = 2,2$ Hz) est attribué au proton H-2'. Le signal résonant à $\delta_H = 7,63$ ppm (*dd*, $J = 8,5-2,2$ Hz) correspond au proton H-6' et en conséquence le proton H-5' résonne à $\delta_H = 6,86$ ppm (*d*, $J = 8,4$ Hz).

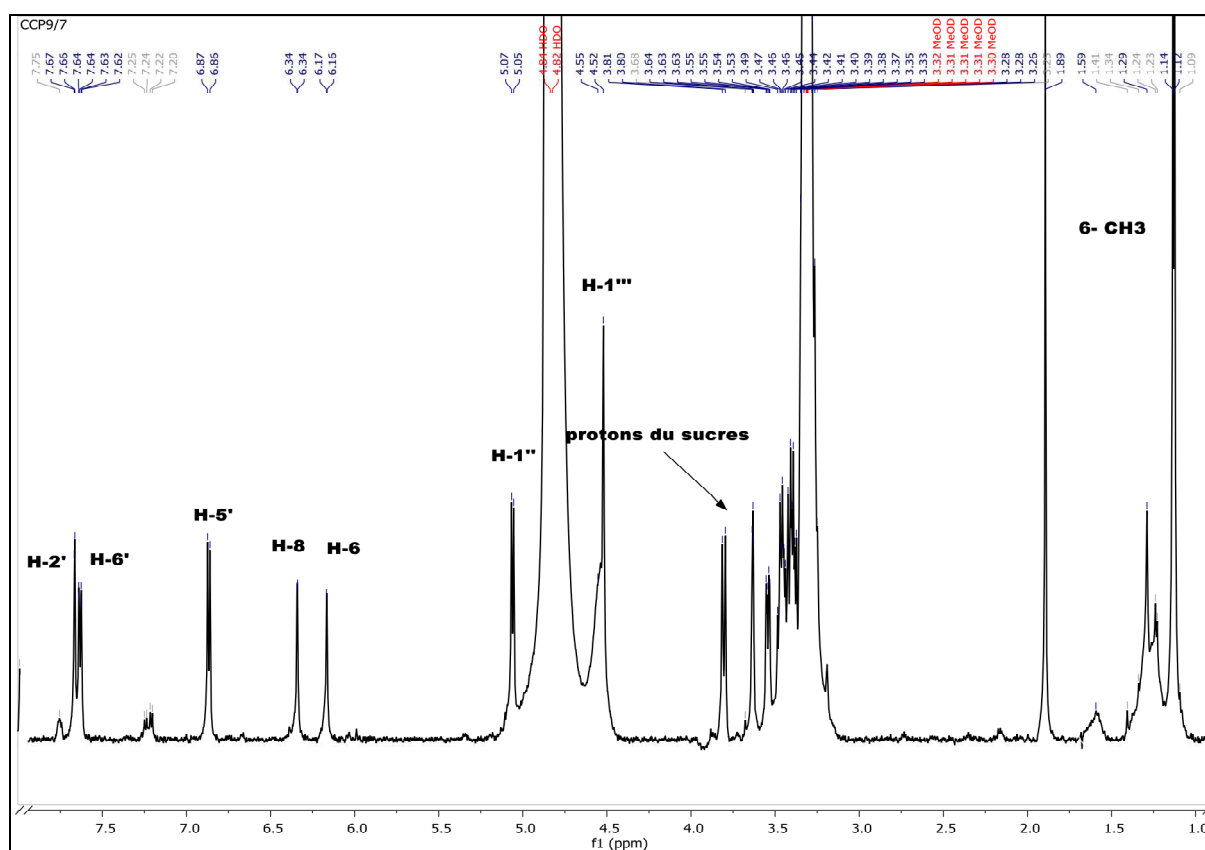


Figure IV.84. Spectre RMN ^1H (600 MHz, MeOH- d_4) du composé CCP/9/7

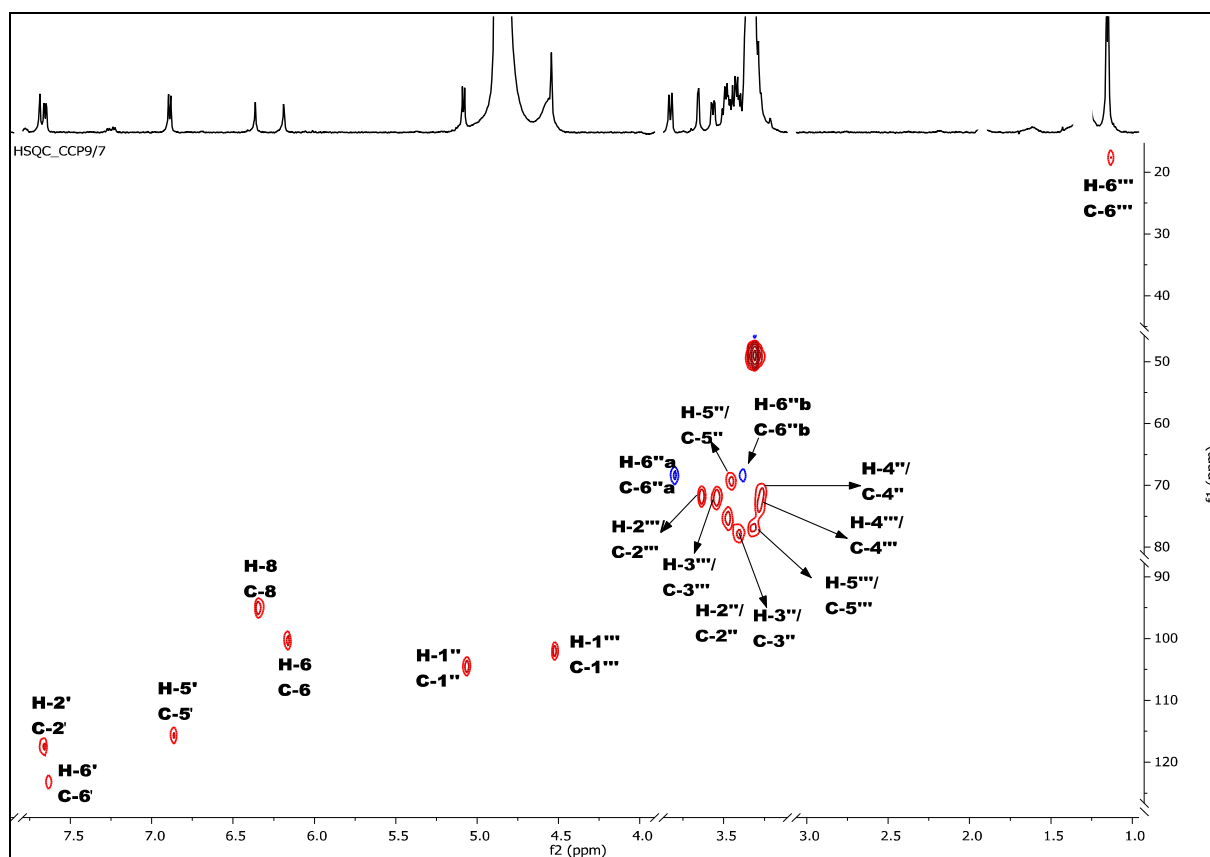


Figure IV.85. Spectre HSQC (600 MHz, MeOH-*d*4) du composé CCP/9/7

La densité remarquée des signaux sortant dans la zone des protons et carbones osidiques témoigne de la présence de plus d'une unité osidique. Ceci est supporté par les deux signaux des protons anomériques résonant à $\delta_H = 5,06$ (d, $J = 7,7$ Hz, H-1'') et $4,52$ (s, H-1'''); **figure [IV.84.]**; liés aux carbones C-1'' à $\delta_C = 104,5$ ppm et C-1''' à $\delta_C = 101,9$ ppm, par l'analyse du spectre HSQC. Ces données attestent la présence des deux osides

L'existence d'un hexose de type glucose est démontrée par les corrélations observées sur le spectre COSY H-H ; **figure [IV.86.]** ; entre le proton anomérique H-1'' à $\delta_H = 5,06$ ppm et le proton H-2'' à $\delta_H = 3,47$ ppm ainsi par les grandes valeurs des constantes de couplage de H-protons. Le couplage des protons H-1'' et H-2'' avec $J = 7,4$ Hz attribue pour ce glucose une configuration β . Il s'agit donc d'un β -D-glucose.

Ainsi, la présence d'un rhamnose est mise en évidence suite à l'analyse des corrélations observées sur le spectre COSY H-H ; **figure [IV.86.]** ; des protons osidiques restant en partant du deuxième proton anomérique H-1''' à $\delta_H = 4,52$ ppm (s, 1H). Ces corrélations permettent de repérer l'enchaînement H-1'''/H-2''' à $\delta_H = 3,63$ ppm (t, $J = 2,4$ Hz). Les valeurs de constantes de couplage indiquent une orientation équatoriale pour les protons H-1''' et H-

2''' et un arrangement axial pour les protons H-3''', H-4''' et H-5''' confirmant alors l'existence de l'unité osidique α -L-rhamnose.

L'enchaînement osidique est déterminé comme étant un rutinoside impliquant une jonction (1 \rightarrow 6) glucose-rhamnose, en raison d'une part, du déblindage du carbone C-6'' ($\delta_C = 68.1$) du glucose par rapport à un glucose terminal C-6'' à $\delta_C = 61$ ppm et d'autre part, de la valeur du déplacement chimique du carbone anomérique C-1''' à $\delta_C = 101.9$ ppm du rhamnose.

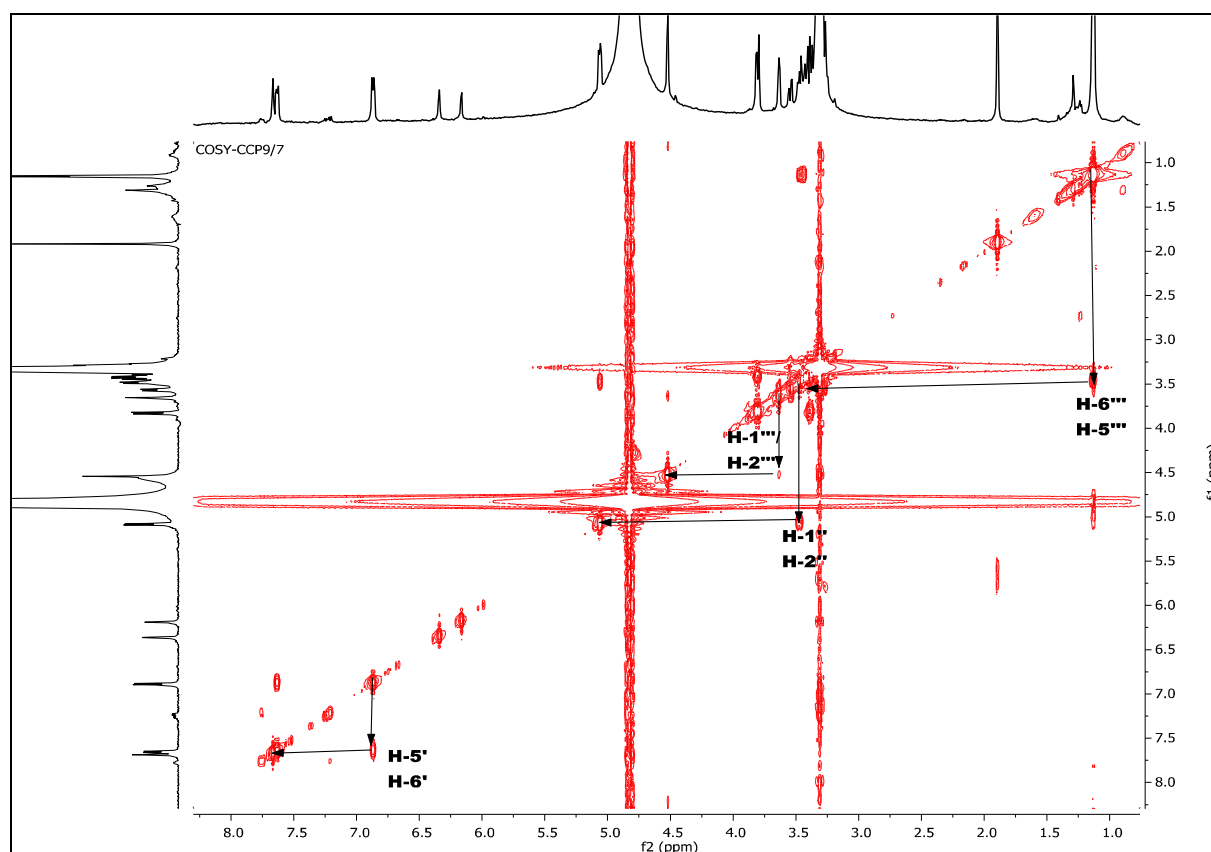


Figure IV.86. Spectre COSY (600 MHz, MeOH-*d*4) du composé CCP/9/7

L'ensemble de ces données spectroscopiques, et en comparaison avec celles de la littérature [7] permettent d'attribuer pour le composé CCP/9/7 la dénomination : Quercétine-3-O-rutinoside (Rutine) ; figure [IV.87.]

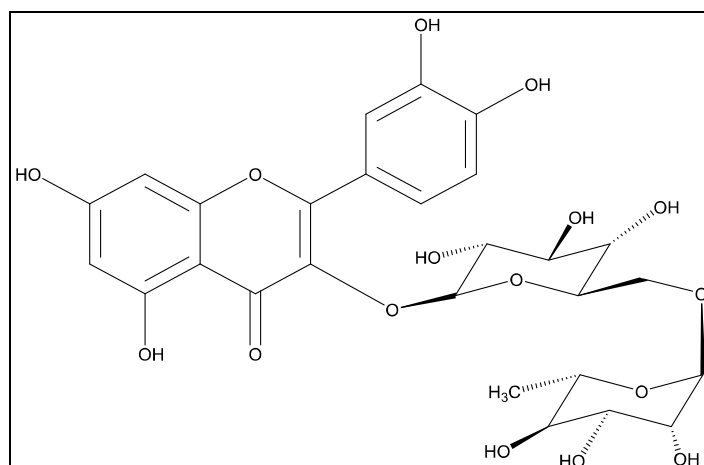
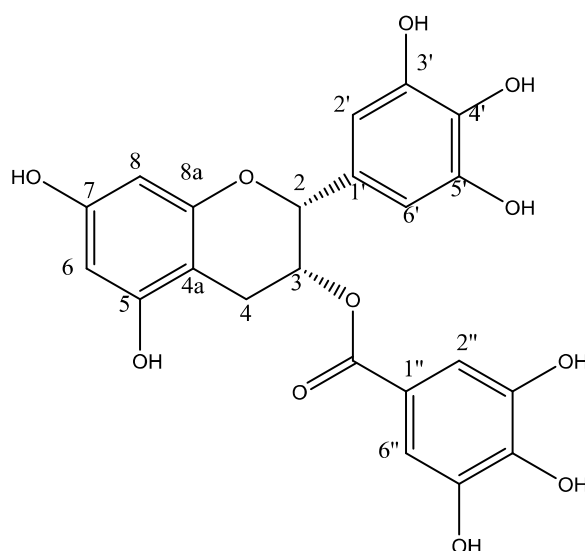


Figure IV.87. La structure de Rutine

IV.3.6. Elucidation structurale du composé CCP/4/14



L'analyse du spectre RMN ^1H ; figure [IV.88.] ; montre:

- Un signal sous forme d'un doublet de doublet (*dd*) à $\delta_{\text{H}} = 2,87$ ppm avec une constante de couplage $J=17,4$ et $2,6$ Hz (un couplage géminal et ortho) attribué à H-4 α .
- Un signal sous forme d'un doublet de doublet (*dd*) à $\delta_{\text{H}} = 3,02$ ppm avec une constante de couplage $J= 17,3$ et $4,7$ Hz (un couplage géminal et *ortho*) attribué à H-4 β .
- Par ailleurs, le signal sous forme d'un singulet (*s*) qui apparait à $\delta_{\text{H}} = 5,05$ ppm attribué à H-2.
- Le signal à $\delta_{\text{H}} = 5,55$ ppm sous forme d'un singulet (*s*) attribuable à H-3.

- Le signal à $\delta_H = 5,98$ ppm sous forme d'un singulet (*s*) attribuable à H-6 / H-8.
- Le signal à $\delta_H = 6,83$ ppm sous forme d'un doublet (*d*, $J = 7.9$ Hz ; un couplage ortho) attribuable à H-6'.
- Le signal à $\delta_H = 6,72$ ppm sous forme d'un doublet (*d*, $J = 8.1$ Hz ; un couplage ortho) attribuable à H-5'. Ce ci confirme l'hydroxylation des positions 3' et 4' du cycle B.
- Le signal à $\delta_H = 6,96$ ppm sous forme d'un singulet (*s*) attribuable à H-2'.
- Le signal à $\delta_H = 6,97$ ppm sous forme d'un singulet (*s*) attribuable à H-2''/H-6''.

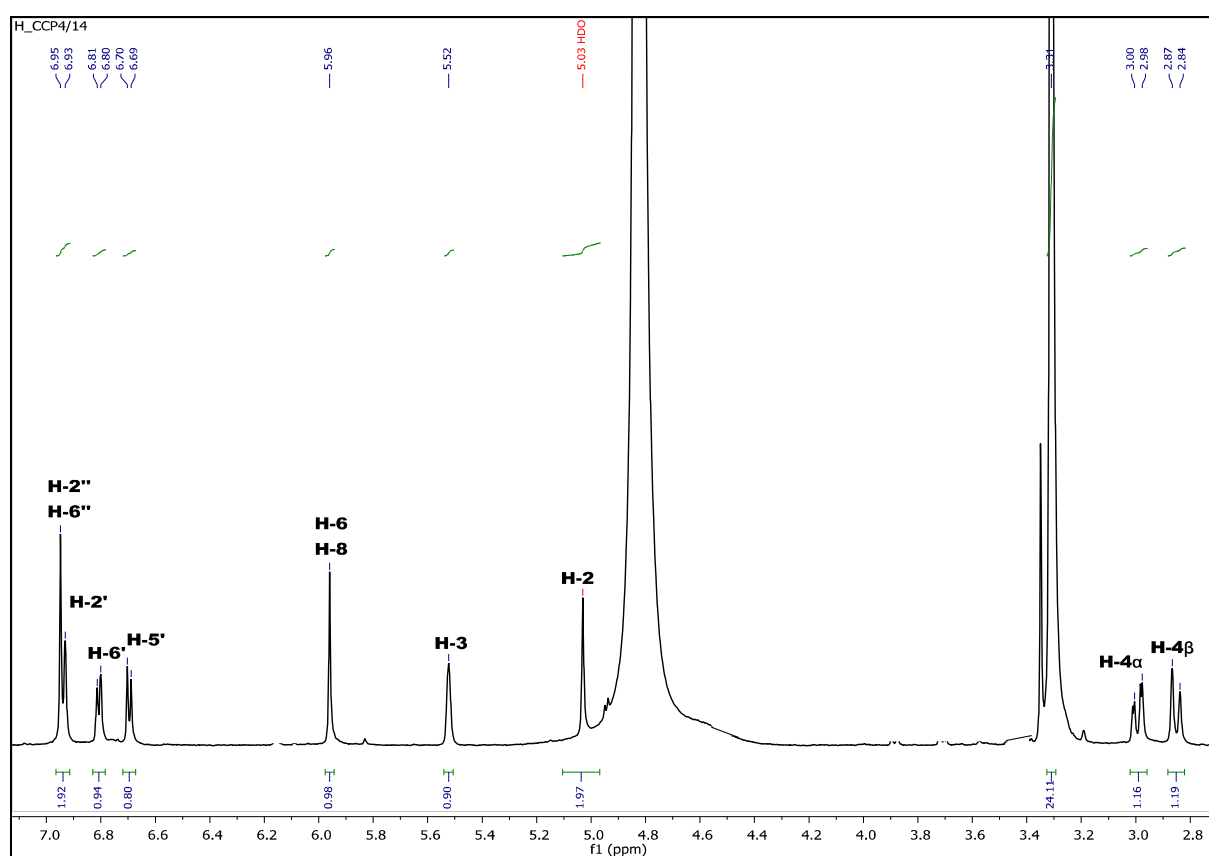


Figure IV.88. Spectre RMN ^1H (600 MHz, MeOH- d_4) du composé CCP/4/14

L'expérience COSY (H-H) ; figure [IV.89.] ; permet d'observé les corrélations suivantes:

- Le proton H-4 α et le proton H-4 β résonant sous forme de doublet de doublet (*dd*) à $\delta_H = 3.02$ ppm et $\delta_H = 2.87$ ppm, les deux protons corrént avec un signal singulet (*s*) à $\delta_H = 5.55$ ppm correspondant au proton H-3, ce dernier donnant une tache de corrélation avec le proton H₂ résonant à $\delta_H = 5.05$ ppm.

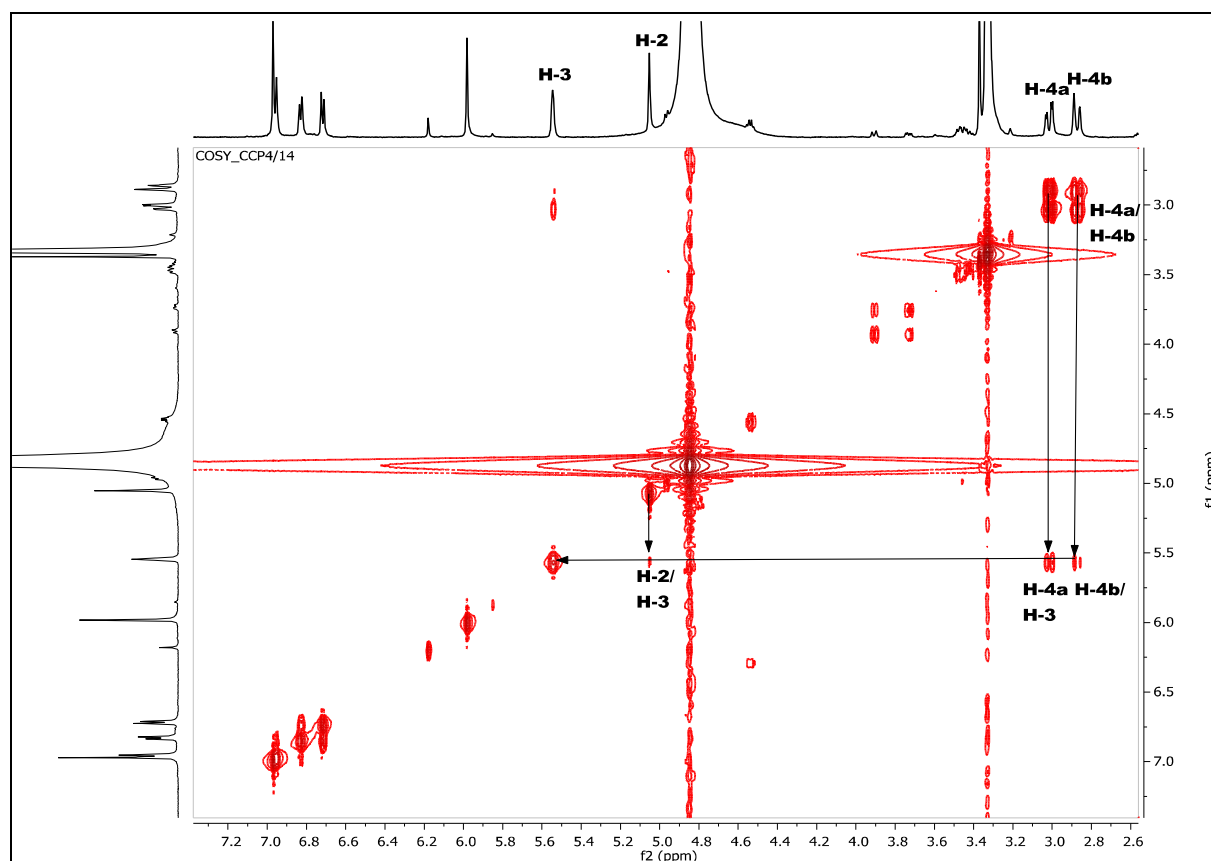


Figure IV.89. Spectre COSY (600 MHz, MeOH-*d*4) du composé CCP/4/14

L'expérience de corrélation direct proton-carbone HSQC ; **figure [IV.90.]** ; montre les couplages entre:

- Les deux protons H-4a, H-4b et son carbone C-4 résonant à $\delta_{\text{H}} = 27.5$ ppm.
- Le proton H-3 et son carbone C-3 résonant à $\delta_{\text{H}} = 69.7$ ppm.
- Le proton H-2 et son carbone C-2 résonant à $\delta_{\text{H}} = 78.7$ ppm.
- Le proton H-8 / H-6 et son carbone C-8/C-6 résonant à $\delta_{\text{H}} = 96.8$ ppm.
- Le proton H-2' et son proton C-2' résonant à $\delta_{\text{H}} = 115,3$ ppm.
- Le proton H-5' et son proton C-5' résonant à $\delta_{\text{H}} = 116.0$ ppm.
- Le proton H-6' et son proton C-6' résonant à $\delta_{\text{H}} = 119.3$ ppm.
- Le proton H-2''/ H-6'' et son proton C-2''/C-6'' résonant à $\delta_{\text{H}} = 110.1$ ppm.

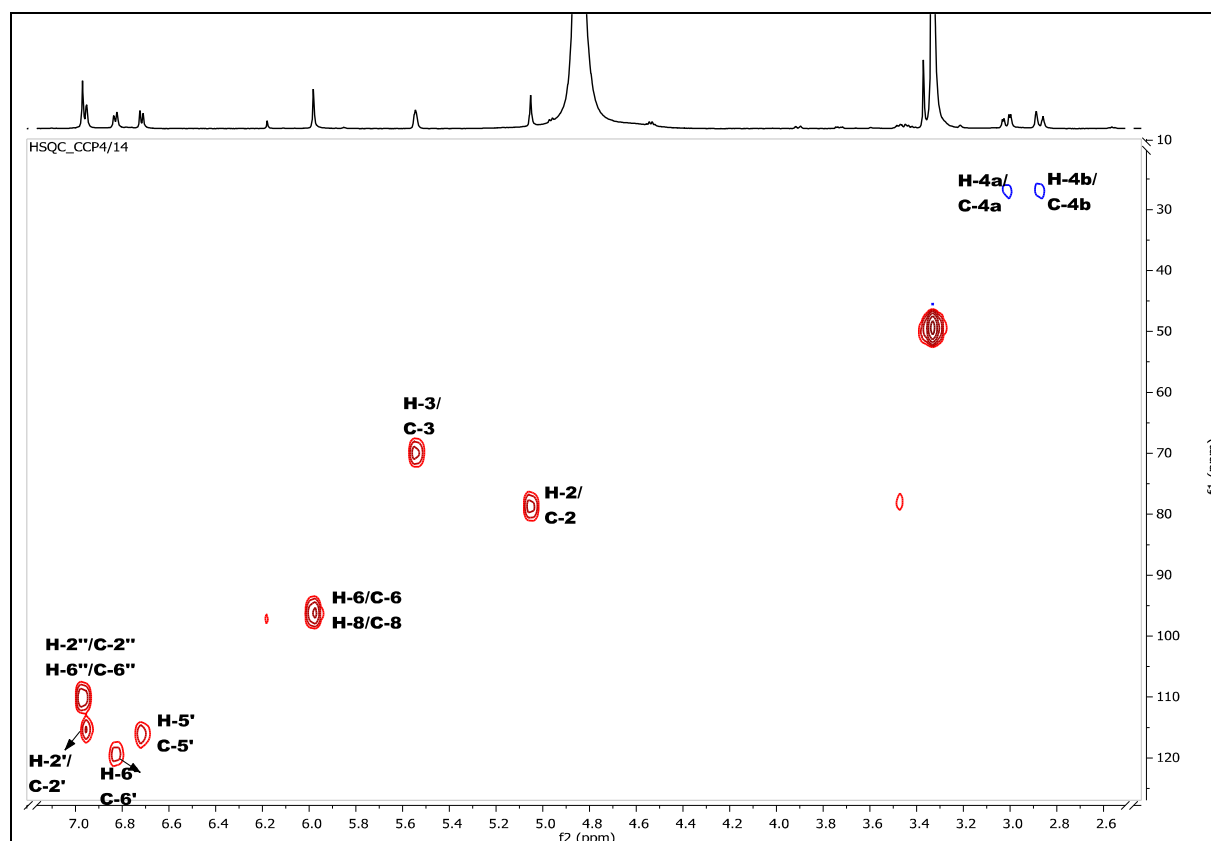


Figure IV.90. Spectre HSQC (600 MHz, MeOH-*d*4) du composé CCP/4/14

En effet le spectre HMBC ; **figure [IV.92.]** ; montre :

- Une tache de corrélation correspond au singulet à $\delta_H = 6.97$ ppm attribué à H-2''/H-6'' et les signaux à $\delta_C = 110.1$ ppm, $\delta_C = 121.4$ ppm, $\delta_C = 140.1$ ppm, $\delta_C = 146.5$ ppm et $\delta_C = 167.8$ ppm, attribués aux carbones C-2'', C-1'', C-4'', C-3''/C-5'' et C=O.
- Une tache de corrélation correspond au singulet à $\delta_H = 6.96$ ppm attribué à H-2' et les signaux à $\delta_C = 78.7$ ppm, $\delta_C = 119.3$ ppm et $\delta_C = 146.1$ ppm, attribués aux carbones C-2, C-6' et C-4', respectivement.
- Une tache de corrélation correspond au doublet à $\delta_H = 6.83$ ppm attribué à H-6' et les signaux à $\delta_C = 78.7$ ppm, $\delta_C = 115.3$ ppm et $\delta_C = 146.1$ ppm, attribués aux carbones C-2, C-2' et C-3', respectivement.
- Une tache de corrélation correspond au doublet à $\delta_H = 6.72$ ppm attribué à H-5' et les signaux à $\delta_C = 115.3$ ppm, $\delta_C = 119.3$ ppm, $\delta_C = 131.6$ ppm et $\delta_C = 146.1$ ppm, attribués aux carbones C-2', C-6', C-1', C-3', respectivement.
- Une tache de corrélation correspond au singulet à $\delta_H = 5.98$ ppm attribué à H-6 / H-8 et les signaux à $\delta_C = 96.8$ ppm, $\delta_C = 99.6$ ppm et $\delta_C = 158.1$ ppm, attribués aux carbones C-6/C-8, C-4a et C-7, respectivement.

- Une tache de corrélation correspond au singulet à $\delta_H = 5.05$ ppm attribué à H-2 et les signaux à $\delta_C = 69.7$ ppm, $\delta_C = 115.3$ ppm et $\delta_C = 119.3$ ppm, attribués aux carbones C-3, C-2' et C-6', respectivement.
- Une tache de corrélation correspond au doublet à $\delta_H = 3.02$ ppm attribué à H-4 α et les signaux à $\delta_C = 99.6$ ppm et $\delta_C = 158.5$ ppm, attribués aux carbones C-4a et C-5, respectivement.
- Une tache de corrélation correspond au doublet à $\delta_H = 2.87$ ppm attribué à H-4 β et les signaux à $\delta_C = 69.7$ ppm, $\delta_C = 78.7$ ppm et $\delta_C = 99.6$ ppm, attribués aux carbones C-3, C-2 et C-4a, respectivement.
- La présence d'un ester gallique est mise en évidence par le $\delta_{C=O} = 167.8$; **figure [IV.92.]**. Le point d'attache de l'ester gallique est confirmé par le spectre HMBC où on observe une tâche de corrélation entre $\delta_{H-3} = 5.55$ ppm et le carbonyle à $\delta_{C=O} = 166,7$ ppm ; **figure [IV.92.]**.

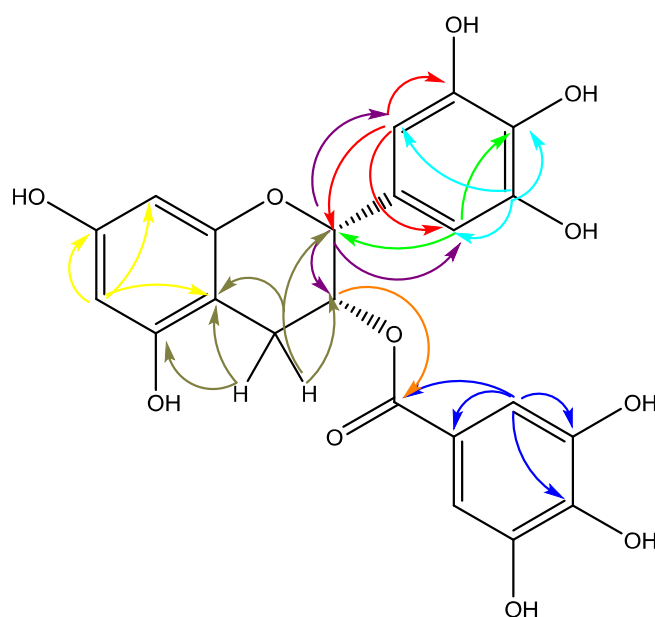


Figure IV.91. Les corrélations HMBC du composé CCP/4/14

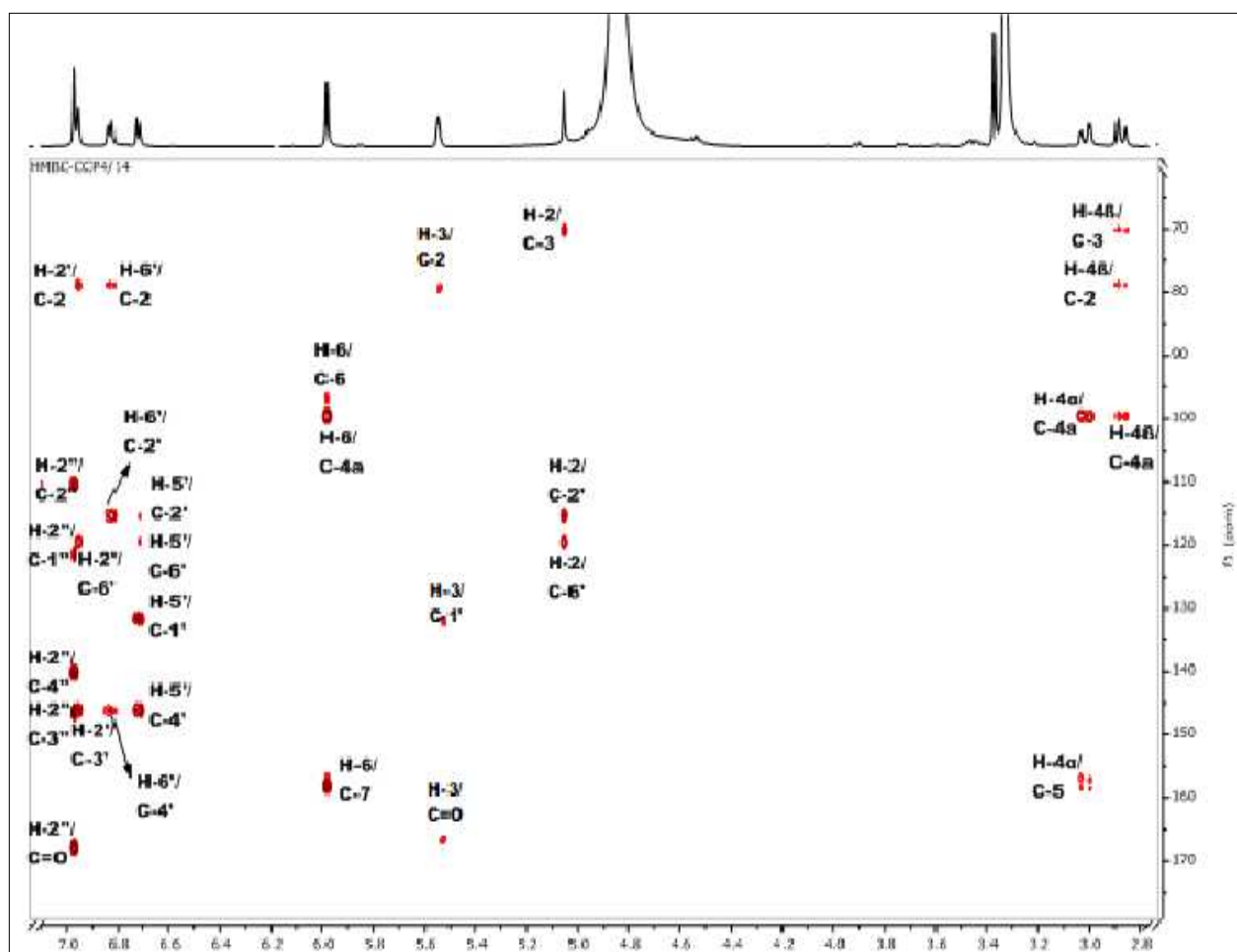


Figure IV.92. Spectre HMBC (600 MHz, MeOH-*d*4) du composé CCP/4/14

Positions	RMN ^{13}C δ (ppm)	RMN ^1H δ (ppm), <i>m</i> , <i>J</i> (Hz)
1	-	-
2	78.7	5.05 (<i>s</i> , 1H)
3	69.7	5.55 (<i>s</i> , 1H)
4	27.0	3.02 (<i>d</i> , <i>J</i> = 17.3 Hz, 1H) 2.87 (<i>d</i> , <i>J</i> = 17.2 Hz, 1H)
4a	99.6	-
5	158.5	-
6	96.8	5.98(<i>s</i> , 1H)
7	158.1	-
8	96.8	5.98(<i>s</i> ,1H)
8a	157	-
1'	131.6	-
2'	115.3	6.96 (<i>s</i> , 1H)
3'	146.1	-
4'	146.1	-
5'	116.0	6.72 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8.1 Hz, 1H)
6'	119.3	6.83 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7.9 Hz, 1H)

1''	121.4	-
2''/6''	110.1	6.97 (s, 2H)
3''/5''	146.5	-
4''	140.1	-
1''' (C=O)	167.8	-

Tableau IV.16. Données de la spectroscopie RMN ^1H et ^{13}C du composé CCP/4/14 (600 MHz, MeOH-*d*4)

Les pics à $\delta_{\text{H-}4\alpha} = 3.02$ ppm (dd, $J_{4\alpha-4\beta} = 17.4$ Hz, $J_{4\alpha-3} = 2.6$ Hz) et $\delta_{\text{H-}4\beta} = 2.87$ (dd, $J_{4\alpha-4\beta} = 17.4$ Hz, $J_{4\beta-3} = 4.6$ Hz) présentent la stéréochimie du cycle C de l'épigallocatechine.

Les corrélations en ^1J (H-C) du spectre HSQC ; **figure [IV.90.]** ; et $^2\text{J-}^3\text{J}$ (H-C) du spectre HMBC ; **figure [IV.92.]** ; en plus de la comparaison des données RMN avec ceux de la littérature [1] ont permis d'attribuer sans équivoque ce composé à l'**Epigallocatechine-3-O-gallate** ; **figure [IV.93.]**

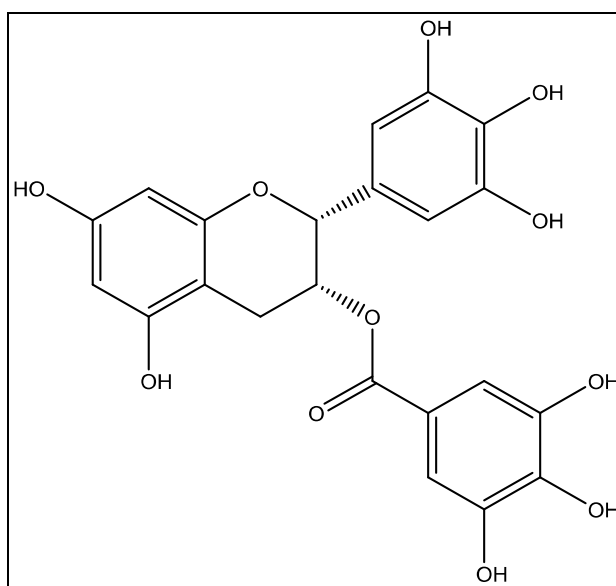
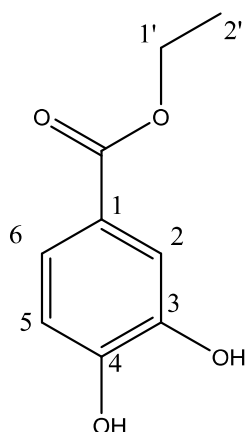


Figure IV.93. La structure de l'**Epigallocatechine-3-O-gallate**.

IV.3.7. Elucidation structurale du composé CCP/11/12



L'examen du spectre RMN ¹H ; **figure [IV.94.]** ; enregistré dans MeOH-*d*₄ à 600 MHz montre:

- Un noyau aromatique tri-substitué. En effet, les protons aromatiques du spectre résonnent sous forme d'un doublet (*d*, *J* = 8.6 Hz) d'intégration 2H à $\delta_{\text{H}} = 7.42$ ppm attribuable aux protons H-2 / H-6, et un doublet (*d*) d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 6.79$ ppm attribuable à H-5.
- La présence d'un groupement OCH₂CH₃ par l'apparition des signaux de O-CH₂ à $\delta_{\text{H}} = 4.29$ ppm (*t*, *J* = 10.5 Hz) / $\delta_{\text{C}} = 61,10$ ppm et du groupement CH₃ à $\delta_{\text{H}} = 1.35$ ppm (*d*, *J* = 7.1) / $\delta_{\text{C}} = 14.54$ ppm.

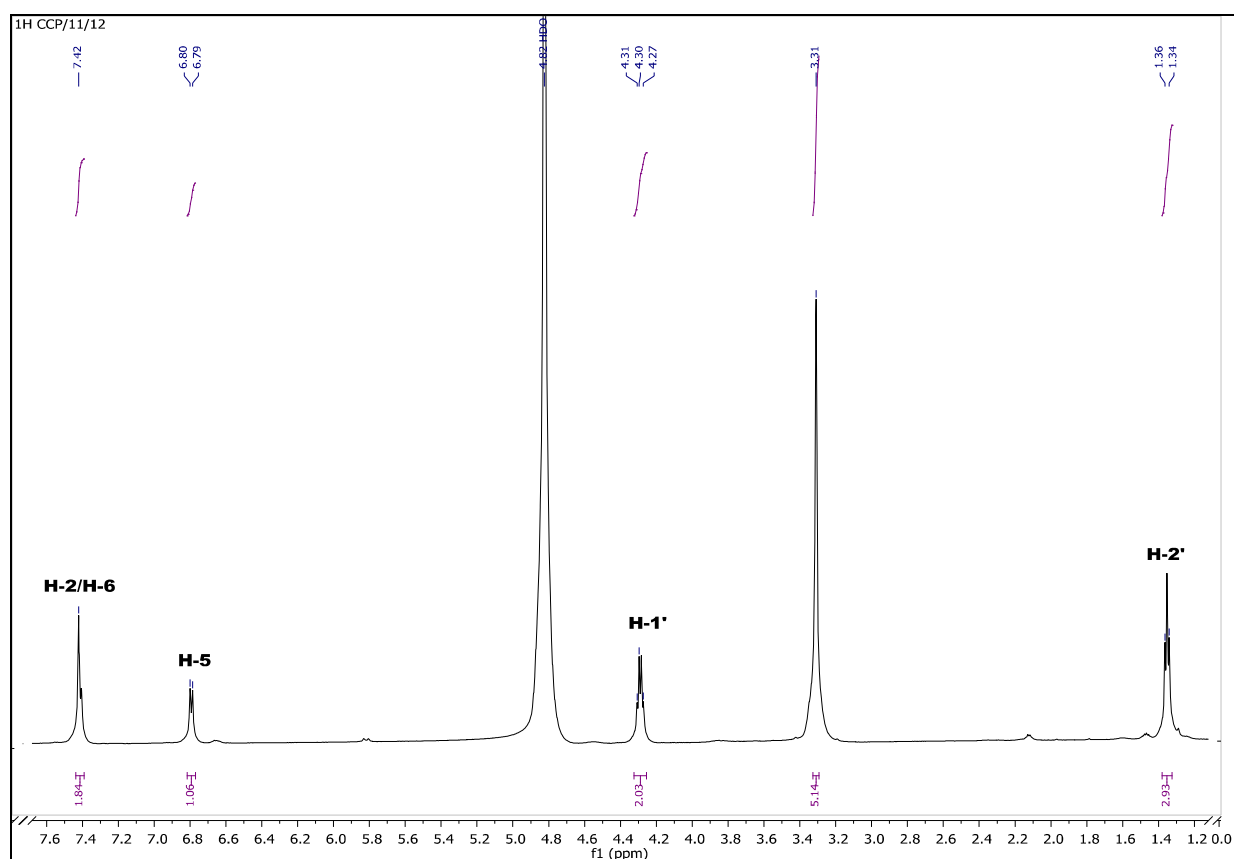


Figure IV.94. Spectre RMN ^1H (600 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé CCP/11/12

Le spectre HMBC montre ; **figure [IV.95.]** :

- Une tache de corrélation correspond au doublet (*d*) à $\delta_{\text{H}} = 7.42$ ppm attribué à H-2 / H-6 et les signaux à $\delta_{\text{C}} = 123.0$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 146.1$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 151.2$ ppm et $\delta_{\text{C}} = 167.8$ ppm, attribués aux carbones C-6, C-4, C-1 et C=O.
- Une tache de corrélation correspond au doublet (*d*) à $\delta_{\text{H}} = 6.79$ ppm attribué à H-5 et les signaux à $\delta_{\text{C}} = 123.0$ ppm et $\delta_{\text{C}} = 145.7$ ppm, attribués aux carbones C-6 et C-3.
- Une tache de corrélation correspond au triplet (*t*) à $\delta_{\text{H}} = 4.29$ ppm attribué à H-1' et les signaux à $\delta_{\text{C}} = 14.5$ ppm et $\delta_{\text{C}} = 167.8$ ppm, attribués aux carbones C-2' et C=O.
- Une tache de corrélation correspond au doublet (*d*) à $\delta_{\text{H}} = 1.35$ ppm attribué à H-2' et le signal à $\delta_{\text{C}} = 61.1$ ppm, attribués aux carbones C-1'.

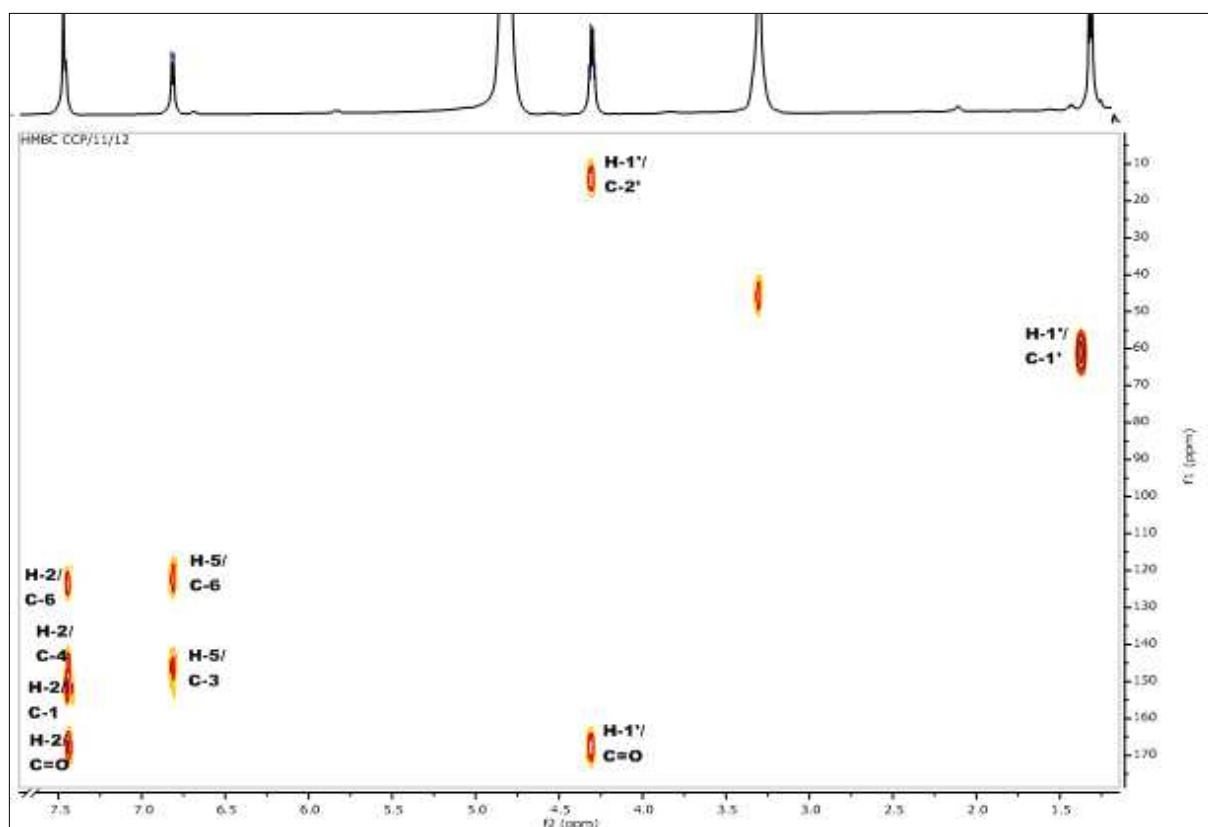


Figure IV.95. Spectre HMBC (600 MHz, MeOH-*d*4) du composé CCP/11/12

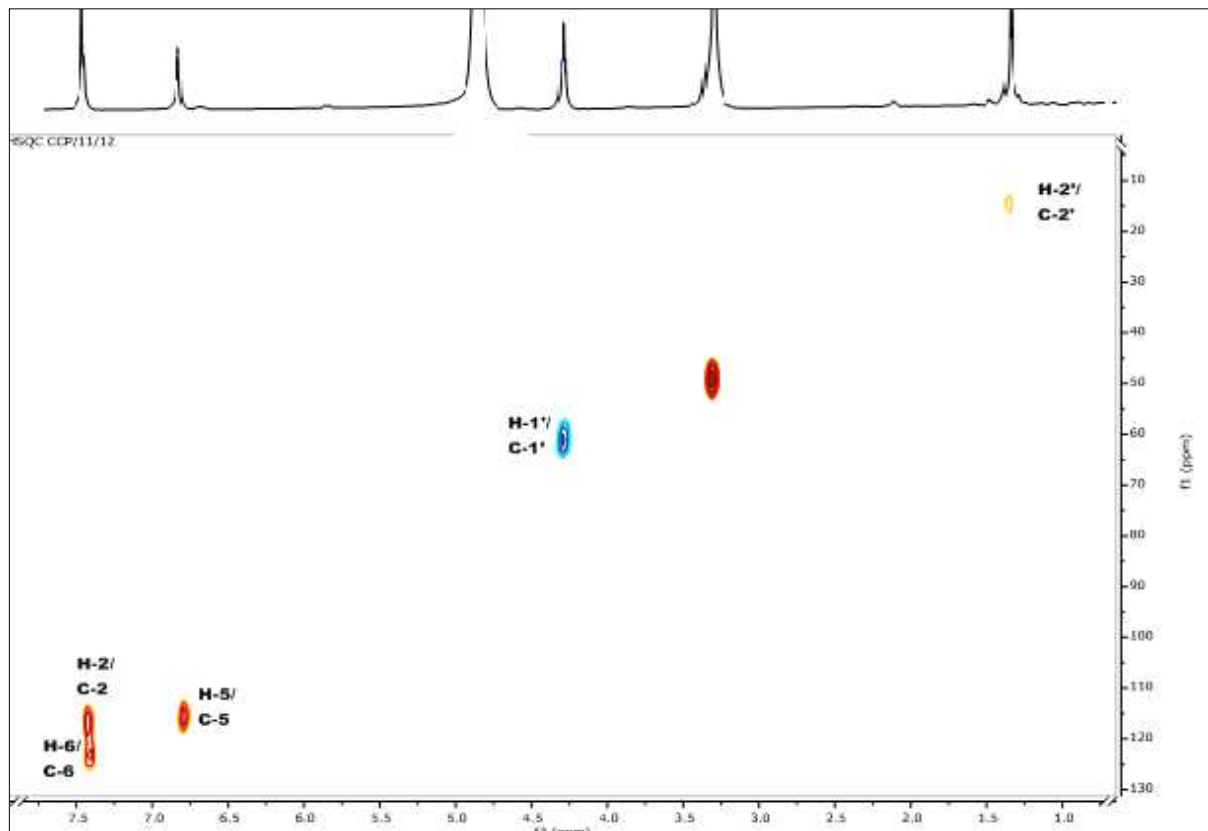


Figure IV.96. Spectre HSQC (600 MHz, MeOH-*d*4) du composé CCP/11/12.

Positions	RMN ^{13}C δ (ppm)	RMN ^1H δ (ppm), <i>m</i> , <i>J</i> (Hz)
1	151.2	-
2	116.8	7.42 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8.6 Hz, 1H)
3	145.7	-
4	146.1	-
5	115.5	6.79 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H)
6	123.0	7.41 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8.6 Hz, 1H)
C=O	167.8	-
1'	61.1	4.29 (<i>t</i> , <i>J</i> = 10.5 Hz, 2H)
2'	14.5	1.35 (<i>d</i> , <i>J</i> = 14.1 Hz, 3H)

Tableau IV.17. Données de la spectroscopie RMN ^1H et ^{13}C (600 MHz, MeOH-*d*4) du composé CCP/11/12

Sur la base de l'ensemble de ces données RMN ^1H , HSQC et HMBC, le composé CCP/11/12 est identifié comme étant **Acide éthyle ester protocatéchique** ; figure [IV.97].

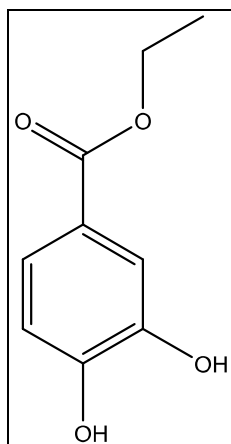


Figure IV.97. La structure de l'acide éthyle ester protocatéchique

IV.4. activité biologique

IV.4.1. Activité antioxydante

IV.4.1.1. Test DPPH

- *Calligonum azel*

Les résultats de la capacité de piégeage des radicaux des trois extraits Chloroforme (CAP1), Acétate d'éthyle (CAP2) et Méthanol (CAP3) de l'espèce *Calligonum azel*, nous permettent de tracer les graphes de variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration pour chaque échantillon testé ; **figure [IV.98.]**. Nous remarquons que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration de tous les extraits ainsi que pour le témoin BHT.

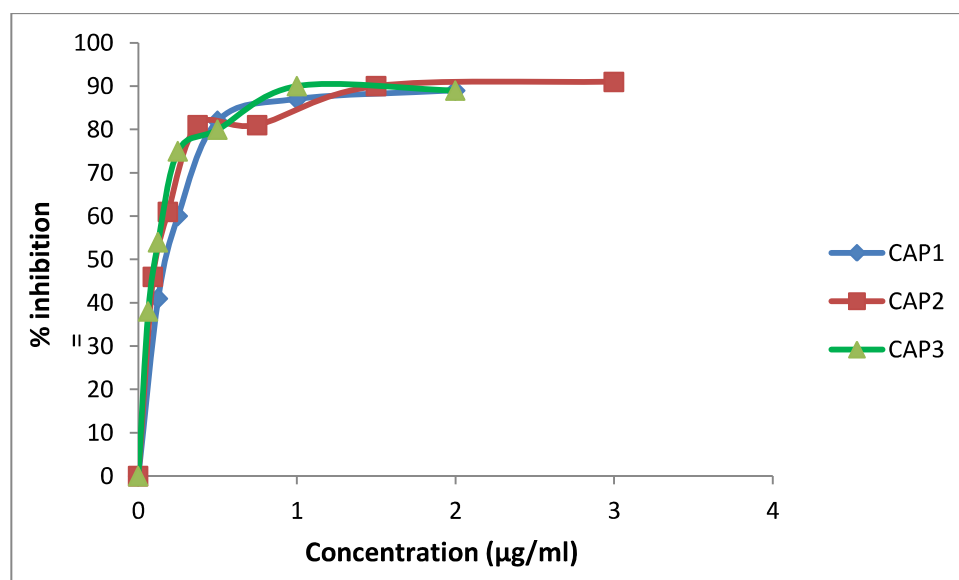


Figure.IV.98. Courbe représentant de l'activité anti radicalaire DPPH des extraits de *C. azel*

Les trois extraits CAP1, CAP2 et CAP3 ont prouvés un effet scavenger puissant vis-à-vis du radical DPPH. Les valeurs des IC_{50} sont inversement proportionnelles à l'activité antioxydante ; **tableau [IV.18.]**

D'après le **figure [IV.98.]** de l'espèce *C. azel*, on remarque un classement décroissant des valeurs de IC_{50} et par conséquent une activité antioxydante croissante : CAP1 ($IC_{50} = 179.88 \pm 0,42 \mu\text{g/ml}$) < CAP2 ($IC_{50} = 113.69 \pm 0,46 \mu\text{g/ml}$) < CAP3 ($IC_{50} = 106.25 \pm 0,82 \mu\text{g/ml}$) par rapport au témoin BHT ($IC_{50} = 73.1 \pm 1.70 \mu\text{g/ml}$) [8].

L'activité anti-radicalaire manifestée par l'extrait CAP1 est deux fois plus moins puissante que celle du BHT.

Extraits	IC ₅₀ (µg/ml)
CAP1	179.88 ± 0,42
CAP2	113.69 ± 0,46
CAP3	106.25 ± 0,82
BHT	73.1 ± 1.70

Tableau IV.18. Pouvoir d'inhibition IC₅₀ des extraits de *C. azel*

En se basant sur ces résultats obtenus, nous pouvons conclure que la variation de capacité anti-oxydante de ces extraits comparativement à celle du témoin BHT pourrait être principalement due à la présence de composés phénoliques, et de leur taux dans ces extraits. En comparaison avec l'antioxydant standard, l'extrait méthanol s'avèrent être mieux actifs comme piègeurs du radical DPPH par rapport à l'extrait acétate d'éthyle, par contre l'extrait chloroforme a montré une capacité la plus basse à piéger les radicaux libres DPPH.

- ***Calligonum comosum***

Les résultats de l'activité anti-radicalaire DPPH de différentes concentrations des trois extraits Chloroforme (CCP1), Acétate d'éthyle (CCP2) et l'extrait Méthanol (CCP3) consignés en pourcentages d'inhibition nous permettent de déterminer les valeurs de l'IC₅₀ des trois extraits pour comparer leurs activités par rapport au témoin BHT ; **figure [IV.99.]**.

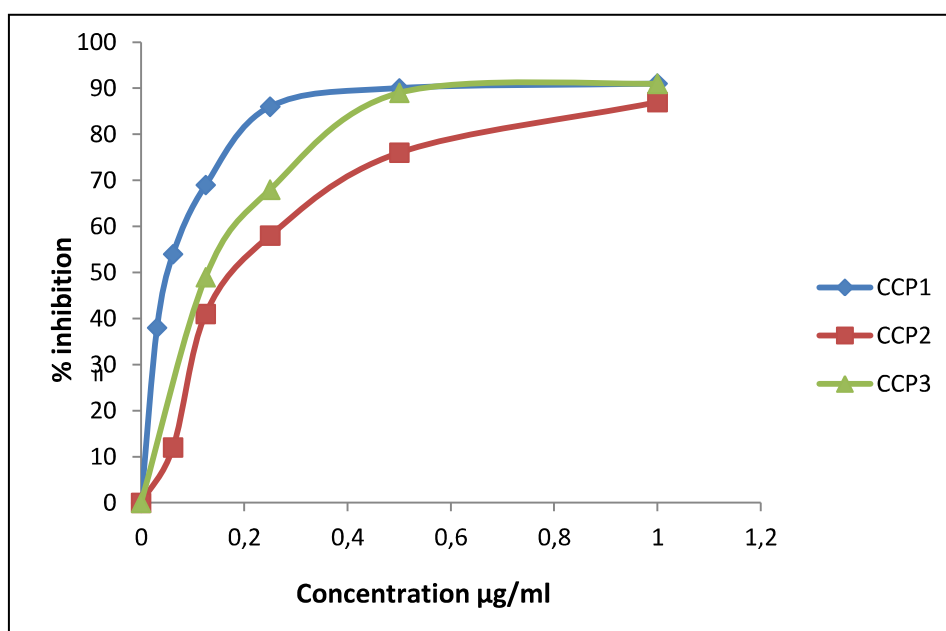


Figure IV.99. Courbe représentant l'activité anti-radicalaire DPPH des extraits de *C. comosum*

A partir de la précédente courbe nous avons calculé les IC_{50} pour faire une comparaison entre nos extraits et le témoin BHT ; **tableau [IV.19.]**.

Extraits	IC_{50} (µg/ml)
CCP1	$52.77 \pm 0,40$
CCP2	184.78 ± 1.56
CCP3	$127.96 \pm 0,18$
BHT	73.10 ± 1.70

Tableau IV.19. Pouvoir d'inhibition IC_{50} des extraits de *C. comosum*

D'après les résultats de cette activité, nous avons remarqué que l'extrait CCP1 a montré le pourcentage d'inhibition le plus élevé, suivi par l'extrait CCP3 et enfin l'extrait CCP2 avec le pourcentage d'inhibition le plus bas. Donc nous pouvons classer nos extraits selon leurs activités : CCP1 ($IC_{50} = 52.77 \pm 0,40$ µg/ml) > CCP3 ($IC_{50} = 127.96 \pm 0,18$ µg/ml) > CCP2 ($IC_{50} = 184.78 \pm 1.56$ µg/ml).

L'activité anti-radicalaire manifestée par CCP1 avec une valeur de $IC_{50} = 52.77 \pm 0.40 \mu\text{g/ml}$ est inférieure à celle du BHT. Tous ces résultats montrent que l'extrait Chloroforme est un antioxydant très actifs, plus fort que les extraits Acétate d'éthyle et Méthanol.

Nous pouvons classer nos extraits selon leurs activités :

$$\text{BHT} > \text{CCP1} > \text{CCP3} > \text{CCP2}$$

L'histogramme ci-dessous ; **figure [IV.100.]** ; résume les résultats du test DPPH réalisé pour les extraits *C. azel* et *C. comosum*.

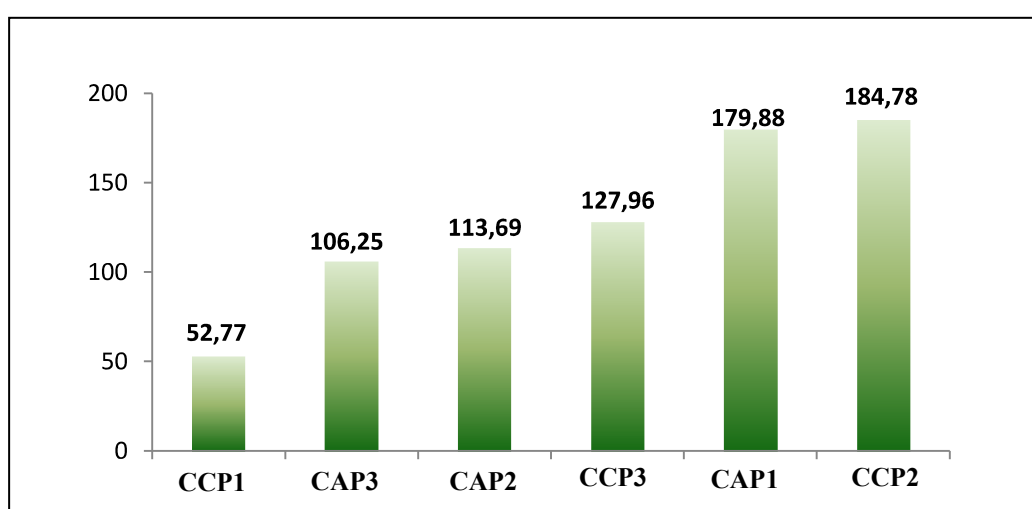


Figure IV.100. Pourcentage de l'activité Anti-oxydante (scavenger) DPPH des différents extraits de *C. azel* et *C. comosum*.

Le profil d'activité anti-radicalaire obtenu des deux espèces révèle que l'extrait CCP1 de *C. comosum* est le plus actif.

IV.4.1.2. Test ABTS

- *Calligonum azel*

La **figure [IV.101.]** montre les droites de régression des pourcentages d'inhibition tracées en fonction de la concentration des extraits étudiés.

On observe que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration des extraits.

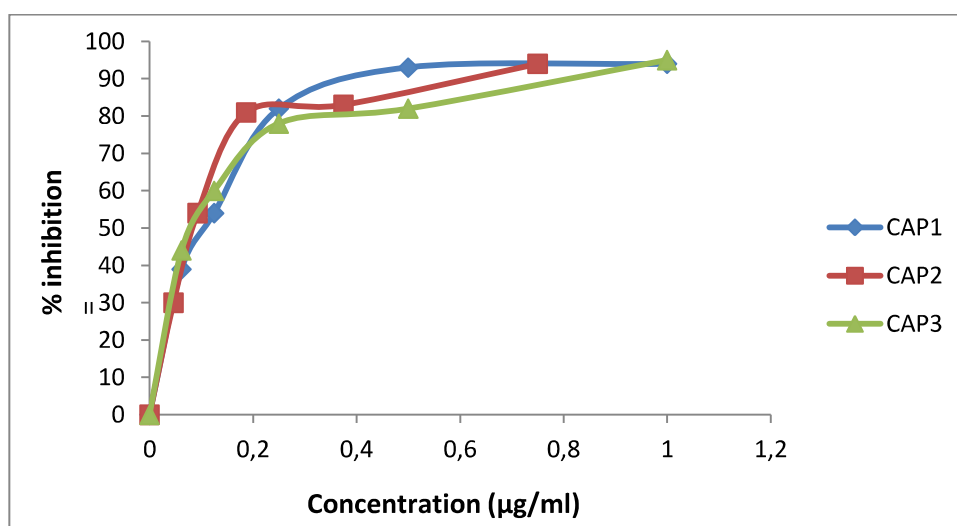


Figure IV.101. Courbe représentant l'activité anti-radicalaire ABTS⁺ des extraits de *C. azel*

Tous les extraits se sont avérés avoir une activité antioxydante par l'essai d'ABTS⁺ avec des pourcentages d'inhibition assez proches.

L'extrait CAP3 est le plus actif, avec une $IC_{50} = 82.22 \pm 0.14 \mu\text{g/ml}$, suivi par l'extrait CAP2 avec une $IC_{50} = 82.37 \pm 0.53 \mu\text{g/ml}$, dont ils sont proche à IC_{50} du témoin Trolox $IC_{50} = 58.14 \pm 2.50 \mu\text{g/ml}$ [9], et enfin l'extrait CAP1 avec $IC_{50} = 104.96 \pm 0.58 \mu\text{g/ml}$; **tableau [IV.20.]**.

Extraits	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
CAP1	104.96 ± 0.58
CAP2	83.37 ± 0.53
CAP3	82.22 ± 0.14
Trolox	58.14 ± 2.50

Tableau IV.20. Pouvoir d'inhibition IC_{50} des extraits de *C. azel*

L'extrait CAP1 a la plus faible activité par rapport aux autres extraits et montre un IC_{50} deux fois plus grand que celui du témoin Trolox. Ces résultats sont logiques car les polyphénols et les flavonoïdes sont plus abondants dans les extraits polaires.

Les résultats obtenus permettent de classer nos extraits selon leurs ordres d'efficacité :

$$\text{Trolox} > \text{CAP3} > \text{CAP2} > \text{CAP1}$$

- ***Calligonum comosum***

Les pourcentages d'inhibitions des extraits testés à différentes concentration par la méthode de l'ABTS⁺ nous ont permis de dessiner la courbe présentée dans la **figure [IV.102.]**

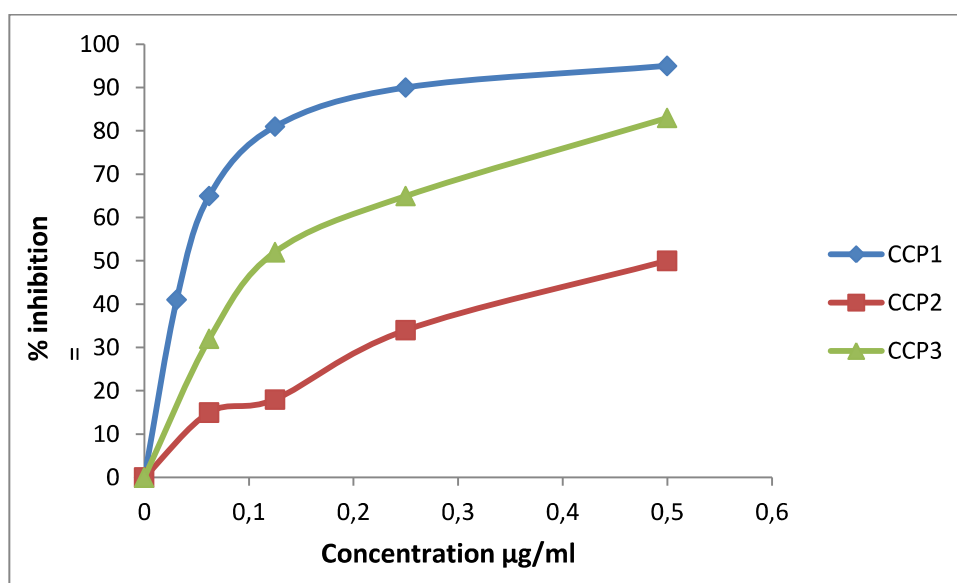


Figure IV.102. Courbe représentant l'activité anti radicalaire ABTS⁺ des extraits de *C. comosum*

A partir de la précédente courbe nous avons calculé les valeurs d'IC₅₀ pour faire une comparaison entre nos extraits et les standards qui sont résumés dans le **tableau [IV.21.]**.

Extraits	IC ₅₀ (µg/ml)
CCP1	41.47 ± 0.45
CCP2	491.58 ± 0.16
CCP3	117.10 ± 0.66
Trolox	58.14 ± 2.50

Tableau IV.21. Pouvoir d'inhibition IC₅₀ des extraits de *C. comosum*

L'extrait CCP1 montre une meilleure activité antioxydante par rapport aux autres extraits ainsi que le standard, avec un IC₅₀ de 41.47 ± 0.45 µg/ml, inférieure à celles du standard Trolox IC₅₀ = 58.14 ± 2.50 µg/ml, alors que l'extrait CCP2 possède l'activité antioxydante la plus faible dans ce test.

Les résultats obtenus permettent de classer nos extraits selon leurs ordres d'efficacité :

$$\text{CCP1} > \text{Trolox} > \text{CCP3} > \text{CCP2}$$

L'histogramme ci-dessous ; **figure [IV.103.]** ; résume les résultats des tests ABTS⁺ réalisés pour les extraits *C. azel* et *C. comosum*.

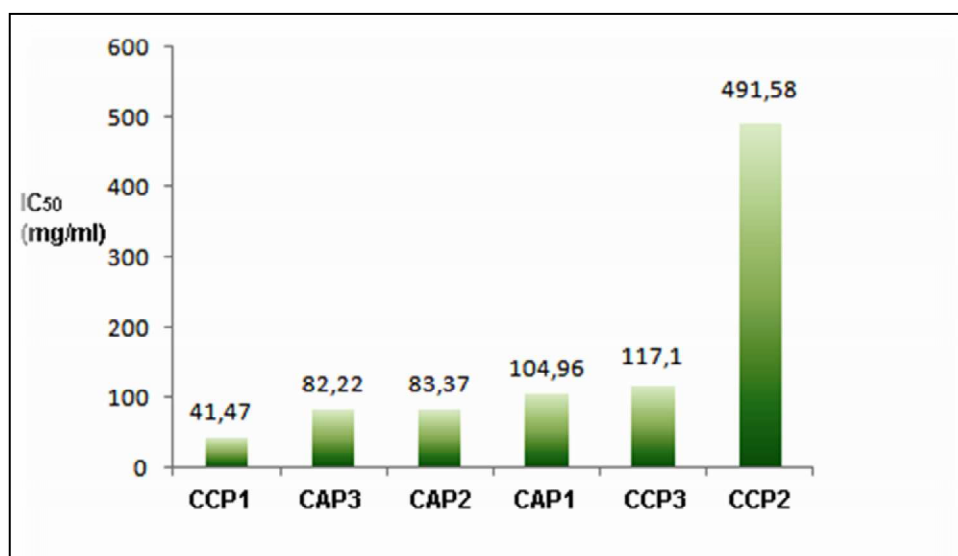


Figure IV.103. Pourcentage de l'activité Antioxydante ABTS⁺ des différents extraits de *C. azel* et *C. comosum*

IV.4.1.3. Test FRAP

- *Calligonum azel*

Dans la présente étude, les résultats de l'activité réductrice de l'ion ferrique des extraits Chloroforme (CAP1), Acétate d'éthyle (CAP2) et Méthanol (CAP3) sont présentés dans la figure [IV.104.].

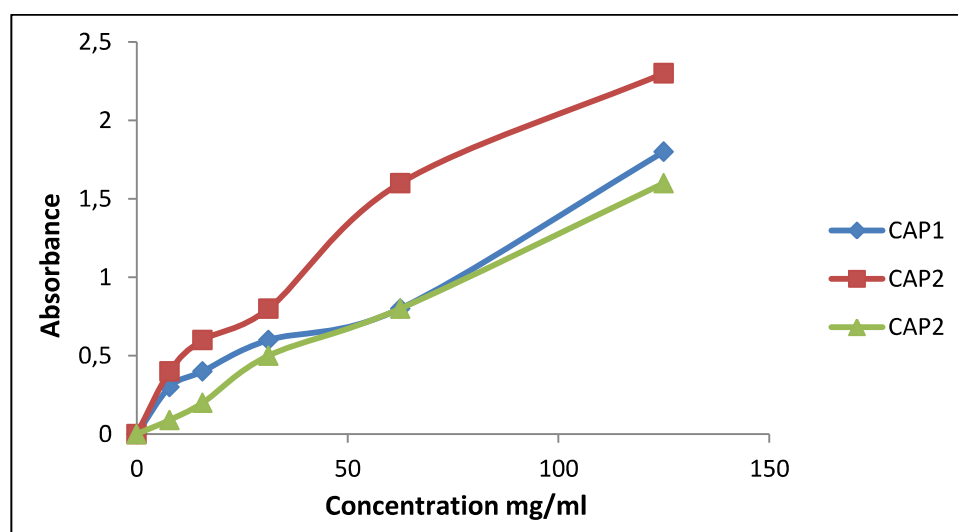


Figure IV.104. Courbe représentant l'activité anti radicalaire FRAP des extraits de *C. azel*

L'absorbance des trois extraits est clairement augmenté, en raison de la formation du complexe $[\text{Fe}^{2+}\text{-TPTZ}]$ avec une concentration croissante. Les extraits ont montré une augmentation de pouvoir réducteur ferrique avec la concentration accrue.

Le tableau ci-dessous **tableau [IV.22.]** ; résume les valeurs du pouvoir antioxydant IC_{50} de chaque extrait testé ainsi que le standard BHA, calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés.

Extraits	IC_{50} (mg/ml)
CAP1	22.30 ± 0.45
CAP2	491.58 ± 0.16
CAP3	117.10 ± 0.66
BHA	0.048 ± 0.50

Tableau IV.22. Pouvoir d'inhibition IC_{50} des extraits de *C. azel*

Tous les extraits ont montré des valeurs de IC_{50} très grand a celui du standard $\text{IC}_{50} = 0.048 \pm 0.50$ (mg/ml), ce qui permet de nous conclure qu'aucun des extraits a montré une activité en comparaison avec le standard BHA.

Le classement des extraits par ordres d'efficacité est comme suit:

$$\text{BHA} > \text{CAP1} > \text{CAP3} > \text{CAP2}$$

- *Calligonum comosum*

Les résultats obtenus du test de mesure de l'activité réductrice de l'ion ferrique des extraits Chloroforme (CCP1), Acétate d'éthyle (CCP2) et Méthanol (CCP3) nous permettent de tracer le graphe de variation de l'absorbance en fonction de la concentration pour chaque échantillon testé ; **figure [IV.105.]**.

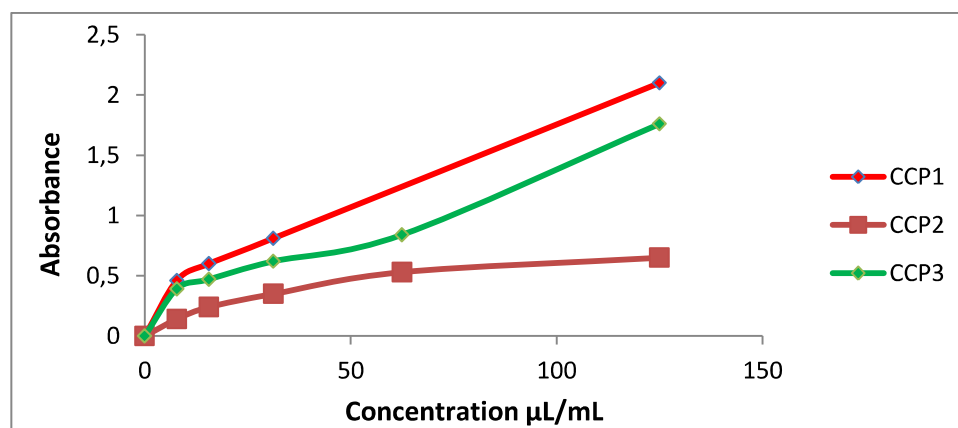


Figure IV.105. Courbe représentant l'activité anti-radicalaire FRAP des extraits de *C. comosum*

La valeur de l'IC₅₀ des trois extraits ainsi que le témoin BHA, sont également regroupé sur le **tableau [IV.23.]**

Extraits	IC ₅₀ (mg/ml)
CCP1	9.31 ± 0.38
CCP2	1338.81 ± 24.88
CCP3	17.69 ± 0.98
BHA	0.048 ± 0.50

Tableau IV.23. Pouvoir d'inhibition IC₅₀ des extraits de *C. comosum*

Les résultats obtenus ont été comparé par rapport au standard BHA avec IC₅₀ = 0.048 ± 0.50 mg/ml [9].

Tous les extraits de *C. comosum* ont montré un pouvoir réducteur de l'ion ferrique avec un IC₅₀ de 9.31 ± 0.38 mg/ml, 1338.81 ± 24.88 et 17.69 ± 0.98 de CCP1, CCP2, CCP3 respectivement, ce qui est relativement très faible par rapport au standard BHA ; **tableau [IV.23.]**.

L'histogramme ci-dessous ; **figure [IV.106.]** ; résume les résultats du test FRAP réalise pour les extraits *C. azel* et *C. comosum*.

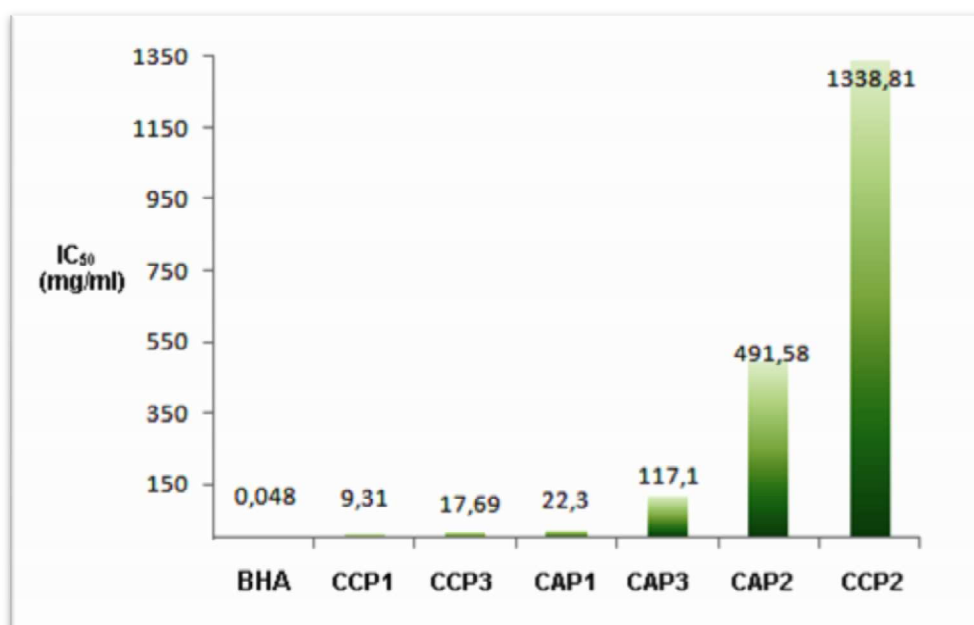


Figure IV.106. Pourcentage de l'activité Antioxydante FRAP des différents extraits de *C. azel* et *C. comosum*

IV.4.2. Activité antibactérienne

- *Calligonum azel*

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a été réalisée sur les trois extraits Chloroforme (CAP1), Acétate d'éthyle (CAP2) et Méthanol (CAP2) de *C. azel* et sur l'antibiotique contrôle ampicilline (10 mg/ml), contre les souches bactériennes citées ci-dessous.

Tous les résultats obtenus des zones d'inhibitions (ZI) des trois extraits de *C. azel* ainsi que les valeurs de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) sont regroupés dans le **tableau [IV.24.]**

Micro-organismes		Extraits organiques de <i>C. azel</i>												Standard		
		CAP1				CAP2				CAP3				Ampicilline (10µg/ml)		
		ZI ± DS	CMI	CMB	CMB / CMI	ZI ± DS	CMI	CMB	CMB / CMI	ZI ± DS	CMI	CMB	CMB / CMI	ZI ± DS	CMI	CMB
SP ₃	<i>Staphylococcus epidermidis</i> CIP 106510	16.3±0.58	2.34	9.37	4	14.7±0.58	1.17	4.68	4	6±0	9.37	37.5	4	21.33±0.57	0.07	0.62
SP ₁	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	17±1	2.34	9.37	4	17.7±0.58	2.43	9.37	3.85	16.3±0.58	1.17	4.68	4	26.66±0.57	0.07	0.62
SP ₁₃	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802	16.3±0.58	2.34	9.37	4	13.7±1.53	1.17	4.68	4	6±0	9.37	37.5	4	13.33±0.57	0.01	3
SP ₆	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	20±0	1.17	4.68	4	16±1	2.34	18.7	7.99	16.3±0.58	1.17	4.68	4	12.33±0.57	0.02	0.09
SP ₁₁	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	16.3±1.53	2.34	9.37	4	14.3±0.58	2.34	9.37	4	6±0	9.37	37.5	4	26±1	0.07	0.62
SP ₅	<i>E. coli</i> ATCC 35218	11.7±0.58	2.34	9.37	4	16.3±0.58	2.34	9.37	4	6±0	9.37	37.5	4	12.33±0.57	0.02	0.09
SP ₉	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 1408	16.7±0.58	2.34	9.37	4	6±0	1.17	4.68	4	14.3±0.58	2.34	9.37	4	18±1	0.02	0.09
PAO ₁	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	16.3±1.15	2.34	9.37	4	6±0	9.37	37.5	4	6±0	9.37	37.5	4	22.67±0.57	0.01	12

Tableau IV.24. Résultats de l'activité antibactérienne des trois extraits de *C. azel*

ZI : Zone d'Inhibition (en mm)

CAP1 : Extrait Chloroforme du *C. azel*

CAP2 : Extrait Acétate d'éthyle du *C. azel*

CAP3 : Extrait Méthanol du *C. azel*

CMI et CMB: en µg/ml

DS : Ecart type

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

D'après (Ponce *et al.* 2003) [10] et (Moreira *et al.* 2005) [11], les résultats de l'activité antibactérienne de nos extraits sont en majorité très actifs (DZI = 15 - 19 mm) ou actifs (DZI = 9 - 14 mm).

L'extrait chloroforme a montré une meilleure activité antibactérienne contre SP3, SP1, SP13, SP6, SP11, SP9 et PAO1 dont les diamètres d'inhibition sont supérieures à 15 mm, avec une considérable croissance contre SP5 avec un diamètre d'inhibition de 11.7 mm.

L'extrait acétate d'éthyle montre une bonne activité antibactérienne contre SP1, SP6 et SP5 avec un diamètre d'inhibition de 17.7, 16 et 16.3 mm respectivement, et très faible activité contre SP9 et PAO1 avec un diamètre d'inhibition inférieure à 9 dont ZI = 6 mm.

L'extrait de méthanol a une meilleure activité antibactérienne contre SP1 et SP6 avec 16.3 mm de diamètre d'inhibition, avec une bonne activité contre SP9 avec 14.3 de diamètre d'inhibition, mais une faible activité antibactérienne contre SP3, SP13, SP11, SP5 et PAO1 avec un diamètre d'inhibition de 6 mm.

L'extrait CAP2 a montré l'effet antibactérien le plus prononcé sur *Staphylococcus aureus* (SP3) à une CMI de 3.

Concernant les CMB (Concentrations Minimales Bactéricides) enregistrées des trois extraits, les valeurs étaient égales ou proches de celles de la CMI, indiquant une bonne activité bactéricide des extraits testés.

Le rapport CMB / CMI a également été calculé pour mettre en évidence la nature de l'effet antibactérien des extraits testés. Lorsque le rapport est inférieur à 4, l'extrait est considéré comme bactéricide et lorsqu'il est supérieur à 4, il est considéré comme bactériostatique [12].

Tous les extraits ont montrés des valeurs égales à 4, sauf l'extrait CAP2 a montré une valeur de CMB / CMI supérieure à 4 ce qui signifie qu'il s'agit d'un bactériostatique contre *Listeria monocytogenes* (SP6).

Par ailleurs, notre étude a mis en évidence une activité antibactérienne prononcée pour l'extrait chloroforme (CAP1) contre *Staphylococcus epidermidis* CIP 106510, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Salmonella typhimurium* ATCC 1408 et *Pseudomonas aeruginosa* Pao1, et une très bonne activité de l'extrait acétate

d'éthyle (CAP2) contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *E. coli* ATCC 35218, alors que les deux bactéries *Salmonella typhimurium* ATCC 1408 et *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 ont mis une sensibilité vis-à-vis de l'extrait Méthanol (CCP3)

- *Calligonum comosum*

Le **tableau [IV.25.]** montre l'activité antibactérienne (zones d'inhibition, CMI et MBC) des trois extraits Chloroforme (CCP1), Acétate d'éthyle (CCP2) et Méthanol (CCP3) de *C. comosum* contre huit bactéries citées ci-dessus

Micro-organisme		Extraits organiques de <i>C. comosum</i>												Standard		
		CCP1				CCP2				CCP3				Ampicilline (10mg/ml)		
		ZI ± DS	CMI	CMB	CMB / CMI	ZI ± DS	CMI	MBC	CMB / CMI	ZI ± DS	CMI	CMB	CMB / CMI	ZI ± DS	CMI	CMB
SP ₃	<i>Staphylococcus epidermidis</i> CIP 106510	13.7±0.58	2.34	9.37	4	6±0	9.37	37.5	4	6±0	9.37	37.5	4	21.33±0.57	0.07	0.62
SP ₁	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	21.7±0.58	1.17	4.68	4	15.7±0.58	1.17	4.68	4	6±0	9.37	37.5	4	26.66±0.57	0.07	0.62
SP ₁₃	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802	20.7±0.58	1.17	4.68	4	6±0	9.37	37.5	4	7.33±1.15	9.37	37.5	4	13.33±0.57	0.01	3
SP ₆	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	19.7±0.58	1.17	4.68	4	15.7±1.15	1.17	4.68	4	7±1	9.37	37.5	4	12.33±0.57	0.02	0.09
SP ₁₁	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	19.3±1.15	2.34	9.37	4	6±0	9.37	37.5	4	8±0	9.37	37.5	4	26±1	0.07	0.62
SP ₅	<i>E. coli</i> ATCC 35218	19.3±1.53	2.34	9.37	4	7.67±0.58	9.37	37.5		8±0	9.37	37.5	4	12.33±0.57	0.02	0.09
SP ₉	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 1408	24.3±0.58	1.17	4.68	4	16.3±0.58	1.17	4.68	4	15.7±0.58	2.34	9.37	4	18±1	0.02	0.09
PAO ₁	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	17±1	2.34	9.37	4	6±0	9.37	37.5	4	9.67±0.58	9.37	37.5	4	22.67±0.57	0.01	12

Tableau IV.25. Résultats de l'activité antibactérienne des trois extraits de *C. comosum*

ZI : Zone d'Inhibition (en mm)

DS : Ecart type

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice.

CMB : Concentration Minimale Bactéricide.

CMI et CMB: en µg/ml

CCP1 : Extrait Chloroforme du *C. comosum*

CCP2 : Extrait Acétate d'éthyle du *C. comosum*

CCP3 : Extrait Méthanol du *C. comosum*

L'extrait CCP1 a inhibé parfaitement la croissance de la plupart des souches bactériennes dont SP1, SP13, SP6, SP11, SP5, SP9 et PAO1 avec des diamètres de zone d'inhibition de 17 à 24 millimètres, et une considérable croissance contre SP3 avec un diamètre d'inhibition de 13.7 mm.

L'extrait CCP2 a montré une meilleure activité antibactérienne contre SP1, SP3 et SP9 dont les diamètres d'inhibition sont de 15.7, 15.7 et 16.3 mm respectivement.

L'extrait CCP3 a montré une bonne activité antibactérienne contre SP9 avec un diamètre d'inhibition de 15.7 mm, et une très faible activité contre les autres bactéries.

Tous les extraits ont montrés une activité bactéricide contre toutes les bactéries du test avec un MBC / MIC inférieurs à 4.

Les résultats de notre présente étude ont mis en évidence une forte activité antimicrobienne de l'extrait Chloroforme (CCP1) contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *E. coli* ATCC 35218 et *Salmonella typhimurium* ATCC 1408, suivi de l'extrait acétate d'éthyle (CCP2) avec une considerable activité contre quelques bactéries comme *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 et *Salmonella typhimurium* ATCC 1408, et enfin la bacterie *Salmonella typhimurium* ATCC 1408 a mis une sensibilité vis-à-vis de l'extrait Méthanol (CCP3)

IV.4.3. Activité antifongique

L'évaluation de l'activité antifongique des trois extraits Chloroforme (CAP1, CCP1), Acétate d'éthyle (CAP2, CCP2) et Méthanol (CAP3, CCP3) des deux espèces *C. azel* et *C. comosum* respectivement, contre les souches bactériennes *Candida krusei* ATCC 6258 , *Candida albicans* ATCC 2019 , *Candida parapsilosis* ATCC 22019 et *Candida tropicalis* 06-085, a montré que l'extrait CCP1 de l'espèces *C. comosum* développe une forte activité en particulier contre les deux levures *Candida albicans* ATCC 2019 et , *Candida parapsilosis* ATCC 22019, mais aucune activité n'a été observée contre les souches C1 et C4, alors que les deux autres extraits des deux espèces *C. azel* et *C. comosum* ne sont pas actives pour l'activité antifongique.

Le **tableau [IV.26.]** ci-dessous résume les résultats précédents :

Les levures		Extraits						Standard
		CAP1	CAP2	CAP3	CCP1	CCP2	CCP3	Amphotericin B (10 mg/ml)
		ZI ± DS	ZI ± DS	ZI ± DS	ZI ± DS	ZI ± DS	ZI ± DS	ZI ± DS
C ₁	<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	12±0
C ₂	<i>Candida albicans</i> ATCC 2019	6±0	6±0	6±0	18.7±0.58	6±0	8±0	12.66±0.57
C ₃	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	6±0	6±0	6±0	18.7±1.15	6±0	6±0	10.33±0.57
C ₄	<i>Candida tropicalis</i> 06-085	6±0	6±0	6±0	15±1	6±0	6±0	12±0

Tableau IV.26. Résultats de l'activité antifongique des trois extraits des espèces *C. azel* et *C. comosum*

ZI : Zone d'Inhibition (en mm)

DS : Ecart type

CCP1 : Extrait Chloroforme du *C. comosum*

CCP2 : Extrait Acétate d'éthyle du *C. comosum*

CCP3 : Extrait Méthanol du *C. comosum*

CAP1 : Extrait Chloroforme du *C. azel*

CAP2 : Extrait Acétate d'éthyle du *C. azel*

CAP3 : Extrait Méthanol du *C. azel*

IV.4.4. Activité anti-inflammatoire

Les cellules ont été traitées avec les composés testés (100-12,5 μM) pendant 24, 48 et 72 heures. Nos données ont indiqué que pour tous les composés testés l'IC₅₀ était supérieure à 100 μM . Les composés purs acide ethyl ester protocatachuique (**CCP/11/12**), acide- α,β -diamino (-4-hydroxy benzene) butanoïque (**CAP/5/3**), tamgernanetine (**CCP/12/8**), acide 5-(p-hydroxy-phényl) -3-hydroxy-pentanoïque (**CAP/5/6**) et l'acide 5-(p-hydroxy-phenyl)-pent-2-en (**CAP/5/14**); (100-12,5 μM), ont été ajoutés à J774A.1 macrophages 1h avant et simultanément au LipoPolySaccharide (LPS) pendant 24h, cela montre qu'il inhibe la libération de NO dans le milieu cellulaire ; **figure [IV.107.]**. En particulier, l'acide ethyl ester protocatachuique (**CCP/11/12**) et l'acide α, β -diamino-4-hydroxybenzène butanoïque (**CAP/5/3**) inhibaient significativement la libération de NO dans une gamme de concentrations de 100-25 μM ($P < 0,05$ vs LPS, Figure 2 A, B), la tamgernanetine (**CCP/12/8**) a inhibé le NO aux deux concentrations les plus élevées testées ($P < 0,05$ vs LPS) alors que tout effet significatif a été observé pour les concentrations de acide 5-(p-hydroxy-phenyl)-pent-2-en (**CAP/5/14**) et 5 (p-hydroxy- phényl) -3-hydroxy-pentanoïque (**CAP/5/6**) ; **figure [IV.107.]**. Les mêmes composés testés (100-12,5 μM) ont été ajoutés à H₂O₂ Macrophages J774A.1 traités. Dans ces conditions, tous les composés testés inhibaient significativement la libération des espèces réactives de l'oxygène (ROS) à toutes les concentrations testées (100-12,5 μM , $P < 0,01$ vs H₂O₂) ; **figure [IV.108.]**.

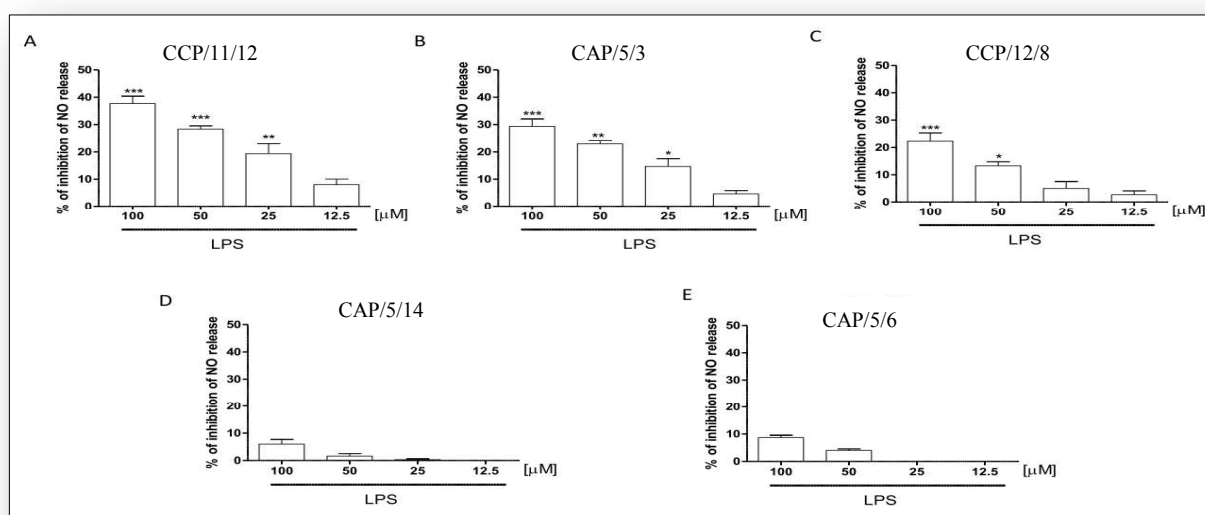


Figure IV.107. Effet des composés **CCP/11/12**, **CAP/5/3**, **CCP/12/8**, **CAP/5/6** et **CAP/5/14** (100-12,5 μM) sur NO.

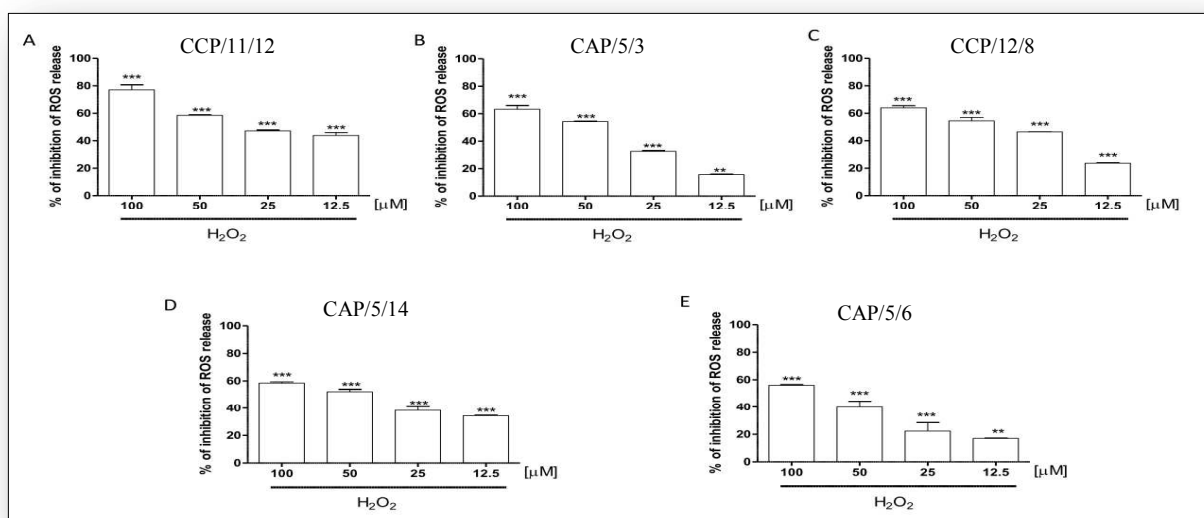


Figure IV.108. Effet des composés **CCP/11/12**, **CAP/5/3**, **CCP/12/8**, **CAP/5/6** et **CAP/5/14** (100-12,5 μM) sur la production de ROS.

IV.4.5. Activité antioxydante de quelques produits isolés

La capacité de acide 5-(*p*-hydroxy-phenyl)-pent-2-en (**CAP/5/14**) et acide éthyle ester protocatichique (**CCP/11/12**) à réduire le taux de peroxydes dans les cellules Jurkat témoins et traitées au BHP a été mesurée par cytofluorimétrie (test DCFH-DA). Chaque produit chimique a été testé à des concentrations de 25 μM et 50 μM. Comme le montre la **figure [IV.109.]**

Tous les composés présentaient un potentiel antioxydant significatif. L'acide éthyle ester protocatichique a une activité antioxydante significative, dont il était capable de réduire le taux de peroxydes basaux des cellules Jurkat et de contracter le taux de peroxydes induit par le traitement au t-BHT.

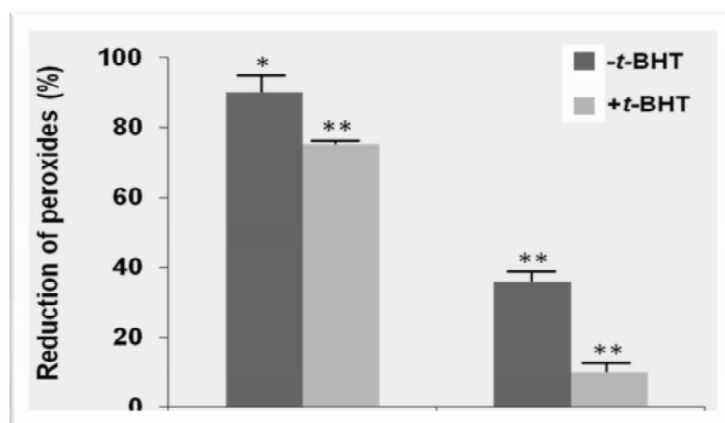
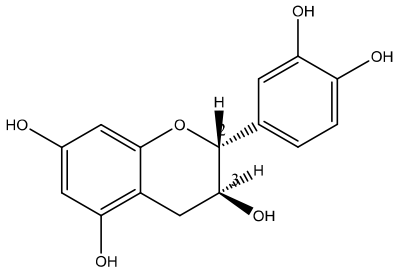
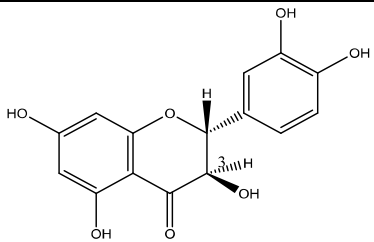
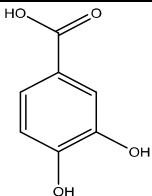
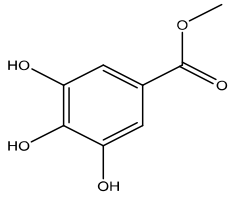
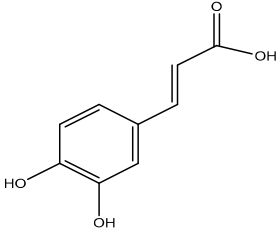
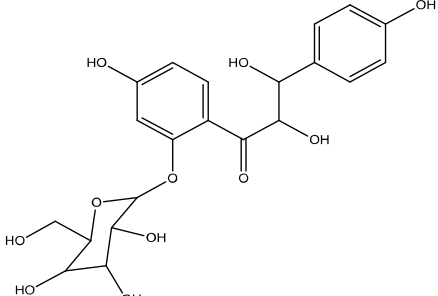
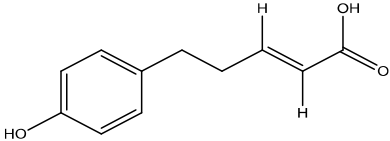


Figure IV.109. Le potentiel antioxydant in-cells des composés CAP/5/14 et CCP/11/12

IV.5. Conclusion

- *Calligonum azel*

L'étude phytochimique de l'espèce *Calligonum azel* a permis d'isoler neuf (09) composés phénoliques identifiés pour la première fois dans cette espèce dont trois sont nouveaux pour le genre : Méthyle gallate [13], Acide protocatéchique [14], Acide caféique [14], et que les trois autres sont décrit pour la première fois dans la famille des polygonacées : 4, 2',4',6'-tetrahydroxy-dihydrochalcone-2'- β -D-glucopyranoside [15], Acide 5-(*p*-hydroxy-phenyl)-3-hydroxy-pentanoïque [16], Acide- α , β -diamino (-4-hydroxy benzene) butanoïque [17], alors que l'Acide 5-(*p*-hydroxy-phenyl)-pent-2-en est décrit pour la première fois dans la littérature. Ces résultats tout à fait originaux soulignent tout l'intérêt de ce travail. Les composés isolés sont les suivants :

Composés	Structures des composés
<ul style="list-style-type: none"> • Composé : 150-21N • Formule brute : C₁₅ H₁₄ O₆ • Nom : Catéchine 	
<ul style="list-style-type: none"> • Composé : CAP-122 • Formule brute : C₁₅ H₁₂ O₇ • Nom : Taxifoline 	
<ul style="list-style-type: none"> • Composé : CAP/4/4 • Formule brute : C₇ H₆ O₄ • Nom : Acide protocatéchique 	
<ul style="list-style-type: none"> • Composé : CAP/4/6 • Formule brute : C₈ H₈ O₅ • Nom : Méthyle gallate 	
<ul style="list-style-type: none"> • Composé : CAP/4/7 • Formule brute : C₉ H₈ O₄ • Nom : Acide caféique 	
<ul style="list-style-type: none"> • Composé : CAP/4/20 • Formule brute : C₂₁ H₂₄ O₁₁ • Nom : 4, 2',4',6'-tetrahydroxy-dihydrochalcone-2'-β- D-glucopyranoside 	
<ul style="list-style-type: none"> • Composé : CAP/5/14 • Formule brute : C₁₁ H₁₂ O₃ • Nom : Acide 5-(p-hydroxyphenyl)-pent-2-en 	

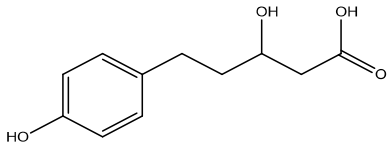
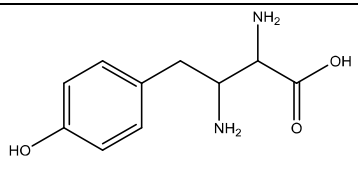
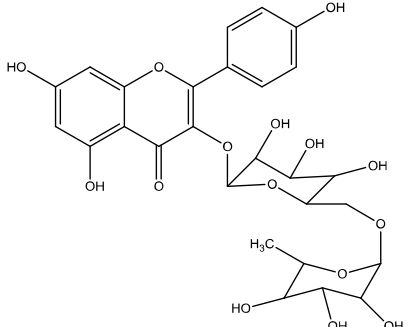
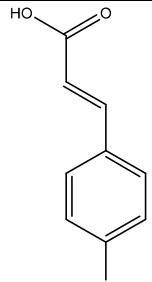
<ul style="list-style-type: none"> • Composé : CAP/5/6 • Formule brute : C₁₁ H₁₄ O₄ • Nom : Acide 5-(<i>p</i>-hydroxy-phenyl)-3-hydroxy-pentanoïque 	
<ul style="list-style-type: none"> • Composé : CAP/5/3 • Formule brute : C₁₁H₁₄O₃N₂ • Nom : Acide-α, β-diamino (-4-hydroxy benzene) butanoïque 	

Tableau IV.27. Les produits purs isolés de l'espèce *C. azel*

- ***Calligonum comosum***

L'étude phytochimique de l'espèce *Calligonum comosum* a permis d'isoler neuf (09) composés phénoliques dont deux sont en commun avec ceux de l'espèce *C. azel* (taxifolin et catechine). Cinq composés sont nouveaux dans l'espèce et genre : Nicotiflorine [18], acide *p*-coumarique [14], rutine [19], Epigallocatechine-3-O-gallate [20], acide ethyl ester protocatachuique [14], taxifolin et la catechine sont décrit pour la première fois dans l'espèce *comosum* [21], tamgermanetin est décrit pour la première dans la famille des polygonacées [22]. Les composés isolés sont les suivants :

Composés	Structures des composés
<ul style="list-style-type: none"> • Composé : CCP/9/12 • Formule brute : C₂₇ H₃₀ O₁₅ • Nom : Nicotiflorine 	
<ul style="list-style-type: none"> • Composé : CCP/10/11 • Formule brute : C₉ H₈ O₃ • Nom : acide <i>p</i>-coumarique 	

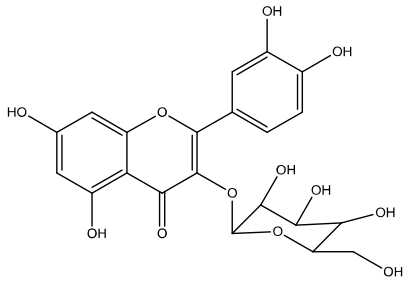
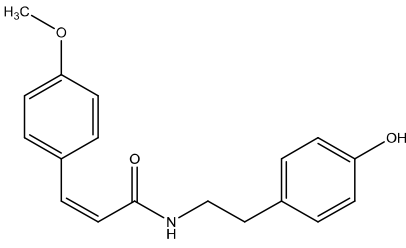
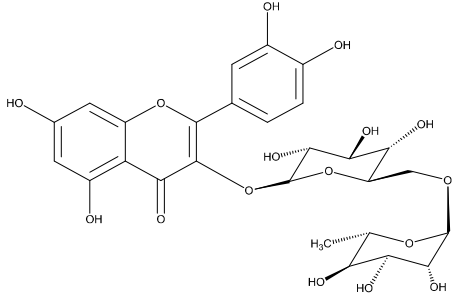
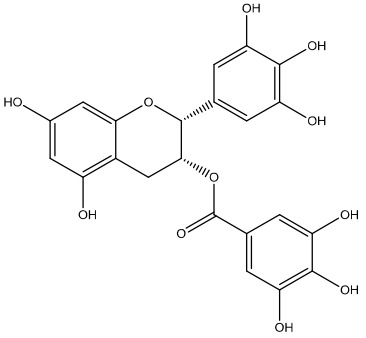
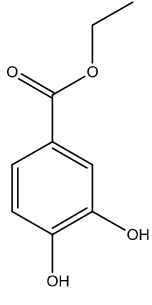
<ul style="list-style-type: none"> • Composé : CCP/6/3 • Formule brute : C₂₁ H₂₀ O₁₂ • Nom : Quéricétine-3-O-β-Glucopyranoside 	
<ul style="list-style-type: none"> • Composé : CCP/12/8 • Formule brute : C₁₈ H₁₉ N O₃ • Nom : tamgermanetin 	
<ul style="list-style-type: none"> • Composé : CCP/9/7 • Formule brute : C₂₇ H₃₀ O₁₆ • Nom : Rutine 	
<ul style="list-style-type: none"> • Composé : CCP/4/14 • Formule brute : C₂₂ H₁₈ O₁₁ • Nom : Epigallocatechine-3-O-gallate 	
<ul style="list-style-type: none"> • Composé : CCP/4/4 • Formule brute : C₉ H₁₀ O₄ • Nom : acide ethyl ester protocatéchique. 	

Tableau IV.28. Les produits purs isolés de l'espèce *C.comosum*

Référence

- [1] Davis, A., L., Cai, Y., Davies, A., P., (1996). Lewis J., R., ¹H and ¹³C NMR Assignments of Some Green Tea Polyphenols. *MagnResonChem*; 34: 887-90.
- [2] Bruneton, J., (2009). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. 4^{ème}. lavoisier ed; p 370.
- [3] Grayer, R., Veitch, N., Andersen, C., Markham, K., (2006). Flavanones and dihydroflavonols. *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*, 917-1002.
- [4] Martin, T., S., Kikuzaki, H., Hisamoto, M., Nakatani, N., (2000). Constituents of *Amomum tsaoko* and their radical scavenging and antioxidant activities. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 77: 667-673.
- [5] Ekaprasada, M., Nurdin, H., Ibrahim, S., Dachriyanus, D., (2009). Antioxidant activity of methyl gallate isolated from the leaves of *Toona sureni*. *Indonesian Journal of Chemistry*, 9: 457-460.
- [6] Świsłocka, R., Kowczyk-Sadowy, M., Kalinowska, M., Lewandowski, W., (2012). Spectroscopic (FT-IR, FT-Raman, ¹H and ¹³C NMR) and theoretical studies of *p*-coumaric acid and alkali metal *p*-coumarates. *Spectroscopy*, 27, 35–48.
- [7] Price, K., R., Colquhoun, I., J., Barnes, K., A., Rhodes, M., J., C., (1998). Composition and Content of Flavonol Glycosides in Green Beans and Their Fate during Processing. *J. Agric. Food Chem*, 46, 4898 – 4903
- [8] Chaouche, T., M., Haddouchi, F., Ksouri, R., Atik-Bekkara, F., (2014). Evaluation of antioxidant activity of hydromethanolic extracts of some medicinal species from South Algeria. *Journal of the Chinese Medical Association* 77 302 - 307
- [9] Snoussi, M., Noumi, E., Trabelsi, N., Flamini, G., Papetti, A., De Feo, V., (2015). *Mentha spicata* Essential Oil: Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities against Planktonic and Biofilm Cultures of *Vibrio* spp. Strains. *Molecules*, 20, 14402-14424
- [10] Ponce, A., G., Fritz, R., del Valle, C., E., Roura, S., I., (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 36: 679–684.
- [11] Moreira, M., R., Ponce, A., G., de Valle, C., E., Roura, S., I., (2005). Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie-LWT*, 38: 565–570.
- [12] Boulaaba, M., Snoussi, M., Saada, M., Mkadmini, K., Smaoui, A., Abdelly, C.,

- Ksouri, R., (2015). Antimicrobial activities and phytochemical analysis of *Tamarix gallica* extracts. *Industrial Crops and Products* 76, 1114–1122.
- [13] Zhang, W., J., Li, X., C., Liu, Y., Q., Yao, R., C., Nonaka, G., I., Yang, C., R., (1994). Phenolic constituents from *Fagopyrum dibotrys*. *Acta botanica yunnanica*, 4: 354-356.
- [14] Muhammad, W., Muhammad, S., A., Muhammad, U., (2015). Genus *Fagopyrum* phytochemical and ethnopharmacological review, *Indian Research Journal of Pharmacy and Science*, 4- 1-14; Journal home page: <https://www.irjps.in>
- [15] Nie, R., L., Takashi, T., Zhou, J., Tanaka O., (1982) Phlorizin and trilobatin, weet dihydrochalcone-glucosides from leaves of *Lithocarpus litseifolius* (Hance) Rehd. (Fagaceae). *Agricultural and Biological Chemistry*, 46, 1933-1934.
- [16] Ayer, W., A., Singer, P., P., (1980) Phenolic metabolites of the bird's nest fungus *Nidula niveo-tomentosa*. *Phytochemistry*, 19, 2717-2721
- [17] Kidwai M., M., Khan, N., H., Ali, M., (1979) A novel synthesis of 3-substituted pyruvic acids a new route to α,β -diamino acids. *Synthetic Communications*, 9, 363-376.
- [18] Jiang, S., Liu, Q., Xie, Y., Zeng, H., Zhang, L., Jiang, X., Chen, X., (2014). Separation of five flavonoids from tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn) grains via off line two dimensional high speed counter current chromatography. *Food Chemistry*.
- [19] Imai, K., Furuya, K., (1951). Phytochemical component of *Fagopyrum cymosum*. *Journal of the pharmaceutical society of japan*, 71: 263- 266.
- [20] Hyeji, S., Hayeon, C., Byoungduck, P., Ki Yong, L., (2016). Identification of Antioxidative Constituents from *Polygonum aviculare* using LC-MS Coupled with DPPH Assay. *Natural Product Sciences* 22(1): 64-69.
- [21] Sabry, L., Sattar, M., A., Amin, H., A., Sattar, E., A., (2013). Antiosteoporotic effect of some herbal extracts versus alendronate on an animal model of osteoporosis. *Life Sci J.* 10:177–187.
- [22] Nawwar, M., A., Swilam, N., F., Hashim, A., N., Al-Abd, A., M., Abdel-Naim, A., B., Lindequist, U., (2013) Cytotoxic isoferulic acilamide from *Myricaria germanica* (Tamaricaceae). *Plant Signaling & Behavior*, 8, 33-40.

CHAPITRE V

Composition chimique et activité biologique de l'huile essentielle de *T. ciliatus*

V.1. Introduction

De nombreux composés naturels isolés à partir de plantes ont démontré un large spectre d'activités biologiques. Parmi ces différents types de substances naturelles, les huiles essentielles des plantes aromatiques et médicinales, qui ont reçu une attention particulière comme agents naturels à grand potentiel pour la conservation des aliments. En outre, les huiles essentielles se sont avérées avoir divers effets pharmacologiques: comme antispasmodique, carminative, hépatoprotecteur, antiviraux, anticancéreux [1-2] et antioxydants [3].

Les huiles essentielles sont un mélange complexe de composés, principalement des mono terpènes, des sesquiterpènes et des composés oxygénés (alcools, aldéhydes, esters, éthers, cétones et phénols). D'autres composés volatiles spécifiques comprennent le phénylpropène, le soufre ou l'azote. Généralement, la composition de l'huile est un équilibre de divers composés, bien que de nombreuses espèces puissent comporter le même constituant [4]. Elles ont trouvées leur place en aromathérapie, en pharmacie, en parfumerie, en cosmétique et dans la conservation des aliments.

Ce sont des liquides huileux aromatiques, volatils, caractérisés par une forte odeur, souvent colorés, et généralement avec une densité inférieure à celle de l'eau. Ils peuvent être synthétisés par tout organe végétal (fleurs, bourgeons, graines, feuilles, brindilles, écorces, herbes, bois, fruits et racines) et stockés dans des cellules sécrétoires, des cavités, des canaux, des cellules épidermiques ou des trichomes [5-6].

La région méditerranéenne d'une manière générale et l'Algérie en particulier, avec son climat doux et ensoleillé est particulièrement favorable à la culture des plantes aromatiques et médicinales. La production des huiles essentielles à partir de ces plantes pourrait constituer à ce titre une source économique importante pour notre pays.

V.2. Origine des huiles essentielles

Toutes les parties des plantes aromatiques, tous leurs organes végétaux, peuvent contenir de l'huile essentielle.

- Les fleurs: oranger, rose, lavande ; le bouton floral (girofle) ou les bractées (ylang-ylang) ;
- Les feuilles: eucalyptus, menthe, thym, laurier, sarriette, sauge, aiguilles de pin et sapin ;
- Les organes souterrains: racines (vétiver, angélique), rhizomes (gingembre, acore) ;
- Les fruits: fenouil, anis, épicarpes des Citrus ;
- Les graines : noix de muscade;
- Le bois et les écorces: cannelle, santal, bois de rose.

Les huiles essentielles sont stockées dans des structures cellulaires spécialisées (cellules à huile essentielle, cellules à poils sécréteurs (comme dans la menthe), canaux sécréteurs) et ont vraisemblablement un rôle défensif : protection du bois contre les insectes et les champignons, action répulsive contre les animaux herbivores [7].

V.3. Composition chimique

Sur le plan chimique, les huiles essentielles sont des mélanges de structure extrêmement complexes, pouvant contenir plus de 300 composés différents. Ces substances sont des molécules très volatiles appartenant pour la grande majorité à la famille des terpènes comme les monoterpènes (myrcène, β -pinène, γ -terpinène) et les sesquiterpènes (β -caryophyllène, α -humulène, β -bisabolène) [8].

V.4. Méthodes d'extraction des huiles essentielles

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles. A la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter. D'autres méthodes peuvent être employées (expression, fermentation, enfleurage ou extraction) et leur choix peut influencer sur la composition chimique, les propriétés organoleptiques et donc l'activité biologique [9].

V.5. Aspect botanique de la famille des Lamiacées

V.5.1. Description de la famille des Lamiacées

La famille des Lamiacées ou labiées aussi nommée labiacées [10], est l'une des plus répandues dans le règne végétal [11]. Cette famille de plante angiospermes dicotylédones comprend environ 258 genres et 6970 espèces [12]. Elle est l'une des familles les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extraits à fort pouvoir antibactérien, antifongique, anti-inflammatoire et antioxydant [13-14-15].

Il est bien connu que les huiles essentielles extraites des plantes de cette famille possèdent des propriétés pharmacologiques tant sur le plan humain qu'industriel. De nombreuses propriétés leurs sont conférées : anti-infectieuses, antispasmodiques, antalgiques, toniques, digestives, cicatrisantes.

Les huiles essentielles par la diversité des constituants qui les composent, sont des substances très actives [6-15]. La région méditerranéenne a été le centre principal pour domestication et culture de Labiatae [16]. Les genres les plus cités dans la littérature sont : *Salvia officinalis* [17], *Mentha spicata* [18], *Origanum vulgare* [19], *Rosmarinus officinalis* [20-21], *Ocimum basilicum* [22] ainsi que de nombreuses espèces du genre *Thymus* qui ont été abondamment étudiées de ce point de vue [23-24-25-26]. Un très grand nombre de genre de la famille des Lamiacées sont des sources riches en terpénoïdes, flavonoïdes, iridiodes glycosylés et composés phénoliques [16]. Le genre *Thymus* représentant l'objectif de notre recherche, il regroupe plus de 400 espèces répartie dans la Méditerranée et en Iran ; 26 espèces poussant en Algérie [27]. Il regroupe un grand nombre d'espèces, sous-espèces et variétés de plantes sauvage. Leurs huiles essentielles sont largement utilisées dans la médecine alternative grâce à leurs propriétés antiseptiques, antispasmodiques et antimicrobienne [28], anti-inflammatoires et antioxydants [14-26].

V.5.2. Description botanique de la famille

La détermination botanique de cette famille est souvent délicate en raison de la variabilité extrême de ses espèces qui peuvent être soit herbacées soit des sous-arbrisseaux à poils glanduleux aromatiques. Certaines espèces sont dressées, d'autres couchées, elles portent des feuilles opposées ou verticillées. Leur tige est carrée, les fleurs sont bisexuées, irrégulières, groupées à l'aisselle des feuilles en inflorescences plus ou moins allongées ou en

inflorescences terminales plus ou moins denses, à calice tubuleux ou en cloche persistant, à corolle à tube très développé, ordinairement caduque et à 2 lèvres (rarement 1). Le fruit sec se séparant en quatre articles contenant chacun une graine [27].

V.6. Aspect botanique du genre *Thym*

V.6.1. Description du genre

Le terme «Thym» est apparu dans la langue française au XIIe siècle, d'abord sous la forme de «tym» selon certaines sources. Il est dérivé du latin thymus qui l'a emprunté du grec thumos signifiant, de façon quelque peu obscure, «grosneur ou loupe» (par référence à la glande, le thymus), communément appelé "zaitra" en Algérie. Il semblerait que, pendant longtemps, le thym ait surtout été utilisé en médecine et dans les rituels religieux ou magiques, ses usages culinaires se limitant à aromatiser le fromage et les liqueurs.

Ses feuilles sont riches en huiles essentielles dont les propriétés sont mises à profit en phytothérapie et en médecine, comme produit vétérinaire (antiparasites, antispasmodique, septique et digestif). Cela a été mentionné dans plusieurs études [26-29-30]. Il est très utilisé en médecine traditionnelle sous plusieurs formes : les feuilles sont utilisées en infusion contre la toux, en décoction pour guérir les maux de tête, hypertension et gastrites, en usage externe comme cicatrisants.

V.6.2. Description botanique du genre

Les thym (Thymus) sont des plantes basses sous-ligneuses, odorantes, pouvant atteindre 40cm de hauteur. Ils possèdent de petites feuilles recourbées sur les bords de couleur verte foncé, et qui sont recouvertes de poils et de glandes (appelés trichomes [27]). Les trichomes contiennent l'huile essentielle majoritairement composée de mono-terpènes. Les calices et les jeunes tiges sont aussi couverts de ces structures qui libèrent l'essence par simple contact, bien qu'en plus faible densité sur les tiges. Ses petites fleurs zygomorphes sont regroupées en glomérules et leur couleur varie du blanc au violet en passant par la rose [31].

V.6.3. Place dans la systématique [27]

Règne	⇒	Plantae
Embranchement	⇒	Spermaphytes (phanérogames)
Sous-embranchement	⇒	Angiospermes
Ordre	⇒	Tubiflorales
Sous ordre	⇒	Verbéninées
Famille	⇒	Lamiaceae
Genre	⇒	<i>Thymus</i>

V.7. Répartition géographique

V.7.1 Dans le monde

Le genre *Thymus* est l'un des genres les plus diversifiés de la famille des labiées [16]. Selon Dob *et al.* (2006) [32], il existe près de 350 espèces de thym réparties entre l'Europe, l'Asie de l'ouest et la Méditerranée. C'est une plante très répandue dans le nord ouest africain (Maroc, Tunisie, Algérie et Libye). Elle pousse également sur les montagnes d'Ethiopie et d'Arabie du sud ouest en passant par la péninsule du Sinaï en Egypte. On peut la trouver également en Sibérie et même en Himalaya.

Selon une étude menée par Nickavar *et al.* (2005) [33], environ 110 espèces différentes du genre *Thymus* se concentrent dans le bassin méditerranéen. C'est pour cela que l'on peut considérer la région méditerranéenne comme étant le centre de ce genre.

V.7.2. En Algérie

L'Algérie est connue par sa richesse en plantes médicinales au regard de sa superficie et de sa diversité bioclimatique. Le *Thymus* de la famille des Lamiacées, comprend plusieurs espèces botaniques réparties sur tout le littoral et même dans les régions internes jusqu'aux zones arides [34]. Il est représenté en Algérie par de nombreuses espèces qui ne se prêtent pas aisément à la détermination en raison de leur variabilité et leur tendance à s'hybrider facilement.

V.8. Huile essentielle du thym

L'essence de thym est souvent rapportée comme étant parmi les huiles essentielles les plus actives [29-11]. Les huiles essentielles de thym sont composées par des molécules aromatiques d'origine végétale présentant une très grande diversité de structure. La variabilité chimique des huiles essentielles de thym dépend de plusieurs facteurs qui sont généralement d'ordres climatiques et environnementaux mais, qui peuvent être aussi d'ordres génétique et saisonnier (stade végétale) [35]. Ainsi, une étude menée par Dob *et al*, (2006) [32] sur les *Thymus* d'Afrique du Nord a montré que le composé majoritaire est le thymol chez les espèces d'Algérie et du Maroc et le carvacrol chez les espèces de Tunisie.

V.9. Travaux antérieurs

Le genre *Thymus* englobe de nombreuses espèces et variétés et la composition chimique de leurs huiles essentielles a été étudiée depuis longtemps [36-37-38-39-40-41-42-43]. Les huiles essentielles de plusieurs espèces de thym ont déjà prouvé leurs propriétés antibactériennes et antifongiques [44-45-46-47].

V.10. Activités biologiques

Le thym est la plante médicinale la plus utilisée en médecine traditionnelle algérienne comme expectorant, antitussif, antiseptique, stomachique, antispasmodique, carminatif, anthelminthique et diurétique. Il est aussi utilisé comme condiment: le thym sec, ayant subi un séchage préalable permettant sa conservation, est destiné aux grillades alors que les huiles essentielles, extraites du matériel végétal, servent d'aromatisants. En usage cosmétique, l'emploi du thym est classique dans la constitution des parfums, on trouve également, dans l'huile essentielle du thym une composante antiseptique et cicatrisante dans les produits destinés aux soins de beauté [48-49]. Les études ont surtout montré l'activité anti-oxydante [50-51]; des espèces de genre *Thymus* étudiées. Les activités, antimicrobiennes [52-53], spasmolytique et mutagénique [54] (vis-à-vis de la bactérie *Salmonella triphymurium*) ont été établies.

V.11. Composition chimique

Les principaux métabolites secondaires du genre *Thymus* sont les flavonoïdes. Le genre *Thymus* appartient à la sous-famille des Nepetoideae réputée pour stocker des flavonoïdes

polyméthoxylés, [55-56]. La lutéoline et la 6-hydroxylutéoline sont des chémomarqueurs des espèces *Thymus*, la thymusine (5,6- dihydroxy-7, 8,4'-triméthoxyflavone) est aussi caractéristique de cette sous-famille.

L'huile essentielle de *Thymus ciliatus* est composée principalement de thymol, de β -E-ocimène et d' α -terpinène accompagnés d'autres constituants à des teneurs relativement faibles : linalol, δ -3-carène, 1,8-cinéole et carvacrol [57].

V.12. Etude chimique de l'huile essentielle de *Thymus ciliatus*

V.12.1. Description botanique de l'espèce

Thymus ciliatus (Desf) Benth. Est un arbrisseau de petite taille, mais pouvant former des touffes bien étalées sur le sol ; les feuilles florales sont différentes des feuilles caulinaires, en général fortement dilatées à leur portion inférieure. Rencontrée dans les broussailles, matorrals, sur substrats calcaires et siliceux et sur sols rocailleux et bien drainés [57]. Dans la flore algérienne, il y a 12 espèces de thymus dont 9 sont endémiques [58].

V.12.2. Place dans la systématique [27]

Règne	⇒	Plantae
Embranchement	⇒	Spermaphytes (phanérogames)
Sous-embranchement	⇒	Angiospermes
Classe	⇒	Dicotylédones
Sous classe	⇒	Métachlamydées (gamopétales)
Ordre	⇒	Tubiflorales
Sous ordre	⇒	Verbéninées
Famille	⇒	Lamiaceae
Genre	⇒	<i>Thymus</i>
Espèce	⇒	<i>ciliatus</i>



Figure V.1. L'espèce *Thymus ciliatus*

V.12.3. Matériel végétal

La plante a été récoltée en Mars 2013, dans la région de Bechar, identifiée par le professeur Mohamed Kaabache (Département des sciences de la nature et de la vie, Université Ferhat Abbas, Sétif, Algérie. Un spécimen (N° 123TC) a été déposé au niveau de l'herbier de l'unité de recherche VARENBIOMOL. Université des Frères Mentouri de Constantine.

Après séchage dans un endroit sec, à l'abri des rayons solaires, les fleurs et les feuilles ont été pesées séparément 300g.

V.12.4. L'hydrodistillation des huiles essentielles

Nous avons utilisé l'hydrodistillation dans un Clevenger, durant 3 heures pour extraire l'huile essentielle de la partie aérienne fraîche de la plante.

V.12.5. Méthode d'extraction

Dans un ballon, 300 g des parties aériennes de la plante sont mises en contact avec 500 ml d'eau distillée dans le ballon. L'ensemble est porté à ébullition pendant 2h. L'huile essentielle est alors entraînée par la vapeur d'eau. Elle est ensuite condensée en passant par le condensateur. Le liquide recueilli résulte en un distillat avec une couche d'huile mince à la

surface qui sera par la suite séparée, après repos du liquide. L'huile essentielle obtenue est ensuite placée sur un desséchant de type sulfate de magnésium ($MgSO_4$), afin d'éliminer toute trace éventuelle d'eau. Elle est gardée au réfrigérateur à 4°C et à l'obscurité jusqu'à analyse et tests biologiques [59].

V.12.6. Identification et analyses chromatographiques des huiles essentielles

L'analyse des huiles essentielles, l'identification des constituants, la recherche d'éventuelles falsifications peuvent se faire à l'aide de techniques telles que la chromatographie en phase gazeuse sur phases stationnaires polaires, apolaires, couplée avec une détection par spectrométrie de masse.

❖ Analyse GC

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse de l'huile essentielle de *Thymus ciliatus* a été réalisée ; à l'Institut Supérieur de Biotechnologie de Monastir (Université de Monastir); 5000, Rue Taher Haddad, Monastir, Tunisie; en utilisant un HP 5890-series II équipé de détecteurs à ionisation de flamme (FID), HP-5 (BP-1) (5% phenyl + 95% diméthylpolysiloxane) 30m x 0,25 mm ID, 0,25 µm d'épaisseur de colonne capillaire. Le gaz porteur était de l'azote (1,2 m / min). La température du programme était 1 min isotherme à 50 °C, puis 50-280 °C (BP-1) et 50-220 °C (BP-20) à raison de 5 °C / min et maintenu isotherme pendant 1 min. la température du port d'injection était 250 °C, celle du détecteur était 280 °C. Le volume injecté: 1 µl de solution à 1% (dilué dans l'hexane). Les pourcentages des constituants ont été calculés par intégration électronique des zones de pics du FID [60].

❖ Analyse GC/MS

Les analyses des constituants volatils ont été effectuées sur un Hewlett-Packard GC-Système MS (GC: 5890-série II, MSD 5972). Le capillaire HP-5 MS à base de silice fondue colonne (30 m 0,25 mm ID, épaisseur de film de 0,25 lm) a été directement couplée à la MS. Le gaz porteur était de l'hélium, avec un débit de 1,2 ml/mn. La température a été programmée (50 °C pendant 1 min, puis 50-280 °C à 5 °C / min) et par la suite gardé sous cette température pendant 2 min [60].

- Port d'injecteur: 250 °C,

- Détecteur: 280 C,
- Split ratio 1:50.
- Volume injecté: 1 µl de solution à 1% (dilué dans l'hexane):
- Le potentiel d'ionisation 70 eV;
- Temps de balayage 1,5 s;
- Gamme de masse 40-300 amu.

Logiciel adopté pour traiter les spectres de masse et les chromatogrammes était une station de Chem. Les composants de l'huile essentielle ont été identifiés en comparant leurs spectres de masse avec ceux dans la bibliothèque GC-MS Wiley 275 et ceux de la littérature [61], ainsi que par la comparaison de leurs indices de rétention avec des données de la littérature [61-62]. Les indices de rétention des composants ont été déterminé par rapport aux temps de rétention d'une série de *n*-alcane (par rapport à C₉ - C₂₈ sur les colonnes HP5 et HP-20M).

V.12.7. Identification des composants

Les composants de l'huile essentielle ont été identifiés en fonction de leurs Indices de Rétention (RI) (déterminé par référence à une série homologue d'alcane normaux), et par comparaison de leurs modèles de fragmentation de spectrométrie de masse avec ceux rapportés dans la littérature [63-64].

V.12.8. Analyse comparative de la composition d'huiles essentielles de *Thymus ciliatus*

Les analyses GC et GC-MS des huiles ont révélé la présence de vingt cinq (25) composés représentant 87.18 % de l'huile essentielle de *T. ciliatus*, qui ont été listé selon l'ordre de leur indice de rétention **tableau [V.1.]**, dont les principaux composants sont : thymol (54.26%), *p*-cymen-7-ol (17.58 %), carvacrol (9.228%), *o*-cymene (5.72 %)

Les résultats d'analyse sont consignés dans le **tableau [V.1.]**, et le profile chromatographique est illustré dans la **figure [V.3.]**.

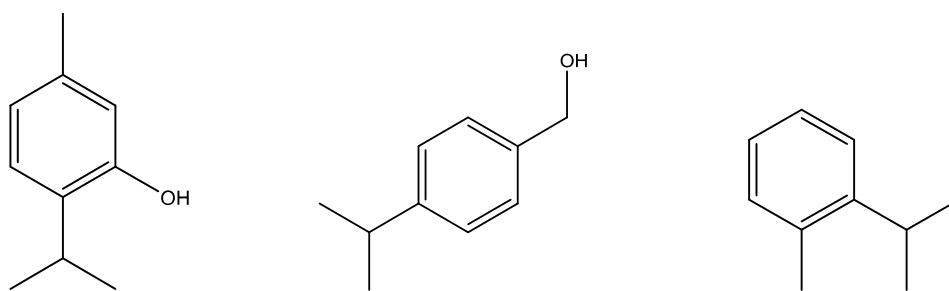


Figure V.2. Structure des composés majoritaires de l'huile essentielle de *Thymus ciliatus*

N°	Composants	Tr (min)	IR	Pourcentage %
1	α -pinene	17,682	939	0,058
2	3- octanone	21,379	992	0,885
3	β-E ocimene	24,666	1026	5,723
4	limonene	24,993	1029	0,158
5	γ -terpinene	28,075	1059	0,478
6	cis sabinene hydrate	28,559	1070	0,117
7	linalool oxide trans furanoide	29,811	1986	0,146
8	linalool	30,522	1096	0,156
9	carvacrol	30,753	1109	9,228
10	isoborneol	35,567	1160	0,896
11	Trans- β - Terpineol	36,47	1163	0,332
12	α -terpineol	37,532	1188	0,069
13	dihydro carvone cis	37,945	1192	0,065
14	thymol methyl ether	40,642	1235	0,822
15	carvacrol methyl ether	41,284	1241	1,373
16	<i>p</i>-cymen-7-ol	44,772	1290	17,581
17	thymol	45,532	1290	54,264
18	cyclosativene	50,24	1371	0,218
19	α -acoradiene	56,604	1466	0,703
20	α -amorphene	57,728	1484	0,185
21	trans-muurolo-4(14),5-diene	58,077	1493	0,119
22	cis- β -guaiene	58,891	1502	0,442
23	δ -amorphene	59,451	1512	1,132
24	Bisabolene (E) Υ	60,589	1531	0,771
25	caryophyllene oxide	62,98	1583	0,403
26	n-eicosane	84,709	2000	0,087

Tableau V.1. Composition de l'huile essentielle des parties aériennes fraîches de *Thymus ciliatus*

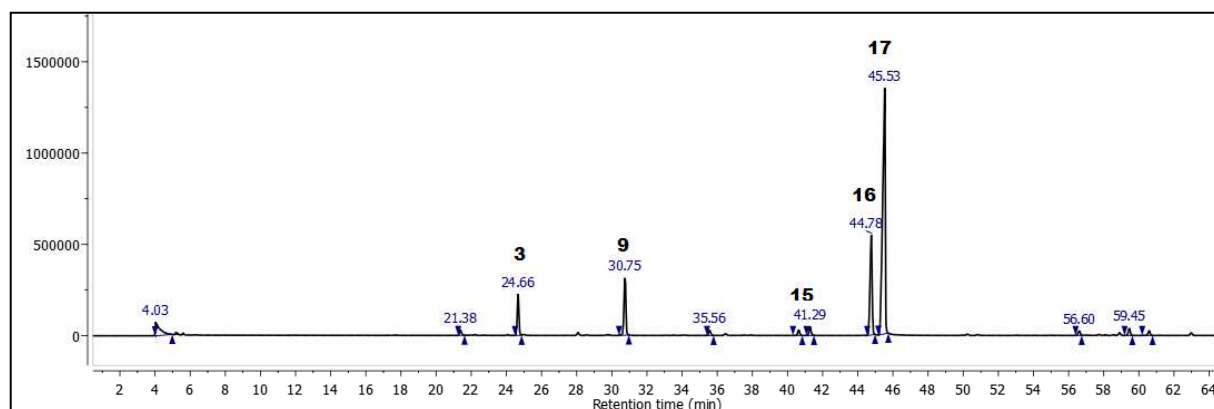


Figure V.3. Profil chromatographique de l'huile essentielle de *Thymus ciliatus* (les numéros des pics peuvent s'identifier dans le **Tableau.V.1.**)

C'est la première fois que **p-cymen-7-ol** (17,58%) se trouve en tant que composant majoritaire de l'huile essentielle de *T. ciliatus*.

L'huile essentielle des espèces Algériennes de *T. ciliatus* étaient chimiotypiques du thymol (79,1%, 44,2%) [65-66].

En plus, notre huile actuelle a été caractérisée aussi par la présence principale de carvacrol methyl ether (1,373%).

L'huile essentielle de *T. ciliatus* présente un polymorphisme chimique très important. En effet, Benjilali *et al.* 1987 [45]; ont montré que le profil chimique de 14 échantillons de *T. ciliatus* de différentes régions du Maroc est très variable. La teneur et la nature des composés majoritaires varient considérablement d'un échantillon à l'autre en fonction de l'origine des plantes : thymol (0,3-29,3 %), carvacrol (0,4-21,7 %), acétate d' α -terpényle (0-42,9 %), acétate de géranyle (0-21,7 %), butyrate de géranyle (0-26,7 %), camphre (0,4-28,4 %) et bornéol (0,1-31,6 %). C'est le cas aussi pour *T. ciliatus* de l'Algérie, pour lequel Giordani *et al.* (2008) [67] ; ont montré que l'huile essentielle de cette espèce originaire de Djebel Ansel est dominée par le thymol (60,52 %). Alors que le carvacrol (72,4-80,3 %) est le constituant principal de huit provenances de *T. ciliatus* ssp. eu-ciliatus de la région de Tlemcen [68-69]. Par conséquent, les compositions des huiles essentielles de *T. ciliatus* récoltées en Maroc, et même en Algérie étaient tout à fait différentes de la présente huile de la wilaya de Bechar. Les différences qualitatives et quantitatives dans la composition chimique des huiles essentielles, du point de vue qualitatif et quantitatif, peuvent être dues à certains facteurs

écologiques, à la partie de la plante utilisée, à l'âge de la plante et à la période du cycle végétatif, ou même à des facteurs génétiques [70-71-72-73-74].

V.12.9. Activité antibactérienne

V.12.9.1. Microorganismes testés

Quatre bactéries (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Staphylococcus aureus*) ont été choisies pour leur fréquence élevée à contaminer les denrées alimentaires et pour leur pathogénicité.

V.12.9.2. La méthode des disques

Le test d'activité antibactérienne a été réalisé selon le protocole décrit par Snoussi *et al.* [75]. Pour les expériences, une anse de micro-organismes a été enrichie sur un tube contenant 9 mL de bouillon Mueller-Hinton additionné de 1% de NaCl puis incubé à 37 ° C pour 18-24 heures. Les cultures d'une nuit ont été utilisées pour l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Thymus ciliatus*. Les inoculums ont été striés sur Mueller des plaques d'agar agar à 1% de NaCl Hinton; puis les disques filtrants stériles (diamètre 6 mm, Biolife, Milan, Italie) ont été imprégné de 10,4 µL d'huile essentielle (10,4 µL d'huile essentielle pesait 10 mg). Les plats ont été incubés à 37°C pendant 18-24 heures pour les souches microbiennes. Le diamètre des zones d'inhibition a été mesuré avec une règle plate de 1 mm. Chaque expérience a été réalisée en triple et le diamètre moyen de la zone d'inhibition a été enregistré.

V.12.9.3. Résultats et discussions

Le **tableau [V.2.]** montre les résultats de l'activité antibactérienne de l'huiles essentielle de *T. ciliatus*, dont elle a exercée une forte activité antibactérienne contre *E. coli* ATCC, *S. aureus* ATCC et *S. aureus* avec un diamètre d'inhibition de 21, 24 et 20 mm, respectivement. En effet, plusieurs auteurs (Pellecuer *et al.*, 1980 [44]; Panizzi *et al.*, 1993 [28]; Satrani, B., 2008 [76]), ont montrés que l'importante bioactivité de l'huile essentielle de *T. ciliatus* est en relation avec sa teneur élevée en thymol et carvacrol.

Dorman *et al.* (2000) [77] ont démontré que le thymol est le composé qui possède le plus large spectre d'activité antibactérienne contre 25 genres de bactéries testées.

Bactéries	Zone d'inhibition (mm)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	21
<i>Escherichia coli</i>	19
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	24
<i>Staphylococcus aureus</i>	20

Tableau V.2. Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Thymus ciliatus*

Référence

- [1] Bowles, E., J., (2004). The chemistry of aromatherapeutic oils. 3rd Ed. Crows Nest, NSW: Allen& Unwin Academic.
- [2] Lahlou, M., (2004). Essential oils and fragrance compounds: bioactivity and mechanisms of action. *Flavour .Fragr. J* .19, 159–165.
- [3] Viuda Martos, M., Mohamady, M., A., Fernández, L., J., Abd ElRazik, K., A., Omer, E., A., Pérez Alvarez, J., A., Sendra, E., (2011). In vitro antioxidant and antibacterial activities of essentials oils obtained from Egyptian aromatic plants. *Food Control*. 22: 1715-1722.
- [4] Cowan, M., M., (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Micobial. Rev*; 12 (4); pp 564 – 582.
- [5] Burt, S., (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential application in Foods. A review intern: *J. Food. Microbiol*. 94: 223-253.
- [6] Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., (2008). Biological effects of essential oils. *Rev: Food. Chem.Toxicol*. 46: 446–475
- [7] Hurtel, J., M., (2006). Huiles essentielles et Médecine. Aromathérapie et santé. Consulter le 02/09/2017 sur: www.phytomania.com
- [8] Croteau R., Kutchan, T., M., Lewis, N., G., (2000). Natural products (secondary metabolites). In B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones, eds, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, pp 1250–1268
- [9] Corbo, M., R., Bevilacqua, A., Campaniello, D., D'Amato, D., Speranza, B., Sinigaglia, M., (2009). Prolonging microbial shelf life of foods through the use of natural compounds and nonthermal approaches – a review. *Int J Food Sci Technol.*, 44: 223-241.
- [10] Guignard, J., L., (1998). *Abrégé botanique*. 11^{ème} Edition Masson, Paris.
- [11] Naghdi, B., H., Yazdani, D., Mohammed Ali, S., Nazari, F., (2004). Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme. *Thymus vulgaris L-Industrial Crops and Products*; Vol.19; pp 231-236.
- [12] Botineau, M., (2010). *Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs*. Ed TEC&DOC, Lavoisier, Paris. P: 1021-1043.
- [13] Gherman, C., Culea, M., Cozar, O., (2000). Comparative analysis of some active principles of herb plants by GC/MS-Talanta; Vol. 53; PP 253-262.

- [14] Bouhdid, S., Idaomar, M., Zhiri, A., Bouhdid, D., Skali, N, S., Abrini, J., (2006). *Thymus* essential oils: chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities. Biochimie, Substances Naturelles et environnement, Congrès International de biochimies, Agadir ; pp 324-327
- [15] Hilan, C., Sfei, R., Jawish, D., Aitour, S., (2006). Huiles essentielles de certaines plantes médicinales libanaises de la famille des Lamiaceae- Lebanese Science Journal ; Vol.7 ; N°2.
- [16] Naghibi, F., Mosaddegh, M., Mohammadi, M., S., Ghorbani, A., (2005). Labiatae Family in folk Medicine in Iran: from Ethnobotany to Pharmacology-Iranian journal of pharmaceutical research, vol. 2; pp 63-79.
- [17] Fellah, S., Romadhane, M., Abderraba, M., (2006). Extraction et étude des huiles essentielles de la *Salvia officinalis*. L cueillie dans deux régions différentes de la Tunisie-Journal de la Société Algérienne de Chimie J.Soc. Alger, Chin. ; Vol, 16 ; N° 2 ; pp 193-202.
- [18] Choudhury, R., P., Kumar, A., Garg, A., N., (2006). Analysis of Indian mint (*Mentha spicata*) for essential, trace and toxic elements and its antioxidant behavior-Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis; Vol. 41; pp 825-832.
- [19] Dimitrijevic, S., I., Mihajlovski, K., R., Antonovic D., G., Milanovic Stevanovic, M., R., Mijin, D., Z., A., (2007). Study of the synergistic antilisterial effects of a sub-lethal dose of lactic acid and essential oils from *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Origanum vulgare* L- Food Chemistry; Vol.104; pp 774-782.
- [20] Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M., B., Taghizadeh, M., Astaneh, S., A., Rasooli, I., (2007). Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils Food Chemistry; 2007, Vol.102; pp: 898-904.
- [21] Marzouk, Z., Neffati, A., Marzouk, B., Chraief, I., Khemiss, F., Chekir Ghedira, L., Boukef, K., (2006). Chemical composition and antibacterial and antimutagenic activity of Tunisian *Rosmarinus officinalis* L. oil from Kasrine- Journal of Food Agriculture & Environment; Vol.4; N°3-4; pp 61-65.
- [22] Lee, K., W., Kim, Y., J., Lee, H., J., Lee, C., Y., (2003). Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than teas and Red Wine. J. Agric. Food. Chem. 51: 7292-7295.
- [23] Rota, M., C., Herrera, A., Martinez, R., M., Sotomayor, J., A., Jordan, M., J., (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis*

- and *Thymus hyemalis* essential oils-Food Control; Vol.19; pp 681-687.
- [24] Bagamboula, C., F., Uyttendaele, M., Debevere, J., (2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*-Food Microbiology; Vol.21; pp33-42.
- [25] Elhabazi, K., Dicko, A., Desor, F., Dalal, A., Younos, C., Soulimani, R., (2006). Preliminary study on immunological and behavioural effects of *Thymus broussonetii* Boiss., an endemic species in Morocco-Journal of Ethnopharmacology; Vol 103,pp 413-419.
- [26] Ebrahimi, S., N., Mirjalili, J., H., Sonboli, A., Yousefzadi, M., (2008). Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages- Journal Food Chemis; Vol. 10; pp 1016.
- [27] Quezel, P., Santa, S., (1962). Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome I, centre nationale de la recherche scientifique, Paris, 611.
- [28] Panizzi, L., Flamini, G., Cioni, P., L., Morelli, I., (1993). Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean Lamiaceae. J. Ethnopharmacol. 39: 167-170
- [29] Rasooli, I., Rezaei, M., B., Allameh, A., (2006). Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of *thyme* essential oils on *Listeria monocytogenes*. International Journal of Infectious Diseases; Vol. 10; pp 236-241
- [30] Cosentino, S., Tuberoso, C., I., G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E., Palmas, F., (1999). *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of *Sardinian Thymus* essential oils. Letters in Applied Microbiology; Vol. 29; pp 130-135.
- [31] Soto-Mendivil, E., A., Moreno-Rodriguez, J., F., Estarron-Espinosa, M., Garcia-Fajardo, J., A., Obledo-Vazquez, E., N., (2006). Chemical composition and fungicidal activity of the essential oil of *Thymus vulgaris* against *Alternaria citri*-E-Gnosis [online]; Vol. 4; N° 16
- [32] Dob, T., Dahmane, D., Benabdelkader, T., Chelghoum, C., (2006). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus fontanesii*- Journal of pharmaceutical biology (Pharm. Bio.); Vol.44; N°8; pp 607-612.
- [33] Nickavar, B., Mojab, F., Dolat-Abadi, R., (2005). Analysis of the essential oils of two *Thymus* species from Iran-Food Chemistry; Vol. 90; pp 609-611.
- [34] Saidj, F., (2006). Extraction de l'huile essentielle de thym : *Thymus numidicus*

- kabylica-Thèse de magistère en Technologie des hydrocarbures, Département génie des procédés chimiques et pharmaceutiques ; université M'Hamed Bougara-Boumerdes.
- [35] Loziene, K., Venskutonis, P., R., Sipailiene, A., Labokas, J., (2007). Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. chemotypes. Food Chemistry; Vol. 103; pp 546-559
- [36] Papageorgio, V., (1980). GLC-MS computer analysis of the essential oil of *Thymus capitatus*. Planta Medica Suppl., 29-33.
- [37] Baser, K., H., C., Ozek, T., Tumen, G., (1992). Essential oils of *Thymus cariensis* and *Thymus haussknechtii*, two endemic species in Turkey. J. Essent. Oil Res., 4, 659-661.
- [38] Baser, K., H., C., Kirimer, N., Tumen, G., Duman, H., (1998). Composition of the essential oils of *Thymus canaoviridis* Jalas. J. Essent. Oil Res., 10, 199-200.
- [39] Vila, R., (1995). Composition and study of the variability of the essential oil of *Thymus funkii* Cosson. Flavour Fragrance J., 10, 379-383.
- [40] Guillen, M., D., Manzanos, M., J., (1998). Study of composition of different parts of a Spanish *Thymus vulgaris* L. Plant Food Chem., 3, 373-383.
- [41] Loziene, K., Vauciunine, J., Venskutonis, P., (1998). Chemical composition of the essential oil of creeping thyme (*Thymus serpyllum* L.) growing wild in Lithuania. Planta Medica, 64, 772-773.
- [42] Saez, F., (1998). Variability in essential oils from populations of *Thymus hyemalis* Lange in southeastern Spain. J. Herbs Spices Med. Plants, 5, 65-76.
- [43] Tumen, G., Baser, K., H., C., Demirci, B., Ermin, N., (1998). The essential oils of *Satureja coerulea* Janka and *Thymus aznavourii* Velen. Flavour Fragrance J., 13(1), 65-67
- [44] Pellecuer, J., Jacob, M., Simeon, M., Allegrini, J., (1980). Therapeutic value of the cultivated mountain savory (*Satureia Montana* L.). Acta Hort., 96, 35-39.
- [45] Benjilali, B., Hammouni, M., M'Hamedi, A., Richard, H., (1987). Essential oil composition of different Moroccan thyme varieties: principal component analysis. Sci. Aliments, 7, 275-299.
- [46] Benjilali, B., Hammouni, M., Richard, H., (1987). Chemical polymorphism of Moroccan thyme essential oils: compounds characterization. Sci. Aliments, 7, 77-91
- [47] Agnihotri, S., Vaidy, A., D., B., (1996). A novel approach to study antibacterial properties of volatile components of selected Indian medicinal herbs. Indian J. Exp. Biol., 34(7), 712-715.

- [48] Kosaka, K., Miyazaki, H., Ito, H., Osanai, Y., Kokai, T., K., (2000). CODEN: JKXXAF JP 2000072650 A2 20000307 Patent written in Japanese. Application: JP 98-244957 19980831; pp 6
- [49] Tanaka, H., Narisu, Co., (2003). Ltd Jpn. Kokai Tokkyo Koho., Division of Jpn. Appl. No. 01 189.690. CODEN: JKXXAF JP 2003002811 A2 20030108. Patent written in Japanese. Application 20010622; pp 10
- [50] Kulevanova, S., Panovska, T., K., (2002). Inhibition of thermal autooxidation of lard by antioxidative action of *Thymus* extracts. *Acta Pharmaceutica*; 52, 29
- [51] Dugas, A., J., Jr., Castaneda, A., J., Bonin, G., C., Price, K., L., Fischer, N., H., Nikolaus., G., W., Winston, J., (2000). Evaluation of the Total Peroxyl Radical-Scavenging Capacity of Flavonoids: Structure–Activity Relationships. *J. Nat. Prod*; 63, 327.
- [52] Saeki, Y., Ito, Y., Y., Shibata, M., Sato, Y., Y., Okuda, K., Takazoe, I., (1994). Antimicrobial action of natural substances on oral bacteria,” *The Bulletin of Tokyo Dental College*; vol. 30, no. 3, pp. 129–135. *Bulletin of Tokyo Dental College*; Vol. 30; pp 129.
- [53] Kandil, O., Radwan, N., M., Hassan, A., B., Amer, A., M., M., El-Banna, H., A., Amer, W., M., M., (1994). Extracts and fractions of *Thymus capitatus* exhibit antimicrobial activities. *J. Ethnopharmacol*; 44, 19
- [54] Kazuki, K., Hiroshi, K., Kazuyasu, S., Hitoshi, A., Gen-ichi D., (1995). Specific Desmutagens (Antimutagens) in Oregano against a Dietary Carcinogen, Trp-P-2, Are Galangin and Quercetin. *J. Agric. Food Chem.*, 1995, 43(2), pp 404–409. DOI: 10.1021/jf00050a028
- [55] Ismaili, H., Tortora, S., Sosa, S., Fkih, T., S., Ildrissi, A., Della Loggia, R., Tubaro, A., Aquino, R., (2001). Topical anti-inflammatory activity of *Thymus wilddenowii*. *J. Pharm. & Pharmacol.*, 53, 1645.
- [56] Haraguchi, H., Saito, T., Ishikawa, H., Date, H., Kataoka, S., Tamura, Y., Mizutani, K., (1996). Antiperoxidative components in *Thymus vulgaris*. *Planta Med.*, 62, 217
- [57] Benabid, A., (2000). Flore et ecosystems du Maroc. Evaluation et préservation de la biodiversité. Paris : Edition Ibis Press ; 159-161.
- [58] Quezel, P., P., Santa, S., (1963). Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales. C.N.R.S., Paris, France, 805-806.
- [59] Willem, J., P., (2004). Les huiles essentielles, Médecine d'avenir. Ed, Dauphin, Paris.

- P: 311.
- [60] Hajlaoui, H., Mighri, H., Noumi, E., Snoussi, M., Trabelsi, N., Ksouri, R., ABakhrouf, D., (2010). Chemical composition and biological activities of Tunisian *Cuminum cyminum* L. essential oil: A high effectiveness against *Vibrio* spp. Strains. Food and chemical toxicology 48. 2186-2192
- [61] Adams, R., P., (1995). Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Carol Stream, Allured, IL.
- [62] Sibanda, S., Chigwada, G., Poole, M., Gwebu, E., T., Noletto, J., A., Schmidt, J., M., Rea, A., I., Setzer, W., N., (2004). Composition and bioactivity of the leaf essential oil of *Heteropyxis dehniae* from Zimbabwe. Journal of Ethnopharmacol 92(107).
- [63] Adams, R., P., (2007). Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, Allured Publishing Co. Carol Stream, Illinois; 4th Ed.
- [64] Mc Lafferty, F., W., Stauffer, D., B., (1991). The Important Peak Index of the Registry of New York. Mass Spectral Data. John Wiley & Son.
- [65] Kabouche, A., Ghannadi, A., Kabouche, Z., (2009). The highest thymol containing essential oil of the genus. Prod. Com; 4, 12511252.
- [66] El Ajjouri, M., Ghanmi, M., Satrani, B., Amarti, F., Rahouti, M., Aafi, A., Ismaili, M., R., Farah, A., (2010). Composition chimique et activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. contre les champignons de pourriture du bois. Acta Botanica Gallica; 157, 285-294.
- [67] Giordani, R., Hadeif, Y., Kaloustian, J., (2008). Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. Fitoterapia, 79, 199- 203.
- [68] Alaoui Jamali, C., El Bouzidi, L., Bekkouche, K., Lahcen, H., Markouk, M., Wohlmuth, H., Leach, D., Abbad, A., (2012). Chem. Biodiversity; 9, 1188-1196.
- [69] Bousmaha-Marroki, L., Atik-Bekkara, F., Tomi, F., Casanova, J., J., (2007). Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. ssp. eu-ciliatus Maire from Algeria. Essent. Oil. Res; 19, 490-493.
- [70] Senatore, F., (1996). Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of a thyme (*Thymuspulegioides* L.) growing wild in Campania (Southern Italy). J. Agric. Food Chem., 44, 1327-1332.
- [71] Kokkini, S., Regina, K., Antonia, D., Nikos, K., Tom, L., (1997). Autumn essential oils of Greek *oregano*. Phytochemistry, 44(5), 883-886.

- [72] Russo, M., Galletti, G., C., Bocchini, P., Carnacini, A., (1998). Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link)): a preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 3741-3746.
- [73] Thompson, J., D., (2003). Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotype. *J. Chem. Ecol.*, 29(4), 859-880.
- [74] Karousou, R., Koureas, D., N., Kokkini, S., (2005). Essential oil composition is related to the natural habitats: *Coridothymus capitatus* and *Satureja thymbra* in NATURA 2000 sites of Crete. *Photochemistry*, 66, 2668-2673.
- [75] Snoussi, M., Hajlaoui, H., Noumi, E., Usai, D., Sechi, L., A., Zanetti, S., Bakhrouf, A., (2008). In-vitro anti-Vibrio spp. activity and chemical composition of some Tunisian aromatic plants. *World J. Microbiol. Biotechnol*, 24, 3071–3076
- [76] Satrani, B., (2008). Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cladanthus mixtus*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 146, 85-96.
- [77] Dorman, H., J., D., Deans, S., G., (2000). Antimicrobial agents from plants: antimicrobial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.*, 88, 308-316.

CONCLUSION GENERALE

Notre travail de recherche est centré premièrement ; sur la valorisation de deux espèces endémique de la famille de Polygonaceae : *Calligonum azel* et *Calligonum comosum* ; deuxièmement ; sur la composition chimique ainsi que l'étude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de l'espèce *Thymus ciliatus* de la famille de Lamiaceae.

Le choix des plantes sélectionnées, dans le cadre de ce travail, repose principalement sur l'appartenance de ces espèces à deux grandes familles (Polygonaceae et Lamiaceae), connues pour sa richesse en divers métabolites secondaires d'un grand intérêt biologique, ainsi que pour la bonne réputation de l'utilisation de ces plantes dans la médecine traditionnelle locale. L'une des espèces (*Calligonum azel*) n'a pas fait l'objet d'investigation phytochimique antérieure.

Après l'extraction hydro-alcoolique des parties aériennes des deux espèces *C. azel* et *C. comosum*, concentration et affrontement par des solvants de polarité croissante, les extraits organiques ont été étudiés chimiquement en utilisant les méthodes de séparation chromatographiques (CC, CCM, CCP et CLHP). La détermination des structures isolées a été réalisée par des méthodes spectrales notamment RMN 1D et 2D (^1H , ^{13}C , J -modulé, DEPT, COSY, HSQC, HMBC et ROESY), la spectroscopie de masse HRESI-MS, ESI-MS, l'UV-Visible et l'IR.

Nos travaux de séparation et de purification des produits purs de l'espèce *C. azel* ont conduit à l'isolement de neuf (09) composés natifs dont trois sont originaux dans la famille de Polygonaceae et un dans la littérature :

- Catéchine
- Taxifoline
- Acide protocatéchique,
- Méthyle gallate
- Acide caféique.
- 4,2',4',6'-tétrahydroxy-dihydrochalcone-2'- β -*D*-glucopyranoside
- Acide 5-(*p*-hydroxy-phenyl)-pent-2-en (**Nouveau produit**)
- Acide 5-(*p*-hydroxy-phenyl)-3-hydroxy-pentanoïque
- Acide- α,β -diamino (-4-hydroxy benzene) butanoïque.

Nos travaux de séparation et de purification des produits purs de l'espèce *C. comosum* ont conduit à l'isolement de neuf (09) composés natifs dont un est décrit pour la première fois dans la famille de Polygonaceae:

- Nicotiflorine
- Acide-*p*-coumarique
- Isoquercetine
- Tamgermanetin
- Rutine
- Epigallocatechine-3-*O*-gallate
- Ethyl ester protocatéchique acide.
- Taxifoline
- Catéchine

La même étude a montré la présence de certains composés phénoliques communs entre les deux espèces dont la Catéchine et la taxifoline.

Certains des composés phénoliques isolés de l'espèce *C. azel* ont montrés un potentiel antioxydant significatif et la capacité de l'acide 5-(*p*-OH-phenyl)-pent-2-en-oic et l'acide éthyle ester protocatéchique à réduire le taux de peroxydes dans les cellules Jurkat témoins. Ce dernier a une activité anti-oxydante significative et en particulier capable de réduire le taux de peroxydes basaux des cellules Jurkat et de contracter le taux de peroxydes induit par le traitement au *t*-BHT.

Les composés acide- α,β -diamino (-4-hydroxy benzene) butanoïque et catechine-3-*O*-gallate et isoquercetine ont significativement des propriétés anti-inflammatoires.

Le potentiel anti-radicalaire des extraits isolés a été déterminé par la méthode du DPPH, ABTS et FRAP, ainsi que l'activité antibactérienne et antifongique déterminée par la méthode des disques, ont montrés que les extraits des deux espèces possèdent une excellente activité antioxydante pour l'extrait chloroforme et acétate d'éthyle de *C. azel* et l'extrait Chloroforme de *C. comosum*, une efficacité antibactérienne pour les deux extraits chloroforme des deux espèces *C. azel* et *C. comosum*, une meilleure activité antifongique contre *Candida albicans* ATCC 2019 et *Candida parapsilosis* ATCC 22019 pour l'extrait chloroforme de *C. comosum*.

Les parties aériennes de *Thymus ciliatus* sont soumises à l'extraction par hydrodistillation et les analyses par chromatographie en phase gazeuse (CG) et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (CG/MS), ont révélés la présence de vingt cinq (25) composés représentant 87.18 % de l'huile essentielle de *T. ciliatus*, majoritairement composé de thymol (54.26%), *p*-cymen-7-ol (17.58 %), carvacrol (9.22%), *o*-cymene (5.72 %), en plus de carvacrol méthyle éther (1,37%).

L'huile essentielle a manifestée un grand pouvoir antimicrobien vis-à-vis *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 et *Staphylococcus aureus* grâce à sa richesse en thymol.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication internationale et des communications internationales dans des congrès internationales de spécialité.

Résumé

Notre travail phytochimique et biologique concerne les parties aériennes de deux espèces endémiques sahariennes appartenant à la famille de polygonaceae : *Calligonum azel* et *Calligonum comosum*, et une espèce *Thymus ciliatus* de la famille de Lamiaceae.

L'objet de notre travail a porté sur la valorisation de la flore algérienne. Pour cela, nous avons réalisé premièrement ; une étude phytochimique de *C. azel* et *C. comosum*, qui a concerné essentiellement les composés biologiquement actifs puis nous avons testé les propriétés antioxydantes, l'activité antibactérienne et l'anti-inflammatoire de tous les extraits et de quelques composés isolés, deuxièmement ; nous avons étudié la composition chimique et l'activité biologiques de l'huile essentielle de *Thymus ciliatus*.

L'étude des parties aériennes de *C. azel* et *C. comosum*, afin de connaître les substances actifs responsables de leur activité biologique, conduisant à la purification, l'identification chromatographiques (CC, CCM et HPLC), et la caractérisation par les différentes méthodes spectroscopiques (RMN 1D et 2D, MS et UV) de vingt et un (21) produits purs dont dix huit (18) identifiés.

L'investigation des activités biologiques des extraits de *C. azel* et de *C. comosum* montre que la meilleure activité antioxydante a été manifestée par les extraits Chloroforme et acétate d'éthyle de *C. azel* et l'extrait Chloroforme de *C. comosum*. Les extraits chloroforme des deux espèces ont manifestés la meilleure activité antibactérienne. L'extrait chloroforme de *C. comosum* possède une meilleure activité antifongique contre *Candida albicans* ATCC 2019 et *Candida parapsilosis* ATCC 22019.

Parmi les composés isolés, trois possèdent une activité antioxydante et anti inflammatoire. Il s'agit de: acide éthyle ester protocatéchique, acide- α,β -diamino (-4-hydroxy benzene) butanoïque et tamgernanetin.

L'analyse qualitative et quantitative de l'huile essentielle de *T. ciliatus* a permis d'identifier 25 constituants représentant 87.18 % de l'huile essentielle. L'analyse CG et CG-MS a montré qu'elle est majoritairement composée par le thymol (54.26%), carvacrol méthyle éther (1,373 %), *o*-cymene (5.72 %) carvacrol (1.373%) *p*-cymen-7-ol (17.58 %), c'est la première fois que ce dernier se trouve majoritaire dans l'huile essentielle de *T. ciliatus*.

L'évaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *T. ciliatus in vitro* vis-à-vis des microorganismes est effectuée par la méthode de diffusion sur disque. Les résultats montrent qu'elle exerce un effet très puissant à inhiber *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 et *Staphylococcus aureus*.

L'ensemble de nos travaux confirme des propriétés médicinales d'espèces sahariennes, et contribue à leurs descriptions scientifiques.

Mots clés: *Calligonum azel*, *Calligonum comosum*, *Thymus ciliatus*, Polygonaceae, Lamiaceae, RMN 1D et 2D, CLHP, HRESIMS, activités biologiques, huile essentielle.

Abstract

The phytochemical and biological study concerns the aerial parts of two endemic Saharian species belonging to the polygonaceae family: *Calligonum azel* and *Calligonum comosum* and a third one belonging to the Lamiaceae family.

The object of our work focused on the valorization of the Algerian flora. For this, firstly; we carried out a phytochemical study on *Calligonum azel* and *Calligonum comosum* which concerned mainly the biologically active compounds then we tested the antioxidant, antibacterial, antifungal and anti-inflammatory properties of all the organic extracts and some isolated compounds. Secondly; we studied the chemical composition and biological activities of *Thymus ciliatus* essential oil.

The study of aerial parts of *C. azel* and *C. comosum*, in order to know the active compounds responsible for their biological activity, leading to purification, chromatographic identification (CC, TLC and HPLC), and characterization using the different spectroscopic methods (1D and 2D NMR, MS and UV) of twenty one pure compounds (21) in which eighteen (18) compounds were identified.

The investigation of the biological activities of the extracts of *Calligonum azel* and *Calligonum comosum* showed that the best antioxidant activity was exhibited by the Chloroform and ethyl acetate extracts of *C. azel* and the Chloroform extract of *C. comosum*. The chloroform extracts of both species showed the best antibacterial activity. Chloroform extract from *C. comosum* has better antifungal activity against *Candida albicans* ATCC 2019 and *Candida parapsilosis* ATCC 22019.

From the isolated compounds, three have an antioxidant and anti-inflammatory activity. These compounds were: protocatechuic ethyl ester acid, α , β -diamino (4-hydroxy benzene) butanoic acid and tamgernanetin.

The qualitative and quantitative analysis of essential oil of *T. ciliatus* allows the identification of 25 compounds representing 87.18 % of the total essential oil mainly. The GC and GC-MS analysis showed that this essential oils was mainly rich of thymol (54.26%), carvacrol methyl ether (1.373 %), *o*-cymene (5.72 %) carvacrol (1.373%) *p*-cymen-7-ol (17.58 %), however it was the first time that *p*-cymen-7-ol (17.58 %) was found as main component in the essential oils of *T. ciliatus*.

The evaluation of the antibacterial activity was assessed by disc diffusion method against bacterial strains. The essential oil exhibited a good antibacterial activity against *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 and *Staphylococcus aureus*.

All of our works confirms the medicinal properties of the Saharian species, and contributes to their scientific descriptions.

Key words: *Calligonum azel*, *Calligonum comosum*, polygonaceae, Lamiaceae, NMR 1D and 2D, HPLC, HRESIMS, Biological activities, essential oil.

ملخص

يتمحور هذا العمل حول الدراسة الفيتوكيميائية والبيولوجية للأجزاء الهوائية لنبتين صحراويتين تنتميان إلى عائلة Lamiaceae و *Calligonum azel* : Polygonaceae و *Calligonum comosum* و نبتة تنتمي إلى عائلة Lamiaceae و *Thymus ciliatus* :

الغرض من هذه الدراسة هي تمييز النباتات الجزائرية و خاصة الصحراوية منها. لهذا، أجرينا أولا دراسة فيتوكيميائية لاستخلاص مركبات نشطة بيولوجيا من النبتتين : *C.azel* et *C.comosum* و من تم اختبارنا خصائص مضادات الأكسدة، مضادات البكتيريا، النشاط المضاد للالتهابات و مضادات الفطريات لكل المستخلصات العضوية و لبعض المركبات النقية المعزولة من النبتتين، ثانيا دراسة المكونات الكيميائية و الخصائص البيولوجية لمستخلص الزيوت الأساسية لنبتة *Thymus ciliatus*.

أستخلص الأجزاء الهوائية للنبتتين (*C.azel*, *C.comosum*)، و كذا الفصل الكروماتوغرافي باستعمال مختلف التقنيات (كروماتوغرافيا العمود، كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة و كروماتوغرافيا HPLC)، حيث سمح لنا بعزل واحد و عشرون مركب نقي و تحديد الصيغة الكيميائية لثمانية عشر مركب منها باستعمال مختلف الطرق الطيفية (D1 RMN و D2 ، MS و الأشعة فوق البنفسجية).

وقد أظهرت الاختبارات البيولوجية على المستخلصات العضوية للنبتتين أن : أفضل فعالية لمضاد الأكسدة ظهرت في مستخلصات ثلاثي كلور الميثان و خلاص الإيثيل الخاصة بنبتة *C.azel* . و مستخلص ثلاثي كلور الميثان بالنسبة لنبتة *C.comosum*

كما أظهرت المستخلصات العضوية ثلاثي كلور الميثان لكلا النبتتين أن النشاط المضاد للبكتريا هو الأفضل مقارنة بالمستخلصات العضوية الأخرى .

المستخلص العضوي ثلاثي كلور الميثان لنبتة *C.comosum* يملك نشاط مضاد للفطريات *Candida albican* ATCC 2019 و *Candida parapsilosis* ATCC 22019 أفضل مقارنة بالمستخلصات العضوية الأخرى.

من بين المركبات النقية المعزولة، لدينا ثلاثة منها تعتبر مضادات للأكسدة و لديها نشاط مضاد للالتهابات و هي: حمض إيثيل استر protocatachique، حمض α ، β ثنائي أمين (البنزين -4-هيدروكسي) البوتانويك و tamgeranetine.

الدراسة الكمية و النوعية لمستخلص الزيوت الأساسية لنبتة *Thymus ciliatus* سمح لنا بالتعرف على 25 مركب يمثل 87.18 من الزيوت الأساسية. الدراسة الكروماتوغرافية الغازية (CG-MS) وجود مركبات أساسية هي thymol (54.26%)، (1,373 %)، carvacrol methyl ether، (5.72 %)، o-cymene، (1.373%)، p-carvacrol، (17.58 %) cymen-7-ol

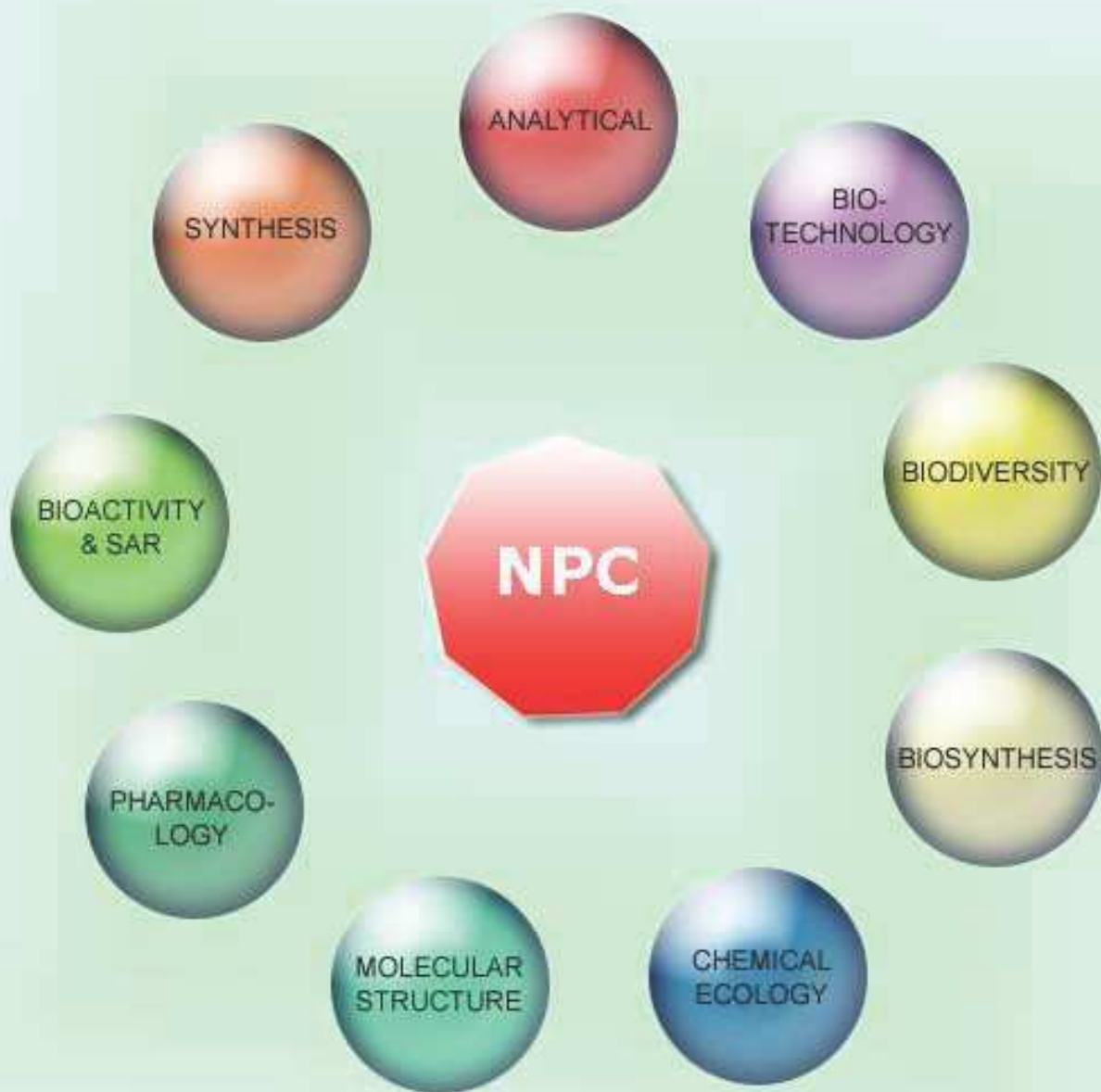
بينت نتائج الفعالية المضادة للبكتيريا للزيوت الأساسية للنبتة امتلاكها فعالية جيدة ضد *Escherichia col* ATCC 25922، *Staphylococcus aureus* ATCC 43300، *Staphylococcus aureus*.

جميع النتائج المتحصل عليها تؤكد الخصائص الطبية و يساهم في إعطاءها أهمية علمية.

الكلمات المفتاحية: *Calligonum azel*, *Calligonum comosum*, Polygonaceae, Lamiaceae, مطيافية الرنين المغناطيسي 1D و 2D، كروماتوغرافيا HPLC، مطيافية الكتلة، النضاطات البيولوجية، الزيوت الأساسية

NATURAL PRODUCT COMMUNICATIONS

An International Journal for Communications and Reviews Covering all
Aspects of Natural Products Research



Volume 12. Issue 12. Pages 1821-1970. 2017
ISSN 1934-578X (printed); ISSN 1555-9475 (online)
www.naturalproduct.us

EDITOR-IN-CHIEF**DR. PAWAN K AGRAWAL**

Natural Product Inc.
7963, Anderson Park Lane,
Westerville, Ohio 43081, USA
agrawal@naturalproduct.us

EDITORS**PROFESSOR ALEJANDRO F. BARRERO**

Department of Organic Chemistry, University of Granada,
Campus de Fuente Nueva, s/n, 18071, Granada, Spain
afbarre@ugr.es

PROFESSOR MAURIZIO BRUNO

Department STEBICEF,
University of Palermo, Viale delle Scienze,
Parco d'Orleans II - 90128 Palermo, Italy
maurizio.bruno@unipa.it

PROFESSOR VLADIMIR I. KALININ

G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry,
Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences,
Pr. 100-letya Vladivostoka 159, 690022,
Vladivostok, Russian Federation
kalininv@piboc.dvo.ru

PROFESSOR YOSHIHIRO MIMAKI

School of Pharmacy,
Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences,
Horinouchi 1432-1, Hachioji, Tokyo 192-0392, Japan
mimakiy@ps.toyaku.ac.jp

PROFESSOR STEPHEN G. PYNE

Department of Chemistry, University of Wollongong,
Wollongong, New South Wales, 2522, Australia
spyne@uow.edu.au

PROFESSOR MANFRED G. REINECKE

Department of Chemistry, Texas Christian University,
Forts Worth, TX 76129, USA
m.reinecke@tcu.edu

PROFESSOR WILLIAM N. SETZER

Department of Chemistry, The University of Alabama in Huntsville,
Huntsville, AL 35809, USA
wsetzer@chemistry.uah.edu

PROFESSOR PING-JYUN SUNG

National Museum of Marine Biology and Aquarium
Checheng, Pingtung 944
Taiwan
pjsung@nmmba.gov.tw

PROFESSOR YASUHIRO TEZUKA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokuriku University,
Ho-3 Kanagawa-machi, Kanazawa 920-1181, Japan
y-tezuka@hokuriku-u.ac.jp

PROFESSOR DAVID E. THURSTON

Institute of Pharmaceutical Science
Faculty of Life Sciences & Medicine
King's College London, Britannia House
7 Trinity Street, London SE1 1DB, UK
david.thurston@kcl.ac.uk

HONORARY EDITOR**PROFESSOR GERALD BLUNDEN**

The School of Pharmacy & Biomedical Sciences,
University of Portsmouth,
Portsmouth, PO1 2DT U.K.
axuf64@dsl.pipex.com

ADVISORY BOARD

Prof. Giovanni Appendino
Novara, Italy

Prof. Norbert Arnold
Halle, Germany

Prof. Yoshinori Asakawa
Tokushima, Japan

Prof. Vassaya Bankova
Sofia, Bulgaria

Prof. Roberto G. S. Berlinck
São Carlos, Brazil

Prof. Anna R. Bilia
Florence, Italy

Prof. Geoffrey Cordell
Chicago, IL, USA

Prof. Fatih Demirci
Eskişehir, Turkey

Prof. Francesco Epifano
Chieti Scalo, Italy

Prof. Ana Cristina Figueiredo
Lisbon, Portugal

Prof. Cristina Gracia-Viguera
Murcia, Spain

Dr. Christopher Gray
Saint John, NB, Canada

Prof. Dominique Guillaume
Reims, France

Prof. Duvvuru Gunasekar
Tirupati, India

Prof. Hisahiro Hagiwara
Niigata, Japan

Prof. Judith Hohmann
Szeged, Hungary

Prof. Tsukasa Iwashina
Tsukuba, Japan

Prof. Leopold Jirovetz
Vienna, Austria

Prof. Phan Van Kiem
Hanoi, Vietnam

Prof. Niel A. Koorbanally
Durban, South Africa

Prof. Chiaki Kuroda
Tokyo, Japan

Prof. Hartmut Laatsch
Gottingen, Germany

Prof. Marie Lacaillle-Dubois
Dijon, France

Prof. Shoei-Sheng Lee
Taipei, Taiwan

Prof. M. Soledade C. Pedras
Saskatoon, Canada

Prof. Luc Pieters
Antwerp, Belgium

Prof. Peter Proksch
Düsseldorf, Germany

Prof. Phila Raharivelomanana
Tahiti, French Polynesia

Prof. Stefano Serra
Milano, Italy

Dr. Bikram Singh
Palampur, India

Prof. Leandros A. Skaltsounis
Zografou, Greece

Prof. John L. Sorensen
Manitoba, Canada

Prof. Johannes van Staden
Scottsville, South Africa

Prof. Valentin Stonik
Vladivostok, Russia

Prof. Winston F. Tinto
Barbados, West Indies

Prof. Sylvia Urban
Melbourne, Australia

Prof. Karen Valant-Vetschera
Vienna, Austria

INFORMATION FOR AUTHORS

Full details of how to submit a manuscript for publication in Natural Product Communications are given in Information for Authors on our Web site <http://www.naturalproduct.us>.

Authors may reproduce/republish portions of their published contribution without seeking permission from NPC, provided that any such republication is accompanied by an acknowledgment (original citation)-Reproduced by permission of Natural Product Communications. Any unauthorized reproduction, transmission or storage may result in either civil or criminal liability.

The publication of each of the articles contained herein is protected by copyright. Except as allowed under national "fair use" laws, copying is not permitted by any means or for any purpose, such as for distribution to any third party (whether by sale, loan, gift, or otherwise); as agent (express or implied) of any third party; for purposes of advertising or promotion; or to create collective or derivative works. Such permission requests, or other inquiries, should be addressed to the Natural Product Inc. (NPI). A photocopy license is available from the NPI for institutional subscribers that need to make multiple copies of single articles for internal study or research purposes.

To Subscribe: Natural Product Communications is a journal published monthly. 2017 subscription price: US\$2,595 (Print, ISSN# 1934-578X); US\$2,595 (Web edition, ISSN# 1555-9475); US\$2,995 (Print + single site online); US\$595 (Personal online). Orders should be addressed to Subscription Department, Natural Product Communications, Natural Product Inc., 7963 Anderson Park Lane, Westerville, Ohio 43081, USA. Subscriptions are renewed on an annual basis. Claims for nonreceipt of issues will be honored if made within three months of publication of the issue. All issues are dispatched by airmail throughout the world, excluding the USA and Canada.

Phytochemical Study and Antioxidant Activity of *Calligonum azel* and *C. comosum*

Soumia Belaabed^a, Nouredine Beghidja^a, Khalfaoui Ayoub^a, Massimiliano D'Ambola^b, Marinella De Leo^{c,*}, Roberta Cotugno^b, Stefania Marzocco^b and Nunziatina De Tommasi^b

^aDepartment of Chemistry, Research Unit, Development of Natural Resources, Bioactive Molecules, Physicochemical and Biological Analysis, University Mentouri Constantine 1, 325 route Ain El Bey, Constantine 21017, Algeria

^bDipartimento di Farmacia, Università di Salerno, Via Giovanni Paolo II 132, 84084 Fisciano (SA), Italy

^cDipartimento di Farmacia, Università di Pisa, via Bonanno 33, 56126 Pisa, Italy

marinella.deleo@unipi.it

Received: October 3rd, 2017; Accepted: October 26th, 2017

One new phenolic compound (**1**) together with nine known derivatives were isolated from the aerial part apolar extracts of *Calligonum azel* Maire and *Calligonum comosum* L'Hér (Polygonaceae). Their structures were established on the basis of 1D and 2D NMR spectroscopy, as well as ESI-MS analysis. The anti-inflammatory and antioxidant potential of pure compounds was evaluated in J774A.1 murine macrophages and Jurkat cells. Among tested molecules, 4-ethoxy-1,2-benzendiol, tamgermanetin, and α,β -diamino-4-hydroxybenzene butanoic acid exerted the more interesting activity.

Keywords: *Calligonum azel*, *Calligonum comosum*, Phenolic compounds, NMR, Antioxidant activity, Anti-inflammatory activity.

The genus *Calligonum*, belonging to the family of Polygonaceae, includes 80 species distributed throughout Northern Africa, Southern Europe and Western Asia. *Calligonum azel* Maire and *Calligonum comosum* L'Hér are shrub-like endemic species of North Africa [1]. *C. azel* is traditionally used to treat peptic ulcer diseases and particularly its leaves are used for tanning of goatskin [2], while *C. comosum* is used for abdominal diseases and toothache in folk medicine and its fruits are eaten by locals [3]. Pharmacological investigations revealed that *C. comosum* showed protective effects against haloperidol-induced oxidative stress [4], anti-osteoporotic, hypoglycemic [5], cytotoxic, antioxidant [6], anthelmintic [7], and antimicrobial activity [8]. Antioxidant and antimicrobial properties are also reported for *C. azel* seeds, leaves, bark and roots [9]. Previous phytochemical studies reported the identification of volatile constituents [1, 9] and polyphenols [2, 6, 9] in both *C. comosum* and *C. azel*.

In the present study, we report the chemical composition and the evaluation of antioxidant and anti-inflammatory activities of *C. azel* and *C. comosum* aerial parts apolar extracts. One new phenolic compound (**1**, Figure 1) was characterized from the ethyl acetate *C. azel* extract by NMR and MS experiments, together with phlorizin [10] and five phenolic compounds identified as protocatechuic acid [11], methyl gallate [11], caffeic acid [11], 5-(*p*-hydroxy-phenyl)-3-hydroxy-pentanoic acid [12], and α,β -diamino-4-hydroxybenzenebutanoic acid [13]. The phytochemical study of chloroformic extract of *C. comosum* led to the isolation of coumaric acid [11], 4-ethoxy-1,2-benzendiol [11], and tamgermanetin [14]. All known compounds were identified by comparison of their spectroscopic data with those reported in the literature.

Compound **1** was obtained as a yellowish solid. HRESIMS spectrum of compound **1** exhibited a molecular deprotonated ion peak $[M-H]^-$ at m/z 191 (calcd. for $C_{11}H_{11}O_3$, 191.0708) in accordance with the molecular formula $C_{11}H_{12}O_3$, and requiring six degrees of unsaturation. The ^{13}C NMR spectrum (Table 1) exhibited 11 signals, which on the basis of NMR data were assigned to one

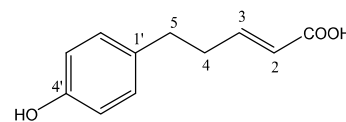


Figure 1: Structure of compound 1.

α,β -unsaturated carboxylic group (δ_C 122.7, 147.7, and 169.9 ppm), one quaternary carbon (δ_C 131.8 ppm), four methines (δ_C 114.7 and 129.0 ppm), and two methylenes (δ_C 34.4 and 33.8 ppm). The 1H NMR data confirmed the presence of an α,β -unsaturated carboxylic group with signals at δ_H 5.81 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-2), 6.94 (1H, dt, $J = 14.6, 6.9$ Hz, H-3) and a *p*-substituted phenol at δ_H 6.73 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-3', H-5') and 7.04 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-2', H-6'). The ^{13}C NMR signals were assigned on the basis of the HSQC spectrum, while HMBC experiment led to locate the groups. The signal at δ_H 6.94 (H-3) correlated with carbon resonances at δ_C 169.9 (C-1), 33.8 (C-5), and δ_C 122.7 (C-2), while the signal at δ_H 7.04 (C-6') correlated with carbon resonances at δ_C 156.0 (C-4'), δ_C 33.8 (C-5), and δ_C 114.7 (C-3') leading the location of one hydroxyl group at C-4' [12]. Thus, compound **1** was identified as 5-(*p*-hydroxy-phenyl)-pent-2-en-2-enoic acid.

Table 1: 1H and ^{13}C NMR data of compound **1** (MeOH-*d*₄, 600 MHz)^a.

1		
Position	δ_H	δ_C
1	-	169.9
2	5.81 d (15.6)	122.7
3	6.94 dt (14.6, 6.9)	147.7
4	2.50 q (7.1)	34.4
5	2.71 t (7.5)	33.8
1'	-	131.8
2'	7.04 d (8.2)	129.0
3'	6.73 d (8.2)	114.7
4'	-	156.0
5'	6.73 d (8.2)	114.7
6'	7.04 d (8.2)	129.0

^a J values, in parenthesis, are reported in Hz; chemical shifts are given in ppm; assignments were confirmed by HSQC and HMBC experiments.

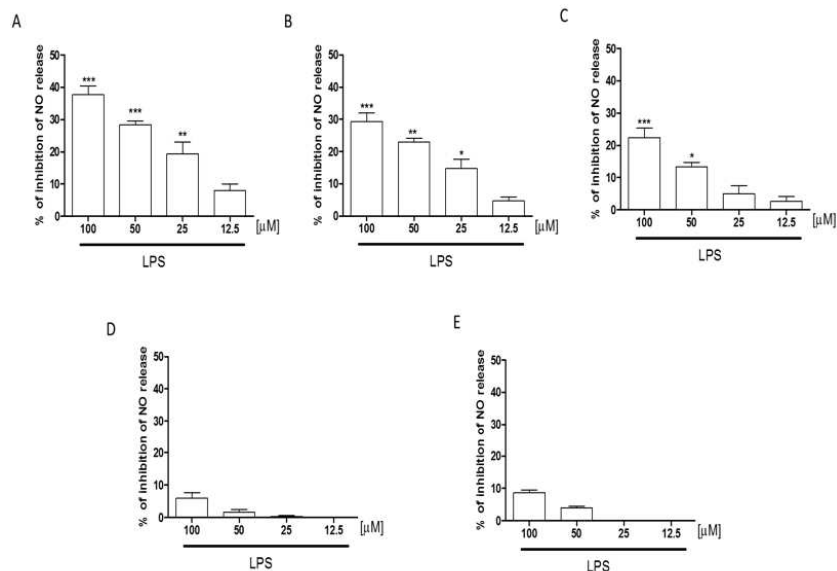


Figure 2: Effect of 4-ethoxy-1,2-benzendiol (A), α,β -diamino-4-hydroxybenzenebutanoic acid (B), tamgermanetin (C), **1** (D), 5-(*p*-hydroxy-phenyl)-3-hydroxy-pentanoic acid (E) (100-12.5 μM) on NO release. Data are expressed as % of inhibition of NO release vs LPS (1 $\mu\text{g/mL}$). ***, ** and * denote $P<0.001$, $P<0.01$ and $P<0.05$ vs LPS.

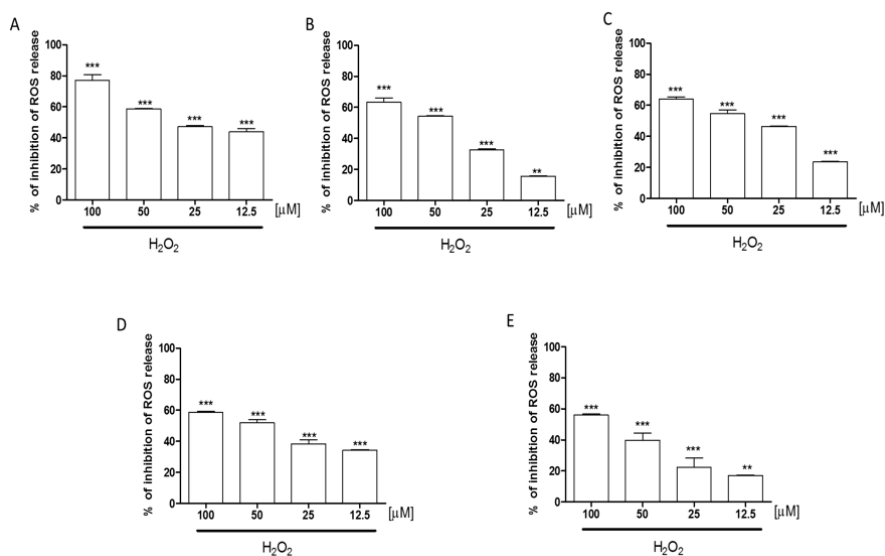


Figure 3: Effect of 4-ethoxy-1,2-benzendiol (A), α,β -diamino-4-hydroxybenzenebutanoic acid (B), tamgermanetin (C), **1** (D), 5-(*p*-hydroxy-phenyl)-3-hydroxy-pentanoic acid (E) (100-12.5 μM) on ROS production. Data are expressed as % of inhibition of ROS release vs H_2O_2 (1 mM). ***, ** denote $P<0.001$, $P<0.01$ vs H_2O_2 .

The most abundant compounds 4-ethoxy-1,2-benzendiol, α,β -diamino-4-hydroxybenzenebutanoic acid, tamgermanetin, 5-(*p*-hydroxy-phenyl)-3-hydroxy-pentanoic acid, and **1** were tested to evaluate their antioxidant and anti-inflammatory activities in J774A.1 and Jurkat cells. First the evaluation of the cellular viability was performed. The cells were treated with the tested compounds (100-12.5 μM) for 24, 48 and 72 h. Our data indicated that for all tested compounds the IC_{50} was higher than 100 μM . 4-ethoxy-1,2-benzendiol, α,β -diamino-4-hydroxybenzenebutanoic acid, tamgermanetin, 5-(*p*-hydroxy-phenyl)-3-hydroxy-pentanoic acid, and **1** (100-12.5 μM), added to J774A.1 macrophages 1 h before and simultaneously to lipopolysaccharide (LPS) for 24 h, inhibited NO release in cellular medium (Figure 2). In particular, 4-ethoxy-1,2-benzendiol and α,β -diamino-4-hydroxybenzenebutanoic acid significantly inhibited NO release in a concentration range of 100-25 μM ($P<0.05$ vs LPS; Figure 2 A, B), tamgermanetin inhibited NO at the two highest concentration tested ($P<0.05$ vs LPS; Figure 2 C) while any significant effect was observed for **1** and 5-(*p*-

hydroxy-phenyl)-3-hydroxy-pentanoic acid (Figure 2 D, E). 4-ethoxy-1,2-benzendiol, α,β -diamino-4-hydroxybenzenebutanoic acid, tamgermanetin, 5-(*p*-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-pentanoic acid, and **1** (100-12.5 μM) were added to H_2O_2 -treated J774A.1 macrophages. In these conditions, all the tested compounds significantly inhibited reactive oxygen species (ROS) release at all assayed concentrations (100-12.5 μM ; $P<0.01$ vs H_2O_2) (Figure 3).

The antioxidant activity was also tested in Jurkat cells. The ability of compounds to reduce the level of peroxides in control and BHP-treated Jurkat cells was measured by cytofluorimetry. Each chemical was tested at 25 μM and 50 μM concentrations, being the latter the dose not cytotoxic. As shown in Figure 4, only **1** and 4-ethoxy-1,2-benzendiol displayed a significant antioxidant potential. 4-ethoxy-1,2-benzendiol was able to reduce the rate of basal peroxides of Jurkat cells and to contract the rate of peroxides induced by *t*-BHT treatment.

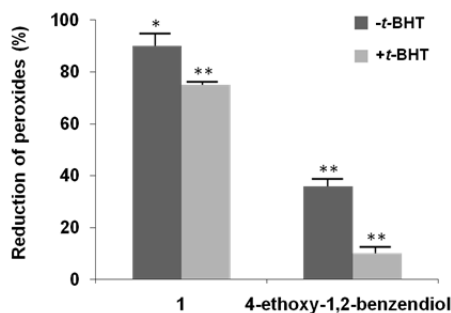


Figure 4: In-cells antioxidant potential of compounds 1 and 4-ethoxy-1,2-benzendiol. Unstimulated (white bars) and BHP-stimulated (black bars) Jurkat cells were incubated with phenolic compounds (50 μ M) or vehicle only. Data shown were obtained using the mean fluorescence values and are the mean values \pm SD of at least three experiments performed in duplicate. P values were always <0.01 .

Experimental

Reagents: Unless stated otherwise, all reagents and compounds were purchased from Sigma Chemicals Company (Milan, Italy).

General experimental procedures: Briefly, NMR experiments were performed on a Bruker DRX-600 spectrometer (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany) [15]. HRESIMS were acquired in negative ion mode on a Q-TOF premier spectrometer equipped with a nanoelectrospray ion source (Waters, Milford, MA, USA). HPLC were conducted on Shimadzu LC-8A series pumping system with Shimadzu RID-10A refractive index detector, C_{18} and C_8 μ -Bondapak column (30 cm \times 7.8 mm, 10 μ m, Waters, Milford, MA, USA) using mixtures of MeOH- H_2O at flow 2.0 mL/min [16].

Plant material: *C. comosum* and *C. azel* were collected in Bechar province, South West of Algeria, in April 2011. The plants were identified by Prof. Mouhammed Kaabache of the University of Setif, Algeria. Vouchers specimen N $^{\circ}$ 121CA (*C. azel*) and N $^{\circ}$ 122CC (*C. comosum*) have been deposited in the Herbarium of the Chemistry Department at the University of Constantine, Algeria.

Extraction and isolation: Both dried and powdered aerial parts of *C. azel* and *C. comosum* were extracted with MeOH- H_2O (4:1) to give 72.5 g and 82.6 g of crude hydroalcoholic extracts, respectively. The crude extracts of *C. azel* and *C. comosum* were dissolved in water and afterwards partitioned with petroleum ether (0.40 g, 3.1 g), chloroform (0.50 g, 6.0 g), ethyl acetate (14.0 g, 18.2 g), and *n*-butanol (80.0 g, 52.3 g), respectively.

A part (2.6 g) of the *C. azel* ethyl acetate extract was separated by Sephadex LH-20 with MeOH as eluent, at flow rate 1 mL/min, to give 9 fractions (A-I). Fraction E (156.2 mg) was purified by RP-HPLC with MeOH- H_2O (7:13), to yield pure protocatechuic acid (0.8 mg, t_R 6 min), methyl gallate (0.9 mg, t_R 8.3 min), caffeic acid (0.8 mg, t_R 10.3 min), phlorizin (0.5 mg, t_R 61.1 min). Fraction D (257 mg) was subjected to RP-HPLC using MeOH- H_2O (7:13), to yield pure 5-(*p*-hydroxy-phenyl)-3-hydroxy-pentanoic acid (1.5 mg, t_R 12 min), 5-(*p*-hydroxy-phenyl)-pent-2-en-oic acid (1) (1.4 mg, t_R 50 min) and α,β -diamino-4-hydroxybenzenebutanoic acid (1.6 mg, t_R 7.1 min).

The chloroformic extract of *C. comosum* was chromatographed over a silica gel column using increasing concentrations of $CHCl_3$ /MeOH (between 1% and 100%) to give 10 fractions (A-J). Fraction D (83 mg) was purified by RP-HPLC with MeOH- H_2O (31:19) to yield pure coumaric acid (0.5 mg, t_R 13 min). Fraction I (230 mg) was purified by RP-HPLC with MeOH- H_2O (7:13) to yield pure 4-ethoxy-1,2-benzendiol (1.8 mg, t_R 14 min). Fraction J (214.2 mg)

was purified by RP-HPLC with MeOH- H_2O (2:3), to yield pure tangermetin (1.9 mg, t_R 55.6 min).

5-(*p*-hydroxy-phenyl)-pent-2-en-oic acid (1)

Yellowish solid.

1H and ^{13}C NMR: Table 1.

ESI(-)MS: m/z 191 [M- H] $^-$.

HRESIMS: m/z 191.0711 [M- H] $^-$ (calculated for $C_{11}H_{11}O_3$, 191.0708).

Cell cultures: J774A.1 (murine monocyte macrophage) and Jurkat (T-cell leukemia) cell lines were obtained from the American Type Cell Culture (ATCC) (Rockville, MD, USA). Cells were maintained in DMEM (J774A.1) or RPMI 1640 (Jurkat), supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 25 mM (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 2 mM glutamine, 100 u/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin at 37 $^{\circ}C$ in a 5% CO_2 atmosphere. Macrophages J774A.1 were plated in 96 well plates (5.0×10^4) for 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-phenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay or in 24 well plates (3.0×10^5) for NO and ROS production and allowed to adhere for 4 h. Thereafter, the medium was replaced with fresh medium pure or containing serial dilutions of tested compounds (100-12.5 μ M) for 24, 48 and 72 h for MTT assay, or for 1 h and then co-exposed to a final concentration of LPS (1 μ g/mL) for further 24 h for NO release, or for 1 h and then co-exposed to a final concentration of H_2O_2 (1 mM) for 1 h for ROS detection.

Anti-proliferative assay: J774A.1 macrophages (5×10^4 /well) were placed on 96-well plates and allowed to adhere for 4 h. Thereafter, the medium was replaced with fresh medium alone or containing serial dilutions of the compounds (100-12.5 μ M) and cells were incubated for 24, 48 and 72 h. Cell viability was assessed through MTT assay as previously reported [17]. Briefly, 25 μ L of MTT (5 mg/mL) was added and the cells were incubated for an additional 3 h. Thereafter, cells were lysed and the dark blue crystals solubilized with 100 μ L of a solution containing 50% (mL/L) *N,N*-dimethylformamide, 20% (mL/L) sodium dodecyl sulfate (SDS) with an adjusted pH of 4.5. The optical density (OD) of each well was measured with a microplate spectrophotometer Titertek (Dasit, Cornaredo, Milan, Italy), equipped with a 620 nm filter. Cells viability in response to treatment was calculated as: % dead cells = $100 - (OD \text{ treated}/OD \text{ control}) \times 100$.

Measurement of NO release: NO generation was measured as nitrite (NO_2^-), index of NO released by cells, in the culture medium of J774A.1 macrophages 24 h after LPS stimulation by Griess reaction, as previously reported [18]. Briefly, 100 μ L of cell culture medium were mixed with 100 μ L of Griess reagent, equal volumes of 1% (w:v) sulphanilamide in 5% (v:v) phosphoric acid and 0.1% (w:v) naphthylethylenediamine-hydrogen chloride and incubated at room temperature for 10 min, and then the absorbance was measured at 550 nm in a microplate reader Titertek. The amount of NO_2^- in the measured samples is expressed as μ M concentration, which was calculated via a sodium NO_2^- standard curve.

Measurement of intracellular ROS: The evaluation of intracellular peroxides concentration was performed according to Rothe et al. with some modifications [19]. In details, Jurkat cells were collected by centrifugation and suspended in RPMI containing 5% FBS at a density of 5×10^5 cells/mL. FBS concentration was lowered to 2% to increase the uptake rate of compounds and reagents in the short-incubation time (1 h) chosen for the assay. Cell suspensions were incubated with increasing concentrations of compounds or vehicle only at 37 $^{\circ}C$. For each sample duplicate test tubes were prepared.

After 30 min of incubation, BHT (550 mM final concentration) or an equal volume of vehicle were added. This allowed us to monitor the effect of compound **1** on BHT-induced peroxide elevation or the basal levels of peroxides, respectively. In the last 15 min of incubation cells were loaded with 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), 8 mM final concentration. Test tubes were gently mixed several times along the incubation period (1 h). Cells suspension were then washed, resuspended in an equal volume of medium and 10.000 events were analyzed for DCF-fluorescence by cytofluorimetry (BD FACSCalibur™ instrument, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). DCF green fluorescence was analyzed in the FL1 channel (lexc488 nm; lem 1535 nm). Before the

cytofluorimetric analysis an aliquot of each sample was withdrawn to evaluate cell viability by Tripan-blue exclusion test.

Data analysis: Data are reported as mean \pm standard error mean (s.e.m.) values of at least three independent experiments. Statistical analysis was performed by analysis of variance test, and multiple comparisons were made by Bonferroni's test by using GraphPad Prism software. P-values smaller than 0.05 were considered as significant.

Acknowledgments - The authors would like to thank Dr. Nicola Malafrente for his contribution to the work.

References

- [1] Dhief A, Zouari S, Abdellaoui R, Aschi-Smiti S, Neffati M. (2011) Comparative study of chemical composition of the essential oils from three *Calligonum* species growing-wild in Tunisian desert. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, **14**, 11-22.
- [2] Bannour M, Lachenmeier DW, Straub I, Kohl-Himmelseher M, Khadhri A, Aschi-Smiti S, Belgacem H. (2016) Evaluation of *Calligonum azel* Maire, a North African desert plant, for its nutritional potential as a sustainable food and feed. *Food Research International*, **89**, 558-564.
- [3] Jongbloed M, Feulner G, Böer B, Western AR. (2003). The comprehensive guide to the wild flowers of the United Arab Emirates. Environmental Research and Wildlife Development Agency, Abu Dhabi.
- [4] Abdel-Sattar EA, Mounceir SM, Asaad GF, Abdallah HM. (2014). Protective effect of *Calligonum comosum* on haloperidol induced oxidative stress in rat. *Toxicology and Industrial Health*, **30**,147-153.
- [5] Sabry L, Sattar MA, Amin HA, Sattar EA. (2013) Antiosteoporotic effect of some herbal extracts versus alendronate on an animal model of osteoporosis. *Life Science Journal*, **10**, 177-187.
- [6] Badria FA, Ameen M, Akl MR. (2007) Evaluation of cytotoxic compounds from *Calligonum comosum* L. growing in Egypt. *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, **62**, 656-660.
- [7] Degheidy NS, Sharaf EM, Fathi SM. (2013) Field evaluation of anthelmintic efficacy of *Calligonum comosum* against fasciolosis in sheep at Taif, KSA. *Global Veterinaria*, **11**, 377-384.
- [8] Alkhalifah DHM. (2013) *In-vitro* antibacterial activity of ethanol extract of *Calligonum comosum* plant against four human pathogens in Saudi Arabia. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, **3**, 170-175.
- [9] Bannour M, Aouadhi C, Khalifaoui H, Aschi-Smiti S, Khadhri A. (2016) Barks essential oil, secondary metabolites and biological activities of four organs of Tunisian *Calligonum azel* Maire. *Chemistry & Biodiversity*, **13**, 1527-1536.
- [10] Nie RL, Takashi T, Zhou J, Tanaka O. (1982) Phlorizin and trilobatin, weet dihydrochalcone-glucosides from leaves of *Lithocarpus litseifolius* (Hance) Rehd. (Fagaceae). *Agricultural and Biological Chemistry*, **46**, 1933-1934.
- [11] Jayaprakasha GK, Ohnishi-Kameyama M, Ono H, Yoshida M, Jaganmohan RL. (2006) Phenolic constituents in the fruits of *Cinnamomum zeylanicum* and their antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 1672-1679.
- [12] Ayer WA, Singer PP. (1980) Phenolic metabolites of the bird's nest fungus *Nidula niveo-tomentosa*. *Phytochemistry*, **19**, 2717-2721.
- [13] Kidwai MM, Khan NH, Ali M. (1979) A novel synthesis of 3-substituted pyruvic acids a new route to α,β -diamino acids. *Synthetic Communications*, **9**, 363-376.
- [14] Nawwar MA, Swilam NF, Hashim AN, Al-Abd AM, Abdel-Naim AB, Lindequist U. (2013) Cytotoxic isoferulic acilamide from *Myricaria germanica* (Tamaricaceae). *Plant Signaling & Behavior*, **8**, 33-40.
- [15] Jimenez-Usuga N del S, Malafrente N, Cotugno R, De Leo M, Osorio E, De Tommasi N. (2016) New sesquiterpene lactones from *Ambrosia cumanensis* Kunth. *Fitoterapia*, **113**, 170-174.
- [16] Jimenez Usuga N del S, Malafrente N, Durango EJO, Braca A, De Tommasi N. (2016) Phytochemical investigation of *Pseudelephantopus spiralis* (Less.) Cronquist. *Phytochemistry Letters*, **15**, 256-259.
- [17] Dal Piaz F, Vera Saltos MB, Franceschelli S, Forte G, Marzocco S, Tuccinardi T, Poli G, Nejad Ebrahimi S, Hamburger M, De Tommasi N, Braca A. (2016) Drug Affinity Responsive Target Stability (DARTS) identifies laurifolioside as a new clathrin heavy chain modulator. *Journal of Natural Products*, **79**, 2681-2692.
- [18] Marzocco S, Adesso S, Alilou M, Stuppner H, Schwaiger S. (2017) Anti-inflammatory and anti-oxidant potential of the root extract and constituents of *Doronicum austriacum*. *Molecules*, **22**, pii: E1003.
- [19] Rothe G, Valet G. (1996) Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein. *Journal of Leukocyte Biology*, **47**, 440-448.

A New Cytotoxic Polyacetylenic Alcohol from a Sponge <i>Callyspongia</i> sp. Walter Balansa, Agus Trianto, Nicole J. de Voogd and Junichi Tanaka	1909
Analysis of the Configuration of an Isolated Double Bond in Some Lipids by Selective Homonuclear Decoupling Elena A. Santalova and Vladimir A. Denisenko	1913
Structural Analysis of Two Bioactive Components of an Edible Mushroom, <i>Termitomyces microcarpus</i> Sunil Kumar Bhanja and Dilip Rout	1917
Exploring Co-fermentation of Glucose and Galactose using <i>Clostridium acetobutylicum</i> and <i>Clostridium beijerinckii</i> for Biofuels Mi Tang, Jiawen Liu, Zhuoliang Ye, Shumin Zhuo, Weiyang Zhang, Xiao Li and Dongyang Chen	1921
Ethanol Extract of <i>Rubus coreanus</i> Fruits Inhibits Bone Marrow-Derived Osteoclast Differentiation and Lipopolysaccharide-Induced Bone Loss Tae-Ho Kim, Chae Gyeong Jeong, Hyeong-U Son, Man-Il Huh, Shin-Yoon Kim, Hong Kyun Kim and Sang-Han Lee	1925
Volatile Chemical Constituents of the Chilean Bryophytes Jorge Cuvertino-Santoni, Yoshinori Asakawa, Mohammed Nour and Gloria Montenegro	1929
Volatile Compounds in the Aerial Parts of <i>Achillea collina</i> Collected in the Urban Area of Vienna (Austria) Remigius Chizzola	1933
Effect of Harvest and Drying on Composition of Volatile Profile of Elderflowers (<i>Sambucus nigra</i>) from Wild Tomáš Bajer, Petra Bajerová and Karel Ventura	1937
Chemical Composition of the Essential oil of <i>Syzygium kanarensis</i>: An Endemic and Rediscovered Species from the Western Ghats, India Rajesh K. Joshi, H. Sooryaprakash Shenoy and Ramakrishna Marati	1943
Chemical Composition of Essential Oil, Antioxidant, Antidiabetic, Anti-obesity, and Neuroprotective Properties of <i>Prangos gaubae</i> Mir Babak Bahadori, Gokhan Zengin, Shahram Bahadori, Filippo Maggi and Leila Dinparast	1945
Exploring the Effect of the Composition of Three Different Oregano Essential Oils on the Growth of Multidrug-Resistant Cystic Fibrosis <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Strains Valentina Maggini, Giovanna Pesavento, Isabel Maida, Antonella Lo Nostro, Carmela Calónico, Chiara Sassoli, Elena Perrin, Marco Fondi, Alessio Mengoni, Carolina Chiellini, Alfredo Vannacci, Eugenia Gallo, Luigi Gori, Patrizia Bogani, Anna Rita Bilia, Silvia Campana, Novella Ravenni, Daniela Dolce, Fabio Firenzuoli and Renato Fani	1949

Accounts/Reviews

Antifungal Activity Based Studies of Amaryllidaceae Plant Extracts Jerald J. Nair and Johannes van Staden	1953
Herbal Therapy in Pregnancy - What to Expect When You Expect? Artur L. Belica, Nenad B. Četković, Nataša B. Milić and Nataša P. Milošević	1957

Natural Product Communications

2017

Volume 12, Number 12

Contents

<u>Original Paper</u>	<u>Page</u>
Bioactive Secondary Metabolites from the Aerial Parts of <i>Buddleja macrostachya</i> Truong Thi Thu Hien, Tran Hong Quang, Nguyen Xuan Nhiem, Bui Huu Tai, Pham Hai Yen, Duong Thi Hai Yen, Nguyen Thi Thanh Ngan, Youn-Chul Kim, Hyuncheol Oh, Chau Van Minh and Phan Van Kiem	1821
A New Picrotoxane Sesquiterpene Glucoside from <i>Dendrobium nobile</i> Nguyen Thi Viet Thanh, Giang Thi Phuong Ly, Le Huyen Tram, Bui Huu Tai, Vu Quoc Huy and Phan Van Kiem	1825
Antioxidant Sesquiterpenes from <i>Penicillium citreonigrum</i> Wei-Hua Yuan, Ying Zhang, Peng Zhang and Ru-Ru Ding	1827
Sessilifol A and B, Urease Inhibitory Pimarane-type Diterpenes from <i>Hymenocrater sessilifolius</i> Sadia Khan, Muhammad Shaiq Ali, Zeeshan Ahmed, Mehreen Lateef, Sammer Yousuf, Viqar Uddin Ahmad, Itrat Fatima and Rasool Bakhsh Tareen	1831
Rumphellolide J, an Ester of 4β,8β-Epoxyxycaryophyllan-5-ol and Rumphellaic acid A, from the Gorgonian <i>Rumphella antipathies</i> Chi-Cheng Lin, Hsu-Ming Chung, Yin-Di Su, Bo-Rong Peng, Wei-Hsien Wang, Tsong-Long Hwang, Yang-Chang Wu and Ping-Jyun Sung	1835
Determination of Oleanolic and Ursolic Acids in <i>Sambuci flos</i> Using HPLC with a New Reversed-phase Column Packed with Naphthalene Bounded Silica Michał Gleński and Maciej Włodarczyk	1839
Structural Analogues of Lanosterol from Marine Organisms of the Class <i>Asteroidea</i> as Potential Inhibitors of Human and <i>Candida albicans</i> Lanosterol 14α-demethylases Leonid A. Kaluzhskiy, Tatsiana V. Shkel, Natalia V. Ivanchina, Alla A. Kicha, Irina P. Grabovec, Andrei A. Gilep, Natallia V. Strushkevich, Mikhail A. Chernovetsky, Alexei E. Medvedev, Sergey A. Usanov and Alexis S. Ivanov	1843
Comparison of Anti-Inflammatory Activities of Structurally Similar Triterpenoids Isolated from Bitter Melon Hsueh-Ling Cheng, Ming-Hao Yang, Rista Anggriani and Chi-I Chang	1847
Xenocyloin Derivatives from Liquid Cultures of <i>Xenorhabdus bovienii</i> SN52 Feng Yu, Xiaomei Tian, Ying Sun, Yuhui Bi, Zhiguo Yu and Li Qin	1851
Cyclopiperettine, A New Amide from <i>Piper nigrum</i> Jie Ren, Ting Zeng, Zulfiqar Ali, Mei Wang, Jiyeong Bae, Amar G. Chittiboyina, Wei Wang, Shunxiang Li and Ikhlas A. Khan	1855
Phytochemical Profile and Antibacterial Activity of <i>Retama raetam</i> and <i>R. sphaerocarpa</i> cladodes from Algeria Nawal Hammouche-Mokrane, Antonio J. León-González, Inmaculada Navarro, Farida Boulila, Said Benallaoua and Carmen Martín-Cordero	1857
Pectolarigenin Suppresses Pancreatic Cancer Cell Growth by Inhibiting STAT3 Signaling Bin Zhou, Zhong Hong, Hailun Zheng, Min Chen, Lingyi Shi, Chengguang Zhao and Haixin Qian	1861
LC-MS/MS Analysis of Flavonoid Compounds from <i>Zanthoxylum zanthoxyloides</i> Extracts and Their Antioxidant Activities Yoro Tine, Yin Yang, Franck Renucci, Jean Costa, Alassane Wélé and Julien Paolini	1865
Microwave-assisted Acid Hydrolysis to Produce Vitexin from <i>Crataegus pinnatifida</i> Leaves and its Angiogenic Activity Meng Luo, Xin Ruan, Jiao-Yang Hu, Xuan Yang, Wen-Miao Xing, Yu-Jie Fu and Fan-Song Mu	1869
An Efficient Synthesis of Angelmarin and its Analogs Su-You Liu, Na Xu, Li-Jun Liu, Ying-Xiong Wang and Da-You Ma	1873
Three New Bibenzyls from the Twigs of <i>Smilax longifolia</i> Yuka Imura, Kenichi Harada, Miwa Kubo and Yoshiyasu Fukuyama	1877
High Anticancer Properties of Defatted <i>Jatropha Curcus</i> Seed Residue and its Active Compound, Isoamericanol A Ayako Katagi, Li Sui, Kazuyo Kamitori, Toshisada Suzuki, Takeshi Katayama, Akram Hossain, Chisato Noguchi, Youyi Dong, Fuminori Yamaguchi and Masaaki Tokuda	1881
Antioxidant Activity of 1'-Hydroxyethylnaphthazarins and their Derivatives Natalia K. Utkina and Natalia D. Pokhilo	1885
Antifungal Activity of the Extract and the Active Substances of Endophytic <i>Nigrospora</i> sp. from the Traditional Chinese Medicinal Plant <i>Stephania kwangsiensis</i> Haiyu Luo, Qiuyan Zhou, Yecheng Deng, Zhiyong Deng, Zhen Qing and Wenbin Sun	1889
A Rapid Determination and Quantification of Three Biologically Active Polyisoprenylated Benzophenones using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (MRM) Method in Five <i>Garcinia</i> species from Cameroon Bernadette Messi Biloa, Raimana Ho, Guillaume Marti, Alain Meli Lannang, Jean-Luc Wolfender and Kurt Hostettmann	1893
In vitro Anthelmintic Activity of Two Aloe-derived Active Principles against Sheep Gastrointestinal Nematodes Gianluca Fichi, Matteo Mattellini, Elisa Meloni, Guido Flamini and Stefania Perrucci	1897
Phytochemical Study and Antioxidant Activity of <i>Calligonum azel</i> and <i>C. comosum</i> Soumia Belaabed, Noureddine Beghidja, Khalfauoi Ayoub, Massimiliano D'Ambola, Marinella De Leo, Roberta Cotugno, Stefania Marzocco and Nunziatina De Tommasi	1901
Beneficial Effects of Curcumin on the Wound-healing Process after Tooth Extraction Aleksandar Mitic, Kosta Todorovic, Nenad Stojiljkovic, Nikola Stojanovic, Sonja Ilic, Ana Todorovic and Slavica Stojnev	1905

Continued inside backcover