

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

UNIVERSITE DES FRERES MENTOURI
CONSTANTINE 1

FACULTE DES SCIENCES EXACTES DEPARTEMENT DE CHIMIE

THESE: Présentée en vue de l'obtention du diplôme du

Doctorat en sciences

N° ordre :11/DS/2019
N° serie :02/Ch/2019

Option Phytochimie

INTITULÉ:

ETUDE PHYTOCHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DE DEUX
ESPECES DE PLANTES DE LA FLORE DE L'EST
ALGERIEN :*Calamintha baborensis* Batt et *Cistus villosus*

Par
M^{me} **SERAOU ROFIA**
Epouse **KHAZNADAR**

Devant la commission de jury :

Soutenu le :17/01/2019

Pr. Akkal Salah	(U. des frères Mentouri-Constantine I)	Président
Dr. Benkiniouar Rachid	(U. des frères Mentouri-Constantine I)	Encadreur
Dr. Touil Ahmed	(U. des frères Mentouri-Constantine I)	Examineur
Dr. Zaidi Farouk	(U. Ferhat Abbas-Setif)	Examineur
Pr. Zellagui Ammar	(U. Larbi Ben M'Hidi-O.El Bouaghi)	Examineur
Pr. Dendougui Houcine	(U. Kasdi Merbah-Ouargla)	Examineur

2018-2019

REMERCIEMENTS

Ce travail de recherche a été effectué au Laboratoire de phytochimie et de synthèse organique PHYSYNOR de l'université des frères Mentouri Constantine 1, sous la direction de monsieur BENKINIOUAR Rachid Maître de conférences au département de chimie, faculté des sciences exactes.

Je profite de l'occasion qui m'est ainsi donnée pour exprimer à Monsieur BENKINIOUAR ma respectueuse gratitude. J'ai été très sensible à sa grande disponibilité et à la totale confiance qu'il m'a accordée. Je le remercie sincèrement, qu'il trouve ici, l'expression de ma profonde reconnaissance tant pour son dévouement exemplaire et son encadrement sans faille que pour ses recommandations et avis judicieux durant nos séances de travail. Sa grande expérience, ses précieux conseils et ses encouragements ont permis le bon déroulement et l'aboutissement de ce travail de thèse. J'ai trouvé en lui un directeur ouvert qui m'a guidé dans mon travail tout au long de ces années. Je le remercie de s'être soucié de mon devenir.

Je tiens à exprimer ma très grande considération et ma vive reconnaissance à Monsieur AKKAL Salah, professeur au département de chimie, faculté des sciences exactes directeur du laboratoire de phytochimie et analyses physico-chimiques et biologiques pour l'aide précieuse qu'il m'a donnée et qui fut aussi bien matérielle que morale. Je le remercie pour l'importance qu'il a accordée à mon travail qui n'est autre qu'une marque d'intérêt ainsi que pour sa disponibilité.

Je témoigne de mon obligeance et de ma reconnaissance au professeur GASPAR Ros Berruezo et au Dr GEMA NIETO Martinez membres de l'équipe de recherche au sein du laboratoire de technologie alimentaire et de nutrition à la faculté des sciences vétérinaires de Murcia (Espagne) pour m'avoir très chaleureusement accueilli dans son laboratoire ainsi que son équipe formidable (Tony , Ruben, Thereza, Mamen) et pour la facilité dont j'ai bénéficié durant mon séjour et ceci concerne aussi bien l'accessibilité aux appareils qu'aux produits. Je remercie fortement l'équipe de techniciens qui m'ont aidé à la réalisation des analyses GC-MS et LC-MS en Espagne et qui ont été présents à chaque fois que je les sollicitais.

J'exprime également mon profond respect et mes grands remerciements au professeur Jaime Bermejo ainsi qu'à FRANCIS LEON FRANCESCO et IGNIACIO BROUARD de l'université La Laguna de Tenerife (iles Canaries) pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire

et l'aide qu'il m'ont fournie ainsi que le temps qu'ils m'ont consacré tout au long de mon séjour et pour avoir mis en ma disposition les appareils d'analyses spectrales RMN et Masse.

J'adresse mes sincères remerciements au professeur DENDOUGUI Houcine de l'université d'Ouargla pour son amabilité d'avoir bien accepté d'être un membre dans mon jury.

Je remercie également le professeur ZELLAGUI Ammar de l'université d'Oum El Bouaghi d'avoir bien accepté de juger la partie biologique de mon travail.

Je remercie le professeur ZAIDI Farouk de l'université Ferhat Abbas de Sétif d'avoir bien voulu être un examinateur dans mon jury de thèse.

Sans oublier bien sur de remercier le docteur Ahmed TOUIL de l'université des frères Mentouri de Constantine pour l'aide précieuse qu'il m'a offert aussi bien matérielle en me fournissant tout les moyens (produits et matériels) que morale.

Une pensée amicale à mes collègues enseignant (e)s du département de chimie, de l'université des frères Mentouri Constantine 1, pour leurs collaborations et soutien.

Un grand merci à AMIRA Labed pour son aide précieuse à la réalisation de ce travail ainsi que pour ses encouragements qui m'ont été très bénéfiques et à toutes les personnes qui m'ont soutenu de près ou de loin au cours de la réalisation de ce travail.

Dédicace

A Allah le tout puissant , l'unique, le
miséricordieux

A mes chers défunts parents

A mon cher défunt beau père

A mon époux

A mes chers enfants

A ma sœur

A tous ceux que j'aime

Je dédie ce modeste travail

TABLE DES MATIÈRES

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

CHAPITRE I : GENERALITES

I-A- Aspects chimiques des flavonoïdes	
I-A-1-Introduction.....	05
I-A-2-biosynthèse des flavonoïdes.....	07
I-A-3-propriétés des flavonoïdes.....	10
I-A-4-Intérêt pour la santé.....	11
I-A-5--relation structure-activité.....	11
I-B -Les huiles essentielles.....	14
I-B-1-Définition.....	14
I-B-2-Répartition.....	14
I-B-3-Origine dans les végétaux	15
I-B-4-les systèmes sécréteurs.....	16
I-B-5-Rôle des huiles essentielles	18
I-B-6-Composition chimique	19
I-B-7-Biosynthèse des terpènes.....	19
I-B-8-Méthodes d'extraction	24
I-B-8-a-Introduction.....	24
I-B-8-b-hydrodistillation	25
I-B-8-c-Entrainement à la vapeur.....	26
I-B-8-d-Hydrodiffusion.....	27
I-B-8-e-Extraction par des fluides supercritiques	27
I-B-8-f-Extraction aux micro-ondes.....	29
I-C- L'Activité anti-oxydante.....	29
I-C-1-Généralités sur les antioxydants.....	29
I-C-2-Méthodes de détermination de l'activité antioxydante	32
I-C-2-a-Par le DPPH	33

I-C-2-b-Par l'ABTS.....	33
I-C-2-c-Par le Frap	35
I-C-2-d-Par l'ORAC.....	36
Références	37

Chapitre II : Etudes antérieures sur les deux genres étudiés

II 1- Etude bibliographique sur le genre Cistus	48
II-1-1 Introduction.....	48
II-1-2-Classification	48
II-1-3-Utilisation traditionnelle.....	49
II-1-4-Activité biologique	49
II-1-5-Etude botanique	50
II-1-6-Etude chimique.....	53
II-1-6-1-Diterpènes isolés du genre cistus	54
II-1-6-2-Flavonoides isolés du genre Cistus	58
II 2 Etudes bibliographiques du genre Calamintha.....	62
II--2-1-Présentation de la famille des labiées.....	62
II-2-1-1-Introduction	62
II-2-1-2-Caractéristiques botaniques.....	63
II-2-1-3-Classification.....	65
II-2-1-4-Principaux métabolites secondaires dans la famille.....	67
II-2-1-5-Utilisations traditionnelles des Lamiacées.....	70
II-2-1-6Travaux antérieurs sur le genre Calamintha.....	72
Références	75

Chapitre III. Méthodes de séparation et d'analyse

III-Mode d'obtention des produits	84
III-1-Les extractions	84
III-2-Les séparations.....	84
III-2-1-Chromatographie sur couches minces.....	85

- CCM à répétitions	86
- CCM à multi solvants	86
III-2-2-Chromatographie sur colonne ouverte	87
- Polyamide	87
- Silice.....	87
- Sephadex	88
III-2-3-Chromatographie sur papier	88
III-2-4-Filtration sur gel	89
III- 2-5- Réactifs de révélation chimiques	89
III-2-6-Fluorescence sous lumière de Wood.....	89
III-3 Méthodes d'analyse.....	90
III-3-1-Règles de la spectroscopie UV.....	90
III-3-2-Règles de la spectroscopie de Masse	92
- définition	92
- Composition.....	92
III-3-2-1- HPLC couplée à la masse	93
-définition.....	93
-performances.....	93
III-3-2-2-Spectroscopie de masse tandem	93
-définition.....	93
-composition.....	94
-performances.....	94
-les applications.....	95
III-3-2-3-Analyses des polyphénols par les techniques SM avec différents couplages	95
III-3-2-4- -Utilisation de ces techniques dans l'analyse des flavonoïdes	98
III-3-2-5-conclusion	101
III-4-ionisation par electrospray.....	102
III-5-APCI	102

Références	104
------------------	-----

Chapitre IV : Protocole expérimental , Résultats et discussions

Partie phytochimique

A -protocole expérimental.....	107
Pour le genre <i>cistus villosus</i>	107
A-1-1-Récolte du matériel végétal	107
A-1-2-Macération et extraction	107
B- séparation et discussion des résultats	110
B-1- a-séparation de la fraction acétate d'éthyle	110
B-1-b-Séparation des produits de la fraction VI	112
-Discussion des résultats spectroscopiques.....	112
B-1-c-Séparation de la fraction VIII	120
-Discussion des résultats	121
B-1-d-Séparation et discussion des résultats spectroscopiques des fractions XI-2, XI-3,XI-4	130
B-2- Chromatographie en phase gazeuse GC/MS	137
B-2-a- Identification des composés.....	138
B-2-b- Discussions des résultats de la chromatographie GC/MS.....	143
Pour le genre <i>Calamintha Baborensis</i>	144
A-2-1-Récolte du matériel végétal	144
A-2-2-Macération, extraction et séparation	144
A-2-3-Extraction de l'huile essentielle	146
A-2-4-Analyse des huiles essentielles et des extraits apolaires	147
a-Chromatographie en phase gazeuse.....	147
b-Identification des composés.....	147
B-2-Discussion des résultats	157
B -2 - a-Discussions des résultats de la chromatographie gazeuse GC/MS.....	157
B-2-b- Discussion des résultats de la LC/MS/MS	161

Identification des produits B1 , B2,B3.....	162
Identification des produits D1,D2,D3,.....	166

Partie biologique

A-protocole expérimental.....	169
A-1- Dosage des polyphénols totaux des deux plantes	169
A-2 activité antioxydante	171
a-L'activité antiradicalaire DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl).....	172
b-L'activité antiradicalaire par le test ABTS	172
c-L'activité antiradicalaire par le test FRAP	173
d-L'activité antiradicalaire par le test ORAC	173
B-Résultats et discussions	175
B-1- <i>Calamintha Baborensis</i>	176
B-2- <i>Cistus villosus</i>	177
A-3-Etude microbiologique	178
A3-1 <i>cistus villosus</i>	178
A-3-1-1-activité antimicrobienne.....	179
A-3-1-2-évaluation du test	179
A-3-2- <i>Calamintha baborensis Batt</i>	180
A-3-2-1-Dosage de l'activité antibactérienne	180
A-3-2-2-Evaluation de l'activité antibactérienne	181
Références	185
CONCLUSION	192
Résumé	

Liste des tableaux :

No	Titre	Page
1	Liste des enzymes conduisant aux différentes classes de flavonoïdes	8
2	Classification de la famille des lamiacées	67
3	Répartition de ces structures dans quelques espèces des Lamiacées.	70
4	Fluorescence des flavonoïdes sous lumière de Wood	90
5	Relation structure-R _f	92
6	Domaines d'absorption des flavonoïdes sous UV-Visible (Méthanol)	92
7	Classification des polyphénols	97
8	Structure des différents flavonoïdes aglycones étudiés	99
9	Fragment ESI-MS/MS des flavones 1-6	100
10	Fragment ESI-MS/MS des flavones 7-11	101
11	Fragment ESI-MS/MS des flavones 12-15	101
12	Fractionnement sur colonne de gel de silice de la phase acoet.	113
13	Fractions récoltées	114
14	Déplacements chimiques des protons et carbones du composé VI-3	116
15	Purification du composé VIII-3	122
16	Résultats du ¹³ C du composé VIII-3	127
17	Sous fractions de XI	132
18a	Les constituants majoritaires de l'extrait hexanoïque de la plante <i>Cistus villosus</i>	142
18b	Les constituants majoritaires de l'extrait chloroforme de la plante <i>Cistus villosus</i>	142
19	Structure des constituants majoritaires des extraits apolaires de <i>Cistus villosus</i>	144
20	Identification des constituants de l'huile essentielle de <i>C. Baborensis</i>	152
21	Composition de l'extrait hexanoïque de <i>Calamintha baborensis</i> Batt.:	153
22	Composition de l'extrait chloroformique de <i>Calamintha baborensis</i> Batt :	154
23	Structure des composés majoritaires constituant l'huile essentielle et les extraits apolaires de <i>Calamintha baborensis</i> :	156
24	Le tableau de l'absorbance en fonction des concentrations en mg / l d'acide gallique.	171
25	La teneur en composés phénoliques totaux des deux plantes	172

26	Différents tests antiradicalaires effectués sur <i>Calamintha baborensis</i>	176
27	Différents tests antioxydants effectués sur les extraits polaires de <i>Cistus villosus</i>	178
28	Effet inhibiteur de l'extrait <i>n</i> butanolique de <i>Cistus villosus</i>	180
29	Le %d'inhibition suivant les valeurs de diamètre (mm) et de CMI des extraits de la plante <i>Calamintha baborensisbatt</i>	183

Liste des figures :

No	Titre	Page
1	L'épiderme supérieur de l' <i>Origan vulgare</i>	15
2	Glandes sécrétrices	16
3	Cavités secretrices de l'espèce <i>Eucalyptus citriodora</i>	17
4	Localisation des structures sécrétrices (canal sécréteur) dans la graine de carvi	18
5	Montage d'hydro distillation	26
6	Entraînement à la vapeur d'eau ascendante et descendante	27
7	Installation d'extraction au CO ₂ supercritique de laboratoire	28
8	Appareil d'extraction par micro-ondes	29
9	Photo de <i>Cistus creticus</i>	49
10	Carte de répartition géographique de la famille des Lamiacées (en rouge)	64
11	Les caractéristiques morphologiques d'une Lamiacées (Skafia-Crete, 2010)	65
12	Poils sécréteurs	65
13	Descriptif de l'espèce <i>C. Grandiflora</i>	67
14	<u>Fruits</u> ou <u>nucales</u> de l'espèce <i>C. Grandiflora</i>	68
15	Détection des acides gras par LC/MS/MS	95
16	Ionisation chimique à pression atmosphérique	103
17	CCM bidimensionnelle des deux phases :n-butanolique et acétate d'éthyle	111
18	Comportement chromatographique des fractions obtenues	113
19	Spectre RMN ¹ H du composé VI-3 (CD ₃ OD, 500 MHz)	117
20	Spectre RMN ¹³ C du composé VI-3 (CD ₃ OD, 500 MHz)	117
21	Spectre de masse du composé VI-3 en mode ES ⁺	118
22	Spectre COSY du composé VI-3	119
23	Spectre HSQC du composé VI-3	120
24	Spectre HMBC du composé VI-3 (partie I δ _c entre 100 et 180 ppm)	121
25	Spectre UV du produit VIII-3en présence de meoh et meoh+ naoh	123
26	Spectre UV du produit VIII-3 enregistré dans naoac et naoac/H ₃ BO ₃	124
27	Spectre UV du produit VIII-3 enregistré dans alcl ₃ et alcl ₃ +hcl	125

28	Spectre RMN ¹ H du composé VIII-3 (CD ₃ OD, 500 MHz)	125
29	Partie osidique du composé VIII-3 (CD ₃ OD, 500 MHz)	126
30	Spectre RMN ¹³ C du composé VIII-3 (CD ₃ OD, 125 MHz)	127
31	Spectre COSY du composé VIII-3 (zone osidique)	128
32	Spectre HSQC du composé VIII-3	129
33	Spectre ROESY du composé VIII-3	130
34	Spectre de masse ES ⁺ du composé VIII-3	131
35	Chromatogramme HPLC du composé XI-2	132
36	Spectre de masse (API- ES négatif) du composé XI-2	133
37	Spectre RMN ¹ H du composé XI-3 (DMSO, 500 MHz)	135
38	Spectre RMN ¹ H du composé XI-3 (étalement entre 5.3-7 ppm)	135
39a	Spectres RMN ¹ H du composé XI-4 (MEOD, 500 MHz)	136
39b	Spectres RMN ¹ H du composé XI-4 (entre 5.9 et 7.3 ppm)	137
40	Spectre RMN ¹ H du composé XI-4 (étalement entre 3 et 4.5 ppm)	137
41	Spectre masse ES ⁺ du composé XI-4	138
42	Chromatogramme GC de l'extrait Hexane de <i>C.villosus</i>	140
43	Chromatogramme GC de l'extrait chloroforme de <i>C.villosus</i>	141
44	Montage simple d'une hydrodistillation	148
45	Chromatogramme CPG de l'huile essentielle de <i>Calamintha baborensis</i>	149
46	Chromatogramme CPG de l'extrait hexane de <i>C. Baborensis</i>	150
47	Chromatogramme CPG de l'extrait chloroforme de <i>C. Baborensis</i>	151
48	Chromatogramme HPLC de la fraction B de l'extrait <i>n</i> -butanol	163
49	Spectre de masse ESI du produit B1	164
50	Spectre de masse ESI du produit B2	165
51	Spectre MS du produit B3	166
52	Spectre MS ² du produit B3	166
53	Chromatogramme de la fraction D	167
54	Spectre de masse ESI du produit D1	167
55	Spectre MS du produit D2	168
56	Spectre MS ² du produit D2	168
57	Spectre de masse ESI du produit D3	170

58	La courbe d'étalonnage	171
59	Courbe du trolox	175
60	Différents tests antibactériens des différents extraits étudiés de <i>Calamintha baborensis</i> Batt.	184
61	Diagramme du % d'inhibition des extraits testés	184
62	Diagramme du diamètre d'inhibition	185

Liste des schémas :

No	Titre	Page
1	Structure de base d'un flavonoïde	5
2	Les différentes classes de composés	6
3	Formation de la chalcone	7
4	Voie de biosynthèse conduisant à la majorité des flavonoïdes	9
5	Structure de base d'une flavone (1) et d'une isoflavone(2)	11
6	Structure de squelette de quelques molécules flavonoidiques ayant des activités thérapeutiques	13
7	Formation de l'acide mévalonique	20
8	Formation de l'isopentylpyrophosphate(IPP) à partir de l'acide mévalonique	20
9	Isomérisation de l'ipp en pyrophosphate de diméthylallyle (DMAPP).	20
10	Biosynthèse du diphosphate de géranyle (GPP) par le mécanisme d'ionisation-condensation-élimination	21
11	Structure des différents précurseurs des monoterpènes	21
12	Le mécanisme de formation du cation α -terpényle	22
13	Formation du pyrophosphate de farnésyle (FPP) par condensation du GPP avec l'ipp	22
14	Voies de biosynthèse des sesquiterpènes à partir du pyrophosphate de farnésyle	23
15	Voies de biosynthèse des monoterpènes cycliques à partir du cation α -terpényle	23
16	Mécanisme de formation des alcools et des cétones terpéniques	24
17	Appareil d'hydro distillation Dean-Stark	26
18	Réaction de base de la synthèse et de la dégradation des ERO	31
19	Structure 1,1-diphényl-2-Picryl-Hydrazyl et 1,1-diphényl-2-Picryl-Hydrazine	33
20	Formation et piégeage du radical ABTS ^{•+} par un antioxydant donneur de H [•]	35
21	Chélation d'ions ferreux	36
22	Composés minoritaires de l'espèce <i>C. Laurifolius</i>	55
23	Composés de l'extrait éthanoïque de l'espèce <i>C. Laurifolius</i>	56
24	Composés isolés de l'espèce <i>C. Symphytifolius</i>	57
25	Composés terpéniques isolés de l'espèce <i>C. Ladaniferus</i>	57
26	Composés terpéniques isolés de l'espèce <i>C. Palinhæ</i>	58
27	Flavonoides isolés de l'espèce <i>C. Laurifolius</i>	59
28	Flavonoides isolés de l'espèce <i>C. Incanus</i>	60
29	Composés isolés de l'espèce <i>C. Incanus</i>	60
30	Tannins isolés de l'espèce <i>C. Incanus</i>	60
31	Tannins isolés de l'extrait méthanolique de l'espèce <i>C. Incanus</i>	62
32	Composés tanniques isolés de l'extrait acét de l'espèce <i>C. salvifolius</i>	63
33	Les flavonoïdes <i>p</i> -coumarylglucosides	70
34	Un dérivé de l'acacétine <i>Calamintha glandulosa</i>	73

Liste des schémas :

34'	Le 3',4'-diméthoxyquercétine-3,7-di-O-glucoside	73
35	Le composé AL-Quds	74
36	Flavonoïdes étudiés	99
37	Fragmentation des flavones	100
38	Protocole d'extraction de l'espèce <i>Cistus villosus</i>	110
39	Obtention des fractions finales de l'espèce <i>Cistus villosus</i>	112
40	Fragmentation de la vicenine2	134
41	Protocole d'extraction de l'espèce <i>Calamintha baborensis</i>	147
42	Tests antioxydants et antimicrobiens des extraits des deux plantes	172

Liste des abréviations

FPP :	Farnesil pyrophosphate
GGPP :	Geranylgeranyl pyrophosphate
NPP:	Neryl pyrophosphate
Glu :	Glucose
GPP :	Geranyl pyrophosphate
HE:	Huile essentielle

Technique chromatographique et Détermination structurale :

CC :	Chromatographie sur Colonne ouverte de silice
CCM :	Chromatographie sur Couche Mince
d :	doublet
dd :	doublet de doublet
DEPT :	distortionless enhanced polarization transfer
dl :	doublet large
dq :	doublet de quadruplet
dt :	doublet de triplet
Gal :	β -D-galactopyranose
GC :	Chromatographie Gazeuse
GC-MS :	Chromatographie Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse
Glu :	β -D-glucopyranose
HMBC:	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC :	heteronuclear single quantum connectivity
Hz :	Hertz
IC :	Ionisation chimique
IE :	Impact électronique
IR :	Indice de rétention
J :	constante de couplage
J(Hz) :	Constante de couplage exprimée en Hertz
l :	litre
LC/MS :	Chromatographie Liquide couplée à la spectrométrie de masse

LC/MS/MS:	Chromatographie Liquide couplée à deux spectrométries de masse
m :	Multiplet
m/z :	masse/charge d'un ion
MeOH :	Méthanol
MHz :	méga Hertz
min :	minute
mL :	millilitre
NOESY :	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
PM :	Poids moléculaire
Ppm :	parties par million
q :	Quadruplet
qt :	quintuplet
rf :	rapport frontal
Rha :	Rhamnose
RMN :	Résonance Magnétique Nucléaire
RMN 1H :	résonance magnétique nucléaire du proton
ROESY :	Rotating Overhauser Effect Spectroscopy
s :	Singulet
SM :	Spectrométrie de masse
t :	Triplet
TMS :	Triméthylsilane
Tr ou RT:	Temps de rétention
uma :	Unité de masse atomique
UV :	Ultraviolet
δC :	déplacement chimique du carbone en ppm
δH :	déplacement chimique du proton en ppm
λ_{max} :	longueur d'onde maximale

Solvants et réactifs :

AcOEt :	acétate d'éthyle
AlCl₃ :	chlorure d'aluminium
BuOH :	<i>n</i> -butanol
CD₃OD :	méthanol deutéré
CDCl₃ :	chloroforme deutéré
CHCl₃ :	chloroforme
CDCl₃ :	chloroforme deutéré
EtOH :	éthanol
HCO₂H :	acide formique
H₂O :	eau
H₃BO₃ :	acide borique
HCl :	acide chlorhydrique
H₂SO₄ :	acide sulfurique
KMNO₄ :	permanganate de potassium
MeOH :	méthanol
M-H :	Mueller-Hinton
NaCl :	chlorure de sodium
NaOAc :	acétate de sodium
NaOH :	hydroxide de sodium
NH₄Ac :	acétate d'ammonium
<i>t</i>-BuOK :	tert-butylate de potassium

Activité biologique :

ABTS :	2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique)
ATCC :	american type culture collection
CMI :	concentration minimale inhibitrice
DPPH :	1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl
FRAP :	ferric reducing antioxidant power.
CI₅₀ :	concentration inhibitrice à 50%

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses ressources trouvées dans son environnement afin de traiter et de soigner toutes sortes de maladies (LEE, KH. 2004). Actuellement, l'organisation mondiale de la santé (OMS) estime qu'environ 81% de l'humanité a recours aux préparations traditionnelles à base de plantes en tant que soins de santé primaire (WORLD HEALTH ORGANISATION, 2000). Les médicaments à base de plantes sont encore largement utilisés et ont une importance considérable dans le commerce international.

Plus de 120 composés provenant de plantes sont aujourd'hui utilisés en médecine moderne et près de 75% d'entre eux sont utilisés selon leur usage traditionnel. (CORDELL, G.A., COLVARD, M.D., 2005). Parmi les 25 composés pharmaceutiques les plus vendus au monde, 12 sont issus de produits naturels (GORDON, M, 1997, ROLLINGER, J. M., 2004). Cela signifie que le nombre de médicaments issus de produits naturels est supérieur à celui des produits issus de la chimie combinatoire où plus de 10 000 molécules doivent être synthétisées puis testées afin de mener au développement d'un seul médicament. (VERPOORTE, R., 1998, ADAMS, C. 2004). Par conséquent, les quelque 250 à 300 000 espèces inventoriées de plantes que l'on trouve sur terre, dont seulement 5 à 15% ont fait l'objet de recherches de molécules bioactives, représentent un réservoir immense de nouveaux composés médicinaux potentiels (FABRICANT, D.S., FARNSWORTH, N.R., 2001, CUTLER, S.J., CUTLER, H.G., 2000).

Selon certains auteurs, les composés d'origine naturelle présentent l'avantage d'une très grande diversité de structures chimiques et ils possèdent aussi un très large éventail d'activités biologiques (ROLLINGER J.M. 2004).

Les propriétés antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début du 20ème siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser (YANO, Y. 2006). Récemment, l'attention s'est portée sur les herbes et les épices comme source d'antioxydants, qui peuvent être employés pour se protéger contre les effets du stress oxydant (MATA, A.T. 2007).

L'étude de la chimie des plantes est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté.

Cela tient principalement au fait que le règne végétal représente une source importante d'une immense variété de molécules bioactives (FERRARI, J. 2002). Cette matière végétale contient un grand nombre de molécules qui ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie, en alimentation, en cosmétologie et en dermopharmacie. Parmi ces composés on retrouve, les coumarines, les alcaloïdes, les acides phénoliques, les tanins, les lignanes, les terpènes et les flavonoïdes. (BAHORUN, T., 1997, MARFAK, A., 2003).

La position biogéographique de l'Algérie et la structure de ses étages bioclimatiques font de ses terroirs un gisement relativement important de ressources biologiques qui a eu à subir, par ailleurs, l'influence de diverses civilisations, en termes de flux, d'introduction et de pillage d'espèces, de taxons et de types génétiques croisés. Les pratiques agricoles héritées de ces brassages successifs de populations, porteuses de savoir-faire, ont contribué, de biens de façons, à l'enrichissement et à l'originalité de cet environnement agricole et culturel (Ferrah et Yahyaoui, s.d.). L'Algérie se caractérise par une grande diversité physionomique constituée des éléments naturels suivants : une zone littorale (véritable façade maritime) sur plus de 1200 Km, une zone côtière riche en plaines, des zones montagneuses de l'Atlas tellien, des hautes plaines steppiques, des montagnes de l'Atlas saharien, de grandes formations sableuses (dunes et ergs), de grands plateaux sahariens, des massifs montagneux au cœur du Sahara central (Ahaggar et Tassili N'Ajjer). A ces ensembles géographiques naturels correspondent des divisions biogéographiques bien délimitées, des bioclimats variés (de l'humide au désertique) et une abondante végétation méditerranéenne et saharienne qui se distribue du Nord au Sud selon les étages bioclimatiques. Selon Mediouni , la biodiversité algérienne (naturelle et agricole) compte environ 16000 espèces, mais l'économie algérienne n'en utilise que moins de 1 % de ce total. Sur les 3139 espèces décrites par Quezel et Santa (Quezel, Santa, 1962), Zeraia (ZERAIA, 1983) in Matet (MATET, 2005) dénombre 289 espèces assez rares, 647 rares, 640 très rares, 35 rarissimes et 168 endémiques. Ceci montre que 40,53% (1286 espèces) de la flore algérienne sont rares à très rares ce qui témoigne de l'urgence des actions de conservation (MEDIOUNI.1999).

Le nombre d'espèces endémiques algériennes se situe aux environs de 250 sur un total de 2840 espèces environ, soit 8,5%. Parmi ces espèces: le pistachier de l'Atlas, le Pin noir, le Cyprès du tassili, le Sapin de Numidie. Les endémiques larges seraient au nombre de 294 qui sont généralement représentées par des endémiques maghrébines (122 espèces) ou nord africaines (112 espèces). D'autres sont propres à deux pays : les algéro-marocaines sont au nombre de 58 et les algéro-tunisiennes au nombre de 33.

L'Algérie recèle d'un patrimoine végétal important par sa richesse et sa diversité dans les régions côtières, les massifs montagneux, les hauts-plateaux, la steppe et les oasis sahariennes : on y trouve plus de 3000 espèces végétales. Parmi ces ressources naturelles les plantes aromatiques et médicinales occupent une large place et jouent un grand rôle dans l'économie nationale. Elles sont utilisées dans différents domaines : industrie alimentaire, conserverie, pharmaceutique, et phytothérapie (DURAFFOURD 1997)

Pendant longtemps, les remèdes naturels et surtout les plantes médicinales furent le principal recours de la médecine de nos grands-parents, malgré l'important développement de l'industrie pharmaceutique qui a permis à la médecine moderne de traiter un grand nombre de maladies souvent mortelles. Environ 80% de la population mondiale profite des apports de la médecine traditionnelle à base des plantes reconnaissant ainsi les savoirs empiriques de nos ancêtres (EL RHAFFARI , 2004). En effet, les plantes possèdent des milliers de substances actives à l'intérieur de leurs organes (feuilles, fleurs, racines,...) et peuvent, selon des techniques chimiques (extraction, distillation,...), permettre l'isolation du principe actif pour l'utiliser en pharmacie. Ces remèdes naturels sont bien souvent très efficaces avec moins d'effets secondaires reconnus que beaucoup de médicaments de synthèse, mais peuvent néanmoins être mortels ou toxiques pour l'organisme lorsqu'ils sont mal utilisés (DURAFFOURD. 1997).

Ainsi notre thèse présente quatre grands chapitres :

Le premier chapitre traite de généralités sur les flavonoïdes, les huiles essentielles et leurs méthodes d'extraction et enfin quelques informations concernant les oxydants, le phénomène d'oxydation et les antioxydants.

Le second chapitre renvoie sur les études antérieures faites sur les genres des deux plantes étudiées en question à savoir *Calamintha babrensis* Batt et *Cistus villosus*.

Le troisième chapitre évoque les différentes méthodes d'analyse structurales et d'identification de nos produits.

Le dernier chapitre regroupe tout les résultats auxquels nous sommes parvenus aussi bien sur l'étude phytochimique et biologique ainsi que la discussion des résultats.

Enfin on a terminé notre présent travail par une conclusion générale sur les travaux réalisés ainsi que les références qui s'y rapportent.



Chapitre I

Chapitre I : GÉNÉRALITÉS

A. ASPECT CHIMIQUE SUR LES FLAVONOÏDES

A.1- Introduction

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des anti-radicalaire, anti-inflammatoire, analgésique, anti-allergique, antispasmodique, antibactérienne, hépatoprotectrice, œstrogénique et/ou anti-œstrogénique etc. Ils sont également connus pour moduler l'activité de plusieurs enzymes ou de récepteurs cellulaires (HUMER, 2008).

Le terme flavonoïde regroupe une très large gamme de composés naturels polyphénoliques. On distingue les flavonoïdes, qui regroupent différents types de noyaux tels que : flavones, flavonols, flavanones, flavanonols, flavanes, flavan-3-ols, flavylum, chalcones, auronnes, et les isoflavonoïdes dans lesquels on trouve les noyaux isoflavones, isoflavonols, isoflavanes, ptérocarpanes, coumaronochromones, 3-arylcoumarines, coumestanes, roténoïdes.

Les flavonoïdes ont tous une origine biosynthétique commune. Ce groupe de composés est défini par une structure générale en C₁₅, caractérisée par un enchaînement C₆-C₃-C₆ (CHEBIL, L., 2006).

Les flavonoïdes ont un squelette de base formé par deux cycles en C₆ (A et B) reliés entre eux par une chaîne en C₃ qui peut évoluer en un hétérocycle (cycle C) (Schéma 1). Les flavonoïdes sont des cristaux présentant des couleurs allant du jaune clair au jaune or. Selon les détails structuraux les flavonoïdes se divisent en 6 groupes : flavones, flavonols, flavonones, isoflavones, chalcones auronnes.

Ces composés existent sous forme libre dite aglycone ou sous forme d'hétérosides, c'est à-dire liée à des oses et autres substances (HELLER et FORKMANN, 1993) comme le montre le

Schéma 1 :

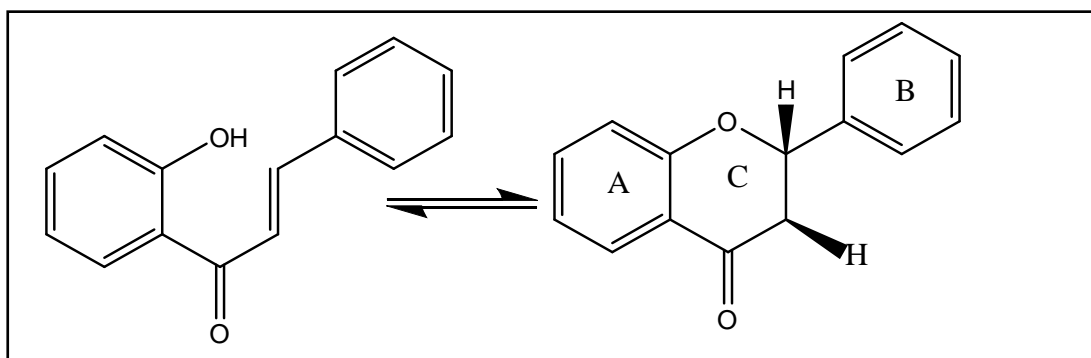


Schéma 1: Structure de base d'un flavonoïde

Les différentes classes de composés sont résumées sur le schéma 2 suivant :

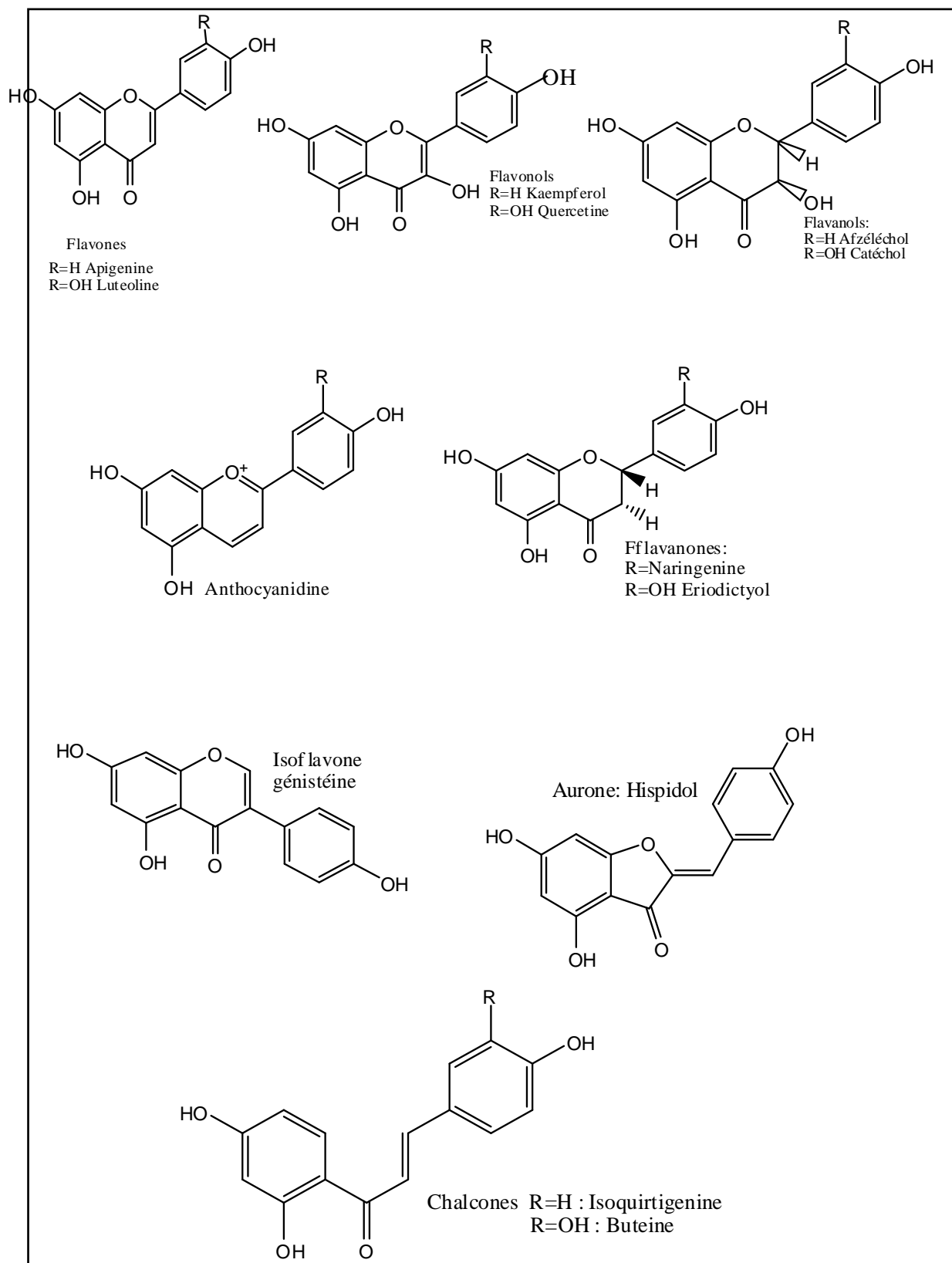


Schéma 2: Les différentes classes de composés

A.2-Biosynthèse des flavonoïdes

L'étape clé de la formation des flavonoïdes est la condensation, catalysée par la chalconesynthase, de trois molécules de malonyl-CoA avec un ester du coenzyme A et d'un acide hydrocinnamique (DENDOUGUI, 2002), en général le *p*- coumaroyl- CoA. Le produit de la réaction est une chalcone (dans le cas présent la 4, 2', 4', 6'-tétrahydroxy chalcone) selon le schéma 3 :

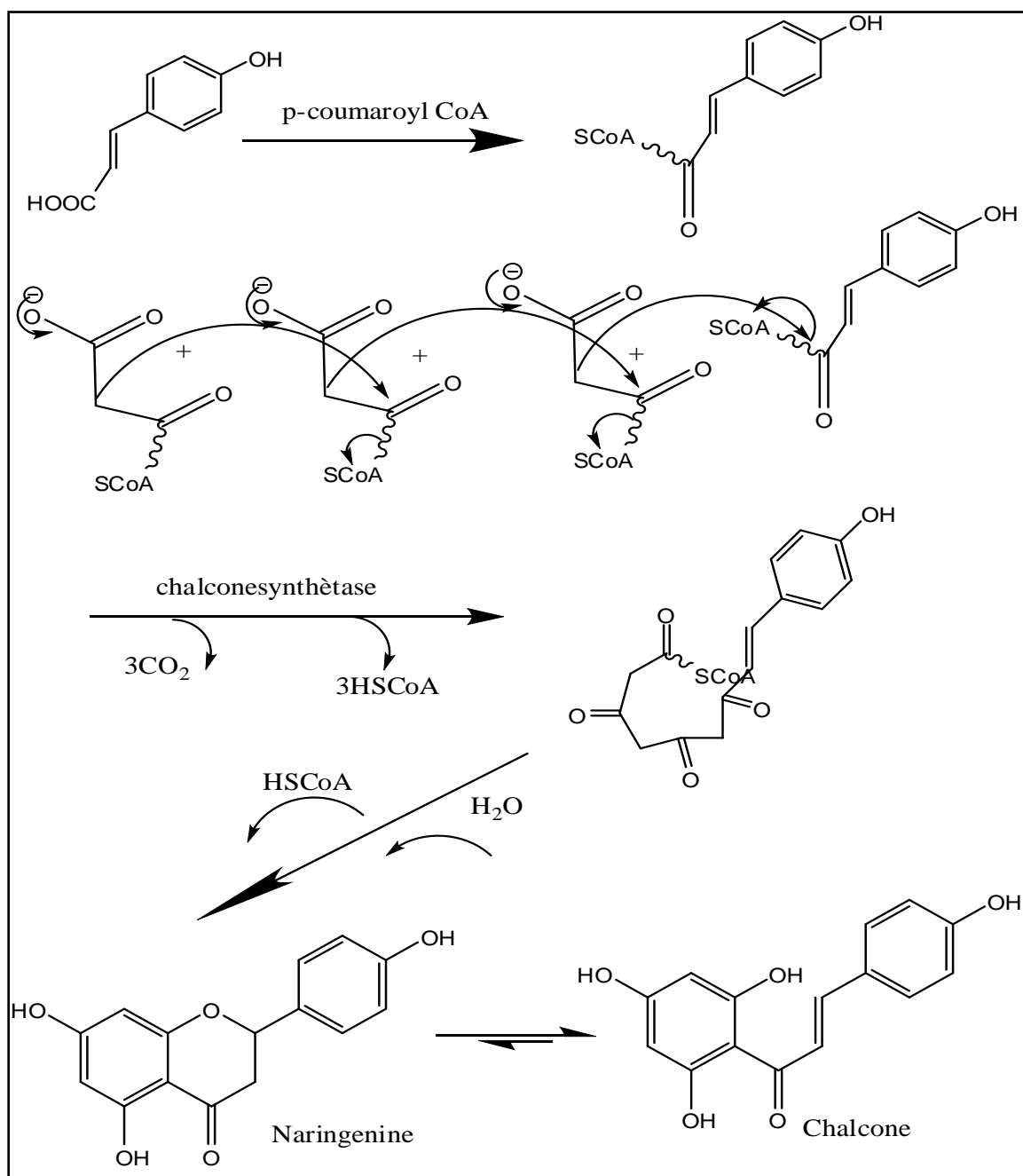


Schéma 3: Formation de la chalcone

Cette chalcone est l'intermédiaire caractéristique de la biosynthèse des divers flavonoïdes. Elle est en équilibre avec la naringénine. Cet équilibre étant contrôlé par une enzyme la *chalcone isomérase*, cette dernière induit une fermeture stéréospécifique du cycle (addition syn. sur la double liaison) conduisant à la seule (2S)-flavanone (BRUNETON, J., 2009).

- Les aurones dérivent directement des chalcones.
- L'oxydation des flavanones suivie de réarrangement (déplacement d'un groupement aryle de C2 à C3), conduit à la formation d'isoflavone. Elle est considérée comme une réaction spécifique pour la biogenèse des isoflavonoïdes (KOCHS, G., 1986) où le composé 2-hydroxyisoflavone est un intermédiaire (STOTZ, G., 1984)
- L'introduction d'une double liaison entre C2 et C3 dans les flavanones conduit à la formation des flavones (réaction catalysée par deux types d'enzymes différentes : la *flavone synthase I* et la *flavone synthase II*). (tableau1) :
- L'hydroxylation des flavanones en position 3 conduit aux dihydroflavonols (réaction catalysée par l'enzyme *flavanone 3-hydroxylase*).
- Le dihydroflavonol est considéré comme un intermédiaire direct pour la synthèse des flavonols et des flavan-3,4-diols, c'est l'intermédiaire biosynthétique dans la formation des proanthocyanidines, des anthocyanidines et catéchines (flavonols).
- Les flavonols sont formés par l'introduction d'une double liaison entre C2 et C3 dans les dihydroflavonols en présence de l'enzyme *flavonol synthase*. Le tableau 1 suivant représente la liste des enzymes conduisant aux différentes classes de flavonoïdes

Tableau 1 : Liste des enzymes conduisant aux différentes classes de flavonoïdes (SCHIRLEY, 1996).

No	Enzyme	Acronyme
1	Chalcone Synthase	CHS
2	Polyketide Reductase	PKR
3	Chalcone Isomérase	CHI
4	2-Hydroxy isoflavone Synthase	IFS
5	2-Hydroxy isoflavone Déhydratase	IFD
6	Flavone Synthase I et II	FNSI-II
7	Flavone -4 Reductase	FVR
8	Flavone 3- Hydroxylase	FHT
9	Flavonol Synthase	FLS
10	Dihydroflavonol 4-Réductase	DFR
11	Leucoanthocyanidine 4-Réductase	LAR
12	Anthocyanidine Synthase	ANS
13	Palargonidine 3- O-Transférase	FGT

Le schéma 4 suivant représente la voie biosynthétique des différentes molécules de flavonoïdes.

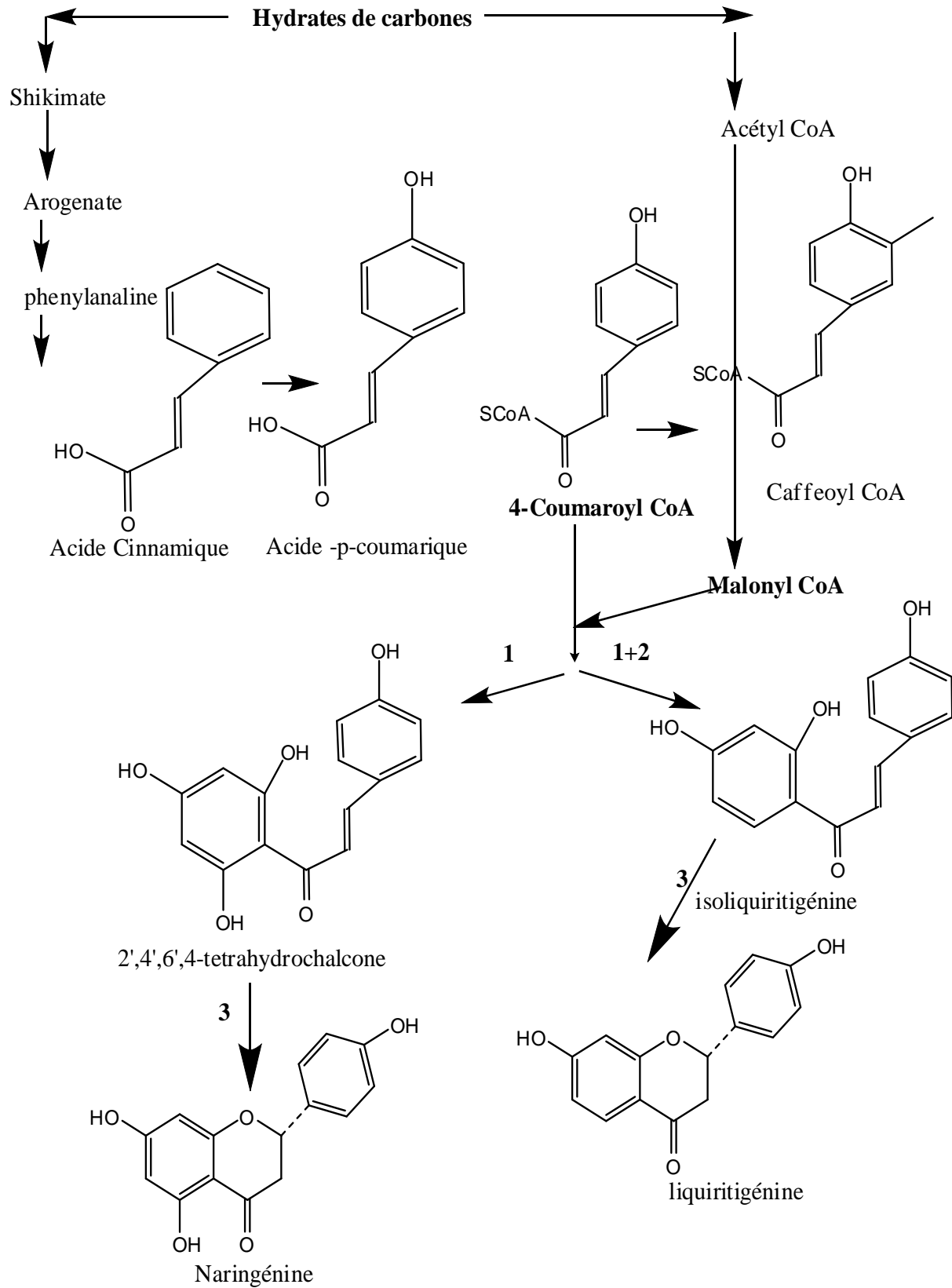


Schéma 4 : Voie biosynthétique conduisant à la majorité des flavonoïdes

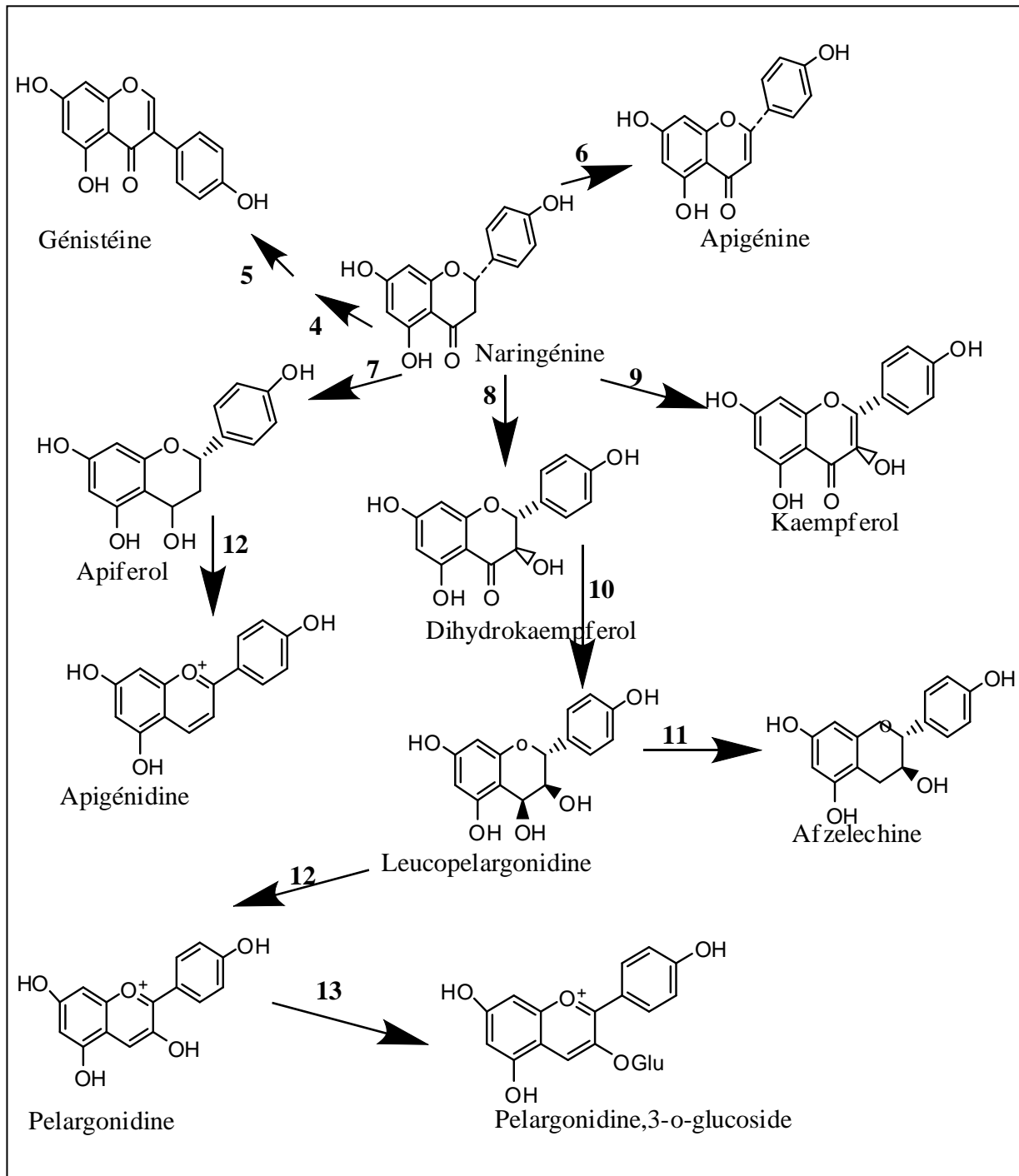


Schéma 4 suite : Voie biosynthétique conduisant à la majorité des flavonoïdes

A.3- Propriétés des flavonoïdes

Connus pour leurs multiples rôles, les composés phénoliques ont attirés l'attention d'un grand nombre de chercheurs de différentes disciplines (biologistes, chimistes, pharmaciens et médecins) ces deux dernières décennies. Des travaux ont montré que les flavonoïdes sont associés à de nombreux processus physiologiques tels que la croissance cellulaire, la dormance des bourgeons, la floraison (NITSCH, 1961 ; ALIBERT, 1977).

Un certain type de ces substances est responsable de la coloration des fleurs et des fruits (MARKARIS, 1982), d'autres dont l'absorption en UV est importante protègent la plante vis-à-vis des rayons UV-B de la lumière solaire (HARBORNE, 1992).

D'autres études ont montré que les flavonoïdes interviennent dans la défense des plantes comme agents protecteurs contre les invasions microbiennes (HARBORNE, 1985 ; COWAN, 1999). Certaines études ont étendu cet effet à une activité antifongique (GAFNER, 1996) Par ailleurs, beaucoup d'isoflavonoïdes sont considérés comme des phytoalexines, connues pour leur réponse à l'attaque microbienne (DIXON, 2004).

A.4 -Intérêt des flavonoïdes pour la santé

De nombreuses études épidémiologiques ont montré qu'une alimentation riche en polyphénols diminue le risque de cancers, d'affections cardiovasculaires et d'autres maladies chroniques.

Ces effets sont confirmés dans diverses études :

- En ce qui concerne le cancer, il est établi qu'une consommation régulière de fruits et de légumes diminue le risque de cancer jusqu'à 50% (BLOCK, 1992).
- Pour ce qui est des maladies cardiovasculaires, les données relatives à l'influence des flavonoïdes restent fragmentaires, et les résultats ne sont pas concluants (FAGGIOTTO, 1998; VAN DE VIJER, 1997 ; HOLLMANN, 1998)
- Leur intérêt comme antioxydants se manifeste également dans le domaine de la protection contre le stress photo-oxydant cutané induit par l'exposition aux rayons solaires (FUCHS, 1998).

De plus en plus de travaux tentent à l'heure actuelle de cerner les effets protecteurs de certains aliments particuliers. C'est ainsi que le thé vert est l'objet de plusieurs études, (WEISBURGER, 1998), c'est l'une des principales sources d'apport de flavonoïdes (COOK, 1996).

A.5-Relations structure – réactivité

Selon le schéma 5 suivant représente la structure d'une flavone et d'une isoflavone.

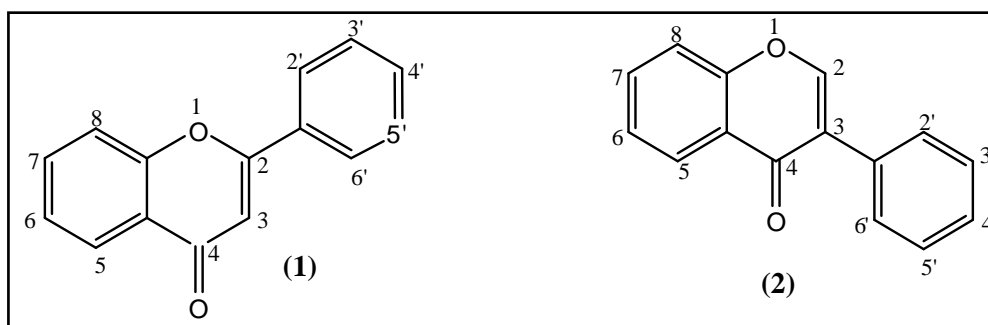


Schéma 5: Structure de base d'une flavone (1) et d'une isoflavone (2)

La preuve des effets protecteurs des antioxydants est fondée sur diverses études. Il a été montré que les flavonoïdes agissent comme des fixateurs de plusieurs espèces oxydantes telles que l'anion peroxyde (O_2^-), le radical hydroxyle ou les radicaux peroxydes. Les données de la littérature montrent une mise en évidence de certaines relations entre la structure chimique du flavonoïde et l'activité antioxydante :

- La présence du groupe hydroxyle 3-OH lié à la double liaison C2=C3, et son emplacement adjacent au groupement carbonyle de l'hétérocycle (C) en position C4 est exigé pour la grande efficacité de l'activité antioxydante (SHAHIDI, 1992). Cette activité atteint son maximum quand le noyau B est substitué par un système orthodiphénolique.
- La O-méthylation des substituant hydroxyles du squelette flavonique réduit l'activité antioxydante des flavonoïdes (YOKOSAWA, 1998 ; CAO, 1997).
- Les groupements hydroxyles en position 3, 5, 7, 3', 4' participent dans l'inhibition de la peroxydation lipidique.
- La capacité antioxydante des flavonoïdes revient à leur aptitude à former des chélates métalliques, par l'ensemble (3-hydroxy, 4-oxo) ou (5-hydroxy, 4-oxo) (KITTA, 1992).
- Les groupes hydroxyles 5-OH, 7-OH, et la double liaison C2=C3 qui sont des sites potentiels de réactivité, sont essentiels pour l'activité inhibitrice des flavonoïdes de l'enzyme Xanthine oxydase et du radical peroxyde produit par cette dernière (COS, P., et al. 1998).

Un type particulier de flavonoïdes, les isoflavones, suscite beaucoup l'intérêt des chercheurs. En effet, les activités biologiques diverses de la génistéine (4', 5, 7 trihydroxyisoflavone) ont fait l'objet de nombreuses études publiées durant les dix dernières années. La majorité de ces études ont porté sur les activités pharmacologiques de la génistéine comme inhibiteur de tyrosine kinase, sur ses activités chimio-préventives contre le cancer et les maladies cardiovasculaires et essentiellement sur son activité phyto-œstrogénique (GORDON, 1996).

Les recherches ont prouvé que l'augmentation du nombre de groupements hydroxyles (OH) sur le noyau A ou B provoque une augmentation dans l'activité anticancéreuse, la double liaison C2-C3 est nécessaire pour activer cette effet (HARBORN, 1990), le schéma 6 suivant représente la structure des squelettes des molécules flavoniques ayant des activités thérapeutiques.

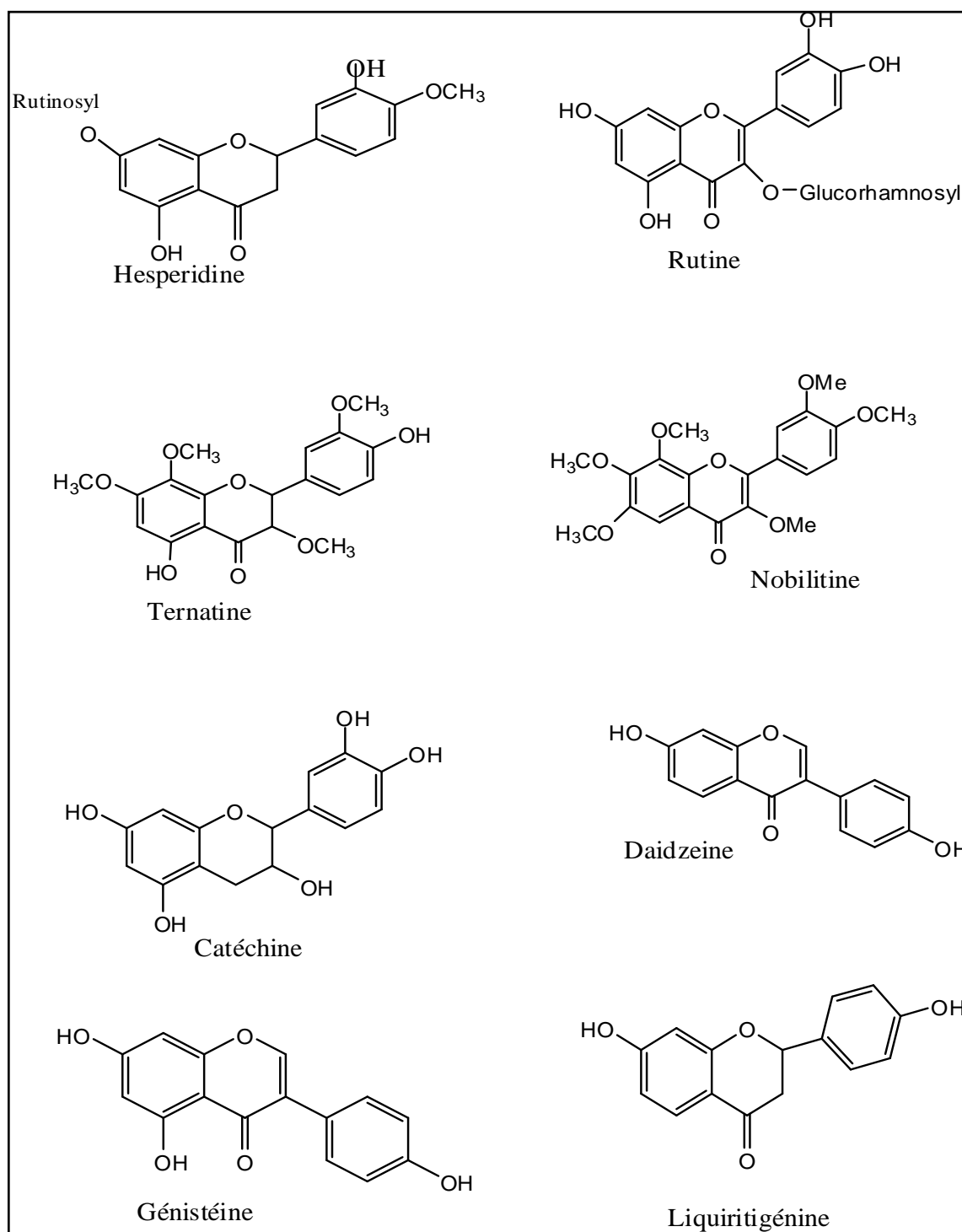


Schéma 6 : Structure de squelette de quelques molécules flavonoidiques ayant des activités thérapeutiques

B-LES HUILES ESSENTIELLES :

B.1- Définition des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont un mélange complexe de composés, principalement des monoterpènes, 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 avoir le même constituant (COWAN, 1999).

Ces composantes volatiles sont synthétisées par les plantes aromatiques sous forme de métabolites secondaires et adaptées en tant que partie du système de défense à base de plantes contre bactérienne, virale, fongique et les attaques d'insectes. L'histoire de l'application des huiles essentielles revient sur les temps anciens, étant utilisées principalement pour leur arôme, propriétés sanitaires et médicinales.

La plante utilise l'huile pour favoriser la pollinisation, comme source énergétique, facilitant certaines réactions chimiques et conservant l'humidité des plantes dans les climats désertiques. Les huiles essentielles ont, à toutes époques, occupé une place importante dans la vie quotidienne de l'homme qui les utilisait autant pour se parfumer, aromatiser la nourriture ou même se soigner (ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION, 1986) (BAKKALI, 2008).

Par ailleurs la norme AFNOR NF T-75-006 définit l'huile essentielle comme : « un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par hydro-distillation, l'huile essentielle est alors séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques ».

B.2- Répartition

Les huiles essentielles sont presque exclusives de l'embranchement des spermaphytes, elles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs. Les genres qui sont capables d'élaborer ces principes volatils sont répartis sur presque une soixantaine de familles (BENYAHIA, 2006) Parmi les familles végétales les plus productrices d'huiles essentielles, on distingue les *Labiatae* (KATSIOTIS, 1990 ; AMARTI, 2010 ; LORENZO, 2002), les *Asteraceae* (GAZIM, 2008), les *Myrtaceae* (BENAYACHE, 2001), les *Lauraceae* (CHAVERRI, 2005) et les *Apiaceae* (DJARRI, 2007 ; OROOJALIANA, 2010).

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

Fleurs (*Ferula goangulata*) (AKHLAGHI, 2008), feuilles (*Torilis arvensis*) (SAAD, 1995) et bien que cela semble peu commun, dans : les racines (*Heracleumpersicum*) (MOJAB, 2003) les rhizomes (*Zingiber officinale*) (GEIGER, 2005) , le bois (*Santalum album*) (HOWES, 2004), les écorces (*Cinnamomum verum*) (JHAM, 2005), les fruits (*Daucus carota*) (GLISIC, 2007) ou les graines (*Daucus carota*) (ÖZCAN, 1987).

Si tous les organes d'une même espèce renferment une huile essentielle, la composition de cette dernière peut varier selon sa localisation (BRUNETON, 2009).

Dans la plus part des cas, les huiles essentielles se forment dans le cytosol des cellules, où elles se rassemblent en gouttelettes comme la plupart des substances lipophiles ou bien elles s'accumulent dans les vacuoles des cellules épidermiques ou des cellules du mésophile de nombreux pétales. Selon les périodes, ces essences traversent la paroi cellulaire vers l'extérieur de la cuticule sous forme de vapeurs.

B.3- Origine dans les végétaux

Considérées comme des produits du métabolisme secondaire des plantes (HATANAKA, 2006), les huiles essentielles sont produites et stockées dans des structures cellulaires spécialisées, ces structures sont divisées en deux groupes (SVOBODA, 2000) :

- Celles qui produisent l'huile essentielle sur la surface de la plante et qui sécrètent habituellement des substances directement à l'extérieur de la plante (sécrétion exogène).
- Celles qui produisent les huiles essentielles dans le corps de la plante et sécrètent ces substances dans les espaces intercellulaires spécialisés (sécrétion endogène).

Dans le cas par exemple de l'*Origan vulgaire*, l'huile essentielle est localisée dans les deux épidermes et principalement dans l'épiderme supérieur (SKOULA, 1999) comme le montre la figure 1 suivante.

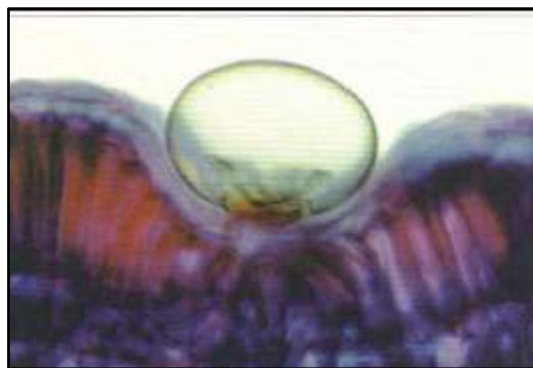


Figure 1 : L'épiderme supérieur de l'*Origan vulgaire*

B.4-Les systèmes sécréteurs

Les examens réalisés à différents stades de croissance des plantes aromatiques par microscopie à balayage électronique ont permis, ces dernières années, une considérable avancée des connaissances concernant l'appareil sécréteur des plantes aromatiques.

Les calices des fleurs présentent une succession régulière de côtes et de sillons abritant les structures productrices des essences (ou glandes sécrétrices). Ces glandes épidermiques, de forme sphérique, ont un diamètre inférieur au dixième du millimètre, leur activité se traduit par la synthèse de tous les constituants des huiles essentielles, puis ultérieurement, par leur stockage durable (**figure 2**)



Glande sécrétrice de l'épiderme d'une
feuille avec cuticule intacte

Rupture de la cuticule montrant les
cellules sécrétrices

Figure 2: Glandes sécrétrices

Les glandes sécrétrices sont réparties sur l'ensemble de la plante, rares sur les faces supérieures des feuilles et des tiges, elles sont un peu plus nombreuses sur le dessous des feuilles, mais elles abondent surtout sur le calice des fleurs.

La tête pluricellulaire de la glande sécrétrice est recouverte d'une peau appelée "cuticule". Au fur et à mesure que les cellules sécrétrices vont produire l'huile essentielle, celle-ci va être accumulée sous la cuticule qui se soulève petit à petit jusqu'à permettre un volume de stockage supérieur au double de celui des cellules sécrétrices elles-mêmes. Ces réservoirs de stockage représentent les glandes réceptrices, qui sont formées en général de huit cellules, groupées pour former une "tête" portée par un large pied unicellulaire qui les fixe à l'épiderme du calice.

La formation des huiles essentielles dans les végétaux est le fait d'une multitude de réactions biochimiques dont certaines ne sont pas encore élucidées. Elles prennent naissance dans des appareils sécréteurs qui ont une forme variée. Il s'agit par exemple :

- Trichomes Glandulaires (*Lamiaceae*)
- Cavités sécrétrices (*Myrtaceae* et *Rutaceae*)
- Canaux sécréteurs (*Apiaceae* et *Asteraceae*) (SVOBODA, 2003)

B.4-a-Trichomes glandulaires (*Lamiaceae*)

Les trichomes sont des structures se retrouvant partout dans le règne végétal, incluant les feuilles, les tiges, les racines, et les fleurs des plantes terrestres. Ces structures épidermiques spécialisées, peuvent avoir plusieurs fonctions en physiologie végétale, y compris la protection contre la déshydratation ou les prédateurs, la sécrétion d'huiles, l'absorption d'eau et de minéraux, et même la réflexion de la lumière.

Les trichomes glandulaires contiennent des huiles volatiles et d'autres sécrétions qui sont produites par les plantes. Dans les *Lamiaceae*, il existe deux types de trichomes généralement présents sur les feuilles et les tiges (ASCENSÃO, 1995).

B.4-b-Cavités sécrétrices (*Myrtaceae* et *Rutaceae*)

L'analyse au microscope optique a permis d'étudier plus en détail la formation des cavités sécrétrices (BENNICI, 2004). Les précurseurs des cellules des cavités sécrétrices, en comparaison avec les cellules environnantes, sont bien reconnaissables à leurs caractéristiques (jeunes, de très petite taille, avec un cytoplasme plus dense, de petites vacuoles, et des parois minces). La figure 3 suivante représente les cavités sécrétrices de l'espèce *Eucalyptus citriodora* (Svoboda KP 2003).

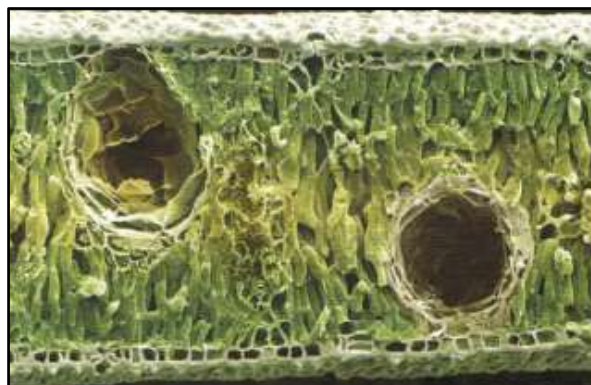


Figure 3: Cavités sécrétrices de l'espèce *Eucalyptus citriodora*.

B.4-c-Canaux sécréteurs (*Apiaceae* et *Asteraceae*)

Cavité ou conduit de forme plus ou moins cylindrique, né par écartement des cellules qui le délimitent et qui reçoit les produits après leurs sécrétions. Le nombre des canaux sécréteurs est extrêmement variable dans les fruits des *Apiaceae*, par exemple, six pour *Carum capticum* et une dizaine pour *Crithmum maritimum* (GERSBACH, 2002). Chez la famille des *Apiaceae*, ces structures ne sont pas seulement liées à la production et l'accumulation des huiles essentielles (SARAFIS, 1990), mais semblent également être des sites de la synthèse de substances biologiquement actives, y compris les coumarines, les furano-coumarines, et les flavonoïdes (ZOBEL, 1993).

La figure 4 suivante montre les travaux réalisés sur la structure cellulaire de la graine de *Carum carvi* (*Apiaceae*) (SVOBODA, 2003).

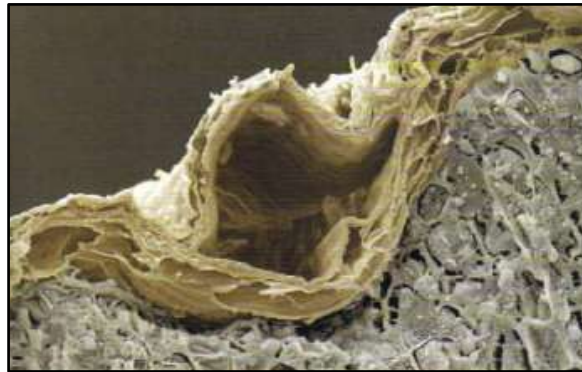


Figure 4 : Localisation des structures sécrétrices (canal sécréteur) dans la graine de carvi

B.5-Rôle des huiles essentielles

Les terpènes avec les flavonoïdes constituent le plus grand ensemble des métabolites secondaires des végétaux (BRUNETON, 2009). Les huiles essentielles qui sont principalement composées de terpènes, n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs et sont stockées dans toutes les parties (fleurs, feuilles, écorces, racines, rhizomes, fruits et graines). Les rôles biologiques des terpènes et des huiles essentielles sont souvent obscurs. Il est toutefois vraisemblable qu'ils jouent un rôle écologique dans les interactions :

végétal-végétal, végétal-animal et pourraient même constituer des supports de communication par des transferts de messages biologiques sélectifs (BRUNETON, 2009).

En effet, les huiles essentielles contribuent à l'équilibre des écosystèmes, attirent les abeilles et les insectes responsables de la pollinisation protègent les végétaux contre les herbivores et les rongeurs, elles possèdent des propriétés antifongiques et antibactériennes (RICCIARDELLI D'ALBORE, 1986),.

Pour les plantes désertiques, l'utilité des huiles essentielles a été rattachée à la conservation de l'humidité indispensable à la vie des plantes. Exposées à des climats désertiques, les vapeurs aromatiques ont pour propriété de saturer l'air autour de la plante, en permettant une résistance aux grandes variations de températures entre le jour et la nuit. Elles peuvent aussi servir de solvants bioactifs pour les composés lipophiles (HAY ROBERT, 1993).

B.6-Composition chimique

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de constituants hétérogènes. Ils appartiennent de façon exclusive à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes, le groupe des terpénoïdes d'une part et le groupe des aromatiques et des aliphatiques (alcanes, alcènes, alcénols, phénols etc...) de l'autre.

Dans chaque groupe de terpènes, un précurseur unique conduit aux différents constituants connus, par une succession de réactions classiques (KURT, 1998). Les plus connus de ces produits sont les monoterpènes qui répondent à la formule brute $C_{10}H_{16}$, les sesquiterpènes $C_{15}H_{24}$ et les diterpènes $C_{20}H_{32}$.

Les monoterpènes et les sesquiterpènes se retrouvent presque toujours dans les huiles essentielles sous forme acyclique, monocyclique ou bicyclique avec l'existence de nombreuses molécules fonctionnalisées (alcools, aldéhydes, cétones, esters, éthers, peroxydes).

B.7- Biosynthèse des terpènes.

La biosynthèse des terpènes est initialisée par la formation d'unités à cinq atomes de carbones (C5) ou isoprènes actifs, la formation de l'acéto-acétate et la condensation aldolique avec une molécule d'acétyl-CoA se produit en présence du CoA synthase et du CoA réductase, pour former l'acide 3R- mévalonique (MVA) (schéma 7) :

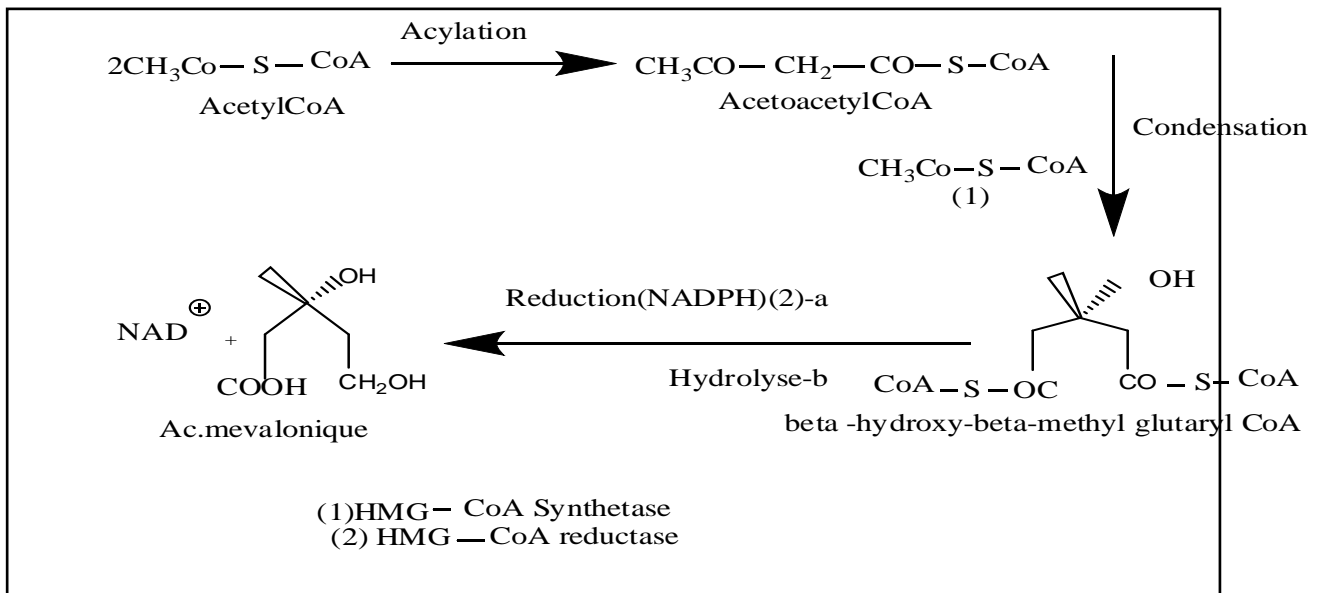


Schéma 7: Formation de l'acide mévalonique

La conversion du MVA en structures hémiterpéniques est réalisée en trois phosphorylations successives, permettant d'introduire le groupe pyrophosphate, dont l'élimination conduit à la formation de deux isomères : le pyrophosphate d'isopentényle (IPP) et du pyrophosphate de diméthylallyle (DMAPP) (schémas 8 et 9) :

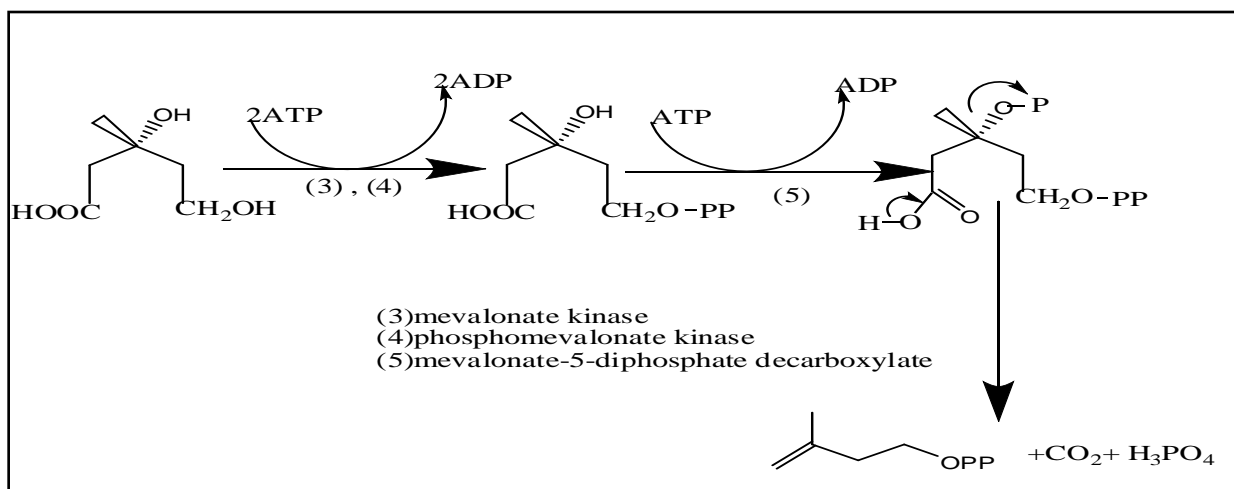


Schéma 8 : Formation de l'isopentylpyrophosphate(IPP) à partir de l'acide mévalonique

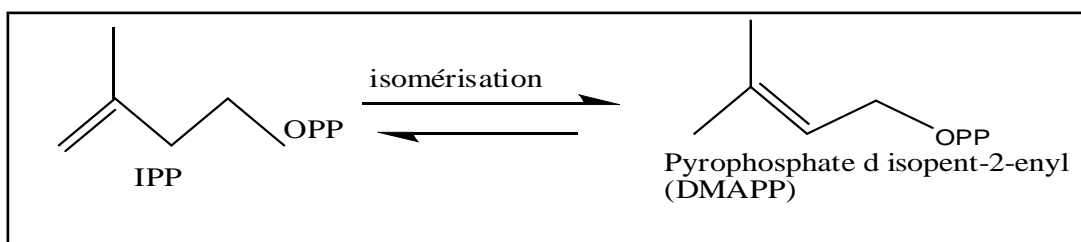


Schéma 9: Isomérisation de l'IPP en pyrophosphate de diméthylallyle (DMAPP).

La condensation de ces deux unités aboutit à la formation du pyrophosphate de géranyle (GPP), le précurseur le plus probable des monoterpènes acycliques, tandis que son isomère le pyrophosphate de Néryle (NPP) aboutit aux monoterpènes cycliques comme le montre le Schéma 10 suivant (POULTER, 1978 : POULTER, 1981). Le schéma 11 représente les différentes structures des précurseurs des monoterpènes.

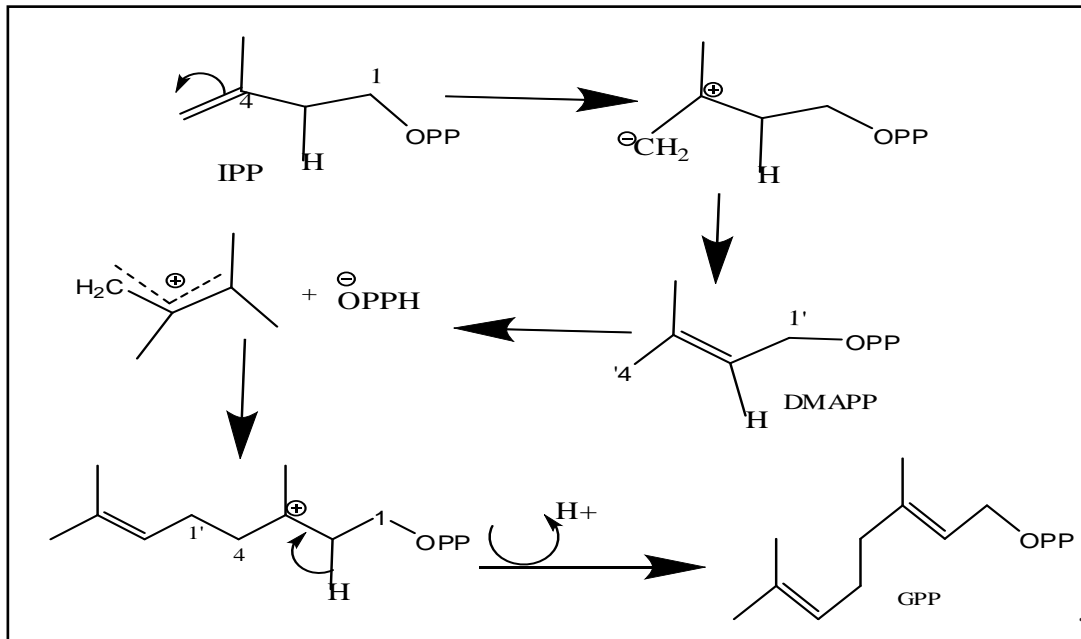


Schéma 10 : Biosynthèse du diphosphate de géranyle (GPP) par le mécanisme d'ionisation-condensation-élimination.

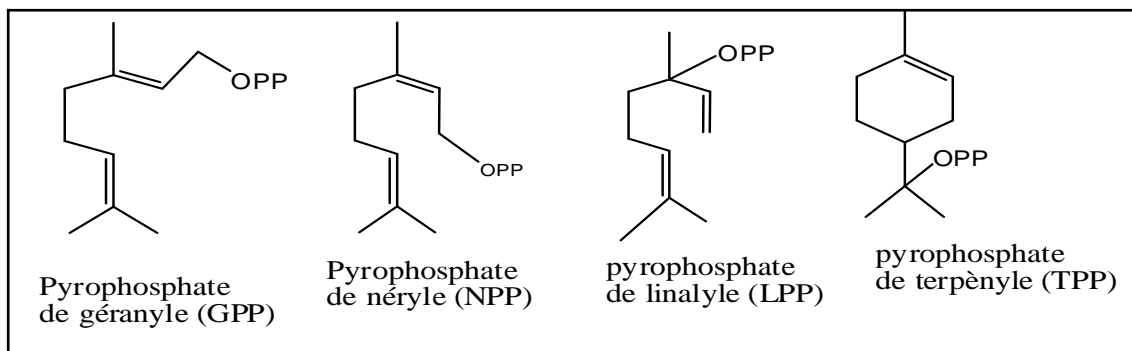


Schéma 11 : Structure des différents précurseurs des monoterpènes

Les monoterpènes cycliques dérivent d'un même mécanisme réactionnel électrophile : ionisation en carbocation géranyle puis réarrangement avec migration du groupement diphosphate et isomérisation pour donner le pyrophosphate de Linalyle (LPP), le LPP à son tour subit ensuite une rotation C2-C3 suivie par une ionisation donnant naissance au cation linalyle. Ce dernier régénère après sa cyclisation en C6-C1 son correspondant monocyclique,

le carbocation α -terpényle véritable plaque tournante dans la biogénèse des monoterpènes cycliques (ALONSO, 1991).

Dans un premier temps, le GPP est convertie par une enzyme en (3R) ou la (3S) Linalyle Pyrophosphate qui, après un changement de conformation, réagit pour donner un cation cyclique comme le montre le schéma 12 suivant :

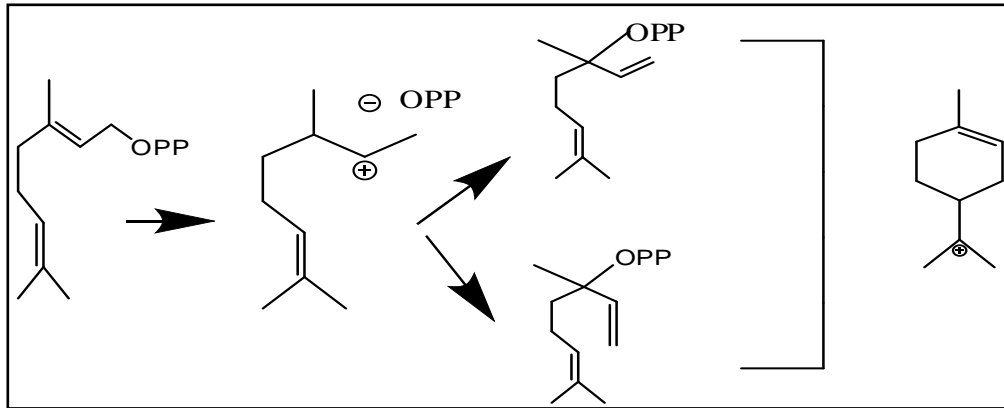


Schéma 12 : Le mécanisme de formation du cation α -terpényle

La condensation du pyrophosphate de géranyle (GPP) avec une molécule de pyrophosphate d'isopentényle (IPP) permet d'obtenir le pyrophosphate de farnésyle (schéma 13), qui est le précurseur des sesquiterpènes (schéma 14) (ALONSO, 2000).

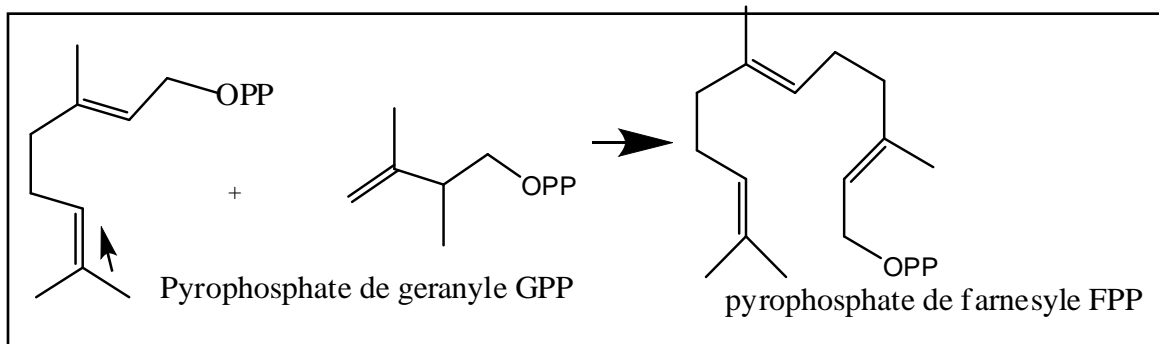


Schéma 13 : Formation du pyrophosphate de farnésyle (FPP) par condensation du GPP avec l'IPP

Le carbocation α -terpényle résultant, reste un intermédiaire et peut réagir de différentes manières. Chaque monoterpène cyclase catalyse généralement une voie de réaction préférentielle schéma 15 (ALONSO, 2000).

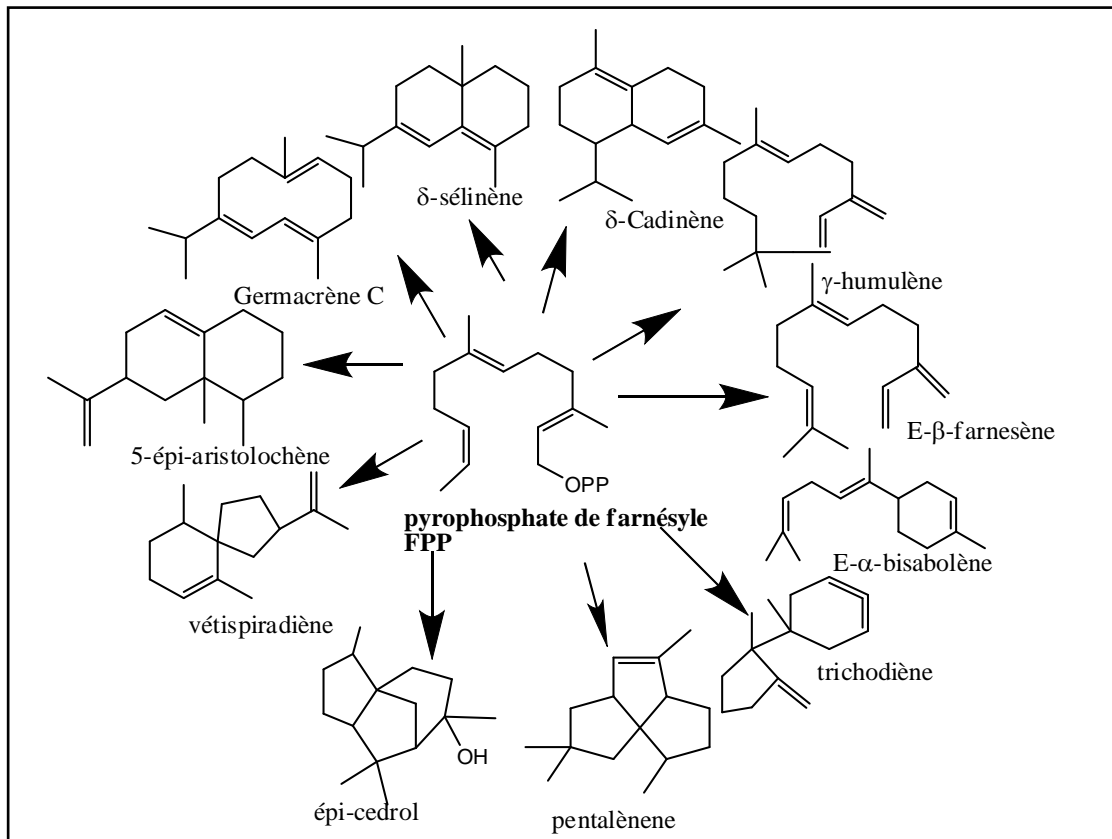


Schéma 14 : Voies de biosynthèse des sesquiterpènes à partir du pyrophosphate de farnésyle

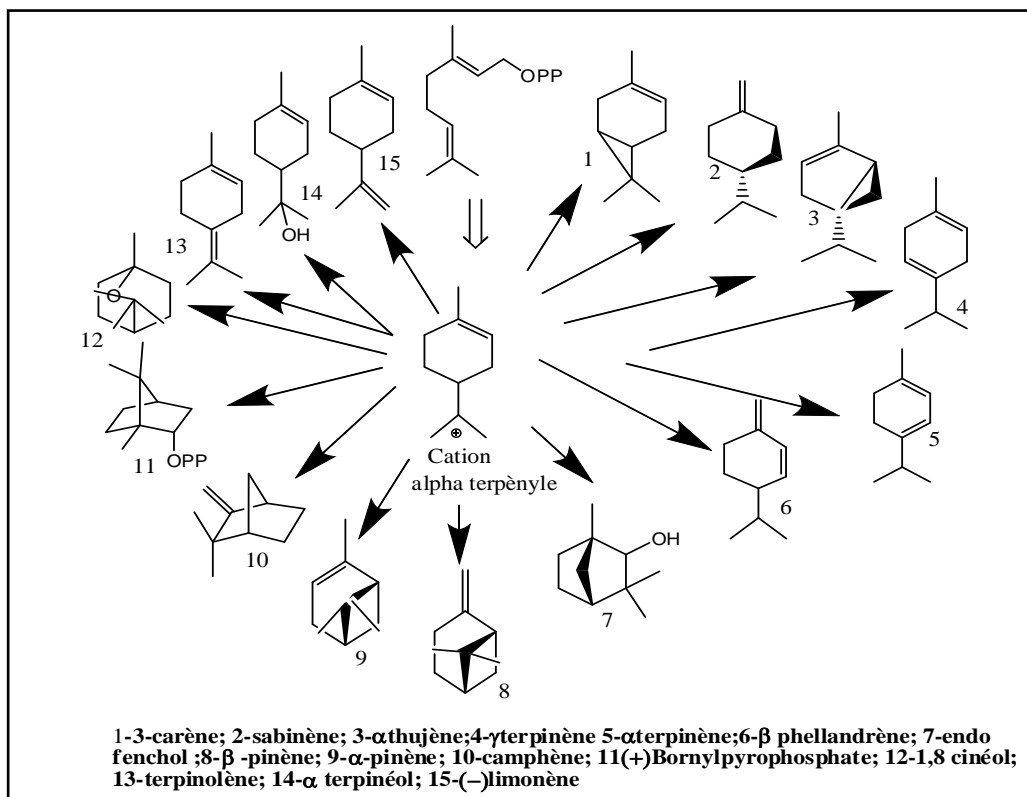


Schéma 15 : Voies de biosynthèse des monoterpènes cycliques à partir du cation α-terpényle

Les réactions se poursuivent et se terminent soit par formation d'hydrocarbures soit par addition d'un nucléophile tel que l'eau et donc formation d'un alcool. L'oxydation et l'estérification de ce dernier donnent naissance aux multiples cétones et acétates connus dans la gamme des huiles essentielles (schéma 16) (ALONSO, 2000).

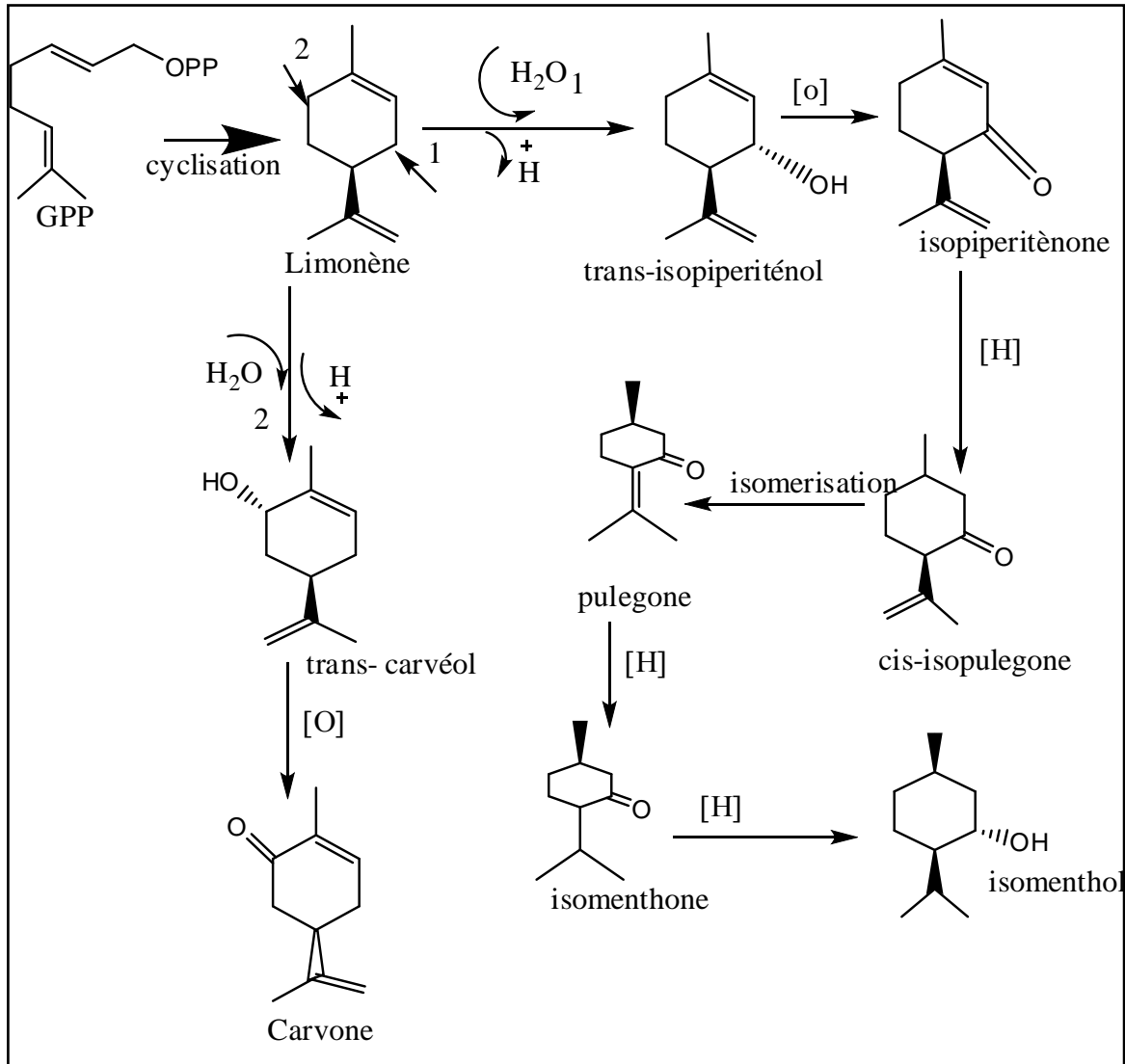


Schéma 16 : Mécanisme de formation des alcools et des cétones terpéniques

B.8-Méthode d'extraction des huiles essentielles

B.8-1 Introduction

Il semblerait que ce sont les Egyptiens, dont l'histoire remonte à plus de 4 000 ans qui furent les premiers à tirer parti du règne végétal dans un souci esthétique et spirituel, de petits vases ayant semble-t-il contenues des essences et parfums ont été retrouvées dans les sarcophages des rois.

Plus tard, la civilisation Arabe dont Bagdad, Bassora et Damas étaient les principaux centres commerciaux, donna une grande impulsion à l'Art de la distillation, grâce à un éminent savant « Abu'Ali al-Husayn ibn 'Abd Allah ibn Sina » (930-1037) connu en Occident sous le nom d'Avicenne, qui inventa autour de l'an 1000 l'alambic et ainsi l'extraction des huiles essentielles par distillation est née (ZHIRI, A. 2006).

Grâce à la découverte de la distillation et à la compréhension des phénomènes qui la régissent, de nombreuses autres techniques d'extraction utilisant un chauffage, ont vu le jour. C'est ainsi que l'hydro-distillation et l'entraînement à la vapeur furent utilisés pour extraire l'huile essentielle d'une grande partie de végétaux.

B.8- 2 Hydro-distillation

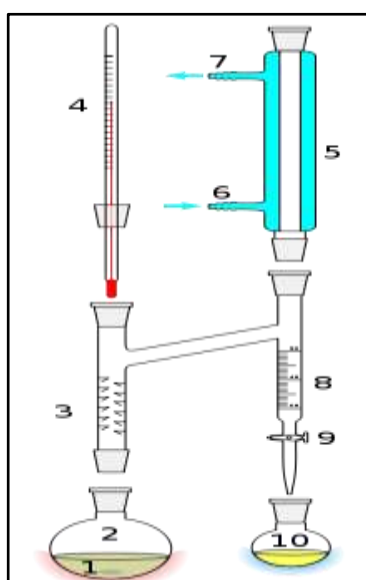
L'hydrodistillation proprement dite, est la méthode normée pour l'extraction d'une huile essentielle (AFNOR1992) Le principe de l'hydrodistillation correspond à une distillation hétérogène. Le procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un bain d'eau. L'ensemble est ensuite porté à ébullition généralement à pression atmosphérique (figure 5). La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales.

Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique. Sachant que la température d'ébullition d'un mélange est atteinte lorsque la somme des tensions de vapeur de chacun des constituants est égale à la pression d'évaporation, elle est donc inférieure à chacun des points d'ébullition des substances pures. Ainsi le mélange azéotropique « eau + huile essentielle » distille à une température égale à 100°C et à pression atmosphérique alors que les températures d'ébullition des composés aromatiques sont pour la plupart très élevées. Une fois condensées, eau et molécules aromatiques du fait de leurs différences de densité, se séparent en une phase aqueuse et une phase organique (l'huile essentielle), comme représenté par le schéma 17 suivant.

Cette méthode est simple dans son principe et ne nécessite pas un appareillage coûteux. Cependant, à cause de l'eau, de l'acidité, de la température du milieu, il peut se produire des réactions d'hydrolyse, de réarrangement, de racémisation, d'oxydation, d'isomérisation, etc. qui peuvent très sensiblement conduire à une dénaturation. (Figure 5).



Figure 5: Montage d'hydrodistillation



- 1 : Barreau magnétique pour l'agitation ou pierres ponce
- 2 : Ballon rond à col rodé contenant le milieu réactionnel
- 3 : Colonne Vigreux
- 4 : Thermomètre gradué
- 5 : Réfrigérant droit
- 6 : Entrée de l'eau de refroidissement
- 7 : Sortie de l'eau de refroidissement
- 8 : Burette
- 9 : Robinet
- 10 : Récipient de récupération du distillat

Schéma 17 : Appareil d'hydro-distillation Dean-Stark.

B.8-3-Entraînement à la vapeur d'eau

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. De la vapeur d'eau traverse la matière végétale située au-dessus d'une grille.

Durant le passage de la vapeur à travers le matériel, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange « eau +huile essentielle ».

B.8-4-Hydrodiffusion

L'hydrodiffusion est une variante de l'entraînement à la vapeur, le flux de vapeur n'est pas ascendant mais descendant. Le principe de cette méthode réside dans l'utilisation de la pesanteur pour dégager et condenser le mélange «vapeur d'eau-huile essentielle» dispersé dans la matière végétale (MEYER-WARNOD, B., 1984). Comme pour l'entraînement à la vapeur d'eau, l'hydrodiffusion présente l'avantage de ne pas mettre en contact le matériel végétal et l'eau. De plus, l'hydrodiffusion permet une économie d'énergie due à la réduction de la durée de la distillation et donc à la réduction de la consommation de vapeur. (**Figure 6**) (LUCCHESI, M.E., 2005).

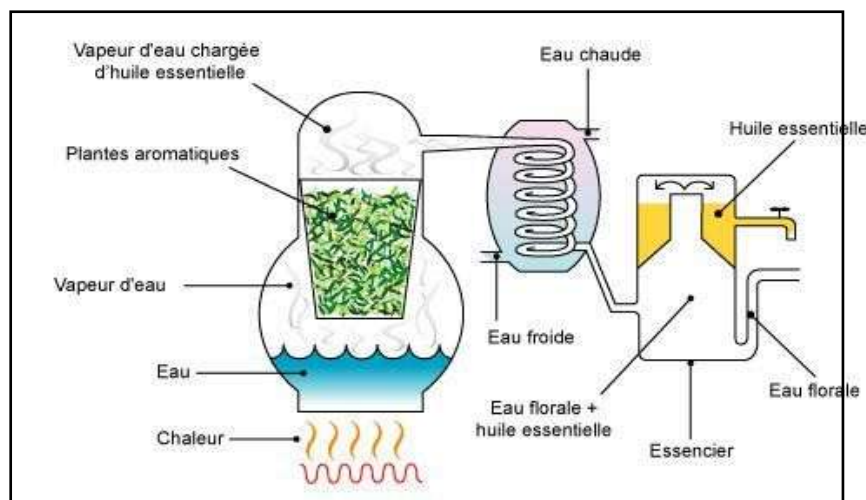


Figure 6: Entraînement à la vapeur d'eau ascendante et descendante

La rareté et la fragilité de certains végétaux permirent l'élaboration de nouvelles techniques d'extraction toujours plus pointues, plus spécifiques et utilisant les dernières avancées technologies offertes, comme l'extraction par les fluides supercritiques ou l'extraction par les micro-ondes. Ces dernières sont mises à contribution afin d'offrir des huiles essentielles dans des délais plus courts par rapport à ceux des techniques traditionnelles.

B.8-5- Extraction par les fluides supercritiques

L'utilisation des fluides supercritiques est assez récente et seul le CO₂ est aujourd'hui universellement employé, en raison de sa disponibilité et des conditions relativement simples d'obtention.

Un fluide est qualifié de supercritique quand il est placé au-delà de son point critique. Ainsi, lorsque l'on porte un composé (liquide ou gazeux) dans des conditions de pression et de température particulières, il cessera d'être liquide ou gazeux pour se trouver à la fois à l'état liquide et gazeux, l'équilibre entre ces deux états se faisant de manière continue et le fluide supercritique présente alors des propriétés solvantes tout à fait remarquables.

Si l'on expose une matière organique à un fluide supercritique, l'état gazeux pénétrera dans les cellules et s'y trouvera en équilibre avec son état liquide dans lequel les molécules vont se dissoudre. Le liquide étant également en équilibre avec l'état gazeux, la vapeur va entraîner hors de la cellule les molécules que l'on cherche à extraire.

Ce type de phénomène est unique et permet de contourner le problème de la barrière cellulaire que certains solvants ne peuvent franchir. Pour récupérer les composés organiques que l'on a cherché à extraire, il suffit de laisser le CO₂ s'échapper sous forme de gaz en le ramenant dans des conditions de pression et de température normales.

L'avantage de cette méthode est la possibilité d'éliminer et de recycler le solvant par simple détente. De plus les températures d'extraction sont basses dans le cas du dioxyde de carbone et non agressives pour les constituants les plus fragiles. A ces différents avantages s'ajoutent ceux de l'innocuité, d'inertie et d'inflammabilité du CO₂.

L'extraction est donc ici plus poussée et surtout beaucoup plus sûre et propre, puisque nous éliminons totalement la présence de solvant et donc de polluant (Figure 7).

Pour information, le CO₂ supercritique est employé à une température d'environ 30°C pour des pressions allant de 74 à 300 fois la pression atmosphérique.

Le gain de temps et les économies ainsi réalisées sont plus qu'appréciables, mais le frein du développement de cette technologie est le coût élevé des appareillages lié à l'application de pressions de plusieurs centaines de bars.

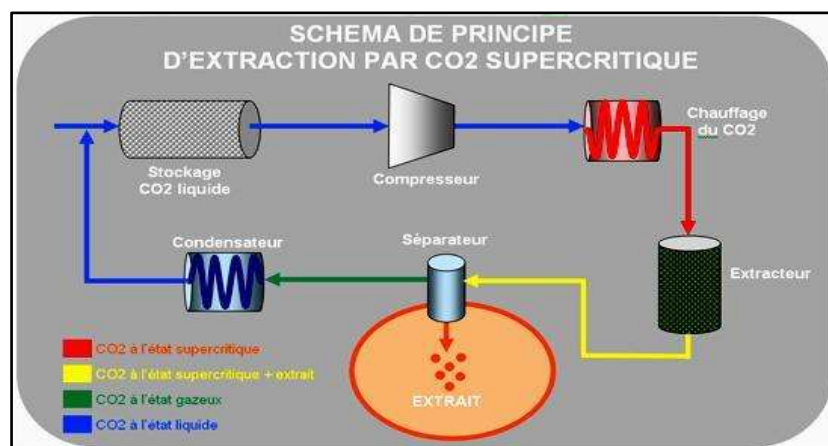


Figure 7 : Installation d'extraction au CO₂ supercritique de laboratoire (PENCHEV, P. 2010)

B.8-6- Extraction aux micro-ondes

L'extraction sans solvant assistée par micro-ondes est inspirée d'un ancien procédé de distillation dite « sèche » utilisé par les alchimistes Arabes, qui consiste en une distillation sèche à l'aide d'un alambic utilisant le soleil comme source de chaleur.

L'extraction assistée par micro-ondes a été développée en remplaçant l'énergie solaire par un chauffage micro-ondes plus performant, plus spécifique et beaucoup moins polluant. Dans ce procédé, la plante est chauffée sélectivement par un rayonnement microondes dans une enceinte, l'huile essentielle est entraînée dans le mélange azéotrope formé avec la vapeur d'eau propre à la plante traitée. Ce procédé, très rapide et peu consommateur d'énergie, livre un produit qui est, le plus souvent, de qualité supérieure à celui du produit d'hydrodistillation (BRUNETON, J. 2009) **figure 8** :

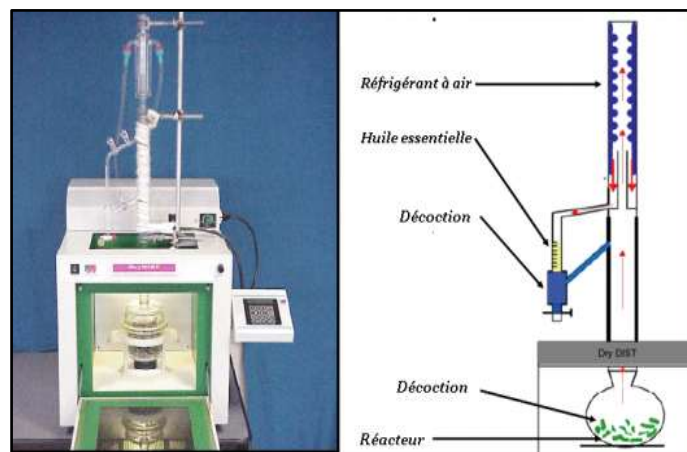


Figure 8 : Appareil d'extraction par micro-ondes

C-Activité Biologique :

C.1- Généralités sur les antioxydants :

Les composés antioxydants font actuellement l'objet de nombreuses études car, en plus d'un intérêt certain dans la conservation des denrées comestibles pour l'industrie agroalimentaire, ils pourraient s'avérer utiles dans la prophylaxie ou le traitement de nombreuses pathologies.

En effet, on met actuellement en évidence le rôle néfaste de processus oxydatifs incontrôlés et de réactions de type radicalaire dans la genèse, l'entretien ou les séquelles d'un nombre croissant de maladies, généralement liées au vieillissement, que leur mécanisme soit bien connu (athérosclérose) ou encore à l'étude (maladies neurodégénératives) (Hennebelle, T., 2006)

Ces dernières années, l'intérêt porté aux antioxydants naturels a augmenté considérablement à cause de leurs propriétés thérapeutiques. Des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir de plusieurs substances naturelles à savoir, les plantes médicinales et les produits agroalimentaires (SANCHEZ-MORENO, 2002 ; MARC, 2004 ; HUANG, 2005).

L'oxygène, indispensable à la vie, est un radical libre : il possède deux électrons non appariés, ceci explique sa grande réactivité. Cependant, la plupart des réactions oxydatives qu'il est susceptible de provoquer spontanément dans un organisme humain sont extrêmement lentes. Il est donc peu toxique par lui-même.

Mais sous l'action de radiations ionisantes, de rayons UV, de métaux de transition ou au cours de réactions enzymatiques, plusieurs espèces beaucoup plus réactives sont produites (Schéma 18).

L'appellation « espèces réactives de l'oxygène » (ERO) inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit, mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante (COHEN, 2002, NOVELLI, 1997) :

- **L'anion-radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)** est issu de la réaction de l'oxygène avec un électron, souvent au niveau de la chaîne de transport d'électrons de la membrane mitochondriale (l'électron est alors transféré par l'intermédiaire d'un radical semi ubiquinone) ou au cours de la lutte des leucocytes contre les bactéries et les virus.

- **Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)** provient d'une réaction entre deux anions superoxyde qui met fin au processus radicalaire. Il s'agit d'un oxydant beaucoup moins puissant, mais on considère qu'il joue avec ce dernier un rôle important dans le stress oxydatif car ils diffusent facilement à travers les membranes vers des organites vulnérables des cellules comme le noyau ou la mitochondrie.

- **L'anion hypochlorite ($ClO^{\cdot-}$)** est produit à partir du peroxyde d'hydrogène par la myéloperoxydase (MPO). Il n'est présent que lors d'infections et peut participer au stress oxydatif lié à celles-ci (Schéma 18).

- **Le radical hydroxyle (HO^{\cdot})** est le produit de la réaction du peroxyde d'hydrogène avec des ions métalliques comme par exemple Fe^{2+} (réaction de Fenton). C'est l'espèce chimique la plus réactive et elle joue un rôle majeur dans la peroxydation lipidique et la destruction du matériel génétique (Schéma 18).

L'oxygène singulet (O_2^1) est produit sous l'effet du rayonnement UV ou par les leucocytes. Il est à l'origine du vieillissement cutané, de la cataracte, de la dégénérescence maculaire liée à l'âge et de certains cancers de la peau (Schéma 18).

· **L'oxyde nitrique (NO[•])**, produit par la NO synthétase, est un vasodilatateur physiologique (on l'appelle parfois EDRF : *endothelium derived relaxing factor*) et joue aussi un rôle de messenger inter neuronal. Il peut avoir un rôle néfaste (Schéma 18).

Le peroxy-nitrite (ONOO⁻) est issu de la réaction entre O₂^{-•} et NO[•], il est très néfaste pour les protéines et les gènes, il est impliqué dans l'athérosclérose, les maladies neurodégénératives, la polyarthrite rhumatoïde et les maladies inflammatoires chroniques intestinales comme la maladie de Crohn (Schéma 18).

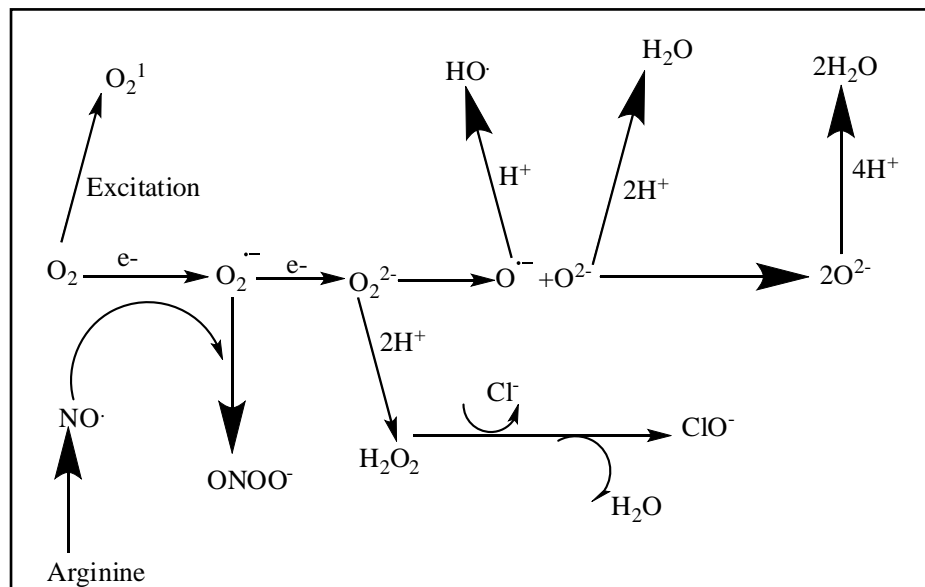


Schéma 18 : Réactions de base de la synthèse et de la dégradation des ERO

En l'absence d'agression extérieure particulière d'origine chimique ou radiative, les ERO sont produites physiologiquement à cause d'imperfections au niveau de la gestion de l'oxygène dans des processus comme la respiration mitochondriale, la phagocytose (au cours de laquelle survient une « flambée respiratoire », qui entraîne la production d'anions superoxyde, peroxyde et hypochlorite, toxiques pour les agents infectieux mais aussi pour les cellules humaines), les réactions de détoxification mettant en jeu les cytochromes P450 ou des oxydases, et le métabolisme des prostanoïdes. La production d'ERO et de radicaux libres est donc normale. Elle joue un rôle et ne devient problématique que si elle est excessive ou survient au mauvais endroit.

En plus de cette production « basale », l'activation de systèmes enzymatiques, lors de situations de stress de l'organisme, peut entraîner une formation accrue d'ERO, dont l'effet sera particulièrement délétère. On considère généralement que, si aucune pathologie n'est

directement et uniquement causée par les ERO, la production excessive de radicaux libres peut entrer en jeu dans l'aggravation de diverses maladies. Un exemple classique est le phénomène d'ischémie-reperfusion observé lors des infarctus du myocarde : la privation d'oxygène entraîne une augmentation de la libération d'enzymes comme la xanthine oxydase qui, une fois l'approvisionnement des cellules rétabli et en présence d'une grande quantité d'oxygène arrivé brutalement, vont synthétiser beaucoup d'ERO, sources de lésions supplémentaires pour l'endothélium cardiovasculaire et responsables d'une partie des séquelles de l'infarctus (ou de toute autre situation d'ischémie).

Les antioxydants peuvent être définis comme les substances qui, présentes à faible concentration par rapport à un substrat oxydable, sont capables de ralentir ou d'inhiber l'oxydation de ce substrat. Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances, comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques, mais aussi de petites molécules hydro- ou liposolubles. L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité de résister à l'oxydation.

Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques. En effet, la plupart des antioxydants synthétisés ou d'origine naturelle possèdent des groupements hydroxyphénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles (OH^\bullet) et superoxydes (O_2^\bullet) (RICE-EVANS, 1995, BURDA, 2001, BARTOSZ, 2003, ANTOLOVICH, 2002).

C.2-Méthodes de détermination de l'activité antioxydante

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, *in vitro* et *in vivo*, l'activité antioxydante par piégeage de différents radicaux (RICARDO DA SILVA, J.M. . 1991, BENZIE, I. F., STRAIN, J. 1996, RE, R. 1999, SHARMA OM, P., BHAT, T. K. 2009) on cite:

- 1- Le test du diphenylpicrylhydrazyl (**DPPH**).
- 2- La décoloration ABTS, acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzo-thiazoline-6-sulfonique) ($\text{ABTS}^{+\bullet}$).
- 3- Le test de blanchissement ou de décoloration du β -carotène (Système β -carotène /Acide linoléique).
- 4- Le test utilisant le pouvoir réducteur des ions ferriques, chélation des ions ferreux (**FRAP**) en anglais: "ferric reducing antioxidant power".

5- Le test utilisant le pouvoir réducteur des ions cupriques (**CUPRAC**) en anglais: "Cupric reducing antioxidant capacity".

6- Test utilisant la fluoriscine en présence de l'oxydant, en mesurant la dégradation de la fluoescine par analyse spectro-fluoro-métrique (ORAC)

Ci-après, sont représentés les différents tests antioxydants effectués sur les extraits des espèces étudiées.

C.2.1-Test au DPPH :

Principe : Le DPPH est un radical libre stable que nous avons utilisé pour remplacer les radicaux libres produits par les cellules en réponses à des stress internes ou externes. En présence d'un antioxydant, la couleur violette caractéristique du DPPH virait au jaune (**schéma 19**), La mesure par spectrophotométrie est réalisée à $\lambda_{\text{max}} = 517 \text{ nm}$, l'activité est déterminée par la mesure de la diminution de l'absorbance.

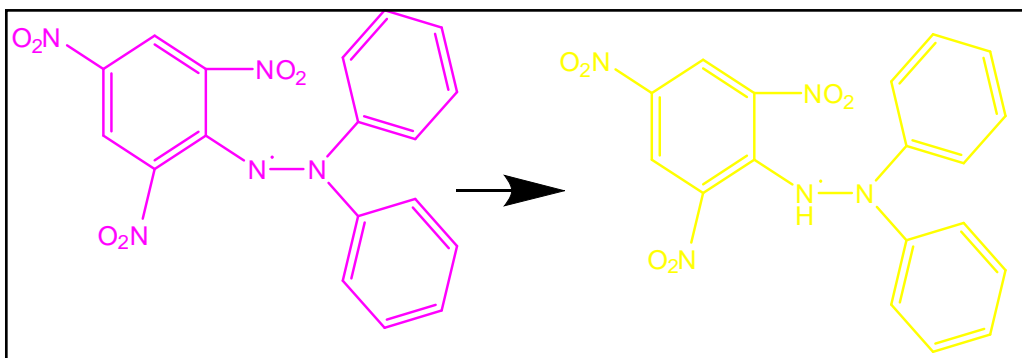


Schéma 19: Structure 1,1-DiPhényl-2-Picryl-Hydrazyl et 1,1-DiPhényl-2-Picryl-Hydrazine
L'ajout de différentes dilutions des extraits à la solution de DPPH permettait de déterminer celle qui abaissait le plus l'absorbance.

Application : Cette activité a été testée selon la méthode décrite par (BRAND . 1995)

Pourcentage de l'activité antioxydante = $(\text{Abs DPPH} - \text{Abs finale}) / \text{Abs DPPH} \times 100$

Abs DPPH : Absorbance de départ de la solution 1 molaire du DPPH.

Abs finale: La valeur stable de l'absorbance après l'ajout de l'extrait.

2-Le test à l'ABTS :

La décoloration ABTS, acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS•+) ou la méthode TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity)

La méthode TEAC est un test de décoloration basé sur la capacité d'un antioxydant à réduire le radical-cation $ABTS^{+\bullet}$, le 2,2 azinobis (acide 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) (Pellegrini et coll., 2003). Cette méthode détermine l'activité antioxydante des composés hydrophiles et lipophiles qui peuvent se dissoudre dans une solution aqueuse ou de l'éthanol acidifié (SANCHEZ-MORENO, 2002). La valeur TEAC correspond à la concentration (mmol/l ou mg/l) de Trolox (l'analogue hydrophile de la vitamine E) ayant la même activité que la concentration unitaire du composé à tester (CQVB, 2008 ; USDA, 2007; Marc , 2004). Cette méthode a été employée dans de nombreux laboratoires en raison de sa simplicité, de sa rapidité et de sa corrélation avec l'activité biologique des antioxydants. Les principaux inconvénients de la méthode TEAC sont les suivantes: le radical-cation $ABTS^{+\bullet}$ doit être généré à partir des sels ABTS, les radicaux libres générés ne sont pas stables durant de longues périodes et il est difficile de comparer les valeurs à d'autres études parce que la technique n'est pas standardisée (SANCHEZ-MORENO, 2002). Il est préférable d'utiliser cette méthode pour fournir un ordre de classement aux antioxydants à l'étude (PHIPPS , 2007; PRIOR, 2005).

L' $ABTS^{\bullet}$ est un radical libre stable. Il est très utilisé pour évaluer le pouvoir antioxydant des fluides biologiques, des huiles essentielles, des extraits ou bien des composés purs. Rice-EVANS, C. A . 1995). Ce radical cation est facilement formé par oxydation en présence de persulfate de potassium pour donner une solution colorée en vert-bleu **schéma 20** :

Le radical $ABTS^{+\bullet}$ (absorbant à 734 nm) est formé par arrachement d'un électron e^- à un atome d'azote de l'ABTS. En présence de Trolox (ou d'antioxydant donneur de H^{\bullet}), l'atome d'azote concerné piège un H^{\bullet} , conduisant à l' $ABTS^+$, ce qui entraîne la décoloration de la solution (LIEN E.J . 1999).

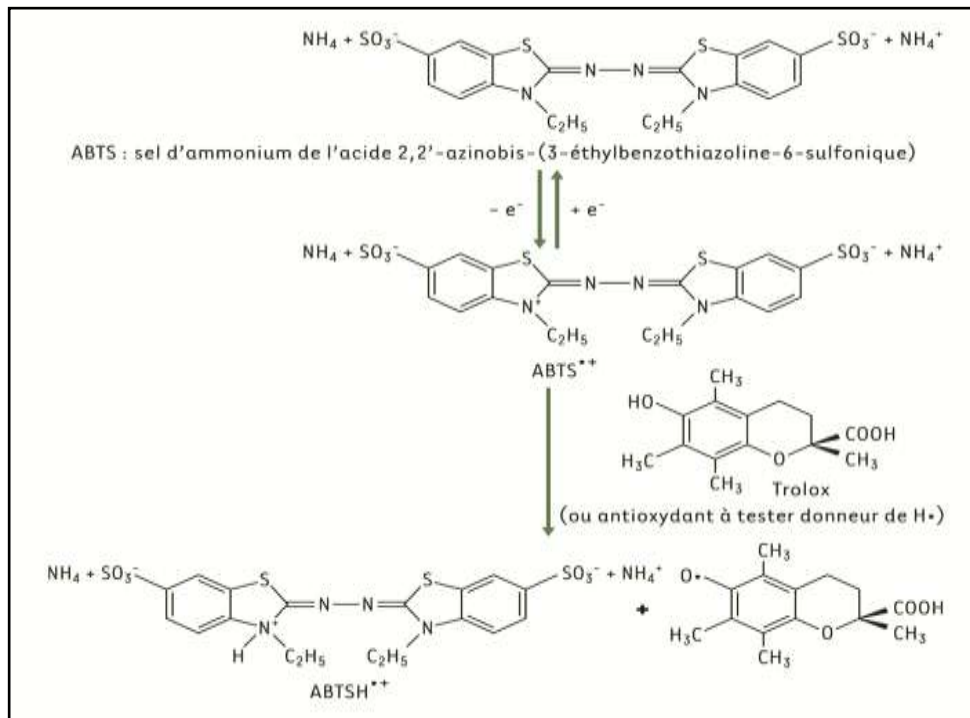


Schéma 20 : Formation et piégeage du radical ABTS^{•+} par un antioxydant donneur de H•.

Le radical formé est stable avec des coefficients d'extinction molaire élevés à 416, 650 et 734 nm. La concentration de ce radical peut être déterminée en mesurant l'absorbance à ces longueurs d'onde (BARTOSZ, G. 2003).

3- Le test (FRAP)

La méthode FRAP, un dosage colorimétrique du transfert d'électrons, évalue la réduction (le passage de la forme ferrique à ferreux) en présence d'un antioxydant (PELLEGRINI ., 2003; CAO, 1998; CAO et PRIOR 1998). Une molécule change de couleur une fois qu'elle est réduite, ce qui permet la quantification par spectrophotométrie. Les avantages de cette méthode sont qu'elle est simple, rapide, peu coûteuse et robuste. En revanche, les désavantages sont qu'elle n'est pas capable de détecter les protéines ou les composés contenant le group SH, incluant les thiols, qui peuvent transférer l'hydrogène. Pour cette raison, le test FRAP sous-estime souvent l'activité antioxydante du sérum sanguin (PHIPPS, , 2007; PRIOR, , 2005)

La méthode de la réduction du fer est basée sur la réduction de fer ferrique en sel de fer ferreux par les antioxydants qui donnent la couleur bleue (OU, B. 2001). Selon le schéma 20) la capacité chélatrice des fractions étudiées est déterminée selon la méthode de (BENZIE

I.F.F. et STRAIN, J. 1996). La méthode est basée sur l'inhibition de la formation du complexe Fe(II)-Ferrosine après le traitement des échantillons avec les ions Fe^{2+} , Fe^{3+} , -TPTZ+ antioxydant réduit $\rightarrow \text{Fe}^{2+}$ -TPTZ (bleue intense à 595 nm).

Chélation d'ions ferreux (PRIOR, R. L . 2005).

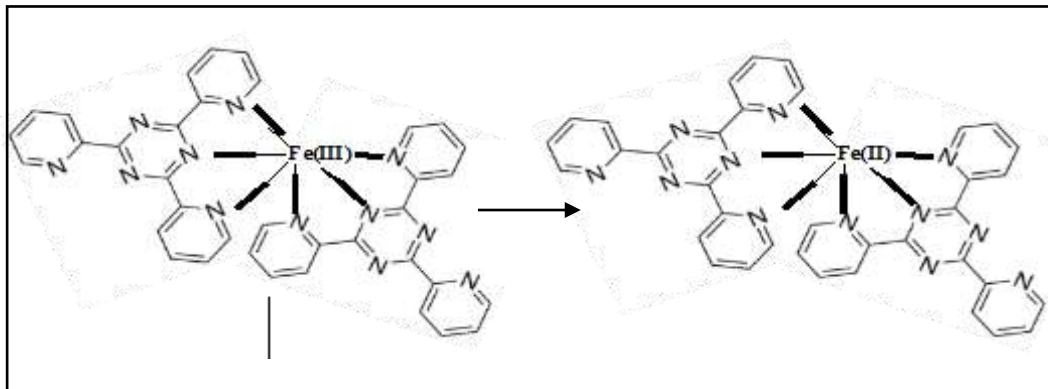



Schéma 21 : Chélation d'ions ferreux

4-Test de L'ORAC :

La méthode ORAC, une analyse spectrofluorimétrique, mesure la dégradation de la fluorescéine en présence de l'oxydant AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropane)] dichlorhydrate) (CAO, 1998). La présence d'un antioxydant ralentit la décomposition de la fluorescence et ce déclin de l'intensité de la fluorescence est quantifié à l'aide d'un fluorimètre (CAO, 1998; PRIOR, 2005). La méthode ORAC fait intervenir une mesure cinétique afin de déterminer le potentiel antioxydant. Des courbes de décroissance sont tracées, l'intensité de fluorescence en fonction du temps, et la zone située entre les deux courbes de décroissance (en présence d'un antioxydant ou non) est calculée. Le potentiel antioxydant est quantifié par la Trolox, un analogue de la vitamine E. Le calcul des aires sous la courbe est la seule méthode qui détermine à la fois le pourcentage d'inhibition et le temps d'inhibition d'une réaction (CQVB, 2008; LAGUERRE, 2007; CAO, 1998; AVANT, 2003).

La méthode ORAC a pour avantage d'être sensible, standardisée et adaptée aux matrices hydrophiles et lipophiles (CQVB, 2008). Les inconvénients principaux de cette méthode sont qu'elle varie selon la température, elle ne mesure que des radicaux peroxydes, et elle ne tient pas compte d'autres radicaux qui sont physiologiquement réactifs (CQVB, 2008; PHIPPS, 2007).



REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES
DU CHAPITRE I

A

- ADAMS, C.; BRANTNER, V.V.**, Estimating the costs of new drug development: is it really 802 million dollars? Social Science Research Network. 2004.
- AFNOR** (Normes), Recueil des normes françaises, Huiles essentielles, Paris, 1992.
- AHMAD, N.; MUKHTAR, H.**, *Nutr. Rev.*, Green tea polyphenols and cancer: biologic mechanisms and practical implications, (57), 1999, 78-83.
- AKHLAGHI, H.**, *Chem. Nat. Compd.*, The essential oils from flowers, stems and leaves of *Ferulagoangulata* from Iran, (44), 2008, 396-397.
- ALIBERT, G.; RANJEVA, R.; BOUDET, M.A.**, *Physiol. Veg.*, Organisation subcellulaire des voies de synthèse des composés phénoliques, (15), 1977, 279-301.
- ALONSO, W.R.; CROTEAU, R.**, *Arch. Biochem. Biophys.*, Purification and Characterization of the Monoterpene Cyclase -Terpinene Synthase from *Thymus vulgaris*, (286), 1991, 511-517.
- AMARTI, F.; SATRANI, B.; GHANMI, M.; FARAH, A.; AAFI, A.; AARAB, L.; EL AJJOURI, M.; CHAOUCH, A.**, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. Du Maroc, (14), 2010, 141-148.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K.**, *Analyst Comments Toxicol.*, Methods for testing antioxidant activity, (127), 2002, 183-198.
- APAK, R.; GUÇLU, K.; OZYUREK, M.; CELIK, S. E.**, *Microchim Acta*. Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay, (160), 2008, 413-419.
- APAK, R.; GÜÇLÜ, K.; ÖZYÜREK, M.; KARADEMIR, S. E.**, *J. Agri. Food Chem.*, Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E. using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method, (52), 2004, 7970-7981.
- ARRAS, G.; USAI, M.**, *J. Food Prot.*, Fungitoxic activity of 12 essential oils against four postharvest citrus pathogens: Chemical analysis of *Thymus capitatus* oil and its effect insubatmospheric pressure conditions, (64), 2001, 1025-1029.
- ASCENSÃO, L.; MARQUES, N.; PAIS, M.S.**, *Ann. Botany*, Glandular trichomes on vegetative and reproductive organs of *Leonotisleonurus* (Lamiaceae), (75), 1995, 619-626.

ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION. Huiles essentielles, AFNOR, Paris.NFT 75-006, 1986.

B

BACON, J.D. MABRY, T. A.,*Rev. Latino. Quim.*,UV Spectral procedures for distinguishing free and substituted 7-hydroxyl groups in flavones and flavanols, (7), 1976,83-86.

BAHORUN, T.,*Food Agri. Resarch Coun.*,Substances naturelles actives: la flore mauricienne, une sourced'approvisionnement potentielle, 1997,83-94.

BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M.*Food.Chem.Toxicol.*, Biological effects of essential oils,(46), 2008, 446-475.

BARTOSZ, G., *Comm. toxoco.*, Generation of reactive oxygen species in biological systems, (9), 2003, 5-21.

BENNICI, A.; TANI, C.,*Flora*, Anatomical and ultra structural study of the secretory cavity development of *Citrus sinensis*and *Citrus limon*: evaluation of schizolysigenous ontogeny, (199),2004, 464-475.

BENAYACHE, S.; BENAYACHE, F.; BENYAHIA, S.; CHALCHAT, J.C.; GARRY, R.P., *J. Essent. Oil Res.*, Leaf Oils of some *Eucalyptus* Species Growing in Algeria, (13), 2001, 210-213.

BENYAHIA, S., Recherche des métabolites secondaires terpéniques et phénoliques d'espèces d'Eucalyptus Algériens. Détermination structurale et activité biologique, Thèse de doctorat d'état, Université Mentouri, Constantine, 2006.

BENZIE, I. F.; STRAIN, J., *Analy. Biochem.*,The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as ameasure of antioxidant power: The FRAP assay,(239),1996, 70-76.

BLOCK, G.; PATTERSON, B.; SUBAR, A., *Nutr. Cancer*, Fruit, vegetables and cancerprevention: a review of the epidemiological evidence, (18), 1992, 1-29.

BLOIS, M. S., *Nature*, Antioxidant determinations by the use of stable free radical.(181), 1958,1199-1200.

BRUNETON, J., Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Tec & Doc. 4ème Ed Lavoisier, Paris, 2009.

BURDA, S.; OLESZEK, W.,*J. Agri. Food Chem.* Antioxidant and antiradical activities of flavonoids, (49),2001, 2774-2779.

C

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R.L., *Free Radic. Biol. Med.*, Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships, (22), 1997, 749-760.

- CHAMI, F.**, Evaluation in vitro de l'Action Antifongique des Huiles Essentielles d'Origan et de Girofle et de leurs Composés Majoritaires in vivo Application dans la Prophylaxie et le Traitement de la Candidose Vaginale sur des Modèles de Rat et de Souris Immunodéprimés, Thèse de Doctorat, Université Sidi Mohamed Ben Abdallah, Fès, 2005
- CHAVERRI, C.; CICCIO, J. F.**, *Int. J. Trop. Biol.*, Essential oil of trees of the genus *Ocotea* (Lauraceae) in Costa Rica., I. *Ocoteabrenesii*, (53), 2005, 431-436.
- CHEBIL, L.**, Acylation des flavonoïdes par les lipases de *Candida antarctica* et de *Pseudomonas cepacia* : études cinétique, structurale et conformationnelle, Thèse de doctorat de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, 2006.
- COOK, N.C.; SAMMAN, S.**, *J. Nutr. Biochem.*, Flavonoids-chemistry, Metabolism, cardioprotective effects and dietary sources, (7), 1996, 66-76.
- CORDELL, G.A.; COLVARD, M.D.**, *J. Ethnophar.*, Some thoughts on the futures of ethnopharmacology, (100), 2005, 5-14.
- COS, P.; YING, L.; CALOMME, M.; HU, J. P.; CIMANGA, K.; POEL, B.V.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.J.; BERPHE, D.V.**, *J. Nat. Prod.*, Structure-Activity Relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of Xanthine Oxidase and Superoxide scavengers, (61), 1998, 71-76.
- COWAN, N. M.**, *Clinical Microb. Rev.*, Plant products as anti-microbial agents, (12), 1999, 564-582.
- CUTLER, S.J.; CUTLER, H.G.**, *Biologically active natural products: Pharmaceuticals*. CRC Press, New-York, 2000, 277.

D

- DAVIS E.M.; CROTEAU, R.**, *Top. Curr. Chem.*, Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes, (209), 2000, 53-95.
- DECKER, E. A.; WELCH, B.**, *J. Agri. Food Chem.*, Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food, (38), 1990, 674-677.
- DENDOUGUI, H.**, Thèse de doctorat d'Etat en Chimie (en arabe), Université MENTOURI, Constantine. 2002.
- DIXON, R.A.**, *Annu. Rev. Plant. Biol.*, Phytoestrogens, (55), 2004, 225-261.
- DJARRI, L.; MEDJROUBI, K.; AKKAL, S.; ELOMRI, A.; SEGUIN, E.; VÉRITÉ, P.**, *Grasas y Aceites*, Chemical composition of carrot seeds (*Daucus carota* L.) cultivated in Turkey: characterization of the seed oil and essential oil, (58), 2007, 359-365.

DONGMO, P.M.J.; KUATE, J.; BOYOM, F.F.; DUCELIER, D.; DAMESSE, F.; ZOLLO, P.H.A.; MENUT, C.; BESSIERE, J.M., *Fruits*, Composition chimique et activité antifongique in vitro des huiles essentielles de *Citrus* sur la croissance mycélienne de *Phaeoramularia angolensis*, (57), 2002,95-104

DURAFFOURD, C.; LAPRAZ, J-C.; CHEMLI, R., La plante médicinale de la tradition à la science. 1er congrès Intercontinental. Tunis. Ed. Granche. Paris, 1997.

E

EL-RHAFFARIL.; ZAID, A., Pratique de la phytothérapie dans le sud-est du Maroc (Tafilalet). Un savoir empirique pour une pharmacopée rénovée. Origine des pharmacopées traditionnelles et élaboration des pharmacopées savantes, 2004.

F

FABRICANT, D.S.; FARNSWORTH, N.R., *Environ Health Perspect.*, The value of plants used in traditional medicine for drug discovery, (109), 2001, 69-75.

FAGGIOTTO, A.; POLI, A.; CATAPANO, A., *Curr. Opin. Lipido.*, Anti-oxidants and coronary artery disease, (9), 1998, 541-549.

FERRARI, J., Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des Thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles: *Gnidiainvolucrata* Steud. ex A. Rich., thèse de doctorat, Lausanne, 2002.

FREEMAN, R.R., High Resolution Gas Chromatography, Second edition; Hewlett-Packard, 1981.

FUCHS, J., *Free Rad. Biol. Med.*, Potentials and limitations of the natural anti-oxidants RRR- α -tocophérol, L-ascorbic acid and b-carotene in cutaneous photoprotection, (25), 1998, 848-873.

G

GAFNER, S.; WOLFENDER, E.F.; MAVI, S.; HOSTETTMAN, K., *Planta Med.*, Antifungal antibacterial chalcones from *Myricaserrata*, (62), 1996, 67-69.

GAZIM, Z.C.; REZENDE, C.M.; FRAGA, S.R.; SVIDZINSKI, T.I.E.; CORTEZ, D.A.G., *Braz. J. Microbiol.*, Antifungal Activity of the Essential Oil from *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) Growing in Brazil, (39), 2008, 61-63.

GEIGER, J. L., *Int. J. Aromather.*, The essential oil of ginger, *Zingiber officinale*, and anaesthesia, (15), 2005, 7.

GERSBACH, P.V.; REDDY, N., *Ann. Bot.*, Non-invasive localization of thymol accumulation in *Carumcapiticum* (Apiaceae) fruits by chemical shift selective magnetic resonance imaging, (90), 2002, 253-257.

GLISIC, S.B.; MISIC, D.R.; STAMENIC, M.D.; ZIZOVIC, I.T.; ASANIN, R.M.; SKALA, D.U., *Food Chemistry*, Supercritical carbon dioxide extraction of carrot fruit essential oil: Chemical composition and antimicrobial activity, (105), 2007, 346-352.

GORDON, M.; CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J.; SNADER, K.M., *J. Nat. Prod.*, Natural products in drug discovery and development, (60), 1997, 52-60.

GORDON, H.M., *Nat. Prod. Rep.*, Dietary Antioxydants in Disease Prevention, (13), 1996, 265-273.

GULCIN, I., *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, Measurement of antioxidant ability of melatonin and serotonin by the DMPD and CUPRAC methods as trolox equivalent, (23), 2008, 871-876.

H

HARBORNE, J.B., *Annual Proce. Phytoch. Socie. Europe*, Phenolics and plant defence, (25), 1985, 393-408.

HARBORN, J. B., *The flavonoïds: advances in research since 1980*, Chapman and Hall, London, 1988.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A., *Phytochemistry*, Advances in flavonoid research since 1992, (55), 2000, 481-564.

HATANAKA, A.; KAJIWARA, T.; SEKIYA, J. *FlavourFragr. J.*, Composition of the essential oil of aerial parts of an endemic species of the Apiaceae of Algeria, *Daucusreboudii* Coss., (21), 2006, 647-649.

HAYROBERT, K.M.; WATERMAN, P.G., *Volatile Oil Crops, Their Biology, Biochemistry and Production*, John Wiley and Sons Inc., New York, 1993.

HOLLMANN, P.C.H.; KATAN, M.B., *Arch. Toxicol. Suppl.*, Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man, (20), 1998, 237-248.

HOWES, M-J. R.; SIMMONDS, M.S.J.; KITE, G.C., *J. Chromat. A*, Evaluation of the quality of sandalwood essential oils by gas, chromatography-mass spectrometry, (1028), 2004, 307-312.

HUMMER, W.; SCHREIER, P., *Mol. Nutr. Food Res.*, Analysis of proanthocyanidins, (52), 2008, 1381-1398.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L., *J. Agri. Food Chem.* The chemistry behind antioxidant capacity assays, (53), 2005, 1841-1856.

I

INOUYEA, S.; TAKIZAWAB, T.; YAMAGUCHI, H., *J. Antimicrob. Chemother.*, Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact, (47), 2001, 565-573.

J

JHAM, G. N.; DHINGRA, O.D.; JARDIM, C.M.; VALENTE, V.M.M., *Fitopatol.Bras.*, Identification of the Major Fungitoxic Component of *Cinnamon* Bark Oil, (30), 2005, 404-408.

JURD, L., *The Chemistry of Flavonoid Compounds*, Pergamon Press, Oxford, 1962.

JURD, L.; HOROWITZ, R., *Spectral properties of flavonoid compounds*, pergamon press, Oxford, 1962.

JURD, L.; HOROWITZ, R., *Spectral properties of flavonoid compounds*, in: "The chemistry of flavonoid compounds", Pergamon Press, New York, 1962.

K

KATA, M., *Am. J. Clin. Nutr.*, Flavonoïds and heart disease, (65), 1997, 1542-1543.

WEISBURGER, J., *Nutr. Cancer*, Green tea and cancer in humans: a review of the literature, (31), 1998, 151-159.

KATSIOTIS, S.T.; CHATZOPULOU, P.; SVENDSEN, A.B.,*Sci. Pharm.*, The Essential Oil of *Thymus sibthorpii* Benth. Growing Wild in Greece, (58), 1990, 303-306.

KITTA, K.; HAGIWARA, Y.; SHILAMOTO, T.,*J. Agric. Food.Chem.*, Antioxidative activity of an Isoflavonoid, 2''-O-Glycosylisovitexin Isolated from Green barley leaves,(40), 1992, 1843-1845.

KOCHS, G.; GRISEBACH, H.,*Eur. J. Biochem.*, Enzymic synthesis of isoflavones, (155), 1986, 311-318.

KOUAME, J.; GNOULA, C.; PALE, E.; BASSOLE, H.; GUISSOU, I. P.; SIMPORE, J.;NIKIEMA, J.B., *Sciences de la Santé. Etude des propriétés cytotoxiques et anti-radicalaires d'extraits de feuilles et de galles de Guierasenegalensis* J. F. Gmel (Combretaceae). Science et technique, (32), 2009, 14.

KURT B.G. TORSSELL, *Nat. Prod. Chem.*, A mechanistic, biosynthetic and ecological approach, Apotekarsocieteten, Stockholm, 1998.

L

- LARSONN, J.; GOTTFRIES, J.; BOHIN, L.; BACKLUND, A.,** *J. Nat. Prod.*, Expanding the ChemGPS chemical space with natural products, (68), 2005, 985-991.
- LEBRETON, P.; JAY, M.; VOIRIN, B.; BOUCHEZ, M.P.,** *Chim. Anal. Fr.*, Sur l'analyse qualitative et quantitative des flavonoïdes, (49), 1967, 375-383.
- LEE, K.H.,** *J. Nat. Prod.*, Current developments in the discovery and design of new drug candidates from plant natural product lead, (67), 2004, 273-283.
- LIEN, E.J.; REN, S.; BUI, H.H.; WANG, R.,** *Free Radic. Biol. Med.*, Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants, (26), 1999, 285-94.
- LORENZO, D.; PAZ, D.; DELLACASSA, E.; DAVIES, P.; VILA, R.; CANIGUERAL, S.,** *Braz. Arch. Biol. Techn.*, Essential oils of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguay, (45), 2002, 519-524.
- LUCCHESI, M.E.,** Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes, Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles, Thèse de doctorat en sciences, Université de la REUNION, 2005.

M

- MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B.,** The systematic identification of flavonoids, Springer-Verlag, New York, 1970.
- MARC, FR.; DAVIN, A.; DEGLENE-BENBRAHIM, L.; FERRAND, C.,** *Médecine sciences*, Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *Erudit, M/S* : (20), 2004, 458-463.
- MARFAK, A.,** Radiolyse gamma des flavonoïdes, Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation de depsides, thèse de doctorat, Limoges, 2003.
- MARKAKIS, P.,** Anthocyanins as food colors, Academic Press. New York, 1982.
- MARKHAM, K. R.,** Techniques of flavonoids identification, Academic press, London. 1982.
- MARKHAM, K.R.,** Method in plant biochemistry, Academic Press, London, 1989.
- MARKHAM, K.R.; MABRY, T.J.,** *Phytochemistry*, A procedure for the ultraviolet spectral detection of *ortho*-dihydroxyl groups in flavonoids, (7), 1968, 1197-1200.
- MATA, A.T.; PROENC, C.; FERREIRA, A.R.; SERRALHEIRO, M.L.M.; NOGUEIRA, J.M.F.; ARAUJO, M.E.M.,** *Food Chem.*, Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices, (103), 2007, 778-786.
- MBATA, T.I.; SAIKIA, A.,** *Int. J. Food Saf.*, Antibacterial activity of essential oil from *Ocimum gratissimum* on *Listeria monocytogenes*, (7), 2006, 15-19.

MOJAB, F.; NICKAVAR, B., *Iran. J. Pharm. Res.*, Composition of the Essential Oil of the Root of *Heracleum persicum* from Iran, (2), 2003, 245-247.

MEYER-WARNOD, B., *Perfum. Flavor.*, Natural essential oils: extraction processes and applications to some major oils, (9), 1984, 93-103.

N

NITSCH, J.P.; NITSCH, C., *Bull. Soc. Fr., Synergistes naturels des auxines et des gibberelilines*, (26), 1961, 2237-2240.

O

OROOJALIANA, F.; KASRA-KERMANSIAHIA, R.; AZIZIC, M.; BASSAMID, M.R., *Food Chemistry*, Phytochemical composition of the essential oils from three Apiaceae species and their antibacterial effects on food-borne pathogens, (120), 2010, 765-770.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L., *J. Agri. Food Chem.*, Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe, (49), 2001, 4619-4626.

OUSSALAH, M.; CAILLET S.; LACROIX, M., *J. Food Prot.*, Mechanism of Action of Spanish *oregano*, Chinese *cinnamon* and *savory* essential oils on *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. (69), 2006, 1046-1055.

ÖZCAN, M.M.; CHALCHAT, J.C., *Chem. Phys. Lipids*, Biosynthesis pathway for C6-aldehydes formation from linolenic acid in green leaves, (44), 1987, 341-361.

P

PATTNAIK, S.; SUBRAMANYAM, V. R.; BAPAJI, M.; KOLE, C. R., *Microbios*, Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils, (89), 1997, 39-46.

PENCHEV, P., Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basse et haute pressions, Thèse de doctorat, Université de Toulouse, 2010.

POULTER, C.D.; RILLING, H.C., *J. Acc. Chem. Res.*, The prenyl transfer reaction. Enzymatic and mechanistic studies of the 1'-4 coupling reaction in the terpene biosynthetic pathway, (11), 1978, 307-313.

POULTER, C.D.; RILLING, H.C., *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds*, Vol.I, Ed. Wiley, New York, 1981.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K., *J. Agri. Food Chem.*, Standardize methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, (53), 2005,4290-4302.

R

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C., *Free Rad. Biol. Med.*, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, (26), 1999,1231-1237.

RICARDO DA SILVA, J.M.; DARMON, N.; FERNANDEZ, Y.; MITJAVILA, S., *J. Agri. Food Chem.*, Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. (39), 1991, 549-1552.

RICCIARDELLI D'ALBORE, G.C., *Apidologie*, Les insectes pollinisateurs de quelques ombellifères d'intérêt agricole et condimentaire (*Angelica archangelica* L., *Carum carvi* L., *Petroselinum crispum* A.W. HILL., *Apium graveolens* L., *Pinpinella anisum* L., *Daucus carota* L., *Foeniculum vulgare* MILLER V. *Azoricum* THELL.), (17), 1986, 107-112.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; BOLWELL, P. G.; BRAMLEY, P. M.; PRIDHAM J. B., *Free Rad. Res.*, The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids, (22), 1995,375-383.

ROLLINGER, J.M.; HAUPT, S.; STUPPNER, H.; LANGER, T. J., *J. Chem. Inform and Computer Scie.*, Combining ethnopharmacology and virtual screening for lead structure discovery: COX-inhibitors as application example, (44), 2004, 480-488.

S

SAAD, H-E.A.; EL-SHARKAWY, S.H.; HALIM, A.F., *Pharm. Acta. Helv.*, Composition of the essential oils of the leaves and stems of *Torilis arvensis*, (70), 1995, 85-87.

SANCHEZ-MORENO, C., *Food Sci. Techn. Inter.*, Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems, (8), 2002,121-137.

SARAFIS, V.; RUMPEL, H.; POPE, J.; KUHN, W., *Protoplasma*, Non-invasive histochemistry of plant materials by magnetic resonance microscopy, (159), 1990, 70-73.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, P.K., *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, Phenolic antioxidants, (32), 1992, 67-103.

SHARMA, OM, P.; BHAT, T. K., *Food Chemistry*. DPPH antioxidant assay revisited, (113), 2009, 1202.

SHIRLEY, B. W., *Trends Plant Sci.*, Flavonoid biosynthesis: a new function for an old pathway, (1), 1996, 377-382.

SKOULA, M.; GOTSIU, P.; NAXAKIS, G.; JOHNSON, C.B., *Phytochemistry*, A chemosystematic investigation on the mono- and sesquiterpenoids in the genus *Origanum* (Labiatae), (52), 1999, 649-657.

STOTZ, G.; SPRIBILLE, R.; FORKMANN, G.J., *Plant Physiol.*, Flavonoid biosynthesis in flowers of *Verbena hybrida*, (116), 1984, 173-183.

SVOBODA, K.P., Secretory structures of Aromatic and medicinal plant. Microscopic Publications. Powys, UK, 2000.

SVOBODA, K.P.; GREENAWAY, R. I., *Int. Jour. Arom.*, Investigation of volatile oil gland of *Satureja hortensis* L. (*Summer savory*) and phytochemical comparison of different varieties, (13), 2003, 196-202.

V

VAN DE VIJER, L.P.; KARDINAAL, A.F.; GROBBEE, D.E.; PRINCEN, H.M.; VANDEN POPPEL, G., *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty. Acids*, Lipoprotein oxidation, anti-oxidants and cardiovascular risk: epidemiologic evidence, (57), 1997, 479-87.

VAN HET HOF, K.H.; BOER, H.S.; WISEMAN, S.A.; LIEN, N.; WESTRATE, A.; TIJBURG, L.B., *Am. J. Clin. Nutr.*, Consumption of green or black tea does not increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in humans, (66), 1997, 1125-1129.

VAN HET HOF, K.H.; WISEMAN, S.; YANG, C.; TIJBURG L., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, Plasma and lipoprotein levels of tea catechins following repeated tea consumption, (220), 1999, 203-209.

VERPOORTE, R., *Drug Discov. Today*, Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development, (3), 1998, 232-238.

W

WEISBURGER, J., *Chemoprevention of cancer by tea*, IOC Press, New York, 1998.

WORLD HEALTH ORGANISATION. A report of the consultation meeting on traditional and modern medicine: Harmonizing two approaches, Beijing, China, 2000, 22-26.

Y

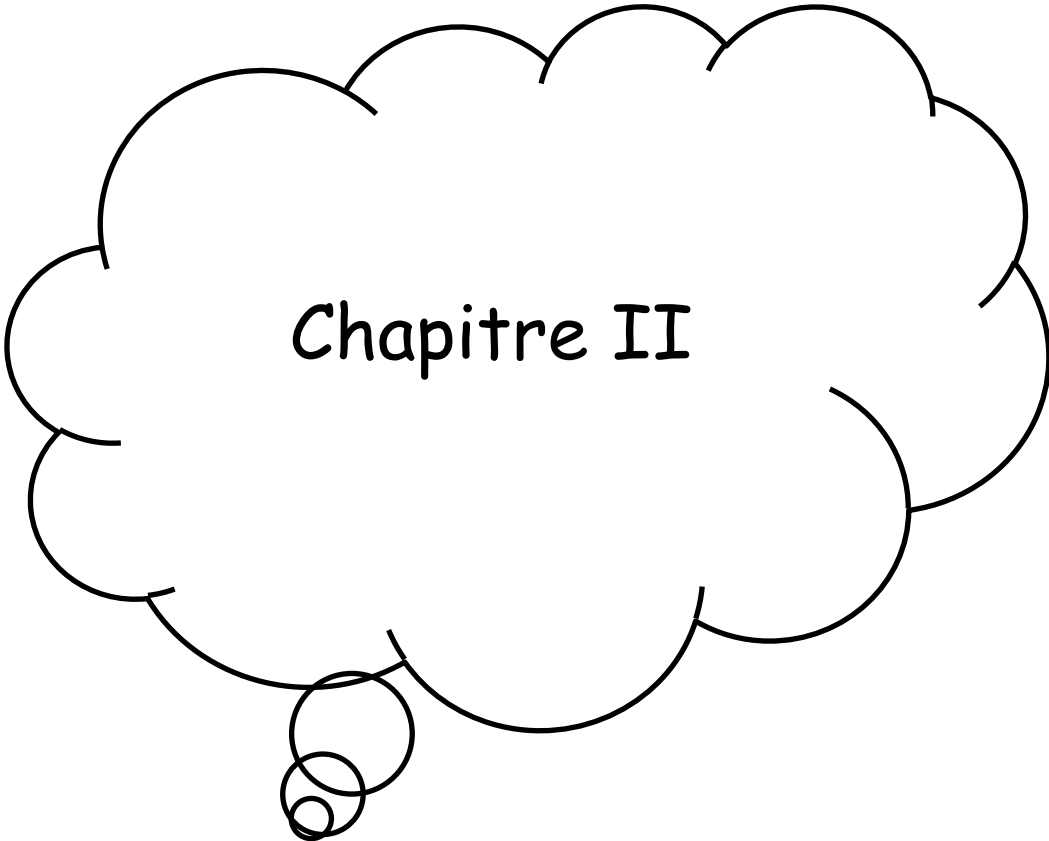
YANO, Y.; SATOMI, M.; OIKAWA, H., *Inter. J. Food Microb.*, Antimicrobial effect of spices and herbs on *Vibrio parahaemolyticus*, (111), 2006, 6-11.

YOKOZAWA, T.; CHEN, C.P.; DONG, E.; TANAKA, T.; NONAKA, G. I.; NISHIOKA, I., *Biochem. Pharmacol.*, Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, (**56**), 1998, 213-222.

Z

ZHIRI, A., *Nutra News*, Aromathérapie...un peu d'histoire..., (Octobre), 2006, 6-7.

ZOBEL, A.M., MARCH, R.E., *Ann. Bot.* Autofluorescence reveals different histological localizations of furanocoumarins in fruits of some Umbellifereae and Leguminosae, (**71**), 1993, 251-255.



Chapitre II

II 1-Etude bibliographique du genre *Cistus*

II-1-1 Introduction :












L'Algérie constitue avec le Maroc et la péninsule ibérique, le territoire de prédilection des Cistacées de l'ancien monde (OZENDA. P., 1977).

Malgré l'apparition de nombreuses monographies et de très nombreux travaux de détail, la famille des cistacées est l'une des plus difficiles à étudier (ISERIN. P., 1997).



Figure 9 : Photo de *Cistus creticus*

II-1-2-Classification

Domaine		Biota
Règne		Plantae Haeckel ,1866
Sous/règne		Viridae plantae
Division		Magnoliophyta Cronquist, Takhtajan &w Zimmermann , 1966.
Classe :		Equisetopsida C Agardh , 1825.
Sous/classe		Magnoliidae Novak ex Takht ,1967
Super ordre		Rosanae Takht , 1967.
Ordre		Malvales Juss .ex Bercht & J.Presl ,1820
Famille		Cistaceae Juss .1789
Genre		<i>Cistus</i> L .1753
Espèce		<i>Cistus Creticus</i> L , 1759.

Variété : *Cistus Creticus* var. *corsicus* (Loisel) Greuter 1967.

II-1-3-Utilisation traditionnelles

Plusieurs espèces et hybrides de genre *Cistus*, *Halimium* et *Helianthemum* sont cultivés comme plantes ornementales.

Les feuilles de plusieurs espèces de genre *Cistus* produisent le ladanum, une résine aromatique jadis utilisée en médecine (HYWOOD. V., 1996).

A Marrakech, les graines de quelques espèces du genre *Cistus* sont apprêtées avec des épices, s'emploient comme aliment apéritif. On les prescrit aussi comme aphrodisiaque.

A Rabat, les feuilles de *Cistus albidus* L sont utilisées comme agent digestif et sont consommées sous forme des tisanes.

Dans le nord du Maroc (douar Agan, région de Talambot), les fruits des cistes (*âmerîl*) servent à confectionner le harkûs (fard à tatouage). Les fruits de cistes mélangés à des fruits d'*Juniperus phoenicea* sont enveloppés dans un tissu humecté d'huile puis flambés sous une assiette ; le noir de fumée ainsi obtenue est récupéré pour faire les tatouages.

Les graines pilées de la plupart des cistes sont consommées dans les campagnes marocaines, comme amuse-gueule. Dans la région de Taïneste, ses graines sont utilisées comme chapelure dans la préparation des gâteaux. Le bétail apprécie les pousses de *C. salvifolius* (BELLAKHDAR. J., 1997).

II-1-4-Activités biologiques

Toutes les espèces de la famille *Cistaceae* sont fréquemment employées dans la médecine traditionnelle pour leurs propriétés antimicrobienne, antitumorale, antivirale anti-inflammatoire, antifongique, antiulcer, anti oxydante, et activités spasmolytique et hypotensive (BOUAMAMA. H. 2006).

Diverses espèces de *Cistus* sont employées en Italie, en Grèce, en Espagne et en Turquie pour le traitement de la diarrhée et des ulcères peptiques ; en tant que remèdes généraux pour traiter plusieurs maladies de peau et comme agents anti-inflammatoires et antispasmodiques (BASABA. E. 2007).

Les investigations pharmacologiques réalisées sur les extraits de feuille de *Cistus* ont prouvé des propriétés antimicrobiennes, contre beaucoup de bactéries et mycètes responsables des infections humaines (BASABA. E. 2006).

II-1-5-Etude botanique : classification et morphologie

La famille des Cistacées comprend cinq genres déterminés à partir de l'étude des fruits et des stigmates : *Cistus*, *Helianthemum*, *Fumana*, *Halimum* et *Tuberaria*, les deux premiers étant les plus répandus (FLORA EUROPEA, 1968).

Les Cistacées sont des plantes herbacées ou ligneuses comprenant près de cent espèces réparties sur le pourtour du bassin méditerranéen et dans certaines de ses îles (Sardaigne, Sicile et Corse) (BONNIER., G. 1932).

Les espèces du genre *Cistus* possèdent des feuilles simples, opposées, sans stipule, ovales, oblongues ou lancéolées. Elles sont généralement recouvertes de poils étoilés qui créent des espaces isolants empêchant la transpiration et permettant une adaptation à une relative sécheresse (COSTE. H. 1937).

La floraison abondante des espèces du genre *Cistus* (FOURNIER. P., 1977, GAMISANS. J., MONOD. D.J., 1939).se produit au printemps. Les fleurs hermaphrodites sont solitaires ou réunies en inflorescences et le calice persistant est composé de trois à cinq sépales. Les pétales, qui forment une corolle éphémère, sont extrêmement délicats et toujours au nombre de 5. Leurs couleurs vont du blanc au jaune, à l'orange et au rose. Les pétales sont étroitement enroulés dans le bouton en sens inverse de celui dans lequel sont enroulés les sépales. Les étamines sont nombreuses et toujours libres, l'ovaire est supère et le fruit est une capsule de 2 à 10 loges et valves, à plusieurs graines tétraèdres ou subtrigones, renfermant une plantule enroulée ou spiralée (COSTE. H. 1937).

Les cistes sont des espèces pionnières des environnements dégradés en raison de perturbations humaines ; par exemple, les champs abandonnés sont entièrement envahis par les cistes (BRAN-BLANQUET J., BOLOS O.1950). La Cistacée s'installe souvent après les incendies et joue un rôle important dans la dynamique de succession car ce sont les premiers arbustes à émerger après le feu, permettant ainsi la germination des autres plantes (LUIS-CALABUIG E. 1996). Les espèces du genre *Cistus* sont présentes dans les terrains chauds, ensoleillés, protégés des intempéries (BERTHIER A. 1976). Le genre *Cistus* comprend une trentaine

d'espèces habitant la région méditerranéenne d'Europe, d'Asie, et d'Afrique. Les espèces les plus répandues dans cette région sont *Cistus ladaniferus* (Ciste à gomme), *Cistus monspeliensis* (Ciste de Montpellier), *Cistus salviifolius* (Ciste à feuille de Sauge), *Cistus laurifolius* (Ciste à feuille de Laurier), *Cistus creticus* (Ciste de Crète) et *Cistus albidus* (Ciste cotonneux). D'autres espèces sont présentes en moindre abondance : *Cistus populifolius* (Ciste à feuille de peuplier), *Cistus crispus* (Ciste crépu), *Cistus hirsutus*, *Cistus bourgeanus*, *Cistus pouzolzii*, *Cistus heterophyllus*, *Cistus parviflorus*, *Cistus varius*, *Cistus albanicus*, *Cistus palhinhae*, *Cistus clusii* et *Cistus libanotis* (ROUSTAND T. 1964).

Il existe une corrélation étroite entre les espèces de cistes et la nature du sol. Ainsi, *Cistus albidus* est réputé calcicole alors que *Cistus monspeliensis* et *Cistus salviifolius* sont plutôt calcifuges (COULOUMA A. 1933).

A la suite, nous donnons les principales caractéristiques botaniques des espèces les plus répandues :

- *Cistus ladaniferus* (BONNIER G. 1932, COSTE H. 1937) est très répandu dans la région méditerranéenne à basse altitude (Portugal, Espagne, Italie septentrionale, Algérie, Maroc). Il est peu présent en France (Massif de l'Esterel) ; en Corse, quelques essais de culture sont actuellement réalisés par des producteurs locaux d'huiles essentielles. C'est un arbrisseau très odorant et très visqueux qui peut atteindre deux mètres de hauteur. Les feuilles sont vert sombre, glabres, presque sans poils sur la face supérieure alors qu'elles apparaissent tomenteuses et blanchâtres sur la face inférieure. Les fleurs mesurent de 6 à 8 centimètres de large et sont blanches, souvent jaunes ou tachées de pourpre vers l'onglet. Les trois sépales sont presque égaux et couverts de nombreux tubercules portant de nombreux poils. Enfin, la période de floraison s'étale d'Avril à Juin.

- *Cistus monspeliensis* (BONNIER G. 1932, MONOD D.J., 1939) est une espèce commune en France, en Afrique du Nord, à Chypre et sur les Iles Canaries à relativement basse altitude (<1000mètres). Elle affectionne particulièrement les terrains riches en éléments meubles et colonise les terrains parcourus par les incendies. Sa présence apparaît beaucoup plus liée à la nature physique qu'à la nature chimique du milieu. *Cistus monspeliensis* est très abondant en Corse, notamment à basse et moyenne altitude (étage mesoméditerranéen). C'est un arbrisseau d'environ un mètre, très odorant, verdâtre, possédant des rameaux, des pédoncules et des calices velus et visqueux. Les feuilles sont sessiles, lancéolées-linéaires, rugueuses-

réticulées, trinervées, beaucoup plus longues que larges et à bords enroulés. Les fleurs de couleur blanche, disposées en grappe unilatérale sur un pédoncule dressé, mesurent de 2 à 3 centimètres. Les sépales, au nombre de cinq, sont en forme de cœur et la floraison va de Mai à Juin.

- *Cistus salviifolius* (COSTE H. 1937, MONOD D.J., 1939) est présent dans toute la région méditerranéenne, dans les bois clairs, sur les coteaux, sur le sable maritime et sur les sols siliceux. En France, il s'étend des Pyrénées Atlantiques jusqu'à l'île de Noirmoutier et en Corse.

C'est un sous-arbrisseau non visqueux mesurant de 30 à 80 cm avec des rameaux verts, diffus et couverts de poils étoilés. Les feuilles opposées, ovales-oblongues, velues sont courtement pétiolées, tomenteuses et les fleurs qui apparaissent en Mai et Juin sont longuement pédonculées, solitaires ou par 2-4. Elles sont formées de pétales blancs tachés de jaune à l'onglet et la corolle mesure entre 4 et 5 cm. Le fruit est une capsule anguleuse à 5 loges.

- *Cistus creticus* (Syn. *Cistus incanus* ou *Cistus villosus*) (COSTE. H. 1937, MONOD. D.J., 1939) abondant sur le pourtour du bassin méditerranéen oriental et à l'Ouest jusqu'en Corse, en Sardaigne, en Italie du Sud et en Afrique du Nord, est absent de France continentale.

C'est un arbrisseau mesurant environ un mètre ; ses feuilles simples, opposées, vertes sont brièvement pétiolées et un peu ondulées sur les bords. La floraison a lieu à la fin du printemps et ses pétales roses sont chiffonnés. C'est une espèce polymorphe dans laquelle on distingue plusieurs variétés, parfois élevées au rang de sous-espèces : la variété *eriocephalus* ou *incanus* (Corse et Italie) chez laquelle les jeunes rameaux, les pédoncules floraux et les sépales sont recouverts de longs poils blancs soyeux, la variété *corsicus* (Îles de l'Ouest du bassin méditerranéen) à poils étoilés, courts et enfin, la variété *creticus* (bassin méditerranéen oriental) qui n'existe pas en France et que l'on rencontre surtout dans l'Est du bassin méditerranéen.

- *Cistus laurifolius* (BONNIER. G. 1932, COSTE. H. 1937) est une espèce répandue dans l'ensemble de la région méditerranéenne, excepté dans la partie orientale, qui semble absente de Corse. Cet arbrisseau mesure jusqu'à 1,50 m de hauteur, il est très odorant, verdâtre, avec des rameaux velus et glutineux. Ces feuilles sont pétiolées, vertes et glabres au-dessus, blanches et soyeuses en dessous. L'inflorescence est un - *Cistus laurifolius* (BONNIER. G. 1932, COSTE. H. 1937) est une espèce répandue dans l'ensemble de la région

méditerranéenne, excepté dans la partie orientale, qui semble absente de Corse. Cet arbrisseau mesure jusqu'à 1,50 m de hauteur, il est très odorant, verdâtre, avec des rameaux velus et glutineux. Ces feuilles sont pétiolées, vertes et glabres au-dessus, blanches et soyeuses en dessous. L'inflorescence est un corymbe, de 3 à 12 fleurs blanches avec onglet jaune qui apparaissent en juin. Le fruit est une capsule à 5 loges et les graines sont tuberculeuses.

- *Cistus albidus* (COSTE H. 1937, GAUSSEN H. 1982), plus couramment appelé Ciste blanc ou Ciste cotonneux, peu odorant, se trouve sous forme d'arbrisseau de 40 cm à 1 m de hauteur. Les feuilles d'un beau gris duveteux sont sessiles, demi embarrassantes, oblongues elliptiques, opposées et très velues sur les 2 faces. Les fleurs de 4 à 6 cm de long, d'un rose lumineux sont pédonculées et en ombelle au sommet des rameaux. Les sépales, au nombre de 5, sont largement ovales, acuminés et velus. Les pétales, 2 à 3 fois plus longs que le calice, ont un aspect fripé. Le fruit quant à lui, se présente sous forme de capsule ovoïde à 5 loges, velu, plus court que le calice. *Cistus albidus* dont la période de floraison va de mai à juin, pousse dans les garrigues et sur les coteaux surtout calcaires (Bonnier G 1932). On le trouve sur tout le pourtour méditerranéen: Sardaigne, Italie, Baléares, Espagne, Portugal et Algérie. En Corse, cette espèce a été observée pour la dernière fois dans les années 30 et n'a plus jamais été signalée (GAMISANS. J., MONOD. D.J. 1993).

II-1-6- Etudes chimiques de la famille des Cistaceae

La majorité des études phytochimiques effectuées sur un nombre important d'espèces de la famille des Cistacées montre la richesse ainsi que la diversité structurale de ces dernières en métabolites secondaires incluant en particulier les terpènes, les composés phénoliques constituant principalement les flavonoïdes, et les tanins en faibles quantités.

Le genre *Cistus*

Le genre *Cistus* comporte plusieurs plantes sous forme d'arbustes éternels. Ces arbustes sauvages se développent dans les bords marocains et méditerranéens avec 16 espèces de *Cistus* (HYWOOD. V. 1996).

Les études phytochimiques réalisées sur ces espèces révèlent une grande richesse en huiles essentielles, en particulier le ladanum, le labdanum (ladano), et les flavonoïdes (comme aglycones et glycosides), les pro-anthocyanidines, les terpenoïdes et les tannins (DE DEPASCUAL TERESA J. 1981).

Le genre *Cistus* est le plus étudié sur le plan phytochimique, et les diverses études montrent la présence de terpenoïdes et de flavonoïdes.

II-1-6-1-Diterpènes isolés du genre *Cistus*

Ces composés sont les constituants majoritaires des extraits des espèces de genre *Cistus*. Les labdanes bicycliques de la série normale sont les plus décrits dans la littérature. Certains labdanes réarrangés appartenant à la série antipode sont également présents, c'est le cas de l'espèce *C. laurifolius* dans laquelle les *ent*-labdanes et les *ent*-labdanes réarrangés (cis-clerodanes) ont été isolés (DEPASCUAL TERESA J. 1981, DEPASCUAL TERESA J. 1981).

L'acide acétyle laurifolique est le *ent*-labdane majoritaire (ester méthylique 1 de l'acide salmantique 2, et l'acide 3-oxo-cativique 4) isolé de l'espèce *C. laurifolius* et dont la structure a été déterminée par synthèse et qui a été confirmée récemment par les rayons X (DE PASCUAL TERESA J. 1981).

D'autres composés minoritaires avec un squelette *ent*-labdane réarrangé : l'acide salmantique 1, le 3,15-diol correspondant (salmantidiol) 3, et les deux énantiomères l'acide labdanolique 5 et l'acide populifolique 6 (DE PASCAL TERESA. J. 1981), schéma 22.

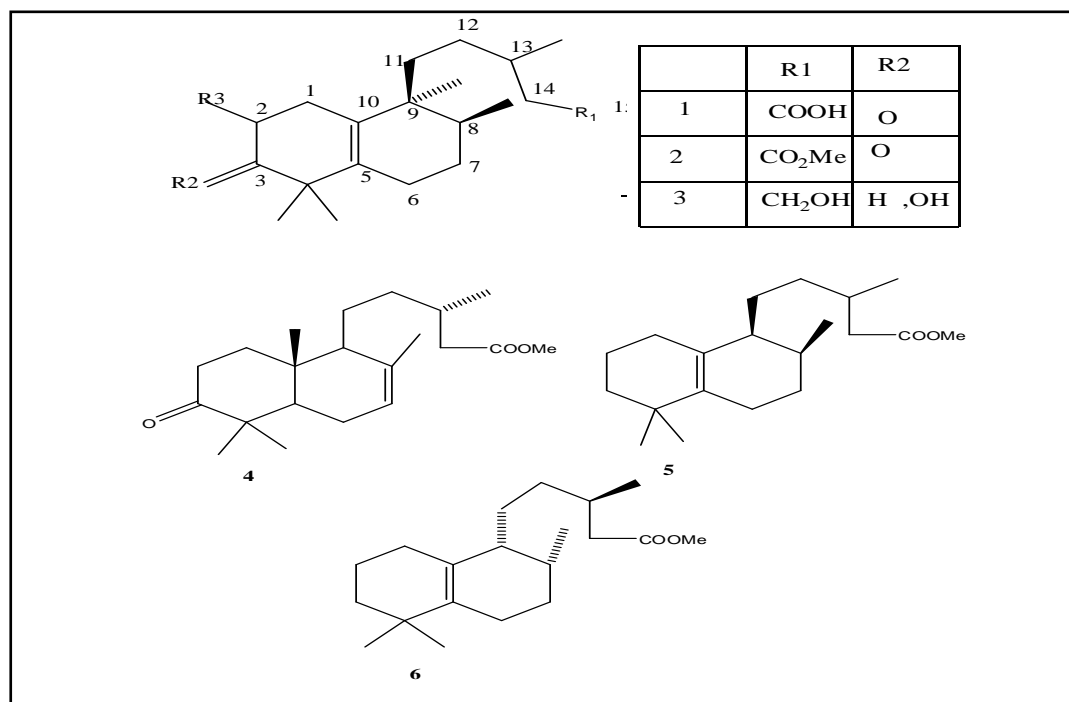


Schéma 22 : Composés minoritaires de l'espèce *C. Laurifolius*

Une étude récente effectuée par JULLIO, G. et ses collaborateurs sur l'extrait éthanolique de l'espèce *C. laurifolius* a permis l'isolement d'un acide diterpénique, l'acide 6 β , 8 β -dihydroxy-ent-13-E-labden-15-oïque, (l'acide laurifolique) 7, la séparation a permis aussi l'isolement de trois composés glycosylés de dérivés du β -D-glucopyranosiloxyéthane 1,3-Diacetoxy-5-(tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosiloxy)benzene 8 et deux dérivés inositol, 1-O-méthyl 3,4,5,6,pentacetyl-epi inositol 9, 10-méthyl 3,4,5,6,tetraacetyl-epi-inositol 10 (DE PASCAL TERESA, J. 1986) schéma 23 :

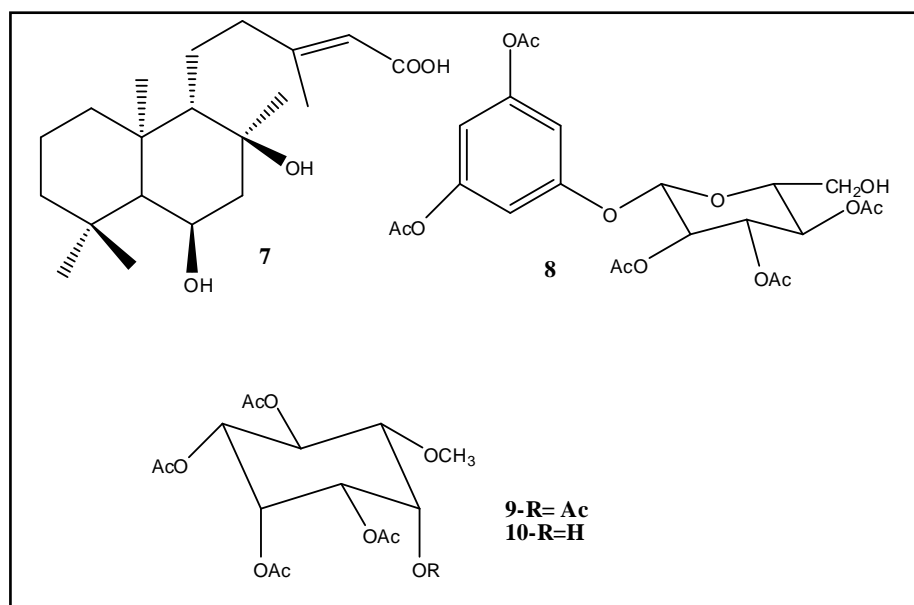


Schéma 23 : Composés de l'extrait éthanolique de l'espèce *C Laurifolius*

L'investigation chimique menée sur les parties aériennes de l'espèce *C. symphytifolius* a donné en plus de, l'acide cativique 11, l'acide labdenique 12, l'acide labdanolique 13 et labdan-8 α ,15-diol 14 ; trois diterpènes bicycliques qui sont l'acide Cistadieni que 15, l'ester de méthyle de l'acide cistenolique 16, et labd-13(E)-ene-8 α ,15diol 17, les structures de ces derniers ont été déterminées par des études et des corrélations spectrales. Les études basés sur les techniques de dichroïsme circulaire ont prouvé que l'acide cistenolique et l'acide salvique sont des énantiomères, et la structure de l'acide salvique a été déterminé comme suit : acide 7 α -hydroxy-labd-8(17)-en-15oïque.18 (CALABUIG, M. T. 1981). cistenolique et l'acide salvique sont des énantiomères, et la structure de l'acide salvique a été déterminé comme suit : acide 7 α -hydroxy-labd-8(17)-en-15oïque.18 (CALABUIG, M. T. 1981) schéma 24 :

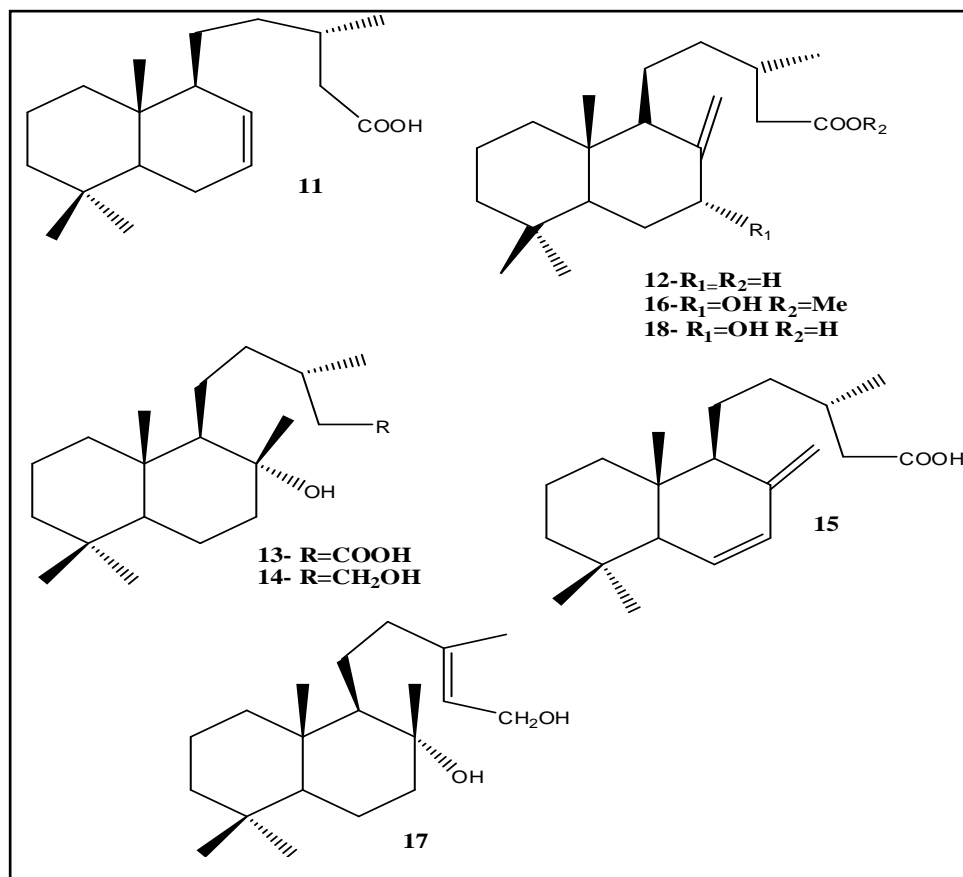


Schéma 24 : Composés isolés de l'espèce *C. symphytifolius*

L'étude phytochimique récente de l'espèce *C. ladaniferus* a fourni trois acides diterpéniques à squelette labdène : l'acide 6,8(17)-labdadien-15-oïque 19, l'acide 7-oxo-8-labden-15-oïque 20 et l'acide 6 β -acétoxy-7-oxo-8-labden-15-oïque 21, en plus des acides labdanoliques : l'acide 7 α -hydroxy-8(17)-labden-15-oïque 22, l'acide 8 α -méthoxy-labda-15oïque 23 et 8 α -hydroxy-13(E)-labden-15-oïque 24 qui ont été isolés de l'extrait hexanique (DE PASCAL TERESA, J. 1982). (Schéma 25,26) R=CH₂-CH₂-CH(Me)-CH₂-COOH

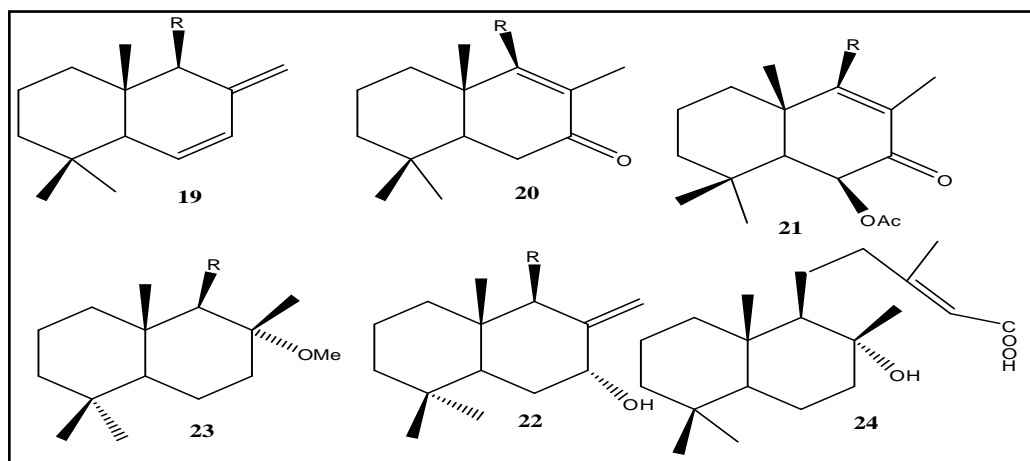


Schéma 25: Composés terpéniques isolés de l'espèce *C. ladaniferus*

L'étude phytochimique de l'espèce *C. palinxae* a permis d'isoler deux acides. L'acide 8 α -méthoxy-labden-15-oïque 25 et l'acide (5R, 8R, 9S, 10S)-2-oxo-3-cisceleroden-15-oïque 26. D'autres dérivés hydroxylés sont aussi identifiés dans cette espèce à savoir : 8,15 labdanediol 27, 6-oxo-7-labden-15-ol 28, 6 β -hydroxy-8(17)labden-15 ol 29, 8-hydroxy-15 β -phenylpropiony-labdane 30, 8-hydroxy-15-acetoxylabdane 31, 8-labden-15-ol 32 Et 8-Epi-15-labdanediol 33 (DE PASCAL TERESA, J. 1983).

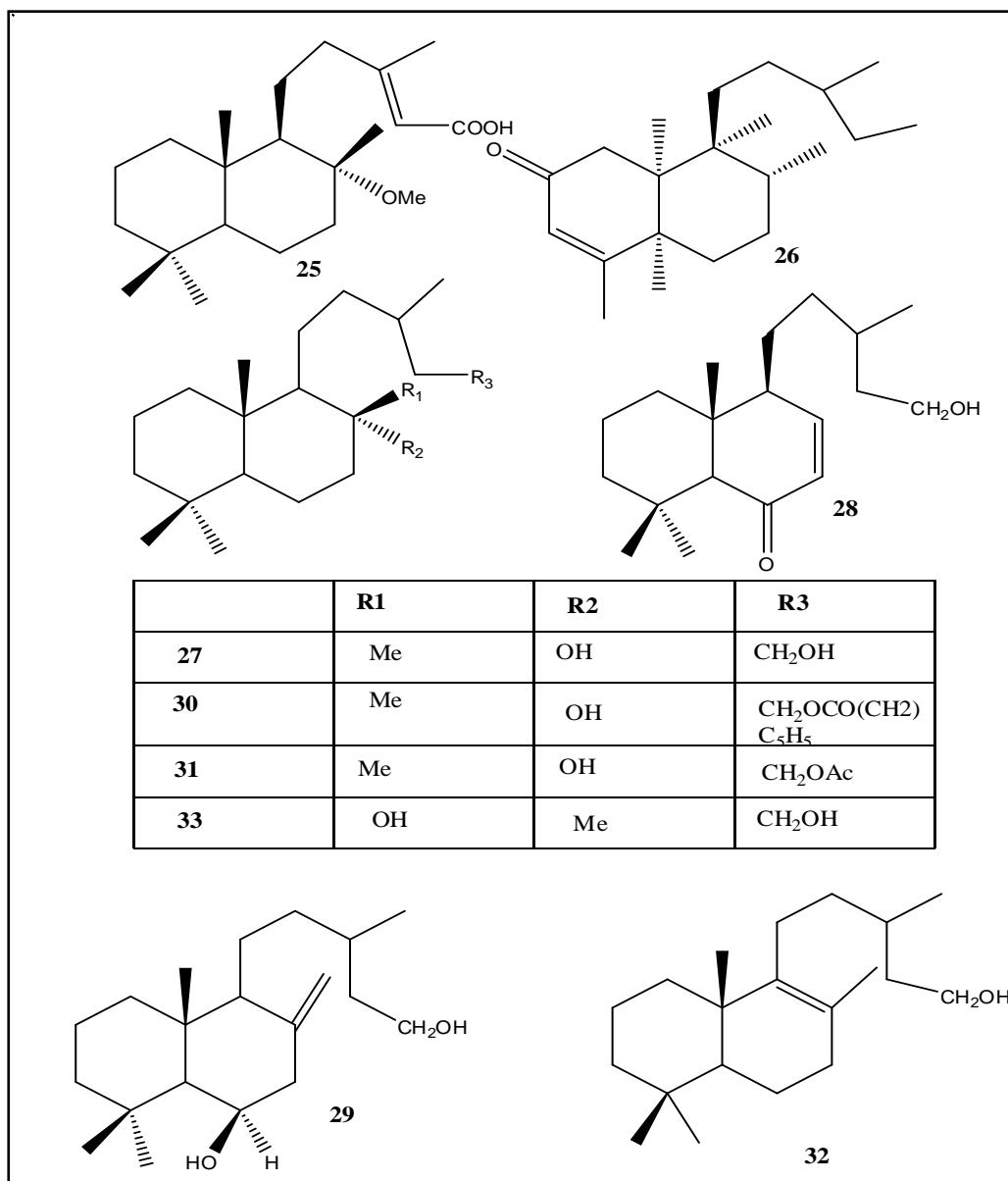


Schéma 26 : Composés terpéniques isolés de l'espèce *C. palinxae*

II-1-6-2-Les flavonoïdes isolés du genre *Cistus* :

Une étude quantitative et qualitative des flavonoïdes aglycones et glycosylés a été réalisée sur les différentes parties de l'espèce *C. laurifolius* (VOGT, T. et GULTEZ, P. G. 1994). Cette étude a permis la détection des flavonoïdes dérivés quercétine, myricétine, apéginine, lutéoline, et kaempférol, il s'agit des composés suivants : Le dérivé méthyle éther quercétine est le composé majoritaire de ces composés, par contre le quercétine 3-galactoside est le composé glycoside prédominant dans les jeunes feuilles. En outre le composé myricétine glucoside est le composé majoritaire détecté dans les tissus mûrs (**schéma 27**).

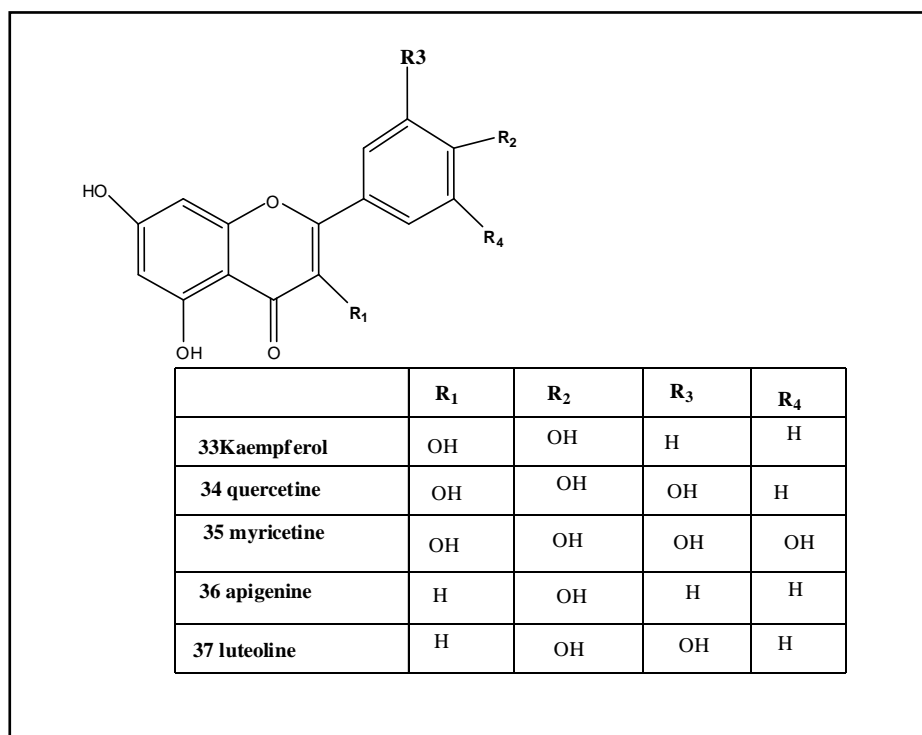


Schéma 27 : flavonoïdes isolés de l'espèce *C. laurifolius*

L'espèce *C. incanus* est une plante très utilisée dans la médecine traditionnelle dans le nord de la Grèce comme un traitement général anti-inflammatoire des maladies de la peau.

Deux études phytochimiques réalisées par Frank Peterleit et ses collaborateurs (PETERLEIT, F. 1991) ont permis l'isolement et la caractérisation des flavonoïdes possédant le squelette flavan-3-ol, il s'agit du monomère flavan-3-ol : (+) catechine 38 (+)-gallocatechine 39, (+)-catechin-3-O- α -L-rhamnoside 40, gallocatechin 3-O-gallate 41, 2R,3R dihydromyricetine 42, dimer flavan-3-ol : procyanidine B-1 43, procyanidine B-3 44, gallocatechine-(4 α —8)-catechine 45, gallocatechine-(4 α —8)-gallocatechine 46, gallocatechine-(4 α —6)-

gallo catechine 47, catechine-(4 α —8)-gallo catechine 48, trimere flavan-3-ol gallo catechine-(4 α —8)-gallo catechine-(4 α —8)-catechine 50 (schéma 28 -30) :

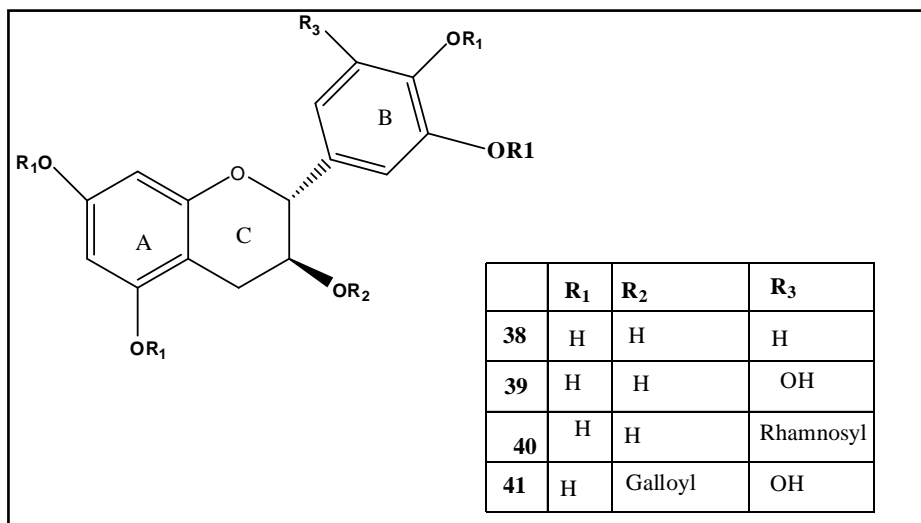


Schéma 28 : Flavonoides isolés de l'espèce *C. incanus*

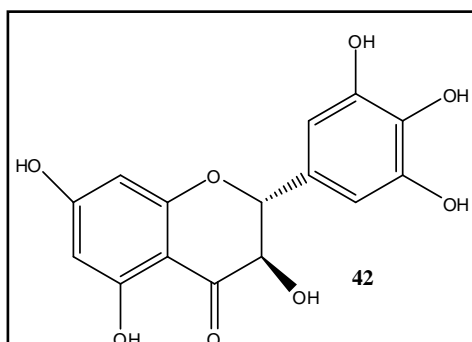
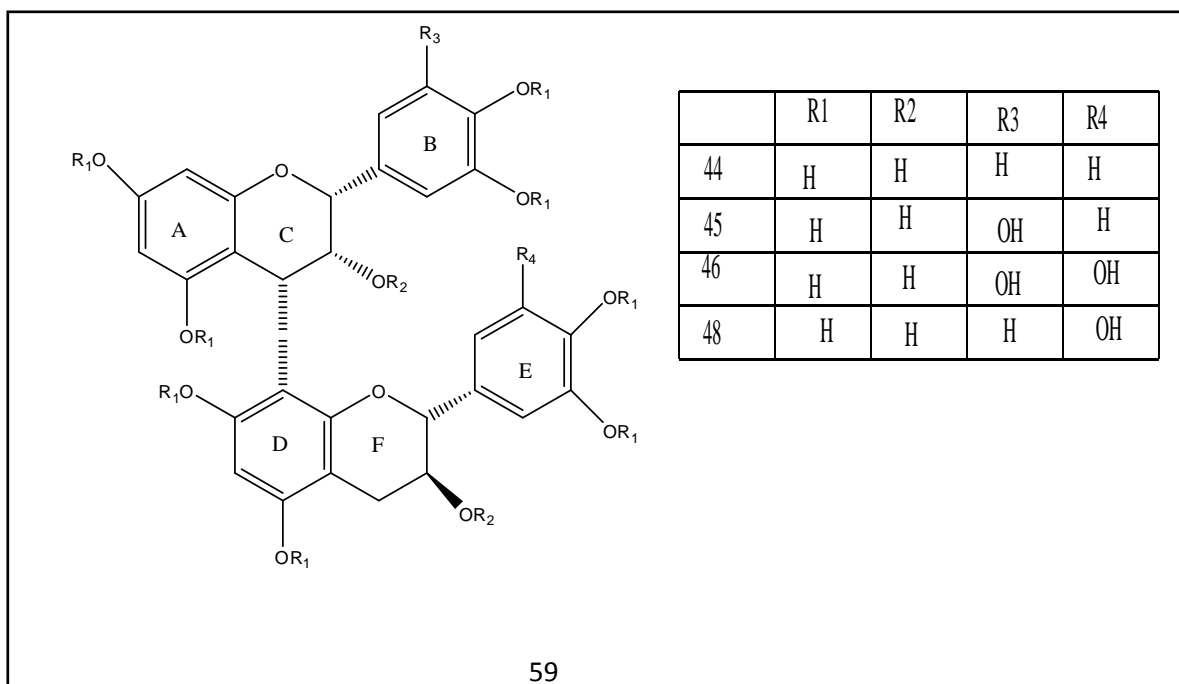


Schéma 29 : Composés isolés de l'espèce *C. incanus*



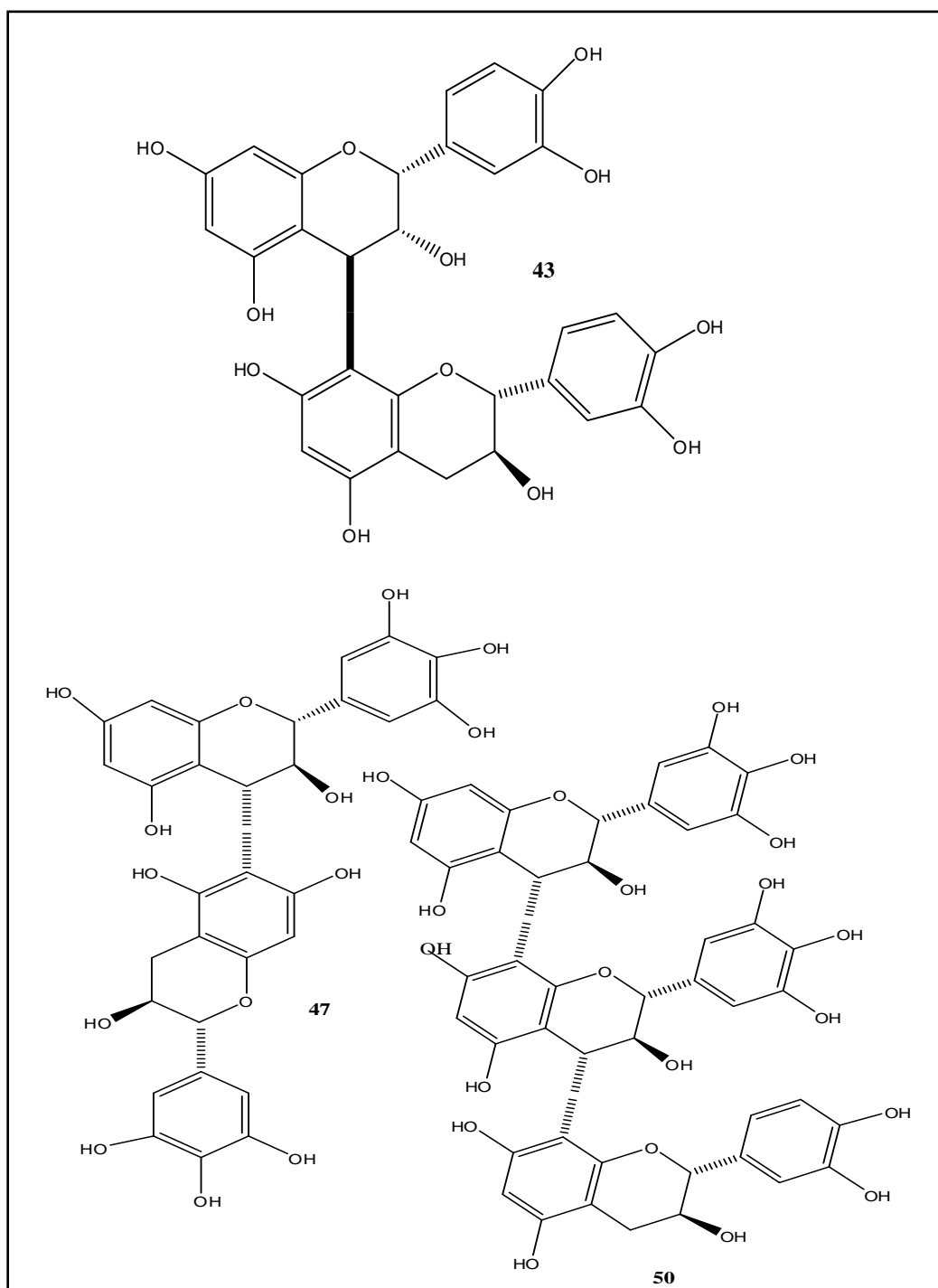


Schéma 30 : Tannins isolés de l'espèce *C. incanus*

En plus, de protocatechinique acide et (-) shikimique acide six dérivés flavonoïdiques appartenant au groupe cyanidine, epicatechine-(4 β —6)-catechine 51, epigallocatechine-3-O-gallate-(4 β —6)-gallocatechine 52, epigallocatechine-(4 β —8)catechine 53, epigallocatechine-(4 β —8)-gallocatechine 54, epigallocatechine-3-Ogallate-(4 β —8)-gallocatechine 55, tous ces composés ont été isolés de l'extrait méthanolique des parties aériennes de l'espèce *C. incanus* (DANNE A. 1993) **schéma 31 :**

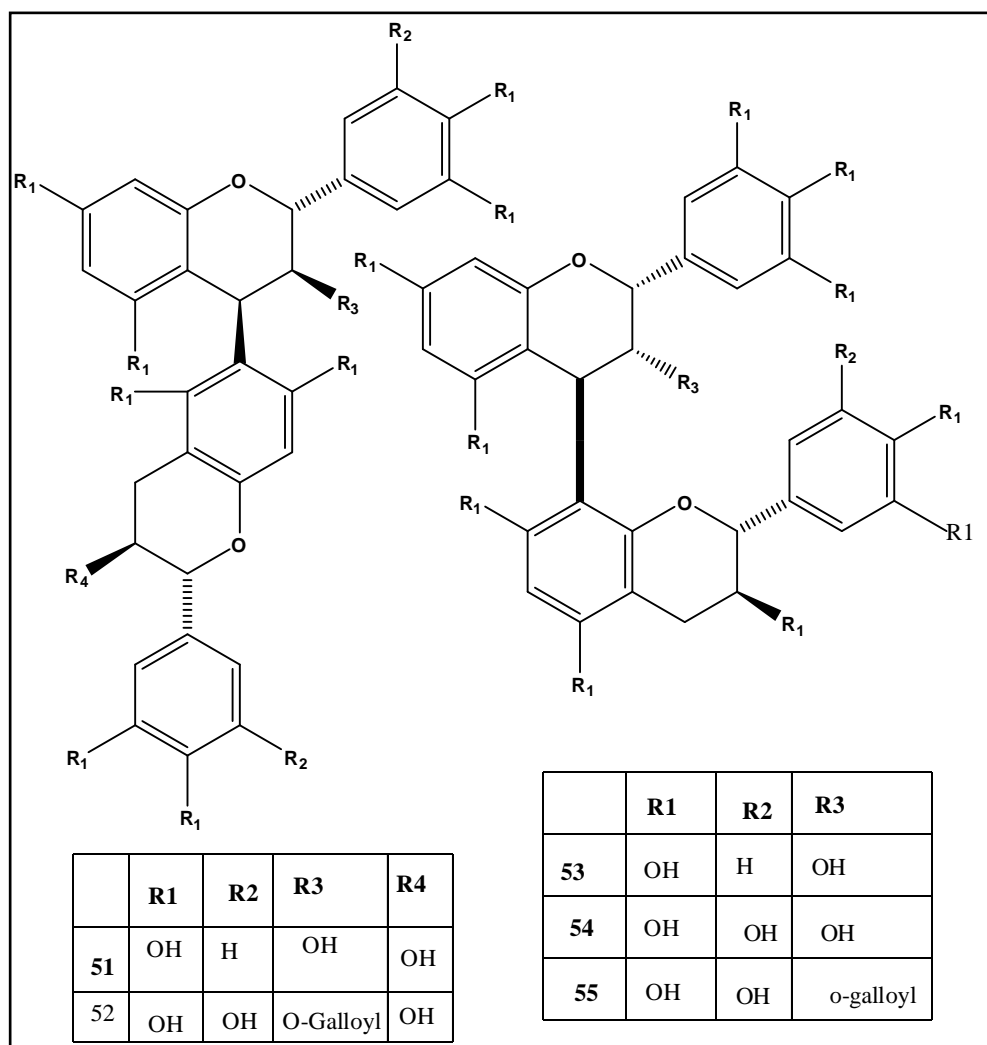
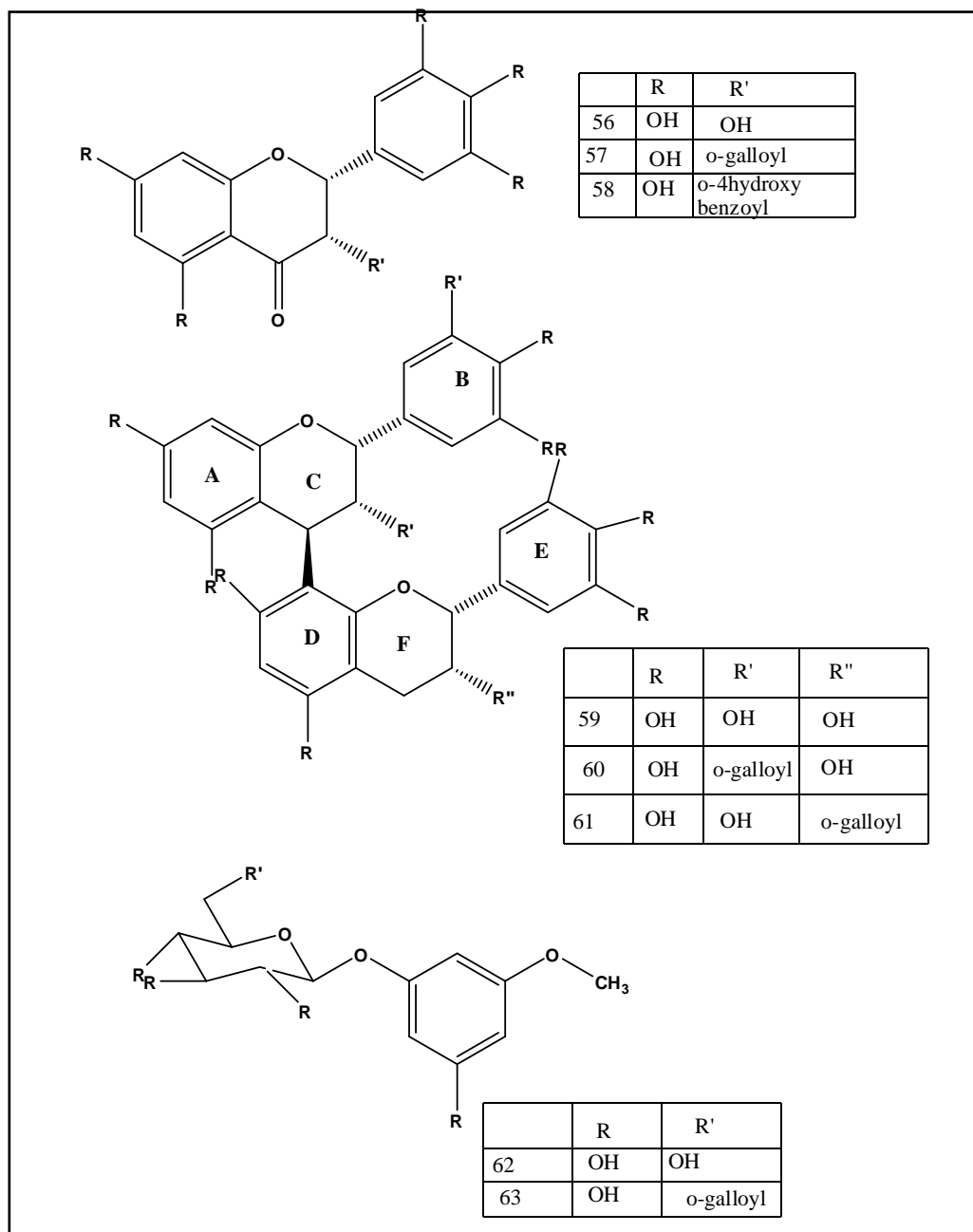


Schéma 31 : Tannins isolés de l'extrait méthanolique de l'espèce *C. incanus*

L'extrait acétate d'éthyle de la fraction aqueuse acétonique (3/7) des parties aériennes de l'espèce *C. salvifolius* a été chromatographié sur séphadex LH-20, après une série de purification sur colonne les composés ont été isolés. Ces composés sont des dérivés de flav-3-ol, catechine, epicatechine, gallo catechine, epigallocatechine 56, epicatechine 3-O-gallate, gallo catechine 3-O-gallate, epigallocatechine 3-O-gallate 57, epigallocatechin 3-O-p-hydroxy benzoate 58, prodilphinidine epigallocatechine(4 β —8) epigallocatechine 59, epigallocatechine 3-O-gallate-(4 β —8)-epigallocatechine 60, epigallocatechine-(4 β —8)-epigallocatechine-3-O-gallate 61, epigallocatechine-(4 β —6) epigallocatechine-3-O-gallate, et phloroglucinol glucosides : 1-O- β -D-glucopyranosyl-3O-methoxy-5-hydroxybenzene 62, 1-O- β -D-(6'O-galloyl)-glucopyranosyl-3-methoxy5-hydroxy-benzène 63 (DANNE, A. 1994) (**schéma 32**) :

Schéma 32 : Composés tanniques isolés de l'extrait AcOEt de l'espèce *C. salvifolius*

II-2-Etude bibliographique du genre *Calamintha* :

II-2-1Présentation de la famille des Lamiaceae I

II-2-1-1. Introduction :

Les Labiées ou Lamiacées constituent une importante famille de plantes angiospermes dicotylédones herbacées ou légèrement ligneuses et comprennent, selon les auteurs, de 233 à 263 genres (HEYWOOD . 2007) et de 6900 à 7200 espèces (HEYWOOD *l.* 2007 ; GRAYER

. 2003) qui se répartissent sur tout le globe (**Figure 10**). C'est une famille très importante en Algérie, représentée par 28 genres et 146 espèces. La plupart des plantes de cette famille sont partiellement ligneuses, formant des arbustes (très rarement des arbres). C'est la famille des aromatiques utilisées tant en cuisine qu'en parfumerie ou en pharmacie également, comme par exemple la ballote, le basilic, la bugle, l'hysope, la lavande, la marjolaine, la mélisse, ...). Il s'agit d'une vaste famille, très typique du monde végétal, et qui possède une importance économique due à la production des huiles essentielles (GUIGNARD . 2001) et de miel (les miels de lavande, et de romarin sont réputés). Cette famille est très répandue dans les régions tempérées et surtout méditerranéennes (GUIGNARD . 2004).



Figure 10: Carte de répartition géographique de la famille des Lamiacées (en rouge)

II-2-1-2- Caractéristiques botaniques

Ce sont des herbes à tiges quadrangulaires souvent renflées aux nœuds et se multipliant, en une même saison, à l'aide de rejets aériens : (stolons) ou souterrains : (rhizomes).

Leurs feuilles sont toujours simples et opposées sans stipules, ou verticillées. Les feuilles, velues, ont un limbe à surface réduite, épais et souvent enroulé par dessous. Elles possèdent des stomates enfoncés (protection contre l'évaporation) et un hypoderme collenchymateux très développé.

Les fleurs sont hermaphrodites, elles sont regroupées à l'aisselle des feuilles supérieures, en glomérules, eux-mêmes souvent regroupés en épis plus ou moins denses. Leur calice persistant est formé de 5 sépales diversement soudés et a souvent 2 lèvres (**Figure 11**).

La corolle possède un tube plus ou moins long et généralement à 2 lèvres, ce qui a donné son nom à la famille (en latin *labia* = lèvre) : 2 pétales forment une lèvre supérieure et 3 autres pétales, une lèvre inférieure.

Les étamines sont au nombre de 5, mais l'une d'elles est presque toujours avortée : 2 des 4 étamines fertiles sont plus longues et 2 plus courtes (l'androcée est dit didyname). L'ovaire est

supère ; les 2 carpelles sont profondément lobes, le style sort de la base des lobes (style gynobasique). Le fruit est le plus souvent un schizocarpe (tetrakene lisse) mais a parfois un aspect charnu ou drupacé (**Figure 12**).

Les Lamiacées ont un épiderme très riche en poils tecteurs et en poils sécréteurs. Ces deux catégories de poils se retrouvent au niveau de tous les organes aériens (**Figure 13**).

Ce sont des plantes à essences dont l'odeur se dégage au simple toucher : en effet la localisation des huiles essentielles est très externe, elles se forment dans des poils à essence et se localisent sous la cuticule qui se soulève.

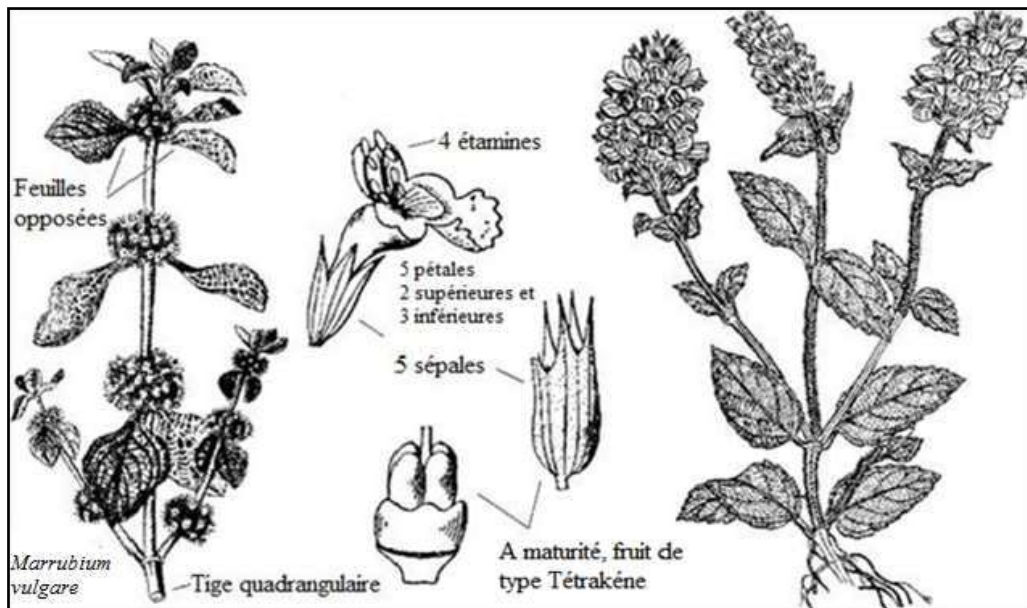


Figure 11 : Les caractéristiques morphologiques d'une Lamiacées (Skafia-Crete, 2010)

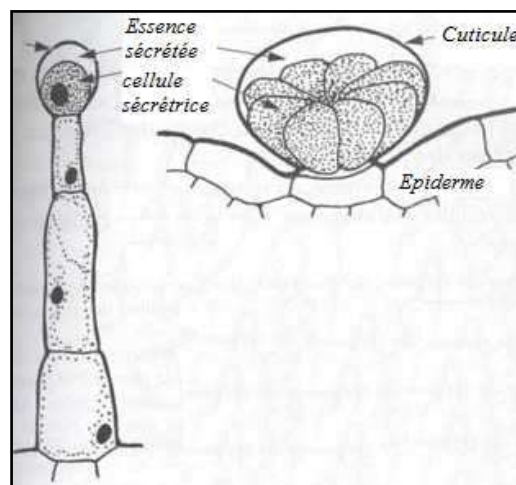


Figure 12 : Poils sécréteurs

II-2-1-3-Classification de la famille des Lamiacées

La famille des Lamiacées possède une distribution cosmopolite et des caractères morphologiques caractéristiques. En 1789 de Jussieu a nommé la famille Lamiacées, la classification de la majorité des sous-familles a été faite par Bentham en 1876 et la révision a été présentée par Briquet en 1895. La classification de ce dernier a longtemps été la plus utilisée pour cette famille de plantes. En 1992, 21 genres de Verbénacées ont été transférés aux Lamiacées (CANTINO, 1992).

Ancienne Classification

Embranchement → Spermaphytes (plantes à graines)
 Sous embranchement → Angiospermes (plantes à ovaire)
 Classe → Dicotylédones
 Sous-classe → Gamopétales (pétales soudés)
 Série Superovariées Tétracycliques (ovaire supère, 1 seul verticale d'étamines)
 Ordre → Lamiales
 Famille → Lamiacées

Cependant les rapports récents de la biologie moléculaire et le développement de la systématique moléculaire basée sur l'analyse des séquences de gènes, ont bouleversé les classifications usuelles et ont proposé en 1998 une nouvelle classification ordinaire des plantes (APG., 1998).

Classification selon l'APG (Angiosperm Phylogeny Group)

Régne → Plantae
 Angiospermes ou Magnoliophyta Euangiospermes Eudicotylédones →
 Eudicotylédone Supérieures gamopétales Astéridées
 Ordre → Lamiales
 Famille → *Lamiaceae*

La classification APG est la classification scientifique des Angiospermes la plus récente établie selon les travaux d'un groupe de chercheurs, the *Angiosperm Phylogeny Group*. Elle traduit les efforts faits en systématique pour que les systèmes de classification reflètent au

mieux la phylogénie des familles mise en lumière par les avancées constantes de la génétique (SPICHIGER . 2000).

Cette classification, révisée en 2003 (APG, 2003) et basée en grande partie sur les analyses des gènes chloroplastiques, introduit, même au niveau des familles, des changements notables avec la classification classique. Par exemple, l'ancienne famille des *Liliacées* est maintenant éclatée en une dizaine de familles. Le tableau ci-dessous présente l'évolution de la classification de la famille des Lamiacées. Comme le montre le **tableau 2**:

Tableau 2 : Classification de la famille des Lamiacées.

	Engler 1877-1924	Cronquist 1957-1988	Dahlgren 1981-1983	Thorne 1992	Takhtajan 1997	APG II 2003
Classe	Dicotyledone	Magnoliopsidae	Magnoliopsidae	Magnoliopsidae	Magnoliopsidae	Tricolpees Evoluees
Sous-classe	Sympetalae	Asteridae	Magnoliidae	Magnoliidae	Lamiidae	<i>Asteridae</i>
Super-ordre			Lamianae	Gentiananae	Lamianae	Euasteridees I
Ordre	Tubiflorae	Lamiales	Lamiales	Scrophulariales	Lamiales	Lamiales
Sous ordre	Verbenineae					
Famille	Labiatae	Lamiaceae	Lamiaceae	Lamiaceae	Lamiaceae	Lamiaceae

Le genre *Calamintha* :



Figure 13: Descriptif de l'espèce *C. grandiflora*

Le genre *Calamintha* : compte environ 50 espèces réparties dans les régions tempérées de l'hémisphère nord.

Ce sont des plantes vivaces ou sous-arbrisseaux hermaphrodites à feuilles entières ou faiblement dentées les fleurs sont souvent en grappe lâches ou

fleurs à calice bilobé, gibbeux à la base, à 2 lèvres. Les étamines sont par paires, un peu conniventes les fruits ou nucales ovoïdes, lisses (**figure 14**) :



Figure 14: Fruits ou nucales de l'espèce *C. grandiflora*

II-2-1-4-Principaux métabolites secondaires des Lamiacées :

La famille des Lamiacées est connue pour la grande diversité des métabolites secondaires qu'elle contient et notamment pour ceux des huiles essentielles. Cette famille est donc une source importante des terpénoïdes, et plus particulièrement de di terpènes dont les noyaux sont de type clerodane, kaurane, labdane, pimarane, abietane et autres (MENEZES . 1993). On y trouve également un nombre important de flavonoïdes (TOMAS-BARBERAN . 1990) et des phénylpropanoïdes (JIMENEZ . 1994).

II-2-1-4-a-Les terpènes

Les terpénoïdes constituent une classe de substances naturelles extrêmement abondante. Ils sont présents chez tous les organismes vivants et peuvent avoir des rôles physiologiques marqués. Ils constituent l'une des classes de composés naturels les plus polymorphes. Plus de 30000 composés ont été répertoriés dans le règne végétal (DE LUCA . 2000).

II-2-1-4-b-Les diterpènes

Parmi les terpènes, les di terpènes (molécules en C_{20}) sont particulièrement étudiés (aux côtés des mono terpènes) dans la famille des Lamiacées. Ils appartiennent à une classe de métabolites secondaires qui possèdent une grande diversité de structures.

Les squelettes di terpéniques sont majoritairement présents chez les Angiospermes et plus particulièrement chez les Astéracées (SEAMAN .1990) et les Lamiacées (MENEZES . 1993 ; DEMETZOS . 2001) ou ils ont été utilisés comme des marqueurs chimio taxonomiques.

L'étude de l'évolution des Angiospermes (FIGUEIREDO. 1995 ; FRAGA . 1995 ; MENEZES. 1995) a montré que ce type de composé peut être également utilisé dans les études phytogéographiques (COLE. 1992 ; ESQUIVEL. 1996) ou encore pour différencier des variétés au sein d'une même espèce (KUBO . 1982).

Dans le but de construire une base de données sur les squelettes di terpéniques isolés des Lamiacées et la corrélation entre les caractéristiques structurales et l'origine botanique, une étude de la littérature montrent que les diterpènes peuvent être divisés en 91 squelettes (VESTRI, A . 2001).

Treize squelettes diterpéniques sont plus fréquemment isolés de cette famille et regroupent 87,8% des composés de ce type identifiés dans le règne végétal.

Plus de 600 di terpènes ont été isolés d'un seul genre *Isodon* et sont principalement de type ent-kaurane (SUNO 2001 ; 1997 ; HAN . 2004) depuis la première investigation en 1910, on peut citer comme exemple le Maoecrystal Z (6,7:8,15-di-seco-7,20-olide-6,8-cyclo-ent-kaurane), un nouvel ent- kaurane isolé de *Isodoneriocalyx* (HAN .2006).

La composition phytochimique des plantes du genre *Salvia* est étudiée depuis longtemps en raison de son utilisation en médecine traditionnelle.

Des études phytochimiques réalisées sur les parties aériennes et les racines des espèces Européenne et Asiatique du genre *Salvia* ont permis d'isoler différents types de diterpénoïdes en particulier de type abietane (RODRIGUEZ-HAHN. 1996): on peut citer comme exemple ceux isolés des espèces turques de *Salvia* (sous genre : *Salvia*, *Aleonia* et *Sclarea*) qui présentent une grande diversité structurale (ULUBELEN . 1998).

II-2-1-4-c-Les composés phénoliques

Un grand nombre de composés poly phénoliques a été répertorié chez les Lamiacées (THOMAS-BARBERAN. 1990). Plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés, et parmi eux 70% des aglycones appartiennent au groupe des flavones : l'apigénine et la lutéoline sont les plus fréquemment rencontrées. Les flavanones sont représentées particulièrement par la naringénine et correspondent à 10% des aglycones. Enfin, les flavonols représentent également 10% des composés caractérisés (REGNAULT-ROGET, 2004).

Les flavonoïdes glycosylés quant à eux, sont fréquemment des flavones-7-*O*-glycosylés. Des isoflavones ont été également identifiées, comme le 8-méthoxygénisteine-7-*O*- α -L-rhamnoside, 4'-*O*- β -D-glucoside isolée du genre *Salvia* mais sont plus rares.

Lorsqu'on analyse la répartition de ces composés dans les différentes sous-familles on constate que les *Lamioideae* sont très riches en apigénine, lutéoline et chrysoeriol substitués en 7 le plus souvent, mais aussi en 8, par un groupement *O*-glucosyl ou *O*-glucuronyl (TOMAS-BARBERAN . 1988). Des *C*-glycosides de flavones ont été répertoriés plus spécifiquement dans la sous-famille des *Nepetoideae*, et plus particulièrement dans *Teucrium pilosum* (HUSEIN. 1981). Divers travaux ont rapportés la présence de flavone *p*-coumarylglycosides (A) comme l'apigénine (RAO. 1983 ; NAWWAR, 1989; TOMAS-BARBERAN. 1986 ; ITOKAWA. 1981) et les flavones 8-hydroxy-7- allosylglucosides (B) (LENHERR . 1987 ; AL-ANSARI. 1991 ; TOMAS-BARBERAN. 1991 ; MARIN. 2004) dans les *Lamioideae* (tribu : Stachydeae). Généralement on ne trouve pas ces deux types de composés dans la même espèce. Ainsi les flavonoïdes *p*-coumarylglycosides sont présents dans toutes les espèces étudiées des genres *Ballota*, *Phlomis* et *Marrubium*. Ils sont systématiquement présents dans les sous genres *Marrubiastrum* de *Sideritis*, dans sous-genre *Galeopsis* et dans la section *Betonica* du genre *Stachys* la section *Betonica* du genre *Stachys* (schéma 33) :

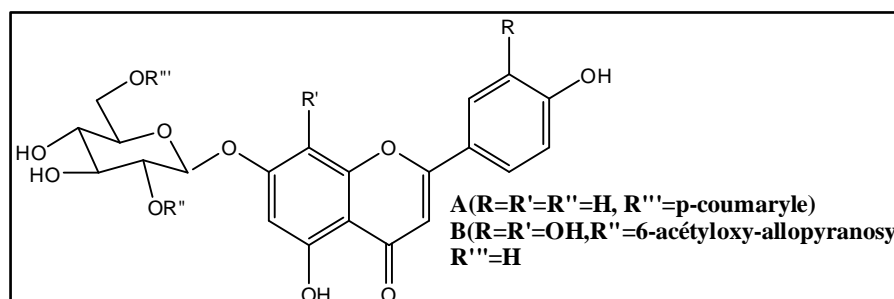


Schéma 33 : Les flavonoïdes *p*-coumarylglycosides

Les dérivés de l'apigénine -*p*-coumarylglycoside sont les plus fréquemment rencontrés dans un grand nombre d'espèces de la famille des Lamiacées mais ceux de la lutéoline, du chrysoeriol, du kaempférol et de l'isorhamnétine glycosylés ont été également détectés.

Le tableau ci-dessous montre la répartition de ces structures dans quelques espèces des Lamiacées. Comme le montre le **tableau 3** :

Tableau 3 : Répartition de ces structures dans quelques espèces des Lamiacées.

Espèce	Flavone 8-hydroxy Allosylglucoside	Flavonoïde <i>p</i> -coumaryl glucoside
<i>Phlomis lychnitis</i>	-	+
<i>Phlomis herba-venti</i>	-	+

<i>Phlomis crinita Cav</i>	-	+
<i>Phlomis cretica C.Presl</i>	-	+
<i>Phlomis purpurea</i>	-	+
<i>Marrubium vulgare</i>	-	+
<i>Marrubium supinum</i>	-	+
<i>Marrubium peregrinum</i>	-	+
<i>Sideritis angustifolia Lag</i>	+	-
<i>Sideritis leucantha Cav</i>	+	-
<i>Sideritis incana</i>	+	-
<i>Sideritis hirsuta</i>	+	-
<i>Teucrium chamaedrys</i>	+	-

La distribution des flavonoïdes (*p*-coumarylglucoside et 8-hydroxyflavone allosylglucoside) dans quelques espèces de la famille des Lamiacées (TOMAS-BARBERAN, 1992).

Les flavones, les flavones glycosylés, les flavones glycosylés coumarylés (Tomas-BARBERAN . 1992) et l'acetoside (type phenylethanoïdes) (PEDERSEN, 2000) sont des marqueurs chimiotaxonomiques des *Lamioideae* dont le genre *Marrubium* et *Phlomis* fait partie. Ils sont rarement isolés de la sous-famille *Nepetoideae*. Les flavones 5, 6, 7, 4' tetra-*O*-substitués comme ladaneine sont spécifiques des genres *Marrubium* et *Ballota*. En effet, aucune de ces structures n'a été rencontrée dans d'autres genres de cette sous-famille (comme par exemple *Phlomis*) (VALANT-VETSCHERA , 2003).

II-2-1-5-Utilisations traditionnelles des Lamiacées

La famille des Lamiacées regroupe un grand nombre d'espèces d'intérêt économique majeur (Guignard, 2004) et dont les applications sont très variées, comme la parfumerie, la cuisine, la phytothérapie et l'aromathérapie :

En parfumerie : même si les parfums de synthèse tendent à remplacer ces essences, la parfumerie de luxe continue à utiliser ces plantes en les distillant, afin d'en extraire le précieux parfum qu'elles contiennent et de perdurer la qualité de ses produits : on y utilise les fleurs de la lavande (*Lavandula angustifolia*), de patchouli (*Pogostemon patchouly*), par exemple.

En cuisine : de nombreuses herbes aromatiques sont des Lamiacées : basilic, menthe, thym, romarin, sauge...

En phytothérapie et aromathérapie : cette famille est une importante source d'huiles essentielles, d'infusion et antibiotiques naturels pour l'aromathérapie, l'industrie des cosmétiques. D'autres huiles sont utilisées également pour leurs propriétés hydratantes.

Cette famille possède également un effet répulsif contre les insectes indésirables, on peut citer comme exemple l'utilisation de *Melissa officinalis* contre les moustiques.

Selon QUEZEL et SANTA (1963), les Lamiacées constituent une famille très importante dans la flore algérienne représentée par 28 genres et 146 espèces contre 8 genres et 12 espèces décrites par OZENDA (1991) dans toute le Sahara.

Thymus vulgaris est une des plantes aromatiques les plus populaires dans le monde. Cette plante est traditionnellement utilisées lors de congestions nasales, de rhume, pour le traitement des petites plaies, pour soulager les piqûres d'insectes, les douleurs rhumatismales et en bain de bouche (POLETTI . 1988 ; BRUNETON .1999).

En Turquie parmi les espèces étudiées par leurs activités biologiques utilisées par la population dans différents domaines, on peut citer : *l'origanum, satureja, thymbra, et thymus* sont connus sous le nom kekik en Turquie et largement utilisés en médecine traditionnelle (SATIL . 2005) pour soigner les maux de ventre et le rhume. Les espèces du genre *Origanum* sont utilisées comme herbe pour faire le the et leur poudre est utilisée pour l'obtention de l'huile essentielle (oregano) et l'eau aromatique qui est riche en carvacrol, il lutte contre les maladies gastro intestinales, réduit le cholestérol et la glycémie. Il possède aussi des propriétés antispasmodiques (BASER. 2002) et antibactériennes (LAMBERT. 2001).

Le genre *Sideritis* connu sous le nom de « dagcayi » en Turquie est largement distribue dans le monde avec 150 espèces ; 46 espèces sont présentes en Turquie, dont 42 sont endémiques. Ce genre est utilisé comme anti-inflammatoire (YESILADA . 1989), antispasmodique (EZER, 1992), antimicrobien (EZER, 1994 ; AKCOS .1998). Il est utilisé sous forme de thé pour soigner le rhume.

Depuis l'Antiquité, Romains, Grecs, Egyptiens et Arabes, l'ont toujours utilisée comme compresse contre les morsures de serpents, et mélangée à la graisse d'ours par certaines tribus amérindiennes, pour guérir les problèmes de peau et les verrues. Les chinois l'échangeaient même contre leurs meilleures feuilles de the et les «anciens» avaient l'habitude d'en faire une cure d'une semaine.

Anisomeles est un genre de la famille *Lamiaceae* compris environ 8 espèces, ces dernières sont très utilisées en médecine traditionnelle dans les régions sud et tropical de l'Asie (HUANG . 2003). En particulier *Anisomeles indica*. Kuntze, trouvée seulement a Taiwan, est

utilisée pour traiter différentes maladies tels que les maladies inflammatoires (Rao . 2009), les maladies gastro-intestinales, l'hypertension, et les maladies qui touchent le système immunitaire (KAO. 1985 ; HUANG. 2003). *Teucrium polium aurasiacum*, une plante de l'Atlas saharien (Hoggar), est utilisée en médecine traditionnelle pour ses propriétés diurétique diaphoretique, antipyrétique, antispasmodique, anti-inflammatoire, antihypertensive, antinociceptive et hypolipidemiante (GALATI. 2000 ; TARIQ . 1989 ; SULEIMAN. 1998; ABDOLLAH . 2003 ; RASEKH . 2001). Les huiles essentielles de cette plante présentent des activités antimicrobiennes (THOPPIL . 2001) et antispasmodiques (HASSAN . 1979).

II-2-1-6-Travaux antérieurs sur le genre *Calamintha*

Le genre *Calamintha* présente beaucoup de références (150) dont la plupart concernent les huiles essentielles ainsi que sur les effets thérapeutiques de ces huiles antimicrobiennes (STANIC GET . 1999) , alors que les travaux effectués sur les flavonoïdes (13) de ce genre sont très limités, et les quelques publications montrent qu'ils présentent une bonne diversité en flavonoïdes sous forme d'hétérosides dont certains ont pu être isolés pour la première fois chez ce genre et on peut citer parmi les composés nouveaux :

L'acacétine 7-O-[6''''-O-6-acétylglucosyl(1''''→2'')]rhamnosyl(1''''→6'')glucoside isolés chez *Calamintha glandulosa* (MARIN P.D . 2001). (schéma 34)

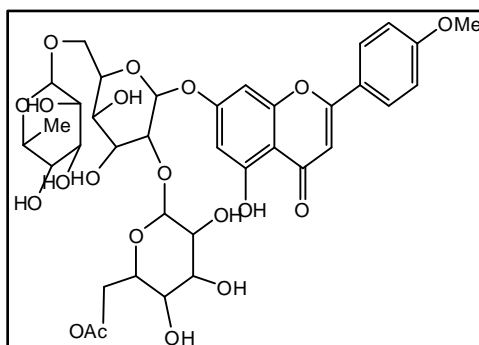


Schéma 34 : Un dérivé de l'acacétine *Calamintha glandulosa*

Ainsi que les composés 3',4'-diméthoxyquercétine-3,7-di-O-glucoside isolé chez *Calamintha grandiflora* (SOULELES . 1991) comme le montre le schéma 34' :

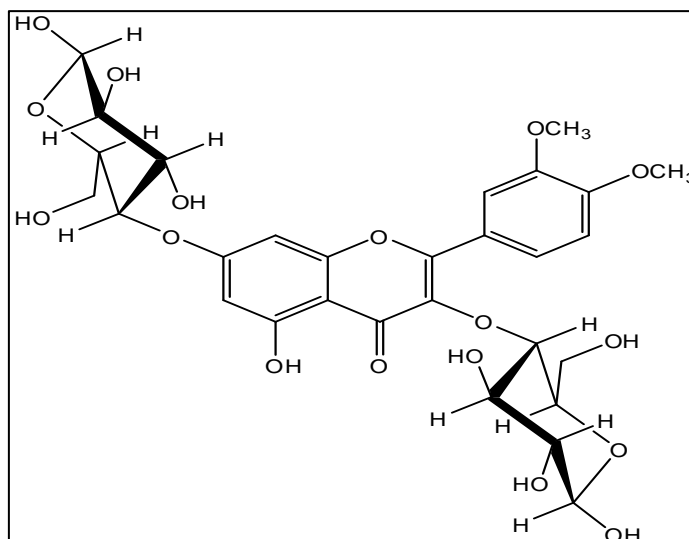


Schéma 34' : le 3',4'-diméthoxyquercétine-3,7-di-O-glucoside

et le composé "Al Quds" isolé de l'espèce *Calamintha incana* (DARDASS A.K . 1999) (schéma 35) :

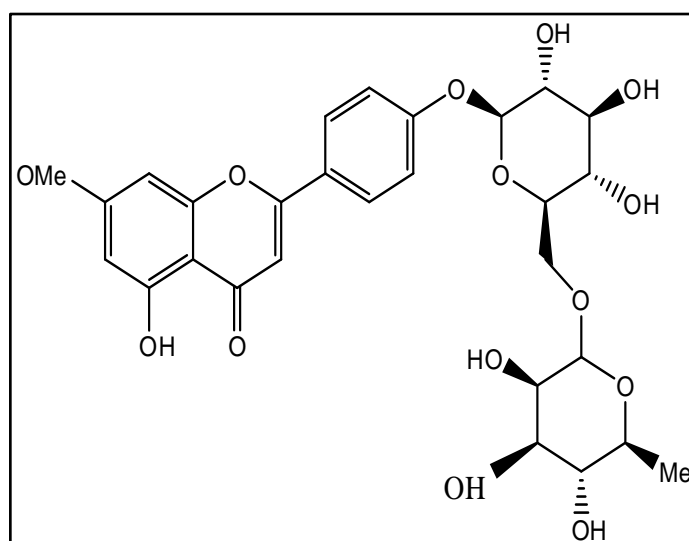


Schéma 35 : Le composé AL-Quds

Par ailleurs d'autres composés hétérosides ont pu être isolés et identifiés comme :

- Acacétine-7-O-rhamnosyl(1''''→6'')glucoside *Calamintha glandulosa*. (MARIN. P.D .2001).
- Rutine et isorhamnétine-3-O-Galactoside *Calamintha grandiflora* (STANIC .G . 1999).
- Acacétine- 7- O- beta - galactoside ; Acacétine- 7- O- beta -rutinoside; Acacétine-7-O-beta-diglucoside ; Acacétine-7-O-beta-galactosidorhamnoside ; la quercétine-3-O-beta diglucoside

Calamintha népéta(L). (SOULELES C . 1985).

D'autres composés de type aglycone ont pu être isolés et identifiés chez l'espèce *Calamintha nepeta* (THOMAS BARBERAN . 1988) comme étant :

- 5,6,4'-trihydroxy-7-8 diméthoxyflavone(thymusine)
- 5,6,4'-trihydroxy-7,8,3' triméthoxyflavone(thymonine)
- 5,6-dihydroxy-7,8,3',4'-tétraméthoxy flavone.
- 5,6-dihydroxy-7 ;8,4'-triméthoxyflavone(pebrelline).
- 5,6,4'-trihydroxy-7 ,3'-diméthoxyflavone.
- 5,6-dihydroxy-7,3',4'-triméthoxyflavone.
- 5,6-dihydroxy-7,4'-diméthoxyflavone (ladanéine).

Quatre aglycones ont été isolées chez l'espèce *Calamintha Baborensis* (Benkiniouar. R thèse de doctorat décembre 2007) et qui sont : l'apigénine, la lutéoline , la 5,8,4'-trihydroxy-6,7,3'-triméthoxyflavone et la 5,6-dihydroxy7,4'-diméthoxyflavone.

Tous ces produits isolés chez cette espèce sont caractéristiques de la famille des Labiées.

A hand-drawn thought bubble with a scalloped border and a tail of three overlapping circles at the bottom. The text inside is centered and written in a simple, uppercase font.

REFERENCE DU
CHAPITRE II

A

ABDOLLAHL, M.; KARIMPOUR, H.; MONSEF-ESFEHANI, H. R., *Pharma.Resear*, Antinociceptive effects of *Teucrium polium* total extract and essential oil In mouse writhing test, (1), 2003, 31-35.

AKCOS, Y.; EZER, N.; OZCLIK, B.; ABBASOLU, U., *J.Pharm. Science*, Iridoid glucosides from *Sideritislycia Boiss et Heldr* and its antimicrobial activities, (23), 1998, 99-103.

AL-ANSARI, M. A.; BARRON, D.; ABDALLA, M. F.; SALEH, N. A. M.; LE QUERE J. L., *Phytochemistry*, Flavonoid constituents of *Stachys aegyptiaca*. (30), 1991, 1169-1173.

B

BASABA, E.; CALZADA, F.; COMPOS, R., *J. Ethopharm.*, Antigiardial activity of methanolic extracts from *Helianthemum glomeratum* Lag. and *Rubus coriifolius* Focke in suckling mice CD-1, (108), 2006, 395–397.

BASABA, E.; CALZADA, F.; COMPOS, R., *J. Ethopharm.*, In vivo antigiardial activity of three flavonoids isolated of some medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of diarrhea. (109), 2007, 552-554

BELLAKHDAR, J., Médecine arabe ancienne et savoir populaires. La pharmacopée marocaine traditionnelle, Ibris Press, 1997, 254.

BENKINIOUAR .R thèse de doctorat « contribution à l'étude des composés phénoliques de certaines espèces des labiées de la flore Algérienne » soutenue en décembre 2007.

BENTHAM G., *Labiatae*, In: Bentham G., Hooker J. D. (Eds), *Genera Plantarum*, Reeve and Co, London, (2), 1876, 1160–1223.

BERTHIER, A., La gomme de labdanum en Espagne, *Revista italiana*, (6), 1976, 315-317.

BONNIER, G., Flore complète de France, Suisse et Belgique, Tome II, 1985, 1912-1932.

BOUAMAMAA, H.; NOEL, T.; VILLARD, J.; BENHARREF, A.; JANA, M., *J.Ethnopharm.*, Antimicrobial activities of the leaf extracts of two Moroccan *Cistus* L. species., 2006, 104–107

BRAN-BLANQUET, J.; BOLOS, O., Aperçu des groupements végétaux des montagnes Tarragonaises, *Collectanea botanica*, II(3), 1950, 302-342.

BRIQUET J., *Labiatae*. In: Engler, A., Prantl, K. (Eds.), *Die natürlichen Pflanzenfamilien*, Teil 4, Abt. 3a, W. Engelmann, Leipzig, 1895–1897, 183–375.

BRUNETON, J., Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales 3. e. édition Tec et Doc. Paris, 1999.

C

- CALABUIG, M. T.; CORTES, M.; FRANCISCO, C. G.; HERNANDEZ, R.; SUAREZ, E.,** *Phytochemistry*, Labdane diterpenes from *Cistus symphytifolius*, (20), 1981, 2255-2258.
- CANTINO, P. D.; HARLEY, R. M.; WAGSTAFF, S. J.,** Genera and Classification. In Harley, R.M. Reynolds, T. (eds) Advances in Labiate Science. Royal Botanic Gardens, Kew, 1992, 511-522.
- COLE, M. D.,** The significance of the terpenoids in the *Labiatae*. In Harley R. M., Reynolds, T. (eds). Advances in Labiatea Science. Royal Botanic Gardens, Kew, 1992. 315-324.
- COSTE, H.,** (Abbé), Flore descriptive et illustrée de la France, de la Corse, et des contrées limitrophes, Librairie Scientifique et Technique Albert Blanchard, Tome I, 1937.
- COULOUMA, A.,** *Bull. Soc. Royale de Bot. de Belgique*, Contribution à l'étude chimique des Cistes, LXVII (1), 1933, 86-94.

D

- DANNE, A.; PETERTEIT, F.; NAHRESTEDT, A.,** *Phytochemistry*, Proanthocyanidins from *cistus incanus*, (4), 1993, 1129-1133,
- DANNE, A.; PETERTEIT, F.; NAHRESTEDT, A.,** *Phytochemistry*, Flavan-3-ols, prodelphinidins and further polyphenols from *cistus salvifolius*, (2), 1994, 533-538,
- DARDASS, A. K.; FIRDOUS, S.; ALI, Z.; AHMAD, V, U.,** *Zeitsch. Naturf., B, Chemical Sciences*, Alquds, a new flavone glycoside from *Calamintha incara*, (4), 1999, 569-571.
- DE LUCA, V.; PIERRE, B. ST.,** *Trends in Plant Scien.,* The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis, (5), 2000, 349-364.
- DE PASCAL TERESA, J.; BILLIDO, I. S.; BSABE, P.; MARCOS, I. S.; RUANO L. F.; URONES. J. G.,** *Phytochemistry*, Labdane diterpenoids from *Cistus ladiniferus*, (21), 1982, 899- 901,
- DE PASCAL TERESA, J.; URONES, J. G.; MARCOS, I. S.; BSABE, P.; NUNE, L.,** *Phytochemistry*, Diterpenoids and flavonoids from *Cistus palinhea*, (22), 1983, 2805-2808,
- DE PASCAL TERESA, J.; URONES, J.G.; MARCOS, I. S.; BARCALA, P. B.; NARCISO, M.,** *Phytochemistry*, Diterpenoid and other components of *Cistus laurifolius*, (25), 1986, 1185-1187.
- DE PASCUAL TERESA, J.; BASABE, P.; MARCOS, I. S.; BERMEJO. F.; URONES. J. G.,** *An. Quim. (77C)*, 1981, 184.

DE PASCUAL TERESA, J.; URONES, J. G.; BASABE, P.; BERMEJO, F.; MARCOS, I. S., *An. Quim.* (77C), 1981, 290.

DE PASCUAL TERESA, J.; URONES, J. G.; MARCOS, I. S.; BERMEJO, F., BASABE, P., *Phytochemistry*, Rearranged labdane salmantic acid from *Cistus Laurifolius.*, (22), 1983, 2783-2785.

DEMETZOS, C.; DIMAS, K. S., *Stud. Natl Prod Chem*, Labdane-type diterpenes: Chemistry and biological activity. F, 2001, 235-292.

E

EZER N.; SEZIK E.; EROL K.; OZDEMIR, M., *Anadou Univ Pub*, The spazmotic activity of some *Sideritis* species. Proceedings of the 9th Symposium on the Plant Drugs. Eskişehir, 16-19 May 1991. Proceedings book (ed. Başer K. H. C), (641), 1992, 88-93.

EZER, N.; USLUER, G.; GUNEŞ, E. K., *Fitoterapia*, Antibacterial activity of some *Sideritis* species. (65), 1994, 549-551.

F

FIGUEIREDO, M. R.; KAPLAN, M. A. C.; GOTTLIEB, O. R., *Plant Syst. Evolu*, Diterpenes Taxanomic Markers.(195), 1995, 149-158.

FLORA EUROPEA, Vol. 2, Cambridge University Press, 1968.

FOURNIER, P., *Les quatre flores de France*, Ed. Lechevalier-Paris, (432), 1977, 438-440.

FRAGA, B. M.; HERNANDEZ, M. G.; SANTANA, J. M. H.; TERRERO, D.; GALVAN, M. F., *Biochem. Syst. Ecology*, A chemotaxonomical study of *Sideritis massoniana* taxa, (7/8), 1995, 835-842.

G

GALATI, E. M.; MONDELLO, M. R.; D'AQUINO, A.; MICELL, N.; SANOGO, R.; TZAKOU, O., *J. Ethnopharm.* Effects of *Teucrium divaricatum* Heldr.ssp.*divaricatum* decoction on experimental ulcer in rats, (72), 2000, 337-342.

GAMISANS, J.; MONOD D.J., *Catalogue des plantes vasculaires de la Corse*, Ed. des Conservatoires Botaniques, Genève, 1993.

GAUSSEN, H.; LEROY, J.F.; OZENDA, P.; DE BOTANIQUE, P.; MASSON, E.D., Paris, (2) 1982, 296.

GRAYER, R. J.; ECKERT, M. R.; VEITCH, N. C.; KITE, G. C., *Phytochemistry*, The chemotaxonomic significance of two bioactive caffeic acid esters, Nepetoidins A and B, in the Lamiaceae, (64), 2003, 519-528.

GUIGNARD, J. L.; DUPONT, F., Botanique Systématique moléculaire. 13e édition. Masson, Paris, 2004.

GUIGNARD, J. L.; PELT, J. M., Botanique Systematique moleculaire 12e édition. Masson, Paris, 2001, 49.

H

HAN, Q. B.; CHEUNG, S.; TAI, J.; QIAO, C.-F.; SONG, J.-Z.; TSO, T.-F.; SUN, H.-D.; XU, H.-X., *Organic Letters*, Maoecrystal Z, a cytotoxic diterpene from *Isodon eriocalyx* with a unique skeleton, (21), 2006, 4727-4730.

HAN, Q. B.; ZHANG, J. X.; ZHAO, A. H.; SUN, H. D.; LU, Y.; WU, Y. S.; ZHENG, Q. T., *Tetrahedron*, Two novel tricyclic diterpenoids from *Isodon rubescens* var. *taihangensis*, (60), 2004, 2373-2377.

HASSAN, M. M. A.; MUHTADI, F. J.; AL-BADR, A., *J. Pharm. Sciences*, Antispasmodic GLC-mass spectrometry of *Teucrium polium* essential oil, (68), 1979, 800-801.

HEYWOOD, V. H.; BRUMITT, R. K.; CULHAM, A.; SEBERG, O., Flowering plant families of the world. Royal botanic Gardens, Kew, 2007.

HUANG, T. C.; HUANG, T. C.; HSIEH, C. F.; BOUFFORD, D. E.; KUOH, C. S.; OHASHI, H.; PENG, C. I.; TSAI, J. L.; YANG, K. C.; HSIAO, A.; TSAI, J. M. (Eds.), Flora of Taiwan, 2nd ed. National Science Council of the Republic of China, Taipei, 2003, 437-448.

HUSEIN, S. Z.; MARKHAM, K. R., *Phytochemistry*, The glycoflavone vicenin-2 its distribution in related genera within the *labiatae*, (20), 1981, 1171

HYWOOD, V., Les plantes à fleurs, Nathan, 1996.

I

ISERIN, P., Larousse Encyclopédie des plantes médicinales, 2eme édition, Parie, France 1997, 10-11

ITOKAWA, H.; SUTO, K.; TAKEYA, K., *Chem. Pharm. Bulletin*, Studies on a novel p-coumaroyl glucoside of apigenin and on other flavonoids isolated from Patchouli (*Labiatae*). (29), 1981, 254-256.

J

JAVIDINIA, K., *J. Essent. Oil Research*, Composition of the essential oil of *Helianthemum kahiricum*, 2007, jan/ fev.

JIMÉNEZ C., RIGUERA R., *Nat. Prod. Reports*, Phenylpropanoid glycosides in Plants: Structure and biological activity, (11), 1994, 591-606.

K

KAO, M. T., Popular Herbal remedies of Taiwan. SMC, Publishing Inc, Taipei, 1985.

KUBO, I.; GANJIAN, I.; KUBOTA, T., *Phytochemistry*, Chemotaxonomic significance of ent-kaurene diterpenes in *Rabdosia umbrosus* varieties, (1), 1982, 81-83.

L

LAMBERT, RP. N.; COOTE, P. J.; NYCHAS, G. J., *J. Appli Biol.*, A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of aregano essential oil, Tymol, and carvacrol, (91), 2001, 453-462

LAWRENCE B.M., Progress in essentials oils, *Perfumer & Flavorist*, 1984, 9 (Feb/Mar), 49-60. (Mar/Apr), 78-79.

LENHER A., LAHLOUB M. F., STICHER O., *Phytochemistry*, *Stachys recta*, (23), 1984, 2343-2345

LENHER, A.; MABRY, T. J., *Phytochemistry*, Acetylated allose-containing flavonoid glucosides from *Stachys anisochila*, (26), 1987, 1185-1188

LUIS-CALABUIG, E.; TARREGAR, R.; ALONSO, I., *Int. J. Wildland Fire*, Seedling regeneration of two *Cistus* species after experimental disturbances, (1), 1996, 13-19.

M

MARIN, P. D.; GRAYER, R. J., Veitch, N.C Kite G C , Harborne, J.B., *Phytochemistry*, Acacetin glycosides as taxonomic markers in *Calamintha* and *Micromeria*. (6), 2001, 943-947.

MARIN, P. D.; GRAYER, R. J.; GRUJIC-JOVANOVIC, S.; KITE, G. C.; VEITCH, N. C., *Phytochemistry*, Glycosides of tricetin methyl ethers as chemosystematic markers in *Stachys* subgenus *Betonica*, (65), 2004, 1247-1253.

MENEZES F. S., KAPLAN M. A. C., *An Acad Bras Ci*, Chemoevolutionary polarization in the *Lamiiflorae*, (67), 1995, 455-460.

MENEZES, F. S.; KAPLAN, M. A. C., *Bras.Cienc. Farma.*, Ocorrencias de diterpenoides na familia *Lamiaceae*. *Revista*, (2), 1993, 45-46.

NAWWAR MAHMOUD, A. M.; EL-MOUSALLAMY AMANY, M. D.; BARAKAT, H. H.; BUDDRUS, J.; LINSCHIED; M., *Phytochemistry*, Flavonoid lactates from leaves of *Marrubium vulgare*, (11), 1989, 3201-3206.

N

NIKOLOVA, M.; ASENOV, A., *Nat. prod. Research*, Surface flavonoid aglycones in newly studied plant species, (20), 2006, 103-106.

O

OZENDA, P., Flore du Sahara, Ed, CNRS, Paris, France, 1977, 349-350.

OZENDA, P., Flore et végétation du Sahara (2e ed). Paris, France, CNRS, 1991, 662.

P

PEDERSEN, J. A., *Biochem. System. Ecology*, Distribution and taxonomic implications of some phenolics in the family Lamiaceae determined by ESR Spectroscopy,(28), 2000, 229-253.

PETEREIT, FRANK.; KOLODZIEJ, H.; NAHRESTED, A., *Phytochemistry*, Flavan-3-ols and proanthocyanidins from *Cistus incanus*, (3), 1991, 981-985

POLETTI, A., Fleurs et plantes medicinales 2eme Ed Delachaux et Nistle S A Suisse, 1988. 103-131.

Q

QUEZEL, F.; SANTANA, S., Nouvelle Flore de l'Algerie et des regions Desertiques Meridionales, 1.2, 801-802 Ed CNRS, Paris France 1962-1963.

QUEZEL, P.; SANTA, S., Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome 2 CNRS, Paris France, 1963, 693-694.

R

RAO, L. J. M.; KUMARI, G. N. K.; RAO, N. S. P., *Phytochemistry*, Two further acylated flavone glucosides from *Anisomeles ovata*, (4),1983, 1058.

RAO, Y. K.; FANG, S.-H.; HSIEH, S.-C.; YEH, T.-H.; TZENG, Y.-M., *J. Ethnopharm.*, The constituents of *Anisomeles indica* and their anti-inflammatory activities, (2), 2009, 292-296.

RASEKH, H. R. K.; KHOSHNOOD, M. J.; KAMALINEJAD, M.; SHAFAGHL, M.; KHADEM, G., Hypolipidemic effects of *Teucrium polium* in rats. *Fitoterapia*, (72), 2001, 937-939.

REGNAULT-ROGER, C.; RIBODEAU, M.; HAMRAOUI, A.; BAREAU, I., BLANCHARD, P.; GIL-MUNOZ, M-I.; BARBERAN, F. T., *J. Stored Prod. Research*, Polyphenolic compounds Host choice of insects 41 of Mediterranean *Lamiaceae* and investigation of orientational effects on *Acanthoscelides obtectus* (Say), (4), 2004, 395-408.

RODRIGUEZ-HAHN, L.; ESQUIVEL, B.; CARDENAS, J., In secondary metabolites from Mexican plants: Chemistry and biological properties, Ed. L. Rodriguez-Hahn, Research Sign Post, India, 1996, 19.

ROUSTAND, T., Contribution à l'étude botanique et phytochimique du genre *Cistus*, Thèse de doctorat, Université de Pharmacie de Montpellier, 1984.

S

SATIL, F.; KAYA, A.; BICAKCI, A.; OZATLI, S.; TUMEN, G., *Pakistan J. Bot.*, Comparative morphological-anatomical and palynological studies on two species grew in East Anatolia *Thymus migricus* klokov and des.-shost *Thymus fedtschenkoi* ronninger var. *handelii* (ronninger) jalas, (37), 2005, 531-549.

SEAMAN, F.; BOHLMANN, F.; ZDERO C.; MABRY T. J., Diterpenes of flowering plants- *Compositae* (*Asteraceae*). Springer-erlag, New York, 1990.

SOULELES, C.; SHAMMAS, G., *Plantes médicinales et phytothérapie*, Tome XIX, 1985, 286-290.

SOULELES, C.; HARVALAG, C., CHINOUE, J., *Inter. J. Pharm.*, Flavonoids from *Calamintha grandiflora*, (4), 1991, 317-319.

SPICHIGER, R. E.; SAVOLAINEN, V. V.; FIGEAT, M., *Botanique Systematique des Plantes a Fleurs*. Presses polytechniques et universitaires romandes. Lausanne, 2000.

STANIC, G.; BLAZEVIC, N.; BREKIC, D.; LUKAC, G., *Acta pharma.*, The compositions of essential oils of *Calamintha nepeta* L. Savi subsp. *glandulosa* Rep. P. W Ball and *Calamintha sylvatica* Bromf. subsp. *sylvatica* (2), 1999, 107-112.

SULEIMAN, M. S.; ABDELGHANL, A. S.; EI-KHALIL, S.; AMIN R., *J. Ethnophar.*, Effect of *Teucrium polium* boiled extract on Intestinal motility and blood pressure, (22), 1998, 111-116.

SUN, H. D.; YU, Y. C.; JIANG, B, Diterpenoids from *Isodon* species; Science Press: Beijing, China, 2001.

T

TARIQ, M.; AGEEL, A. M.; AL-YAHIA, M. A.; MOSSA, J. S.; AL-SAID, M. S., *Inter. J Tissue Reactants*, Anti-inflammatory activity of *Teucrium polium*, (11), 1989, 185-188.

THOPPIL, J. E.; MINIJA, J.; TAJO, A.; DEENA, M. J., *J. Nat. Remedies*, Antimicrobial activity of *Teucrium plectranthoides* Gamble essential oil, (1), 2001, 155-157.

TOMAS –BARBERAN, F.A.; HUSSEIN, S.; ZAND GIL, M, I., *Biochem. System. Ecology*, The distribution of methylated flavones in the Lamiaceae, (1), 1988, 43-46.

TOMAS-BARBERAN, F. A., *Fitoterapia*, The flavonoid compounds from the *Labiatae*. (57), 1986, 67-95.

TOMAS-BARBERAN, F. A., RENEE, J.; GRAYER-BARKMEIJER, G. M. I.; HARBORNE J. B., *Phytochemistry*, Distribution of 6-hydroxy-6-methoxy- and 2-hydroxyflavone glycosides in the *Labiatae*, the *Scrophulariaceae* and related family, (27), 1988, 2631-2645

TOMAS-BARBERAN, F. A.; GIL, M. I., *Royal Bot. Gardens*, Chemistry and natural distribution of flavonoid in the *Labiatae*. In: Harley, R.M., Raynolds, T. (Eds.), *Advances in Labiatae Science.*, Kew, 1992, 299–305.

TOMAS-BARBERAN, F. A.; GIL, M. I.; FERRERES, F.; TOMAS-LORENTE, F., *Phytochemistry*, Correlations between flavonoid composition and infrageneric taxonomy of some European *Galeopsis* species, (30), 1991, 3311-3314.

TOMAS-BARBERAN, F.; GIL MUNOZ, M. I., *Revi. Latinoam. Quimica*, *Labiatae* flavonoids: chemical, chemotaxonomical, economical and ecological aspects, (3-4), 1990. 134–139.

U

ULUBELEN, A.; TOPCU, G., *Stud. Nat. Prod. Chem*, Chemical and biological investigation of some *Salvia* species growing in Turkey In Atta-ur-Rahman, (20), 1998, 659- 718.

V

VALANT-VETSCHERA, K. M.; ROITMAN, J. N.; WOLLENWEBER, E., *Biochem. Systema. Ecology*, Chemodiversity of exudate flavonoids in some members of the *Lamiaceae*, (11), 2003.1279–1289.

VESTRI ALVARENGA, S. A.; GASTMANS, J. P.; DO VALE RODRIGUES, G.; MAURENO, P. R. H.; DE PAULO EMERENCIANO, V., *Phytochemistry*, A computer-assisted approach for chemotaxonomic studies- diterpenes in *Lamiaceae*,(56),2001,583-595.

VOGT, T.; GULTEZ, P.G., *Phytochemistry*, Accumulation of flavonoids during leaf development in *Cistus laurifolius*, (36), 1994, 591-597,

Y

YEŞILADA, E.; EZER, N., *Inter. J Crude Drugs Resea.*, Antiinflammatory activity of some *Sideritis* species growing in Turkey, (27), 1989.38-40.

A hand-drawn thought bubble with a scalloped border and a tail of three small circles at the bottom left. The text "Chapitre III" is centered inside the bubble.

Chapitre III

III-Modes d'obtention des produits

III-1-Les extractions

L'obtention d'une substance naturelle à partir de végétaux nécessite souvent une extraction avec un solvant approprié. Cette extraction peut être de nature continue (percolation ou entraînement à la vapeur) où l'extracteur Soxhlet est de loin le plus utilisé, elle peut être aussi de nature discontinue. Cette dernière consiste à laisser macérer le végétal dans un solvant à température ambiante, à chaud ou même parfois porter le tout à ébullition pour en extraire les constituants solubles. Cette opération peut être répétée plusieurs fois (2 à 3 fois). Après évaporation totale du solvant on obtient bien évidemment ainsi un extrait brut.

Souvent cette extraction est suivie par une autre. Seulement à la différence de la première, c'est une extraction liquide-liquide qui s'effectue dans une ampoule à décanter (Affrontement). Cette dernière consiste à transférer qualitativement et quantitativement le ou les produits recherchés. Le choix du solvant d'extraction devient alors impératif.

Enfin, comme le transfert dépend du coefficient de partage et de l'efficacité de chaque extraction (vitesse de transfert), on peut toujours vérifier que cette opération est achevée en évaporant une partie de la dernière extraction, ce qui permet d'évaluer la quantité du résidu.

Pour les deux plantes, c'est la partie aérienne (feuilles et fleurs) qui a subi des macérations dans un mélange méthanol/eau (MeOH/H₂O 7/3) ce qui a conduit à l'obtention d'un extrait hydro-alcoolique. Ce dernier repris par de l'eau bouillante a subi après refroidissement une décantation. La phase aqueuse a subi des extractions liquide-liquide.

III-2-Les séparations

La chromatographie est une méthode physique de séparation basée sur les différences d'affinité des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile. Selon la technique mise en jeu, la séparation des produits entraînés par la phase mobile résulte soit de leurs adsorptions et de leurs désorptions successives sur la phase stationnaire, soit de leurs solubilités différentes dans chaque phase, dans le cas où les deux phases sont des liquides.

Il existe plusieurs méthodes de séparations chromatographiques et c'est en fonction de l'objectif fixé au préalable et de la faisabilité de la méthode qu'est utilisée une colonne (C.C), une couche mince (C.C.M) ou du papier (C.P). Nous avons également la chromatographie

liquide à haute pression (**H.P.L.C**) et la chromatographie en phase gazeuse (**C.P.G**) ces méthodes sont des techniques instrumentales basées sur les mêmes principes que ceux de la chromatographie classique sur colonne et sont de plus en plus utilisées.

III-2-1-Chromatographie préparative sur couche mince (TLC)

La chromatographie sur couche mince (**CCM**) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption ; la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi rigide de matière plastique ou d'aluminium .Une plaque de chromatographie sur couche mince (**TLC**, **CCM** en français) se compose donc, d'un support, en aluminium ou en verre, sur lequel a été étendue une fine couche d'un milieu de sorption (p. ex. la silice, SiO_2) comme phase stationnaire. Ces plaques sont plongées d'env. 0, 5 cm dans une phase mobile. Cette dernière est généralement un mélange binaire ou ternaire de solvants, adapté au type de séparation recherché. Les composés déposés à env.1 cm du bas de la plaque sont alors humectés et dissous par la phase mobile qui progresse par capillarité le long de la phase stationnaire. Selon la nature des phases mobile et stationnaire, deux types de mécanismes d'interaction permettent la séparation de composés présents en mélange : l'adsorption sur la surface de la phase stationnaire solide et le partage entre un film de phase stationnaire liquide et la phase mobile (PACHALY, 1999).

Du fait de ses faibles contraintes techniques, de son emploi simple et de son coût relativement modeste, **la TLC** est un outil de choix pour l'analyse phytochimique de routine d'extraits bruts, de fractions, ainsi que de produits purs isolés. Les quantités déposées sur les plaques sont normalement de 100 μg pour les extraits et de 10 μg pour les produits purs.

Cette technique prise dans sa forme préparative est souvent utilisée en dernier lieu, c'est-à-dire à partir du moment où les autres techniques chromatographiques ont montré leurs limites. Effectivement, une fois le système de solvants ou bien l'éluant étant bien choisi, cette technique utilisée sous sa forme préparative est souvent très avantageuse car la transposition à partir des **CCM** analytiques est facile. Le procédé est rapide et permet d'isoler des quantités de substances suffisantes pour des analyses de structures ; elle permet également l'obtention de produits purs à tous les coups

Toujours dans le même contexte, cette technique peut être utilisée d'une manière classique mais aussi selon d'autres variantes et qui sont :

-CCM à répétition :

Une fois le solvant ayant migré sur quelques centimètres, la plaque est sortie de la cuve puis séchée. Elle est en ensuite replongée dans le même solvant pour une nouvelle migration, poursuivie plus loin que la précédente. Ces opérations de migration et de séchage successifs peuvent être répétées plusieurs fois et assez souvent, les séparations sont de ce fait, bien meilleures qu'avec une migration unique.

-CCM à multi solvants :

Elle consiste à faire passer sur la même plaque et dans la même direction plusieurs solvants différents. A l'aide d'un solvant approprié (apolaire), les substances les moins polaires seront déplacées. La plaque est retirée, une fois séchée, elle va être soumise à une seconde opération d'élution mais cette fois ci avec un solvant plus fort (polaire) qui déplacera forcément les composés les plus polaires qui étaient fortement adsorbés. Cette opération peut si besoin est, être répétée autant de fois, dans la mesure où les séparations s'avèrent intéressantes.

Rappelons toutefois qu'en plus de la **CCM** monodimensionnelle, il est parfois utile d'utiliser la **CCM** bidimensionnelle aussi bien sous sa forme préparative qu'analytique.

Comme pour le papier, il est possible d'exécuter des **CCM** à deux dimensions pour séparer les mélanges particulièrement complexes. Une première migration avec un premier solvant se fait dans le sens 1 et dans un deuxième temps, la plaque séchée, est développée de nouveau dans le sens 2 avec un deuxième solvant. Il faut remarquer que les R_f sont quelquefois modifiés lorsque la plaque a subi une première migration et un séchage, si bien que l'identification peut être difficile. Remarquons aussi que dans la **CCM** bidimensionnelle, le temps de migration est plus long et que la diffusion est plus marquée que dans une **CCM** à une seule dimension. Le seuil de détection d'une substance est plus élevé et la sensibilité demeure plus grande que sur le papier.

L'application de ces techniques chromatographiques, d'une manière systématique ou sélective permet à coup sûr d'obtenir des produits purs. A ce stade, le degré de pureté est apprécié par les résultats de différents contrôles chromatographiques effectués sur les produits isolés. Ces contrôles doivent nécessairement être effectués dans au moins deux ou trois solvants différents un dans la mesure du possible, un ultime contrôle sur **H.P.L.C** est toujours bénéfique pour la suite du travail. Ce n'est qu'à ce moment que les produits isolés seront enfin prêts pour l'identification structurale.

III-2-2-Chromatographie sur colonne ouverte (CC)

Alors que toutes les autres méthodes chromatographiques sont habituellement employées pour l'analyse, la séparation ou la purification de faibles quantités de produits, la **CC** peut être une méthode préparative ; elle permet en effet, la séparation des constituants d'un mélange et leur isolement, à partir d'échantillons dont la masse peut atteindre parfois jusqu'à plusieurs grammes.

Donc la méthode généralement utilisée en première intention pour le fractionnement d'extraits bruts ou de fractions complexes est la chromatographie sur colonne ouverte. La taille de la colonne, la granulométrie de la phase stationnaire et la composition initiale de la phase mobile sont déterminées d'après la quantité et la qualité de l'échantillon à fractionner (extrait brut ou fraction enrichie) et au moyen d'analyses **TLC** préalables (HOSTETTMANN . 1997).

Dans notre cas, il a été question de trois **CC** bien distinctes à savoir :

-CC de polyamideSC₆ :

Utilisée en premier lieu, elle permet de dégraisser l'extrait, d'éliminer les pigments chlorophylliens et de départager le tout en bloc de composés plus ou moins similaires. .

Le gradient d'élution utilisé en chromatographie sur colonne de polyamide **SC₆** est l'éluant constitué du mélange Toluène/Methanol avec comme solvant de base le Toluène ou le mélange Eau/ Méthanol avec comme solvant de base l'eau.

-CC de silice SiO₂ :

Utilisée quand les composés à séparer ont des affinités avec ce support chromatographique. Cette technique permet parfois d'obtenir des produits relativement purs.

Dans le présent travail, la phase stationnaire est du Silicagel 60 (Merck) de granulométrie 35-70 μm ou 70-230 μm .

Le conditionnement manuel d'une colonne commence par le dépôt d'un coton hydrophile dans l'embouchure d'écoulement. La phase stationnaire est mise en suspension dans l'éluant de départ (boue, *slurry*) et versée dans la colonne en plusieurs fois jusqu'à stabilisation au niveau désiré. L'échantillon à fractionner est adsorbé sur une quantité de phase stationnaire correspondant de 1 à 2 fois sa masse, puis déposé soigneusement à la surface du gel de silice. Le tout est ensuite recouvert d'une fine couche protectrice de sable.

Les phases mobiles pour colonnes ouvertes utilisées dans ce travail sont des mélanges dont la composition de l'éluant de départ est déterminée par analyse **TLC**, en essayant de faire migrer les substances d'intérêt à un R_f plus ou moins connu.

L'élution se fait en mode gradient et les dernières fractions sont lixiviées avec du méthanol pur. Le débit varie en fonction du type de séparation souhaité et peut aller d'env. 1 ml/min (fractions enrichies) à 10 ml/min (extrait brut).

Les fractions sont récupérées dans des tubes à essai (10-250 ml) disposés sur un collecteur (ISCO Retriever II, Büchi B- 683).

L'analyse par **TLC** du contenu des tubes permet finalement de réunir rationnellement les fractions avant d'éliminer les solvants à l'évaporateur rotatif (Büchi Rotavapor).

-CC de Séphadex LH20 : à l'inverse des autres colonnes, celle-ci fonctionne en termes de tamis moléculaire et c'est en fonction de leurs poids moléculaire que les produits sont élués. Cette technique est généralement utilisée en dernier lieu car elle permet d'atteindre l'ultime purification et ainsi l'obtention de produits purs isolés.

III-2-3-La chromatographie préparative sur papier (Wattman^o3)

(MARKHAM.1982)

La chromatographie sur papier Whattman N^o3 ou autre est une méthode de séparation dont la technique est semblable à celle sur couche mince, mais dont le principe repose surtout sur des phénomènes de partage .elle est utilisée sous sa forme monodimensionnelle ou bidimensionnelle en chromatographie analytique ou préparative, tout comme les **CCM**.

Cette méthode présente certains avantages dans le cas de la séparation des composés hétérosides, de même qu'elle permet de débarrasser l'échantillon des composés acides phénoliques qui accompagnent souvent les flavonoïdes.

Enfin bien qu'elle soit très bénéfique, elle est souvent ignorée au dépend d'autres méthodes vu le principal inconvénient de la présence de la cellulose du papier qui est souvent entraînée avec les produits séparés.

Les solvants utilisés sont pour la plupart des cas, des solutions aqueuses d'acide acétique **CH₃COOH (S4)** avec des concentrations allant de 15 à 50% ou bien la phase organique du mélange *n*-Butanol/Acide acétique/Eau (**BAW(S5)**) dans les proportions en volume 4/1/5 respectivement.

III-2-4-Filtration sur gel

La filtration sur gel, ou chromatographie d'exclusion, repose sur la séparation de constituants en mélange en fonction de leur poids moléculaire et de leur structure spatiale (HOSTETTMANN . 1997).

Dans notre laboratoire, nous utilisons un gel de dextrane hydroxypropylé réticulé, le Sephadex LH-20 (Pharmacia), pour le fractionnement de mélanges simples ou la purification de produits. Le système de solvant employé dans le présent travail expérimental est un mélange binaire MeOH-eau (5:1) et le débit est réglé au minimum (env. 10 ml en 15 min). Les fractions sont récoltées dans des tubes à essai de 10 mL disposés sur un collecteur Retriever II (ISCO).

III-2-5-Réactifs de révélation chimique sur CCM

L'utilisation de réactifs chimiques en solution, vaporisés sur les chromatogrammes sur couche mince, permettent de compléter les observations faites visuellement sous les lampes UV à 254 nm (extinction de la fluorescence) et 366 nm (fluorescence propre). En effet, un choix adapté de réactifs permet non seulement de mettre en évidence des constituants ou classes de constituants présents dans un extrait (criblage général), mais offre en plus une méthode simple et rapide pour localiser un composé particulier dans un mélange (extrait, fraction enrichie,...). L'utilisation d'un réactif polyvalent est particulièrement adaptée pour réunir rationnellement les fractions récoltées suite à une séparation préparative ou semi-préparative.

Avant d'entamer la partie résultats et discussions, il est nécessaire de rappeler quelques notions pratiques liées directement aux procédés utilisés lors de l'identification structurale des flavonoïdes isolés à partir des deux plantes.

III-2-6-La fluorescence sous lumière de Wood :

La fluorescence du produit soumis à la lumière ultra-violette (lumière de Wood) représente l'étape primaire de l'analyse, elle joue un rôle important pour l'identification structurale.

Les différentes interprétations des fluorescences sous U.V des flavonoïdes sont résumées dans le **tableau 4** suivant : (MABRY, T J. 1970, MARKHAMK, R. 1982).

III-3-1-Règles de la spectroscopie UV

Le type de flavonoïde dépend de la fluorescence de celui-ci sous la lumière de Wood comme le montre le tableau 4

Tableau 4 : Fluorescence des flavonoïdes sous lumière de Wood.

Fluorescence	Type de flavonoïdes
Noir	Flavonols 5,6,7 tri – OH libres. Flavonols 5,7,8 tri-OH libres.
Brun noir	3-OH absent ou 3-OH substitué.
Violet	Flavones 5-OH et 4' -OH. Flavones 3-OR et 5-OH, 4'OR. Flavones ou flavonols 5-OH avec 4' -OH absent ou substitué. Flavones 6 ou 8 OH. Chalcones ,isoflavones, di-hydro-flavonols, flavanones.
Bleu-clair (fluorescent)	Flavones sans 5-OH libre. Flavonols sans 5-OH libre.
Jaune, jaune terne, Fluorescence orangée	Flavonols 3-OH libre avec ou sans 5-OH libre.
Jaune vert brillant	5-OH libre ou 5-OH substitué
Jaune fluorescent	Flavonols avec 3-OH libre. Aurones, chalcones, Flavonones.
Jaune pale	Di-hydro-flavonols.

Le rapport frontal R_f :

La valeur du R_f est définie comme suit :

$$R_f = \frac{\text{La distance entre l'origine et la tâche du produit}}{\text{La distance entre l'origine et le front du solvant}}$$

Cette valeur dépend des conditions expérimentales de chromatographie telles que : La nature du solvant et la concentration de l'échantillon (LESPAGNOL. A. 1974) (BERTHILLIER, A. 1972), elle permet d'avoir une idée sur la nature du flavonoïde ainsi que la nature et le nombre de substituant (BATE-SMITH, E.C. 1950). La relation R_f –structure de quelques exemples est illustrée dans le **tableau 5** ci-dessous :(GAYON. P.R. 1968, LOISELEUR. J. 1963).

Tableau 5: Relation structure- R_f

Structure flavonique	R_f
Augmentation des groupements Hydroxyles	Diminution du R_f (éluant organique C.P)
Glycosylation	R_f augmente dans un solvant aqueux. R_f diminue dans un solvant alcoolique.
Méthylation d' un hydroxyle en position 5.	R_f diminue dans un solvant alcoolique.
Hydroxyles méthylés	Augmentation du R_f dans un solvant alcoolique.

Le tableau suivant représente pour les principales familles de flavonoïdes, les maximums d'absorption des spectres enregistrés dans le méthanol (MARKHAM, K.R. 1982).

Tableau 6 : Domaines d'absorption des flavonoïdes sous UV-Visible (Méthanol)

Bande II	Bande I	Type de flavonoides
250-280	310-350	Flavones
250-280	330-360	Flavonols (3-OHsubstitué)
250-280	350-385	Flavonols (3-OH libre)
245-275	310-330 épaulements Pic à 320	Isoflavones, isoflavones (5-deoxy-6,7-dioxygénés)
275-295	300-330	Flavones et dihydroflavonols
230-270	340-390	Chalcones
230-270 Basse intensité	380-430	Aurones
270-280	465-560	Anthocyanes et anthocyanidines

III-3-2-EPREUVES D'ANALYSE PAR SPECTROSCOPIE DE MASSE

Introduction

Apparue au début du XXe siècle, la spectrométrie de masse a apporté des éléments clés pour la compréhension du noyau atomique. Elle est issue de la découverte, par Eugen Goldstein en 1886, des rayons canaux dus aux ions positifs et de leur analyse par un champ magnétique, par Wilhelm Wien en 1898. Le spectromètre de masse, initialement conçu par le Britannique Joseph John Thomson, En 1912, il obtient des spectres de masses de plusieurs composés gazeux : N₂, O₂, CO, CO₂, etc. Il met en évidence les ions négatifs et les ions multichargés.

L'année suivante, il découvre les isotopes $A = 20$ et $A = 22$ du néon (HOFMANN, E. 1999, CONSTANTIN, E. 1996).

C'est une technique d'analyse physicochimique permettant de détecter, d'identifier et de quantifier des molécules d'intérêt, par mesure de leur masse. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). De plus la spectrométrie de masse permet de caractériser la structure chimique des molécules en les fragmentant (WATSON, J.T. SPARKMAN, O.D. 2007).

-La spectrométrie de masse

Définition

La spectrométrie de masse est une technique analytique très puissante et très sensible permettant d'analyser des composés organiques solides, liquides ou gazeux. Elle permet de déterminer la masse moléculaire, de corréler le spectre d'un composé avec sa structure, d'expliquer des mécanismes de ruptures de liaisons, elle joue aujourd'hui un rôle important dans les études de pollution de l'environnement et de dopage grâce à sa sensibilité, sa sélectivité et sa possibilité de faire des analyses quantitatives rapides (HOFMANN, E. 1999) .

Composition

Un spectromètre de masse est constitué de :

- 1- Système d'introduction de l'échantillon
- 2- Source d'ions ou chambre d'ionisation
- 3- Analyseur qui sépare les ions en fonction de leur masse et de leur charge
- 4- Détecteur qui détecte les ions sortant de l'analyseur

III-3-2-1. HPLC couplée à la masse (LC/MS)

Définition

La chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse est une méthode d'analyse qui combine les performances de la chromatographie en phase liquide et de la spectrométrie de masse afin d'identifier et/ou de quantifier précisément de nombreuses substances. La LC-MS utilise un système de CLHP, mais au moment où les phases mobiles du liquide quittent la colonne, l'échantillon est vaporisé sous forme de micro-gouttelettes. Celles-ci s'évaporent rapidement et libèrent des molécules ionisées de l'analyte qui sont ensuite séparées dans la spectrométrie de masse.

Composition

Une unité LC-MS est composée de deux blocs principaux : un chromatographe en phase liquide et un spectromètre de masse.

Performances

Intérêt du couplage LC-/MS

- Séparation d'un mélange afin d'obtenir une identification de la plupart des constituants
- Avoir la sensibilité la plus élevée possible
- Etre universel, c'est-à-dire détecter toutes les substances éluées
- Fournir le plus de données structurales possibles
- Etre sélectif (identification d'un constituant ciblé)
- Permettre des analyses quantitatives

III-3-2-2-Spectrométrie de masse tandem (LC/MS/MS)

Définition

La spectrométrie de masse tandem (MS/MS) et son utilisation dans la chimie organique est apparue dans les années 60 (JENNINGS, K.R. 1968). Le développement d'instruments variés éventuellement couplés à la chromatographie a conduit dans les années 70 et 80 à une multiplication des domaines d'applications de la spectrométrie de masse tandem, en particulier dans les sciences du vivant (NIESSSEN, W. M. A. 2000, DASS, C. 2007).

Le tandem MS/MS se différencie de la MS par une fragmentation des ions pour permettre une meilleure identification. Les ions séparés lors d'un simple MS sont sélectionnés dans un

collecteur et sont fragmentés. Les fragments sont analysés dans un deuxième analyseur (fragments MS). L'identification obtenue est plus fine et plus exacte. La spectrométrie de masse permet une analyse qualitative et quantitative (JENNINGS, K.R. 1968, NIESSEN, W. M. A. 2000, DASS, C. 2007).

Composition

Il est composé sous sa forme

a- **Simple MS** : d'un ionisateur, d'un analyseur et d'un détecteur

b- **Tandem MS/MS** : d'un collecteur d'ions et d'un deuxième analyseur en plus de la partie simple MS.

Un spectromètre de masse est composé principalement de : un ionisateur, un détecteur et un analyseur de masse.

c- **L'ionisateur** : Sert à produire des ions positifs ou négatifs. Les principales sources ioniques dépendent de l'échantillon à analyser

d- **L'analyseur de masse** : sert à séparer les ions collectés soit sous l'action d'un champ électrique, soit sous l'action d'un champ magnétique. Il peut être couplé avec presque tous les ionisateurs. Les analyseurs de masse se différencient par leur résolution et leur domaine de masse d'analyse.

e- **Le détecteur** : sert à mesurer le nombre d'électrons et à amplifier le signal pour atteindre une bonne sensibilité. Le plus utilisé est un multiplicateur d'électrons. Ensuite le signal est enregistré et un spectre de masse est produit.

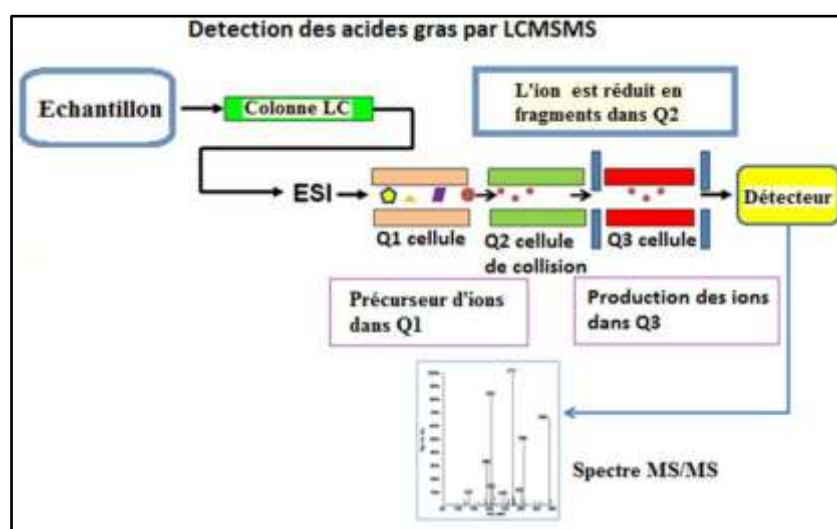


Figure 15 : Détection des acides gras par LC/MS/MS

Performances

L'analyse par spectrométrie de masse de type triple quadripôle (MS/MS) est la méthode de prédilection pour une quantification précise et une confirmation de traces d'analytes dans des matrices complexes. Détection des drogues et des métabolites dans des échantillons biologiques, polluants présents dans l'environnement, pesticides contenus dans les aliments... les analystes du monde entier font face au défi de la détection d'un plus grand nombre d'analytes cibles avec une plus grande sensibilité et dans un nombre d'échantillons considérablement plus important.

Les performances d'un spectromètre de masse MS et MS/MS sont déterminées par :

- a- Sa résolution : son pouvoir à séparer des ions de masses voisines
- b- Son exactitude : son pouvoir à mesurer la masse exacte d'un ion
- c- Sa sensibilité : son pouvoir à mesurer les petites quantités
- d- Son domaine de masse : son échelle de mesure de masse

Les applications de la spectrométrie de masse

Les domaines d'application de la spectrométrie de masse au laboratoire médical en mode simple ou en mode tandem sont multiples. Les analyses peuvent être destinées à:

- La recherche biomédicale :

- Recherche de biomarqueurs et identification de protéines

- La chimie clinique :

- Dosage de l'homocystéine plasmatique totale
- Dépistage néonatal de maladies métaboliques (ex. cycle urée)
- Analyse quantitative des stéroïdes

- La toxicologie :

- Dosage des drogues et alcools Suivi thérapeutique des médicaments (immunosuppresseurs, antirétroviraux, antidépresseurs)
- Recherche des intoxications médicamenteuses
- Pureté des produits pharmaceutiques et étude de leurs métabolites

Cette méthode s'applique dans beaucoup d'autres domaines non médicaux comme l'analyse écotoxicologique, l'agroalimentaire, les parfums ou l'alimentation.

III-3-2-3- Analyse des polyphénols par les techniques SM avec différents couplages

Les polyphénols constituent une famille de molécules organiques largement présente dans le règne végétal. Ils sont caractérisés, par la présence de plusieurs groupements phénoliques associés en structures plus ou moins complexes généralement de haut poids moléculaire.


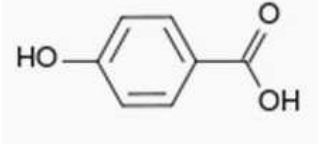
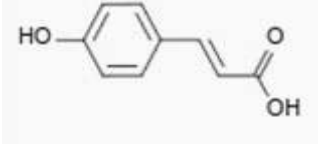
Les polyphénols prennent une importance croissante, notamment grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé (STANLEY . 2003). En effet, leur rôle d'antioxydants naturels suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer (CHEN D. 2004), des maladies inflammatoires (LAUGHTON M.J. et al. 1991), cardiovasculaires (FRANKEL E.N. 1991) et neurodégénératives (ORGOGOZO, J. M. 1997).

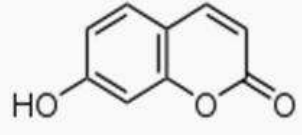
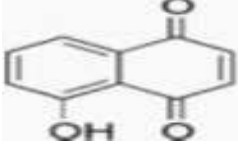
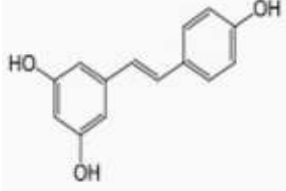
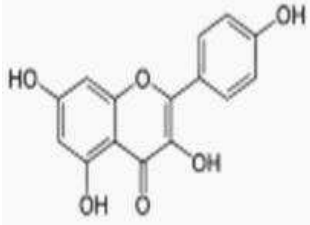
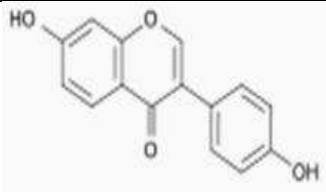
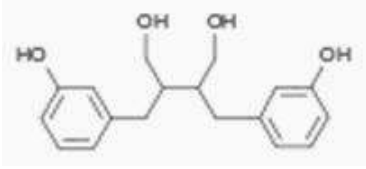
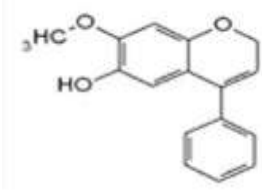
Les polyphénols naturels regroupent un vaste ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique, portant un ou plusieurs groupes hydroxyles, en plus d'autres substituant. Ils peuvent aller de molécules simples, comme les acides phénoliques (acide gallique), à des composés hautement polymérisés, de plus de 30 000 Dalton, comme les tanins (acide tannique).

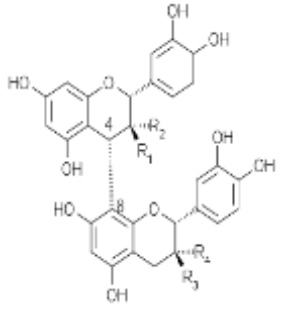
Les polyphénols sont communément subdivisés en phénols simples, acides-phénols (dérivés de l'acide benzoïque ou cinnamique) et coumarines, en naphtoquinones, en stilbénoides (deux cycles C6 liés par 2C), en flavonoïdes, isoflavonoïdes et anthocyanes et en formes polymérisées : lignanes, lignines, tanins condensés. Ces squelettes carbonés de bases sont issus du métabolisme secondaire des plantes, élaborés par la voie du shikimate (DEWICK, P. M. 1995).

En se basant sur la structure carbonée de base, on peut dégager les principales classes de composés phénoliques suivantes **Tableau 7** :

Tableau 7 : Classification des polyphénols.

Squelette Carboné	Classe	Exemple	Formule
C6	Phénols simples	hydroquinone	
C6-C1	Acides hydroxybenzoïques	acide parahydroxybenzoïque	
C6-C3	Acides hydroxycinnamiques	acide p-coumarique	

	Coumarines	Ombelliférone	
C6-C4	Naphtoquinones	Juglon	
C6-C2-C6	Stilbénoides	trans-resvératrol	
C6-C3-C6	Flavonoïdes	Kaempférol	
	Isoflavonoïdes	Daidzéine	
(C6-C3)2	Lignanes	Entérodiol	
	Anthocyanes	Dalchiniol	

(C6-C3)n	Lignines		
(C6-C3-C6)n	Tanins condensés	Procyanidol	

III-3-2-4-Utilisation des techniques de spectrométrie couplée dans l'analyse des flavonoïdes

Optimisation de 11 flavonoïdes naturels et 5 flavonoïdes synthétiques :

D'après l'étude faite par Nicolas Fabre et Isabelle Rustan du Laboratoire de Pharmacognosie, Université de Louvain, Bruxelles, Belgique (FABRE N. 2001) et dans le but de criblage phytochimique des flavonoïdes chez les plantes, avec l'utilisation d'une HPLC couplée à la spectrométrie de l'électro-pulvérisation est développé pour la séparation et la détection des 11 flavonoïdes qui se produisent fréquemment les aglycones (1-4, 7, 9-10, et 11-14) dans le mode d'ions négatifs afin de vérifier leur comportement par la spectrométrie de masse.

L'analyse des 11 flavonoïdes aglycones naturelles par LC-MS a été gérée par la spectrométrie de masse pour proposer un schéma plausible de la fragmentation pour chaque composé étudié. L'analyse des composés synthétiques complémentaires (5, 6, 8 et 15) affiché dans le schéma 37 a été utile au soutien plausible de la fragmentation.

Les tableaux 8, 9 et 10 montrent l'affichage des fragments les plus caractéristiques observées pour chaque composé obtenu par MS² à partir des 2 M [H]⁻ ions (schéma 36) :

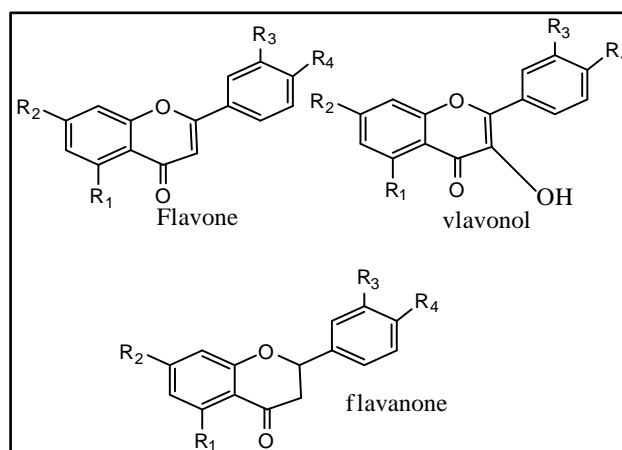


Schéma 36 : Flavonoïdes étudiés

Tableau 8 : Structures des différents flavonoïdes aglycones étudiés

Nom	[M-H] ⁻	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Flavone					
1- Lutéoline	285	OH	OH	OH	OH
2- Apigénine	269	OH	OH	H	OH
3- Genkwanine	283	H	OCH ₃	H	OH
4- Chrysin	253	OH	OH	H	H
5- 7-OH flavone	237	H	OH	H	H
6- Flavone	271	H	H	H	H
Flavonol					
7- Quercétine	301	OH	OH	OH	OH
8- Fistine	285	H	OH	OH	OH
9- Kaempférol	285	OH	OH	H	OH
10- Galangine	269	OH	OH	H	H
11- Kaempféride	299	OH	OH	H	OCH ₃
Flavanone					
12- Eriodictyol	287	OH	OH	OH	OH
13- Naringénine	271	OH	OH	H	OH
14- Isosakuramétine	285	OH	OH	H	OCH ₃
15- Flavanone	223	H	H	H	H

Fragmentation des flavones

Le comportement de fragmentation établi pour la lutéoline peut être appliqué à d'autres composés. En général, toutes les flavones étudiées ici (sauf la genkwanine, 3, qui ne perd pas un radical CH) présentent des pertes neutres de CO et CO₂ (**Tableau 9**)

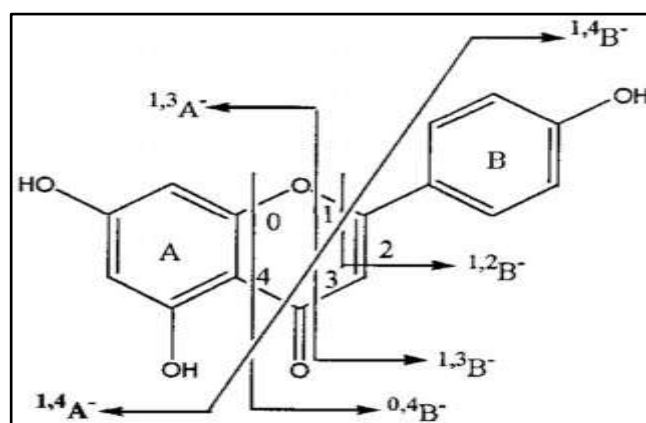


Schéma 37 : Fragmentation des flavones

Nomenclature adoptée pour la retrocyclisation et différents clivages observés dans cette étude adaptée de (MA, Y. L. 1997, LI, D. T. 2000).

Tableau 9:

Fragment ESI-MS/MS des flavones 1-6

m/z	1	2	3	4	5	6
[M-H]-	285	269(60)	283(5)	253(5)	237(100)	221
[M-H-CH3]-	100	-	268	-	-	(100)
[M-H-H2O]-	-	-	(100)	-	-	-
[M-H-CO]-	267(1)	241(1)	-	2225(1)	209(6)	-
[M-H-C2H2O]-	257(3)	227(3)	-	-	-	193
[M-CO2-CO]-	243(28)	225	-	209(75)	193(5)	-
[M-H-C2H2OCO2]-	241(65)	(100)	-	181(2)	-	-
[M-H-2CO2]-	217(23)	201(40)	-	-	165(1)	-
[M-H-C3O2- C2H2O]-	213(3)	-	-	165(1)	-	-
1,3A-	197(1)	181(2)	-	-	-	-
-H-CO2]-	175(35)	159(1)	-	-	-	-
[M-H-C3O2]-	151(4)	151(10)	151(1)	-	-	-
[M-H 1,4B- +2H	-	149(36)	-	-	-	-
1,3A- -CO2	133(1)	107(1)	-	-	-	-
1,3B-		117(1)	-	-	-	-

Fragmentation des flavonols

Les fragments présentés dans le tableau 2 représentent l'ion pseudo moléculaire des flavonols aglycone qui montre le même type de pertes neutres que ceux décrit pour les aglycones du flavones (**Tableau 10**)

Tableau 10 : Fragment ESI-MS/MS des flavonols 7-11

m/z	7	8	9	10	11
[M-H]-	301(1) ^a	285(36)	285(100)	269(100)	-
[M-H-CH3]-	-	-	-	-	284(7)
[M-H-CO]-	273(11)	257(22)	257(3)	241(3)	256(3)
[M-H- C2H2O]-	-	-	243(2)	227(11)	-
[M-H-CO2]-	257(5)	241(15)	241(1)	225(3)	240(5)
[M-H-2CO]-	-	229(3)	229(3)	213(10)	228(10)
[M-H- CO2-CO]-	299(1)	213(3)	213(3)	197(12)	212(1)
[M-H-C2H2O-CO2]-	-	-	199(1)	183(1)	-
[M-H-cycle B]-	193(1)	177(1)	-	-	-
1,2A-	175(100)	163(100)	-	-	-
1,2A- -CO (7,8); 1,2A- (9,11)	151(67)	135(54)	151(1)	-	151(100)
1,3B-	121(1)	121(4)	-	-	-
1,3B-	107	91(2)	-	-	107(4)
1,3A—CO-CO2					

Fragmentation des flavanones

Les différents ions produits fournis par les quatre ions pseudomoléculaire des aglycones de flavanones étudiées ici sont affichés dans le **tableau 11** :

Tableau 11 : Fragment ESI-MS/MS des flavanones 12-15

m/z	12	13	14	15
[M-H]-	287(0) ^a	271(0)	285(2)	223(70)
[M-H-CH ₃]-	-	-	270(75)	-
[M-H-CO]-	-	-	257(1)	195(100)
[M-H-C ₂ H ₂ O]-	-	-	243(100)	-
[M-H-CO ₂]-	-	227(1)	241(18)	-
[M-H- C ₂ H ₂ O-CH ₃]-	-	-	228(1)	-
[M-H-CO ₂ -CH ₃]-	-	-	226(8)	-
[M-H-C ₃ O ₂]-	-	-	217(8)	-
[M-H-C ₂ H ₂ O-CO ₂]-	-	-	199(2)	-
[M-H-cycle B]-	-	177(18)	-	-
[M-H-C ₃ O ₂ -C ₂ H ₂ O]-	-	-	175(6)	-
1,3A-	151(100)	151(100)	164(88)	-
-CH ₃ ^{0,4} B-	-	-	151(12)	-
-CH ₃ ^{0,4} B- -CO]-	-	-	136(3)	-
1,3B-	135(3)	119(3)	-	-
1,4A-	125(1)	-	125(1)	-
1,3A—CO ₂	107(1)	107(3)	107(1)	-

III-3-2-5-Conclusion

La LC/MS/MS mesure le m/z du composé ainsi que ses intermédiaires (sous-produits) cela fournit une précision supplémentaire et une plus grande sensibilité qui peut nous donner plus d'informations structurales sur notre produit.

L'avantage de LC/MS/MS par rapport à LC/MS reste dans l'exemple, si deux composés de même poids moléculaire qui vont produire le même ion moléculaire, peuvent être identifiés et quantifiés sur la base des différences entre les ions formés après la fragmentation.

Cette étude portant sur différents flavonoïdes aglycones en utilisant la spectrométrie de masse en mode d'ions négatifs a révélé de nouvelles voies de fragmentation.

Les fragments nous donnent des informations structurales qui peuvent être très intéressantes dans le criblage phytochimique. Dans l'analyse phytochimique d'extrait brut de plantes, le mode d'ions négatifs devrait être plus sélectif et plus sensible que le mode d'ions positifs.

Ionisation par electrospray

Une technique très douce, elle consiste à injecter la solution contenant le produit à analyser dans la source et la formation des ions à lieu lors de la volatilisation. Généralement, placés à la sortie d'un appareil d'électrophorèse capillaire ou de chromatographie liquide à micro colonne, ces procédés très sensibles et maintenant très utilisés, commencent par transformer la phase mobile liquide en un fin brouillard aqueux contenant l'espèce à analyser. La phase mobile peut apporter des ions H^+ , selon le pH de la solution et contenir des cations tels que : NH_4^+ , Na^+ , K^+ (cas d'un électrolyte). Deux techniques sont à distinguer :

III-4-Electrospray ion ou ionspray (ESI)

Les gouttelettes sont formées à l'extrémité d'une fin capillaire de silice métallisé en surface et porté à un potentiel élevé positif (si l'on a choisi d'étudier des ions positifs). Le champ électrique intense leur confère une densité de charge (z/m) importante. Par effet d'un gaz sec, elles s'évaporent progressivement en perdant des molécules de solvant par des mécanismes complexes de dé solvation et d'évaporation .Leur densité de charge devenant trop grande , elles explosent en libérant des ions non fragmentés et protonés ou " cationiques" de l'analyte, porteur d'un nombre de charge variables (environ 1charge pour 1000 Da en masse). La figure suivante représente l'appareil utilisé pour l'ionisation à pression atmosphérique par électrospray.

III-5-Ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI)

Les microgouttes sortant de la buse sont concentrées par chauffage avant d'arriver dans une zone où se trouve un gaz tel que l'azote et de la vapeur d'eau qui sont ionisés par des décharges corona (figure ci-dessous). Il se produit des collisions nombreuses ions/molécules avec transfert d'électrons et de protons. Ce processus d'ionisation chimique fournit des ions multichargés de type $(M+nH^+)$.

Le grand avantage de ces techniques très douces est l'obtention d'ions multichargés (z peut dépasser 30), pseudo moléculaires, formés avant d'entrer dans le spectromètre. Elles ont permis d'étendre la gamme de masse des appareils jusqu'à 100000 Da (ex : protéines, polysaccharides et autre polymères) (**Figure 16**) :

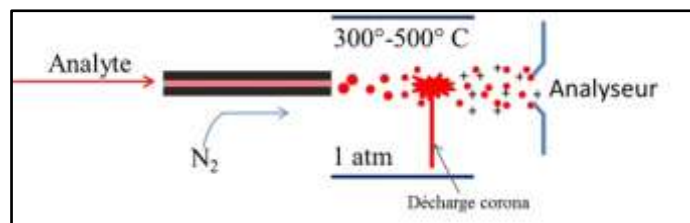


Figure 16: Ionisation chimique à pression atmosphérique



REFERENCES DU
CHAPITRE III

B

BATE-SMITH, E. C.; WESTALL, R .G., *Bioph, Acta* , Chromatography behavior and chemical structure, some naturally occurring phenolic substances, (4), 1950, 427-440.

BERTHILLIER, A., La chromatographie et ses applications, Dunod, Paris, 1972.

C

CHEN, D.; DANIEL, K.G.; KUHN, D.J.;KAZI, A.;BHUIYAN, M.;LI, L.;WANG, Z.;WAN, S.B.;LAM, W.H.;CHAN, T.H., DOU, Q.P., *Front Biosci.*, Green tea and tea polyphenols in cancer prevention, (9), 2004. 2618-31.

CONSTANTIN, E.;TRALDI, P.;FAVRETTO, D.;SCHNELL, A., Spectrométrie de Masse : Principes et Applications. Technique et Documentation Lavoisier. 2ème édition, 1996.

D

DASS, C., Fundamentals of contemporary mass spectrometry, John Wiley & Sons Publishers, Wiley. Inter. Science, 2007.

DEWICK, P. M., *Nat. Prod. Rep.*, The biosynthesis of shikimate metabolites, (12), 1995, 579-607.

F

FABRE, N.;RUSTAN, I.;HOFFMANN, E.;LECLERCQ, J. Q., *J. Am. Soc., Mass Spectrom.*, Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry, (12), 2001, 707–715.

FRANKEL, E.N.;KANNER, J.;GERMAN, J.B.;PARKS, E.;KINSELLA, J. E., *Lancet*, Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine.(341), 1993,454-457.

G

GAYON, P R ., Les composés phénoliques des végétaux, Dunod, 1968.

H

HOFMANN, E.;CHARRETTE, J.;STROOBANT, V., Spectrométrie de Masse : cours et exercices corrigés, Dunod. 2ème édition, 1999.

HOSTETTMANN, K., Tout Savoir sur le Pouvoir des Plantes, Sources de Médicaments. Editions Favre SA, Lausanne, 1997.

HOSTETTMANN, K., Tout Savoir sur les Aphrodisiaques Naturels. Editions Favre SA, Lausanne, 2000.

HOSTETTMANN, K.; HOSTETTMANN, M., Xanthonés. In: Harborne, J.B. (ed.), *Methods in Plant. Biochemistry – Vol. 1: Plant Phenolics*. Academic Press, London, 1989, 493-508.

HOSTETTMANN, K.; HOSTETTMANN, M.; RODRIGUEZ, S.; WOLFENDER, J.L., LC-Hyphenated Techniques in the Search for New Bioactive Plant Constituents. In : Cooper, R., Snyder, J.K. (eds.), *The Biology-Chemistry Interface – A Tribute to Koji Nakanishi*. Marcel Dekker, Inc., New-York, 1999, 65-101.

HOSTETTMANN, K.; KIZU, H.; TOMIMORI, T., *Planta Med.*, Molluscicidal properties of various saponins, **(44)**, (1982), 34-35.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, M.; HOSTETTMANN, M., Preparative chromatography techniques applications in natural product isolation. 2nd edition, Springer Verlag, Berlin, 1997, 10-11.

HOSTETTMANN, K.; WAGNER, H., *Phytochemistry*, Xanthone glycosides, **(16)**, 1977, 821-829.

J

JENNINGS, K.R., Collision-induced decompositions of aromatic molecular ions, I. *J. Mass Spectrom of Ion Phys.*, 1968, 227-235.

L

LAUGHTON, M.J.; EVANS, P.J.; MORONEY, M.A.; HOULT, J.R.; HALLIWELL, B., *Biochem. Pharmacol.*, Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability, **(9)**, 1991, 1673-1681.

LESPAGNOL, A.; CŒUR, A.; LESPAGNOL, C.; LESIEUR, D., *Chimie des médicaments*, tec et doc, Paris, 1974.

LI, D. T.; SHEEN, J. F.; HER, G.R., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, Structural analysis of chromophore-labeled disaccharides by capillary electrophoresis tandem mass spectrometry using ion trap mass spectrometry, **(11)**, 2000, 292–300.

M

MA, Y. L.; LI, Q. M.; VAN DEN HEUVEL, H.; CLAYES, M., *Rapid Commun. Mass. Spectrom.*, Characterization of flavone and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry, (12), 1997, 1357–1364.

MABRYT, J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M.B., the systematic Identification of flavonoids, Springer-Verlag, New York, 1970.

MARKHAM, K.R., Techniques of flavonoids identification, 1982.

N

NIESSEN, W. M. A., MS-MS and MS_n, dans encyclopedia of spectroscopy and spectrometry (Lindon J. C., Tranter G. E., Holmes J. L. Eds.) Academic press, 2000, 1404-1410.

O

ORGOGOZO, J.M.; DARTIGUES, J.F.; LAFONT, S.; LETENNEUR, L.; COMMENGES, D.; SALAMON, R.; RENAUD, S.; BRETELER, M.B., *Rev. Neurol.*, Wine consumption and dementia in the elderly: a prospective community study in the Bordeaux area, (153), 1997, 185-192.

P

PACHALY, P., Dünnschicht-Chromatographie in der Apotheke. 1. bis 4. Lieferung, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1999.

S

STANLEY, F.; WAINAPEL, M. P. H.; FAST M. D., Antioxidants and the free radical theory of degenerative disease, alternative medicine and rehabilitation, in: Hoffman, R.L. (ed) Nutritional in Rehabilitation. Demos Medical Publishing, Newyork, 2003.

W

WATSON, J. T.; SPARKMAN, O. D., Introduction of mass spectrometry: Instrumentation, applications and strategies for data interpretation. (4th Eds), John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, England, 2007.



Chapitre IV

Partie phytochimique

Cistus villosus

A-Protocole expérimental

A-1-Récolte du matériel végétal

Les parties aériennes de la plante ont été collectées au cours de la période de floraison en Mai 2008 dans la région de Bouhemama (Aurès) celle-ci a été identifiée par le professeur Kaabache de l'université de Sétif .

Après séchage dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires, les parties aériennes ont été coupées en petits morceaux , nous avons ainsi obtenu et pesé une masse de 500g .

A-2-Macération et extraction

Le matériel végétal de masse 500 g a subi une macération dans un mélange hydro-alcoolique (MeOH/H₂O ; 80 :20 ; V/V), cette opération a été effectuée trois fois à froid. Les phases hydroalcooliques ont été réunies et concentrées à sec, ce qui nous a donné une masse de l'extrait de 49 g. L'extrait brut ainsi obtenu a été dilué dans de l'eau distillée bouillante, puis laissé au repos pendant une nuit. Après décantation cette phase aqueuse a subi une filtration, afin d'éliminer la chlorophylle les graisses et les cires. La phase aqueuse a subi des affrontements par solvants de polarité croissante (Hexane, Chloroforme, Acétate d'éthyle et n-Butanol 300ml pour chaque extraction et deux fois chacune). Les quatre extraits organiques récupérés ont été concentrés puis pesés, ce qui nous a donné les masses suivantes : 2.96 g pour la fraction hexane, 4.87 g pour la fraction chloroformique, 7.64 g pour la fraction acétate d'éthyle et 18.32 g pour la fraction n-butanolique. Le schéma 38 suivant représente les différentes étapes effectuées lors de cette opération.

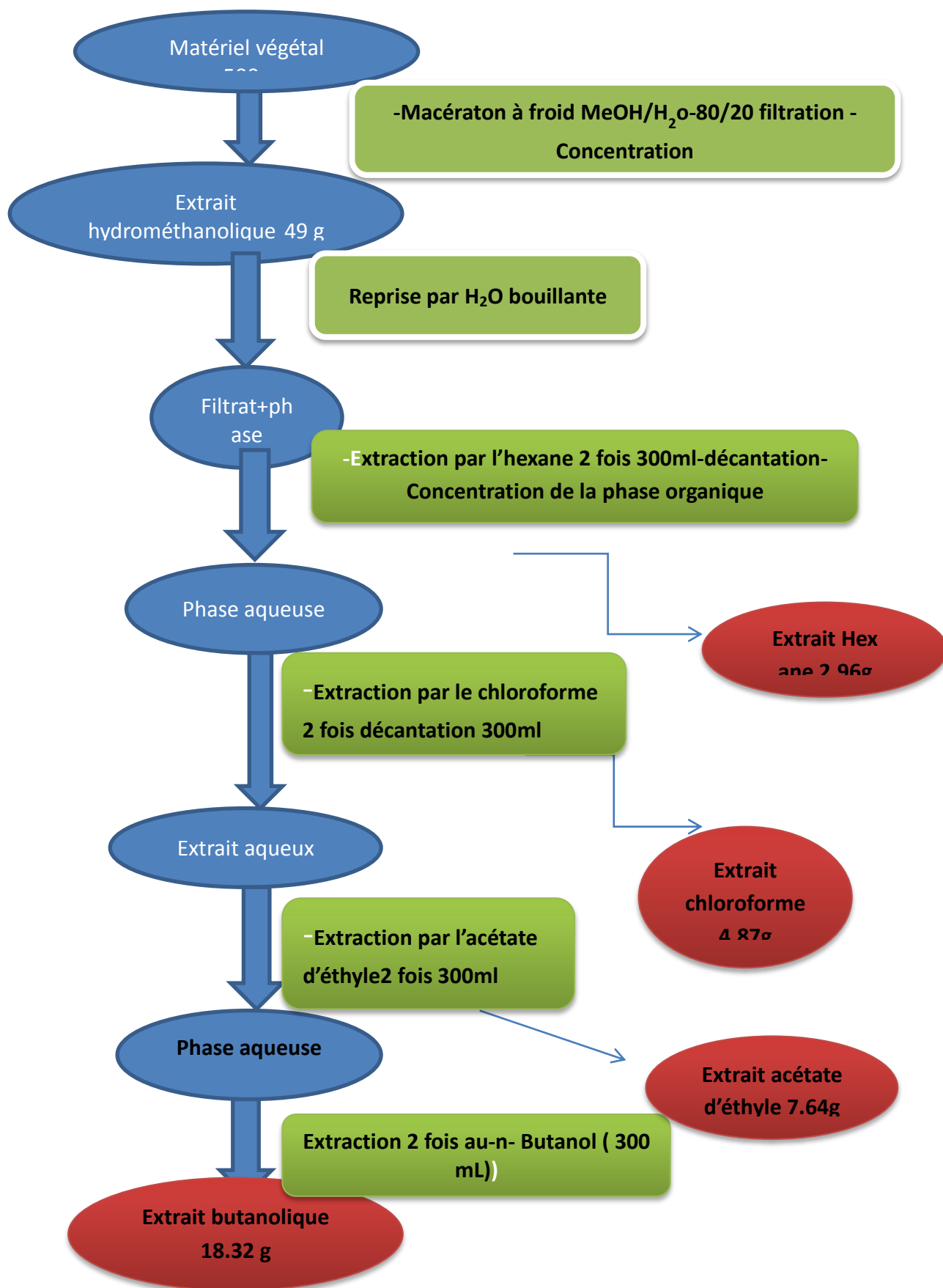


Schéma 38 : Protocole d'extraction de l'espèce *Cistus villosus*

Les quatre extraits obtenus après les divers affrontements par les solvants ont subi des analyses d'identification à savoir une analyse par GC/MS pour les extraits hexane et chloroforme, de la chromatographie sur colonne pour la phase acétate d'éthyle. Le schéma 39 illustre les différentes analyses qu'ont subies les différents extraits ainsi que les fractions finales obtenues lors de la séparation par chromatographie sur colonne de gel de silice.

Sur la base des tests chromatographiques sur CCM et sur papier dans différents systèmes, on a constaté que la phase acétate d'éthyle présentait une diversité en composés phénoliques séparables et presque identique à celle de la phase butanolique, ce qui nous a conduit à soumettre cette phase à une séparation sur colonne de gel de silice. Le choix de la phase mobile pour la séparation sur colonne a été fait sur la base des tests réalisés sur CCM de gel de silice effectués dans un système aqueux comme le montre la figure 17 :

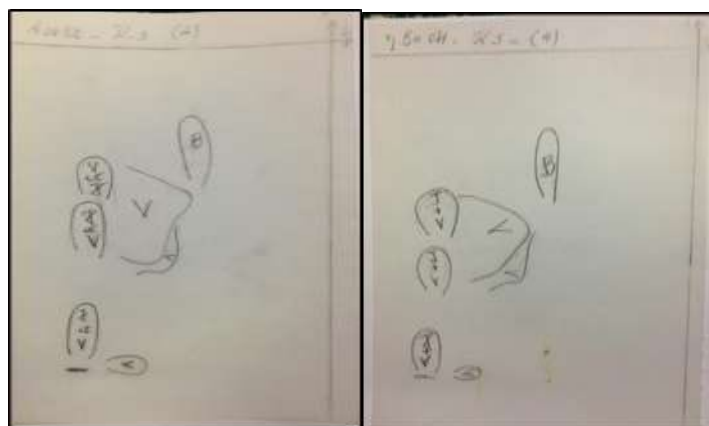


Figure 17: CCM bidimensionnelle des deux phases :n-butanolique et acétate d'éthyle

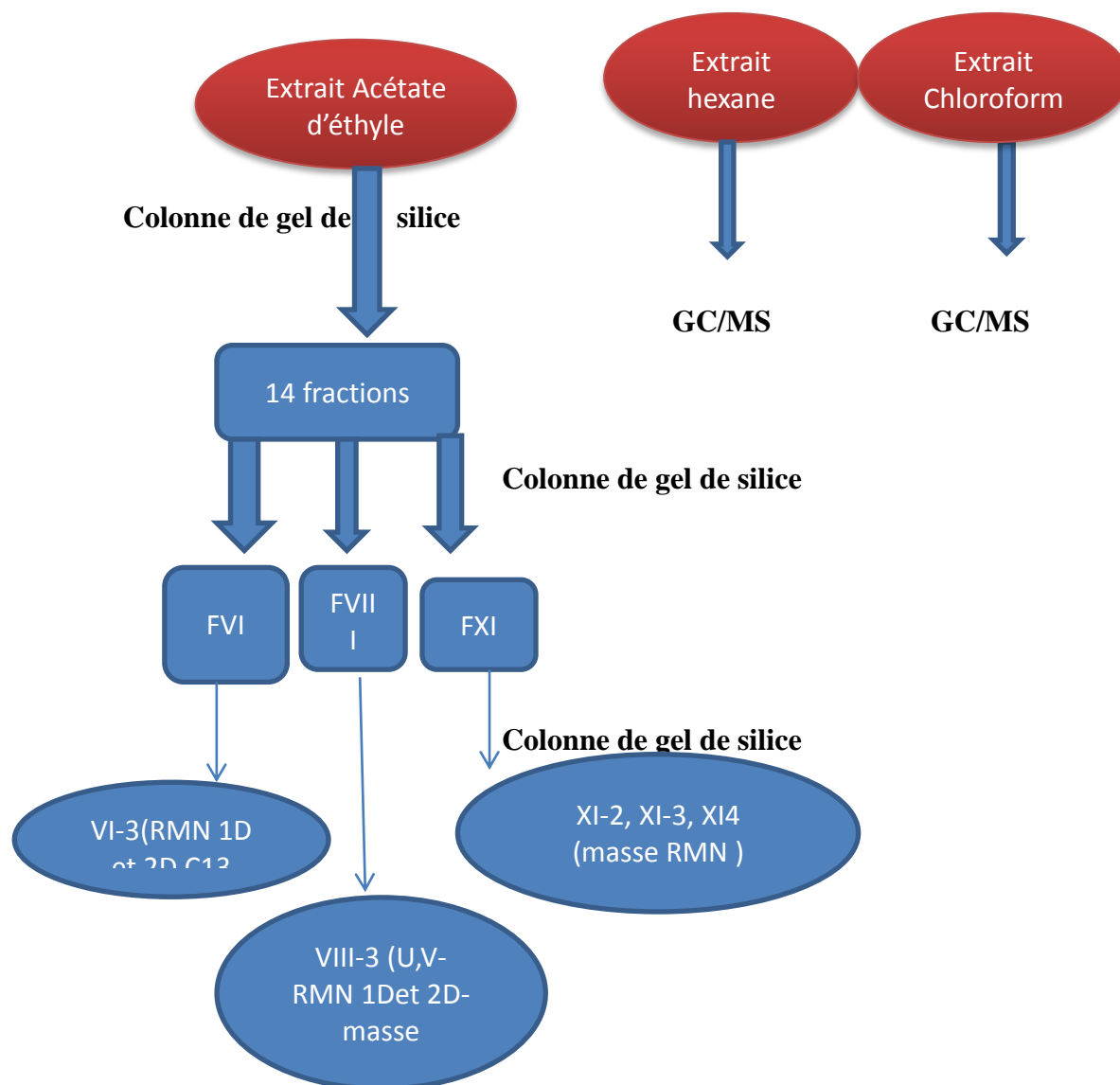


Schéma 39 : Obtention des fractions finales

B- Séparation des fractions et discussions des résultats obtenus

B-1- a-séparation de la fraction acétate d'éthyle

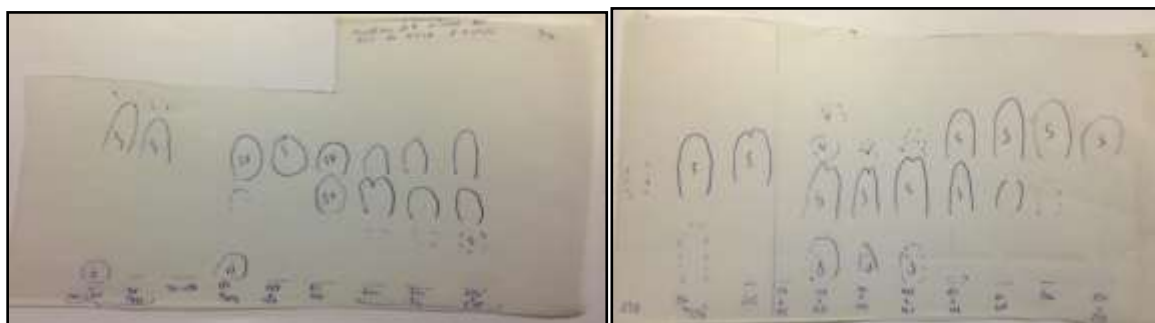
Une masse de 7 g de la fraction acétate d'éthyle a été déposée sur une colonne de gel de silice. La séparation a été réalisée par un gradient de polarité de la phase mobile, constituée du mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle/méthanol. Le suivi de la progression de cette colonne a été effectué sur plaques CCM sur gel de silice, visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm), puis révélées avec de l'acide sulfurique et l'anisaldéhyde, ce qui a permis de collecter 250 fractions de 100 ml. Après tests sur CCM de gel de silice, ces différentes

fractions ont été réunies selon leurs comportements chromatographiques, le résultat de cette opération est représenté sur le tableau 12 suivant.

Tableau 12 : Fractionnement sur colonne de gel de silice de la phase AcOEt.

Fractions	Numero	Système d'éluion	Remarques
1-10	I	100% dichlorométhane	Mélange en faible quantité
10-40	II	80% /20% dichlo/Acétate	Mélange en faible quantité
40-98	III	60%/-40%	Mélange en faible quantité
100-110	IV	30%/70% dichloro/acétate	Mélange non séparable
111-125	V	100% Acétate	Amas de produits
126-150	VI	90%/10% Acétate /MeOH	Mélange avec produit majoritaire
151-173	VII	80/20	Produit majoritaire
174-200	VIII	70/30	Mélange avec produit majoritaire
201-210	IX	60/40	Mélange non séparable
211-220	X	50/50	Mélange de produits
220-230	XI	40/60	Présence de produit majoritaire
230-240	XII	25/75	Mélange de produits
240-250	XIII	15/85	Présence de produit majoritaire
251-PLUS	XIV	100%MeOH	Résidus

Ces nouvelles fractions (de I à XIV) ont subi des tests sur CCM de gel de silice dans le système dichlorométhane/méthanol dans un rapport en volume 7/3. Les résultats de ces tests sont représentés dans la figure 20 suivante. :



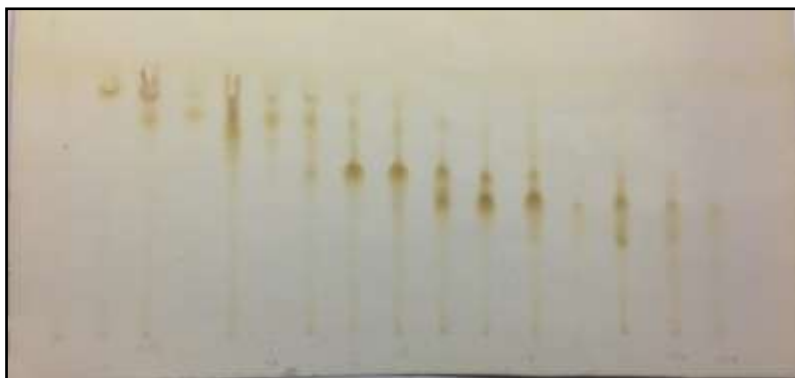


Figure 18: Comportement chromatographiques des fractions obtenues

Parmi les fractions collectées on a choisi, les fractions VI, VIII et XI qui présentaient une diversité en composés phénoliques séparables les détails de la séparation des produits de ces deux fractions sont représentés ci –dessous .

B-1-b-Séparation des produits de la fraction VI :

La fraction VI (400 mg) a subi une séparation sur colonne de gel de silice, dans le système dichlorométhane /isopropanol par un gradient de polarité croissante, on a pu obtenir 29 fractions de 20 ml qui ont été regroupées à leur tour en cinq sous fractions après control sur CCM de gel de silice dans le système d'éluion, dichlorométhane/Méthanol 60/40. Les résultats qui ont découlé de cette colonne une fois les fractions réunies, sont résumés dans le tableau 13 ci –dessous :

Tableau 13 Fractions récoltées

Sous fractions	observations
FVI-1 (de 1 à 6)	Traces
F VI -2 (de 7 à 11)	Mélange
FVI-3 (de 12 à 19)	Produit majoritaire
FVI-4 (de 20 à 25)	Mélange non séparable
FVI-5 (de 26 à 29)	Mélange

La fraction VI-3 (25mg) a subi une purification sur colonne Sephadex LH20, le produit obtenu VI-3 a subi des analyses par RMN.

Discussion des résultats spectroscopiques

Le composé VI-3 présentait un R_f égal à 0.6 sur CCM de gel de silice dans le système d'éluion : $\text{CHCl}_3 / \text{MeOH} / \text{H}_2\text{O}$ 80/20/2 v/v) sa fluorescence sous la lumière UV était brune, qui après révélation par le réactif à base de la vanilline sulfurique a donné une coloration jaune ces informations sont en faveur d'une structure de type hétéroside.(MARKHAM)

Les spectres RMN ^1H et RMN ^{13}C de ce composé sont représentés sur les figures 21-22, et présentent des signaux caractéristiques d'un squelette de base de type Kaempférol.

Le spectre RMN proton de ce composé présente deux doublets dont la constante de couplage est $J = 8,1$ Hz, correspondant à un couplage *ortho*, les déplacements chimiques de ces doublets sont $\delta = 6,80$ et $7,97$ attribuables aux protons aromatiques H3', H5' et H2', H6' respectivement. Les doublets à $\delta = 6,13$ et $6,30$ de constante de couplage $J = 2,3$ Hz (couplage *méta*), attribuables aux protons H6 et H8 respectivement, l'absence d'un singulet entre 6 et 6.5 ppm montre que la position 3 est substituée.

Les deux doublets à $\delta = 6,06$ et $\delta = 7,39$ de $J = 16$ Hz sont caractéristiques de protons oléfiniques en position *trans*. Les deux doublets à $\delta = 6,80$ et $\delta = 7,30$ avec un $J = 8,1$ Hz correspondent aux protons d'un noyau aromatique *para* substitué, ces dernières informations montrent la présence dans la molécule d'un système de type coumaroylé.

Le doublet à 5.24 ppm de constante de couplage 6 Hz correspond à un proton anomérique d'un sucre lié à la génine en position 3. La présence du sucre est confirmée par les protons résonnant entre 3.32 et 3.45 ppm. Les attributions des protons du sucre vont être confirmées par l'HMQC.

L'apparition de deux doublets de doublets à 4.28 et 4.21 H6a'', H6b'' ppm de constantes de couplage $j = 12$ et $j = 6,1$ Hz montre que l'hexose est de type glucose (galactose) substitué en 6 du sucre par un système coumaroylé.

Le spectre RMN C^{13} présente cinq pics entre 60 et 78 ppm caractéristiques de la présence d'un sucre de type hexose, car le proton anomérique sort au-delà de cette limite (104 ppm). L'attribution des pics aux différents carbones a été réalisée par comparaison à la bibliographie, et les résultats sont représentés dans le tableau 14 ci-dessous.

Sachant que la molécule présente un squelette de base de type kaempférol, on s'attend à 13 pics caractéristiques de cette génine, ces pics caractéristiques de cette génine sont représentés dans le tableau 14 par comparaison aux références. Les carbones de déplacements chimiques : 114.8 et 146.6 ppm correspondent aux carbones oléfiniques de la fonction coumaroylé alors que le pic à 168.8 ppm est caractéristique du carbonyle du squelette coumaroylé les pics à 127.1, 131.2, 116.8 et 161.2 ppm correspondent respectivement aux carbones C1'', C2'', C6'', C3'' et C5'' et C4'' du noyau aromatique d'une fonction coumaroylé.

Tableau 14 : Déplacements chimiques des protons et carbones du composé VI-3

No	δ C (ppm)	δ H (ppm)	J (Hz)
----	------------------	------------------	--------

Aglycone			
1 (O)	-	-	-
2 (C)	158,5	-	-
3 (C)	135,2	-	-
4 (CO)	179,5	-	-
5 (C)	163,0	-	-
6 (CH)	100,0	6,13 <i>d</i>	2,3
7 (C)	166,0	-	-
8 (CH)	94,0	6,30 <i>d</i>	2,3
9 (C)	159,4	-	-
10 (C)	105,6	-	-
1' (C)	122,8	-	-
2', 6' (CH)	132,2	7,97 <i>d</i>	8,1
3', 5' (CH)	116,1	6,80 <i>d</i>	8,1
4' (C)	161,6	-	-
glucose			
1'' (CH)	104,0	5,24 <i>d</i>	7,6
2'' (CH)	78,0	3,45 <i>m</i>	-
3'' (CH)	75,7	3,42 <i>m</i>	-
4'' (CH)	71,8	3,32 <i>m</i>	-
5'' (CH)	75,8	3,45 <i>m</i>	-
6a'' (CH)	64,3	4,28 <i>dd</i>	12,0, 6,1
6b'' (CH)		4,21 <i>dd</i>	12,0, 6,1
Coumaroyl			
1''' (C)	127,1	-	-
2''' , 6''' (CH)	131,2	7,30 <i>d</i>	8,1
3''' , 5''' (CH)	116,8	6,80 <i>d</i>	8,1
4''' (C)	161,2	-	-
7''' (CH)	146,6	7.39 <i>d</i>	16,1
8''' (CH)	114,8	6.06 <i>d</i>	16,1
9''' (CO)	168,8	-	-

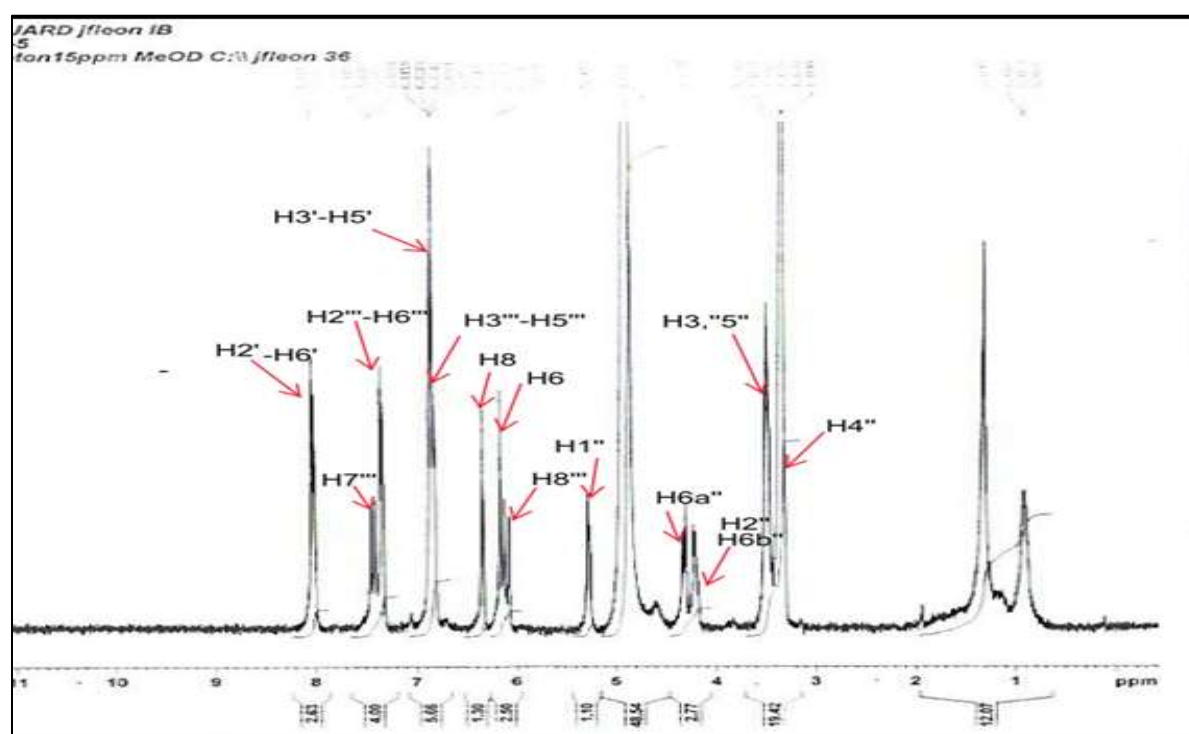


Figure 19 : Spectre RMN ^1H du composé **VI-3** (CD_3OD , 500 MHz)

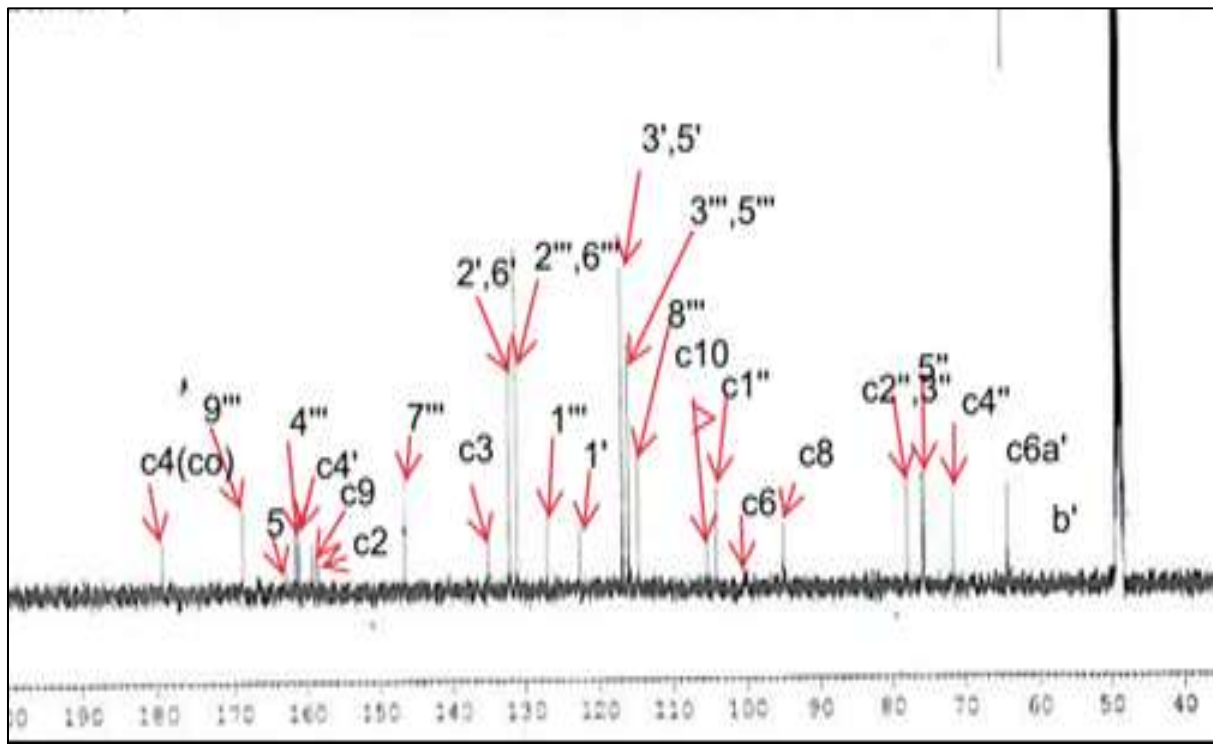


Figure 20: Spectre RMN ^{13}C du composé **VI-3** (CD_3OD , 500 MHz)

Le composé **VI-3** a été obtenu sous forme d'une poudre jaune, l'analyse de ce composé par spectrométrie de masse (ES^+) (fig 21) a donné un pic pseudo moléculaire $[\text{M}+\text{Na}]^+$ à $m/z = 617.127$, qui correspond à une masse moléculaire $m/z = 594.127$ et une formule brute $\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{O}_{13}$.

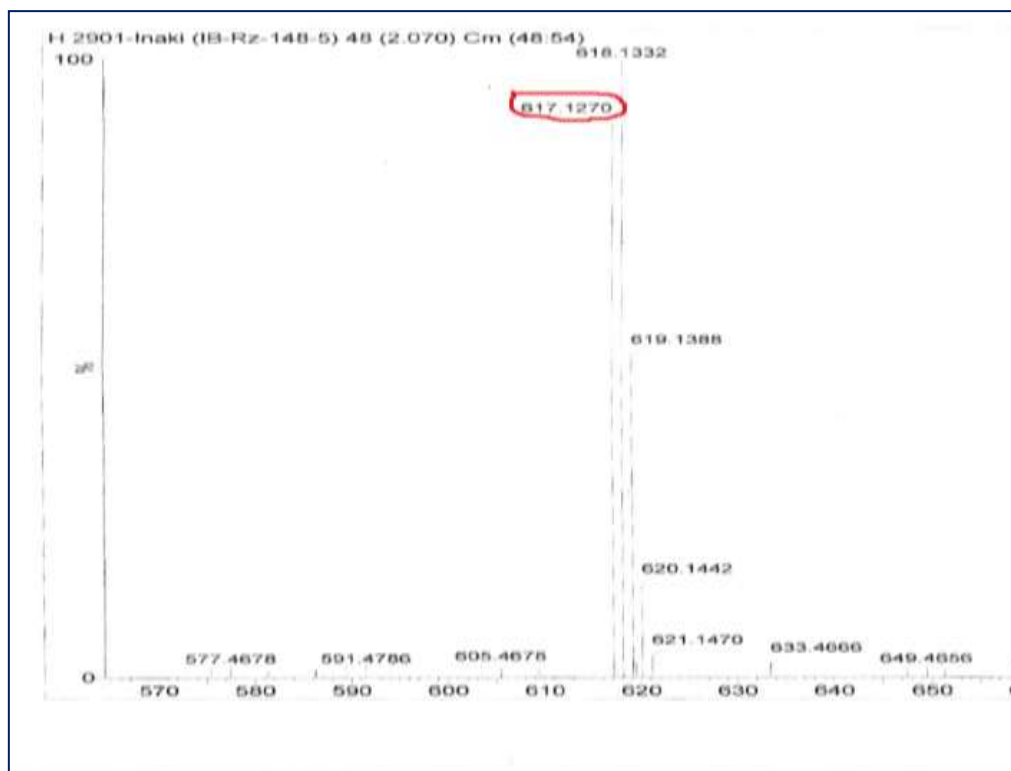


Figure 21: Spectre de masse du composé **VI-3** en mode ES^+

Le spectre RMN COSY (figure 24) de ce composé, montre un premier couplage entre les protons protons à ($\delta = 6,30$ et $\delta = 6,13$), correspondant aux protons H-6 et H-8 de la génine, un second couplage entre les protons de déplacements chimiques ($\delta = 6,80$, $\delta = 7,97$). Correspondant respectivement aux protons H3'-H5' et H2'-H6'.

Les protons de déplacements chimiques : ($\delta = 6,06$ et $\delta = 7,39$) présentent un couplage ce qui confirme la présence d'un système éthylénique. ces protons correspondent respectivement aux protons H7''' et H8''' de la fonction coumaroylé.

La RMN COSY confirme le couplage des protons aromatiques de déplacements chimiques ($\delta = 6,80$ et $\delta = 7,30$), ces protons correspondent respectivement aux protons H-3''', H-5''' et H-2''', H6''' de la fonction coumaroylé. (figure 22).

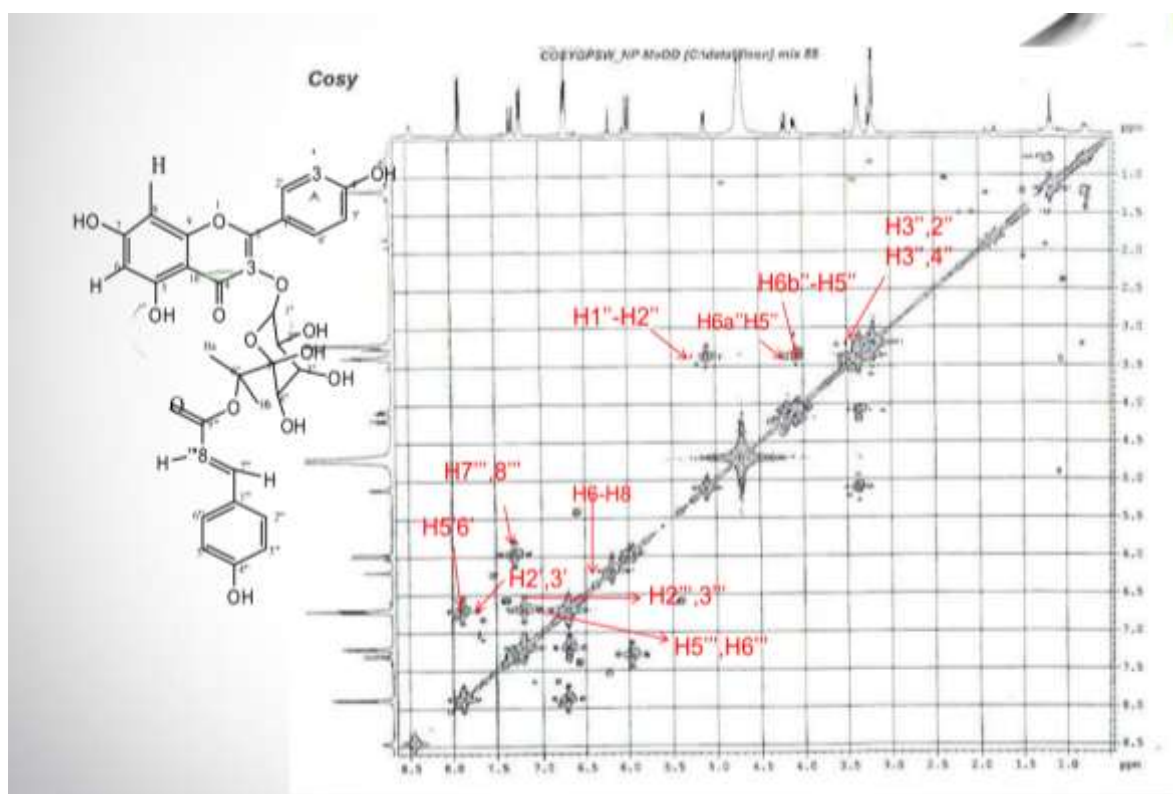


Figure 22: Spectre COSY du composé VI-3

L'expérience HSQC (figure 23) confirme les interprétations des spectres RMN proton et carbone 13 les corrélations proton-carbone sont représentées dans le spectre :

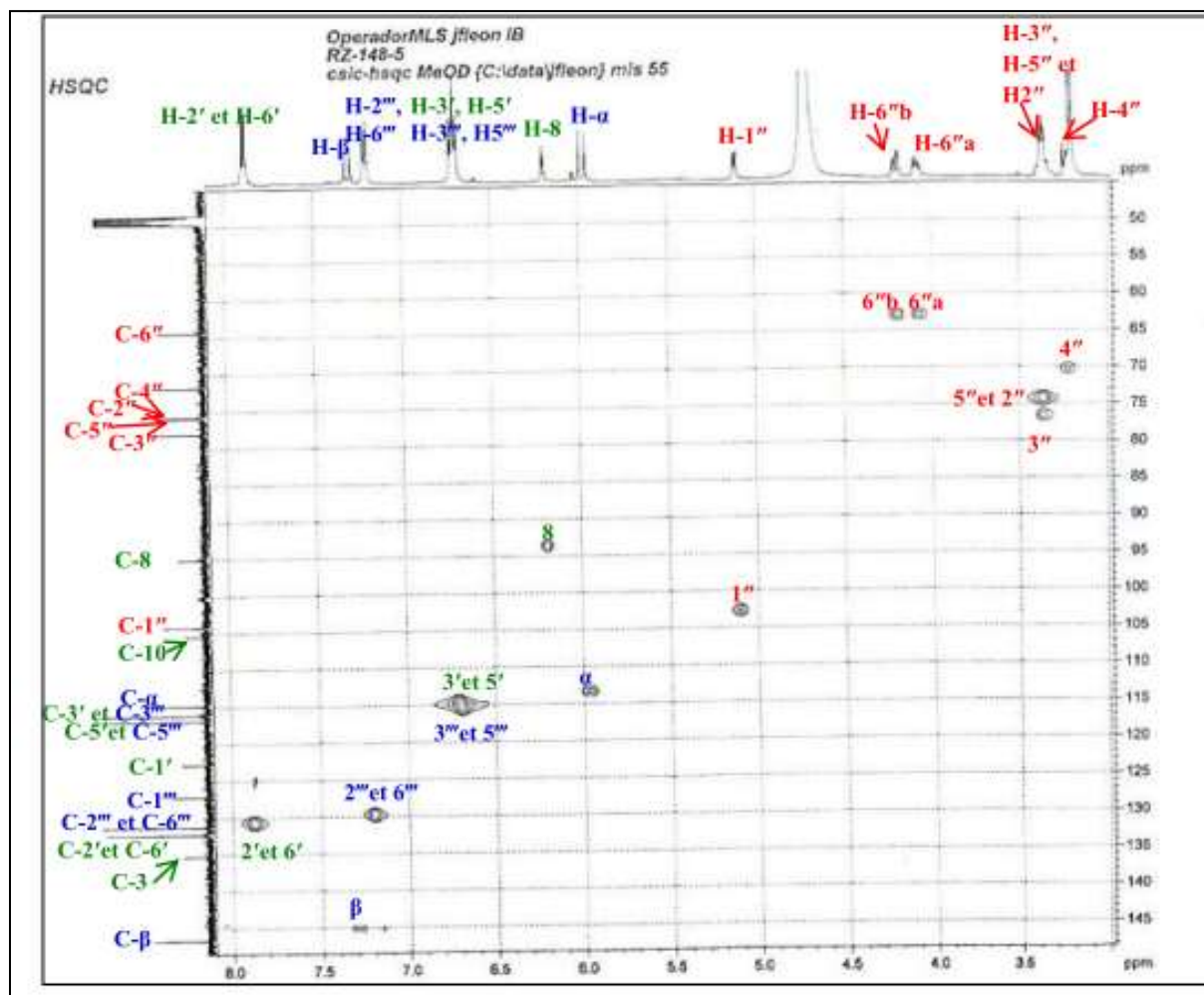


Figure 23: Spectre HSQC du composé VI-3

L'enregistrement du spectre HMBC (figure 24) de ce composé a donné les taches de corrélations proton –carbone des protons et carbones du squelette de la génine et du coumaroyle alors que ceux de la partie osidique n'ont pas été détecté. le proton H7''' (H α) présente une tache de corrélation avec le carbone C1''' du noyau aromatique les protons H3'''-H5''' présentent des corrélations avec les carbones C1''' et C4''' cependant que les protons H3'-H5' n'ont montré qu'une seule tache de corrélation avec le carbone C1'. alors que les protons H2''' et H6''' ont montré trois taches de corrélation avec les carbones avec les carbones C2''', C6''', C 7'''(C α) et le carbone C4'''. le proton éthylénique d'autre part H8'''(H β) corrèle avec les carbones C2''' et C 6''' le carbonyle C9''' enfin les protons H2'et H6' du noyau B de la génine présentent des corrélations avec les carbones C2',C6' C4'

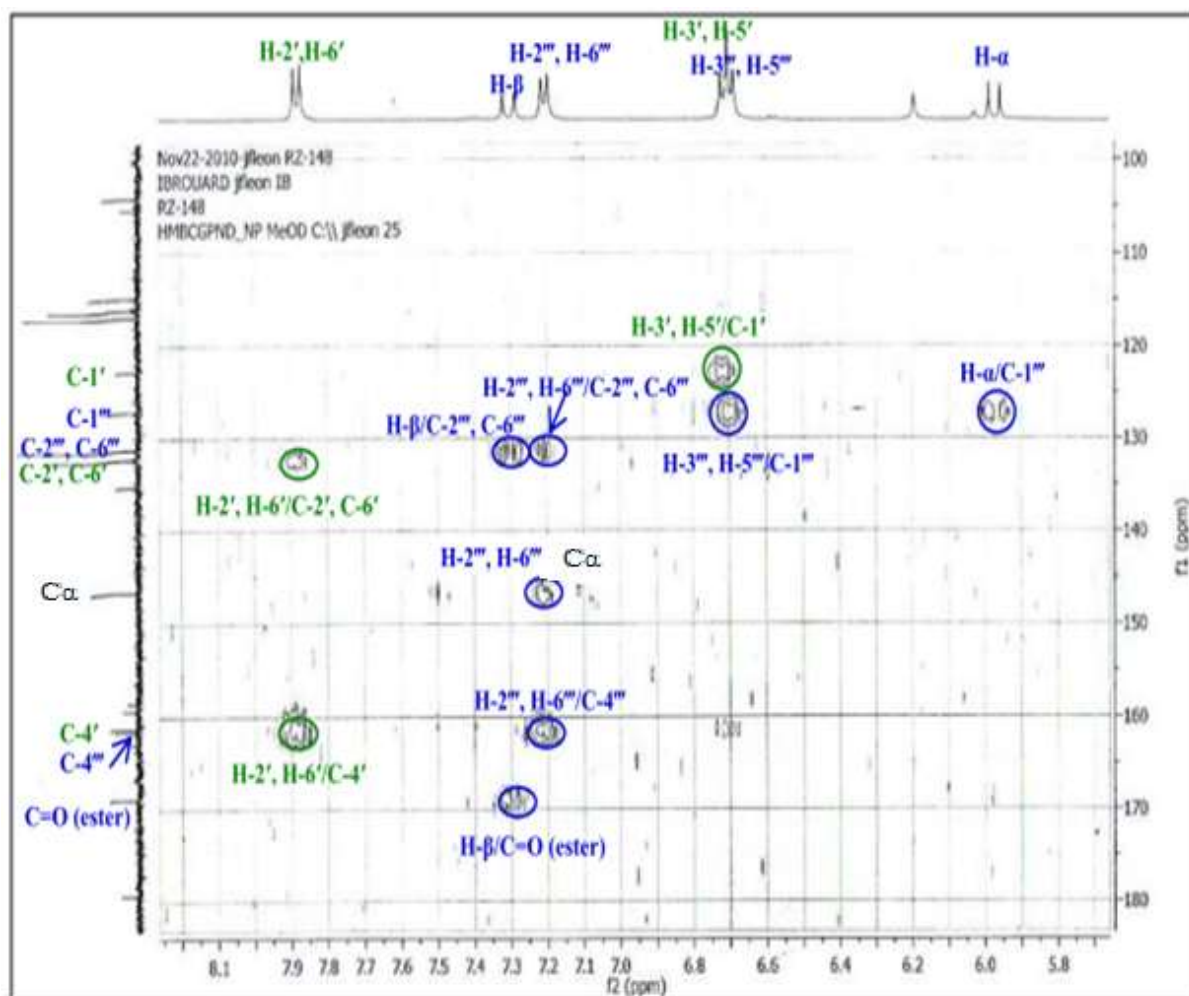
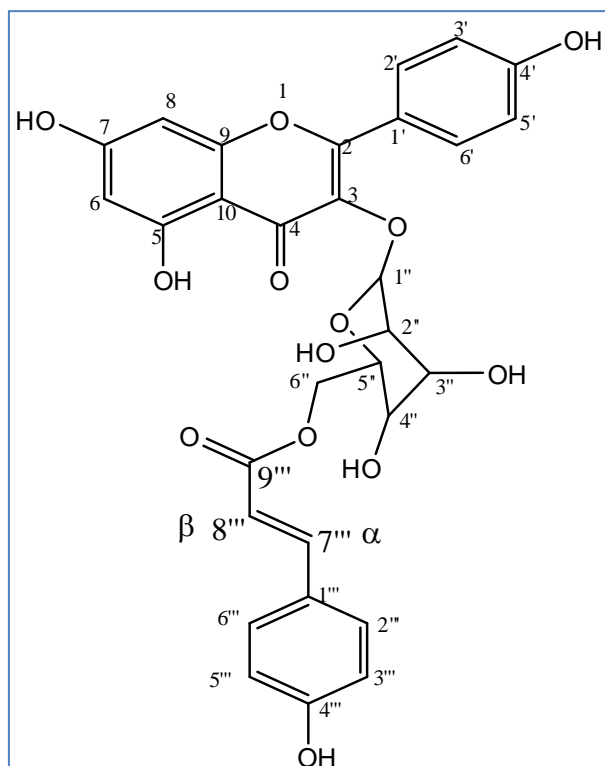


Figure 24 : Spectre HMBC du composé **VI-3** (partie I δ_C entre 100 et 180 ppm)

Sur la base de toutes ces informations sou citées, on peut confirmer que la structure du composé VI-3 est le **3-O-[(6''-O- *E-p*-coumaroyl)- β -D-glucosyl]-kaempferol (Tilirioside)** selon la systématique c' est le : 4H-1-Benzopyran-4-one, 3,5-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-3-[[6-O-[(2E)-3-(4-hydroxyphenyl)-1-oxo-2-propen-1-yl]- β -D glucopyranosyl]]

D'après la bibliographie ce composé est identifié antérieurement des feuilles de *Stenochlaena palustris* (SACHIKO .2004) et des fruits de *Fragaria ananassa* (LIU. 1998) mais la première fois qu'il est identifié dans le genre *Cistus*.



3-o-[(6''-o- E-p-coumaroyl)-β-D-glucopyranosyle]- kaempferol (Tilirioside)

B-1-c-Séparation de la fraction VIII :

La fraction VIII (285 mg) a été séparée sur colonne de silice en utilisant comme système d'éluant le mélange dichlorométhane /MeOH par gradient de polarité, nous avons pu collecter 20 fractions de 25 ml chacune qui après tests chromatographiques ont été réunies en 4 fractions. Les résultats des tests chromatographiques sur CCM de gel de silice sont résumés dans le tableau 15 :

Tableau 15 : Purification du composé VIII-3

Sous fractions	observations
F VIII-1 (de 1 à 7)	Mélange
F VIII-2 (de 8 à 12)	Mélange de produits
F VIII-3 (de13 à 17)	Mono tâche
FVIII-4 (de 18 à 20)	Traces

Selon le comportement de ces nouvelles fractions, on a constaté que la fraction VIII-3 présentait un composé majoritaire séparable alors que les autres fractions VIII-1 et VIII-2 présentaient une complexité du mélange cependant la fraction VIII-4 ne présentait que des traces de composés ; ce qui nous a amené à séparer sur CCM le produit majoritaire de la fraction VIII-3, ce dernier a subi une ultime purification sur colonne de cephadex LH20

Discussion des résultats spectroscopiques

Ce composé présentait une fluorescence violette sous lumière UV. Les valeurs de R_f de ce composé sur papier Wattman 1, dans les systèmes AcOH 15% et BAW (4 :1 :5) étaient de 0.2 et 0.42, ces informations sont en faveur d'une structure de type flavone ou flavonol monoglycosylé.

L'analyse par spectrophotométrie UV. Visible de ce composé dans le méthanol (figure 25) a donné deux bandes d'absorption maximale à 256-357 nm, ces informations sont en faveur d'une structure de type flavonol 3-O-substitué. Le spectre méthanolique de ce composé en présence de NaOH présente une nouvelle bande à 325 nm ce qui est en faveur de la présence de l'hydroxyle libre en position 7 (figure 25). Le déplacement bathochrome de 59 nm de la bande I du spectre enregistré en présence de NaOH par rapport à celui enregistré dans le méthanol montre la présence de l'hydroxyle libre en position 4' (figure 25)

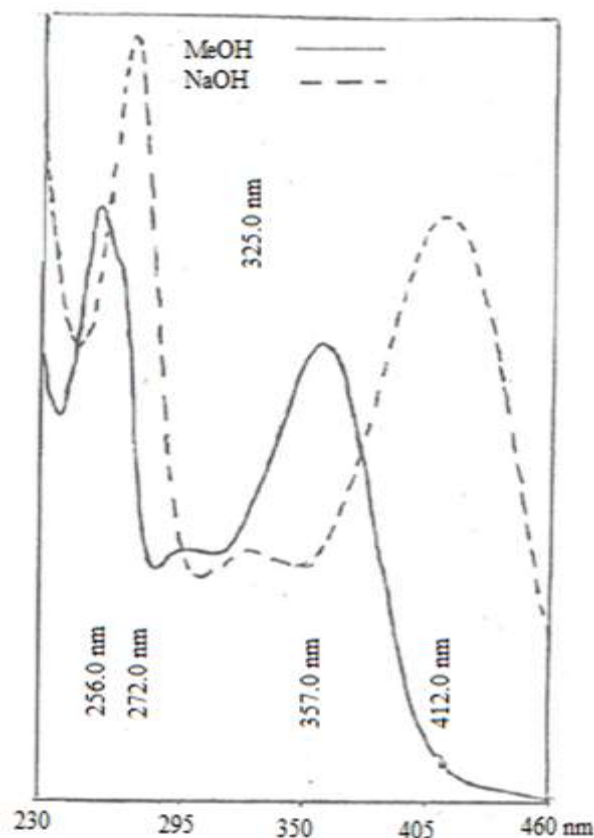


Figure 25 spectre UV du produit VIII-3en présence de MeOH et MeOH+ NaOH

Le déplacement bathochrome de 12 nm de la bande II du spectre enregistré en présence de NaOAc par rapport à celui enregistré dans le méthanol confirme la présence de l'hydroxyle libre en position 7.

Le déplacement bathochrome de 22 nm de la bande I du spectre enregistré en présence de NaOAc + H₃BO₃ par rapport à celui du méthanol (figure 26) est en faveur d'un système ortho di hydroxylé sur le noyau B (3'-4').

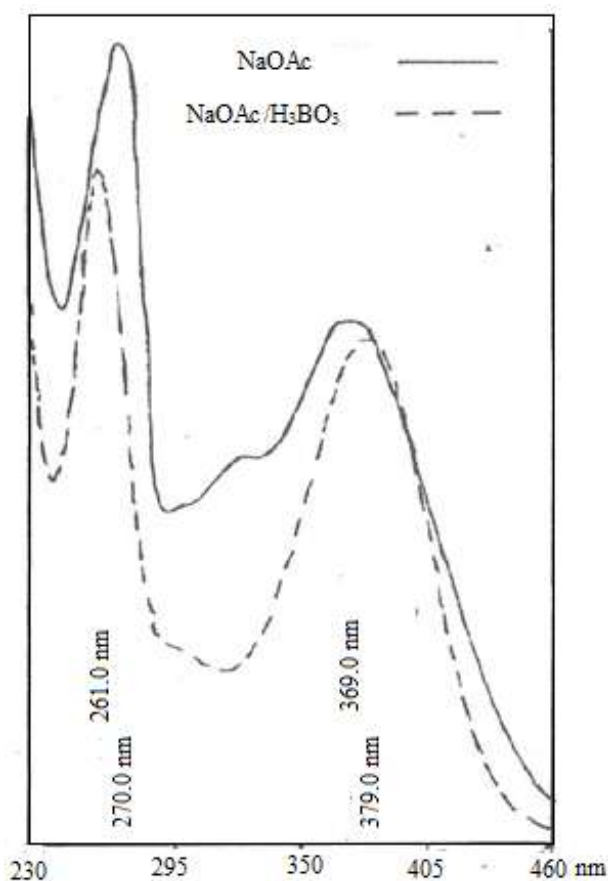


Figure 26 : spectre UV du produit VIII-3 enregistré dans NaOAc et NaOAc/H₃BO₃

Le déplacement bathochrome de (43 nm) de la bande I du spectre enregistré dans AlCl₃/HCl (figure 27) par rapport à celui du spectre méthanol montre la présence de l'hydroxyle libre en position 5.

Le déplacement hypsochrome de 24 nm de la bande I du spectre méthanol en présence de AlCl₃/HCl par rapport à celui du spectre AlCl₃ confirme la présence d'un système *ortho* -*di* -OH sur le noyau B (figure 27).

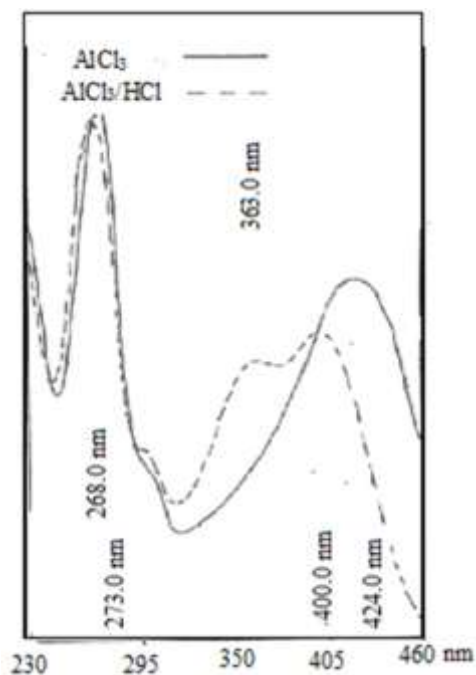


Figure 27 : spectre UV du produit VIII-3 enregistré dans AlCl_3 et AlCl_3+HCl

Sur la base de ces informations on peut dire que le composé est la quercétine substituée en position 3. L'analyse par ESI en mode positive de ce composé a montré un pic pseudo moléculaire $m/z = 487$ correspondant à $[\text{M}+\text{Na}]^+$ qui correspond à une formule brute de

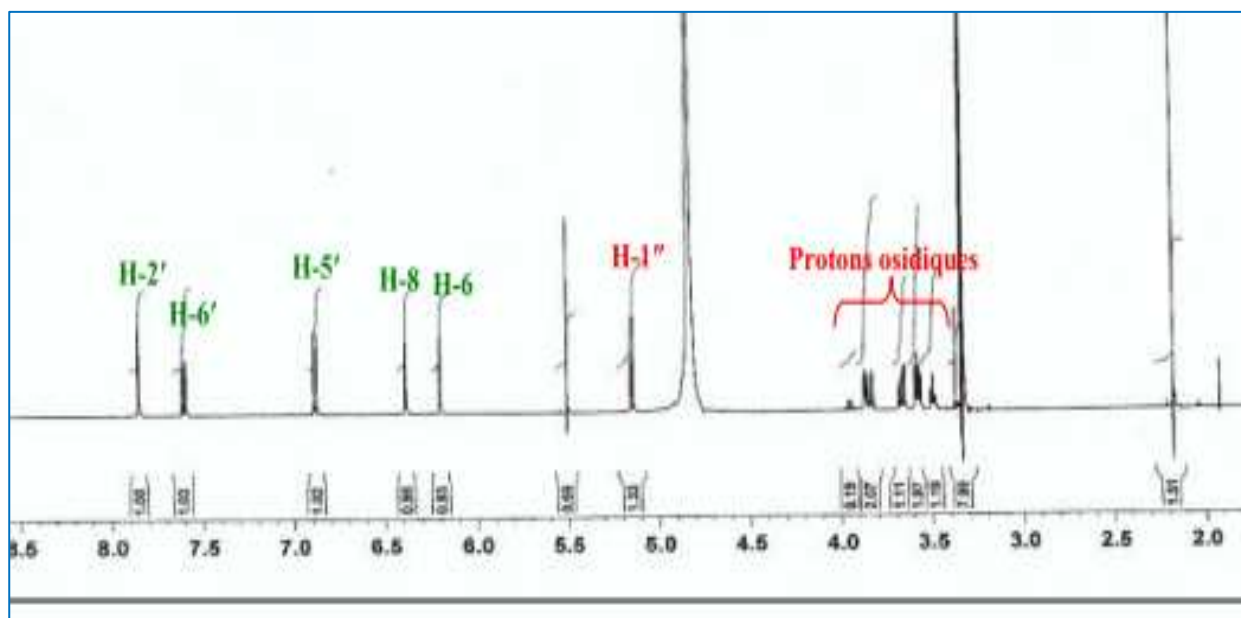


Figure 28: Spectre RMN ^1H du composé VIII-3 (CD_3OD , 500 MHz)

$C_{21}H_{23}O_{12}$, ce qui montre que le composé possède une masse 464 Sachant que la génine est la quercétine , alors le substituant présente une masse de 163 uma caractéristique d'un hexose (glucose) la série spectrale viendra confirmer la structure figure 28

En effet le spectre RMN 1H montre les deux protons $H_{2'}$ et $H_{6'}$ qui sortent à 7.51 et 7.85 ppm , le proton $H_{5'}$ qui sort à 6.85 ppm les protons H_6 et H_8 qui sortent respectivement à 6.2 et 6.4 ppm les protons osidiques sortent entre 3.35 et 3.80 ppm alors que le proton anomérique du sucre sort ,lui à 5.15ppm l'attribution des protons osidiques est bien détaillée sur le spectre de l'étalement de la partie osidique entre 3.35 et 3.85 (figure 29).

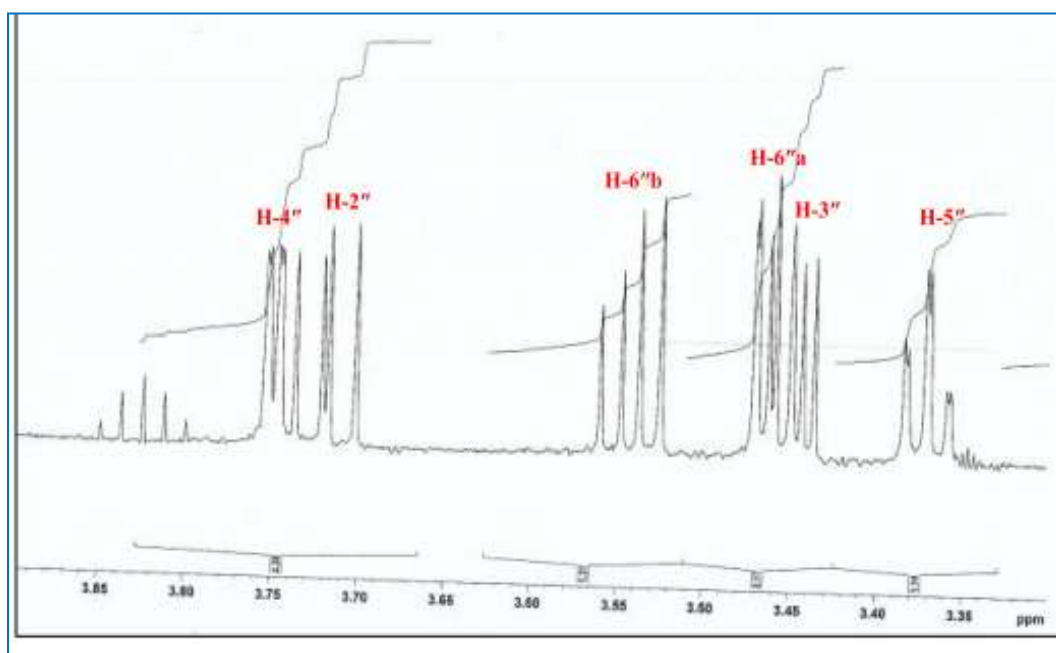


Figure 29: Partie osidique du composé VIII-3 (CD₃OD, 500 MHz)

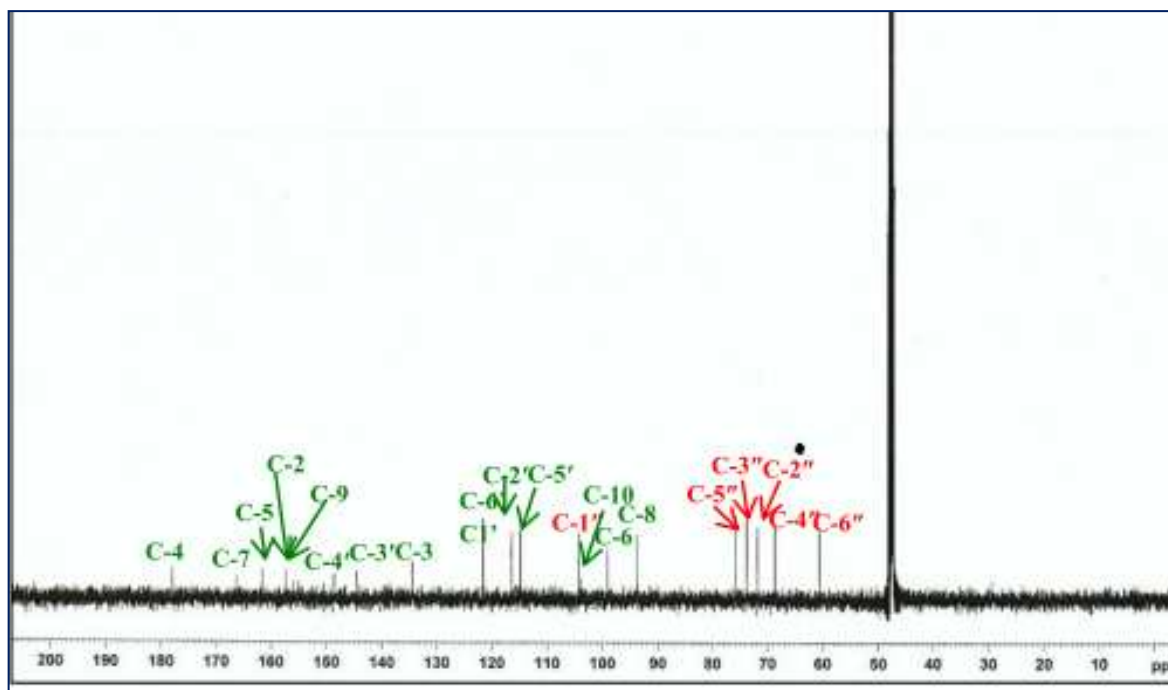


Figure 30: Spectre RMN ^{13}C du composé VIII-3 (CD_3OD , 125 MHz)

Le spectre ^{13}C affiche le nombre exact de carbone de la molécule à savoir les cinq carbones du sucre entre 60 et 80 ppm alors que le C1'' sort à environ 104 ppm les quinze carbones de l'aglycone se trouvent situés entre 90 et 180 ppm (tableau 16) :

Tableau 16 résultats du ^{13}C du composé VIII-3

No	$\delta \text{ C}$ (ppm)
Aglycone	
1 (O)	-
2 ©	156.0
3 ©	133.2
4 (CO)	177.2
5 ©	161.2
6 (CH)	99.2
7 ©	166.0
8 (CH)	93.8
9 ©	156.5
10 ©	103.4
glucose	
1' ©	121.1
2'	115.3
3',	145.0
4'	148.8
5'	116.2
6' ©	121.6

1''(CH)	101.1
2''(CH)	74.2
3''(CH)	76.6
4''(CH)	70.0
5''(CH)	77.5
6a''(CH)	61
6b''(CH)	

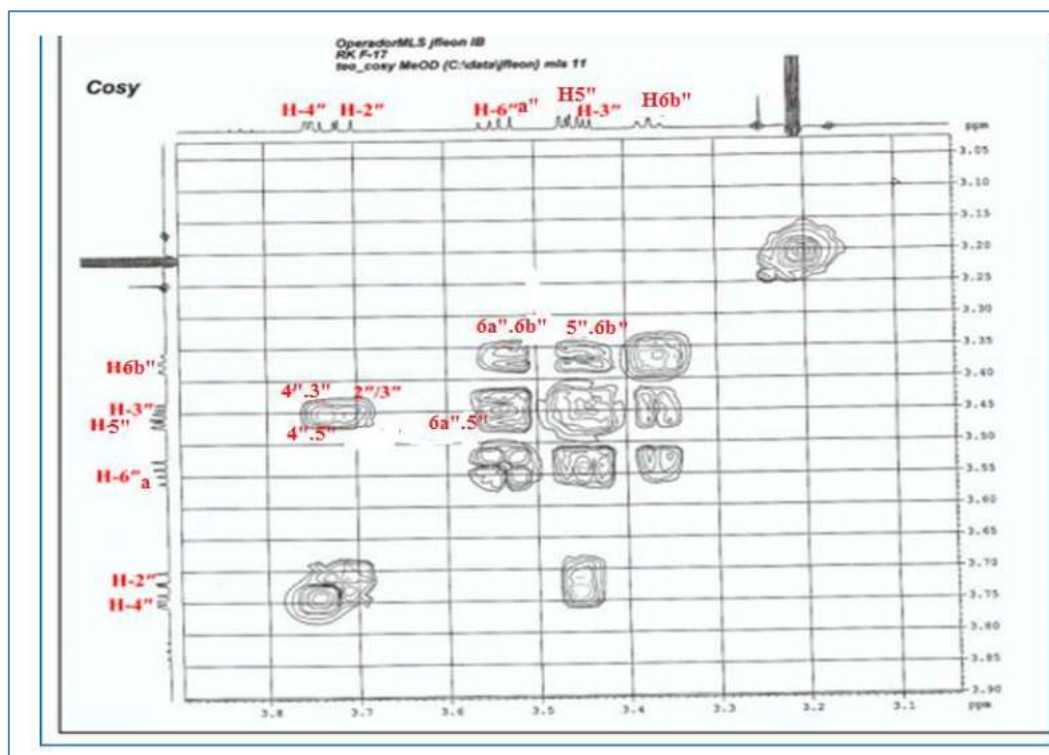


Figure 31 : Spectre COSY du composé VIII-3 (zone osidique)

Le spectre COSY montre la corrélation des protons du sucre en effet les protons H5'' et H6'' sont corrélés entre eux , nous avons également la corrélation H6a'' avec H6b'' des protons géminés entre 3.35 -3.45ppm ainsi que la corrélation entre les protons H2'',H3'' et H3'',H4''.

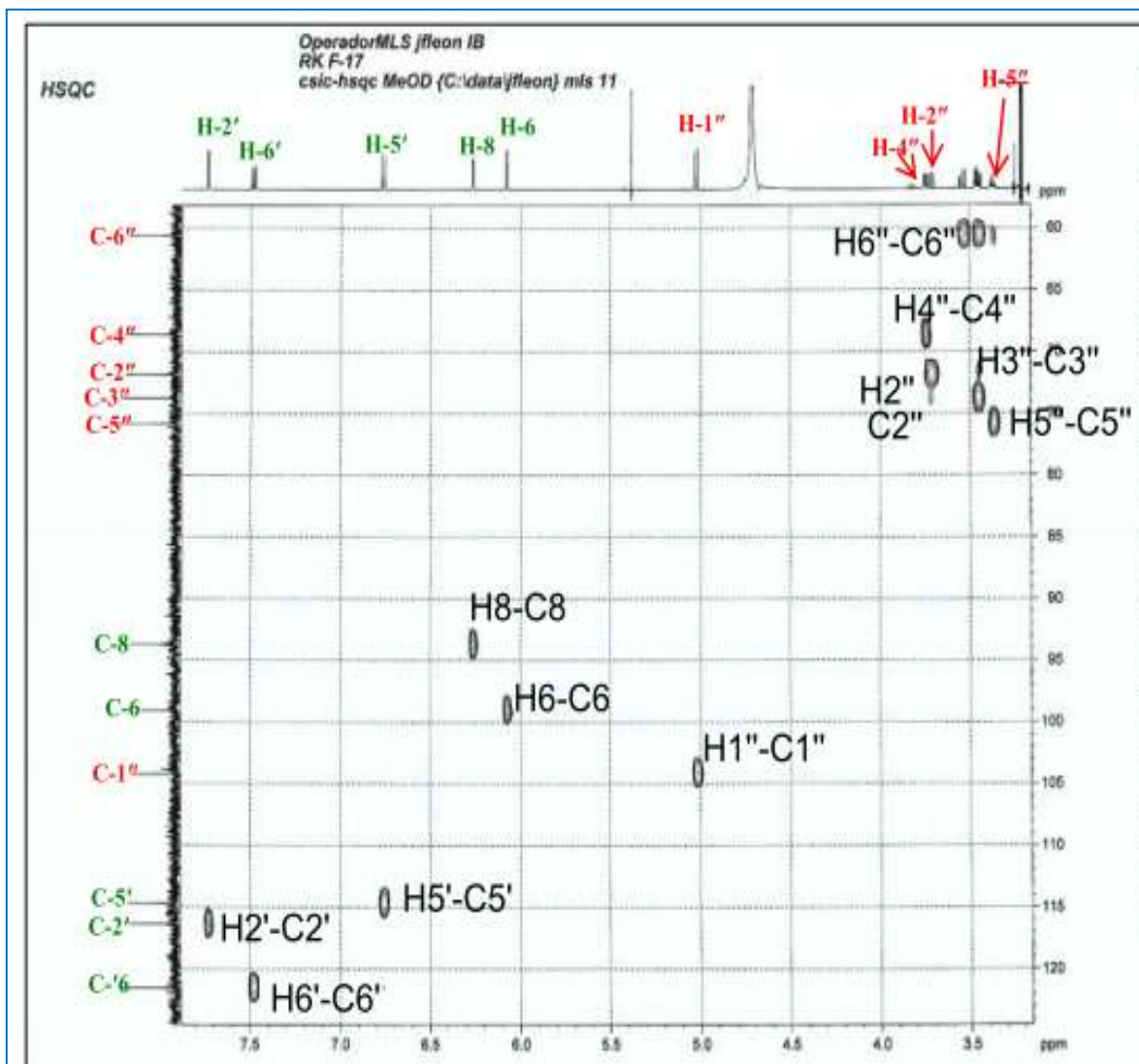


Figure 32: Spectre HSQC du composé VIII-3

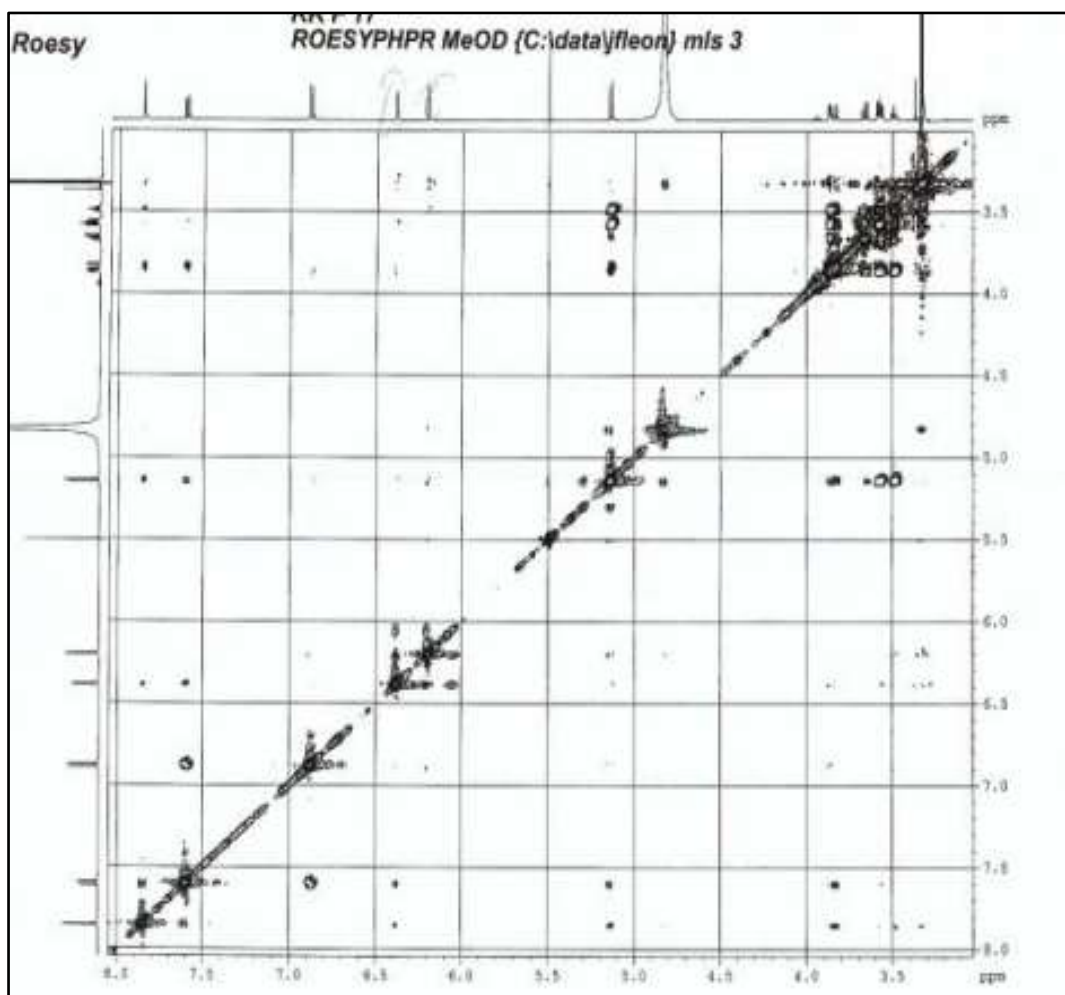


Figure 33: Spectre ROESY du composé VIII-3

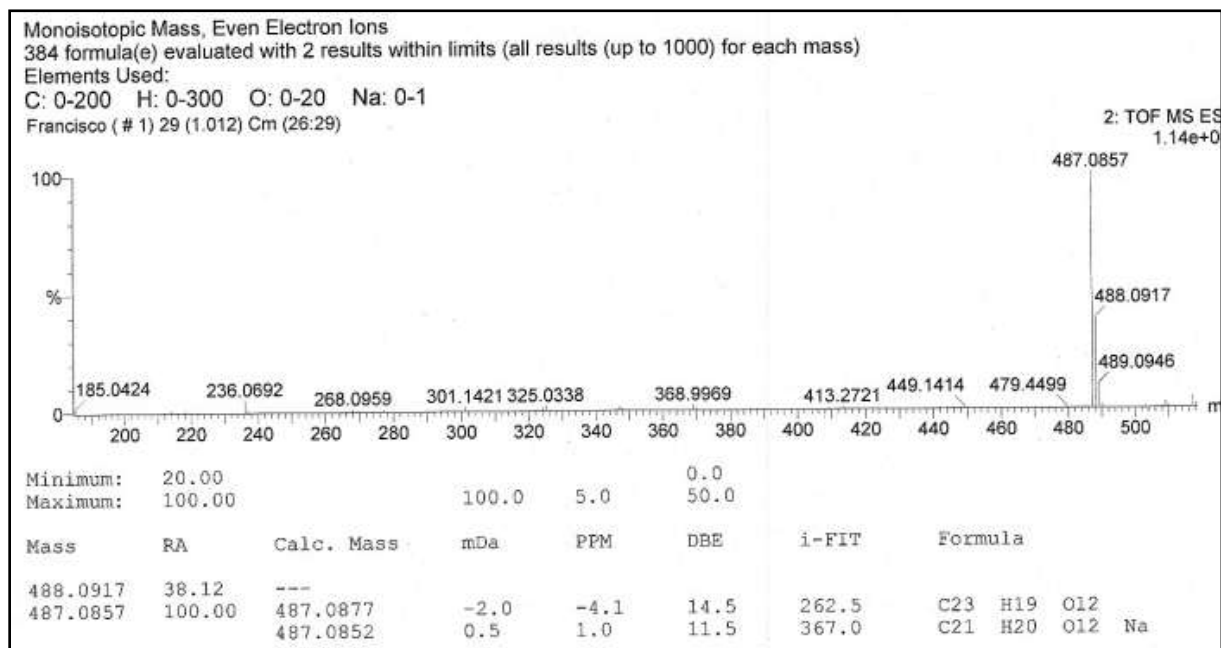
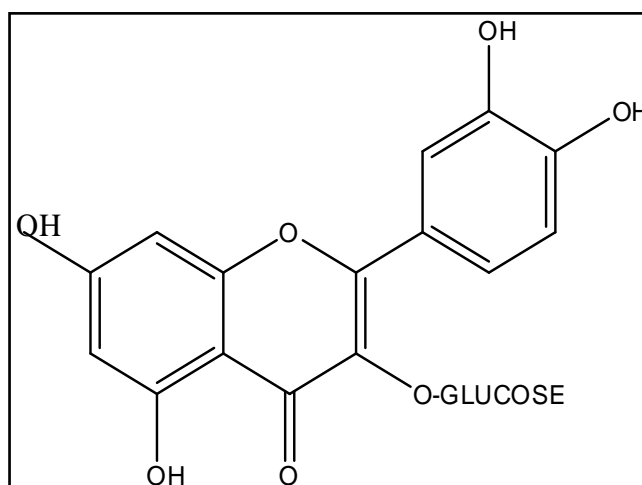


Figure 34: Spectre de masse ES⁺ du composé **VIII-3**

A la lumière des résultats spectroscopiques complets nous proposons la structure de la quercetine-3-O- β -glucose.



Produit VIII-3

B-1-d-Séparation et discussion des résultats spectroscopiques des fractions XI-2, XI-3, XI-4

Les fractions **XI-2** **XI-3** et **XI-4** sont issues de la fraction mère XI qui a subi une séparation par colonne de gel silice avec le système dichlorométhane/MeOH . Une fois les 20 fractions de 20 ml chacune , réunies et après control par CCM sur gel de silice, elles ont donné cinq fractions principales dont trois fractions sont riches en produit majoritaire (mono tâche) tableau 17 .Les fractions ayant donné des produits majoritaires ont subi une ultime purification sur Séphadex:

Tableau 17

sous fractions	Comportement
XI-1(de 1à5)	Traces
XI-2(de 6 à10)	Produit majoritaire
XI-3 (de11 à 13)	Produit majoritaire
XI-4 (de 14à16)	Produit majoritaire
XI-5 ,(de 17 à 20)	Mélange

Le chromatogramme HPLC couplé à la masse du composé XI- 2 ont donné l'allure suivante :

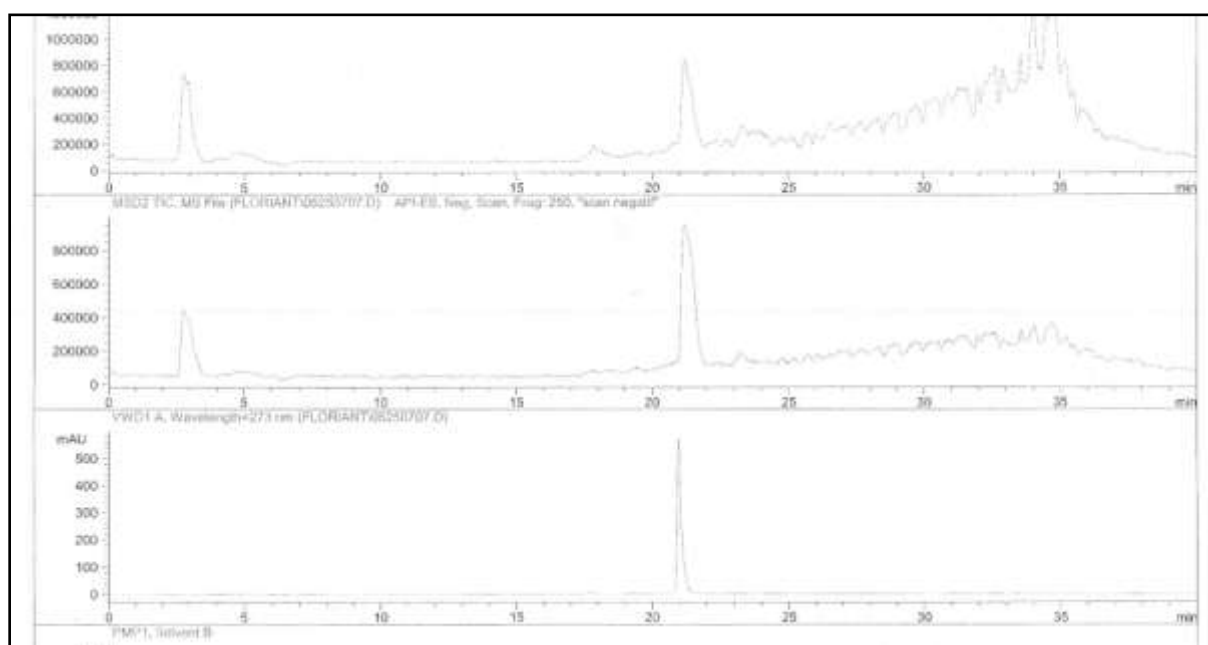


Figure 35 :Chromatogramme HPLC du composé XI-2

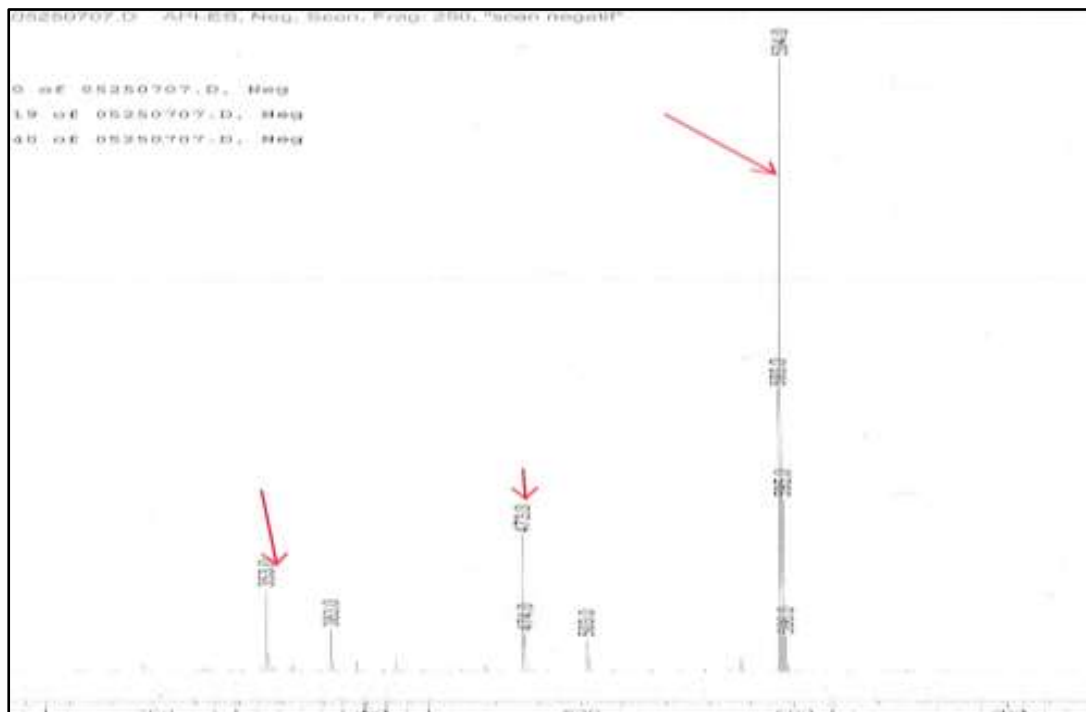


Figure 36: Spectre de masse(API- ES négatif) du composé XI-2

Les fragments à $m/z = 593, 503, 473 ; 353$ proposent la structure de l'apigénine 6,8 di-C-glucose (vicénine 2)(Silva . D. et al 2013).le schéma de fragmentation ci-dessous illustre l'obtention des différents pics : schéma 40 .

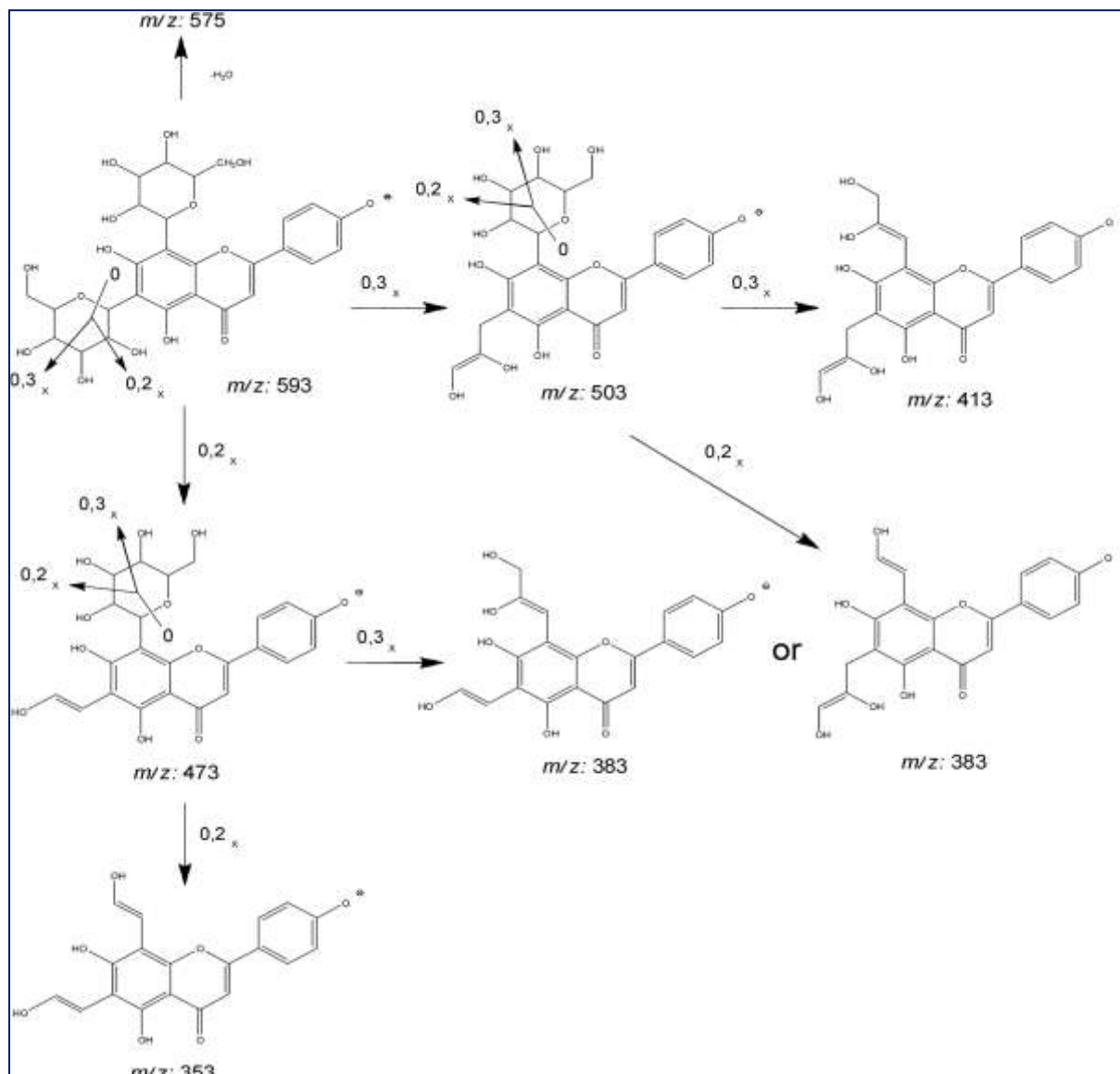
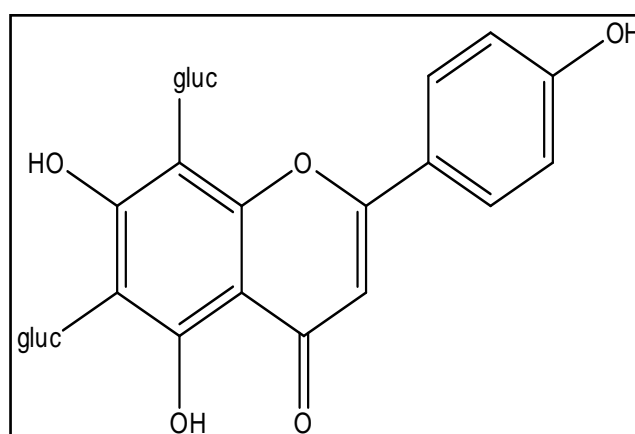


Schéma 40 fragmentation de la vicénine 2



Produit XI-2(vicénine 2)

Le spectre proton du composé XI-3 a donné l'allure suivante :

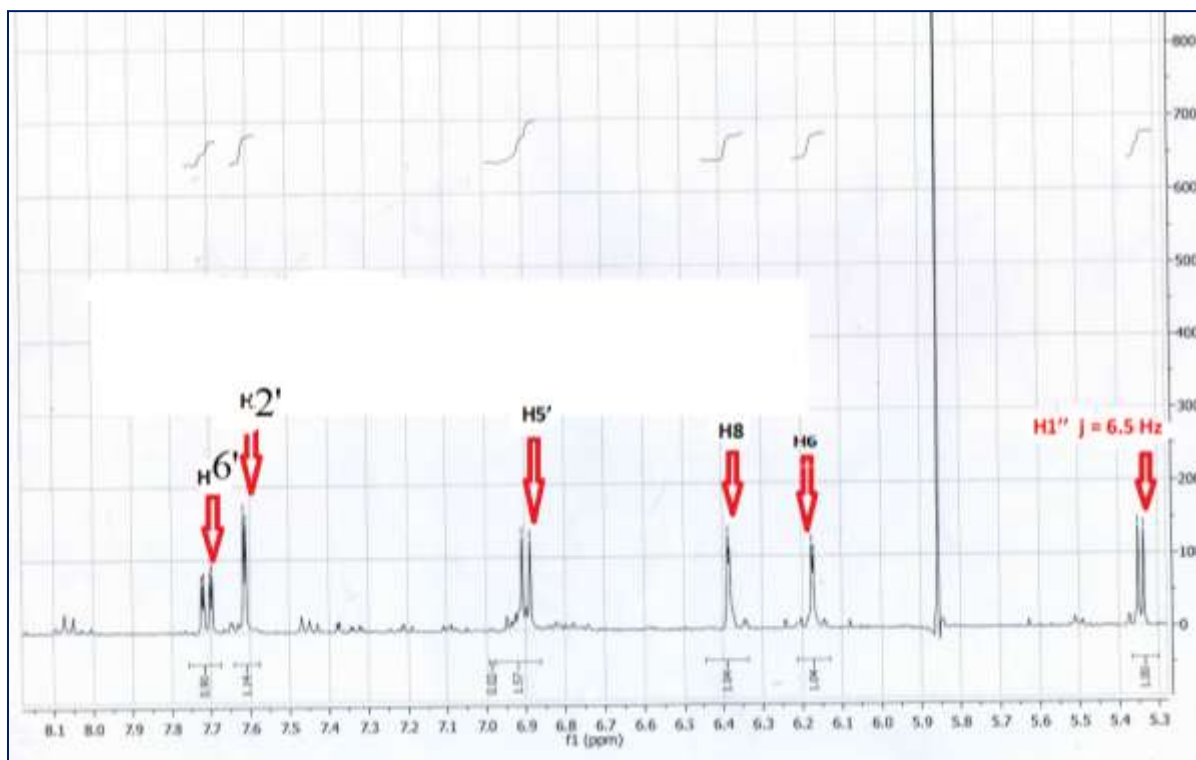


Figure 37 : Spectre RMN ^1H du composé XI-3 (DMSO, 500 MHz)

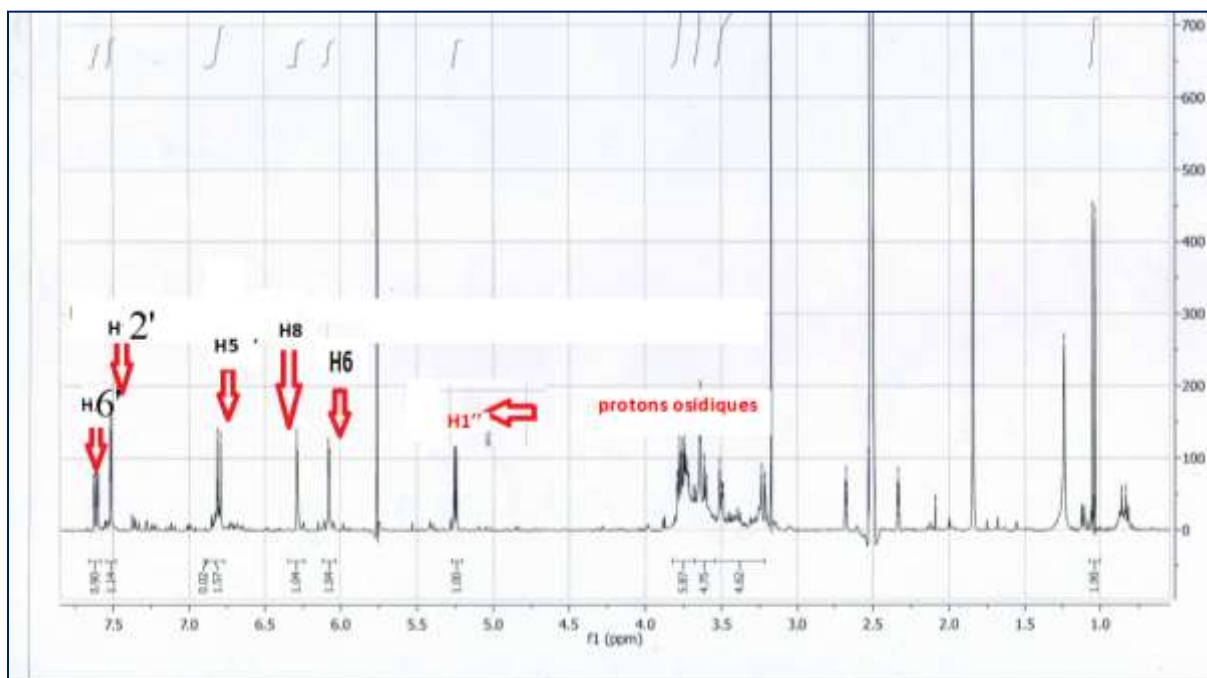
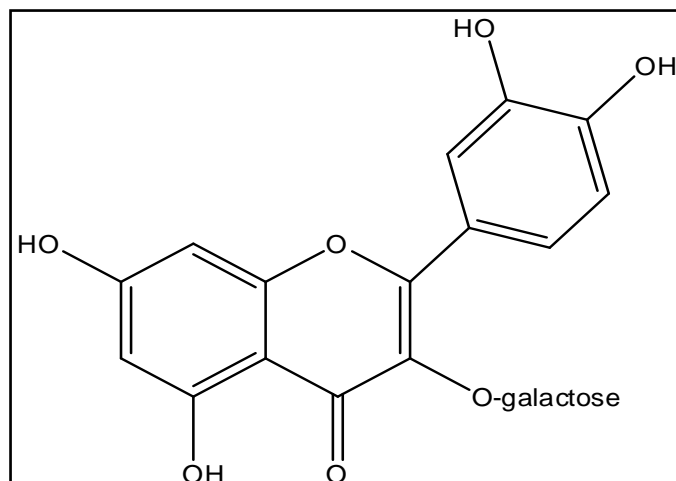


Figure 38 : Spectre RMN ^1H du composé XI-3 (étalement entre 5.3-7 ppm)

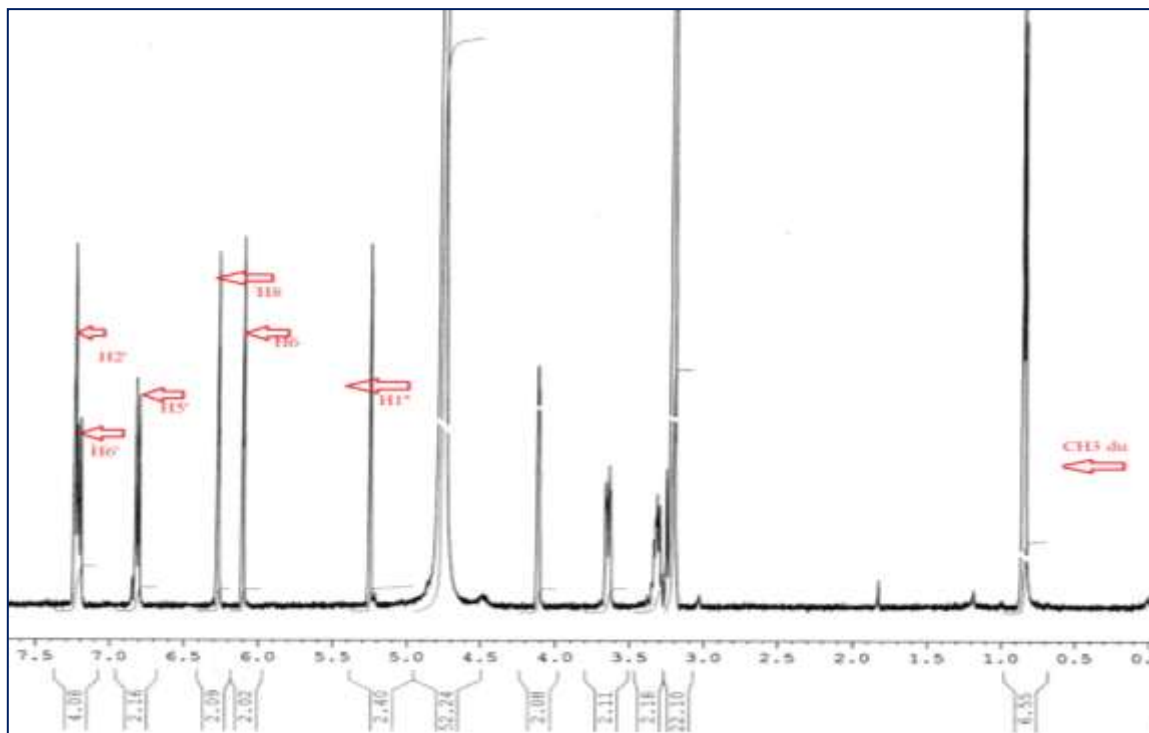
Le spectre RMN proton de la fraction XI-3 est identique au spectre précédant celui du composé VIII-3 sauf que les protons H5' et H6' sortent sous forme de doublets avec des

constantes de couplage d'une valeur de 8 Hz alors que pour la quercétine 3-o- β glucose ils sortent sous forme de singulets ,le H8 sort sous forme de singulet à 6.40 ppm dans la quercétine 3-O- β - galactose alors que chez le β -o- glucose il sort sous forme de doublet avec une constante de couplage égale à 2Hz cette conclusion a été faite comparativement aux résultats de la bibliographie (NEHME, C.J. 2005)

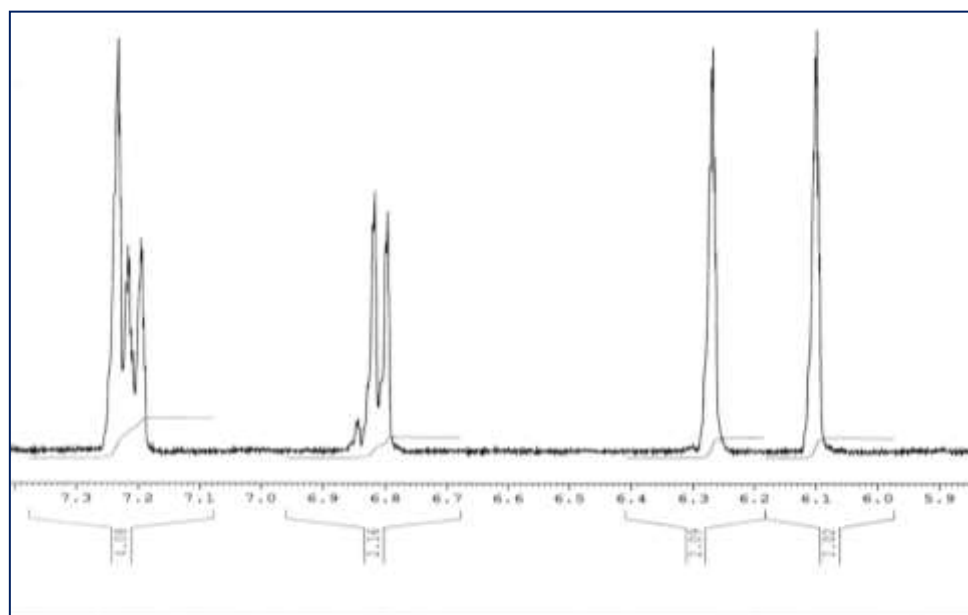


Structure du composé XI-3

Le spectre proton du composé XI-4



Figures 39 a, : Spectres RMN ^1H du composé XI-4 (MEOD, 500 MHz)



Figures 39 b, : Spectres RMN ^1H du composé XI-4 (entre 5.9 et 7.3 ppm)

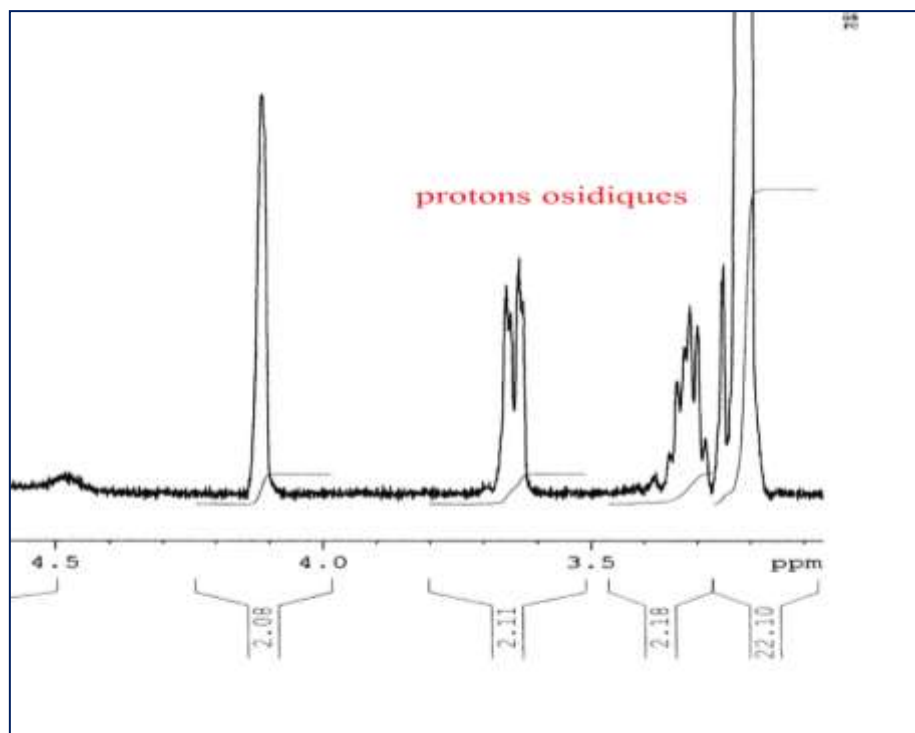
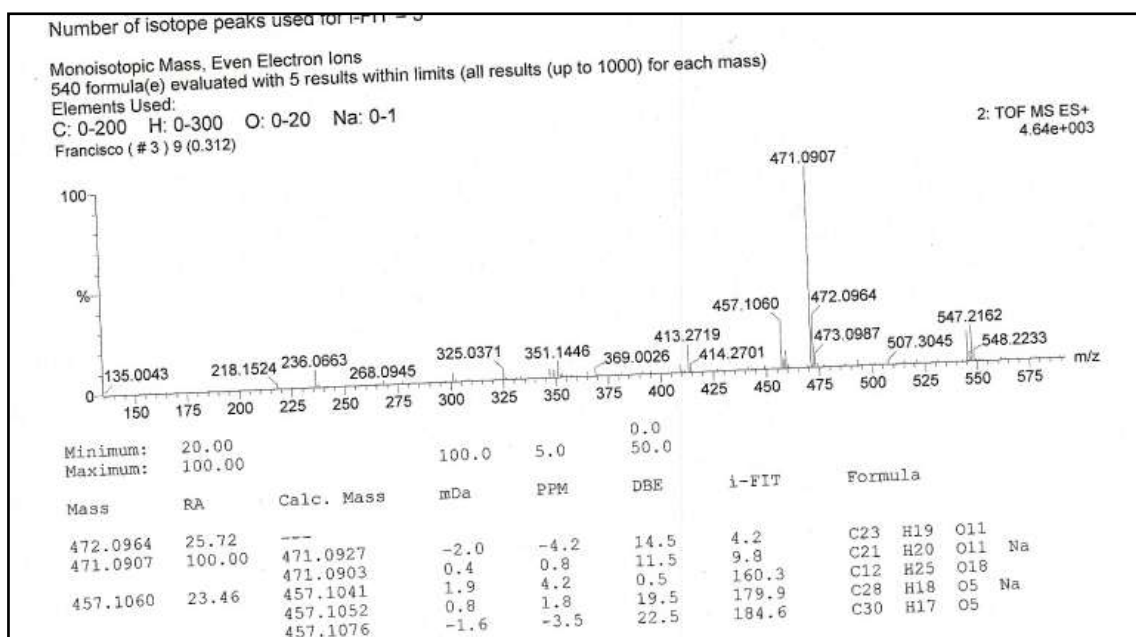
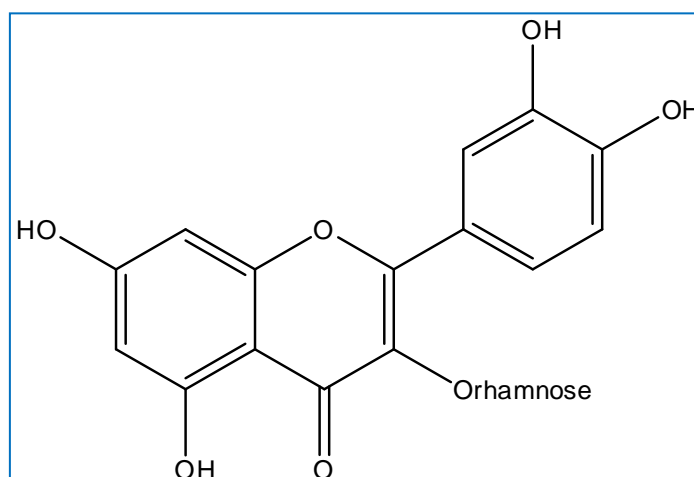


Figure 40: Spectre RMN ^1H du composé XI-4 (étalement entre 3 et 4.5 ppm)

Le spectre proton du composé XI-4 est celui de la quercétine 3-O-rhamnose car il est identique à celui du produit XI-3 sauf par rapport au pic à 0.8 ppm sous forme de doublet avec une constante de couplage $j=6\text{Hz}$ d'intégration trois protons correspondant au méthyle du rhamnose le H1'' sort à 5.3 ppm sous forme de singulet alors que dans les deux autres composés ils sortent sous forme de doublets avec une constante de couplage $j=7\text{Hz}$ le proton H6' sort sous forme de doublets à 7.3 ppm avec une constante de couplage $j=8\text{Hz}$. (NEHME, C.J. 2005). la structure est confirmée par le spectre de masse qui a donné un pic pseudo moléculaire à $m/z = 471$ correspondant à $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ce qui donne une masse moléculaire de $m/z = 448$

Figure 41 : Spectre masse ES⁺ du composé XI-4

Structure du produit XI-4

B-2- Chromatographie en phase gazeuse GC/MS

Les deux extraits hexane et chloroforme ont été analysés sur un appareil de chromatographie en phase gazeuse (GC-7890B Agilent) couplé à la masse MS-(5977A Agilent) en utilisant une colonne capillaire (Agilent CP9205 VF-WAXms) de longueur 30 m, 0,25 mm de diamètre intérieur, 0,25 µm d'épaisseur du film). La température du four GC a subi un gradient de température allant de 50 °C à 210 °C à raison de 4, 5 °C/min à la fin de cette opération le four a été maintenu à 210°C pendant six minutes. Les échantillons ont été dilués dans de l'hexane (1 µl, 1/100).

B-2-a-Identification des composés

L'identification des substances volatiles a été basée sur le calcul des temps de rétention et des spectres de masse par appariement informatisé de l'huile essentielle avec la bibliothèque de recherche de la base de données NIST 11L.

Les résultats ainsi que les chromatogrammes GC obtenus ont été cités ci-dessous (figure 42-43).

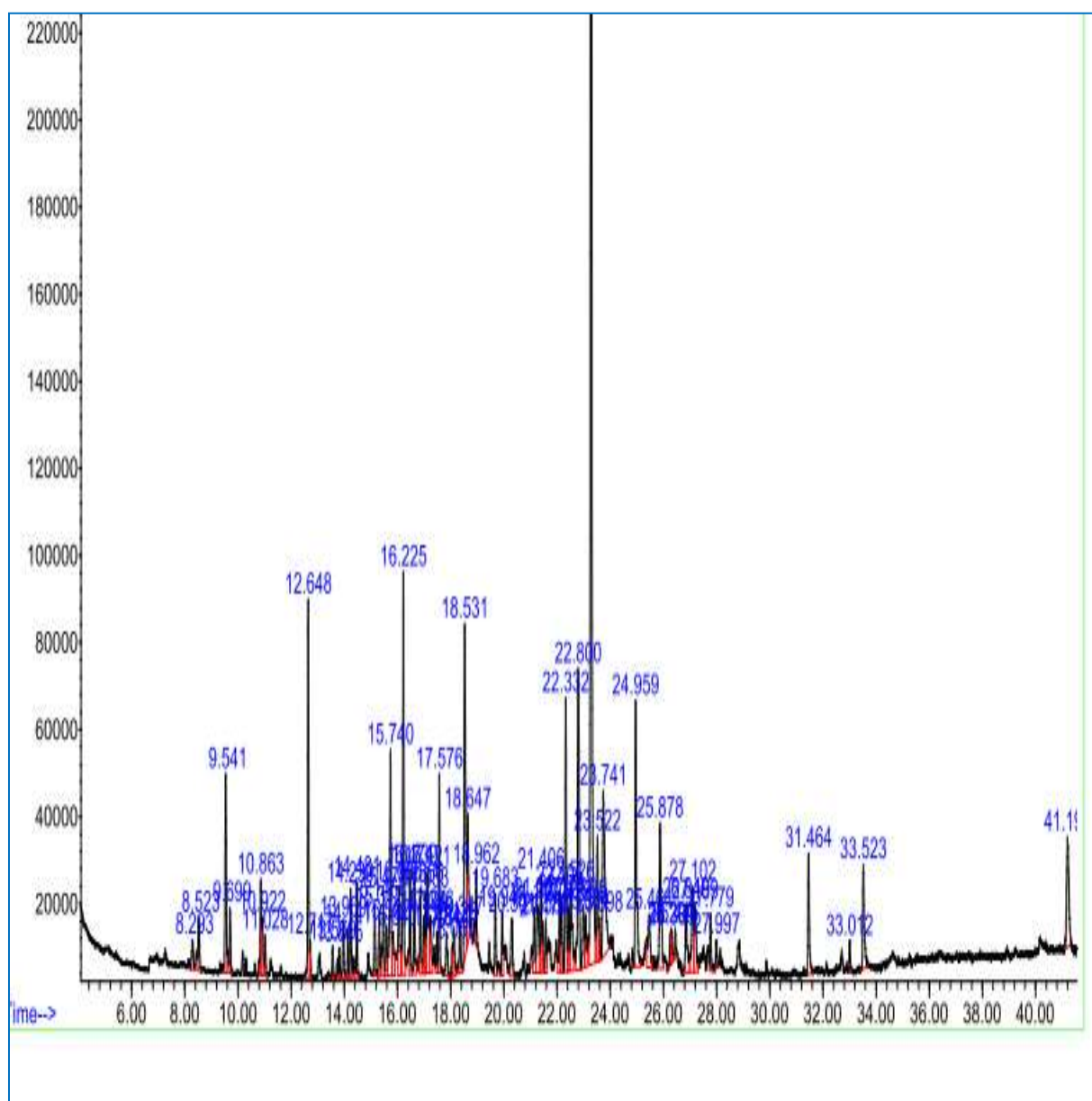


Figure 42. Chromatogramme GC de l'extrait Hexane de *C.villosus*

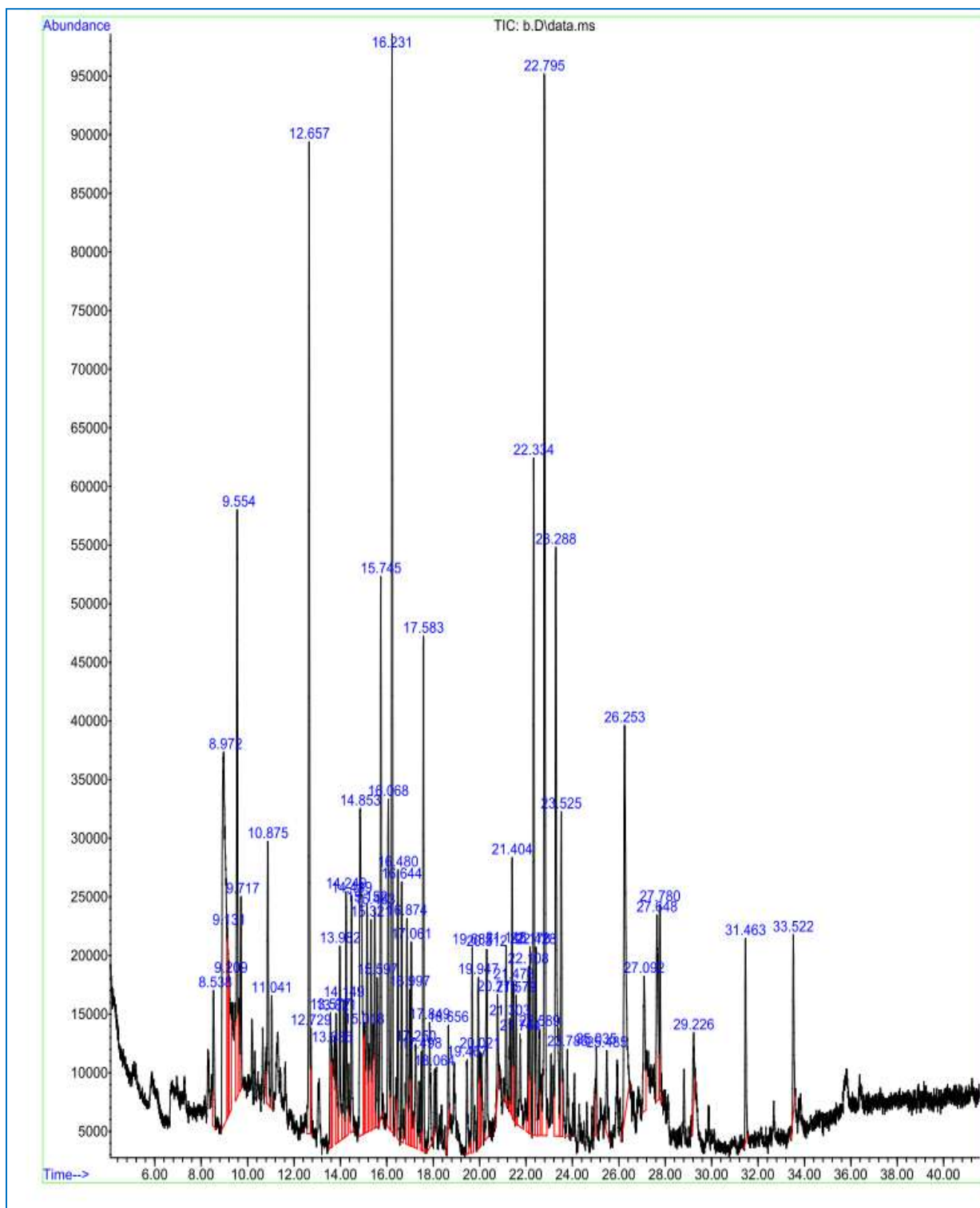


Figure 43. Chromatogramme GC de l'extrait chloroforme de *C. villosus*

Tableau 18a : Les constituants majoritaires de l'extrait hexanoïque de la plante *Cistus villosus*

Composés	T _R	Aire %
Undecane, 5-methyl-	9.542	2.01
Silane, cyclohexyldimethoxymethyl	12.649	3.39
Undecane, 2,7-dimethyl-	9.700	0.63
Undecane, 4,4-dimethyl-	15.738	2.41
Decane, 2,3,6-trimethyl-	16.228	3.42
Phenol, 2,3,5,6-tetramethyl-	17.120	1.51
Dodecane, 1-iodo-	17.574	1.55
Butanoic acid, butyl ester	18.962	0.67
Tetradecane	19.684	0.72
Dimethyl phthalate	21.264	1.30
Pentacosane	22.331	2.43
Phenol, 2,5-bis(1,1-dimethylethyl)	22.797	3.83
2(4H)-Benzofuranone, 5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-, (R)-	23.281	23.15
Decane, 1-bromo-2-methyl-	23.520	1.32
Nonanedioic acid, dimethyl ester	23.741	3.32
Diethyl Phthalate	24.959	3.32
1,1,4,5,6-pentamethyl-2,3-dihydro-1H-indene	25.467	0.94
3-Butanone,1-(2,3,6-trimethylphenyl)-	25.880	2.09
2-Cyclohexen-1-one, 2,4,4-trimethyl-3-(3-oxo-1-butenyl)-	26.848	1.01
Phthalic acid, hept-3-yl isobutyl ester	31.464	1.25
Dibutyl phthalate	33.522	1.39
Silane, chlorodiethyl(2-hexyloxy)-	27.104	1.26
Nonanedioic acid, dimethyl ester	23.741	3.32
3-Ethyl-3-methylheptane	23.520	1.32
Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)	22.797	3.83
Pentacosane	22.331	2.43
Phthalic acid, 2-bromo-4-fluorophenyl methyl ester	21.264	1.30

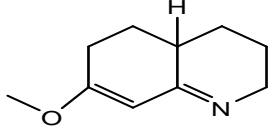
Tableau 18b : Les constituants majoritaires de l'extrait chloroforme de la plante *Cistus villosus*

Composés	T _R	Aire%
Octane, 2,6-dimethyl-	8.522	0.62
Undecane, 5-methyl-	9.54	2.01
Undecane, 2,7-dimethyl-	9.700	0.63
Decane, 2,3,6-trimethyl-	16.228	3.42
Heptadecane	16.473	0.88
Triacotane	16.636	0.99
3-Ethyl-3-methylheptane	17.120	1.51
Undecane, 5,7-dimethyl-	9.554	3.67
Silane, cyclohexyldimethoxymethyl	27.104	1.26
Silane, cyclohexyldimethoxymethyl-	12.649	3.39
Dodecane, 1-iodo-	17.574	1.55
Decane, 1-bromo-2-methyl-	23.520	1.32
1,1,4,5,6-pentamethyl-2,3-dihydro-1H-indene	25.467	0.94
Phenol, 2,3,5,6-tetramethyl-	17.120	1.51
Phenol, 2,5-bis(1,1-dimethylethyl)	22.797	3.83

Butane, 1,1'-[oxybis(2,1-ethanediy loxy)]bis-	13.576	0.97
Propanoic acid, 2-methyl-, 2,2-dim ethyl-1-(2-hydroxy-1-methylethyl)propyl ester	18.344	0.58
Butanoic acid, butyl ester	18.962	0.67
Nonanedioic acid, dimethyl ester	23.741	3.32
2(4H)-Benzofuranone, 5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-, (R)-	23.281	23.15
3-Butanone,1-(2,3,6-trimethylpheny l)-	25.880	2.09
2-Cyclohexen-1-one, 2,4,4-trimethy l-3-(3-oxo-1-butenyl)-	26.848	1.01
2H-1-Benzopyran-2-one, 6-hydroxy-7-methoxy-4-methyl-	26.848	1.01
2-Methylsulfonyl-5-dimethylaminomethyleneaminopyrimidine	33.015	0.29
2-Formylphenoxathin	33.015	0.29
3-Butanone,1-(2,3,6-trimethylpheny l)-	25.880	2.09
2-Cyclohexen-1-one, 4-(3-hydroxy-butenyl)-3,5,5-trimethyl-, [R-[R* R*-(E)]]	26.288	0.43
Benzyl alcohol	8.971	6.91
Sulfurous acid, decyl 2-ethylhexyl ester	14.246	1.40
Phenol, 2-amino-4-methoxy-	14.852	4.20
4-Isopropyl-1,3-cyclohexanedione	16.997	0.84
Octatriacontyl pentafluoropropionate	19.947	0.96
Nonahexacontanoic acid	22.430	1.11
Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl	22.797	6.63
2(4H)-Benzofuranone, 5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-	23.286	4.75
2,5-Heptanedione, 3,3,6-trimethyl-	23.525	1.81
2-Cyclohexen-1-one, 4-(3-hydroxy- -butenyl)-3,5,5-trimethyl-	26.253	4.05
Quinoline, 2,3,4,4a,5,6-hexahydro- 7-methoxy-	27.093	1.21
5H-Inden-5-one, 1,2,3,3a,4,7a-hexa hydro-7a-methyl-, trans-	27.646	1.69
Phthalic acid, hex-3-yl isobutyl ester	31.464	1.11
Eugenol	18.53	4.29

Tableau 19 : Structure des constituants majoritaires des extraits apolaires de *Cistus villosus*

Nom du composé	Formule brute	Masse moléculaire g/mole	Structure
Decane, 2,3,6-trimethyl-	$C_{13}H_{28}$	184.36	
Undecane, 5,7-dimethyl	$C_{13}H_{28}$	184.36	
Silane, cyclohexyldimethoxymethyl	$C_9H_{20}O_2Si$	188.33	
Phenol, 2,5-bis(1,1-dimethylethyl)	$C_{14}H_{22}O$	206.32	
Nonanedioic acid, dimethyl ester	$C_{11}H_{20}O_4$	216.27	
2(4H)-Benzofuranone, 5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-, (R)-	$C_{11}H_{16}O_2$	180.24	
3-Butanone,1-(2,3,6-trimethylphenyl)-	$C_{13}H_{18}O$	190.28	
Benzyl alcohol	C_7H_8O	108.137	
Phenol, 2-amino-4-methoxy-	$C_7H_9NO_2$	139.151	
Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)	$C_{14}H_{22}O$	206.32	
2-Cyclohexen-1-one, 4-(3-hydroxy-5-trimethyl-3,5,5-trimethylbutenyl)-	$C_{13}H_{20}O_2$	208.296	

	$C_{10}H_{15}NO$	165.236	
--	------------------	---------	--

B-2-b Discussions des résultats de la chromatographie GC/MS:

Les principaux constituants des extraits apolaires de la plante *Cistus villosus* s'avèrent être une panoplie de produits dont principalement le 5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-, (R)-2(4H)-benzofuranone, vient ensuite l'eugénol, l'alcool benzylique, 4-(3-hydroxy--butenyl)-3,5,5-trimethyl-2-cyclohexen-1-one (terpène), 2-amino-4-methoxy-phénol, 2,3,4,4a,5,6-hexahydro-7-methoxy-quinoline (composés azotés) ainsi que 2,4-bis(1,1-diméthylethyl)-phenol et des hydrocarbures beaucoup de composés sont communs aux deux extraits comme le montrent les tableaux 17a et 17b.

Les extraits apolaires obtenus à partir de *Cistus creticus* (Grèce) et de son labdanum ont été principalement étudiés par (DEMETZOS .1992) qui ont identifié plusieurs constituants par CPG/SM.

Les huiles essentielles obtenues à partir de la résine labdanum de *Cistus creticus*, (DEMETZOS . 2002) ont montré la présence de 52 composés représentant 97,4% de la composition chimique totale. Parmi les composés majoritaires on peut citer l'oxyde de manoyle (12,1%), l'oxyde de 13-*épi*-manoyle (19,8%) et l' α -pinène (10,3%), de même qu'elles ont également montré la présence d'un sesquiterpène, le drima-7,9(11)-diène (16,1%). Plus récemment, les mêmes auteurs ont mis en évidence la présence de trois diterpènes à squelette labdane : sclaréol, *ent*-3-b-hydroxyoxyde de 13-*épi*-manoyle et *ent*-3-b-acétoxy oxyde de 13-*épi*-manoyle.

Les huiles essentielles préparées à partir de *Cistus creticus* ssp *creticus* sont dominées par des diterpènes à squelette labdane (oxyde de manoyle et oxyde de 13-*épi*-manoyle) alors que celles obtenues à partir la sous-espèce *eriocephalus* sont dominées par des sesquiterpènes hydrocarbonés (d-cadinène, α -cadinène et α -copaène) et par des sesquiterpènes oxygénés (bulnesol, viridiflorol et lédol).

L'étude réalisée par ANASTASSAKI . 1999 sur les Huiles essentielles de la même plante a montré la présence de diterpènes à squelette labdane contenus dans les extraits hexane des fruits, des feuilles et du labdanum de ces deux sous-espèces étudiées .

Les huiles essentielles sont caractérisées par la présence de diterpènes en proportion importante, principalement des composés à squelette labdane. ont mis en évidence l'existence de deux chimio types se différenciant par l'abondance en di terpènes à squelette labdane. on remarque que selon la position géographique, le climat, la nature du sol la même espèce ne produit pas les mêmes composés.

Calamintha Baborensis

A-2-1-Récolte du matériel végétal

Les parties aériennes de cette plante ont été collectées au cours de la période de floraison à Jijel, au Nord-Est de l'Algérie en Mai 2014 . Après séchage de la plante dans un endroit sombre aéré, celle-ci a été broyée et tamisée ensuite stockée, après son identification nous avons obtenu une masse de 450g(150g ont été utilisés pour l'huile essentielle et 300g ont subit une macération hydroalcoolique ensuite des extractions liquide-liquide avec différents solvants).

A-2-2-Macération, extraction et séparation

Le même mode opératoire pour les extractions a été réalisé pour les deux plantes à savoir, les feuilles et les fleurs de la plante (300 g), ont subi une macérations dans un mélange méthanol /eau : 80/20 permettant ainsi l'obtention d'un extrait hydroalcoolique . Après évaporation à sec ce dernier ensuite repris par de l'eau bouillante, celui-ci a subi à son tour des extractions liquide-liquide avec d'abord des solvants apolaires tels que : l'hexane et le chloroforme ensuite avec l'acétate d'éthyle (AcOEt) et enfin avec le *n*-Butanol. Toutes ces étapes ainsi que les différentes analyses effectuées sont représentées ci-dessous (**schéma 41**) :

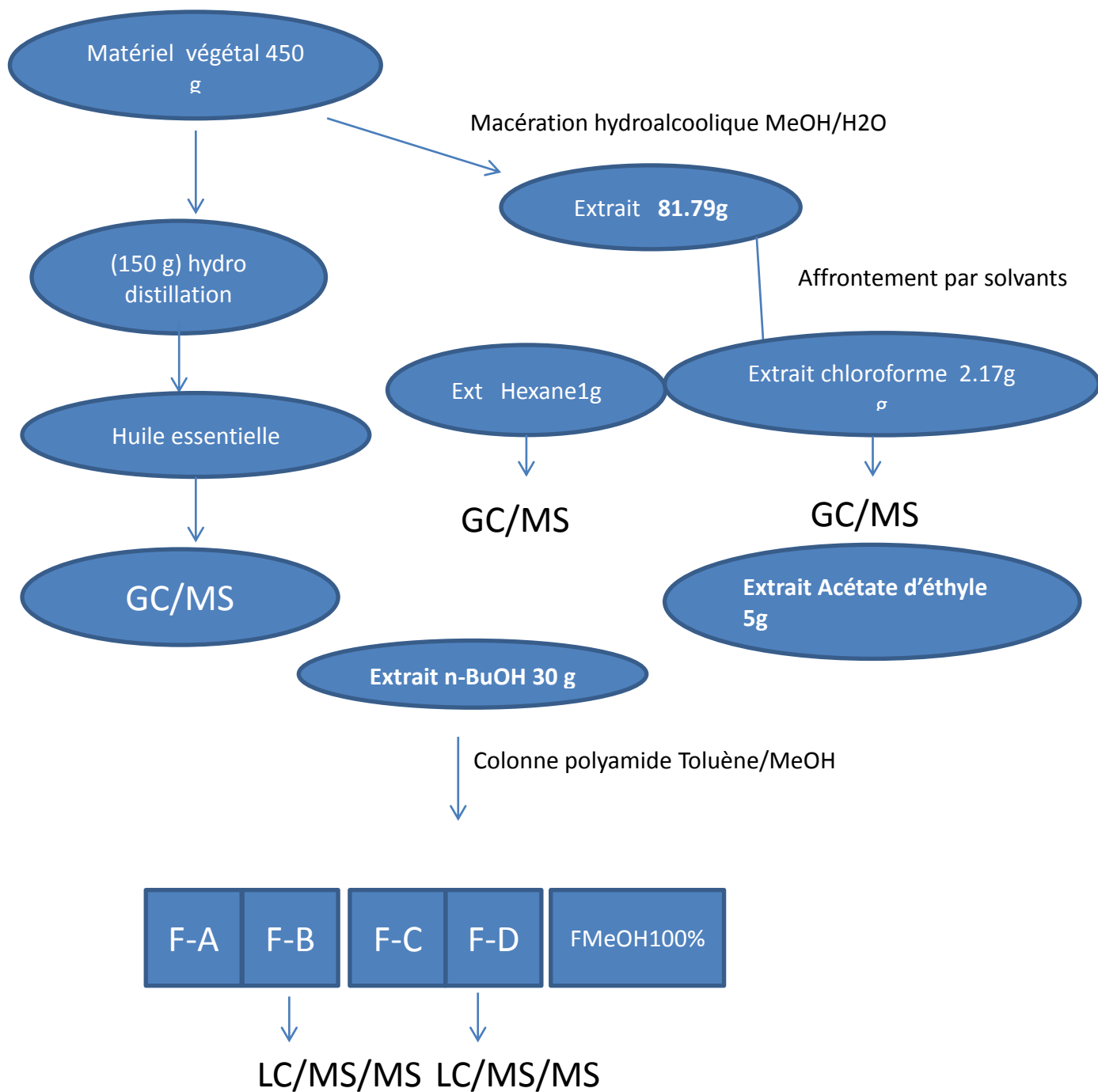


Schéma 41 : Protocole d'extraction de l'espèce *Calamintha baborensis*

La fraction butanolique a subi une séparation par chromatographie sur colonne de polyamide SC₆ en utilisant comme système d'éluion le mélange toluène/ méthanol allant du 100% en

toluène jusqu'à 100% en méthanol, cette séparation a donné les fractions A ,B, C ,D et méthanol 100 % comme c'est indiqué précédemment dans le schéma 40.

A-2-3-Extraction de l'huile essentielle

Nous avons soumis les parties aériennes de la plante à une hydrodistillation pendant 3 heures, en se servant d'un dispositif d'extraction type Clevenger. L'opération consiste à immerger une quantité de la masse végétale (150g) dans un ballon en verre (de 1litre) contenant 500 ml d'eau distillée .Nous avons porté le mélange à ébullition à l'aide d'une chauffe ballon. Les vapeurs chargées de l'huile essentielle passent à travers le réfrigérant où aura lieu la condensation. Les gouttelettes d'huile ainsi produites s'accumulent dans le tube rempli au préalable d'eau distillée. En raison de la différence de densité, l'huile surnage à la surface de l'eau et elle est récupérée, puis séchée par un déshydratant (sulfate de sodium) pour éliminer le peu d'eau susceptible d'avoir été retenu dans l'huile.

L'huile ainsi obtenue a été conservé dans des flacons inactiniques à l'abri de la lumière et à une température de 4 °C (figure 44).

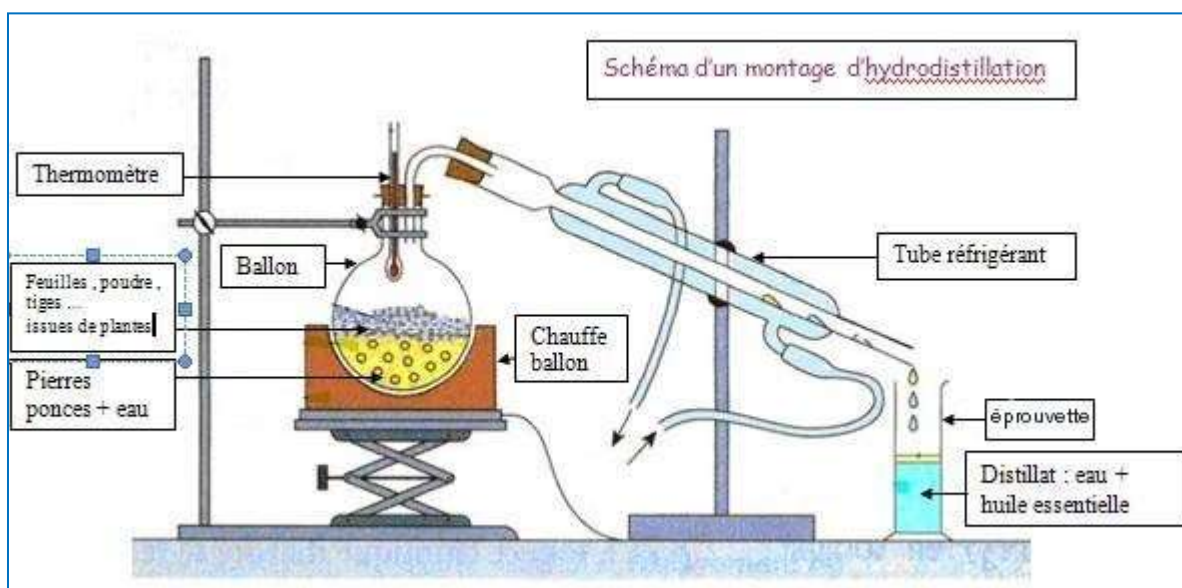


Figure 44 : Montage simple d'une hydrodistillation

A-2-4-Analyse des huiles essentielles et des extraits apolaires par GC/MS

a-Chromatographie en phase gazeuse

De même que précédemment, l'huile essentielle ainsi que les extraits apolaires ont été analysés sur le même appareil de chromatographie en phase gazeuse (GC-7890B Agilent)

couplé à la masse MS-(5977A Agilent) en utilisant une colonne capillaire (Agilent CP9205 VF-WAXms) de longueur 30 m, 0,25 mm de diamètre intérieur, 0,25 μm d'épaisseur du film). La température du four GC a subi un gradient de température allant de 50 °C à 210 °C à raison de 4, 5 °C/min à la fin de cette opération le four a été maintenu à 210°C pendant six minutes. les échantillons ont été dilués dans de l'hexane (1 μl , 1/100).

b-Identification des composés

L'identification des substances volatiles a été basée sur le calcul des temps de rétention et des spectres de masse par appariement informatisé de l'huile essentielle avec la bibliothèque de recherche de la base de données NIST 11L (National Institut of Standard and Technology). Les résultats obtenus à partir de l'huile essentielle ainsi que les extraits hexane et chloroforme et leurs chromatogrammes sont cités ci-dessous figures (45, 46 et 47):

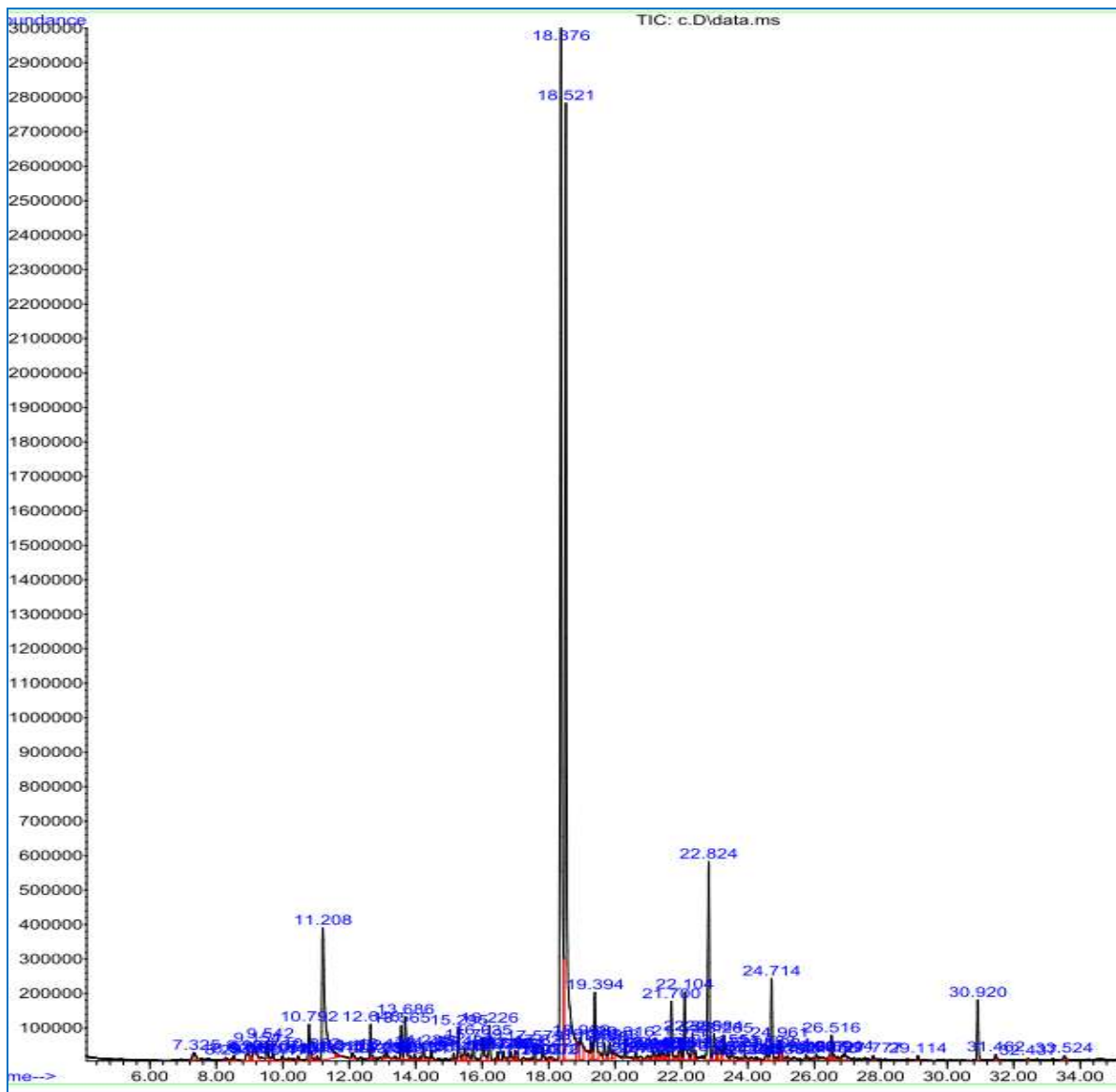


Figure 45. Chromatogramme CPG de l'huile essentielle de *Calamintha baborensis*

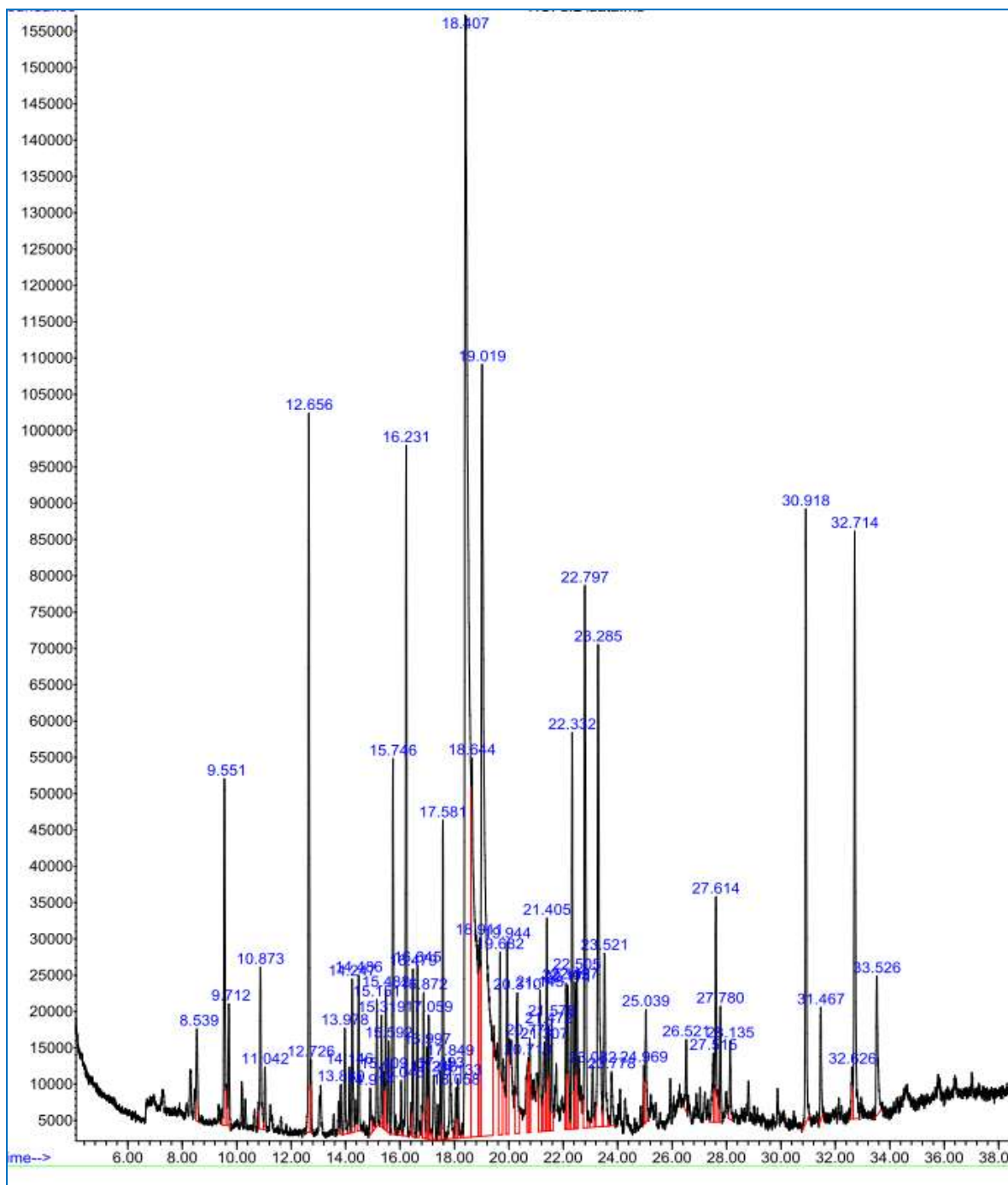


Figure 46. Chromatogramme CPG de l'extrait hexane de *C. baborensis*

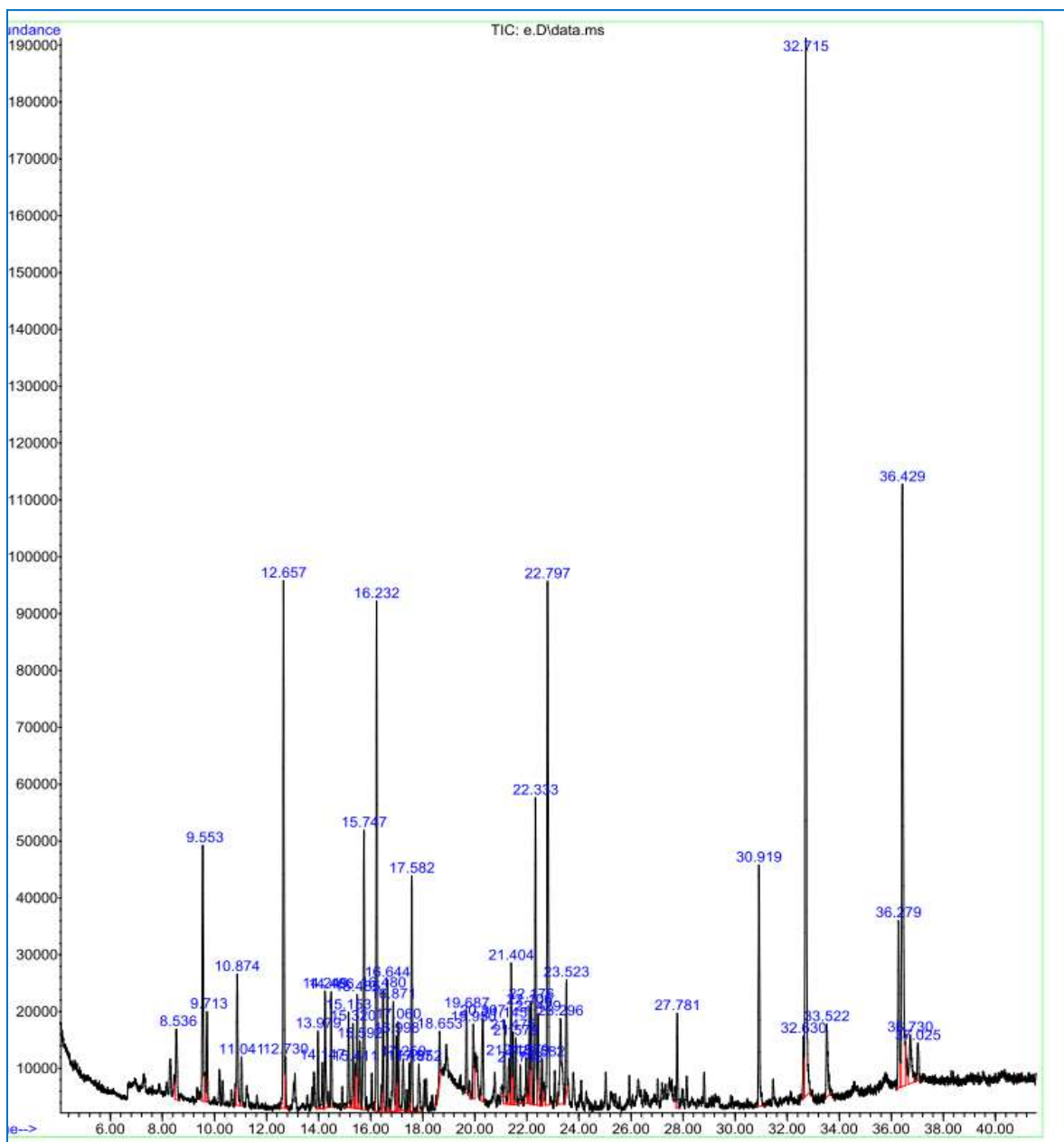


Figure 47. Chromatogramme CPG de l'extrait chloroforme de *C. baborensis*

Tableau 20 : Identification des constituants de l'huile essentielle de *C. baborensis*

Monoterpènes, sesquiterpènes et relatifs	T _R	%AIRE
α -terpineol	13.56	0.74
Eugenol	18.51	27.04
Methyleugenol	19.84	0.49
bicyclo 5,2,0 nonane 2-methylene-4,8,8- tri methyl-4vinyl	20.31	0.43
1,3,7,7-tetramethyl-9-oxo-2-oxabicyclo(4,4,0)dec-5-ene	21.31	0.17
3-buten-2-one , 4-(2,6,6-trimethyl -1-cyclohexen-1-yl)-	22.10	1.71
Trans-beta-ionone	22.10	1.71
Megastigmatrienone	24.56	0.33
Caryophylleneoxide	24.71	1.84
selina-6-en-4-ol	26.51	0.57
phytol	36.73	0.14
Composés du cycle benzène		
4-acetylanisole	18.96	1.01
butylated hydroxy toluene (antioxydant très puissant)	21.70	1.28
dihydrocoumarin,4,4,5,7,8- pentamethyl	21.91	0.16
1,4-naphtoquinone, 6-ethyl -2,5-dihydroxy	21.91	0.16
Diethylphtalate	24.95	0.48
Alcools, aldéhydes, cétones		
1-octen-3 ol	7.32	0.36
Benzyl alcool	8.93	0.36
1,6-octadien-3-ol ,3,7-dimethyl	10.79	0.87
Phenylethylalcohol	11.20	6.58
1,3-benzenediol, 5-(diméthylamino)	23.90	0.23
Benzenemethanol,2,4-dimethyl	26.06	0.15
Benzeneacetaldehyde	9.15	0.79
decanal	10.17	0.10
benzeneacetaldehyde,alpha -ethylidene-	16.036	0.77
3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzaldehyde	29.11	0.10
2,6,6-trimethyl-2-cyclohexen-1,4-dione	12.10	0.23
2-cyclohexen-1-one, 5-methyl-2-(1-méthylethyl)-	15.29	0.80
3-methoxyacetophenone	18.37	26.46
betadamasconone	19.29	0.52
cyclohexanone,2-(2-butynyl)	19.94	0.23
2,5-cyclohexadiene-1,4dione,2,6-bis(1,1-diméthylethyl)	21.57	0.24
2-pentanone,4-cyclohexylidene-3,3-diethyl-	21.9	0.49
2-pentadecanone,6,1,14-trimethyl	30.92	1.23
Esters des acides gras		
oxalicacid, isohexylpentyl ester	8.28	0.08
2-thiophenecarboxilicacid,2-phenylethylester	13.12	0.23
Sulfurousacid ,2-ethylhexyl hexadecyl ester	14.23	0.33
Sulfurousacid ,pentylundecylester	15.48	0.33
Oxalic acid ,bis(6-etyloct-3-yl)ester	15.73	0.44
Sulfurousacid,hexylpentylester	16.86	0.28
Cyclohexanecarboxilicacid,2,3-dichlorophenyl ester	22.98	0.80
Cyclopentaneaceticacid,3-oxo-2-pentyl-méthylester	26.45	0.10
Phtalicacid,hex-3-yl isobutyl ester	31.46	0.16
1,2-benzenedicarboxilic acid,butyloctylester	33.52	0.13
Hydrocarbures		

Decane,4-methyl-	8.52	0.14
Decane,2,3,7-trimethyl-	9.54	0.52
3-ethyl-3-methylheptane	9.70	0.20
10-methylnonadecane	10.86	0.24
Octane,5-ethyl-2-methyl-	11.03	0.13
heneicosane	13.97	0.12
Undecane,4,8-dimethyl	14.47	0.28
Decane,1,1'-oxybis-	15.14	0.14
10-methylnonadecane	15.59	0.22
heneicosane	16.47	0.17
heptadecane ;8-methyl	16.64	0.23
heptadecane	17.05	0.16
1-ethyl-2,2,6-trimethylcyclohexane	17.24	0.10
pentacosane	17.58	0.33
ethyltetramethylcyclopentadiene	20.98	0.14
hexacosane	21.40	0.24
pentadecane	22.41	0.22
tridecane,3-methyl	23.52	0.26
Composés azotés		
Nornicotine	17.82	0.39
5-fluoro-8-quinolinol	19.68	0.45
Heterocycles oxygénés		
Ethyl-2(5-methyl-5-vinyltetrahydrofuran-2-yl)propan-2-yl carbonate	10.46	0.13
3,6-dimethyl-2,3,3a,4,5,7ahexahydrobenzofuran	13.68	1.23
2(4H)-benzofuranone,5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl	23.28	0.88
Indènes		
1H-indene-1-one,2,3-dihydro-3,4,7-trimethyl	19.39	2.01
Composés contenant Si,S ,F		
Silane,cyclohexyldimethoxymethyl-	12.64	0.72
Diethyldivinylsilane	23.06	0.10
Benzene,1-methyl-3-((2-methylpropyl)thio)-	23.15	0.50

Tableau 21:Composition de l'extrait hexanoïque de *Calamintha baborensis* Batt.:

Hydrocarbures	T_R	% Aire
Octane,2,6-dimethyl	8.54	0.60
Decane,3,6-dimethyl	9.54	1.97
Undecane,5,7-dimethyl	9.71	0.67
Dodecane,2,6,10-trimethyl-	11.04	0.32
tritetracontane	13.97	0.57
pentadecane	14.48	0.76
2-methyloctacosane	15.31	0.49
Hexadecane,2,6,11,15-tetramethyl	16.04	0.30
Heptadecane,2,6,10,15-tetramethyl	16.47	0.77
4,4-dipropylheptane	17.06	0.57
tridecane	18.05	0.27
tetradecane	19.68	1.40
Hentriacontane	20.30	1.13
Pentadecane,2,6,10-trimethyl-	21.40	1.18
hexacosane	22.17	0.90
heptacosane	22.33	1.99

Heneicosane	23.77	0.38
Composés du cycle benzène		
4-acetylanisole	18.64	6.86
phenol,2,4-bis(1,1-dimethylethyl)	22.79	3.42
Composés contenant Si,S		
Silane,cyclohexyldiméthoxyméthyl	12.65	3.38
Sulfurousacid ,butylnonylester	12.72	0.27
Sulfurousacid,pentadecyl 2-propylester	32.18	0.31
Esters		
Oxalicacid, 6-ethyloct-3-yl isobutylester	15.74	1.88
Aceticacid,trichloro, octylester	17.24	0.44
Benzoic acid, 4-methoxy methyl ester	19.02	12.72
Glycine, N-(2,6-difluorobenzoyl)-octylester	22.50	0.76
Diethylphtalate	24.97	0.29
Methyl tetradecanoate	28.13	0.44
Phtalic acid,hept-3-yl isobutylester	31.47	0.62
Pentadecanoicacid , 14-methyl-methylester	32.71	3.32
Phtalic acid, butyl hept-2-yl ester	33.52	1.08
Alcènes		
2,3-dimethyl-3-heptene(Z)	16.99	0.42
3,9-epoxy-p-mentha-1,8(10)-diene	19.94	1.20
2,4,4,6,6,8,8-heptamethyl-2-nonene	27.61	1.25
Cétones		
3-methoxyacetophenone	18.40	17.86
Ortho-methoxyacetophenone	18.90	1.62
2-pentadecanone,6,10,14-trimethyl	30.91	3.12
3-methyl-3 ,5-(cyanoethyl)tetrahydro-4-thiopyranone	32.64	0.35
Alcools		
1-dodecanol,2-octyl-	17.49	0.32
Heterocycles Oxygénés et azotés		
5,6-dihydro-5-methyl-4H-1,3,5-dithiazine 2 (4H)-benzofuranone,5,6,7,7a	20.71	0.48
-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-,(R)-	23.28	3.71
6H-pyrazolo(1,2-a)(1,2,4,5)tetrazine,hexahydro-2,3-dimethyl	26.52	0.38
Autres		
Dodecane , 1-iodo	16.64	0.79
2-bromo dodecane	21.14	0.90

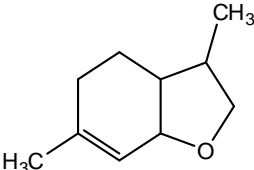
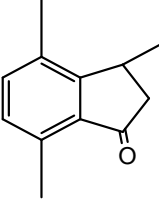
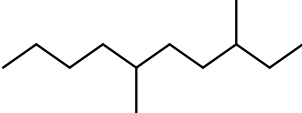


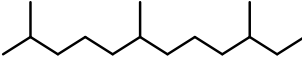

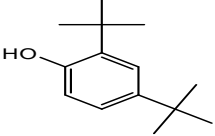
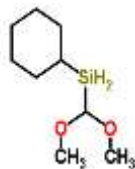
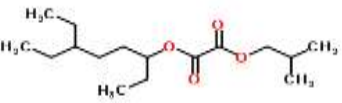
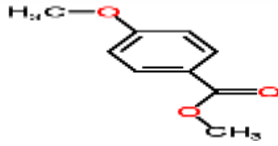
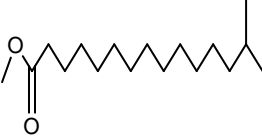
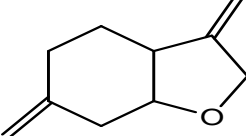
Tableau 22:Composition de l'extrait chloroformique de *Calamintha baborensis* Batt :


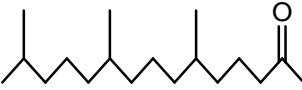
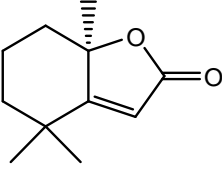
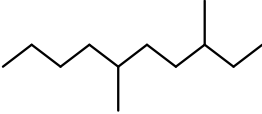

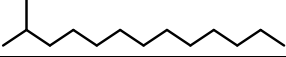
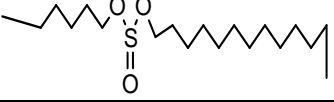
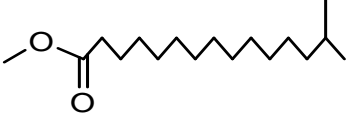


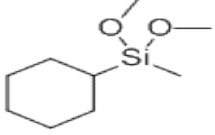
Hydrocarbures	T_R	% Aire
Octane,2,6-dimethyl-	8.53	1.12
Decane ,3,6-dimethyl	9.55	3.40
Undecane ,5,7-dimethyl-	9.71	1.09
heptadecane	13.97	0.84
Dodecane ,4,6-dimethyl-	15.48	1.27
hexadecane	16.23	5.08
1-ethyl-2,2,6-trimethylcyclohexane	16.99	0.73
octadecane	20.30	1.25
eicosane,10-methyl	21.31	0.55

octacosane	22.17	1.29
tridecane,2-methyl-	22.33	3.31
heptacosane	23.52	1.22
Composés du cycle benzène		
Phenol ,2,4-bis (1,1-dimethylethyl)-	22.79	7.18
Heterocycles Oxygénés et azotés		
2(4H)-benzofuranone,5,6,7,7a-tetrahydro 4,4,7a-trimethyl-	23.29	1.91
cyanoacetylurea	32.63	0.65
histidine , 1 ,N-dimethyl-4-nitro-	36.72	1.20
Esters et acides		
Sulfurous acid , decyl hexyl ester	15.74	3.20
Sulfurousacid ,dodecyl 2 -propylester	16.86	1.47
Trichloroacetic acid ,6-ethyl-3-octyl ester	17.49	0.50
Nonahexacontanoicacid	21.14	0.95
Pentadecanoicacid , 14-methyl-,methylester	32.71	12.99
Phtalicacid , butyl 4 -methylpent-2-ylester	33.52	1.29
9,12-octadecadienoic acid (Z,Z)-methyl ester	36.27	2.42
9,12,15-octadecatrienoic acid , methyl ester ,(Z,Z,Z)-	36.43	9.63
Cétones,aldéhydes,alcools		
1-dodecanol , 2-octyl-	17.24	0.75
Ethanone,1-(2-hydroxy-5-methylphenyl)-	18.65	0.54
p-cymen-7-ol	18.65	0.54
4-hydroxy-2-methylacetophenone	18.65	0.54
2-pentadecanone , 6,10,14-trimethyl	30.91	2.92
Autres		
Silane,cyclohexyldimethoxymethyl-	12.65	5.74
Silane ,trichlorooctadecyl-	21.40	1.65

Tableau 23 : Structure des composés majoritaires constituant l'huile essentielle et les extraits apolaires de *Calamintha baborensis* :

Nom du composé	Formule brute	Masse moléculaire g/mole	Structure
Eugénol	$C_{10}H_{12}O_2$	164.2	
3-buten-2-one , 4-(2,6,6-trimethyl - 1-cyclohexen-1-yl)-	$C_{13}H_{20}O$	192.302 Il manque une double liaison en α du carbonyl	
Caryophylleneoxide	$C_{15}H_{24}O$	220.356	
4-acetylanisole	$C_9H_{10}O_2$	150.174	
butylated hydroxy toluene	$C_{15}H_{24}O$	220.36	
Phenylethylalcohol	$C_8H_{10}O$	122.16	
3-methoxyacetophenone	$C_9H_{10}O_2$	150.177	
2-pentadecanone,6,1,14-trimethyl	$C_{18}H_{36}O$	268.48	
betadamasconone	$C_{13}H_{18}O$	190.29	

3,6-dimethyl- 2,3,3a,4,5,7ahexahydrobenzofuran	C₁₀H₁₆O	152.233	
1H-indene-1-one,2,3-dihydro-3,4,7-trimethyl	C₁₂H₁₄O	174.24	
Decane,3,6-dimethyl	C₁₂H₂₆	170.33	
tetradecane	C₁₄H₃₀	198.39	
Hentriacontane	C₃₁H₆₄	436.835	
Pentadecane,2,6,10-trimethyl-	C₁₈H₃₈	254.454	
heptacosane	C₂₇H₅₆	380.74	
phenol,2,4-bis(1,1-dimethylethyl	C₁₄H₂₂O	206.329	
Silane,cyclohexyldimethoxymethyl	C₉H₂₀O₂Si	188.339	
Oxalic acid, 6-ethyloct-3-yl isobutylester	C₁₆H₃₀O₄	286.407	
Benzoic acid, 4-methoxy methyl ester	C₉H₁₀O₃	166.174	
Pentadecanoic acid , 14-methyl-methylester	C₁₇H₃₄O₂	270.45	
3,9-epoxy-p-mentha-1,8(10)-diene	C₁₀H₁₄O	150.21	

2,4,4,6,6,8,8-heptamethyl-2-nonene	$C_{16}H_{32}$	224.42	
2-pentadecanone,6,10,14-trimethyl	$C_{18}H_{36}O$	268.48	
tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-,(R)-	$C_{11}H_{16}O_2$	180.24	
Decane ,3,6-dimethyl	$C_{12}H_{26}$	170.33	
hexadecane	$C_{16}H_{34}$	226.44	
tridecane,2-methyl-	$C_{14}H_{30}$	198.39	
Sulfurous acid , decyl hexyl ester	$C_{18}H_{38}O_3S$	334.55	
Pentadecanoicacid,14-methyl-,methylester	$C_{17}H_{34}O_2$	270.451	
9,12,15-octadecatrienoic acid , methyl ester ,(Z,Z,Z)-	$C_{19}H_{32}O_2$	292.4562	
2-pentadecanone, 6,10,14-trimethyl	$C_{18}H_{36}O$	268.4778	
Silane,cyclohexyldimethoxymethyl-	$C_9H_{20}O_2Si$	188.339	

B -2 a-Discussions des résultats de la chromatographie gazeuse GC/MS

Les tableaux 20, 21 et 22 montrent les principaux composants de l'huile essentielle ainsi que des extraits apolaires de *Calamintha baborensis*. Les pourcentages des composés identifiés dans l'huile essentielle, l'extrait hexane et l'extrait chloroforme sont 73,07%, 94,35% et 97,9% respectivement. Le nombre de composés volatils obtenus dans l'analyse par GC-MS de

l'huile essentielle est significativement supérieur à celui obtenu pour les deux autres extraits apolaires (hexanoïque et chloroformique).

Le constituant majeur de l'huile essentielle est l'eugéol (27,04%) suivi de la 3-méthoxyacétophénone (26,4%) de composés terpéniques comme l'oxyde de caryophyllène (1,84%) trans β -ionone (1,71%) α -terpinéol (0,74%), un peu de composés phénoliques: alcool phényléthylique (6,58%), alcool benzylique (0,36%), butylhydroxytoluène (1,28%) 1,4-naphtoquinone, 6-éthyl-2,5-dihydroxy (0,16%), des composés azotés sous forme de nicotine (0,39%), 5-Fluoro-8-quinolinol (0,45%), certains hétérocycles oxygénés comme 3,6-diméthyl-2,3,3a, 4,5,7a hexahydrobenzofuranes ainsi que (1-H-indène-1-one, 2,3-dihydro 3,4,7 triméthyl (2,01%), l'extrait hexanoïque est riche en 3-méthoxyacétophénone (17,86%), acide benzoïque, 4-méthoxyméthylester (12,72%) et hétérocycles oxygénés également présents dans l'extrait chloroformique contenant en majorité de l'acide pentadécanoïque 14-méthylméthylester (12,99%) et des composés phénoliques comme le phénol 2,4-bis (1,1-diméthyléthyl) (7,18%). La différence entre la composition des différentes fractions est due non seulement à la méthode d'extraction et à la polarité des solvants et bien sûr de la nature des métabolites extraits mais aussi de la concentration de l'échantillon lors de l'analyse. Le chémotype de l'huile essentielle isolée des feuilles de *C. grandiflora* L. par hydrodistillation et analysée (GC-MS) a été caractérisé par les monoterpènes oxygénés du squelette *p*-menthane, à savoir menthone, isomenthone, isomenthol et pulegone dans les pourcentages 34,07%, 7,65%, 19,83% et 19,54%, respectivement. (DOBRAVISKYTE . 2012) nous avons constaté dans les études antérieures des plantes d'origine grecque et française (SOULELES, C. 1990, CARNAT, A. L, 1991) que les mêmes structures (que chez *C. grandiflora*) étaient les plus abondantes mais avec des pourcentages différents dans l'espèce algérienne *Satureja Calamintha* (KABOUCHE, Z. 2013).

Un chimio type complètement différent a été rapporté chez un *C. grandiflora* turc avec de l'isopinocampone comme composé principal (52,6%) dans l'huile totale (BASER K.H.C . 1993), ce qui n'est pas surprenant car le polymorphisme chimique est caractéristique de nombreuses espèces de la famille des Lamiacées. La composition des huiles essentielles varie beaucoup en fonction des changements climatiques annuels, de la nature du sol; par conséquent, même au sein du même chimio type, des variations assez importantes de la composition en huile essentielle sont possibles.

Les composés qui ont été trouvés comme constituants principaux des huiles essentielles des taxons appartenant au complexe *Calamintha officinalis-nepeta* sont bio synthétiquement

apparentés ayant un squelette de carbone *p*-menthane. De plus, il semble qu'ils peuvent aider à diviser le complexe en deux paires de taxons liés chimiquement:

(i) *C. menthifolia* (qui appartient au complexe *C. officinalis-nepeta*, taxonomiquement difficile, la source de beaucoup de difficulté et de confusion. Les traitements les plus conservateurs l'ont considéré comme un taxon infra spécifiques d'une seule espèce (cf. GAMS 1927), tandis que d'autres lui ont reconnu plusieurs espèces) et *C. glandulosa*, avec des huiles essentielles caractérisées par de grandes quantités d'oxyde de pipéritone ou d'oxyde de pipériténone.

(ii) *C. nepeta* - *C. ascendens*, avec des huiles essentielles caractérisées par de grandes quantités de pulegone, menthone et isomenthone ou menthol. Cependant, la variabilité chimique au sein des taxons devrait être considérée ; et plus d'analyses chimiques de différentes populations sont nécessaires. En outre, il convient de noter que ces composés caractérisent différents chémotypes des espèces du genre *Mentha*. Les données biogénétiques de ce genre démontrent que la formation des composés d'huile essentielle cités ci-dessus est contrôlée par un certain nombre de gènes responsables des interconversions monoterpénoïdes. Ainsi, l'oxyde de pipéritone et l'oxyde de pipériténone sont formés à partir de l'époxydation de la pipéritone et de la pipériténone, respectivement, et un allèle récessif (o) est responsable des deux conversions. La réduction de la pipériténone à la cétone pulegone est contrôlée par un allèle dominant (A), tandis que dans la conversion de (+)-pulegone en (-)-menthone ou (+)-isomenthone, un seul locus à plusieurs allèles est impliqué (MURRAY . 1980, KOKKINI, 1991).

Une comparaison de la composition qualitative et quantitative de l'huile essentielle de *Calamintha taxa* à celles d'autres genres du groupe *Satureja* montre que seulement chez *Acinos suaveolens* . les mêmes composés (pulegone et isomenthone) ont été trouvés comme constituants principaux (KOKKALOU, 1988).

Les taxons *Satureja* qui sont aussi riches en carvacrol et / ou le thymol sont : *S. montana* subsp. *variegata* (Hosi) P. W. BALL (STANCHER & POLDINI 1969), *S. thymbra* (RAVID et PUTIEVSKY 1985, KOKKINI et VOKOU, 1989), et *S. hortensis* L. (THIEME et NGUYEN THI TAM 1972).

Ainsi, les sous- espèces *Satureja* Européennes sont caractérisées par les phénols, leurs huiles essentielles sont riches en linalol. Ceci supporte l'hypothèse de ADZET et PASSET (1972) que les taxons du genre *Calamintha* pourraient être distingués de ceux de sous-espèces. *Satureja* sur la base de leurs constituants d'huiles essentielles.

Ainsi, *S. douglasii* BENTH . BRIQ. (Synonyme de *Micromeria douglasii* BENT se produisant en Amérique du Nord, produit des huiles avec de grandes quantités de menthone ou d'isomenthone ou pulegone ou carvone (LINCOLN et LANGENHEIM 1976).

S.pseudosimensis BRENA (synonyme *Calamintha simensis* BENTH .et *C. cryptantha* VATKE var. *mildbraedii* PEV, KINS), une espèce d'Afrique tropicale, possède des huiles riches en oxyde de pipéritone ou menthone et isomenthone (NTEZURUBANZA, .1987).

Cependant, les relations taxonomiques de ces taxons avec les Sous-espèces *Satureja* européennes sont toujours incertaines. En outre, suivant le concept générique de BRIQUET (1895) pour le groupe *Satureja*, ils ont inclus les genres *Calamintha*, *Acinos*, *Micromeria*, et *Clinopodium* dans le genre *Satureja*. on peut donc affirmer que l'utilisation des deux : l'anatomie du trichome glandulaire et les constituants des huiles essentielles, sera très utile pour la solution des problèmes taxonomiques très complexes du groupe *Satureja* et devrait être considérée dans les futures investigations (HANLIDOU . 1991).

Une analyse par HPLC en phase inverse sur l'extrait des feuilles de l'espèce *Calamintha ashei* (H. FISCHER*.1989) a montré la présence de cinq monoterpènes de menthofurane dont Le (+) Evodone et la désacétyl- calaminthone qui sont les principaux constituants. Les Concentrations de (+) -evodone et de la désacétylcalaminthone étaient de 0,66 et 0,74 mM, respectivement cette étude collaborative a fourni des preuves que les terpènes, en général, et les monoterpènes, en particulier, jouent un rôle majeur pour l'action des menthes endémiques comme celle de *Calamintha ashei* et *Conradina canescens* (H. FISCHER*), les résultats de cette étude sur la solubilité dans l'eau d'une série de puissants monoterpènes phytotoxiques a ouvert de nouvelles portes pour les futures études écologiques de ce groupe de composés en termes écologiques généraux (WEIDENHAMER, J. 1994) nous concluons notre discussion sur le fait que ayant fait une petite étude comparative sur quelques genres *calamintha* nous avons constaté que chez ce genre les huiles essentielles et les extraits apolaires produisent une diversité incroyable de composés à savoir les menthofuranes, les menthones les oxides de piperitone, carvone, pulegone ,linalol, carvacrol et tymol ainsi pour la première fois dans l'espèce *baborensis* qui est endémique et pour la première fois étudiée on a pu observer que le principal constituant de son huile essentielle était l'eugénol. suivi du 3-méthoxyacétophénone.

B-2-b Discussion des résultats de la LC/MS/MS

Après avoir fait des tests chromatographiques des fractions de colonne (A, B, C et D) de l'extrait *n*-butanol et pour des considérations liées directement au contenu flavonique du point de vue qualitatif et quantitatif ces fractions ont fait l'objet d'une analyse par LC-MS/MS et pour des raisons de difficultés d'interprétations par manque de base de données, seules les fractions B et D ont fait l'objet de tentative d'interprétation de leur spectres de masse en se basant sur des comparaisons par rapport à des travaux bibliographiques antérieures.

Les fractions A, B, C et D de l'extrait *n*-butanol de parties aériennes de la plante *Calamintha barborensis* ont été analysées par HPLC en utilisant un instrument Agilent série 1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) avec les caractéristiques suivantes :

Eluent : Solvant A 98 % (acide formique 1 %), solvant B (ACN 2%)

Gradient programme : (0 min) 2 % B, (0-50 min) 40 % B, (50-60 min) 98 % B

Flow rate: 0.8 ml/min

Injection: 30 µL

Temperature : 28.0 C°

Detector : DAD Agilent 1100 Diode Array Detector 1

UV-détection : 190-600 nm

L'HPLC est couplé avec un spectromètre de masse type 5977A Agilent (Germany).

Ion source : ESI, négative mode

Ion polarity: Negative

Temperature: 350 C°

Skim 1 : -17.4 volt

Skim 2 : -6.0 volt

Nebulizer pressure: 65 psi (N₂)

Drying gas flow: 9.5 L/min (N₂)

Scan range: 150-1500 m/z

Capillary Exit: -84.9 volt

Par manque de témoins (produits standards) et les spectres UV, les structures proposées pour quelques produits sont des tentatives d'identifications.

Analyse de la fraction B

Ci-dessous on observe le chromatogramme HPLC de la fraction B de l'extrait *n*-butanol

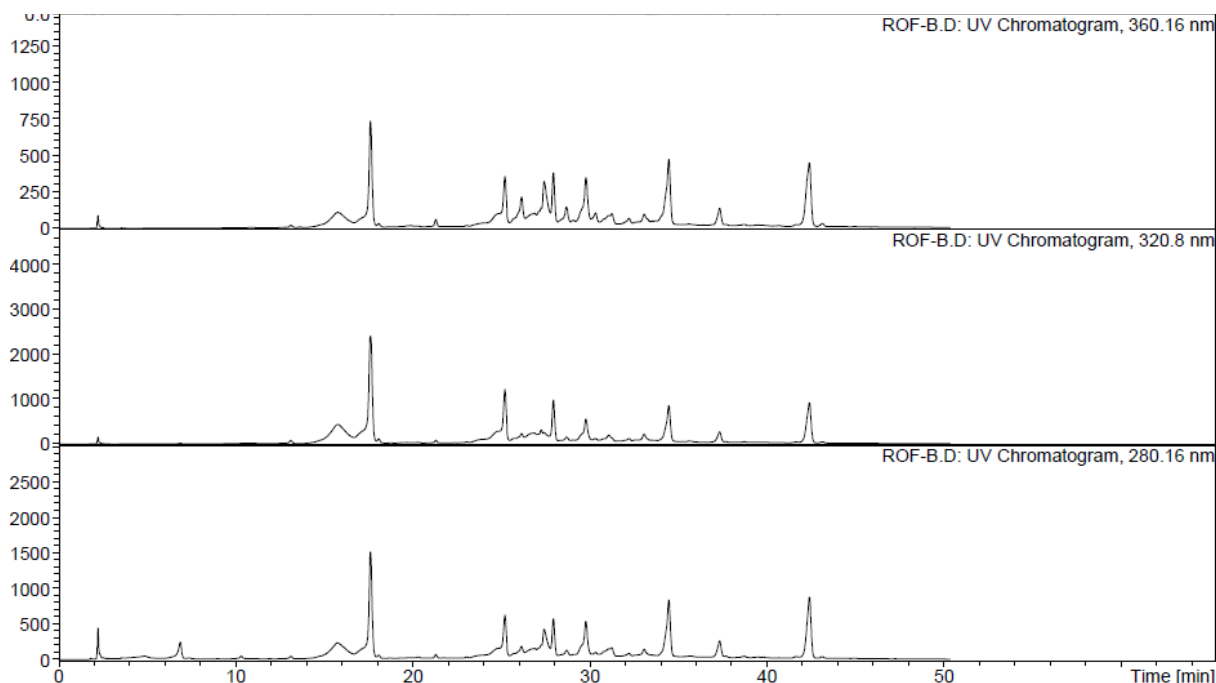


Figure-48. Chromatogramme HPLC de la fraction B de l'extrait *n*-butanol

Le chromatogramme de la fraction B présente plusieurs pics entre la dixième et la cinquantième minute ce qui montre un profil riche en polyphénols aussi bien aglycones qu'hétérosides (les longueurs d'onde à 260 ,320 et 360 nm) ce qui nous a amené à pousser nos investigations afin d'élucider certaines structures que nous nous sommes permis de proposer.

Identification du produit B1

Le produit **B1** apparaît à 13.0 min. avec $m/z = 352.8$ qui correspond au pic quasi moléculaire $[M-H]^-$, son spectre MS^2 (figure-49) montre la présence des fragments suivants : $m/z = 190.8$ (35%), 178.9 (19%). Ces fragments et leurs intensités son en faveur de 3-*o*-cafféoylquinique acide [N. MIKHAEL et al 2003].

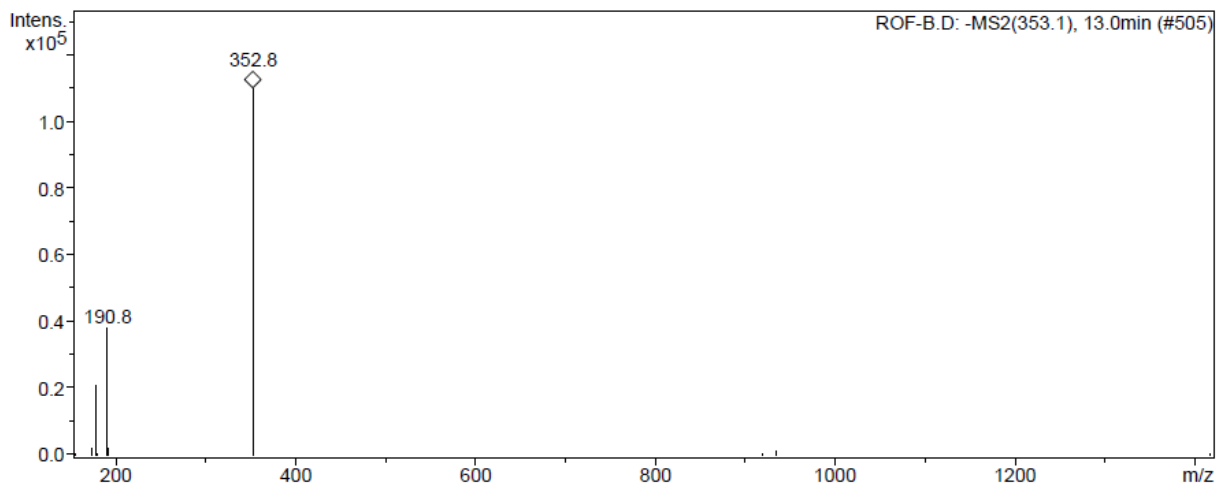
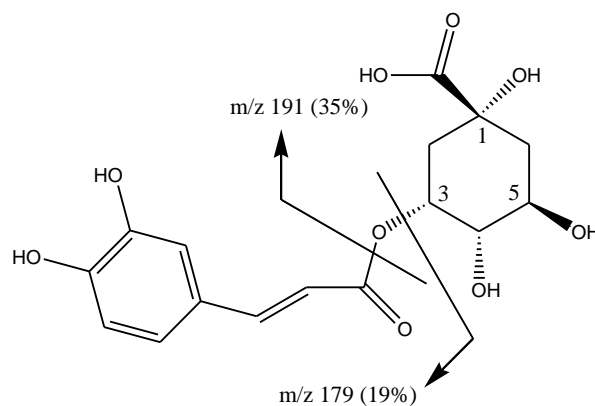


Figure-49. Spectre de masse ESI du produit **B1**



Structure du composé B1

Identification du produit B2

Le produit **B2** apparaît à 21.3 min. avec un $m/z = 593.2$ qui correspond au pic quasimoléculaire $[M-H]^-$ et son spectre MS^2 (figure-50) donne les fragments suivants : $m/z = 503$ (25%), 473.0 (100%) et 353.0 (51%) qui correspondent respectivement à $[M-H-90]^-$, $[M-H-120]^-$ et $[M-H-120-120]^-$. Ces fragments confirment la présence de deux hexoses et leurs conjonctions par des liaisons C-C à la génine, enfin la nature de l'aglycone comme étant l'apigénine est confirmée par la présence du fragment $[aglycone+113]^-$ à $m/z = 383$ (30%) [Ferrerres, F et al 2003].

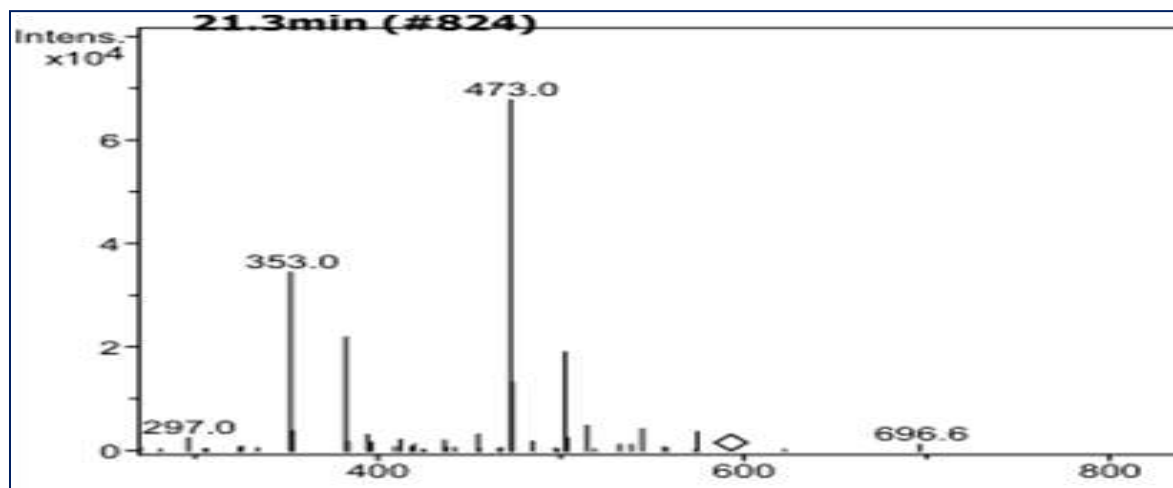
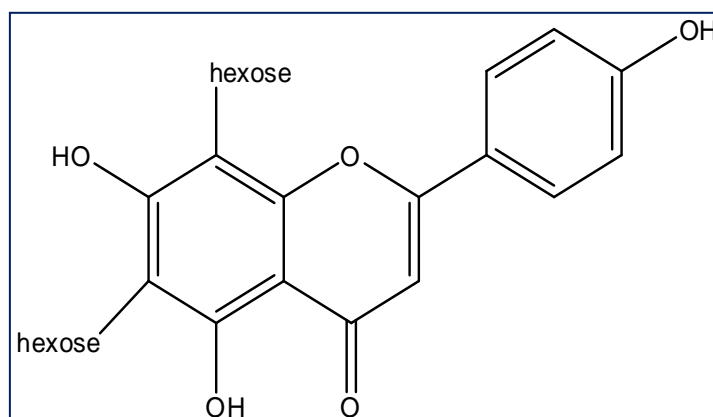


Figure-50. Spectre de masse ESI du produit **B2**

Les sucres sont liés aux positions 6 et/ou 8 seulement des flavone-C-glycosides, le produit **B2** a été identifié comme étant : l'**apigénine-6,8-di-C-hexoside**



Structure du composé B2

Identification du produit B3

Le produit B3 apparaît à 32.1 min. avec $m/z = 431.4$ $[M-H]^-$ et son spectre MS2 (figures-51-52) montre l'existence d'un fragment à $m/z = 268.8$ qui correspond à la perte d'un hexose (-162), vu que le site de glycosylation la plus probable est la position 7 alors la structure proposée pour ce produit est l'**apigénine-7-O-hexoside**.

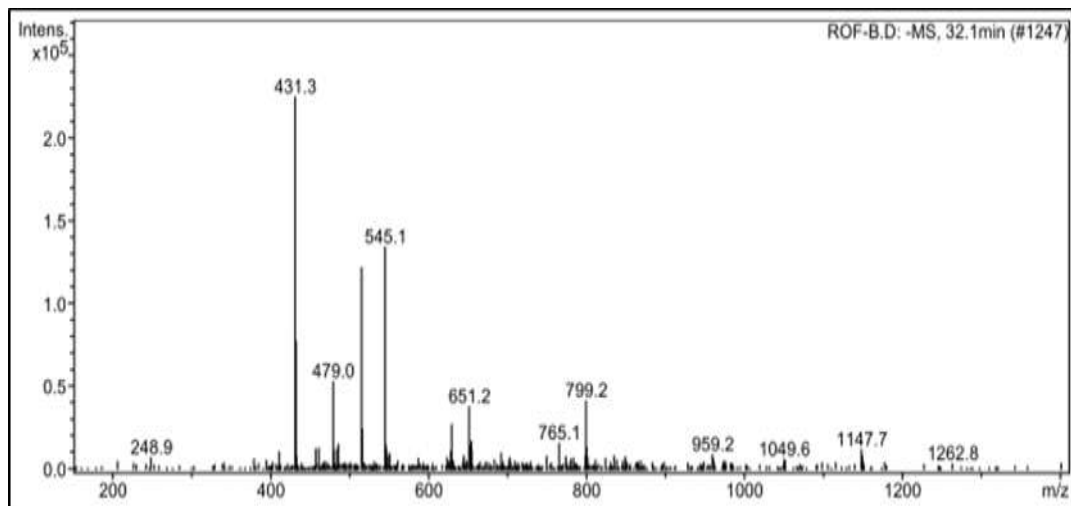
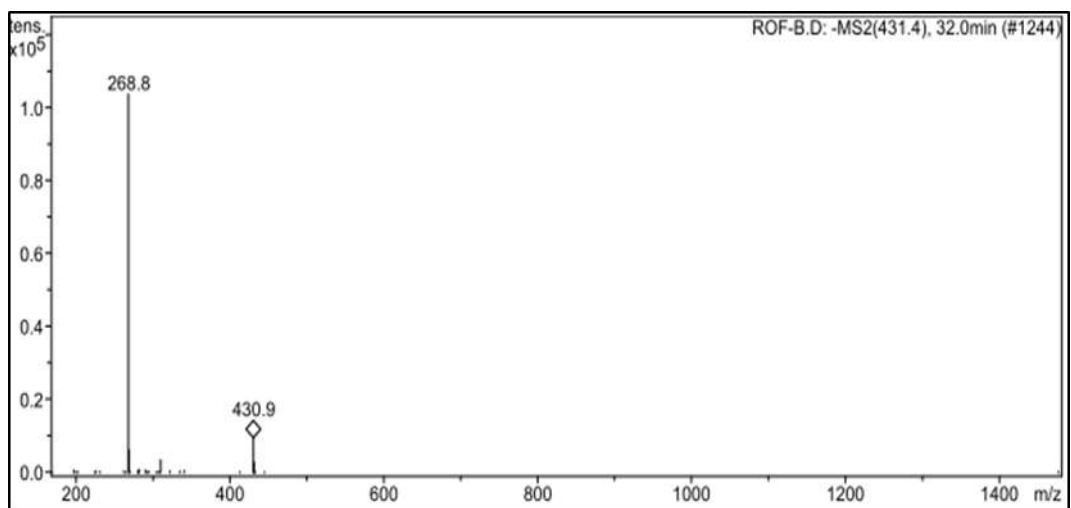
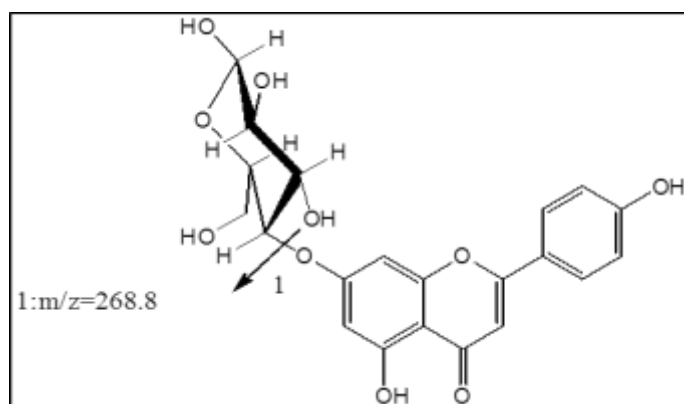


Figure 51: Spectre MS du produit B3

Figure 52: Spectre MS² du produit B3

Structure du composé B3 :l' Apigénine 7-O-glucoside

Analyse de la fraction D

L'analyse de la fraction D de l'extrait *n*-butanol de *Calamintha baborensis* par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a donné le chromatogramme suivant (figure-53) :

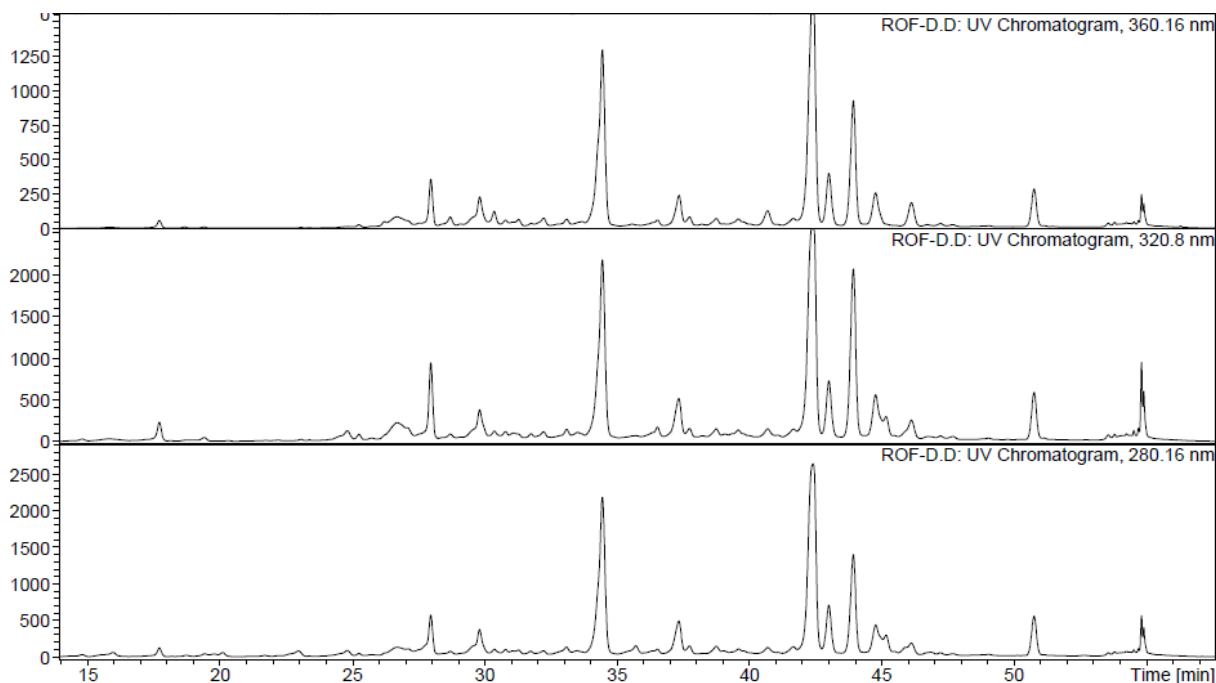


Figure-53. Chromatogramme de la fraction D

De même que pour la fraction B déjà étudiée le profil du chromatogramme montre une fraction D riche en composés phénoliques.

Identification du produit D1

Le produit D1 apparaît à 15.9 min. avec $m/z = 352.8$ (58%) qui correspond au pic quasimoléculaire $[M-H]^-$, son spectre MS^2 (figure-54) montre la présence des fragments suivants : $m/z = 190.8$ (100%), 179.0 (2%). Ces fragments et leurs intensités sont en faveur de 5-O-cafféoylquinique acide [Michael et al. 2003], qui est un isomère du produit B1.

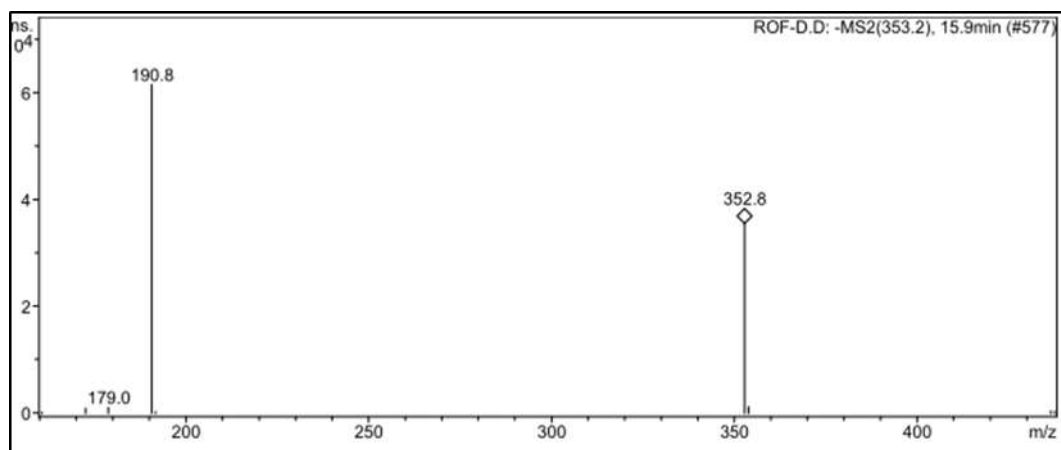
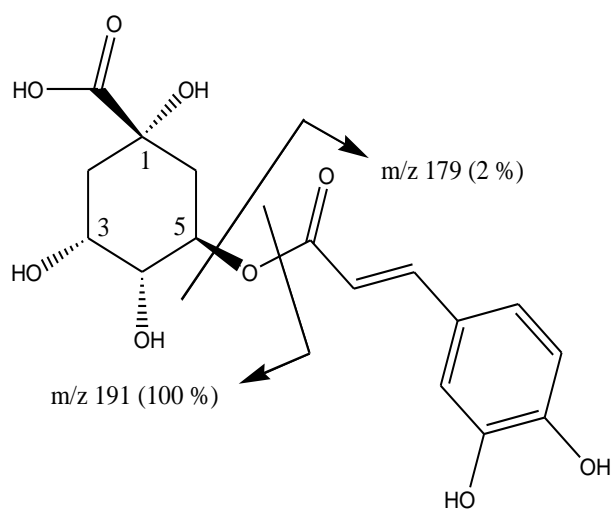
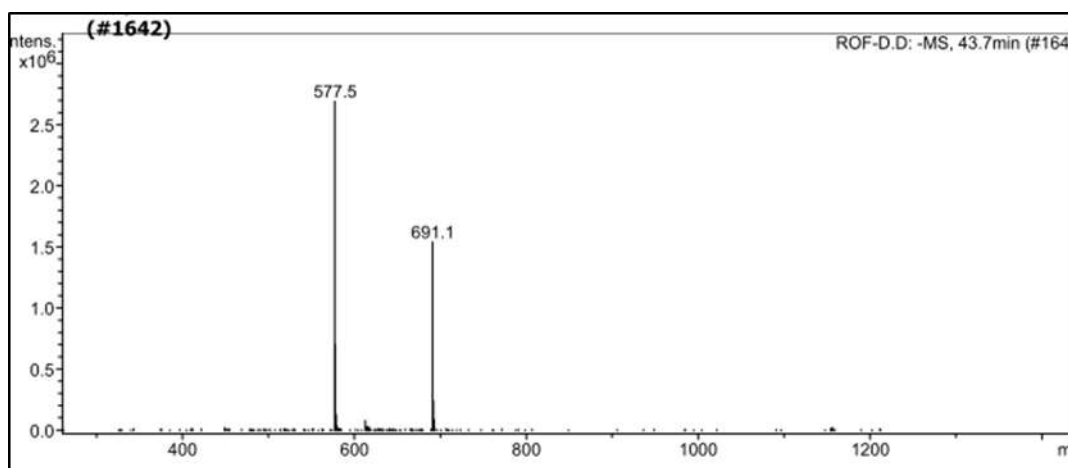


Figure 54 : Spectre de masse ESI du produit **D1****Identification du produit D2**

Le produit **D2** apparaît à 43.7 min. avec $m/z = 577.5$ pour $[M-H]^-$ et son spectre MS^2 en mode négative (figure-55) présente les fragments à $m/z = 268.8$ (100%) qui correspond à la perte de 308 (-162-147) dont la conjonction entre les deux sucres est indéfini qui confirme la présence d'un hexose et du déoxyhexose. dont la conjonction entre les deux sucres est indéfini. Alors, la structure proposée est : l' **Apigénine-7-*o*-deoxyhexosyl-hexoside**

**Figure 55** : Spectre MS du produit **D2**

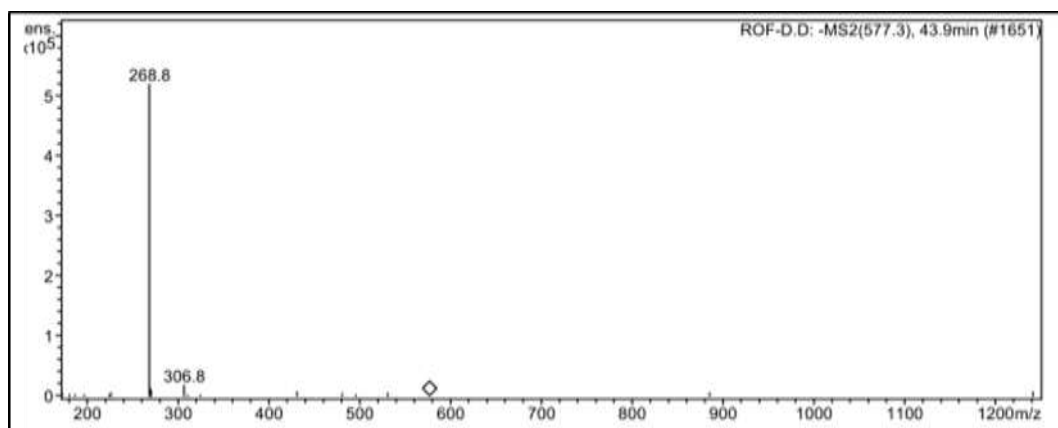
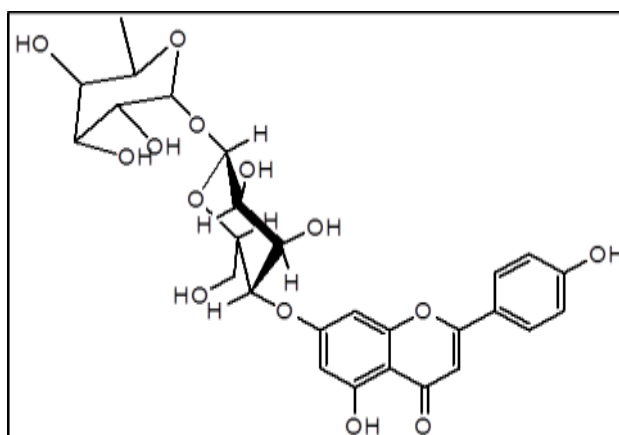


Figure 56 : Spectre MS² du produit D2



Structure du composé D2: apigénine-7-O-glucosylrhamnose (ou isomères)

Identification du produit D3

Le produit **D3** apparaît à 47.6 min. avec $m/z = 577.4$ pour $[M-H]^-$ et son spectre MS² en mode négative (figure-57) présente les fragments à $m/z = 430.9$ (27%), 306.9 (3%), 268.9 (100%), qui confirme la présence d'un hexose et du déoxyhexose. Alors, la structure proposée est: **Apigénine-7-o-deoxyhexosyl-hexoside** (isomère de **D2**).

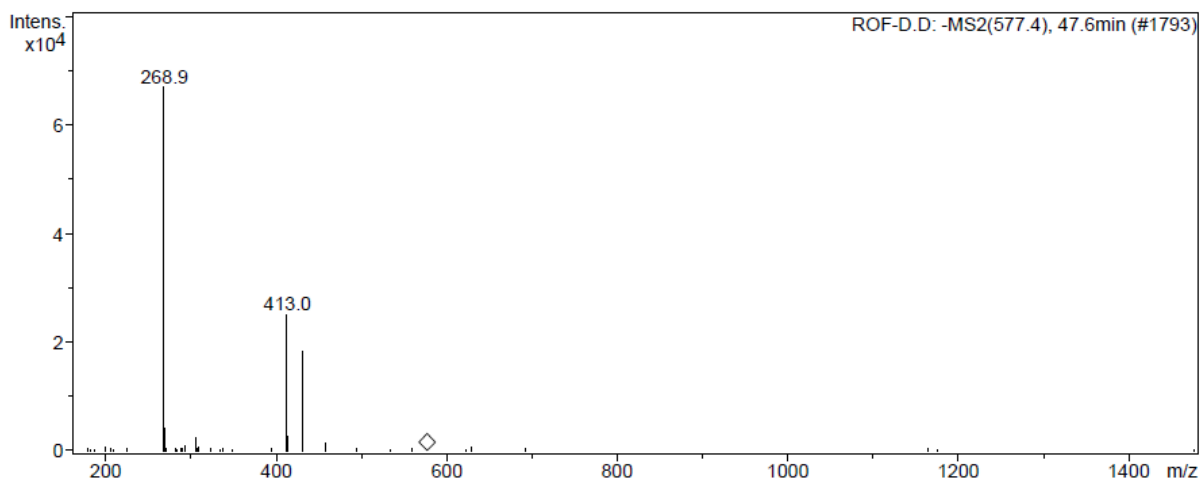


Figure-57. Spectre de masse ESI du produit D3

Partie activité biologique

Cette partie a été consacrée à l'étude de certains extraits des deux plantes par rapport à leur teneur en polyphénols (dosage des polyphénols totaux) ces derniers étant en grande partie responsables de leur activité antioxydante ce qui nous a amené à faire l'étude de leur activité antioxydante par des tests connus comme celui du DPPH, FRAP, ABTS et l'ORAC celui-ci étant moins connu que les précédents. Par ailleurs nous avons complété notre étude par des tests antimicrobiens .

A-protocole expérimental

A-1- Dosage des polyphénols totaux des deux plantes :

Les deux extraits acétate d'éthyle et butanolique des deux plantes ont été soumis à ce dosage. La réaction est basée sur la réduction de l'acide phosphomolybdique du réactif Folin-ciocalteu (un acide de couleur jaune, constitué de polyhétérocycles acides contenant du molybdène et du tungstène) par les polyphénols en milieu alcalin (CATALANO, 1999).

Elle se traduit par le développement d'une coloration bleu foncée due à la formation d'un complexe molybdène tungstène mesurée au spectrophotomètre.

Le réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration produite, dont l'absorption est mesurée à 760 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents

dans l'extrait végétal (RIBEREAU. P, 1968). La concentration en composés phénoliques totaux exprimée en mg d'acide gallique équivalent (GAE)/100g d'extrait a été déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant l'acide gallique comme standard (SINGLETON V.L 1965) comme le souligne la figure 58 et le tableau 24

Concentration en mg/l d'acide gallique	Absorbance
0	0,0825
20	0,1245
40	0,3712
60	0,5214
80	0,7621
100	0,9233

Tableau 24 l'absorbance en fonction des concentrations en mg/ml d'acide gallique

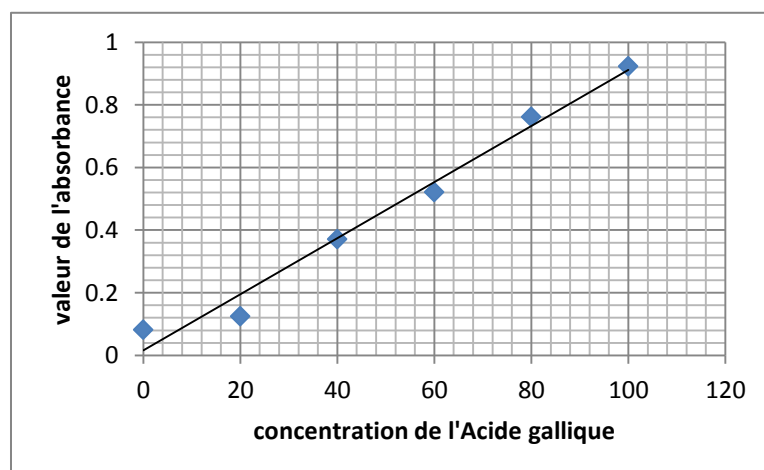


Figure 58 : la courbe d'étalonnage

Le dosage des polyphénols est effectué par la méthode de SINGLETON et ROSI, 1965 reportée par DOGYAN et al., 2005. En effet, 200 µl d'extrait d'échantillon d'une concentration de (1 mg / mL) ont été ajoutés à 1,0 ml de réactif Folin Ciocalteu (dilué au 1/10 avec de l'eau) et 0,8 mL de solution à 7,5% de carbonate de sodium Na_2CO_3 ont été ajoutés après 5 min. Le mélange est laissé 30 mn et l'absorbance est mesurée à 765 nm contre un blanc, avec un spectrophotomètre 300 LC UV Visible. La teneur en composés phénoliques

totaux est exprimée en équivalent d'acide gallique (GAE) en mg /L d'extrait comme le montre le tableau 25.

Tableau 25: La teneur en composés phénoliques totaux des deux plantes

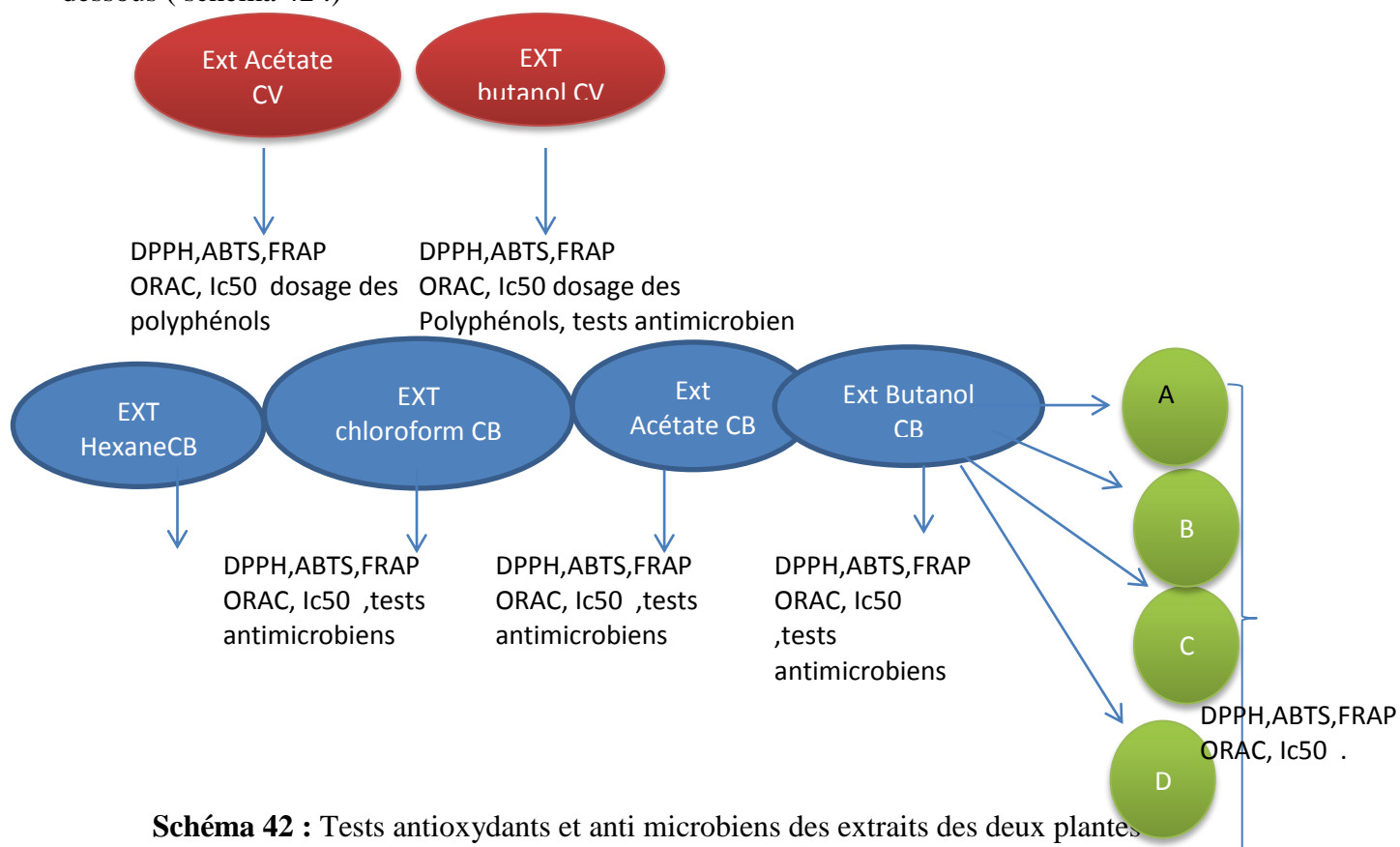
Extraits	C	TPC(A)
EtOAc <i>Calamintha</i>	mg/mL	7 ± 0.01
BuOH <i>Calamintha</i>	mg/mL	7.33 ± 0.02
EtOAc <i>Cistus villosus</i>	mg/mL	60 ±0.01
BuOH <i>Cistus villosus</i>	mg/mL	22.23±0.02

A : mg d'acide gallique /g de poudre C : Concentration

A-2 activité antioxydante

Les tests de l'activité antioxydante ont été fait sur certains extraits des deux plantes (CV pour *Cistus villosus* et CB pour *Calamintha Baborensis*) ainsi les extraits obtenus après affrontements par les divers solvants et qui sont concernés par ces tests sont schématisés ci-

dessous (schéma 42 :)



a-L'activité antiradicalaire DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl)

L'activité antioxydante DPPH a été évaluée selon la méthode citée PAR (BRAND WILLIAMS W., 1995), (SANCHEZ, C, MORENA 1998). Afin d'estimer la capacité de piégeage de DPPH^{*} (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) à 0,1 ml de chacun des extraits étudiés on a ajouté 3,9 mL de solution de méthanol DPPH fraîchement préparée à $6,39.10^{-5}$ M à température ambiante. Après 30 min dans l'obscurité, l'absorption a été mesurée à 515 nm par le spectrophotomètre thermo Scientific evolution 300LC-UV-Visible en référence à un blanc, l'effet piègeur est calculé à partir de la diminution de l'absorbance contre le témoin. Le RSC (capacité de piégeage des radicaux) a été exprimé en pourcentage d'inhibition du trolox (acide 6-hydroxy-2.5.7.8-tétraméthylchroman-2-carboxylique) en utilisant une courbe d'étalonnage préparée. L'étendue de l'extinction du radical DPPH par l'extrait a été comparée à des quantités standards de Trolox. Les concentrations d'étalon de Trolox utilisées pour la courbe d'étalonnage étaient (10,50, 100, 250, 500, μ M).

% scavenging = $\frac{\text{abs du contrôle} - \text{abs de l'échantillon}}{\text{abs du contrôle}} \times 100$

L'abs du contrôle est l'absorbance de la solution de DPPH

L'abs de l'échantillon est l'absorbance de l'échantillon à tester.

Tous les tests ont été réalisés en trois fois.

b-L'activité anti radicalaire par le test ABTS :

La détermination de la capacité de piégeage de la solution ABTS^{*+} a été estimée par la méthode de PELLEGRINI 1999. Le cation radical ABTS a été généré en faisant réagir l'ABTS (acide 2,2'-azinobis- (3-éthylbenzothiazolin-6-sulfonique), 7,0 mM et le persulfate de potassium nous avons laissé le mélange reposer dans l'obscurité à température ambiante pendant 12 à 16 heures, de sorte que la solution ABTS^{*+} a été diluée avec du PBS (Phosphate Buffered Saline), (Gibco®, NY, ETATS-UNIS); pH 7,4; 10 mM) pour atteindre une absorbance de 0,70 à 734 nm. 10 μ l de chaque extrait cité ci-dessus ont été ajoutés avec un pipetman calibré à 990 μ l de solution de travail ABTS; après 10mn de réaction dans l'obscurité la lecture de l'absorbance est prise par un spectrophotomètre de marque (Thermo Scientific Evolution 300LC UV Visible) en référence à un blanc. L'effet piègeur a été exprimé en valeur TEAC (capacité antioxydante équivalente au Trolox).

% scavenging = $\left[\frac{\text{abs du contrôle} - \text{abs de l'échantillon}}{\text{abs du contrôle}} \right] \times 100$

L' abs du contrôle : est l'absorbance de la solution ABTS

L'abs échantillon est l'absorbance de l'échantillon. Tous les tests ont été réalisés trois fois .

c-L'activité antiradicalaire par le test FRAP:

La capacité des extraits de plantes à réduire l'ion ferrique en ion ferreux (dosage FRAP) est un autre test fréquemment utilisé pour évaluer le pouvoir antioxydant (BENZIE, I.F.F, 1996). L'ion ferreux (Fe^{2+}) produit dans ce test forme un complexe bleu (Fe^{2+} / TPTZ tripyridyltriazine complex.) absorbant à 593 nm. Brièvement, le réactif a été préparé en mélangeant un tampon acétate (300 mM, pH 3,6), une solution de TPTZ 10 mM dans HCl 40 mM et $FeCl_3(6H_2O)$ 20 mM dans un rapport en volume 10: 1: 1 . Premièrement, 1 ml de réactif FRAP fraîchement préparé a été versé dans une cuve dont l'absorbance (A_0) du réactif témoin a été lue à 593 nm, puis l'absorbance d'un mélange de 1 mL de FRAP et de 100 μ L d'échantillon ou Trolox a été mesurée après 4 mn d'incubation, avec un spectrophotomètre (300LC UV Visible) .Le pouvoir antioxydant réducteur ferrique (FRAP) a été calculé en mmol Trolox / mL.

d-L'activité antiradicalaire par le test ORAC: (Oxygen radical absorbance capacity)

Sur la base de la méthodologie décrite par (HELD.P . 2013), 20 μ L de chaque extrait (mg / mL) ont été dilués 50, 100, 200 dans du tampon phosphate (pH 7.4) et 20 μ L de blanc (tampon phosphate) ont été pipetés dans des puits appropriés ont été préparés en fonction de l'activité antioxydante de chaque échantillon analysé. Une aliquote (20 μ L) des solutions d'étalonnage diluées simples ou vierges (tampon phosphate) ou Trolox (6,25, 12,5, 25, 50 μ M) a été ajoutée à un puits dans une microplaque à 96 puits (Costar, New York, USA). 200 μ L de solution de travail de fluorescéine à 0,095 μ M ont été ajoutés à chaque puits de plaque, puis la microplaque a été incubée à 37 ° C pendant 15 min avant d'ajouter une aliquote de 20 μ L de solutions AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride) (79,6 mM) dans chaque puits sous forme de radicaux peroxyde générateur pour démarrer la réaction. Le lecteur de microplaques (lecteur de microplaques à détection multiple (SynergyTM HT), Biotek Instruments, Winooski, VT, USA) a été programmé pour lire la fluorescence avec une longueur d'onde d'excitation de 485 nm et une longueur d'onde d'émission de 528 nm pendant 1 h30min en utilisant le logiciel GEN 5TM (HELD P . 2013). Les valeurs ORAC finales ont été calculées en utilisant un modèle de régression linéaire ($Y = aX + b$) entre la concentration du Trolox (μ M) et la surface nette sous la courbe de décroissance de la fluorescéine (figure

59) . Les données sont exprimées en micromoles d'équivalents Trolox (µmol TE) pour 100 g de poids frais d'échantillon. L'aire sous la courbe (AUC) a été calculée en utilisant l'équation suivante:

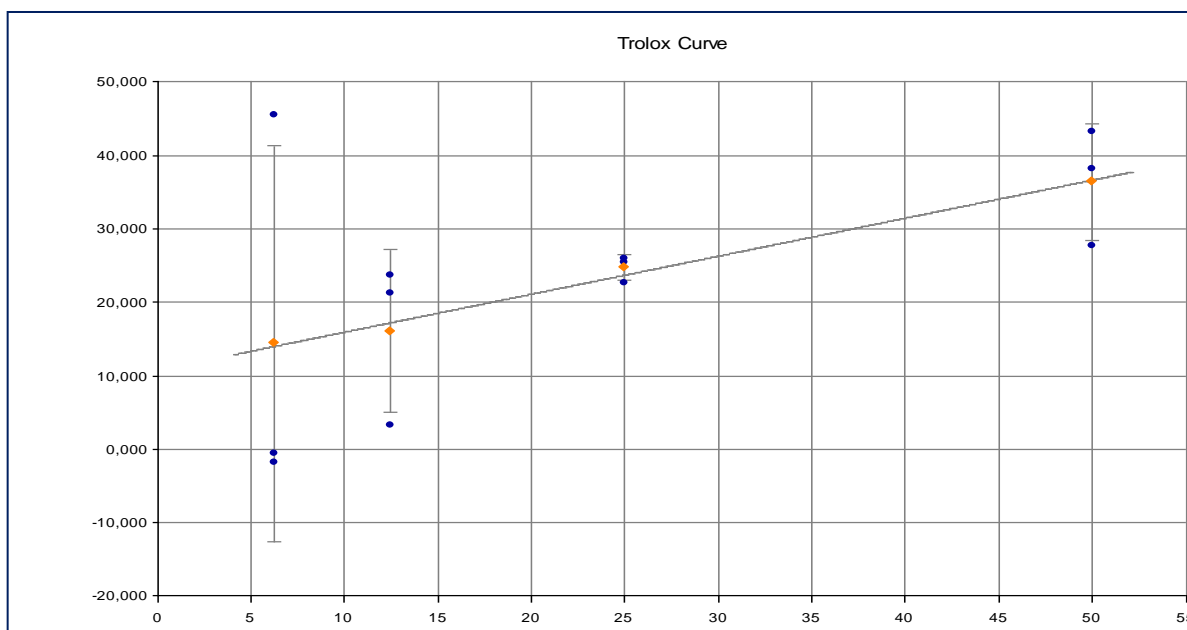
$$AUC = 1 + (R2 / R1) + (R3 / R1) + \dots + (R91 / R1)$$

Où : R1 = la lecture de fluorescence initiale,

R91 = la dernière lecture de fluorescence à la 91ème min.

L'AUC ; (area under the curve) nette a été obtenue en soustrayant l'AUC du blanc de celle d'un échantillon.(Net AUC = AUCsample – AUC blank).

AUC nette= AUC échantillon – AUC blanc figure 59



Nom de la courbe	Formule de la courbe	A	B	R ²
Trolox	Y=A*X+B	0,518	10,8	0,991

Figure 59 courbe du Trolox

La figure 59 montre les différentes valeurs de l'aire sous la courbe de décroissance de la fluoresceine obtenue à partir des différentes concentrations utilisées du Trolox, c'est une courbe à progression linéaire avec un R^2 égal à 0.99.

B-Résultats et discussions

B-1- *Calamintha baborensis*

Le tableau 26 suivant montre les différents tests anti radicalaires effectués sur les différents extraits de cette plante.

Tableau 26: Différents tests antiradicaux effectués sur *Calamintha baborensis*

	Hex	Chlo	AcOEt	BuOH	A	B	C	D
ABTS ^a % scaveng	6.9± 0.29	7.12± 1.31	68.9± 0.22	27.67± 0.05	46.06± 0.08	81.78± 0.19	40.41± 0.13	32.66± 0.07
DPPH ^{a*} % scavenging	58.6± 0.017	76.85± 0.14	81.70± 0.09	80.99± 0.09	62.02± 0.14	82.66± 0.03	84.24± 0.07	84.59± 0.03
FRAP $\mu\text{M}/\text{mg}$	36.5± 0.07	23.9± 0.08	18.47± 0.1	19.52±0. 13	32.2± 0.10	18.85±0. 10	17.85±0. 01	18.35± 0.06
ORAC ^b $\mu\text{M}/\text{mg}$	<4.06	8.35 ^c	37.28 ^d	21.73 ^d	> 52.8	>52.8	> 52.18	32.92 ^d
IC ₅₀	68.7 ^a	68 ^a	23 ^c	53.5 ^b	39.9 ^b	13.47 ^c	40.4 ^b	49.8 ^b

a: concentration des échantillons en mg / mL dilution 1/100

a *: concentration des échantillons en mg / mL

b: Différentes concentrations de Trolox en μM 6,25 ; 12,5 ; 25 ; 50.

c: dilution de l'échantillon à 20 μg / mL

d: dilution de l'échantillon à 10 μg / mL

Discussion des résultats:

La présence de différents antioxydants dans les tissus végétaux rend difficile la quantification des extractions (fractions) utilisées pour assurer une extraction maximale des antioxydants disponibles (DORMAN, H.I.D .2004). La mesure RSC (capacité de piégeage des radicaux) dans DPPH et les analyses ABTS⁺ sont des méthodes faciles, rapides et sensibles et par conséquent les plus fréquemment appliquées pour l'évaluation préliminaire du pouvoir

antioxydant de diverses substances naturelles. Le DPPH a été largement utilisé comme source de radicaux libres pour évaluer les substances réductrices (COTELLE, N . 1996). C'est donc un réactif utile pour étudier les activités d'élimination des radicaux libres des composés. Les quatre extraits testés de *Calamintha baborensis* montrent un pourcentage élevé d'inhibition du radical DPPH de 58,6 à 81,7% dans l' ABTS⁺. Les extraits : hexanoïque et chloroformique ont donné un pourcentage d'inhibition plus faible (6,90% et 7,12%) la raison est probablement due au prétraitement de l'échantillon (solubilité dans le chloroforme) l' ABTS⁺ est utilisé pour les composés hydrophiles utilisant des solvants polaires. Dans ce test,(FRAP) l'activité antioxydante est déterminée sur la base de la capacité à réduire le fer ferrique (III) en fer ferreux (II) et les résultats sont exprimés en mg d'équivalent de fer ferreux par ml d'échantillon. Le pouvoir réducteur ferrique des différents extraits était de l'ordre de 19,52 à 36,5 mg Fe (II) / ml (**tableau 19**). L'extrait d'acétate d'éthyle donne le pouvoir antioxydant le plus élevé avec les différentes méthodes sauf avec le dosage FRAP. La différence observée peut être expliquée par les différentes polarités du solvant et le pH dans les milieux réactionnels (KOLEVA, I.I. 2002) pour le test ORAC l'extrait à l'acétate d'éthyle et les extraits butanoliques montrent un pouvoir antioxydant élevé avec des concentrations de 37,28 et 21,73 μM / mL respectivement. Les quatre fractions A, B, C, D de polarité croissante appartenant à la fraction butanolique ont donné de bons résultats en accord avec les différents tests ci-dessus; on remarque cependant que le pouvoir antioxydant des molécules dans un même extrait n'est pas nécessairement le même que lorsqu'elles sont séparées (pouvoir synergique). Les composés phénoliques totaux des fractions polaires de *Calamintha baborensis* contenues dans cette plante sont respectivement d'environ 7 et 7,33 mg GAE / g de poids sec dans les fractions AcOEt et BuOH, soit pratiquement la même quantité que dans le **tableau 18**. Contre 3,71 et 9,46 dans AcOEt et BuOH de *Calamintha clinopodium* mg GAE / g poudre (KHOUIJA, KHALED 2014) ,(STAGOS, D . 2012) ont rapporté dans leur étude sur le contenu phénolique de 24 espèces de *Lamiaceae*, entre 91 et 575 mg GAE / poids sec ces valeurs sont plus élevées que celles dans la présente étude le potentiel antioxydant des extraits de *C. grandiflora* a été évalué par le DPPH et l' ABTS⁺. L'élimination des radicaux libres, la réduction des ions ferriques (FRAP) et par l'effet sur la peroxydation de l'huile. La teneur en composés phénoliques totaux, flavonoïdes et flavonols a été déterminé par spectrophotométrie. Les acides C rosmariniques et salvianoliques ont été identifiés comme principaux antioxydants chez *C. grandiflora* (DOBRAVALSKYTE, D. 2012).

Par ailleurs une étude a été entreprise pour étudier l'activité antioxydante des extraits bruts et des composés purs des parties aériennes de *Calamintha officinalis* Moench. (*Lamiaceae*) deux acides hydroxycinnamiques, connus, ont montré une activité puissante : l'acide rosamarinique (1) et l'acide caféique(2). L'acide rosamarinique et l'acide caféique ont tous deux montré une activité significative, encore plus que le contrôle positif :le glibenclamide

Des travaux précédents ont montré que la quantité de composés phénoliques dans les plantes dépend des conditions édaphiques et environnementales (température, intensité lumineuse, salinité et stress hydrique) ainsi que des facteurs biologiques (génotype, organe et antogénie). Par ailleurs, la solubilité des composés phénoliques est due au type de solvant (polarité) utilisé, au degré de polymérisation et à leur interaction (KSOURI, R. 2008).

B-2- *Cistus villosus*

De même que pour la plante précédente le tableau 27 montre les résultats des tests antioxydants effectués sur les extraits Acétate d'éthyle et n-Butanol de cette plante

Tableau 27 : Différents tests antioxydants effectués sur les fractions polaires de *Cistus villosus* :

Extraits étudiés	Acétate d'éthyle	Butanolique
DPPH ^{a*} % scaveng	74.63	57.41
ABTS ^a % scaveng	44.24	64.15
FRAP μ M/mg	19.72	19.27
ORAC ^b μ M/mg	<4.06	30.70
IC ₅₀	42.3	51.2

Discussion des résultats

Les deux extraits acétate et butanol de l'espèce *C.villosus* montrent un résultat supérieur à 50% pour le test au DPPH (74.63% pour l'extrait acétate et 57.41 pour l'extrait butanol) ce qui est un bon résultat en soit avec le test ABTS les deux valeurs sont satisfaisantes sauf qu'elles se sont inversées en faveur de l'extrait butanol avec une valeur de 64.15% pour ce qui est du test FRAP il semble que les deux extraits ont donné le même effet mais avec une valeur plutôt conséquente(19.72 μ M/mg) pour le test ORAC l'extrait butanolique a donné un bon résultat avec une valeur de 30.70 μ M/mg.

L'étude récente d'une équipe tunisienne(MAHMOUDI, H. 2016.) a été faite sur les feuilles de deux espèces connues de ciste (*salvifolius* et *monspeliensis*).Des trois extraits étudiés (Ethanol, Hexane et aqueux) le premier a été celui qui contenait le plus de polyphénols

comparé à celui de l'hexane et aqueux pour les deux espèces *Salvifolius* et *Monspeliensis* (49.98 ± 3.39 et 56.40 ± 1.61 mg GAE/g de matière sèche). Pour les activités antioxydantes avec le DPPH et l'ABTS les extraits polaires (aqueux et éthanolique des deux espèces ont donné les meilleures activités en effet, l'extrait éthanolique de l'espèce *C. Salvifolius* a donné la plus grande valeur d'activité que celles de l'espèce *C. Monspeliensis* avec le DPPH (0.13 contre $0.24 \mu\text{g/ml}$ pour les IC_{50}) et (16.75 contre $18.92 \mu\text{g/ml}$) pour l'ABTS alors que l'extrait aqueux de *C. Monspeliensis* a donné la meilleure activité (1.22 contre $1.29 \mu\text{g/ml}$) pour le DPPH et 24.12 contre 29.75 pour l'ABTS ; les résultats de cette étude effectués sur le même genre mais deux espèces différentes semblent être en accord avec ceux qu'on a obtenu avec nos extraits polaires (acétate et butanol) l'activité anti radicalaire est probablement due à la présence de polyphénols qui eux se trouvent généralement dans les extraits polaires.

A-3-Etude de l'activité antibactérienne :

Les substances phénoliques ont généralement une activité antimicrobienne importante et il est supposé que leur fonction dans les tissus où elles s'accumulent pourrait être celle de fournir des barrières chimiques aux micro-organismes envahisseurs. Il a été postulé que les flavonoïdes méthylés et lipophiles sont particulièrement appropriés comme protection contre les organismes pathogènes, en raison de leur facilité de pénétration dans les cellules bactériennes (WILLIAMSON et al. 2000).

A3-1- Cistus villosus

En raison de ces hypothèses, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'activité antibactérienne de l'extrait butanolique de *cistus villosus*. Le test de diffusion a été appliqué à quatre souches bactériennes. Les résultats résumés sont présentés dans le tableau 21:

Les souches de microorganismes: toutes les bactéries (souches standard; *E. coli* ATCC25922, *Pseudomonas aerogenosa* ATCC27853 et souches cliniques; *Klebsiella pneumoniae*, *staphylococcus aureus*) ont été obtenues au laboratoire de bactériologie du centre hospitalier de Constantine (CHU).

Il a été montré que l'extrait *n*-butolique de *Cistus villosus* empêchait la croissance de tous les microorganismes testés avec un diamètre moyen de la zone d'inhibition augmentant proportionnellement aux concentrations des échantillons testés. L'inhibition obtenue variait

de 6,00 à 27.00 mm avec une zone d'inhibition maximale vis-à-vis *Klebsiella pneumoniae* à $2.10^3 \mu\text{g} / \text{mL}$. M.

A-3-1-1-Activité antimicrobienne:

Le test antimicrobien a été réalisé sur l'extrait butanolique de *Cistus villosus* en utilisant la méthode de diffusion Agar-Agar (NCCLS), contre quatre bactéries pathogènes humaines, y compris les bactéries Gram positives (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aerogenosa* ATCC27853); gram négative (*E.coli* ATCC25922 et *Klebsiella pneumonia*).

Les souches bactériennes ont d'abord été cultivées sur du milieu Muller Hinton (MHI) à 37 °C pendant 24 h avant l'ensemencement sur la gélose nutritive et l'extrait a été monté sur des disques de papier filtre stériles (6 mm de diamètre) aux concentrations suivantes (2000, 100 et 25 $\mu\text{g} / \text{mL}$) les disques ont été placés sur le milieu d'agar inoculé. Les disques de Pétri traités ont été conservés à 4 °C pendant 1 heure et incubés à 37 °C pendant 24 heures. L'activité antibactérienne a été évaluée en mesurant la zone d'inhibition de la croissance entourant les disques. Chaque expérience a été réalisée trois fois (tableau 28)

Tableau 28: Effet inhibiteur de l'extrait *n*-butanolique de *Cistus villosus*:

Souches bactériennes	25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$
<i>E.coli</i> ATCC25922(gram+)	12	19.33	25.00 \pm 0.00
<i>Klebsiella pneumonia</i>	13.00	16 \pm 0.5	27.00 \pm 1.52
<i>Staphylococcus aureus</i> (gram -)	17.66	19.00 \pm 00	25.33 \pm 0.57
<i>Pseudomonas aerogenosa</i> ATCC27853(gram-)	6.0 \pm 1.73	12.33 \pm 1.52	19.00 \pm 0.57

A-3-1-2-évaluation du test :

Les tests antimicrobiens ont donné le meilleur résultat avec *Klebsiella pneumonia* avec un diamètre d'inhibition de 27.00 mm et une concentration de 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Des études antérieures ont rapporté que les bactéries à Gram positif sont plus sensibles aux huiles et extraits végétaux que les bactéries à Gram négatif (MAHBOUBI; HAGHI, 2008; BOUKHEBTI et al., 2011), en raison de la présence de lipopolysaccharide hydrophobe dans

la membrane externe des bactéries à gram-négative (qui fournit une protection contre plusieurs agents) (NIKAIDO; VAARA, 1985). Cependant, aucun des deux extraits éthanoliques des deux espèces de cistus étudiées déjà citées (MAHMOUDI, H. 2016.) (*salvifolius* et *monspeliensis*) n'a montré une sélectivité vis-à-vis d'une activité antimicrobienne basée sur la différence due à la paroi cellulaire bactérienne Cette constatation est distincte de celle de extraits de *C. ladaniferus* et *C. monspeliensis* qui étaient nettement plus actifs contre es bactéries à gram positive que celles à Gram négatif (BENAYAD . 2013). Les activités antimicrobiennes des deux extraits éthanol de feuilles de cistus (*salvifolius* et *monspeliensis*) étaient comparables à une gamme d'extraits développés à partir d'autres espèces dans ce genre. (BOUAMAMA . 1999; 2006) ont rapporté que les extraits organiques et aqueux de *C. incanus* et *C. monspeliensis* se distinguait nettement par leur activités antimicrobiennes. Ici, l'extrait de *C. villosus* a montré une activité plus forte de *C. monspeliensis* lorsqu'il est utilisé sur *Staphylococcus aureus* (MIC 0.8 mg / ml) et de *Candida glabrata* (CMI 0,2 mg / ml). (GÜVENÇ .2005) ont démontré que les extraits à l'eau, méthanol, chloroforme, acétate d'éthyle et butanol de cinq espèces de ciste: *C. creticus*. L., *C. laurifolius*. L., *C. monspeliensis*. L., *C. parviflorus*. Lam. Et *C. salviifolius*. L. chacun a montré au moins une activité contre *B. subtilis* et *B. cereus*. Ici, les extraits lyophilisés ont montré une plus forte activité contre *S. aureus* et l'extrait butanol des extraits de feuilles et de fruits de *C. creticus* ont montré une plus forte activité contre *S. subtilis*, *S. faecalis*., *B. subtilis*, *B. cereus*., *E. coli*., alors que tous les extraits n'étaient pas actifs contre *P. aeruginosa* ou *C. albicans*. L'un des résultats précieux de cette étude est que espèces microbiennes démontrant les plus grandes zones d'inhibition (utilisant la méthode de diffusion sur disque) ne présentent pas nécessairement les MIC et MBC ayant les plus basses valeurs La taille de la zone d'inhibition n'a pas nécessairement été réduite. ceci ne reflète pas exactement l'efficacité antibactérienne d'un composé, car les zones d'inhibition peuvent être affectées par la solubilité de l'extrait, son domaine de diffusion dans la gélose, et son taux d'évaporation qui peut affecter la posologie efficace, entre autres (KIM , 1995; CIMANGA . 2002; HERNANDEZ .2005).

A-3-2- *Calamintha baborensis* Batt. :

A-3-2-1-Dosage de l'activité antibactérienne

Le pouvoir antibactérien des extraits a été évalué sur les extraits apolaire et polaire de la plante. Il a été déterminé par la méthode de diffusion discale (ANDREW, J. M. 2005, CHANWITHEESUK, A. 2007) en utilisant une suspension de bactéries *E. coli* ajustée à une concentration standard de 0,5 Mc Farland pour obtenir une dilution de solution connue. La concentration bactérienne équivalente à $1,5 \cdot 10^8$ cfu / mL. Cette suspension a été préparée à partir de culture fraîche de souche, réactivée dans un bouillon pour infusion de cerveau et de coeur (bouillon BHI) préparée en dissolvant 37 g /L d'eau distillée et incubée pendant 24 h, en ajoutant le microorganisme à tubes contenant une solution saline stérile dont la turbidité est mesurée au densitomètre (Densimat (Biomerieux) à une longueur d'onde de 600 nm.

Cette suspension a été étalée sur de l'agar BHI enrichi, préparé en pesant 52 g d'agar dans 1 litre d'eau distillée, autoclavée pendant 15 min à 121 °C, puis répartie dans des boîtes de Pétri.

Des disques filtres en papier Whatman stériles (Scheleider et Schull) de 6 mm de diamètre ont été imprégnés de 40, 60, 100 µl / disque / échantillon, puis placés à la surface de chaque boîte de Pétri, où elle avait été préalablement inoculée avec le microorganisme à analyser.

En tant que contrôle positif, on utilise l'oxytétracycline, la concentration en antibiotique était d'environ 8,33 mg / mL et on l'a diluée à 1/2, 1/3, 1/4 disque ont été imprégnées de 40 µL de chaque dilution. Comme contrôle négatif, nous avons utilisé de l'eau distillée. Les plaques d'échantillons testés ont été incubées à 37 °C pendant 24 h. Après incubation, le diamètre des zones d'inhibition est mesuré autour des disques et le résultat est exprimé en % d'inhibition contre l'organisme analysé. Les valeurs étaient la moyenne de cinq mesures par disque, prenant les trois directions pour minimiser les erreurs (OZTURK, S. 2007), le taux d'inhibition a été déduit de la relation suivante:

$$\% \text{ d'inhibition} = (R_c - R_s) \times 100 / R_c$$

R_c: rayon de croissance du témoin préparé avec de l'eau distillée stérile.

R_s: rayon de croissance en présence de l'extrait de plante.

A-3-2-2-Evaluation de l'activité antibactérienne

Les extraits apolaires de la plante *Calamintha baborensis* Batt. ont donné de bons résultats antibactériens contre *E. coli* avec un diamètre de zone d'inhibition de 19 mm et 19,2 mm (tableau 28) pour l'extrait Hexane et Chloroforme, respectivement, en comparant les

fractions A, B ,C des huiles essentielles obtenues à partir des parties aériennes de *Calamintha betulifolia* Boiss. et Bal recueillis dans trois localités différentes en Turquie, les résultats des effets antimicrobiens des huiles essentielles de *C. betulifolia* signalés pour la première fois, montrent les résultats de la CMI en mg / ml contre *E.coli* environ > 0,5 pour A, 0,125 pour B, 0,06 pour C (0,003 pour chloramphénicol standard) (KÜRKCÜOĞLU, M. 2007). Par ailleurs, *Calamintha nepeta* (L) savi de molina di quosa (Italie) montre une bonne action avec une valeur de CMI de (10 µg / ml) contre *E. coli* ATCC 25922 (PANIZZI, L. 1993). L'activité microbienne de l'huile de *Calamintha nepeta* (L) savi ssp *nepeta varisidonda* (borb) Hayek de Serbie a été criblée contre *E. coli* 95, ce qui a donné une zone de diamètre d'inhibition de 24,8 mm (1: 10) huile: éthanol, 20,2 mm (1: 20), 15,3 (1: 30), 14,7 (1: 50). Il a été constaté que tous les microorganismes étaient sensibles à l'huile, à toutes les dilutions, cependant, l'activité de l'huile a diminué avec les dilutions (KITIC,D. 2005), microbienne les recherches sur l'huile *C.nepeta ssp glandulosa* ont donné des résultats similaires dans les mêmes conditions (KITIC,D. 2002).

La comparaison faite sur les différentes espèces du genre *cistus* nous a apporté des éclaircissements quant au comportement de leur extraits apolaires vis-à-vis de différentes souches bactériennes. Nos extraits Hexane et Chloroforme (apolaires) de *C. baborensis* comparables aux huiles essentielles du même genre, sont riches en composés lipophiles qui traversent facilement les lames microbiennes elles-mêmes constituées de molécules à caractère lipidique cependant ces extraits ne réagissent pas de la même façon contre toutes les bactéries ce qui est prévisible vu que le meilleur résultat est celui avec un volume de 100 µL .

Les résultats sont donnés sous forme de figure 60,61,62 ainsi que sous forme de tableau 29..

Tableau 29: Le% d'inhibition suivant les valeurs de diamètre (mm) et de CMI des extraits de *Calamintha baborensis*.

	Extrait Hexane	Extrait Chlor	Extrait Ac EtO	Extrait BuOH	oxytetracycline
Diam (mm)	10.8±0.83(40µL)	12.4±0.54	11.4±0.54	10.4±0.54	-
	12.8±0.4 (60µL)	16±1.00	12.8±0.44	10.2±0.44	-
	19±1.22 (100µL)	19.2±0.83	13.2±0.44	14.2±0.44	-
% of inhibition	43.2%	49.6%	45.6%	41.6%	-
	51.2%	64%	51.2%	40.8%	-
	76%	76.8%	52.8	56.8%	-
CMI (µg/mL)	43 ^a	43.4 ^a	30 ^b	32 ^b	8

a, b : signifie une différence significative entre les résultats de CMI de différentes fractions solubles d'extrait hydroalcoolique des feuilles de Lamiacées algérienne *Calamintha baborensis* Batt.) (<0,05).



Figure 60: Différents tests antibactériens des différents extraits étudiés de *Calamintha baborensis* Batt.

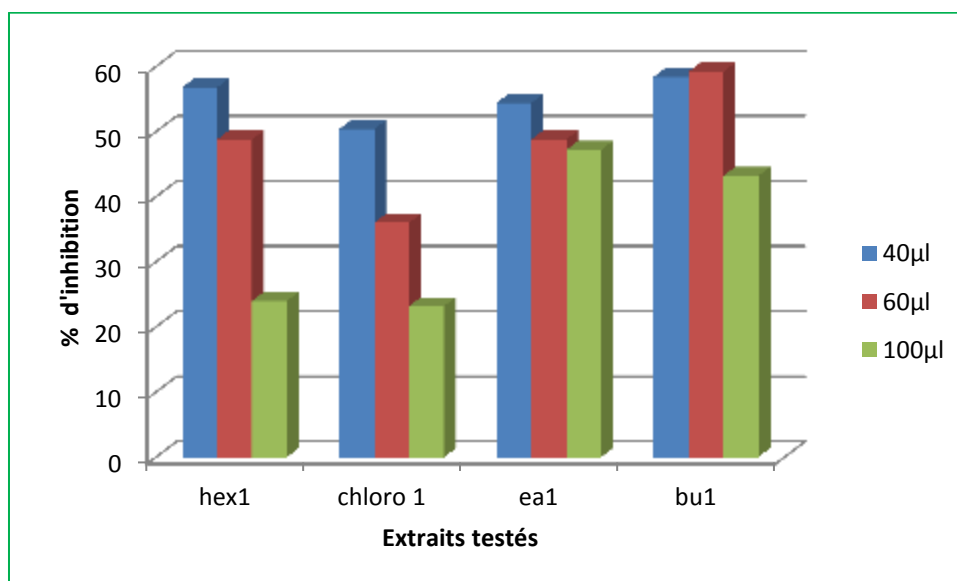
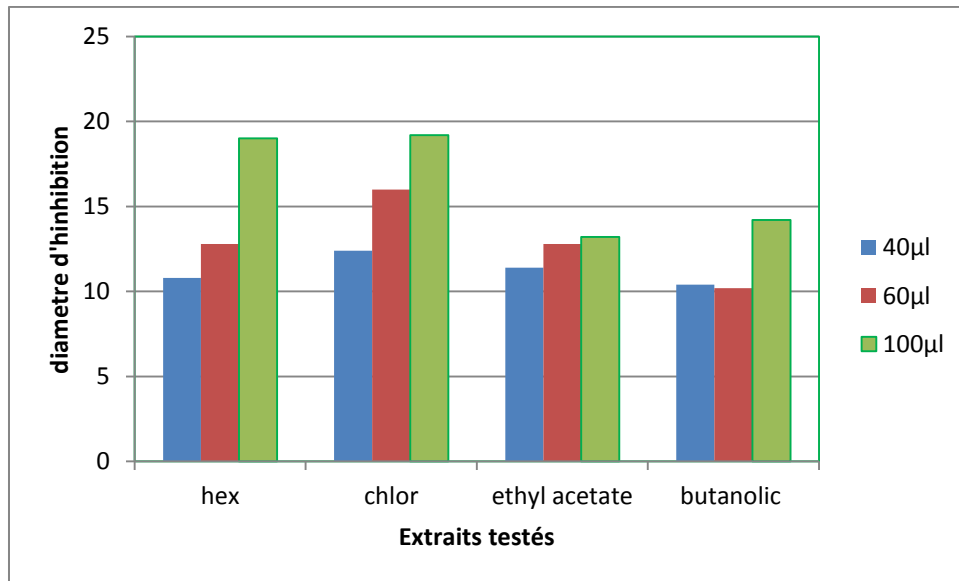


Figure 61 :Diagramme du % d'inhibition des extraits testés**Figure 62 : diagramme du diamètre d'inhibition**



REFERENCES DU
CHAPITRE IV

A

ADZET, T.; PASSET, J., *Riv. Ital EPPOS*, Chemotaxonomie du genre *Satureja-Calamintha*. (54), 1972, 482-486.

ANASTASSAKI, T.; DEMETZOS, C.; PERDETZOGLU, D.; GAZOULI, M.; LOUKIS, A.; HARVALA, C., *Planta Med.*, Analysis of labdane-type diterpenes from *Cistus creticus* (subsp. *creticus* and subsp. *eriocephalus*), by GC and GC-MS, (65), 1999, 735-739.

ANDREW, J. M. J., *Antimicrob. Chemother.*, BSAC standardized disc susceptibility testing method, (56), 2005, 60 – 76.

B

BASER, K. H. C.; OZEK, T., *Planta Med.*, Composition of the essential oil of *Calamintha grandiflora*, (59), 1993, 390.

BENAYAD, N.; MENNANE, Z.; CHAROF, R.; HAKIKI, A.; MOSADDAK, M *Journal Of Materials and Environmental Science*. Antibacterial activity of essential oil and some extracts of *Cistus ladaniferus* from Oulmes in Morocco., v. 4, n. 6, p. 1066-1071, 2013.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J., *Anal. Biochem*, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power e FRAP assay, (239), 1996, 70-76.

BOUAMAMA, H.; VILLARD, J.; BENHARREF, A.; JANA, M. . *Therapie Antibacterial and antifungal activities of Cistus incanus and Cistus monspeliensis leaf extracts*, v. 54, p. 731. 1999. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2005.08.062>

BOUKHEBTI, H.; CHAKER, A.N.; BELHADJ, H.; SAHLI, F.; RAMDHANI, M.; LAOUER, H.; HARZALLAH, D *Der Pharmacia Letters*. Chemical composition and antibacterial activity of *Mentha pulegium* L. and *Mentha spicata* L. essential oils.. v. 3, p. 267-275, 2011.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E; BERSET, C., *Food Sci. Technol.*, Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, (28), 1995, 25-30.

C

CARNAT, A.P.; CHOSSEGROS, A.; LAMAISON, J. L., *J. Essential oil Res.*, The essential oil of *Satureja grandiflora* (L) Scheele from France. (3), 1991, 361-362

CATALANO, L.; FRANCO, I.; DE NOBILI, M.; EITA, L., *Agrochimica*, Polyphenols in olive mill waste waters and their depuration plant effluents: a comparison of the Folin-Ciocalteu and HPLC methods. (43), 1999, 193-205.

CHANWITHEESUK, A.; TEERAWUTGULRAG, A.; KILBURN, J. D.; RAKARIYATHAM, N., *Food Chem., Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk ., (100), 2007, 1044-1048.*

CIMANGA, K.; KAMBU, K.; TONA, L.; APERS, S.; DE BRUYNE, T.; HERMANS, N.; TOTTE, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.J *Journal of Ethnopharmacology.*

Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo., v. 79, p. 213–220, 2002. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00384-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00384-1)

COTELLE, N.; BEMIER, J. L.; CATTEAU, J. P.; POMMERY, J.; WALLET, J. C.; GAYDOU, E. M., *Free Radical Biol. Med.,* Antioxidant properties of hydroxyl flavones, (20), 1996, 35-43.

D

DEMETZOS C., LOUKIS A., *J. Essent. Oil Res.,* Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cistus creticus* L., (7), 1995, 407-410.

DEMETZOS, C.; ANASTASSAKI, T.; PERDETZOGLU, D., *Z. Naturforsch.,* A chemometric interpopulation of the essential oils of *Cistus creticus* L. growing in Crete (Greece), (57c), 2002, 89-94.

DEMETZOS, C.; KATERINOPOULOS, H.; KOUVARALIS, A.; STRATIGAKIS, N.; LOUKIS, A.; EKONOMAKIS, C.; SPILIOTIS, V.; TSAKNIS, J., *Planta Med.,* Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus*, (63), 1997, 477-479.

DEMETZOS, C.; MITAKU, S.; LOUKIS, A.; HARVALA, C., *J. Essent. Oil Res.,* A new drimane sesquiterpene, isomers of manoyl oxide and other volatile constituents from the resin “ladano” of *Cistus incanus* subsp. *creticus* (L.) Heywood, (6), 1994, 37-41.

DEMETZOS, C.; STAHL, B.; ANASTASSAKI, T.; GAZOULI, M.; TZOUVELEKIS, L.S.; RALLIS, M., *Planta Med.,* Chemical analysis and antimicrobial activity of the resin ladano, of its essential oil and of the isolated compounds, (65), 1999, 76-78.

DOBRAVALSKYTE, D.; VENSKUTONIS, P. R.; TALOU, T., *Food Chem.,* Antioxidant Properties and essential oil composition of *Calamintha grandiflora*, (135), 2012, 1539-1546.

DOGÿAN, S.; TURAN, Y.; ERTUERK, H.; ARSLAN, D., *J. Agric. Food Chem.,* Characterization and purification of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynarascolymus* L.), (53), 2005, 776-785.

DORMAN, H. I. D.; HILTUNEN, R., *Foodchem.*, Fe(III) reductive and free radical scavenging properties of summer savory (*Satureja hortensis* L.) extract and subfractions, (88), 2004, 193-199.

F

FALCÃO, S.I. ; VALE, N.; GOMES, P.; DOMINGUES, M.R. ; FREIRE, C.; CARDOSO, S. M.; VILAS-BOAS, M. *Phytoch. Analysis*, Phenolic profiling of portuguese propolis bylc–ms spectrometry: uncommon propolis rich in flavonoid glycosides, (4), 2012, 309-318.

FERRERES, F., Silva, B.M., Andrade, P.B., Seabra, R.M., and Ferreira, M.A *Phytochemical Analysis*. Approach to the study of C-glycosyl flavones by ion trap HPLC–PAD–ESI/MS/MS: Application to seeds of quince (*Cydonia oblonga*)., (2003). 14, 352–359.

FERRERES, F. ; LLORACH, R. ; GIL-IZQUIERDO, A.J. *Mass Spectrom.* Characterization of the interglycosidic linkage in di-, tri-, tetra- and pentaglycosylated flavonoids and differentiation of positional isomers by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, (3), 2004, 312-321

G

GAMS, H.: *Satureja* L. - In HEGI, G., (Ed.): 1927 Illustrierte Flora von Mittel-Europa 5, pp. 2279-2302. - Miinchen: Hanser.

H

HELD, P. Performing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assays with Synergy™ HT multi-detection microplate reader. Application note from Biotek. [http://www.biotek.com/resources/tech_res_detail.php\(id=161\)](http://www.biotek.com/resources/tech_res_detail.php(id=161)). (2005). Accessed on 20 December 2013.

HERNÁNDEZ, T.; CANALES, M.; AVILA, J.G.; GARCÍA, A.M.; MARTÍNEZ, A.; CABALLERO J.; ROMO DE VIVAR, A.; LIRA, R. *Journal of Ethnopharmacology*, Composition and antibacterial activity of essential oil of *Lantana achyranthifolia* Desf. (Verbenaceae). v. 96, n. 3, p. 551–2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2004.09.044>
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2008.07.023>

K

KABOUCHE, Z.; BENSOUICI, C.; BENMERACHE, A.; CHIBANI, S., Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil of *Satureja Calamintha* ssp. *sylvatica* from Jijel, Algeria, *Der pharmacia Lettre*, (2), 2013, 224-227.

KHLED KHOUDJA, N.; BOULEKBACHE-MAKHLOUF, L.; MADANI, K., *Indust. Crops and Prod.*, Antioxydant capacity of crude extracts and their solvent fractions of selected Algerian Lamiaceae, (52), 2014, 177-182.

KIM, J.; MARSHALL, M.R.; WEI, C *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens., v. 43, p. 2839–2845, 1995. <http://dx.doi.org/10.1021/jf00059a013>

KITIC, D.; PALIC, R.; STOJANOVIC, G., RISTIC, M.; RANDJELOVIC, V., *J. Essent. Oil Res.*, Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Calamintha nepeta* (L.) Savi ssp. *glandulosa* (Req.) P.W. Ball from Montenegro, (14), 2002, 150-152.

KITIC, D.; STOJANOVIC, G.; PALIC, R.; RANDJELOVIC, V., *J. Essent. Oil Res.*, Chemical composition and microbial activity of the essential oil of *Calamintha nepeta* (L.) Savi ssp. *nepeta* var. *subisodonda* (Borb.) Hayek from Serbia, (17), 2005, 701-703

KOKKALOU, E., *Planta Medica*, Composition of the volatile oil from *Acinos suaveolens*, (53), 1988, 340- 342.

KOKKINI, S., Chemical races within the genus *Mentha* L. - In LINSKENS, H. F., JACKSON, J. F., (Eds.): *Modern methods of plant analysis, new series, 12.* - Berlin, Heidelberg: Springer, 1991:

KOLEVA, I.I.; VAN BEEK, T.A.; LINSSEN, J.P.H.; GROOT, A.; EVSTATIEVA, L.N., *Phytochem. Anal.*, Screening of plant extracts for antioxidant activity A comparative study on three testing methods, (13), 2002, 8-17.

KSOURI, R.; MEGDICHE, W.; FALLEH, H.; TRABELSI, N.; BOULAABA, M.; SMAOUI, A.; ABDELLY, C., *C.R. Biol.*, Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes, (331), 2008, 865-873.

ℒ

LINCOLN, D.E.; LANGENHEIM, J. H., *Biochem. Syst. Ecol.* Geographic patterns of monoterpenoid composition in *Satureja douglasii*, (4): 1976, 237-248.

LIU, H.; ORJALA, J.; STICHER, O.; RALI, T., *J. Nat. prod.*, Acylated flavonol glycosides from leaves of *Stenochlaena palustris*, (62), 1998, 70-75.

M

MAHBOUBI, M., HAGHI, G *Journal of Ethnopharmacology*. Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil.. v. 119, n. 2, p. 325–327, 2008.

MAHMOUDI, H. , AOUADHI, C KADDOUR, R GRUBER, M ZARGOUNI, H ZAOUALI, W BEN HAMIDA, N BEN NASRI, M OUERGHI, Z, KARIM HOSNI, K *Biosci. J.* comparison of antioxidant and antimicrobial activities of two cultivated cistus species from Tunisia., Uberlândia, v. 32, n. 1, p. 226-237, Jan./Feb. 2016.

MICHAEL N. CLIFFORD, KELLY L. JOHNSTON, SUSAN KNIGHT AND NIKOLAI KUHNERT *J. Agric. Food Chim.*. Hierarchical scheme for LC-MSⁿ Identification of chlorogenic acids. 2003, 51, 2900-2911.

MOHINI VERMA, R.; IRCHHAIYA, P. P.; SINGH, D. K.; VINOD, K., *IJPSR*, Studies on antiulcer activity of essential oil of *Calamintha officinalis* moench, (10), 2011, 2799-2736.

MURRAY, M. J.; LINCOLN, D. E.; HEFENDEHL, F. W., *Phytochemistry*, Chemogenetic evidence supporting multiple allele control of the biosynthesis of (-)-menthone and (+)-isomenthone stereoisomers in *Mentha* species, (19), 1980, 2103- 2110.

N

NEHME, C. J.; BASTOS, W. L.; DE ARAUJO, A. J.; CAVALHEIRO A. J., *phytochemical Analytical.*, An HPLC-PAD Method to Analyse Flavonoid Glycosides and Styrylpyrones from *Cryptocarya* Species (Lauraceae), (16), 2005, 93-97.

NIKAIDO, H.; VAARA, M. *Microbiology Review*. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. v. 49, p. 1-32, 1985.

NTEZURUBANZA, L.; SCHEFVER, J. J. C.; BAERHEIM SVENDSEN, A., *Sci. Pharm.* Composition of the essential oil of *Satureja pseudosirnensis* grown in Rwanda. (55), 1987, 177- 182.

O

OZTURK, S.; ERCISLI, S. *Food Control*, Antibacterial activity and chemical constitutions of *Ziziphora clinopodioides*, (18), 2007, 535-540

P

PANIZZI, L.; FLAMINI, G.; CIONI, P. L.; MORELLI, I., *J.Ethnopharmacol.*, Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean Lamiaceae. (39), 1993, 167 -170

PELLEGRINI, R.;PROTEGGENTE, N.;PANNALA, A.;YANG, A.;RICE EVANS, M., *Free radical biol. Med.*, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay,(26),1999, 1231-1237.

R

RAKARIYATHAM, N., *Food Chem.*, Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk. (100), 2007, 1044-1048.

RAVID, U.; PUTIEVSKY, E., *Planta Medica*, Composition of essential oils of *Thyrnbra spicata* and *Satureja thyrnbra* chemotypes,(51), 1985,337-338.

RIBEREAU, P.,Gayon. Les composés phénoliques des végétaux .Ed. Dunod. Paris, 1968, 254.

S

SACHIKO, T.; KOYOKO, T.; MAKI, A.; HIROYUKI, O.; HIROSHI, H.; EIJI, I.; TOMIHISA, O, *J. Nat. prod.*, Isolation of cytochrome P450 inhibitors from strawberry fruit, *fragaria ananassan* , (67), 2004, 1839-1841.

SANCHEZ MORENO, C.; LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F., *J. Sci. Food Agr.*, A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols, (2), 1998, 270–276

SILVA DENISE BRENTA , IZABEL CRISTINA CASANOVA TURATTI¹, DAYANA RUBIO GOUVEIA¹, MADELEINE ERNST¹,SIMONE PA'DUA TEIXEIRA² & NORBERTO PEPORINE LOPES¹ *natural products mass spectrometry ecology* Mass Spectrometry of Flavonoid Vicenin-2, Based Sunlight Barriers in *Lychnophora* species ; 2013.

SINGLETON, V.L.; ROSSI. J. A., *Am. J. enology and Viticulture*. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdc-phosphotungstic acid reagents, (16), 1965, 144-158.

SOULELES, C.; ARGYRIADOU, N., *Planta Med.*, The volatile constituents of *Calamintha grandiflora*, (56), 1990, 234-235.

STAGOS, D.; PORTESIS, N.; SPANOU, C.; MOSSIALOS, D.; ALIGIANNIS, N.; CHAITA, E.; PANAGOULIS, C.; RERI, E.; SKALTSOUNIS, L.; TSATSAKIS, A., KOURETAS, *Food Chem. Toxicol.*, Correlation of total polyphenolic content with

antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic Lamiaceae species. (50), 2012, 4115-4124.

STANCHER, B.; POLDINI, L., *Giorn.Bot.Ital.* Gli olii essenziali di *Satureia variegata* HOST, (103), 1969, 65-77.

STEFANO, E., *Flav. Fragr. J.* The volatile oil of *Calamintha nepeta* (L.) SAVI subsp, *glandulosa* (REQ.) P. W. BALL endemic of Greece, (5), 1990, 23- 26.

T

THIEME, H.; NGUYEN T. T., *Die Pharmazie*, Untersuchungen fiber die Akkumulation und die Zusammensetzung der/itherischen Ole von *Satureja hortensis* L., *Satureja montana* L. und *Artemisia dracunculus* L. im Verlaufder Ontogenese, (27)1972, 255 - 265.

V

VOKOU, A., (Eds.): Aromatic plants: basic and applied aspects, Hauge, Boston, London: Martinus Nijhoff, 197-202.

W

WEIDENHAMER, J.; MENELAOUFRANCISCO, M.; MACÍASG, A.; WILLIAMSON B., *J. Chem. Ecology*, Allelopathic potential of menthofuran monoterpenes from *Calamintha ashei*, (12), 1994, 3345-59.

WILLIAMSON A, DAY AJ, PLUMB GW, COUTEAU D *Biochem. Socie Transact.*, Human metabolic pathways of dietary flavonoids and cinnamates, (28), 2000, 16–22

A l'issue de la présente recherche qui représente une contribution à l'étude phytochimique d'une plante endémique de la flore Algérienne : *Calamintha baborensis* Batt. et d'une plante ordinaire appartenant à la famille des cistacées : *Cistus villosus* mais n'ayant pas fait l'objet de beaucoup de recherche en Algérie L'objectif était : d'une part, atteindre des structures nouvelles pour ces représentants de la flore Algérienne et d'autre part évaluer l'importance de cette dernière.

La mise en place de techniques d'extraction classiques des huiles essentielles des parties aériennes de *Calamintha baborensis* Batt a conduit à évaluer la richesse en composés divers de son huile essentielle ; (pourcentage appréciable en eugénol 27 % ainsi qu'en acétophénone 26%) ainsi que la diversité en produits odorants de ses extraits apolaires (4-acétylanisole 6.86% , et le 4-methoxy methyl ester de l'acide benzoïque 12.72%) et à l'étude du pouvoir antioxydant de cette dernière par des techniques qui sont :le DPPH, l'ABTS,le FRAP et l'ORAC qui est une technique peu utilisée chose qui a été faite pour **la première fois** pour cette plante qui **est endémique**.

En faisant appel aux différentes méthodes modernes d'analyse spectroscopiques, particulièrement les techniques LC/MS/MS nous avons pu étudier qualitativement la teneur de quelques fractions en polyphénols et proposer quelques structures de flavonoïdes hétérosides (vicénine , l'apigénine mono et diglycosylée) Bien sur nous n'avons pu avancer ces structures qu'en comparant avec la littérature, par la suite des analyses RMN (¹H, ¹³C, COSY, HMQC et HMBC), viendront corroborer nos hypothèses.

Cinq produits identifiés par RMN ont été isolés de la plante *Cistus villosus* qui sont :le **tilirioside** isolé pour la **première fois** dans le genre *cistus villosus* ainsi que trois dérivés hexosylés de la quercétine (le glucosyl, le ramnosyl et le galactosyl) et aussi la vicénine ainsi qu'une panoplie d'autres produits qui ont été proposés par Spectroscopies GC/MS ,cette plante a fait l'objet d'une étude de son activité antioxydante par les techniques DPPH,FRAP,ABTS et ORAC ainsi que d'une brève étude microbiologique pour chacune des deux plantes.

Chaque plante est un réservoir potentiel de métabolites avec des caractéristiques phytochimiques et pharmaco chimiques originales intéressantes à explorer et à valoriser c'est pourquoi nous ouvrons la voie à d'autres futurs chercheurs pour poursuivre dans le domaine de la phytochimie.

Résumé

Une recherche bibliographique a montré que les espèces du genre *cistacées* et du genre *Calamintha* largement présentes dans le règne végétal, sont très utilisées en médecine traditionnelle par les populations locales notamment en Algérie.

Appartenant à la famille des cistacées pour l'une et la famille des labiées pour la deuxième, ces deux genres sont réputés pour accumuler des substances de type flavonique, molécules connues pour leur activités biologiques diverses notamment anti-oxydante .

Dans ce travail, notre intérêt a porté sur l'isolement de métabolites secondaires à la recherche de nouveaux modèles phénoliques susceptibles d'être bioactifs.

Concernant le choix des espèces à étudier, notre critère principal a été l'endémisme et le fait que certaines espèces n'ont jamais fait l'objet d'investigations phytochimiques ceci concernant la plante *Calamintha baborensis*. Pour la seconde plante *Cistus Villosus* notre choix a été arbitraire car sur une liste de 15 plantes cueillies dans la région de Bouhmama, connue pour sa richesse floristique notre choix s'est porté sur cette plante car elle présentait une carte flavonique bidimensionnelle relativement riche et peu compliquée à séparer .

Nos travaux d'extraction des parties aériennes (feuilles et fleurs) de l'espèce endémique *Calamintha Baborensis* suivie de séparations chromatographiques (CC, CCM), nous ont permis d'isoler et d'identifier grâce aux techniques de la LC-MS /MSⁿ quelques molécules de flavonoides hétérosides connus. Le traitement analogue des parties aériennes de l'espèce *Cistus Villosus* a conduit à la séparation et à l'identification par les techniques de masse et de RMN mono et bidimensionnelle de cinq autres molécules : le tilirioside isolé pour la première fois chez ce genre ainsi que trois dérivés hexosylés de la quercétine : le glucosyl, le ramnosyl et le galactosyl et enfin la vicénine.

L'analyse CG/MS de l'huile essentielle de *Calamintha Baborensis* ainsi que celle de ses fractions apolaires a montré une grande variété de composés dont majoritairement l'eugénol (27,04%) suivi de la 3-méthoxyacétophénone (26,4%) de composés terpéniques comme l'oxyde de caryophyllène (1,84%) trans bêta-ionone (1,71%) alcool phényléthylique (6,58%).

L'analyse CG/MS des fractions apolaires de *Cistus villosus* ont montré une panoplie de composés à savoir le 5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-, (R)- 2(4H)-Benzofuranone , vient ensuite l'eugénol, l'alcool benzylique un terpène qui est le 4-(3-hydroxy--butenyl)-3,5,5-trimethyl-2-Cyclohexen-1-one un composé azoté qui est le 2-amino-4-methoxy-phénol et également le , 2,3,4,4a,5,6-hexahydro- 7-methoxy-quinoline ainsi que le , 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol et majoritairement des hydrocarbures

Les extraits Acétate d'éthyle(EtOAc) et n-Butanol (n-BuOH) de la plante *Calamintha* ont donné les valeurs les plus élevées de pouvoir antioxydant avec différentes méthodes :l'ABTS avait un pourcentage d'inhibition de 68,9 / 81,7% et celle du DPPH était de 27,6 / 80,99% et avec l'ORAC / FRAP était de 37,28 / 28,47 μ M/ml et 21,73 / 19,52 μ M / ml respectivement; en outre, ils ont été évalués pour leur teneur en phénols totaux. L'activité antibactérienne des extraits montre de bons résultats avec des fractions hexanoïques et chloroformiques contre E. coli (19 mm et 19,2 mm) respectivement.

Nous avons complété notre travail par une petite étude microbiologique sur les fractions brutes des deux plantes et qui ont donné des résultats satisfaisants qui seront préliminaires à de futurs travaux de recherche.

Mots clés :

Flavonoides, huiles essentielles,GC/MS/MS, *Cistus villosus*, *Calamintha Baborensis*.

Activité antioxydante.

summary

A literature search has shown that species of the genus *cistaceae* and genus *Calamintha* widely present in the plant kingdom, are widely used in traditional medicine by local populations, particularly in Algeria.

Belonging to the *cistaceae* family for one and the labiate family for the second, these two genera are reputed to accumulate substances of the flavonic type, molecules known for their various biological activities including antioxidant.

In this work, our interest focused on the isolation of secondary metabolites in search of new phenolic models that can be bioactive.

Regarding the choice of species to study, our main criterion was endemism and the fact that certain species have never been the subject of phytochemical investigations concerning the plant *Calamintha baborensis*. For the second plant *Cistus Villosus* our choice was arbitrary because on a list of 15 plants picked in the region of Bouhmama, known for its floristic richness our choice fell on this plant because it presented a two-dimensional flavonic map relatively rich and little complicated to separate.

Our extraction work on the aerial parts (leaves and flowers) of the endemic species *Calamintha Baborensis* followed by chromatographic separations (CC, CCM) allowed us to isolate and identify using LC-MS / MSⁿ techniques. several known flavonoid molecules. Analogous treatment of the aerial parts of the *Cistus Villosus* species led to the separation and identification by MNR technics of five molecules : tilirioside isolated for the first time in this genus and also (ramnosyl, glycosyl and galactosyl) three hexosylated forms of quercetin and the vicenin.

The GC / MS analysis of the essential oil of *Calamintha Baborensis* as well as that of its nonpolar fractions showed a wide variety of compounds, mainly eugenol (27.04%) followed by 3-methoxyacetophenone (26.4%).) terpene compounds such as caryophyllene oxide (1.84%) trans beta-ionone (1.71%) phenylethyl alcohol (6.58%).

GC / MS analysis of apolar fractions of *cistus villosus* showed a variety of compounds, namely 5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-, (R) -2 (4H) -Benzofuranone Then comes eugenol, benzyl alcohol, a terpene which is 4- (3-hydroxy-butenyl) -3,5,5-trimethyl-2-cyclohexen-1-one, a nitrogen compound which is 2- amino-4-methoxy-phenol and also 2,3,4,4a, 5,6-hexahydro-7-methoxy-quinoline as well as 1,2,4-bis (1,1-dimethylethyl) -phenol and for the most part hydrocarbons

The extracts EtOAc and n-BuOH of the plant *Calamintha* gave the highest values of antioxidant power with different methods ABTS was a % of inhibition of 68.9/81.7% and DPPH was 27.6/80.99% and with ORAC/FRAP was 37.28/28.47 and 21.73/19.52 $\mu\text{M}/\text{ml}$ respectively.

We completed our work with a small microbiological study of the raw fractions of both plants, which yielded satisfactory results that will be preliminary to future researches.

Keywords :

Flavonoids, essential oils, GC / MS / MS, *Cistus villosus*, *Calamintha Baborensis*.

Antioxydant activity.

ملخص :

أظهرت بحوث سابقة أن الأنواع من جنس *cistaceae* و جنس *Calamintha* الموجود على نطاق واسع في المملكة النباتية ، تستخدم على نطاق واسع في الطب التقليدي من قبل السكان المحليين ، وخاصة في الجزائر. تنتمي إلى عائلة *cistaceae* للنبتة الأولى و عائلة *labiate* للنبتة الثانية، وتشتهر هذه الأجناس اثنتين بتراكم المواد من نوع الفلافونويدات :جزينات معروفة بأنشطتها البيولوجية المختلفة بما في ذلك مضادات الأكسدة. في هذا العمل ، ركزنا اهتمامنا على عزل مركبات من الايض الثانوي للبحث عن نماذج فينولية جديدة يمكن أن تكون نشطة بيولوجيًا.

فيما يتعلق باختيارنا للأنواع المدروسة ، كان معيارنا الرئيسي هو النوطن والحقيقة أن بعض الأنواع لم تكن قط موضوع تحقيقات كيميائية هذا فيما يخص كالامينتا بابورينسيس. بالنسبة *Cistus Villosus* الثاني ، كان اختيارنا اختيارًا عشوائيًا لأنه في قائمة تضم 15 نباتًا تم التقاطها في منطقة Bouhmama ، المعرفة بثروتها النباتية المتنوعة ، وقع اختيارنا على هذا النوع لأنه قدم خريطة فلافونية ثنائية الأبعاد غنية نسبيًا وغير معقدة للفصل

عملنا على استخلاص الأجزاء الهوائية (أوراق الشجر والزهور) من النوع *Baborensis* ثم قمنا بفصل الكروماتوغرافي (CC)، (TLC)، مكننا من عزل وتحديد مع تقنيات LC-MS / MSN العديد من جزينات الفلافونويد المعروفة. أدت المعالجة التناظرية للأجزاء الهوائية لأنواع *Cistus Villosus* إلى فصل وتحديد أربعة مركبات.

تحليل GC / MS للنوع *Baborensis calamintha* أن من جزيناته عديم الأقطاب أظهرت مجموعة واسعة من المركبات بما في ذلك في الغالب الأوجينول (27.04٪)، يليه (26.43) methoxyacetophenone-٪ مركبات terpene مثل أكسيد caryophyllene (1.84) ٪ (عبر بيتا ايون 1.71) phenylethyl (الكحول) (6.58) ٪).

أظهر تحليل GC / MS الكسور قريضة villosus عديم الأقطاب مجموعة من المركبات وهي a-tetrahydro-7،7،6،5- وهو 4-3- هيدروكسي-3- (butenyl) -، 5،-5-ثلاثي-2-1-cyclohexen- واحد مركب النتروجين وهو 2- أمينو-4-ميثوكسي الفينول وأيضا، 2،3،4،5،6-hexahydro-7-،5، a،4،3،2-، 6-ميثوكسي الكينولين وكذلك، 2،4 مكرر (1،1-phenol) -dimethylethyl- وأساسا الهيدروكربونات.

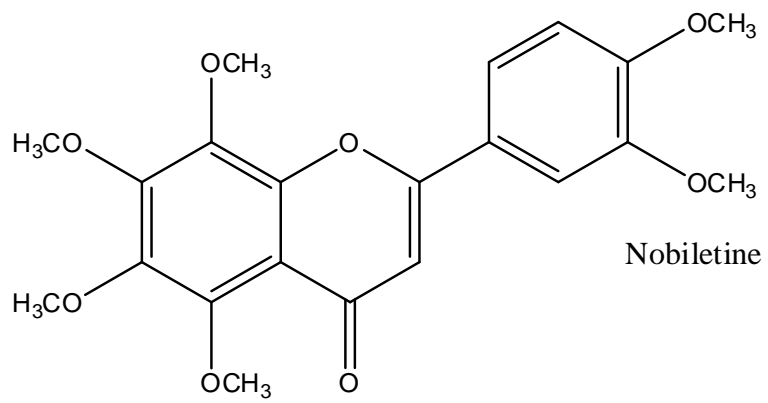
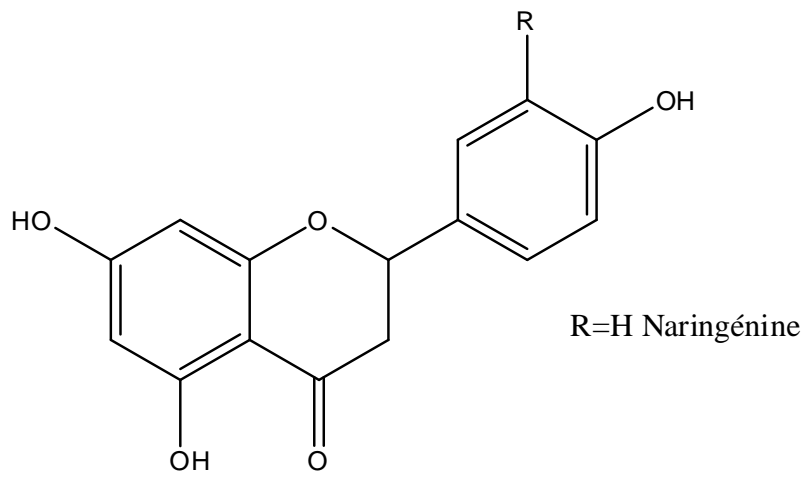
أعطت مستخلصات EtOAc و n-BuOH من النبات أعلى قيم القدرة المضادة للأكسدة بطرق مختلفة ABTS كانت ٪ من تثبيط 68.9 / 81.7 ٪ و DPPH كانت 27.6 / 80.99 ٪ ومع ORAC / FRAP كانت 28.47 / 37.28 و 19.52 21.73 / ميكرومتر / مل على التوالي.

أكملنا عملنا مع دراسة ميكروبيولوجية صغيرة للكسور الخام من كلا النباتين ، والتي أسفرت عن نتائج مرضية ستكون أولية للبحث في المستقبل.

كلمات البحث:

الفلافونيدات ، الزيوت الأساسية ، GC / MS / MS ، *Cistus villosus* ، *Calamintha Baborensis* نشاط مضاد للأكسدة.

Erratum



Page 6 structure de la naringénine (non chirale)

Page 13 structure de la nobilétine

PHYTOCHEMICAL INVESTIGATION, ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ASSAYS OF ALGERIAN PLANT *CALAMINTHA BABORENSIS* BATT.

Rofia Seraoui,^{1,*} Rachid Benkiniouar,¹
Salah Akkal,¹ Gaspar Ros,²
and Gema Nieto²

Original article submitted July 18, 2016.

The aim of this work was to evaluate the antioxidant capacity of some increasing polarity soluble fractions of hydroalcoholic extract of the leaves of Algerian Lamiaceae *Calamintha baborensis* Batt., including hexanoic (Hex), chloroformic (Chlor), ethyl acetate (EtOAc) and n-butanolic (n-BuOH) and four subfractions (A, B, C, D) resulting from fractionation on a polyamide column. The EtOAc and n-BuOH extracts of the plant gave the highest values of antioxidant power by different methods: ABTS, percentage inhibition of 68.9/81.7%; DPPH, 27.6/80.99%; ORAC/FRAP, 37.28/28.47 and 21.73/19.52 $\mu\text{M}/\text{mL}$, respectively; IC₅₀ values, 23 and 53.5 ppm. In addition, they were evaluated for their total phenolic content. The antibacterial activity of extracts showed good results with hexanoic and chloroformic fractions against *E. coli* (19 mm and 19.2 mm diameter of inhibition zone and MIC values about 43 and 43.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively.) Apolar fractions from the leaves of *C. Baborensis* Batt. were analyzed by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). The main components of the essential oil of *C. baborensis* Batt. are eugenol (27.04%) and 3-methoxy acetophenone (26.4%).

Keywords: *Calamintha baborensis* Batt., total phenolic compounds, GC-MS, antioxidant activity, antibacterial activity.

1. INTRODUCTION

Free radicals are likely to cause degradation of biological molecules by oxidation that is called oxidative stress. Oxidative stress appears to be the main cause of many diseases such as cardiovascular diseases, cancer, cataracts, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, ulcer, edema, and premature aging of the skin [1 – 5]. Herbs are often defined as any part of a plant that is used in the diet for its aromatic properties; however, they were also reported as a source of various bioactive phytochemicals, particularly possessing high antioxidant power [6, 7]. Volatile fractions of plants, traditionally called essential oils, were also studied for their antioxi-

dant properties [8 – 10] and proposed as potential substitutes for synthetic antioxidants [11].

Calamintha is a genus of plants that belongs to the Lamiaceae family. Commonly called the calamints, there are about eight species in the genus (around 30 before revisions in taxonomy) which are native to the northern temperate regions of Europe, Asia and America. *Calamintha* species are used in the popular Middle Eastern culinary blend called Za'atar that is a general name for any Middle Eastern herbs from the genera *Origanum* (oregano), *Calamintha* (calamint), *Thymus* (thyme) and *Satureja* (savory). The leaves are aromatic, diaphoretic and expectorant [12]. An infusion of *Calamintha* is used in the treatment of jaundice, nervous complaints, convulsions and cramps. A warm poultice of the leaves may help soothe bruises and rheumatic pains [12]. In the present study, the antioxidant activity of *Calamintha baborensis* Batt. extracts

were evaluated by the DPPH, ABTS, FRAP and ORAC assay methods. The results were compared with an antioxidant standard, trolox. In addition, total phenolic contents were determined by colorimetric methods.

¹ Department of Chemistry, Faculty of Exact Sciences, Laboratory of Phytochemistry, Natural Products and Organic Synthesis (Physynor), University Brother Mentouri Constantine 1, 25000 Constantine, Algeria.

² Department of Food Technology, Nutrition and Food Science, Faculty of Veterinary Sciences, University of Murcia, Campus de Espinardo, Espinardo, Murcia 30100, Spain.

* e-mail: rofiaseraoui@yahoo.fr.

2. EXPERIMENTAL PART

2.1. Materials and Methods

Plant material. The aerial parts of *C. baborensis* Batt. Plants were collected from Jijel eastern region of Algeria in May 2014 at flowering vegetation phase, which is considered as a preferable time in terms of phytochemical composition and functional properties of herbs, leaves separated and dried at room temperature (22–28°C) for one month in the dark and then stored in sealed paper bags until use. Plants were identified in the laboratory of the botany Faculty of Life and Nature Sciences, University of Setif.

Preparation of essential oil and extracts. 150g of air dried leaves of *C. baborensis* Batt. were mixed with 1000 mL distilled water and the essential oil was isolated by hydrodistillation for 3 h in a Clevenger type apparatus. The obtained oil was separated from water and dried over anhydrous sodium sulfate. Isolation of essential oils was performed in duplicate and the samples were stored in sealed glass vial in a freezer prior to further analysis.

Extraction and fractionation. Aerial parts of *C. baborensis* Batt. (150 g) were crushed and extracted with 80% aqueous methanol using a solvent to powder ratio of 10/1 (v/w) for 72 h at room temperature. The process was repeated twice with the same powder. The resulting extracts were combined, filtered, and concentrated under vacuum. The aqueous solution has been submitted to liquid-liquid extraction with four solvents sequentially in increasing order of polarity: hexane, chloroform, ethyl acetate, and finally n-butanol using a volume of 100 mL for each solvent. The extracts had to be standardized, i.e. characterized by the content of any substance so as to evaluate the specificity and uniqueness of the extract. Partition with hexane yielded the hexane fraction (Hex F) and the defatted crude extract which was successively partitioned with chloroform, ethyl acetate and n-butanol to yield the chloroformic (chlor F), ethyl acetate (EtOAc F) and n-butanol (BuOH F); each extraction was repeated twice. All fractions were filtered and evaporated to dryness under vacuum. Then, they were dissolved in ethanol to obtain the final concentration for each extract and stored in colored tubes to avoid light. Subfractions A, B, C, and D result from butanolic fraction by polyamide column fractionation with toluene – methanol eluent system. They have been obtained, respectively, with eluents 80/20% Tol-MeOH (Fraction A), 50/50% Tol/MeOH (Fraction B), 30/70% Tol/MeOH (Fraction C), and 100% MeOH (Fraction D).

Gas chromatography and mass spectrometry (GC–MS). The essential oil was analyzed on Agilent GC-7890B and Agilent MS-5977A (Germany) using acq method set and Agilent CP9205 VF-WAXms capillary column (30 m length, 0.25 mm id., 0.25 µm film thickness). GC oven temperature was programmed from 50°C (0 min hold) to 210°C (6 min hold) at 4.5°C/min; samples were diluted in hexane (1 µL, 1/100 v/v). Identification of volatiles was based on calculating %areas, retention times, and mass spec-

tra by computerized matching of essential oil and polar compound with NIST 11.L database search library.

Determination of total phenolic content. The concentration of total phenolics in various organic polar extracts was determined by using Folin – Ciocalteu reagent. Briefly, 200 µl of sample extract (1 mg /mL) was added to 1.0 ml of Folin – Ciocalteu reagent (diluted 1/10 with water) and 0.8 mL of 7.5 % solution of sodium carbonate Na₂CO₃ was added after 5 min. The mixture was kept for 30 min and the optical absorbance was measured at 765 nm against a blank on a 300 LC/UV-Vis spectrophotometer. The total phenolic content was expressed as gallic acid equivalent (GAE) mg per liter extract solution.

2.2. Evaluation of Antioxidant Activity

Determination of DPPH radical scavenging capacity. The antioxidant activity was evaluated according to the method cited by [13, 14]. In order to estimate the DPPH^{*} (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) scavenging capability, 0.1 mL of the investigated extracts (Hex F, Chlor F, EtOAc F, BuOH F, and A, B, C, D subfractions) of *C. baborensis* Batt. were added to 3.9 ml of freshly prepared DPPH methanol solution $6.39 \cdot 10^{-5}$ M at room temperature. After 30 min exposure in the dark, the absorption was measured at 515 nm on Thermo Scientific Evolution 300LC-UV-Visible spectrophotometer in reference to a blank, and the scavenging effect was calculated from the decrease in absorbance against the control. The RSC (radical scavenging capacity) was expressed as a percentage of inhibition of trolox (6-hydroxy-2.5.7.8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) using a prepared calibration curve:

$$\text{RSC} = (\text{Control}_{\text{abs}} - \text{Sample}_{\text{abs}}) / \text{Control}_{\text{abs}} \times 100 [\%],$$

where $\text{Control}_{\text{abs}}$ is the absorbance of DPPH solution and $\text{Sample}_{\text{abs}}$ is the absorbance of the test sample. The extent of DPPH radical quenching by extract was compared with standard amounts of trolox. The concentrations of trolox standard used for calibration curve were 10, 50, 100, 250, 500 µM). All tests were performed in triplicate.

Determination of ABTS radical cation scavenging capacity. The ABTS⁺ solution scavenging capacity was estimated by method of Pellegrini [15]. The ABTS radical cation was generated by reacting ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid) (7.0 mM) and potassium persulfate (2.45 mM). The mixture was allowed to stand in the dark at room temperature for 12–16 h. Then, the ABTS⁺ solution was diluted with PBS (Phosphate Buffered Saline, Gibco, NY, USA; pH 7.4; 10 mM) in order to reach an absorbance of 0.70 at 734 nm. Aliquot (10 µL) of each extract was added with calibrated Pipetman to 990 µL of ABTS work solution. After 10 min of reacting in the dark, the absorbance reading was taken on Thermo Scientific Evolution 300 LC/UV-Vis spectrophotometer in reference to a blank. The percentage

scavenging effect was calculated as TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) value [15]:

$$\% \text{Scavenging} = \frac{\text{Control}_{\text{abs}} - \text{Sample}_{\text{abs}}}{\text{Control}_{\text{abs}}} \times 100[\%],$$

where $\text{Control}_{\text{abs}}$ is the absorbance of ABTS solution and $\text{Sample}_{\text{abs}}$ is the absorbance of the test sample. All tests were performed in triplicate.

Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay. The ability of plant extracts to reduce ferric ion to ferrous ion (FRAP assay) is another indicator frequently used for assessing the antioxidant power [16]. Ferrous ion (Fe^{2+}) produced in this assay forms a blue complex ($\text{Fe}^{2+}/\text{TPTZ}$) absorbing at 593 nm. Briefly, the reagent was prepared by mixing acetate buffer (300 mM, pH 3.6), a solution of 10 mM TPTZ in 40 mM HCl, and 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ at 10:1:1 (v/v) ratio. First, 1 mL of freshly prepared FRAP reagent was powered in a tube, the absorbance (A_{593}) of the control reagent was read at 593 nm, then the absorbance of a mixture of 1 ml of frap and 100 μL of sample or trolox was measured after 4 min incubation on a 300LC/UV-Vis spectrophotometer. The FRAP was expressed as mmol trolox/mL.

Determination of oxygen radical absorbance capacity (ORAC). Based on the methodology described in [17], 20 μL of each extract were diluted 50, 100, 200-fold in phosphate buffer (pH 7.4) and 20 μL of blank (phosphate buffer) were pipetted into appropriate wells. These dilutions were prepared according to the antioxidant activity of each analyzed sample. Aliquot (20 μL) of diluted sample or blank (phosphate buffer) or trolox calibration solutions (6.25, 12.5, 25, 50 μM) was added to a well in 96-well Bottom Reading Microplate (Costar, NY, USA), 200 μL of fluorescein work solution at 0.095 μM was added to each well, and the microplates were incubated at 37°C for 15 min before an aliquot of 20 μL AAPH solutions (79.6 μM) was added to each well as peroxy radicals generator to start reaction. The microplate reader (Multi-Detection Microplate Reader Synergy HT, Biotek Instruments, Winooski, VT, USA) was programmed to read the fluorescence with an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 528 nm at 1 min interval for 1:30 h using GEN 5 software [17]. The final ORAC values were calculated using a linear regression model ($Y = aX + b$) between trolox concentration (μM) and the net area under the fluorescein decay curve. Data are expressed as micromoles of Trolox Equivalent ($\mu\text{mol TE}$) per 100 g of fresh sample weight. The area under curve (AUC) was calculated using the following formula:

$$\text{AUC} = 1 + (R_2/R_1) + (R_3/R_1) + \dots + (R_{91}/R_1),$$

where R_1 is the initial fluorescence reading and R_{91} is the last fluorescence reading at the 91 min.

The net AUC was obtained by subtracting the AUC of the blank from that of a sample.

2.3. Evaluation of Antibacterial Activity

The antibacterial power of plant extracts was evaluated for apolar and polar fractions of extract. This was determined by the disc diffusion method [18, 19] using a suspension of *E. coli* bacteria adjusted to 0.5 McFarland standard concentration to obtain a solution of known concentration of bacteria equivalent to 1.5×10^8 cfu/mL. This suspension was made from fresh culture of strain, revived in a brain heart infusion (BHI) broth prepared by dissolving 37g/L of distilled water and incubated for 24 h, adding the test microorganism to tubes containing sterile saline solution, whose turbidity was measured on the Densimat (Biomérieux) densitometer at a wavelength of 600 nm. This suspension was plated on BHI enriched agar, which was prepared by weighing 52 g agar in 11 mL of distilled water and autoclaved for 15 min at 121°C and then dispensed into Petri dishes.

Sterile Whatman (Scheideider & Schull) paper filter discs of 6 mm diameter were impregnated with 40, 60, and 100 μL /disk/sample and then placed on the surface of each Petri dish, where it had previously been inoculated with the test microorganism. Oxytetracycline was used as positive control: the antibiotic stock solution was prepared at concentration about 8.33 mg/mL, diluted to 1/2, 1/3, and 1/4, and then disks were impregnated with 40 μL of each dilution. The negative control was distilled water. The plates of tested samples were incubated at 37°C for 24 h. After incubation, the diameter of the inhibition zone around each disk was measured and the result expressed in %inhibition against the test organism. The values were averaged over five measurements per disk, taking three directions to minimize error [20], and the rate of inhibition was assessed from the following relationship:

$$\% \text{ Inhibition} = (R_c - R_s)/R_c \times 100 [\%],$$

where R_c is the radius of microbe growth in the control prepared with sterile distilled water and

R_s is the radius of growth in the presence of the plant extract.

Statistical analysis. The least-squares mean and significance of the treatment (between various soluble fractions of hydroalcoholic extract of the leaves of Algerian Lamiaceae *C. baborensis* Batt) were calculated using the type IV sum of least squares, followed by the Scheffe mean test. The value of $P < 0.05$ was considered statistically significant. The data were analyzed using Statistix 8.0 for Windows (Analytical Software, NY, USA).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. GC-MS Analysis

Tables 1 – 3 show data on the main components of apolar fractions of *C. baborensis* Batt. The percentage of identified

TABLE 1. Identified components of essential oil of *C. baborensis* Batt.

Monoterpenes, sesquiterpenes and relatives	RT	%Area
A-terpineol	13.56	0.74
Eugenol	18.51	27.04
Methyleugenol	19.84	0.49
bicyclo 5,2,0 nonane2-methylene-4,8,8-trimethyl-4-vinyl	20.31	0.43
1,3,7,7-tetramethyl-9-oxo-2-oxabicyclo(4,4,0)dec-5-ene	21.31	0.17
3-buten-2-one, 4-(2,6,6-trimethyl -1-cyclohexen-1-yl)-	22.10	1.71
Trans-beta-ionone	22.10	1.71
Megastigmatrienone	24.56	0.33
Caryophylleneoxide	24.71	1.84
selina-6-en-4-ol	26.51	0.57
phytol	36.73	0.14
Compounds of benzene ring		
4-acetylanisole	18.96	1.01
butylated hydroxy toluene	21.70	1.28
dihydrocoumarin,4,4,5,7,8- pentamethyl	21.91	0.16
1,4-naphtoquinone, 6-ethyl -2,5-dihydroxy	21.91	0.16
Diethylphthalate	24.95	0.48
Alcools, aldehydes, ketones		
1-octen-3 ol	7.32	0.36
benzyl alcool	8.93	0.36
1,6-octadien-3-ol,3,7-dimethyl	10.79	0.87
Phenylethylalcohol	11.20	6.58
1,3-benzenediol, 5-(dimethylamino)	23.90	0.23
benzenemethanol,2,4-dimethyl	26.06	0.15
Benzeneacetaldehyde	9.15	0.79
decanal	10.17	0.10
benzeneacetaldehyde, alpha -ethylidene-	16.036	0.77
3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzaldehyde	29.11	0.10
2,6,6-trimethyl-2-cyclohexen-1,4-dione	12.10	0.23
2-cyclohexen-1-one, 5-methyl-2-(1-methylethyl)-	15.29	0.80
3-methoxyacetophenone	18.37	26.46
Betadamasenone	19.29	0.52
cyclohexanone,2-(2-butynyl)	19.94	0.23
2,5-cyclohexadiene-1,4dione,2,6-bis(1,1-dimethylethyl)	21.57	0.24
2-pentanone,4-cyclohexylidene-3,3-diethyl-	21.9	0.49
2-pentadecanone,6,1,14-trimethyl	30.92	1.23
Esters of fatty acids		
oxalicacid, isoheptylpentyl ester0.08	8.28	0.08
2-thiophenecarboxylicacid,2-phenylethylester	13.12	0.23
sulfurousacid,2-ethylhexyl hexadecyl ester	14.23	0.33
sulfurousacid, pentylundecylester	15.48	0.33
oxalic acid, bis(6-etyloct-3-yl)ester	15.73	0.44
sulfurousacid, hexylpentylester	16.86	0.28
cyclohexanecarboxylicacid,2,3-dichlorophenyl ester	22.98	0.80

Monoterpenes, sesquiterpenes and relatives	RT	%Area
cyclopentaneaceticacid,3-oxo-2-pentyl-methylester	26.45	0.10
phtalicacid, hex-3-yl isobutyl ester	31.46	0.16
1,2-benzenedicarboxylic acid, butyloctylester	33.52	0.13
Hydrocarbons		
decane,4-metyl-	8.52	0.14
decane,2,3,7-trimetyl-	9.54	0.52
3-ethyl-3-methylheptane	9.70	0.20
10-methylnonadecane	10.86	0.24
octane,5-ethyl-2-methyl-	11.03	0.13
heneicosane	13.97	0.12
undecane,4,8-dimethyl	14.47	0.28
decane,1,1'-oxybis-	15.14	0.14
10-methylnonadecane	15.59	0.22
heneicosane	16.47	0.17
heptadecane,8-methyl	16.64	0.23
heptadecane	17.05	0.16
1-ethyl-2,2,6-trimethylcyclohexane	17.24	0.10
pentacosane	17.58	0.33
ethyltetramethylcyclopentadiene	20.98	0.14
hexacosane	21.40	0.24
pentadecane	22.41	0.22
tridecane,3-methyl	23.52	0.26
N –containing constituents		
Normicotine	17.82	0.39
5-fluoro-8-quinolinol	19.68	0.45
Furan-O-heterocycles		
Ethyl-2(5-methyl-5-vinyltetrahydrofuran-2-yl)propan-2-yl carbonate	10.46	0.13
3,6-dimethyl-2,3,3a,4,5,7ahexahydrobenzofuran	13.68	1.23
2(4H)-benzofuranone,5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl	23.28	0.88
Indenes		
1H-indene-1-one,2,3-dihydro-3,4,7-trimethyl	19.39	2.01
Si, S,F Compounds		
silane, cyclohexyldimethoxymethyl-	12.64	0.72
Diethyldivinylsilane	23.06	0.10
benzene,1-methyl-3-((2-methylpropyl)thio)-	23.15	0.50

compounds is 73.07% in the essential oil, 94.35% in hexanoic fraction, and 97.9% in chloroformic fraction. The number of volatile compounds identified by

GC-MS analysis of the essential oil is significantly greater than that obtained for the other two a polar fractions (hexanoic and chloroformic).

The major constituent of essential oil is eugenol (27.04%) followed by 3-methoxy acetophenone (26.4%) and phenyl ethyl alcohol (6.58%). The hexanoic fraction is rich in 3-methoxyacetophenone (17.86%), benzoic acid 4-metho-

xymethylester (12.72%), and O-heterocycles. The latter are also present in the chloroformic fraction containing mostly pentadecanoic acid 14-methylmethylester (12.99%) and phenolic compounds such as 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)phenol (7.18%). The difference between compositions of various fractions is not only related to the extraction method, polarity of solvents, and of course the nature of metabolites extracted, but also depends on the sample concentration used in analysis. The chemotype of *C. grandiflora* essential oil analyzed may be characterized by the oxygenated *p*-menthane skele-

Table 2. Composition of Hexanoic Fraction of *C. baborensis* Batt.

Hydrocarbons	RT	% Area
octane,2,6-dimethyl	8.54	0.60
decane,3,6-dimethyl	9.54	1.97
undecane,5,7-dimethyl	9.71	0.67
dodecane,2,6,10-trimethyl-	11.04	0.32
tritetracontane	13.97	0.57
pentadecane	14.48	0.76
2-methyloctacosane	15.31	0.49
hexadecane,2,6,11,15-tetramethyl	16.04	0.30
heptadecane,2,6,10,15-tetramethyl	16.47	0.77
4,4-dipropylheptane	17.06	0.57
tridecane	18.05	0.27
tetradecane	19.68	1.40
hentriacontane	20.30	1.13
pentadecane,2,6,10-trimethyl-	21.40	1.18
hexacosane	22.17	0.90
heptacosane	22.33	1.99
Heneicosane	23.77	0.38
Compounds of benzene ring		
4-acetylanisole	18.64	6.86
phenol,2,4-bis(1,1-dimethylethyl)	22.79	3.42
Si, S compounds		
silane, cyclohexyldimethoxymethyl	12.65	3.38
sulfurousacid, butylnonylester	12.72	0.27
sulfurousacid, pentadecyl 2-propylester	32.18	0.31
Esters		
oxalicacid, 6-ethyloct-3-yl isobutylester	15.74	1.88
aceticacid, trichloro, octylester	17.24	0.44
benzoic acid, 4-methoxy methyl ester	19.02	12.72
glycine, n-(2,6-difluorobenzoyl)-octylester, 22.50	0.76	
diethylphtalate	24.97	0.29
methyl tetradecanoate	28.13	0.44
phtalic acid, hept-3-yl isobutylester	31.47	0.62
pentadecanoicacid, 14-methyl-methylester	32.71	3.32
phtalic acid, butyl hept-2-yl ester	33.52	1.08
Alkenes		
2,3-dimethyl-3-heptene(z)	16.99	0.42
3,9-epoxy-p-mentha-1,8(10)-diene	19.94	1.20
2,4,4,6,6,8,8-heptamethyl-2-nonene	27.61	1.25
Ketones		
3-methoxyacetophenone	18.40	17.86
ortho-methoxyacetophenone	18.90	1.62
2-pentadecanone,6,10,14-trimethyl	30.91	3.12
3-methyl-3,5-(cyanoethyl)tetrahydro-4-thiopyranone	32.64	0.35

Hydrocarbons	RT	% Area
Alcool		
1-dodecanol,2-octyl-	17.49	0.32
O- and N-Heterocycles		
5,6-dihydro-5-methyl-4h-1,3,5-dithiazine	20.71	0.48
2 (4h)-benzofuranone,5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-,(r)-	23.28	3.71
6h-pyrazolo(1,2-a)(1,2,4,5)tetrazine, hexahydro-2,3-dimethyl	26.52	0.38
Others		
dodecane, 1-iodo	16.64	0.79
2-bromo dodecane	21.14	0.90

ton monoterpenes, namely menthone, isomenthone, isomenthol and pulegone [21]; the same structures were most abundant in previous studies of these plants from Greece and France origin [22, 23] at various percentages.

A completely different chemotype was reported in Turkish *C. grandiflora* with isopinocampone as major compound (52.6%) in the total oil [24, 25]. This is not surprising because chemical polymorphism is characteristic of many Lamiaceae family species. The composition of essential oils varies very much depending on annual climatic changes and nature of ground. Therefore, even within the same chemotype, quite remarkable variations in essential oil composition are possible.

3.2. Antioxidant Activity

The presence of different antioxidants in plant tissues makes it relatively difficult to quantify extractions (fractions) used to provide for the maximum isolation of available antioxidants [26]. The RSC (radical scavenging capacity) measurement by DPPH and ABTS⁺ assays provide easy, rapid and sensitive methods and therefore most frequently applied for the preliminary assessment of antioxidant power of various natural substances.

DPPH has been used extensively as a free radical to evaluate reducing power of substances [26, 27], so it is a useful reagent for investigating the free radical scavenging activities of compounds. The four tested *C. baborensis* Batt. extracts showed high percentage inhibition of DPPH radical, ranging from 58.6 to 81.7%, while in ABTS⁺ assay, the hexanoic and chloroformic fractions gave a lower %inhibition (6.90% and 7.12%, respectively), probably because of pretreatment of the samples (solubility in chloroform). ABTS⁺ assay is used for hydrophilic compounds in the case of polar solvents. FRAP assay is a versatile method and can be readily applied to both lipophilic and hydrophilic extracts of various plants. In this assay, the antioxidant activity is determined based on the ability to reduce ferric (FeIII) to ferrous (FeII) iron and the results are expressed in mg ferrous iron equivalents per mL of sample solution. The ferric reducing power of different extracts was in the range of 19.52 – 36.5 mg Fe(II)/mL (Table 4). The ethyl acetate ex-

tract shows the highest antioxidant power according to different methods, except for the FRAP assay. The observed discrepancy can be explained by different solvent polarities and pH of the reaction media [28]. For the ORAC test, ethyl acetate and butanolic extracts showed maximum antioxidant power at concentrations of 37.28 and 21.73 µM/mL, respectively.

The four subfractions (A, B, C, D) with increasing polarity, belonging to the butanolic fraction gave good results in different tests described above. It should be noticed, however, that the antioxidant power of molecules in the same extract is not necessarily identical to what they show separately (synergistic effect).

3.3. Phytochemical Screening

Total phenolics content in polar fractions of *C. baborensis* Batt. plant extract is about 7 and 7.33 mg GAE/g dry weight for EtOAc and BuOH fractions, respectively, which is virtually the same amount (Table 5). Against 3.71 and 9.46 mg GAE/g powder in EA and BuOH extracts of *Calamintha clinopodium* reported in [29, 30], the study of phenolics content in 24 species of Lamiaceae gave values between 91 and 575 mg GAE/dry weight. These values are higher than those in the present study. Previous works showed that the amount of phenolics in plants depend on edaphic and environmental conditions (temperature, daylight intensity, salinity and water stress) as well as on biological factors (genotype and organ ontogenesis). In addition, the solubility of phenolic compounds depends on the type of solvent (polarity), the degree of polymerization, and their interaction [31].

3.4. Antibacterial Activity

Apolar fractions of *C. baborensis* Batt. plant extract showed good antibacterial activity against *E. coli* with an inhibition zone diameter of 19 and 19.2 mm for Hex F and Chlor F, respectively. In comparison to aqueous distilled essential oil fractions A, B, C from the aerial parts of *C. betulifolia* Boiss. et Bal. collected from three different localities in Turkey (Table 6) data on the antimicrobial effects of *C. betulifolia* essential oils reported for the first time show

the MIC values against *E. coli* (in mg/mL) about > 0.5 for A, 0.125 for B, and 0.06 for C (against 0.003 for standard chloramphenicol) [24]. Otherwise, *C. nepeta* (L) savi from molina di quosa (Italy) shows good activity with a MIC value of 10 µg/mL against *E. coli* ATCC 25922 [25]. The microbial activity of the oil of *C. nepeta* (L) savi ssp *nepeta* var.

subisidonda (borb) Hayek from Serbia was screened against *E. coli* 95 giving an inhibition zone diameter of 24.8 mm (1 : 10 oil : ethanol), 20.2 mm (1 : 20), 15.3 mm (1 : 30), and 14.7 mm (1 : 50). It was found that all the microorganisms were susceptible to the oil at all dilutions, however, the oil activity declined with dilutions. Microbial investigations of

Table 3. Composition of Chloroformic Fraction of *C. baborensis* Batt.

Hydrocarbons	RT	%Area
Octane,2,6-dimethyl	8.53	1.12
Decane,3,6-dimethyl	9.55	3.40
Undecane,5,7-dimethyl-	9.71	1.09
heptadecane	13.97	0.84
Dodecane,4,6-dimethyl-	15.48	1.27
hexadecane	16.23	5.08
1-ethyl-2,2,6-trimethylcyclohexane	16.99	0.73
octadecane	20.30	1.25
eicosane,10-methyl	21.31	0.55
octacosane	22.17	1.29
tridecane,2-methyl-	22.33	3.31
heptacosane	23.52	1.22
Compounds of benzene ring		
Phenol,2,4-bis (1,1-dimethylethyl)-	22.79	7.18
N-, O-Heterocycls		
2(4H)-benzofuranone,5,6,7,7a-tetrahydro	23.29	1.91
-4,4,7a-trimethyl-		
cyanoacetylurea	32.63	0.65
histidine, 1, N-dimethyl-4-nitro-	36.72	1.20
Esters and acids		
Sulfurous acid, decyl hexyl ester	15.74	3.20
Sulfurousacid, dodecyl 2 -propylester	16.86	1.47
Trichloroacetic acid,6-ethyl-3-octyl ester	17.49	0.50
Nonahexacontanoicacid	21.14	0.95
Pentadecanoicacid, 14-methyl-, methylester	32.71	12.99
Phtalicacid, butyl 4 -methylpent-2-ylester	33.52	1.29
9,12-octadecadienoic acid (Z, Z)-methyl ester	36.27	2.42
9,12,15-octadecatrienoic acid, methyl ester,(Z, Z,Z)-	36.43	9.63
Ketones, aldehydes, alcohols		
1-dodecanol, 2-octyl-	17.24	0.75
Ethanone,1-(2-hydroxy-5-methylphenyl)-	18.65	0.54
p-cymen-7-ol	18.65	0.54
4-hydroxy-2-methylacetophenone	18.65	0.54
2-pentadecanone, 6,10,14-trimethyl	30.91	2.92
Others		
Silane, cyclohexyldimethoxymethyl-	12.65	5.74
Silane, trichlorooctadecyl-	21.40	1.65

TABLE 4. Antioxidant Properties of *C. baborensis* Extracts Measured by FRAP, ABTS⁺, DPPH, and ORAC Scavenging Assays

	Hex	Chlor	Ea	BuOH	A	B	C	D
ABTS ¹ %scavenging	6.9 ± 0.29 ^c	7.12 ± 1.31 ^c	68.9 ± 0.22 ^a	27.67 ± 0.05 ^b	46.06 ± 0.08 ^b	81.78 ± 0.19 ^a	40.41 ± 0.13 ^b	32.66 ± 0.07 ^b
DPPH ^{1*} %scavenging	58.6 ± 0.017 ^c	76.85 ± 0.14 ^b	81.70 ± 0.09 ^a	80.99 ± 0.09 ^a	62.02 ± 0.14 ^c	82.66 ± 0.03 ^a	84.24 ± 0.07 ^a	84.59 ± 0.03 ^a
FRAP μM/mg	36.5 ± 0.07 ^a	23.9 ± 0.08 ^b	18.47 ± 0.1 ^c	19.52 ± 0.13 ^c	32.2 ± 0.10 ^a	18.85 ± 0.10 ^c	17.85 ± 0.01 ^c	18.35 ± 0.06 ^c
ORAC ² μM/mg	< 4.06 ^c	8.35 ^{3 c}	37.28 ^{4b}	21.73 ^{4b}	> 52.8 ^a	> 52.8 ^a	> 52.18 ^a	32.92 ^{4b}
IC50 ppm	68.7 ^a	68 ^a	23 ^c	53.5 ^b	39.9 ^b	13.47 ^c	40.4 ^b	49.8 ^b

Fractions: Hex (hexanoic), Chlor (chloroformic), Ea (ethyl acetate), BuOH (butanolic); A, B, C, D (subfractions of BuOH). ¹Sample concentration in mg/mL dilution 1/100; ^{1*} sample concentration in mg/mL; ² different conc. of trolox in μM (6.25, 12.5, 25, 50); ³ sample dilution at 20 μg/mL; ⁴ sample dilution at 10 μg/mL; ^{a, b, c, d} significant differences between various soluble fractions of hydroalcoholic extract of the leaves of Algerian Lamiaceae *C. baborensis* Batt. ($P < 0.05$).

the oil of *C. nepeta* ssp *glandulosa* gave similar results under the same conditions [27].

4. CONCLUSION

Summarizing all data obtained from the results of this investigation, it can be concluded that *C. baborensis* Batt. from Algeria, an endemic plant studied in this work for the first time contains valuable biologically active components including antioxidants and volatile compounds, which can find wide practical application in various areas such as formulation and production of food additives and healthy supplements, so it can be used as source of natural antioxidant agents. Therefore, findings of this work are useful to further research, in particular, for the identification of specific phenolics responsible for the antioxidant activity of *C. baborensis* Batt.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to express their thanks to the Algerian Ministry of Higher Education and Research (MESRS) for financial support.

TABLE 5. Total Amount of Phenolics in Polar Extracts of *C. Baborensis* Batt.

Extract	C	TPC (A)
Ethyl acetate (EtOAc)	mg/mL	7 ± 0.01
Butanolic (BuOH)	mg/mL	7.332 ± 0.02

A: Values expressed as mg GAE/g powder; TPC: total phenolic content; C: concentration used for determination of TPC (mg/mL)

TABLE 6. Percentage Inhibition, Zone Diameter (mm) and MIC Values of Various Fractions of *C. baborensis* Batt. Herbs

	Hex F	Chlor F	EtOAc F	BuOH F	Oxytetracycline
Diam (mm)	10.8 ± 0.83(40 μl)	12.4 ± 0.54	11.4 ± 0.54	10.4 ± 0.54	–
	12.8 ± 0.44	10.2 ± 0.44	–		
	12.8 ± 0.4 (60 μl)	16 ± 1.00	13.2 ± 0.44	14.2 ± 0.44	–
	19 ± 1.22	19.2 ± 0.83			
	(100 μl)				
% Inhibition	43.2%	49.6%	45.6%	41.6%	-
	51.2%	64%	51.2%	40.8%	-
	76%	76.8%	52.8	56.8%	-
MIC (μg/mL)	43 ^a	43.4 ^a	30 ^b	32 ^b	8

^{a, b} Significant ($P < 0.05$) differences between MIC values of various soluble fractions of hydroalcoholic extract of the leaves of Algerian Lamiaceae *C. baborensis* Batt.

REFERENCES

1. W. F. Petrone, D. K. English, K. Wong, and J. M. McCord, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **77**, 1159 – 163 (1980).
2. B. Halliwell, C. E. Cross, and J. M. C. Gutteridge, *J. Lab. Clin. Med.*, **119**, 598 – 620 (1992).
3. T. Finkel and N. J. Holbrook, *Nature*, **408**, 239 – 247 (2000).
4. S. E. Atawodi, *Afr. J. Biotechnol.*, **4**(2), 177 – 182 (2005).
5. I. S. R. Georgetti, R. Casagrande, V. M. Di Mambro, et al., *Pharma Sci. Arlington*, **5**, 1 – 5 (2003).
6. M. P. Kahkonen, A. I. Hopia, H. J. Vuorela, et al., *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 3954 – 3962 (1999).
7. Y. Velioglu, G. Mazza, L. Gao, and B. Oomah, *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 4113 – 4117 (1998).
8. N. A. Botsoglou, S. H. Grigoropoulou, E. Botsoglou, and A. Govaris, *Meat Sci.*, **65**, 1193 – 1200 (2003).
9. V. Lagouri and D. Boskou, *Food Sci.*, **37**, 869 – 879 (1995).
10. G. Ruberto and M. T. Baratta, *Food Chem.*, **69**, 167 – 174 (2000).
11. N. Mimica-Dukic, B. Bozin, M. Sokovic, et al., *Planta Med.*, **69**, 413 – 419 (2003).
12. R. Phillips, N. Foy, *Herbs*, Pan Books, London (1990). ISBN 0-330-30725-8.
13. W. Brand-Williams, M. Cuvelier, and C. Berset, *Food Sci. Technol.*, **28**, 25 – 30 (1995).
14. C. Sanchez Moreno, J. A. Larrauri, and F. Saura-Calixto, *J. Sci. Food Agric.*, **76**(2), 270–276 (1998).
15. R. Pellegrini, N. Proteggente, A. Pannala, et al., *Free Radical Biol. Med.*, **26**, 1231 – 1237 (1999).
16. I. F. F. Benzie and J. Strain, *Anal. Biochem.*, **239**, 70 – 76 (1996).
17. P. Held, Performing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assays with Synergy™ HT multi-detection microplate reader. Biotek. [http://www.biotek.com/resources/tech_res_detail.php\(id=161\)\(2005\)](http://www.biotek.com/resources/tech_res_detail.php(id=161)(2005)). Accessed on 20 December 2013.
18. J. M. Andrew, *J. Antimicrob. Chemother.*, **56**, 60 – 76 (2005).
19. A. Chanwitheesuk, A. Teerawutgulrag, J. D. Kilburn, and N. Rakariyatham, *Food Chem.*, **100**, 1044 – 1048 (2007).
20. S. Ozturk and S. Ercisli, *Food Control*, **18**, 535 – 540 (2007).
21. D. Dobravalskytė, P. R. Venskutonis, and T. Talou, *Food Chem.*, **135**, 1539 – 1546 (2012).
22. C. Souleles and N. Argyriadou, *Planta Med.*, **56**, 234 – 235 (1990).
23. A. P. Carnat, A. Chossegros, and J. L. Lamaison, *J. Essent. Oil Res.*, **3**, 361 – 362 (1991).
24. M. Kürkçüoğlu, G. Iscan, T. Ozek, et al., *J. Essent. Oil Res.*, **19**, 285–287 (2007).
25. K. H. C. Baser and T. Ozek, *Planta Med.*, **59**, 390 (1993).
26. H. I. D. Dorman and R. Hiltunen, *Food Chem.*, **88**, 193 – 199 (2004).
27. N. Cotelle, J. L. Bemier, J. P. Catteau, et al., *Free Radical Biol. Med.*, **20**, 35 – 43 (1996).
28. I. I. Koleva, T. A. Van Beek, J. P. H. Linssen, et al., *Phytochem. Anal.*, **13**, 8 – 17 (2002).
29. N. Khled Khoudja, L. Boulekbache-Makhlouf, and K. Madani, *Ind. Crops Prod.*, **52**, 177 – 182 (2014).
30. D. Stagos, C. Spanou, N. Mossialos Portesis, et al., *Food Chem. Toxicol.*, **50**, 4115 – 4124 (2012).
31. R. Ksouri, W. Megdiche, H. Falleh, et al., *C. R. Biol.*, **331**, 865 – 873 (2008).
32. L. Panizzi, G. Flamini, P. L. Cioni, and I. Morelli, *J. Ethnopharmacol.*, **39**, 167 – 170 (1993).
33. D. Kitic, G. Stojanovic, R. Palic, and V. Randjelovic, *J. Essent. Oil Res.*, **17**, 701 – 703 (2005).
34. D. Kitic, R. Palic, G. Stojanovic, et al., *J. Essent. Oil Res.*, **14**, 150 (2002).

Résumé

Une recherche bibliographique a montré que les espèces du genre *Cistaceae* et du genre *Calamintha* largement présentes dans le règne végétal, sont très utilisées en médecine traditionnelle par les populations locales notamment en Algérie.

Appartenant à la famille des cistacées pour l'une et la famille des labiées pour la deuxième, ces deux genres sont réputés pour accumuler des substances de type flavonique, molécules connues pour leur activités biologiques diverses notamment anti-oxydante .

Dans ce travail, notre intérêt a porté sur l'isolement de métabolites secondaires à la recherche de nouveaux modèles phénoliques susceptibles d'être bioactifs.

Concernant le choix des espèces à étudier, notre critère principal a été l'endémisme et le fait que certaines espèces n'ont jamais fait l'objet d'investigations phytochimiques ceci concernant la plante *Calamintha baborensis*. Pour la seconde plante *Cistus villosus* notre choix a été arbitraire car sur une liste de 15 plantes cueillies dans la région de Bouhmama, connue pour sa richesse floristique notre choix s'est porté sur cette plante car elle présentait une carte flavonique bidimensionnelle relativement riche et peu compliquée à séparer .

Nos travaux d'extraction des parties aériennes (feuilles et fleurs) de l'espèce endémique *Calamintha baborensis* suivie de séparations chromatographiques (CC, CCM), nous ont permis d'isoler et d'identifier grâce aux techniques de la LC-MS /MSⁿ plusieurs molécules de flavonoïdes aglycones et hétérosides connus. Le traitement analogue des parties aériennes de l'espèce *Cistus villosus* a conduit à la séparation et à l'identification de quatre autres molécules.

L'analyse GC/MS de l'huile essentielle de *Calamintha baborensis* ainsi que celle de ses fractions apolaires a montré une grande variété de composés dont majoritairement l'eugénol (27,04%) suivi de la 3-méthoxyacétophénone (26,4%) de composés terpéniques comme l'oxyde de caryophyllène (1,84%) trans bêta-ionone (1,71%) alcool phényléthyl (6,58%).

L'analyse GC/MS des fractions apolaires de *cistus villosus* ont montré une panoplie de composés à savoir le 5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-triméthyl-, (R)-2(4H)-Benzofuranone, vient ensuite l'eugénol, l'alcool benzyl un terpène qui est le 4-(3-hydroxy--butenyl)-3,5,5-triméthyl-2-Cyclohexen-1-one un composé azoté qui est le 2-amino-4-méthoxy-phénol et également le , 2,3,4,4a,5,6-hexahydro- 7-méthoxy-quinoline ainsi que le , 2,4-bis(1,1-diméthylethyl)-phénol et majoritairement des hydrocarbures.

Les extraits AcOEt et *n*-BuOH de la plante *Calamintha* ont donné les valeurs les plus élevées de pouvoir antioxydant avec différentes méthodes : l'ABTS avait un % d'inhibition de 68,9 /81,7% et celle du DPPH était de 27,6 / 80,99% et avec l'ORAC / FRAP était de 37,28 / 28,47 et 21,73 / 19,52 µM / mL respectivement; en outre, ils ont été évalués pour leur teneur en phénols totaux. L'activité antibactérienne des extraits montre de bons résultats avec des fractions hexanoïques et chloroformiques contre *E. coli* (19 mm et 19,2 mm) respectivement.

Nous avons complété notre travail par une petite étude microbiologique sur les fractions brutes des deux plantes et qui ont donné des résultats satisfaisants qui seront préliminaires à de futurs travaux de recherche.

Mots clés :

Flavonoïdes, huiles essentielles, GC/MS/MS, *Cistus villosus*, *Calamintha baborensis*. Activité antioxydante.

Summary

A literature search has shown that species of the genus *Cistaceae* and genus *Calamintha* widely present in the plant kingdom are widely used in traditional medicine by local populations, particularly in Algeria.

Belonging to the *cistaceae* family for one and the *labiates* family for the second, these two genera are reputed to accumulate substances of the flavonic type, molecules known for their various biological activities including antioxidant.

In this work, our interest focused on the isolation of secondary metabolites in search of new phenolic models that can be bioactive.

Regarding the choice of species to study, our main criterion was endemism and the fact that certain species have never been the subject of phytochemical investigations concerning the plant *Calamintha baborensis*. For the second plant *Cistus villosus* our choice was arbitrary because on a list of 15 plants picked in the region of Bouhmama, known for its floristic richness our choice fell on this plant because it presented a two-dimensional flavonic map relatively rich and little complicated to separate.

Our extraction work on the aerial parts (leaves and flowers) of the endemic species *Calamintha baborensis* followed by chromatographic separations (CC, CCM) allowed us to isolate and identify using LC-MS / MSⁿ techniques. Several known flavonoid molecules. Analogous treatment of the aerial parts of the *Cistus villosus* species led to the separation and identification of four other molecules.

The GC / MS analysis of the essential oil of *Calamintha baborensis* as well as that of its nonpolar fractions showed a wide variety of compounds, mainly eugenol (27.04%) followed by 3-methoxyacetophenone (26.4%).) terpene compounds such as caryophyllene oxide (1.84%) trans beta-ionone (1.71%) phenylethyl alcohol (6.58%).

GC / MS analysis of apolar fractions of *Cistus villosus* showed a variety of compounds, namely 5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-, (R) -2 (4H) -Benzofuranone Then comes eugenol, benzyl alcohol, a terpene which is 4- (3-hydroxy-butenyl) -3,5,5-trimethyl-2-cyclohexen-1-one, a nitrogen compound which is 2- amino-4-methoxy-phenol and also 2,3,4,4a, 5,6-hexahydro-7-methoxy-quinoline as well as 1,2,4-bis (1,1-dimethylethyl) -phenol and for the most part hydrocarbons

The extracts EtOAc and *n*-BuOH of the plant *Calamintha* gave the highest values of antioxidant power with different methods ABTS was a % of inhibition of 68.9/81.7% and DPPH was 27.6/80.99% and with ORAC/FRAP was 37.28/28.47 and 21.73/19.52 µM/ml respectively.

We completed our work with a small microbiological study of the raw fractions of both plants, which yielded satisfactory results that will be preliminary to future research.

Keywords :

Flavonoids, essential oils, GC / MS / MS, *Cistus villosus*, *Calamintha baborensis*, Antioxydant activity.