

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

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

N° d'ordre :

N° de série :

## THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences

Spécialité : Chimie organique  
Option : Phytochimie

Par

M<sup>elle</sup> ACHOUB Hanane

THEME

**Etude phytochimique et biologique de deux plantes médicinales  
Algériennes : *Thymus ciliatus* (Desf) (Lamiaceae) et *Asteriscus  
graveolens* (Forsk.) Dc. (Asteraceae).**

Devant le jury :

<b>M<sup>me</sup>. BENAYACHE Fadila</b>	Pr. Université frères Mentouri, Constantine 1	<b>Présidente</b>
<b>M<sup>r</sup>. ZAITER Lahcene</b>	Pr. Université frères Mentouri, Constantine 1	<b>Directeur et rapporteur</b>
<b>M<sup>r</sup>. RASTRELLI Luca</b>	Pr. Université Salerno, Italie	<b>Examineur</b>
<b>M<sup>r</sup>. BOUJERDA Azzedine</b>	Pr. Université Mohamed Seddik Ben Yahia, Jijel	<b>Examineur</b>
<b>M<sup>me</sup>. BICHA Sabrina</b>	Pr. Université frères Mentouri, Constantine 1	<b>Examinatrice</b>
<b>M<sup>me</sup>.SEGUENI Narimane</b>	MCA. Université Salah Boubnider, Constantine 3	<b>Examinatrice</b>

**Soutenu le 30/11/2020**

# *Dédicace*

*A mes chers parents pour leur amour, leurs prières, leurs sacrifices et leurs encouragements à chaque instant tout au long de mes études. Que ce travail soit, pour eux, un faible témoignage de ma profonde affection et tendresse.*

*A mes chères sœurs Samira et Kamilia.*

*A mes chers frères Ahmed, Ibrahim et Bourhane.*

*A mes chers neveux et nièce Yahia, Siradj Dikra et Amira*

*A tous mes amis et collègues.*

*A toute ma famille.*

♥♥ Hanane ♥♥

## *Remerciements*

Avant tout, je remercie mon DIEU tout puissant, de m'avoir donné la volonté, le courage et la patience pour réaliser ce travail.

Ce travail a été réalisé en collaboration entre l'Unité de recherche: Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques (VARENBIOMOL) Université Frères Mentouri, Constantine 1 et le laboratoire de Food and phytochemistry de l'université de Salerno, Italie.

Je tiens particulièrement à remercier mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur **ZAITER Lahcene** pour m'avoir guidée dans mon travail tout au long de ces années, ainsi que pour sa gentillesse, ses précieux conseils, ses encouragements et sa disponibilité.

J'adresse chaleureusement mes remerciements à madame la Professeure **BENAYACHE Fadila** pour ses conseils précieux, ses efforts, ses compétences scientifiques et pour son soutien et sa gentillesse. Qu'elle trouve ici le témoignage de ma profonde gratitude. Ainsi, pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant de présider le jury de cette thèse.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur **RASTRELLI Luca**, Professeur et directeur de laboratoire de Food and phytochemistry de l'université Salerno, Italie, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, pour m'avoir fait confiance, m'avoir encouragée et conseillée tout en me laissant une grande liberté ; pour son soutien et sa grande générosité, qu'il soit assuré de ma profonde gratitude.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements à Madame **MENCHERINI Teresa** pour m'avoir donné l'opportunité d'être au sein de son laboratoire et pour m'avoir guidée dans mon travail durant mes stages. Je la remercie pour sa confiance, ses conseils, sa gentillesse et surtout pour l'identification structurale des produits isolés. Les remerciements exprimés ici donc ne seront jamais à la hauteur de votre implication dans la réalisation de ce travail de thèse.

Mes vifs remerciements s'adressent également, à **Mr. BOUJERDA Azzedine**, Professeur à l'université de Mohamed Seddik Ben Yahia, Jijel, **M<sup>me</sup> BICHA Sabrina** Professeure à l'université Frères Mentouri Constantine 1 et **M<sup>me</sup> SEGUENI Narimane** Maître de conférences à l'université de Constantine 3, qui m'ont honorée en acceptant de faire partie du jury de ma thèse.

Même s'il n'est pas parmi les membres du jury comme dans les autres thèses, je tiens à remercier **Mr. BENAYACHE Samir**, Professeur à l'université Frères Mentouri Constantine 1, pour ses encouragements, sa disponibilité et ses précieux conseils.

Je remercie vivement madame **AMEDDAH Souad** et monsieur **MENAD Ahmed** professeurs à l'université Frères Mentouri, Constantine 1 et leurs équipes de recherche, pour la réalisation des essais biologiques.

J'adresse mes remerciements à **Mr. SEGHIRI Ramdane**, Professeur à l'université Frères Mentouri Constantine 1, pour sa gentillesse, sa disponibilité, ses encouragements au cours de ce travail.

Je remercie également **Jean-claude CHALCHAT, Pierre CHALARD** Professeurs à l'école Nationale Supérieure de Chimie, de Clermont-France pour l'analyse de l'huile essentielle d'une de mes plantes.

Je voudrais également remercier les ingénieurs de notre unité de recherche : monsieur **HAZMOUNE Hichem** et madame **TEBBOUB Naouel** pour leur aide et leur disponibilité.

Je remercie mon amie **Francesca Cerrone** pour sa gentillesse, ses encouragements, ainsi que son aide. Je n'oublierai jamais les bons moments qu'on a passés ensemble.

Mes remerciements vont aux Docteur **Tiziana Esposito** de l'université de Salerno, Italie, pour son amitié, son aide et son soutien durant mon séjour à Salerno.

Je remercie également tous mes collègues de notre unité de recherche VARENBIOMOL pour leur disponibilité, leur soutien, leur encouragement et leur bonne humeur, qui m'ont apporté tout au long de ma thèse. Je cite en particulier : Wasssila, Feryal, Halima, Nassima, naima, Hanane Belbache, Hanane Aissaoui, Samira, Khawla, Sara, Laila, Chahra, Tamer, Tarek, Widad, Randa, Houria, Redouane, Sihem, Imene, Marwa, Ines....

Mes remerciements les plus profonds vont à mes amies : Soumia, Nesrine, Fatine, Wissam, Sara, Hanane, Maria, Marwa, Selma, pour leur soutien moral et pour les bons moments passés ensemble en Italie.

Finalement, toute ma gratitude et amour vont à mes chers parents qui n'ont jamais douté de moi et qui m'ont aidée et encouragée tout au long de ma vie et mes études.

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



## *Abréviations :*

### **Techniques chromatographiques**

**CCM** : Chromatographie sur couche mince

**HPLC** : Chromatographie liquide à haute performance

**CG** : Chromatographie gazeuse

**CG/SM** : Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

### **Détermination structurale**

**ax** : axial

**COSY** : correlated spectroscopy

**d** : doublet

**dd** : doublet de doublet

**dl** : doublet large

**eq** : équatorial

**J (Hz)** : constante de couplage exprimée en Hz

**HE** : Huile essentielle

**HMBC** : Heteronuclear Multiple Bonding Connectivity

**HSQC** : Heteronuclear Single Quantum Connectivity

**m** : multiplet

**m/z** : masse/charge d'un ion

**RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire

**RMN <sup>1</sup>H** : Résonance Magnétique Nucléaire du proton

**RMN <sup>13</sup>C** : Résonance Magnétique Nucléaire du carbone 13

**s** : singulet

**sl** : singulet large

**t** : triplet

**µg** : Micro-gramme

**UV** : Ultra-Violet

**δC** : Déplacement chimique du carbone en ppm

**δH** : Déplacement chimique du proton en ppm

### **Activités biologiques**

**DPPH** : 1,1-Diphényl-2-PicrylHydrazyle

**BHA** : ButylHydroxyAnisole

**BHT** : ButylHydroxyToluene

**IC<sub>50</sub>** : Concentration inhibitrice à 50%

**I%** : Pourcentage d'inhibiton

**HCT116** : Cellules de cancer du côlon humain

**DLD1**: Cellule d'adénocarcinome colorectal humain

**DMEM** :Dulbecco's Modified Eagle Medium

**HDFa** :Human Dermal Fibroblasts, adult

**FBS** : Fetal Bovine Serum

**MTT** : 3-(4,5-dimethylthiazol- 2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

## SOMMAIRE

Introduction.....	1
Références.....	3

### *Chapitre I : Rappel Bibliographique*

Introduction .....	4
I.1.Présentation de La famille des lamiacées .....	4
I.2.Le genre <i>Thymus</i> .....	4
I.2.1.Classification taxonomique.....	5
I.2.2.Description morphologique.....	5
I.2.3.Répartition géographique .....	6
I.2.3.1.Dans le monde .....	6
I.2.3.2.En Algérie .....	6
I.2.4. Utilisations et activités biologiques .....	8
I.3. Métabolites isolés du genre <i>Thymus</i> .....	8
I.3.1.Les acides phénoliques .....	8
I.3.2 Les flavonoïdes .....	12
I. 3.3. Les terpénoïdes .....	18
I. 4. La famille des Asteraceae .....	21
I. 4. 1. Généralités .....	21
I. 4. 2. Distribution .....	21
I. 4. 3. Caractéristiques morphologiques des Asteraceae .....	22
I.4.4. Position systématique de la famille des Asteraceae .....	23
I.4.5.Utilisations économiques et thérapeutiques .....	24
I.5.Description botanique du genre <i>Asteriscus</i> .....	24
I. 5. 1. Systématique .....	25
I.6. Principaux métabolites secondaires du genre <i>Asteriscus</i> .....	25
I.6.1. Les sesquiterpènes .....	25
I.6.2 Les flavonoïdes .....	33
I.6.3 Autres métabolites secondaires .....	36
I.6.4. Utilisations et activités biologiques.....	40



Conclusion.....	41
Références.....	42

## *Chapitre II : Travaux personnels*

II.1. Etude phytochimique de l'espèce <i>thymus ciliatus</i> (desf) .....	54
II. 1. 1. Place dans la systématique .....	54
II. 1. 2. Description botanique.....	54
II.1.3. Récolte de la matière végétale.....	55
II.1.4 Extraction de la matière végétale.....	55
II.1.5. Séparation chromatographique de l'extrait acétate d'éthyle.....	58
II.1.6. Séparation chromatographique sur colonne .....	58
II.1.7. Séparation et purification des fractions .....	60
II.2. Etude phytochimique de l'espèce <i>Asteriscus graveolens</i> (Forsk.) dc. ....	64
II.2. 1. Place dans la systématique.....	64
II.2.2. Description botanique.....	64
II.2.3. Noms Vernaculaires.....	65
II.2.4. Synonymes.....	65
II.2.5. Protocole expérimental .....	65
II.2.5.1. Récolte de la matière végétale.....	65
II.2.5.2. Extraction de la matière végétale.....	65
II.2.6. Etude des extraits .....	68
II.2.6.1. Séparation chromatographique de l'extrait acétate d'éthyle.....	68
II.2.6.2. Séparation et purification des fractions.....	70
II.2.6.3. Séparation chromatographique de l'extrait <i>n</i> -butanol.....	72
II.2.6.4. Séparation et purification des fractions.....	74
II.3. Etude biologique .....	75
II.3.1. Dosage des polyphénols totaux .....	75
II.3.2. Dosage des flavonoïdes totaux.....	76
II.3.3. Activité antioxydante .....	76

II.3.3.1. Activité anti radicalaire DPPH .....	76
II.3.3.2. Test de blanchissement du $\beta$ -carotène .....	77
II.3.4. Etude de l'activité cytotoxique .....	78
II.3.4.1. Cellules et traitement .....	78
II.3.4.2. Test de viabilité.....	78
Conclusion.....	79
Références.....	80

### *Chapitre III: Résultats et discussions*

III.1. Identification structurale des composés isolés de l'espèce <i>thymus ciliatus</i> .....	81
III.1.1. Détermination structurale du composé TCf16-1 .....	81
III.1.2. Détermination structurale du composé TCf16-2 .....	85
III.1.3. Détermination structurale du composé TCf16-3.....	89
III.1.4. Détermination structurale du composé TC/20/17 .....	94
III.1.5. Détermination structurale du composé TC/24/7 .....	101
III.1.6. Détermination structurale du composé TC/24/9.....	108
III.1.7. Détermination structurale du composé TC/22/8.....	113
III.2. Identification structurale des composés isolés de l'espèce <i>A. grageolens</i> .....	115
III.2.1. Identification des produits isolés de la phase acétate d'éthyle... ..	115
III.2.1.1. Détermination structurale du composé Ag f10 .....	115
III.2.1.2. Détermination structurale du composé Ag f8.....	126
III.2.1.3. Détermination structurale du composé Ag /10/12 .....	133
III.2.1.4. Détermination structurale du composé Ag /14/12... ..	143
III.2.1.5. Détermination structurale du composé Ag /16/23 .....	157
III.2.2 Identification des produits isolés de la phase <i>n</i> -butanol.....	168
III.2.2.1. Détermination structurale du composé Ag /48/6 .....	168
III.2.2.2. Détermination structurale du composé Ag /48/10.....	184
III.2.2.3. Détermination structurale du composé Ag /48/13 .....	192
III.2.2.4. Détermination structurale du composé Ag /52/10.....	204

III.2.2.5.Détermination structurale du composé Ag /58/6 .....	212
III.3.Résultats des activités biologiques .....	220
III.3.1.Dosage des polyphénols et des flavonoïdes des extraits de <i>T. ciliatus</i> .....	220
III.3.2.Activité antioxydante des extraits de <i>T. ciliatus</i> .....	221
III.3.3.Activité antioxydante des extraits d' <i>Asteriscus graveolens</i> .....	222
III.3.3.1.Activité anti radicalaire DPPH.....	222
III.3.3.2.Test de blanchissement du $\beta$ -carotène.....	224
III.3.4.Activité cytotoxique.....	225
Références.....	228

#### ***Chapitre IV : Analyse GC et GC/MS de l'huile essentielle de Thymus ciliatus***

Introduction.....	231
IV.1.Les travaux intérieurs sur les huiles essentielles du genre <i>Thymus</i> .....	231
IV.2.Extraction de l'huile essentielle de <i>Thymus ciliatus</i> (Desf).....	234
IV.3.Analyse GC et GC/MS de l'huile essentielle .....	234
IV.3.1.Analyse GC-FID.....	234
IV.3.2.Analyse GC/MS.....	235
IV.4. Résultats et discussion.....	235
Conclusion.....	239
Références.....	240
Conclusion générale.....	244

# *Introduction générale*

### **Introduction générale**

Les plantes ont depuis longtemps présenté un rôle très important pour l'humanité, car elles peuvent synthétiser un grand nombre de molécules organiques complexes dotées souvent d'activités biologiques potentielles. Elles constituent des merveilleuses usines végétales qui nous donnent la joie de guérir par un geste thérapeutique. L'utilisation thérapeutique des extraordinaires vertus des plantes pour le traitement de toutes les maladies de l'homme est très ancienne et a évolué avec l'histoire et le développement de l'humanité. On s'en sert traditionnellement pour se soigner, se détendre, aromatiser la nourriture et conserver les aliments (ou les cadavres).

Aujourd'hui, la recherche de nouveaux agents pharmacologiques actifs *via* le screening de sources naturelles, a abouti à la découverte d'un grand nombre de médicaments utiles jouant un rôle majeur dans le traitement de nombreuses maladies humaines [1]. La recherche de nouvelles molécules médicamenteuses d'origine naturelle est basée sur les études phytochimiques et pharmacologiques. De ce fait, la valorisation des ressources naturelles est une préoccupation qui devient de plus en plus importante dans de nombreux pays dont l'Algérie [2].

L'Algérie, en raison de son climat diversifié (méditerranéen, semi-aride et saharien) et la nature de ses sols, possède une flore particulièrement riche et variée en plantes aromatiques, médicinales, toxiques et condimentaires, dont la plupart existe à l'état spontané. Cette flore compte environ 3000 espèces réparties dans 150 familles botaniques parmi lesquelles 15 % sont endémiques [3]. Cette flore comprend environ 4000 taxons répartis en 131 familles et 917 genres. Le nombre d'endémiques nationales est de 464 (387 espèces, 53 sous espèces et 24 variétés) [4].

Dans le cadre de la recherche de nouvelles molécules biologiquement actives d'origine végétale qui peuvent intervenir dans des applications thérapeutiques notre laboratoire a entamé depuis plusieurs années un programme de recherche destiné à l'exploitation des ressources naturelles d'origine végétale des plantes algériennes. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à l'étude chimique et biologique de deux espèces nommées *Thymus ciliatus* (Desf) et *Asteriscus graveolens* (Forsk.) dc. qui appartiennent aux familles Lamiaceae et Asteraceae respectivement.

## *Introduction générale*

---

Cette thèse de doctorat, contenant une introduction et une conclusion générale, est subdivisée en quatre chapitres :

Le premier chapitre est consacrée à une synthèse bibliographique sur les deux familles Asteraceae et Lamiaceae, leurs répartition géographique, usages traditionnels et à une étude bibliographique sur les genres auxquels elles appartiennent, du point de vue composition en métabolites secondaires et activités biologiques.

Le deuxième chapitre concerne l'étude phytochimique des deux espèces *Thymus ciliatus* (Desf) et *Asteriscus graveolens* (Forsk.) dc. Ce chapitre, présente les procédures relatives à l'extraction, la séparation et la purification des composés obtenus à l'état pur, ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydante et la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes de certains extraits.

L'interprétation et la discussion des résultats phytochimiques et biologiques réalisés sur les deux espèces seront exposées dans le troisième chapitre.

Enfin le quatrième chapitre est réservé à une étude bibliographique sur les huiles essentielles du genre *Thymus*, la description des travaux et la discussion des résultats de l'analyse qualitative et quantitative de l'huile essentielle de *Thymus ciliatus* (Desf) par l'utilisation des techniques d'analyse GC-FID et GC-MS.

### *Références*

- [1] Gurib-Fakim A.2006. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*.27:1-93.
- [2] Muanda F, Koné D, Dicko A. Soulimani R, Younos C.2009. Phytochemical composition and antioxidant capacity of three malian medecinal plant parts. *Evid Based Complement Alternat Med* .3:147–160.
- [3] Quezel P, Santa S. 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. In : CNRS (Ed.), Vol. 1 -2. Paris.
- [4] Radford, EA, Catullo G,De MontmollinB.2011.Zones importantes pour les plantes en Méditerranée méridionale et orientale, VICN, Planta life, Gland, Suisse et Malaga, Espagne.

*Chapitre I*  
*Rappel Bibliographique*



## **INTRODUCTION**

Les plantes médicinales, dont l'utilisation à différentes fins remonte très loin dans l'histoire, connaissent aujourd'hui un regain d'intérêt partout dans le monde. Ces plantes qui demeurent la principale source de substances naturelles de plus en plus utilisées dans les industries pharmaceutiques, cosmétiques ou agro-alimentaires occupent une place de choix dans l'agriculture, l'industrie, la recherche scientifique, la médecine et l'environnement.

### **I.1.Présentation de La famille des lamiacées :**

La famille des lamiacées est l'une des plus répandues dans le règne végétal. C'est une famille d'une grande importance aussi bien pour son utilisation en industrie alimentaire et en parfumerie qu'en thérapeutique [1]. Elle est l'une des familles les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extraits à fort pouvoir antibactérien, antifongique, anti-inflammatoire et antioxydant [2-4]. Il est bien connu que les huiles essentielles extraites des plantes de cette famille possèdent des propriétés pharmacologiques tant sur le plan humain qu'industriel. De nombreuses propriétés leurs sont conférées : anti-infectieuses, antispasmodiques, antalgiques, toniques, digestives, cicatrisantes...Les huiles essentielles par la diversité des constituants qui les composent, sont des substances très actives [4,5].

Cette famille comprend près de 6700 espèces regroupées dans environ 250 genres [6]. Les labiées sont des arbustes, sous arbrisseaux, ou plante herbacées en générale odorantes, à tige quadrangulaires, feuilles en général opposées sans stipules. Fleurs pentamères en générale hermaphrodites. Calice à cinq divisions. Corolle en générale bilabiée longuement tubuleuse parfois à 4-5 lobes subégaux ou à une seule lèvre, lèvre inférieure trilobée, la supérieure bilobée. Étamines 4, la cinquième nulle ou très réduite, parfois deux étamines et deux staminodes. Ovaire super à carpelles originellement bi-ovulés, ensuite uniovulés par la constitution d'une fausse cloison [7].

La famille des lamiacées contient une très large gamme de composés comme les terpénoïdes, les iridoïdes, les composés phénoliques, et les flavonoïdes. Les huiles essentielles et plus précisément les courtes chaînes des terpénoïdes sont responsables de l'odeur et la saveur caractéristique des plantes [1].

### **I.2.Le genre *Thymus* :**

Le nom *Thymus* vient probablement du latin "thymus" qui signifie «parfumé» ou du grec "thymos" qui signifie "courage" ou "force" [8].

Le thym est une épice importante dans la cuisine à domicile ainsi que dans les industries alimentaires et de l'arôme. En plus c'est une plante médicinale largement utilisée, avec une ancienne tradition qui remonte aux Egyptiens, qui l'utilisaient dans les onguents pour l'embaumement, puis les Grecs et les Romains qui l'utilisaient à des fins thérapeutiques [9,10].

Le genre *Thymus* est connu pour avoir des propriétés médicinales qui le rendent parmi les genres les plus intéressants du point de vue de l'activité biologique. Appartenant à la famille des Lamiaceae, le genre *Thymus* comprend une variété d'espèces dont une grande partie se situe dans la zone méditerranéenne [11].

Toutes les espèces du genre *Thymus* produisent des huiles essentielles [12] et se caractérisent par une grande variabilité chimique [13].

### I.2.1. Classification taxonomique :

<b>Règne</b>	<b>Plantae</b>
<b>Sous-règne</b>	Tracheobionta
<b>Embranchement</b>	Spermaphytes (phanérogames)
<b>Sous-embranchement</b>	Magnoliophytina (Angiospermes)
<b>Classe</b>	Magnoliopsida (Dicotyledones)
<b>Sous-classe</b>	Asteridae
<b>Ordre</b>	Lamiales
<b>Famille</b>	Lamiaceae
<b>Genre</b>	<i>Thymus</i>

### I.2.2. Description morphologique :

Le thym est un sous arbrisseau touffu à tige dressée, ligneuse, érigées ou prostrées, odorantes. Inflorescences en faux verticilles, rameuse et tortueuse à la base, pouvant atteindre 40 cm de hauteur. Les rameaux blanchâtre, courtement velus, portent des feuilles plus ou moins contractées, persistantes, de petite taille (3 à 12mm de long sur 0.5 à 3 mm de large), opposées, lancéolées ou linéaire, à limbe entier, elles sont de couleur vert grisâtre. Les fleurs du thym sont regroupées par 2 ou à l'aisselle de feuilles, rassemblées en glomérule ovoïdes, elles sont de petite taille et zygomorphe, le calice est velu, hérissé de poils durs, en forme de

tube ventru à la base et de 3 à 4 mm de long, il est formé de 5 sépales soudés en deux lèvres inégales, celle du haut étant tridentée et celle du bas bilobée, ciliés et arquée, la corolle est de taille variable, bilabée et de couleur varie du blanc au violet en passant par la rose.

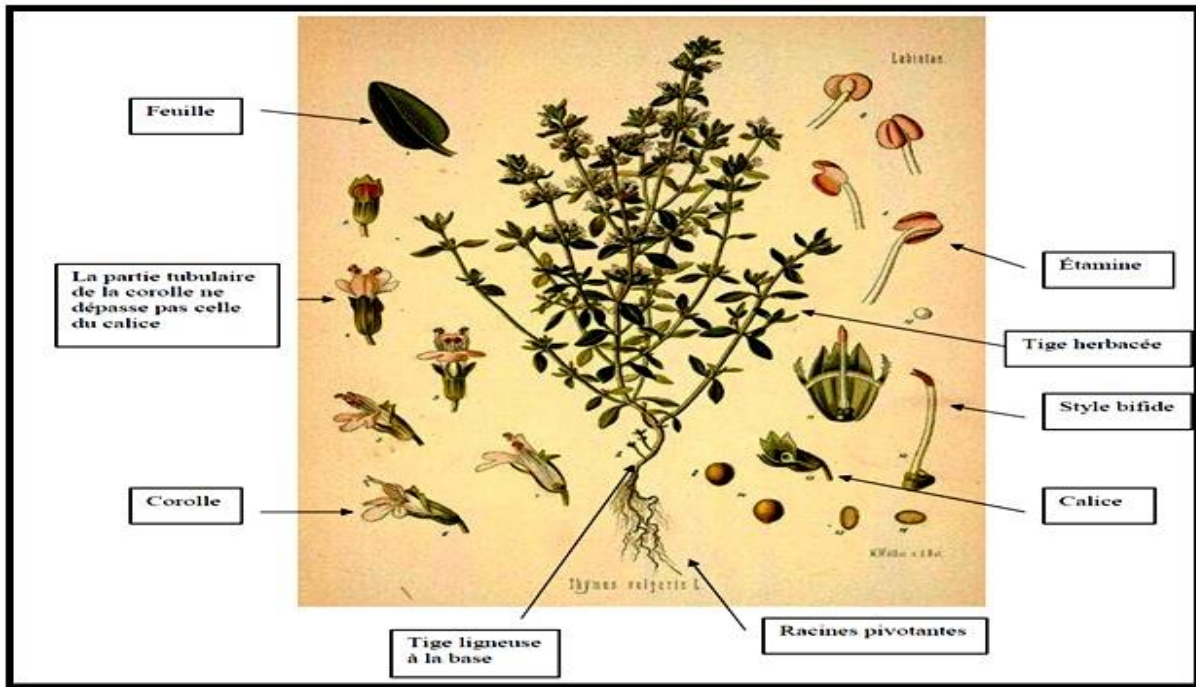


Figure I.1: Caractères morphologique de *Thymus*.

### I.2.3. Répartition géographique :

#### I.2.3.1. Dans le monde :

Le genre *Thymus* est l'un des 250 genres les plus diversifiés de la famille des labiées [1]. Il existe près de 350 espèces de thym réparties entre l'Europe, l'Asie de l'ouest et la Méditerranée. C'est une plante très répandue dans le nord-ouest africain (Maroc, Tunisie, Algérie et Libye). Elle pousse également sur les montagnes d'Ethiopie et d'Arabie du sud-ouest en passant par la péninsule du Sinaï en Egypte. On peut la trouver également en Sibérie et même en Himalaya [14].

Selon une étude menée par des botanistes, environ 110 espèces différentes du genre *Thymus* se concentrent dans le bassin méditerranéen. C'est pour cela que l'on peut considérer la région méditerranéenne comme étant le centre de ce genre [15].

#### I.2.3.2. En Algérie :

Algérie est connue par sa richesse en plantes médicinales au regard de sa superficie et de sa diversité bioclimatique. Le *Thymus* de la famille des Lamiacées ou Labiées, comprend

plusieurs espèces botaniques réparties sur tout le littoral et même dans les régions internes jusqu'aux zones arides [16].

En Algérie, 12 espèces de *Thymus* colonisent le territoire du pays [13]. Parmi elles, certaines sont endémiques de l'Algérie telles que *Thymus pallescens* de Noé, *Thymus dreatensis* Batt., *Thymus guyonii* de Noé et *Thymus lanceolatus* Desf., d'autres sont endémiques du nord-africain comme *Thymus ciliatus* Desf., *Thymus fontanesii* Boiss. et Reut., *Thymus numidicus* Poiret., *Thymus munbyanus* Boiss. et Reut. Et *Thymus algeriensis* Boiss. Et Reut. [11, 17,18].

Le tableau I.1 montre la localisation des principales espèces de thym en Algérie [16] :

**Tableau I.1** : Localisation des principales espèces de genre *Thymus* en Algérie.

Espèces	Découverte par	Localisation
<i>Thymus capitatus</i>	Hoffman et Link	Rare dans la région de Tlemcen
<i>Thymus fontanesii</i>	Boiss et Reuter	Commun dans le Tell Endémique Est Algérie-Tunisie
<i>Thymus commutatus</i>	Battandier	Endémique Oran
<i>Thymus numidicus</i>	Poiret	Assez rare dans : Le sous secteur de l'atlas tellien La grande et la petite Kabylie De Skikda à la frontière tunisienne Tell constantinois
<i>Thymus guyoni</i>	Noé	Rare dans le sous secteur des hauts plateaux algérois, oranais et constantinois
<i>Thymus lancéolatus</i>	Desfontaine	Rare dans : le secteur de l'atlas tellien (Terni de Médéa Benchicao) et dans le sous secteur des hauts plateaux algérois, oranais (Tiaret) et constantinoi
<i>Thymus pallidus</i>	Coss	Très rare dans le sous secteur de L'Atlas Saharien et constantinois
<i>Thymus hirtus</i>	Willd	Commun sauf sur le littoral
<i>Thymus glandulosus</i>	Lag	Très rare dans le sous secteur des hauts plateaux algérois
<i>Thymus algeriensis</i>	Boiss et Reuter	Très commun dans le sous secteur des hauts plateaux algérois, oranai
<i>Thymus munbyanus</i>	Boiss et Reuter	Endémique dans le secteur Nord algérois

**I.2.4. Utilisations et activités biologiques :**

Les espèces du genre *Thymus* sont parmi les plantes aromatiques et médicinales les plus utilisées dans le monde entier grâce à leurs multiples vertus thérapeutiques [19].

Le thym est l'une des plantes les plus utilisées comme épices et extraits à fort pouvoir antibactérien et anti inflammatoire dans la pharmacopée traditionnelle. En effet, le thym "Zaatar" est très utilisé en médecine traditionnelle sous plusieurs formes : les feuilles sont utilisées en infusion contre la toux, en décoction pour guérir les maux de tête, hypertension et gastrites, en usage externe comme cicatrisants et antiseptiques. Les feuilles de thym sont riches en huile essentielle dont les propriétés mises à profit en phytothérapie. Elle est très antiseptique et utilisée à ce titre pour soigner les infections pulmonaires. Son action antiseptique s'exerce également sur le système digestif et notamment en cas de diarrhée et il est aussi vermifuge [20-21]. Les huiles essentielles et les extraits du genre *Thymus* ont des utilisations pharmaceutiques, cosmétologie, l'industrie de parfumerie ainsi que dans l'assaisonnement et dans la préservation de plusieurs aliments.

Plusieurs études réalisées sur le genre *Thymus* ont montré leurs activités antibactériennes [22-26], antifongique [27-30], antioxydante [31-33] et insecticide [34-35].

**I.3. Métabolites isolés du genre *Thymus* :**

Le genre *Thymus* a fait l'objet de nombreuses études phytochimiques, ces travaux ont conduit à l'isolement et l'identification de divers métabolites secondaires tels que les acides phénoliques, les flavonoïdes, les terpenoïdes, les huiles essentielles [36,37].

**I.3.1. Les acides phénoliques :**

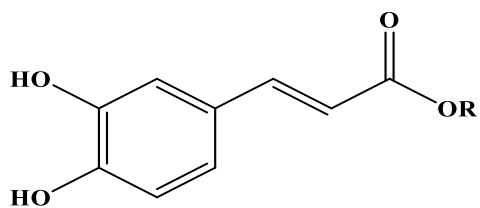
Le terme d'acide phénolique peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. En phytochimie, l'emploi de cette dénomination est réservé aux seuls dérivés de l'acide benzoïque ou de l'acide cinnamique.

Petersen & Simmonds rapportent que l'acide rosmarinique est l'un des plus importants polyphénols antioxydants dans le thym et il est aussi largement trouvé dans les plantes de la famille des Lamiaceae [38].

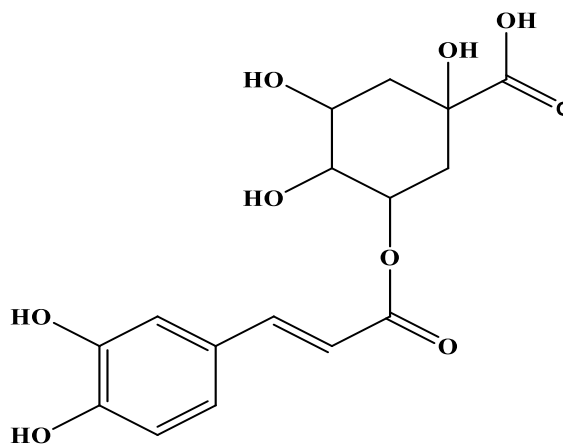
L'investigation phytochimique de la plante *Thymus capitatus* a conduit à l'isolement de l'acide carnosique et l'acide rosmarinique à partir de l'extrait aqueux [39].

Tableau I.2: Les Acides Phénoliques du genre *Thymus*.

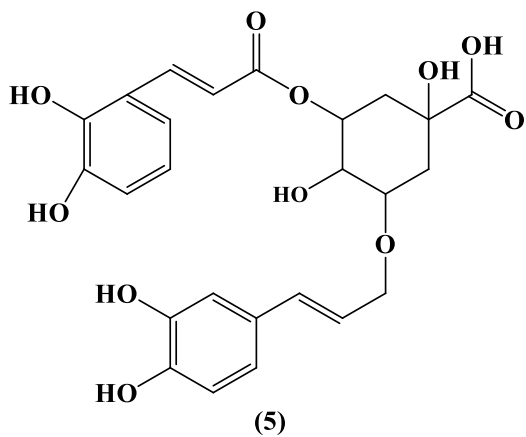
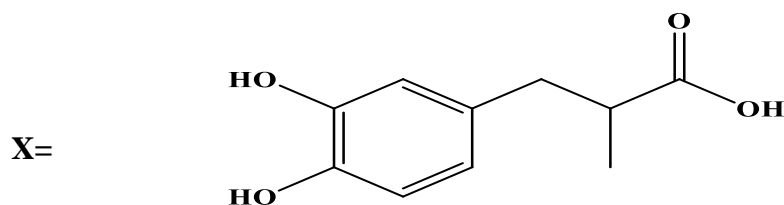
<b>Composés</b>	<b>Espèces</b>	<b>Références</b>
Acide caféique (1)	<i>T. vulgaris</i> L.	[40, 41,42]
	<i>T. serpyllum</i>	[43, 44, 45,46]
	<i>T. quinquecostatus</i>	[47]
Acide chlorogénique (2)	<i>T. vulgaris</i> L.	[37]
	<i>T. serpyllum</i>	[43]
	<i>T. webbianus</i>	[48]
Acide caféique éthyle ester (3)	<i>T. serpyllum</i>	[43]
Acide caféique glucoside (4)	<i>T. vulgaris</i> L.	[49,37]
Acide dicafféoylquinique (5)	<i>T. vulgaris</i> L.	[37]
	<i>T. webbianus</i>	[48]
Acide rosmarinique (6)	<i>T. vulgaris</i> L.	[40, 41, 45, 49, 50, 51,52]
	<i>T. serpyllum</i>	[41, 43, 45,46]
	<i>T. sipyleus</i>	[53]
	<i>T. quinquecostatus</i>	[47]
	<i>T.alternans</i>	[79]
Acide lithospermique (7)	<i>T. serpyllum</i>	[45]
Acide rosmarinique glucoside (8)	<i>T. vulgaris</i> L.	[49]
Acide 3'-O-(8''-Z-Cafféoyl) rosmarinique (9)	<i>T. vulgaris</i> L.	[51]
Rosmarinate de méthyle (10)	<i>T. vulgaris</i> L.	[45]
Acide Salvianolique I (11)	<i>T. vulgaris</i> L.	[49]
Acide Salvianolique K (12)	<i>T. vulgaris</i> L.	[49]
Acide gentisique (13)	<i>T. vulgaris</i> L.	[40]
Acide protocatechuique (14)	<i>T. vulgaris</i> L.	[37,40]
Acide hydroxybenzoïque (15)	<i>T. vulgaris</i> L.	[37, 40,41]
	<i>T. serpyllum</i>	[43]
Acide férulique (16)	<i>T. vulgaris</i> L.	[37,54]
	<i>T. webbianus</i>	[48]
Acide <i>p</i> - coumarique (17)	<i>T. serpyllum</i>	[43]
	<i>T. vulgaris</i> L	[37,40]
	<i>T. vulgaris</i> L	[40]
Acide gallique (18)	<i>T. vulgaris</i> L	[40]
	<i>T. webbianus</i>	[48]
Acide syringique (19)	<i>T. vulgaris</i> L	[40]
Acide hydroxybenzoïque- <i>O</i> -hexoside (20)	<i>T. vulgaris</i> L	[37]
Acide vanillique (21)	<i>T. vulgaris</i> L	[37,40]
	<i>T. serpyllum</i>	[43]



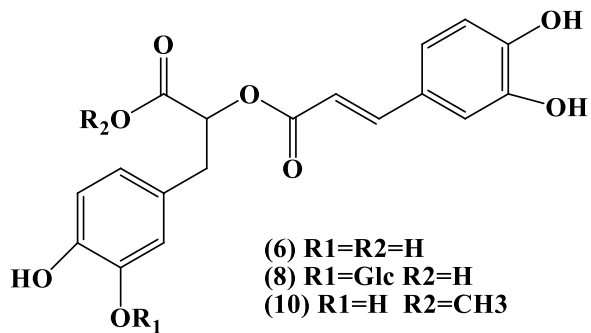
- (1) R=H
- (3) R=CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>
- (4) R=Glc



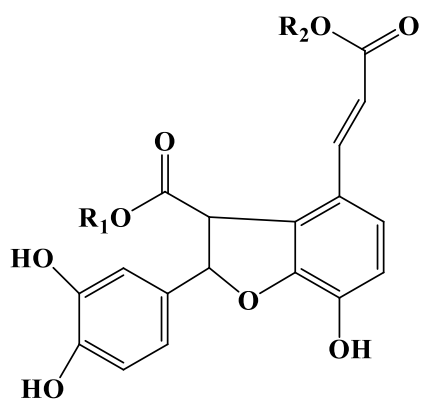
(2)



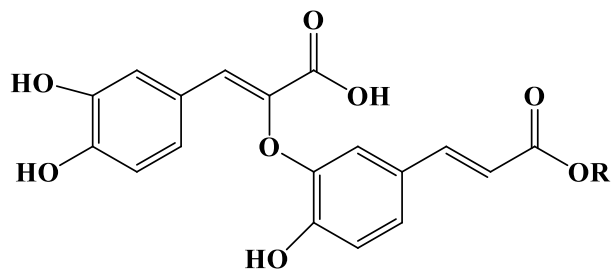
(5)



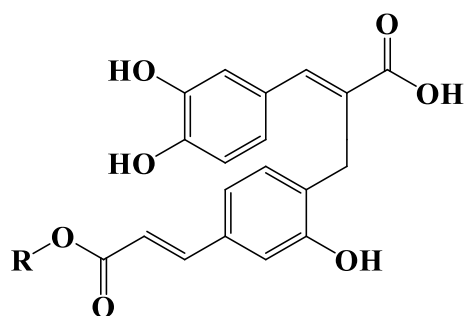
- (6) R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=H
- (8) R<sub>1</sub>=Glc R<sub>2</sub>=H
- (10) R<sub>1</sub>=H R<sub>2</sub>=CH<sub>3</sub>



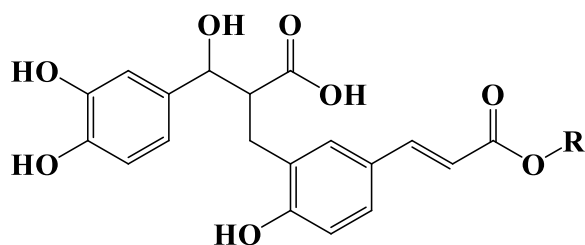
(7) R<sub>1</sub>=H  
R<sub>2</sub>=X



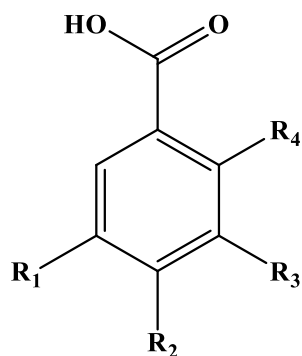
(9) R=X



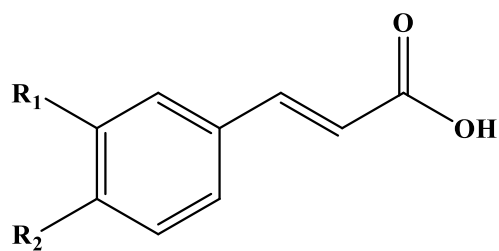
(11) R=X



(12) R=X



- (13) R<sub>1</sub> = R<sub>4</sub> = OH R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = H  
 (14) R<sub>1</sub> = R<sub>4</sub> = H R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = OH  
 (15) R<sub>1</sub> = R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = H R<sub>2</sub> = OH  
 (18) R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = OH R<sub>4</sub> = H  
 (19) R<sub>1</sub> = R<sub>3</sub> = OCH<sub>3</sub> R<sub>2</sub> = OH R<sub>4</sub> = H  
 (20) R<sub>1</sub> = R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = H R<sub>2</sub> = OGLc  
 (21) R<sub>1</sub> = R<sub>4</sub> = H R<sub>2</sub> = OH R<sub>3</sub> = OCH<sub>3</sub>

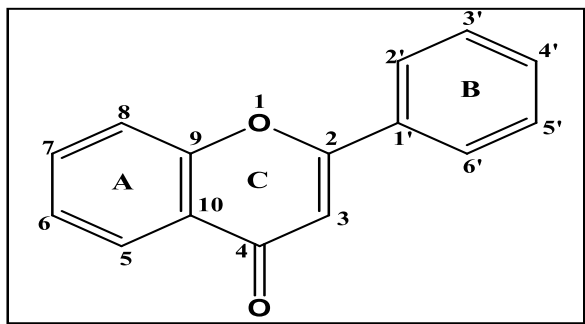


- (16) R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub> R<sub>2</sub> = OH  
 (17) R<sub>1</sub> = H R<sub>2</sub> = OH



### I.3.2 Les flavonoïdes :

Le terme flavonoïde rassemble une très large gamme de composés naturels. Leur fonction principale semble être la coloration des plantes. Ils possèdent un squelette de base à quinze atomes de carbone constitué de deux noyaux benzéniques (A et B) reliés par une chaîne en C<sub>3</sub>[55].



**Figure I.2 :** Squelette de base des flavonoïdes.

Les flavonoïdes sont responsables de la couleur variée des fleurs et des fruits [56] et représentent une source importante d'antioxydants dans notre alimentation [57,58]. De nos jours, les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités anti-tumorale [59], anti carcinogène [60], anti-inflammatoire [61], antivirale [62], antiallergique [63], anti hépatotoxique [64].

Les espèces du genre *thymus* sont riches en flavonoïdes, elles ont permis l'isolement d'un bon nombre d'entre eux. La recherche bibliographique réalisée sur les flavonoïdes du genre *Thymus*, montre la présence de : flavones, flavanones, flavonols et dihydroflavonols. Nous présentons dans le tableau I.3 les principaux Flavonoïdes trouvés dans le genre *Thymus*.

**Tableau I.3 :** Les flavonoïdes isolés du genre *Thymus*.

<b>Composés</b>	<b>Espèces</b>	<b>Références</b>
Lutéoline (22)	<i>T. vulgaris</i> L.	[37, 41, 45,52]
	<i>T. serpyllum</i>	[41, 43,45]
	<i>T. sipyleus</i>	[53]
	<i>T. herba-barona</i>	[69]
	<i>T. striatus</i>	[74]
	<i>T. webbianus</i>	[48]
	<i>T. hirtus</i>	[68]
Apigénine (23)	<i>T. numidicus</i>	[71,72]
	<i>T. vulgaris</i> L.	[37,41]
	<i>T. serpyllum</i>	[41,43]
	<i>T. herba-barona</i>	[69]
	<i>T. striatus</i>	[74]
	<i>T. webbianus</i>	[48]
	<i>T. numidicus</i>	[71,72]

Tableau I.3 : Les flavonoïdes isolés du genre *Thymus* (suite).

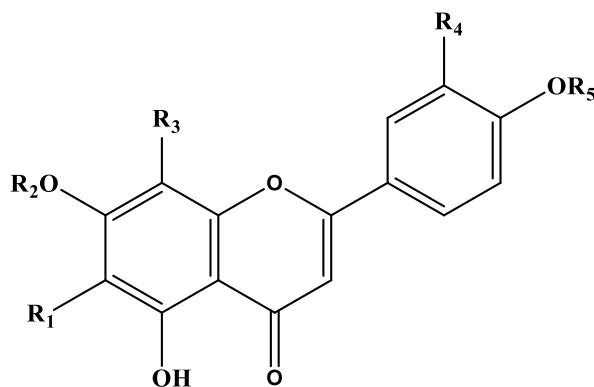
	<i>T. hirtus</i>	[68]
Diosmétine (24)	<i>T. hirtus</i>	[68]
Lutéoline 7- méthyl éther (25)	<i>T. hyemalis</i>	[75]
	<i>T. baeticus</i>	[75]
Lutéoline-7-O- β -D-glucoside (26)	<i>T. vulgaris L.</i>	[37, 41, 50,52,76]
	<i>T. serpyllum</i>	[41,43]
	<i>T. sipyleus</i>	[53]
	<i>T. webbianus</i>	[48]
	<i>T.numidicus</i>	[71]
Lutéoline-7-O- rutinoside (27)	<i>T. vulgaris L.</i>	[35,37]
	<i>T. serpyllum</i>	[45]
Lutéoline-7-O- β -D-glucuronide (28)	<i>T. vulgaris L.</i>	[37, 45, 49,51]
	<i>T. serpyllum</i>	[43,45]
	<i>T. sipyleus</i>	[53]
Lutéoline-7-O- diglucoside (29)	<i>T. vulgaris L.</i>	[76 ;77]
Luteolin-acetyl-O-glycoside (30)	<i>T. vulgaris L.</i>	[76]
Luteolin-7-O-(6''-feruloyl)-β-glucopyranoside (31)	<i>T. sipyleus</i>	[53]
Apigénine-7-O- β -D-glucoside (32)	<i>T. vulgaris L.</i>	[37,41]
	<i>T. serpyllum</i>	[41]
	<i>T. webbianus</i>	[48]
	<i>T.numidicus</i>	[71]
	<i>T. alternans</i>	[79]
Apigénine-7-O-glucuronide (33)	<i>T. vulgaris L.</i>	[49,52,77]
	<i>T. serpyllum</i>	[43]
Apigénin-6,8-di-C-glucoside (34)	<i>T. webbianus</i>	[48]
	<i>T. vulgaris L.</i>	[52]
Thymusine (35)	<i>T. herba-barona</i>	[69]
	<i>T. striatus</i>	[74]
	<i>T. hyemalis</i>	[75]
	<i>T. baeticus</i>	[75]
Thymonine (36)	<i>T. striatus</i>	[74]
	<i>T. striatus</i>	[75]
	<i>T. hyemalis</i>	[75]
	<i>T. serpyllum</i>	[77]
Pebrelline (37)	<i>T. striatus</i>	[74]
Gardénine B (38)	<i>T. striatus</i>	[74]
	<i>T. hyemalis et T. baeticus</i>	[75]
Desméthylnobiletine (39)	<i>T. striatus</i>	[74]
Cirsilinéol (40)	<i>T. vulgaris L.</i>	[70,77]
	<i>T. herba-barona</i>	[69]

Tableau I.3 : Les flavonoïdes isolés du genre *Thymus* (suite).

	<i>T. hyemalis et T. baeticus</i>	[75]
	<i>T. numidicus</i>	[71]
Sorbifoline (41)	<i>T. herba-barona</i>	[69]
	<i>T. hyemalis et T. baeticus</i>	[75]
	<i>T. vulgaris L.</i>	[70]
Salvigénine (42)	<i>T. striatus</i>	[74]
Ladanéine (43)		
Cirsimaritine (44)	<i>T. serpyllum</i>	[43]
	<i>T. herba-barona</i>	[69]
	<i>T. vulgaris L.</i>	[37]
	<i>T. hyemalis et T. baeticus</i>	[75]
	<i>T. numidicus</i>	[71]
Xanthomicrol (45)	<i>T. serpyllum</i>	[74 ;78]
	<i>T. herba-barona</i>	[69]
	<i>T. hyemalis et T. baeticus</i>	[75]
	<i>T. numidicus</i>	[72]
Sidéritoflavone (46)	<i>T. herba-barona</i>	[69]
	<i>T. numidicus</i>	[72]
Cirsiliol(47)	<i>T. herba-barona</i>	[69]
8-méthoxycirsilinéol (48)	<i>T. herba-barona</i>	[69]
	<i>T. serpyllum</i>	[78]
5-Desmethylinensetine (49)	<i>T. numidicus</i>	[72]
Genkwanine (50)	<i>T. herba-barona</i>	[69]
	<i>T. serpyllum</i>	[78]
8C-(hydroxybenzyl) apigénine (51)	<i>T. hirtus</i>	[68]
8C-(hydroxybenzyl) lutéoline (52)	<i>T. hirtus</i>	[68]
8C-(hydroxybenzyl) diosmétine (53)	<i>T. hirtus</i>	[68]
Eridioctyol (54)	<i>T. vulgaris L.</i>	[45,51]
	<i>T. herba-barona</i>	[69]
	<i>T. serpyllum</i>	[43,45]
	<i>T. webbianus</i>	[48]
	<i>T. hyemalis et T. baeticus</i>	[75]
Eriocitrine (55)	<i>T. vulgaris L.</i>	[41, 45,50]
	<i>T. serpyllum</i>	[41,45]
Eriodictoyl-7-O-glucoside (56)	<i>T. vulgaris L.</i>	[45,49]
Eridioctyol-7-O-glucuronide (57)	<i>T. vulgaris L.</i>	[49,77]
	<i>T. serpyllum</i>	[43]
Naringénine (58)	<i>T. vulgaris L.</i>	[45]
	<i>T. herba-barona</i>	[69]
	<i>T. webbianus</i>	[48]
	<i>T. hyemalis et T. baeticus</i>	[75]

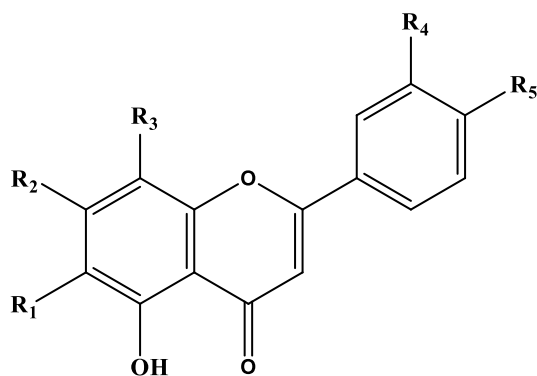
Tableau I.3 : Les flavonoïdes isolés du genre *Thymus* (suite).

	<i>T. numidicus</i>	[73]
Naringénine-7- <i>O</i> -glucoside (59)	<i>T. vulgaris</i> L.	[45]
Naringénine-7- <i>O</i> -rutinoside (60)	<i>T. vulgaris</i> L.	[45]
8-Prénylnaringénine (61)	<i>T. serpyllum</i>	[43]
Hespéridine (62)	<i>T. vulgaris</i> L.	[45]
Quercétine (63)	<i>T. vulgaris</i> L.	[37,41]
	<i>T. serpyllum</i>	[41,78]
	<i>T. hyemalis</i> et <i>T. baeticus</i>	[75]
Rutine (64)	<i>T. vulgaris</i> L.	[37,78]
Quercétine-3- <i>O</i> -glucoside (65)	<i>T. vulgaris</i> L.	[37]
8C-(hydroxybenzyl) quercétine (66)	<i>T. hirtus</i>	[68]
8C-(hydroxybenzyl) kaempférol (67)	<i>T. hirtus</i>	[68]
Isorhamnétine (68)	<i>T. vulgaris</i> L.	[37]
Isorhamnétine- <i>O</i> -glucoside (69)	<i>T. vulgaris</i> L.	[37]
Taxifoline (70)	<i>T. vulgaris</i> L.	[51]
	<i>T. quinquecostatus</i>	[53]
	<i>T. hyemalis</i> et <i>T. baeticus</i>	[75]
Aromadendrine (71)	<i>T. quinquecostatus</i>	[53]
	<i>T. hyemalis</i> et <i>T. baeticus</i>	[75]

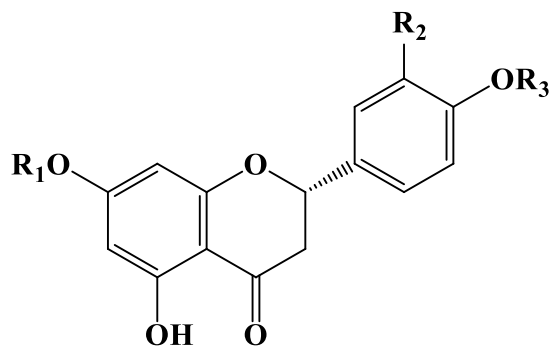


Structure	R1	R2	R3	R4	R5
(22)	H	H	H	OH	H
(23)	H	H	H	H	H
(24)	H	H	H	OH	Me
(25)	H	Me	H	OH	H
(26)	H	Glc	H	OH	H
(27)	H	Rut	H	OH	H
(28)	H	Gluc	H	OH	H
(29)	H	Glc-Glc	H	OH	H
(30)	H	AcGlc	H	OH	H

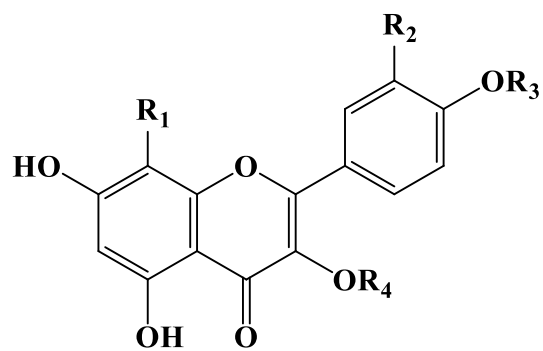
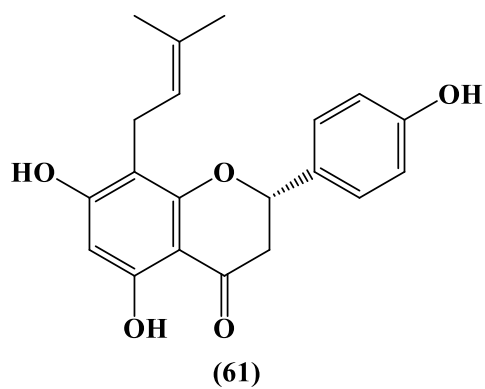
(31)	H	GlcFer	H	OH	H
(32)	H	Glc	H	H	H
(33)	H	Glcu	H	H	H
(34)	Glc	H	Glc	H	H
(35)	OH	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H
(36)	OH	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
(37)	OH	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
(38)	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
(39)	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
(40)	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	H
(41)	OH	CH <sub>3</sub>	H	H	H
(42)	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>
(43)	OH	CH <sub>3</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>
(44)	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	H
(45)	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H
(46)	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH	H



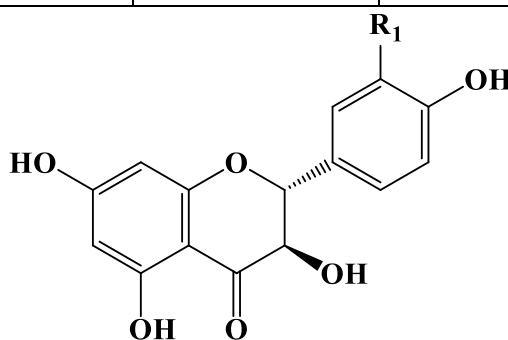
Structure	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
(47)	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	OH	OH
(48)	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH
(49)	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
(50)	OH	OCH <sub>3</sub>	H	H	OH
(51)	OH	OH	Benzyl -OH	H	OH
(52)	H	OH	Benzyl -OH	OH	OH
(53)	H	OH	Benzyl -OH	OH	OCH <sub>3</sub>



Structure	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
(54)	H	OH	H
(55)	Rut	OH	H
(56)	Glc	OH	H
(57)	GlcU	OH	H
(58)	H	H	H
(59)	Glc	H	H
(60)	Rut	H	H
(62)	Rut	OH	CH <sub>3</sub>



Structure	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
(63)	H	OH	H	H
(64)	H	OH	H	Rut
(65)	H	OH	H	GLc
(66)	Benzyl-OH	OH	H	H
(67)	Benzyl-OH	H	H	H
(68)	H	OCH <sub>3</sub>	H	H
(69)	H	OCH <sub>3</sub>	H	GLc

(70) R<sub>1</sub>=OH(71) R<sub>1</sub>=H

### I. 3.3. Les terpénoïdes :

Les terpènes (= Terpénoïdes) sont des constituants habituels des cellules végétales, impliqués ou non dans des fonctions métaboliques essentielles. Ils sont d'origine végétale et constituent la source odoriférante des plantes, cette odeur est due à la libération des molécules très volatiles contenant 10, 15 et 20 atomes de carbone .

Du point de vue structural, les terpènes constituent une grande famille de composés prénologes, c'est-à-dire d'homologues à enchaînement isoprénique [80]. Ces substances organiques font partie des métabolites secondaires, les plus répandus dans la nature [81]. En effet, plus de 36.000 structures différentes ont été identifiées [82]. La dénomination des différentes classes de molécules terpéniques repose sur le nombre de motifs isoprènes constituant leur squelette. Ainsi on rencontre : monoterpène à 10 atomes de carbone, sesquiterpène à 15 atomes de carbone, diterpène à 20 atomes de carbone, tri, tétra à 30, 40 atomes de carbone etc.

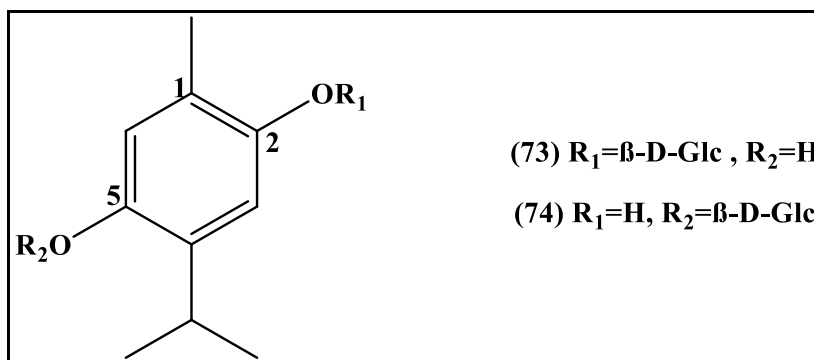
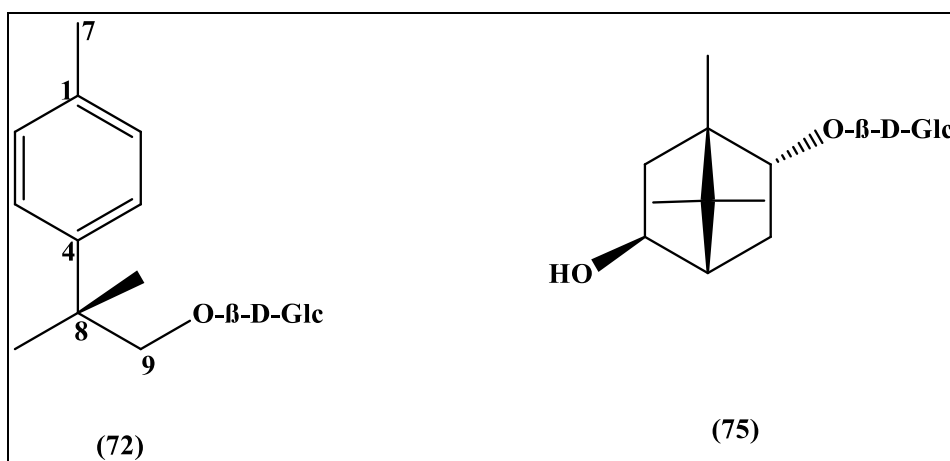
- **Les monoterpènes**

Les monoterpènes sont les plus simples constituants des terpènes dont la majorité est rencontrée dans les huiles essentielles (90% des huiles essentielles sont des monoterpènes). Ils comportent dix (10) atomes de carbones et sont issus de la condensation de deux unités isoprène. Ils peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques. [83].

L'investigation phytochimique menée sur les parties aériennes de l'espèce *Thymus vulgaris* .L a abouti à l'isolement de monoterpènes glycosylés, dont un nouveau (R)-p-cymen-9-yl beta-Dglucopyranoside (72) et trois connus, le tableau I.4 contient quelques exemples de monoterpènes glycosylés isolés [84].

**Tableau I.4 :** quelques monoterpènes glycosylés isolés du genre *Thymus*.

Composés	Espèces	Référence
(R)-p-cymen-9-yl - $\beta$ -D-glucopyranoside (72)	<i>T. vulgaris</i> .L	[84]
2- $\beta$ -D-glucopyranosylthymoquinols (73)		
5- $\beta$ -D- glucopyranosylthymoquinols (74)		
(-)-angelicoidenol- $\beta$ -D-glucopyranoside(75)		



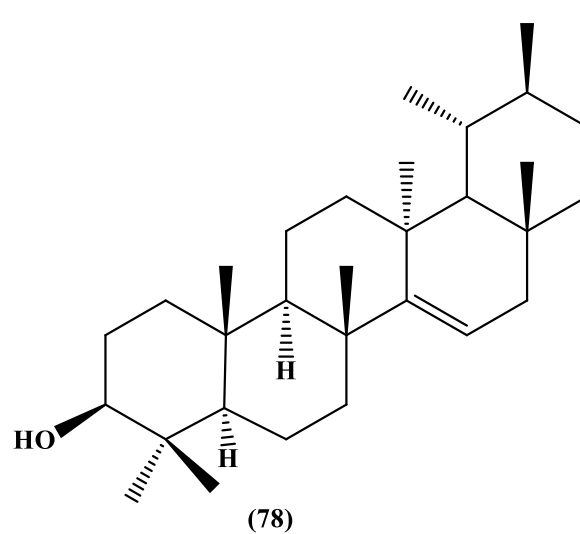
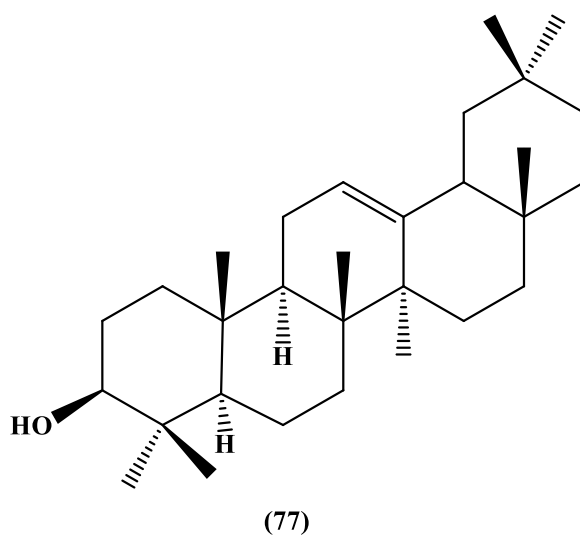
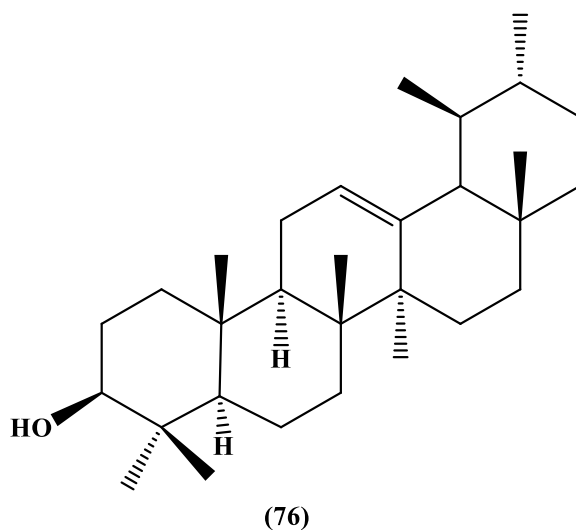
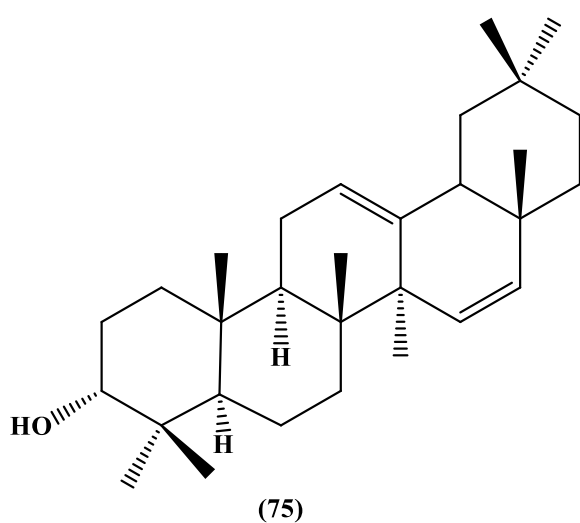
- **Les triterpènes :**

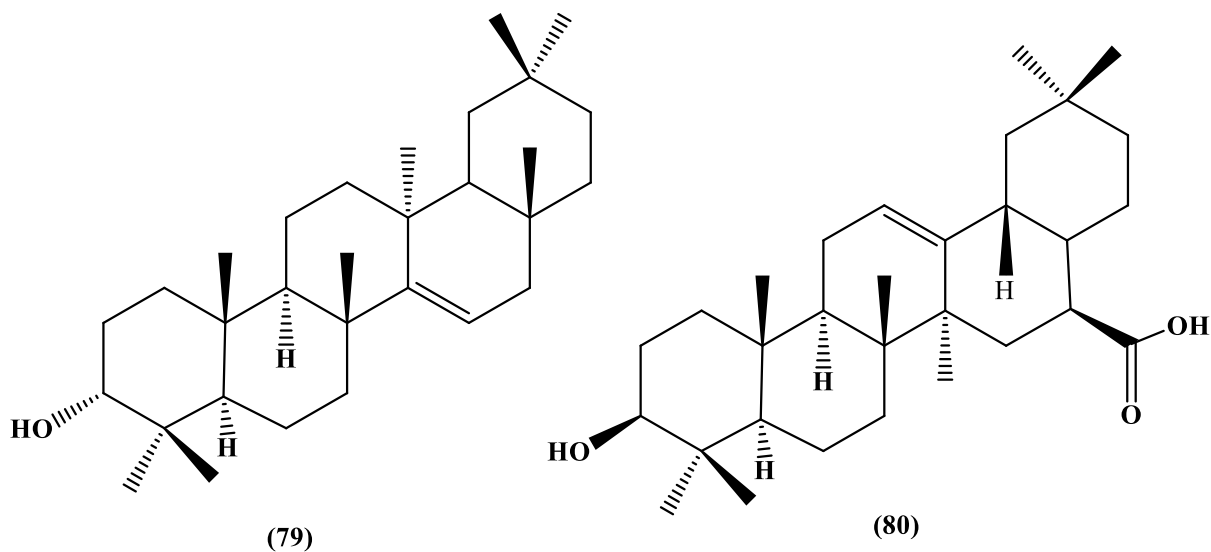
Les triterpénoïdes sont une classe de métabolites secondaires dont la structure de base est en C30, ce groupe est très répandu dans le règne végétal et animal. Ces composés sont issus de la cyclisation de l'époxysqualène et quelque fois du squalène. Ils peuvent être classés en trois groupes : acyclique, tétracyclique et pentacyclique [85-87]. Ce type de composés possède des



propriétés pharmacologiques telles que: anti-inflammatoire[88], antibactérienne [89], antifongique [90], antiviral [91], antitumorale [92], antidiabétique[93], anti-ulcero-génique [94], anti-cariogénique [95], hépatoprotective [96], neuroprotective[97], anti-parasitique [98], analgésique [99] et antioxydante [100].

Une étude phytochimique réalisée par Dall'Acqua et ses collaborateurs sur les extraits de *thymus alternans*, a permis d'isoler et d'identifier les triterpènes suivants : 3  $\alpha$  -hydroxy-urs-12,15-diene (**75**),  $\alpha$ -amyrine (**76**),  $\beta$ -amyrine (**77**), isoursenol (**78**), epitaraxerol (**79**) et acide oléanolique (**80**) [79].





## I. 4. La famille des Asteraceae:

### I. 4. 1. Généralités :

Le mot « Aster » du grec signifie étoile, en relation avec la forme de la fleur.

La famille Asteraceae est la plus vaste du groupe des dicotylédones. Plusieurs plantes de cette famille sont cultivées pour leur valeur alimentaire (le tournesol, le topinambour, la laitue, la chicorée, la camomille, *etc.*) ou comme plantes décoratives (les dahlias, les asters, les rudbeckies, les gaillardes, *etc.*).

En effet, il a été rapporté que les fleurs et les feuilles de ces plantes possèdent des propriétés antibactériennes, antifongiques, antiviraux et anti-inflammatoires [101]. De ce fait, de nombreuses espèces de cette famille sont utilisées en médecine traditionnelle [102].

Les principes amers (sesquiterpènes lactones), les corps insaturés, les flavonoïdes, les coumarines, les polyphénols, les terpènes..., principaux constituants chimiques des Astéracées expliquent la diversité de leurs activités pharmacologiques [102].

### I. 4. 2. Distribution :

La famille des Astéracées est la plus étendue du monde végétal, avec environ 25000 espèces réparties en 1300 genres, dispersées sur toute la Terre [103].

Cette famille est la plus vaste du groupe des dicotylédones. On y retrouve un grand nombre d'espèces très communes dans les champs et les villes. Ce sont des plantes herbacées pour la plupart. Mais, il existe de rares espèces arborescentes qui peuplent principalement les régions tropicales de la planète (Genres: *Olearia*, *Cassinia*, *Baccharis*, *Senecio*, par exemple).

### I. 4. 3. Caractéristiques morphologiques des Asteraceae :

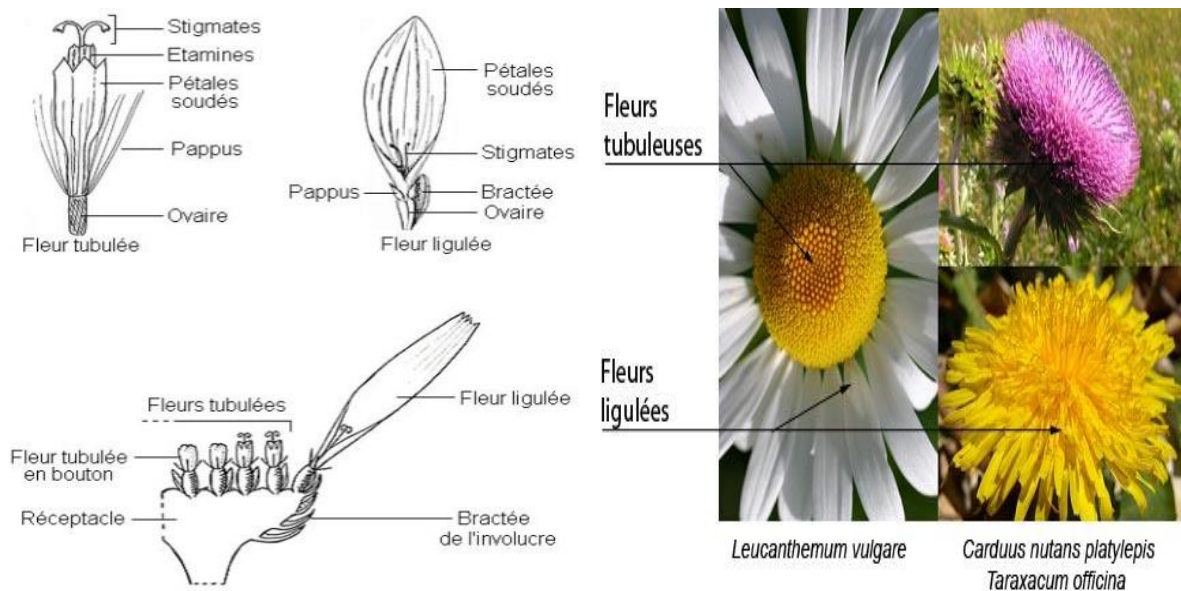
Les Asteraceae ont la caractéristique commune d'avoir des fleurs réunies en capitules, c'est-à-dire serrées les uns à côté des autres, sans pédoncules, placées sur l'extrémité d'un rameau ou d'une tige et entourées d'une structure formée par des bractées florales. Cette structure en forme de coupe ou de collecte est appelé un involucre.

La fleur des astéracées est très particulière: les étamines sont soudées par leurs anthères déhiscentes vers l'intérieur. Sous les stigmates sont situés des «brosses à pollen». La croissance rapide du style permet un brossage du pollen et sa récupération. Une fois que le stigmate a traversé le tube formé par les anthères, les stigmates se déplient et exposent leur face gluante au pollen. Il faut penser qu'à ce moment-là, du nectar est sécrété.

Les fleurs des astéracées, appelées aussi fleurons, se présentent sous deux formes:

- Des languettes, ou ligules, dans lesquelles, les équivalents de pétales sont soudés, généralement par cinq, parfois par trois, reconnaissable seulement aux deux dents de la languette, et où un pétale prédomine.
- Des tubes terminés par des lèvres, imperceptibles ou s'ouvrant plus ou moins largement en cinq lobes.

Dans le premier cas on parle de fleurons ligulés, dans le second, de fleurons tubulés [104].



**Figure I. 3:** Types de fleurs des Asteraceae.

Les Astéracées sont caractérisées par l'inflorescence en capitule. Un capitule comprend un réceptacle commun, plat le plus souvent, sur lequel sont insérées de la base au sommet, en ordre spiralé : d'abord des bractées stériles vertes (parfois écailluses, à crochets ou épineuses)

formant un involucre, ensuite des petites bractées fertiles non vertes ou paillettes, axillant chacune une fleur. L'ensemble forme une fleur composée, ce qui justifie l'emploi du mot "Composées" pour désigner cette famille [105,106]. Suivant le type de fleur composant le capitule, on distingue trois types de capitules:

- Liguliflores dont les capitules sont uniquement composés de ligules (languettes comme les pissenlits, chicorées, etc.);
- Tubuliflores dont les capitules sont uniquement composés de tubules (petits tubes comme chez les chardons) ;
- Radiées : en faisant la synthèse des deux types de fleurons on obtient les radiées dont le capitule est composé de ligules imitant les pétales à la périphérie et de tubules imitant les étamines et le pistil au centre [107,108].

Les fruits sont des akènes, souvent couronnés d'une aigrette de soies appelée *Pappus* qui favorise la dispersion des grains par le vent [109].



**Figure I.4:** Les fruits de *Taraxacum campyloides* (Asteraceae).

#### I.4.4. Position systématique de la famille des Asteraceae :

Selon Engler, les Asteraceae appartiennent à l'ordre des Campanulales. Pour Cronquist, cette même famille est rattachée au superordre des Asteridées et l'ordre des Astrales. Dahlgren classe la famille des Asteraceae dans le super ordre des Asteriflorées et l'ordre des Astrales. Thome a élaboré une classification selon laquelle les Asteraceae se trouvent dans le superordre des Asteranées et l'ordre des Astrales [107].

D'après APG III, l'immense famille des Asteraceae est subdivisée en cinq sous familles principales:

- ❖ Les Branadesioidées et Mutisioidées sont des arbustes ou des plantes herbacées poussant principalement en Amérique du Sud. Il s'agit de formes archaïques d'astéracées, dont les fleurs sont à corolle zygomorphe bilabée 1/4 (Barnadésioidées)

ou bilabée 2/3 (Mutisoidées), cette dernière comprenant le *Gerbera*, plante sud-africaine cultivée pour ses beaux capitules en forme de marguerite [110].

- ❖ Les Carduoides possèdent des fleurs typiquement roses, bleues ou pourpres, toutes en tube, comme celles du capitule du Bleuet. Les Chardons, les Cirsés et beaucoup d'Astéracées épineuses méditerranéennes se trouvent dans cette sous-famille.
- ❖ Les Cichorioidées correspondent à des Astéracées à latex, dont le nom est évoqué dans les espèces comme *Lactuca*, Laitue, Laiteron. Les capitules ne portent que des fleurs ligulées terminées par 5 dents, formant une languette typiquement jaune, parfois bleue.
- ❖ Les Astéroïdées, avec 16000 espèces, forment l'essentiel des Astéracées. Ce groupe diversifié caractérisé par ses capitules «radiés», comportant au centre, des fleurs tubulées généralement jaunes et à la périphérie des fleurs ligulées terminées par 3 dents, blanches comme chez la marguerite. Dans ce groupe on inclut aussi des espèces ayant perdu secondairement leurs fleurs ligulées comme les Armoises.

Les Astéroïdes sont elles mêmes divisées en nombreuses tribus dont les plus importantes sont : les Anthémidées, les Astérées, les sénécionées et les Hélianthées [110].

#### **I.4.5. Utilisations économiques et thérapeutiques :**

Cette vaste famille est économiquement importante, elle fournit des plantes alimentaires: La laitue est la plante la plus cultivée de la famille, suivie de l'artichaut, de l'endive, du salsifis, de la chicorée, de l'estragon et du tournesol. De nombreuses autres espèces ont une utilisation ornementale, telle que la marguerite, le dahlia, le zinnia, le cosmos, le chrysanthème et l'aster. Plusieurs espèces sont utilisées en pharmacie: l'Arnica (*Arnica montana* L.), la camomille (*Matricaria chamomilla* L. et *Anthemis nobilis* L.), le pied de chat (*Antennaria Djioca* Gartn), le tussilage (*Tussilago farfara* L.). Certains comme le genre *Pyrethrum* fournissent un insecticide, d'autres (genre *Artemisia*) sont utilisés comme plantes médicinales et dans la fabrication de liqueurs comme l'absinthe ou le génépi [111].

#### **I.5. Description botanique du genre *Asteriscus* :**

Le genre botanique méditerranéen *Asteriscus* appartient à la famille des Asteraceae, les fleurs (ou fleurons) sont groupées sur un capitule entouré d'un involucre de bractées. Elles sont de couleur jaune, les périphériques ligulés, celles du disque central tubulées. Les feuilles, simples, sont alternes, plus ou moins lancéolées. Les bractées, semblables aux feuilles supérieures, se terminent par une pointe ou par une épine [112].

Syn=*Bubonium*=*Bupthalmum*=*Nauplius*=*Odontospermum*[113-115].

**I. 5. 1. Systématique :**

<b>Règne</b>	<b>Plantae</b>
<b>Sous-règne</b>	Tracheobionta (Plantes vasculaires)
<b>Embranchement</b>	Phanerogamae (Phanérogames)
<b>Sous-embranchement</b>	Magnoliophytina (Angiospermes)
<b>Classe</b>	Magnoliopsida (Dicotyledones)
<b>Sous-classe</b>	Asteridae
<b>Ordre</b>	Asterales
<b>Famille</b>	Asteraceae (Compositae)
<b>Genre</b>	<i>Asteriscus</i>

**I.6. Principaux métabolites secondaires du genre *Asteriscus* :**

Le genre *Asteriscus*, comme les autres genres de la famille Asteraceae, a fait l'objet de nombreuses études phytochimiques qui ont abouti à la mise en évidence d'un nombre non négligeable de métabolites secondaires. Les substances dominantes sont les flavonoïdes et les sesquiterpènes.

**I.6.1. Les sesquiterpènes :**

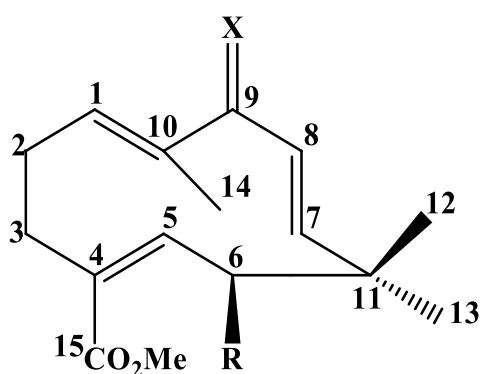
Les sesquiterpènes sont des composés de quinze atomes de carbone formée de 3 unités isoprène et comme formule moléculaire  $C_{15}H_{24}$ . Comme les monoterpènes, une molécule de sesquiterpène peuvent aussi être soient acycliques, monocycliques, bicycliques ou tricycliques. Outre ces composés, on peut également trouver chez les plantes d'autres produits tels que les lactones sesquiterpéniques. Ce genre de produits résulte de l'oxydation d'un groupe méthyle du groupe isopropyle attaché au squelette de base sesquiterpénique pour engendrer le groupe lactone [116]. En s'appuyant sur la structure carbonée de base, on peut dégager les principales classes de lactones sesquiterpéniques : les germacranolides, les élémanolides, les les guaianolides et les pseudoguaianolides [117].

Les sesquiterpènes constituent un groupe de substances naturelles très importantes dans la famille des Astéracées ayant une large variété d'activités biologiques. Ils possèdent des propriétés : neurotoxique [118], anti-inflammatoire [119], antileucémique [120], antifongique

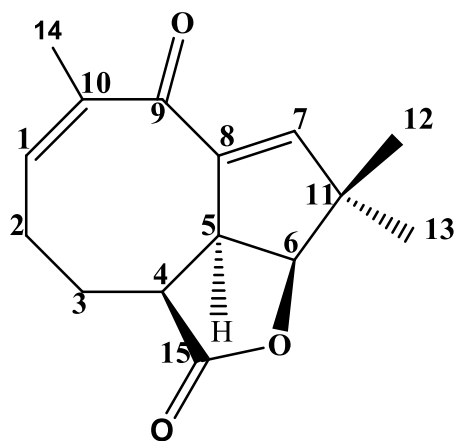
[121], anti-tumorale [122], anticancéreuse [123,124], antidiabétique [125] et des propriétés anti-infectieux [126,127].

Les sesquiterpènes constituent un groupe de substances naturelles très importantes dans le genre *Asteriscus* ayant une large variété d'activités biologiques, en citant quelques exemples :

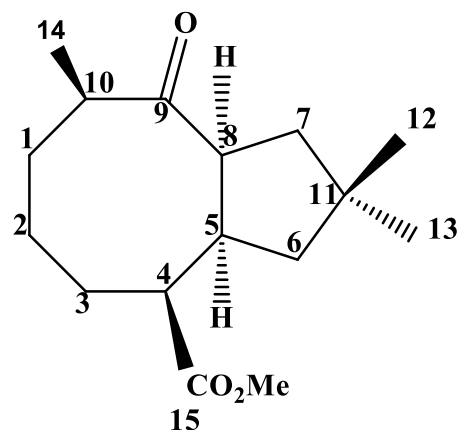
L'étude phytochimique de l'espèce *Asteriscus graveolens* [128] a abouti à l'isolement et la caractérisation de onze sesquiterpènes lactones à squelette humulène : methyl-9-oxo-1(10)*E*,7*E*- $\alpha$ -humulene-15-oate (**81**), methyl-9-oxo-1(10)*E*,7*Z*- $\alpha$ -humulene-15-oate (**82**), methyl-9-oxo-1(10)*Z*,7*Z*- $\alpha$ -humulene-15-oate (**83**), methyl-9-oxo-1(10)*Z*,7*E*- $\alpha$ -humulene-15-oate (**84**), methyl-6-acetoxy-9-oxo-1(10)*E*,7*E*- $\alpha$ -humulene-15-oate (**85**), methyl-6-acetoxy-9-oxo-1(10)*E*,7*Z*- $\alpha$ -humulene-15-oate (**86**), methyl-6-acetoxy-9-oxo-1(10)*Z*,7*E*- $\alpha$ -humulene-15-oate (**87**), methyl-6-acetoxy-9-oxo-1(10)*Z*,7*Z*- $\alpha$ -humulene-15-oate (**88**), 4*E*-methyl-6-acetoxy-9-oxo-1(10)*Z*,7*Z*- $\alpha$ -humulene-15-oate (**89**), 4*E*-methyl-6-acetoxy-9-oxo-1(10)*E*,7*Z*- $\alpha$ -humulene-15-oate (**90**), methyl-9-hydroxy-1(10)*E*,7*Z*- $\alpha$ -humulene-15-oate (**91**). Ce même travail a révélé également la présence de: 1, 10, 7,8 tétradihydroasteriscanolide (**92**), méthyl-3 $\alpha$ -5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ ,10 $\alpha$ H-asteriscan-15-oate (**93**), bisabol-2,10-dièn-1-one (**94**), 6 $\alpha$ -hydroxybisabol-2,10-dièn-1-one (**95**).



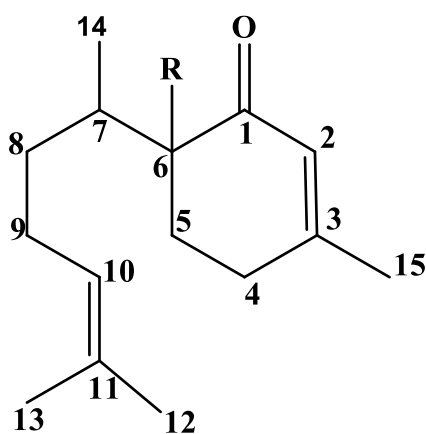
	(81)	(82)	(83)	(84)	(85)	(86)	(87)	(88)	(89)	(90)	(91)
R	H	H	H	H	OAc	OAc	OAc	OAc	OAc	OAc	H
X	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	OH, H
$\Delta^{1(10)}$	E	E	Z	Z	E	E	Z	Z	Z	E	E
$\Delta^7$	E	Z	Z	E	E	Z	Z	Z	Z	Z	Z
									4E	4E	



(92)



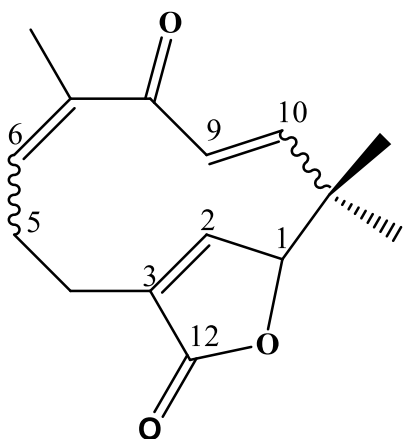
(93)



(94) R=H

(95) R=OH

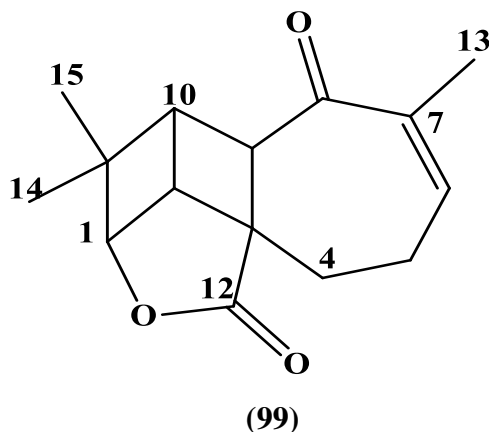
Les travaux réalisés sur les parties aériennes de l'espèce *Asteriscus aquaticus* L. par San Feliciano et son collaborateurs [129,130] ont permis d'isoler quatre sesquiterpènes lactones à squelette humulène suivants : asteriscunolide A (95), asteriscunolide B (96), asteriscunolide C (97) et asteriscunolide D (98).



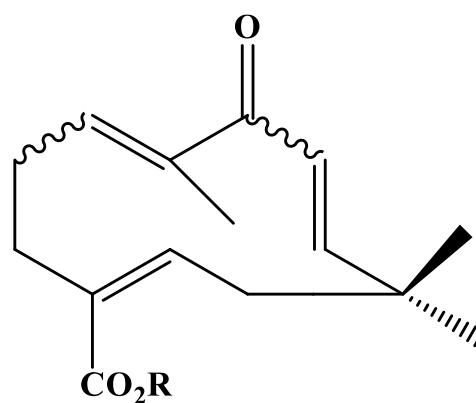
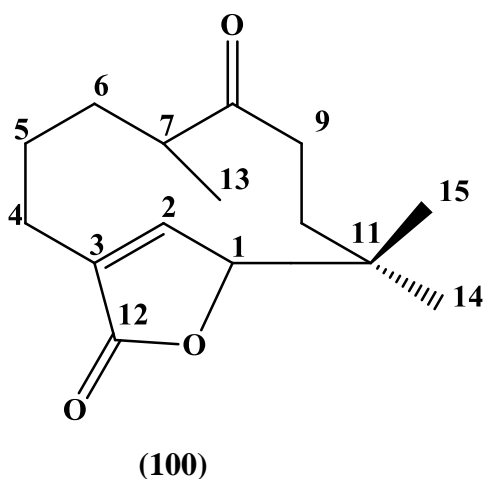
	(95)	(96)	(97)	(98)
$\Delta^6$	Z	E	Z	E
$\Delta^9$	Z	Z	E	E



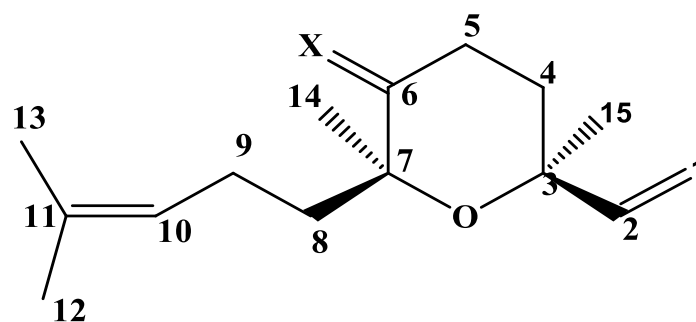
Les travaux poursuivis en 1989 par les mêmes chercheurs sur l'extrait hexane de la même espèce a conduit à l'identification d'un nouveau sesquiterpène lactone nommé aquatolide (**99**) [131].



Un nouveau dérivé humulène 8-oxo-6,7,9,10-tetrahydrohumulen-1,12-olide (**100**), ainsi que six dérivés connus asteriscunolides A (**95**), C (**97**) et D (**98**), acide 8-oxo- $\alpha$ -humula-6Z,9E-dièn-12-oïque (**101**), acide 8-oxo- $\alpha$ -humula-6E,9Z-dièn-12-oïque (**102**), acide 8-oxo- $\alpha$ -humula-6E,9E-dièn-12-oïque (**103**) ont été isolés à partir de l'extrait chloroformique de l'espèce *Asteriscus vogelii* [132].



Une étude phytochimique sur les parties aériennes de l'espèce *Asteriscus serzceus* [133] a permis d'isoler deux nouveaux dérivés nerolidol : 6-oxo-cyclonérolidol (**104**), 6 $\alpha$ -hydroxycyclonérolidol (**105**) avec les quatre asteriscunolides A (**95**), B (**96**), C (**97**) et D (**98**).

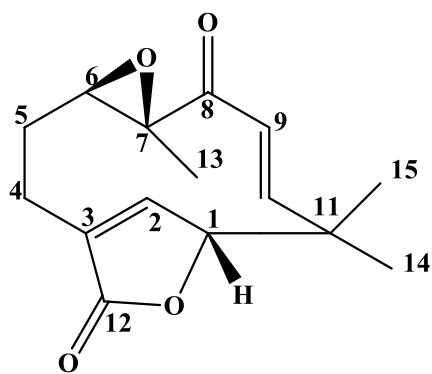


(104) X=O

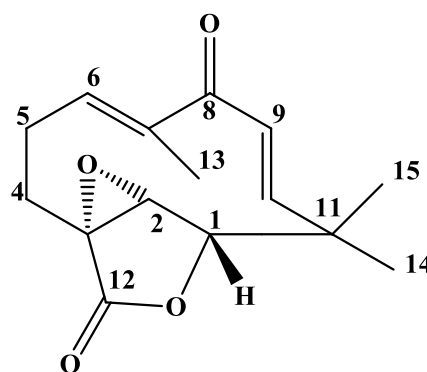
(105) X=  $\alpha$ OH,H

L'investigation chimique réalisée sur l'extrait éthanol de l'espèce *Asteriscus graveolens* subsp. *stenophyllus* par J. Triana et al. (2016) a conduit à l'isolement et l'identification de cinq nouveaux sesquiterpènes lactones nommés : 6 $\beta$ , 7 $\beta$ -epoxyasteriscunolide A (**106**), 2 $\alpha$ , 3 $\alpha$ -epoxyasteriscunolide C (**107**), 6 $\beta$ -hydroxyasteriscunolide A (**108**), 6 $\beta$ -ethoxyasteriscunolide A (**109**), asteriscanolidenol (**110**), avec d'autres sesquiterpènes connus asteriscunolide A (**95**), asteriscunolide C (**97**), 8-oxo-6,7,9,10-tetrahydrohumulen-1,12-olide (**100**), asteriscanolide (**111**), acide 8-oxo- $\alpha$ -humula-6E,9Z-diène-12-oïque (**102**) [134].

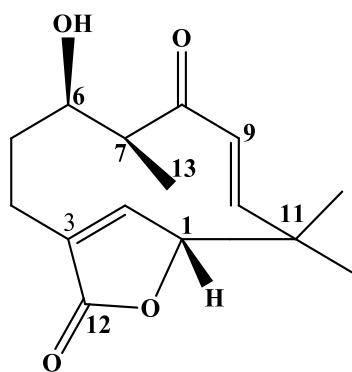
Ainsi, ces chercheurs ont isolé à partir de l'extrait éthanolique de l'espèce *Asteriscus schultzii* [134] deux sesquiterpènes connus 1 $\alpha$ ,4 $\beta$ ,6 $\beta$ -trihydroxyeudesmane (**112**) et teuclatriol (**113**).



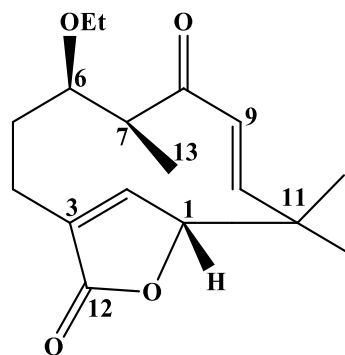
(106)



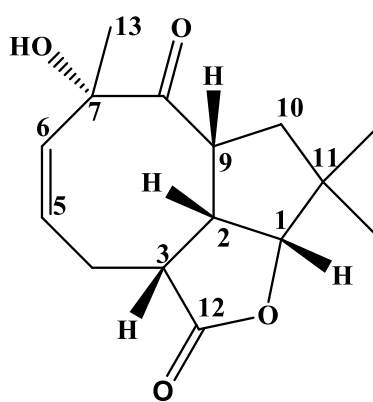
(107)



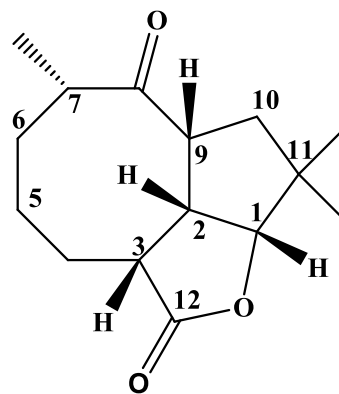
(108)



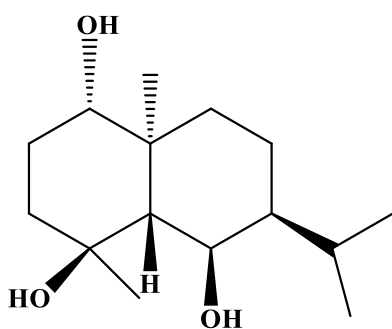
(109)



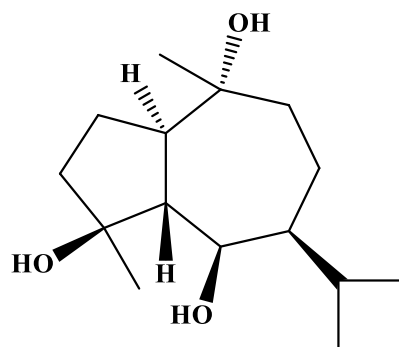
(110)



(111)



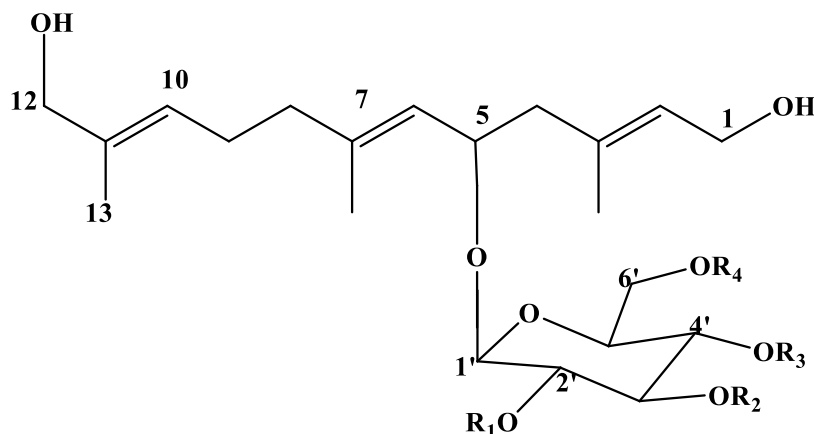
(112)



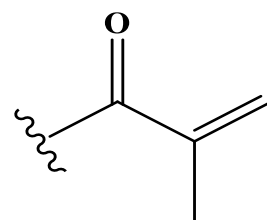
(113)

A partir des parties aériennes de la plante *A. pygmaeum* [135] quatre nouveaux sesquiterpènes de type farnésol ont été isolés : 1,5,12 Trihydroxy-5-O (4'-O-angeloyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-farnésol (**114**), 1,5,12 Trihydroxy-5-O (3'-O-acetyl-4'-O-angeloyl- $\beta$ -D-

glucopyranosyl)-farnesol (**115**), 1,5,12 Trihydroxy-5-O (2',3'-O-diacetyl-4'-O-angeloyl- $\beta$  – D-glucopyranosyl)-farnesol (**116**) et 1,5,12 Trihydroxy-5-O (2',3',6'-O-triacetyl-4'-O-angeloyl- $\beta$  –D-glucopyranosyl)-farnesol (**117**).

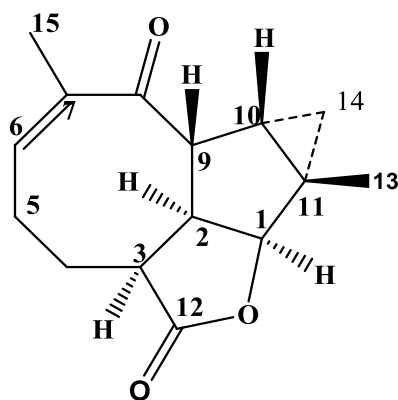


	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
(114)	H	H	Ang	H
(115)	H	Ac	Ang	H
(116)	Ac	Ac	Ang	H
(117)	Ac	Ac	Ang	Ac



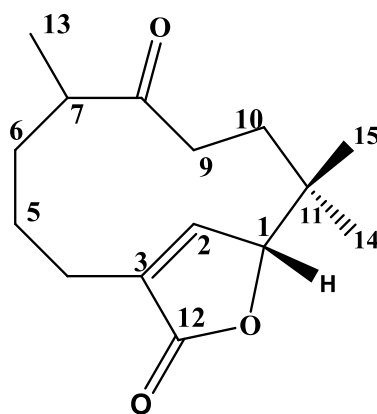
Ang=Angéloyl

L'analyse de l'extrait chloroformique des parties aériennes de l'espèce *Nauplius graveolens subsp. odorus* [136] a conduit à l'isolement d'un nouveau sesquiterpène lactone nommé naupliode (**118**), avec d'autres sesquiterpènes connus asteriscunolide A (**95**), asteriscunolide C (**97**) et 6, 7, 9,10-tétrahydroasteriscunolide (**92**). Leurs structures ont été déterminées par analyse spectroscopique (RMN et ESI-MS) et par comparaison avec les données rapportées dans la littérature.



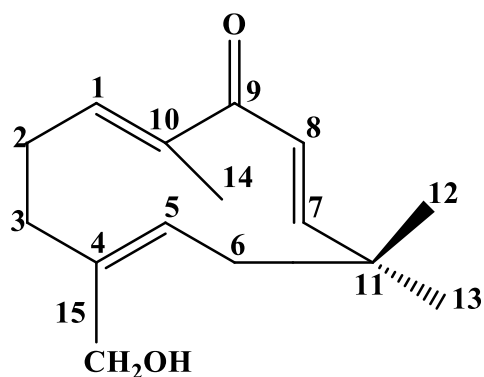
(118)

Un nouveau sesquiterpène lactone 6,7,9,10-tetrahydroasteriscunolide (**119**), ainsi que deux dérivés connus asteriscunolides A (**95**) et D (**98**) ont été isolés à partir de l'extrait acétone de l'espèce *Nauplius aquaticus* [137].

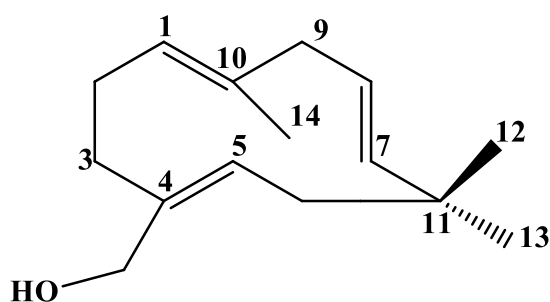


(119)

L'étude réalisée par Bohalmann.F et *al.* (1992) s'intéresse aux parties aériennes de l'espèce *Nauplius intermedius* [138]. Cette investigation révèle l'existence de cinq nouveaux sesquiterpènes lactones à squelette humulène nommés : 15-Hydroxyhumula-1(10)E,4Z,7Z-trien-9-one (**120**), 15-Hydroxyhumula-1(10)E,4Z,7E-trien-9-one (**121**), 15-Hydroxyhumula-1(10)Z,4Z,7Z-trien-9-one (**122**), 15-Hydroxyhumula-1(10)Z,4Z,7E-trien-9-one (**123**), 15-Hydroxyhumula-1(10)E,4Z,7E-triene (**124**), avec d'autres sesquiterpènes connus.

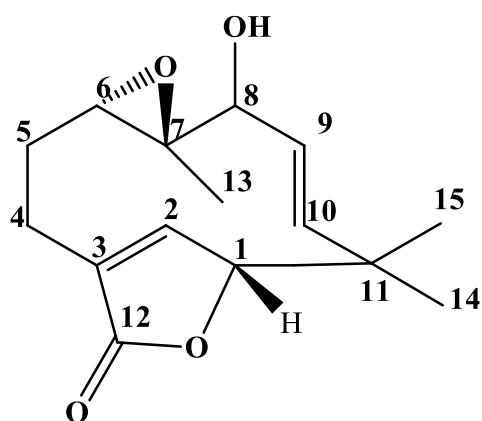


	(120)	(121)	(122)	(123)
$\Delta^{1(10)}$	E	E	Z	Z
$\Delta^7$	Z	E	Z	E

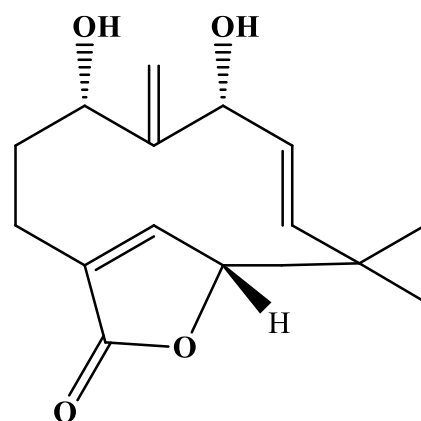


(124)

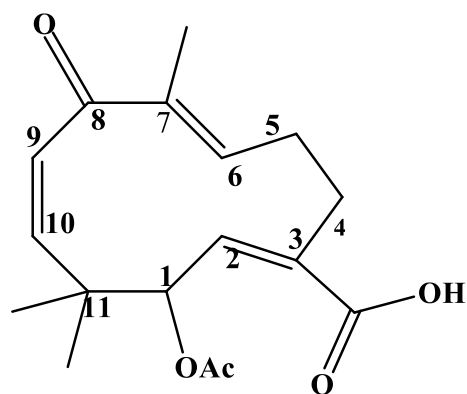
Une étude phytochimique a été réalisée sur les parties aériennes de l'espèce *Asteriscus graveolens* par Hammoud.L et al. (2018) [139] dans notre laboratoire a permis d'isoler et d'identifier trois nouveaux sesquiterpènes lactones à squelette humulène : (-)-asteriscunolides I ( **125** ), J ( **126** ) et (-)-(2Z,6E,9Z)-8-oxo-1a-acetoxy-2,6,9-humulatrien-12-oic acid ( **127** ), ainsi que d'autres sesquiterpènes connus asteriscunolide A ( **95** ), asteriscunolide B ( **96** ) et asteriscunolide F ( **128** ).



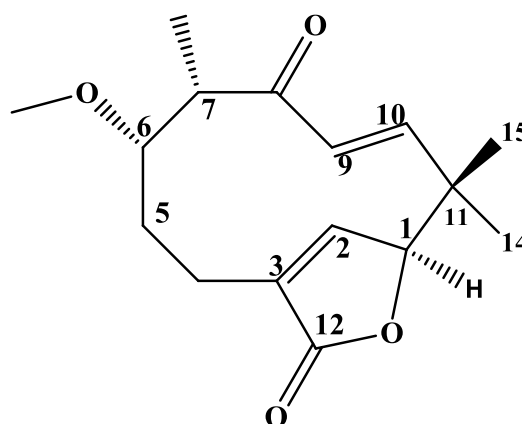
(125)



(126)



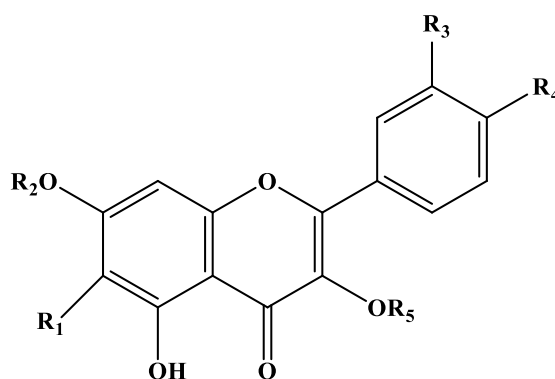
(127)



(128)

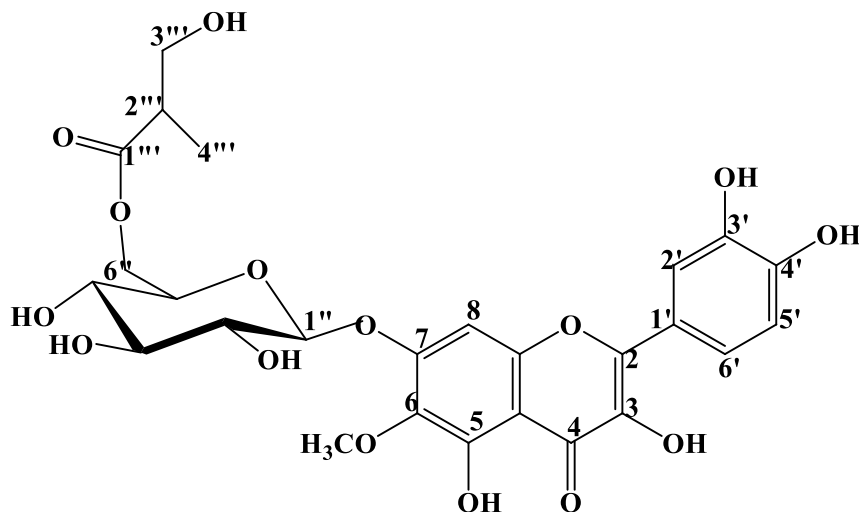
### I.6.2 Les flavonoïdes :

Le groupe de Ahmed AA (1991) [140], a montré que l'analyse des métabolites secondaires extraits à partir des parties aériennes de l'espèce *Asteriscus graveolens* conduit à l'isolement de onze flavonoïdes il s'agit de : Lutéolin-7-O-  $\beta$ -D-glucoside (**26**), quercetin-3-O-  $\beta$ -D-glucoside (**129**), quercetin-3-O-galactoside (**130**), quercetin-7-O-  $\beta$ -D-glucoside (**131**), Kaempferol-3-O-  $\beta$ -D-glucoside (**132**), Kaempferol-3-O-galactoside (**133**), Kaempferol-7-O-  $\beta$ -D-glucoside (**134**), quercétine (**63**), quercetin 3,4'-dimethyl ether (**135**), quercetagine 3,6,3'-trimethyl ether (**136**), tamarixétine 3-O- $\beta$ -D-robinobioside (**137**).



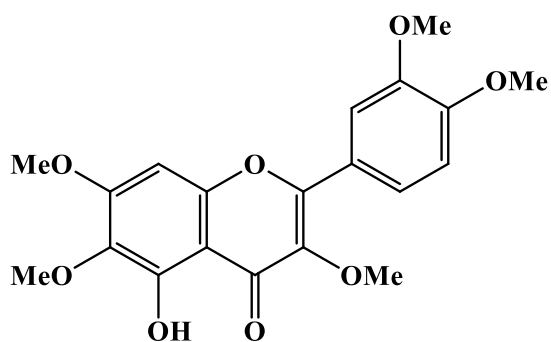
Structure	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
(129)	H	H	OH	OH	Glu
(130)	H	H	OH	OH	Gala
(131)	H	Glu	OH	OH	H
(132)	H	H	H	OH	Glu
(133)	H	H	H	OH	Gala
(134)	H	Glu	H	OH	H
(135)	H	H	OH	OMe	OMe
(136)	OMe	H	OMe	OH	OMe
(137)	H	H	H	OMe	Rham (1-6)-gal

L'étude phytochimique réalisée par Ezzat. MI et al (2016) [141] sur les parties aériennes de l'espèce *Asteriscus maritimus* (L.) Less (Tunisie) a permis d'isoler et de caractériser par les méthodes spectrales, principalement la RMN mono et bidimensionnelle ainsi que la spectrométrie de masse, un nouveau flavonoïde 7-O-β-D-[(2''')S) 6'' (3''-hydroxy-2''-methylpropanoyl)] glucopyranoside (**138**) et la lutéoline (**22**).

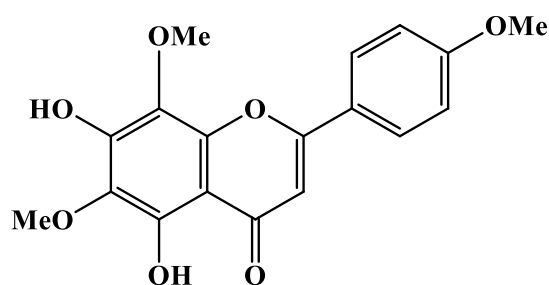


(138)

Une étude chimique a été faite sur les feuilles de la plante d'*Asteriscus graveolens* subsp. *Odorus* [142] montrant l'existence de trois flavonoïdes : névadensine (**139**), lutéoline (**22**) et artemétine (**140**).



(139)

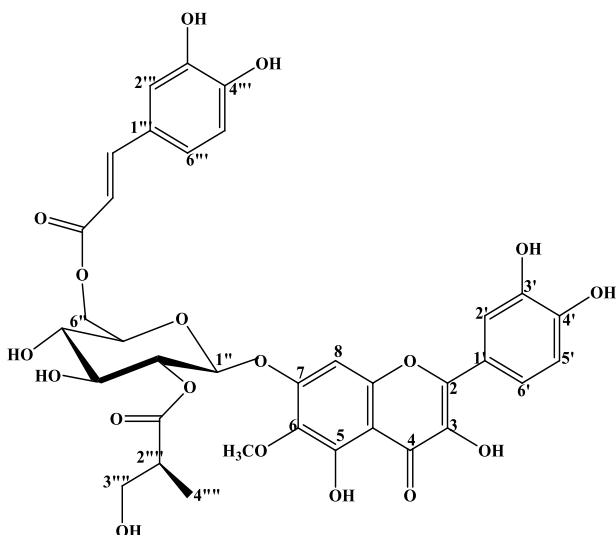


(140)

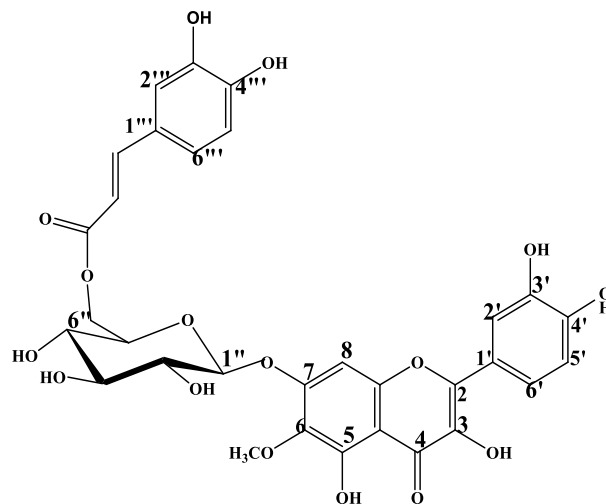
L'investigation phytochimique effectuée sur l'extrait butanolique de l'espèce *Asteriscus maritimus* (L.) Less (Annaba-Algérie) [143] a mené à l'isolement et l'identification d'un nouveau flavonol nommé Astermaritimoside (**141**) ou patuletin-7-O-[6-O-caffeoyl-2-O-[(S)3-



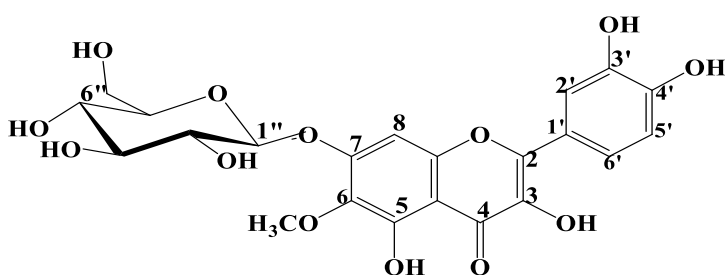
hydroxyisobutanoyl]glucopyranoside], ainsi que quatre flavonoïdes connus patuletin 7-O-β-[6-O-(3-hydroxyisobutanoyl) glucopyranoside], patuletin-7-O-[6-O-caffeoylglucopyranoside] (142), patuletin-7-O-β-D-glucopyranoside (143) et quercetin-3-O-β-rutinoside (144). Leurs structures ont été établies par RMN 1D et 2D, HREI-MS et par comparaison avec les données de la littérature.



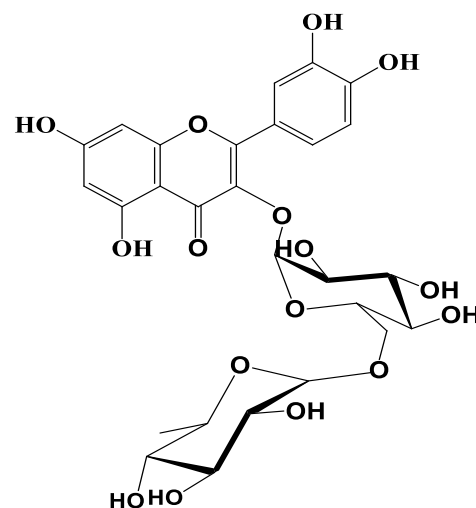
(141)



(142)



(143)



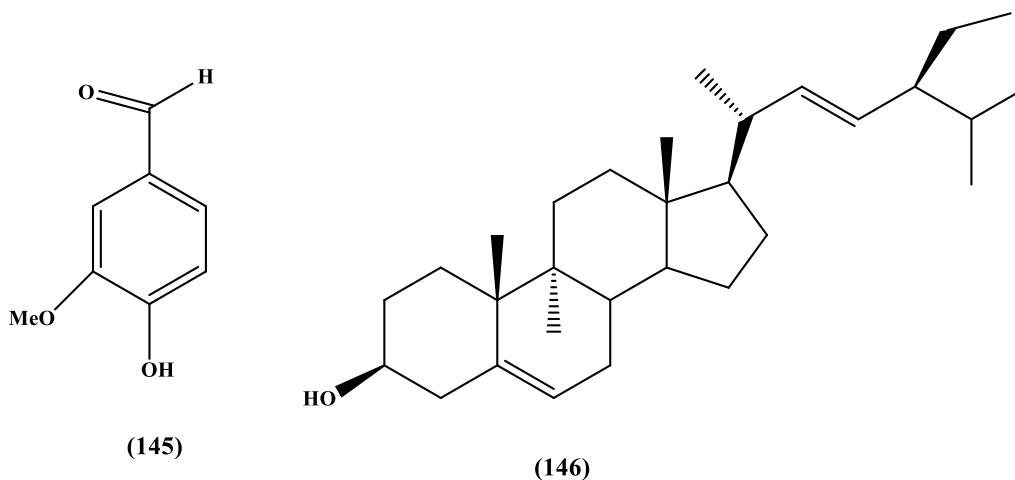
(144)

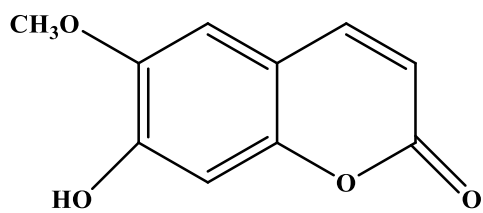
### I.6.3 Autres métabolites secondaires :

Dans le genre *Asteriscus*, d'autres types de composés moins dominants ont été isolés et identifiés. Un certain nombre est cité dans le tableau I.5 ci-dessous.

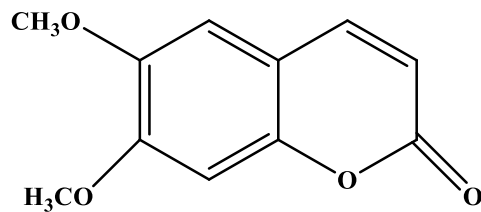
Tableau I.5 : Autres métabolites secondaires du genre *Asteriscus*.

Composés	Espèces	Références
Vanilline (145)	<i>A. graveolens</i> subsp. <i>stenophyllus</i>	[134]
Stigmastérol (146)	<i>A. schultzii</i>	
	<i>A. graveolens</i> subsp. <i>stenophyllus</i>	
Scopolétine (147)	<i>A. schultzii</i>	
Scoparone (148)	<i>A. schultzii</i>	
5,6,7-triméthoxycoumarine (149)	<i>A. schultzii</i>	
Acide déhydroabietique (150)	<i>A. schultzii</i>	
Acide 7-oxodéhydroabietique (151)	<i>A. schultzii</i>	[141]
$\beta$ -sitostérol (152)	<i>A. maritimus</i>	
Acide chlorogénique (2)		
<i>P</i> -hydroxy-méthylbenzoate (153)		
Acide protocatéchique (14)	<i>A. maritimus</i>	[144]
Asterisulphoxide (154)		
Asterisulphone (155)		
4-hydroxy-2-méthoxybenzaldéhyde (156)		
Coniféraldéhyde (153)		
Méthylcafféate (158)		[144]
Isobutyrate 10-isobutyryloxy-8,9-époxythymyle (159)	<i>A. maritimus</i>	[145]
8,9-dihydroxy-10-isobutyryloxythymol (160)		
8-hydroxy-9,14-diisobutyryloxythymol (161)		
cis-8-acétoxychrysanthényl acétate (162)	<i>A. graveolens</i>	[145]

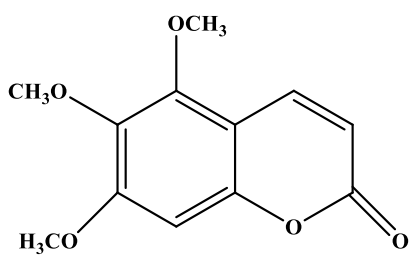




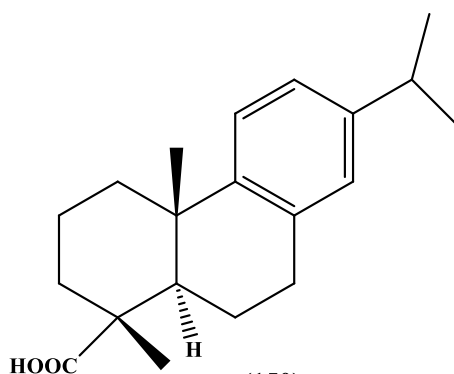
(147)



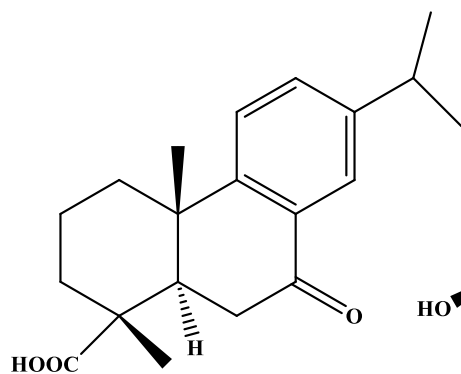
(148)



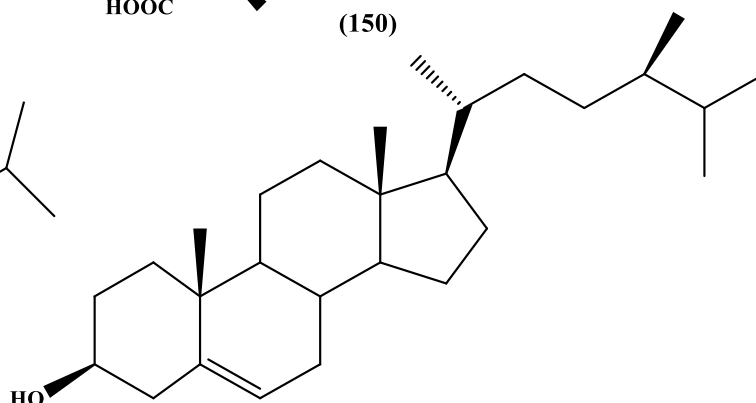
(149)



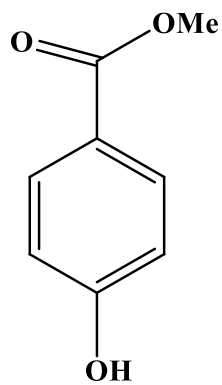
(150)



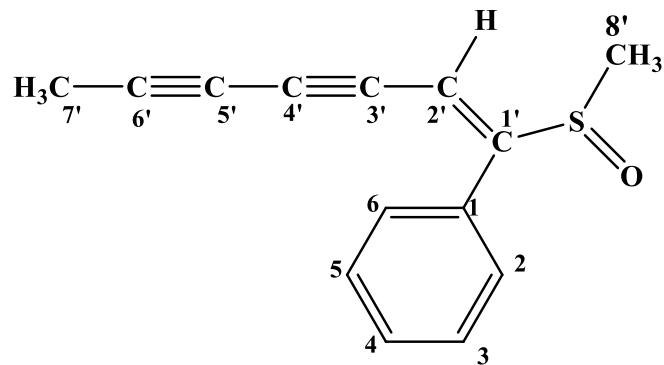
(151)



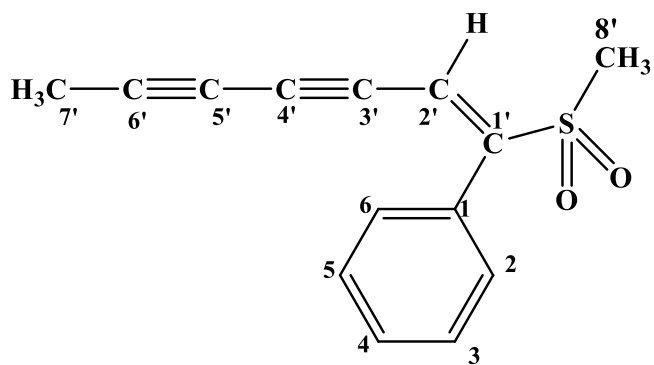
(152)



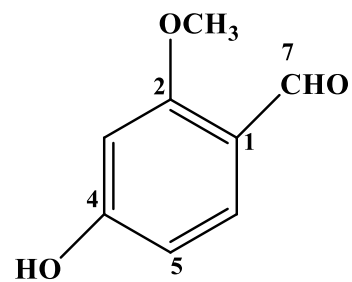
(153)



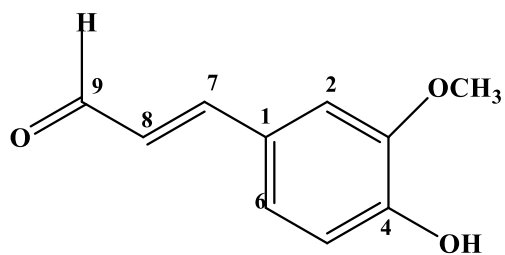
(154)



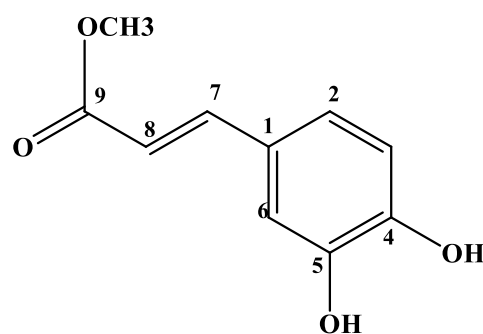
(155)



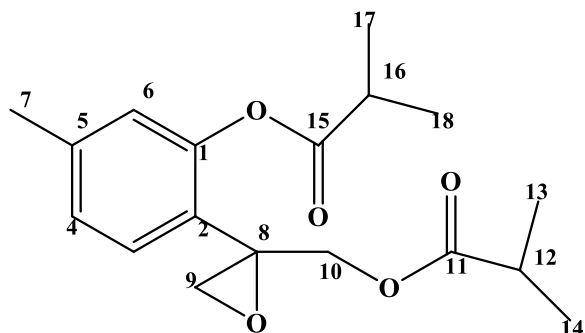
(156)



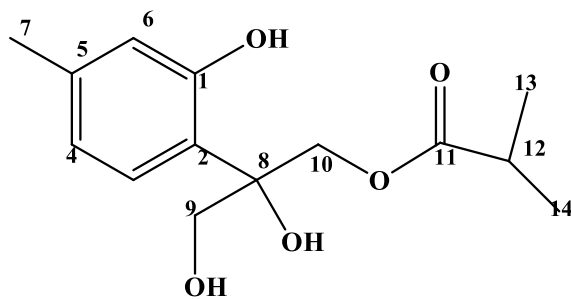
(157)



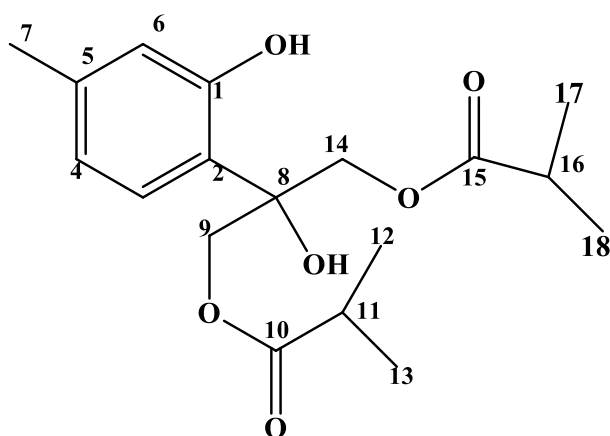
(158)



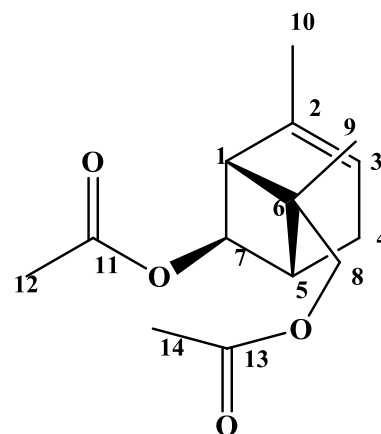
(159)



(160)



(161)



(162)

#### I.6.4. Utilisations et activités biologiques :

La recherche bibliographique menée sur les espèces du genre *Asteriscus* montre qu'elles ont des propriétés thérapeutiques intéressantes et sont utilisées en médecine traditionnelle pour guérir diverses maladies. *Asteriscus graveolens* a été utilisée dans la médecine traditionnelle au Sahara pour traiter la fièvre, les douleurs céphaliques, la bronchite, le traitement des troubles gastro-intestinaux, la sinusite, le traitement de stérilité chez les femmes et comme anti-inflammatoire [146,147].

Le genre *Asteriscus* présente un grand intérêt thérapeutique, notamment comme source naturelle de sesquiterpènes lactones et flavonoïdes qui sont les constituants majoritaires de ce genre. Beaucoup d'espèces de ce genre ont fait l'objet de nombreux travaux scientifiques mettant en évidence des activités variées, on peut citer comme exemple:

Une étude biologique *in vitro* effectuée sur l'huile essentielle d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus*, poussant en Maroc, a révélé une bonne activité antifongique contre les champignons suivants : *Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum* et *Botrytis cinerea*. De plus, cette étude a montré que cette huile possède une bonne activité antioxydante avec le DPPH [148].

L'huile essentielle d'*Asteriscus maritimus* (L.) Less poussant en Tunisie, a été testée contre trois bactéries : *Pseudomonas* sp. (Pa 499), *Burkholderia* sp. (Bg 35) et *Bacillus* sp. (Bp 420) ; et les résultats ont montrés que l'huile essentielle à une activité antibactérienne significative. Ansi, cette étude a montré que cette huile possède une bonne activité anti-acetylcholinesterase et aussi une activité antifongique [149].

Les lactones sesquiterpéniques : 6 $\beta$ , 7 $\beta$ -epoxyasteriscunolide A (**106**), 2 $\alpha$ , 3 $\alpha$ -epoxyasteriscunolide C (**107**), 6 $\beta$ -hydroxyasteriscunolide A (**108**), 6 $\beta$ -ethoxyasteriscunolide A (**109**), et asteriscanolidenol (**110**) ont été testés pour leurs activités cytotoxiques contre la lignée cellulaires de leucémie humaine HL-60 et MOLT-3. Les résultats ont montré que le composé (106) donne une activité cytotoxique élevée (IC<sub>50</sub>=4.1 –5.4  $\mu$ M) [134].

L'étude réalisée par Ezzat MI et al. (2016) [141] a montré que l'extrait EtOH des parties aériennes de l'espèce *Asteriscus maritimus* (L.) révèle une activité anti-oxydante et anti-inflammatoire importante. Cette activité est en corrélation avec les teneurs en composés phénoliques (107.36  $\pm$  0.051 mg GAE/g extrait).

L'extrait butanolique d'*Asteriscus maritimus* (L.), ainsi que les flavonoïdes isolés ont montré une bonne activité anti-oxydante avec le DPPH [143].

L'activité anti-oxydante de l'extrait méthanolique obtenue des parties aériennes d'*Asteriscus graveolens* a été étudié avec trois autres plantes sahariennes d'Algérie [150] révèlent une activité plus importante par rapport à celle trouvée par Daur [150] et Djeridane et al. [152] sur *Asteriscus graveolens* et *Asteriscus pygmaeus*.

Les lactones sesquiterpènes isolé d'*Asteriscus vogelii*, ont montré une activité phytotoxique et cytotoxique. Le composé (**98**) indiquent une activité cytotoxique très élevée contre les cellules P-338 lymphome chez les rats, A-549 carcinome du poumon humain, HT-29 carcinome du côlon humain et MEL-28 mélanome humain [132].

### Conclusion

A l'issue de cette recherche bibliographique exhaustive, il est à relever aisément que les acides phénoliques, les flavonoïdes et les terpenoïdes constituent principalement la majorité des métabolites secondaires que renferment les espèces du genre *Thymus*. Ces composés sont considérés comme étant responsables des nombreuses activités biologiques de ces plantes.

Concernant le genre *Asteriscus*, l'étude bibliographique a montré la richesse des espèces de ce genre en métabolites secondaires, notamment de type sesquiterpènes lactones et flavonoïdes qui sont bien connues pour leur grande importance en activités biologiques.

Pour toutes ces raisons, nous avons entrepris au cours de ce travail l'étude de deux espèces Algériennes: *Thymus ciliatus* (desf) et *Asteriscus graveolens* (forsk).DC.

**Références**

- [1] Naghibi F, Mosaddegh M, Mohammadi MS, Ghorbani A.2005.Labiatae Family in folk Medicine in Ira from Ethnobotany to Pharmacology.Iranian journal of pharmaceutical research. 2: 63-79.
- [2] Gherman C, Culea M, Cozar O.2000.Comparative analysis of some active principles of herb plants by GC/MS-Talanta. 53: 253-262.
- [3] Bouhdid S, Idaomar M, Zhiri A, Bouhdid D, Skali NS , Abrini J.2006.Thymus essential oils: chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities. Biochimie, Substances Naturelles et environnement, Congrès Intrntional de biochimies, Agadir. 324-327.
- [4] Hilan C, Sfeir R, Jawish D et Aitour S.2006.Huiles essentielles de certaines plantes medicinales libanaises de la famille des Lamiaceae.Lebanese Science Journal.7 (2) ; 13-21.
- [5] Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D.2008. Review MI-Biological effects of essential oils- A review Food and Chemical Toxicology. 46: 446-475.
- [6] Miller RE, Mc Conville MJ, Woodrow IE.2006. Cyanogenic glycosides from the rare Australian endemic rainforest tree Clerodendrum grayi (Lamiaceae), Phytochemistry. 67 : 43-51.
- [7] Quezel, P, et Santa, S.1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I, C.N.R.S.Paris.
- [8]Stahl-Biskup E. & Saez F. 2002. Thyme, The genus Thymus. Taylor and Francis. 331 pp.
- [9]Barros L, Heleno SA, Carvalho AM, Ferreira I.C.F.R. 2010. Lamiaceae often used in Portuguese folk medicine as a source of powerful antioxidants: vitamins and phenolic. Food Sci. Technol. 43: 544–550.
- [10]Napoli EM, Curcuruto G, Ruberto G. 2010. Screening of the essential oil composition of wild Sicilian thyme. Biochem. Syst. Ecol. 38: 816–822.
- [11] Hazzit M, Baaliouamer A, Faleiro ML, Miguel MG.2006.Composition of the essential oils of Thymus and Origanum species from Algeria and their antioxidant and antimicrobial activities. J Agric Food Chem. 54: 6314–21.
- [12] Bousmaha-Marroki L, Atik-Bekkara F, Tomi F, Casanova J .2007.Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. ssp. *eu-ciliatus* Maire from Algeria. J Essent Oil Res .19: 490–3.

- [13] Dob T, Dahmane D, Benabdelkader T, Chelghoum C. 2006. Studies on the essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus algeriensis* Boiss. Et Reut. Int J Aromather. 16: 95–100
- [14] Dob T, Dahmane D, Benabdelkader T, Chelghoum C. 2006. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus fontanesii*. Journal of pharmaceutical biology (Pharm. Bio.).44(8): 607-612.
- [15] Nickavar B, Mojab F, Dolat-Abadi .2005. R-Analysis of the essential oils of two *Thymus* species from Iran. J Food Chemistry .90:609-611.
- [16] Saidj F. 2006. Extraction de l'huile essentielle de thym : *Thymus numidicus kabylica* - Thèse de magistère en Technologie des hydrocarbures, Département génie des procédés chimiques et pharmaceutiques ; université M'Hamed Bougara-Boumerdes.
- [17] Hazzit M, Baaliouamer A, Verissimo AR, et al. 2009. Chemical composition and biological activities of Algerian *Thymus* oils. Food Chem .116: 714–21.
- [18] Bekhechi C, Bekkara FA, Abdelouahid DE, Felix T, Casanova J. 2007. Composition and antibacterial activity of the essential oil of *Thymus fontanesii* Boiss. Et Reut. From Algeria. J Essent Oil Res. 19: 594–6.
- [19] Alaoui-Jamali C, Kasrati A, Leach D, Abbad A. 2016. Comparative Study of Insecticidal Activities of Wild Thyme Species Essential Oils Originated from South Western Morocco. Phytothérapie. 10298-016-1051-6.
- [20] Bellakhdar J. 1997. La Pharmacopée marocaine traditionnelle .Médecine arabe ancienne et savoirs populaires, Paris, Ibis Press. 64.
- [21] Ebrahimi SN, Hadian J, Mirjalili MH, Sonboli A, Yousefzadi MM. 2008. Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. Food Chemistry. 110 (4): 927–931.
- [22] Imelouane B, Amhamdi H, wathelet JP, Ankit M, Khedid , El Bachiri A. 2009. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of thyme (*Thymus vulgaris*) from Eastern Morocco. International journal of agriculture & biology .11: 205- 208.
- [23] Rota MC, Herrera A, Martinez RM, Sotomayor J, Jordan MJ. 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *thymus vulgaris*, *thymus zygis* and *thymus hyemalis* .essential oils Food control .19: 681 -687.
- [24] De Martino L, Bruno M, Formisano C, De Feo V, Napolitano F, Rosselli S, Senatore F. 2009. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from two species of *thymus* growing wild in southern Italy. Molecules. 14: 4614-4624



- [25] Loziene K, Venskutonis PR, Sipailiene A, Labokas J. 2007. Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. chemotypes. Food Chem. 103: 546-559.
- [26] Amarti F, Satrani B, Ghanmi M, Farah A, Aafi A, Aarab L, El Ajjouri M, Chaouch A. 2010. Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut .et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. Du Maroc. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 14(1) : 141 -148.
- [27] Pinto E, C.PinaVaz,Salgueiro L, Gonçalves MJ, Costa-de-Oliveira S, Cavaleiro C, Palmeira A, Rodrigues A, Martinez-de-Oliveira J. 2006. Antifungal activity of the essential oil of *thymus pulegioides* on candida, Aspergillus and dermatophyte species. Journal of medical microbiology. 55:1367-1373.
- [28] Goncalves MJ, Cruz MT, Cavaleiro C, Lopes MC, Salgueiro L. 2010. Chemical, antifungal and cytotoxic evaluation of the essential oil of *thymus Zygis* subsp. Sylvestris. Industrial crops and products .32:70-75.
- [29] Giordani R, Hadeif Y, Kaloustian J. 2008. Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants .Fitoterapia. 79:199 – 203.
- [30] Karaman S, Digrak M, Ravid U A, Ilcim A. 2001. Antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Thymus revolutus* Celak. From Turkey. J. Ethnopharmacology.76: 183-186.
- [31] SariKurkcu C, Sabih Ozer M, Eskici M, Tepe B, Can S, Mete E. 2010. Essential oil composition and antioxidant activity of *thymus longicaulis* C. Prest Subsp. Longicaulis Var.longicaulis Food and chemical toxicology .48:1801 – 1805.
- [32] Bounatirou S, Smiti S, Miguel M G, Faleiro L ,Rejeb MN, Neffati M, Costa MM. Figueiredo AC, Barroso JG,Pedro LG. 2007. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* .Food Chemistry. 105: 146-155.
- [33] El Ouariachi E, Paolini J, Bouyanzer A, Tomi P, Hammouti B, Salghi R, Majidi L, Costa J. 2011. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils and solvent extracts of *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns and link from Morocco. Journal of Medicinal Plants Research. 5(24):5773-5778.
- [34] Byung-Ho L, Peter CA, Fa'ale T, Won-Sik C. 2004. Fumigant toxicity of essential oils from the Myrtaceae family and 1,8-cineole against 3 major stored-grain insects. Journal of Stored Products Research .40: 553–564.

- [35] Kordali Sa, Cakir A, Ozer H, Cakmakci R, Kesdek M, Mete E. 2008. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. *Bioresource Technology* .99: 8788–8795.
- [36] Boros B, Jakabová S, Dörnyei Á, Horváth G, Pluhár Z, Kilár F, Felinger A. 2010. Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography-mass spectrometry in *Thymus* species. *Journal of Chromatography A*.1217 (51): 7972-7980.
- [37] Hossain, MB, Rai D , Brunton NP, Martin-Diana AB, Barry-Ryan C. 2010. Characterization of Phenolic Composition in Lamiaceae Spices by LC-ESI-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58(19): 10576-10581.
- [38] Petersen M, Simmonds M J. 2003. Molecules of Interest, Rosmarinic acid. *Phytochemistry*. 62: 121 -125.
- [39] Achour S, Khelifi E, Attia Y, Ferjani E, Hellal A H. 2012. Concentration of Antioxidant Polyphenols from *Thymus capitatus* extracts by Membrane Process Technology. *Journal of Food Science*. 77 (6): 703-709.
- [40] Zgorcka G, Glowniak K.2001. Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the Lamiaceae family. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 26(1): 79-87
- [41] Kulisic T, Dragovic-Uzela, V, Milos M.2006. Antioxidant activity of aqueous tea infusions prepared from oregano, thyme and wild thyme. *Food Technology and Biotechnology*. 44(4): 485-492.
- [42] Wang H, Provan GJ, Helliwell K.2004. Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC. *Food Chem*. 87(2): 307-311.
- [43] Miron, T L, Plaza M, Bahrim, G, Ibanez E, Herrero M. 2011. Chemical composition of bioactive pressurized extracts of Romanian aromatic plants. *Journal of Chromatography A*. 1218(30): 4918-4927.
- [44] Kulisic T, Dragovic-Uzelac V, Milos M.2006. Antioxidant activity of aqueous tea infusions prepared from oregano, thyme and wild thyme. *Food Technology and Biotechnology* 44(4): 485-492.
- [45] Fecka I., Turek S. 2008. Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from Lamiaceae: thyme, wild thyme and sweet marjoram by chromatographic techniques. *Food Chem*.108 (3): 1039-1053.

- [46] Janicsak G, Mathe I, Miklossy-Vari V, Blunden, G.1999. Comparative studies of the rosmarinic and caffeic acid contents of Lamiaceae species. *Biochemical Systematics and Ecology*. 27(7):733-738.
- [47] Lee IC, Bae JS, Kim T, Kwon OJ, Kim T.2011. H.Polyphenolic Constituents from the Aerial Parts of *Thymus quinquecostatus* var. *japonica* Collected on Ulleung Island. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 54(5): 811-816.
- [48] Blazquez M A, Manez S, Zafrapolo M C.1994. Further flavonoids and other phenolics of *Thymus-webbianus* rouy. *Z. Naturforsch. I.* 49(9-10): 687-688.
- [49] Nagy T O, Solar S, Sontag G, Koenig J.2011. Identification of phenolic components in dried spices and influence of irradiation. *Food Chem.* 128(2): 530-534.
- [50] Wang M, Li J, Ho GS, Peng X, Ho C T.1998. Isolation and identification of antioxidative flavonoid glycosides from thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Journal of Food Lipids.* 5(4): 313-321.
- [51] Dapkevicius A, van Beek T A, Lelyveld G P, van Veldhuizen A, de Groot A, Linssen J P H, Venskutonis R.2002.. Isolation and structure elucidation of radical scavengers from *Thymus vulgaris* leaves. *Journal of Natural Products.* 65(6): 892-896.
- [52] Reichling J, Nolkemper S, Stintzing FC, Schnitzler P.2008. Impact of Ethanolic Lamiaceae Extracts on Herpesvirus Infectivity in Cell Culture. *Forschende Komplementarmedizin.* 15(6): 313-320.
- [53] Ozgen U, Mavi A, Terzi Z, Kazaz C, Asci A, Kaya Y, Secen H.2011. Relationship Between Chemical Structure and Antioxidant Activity of Luteolin and Its Glycosides Isolated from *Thymus sipyleus* subsp *sipyleus* var. *sipyleus*. *Rec. Nat. Prod.* 5 (1): 12-21.
- [54] Wojdylo A, Oszmianski J, Czemery R.2007. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem.* 105(3):940-949.
- [55] Bruneton J. 1999. *Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales.* Édition : Techniques et Documentation Lavoisier, Paris.
- [56] Goto T, Kondo T. 1991. Structure and molecular stacking of anthocyanins Flower color variation. *Angewandte Chemie.* 30: 17-33.
- [57] Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science.* 2:152.
- [58] Van dB, Haenen G, Van dBH, Van dVW, Bast A. 2000. The predictive value of antioxidant capacity of structurally related flavonoids using the Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. *Food Chemistry.* 70: 391-395.

- [59] Stavric B, Matul TI. 1992. Flavonoids in food. Their significance for nutrition and health, Lipid soluble and antioxidants. *Biochemistry and clinical applications*. 274-294.
- [60] Das H C, Wang J H, Lien E J. 1994. Carcinogenicity and cancer preventing activities of flavonoids: A structure-system-activity relationship (SSAR) analysis. *Progress in Drug Research*. 42 :133–136.
- [61] Bidet D, Gaignault JC, Girard P, Trotin F. 1987. Inflammation, allergie, douleur et acide arachidonique : du jardin des Hespérides à la cascade de l'acide arachidonique : Les flavonoïdes. *L'actualité chimique*. 89 – 97 .
- [62] Amaral AC F, Kuster RM, Gonçalves JLS, Wigg M D. 1999. Antiviral investigation on the flavonoids of *Chamaesyce thymifolia*. *Fitoterapia*. 70: 293-295.
- [63] Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AnA, Capasso F. 1999. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Review life sciences*. 65 : 337-353.
- [64] Wagner H, Wierer M, Bauer R. 1986. In vitro Hemmung der Prostaglandin Biosynthese durch etherische Öle und phenolische Verbindungen. *Planta Medica*. 52(3):184-187.
- [65] Hernández L, Tomás-Barberán F A, Tomás-Lorente .1987. A chemotaxonomic study of free flavone aglycones from some Iberian *Thymus* species. *Biochem. Syst. Ecol.* 15: 61–67.
- [66] Tomas-Barberan, F A, Husain S Z, Gil M I. 1988. The Distribution of Methylated Flavones in the Lamiaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*. 16:43-46.
- [67] Tomas-Barberan FA, Wollenweber E. 1990. Flavonoid aglycones from the leaf surfaces of some *Labiatae* species. *Plant Systematics and Evolution*. 173:109-118.
- [68] Merghem R, Jay M, Viricel MR, Bayet C, Voirin B. 1995. Five 8- C-benzylated flavonoids from *Thymus hirtus* (Labiatae). *Phytochemistry*. 38: 637-640.
- [69] Corticchiato M, Bernardini A, Costa J, Bayet C, Saunois A, Voirin, B. 1995. Free flavonoid aglycones from *Thymus herba-barona* and its monoterpenoid chemotypes. *Phytochemistry*. 40 (1): 115-120.
- [70] Miura K, Nakatani N. 1989. Antioxidative activity of p-coumarone from thyme (*Thymus vulgaris* L). *Agricultural and Biological Chemistry* .53(11): 3043-3045.
- [71] Benayache, F, Boureghda A, Ameddah S, Marchioni E, Benayache F, Benayache S. 2014. Flavonoids from *Thymus numidicus* Poiret. *Der Pharm. Lett*. 6 (2): 50-54.
- [72] Benkiniouar R, Touil A, Zaidi F, Rhouati S, Ghosson E, Seguin E, Comte G, Bellvert F. 2010. Isolation and identification of five free flavonoid aglycones from *thymus numidicus*. *J. Soc. Alger. Chim*. 20 (1): 11-15.
- [73] Dimitrios G, Samah D, Helen S. 2015. Secondary metabolites from *Thymus numidicus* Poiret. *Biochemical Systematics and Ecology* .59: 104-106.

- [74] Marin P D, Grayer R J, Kite GC, Veljic M.2005. External flavones from *Thymus striatus* Vahl (Lamiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*. 33(11): 1179-1182.
- [75] Horwath AB, Grayer RJ, Keith-Lucas DM, Simmonds MSJ. 2008. Chemical composition of wild populations of *Thymus* from different climatic regions in southeast Spain. *Biochemical Systematics and Ecology*. 36(2): 117-133.
- [76] Justesen U.2000. Negative atmospheric pressure chemical ionization low-energy collision activation mass spectrometry for the identification of flavonoids in extracts of fresh herbs. *Journal of Chromatography A*. 902(2): 369-379.
- [77] Olechnowicz-Stepien O, Lamer-Zarawska E.1975. Study of the flavonoid fraction of some plants of the labiateae family. *Herba Pol.*21:347-365.
- [78]Regnault-Roger C, Ribodeau M, Hamraoui A, Bareau I, Blanchard P, Gil-Munoz M-I, Thomas-Barberan F. 2004. Polyphenolic compounds of Mediterranean Lamiaceae and investigation of genotoxic effects on *Acanthoscelides obtectus* (Say). *Journal of Stored Products Research* .40: 395–408.
- [79] Dall'Acqua S, Peron G, Ferrar SI, Gandin V, Bramucci M, Quassinti L, Mártonfi P, Maggi .2017. Phytochemical investigations and antiproliferative secondary metabolites from *Thymus alternans* growing in Slovakia. *Pharmaceutical Biology*. 55(1): 1162-1170
- [80] Donald JC, Gearge SH.1968. « Chimie organique », 2 Edition, Gautier Villars.
- [81] Bouvier F, Rahier A, Camara B.2005. Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. *Progress in lipid research* .44: 357-429.
- [82] Hill R A.2002. dictionary of natural products on CD-ROM, Ed. Version 1 0 :2. Chapman & Hall, CRC, New York.
- [83] Bakkali F.2007. Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem. Toxicol*.
- [84] Takeuchi H, Lu ZG, Fujita T. 2004. New monoterpene glucoside from the aerial parts of thyme (*thymus vulgaris* L.) *Bioscience. Biotechnology and biochemistry*. 68 (5): 1113- 1134.
- [85] Bruneton J. 1999. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Ed. (3), Paris.
- [86] Dey P M, Harborne J B. 1991. Methods in plant biochemistry. Volume 7. Terpenoids. Academic press.
- [87]Manitto P. 1981. Biosynthesis of natural products. John Willey et sons. New York.
- [88] Fu L, Zhang S, Li N, Wang J, Zhao M, Sakai J, Hasegawa T, Mitsui T, Kataoka T, Oka S, Kiuchi M, Hirose K, Ando M. 2005. Three new triterpenes from *Nerium oleander* and biological activity of the isolated compounds. *J. Nat. Prod.* 68:198–206.
- [89] Katerere DR, Gray AI, Nash RJ, Waigh RD.2003. Antimicrobial activity of pentacyclic

- triterpenes isolated from African Combretaceae. *Phytochemistry*. 63:81–88.
- [90] Yuan WH, Yi YH, Xue M, Zhang HW, La MP. 2008. Two antifungal active triterpene glycosides from sea cucumber *Holothuria (Microthele) axiloga*. *Chin. J. Nat. Med.* 6:105–108.
- [91] Kuo RY, Qian K, Morris-Natschke SL, Lee KH. 2009. Plant derived triterpenes and analogues as antitumor and antiHIV agents. *Nat. Prod.* 26:1321–1344.
- [92] Saxena BB, Zhu L, Hao M, Kisilis E, Katdare M, Oktem O, Bomshteyn A, Rathnam P. 2006. Boc-lysinate-betulonic acid: a potent, anti-prostate cancer agent. *Bioorg. Med. Chem.* 14:6349–6358.
- [93] Wen Y, Sun H, Liu J, Wu G, Zhang L, Wu X, Ni P. 2005. Pentacyclic triterpenes. Part 1. The first example of naturally occurring pentacyclic triterpenes as a new class of inhibitors of glycogen phosphorylases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15:4944–4948.
- [94] De Andrade SF, Comunello E, Noldin VF, Delle Monache F, Cechinel Filho V, Niero R. Antiulcerogenic activity of fractions and 3, 15-dioxo-21a-hydroxy-friedelane isolated from *Maytenus robusta* (Celastraceae). *Arch. Pharm. Res.* 2008. 31:41–46.
- [95] Segal R, Pisanty S, Wormser R, Azaz E, Seia MN. 2006. Anticariogenic activity of licorine and glycyrrhizine I. Inhibition of in vitro plaque formation by *Streptococcus mutans*. *J. Pharm. Sc.* 74:79–81.
- [96] Liu J. 1995. Pharmacology of oleanolic and ursolic acids. *J. Ethnopharma.* 49:57–68.
- [97] Lee MK, Kim YC. 2001. Five novel neuroprotective saponin esters of *Ulmus davidiana* var. *japonica*. *J. Nat. Prod.* 64:328–331.
- [98] Danelli MGM, Soares DC, Abreu HS, Pecanha LMT, Saraiva EM. 2009. Leishmanicidal effect of LLD-3, a nor-triterpene isolated from *Lophanthera lactescens*. *Phytochemistry*. 70 :608–614.
- [99] Tapondjou LA, Lontsi D, Sondengam BL, Choi J, Lee KT, Jung HJ. 2003. In vivo anti-conceptive and anti-inflammatory effects of the two triterpenes, ursolic acid and 23-hydroxyursolic acid, from *Cussonia bancoensis*. *Arch. Pharm. Res.* 26:143–146.
- [100] D'Abrosca B, Florentino A, Monaco P, Pacifico S. 2005. Radical-scavenging activities of new hydroxylated ursane triterpenes from cv. Annurca apples. *Chem. Biodiv.* 2:953–958.
- [101] Matsuda H, Morikawa T, Toguchida I, Harima S, Oshikawa MY. 2002. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 50 : 972.
- [102] Sarembaud A, Poitevin B. 1996. Médicament à usage homéopathique. Ed. Masson. 256 p. Paris.
- [103] Bremer K. 1994. Asteraceae, Cladistics and Classification. (Timber Press), 752 p, Portland, Oregon.

- [104] Barkely TM, Brouillet L, Strother JL.2006. Flora of north America Asteraceae. 19 :3-69.
- [105] Dupont F, Pguignard J.2007. Botanique systématique moléculaire. 14ème édition. 248.
- [106] Boullard B.1997. Dictionnaire : Plantes et champignons.202.
- [107] Spichiger RE, Savolainen VV, Figeat M,Jeanmonod D.2004.Botanique Systématique des plantes à fleurs .3ème édition, 348-349.
- [108] Florin JM.2008. les astéracées, une famille solaire. Biodynamis, N° 64.
- [109] Usher G.1966.A dictionary of botany, including terms used in biochemistry, soil science, and statistics. Constable & Co Ltd, London.
- [110]Dupont F, Guignard JL. 2012. Abrégé de Botanique 15<sup>ème</sup> édition. Editions Masson, Paris.
- [111] Gausсен H, Leroy F. 1982. Précis de botanique (Végétaux supérieurs). 2<sup>ème</sup> édition, 424-426.
- [113] Wiklund A. 1985. The genus *Asteriscus* (*Asteraceae-Inuleae*).Nordic J. Bot. 5: 299-314.
- [114] Wiklund A. 1987. The genus *Nauplius* (*Asteraceae- Inuleae*).Nordic J. Bot. 7: 1-23 .
- [115] Greuter W.1997.Save *Asteriscus*, sink *Nauplius* (*Compositae*).Flora. Mediterranea.7: 41-48.
- [116] Herz W. 1977. In : V.H.Heywood, J.B.Harbone, B.L.Turner (Eds.), « The biology and chemistry of the compositae », Academic Press, London, P.337, Chapter 11.
- [117]Yoshioka H, Mabry TJ, Timmermann BN. 1973. Sesquiterpene Lactones : Chemistry, NMR and Plant Distribution, University of Tokyo Press.
- [118] Robles M, Aregullin M, West J, Rodriguez E. 1995. Recent studies on the Zoo pharmacognosy, pharmacology, and neurotoxicology of sesquiterpene lactones. Planta Medica. 61: 199-203.
- [119] Cho J Y, Baik UK, Jung JH, Park M. 2000. In vitro anti-inflammatory effects of cynaropicrin, a sesquiterpene lactone, from *Saussurea lappa*. European Journal of Pharmacology. 398: 399-407.
- [120] Kasai R, Shingu T, Wu RY, Hal IH, Lee KH. 1982. Anti tumor agents 57. The isolation and structural elucidation of microhelenin a new anti leukemic norpseudoguaianolide and microhelenin from *Helenium microcephalum*. Journal of Natural Products. 45(3): 317-320.
- [121] Skaltse H, Lazari, D, Panagouleas C, Geogiadou E, Garcia B, Sokovic M. 2000. Sesquiterpene lactones from *Centaurea thessala* and *Centaurea attica*. Antifungal activity. Phytochemistry. 55(8): 903-908.

- [122] Picman AK. 1986. Biological activities of sesquiterpene lactones. *Biochemical Systematics and Ecology*. 14 : 255-281.
- [123] Zhang S, Won YK, Ong CN, Shen HM. 2005. Anti-cancer potential of sesquiterpene lactones: bioactivity and molecular mechanisms. *Curr. Med. Chem. Anti-cancer Agents*. 5:239–149.
- [124] Christensen SB, Skytte DM, Denmeade SR, Dionne C, Møller JV, Nissen P, Isaacs JT. 2009. A Trojan Horse in Drug Development: Targeting of Thapsigargin Towards Prostate Cancer Cells. *Anti-cancer Agents Med Chem*. 9:276–294.
- [125] Eliza J, Daisy P, Ignacimuthu S, Duraipandiyar V. 2009. Normoglycemic and hypolipidemic effect of costunolide isolated from *Costus speciosus* (Koen ex. Retz.) Sm. In streptozotocin-induced diabetic rats. *Chem.-Biol. Interact*. 179:329–334.
- [126] Tiunan TS, Ueda-Nakamura T, Garcia Cortez DA, Dias Filho BP, Morgado-Díaz JA, deSouza W, Nakamura CV. 2005. Antileishmanial activity of parthenolide, a sesquiterpene lactone isolated from *Tanacetum parthenium*. *Antimicrob. Agents. Chemother*. 49:176–182.
- [127] Boulanger D, Brouillette E, Jaspard F, Malouin F, Mainil J, Bureau F, Lekeux P. 2007. Helenalin reduces *Staphylococcus aureus* infection in vitro and in vivo. *Vet Microbiol*. 119:330–338.
- [128] El-Dahmy S, Jakupovic J, Bohlmann F, Sarg TM. 1985. New humulene derivatives from *Asteriscus graveolens*. *Tetrahedron*. 41:309–316.
- [129] San Feliciano A, Barrero AF, Medarde M, del Corral JM, Ledesma E, Sanchez-Ferrando F. 1982. Asteriscunolide A: Humulanolide from *Asteriscus aquaticus*. *Tetrahedron Letters*. 23:3097-3100.
- [130] San Feliciano A, Barrero AF, Medarde M, del Corral JM, Aizpiri AA, Sánchez-Ferrando F. 1984. Asteriscunolides A, B, C and D, the first humulanolides; two pairs of conformationally stable stereoisomers. *Tetrahedron*. 40:873–878.
- [131] San Feliciano A, Medarde M, Miguel del Corral JM, Aramburu A, Gordaliza M, Barrero AF. 1989. Aquatolide. A new type of humulane-related sesquiterpene lactone. *Tetrahedron Lett*. 30:2851–2854.
- [132] Rauter AP, Branco I, Bermejo J, González AG, Garcia-Grávalos MD, Feliciano AS. 2001. Bioactive humulene derivatives from *Asteriscus vogelii*. *Phytochemistry*. 56 :167–171.
- [133] Jakupovic J, Lehmann L, Bohlmann F, Hodgson AA. 1987. Nerolidol derivatives from *Asteriscus sericeus*. *Phytochemistry*. 26:2854–2855.



- [134] Triana J, Eiroa JL, Morales M, J. Pérez FJ, Brouard I, Quintana J, Estévez MR, Estévez F, León F. 2016. Sesquiterpenoids Isolated from Two Species of the *Asteriscus* Alliance. *J Nat Prod.* 79:1292–1297.
- [135] Ahmed AA. 1992. Farnesol and thymol derivatives from *Asteriscus pygmaeus*. *J Nat Prod.* 55:824–827.
- [136] Akssira M, Mellouki F, Salhi A, Alilou H, Saouf A, El Hanbali F, Jesu's F. Arteaga and Alejandro F. Barrero. 2006. Naupliolide, a sesquiterpene lactone with a novel tetracyclic skeleton from *Nauplius graveolens subsp. Odorus*. *Tetrahedron Letters.* 47: 6719–6721.
- [137] Chaari A, Ben Jannet H, Mighri Z, Robinot C, Kunesch N. Isolation and structure determination of a new sesquiterpene lactone from *Nauplius aquaticus*. 2001. *Nat. Prod. Lett.* 15: 419-423.
- [138] Bohlmann F, Pauls A. 1992. Humulane derivatives from *Nauplius ntermedius*. *Phytochemistry.* 31 :1663-1665.
- [139] Hammoud L, León F, Brouard I, Gonzalez-Platas J, Benayache S, Mosset P, Benayache F. 2018. Humulene derivatives from Saharian *Asteriscus graveolens*. *Tetrahedron Lett.* 59(27):2668–2670.
- [140] Ahmed AA, Ishak MS, Micheal HN, El-Ansari MA, El-Sissi HI. 1991. Flavonoids of *Asteriscus graveolens*. *J Nat Prod.* 54:1092–1093.
- [141] Ezzat MI, Ezzat SM, El Deeb KS, El Fishawy AM, El-Toumy SA. 2016. A new acylated flavonol from the aerial parts of *Asteriscus maritimus* (L.) Less (Asteraceae). *Natural Product Research*, 2: 1 -9.
- [142] Alilou H., Bencharki B., Idrissi Hassani LM, Barka N. 2014. Screening phytochimique et identification spectroscopique des flavonoïdes d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus*. *Revue Afrique Science.* 10 (3) : 316-328.
- [143] Daroui-Mokaddema H, Kabouche A, Boutaghane N, Calliste C, Duroux J, Kabouche Z. 2017. Antioxidant Flavonoids from *Asteriscus maritimus*. *Natural Product Communications* Vol. 12 (0).
- [144] Medimagh S, Daami-Remadi M, Abreuc P, Harzallah-Skhirid F, Ben Janneta H, Hamza MA. 2014. Asterisulphoxide and asterisulphone: two new antibacterial and antifungal metabolites from the Tunisian *Asteriscus maritimus* (L.) Less. *Natural Product Research.* 28:1418–1426
- [145] Cristofari G, Znin M, Majidi L, Mazouz, Tomi P, Costa J, Paolini J. 2012. Chemical Diversity of Essential Oils from *Asteriscus graveolens* (Forssk.) Less.: Identification of cis-8-

Acetoxychrysanthenyl Acetate as a New Natural Component. Chemistry & biodiversity. 9:727-738.

[146] Bellakhdar J, Baayaoui A, Kazdari A, Marechal J. 1987. Herboristes et médecine traditionnelle à Tissint, oasis présaharien du Sud Marocain (province de Tata). Al Biruniya. 3 : 7-50.

[147] Cheriti A.2000. Plantes Médicinales de la Région de Bechar, Sud Ouest Algérie: Etude Ethnopharmacologique. Rapport CRSTRA: Algérie.

[148] Alilou H, Asdadi A, Idrissi Hassani LM , González-Mas MC, Blázquez MA, Akssira M.2014. Antifungal and Antioxidant Activity of *Asteriscus graveolens* subsp. odorus Essential Oil. Journal of Natural Sciences Research.4:1-10.

[149] Medimagh S, Daami-Remadi M, Jabnoun-Khiareddine H, Ben Jannet , Hamza MA.2012. Chemical composition, Antimicrobial and antiacetylcholinesterase activities of essential oils from the Tunisian *Asteriscus maritimus* (L.) Less. Mediterr.J.Chem. 2:459-470.

[150] Haddouchi F, Chaouche T, Halla N.2016. Screening phytochimique, activités antioxydantes et pouvoir hémolytique de quatre plantes sahariennes d'Algérie. Phytothérapie. 1-9

[151] Daur I .2015. Chemical composition of selected Saudi medicinal plants. Arabian J Chem.8:329–32.

[152] Djeridane A, Yousfi M, Brunel JM,Stocker P. 2010. Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the in vitro antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. Food Chem Toxicol. 48:2599–606.

*Chapitre II*  
*Travaux personnels*

## II.1. Etude phytochimique de l'espèce *Thymus ciliatus* (Desf) :

### II. 1. 1. Place dans la systématique :

<b>Règne</b>	Plantae
<b>Sous-règne</b>	Tracheobionta
<b>Embranchement</b>	Spermaphytes (phanérogames)
<b>Sous-embranchement</b>	Magnoliophytina (Angiospermes)
<b>Classe</b>	Magnoliopsida (Dicotyledones)
<b>Sous-classe</b>	Asteridae
<b>Ordre</b>	Lamiales
<b>Famille</b>	Lamiaceae
<b>Genre</b>	<i>Thymus</i>
<b>Espèce</b>	<i>Thymus ciliatus</i> (desf)

### II. 1. 2. Description botanique :

*Thymus ciliatus* (Desf) est un arbrisseau de petite taille, mais pouvant former des touffes bien étalées sur le sol ; les feuilles florales sont différentes des feuilles caulinaires, en général fortement dilatées à leur portion inférieure. Epis florifères larges de 16-20 mm. Fleurs plus grandes à corolle plus longuement exserte. Rencontrée dans les broussailles, matorrals, sur substrats calcaires et siliceux et sur sols rocailleux et bien drainés [1,2].



**Figure II.1 :** *Thymus ciliatus* (Desf).

### II.1.3. Récolte de la matière végétale :

La plante a été récoltée au mois de juin 2013, de la région de Msila. L'espèce a été séchée dans un endroit frais et aéré à l'abri des rayons solaires et de l'humidité. Les parties aériennes de la plante sont coupées en petits morceaux, broyées et pesées (m=2 kg).

### II.1.4 Extraction de la matière végétale :

Le matériel végétal est mis à macérer dans un mélange hydroalcoolique (Ethanol/Eau ; 80 : 20 ; v/v) pendant 48 heures à température ambiante. Le premier extrait récupéré est concentré sous pression réduite à une température modérée (environ 35 °C). La macération est répétée 4 fois avec renouvellement du solvant et dure dans chaque cas 48 heures.

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

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

Les quatre phases organiques ainsi obtenues sont concentrées à sec sous pression réduite, pesées et les rendements sont donnés dans le tableau II.1.

Tableau II.1 : Rendements des extraits.

<i>Matériel végétal</i>	<i>Extrait</i>	<i>Masse (g)</i>	<i>Rendement (%)</i>
2000g	Ethér de pétrole	0.7	0.055
	Chloroforme	1.5	0.075
	Acétate d'éthyle	12	0.6
	<i>n</i> -butanol	24	1.6

Le protocole d'extraction est résumé dans l'organigramme présenté dans le schéma II.1 montrant les différentes étapes du processus d'extraction.

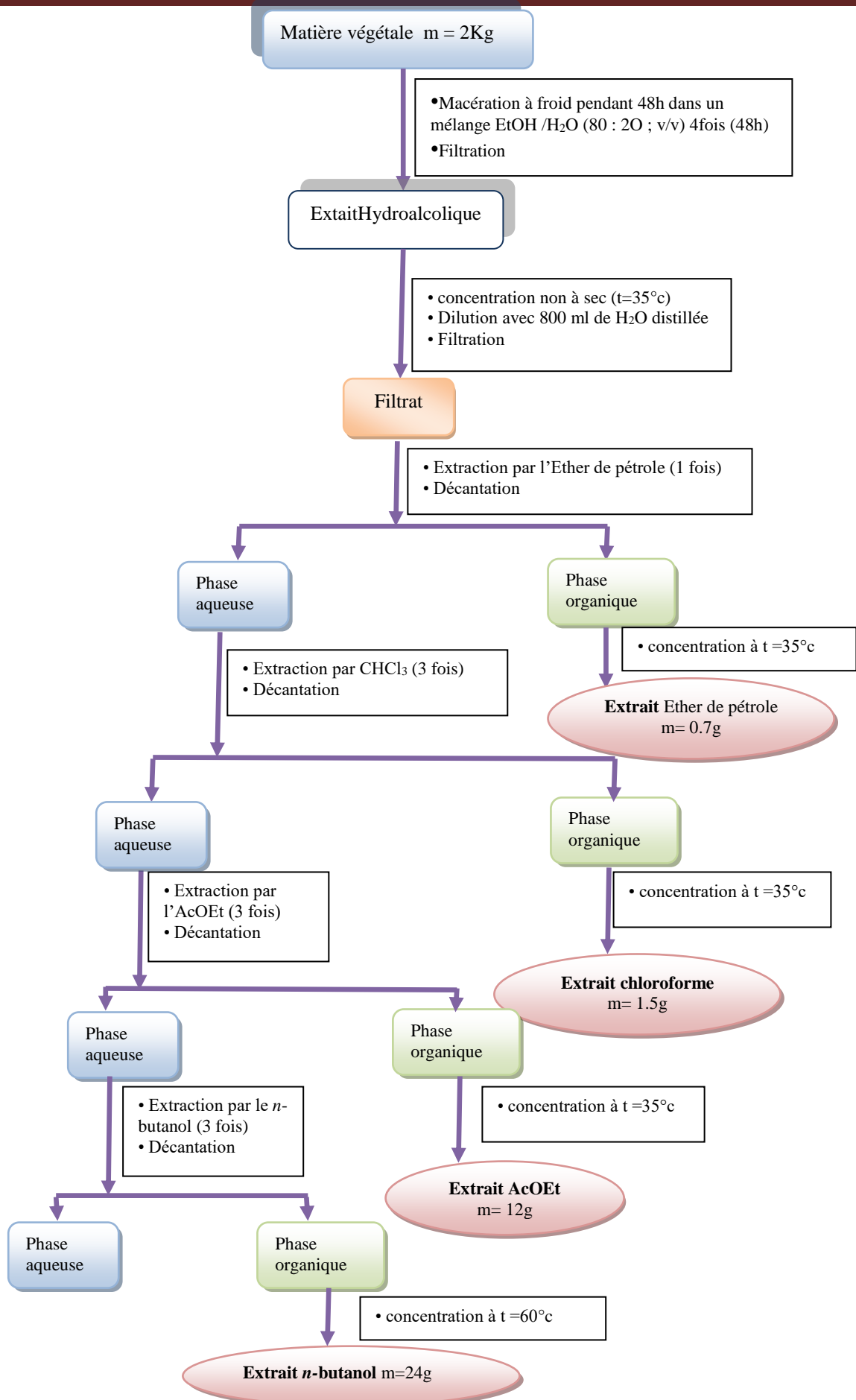


Schéma II.1: Protocole d'extraction de *Thymus ciliatus* (desf).

### II.1.5. Séparation chromatographique de l'extrait acétate d'éthyle:

Avant d'entamer la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait AcOEt, nous avons procédé à des tests chromatographiques sur couche mince de gel de silice déposée sur une feuille d'aluminium, la meilleure séparation a été obtenue avec le système de solvant  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{COCH}_3$  dans les proportions (9:1).



**Figure II.2 :** Plaque CCM de l'extrait AcOEt éluée dans le système  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{COCH}_3$  (9 :1).

### II.1.6. Séparation chromatographique sur colonne :

Une masse d'environ 10g d'extrait AcOEt dissout dans du méthanol est mélangée à une petite quantité de gel de silice (de la colonne), l'ensemble est séché sous vide, puis pulvérisé jusqu'à obtention d'une poudre homogène. Cette poudre est déposée sur la colonne de gel de silice, préparée dans le chloroforme. L'élution a été réalisée par du chloroforme avec un graduant d'acétone en commençant par le dichlorométhane pur et en terminant par l'acétone pur avec un fractionnement tous les 50 ml. Le suivi de ces fractions est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice 60 sur support aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière de (254 et 365 nm) puis révélées avec l'anysaldéhyde et chauffées à 100°C. La progression de cette colonne est donnée dans le tableau II.2.



**Tableau II.2:** Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait AcOEt.

<i>Pots</i>	<i>Fractions</i>	<b>Système d'éluion %</b>			<b>Le poids de la fraction (mg)</b>
		<b>CHCl<sub>3</sub></b>	<b>CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub></b>	<b>MeOH</b>	
1-25	F1	100	0	-	16
26-48	F2	100	0	-	20
49-60			2	-	
61-65	F3	98	2	-	25
66-68			97	3	
69-78	F4			-	27
79-97			95	5	
98-104	F5	92	8	-	13
105-117	F6			-	34
118-123	F7	92	8	-	45
124-128			90	10	
129-141	F8			-	97
142-148			88	12	
149-163	F9	88	12	-	80
164-169	F10	88	12	-	55
170-174	F11	86	14	-	48
175-186	F12	86	14	-	110
187-203	F13	86	14	-	220
204-206			84	16	
207-2014	F14	84	16	-	190
215-233	F15	84	16	-	380
234-249			82	18	
250-273	F16	80	20	-	835
274-293	F17	78	22	-	420
294-299			75	25	
300-311	F18			-	350

**Tableau II.2:** Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait AcOEt (suite).

312-327		70	30	-	
328-331	F19			-	
332-337		65	35	-	233
338-351	F20			-	210
352-371	F21	60	40	-	250
372-389	F22	55	45	-	591
390-409	F23	50	50	-	459
410-427	F24	45	55	-	780
428-446	F25	40	60	-	988
447-483	F26	30	70	-	630
484-504	F27	20	80	-	375
505-530	F28	10	90	-	275
531-560		0	100	-	
561-600	F29	0	0	100	405

### II.1.7. Séparation et purification des fractions :

Parmi les 29 fractions obtenues, on a procédé à la séparation des fractions, F15, F16, F19, F21 et F23.

- ❖ La fraction F16 (835mg) a subi une chromatographie sur colonne de gel de silice avec un système d'éluant chloroforme/acétone (9 :1) de polarité croissante. Des fractions de 25 ml ont été recueillies et réunies selon leur profil en CCM pour donner 19 sous fractions. La progression de cette colonne est donnée dans le tableau II.3.

**Tableau II.3:** Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de la fraction F16.

<i>Pots</i>	<i>Système d'éluant</i>		<i>Sous Fractions</i>	<i>Le poids de sous fraction (mg)</i>
	<i>CHCl<sub>3</sub> %</i>	<i>CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub> %</i>		
1-4	100	0	F'1	5
5-12	99	1		
13-19	98	2	F'2	7
20-27	97	3	F'3	9

**Tableau II.3:** Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de la fraction F16 (suite).

28-36	96	4	F'4	15.7
37-45	94	6		
46-55	92	8	F'5	5
56-67	91	9	F'6	5.9
68-80	90	10	F'7	9.9
81-88	89	11	F'8	43
89-100	88	12	F'9	48
101-108	86	14	F'10	65
109-120	84	16	F'11	77.9
121-126	82	18	F'12	121
127-135	80	20	F'13	128
136-145	78	22	F'14	87
146-153	75	25		
154-163	70	30	F'15	33
164-177	65	35		
178-182	60	40	F'16	19
183-192	50	50		
193-199	40	60	F'17	20.8
200-209	30	70		
210-221	20	80	F'18	42.5
222-228	10	90		
229-240	0	100	F'19	28.7

- La sous-fraction F-13'(128mg) soumise à une purification sur plaques préparatives dans le système d'élution  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{COCH}_3$  (9 :1), donnant ainsi deux composés purs **TCf16-1** (5,6 mg) et **TCf16-3** (8,5 mg).
- La sous-fraction F-12' de masse 121mg, contient un produit majoritaire qui a précipité dans le mélange ( $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ). Ce précipité a été lavé au chloroforme pour

donner le composé **TCf16-2** sous forme de poudre jaune (m=15mg). Par ailleurs, ce précipité jaunâtre est dissout dans le MeOH, testé sur une plaque analytique de gel de silice, élué avec le système  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{COCH}_3$  (9:1), donne un spot unique de fluorescence noir violette à 365 nm.

- ❖ La fraction F15 (380mg) a été soumise à une chromatographie par CLHP semi-préparative en utilisant les conditions chromatographiques suivantes :

Colonne : C18 synergis 4 $\mu$  fusion n-RP 80A ; new column 250 $\times$ 10.0mm ;phenomenex.

Eluant : MeOH/H<sub>2</sub>O (60 :40 %).

La concentration de la fraction : 10 mg/100  $\mu$ l (dans le MeOH).

Le volume injecté : 100 $\mu$ l.

Débit : 2 ml / min.

A l'issue de cette séparation quatre composés ont été obtenus : **TC/20/6**(1.8mg) ; **TC/20/7**(1.1mg) ; **TC/20/9**(2.1mg) et **TC/20/17**(0.9mg).

- ❖ La fraction F19 (233 mg) a été purifiée par CLHP semi-préparative pour donner le composé **TC/22/7**(1.6mg), en utilisant les conditions chromatographiques suivantes :

Colonne : C18 synergis 4 $\mu$  fusion n-RP 80A ; new column 250 $\times$ 10.0mm ;phenomenex.

Eluant : MeOH/H<sub>2</sub>O (40:60 %).

La concentration de la fraction : 10 mg/100  $\mu$ l (dans le MeOH).

Le volume injecté : 100 $\mu$ l.

Débit : 2 ml / min.

- ❖ La fraction F21 (250 mg) a été purifiée par CLHP semi-préparative en utilisant comme éluant MeOH/H<sub>2</sub>O (55 :45) et la même colonne pour obtenir les composés **TC/24/7** (2.4mg) et **TC/24/9**(1.3mg).

- ❖ La fraction F23 (459 mg) qui fait l'objet à son tour d'une purification sur la même colonne HPLC avec MeOH/H<sub>2</sub>O (50 :50). Cette purification a abouti à l'isolement du composé **TC/34/4** (3.1mg).

Le schéma ci-après résume les étapes de purification de l'extrait AcOEt des parties aériennes de la plante *T.ciliatus* (schéma II.2).

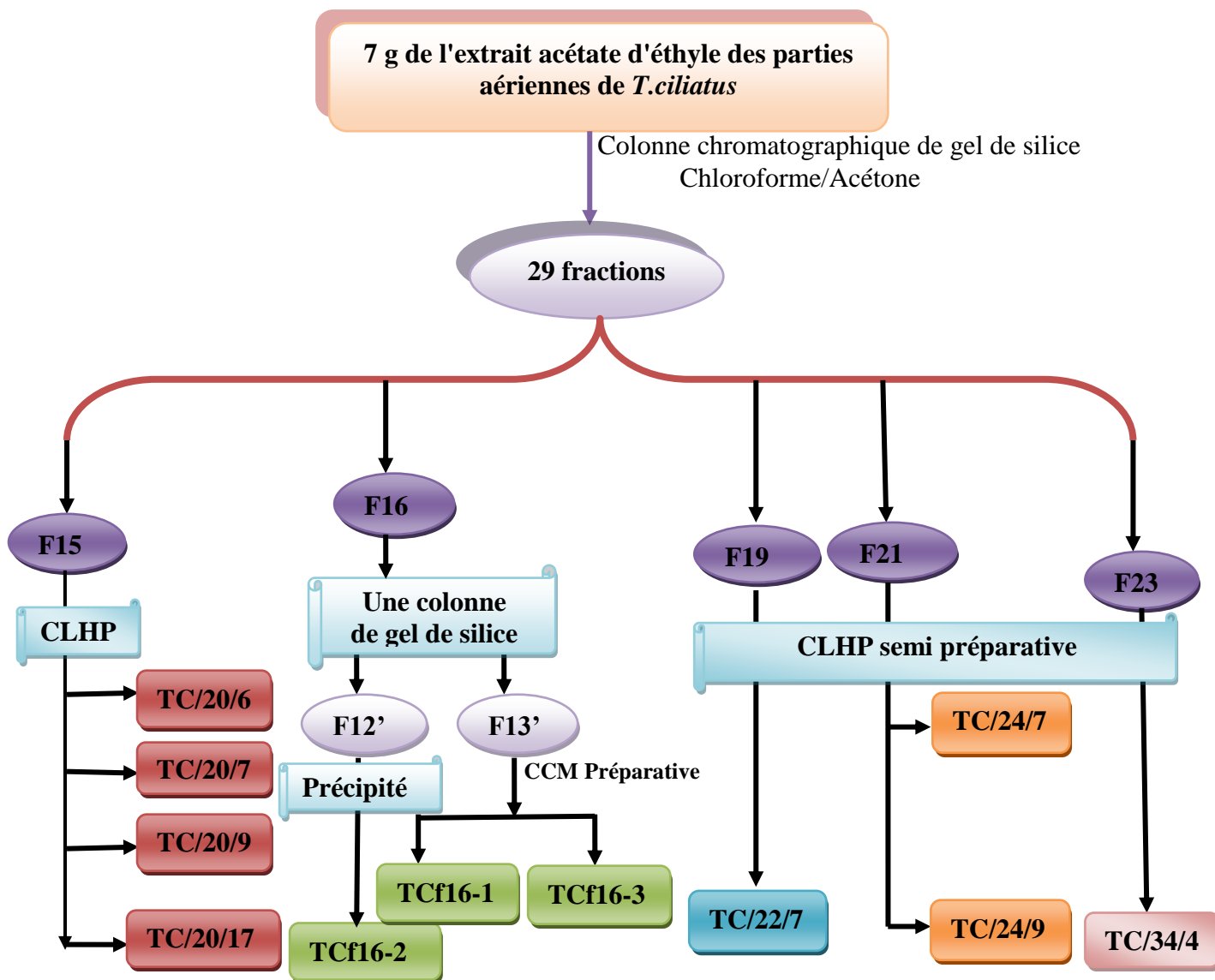


Schéma II. 2. Séparation et purification de l'extrait AcOEt de l'espèce *Thymus ciliatus* (desf).

## II.2. Etude phytochimique de l'espèce *Asteriscus graveolens* (Forsk.) Dc. :

### II.2. 1. Place dans la systématique :

<b>Règne</b>	<b>Plantae</b>
<b>Sous-règne</b>	Tracheobionta
<b>Embranchement</b>	Spermaphytes
<b>Sous-embranchement</b>	Angiospermes
<b>Classe</b>	Dicotyledones
<b>Sous-classe</b>	Asteridae
<b>Ordre</b>	Astérales
<b>Famille</b>	Asteraceae
<b>Genre</b>	<i>Asteriscus</i>
<b>Espèce</b>	<i>Asteriscus graveolens</i> (Forsk.) Dc.

### II.2.2. Description botanique :

*Asteriscus graveolens* (Forsk.) Dc. est un sous-arbrisseau de 20-50 cm, à écorce crevassée et blanche dans les parties âgées. Rameaux très étalés naissant peu au-dessous des capitules. Feuilles linéaires, incisées-dentées, velues-soyeuses, vert pâle; les supérieures enveloppant presque entières et entourant le capitule qu'elles dépassent longuement. Les capitules médiocres à ligules à peine plus longues que les fleurons. Involucre à bractées externes linéaires-aiguës, les intérieures oblongues. Fleurs jaunes; écailles du réceptacle allongées et dures, dépassant longuement les achaines, ceux-ci en cône renversé, arqués, velus, à quatre côtes très saillantes, tronqués au sommet et à aigrette remplacée par une couronne de quatre écailles membraneuses déchiquetées. Très commun dans tout le Sahara, surtout dans les dépressions argilo-sablonneuses [1,3].



**Figure II.3:** *Asteriscus graveolens* (Forsk.) Dc.

### II.2.3. Noms Vernaculaires :

Negued, Tamayout, tafss

### II.2.4. Synonymes:

*Bubonium graveolens* (Forsk.)

*Bupthalmum graveolens* Forsk.)

*Nauplius graveolens* (Forssk.) [1, 4,5].

### II.2.5. Protocole expérimental :

#### II.2.5.1. Récolte de la matière végétale :

La plante a été récoltée au mois d'Avril 2014, de la région de Biskra ; L'espèce a été séchée dans un endroit sec et aéré, à l'abri des rayons solaires les parties aériennes broyées (feuilles et fleurs) sont pesées (m=2 kg).

#### II.2.5.2. Extraction de la matière végétale :

Le matériel végétal de masse 2Kg, subit une macération dans un mélange hydroalcoolique (Ethanol/Eau ; 80 : 20 ; v/v) pendant 48 heures à température ambiante. Le premier extrait récupéré est concentré sous pression réduite à une température modérée (environ 35 °C). La macération est répétée 4 fois avec renouvellement du solvant et dure dans chaque cas de 48 heures.

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

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

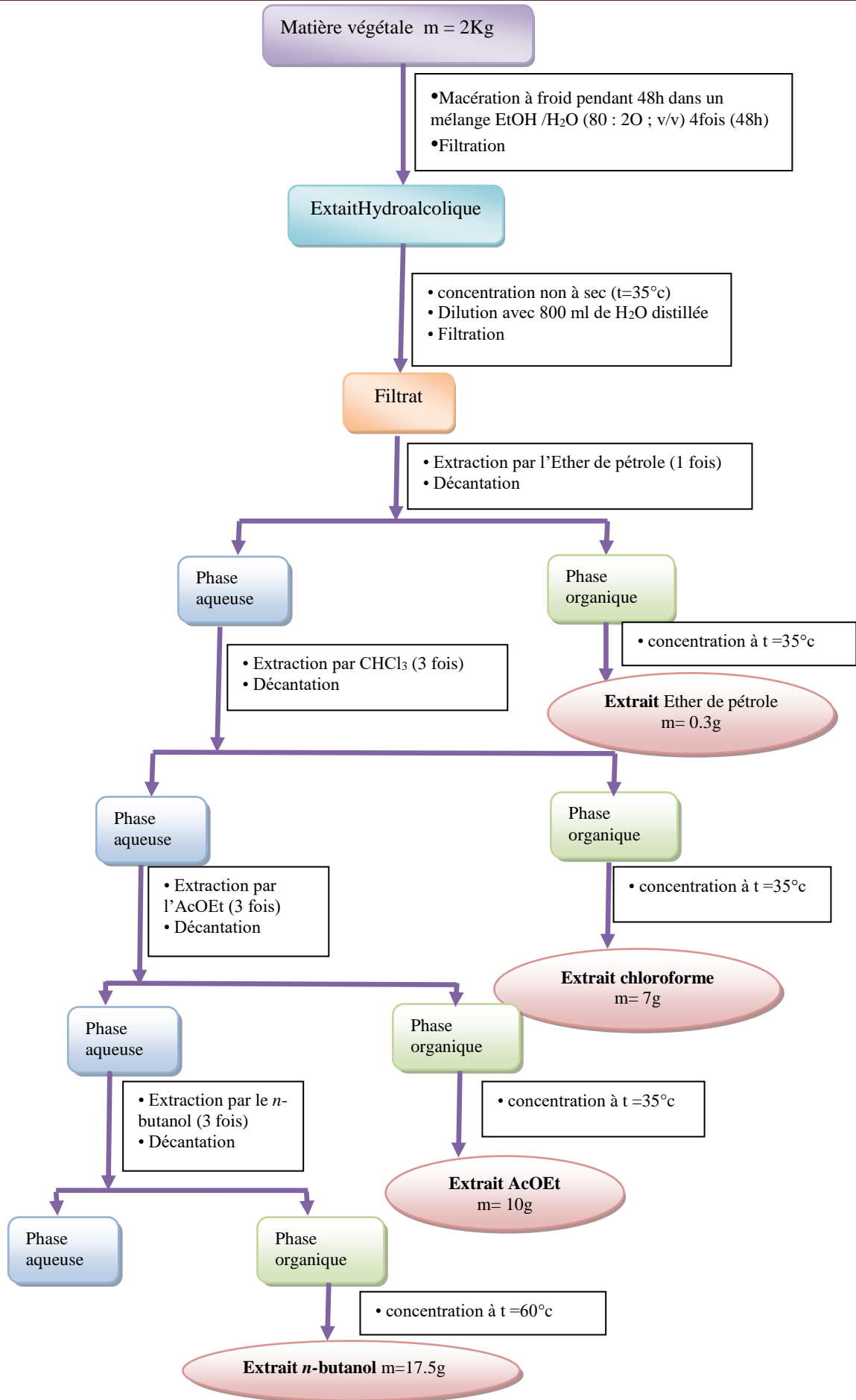
Les quatre phases organiques ainsi obtenues sont concentrées à sec sous pression réduite donnant les extraits correspondants dont les masses et les rendements évalués par rapport au poids du matériel végétal sec sont reportés dans le tableau II.4.

**Tableau II.4 : Rendements des extraits.**

<i>Matériel végétal</i>	<i>Extrait</i>	<i>Masse (g)</i>	<i>Rendement (%)</i>
2000g	Ether de pétrole	0.3	0.015
	Chloroforme	7	0.35
	Acétate d'éthyle	10	0.5
	<i>n</i> -butanol	17	0.85

Les différentes étapes de cette extraction sont récapitulées dans le schéma II.3.



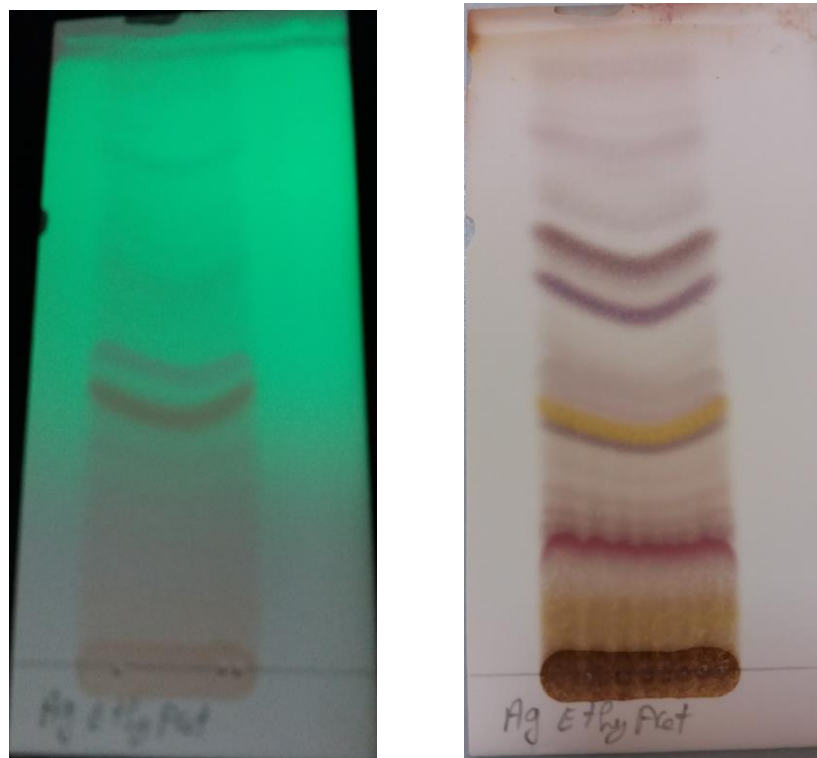


**Schéma II.3:** Protocole d'extraction d'*Asteriscus graveolens* (Forsk.) Dc.

## II.2.6. Etude des extraits :

### II.2.6.1. Séparation chromatographique de l'extrait acétate d'éthyle:

Avant d'entamer la séparation par chromatographie sur colonne de cet extrait, nous avons procédé à des tests chromatographiques sur couche mince de gel de silice, la meilleure séparation obtenue était avec l'éluant Chloroforme/Acétone (8 :2).



**Figure II.4 :** Plaque CCM de l'extrait AcOEt éluée dans le système  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{COCH}_3$  (8 :2).

Environ 8g de l'extrait acétate d'éthyle sont dissous dans du méthanol et mélangés à une petite quantité de gel de silice, l'ensemble est séché sous vide, puis pulvérisé jusqu'à obtention d'une poudre homogène. Cette dernière est déposée sur la colonne de gel de silice, préparée dans le chloroforme. L'éluion débute avec le même solvant dont la polarité sera augmentée par addition progressive d'acétone et terminée par du méthanol pur. Des pots de 50 ml sont recueillis et analysés par chromatographie sur couche mince (CCM). Le suivi de ces fractions est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support d'aluminium en utilisant divers systèmes d'éluion. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365nm) puis révélées par l'ansaldéhyde et chauffées à 100°C, pendant quelques minutes. Les fractions présentant le même profil chromatographique sont réunies donnant ainsi 24 fractions. La progression de cette colonne est donnée dans le tableau II.5.

**Tableau II.5:** Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait AcOEt.

Pots	Fractions	Système d'éluion %			Le poids de la fraction (mg)	
		CHCl <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub>	MeOH		
1-26	F1	100	0	-	9	
27-45	F2	99	1	-	13	
46-60	F3	98	2	-	25	
61-69	F4			-		47
70-89				-		
90-97	F5	96	4	-	66.7	
98-109				-		
110-125	F6	94	6	-	87.3	
126-139		92	8	-		
140-153	F7	90	10	-	74.5	
154-169				-		
170-179	F8	88	12	-	63.2	
180-194				-		
195-204	F9	86	14	-	117.4	
205-216				-		
217-235	F10	84	16	-	148.5	
236-249	F11	82	18	-	163.3	
250-252				-		
253-274	F12	-	-	-	203.4	
275-300	F13	80	20	-	384.6	
301-324		78	22	-		
325-349	F14	75	25	-	218	
350-374		73	27	-		
375-400	F15	70	25	-	466.5	
401-429	F16	65	35	-	387.6	
430-454	F17	60	40	-	301.4	
455-479		55	45	-		
480-514	F18	50	50	-	556.7	

**Tableau II.5:** Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait AcOEt (suite).

515-525		45	55	-	
526-549	F19	40	60	-	207.8
550-574	F20	35	65	-	395.2
575-599	F21	30	70	-	267
600-629	F22	25	75	-	570.5
630-650	F23	20	80	-	425.6
651-675	F24	10	90	-	520
676-698		0	100	-	
699-715	F25	0	0	100	302.3

### II.2.6.2. Séparation et purification des fractions :

Parmi les 25 fractions obtenues, seules les fractions F8, F9, F10, F1, F14, F15 et F17 ont été traitées.

- Le précipité blanc formé dans la fraction F8 (63.2 mg) a été lavé plusieurs fois avec le méthanol pour donner le produit pur **AgF8** (26,5 mg). Par ailleurs, ce précipité est dissous dans le chloroforme et testé sur plaque analytique de gel de silice, éluée par le système : chloroforme/acétone (9 : 1), donne un spot unique de fluorescence noir à 254 nm qui se révèle en mauve à l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C pendant 3min.
- Les fractions F9 (117.4 mg), F10 (148.5 mg) contenant des précipités blancs, ont été lavées plusieurs fois avec le méthanol pour donner des produits nommés **AgF9** (33mg) et **AgF10** (45mg) respectivement.

Un test de vérification de la pureté de ces deux produits a été entrepris sur plaques CCM dans le système chloroforme/acétone (9 : 1) a montré qu'il s'agit du même produit. Elle se colore en mauve foncé après révélation à l'acide sulfurique et chauffage pendant 3 mn.

- La fraction F14 (218 mg) a été purifiée par HPLC semi-préparative sur une colonne C18 (synergi 4 $\mu$  fusion n-RP 80A; new column 250 $\times$ 10.0mm; phenomenex) en utilisant comme éluant le MeOH/H<sub>2</sub>O (65 :35); avec un débit de 2 ml/mn. Cette purification a permis d'obtenir les deux composés **Ag/14/12** (3.1mg) et **Ag/14/16** (2.9mg).

- La fraction F15 (466.5 mg) a fait l'objet d'une purification par CLHP semi-préparative sur une colonne C18 (synergi 4 $\mu$  fusion n-RP 80A; new column 250 $\times$ 10.0mm; phenomenex) en utilisant comme éluant le MeOH/H<sub>2</sub>O (60 :40); avec un débit de 2 ml/mn. Cette purification a conduit à l'isolement du composé **Ag/16/23**(3mg).
- La fraction F16 (387.6 mg) a été purifiée par CLHP semi-préparative en utilisant comme éluant MeOH/H<sub>2</sub>O (45 :55) et la même colonne pour obtenir le composé **Ag/F16/17**(1.7mg).
- La fraction F17 (301.4 mg) a été soumise à une purification par CLHP semi-préparative en analyse C18 -bondapack colonne en utilisant comme éluant le MeOH/H<sub>2</sub>O (60 :40); avec un débit de 2 ml/mn, pour donner le composé **Ag/10/12** (6.3mg).

Le schéma ci-après résume les étapes de purification de l'extrait AcOEt des parties aériennes de la plante *Asteriscus graveolens* (Forsk.) Dc. (Schéma II.4).

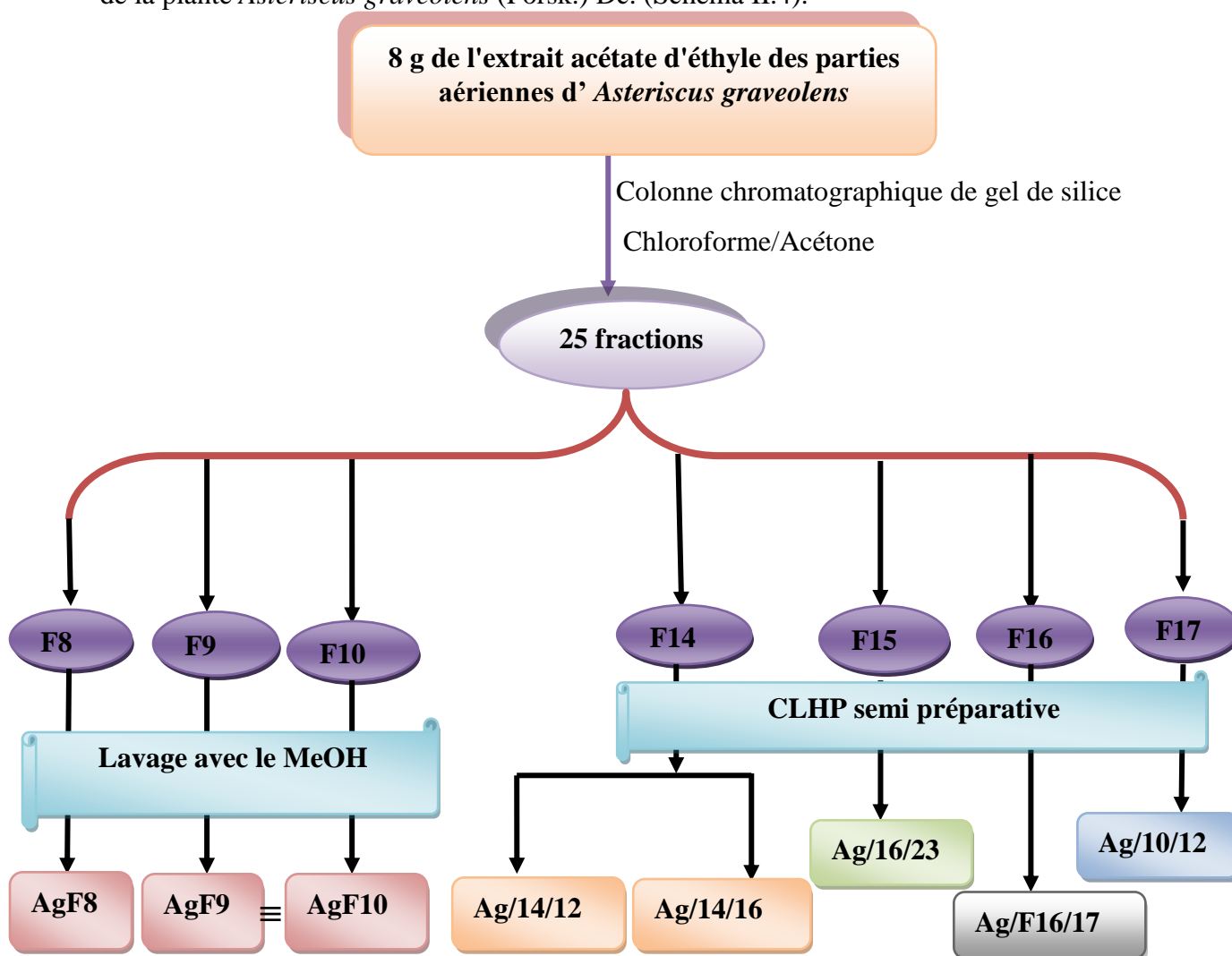


Schéma II. 4. Séparation et purification de l'extrait AcOEt de l'espèce *Asteriscus graveolens* (Forsk.) Dc.

### II.2.6.3. Séparation chromatographique de l'extrait *n*-butanol :

Une masse d'environ 10g d'extrait *n*-butanol dissout dans du méthanol est mélangée à une petite quantité de gel de silice, l'ensemble est séché sous vide, puis pulvérisé jusqu'à obtention d'une poudre homogène. Cette poudre est déposée sur la colonne de gel de silice, préparée dans le dichlorométhane. L'élution a été réalisée par du chloroforme avec un éluant de méthanol en commençant par le chloroforme pur et en terminant par le méthanol pur avec un fractionnement tous les 100 ml. Le suivi de ces fractions est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice 60 sur support aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière de 254 et 365 nm puis révélées avec l'anysaldéhyde et chauffées à 100°C. La progression de cette colonne est donnée dans le tableau II.6.

**Tableau II.6:** Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait *n*-butanol.

<i>Pots</i>	<i>Fractions</i>	<b>Système d'élution %</b>		<b>Le poids de la fraction (mg)</b>
		<b>CHCl<sub>3</sub></b>	<b>MeOH</b>	
1-13	F1	100	0	23
14-23	F2			27
24-34	F3	98	2	33
35-45	F4			38
46-51	F5	96	4	93.3
52-63	F6			71.2
64-84	F7	94	6	78.3
85-105	F8	92	8	156.4
106-127	F9	90	10	345
128-137	F10			356.5
138-156	F11	85	15	505
157-182	F12	80	20	380.8
183-192	F13	75	25	1027
193-202	F14			459.6
203-221	F15	70	30	530
222-241	F16	65	35	222.4

**Tableau II.6:** Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait *n*-butanol (suite).

242-260	F17	60	40	336
261-280	F18	50	50	718.5
281-296	F19	40	60	544.2
297-320	F20	30	70	442.6
321-334	F21	20	80	603.9
335-350	F22	10	90	425.6
351-380	F23	0	100	788

#### II.2.6.4. Séparation et purification des fractions :

Les fractions F9, F11, F12, F14 et F16 ont été purifiées par HPLC semi-préparative sur une colonne C8 (250 10.0 mm i.d. 10 lm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) en utilisant comme éluant le MeOH / H<sub>2</sub>O. Les résultats de cette séparation sont regroupés dans le tableau II.6.

**Tableau II.6:** Résultats de la séparation par HPLC semi-préparative des fractions de l'extrait *n*-butanol.

Fractions	Système d'élution (MeOH /H <sub>2</sub> O)%	Produits isolés
F9 (345 mg)	(35/65)	<b>Ag/48/6</b> (6.2 mg)
		<b>Ag/48/10</b> (2.1 mg)
		<b>Ag/48/13</b> (1.0 mg)
		<b>Ag/48/15</b> (0.5 mg)
F11 (505 mg)	(35/65)	<b>Ag/50/12</b> (1.2 mg)
F12 (308.8 mg)	(40/60)	<b>Ag/52/12</b> (3.6 mg)
F14 (459.6 mg)	(40/60)	<b>Ag/56/9</b> (1.2 mg)
F16 (222.4 mg)	(20/80)	<b>Ag/58/6</b> (2.4 mg)
		<b>Ag/56/9</b> (1.3 mg)

Le schéma ci-dessous (schéma II.5) récapitule les étapes de séparation et de purification de l'extrait *n*-butanol des parties aériennes de la plante *Asteriscus graveolens* (Forsk.) Dc.

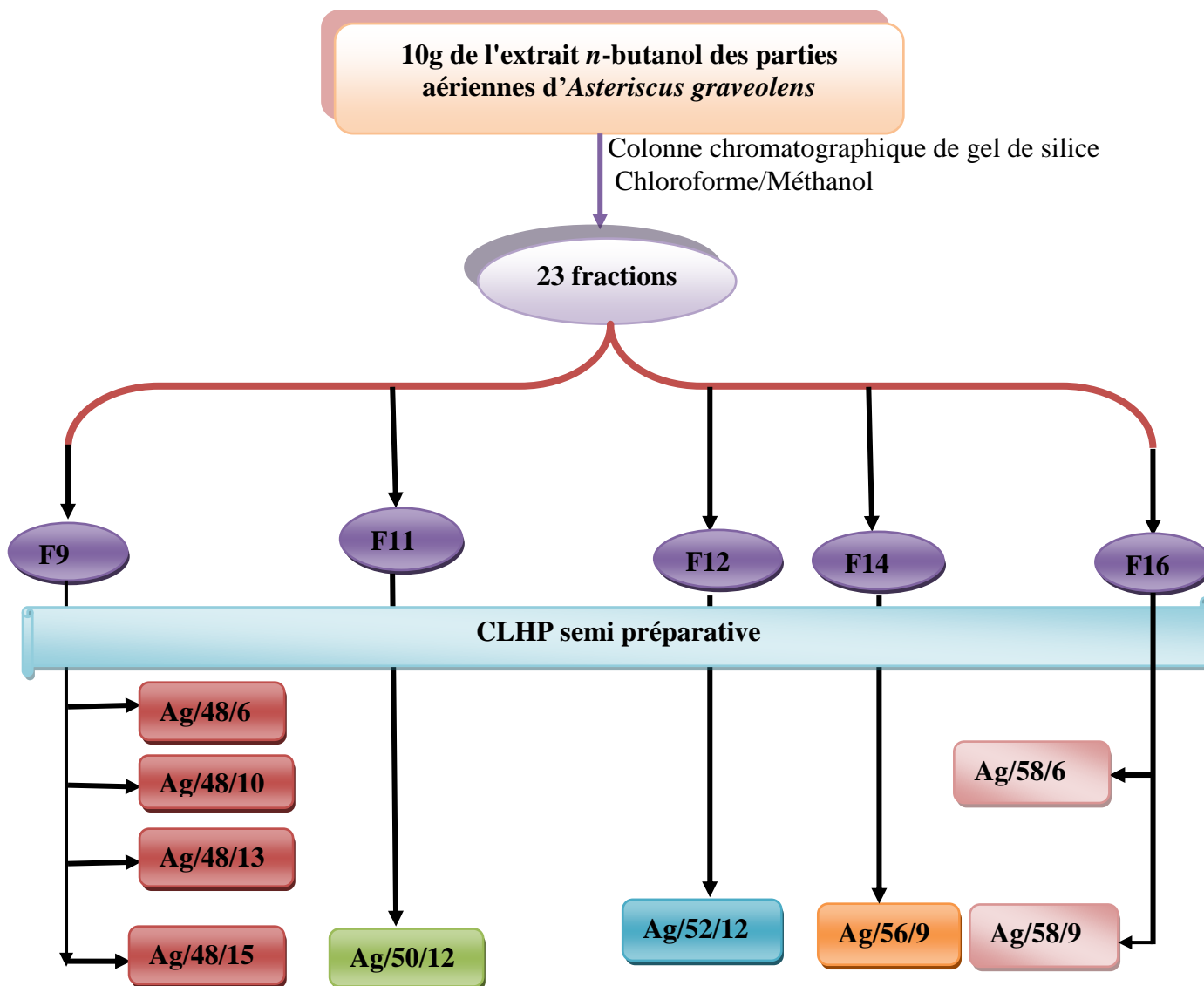


Schéma II. 5. Séparation et purification de l'extrait *n*-butanol de l'espèce *Asteriscus graveolens* (Forsk.) Dc.



### II.3. Etude biologique :

#### II.3.1. Dosage des polyphénols totaux :

La teneur en composés phénoliques des extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol de *Thymus ciliatus* a été déterminé en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu selon la méthode de Singleton *et al* [6].

20 µl de l'extrait (1mg/ml) a été mélangé avec 100 µl de réactif de Folin-Ciocalteu et 1580 µl d'eau distillée. Après 3 min, 300 µl de carbonate de sodium (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) sont additionnés. Le mélange a été agité, l'absorbance a été mesurée à 765 nm après 2h d'incubation à température ambiante. L'acide gallique (50-500 µg/ml) est le standard utilisé pour établir la courbe d'étalonnage à partir de laquelle la concentration des polyphénols totaux des extraits est calculée. Tous les tests ont été effectués en triplicats et la concentration en contenu phénolique a été calculée et exprimée en µg d'équivalent d'acide gallique par mg d'extrait (GAE µg / mg d'extrait) à l'aide de l'équation suivante obtenue à partir d'une courbe standard d'acide gallique (R<sup>2</sup> = 0,991).

**Absorbance = 0,001 × acide gallique (µg).**

#### II.3.2. Dosage des flavonoïdes totaux :

La détermination des flavonoïdes totaux des extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol de *Thymus ciliatus* a été estimée par la méthode colorimétrique au chlorure d'aluminium décrite par Wang *et al.*[7].

Pour un volume de 0,5 ml d'échantillon on ajoute 0,5 ml de la solution méthanolique d'AlCl<sub>3</sub> (2%). Après 1 heure d'incubation à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 420 nm. Le contenu flavonoïdes totaux a été calculé en µg d'équivalent de quercétine (QE) par mg d'extrait en utilisant l'équation suivante obtenue à partir d'une courbe d'étalonnage de la quercétine comme standard (R<sup>2</sup> = 0,983).

**Absorbance = 0,34 × Quercétine (µg) + 0,015.**

#### II.3.3. Activité antioxydante :

##### II.3.3.1. Activité anti radicalaire DPPH :

###### ❖ L'espèce *Thymus ciliatus*

L'activité anti-radicalaire des extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol de *Thymus ciliatus* a été évaluée par la technique du piégeage du radical libre DPPH (1,1- diphenyl-2-picrylhydrazyle), décrite par Braca *et al* [8].

3 ml d'une solution méthanolique de DPPH (0,004%) a été ajouté à différentes concentration des extraits (1 ; 5 ; 10; 15; 20 ; 30 ; 50 ; 100 ; 200 ; 250 µg/ml). Après incubation à

température ambiante et à l'obscurité pendant 30 min, l'absorbance a été mesurée à 517 nm. La référence standard utilisée pour la comparaison est l'acide ascorbique. Le pourcentage inhibiteur du radical DPPH (I%) a été calculé selon la formule :  $I\% = [(A_c - A_s) / A_c] \times 100$   
**A<sub>c</sub>** est l'absorbance du contrôle (DPPH seul).

**A<sub>s</sub>** l'absorbance de l'échantillon testée ou de l'acide ascorbique qui a été utilisé comme standard.

#### ❖ L'espèce *Asteriscus graveolens*

L'activité anti-radicalaire des extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol d'*Asteriscus graveolens* a été évaluée par le test de DPPH (1,1- diphenyl-2-picrilhydrazyl), on se basant sur la méthode décrite par Blois [9].

40 µl de différentes concentrations (12,5 ; 25 ; 50 ; 100 ; 200 µg/ml) des extraits de la plante ont été ajoutés à 160 µl de la solution de DPPH. Le α-tocophérol, BHT et le BHA sont utilisés comme standards antioxydants pour la comparaison de l'activité avec les extraits utilisés. Après incubation à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 min, l'absorbance a été mesurée à 517 nm en insérant la microplaque dans le spectrophotomètre. La faible valeur d'absorbance de la réaction du mélange indique une activité de piégeage des radicaux libres supérieure. La capacité à piéger le radical DPPH a été calculée selon l'équation suivante :

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

**A<sub>Blanc</sub>** est l'absorbance de la réaction témoin contenant tous les réactifs sans l'extrait.

**A<sub>Extrait</sub>** est l'absorbance de la réaction contenant les réactifs et l'extrait.

#### II.3.3.2. Test de blanchissement du β-carotène :

L'activité de blanchissement du β-carotène des extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol d'*Asteriscus graveolens* a été évaluée en utilisant la méthode décrite par Marco [10].

L'acide linoléique en émulsion aqueuse est oxydé. Les radicaux libres formés sont piégés par la β-carotène. La mesure de l'activité antioxydante suit la diminution de la densité optique en fonction du temps. En effet la décoloration du β-carotène résulte du piégeage des radicaux formés au cours de l'autoxydation de l'acide linoléique, ce qui a pour effet de diminuer la conjugaison.

Une masse de 0.5 mg de β-carotène dissoute dans 1 ml de chloroforme puis ajouté à un volume de 25 µl d'acide linoléique et de 200 mg de Tween 40, en donnant un mélange émulsifiant. Après l'évaporation du chloroforme, 50 ml d'eau distillée saturée en oxygène, ont été ajoutés (barboter à l'oxygène pendant 30 min avec un débit de 100 ml/min) tout cela pour

donner la solution A. L'absorbance du  $\beta$ -carotène doit être entre 0.8-0.9 nm et mesurée à 470 nm.

Les activités antioxydantes (pourcentage d'inhibition) des échantillons ont été calculées selon l'équation suivante:

**Inhibition % = (Absorbance du  $\beta$ -carotène à 24 h / Absorbance initiale du  $\beta$ -carotène)  $\times$  100.**

### **II.3.4. Etude de l'activité cytotoxique :**

#### **II.3.4.1. Cellules et traitement :**

Les lignées cellulaires utilisées pour évaluer l'activité cytotoxique sont HCT116 (cancer du côlon humain) et DLD1 (adénocarcinome colorectal humain). Ces deux lignées ont été obtenues à partir de l'American Type Cell Culture (ATCC) (Rockville, MD, USA).

Les cellules ont été maintenues dans du DMEM additionné de 10% de FBS, 100 mg/l de streptomycine et de pénicilline 100 UI/ml à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO<sub>2</sub>. Pour assurer une croissance logarithmique, les cellules ont été repiquées tous les deux jours.

Les fibroblastes dermiques humains primaires (HDFa), isolés à partir de peau d'adulte, ont été obtenus auprès de Gibco, Life Technology Corporation. Des cellules HDFa ont été cultivées en milieu M106 additionné de 100 U/ml de pénicilline, 100  $\mu$ g/ml de streptomycine, de sérum de veau fœtal (2% ; v/v), d'hydrocortisone (1  $\mu$ g/ml), de facteur de croissance épidermique humain (10 ng/ml) et de facteur de croissance basique des fibroblastes / héparine (10  $\mu$ g/ml), en cultures monocouches à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO<sub>2</sub> dans l'air. Des HDFa (4 x 10<sup>3</sup> cellules par puits) ont été cultivées en triple dans des plaques à 96 puits dans un volume final de 100  $\mu$ l de milieu complet M106. Les solutions mères d'extraits et de composés purifiés (5 mg/ml) ont été préparé dans le DMSO et ont été stockés dans l'obscurité à 4°C. Des dilutions appropriées ont été préparées dans un milieu de culture immédiatement avant utilisation. Dans toutes les expériences, la concentration finale de DMSO ne dépassait pas 0,15% (v/v).

#### **II.3.4.2. Test de viabilité :**

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques à 96 puits et incubées pendant les temps établis en l'absence (véhicule uniquement) et en présence de différentes concentrations d'extraits (1,00-0,050 mg/ml) ou de composés (1,0-0,1 mM). Le jour avant les traitements, les cellules ont étéensemencées à une densité cellulaire de 1 x 10<sup>4</sup> cellules / puits. Le nombre de cellules viables a été quantifié par dosage de MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-

diphenyltetrazolium Bromide) [11]. L'absorption à 550 nm pour chaque puits a été évaluée en utilisant un lecteur de microplaques (Lab Systems, Vienna, VA, USA). Dans certaines expériences, la viabilité cellulaire a également été vérifiée par un essai d'exclusion au bleu de Trypan en utilisant une chambre de comptage de Bürker. Les valeurs de concentration inhibitrice demi-maximale (CI<sub>50</sub>) ont été calculées à partir des courbes dose-réponse de viabilité cellulaire et définies comme étant la concentration entraînant une inhibition de 50% de la survie cellulaire par rapport aux témoins. Les valeurs CI<sub>50</sub> ont été réalisées avec le logiciel GraphPad.

**Conclusion :**

L'étude phytochimiques en utilisant différentes méthodes chromatographiques de deux espèces : *Asteriscus graveolens* (Forsk.) dc.et *Thymus ciliatus* (Desf) nous a permis d'isoler 27 produits purs. Les résultats et la discussion de ces analyses seront développés au chapitre III.

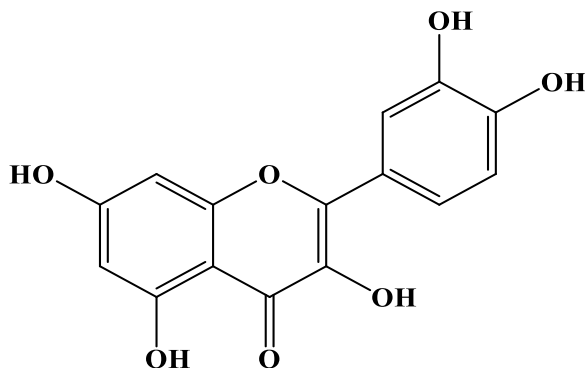
**Références**

- [1] Quezel, P, et Santa, S.1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II.C.N.R.S.Paris.
- [2] Benabid A. 2000.Flore et ecosystems du Maroc. Evaluation et préservation de la biodiversité. Paris : Edition Ibis Press 159-161.
- [3] Ozenda P. 2004. Flore et Végétation du Sahara. 3ème édition. Edition CNRS. Paris.
- [4] Greuter W.1997.Save *Asteriscus*, sink *Nauplius* (Compositae).Flora. Mediterranea.7: 41-48.
- [5] Wiklund A. 1985. The genus *Asteriscus* (*Asteraceae-Inuleae*).Nordic 1. Bot. 5: 299-314.
- [6] Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM.1999.Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Methods in enzymology .299:152-178.
- [7] Wang H, Gao XD, Zhou GC, Cai L, Yao WB.2008. In vitro and in vivo antioxidant activity of aqueous extract from *Choerospondias axillaris* fruit. Food Chemistry. 106:888-895.
- [8] Braca A,De Tommasi N, Di Bari L, Pizza C, Politi M, Morelli I.2001. Antioxidant principles from *bauhinia tarapotensis*. Journal of natural products.64: 892-895.
- [9] Blois MS.1958. Antioxidant determinations by the use of a stable Free Radical. Nature. 4617 (181): 1119-1200.
- [10] Marco GJ. 1968. A rapid method for evaluation of antioxidants. J. Am. Oil Chem. Soc. 45:594–598.
- [11] Esposito T, Sansone F, Franceschelli S, Del Gaudio P, Picerno P, Aquino RP, Mencherini T. 2017.Hazelnut (*Corylus avellana* L.) shells extract: phenolic composition, antioxidant effect and cytotoxic activity on human cancer cell lines. Int J Mol Sci. 18(2):392–404.

*Chapitre III*  
*Résultats et discussions*

### III.1. Identification structurale des composés isolés de l'espèce *thymus ciliatus* :

#### III.1.1. Détermination structurale du composé TCf16-1 :



Ce produit se présente sous forme d'une poudre jaune et de fluorescence jaune sous la lampe UV à 365 nm.

L'étude de la série spectrale UV (spectre III.1) donne les indications suivantes:

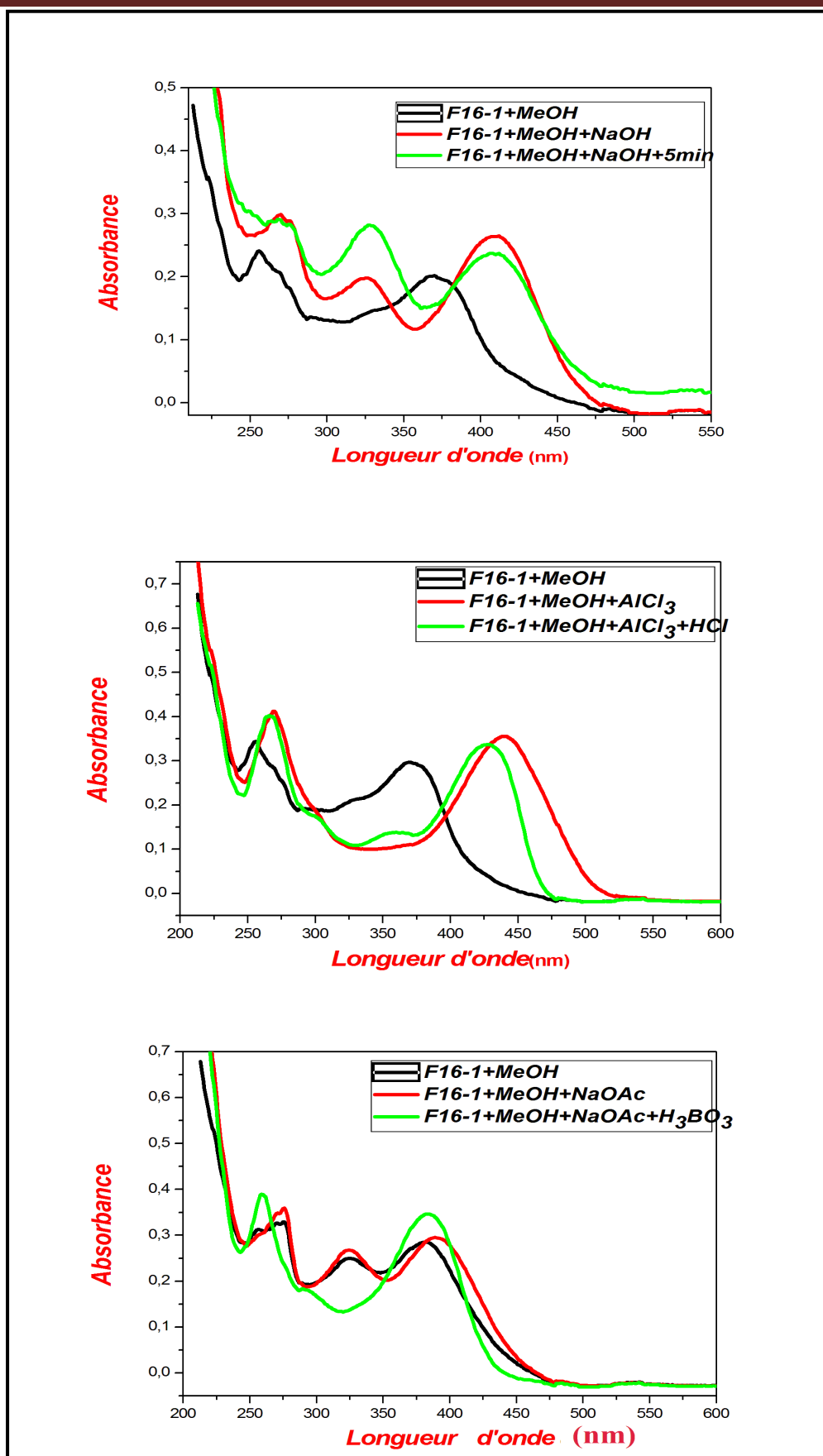
- ✚ La valeur maximale de la longueur d'onde de la bande I ( $\lambda=370$  nm) en présence du méthanol oriente vers la structure d'un flavonol.
- ✚ L'addition du réactif NaOH provoquant un déplacement bathochrome  $\Delta\lambda=+39$  nm, de la bande I suggère la présence d'un groupe OH libre en position 4'.
- ✚ L'addition de NaOAc provoquant un déplacement bathochrome de la bande II ( $\Delta\lambda = +20$  nm) par rapport au spectre MeOH, indique la présence d'un OH libre en 7, confirmé par l'apparition d'une nouvelle bande à 325 nm dans le spectre MeOH+NaOH comparativement à celui enregistré dans le MeOH.
- ✚ L'effet bathochrome de la bande I (+14 nm) après addition de  $H_3BO_3$  en présence de NaOAc par rapport au spectre dans MeOH indique la présence d'un système ortho di-OH sur le cycle B.
- ✚ L'effet bathochrome de la bande I en comparant les spectres  $AlCl_3 + HCl / MeOH$  ( $\Delta\lambda = +56$  nm), indique la présence d'un groupement hydroxyle libre en position 5.

Les résultats relatifs à cette série spectrale UV sont rassemblés dans le tableau III-1.

**Tableau III.1:** Données de la série spectrale UV du composé **F16-1**.

<i>Réactifs</i>	<i>Bande I</i>	<i>Autres bandes</i>	<i>Bande II</i>	<i>Commentaire</i>
MeOH	370	/	256	Flavonol
+NaOH	409	325	269	OH en 7
+NaOH+5min	Spectre stable			
+AlCl <sub>3</sub>	440	/	269	OH libre en 5 ortho di-OH sur le cycle B
+AlCl <sub>3</sub> +HCl	426	/	266	
+NaOAc	390	325	276	OH en 7
+NaOAc+H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	384	/	259	Ortho di-OH sur B





Spectre III.1: Série spectrale UV-Vis du composé f16-1.

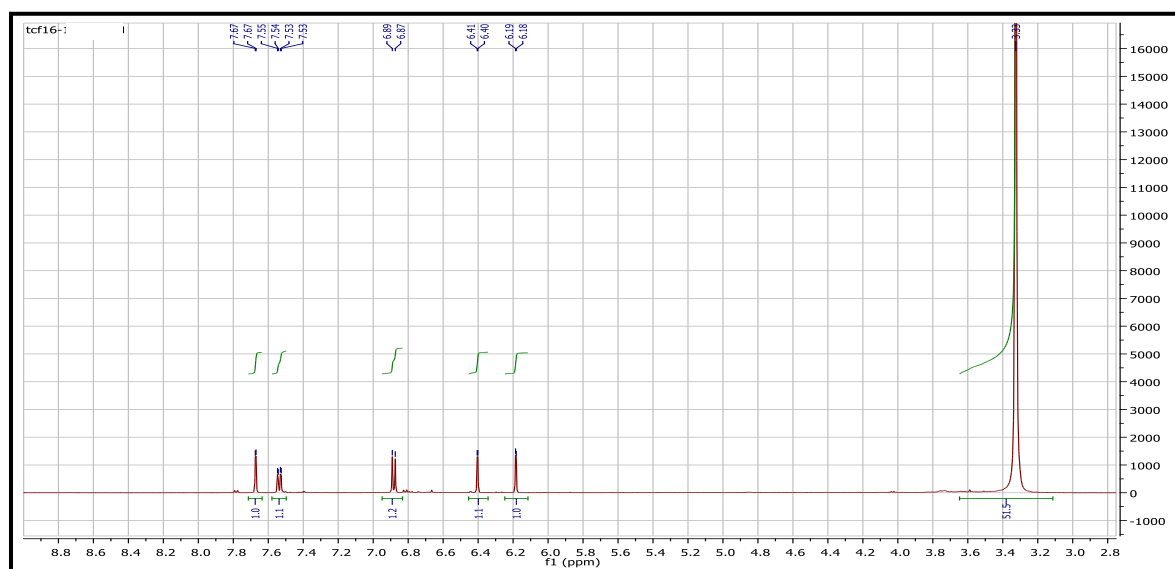
L'étude du spectre RMN  $^1\text{H}$  (Spectre III.2) donne les indications suivantes :

- ❖ Un doublet d'intégration 1H ( $J = 2.1$  Hz), indicateur d'un couplage méta à  $\delta = 7.67$  ppm attribuable à H-2'.
- ❖ Un doublet dédoublet d'intégration 1H ( $J = 8.6$  Hz,  $J = 2.1$  Hz), indicateur d'un couplage méta et d'un couplage ortho à  $\delta = 7.55$  ppm attribuable à H-6'.
- ❖ Un doublet d'intégration 1H à  $\delta = 6.89$  ppm ( $J = 8.6$  Hz), indicateur d'un couplage ortho attribuable à H-5'.
- ❖ Deux doublet d'intégration 1H chacun, le premier à  $\delta = 6.19$  ppm et le second à  $\delta = 6.41$  ppm avec une constante de couplage  $J = 2.0$  Hz (couplage méta) attribuables à H-6 et H-8 respectivement.

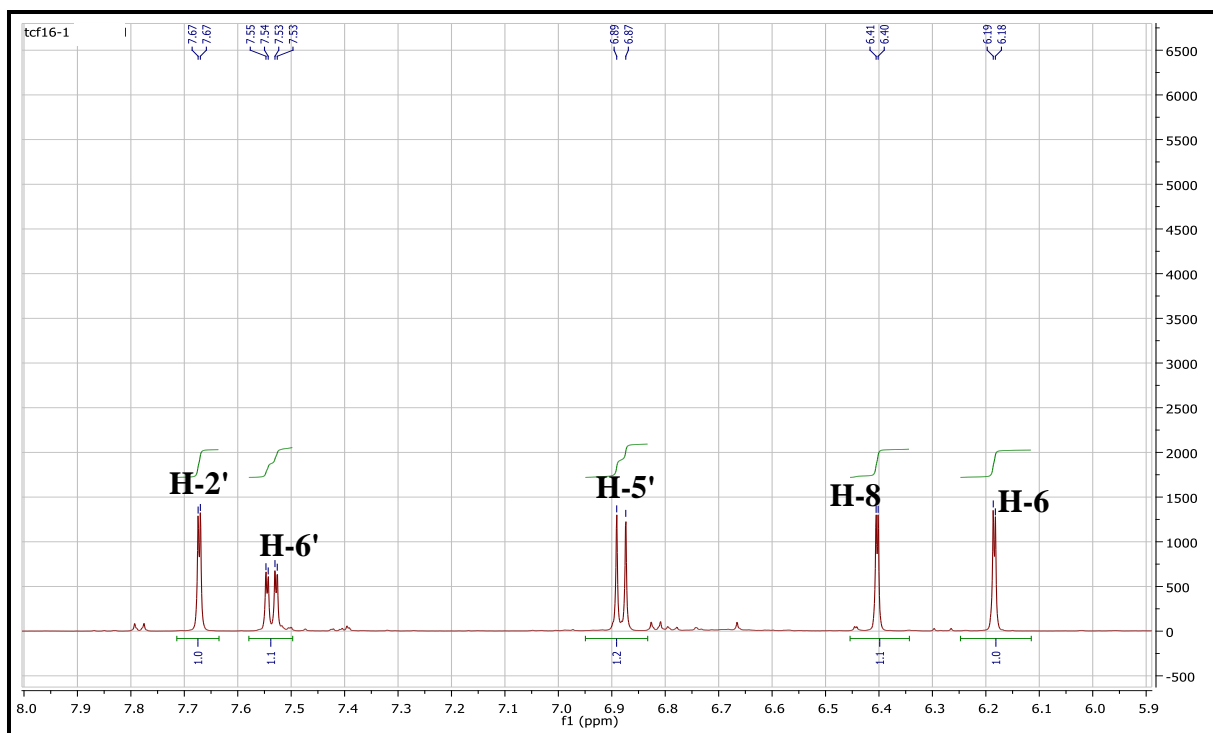
L'ensemble de ces données est reporté dans le tableau III.2.

**Tableau III.2:** Données de la spectrométrie RMN  $^1\text{H}$  du composé **TC F16-1**.

$\delta$ (PPM)	Intégration	Multiplicité $J$ (Hz)	Attribution
7.67	1-H	d (2.1)	H-2'
7.55	1-H	dd (8.6 et 2.1)	H-6'
6.89	1-H	d (8.6)	H-5'
6.19	1-H	d (2.0)	H-6
6.41	1-H	d (2.0)	H-8



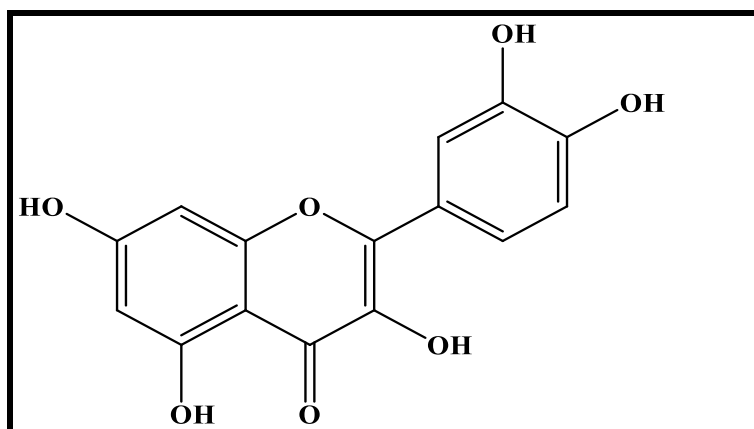
**Spectre III.2:** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm) du composé **TCF16-1**.



**Spectre III.3:** Spectre RMN<sup>1</sup>H (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) du composé TCF16-1.

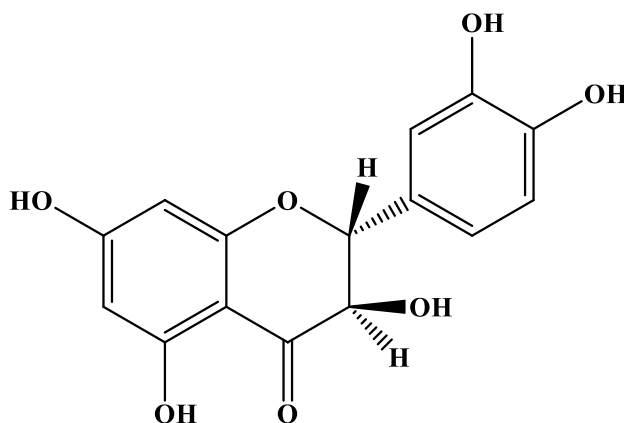
Les données spectroscopiques (RMN <sup>1</sup>H et UV) mène à la structure reportée dans la figure III.1, c'est la **3, 5, 7,3',4'-pentahydroxyflavonol** connue sous le nom de **Quercétine**. Cette molécule a été isolée antérieurement de plusieurs espèces du genre *Thymus*.

La quercétine est réputée pour être le plus actif des flavonoïdes. Elle possède des activités biologiques intéressantes comme anti-oxydantes [1], anti-inflammatoires [2] et anti-histaminiques [3]. Elle a aussi des effets positifs sur les capillaires et le système cardiovasculaire [4].



**Figure III.1:** Structure du composé TCF16-1 Quercétine.

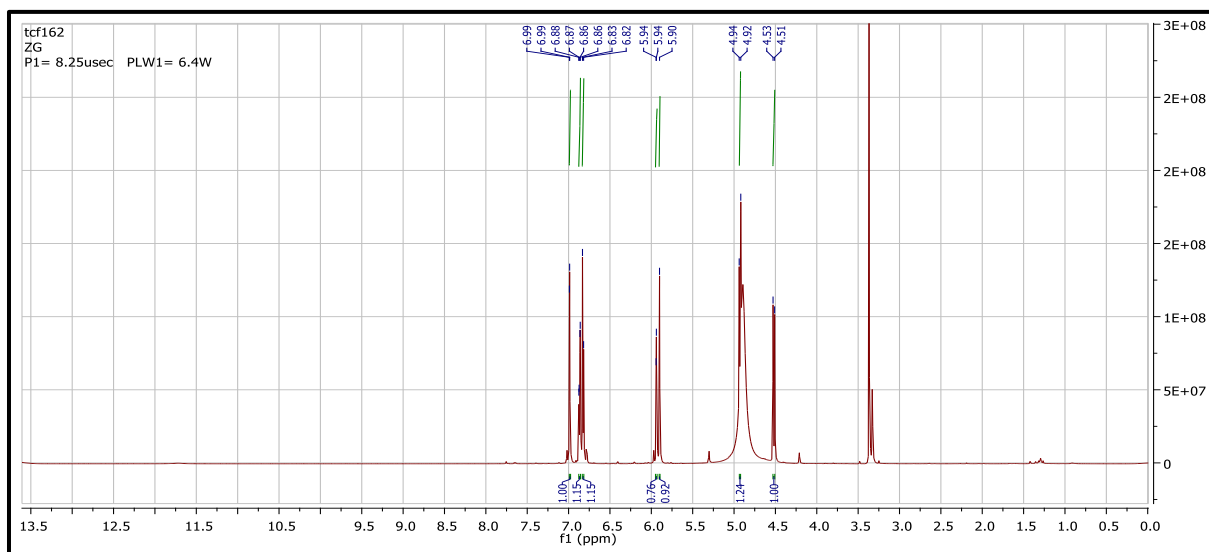
## III.1.2. Détermination structurale du composé TCF16-2 :



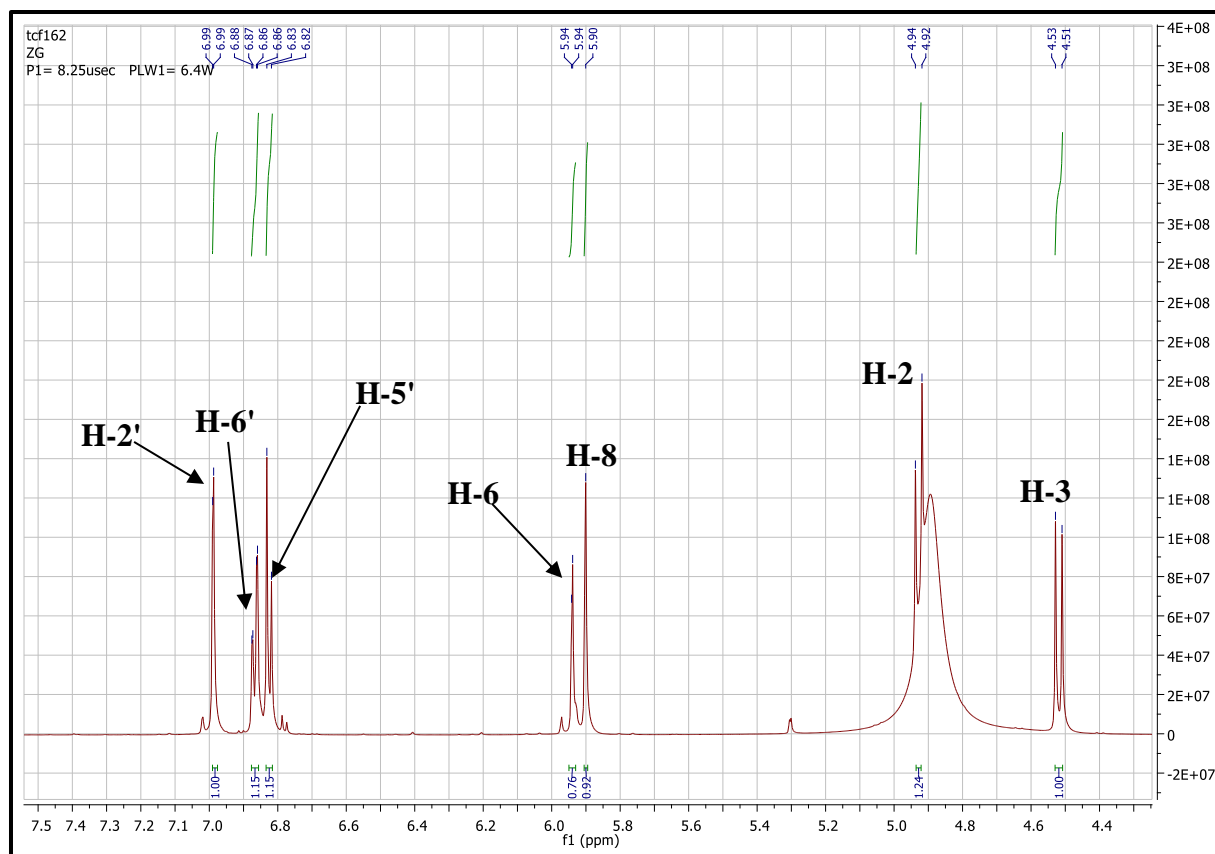
L'examen du spectre RMN  $^1\text{H}$  (Spectre III.4) ainsi que le spectre étalé (spectre III.5) de ce composé, montre qu'il s'agit d'un Flavonoïde de type dihydroflavonol caractérisé par :

- ❖ Un doublet d'intégration 1H ( $J = 1.6$  Hz), à  $\delta = 6.99$  ppm attribuable à H-2'.
- ❖ Un doublet dédoublé d'intégration 1H, à  $\delta = 6.86$  ppm ( $J = 8.1$  Hz ;  $J = 1.6$  Hz) attribuable à H-6'.
- ❖ Un doublet d'intégration 1H, à  $\delta = 6.83$  ppm ( $J = 8.1$  Hz), indicateur d'un couplage ortho attribuable à H-5'.
- ❖ Un doublet d'intégration 1H, à  $\delta = 5.94$  ppm ( $J = 1.6$  Hz) attribuable à H-6.
- ❖ Un doublet d'intégration 1H, à  $\delta = 5.90$  ppm ( $J = 1.6$  Hz) attribuable à H-8.
- ❖ Un doublet d'intégration 1H, à  $\delta = 4.92$  ppm ( $J = 11.5$  Hz) attribuable à H-2.
- ❖ Un doublet d'intégration 1H, à  $\delta = 4.51$  ppm ( $J = 11.5$  Hz) attribuable à H-3.

La valeur 11.5 Hz de la constante de couplage, indique une disposition Trans des protons vicinaux H-2 et H-3.

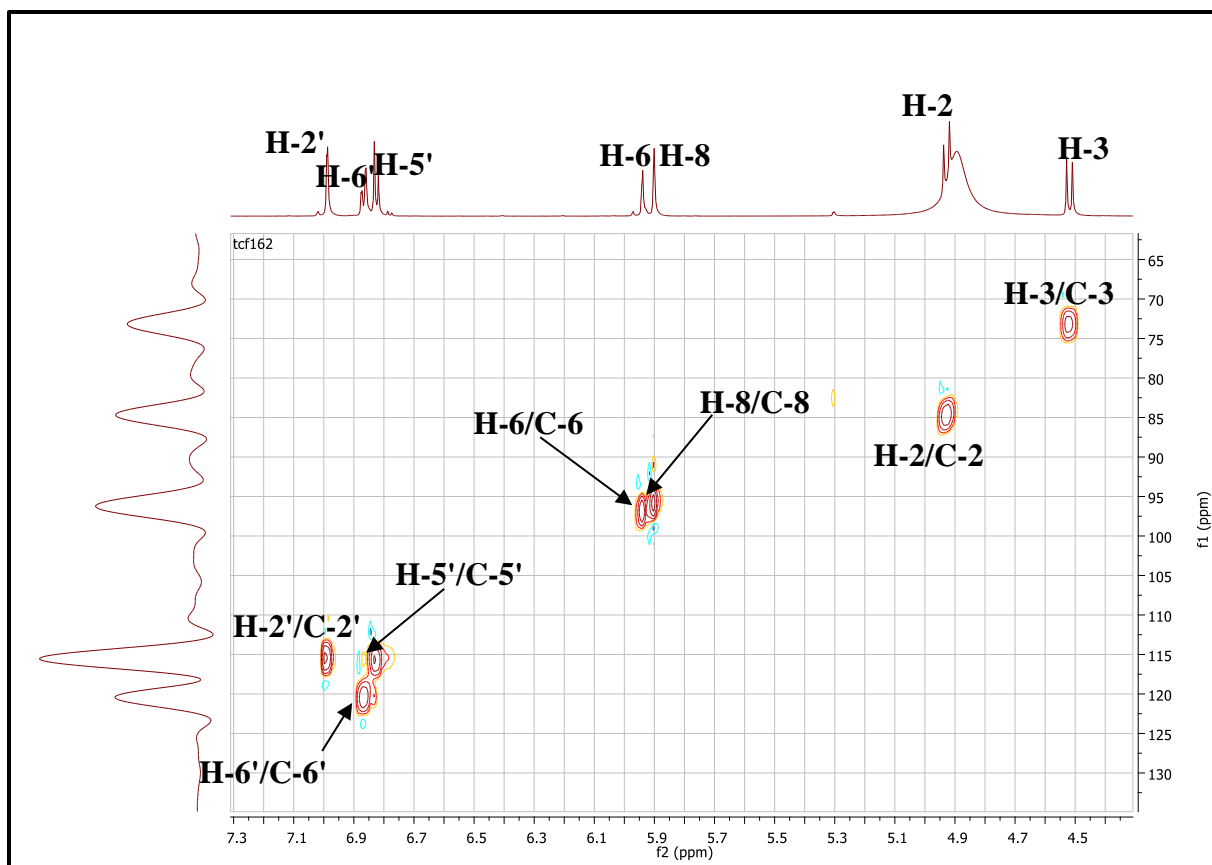


**Spectre III.4:** Spectre RMN $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm) du composé TCF16-2.



**Spectre III.5:** Spectre RMN<sup>1</sup>H (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) étalé du composé **TCF16-2**.

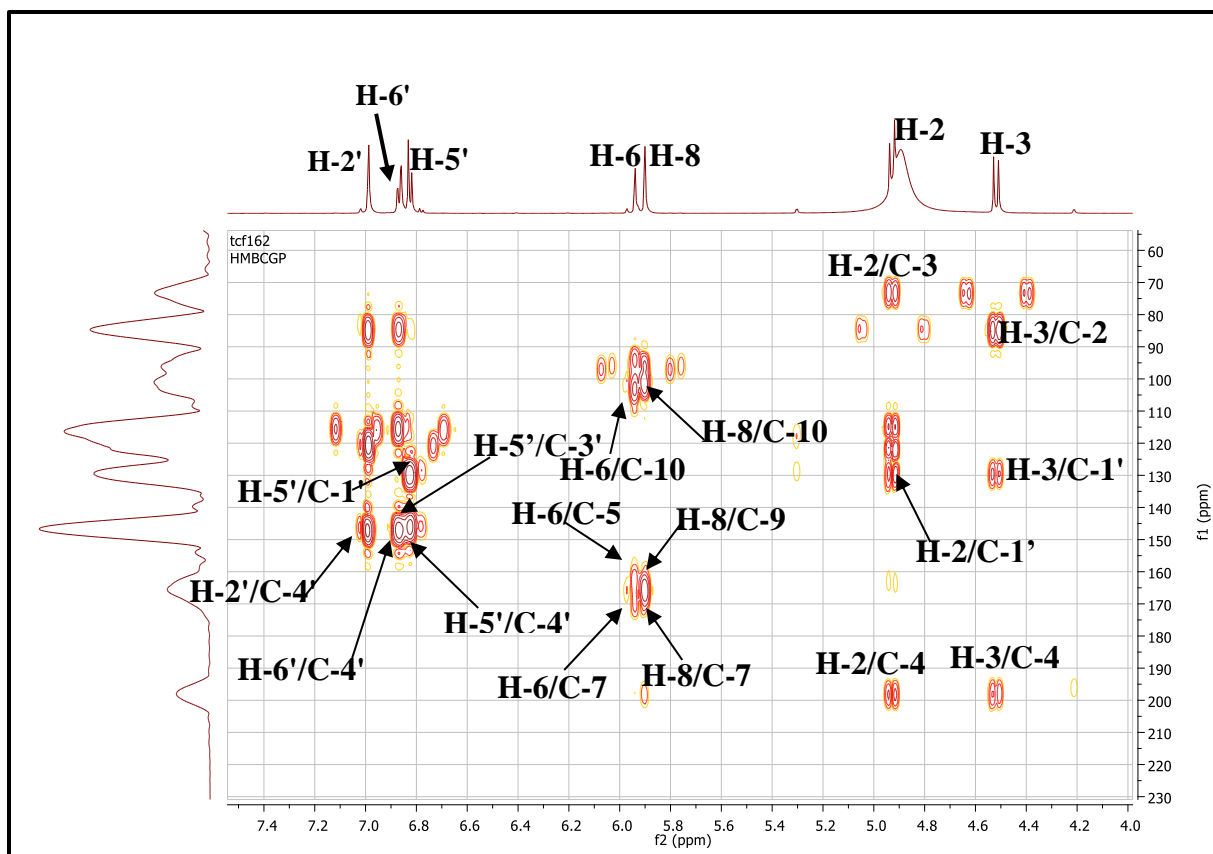
L'examen du spectre HSQC (spectre III.6) permet de localiser les noyaux C-2', C-5', C-6', C-8, C-6, C-3, et C-2 du noyaux flavonique à δ<sub>c</sub> (115.50 ; 116.30 ; 120.50 ; 94.72 ; 97.15 ; 73.36 ; 85.0 ppm) respectivement.



**Spectre III.6:** Spectre HSQC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm) du composé **Tcf16-2**.

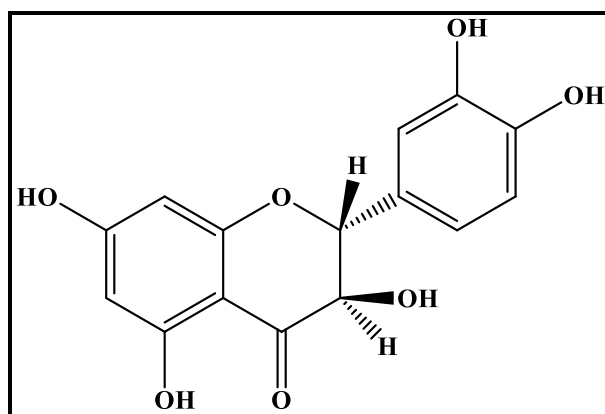
L'examen du spectre HMBC (spectre III.7) donne les indications suivantes :

- ✚ C-4 à  $\delta = 198.64$  ppm grâce à sa corrélation avec H-2 et H-3.
- ✚ C-5 à  $\delta = 165.15$  ppm grâce à sa corrélation avec H-6 et C-8.
- ✚ C-7 à  $\delta = 170.73$  ppm grâce à sa corrélation avec H-6 et C-8.
- ✚ C-10 à  $\delta = 102.80$  ppm grâce à sa corrélation avec H-6 et C-8.
- ✚ C-1' à  $\delta = 129.36$  ppm grâce à sa corrélation avec H-5' ; H-2 et H-3.
- ✚ C-4' à  $\delta = 147.92$  ppm grâce à sa corrélation avec H-5' et H-2', H-6'.
- ✚ C-3' à  $\delta = 146.27$  ppm grâce à sa corrélation avec H-5'.



**Spectre III.7:** Spectre HMBC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm) du composé **TCf16-2**.

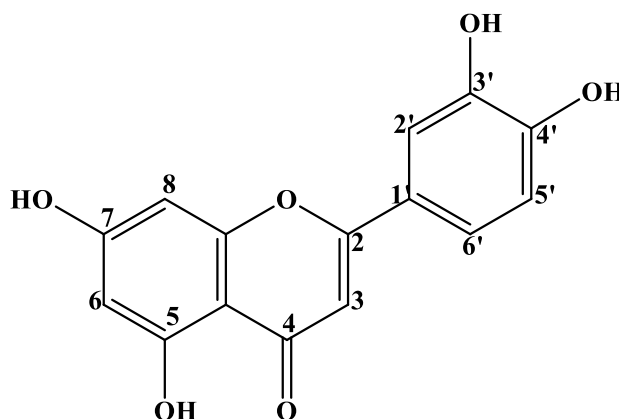
Toutes ces données mènent à un dihydroflavonol (3-hydroxyflavanone ou flavanonol). La stéréochimie de la position C-2 est déterminée (2R) grâce à la biogenèse des dihydroflavonols qui impose une orientation  $\alpha$  au cycle B ; celle de la position C-3 est déterminée (3R) grâce à la valeur de la constante de couplage (11.5 Hz) entre H-2/H-3 qui signifie une disposition trans de ces deux noyaux, Ce composé est donc la (2R, 3R)- dihydroquercétine. Cette molécule reportée dans la figure III.2 est connue sous le nom Taxifoline, elle a été isolée auparavant de *Rhamnus pallasii* (Rhamnaceae) [5].



**Figure III.2:** Structure du composé TCF16-2 **Taxifoline**.

**Tableau III.3:** Données de la spectrométrie RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  du composé TC F16-2.

Position	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$J$ (Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
2	4.92	d (11.5)	85.0
3	4.51	d (11.5)	73.36
4	-	-	198.64
5	-	-	165.15
6	5.94	d (1.6)	97.15
7	-	-	170.73
8	5.90	d (1.6)	94.79
9	-	-	165.72
10	-	-	102.80
1'	-	-	129.36
2'	6.99	d (1.6)	115.50
3'	-	-	146.27
4'	-	-	147.92
5'	6.83	d (8.1)	116.30
6'	6.86	dd (8.1 ; 1.6)	120.5

**III.1.3. Détermination structurale du composé TCf16-3 :**

L'étude de la série spectrale UV (spectre III.8) donne les indications suivantes:

- ❖ Le spectre enregistré dans le méthanol montre deux bandes d'absorption, une bande II à 267 nm et une bande I à 349 nm orientant vers une structure flavonique de type Flavone ou un flavonol substitué en 3.
- ❖ Le déplacement bathochrome de la bande I ( $\Delta\lambda = +53$  nm) avec augmentation de son intensité provoqué par l'addition de NaOH laisse supposer la présence d'un OH libre en 4'. L'apparition d'une nouvelle bande dans le même spectre à 325 nm suggère la présence d'un OH libre en position 7
- ❖ L'addition de NaOAc induit un déplacement bathochrome de la bande II ( $\Delta\lambda = + 5$  nm) par rapport au spectre MeOH confirmant ainsi la présence d'un OH libre en 7.

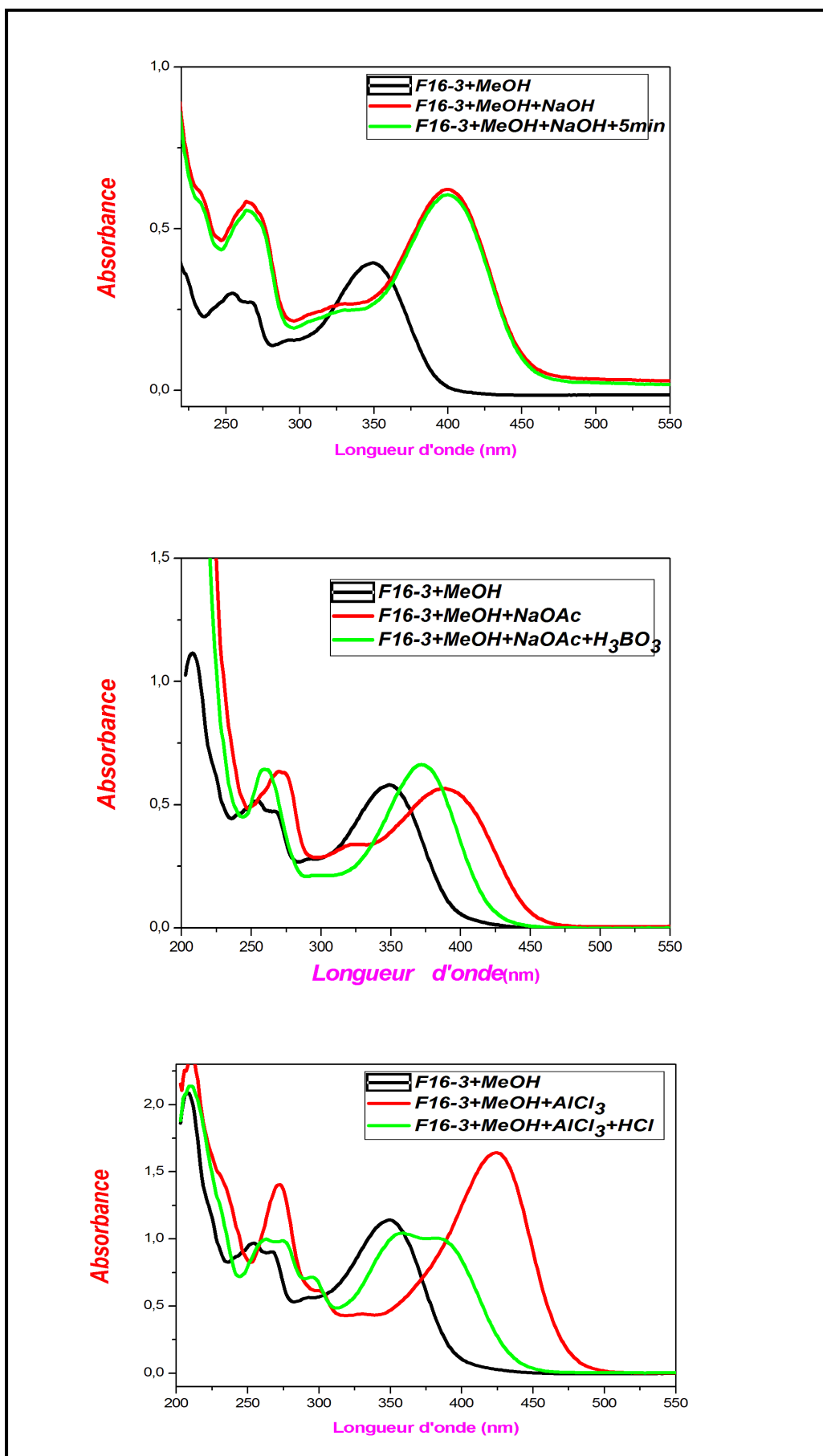


- ❖ Le déplacement bathochrome de la bande I ( $\Delta\lambda = +24\text{nm}$ ) noté en comparant les spectres  $\text{CH}_3\text{OH}$  et  $\text{NaOAc} + \text{H}_3\text{BO}_3$  révèle également la présence d'un système ortho dihydroxylé sur le cycle B.
- ❖ L'addition des réactifs  $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$  donne un déplacement bathochrome de la bande I ( $\Delta\lambda = +36\text{ nm}$ ) par rapport au spectre enregistré dans  $\text{CH}_3\text{OH}$ , indique la présence d'un groupement hydroxyle libre en position 5. Le déplacement hypsochrome de la bande I ( $\Delta\lambda = -38\text{ nm}$ ) en comparant le spectre enregistré dans  $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$  et celui enregistré dans le  $\text{AlCl}_3$  confirme la présence d'un système ortho dihydroxyle sur le cycle B.

Les résultats relatifs à cette série spectrale UV sont rassemblés dans le tableau III.4.

**Tableau III.4:** Données de la série spectrale UV du composé TCF16-3.

<i>Réactifs</i>	<i>Bande I</i>	<i>Autres bandes</i>	<i>Bande II</i>	<i>Commentaire</i>
MeOH	349	/	267	Flavone
+NaOH	400	325	266	OH en 4' et OH en 7
Spectre stable avec NaOH après 5min				
+AlCl <sub>3</sub>	423	/	272	Ortho di-OH sur B avec 5- OH
+AlCl <sub>3</sub> +HCl	385	/	274	OH libre en 5
+NaOAc	391	/	272	OH en 7
+NaOAc+H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	372	/	261	Ortho di-OH sur le cycle B



Spectre III.8: Série spectrale UV-Vis du composé TCf16-3.

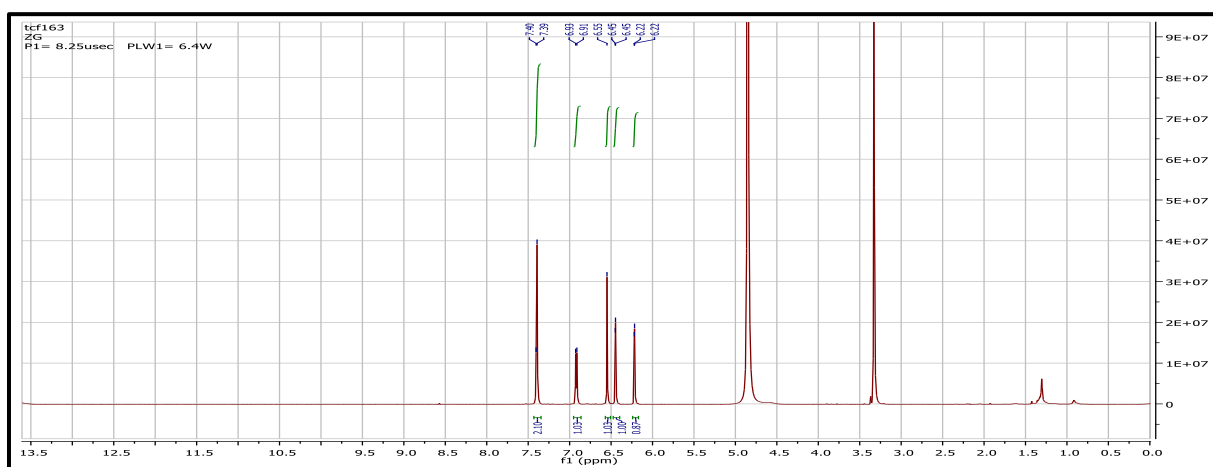
L'examen du spectre RMN  $^1\text{H}$  (spectre III.9) ainsi que le spectre étalé (spectre III.10) montre la présence des signaux caractéristiques d'un flavonoïde de type flavone qu'on peut identifier par:

- ❖ Un singulet d'intégration 1H à  $\delta = 6.55$  ppm attribuable à H-3.
- ❖ Deux doublets d'intégration 1H chacun, le premier à  $\delta_{\text{H}} = 6.44$  ppm, le second à  $\delta=6.22$  ppm avec une constante de couplage  $J = 2.2$  Hz (couplage méta) attribuables à H-8 et H-6 respectivement, indiquant ainsi une substitution des carbones 5 et 7.
- ❖ Un doublet d'intégration 1H à  $\delta = 6.92$  ppm ( $J = 8.3$  Hz), indicateur d'un couplage ortho attribuable à H-5'.
- ❖ Un signal à  $\delta_{\text{H}} = 7.40$  ppm d'intégration 2H attribuable à H-2' et H-6', ce signal correspond en fait à deux signaux superposés l'un deux sous forme d'un doublet dédoublé ( $J=8.3$  Hz,  $J=2.0$  Hz) caractérisant H-6' et l'autre sous forme d'un doublet ( $J = 2.0$  Hz) caractérisant H-2'.

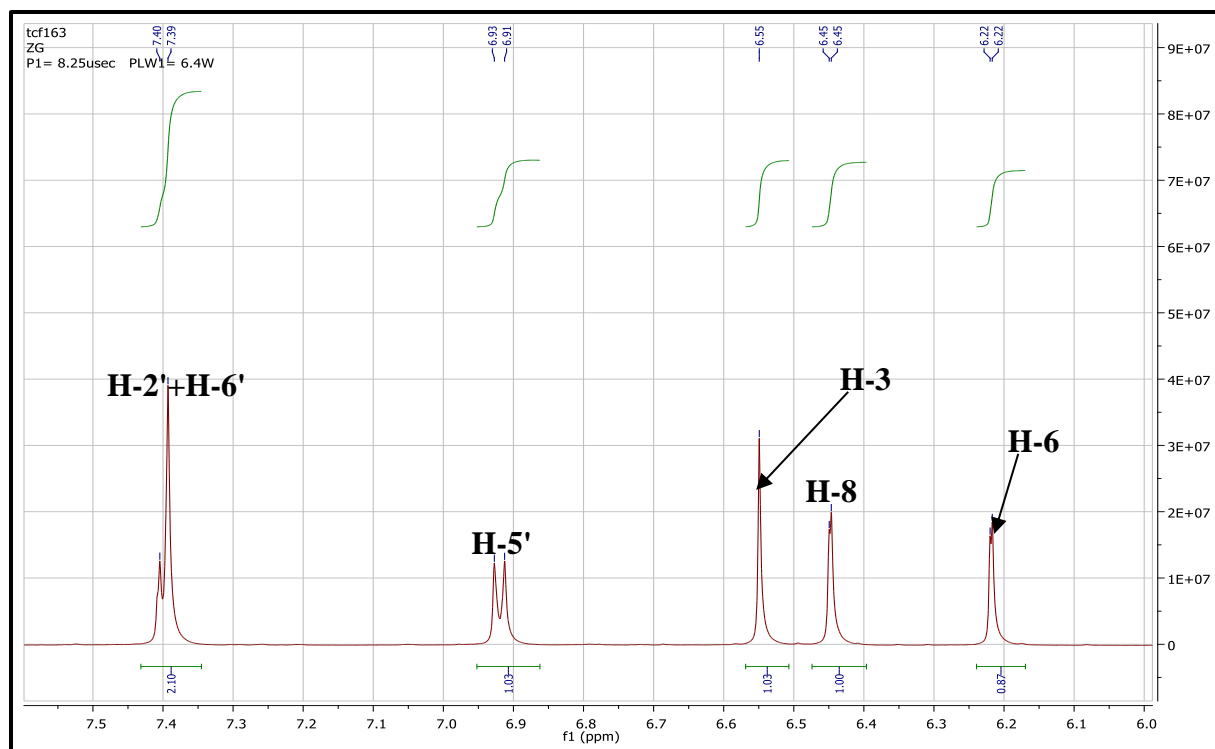
L'ensemble de ces données est reporté dans le tableau III.5.

**Tableau III.5:** Données de la spectrométrie RMN  $^1\text{H}$  du composé **TCF16-3**.

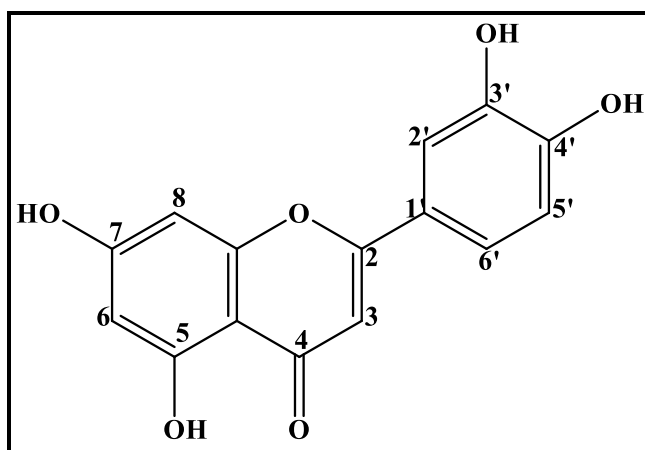
$\delta(\text{ppm})$	Intégration	Multiplicité $J(\text{Hz})$	Attribution
7.40	1-H	d d (8.3et2.0)	H-6'
7.40	1-H	d (2.0)	H-2'
6.92	1-H	d (8.3)	H-5'
6.44	1-H	d (2.2)	H-8
6.55	1-H	S	H-3
6.22	1-H	d (2.2)	H-6



**Spectre III.9:** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm) du composé **TCF16-3**.

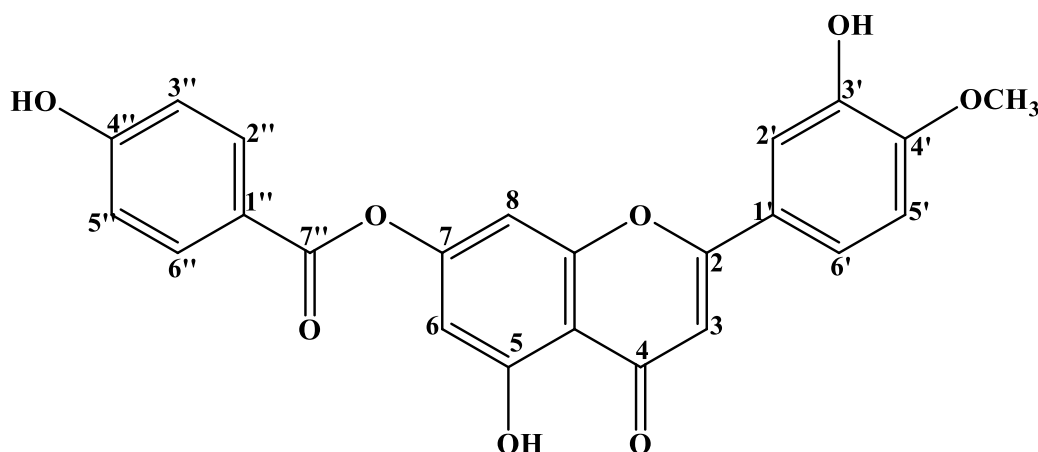


**Spectre III.10:** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm) étalé du composé TCF16-3. L'ensemble des données spectrales de RMN  $^1\text{H}$  et de la série spectrale UV-visible indique que la structure finale du composé TCF16-3 est comme suit:



**Figure III.3:** Structure du composé TCF16-3 Lutéoline.

## III.1.4. Détermination structurale du composé TC/20/17 :



L'examen du spectre RMN  $^1\text{H}$  (Spectre III.12) montre la présence de signaux caractéristiques d'un squelette flavonique :

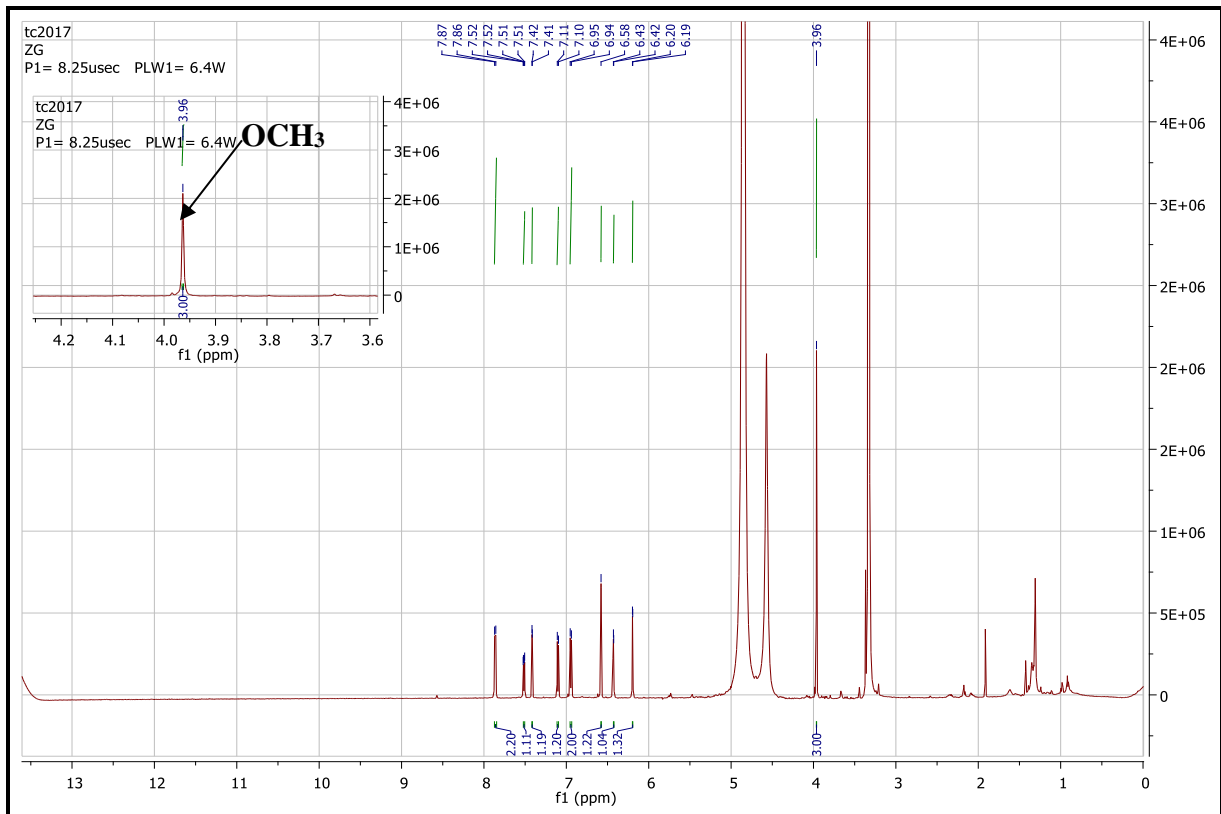
- ❖ Un singulet d'intégration 1H à  $\delta = 6.59$  ppm attribuable à H-3.
- ❖ Deux doublets d'intégration 1H chacun, le premier à  $\delta_{\text{H}} = 6.44$  ppm, le second à  $\delta_{\text{H}} = 6.20$  ppm avec une constante de couplage  $J = 2.2$  Hz (couplage méta) attribuables à H-8 et H-6 respectivement, indiquant ainsi une substitution des carbones 5 et 7.
- ❖ Un doublet d'intégration 1H ( $J = 2.2$  Hz), indicateur d'un couplage méta à  $\delta = 7.41$  ppm attribuable à H-2'.
- ❖ Un doublet dédoublé ( $J = 8.6$  Hz ;  $J = 2.2$  Hz), indicateur d'un couplage ortho et d'un couplage méta à  $\delta = 7.52$  ppm attribuable à H-6'.
- ❖ Un doublet d'intégration 1H à  $\delta = 7.11$  ppm ( $J = 8.6$  Hz), indicateur d'un couplage ortho attribuable à H-5'.

La présence de ces trois derniers signaux est en faveur d'un cycle B substitué en positions 3' et 4'.

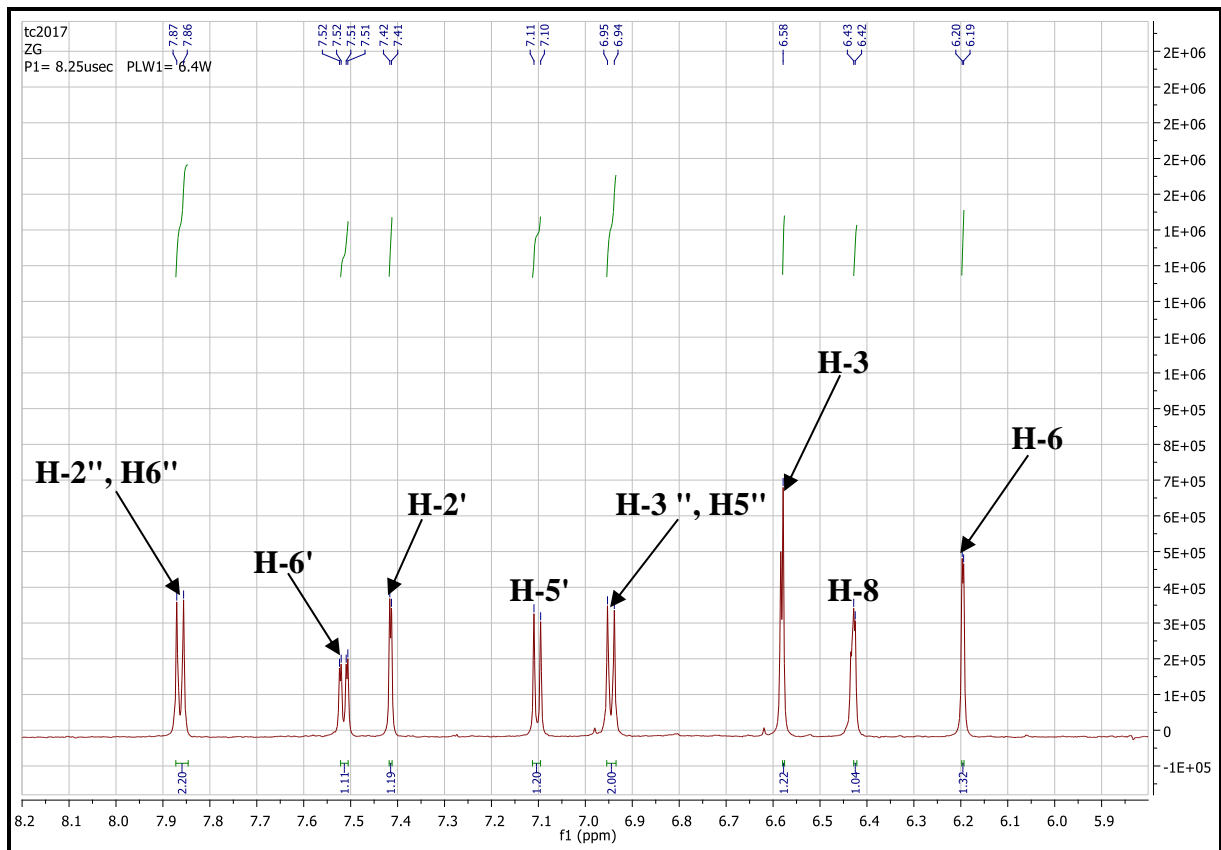
- ❖ Un singulet d'intégration 3H à  $\delta = 3.97$  ppm attribuable à un groupement  $\text{OCH}_3$ .

Ce spectre montre également la présence des signaux caractéristiques d'un noyau aromatique para-substitué, notamment :

- ❖ Un doublet d'intégration 2H, à  $\delta_{\text{H}} = 7.86$  ppm ( $J = 8.8$  Hz) attribuable à H-2'', H6''.
- ❖ Un doublet d'intégration 2H, à  $\delta_{\text{H}} = 6.94$  ppm ( $J = 8.8$  Hz) attribuable à H-3'', H5'', indiquant la présence d'un *p*-hydroxybenzoyl dans la molécule [6].



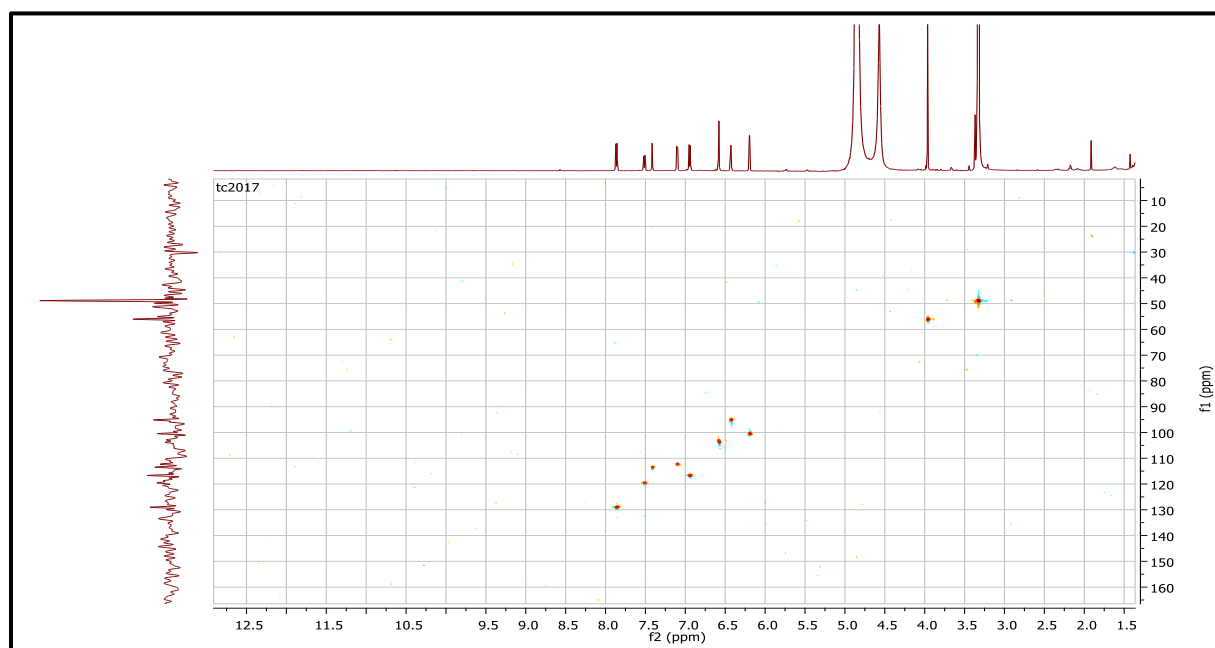
Spectre III.11: Spectre RMN <sup>1</sup>H (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) du composé TC/20/17.



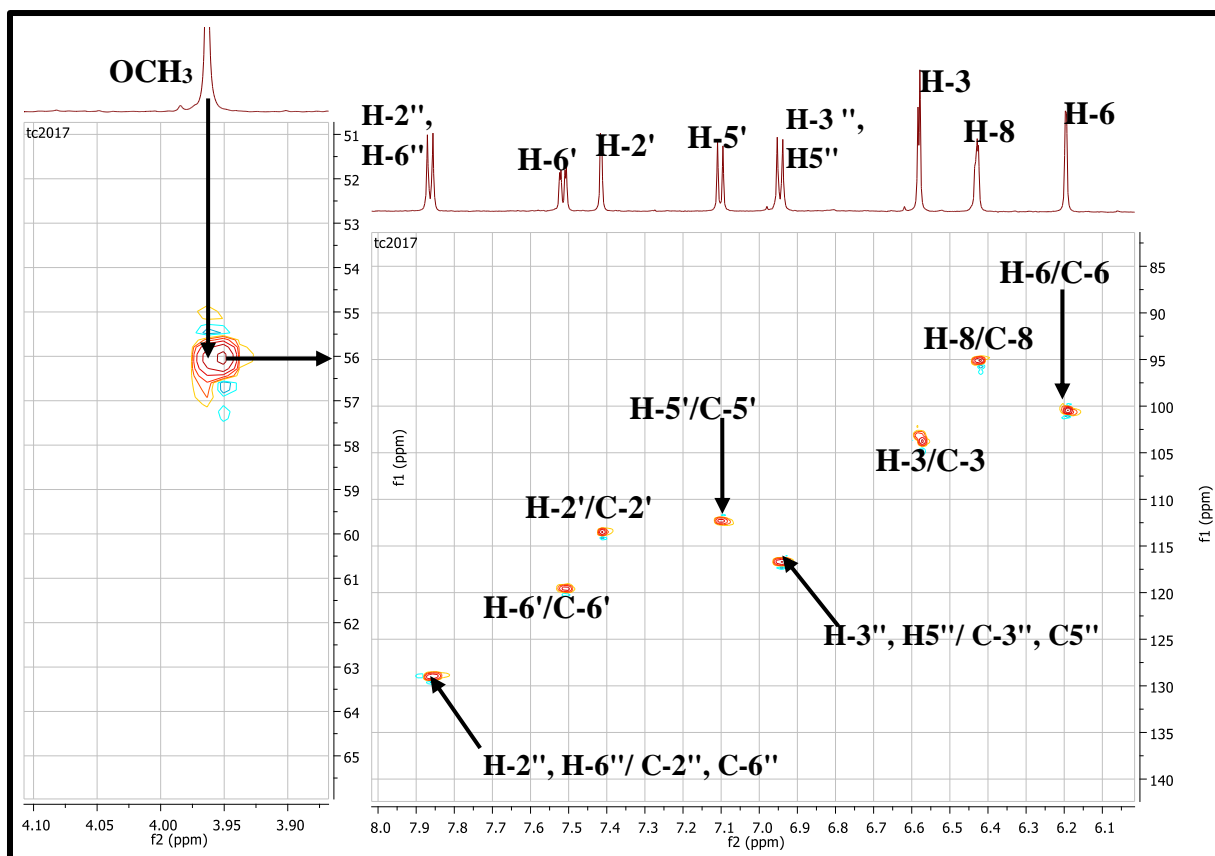
Spectre III.12: Spectre RMN <sup>1</sup>H étalé (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) du composé TC/20/17.

L'examen du spectre HSQC (spectre III.13, et III.14) permet d'effectuer les attributions suivantes :

- Une tache de corrélation entre H-6' et un atome de carbone qui ne peut être que C-6' à  $\delta = 119.5$  ppm.
- Une tache de corrélation entre H-2' et un atome de carbone qui ne peut être que C-2' à  $\delta = 113.6$  ppm.
- Le H-5' permet l'attribution du C-5' à  $\delta=112.0$  ppm.
- Le H-3 permet l'attribution du C-3 à  $\delta=103.5$  ppm.
- Le H-6 permet l'attribution du C-6 à  $\delta=100.6$  ppm.
- Le H-8 permet l'attribution du C-8 à  $\delta=95.2$  ppm.
- Une tache de corrélation entre H-2", H-6" et deux atomes de carbones à  $\delta = 129.2$  ppm attribuables à C-2" et C-6".
- Une tache de corrélation entre H-3", H-5" et deux atomes de carbones à  $\delta = 116.6$  ppm attribuables à C-3" et C-5".



**Spectre III.13:** Spectre HSQC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm) du composé **TC/20/17**.



**Spectre III.14:** Spectre HSQC étalé (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm) du composé **TC/2017**.

L'étude du spectre relatif à l'expérience HMBC (spectre III.15) et ses étalements (spectre III.16 et III.17) mettent en évidence les corrélations proton-carbone à longue distance, permettant de tirer les indications suivantes :

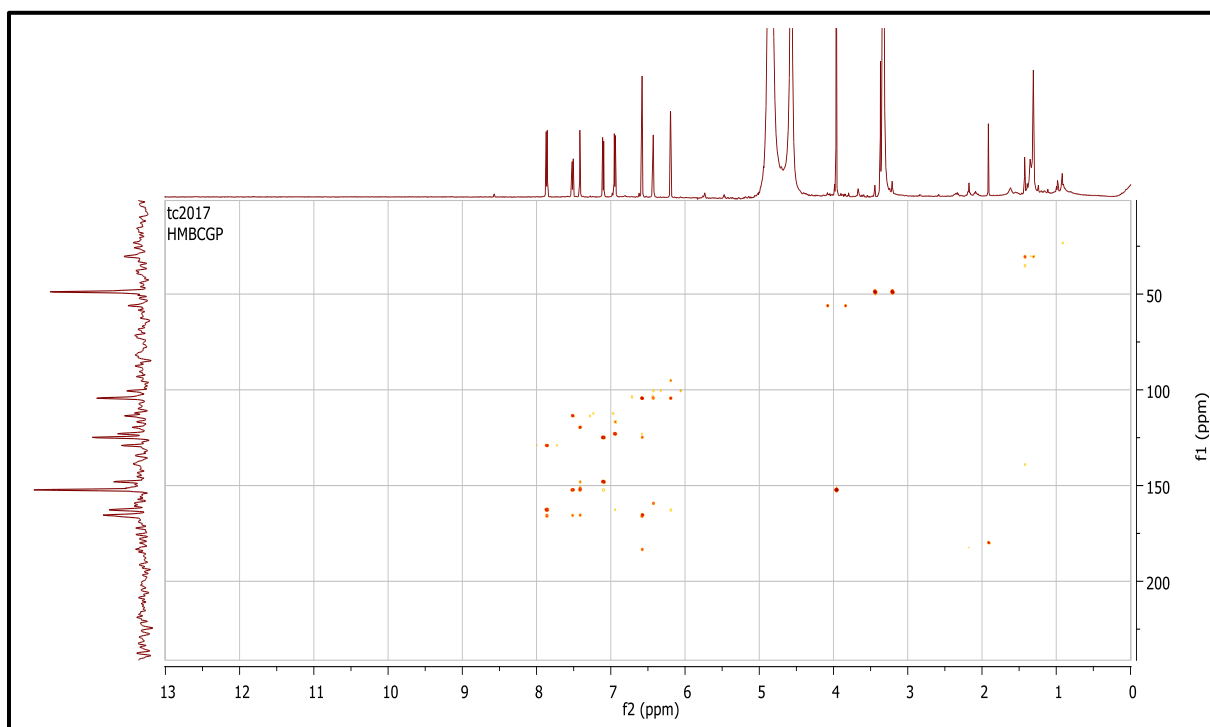
- ✚ C-2 à  $\delta = 165.5$  ppm grâce à sa corrélation avec H-2', H-6' et H-3.
- ✚ C-4 à  $\delta = 183.7$  ppm grâce à sa corrélation avec H-3.
- ✚ C-5 à  $\delta = 162.6$  ppm grâce à sa corrélation avec H-6.
- ✚ C-7 à  $\delta = 168.0$  ppm grâce à sa corrélation avec H-6 et H-8.
- ✚ C-9 à  $\delta = 159.2$  ppm grâce à sa corrélation avec H-8.
- ✚ C-10 à  $\delta = 104.4$  ppm grâce à sa corrélation avec H-3, H-6 et H-8.
- ✚ C-1' à  $\delta = 124.9$  ppm grâce à sa corrélation avec H-5' et H-3.
- ✚ Trois taches de corrélation entre H-2', H-5' et H-6' et un atome de carbone résonant à  $\delta = 152.2$  ppm attribuable à C-4'.
- ✚ Les protons H-3'' et H-5'' montrent trois taches de corrélation :
  - la première avec l'atome de carbone à  $\delta = 116.6$  ppm confirme le C-3'' et C-5''.
  - La deuxième avec l'atome de carbone à  $\delta = 162.6$  ppm qui ne peut être attribué qu'à C-4''.



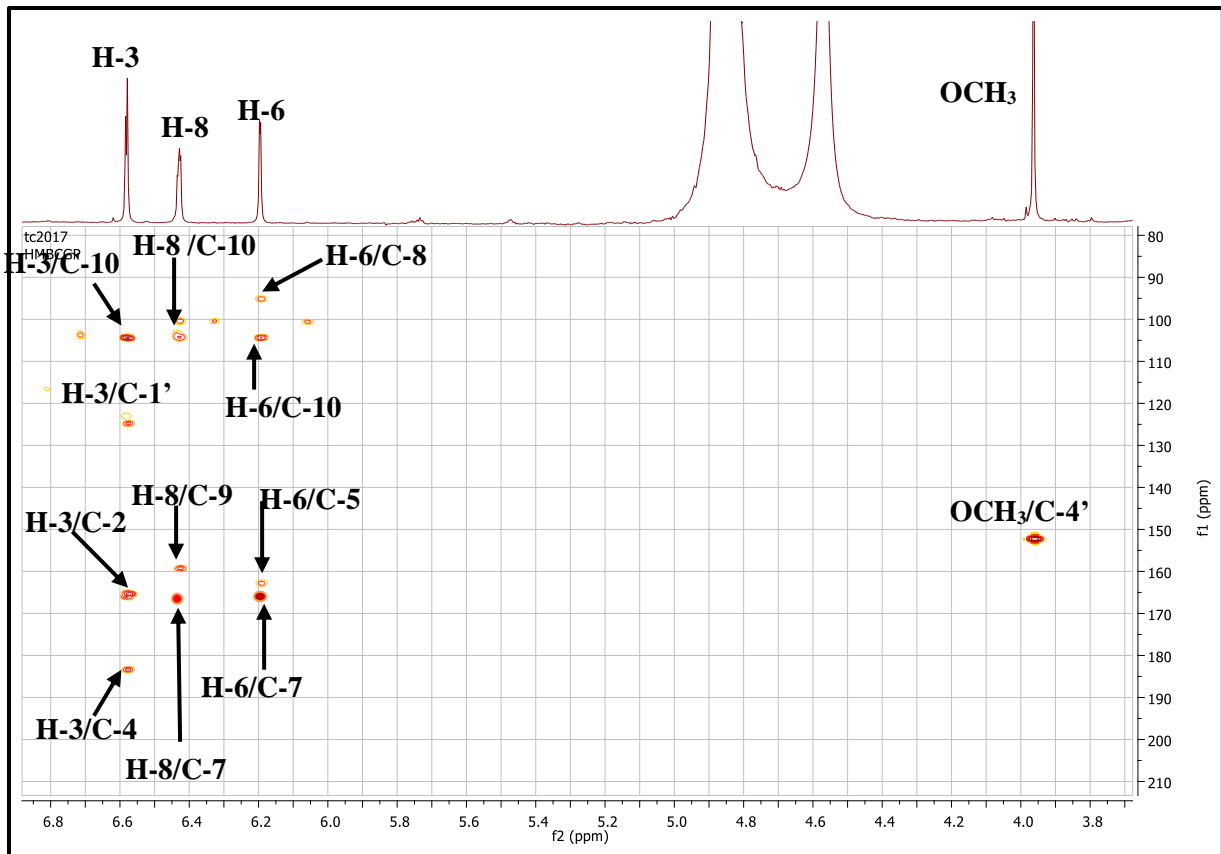
- La troisième avec l'atome de carbone à  $\delta = 123.0$  qui ne peut être que C-1".
- ✚ Les protons H-2" et H-6" montre trois taches de corrélation :
  - la première avec l'atome de carbone à  $\delta = 129.2$  ppm confirme le C-2" et C-6".
  - La deuxième avec l'atome de carbone à  $\delta = 162.6$  ppm confirme le C-4".
  - La troisième avec l'atome de carbone d'un carbonyle caractéristique d'une fonction ester à  $\delta = 165.7$  qui ne peut être que C-7".

Le spectre HMBC montre aussi une corrélation entre le groupement méthoxyle à  $\delta_H = 3.97$  ppm et le carbone C-4' à  $\delta_C = 152.2$  ppm ce qui indique que le méthoxyle est porté par le carbone C-4'.

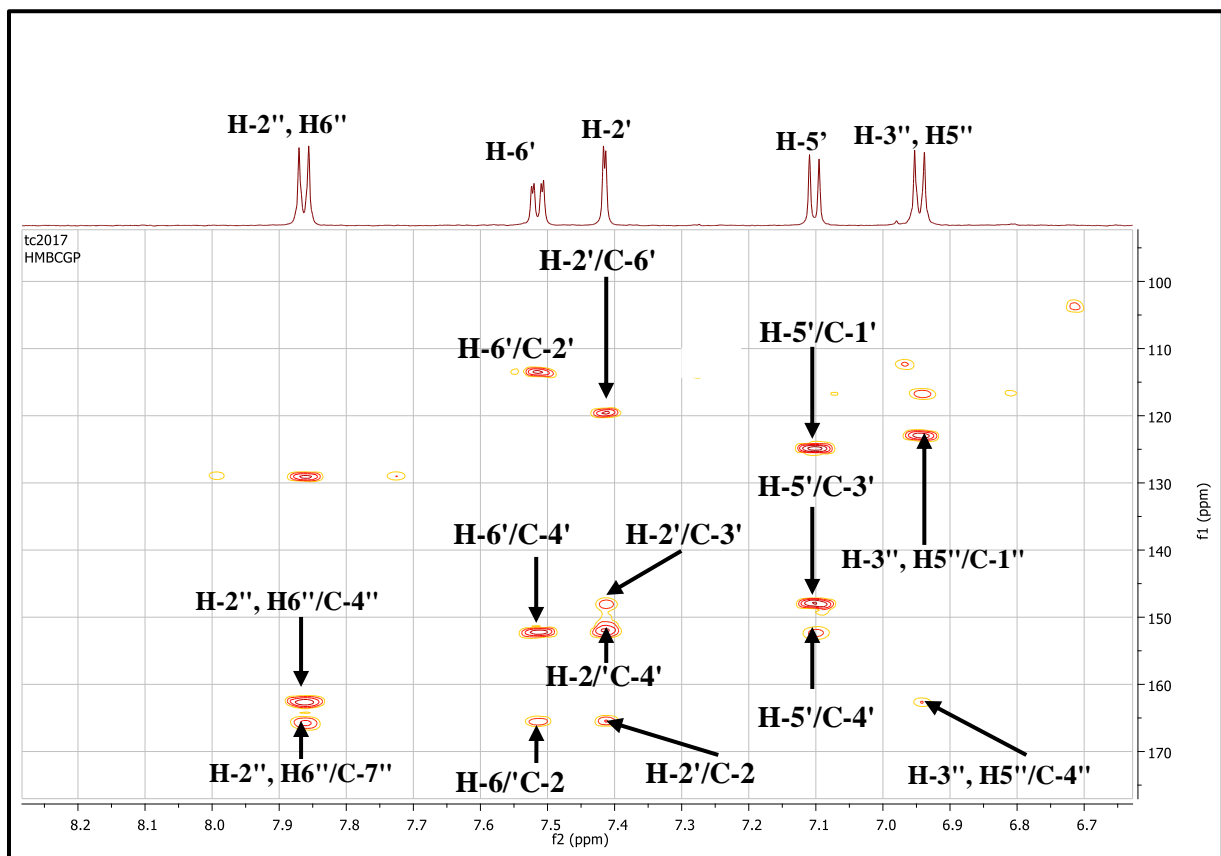
La valeur élevée du déplacement de C-7 ( $\delta_C = 168$  ppm) permet de placer le groupement p-hydroxybenzoyl en cette position [7].



**Spectre III.15:** Spectre HMBC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm) du composé TC/20/17.

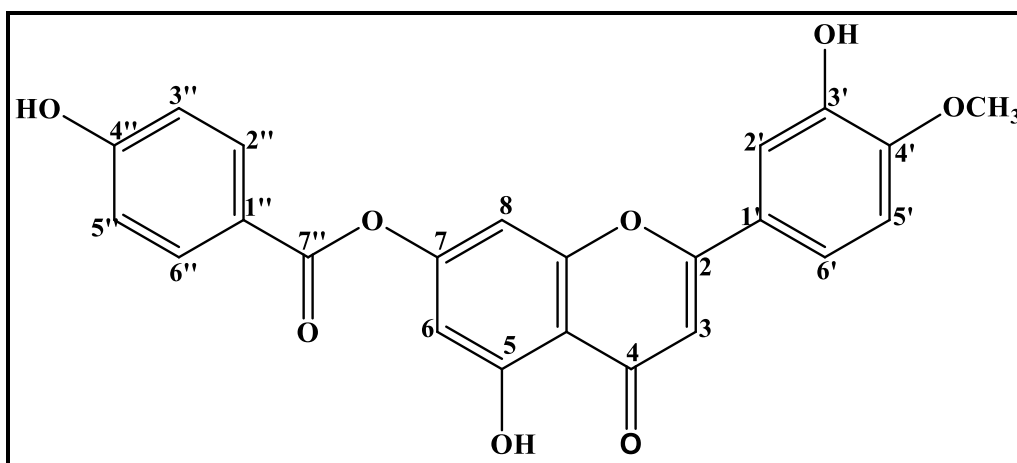


Spectre III.16: Spectre HMBC étalé (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) du composé TC/20/17.



Spectre III.17: Spectre HMBC étalé (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) du composé TC/20/17.

L'ensemble de ces données mène à la structure reportée dans la Figure III.4 Il s'agit du 5,3'-dihydroxy-7-(p-hydroxybenzoyl)-4'-methoxyflavone. Cette molécule est nouvelle, elle est décrite pour la première fois dans la littérature.



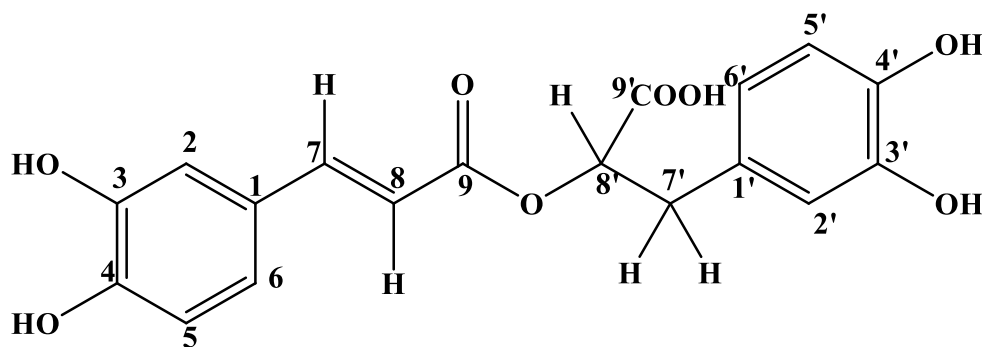
**Figure III.4:** Structure du composé TC/20/17.

Les données spectroscopiques relatives à cette molécule sont rassemblées dans le tableau III.6.

**Tableau III.6:** Données de la spectrométrie RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  du composé TC/20/7.

Position	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$J$ (Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
2	-		165.5
3	6.59	s	103.5
4	-	-	183.7
5	-	-	162.6
6	6.20	d (2.2)	100.6
7	-	-	168.0
8	6.44	d (2.2)	95.2
9	-	-	159.2
10	-	-	104.4
1'	-		124.9
2'	7.41	d (2.2)	113.6
3'	-	-	147.0
4'	-	-	152.2
5'	7.11	d (8.6)	112.0
6'	7.25	dd (8.6 ; 2.2)	119.5
1''	-	-	123.0
2'',6''	7.86	d (8.8)	129.2
3'',5''	6.94	d (8.8)	116.6
4''	-	-	162.6
7''	-	-	165.7
OMe-4'	3.97	s	56.0

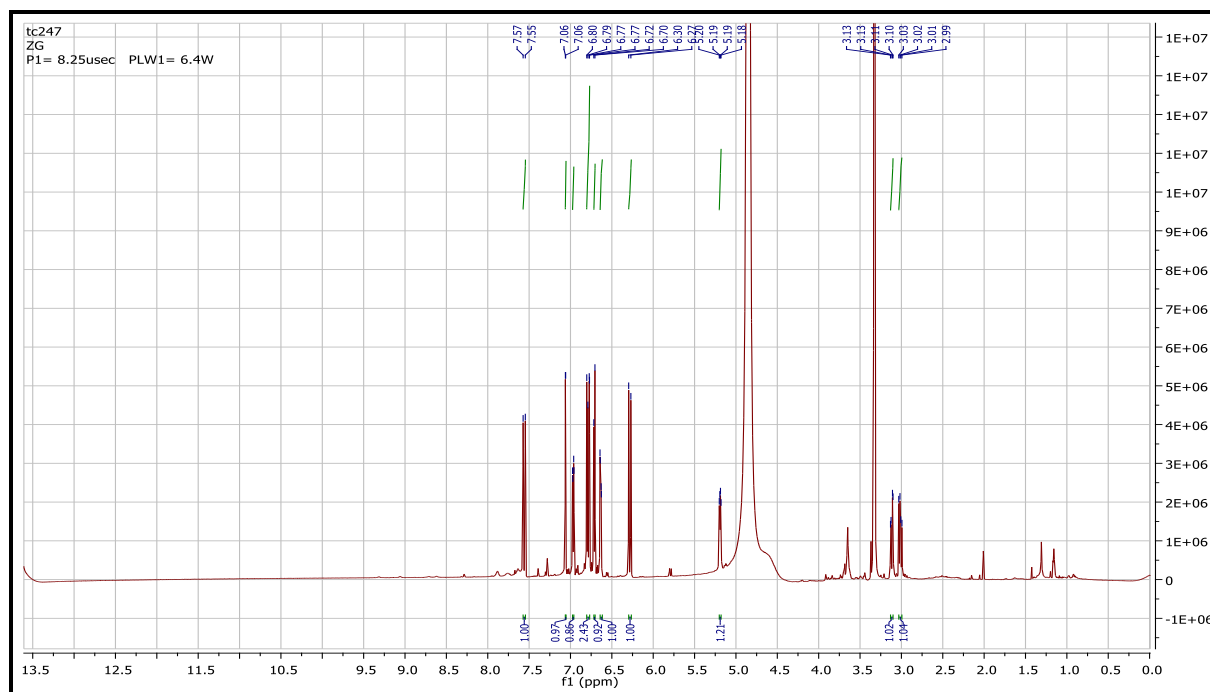
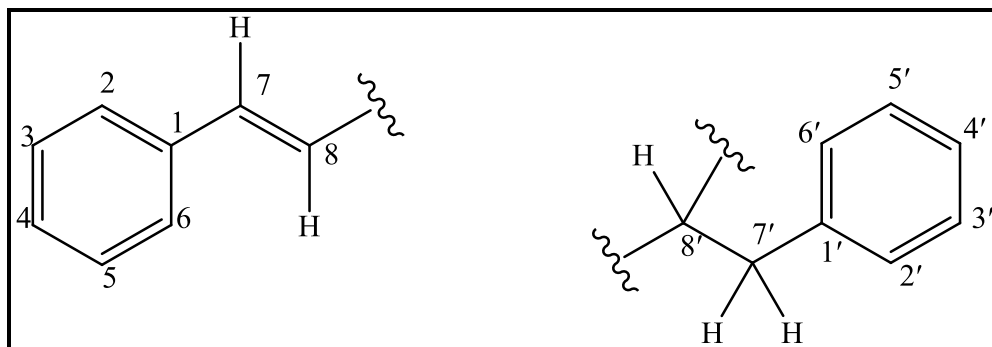
## III.1.5. Détermination structurale du composé TC/24/7 :



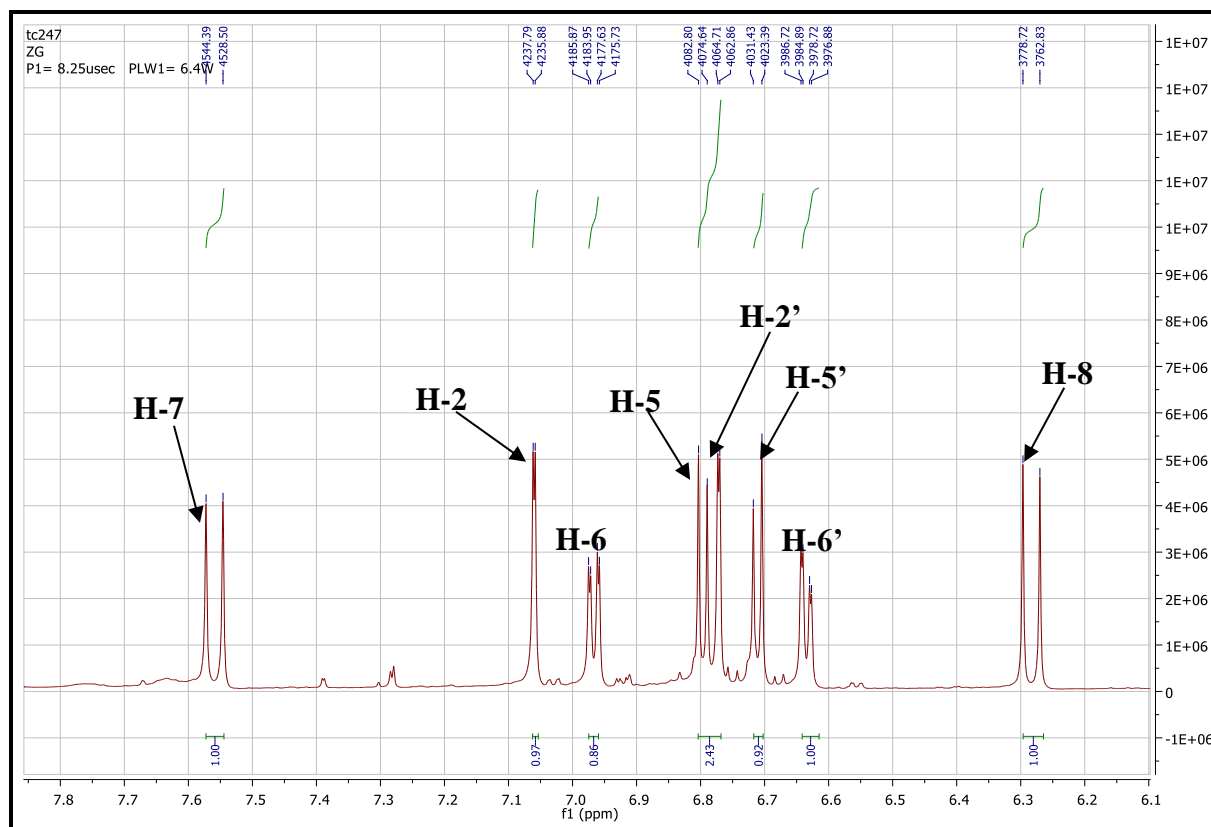
L'examen du spectre de RMN  $^1\text{H}$  (Spectre III.18) et ses étalements (Spectre III.19, 20) montre la présence de :

- ❖ Deux signaux résonant à  $\delta_{\text{H}} = 6.28$  et  $7.56$  ppm sous forme d'un doublet (d,  $J = 15.9$  Hz) et intégrant chacun pour un proton à correspondant à deux protons oléfiniques. La constante de couplage ( $J = 15.9$  Hz) élevée indique une géométrie trans de la double liaison. Le déblindage de déplacement chimique de l'un de ces proton ( $\delta_{\text{H}} = 7.56$  ppm) indique que cette double liaison est liée à un noyau aromatique.
- ❖ Des signaux résonant dans l'intervalle ( $6.63$ - $7.06$  ppm) intégrant pour six protons caractéristiques des protons aromatiques, montre la présence de deux noyaux aromatiques :
  - Un signal sous forme d'un doublet de doublets d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} 6.63$  ppm ( $J = 8.1 ; 2$  Hz).
  - Un signal sous forme de doublet d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} 6.8$  ppm ( $J = 2$  Hz).
  - Un signal sous forme de doublet d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} 6.77$  ppm ( $J = 8.1$  Hz).
  - Un doublet de doublets d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} 6.96$  ppm ( $J = 8.2 ; 2$  Hz).
  - Un signal sous forme de doublet d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} 6.71$  ppm ( $J = 8$  Hz)
  - Un autre signal sous forme de doublet d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} 7.05$  ppm ( $J = 2$  Hz)
- ❖ Un signal sous forme d'un doublet de doublet résonant à  $\delta_{\text{H}} = 5.19$  ppm (dd,  $J = 8.5 ; 4.2$  Hz) et intégrant pour un proton correspondant à un groupement oxyméthine OCH. Le déblindage fort de ce proton, en comparaison avec les protons oléfiniques suggère qu'il est lié à une fonction qui présente un pouvoir attracteur puissant.
- ❖ Deux signaux, l'un apparaît sous forme d'un multiplet à  $\delta_{\text{H}} = 3.03$  ppm et l'autre apparaît sous forme d'un doublet de doublet à  $\delta_{\text{H}} = 3.12$  ppm (dd,  $J = 14.4 ; 8.5$  Hz), correspondant à deux protons oléfiniques.

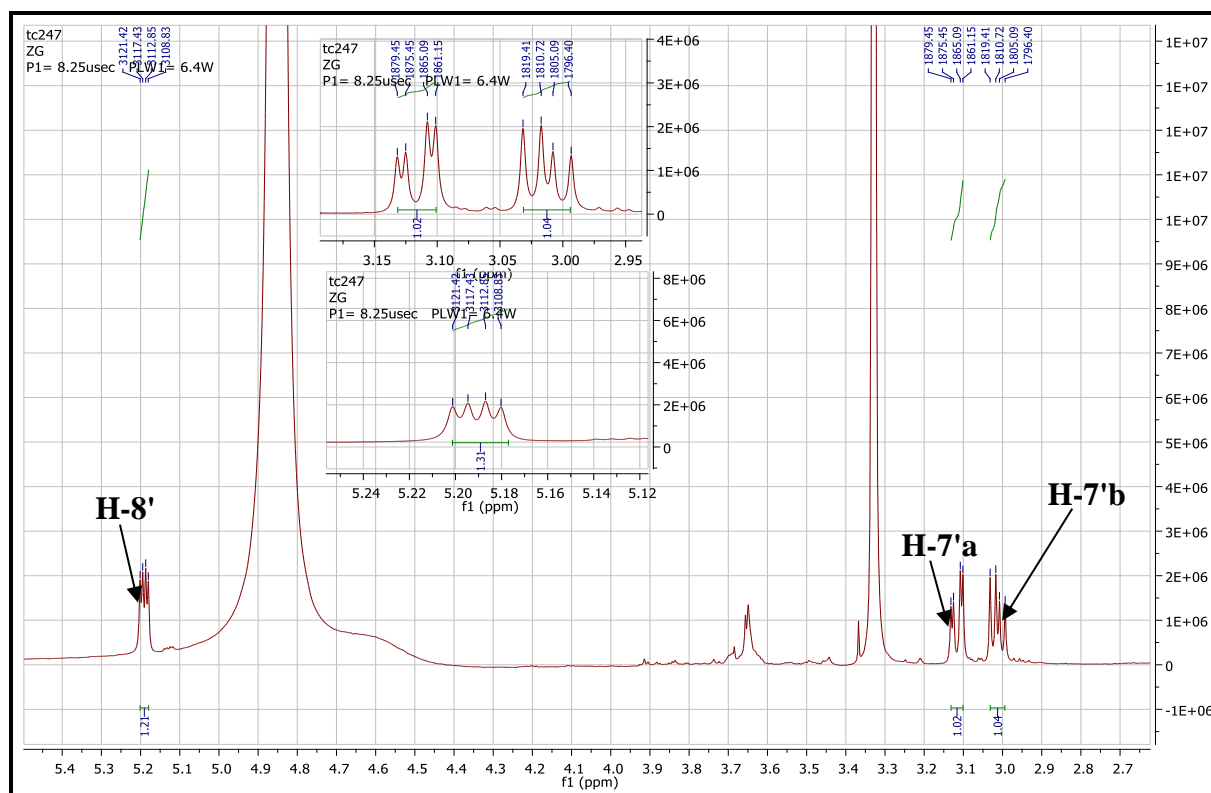
Ce raisonnement permet de suggérer les fragmentations suivantes qui appartiennent proviennent d'un composé phénolique :



Spectre III.18: Spectre de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm) du composé TC/24/7



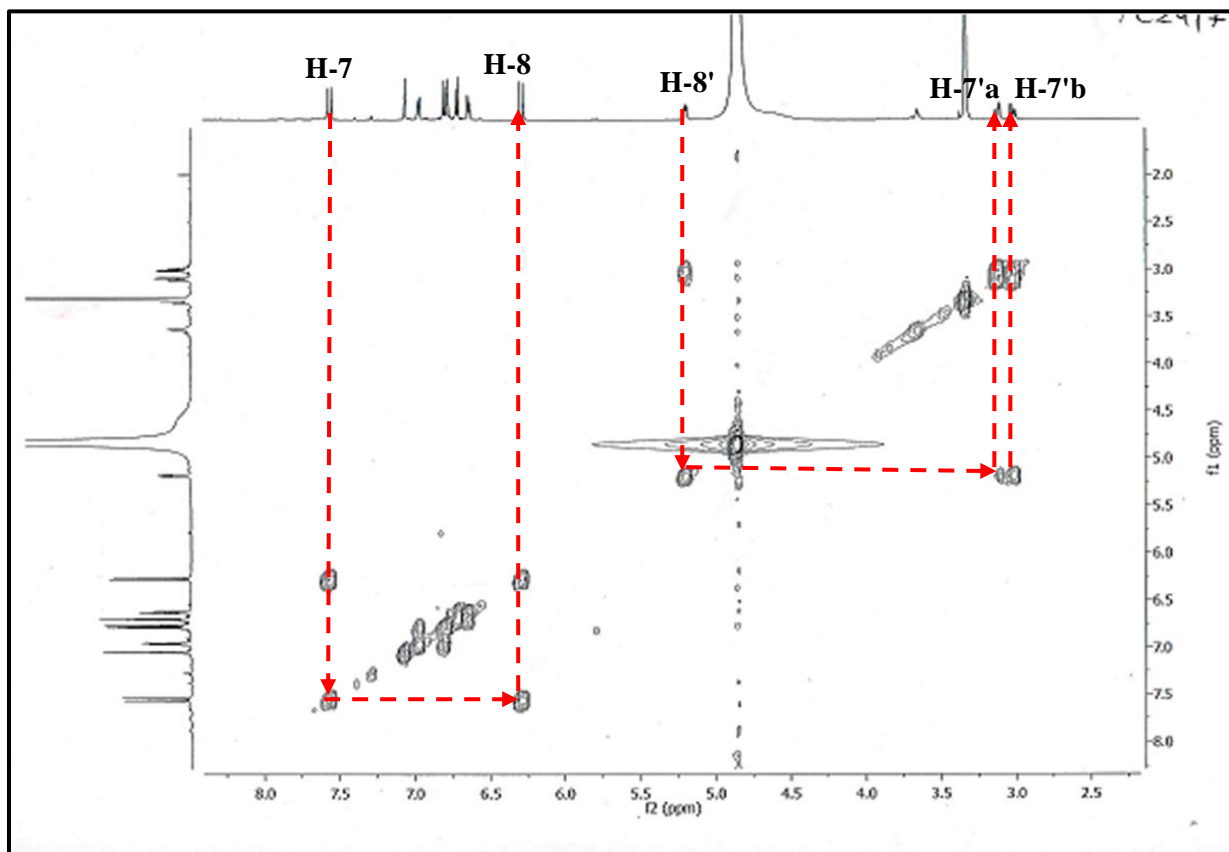
Spectre III.19: Spectre de RMN  $^1\text{H}$  étalé (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm) du composé TC/24/7.



Spectre III.20: Spectre de RMN  $^1\text{H}$  étalé (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm) du composé TC/24/7.

L'expérience COSY (H-H) (spectre III.21) met en évidence les corrélations entre :

- ✚ Le proton (H-7'a) et le proton (H-7'b) résonant respectivement à  $\delta_H = 3.04$  ppm et  $\delta_H = 3.14$  ppm.
- ✚ Les deux protons H-7' et le proton H-8' résonant à  $\delta_H = 5.18$  ppm.
- ✚ Les protons de la double liaison, H-7 résonant  $\delta_H = 7.56$  ppm et H-8 résonant à  $\delta_H = 6.28$  ppm.

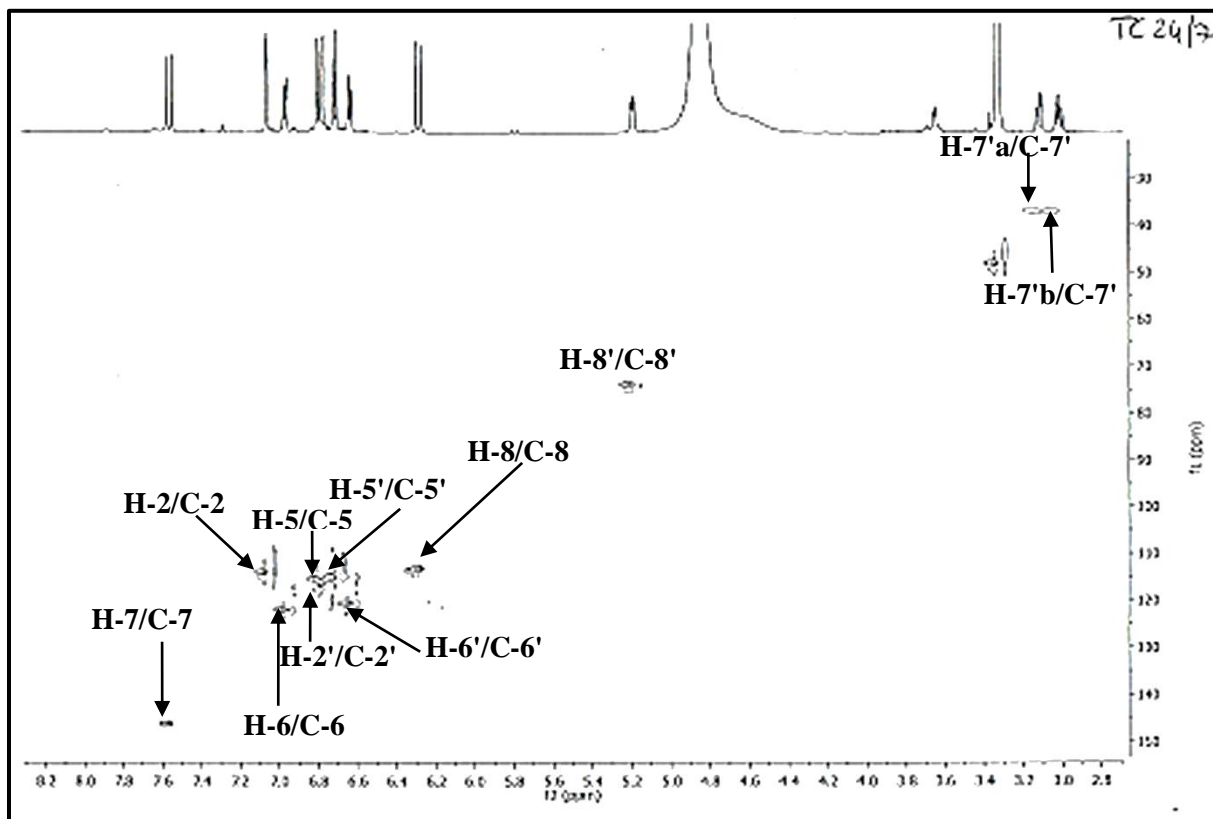


**Spectre III.21:** Spectre COSY ( $1H-^1H$ ) (400 MHz,  $CD_3OD$ ,  $\delta$  ppm) du composé **TC/24/7**.

L'examen du spectre HSQC (spectre III.22) permet d'observer les couplages entre les carbones et les protons directement liés entre eux ainsi :

- Les deux protons H-7' ( $\delta_H = 3.04, 3.14$  ppm) permet l'attribution du C-7' à  $\delta = 37.6$  ppm.
- Le proton H-8' résonant à  $\delta_H = 5.19$  ppm permet l'attribution du C-8' à  $\delta = 74.2$  ppm.
- Le proton H-2 résonant à  $\delta_H = 7.05$  ppm permet l'attribution du C-2 à  $\delta = 114.8$  ppm.
- Le proton H5 ( $\delta_H = 6.77$  ppm) permet l'attribution du C-5 à  $\delta = 116.1$  ppm.
- Le proton H-6 ( $\delta_H = 6.96$  ppm) permet l'attribution du C-6 à  $\delta = 122.8$  ppm.
- Le proton H-7 ( $\delta_H = 7.56$  ppm) permet l'attribution du C-7 à  $\delta = 147.5$  ppm.

- Le proton H-8 ( $\delta_H = 6.28$  ppm) permet l'attribution du C- 8 à  $\delta_C = 113.7$  ppm.
- Le proton H-2' ( $\delta_H = 6.80$  ppm) permet l'attribution du C-2' à  $\delta_C = 117.1$  ppm.
- Le proton H-5' ( $\delta_H = 6.71$  ppm) permet l'attribution du C-5' à  $\delta_C = 116$  ppm.
- Le proton H-6' ( $\delta_H = 6.63$  ppm) permet l'attribution du C-6' à  $\delta_C = 121.5$  ppm.



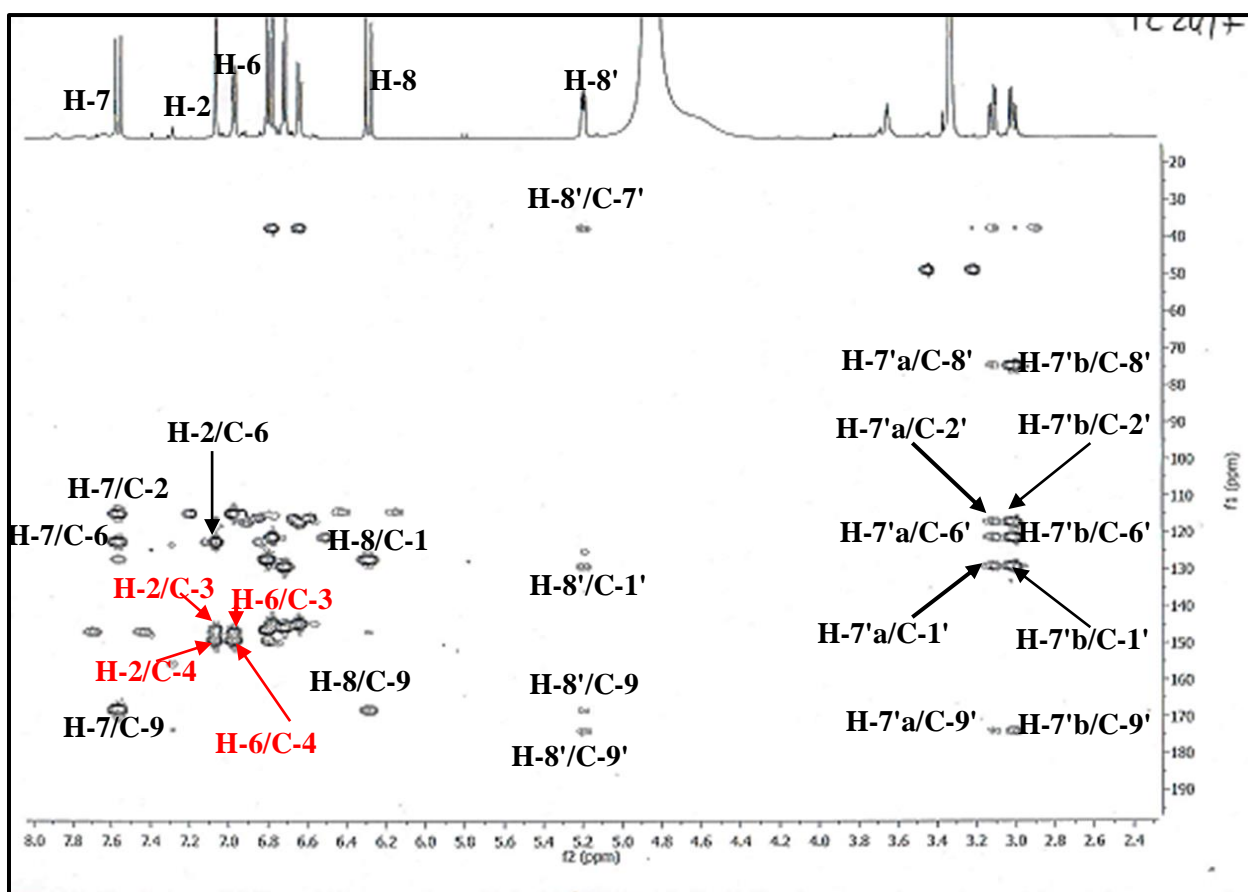
**Spectre III.22:** Spectre HSQC (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm) du composé TC/24/7.

Le spectre de l'expérience HMBC (spectre III.23) de ce produit également permis l'attribution des autres carbones quaternaires notamment :

- Les protons H-7' corrélient avec les carbones résonant à  $\delta_C = 174$  ppm et  $128.7$  ppm respectivement, ces deux carbones ne montrent aucune corrélation C-H dans l'expérience HSQC qui nous prouve que ce sont des carbones quaternaires, la valeur de déplacement chimique ( $\delta_C = 174$  ppm) montre que c'est un carbone d'une fonction acide C-9', et le deuxième c'est le carbone aromatique C-1'.
- Ces deux protons montrent des tâches de corrélation avec les carbones résonants à  $\delta_C = 117.2$  et  $122.5$  ppm, ce sont les carbones C-6' et C-2' respectivement. Les protons de ces deux derniers carbones corrélient avec un carbone à  $\delta_C = 145.1$  ppm et avec un autre carbone à  $\delta_C = 146$  ppm qui confirme leur hydroxylation et leur attribution à C4' et C3' respectivement.



- Le proton oléfinique H-7 corrèle avec les deux atomes de carbone C-2 à  $\delta_C$  114.8 ppm et C-6 à  $\delta_C$  122.8 ppm permettant ainsi de relier la double liaison au noyau aromatique. il corrèle aussi avec un carbone résonant à  $\delta_C = 168.7$  ppm, qui devrait être un carbonyle d'une fonction ester C-9.
- Le deuxième proton oléfinique H-8 résonant à  $\delta_H = 6.27$  ppm corrèle avec le carbone C-9 ( $\delta_C = 168.7$  ppm) et un carbone quaternaire résonant à  $\delta_C = 127.2$  ppm, ne peut être le carbone aromatique C-1.
- Des tâches de corrélation sont observées entre le proton H-8' et les carbones C-7', C-9 et C-1' respectivement ( $\delta_C = 37, 168.7$  et  $128.7$  ppm). Il corrèle également avec le carbonyle à  $\delta_C$  174 ppm ce qui confirme que le carbonyle est un acide carboxylique.
- Les protons H-2 et H-6 corrélient avec les carbones aromatiques quaternaires résonants à  $\delta_C = 147.8$  et  $149.9$  ppm, ce indique que sont les carbones qui portent les fonctions hydroxyl OH, C-3 et C-4 respectivement.



Spectre III.23: Spectre HMBC (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm) du composé TC/24/7.

A la lumière de toutes ses données spectrales, et par leurs comparaison à celles de la littérature [8], nous avons pu établir la structure du composé **TC/24/7**, il s'agit de l'**acide rosmarinique**. Il a été isolé pour la première fois à l'état pur par deux chimistes italiens, Scarpati et Oriente, en 1958 [8-10]. Son nom provient du nom de la plante à partir de laquelle il a été isolé, le romarin (*Rosmarinus Officinalis*).

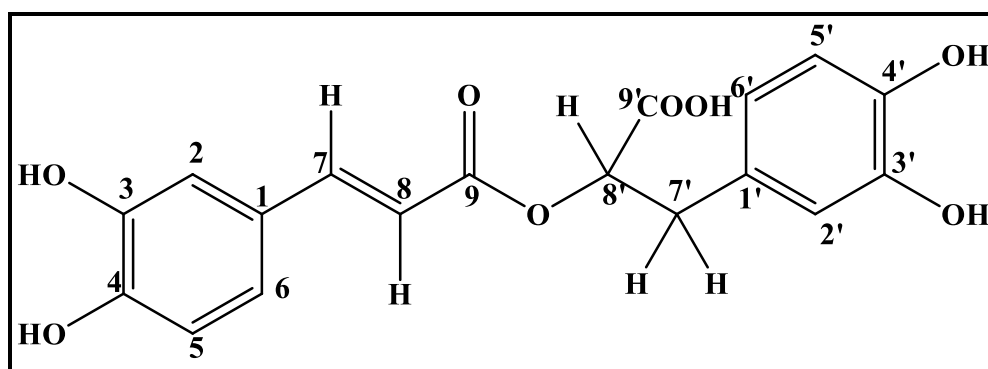
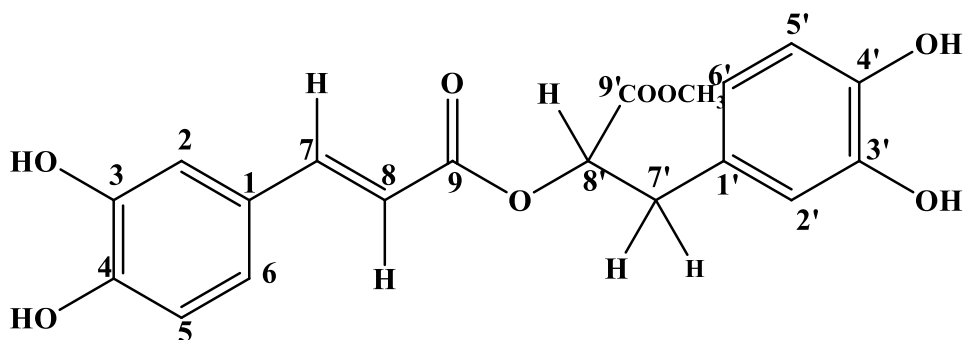


Figure III.5: Structure du composé **TC/24/7** l'acide rosmarinique.

Tableau III.7: Données de la spectrométrie RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  du composé **TC/24/7**.

Position	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$J$ (Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
1	-	-	127.2
2	7.05	d (2.0)	114.8
3	-	-	147.8
4	-	-	149.9
5	6.77	d (8.2)	116.1
6	6.96	dd (8.2 ; 2.0)	122.8
7	7.56	d (15.9)	147.5
8	6.28	d (15.9)	113.7
9	-	-	168.7
1'	-	-	128.7
2	6.8	d (2.4)	117.2
3'	-	-	146
4'	-	-	145.1
5'	6.71	d (8.1)	116
6'	6.63	dd (8.2 ; 2.1)	121.5
H-7'a	3.04	dd (14.4 ; 8.5)	37.1
H-7'b	3.14	dd (14.4 ; 4.2)	37.1
8'	5.19	dd (8.1 ; 4.2)	74.2
9'	-	-	174

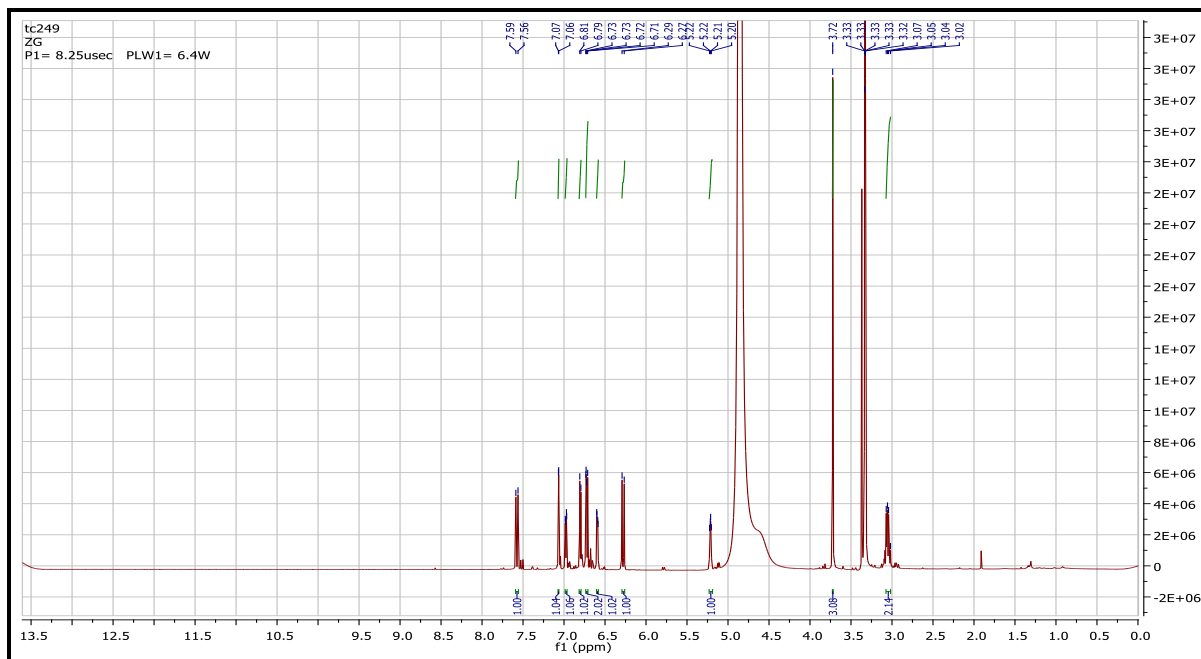
## III.1.6. Détermination structurale du composé TC/24/9 :



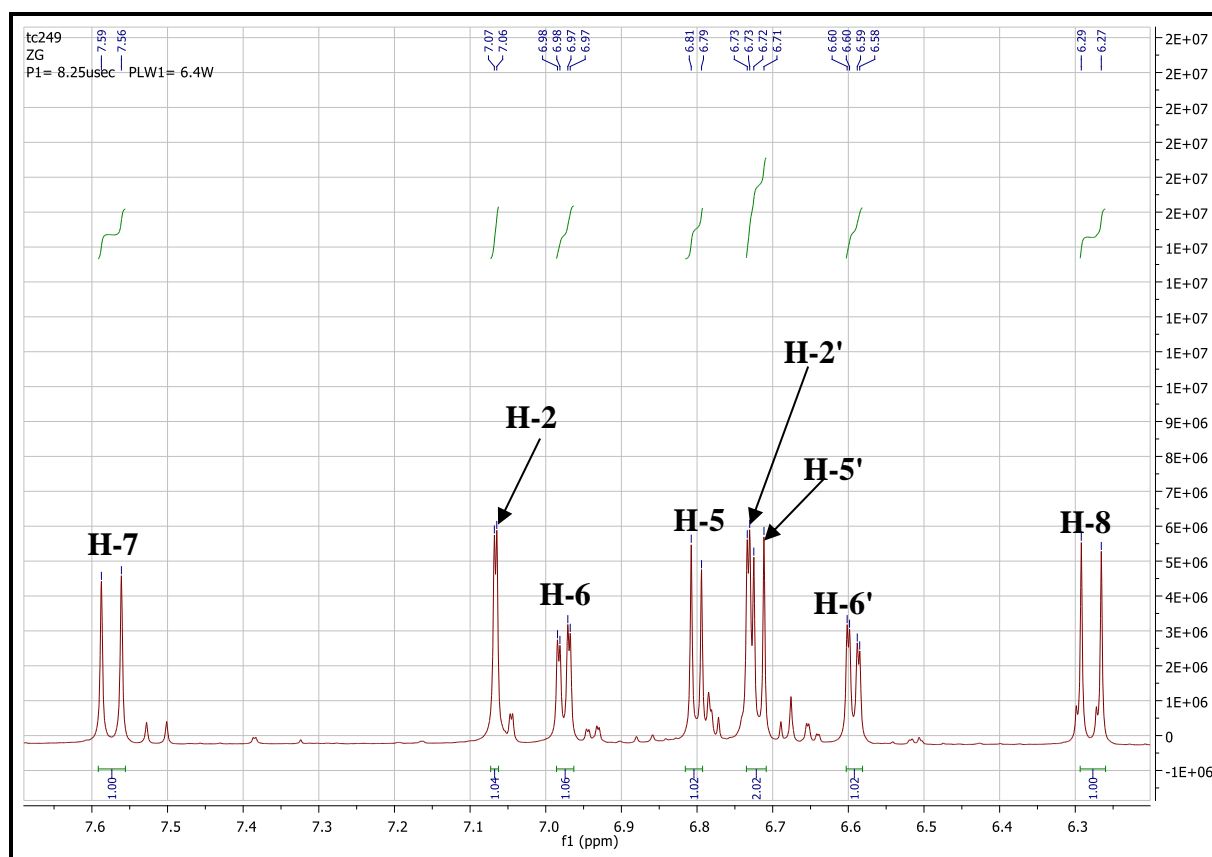
Le spectre RMN  $^1\text{H}$  (spectre III.24) et ses étalements (spectre III.25), (spectre III.26) montre la présence de deux noyaux aromatiques, 2 protons oléfiniques en position trans correspondant à une partie caféique et un méthoxyle. Le spectre proton de ce composé est en tout point similaire à celui du composé **TC/24/7** mis à part un signal supplémentaire sous forme de singulet (3H) à  $\delta_{\text{H}}$  3,72 ppm. Il s'agit donc de l'acide rosmarinique méthyle ester.

Les signaux caractéristiques sont les suivantes :

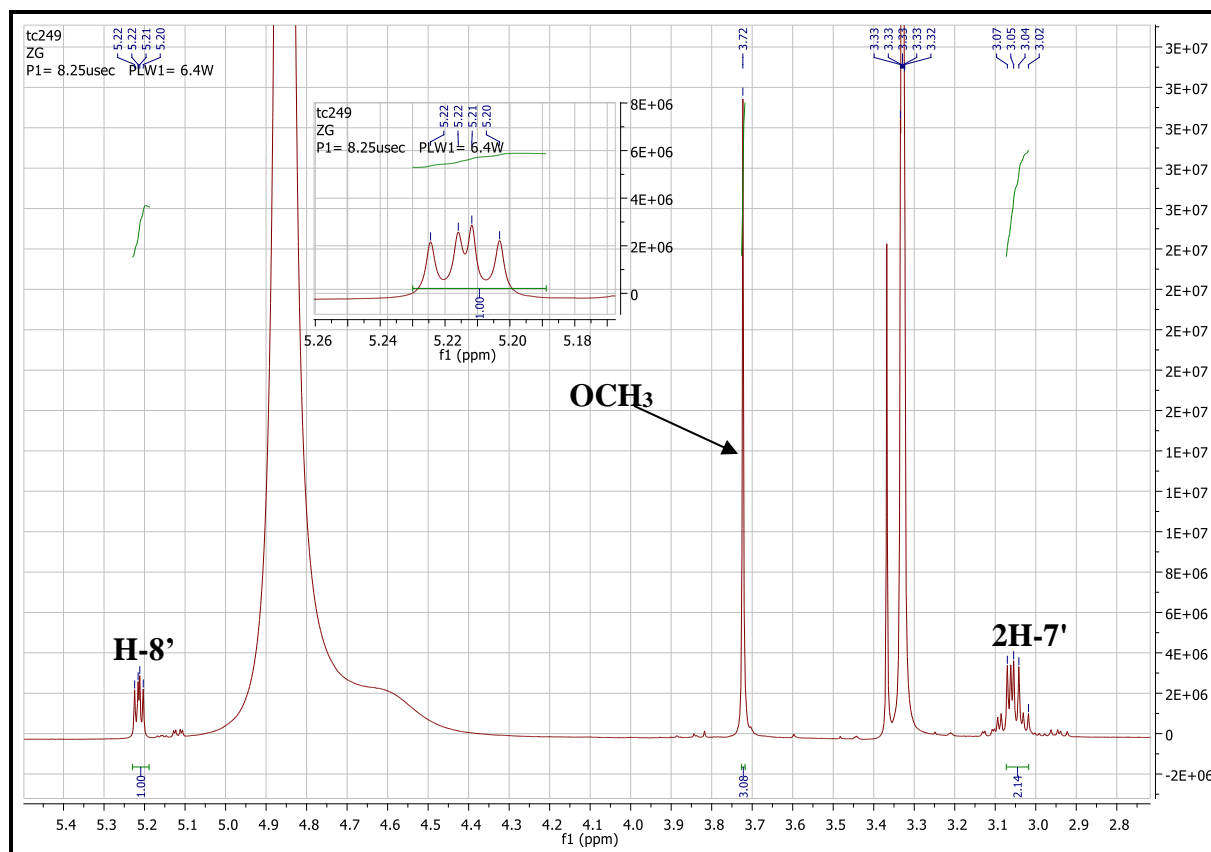
- ❖ Deux signaux sous forme de doublet à  $\delta_{\text{H}} = 6.29$  ppm et  $\delta_{\text{H}} = 7.56$  ppm ( $J = 15.9$  Hz) attribuable à H-8 et H-7 respectivement.
- ❖ Un doublet à  $\delta_{\text{H}} = 7.07$  ppm ( $J = 2$  Hz) et un doublet de doublets à  $\delta_{\text{H}} = 6.98$  ppm ( $J = 8.2 ; 2$  Hz) et un doublet à  $\delta_{\text{H}} = 6.81$  ppm ( $J = 8.2$  Hz) respectivement attribués aux protons H-2, H-6 et H-5 du premier noyau aromatique correspondant à la partie caféique.
- ❖ Un signal sous forme d'un doublet résonant à  $\delta_{\text{H}} = 6.73$  ppm ( $J = 2$  Hz) et un doublet à  $\delta_{\text{H}} = 6.71$  ppm ( $J = 8$  Hz) et un doublet de doublets à  $\delta_{\text{H}} = 6.59$  ppm ( $J = 8 ; 2$  Hz) respectivement attribués aux protons H-2', H-5' et H-6' du deuxième noyau aromatique.
- ❖ Un signal sous forme de doublet de doublets d'intégration 1H 5.22 ppm ( $J = 7.8 ; 5.2$  Hz) attribuable à H-8'.
- ❖ Un signal sous forme de singulet d'intégration 3H à 3,72 ppm attribuable à un méthoxyle d'ester.
- ❖ Un signal sous forme de multiplet d'intégration 2H à 3.04 ppm, attribuables aux 2H-7'.



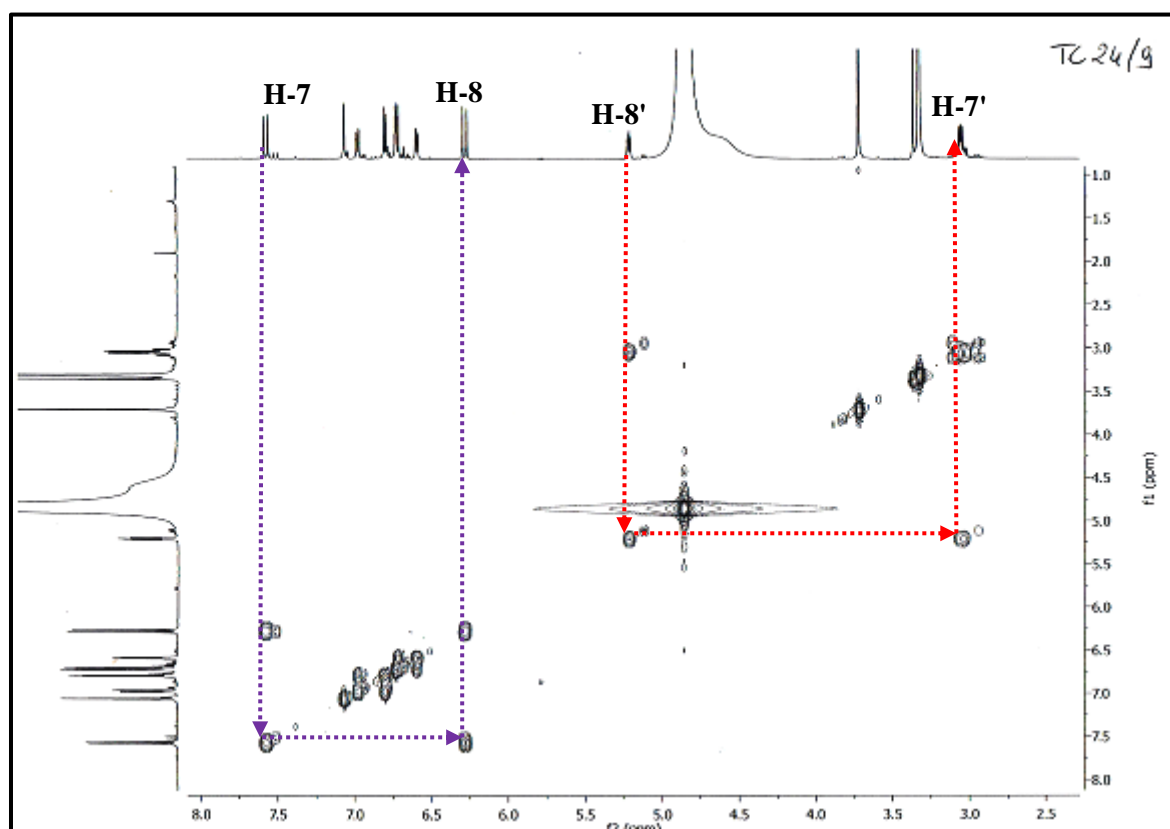
Spectre III.24: Spectre de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm) du composé TC/24/9.



Spectre III.25: Spectre de RMN  $^1\text{H}$  étalé (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm) du composé TC/24/9.



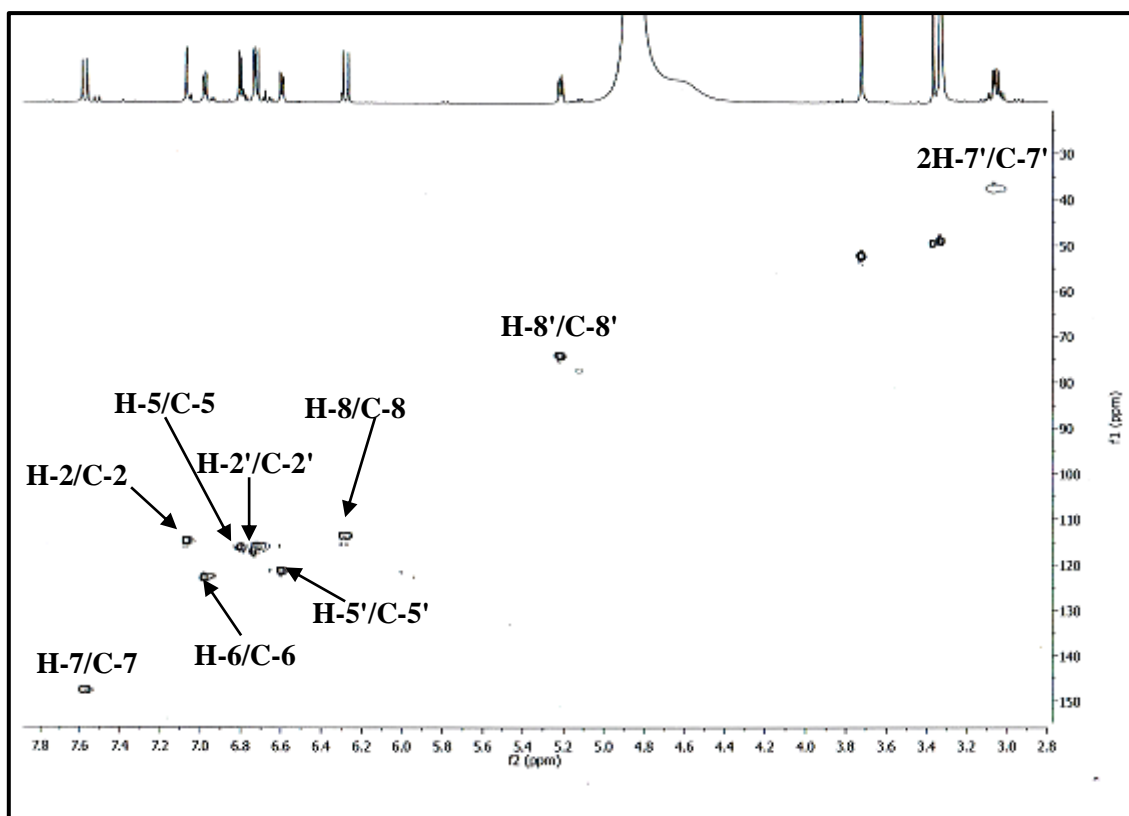
Spectre III.26: Spectre de RMN  $^1\text{H}$  étalé (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm) du composé TC/24/9.



Spectre III.27: Spectre COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm) du composé TC/24/9.

L'examen du spectre HSQC (spectre III.28) permet de localiser :

- ✚ Le carbone du methoxyle OCH<sub>3</sub> à  $\delta_C$  52.31 ppm.
- ✚ les carbones C<sub>2</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>5</sub> et C<sub>2'</sub>, C<sub>6'</sub>, C<sub>5'</sub> à  $\delta_C$  (114.88 ; 122.9 ; 116.3 et 117.23 ; 121.72 ; 116.51) ppm respectivement.
- ✚ Les carbones du groupement éthylénique CH=CH à  $\delta_C$  (147.8 et 1113.85) ppm attribuable aux carbones C-7 et C-78.
- ✚ Les carbones des groupements CH<sub>2</sub> et CHO à  $\delta_C$  (37.65 et 74.62) ppm attribuable aux carbones C-7' et C-8'.

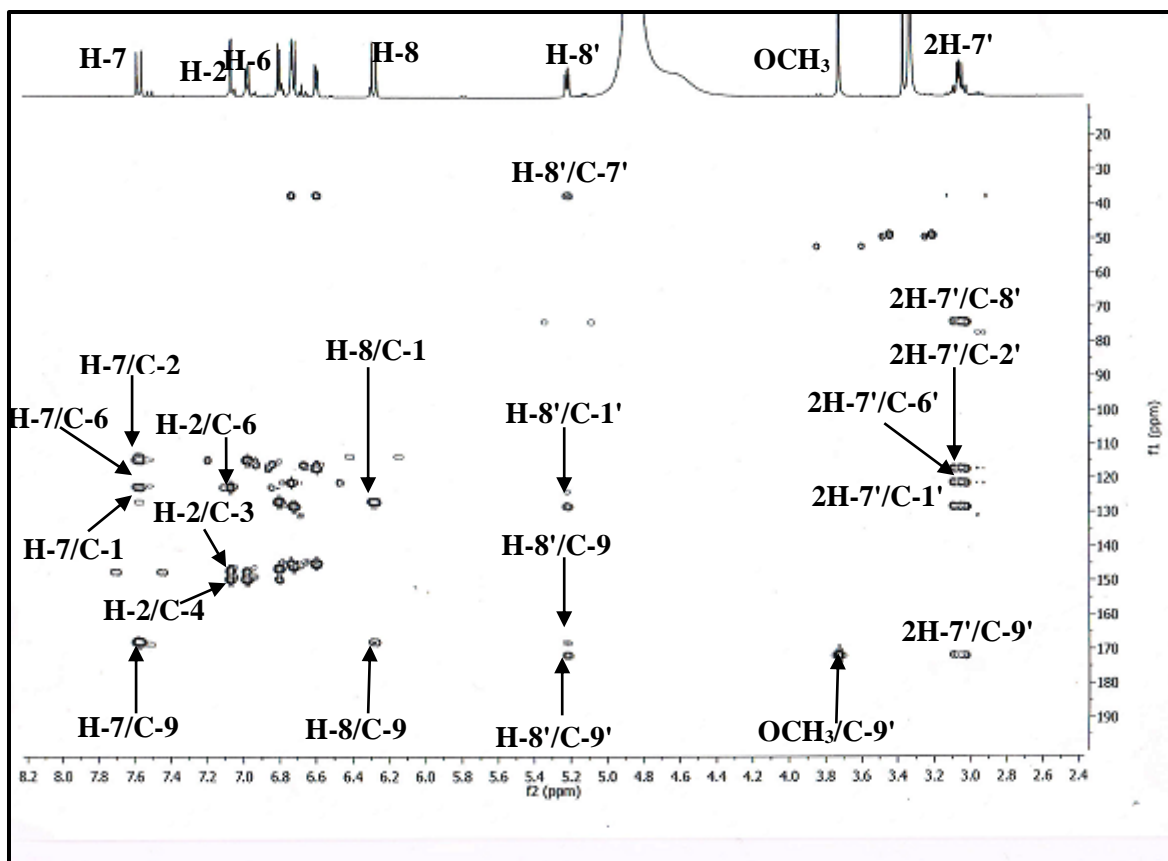


**Spectre III.28:** Spectre HSQC (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm) du composé **TC/24/9**.

La corrélation observée sur le spectre HMBC (spectre III.29) entre les trois protons du groupement methoxyle et le carbone C-9' ( $\delta_C$  =172 ppm).Ce qui indique la substitution de l'hydrogène du carbonyle par un méthyle.

Les deux protons H<sub>2</sub>-7' corèlent avec le carbone C-8' à  $\delta_C$  =74.62 ppm et C-9' à 172 ppm et les deux carbones aromatiques C-2' à  $\delta_C$  117.23ppm et C-6' à  $\delta_C$  121.72ppm.

Le reste est identique point par point au composé **TC/24/7**



Spectre III.29: Spectre HMBC (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) du composé TC/24/9.

La structure du composé TC/24/9 est donc établie comme étant le rosmarinat de méthyle (acide rosmarinique méthyle ester) ou 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-hydroxypropanoic acide 2-*O*-(3,4-dihydroxyphenyl- *2E*-cinnamoyl) méthyle ester. Ce composé est connu, il a été isolé pour la première fois dans l'espèce *Rosmarinus officinalis* [8-10]. Ce composé est décrit dans le genre *Thymus* et d'autres genres de la famille des Lamiaceae, tels que : *Salvia bowleyana* [11], *Salvia miltiorrhiza* [12] et *Thymus serpyllum* [13].

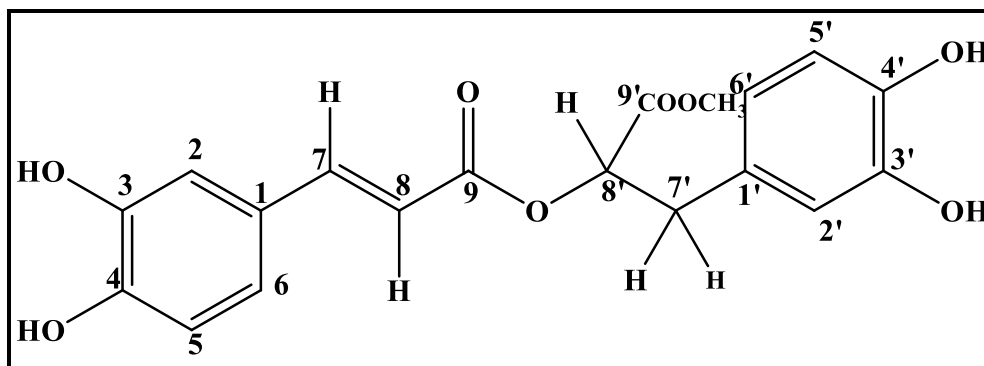
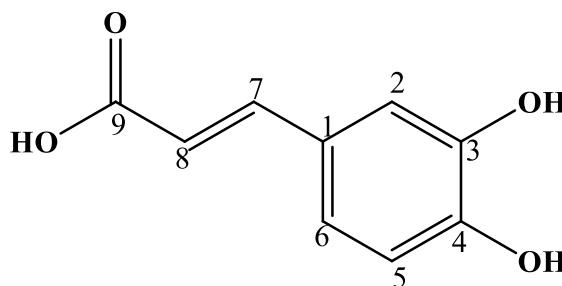


Figure III.6: Structure du composé TC/24/7 l'acide rosmarinique méthyle ester.

Tableau III.8: Données de la spectrométrie RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  du composé TC/24/9.

Position	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$J$ (Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
1	-	-	127.2
2	7.07	d (2.0)	114.88
3	-	-	147.9
4	-	-	149.9
5	6.81	d (8.2)	116.3
6	6.98	dd (8.2 ; 2.0)	122.9
7	7.56	d (15.9)	147.8
8	6.28	d (15.9)	113.85
9	-	-	168.56
1'	-	-	128.84
2'	6.73	d(2)	117.23
3'	-	-	146.22
4'	-	-	145.3
5'	6.71	d (8.1)	116.51
6'	6.59	dd (8.2 ; 2)	121.72
2H-7'	3.04	m	37.65
8'	5.18	dd (8.1 ; 4.2)	74.62
9'	-	-	172
OCH <sub>3</sub>	3.72	-	52.3

### III.1.7. Détermination structurale du composé TC/22/8 :

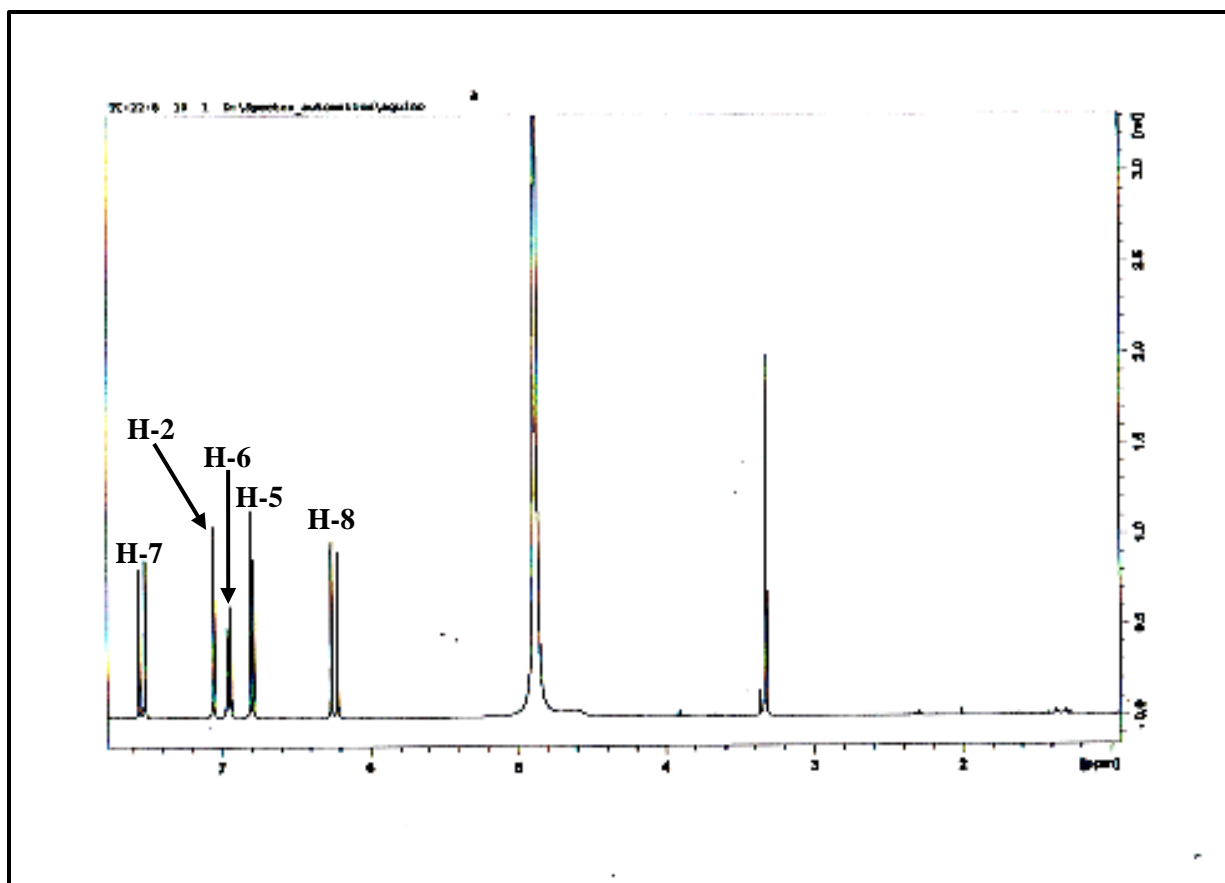


Le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Spectre III.30) indique la présence d'un noyau aromatique trisubstitué, dont les trois protons aromatiques raisonnent sous forme de :

- ✚ Un doublet de doublets d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} = 6.95$  ppm ( $J = 8 ; 1.9$  Hz)
- ✚ Un doublet d'intensité 1H à  $\delta_{\text{H}} = 6.8$  ppm ( $J = 8$  Hz).
- ✚ Un doublet d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} = 7.05$  ppm ( $J = 1.9$  Hz).

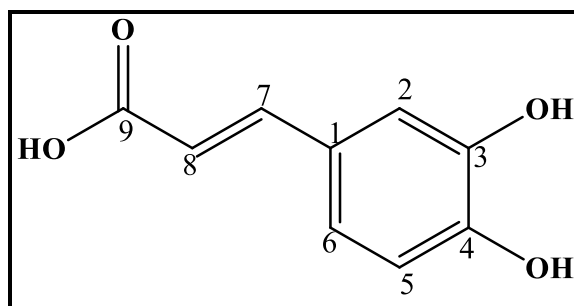
Le spectre (spectre III.30) montre également la présence de deux doublets intégrant chacun pour 1H à  $\delta_{\text{H}} = 7.58$  ppm ( $J = 15.9$  Hz) et  $\delta_{\text{H}} = 6.24$  ppm ( $J = 15.9$  Hz). Les valeurs des déplacements chimiques de ces deux protons et la valeur de leur constante de couplage ( $J = 15.9$  Hz) sont caractérisés d'une double liaison de configuration trans.





**Spctre III.30:** Spectre de RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm) du composé **TC/22/8**.

L'ensemble de cette analyse et par comparaison avec les données de la littérature montre qu'il s'agit de l'acide caféique.



**Figure III.7:** Structure du composé **TC/24/7** acide caféique.

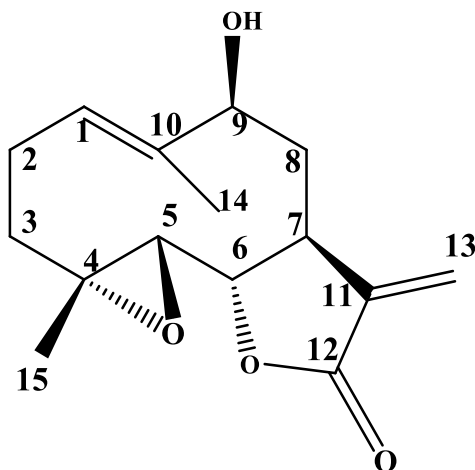
**Tableau III.9:** Données de la spectrométrie RMN  $^1\text{H}$  du composé **TC/22/8**.

$\delta$ (ppm)	Intégration	Multiplicité $J(\text{Hz})$	Attribution
6.8	1-H	d (8.0)	H-5
6.95	1-H	dd (8.0 ; 1.9)	H-6
7.05	1-H	d (1.9)	H-2
6.24	1-H	d (15.9)	H-8
7.58	1-H	d (15.9)	H-7

## III.2. Identification structurale des composés isolés de l'espèce *A. grageolens* :

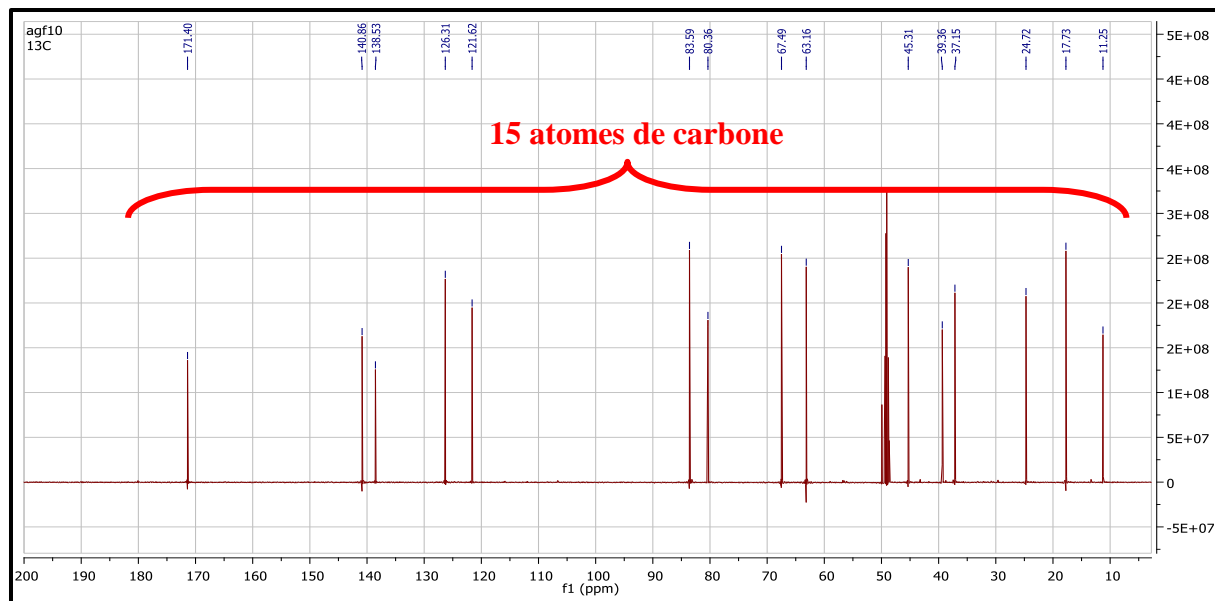
### III.2.1. Identification des produits isolés de la phase acétate d'éthyle :

#### III.2.1.1. Détermination structurale du composé Ag f10 :

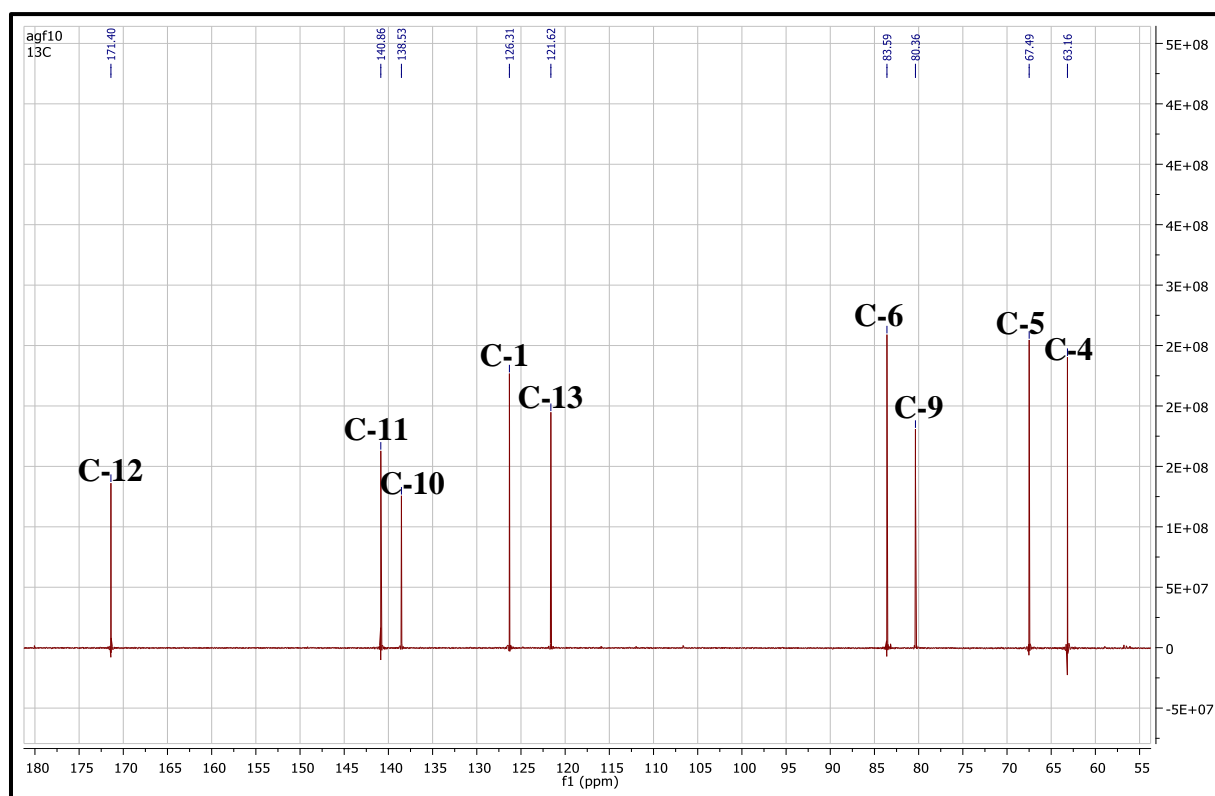


L'examen des spectres de RMN<sup>13</sup>C (Spectre III.31) et HSQC montre la présence de quinze atomes de carbone orientant vers un squelette de type sesquiterpène lactone. Ces quinze atomes de carbone peuvent être répartis comme suit :

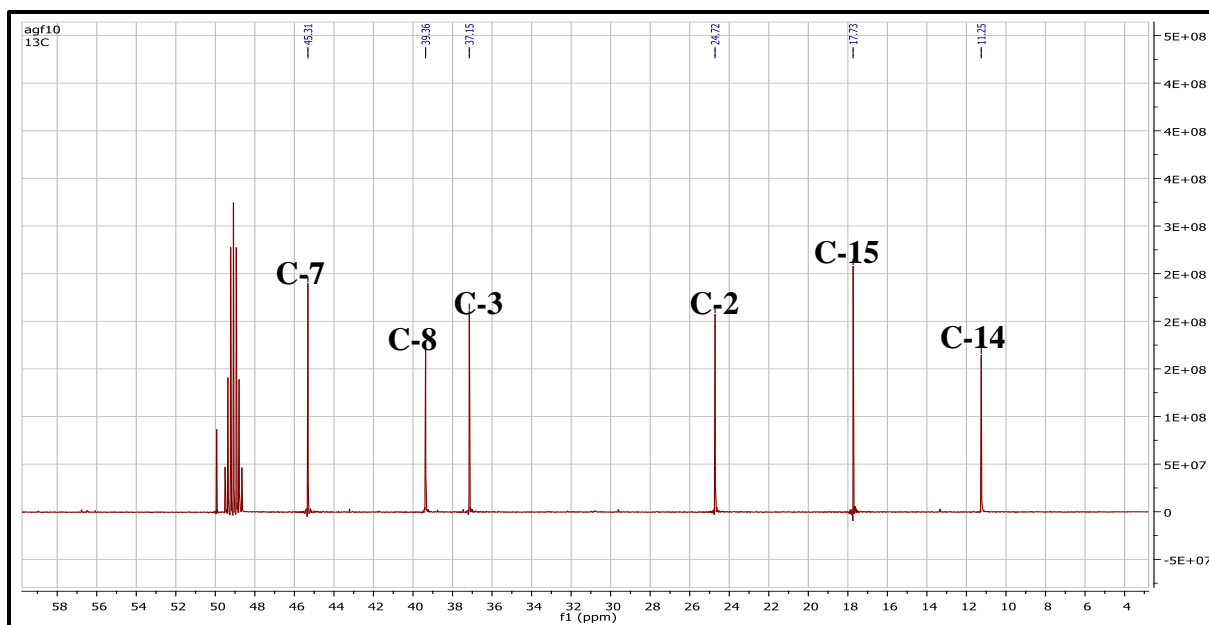
- Deux groupements méthyle à  $\delta_C = 11.25$  ;  $17.73$  ppm.
- Quatre groupements CH<sub>2</sub> dont :
  - 3 CH<sub>2</sub> non oxygénés à  $\delta_C = 24.72$  ;  $37.15$  ;  $39.36$  ppm.
  - 1 éthylénique à  $\delta_C = 121.62$  ppm.
- Cinq groupements CH dont :
  - 1 CH éthylénique à  $\delta_C = 126.31$  ppm.
  - 3 CH oxygénés à  $\delta_C = 67.49$  ;  $80.36$  et  $83.59$  ppm. Le déplacement chimique de ce dernier est caractéristique d'un CH de fermeture d'une lactone sesquiterpénique.
  - 1 CH non oxygénés à  $\delta_C = 45.31$  ppm.
- Quatre carbones quaternaires dont :
  - 1C à  $\delta = 171.40$  ppm caractéristique d'un carbonyle d'une  $\gamma$ -lactone sesquiterpénique  $\alpha,\beta$ -insaturée.
  - Deux Cq à  $\delta_C = 140.86$  et  $138.53$  ppm attribuables à deux carbones éthyléniques.
  - 1Cq à  $\delta_C = 63.16$  ppm attribuable à un carbone oxygéné.



Spectre III.31: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé Ag f10.

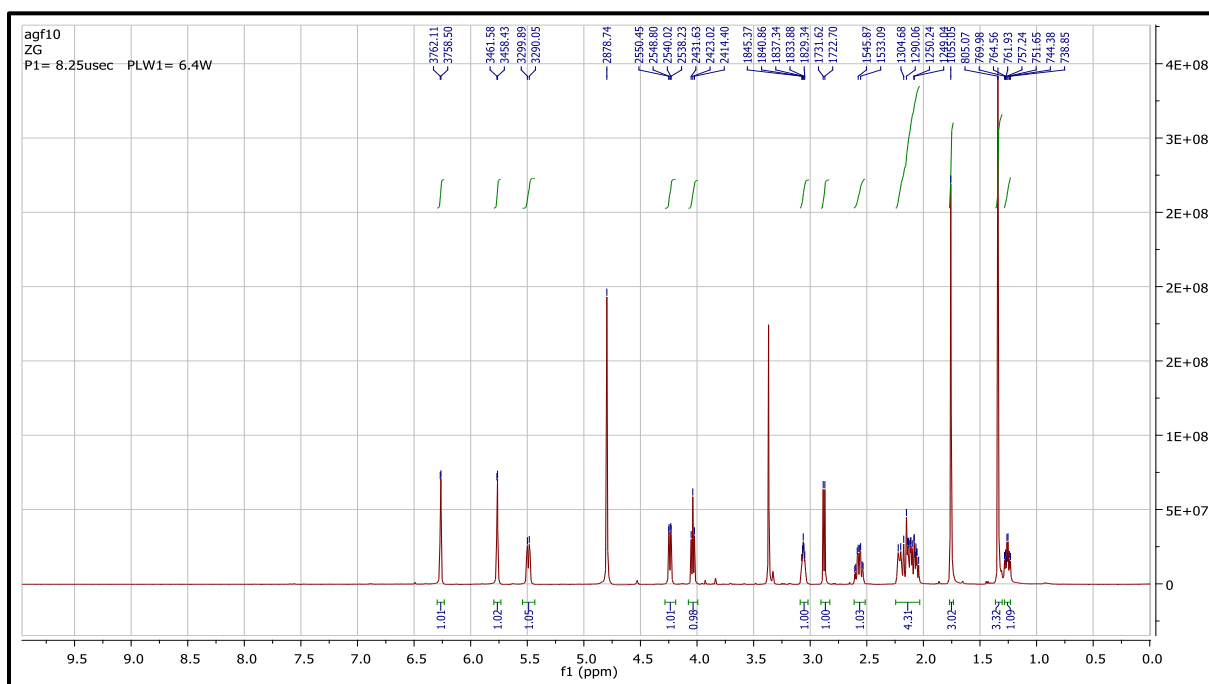


Spectre III.32: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé Ag f10 (étalement).

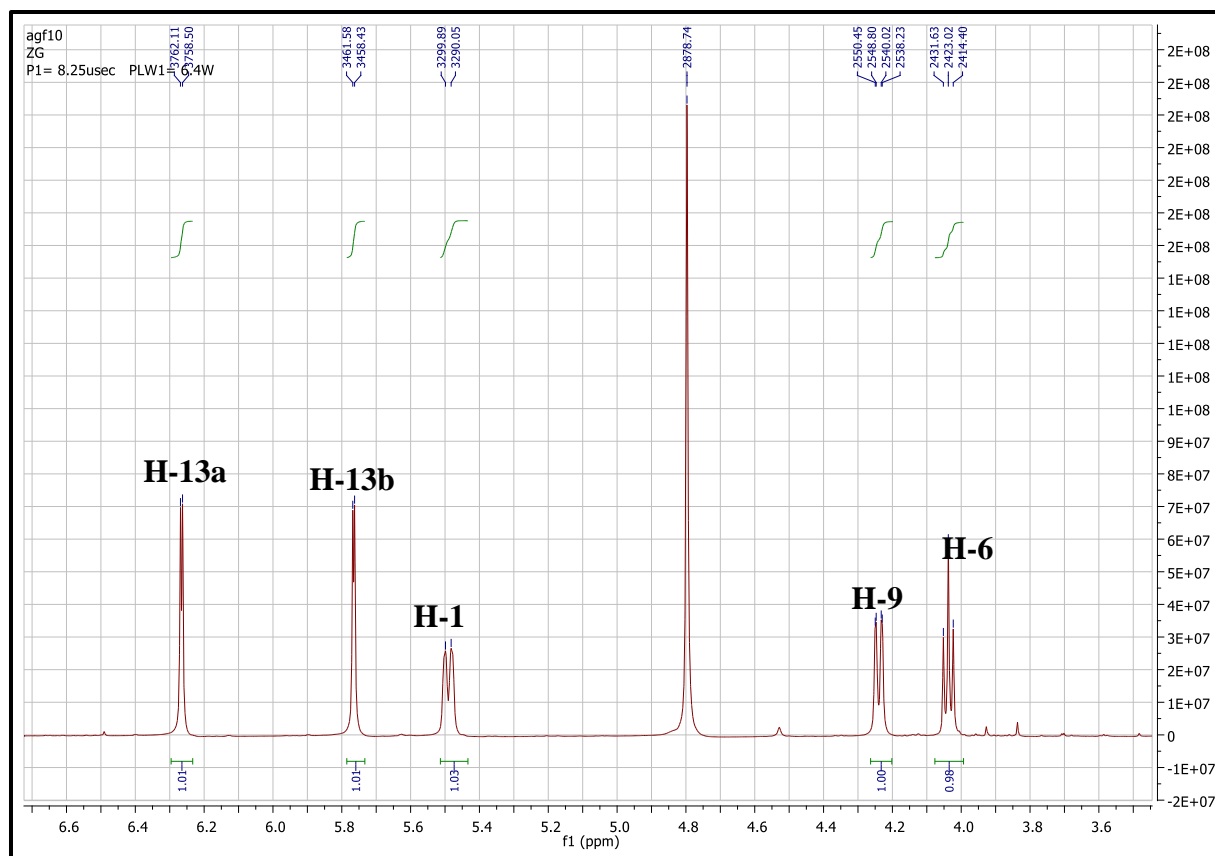


**Spectre III.33:** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  étalé (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé **Ag f10**.

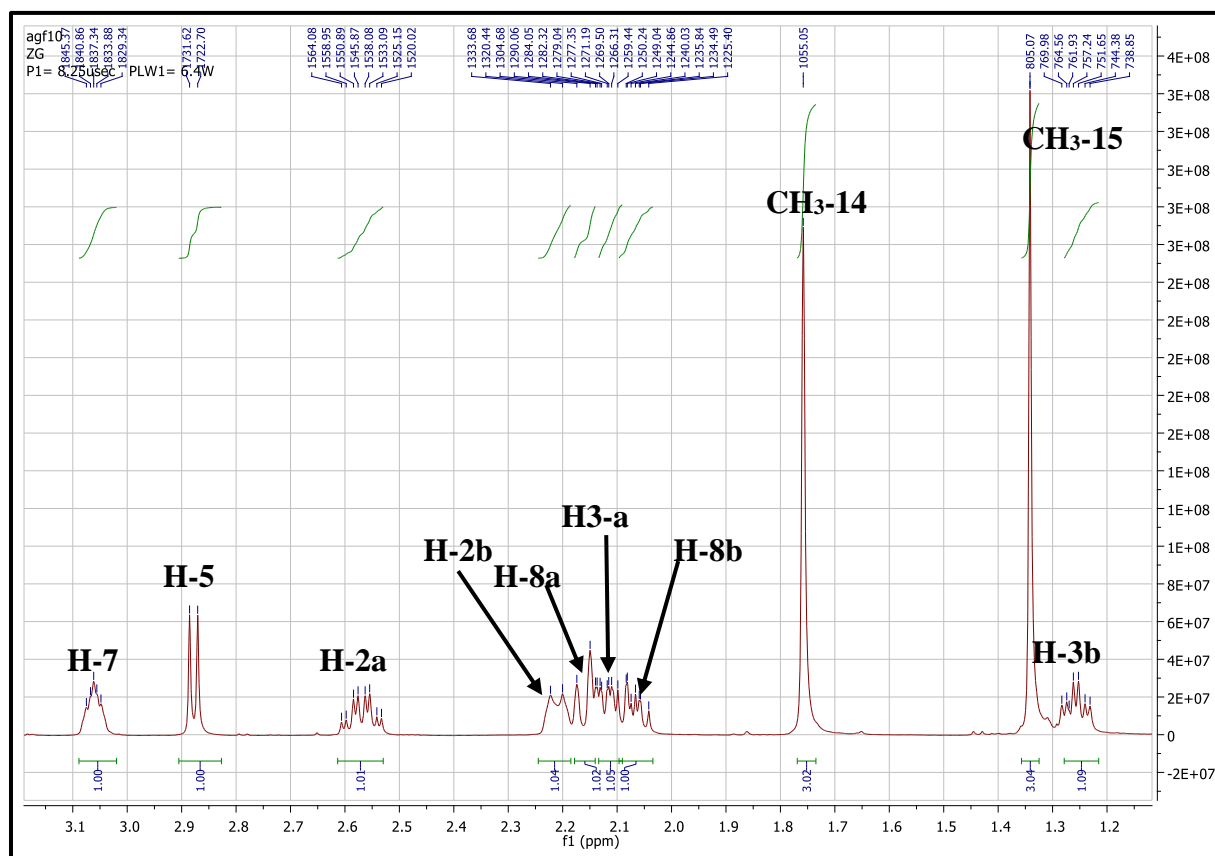
L'examen du spectre RMN  $^1\text{H}$  (Spectre III.35) montre la présence de deux doublets d'intégration 1H chacun à  $\delta_{\text{H}}$  6.26 ( $J = 3.6$  Hz) et  $\delta_{\text{H}}$  5.76 ppm ( $J = 3.1$  Hz) montrant un couplage allylique caractéristique d'un groupement exométhylène conjugué avec le carbonyle d'une lactone sesquiterpénique correspondants aux protons H-13a et H-13b. Ces deux protons corrélant avec le même carbone qui apparaît à  $\delta_{\text{C}} = 122.62$  ppm sur le spectre HSQC, cette observation confirme que ces deux protons sont portés par le même carbone éthylénique (C-13).



**Spectre III.34 :** spectre RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz,  $\delta$  ppm) du composé **Ag f10**.



Spectre III.35 : spectre RMN  $^1\text{H}$  étalé ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz,  $\delta$  ppm) du composé Ag f10.



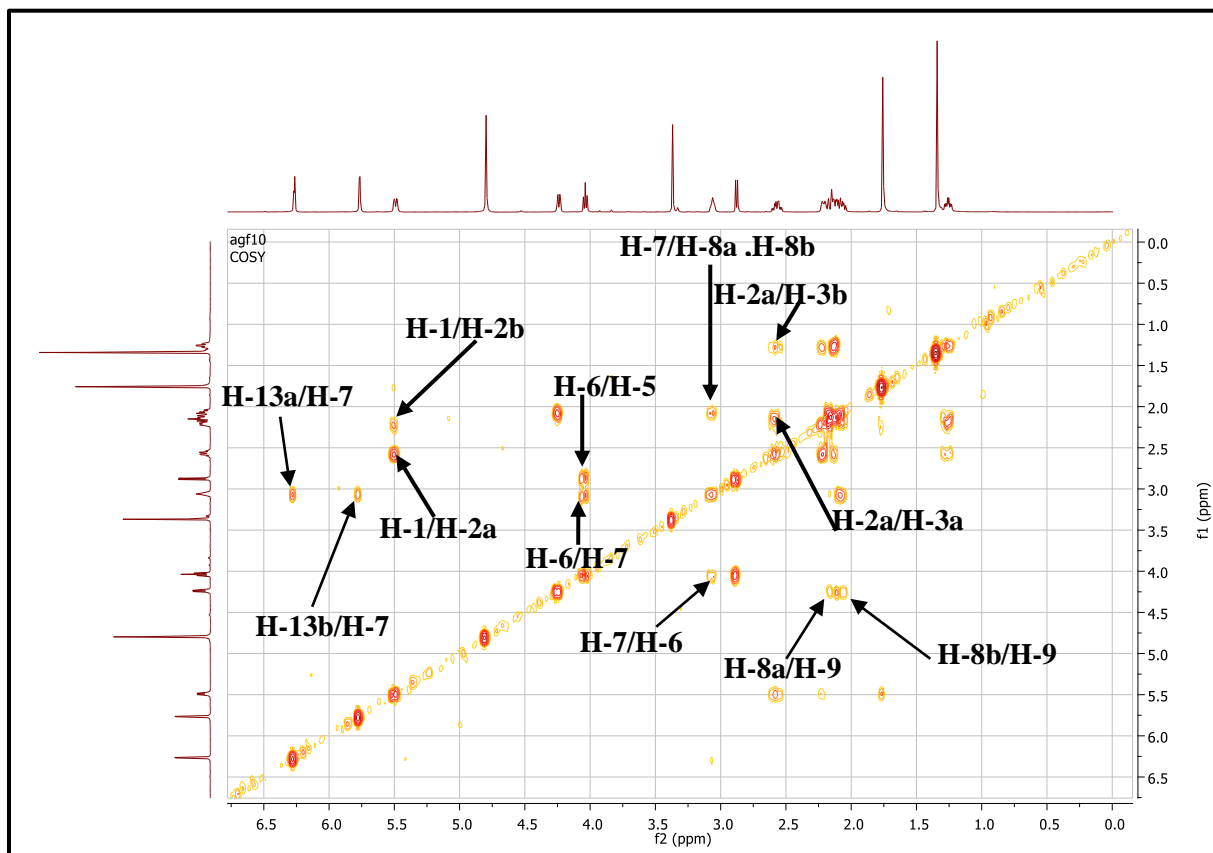
Spectre III.36 : spectre RMN  $^1\text{H}$  étalé ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz,  $\delta$  ppm) du composé Ag f10.

Le signal à  $\delta_H$  3.06 ppm sous forme d'un multiplet est attribuable au proton H-7 grâce à sa corrélation avec les deux protons H-13a et H-13b sur le spectre COSY ( $^1H$ - $^1H$ ) (Spectre III.37). Ce noyau corrèle également avec trois autres protons, la première avec un proton dont le signal apparaît sous forme d'un triplet à  $\delta_H$  4.05 ppm ( $t$ ;  $J=8.6$  Hz). D'après sa multiplicité et son déplacement chimique, ce noyau ne peut être que H-6.

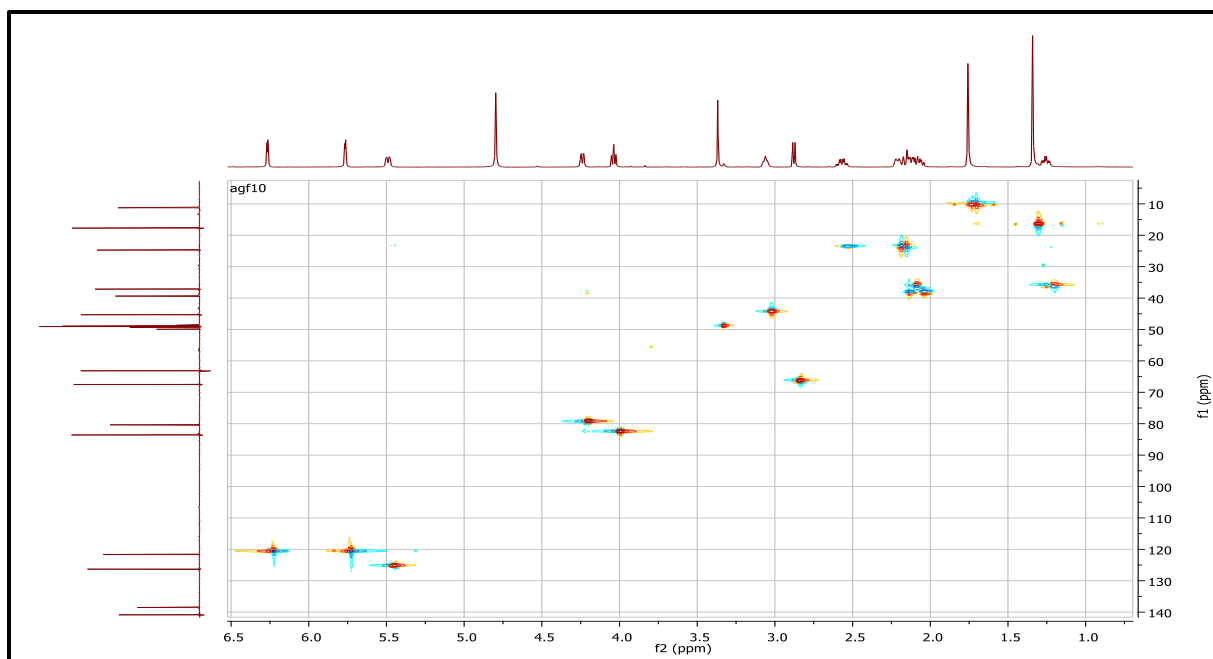
L'examen du spectre HSQC (spectre III.39) montre une corrélation entre le H-6 et le carbone du groupement CH à  $\delta_C = 83.59$  ppm, caractéristique du point de fermeture de la lactone sesquiterpénique, ce qui mène à une lactone fermée en C-6.

Les deux autres taches de corrélations concernent deux protons portés par le même atome de carbone ( $\delta_C=39.36$  ppm) sur le spectre HSQC, les signaux de ces deux protons qui ne peuvent être que H-8b et H-8a apparaissent sous forme d'un multiplet à  $\delta_H$  2.08 ; 2.17 respectivement. Toujours sur le spectre COSY ( $^1H$ - $^1H$ ) (Spectre III.37) la localisation des protons en C-8 mène à celui de H-9 sous forme d'un doublet de doublet à  $\delta_H$  4.24 ppm ( $J=10.4$  ; 1.7Hz). Les valeurs des déplacements chimiques de ce proton et de son carbone ( $\delta_C= 80.36$  ppm) indiquent que cette position est oxygénée.

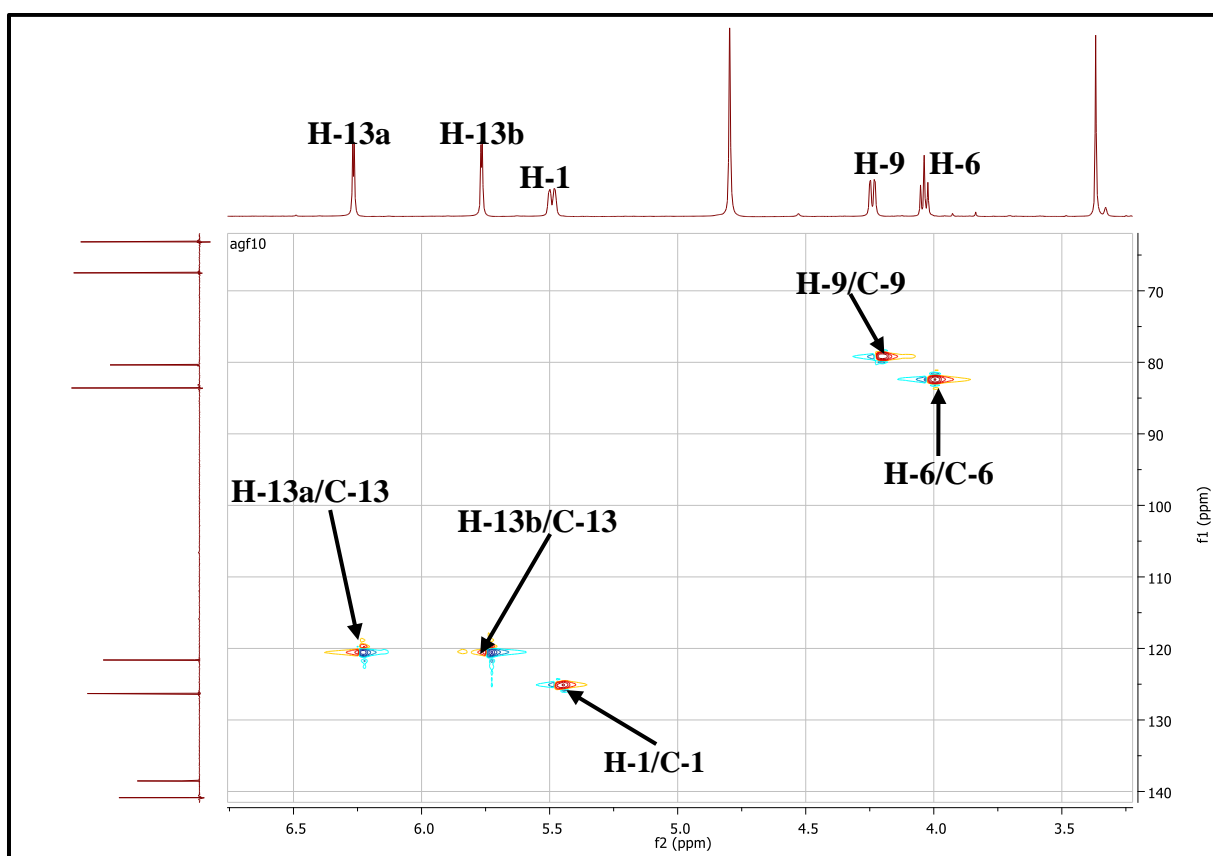
Vu que cette molécule ne comporte que 15 atomes de carbones, le C-9 doit être hydroxylé.



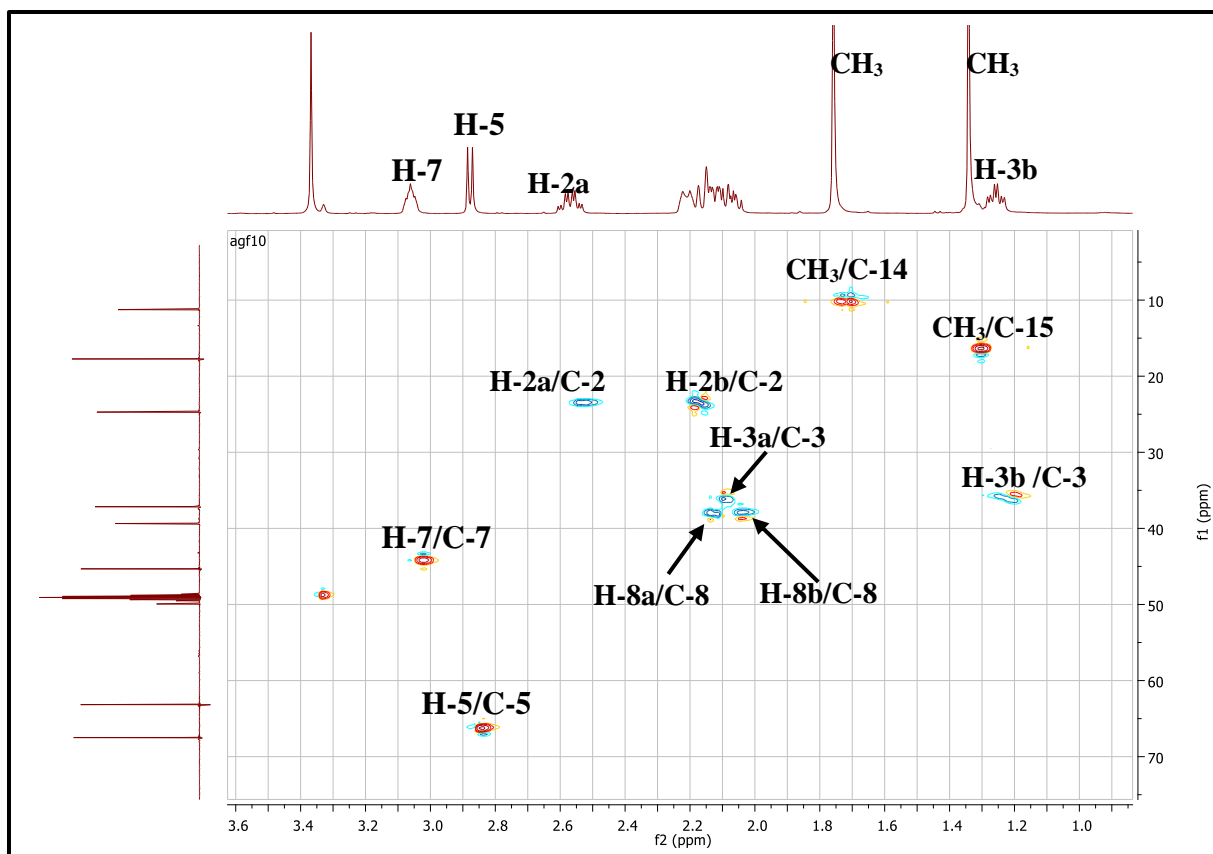
Spectre III.37 : Spectre COSY ( $^1H$ - $^1H$ ) ( $CDCl_3$ , 600 MHz,  $\delta$  ppm) du composé Agf10.



Spectre III.38 : Spectre HSQC (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz,  $\delta$  ppm) du composé Agf10.



Spectre III.39 : Spectre HSQC étalé (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz,  $\delta$  ppm) du composé Agf10.



**Spectre III.40** : Spectre HSQC étalé ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz,  $\delta$  ppm) du composé **Agf10**.

Le H-9 corrèle uniquement avec les 2H-8 ce qui signifie l'absence de protons sur le carbone C-10. L'examen du spectre HMBC et l'attribution du proton H-9 permet l'attribution du carbone C-10 au carbone quaternaire à  $\delta_{\text{C}}$  138.53 ppm et celui du C-14 au méthyle à  $\delta_{\text{C}}$  11.25 ppm ( $\delta_{\text{H}}$  1.77 ppm). La valeur du déplacement chimique de C-10, imposent la présence d'une double liaison entre C-10 et C-1. Le signal à  $\delta_{\text{H}}$  5.50 ppm est attribuable au proton H-1 grâce à sa corrélation avec le méthyle en C-14 sur le spectre HMBC.

Ainsi à ce stade de l'établissement de la structure du composé **Agf10**, la localisation du C-10 a permis de mettre en évidence un squelette sesquiterpénique comportant une double liaison entre C-10 – C-1, un groupement méthyle en C-10. Notre analyse indique que ce composé est de type germacranolide.

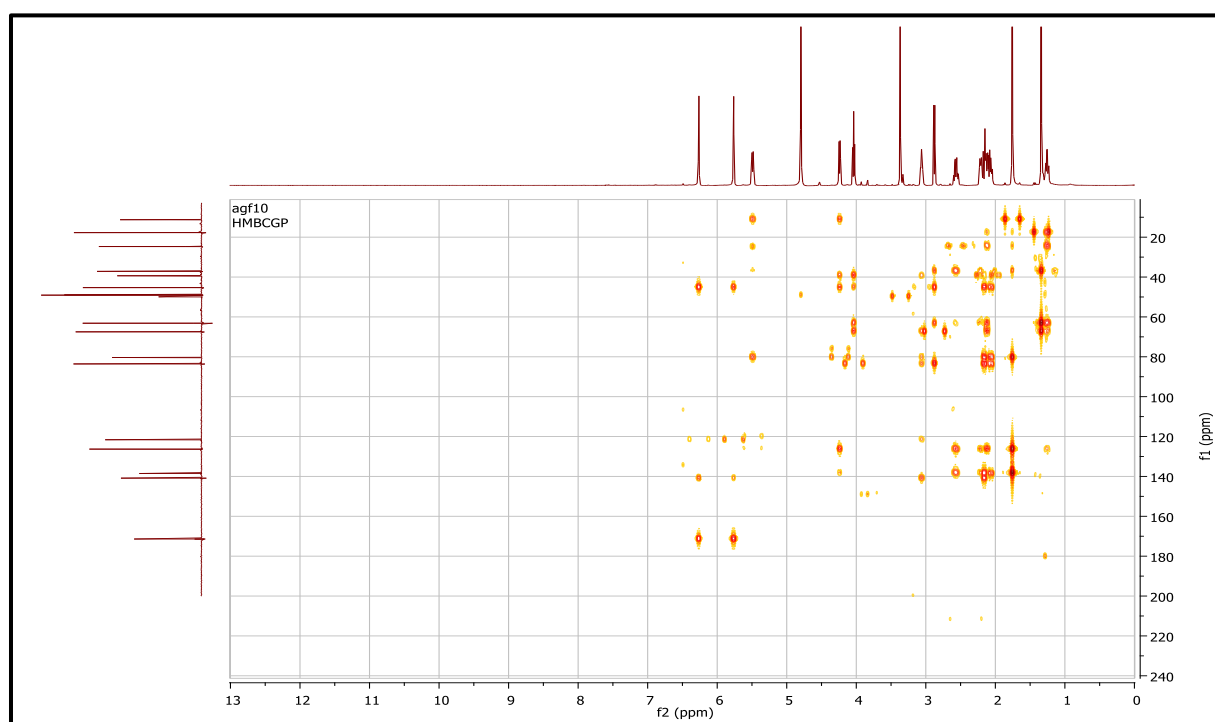
Un retour vers le spectre COSY (Spectre III.37), la localisation de H-1 mène à celle de H-2b à  $\delta = 2,22$  ppm et à celle de H-2a à  $\delta = 2,58$  ppm sous forme de deux multiplets, ces deux protons corrélant sur le spectre HSQC avec le même carbone à  $\delta_{\text{C}} = 24,72$  ppm (C-2). L'attribution de ces derniers noyaux mène à celle de H-3a et H-3b résonant sous forme de multiplets à  $\delta = 1,25$  et 2,13 ppm respectivement ( $\delta_{\text{C}} = 37,15$  ppm).



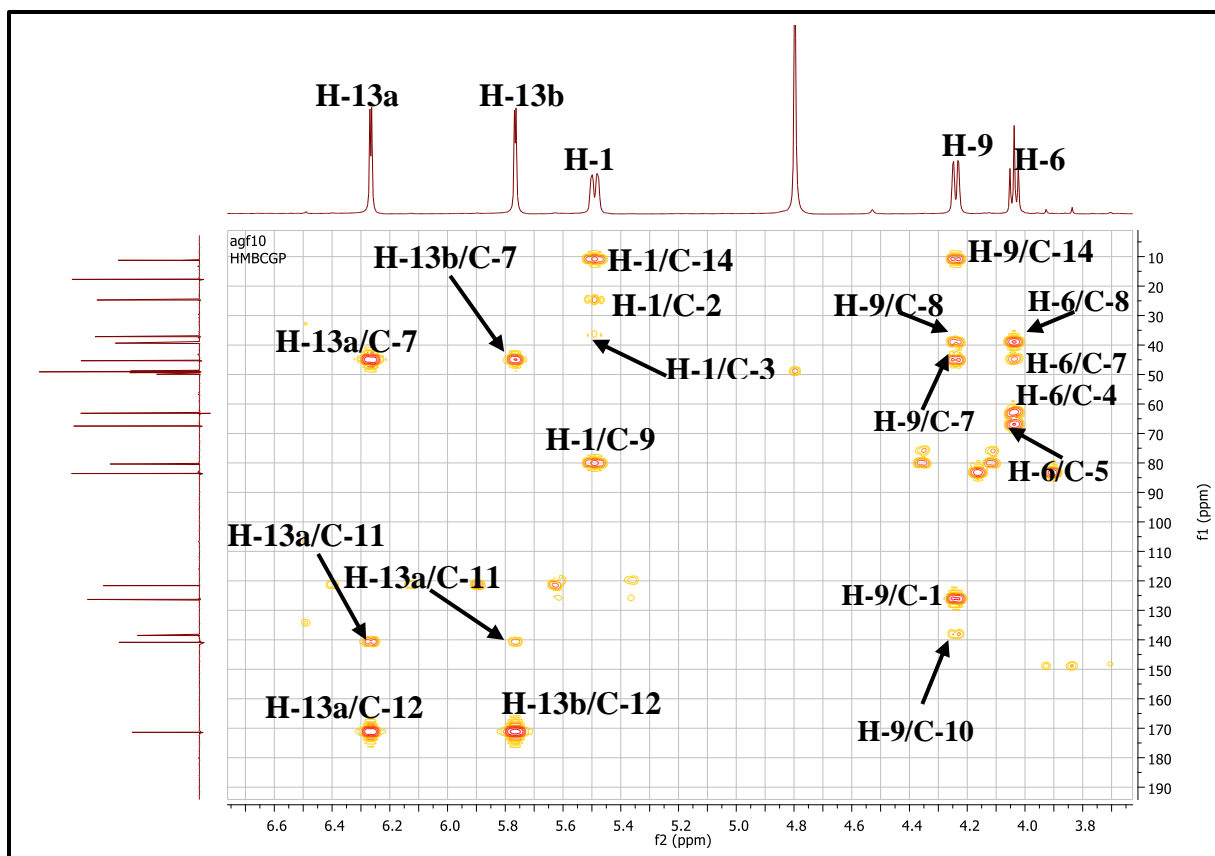
Par ailleurs et toujours sur le spectre COSY et l'attribution de H-6 mène à la localisation de H-5 sous forme d'un doublet à  $\delta_{\text{H}}=2.88$  ppm ( $J=8.9$  Hz),  $\delta_{\text{C}}=67.49$  ppm, la multiplicité de H-5 oriente vers un C-4 quaternaire.

Un examen approfondi du spectre HMBC, le proton H-5 montre une corrélation avec le carbone quaternaire à  $\delta_{\text{C}}$  63.16 ppm attribuable au C-4. Les valeurs des déplacements chimiques de C-4 et C-5, suggèrent une fonction époxyde dans ces positions.

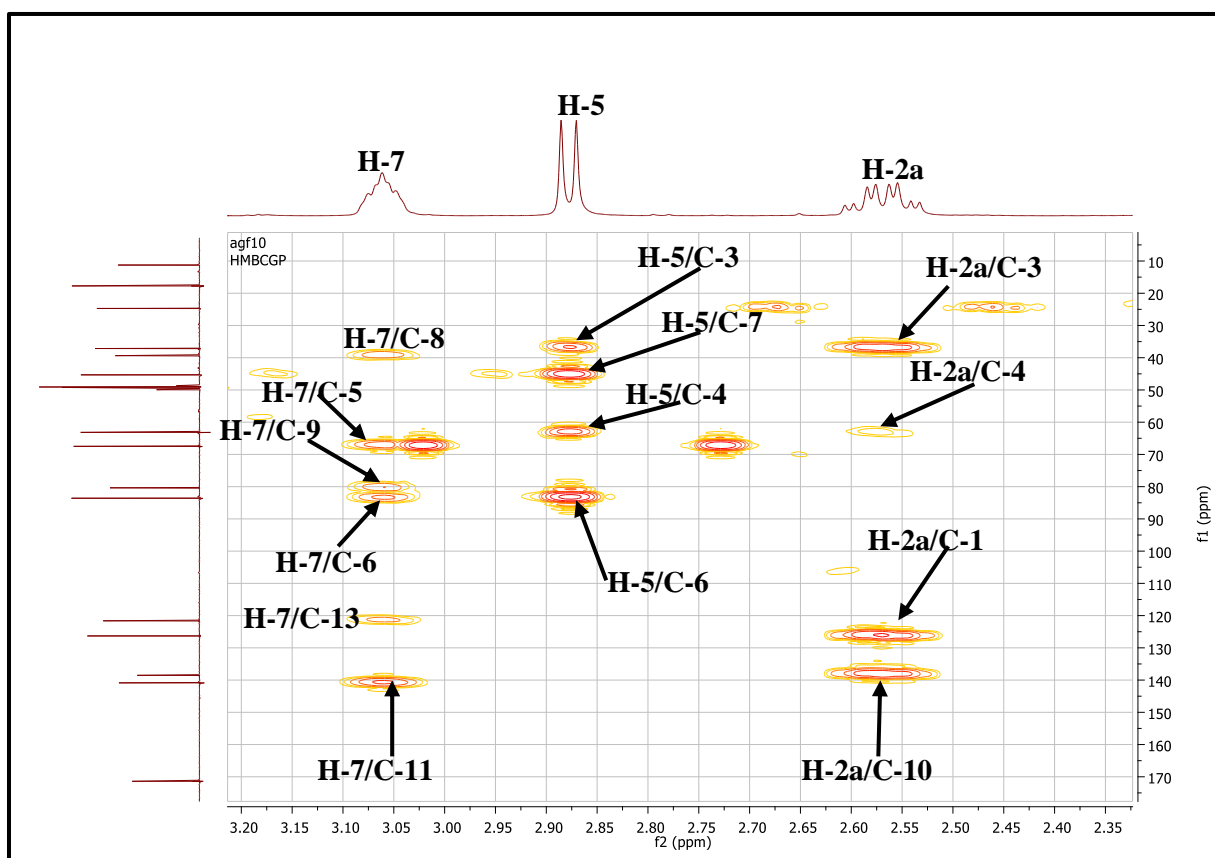
En effet, le spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé Agf10, montre également la présence d'un autre groupement méthyle à  $\delta_{\text{H}}=1.35$  ppm qui ne peut être que C-15. Ce dernier corrèle clairement avec le carbone à  $\delta_{\text{C}}$  63.16 ppm (C-4) sur le spectre HMBC, ce qui place ce groupement méthyle sur ce carbone.



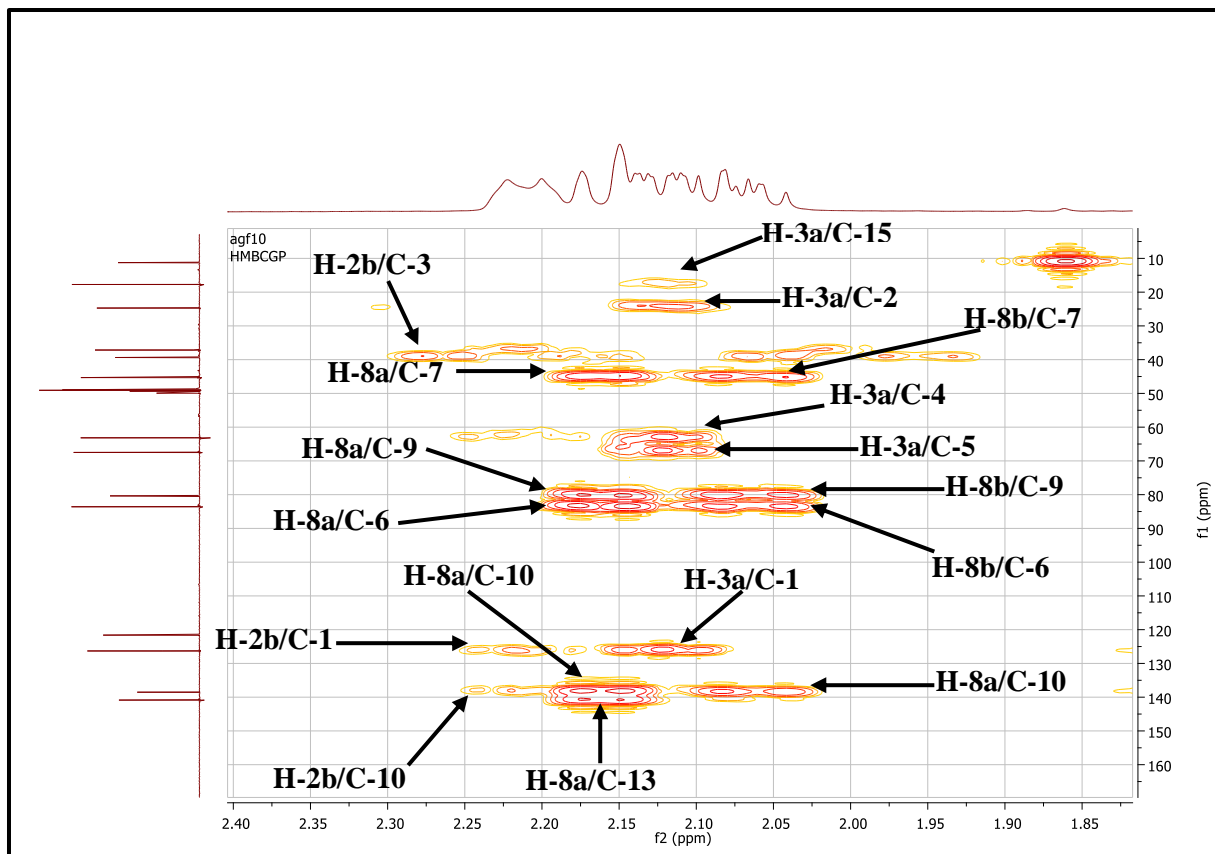
**Spectre III.41** : Spectre HMBC ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz,  $\delta$  ppm) du composé **Agf10**.



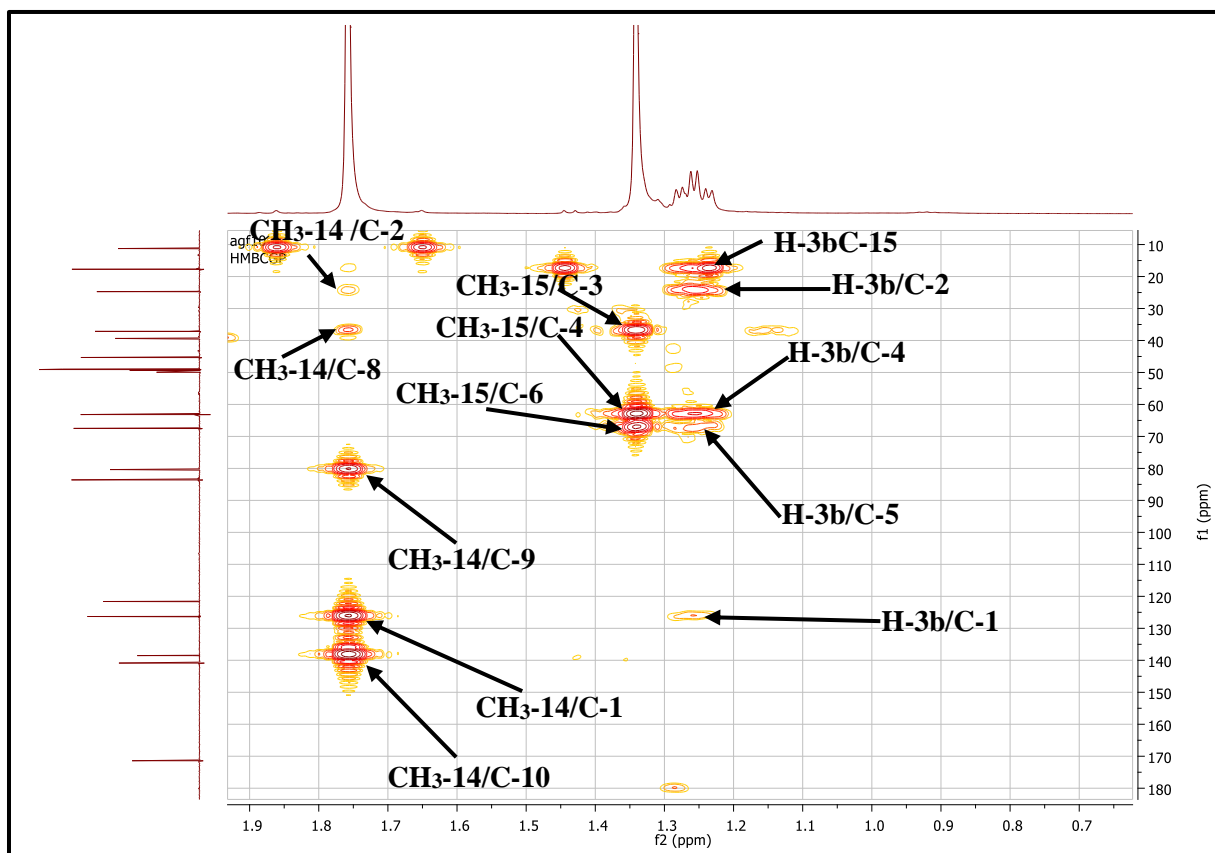
Spectre III.42 : Spectre HMBC étalé (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz, δ ppm) du composé Agf10.



Spectre III.43 : Spectre HMBC étalé (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz, δ ppm) du composé Agf10.



Spectre III.44 : Spectre HMBC étalé (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz, δ ppm) du composé Agf10.



Spectre III.45 : Spectre HMBC étalé (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz, δ ppm) du composé Agf10.

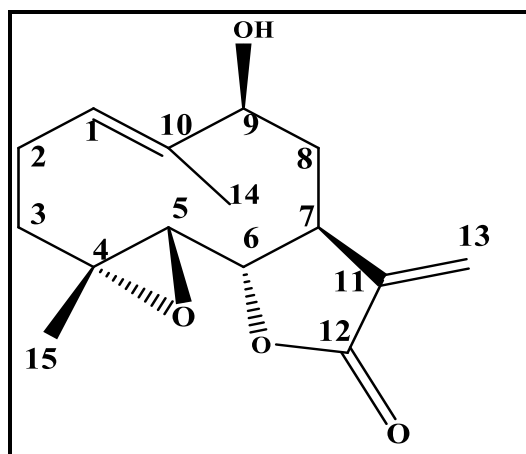
A ce stade de notre étude structurale, nous avons une lactone sesquiterpénique de type germacranolide hydroxylé en position 9. Il reste à préciser les configurations des centres chiraux.

La stéréochimie de C-5, C-6 et C-7 est déduite des valeurs des constantes de couplage relevées dans les signaux de H-5, H-6 qui montrent des interactions *trans* diaxiales entre H-5, H-6 et H-6, H-7. Ceci confère des orientations  $\alpha$  pour H-5,  $\beta$  pour H-6 et  $\alpha$  pour H-7.

La stéréochimie du carbone C-9 est établie grâce à la valeur de la constante de couplage relevée dans le signal de H-9. En effet le signal de H-9 apparaît sous forme d'un doublet de doublets  $J = 10.4 ; 1.7$  Hz, comme ce proton est couplé aux deux protons de la position C-8, il est clair que la valeur 10.4 Hz résulte d'une interaction de couplage axial-axial, qui ne peut exister que si H-9 est en position axiale soit une orientation  $\alpha$ . Par conséquent le groupement OH-9 admet une orientation  $\beta$ .

L'ensemble de ces données spectrales et la comparaison avec celles de la littérature mènent à la structure reportée dans la figure III.8 il s'agit du : 9  $\beta$ -hydroxyparthenolide.

Il est important de signaler que nous reportons pour la première fois ce composé du genre *Asteriscus*. Il a été décrit pour la première fois dans l'espèce *Anvillea garcinii* (Burm.) (S.) DC (Asteraceae) [14]. Ce composé est connu par ses activités biologiques intéressantes : antitumorale et cytotoxique [14,15].



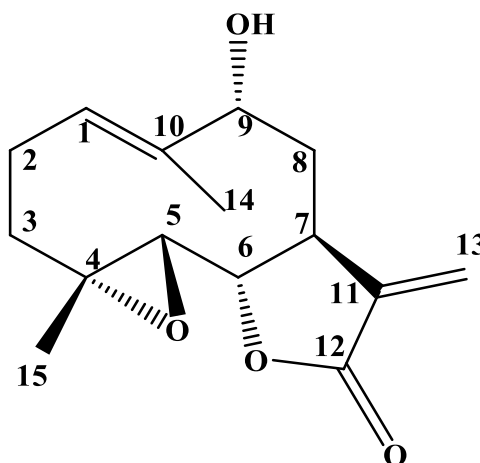
**Figure III.8:** Structure du composé Agf10 :9  $\beta$ -hydroxyparthenolide.

Les données spectroscopiques relatives à cette molécule sont rassemblées dans le tableau III-10.

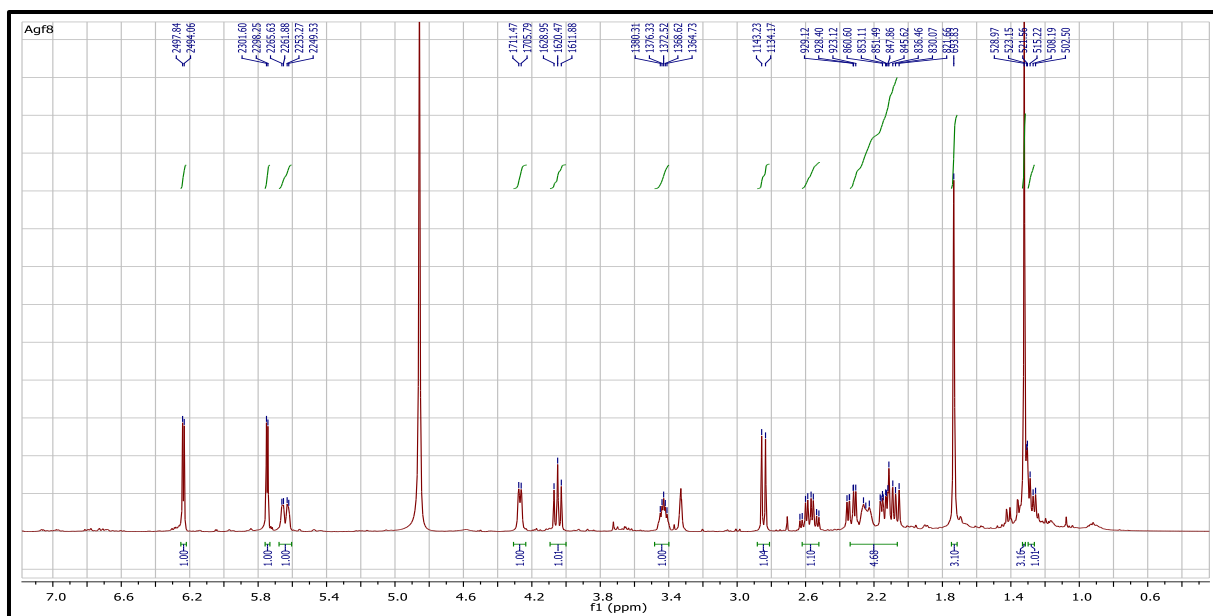
Tableau III.10: Données de la spectrométrie RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  du composé Agf10.

Position	$\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
1	5.50 d (9.8)	126.31
2a	2.58 m	24.72
2b	2.22 m	
3a	2.13 m	37.15
3b	1.25 m	
4	-	63.16
5	2.88 d (8.9)	67.49
6	4.05 t (8.6)	83.59
7	3.06 m	45.31
8a	2.08 m	39.36
8b	2.17 m	
9	4.24 dd (10.4 ; 1.7)	80.36
10	-	138.53
11	-	140.05
12	-	171.40
13a	6.26 d (3.1)	121.62
13b	5.76d (3.6)	
14	1.77s	11.25
15	1.35s	17.73

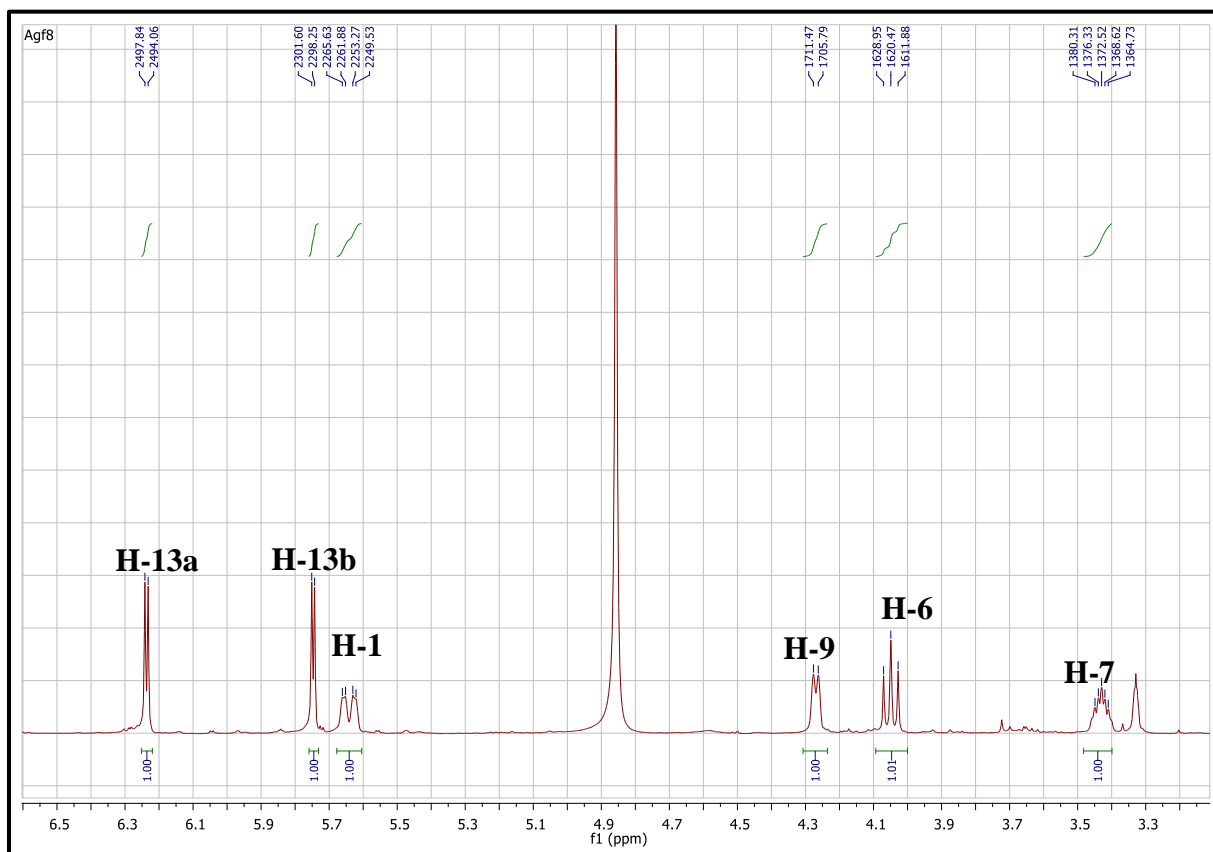
## III.2.1.2. Détermination structurale du composé Ag f8 :



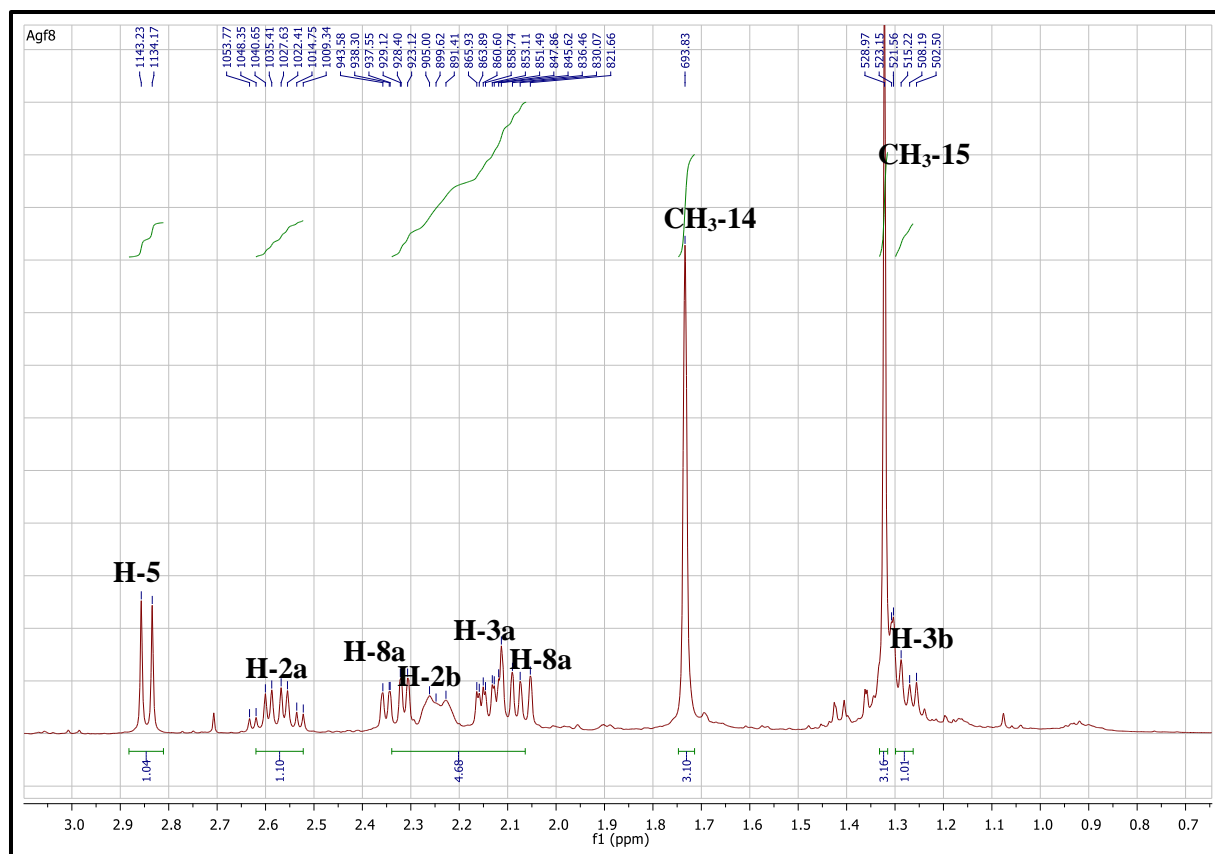
La comparaison des spectres de ce composé à ceux du composé Agf10 montre une parfaite similitude entre ces deux structures, la seule différence observé c'est au niveau de signal H-9 qui apparait sous forme d'un doublet à 4.27 ppm avec un constant de couplage  $J=4.6$  Hz caractéristique d'un H-9 de stéréochimie  $\beta$ , soit une position équatoriale. Ce qui suggère un changement d'orientation de ce proton. Il s'agit donc d'un **9  $\alpha$ -hydroxyparthenolide**.



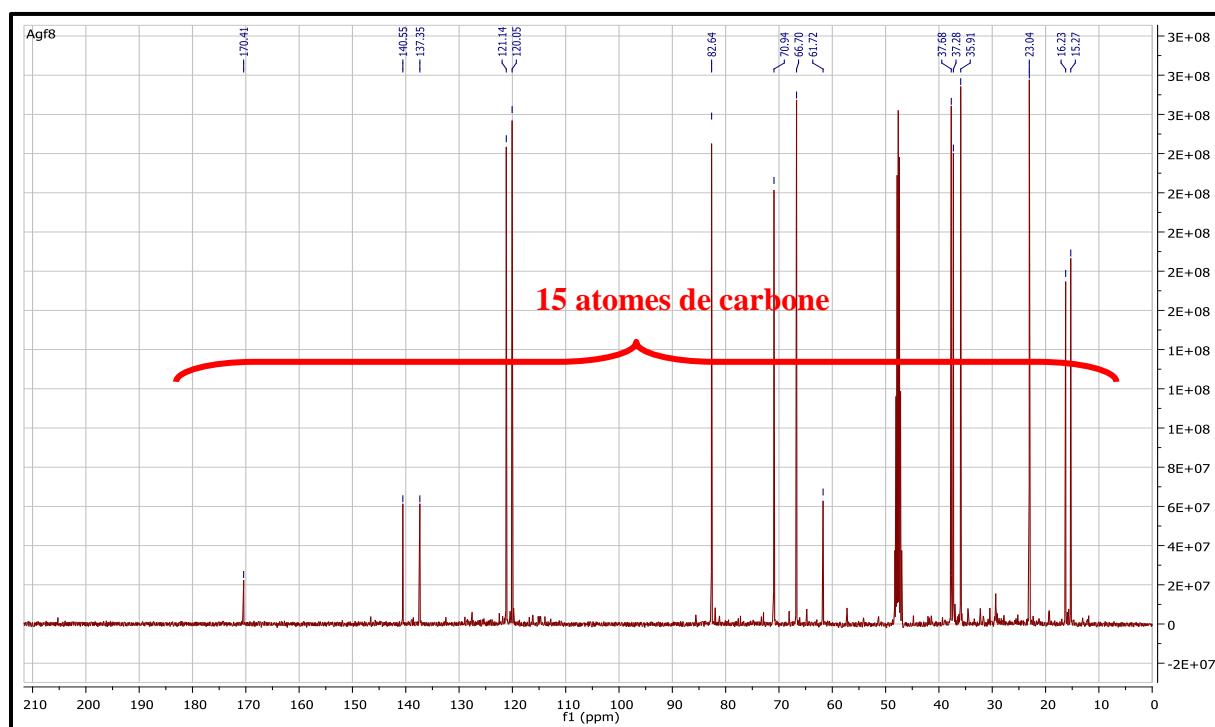
Spectre III.46 : spectre RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz,  $\delta$  ppm) du composé Ag f8.



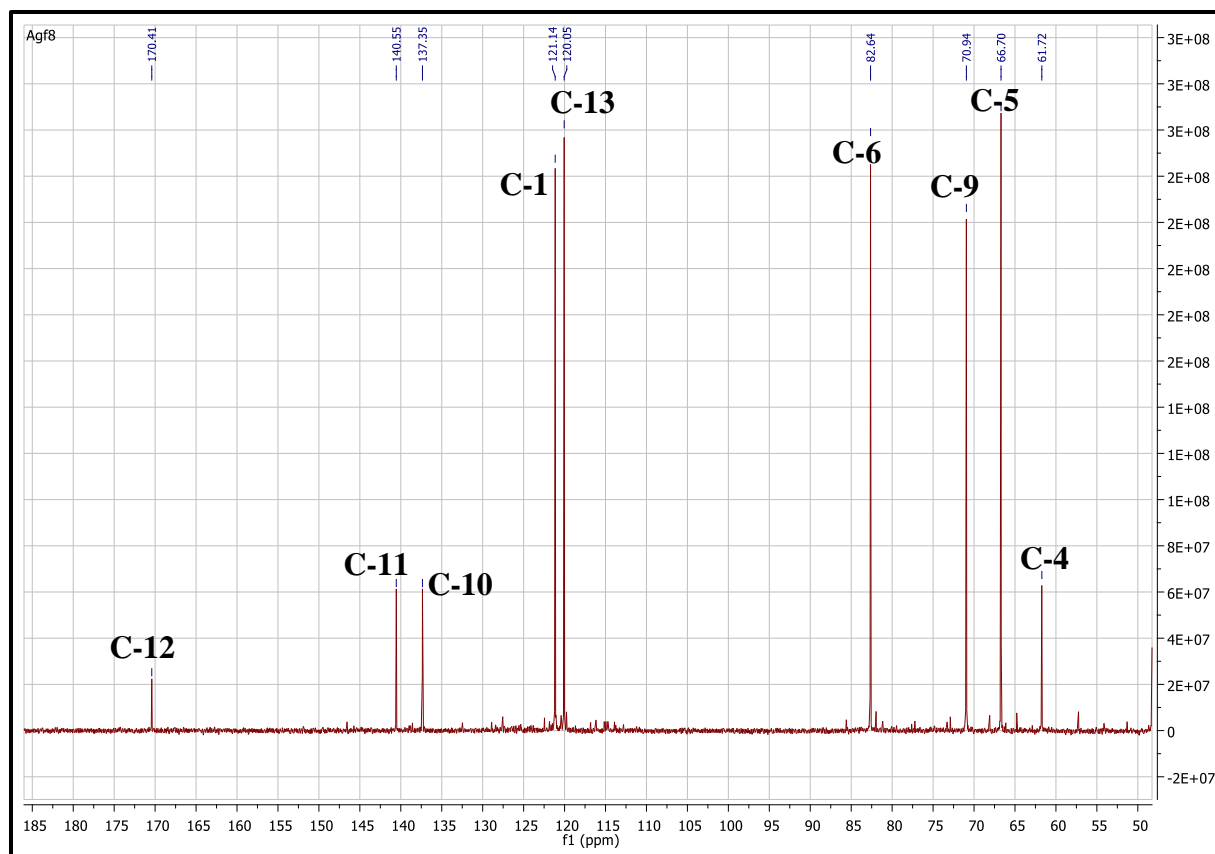
Spectre III.47 : spectre RMN  $^1\text{H}$  étalé ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz,  $\delta$  ppm) du composé Ag f8.



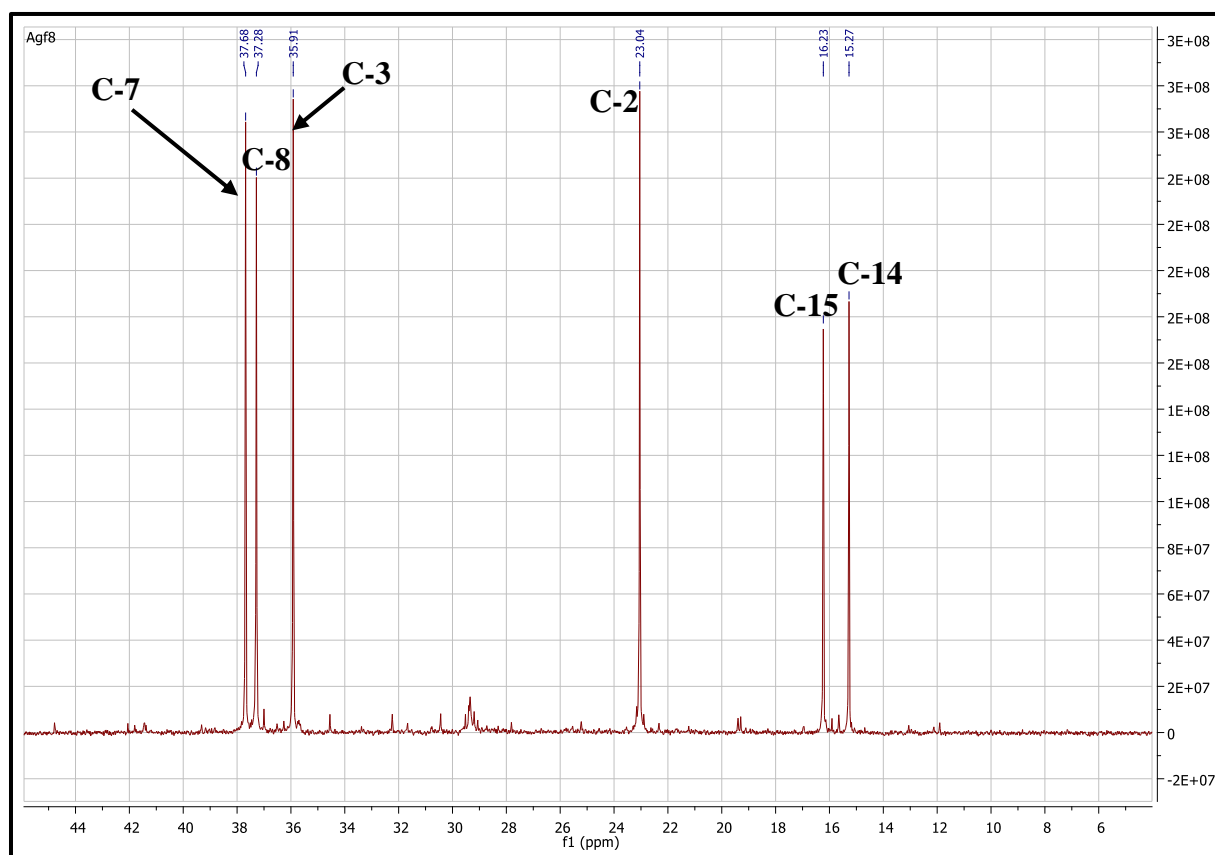
Spectre III.48 : spectre RMN <sup>1</sup>H étalé (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz, δ ppm) du composé Ag f8.



Spectre III.49: Spectre RMN <sup>13</sup>C (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm) du composé Ag f8.

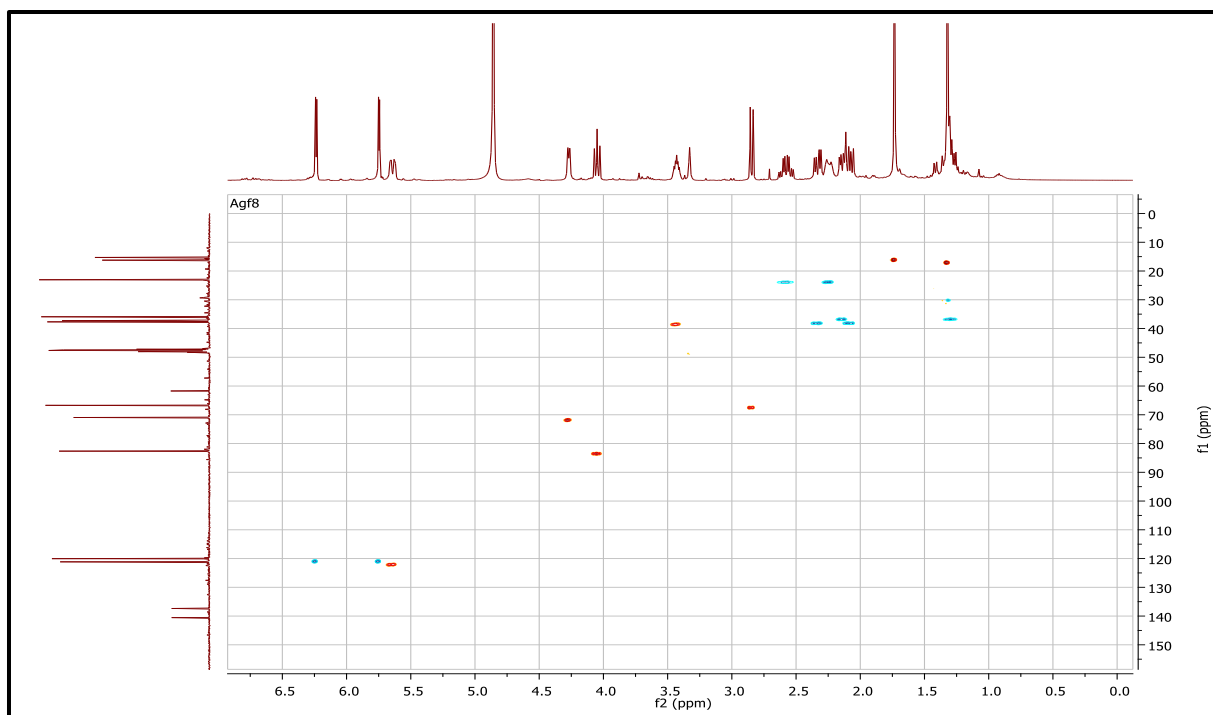


Spectre III.50: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé Ag f8 (étalement).

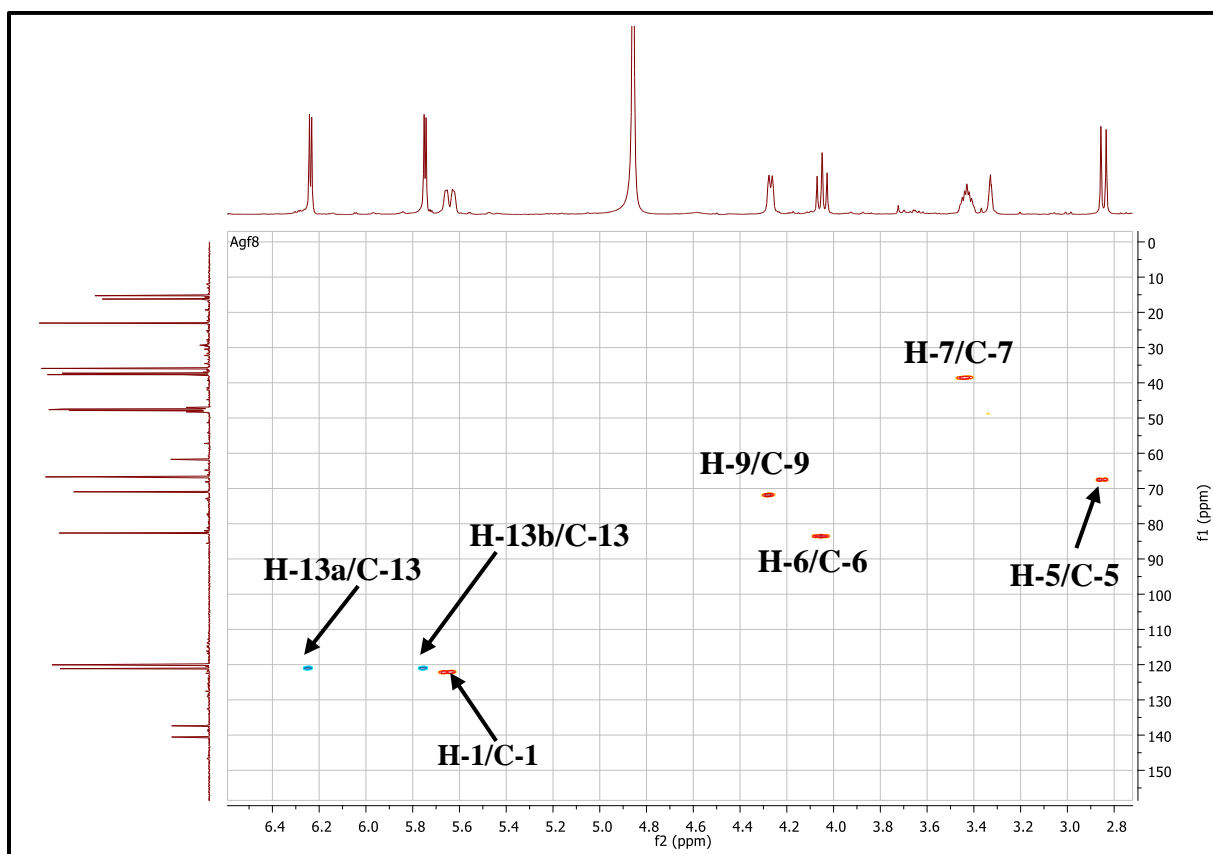


Spectre III.51: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé Ag f8 (étalement).

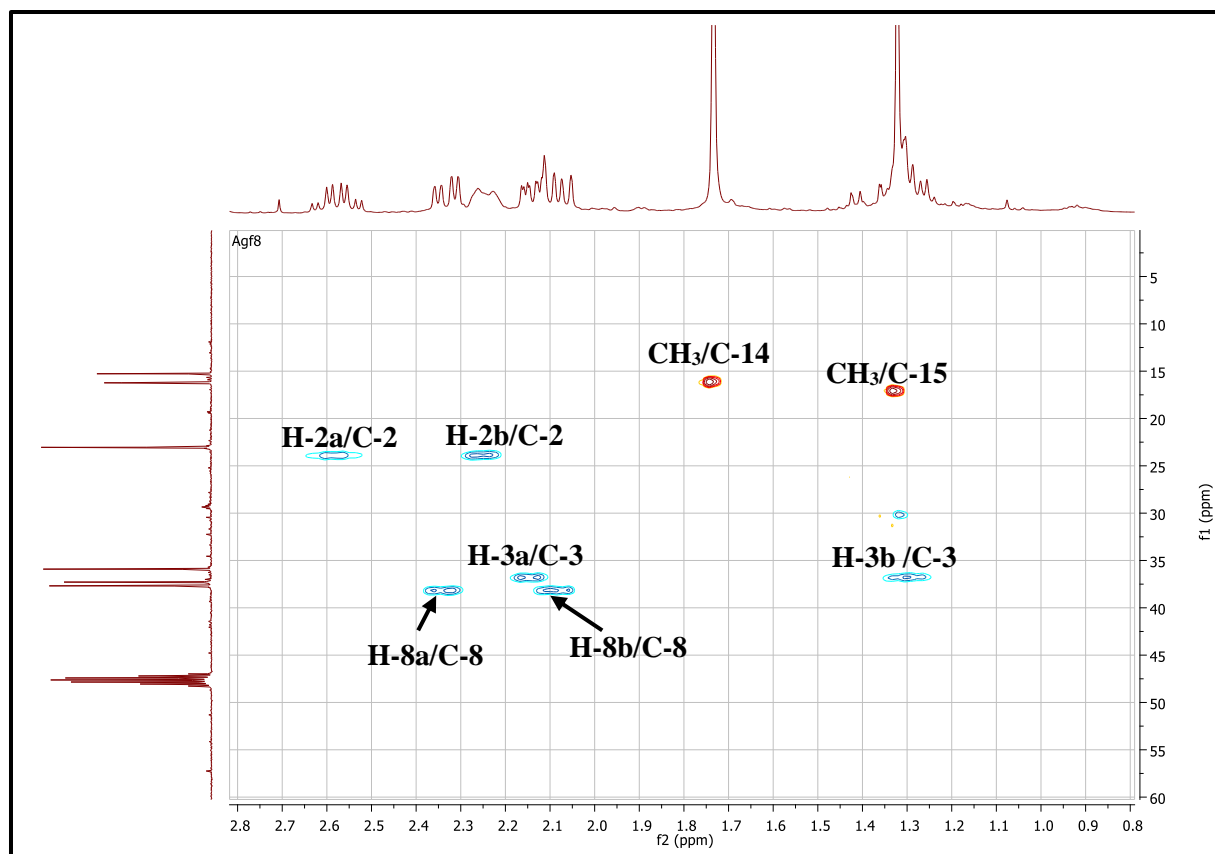




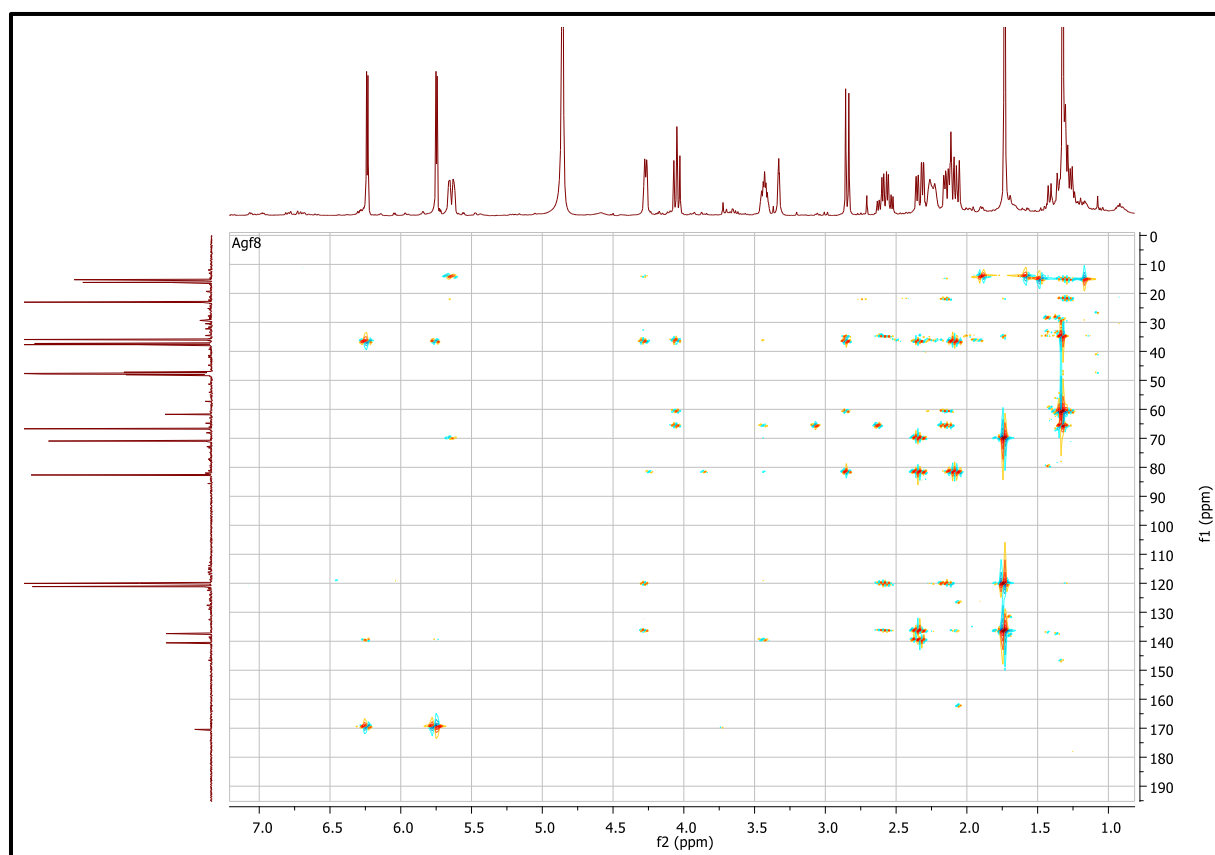
Spectre III.52 : Spectre HSQC ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz,  $\delta$  ppm) du composé Agf8.



Spectre III.53 : Spectre HSQC étalé ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz,  $\delta$  ppm) du composé Agf8.

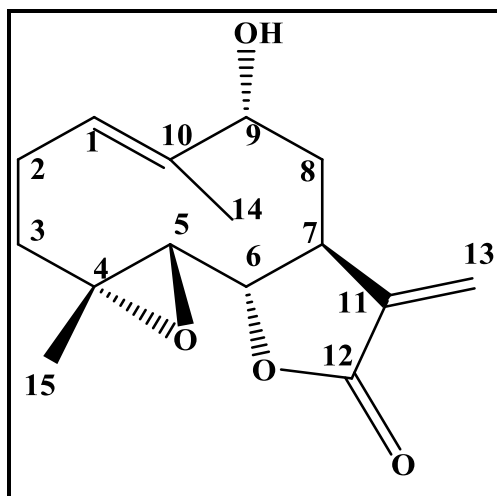


Spectre III.54 : Spectre HSQC étalé (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz,  $\delta$  ppm) du composé Agf8.



Spectre III.55 : Spectre HMBC (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz,  $\delta$  ppm) du composé Agf8.

L'ensemble de ces données mènent à la structure du : 9  $\alpha$ -hydroxyparthenolide reportée dans la figure III.9.



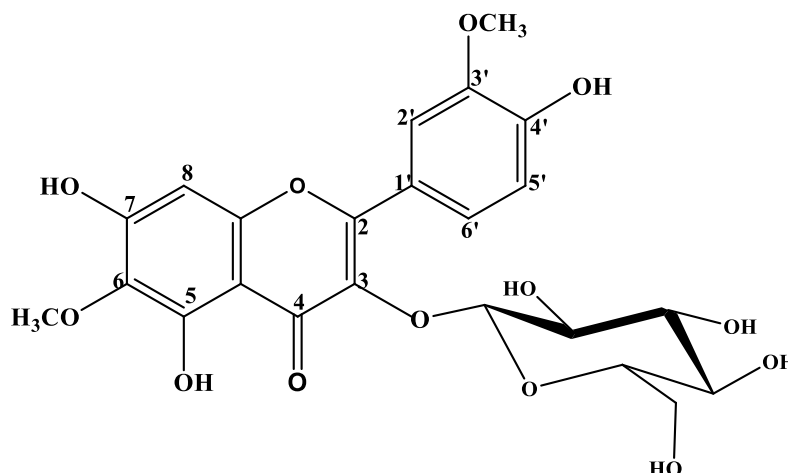
**Figure III.9:** Structure du composé Agf8 :9  $\alpha$ -hydroxyparthenolide.

Les données spectroscopiques relatives à cette molécule sont rassemblées dans le tableau III-11.

**Tableau III.11:** Données de la spectrométrie RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  du composé Agf8.

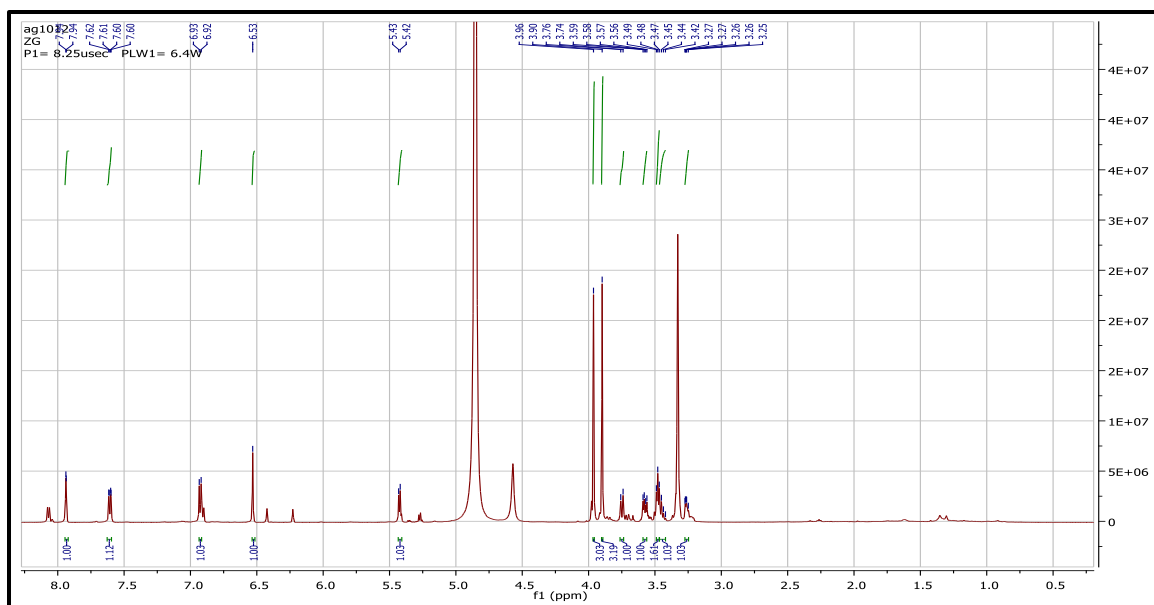
Position	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
1	5.62 dd (12.3 ; 3.7)	121.14
2a	2.57m	23.04
2b	2.15 m	
3a	2.15 m	
3b	1.27 m	35.91
4	-	61.72
5	2.84 d (8.9)	66.70
6	4.05 t (8.5)	82.64
7	3.43 m	37.68
8a	2.33 m	37.28
8b	2.07 m	
9	4.27 d (4.6)	70.94
10	-	137.35
11	-	140.55
12	-	170.41
13a	5.75 d (3.3)	120.06
13b	6.24 d (3.7)	
14	1.73 s	15.27
15	1.32 s	16.23

## III.2.1.3. Détermination structurale du composé Ag /10/12 :

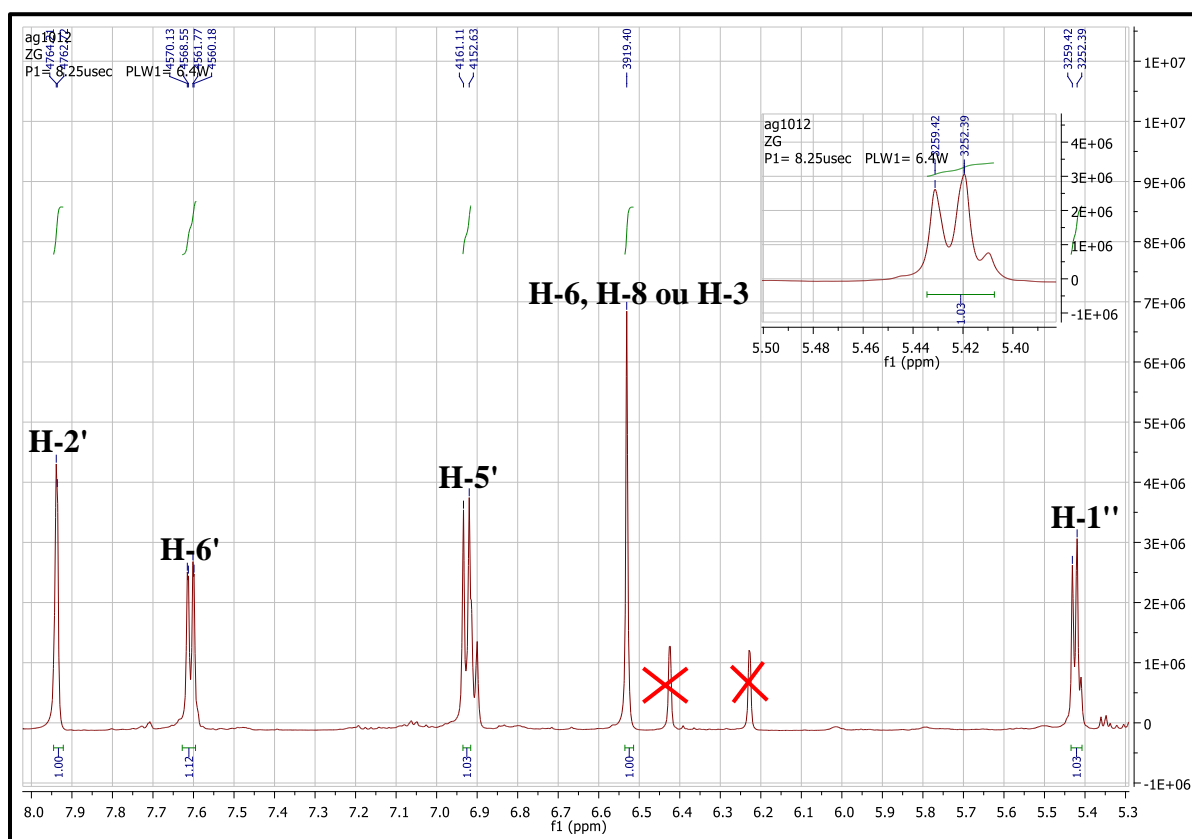


L'examen du spectre RMN  $^1\text{H}$  (Spectre III.56), enregistré dans  $\text{CD}_3\text{OD}$ , montre la présence des signaux caractéristiques d'un squelette de type flavonoïde que l'on peut identifier par :

- Un doublet d'intégration 1 H, à  $\delta_{\text{H}}$  7.94 ppm ( $J = 1.6$  Hz) attribuable à H-2'.
- Un doublet de doublets d'intégration 1 H, à  $\delta_{\text{H}}$  7.61 ppm ( $J = 8.5$  ; 1.6 Hz) attribuable à H-6'.
- Un doublet d'intégration 1 H, à  $\delta_{\text{H}}$  6.93 ppm ( $J = 8.5$  Hz) attribuable à H-5'. Ces signaux indiquent qu'il s'agit d'une disubstitution du noyau B.
- Un singulet d'intégration 1 H à  $\delta_{\text{H}}$  6.53 ppm attribuable soit à H-3, H-6 ou H-8.
- Deux singulets d'intégration 3H chacun à  $\delta_{\text{H}} = 3.90$  et 3.97 ppm attribuables aux protons de deux groupements  $\text{OCH}_3$ .
- Un doublet d'intégration 1H à  $\delta = 5.42$  ppm ( $J = 7.0$  Hz), attribuable au proton anomérique d'un sucre relié à l'aglycone par un pont oxygène. D'après la valeur de la constante de couplage ( $J = 7.0$  Hz), cette entité peut être un glucosyle ou un galactosyle avec une configuration  $\beta$  entre le sucre et la génine.
- Un ensemble de multiplets dans l'intervalle 3.2- 3.8 ppm attribuable par conséquent aux autres protons du sucre.



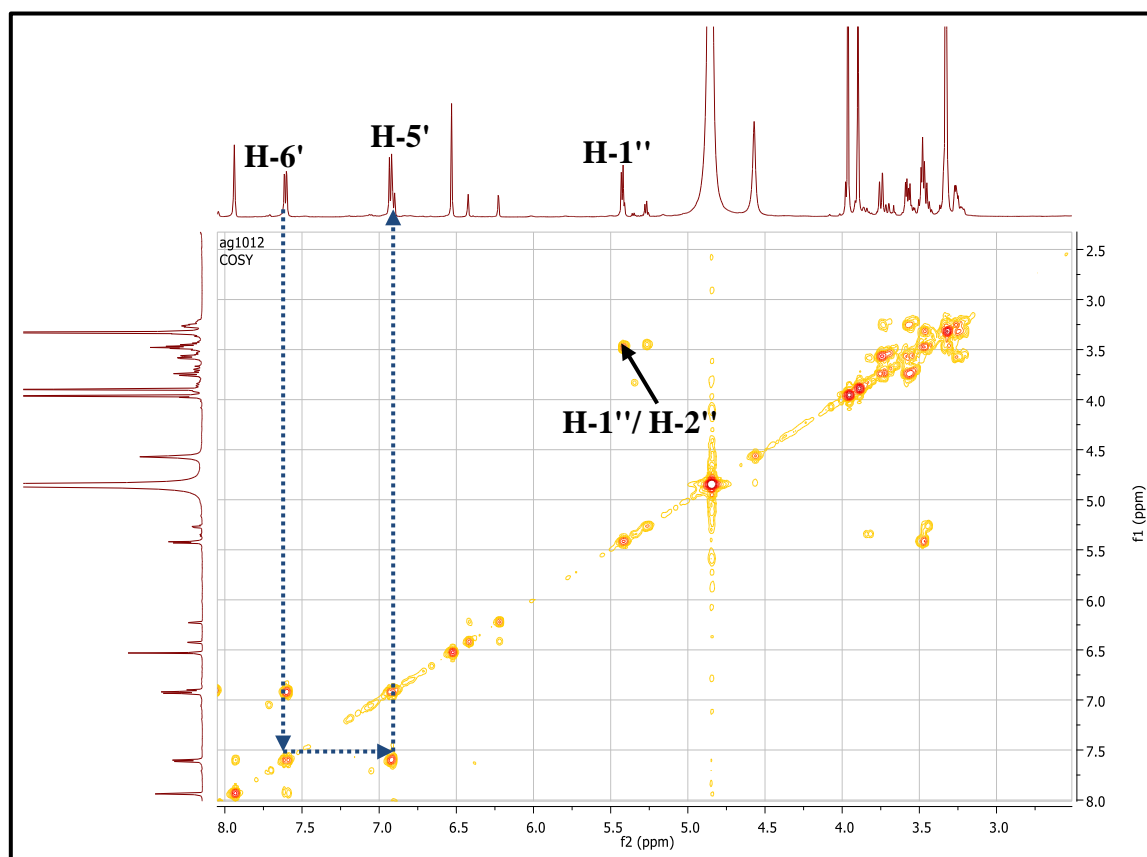
Spectre III.56: Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé Ag/10/12 (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm).



Spectre III.57: Spectre RMN  $^1\text{H}$  étalé du composé Ag/10/12 (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm).

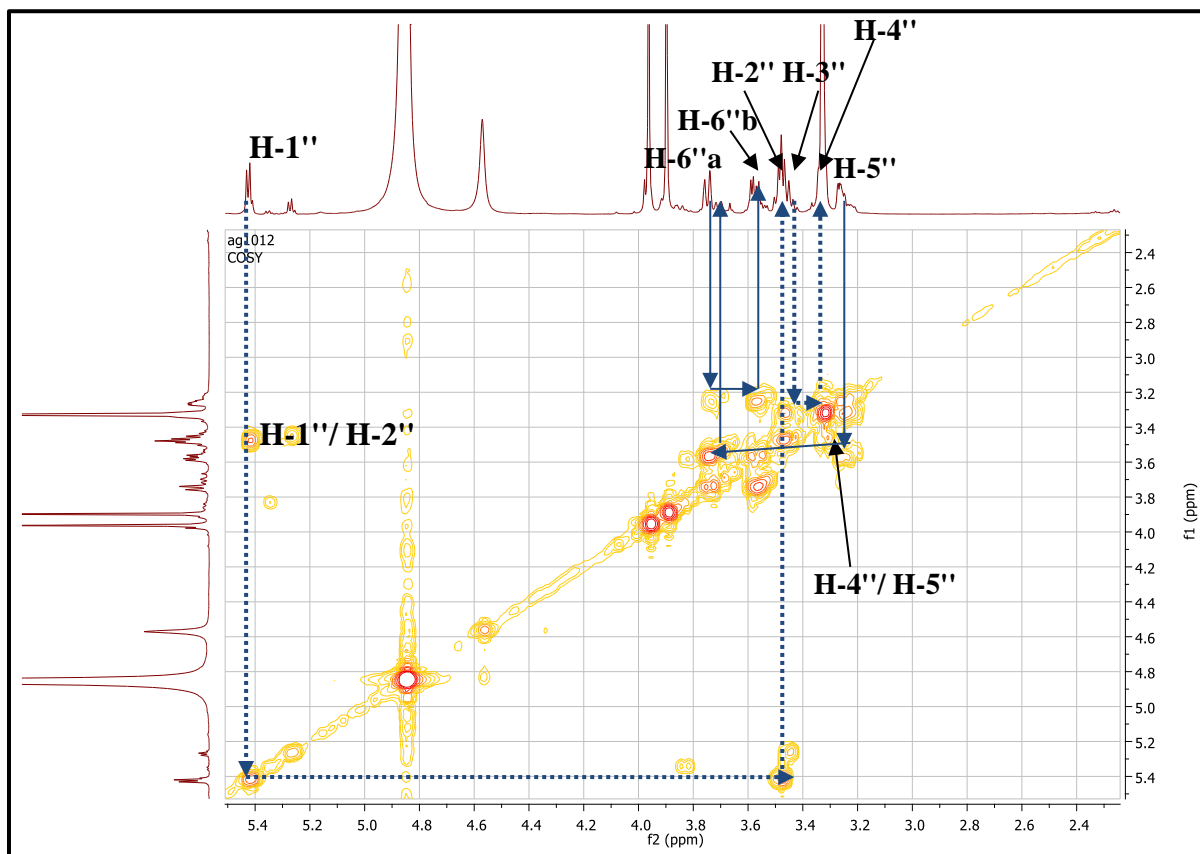
L'examen du spectre relatif à l'expérience COSY (Spectre III.58) montre une tache de corrélation entre le proton H-5' et le proton H-6' confirmant le couplage ortho.

Sur le spectre relatif à l'expérience COSY (Spectre III.59), le proton anomérique H-1'' montre une tache de corrélation avec le proton résonant sous forme d'un triplet à  $\delta_H = 3.49$  ppm, ce proton est attribuable à H-2''. Toujours sur le spectre relatif à l'expérience COSY, ce proton H-2'' corrèle avec le proton résonant sous forme d'un triplet ( $J = 9.0$  Hz) à  $\delta_H = 3.45$  ppm attribuable à H-3''. La multiplicité de ce signal et la valeur de la constante de couplage supposent des interactions axiale-axiale entre H-2''/H-3'' ; H-3''/H-4'' et indiquent par conséquent des orientations axiales de H-3'' et H-4''. Ces observations orientent vers un groupement glucopyranoside. Ce proton (H-3'') corrèle à son tour avec le proton H-4'' résonant à  $\delta_H 3.33$  ppm. Une autre tâche de corrélation a été également observée dans le spectre COSY, entre le proton H-4'' et le proton H-5'' résonant sous forme d'un multiplet à  $\delta_H 3.25$  ppm. Ce dernier noyau (H-5'') mène à l'attribution de H-6''b à  $\delta = 3.56$  ppm sous forme d'un doublet de doublets ( $J = 11.8 ; 5.7$ Hz) et à H-6''a (dl) ( $J = 11.8$ ) à  $\delta = 3.74$  ppm.

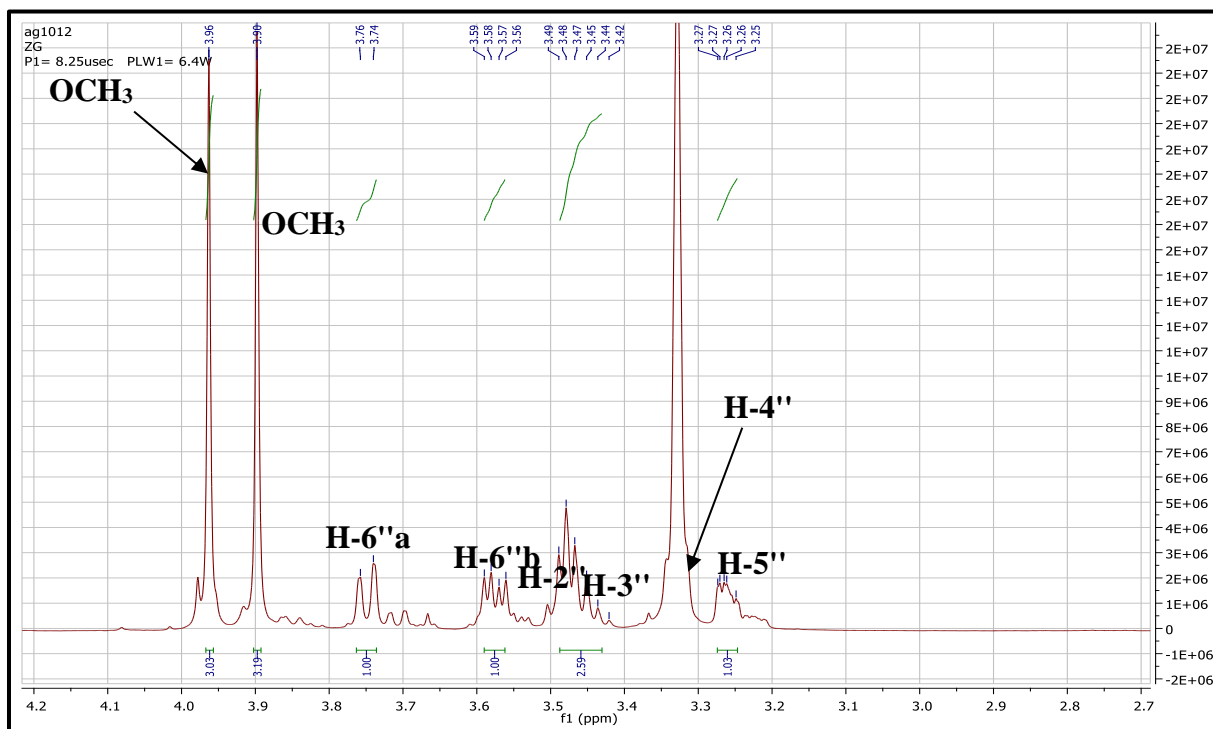


Spectre III.58: Spectre de COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) du composé **Ag/10/12** dans  $\text{CD}_3\text{OD}$ (étalment) .

...



Spectre III.59: Spectre COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) du composé Ag/10/12 dans  $\text{CD}_3\text{OD}$ (étalment) .

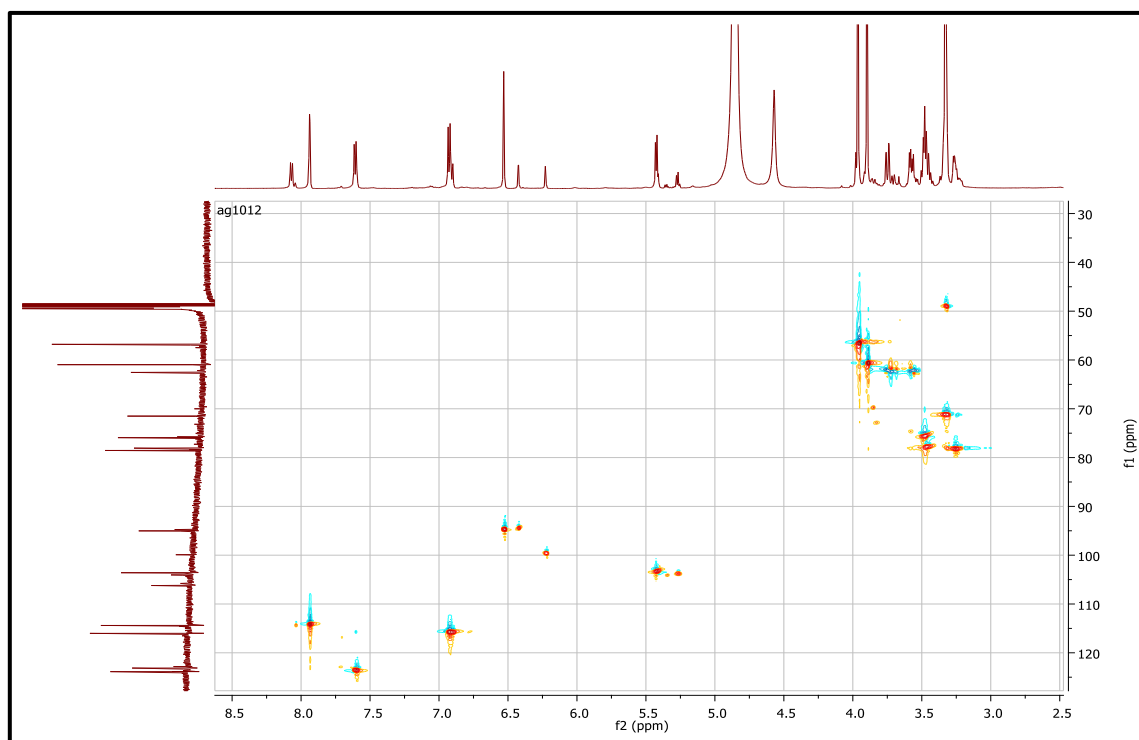


Spectre III.60: Spectre RMN  $^1\text{H}$ étalé (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm) du composé Ag/10/12.

L'examen du spectre HSQC (spectre III.61, III.62 et III.63) permet l'attribution des signaux des protons aux atomes de carbone correspondants:

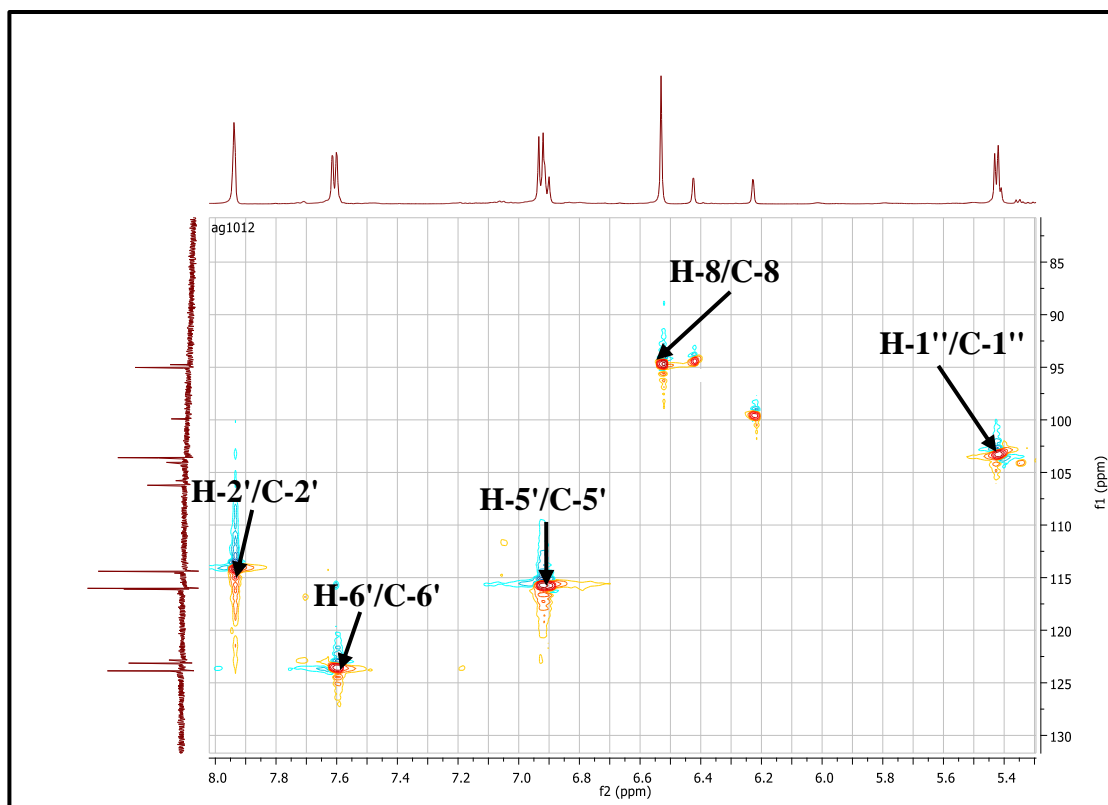
- Une tache de corrélation entre H-2' et un atome de carbone qui ne peut être que C-2' à  $\delta = 114.40$  ppm.
- Une tache de corrélation entre H-6' et un atome de carbone qui ne peut être que C-6' à  $\delta = 123,86$  ppm.
- Le H-5' permet l'attribution du C-5' à  $\delta=116.02$  ppm.
- Le proton à  $\delta_H = 6.53$  ppm corrèle avec le carbone à  $\delta_c = 95.02$  ppm. La valeur du déplacement chimique de ce carbone indique qu'il s'agit du C-8, car ceux de C-3 et C-6 seraient plus élevés. De ce fait, ce proton sera attribué à H-8.

Le même spectre indique les déplacements chimiques des carbones osidiques : le carbone anomérique C-1" à  $\delta=103.59$  ppm, C-2" à  $\delta=75.92$  ppm, C-3" à  $\delta=78.06$  ppm, C-4" à  $\delta=71.50$  ppm, C-5" à  $\delta=78.54$  ppm et le C-6" à  $\delta=62.55$

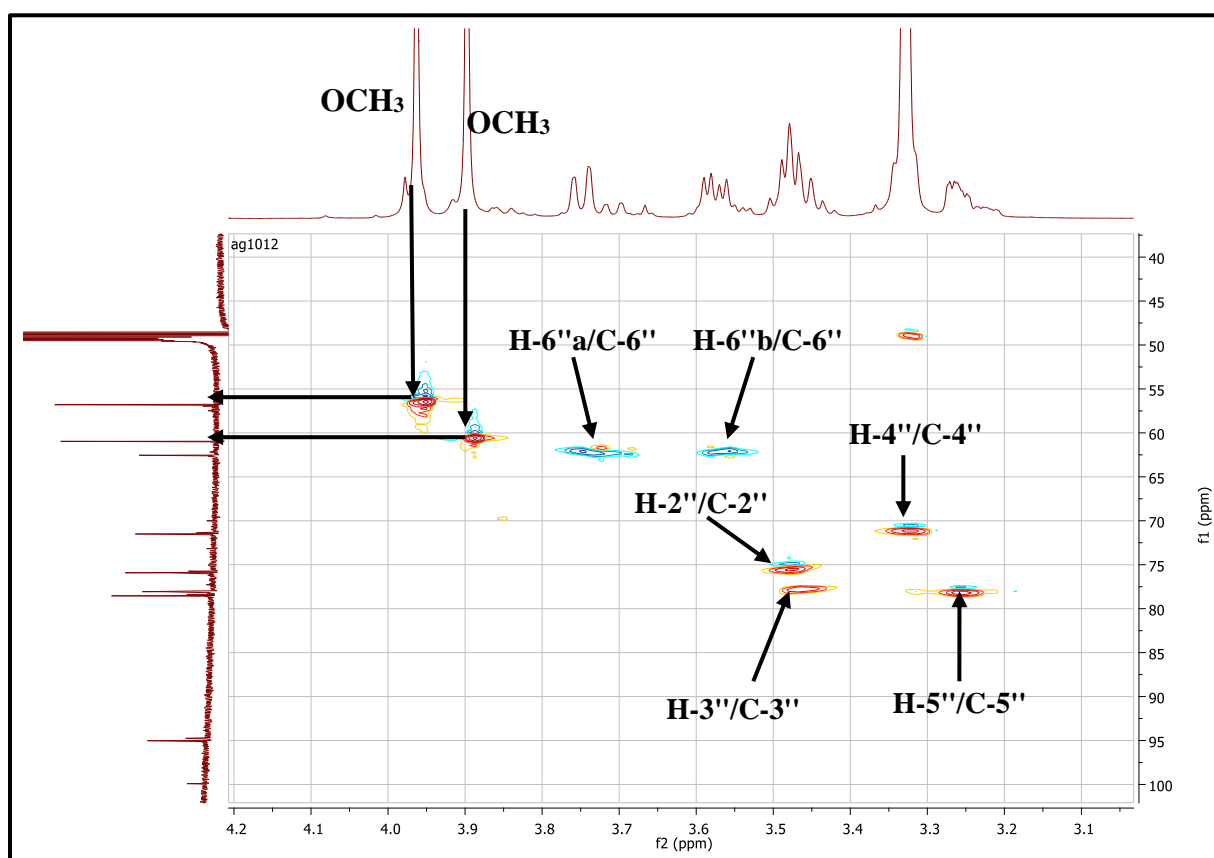


**Spectre III.61:** Spectre de HSQC (400 MHz ; CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm) du composé Ag/10/12.





Spectre III.62: Spectre de HSQC (400 MHz ; CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm) du composé Ag/10/12.



Spectre III.63: Spectre de HSQC (400 MHz ; CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm) du composé Ag/10/12.

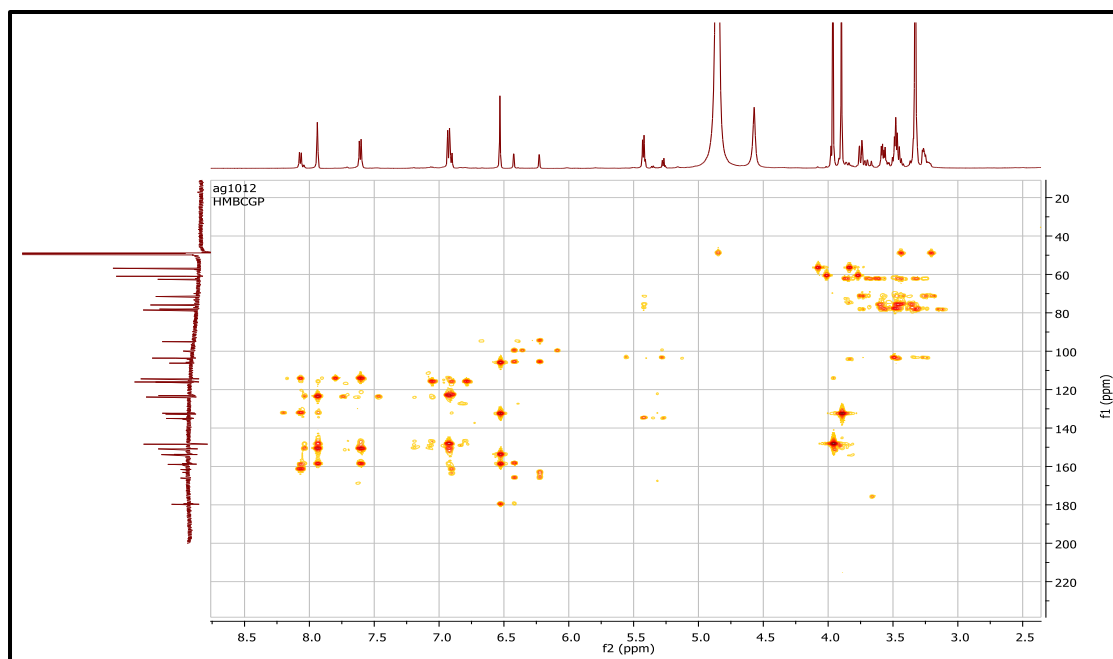
L'étude du spectre relatif à l'expérience HMBC (spectre III.64) et ses étalements (spectre III.65 et III.66) mettent en évidence les corrélations proton-carbone à longue distance, permettant de tirer les indications suivantes :

- C-2 à  $\delta = 158.84$  ppm grâce à sa corrélation avec H-2', H-6'.
- C-1' à  $\delta = 123.13$  ppm grâce à sa corrélation avec H-2' et H-5'.
- Trois taches de corrélation entre H-2', H-5' et H-6' et un atome de carbone résonant à  $\delta = 150.86$  ppm attribuable à C-4'
- C-3' à  $\delta = 148.43$  ppm grâce à sa corrélation avec H-2' et H-5'.
- ✚ Le proton H-8 montre cinq taches de corrélation :
  - La première avec l'atome de carbone à  $\delta = 106.22$  ppm attribuable à C-10.
  - La deuxième avec l'atome de carbone à  $\delta = 132.28$  ppm attribuable à C-6.
  - La troisième avec un atome de carbone oxygéné à  $\delta = 153.85$  ppm qui ne peut être attribué qu'au C-9.
  - La quatrième avec un autre atome de carbone oxygéné représenté par le signal à  $\delta = 179.40$  ppm qui ne peut que le C-4.
  - la cinquième avec l'atome de carbone a  $\delta = 158.92$  ppm attribuable à C-7.

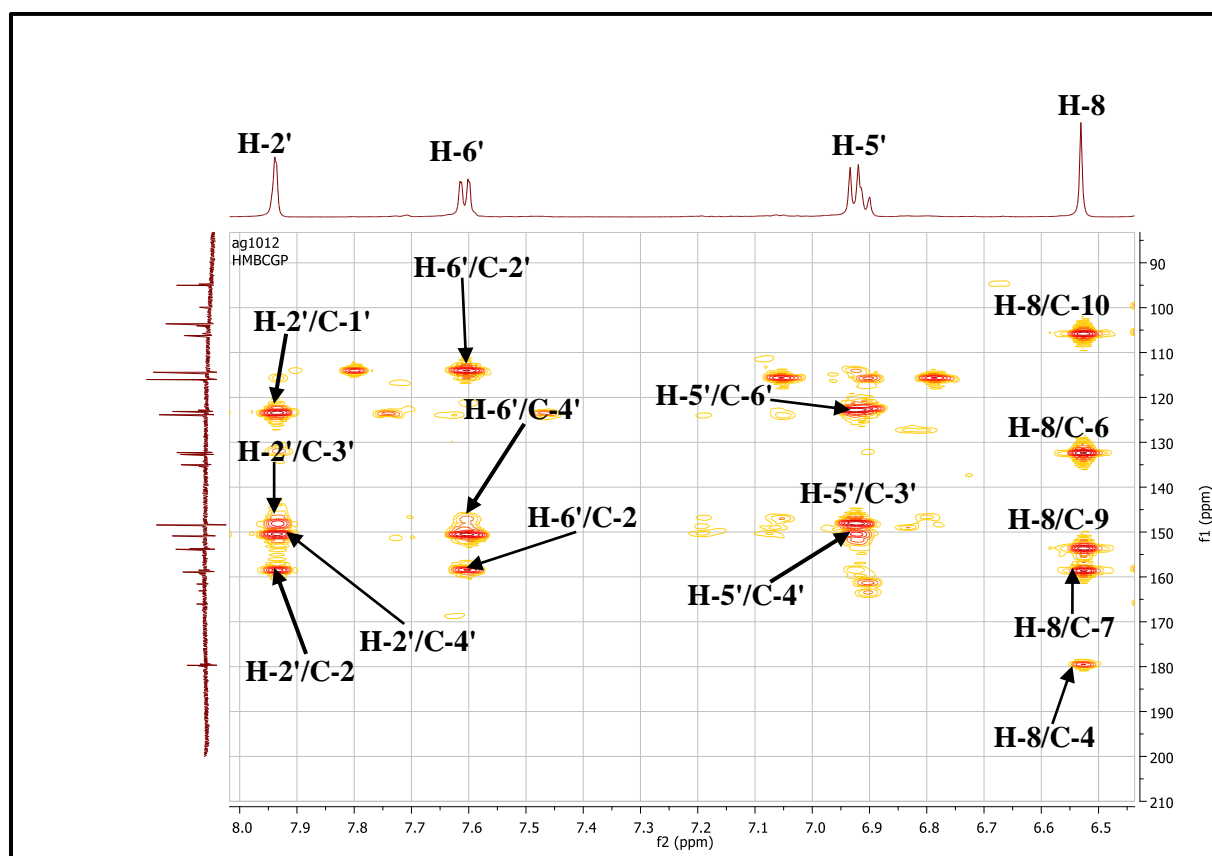
Toujours sur le spectre de l'expérience HMBC, le proton anomérique du glucose H- 1'' montre une tache de corrélation avec un atome de carbone à  $\delta_C 135.0$  ppm qui ne peuvent être que le C-3. La présence de cette corrélation entre le C-3 et le proton anomérique, indique que l'entité sucre est placée en C-3.

Les deux méthoxyles peuvent être localisés sur le squelette flavonique comme suit:

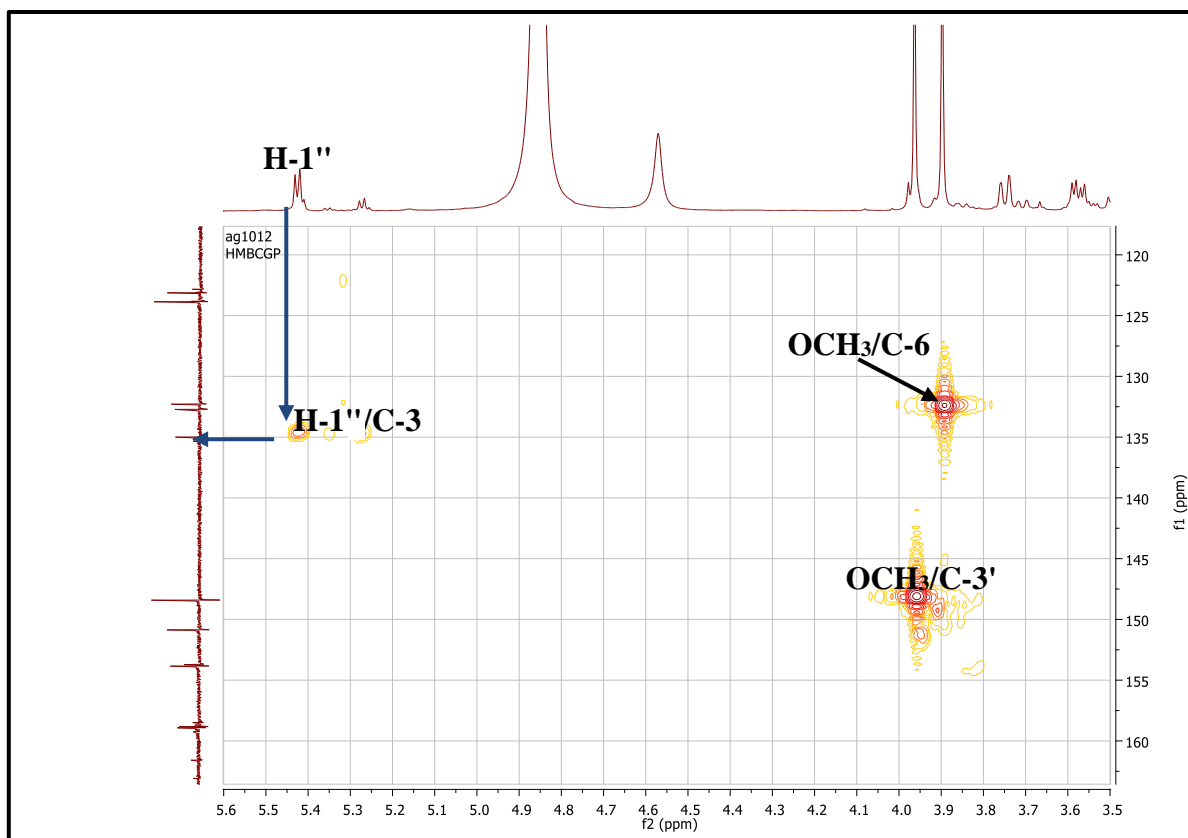
- ✚ Celui à  $\delta_H = 3.90$  en C-6 ( $\delta_C 132.28$  ppm) grâce à la corrélation de ses protons avec le C-6 sur le spectre de HMBC.
- ✚ Celui à  $\delta_H = 3.97$  en C-3' ( $\delta_C 148.43$  ppm) grâce à la corrélation de ses protons avec le C-3' sur le spectre de HMBC.



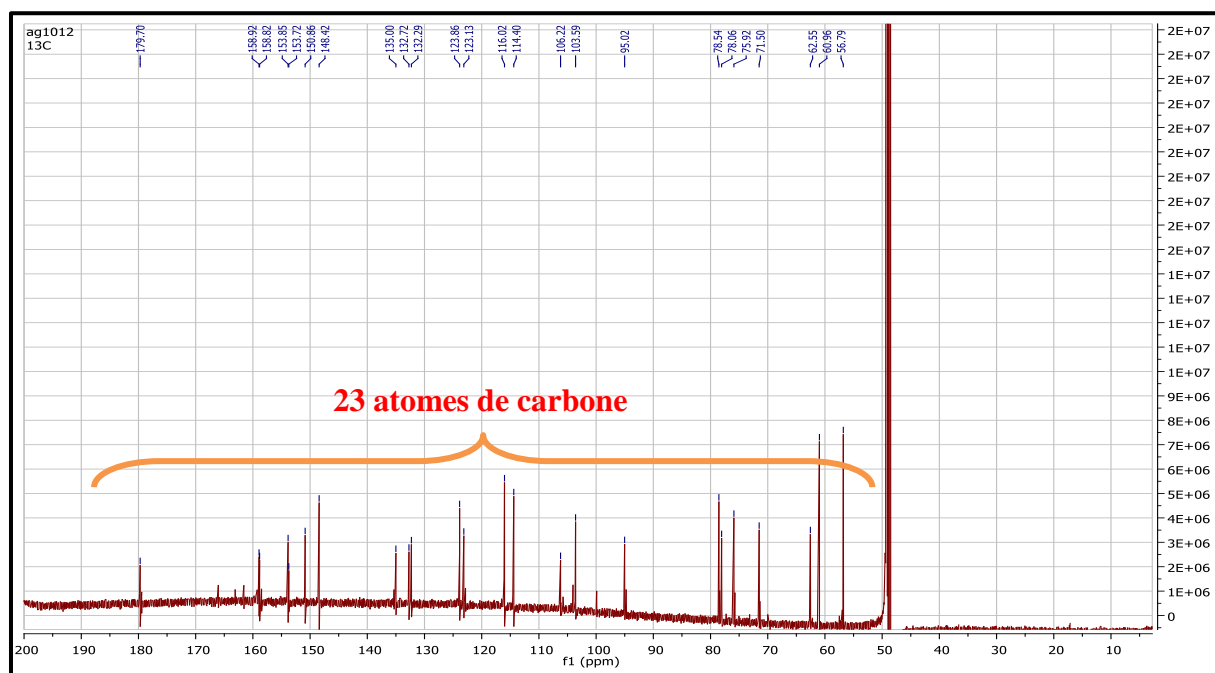
Spectre III.64: Spectre HMBC (400 MHz ; CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) du composé Ag/10/12.



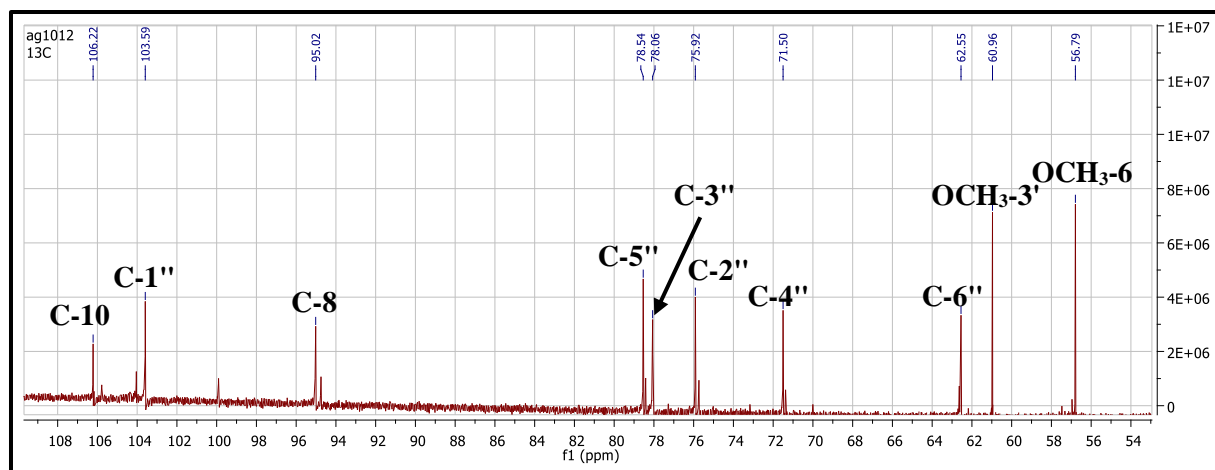
Spectre III.65: Spectre HMBC (400 MHz ; CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) du composé Ag/10/12.



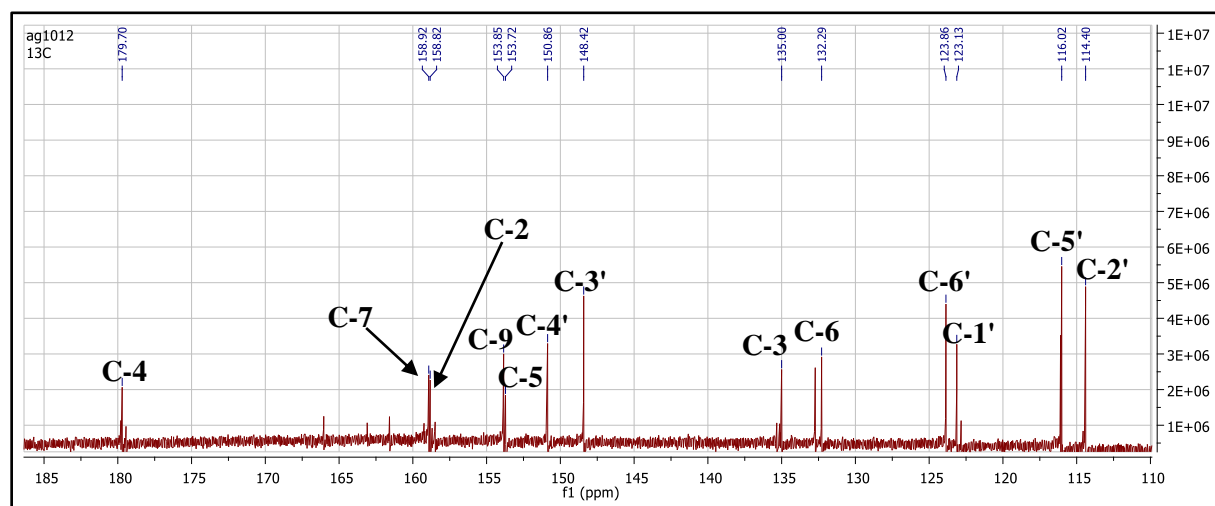
Spectre III.66: Spectre HMBC (400 MHz ; CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm) du composé Ag/10/12 .



Spectre III.67: Spectre RMN <sup>13</sup>C (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm) du composé Ag/10/12.



Spectre III.68: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm) du composé Ag/10/12.



Spectre III.69: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm) du composé Ag/10/12.

Ces données, en accord avec celles de la littérature [16], nous ont permis d'identifier le composé Ag/10/12 comme étant la spinacétin 3-*O*- $\beta$  glucopyranoside.

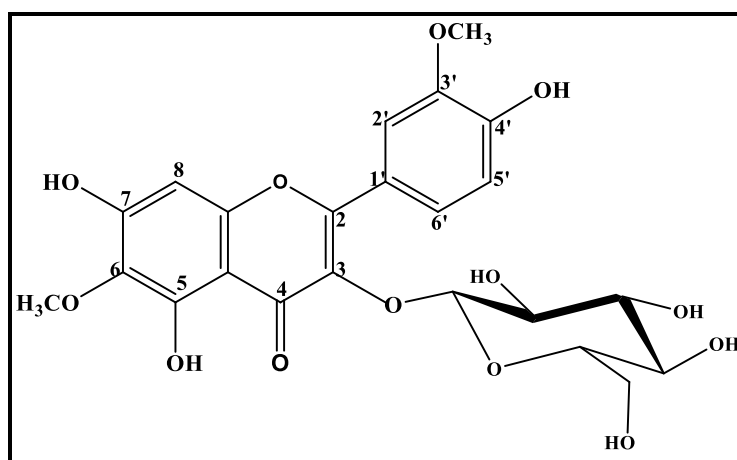


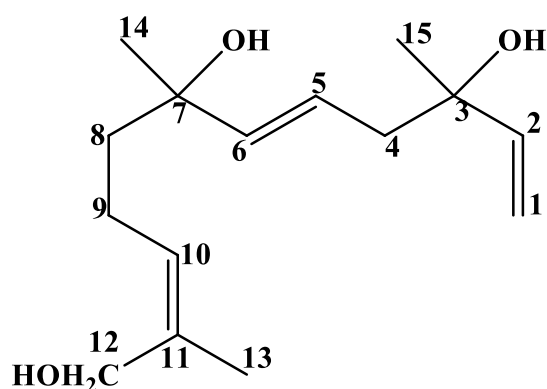
Figure III.10: Structure du composé Ag/10/12 spinacétin 3-*O*- $\beta$  glucopyranoside.

Les données relative aux spectres de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de ce composé sont reportées dans le tableau III.12.

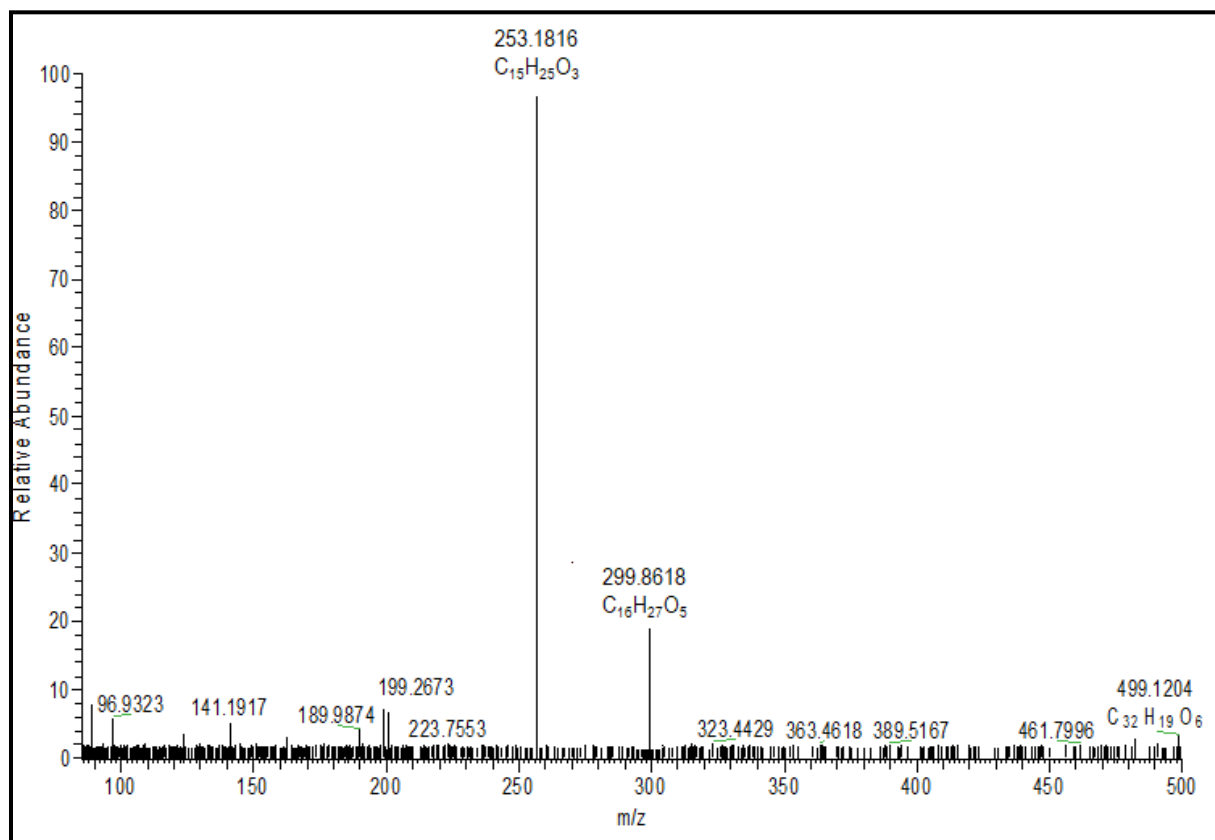
**Tableau III.12:** Données de la spectrométrie RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  du composé Ag/10/12.

Position	$\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
2	-	158.84
3	-	135.0
4	-	179.70
5	-	153.72
6	-	132.28
7	-	158.92
8	6.53 s	95.02
9	-	153.85
10	-	106.22
1'	-	123.13
2'	7.94 d (1.6)	114.4
3'	-	148.43
4'	-	150.86
5'	6.92 d (8.5)	116.02
6'	7.62 dd (8.5 ; 1.6)	123.86
1''	5.42 d (7.0)	103.59
2''	3.49 t (7.0)	75.92
3''	3.45 t (9.0)	78.06
4''	3.33	71.50
5''	3.25 m	78.54
6'' a	3.74 dl (11.6)	62.55
6'' b	3.56 dd (5.7 ; 11.6)	
OMe-6	3.90 s	60.96
OMe-3'	3.97 s	56.79

### III. 2.1.4. Détermination structurale du composé Ag /14/12 :



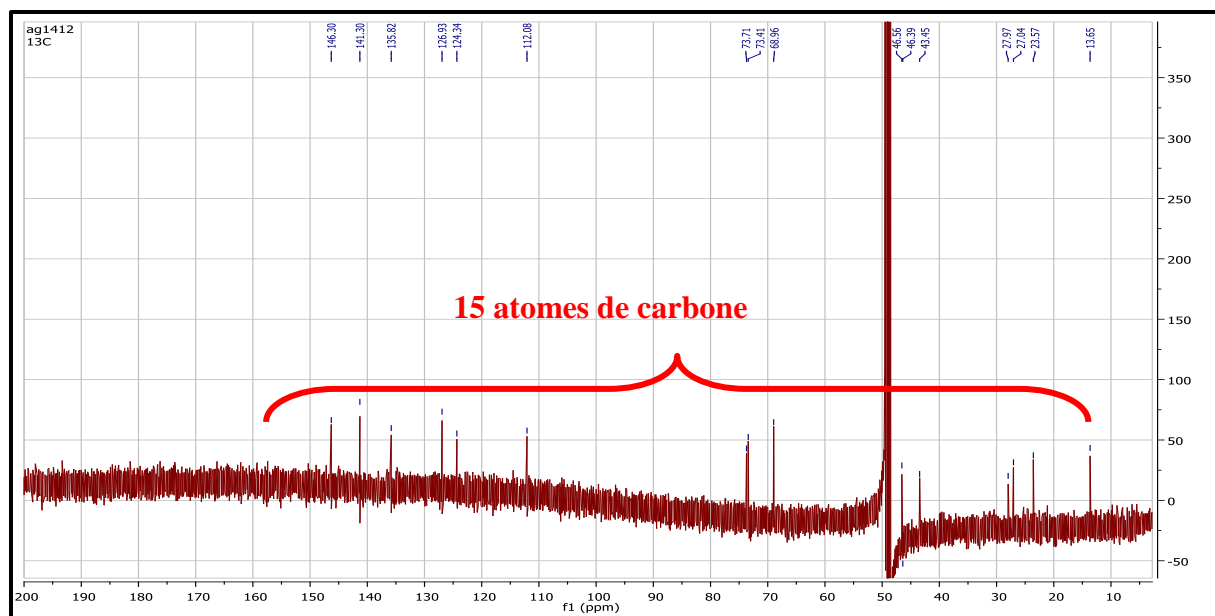
Le spectre de masse à haute résolution enregistré en mode ESI (-) de ce composé donne un pic moléculaire à  $m/z$  253.1816  $[M-H]^-$  correspondant à une formule brute  $C_{15}H_{26}O_3$ , soit un composé à trois insaturations.



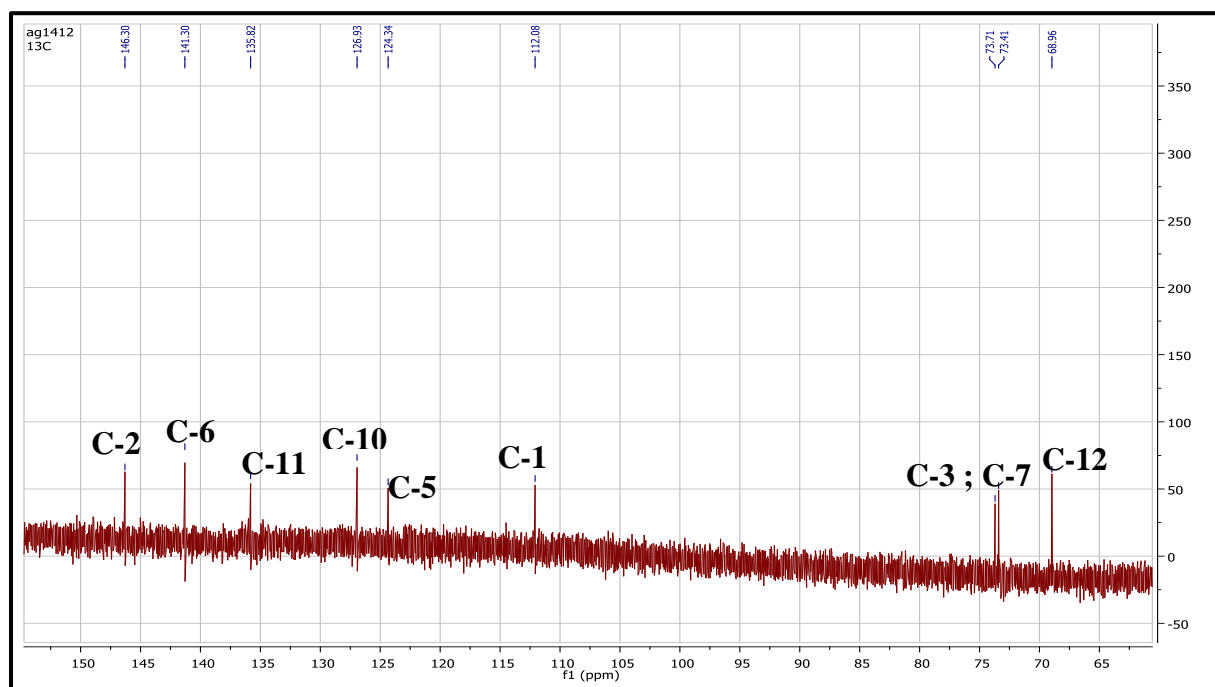
**Spectre III.70** : Spectre HR-ESI-MS du composé **Ag/14/12**.

L'étude du spectre RMN  $^{13}C$  (Spectre III.70) de ce composé montre la présence de quinze atomes de carbone, à partir de cette information on peut déduire que notre composé est un sesquiterpène. Ces quinze atomes de carbone peuvent être répartis comme suit :

- Trois groupements méthyle à  $\delta_C = 13.65$  ; 27.04 et 27.97 ppm.
- Cinq groupements  $CH_2$  dont :
  - 3  $CH_2$  non oxygénés à  $\delta_C = 23.57$  ; 43.45 et 46.56 ppm.
  - 1 éthylénique à  $\delta_C = 112.08$  ppm.
  - 1  $CH_2$  oxygéné à  $\delta_C = 68.96$  ppm.
- Quatre groupements  $CH$  éthylénique à  $\delta_C = 124.34$  ; 126.93 ; 141.30 et 146.30 ppm.
- Trois carbones quaternaires dont :
  - 2C à  $\delta_C = 73.41$  ; 73.71 ppm attribuables à deux carbones oxygénés.
  - 1C à  $\delta_C = 135.82$  ppm. ppm attribuable à un carbone éthylénique.

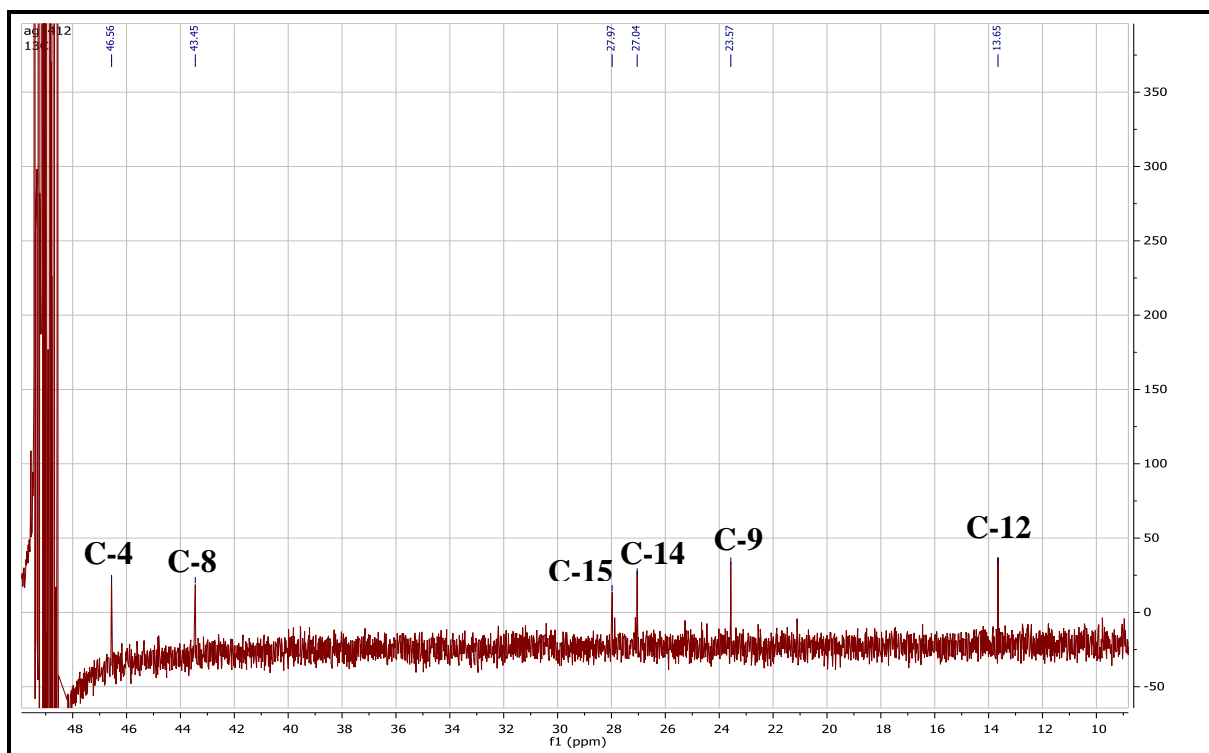


Spectre III.70: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm) du composé AG/14/12.



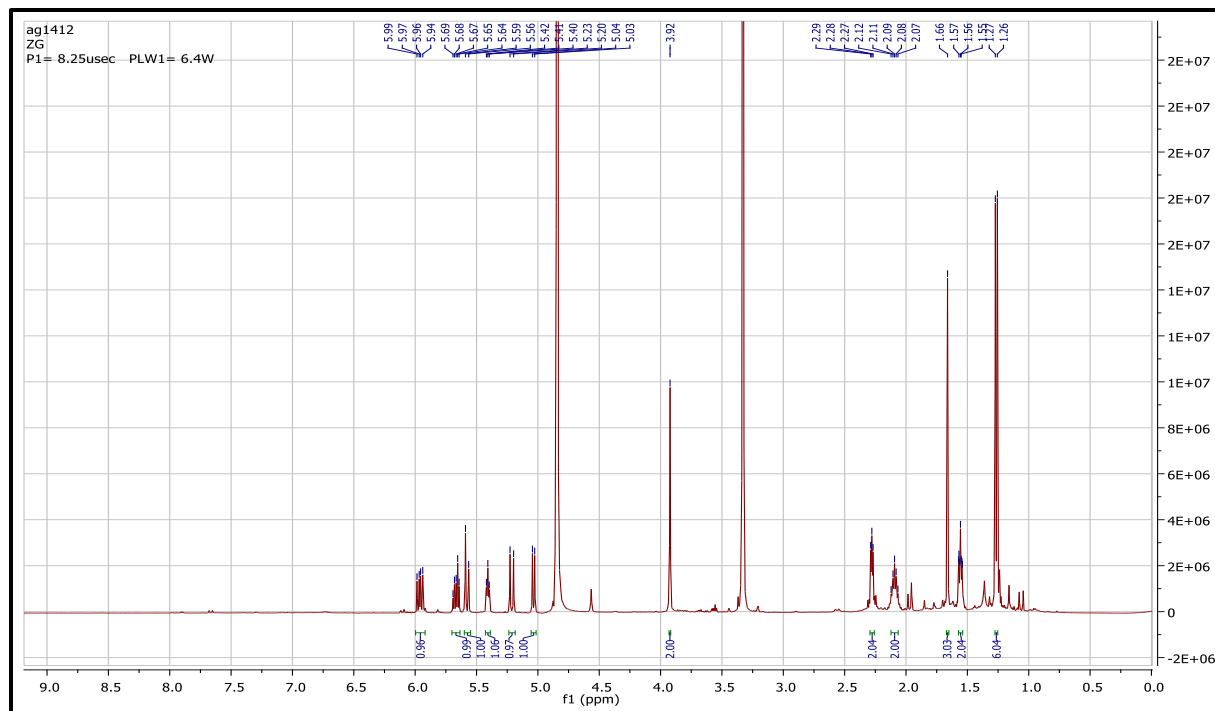
Spectre III.71: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  étalé (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm) du composé AG/14/12.



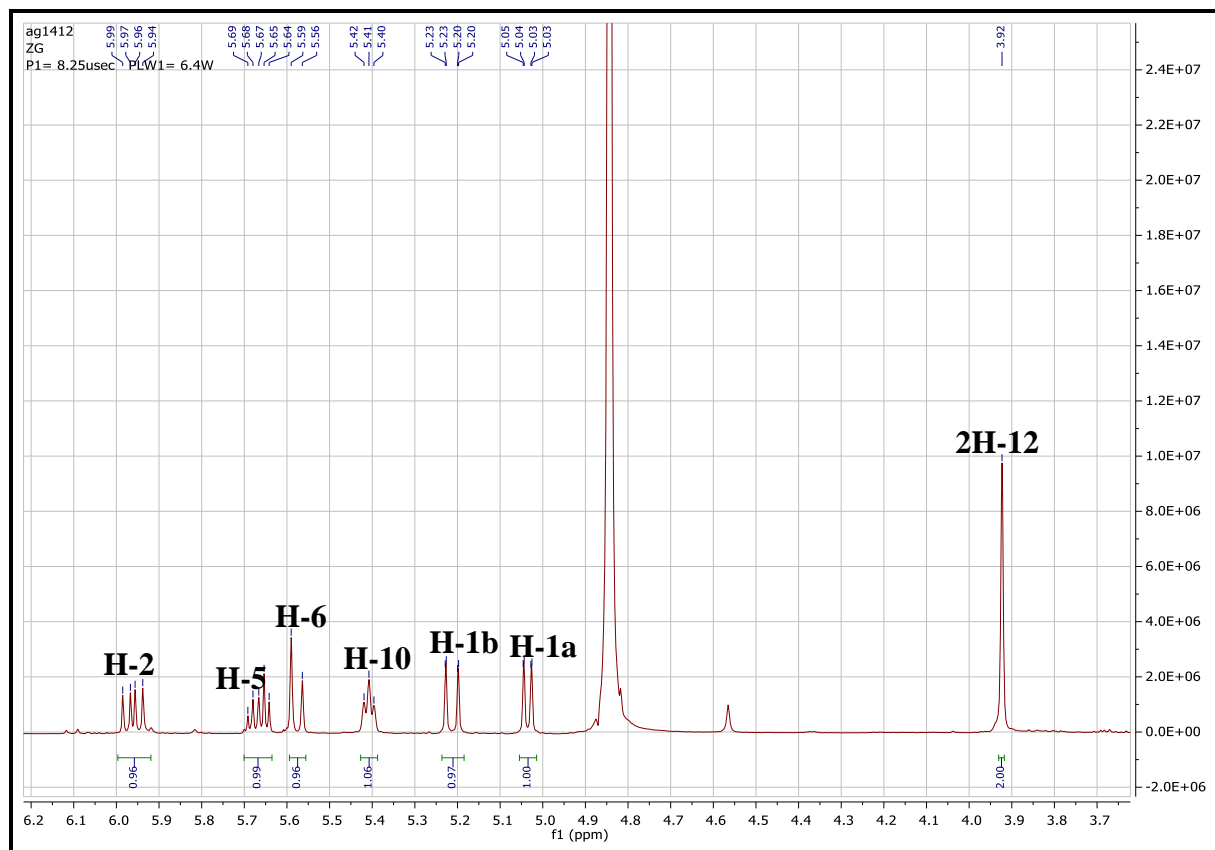


**Spectre III.72:** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  étalé (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm) du composé AG/14/12.

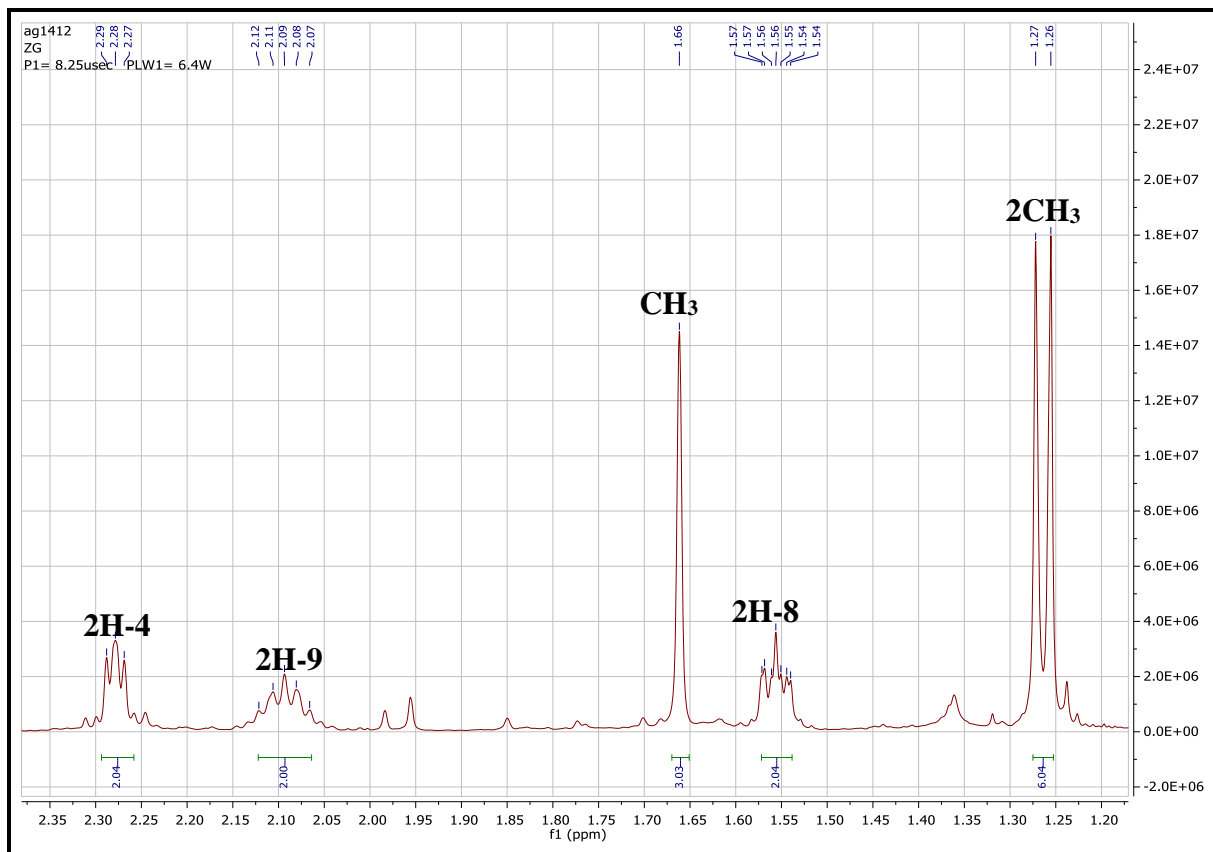
L'examen du spectre RMN  $^1\text{H}$  (Spectre III.73) montre la présence de deux doublets de doublets d'intégration 1H chacun à  $\delta$  5.21 ( $J = 17.3 ; 1.5$  Hz) et  $\delta$  5.04 ppm ( $J = 10.8 ; 1.5$  Hz) correspondant à deux protons éthyléniques que nous numérotions H-1a et H-1b et corrélant sur le spectre HSQC au carbone résonant à  $\delta_{\text{C}}$  112.08 ppm. Ces deux protons montrent des taches de corrélation sur le spectre COSY (Spectre III.77), avec le proton du CH éthylénique résonant sous forme d'un doublet de doublets ( $J = 17.3 ; 10.8$  Hz) à  $\delta_{\text{H}} = 5.96$  ppm ( $\delta_{\text{C}}$  146.30 ppm) ce qui place ce groupement CH en position vicinale par rapport à ce  $\text{CH}_2$  (C-1). Ce proton sera numéroté H-2 et son carbone C-2.



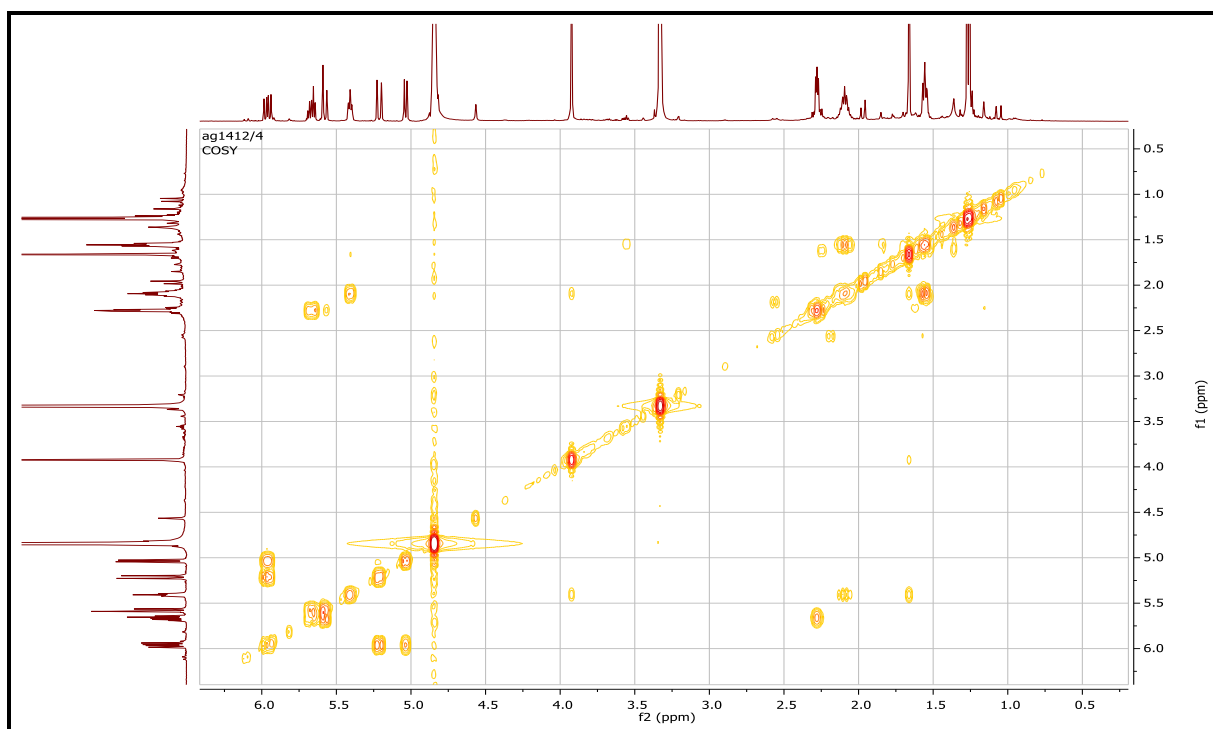
Spectre III.73 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm) du composé Ag/14/12.



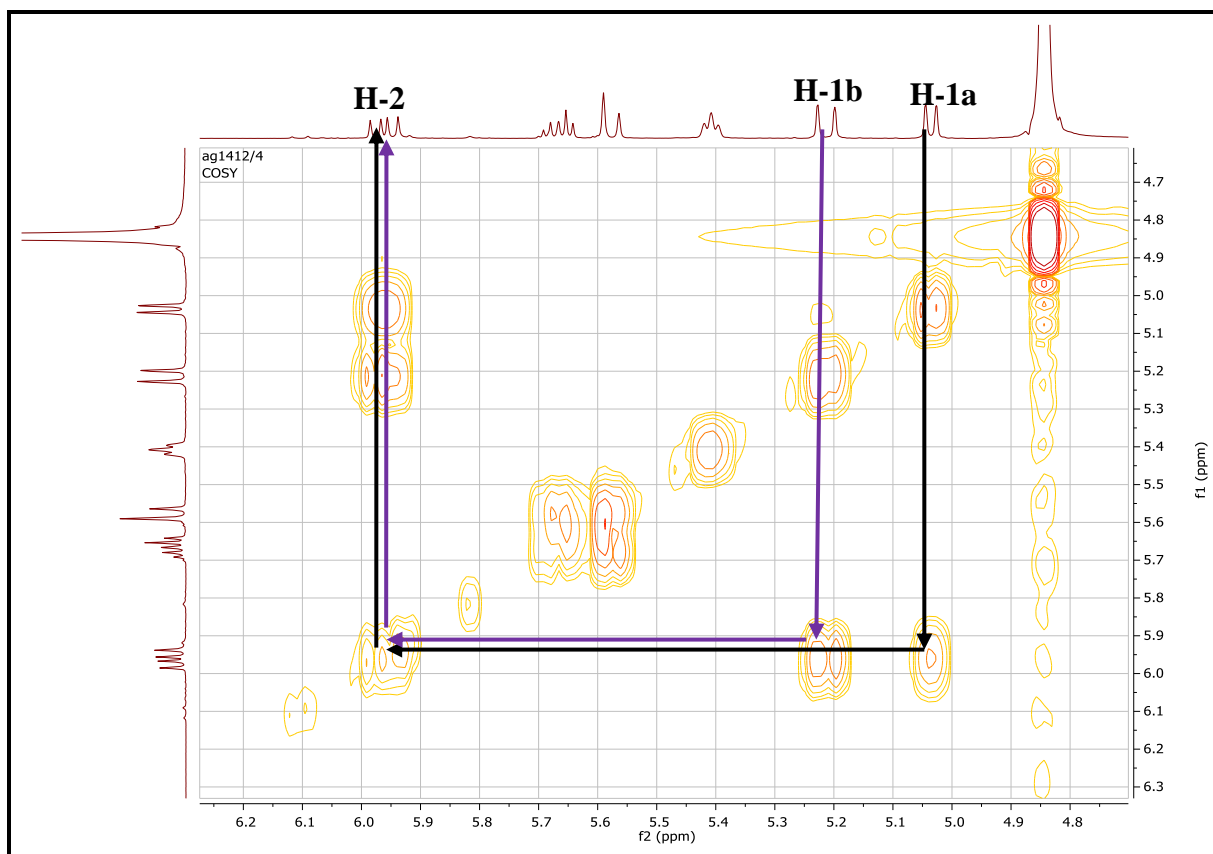
Spectre III.74: Spectre RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm) du composé Ag /14/12.



Spectre III.75: Spectre RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm) du composé Ag /14/12.



Spectre III.76: Spectre de COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) du composé Ag/14/12 dans  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



Spectre III.77: Spectre de COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) du composé Ag/14/12 dans  $\text{CD}_3\text{OD}$  (étalement).

Sur le spectre relatif à l'expérience HMBC (Spectre III.78), les protons H-1a, H-1b et H-2 montrent des corrélations avec le carbone quaternaire résonant à  $\delta_{\text{C}} = 73.71$  ppm indiquant que ce carbone est attaché à C-2, nous numérotons alors cette position C-3. D'après la valeur de son déplacement chimique ce carbone quaternaire est oxygéné.

Un groupement méthyle résonant sous forme d'un singulet à  $\delta_{\text{H}} = 1.25$  ppm ( $\delta_{\text{C}} = 27.97$  ppm) dont les corrélations des protons observées sur le spectre HMBC (Spectre III.78), avec les carbones C-2 et C-3 indiquent qu'il est en position C-3.

A ce stade de notre analyse, nous pouvons proposer l'entité reportée dans la figure III.11.

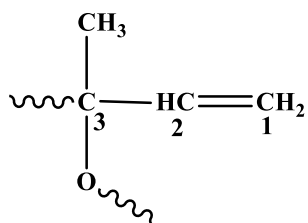
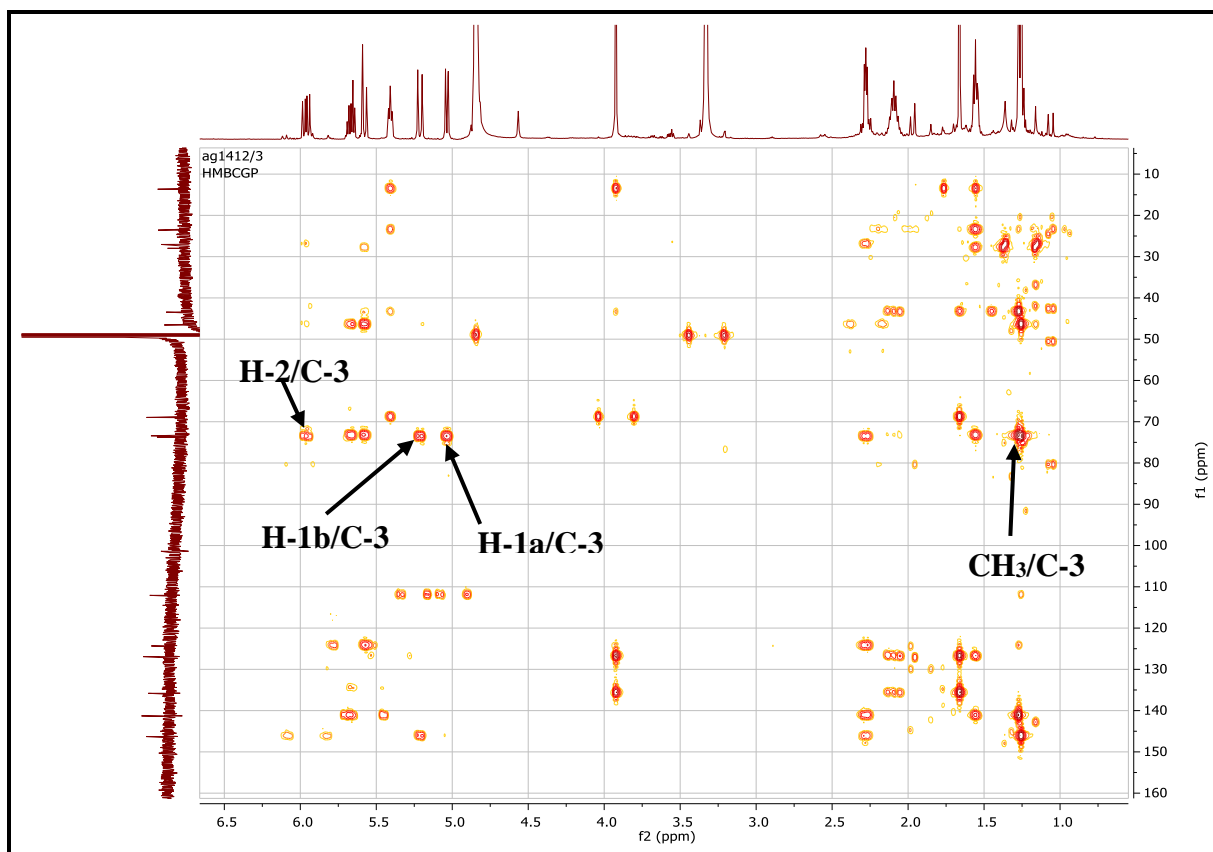


Figure III.11: Structure partielle du composé Ag /14/12.

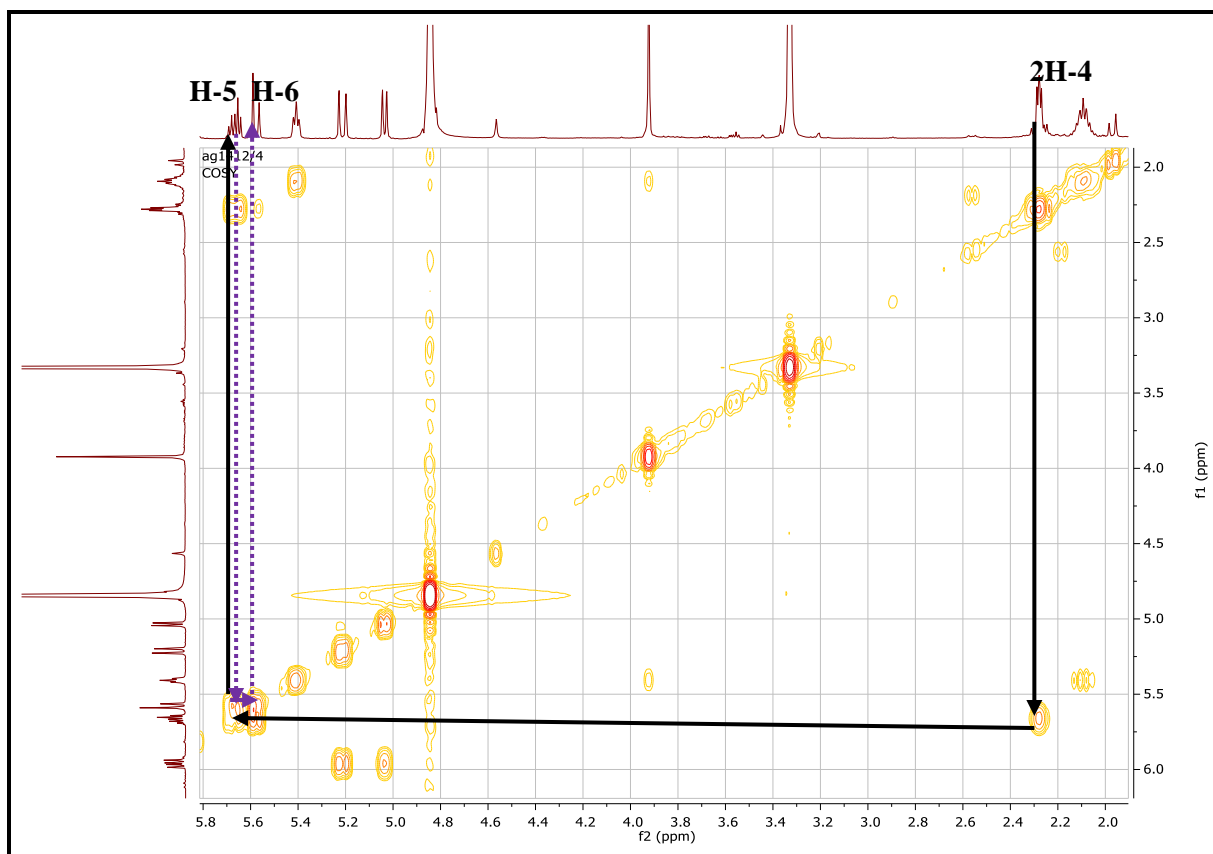


**Spectre III.78:** Spectre HMBC (600 MHz ; CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm) du composé Ag/14/12.

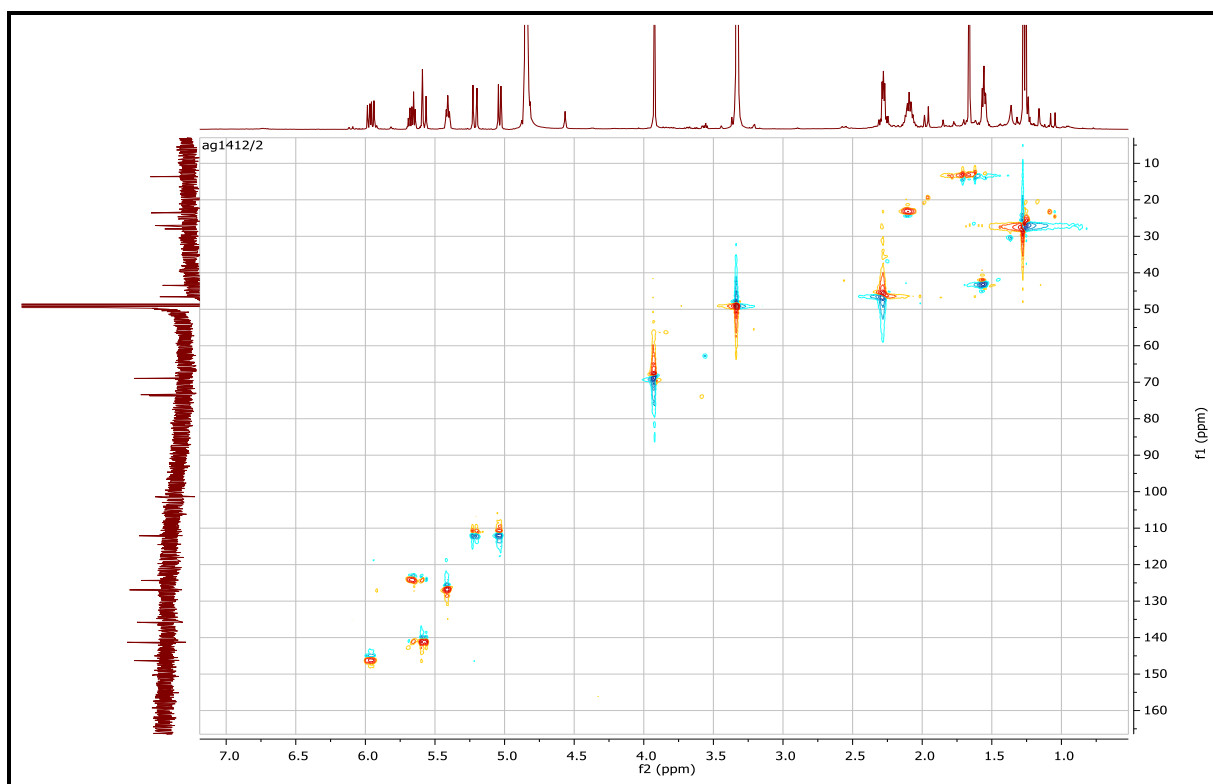
Un signal sous forme de multiplet d'intégration 2H à  $\delta_{\text{H}} = 2.28$  ppm, ces deux protons corrélient sur le spectre HSQC au carbone du méthylène à  $\delta_{\text{C}} = 46.56$  ppm. Sur le spectre HMBC les protons de ce groupement CH<sub>2</sub> montrent des taches de corrélation nettes avec les carbones C-2 et C-3 (Spectre III.82), ce qui nous permet de les placer en position C-4.

Sur le spectre relatif à l'expérience COSY (Spectre III.79), les protons de ce CH<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>-4) montre une tache de corrélation avec un CH éthylénique résonant sous forme d'un multiplet à  $\delta_{\text{H}-5} = 5,66$  ppm, grâce au spectre HSQC on relève  $\delta_{\text{C}-5}$  à 124.34 ppm. Cette observation suffit pour placer le carbone éthylénique en position vicinale par rapport à C-4.

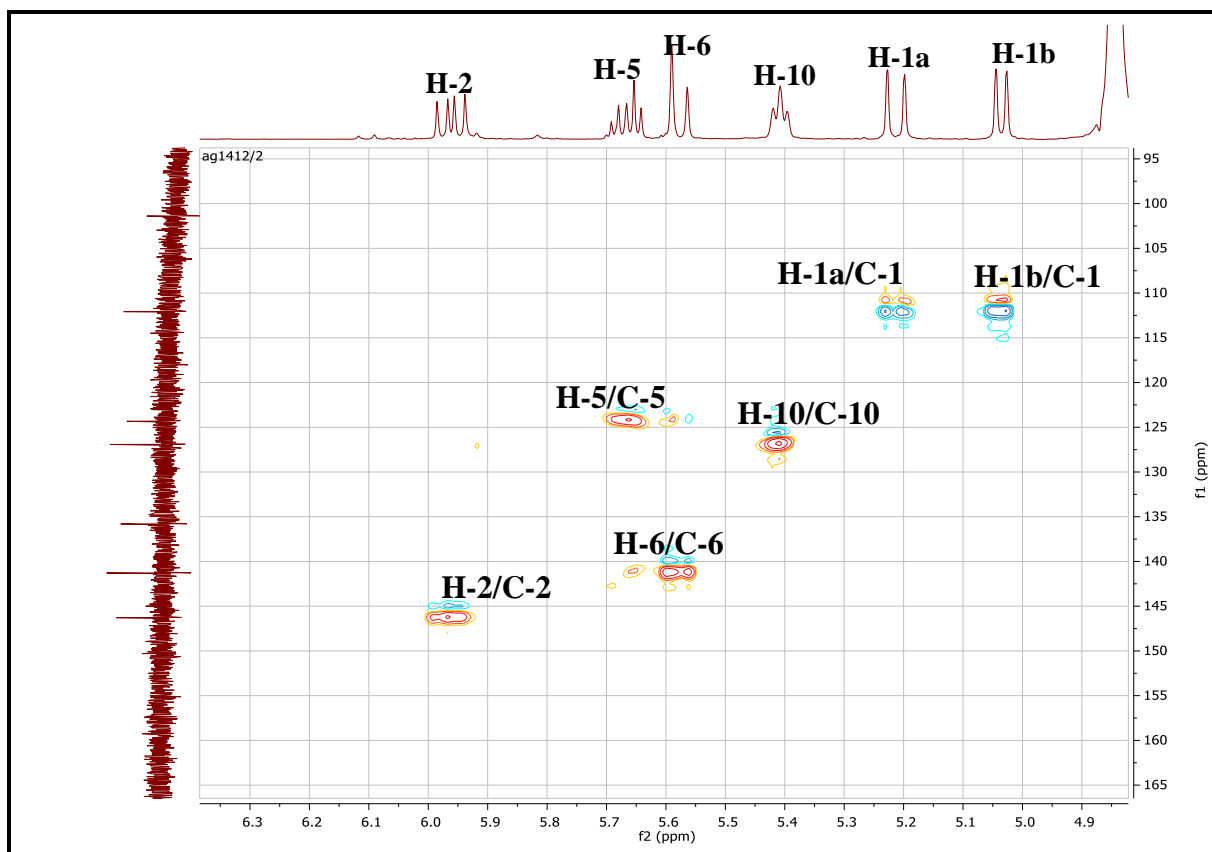
Toujours sur le spectre COSY, le proton H-5 permet la localisation de H-6 à  $\delta = 5.58$  ppm sous forme d'un doublet ( $J = 15.7$  Hz). Son carbone est assigné par l'analyse du spectre HSQC à  $\delta_{\text{C}-6} = 141.30$  ppm.



Spectre III.79: Spectre de COSY ( $1\text{H}-^1\text{H}$ ) du composé Ag/14/12 dans  $\text{CD}_3\text{OD}$  (étalement).

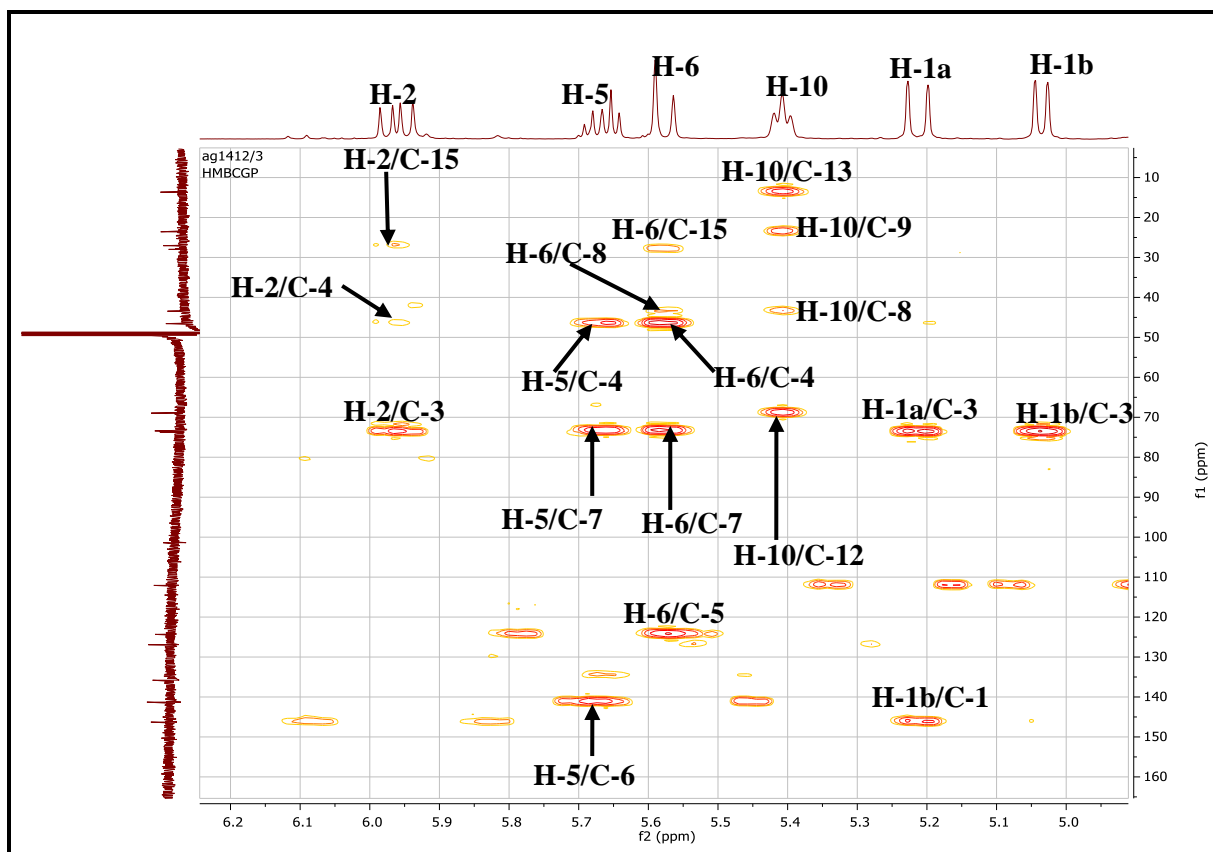


Spectre III.80 : Spectre HSQC (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm) du composé Ag/14/12.



**Spectre III.8 1:** Spectre HSQC étalé (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm) du composé Ag/14/12.

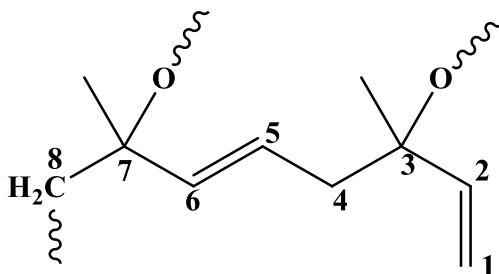
Sur le spectre HMBC (Spectre III.82), les protons H-5 et H-6 montrent des corrélations avec le carbone quaternaire résonant à  $\delta_C = 73.41$  ppm indiquant que ce carbone est attaché à C-6, nous numérotions alors cette position C-7. La valeur du déplacement chimique de C-7 est en faveur d'une oxygénation à ce niveau. Ce même carbone ( $\delta_C = 73.41$  ppm) montre à son tour une tache de corrélation avec les 3H du groupement méthyle à  $\delta_H = 1.28$  ppm ( $\delta_C = 27.04$  ppm) permettant l'emplacement de ce dernier sur ce carbone.



**Spectre III.82** : Spectre HMBC étalé (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm) du composé **Ag/14/12**.

Un retour vers le spectre HMBC (Spectre III.82), le carbone quaternaire C-7, le carbone du groupement CH éthylénique (C-6) et le groupement méthyle (CH<sub>3</sub>-15) montrent des taches de corrélation avec les protons d'un autre groupement CH<sub>2</sub> résonant sur le spectre proton (Spectre III.75) sous forme d'un multiplet à  $\delta_H = 1.56$  ( $\delta_C = 43.45$  ppm). Nous pouvons alors numéroter le carbone de ce groupement méthylène C-8.

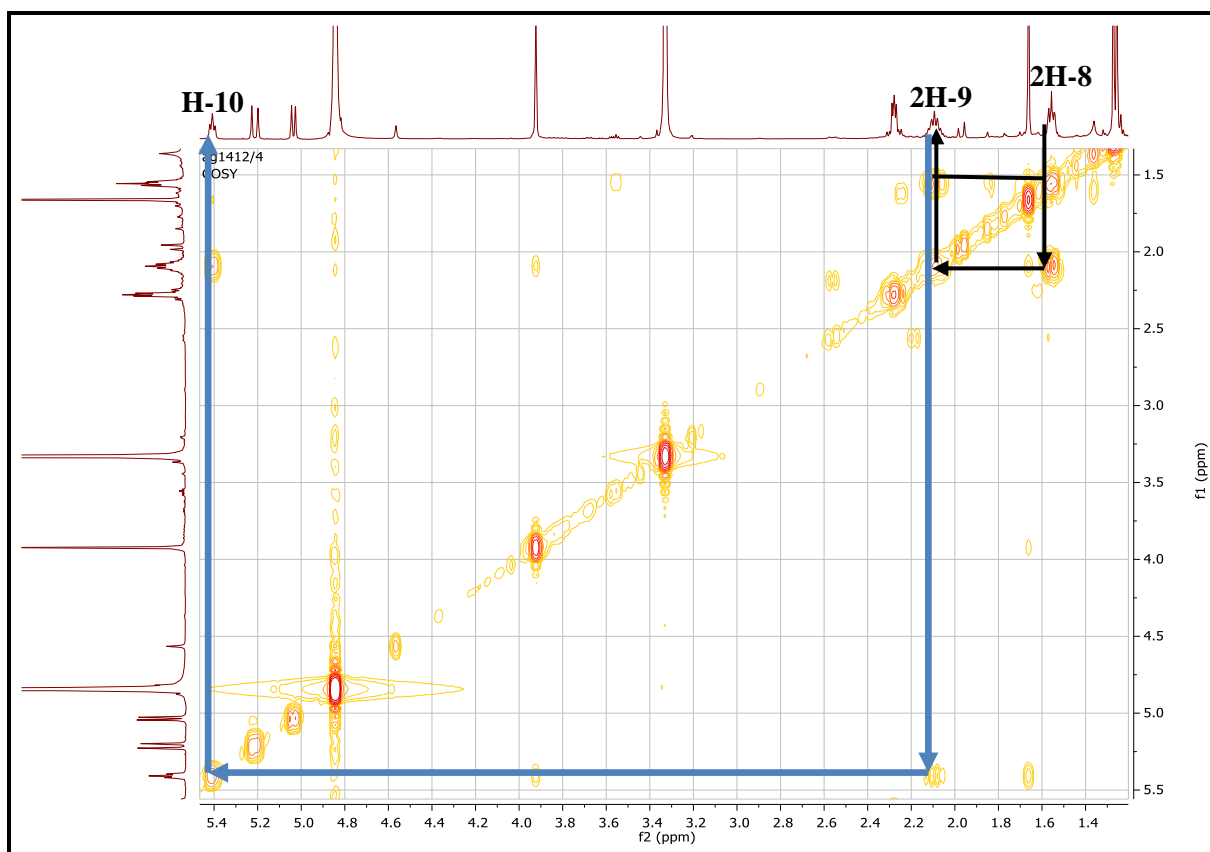
A ce stade de notre analyse, nous pouvons proposer l'entité reportée dans la figure III.12.



**Figure 12**: Structure partielle du composé **Ag /14/12**.



Sur le spectre COSY (Spectre III.83), les deux protons H<sub>2</sub>-8 montrent des taches de corrélation avec les protons du dernier méthylène non oxygéné attendu dans cette molécule. Ses protons résonnent sous forme d'un multiplet à  $\delta_{\text{H}} = 2.09$  ( $\delta_{\text{C}} = 23.53$  ppm), ceci permet de placer ce groupement CH<sub>2</sub> à la position C-9 de cette chaîne.



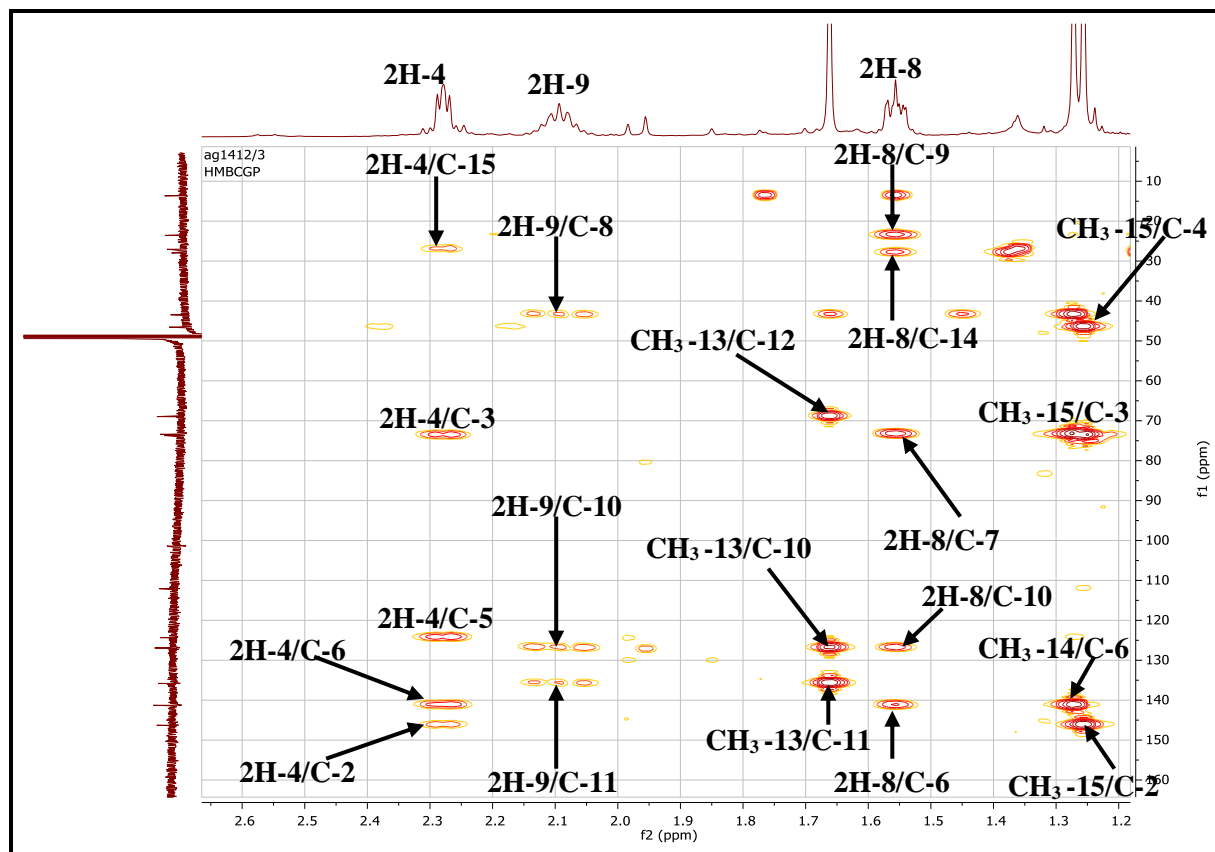
**Spectre III.83:** Spectre de COSY (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H) du composé **Ag/14/12** dans CD<sub>3</sub>OD (étalment).

Un signal d'intégration 1H sous forme d'un triplet à  $\delta_{\text{H}} = 5.41$  ppm ( $\delta_{\text{C}} = 126.93$  ppm) ( $J = 6.9$  Hz) correspondant à un proton d'un groupement CH éthylénique, corrélant sur le spectre COSY avec H<sub>2</sub>-9. Ce couplage permet d'attribuer ce groupement éthylénique à la position C-10. La multiplicité du signal du proton de ce groupement CH indique que le carbone éthylénique délimitant cette double liaison est quaternaire. En effet, le spectre HMBC (Spectre IV.84) montre des taches de corrélation entre H<sub>2</sub>-9 et le carbone quaternaire à  $\delta_{\text{C}} = 135.82$  ppm que nous pouvons alors attribuer à C-11. Sur le même spectre HMBC, ce même carbone (C-11) montre à son tour une tache de corrélation avec les 3H du groupement méthyle à  $\delta_{\text{H}} = 1.66$  ppm ( $\delta_{\text{C}} = 13.65$  ppm) permettant l'emplacement de ce dernier sur ce carbone quaternaire C-11. Nous les numérotions le carbone de ce méthyle C-13

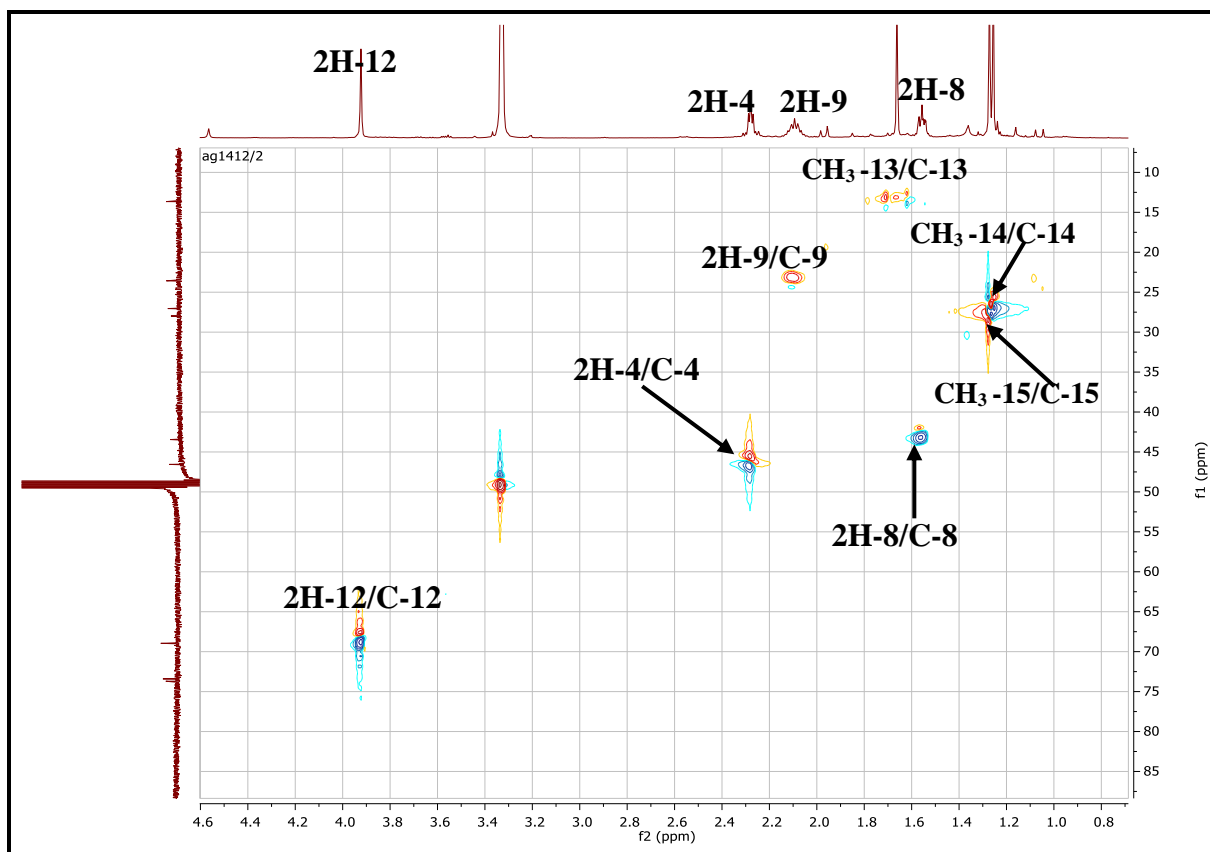
Un signal d'intégration 2H sous forme d'un singulet résonant à  $\delta_{\text{H}} = 3.92$  ppm. Ces deux protons corréleront sur le spectre HSQC (spectre III.85) au carbone du méthylène à  $\delta_{\text{C}} = 68.96$

ppm, nous le numérotions C-12. La valeur du déplacement chimique de C-12 est en faveur d'une oxygénation à ce niveau. La présence de ce CH<sub>2</sub> en cette position est d'ailleurs confirmée par les taches de corrélation entre les carbones C-10, C-11 et C-13 et les protons de ce groupement (H<sub>2</sub>-12) observées sur le spectre HMBC (Spectre III.84).

Les carbones des groupements méthyles portés par le C-3 et le C-7, seront numérotés C-15 et C-14 respectivement.



Spectre III.84 : Spectre HMBC étalé (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) du composé Ag/14/12.



Spectre III.85 : Spectre HSQC étalé (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) du composé Ag/14/12.

A ce stade de notre analyse, il est clair que nous avons utilisé tous les atomes de carbone et d'oxygène vu la formule brute de cette molécule C<sub>15</sub>H<sub>26</sub>O<sub>3</sub>. Il reste à placer trois atomes d'hydrogène sur le substituant ce qui mène à la présence de trois hydroxyles sur les trois carbones C-3, C-7 et C-12.

Cette analyse structurale permet d'identifier le composé Ag/14/12 comme étant le **7,12-dihydroxy-6,7-dihydro-5,(6) E-dehydronerolidol**. Cette molécule est nouvelle, elle est décrite pour la première fois dans la littérature et ses données complètes de la RMN<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C sont reportées dans le tableau III.13.

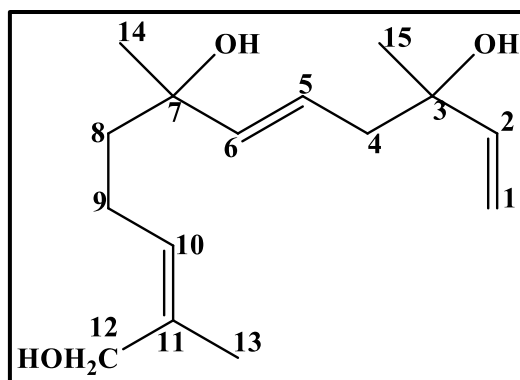
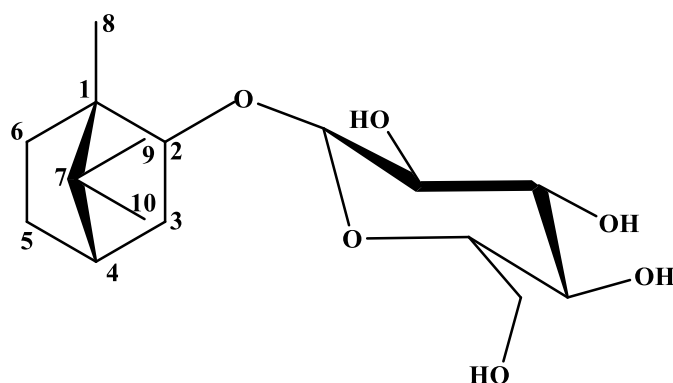


Figure III.13: Structure du composé Ag/14/12 :7,12-dihydroxy-6,7-dihydro-5,6 E-dehydronerolidol.

Tableau III.13: Données de la spectrométrie RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  du composé Ag/10/14.

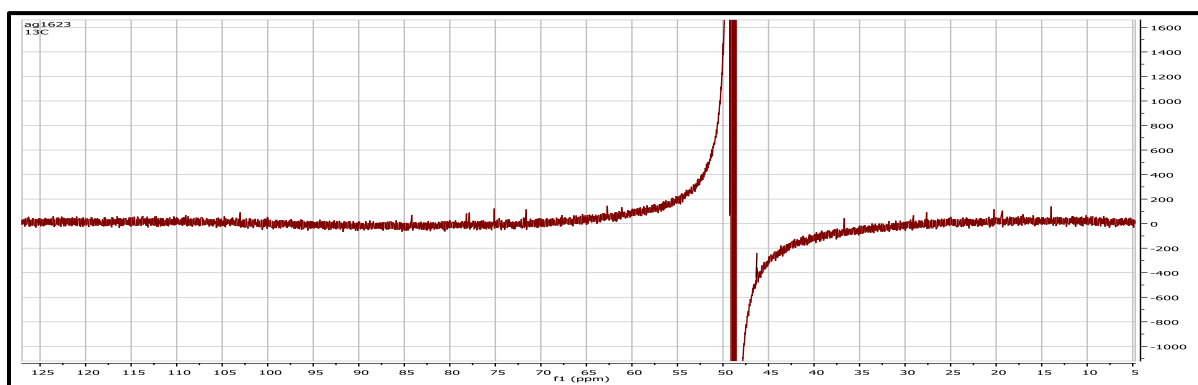
Position	$\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
1a	5.21 dd (10.8 ; 1.5)	112.08
1b	5.04 d (17.3 ; 1.5)	
2	5.96 dd (10.8 ; 17.3)	146.30
3	-	73.71
4	2.28 m	46.56
5	5.66 m	124.34
6	5.58 d (15.7)	141.30
7	-	73.41
8	1.56 m	43.45
9	2.09 m	23.53
10	5.41 t (6.9)	126.93
11	-	135.82
12	3.92	68.96
13	1.66	13.65
14	1.25	27.97
15	1.28	27.04

### III.2.1.5. Détermination structurale du composé Ag /16/23 :

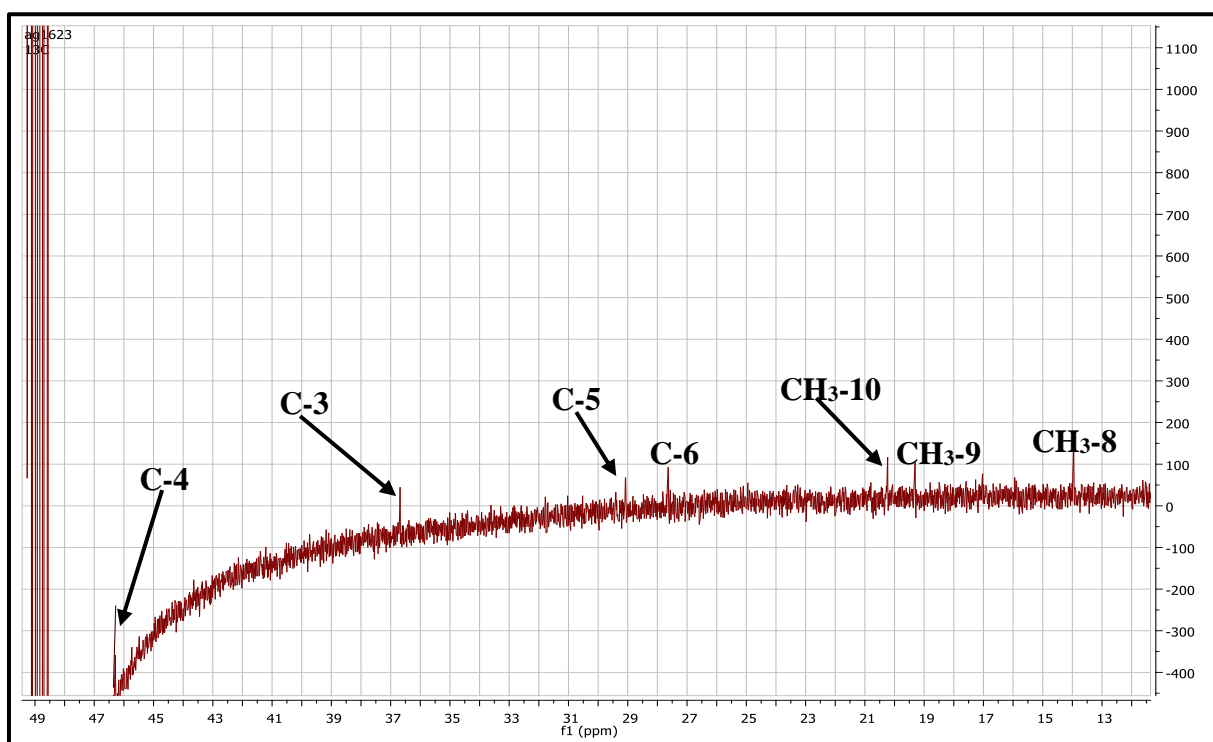


L'étude simultanée des spectres, RMN  $^1\text{H}$  (Spectre III.), RMN  $^{13}\text{C}$  (Spectre III.) et HSQC (Spectre III.) du composé **Ag/16/23**, montre la présence de seize atomes de carbone, dont six relatifs à un hexose et 10 relatifs à l' aglycone, que nous pouvons répartir comme suit :

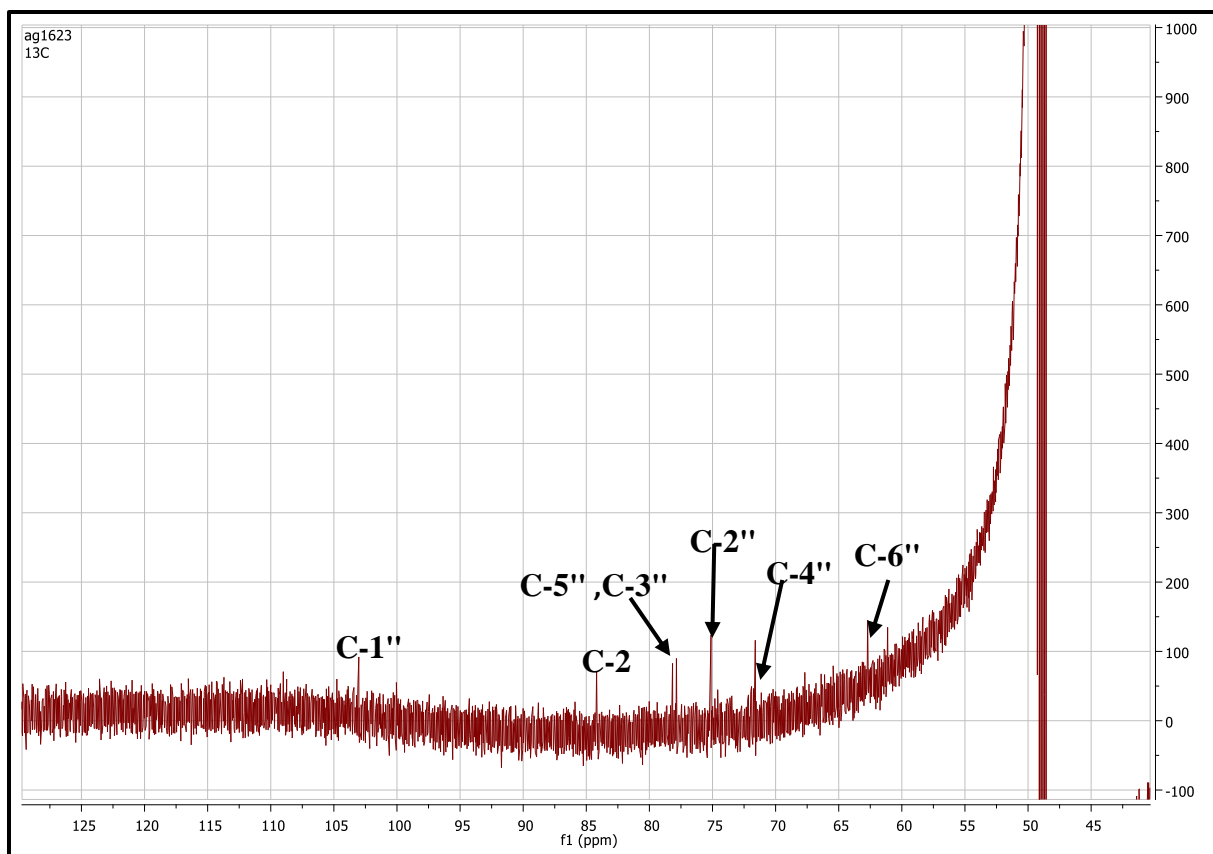
- Trois groupements méthyles à  $\delta_{\text{C}} = 13.56 ; 19.31$  et  $20.16$  ppm.
- Trois groupements  $\text{CH}_2$  non oxygénés à  $\delta_{\text{C}} = 26.91 ; 28.55$  et  $36.05$  ppm.
- Deux groupements  $\text{CH}$  l'un à  $\delta_{\text{C}} = 46.15$  ppm attribuable à un carbone non oxygéné et le second à  $\delta_{\text{C}} = 84.91$  ppm attribuable à un carbone oxygéné.
- Deux carbones quaternaires à  $\delta_{\text{C}} = 48.71$  et  $49.33$  ppm.



**Spectre III.86:** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm) du composé **Ag/16/23**.



**Spectre III.87:** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  étalé (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm) du composé **Ag/16/23**.

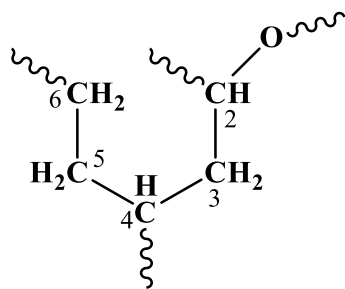


**Spectre III.88:** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm) étalé du composé **Ag/16/23**.

Sur le spectre COSY le proton à  $\delta_{\text{H}}$  4.16 ppm (CH oxygéné) montre une corrélation avec les deux protons du groupement  $\text{CH}_2$  résonant sous forme d'un multiplet chacun à  $\delta_{\text{H}}$  1.20 et 2.18 ppm ( $\delta_{\text{C}}$  36.05 ppm) ce qui place ce groupement  $\text{CH}_2$  en position vicinale par rapport à ce groupement CH. Ces deux protons montrent également des taches de corrélation avec le proton du groupement CH non oxygéné à  $\delta_{\text{H}}$  1.64 ppm ( $\delta_{\text{C}}$  46.15 ppm).

Sur le même spectre COSY ce proton corréle à son tour avec les deux protons du groupement  $\text{CH}_2$  résonant sous forme d'un multiplet chacun à  $\delta_{\text{H}}$  1.33 et 1.75 ppm, ces deux protons corrélant sur le spectre HSQC avec le même carbone à  $\delta_{\text{C}}$  28.55 ppm. Ces derniers noyaux corrélent avec ceux du groupement  $\text{CH}_2$  à  $\delta_{\text{H}}$  1.25 et 2.12 ppm ( $\delta_{\text{C}}$  26.91 ppm).

Ces observations permettent de proposer à ce stade de notre analyse l'entité reportée dans la figure III.14.



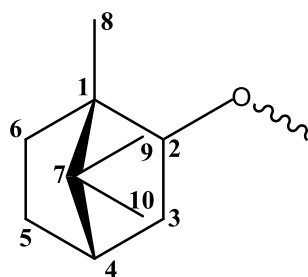
**Figure III. 14:** Structure partielle du composé **Ag /16/23**.

L'examen du spectre HMBC permet de confirmer l'enchaînement précédent, et montre clairement des corrélations entre les protons du CH<sub>2</sub> (C-6 ;  $\delta_C$  26.91 ppm) et le proton oxygéné en position 2 avec un carbone quaternaire à  $\delta_C$  48.71 ppm. Cette observation implique la présence d'une liaison entre ces groupement et le carbone quaternaire numéroté C-1.

Par ailleurs sur le spectre HMBC, Le carbone de CH oxygéné (C-2) corrèle également avec les protons du méthyle à  $\delta_H$  0.91 ppm ( $\delta_C$  13.56 ppm), ce qui suppose la substitution du carbone quaternaire voisin (C-1) par ce groupement par ce groupement méthyle.

Toujours sur le spectre HMBC, les deux méthyles restants montrent des taches de corrélation avec le carbone quaternaire résonant à  $\delta_C$  =49.33ppm ; cette situation suppose qu'ils sont tous les deux portés par ce carbone quaternaire. Nous numérotions ce carbone quaternaire C-7. Les protons de ces deux méthyles dont nous numérotions les carbones C-9 et C-10, montrent également des corrélations avec le carbone du CH (C-4 ;  $\delta_C$  =46.15 ppm), ce qui indique que le carbone quaternaire précédant est lié à ce groupement CH.

L'ensemble de ces analyses mène à une génine ayant un squelette monoterpénique bicyclique reporté dans la Figure III.15.



**Figure III.15:** Structure partielle du composé **Ag /16/23**.

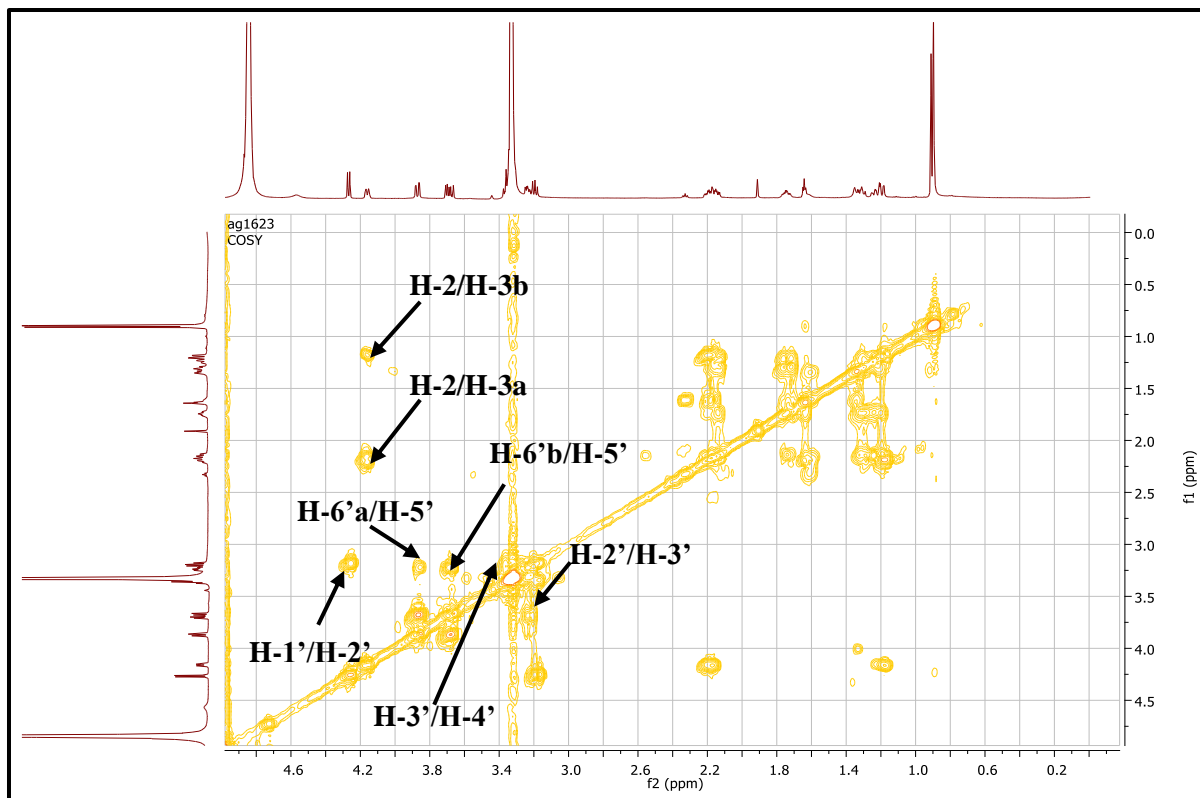
L'examen du spectre RMN  $^1\text{H}$  montre la présence d'un doublet d'intégration 1H à  $\delta = 4.26$  ppm ( $J = 7.8$  Hz), attribuable au proton anomérique d'un sucre relié à l'aglycone par un pont oxygène. D'après la valeur de la constante de couplage ( $J = 7.8$  Hz), cette entité peut être un glucosyle ou un galactosyle avec une configuration  $\beta$  entre le sucre et la génine.

Un retour vers le spectre COSY (spectre III.89) permet en effet de mettre en évidence la localisation du H-2' à  $\delta = 3.19$  ppm sous forme d'un triplet ( $J=7.8\text{Hz}$ ) grâce à sa corrélation avec le proton anomérique H-1', ce dernier permet de localiser le proton H-3' à  $\delta_{\text{H}} 3.36$  ppm sous forme de multiplet qui corréle à son tour avec le proton H-4' résonant à  $\delta_{\text{H}} 3.31$  ppm (recouvert partiellement par le pic du solvant). L'attribution de H-4' permet à son tour de localiser H-5' sous forme d'un multiplet à 3.24 ppm. Ce dernier noyau (H-5') mène à l'attribution de H-6'a à 3.87 ppm sous forme de doublet de doublets ( $J=11.8; 2.3\text{Hz}$ ) et H-6'b à 3.69 ppm *dd* ( $J=11.8; 5.4$  Hz).

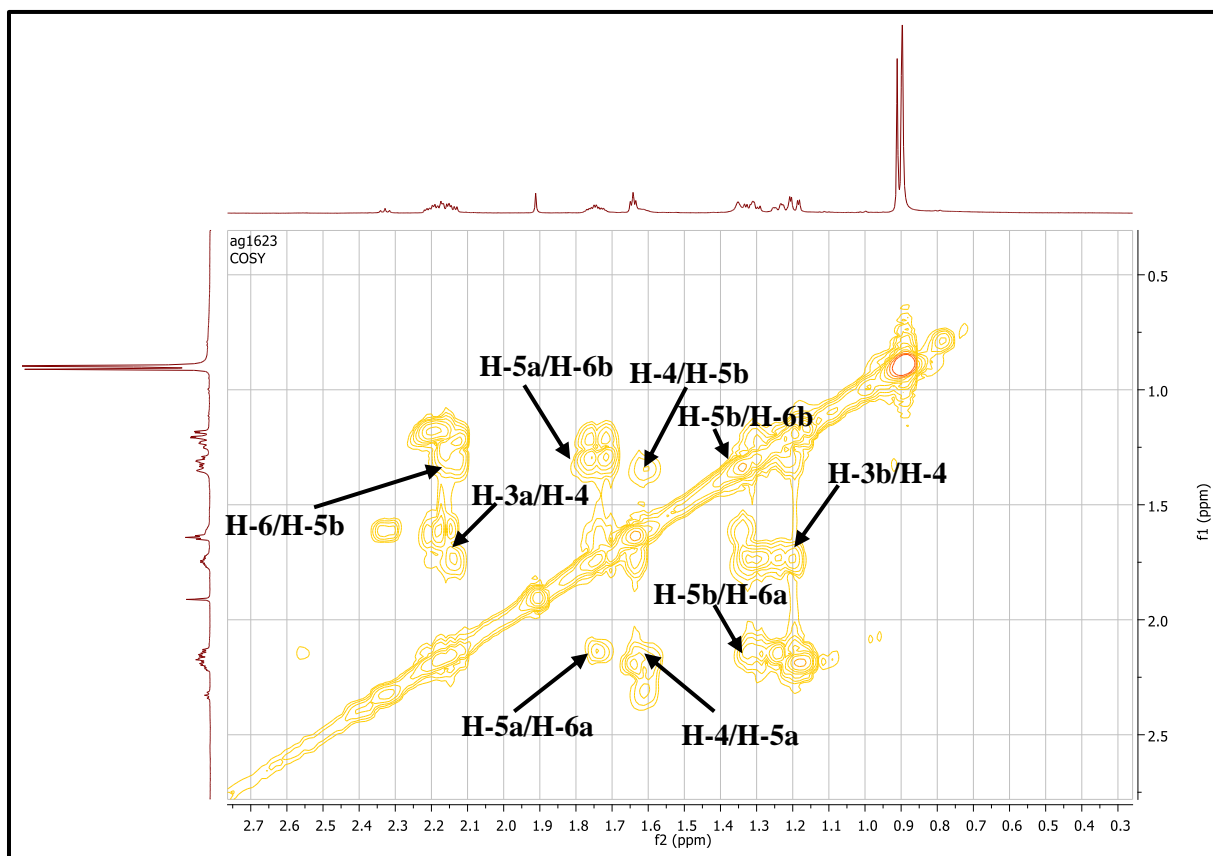
Le spectre HSQC (spectre III.95) permet également d'attribuer les carbones de sucre : C-1', C-2', C-3', C-4', C-5' et C6' aux signaux à  $\delta_{\text{C}}$  (102.82; 74.77 ; 77.92 ; 71.28 ; 77.46 et 62.35 ppm).

Les grandes valeurs des constantes de couplage ( $J > 7$ ) montrent que ces protons sont axiaux. Leurs déplacements chimiques ainsi que les déplacements de leurs carbones sont caractéristiques d'un glucose de configuration  $\beta$  [17].



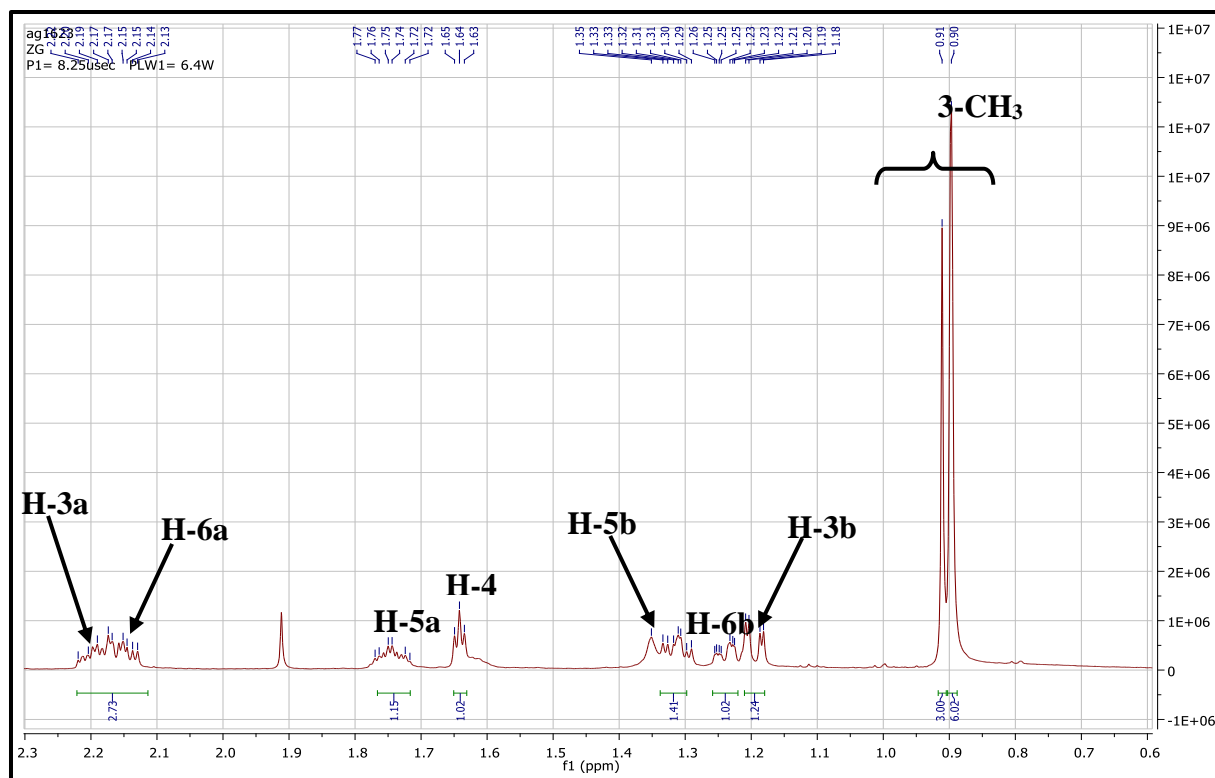


Spectre III.89 : Spectre COSY (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) du composé Ag /16/23.

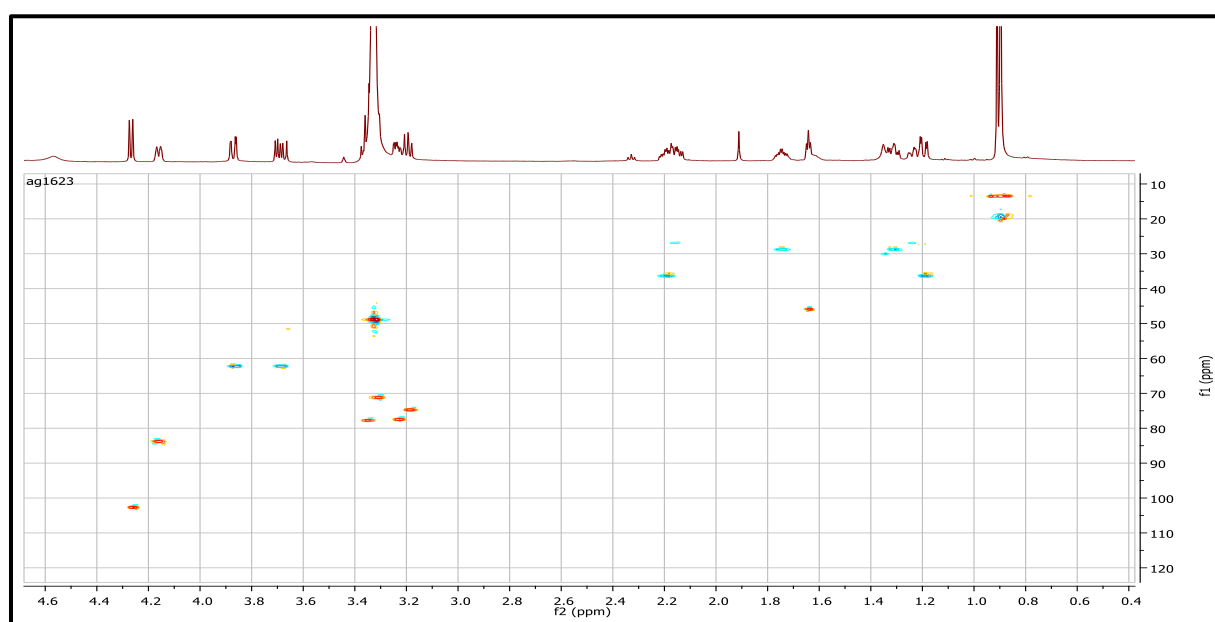


Spectre III.90 : Spectre COSY (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) du composé Ag /16/23.

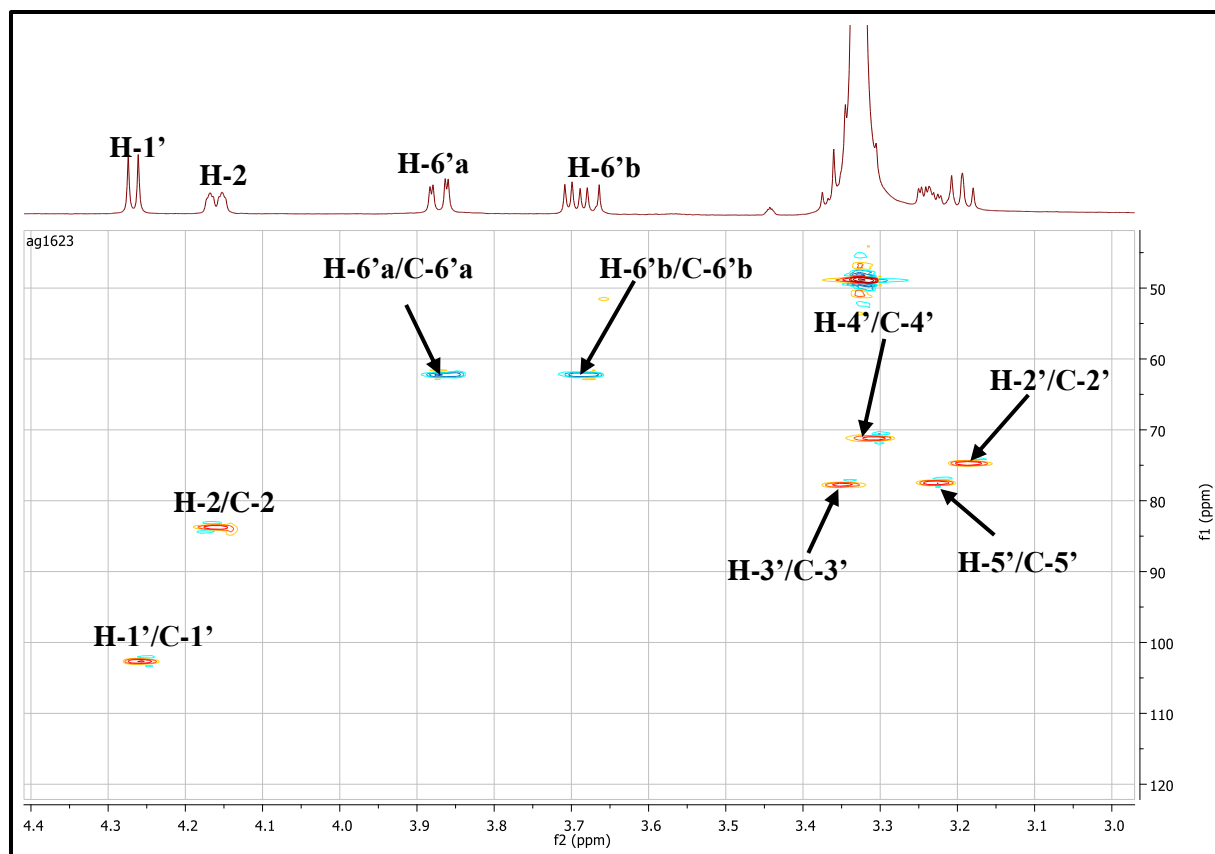




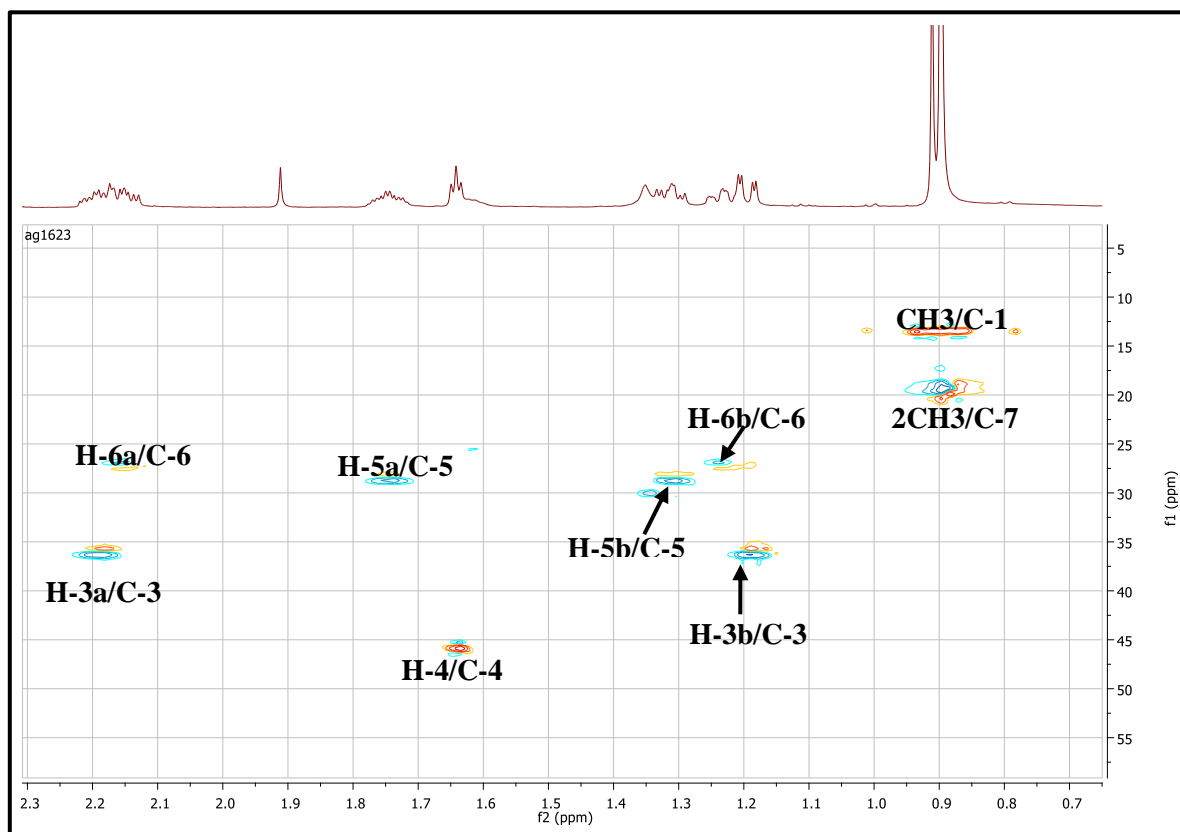
Spectre III.93: Spectre RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) du composé Ag /16/23.



Spectre III.94: Spectre HSQC (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) du composé Ag /16/23.

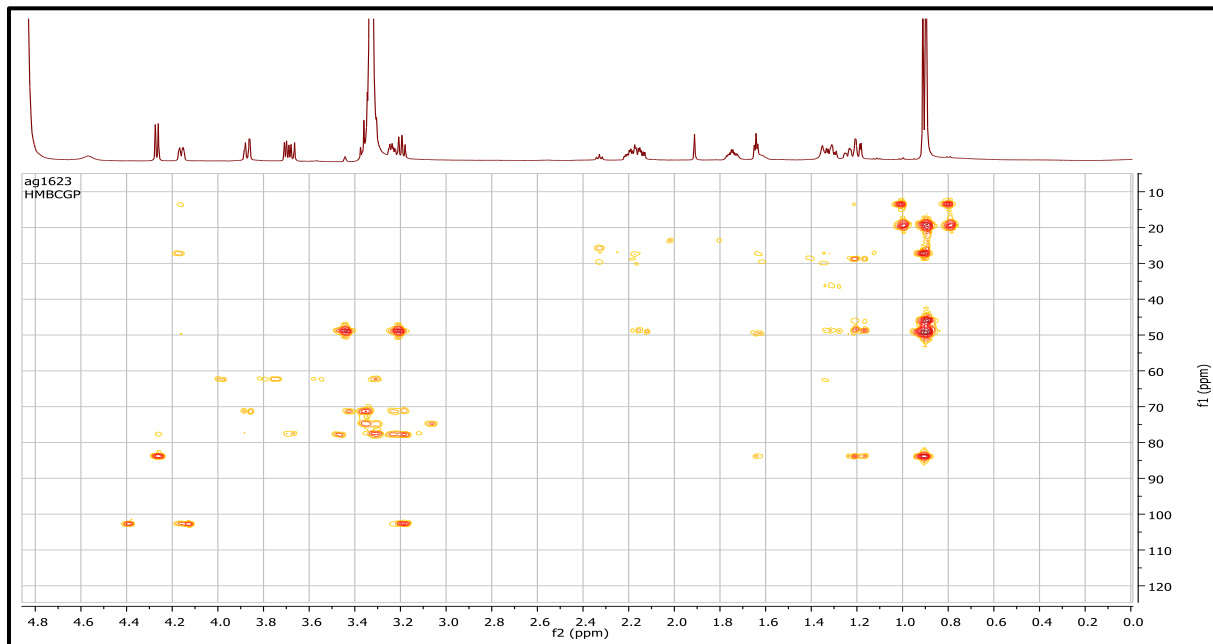


Spectre III.95: Spectre HSQC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) du composé Ag /16/23.

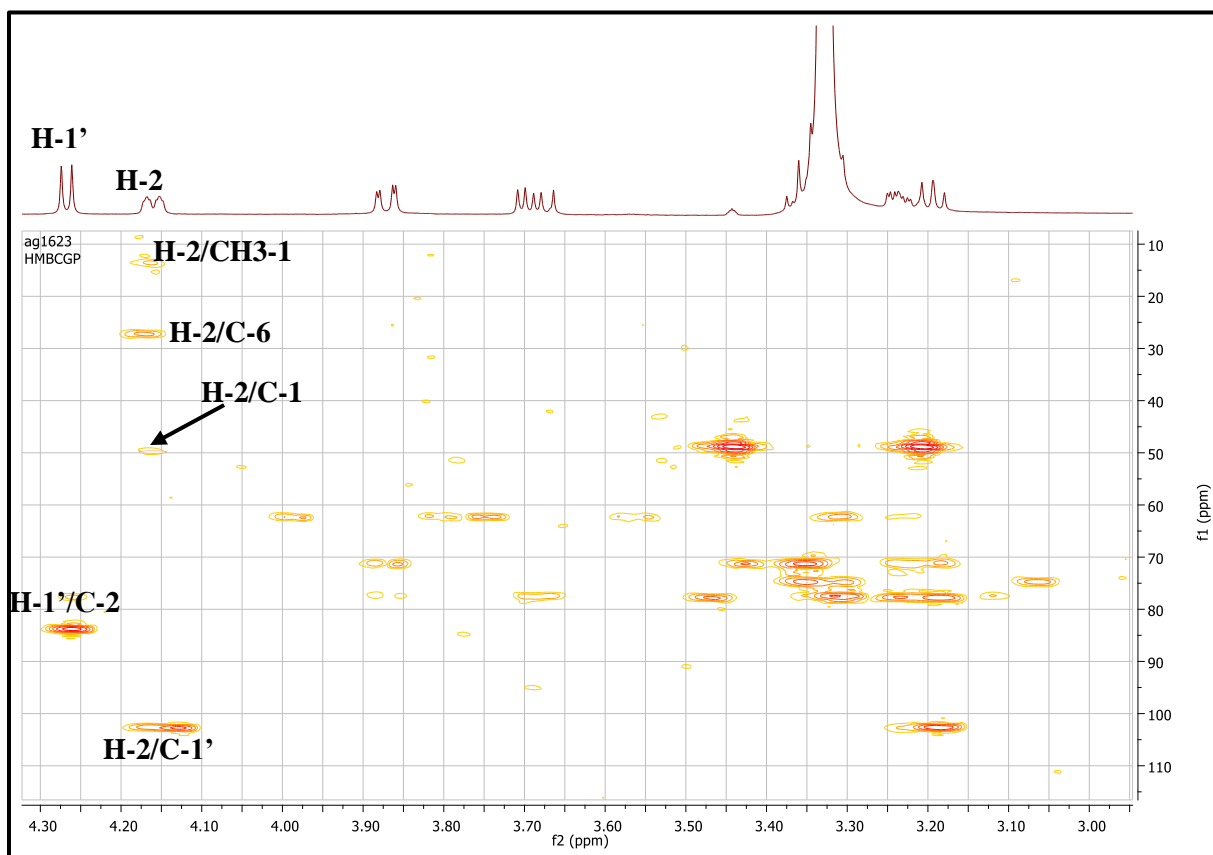


Spectre III.96: Spectre HSQC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) du composé Ag /16/23.

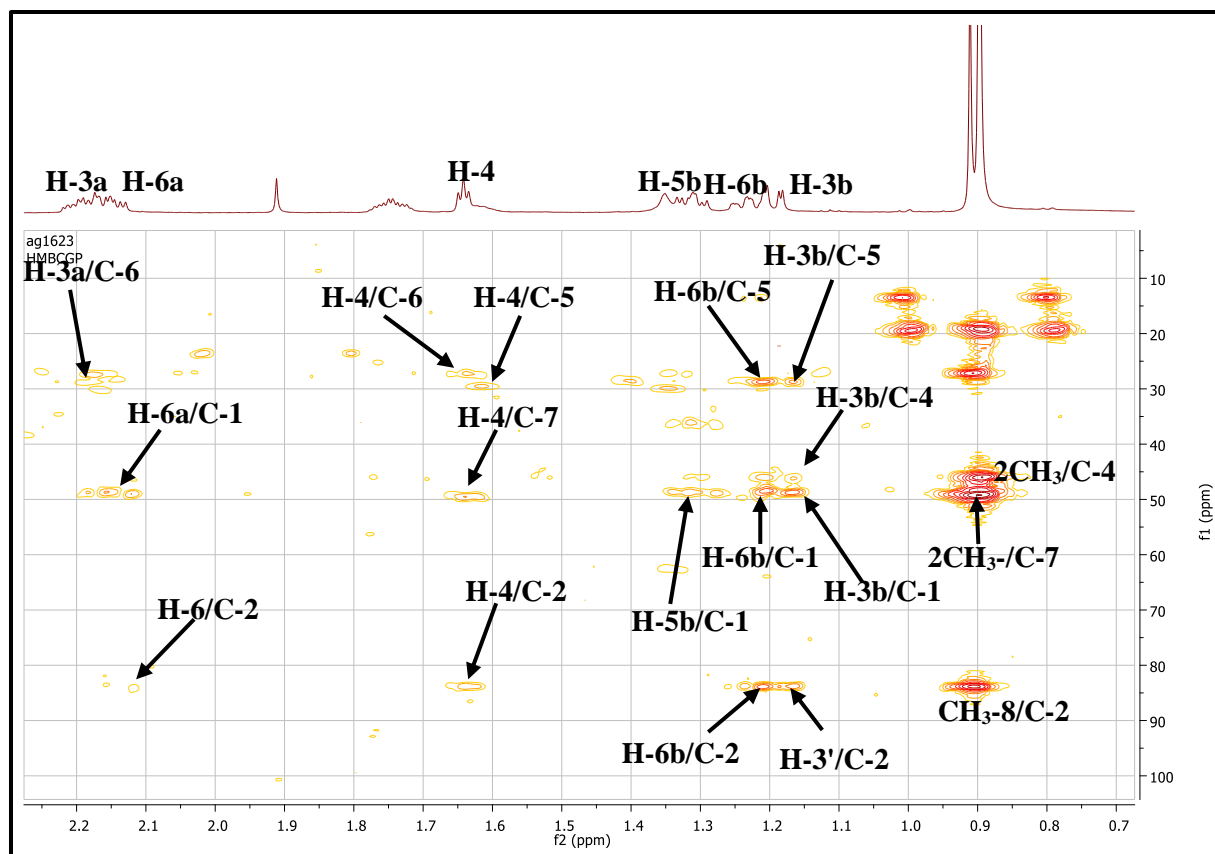
Sur le spectre relatif à l'expérience HMBC (Spectre III.98), on observe une tache de corrélation entre le proton anomérique  $\delta_{\text{H}} = 4.26$  ppm et le carbone C-2 ( $\delta_{\text{C}} = 84.91$  ppm) de la génine, ce qui nous permet de positionner le glucose en position C- 2.



Spectre III.97: Spectre HMBC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) du composé Ag /16/23.



Spectre III.98: Spectre HMBC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) du composé Ag /16/23.



Spectre III.99: Spectre HMBC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) du composé Ag/16/23.

Toutes ces données spectrales et la comparaison avec celles de la littérature [18,19] mène à la structure du composé Ag/16/23 indiqué ci-dessous et connu sous le nom : **bornéol 2-O-β-D-glucopyranoside**.

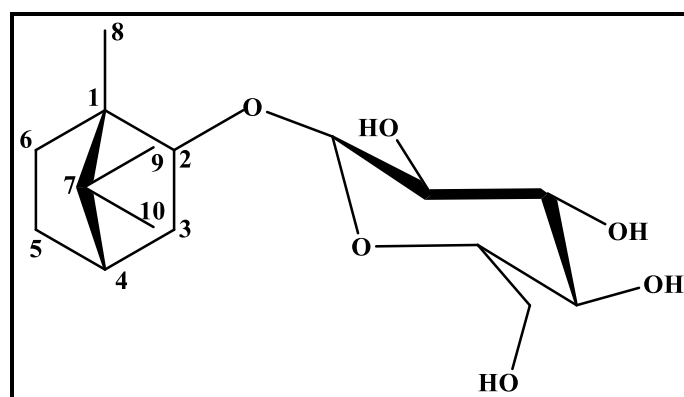


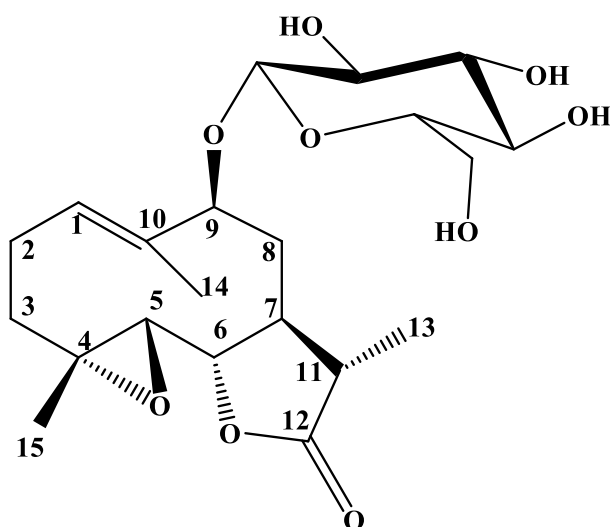
Figure III.16: Structure du composé Ag/16/13 : bornéol 2-O-β-D-glucopyranoside.

Tableau III.14: Données de la spectrométrie RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  du composé Ag /16/23

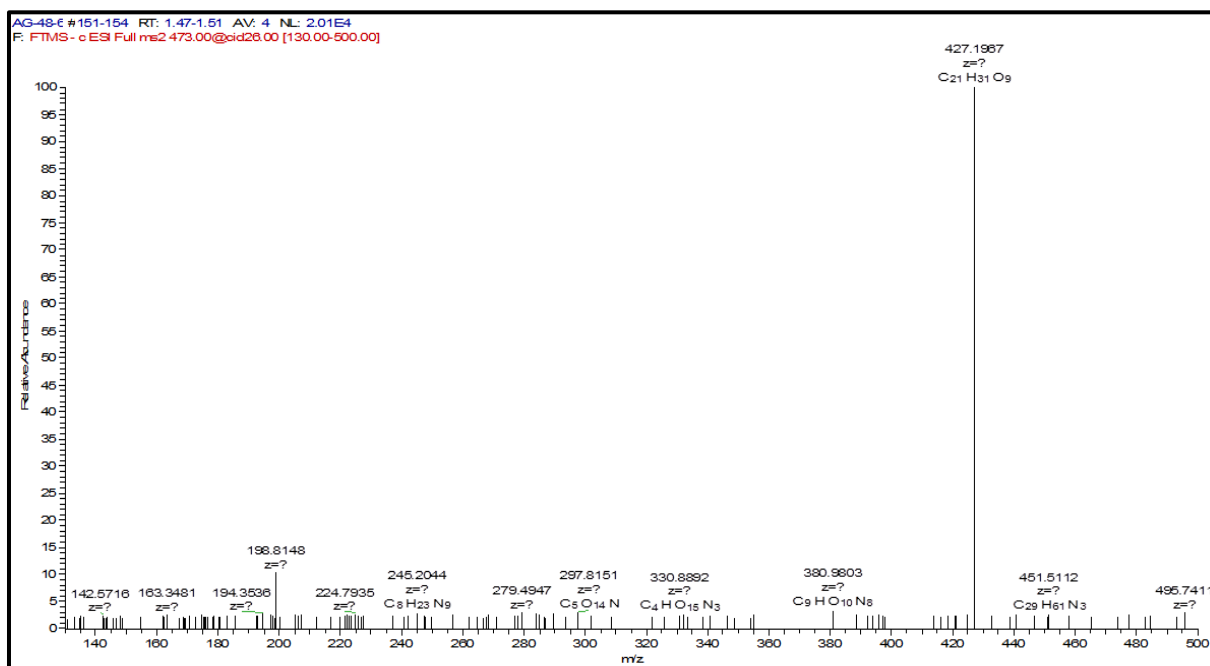
Position	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$J$ (Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
1	-	-	48.71
2	4.16	m	84.91
3a	2.18	m	36.05
3b	1.20	m	
4	1.64		46.15
5a	1.75	m	28.55
5b	1.33	m	
6a	2.12	m	26.91
6b	1.25	m	
7	-	-	49.33
1'	4.26	d (7.8)	102.87
2'	3.19	m	74.77
3'	3.36	m	77.92
4'	3.31	m	71.28
5'	3.24	m	77.64
6'a	3.87	dd (11.8 ; 2.3)	62.35
6'b	3.69	dd (11.8 ; 5.4)	
CH <sub>3</sub> -8	0.91	s	13.56
CH <sub>3</sub> -9	0.90	s	19.31
CH <sub>3</sub> -10	0.90	s	20.16

### III.2.2 Identification des produits isolés de la phase *n*-butanol :

#### III.2.2.1. Détermination structurale du composé Ag /48/6 :



L'analyse du spectre de masse à haute résolution (HRESI-MS) enregistré en mode négatif (Spectre III.100), montre la présence d'un ion à  $m/z = 427.1967$   $[M-H]^-$  orientant vers la formule brute  $C_{21}H_{32}O_9$  pour cette molécule qui doit contenir ainsi six insaturations.



**Spectre III.100** : Spectre HR-ESI-MS du composé **Ag/48/6**.

Le spectre RMN  $^{13}C$  du composé **Ag/48/6** (Spectre III.104) révèle la présence des signaux de carbones osidiques entre 60.0 et 100.0 ppm.

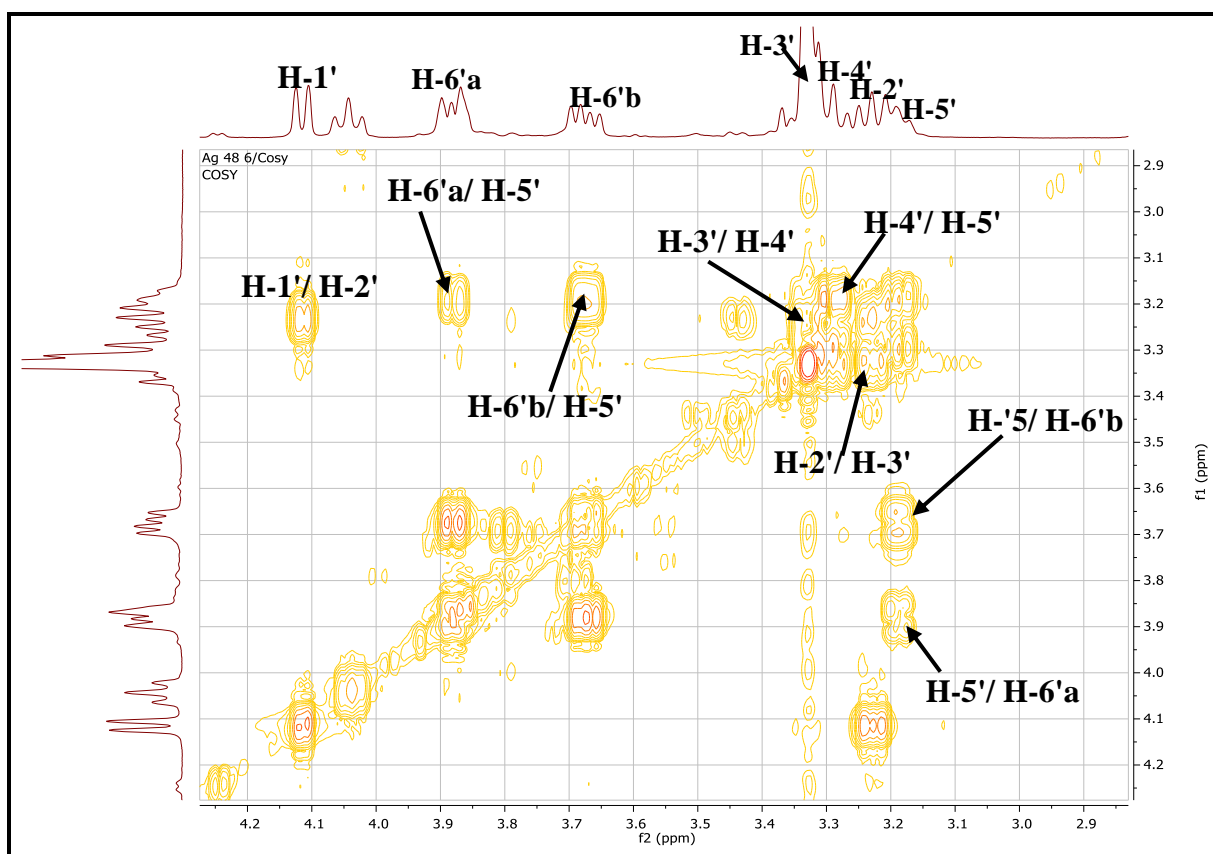
La présence d'une unité osidique est clairement observée sur le spectre RMN  $^1H$  qui montre un ensemble de signaux identifiés par les taches de corrélations visualisées sur les spectres COSY et HSQC on observe en effet :

Un signal sous forme d'un doublet ( $J = 7.7\text{Hz}$ ) d'intégration 1H localisé à  $\delta_H = 4.12$  ppm ( $\delta_C = 99.8$  ppm), attribuable au proton anomérique d'un sucre relié à l'aglycone par un pont oxygène. D'après la valeur de la constante de couplage ( $J = 7.7$  Hz), cette entité peut être un glucosyle ou un galactosyle avec une configuration  $\beta$  entre le sucre et la génine. Cette valeur indique également une interaction trans - di-axiale entre H-1' et H-2'.

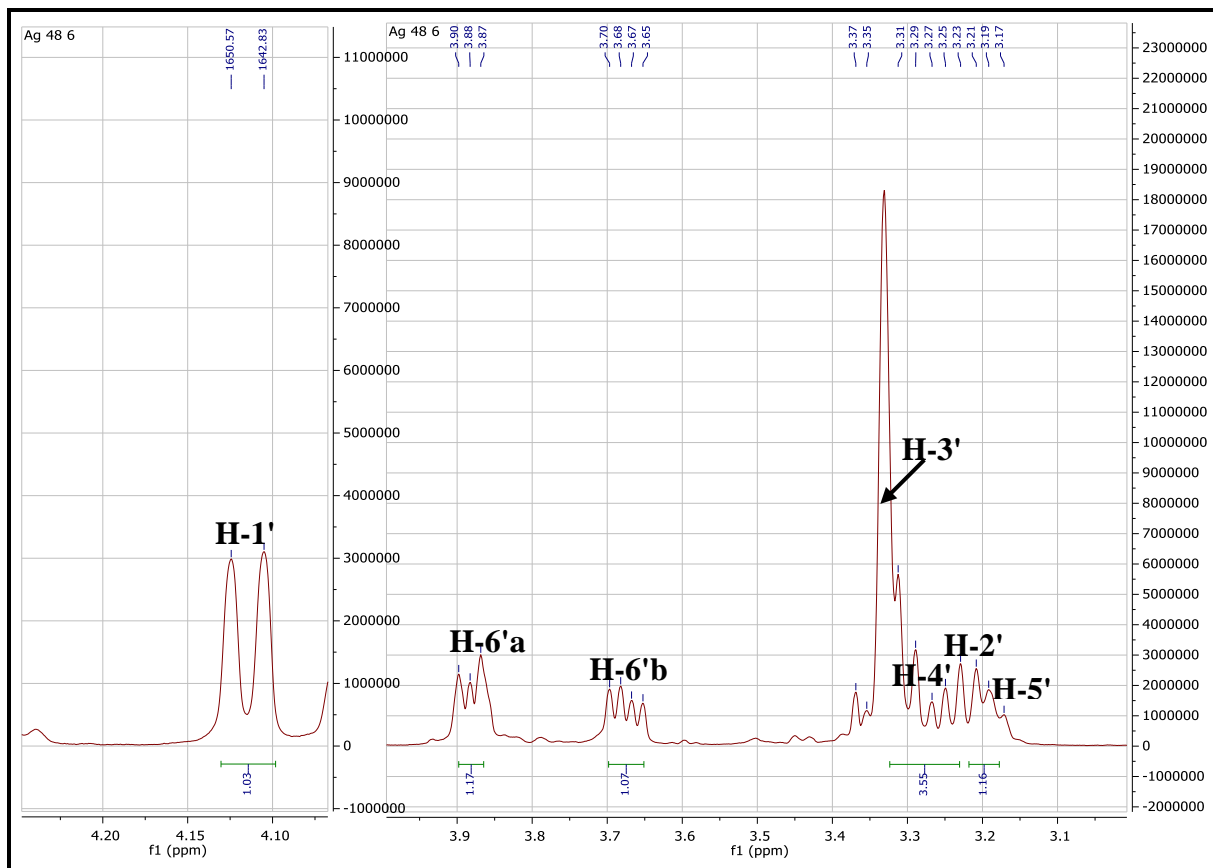
A partir du proton anomérique H-1' identifié précédemment, le spectre COSY permet de localiser le H-2' résonant sous forme d'un triplet à 3.24 ppm ( $J = 8.5$  Hz ;  $\delta_C = 74.6$  ppm). Ce dernier permet de localiser le proton H-3' à  $\delta_H = 3.33$  ppm ( $\delta_C = 77.9$  ppm) (recouvert partiellement par le pic du solvant). Toujours sur le spectre relatif à l'expérience COSY, ce



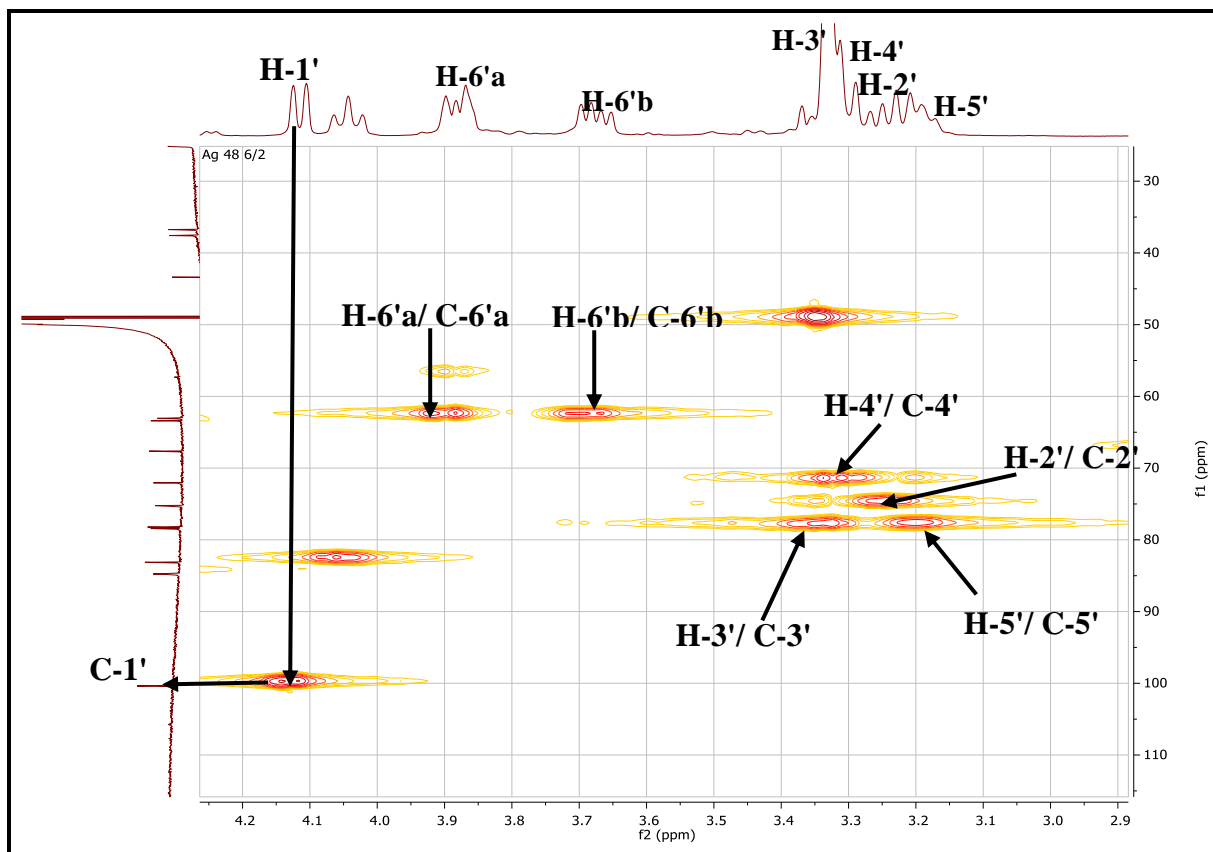
proton H-3' corrèle avec le proton résonant sous forme d'un triplet à  $\delta_H$  3.31 ( $J = 8.5$  Hz ;  $\delta_C = 71.4$  ppm) attribuable à H-4'. La multiplicité de ce signal triplet et la valeur de la constante de couplage ( 8.5 Hz) supposent des interactions axiale-axiale entre H-3'/H-4'; H-4'/ H-5' et indiquent une orientation axiale de H-3', ce qui oriente vers un groupement glucopyranoside. L'attribution de H-4' permet à son tour de localiser H-5' sous forme d'un multiplet à 3.19 ppm ( $\delta_C = 77.7$  ppm). Ce dernier noyau (H-5') mène à l'attribution de H-6'a à 3.90 ppm sous forme de doublet de doublets ( $J = 12.0; 4.5$  Hz) et H-6'b à 3.69 ppm dd ( $J = 12.0 ; 6.0$  Hz ;  $\delta_C = 62.5$  ppm).



Spectre III.101 : Spectre COSY (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm) du composé Ag /48/6.



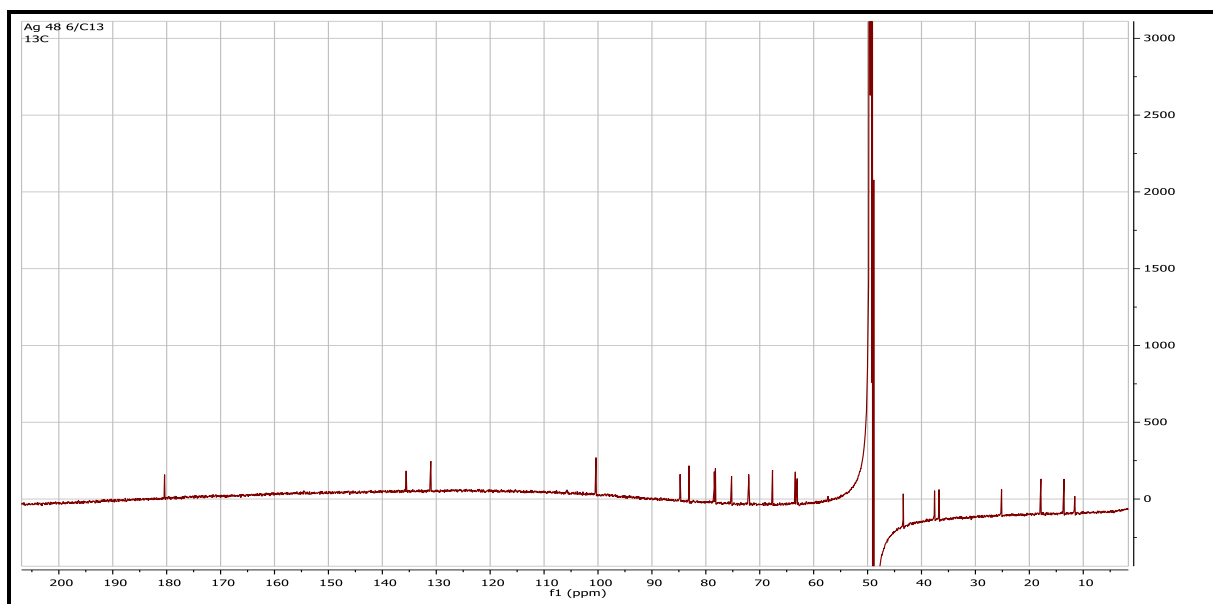
Spectre III.102: Spectre RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm) du composé Ag /48/6.



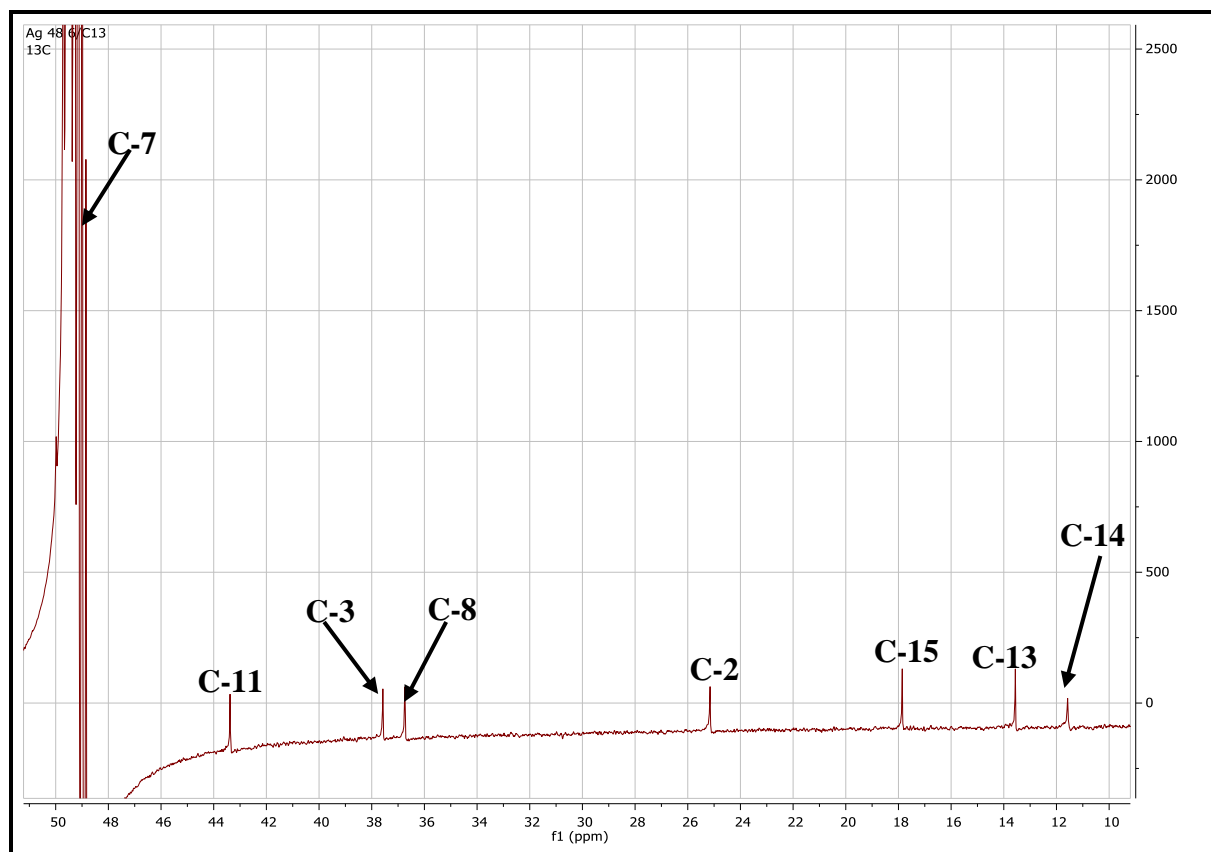
Spectre III.103 : Spectre HSQC (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm) du composé Ag/48/6.

En faisant abstraction des signaux de la partie osidique, les spectres des expériences RMN  $^{13}\text{C}$ , HSQC et HMBC montrent:

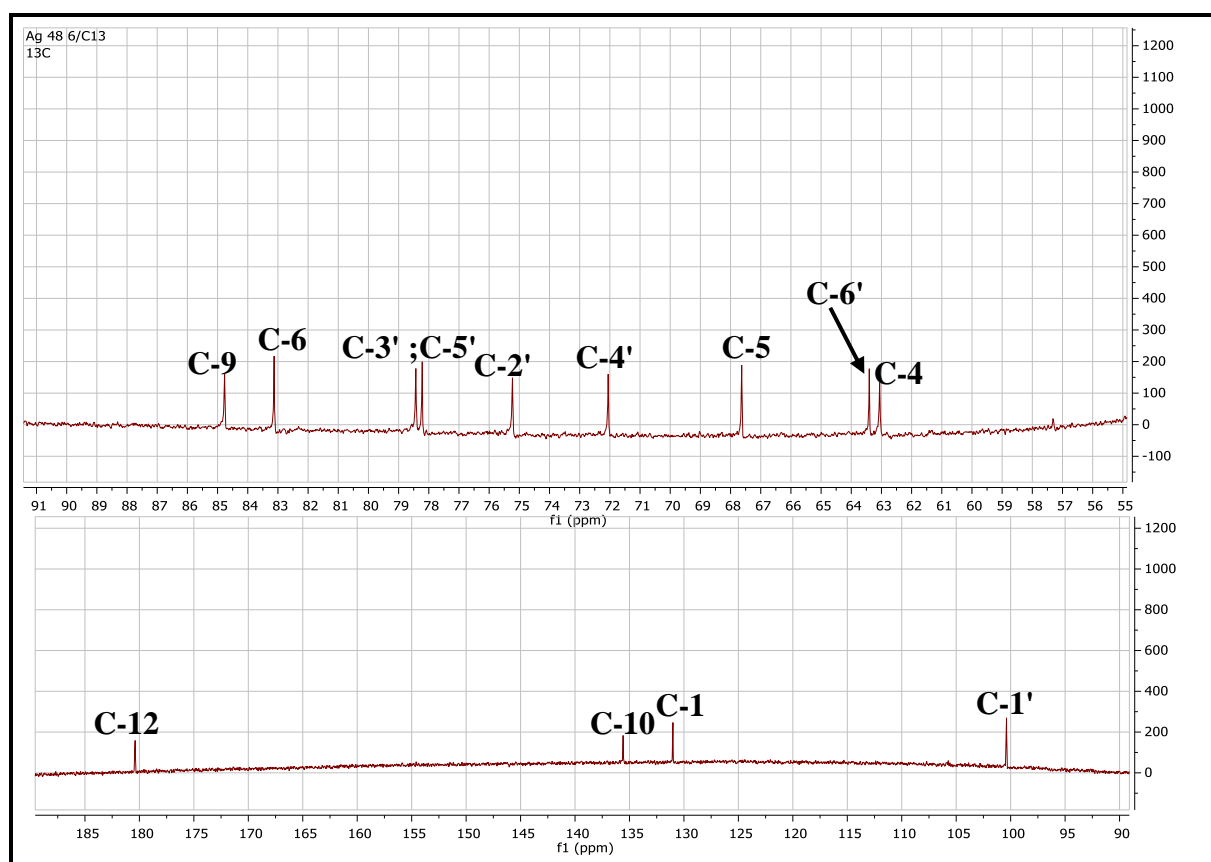
- Trois groupements méthyle à  $\delta_{\text{C}} = 12.6 ; 10.9$  et  $17.2$  ppm.
- Trois groupements  $\text{CH}_2$  dont :
  - 3  $\text{CH}_2$  non oxygénés à  $\delta_{\text{C}} = 23.9 ; 36.9$  et  $36.3$  ppm.
- Six groupements  $\text{CH}$  dont :
  - 1  $\text{CH}$  éthylénique à  $\delta_{\text{C}} = 130.2$  ppm.
  - 3  $\text{CH}$  oxygénés à  $\delta_{\text{C}} = 66.9 ; 83.8$  et  $82.4$  ppm. Le déplacement chimique de ce dernier est caractéristique d'un  $\text{CH}$  de fermeture d'une lactone sesquiterpénique.
  - 2  $\text{CH}$  non oxygénés à  $\delta_{\text{C}} = 49.3$  et  $42.8$  ppm.
- Trois carbones quaternaires dont :
  - 1  $\text{C}$  à  $\delta_{\text{C}} = 180$  ppm caractéristique d'un carbonyle d'une  $\gamma$ -lactone sesquiterpénique  $\alpha, \beta$ -insaturée.
  - Un  $\text{C}_q$  à  $\delta_{\text{C}} = 135.5$  ppm attribuable à un carbone éthylénique.
  - 1  $\text{C}_q$  à  $\delta_{\text{C}} = 63.16$  ppm attribuable à un carbone oxygéné.



**Spectre III.104:** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm) du composé **Ag/84/6**.

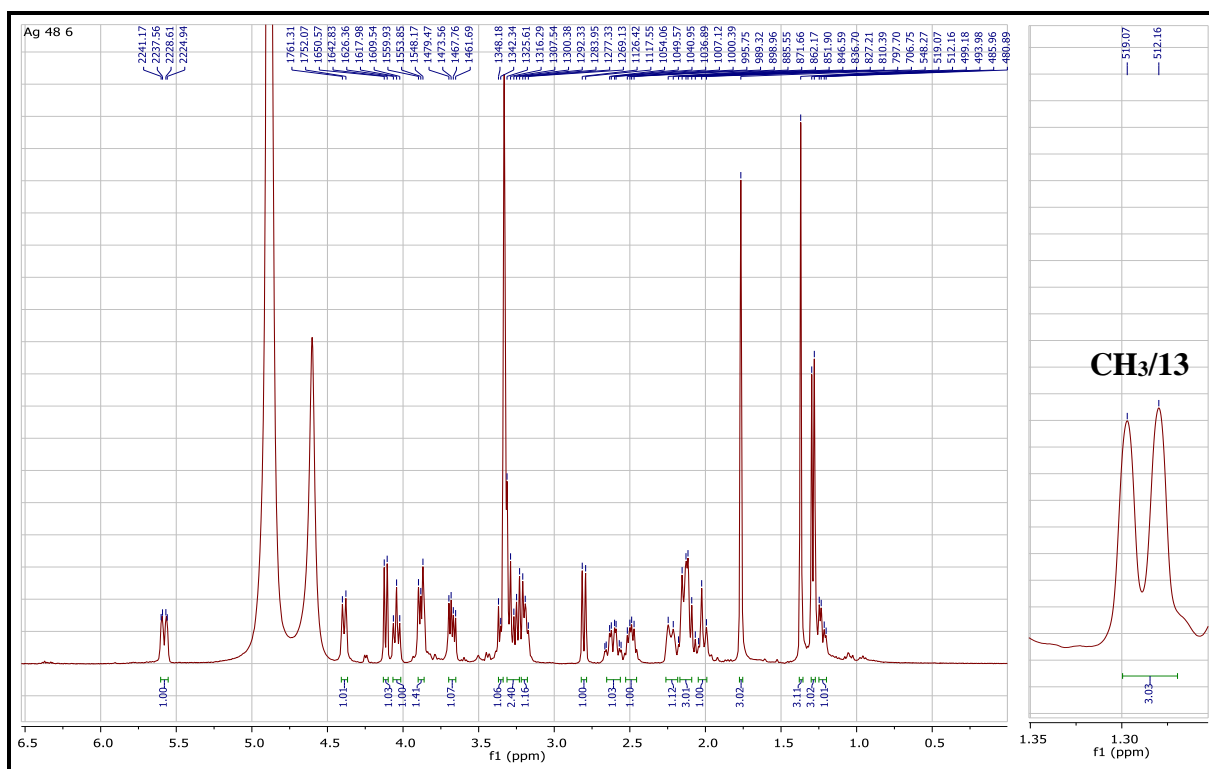


Spectre III.105: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm) étalé du composé Ag/48/6.



Spectre III.106: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm) étalé du composé Ag/48/6.

Le spectre RMN du proton  $^1\text{H}$  enregistré dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$  (Spectre III.107) de ce composé montre un doublet d'intégration 3H à  $\delta_{\text{H}}$  1.29 ppm ( $J=6.9\text{Hz}$ ) correspondant à un groupement  $\text{CH}_3$ . La multiplicité du signal du méthyle (doublet) est en faveur d'un carbone qui porte un hydrogène voisin à ce méthyle. Le carbone du groupement  $\text{CH}_3$  est attribué au C-13. La constante de couplage signalée plus haut est attribuée à l'interaction des protons du groupement  $\text{CH}_3$  avec l'hydrogène en position 11.



**Spectre III.107:** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm) du composé **Ag /48/6**.

Sur le spectre COSY les protons du méthyle montrent une tache de corrélation avec le proton d'un CH résonant sous forme d'un multiplet à  $\delta_{\text{H}} = 2.51$  ppm ( $\delta_{\text{C}} 42.8$  ppm) attribuable à H-11. Ce dernier montre une tache de corrélation avec le proton apparaissant sous forme d'un multiplet à  $\delta_{\text{H}} = 2.15$  ppm qui ne peut être attribué qu'à H-7, grâce au spectre HSQC on relève  $\delta_{\text{C}-7}$  à 49.3 ppm.

Toujours sur le spectre COSY, le proton H-7 montre des taches de corrélations avec trois autres protons, la première avec un proton dont le signal apparaît sous forme d'un triplet à  $\delta_{\text{H}}$  4.04 ppm (t ;  $J=8.4$  Hz). D'après sa multiplicité et son déplacement chimique, ce noyau ne peut être que H-6. Les deux autres taches de corrélations concernent deux protons portés par le même atome de carbone ( $\delta_{\text{C}} = 36.3$  ppm) sur le spectre HSQC, les signaux de ces deux

protons qui ne peuvent être que H-8b et H-8a apparaissent sous forme d'un multiplet à  $\delta_H$  2.02 ; 2.15 respectivement.

L'attribution de H-6 et sa corrélation sur le spectre HSQC (Spectre III.111) avec le carbone du CH à  $\delta_C = 82.4$  ppm dont la valeur du déplacement chimique est caractéristique du point de fermeture d'une  $\gamma$ lactone, indique que cette lactone sesquiterpénique est fermée en C-6.

A ce stade de notre analyse, nous pouvons proposer l'entité reportée dans la figure III.7.

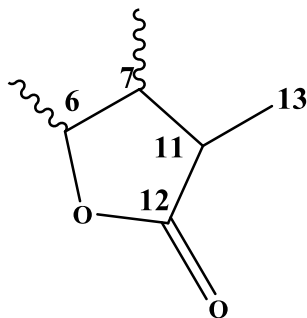
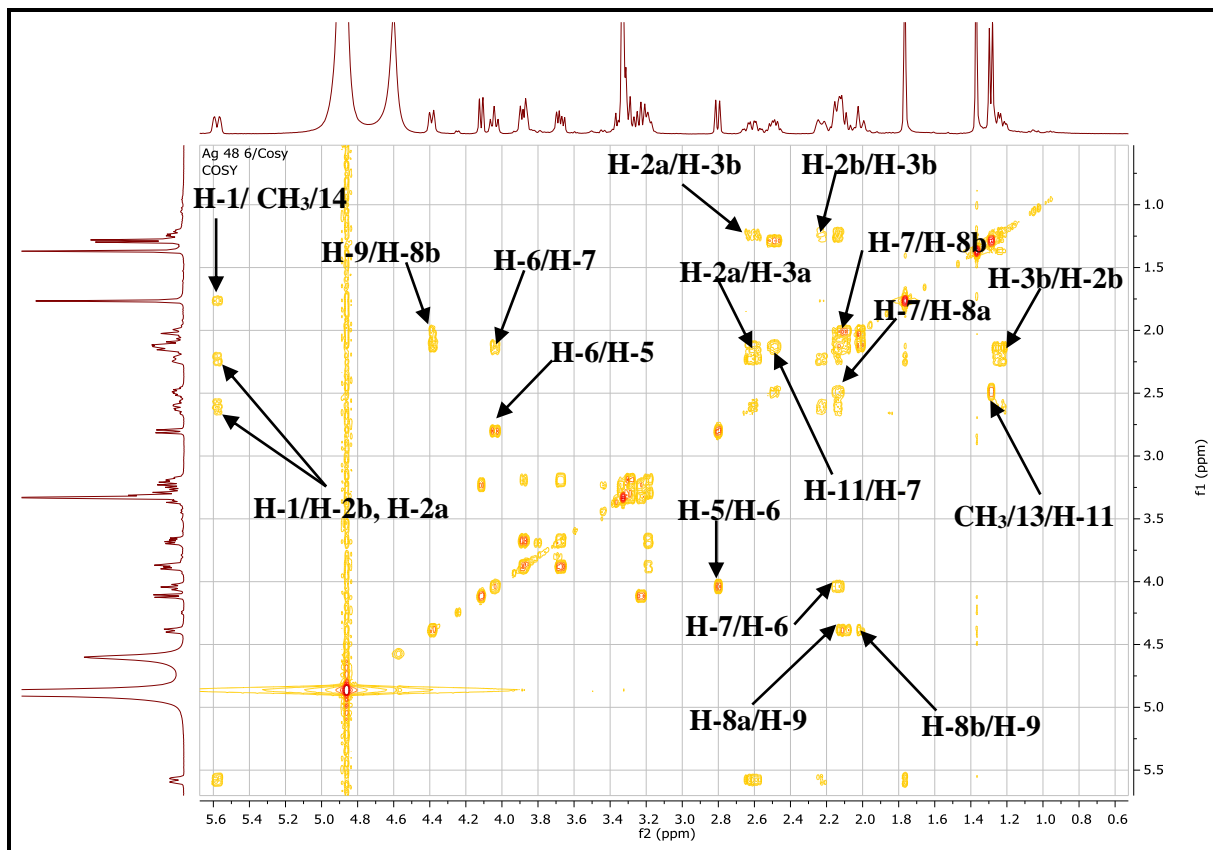


Figure III.17: Structure partielle du composé Ag /46/6.



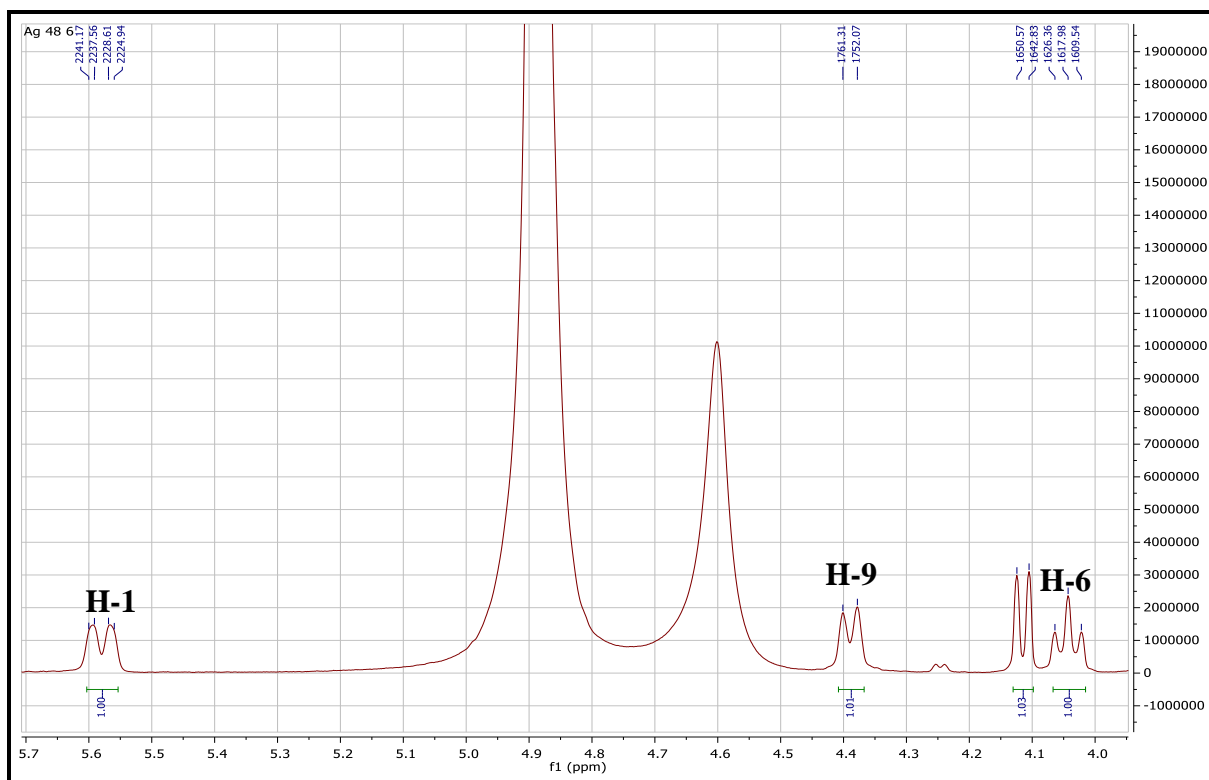
Spectre III.108 : Spectre COSY (600 MHz,  $CD_3OD$ ,  $\delta$  ppm) du composé Ag/48/6.

Toujours sur le spectre COSY, les deux protons H-8a et H-8b montrent une tache de corrélation avec le proton apparaissant sous forme d'un doublet ( $J=9.2$  Hz) à  $\delta_H = 4.40$  ppm qui ne peut être attribué qu'à H-9. Grâce au spectre HSQC on relève  $\delta_{C-9}$  à 83.8 ppm, la multiplicité de H-9 (doublet) et la valeur du déplacement de son carbone C-9 ( $\delta_C = 83.8$  ppm) orientent bien vers une oxygénation à ce niveau et d'autre part vers la présence d'un carbone quaternaire en position vicinale soit en position C-10. En effet, sur le spectre HMBC (Spectre III.115), les protons H-8a et H-8b montrent des corrélations avec le carbone quaternaire éthylénique à  $\delta_C = 133.5$  ppm que nous pouvons alors attribuer à C-10.

Toujours sur le spectre HMBC (Spectre III.114), les deux protons H<sub>2</sub>-8 et H-9 montrent des taches de corrélation avec les protons du groupement méthyle résonant sous forme de singulet à  $\delta_H = 1.77$  ppm ( $\delta_C = 10.9$  ppm) indiquent qu'il est en position C-10. Ceci est appuyé par la multiplicité du signal de ses protons. Le carbone de ce groupement méthyle est numéroté C-14 d'après la numérotation adoptée pour les squelettes sesquiterpéniques. Sur le même spectre HMBC, le H-9 et les protons du groupement méthyle en position C-14 corrélaient avec le proton du groupement CH éthylénique résonant sous forme d'un doublet de doublets ( $J = 12.5$  ; 3.6 Hz) à  $\delta_H = 5.59$  ppm ( $\delta_C = 130.2$  ppm) attribuable au proton H-1.

Les valeurs du déplacement chimique de C-10 et C-1, imposent la présence d'une double liaison entre C-10 et C-1. La présence du groupement méthyle en C-10 est d'ailleurs confirmée sur le spectre COSY (Spectre III.108), où l'on relève un couplage à longue distance entre les protons de ce méthyle et le proton H-1.

Ainsi à ce stade de l'établissement de la structure du composé **Ag/48/6**, La présence de la double liaison entre C-1 et C-10 et le groupement méthyle en C-10 a permis de mettre en évidence un squelette sesquiterpénique de type germacranolide.

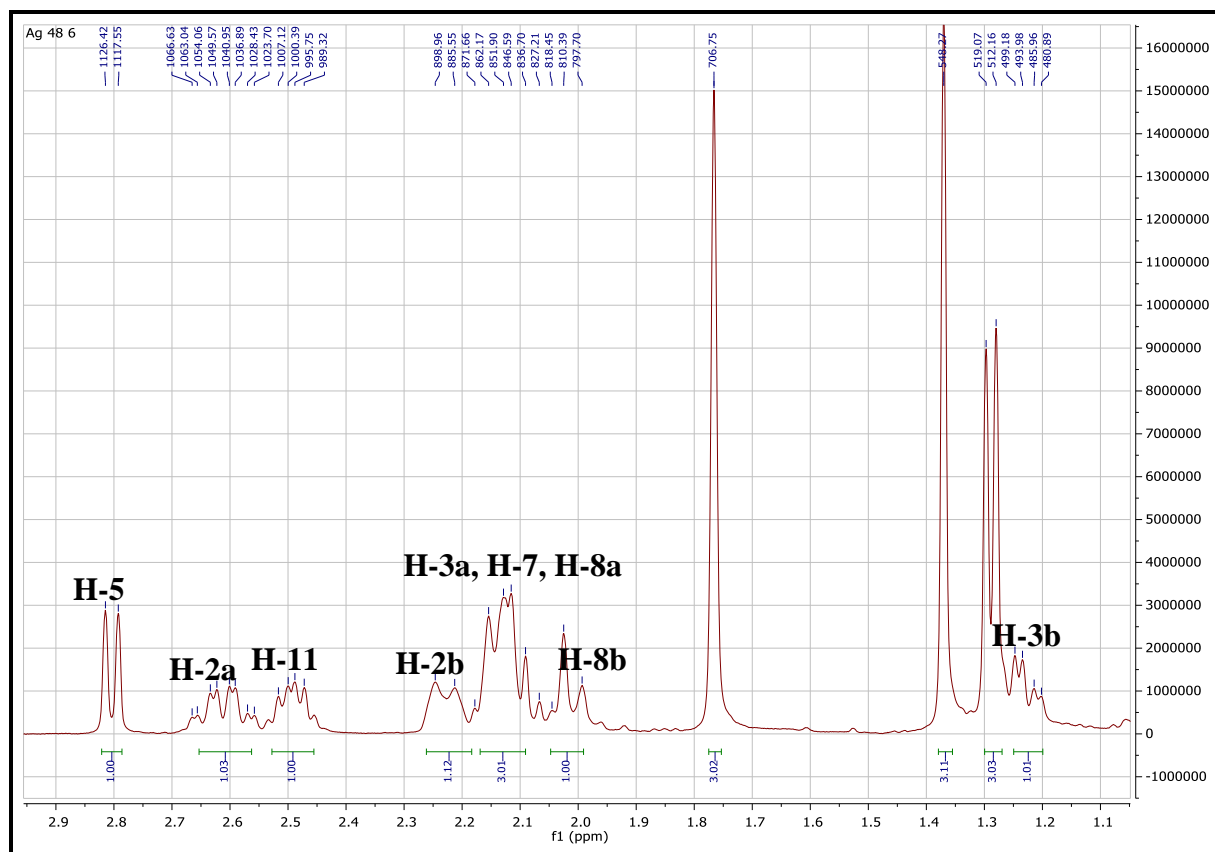


**Spectre III.109** : Spectre RMN  $^1\text{H}$  étalé (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm) du composé **Ag/48/6**.

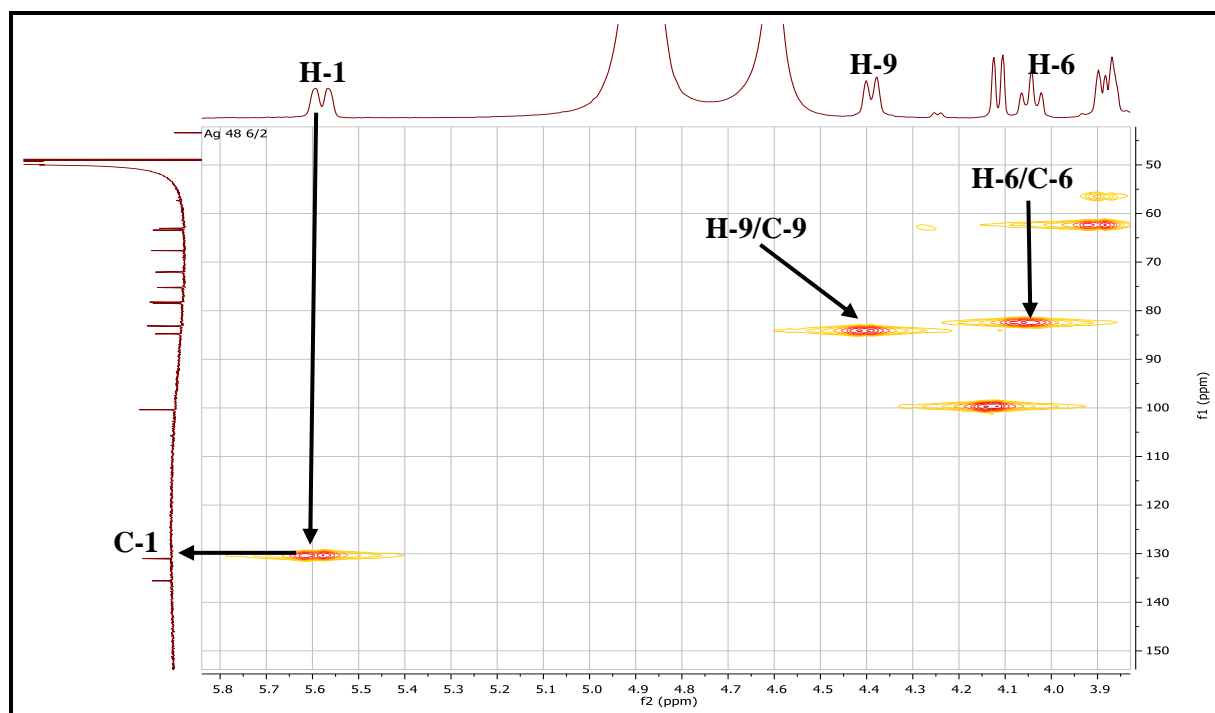
Un retour vers le spectre COSY (Spectre III.108), la localisation de H-1 mène à celle de H-2b à  $\delta = 2.24$  ppm sous forme de multiplet et à celle de H-2a résonnant ppm sous forme d'un doublet de quadruplets à  $\delta = 2.62$  ppm ( $J = 12.6 ; 4.6$  Hz), ces deux protons corrélant sur le spectre HSQC avec le même carbone à  $\delta_{\text{C}} = 23.9$  ppm (C-2). De même, l'attribution de ces derniers noyaux permet grâce toujours à l'analyse du spectre COSY de localiser les signaux des protons H-3a et H-3b résonant sous forme de deux multiplets à  $\delta_{\text{H}} = 1.25$  et  $2.15$  ppm ( $\delta_{\text{C}} = 36.9$  ppm) respectivement.

Par ailleurs et toujours grâce au spectre COSY (Spectre III.108), l'attribution de H-6 mène à la localisation de H-5 sous forme d'un doublet ( $J = 8.8$  Hz) à  $\delta_{\text{H}} = 2.81$  ppm, la multiplicité de H-5 oriente vers un C-4 quaternaire. Le spectre HSQC permet la localisation de C-5 à  $\delta_{\text{C}} = 66.9$  ppm.

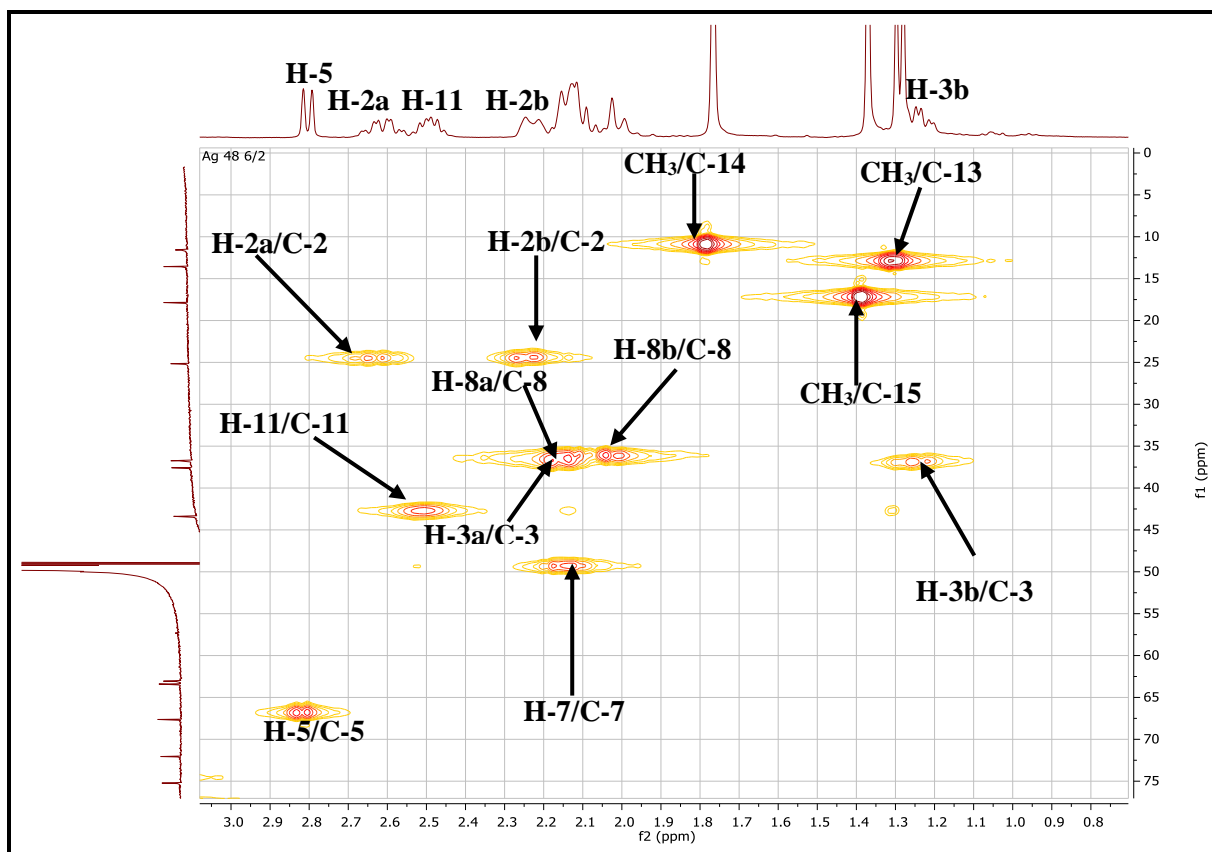




Spectre III.110 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  étalé (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm) du composé Ag/48/6.



Spectre III.111 : Spectre HSQC étalé (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm) du composé Ag/48/6.



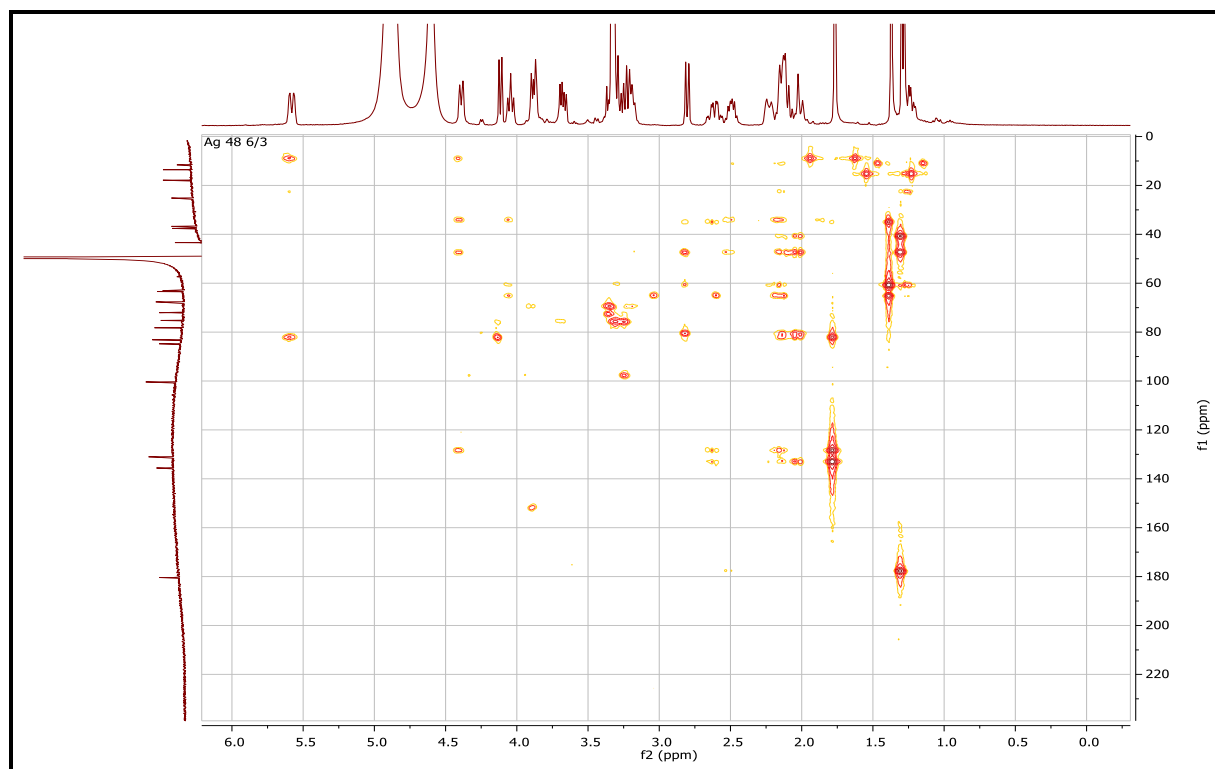
**Spectre III.112** : Spectre HSQC étalé (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm) du composé Ag/48/6.

Un examen approfondi du spectre HMBC, permet de repérer une tache de corrélation entre le proton H-5 et le carbone quaternaire à  $\delta_C$  62.6 ppm. Ce carbone ne peut être que le C-4. Vu les valeurs des déplacements chimiques de C-4 et C-5 et la formule brute de cette molécule notamment le nombre d'atomes d'oxygène et le degré d'insaturations, suggèrent la présence d'une fonction époxyde entre ces positions.

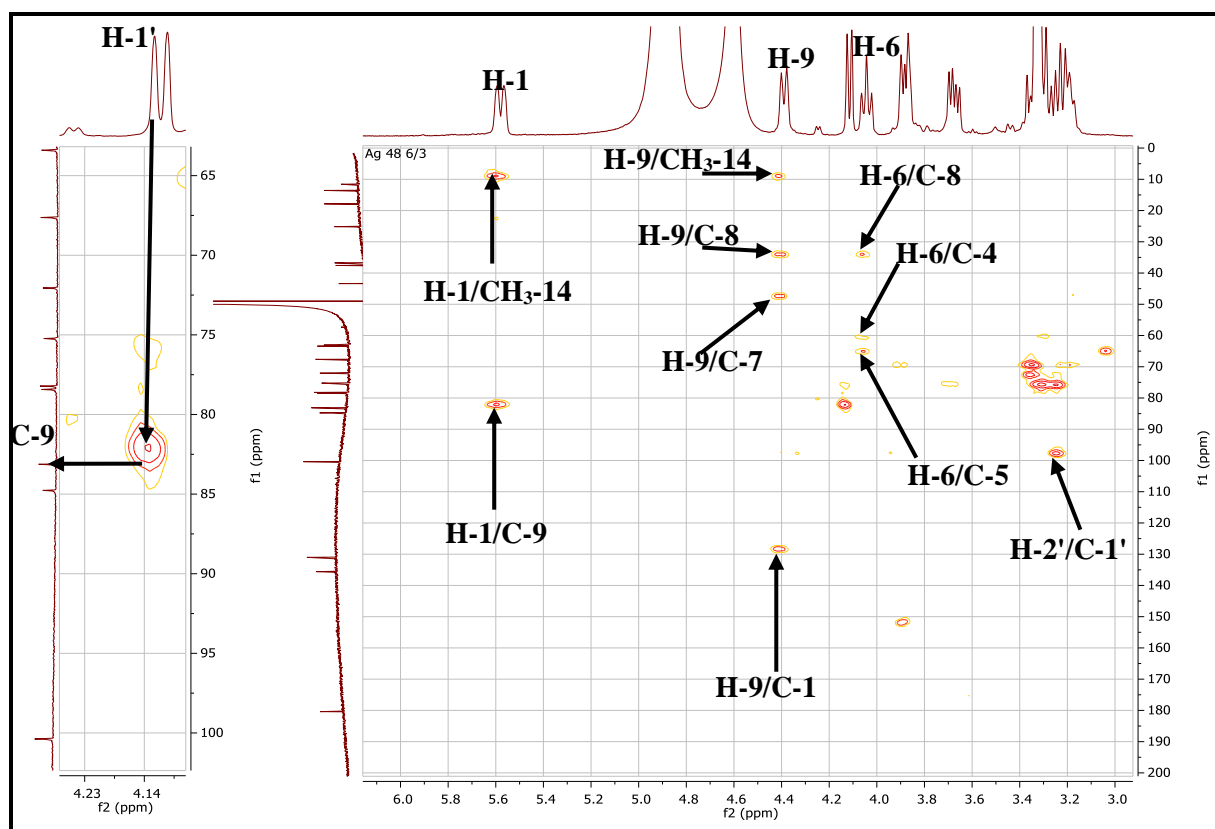
Sur le même spectre HMBC, le carbone (C-4) montre à son tour une tache de corrélation avec les 3H du groupement méthyle à  $\delta_H$  = 1.39 ppm ( $\delta_C$  = 17.2 ppm) permettant l'emplacement de ce dernier sur ce carbone quaternaire. Ce groupement méthyle ne peut être que C-15.

Toujours sur le spectre relatif à l'expérience HMBC on observe une tache de corrélation entre H-1' et le carbone à 83.8 ppm C-9 indiquant que le glucose est fixé sur la génine en position 9.

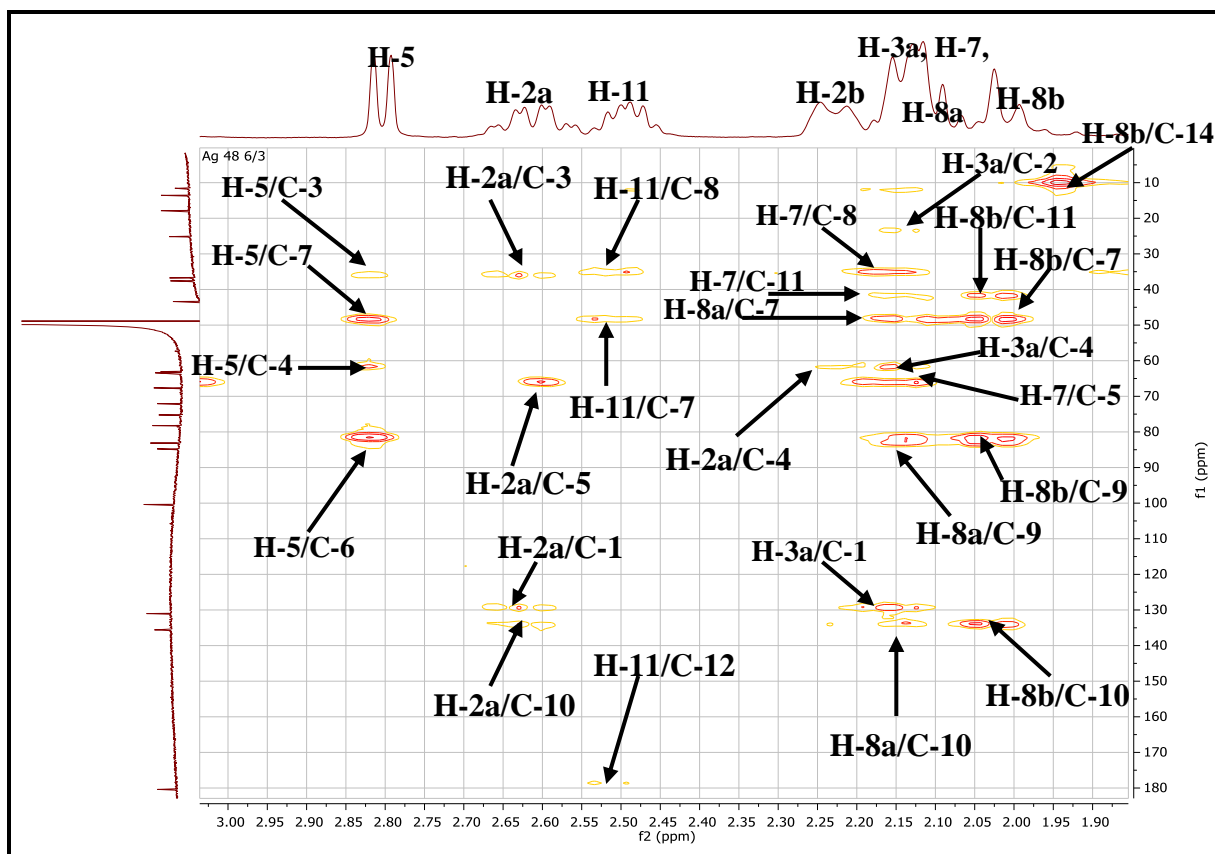
A ce stade de notre analyse, nous sommes donc en présence d'une lactone sesquiterpénique de type germacranolide substitué en C-9 par un groupement glucopyranoside.



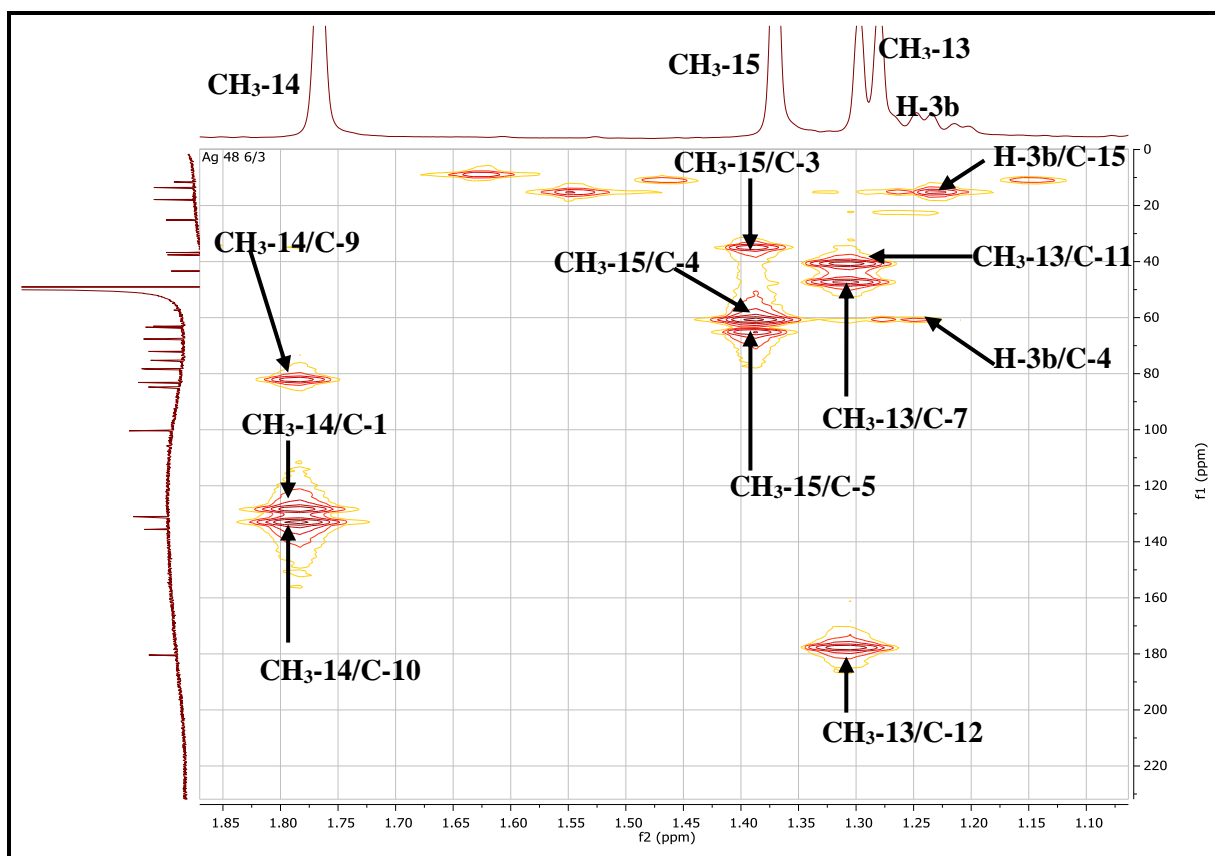
Spectre III.113 : Spectre HMBC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) du composé Ag/48/6.



Spectre III.114 : Spectre HMBC étalé (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) du composé Ag/48/6.

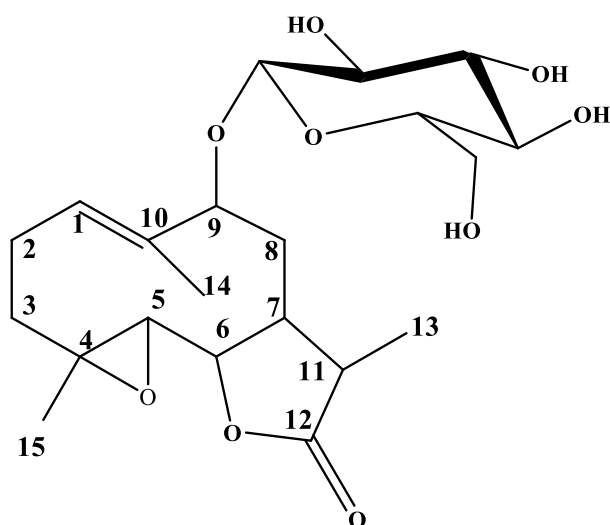


Spectre III.115 : Spectre HMBC étalé (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) du composé Ag/48/6.



Spectre III.116 : Spectre HMBC étalé (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) du composé Ag/48/6.

L'ensemble de cette analyse mène à la structure plane reportée dans la figure III.18.



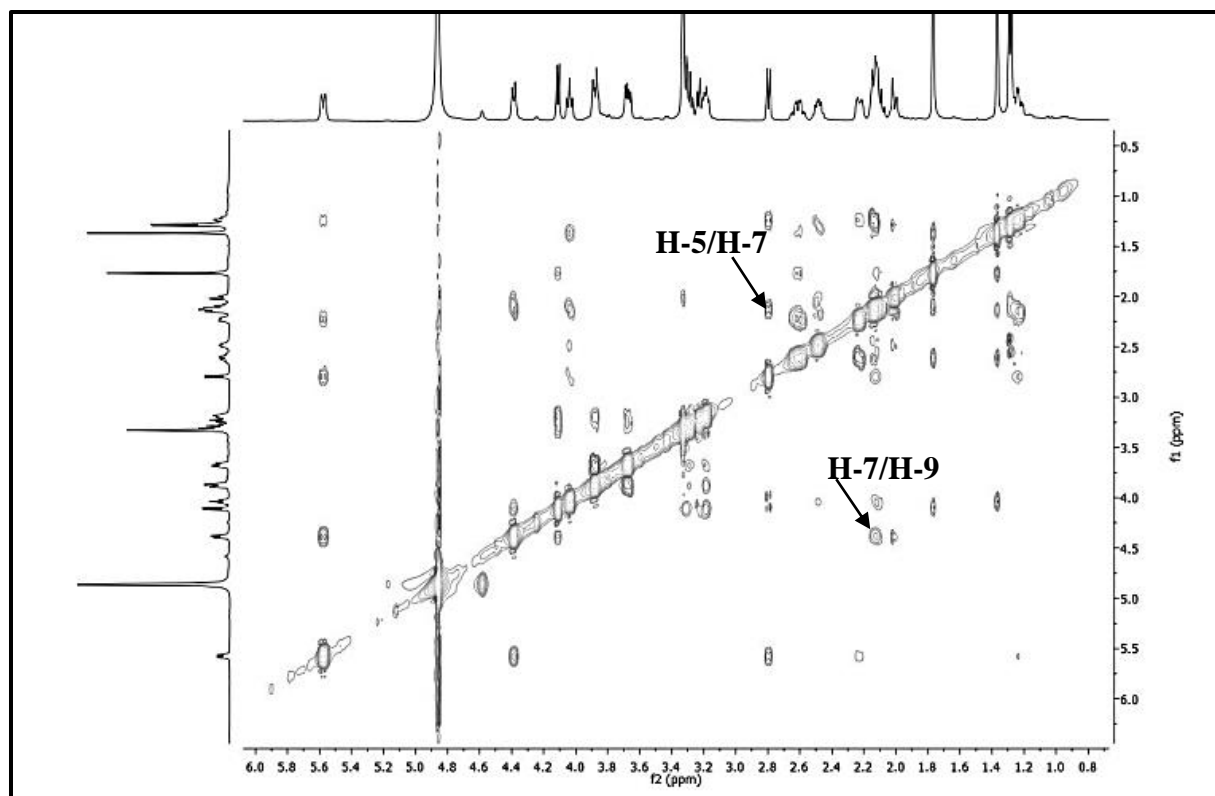
**Figure III.18:** Structure plane du composé Ag/48/6.

La stéréochimie de C-5, C-6 et C-7 est déduite des valeurs des constantes de couplage relevées dans les signaux de H-5, H-6 qui montrent des interactions *trans* diaxiales entre H-5, H-6 et H-6, H-7. Ceci confère des orientations  $\alpha$  pour H-5,  $\beta$  pour H-6 et  $\alpha$  pour H-7.

La stéréochimie du carbone C-9 est établie grâce à la valeur de la constante de couplage relevée dans le signal de H-9. En effet le signal de H-9 apparait sous forme d'un doublet (9.2 Hz), comme ce proton est couplé aux deux protons de la position C-8, il est clair que la valeur 9.2 Hz résulte d'une interaction de couplage axial-axial, qui ne peut exister que si H-9 est en position axiale soit une orientation  $\alpha$ . Par conséquent le groupement glucopyranoside admet une orientation  $\beta$ .

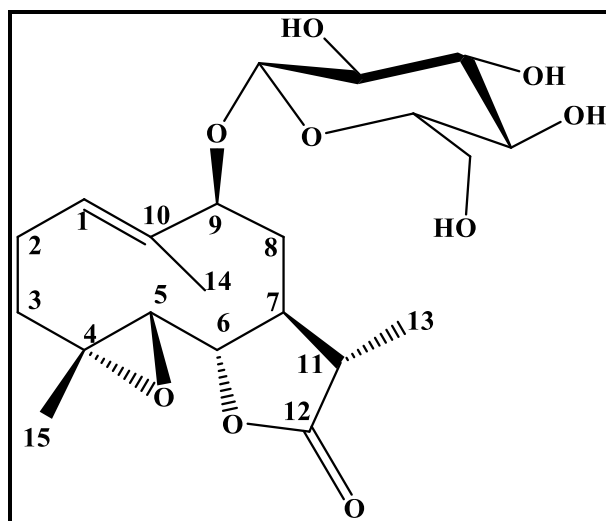
En ce qui concerne la configuration de la double liaison entre C-1 et C-10, elle est déduite *trans*, vu la valeur inférieure à 20 ppm du déplacement chimique du carbone du CH<sub>3</sub>-14 [20].

Ces stéréochimies sont toutes confirmées par le spectre ROESY (Spectre III.117) qui montre en particulier : des taches de corrélation NOE entre H-5 et H-7, H-9.



**Spectre III.117** : Spectre ROESY (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) du composé Ag/48/6.

L'ensemble de ces données mène à la structure reportée dans la figure III.19. Il s'agit du **9β-hydroxy-11β, 13-dihydroparthenolide-9-O-β-D-glucopyranoside**. Cette molécule est nouvelle, elle est décrite pour la première fois dans la littérature.

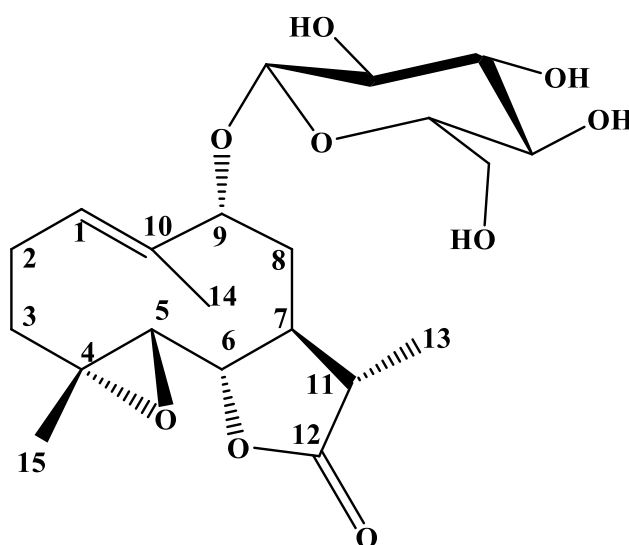


**Figure III.19**: Structure du composé Ag/48/6 : **9β-hydroxy-11β, 13-dihydroparthenolide-9-O-β-D-glucopyranoside**.

Tableau III.15: Données de la spectrométrie RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  du composé Ag/48/6.

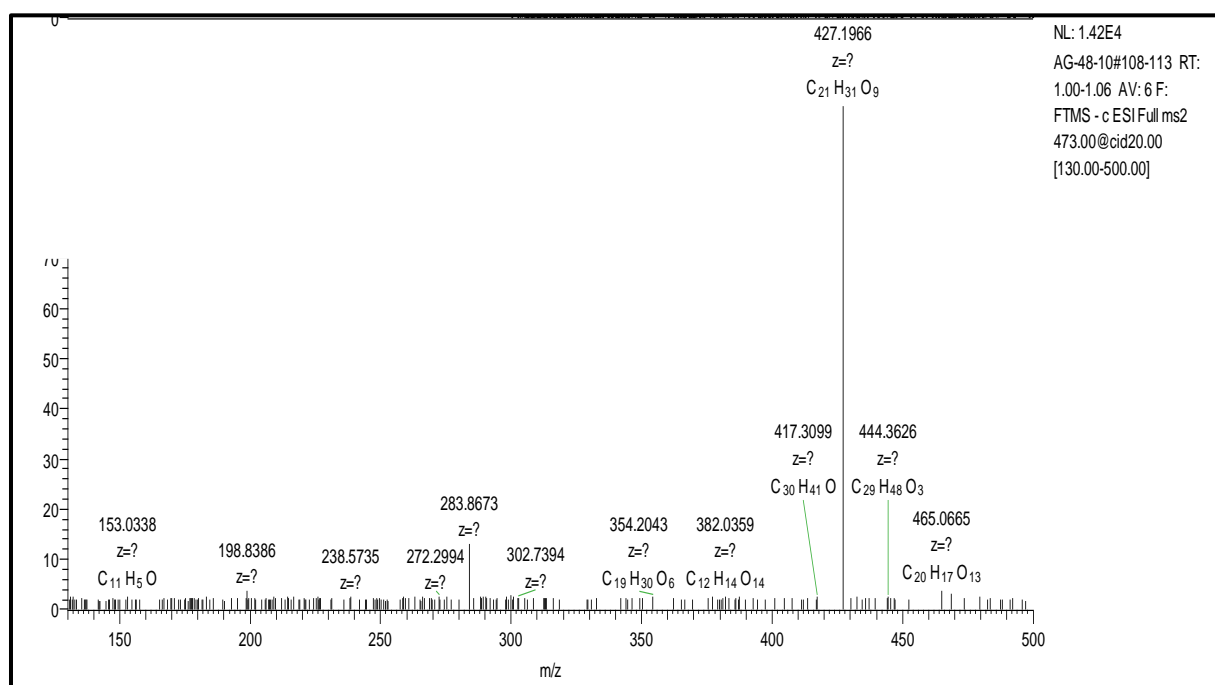
Position	$\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
1	5.59(1H,dd,12.5;3.6)	130.2
2a	2.62(1H,dq,12.6;4.6)	23.9
2b	2.24(1H,m)	
3a	2.15(1H,m)	36.9
3b	1.25(1H,m)	
4	-	62.6
5	2.81(1H,d,8.8)	66.9
6	4.05(1H,t,8.4)	82.4
7	2.15(1H,m)	49.3
8a	2.15(1H,m)	36.3
8b	2.02(1H,m)	
9	4.40(1H,d,9.2)	83.8
10	-	135.5
11	2.51(1H,m)	42.8
12	-	180
13	1.29(1H,d,6.9)	12.6
14	1.77(3H, s)	10.9
15	1.39(3H, s)	17.2
1'	4.12(1H,d,7.7)	99.8
2'	3.24 (1H;t,8.5)	74.6
3'	3.33 (1H,m)	77.9
4'	3.31(1H t,8.5)	71.4
5'	3.19(1H ,m)	77.7
6'a	3.90(dd,12.0;4.5)	62.5
6'b	3.69(dd,12.0;6.0)	

## III.2.2.2. Détermination structurale du composé Ag /48/10 :



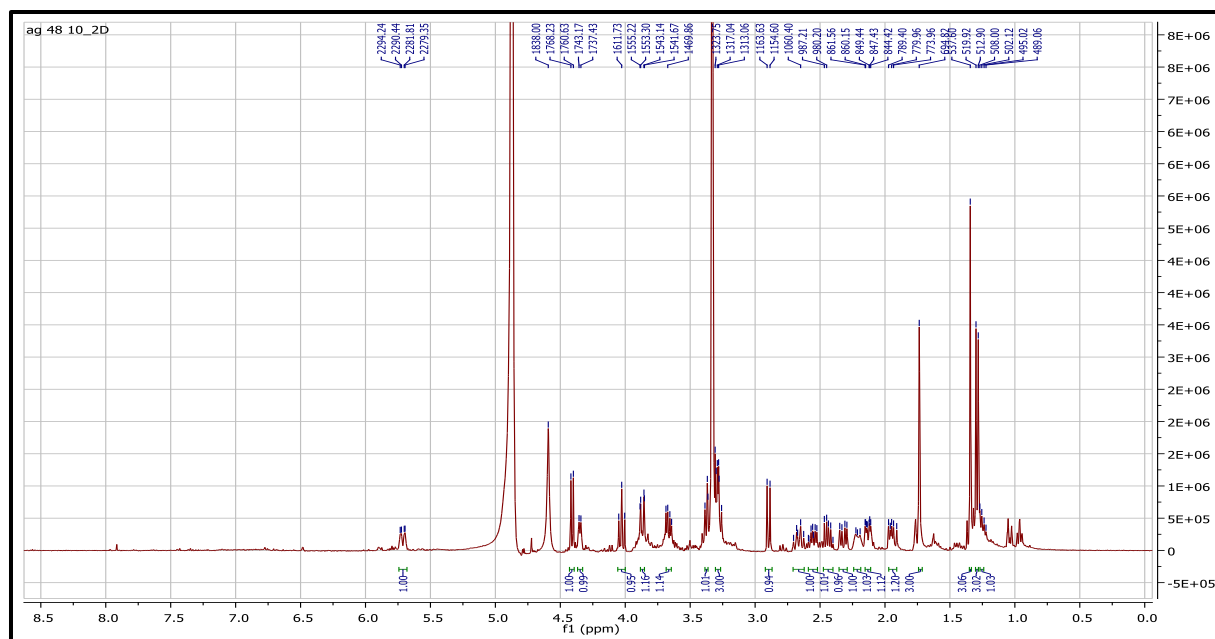
L'examen du spectre de masse à haute résolution du composé **Ag /48/10** montre la présence d'un même ion quasi-moléculaire correspondant à la même formule brute  $C_{21}H_{31}O_9$  que le composé **Ag /48/6**.

Une analyse comparative entre les données spectrales de la RMN  $^1H$  et  $^{13}C$ , (tableau-17), des composés **Ag /48/10** et **Ag /48/6**, montre qu'il s'agit de deux structures identiques, la seule différence observée c'est au niveau de signal H-9 qui apparaît sous forme d'un doublet à 4.35 ppm ( $\delta_c = 77$  ppm) avec un constant de couplage  $J=5.7$  Hz caractéristique d'un H-9 de stéréochimie  $\beta$ , soit une position équatoriale. La stéréochimie de cette molécule est confirmée par le spectre ROESY qui montre des taches de corrélation NOE entre les protons du méthyle-14, H-6 et H-9.

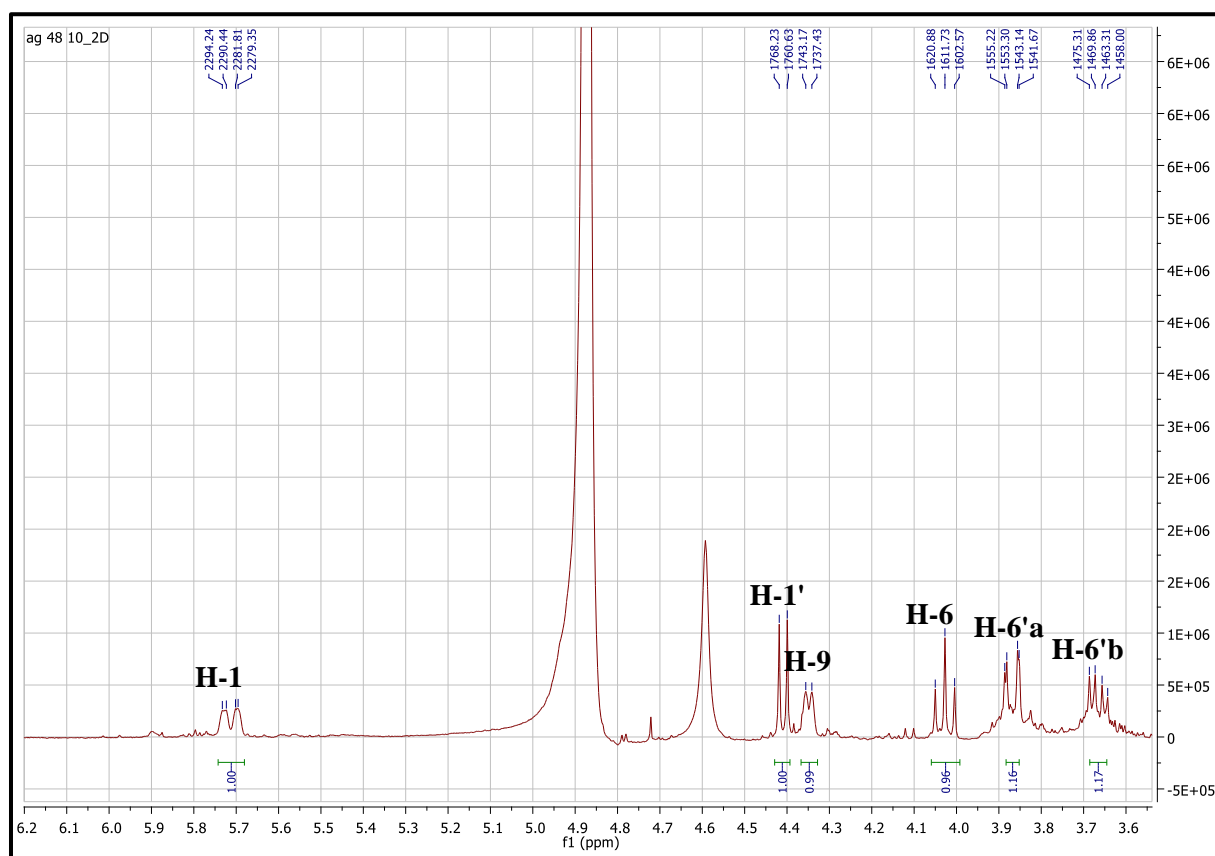


Spectre III.118 : Spectre HR-ESI-MS du composé **Ag/48/10**.

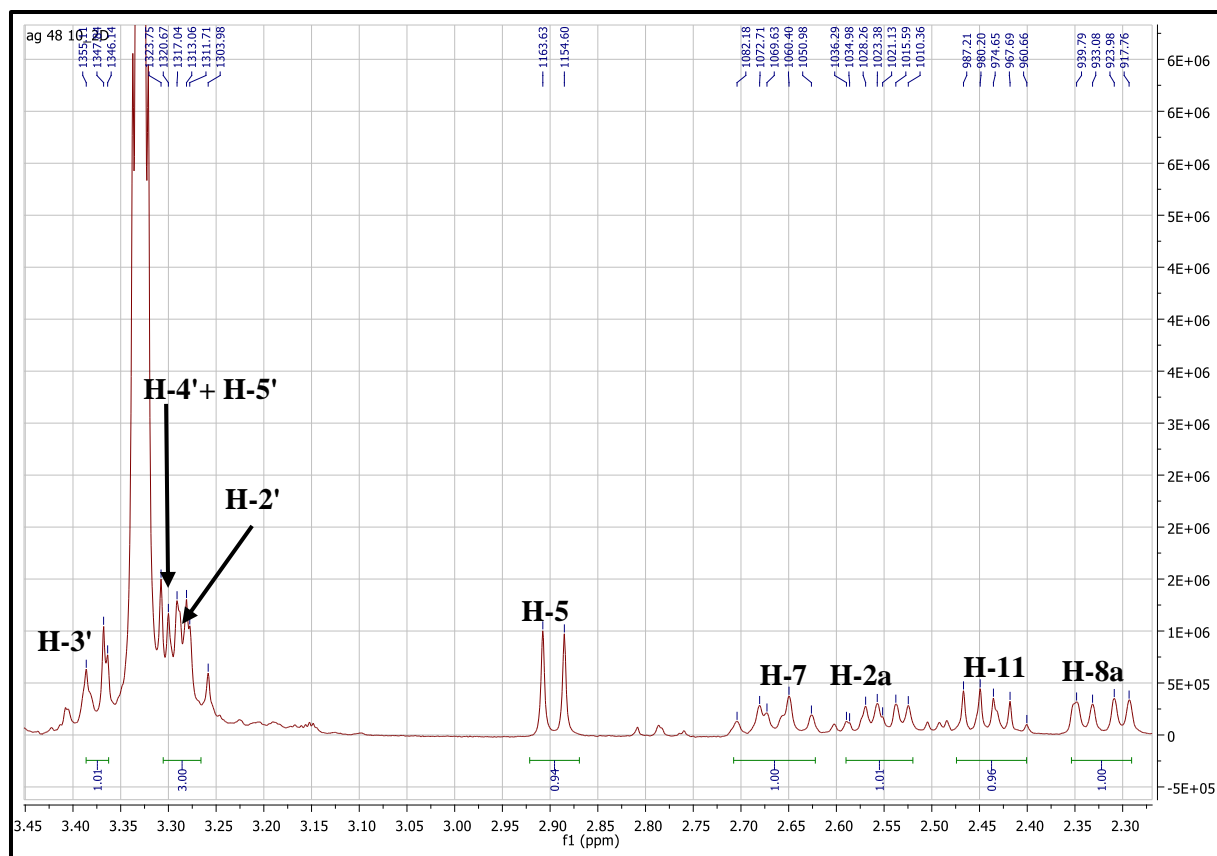




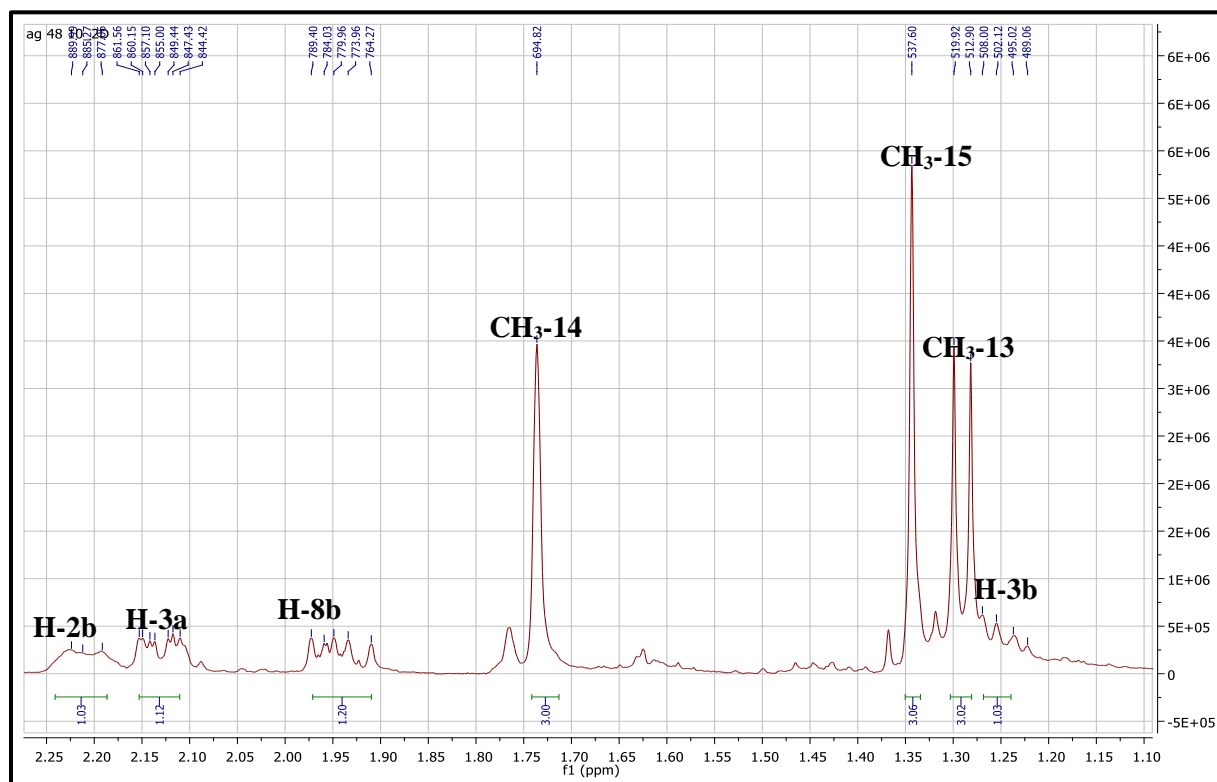
Spectre III.119: Spectre RMN <sup>1</sup>H (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) du composé Ag /48/10.



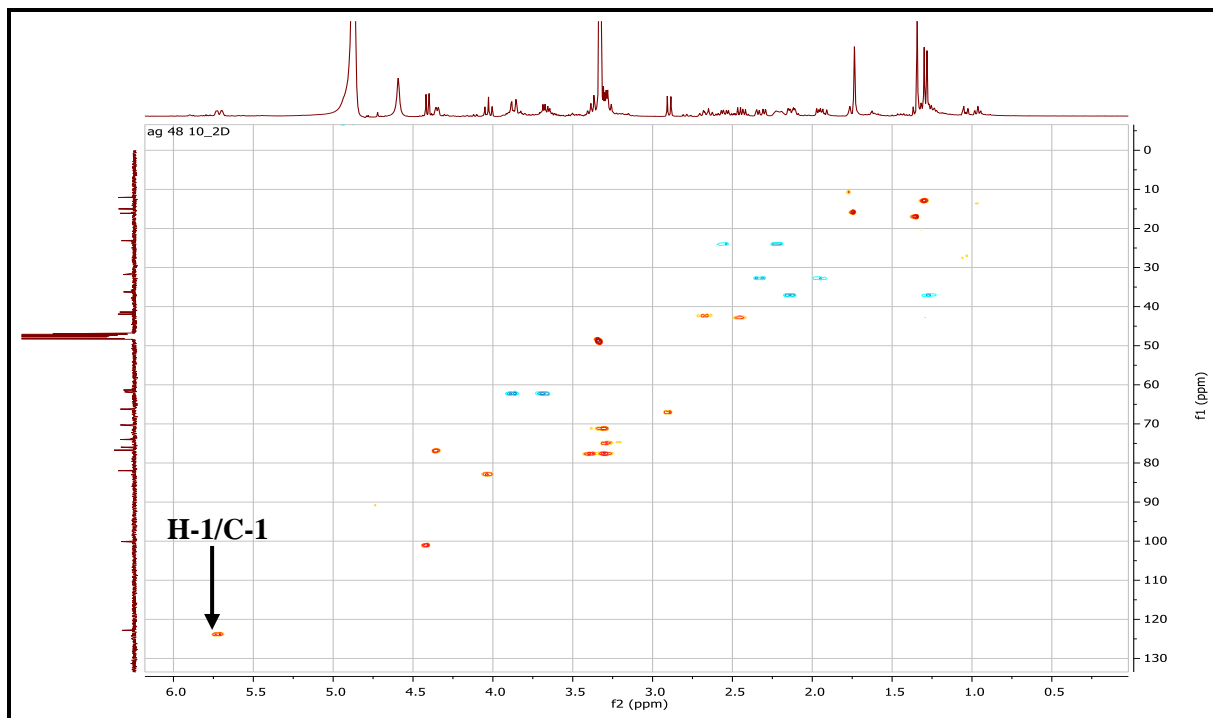
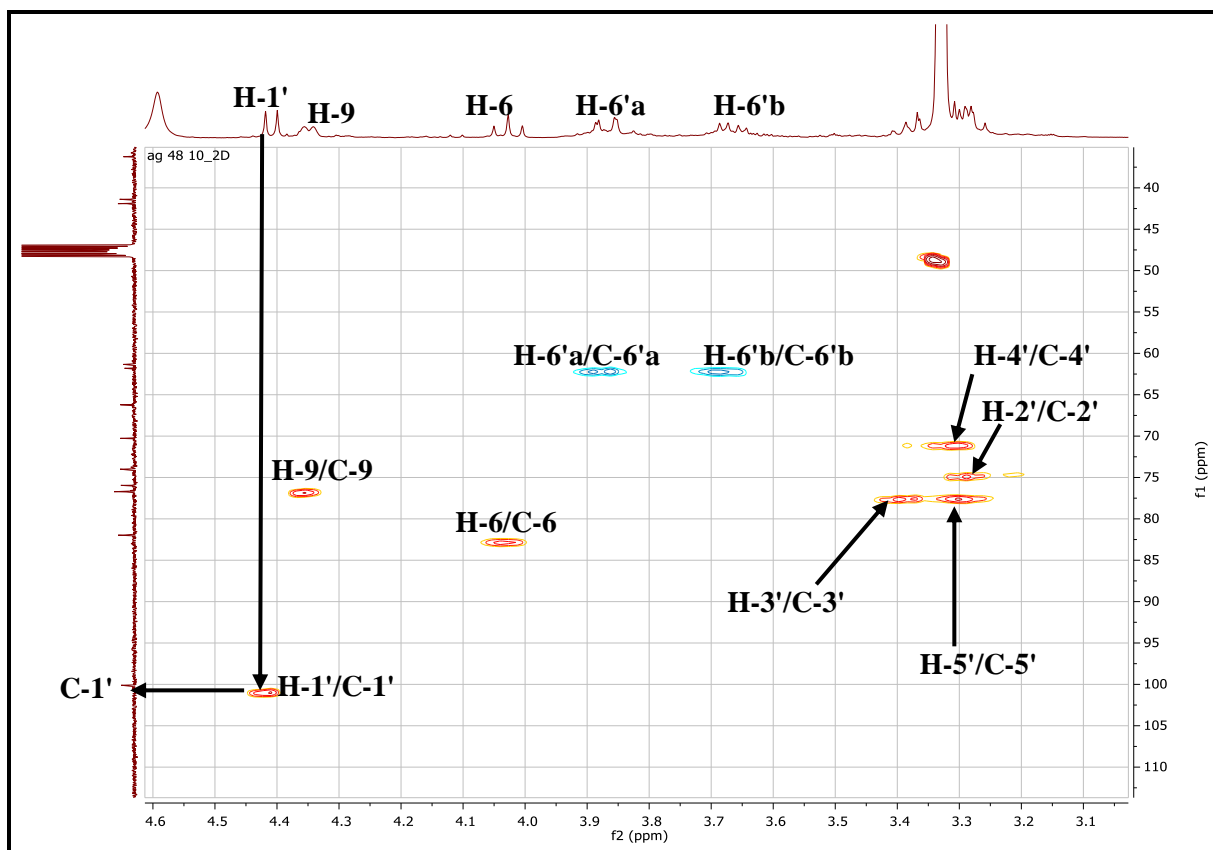
Spectre III.120: Spectre RMN <sup>1</sup>H étalé (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) du composé Ag /48/10.

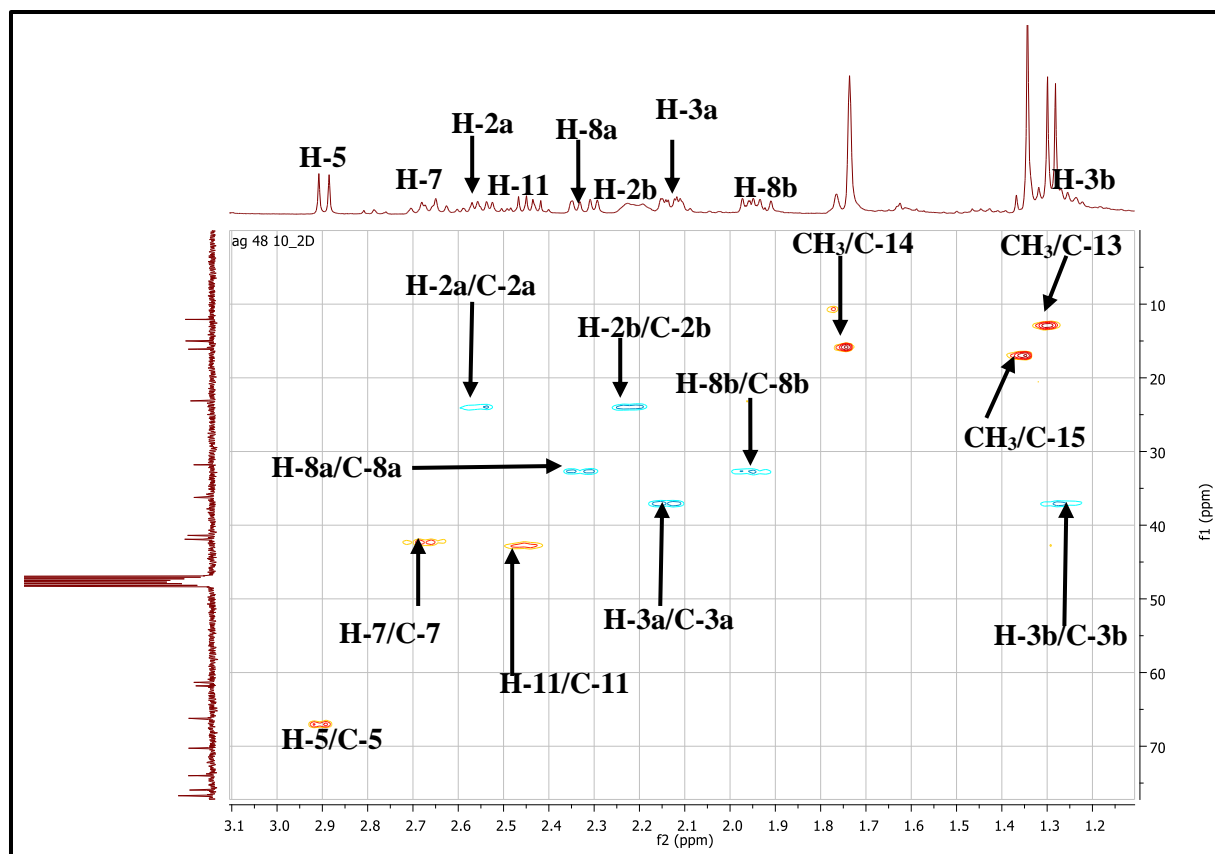


Spectre III.121: Spectre RMN  $^1\text{H}$  étalé (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm) du composé Ag /48/10.

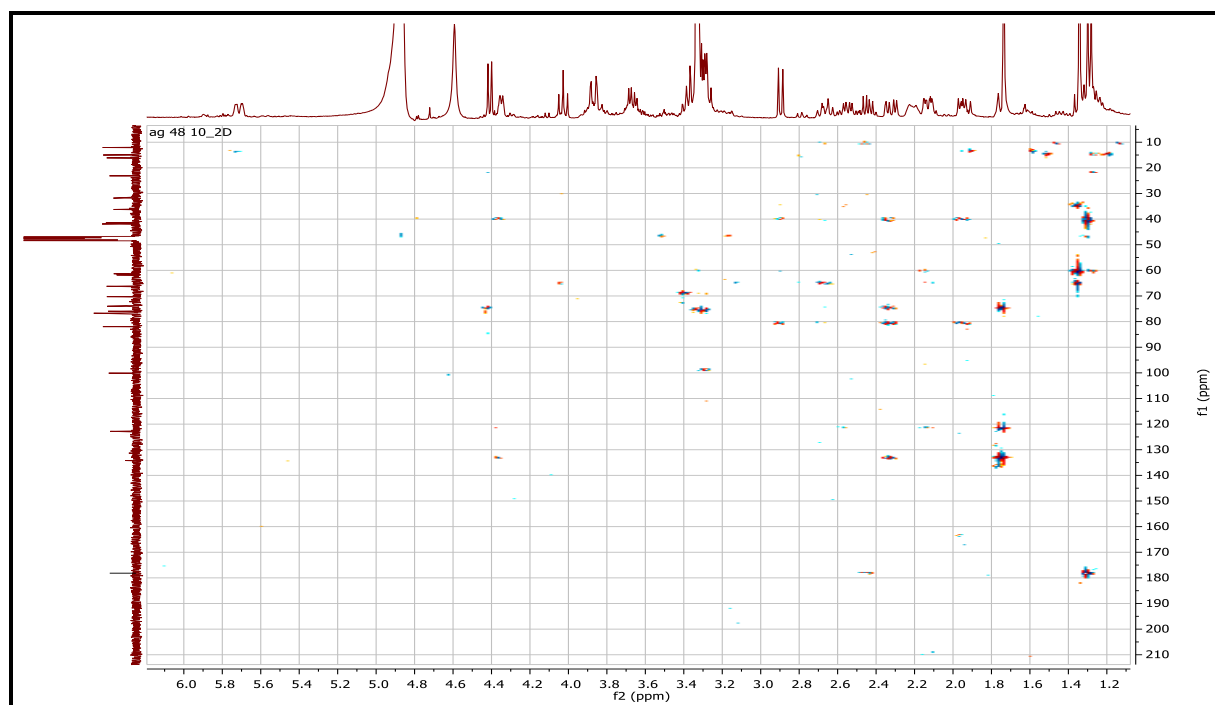


Spectre III.122: Spectre RMN  $^1\text{H}$  étalé (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm) du composé Ag /48/10.

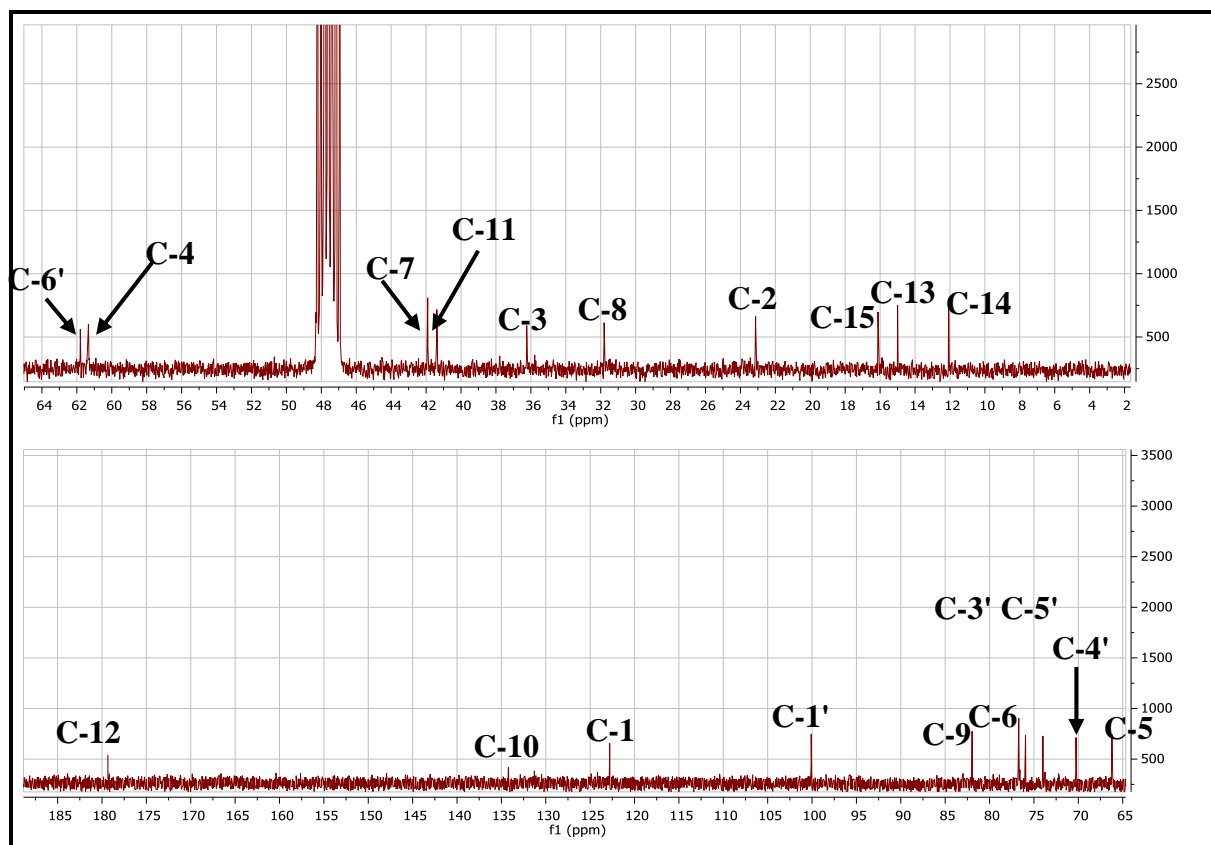
Spectre III.123: Spectre HSQC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm) du composé Ag /48/10.Spectre III.124: Spectre HSQC étalé (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm) du composé Ag /48/10.



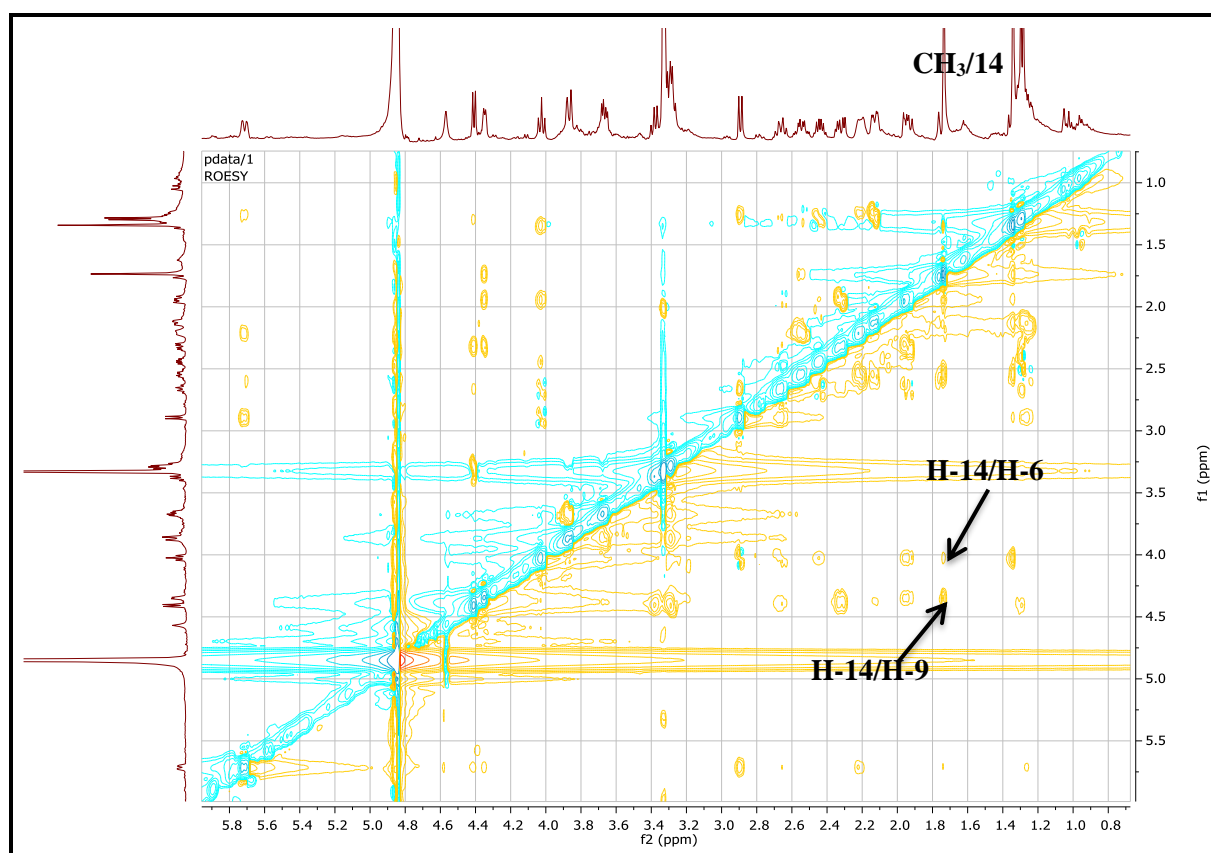
Spectre III.125: Spectre HSQC étalé (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) du composé Ag /48/10.



Spectre IV.126: Spectre HMBC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) du composé Ag /48/10.



Spectre IV.127: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  étalé (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm) du composé Ag/48/10.



Spectre III.128 : Spectre ROESY (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm) du composé Ag/48/10.

L'ensemble de ces données mène à la structure reportée dans la figure III.20. Il s'agit du **9 $\alpha$ -hydroxy-11 $\beta$ , 13-dihydroparthenolide-9-O- $\beta$ -D-glucopyranoside**. Cette molécule est nouvelle, elle est décrite pour la première fois dans la littérature.

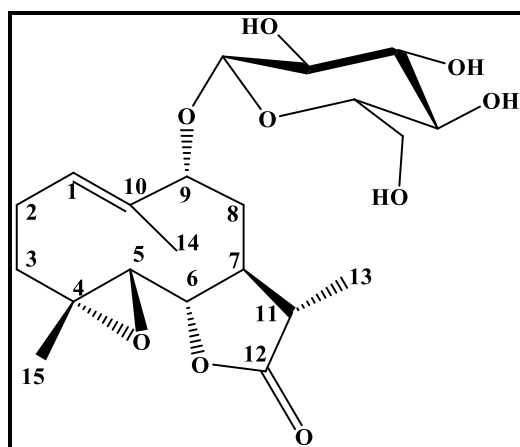


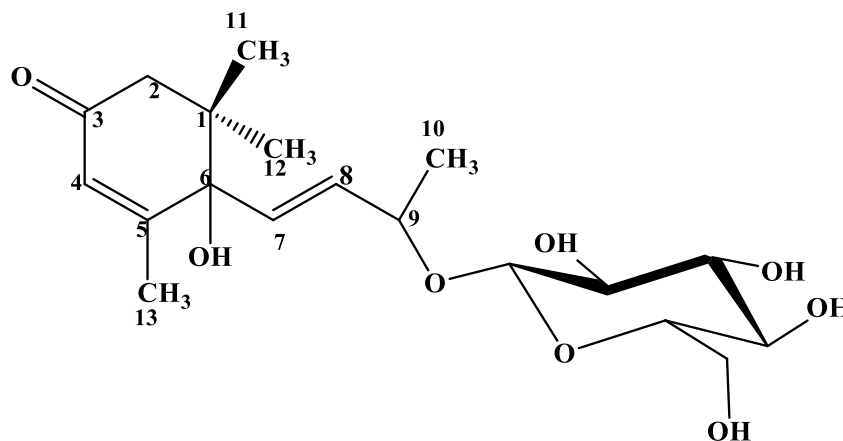
Figure III.20: Structure du composé Ag/48/10 : **9 $\alpha$ -hydroxy-11 $\beta$ ,13-dihydroparthenolide-9-O- $\beta$ -D-glucopyranoside**.

Tableau III.15: Données de la spectrométrie RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  du composé Ag/48/10.

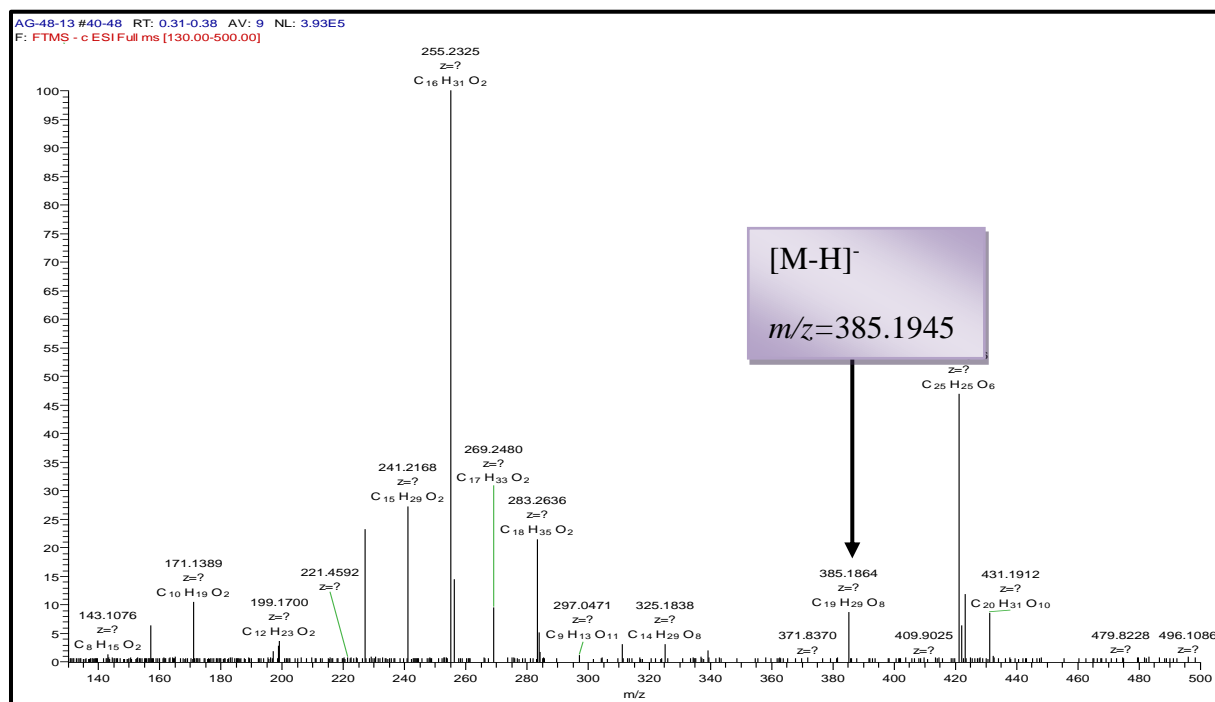
Position	$\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
1	5.73 (1H, dd, 12.6, 3.8)	124.1
2a	2.56 (1H, m)	24.3
2b	2.22 (1H, m)	
3a	2.14 (1H, m)	37.5
3b	1.28 (1H, m)	
4	-	62.8
5	2.91 (1H, d, 9)	67
6	4.04 (1H, t, 9.1)	82.9
7	2.68 (1H, m)	42.6
8a	2.33 (1H, m)	32.8
8b	1.96 (1H, m)	
9	4.35 (1H, d, 5.7)	77
10	-	135
11	2.45 (1H, m)	42.6
12	-	180.3
13	1.30 (1H, d, 6.9)	13.1
14	1.75 (3H, s)	16.3
15	1.36 (3H, s)	16.9
1'	4.42 (1H, d, 7.6)	100.8
2'	3.29 (1H, dd, 9.0, 7.4)	75.2
3'	3.39 (1H, t, 8.9)	77.6

4'	3.31 (1H, t, 8.9)	71.1
5'	3.30 (1H, m)	77.9
6'a	3.88 (1Hdd (12.1, 3.0)	62.6
6'b	3.69 (1H, dd ,12.1, 4.4)	

### III.2.2.3. Détermination structurale du composé Ag /48/13 :



Le spectre de masse (SMHR) en mode d'ionisation électrospray négatif obtenu pour le produit **Ag /48/13**, donne un pic quasimoléculaire  $[M-H]^-$  de masse exacte  $m/z=385.1945$  permettant ainsi de déduire une formule brute de  $C_{19}H_{30}O_8$  pour cette molécule et une masse de 386 Da avec 5 insaturations.



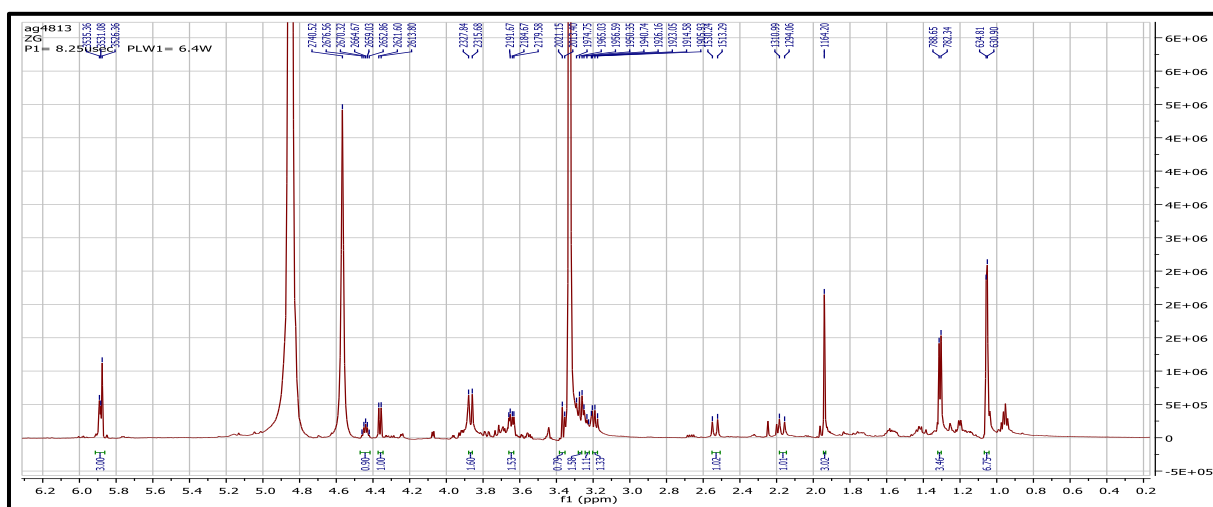
Spectre III.129 : Spectre HR-ESI-MS du composé Ag/48/13.

L'examen des spectres RMN  $^1\text{H}$  (spectre III.131), RMN  $^{13}\text{C}$  (spectre III.134), HSQC (spectre III.133), COSY (spectre III.132) révèle la présence des signaux caractéristique d'un groupement hexose, qui peuvent être répartis comme suit :

Un signal sous forme d'un doublet ( $J= 7.7\text{Hz}$ ) d'intégration 1H localisé à  $\delta_{\text{H}}=4.36$  ppm, attribuable au proton anomérique; porté par le carbone résonant à  $\delta_{\text{C}}= 102.74$  ppm. Les valeurs des déplacements chimiques de ce proton et son carbone orientent bien vers une jonction  $O\text{-}\beta\text{-glycoside}$ . La valeur 7.7 Hz de la constante de couplage, indique également une interaction trans - di-axiale entre H-1' et H-2'.

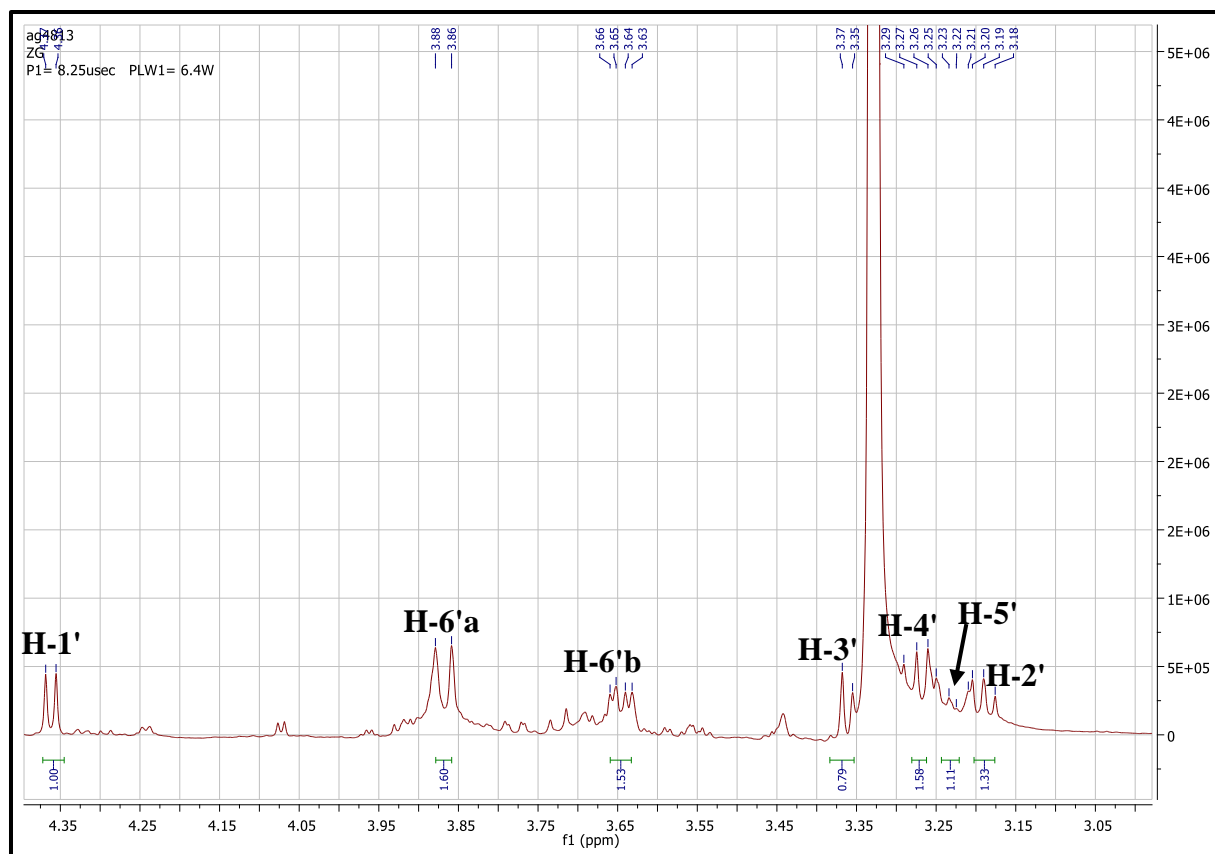
Deux signaux d'intégration 1H pour chacun, attribuables respectivement à H-6'b, H-6'a à  $\delta_{\text{H}} = 3.87$  ppm (*dl*,  $J= 11.8$  Hz) et  $\delta = 3.65$  ppm (*dd*,  $J = 11.8, 4.8$  Hz), portés par le carbone résonnant à  $\delta_{\text{C}}= 62.83$  ppm.

A partir du proton anomérique H-1' identifié précédemment, le spectre COSY permet de localiser le H-2' résonant sous forme d'un triplet à 3.19 ppm ( $J= 7.7\text{Hz}$  ;  $\delta_{\text{C}} = 75.25\text{ppm}$ ). Ce dernier permet de localiser le proton H-3' à  $\delta_{\text{H}} 3.35$  ppm ( $\delta_{\text{C}} = 78.02$  ppm) .Le spectre relatif à l'expérience COSY montre également des taches de corrélation entre les protons H-6'a et H-6'' b et le proton résonant sous forme d'un multiplet à  $\delta_{\text{H}} = 3.24$  ppm attribuable à H-5' ( $\delta_{\text{C}} = 77.28$  ppm). L'attribution de H-5' permet à son tour de localiser H-4' sous forme d'un triplet à 3.27 ppm ( $J= 8.4\text{Hz}$  ;  $\delta_{\text{C}} = 71.66$  ppm).La multiplicité du signal de H-4' (t) et la valeur de la constante de couplage (8.4 Hz) supposent des interactions axiale-axiale entre H-3'/H-4' et H-4'/H-5' et indiquent des orientations axiales de H-3'', H-4' et H-5' ce qui oriente vers un groupement glucopyranoside.

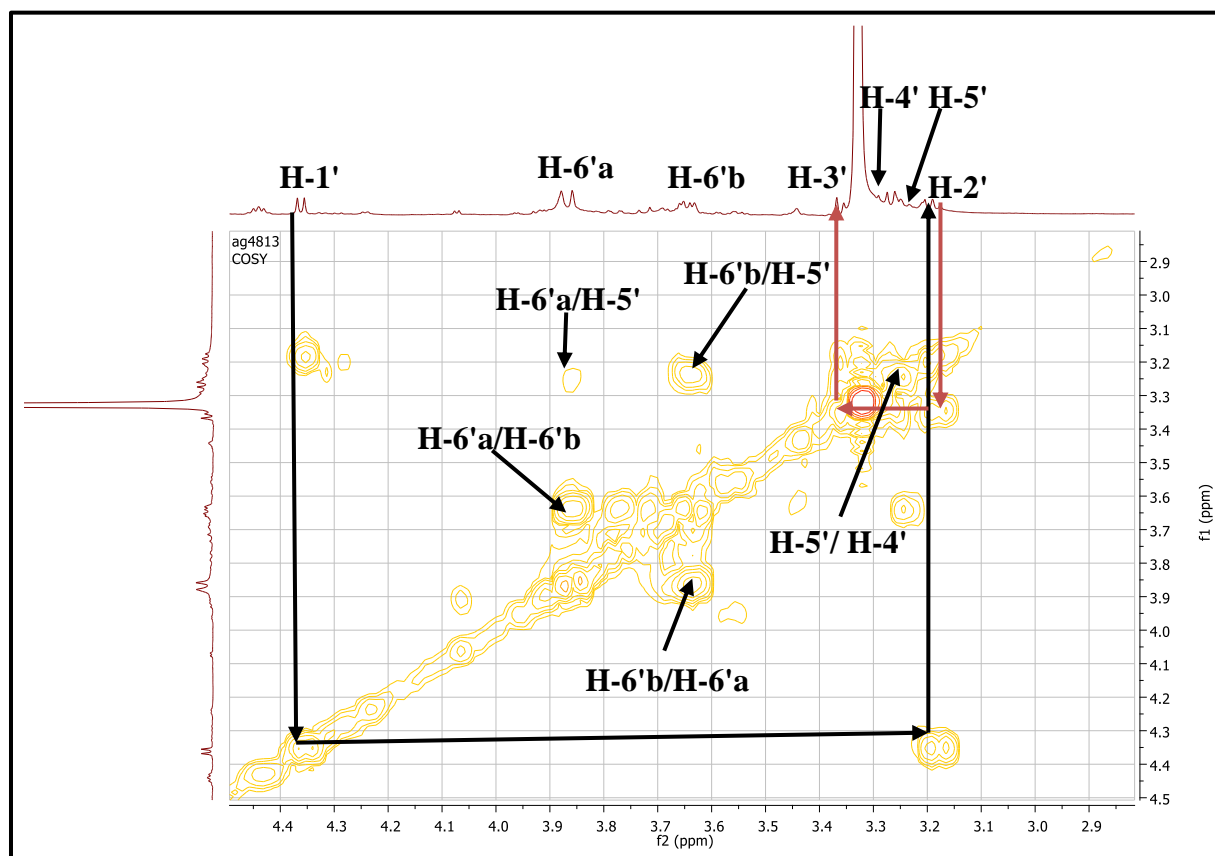


**Spectre III.130:** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm) du composé Ag /48/13.

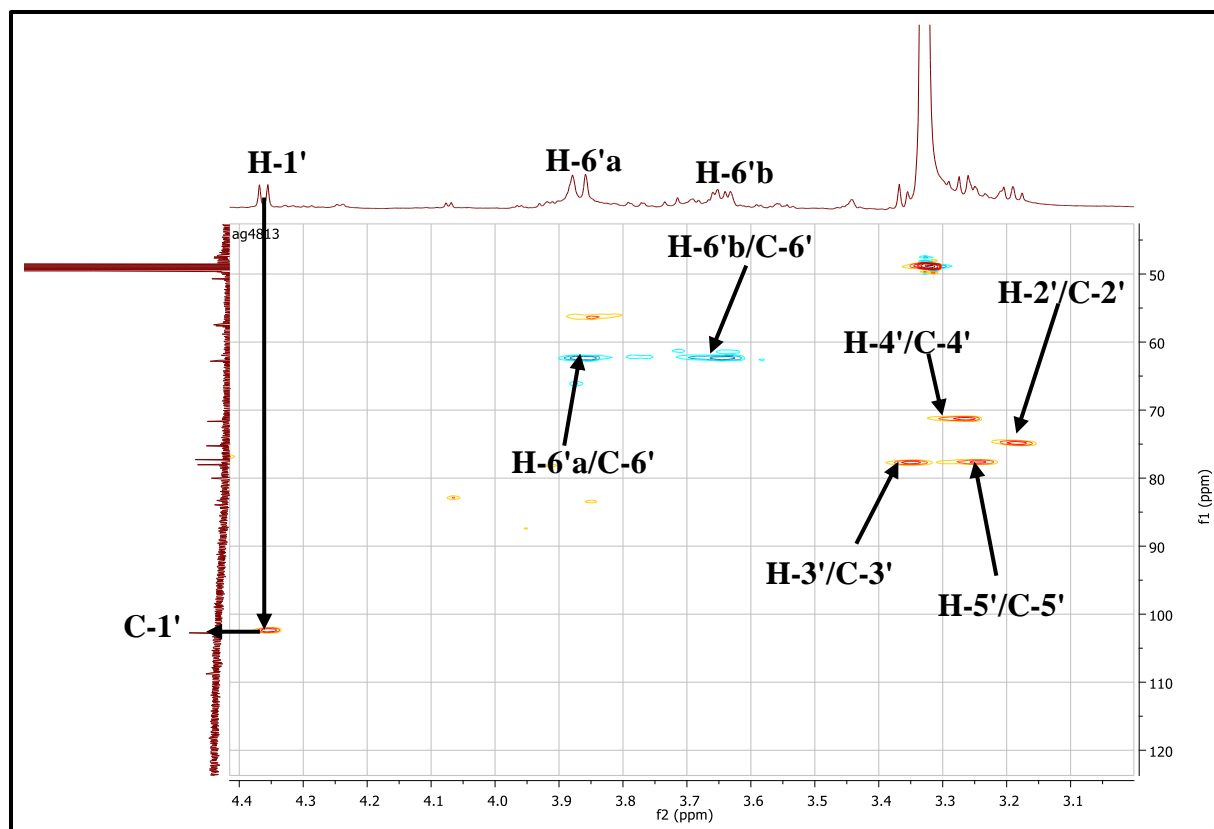




Spectre III.131: Spectre RMN  $^1\text{H}$  étalé (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm) du composé Ag /48/13.



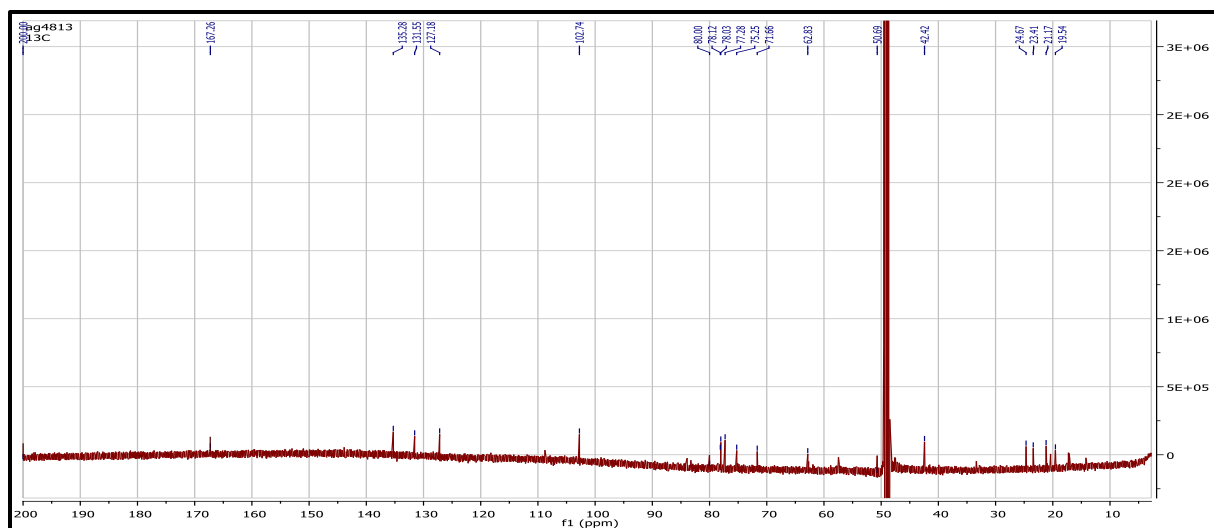
Spectre III.132: Spectre COSY étalé (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm) du composé Ag /48/13.



**Spectre III.133:** Spectre HSQC étalé (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm) du composé Ag /48/13.

En faisant abstraction des signaux de la partie osidique, les spectres des expériences RMN <sup>13</sup>C, HSQC et HMBC montrent :

- ✚ 4 groupements méthyles à  $\delta_C = 19.54 ; 21.17 ; 23.41$  et  $24.67$  ppm.
- ✚ 4 carbones quaternaires parmi lesquels un carbonyle d'une cétone conjuguée à  $\delta_C = 200.01$  ppm et trois autres à  $42.42 ; 80 ; 167.26$  ppm.
- ✚ 4 groupements CH dont :
  - 1 CH oxygéné à  $\delta_C = 78.12$  ;
  - 3 CH éthyléniques à  $127.18 ; 131.55$  et  $135.28$  ppm.
- ✚ 1 CH<sub>2</sub> à  $\delta_C = 50.69$  ppm.

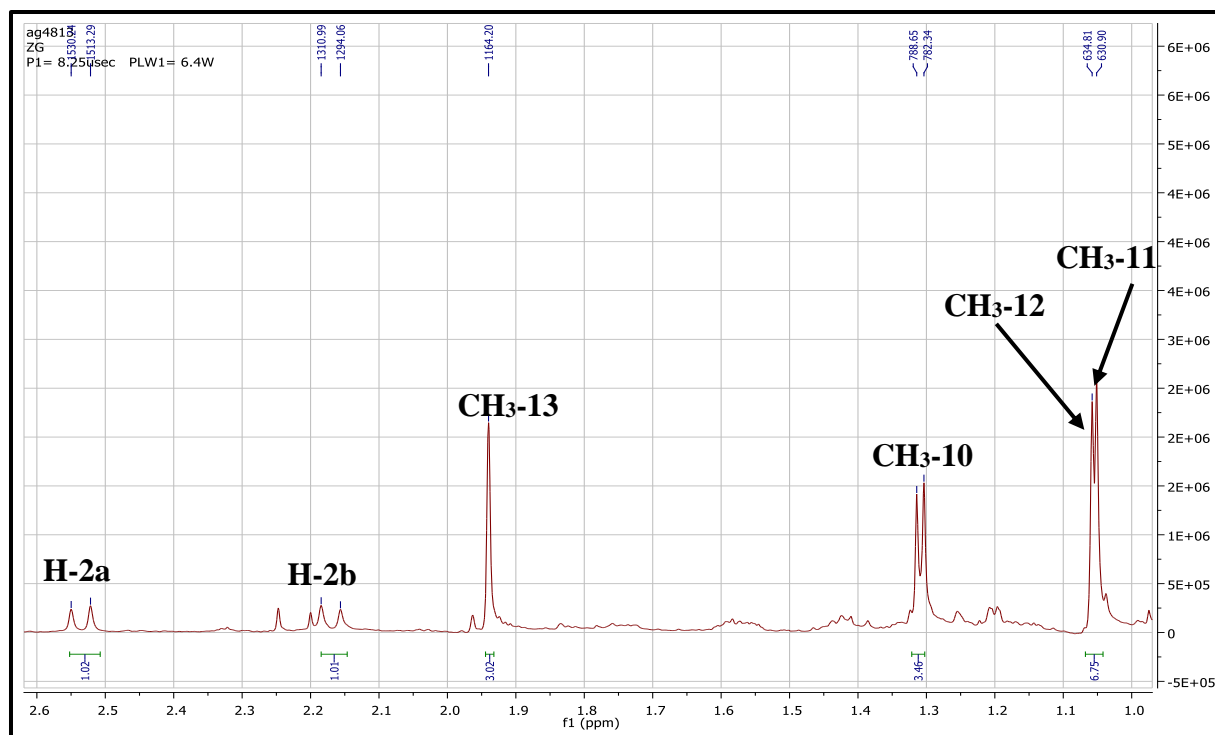


**Spectre III.134:** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm) du composé **Ag/48/13**.

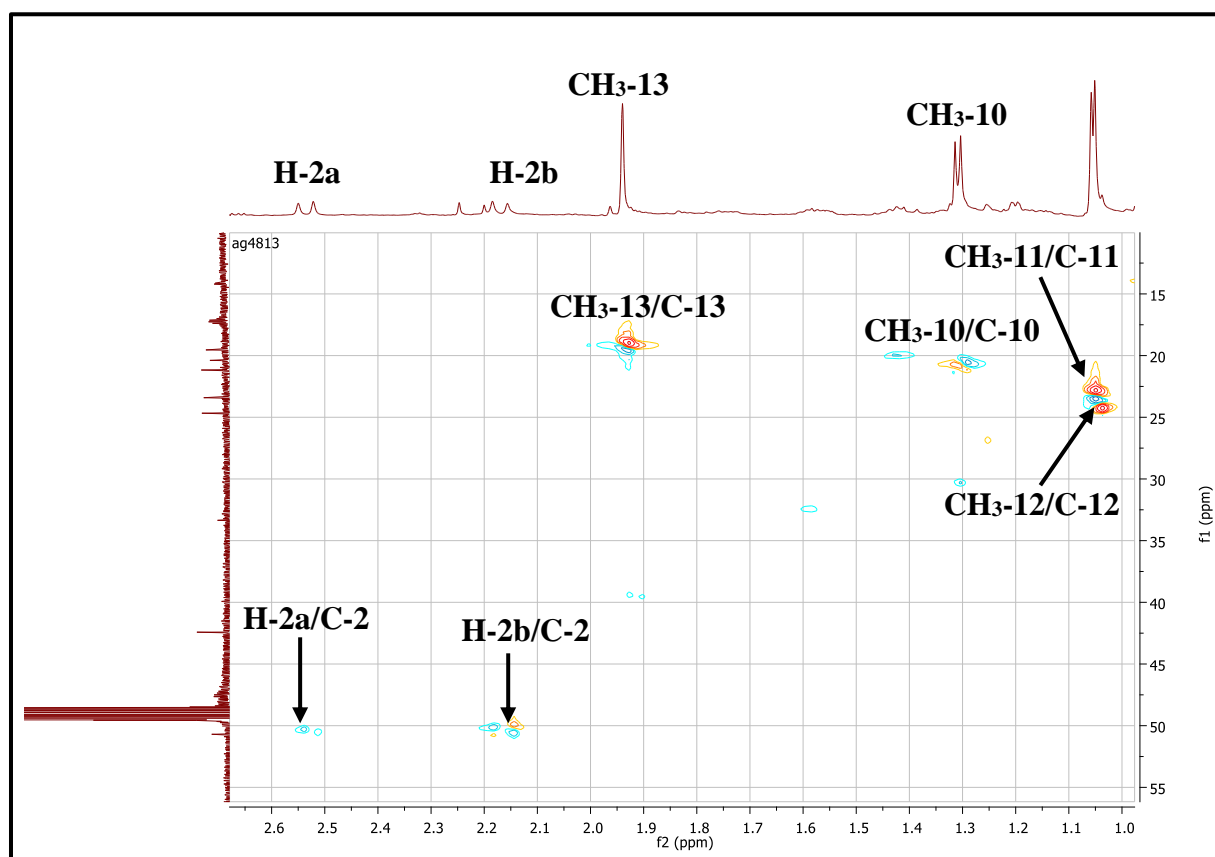
L'analyse simultanée de spectres RMN $^1\text{H}$  (Spectre III.135) et HSQC (spectre III.136) de ce composé, montrent la présence de deux singulets d'intégration 3H chacun caractéristiques de deux groupements méthyles à  $\delta_{\text{H}} = 1.05$  ppm ( $\delta_{\text{C}} = 23.41$  ppm) et  $\delta_{\text{H}} = 1.06$  ppm ( $\delta_{\text{C}} = 24.67$  ppm). Sur le spectre HMBC (Spectre III.137), les deux méthyles montrent des taches de corrélation avec le carbone quaternaire résonant à  $\delta_{\text{C}} 42.42$  ppm ; cette situation suppose qu'ils sont tous les deux portés par le même atome de carbone qui doit être quaternaire vu la multiplicité des signaux de ces deux méthyles. Nous numérotions ce carbone quaternaire C-1.

Toujours sur le spectre HMBC (Spectre III.137), les deux groupements méthyles montrent des corrélations avec les protons du groupement  $\text{CH}_2$  résonant sous forme de deux doublets à  $\delta 2.54$  ( $J = 16.9$  Hz) et  $\delta 2.17$  ppm ( $J = 16.9$  Hz), grâce au spectre HSQC on relève le carbone de ce méthylène à  $\delta_{\text{C}} = 50.69$  ppm. Nous numérotions le carbone de ce méthylène C-2 et ses protons H-2a et H-2b.

Sur le même spectre HMBC, les deux protons du méthylène montrent des taches de corrélation avec le carbone du carbonyle à  $\delta_{\text{C}} = 200.01$  ppm que nous pouvons alors numérotier C-3. D'après la valeur du déplacement chimique de ce carbonyle il s'agit d'un carbonyle de cétone probablement conjugué avec une double liaison ceci est confirmé par la corrélation entre un des protons méthylène ( $\delta_{\text{H}} = 2.17$  ppm) et le carbone du CH éthylénique résonant à  $\delta_{\text{C}} = 127.18$  ppm ( $\delta_{\text{H}} = 5.89$  ppm). Nous pouvons alors numérotier le carbone de ce groupement éthylénique C-4.

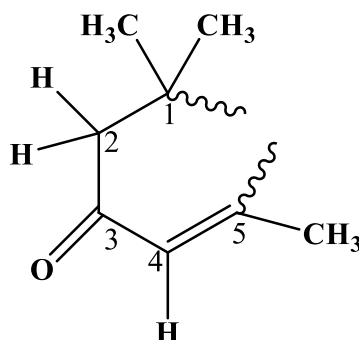


Spectre III.135: Spectre RMN  $^1\text{H}$  étalé (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm) du composé Ag /48/13.



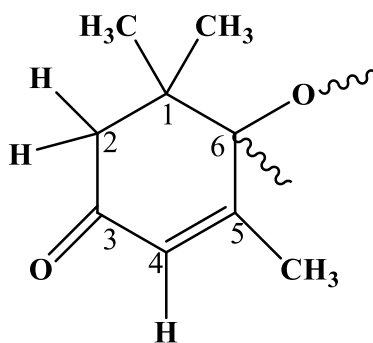
Spectre III.136: Spectre HSQC étalé (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm) du composé Ag /48/13.

Toujours sur le spectre HMBC (Spectre III.137), le proton éthylénique H-4 montre des taches de corrélation avec le carbone du méthyle résonant sous forme d'un singulet à  $\delta_H = 1.94$  ppm ( $\delta_C = 19.54$  ppm) et avec le carbone quaternaire à  $\delta_C = 167.26$  ppm. Ceci suppose que le groupement méthyle est porté par le carbone éthylénique à  $\delta_C = 167.26$  ppm (C-5). La présence de ce groupement  $\text{CH}_3$  en cette position est d'ailleurs confirmée par de corrélation entre ce groupement et le carbone à  $\delta_C = 167.26$  ppm et le carbone du groupement CH éthylénique à  $\delta_C = 127.18$  ppm. Cette analyse permet de proposer l'entité reportée dans la figure III.21.

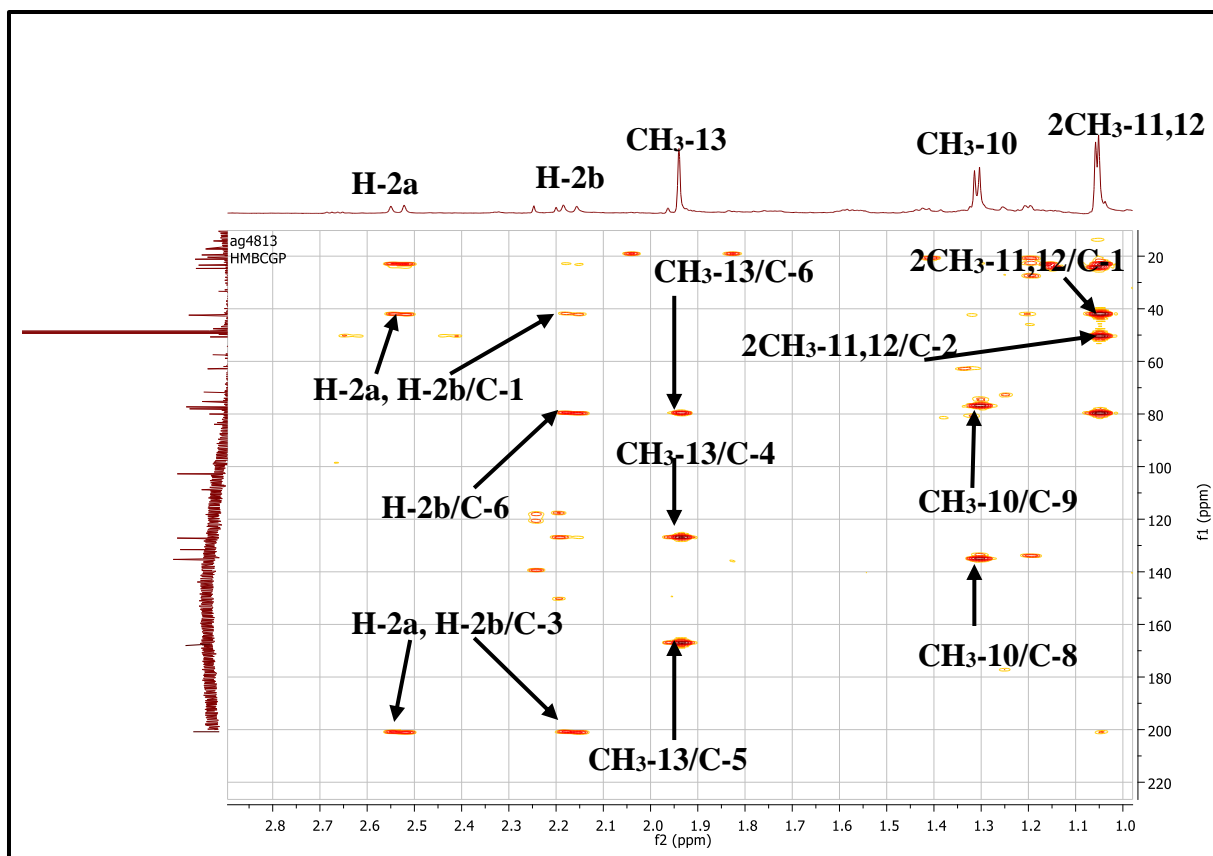


**Figure III.21 :** Structure partielle du composé Ag /48/13.

Sur le spectre HMBC (Spectre IV.56-3), Le proton H-4 et les protons du groupement  $\text{CH}_3$  en C-5 montrent des corrélations avec le carbone quaternaire résonant à  $\delta_C = 80$  ppm. D'après la valeur de son déplacement chimique ce carbone quaternaire est oxygéné. Nous le numérotions C-6. En effet, le spectre HMBC montre une tache corrélation entre C-6 et les protons des méthyles portés par C-1. Cette corrélation signifie que le carbone C-6 est lié au carbone C-1, Ceci permet d'avoir la fermeture du cycle comme le montre la figure III.22



**Figure III.22 :** Structure partielle du composé Ag /48/13.



**Spectre III.137:** Spectre HMBC étalé (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) du composé Ag 48/13.

Le spectre HMBC (Spectre III.141) montre également des corrélations entre le carbone C-6 à  $\delta_C = 80$  ppm et les protons éthyléniques à  $\delta_H = 5.88$  ppm ( $\delta_C = 131.55$  ppm) et 5.87 ppm ( $\delta_C = 135.28$  ppm) signifiant la substitution de ce cycle en C-6 par une double liaison. Nous numérotons les carbones éthyléniques C-7 et C-8.

Sur le spectre COSY (Spectre III.140), le proton H-8 montre une tache de corrélation avec le groupement CH résonant sous forme d'un multiplet à  $\delta_H = 4.44$  ppm ( $\delta_C = 78.12$  ppm). Nous pouvons alors numéroter le carbone de ce groupement méthyne C-9. Sur le même spectre COSY, le proton H-9 montre une tache de corrélation avec les protons du groupement méthyle résonant sous forme d'un doublet ( $J = 6.3$  Hz) à  $\delta_H = 1.31$  ppm ( $\delta_C = 21.17$  ppm). Ce couplage permet d'attribuer ce groupement CH<sub>3</sub> à la position C-10 de cette molécule.

A ce stade de notre analyse, nous pouvons proposer l'entité reportée dans la figure III.23.

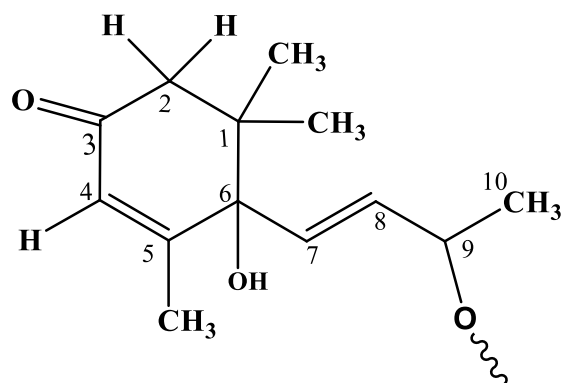
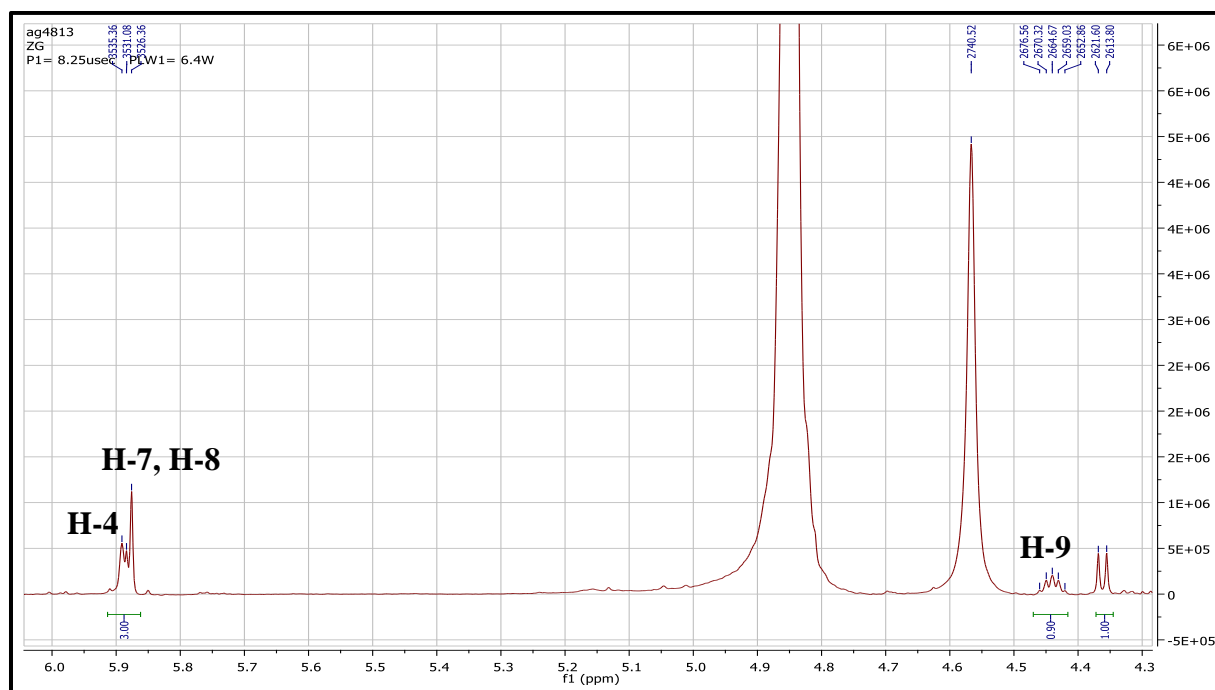
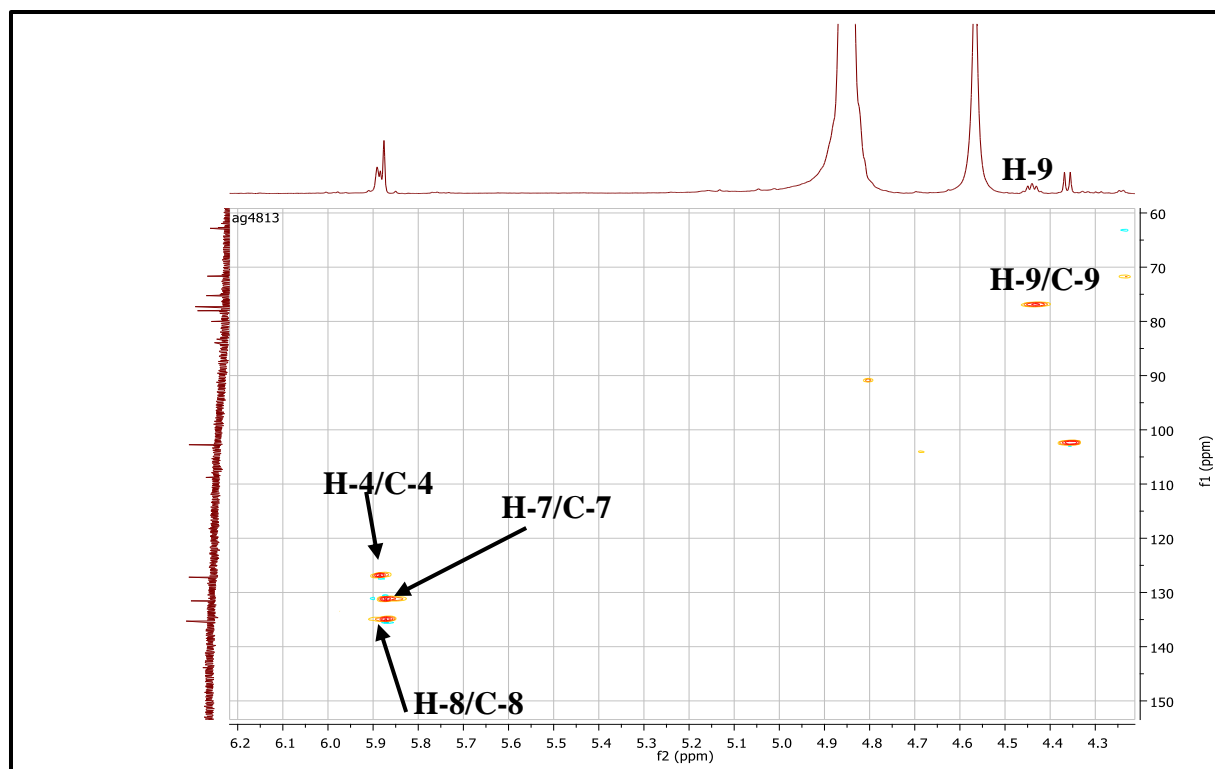


Figure III.23 : Structure partielle du composé Ag /48/13.

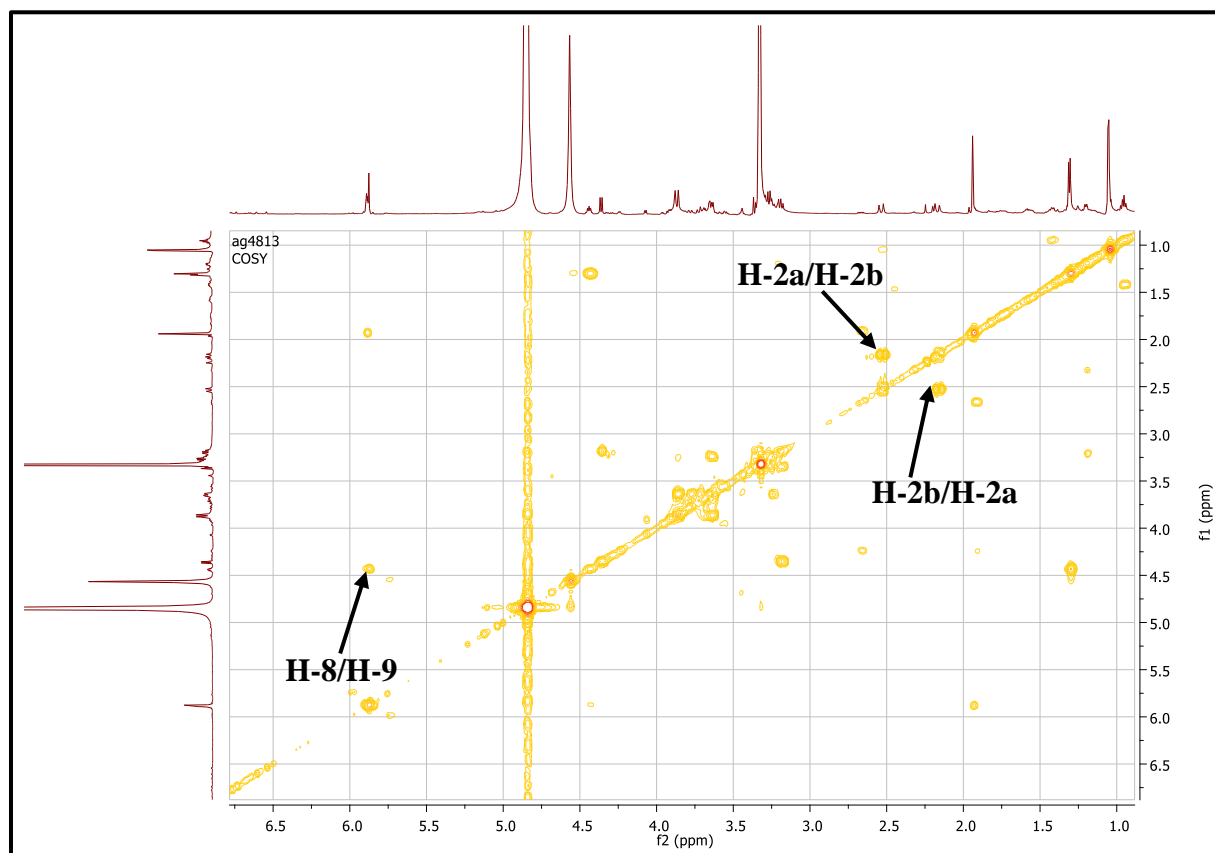
Le spectre HMBC permet de positionner le groupement glucopyranoside précédemment invoqué en position C-9 ( $\delta_C = 78.12$  ppm) grâce à la corrélation observée entre le proton anomérique H-1' et le carbone C-9.



Spectre III.138: Spectre RMN  $^1\text{H}$  étalé (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm) du composé Ag /48/13.

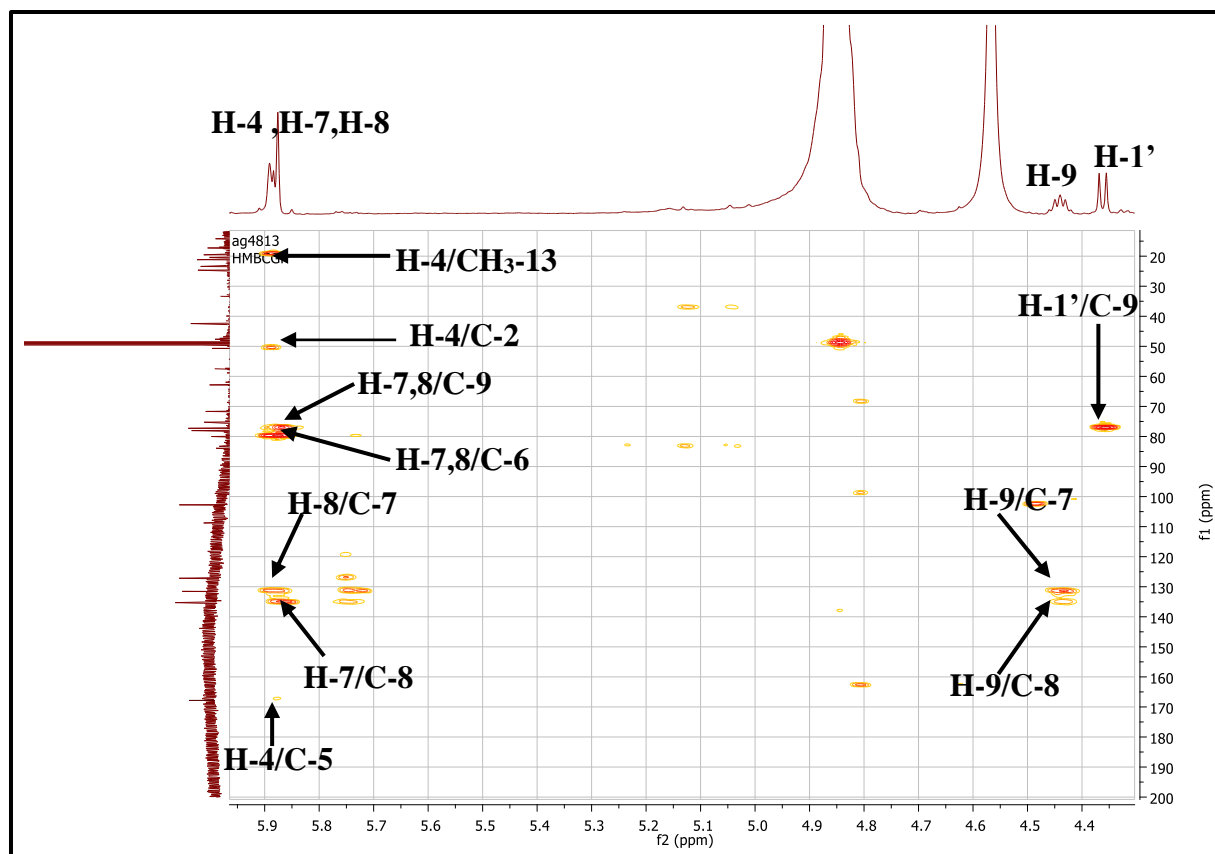


Spectre III.139: Spectre HSQC étalé (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) du composé Ag /48/13.

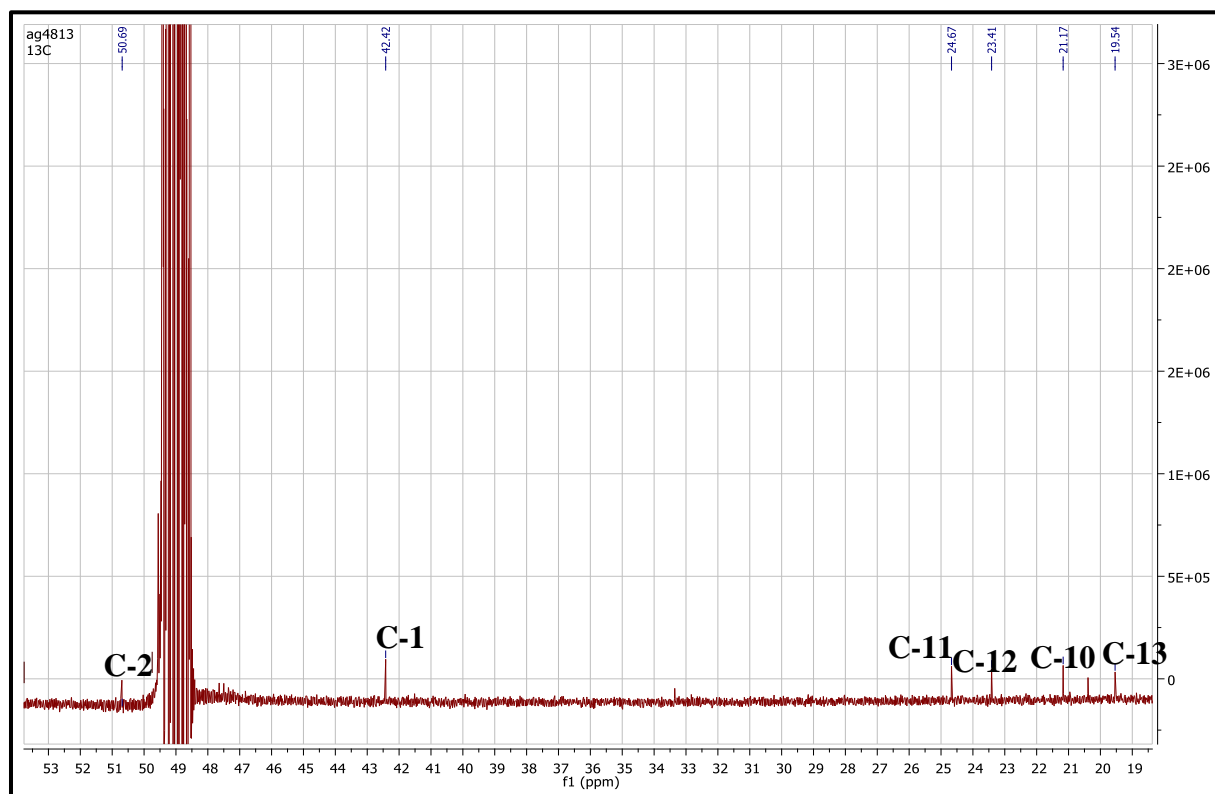


Spectre III.140: Spectre COSY étalé (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) du composé Ag /48/13.

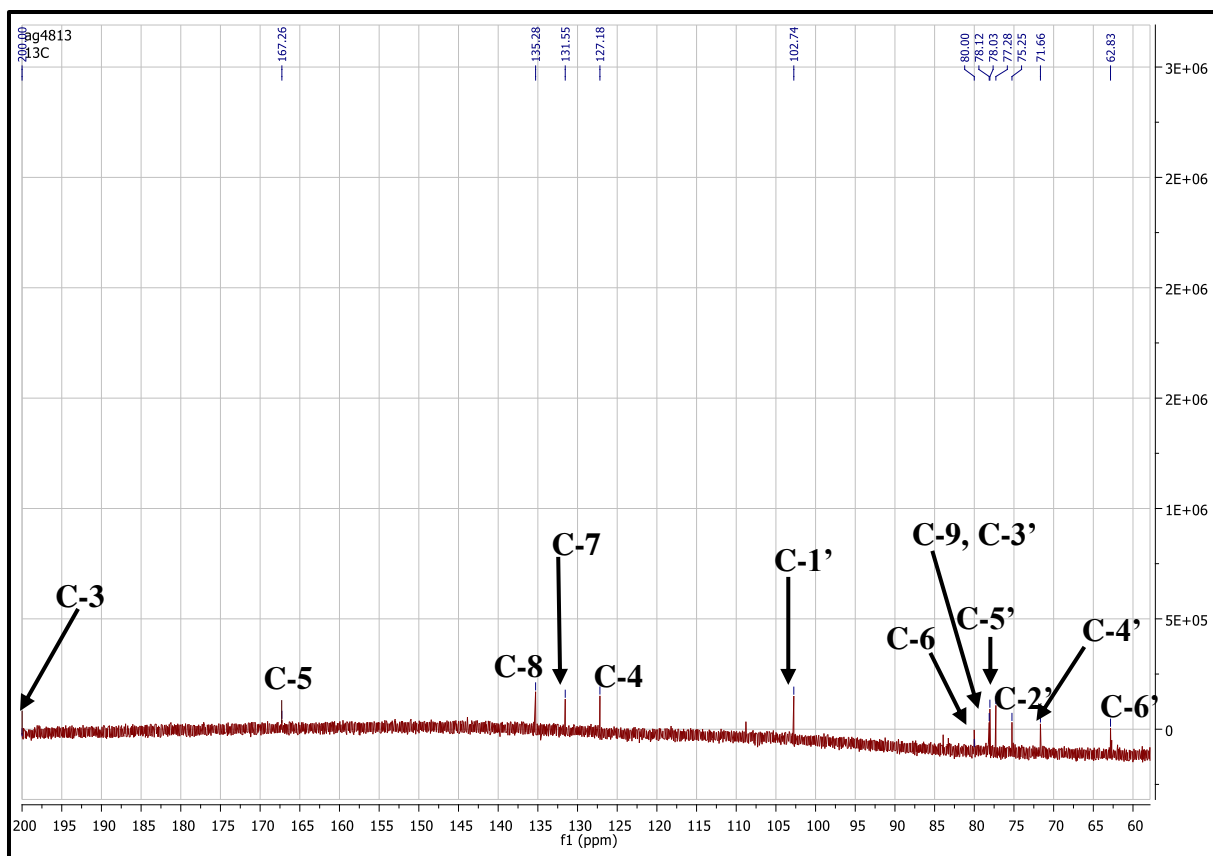




Spectre III.141: Spectre HMBC étalé (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) du composé Ag/48/13.



Spectre III.142: Spectre RMN <sup>13</sup>C (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) du composé Ag/84/13.



Spectre III.143: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm) du composé Ag/84/13.

Toutes ces données spectrales et la comparaison avec celles de la littérature [21] nous permettent de proposer pour le composé Ag/84/13 la structure (6*S*,9*R*)-9-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyloxy-6-hydroxy-3-oxo- $\alpha$ -ionol, appelée également (6*S*, 9*R*)-roseoside. Il a été isolé antérieurement des espèces *Corchorus olitorius* (Tiliaceae) [22] et *Eriobotrya japonica* (Rosaceae) [23]. Ce composé est connu par ses activités biologiques intéressantes : antihistaminique [22] et antitumorale [23].

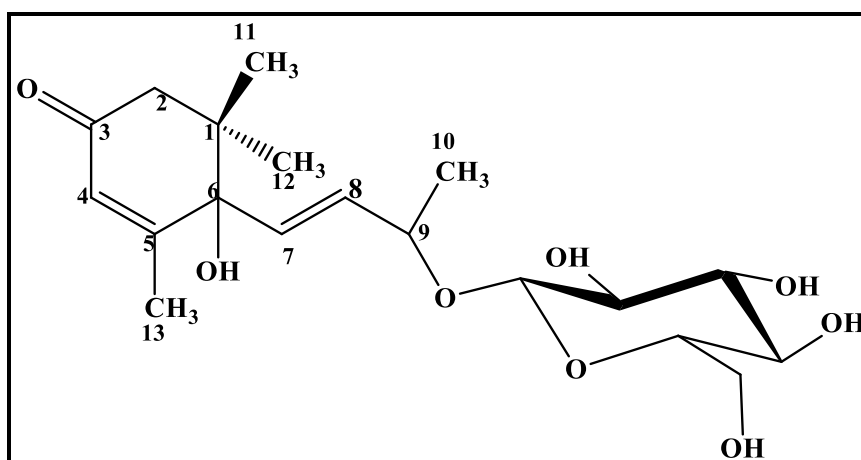
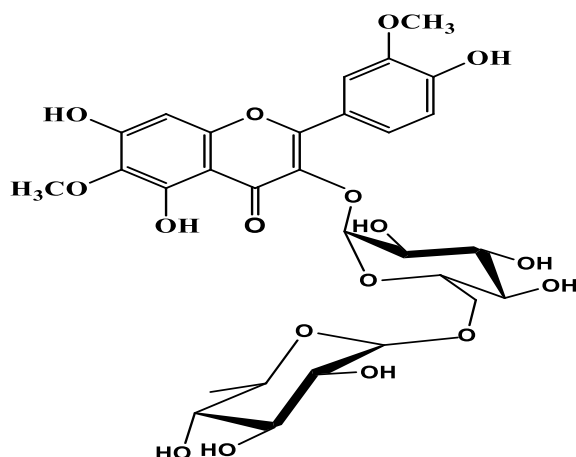


Figure III.24: Structure du composé Ag/48/13 (6*S*, 9*R*)-roseoside.

Tableau III.17: Données de la spectrométrie RMN <sup>1</sup>H et RMN <sup>13</sup>C du composé Ag/48/13.

Position	$\delta_H$ (m, J Hz)	$\delta_C$ (ppm)	Position	$\delta_H$ (m, J Hz)	$\delta_C$ (ppm)
1	-	42.42	11	1.05 s	23.14
2a	2.17 (d, 16.9)		12	1.06 s	24.67
2b	2.54 (d, 16.9)		13	1.94 s	19.54
3	-	200.01	Glucose		
4	5.89	127.18	1'	4.63 (d, 7.7)	102.74
5	-	167.26	2'	3.19 (t, 7.7)	75.25
6	-	80	3'	3.35 m	78.02
7	5.88	131.55	4'	3.27 (t, 8.4)	71.66
8	5.87	135.28	5'	3.24 m	77.28
9	4.44 m	80	6'a	3.65 (dd, 11.8 ; 4.8)	
10	1.31 (d, 6.3)	21.17	6'b	3.87 (dl, 11.8)	

#### III.2.2.4. Détermination structurale du composé Ag /52/10 :

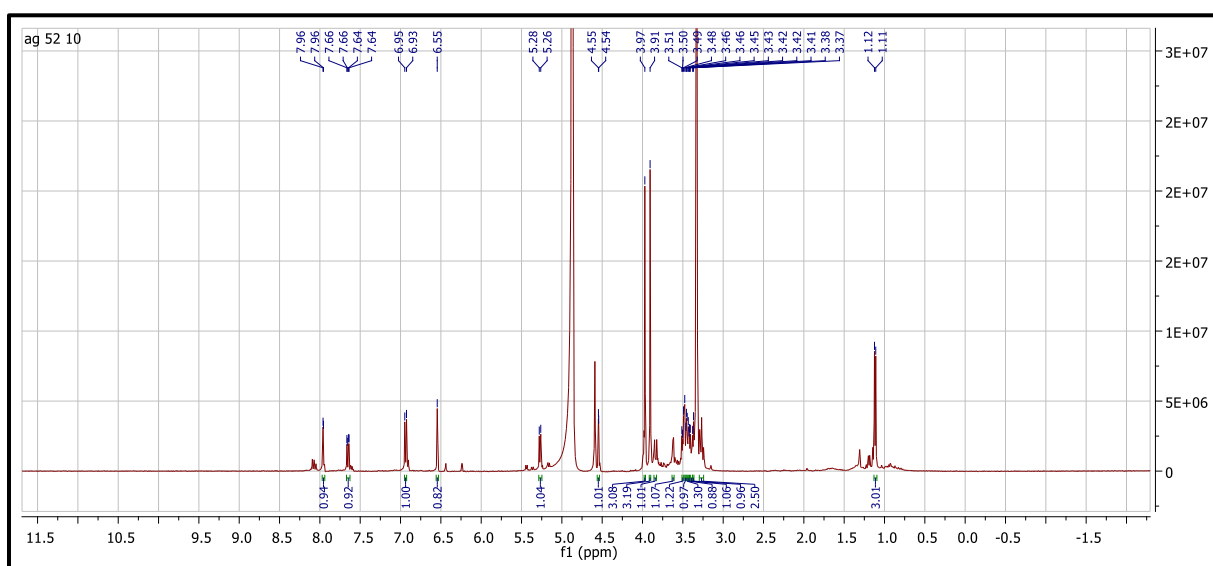


L'analyse des spectres RMN <sup>1</sup>H enregistré dans CD<sub>3</sub>OD du composé Ag /52/10 (Spectre III.144) montre une grande similitude structurale, notamment au niveau de la génine, avec le composé Ag /10/12 déjà identifié. En fait, le spectre RMN <sup>1</sup>H montre les signaux suivants :

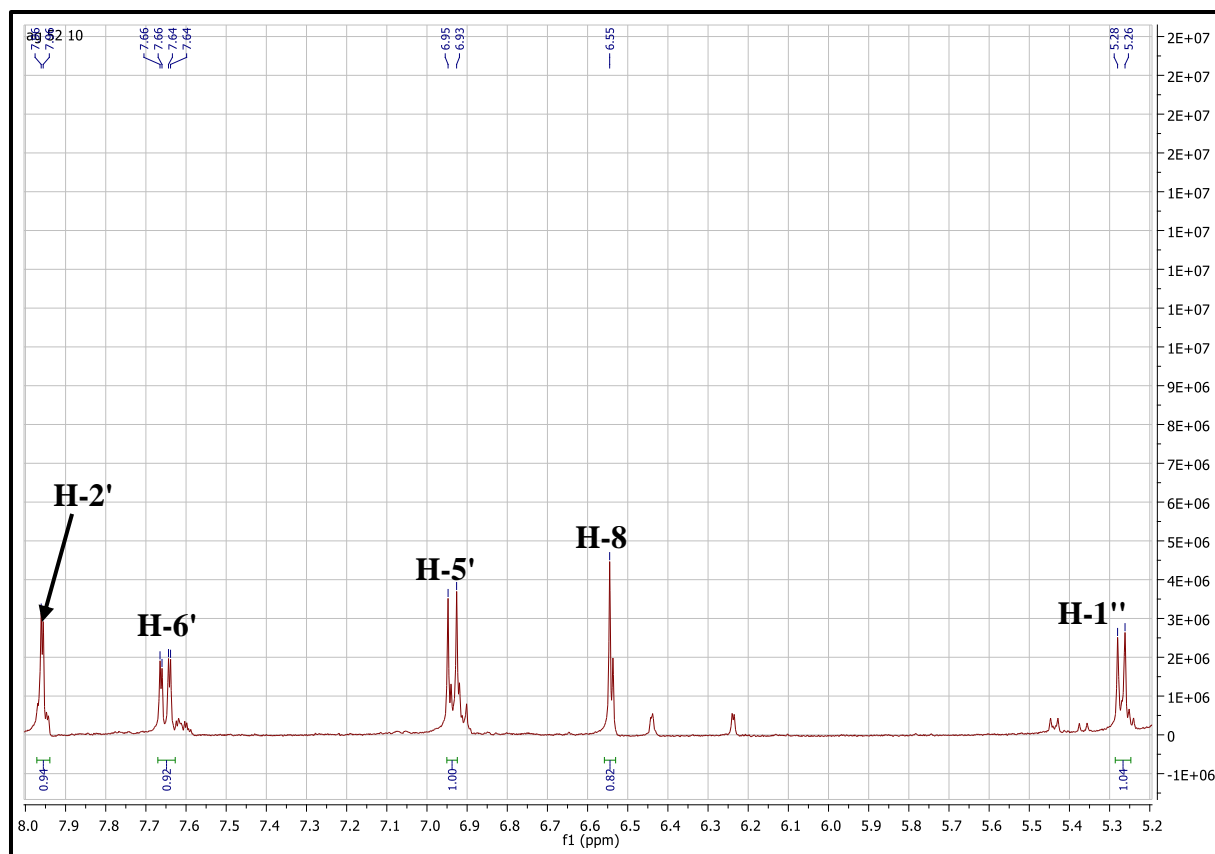
- Un doublet d'intégration 1 H, à  $\delta_H = 7.96$  ppm ( $J = 1.6$  Hz) attribuable à H-2'.
- Un doublet de doublets d'intégration 1 H, à  $\delta_H = 7.66$  ppm ( $J = 8.4 ; 1.6$  Hz) attribuable à H-6'.
- Un doublet d'intégration 1 H, à  $\delta_H = 6.93$  ppm ( $J = 8.4$  Hz) attribuable à H-5'. Ces signaux indiquent qu'il s'agit d'une disubstitution du noyau B.
- Un singulet d'intégration 1 H à  $\delta_H = 6.55$  ppm attribuable à H-8.

- Deux singulets d'intégration 3H chacun à  $\delta_H = 3.91$  et  $3.97$  ppm attribuables aux protons de deux groupements  $OCH_3$ .

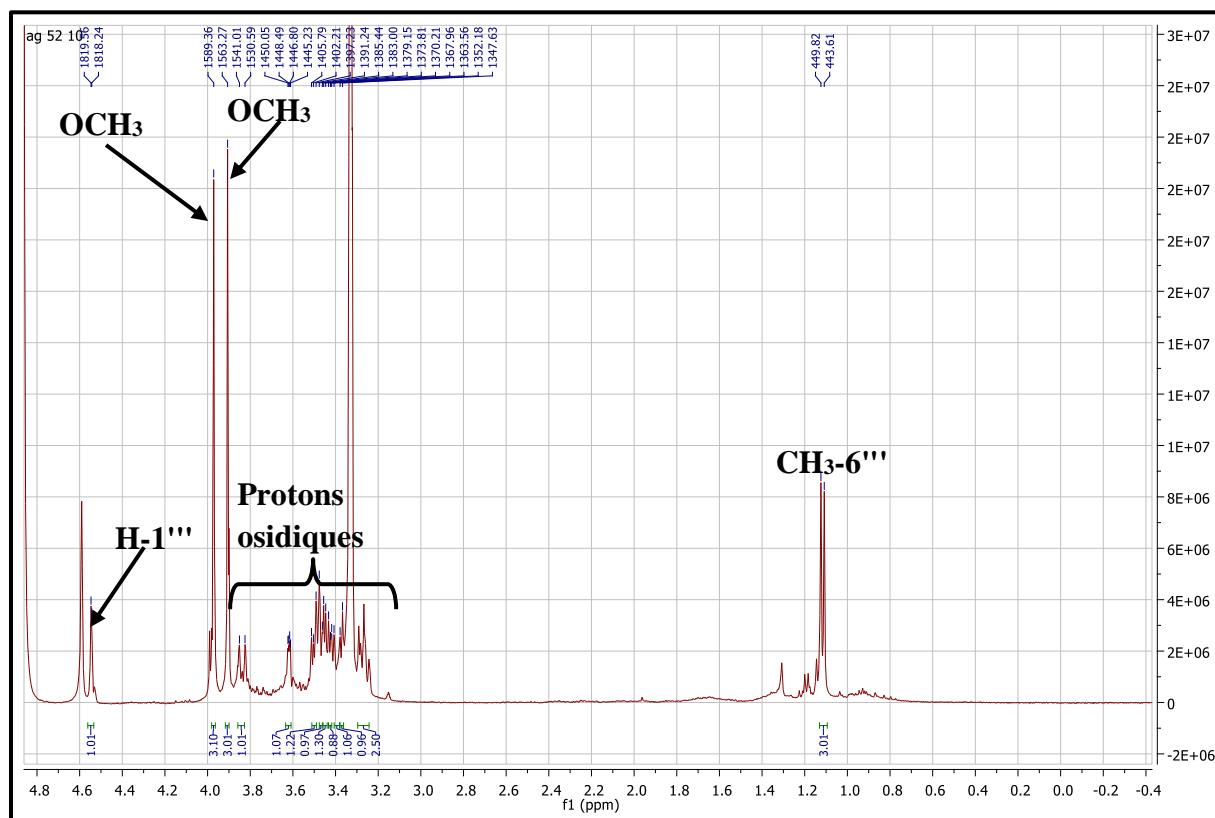
La différence entre les composés **Ag /52/10** et **Ag /10/12** réside donc au niveau de la partie osidique. En effet, le spectre RMN  $^1H$  permet d'observer deux signaux caractéristiques de protons anomères à  $\delta_H = 4.55$  ppm (*d*,  $J = 1,4$  Hz) et  $\delta_H = 5.28$  ppm (*d*,  $J = 7.4$  Hz) indiquant la présence de deux unités osidiques, ainsi que les autres signaux de ces deux sucre entre  $\delta_H = 3.2$ -  $3.9$  ppm. La présence d'un groupement méthyle à  $\delta_H 1.12$  ppm (*d*,  $J = 6.2$  Hz) observé sur le spectre RMN  $^1H$  et la constante de couplage du premier proton anomère (*d*,  $J = 1.4$  Hz) montre clairement qu'une des deux unités osidiques est un rhamnose.



**Spectre III.144:** Spectre RMN  $^1H$  (400 MHz,  $CD_3OD$ ,  $\delta$  ppm) du composé **Ag /52/10** .



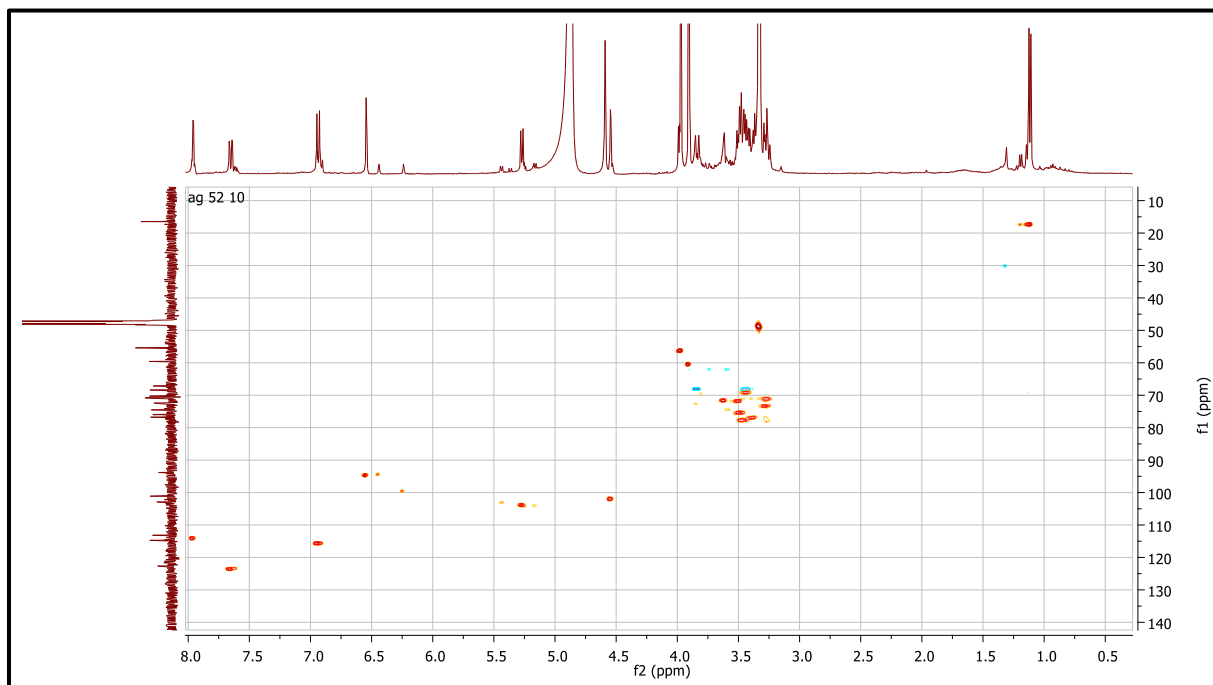
Spectre III.145: Spectre RMN  $^1\text{H}$  étalé (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm) du composé Ag/52/10.



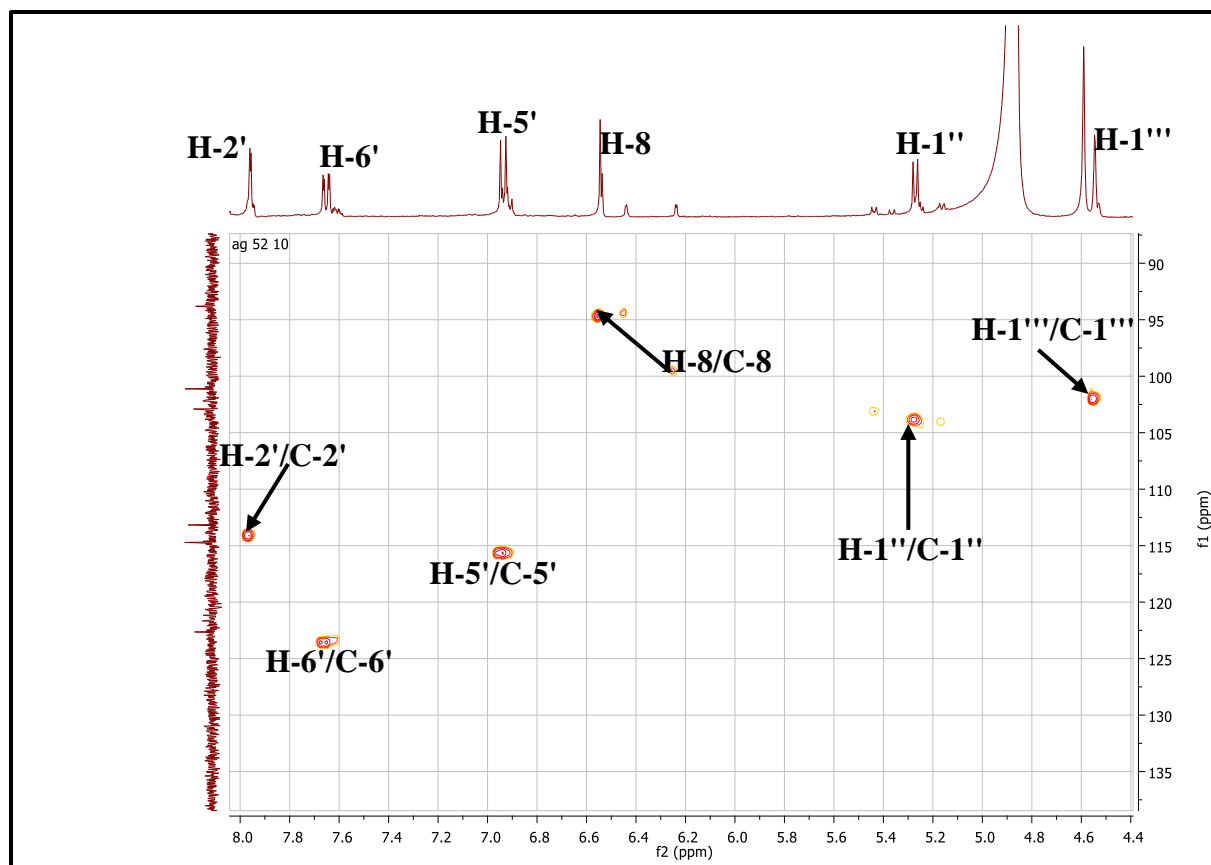
Spectre III.146: Spectre RMN  $^1\text{H}$  étalé (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm) du composé Ag/52/10.

L'examen du spectre HSQC (spectre III.147) et son étalement (spectre III.148) permettent de localiser les noyaux C-2', C-5', C-6' et C-8 du noyau flavonique à  $\delta_C$  (114.52 ; 115.63 ; 123.4 et 94.6 ppm) respectivement et les carbones des méthoxyles à  $\delta_C$  (56.25 et 60.55ppm) respectivement.

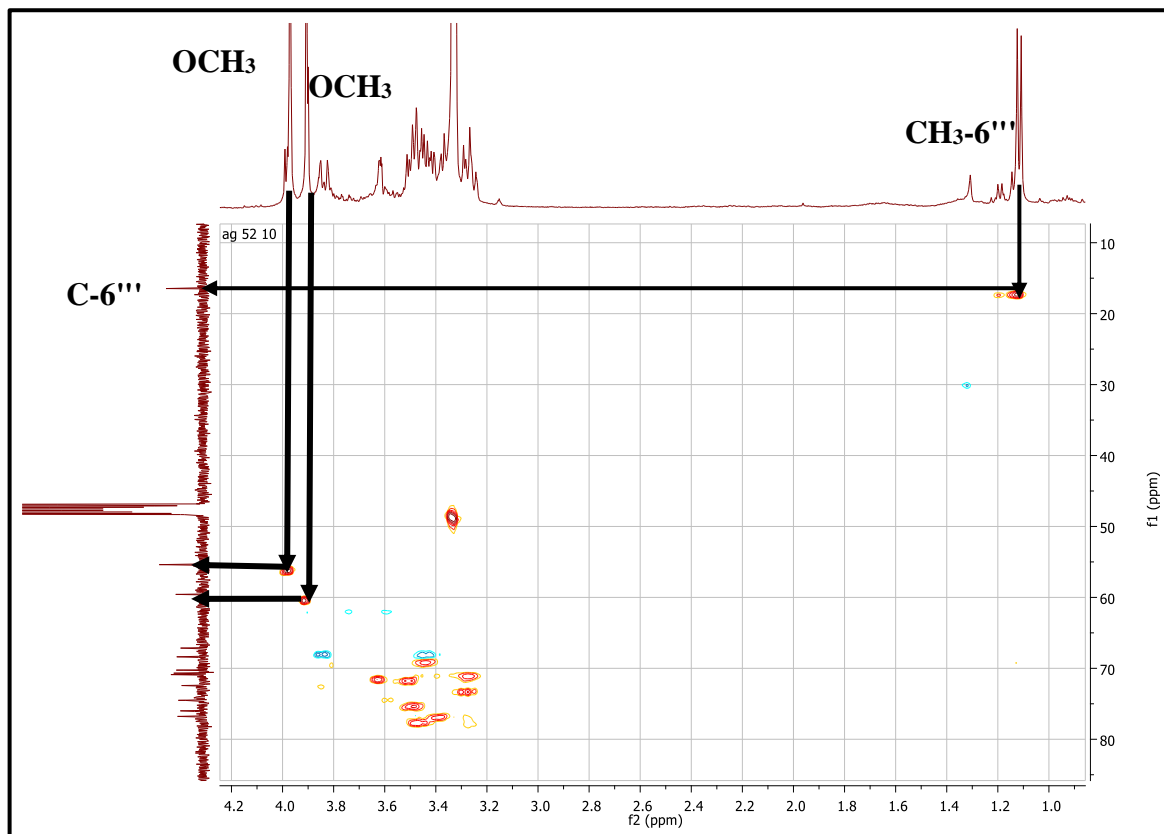
Le même spectre permet également d'attribuer les carbones osidiques  $\delta_C$  103.91 ppm, 73.5 ppm, 76.84 ppm, 71.6 ppm, 77.7 ppm et 67.9 ppm attribuables respectivement aux carbones C-1'', C-2'', C-3'', C-4'', C-5'' et C-6'' qui sont caractéristiques des carbones d'un glucose selon la littérature . Ainsi les carbones osidiques du rhamose résonnant à  $\delta_C$  102.1 ppm, 71.22 ppm, 75.5 ppm, 71.6 ppm, 69.37 ppm et 17.54 ppm sont attribuables aux carbones C-1''', C-2''', C-3''', C-4''', C-5''' et C-6'''.



**Spectre III.147:** Spectre HSQC (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm) du composé Ag /52/10.



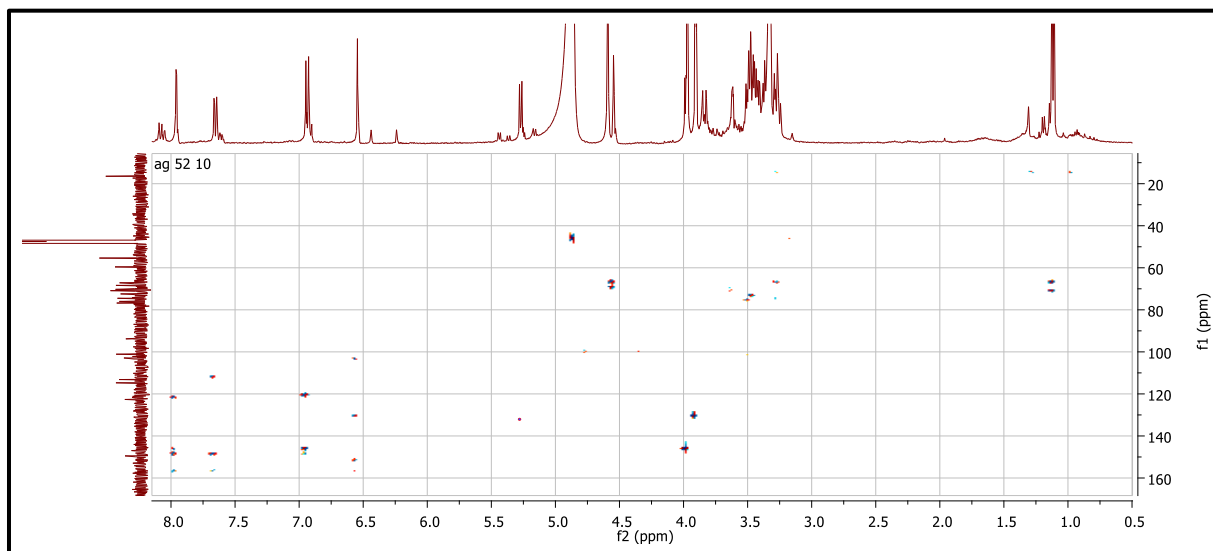
Spectre III.148: Spectre HSQC étalé (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) du composé Ag /52/10.



Spectre III.149: Spectre HSQC étalé (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) du composé Ag /52/10.

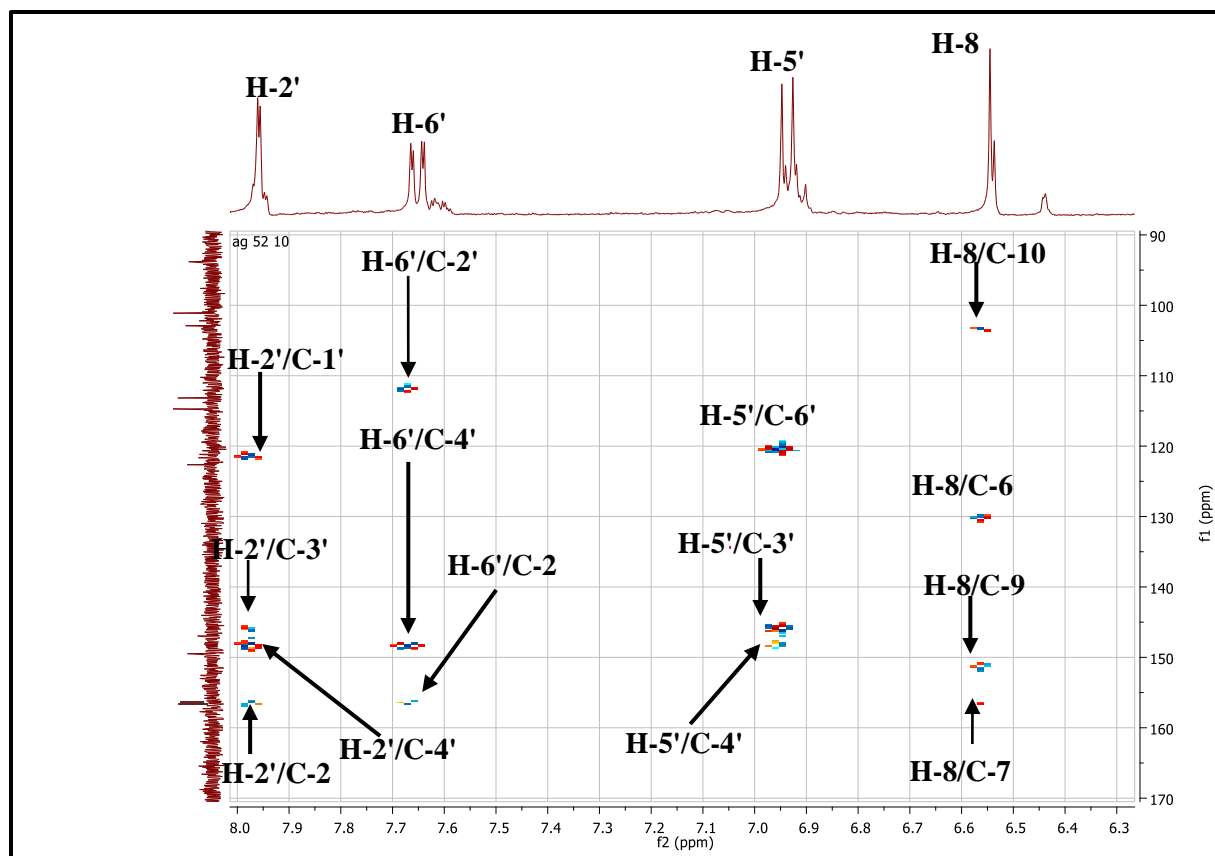
L'interprétation du spectre HMBC montre une tache de corrélation entre le proton anomérique du glucose à  $\delta_H = 5.28$  ppm et le carbone à  $\delta_C = 133.2$  ppm attribué au carbone C-3. Ce qui permet de placer le substituant glucose sur le carbone C-3.

Sur ce même spectre on observe une tache de corrélation entre le proton anomérique H-1'' à  $\delta_H 4.55$  ppm du rhamnose avec le carbone C-6'' à  $\delta_C 67.94$  ppm du glucose, menant ainsi à une jonction entre l'oxygène en C-6'' avec le C1''.

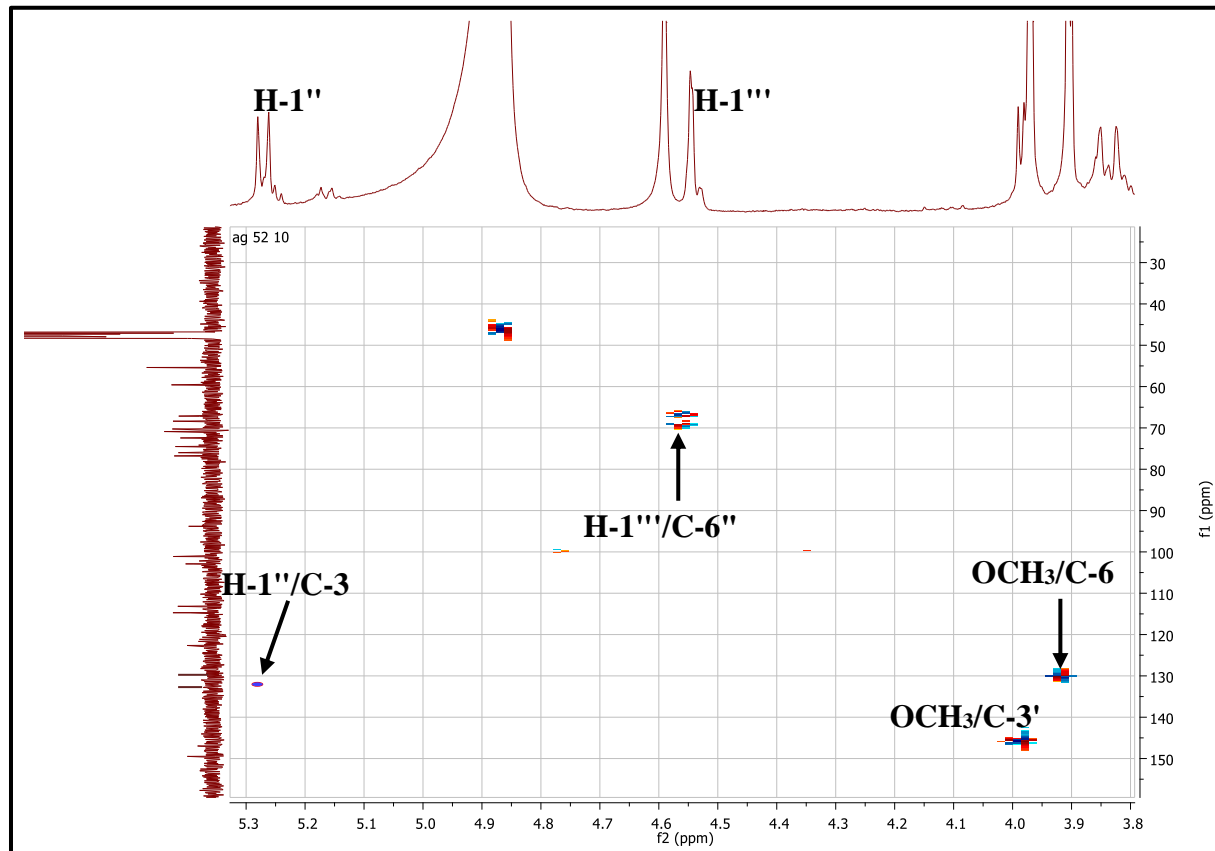


**Spectre III.150:** Spectre HMBC (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm) du composé **Ag /52/10**.





Spectre III.151: Spectre HMBC étalé (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) du composé Ag /52/10.



Spectre III.152: Spectre HMBC étalé (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) du composé Ag /52/10.

L'ensemble de ces données et la comparaison avec celles de la littérature [24] mène à la structure reportée dans la Figure III.25. Il s'agit de la spinacétine 3-*O*-rutinoïde.

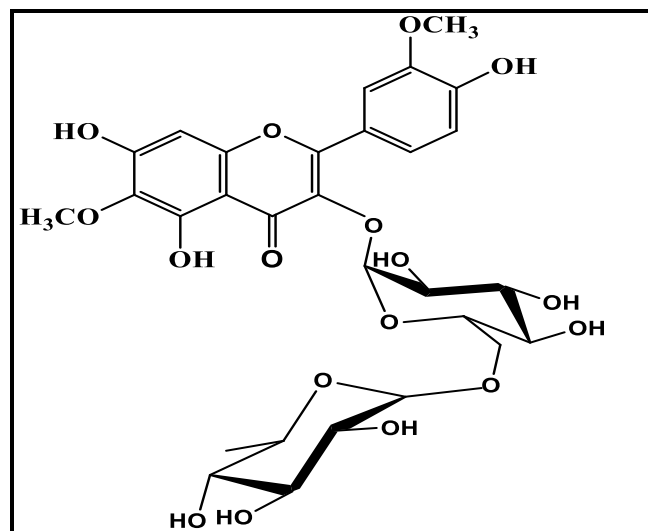


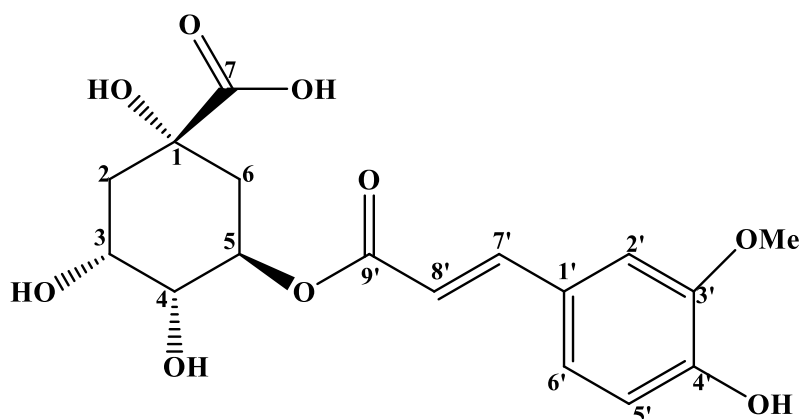
Figure III.25: Structure du composé Ag/52/10 spinacétine 3-*O*-rutinoïde.

Les déplacements chimiques des protons et carbones du composé Ag/52/10 sont regroupés dans le tableau III.18.

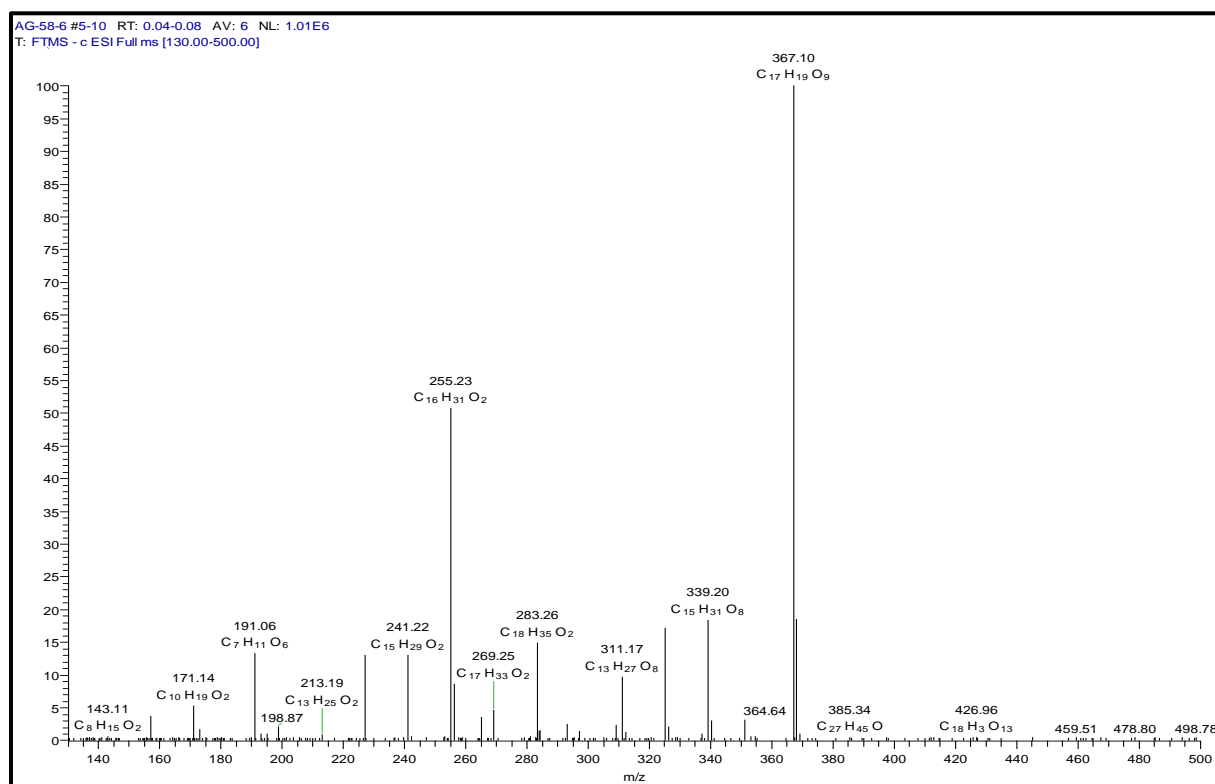
Tableau III.18: Données de la spectrométrie RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  du composé Ag/52/10.

Position	$\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	Position	$\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
2	-	156.82	1''	5.27 (d ; 7.4)	103.9
3	-	133.2	2''	3.28 m	73.5
4	-	179.85	3''	3.40 m	76.84
5	-	153.5	4''	3.51 m	71.78
6	-	130.37	5''	3.48 m	77.7
7	-	156.82	6''	3.45, 3.85	67.9
8	6.55 s	94.6	1'''	4.55 (d ; 1.4)	102.1
9	-	151.26	2'''	3.28 m	71.22
10	-	103.9	3'''	3.50	75.5
1'	-	121.52	4'''	3.63	71.6
2'	7.96 (d ; 1.6)	114.52	5'''	3.44 m	69.37
3'	-	146.2	6'''	1.12 (d ; 6.2)	17.35
4'	-	148.38	OMe-6	3.91 s	60.55
5'	6.93 (d ; 8.4)	115.63	OMe-3'	3.97 s	56.25
6'	7.66 (dd ; 1.6, 8.4)	123.5			

## III.2.2.5. Détermination structurale du composé Ag /58/6 :



L'analyse du spectre de masse à haute résolution enregistré en mode ESI (-) (Spectre III.150), montre la présence d'un ion à  $m/z = 397.10$   $[M-H]^-$  orientant vers la formule brute  $C_{17}H_{20}O_9$  pour cette molécule contenant 8 insaturations.



Spectre III.150 : Spectre HR-ESI-MS du composé Ag/48/13.

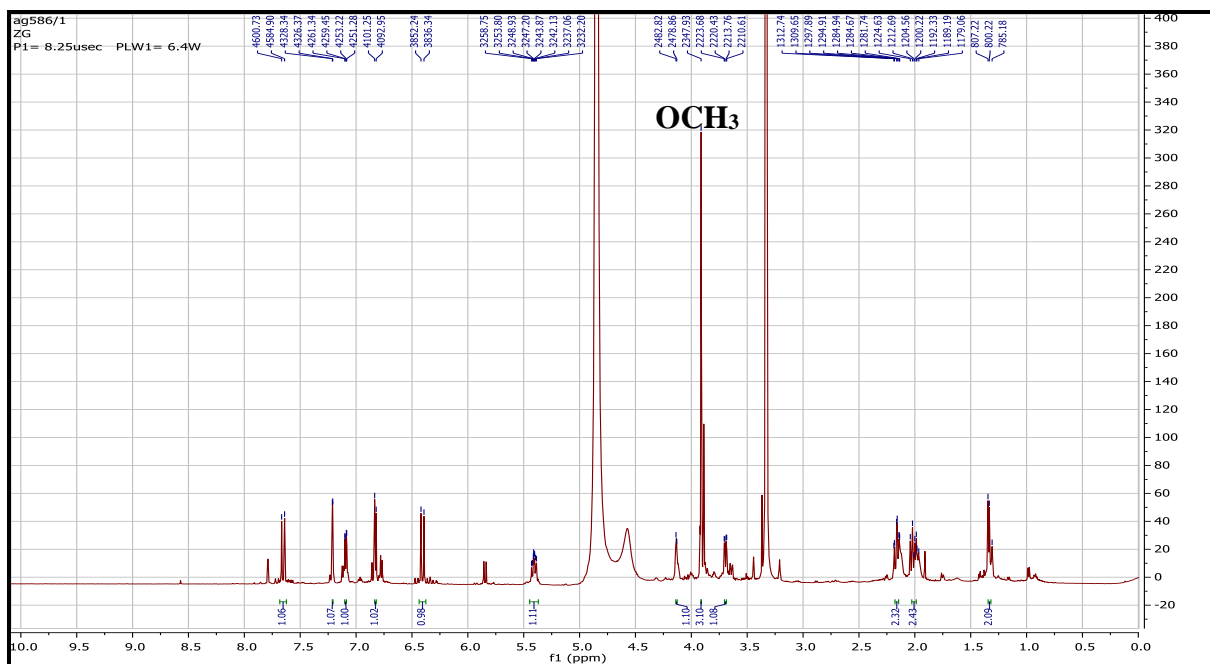
L'examen du spectre RMN  $^1H$  (Spectre III.151) et son étalement (Spectre III.152) montre la présence de trois protons d'un noyau aromatique résonant sous forme :

- ❖ Un doublet d'intégration 1H ( $J = 1.9$  Hz), indicateur d'un couplage méta à  $\delta_H = 7.21$  ppm.
- ❖ Un doublet dédoublé ( $J = 8.1$  Hz ;  $J = 1.9$  Hz), indicateur d'un couplage ortho et d'un couplage méta à  $\delta_H = 7.09$  ppm.
- ❖ Un doublet d'intégration 1H à  $\delta_H = 6.83$  ppm ( $J = 8.1$  Hz), indicateur d'un couplage ortho.

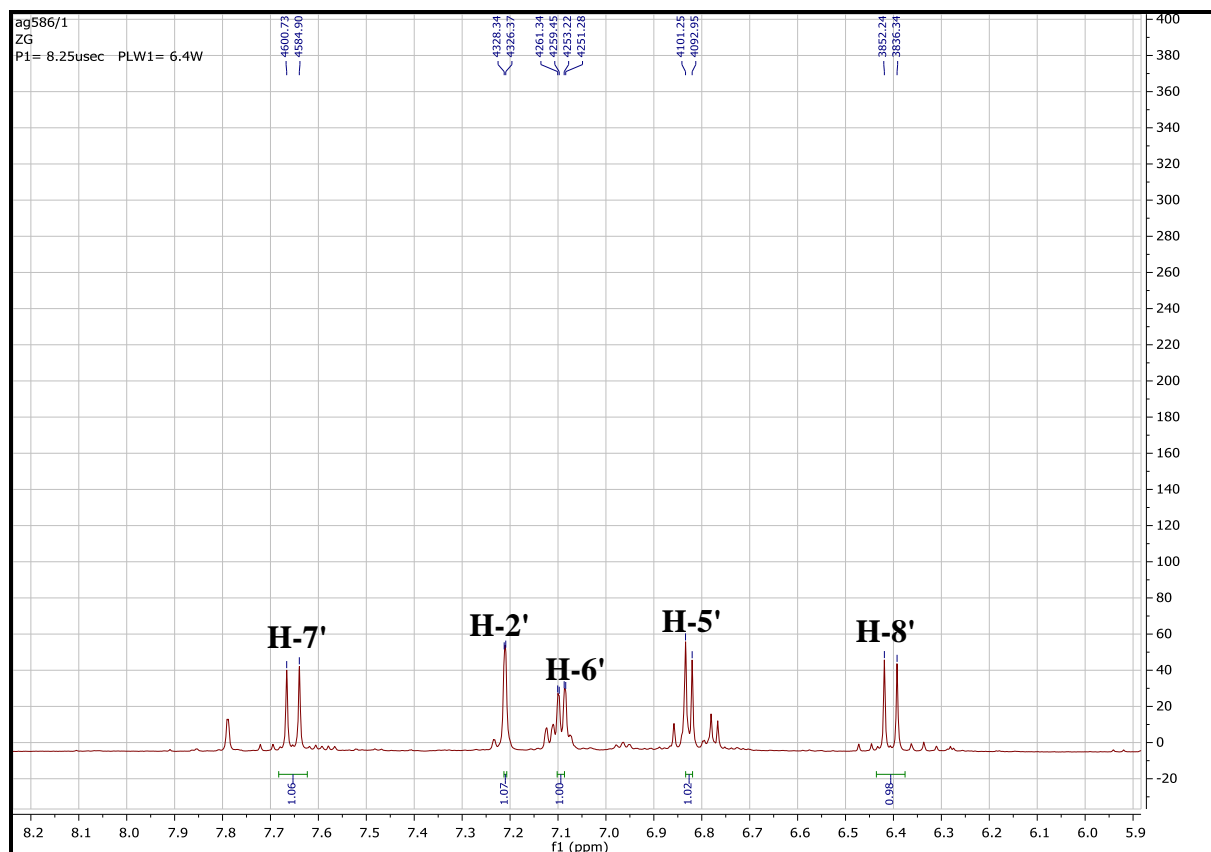
Les valeurs des déplacements chimiques de ces protons ainsi que celles des constantes de couplage orientent vers la présence d'un cycle aromatique tri substitué en méta et en para.

Ce spectre montre également :

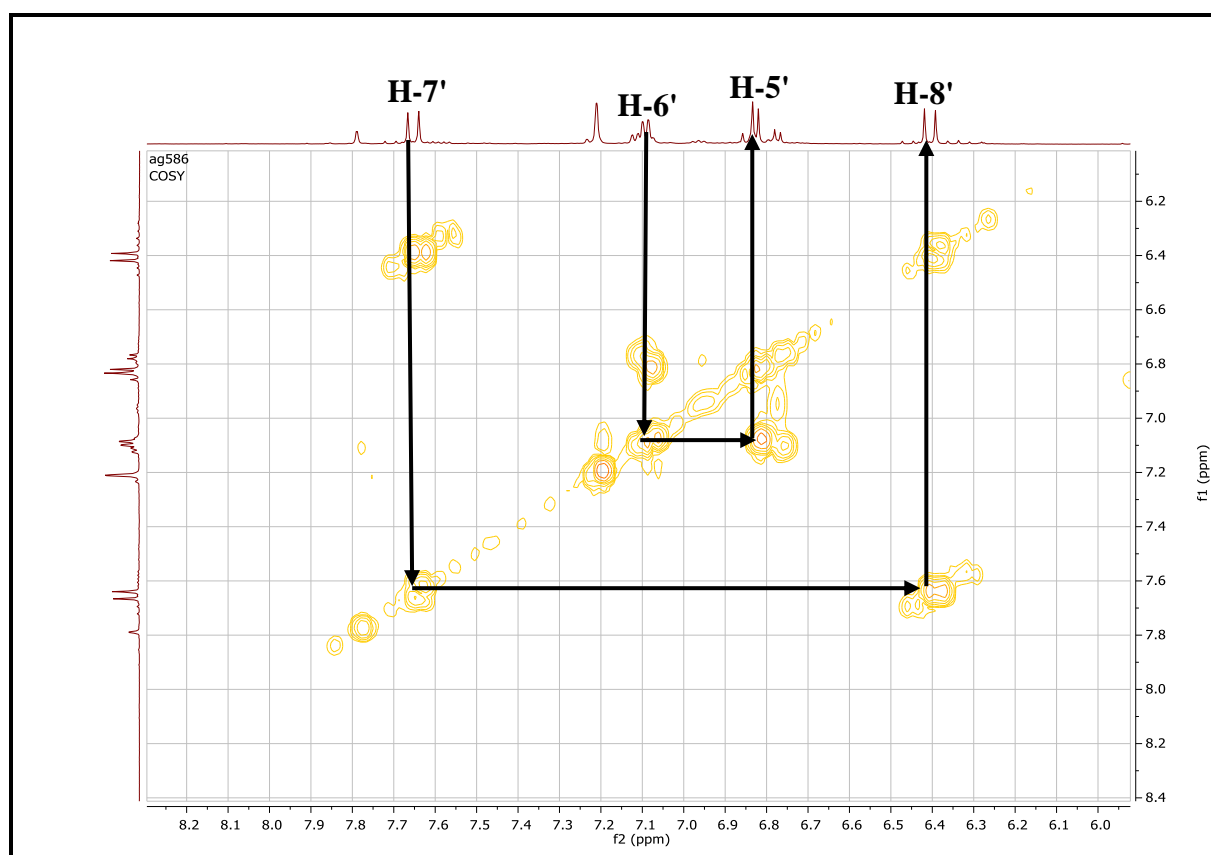
- ✚ un singulet d'intégration 3H à  $\delta_H = 3.91$  ppm correspondant à un groupement O-CH<sub>3</sub>.
- ✚ Deux signaux sous forme d'un doublet d'intégration 1H chacun à 6.41 ppm et 7.65 ppm avec une constante de couplage ( $J = 15.9$  Hz) caractéristique d'un groupement CH=CH de configuration *trans*. Ceci est confirmé par les taches de corrélations se trouvant sur le spectre COSY.



Spectre III.151: Spectre RMN <sup>1</sup>H (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm) du composé Ag /58/6.



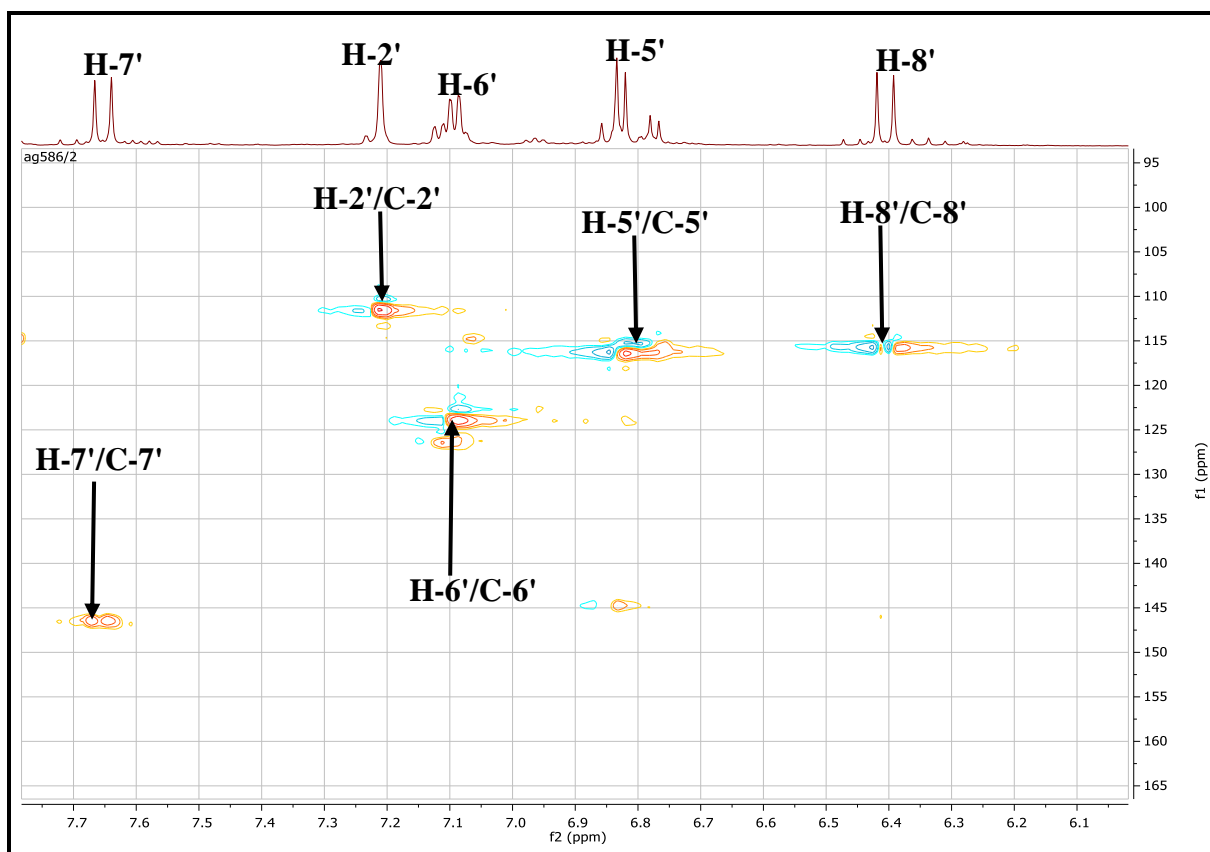
Spectre III.152: Spectre RMN  $^1\text{H}$  étalé (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm) du composé Ag /58/6.



Spectre III.153: Spectre COSY étalé (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm) du composé Ag /58/6.

L'examen du spectre HMBC (Spectre III.155) montre une tache de corrélation nette entre le premier proton éthylénique à  $\delta_{\text{H}}=7.65$  ppm ( $\delta_{\text{C}} 146.43$  ppm) et le carbone du carbonyle à  $\delta_{\text{C}}=168.90$  ppm et une autre tache entre le deuxième proton éthylénique à  $\delta_{\text{H}}=6.41$  ppm ( $\delta_{\text{C}} 115,67$  ppm) et le carbone aromatique quaternaire non oxygéné à  $\delta_{\text{C}}=127.51$  ppm. Ces deux corrélations indiquent clairement que la double liaison est liée d'une part au groupement carbonyle et d'autre part au cycle aromatique. La numérotation du cycle aromatique se fera à partir de ce carbone quaternaire porteur de la double liaison C1', nous pouvons donc numéroter les carbones porteurs des protons précédents par C-2', C-5' et C-6' et le CH lié au cycle aromatique par C-7' et le deuxième CH par C-8'.

L'examen du spectre HSQC (Spectre III.154) permet de localiser C-2' à  $\delta_{\text{C}} = 111.85$  ppm ; C-6' à  $\delta_{\text{C}} = 123.87$  ppm ; C-5' à  $\delta_{\text{C}} = 116.42$  ppm.



**Spectre III.154:** Spectre HSQC étalé (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm) du composé Ag 58/6.

Sur le spectre HMBC (Spectre III.155), le proton H-5' montre une tache de corrélation avec le carbone aromatique oxygéné à  $\delta_{\text{C}} = 149.23$  ppm attribuable à C3'. Ce dernier carbone C-3' montre une corrélation avec les protons du groupement OCH<sub>3</sub>, cette observation permet de placer ce méthoxyle en cette position. Par ailleurs, les protons H-2' et H-6' corrélient avec le même atome de carbone résonant à  $\delta = 150.24$  ppm, attribuable par conséquent au carbone C-

4'. La valeur du déplacement chimique de ce carbone C-4' impose une hydroxylation de ce noyau.

A ce stade de notre analyse, nous pouvons proposer l'entité reportée dans la figure III.26.

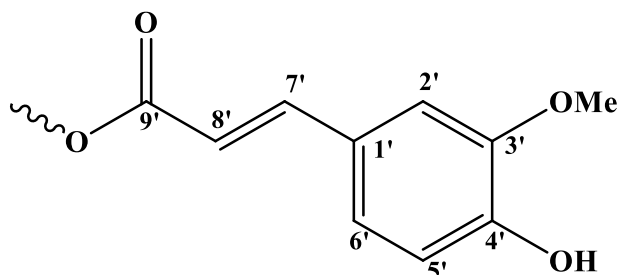
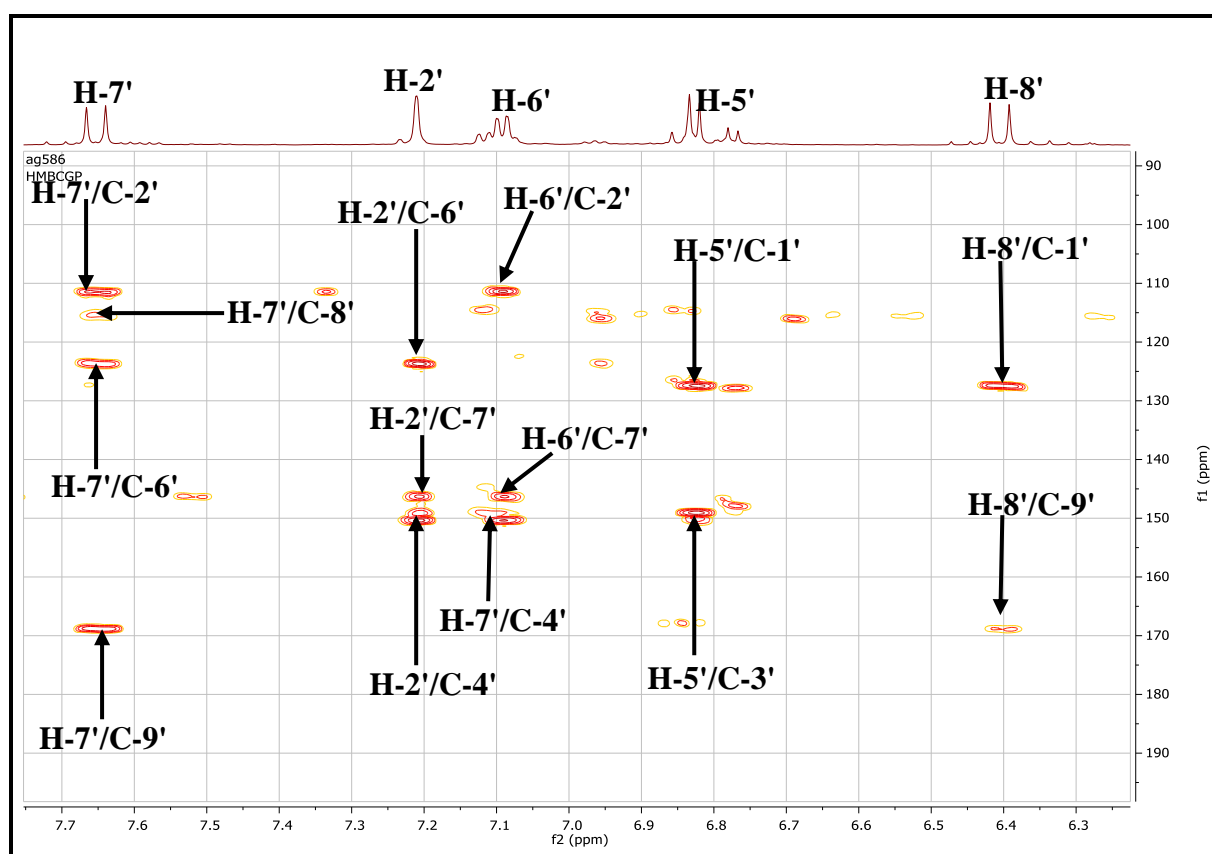


Figure III.26: Structure partielle du Composé Ag /58/6.



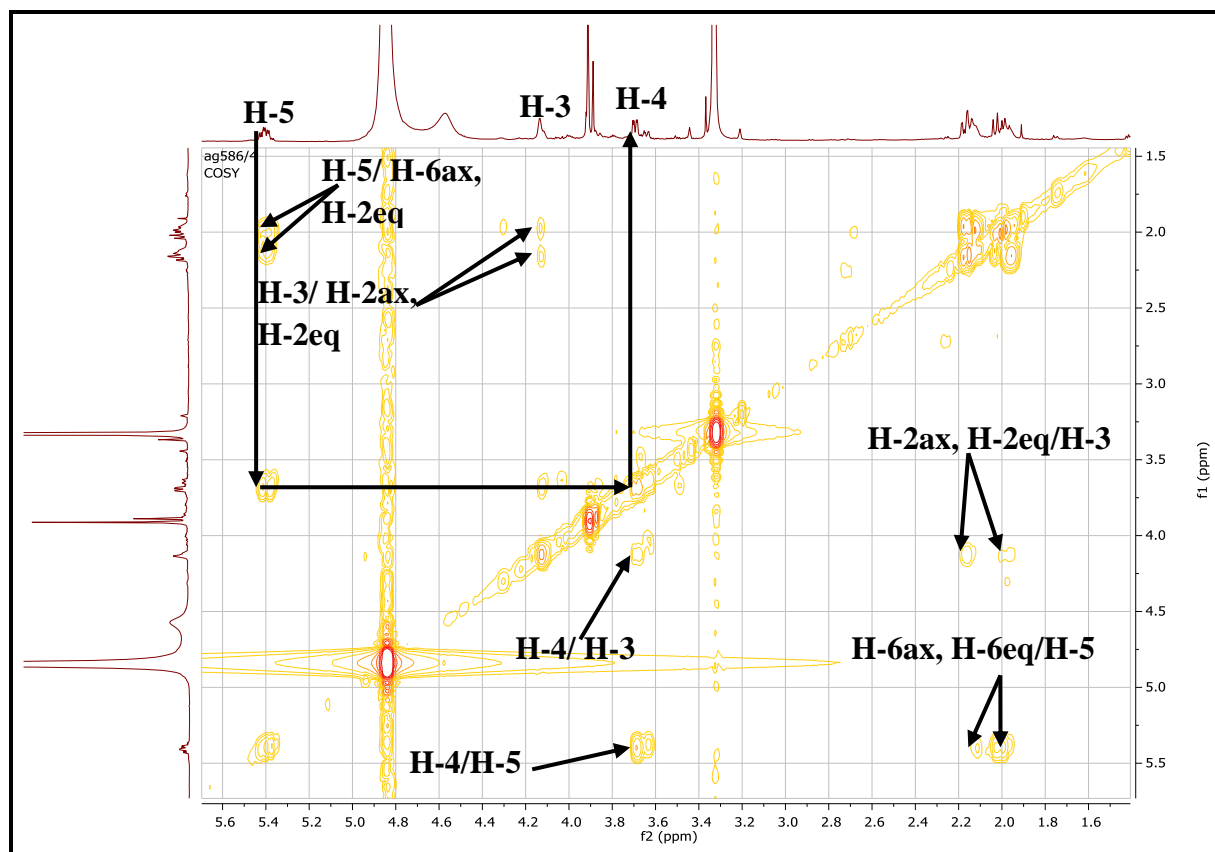
Spectre III.155: Spectre HMBC étalé (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) du composé Ag /58/6.

Le spectre de RMN <sup>1</sup>H (Spectre III.156) de cette molécule montre également des signaux caractéristiques des protons de l'acide quinique [25] :

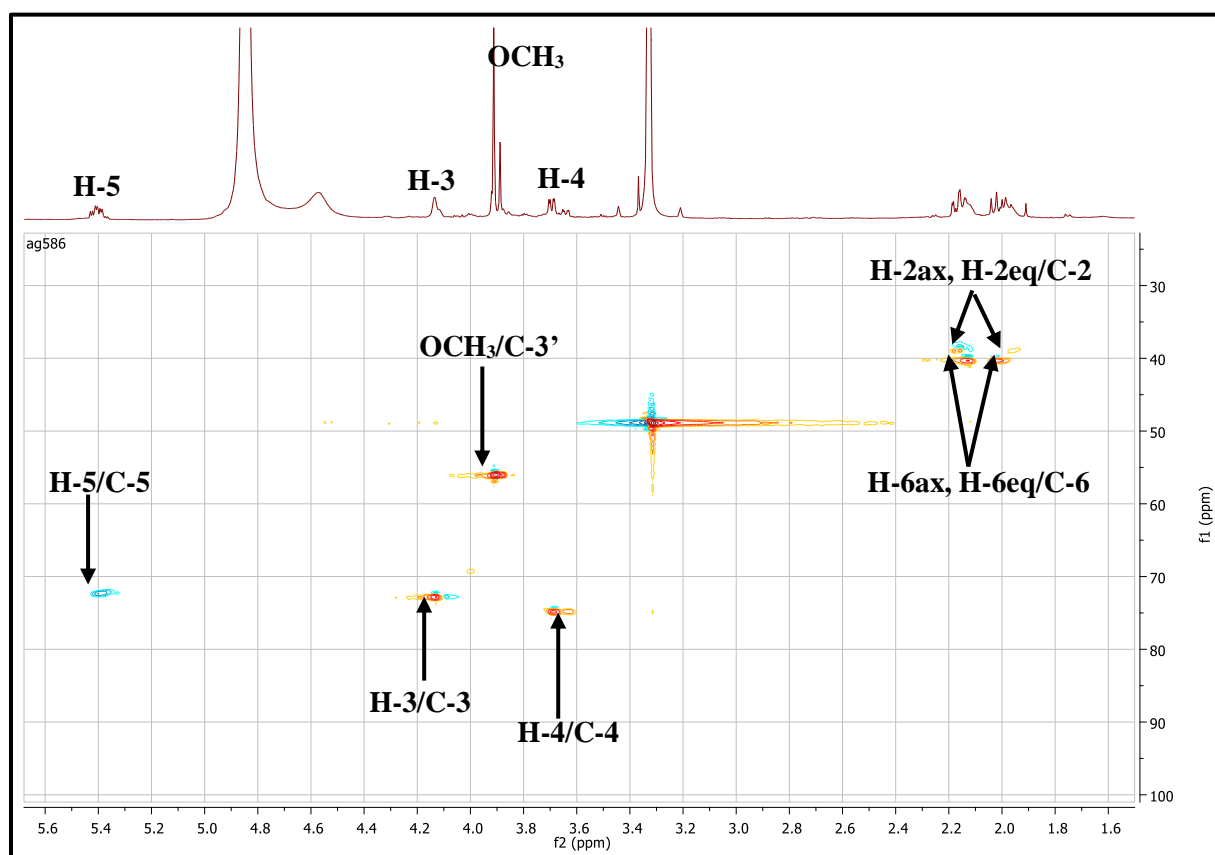
- ✚ Un doublet de doublet intégrant pour 1H à  $\delta_H = 3.69$  ppm ( $J = 9.9 ; 3.2$  Hz) attribuable à H-4.
- ✚ Un multiplet intégrant pour 1H à  $\delta_H = 4.12$  ppm attribuable à H-3.



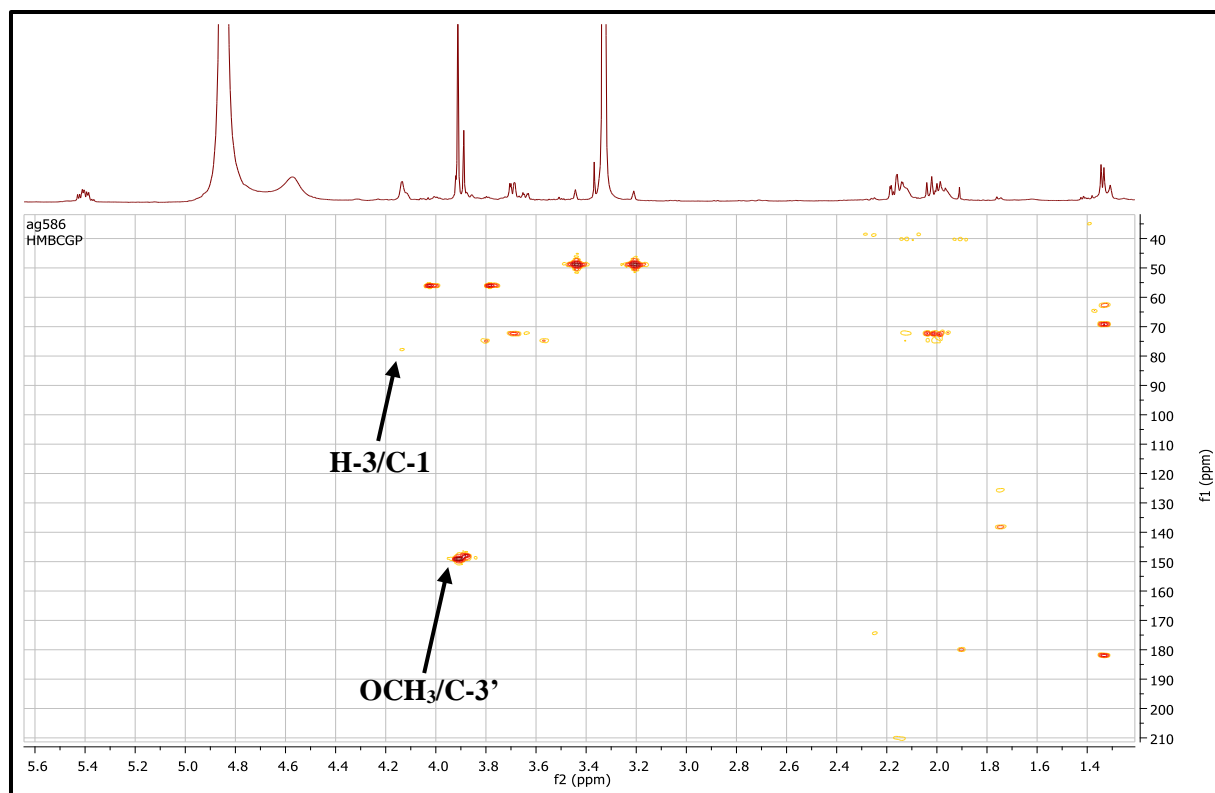




Spectre III.157: Spectre COSY étalé (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) du composé Ag /58/6.



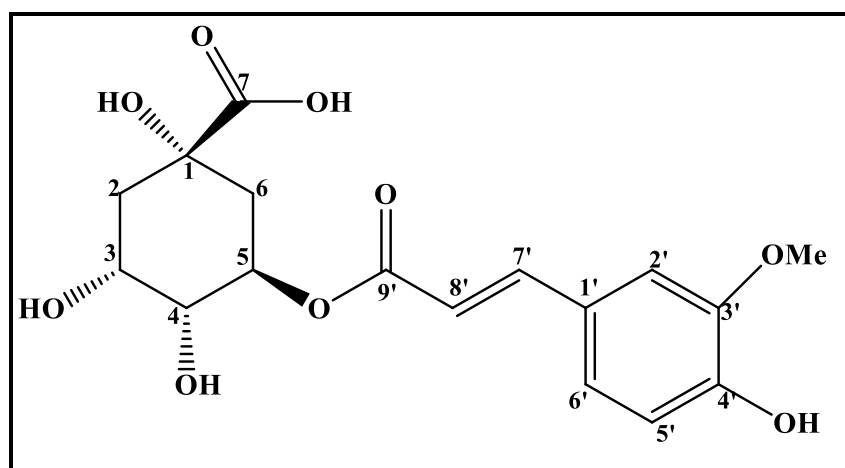
Spectre III.158: Spectre HSQC étalé (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) du composé Ag /58/6.



**Spectre III.159:** Spectre HMBC étalé (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) du composé **Ag/58/6**.

La valeur du déplacement chimique de H-5 suffit pour placer le groupement féruloyle en C-5 [25].

Ces données, en accord avec celles de la littérature [26], nous ont permis d'identifier le composé **Ag/58/6** comme étant l' **acide 5-O- féruloylquinique**.



**Figure III.27:** Structure du composé **Ag/58/6** acide 5-O- féruloylquinique.

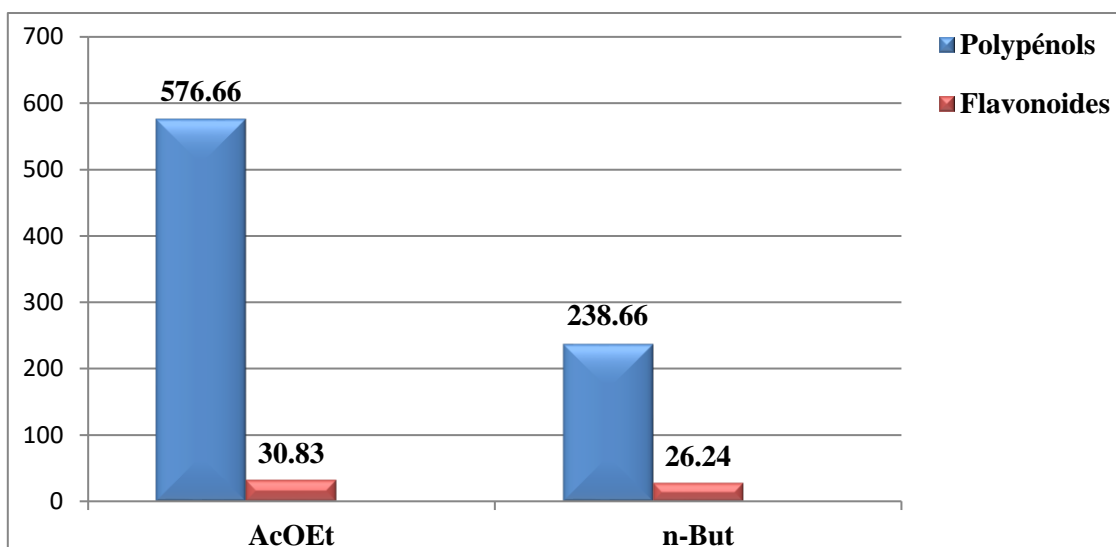
**Tableau III.19:** Données de la spectrométrie RMN <sup>1</sup>H et RMN <sup>13</sup>C du composé **Ag/58/6**.

Position	$\delta_H$ (m, J Hz)	$\delta_C$ (ppm)
1	-	77.45
2ax	2.04	39.25
2eq	2.15	
3	4.12 m	72.94
4	3.69 (dd 9.9 ; 3,2)	74.98
5	5.41 (dt ; 11.7; 9.9; 4.9)	72.35
6ax	2.01	40.53
6eq	2.13	
7	-	181.91
1'	-	127.51
2'	7.21 (d ; 1.9)	111.85
3'	-	149.23
4'	-	150.24
5'	6.83 (d ; 8.1)	116.42
6'	7.09 (dd ; 8,1 ; 1,9)	123.87
7'	7.65	146.43
8'	6.41	115.67
9'	-	168.90
OMe-3'	3.91 s	56.10

### III.3. Résultats des activités biologiques :

#### III.3.1. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes des extraits de *T. ciliatus* :

Les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux des extraits : acétate d'éthyle et *n*-butanol de cette plante ont été exprimées en microgramme d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait ( $\mu\text{g}$  EAG/ mg d'extrait) pour les polyphénols et en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait ( $\mu\text{g}$  EQ/ mg d'extrait) pour les flavonoïdes et ils sont reportés dans La figure présenté III.28.



**Figure III.28 : Les teneurs des composés phénoliques et des flavonoïdes d'extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol de *thymus ciliatus*.**

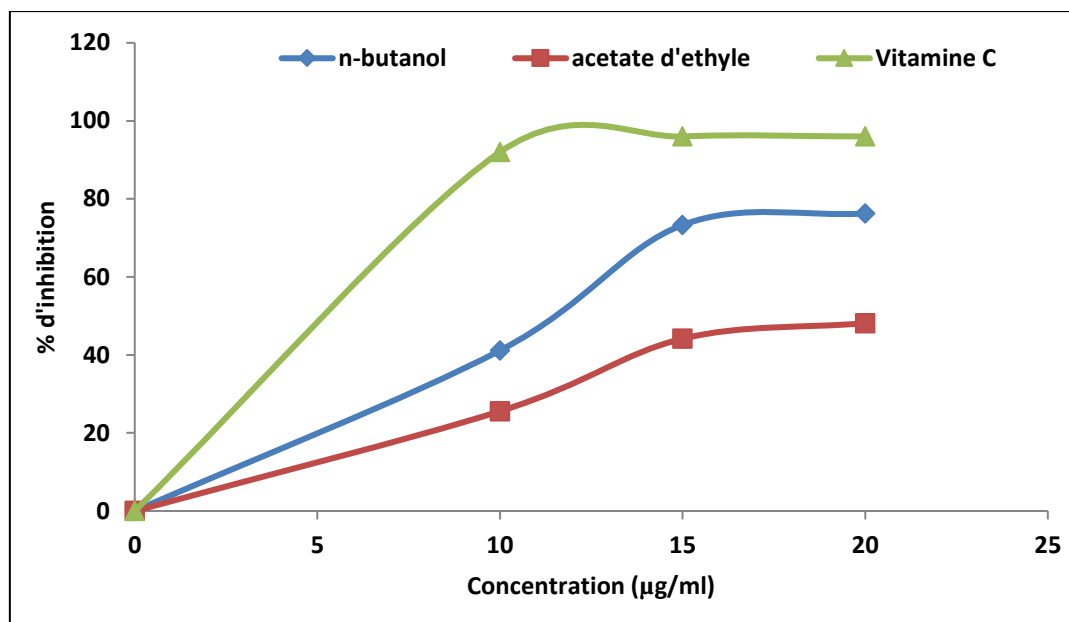
Les résultats du dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes révèlent que l'extrait acétate d'éthyle de la plante *thymus ciliatus* est le plus riche en polyphénols totaux ( $576.66 \pm 29.50$  µg EGA/mg d'extrait) et en flavonoïdes ( $30.83 \pm 0.124$  µg EQ/mg d'extrait) que celui de l'extrait *n*-BuOH qui présente des teneurs en polyphénols ( $238.66 \pm 38,65$  µg EGA/mg d'extrait) et en flavonoïdes ( $26.24 \pm 1.87$  EQ/mg d'extrait).

Plusieurs facteurs peuvent affecter la teneur en composés phénoliques. De nombreuses études ont montré que les facteurs géographiques, climatiques, génétiques, niveau de maturité à la récolte, la période de stockage et la technique d'extraction employée ont une forte influence sur le contenu en polyphénols [27, 28]. La grande diversité structurale des composés phénoliques et des flavonoïdes leur a permis de posséder de nombreuses activités biologiques telles que leur capacité à piéger les radicaux libres.

### III.3.2. Activité antioxydante des extraits de *T. ciliatus* :

L'étude portée sur l'évaluation de l'activité anti-oxydante des différents extraits des parties aériennes de l'espèce étudiées vis-à-vis du radical libre DPPH, montre que les extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol ont manifesté un bon effet scavenger avec  $IC_{50} = 11.05$  µg/ ml et  $IC_{50} = 12.74$  µg/ ml respectivement par rapport au témoin positif qui est la Vitamine C ( $IC_{50} = 5$  µg/ ml).

Cette bonne activité anti-oxydante de l'espèce étudiée est expliquée par la richesse de cette plante en composés phénoliques qui sont des composants antioxydants puissants [29].



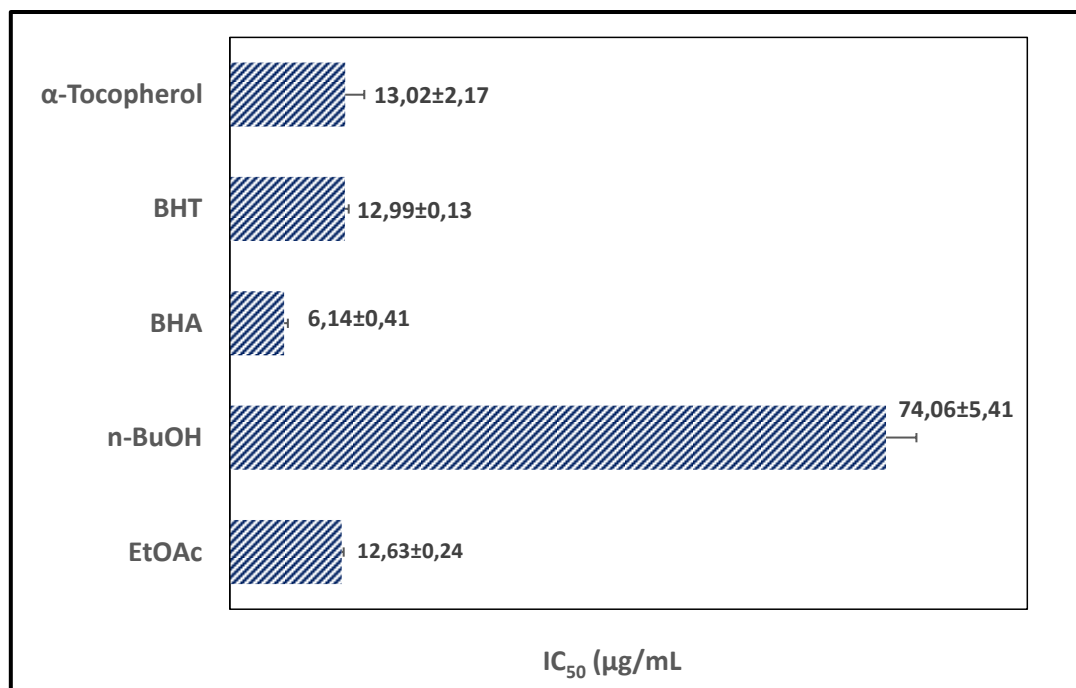
**Figure III.29:** L'activité antioxydante des extraits acétate d'éthyle et n-butanol et la vitamine C vis-à-vis de radical libre DPPH. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  Ecart type (n = 3).

### III.3.3. Activité antioxydante des extraits d'*Asteriscus graveolens* :

Deux méthodes ont été utilisées pour évaluer l'activité antioxydante des extraits acétate d'éthyle et n-butanol d'*Asteriscus graveolens*.

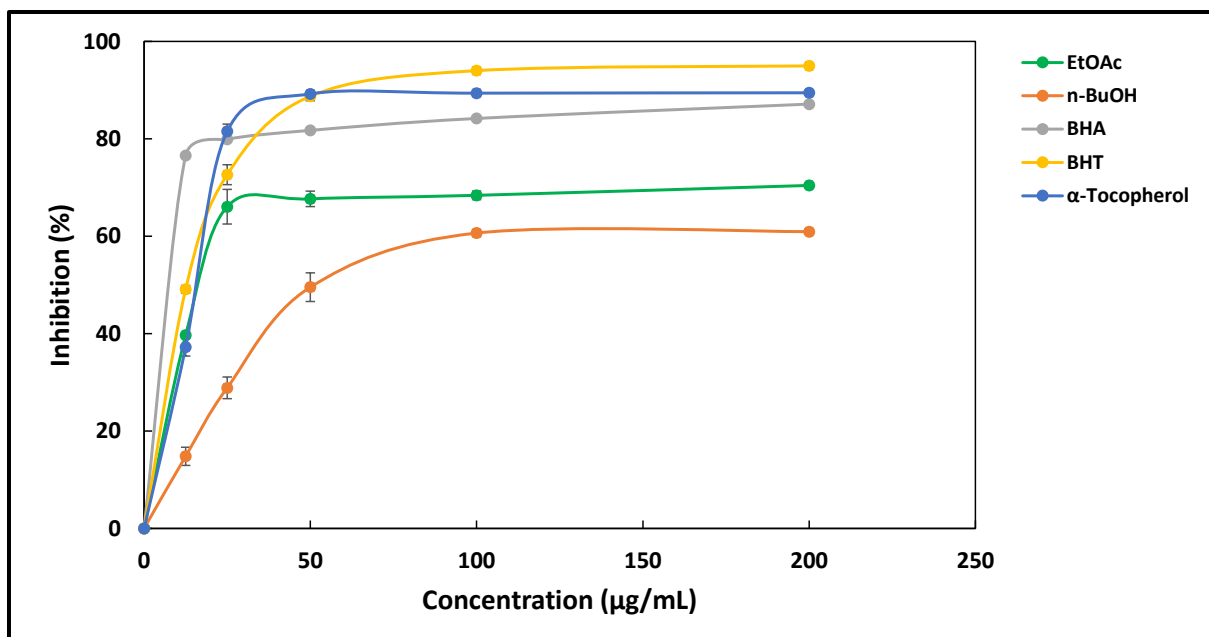
#### III.3.3.1. Activité anti radicalaire DPPH :

L'activité anti-radicalaire du DPPH a été évaluée par spectrophotométrie selon la méthode décrite par (Blois 1958). Le  $\alpha$ -tocophérol, BHT et le BHA sont utilisés comme standards antioxydants.



**Figure III.30:** Les valeurs IC<sub>50</sub> de l'effet scavenger de DPPH des extraits AcOEt, *n*-BuOH et des standards. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart type (n=3).

D'après la figure III.30 ; l'extrait acétate d'éthyle a montré une excellente activité antiradicalaire avec une IC<sub>50</sub>= 12.63±0.24 µg/ ml, même supérieure à celle des standards BHT (IC<sub>50</sub>= 12.99±0.41 µg/ ml) et l'α-tocophérol (IC<sub>50</sub>= 13.02±5,17 µg/ ml). Par contre l'extrait *n*-butanol a manifesté une faible activité antioxydante (IC<sub>50</sub>=74.06±5.41 µg/mL) en comparant avec l'extrait acétate d'éthyle et à celle des standards utilisés. Les résultats obtenus ont permis de classer les extraits et les standards en fonction de leur IC<sub>50</sub> comme suit: BHA: 6.14±0.41 > EtOAc 12.63±0.24 > BHT: 12.99±0.41 > α-Tocopherol : 13.02±5,17 > , *n*-BuOH 74.06±5.41 µg/mL.



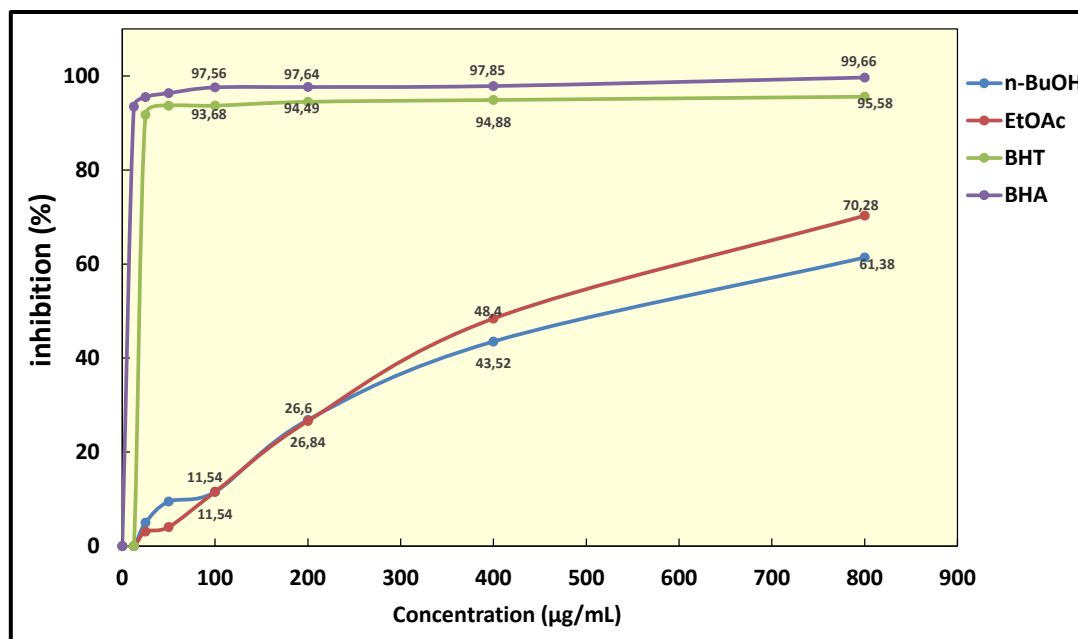
**Figure III. 31** : L'effet scavenger de DPPH des extraits AcOEt, *n*-BuOH et des standards. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart type ( $n=3$ ).

### III.3.3.2. Test de blanchissement du $\beta$ -carotène :

Les résultats obtenus montrent que l'effet des deux extraits EtOAc et *n*-BuOH ont apaisé l'auto-oxydation du  $\beta$ -carotène par les hydroperoxydes d'une manière comparable jusqu'à la concentration de 400  $\mu\text{g/mL}$ . Mais à partir de ce seuil, l'effet de l'extrait EtOAc devient plus prononcé que celui de l'extrait *n*-BuOH. A 800  $\mu\text{g/mL}$ , l'inhibition de l'oxydation du  $\beta$ -carotène par les extraits EtOAc et *n*-BuOH atteint successivement 63,38 $\pm$ 0,20 et 70,28 $\pm$ 2,06 % (Figure III.32).

**Tableau III.20.** Inhibition du  $\beta$ -carotène par les extraits d'*Asteriscus graveolens*.

Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	BHT	BHA
0	0	0	0	
12.5	0	0	88.29 $\pm$ 0.10	93.48 $\pm$ 0.44
25	4,98 $\pm$ 1,97	3,08 $\pm$ 0,12	91.70 $\pm$ 0.36	95.52 $\pm$ 0.33
50	9,47 $\pm$ 3,82	1,31 $\pm$ 4,07	93.65 $\pm$ 0.30	96.34 $\pm$ 0.55
100	11,54 $\pm$ 3,87	5,98 $\pm$ 1,17	93.68 $\pm$ 0.46	97.56 $\pm$ 0.19
200	26,84 $\pm$ 3,61	26,60 $\pm$ 1,81	94.49 $\pm$ 0.07	97.64 $\pm$ 2.22
400	43,52 $\pm$ 3,40	43,40 $\pm$ 5,65	94.88 $\pm$ 0.10	97.85 $\pm$ 0.32
800	63,38 $\pm$ 0,20	70,28 $\pm$ 2,06	95.58 $\pm$ 0.19	99.66 $\pm$ 0.52



**Figure III.32 :** l'inhibition de la peroxydation lipidique des extraits EtOAc, *n*-BuOH et des standards. Les valeurs sont exprimées en en moyenne  $\pm$  écart type ( $n=3$ ).

### III.3.4. Activité cytotoxique :

L'activité cytotoxique des extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol (de 0.400 à 0.050 mg/mL) et de quelques produits isolés (de 1.0 à 0.01 mg/mL) d'*Asteriscus graveolens* a été réalisée contre deux variétés de cellules tumorales humaines (carcinome HCT116 et adénocarcinome colorectal DLD1), et dans une variété de cellule normale (fibroblaste cutané humain primaire, HDFa) en utilisant le test MTT (3 (4,5- dimethylthiazol-2-yl) - bromure 2,5-diphenyltetrazolium). Les composés sesquiterpéniques concernés par l'évaluation de leur activité cytotoxique sont reportés dans le tableau III.21.

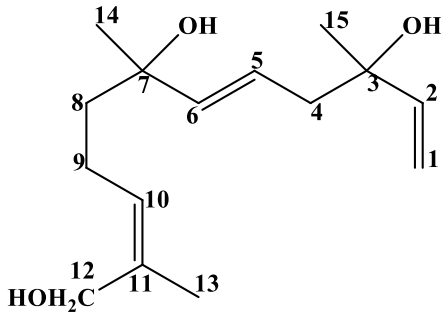
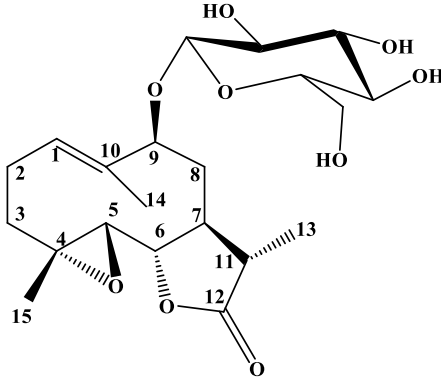
On constate, à partir de ce tableau, que l'extrait acétate d'éthyle présentait un effet cytotoxique plus efficace avec des valeurs de  $IC_{50} = 89.4$  et  $167.1 \mu\text{g} / \text{mL}$  que l'extrait *n*-butanol ( $IC_{50} = 204,6$  et  $296,0 \mu\text{g} / \text{mL}$ ) vis-à-vis des lignées cellulaires HCT116 et DLD1 respectivement. En revanche, le  $9\alpha$ -hydroxyparthenolide ( $IC_{50} = 33.5$  et  $38.9 \mu\text{g} / \text{mL}$ ) et  $9\beta$  hydroxyparthenolide ( $IC_{50} = 32.6$  et  $34.9 \mu\text{g} / \text{mL}$ ) étant le plus actif, suivi par le sesquiterpène acyclique 7,12-dihydroxy-6,7-dihydro-5,(6)E-dehydronerolidol avec des valeurs de  $IC_{50} = 98.0$  et  $149.3 \mu\text{g} / \text{mL}$  isolés de l'extrait AcOEt. La forte activité de l'extrait acétate d'éthyle serait due à la présence de ces composés.

Les deux composés,  $9\beta$  -hydroxy-11  $\beta$ ,13-dihydroparthenolide-9-O-  $\beta$  -D-glucopyranoside ( $IC_{50} = 412.2$  et  $562.5 \mu\text{g} / \text{mL}$ ) et  $9\alpha$ -hydroxy-11 $\beta$ ,13-dihydroparthenolide -9-O-  $\beta$  -D-glucopyranoside ( $IC_{50} = 359.8$  et  $728.1 \mu\text{g} / \text{mL}$ ), isolés tous deux de l'extrait *n*-butanol, ont

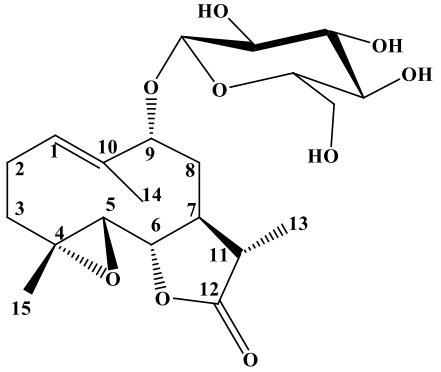
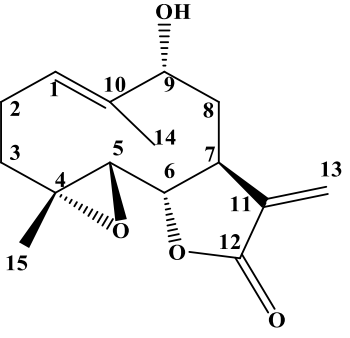
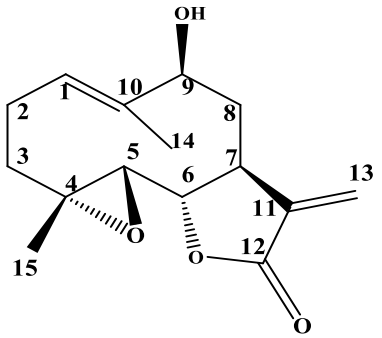


manifesté un activité cytotoxique moins efficace par rapport au 9-  $\alpha$  hydroxyparthénolide (environ 10 fois sur HCT116 et 18 fois sur DLD1) . En comparant les résultats de ces composés avec ceux du 9 $\alpha$ -hydroxyparthenolide et 9 $\beta$ -hydroxyparthenolide aux quels ils sont structurellement liés, on constate que L'absence de l' unité  $\alpha$  -méthylène- $\gamma$ -lactone dans les deux nouveaux composés sesquiterpéniques réduit l'effet cytotoxique et cela conformément aux résultats de la littérature [30]. Aucun effet cytotoxique n'a été observé dans les fibroblastes primaires ( HDFa) jusqu'à 0,050 mg / mL pour les extraits et 1,0 mg / mL pour les composés purs.

**Tableau III.21** : L'activité cytotoxique d'extraits et des produits de l'espèce *A. graveolens*

	HCT116 <sup>a</sup> ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )	DLD1 <sup>b</sup> ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )
EtOAc	89.4 $\pm$ 2.6	167.1 $\pm$ 7.3
<i>n</i> -BuOH	204.6 $\pm$ 10.3	296.0 $\pm$ 9.9
7,12-dihydroxy-6,7-dihydro-5,(6)E-dehydronerolidol 	149.3 $\pm$ 5.6	98.0 $\pm$ 8.7
9 $\beta$ -hydroxy-11 $\beta$ ,13-dihydroparthenolide-9-O- $\beta$ -D-glucopyranoside. 	412.2 $\pm$ 12.1	562.5 $\pm$ 13.6

**Tableau III.21 :** L'activité cytotoxique d'extraits et des produits de l'espèce *A. graveolens* (suite).

<p>9<math>\alpha</math>-hydroxy-11<math>\beta</math>,13-dihydroparthenolide - 9-O- <math>\beta</math>-D-glucopyranoside</p> 	359.8 $\pm$ 11.5	728.1 $\pm$ 19.2
<p>9<math>\alpha</math>-hydroxyparthenolide</p> 	38.9 $\pm$ 1.3	33.5 $\pm$ 1.9
<p>9<math>\beta</math>-hydroxyparthenolide</p> 	34.9 $\pm$ 1.2	32.6 $\pm$ 2.1

Note:

a- ligne cellulaire du cancer du côlon humain.

b- lignée cellulaire d'adénocarcinome colorectal humain.

**Références**

- [1] Mc Anlis GT, Mc Eneny J, Pearce J, Young IS. 1999. Absorption and antioxidant effects of quercetin from onions, in man. *Eur. J. Clin. Nutr.* 53: 92-96.
- [2] Tarayre JP, Laouressergues H. 1977. Advantages of a combination of proteolytic enzymes, flavonoids and ascorbic acid in comparison with non-steroid antiinflammatory agents. *Arzneimittel forschung.* 27: 1144-1149.
- [3] Thornhill SM, Kelly AM. 2000. Natural treatment of perennial allergic rhinitis. *Altern. Med. Rev.* 5: 448-454.
- [4] Janssen K, Mensink RP, Cox FJ, Harryvan, JL, Hovenier R, Hollman P, Katan MB. 1998. Effects of the flavonoids quercetin and apigenin on hemostasis in healthy volunteers: results from an in vitro and a dietary supplement study. *Am. J. Clin. Nutr.* 67: 255-262.
- [5] Sakushima A, Coskun M, Hisada S, Nishibe S. 1983. Flavonoids from *Rhamnus pallasii*. *Phytochemistry.* 22:1677-1678.
- [6] Riaz N, Malik A, Rehman AU, Ahmed Z, Muhammad P, Nawaz SA, Siddiqui J, Choudhary MI. 2004. Lipooxygenase inhibiting and antioxidant oligostilbene and monoterpene galactoside from *Paeonia emodi*. *Phytochemistry.* 65:1129-1135.
- [7] Ahmad I, Chaudhary BA, Janbaz KH. 2010. Cinerascenone, A New Flavonoid from *Vernonia cinerascens*. *J. Chem. Soc. Pak.* 32: 101.
- [8] Trute A, Nahrstedt A. 1996. Separation of Rosmarinic Acid Enantiomers by Three Different Chromatographic Methods (HPLC, CE, GC) and the Determination of Rosmarinic Acid in *Hedera helix* L, *Phytochemical Analysis, Phytochemical Analysis.* 7: 204 -208.
- [9] Petersen M, Simmonds M. SJ. 2003. Molecules of interest: Rosmarinic acid, *Phytochemistry.* 62: 121 -125.
- [10] Scarpati M, Oriente G. 1958. Isolamento e costituzione dell'acido rosmarinico (dal *Rosmarinus off*) *Ric. Sci.* 28:2329-2333.
- [11] Li J, Li L, Song W. 1994. Chemical constituents of root of Bowley sage (*Salvia bowleyana*). *Zhongcaoyao.* 25 : 347-349.
- [12] Kohda H, Takeda O, Tanaka S, Yamasaki K, Yamashita A, Kurokawa T, Ishibashi S. 1989. Isolation of inhibitors of adenylate cyclase from Dan-shen, the root of *Salvia miltiorrhiza*. *Chem. Pharm. Bull.* 37(5): 1287-1290.
- [13] Aziz S, Irshad M, Habib-ur-Rehman . 2014 . Isolation of a New Antibacterial Polyphenol from *Thymus serpyllum* . *Chem. Nat. Compd.* 49(6):1023-1027.

- [14] Abdel Sattar E, Galal AM, Mossa, GS. 1996. Antitumor germacranolides from *Anvillea garcinii*. J Nat Prod. 59,403–405.
- [15] Harvala E, Aligiannis N, Skaltsounis AL, Pratsinis H, Lambrinidis G, Harvala C, Chinou L. 2002. Cytotoxic Germacranolides from *Inula verbascifolia* subsp. Methane. J Nat Prod. 65, 1045-1048.
- [16] Merfort I, Wendisch D. 1987. Flavonoid Glycosides from *Arnica montana* and *Arnica chamissonis*. Planta Med. 53 (5):434-7.
- [17] Agrawal, P.K. 1989. Carbon-13 NMR of flavonoids. Central Institute of Medical and Aromatic Plants, India. Édition Elsevier, New York.
- [18] Orihara Y, Furuya T. 1993. Biotransformation of (-)-borneol by cultured cells of *eucalyptus perriniana*. Phytochemistry .34: 1045-1047.
- [19] Guo T, Tan SB, Wang Y, Chang J. 2018. Two new monoterpenoid glycosides from the fresh rhizome of Tongling White Ginger ( *Zingiber officinale*). Nat Prod Res. 32(1):71 –76.
- [20] Buděšínský M, Šaman D. 1995. Annual reports on NMR spectroscopy. Academic press limited, Oval Road, London NW1 7DX. 30 :231-475.
- [21] Otsuka H, Yao M, Kamada, K, Takeda Y. 1995. Alangionosides G-M: glycosides of megastigmane derivatives from the leaves of *Alangium premnifolium*. Chem. Pharm. Bull. 43:754–759
- [22] Yoshikawa M, Shimada H, Saka M, Yoshizumi S, Yamahara J, Matsuda H. 1997. Medicinal foodstuffs. V. Moroheiya. (1): Absolute stereostructures of corchoionosides A, B, and C, histamine release inhibitors from the leaves of Vietnamese *Corchorus olitorius* L. (Tiliaceae). Chem Pharm Bull. 45(3): 464-469
- [23] Ito H, Kobayashi E, Li SH., Hatano T, Sugita D, Kubo N, Shimura S, Itoh Y, Tokuda H, Nishino H, Yoshida T. 2002 . Antitumor activity of compounds isolated from leaves of *Eriobotrya japonica*. J Agric Food Chem. 50(8) : 2400-2403.
- [24] DeOliveira DB, de Almeida AP, De BASGL, Auvin C, Kaiser CR, Costa SS. Costa. 2003. First Isolation of a Symmetrical Glycosylated Methylene Bisflavonoid. Planta Med. 69(4): 382-384.
- [25] Chan EWC, Lim YY, Ling SK, Tan SP., Lim KK, Khoo MGH. 2009. Caffeoylquinique acids from leaves of *Etilingera species* (Zingiberaceae). LWT-Food Science and Technology. 42: 1026-1030.

- [26] Dokli I, Navarini L, Hamersak Z. 2013. Syntheses of 3-, 4-, and 5-O-feruloylquinic acids. *Tetrahedron Asymmetry*. 24(13–14):785–790.
- [27] Podsedek, A.2007. Natural antioxidants and antioxidant capacity of brassica vegetables: A review. *LWT- Food Science and Technology*. 40: 1-11.
- [28] Ghasemzadeh A, Jaafar Hawa ZE, Rahmat A.2011. Effects of solvent type on phenolics, flavonoids content, and antioxidant activities in two varieties of young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5(7) :1147-1154.
- [29] Rice-Evans Ca, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM, Pridham JB.1995. The Relative antioxidant activities oplant derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*. 22:375-383.
- [30] Parodi FJ, Nauman M, Fischer A, Nikolaus H. 1987. Complete carton-13 assignments of the sesquiterpene lactone 11,13,-dihydroparthenolide using 2D-inadequate. *Spectrosc Lett*. 20(5): 445–450

# *Chapitre IV*

## *Analyse GC et GC/MS de l'huile essentielle de Thymus ciliatus*

**Introduction :**

Les plantes produisent naturellement des substances actives permettant de se protéger des insectes, de maladies ou d'attaques extérieures. De celles-ci ont été tirées les huiles essentielles. L'utilisation des huiles essentielles en parfumerie, dans les rituels religieux, en cuisine avec les herbes dites aromatiques, en cosmétologie, et en thérapeutique est avérée depuis l'Antiquité.

Selon la Commission de la Pharmacopée Européenne, une huile essentielle est un « produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition » [1].

Les huiles essentielles sont dotées d'un très grand nombre de composant chimiques, qui leur confèrent leurs différentes propriétés et éventuelles toxicités. On peut diviser ces composants chimiques en deux grands groupes: le groupe majeur des terpénoïdes et le groupe des composés aromatiques qui sont des dérivés du hénylpropanoïdes [2].

Actuellement, près de 3000 huiles essentielles sont décrites, parmi lesquelles environ 300 présentent une importance commerciale dans le cadre d'applications pharmaceutiques, cosmétiques, alimentaires, agronomiques ou dans le domaine de la parfumerie [3,4].

**IV.1. Les travaux antérieurs sur les huiles essentielles du genre *Thymus* :**

Un grand nombre d'espèces du genre *Thymus* ont déjà fait l'objet d'études chimiques sur les huiles essentielles. Le thymol et le carvacrol sont les principaux composés phénoliques trouvés dans les huiles essentielles de ce genre, ainsi que le *p*-cymène, le 1,8-cinéole, le linalool et d'autres monoterpènes. Les espèces peuvent être regroupées selon des chémotypes le thymol et son isomère le carvacrol avec d'autres composés.

- ✚ **Chémotype1** : Huile riche en thymol et/ou carvacrol.
- ✚ **Chémotype2** : Huile riche en *p*-cymène et/ou  $\gamma$ -terpinène.
- ✚ **Chémotype 3** : Huile riche en  $\beta$ -phéllandrène.
- ✚ **Chémotype 4** : Huile riche en  $\alpha$ -terpinéol.

- ✚ **Chémotype 5** : Huile riche en linalool.
- ✚ **Chémotype 6** : Huile riche en bornéol/1,8-cinéole.
- ✚ **Chémotype 7** : Huile riche en  $\alpha$ -terpinène,  $\beta$ -O-cymène.
- ✚ **Chémotype 8** : Huile riche en camphre.
- ✚ **Chémotype 9** : Huile riche en géraniol.

Le tableau 2 rapporte les composants majoritaires des huiles essentielles de quelques espèces du genre *Thymus*.

**Tableau IV.1.** Composants majoritaires ( $\% \geq 5,0$ ) d'huiles essentielles du genre *Thymus*.

Espèce	Composants majoritaire	Pourcentage (%)	Origine	Réf
<i>T. numidicus</i>	Thymol	40.4	<b>Algérie</b>	Y. Messara 2018 [5]
	Carvacrol	13.37		
<i>T. praeocox</i>	Thymol	48.10	<b>Turquie</b>	Avci <i>et al.</i> , 2011 [6]
	Carvacrol	22.20		
<i>T. lanceolatus</i>	Thymol	80.2	<b>Algérie</b>	Nouasri <i>et al.</i> , 2015 [7]
	Carvacrol	6.25		
<i>T. quinquecristatus</i>	Thymol	28.5	<b>Chine</b>	Yang <i>et al.</i> , 2004 [8]
	Carvacrol	11.4		
<i>T. guyonii</i>	Thymol	21.2	<b>Algérie</b>	Zeghib <i>et al.</i> 2018 [9]
	Carvacrol	55.6		
	O-cymène	9.7		
	$\delta$ -terpinène	5.7		
<i>T. capitatus</i>	Carvacrol	81.2	<b>Espagne</b>	Casiglia <i>et al.</i> 2015 [10]
	<i>p</i> -Cymène	22.8		
	$\gamma$ -Terpinène	34.4		
<i>T. pallescens</i>	Thymol	7.5	<b>Algérie</b>	Benchabane <i>et al.</i> , 2015 [11]
	Carvacrol	68.2		
	<i>p</i> -Cymène	10.3		
	$\gamma$ -Terpinène	9.1		



**Tableau IV.1.** Composants majoritaires (% $\geq$ 5,0) d'huiles essentielles du genre *Thymus* (suite).

<i>T. broussonetti</i>	Thymol <i>p</i> -Cymène $\gamma$ -Terpinène	60.5 8.5 9.5	<b>Maroc</b>	El-ouariachi <i>et al.</i> , 2014 [12]
<i>T. zygoides</i>	Thymol <i>p</i> -Cymène $\gamma$ -Terpinène	19.5 19.4 17.2	<b>Grèce</b>	Tzakou <i>et al.</i> , 2008 [13]
<i>T. vulgaris</i>	Thymol Carvacrol <i>p</i> -Cymène $\gamma$ -Terpinène	32.67 8.32 16.68 12.65	<b>Iran</b>	Moghtader 2012 [14]
<i>T. persicuss</i>	Thymol Carvacrol $\beta$ -Phéllandrène $\gamma$ -Terpinène 1,8-Cinéole	10.38 25.71 11.62 5.63 5.24	<b>Iran</b>	Meshkatalasadat <i>et al.</i> 2006 [15]
<i>T. longicaulis</i>	Thymol Carvacrol $\beta$ -Phéllandrène $\alpha$ -Terpinéol Linalool	15.26 12.65 19.07 14.23 9.63	<b>Kosovo</b>	Hatipi <i>et al.</i> , 2013 [16]
<i>T. daenensis</i>	Géraniol Acétate de géranyl	66.8 13.9	<b>Iran</b>	Sabahi <i>et al.</i> , 2013 [17]
<i>T. vulgaris</i>	Carvacrol Thymol Linalool	57.3 10.67 11.8	<b>Iran</b>	Abdeni <i>et al.</i> 2014 [18]
<i>T. numidicus</i>	Thymol Linalool <i>p</i> -Cymène	54.1 5.4 15.3	<b>Algérie</b>	Benayache <i>et al.</i> , 2014 [19]
<i>T. fedisehenkoi</i>	Linalool $\alpha$ -Terpinéol	63.77 10.17	<b>Iran</b>	Khorshidi <i>et al.</i> , 2014 [20]

**Tableau IV.1.** Composants majoritaires (% $\geq$ 5,0) d'huiles essentielles du genre *Thymus* (suite).

<i>T. zygis</i>	Thymol	23.8	<b>Ibérie</b>	Gonçalves <i>et al.</i> , 2010 [21]
	Carvacrol	25		
	Linalool	30		
	Géraniol	19.8		
	Acétate de géranyl	20.8		
<i>T. eriocalyx</i>	Thymol	79	<b>Turquie</b>	Kucukbay <i>et al.</i> , 2010 [22]
	Bornéol	11.9		
	1,8-Cinéole	9.8		
<i>T. palludis</i>	camphre	18.9	<b>Maroc</b>	Elbouchttaoui <i>et al.</i> , 2014 [23]
	Bornéol	36.6		
	$\alpha$ -Terpinéol	10		
<i>T. ciliatus</i>	Thymol	44.2	<b>Maroc</b>	El Ajjouri <i>et al.</i> , 2010 [24]
	$\alpha$ -Terpinène	12.3		
	$\beta$ - <i>O</i> -Cymène	25.8		
<i>T. algeriensis</i>	Camphre	15.7	<b>Algérie</b>	Hamdani <i>et al.</i> , 2015 [25]
	Bornéol	28		
	Camphène	20.9		
<i>T. glabrescens</i>	Géraniol	55.5	<b>Roumanie</b>	Pavel <i>et al.</i> , 2010 [26]
	Acétate de néryl	11.1		
	$\beta$ -Bisabolène	6.7		
<i>T. citriodorus</i>	Géraniol	45.5	<b>Iran</b>	Omidbaigi <i>et al.</i> , 2005 [27]
	Géranial	13.9		
	Néral	10.1		
	Nérol	5.2		

#### **IV.2.Extraction de l'huile essentielle de *Thymus ciliatus* (Desf):**

Les parties aériennes de la plante ont été soumises à une distillation par entrainement à la vapeur dans un appareil Kaiser Lang pendant trois heures. L'huile essentielle obtenue a été recueillie et séchée avec du sulfate de sodium anhydre, puis conservée à 4 ° C jusqu'à son analyse. Le rendement des huiles a été calculé par rapport au poids sec de la plante.

### **IV.3. Analyse GC et GC/MS de l'huile essentielle :**

#### **IV.3.1. Analyse GC-FID :**

L'huile essentielle a été analysée sur un appareil de type Agilent (GC-FID) Modèle 6890 A, équipé d'une colonne capillaire HP-5MS (5% -diphényle- 95%- diméthyl polysiloxane (longueur : 25 m, et de 0,25 mm de diamètre intérieur. L'épaisseur du film est 0,25  $\mu\text{m}$ )), programmé de 50°C (5 min) à 250°C à 3°C/min et maintenue pendant 10 min. Les températures de l'Injecteur et du détecteur à ionisation de flamme étaient de 280 et 300°C, respectivement. L'huile essentielle a été diluée dans de l'acétone à 3,5% (v/v) et 1  $\mu\text{l}$  a été injecté en mode split (1/60), l'hélium a été utilisé comme gaz vecteur (1,0 ml/min). Les solutions d'alcane standards (C8 à C20) ont été analysées dans les mêmes conditions pour le calcul des indices de rétention (IR) en utilisant l'équation de Van del Dool et Kratz.

#### **IV.3.2. Analyse GC/MS**

La spectrométrie de masse a été effectuée sur un ensemble chromatographe phase gazeuse – spectromètre de masse Agilent (CG-SM) Modèle 7890/5975, équipé d'une colonne capillaire HP-5MS (25 m x 0,25 mm, épaisseur du film 0,25  $\mu\text{m}$ ) programmé avec les mêmes conditions que pour GC-FID. Le spectromètre de masse (MS) est en mode d'ionisation impact électronique, énergie 70 eV et le multiplicateur d'électrons à 2200 V, la source d'ions et le quadripôle du SM étaient à 230 et 180 °C, respectivement. Les données spectrales de masse ont été acquises en mode balayage dans la gamme des  $m/z$  33-450 Da. Les constituants de l'huile essentielle ont été identifiés par comparaison de leurs spectres de masse et leur indices de rétention (RI) avec ceux des composés de référence des banques de données telles que : Adams [28] et Mc Lafferty et Stauffer [29]. Les proportions des composés identifiés ont été calculées par normalisation interne.

### **IV.4. Résultats et discussion**

L'huile essentielle des parties aériennes de *Thymus ciliatus* (Desf) est obtenue par entraînement à la vapeur, avec un rendement de 0,46 % (masse/masse, par rapport à la matière végétale sèche).

Cette étude a permis l'identification de 75 constituants correspondants à 95,57% de l'huile totale. Les principaux constituants sont : élémol (6.80%), carvacrol (5.86%),  $\gamma$ -muurolène (5.18%),  $\beta$ -sesquiphellandrène (5.09%), bicyclogermacrène (5.04%) ,  $\beta$ -Pinène (4.49%) et le curcumène (4.20%). les autres constituants sont le 1,8 -cinéol (3.66%),  $\beta$ -eudésmol (2.92%),

$\beta$ -bisabolène (2.81%),  $\beta$ -silinène (2.75%), camphre (2.64%),germacrone ( 2.34%),  $\alpha$ -zingiberène( 2.12%),  $\delta$ -cadinène (2.08%), caryophyllène oxide (1.90%), spathuléol (1.88%), Caryophyllène(E-) (1.88%), ar-tumérone (1.79%),  $\alpha$ -Pinène (1.52%) , limonène (1.52%) selina-4,11-diène (1.46%), curzerénone (1.41%), germacrone B (1.37%), acétate de bornyle (1.31%),  $\beta$ -farnesène (1.28%),bornéol (1.23%), myrténal (1.16%), zingiberenol(1.15%) et sabinène (1.13%).

La composition et les pourcentages des composants identifiés sont reportés dans le tableau IV.2. Les composés sont classés par ordre de leur temps de rétention expérimental et de leurs indices de rétention (IR).

**Tableau IV.2 :** Composition de l'huile essentielle de *Thymus ciliatus* (Desf).

N°	RT	<sup>b</sup> RI	<sup>a</sup> Composés	%
1	5.937	923	$\alpha$ -Thujène	0.15
2	6.108	931	$\alpha$ -Pinène	1.52
3	6.108	947	Camphène	0.39
4	6.579	951	Thuja-2,4(10)-diène	0.10
5	7.028	971	Sabinène	1.13
6	7.143	976	$\beta$ -Pinène	4.49
7	7.41	987	Myrcène	0.98
8	8.019	1014	$\alpha$ -terpinène	0.15
9	8.201	1023	Ortho-cymène	0.40
10	8.299	1027	Limonène	1.52
11	8.37	1031	1,8 -cinéol	3.66
12	8.66	1044	$\beta$ -Ocimène	0.38
13	8.922	1056	$\gamma$ -Terpinène	0.21
14	9.198	1069	Cis-sabienène hydrate	0.20
15	9.487	1082	Terpinolène	0.07
16	9.811	1097	Linalool	0.40
17	9.941	1104	NI	0.13
18	10.362	1125	$\alpha$ -Campholénal	0.28
19	10.606	1138	Nopinone	0.10
20	10.661	1141	Trans-Pinocarvéol	0.64
21	10.76	1146	Trans-verbénol	0.94
22	10.791	1147	Camphre	2.64
23	1.982	1157	Sabina ketone	0.14
24	11.073	1162	Pinocarvone	0.56
25	11.281	1172	Bornéol	1.23
26	11.432	1180	Terpinén-4-ol	0.42
27	11.567	1187	p-Cymén-8-ol	0.18

**Tableau IV.2 :** Composition de l'huile essentielle de *Thymus ciliatus* (Desf) (suite).

28	11.719	1195	Myrténal	1.16
29	11.942	1207	Verbénone	0.43
30	12.158	1219	Trans-carveol	0.23
31	12.317	12228	NI	0.11
32	12.61	1244	Carvone	0.22
33	13.32	1283	Acétate de bornyle	1.32
34	13.628	1300	Carvacrol	5.86
35	14.146	1331	Bicycloelemène	0.28
36	14.389	1345	δ-Elemène	0.18
37	14.683	1362	Acétate de carvacrol	0.06
38	14.901	1375	α-Copaène	0.43
39	14.994	1381	α-Elemène	0.03
40	15.042	1384	β-Bourbonène	0.38
41	15.122	1388	β-Elemène	0.79
42	15.307	1399	Sesquithujène	0.63
43	15.423	1409	NI	0.14
44	15.645	1420	Caryophyllene(E-)	1.88
45	15.765	1428	γ-Elemène	0.22
46	15.804	143	β-Copaène	0.12
47	15.863	1434	α-Guaiène	0.15
48	16.114	1450	β-Farnesène	1.29
49	16.221	1457	α-Humulène	0.52
50	16.288	1461	Caryolphyllène	0.56
51	16.45	1471	Aristolochène	0.17
52	16.486	1473	Selina-4,11-diène	1.46
53	16.607	1481	Curcumène	4.20
54	16.644	1483	γ-Muuroène	5.18
55	16.691	1486	NI	0.81
56	13.952	1491	β-Silinène	2.75
57	16.804	1493	α-Zingiberène	2.12
58	16.864	1497	Bicyclogermacrène	5.04
59	17	1506	β-Bisabolène	2.81
60	17.111	1513	γ-Cadinène	0.36
61	17.175	1518	δ-Cadinène	2.08
62	17.264	1524	β-Sesquiphellandrène	5.09
63	17.561	1543	α-Calacorène	0.32
64	17.674	1551	Elémol	6.80
65	17.824	1561	Germacrone B	1.37
66	18.101	1579	Spathuléol	1.88
67	18.188	1585	Oxide de caryophyllène	1.90

**Tableau IV.2 :** Composition de l'huile essentielle de *Thymus ciliatus* (Desf) (suite).

68	18.38	1598	Trans- $\beta$ -elemenone	0.15
69	18.419	1601	Curzerénone	1.41
70	18.515	1607	NI	0.23
71	18.605	1614	Zingiberenol	1.15
72	18.851	1631	NI	0.36
73	18.894	1634	$\gamma$ -Eudésmol	0.75
74	19.03	1644	$\alpha$ -muurolol	0.22
75	19.058	1645	Epi- $\alpha$ -muurolol	0.19
76	19.245	1659	$\beta$ -Eudésmol	2.92
77	19.309	1663	Ar-tumérone	1.79
78	19.663	1688	NI	0.90
79	19.768	1695	Germacrone	2.34
80	19.84	1701	NI	0.78
81	20.407	1742	6S,7R-bisabolène	0.84
82	20.467	1747	NI	0.91
83	20.651	1761	Aristolone	0.20
84	21.651	1836	2-Pentadecanone-6,10,14-trimethyl	0.46
Total identifiés				95.57

TR : Temps de rétention

IR : Indice de rétention

a : Les composés sont énumérés dans l'ordre de leur IR

b : IR mesuré par rapport à *n*-alcanes (C8 à C20) (colonne HP-5 MS)

NI: Composés non identifiés

La composition de la présente huile est différente de celle rapportée antérieurement pour celle de l'échantillon poussant à Batna (Algérie) qui est majoritairement composée du thymol (79.1%) et *p*-cymène (5.6%) [30]. Les huiles essentielles de *T. ciliatus* de la région de Azrou Maroc sont caractérisées par la présence de thymol (44,2%),  $\beta$ -E-ocimène (25,8 %) et  $\alpha$ -terpinène (12,3 %) comme principaux constituants chimiques [31]. l'huile essentielle étudiée par Ksouri et al ont montré que l'huile essentielle de cette espèce originaire de Djebel Haouara Guelma (Algérie) est dominée par le thymol (62.41%), *p*-cymène (15.51%) et carvacrol (6.12%)[32].Ghorab et al rapportent 28 composés représentant 98,49 % pour l'huile essentielle de *T. ciliatus* de la région de Ain Mlila Oum El Bouaghi (Algérie), cette huile est majoritairement composée de thymol (54.98%),  $\gamma$ -terpinène (11.33%), *p*-cymène (6.66%) et

carvacrol (4.96%) [33]. Les essences de *T. ciliatus* originaires de Imilchil Maroc présentent les mêmes composés majoritaires, mais elles sont plus riches en carvacrol (26.2%) que en p-cymène (19.6%), en plus du thymol (17.3%) et du  $\gamma$ -terpinène (14.6%) [34]. Alors que le carvacrol (80.3%) et le p-cymène (6.1%) sont les composés majoritaires de *T. ciliatus* de la région de Tlemcen [35].

Nos résultats montrent la présence exclusive d'élémol (6.80%),  $\gamma$ -muurolène (5.18%),  $\beta$ -sesquiphellandrène (5.09%) et bicyclogermacrène (5.04%). Ces résultats (tableau IV.2) ont montré des différences significatives avec les études antérieures sur cette espèce. Ces principales composantes de notre échantillon semblent être spécifiques à l'espèce Algérienne et sont décrites pour la première fois dans l'espèce *T. ciliatus*.

Les variations rencontrées dans la composition chimique des huiles essentielles, du point de vue qualitatif et quantitatif, peuvent être dues à plusieurs facteurs tels que les paramètres écologiques, à la partie de la plante utilisée, à l'âge de la plante et à la période du cycle végétatif, ou même à des facteurs génétiques [36-40].

#### **Conclusion :**

L'étude de la composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes de *Thymus ciliatus* (Desf) a mené à l'identification de 75 constituants représentant 95,57% de l'huile essentielle totale. Cette huile est majoritairement composée de :élémol (6.80%), carvacrol (5.86%),  $\gamma$ -muurolène (5.18%),  $\beta$ -sesquiphellandrène (5.09%), bicyclogermacrène (5.04%),  $\beta$ -Pinène (4.49%) et le curcumène (4.20%).

**Références**

- [1] Bruneton J. 2009. Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. 4<sup>ème</sup> édition : Paris, Lavoisier Tech. & Doc, 567.
- [2] Buchanan B.B, Grisse W, Jones R.L. 2000. Biochemistry & Molecular Biology of plants. American Society of plant Physiologists: Rockville, MA, 1367.
- [3] Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. 2008. Biological effects oils. A review Science Direct. Food and Chemical Toxicology. 46: 446-475.
- [4] Tajkarimi MM, Ibrahim SA, Cliver DO. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food control. 21: 1199-1218.
- [5] Messara Y , Fernane F, Meddour R. 2018. Chemical Composition, Antibacterial, and Antifungal activities of the Essential Oil of *Thymus numidicus* Poiret from Algeria, Phytothérapie . 16:163-168.
- [6] Avci AB. 2011. Chemical variation on the essential oil of *Thymus praecox* ssp. *scorpillii* var. *laniger*. Int. J. Agric. Biol .13 : 607-610.
- [7] Nouasri A, Dob T, Toumi M, Dahmane D, Krimat S, Lamari L, Chelgoume C. 2015. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus lanceolatus* Desf., an endemic thyme from Algeria, J. Essent. Oil Bear. Pl . 18 : 1246-1252.
- [8] Yang M, Hao F, Han J. 2004. Study on the chemical components of essential oil of *Thymus quinquecostatus* in Ningxia Guyuan by GC-MS. Ningxia Daxue Xuebao, Ziran Kexueban .25 : 353-355.
- [9] Zeghib A, Kabouche A, Laggoune S, Calliste CA, Simon A, Bressolier Ph, Aouni M, Je Duroux JL , Kabouche Z. 2017. Antibacterial, Antiviral, Antioxidant and Antiproliferative Activities of *Thymus guyonii* Essential Oil. Natural Product Communications. 12(10) : 16551-1654.
- [10] Casiglia S, Bruno M, Scandolera E, Senatore F, Senatore F. 2015. Influence of harvesting time on composition of the essential oil of *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns. & Link. Growing wild in northern Sicily and its activity on microorganisms affecting historical art crafts. Arabian J. Chem, In press. CDRI



- [11] Benchabane O, Hazzit M, Mouhouche F, Baaliouamer A.2015. Influence of extraction duration on the chemical composition and biological activities of essential oil of *Thymus pallescens* de Noé. Arab J Sci Eng .40:1855-1865.
- [12] El Ouariachi EM, Hamdani I, Bouyanzer A, Hammouti B, Majidi L, Costa J, Paolini J, Chetouani A. 2014. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils of *Thymus broussonetii* Boiss. and *Thymus algeriensis* Boiss. from Morocco. Asian Pac. J. Trop. Dis .4 : 281-286.
- [13] Tzakou O, Couladis M. 2008. Essential oil of *Thymus zygioides* var. *lycaonicus* from Greece. J. Essent. Oil Res .20:442-443
- [14] Moghtader M. 2012. Antifungal effects of the essential oil from *Thymus vulgaris* L. and comparison with synthetic thymol on *Aspergillus Niger*. J. Yeast Fungal Res .3:83-88.
- [15] Meshkatalasadat MH, Sarabi RS, Amiri H, Piraei M. 2006. GC/MS analysis of the essential oil of *Thymus persicus* leaves. Asian J. Chem .18:2385-2387.
- [16] Hatipi IM, Papajani V, Cavar S, Matevski V. 2013. GC/MS analysis of the essential oil of *Thymus longicaulis* Presl. From Kosovo. Glas. hem. tehnol. Bosne Herceg .41: 6-10.
- [17] Sabahi Z, Zarshenas MM, Farmani F, Faridi P, Moein S, Moein M. 2013. Essential oil composition and in vitro antioxidant activity of ethanolic extract of *Thymus daenensis* celak from Iran. Global J. Pharmacol. 7 : 153-158.
- [18] Abedini S, Sahebkar A, Hassanzadeh-Khayyat M. 2014. Chemical Composition of the Essential Oil of *Thymus vulgaris* L. Grown in Iran. J. Essent. Oil Bear. Pl .17:538-543.
- [19] Benayache F, Chalard P, Figueredo G, Benayache F, Benayache S. 2014. Chemical composition of the essential oil of *Thymus numidicus* Poiret. Pharm. Lett .6:182-185.
- [20] Khorshidi J, Rasouli M, Rustaiee AR, Mohamadparast B. 2014. Chemical Composition of the Essential Oil of *Thymus fedtschenkoi* Growing Wild in Iran. J. Essent. Oil Bear. Pl17: 173-175.
- [21] Gonçalves MJ, Cruz MT, Cavaleiro C, Lopes MC., Salgueiro L. 2010. Chemical antifungal and cytotoxic evaluation of the essential oil of *Thymus zygis* subsp. *Sylvestris*. Ind. Corps Prod 32: 70-75.
- [22] Kucukbay FZ, Kuyumcu E.2010. Essential oil composition of *Thymus eriocalyx* (Ronniger) Jalas Turkey. Asian J. Chem .22:3615-3621.

- [23] Elbouchtaoui MC, Anejjar A, Salghi R, Chebli B, Idrissi Hassani LM, Hmamouchi M, Hammouti B. 2014. Inhibition of steel corrosion in 1 M HCl by the essential oil of *Thymus pallidus*. *Der Pharma Chemica* 6: 406-414.
- [24] El Ajjouri M, Ghanmi M, Satrani B, Amarti F, Rahouti M, Aafi A, Ismaili MR, Farah A, 2010. Chemical composition and antifungal activity of *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. And *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. Essential oil against wood-rotting fungi. *Acta Bot Gallica*. 157 : 285-294.
- [25] Hamdani I, El Ouariachi E, Mokhtari O, Salhi A, Chahboun N, ElMahi B, Bouyanzer A, Zarrouk A, Hammouti B, Costa J. 2015. Chemical constituents and corrosion inhibition of mild steel by the essential oil of *Thymus algeriensis* in 1.0 M hydrochloric acid solution. *Der Pharma Chemica*. 7 :252-264.
- [26] Pavel M, Ristic M, Stevic T.2010. Essential oil of *Thymus pulegioides* and *Thymus glabrescens* from Romania : chemical composition and antimicrobial activity. *J. Serb. Chem. Soc* .75: 27-34.
- [27] Omidbaigi R, Sefidkon MH. 2005. Essential oil composition of *Thymus citriodorus* L. cultivated in Iran. *Flav. Frag. J* .20 : 237-238.
- [28] Adams RP.1995. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Allured Publishing Co. Carol Stream, Illinois.
- [29] Mc Lafferty FW, Stauffer DB. 1991.The Wiley/NBS registry of mass spectral data. 5<sup>th</sup> Edition, J. Wiley and Sons, New York .
- [30] Kabouche A, Ghannadi A, Kabouche Z. 2009.*Thymus ciliatus* – The Highest Thymol Containing Essential Oil of the Genus. *Nat. Prod. Comp*. 4(9):1251-1252.
- [31] Amarti F, Satrani B, Ghanmi M, Farah A, Aafi A, Aarab L, El Ajjouri M, Chaouch A.2007. Chemical composition and antimicrobial activity of the *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. and *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. essential oils of Morocco.*Biotechnol. Agr. Soc. Environ*.14(1): 141-148 .
- [32] Ksouri S, Djebir S , Bentorki AA , Gouri A , Hadeff A , Benakhla A.2017.Antifungal activity of essential oils extract from *Origanum floribundum* Munby, *Rosmarinus officinalis* L. and *Thymus ciliatus* Desf. Against *Candida albicans* isolated from bovine clinical mastitis . *J Mycol Med*. 27(2):245-249.
- [33] Ghorab H, Kabouche A, Semra Z, Ghannadi A, Sajjadi EB, Touzani R, Kabouche Z.2013. Biological activities and compositions of the essential oil of *Thymus ciliatus* from Algeria .*Der. Pharm.Lettre*. 5 (1) :28-32.
- [34] Alaoui Jamali C, El Bouzidi L, Bekkouche K, Lahcen H, Markouk M, Wohlmuth, H, Leach, D, Abbad A. 2012. Chemical Composition and Antioxidant and Anticandidal Activities of Essential Oils from Different Wild Moroccan *Thymus* Species. *Chem. Biodiv*. 9: 1188-1197.

- [35] Bousmaha-Marroki, L, Atik-Bekkara F, Tomi F., Casanova J.2007. The Essential Oil of *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. ssp. *eu-ciliatus* Maire from Algeria. *J. Essent. Oil Res.* 19: 490-493.
- [36] Senatore F. 1996. Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of a thyme (*Thymus pulegioides* L.) growing wild in Campania (Southern Italy). *J. Agric. Food Chem.* 44:1 327-1 332.
- [37] Kokkini S., R. Karoussou, A. Dardiotis, N. Krigas & T. Lanaras, 1997.- Autumn essential oils of Greek oregano. *Phytochemistry.* 44, 883-886.
- [38] Russo M, Galletti GC, Bocchini P, Garnacini A. 1998. Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* Link): a preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis. *J. Agric. Food Chem.* 46: 3741 -3746
- [39] Thompson JD, Chalchat JC, Michet A, Linhart YB, Ehlers B. 2003. Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotype. *J. Chem. Ecol.* 29 (4):859-880.
- [40] Karousou R, Koureas DN, Kokkini S. 2005. Essential oil composition is related to the natural habitats: *Coridothymus capitatus* and *Satureja thymbra* in Natura 2000 sites of Crete. *Phytochemistry.* 66 : 2668-2673.

# *Conclusion générale*

## *Conclusion générale*

Le présent travail a été consacré à l'étude phytochimique et l'évaluation du potentiel biologique de deux espèces végétales algériennes *Thymus ciliatus* (Desf) et *Asteriscus graveolens* (Forsk.) dc. appartenant aux familles Lamiaceae et Asteraceae respectivement connues pour leur richesse en divers métabolites secondaires d'un grand intérêt biologique, ainsi que pour la bonne réputation de l'utilisation de ces plantes dans la médecine traditionnelle locale.

L'étude phytochimique réalisée sur l'extrait acétate d'éthyle des parties aériennes de la plante *Thymus ciliatus* (Desf) a mené à l'isolement de 11 composés dont 7 ont été identifiés, l'un entre eux a été isolé pour la première fois. Ces composés identifiés sont :

- ✚ **Quercétine**
- ✚ **Taxifoline**
- ✚ **Lutéoline**
- ✚ **5,3'-dihydroxy-7-(p-hydroxybenzoyl)-4'-methoxyflavone (nouveau)**
- ✚ **l'acide rosmarinique**
- ✚ **l'acide rosmarinique methyle ester**
- ✚ **acide caféique**

L'investigation phytochimique qui a porté sur les extraits acétate d'éthyle et *n*-butanolique de l'espèce *Asteriscus graveolens* (Forsk.) dc. a permis d'isoler 16 composés, nous avons établi à l'heure actuelle la structure de 10 composés, parmi lesquels trois ont des structures nouvelles qui n'ont jamais été décrites dans la littérature. Il s'agit de :

- ✚ **9  $\beta$ -hydroxyparthenolide**
- ✚ **9  $\alpha$ -hydroxyparthenolide**
- ✚ **spinacetin 3-*O*- $\beta$  glucopyranoside**
- ✚ **7,12-dihydroxy-6,7-dihydro-5,(6) *E*-dehydroneolidol (nouveau)**
- ✚ **borneol 2-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside**
- ✚ **9 $\beta$ -hydroxy-11 $\beta$ ,13-dihydroparthenolide-9-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (nouveau)**
- ✚ **9 $\alpha$ -hydroxy-11 $\beta$ ,13-dihydroparthenolide-9-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (nouveau)**
- ✚ **(6*S*, 9*R*)-roseoside**
- ✚ **spinacetin 3-*O*-rutinoide**
- ✚ **acide 5-*O*- feruloylquinique**

L'identification structurale a été réalisée par l'analyse combinée des données spectrales obtenues par des méthodes spectroscopiques RMN 1D ( $^1\text{H}$  et  $\text{C}^{13}$ ) et RMN 2D (COSY, HSQC et HMB) de la spectrométrie de masse et de la spectrophotométrie UV-Vis, ainsi que par la comparaison avec les données de la littérature.

La quantification des polyphénols et des flavonoïdes totaux des extraits AcOEt et *n*-BuOH des parties aériennes de *Thymus ciliatus* (Desf) a montré que l'extrait acétate d'éthyle a une forte teneur par rapport au l'extrait *n*-BuOH. Ces deux extraits ont manifesté une excellente activité antioxydante *viv-à-vis* le radical libre DPPH.

L'activité antioxydante des extraits AcOEt et *n*-BuOH de l'espèce *Asteriscus graveolens* a été évaluée par les méthodes du DPPH et celle de blanchissement du  $\beta$ -carotène. Le meilleur résultat a été obtenu pour l'extrait acétate d'éthyle notamment dans la méthode du DPPH où son effet est supérieur à celui des standards BHT et l' $\alpha$ -tocophérol.

L'activité cytotoxique des extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol et de quelques produits isolés d'*Asteriscus graveolens* a été réalisée vis à vis des lignées cellulaires humaine (HCT-116, DLD1 et HDFa). Les résultats révèlent que les extraits AcOEt ainsi que les produits isolés  $9\alpha$ -hydroxyparthenolide,  $9\beta$  hydroxyparthenolide et 7,12-dihydroxy-6,7-dihydro-5,(6)E-dehydronerolidol ont montré une activité significative par rapport aux l'extrait *n*-BuOH et les deux nouveaux composés  $9\beta$  -hydroxy-11  $\beta$ ,13-dihydroparthenolide-9-O-  $\beta$  -D-glucopyranoside  $9\alpha$ -hydroxy-11 $\beta$ ,13-dihydroparthenolide -9-O-  $\beta$  -D-glucopyranoside.

La composition de l'huile essentielle des parties aériennes de l'espèce *T. ciliatus* (Desf) obtenue par entraînement à la vapeur d'eau, a été analysée par GC-FID et CG-MS. Les composés majoritaires identifiés sont : élémol (6.80%), carvacrol (5.86%),  $\gamma$ -muurolène (5.18%),  $\beta$ -sesquiphellandrène (5.09%), bicyclogermacrène (5.04%),  $\beta$ -Pinène (4.49%) et curcumène (4.20%).

## Résumé

Ce travail est consacré à l'étude phytochimique et biologique de deux plantes médicinales Algériennes *Thymus ciliatus* (Desf) et *Asteriscus graveolens* (Forsk.) dc. appartenant aux familles Lamiaceae et Asteraceae ,respectivement. Cette étude a permis d'isoler vingt-sept produits dont dix-sept ont été identifiés. Parmi les composés isolés, 5 sesquiterpènes dont 3 nouvelles, 6 flavonoïdes dont 1 nouvelle, 4 composés phénoliques et 2 monoterpènes. Les structures des produits isolés ont été élucidées principalement par la combinaison des méthodes spectroscopiques : RMN 1 D et 2D (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COSY, HSQC et HMBC), spectrophotométrie UV, par la spectrométrie de masse à haute résolution et par la comparaison avec les données de la littérature.

La quantification des polyphénols et des flavonoïdes totaux des extraits AcOEt et *n*-BuOH des parties aériennes de *Thymus ciliatus* (Desf) a montré que l'extrait acétate d'éthyle a une forte teneur par rapport au l'extrait *n*-BuOH.Ces deux extraits ont manifesté une excellente activité antioxydante *viv-à-vis* le radical libre DPPH.

L'activité antioxydante des extraits AcOEt et *n*-BuOH de l'espèce *Asteriscus graveolens* a été évaluée par les méthodes du DPPH et celle de blanchissement du β-Carotrène. Le meilleur résultat a été obtenu pour l'extrait acétate d'éthyle notamment dans la méthode du DPPH où son effet est supérieur à celle des standards BHT et l'α-tocophérol.

Les deux extraits et quelques produits isolés d'*Asteriscus graveolens* ont été testés pour leur cytotoxicité vis à vis des lignées cellulaires humaine (HCT-116, DLD1 et HDFa). Les résultats révèlent que les extraits AcOEt ainsi que les produits isolés 9 α-hydroxyparthenolide, 9β-hydroxyparthenolide et 7,12-dihydroxy-6,7-dihydro-5,(6) *E*-dehydronerolidol ont montré une activité significative par rapport aux l'extrait *n*-BuOH et les deux nouveaux composés .

L'analyse de l'huile essentielle des parties aériennes de *Thymus ciliatus* (Desf) par GC-FID et GC/MS a montré que cette huile est majoritairement composée d' élémol (6.80%), carvacrol (5.86%), γ-muuroène (5.18%), β-sesquiphellandrène (5.09%), bicyclogermacrène (5.04%) , β-Pinène (4.49%) et curcumène (4.20%).

**Mots clés :** *Thymus ciliatus* (Desf) , *Asteriscus graveolens* (Forsk.) dc. , Lamiaceae, Asteraceae , sesquiterpènes , flavonoïdes ,composés phénoliques , monoterpènes,activité antioxydante ,huile essentielle, cytotoxicité.

## *Abstract*

This work concerned the phytochemical and biological study of two Algerian medicinal plants *Thymus ciliatus* (Desf) and *Asteriscus graveolens* (Forsk.) dc. belonging to the families Lamiaceae and Asteraceae, respectively. This study led to the isolation of twenty seven products from which seventeen were identified including. Among the isolated compounds, 5 sesquiterpenes from which 3 were new, 6 flavonoids which 1 is new, 4 phenolic compounds and 2 monoterpenes. The structures of the isolated products were elucidated mainly by the combination of spectroscopic methods mainly: NMR techniques ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, HSQC and HMBC), UV spectrophotometry, we also used high resolution mass spectrometry methods and comparison with literature data.

The quantification of total phenols and total flavonoids contents of the EtOAc, *n*BuOH extracts of the aerial parts of *Thymus ciliatus* (Desf) were determined, EtOAc extract had the highest phenolic and flavonoid contents followed by *n*-butanol extract. This extracts showed an excellent antioxidant activity by DPPH test.

The antioxidant activity of AcOEt and *n*-BuOH extracts of *Asteriscus graveolens* was estimated by the DPPH test and  $\beta$ -Carotene bleaching assay. The best result was obtained for the ethyl acetate extract, especially in the DPPH method, where its effect is greater than BHT and  $\alpha$ -tocopherol used as standards.

Both extracts and some isolated compounds of *Asteriscus graveolens* were tested for their cytotoxic effect in human cancer cell lines (HCT-116, DLD1 and HDFa). The results indicate that EtOAc extract and isolated compounds 9  $\alpha$ -hydroxyparthenolide, 9 $\beta$ -hydroxyparthenolide et 7,12-dihydroxy-6,7-dihydro-5,(6) *E*-dehydroneolidol showed significant activity compared to the *n*-BuOH extract and and the two new compounds.

The chemical composition of the essential oil of aerial parts of *Thymus ciliatus* (Desf) Benth studied by GC-FID and GC-MS showed that this oil is mainly composed of elemol (6.80%), carvacrol (5.86%),  $\gamma$ -muurolene (5.18%),  $\beta$ -sesquiphellandrene (5.09%), bicyclogermacrene (5.04%),  $\beta$ -Pinene (4.49%) and curcumene (4.20%).

**Keywords:** *Thymus ciliatus* (Desf), *Asteriscus graveolens* (Forsk.) dc., Lamiaceae, Asteraceae, sesquiterpenes, flavonoids, phenolic compounds, monoterpenes, Antioxidant activity, essential oil, cytotoxic effect.



## ملخص

انصب اهتمامنا في هذا العمل على الدراسة الفيتوكيميائية والبيولوجية لنبتتين *Asteriscus* و *Thymus ciliatus* (Desf) على التوالي. سمحت هذه الدراسة بعزل سبعة وعشرون مركبا و تحديد بنية سبعة عشر مركبا منها. من بين هذه المركبات المعزولة ، 5 سسكويثربينات من بينها 3 مركبات جديدة ، 6 مركبات فلافونويد من بينها مركب جديد ، 4 مركبات فينولية و 2 من مركبات أحادية التربينات. تم التعرف على بنى المركبات المعزولة من خلال مختلف التقنيات الطيفية ، مثل الرنين النووي المغناطيسي أحادي وثنائي البعد، الأشعة فوق البنفسجية ، مطيافية الكتلة إلى جانب مقارنة النتائج مع مختلف المراجع.

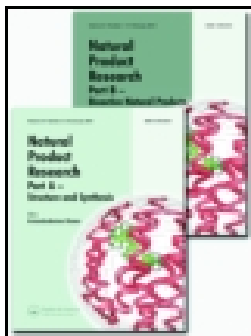
تم قياس كمية البوليفينول الكلي والفلافونويد الكلي لمستخلصات أسيتات الإيثيل واليوتانول للأجزاء الهوائية للنبتة *Thymus ciliatus* (Desf) حيث أظهرت هذه الدراسة أن مستخلص أسيتات الإيثيل يحتوي على نسبة عالية مقارنة بمستخلص اليوتانول . أظهر هذان المستخلصان نشاطاً جيداً مضاداً للأكسدة مع الجذر الحر DPPH .

تم تقييم نشاط مضادات الأكسدة لمستخلصات أسيتات الإيثيل واليوتانول لنبات *Asteriscus graveolens* باستعمال طريقة  $\beta$ -carotène و DPPH. تم الحصول على أفضل نتيجة لمستخلص أسيتات الإيثيل ، خاصة في طريقة DPPH ، حيث كان تأثيره أكبر من تأثير المرجعين BHT و  $\alpha$ -tocopherol.

تم اختبار المستخلصين وبعض المركبات المعزولة من *Asteriscus graveolens* لتأثيرها على السمية بخلايا سرطانية (مصدر بشري) (HCT116، DLD 1 و HDFa). أظهرت النتائج أن مستخلص أسيتات الإيثيل وكذلك المركبات المعزولة  $9\beta$ -hydroxyparthenolide،  $9\alpha$ -hydroxyparthenolide و  $7,12$ -dihydroxy-6,7-dihydro-5,(6) *E*-dehydroneerolidol نشاطاً كبيراً مقارنة بمستخلص اليوتانول والمركبين الجديدين.

تحليل الزيت الأساسي للأجزاء الهوائية للنبتة *Thymus ciliatus* (Desf) باستخدام كروماتوغرافيا الطور الغازي-GC-FID و كروماتوغرافيا الطور الغازي بالتزاوج مع مطيافية الكتلة GC-MS أظهر أن هذا الزيت يتكون أساسا من elemol (6.80%)، carvacrol (5.86%)،  $\gamma$ -muurolene (5.18%)،  $\beta$ -sesquiphellandrene (5.09%)، bicyclogermacrene (5.04%)،  $\beta$ -Pinene (4.49%) and curcumene (4.20%).

**الكلمات المفتاحية:** *Thymus ciliatus* (Desf) ، *Asteriscus graveolens* (Forsk.) dc. ، Lamiaceae ، Asteraceae ، سسكويثربينات ؛ ، فلافونويد ، مركبات فينولية، أحادية التربينات، نشاط مضادات الأكسدة ، الزيت الأساسي ، التأثير السمي للخلايا.



# Natural Product Research

Formerly Natural Product Letters

ISSN: 1478-6419 (Print) 1478-6427 (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/gnpl20>


## New sesquiterpenes from *Asteriscus graveolens*

Hanane Achoub, Teresa Mencherini, Tiziana Esposito, Rastrelli Luca, Rita Aquino, Patrizia Gazzero, Lahcene Zaiter, Fadila Benayache & Samir Benayache

To cite this article: Hanane Achoub, Teresa Mencherini, Tiziana Esposito, Rastrelli Luca, Rita Aquino, Patrizia Gazzero, Lahcene Zaiter, Fadila Benayache & Samir Benayache (2019): New sesquiterpenes from *Asteriscus graveolens*, Natural Product Research, DOI: [10.1080/14786419.2019.1666390](https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1666390)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1666390>

 View supplementary material 

 Published online: 23 Sep 2019.

 Submit your article to this journal 

 View related articles 

 View Crossmark data 



## New sesquiterpenes from *Asteriscus graveolens*

Hanane Achoub<sup>a</sup>, Teresa Mencherini<sup>b</sup>, Tiziana Esposito<sup>b</sup>, Rastrelli Luca<sup>b</sup>, Rita Aquino<sup>b</sup>, Patrizia Gazzero<sup>b</sup>, Lahcene Zaiter<sup>a</sup>, Fadila Benayache<sup>a</sup> and Samir Benayache<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Unité de recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques, Université Frères Mentouri, Constantine, Algeria; <sup>b</sup>Department of Pharmacy, University of Salerno, Fisciano, Salerno, Italy

### ABSTRACT

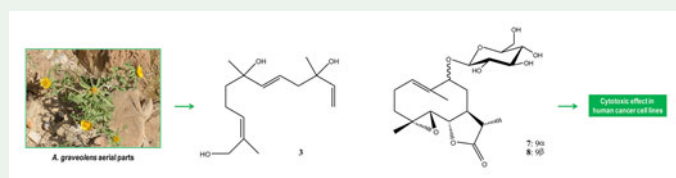
*Asteriscus graveolens* (Forsk) Less. is a Saharan medicinal plant of Asteraceae family. A new acyclic sesquiterpene [7,12-dihydroxy-6,7-dihydro-5(6) *E*-dehydroneolidol (**3**)] and sesquiterpene germacranolide lactone derivatives [9 $\beta$ -hydroxy-11 $\beta$ ,13-dihydro-parthenolide-9-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**7**) and 9 $\alpha$ -hydroxy-11 $\beta$ ,13-dihydroparthenolide-9-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**8**)] along with eight known compounds were isolated from polar extracts of aerial parts. Their structures were established by the analysis of 1D- 2D-NMR and high-resolution mass spectrometry data. *A. graveolens* extracts and compounds showed a significant ( $P < 0.05$ ) and concentration dependent inhibitory effect on the growth of Human Colon Carcinoma (HCT116) and Human Colorectal Adenocarcinoma (DLD1) cells with IC<sub>50</sub> in a concentration range from 89.4 to 296.0  $\mu$ g/mL for extracts and from 32.6 to 728.1  $\mu$ g/mL for compounds. No cytotoxic effects was evidenced in normal Primary Human Dermal Fibroblast (HDFa) up to 0.050 mg/mL for extracts and 1.0 mg/mL for pure compounds.

### ARTICLE HISTORY

Received 17 July 2019  
Accepted 29 August 2019


### KEYWORDS


*Asteriscus graveolens*;  
Asteraceae; cytotoxicity;  
sesquiterpenes



## 1. Introduction

*Asteriscus graveolens* (Forsk) Less. [Syn. *Bubonium graveolens*, *Buphthalmum graveolens* (Forsk.), *Nauplius graveolens*, and *Bubonium odorum* (Schoub.) (Hammoud et al. 2018)] (Asteraceae family) is an herbaceous aromatic plant, growing in Saharan regions, mainly in south-western of Algeria and Morocco. In northern Africa folk medicine the specie is used for the treatment of fever, cephalic pains, bronchitis, but also as

CONTACT Teresa Mencherini  [tmencherini@unisa.it](mailto:tmencherini@unisa.it)

 Supplemental data for this article can be accessed at <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1666390>.

© 2019 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

stomachic agent. The infusion from the aerial parts is considered antidiabetic (hypoglycemic), anti-inflammatory and applied for gastric and intestinal affections (Ziani et al. 2015). Derivatives from *A. graveolens* are used as antioxidants and to protect the damage caused by environmental pollution (Hammoud et al. 2018).

Previous phytochemical studies reported the isolation and identification from *Asteriscus* genus of flavonoids (Ezzat et al. 2016), bisabolone hydroperoxides (Sarg et al. 1994), and mainly sesquiterpene lactones with humulene and asteriscane skeletons (Akssira et al. 2006; Hammoud et al. 2018). In this paper, the isolation and identification of a new acyclic sesquiterpene (**3**) and two new sesquiterpene germacranolide lactone derivatives (**7** and **8**) along with known compounds from polar extracts of *A. graveolens* aerial parts is described. Moreover, the effect of extracts and pure compounds on the growth of human colon cancer (HCT116) and human colorectal adenocarcinoma (DLD1) cell lines was investigated.

## 2. Results and discussion

Aerial parts of *A. graveolens* (Forsk.) Less. were macerated at room temperature with EtOH:H<sub>2</sub>O (80:20 v/v) (three times, 48 h each time). After filtration, the filtrate was concentrated and dispersed with H<sub>2</sub>O. The resulting solution was extracted successively with petroleum ether, chloroform, ethyl acetate (E), and *n*-butanol (B). E and B extracts were fractionated and purified by a combination of chromatographic methods to obtain three new sesquiterpenes (**3**, **7–8**) (Figure 1) along with known compounds.

Compound **3**, obtained as white amorphous powder, was assigned the molecular formula C<sub>15</sub>H<sub>26</sub>O<sub>3</sub> as determined by its negative HRESIMS data (*m/z* 253.1816 [M-H]<sup>-</sup>). The <sup>1</sup>H NMR spectrum indicated the presence of five olefinic protons at δ<sub>H</sub> 5.96 (1 H, ddd, *J* = 17.5, 10.8, 5.5 Hz), 5.21 (1 H, dd, *J* = 17.5, 1.0 Hz), 5.66 (1 H, dt, *J* = 15.7, 8.6 Hz), 5.58 (1 H, d, *J* = 15.7 Hz), and 5.41 (1 H, t, *J* = 13.8, 6.5 Hz); three tertiary methyl groups at δ<sub>H</sub> 1.25 (3 H, s), 1.28 (3 H, s), and 1.66 (3 H, s); a hydroxymethyl group at δ<sub>H</sub> 3.92 (2 H, brs), and three methylene groups at δ<sub>H</sub> 2.28 (2 H, m), 2.09 (2 H, m), and 1.56 (2 H, m). The <sup>13</sup>C-NMR spectrum showed the signals of 15 carbons, of which six olefinic resonances at δ<sub>C</sub> 148.1, 146.2, 135.4, 126.6, 123.9, and 112.0; three methyl groups at δ<sub>C</sub> 27.7, 27.1, and 13.6; two oxygen-bearing *sp*<sup>3</sup> carbons at δ<sub>C</sub> 74.1 and 72.8; a

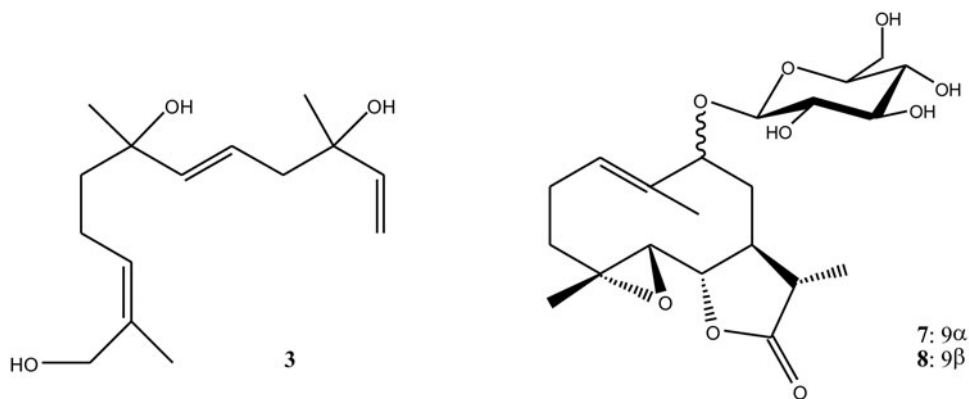


Figure 1. Chemical structures of compounds 3, 7-8 isolated from *A. graveolens* aerial parts.

hydroxymethyl carbon at  $\delta_C$  68.7, and three methylene carbons at  $\delta_C$  45.9, 42.9, and 23.1. The 2D-COSY spectrum allowed to establish the proton sequences of compound **3** by the correlations of the olefinic protons (H-5,  $\delta_H$  5.66, and H-6,  $\delta_H$  5.58) with the methylene proton (H-4,  $\delta_H$  2.28); the olefinic proton H-10 ( $\delta_H$  5.41) with the methylene proton H-9 ( $\delta_H$  2.09), and of this with H-8 proton ( $\delta_H$  1.56); the olefinic proton H-2 ( $\delta_H$  5.96) with the two protons H-1 ( $\delta_H$  5.21 and 5.04). On the basis of the resonances of all the proton and carbon signals (Table S1), assigned through the two-dimensional HSQC, COSY, and HMBC data, it was concluded that the compound **3** is an isomer of the 7-hydroxy nerolidol with a  $\Delta^5$  double bond with *trans* configuration ( $J_{5,6} = 15.7$  Hz) (Zdero and Bohlmann 1989). Moreover, in the HMBC spectrum the long-range correlations between the proton at  $\delta_H$  3.92 (H-12) and the carbons at  $\delta_C$  13.6 (C-13), 135.4 (C-11), and 126.6 (C-10) allowed to place the hydroxymethyl group at C-12 ( $\delta_C$  68.7). In conclusion, compound **3** was identified as 7,12-dihydroxy-6,7-dihydro-5,(6) *E*-dehydronerolidol.

Compound **7**, obtained as white amorphous powder, showed a quasi molecular ion peak at  $m/z$  427.1971 for  $[M + H]^+$  in the HRESIMS, allowing the assignment of molecular formula  $C_{21}H_{32}O_9$ . Analysis of  $^1H$  and  $^{13}C$  NMR data (Table S1) suggested a glycosidic sesquiterpene lactone derivative of 9-hydroxy dihydroparthenolide. The  $^1H$  NMR spectrum of **7** revealed the presence of two tertiary methyls ( $\delta_H$  1.39 and 1.77) and a secondary methyl group ( $\delta_H$  1.29,  $d$   $J = 6.9$  Hz), an olefinic proton at  $\delta_H$  5.59 (1H, dd,  $J = 1.1$  and 12.2 Hz), an anomeric proton ( $\delta_H$  4.12,  $d$   $J = 7.5$  Hz), three methylene groups ( $\delta_H$  1.25, 2.15, 2.02, 2.24, and 2.62), and five methine groups ( $\delta_H$  2.15, 2.51, 2.81, 4.05, and 4.40) three of which ( $\delta_H$  2.81, 4.05, and 4.40) bounded to an oxygen atom. The  $^{13}C$  NMR spectrum showed, for the aglycon moiety, 15 signals that were correlated to the corresponding proton chemical shifts from the HSQC experiment, leading to the identification of the aglycon as 9 $\beta$ -hydroxy-11 $\beta$ ,13-dihydroparthenolide (Ruangrungsi et al. 1988). In the HMBC spectrum, the long range correlations confirmed the position of the double bond in C1–C10, the hydroxyl group in C-9, the methyl groups in C-13, C-14, and C-15. Moreover, the epoxy ring was placed in C4–C5 position for the correlation between H-5 ( $\delta_H$  2.81) and C-4 ( $\delta_C$  62.6), C-3 ( $\delta_C$  36.9), and C-6 ( $\delta_C$  82.4). The  $\alpha$ -methyl- $\gamma$ -lactone unit was placed at C6–C7 position by correlation between H-6 ( $\delta_H$  4.05) and C-5 ( $\delta_C$  66.9) and between H-7 ( $\delta_H$  2.15) and C-5 ( $\delta_C$  66.9). In the 2D-ROESY spectrum, the presence of NOE signals between H-9 ( $\delta_H$  4.40) and H-5 ( $\delta_H$  2.81) suggested that these protons were oriented from the same side of the molecule and support their axial orientation according to the observed coupling constants (H-9,  $\delta_H$  4.40, dd,  $J_{8\alpha,9} = 9.7$  Hz and  $J_{8\beta,9} = 2.0$  Hz), as reported in the literature for similar molecules (Harvala et al. 2002). The structure of the sugar moiety was deduced by using 1D TOCSY and 2D NMR experiments, which indicated the presence of a  $\beta$ -glucopyranoside. The configuration of the sugar unit was assigned by hydrolysis of **7** with 1N HCl. The HMBC correlation between the anomeric proton ( $\delta_H$  4.12) and the carbon at  $\delta_C$  83.8 showed the linkage of the  $\beta$ -D-glucopyranose unit in C-9 position of the molecule. Therefore, compound **7** was identified as 9 $\beta$ -hydroxy-11 $\beta$ ,13-dihydroparthenolide-9-O- $\beta$ -D-glucopyranoside.

The chemical structure of compound **8** was determined by comparing its HRESIMS and NMR data with those of compound **7**. Compound **8** resulted an epimer in C-9 of compound **7**. The proton H-9 ( $\delta_H$  4.35, dd) showed in the  $^1H$  NMR spectrum coupling constants  $J_{8\alpha,9} = 6.0$  Hz and  $J_{8\beta,9} = 1.0$  Hz which demonstrated its equatorial orientation

(Harvala et al. 2002). Moreover, in the 2D-ROESY spectrum the NOE signals between H-9 ( $\delta_{\text{H}}$  4.35) and the methyl group in C-15 ( $\delta_{\text{H}}$  1.75), and of the latter with the methyl in C-14 ( $\delta_{\text{H}}$  1.36) were evident suggesting that these protons are oriented by the same side of the molecule. Thus, compound **8** was identified as 9 $\alpha$ -hydroxy-11 $\beta$ ,13-dihydro-parthenolide-9-O- $\beta$ -D-glucopyranoside.

The structures of known compounds were elucidated as 9 $\alpha$ -hydroxyparthenolide (**1**), 9 $\beta$ -hydroxyparthenolide (**2**) (Sattar et al. 1996), quercetin 7-O-methylester (rhamnetin) (**3**) (Lee et al. 2008), borneol 2-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**5**) (Guo et al. 2018), spinacetin 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**6**) (Merfort and Wendisch 1987), roseoside (**9**) (Bhakuni et al. 1974), spinacetin 3-O-rutinoside (**10**) (Bertrand et al. 2001), 5-O-feruloylquinic acid (**11**) (Dokli et al. 2013) by comparison of experimental data (ESIMS and  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR) with values reported in the literature.

Recent researches (Ziani et al. 2015; Tayeh et al. 2018) have demonstrated the cytotoxic activity of infusion, and ethyl acetate extract and fractions, rich in sesquiterpene lactones, from *A. graveolens* in several tumoral cell lines. Moreover, some secondary metabolites isolated in the present research from the polar extracts of *A. graveolens*, such as 9 $\alpha$ -hydroxyparthenolide (**1**), 9 $\beta$ -hydroxyparthenolide (**2**), showed antitumor activity (Sattar et al. 1996). Based on this evidence, the cytotoxic activity of *A. graveolens* extracts (from 0.400 to 0.050 mg/mL) and isolated sesquiterpenes, 9 $\alpha$ -hydroxyparthenolide (**1**), 9 $\beta$ -hydroxyparthenolide (**2**), and compounds **3**, **7-8** (from 1.0 to 0.01 mg/mL) was evaluated in Human Colon Carcinoma and Human Colorectal Adenocarcinoma (HCT116 and DLD1) cells, and in a normal cell line (Primary Human Dermal Fibroblast, HDFa) by MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay (Aïssaoui et al. 2018). After 48 h of treatment, tested extracts and compounds showed a significant ( $P < 0.05$ ) and concentration dependent inhibitory effect on the growth of the treated HCT116 and DLD1 cells.  $\text{IC}_{50}$  values, obtained from dose-response curves are reported in Table S2. Extract E ( $\text{IC}_{50} = 89.4$  and  $167.1 \mu\text{g/mL}$ , respectively) was more effective than extract B ( $\text{IC}_{50} = 204.6$  and  $296.0 \mu\text{g/mL}$ , respectively) on both the cell lines. 9 $\alpha$ -hydroxyparthenolide (**1**) ( $\text{IC}_{50} = 33.5$  and  $38.9 \mu\text{g/mL}$ ), 9 $\beta$ -hydroxyparthenolide (**2**) ( $\text{IC}_{50} = 32.6$  and  $34.9 \mu\text{g/mL}$ ), and the acyclic sesquiterpene **3** ( $\text{IC}_{50}$  of  $98.0$  and  $149.3 \mu\text{g/mL}$ , respectively), isolated from E, appear to be responsible for the different activity of the two extracts of *A. graveolens*. Compounds **7** ( $\text{IC}_{50} = 412.2$  and  $562.5 \mu\text{g/mL}$ ) and **8** ( $\text{IC}_{50} = 359.8$  and  $728.1 \mu\text{g/mL}$ ) showed a lower (about 10-fold on HCT116 and 18-fold on DLD1) cytotoxic activity, compared to 9 $\alpha$ -hydroxyparthenolide (**1**) and 9 $\beta$ -hydroxyparthenolide (**2**), to which they are structurally related. The lack of the  $\alpha$ -methylene- $\gamma$ -lactone unit, previously identified as a structural feature for the biological activity of parthenolide derivatives, reduce the cytotoxic effect of the lactone sesquiterpenes **7** and **8** (Parodi et al. 1987). No cytotoxic effect was observed in primary fibroblasts up to 0.050 mg/mL for extracts and 1.0 mg/mL for pure compounds.

### 3. Experimental

#### 3.1. Materials

Analytical grade ethanol, petroleum ether, chloroform, ethyl acetate, and *n*-buthanol, pyridine, methanol deuterated, MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium

bromide], d-glucose authentic sample, and HPLC-grade methanol were purchased from Sigma-Aldrich (Milan, Italy). HPLC-grade water (18 m $\Omega$ ) was prepared by a Milli-Q50 purification system (Millipore Corp., Bedford, MA). Water and MeOH for the electrospray ionization ESI-MS analysis were of HPLC supergradient quality (Romil Ltd., Cambridge, UK). HCT116 (Human Colon Cancer) and DLD1 (Human Colorectal Adenocarcinoma) cell lines were obtained from the American Type Cell Culture (ATCC) (Rockville, MD, USA). Primary Human Dermal Fibroblasts (HDFa), all reagents, and supplements for cell cultures were obtained from Gibco Life Technology Corp. (Thermo Fischer Scientific, Milan, Italy).

### 3.2. General experimental procedures

A Bruker DRX-600 NMR spectrometer (Bruker BioSpin, GmBH) operating at 599.19 MHz for  $^1\text{H}$  and 150.858 MHz for  $^{13}\text{C}$ , using the TopSpin 3.2 software package (Bruker BioSpin), was used for NMR experiments in  $\text{CD}_3\text{OD}$ . Chemical shifts are expressed in  $\delta$  (parts per million) referring to the solvent peaks  $\delta\text{H}$  3.31 and  $\delta\text{C}$  49.05 for  $\text{CD}_3\text{OD}$ , with coupling constants,  $J$ , in Hertz. Conventional pulse sequences were used for  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  2D-COSY (COrrrelation Spectroscopy),  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence), and HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) experiments (Esposito et al. 2017), ESI-MS experiments were performed with a Finnigan LC-Q Deca spectrometer (Thermoquest, San Jose, CA, USA), equipped with Xcalibur 3.1 software (Thermoquest, San Jose, CA, USA). HRESIMS experiments were carried out with a LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific, San Jose, CA). Optical rotations were recorded with an Autopol IV Automatic polarimeter (Rudolph) equipped with a sodium lamp (589 nm) and a 1 dm microcell. GC analysis was performed using a Dani GC instrument on L-CP-Chirasil-Val column (0.32 mm x 25 m) working with the following temperature program: 100 °C for 1 min, ramp of 5 °C/min up to 180 °C; injector and detector temperature 200 °C; carrier gas  $\text{N}_2$  (2 mL/min); detector dual FID; split ratio 1:30, injection 5  $\mu\text{L}$ . Thin-layer chromatography (TLC) analysis was performed with a precoated silica gel 60  $\text{F}_{254}$  plates (Delchimica, Naples, Italy), and the spray reagent cerium sulfate (saturated solution in dilute  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) and UV (254 and 366 nm) were used for the spot visualization. Column chromatography was carried out on silica gel 60 (40–230 mesh) (Merck KGaA, Darmstadt, Germania), and semi-preparative HPLC separations were conducted on a Waters 590 series pumping system, equipped with a Waters R401 refractive index detector and a Rheodyne injector (100  $\mu\text{L}$  loop), using Synergi Fusion  $\text{C}_{18}$  (250  $\times$  10 mm i.d., 4  $\mu\text{m}$ , Phenomenex, Torrance, CA, USA) or Luna  $\text{C}_8$  (250  $\times$  10.0 mm i.d., 10  $\mu\text{m}$ , Phenomenex, Torrance, CA, USA) as column.

### 3.3. Plant material

Aerial parts of *Asteriscus graveolens* (Forsk.) Less. were collected in April 2017 in Biskra province (Algeria), and identified by Professor Mohamed Kaabache (Setif 1 University). A voucher specimen was kept at the Herbarium of the VARENBIOMOL research unit, University of Constantine 1.

### 3.4. Extraction and isolation

The dried aerial parts of *A. graveolens* (2000 g) were macerated at room temperature with ethanol:water (80:20, v/v) for 48 h, three times. After filtration, the filtrates were concentrated in vacuum at 35 °C in a rotary evaporator obtaining the concentrate extract. The extract was resuspended in water (800 mL) and partitioned with petroleum ether (300 mL), chloroform (3 × 300 mL each), ethyl acetate (3 × 300 mL each), and *n*-butanol (3 × 300 mL each) to yield 0.3, 7, 10, and 17.5 g of the respective residues. A portion of the ethyl acetate extract (E) (8 g) was subjected to silica gel column chromatography eluted with a gradient of mixtures of chloroform/acetone and methanol with increasing polarity to yield five major fractions from E (E<sub>1</sub>–E<sub>5</sub>) according to their TLC profiles (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9:1). Fractions E<sub>1</sub> (26.2 mg) and E<sub>2</sub> (265.9 mg) corresponded to 9 $\alpha$ -hydroxypartenolide (**1**) and 9 $\beta$ -hydroxypartenolide (**2**), respectively. E<sub>3</sub> (100.9 mg) was further purified by semi-preparative HPLC using MeOH–H<sub>2</sub>O (65:35, v/v) as mobile phase, yielding compound (**3**) (5.3 mg, t<sub>R</sub> 20 min), quercetin 7-O-methylester (rhamnetin) (**4**) (3.9 mg, t<sub>R</sub> 24 min), and borneol 2-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**5**) (3.0 mg, t<sub>R</sub> 33 min). Fraction E<sub>4</sub> (180.3 mg) was purified by semi-preparative HPLC using MeOH–H<sub>2</sub>O (60:40, v/v) to give quercetin 7-O-methylester (**4**) (4.8 mg, t<sub>R</sub> 28 min). Fraction E<sub>5</sub> (301.4 mg) was chromatographed by semi-preparative HPLC using MeOH–H<sub>2</sub>O (45:55, v/v) to obtain spinacetin 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**6**) (13.4 mg, t<sub>R</sub> 23 min).

A part of *n*-butanol extract (B) (10 g) was subjected to silica gel column chromatography eluted with CHCl<sub>3</sub>/MeOH step gradients to yield four fractions from B (B<sub>1</sub>–B<sub>4</sub>). Fractions B<sub>1</sub> (345.3 mg), B<sub>2</sub> (380.2 mg), and B<sub>3</sub> (231.7 mg) were separately chromatographed by semi-preparative HPLC using MeOH: H<sub>2</sub>O (35:65, v/v) as eluent to give compound (**7**) (6.2 mg, t<sub>R</sub> 12 min) and (**8**) (2.1 mg, t<sub>R</sub> 18 min), and roseoside (**9**) (1.0 mg, t<sub>R</sub> 21 min) from B<sub>1</sub>, 9 $\alpha$ -hydroxypartenolide (**1**) (1.6 mg, t<sub>R</sub> 26 min) from B<sub>2</sub>, and spinacetin 3-O-rutinoside (**10**) from B<sub>3</sub> (3.6 mg, t<sub>R</sub> 42 min). Fraction B<sub>4</sub> (86.4 mg) was purified by semi-preparative HPLC using MeOH:H<sub>2</sub>O (20:80, v/v) as mobile phase to obtain 5-O-feruloyl-quinic acid (**11**) (2.4 mg, t<sub>R</sub> 10 min) and 9 $\beta$ -hydroxypartenolide (**2**) (2.6 mg, t<sub>R</sub> 20 min). All of the compounds met the criteria of  $\geq$  95% purity, as inferred by HPLC and NMR analyses.

Compound **3**: white amorphous powder; +10.3 (c 0.02, MeOH); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$  (ppm): 5.96 (1 H, ddd, *J* = 17.5, 10.8, 5.5 Hz, H-2), 5.66 (1 H, dt, *J* = 15.7, 8.6 Hz, H-5), 5.58 (1 H, d, *J* = 15.7 Hz, H-6), 5.51 (1 H, t, *J* = 13.8, 6.5 Hz, H-10), 5.21 (1 H, dd, *J* = 17.5, 1.0 Hz, H-1), 5.04 (1 H, dd, *J* = 10.8, 1.0, H-1), 3.92 (2 H, brs, H-12), 2.28 (1 H, m, H-4), 2.09 (1 H, m, H-9), 1.66 (3 H, s, H-13), 1.56 (1 H, m, H-8), 1.28 (3 H, s, H-14), 1.25 (3 H, s, H-15); <sup>13</sup>C NMR (600 MHz, CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$  (ppm): 148.1 (C-2), 146.2 (C-6), 135.4 (C-11), 126.6 (C-10); 123.9 (C-5), 112.0 (C-1), 74.1 (C-1), 72.8 (C-7), 68.7 (C-12), 45.9 (C-4), 42.9 (C-8), 27.7 (C-14), 27.1 (C-15), 23.1 (C-9), 13.6 (C-13); HRESIMS: *m/z* 253.1816 [M-H]<sup>-</sup> (calcd. for C<sub>15</sub>H<sub>26</sub>O<sub>3</sub>, *m/z* 253.1948).

Compound **7**: white amorphous powder; -49.6 (c 0.09, MeOH); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$  (ppm): 5.59 (1 H, dd, *J* = 12.2, 1.1 Hz, H-1), 4.40 (1 H, dd, *J* = 9.0, 2.0 Hz, H-9), 4.12 (1 H, d, *J* = 7.5 Hz, Glc-1), 4.05 (1 H, t, *J* = 8.2 Hz, H-6), 3.90 (1 H, dd, *J* = 12.0, 3.0, Glc-6a), 3.69 (1 H, dd, *J* = 12.0, 4.5 Hz, Glc-6b), 3.33 (1 H, m, Glc-5), 3.31 (1 H, m, Glc-4), 3.24 (1 H, dd, *J* = 9.0, 7.5 Hz, Glc-2), 3.19 (1 H, t, *J* = 9.0, Glc-3), 2.82 (1 H, d, *J* = 8.6 Hz, H-5), 2.62 (1 H, dddd, *J* = 13.3, 12.6, 5.0, 4.6 Hz, H-2), 2.51 (1 H, m, H-11), 2.24 (1 H, m, H-2), 2.15 (3 H, m, H-3, H-7, H-8), 2.02 (1 H, m, H-8), 1.77 (3 H, s, H-14), 1.39



(3 H, s, H-15), 1.29 (3 H, d,  $J=6.9$  Hz, H-13), 1.25 (1 H, m, H-3);  $^{13}\text{C}$  NMR (600 MHz,  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ )  $\delta$  (ppm): 180.0 (C-12), 135.5 (C-10), 130.2 (C-1), 99.8 (Glc-1), 83.8 (C-9), 82.4 (C-6), 77.9 (Glc-5), 77.7 (Glc-3), 74.6 (Glc-2), 71.6

(Glc-4), 66.9 (C-5), 62.6 (C-4), 62.5 (Glc-6), 49.3 (C-7), 42.8 (C-11), 36.9 (C-3), 36.3 (C-8), 23.9 (C-2), 17.2 (C-15), 12.6 (C-13), 10.9 (C-14); HRESIMS:  $m/z$  427.1971  $[\text{M}-\text{H}]^-$  (calcd. for  $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_9$ ,  $m/z$  427.1980).

Compound **8**: white amorphous powder; -12.5 (c 0.11, MeOH);  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ )  $\delta$  (ppm); 5.73 (1 H, dd,  $J=12.0, 1.8$  Hz, H-1), 5.42 (1 H, d,  $J=7.4$  Hz, Glc-1), 4.35 (1 H, dd,  $J=6.0, 1.0$  Hz, H-9), 4.04 (1 H, d,  $J=8.9$  Hz, H-6), 3.82 (1 H, dd,  $J=12.1, 3.0$  Glc-6a), 3.69 (1 H, dd,  $J=12.1, 4.4$  Hz, Glc-6b), 3.39 (1 H, t,  $J=8.9$ , Glc-3), 3.31 (2 H, m, Glc-5 and Glc-4), 3.30 (1 H, dd,  $J=9.0, 7.4$  Hz, Glc-2), 2.91 (1 H, d,  $J=8.9$  Hz, H-5), 2.68 (1 H, m, H-7), 2.56 (1 H, dddd,  $J=12.8, 12.6, 4.8$  Hz, H-2), 2.45 (1 H, m, H-11), 2.33 (1 H, m, H-8), 2.22 (1 H, m, H-2), 2.14 (1 H, m, H-3), 1.96 (1 H, m, H-8), 1.75 (3 H, s, H-14), 1.36 (3 H, s, H-15), 1.28 (3 H, d,  $J=6.9$  Hz, H-13), 1.25 (1 H, m, H-3);  $^{13}\text{C}$  NMR (600 MHz,  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ )  $\delta$  (ppm): 180.3 (C-12), 135.0 (C-10), 124.1 (C-1), 100.8 (Glc-1), 82.9 (C-6), 77.9 (Glc-5), 77.6 (Glc-3), 77.0 (C-9), 75.2 (Glc-2), 71.1

(Glc-4), 67.0 (C-5), 62.8 (C-4), 62.6 (Glc-6), 42.6 (C-7), 42.6 (C-11), 37.5 (C-3), 32.8 (C-8), 24.3 (C-2), 16.9 (C-15), 16.3 (C-14), 13.1 (C-13); HRESIMS:  $m/z$  427.1971  $[\text{M}-\text{H}]^-$  (calcd. for  $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_3$ , 427.1979).

### 3.4. Acid hydrolysis of compounds 7–8

A solution of each compound (2.0 mg) in 1 N HCl (1 mL) was stirred at 80 °C in a stoppered reaction vial for 4 h. After cooling, the solution was evaporated under a stream of  $\text{N}_2$ . The residue was dissolved in 1-(trimethylsilyl)imidazole and pyridine (0.2 mL), and the solution was stirred at 60 °C for 5 min. After drying the solution, the residue was partitioned between  $\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{CHCl}_3$  and analyzed by GC using the conditions elsewhere reported (Bechlem et al. 2017)

### 3.5. Cytotoxicity assay

#### 3.5.1. Cells and treatment

HCT116, DLD1, and HDFa cell lines were cultured as previously reported (Aïssaoui et al. 2018). Stock solutions of extracts or compounds (5 mg/mL) in DMSO were stored in the dark at 4 °C. Appropriate dilutions were prepared in culture medium immediately prior to use. In all experiments, the final concentration of DMSO did not exceed 0.15% (v/v).

#### 3.5.2. Cell viability

Cells were seeded in 96-well plates and incubated for the established times in the absence (vehicle only) and in the presence of different concentrations of extracts (1.00–0.050 mg/mL) or compounds (1.0–0.1 mg/mL). The day before treatments, cells were seeded at a cell density of  $1 \times 10^4$  cells/well. The number of viable cells was quantified by MTT assay (Esposito et al. 2017). Half maximal inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) values were calculated from cell viability dose–response curves with GraphPad

Software and defined as the concentration resulting in 50% inhibition in cell survival as compared to controls. Each experimental condition was tested once in triplicate.

### 3.6. Statistical analysis

All results are shown as mean  $\pm$  standard deviation of three independent experiments each performed in triplicate. Statistical analysis was performed by a combination of Student's t test results for each pair of conditions. A value of  $P < 0.05$  was considered as statistically significant.

## 4. Conclusions

The carried out research led to isolate the main secondary metabolites from the aerial parts of *A. graveolens* identifying three new natural sesquiterpenoids (**3**, **7-8**). Moreover, a weak cytotoxic potential of extracts and pure compounds on cancer cell lines was demonstrated.

### Supplemental data

HRESIMS,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, HSQC, HMBC,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, 2D-ROESY spectra, and  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compounds **3**, **7-8** are available online.

### Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

## References

- Aïssaoui H, Mencherini T, Esposito T, De Tommasi N, Gazzero P, Benayache S, Benayache F, Mekkiou R. 2018. *Heliotropium bacciferum* Forssk. (Boraginaceae) extracts: chemical constituents, antioxidant activity and cytotoxic effect in human cancer cell lines. *Nat Prod Res.* 6419: 1–6.
- Aksira M, Mellouki F, Salhi A, Alilou H, Saouf A, El Hanbali F, Arteaga JF, Barrero AF. 2006. Naupliolide, a sesquiterpene lactone with a novel tetracyclic skeleton from Nauplius *graveolens* subsp. *odorus*. *Tetrahedron Lett.* 47(38):6719–6721.
- Bechlem H, Mencherini T, Bouheroum M, Benayache S, Cotugno R, Braca A, De Tommasi N. 2017. New constituents from *gymnocarpus decander*. *Planta Med.* 83(14–15):1200–1206.
- Bertrand C, Fabre N, Moulis C. 2001. Constituents of *Pilocarpus trachylophus*. *Fitoterapia.* 72(7): 844–847.
- Bhakuni DS, Joshi PP, Uprety H, Kapil RS. 1974. Roseoside-A C13 glycoside from *Vinca Rosea*. *Phytochemistry.* 13(11):2541–2543.
- Dokli I, Navarini L, Hameršak Z. 2013. Syntheses of 3-, 4-, and 5-O-feruloylquinic acids. *Tetrahedron Asymmetry.* 24(13–14):785–790.
- Esposito T, Sansone F, Franceschelli S, Del Gaudio P, Picerno P, Aquino RP, Mencherini T. 2017. Hazelnut (*Corylus avellana* L.) shells extract: phenolic composition, antioxidant effect and cytotoxic activity on human cancer cell lines. *Int J Mol Sci.* 18(2):392–404.
- Ezzat MI, Ezzat SM, El Deeb KS, El Fishawy AM, El-Toumy SA. 2016. A new acylated flavonol from the aerial parts of *Asteriscus maritimus* (L.) Less (Asteraceae). *Nat Prod Res.* 30(15):1753–1761.

- Guo T, Tan SB, Wang Y, Chang J. 2018. Two new monoterpenoid glycosides from the fresh rhizome of Tongling White Ginger (*Zingiber officinale*). *Nat Prod Res.* 32(1):71–76.
- Hammoud L, León F, Brouard I, Gonzalez-Platas J, Benayache S, Mosset P, Benayache F. 2018. Humulene derivatives from Saharian *Asteriscus graveolens*. *Tetrahedron Lett.* 59(27):2668–2670.
- Harvala E, Aligiannis N, Skaltsounis AL, Pratsinis H, Lambrinidis G, Harvala C, Chinou I. 2002. Cytotoxic germacranolides from *Inula verbascifolia* subsp. *Methanea*. *J Nat Prod.* 65(7): 1045–1048.
- Lee E, Moon BH, Park Y, Hong S, Lee S, Lee Y, Lim Y. 2008. Effects of hydroxy and methoxy substituents on NMR data in flavonols. *Bull Korean Chem Soc.* 29:507–510.
- Merfort I, Wendisch D. 1987. Flavonoid glycosides from *Arnica montana* and *Arnica chamissonis*. *Planta Med.* 53(5):434–437.
- Parodi FJ, Nauman M, Fischer A, Nikolaus H. 1987. Complete carton-13 assignments of the sesquiterpene lactone 11,13-dihydroparthenolide using 2D-inadequate. *Spectrosc Lett.* 20(5): 445–450.
- Ruangrungsi N, Rivepiboon A, Lange GL, Decicco CP. 1988. Constituents of *paramichelia baillonii*. three new germacranolides. *J Nat Prod.* 51(1):163–167.
- Sarg TM, El-Dahmy SI, Ateya AM, Abdel-Fattah HA. 1994. Two new bisabolone hydroperoxides and biological activity of *Asteriscus graveolens*. *Fitoterapia.* 65(3), 241–244.
- Sattar EA, Galal AM, Mossa GS. 1996. Antitumor germacranolides from *Anvillea garcinii*. *J Nat Prod.* 59:403–405.
- Tayeh Z, Dudai N, Schechter A, Chalifa-Caspi V, Barak S, Ofir R. 2018. Molecular mode of action of *asteriscus graveolens* as an anticancer agent. *Int J Mol Sci.* 19(8):2162.
- Zdero C, Bohlmann F. 1989. Sesquiterpene lactone and other terpenes from *Geigeria* species. *Phytochemistry.* 28(11):3105–3120.
- Ziani BEC, Calhelha RC, Barreira JCM, Barros L, Hazzit M, Ferreira I. 2015. Bioactive properties of medicinal plants from the Algerian flora: selecting the species with the highest potential in view of application purposes. *Ind Crops Prod.* 77:582–589.

**Acta Scientifica Naturalis**

Former Annual of Konstantin Preslavsky University – Chemistry, Physics, Biology, Geography  
Journal homepage: [asn.shu.bg](http://asn.shu.bg)

**Chemical Composition of the Essential Oil of Aerial Parts of *Thymus ciliatus* (Desf.)**

**Hanane Achoub<sup>1</sup>, Lahcene Zaiter<sup>1</sup>, Fadila Benayache<sup>1\*</sup>, Samir Benayache<sup>1</sup>, Jean Claude Chalchat<sup>2</sup>, Pierre Chalard<sup>3</sup>, Gilles Figueredo<sup>4</sup> and Salah Akkal<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Unité de Recherche: Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques. Université Frères Mentouri, Constantine 1, Route d'Aïn El Bey, 25000, Constantine, Algérie.*

<sup>2</sup>*AVAHEA, La Laye 7, 63500 Saint Babel, France.*

<sup>3</sup>*Université Clermont Auvergne, CNRS, SIGMA Clemen, ICCF, F-63000 Clermont–Ferrand, France.*

<sup>4</sup>*Laboratoire d'Analyses des Extraits Végétaux et des Arômes (LEXVA Analytique), 460 Rue du Montant, 63110 Beaumont, France.*

**Abstract:** *The essential oil of the aerial parts of *Thymus ciliatus* (Desf.) belonging to the Lamiaceae family, was obtained by steam distillation and analyzed by GC-FID and GC-MS. 75 components were identified corresponding to 95.57% of the total oil. The major constituents of the oil were: elemol (6.80%), carvacrol (5.86%),  $\gamma$ -muurolene (5.18%),  $\beta$ -sesquiphellandrene (5.09%), bicyclogermacrene (5.04%),  $\beta$ -pinene (4.49%) and curcumene (4.20%), together with other compounds at relatively low levels: 1,8-cineol (3.66%),  $\beta$ -eudesmol (2.92%),  $\beta$ -bisabolene (2.81%),  $\beta$ -silinene (2.75%), camphor (2.64%), germacrone (2.34%),  $\alpha$ -zingiberene (2.12%),  $\delta$ -cadinene (2.08%), caryophyllene oxide (1.90%), spathulenol (1.88%),  $\square$ -caryophyllene (1.88%), ar-turmerone (1.79%),  $\alpha$ -pinene (1.52%), limonene (1.52%), selina-4,11-diene (1.46%), curzerenone (1.41%), germacrone B (1.37%), bornyl acetate (1.31%),  $\beta$ -farnesene (1.28%), borneol (1.23%), myrtenal (1.16%), zingiberenol (1.15%) and sabinene (1.13%). These results differ from those of previous studies reported on this species collected from other regions of Algeria and Morocco.*

**Keywords:** *Thymus ciliatus* (Desf.), Lamiaceae, Essential oil composition.

**Introduction**

The Lamiaceae or Labiatae are a family of flowering plants with a cosmopolitan distribution containing about 236 genera and has been stated to contain 6900 to 7200 species [1]. In Algerian flora, the genus *Thymus* from this

family has 12 species from which 9 are endemic [2]. *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. which is an endemic species for North Africa, includes three sub-species: ssp. *eu-ciliatus* Maire, ssp. *coloratus* (Boiss. et Reut.) Batt. and ssp. *munbyanus* (Boiss. et Reut.) Batt. Many *Thymus* species are used in various regions of the world in the treatment of bronchial, pulmonary, digestive and urinary infections and possess spasmolytic, antitussive and expectorant properties [3]. The essential oils of several species of thyme have already proved their antibacterial and antifungal properties [4-7]. In continuation of our studies on *Thymus* species [8, 9], we report herein, our results concerning the chemical composition of the essential oil of the aerial parts of *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. collected from the area of M'Sila, which were different from those previously reported on this species [10-17].

## **Materials and Methods**

### *Plant Material*

The aerial parts of *T. ciliatus* (Desf.) were collected from M'Sila (GPS coordinates in DMS: 35°42'20.99" N 4°32'30.98" E) on April 2013 and authenticated on the basis of Quezel and Santa (1963) [2] by professor Mohamed Kaabeche, Université Ferhat Abbas, Setif 1, Setif, Algeria. A voucher has been deposited in the Herbarium of the Research Unit VARENBIOMOL, Université Frères Mentouri-Constantine 1, Algeria.

### *Extraction of the essential oil*

The aerial parts of *Thymus ciliatus* (Desf.) were subjected to steam distillation in a Kaiser Lang apparatus for three hours. The obtained essential oil was collected and dried over anhydrous sodium sulphate and kept at 4°C until analysis. The yield of the oil was calculated in relation of the dry weight of the plant.

### *GC-FID Analysis*

The essential oil was analyzed on an Agilent gas chromatograph (GC-FID) Model 6890, equipped with a HP-5MS fused silica capillary column (5%-diphenyl-95%- dimethylpolysiloxane, 25 m x 0.25 mm, film thickness 0.25 µm), programmed from 50°C (5 min) to 250 °C at 3°/min and held for 10 min. Injector and flame ionization detector temperatures were 280 and 300 °C, respectively. The essential oil was diluted in acetone (3.5%, v/v) and injected in split mode (1/60), helium was used as a carrier gas (1.0 mL/min). Solutions of standard alkanes (C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>) were analyzed under the same conditions to calculate retention indices (RI) with Van del Dool and Kratz equation.

### *GC-MS Analysis*

Mass spectrometry was performed on an Agilent gas chromatograph - mass spectrometer (GC-MS) Model 7890/5975, equipped with HP-5MS capillary column (25 m x 0.25 mm, film thickness 0.25  $\mu\text{m}$ ) programmed with the same conditions as for GC-FID. The mass spectrometer (MS) ionization was set in positive electron impact mode at 70 eV and electron multiplier was set at 2200 V. Ion source and MS quadrupole temperatures were 230  $^{\circ}\text{C}$  and 180  $^{\circ}\text{C}$ , respectively. Mass spectral data were acquired in the scan mode in the  $m/z$  range 33-450. The essential oil constituents were identified by matching their mass spectra and retention indices (RI) with those of reference compounds from libraries such as Adams [18] and Mc Lafferty & Stauffer [19]. The proportions of the identified compounds were calculated by internal normalization.

## Results and Discussion

The yield of steam distillation was 0.46% (w/w) in relation to the dry weight of the plant. A total of 75 constituents were determined which account for about 95.57% of the essential oil of *Thymus ciliatus* (Desf.). The identified components (Table 1) are listed in order of their experimental retention times and retention indices. The major constituents of the oil were: elemol (6.80%), carvacrol (5.86%),  $\gamma$ -muurolene (5.18%),  $\beta$ -sesquiphellandrene (5.09%), bicyclogermacrene (5.04%),  $\beta$ -pinene (4.49%) and curcumene (4.20%) together with other compounds at relatively low levels: 1,8 -cineol (3.66%),  $\beta$ -eudesmol (2.92%),  $\beta$ -bisabolene (2.81%),  $\beta$ -silinene (2.75%), camphor (2.64%), germacrone ( 2.34%),  $\alpha$ -zingiberene (2.12%),  $\delta$ -cadinene (2.08%), caryophyllene oxide (1.90%), spathulenol (1.88%),  $\square$ -caryophyllene (1.88%), ar-turmerone (1.79%),  $\alpha$ -pinene (1.52%) , limonene (1.52%), selina-4,11-diene (1.46%), curzerenone (1.41%), germacrone B (1.37%), bornyl acetate (1.32%),  $\beta$ -farnesene (1.28%), borneol (1.23%), myrtenal (1.16%), zingiberenol (1.15%) and sabinene (1.13%).

**Table 1.** Composition of the essential oil of *Thymus ciliatus* (Desf.)

PK	<sup>b</sup> RT	<sup>b</sup> RI	<sup>a</sup> Components	%
1	5.937	923	$\alpha$ -Thujene	0.15
2	6.108	931	$\alpha$ -Pinene	1.52
3	6.308	947	Camphene	0.39
4	6.579	951	Thuja-2,4(10)-diene	0.10
5	7.028	971	Sabinene	1.13
6	7.143	976	$\beta$ -Pinene	4.49
7	7.410	987	Myrcene	0.98
8	8.019	1014	$\alpha$ -Terpinene	0.15
9	8.201	1023	<i>ortho</i> -Cymene	0.40
10	8.299	1027	Limonene	1.52

11	8.370	1031	1,8 -Cineol	3.66
12	8.660	1044	$\beta$ -Ocimene	0.38
13	8.922	1056	$\gamma$ -Terpinene	0.21
14	9.198	1069	<i>cis</i> -Sabinene hydrate	0.20
15	9.487	1082	Terpinolene	0.07
16	9.811	1097	Linalool	0.40
17	9.941	1104	NI	0.13
18	10.362	1125	$\alpha$ -Campholenal	0.28
19	10.606	1138	Nopinone	0.10
20	10.661	1141	<i>trans</i> -Pinocarveol	0.64
21	10.760	1146	<i>trans</i> -Verbenol	0.94
22	10.791	1147	Camphor	2.64
23	1.982	1157	Sabina ketone	0.14
24	11.073	1162	Pinocarvone	0.56
25	11.281	1172	Borneol	1.23
26	11.432	1180	Terpinen-4-ol	0.42
27	11.567	1187	<i>p</i> -Cymen-8-ol	0.18
28	11.719	1195	Myrtenal	1.16
29	11.942	1207	Verbenone	0.43
30	12.158	1219	<i>trans</i> -Carveol	0.23
31	12.317	12228	NI	0.11
32	12.610	1244	Carvone	0.22
33	13.320	1283	Bornyl acetate	1.32
34	13.628	1300	Carvacrol	5.86
35	14.146	1331	Bicycloelemene	0.28
36	14.389	1345	$\delta$ -Elemene	0.18
37	14.683	1362	Carvacrol acetate	0.06
38	14.901	1375	$\alpha$ -Copaene	0.43
39	14.994	1381	$\alpha$ -Elemene	0.03
40	15.042	1384	$\beta$ -Bourbonene	0.38
41	15.122	1388	$\beta$ -Elemene	0.79

42	15.307	1399	Sesquithujene	0.63
43	15.423	1409	NI	0.14
44	15.645	1420	□-Caryophyllene	1.88
45	15.765	1428	γ-Elemene	0.22
46	15.804	143	β-Copaene	0.12
47	15.863	1434	α-Guaiene	0.15
48	16.114	1450	β-Farnesene	1.29
49	16.221	1457	α-Humulene	0.52
50	16.288	1461	□-Caryophyllene	0.56
51	16.450	1471	Aristolochene	0.17
52	16.486	1473	Selina-4,11-diene	1.46
53	16.607	1481	Curcumene	4.20
54	16.644	1483	γ-Muurolene	5.18
55	16.691	1486	NI	0.81
56	13.952	1491	β-Silinen	2.75
57	16.804	1493	α-Zingiberene	2.12
58	16.864	1497	Bicyclogermacrene	5.04
59	17.000	1506	β-Bisabolene	2.81
60	17.111	1513	γ-Cadinene	0.36
61	17.175	1518	δ-Cadinene	2.08
62	17.264	1524	β-Sesquiphellandrene	5.09
63	17.561	1543	α-Calacorene	0.32
64	17.674	1551	Elemol	6.80
65	17.824	1561	Germacrone B	1.37
66	18.101	1579	Spathulenol	1.88
67	18.188	1585	Caryophyllene oxide	1.90
68	18.38	1598	<i>trans</i> -β-Elementone	0.15
69	18.419	1601	Curzerenone	1.41
70	18.515	1607	NI	0.23
71	18.605	1614	Zingiberenol	1.15
72	18.851	1631	NI	0.36



73	18.894	1634	$\gamma$ -Eudesmol	0.75
74	19.03	1644	$\alpha$ -Muurolol	0.22
75	19.058	1645	<i>epi</i> - $\alpha$ -Muurolol	0.19
76	19.245	1659	$\beta$ -Eudesmol	2.92
77	19.309	1663	<i>ar</i> -Turmerone	1.79
78	19.663	1688	NI	0.90
79	19.768	1695	Germacrone	2.34
80	19.84	1701	NI	0.78
81	20.407	1742	(6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> )-Bisabolene	0.84
82	20.467	1747	NI	0.91
83	20.651	1761	Aristolone	0.20
84	21.651	1836	2-Pentadecanone-6,10,14-trimethyl	0.46
<b>Total</b>				<b>95.57</b>
<b>identified</b>				<b>4.37</b>
<b>Not identified</b>				

<sup>a</sup>Compounds are listed in order of their RI

<sup>b</sup>RI (retention index) measured relative to *n*-alkanes (C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>) using HP-5MS

NI: not identified

The comparison of our results with literature data shows important qualitative and quantitative differences in compositions. Indeed, *T. ciliatus*, growing in Batna (Eastern Algeria) was characterized mainly by thymol (79.1%) and *p*-cymene (5.6%) [10]. Thymol (44.2%),  $\beta$ -E-ocimene (25.8%) and  $\alpha$ -terpinene (12.3%) were mainly found in the essential oil of *T. ciliatus* growing in Azrou (89 km south of Fes), Morocco [11]. Other studies reported that essential oil of *T. ciliatus*, collected from Guelma (northeastern Algeria) was dominated by thymol (62.41%), *p*-cymene (15.51%) and carvacrol (6.12%) [20]. On the other hand, essential oil of *T. ciliatus* collected from Ain Mlila in the wilaya of Oum El Bouaghi (Eastern Algerian) was reported to contain thymol (54.98%),  $\gamma$ -terpinene (11.33%), *p*-cymene (6.66%) and carvacrol (4.96%) as dominant compounds [21]. Moreover, *Thymus ciliatus* growing in Imilchil (High Atlas of Morocco) contained as most representative components: carvacrol (26.2%), *p*-cymene (19.6%), thymol (17.3%) and  $\gamma$ -terpinene (14.6%) [22]. We also note that the chemical composition of the essential oil of *T. ciliatus* growing in Remchi, wilaya of Tlemcen in the north west of Algeria, gave a similar profile: carvacrol (80.3%) and *p*-cymene (6.1%) [16]. Thus, the results obtained in this study revealed significant differences in the composition of the essential oil compared with previous studies which were high-thymol chemotypes. Indeed, the present essential oil is characterized by the presence of elemol (6.80%),  $\gamma$ -muurolene

(5.18%),  $\beta$ -sesquiphellandrene (5.09%) and bicyclogermacrene (5.04%) which have not been found in any reported essential oil of *T. ciliatus*. The variations in the chemical composition of the essential oils from the qualitative and quantitative point of view, may be due to certain ecological factors, to the part of the plant used, to the age of the plant and to the period of the vegetative cycle or even genetic factors [23-26].

## Conclusion

The essential oil of *Thymus ciliatus* (Desf.), collected from M'Sila Algeria is characterized by the main presence of Elemol (6.80%), carvacrol (5.86%),  $\gamma$ -muurolene (5.18%),  $\beta$ -sesquiphellandrene (5.09%), bicyclogermacrene (5.04%),  $\beta$ -Pinene (4.49%) and curcumene (4.20%) as major components. It is interesting to note that the chemical composition of the present essential oil differs from those reported in the literature. Our chemotype is exclusively characterized by high level of elemol,  $\gamma$ -muurolene  $\beta$ -sesquiphellandrene and bicyclogermacrene which have not been found in any reported essential oil of *T. ciliatus*. These variations may be explained by the different climates, seasons, geographic and soil conditions as well as altitude differences and harvest periods of the plant.

## Acknowledgements

We are grateful to professor Mohamed Kaabeche (Setif 1 University, Algeria) for the identification of the plant material and MESRS (DGRSDT) for financial support.

## Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

## References

- [1]. Stahl-Biskup, E.; Saez, F., „Thyme. The genus *Thymus*“. London; New York, USA: *Taylor & Francis*, **2002**.
- [2]. Quezel, A.; Santa, S., „Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales“. Tome II, Editions du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, France, **1963**.
- [3]. Evans, W.C., „Pharmacognosy Bailliere Tindall“, London, UK **1998**.
- [4]. Pellecier, J.; Jacob, M.; Simeon de Buechberg, M.; Allegrini, J., „Therapeutic value of the cultivated mountain savory (*Satureia montana* L.)“, *Acta Horti*, **1980**, *96*, 35-39.
- [5]. Benjilali, B.; Hammouni, M.; M'Hamedi, A.; Richard, H., „Essential oil composition of different Moroccan thyme varieties: principal component analysis“, *Sci Aliments*, **1987a**, *7*, 275-299.
- [6]. Benjilali, B.; Hammouni, M.; Richard, H., „Chemical polymorphism of Moroccan thyme essential oils: compounds characterization“, *Sci Aliments*, **1987b**, *7*, 77-91.

- [7]. Agnihotri, S.; Vaidy, A.D.B., „A novel approach to study antibacterial properties of volatile components of selected Indian medicinal herbs“, *Indian J Exp. Biol.*, **1996**, 34(7), 712-715.
- [8]. Boutaoui, N.; Zaiter, L.; Benayache, F.; Benayache, S.; Carradori, S.; Cesa, S.; Giusti, A.M.; Campestre, C.; Menghini, L.; Innosa, D.; Locatelli, M., „Qualitative and quantitative phytochemical analysis of different extracts from *Thymus algeriensis* aerial parts“, *Molecules*, **2018**, 23, 463; doi:10.3390/molecules23020463.
- [9]. Benayache, F.; D'Ambola, M.; Cotugno, R.; Chaouche, M.; Benayache, S.; Benayache, F.; Braca, A., De Tommasi, N., „A new triterpene glucoside from *Genista numidica*“, *Natural Product Communications*, **2018**, 13 (9), 1101-1104.
- [10]. Kabouche, A.; Ghannadi, A.; Kabouche, Z., „*Thymus ciliatus* the highest thymol containing essential oil of the genus“, *Nat Prod Commun*, **2009**, 4(9), 1251-1252.
- [11]. Amarti, F.; Satrani, B.; Ghanmi, M.; Farah, A.; Aafi, A.; Aarab, L.; El Ajjouri, M.; Chaouch, A., „Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc Biotechnol.“, *Agron. Soc. Environ.*, **2010**, 14(1), 141-148.
- [12]. Ajjouri, M.; Ghanmi, M.; Satrani, B.; Amarti, F.; Rahouti, M.; Aafi, A.; Ismaili, MR.; Farah, A., „Composition chimique et activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. contre les champignons de pourriture du bois“, *Acta Bot. Gallica*, **2010**, 157 (2), 285-294.
- [13]. Heni, S.; Bennadja, S.; Djahoudi, A., „Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Thymus ciliatus* growing wild in North Eastern Algeria“, *J App Pharm Sci*, **2015**, 5(12), 056-060.
- [14]. Hazzit, M.; Baaliouamer, A.; Verissimo, A.R.; Faleiro, M.L.; Miguel, M.G., „Chemical composition and biological activities of Algerian *Thymus* oils“, *Food Chem*, **2009**, 116, 714–721.
- [15] Hazzit, M.; Baaliouamer, A.; Faleiro, M.L.; Miguel, M.G., „Composition of the essential oils of *Thymus* and *Origanum* species from Algeria and their antioxidant and antimicrobial activities“, *J Agric Food Chem*, **2006**, 54, 6314–21.
- [16]. Bousmaha-Marroki, L.; Atik-Bekkara, F.; Tomi, F.; Casanova, J., „Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. ssp. *eu-ciliatus* maire from Algeria“, *J Essent Oil Res*, **2007**, 19, 490–493.
- [17]. Touhami, A.; Chefrou, A.; Boukhari, A.; Ismail F., “Comparative study of chemical compositions and antimicrobial effect of different genius of *Thymus* harvested during two period of development”, *J App Pharm Sci*, **2016**, 6 (8), 51-56.
- [18]. Adams, R.P., “ Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy“, Allured Publishing Co. Carol Stream, Illinois, **1995**.
- [19]. Mc Lafferty, F.W.; Stauffer, D.B., „The Wiley/NBS registry of mass spectral data. 5<sup>th</sup> Edition, J. Wiley and Sons, New York, **1991**.

- [20]. Ksouri, S.; Djebir, S.; Bentorki, A.A.; Gouri, A.; Hadeif, Y.; Benakhla, A., “Antifungal activity of essential oils extract from *Origanum floribundum* Munby, *Rosmarinus officinalis* L. and *Thymus ciliatus* Desf. Against *Candida albicans* isolated from bovine clinical mastitis”, *J Mycol Med.* **2017**, *27*, 245-249.
- [21]. Ghorab, H.; Kabouche, A.; Semra, Z.; Ghannadi, A.; Sajjadi, E.B.; Touzani, R.; Kabouche, Z., “Biological activities and compositions of the essential oil of *Thymus ciliatus* from Algeria”, *Der Pharm Lett*, **2013**, *5*, 28-31.
- [22]. Alaoui Jamali, C.; El Bouzidi, L.; Bekkouche, K.; Lahcen, H.; Markouk, M.; Wohlmuth, H.; Leach, D.; Abbad, A.,” Chemical composition and antioxidant and anticandidal activities of essential oils from different wild Moroccan *Thymus* species”, *Chem. Biodiv*, **2012**, *9*, 1188-1197.
- [23]. Kokkini, S.; Karousou, R.; Dardioti, A.; Krigas, N.; Lanaras, T., „Autumn essential oils of Greek oregano“, *Phytochemistry*, **1997**, *44*(5), 883-886.
- [24]. Senatore, F., „Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of a thyme (*Thymus pulegioides* L.) growing wild in Campania (Southern Italy)“, *J Agric Food Chem*, **1996**, *44*, 1327-1332.
- [25]. Russo, M.; Galletti, G.C.; Bocchini, P.; Carnacini, A., „Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link)): a preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis“, *J Agric Food Chem*, **1998**, *46*, 3741-3746.
- [26]. Thompson, J.D.; Chalchat, J.C.; Michet, A.; Linhart, Y.B.; Ehlers, B., „Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotype“, *J Chem Ecol*, **2003**, *29*(4), 859-880.