

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et la Recherche Scientifique

UNIVERSITE CONSTANTINE 1
FACULTE DES SCIENCES EXACTES

N° de série.....

N°d'ordre.....

DEPARTEMENT DE CHIMIE

MEMOIRE

Présentée en vue de l'obtention du grade de

MAGISTER

En chimie organique

Option chimie structurale : synthèse organique et substances naturelles

<p style="font-size: 1.2em;">Etude phytochimique et biologique de <i>l'espèce <i>Thymus numidicus</i> Poiret</i></p>
--

Sous la direction du professeur :

M^f BENAYACHE Samir

Par :

M^{elle} BENAYACHE Feryal

Devant le jury :

M^{me} F. BENAYACHE

Pr. Univ. Constantine 1

Présidente

M^f S. BENAYACHE

Pr. Univ. Constantine 1

Rapporteur

M^{elle} R. MEKKIOU

Pr. Univ. Constantine 1

Examinatrice

M^f M. BOUHEROUM

M.C. Univ. Constantine 1

Examinateur

M^f L.ZAITER

M.C. Univ. Constantine 1

Examinateur

Avril 2013

Dédicace

**A mes très chers parents*

**A mes chers frères et sœurs*

** A toute ma famille et tous mes amis*

Je dédie ce modeste travail.

Remerciements

Ce travail a été réalisé au laboratoire de valorisation des ressources naturelles et synthèse de substances biologiquement actives, faculté des Sciences Exactes, Université de Constantine, sous la direction de monsieur **Samir Benayache**, Professeur à l'université de Constantine, que je tiens à remercier pour sa gentillesse, ses conseils précieux, et sa patience qui ont permis de mener à bon terme ce travail.

Je tiens à remercier madame **Fadila Benayache**, Professeur à l'université de Constantine pour son aide, ses conseils et pour le grand honneur qu'elle me fait en acceptant de présider le jury de soutenance.

Je remercie **M. Ratiba Mekkiou** professeur à l'Université de Constantine pour sa gentillesse et pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant de juger ce travail.

Je tiens à remercier **M^f Mohamed Bouheroum**, Maître de conférences à l'université de Constantine pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie **M^f Zaiter Lahcène**, Maître de conférences à l'université de Constantine pour avoir accepté d'être membre du jury de ce mémoire.

Je remercie monsieur le Professeur **Paul Mosset** de l'école nationale de chimie de Rennes pour l'enregistrement des spectres de masse et de RMN, et monsieur le professeur **Francisco León** et monsieur **Ignacio Brouard** Professeur à l'institut des produits naturels et l'agrobiologie, université La Laguna (Espagne) pour l'enregistrement des spectres RMN.

Je tiens à remercier madame **Souad Menad** pour son aide et sa patience.

Je remercie toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail par un soutien moral ou matériel.

Abréviation

ABCG2 : ATP-binding cassette sous-famille G type 2.

AcOEt : Acétate d'éthyle.

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire.

AlCl₃ : Chlorure d'aluminium.

AS : aurone synthase.

BHE : Barrière hémato-encéphalique.

CHI : chalcone isomérase.

CHS : chalcone synthase

COX-2 : enzyme qui produit les prostaglandines impliquées dans l'inflammation)

COSY : COrelation Spectroscopy Y.

DEPT: Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer.

DFR : dihydroflavonol 4-réductase.

DPPH : Radical 1,1-Diphényl-2 picrylhydrazyl .

EGF : Epidermal Growth Factor.

ER : Récepteurs aux estrogènes.

ESI : Electrospray ionisation.

FHT : flavanone 3-hydrolase.

FLS : flavonol synthase.

FNSI/FNSII : flavone synthase.

IC₅₀ : Concentration Inhibitrice 50.

J (Hz) : Constante de couplage en Hertz.

HL-60 : Lignée de cellules leucémique.

HSQC : Heteronuclear Simple Quantum Coherence

HMBC : Heteronuclear multiple-bond correlation.

IFS : isoflavone synthase.

iNOS : Inductible nitric oxide synthase.

LCR : leucoanthocyanidin réductase.

LDOX : leucoanthocyanidin dioxygenase.

LDL : low density lipoprotein.

LOXs: lipoxygénases.

MDR : Multi-Drug Resistance.

NADH : forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide.

NADPH : forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

NF-KB: nuclear factor KB.

NO : nitric oxide.

NOESY: Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy.

P-gp : glycoprotéine P.

PPAR- γ : Peroxisome proliferator-activated receptors.

PTK : protéine kinase.

R_f : retardation factor.

RMN: résonance magnétique nucléaire.

ROESY : Rotating fram nuclear Overhauser Effect SpectroscopY.

ROS : Reactive Oxygen Species.

S: singulet.

SAMR : *Staphylococcus Aureus* résistant à la méticilline.

SM : Spectométrie de Masse.

TNF- α : tumor necrosis factor- α .

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine.

Sommaire

Introduction générale.....	01
----------------------------	----

Chapitre I : *Le genre *Thymus* et les huiles essentielles*

I-1-Introduction.....	03
I-2-Les plantes aromatiques	03
I-3- Présentation de La famille des lamiacées.....	04
I-4-Le genre <i>Thymus</i>	05
I-4-1-Distribution géographique.....	05
I-4-2-Les propriétés du Thym	07
I-4-3-Principes actifs du Thym	07
I-4-4-Caractère chimique du genre <i>Thymus</i>	07
I-5-Les huiles essentielles.....	13
I-5-1-Définition.....	13
I-5-2-Rôle physiologique	13
I-5-3-Localisation des huiles essentielles	13
I-5-4-Les méthodes d'extraction des huiles essentielles.....	14
I-5-4-1-La distillation.....	14
I-5-4-1-1-L'hydrodistillation	14
I-5-4-1-2-La distillation par entraînement à la vapeur d'eau	15
I-5-4-1-3-L'hydrodiffusion.....	15
I-5-4-2- L'hydrodiffusion assistée par micro-ondes	16
I-5-5 -La composition des huiles essentielles	16
I-5-5-1-Les composés volatils des huiles essentielles.....	16
I-5-5-2- Le chémotype.....	17
I-5-6-Les activités biologiques et antibactériennes des huiles essentielles.....	17
I-5-6-1- Toxicité	17
I-5-6-2- Activités biologiques.....	18
I-5-6-3- Activités antibactériennes	19
I-5-7-Méthodes de détermination des huiles essentielles.....	21
I-6-Conclusion.....	22

Chapitre II : *Les métabolites secondaires*

II-1-Introduction.....	23
II-2-Les terpènes.....	23
II-2-1-Définition	23
II-2-2-Classification.....	23
II-2-3-La biosynthèse des terpènes	30
II-3-Les flavonoïdes.....	33
II-3-1-Généralités.....	33
II-3-2-Structure	34
II-3-3-Classification.....	34
II-3-4-Localisation.....	35
II-3-5- La biosynthèse des flavonoïdes.....	36
II-3-6-Distribution des flavonoïdes.....	38
II-3-7-Activités biologiques des flavonoïdes	38
II-3-7-1- Activités antimicrobiennes.....	38
II-3-7-2- Activités antiparasitaires.....	41
II-3-7-3- Activités estrogéniques et anti-estrogéniques.....	43
II-3-7-4- Potentiel antioxydant.....	45
II-3-7-5- Activité antiproliférative et anticarcinogénique.....	46
II-3-7-6- Activité anti-inflammatoire.....	48
II-3-7-7- Activité sur les maladies neuro-dégénératives.....	49
II-3-7-8- Activité sur le système cardio-vasculaire.....	49
II-3-7-9- Activité insecticide.....	50
II-3-7-10-Autres activités des flavonoïdes.....	50
II-3-8-Séparation et purification.....	50
II-3-9-L'analyse structurale des flavonoïdes.....	51
II-4-Conclusion.....	58

Chapitre III : Travaux personnels

III-1-Introduction.....	59
III-2- Place dans la systématique	59
III-3- Description botanique.....	59
III-4- Les travaux antérieurs	60
III-5- Travaux personnels	61
III-5-1- Extraction de <i>Thymus numidicus</i>	61
III-5-2-Séparation chromatographique de l'extrait acétate d'éthyle	64
III-5-2-1- Séparation chromatographique sur colonne	64
III-5-2-2-Séparation et purification des fractions	66
III-6- Conclusion	69

Chapitre IV : Résultats et discussion

IV-1-Identification des composés isolés de <i>Thymus numidicus</i> (Poiret).....	71
IV-1-1- Identification du composé C.....	71
IV-1-2- Identification du composé F ₃	82
IV-1-3- Identification du composé F ₆ ≡F ₈₋₁	87
IV-1-4- Identification du composé F ₈₋₂	95
IV-1-5-Identification du composé P ₁	104
IV-1-6-Identification du composé P ₂	111
IV-2 -Evaluation de l'activité anti-radicalaire de l'extrait <i>n</i> -BuOH.....	117
IV-3-Extraction des huiles essentielles de <i>Thymus numidicus</i>	120
IV-3-1-Méthode d'extraction	120
IV-3-2-Propriétés Organoleptiques	121
IV-3-3-Analyse des huiles essentielles de <i>T.numidicus</i> par GC et GC-MS en IE.....	121
IV-3-4-Conclusion	126
Références bibliographiques.....	129
Conclusion générale.....	139

Introduction générale

Depuis toujours, les hommes ont utilisé leur environnement et en particulier les plantes pour se soigner. On estime que deux tiers des médicaments actuels ont une origine naturelle (Newmann *et al.*, 2007) : obtenus par hémi-synthèse, à partir d'un pharmacophore ou par modification d'un produit naturel, composés issus des biotechnologies, vaccins, composés d'origine végétale, microbiologique ou animale. Seul un tiers des médicaments commercialisés possède donc une origine purement synthétique.

Il y a environ près de 240 000 à 300 000 espèces de plantes à fleur sur terre. Moins de 10% de ces espèces auraient été étudiés scientifiquement pour leurs propriétés pharmacologiques (Diallo, 2000; Anthony *et al.*, 2005), ce qui fait des plantes un réservoir de molécules bioactives encore peu exploré. Les substances naturelles et les plantes en particulier représentent une immense source de chimiodiversité, avec souvent des structures très originales dont une synthèse totale et rentable (complexité structurale, stéréospécificité...) est souvent impossible à réaliser.

La flore algérienne est caractérisée par sa diversité florale : méditerranéenne, Saharienne et une flore paléo tropical, estimée à plus de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botanique. (Quezel, et Santa 1963). Parmi cette végétation, on trouve les plantes aromatiques utilisées pour l'aromatisation des aliments, les arts culinaires et les vertus médicinales.

Dans le cadre de la valorisation de la flore algérienne on s'est intéressé aux espèces de la famille des lamiacées. La plante sur laquelle a porté notre choix est une espèce de thym "*Thymus numidicus* Poiret " provenant de la région de Djebel El-Ouahch à Constantine.

Notre choix pour cet espèce est justifié par le fait que celle-ci est endémique et riche en huiles essentielles et composés phénoliques notamment les flavonoïdes connus pour leurs activités biologiques diverses.

La présentation de nos travaux peut être répartie comme suit :

Une première partie, bibliographique, Comportant deux chapitres dont :

- Le premier consacré à une présentation botanique de la famille des lamiacées, au genre *Thymus*, aux travaux phytochimiques antérieurs relatifs aux métabolites secondaires les plus courants, reporte également une bibliographie sur les huiles essentielles.

- Le deuxième consacré à l'étude bibliographique des métabolites secondaires (terpènes et flavonoïdes).

Une deuxième partie, expérimentale, consacrée à la présentation de nos travaux personnels, comporte :

- Un troisième chapitre consacré à l'étude phytochimique de l'espèce.

- Un quatrième chapitre consacré à la discussion des résultats obtenus, l'étude de la composition chimique de l'huile essentielle, et l'activité antiradicalaire.

Enfin une conclusion générale.

Chapitre I

Le genre Thymus et

Les huiles essentielles

I-1- Introduction

Environ 35 000 espèces de plantes sont employées dans le monde à des fins médicinales, ce qui constitue le plus large éventail de biodiversité utilisé par les êtres humains (Elqaj *et al.*, 2007). Les médicaments à base de plantes sont considérés comme peu toxiques et doux par rapport aux médicaments pharmaceutiques. L'Afrique dispose d'une diversité importante de plantes médicinales, qui constituent des ressources précieuses pour la grande majorité des populations rurales, où plus de 80% de cette population s'en sert pour leurs besoins de santé (Dibong *et al.*, 2011).

Dans les dernières décennies il y a eu un intérêt croissant pour l'étude des plantes médicinales et leur utilisation traditionnelle dans différentes régions du monde (Muthu *et al.*, 2006). L'enquête ethnobotanique s'est avérée une des approches les plus fiables pour la découverte de nouveaux médicaments. Ainsi la maprouneacine (*Maprounea africana*) utilisée comme agent antidiabétique, le taxol (*Breviflora taxus*) utilisé comme drogue antitumorale, l'artémisinine (*Artemisia annua*) utilisé comme composé antipaludique efficace contre toutes les souches résistantes de *Plasmodium* ont été découvertes à partir de plantes et sont directement employées. (Jain *et al.*, 2009).

I-2- Les plantes aromatiques

Les propriétés antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début du 20^{ème} siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser (Yano *et al.*, 2006).

Récemment, l'attention s'est portée sur les herbes et les épices comme source d'antioxydants, qui peuvent être employés pour se protéger contre les effets du stress oxydant (Mata *et al.*, 2007).

Différentes plantes aromatiques sont caractérisées par la biosynthèse de molécules odorantes qui constituent ce qu'on appelle les huiles essentielles (HE). Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques. En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne. Cependant, elles possèdent également, des propriétés cytotoxiques qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens.

Dans des préparations pharmaceutiques, les terpènes phénoliques, comme le thymol et le carvacrol, sont souvent utilisés comme antiseptiques antibactériens et antifongiques.

Les huiles essentielles les plus étudiées dans la littérature pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques appartiennent à la famille des Lamiacées : thym, origan lavande, menthe, etc...

I-3-Présentation de La famille des lamiacées

La famille des lamiacées est l'une des familles les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extrait à fort pouvoir antimicrobien, antifongique, anti-inflammatoire et antioxydant (Gherman *et al* 2000, Hilan *et al.*, 2006). Les huiles essentielles caractérisent cette famille.

Cette famille comprend près de 6700 espèces regroupées dans environ 250 genres. (Miller *et al.*, 2006). 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 bilabée 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. (Quezel et santa 1963).

Les lamiacées sont très nombreuses les espèces les plus cités dans la littérature sont : *Salvia officinalis* (Fellah *et al.*, 2006), *Mentha spicata* (Choudhury *et al.*, 2006),*Origanum vulgare* (Dimitrijević *et al.* , 2007) , *Rosmarinus officinalis* (Gachkar *et al.* , 2007, Marzouk *et al.*,2006), *Ocimum basilicum* (Lee *et al.* , 2007).

Ainsi que de nombreuses espèces du genre *Thymus* qui ont été abondamment étudiées de ce point de vue. (Rota *et al.* ,2008 ,Elhabazi *et al.*,2006) .

Un très grand nombre de genres de la famille des Lamiacées sont des source riches en terpénoïdes, flavonoïdes, iridoïdes glycosylés et composés phénoliques (Naghibi *et al.*, 2005).

I-4-Le genre Thymus

- ***Origine du nom*** : le nom thym proviendrait aussi bien du latin que du grec

Thymus : «parfumer» (latin)

Thumus : «courage» (grec)

I-4-1-Distribution géographique

- ***Dans le monde***

Le genre *Thymus* est l'un des 250 genres les plus diversifiés de la famille des labiées (Naghibi *et al.*, 2005). Selon Dob *et al.*, 2006 il existe près de 350 espèces de thym réparties entre l'Europe, l'Asie de l'ouest et la méditerranée. C'est un genre très répandu dans le nord ouest africain (Maroc, Algérie, Tunisie et Libye), il pousse également sur les montagnes d'Ethiopie et d'Arabie du sud ouest en passant par la péninsule du Sinaï en Egypte (Mebarki 2010). On peut le trouver également en Sibérie et même en Himalaya. Selon une étude menée par Nickavar *et al.*, 2005, environ 110 espèces différentes du genre *Thymus* se concentrent dans le bassin méditerranéen.

- ***En Algérie***

Le thym comprend plusieurs espèces botaniques réparties sur tout le littoral et même dans les régions internes jusqu'aux zones arides (Mebarki, 2010). Il est représenté en Algérie par de nombreuses espèces qui ne se prêtent pas aisément à la détermination en raison de leurs variabilités et leur tendance à s'hybrider facilement. Le tableau 1 montre la localisation des principales espèces de thym en Algérie.

Tableau 1 : Localisation des principales espèces de genre *Thymus* en Algérie (Mebarki 2010).

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 constantinois
<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 algériensis</i>	Boiss et Reuter	Très commun dans le sous secteur des hauts plateaux algérois, oranais
<i>Thymus munbyanus</i>	Boiss et Reuter	Endémique dans le secteur Nord algérois

I-4-2-Les propriétés du Thym

- Assaisonnement des aliments et des boissons.
- Antiseptique, désinfectant dermique et un spasmolytique bronchique dont il est indiqué pour traiter les infections des voies respiratoires supérieures.
- Les principaux constituants du thym montrent des propriétés vermifuges et vermicides (Bazytko et Strzelecka 2007)
- Propriétés antivirales, antifongiques, anti inflammatoires, et antibactériennes dont une étude récente a montré que les extraits méthanoliques et hexaniques des parties aériennes de *Thymus vulgaris* inhibent la croissance de *Mycobacterium tuberculosis* (bactérie qui cause la tuberculose) (Jiminez-Arellanes *et al*, 2006)
- Propriétés anthelminthiques (Al-Bayati, 2008)
- Propriétés antioxydantes (Takeuchi *et al*, 2004 ; Golmakani et Rezaei, 2008) en raison de ces propriétés, le thym est utilisé comme un conservateur afin de prolonger la durée de conservation des poissons *Thunnus thymnus* durant leur stockage (Selmi et Sadok, 2008).

I-4-3-Principes actifs du Thym

- ***Les acides phénoliques:*** acide caféique (Cowan, 1999), acide rosmarinique (Takeuchi *et al*, 2004).
- ***Les flavonoïdes:*** hespéridine, eriotrécine, narirutine (Takeuchi *et al*, 2004), lutéoline (Bazytko et Strzelecka, 2007).
- ***Les polyphénols:*** tannin (Cowan, 1999 ; Özcan et Chalchat, 2004).

I-4-4-Caractère chimique du genre Thymus

Un grand nombre d'espèces de *Thymus* ont fait, à ce jour, l'objet d'études chimiques et de très nombreux métabolites secondaires ont été isolés les travaux phytochimiques effectués sur le genre *Thymus* ont permis l'isolement, de flavonoïdes et de terpènes.

➤ **Flavonoïdes**

Le tableau 2 rassemble un nombre d'espèces du genre *Thymus*, et leur contenu flavonique.

Tableau 2 : Quelques flavonoïdes isolés d'espèces du genre *Thymus*.

Espèce	Composés isolés	n°	Référence
<i>Thymus vulgaris</i>	Acacétine	<u>2</u>	Regnault-Roger et al., 2004
	Hispiduline	<u>4</u>	
	Cirsimaritine	<u>5</u>	
	Xanthomicrol	<u>6</u>	
	Scutellarine	<u>9</u>	
	Cirsilinéol	<u>13</u>	
	Thymonine	<u>15</u>	
	8-methoxycirsilinéol	<u>16</u>	
	Kampférol	<u>17</u>	
	Quercétine	<u>18</u>	
	rutine	<u>24</u>	
<i>Thymus serpyllum</i>	Acacétine	<u>2</u>	Regnault-Roger et al., 2004
	Genkwanine	<u>3</u>	
	Hispiduline	<u>4</u>	
	Xanthomicrol	<u>6</u>	
	Scutellareine	<u>9</u>	
	Lutéoline	<u>11</u>	
	Thymonine	<u>15</u>	
	8-methoxycirsilinéol	<u>16</u>	
	Quercétine	<u>18</u>	
<i>Thymus algeriensis</i>	Kampférol	<u>17</u>	Martos et al., 1997
	Quercétine	<u>18</u>	
	Isorhamnétine	<u>19</u>	
	5,3'-di-hydroxy-3,7,4',5'- tetraméthoxyflavone	<u>21</u>	
	Galangin	<u>20</u>	
	Chrysine	<u>10</u>	

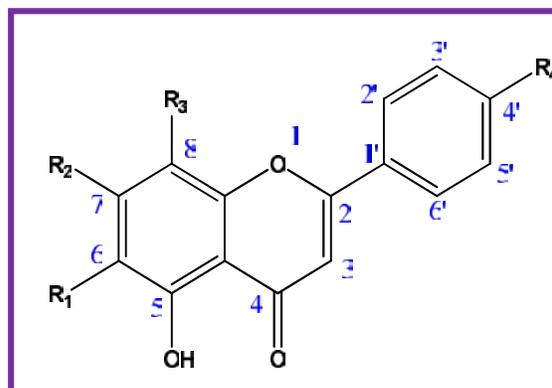
<i>Thymus hirtus</i>	Apigénine	<u>1</u>	Merghem et al., 1995
	Lutéoline	<u>11</u>	
	Diosmétine	<u>12</u>	
<i>Thymus herba barona</i>	Genkwanine	<u>3</u>	Corticchiato et al., 1995
	Xanthomicrol	<u>6</u>	
	Sorbifoline	<u>7</u>	
	Thymusine	<u>8</u>	
	Cirsilinéol	<u>13</u>	
	Cirsiliol	<u>14</u>	
	8-méthoxycirsilinéol	<u>16</u>	
	Naringénine	<u>22</u>	
	Eriodictyol	<u>23</u>	
<i>Thymus capitatus</i>	Lutéoline-7 rutinoside	<u>25</u>	Barberán et al., 1986
	Vicenin-2	<u>26</u>	

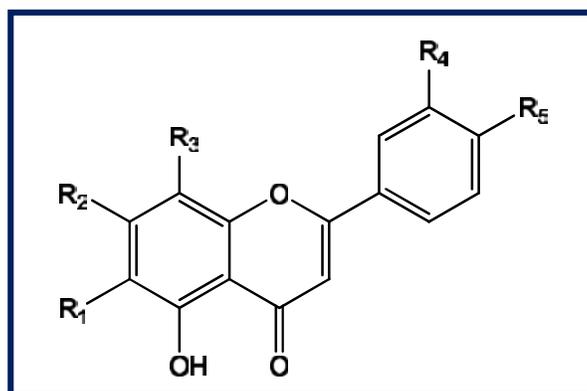


Flavones

Les structures de 01 à 16 sont les suivantes

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
<u>1</u>	H	OH	H	OH
<u>2</u>	H	OH	H	OCH ₃
<u>3</u>	H	OCH ₃	H	OH
<u>4</u>	OCH ₃	OH	H	OH
<u>5</u>	OCH ₃	OCH ₃	H	OH
<u>6</u>	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH
<u>7</u>	OH	OCH ₃	H	OH
<u>8</u>	OH	OCH ₃	OCH ₃	OH
<u>9</u>	OH	OH	H	OH
<u>10</u>	H	OH	H	H

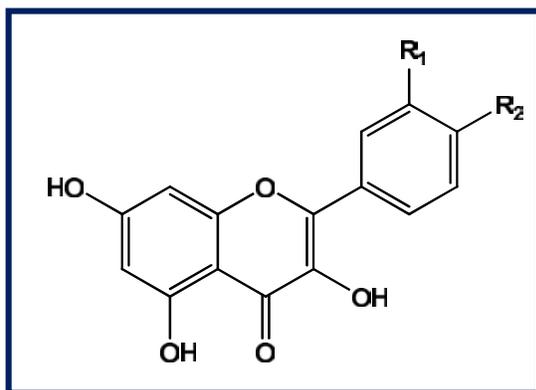




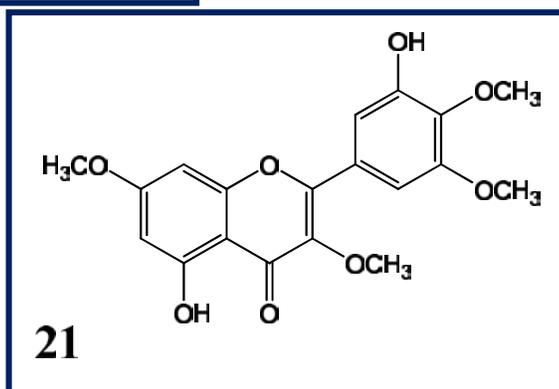
Structures	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
<u>11</u>	H	OH	H	OH	OH
<u>12</u>	H	OH	H	OH	OCH ₃
<u>13</u>	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃	OH
<u>14</u>	OCH ₃	OCH ₃	H	OH	OH
<u>15</u>	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH
➤ <u>16</u>	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH

➤ Flavonols

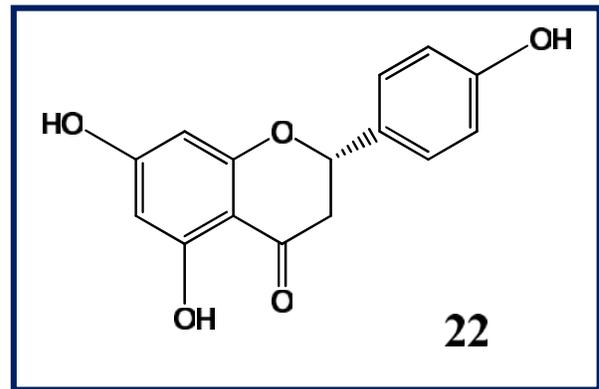
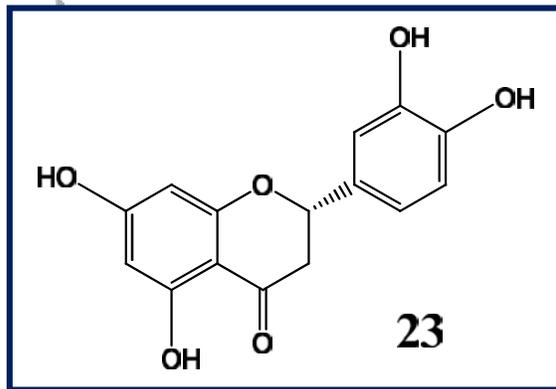
Les structures des flavonols de 17 à 21 sont les suivantes :



Structures	R ₁	R ₂
<u>17</u>	H	OH
<u>18</u>	OH	OH
<u>19</u>	OCH ₃	OH
<u>20</u>	H	H



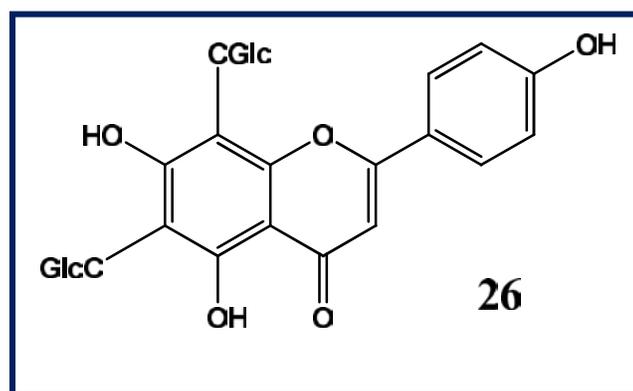
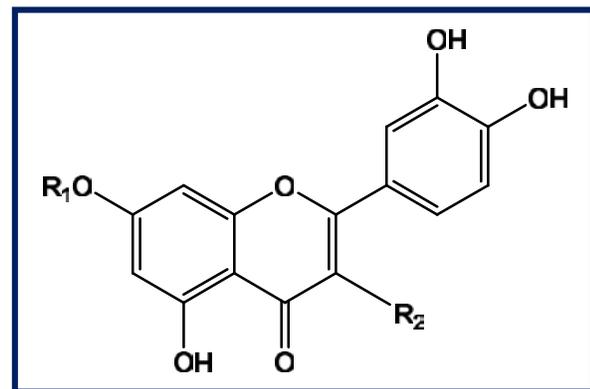
➤ **Flavanones** Les structures des flavanones **22** et **23** sont les suivantes



➤ **Flavonoïdes glycosylés**

Les structures de **24** à **26** sont les suivantes

Structures	R ₁	R ₂
24	H	ORhamGlc
25	RhamGlc	H



✦ Les terpènes

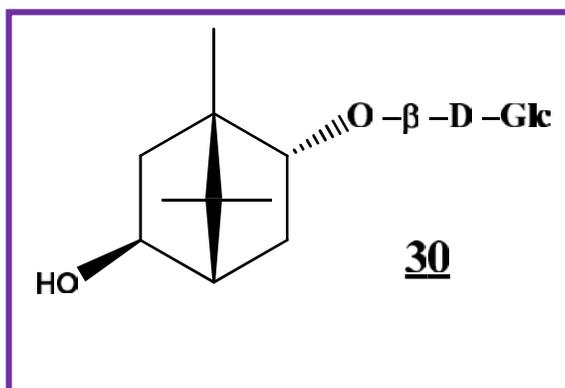
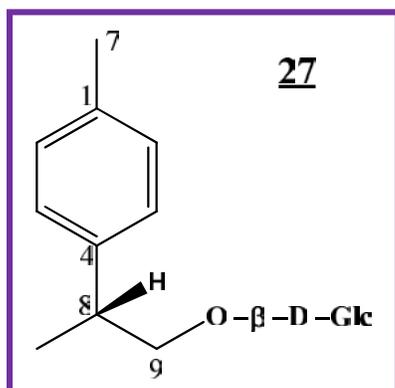
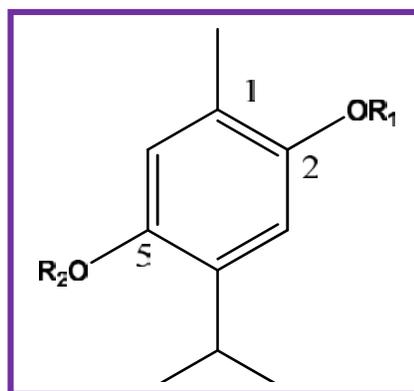
Une étude effectuée sur les parties aériennes de l'espèce *Thymus vulgaris* L a permis l'isolement de monoterpènes glycosylés, dont un nouveau (R)-p-cymen-9-yl beta-D-glucopyranoside **27** et trois connus, le tableau 3 contient quelques exemples de monoterpènes glycosylés isolés.

Tableau 3 : quelque monoterpènes glycosylés isolés de *Thymus vulgaris*

Espèce	Composés isolés	n°	Référence
<i>Thymus vulgaris</i> L	(R)-p-cymen-9-yl beta-D-glucopyranoside	27	Takeuchi et al., 2004
	2-β-D-glucopyranosylthymoquinols	28	
	5-β-D- glucopyranosylthymoquinols	29	
	(-)-angelicoidenol-beta-D-glucopyranoside	30	

Les structures des monoterpènes de **27** à **30** sont les suivantes :

Structures	R ₁	R ₂
28	β-D-Glc	H
29	H	β-D-Glc



I-5-Les huiles essentielles

I-5-1-Définition

Le terme “huile essentielle” a été inventé au 16^{ème} siècle par le médecin suisse Parascelsus von Hohenheim afin de désigner le composé actif d’un remède naturel. Il existe aujourd’hui approximativement 3000 huiles essentielles, dont environ 300 sont réellement commercialisées, destinées principalement à l’industrie des arômes et des parfums (Essawi *et al.*, 2000).

La norme AFNOR NF T 75-006 définit l’huile essentielle comme: « un produit obtenu à partir d’une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d’eau, soit par hydrodistillation. L’huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques» La majorité des huiles essentielles sont des liquides très peu colorés, volatils à température ambiante. Les huiles essentielles dégagent une odeur caractéristique et sont, en général plus légères que l’eau tout en possédant des caractéristiques hydrophobes.

I-5-2-Rôle physiologique

Beaucoup de plantes produisent les H.E en tant que métabolites secondaires, leur rôle exact dans le processus de la vie de la plante reste encore mal connu. Selon bakkali (2008), les H.E peuvent avoir plusieurs effets «utiles» pour la plante : attirer les insectes pour favoriser la pollinisation, comme source énergétique, facilitant certaines réactions chimiques permettant de conserver l’humidité des plantes désertiques, pour leur action répulsive sur les prédateurs.

I-5-3-Localisation des huiles essentielles

Toutes les parties des plantes aromatiques peuvent contenir de l’huile essentielle.

- Les fleurs, exemples : oranger, rose, lavande ; le bouton floral (girofle) ou les bractées (ylang-ylang)
- Les feuilles le plus souvent, exemples : eucalyptus, menthe, thym, laurier, sarriette, sauge, aiguilles de pin et sapin
- Les organes souterrains, exemples : racines (vétiver), rhizomes (gingembre, acore)
- Les fruits, exemples : fenouil, anis, épicarpes des Citrus.
- Les graines: noix de muscade, coriandre.

- Le bois et les écorces, exemples : cannelle, santal, bois de rose.

Les huiles essentielles sont produites par diverses structures spécialement différenciées dont le nombre et les caractéristiques sont très variables.

- Les poils sécréteurs épidermiques rencontrés souvent chez les Lamiacées, Géraniacées et Verbénacées.

- Les organes sécréteurs sous-cutanés comprenant des cellules et des poches sécrétrices qui sont généralement disséminées au sein du tissu végétal chez les Myrtacée, Rutacées, ainsi que des canaux sécréteurs chez les Apiacées.

I-5-4-Les méthodes d'extraction des huiles essentielles

I-5-4-1-La distillation

La méthode est basée sur l'existence d'un azéotrope de température d'ébullition inférieure aux points d'ébullition des deux composés, l'huile essentielle et l'eau, pris séparément. Ainsi, les composés volatils et l'eau distillent simultanément à une température inférieure à 100°. En conséquence, les produits aromatiques sont entraînés par la vapeur d'eau sans subir d'altérations majeures (Franchomme *et al.*, 1990). Il existe trois procédés utilisant ce principe.

I-5-4-1-1-L'hydrodistillation

Il s'agit de la méthode la plus simple et de ce fait la plus anciennement utilisée. Le matériel végétal est immergé directement dans un alambic rempli d'eau placé sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées dans un réfrigérant et l'huile essentielle se sépare de l'hydrolat par simple différence de densité, (figure 1). L'huile essentielle étant plus légère que l'eau (sauf quelques rares exceptions), elle surnage au-dessus de l'hydrolat.

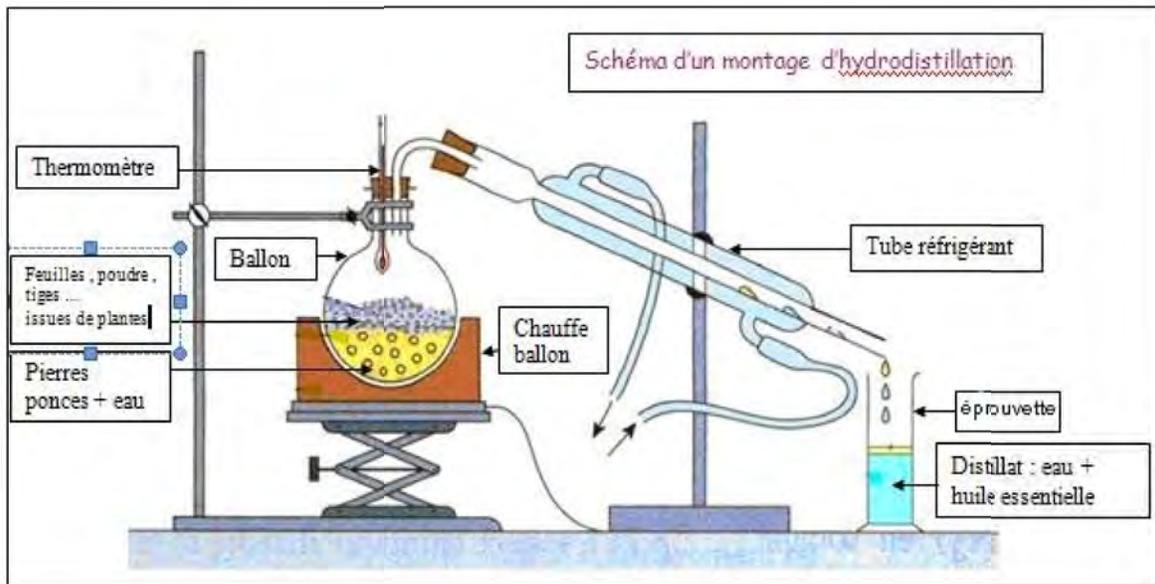


Figure 1 : schéma d'un montage d'hydrodistillation.

I-5-4-1-2-La distillation par entraînement à la vapeur d'eau

Dans ce type de distillation, le matériel végétal ne macère pas directement dans l'eau. Il est placé sur une grille perforée au travers de laquelle passe la vapeur d'eau.

La vapeur endommage la structure des cellules végétales et libère ainsi les molécules volatiles qui sont ensuite entraînées vers le réfrigérant. Cette méthode apporte une amélioration de la qualité de l'huile essentielle en minimisant les altérations hydrolytiques: le matériel végétal ne baignant pas directement dans l'eau bouillante (Franchomme *et al.*, 1990).

I-5-4-1-3-L'hydrodiffusion

Cette technique relativement récente est particulière. Elle consiste à faire passer, du haut vers le bas et à pression réduite, la vapeur d'eau au travers de la matrice végétale. L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc moins dommageable pour les composés volatils. Cependant, l'huile essentielle obtenue avec ce procédé contient des composés non volatils ce qui lui vaut une appellation spéciale: « essence de percolation » (Franchomme *et al.*, 1990 ; Richard, 1992)

I-5-4-2- L'hydrodiffusion assistée par micro-ondes

L'hydrodiffusion assistée par micro-ondes (figure 2) a été développée depuis 2008 par Marilynne Abert Vian et al.

C'est une combinaison de l'hydrodiffusion classique aux micro-ondes. Le ballon où se trouve le matériel végétal (sans solvant) est soumis à un chauffage par micro-ondes. Les cellules végétales éclatent sous l'effet de la chaleur et libèrent l'eau *in situ* et les molécules aromatiques. Le mélange « vapeur d'eau + huile essentielle » est alors poussé vers le condenseur sous l'effet de la pesanteur. (Abert Vian *et al.*, 2008)

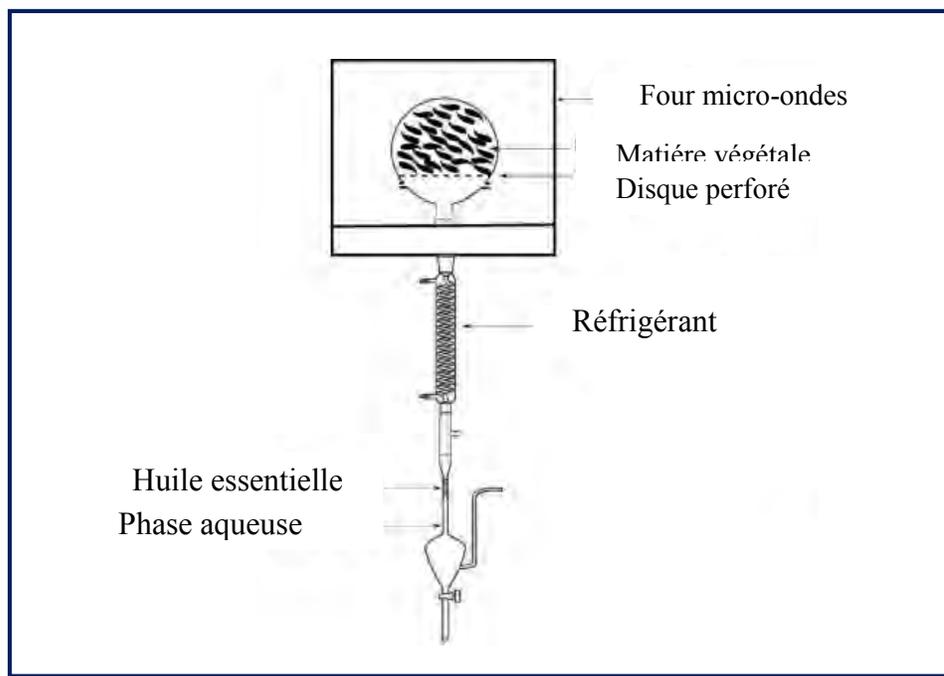


Figure 2 : Schéma d'un montage d'hydrodiffusion assistée par micro-ondes

I-5-5-La composition des huiles essentielles

I-5-5-1-Les composés volatils des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes pouvant contenir plus de 300 composés différents (Sell, 2006). Ces composés sont des molécules volatiles appartenant pour la grande majorité à la famille des terpènes. Rappelons ici que les terpènes sont des composés issus du couplage de plusieurs unités « isopréniques » (C_5H_8), soit deux unités pour les monoterpènes ($C_{10}H_{16}$) et trois pour les sesquiterpènes ($C_{15}H_{24}$). Exceptionnellement, quelques diterpènes ($C_{20}H_{32}$) peuvent se retrouver dans les huiles essentielles (Vila *et al.*, 2002). Plusieurs milliers de

composés appartenant à la famille des terpènes ont, à ce jour, été identifiés dans les huiles essentielles (Modzelewska *et al.*, 2005). La réactivité des cations intermédiaires obtenus lors du processus biosynthétique des mono- et sesquiterpènes explique l'existence d'un grand nombre de molécules dérivées fonctionnalisées telles que des alcools (géraniol, α -bisabolol), des cétones (menthone, β -vétivone), des aldéhydes (citronellal, sinensal), des esters (acétate d' α -terpinyle, acétate de cédryle), des phénols (thymol), etc.

I-5-5-2-Le chémotype

Le chémotype d'une H.E est une référence précise qui indique le composant biochimique majoritaire ou distinctif, présent dans l'H.E. C'est l'élément qui permet de distinguer de H.E extraite d'une même variété botanique mais, d'une composition biochimique différente. Cette classification permet de sélectionner les H.Es pour une utilisation plus précise, et plus efficace. Ce polymorphisme chimique existe chez certaines espèces : *Thymus vulgaris*, *Mentha spicata*, *Origanum vulgare*. Il est important de noter que les H.E à chémotype différent présente non seulement des activités différentes mais aussi des toxicités très variables (Pibiri., 2005)

I-5-6-Les activités biologiques et antibactériennes des huiles essentielles

I-5-6-1 -Toxicité

Les huiles essentielles ne sont pas des produits qui peuvent être utilisés sans risque. Comme tous les produits naturels: "ce n'est pas parce que c'est naturel que c'est sans danger pour l'organisme". Les huiles essentielles contenant surtout des phénols et des aldéhydes peuvent irriter la peau, les yeux et les muqueuses. Notamment les huiles de : Cannelle de Ceylan, Basilic exotique, Menthe, Clou de girofle, Niaouli, Thym à thymol, Marjolaine, Sarriette, Lemon-grass. De plus, certaines huiles essentielles peuvent provoquer des réactions cutanées allergiques (Meynadier *et al.*, 1997). C'est en particulier le cas des huiles essentielles suivantes: la cannelle de Ceylan, la menthe, la Listée, la mélisse, le pin, ou la mousse de chêne.

La proportion de la population développant des allergies cutanées dues aux parfums est en augmentation car l'utilisation de parfums et de produits parfumés (Hayakawa., 1987) ne cesse d'augmenter. Il a été démontré que les allergènes présents dans l'air jouent un rôle évident dans la formation d'eczéma, soit par inhalation, soit par contact cutané (Schnuch., 2006).

Les huiles essentielles qui sont utilisées en parfumerie peuvent se comporter comme irritant des muqueuses respiratoires et favoriser le déclenchement de crises d'asthmes pour les asthmatiques (comme par exemple les sprays désodorisants. (Elberling *et al.*, 2007)

Les cétones et dans une moindre mesure les lactones sont neurotoxiques (romarin, sarriette, cèdre, camphre, thuya, aneth, hysope).

I-5-6-2- Activités biologiques

Les huiles essentielles de cannelle, muscade, clou de girofle, basilic, persil, origan et thym possèdent de puissants composés antioxydants (Edris, 2007). Le thymol et le carvacrol sont les composés les plus actifs. Leur activité est en relation avec leur structure phénolique car les composés de ce type ont des propriétés oxydo-réductrices et jouent ainsi un rôle important en neutralisant les radicaux libres (Braga *et al.*, 2006). L'activité antioxydante des huiles essentielles est également attribuable à certains alcools, éthers, cétones et aldéhydes monoterpéniques: le linalool, le 1,8-cinéole, le gèranial/néral, le citronellal, l'isomenthone, la menthone et quelques monoterpènes non oxygénés tels que l' α -terpinène, le γ -terpinène et l' α -terpinolène (Edris, 2007).

Un effet anti-inflammatoire a été décrit pour les HES de *Protium strumosum*, *Protium lewellyni*, *Protium grandifolium* (Siani *et al.*, 1999), ou plus récemment, pour celle des racines de *Carlina acanthifolia* (Dordevic *et al.*, 2007), qui est capable d'inhiber l'inflammation induite par une injection de carraghénane chez le rat.

Les activités antifongiques de nombreuses HE, incluant les huiles de thym, de citronnelle, de cannelle et de l'arbre à thé (Burt, 2004) ont été décrites. L'efficacité des huiles extraites des achillées : *Achillea fragrantissima* (Barel *et al.*, 1991), *A. setacea*, *A. teretifolia* (Unlu *et al.*, 2002) et *A. millefolium* (Candan *et al.*, 2003), contre la levure pathogène *Candida albicans*, a également été mise en évidence.

Certaines huiles essentielles présentant des activités anti-tumorales ont été utilisées dans le traitement préventif de certains types de cancers. L'huile essentielle, isolée des graines de *Nigella sativa* L, a montré une activité cytotoxique *in vitro* contre différentes lignées cellulaires tumorales. *In vivo*, elle limite la prolifération de métastases hépatiques et retarde la mort des

souris ayant développé la tumeur P815 (Mbarek *et al.*, 2007). L'huile essentielle de *Melissa officinalis* s'est, quant à elle, révélée efficace contre des cellules de lignées cancéreuses humaines, incluant les cellules leucémiques HL-60 et K562 (De Sousa *et al.*, 2004).

D'autres applications médicales ont été étudiées. Les travaux de Jafri *et al.*, (2001) ont prouvé la capacité de l'HE de cardamome à limiter la formation d'ulcères gastriques induits par l'éthanol (Jafri *et al.*, 2001). Il a également été démontré que les huiles essentielles facilitent la pénétration transdermique de substances médicamenteuses lipophiles, comme l'œstradiol (Monti *et al.*, 2002). Des travaux ont analysé les effets des huiles essentielles sur le comportement (Umezu *et al.*, 2006) comme la possibilité de les utiliser dans la lutte contre l'addiction à certaines drogues telles que la nicotine (Zhao *et al.*, 2005).

I-5-6-3-Activités antibactériennes

La première mise en évidence de l'action des huiles essentielles contre les bactéries a été réalisée en 1881 (Boyle, 1955). Depuis, de nombreuses huiles ont été définies comme antibactériennes (Burt, 2004). Leur spectre d'action est très étendu, car elles agissent contre un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques.

Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre (Kalemba *et al.*, 2003). Les huiles essentielles agissent aussi bien sur les bactéries Gram positives que sur les bactéries Gram négatives. Toutefois, les bactéries Gram négatives paraissent moins sensibles à leur action et ceci est directement lié à la structure de leur paroi cellulaire (Burt, 2004). Il existe cependant quelques exceptions.

Les bactéries Gram négatives *Aeromonas hydrophila* (Zheng *et al.*, 2009) et *Campylobacter jejuni* (Wannissorn *et al.*, 2005) ont été décrites comme particulièrement sensibles à l'action des huiles essentielles. La bactérie reconnue comme la moins sensible à leurs effets reste néanmoins la bactérie Gram négative *Pseudomonas aeruginosa* (Dorman *et al.*, 2000).

La croissance des bactéries, résistantes et multi-résistantes aux antibiotiques, peut être inhibée par certaines huiles essentielles. Les huiles d'agrumes, de lavande, de menthe, de genévrier, de l'arbre à thé, de thym et d'eucalyptus se sont révélées particulièrement efficaces

contre les staphylocoques dorés résistants à la méthicilline (antibiotique) (May *et al.*, 2000 ; Tohidpour *et al.*, 2010) et les entérocoques résistants à la vancomycine (antibiotique), (Fisher *et al.*, 2009). Les huiles essentielles, isolées de deux espèces de thym de Corée, *T. magnus* et *T. quinquecostatus*, sont également capables d'inhiber la croissance de bactéries résistantes comme *Streptococcus pneumoniae*, *Samonella typhimurium*, *Salmonella entereditis* et *Staphylococcus aureus* (Shin *et al.*, 2005).

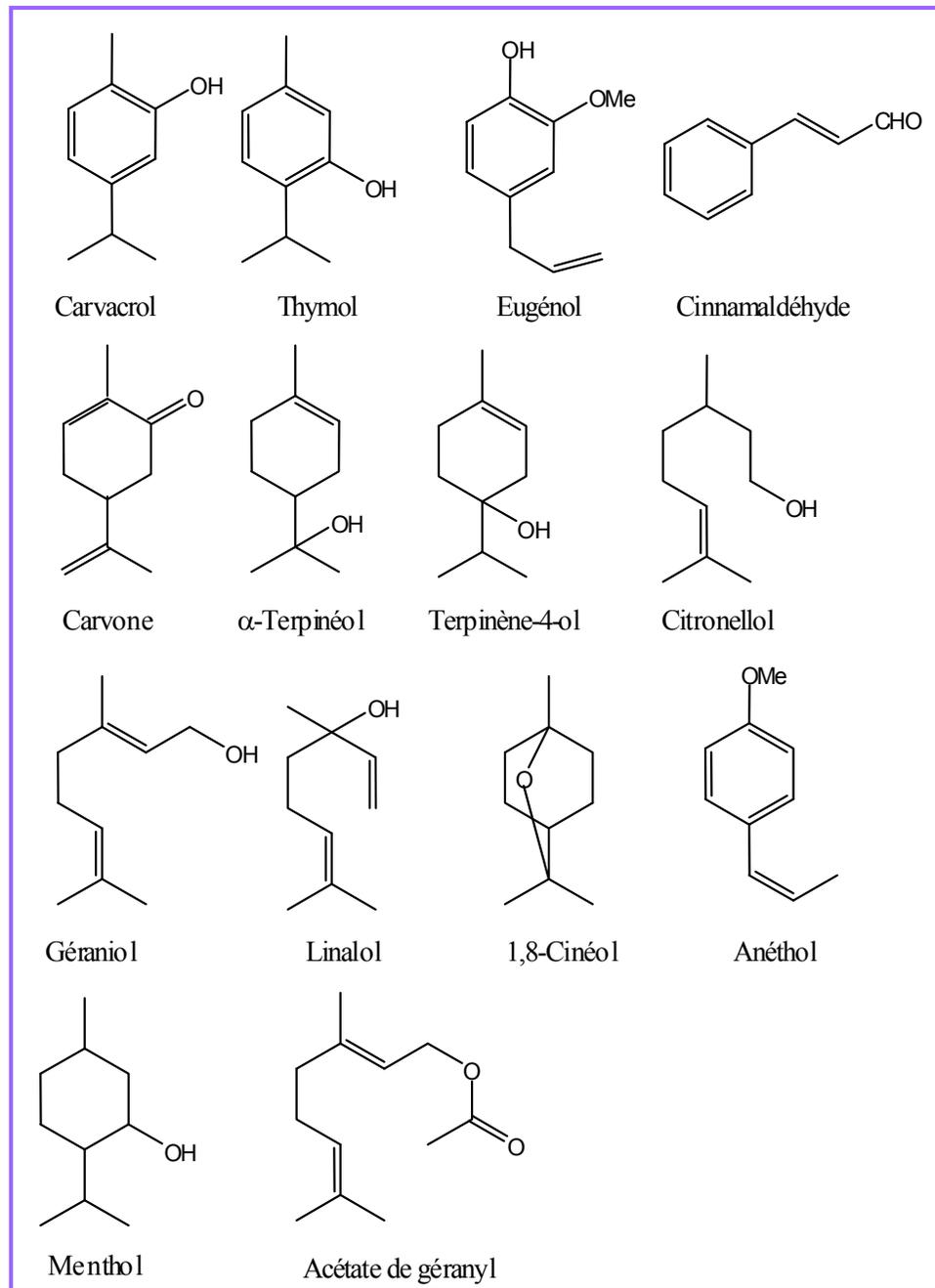


Figure 3. Quelques composés impliqués dans les activités antibactériennes des huiles essentielles. (Kalemba *et al.*, 2003)

I-5-7-Méthodes de détermination des huiles essentielles

L'analyse des huiles essentielles est une opération délicate qui nécessite la mise en œuvre de plusieurs techniques, la technique qui est la plus couramment employée, est l'utilisation du couplage d'une technique chromatographique généralement la chromatographie en phase gazeuse CPG, avec une technique d'identification spectrale, généralement la spectrométrie de masse (SM) ou quelques fois, la spectrométrie Infrarouge par Transformée de Fourier (IRTF).

I-5-7-1-La CPG et les indices de rétention

La CPG est une méthode de séparation mais aussi d'analyse. En effet, les temps de rétention peuvent donner une information sur la nature des molécules et les aires des pics fournissent une quantification relative.

L'identification d'une substance peut être facilitée par la connaissance de son temps de rétention qui est une valeur caractéristique pour une phase stationnaire donnée. En effet, les temps de rétention de chaque composé dépendent des conditions expérimentales (nature et épaisseur de la phase stationnaire, programmation de la température, état de la colonne, etc).

Une meilleure information peut être obtenue grâce à l'utilisation des indices de rétention, mesurés sur les colonnes apolaire et polaire, qui sont plus fiables que les temps de rétention. Ils sont calculés à partir d'une gamme étalon d'alcane ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires. Le calcul peut se faire pour une expérimentation à température constante par interpolation logarithmique: indices de Kováts (IK) (1965), ou en programmation de température par interpolation linéaire indices de rétention ou indices de Van Den Dool et Kratz (Ir) (1963).

I-5-7-2-Le couplage CPG-SM

Le couplage CPG-SM en mode impact électronique (IE), dit CPG-SM(IE), est la technique utilisée en routine pour l'analyse dans le domaine des huiles essentielles. Le principe de la spectrométrie de masse consiste à bombarder à l'aide d'électrons, une molécule qui sera fragmentée ; les différents fragments obtenus, chargés positivement constituent le spectre de masse de la molécule. Cette technique permet d'identifier un composé en comparant son spectre à ceux contenus dans des bibliothèques de spectres informatisées ou sous format papier, ainsi

que celles élaborées de manière interne en laboratoire (Mc Lafferty et Stauffer, 1994; Adams, 2001 etc....)

I-6-Conclusion

Les plantes aromatiques et médicinales constituent une richesse naturelle très importante dont la valorisation demande une parfaite connaissance des propriétés à mettre en valeur, dans ce chapitre plusieurs points ont été soulignés. Le thym de la famille des lamiacée utilisé dans le monde entier pour ses propriétés médicales, quelques propriétés ont été décrites dans ce chapitre avec une présentation botanique de la famille des lamiacées et les métabolites secondaires les plus courants dans ce genre. Sont présentées également les méthodes d'extraction des huiles essentielles et leurs activités biologiques ainsi que les méthodes d'analyse les plus employées.

Chapitre II

Les métabolites secondaires

II-1-Introduction

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protides, lipides, acides nucléiques), ils accumulent fréquemment des métabolites dits « secondaires » dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais qui représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire. Les métabolites secondaires appartiennent à des groupes chimiques variés (alcaloïdes, terpènes, composés phénoliques...) qui sont répartis de manière diversifiée chez les végétaux. (Macheix et al, 2005).

II-2-Les terpènes

II-2-1-Définition

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure soit cyclique soit à chaîne ouverte leur formule brute est $(C_5H_x)_n$ dont le x est variable en fonction du degré d'insaturation de la molécule et n peut prendre des valeurs (1-8) sauf dans les polyterpènes qui peut atteindre plus de 100 (le caoutchouc). La molécule de base est l'isoprène de formule C_5H_8 (figure 4).

Le terme terpénoïde désigne un ensemble de substances présentant le squelette des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhyde, cétone, acide, lactone, etc.)

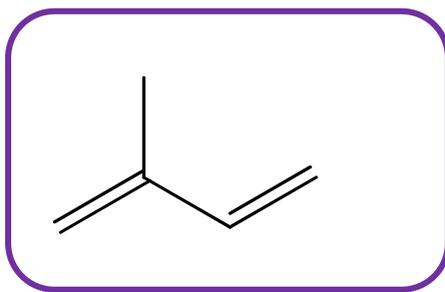


Figure 4 : La molécule d'isoprène

II-2-2-Classification

Dans le règne végétal, les terpénoïdes sont classés dans la catégorie des métabolites secondaires (avec les flavonoïdes et les alcaloïdes). Leur classification est basée sur le nombre de

répétitions de l'unité de base isoprène : hémiterpènes (C5), monoterpènes (C10), sesquiterpènes (C15), diterpènes (C20), sesterpènes (C25), triterpènes (C30), tetraterpènes (C40) et polyterpènes

II-2-2-1- Hémiterpènes

Dans la nature, il existe peu de composés naturels ayant une formule de C5 ramifiée; parmi certains composés naturels trouvés chez les plantes qui peuvent être considérés comme hémiterpène, seul l'isoprène a toutes les caractéristiques biogénétiques des terpènes (Loomis *et* Croteau, 1980).

II-2-2-2-Monoterpènes

Plus de 900 monoterpènes connus se trouvent principalement dans 3 catégories structurales : les monoterpènes linéaires (acyclique), les monoterpènes avec un cycle unique (monocycliques) et ceux avec deux cycles (bicycliques) (figure 5). Ils résultent d'une fusion typique tête-à-queue des unités d'isoprène (Allen *et al.*, 1977).

A-Les monoterpènes acycliques

Le géranyl pyrophosphate (GPP), le premier composé issu du mévalonate est le précurseur de cette catégorie de monoterpènes. Dans ce groupe, le géraniol est le plus répandu dans le règne végétal.

B-Les monoterpènes monocycliques

Ces composés sont formés à partir du néryl pyrophosphate (NPP) ou du géranyl pyrophosphate (GPP) (Croteau *et* Karp, 1977). Les composés aromatiques sont les plus importants dans cette catégorie, comme le p-cymène et ses dérivés hydroxyles qui se trouvent associés avec le γ -terpinène (Poulose *et* Croteau, 1978). On distingue 4 groupes dans cette catégorie:

1- Les hydrocarbures en $C_{10}H_{16}$ contenant deux doubles liaisons: le limonène et les phellandrènes sont les représentants les plus connus de cette famille.

2- Les hydrocarbures en $C_{10}H_{18}$ contenant une double liaison: les terpinéols sont les plus fréquents dans cette famille

3- Les hydrocarbures en $C_{10}H_{20}$: les menthanes (hydrocarbures saturés) n'existent pas à l'état naturel, mais on trouve leurs dérivés alcool et cétone correspondants: le menthol et la menthone.

4- Les hydrocarbures en $C_{10}H_{20}$ contenant un oxyde: dans cette famille, le cinéole ou l'eucalyptol sont très abondants.

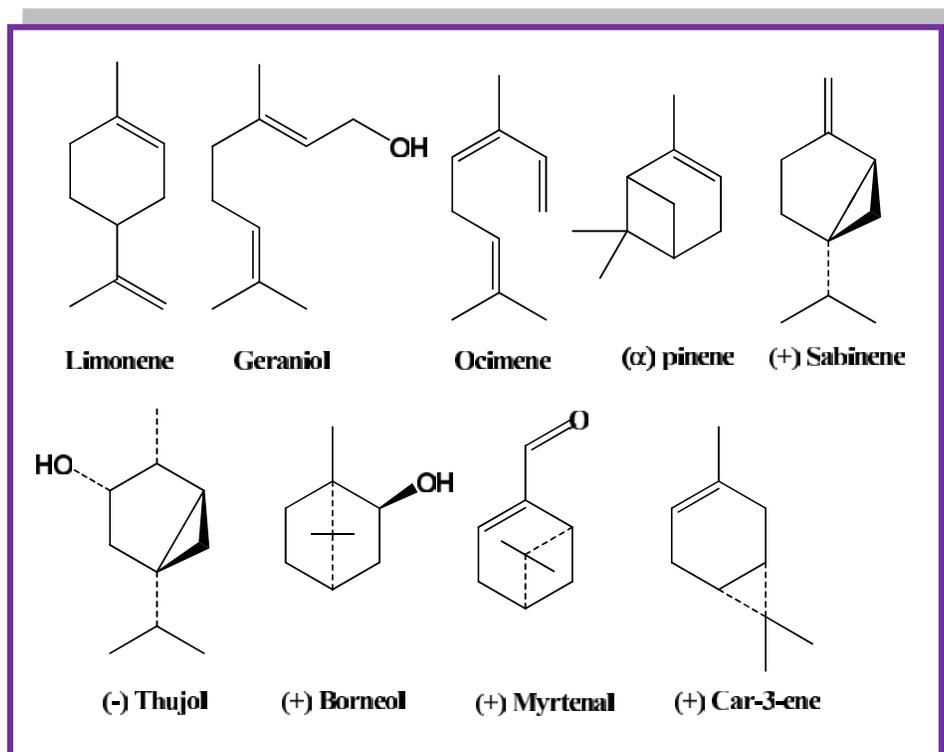


Figure 5 : Quelques molécules représentatives des monoterpènes.

C-Les monoterpènes bicycliques

Ces composés se trouvent dans un grand nombre d'huiles essentielles, surtout celles issues des conifères. La plupart de ces monoterpènes font partie des familles pinane, bornane ou thujane tandis que les familles fenchane et carane sont moins représentées. Les monoterpènes majeurs issus du pinane sont l' α -pinène et le β -pinène qui sont largement distribués dans les plantes (Croteau *et* Karp., 1977). Le bornéol, l'isobornéol et le camphre sont les terpènes les plus importants dans la famille bornane. Les terpènes les plus communs de squelette thujane sont les

cétones thujone et isothujone ainsi que les alcools et les hydrocarbures associés. La fenchone (cétone) et les alcools (α -fenchol et β -fenchol) sont des constituants majeurs de la famille fenchane. Enfin, le Δ -3-carene est le seul monoterpène commun de la famille carane.

II-2-2-3-Sesquiterpènes

Il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes puisqu'elle contient plus de 3000 molécules dont quelques structures sont présentées à la figure 6. Les sesquiterpènes se divisent en plusieurs catégories structurelles, acyclique, monocyclique, bicyclique, tricyclique, polycyclique.

A-Les sesquiterpènes acycliques

Ils sont susceptibles d'être dérivés de *trans*, *trans*-farnésyl pyrophosphate (FPP) qui constitue l'analogue de la génération des monoterpènes acycliques à partir de GPP.

Généralement tous les monoterpènes acycliques ont un analogue sesquiterpène direct.

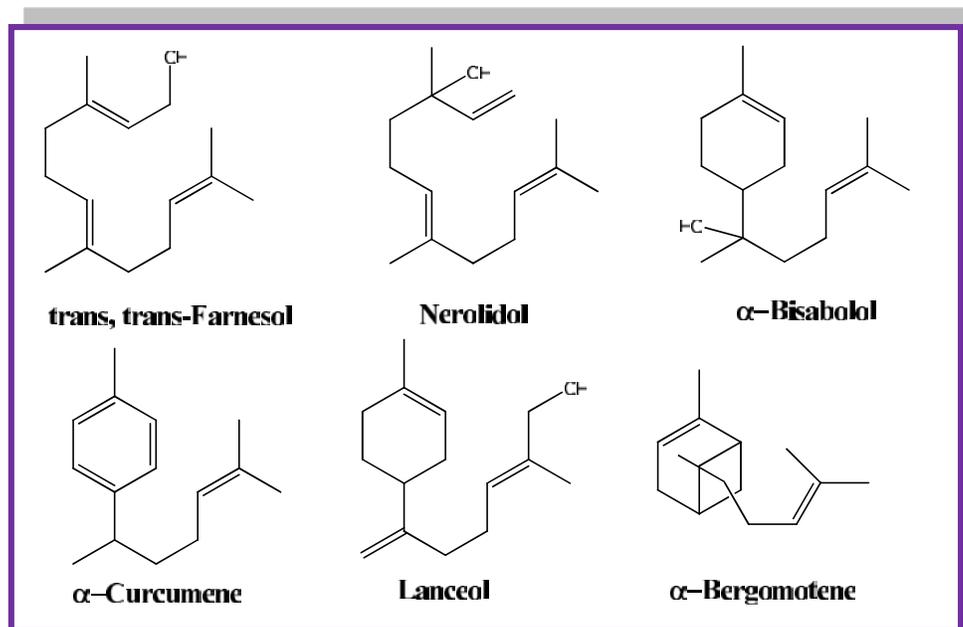


Figure 6 : quelque structures de sesquiterpènes (Loomis *et* Croteau., 1980)

B-Les sesquiterpènes monocyclique

Les sesquiterpènes monocycliques sont divisés principalement en 4 familles: Bisabolan, Germacran, Eleman et Humulan (figure 7). Le zingibérène est un exemple de la famille du Bisabolan, que l'on retrouve par exemple dans l'essence de Gingembre. Le periplanone dérivé du germacrane est une phéromone sexuelle chez la blatte.

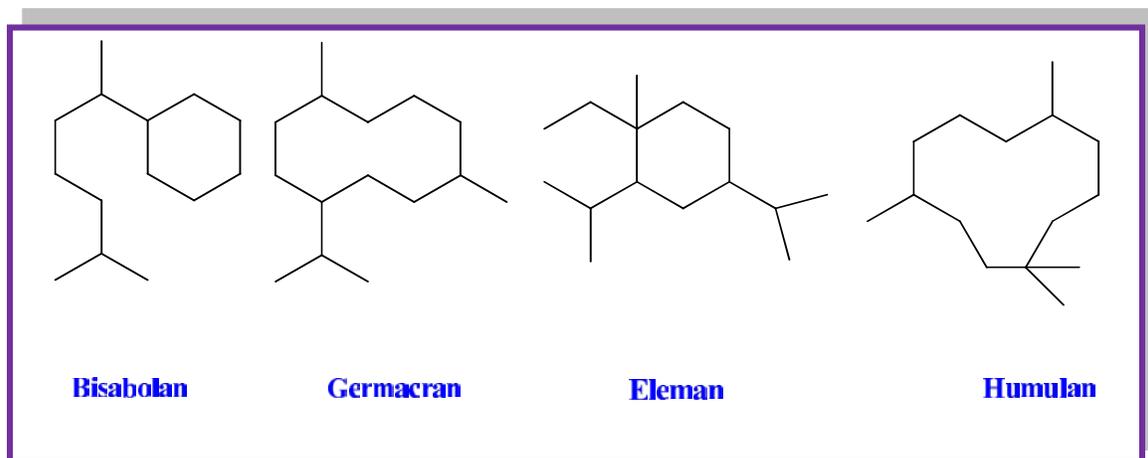


Figure 7 : 4 molécules représentatives des 4 familles principales de sesquiterpènes monocycliques

C-Les sesquiterpènes polycycliques

Parmi les sesquiterpènes polycycliques, le caryophyllène est le plus important, que l'on retrouve principalement dans le poivre et certaines épices.

II-2-2- 4-Diterpènes

Les diterpènes sont des substances avec 20 atomes de carbone (C₂₀) élaborées à partir de 4 unités d'isoprène ; ils se forment à partir de leur précurseur, le géranylgeranyl-pyrophosphate (GGPP). Ces composés sont principalement présents dans les plantes supérieures dans les résines ou les gibbérellines, ainsi que dans les champignons. Il existe environ 2700 diterpènes dans la nature dont la majorité est sous forme cyclique. Parmi les diterpènes linéaires, on rencontre la famille Phytane (figure 8) dont le phytol est le représentant le plus connu dans la chlorophylle ou dans les vitamines K et E. Les diterpènes cycliques sont des dérivés de cyclophytane (figure 9). Le rétinol et le rétinol, deux formes de la vitamine A sont les plus connus dans cette famille.

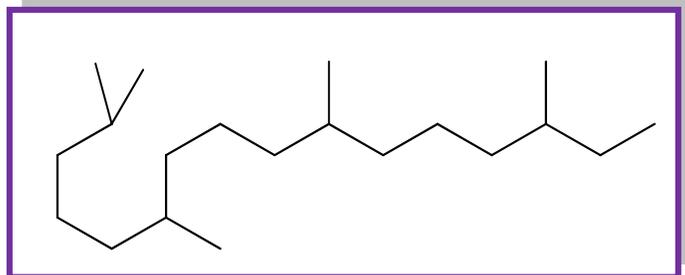


Figure 8: Phytane

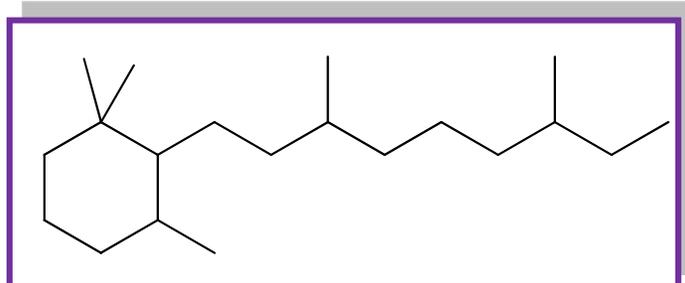


Figure 9 : Cyclophytane

II-2-2-5- Sesterpènes

Les sesterpènes sont des composés en C₂₅, construits à partir de 5 unités d'isoprène. L'acide mévalonique (MVA) semble être le précurseur de cette classe. Ils ont été isolés des plantes, des champignons, des insectes, et des éponges. Il y a plus de 150 sesterpènes bien connus, parmi lesquels une trentaine a une structure de furfurane, dérivé du 3,7,11,15,19-Pentamethyleicosane (figure 10).

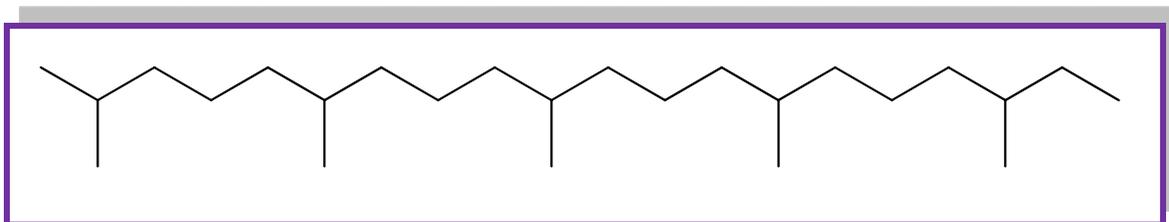


Figure 10 : 3,7,11,15,19-Pentamethyleicosane

Les sesterpènes sont plutôt rares dans la nature ; ils se trouvent soit sous forme linéaire soit cyclique, avec un, deux, trois ou quatre cycles.

II-2-2-6-Triterpènes

Les triterpènes en C₃₀ sont produits à partir de deux molécules de farnésylpyrophosphate (FPP) par une fusion de tête-à-tête. Il y a plus de 1700 triterpènes dans la nature dont la majorité est sous forme tétracyclique ou pentacyclique, la forme acyclique étant très rare. Parmi les triterpènes acycliques, le squalène (figure 11) est le précurseur des autres triterpènes, et aussi des stéroïdes végétaux. La plupart de triterpènes sont des alcools, sous forme libre ou glycoside (les saponines) ou ester. Les triterpènes libres sont des composants principaux des résines ou du latex des végétaux. La vitamine D₂ est un produit dérivé de triterpène.

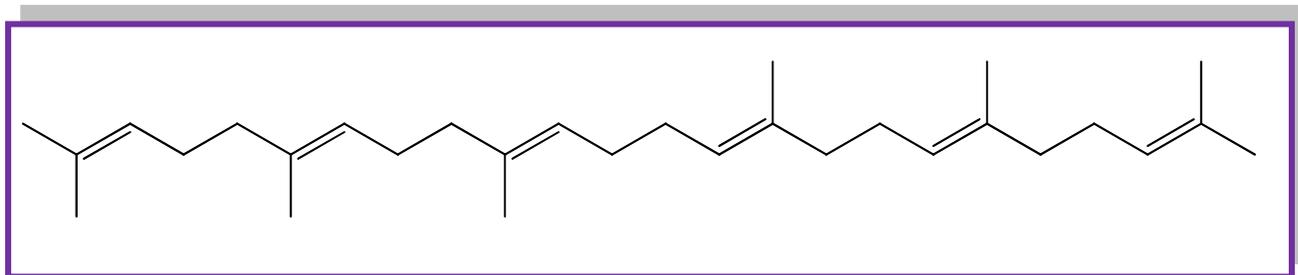


Figure 11: Structure de squalène

II-2-2-7-Tetraterpènes

Les caroténoïdes sont des tetraterpènes, les plus typiques étant les apocaroténoïdes, les diapocaroténoïdes, et les mégastigmanes.

II-2-2-8- Polyterpènes

En général, les polyterpènes ou polyisoprènes se composent de plus de 8 unités d'isoprène. Ces terpènes se trouvent souvent sous deux formes isomériques cis- et trans. Le cis-polyisoprène se trouve dans le caoutchouc indien, alors que le polyisoprène-trans est la partie principale de gutta-percha. Les prenylchoinones sont des polyterpènes comptant jusqu'à 10 unités d'isoprène, parmi eux, on rencontre les vitamines K₁ et K₂ et la vitamine E.

II-2-3-La biosynthèse des terpènes

II-2-3-1- La biosynthèse du diphosphate d'isopentényle

La voie la plus couramment admise pour la synthèse de la molécule d'IPP consiste en la condensation de deux molécules d'acétyl CoA pour former de l'acétoacétyl CoA (figure 12). Cette réaction est d'abord catalysée par une acétoacétyl CoA thiolase, couplée à une Fe(II) quinone (Vollack *et al.*, 1994). Puis l'HMG CoA synthétase catalyse la fixation d'une troisième molécule d'acétyl CoA qui donne le β -hydroxy- β -méthylglutaryl coenzyme A (HMG CoA). L'HMG CoA est aussi un substrat pour 2 autres enzymes spécifiques, l'HMG CoA lyase (HMGL) et la 3-méthylglutaconyl CoA hydratase (MGH) (Van der Heijden *et al.*, 1994). Cette fixation d'un acétyl CoA sur un groupement carbonyle est semblable à la réaction permettant l'entrée de l'acétyl CoA dans le cycle de Krebs par condensation sur l'acide oxaloacétique. La réduction de la fonction acide (engagée dans une liaison thioester) en alcool est catalysée par l'HMG CoA réductase et donne l'acide mévalonique dont seule la forme (3*R*-CH₃) est active.

Un groupement diphosphate va ensuite être fixé sur la fonction alcool primaire de l'acide mévalonique. Le mévalonate 5-diphosphate ainsi formé va réagir avec une troisième molécule d'ATP ; cette réaction fournit un composé instable qui se décompose spontanément en perdant la fonction alcool tertiaire et le groupement carbonyle libre. Ainsi est élaboré un dérivé à 5 atomes de carbone, le diphosphate d'isopentényle (IPP).(figure 12).

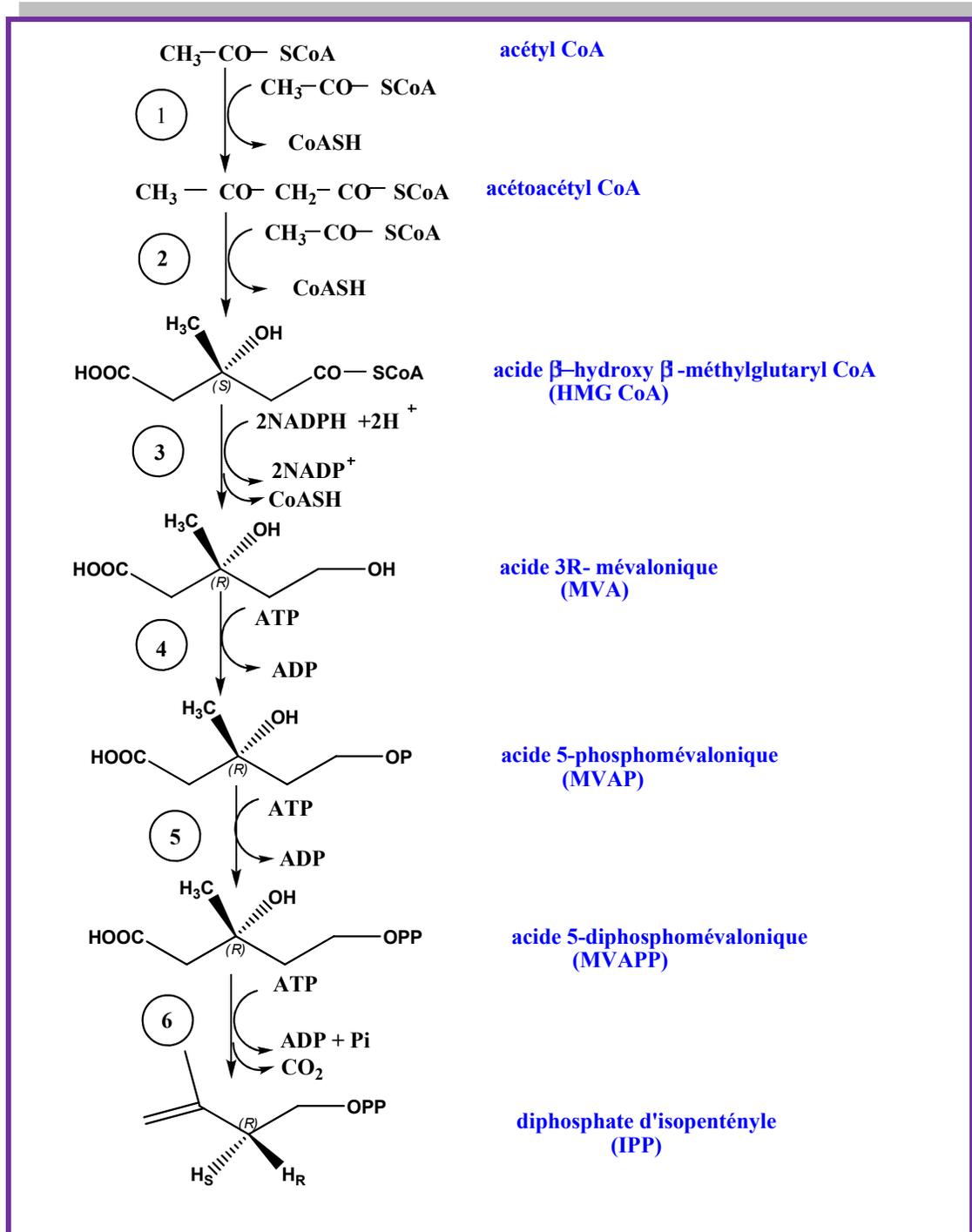


Figure 12 : Principales étapes de la biosynthèse du diphosphate d'isopentényle à partir de l'acétyl CoA

1 : acétoacétyl CoA thiolase

2 : HMG CoA synthétase

3 : HMG CoA réductase décarboxylase

4 : mévalonate kinase

5 : mévalonate 5-phosphate kinase

6 : mévalonate 5-diphosphate

II-2-3-2-Biosynthèse des isoprénoïdes à partir d'IPP

Le diphosphate d'isopentényle (IPP) **1** et le diméthylallyle (DMAPP) **2**, équivalents biologiques de l'isoprène, sont les précurseurs communs de tous les isoprénoïdes (Figure 13) et peuvent s'isomériser grâce à une enzyme, l'IPP isomérase. (Agranoff *et al.*, 1959, 1960, Clifford *et al.*, 1971, Ramos-Valdivia *et al.*, 1997)

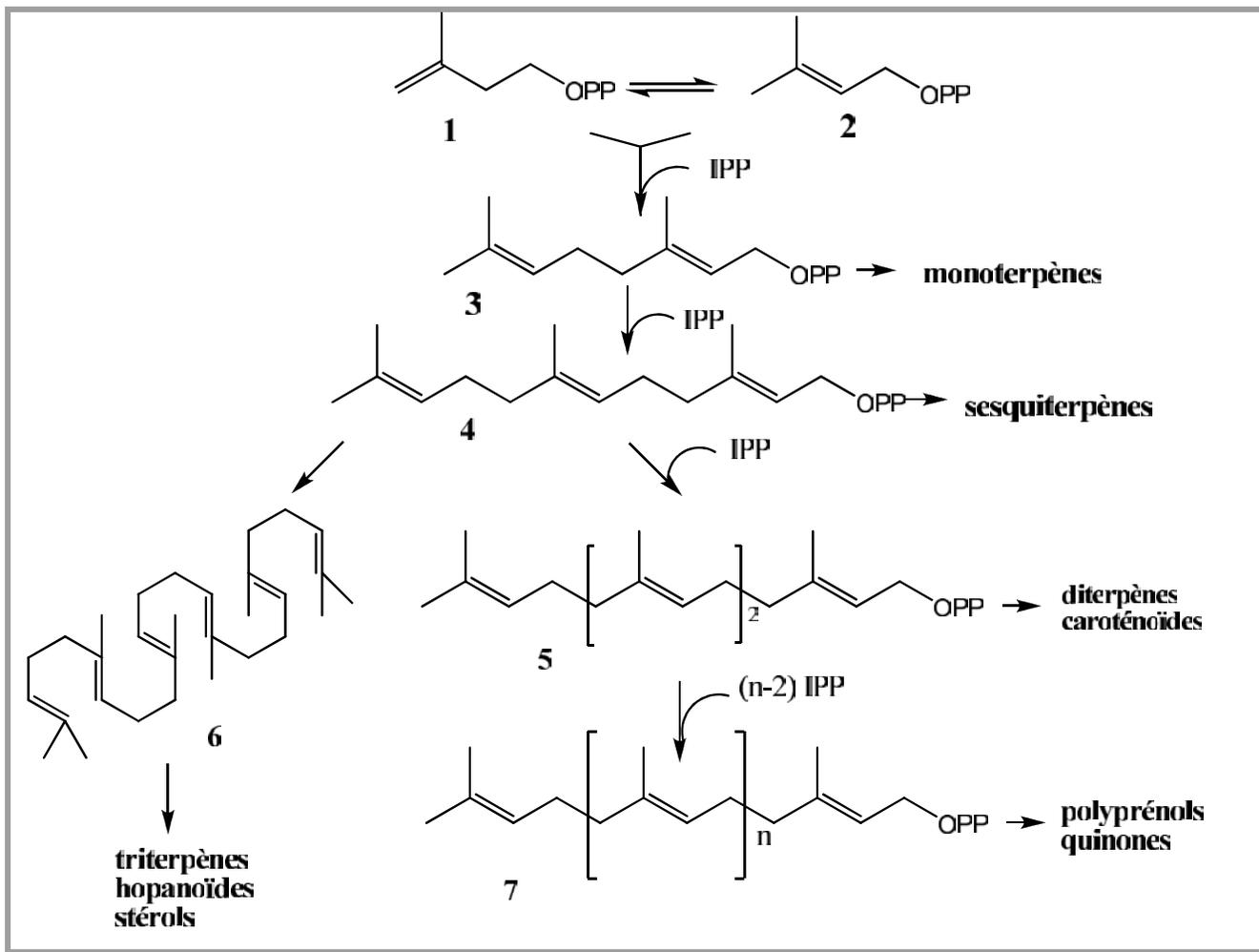


Figure 13 : Biosynthèse des isoprénoïdes à partir du diphosphate d'isopentényle (IPP)

La condensation d'IPP **1** (entité nucléophile) sur le diphosphate de diméthylallyle **2** (entité électrophile) mène au diphosphate de géranyl **3** (GPP, C₁₀), précurseur des monoterpènes

(Figure 13). Une condensation supplémentaire de type tête-à-queue de l'IPP sur le GPP conduit au diphosphate de farnésyle **4** (FPP, C15), précurseur des sesquiterpènes. Une élongation supplémentaire du diphosphate de farnésyle avec une entité d'IPP, conduit au diphosphate de géranylgeranyle **5** (GGPP), précurseur des diterpènes et des caroténoïdes. Tandis qu'une condensation "tête-à-tête" de deux molécules de diphosphate de farnésyle aboutit au squalène **6** (C30), précurseur des triterpènes, des stérols et des hopanoïdes. Enfin, les composés isopréniques en C5n, précurseurs des polyprénols et des quinones, proviennent de condensations successives de l'IPP sur le GGPP **5**. Les prényles transférases permettent l'élongation des chaînes prényles par addition d'une molécule d'IPP. (Ogura *et al.*, 1998). Ces précurseurs acycliques isopréniques **7** peuvent subir différentes réactions chimiques (oxydations, cyclisations suivies de transpositions), ce qui permet de dénombrer à ce jour plus de 22 000 isoprénoïdes. (Connolly *et al.*, 1992)

II-3-Les flavonoïdes

II-3-1-Généralités

Les flavonoïdes ont été isolés par le scientifique E.Chervreul en 1814, mais ont été réellement découverts qu'en 1930 par Albert Szent-Györgyui, désignés sous le nom de vitamine P, en raison de leur efficacité à normaliser la perméabilité des vaisseaux sanguins, cette dénomination fut abandonnée lorsqu'on se rendit compte que ces substances ne correspondaient pas à la définition officielle des vitamines (Nijveldt *et al.*, 2001)

Les travaux relatifs aux flavonoïdes sont multiples depuis la découverte du célèbre "french paradox" correspondant à un bas taux de mortalité cardiovasculaire observé chez les habitants des régions méditerranéennes, associant une consommation de vin rouge à une prise importante de graisses saturées (Ghedira, 2005; Malesev *et al.*, 2007). Près de 4000 flavonoïdes ont été décrits (Medić-Šarić *et al.*, 2004)

II-3-2-Structure

Les flavonoïdes ont tous la même structure chimique de base, ils possèdent un squelette carboné de quinze atomes de carbones constitué de deux cycles aromatiques (A) et (B) qui sont reliés entre eux par une chaîne en C3 en formant ainsi l'hétérocycle (C) (figure 14). Généralement, la structure des flavonoïdes est représentée selon le système C6-C3- C6 (Emerenciano *et al.*, 2007) en formant une structure de type diphenylpropane dont des groupements hydroxyles, oxygènes, méthyles, ou sucres peuvent être rattachés (Narayana, 2001; Malešev *et al.*, 2007).

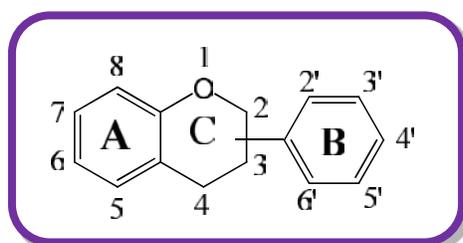


Figure 14 : Squelette de base des flavonoïdes

II-3-3- Classification

Tableau 4 : Principales classes des flavonoïdes (Narayana *et al.*, 2001; W- Erdman *et al.*, 2007)

Classes	Structures chimiques	R3'	R4'	R5'	Exemples
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH3	H	Diosmétine
Flavonols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myrecétine

Flavanols		OH	OH	H	Catéchine
Flavanones		H	OH	H	Naringénine
		OH	OH	H	Eriodictyol
Anthocyanidines		H	OH	H	Pelargonidine
		OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	Delphénidine
Isoflavones		R5	R7	R4'	
		OH	OH	OH	Genisteine
		H	O-Glu	OH	Daidzine

II-3-4- Localisation

Dans la plupart des cas, les flavonoïdes sont présents sous forme glycosidique dans les vacuoles des fleurs, des feuilles, des tiges ou des racines. Les flavonoïdes aglycones, notamment les flavonoïdes simples et polyméthylés, sont plutôt présents sous forme de cires dans les feuilles, les écorces, les bourgeons floraux (Iwashina, 2000).

II-3-5-La biosynthèse des flavonoïdes

Tous les flavonoïdes sont formés via un intermédiaire commun : la 4,2',4',6'-tétrahydroxy-chalcone. Ce précurseur dérive de la condensation de trois molécules d'acétyl coenzyme A, qui correspondront au cycle A, et d'une molécule de 4-hydroxycinnamate-coenzyme A, permettant la formation des cycles B et C. Ce mécanisme est catalysé par la chalcone synthase. La cyclisation de cette chalcone stéréospécifique par la chalcone isomérase forme la (S)-4', 5, 7-trihydroxyflavanone conduisant au squelette de base des flavonoïdes.

Plusieurs enzymes contribuent à l'apparition des différentes classes de flavonoïdes. Dans chaque classe de flavonoïde, les molécules sont ensuite diversifiées par hydroxylation (flavonoïde 3'-hydrolase, flavonoïde 3',5'-hydroxylase), méthylation (O-méthyltransférase), glycosylation (rhamnosyl transférase, flavonoid glycosyl transférase), acylation (acyl-CoA transférase) ou polymérisation (figure 15).

Les enzymes

AS : aurone synthase.

CHI : chalcone isomérase.

CHS : chalcone synthase.

DFR : dihydroflavonol 4-réductase.

FHT : flavanone 3-hydrolase.

FLS : flavonol synthase.

FNSI/FNSII : flavone synthase.

IFS : isoflavone synthase.

LDOX : leucoanthocyanidin dioxygenase.

LCR : leucoanthocyanidin réductase.

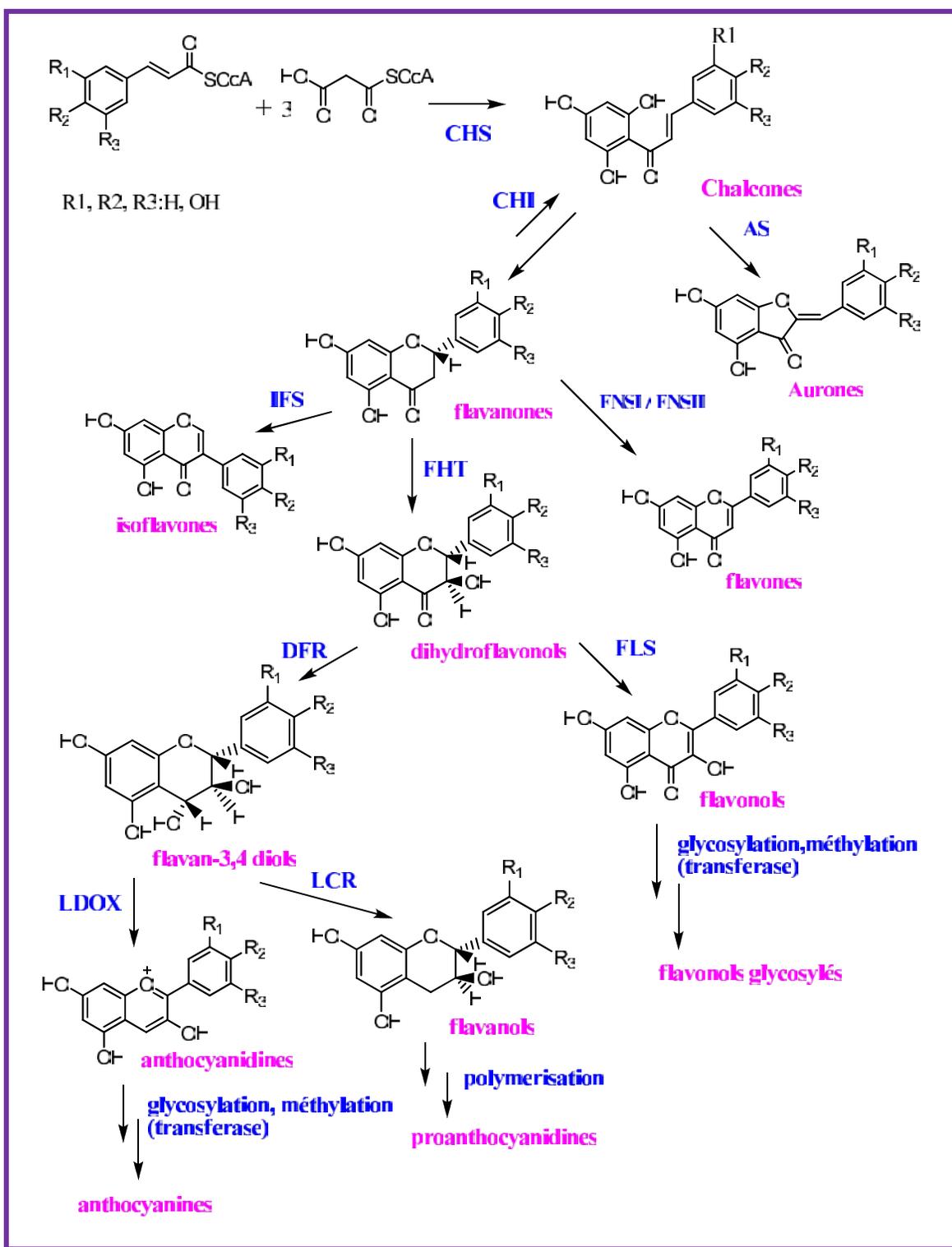


Figure 15 : voies de biosynthèse des flavonoïdes (adaptées de Forkmann et al., 2001 , Winkel-Shirley, 2002).

II-3-6-Distribution des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont souvent rencontrés dans les légumes feuilles (salade, chou, épinard, etc.), ainsi que dans les téguments externes des fruits (tableau 5). La distribution des différentes familles de flavonoïdes dans le règne végétal a été évaluée par plusieurs auteurs (Di carlo *et al.*, 1999 ; Fargeix, 2000 ; Rice-Evans *et al.*, 1996 , Hollman *et al.*, 1999 , Sampson *et al.*, 2002)

Tableau 5 : Distribution des flavonoïdes dans les fruits et légumes.

Famille	Molécules principales	Distribution
Flavone	apigénine, lutéoline, chrysin	Pomme, céleri, grains de céréale,..(teneur = 5-100 mg/kg) herbes aromatiques (persil, romarin, thym), Petroselinum sativum, Apium graveolens...
Flavanone	hespéridine, naringine, taxifoline	Citrus et agrumes (teneur = 250-6000mg/kg) eucalyptus globulus
Flavonol	quercétine, myricétine et kaempférol	Pomme, pamplemousse, radis, endive, brocoli, oignon, chou, laitue, vin rouge, raisin, olive, thé noir,... (teneur = 56-250 mg/kg) Sophora japonica, Stellaria media.
Isoflavones	genisteine et daidzeine	Légumineuses (soja, haricots noirs et pois chiches verts), pousses de luzerne et de trèfle et les graines de tournesol (teneur = 150-1500 mg/kg)
Flavan-3-ol	(+)-catéchine, (-)-epicatéchine,	Thé vert et noir, vin rouge (teneur = 5-250 mg/kg) .Vitis vinifera
Anthocyanes	cyanidine, pelargonidine	Fruits et légumes rouges et violets (pommes, raisins, baies, kaki, cassis...) (100-4000 mg/kg)

II-3-7-Activités biologiques des flavonoïdes

II-3-7-1- Activités antimicrobiennes

II-3-7-1-1-Activité antibactérienne

De nombreux flavonoïdes possèdent des propriétés antibactériennes. Des isoflavones sont connus comme bactéricides ou bactériostatiques, en particulier vis-à-vis des bactéries Gram +. (Jimenez-Gonzalez *et al.*, 2008).

Il a été démontré que les 5-hydroxyflavanones et les 5-hydroxyisoflavanones avec un, deux ou trois groupements hydroxyles en position 7, 2' et 4' inhiberaient la croissance de *Streptococcus* sp., l'hydroxylation la plus importante pour l'activité étant celle en position 2'. Par contre, les méthoxylations diminuent considérablement les effets antibactériens (Cushnie *et al.*, 2005).

Les flavonoïdes agiraient à plusieurs niveaux. Il semblerait que le cycle B joue un rôle important dans l'intercalation avec les acides nucléiques et inhiberait ainsi la synthèse d'ADN et d'ARN. Ils peuvent également inhiber l'ADN gyrase d'*E. Coli*, là encore une hydroxylation du cycle B semble essentielle à l'activité. Certains pourraient inhiber la topoisomérase IV et ainsi perturber la décaténation et le clivage de l'ADN, provoquant un message SOS et une inhibition de la croissance bactérienne. Certaines catéchines (flavan-3-ols), la 2,4,2'-trihydroxy-5'-méthylchalcone, la naringénine et la quercétine possèdent un effet antibactérien en provoquant un changement de perméabilité membranaire. Les licochalcones interféreraient avec le métabolisme énergétique en inhibant la NADH -cytochrome c réductase (Cushnie *et al.*, 2005)

* anti SAMR (*Staphylococcus aureus* méticilline résistants)

Il est suggéré que les isoflavonoïdes agiraient en interférant avec l'incorporation de métabolites et de nutriments dans les cellules bactériennes ou en affectant les acides nucléiques des SAMR. Il semble que la position des prénylations soit importante pour l'activité. En effet, on retrouve des meilleures activités avec des groupements isoprényles en position 3' et en 6. De plus, une hydroxylation en position 5 augmenterait l'activité. La présence d'un groupement hydroxyle aliphatique sur l'isoprényle pourrait être mise en relation avec une action sur les souches de *S. aureus* méticilline résistantes (Botta *et al.*, 2009). De plus une dihydroxylation en méta, soit sur le cycle A soit sur le cycle B, augmente l'activité (Halbwirth, 2010).

Pour les flavanones, une étude indique qu'une 2',4' ou 2',6'-dihydroxylation sur le cycle B et une 5,7-dihydroxylation sur le cycle A sont importantes pour l'activité anti-SAMR. Une substitution en position 6 ou 8 avec une longue chaîne aliphatique (type géranyle ou lavandulyle) augmente l'activité (Cushnie *et al.*, 2005).

* action sur les bactéries impliquées dans la formation des caries dentaires

L'érichristagalline (isoflavonoïde prénylé) apparaît comme un agent intéressant pour la prévention des caries dentaires en inhibant la croissance bactérienne et en interférant avec l'incorporation du glucose, diminuant ainsi la synthèse d'acides organiques (Botta *et al.*, 2009).

II-3-7-1-2- Activité antifongique

De nombreux flavonoïdes possèdent des activités antifongiques, le plus grand nombre appartient aux flavanones et aux flavanes (Grayer *et al.*, 1994). Une flavanone prénylée (5,7,4'-trihydroxy-8-méthyl-6-(3-méthyl-[2-butényl])-(2S)-flavanone) ainsi qu'une flavane (7-hydroxy-3',4'-(méthylènedioxy)-flavane) sont actives contre *Candida albicans*. Alors que plusieurs flavones polyméthoxylées sont actives contre *Aspergillus flavus* (Cushnie *et al.*, 2005).

Quelque soit la classe de flavonoïdes considérée, il apparaît que le caractère lipophile des composés augmente l'activité, permettant aux molécules de pénétrer plus facilement à travers la membrane fongique (Jimenez-Gonzalez *et al.*, 2008 ; Grayer *et al.*, 1994).

II-3-7-1-3- Activité antivirale

La génistéine, ainsi que d'autres flavonoïdes (quercétine, kaempférol, 5,6,7- triméthoxyflavone, 3-méthylkaempférol) sont actifs *in vitro* sur plusieurs souches virales, que ce soit des virus non-enveloppés (poliovirus, adénovirus) ou des virus enveloppés (Retroviridae comme VIH, Flaviviridae, Herpes virus...). Le flavonoïde le plus étudié est de loin la génistéine, néanmoins les mécanismes d'action ne sont pas clairement élucidés (Andres *et al.*, 2009). La génistéine pourrait être active en inhibant la PTK (inhibition de l'entrée du virus), en inhibant la phosphorylation de la glycoprotéine E et d'autres polypeptides viraux (inhibition de

l'assemblage du virus), en inhibant la sécrétion du facteur TNF- α , ou en inhibant l'expression de certains gènes viraux (inhibition de la réplication virale) (Andres *et al.*, 2009).

Des isoflavanones ainsi que des isoflavonoïdes prénylés ont une activité antivirale sur le VIH, des études suggèrent qu'une absence de groupement hydroxyle en position 4' et une absence de tout substituant en position 5 est nécessaire à l'activité (Botta *et al.*, 2009)

Des flavones (baicaléine, robustaflavone, hinokiflavone) sont décrites comme inhibant la reverse transcriptase du VIH-1, une autre flavone, la chryisine apparaît comme la molécule présentant le meilleur index thérapeutique contre VIH-1. (Cushnie *et al.*, 2005).

II-3-7-2- Activités antiparasitaires

De nombreux flavonoïdes possèdent des propriétés antiparasitaires.

➤ *Plasmodium* sp.

Le paludisme est certainement la parasitose la plus importante avec 300 à 600 millions de cas cliniques et près d'un million de morts par an dans le monde (Wright, 2010). Les agents responsables sont *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale*.

La génistéine possède une activité contre *P. falciparum* (Botta *et al.*, 2009). Un certain nombre d'isoflavonoïdes prénylés inhibent la croissance de différentes souches de *P. falciparum*. Des biflavonoïdes sont également connus comme de bons antiplasmodiaux (Batista *et al.*, 2009). Des chalcones prénylées (lichochalcone A et méthyllindératine) sont actives contre *Plasmodium* sp. *in vitro* et *in vivo* (Wright, 2010).

Le mode d'action des flavonoïdes n'est pas encore totalement élucidé mais il semblerait que certains inhibent l'influx de L-glutamine et de myoinositol dans les érythrocytes infectés (Magadula *et al.*, 2009, Kaur *et al.*, 2009).

➤ *Leishmania* sp.

Les leishmanioses sont dues à une vingtaine d'espèces de *Leishmania*. On compte 500 000 nouveaux cas par an. L'arsenal thérapeutique est très limité pour cette infection, avec notamment

apparition de résistances, nombreux effets indésirables et des coûts élevés de traitement. (Griensven *et al.*, 2010).

Dans une étude, menée par Tasdemir *et al.* (2006), sur une centaine de flavonoïdes testés pour leur activité contre *Leishmania donovani*, pratiquement toutes les flavones et les flavon-3-ols sous forme aglycone sont actifs. Pour les flavones, la présence de deux OH, en particulier en positions 5, 7 et 8 augmente l'activité, alors que des méthoxylations diminuent cet effet. Les composés avec la meilleure activité sont les flavon-3-ol. Les hydroxylations ont une influence sur l'activité, mais il est difficile d'établir des relations structures activités, néanmoins la fisétine la plus active. De plus, une glycosylation en position 3 et 5 diminue l'activité. Même si les flavanones aglycones et les flavan-3-ols testées possèdent une activité, ces composés sont moins actifs que les flavones et flavon-3-ols correspondants, ce qui suggère l'importance de la double liaison en 2,3 dans l'activité antileishmanienne (Tasdemir *et al.*, 2006).

➤ *Trypanosoma* sp.

Trypanosoma cruzi est l'agent responsable de la trypanosomiase américaine ou maladie de Chagas. La maladie de Chagas présente deux phases : une phase aigue caractérisée par une inflammation souvent affectant le myocarde, et une phase chronique autoimmune avec destruction du muscle myocardique (Lescure *et al.*, 2010).

T. brucei rhodiense et *T. brucei gambiense* sont responsables de la trypanosomiase africaine ou maladie du sommeil qui touche 500 000 personnes /an en Afrique subsaharienne (Tasdemir *et al.*, 2006).

Tasdemir *et al.*, 2006 ont évalué l'activité d'une centaine de flavonoïdes contre *T. brucei rhodesiense*. Les composés glycosylés ont une activité inférieure à celles des aglycones correspondantes. La double liaison en 2,3 est importante pour l'activité, les flavanones et les flavan-3-ols étant moins actifs que les flavones et flavon-3-ols correspondant. La cétone en position 4 est nécessaire à l'activité. Les isoflavonoides non glycosylés testés possèdent une activité importante contre *T. brucei rhodesiense* (Tasdemir *et al.*, 2006). De plus, une méthoxylation sur le cycle B ou le cycle C tend à diminuer l'activité (Izumi *et al.*, 2011).

De nombreuses flavanones prénylées sont actives contre *T. cruzi*, les dérivés portant un groupement lavandulyle apparaissent comme les plus actifs. Il semble que la prénylation joue un rôle dans l'activité, en effet la naringénine (composé non prénylé) ne possède aucune activité (Uchiyama, 2009).

II-3-7-3- Activités estrogéniques et anti-estrogéniques

Ces activités sont dues essentiellement aux isoflavonoïdes qui font partie des phytoestrogènes. Un phytoestrogène peut être défini comme toute substance issue de plante qui est capable d'induire ou de moduler une réponse estrogénique chez les vertébrés en se liant à des récepteurs estrogéniques. Les phytoestrogènes regroupent des flavanones, des lignanes, des coumestanes et beaucoup d'isoflavonoïdes (Chatenet, 2008).

a- Les récepteurs aux estrogènes

Les phytoestrogènes se lient aux récepteurs nucléaires et aux estrogènes présents sous deux isoformes : ER α et ER β . Ces récepteurs sont tous les deux impliqués dans le développement des follicules ovariens, dans la vascularisation endothéliale, dans le fonctionnement des cellules cardiaques par exemple. Les récepteurs ER α sont impliqués dans la maturation osseuse que ce soit chez les hommes ou chez les femmes, alors que l'isoforme ER β intervient dans la construction osseuse uniquement chez la femme. De plus, ER α est impliqué dans la stimulation folliculaire et dans le maintien de la concentration en lutéine dans le sang, alors que ER β est plutôt impliqué dans les fonctions d'apprentissage et de mémoire (Cornwell *et al.*, 2004). Les phytoestrogènes se lieraient préférentiellement aux récepteurs ER β alors que les estrogènes endogènes se lient aussi bien aux deux isoformes (Strauss *et al.*, 1998).

b- Principales sources de phytoestrogènes

Les principales isoflavones : biochanine A, daidzéine, formononétine, glycitéine, génistéine, sont présentes dans le soja, les trèfles, les pois chiches, l'orge, le seigle, les arachides. Le houblon est également une source de nombreuses flavanones estrogéniques (Virk-Baker *et al.*, 2010).

c- Activités des phytoestrogènes

Beaucoup d'études épidémiologiques ont montré que dans les pays asiatiques, la prévalence de certains cancers est plus faible (consommateurs d'aliments à base de soja) que dans les pays occidentaux. Il apparaît que la consommation d'isoflavones de soja réduit le risque de cancer du sein. Les phytoestrogènes posséderaient une action bénéfique sur plusieurs autres types de cancers : de l'endomètre, de la prostate (Morton *et al.*, 1998), du colon, de la thyroïde, de la vessie (Cornwell *et al.*, 2004). Dans le même sens, les cellules impliquées dans le remodelage osseux étant étroitement régulées par de nombreux facteurs hormonaux, les phytoestrogènes pourraient donc avoir un effet contre l'ostéoporose (Marie *et al.*, 2008).

Les phytoestrogènes peuvent également se lier aux récepteurs nucléaires stéroïdiens comme ceux des androgènes et de la progestérone, ou agir sur d'autres fonctions nucléaires notamment sur l'inhibition des topoisomérases II, ce qui expliquerait leurs effets antiprolifératifs et pro-apoptotiques, et sur l'inhibition de la néo-angiogénèse (Chatenet, 2008). De plus, les phytoestrogènes peuvent agir sur le métabolisme des estrogènes, en bloquant par exemple certaines enzymes comme l'aromatase qui intervient dans la conversion des androgènes en estrogènes (Chatenet, 2008 ; Morton *et al.*, 1998). Ils peuvent également réduire la production d'hormones thyroïdiennes par inhibition de la peroxydase thyroïdienne (Chatenet, 2008).

Les estrogènes ont naturellement un rôle athéroprotecteur, ainsi les phytoestrogènes permettraient de diminuer la formation de la plaque athéroscléreuse et auraient ainsi un rôle dans la prévention des maladies coronaires cardiovasculaires (Tikkanen *et al.*, 2000).

Néanmoins, le mécanisme d'action n'est pas encore clairement élucidé.

Les récepteurs aux estrogènes étant largement présents dans le système nerveux central, il semble que les phytoestrogènes aient des effets sur les fonctions cognitives : un effet antidépresseur par inhibition de la recapture de la sérotonine, des perturbations de la fonction de reproduction en agissant sur l'axe hypothalamo-hypophysaire (Cornwell *et al.*, 2004 ; Lephart *et al.*, 2002), une amélioration de la mémorisation et de la flexibilité mentale (Jamali *et al.*, 2010).

➤ *Isoflavonoïdes*

La prénylation et l'hydroxylation des isoflavonoïdes sont souvent liés à un effet anti-estrogénique (Zhang *et al.*, 2008). La prénylation en position 6 et 8 sur le cycle A, une hydroxylation de la chaîne 6-prényl, une substitution de type catéchol sont associées à une activité anti-estrogénique (Botta *et al.*, 2009).

➤ *flavanones*

La naringénine possède un effet anti-estrogénique par inhibition compétitive de la fixation aux récepteurs estrogéniques (Strauss *et al.*, 1998). La 8-prenylnaringénine, extraite du houblon, apparaît comme l'un des meilleurs phytoestrogènes (Milligan *et al.*, 2002, Kretzschmar *et al.*, 2010).

II-3-7-4- Potentiel antioxydant

L'activité anti-radicalaire des flavonoïdes est conditionnée par (Halbwirth, 2010 ; Kale *et al.*, 2008 ; Mladinka *et al.*, 2010 ; Rufer *et al.*, 2006):

- pour le cycle C : la présence d'une double liaison en 2,3 avec un groupement oxo en 4, et une hydroxylation en 3.
- pour le cycle A : une dihydroxylation en 5,7.
- pour le cycle B : une *ortho*-dihydroxylation.

Le potentiel antioxydant des flavonoïdes peut aussi s'expliquer par la capacité de chélation des ions métalliques par les flavonoïdes (Halbwirth, 2010 ; Leopoldini *et al.*, 2010). Cette capacité est très largement dépendante du nombre d'hydroxyles dans la molécule (Halbwirth, 2010). Les 3 sites de chélation principaux se situent (Mladinka *et al.*, 2010) :

- entre l'hydroxyle en 5 et le carbonyle en position 4.
- entre l'hydroxyle en position 3 et le carbonyle en 4.
- entre les deux hydroxyles en position 3' et 4' sur le cycle B.

Les flavonoïdes peuvent aussi inhiber des lipoxygénases (LOXs), soit directement, soit indirectement par la chélation d'ions métalliques. Les lipoxygénases catalysent l'oxydation d'acide arachidonique en acides gras polyinsaturés (Mladinka *et al.*, 2010).

Certains sont des inhibiteurs compétitifs de la xanthine oxydase, il apparait que la double liaison C2-C3 soit indispensable à cette activité. La NADPH oxydase peut aussi être inhibée par des flavonoïdes. Les composés dont la liaison C2-C3 est saturée sont les plus actifs, de plus, une hydroxylation placée en position *méta* d'une méthylation sur le cycle B augmente l'activité inhibitrice sur la NADPH oxydase (Mladinka *et al.*, 2010).

En ce qui concerne le cas particulier des isoflavonoïdes, il apparait que le potentiel antioxydant dépend de plusieurs caractéristiques structurales (Rufer *et al.*, 2006):

- une dihydroxylation en 5,7.
- une *ortho*-dihydroxylation sur le cycle A ou le cycle B augmente l'activité.

II-3-7-5- Activité antiproliférative et anticarcinogénique

Dans une étude évaluant la cytotoxicité de plus de 100 polyphénols de bas poids moléculaire, sur des lignées cellulaires normales et tumorales, il apparait que les composés sont plus actifs sur les souches cancéreuses que sur les lignées saines (Fukai *et al.*, 2000).

Les composés les plus actifs possèdent un groupe hydrophile (hydroxylation) en position vicinale d'un groupe hydrophobe (prényle ou phényle) (Botta *et al.*, 2009 ; Fukai *et al.*, 2000). La cytotoxicité des flavones prénylées est supérieure à celle des mêmes composés sans substituant. Par contre, il semble que la prénylation ne change pas significativement la cytotoxicité des flavanones, des isoflavanes, des chalcones et des 5-hydroxy-3-phénoxychrom 4-ones, à l'exception de la prénylation de la génistéine (isoflavone) qui augmente de manière significative sa cytotoxicité (Fukai *et al.*, 2000).

Les isoflavonoïdes en particulier peuvent prévenir les cancers hormonaux-dépendants en agissant sur les récepteurs ER. Le soja est l'aliment le plus riche en isoflavones avec 1-3mg/g de poids sec, le composé majoritaire parmi ces isoflavonoïdes étant la génistéine. Il semble qu'un régime riche en génistéine inhibe la croissance des tumeurs de la prostate, en réduisant à la fois le nombre de tumeurs et la taille de ces tumeurs (Boersma *et al.*, 2001 ; Morton *et al.*, 1998).

II-3-7-5-1-Agents supprimeurs de la carcinogénèse

En tant qu'agents supprimeurs de tumeurs, les flavonoïdes interviennent à différents niveaux. En outre, ils peuvent inhiber les topoisomérases I et II, différentes protéines kinases, ils peuvent

également cibler l'apoptose et ainsi induire une mort des cellules tumorales. L'EGCG (gallate d'épigallocatechine) et la quercétine, en se liant au récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor), peuvent supprimer la prolifération ou induire l'apoptose (Kale *et al.*, 2008).

II-3-7-5-2- Action sur la résistance des cellules tumorales

Certains inhibent la glycoprotéine P-gp et d'autres transporteurs d'efflux (Kale *et al.*, 2008 ; Alvarez *et al.*, 2010 ; Colabufo *et al.*, 2010). Ces transporteurs jouent un rôle essentiel dans les phénomènes de résistances des cellules tumorales aux traitements anticancéreux. En effet, ils interfèrent avec la biodisponibilité, la pharmacocinétique et la pharmacodynamie des anticancéreux.. La présence d'un hydroxyle non substitué en position 5 est importante à l'activité contre P-gp (Kale *et al.*, 2008). Les composés prénylés auraient une meilleure affinité pour P-gp (Alvarez *et al.*, 2010).

Deux flavones (6-prénylchrysin et tectochrysin) apparaissent comme des inhibiteurs spécifiques de l'ABCG2 (transporteur impliqué dans les phénomènes MDR dans le cancer du sein). Il semble qu'une hydroxylation en position 5 (cycle A) augmente l'activité, alors qu'une hydroxylation en position 3 diminue l'activité. De plus, sur ce modèle, une prénylation en position 8 augmente plus l'activité qu'en position 6 (Ahmed- Belkacem *et al.*, 2005).

Certaines ptérocarpanes (4-hydroxyamaackiaine, érybraéine C, bitucarpine A) possèdent la même activité que l'étoposide sur des cellules humaines d'adénocarcinome de colon ou induisent l'apoptose sur cellules HL-60 (leucémie humaine) (2,3,9- triméthoxyptérocarpane, médicarpine, vesticarpine) (Jimenez-Gonzalez *et al.*, 2008).

II-3-7-5-3- Action sur la vascularisation des tumeurs

Un effet antitumoral peut-être exercé en inhibant la néovascularisation des tumeurs (composés anti-angiogéniques), ou encore en détruisant la vascularisation déjà existante (agents perturbateurs de la vascularisation tumorale). Les seconds composés en détruisant la vascularisation tumorale préexistante, entraînent un arrêt du flux sanguin dans la tumeur et mènent à une nécrose de la tumeur

Certains flavonoïdes possèdent cette propriété soit en induisant une apoptose sélective des cellules endothéliales tumorales, soit indirectement en augmentant les concentrations dans les tumeurs en TNF- α et d'autres cytokines (McKeage *et al.*, 2010).

De nombreuses études épidémiologiques présentent les régimes riches en flavonoïdes comme liés à une diminution de l'incidence des cancers. De plus, dans de nombreuses études, les flavonoïdes apparaissent actifs contre des cellules tumorales.

Toutefois, il est difficile de corrélérer ces deux constatations, les doses étant très différentes en général entre les études *in vitro* et dans les études épidémiologiques. De plus, étant donné la diversité des structures au sein des flavonoïdes et les différents mécanismes pouvant être mis en jeu, il est très difficile d'établir des relations de structure-activité.

II-3-7-6- Activité anti-inflammatoire

Le facteur de transcription NF- κ B est impliqué dans la régulation de nombreux gènes, il joue un rôle important en particulier dans la réponse inflammatoire. En inhibant l'activation de NF- κ B, certains flavonoïdes s'avèrent posséder des propriétés anti-inflammatoires (Pierini *et al.*, 2008).

Certains flavonoïdes sont des inhibiteurs de l'enzyme COX-2 (enzyme qui produit les prostaglandines impliquées dans l'inflammation) (Pierini *et al.*, 2008). De plus, certains sont suppresseurs de la transcription de COX-2, en activant PPAR- γ (Peroxisome proliferator-activated receptors). Parmi les flavonoïdes testés, les flavanones et les flavan-3-ols sont inactifs, suggérant que la double liaison C2-C3 est essentielle à l'activation de PPAR- γ . De plus, cette activation semble dépendante du nombre et de la position des hydroxyles : des hydroxylations en position 5 et 7 sur le cycle A, et en 4' sur le cycle B augmentent l'activité, alors qu'un hydroxyle en 3' diminue cette activité (Liang *et al.*, 2001).

Les flavonoïdes possèdent une activité comme piègeurs de NO (nitric oxide) mais d'un côté, il semble que cette activité *in vitro* n'ait pas de signification au niveau physiologique, puisqu'elle reste très faible comparée à celles que peuvent avoir certaines molécules "physiologiques" comme l'hémoglobine. Il apparaît plutôt que les flavonoïdes diminueraient la production de NO

par inhibition des protéines induisant la synthèse de iNOS (synthase inductible de NO) notamment par inhibition de l'activation de NF- κ B (Mladinka *et al.*, 2010).

II-3-7-7- Activité sur les maladies neuro-dégénératives

Certains flavonoïdes protègent les neurones vis-à-vis de la toxicité du glutamate. Le glutamate est impliqué dans la mort neuronale, en menant à une accumulation de ROS et en augmentant l'influx calcique. Dans la protection contre le glutamate, il est indispensable que les flavonoïdes possèdent une hydroxylation en 3 et un cycle C insaturé (Zhao, 2009).

Il semblerait également que chez les femmes ménopausées, un manque en estrogènes augmenterait l'incidence de la maladie d'Alzheimer, les phytoestrogènes auraient ainsi un effet bénéfique (Lephart *et al.*, 2002). La genistéine montre également un effet neuroprotecteur à doses faibles (nanomolaire) par un mécanisme faisant intervenir les récepteurs ER, alors qu'à des concentrations plus élevées (micromolaires) le mécanisme intervenant est essentiellement une action antioxydante de la génistéine (Zhao, 2009).

Pour pouvoir exercer ce type d'activité, il faut que les flavonoïdes puissent traverser la barrière hémato-encéphalique. Il a été montré que certains flavonoïdes, en particulier des flavanones pouvaient traverser la BHE. Les flavonoïdes peuvent exercer des effets bénéfiques sur le SNC en protégeant les neurones contre le stress oxydatif et en supprimant l'activation de la microglie et les astrocytes qui sont impliquées dans la neuro inflammation, et de promouvoir la plasticité synaptique, la mémoire et la fonction cognitive. Les flavonoïdes agiraient en se liant aux ATP d'enzymes et de récepteurs, en modulant l'activité de kinases, en affectant la fonction de phosphatases, en préservant l'homéostasie de Ca^{2+} , en modulant les cascades de signalisation aboutissant aux kinases comme par exemple l'activation de facteur de transcription et la liaison à des séquences de promoteur (Spencer, 2007).

II-3-7-8- Activité sur le système cardio-vasculaire

Certains flavonoïdes auraient un effet positif dans l'athérosclérose et les formes stables de maladies cardio-vasculaires en diminuant l'oxydation de LDL par inhibition de LOX, une atténuation du stress oxydatif et une diminution de l'inflammation. Les flavonoïdes auraient

également un intérêt dans le traitement des arythmies et de l'hypertension artérielle, en particulier grâce à une diminution du stress oxydatif. Dans la prévention des infarctus myocardiques, les flavonoïdes agiraient par inhibition de l'agrégation plaquettaire et une diminution des ROS (Mladinka *et al.*, 2010).

Les flavonoïdes inhiberaient l'agrégation plaquettaire par interaction avec les récepteurs aux thromboxanes et possèderaient une action vasodilatatrice, néanmoins, les mécanismes d'action qui interviennent sont encore flous (Mladinka *et al.*, 2010).

II-3-7-9- Activité insecticide

De nombreuses classes de flavonoïdes comprennent des molécules insecticides. Ainsi, des isoflavonoïdes : l'osajine (composé prenylé), la sphaérobiosode (composé glycosylé), la genistéine, des 3-arylcoumarines (scandénine et scandénine A) et des chalcones possèdent des propriétés antiappétantes sur *Achaea janata* (Sreelatha *et al.*, 2009).

II-3-7-10-Autres activités des flavonoïdes

- Protection des plantes contre les radiations UV.
- Implication dans les processus de défense de la plante contre les infections bactériennes et virales.
- Agissent comme des pigments ou des co-pigments.
- Modulation de la distribution d'auxine.
- Fonctionnent comme des signaux moléculaires de reconnaissance entre les bactéries symbiotiques et les légumineuses afin de faciliter la fixation de l'azote moléculaire.
- Régulation de l'élongation des tiges.
- Interviennent dans la maturité des fruits.
- Sont à l'origine des goûts amers et astringents afin de repousser les animaux Herbivores. (Park *et al.*, 2003 ; Subsamanian *et al.*, 2007 ; Yang *et al.*, 2008)

II-3-8-Séparation et purification

La séparation des composés phénoliques est fondée essentiellement sur les différentes techniques chromatographiques telles que :

-La chromatographie liquide sur colonne (CC) : elle est basée sur l'utilisation d'une phase stationnaire comme le silicagel, la cellulose ou le polyamide et une phase mobile constituée par divers systèmes de solvants comme éluant. Elle est la plus utilisée pour la séparation des quantités de mélanges importantes et complexes (Markham, 1982)

-La chromatographie préparative sur papier (CP) : basée sur l'utilisation d'une surface plane de cellulose considérée comme support maintenant par imprégnation une phase stationnaire liquide, les systèmes de solvants les plus utilisés dans cette technique sont :

- L'acide acétique **15** et **30 %** constitue le système aqueux.
- Le *n*-butanol / Acide acétique/ Eau (BAW) **4 /1/ 5** constitue le système Organique (Mabry *et al.*, 1970)

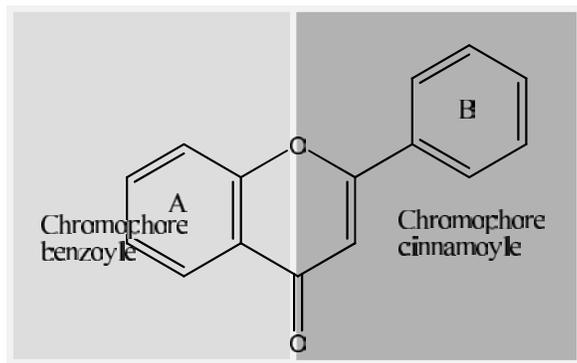
- la chromatographie préparative sur couche mince (CCM), très simple et très rapide, elle est utilisée aussi bien pour la séparation que pour la purification en utilisant les diverses phases stationnaires et les systèmes de solvants appropriés.

La purification ultime des composés phénoliques isolés se fait généralement sur une colonne de Sephadex LH-20 en utilisant le méthanol comme éluant.

II-3-9-L'analyse structurale des flavonoïdes

a)- La spectrométrie UV-visible :

L'action des flavonoïdes dans les plantes résulte en partie de leur effet filtre et de leur forte absorption dans le domaine UV du spectre (Harborne, 2000, Kong, 2003). Les spectres UV des flavonoïdes exhibent deux bandes d'absorption principales dans la région 240-400 nm. La bande I (300- 395 nm) est considérée comme étant associée à l'absorption de la partie cinnamoylé (noyau B) du flavonoïde et la bande II (240-280 nm) à celle de la partie benzoylé comme l'indique le schéma suivant :



Plusieurs facteurs peuvent affecter le spectre d'absorption et le coefficient d'extinction des flavonoïdes. L'augmentation du nombre d'hydroxyles sur la partie aglycone provoque un déplacement bathochrome des bandes d'absorption vers de plus grandes valeurs.

a)-1-le spectre UV visible dans le méthanol

Tableau 6 : Absorption UV des flavonoïdes dans le méthanol (Harborne,1989., Markham 1982)

Classe des flavonoïdes	Absorbance UV- visible λ max (nm)	
	Bande II	Bande I
Flavonol	250-280	330-385
Flavone	250-280	310-350
Flavanone et Dihydroflavanol	275-295	300-330
Flavanol	270-280	-
Chalcone	230-270	340-390
Aurone	230-270	380-430
Anthocyane	270-280	465-560
Isoflavone	245-275	310-330

En absence d'hydroxyle en position 3, cas des flavones, la longueur d'onde de la bande I est plus courte de 20 à 30 nm. La méthylation comme la glycosylation, en particulier sur les hydroxyles en position 3, 5, 7, 4', provoquent un déplacement hypsochrome vers les longueurs d'ondes plus courtes. Toutefois, la nature du sucre n'a généralement pas d'effet (Markham 1982).

a)-2- Le spectre UV en présence de réactifs

Le spectre méthanolique d'un composé flavonique sera modifié par addition d'un certain nombre de réactifs tels que **NaOH**, **NaOAc**, **AlCl₃**, **H₃BO₃** et **HCl**. Ces derniers réagissent avec les groupements hydroxyles par formation de complexes qui se traduira sur le spectre UV par des déplacements bathochromiques ou hypsochromiques des bandes d'absorption, permettant la localisation des hydroxyles libres sur le squelette flavonique.

✦ *Spectre en présence de NaOH*

NaOH ou (**NaOMe**), une base forte, ionise tous les hydroxyles phénoliques du squelette flavonique. Il en résulte un effet bathochrome sur les deux bandes I et II. Cet effet est plus important sur la bande I. Les flavonoïdes très hydroxylés sont instables en présence de ce réactif, particulièrement pour les flavonols ayant un hydroxyle libre en 4'.

Ce déplacement bathochrome suivi d'une variation de l'intensité lumineuse de la bande I renseigne sur le nombre et la position des hydroxyles libres (Ribereau-Gayou., 1968) L'apparition d'une nouvelle bande entre 320 et 335 nm par rapport au spectre MeOH, indique l'existence d'un OH libre en 7.

Cependant, l'effet de NaOH sur les flavones et les flavonols est de détecter les groupements hydroxyles dans les positions 3 et / ou 4' et 7.

Dans le cas des isoflavones hydroxylées sur le noyau A, le spectre montre après addition de NaOH un effet bathochrome des deux bandes I et II. Si l'isoflavone est ortho-dihydroxylée en 3' et 4' le spectre UV montre une réduction d'intensité avec le temps (Mabry *et al.*, 1970).

✦ *Spectre en présence de NaOAc*

L'acétate de sodium, **NaOAc**, base faible ionise les hydroxyles phénoliques les plus acides de la molécule, soit les groupes 7-OH, 4'-OH et 3-OH.

Un faible déplacement bathochrome de la bande II des flavones, et des flavonols traduit la présence d'un hydroxyle libre en position 7. Cet effet peut être perturbé par la présence d'autres substituants en 6 ou en 8 (Mabry *et al.*, 1970)

Dans le cas des isoflavones, le **NaOAc** ionise spécialement le groupement hydroxyle en position 7 (Markham., 1982), ceci se traduit par un déplacement bathochrome de la bande II (6-20 nm). Si ce déplacement n'est pas significatif cela veut dire que le carbone 6 est oxygéné (Mabry, *et al.*, 1970)

➤ *Spectre en présence de NaOAc + H₃BO₃*

Pour réaliser ce spectre, l'acide borique (**H₃BO₃**) est additionné à l'échantillon en présence de **NaOAc**. Ce spectre renseigne sur la présence ou l'absence de système ortho-diOH sur le cycle B (3', 4') ou sur le cycle A (6, 7 ou 7, 8) suite à la formation des chélates dont l'effet se manifeste par un déplacement bathochrome de la bande I (figure 17) (Mabry *et al.*, 1970)

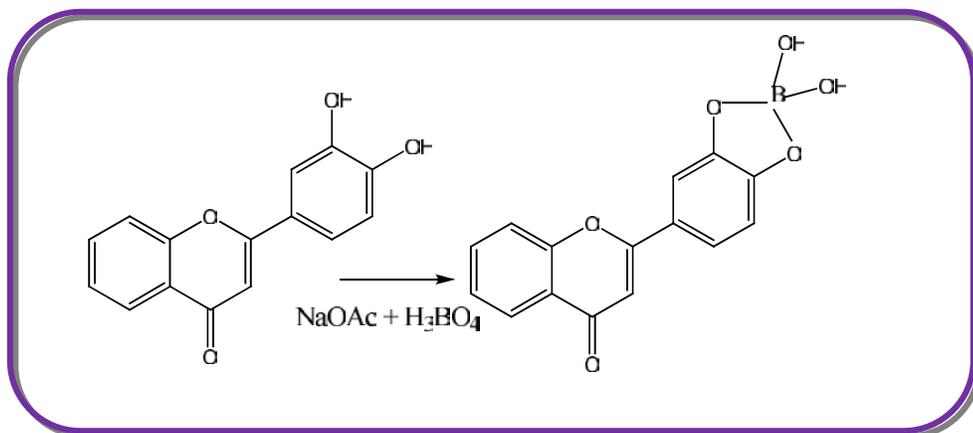


Figure 17 : La formation du complexe.

➤ *Spectre en présence de AlCl₃ et AlCl₃+HCl*

La présence du chlorure d'aluminium (**AlCl₃**) dans la solution méthanolique mène à la formation de complexes entre les hydroxyles ortho du flavonoïde d'une part et les hydroxyles des positions 3 et 5 et la fonction carbonyle d'autre part. La formation de ces complexes se traduit par un effet bathochrome de la bande I par rapport au spectre pris dans le **MeOH**. Les complexes formés entre **AlCl₃** et les groupes ortho-dihydroxyles des noyaux aromatiques **A** et **B** sont instables et se décomposent en présence de **HCl** (Jurd, *et al.*, 1962), par contre, ceux formés entre **AlCl₃** et les hydroxyles **5-OH** ou **3-OH** et la fonction carbonyle sont stables (Horhammer *et al.*, 1952, Jurd *et al.*, 1956). Ces effets se manifestent sur le spectre UV par un déplacement hypsochrome de la bande I. par rapport au spectre après addition de **AlCl₃** et un déplacement bathochrome moins important par rapport au spectre dans le **MeOH**

Tableau 7 : Les principaux déplacements des bandes I et II.

Les réactifs	Les déplacements (nm)		Interprétation
	Bande I	Bande II	
NaOMe (NaOH)	- Stable +45 à +65 1- L'intensité ne diminue pas/ MeOH. 2- L'intensité diminue/ MeOH.		4'-OH 4'-OR ; 3-OH
	- L'intensité diminue avec le temps, décomposition		3,4'-OH ; Ortho di-OH sur A (6,7) ou (7,8) ; Ortho di-OH sur B.
	Nouvelle bande par rapport au spectre MeOH entre [320-335]		7-OH
NaOAc		+5 à +20 déplacement diminue en présence d'un substituant en 6 ou 8.	7-OH
		Pas de déplacement ou très faible.	7-OR
		Spectre qui se décompose avec le temps.	5,6,7-tri-OH ou 5,7,8-tri-OH
NaOAc+H ₃ BO ₃	+12 à +36 +05 à +10		Ortho di-OH sur B Ortho di-OH sur A (6,7) ou (7,8).
AlCl ₃	Une seule bande entre 420-430. Une seule bande entre 440-460.		Ortho di-OH sur B avec 5-OH (flavone) Ortho di-OH sur B avec 5-OH (flavonol)
MeOH / (AlCl ₃ + HCl)	+17 à +20 +35 à +55 +50 à +60		5-OH avec une 6-OR 5-OH et 3-OCH ₃ 3-OH avec ou non 5-OH
AlCl ₃ / (AlCl ₃ + HCl)	-20 à -40 nm avec une bande ou épaulement Entre 350-360 nm -20 à -25 nm		Ortho di-OH sur B Ortho di-OH sur A avec Ortho di-OH sur B ou tri-OH sur B

b)-Relation R_f –Structure

Le R_f est une valeur importante à connaître et facile à déterminer, il est défini comme étant le rapport entre la distance d parcourue par la substance et la distance D parcourue par le front du solvant.

$$R_f = d/D$$

Le R_f (retardation factor) est une caractéristique d'un composé dans des conditions chromatographiques données (éluant, température, phase stationnaire). Le tableau 8 montre la relation entre le R_f et la structure des flavonoïdes.

Tableau 8 : Relation R_f -structure

Structure flavonique	R_f
Augmentation des OH	R_f diminue dans les systèmes organiques
Glycosylation	R_f augmente dans les systèmes aqueux R_f diminue dans les systèmes organiques
Méthylation des OH	R_f augmente dans les systèmes organiques R_f diminue dans les systèmes aqueux
Acylation	R_f augmente dans les systèmes organiques R_f diminue dans les systèmes aqueux

c)-L'hydrolyse acide des hétérosides

Cette manipulation concerne dans un premier temps les flavonoïdes *O*-glycosylés, elle renseigne sur la nature du sucre qui peut être étudié une fois détaché ainsi que celle de l'aglycone. L'identification du sucre se fait par co-chromatographie avec des solutions authentiques.

Les hétérosides *C*-glycosylés résistent à l'hydrolyse acide, cette propriété permet de différencier ce type de liaison dans les flavonoïdes glycosylés.

d)-La Spectrométrie de masse

Cette technique permet la détermination du pic moléculaire des aglycones qui donne globalement le nombre et la nature des substituants hydroxyles ou méthoxyles (Audier, 1966., Nielsen *et al* 1970).

Les pics de fragmentation caractéristiques fournissent des renseignements utiles, notamment sur les structures de substitution des noyaux A et B (Combier., 1968). Cette technique connaît un véritable succès dans ce domaine avec le développement de divers mode d'ionisation permettant l'analyse des structures glycosylés à l'état natif tels que la FAB, et l'électrospray.

e)- La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (R.M.N)

La résonance magnétique nucléaire ou RMN est une technique utilisée pour l'analyse des structures de nombreuses molécules chimiques. Elle sert principalement à la détermination structurale du squelette flavonoïque ainsi que les différents substituant (Wilson, *et al* 1986). Cette méthode renferme plusieurs technique telles que :

1- RMN monodimensionnelle

➤ La RMN du proton (RMN ^1H) :

elle informe sur l'environnement des différents protons flavoniques qui résonnent généralement entre 6 et 8 ppm elle permet de connaître (Markham., *et al.* 1993 , Markham., 1976)

- La position et le nombre de divers protons porté par le flavonoïde.
- Le nombre des substituants méthoxyles porté par le squelette flavonique.
- Le nombre et la nature des sucres liés à l'aglycone.

➤ La RMN du carbone (^{13}C): DEPT 135° et J mod :

Cette technique permet de mettre en évidence tous les carbones de la molécule. Cette expérience permet la mise en évidence des carbones primaires (CH_3), secondaires (CH_2), tertiaire (CH) et dans une moindre mesure les carbones quaternaires. La différence majeure entre le DEPT 135° et le J mod, réside dans le fait que les carbones quaternaires sont détectés avec le J mod alors qu'ils ne le sont avec le DEPT.

2-RMN bidimensionnelles

Les séquences multi-impulsionnelles (Sadler *et al.*, 1988) aboutissent à l'obtention de figures de corrélation qui favorisent une interprétation sans équivoque des spectres monodimensionnels. Parmi ces procédés, nous distinguons la COSY H-H (COrelation SpectroscopY), la ROESY (Rotating fram nuclear Overhauser Effect SpectroscopY) et la NOESY (Nuclear Overhauser).

➤ **La COSY ($^1\text{H} - ^1\text{H}$)**

Cette expérience fournit des informations sur les couplages homonucléaires 2J et 3J (protons séparés par deux ou trois liaisons) entre les protons voisins et ceux qui sont adjacents

➤ **La ROESY ($^1\text{H} - ^1\text{H}$)**

Consiste à observer des effets Overhauser dans le référentiel tournant, ce qui permet l'établissement précis d'une séquence hétérosidique. Elle apporte également la confirmation de certaines attributions de résonance et de configuration des sucres (Massiot *et al.*, 1988).

➤ **La NOESY ($^1\text{H} - ^1\text{H}$)**

Cette expérience mesure également des effets Overhauser et apporte les mêmes informations que la ROESY, permet d'observer les effets Overhauser nucléaires (NOE) entre deux noyaux proches dans l'espace (distance moins de 5 \AA). Elle met en évidence la proximité spatiale des protons via les couplages dipolaires

L'expérience **HMQC** (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) peut mettre en évidence le couplage 1J (Muller *et al.*, 1979), tandis que l'expérience **HMBC** (Heteronuclear Multiple-Bond Connectivity) met en évidence les couplages hétéronucléaires 2J et 3J (Bax *et al.*, 1986).

II-4-Conclusion

Un très grand nombre de genres de la famille des Lamiacées sont des sources riches en terpénoïdes, et composés phénoliques notamment les flavonoïdes, ces deux classes de substances naturelles sont reconnues dans diverses activités biologiques, ce chapitre regroupe les différents classe de ces métabolites, leurs biosynthèses et l'influence des flavonoïdes sur la santé.

Chapitre III

Travaux personnels

III-1-Introduction

De nombreuses études ont révélé que les parties aériennes des espèces du genre *Thymus* sont riches en plusieurs constituants dont la teneur varie selon la variabilité des conditions géographiques, climatiques, de séchage, de stockage et des méthodes d'études (extraction et détection). Les flavonoïdes sont présents en abondance chez le genre *Thymus*. Ils sont présents sous forme d'hétérosides ou, le plus généralement, à l'état libre (aglycones). Ce chapitre présente la séparation et purification de ces substances, dont la détermination structurale est détaillée dans le chapitre suivant.

III-2-Place dans la systématique

Règne	→	Plante
Division	→	Spermaphytes
Subdivision	→	Angiospermes
Classe	→	Dicotylédone
Ordre	→	Lamiales
Famille	→	Lamiacées
Genre	→	<i>Thymus</i>
Espèce	→	<i>Numidicus</i> Poiret

III-3-Description botanique

C'est un très petit arbuste, haut, de cinq à six pousses au plus, dont les racines font grêles, ses branches font chargées presque dès leurs base de rameaux nombreux, épars, presque opposés, étalés, un peu anguleux, droit, légèrement pubescents à leur partie supérieure, garnis de feuilles opposées, presque sessiles, plus longues que les entre-nœuds très ouvertes, étroites, linéaires, très-entières, glabres à leurs deux faces, rétrécis à leur base, aigues à leurs sommet, longues de quatre à cinq lignes, larges d'un peu plus d'une demi-ligne.

Les fleurs font réunies à l'extrémité des rameaux en épis courts, capité, garnis de bractées ovales, lancéolées, aigues, élargies à leur base, ciliées, ponctuées, le calice très velu coloré, à cinq dents sétacées, fortement ciliées de longs poils blanchâtres, la corolle petite, de couleur rose ou un peu purpurine,

les étamines plus longues que la corolle, les anthères un peu globuleuses, à deux loges, le style presque de la même longueur que les étamines, deux stigmates aigus. (Lamarck, et Poiret).

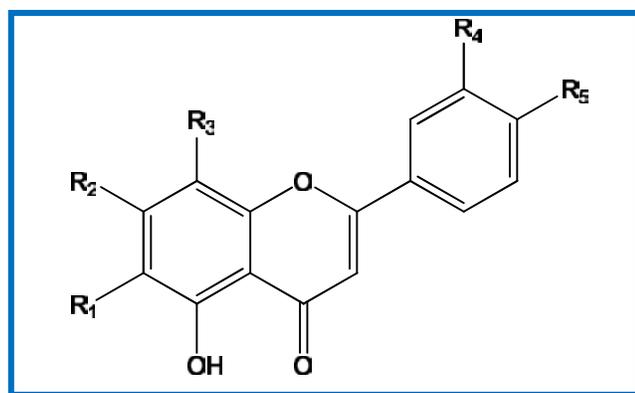
Assez rare : dans le sous secteur de l'atlas tellien, la grande et la petite Kabylie de Skikda à la frontière tunisienne, Tell constantinois. Il existe en Algérie et en Tunisie.



Thymus numidicus Poiret

III-4- Les travaux antérieurs

Les travaux effectués sur *Thymus numidicus* par Benkiniouar *et al.*, 2010 ont mené à l'isolement et la détermination de cinq flavonoïdes de type flavone rassemblés dans le tableau 9.



Composés	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
5,7,4'-trihydroxyflavone (Apigénine)	H	OH	H	H	OH
5,7,3',4' tetrahydroxyflavone (Lutéoline)	H	OH	H	OH	OH
5,4'-dihydroxy-6,7,8 triméthoxyflavone (Xanthomicrole)	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	OH
5,3',4'-trihydroxy-6,7,8 triméthoxyflavone (Sideritoflavone)	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	OH
5-hydroxy-6,7,3',4'-tetraméthoxyflavone (5-Desméthylsinensétine)	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃

Tableau 9 : Les flavonoïdes isolés de *Thymus numidicus* Poiret.

III-5- Travaux personnels

III-5-1- Extraction de *Thymus numidicus* (Poiret)

La plante a été récoltée au mois de juin de l'année 2010, de Djebel El Ouahech à Constantine, après séchage dans un endroit sec et aéré, à l'abri des rayons solaires, les parties aériennes sont pesées (M = 920,5 g).

Le matériel végétale de masse (M = 920,5g) a subi une macération dans un mélange (MeOH/H₂O) avec les proportions (70: 30). La macération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant et dure dans chaque cas de 24 à 48 heures.

Après filtration, concentration non à sec à une température n'excédant pas 37°C, on ajoute 250 ml d'eau distillée et le mélange est filtré. Le filtrat ainsi obtenu est épuisé une seule fois par de l'éther de pétrole, la phase organique séparée et concentrée à sec donnant 0,14 g d'extrait éther de pétrole. La phase aqueuse subit une extraction de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par le dichlorométhane, puis l'acétate d'éthyle et en dernier le *n*-butanol. Les trois phases organiques sont séparées et concentrées à sec donnant les extraits :

- Dichlorométhane (1,6 g).
- Acétate d'éthyle (4,6 g).
- *n*-butanol (18,1 g).

Après concentration de la phase dichlorométhane, on a constaté la formation de cristaux que nous avons récupérés après lavage par l'hexane ensuite CH₂Cl₂.

Durant la concentration de la phase *n*-butanol nous avons constaté la formation d'un précipité marron que nous avons récupéré par filtration.

Le protocole d'extraction est résumé dans la figure 18.

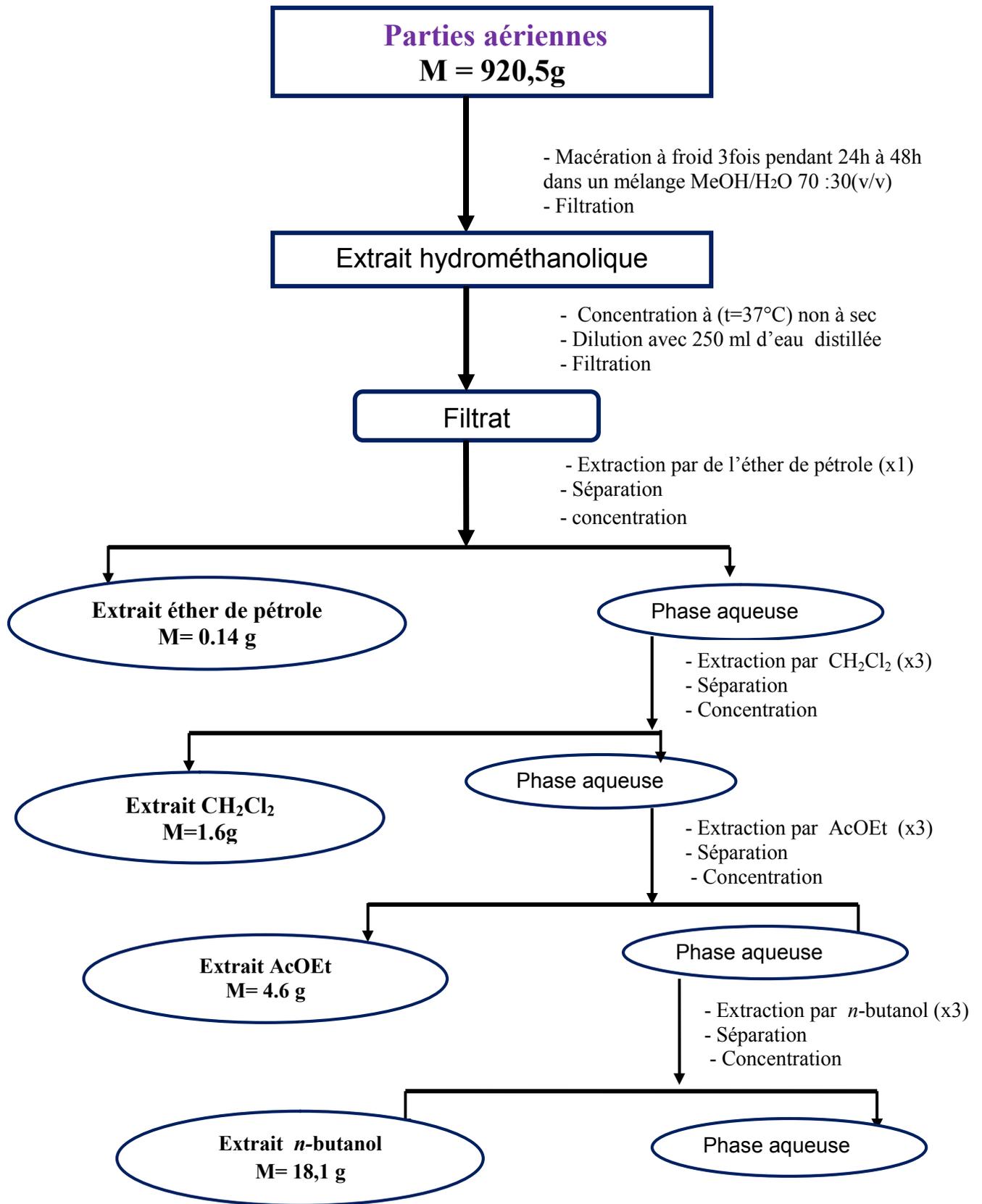


Figure 18 : Protocole d'extraction de *T. numidicus* Poiret.

III-5-2-Séparation chromatographique de l'extrait acétate d'éthyle

III-5-2-1- Séparation chromatographique sur colonne

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 déposé sur une feuille d'Aluminium, la meilleure séparation obtenue était avec le système de solvant chloroforme / méthanol (9,5 : 0,5).

Une masse d'environ 4,6 g d'extrait Acétate d'éthyle est déposée sur une colonne de gel de silice préparée dans le chloroforme. L'élution est réalisée par un gradient de polarité du système chloroforme / méthanol en commençant par du chloroforme pur et en terminant par du méthanol pur. Le suivi de ces fractions est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support d'Aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 366 nm) puis révélées avec de l'anisaldéhyde et chauffées pendant 3 mn à 100°C. La progression de cette colonne est rassemblée dans le tableau 10.

Tableau 10: Le fractionnement de la colonne.

Fraction	Erlen	Volume de pots (ml)	Poids (mg)	System d'élution	
				CHCl ₃ %	MeOH %
1	1-7	100	17	100	0
2	8-15	50	6.3		
3	16-28	50	3.6		
4	29-52	50	3.8	99	1
5	53-57	25	30.9		
6	58-63	25	54.7		
7	64-83	25	77.2		
8	84-91	25	29.3	98	2
9	92-105	25	77.5		
10	106-113	25	35.3		
11	114-128	25	61.2		
12	129-135	25	41.1		
13	136-156	25	112		
14	157-171	25	68.9		
15	172-183	25	37.9	97	3
16	184-205	25	78.5		
17	206-231	25	120.5	96	4
18	232-284	25	301.2		
19	285-353	25	576.3		

20	354-386	25	170	95	5
21	387-394	50	78.5		
22	395-402	50	47.4		
23	403-413	50	55	94	6
24	414-422	50	54.1		
25	423-435	50	56.1		
26	436-442	50	23.9	92	8
27	443-455	50	68.2		
28	456-476	50	88.1	90	10
29	477-487	50	79.2		
30	488-495	50	57.8	85	15
31	496-504	50	48		
32	505-516	50	73.2		
33	517-527	50	180	82	18
34	528-536	50	145.9		
35	537-546	50	96.1	80	20
36	547-551	50	18.2		
37	552-566	50	113.9		
38	567-605	50	146	75	25
39	606-625	50	191.4		
40	626-655	50	233.4	70	30
41	656-675	50	141.4		
42	676-712	50	71.1	60	40
43	713-732	50	155.6		
44	733-751	50	48.2	55	45
45	752-758	100	84.8		
				45	55
				35	65
				25	75
				15	85
				0	100

Après rassemblement selon les résultats du suivi analytique, les fractions sont testées dans deux systèmes différents qui sont : Chloroforme / Méthanol avec différentes proportions et Acétate d'éthyle/ acide/ eau. Ces tests nous ont permis de réaliser un second regroupement qui est présenté dans le tableau 11.

Tableau 11 : Regroupement final des fractions issues de la colonne chromatographique de l'extrait Acétate d'éthyle

N° des fractions	Nouvelles fractions	Observations
1-3	F ₁	Graisses et cires
4 -6	F ₂	Mélange complexe
7	F ₃	Cristaux
8-9	F ₄	Mélange séparable
10-12	F ₅	Mélange complexe
13-16	F ₆	Précipité + mélange
17	F ₇	Mélange séparable
18-20	F ₈	Précipité + mélange
21-22	F ₉	Mélange complexe
23-28	F ₁₀	Mélange séparable
29-31	F ₁₁	Mélange séparable
32-34	F ₁₂	Mélange séparable
35-38	F ₁₃	Mélange complexe
39-40	F ₁₄	Mélange complexe
41-42	F ₁₅	Mélange complexe
43-45	F ₁₆	Fin de la colonne

III-5-2-2-Séparation et purification des fractions

▪ *Purification des cristaux isolés de l'extrait dichlorométhanique*

Après concentration de la phase dichlorométhane, on a constaté la formation des cristaux que nous avons récupéré après lavage par l'hexane ensuite CH₂Cl₂.

Le test chromatographique sur couche mince de gel de silice sur support Aluminium de ces cristaux a montré un produit majoritaire mêlé à un autre produit en faible quantité (figure 19). Ainsi, ces cristaux ont subi une purification sur une colonne de sephadex LH-20 éluée par du MeOH 100% pour donner un produit pur C, de fluorescence noire violette sous lumière de wood, jaune après révélation par l'anisaldéhyde.

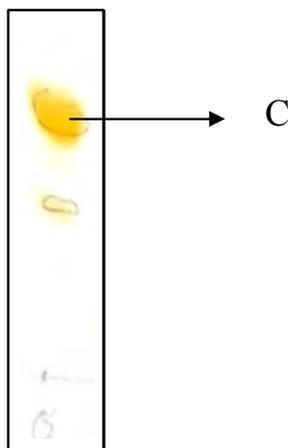


Figure 19 : Plaque CCM éluee avec le système ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 - \text{MeOH} : 9.5 / 0.5$)

▪ **La fraction F_3**

Cette fraction se présente sous forme de cristaux. Après lavage avec de l'hexane ensuite le dichlorométhane les cristaux jaune obtenus sont dissous dans le méthanol et testés sur plaque analytique de gel de silice, éluée par le système : chloroforme - acétone (9.5 / 0.5), le test donne un produit majoritaire mêlé à un autre produit en faible quantité.

Ces cristaux ont été chromatographiée sur plaques préparatives de gel de silice 60 éluées deux fois par le système chloroforme / acétone (9,5 : 0,5) pour donner un produit pur F_3 de fluorescence noire violette sous lumière UV à $\lambda=366\text{nm}$.

▪ **La fraction F_6**

Contenant un précipité, cette fraction a été lavée avec le chloroforme. Le précipité jaunâtre obtenu est dissous dans le méthanol et testé sur plaque analytique de gel de silice, éluée par le système chloroforme / méthanol dans les proportions (9,5 : 0,5), ce précipité donne un spot unique de fluorescence noire violette sous lumière UV à $\lambda = 366 \text{ nm}$, révélée à l'anisaldéhyde la plaque présente toujours un spot unique jaune qui présente le produit F_6 .

▪ *La fraction F₈*

Cette fraction contient un produit majoritaire sous forme de précipité. Après lavage avec le chloroforme. Le précipité jaunâtre obtenu a été testé sur plaque analytique de gel de silice, éluée par le système (CHCl₃, MeOH) dans les proportions (9.5 : 0.5), ce précipité donne deux taches A et B, dont une très intense B (figure 20). Ce précipité jaunâtre ainsi obtenu et testé par co-chromatographie avec F₆ sur plaque analytique de gel de silice, éluées par plusieurs systèmes, ce travail a montré que la tache A est identique à F₆ (même R_f).

Ce précipité a été chromatographié sur une colonne de sephadex LH-20 éluée par du MeOH 100% pour donner deux produit pur F₈₋₁ ≡ F₆ et F₈₋₂ de fluorescence noire violette sous lumière UV à λ=366nm, jaunes après révélation par l'anisaldéhyde. Le produit F₈₋₂ est prédominant pour cette fraction qui est la plus importante du point de vue masse, c'est la raison pour laquelle la séparation n'était pas facile pour les autres produits qui ont été en faible quantité, et on n'a pas pu aboutir à un nombre important de produits purs.

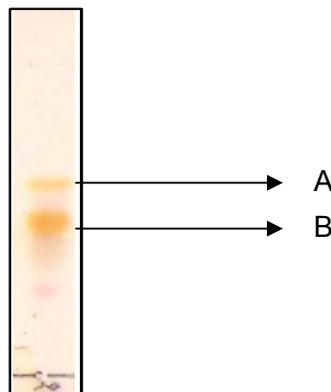


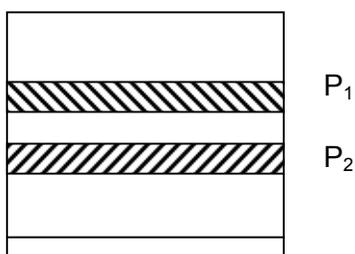
Figure 20 : Plaque CCM éluée avec le système (CHCl₃ / MeOH : 9.5/0.5) puis révélée.

▪ *La fraction F₁₂*

La séparation de cette fraction a été effectuée sur papier wattman III en utilisant comme système d'éluion l'acide acétique 30%. Un produit en quantité intéressante a été purifié sur colonne de sephadex LH-20 éluée par du méthanol pur pour aboutir à un produit pur F₁₂ de fluorescence jaune sous lumière de Wood.

▪ *Séparation et purification du précipité de l'extrait n-butanol*

Durant la concentration de la phase butanolique on a constaté la formation d'un précipité marron que nous avons récupéré, filtré et rincé avec plusieurs solvants. Ce précipité a été dissout dans le méthanol avec quelques gouttes d'eau distillée, ensuite il a subit une chromatographie sur papier wattman III en utilisant comme système d'élution l'acide acétique 30% pour aboutir à deux produits P_1 et P_2 purifiés sur colonne de sephadex, de fluorescence noir violette sous lumière UV à $\lambda=366\text{nm}$, jaune après révélation par l'anisaldéhyde.



III-5- Conclusion

Les travaux de séparation chromatographiques ont permis l'obtention de huit produits purs, un révélé identique $F_6 \equiv F_{8-1}$, ramenant le nombre de produits différents à sept. Nous avons soumis à l'étude structurale six produits : C , F_3 , $F_6 \equiv F_{8-1}$, F_{8-2} , P_1 et P_2 . Un de faible quantité F_{12} .

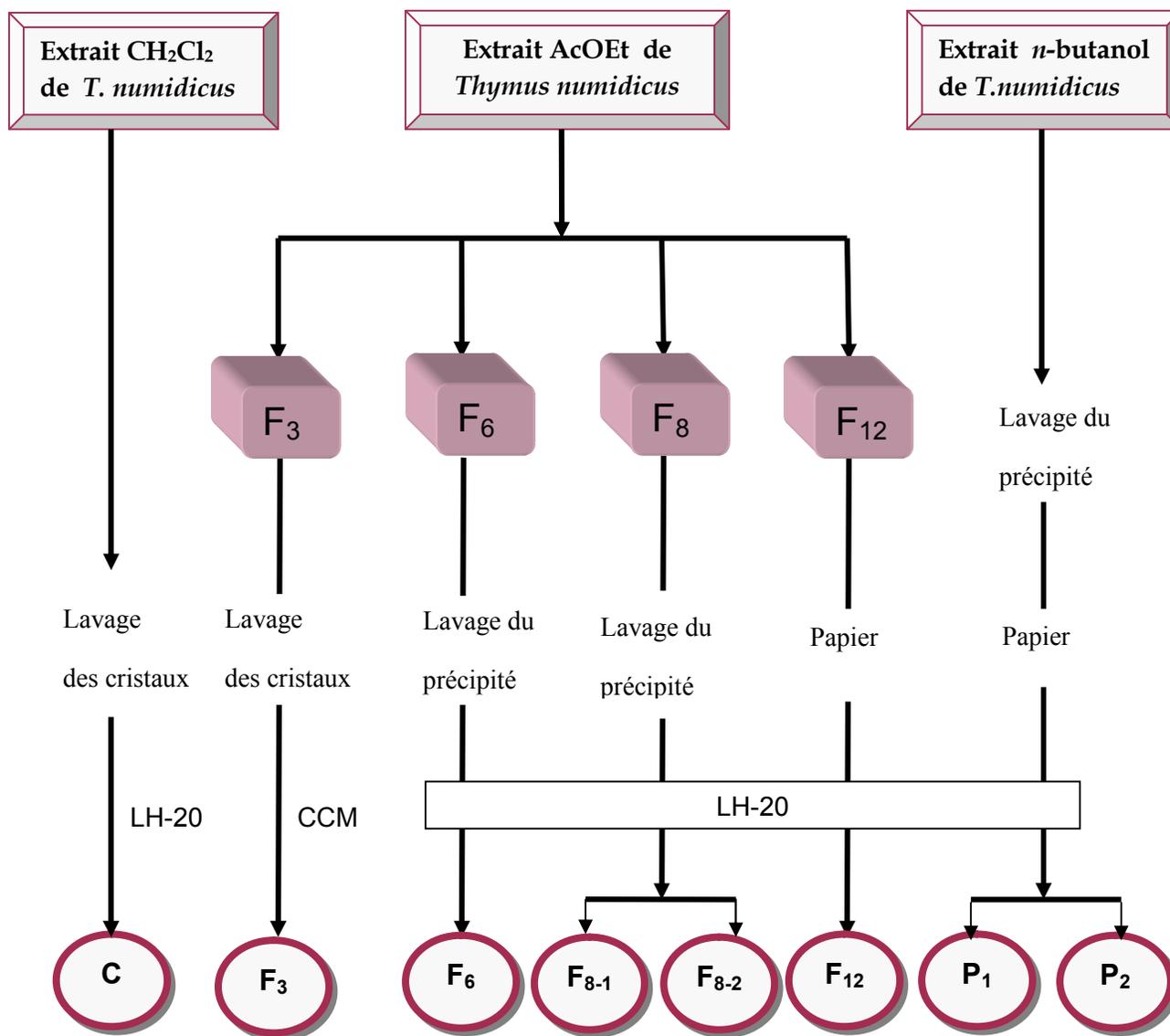


Figure 21 : Résumé des travaux chromatographiques.

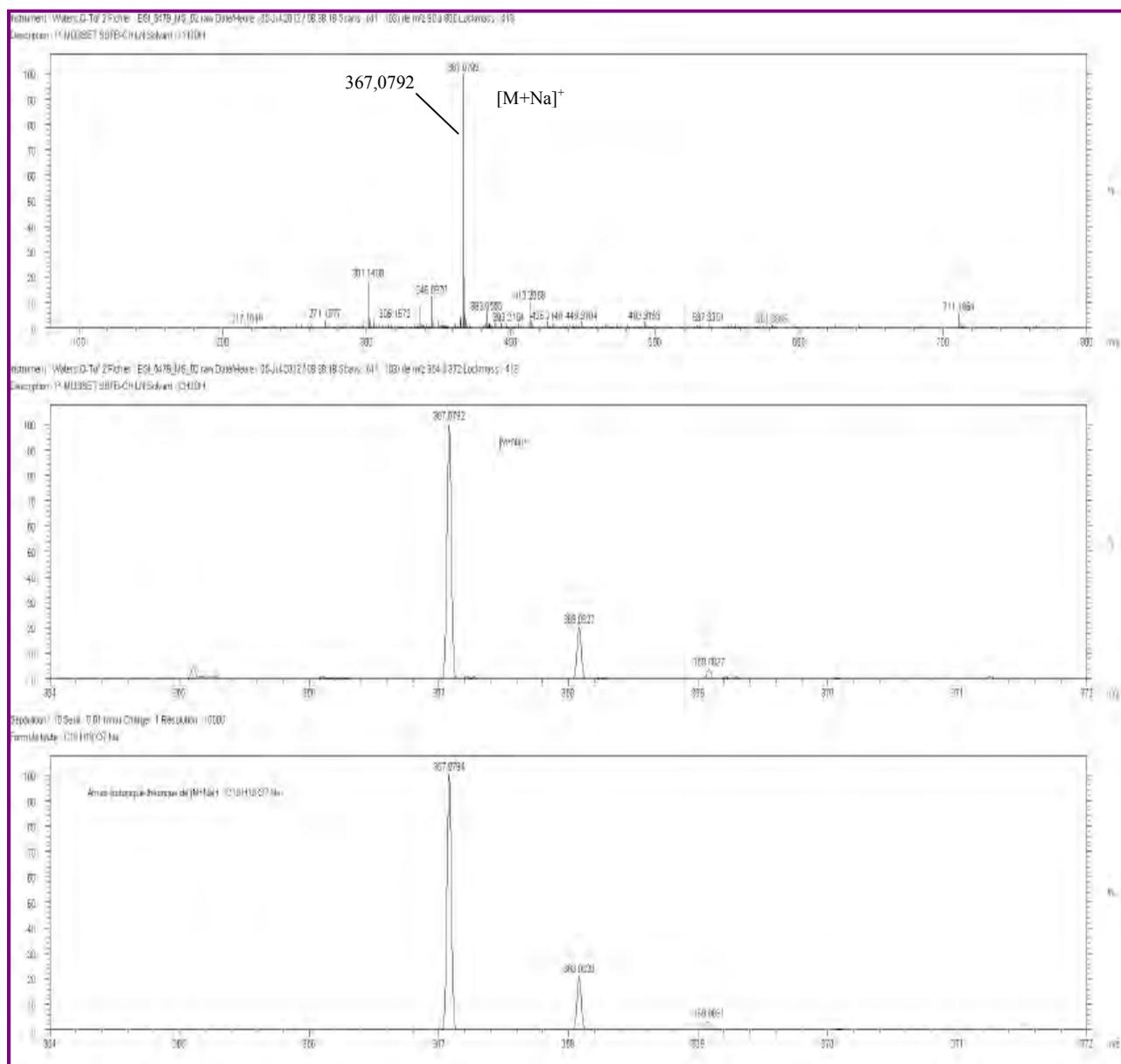
Chapitre IV

Résultat et discussion

IV-1-Identification des composés isolés de *Thymus numidicus* Poiret

IV-1-1-Identification du composé C

Le spectre de masse à haute résolution (SMHR) en mode d'ionisation électrospray positif obtenu pour le produit C (Spectre 1), donne un pic quasimoléculaire $[M+Na]^+$ de masse exacte $m/z = 367,0792$ (calculée pour $C_{18}H_{16}O_7Na = 367,0794$), permet de déduire une formule brute $C_{18}H_{16}O_7$ pour cette molécule et une masse de 344 Da.



Spectre 1 : Spectre SMHR ESI positif du composé C.

La fluorescence :

La fluorescence noir violette de ce produit sous la lumière ultra-violette (366 nm) est caractéristique d'une flavone ou d'un flavonol substitué en position 3.

Les résultats de la série spectrale UV-Visible et leur interprétation:

Réactifs	Bande I (nm)	Autres bandes	Bande II (nm)	Commentaire
MeOH	340	/	275	flavone
+NaOH	403	/	265	OH libre en 4' Pas de OH libre en 7
+AlCl ₃	375	260	290	OH libre en 5 avec oxygénation en 6
+AlCl ₃ / HCl	360	258	290	
+NaOAc	405	345	274	Pas de OH libre en 7 Pas de ortho di-OH sur B
+NaOAc/H ₃ BO ₃	345	/	274	
Spectre stable en présence de NaOH après 5 mn				

Tableau 12 : Données de la série spectrale UV (λ_{\max} nm) du composé C.

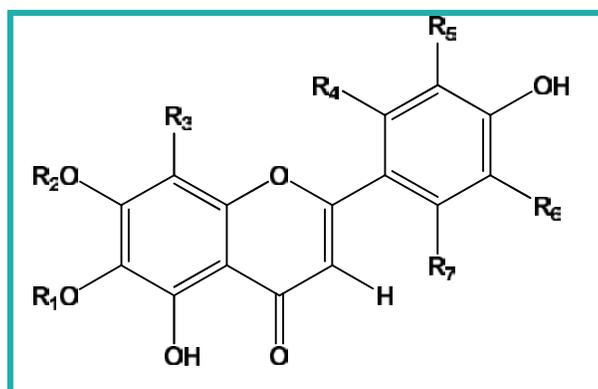
Le maximum d'absorption de la bande I à 340 nm indique qu'il s'agit d'un flavonoïde de type flavone.

Le spectre enregistré en présence de NaOH présente un effet bathochrome (+63nm) avec augmentation de l'intensité lumineuse de la bande I par rapport au spectre méthanolique, ce qui suppose la présence de l'hydroxyle libre en position 4'. L'absence d'une nouvelle bande dans ce spectre indique une substitution en position 7.

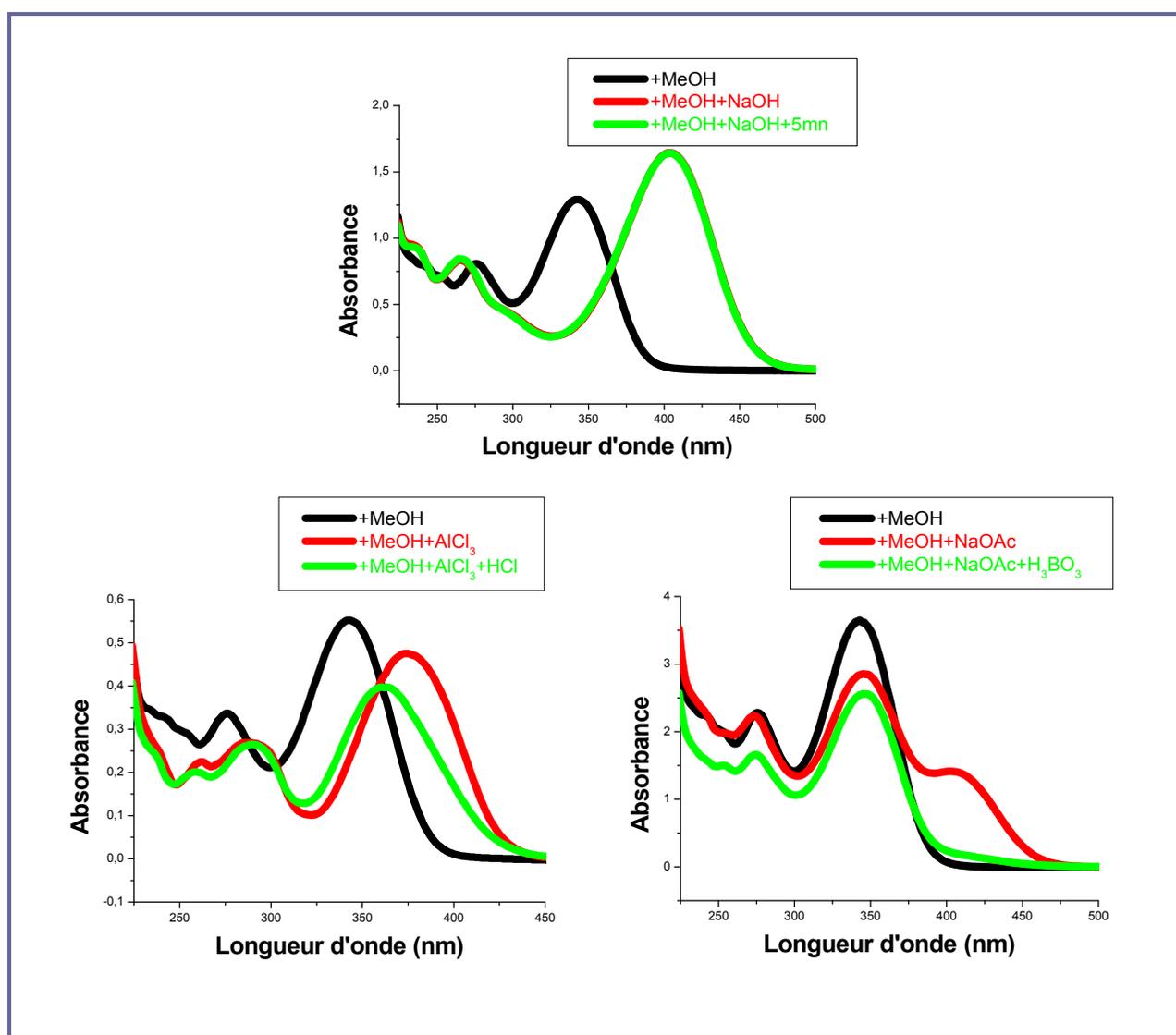
Le spectre (AlCl₃+ HCl) donne un déplacement bathochrome de 20 nm, de la bande I par rapport au spectre méthanolique ce qui conclut l'existence d'un OH libre en 5 avec une oxygénation en position 6.

Les spectres enregistrés en présence de NaOAc et NaOAc + H₃BO₃ ne présentent pas un effet notable par rapport au spectre méthanol ce qui montre que l'hydroxyle en 7 n'est pas libre de même qu'il indique l'absence d'un système ortho di-OH sur le noyau B.

D'après cette interprétation nous proposons la structure partielle suivante :



Avec : R₁, R₂ différents de H et R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ différents de OH.



Spectre 2: Série spectrale UV du composé C.

L'examen du spectre RMN ^1H (spectre 3) montre:

- un singulet à $\delta = 6,67$ ppm d'intégration 1H attribuable à H-3, ce qui confirme une structure de type flavone.
- un singulet à $\delta = 6,83$ ppm d'intégration 1H attribuable à H-8.
- le signal à $\delta = 7,51-7,55$ ppm, d'intégration 2H attribuable à H-2' et H-6'. Ce signal correspond en fait à deux signaux superposés l'un d'eux sous forme d'un doublet dédoublé ($J = 8,4$ Hz et $J = 2,4$ Hz) caractérisant H-6' et l'autre sous forme d'un doublet ($J = 2$ Hz) caractérisant H-2'. Ce signal confirme la substitution des positions 3' et 4' du cycle B. Par ailleurs, le signal sous forme de doublet ($J = 8$ Hz) qui apparaît à $\delta = 6,94$ ppm, est attribuable à H-5'.
- L'étalement du spectre proton de la zone [3,80- 4,00] ppm, montre trois singulets, correspondant à des groupements méthoxyles à $\delta = 3,83$; 3,96 ; et 3,97 ppm.

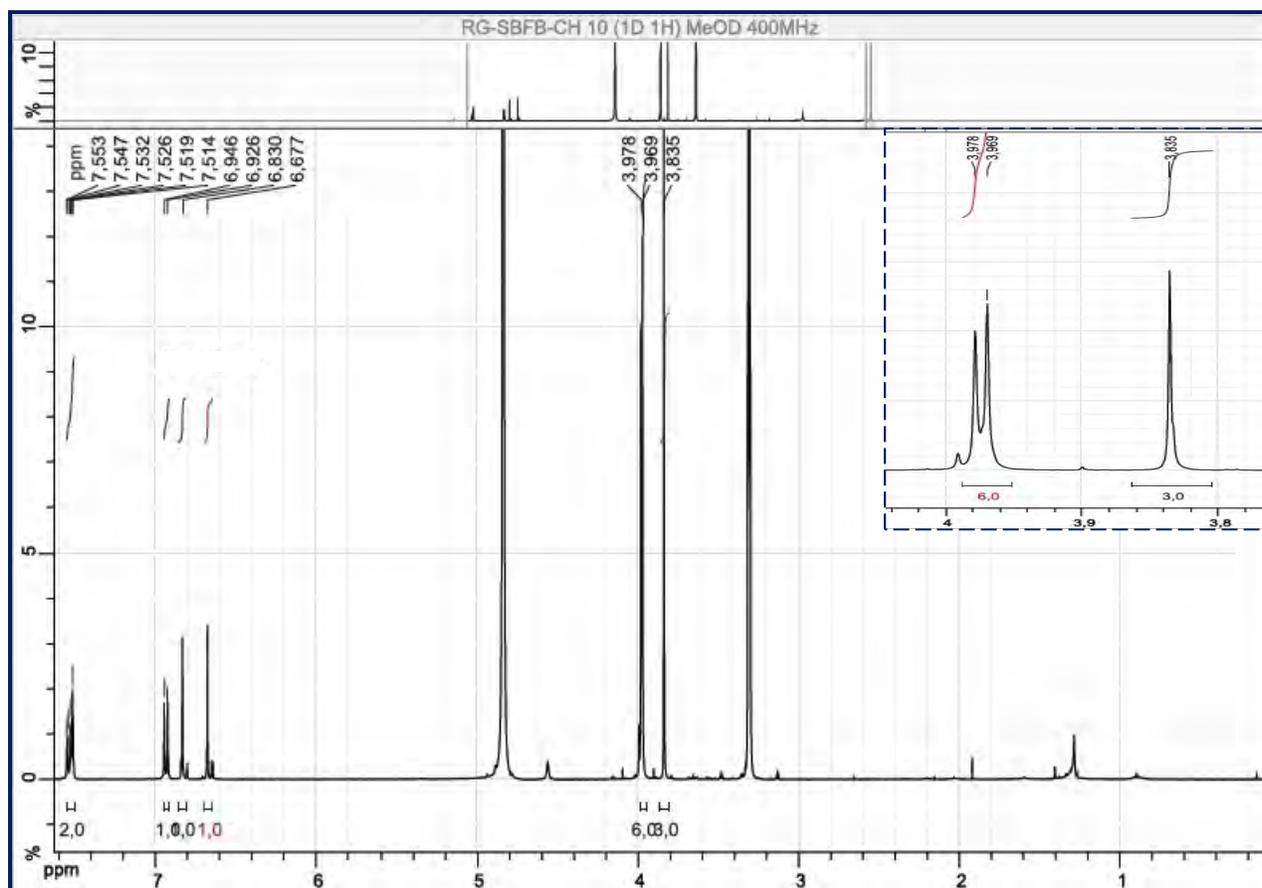
L'examen du spectre COSY (spectre 4) montre une tache de corrélation entre le noyau H-6' ($\delta = 7,54$) et son voisin H-5' ($\delta = 6,94$ ppm).

L'examen du spectre HSQC (Spectre 5) permet de localiser C-2' à $\delta = 110,79$ ppm ; C-5' à $\delta = 116,88$ ppm; C-6' à $\delta = 121,96$ ppm; C-3 à $\delta = 104,19$ ppm; C-8 à $\delta = 92,47$ ppm.

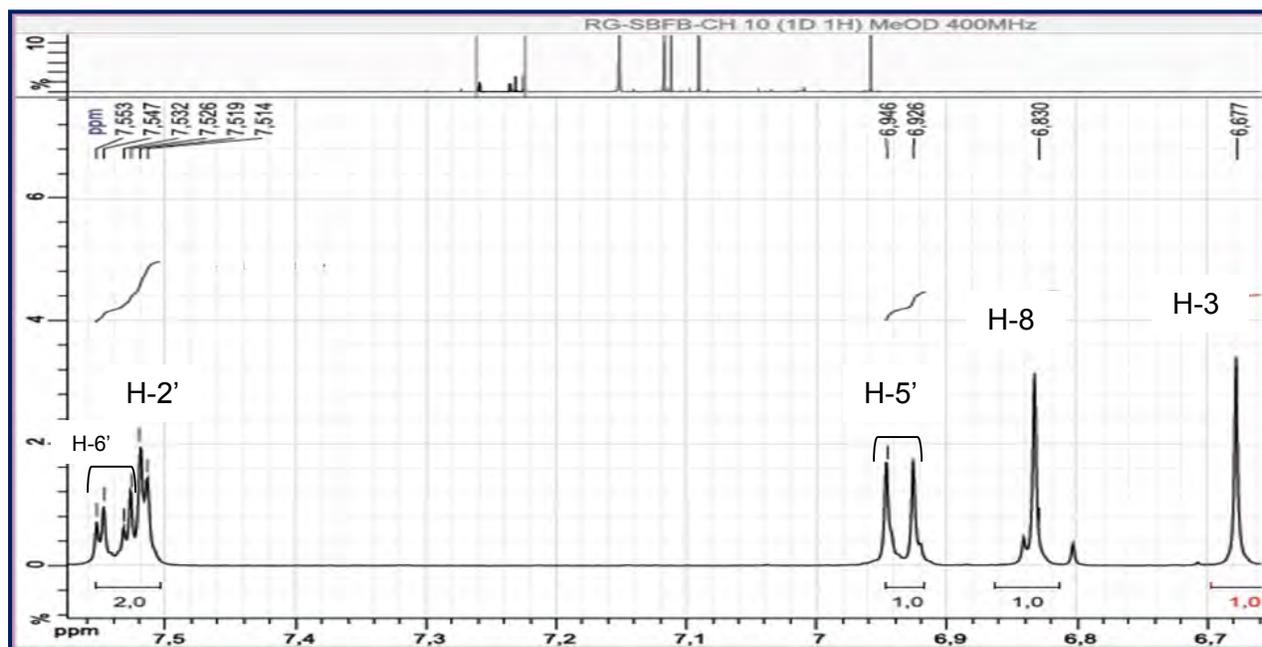
Les résultats de la RMN ^1H sont rassemblés dans le tableau 13 :

Attribution	Multiplicité	J (Hz)	δ (ppm)
H- 6'	dd	8,4 - 2,4	7,54
H -2'	d	2	7,51
H-5'	d	8	6,94
H-8	s	/	6,83
H-3	s	/	6,67
OCH ₃	s	/	3,97
OCH ₃	s	/	3,96
OCH ₃	s	/	3,83

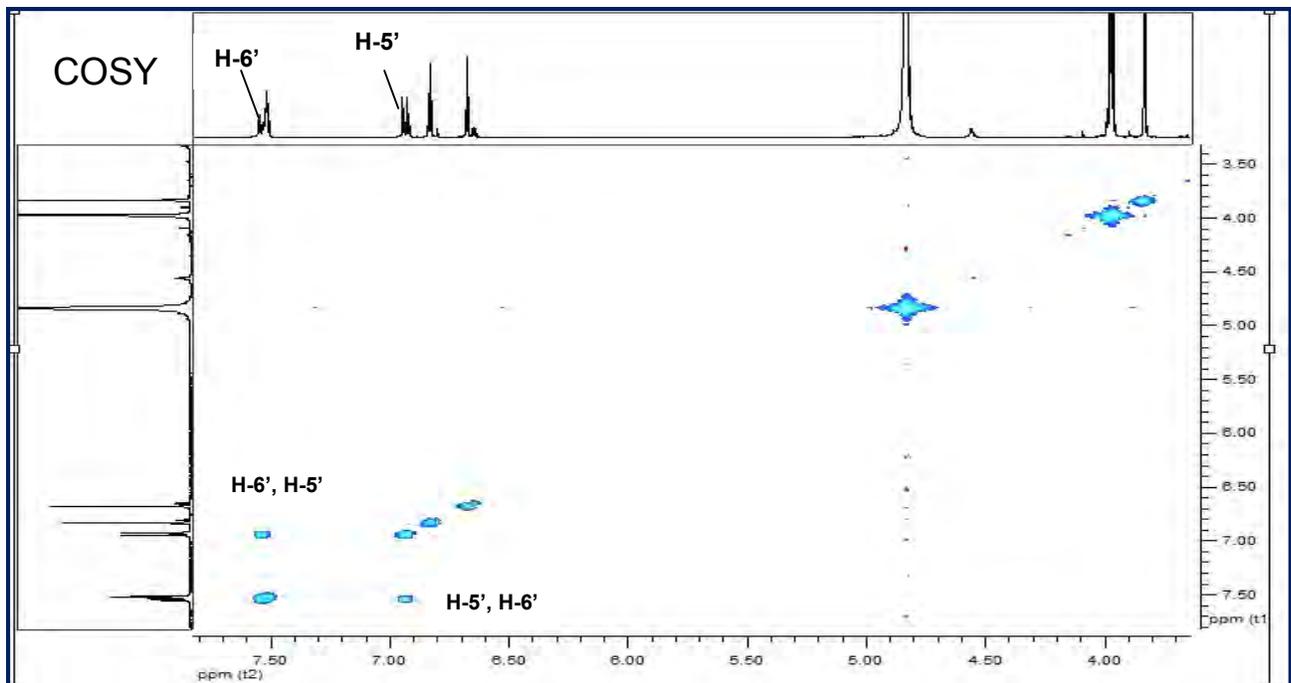
Tableau 13 : Les résultats de RMN ^1H (CD₃OD, 400 MHz) du composé C.



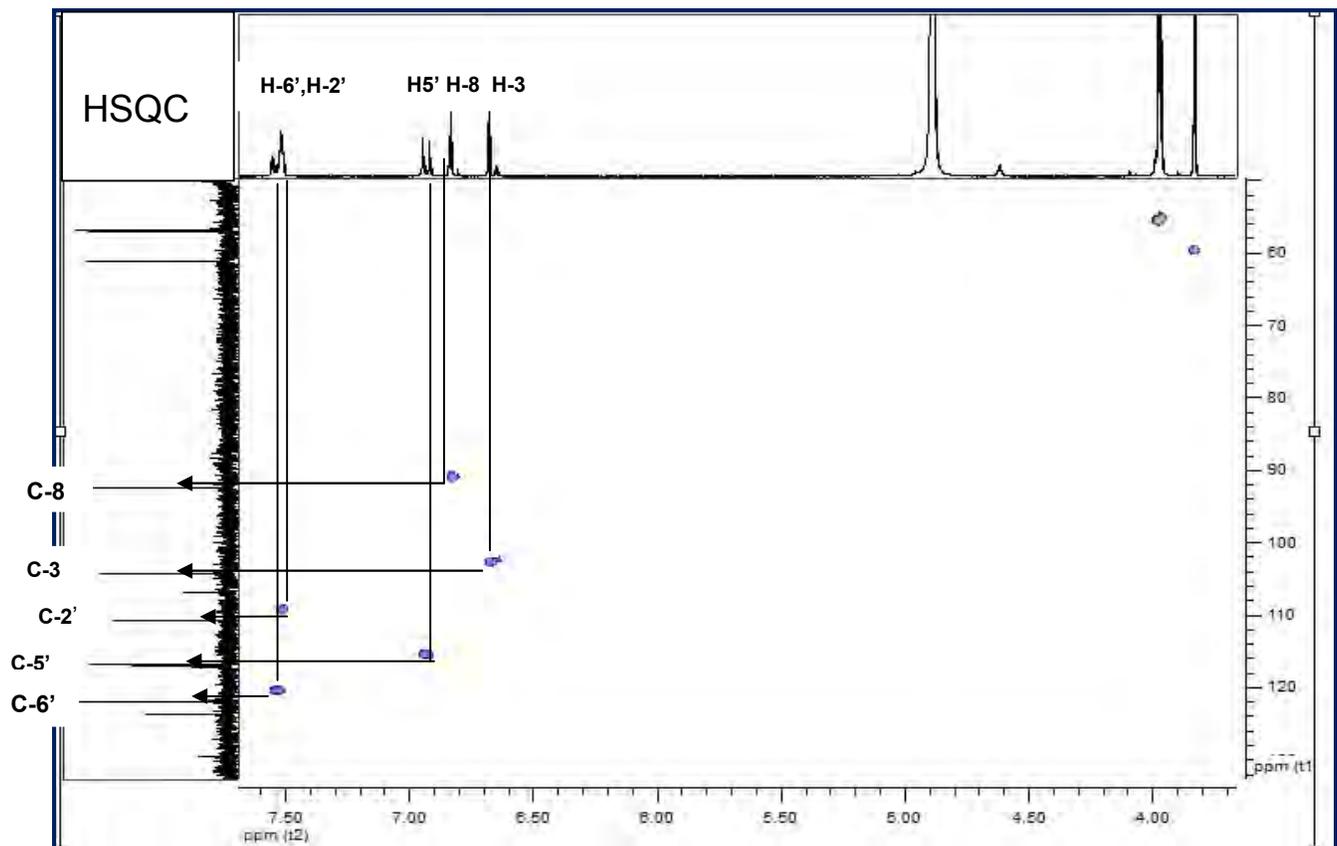
Spectre 3: Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz) du composé C.



Spectre 3-1: Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz) du composé C (étalement).



Spectre 4: Spectre COSY (CD₃OD, 400 MHz) du composé C.



Spectre 5: Spectre HSQC (CD₃OD, 400 MHz) du composé C.

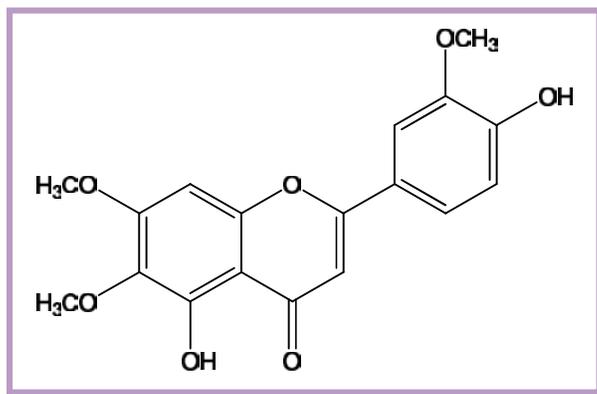
L'examen du spectre HMBC (spectre 6) montre une tache de corrélation de proton H-8 avec le carbone quaternaire oxygéné à $\delta = 160,65$ ppm, ce qui permet l'attribution de ce dernier au C-7. Le même proton montre également une tache de corrélation avec le carbone à $\delta = 154,91$ ppm qui ne peut être que C-9 ainsi une autre tache de corrélation avec le carbone oxygéné à $\delta = 133,81$ ppm attribué à C-6.

Dans ce spectre également le proton H-3 mène à l'attribution de C-1' à $\delta = 123,63$ ppm. Cette attribution est confirmée par la corrélation observée entre ce carbone et le proton H-5', de même H-3, permet l'attribution de C-2 à $\delta = 166,56$ ppm et C-4 à $\delta = 184,36$ ppm.

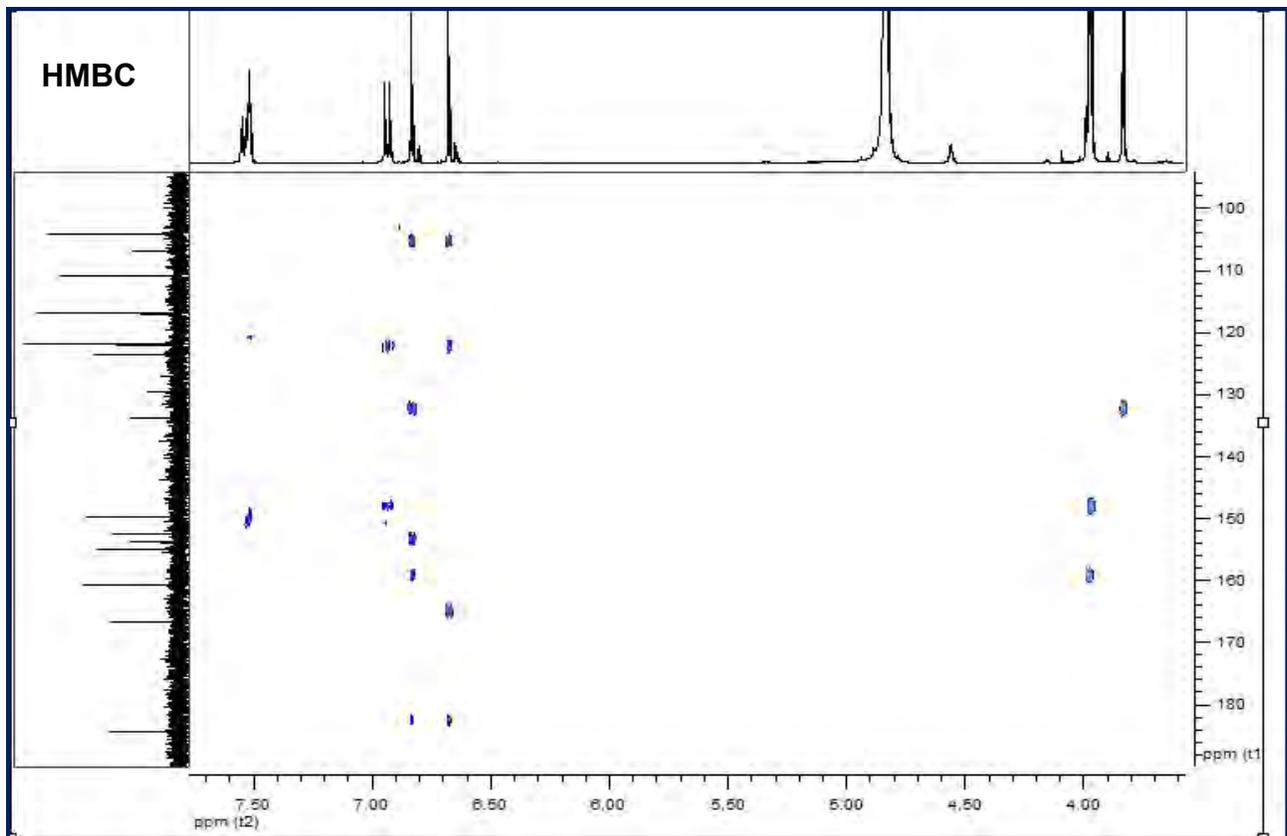
Le proton H-6' mène à la localisation de C-4' à $\delta = 152,35$ ppm de même le proton H-5' permet la localisation de C-3' à $\delta = 149,61$ ppm ce qui permet de placer le méthoxyle à $\delta = 3,96$ ppm en C-3'.

L'examen du spectre NOESY (spectre 7) montre les corrélations spatiales du proton H-2' avec le méthoxyle à $\delta = 3,96$ ppm en C-3', de même le proton H-8 avec le méthoxyle à $\delta = 3,97$ ppm en C-7. Le spectre montre également une tache de corrélation entre le proton H-3 et le proton H-6' à $\delta = 7,54$ ppm, confirmant ainsi toutes nos attributions.

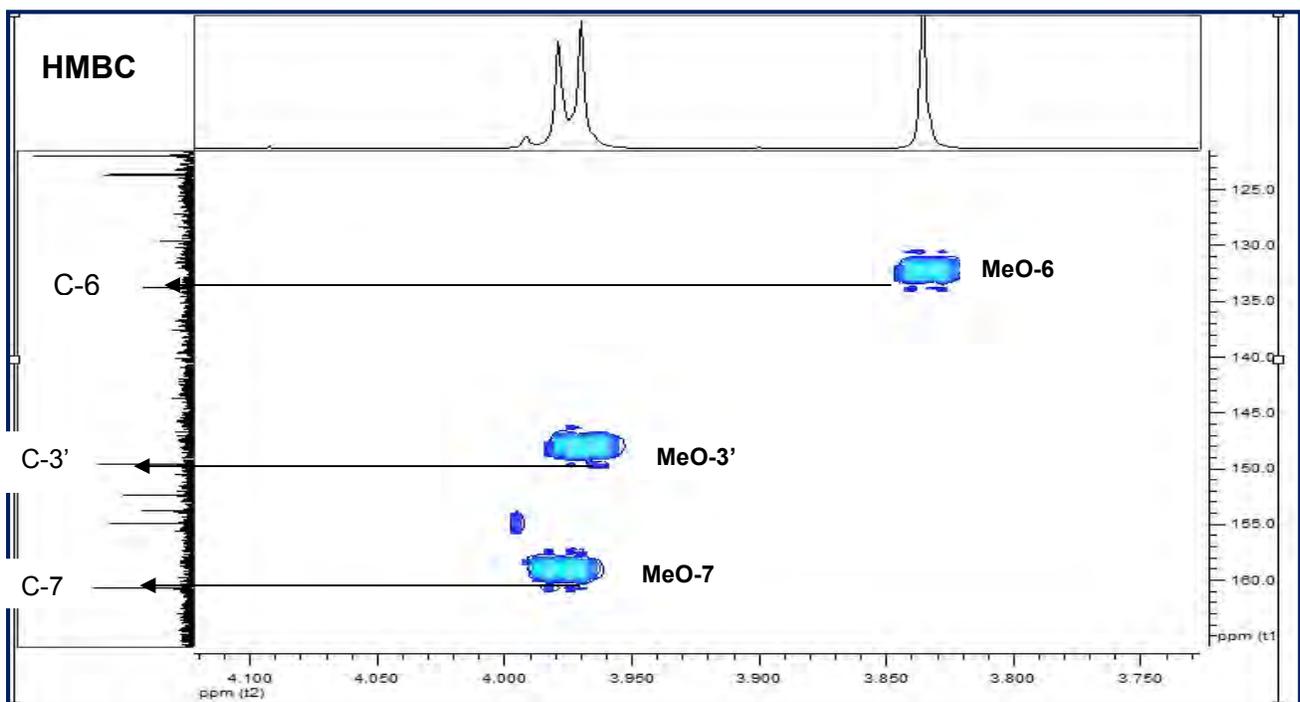
Ces données mènent à la structure : **5,4'-dihydroxy-6,7, 3'-triméthoxyflavone** connue sous le nom **Cirsilinéol**. (Topcu *et al.*, 1996)



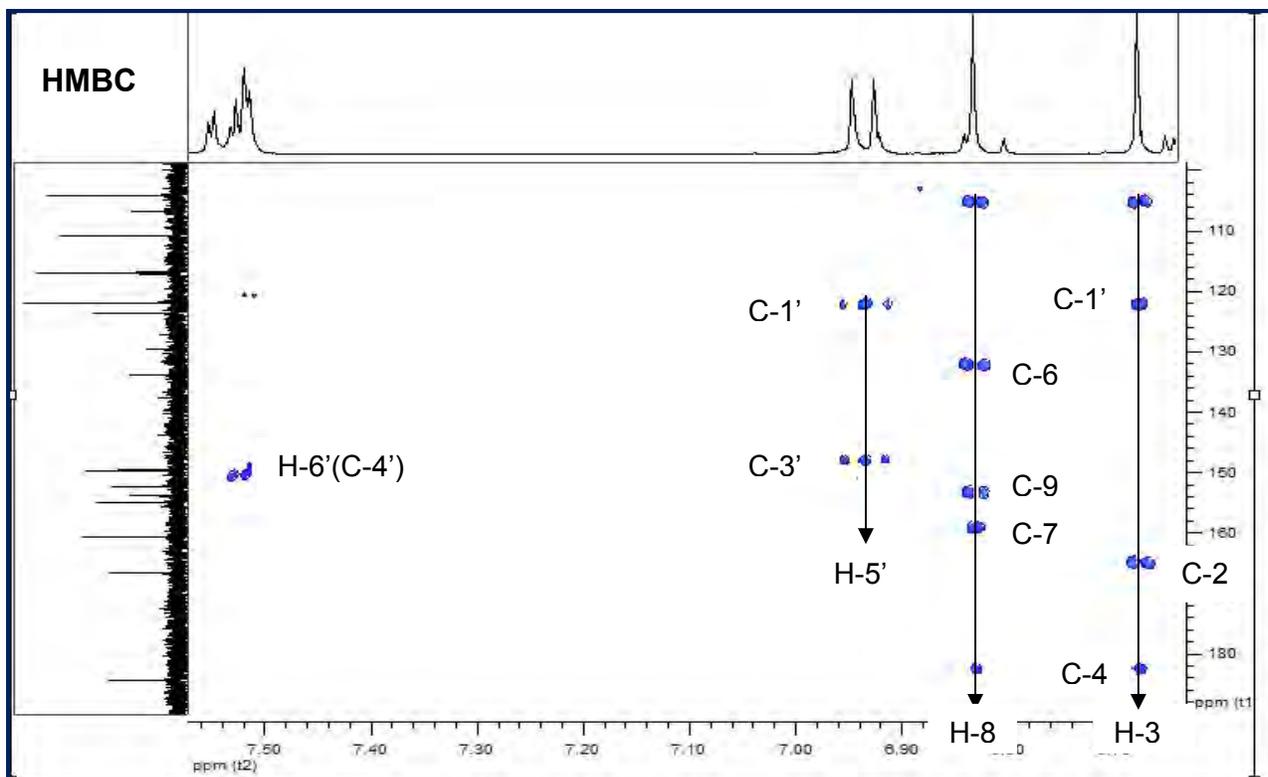
Structure finale du composé C.



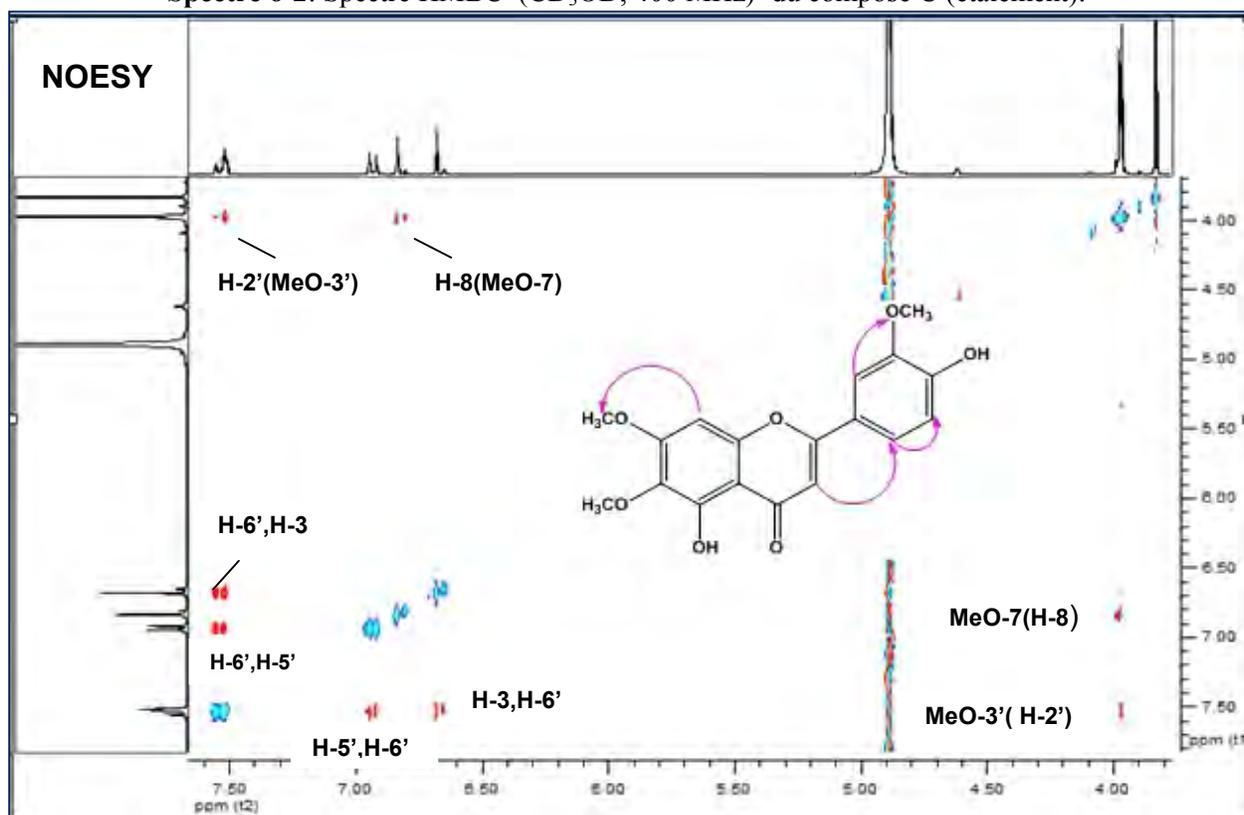
Spectre 6: Spectre HMBC (CD₃OD, 400 MHz) du composé C.



Spectre 6-1: Spectre HMBC (CD₃OD, 400 MHz) du composé C (étalement).



Spectre 6-2: Spectre HMBC (CD₃OD, 400 MHz) du composé C (étalement).

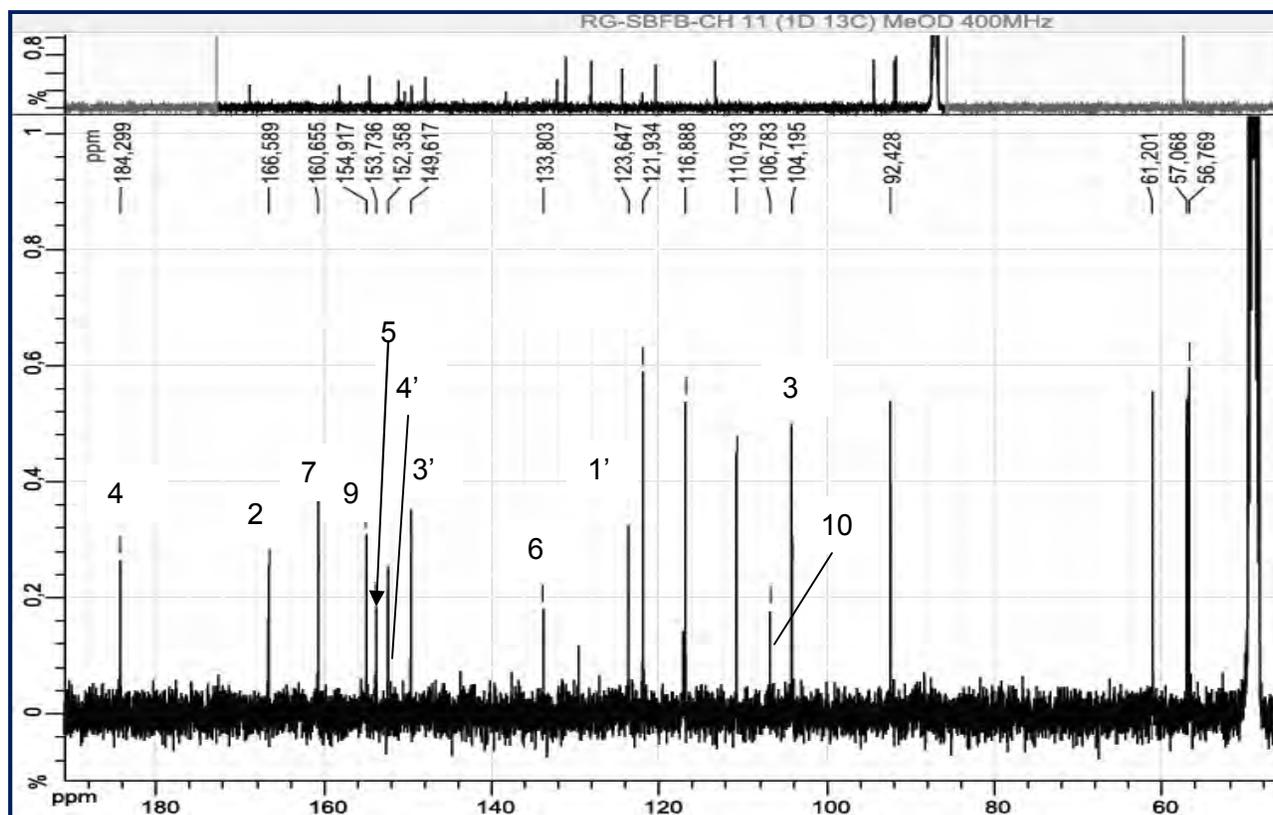


Spectre 7 : Spectre NOESY (CD₃OD, 300 MHz) du composé C.

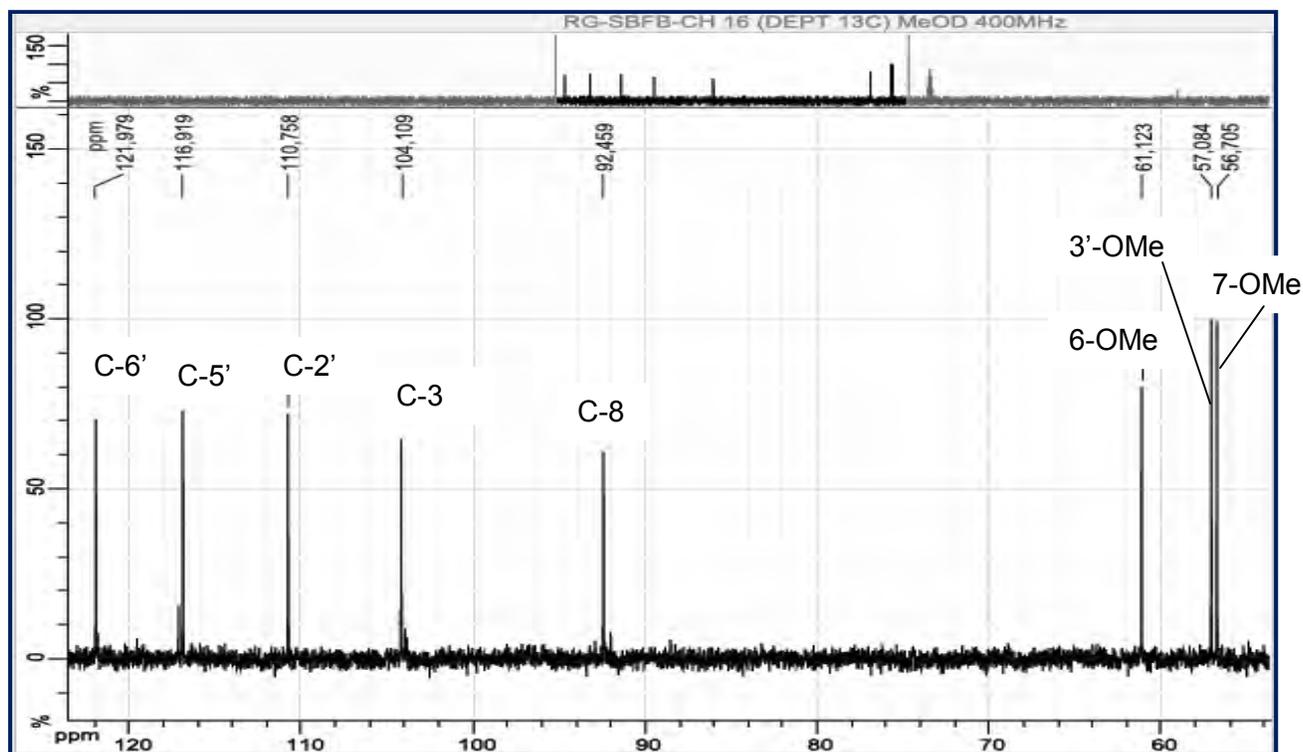
Les données de la RMN ^{13}C (Spectre 8) et l'expérience DEPT 135 (Spectre 9) sont reportés dans le tableau suivant :

δ (ppm)	Attribution	DEPT 135
184,29	C- 4	/
166,58	C-2	/
160,65	C-7	/
154,91	C-9	/
153,73	C-5	/
152,35	C-4'	/
149,61	C-3'	/
133,81	C-6	/
123,63	C-1'	/
121,96	C-6'	CH
116,88	C-5'	CH
110,79	C-2'	CH
106,74	C-10	/
104,19	C-3	CH
92,47	C-8	CH
61,2	6- OMe	CH ₃
57,06	3'-OMe	CH ₃
56,76	7-OMe	CH ₃

Tableau 14 : Les résultats RMN ^{13}C et DEPT 135 (CD₃OD, 400 MHz) du composé C.



Spectre 8: Spectre RMN ^{13}C (CD_3OD , 400 MHz) du composé C.



Spectre 9: Spectre DEPT 135 (CD_3OD , 400 MHz) du composé C.

IV-1-2-Identification du composé F₃**La fluorescence :**

La fluorescence noir violette de ce produit sous la lumière ultra-violette (366 nm) est caractéristique d'une flavone ou d'un flavonol substitué en position 3.

Les résultats de la série spectrale UV-Visible et leur interprétation:

Réactifs	Bande I (nm)	Autres bandes	Bande II (nm)	Commentaire
MeOH	333	/	276	flavone
+NaOH	386	/	272	OH libre en 4' Pas de OH libre en 7
+AlCl ₃	360	/	300	OH libre en 5 avec une oxygénation en 6
+AlCl ₃ / HCl	351	/	300	
+NaOAc	388	342	273	Pas de OH libre en 7
+NaOAc/H ₃ BO ₃	337	/	273	Absence de ortho di-OH sur B
Spectre stable en présence de NaOH après 5 mn				

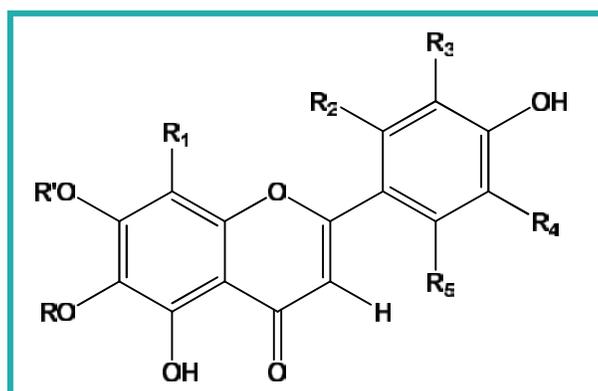
Tableau 15: Données de la série spectrale UV (λ_{\max} nm) du composé F₃

Le maximum d'absorption de la bande I à 333 nm indique qu'il s'agit d'un flavonoïde de type flavone.

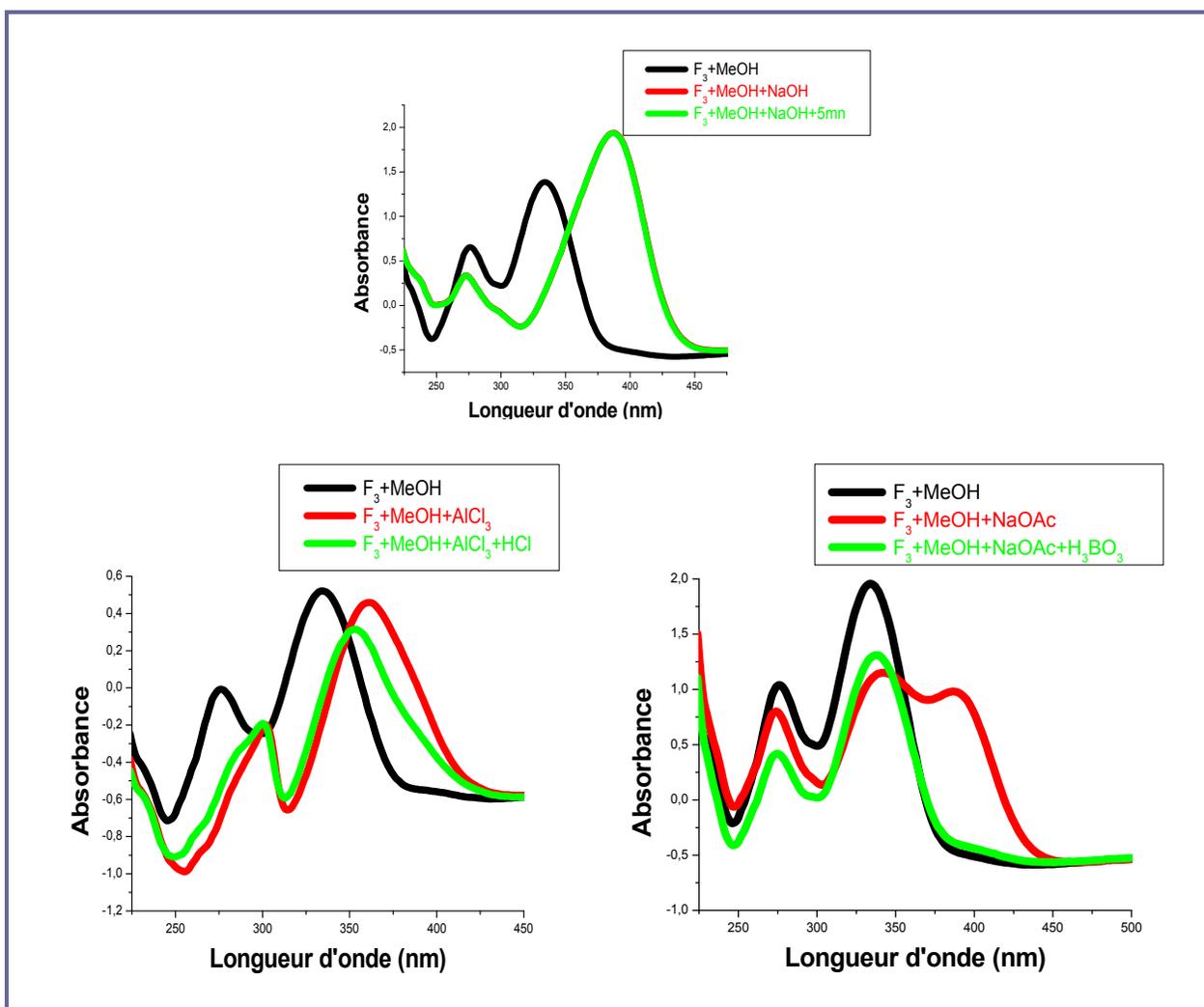
Le spectre enregistré en présence de NaOH présente un effet bathochrome (+53nm) de la bande I par rapport au spectre méthanolique avec une augmentation de l'intensité optique ce qui suppose la présence de l'hydroxyle libre en position 4'. L'absence d'une nouvelle bande dans ce spectre indique une substitution en position 7.

Le réactif (AlCl₃+ HCl) donne un déplacement bathochrome de 18 nm, de la bande I par rapport au spectre méthanolique ce qui conclut l'existence d'un OH libre en 5 avec une oxygénation en position 6. Les spectres enregistrés en présence de NaOAc (bande II) et NaOAc + H₃BO₃ (bande I) ne présentent pas un effet notable par rapport au spectre MeOH ce qui montre que l'hydroxyle en 7 n'est pas libre de même qu'il indique l'absence d'un système ortho di-OH sur le noyau B.

Ces résultats rassemblés dans le tableau 15 mènent à la structure partielle suivante :



Avec R, R' différent de H et R₁, R₂, R₃, R₄ et R₅ différents de OH.



Spectre 10 : Série spectrale UV du composé F₃

Spectroscopie RMN ¹H :

L'examen du spectre proton (Spectre 11) montre la présence de deux doublets ($J = 7,2$ Hz) d'intégration 2H chacun caractéristiques d'un noyau B oxygéné en position 4'. Le premier à $\delta=7,78$ ppm est attribué aux noyaux H-2' et H-6'; le second à $\delta=6,84$ ppm est attribué aux noyaux H-3' et H-5'.

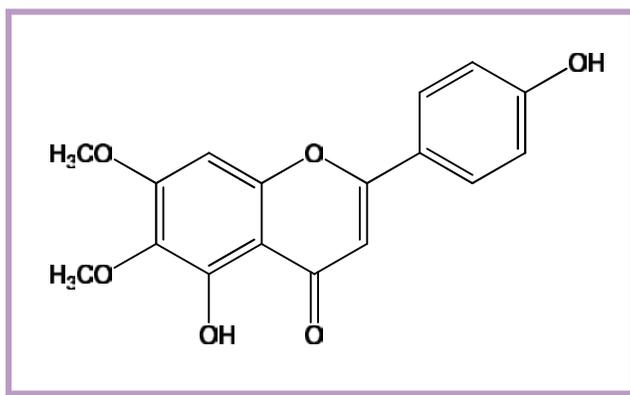
Ce spectre renferme également un signal sous forme de singulet à $\delta=6,71$ ppm d'intégration 1H, attribuable au proton en position C-8, et un signal à $\delta= 6,55$ ppm, d'intégration 1H sous forme d'un singulet attribuable à H-3.

Le spectre montre également deux singulets d'intégration 3H chacun correspondant à des groupements méthoxyles à $\delta = 3,88$ et $3,73$ ppm.

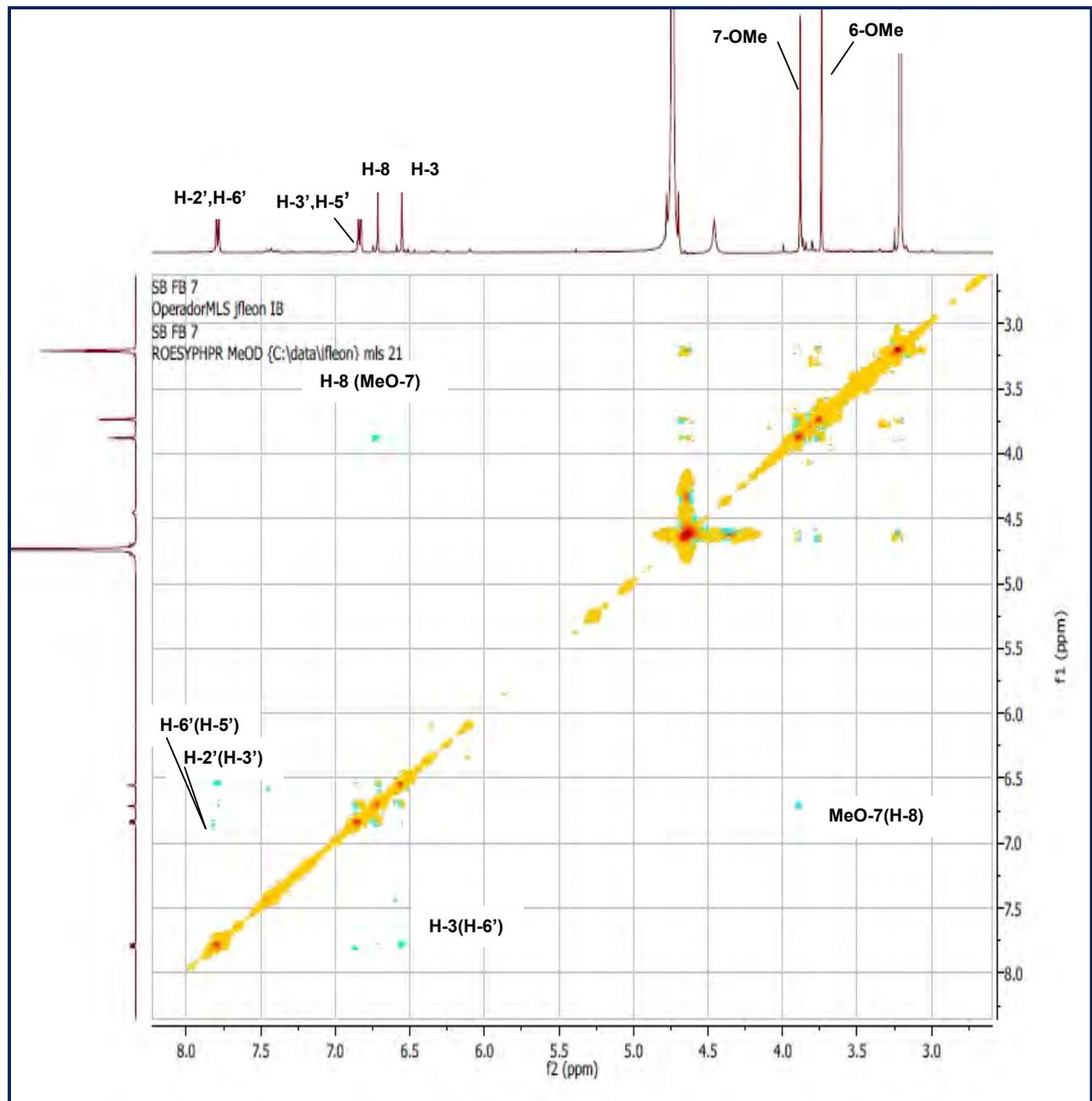
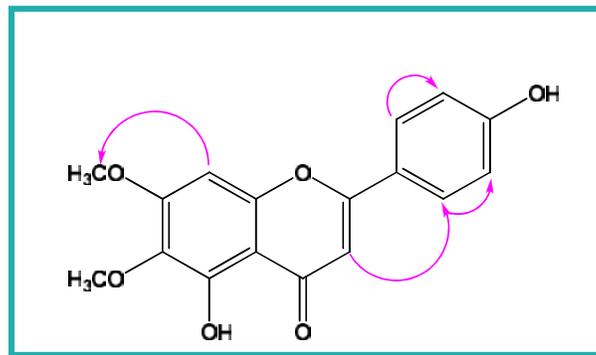
Les données de la série spectrale UV et RMN ¹H permettent de placer ces méthoxyles dans les positions 6 et 7.

L'examen du spectre ROESY (spectre 12) montre les corrélations spatiales entre le proton H-8 et le méthoxyle à $\delta = 3,88$, ce qui permet de placer ce méthoxyle en position C-7 et le méthoxyle à $\delta = 3,73$ ppm en position C-6. Le proton H-3 montre également une corrélation avec le proton H-6'.

Toutes ces données orientent vers le composé **5,4'-dihydroxy- 6,7-dimethoxyflavone** connue sous le nom **Cirsimaritine** (Kolak *et al.*, 2009).



Structure du composé F₃.



Spectre 12 : Spectre ROESY (¹H-¹H) du composé F₃.

IV-1-3- Identification du composé $F_6 \equiv F_{8-1}$ **La fluorescence**

La fluorescence noir-violette de ce produit sous la lumière ultra-violette (366 nm) est caractéristique d'une flavone ou d'un flavonol 3-OR.

Les résultats de la série spectrale UV-Visible et leur interprétation

Réactifs	Bande I (nm)	Autres bandes	Bande II (nm)	Commentaire
MeOH	338	/	268	Flavone
+NaOH	393	325	276	OH libre en 4' OH libre en 7
+AlCl ₃	383	349 302	278	OH libre en 5 Pas d'ortho di-OH sur le cycle B
+AlCl ₃ / HCl	374	341 300	277	
+NaOAc	362	303	274	OH libre en 7
+NaOAc/H ₃ BO ₃	344	/	268	/
Spectre stable en présence de NaOH après 5 mn				

Tableau 17: Données de la série spectrale UV (λ_{\max} nm) du composé $F_6 \equiv F_{8-1}$.

Le maximum d'absorption de la bande I à 338 nm indique qu'il s'agit d'un flavonoïde de type flavone.

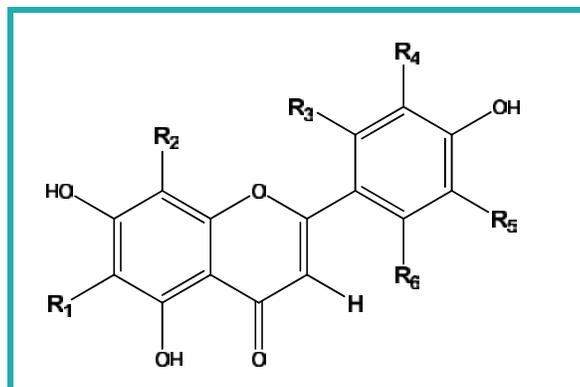
L'effet bathochrome de la bande I (+55 nm) après addition de NaOH par rapport au spectre méthanolique avec augmentation de l'intensité optique oriente vers la présence d'un OH libre en position 4'. L'apparition d'une nouvelle bande indique la présence d'un OH libre en position 7. Ceci est confirmé par l'effet bathochrome de la bande II ($\Delta\lambda = +6$ nm) par rapport au spectre pris dans le MeOH observé sur le spectre après addition de NaOAc.

La comparaison du spectre enregistré en présence de AlCl₃ +HCl par rapport au spectre dans le MeOH montre un effet bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = +36$ nm) indiquant la présence d'un OH libre en position 5.

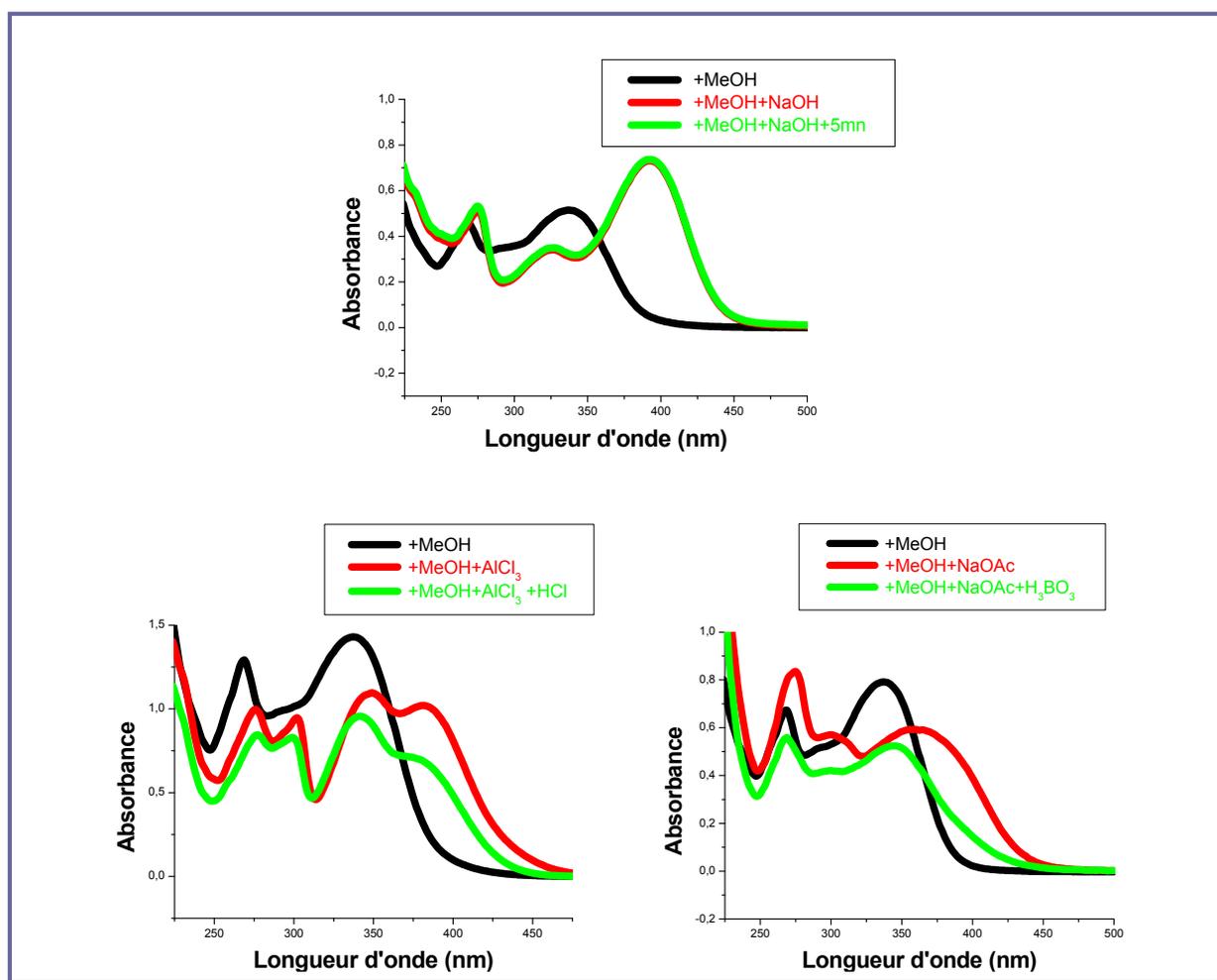
Aucun effet bathochrome de la bande I n'est observé après addition de H₃BO₃ en présence de NaOAc par rapport au spectre dans le méthanol, ce qui indique l'absence de systèmes ortho di-

OH sur le noyau A et le noyau B. Cette hypothèse est confirmée par l'étude du spectre en présence de AlCl_3 qui reste inchangé après addition de HCl .

Ces résultats rassemblés dans le tableau 17 mènent à la structure partielle suivante :



Avec R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 et R_6 différents de OH.



Spectre 13: Série spectrale UV du composé $F_6 \equiv F_{8-1}$

Spectroscopie RMN ¹H :

L'examen du spectre proton (Spectre 14) montre la présence de deux doublets ($J=8,8$ Hz) d'intégration 2H chacun, caractéristiques d'un noyau B oxygéné en position 4'. Le premier à $\delta=7,83$ ppm est attribué aux noyaux H-2' et H-6'; le second à $\delta=6,91$ ppm est attribué aux noyaux H-3' et H-5'.

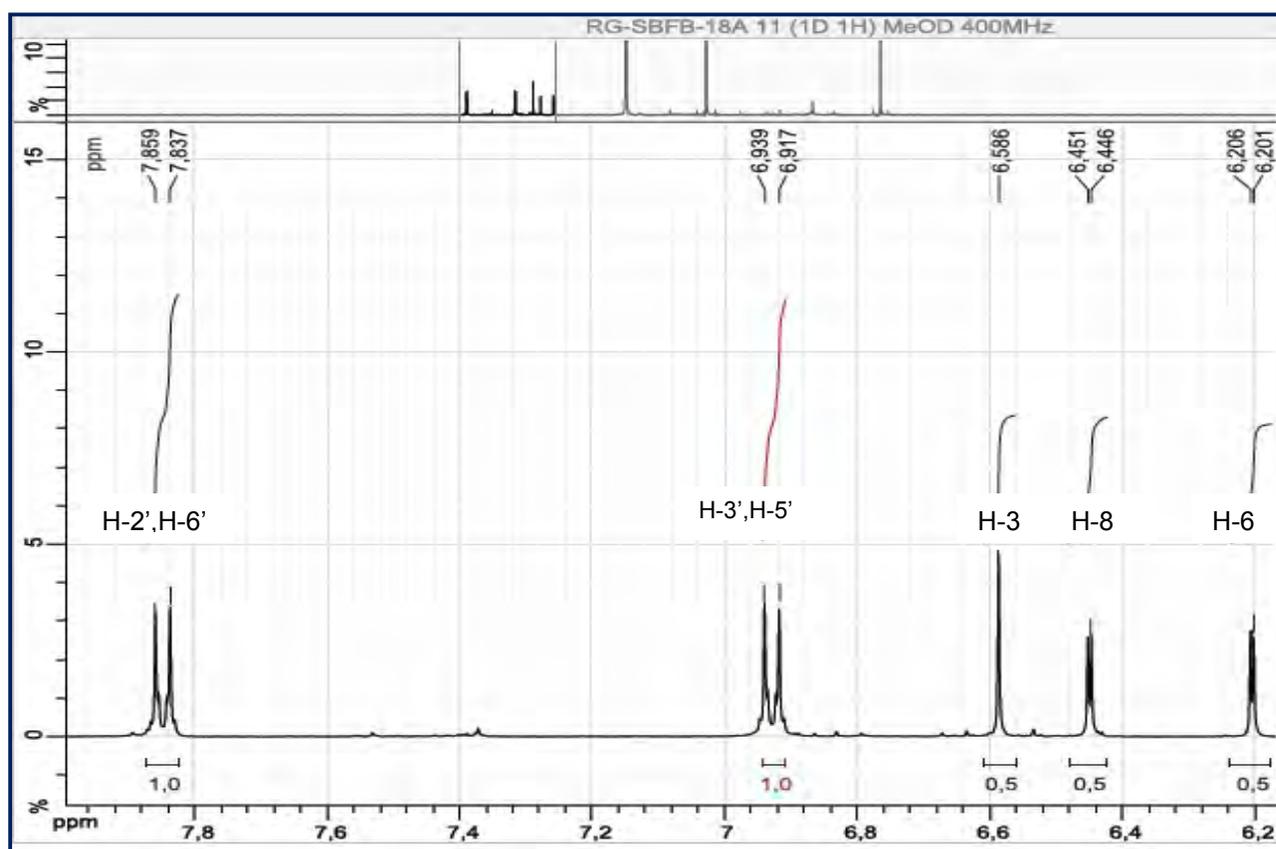
Ce spectre renferme également un signal sous forme de singulet à $\delta=6,58$ ppm, attribuable au proton en position C-3 et deux autres doublets ($J=2$ Hz) à $\delta=6,44$ ppm et $\delta=6,20$ ppm, attribuables à H-8 et H-6 respectivement.

L'examen du spectre COSY (spectre 15) montre une tache de corrélation entre les noyaux H-2',H-6' avec les noyaux H-3', H-5'

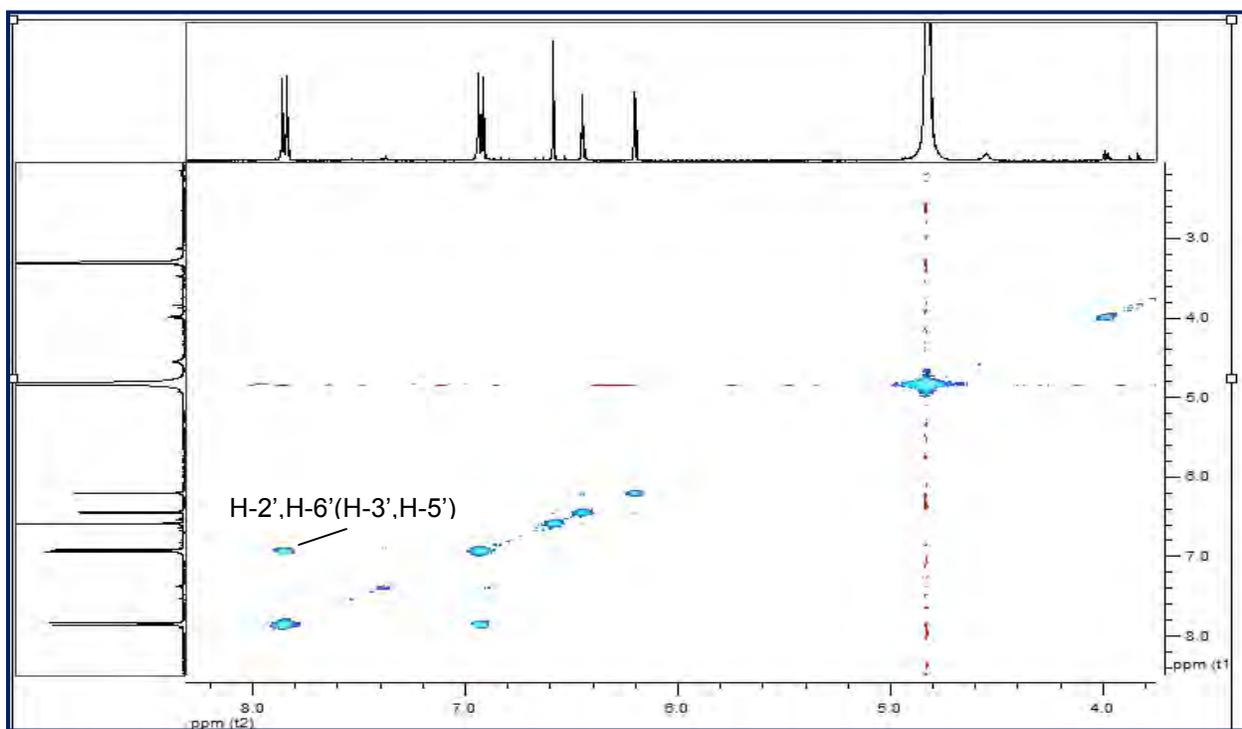
L'examen du spectre HSQC (Spectre 16) permet de localiser C-2', C6' à ($\delta = 129,53$ ppm) ; C-3', C-5' à ($\delta = 117,12$ ppm); C-3 à $\delta = 103,9$ ppm; C-8 à $\delta = 95,21$ ppm, C-6=100,31ppm

δ (ppm)	Attribution	J(Hz)
7,83	H-2',H-6'	8,8
6,91	H-3',H-5'	8,8
6,58	H-3	/
6,44	H-8	2
6,20	H-6	2

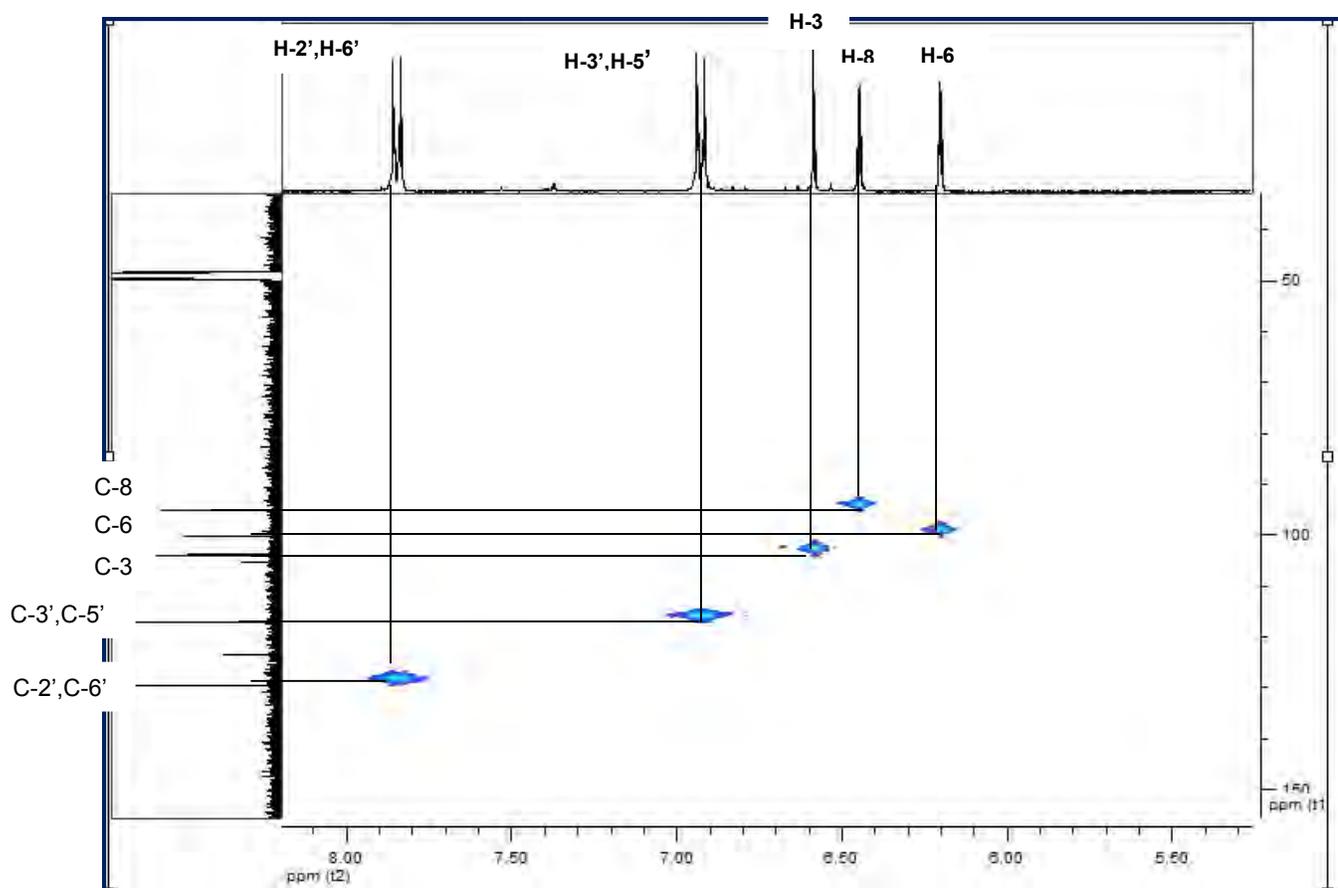
Tableau 18 : Les résultats RMN ¹H (CD₃OD, 400 MHz) du composé F₆≡F₈₋₁



Spectre 14: Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz) du composé $\text{F}_6 \equiv \text{F}_{8-1}$



Spectre 15 : Spectre COSY (CD_3OD , 400 MHz) du composé $\text{F}_6 \equiv \text{F}_{8-1}$.

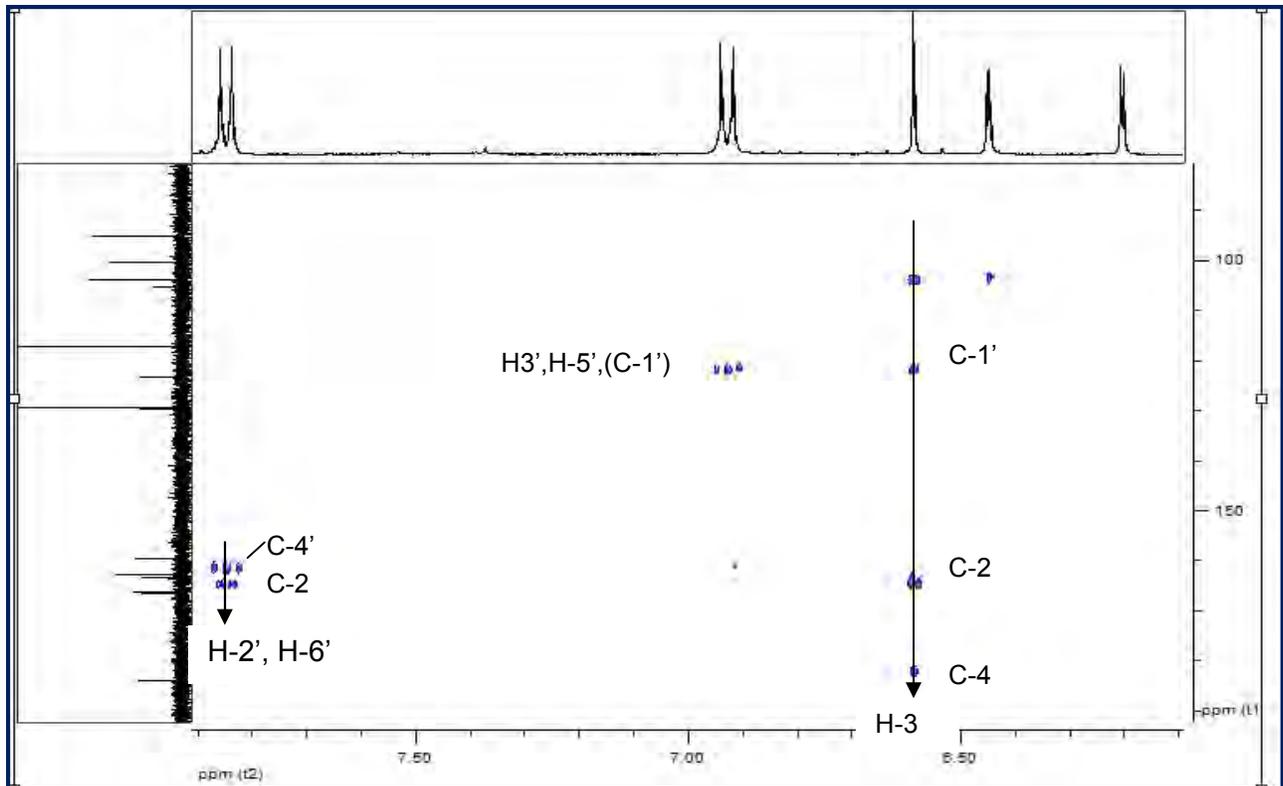


Spectre 16 : Spectre HSQC (CD₃OD, 400 MHz) du composé F₆≡F₈₋₁.

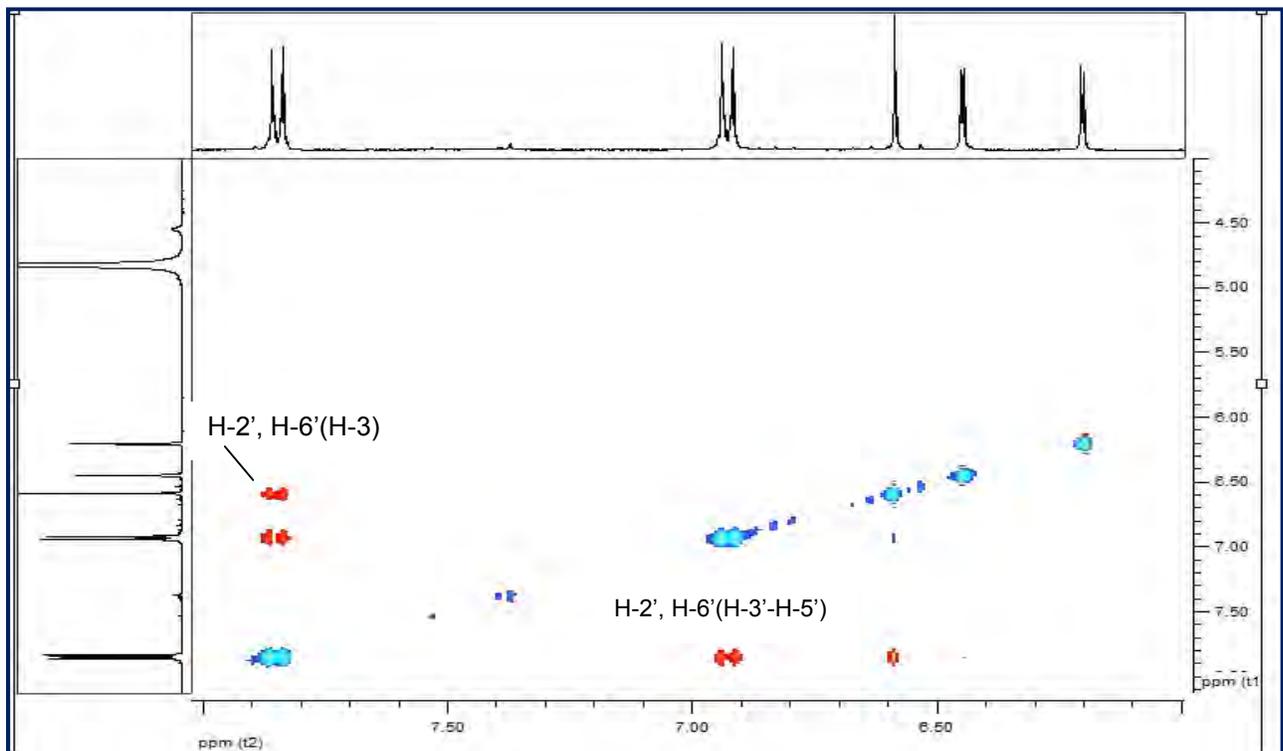
Le spectre HMBC (spectre 17) montre une tache de corrélation de proton H-3 avec le carbone quaternaire à $\delta = 123,42$ ppm attribué à C-1'. Cette attribution est confirmée par la corrélation observée entre ce noyau et les protons H-3' et H-5', de même H-3, H-2' et H-6' permettent l'attribution de C-2 à $\delta = 166,5$ ppm.

Les protons, H-2' et H-6' mènent à la localisation de C-4' à $\delta = 162,87$ ppm.

L'examen du spectre NOESY (spectre 18) montre les corrélations spatiales des protons H-2', H-6' avec les protons H-3', H-5', et le proton H-3 avec le proton H-6'.

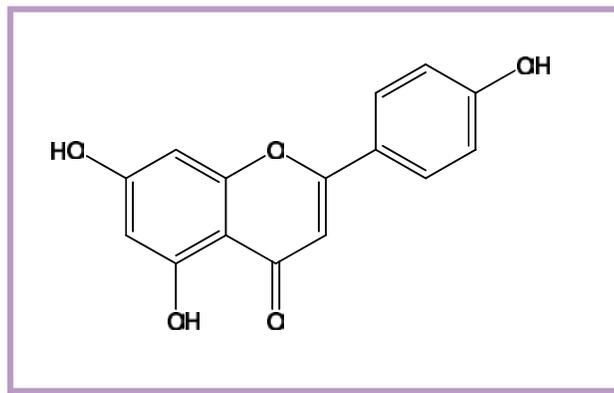


Specre 17 : Specre HMBC (CD_3OD , 400 MHz) du composé $F_6 \equiv F_{8-1}$.



Specre 18 : Specre NOESY (CD_3OD , 300 MHz) du composé $F_6 \equiv F_{8-1}$.

L'ensemble de ces données oriente vers le composé : **4', 5, 7-trihydroxyflavone** connue sous le nom **Apigénine**.



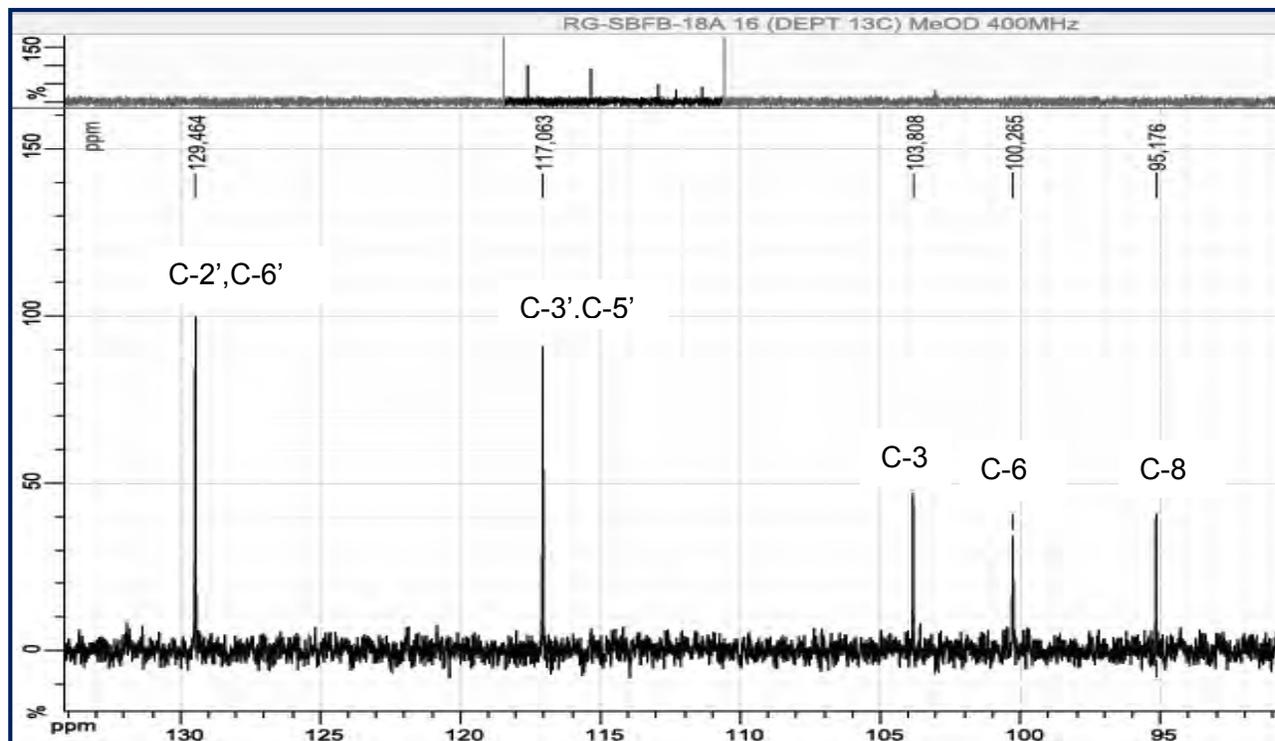
Structure finale du composé $F_6 \equiv F_{8-1}$.

La combinaison des données de l'expérience DEPT 135 (Spectre 19) et la RMN ^{13}C (Spectre 20), permet de mettre en évidence ces éléments.

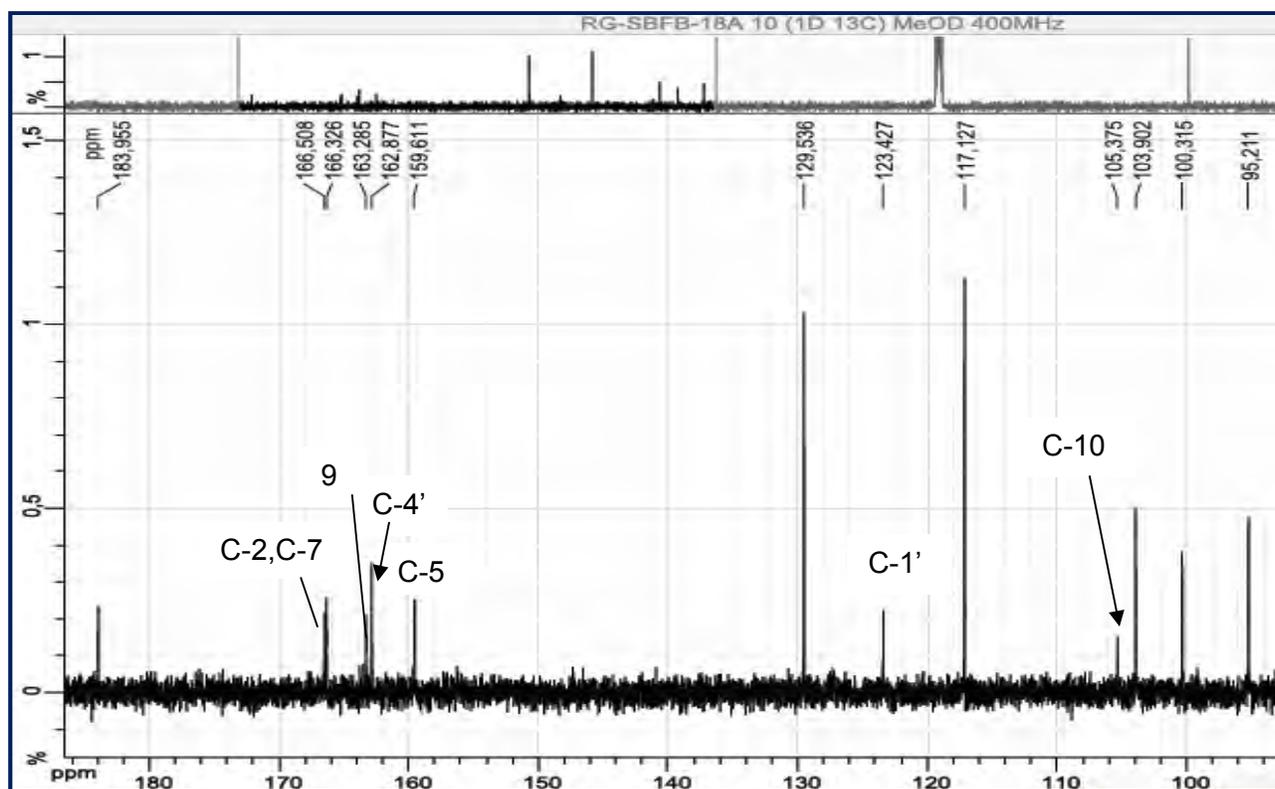
Les données de la RMN ^{13}C sont reportés dans le tableau suivant :

δ (ppm)	Attribution	DEPT 135
183,95	C- 4	/
166,50	C-2	/
166,32	C-7	/
163,28	C-9	/
162,87	C-4'	/
159,61	C-5	/
129,53	C-6',C-2'	CH
123,42	C-1'	/
117,12	C-5',C-3'	CH
105,37	C-10	/
103,9	C-3	CH
100,31	C-6	CH
95,21	C-8	CH

Tableau 19 : Les résultats RMN ^{13}C (CD_3OD , 400 MHz) du composé $F_6 \equiv F_{8-1}$



Spectre 19 : Spectre DEPT 135 (CD₃OD, 400 MHz) du composé F₆≡F₈₋₁.



Spectre 20 : Spectre RMN ¹³C (CD₃OD 400 MHz) du composé F₆≡F₈₋₁.

IV-1-4-Identification du composé F₈₋₂**La fluorescence**

La fluorescence noir-violette sous lumière de Wood de ce composé est caractéristique d'une flavone ou d'un flavonol 3-OR.

Les résultats de la série spectrale UV-Visible et leur interprétation

Réactifs	Bande I (nm)	Autres bandes	Bande II (nm)	Commentaires
MeOH	350	255	266	Flavone ou flavonol 3-OR
+NaOH	402	325	266	OH libre en 4' OH libre en 7
+AlCl ₃	393	358 297	267	OH libre en 5 Ortho di-OH sur le B
+AlCl ₃ / HCl	383	354 295	267	
+NaOAc	370	322	271	OH libre en 7
+NaOAc/H ₃ BO ₃	374	/	260	Ortho di-OH sur le B
Spectre stable en présence de NaOH après 5 mn				

Tableau 20: Données de la série spectrale UV (λ_{\max} nm) du composé F₈₋₂.

Le maximum d'absorption de la bande I dans le méthanol à 350 nm caractéristiques d'une flavone ou flavonol 3-OR.

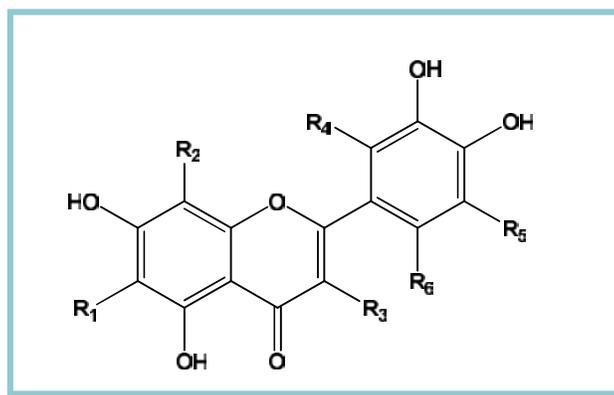
L'addition de NaOH provoquant un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = + 52$ nm) avec augmentation de l'intensité lumineuse par rapport au spectre MeOH indique la présence d'un OH libre en 4', l'apparition d'une nouvelle bande à 325 nm indique l'existence d'un OH libre en 7.

L'addition de NaOAc provoquant un déplacement bathochrome de la bande II ($\Delta\lambda = + 5$ nm) par rapport au spectre MeOH confirme le OH libre en 7.

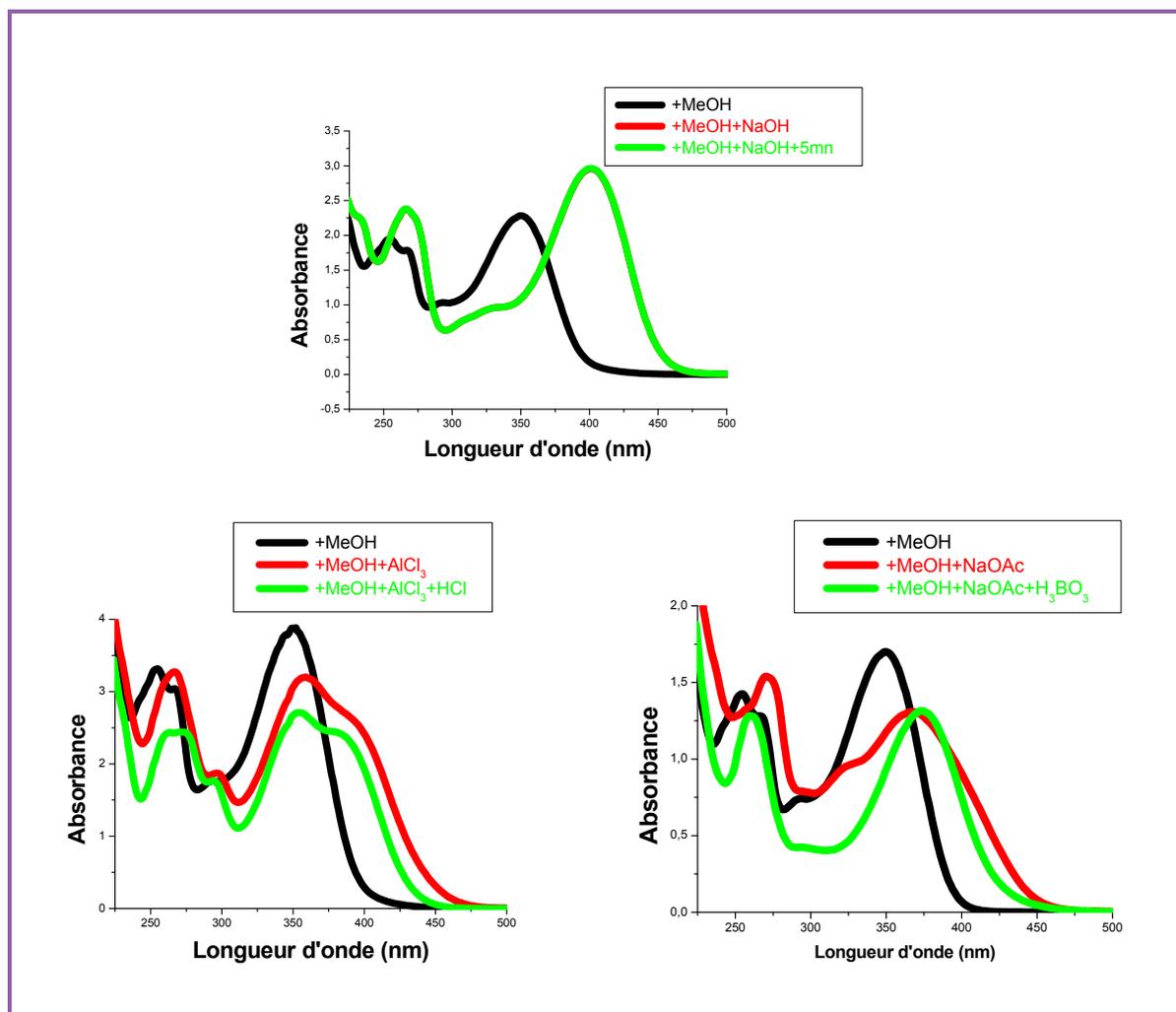
L'effet bathochrome de la bande I en comparant les spectres AlCl₃ + HCl / MeOH ($\Delta\lambda = +33$ nm), indique la présence d'un OH libre en 5.

L'effet bathochrome de la bande I (+24 nm) après addition de H₃BO₃ en présence de NaOAc par rapport au spectre dans MeOH indique la présence d'un système ortho di-OH sur le cycle B.

Ces données permettent la proposition de la structure partielle suivante :



Avec R₁, R₂, R₄, R₅, R₆ différents de OH et R₃ est un H ou un OR.



Spectre 21 : Série spectrale UV du composé F₈₋₂.

Spectroscopie RMN ¹H

L'examen du spectre RMN ¹H (spectre 22) montre :

- un singulet large à $\delta = 12,97$ ppm, attribuable à OH en C-5
- un signal à 7,42-7,39 ppm d'intégration 2H sous forme de multiplet attribuable à H-6' et H-2'.

Ce signal correspond en fait à deux signaux superposés l'un d'eux sous forme d'un doublet dédoublé ($J = 8,1$ Hz et $J = 2,1$ Hz) caractérisant H-6' et l'autre sous forme d'un doublet ($J = 2,1$ Hz) caractérisant H-2'.

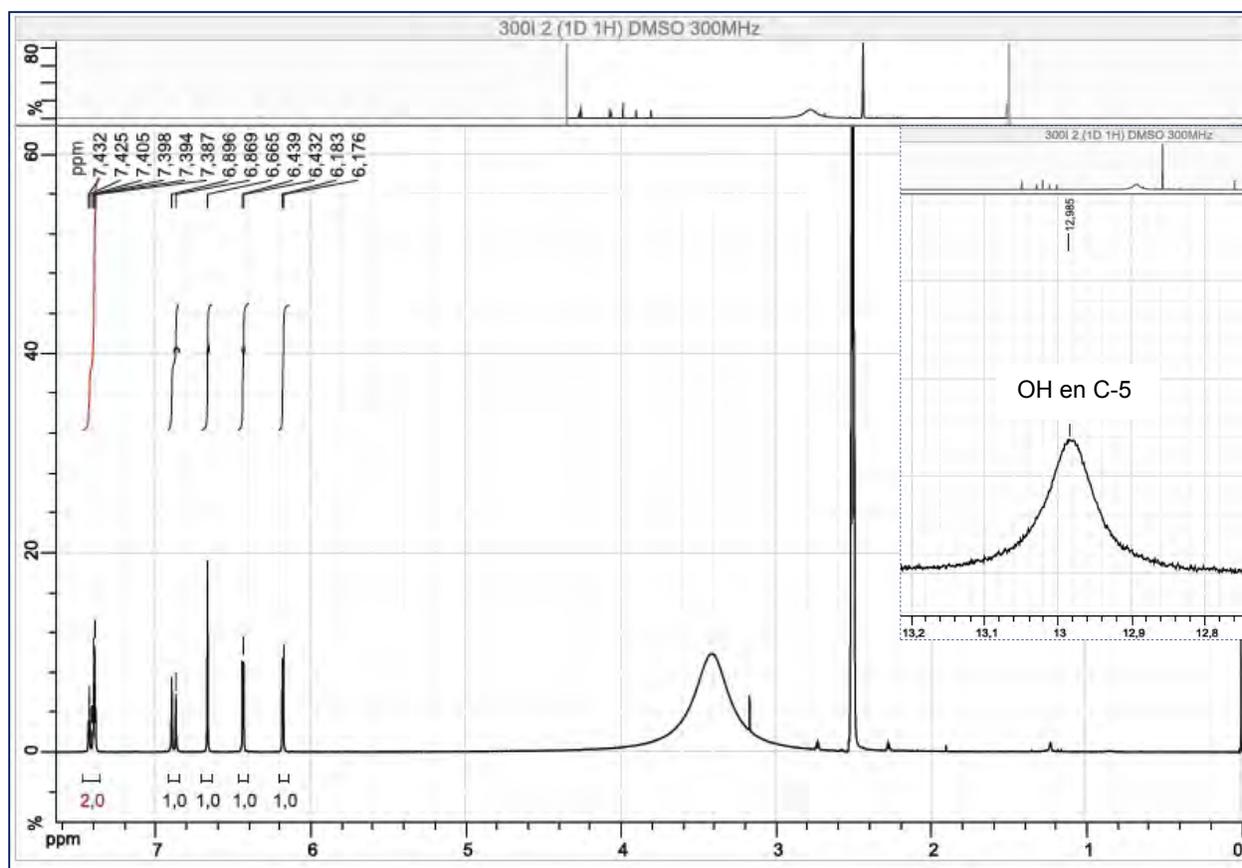
- un signal à $\delta = 6,86$ ppm, d'intégration 1H sous forme d'un doublet ($J = 8,1$ Hz) attribuable à H-5'. Ces observations orientent vers un noyau B substitué en positions 3' et 4'.
- un signal à $\delta = 6,66$ ppm, d'intégration 1H sous forme d'un singulet attribuable à H-3.
- un signal à $\delta = 6,43$ ppm, d'intégration 1H sous forme d'un doublet ($J = 2,1$ Hz) attribuable à H-8.
- un signal à $\delta = 6,18$ ppm, d'intégration 1H sous forme d'un doublet ($J = 2,1$ Hz) attribuable à H-6

L'examen du spectre HSQC (Spectre 23) permet de localiser C-6' à $\delta = 118,87$ ppm ; C-5' à $\delta = 115,91$ ppm; C-2' à $\delta = 113,2$ ppm; C-3 à $\delta = 102,7$ ppm; C-6 à $\delta = 98,81$ ppm; C-8 à $\delta = 93,78$ ppm.

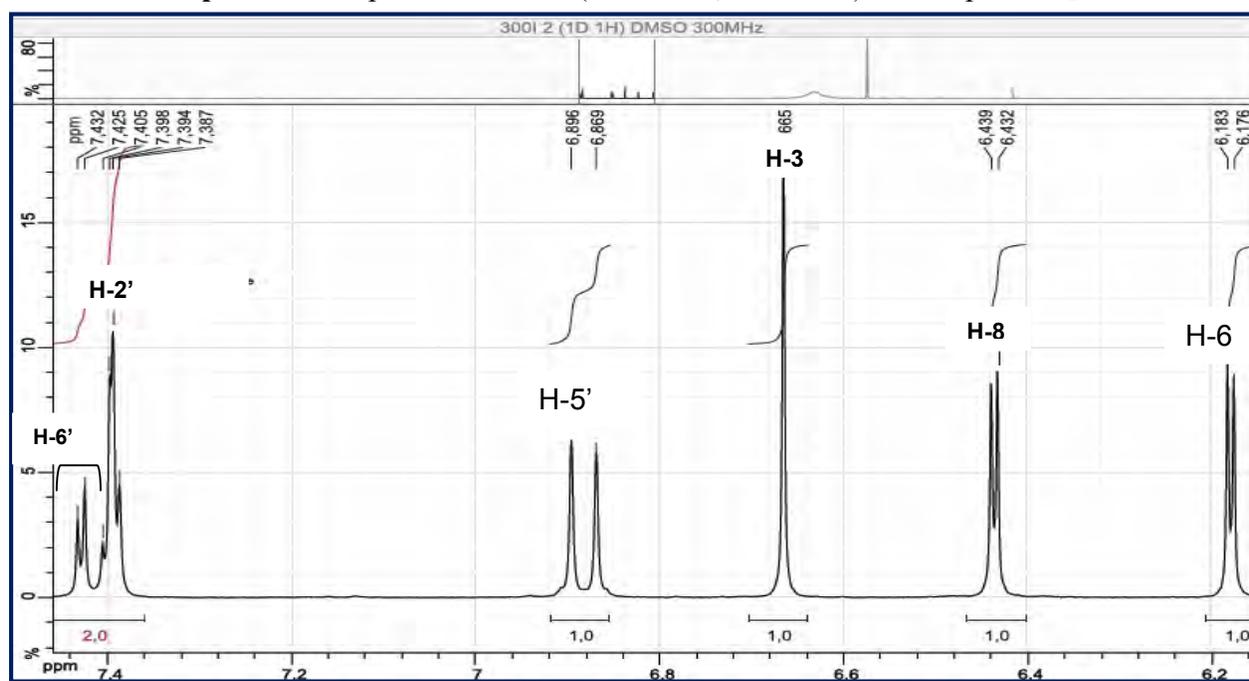
L'examen du spectre COSY (spectre 24) permet de localiser le proton H-6' à ($\delta = 7,42$ ppm) grâce à sa corrélation avec le proton voisin H-5' ($\delta = 6,86$ ppm) et montre également une tache de corrélation entre le proton H-6 ($\delta = 6,18$ ppm) et H-8 ($\delta = 6,43$ ppm).

δ (ppm)	Intégration	Multiplicité	J (Hz)	Attribution
12,97	1H	sl	/	OH en C-5
7.42	1H	dd	8,1 - 2,1	H6'
7.38	1H	d	2,1	H2'
6,86	1H	d	8,1	H5'
6,66	1H	s	/	H3
6,43	1H	d	2,1	H8
6,18	1H	d	2,1	H6

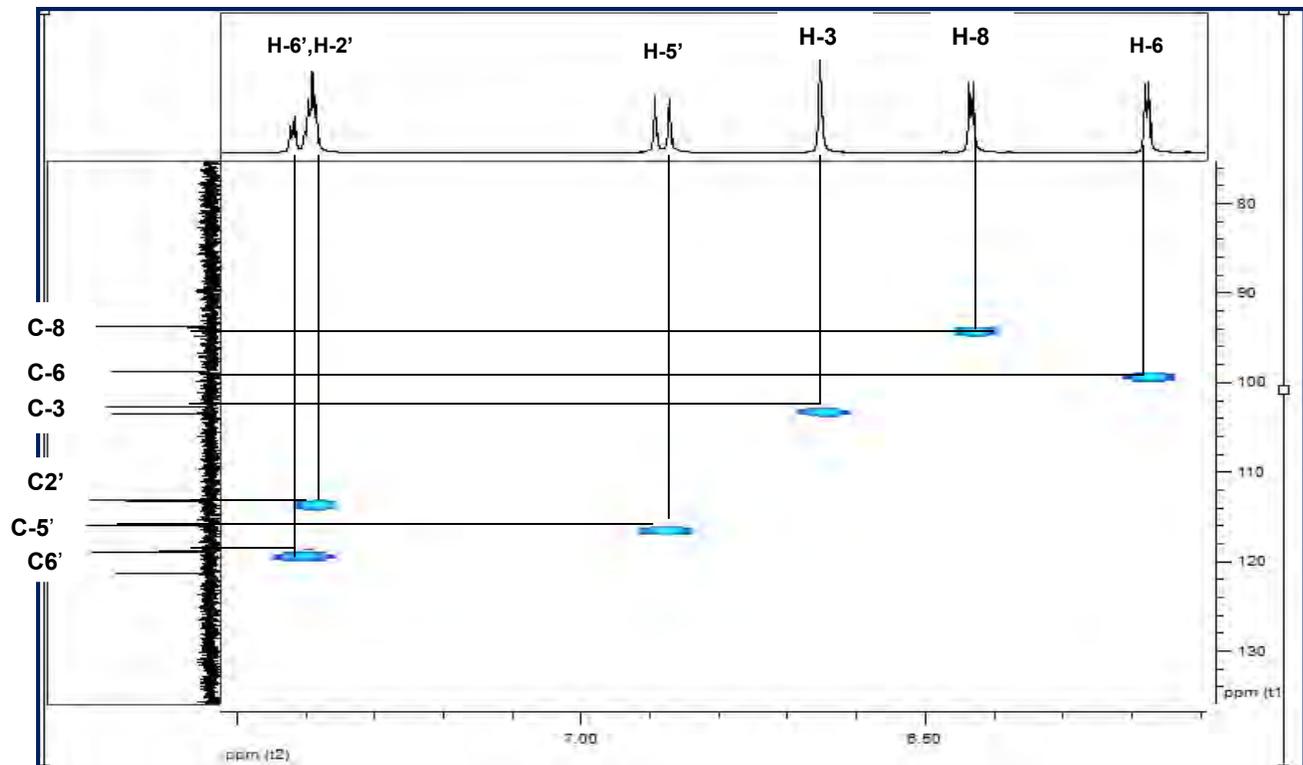
Tableau 21 : Données de la RMN ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz) du composé F₈₋₂.



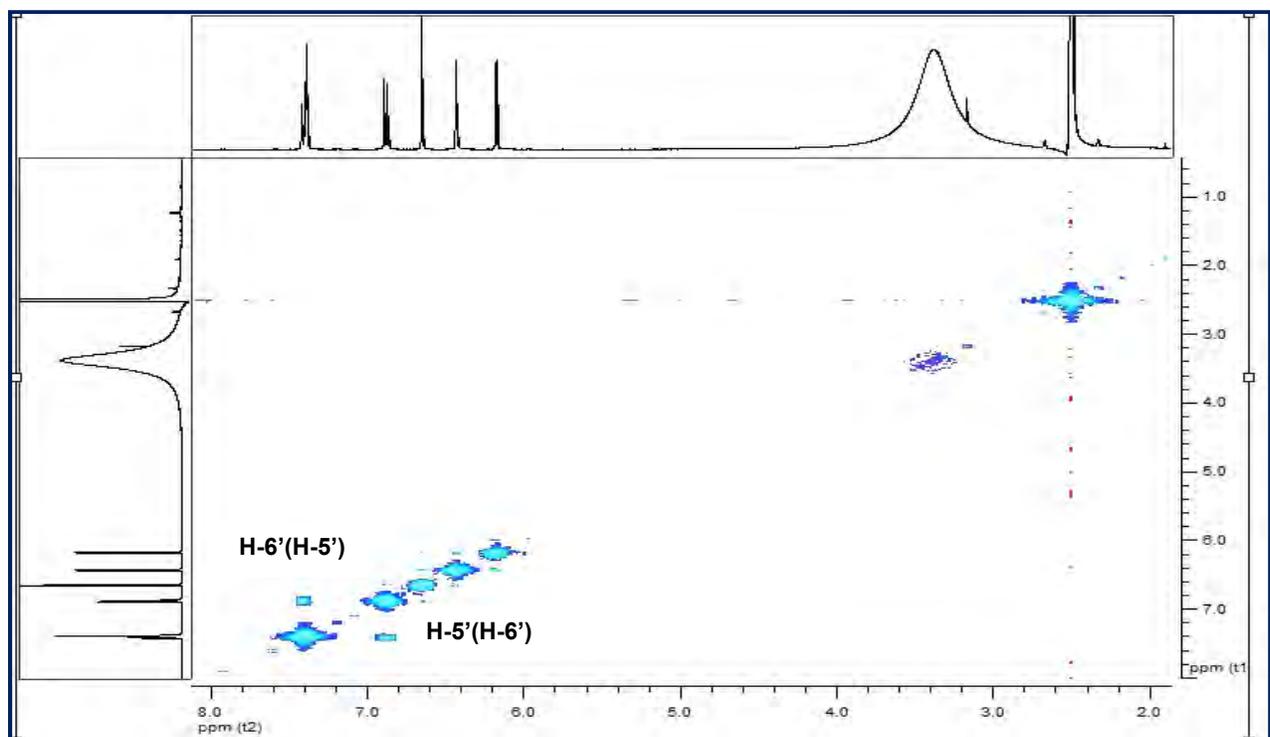
Spectre 22 : Spectre RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) du composé F_{8-2} .



Spectre 22-1 : Spectre RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) du composé F_{8-2} (étalement).



Spectre 23 : Spectre HSQC (DMSO-d₆, 400 MHz) du composé F₈₋₂.



Spectre 24 : Spectre COSY (DMSO-d₆, 400 MHz) du composé F₈₋₂.

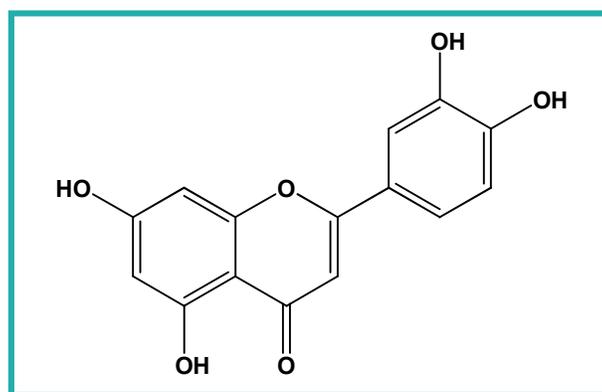
Les spectres DEPT 135 (spectre 25) et RMN ^{13}C (spectre 26) montre neuf carbones quaternaires et six groupements CH dont les données sont reportées dans le tableau suivant :

δ (ppm)	Attribution	DEPT 135
181,52	C-4	/
164,34	C-7	/
163,83	C-2	/
161,38	C-5	/
157,21	C-9	/
149,81	C-4'	/
145,72	C-3'	/
121,26	C-1'	CH
118,87	C-6'	/
115,9	C-5'	CH
113,2	C-2'	CH
103,52	C-10	/
102,7	C-3	CH
98,81	C-6	CH
93,78	C-8	CH

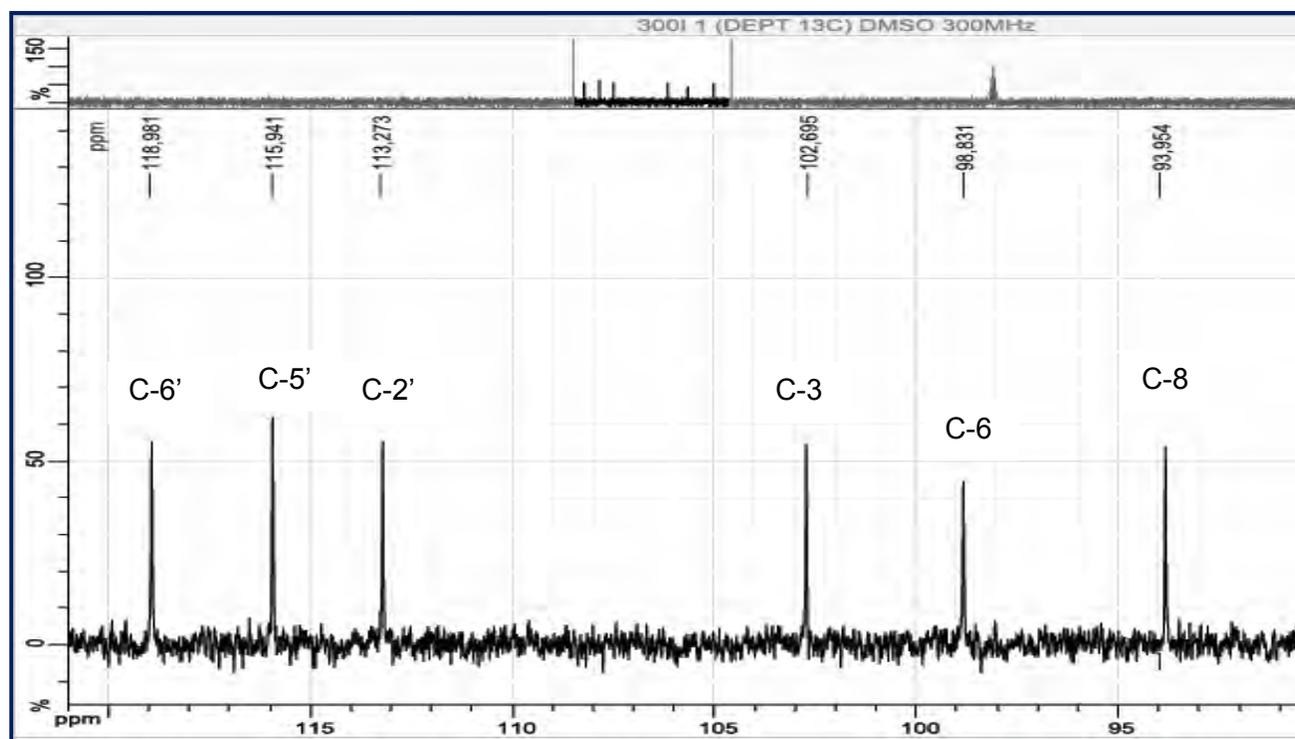
Tableau 22 : Données de la RMN ^{13}C (DMSO- d_6 300 MHz) du composé F₈₋₂

Ces données mènent à la structure finale suivante :

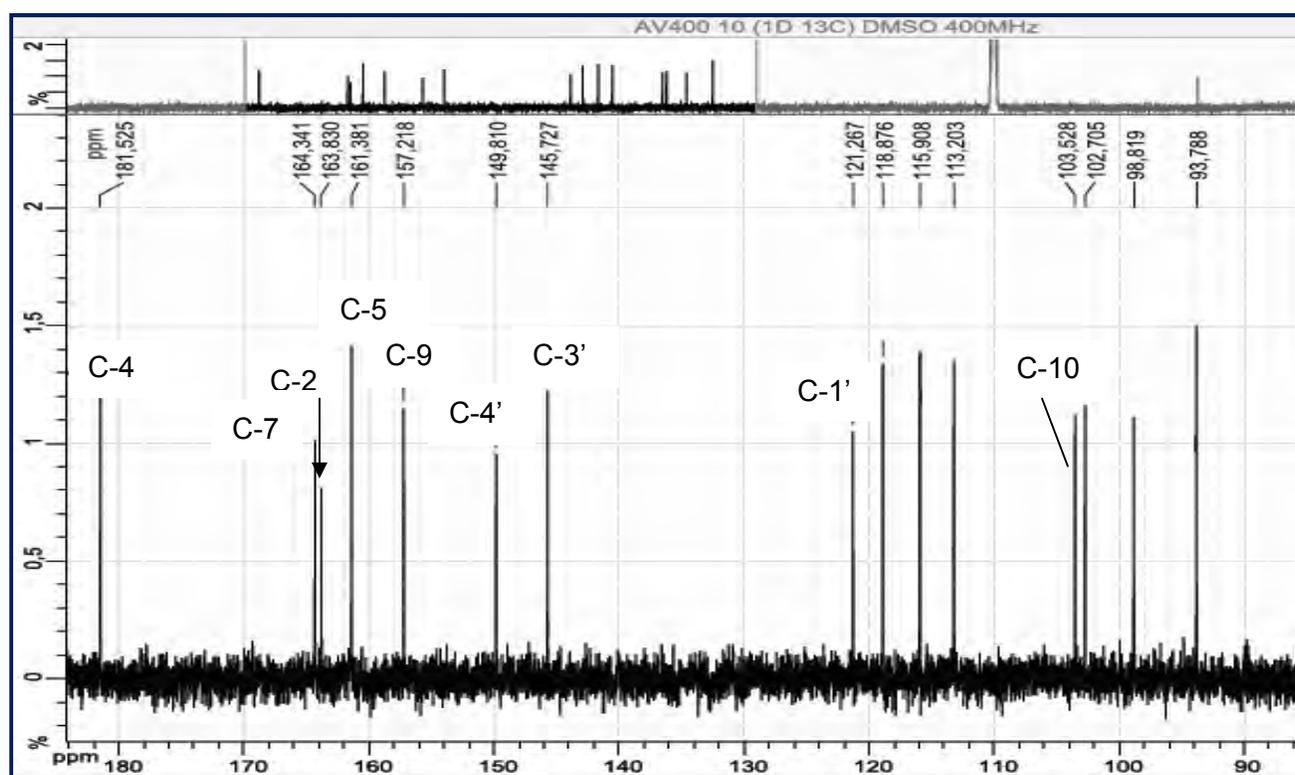
3', 4', 5, 7-tetrahydroxyflavone connue sous le nom de **Lutéoline**.



Structure finale du composé F₈₋₂.

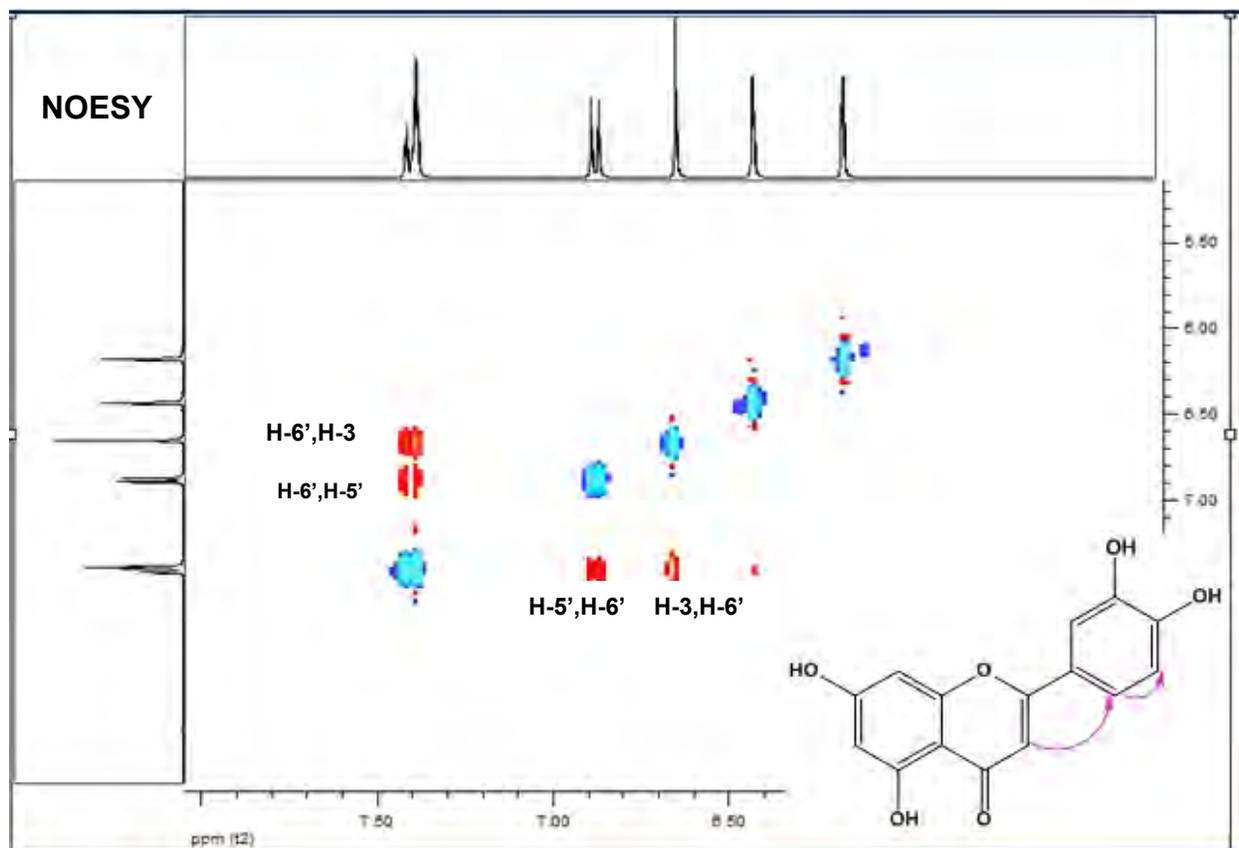


Spectre 25 : Spectre DEPT 135 (DMSO-d₆, 300 MHz) du composé F₈₋₂.



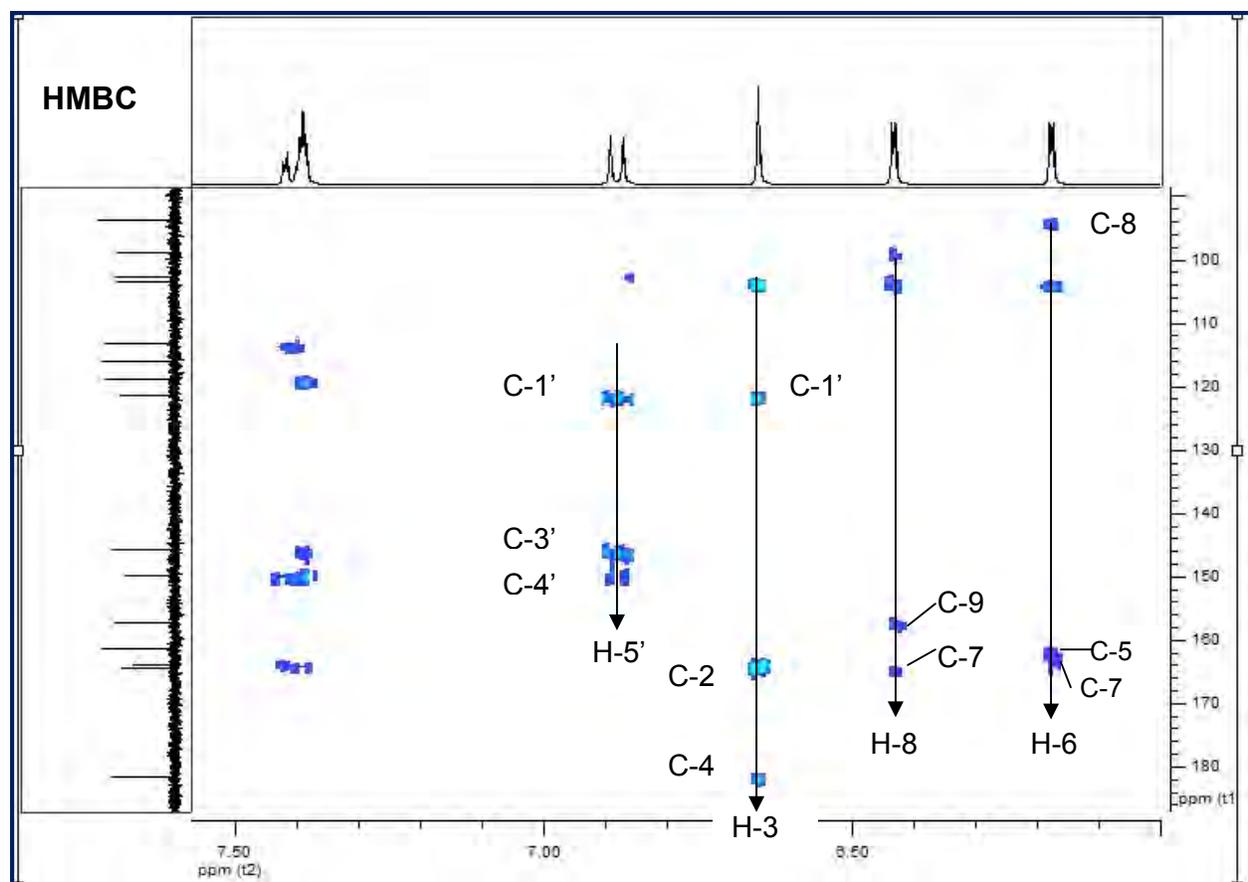
Spectre 26 : Spectre RMN ¹³C (DMSO-d₆, 400 MHz) du composé F₈₋₂.

Le spectre NOESY (spectre 27) montre les corrélations spatiales du proton H-6' avec le proton H-5' et H-3.

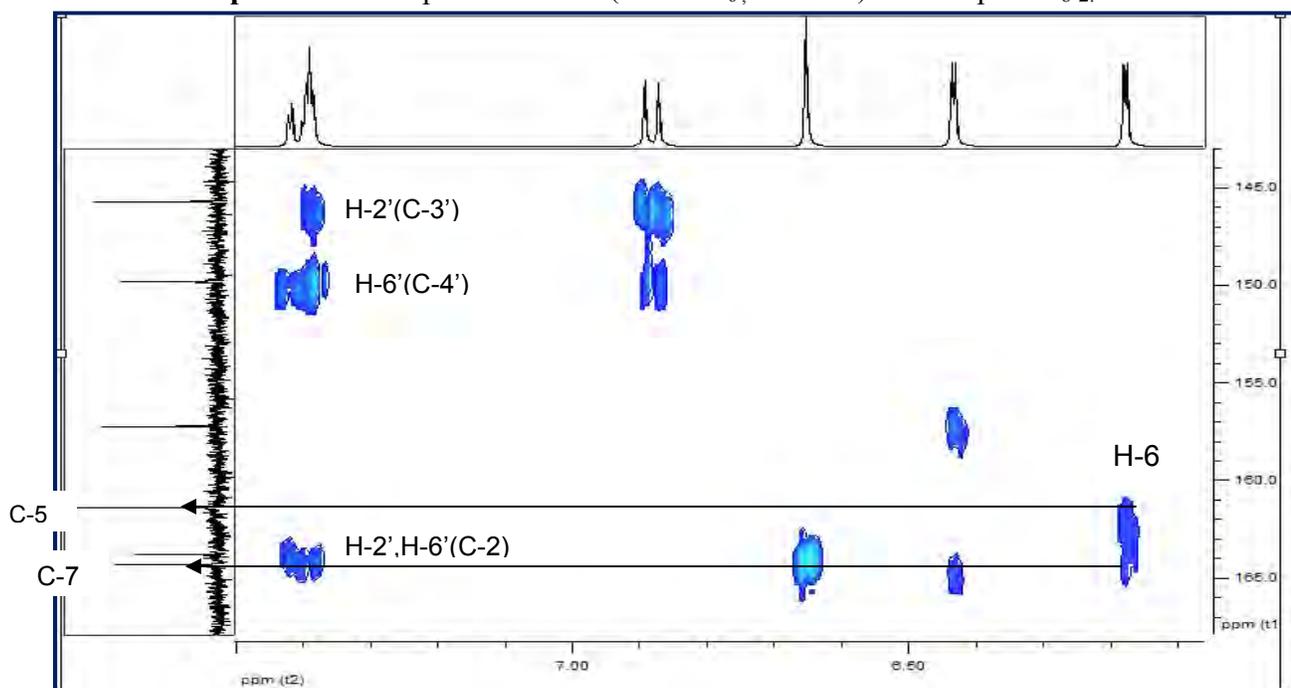


Spectre 27 : Spectre NOESY (DMSO-d₆, 300 MHz) du composé F₈₋₂

Dans le spectre HMBC (spectre 28), les protons H-6 et H-8 montrent des taches de corrélation avec le carbone quaternaire oxygéné à $\delta = 164,3$ ppm, ce qui permet l'attribution de ce dernier au C-7. Par ailleurs et toujours sur le même spectre, le proton H-8 montre une autre tache de corrélation avec le carbone à $\delta = 157,21$ ppm qui ne peut être que C-9, de même le proton H-6 mène à la localisation de C-5 à $\delta = 161,3$ ppm, et le proton H-3 mène à la localisation de C-1' à $\delta = 121,2$ ppm. Cette attribution est confirmée par la corrélation observée entre ce noyau et le proton H-5', de même H-3, H-2' et H-6' permettent l'attribution de C-2 à $\delta = 163,8$ ppm. Le proton H-5' mène à la localisation de C-3', C-4' à $\delta = 145,7$ ppm $\delta = 149,8$ ppm respectivement.



Spectre 28 : Spectre HMBC (DMSO-d₆, 400 MHz) du composé F_{8.2}.



Spectre 28-1 : Spectre HMBC (DMSO-d₆, 400 MHz) du composé F_{8.2} (étalement).

IV-1-6-Identification du composé P₁

La fluorescence

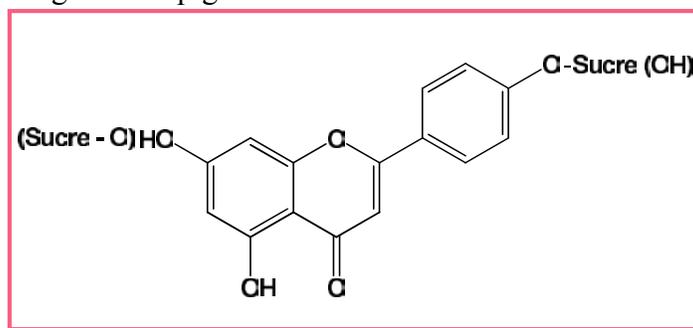
La fluorescence noire violette sous lumière de Wood de ce composé est caractéristique d'une flavone ou d'un flavonol 3-OR.

Spectroscopie RMN ¹H

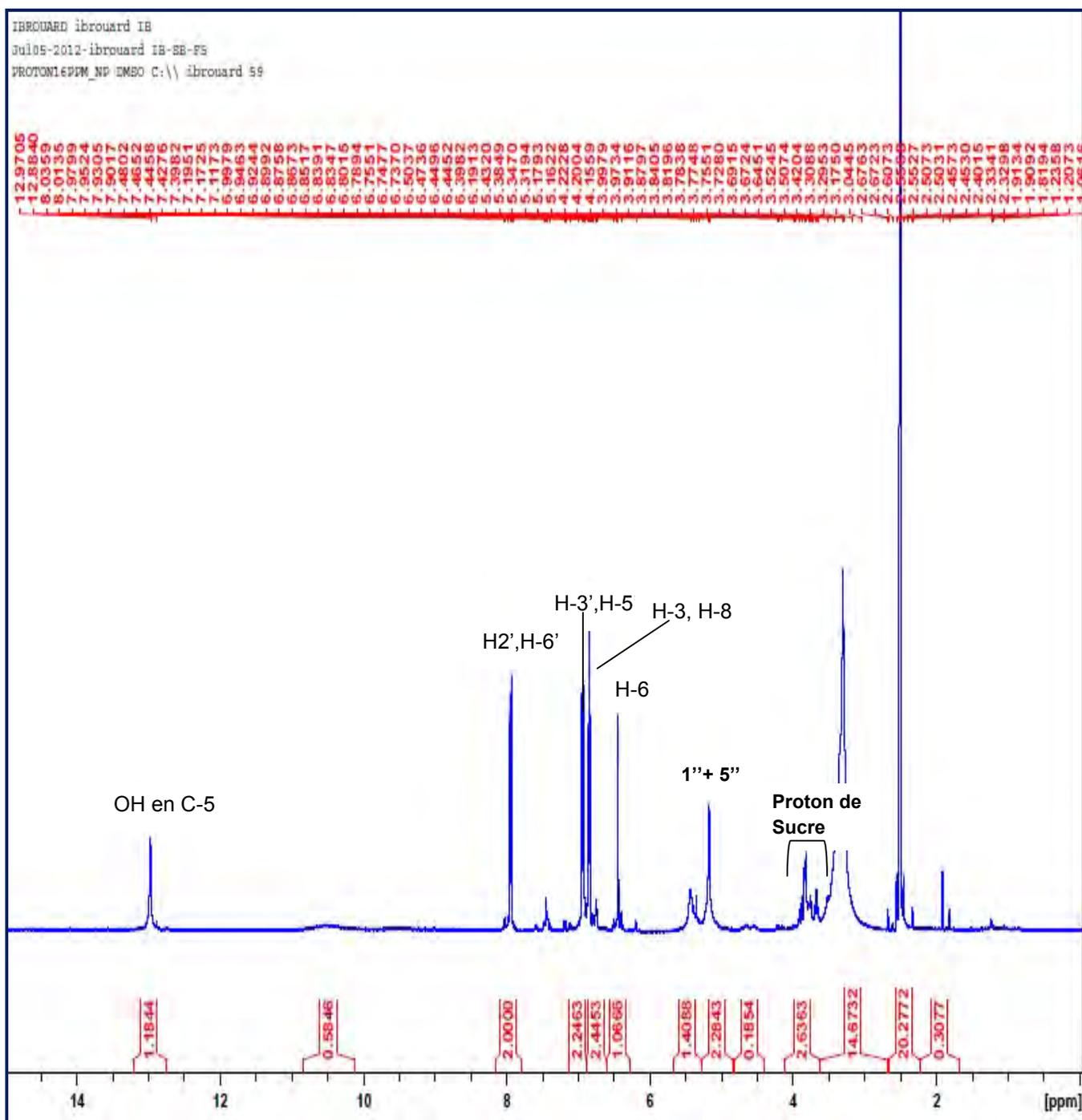
L'examen du spectre de RMN ¹H (Spectre 29) montre la présence de :

- un singulet à $\delta = 12,97$ ppm, attribuable à un OH en C-5.
- deux doublets d'intégration 2H chacun, formant un système AM à $\delta = 8,03$ ppm et $\delta = 6,94$ ppm, ($J = 8,9$ Hz) attribuables à H-2', H-6' et à H-3', H-5' respectivement, indiquant ainsi une oxygénation du noyau B en position 4' d'un flavonoïde.
- un signal à $\delta = 6,83$ ppm d'intégration 2H, caractéristique des protons H-3, et H -8. Ce signal correspond en fait à deux signaux superposés l'un d'eux sous forme d'un doublet ($J = 1,7$ Hz) caractérisant H-8 du noyau A d'un flavonoïde et l'autre sous forme d'un singulet attribuable à H-3 caractéristique d'un flavone.
- un signal à $\delta = 6,44$ ppm, d'intégration 1H sous forme d'un doublet ($J = 1,7$ Hz) attribuable à H-6.
- un doublet à $\delta = 5,17$ ppm ($J = 6,8$ Hz), attribuable au proton anomérique d'un sucre relié à l'aglycone, d'après la valeur de son déplacement chimique, par un pont oxygène avec une configuration β du carbone anomérique.
- un ensemble de multiplets dans l'intervalle 3,64 – 3,91 ppm attribuable par conséquent aux protons du substituant sucre.

L'ensemble de ces données mène à la structure partielle reportée dans le schéma qui est un hétéroside ayant comme génine l'apigénine.



Structure partielle du composé P₁



Spectre 29 : Spectre RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) du composé P₁.

Les données spectroscopiques de ce composé sont reportées dans le tableau suivant :

δ (ppm)	Intégration	Multiplicité	J (Hz)	Attribution
12,97	1H	s	/	OH en C-5
8,03	2H	d	8,9	H-2', H-6'
6,94	2H	d	8,9	H-3', H-5'
6,83	1H	d	1,7	H-8
6,83	1H	s	/	H-3
6,44	1H	d	1,7	H-6
5,17	1H	d	6,8	H-1''
3,64 – 3,91		m		Protons de sucre

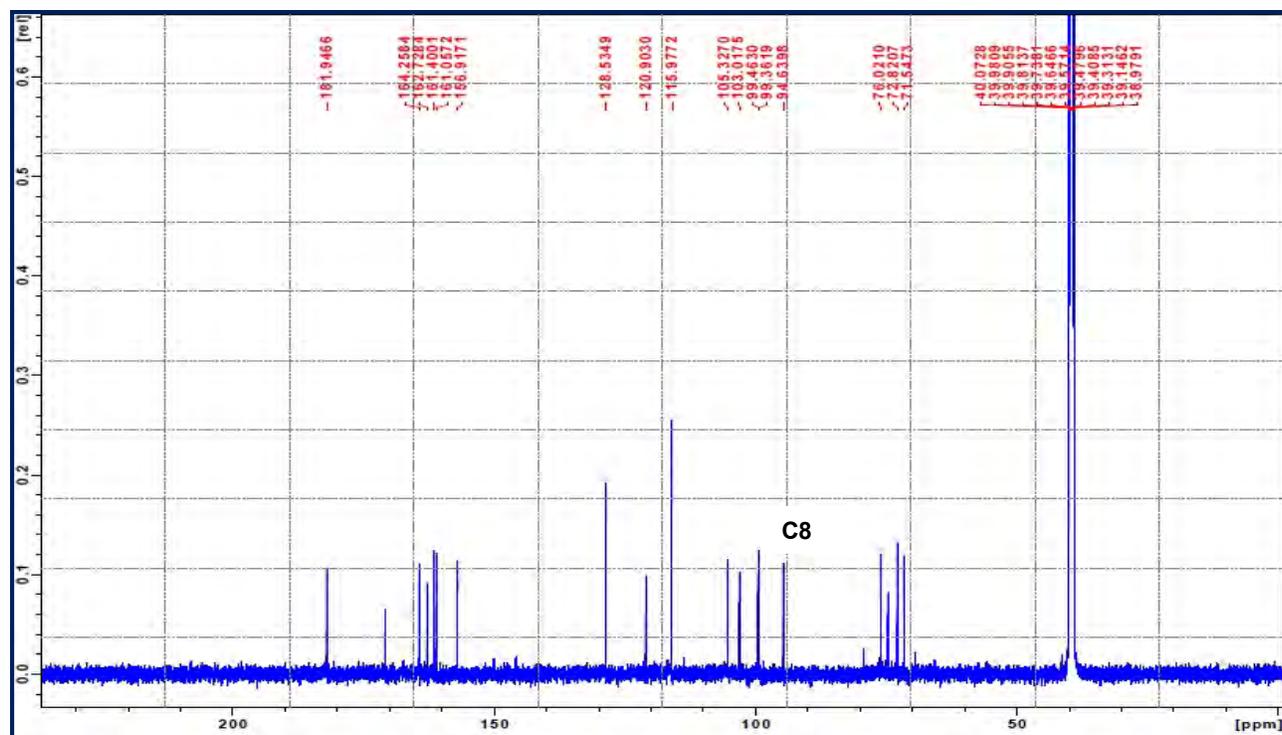
Tableau 23 : Résultats RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) du composé P₁.

Le spectre RMN ^{13}C (Spectre 30) montre un carbone quaternaire à $\delta = 171$ ppm. La valeur de son déplacement oriente vers un carbonyle d'acide. Cette donnée permet d'attribuer le carbone de ce carbonyle au C-6'' de l'entité sucre qui est par conséquent un groupement **glucuronyle**. Par ailleurs les déplacements chimiques de tous les autres carbones sont en tout point comparables avec les données de la littérature (Guvenalp *et al.*, 2009).

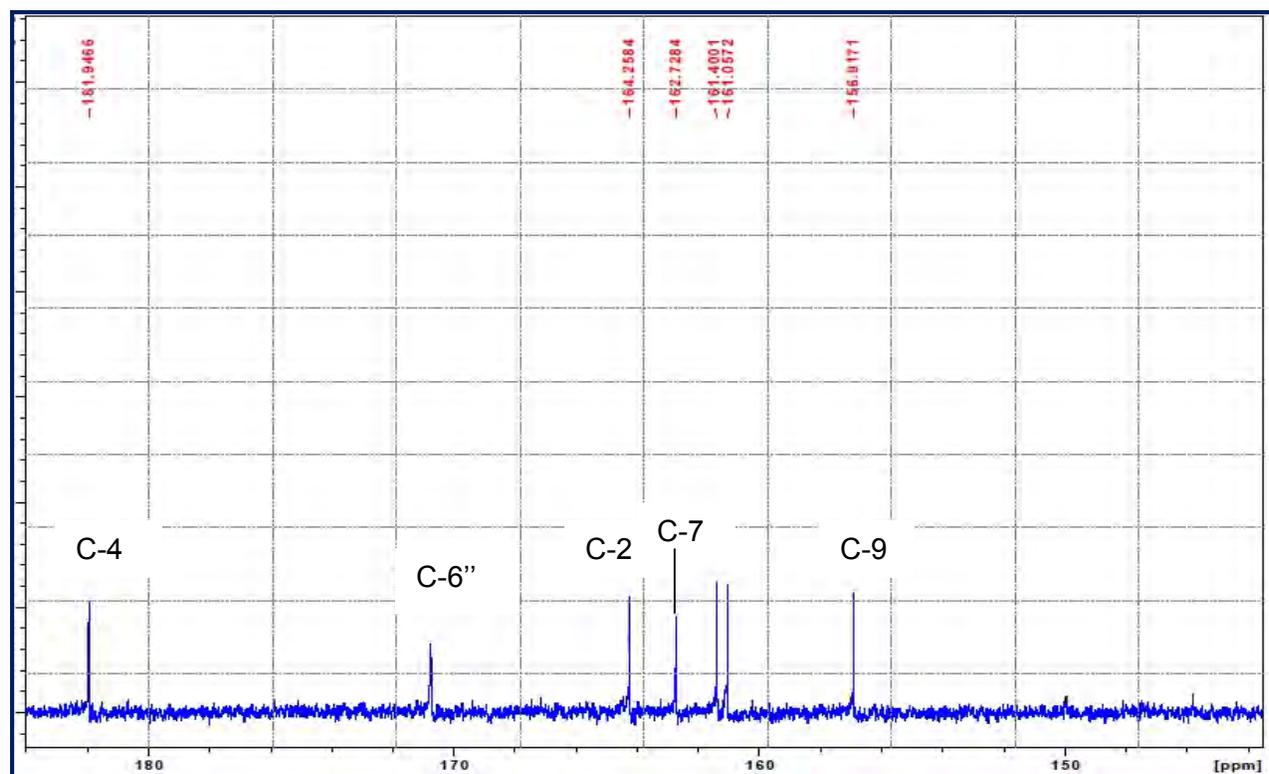
Les données de la RMN ^{13}C sont reportées dans le tableau suivant :

Aglycone	δ (ppm)	littérature
2	164,25	164,9
3	103,01	103,5
4	181,94	182,6
5	161,4	162,4
6	99,36	100,2
7	162,72	163,7
8	94,63	95,3
9	156,91	157,6
10	105,32	105,9
1'	120,9	121,3
2', 6'	128,53	129,4
3', 5'	115,97	116,7
4'	161,05	161,7
Acide glucuronique		
1''	99,46	100,3
2''	72,82	73,6
3''	76,02	77,2
4''	71,54	72,6
5''	74	74,4
6''	171	172,6

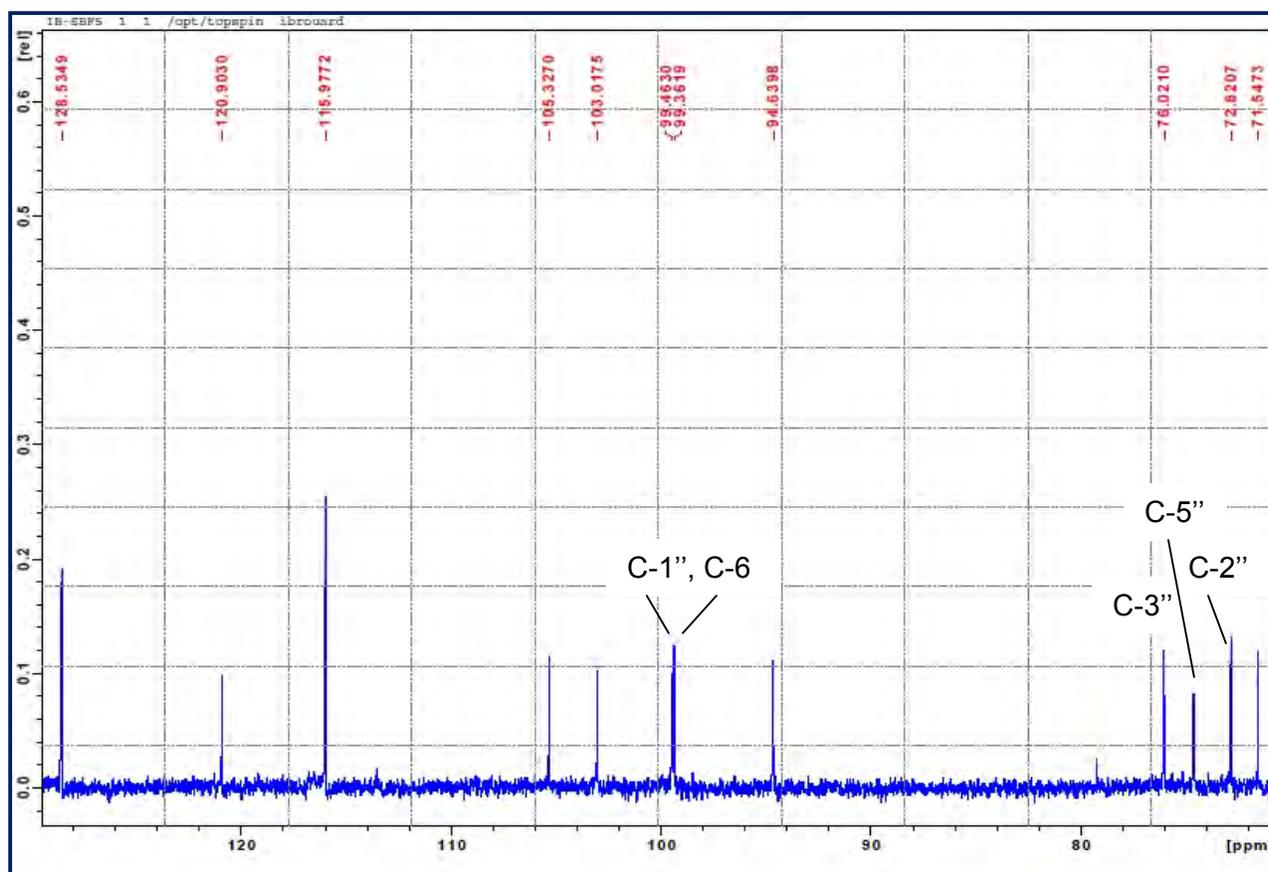
Tableau 24 : Données de la RMN ^{13}C (DMSO- d_6 400 MHz) du composé P₁.



Spectre 30 : Spectre RMN ^{13}C du composé P_1 .



Spectre 30-1 : Spectre RMN ^{13}C du composé P_1 (étalement).



Spectre 30 -2: Spectre RMN ^{13}C du composé P₁ (étalement).

Les résultats de la série spectrale UV-Visible et leur interprétation

Le maximum d'absorption de la bande I dans le méthanol à 335 nm confirme la structure d'une flavone.

L'addition de NaOH provoquant un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = + 50$ nm) avec stabilité de l'intensité lumineuse par rapport au spectre MeOH indique la présence d'un OH libre en 4', l'absence d'une nouvelle bande indique une substitution en position 7. Cette donnée permet de placer le sucre en position 7.

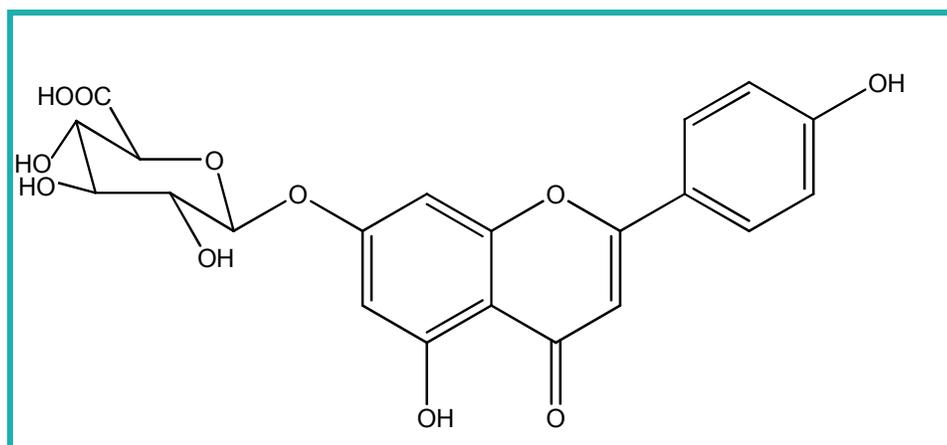
La comparaison du spectre enregistré en présence de $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ par rapport au spectre dans le MeOH montre un effet bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = +46$ nm) confirme la présence d'un OH libre en position 5.

Réactifs	Bande I (nm)	Autres bandes	Bande II (nm)	Commentaires
MeOH	335	/	266	flavone
+NaOH	385	/	270	OH libre en 4' Pas de OH libre en 7
+AlCl ₃	385	345 295	274	OH libre en 5 Pas d'ortho di-OH sur le cycle B
+AlCl ₃ / HCl	381	340 294	276	
+NaOAc	336	/	266	Pas de OH libre en 7
+NaOAc/H ₃ BO ₃	338	/	268	/
Spectre stable en présence de NaOH après 5 mn				

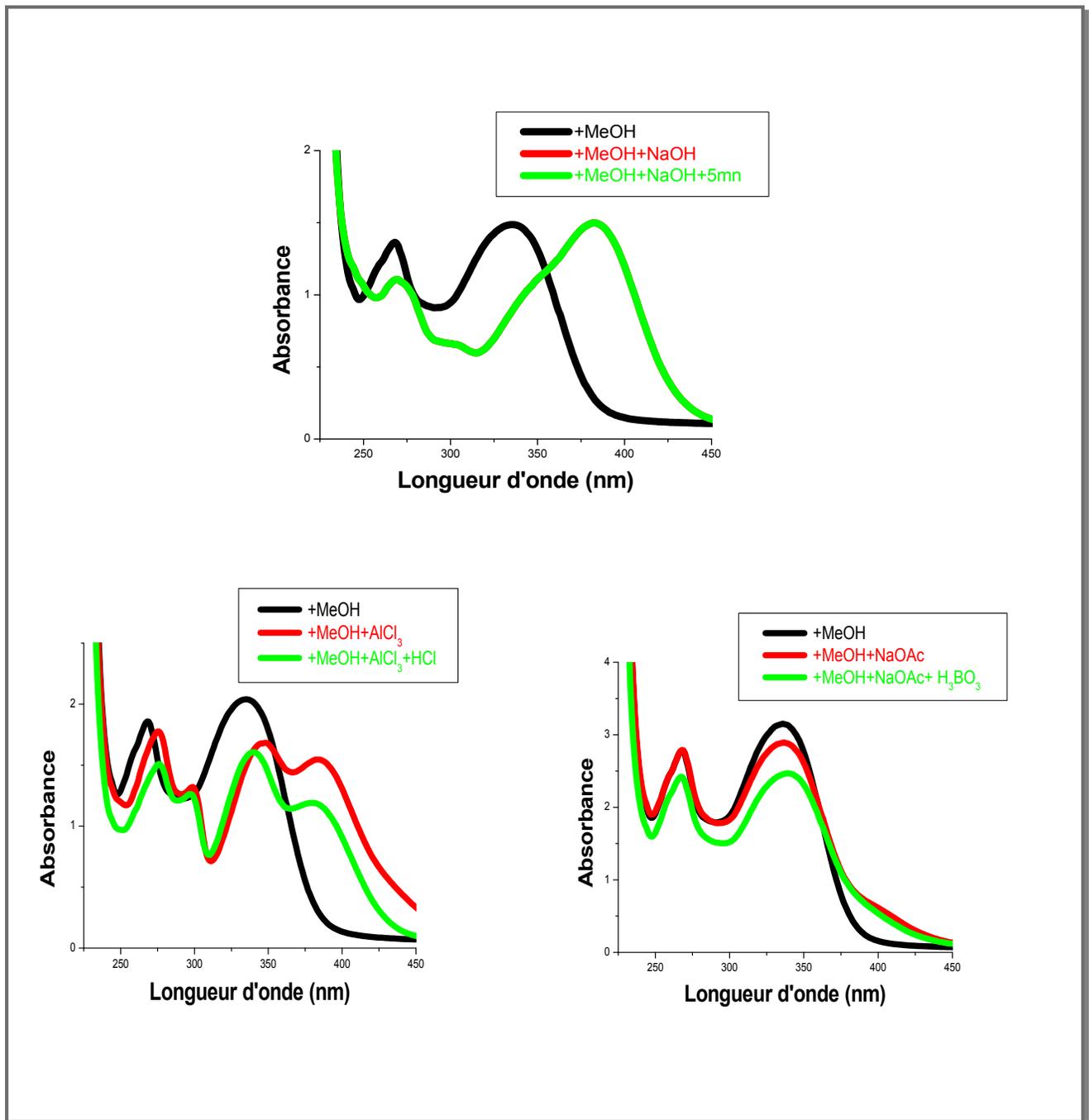
Tableau 25: Données de la série spectrale UV (λ_{\max} nm) du composé P₁.

L'ensemble de ces données reporté dans les tableaux 23, 24 et 25 mène à la structure finale :

5,7,4' -trihydroxy 7-O-glucuronylflavone (7-O-glucuronyl apigénine)



Structure plane du composé P₁

Spectre 31 : Série spectral UV du composé P₁.

IV-1-6-Identification du composé P₂

La fluorescence

La fluorescence noir-violette sous lumière de Wood de ce composé est caractéristique d'une flavone ou d'un flavonol 3-OR.

Les résultats de la série spectrale UV-Visible et leur interprétation

Réactifs	Bande I (nm)	Autres bandes	Bande II (nm)	Commentaires
MeOH	345	255	266	flavone
+NaOH	395	/	266	OH libre en 4' Pas d'OH libre en 7
+AlCl ₃	423	/	273	OH libre en 5 Ortho di-OH sur le B
+AlCl ₃ / HCl	383	350 295	269	
+NaOAc	400	353	264	Pas d'OH libre en 7
+NaOAc/H ₃ BO ₃	374	/	262	Ortho di-OH sur le B
Spectre stable en présence de NaOH après 5 mn				

Tableau 26: Données de la série spectrale UV (λ_{\max} nm) du composé P₂.

Le maximum d'absorption de la bande I dans le méthanol à 345 nm caractéristique d'une flavone.

L'addition de NaOH provoquant un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = + 50\text{nm}$) avec augmentation de l'intensité lumineuse par rapport au spectre MeOH indique la présence d'un OH libre en 4', l'absence d'une nouvelle bande indique la substitution en position 7.

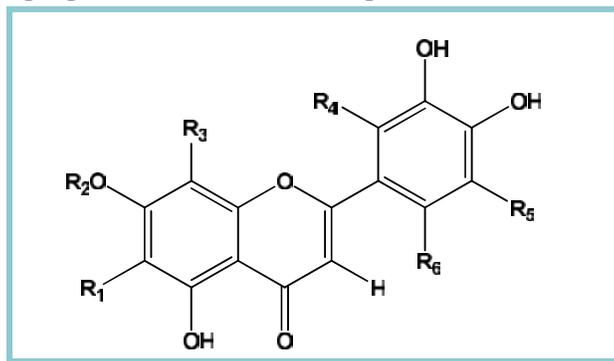
L'effet bathochrome de la bande I en comparant les spectres AlCl₃ + HCl / MeOH ($\Delta\lambda = + 38\text{nm}$), indique la présence d'un OH libre en 5.

L'effet bathochrome de la bande I (+ 29nm) après addition de H₃BO₃ en présence de NaOAc par rapport au spectre dans MeOH indique la présence d'un système ortho di-OH sur le cycle B. Ceci est confirmé par l'effet hypsochrome ($\Delta\lambda = - 40\text{nm}$) de la bande I en comparant les spectres AlCl₃/AlCl₃+HCl.

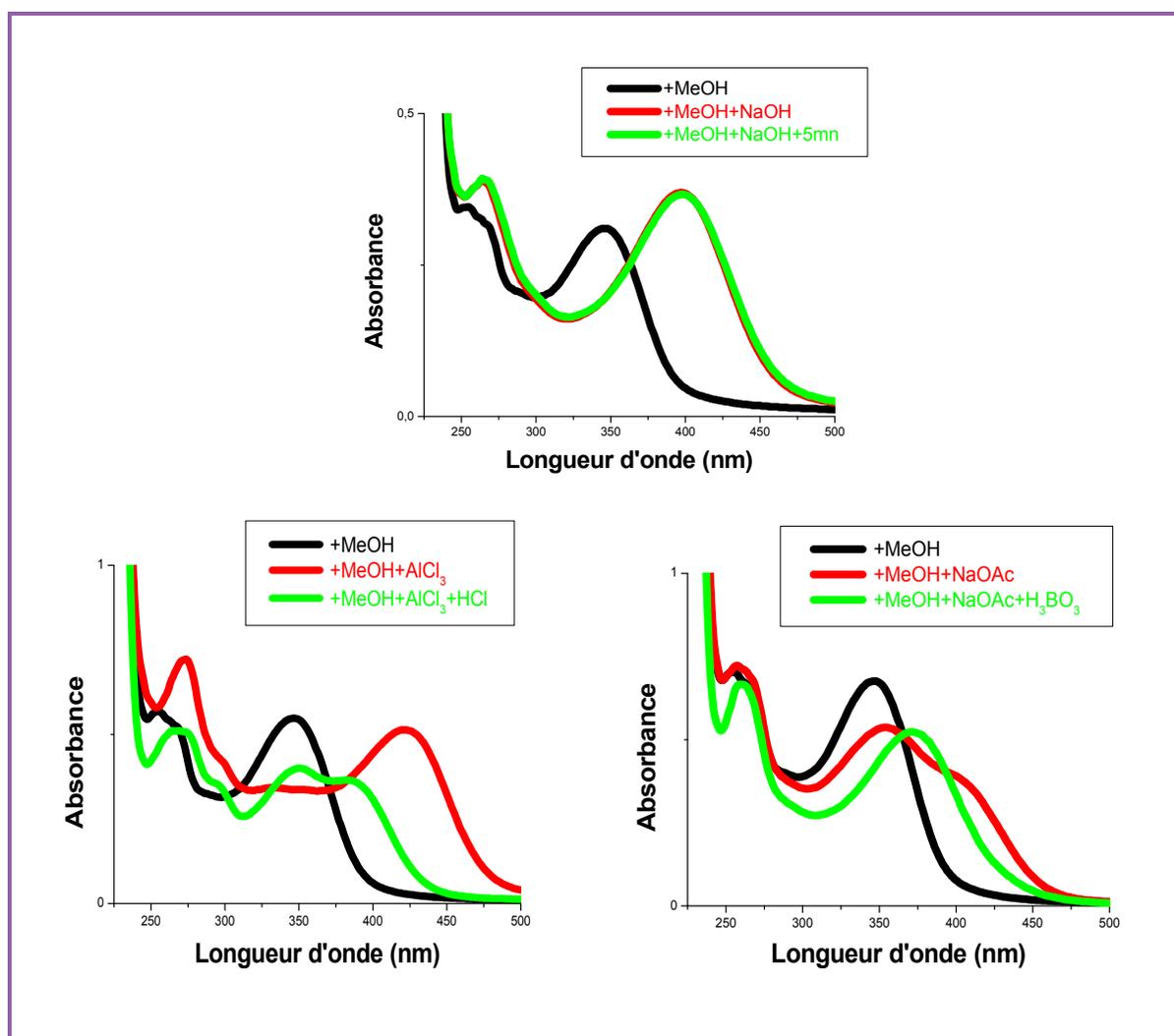
L'addition de NaOAc ne provoquant pas d'effet notable sur la bande II par rapport au spectre

MeOH confirme la substitution en 7 (7- OR).

Ces données permettent la proposition de la structure partielle suivante :



Avec R₁, R₃, R₄, R₅, R₆ différents de OH et R₂ différent de H.



Spectre 32: Série spectrale UV du composé P₂.

L'examen du spectre de RMN ^1H (Spectre 33) montre la présence de :

- un signal à $\delta = 7,43\text{-}7,47$ ppm, d'intégration 2H attribuable à H-2' et H-6'. Ce signal correspond en fait à deux signaux superposés l'un d'eux sous forme d'un doublet dédoublé caractérisant H-6' et l'autre sous forme d'un doublet caractérisant H-2'. Ce signal confirme la substitution des positions 3' et 4' du cycle B. Par ailleurs, le signal sous forme de doublet ($J = 9$ Hz) qui apparaît à $\delta = 6,90$ ppm, est attribuable à H-5'

- un signal à $\delta = 6,76$ ppm, d'intégration 1H sous forme d'un singulet attribuable au H-3, ce qui oriente vers la structure d'une flavone.

- un signal à $\delta = 6,82$ ppm, d'intégration 1H sous forme d'un doublet ($J = 2$ Hz), attribuable à H8.

- un signal à $\delta = 6,43$ ppm, d'intégration 1H sous forme d'un doublet ($J = 2$ Hz) attribuable à H-6.

- un doublet à $\delta = 5,04$ 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 (7,36 Hz) de ce proton avec son voisin en C-2'', cette entité pourrait être un glucosyle ou un galactosyle avec une configuration β du carbone anomérique.

- un ensemble de multiplets dans l'intervalle 3,12 – 3,56 ppm partiellement recouvert par le signal de l'eau de contamination du DMSO- d_6 , attribuable par conséquent aux protons du substituant sucre.

-L'étalement de la partie sucre montre :

-un doublet à $\delta = 3,56$ ppm attribuable a H-5'' la valeur de sa constante de couplage (9,9 Hz) indique une interaction de type axiale-axiale entre ce noyau et son voisin H-4'' la multiplicité de ce signal suppose l'absence de H-6''a et H-6''b et que le C-6'' est quaternaire (C=O).

-un triplet à $\delta = 3,29$ ppm ($J = 8,7$ Hz),

-un triplet à $\delta = 3,24$ ppm ($J = 7,5$ Hz),

-un triplet à $\delta = 3,14$ ppm ($J = 9,8$ Hz), il apparait clairement que ces signaux sont attribuables aux trois protons H- 2'', H- 3'', H- 4''.

Toutes les constantes de couplage sont comprises entre 7,5 et 9,9 Hz, ce qui indique que les protons couplant entre eux sont en position axial-axial sur le cycle. Cette observation oriente vers une entité sucre dérivée du glucose. Le sucre est alors de l'acide glucuronique.

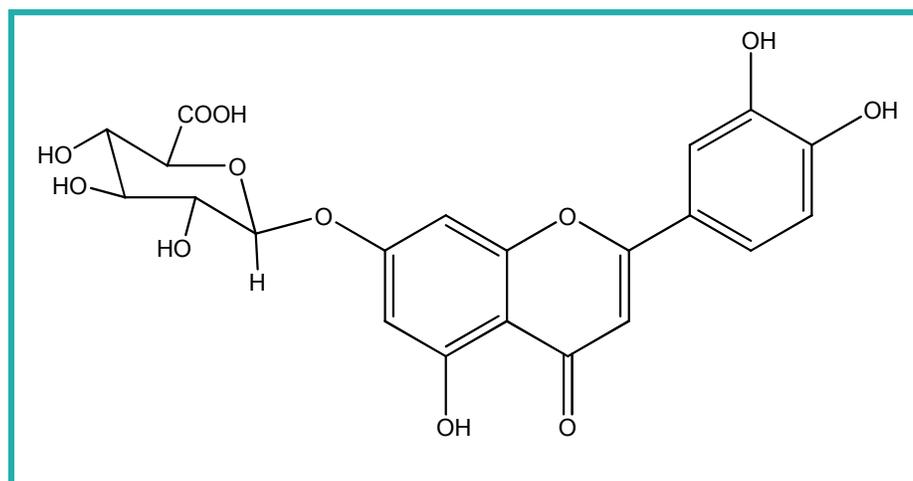
$\delta(\text{ppm})$	$J(\text{Hz})$	Multiplicité	Aglycone
7,47	/	dd	H-6'
7,43	/	d	H-2'
6,9	9	d	H-5'
6,82	2	d	H-8
6,76	/	s	H-3
6,43	2	d	H-6
			Acide glucuronique
5,04	7,36	d	H-1''
3,56	9,9	d	H-5''
3,29	8,7	t	H-2'', H-3'', H-4''
3,24	7,5	t	
3,14	9,8	t	

Tableau 27 : Résultats RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) du composé P₂.

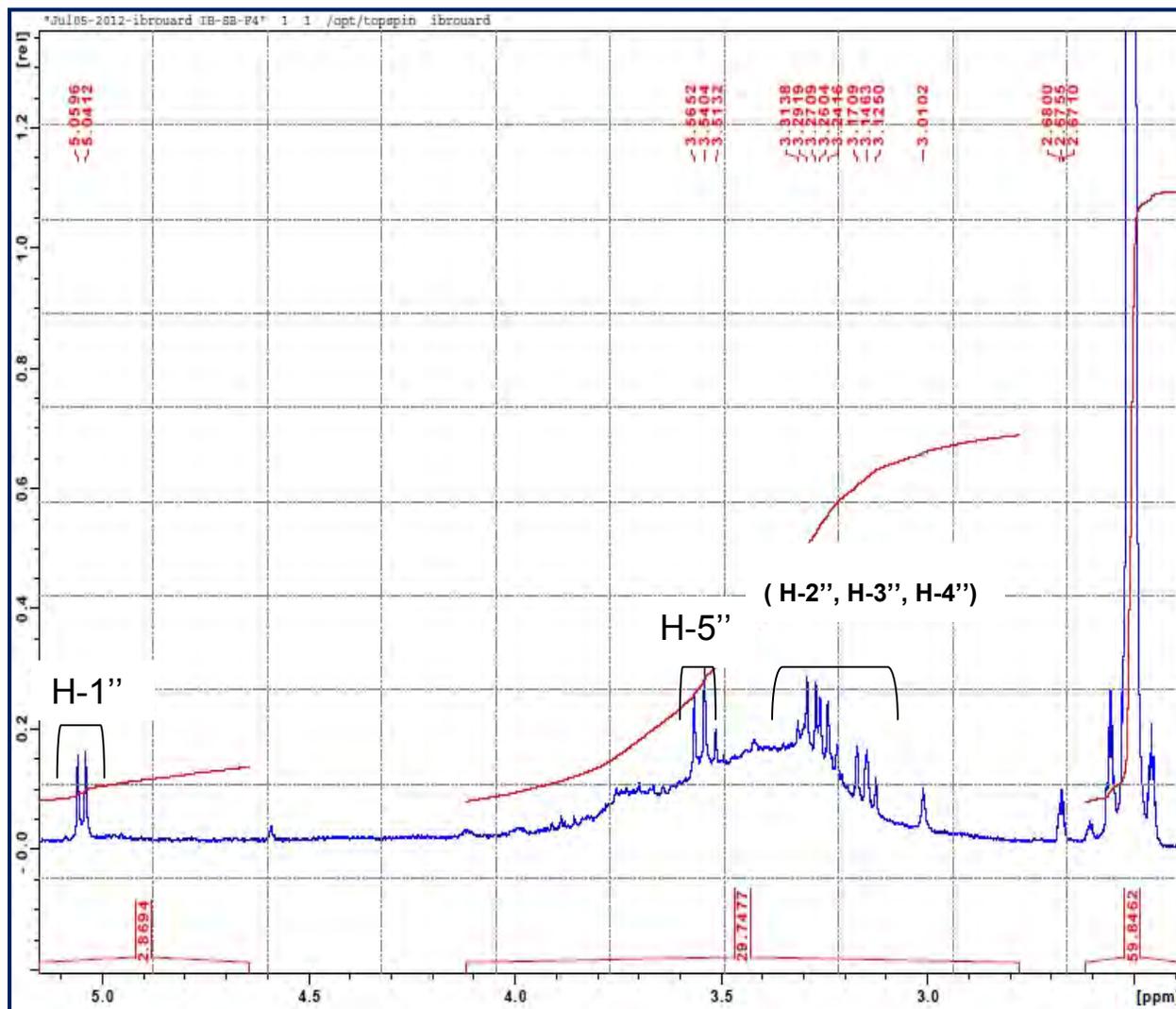
L'ajout de la NaOAc à l'hétéroside n'induit pas de déplacement bathochrome de la bande II, ce qui signifie que c'est le groupe hydroxyle en position 7 qui est glucosylé.

L'ensemble de ces données mène à la structure finale :

5,7,3',4' -tetrahydroxy 7-O-glucuronylflavone (7-O-glucuronyl lutéoline).



Structure plane du composé P₂.



Spectre 33-2 : Spectre RMN ^1H (DMSO-d_6 , 400MHz) du composé P_2 (étalement).

IV-2- Evaluation de L'activité anti-radicalaire de l'extrait *n*-BuOH

IV-2-1-Effet scavenger du radical DPPH

L'activité anti-radicalaire de l'extrait *n*-BuOH des parties aériennes de l'espèce *Thymus numidicus* a été évaluée par le test de DPPH° (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle). Le DPPH°, radicale stable, donne une solution violette et une absorbance caractéristique et maximale à 517 nm. Le principe de ce test repose sur la décoloration de la couleur violette lorsque le DPPH° est réduit par un composé anti-radicalaire (Magalhaes *et al.*, 2006). Pour l'évaluation comparative, deux références standards ont été utilisées, le Trolox et l'acide ascorbique.

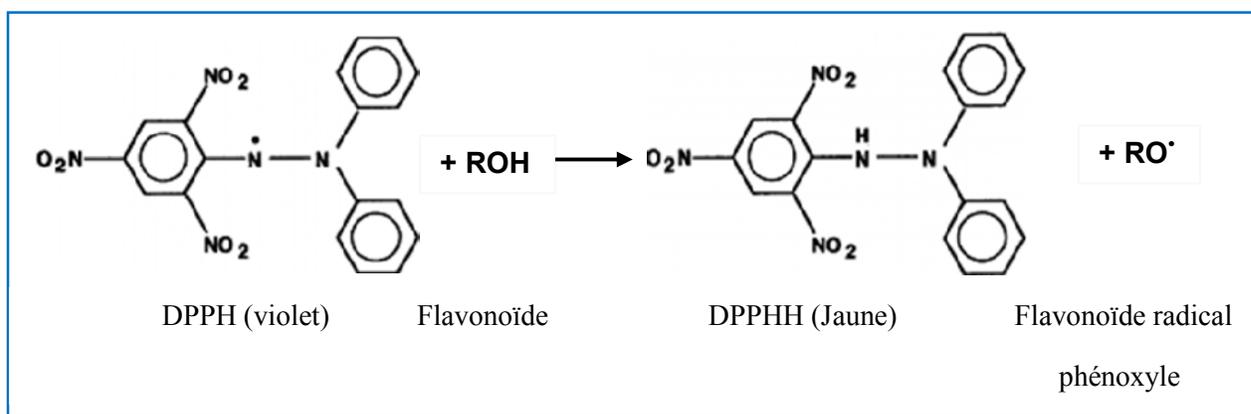


Figure 22: Piégeage de DPPH par les flavonoïdes.

La densité optique DO est mesurée par le spectrophotomètre à 517 nm, après 30 minutes d'incubation à une température ambiante et à l'obscurité, les résultats ont été présentés par la moyenne des trois essais et l'écart type.

La décroissance de l'absorbance est convertie en pourcentage d'activité Scavenger selon l'équation suivante :

$$\text{Activité Scavenger (\%)} = \left(\frac{A \text{ contrôle} - A \text{ échant}}{A \text{ contrôle}} \right) \times 100$$

A contrôle : Absorbance du contrôle

A échant : Absorbance de l'extrait.

Le paramètre IC₅₀ (concentration équivalente à 50% de DPPH perdu) est défini comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH (couleur).

IV-2-2-Résultats

Les résultats obtenus révèlent que l'extrait ***n*-BuOH** de *T. numidicus* possède une activité anti-radicalaire dose dépendante (**50 µg/ ml**). La IC₅₀ est de l'ordre de **35,08 µg/ ml**. Les IC₅₀ des contrôles positifs utilisés, le Trolox et l'acide ascorbique, atteignent **1,97±0,34 µg/ ml** et **6,87±0,15 µg/ ml** respectivement. Cette comparaison nous permettrait de déduire que l'activité antiradicalaire modérée de cette phase, serait dû à la présence de composés polyphénoliques présents dans cette phase. Ceci a été partiellement vu les molécules de type flavones isolées de cette phase. Il reste à poursuivre les travaux sur cette phase pour isoler les autres composés polyphénoliques présents dans cette phase et d'étudier les activités antiradicalaires des molécules isolées pour détecter plus particulièrement les molécules responsables de l'activité observée pour l'extrait.

Concentration µg/ml	DPPH P%	TROLOX	Acide ascorbique
5	5,67±4,95	32,20±1,44	60,84±0,82
10	14,49±6,49	83,94±0,17	67,84±0,62
20	33,89±4,18	84,56±0,17	84,87±0,96
50	76,91±2,36	84,40±0,07	97,08±1,30
100	79,23±0,28	84,17±0,01	
150	79,49±0,42	83,78±0,37	
200	78,96±0,59	83,71±0,09	

Tableau 28: L'effet scavenger l'extrait *n*- BuOH de *T.numidicus* , trolox et de l'acide ascorbique.

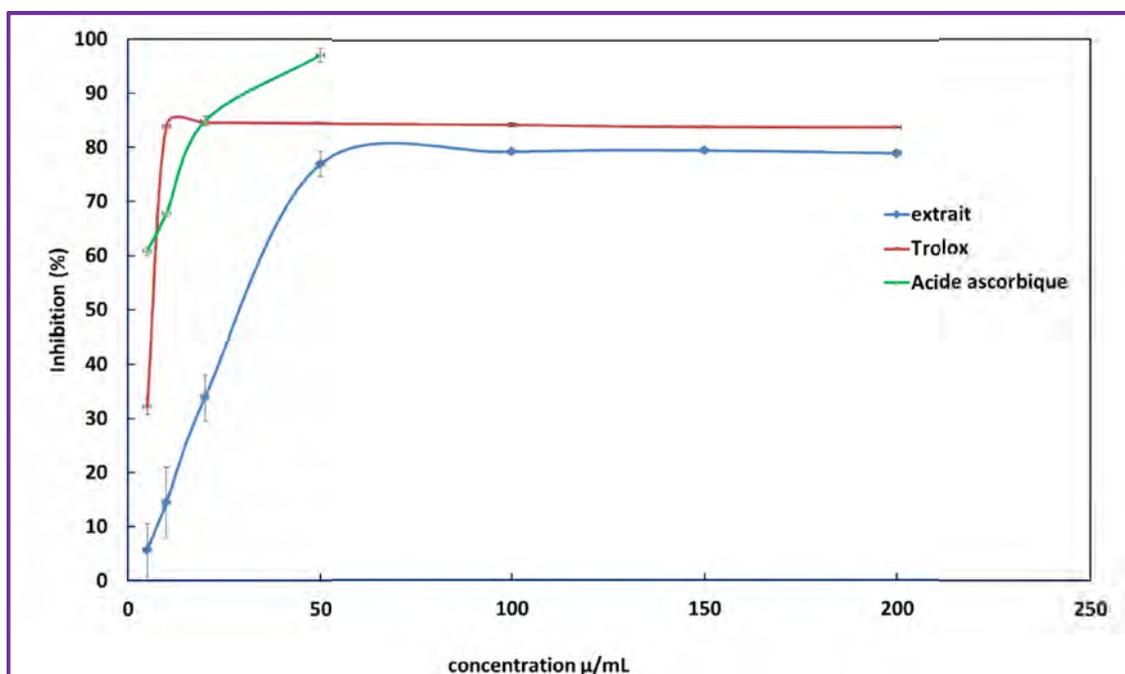


Figure 23 : L'activité anti-radicalaire de l'extrait *n*-BuOH de *T.numidicus*, du trolox et de l'acide ascorbique

IC ₅₀		Moyenne ± écart type (µg/ ml)
DPPH	33,34	35,08
	31,89	
	40,00	
TROLOX	2,21	1,97±0,34
	1,73	
Acide ascorbique	7,03	6,87±0,15
	6,74	
	6,83	

Tableau 29 : Les IC₅₀ d'extrait, Trolox et l'acide ascorbique

IV-3-Extraction des huiles essentielles de *Thymus numidicus*

IV-3-1-Méthode d'extraction

Nous avons utilisé la distillation à vapeur saturée, le végétal n'est pas en contact avec l'eau. Le montage expérimental est constitué d'un ballon chauffé qui permet de produire la vapeur d'eau qui va traverser la partie végétale (300g de la plante *Thymus numidicus* fraîche) préalablement introduite dans un vase situé dans la partie supérieure au dessus du ballon. Une plaque perforée sépare les deux parties et empêche la partie végétale d'être en contact direct avec le reflux provenant du ballon. (Figure 24). La vapeur est condensée sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par différence de densité.



Figure 24 : la distillation d'huile essentielle par entraînement à la vapeur d'eau.

Les conditions opératoires de l'extraction de l'huile essentielle de *Thymus numidicus* sont présentées dans le tableau 30:

Quantité de matière végétale	300 g
Volume d'eau	2 litres
Température	100°C
Temps de la distillation à vapeur	4 h

Tableau 30 : Conditions opératoires d'extraction d'huile essentielle de *Thymus numidicus*.

IV-3-2-Propriétés Organoleptiques :

Aspect : liquide mobile lipide.

Couleur : rouge orange

Odeur : agréable parfumé de thymol

Rendement : 1,2 %.

Le rendement en huiles essentielles a été calculé en fonction de la matière végétale sèche de la partie aérienne de la plante 300 g.

IV-3-3-Analyse des huiles essentielles de Thymus numidicus par le couplage GC et GC-MS en Impacte Electronique:

L'huile essentielle obtenue avec un rendement de 1,2% a été analysée par chromatographie en phase gazeuse sur un appareil de type DELSI et par couplage GC-MS. Conditions d'analyses :

Appareil : GC

Détecteur : MS

Gaz vecteur : He.

Température de l'injecteur et du détecteur : 220 °C

Colonnes : CPWax.

Longueur : 30m.

Température de la colonne : 230°C

Volume injecté : 1µl.

Résultats et discussions:

Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau suivant dans lequel sont reportés les temps de rétention, les indices de Kovats et le pourcentage pour chaque composé dans l'huile.

N°	TR	%	IK	Composés
1	10,051	0,754	931	α -thujène
2	10,31	2,062	939	α -pinene
3	10,901	0,079	953	camphene
4	11,894	0,176	980	β -pinene
5	12,049	0,804	978	octen-3-ol
6	12,225	0,102	984	octanone-3
7	12,333	0,572	991	Myrcène
8	12,652	0,117	993	Octanol-3

9	12,907	0,066	1005	α - phellandréne
10	12,978	0,067	1011	Delta-3-Carène
11	13,278	0,682	1018	alpha terpinène
12	13,587	15,389	1026	para-Cymène
13	13,705	0,604	1031	limonène
14	13,755	0,193	1031	β -phellandréne
15	14,675	0,309	1062	Gamma Terpinène
16	15,11	0,502	1068	cis hydrate de sabinène
17	15,458	0,092	1088	Terpinolène
18	15,728	0,057	1089	Para Cyménène
19	16,08	5,468		Linalol
20	18,316	0,123	1165	Bornéol
21	18,564	0,349	1182	Terpinène-4-ol
22	18,776	0,101	1197	paracymène-8-ol
23	19,032	0,131	1278	alpha terpineol
24	19,121	0,062	1208	Dihydrocarvone trans
25	19,939	1,753	1235	Thymol-methyl éther
26	20,595	3,716	1249	Thymoquinone
27	21,802	54,18	1290	Thymol
28	21,872	0,089		NI
29	21,953	3,821	1298	carvacrol
30	23,964	0,124	1379	Alpha Copaène
31	24,183	0,195	1384	Beta Bourbonnène
32	25,108	1,844	1418	β -Caryophyllène
33	25,348	0,077	1430	β -Copaène
34	25,541	0,268		NI
35	25,994	0,049	1454	α - Humulène
36	26,442	0,323	1477	γ -Muuroène
37	26,614	0,112	1480	Germacrène D
38	26,873	0,094	1486	β -sélinène
39	27,008	0,15	1494	Valencène
40	27,215	0,701	1509	β -Bisabolène
41	27,371	0,234	1510	γ -cadinène
42	27,475	0,336	1520	Δ -Cadinène
43	27,562	0,176	1521	Calaménène Cis
44	27,973	0,069	1530	E- α -bisabolène
45	28,237	0,263	1553	Thymohydroquinone
46	29,025	0,507	1581	Oxyde de Caryophyllène
47	29,764	0,051		6-méthoxyacétone
48	30,643	0,11		selin-11-en-4-alpha ol
49	31,007	0,126	1674	Cadalène
50	31,312	0,185		Isoeugénol
51	33,261	0,166		NI

Tableau 31 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Thymus numidicus*

TR : Temps de rétention.

NI : Composés non identifiés.

Les composés ont été identifiés par comparaison avec les spectres de masse de la base de données NIST avec des pourcentages de concordance supérieure à 90%.

L'huile essentielle est un complexe mixte de 51 composés constituant 98,5% de la quantité totale de l'HE, 48 composés ont été identifiés (Tableau 31). La fraction de monoterpènes oxygénés comme le thymol **3** (54,18%), le linalool **5** (5,46%), le carvacrol **2** (3,82%), le thymoquinone **6** (3,71%), thymol- methyl éther (1,75%) constituent la majorité de la composition de l'huile essentielle, puis viennent les monoterpènes non oxygénés comme le p-cymene **7** (15,38%), l' α -pinène **1** (2,06%), suivi par les sesquiterpènes hydrogénés qui sont présents avec un rendement de 4,61% dont le plus important un sesquiterpène bicycliques le β -caryophyllène **9** (1,84%).

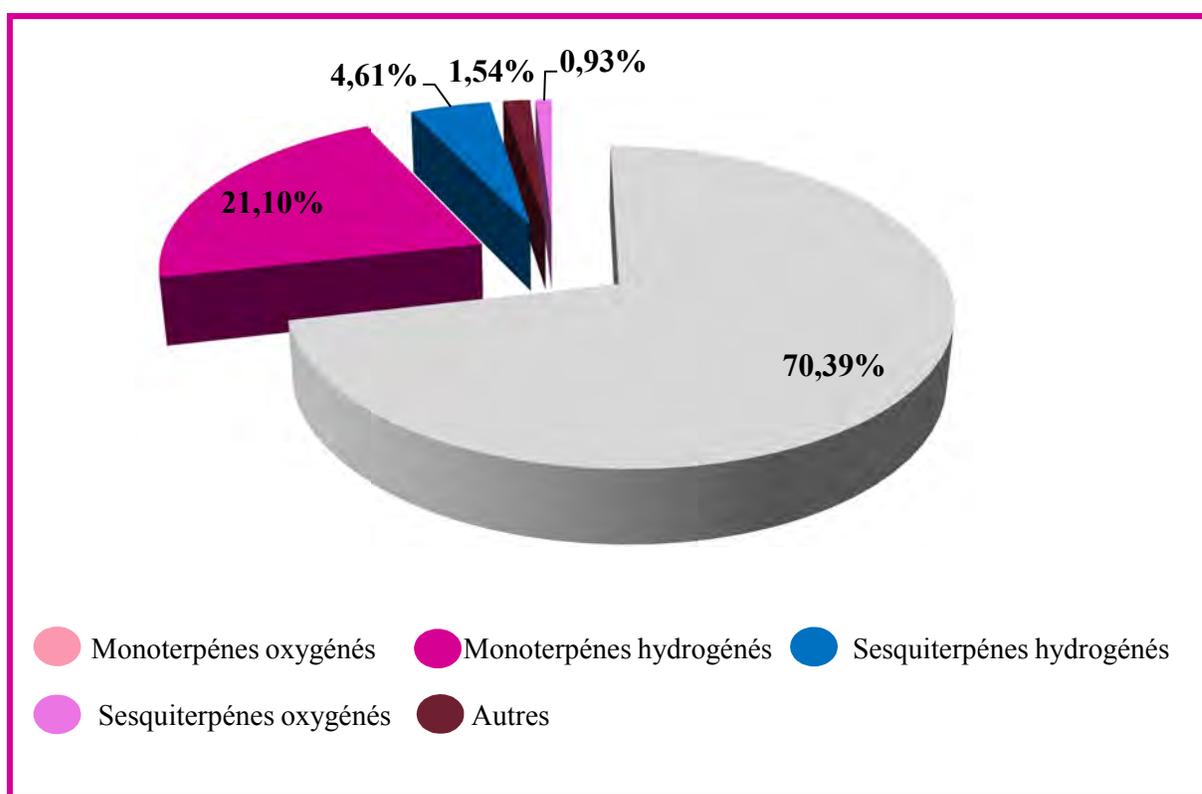


Figure 25 : Rendement des produits obtenus par CPG-MS.

Nous avons comparé les compositions chimiques de différents échantillons d'huiles essentielles de *Thymus numidicus* de Constantine (Djebel El- Ouahch), Annaba (Berrahal) et de Tizi-Ouzou (Yakouren).

Le tableau 32 regroupe les principaux composés des huiles essentielles des trois régions, tandis que la figure 27 permet la comparaison des composés majoritaires de ces échantillons.

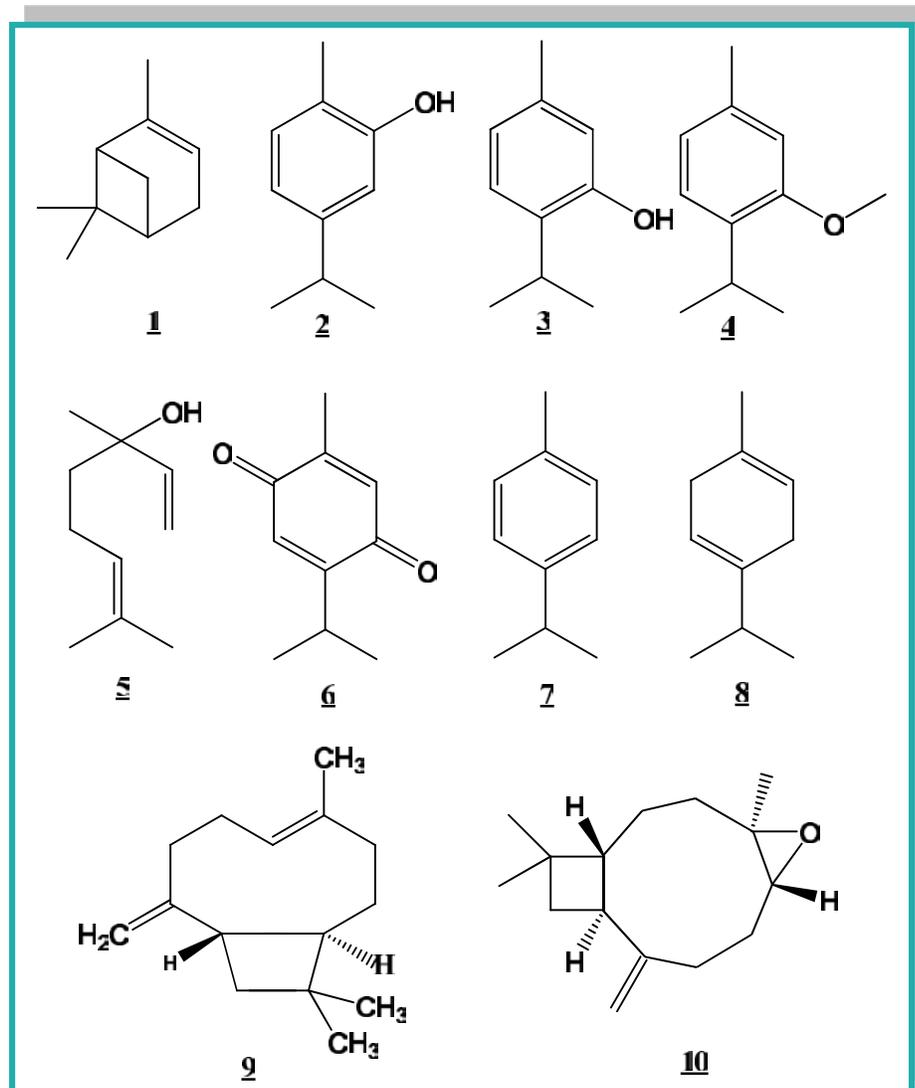


Figure 26: les produits majoritaires dans les huiles essentielles de l'espèce *Thymus numidicus*.

Les travaux reportés antérieurement pour cette huile montrent que le thymol **3** reste toujours le constituant principal (51-68%), suivi par le carvacrol **2** (5,07-16,9%) et p-cymène **7** (10,3%). Dans notre cas la teneur de p-cymène est nettement plus forte (15,38%), tandis que le carvacrol est présent avec une teneur faible (3,82%), on constate pour l'échantillon (3) la teneur la plus élevée en monoterpènes oxygénés (85%) et l'absence de monoterpènes hydrogénés, en effet quand la teneur de l'un de ces éléments (monoterpènes phénoliques et ces précurseurs) augmente dans l'HE de thym, la teneur de l'autre diminue automatiquement (Hudaib *et al.*,2002).

L'étude comparative montre une teneur faible pour les sesquiterpènes (0,9-2,84%), avec une différence dans la composition d'une espèce à l'autre.

Pour l'échantillon (2) on note une différence concernant certains composés, en effet les monoterpènes hydrogénés : β -pinène, α -terpinène, γ -terpinène ne sont pas décrits pour les autres espèces, on constate dans notre cas la présence de thymoquinone (3,71%) contre seulement (0,4%) pour l'espèce de Tizi-Ouzou et absents pour les autres.

Cette différence peut être attribuée au période de la cueillette et les conditions climatiques a titre d'exemple, la matière végétale lors de cette étude a été cueillie au mois de juin 2010, alors que celle étudié à Tizi-Ouzou cueillie en avril 2004.

Composés	Teneurs relative (%)			
	l'espèce étudié Constantine	Annaba	Constantine	Tizi-Ouzou
	(1)	(2)	(3)	(4)
		Hadef <i>et al.</i> , 2004	Kabouche <i>et al.</i> , 2005	Saidj <i>et al.</i> , 2008
α -pinène <u>1</u>	2,06	1,12	-	-
β -pinène	-	1,04	-	-
α -terpinène	-	1,32	-	-
γ -terpinène <u>8</u>	-	7,6	-	-
Trans hydrat de sabinène	-	1	-	-
P-cymen <u>7</u>	15,38	10,3	-	0.5
Linalol <u>5</u>	5,46	8	-	3.3
Thymol <u>3</u>	54,18	60,8	68,2	51
Thymol methyl éther <u>4</u>	1,75	-	-	3.2
Carvacrol <u>2</u>	3,82	5,07	16,9	9.4
Thymoquinone <u>6</u>	3,71	-	-	0.4
Béta Caryophyllène <u>9</u>	1,84	-	-	0.9
Isocaryophyllène	-	-	-	2.7
β -cadinène	-	2,84	-	-
oxyde de caryophyllène <u>10</u>	-	-	-	1.8

Tableau 32: Les principaux composés de l'HE de *T.numidicus* provenant de différentes régions.

Une étude menée par Hadef *et al.*, 2007 a conduit à une relation entre la variation de la composition chimique des huiles essentielles obtenues pendant le cycle biologique et les conditions abiotiques de chaque site. Les huiles essentielles de la période de fin mars et de fin

avril présentent une teneur faible en monoterpènes et élevée en monoterpènes oxygénés et en phénols. Les échantillons du début juin contiennent davantage de phénols. Les périodes de juillet sont caractéristiques de la fin du cycle biologique, avec une teneur élevée en p-cymène et faible en phénols et en linalool.

IV-3-4-Conclusion

Ces résultats rejoignent partiellement les travaux reportés antérieurement pour cette huile et qui montrent que les composés majoritaires sont les monoterpènes avec une teneur élevée en p-cymène (15,38 %), et relativement plus faible en linalool (5,46%) et carvacrol (3,82%). On note dans notre cas la présence de monoterpènes hydrogénés, sesquiterpènes n'ont pas été décrits dans l'étude antérieure de l'HE de cette région (Constantine), notre huile se rapproche plus de l'espèce de Annaba dont le p-cymène est présent avec un rendement (10,3%).

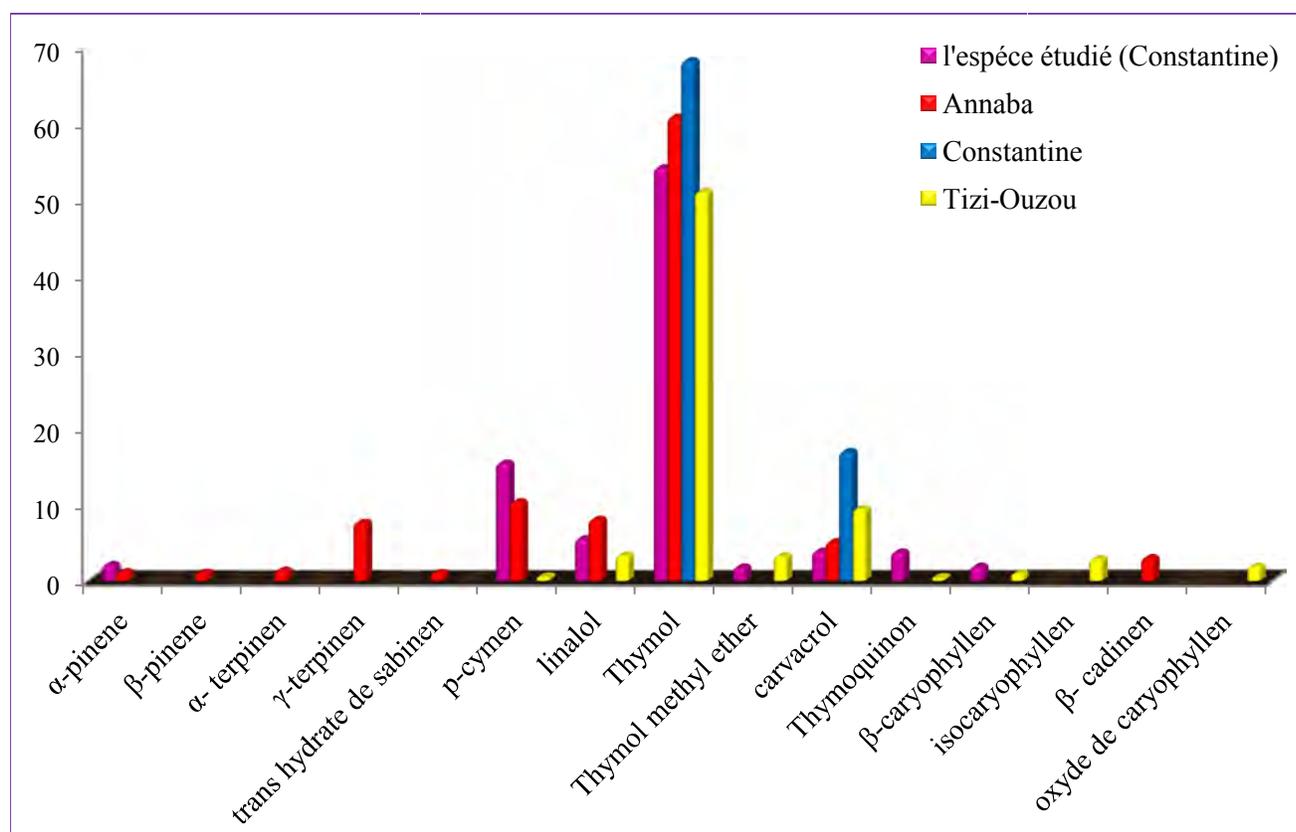


Figure 27: Comparaison des composés majoritaires des huiles essentielles de *Thymus numidicus*.

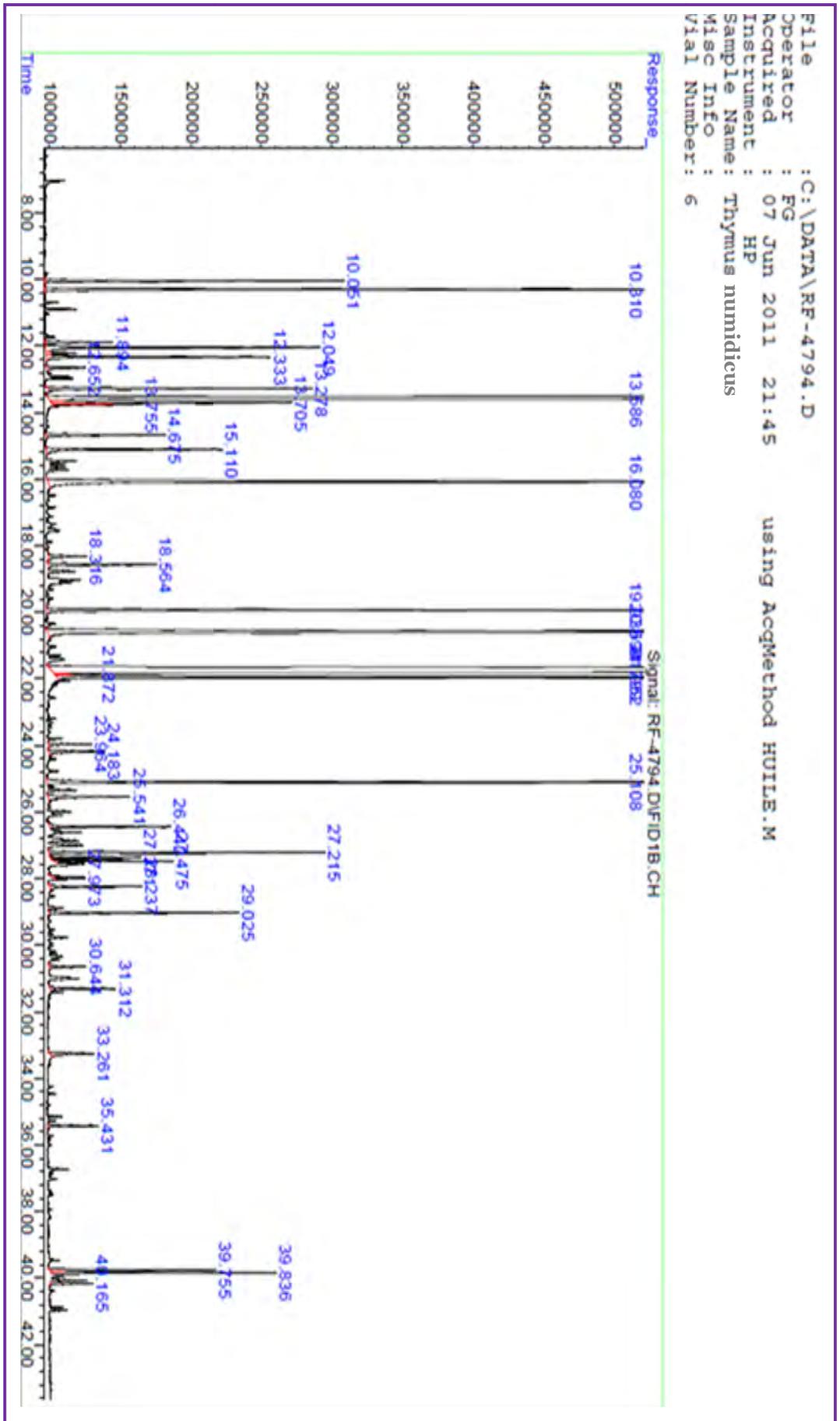
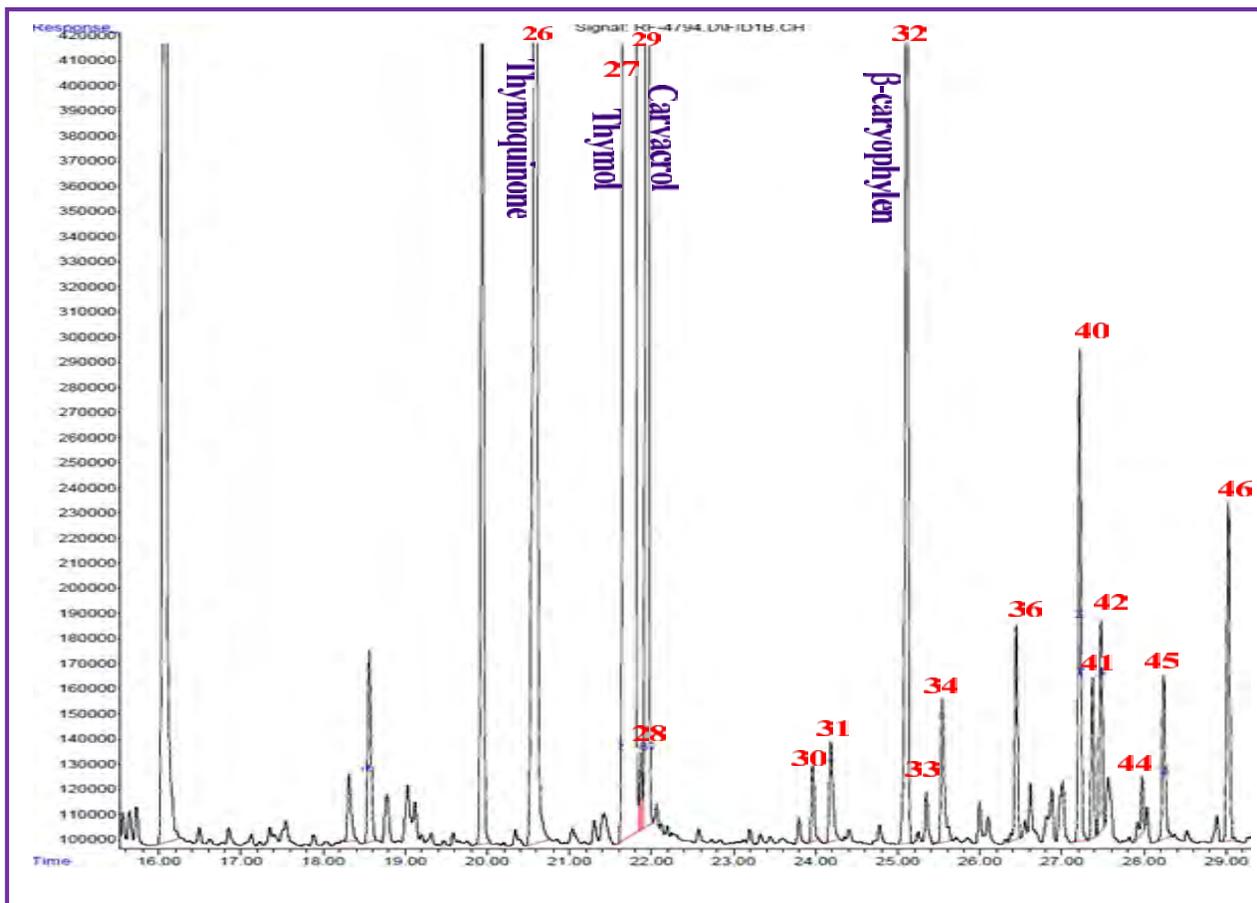
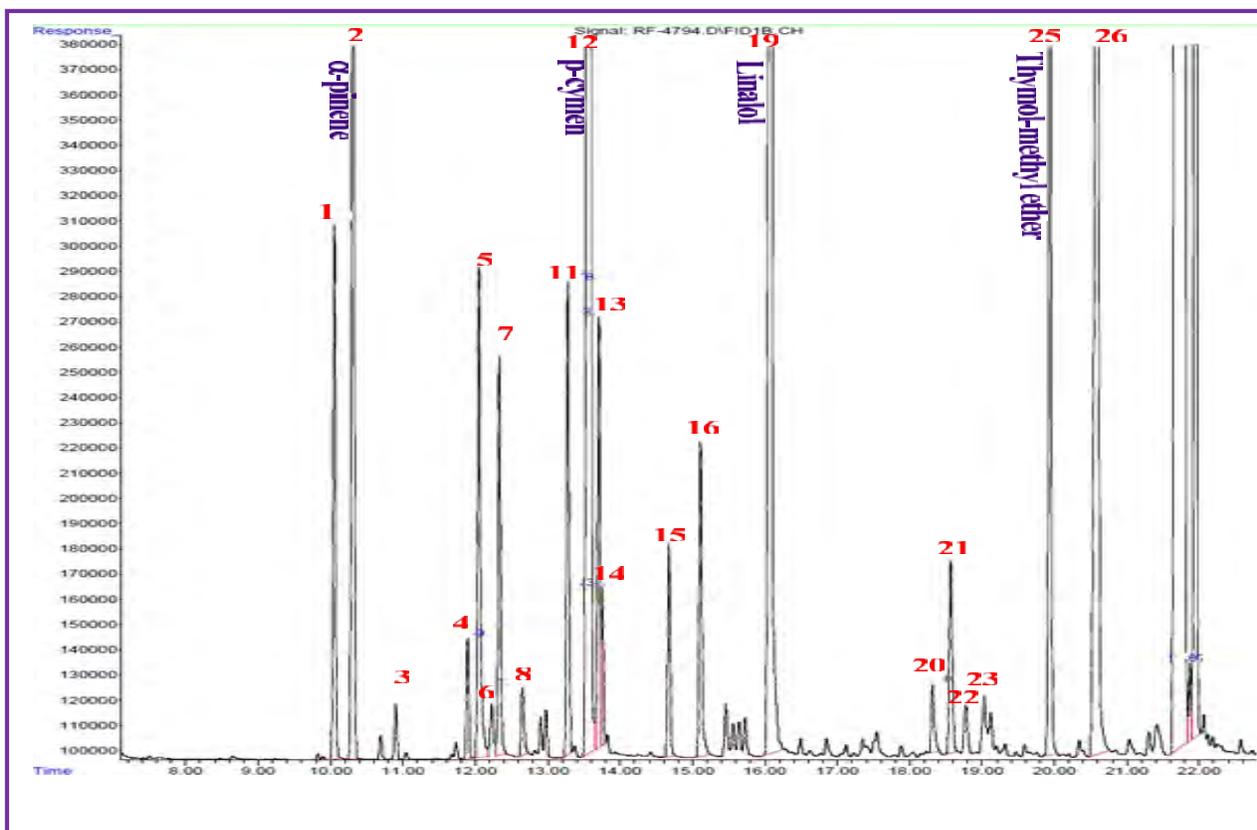


Figure 28 : Chromatogramme GC de l'huile essentielle de *Thymus numidicus*



Conclusion générale

Conclusion générale

Le but principal de notre travail est l'étude phytochimique et biologique d'une espèce de thym endémique *Thymus numidicus* Poiret (Lamiacée). Le critère du choix de cette espèce est dû au fait que le thym utilisé depuis l'antiquité en médecine traditionnelle dont les vertus thérapeutiques sont reconnues.

Nos travaux de séparation et de purification par des méthodes chromatographiques ont permis, l'obtention de huit produits, un révélé identique, six produits ont été identifiés, leurs structures ont été établies par la combinaison des résultats des analyses physico-chimiques notamment ceux de la RMN mono et bidimensionnelle et de la spectrométrie de masse à haute résolution en mode ESI. Il s'agit de :

- **5, 4'-dihydroxy-6, 7, 3'-trimethoxyflavone (Cirsilinéol).**
- **5, 4'-dihydroxy-6, 7-dimethoxyflavone (Cirsimaritine).**
- **5, 7,4'- trihydroxyflavone (Apigénine).**
- **5, 7,3',4'- tétrahydroxyflavone (Lutéoline).**
- **5,7,4'-trihydroxy 7-O-glucuronylflavone (7-O-glucuronyl apigénine)**
- **5,7,3',4'-tetrahydroxy 7-O-glucuronylflavone (7-O-glucuronyl lutéoline)**

Les produits Cirsilinéol, Cirsimaritine, 7-O-glucuronyl apigénine, 7-O-glucuronyl lutéoline sont décrits pour la première fois pour cette espèce.

L'extrait *n*-BuOH obtenus à partir des parties aériennes de *T.numidicus* Poiret a été sélectionné pour évaluer l'activité anti-oxydante en utilisant la méthode de DPPH.

Les résultats ont confirmé les propriétés puissantes que possèdent les flavonoïdes à piéger les radicaux libre dont l'ordre de IC₅₀ est de **35,08 µg/ ml**.

L'analyse par GC et GC-MS des huiles essentielles de cette espèce obtenues par entraînement à la vapeur d'eau à permis l'identification de 48 composés appartenant majoritairement à la classe des monoterpènes, dont le plus important thymol (54,18%) suivi par le p-cymen avec une forte teneur (15,38%) et faible teneur pour linalol (5,46%) et carvacrol (3,82%).

Enfin l'étude de l'extrait *n*-butanol et les tests biologiques se poursuivent à l'heure actuelle.

Références bibliographiques

- Abert Vian M, Fernandez X, Visinoni F, Chemat, F. (2008).** *Journal of Chromatography A*, **1190**: 14–17.
- Adams RP. (2001).** Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography / Quadrupole Mass Spectroscopy. Allured: Carol Stream, IL.
- Agranoff B. W., Eggerer H., Hennig U., Lynen F., (1959).** *J. Am. Chem. Soc.* **81**; 1254-1255.
- Agranoff B. W., Eggerer H., Hennig U., Lynen, F., (1960).** *J. Biol. Chem.*, **235**: 326-332.
- Ahmed-Belkacem A., Pozza A., Munoz-Martinez F., Bates S.E., Castanys S., Gamarro F., Petro A.D. and Perez-Victoria J.M. (2005).** *Cancer Research*; **65**: 4852-4860
- Al-Bayati F. A. (2008).** *Journal of ethnopharmacology*. **166** (3): 403-406.
- Allen, K. G., Banthorpe D. V., Charlwood. B. V (1977).***Phytochemistry* **16**: 79-83
- Elqaj M., Ahami A. , Belghyti D. 2007.** La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires. Maroc.
- Alvarez A., Real R., Perez M., Mendoza G., Prieto J.G. and Merino G. (2010).** *Journal of Pharmaceutical Sciences*; **99**: 598-617.
- Andres A., Donovan S.M., Kuhlenschmidt M.S. (2009).** *Journal of Nutritional Biochemistry*; **20**: 563-569.
- Anthony, J.P., Fyfe, L. Smith, H., (2005).** *Trends in Parasitology* , **21**: 462-468
- Audier, H. (1966).** Etude des composés flavoniques par spectrométrie de masse.
- Bakkali, F., S. Averbeck, D. Averbeck and M. Idaomar. (2008).** *Food and Chemical Toxicology.*, **46**: 446-475
- Barberán F.A.T., Hernández L., Tomás F. (1986).** *Phytochemistry* **25**: 561–562
- Barel S, Segal R, Yashphe J (1991).** *J. Ethnopharmacol.* **33**: 187-191
- Batista R., Junior A.D.J.S. and Oliveira A.B.D. (2009).***Molecules* **14**: 3038-3072.
- Bax A., Summers MF (1986).** *J Am Chem Soc*, **108**: 2093-4.
- Bazytko A. et Strzelecka H. (2007).** *Fitoterapia.*, **78** : 391-395.
- Benkinouar R., Touil A., Zaidi, F, Rhouati S., Chosson E. ,Seguin E, Comte, G.. Bellvert F. (2010).** *J.Soc.Alger.Chim.*, **20**(1), 11-15
- Boersma B.J., Barnes S., Kirk M., Wang C.C., Smith M., Kim H., Xu J., Patel R. and Darley-Usmar V.M. (2001).** *Mutation Research*; **480**: 121-127.

- Botta B., Menendez P., Zappia G., Lima R.A.D., Torge R. and Monache G.D. (2009).** *Current Medicinal Chemistry*; **16**: 3414-3468
- Boyle W. (1955).** *Am. Perfurmer Essent. Oil Rev.* **66**: 25-28
- Braga, P.C; Dal Sasso M.; Culici M.; GaSastri L; Marceca MX; Guffanti E.E.(2006).** *Pharmacology.* **76** :61-68.
- Burt S. (2004)** .review. *Int. J. Food Microbiol.* **94**: 223-253
- Candan F, Unlu M, Tepe B, Daferera D, Polissiou M, Sokmen A, Akpulat HA (2003).** *J. Ethnopharmacol.* **87**: 215-220
- Choudhury RP., Kumar A., Garg AN. (2006).** *J Pharm Biomed Anal.* **7**:825-32
- Chatenet C. (2008).** *Actualités pharmaceutiques* **473**: 10-23.
- Clifford K., Cornforth J. W., Mallaby R., Philipps G.T. (1971).** *J. Chem. Soc., Chem Commun.* 1599-1600.
- Colabufo N.A., Berardi F., Cantore M., Contino M., Inglese C., Niso M. and Perrone R. (2010)** *Journal of Medicinal Chemistry*; **53**: 1883–1897.
- Combier, H. (1968).** Thèse de doctorat, université de Lyon
- Connolly J. D., Hill R. A., (1992)** *Dictionary of terpenoids.* New York: Chapman and Hall.
- Cornwell T., Cohick W. and Raskin I. (2004).***Phytochemistry* ; **65**: 995-1016
- Corticchiato M, Bernardini A, Costa J, Bayet C, Saunois A, Voirin B.(1995).** *Phytochemistry*, **40**: 115–120
- Cowan M. M. (1999).** *Clinical microbiology reviews.*, **12** : 564-570.
- Croteau, R., and F. Karp. (1977).** *Archives of Biochemistry and Biophysics* **184**: 77-86.
- Cushnie T.P.T. and Lamb A.J. (2005).** *International Journal of Antimicrobial Agents*; **26**: 343-356.
- De Sousa AC, Alviano DS, Blank AF, Alves PB, Alviano CS, Gattass CR (2004).** *J. Pharm. Pharmacol.* **56**: 677-681
- Diallo, D., (2000)** . Thèse de doctorat, P 221, Lausanne (Suisse).
- Dibong, S.D., Mpondo Mpondo, E., Ngoye A., Kwin M ,F.,Betti J.L. (2011).** *Journal of Applied Biosciences* **37**: 2496 - 2507
- Di Carlo, G.,Mascolo, N.; Izzo, A. A.; Capasso, F.(1999).** *Life Sciences*, **65** : 337-353.
- Dimitrijević, S.I., Mihajlovski, K.R., Antonović, D.G., Milanović-Stevanović, M.R., Mijina, D.Z. (2007).** *Food chemistry Journal*, **104** :774-782

- Dob T., Darhmane D., Benabdelkader T. Chelghoum T.C.(2006).***Int. J. Aromatherapy*, **16**: 95-100
- Dordevic S, Petrovic S, Dobric S, Milenkovic M, Vucicevic D, Zizic S, Kukic J. (2007).**
J. Ethnopharmacol. **109**: 458-463
- Dorman HJ, Deans SG (2000).** *J. Appl. Microbiol.* **88**: 308-316
- Edris, A.E. (2007).** *A review. Phytother. Res.* **21**: 308-323.
- Elberling J, Skov PS. (2007).** *Clin Exp Allergy.* **37** : 1676-80.
- Elhabazi K, Dicko A, Desor F, Dalal A, Younos C, Soulimani R. (2006).***Journal of Ethnopharmacol.***103** :413-419
- Elqaj M., Ahami A. , Belghyti D. (2007).** La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires. Journée scientifique "ressources naturelles et antibiotiques". Maroc.
- Emerenciano V. P., Barbosa K. O., Scotti M. T. et Ferriro M. J. P. (2007).** *Journal of brazilian chemical society.*, **18** (5) : 891-899.
- Essawi, T. et Srour, M. (2000).** *Journal Of Ethnopharmacology*, **70**: 343-349.
- Fargeix, D. (2000).** Etude des mécanismes d'oxydation des flavonoïdes en relation avec leur activité antioxydante. Effets anti- et pro-oxydants dans l'inhibition de la peroxydation lipidique par les flavonoïdes. Université Claude Bernard- Lyon 1, Lyon,
- Fellah S., Romdhane M., Abderraba A.(2006).** *J.Soc.Alger.Chim.*, **16** : 193-202.
- Fisher K, Phillips C (2009).** *Br. J. Biomed. Sci.* **66**: 180-185
- Forkmann, G.; Martens, S., (2001).** *Current Opinion in Biotechnology*, **12** : 155-160.
- Franchomme, P.; Pénoël, D. (1990).** L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Roger Jallois éditeur. Limoges. 445 p
- Fukai T., Sakagami H., Toguchi M., Takayama F., Iwakura I., Atsumi T., Ueha T., Nakashima H. and Nomura T (2000).** *Anticancer Research* **20**: 2525-2536.
- Gachkar L, Yadegari D, Rezaei M, Taghizadeh M, Astaneh S, Rasooli I.(2007).***Food Chemistry* **102**: 898-904
- Ghedira k. (2005).** *Phytothérapie.*, **3** (4) : 162-169.
- Gherman C, Culea M, Cozar O. (2000).** Comparative analysis of some active principles of herb plants by GC/MS. **53** :253-62
- Golmakani M. T. et Rezaei K. (2008).** *Food chemistry.*, **109** : 925-930.

- Grayer R.J. and Harborne J.B. A (1994).** *Phytochemistry* **37**: 19-42.
- Griensven J., Balasegaram M., Meheus F., Alvar J., Lynen L. and Boelaert M. (2010).** *The Lancet Infectious disease* **10**:184-194.
- Guvenalp Z, Ozbek H, Kuruuzum-uz A., Kazaz C, Demirezer L.O.(2009).** *Turk. J. Chem.* **33**: 667 – 675.
- Hadef, Y., Kaloustian, J., Giordan, R., Regli, P., Chefrour, A., Abou, L., Mikail, C. and Portugal, H. (2004).** Composition chimique et activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* L. et de *Thymus numidicus* Poiret d'Algérie. 6e symposium international d'aromathérapie scientifique et plantes médicinales, Grasse, France.
- Hadef, Y, Kaloustian. J, Chefrour. A, Mikail. C, Abou. L, Giodani. R, Nicolay. A & Portugal. H (2007).** Chemical composition and variability of the essential oil of *Thymus numidicus* Poir. from Algeria
- Halbwirth H. (2010).** *International Journal of Molecular Sciences*; **11**: 595-621.
- Harborne, J. B.; Williams, C. A., (2000).** *Phytochemistry*, **55**: (6), 481-504.
- Harborne .J. (1989).** *Methods in Plant Biochemistry*. Academic Press: Vol. 1 Plant Phenolics.
- Hayakawa R. (1987).** *Contact Dermatitis*, **16**: 272-274.
- Hilan, C., Sfeir, R., Jawich, D. et Aitour, S. (2006).** *Journal Scientifique Libanais*, **7**: 13-22.
- Hollman, P. C. H.; Katan, M. B., (1999).** *Food and Chemical Toxicology*, **37**: (9-10), 937-942.
- Horhammer, L. and Hänsel, R. (1952).** *Arch. Pharm.*, **285**: 438.
- Hudaib M., Speroni E., Di Pietra AM., Cavrini V. (2002).** *J Pharm Biomed Anal.* **20,29**(4):691-700.
- Iwashina T. (2000).** *Journal of Plant Research* **113**: 287-299.
- Izumi E., Ueda-Nakamura T., Filho B.P.D., Junior V.F.V. and Nakamura C.V. (2011).** *Natural Products Reports*; **28**: 809-823.
- Jafri MA, Farah, Javed K, Singh S (2001).***J. Ethnopharmacol.* **75**: 89-94
- Jain S.C., Jain R., Singh R. (2009) .** *Ethnobotanical Leaflets* **13**: 171-88.
- Jamali K., Shinkaruk S., Lamothe V., Potier M. and Enneta-Pelissero C. (2010).***Médecine et Longévité*; **2**: 12-21.
- Jiménez-Arellanes A., Martínez R., García R., León-Díaz R., Aluna-Herrera J., Molina – Salinas G. et Said-Fernández S. (2006).** *Pharmacologyonline.*, **3** : 569-574.

- Jimenez-Gonzalez L., Alvarez-Corral M., Munoz-Dorado M. and Rodriguez-Garcia I. (2008).** *Phytochemistry Reviews* **7**: 125-154.
- Jurd, L. and Horowitz, R. (1962).** Spectral properties of flavonoid compounds, pergamon press, Oxford, 107-2055.
- Jurd, L. and Geissman, T.A. (1956).** *J. Org. Chem.*, **21**: 1395.
- Kabouche, A., Kabouche, Z. and Bruneau, C. (2005).** *Flavour. Frag. J.*, **20**: 235-236.
- Kale A., Gawande S. and Kotwal S. (2008).** *Phytotherapy Research*; **22**: 567-577
- Kalembe D, Kunicka A. (2003).** *Curr. Med. Chem.* **10**: 813-829
- Kaur K., Jain M., Kaur T. and Jain R. (2009).** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*; **17**: 3229-3256.
- Kolak U , Hacibekiroglu I, Ozturk M, Ozgokçe F, Topcu G, Ulubelen A. (2009).** *Turk J Chem.* **33**: 813 – 823.
- Kong, J.-M.; Chia, L.-S.; Goh, N.-K.; Chia, T.-F.; Brouillard, R., (2003).** *Phytochemistry*, **64**, (5), 923-933.
- Kováts E. (1965).** *Advances in Chromatography*, **1** : 229-247.
- Kretschmar G., Zierau O., Wober J., Tischer S., Metz P. and Vollmer G (2010).** *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*; **118**: 1-6.
- Lamarck J-B. M., Poiret J-L M. Dessont. Flor. atlanr. vol. 2. pag. 29**
- Lee SJ. Umamo K., Shibamoto T, Lee KG. (2007).** *Food Chem.* **91**:131-137.
- Leopoldini M., Russo N. and Toscano M. (2010).** *Food Chemistry*; **125**: 288-306.
- Lephart E.D., West T.W., Weber K.S., Rhees R.W., Setchell K.D.R., Adlercreutz H. and Lund T.D. (2002).** *Neurotoxicology and Teratology*; **24**: 5-16.
- Lescure F.X., Loup G.L., Freilij H., Develoux M., Paris L., Brutus L. and Pialoux G. (2010)** *The Lancet Infectious disease*; **10**: 556-570.
- Liang Y.C., Tsai S.H., Tsai D.C., Lin-Shiau S.Y. and Lin J.K. (2001).** *FEBS Letters*; **496**: 12-18.
- Loomis, D., and R. Croteau. (1980).** Biochemistry of Terpenoids: A Comprehensive Treatise. In: P. K. Stumpf and E. E. Conn (eds.) The Biochemistry of Plants. Lipids: Structure and Function No. 4. p 364-410. Academic Press, San Francisco.

- Mabry, T.J., Markham, K.R. and Thomas, M.B. (1970).** The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag New York, Heidelberg. 254p.
- Macheix J, Fleuriet, A, Jay-Allemand C. (2005).** les composées phénoliques des végétaux, un exemple de métabolites secondaires d'importance économique, presses polytechniques et universitaires romandes, ISBN 2-88074-625-6 p 1, p 67, p 162.
- Magadula J.J. and Erasto P. (2009).** *Natural Products Reports*; **26**: 1535-1554.
- Magalhaes L.M., Segundo M.A., Reis S. Lima J.L.F.C.(2006).** *Anal. Chim. Acta.* **558**: 310-318.
- Malešev D. et Kuntić V. (2007).** *Journal of the Serbian chemical society.*, **72** (10) : 921-939.
- Marie P. and Halbout P. (2008);** *Médecine/Sciences* **24**: 105-109.
- Markham, K.R. (1976).** *Tetrahedron*, **32**, pp. 2607-2612.
- Markham, K. (1982).** Techniques of flavonoid identification. Academic Press, p 36-93.
- Markham, K.R. and Geiger, H. (1993).** The Flavonoids Advances in research since 1986. Edited by J. B. Harborne, Chapman & Hall. London.
- Martos, I., Cossentini, M., Ferreres, F. and Tomas-Barberan, F.A. (1997).** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**: pp. 2824-9.
- Marzouk Z., Neffati A., Marzouk B., Chraief I., Fatiha K., Chekir Ghedira L., Boukef K. (2006).** *Food, Agriculture & Environment (JFAE)*. **4** :61-65
- Massiot G, Lavaud C, Le Men-Olivier L, Van binst G, Miller SF, Fales HM. (1988).** *J Chem Soc Perkin Trans 1*: 3071-79.
- Mata, A.T., Proenc, C., Ferreira A.R., Serralheiro M.L.M., Nogueira J.M.F., Araujo, M.E.M. (2007).** *Food Chem.* **103**: 778-786.
- May J, Chan CH, King A, Williams L, French GL (2000).** *J. Antimicrob. Chemother.* **45**: 639-643
- Mbarek LA, Mouse HA, Elabbadi N, Bensalah M, Gamouh A, Aboufatima R, Benharref A, Chait A, Kamal M, Dalal A, Zyad A (2007).** *Braz. J. Med. Biol. Res.* **40**: 839-847
- Mckeage M.J. and Baguley B.C. (2010).** *Cancer*; **116**: 1859–71.
- Mc Lafferty FW, Stauffer DB. (1994).** Wiley Registry of Mass Spectral Data, 6th ed., Mass spectrometry library search system BenchTop/PBM, version 3.10d. Palisade Co.: Newfield
- Mebarki N., 2010.** Thèse de magistère. de chimie, Université –M’Hamed Bougara-Boumerdes.

Medić-Šarić M., Jasprica I., Smolčić-Bubalo A. et Monar A. (2004). *Croatica Chemica. Acta* 77 (1-2) : 361-366.

Merghem R., Jay M., Viricel, M-R., Bayet C., Voirin B, (1995). *Phytochemistry* 38, :637–640

Meynadier J.M . Raison-Peyron. N. (1997). Allergie aux parfums. *Re. Fr. Allergol*,37 : 641-650.

Miller RE, Mc Conville MJ, Woodrow IE. (2006). *Phytochemistry*, 67 : 43-51.

Milligan S., Kalita J., Pocock V., Heyerick A., Cooman L.D., Rong H. and Keukeleire D.D. (2002). *Reproduction*; 123: 235-242.

Mladinka P., Zatloukalova L., Filipisky T. and Hrdina R. (2010).*Free Radical Biology & Medicine*; 49: 963-975.

Modzelewska, A.; Sur, S.; Kumar, K.S.; Khan, S.R. (2005). *Curr. Med.Chem.- Anti-cancer Agents* 5:477-499.

Monti D, Chetoni P, Burgalassi S, Najarro M, Sactton MF, Boldrini E (2002) . *Int. J. Pharm.* 237: 209-214

Morton M.S., Turkes A., Denis L. and Griffiths K. (1998). *British Journal of Urology International*; 84: 549-554.

Muthu, C., Ayyanar, M., Raja, N., Ignacimuthu, S. (2006). *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 2:43 doi:10.1186/1746-4269-2-43

Naghibi F., Mosaddegh M., Motamed S.M., Ghorbani A. (2005).*Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 4(2): 63-79

Narayana K. R., Reddy M. S., Chaluvadi M. R. et Krishna D. R. (2001). *Indian journal of pharmacology.*, 33 : 2-16.

Newmann D. et Cragg G.M (2007). *Journal of Natural Products*; 70: 461-477.

Nielsen, J. G. and Moller, J. (1970). *Acta Chem. Scand.*, 24: 2665.

Nijveldt R. J., Van Nood E., Van Hoorn D. E. C., Boelens P. G., Van Norren K., Van Leeuwen P. A. M. (2001). *American journal of clinical nutrition.*, 74 : 418-425.

Nikavar B. , Mojab F., Doulat-Abadi R . (2005). *Food chemistry* 90(4):609-611

Ogura K., Koyama T., (1998). *Chem. Rev.*, 4 : 1263-1274.

Özcan M. et Chalcha J. C. (2004). *Bulgarian journal of plant physiology.*, 30 (3-4) : 68-73.

Park H. J. et Cha H. C. (2003). *Korean journal of biological society*, 7 : 327-330.

Pibiri M.C. (2005). Assainissement microbiologiques de l’air et des systèmes de ventilations au moyen d’huile essentielle. Thèse de doctorat .polytechnique fédérale de Lausanne.

- Pierini R., Gee J.M., Belshaw N.J. and Johnson I.T. (2008).** *British Journal of Nutrition*; **99**: 53-59.
- Poulose, A. J., and R. Croteau. (1978).** *Archives of Biochemistry and Biophysics* **187**: 307-314.
- Quezel, P. et Santa, S. (1963),** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I, C.N.R.S.Paris.
- Ramos-Valdivia A. C., van der Heidjen R., Verpoorte R., (1997).** *Nat. Prod. Rep.*,**14**: 591-603.
- Regnault-Roger C., Ribodeau M., Hamraoui A., Bateau I., Blanchard P., Gil-Munoz M-I., Thomas-Barberan. (2004).** *Journal of Stored Products Research* **40** : 395–408
- Ribereau-Gayou, J.B. (1968).** The phenolic compounds of vegetals, Edition Dunod, Paris
- Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G. (1996).** *Free Radical Biology and Medicine*, **20**: (7), 933-956.
- Richard, H. (1992).** Épices et Aromates. Technologie et Documentation Lavoisier.Paris. 339p
- Rota, M.C., Herrera, A., Martinez, R.M., Sotomayor, J.A., Jordan, M.J., (2008).***Food Control.* **19**: 681-687.
- Rufer C.E. and Kulling S.E. (2006).***Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **54**: 2926-2931.
- Sadler IH. (1988).** *Nat Prod Rep*; **5**: 101-27.
- Saidj F, Rezzoug S-A, Bentahar F, Boutekedjiret C.(2008).** Journal of essential oil-bearing plants. **11**(4): 397-405.
- Sampson, L.; Rimm, E.; Hollman, P. C. H.; De Vries, J. H. M.; Katan, M. B., (2002).** *Journal of the American Dietetic Association* **102**: (10), 1414-1420.
- Schnuch, Axel Wolfgang Uter. (2006).** Studies of the importance of airborne contact allergens in the onset of contact dermatitis. *Federal Environment Agency*.
- Sell, C.S. (2006).** The Chemistry of Fragrance. From Perfumer to Consumer. 2nd edition. The Royal Society of Chemistry. Cambridge. 329 p.
- Selmi S. et Sadok S. (2008).** *Pan-American Journal of aquatic sciences.*, **3** (1) : 36-45.
- Shin S, Kim JH (2005).** *Arch. Pharm. Res.* **28**: 897-901
- Spencer J.P.E.(2007).** *Genes and Nutrition*; **2**: 257-273.
- Sreelatha T., Hymavathi A., Rao V.R.S., Devanand P., Rani P.U., Rao J.M. and Babu K.S. (2009).** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*; **20**: 549-553.

- Strauss L., Santti R., Saarinen N., Streng T., Joshi S. and Makela S. (1998).** *Toxicology Letters*; **102-103**: 349-354.
- Subsamanian S., Stacey G. et Yu O. (2007).** *Trends in plant science.*, **12** (7) : 282-283.
- Takeuchi H., Lu Z. G. et Fujita T. (2004).** *Bioscience, biotechnology and biochemistry*, **68** (5): 1113- 1134.
- Tasdemir D., Kaiser M., Brun R., Yardley V., Schmidt T.J., Tosun F. and Ruedi P. (2006)** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; **50**: 1352-1364.
- Tikkanen M.J. and Adlercreutz H. (2000).** *Biochemical Pharmacology*; **60**: 1-5.
- Tohidpour A, Sattari M, Omidbaigi R, Yadegar A, Nazemi J (2010).** *Phytomedicine*. **17**: 142-145
- Topcu G, Eris C. (1996).** *Tr.J.of chemisetry*. **20**: 265-267.
- Uchiyama N. Antichagasic .(2009)** *Journal of Health Science* **55**: 31-39.
- Umezu T, Nagano K, Ito H, Kosakai K, Sakaniwa M, Morita M.(2006).** *Pharmacol Biochem Behav.* **85**(4):713-21
- Unlu M, Daferera D, Donmez E, Polissiou M, Tepe B, Sokmen A (2002).** *J. Ethnopharmacol.* **83**: 117-121
- Van Den Dool H, Kratz PD. (1963).** *J. Chromatogr.* **11** : 463-471.
- Van der Heijden R., Verpoorte R., Duine J.A. (1994).**Metabolic enzymes of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A in *Catharanthus roseus*. - *2nd Symposium of the European Network on Pant Terpenoids*, Strasbourg, 23-27
- Vila, R.; Mundina, M.; Tomi, F.; FurSan, R.; Zacchino, S.; Casanova, J.; Canigüreal, S. (2002).** *Planta med.* **68**, 164-167.
- Virk-Baker M.K., Nagy T.R. and Barnes S. (2010).** *Planta Medica*; **76**: 1132-1142.
- Vollack K.U., Weber T., Zeiler S., Raudot V., Bach T.J. , (1994).**- Further studies on the Fe(II)/quinone-stimulated enzymatic conversion of acetyl-CoA into 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA in radish. - *2nd Symposium of the European Network on Pant Terpenoids*, Strasbourg, 23-27
- Wannissorn B, Jarikasem S, Siritwangchai T, Thubthimthed S .(2005).** *Fitoterapia*. **76**: 233-236
- W –Erdman J., Balentine J. D., Arab L., Beecher G., Dwyer J. T., Folts J., Harnly., Burrowes J. (2007).** *Journal of Nutrition.*, **137** (3 suppl) : 718 s-737 s
- Wilson, R.G., Bowie, J.H. et Willams, D.H. (1986).** *Tetrahedron*, **24**: 1407

- Winkel-Shirley, B. (2002).** *Current Opinion in Plant Biology*, **5**: 218-223.
- Wright C.W. (2010).** *Natural Product Reports*; **27**: 961-968.
- Yang R. Y., Lin S. et Kuo G. (2008).** *Asia of pacific journal of clinical nutrition.*, **17** (S1) : 275-279.
- Yano, Y., Satomi, M ., Oikawa, H. (2006).** *International J Food Microbiology*. **111**: 6-11.
- Zhang Y., Li X.L., Yao X.S. and Wong M.S. (2008).** *Archives of Pharmaceutical Research*; **31**: 1534-1539.
- Zhao RJ, Koo BS, Kim GW, Jang EY, Lee JR, Kim MR, Kim SC, Kwon YK, Kim KJ, Huh TL, Kim DH, Shim I, Yang CH. (2005).** *Biol. Pharm. Bull.* **28**: 2323-2326
- Zhao B. (2009).** *Neurochemical Research*; **34**: 630-638.
- Zheng Z.L., Tan Justin Y.W., Liu H.Y., Zhou X.H .,Xiang X. Wang K.Y. (2009).** *Aquaculture* . **292** : 214–218

Résumé

Le thym utilisé depuis l'antiquité en médecine traditionnelle est reconnu par ses vertus thérapeutiques.

Dans ce contexte, le présent travail porte sur l'étude phytochimique et biologique d'une espèce endémique *Thymus numidicus* (Poiret). Notre contribution à l'étude phytochimique nous a permis l'identification de six produits qui sont :

Cirsilinéol, Cirsimaritine, Apigénine, Lutéoline, 7-O-glucuronyl apigénine, 7-O-glucuronyl lutéoline.

Le potentiel anti radicalaire de l'extrait *n*-BuOH a été déterminé par la méthode de DPPH, dont l'ordre de IC₅₀ est de **35,08 µg/ ml**.

L'analyse par GC et GC-MS de l'huile essentielle de cette espèce obtenue par entraînement à la vapeur d'eau à permis l'identification de 48 composés appartenant majoritairement à la classe des monoterpènes, dont le thymol (54,18%) est le constituant principal suivi par le p-cymen (15,38%).

Mots clés :

Thymus numidicus, flavonoïdes, activité antioxydante, huiles essentielles, terpènes, GC/GC.MS.

Summary

The thyme used since the antiquity in traditional medicine, is recognized by their therapeutic virtues.

In this context, the present work concerns phytochemical and biological studies of an endemic species *Thymus numidicus* (Poiret).

The phytochemical study led to the establishment six structures which were: **Cirsilinéol,**

Cirsimaritin, Apigenin, Luteolin, Apigenin-7-O-glucuronide, Luteolin -7-O-glucuronide

Antiradical potential of the *n*-BuOH extract was determined by the DPPH method, the order of IC₅₀ is **35,08 µg/ ml.**

The analysis by GC and GC-MS of the essential oil of *T. numidicus*, obtained by water steam practice led to the identification of 48 compounds belonging essentially to the class of the monoterpenes. From which the most important is thymol (54,18%) and p-cymen (15,38%).

Keyword:

Thymus numidicus, flavonoids, antioxidant activity, essential oils, terpenes, GC/GC.MS.

ملخص:

الزعرمن العائلة الشفوية يعرف منذ القدم بخصائصه العلاجية في هذا السياق يركز هذا العمل على الدراسة الفيتوكيميائية والبيولوجية لنبته محلية *T. numidicus* , حيث سمحت الدراسة الفيتوكيميائية بتحديد البنية لستة مركبات وهي:

Cirsilinéole, Cirsimaritine, Apigénine, Lutéoline, 7-O-glucuronyl apigénine,

7-O-glucuronyl lutéoline.

سمحت الدراسة المنجزة على المستخلص البوتانولي لهذه النبتة لمعرفة الخصائص المضادة للأكسدة علي الحصول علي نتائج فعالة لحصر الجذر الحر DPPH راجع الي وجود الفلافونويدات.

دراسة مكونات الزيت الأساسي لهذه النبتة سمحت بالتعرف علي 48 مركب تابعة أساسا لفئة التربينات الاحادية حيث

المركبات الغالبة: thymol (54,18%), p-cymen (15,38 %).

الكلمات المفتاحية:

Thymus numidicus, الفلافونويدات, الزيوت الطيارة, التربينات, المضادة للأكسدة