

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



**UNIVERSITÉ FERHAT ABBAS - SETIF1**  
**FACULTÉ DE TECHNOLOGIE**

**THESE**

**Présentée au Département de Génie des Procédés**

**Pour l'obtention du diplôme de**

**DOCTORAT EN SCIENCES**

**Option : Génie des Procédés Pharmaceutiques**

**Par**

**M<sup>me</sup> AZI Mouna**

**THÈME**

**Contribution à la valorisation de la flore d'Algérie**  
**Etude phytochimique et biologique des espèces *Origanum floribundum* Munby et *Daucus virgatus* (Poir.) Maire**

**Soutenue le 20/06/2024 devant le Jury :**

<b>OUARI Kamel</b>	<b>Professeur</b>	<b>Université Ferhat Abbas Sétif 1</b>	<b>Président</b>
<b>ZAIDI Farouk</b>	<b>MCA</b>	<b>Université Ferhat Abbas Sétif 1</b>	<b>Directeur de thèse</b>
<b>BENTOUHAMI Embarek</b>	<b>Professeur</b>	<b>Université Ferhat Abbas Sétif 1</b>	<b>Co-Directeur</b>
<b>BENKINIOUAR Rachid</b>	<b>Professeur</b>	<b>Université Mentouri Constantine1</b>	<b>Examineur</b>
<b>TOUIL Ahmed</b>	<b>Professeur</b>	<b>Université Mentouri Constantine1</b>	<b>Examineur</b>
<b>KHETTAL Bachra</b>	<b>Professeur</b>	<b>Université Mira Bejaia</b>	<b>Examinatrice</b>
<b>SOBHI Widad</b>	<b>Professeur</b>	<b>CRBt Ali Mendjli, Constantine</b>	<b>Invitée</b>

"Le don d'une plante utile me semble plus précieux que la découverte d'une mine d'or, et un monument plus durable qu'une pyramide."

*Bernardin de Saint-Pierre (1737-1814)*

## DÉDICACES

*« À la mémoire de ma chère sœur, qui nous a quittés trop tôt. Que son  
âme repose en paix. »*

Chers parents, que Dieu les garde,

En témoignage de ma profonde affection, en reconnaissance de leurs efforts, de leur amour et de leurs encouragements. Qu'ils sachent que ce travail est en partie le fruit de leur soutien, de leur dévouement et de leur abnégation. Leur fierté à mon égard, aujourd'hui, est pour moi la meilleure des récompenses.

À mon cher mari, pour son soutien, sa compréhension et sa patience durant toutes ces longues années de recherche scientifique.

À mes chers enfants, ma source de bonheur et ma raison de vivre.

À mes chers frères, pour leurs aides et leurs encouragements,

À tous ceux qui me sont chers.

## REMERCIEMENTS

Louange à ALLAH, le tout Puissant, le Clément, le Miséricordieux, que je remercie vivement pour m'avoir donné la patience, la force et la volonté pour réaliser ce travail.

C'est avec grande joie que j'ai entrepris cette thèse, et avec un léger pincement au cœur que je la clôture par une conclusion finale résumant les efforts consentis durant toutes ces années de travail et de labeur pour en arriver aujourd'hui à écrire ces remerciements pour exprimer mes sentiments sincères aux personnes ayant contribué de près ou de loin, à l'élaboration de cette thèse. Ainsi, une page importante de ma vie se tourne.

En premier lieu, il convient de remercier Dr. ZAIDI Farouk, mon directeur de thèse, pour m'avoir accueilli dans son équipe au sein du Laboratoire de Chimie, Ingénierie Moléculaire et Nanostructures (LCIMN) de l'université Ferhat Abbas Sétif1, et pour m'avoir donné l'opportunité d'approfondir mes connaissances en phytochimie. Ainsi, je le remercie pour sa confiance en me laissant une grande liberté dans le choix d'orientation de mes recherches tout en étant attentif et généreux en bons conseils. Aussi, je lui exprime mon immense reconnaissance pour avoir supervisé, suivi et mené à bien la direction de cette thèse avec rigueur et efficacité et aussi d'avoir partagé son expérience et sa compétence dans ce domaine de recherche scientifique.

Par ailleurs, ce travail a pu arriver à terme, grâce aussi à la forte implication et le dévouement de mon co-directeur de thèse Pr. BENTOUHAMI Embarek, Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance et mon respect le plus profond. Il a été un réel mentor pour moi, je lui présente mes sincères remerciements pour son aide précieuse, sa gentillesse et son soutien.

Toute ma reconnaissance va également au Dr. Sergio Ortiz AGUIRRE, de l'Equipe Chimie Biologie Intégrative notamment dans la réalisation de la caractérisation et l'identification de mes produits par l'exploitation de techniques innovantes disponibles au niveau de la plateforme de la faculté de pharmacie de l'université de Strasbourg (France) dans le cadre d'une convention scientifique et à qui je ne manque pas d'adresser mes sincères remerciements pour son aide précieuse, sa gentillesse et ses qualités humaines et lui demande de bien vouloir croire en ma profonde gratitude pour l'accomplissement de ce travail.

Je tiens particulièrement à remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail et d'en être les examinateurs.

Je suis sensible à l'honneur que me fait Pr. OUARI Kamel de présider le jury de cette thèse. Qu'il trouve ici le témoignage de mon profond respect.

Je remercie également Pr. KHETTAL Bachra, Pr. BENKINIOUAR Rachid et Pr. TOUIL Ahmed d'avoir accepté d'examiner ce travail. Soyez assurés de ma profonde gratitude.

Je remercie également Pr. LAOUER Hocine pour l'aide qu'il m'a apportée dans l'identification du matériel végétal. Aussi, pour m'avoir ouvert ses portes au niveau du Laboratoire de Valorisation des Ressources Biologiques Naturelles afin d'accomplir le travail sur les huiles essentielles.

Je tiens à rendre hommage au défunt Mr. MERIBAI Youcef, Ex-directeur du Parc National de Djurdjura (PND) auquel je reste également redevable de m'avoir aidé à me procurer le matériel végétal.

Mes plus chaleureux remerciements s'adressent plus spécialement à Pr. SOBHI Widad. Je la remercie pour ses conseils techniques, sa compétence scientifique, et son amitié qui m'est précieuse.

Mes sentiments de reconnaissance et mes sincères remerciements s'adressent particulièrement au Dr. BOUSKOUT Mohammed, chercheur au sein du laboratoire de biotechnologies microbiennes, agrosociétés et environnement, Université Cadi Ayyad, Marrakech- Maroc pour sa collaboration, son aide précieuse, sa compétence scientifique et sa disponibilité.

Je remercie l'ensemble du personnel du laboratoire de biochimie au niveau du Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBt) en particulier Dr. BENSOUICI Chaouki de m'avoir ouvert ses portes et contribuer à l'accomplissement de ce travail de thèse.

Cette thèse doit beaucoup aux nombreuses personnes qui m'ont encouragées et soutenue durant ces années. Je me contenterai donc de remercier du fond du cœur toutes ces personnes qui, en me témoignant leur amitié, m'ont aidé à tenir le coup dans les moments les plus difficiles.

## Résumé

Les travaux présentés dans cette thèse contribuent à la valorisation de deux plantes endémiques d'Algérie, *Daucus virgatus* (Poir.) Maire et *Origanum floribundum* Munby. Une étude phytochimique approfondie a été réalisée sur l'espèce *O. floribundum* en vue d'isoler et d'identifier ses composés flavonoïdiques, en utilisant des méthodes chromatographiques préparatives et analytiques (CC, CCM, HPLC), ainsi que des méthodes de détermination structurale principalement spectroscopiques (UV-Vis RMN et LC/MS-MS). Au total, cinq flavonoïdes ont été isolés, quatre flavones méthoxylées et la lutéoline. Les résultats de l'analyse couplée par LC.DAD.APCI.MS/MS des trois extraits CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt et *n*-BuOH ont révélé la présence de cinq flavonoïdes et quatre acides phénoliques. Les composés rhododendrine et la flavone prénylée Kanzonol E n'avaient jamais été identifiés auparavant dans le genre *Origanum*, ce qui constitue une première citation pour ce genre. De même, la vicénine-2 a été identifiée pour la première fois dans cette espèce.

L'analyse quantitative du contenu en polyphénols (TPC) et en flavonoïdes (TFC) totaux a révélé une forte teneur en polyphénols dans l'extrait acétate d'éthyle (446,5 µg EAG/mg extrait), suivi par l'extrait butanolique (340,6 µg EAG/mg extrait). Cependant, l'extrait dichlorométhane affiche une teneur maximale en flavonoïdes (34,30 µg EQ/mg). L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits testés par différentes méthodes (DPPH, ABTS CUPRAC et pouvoir réducteur du fer) a révélé des activités antiradicalaire et antioxydante très intéressantes, voire très puissantes. Notons que l'extrait acétate d'éthyle a présenté le pouvoir antioxydant le plus élevé. Les extraits testés ont démontré une activité antiradicalaire plus efficace avec le radical cation ABTS<sup>•+</sup> par rapport au radical libre DPPH<sup>•</sup>. De plus, l'extrait butanolique a exhibé la capacité de réduction du fer la plus puissante (A<sub>0,5</sub> = 4,50 µg/ml), surpassant celle du BHA et de l'acide ascorbique. Une corrélation positive a été établie entre l'activité antioxydante et la TPC ainsi qu'en TFC pour les trois extraits.

L'étude réalisée sur l'espèce *D. virgatus* vise à contribuer à la valorisation de son huile essentielle (HE) en déterminant sa composition chimique par analyse GC-MS, révélant la présence de 21 composés. Parmi ceux-ci, le β-pinène (77,9 %) et l'α-pinène (7,6%) étaient les plus abondants. L'activité antimicrobienne a été évaluée contre six bactéries et une levure. Les résultats ont montré que l'HE exerce un effet antimicrobien notable, notamment contre *S. typhimurium* et *C. albicans*, qui ont démontré une sensibilité élevée, avec des zones d'inhibition variant entre 2,3 et 25 mm, et des concentrations minimales inhibitrices de 15,63 et 31,25 µg.ml<sup>-1</sup>, respectivement. Dans le test DPPH<sup>•</sup>, l'HE a révélé un effet antioxydant modéré, avec une valeur IC<sub>50</sub> de 39,61 mg.ml<sup>-1</sup>. L'HE de *D. virgatus* a également présenté un effet inhibiteur significatif contre l'enzyme α-glucosidase (IC<sub>50</sub> = 0,35 mg.ml<sup>-1</sup>), comparé au contrôle positif Acarbose (IC<sub>50</sub> = 0,24 mg.ml<sup>-1</sup>). De plus, un fort effet inhibiteur a été observé contre les enzymes cholinestérases, avec des valeurs IC<sub>50</sub> variant entre 0,33 et 0,20 mg.ml<sup>-1</sup> pour l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase, respectivement.

Ces travaux laissent entrevoir que les deux espèces étudiées offrent un ensemble important de composés bioactifs, qui forment la base de nombreux médicaments thérapeutiques. Ils présentent ainsi une source prometteuse de composés ayant un potentiel anti-oxydant, antimicrobien, anti-Alzheimer et antihyperglycémiant.

**Mots-clés :** *Daucus virgatus*, *Origanum floribundum*, phytochimie, flavonoïde, huile essentielle, antimicrobien, antioxydant, inhibiteur d'enzyme.

## Abstract

The research documented in this thesis makes a valuable contribution to the valorization of *Daucus virgatus* (Poir.) Maire and *Origanum floribundum* Munby are both endemic species to Algeria. In order to isolate and characterize the flavonoid compounds present in *O. floribundum*, an extensive phytochemical analysis was performed. This involved the utilization of chromatographic techniques, including TLC, CC, HPLC, and LC/MS, in addition to primarily spectroscopic structural determination methods like UV-Vis and NMR. A total of five flavonoids were extracted from this species, with luteolin and four methoxylated flavones constituting the majority, and upon analysis with coupled LC-DAD-APCI-MS/MS, the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt, and n-BuOH extracts revealed the presence of five flavonoids and four phenolic acids. The prenylated flavone Kanzonol E and the compounds rhododendrine were not previously identified within the genus *Origanum*; this is the first citation for this genus. In a similar fashion, vicenine-2 was first identified in this species.

The results of a quantitative assessment of total flavonoids (TFC) and total polyphenols (TPC) indicated that the ethyl acetate extract contained the highest concentration of polyphenols (446.5% EAG/mg extract), followed by the butanol extract at 340,6% EAG/mg extract. On the contrary, the dichloromethane extract exhibited a peak flavonoid concentration of 34.30 µg EQ/mg. Analytical activity assessment of the examined extracts via various techniques (DPPH, ABTS, CUPRAC, and ferric reducing power) unveiled antioxidant and radical scavenging properties that were not only intriguing but also quite potent. It is worth noting that the ethyl acetate extract demonstrated the most robust antioxidant activity compared to all other experiments performed. The radical scavenging activity of the examined extracts was found to be more pronounced when the ABTS<sup>•+</sup> radical cation was utilized, as opposed to the DPPH<sup>•</sup> free radical. Furthermore, it was observed that the butanol extract demonstrated the highest ferrous ion-reducing capacity ( $A_{0.50}=4,50$  µg/ml), which exceeded the capacities of BHA and ascorbic acid. For all three extracts, a positive correlation was found between antioxidant activity and both TPC and TFC.

In order to assist in the process of valorizing the essential oil (EO) of *D. virgatus*, a chemical compositional analysis utilizing GC-MS was performed on the plant. This investigation unveiled the existence of twenty-one compounds.  $\alpha$ -pinene (77,9%) and  $\beta$ -pinene (7,6%) constituted the most abundant constituents. The antimicrobial activity against one yeast and six microorganisms was evaluated. The findings indicated that the essential oil (EO) possessed noteworthy antimicrobial properties, specifically against *C. albicans* and *S. typhimurium*. These microorganisms exhibited the highest sensitivity, as evidenced by inhibition zones spanning a range of 2,3 to 25 mm and minimal inhibitory concentrations of 15,63 and 31,25 µg/ml, respectively. The EO exhibited a moderate antioxidant effect in the DPPH assay, as indicated by its IC<sub>50</sub> value of 39,61 mg/ml. Comparatively, the EO of *D. virgatus* and the positive control Acarbose demonstrated substantial inhibitory effects on the  $\alpha$ -glucosidase enzyme (IC<sub>50</sub>=0,35 mg/ml; IC<sub>50</sub>=0,24 mg/ml, respectively). Furthermore, a significant inhibitory impact on cholinesterase enzymes was detected, as evidenced by IC<sub>50</sub> values for acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase ranging from 0,33 to 0,20 mg/ml, respectively.

Based on these results, the two species under investigation may contain a vast array of bioactive compounds, which could be utilized to develop therapeutic pharmaceuticals. Additionally, they emphasize that compounds possessing antioxidant, antimicrobial, anti-Alzheimer's, and antidiabetic properties may be abundant in these plants.

**Keywords :** *Daucus virgatus*, *Origanum floribundum*, phytochemistry, flavonoids, essential oil, antioxidant, antimicrobial, enzymes inhibitory.

## الملخص

تهدف الأبحاث الموثقة في هذه الرسالة إلى الرفع من قيمة نباتين نادريين في الجزائر، وهما الجزر العصي (*Daucus virgatus*) وأحد أنواع الزعتر (*Origanum floribundum* Munby)، حيث يمثلان نوعان من النباتات الأصلية للجزائر. في البداية تم إجراء تحليل نباتي شامل على نوع *O. floribundum* لعزل وتعريف مركباته الفلافونويدية باستخدام تقنيات الكروماتوغرافيا مثل TLC و CC و HPLC و LC/MS، بالإضافة إلى طرق التحديد البنوية الأساسية مثل UV-Vis و NMR. تم عزل خمسة فلافونويدات من هذا النوع كنتيجة أولية، وتتألف بشكل رئيسي من أربعة فلافونات ميتوكسيلية واللوتولين. كشفت نتائج التحليل المقترن بواسطة LC-DAD-APCI-MS/MS لثلاث مستخلصات من  $CH_2Cl_2$  و  $AcOEt$  و  $n-BuOH$  عن وجود خمسة فلافونويدات وأربعة أحماض فينولية.

في هذا السياق، يمكن القول إنه لم يتم تحديد المركبات الروادين والفلافون البرينيل Kazonol E في جنس *Origanum* من قبل، مما يشكل أول ذكر لهذا الجنس. وبالمثل، تم تحديد vicenine-2 لأول مرة في هذا النوع. كشف التقييم الكمي لمحتويات الفلافونويدات الكلية والبوليفينولات الكلية أن استخراج الأسيئات الإيثيلي يحتوي على أعلى تركيز للبوليفينولات (446.5% EAG/mg extract)، تليها بالقرب من استخراج البيوتانول (340.6% EAG/mg extract). على العكس من ذلك، يعرض استخراج الديكلوروميثان تركيزاً قصوى للفلافونويدات (34.30  $\mu g$  EQ/mg). كشف تقييم النشاط الأكسدة باستخدام تقنيات مختلفة (DPPH، ABTS، CUPRAC)، وقدرة الحديد على الاختزال) عن نشاطات مضادة للأكسدة ومضادة للجذور الحرة مثيرة للاهتمام وفعالة للغاية. من الجدير بالذكر أن استخراج الأسيئات الإيثيلي عرض النشاط المضاد للأكسدة الأقوى بين جميع الاختبارات التي أجريت. أظهرت الاختبارات المجراة نشاطاً مضاداً للجذور الحرة أكثر فعالية عند استخدام أيون الراديكال ABTS. مقارنة بالراديكال الحر DPPH. علاوة على ذلك، أظهر استخراج البيوتانول قدرة الاختزال الأكبر لأيون الحديد الثنائي ( $A_{0.5} = 4.50 \mu g/ml$ )، وتفوق ذلك على قدرات BHA وحمض الأسكوربيك. تم تأسيس علاقة إيجابية بين النشاط المضاد للأكسدة وكل من محتويات البوليفينولات الكلية ومحتويات الفلافونويدات الكلية للمستخلصات الثلاثة.

في الجانب الآخر، يهدف البحث المجرى على النوع *D. virgatus* إلى المساهمة في تقدير قيمة زيت الطيار من خلال تحديد تركيبه الكيميائي باستخدام تحليل GC-MS، مما كشف عن وجود 21 مركباً. ومن بين هذه المركبات، كان البينين  $\beta$  (77.9%) والبينين  $\alpha$  (7.6%) الأكثر وفرة. تم تقييم النشاط المضاد للميكروبات ضد ستة بكتيريا وخميرة. أظهرت النتائج أن الزيت الطيار يمتلك تأثيراً مضاداً للميكروبات ملحوظاً، بشكل خاص ضد *S. typhimurium* و *C. albicans*، التي أظهرت حساسية مرتفعة، بمناطق تثبيط تتراوح بين 2.3 و 25 ملم، وتراكيز حدودية مثبطة تتراوح بين 15.63 و 31.25 ميكروغرام/مل على التوالي. في اختبار DPPH، كشف الزيت الطيار عن تأثير مضاد للأكسدة معتدل، بقيمة  $IC_{50}$  تبلغ 39.61 ملغ/مل. كمقارنة، أظهر الزيت الطيار للنوع *D. virgatus* تأثيراً مثبطاً كبيراً ضد إنزيم ألفا جوكوزيداز ( $IC_{50} = 0.35$  ملغ/مل) مقارنة بالضايط الإيجابي أكاربوز ( $IC_{50} = 0.24$  ملغ/مل). بالإضافة إلى ذلك، لوحظ تأثير مثبط قوي ضد إنزيمات الكولين استيراز، بقيم  $IC_{50}$  تتراوح بين 0.33 و 0.20 ملغ/مل للأستيل كولين استيراز والبيوتيريل كولين استيراز على التوالي.

في الأخير، تلمح نتائج هذه الأبحاث إلى أن النوعين المدروسين يوفران مجموعة كبيرة من المركبات الحيوية، مما يشكل قاعدة مهمة من المحتمل أنها تساهم في تطوير الأدوية العلاجية. كما تؤكد على أن هذه النباتات بإمكانها أن تشكل مصدرًا واعدًا للمركبات ذات الخصائص المضادة للأكسدة والمضادة للميكروبات والمضادة للزهايمر والمضادة لمرض السكري.

**الكلمات المفتاحية:** جزر عصوي؛ نبات الأوريجانو (البردقوش)؛ كيمياء النباتية؛ أنشطة حيوية؛ تركيبة الزيوت الأساسية؛ خصائص مضادة للأكسدة؛ مركبات ثانوية؛ فلافونويدات؛ البوليفينولات.

# TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES.....	i
LISTE DES TABLEAUX.....	iii
LISTE DES ABREVIATIONS.....	iv
<b>Introduction générale.....</b>	<b>1</b>
<b>Partie 1. Revue bibliographique.....</b>	<b>4</b>
<b>I. Les plantes: Sources de molécules naturelles bioactives.....</b>	<b>5</b>
1. Naissance de la chimie des substances naturelles.....	5
2. Développement de médicaments à base de plantes.....	5
3. Approche de sélection des plantes pour les études phytochimiques et/ou biologiques.....	7
<b>II. Les métabolites secondaires: principes actifs des plantes.....</b>	<b>8</b>
1. Les métabolites secondaires.....	8
<b>2. Les huiles essentielles.....</b>	<b>9</b>
2.1. Définition réglementaire des huiles essentielles.....	9
2.2. Rôle biologique des huiles essentielles dans les plantes.....	9
2.4. Répartition et localisation des huiles essentielles.....	10
2.5. Procédés d'extraction.....	10
2.6. Critères de qualité des huiles essentielles.....	11
2.7. Composition chimique des huiles essentielles.....	12
2.8. Modes d'action des huiles essentielles.....	19
2.9. Différentes utilisations des huiles essentielles.....	20
<b>3. Les flavonoïdes.....</b>	<b>21</b>
3.1. Origine des flavonoïdes.....	21
3.2. Distribution et localisation.....	21
3.3. Chimie des flavonoïdes.....	21
3.4. Biosynthèse des flavonoïdes.....	23
3.5. Propriétés biologiques et thérapeutiques des flavonoïdes.....	25
3.6. Mécanisme d'action antioxydante des flavonoïdes.....	26
3.7. Mode d'obtention des flavonoïdes.....	29
3.8. Stratégie d'élucidation structurale des flavonoïdes.....	30
3.9. Méthodes analytiques pour caractérisation des mélanges complexes.....	38
<b>III. Description botanique, chimique et pharmacologiques des plantes étudiées.....</b>	<b>39</b>
<b>1. Les zones importantes pour les plantes aromatiques et médicinales en Algérie.....</b>	<b>39</b>
<b>2. Choix des espèces de plantes étudiées.....</b>	<b>40</b>
<b>3. Données botaniques et pharmacologiques de l'espèce <i>D. virgatus</i> (Poir.) Maire.....</b>	<b>40</b>
3.1. Généralités sur la famille des Apiacées.....	40
3.2. Description botanique des Apiacées.....	41
3.3. Aspects chimiques et pharmacologiques des Apiacées.....	42
3.4. Présentation du genre <i>Daucus</i> .....	42
3.5. Taxonomie et description botanique de l'espèce <i>Daucus virgatus</i> (Poir.) Maire.....	43
3.6. Travaux antérieurs du genre <i>Daucus</i> .....	44
<b>4. Données botaniques et pharmacologiques de l'espèce <i>Origanum floribundum</i>.....</b>	<b>51</b>
4.1. Généralités sur la famille des Lamiaceae.....	51
4.2. Description botanique des Lamiacées.....	51
4.3. Aspect chimique et pharmacologique des Lamiacées.....	52
4.4. Présentation du genre <i>Origanum</i> .....	52
4.5. Taxonomie et description botanique de l'espèce <i>Origanum floribundum</i> Munby... ..	53
4.6. Travaux antérieurs du genre <i>Origanum</i> .....	55

<b>Partie 2. Matériel et méthodes.....</b>	<b>59</b>
Objectifs des travaux de la thèse.....	60
<b>Chapitre 1 : Etude phytochimique et biologique des espèces étudiées.....</b>	<b>61</b>
<b>I. Etude phytochimique de l'espèce <i>Origanum floribundum</i>.....</b>	<b>61</b>
1. Récolte et préparation du matériel végétal .....	61
2. Screening phytochimique .....	61
3. Extraction des flavonoïdes.....	62
4. Essais chromatographiques: CCM bidimensionnelle (2D).....	64
5. Fractionnement de l'extrait dichlorométhane CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> .....	64
6. Étude des fractions de la colonne et isolement des flavonoïdes.....	66
7. Fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle (AcOEt) .....	68
8. Analyse structurale des flavonoïdes isolés .....	70
8.1. Spectroscopie UV-Visible .....	71
8.2. Analyse par RMN.....	73
9. Produits détectés suite à l'analyse par couplage LC-DAD-HRMS/MS.....	
<b>II. Etude phytochimique de l'espèce <i>Daucus virgatus</i> .....</b>	<b>75</b>
1. Matériel végétal.....	75
2. Extraction par hydrodistillation.....	75
3. Analyse de l'huile essentielle par la technique GC-MS.....	75
<b>Chapitre 2 : Evaluation des activités biologiques des espèces étudiées.....</b>	<b>76</b>
<b>I. Évaluation du pouvoir antioxydant de l'espèce <i>Origanum floribundum</i>.....</b>	<b>76</b>
1. Analyse colorimétrique par spectrométrie (UV-Visible) .....	76
1.1. Dosage des composés phénoliques par colorimétrie.....	76
1.2. Dosage des flavonoïdes totaux.....	77
2. Activité de piégeage du radical DPPH•.....	77
3. Activité de piégeage du radical positif ABTS•+ .....	78
4. Test de la capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC).....	78
5. Test du pouvoir réducteur.....	79
<b>II. Evaluation des activités biologiques de l'espèce <i>D. virgatus</i>.....</b>	<b>79</b>
1. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE de l'espèces <i>D. virgatus</i> .....	79
1.1. Souches microbiennes testées .....	80
1.2. Méthode de diffusion par disque .....	80
1.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	81
2. Activité de piégeage du radical DPPH•.....	81
3. Essai d'inhibition des enzymes cholinestérases.....	82
4. Essai d'inhibition de l'enzymz α-Glucosidase .....	84
<b>III. Analyse statistique .....</b>	<b>85</b>
<b>Partie 3. Résultats et discussion.....</b>	<b>86</b>
<b>Chapitre 1 : Étude phytochimique des espèces étudiées.....</b>	<b></b>
<b>I. Résultats de l'étude phytochimique de l'espèce <i>O. floribundum</i> .....</b>	<b>87</b>
1. Screening phytochimique .....	87
2. Extraction et calcul de rendement.....	88
3. Chromatographie sur couche mince CCM bidimensionnelle (2D).....	89
4. Fractionnement et purification des extrait dichlorométhane CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> et AcOEt .....	89
5. Résultats de l'analyse chimique de l'espèce <i>O. floribundum</i> .....	94
5.1.1. Elucidation structurale du flavonoïde E1 .....	94
5.1.2. Elucidation structurale du flavonoïde AB <sub>1</sub> .....	97
5.1.3. Elucidation structurale du flavonoïde D11/1 .....	101
5.1.4. Elucidation structurale du flavonoïde F 10/11 .....	104

5.1.5. Elucidation structurale du flavonoïde F 531/2 .....	106
5.2. Résultats de l'analyse par couplage LC-DAD-HRMS/MS .....	108
5.2.1. Composés identifié dans l'extrait CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> .....	109
5.2.2. Composés identifié dans l'extrait n-BuOH.....	114
5.2.3. Composés identifié dans l'extrait AcOEt.....	123
<b>II. Discussion des résultats de l'analyse phytochimique de l'espèce <i>O. floribundum</i>.....</b>	<b>136</b>
<b>III. Résultats de l'analyse GC/MS de l'HE de <i>D. virgatus</i>.....</b>	<b>139</b>
<b>Chapitre 2 : Evaluation des activités biologiques des espèces étudiées.....</b>	<b>143</b>
<b>I. Évaluation du pouvoir antioxydant de l'espèce <i>Origanum floribundum</i>.....</b>	<b>143</b>
1. Dosage spectrophotométrique.....	143
2. Les résultats de l'activité antioxydante .....	146
2.1. Test de Piégeage du radical DPPH•.....	148
2.2. Test ABTS•+.....	149
2.3. Pouvoir réducteur du fer.....	150
2.4. Test CUPRAC.....	151
3. Test statistique de corrélation.....	152
4. Discussion des résultats de l'activité antioxydante d' <i>O. floribundum</i> .....	155
<b>II. Résultats de l'évaluation des activités biologiques de l'espèce <i>D. virgatus</i>.....</b>	<b>158</b>
1. Test de piégeage du radical libre DPPH•.....	158
2. Activité antimicrobienne .....	160
3. Test d'Inhibition des enzymes cholinestérases .....	165
4. Test d'inhibition de l' enzymes α-Glucosidase.....	167
<b>Conclusion générale .....</b>	<b>169</b>
<b>Liste des références .....</b>	<b>174</b>
<b>Liste des annexes .....</b>	<b>186</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure 1: Voies de biosynthese des principaux métabolites secondaire des plantes.....	8
Figure 2 : Classification des terpènes suivant le nombre d'unité isoprene.....	13
Figure 3 : Precurseurs des terpènes.....	14
Figure 4 : Voies de Biosynthese de l'IPP et du DMPP.....	14
Figure 5: Biosynthese des differentes classes de terpénoïdes à partir de l'IPP.....	15
Figure 6: Structure chimique des sesquiterpènes.....	18
Figure 7: Structure des dérivés de phénylpropane.....	19
Figure 8: Squelette de base commun aux flavonoïdes .....	22
Figure 9: Les differentes classes de flavonoïdes .....	23
Figure 10: Schema de la biosynthese des flavonoïdes .....	24
Figure 11: Elements structuraux des flavonoïdes essentiels à leur capacite antiradicalaire.....	28
Figure 12 : Piégeage des (R•) par les flavonoïdes et la formation d'une structure stable.....	28
Figure 13: Mécanismes de l'activité antiradicalaire des flavonoïdes.....	29
Figure 14: Schéma des deux formes limites du squelette flavonoïdiques .....	33
Figure 15: Schéma de fragmentation de flavonoïde (Lutéoline).....	35
Figure 16: Schéma de fragmentation d'une flavone .....	35
Figure 17: La répartition géographique des Zip .....	39
Figure 18: Fleurs et fruits des Apiacees .....	41
Figure 19: L'ombelle des Apiacees .....	41
Figure 20: Feuilles et méricarpes de quelques espèces de <i>Daucus</i> en Algerie.....	43
Figure 21: Illustration de l'espèce <i>D. Virgatus</i> .....	44
Figure 22: Composés majoritaires d'HE de <i>D. Virgatus</i> de Tunisie.....	50
Figure 23: Structures chimiques de Daucovirgolides (1–8) isolés de <i>D. Virgatus</i> .....	51
Figure 24: Illustration de l'espèce <i>Origanum floribundum</i> Munby .....	54
Figure 25 : Schéma du protocole d'extraction des flavonoïdes.....	63
Figure 26 : Schéma de séparation sur colonne et rassemblement des fractions .....	66
Figure 27 : Schéma de fractionnement et purification des sous fractions issues de l'extrait CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ...	67
Figure 28 : Isolement et purification des flavonoïdes de l'extrait CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> .....	68
Figure 29 : Isolement et purification des flavonoïdes de l'extrait AcOEt.....	70
Figure 30 : Réaction du flavonoïde avec le réactif NaOH.....	71
Figure 31 : Réaction du flavonoïde avec le réactif AlCl <sub>3</sub> et AlCl <sub>3</sub> + HCl .....	72
Figure 32 : Reaction du flavonoïde avec le réactif NaOAc et NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	72
Figure 33 : Schémas illustratifs pour l'interprétation de l'analyse spectrale UV-Vis.....	73
Figure 34 : Mécanisme d'inhibition de L'acétylcholinestérase.....	82
Figure 35 : Mécanisme chimique de la méthode d'Ellman.....	83
Figure 36 : Spectre UV et profil HPLC des composés isolés AB <sub>1</sub> (1) et E <sub>11</sub> (2) <b>ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.</b>	83
Figure 37 : Résultat de l'analyse HPLC/DAD/MS-ESI <sup>+</sup> de la fraction E <sub>11</sub> .....	96
Figure 38 : Spectre RMN <sup>1</sup> H de La Fraction E <sub>11</sub> .....	97
Figure 39 : Spectre RMN <sup>1</sup> H de la fraction AB <sub>1</sub> .....	99
Figure 40 : Spectre RMN <sup>1</sup> H de la fraction AB <sub>1</sub> (Avec Agrandissement).....	100
Figure 41 : Carte RMN bidimensionnelle «COSY» .....	100
Figure 42 : Carte RMN bidimensionnelle «HSQC» .....	101
Figure 43 : Schéma de fragmentation de la 5,6 -Di-OH-7,3',4'-tri-Ome flavone .....	103
Figure 44 : Spectres de masse HR-APCI-MS1 (+) de la fraction D <sub>11/1</sub> .....	103
Figure 45 : Spectres de masse HR-APCI-MS2 (+) de la fraction D <sub>11/1</sub> .....	104
Figure 46 : Série Spectrale UV-Visible de la fraction F10/11 .....	106
Figure 47 : Serie Spectrale UV-Visible de la fraction F531/2 .....	108
Figure 48 : Chromatogramme (Tic) de HPLC-APCI-QToF-MS/MS (+) de l'extrait CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> .....	109
Figure 49 : Schémade fragmentations de la cirsimaritin .....	111
Figure 50 : Spectres de masse HR-APCI-MS1 (+) de cirsimaritin.....	111
Figure 51 : Spectres de masse HR-APCI-MS2 (+) de cirsimaritin.....	112

Figure 52 : Schéma de fragmentations de dihydrokämpferol .....	113
Figure 53 : Spectre de masse MS1 en mode positif ( $[M+H]^+=289$ ) de dihydrokaempferol.....	113
Figure 54 : Spectre de masse MS1 en mode négatif ( $[M-H]^-=287$ ) de dihydrokaempferol.....	114
Figure 55 : Spectre de masse MS2 en mode négatif de dihydrokaempferol.....	114
Figure 56 : Chromatogramme (Tic) de HPLC-APCI-QToF-MS/MS (+) de l'extrait <i>n</i> -BuOH.....	115
Figure 57 : Chromatogramme (Tic) de HPLC-APCI-QToF-MS/MS (-) de l'extrait <i>n</i> -BuOH .....	116
Figure 58 : Schéma de fragmentations de la vicénine-2.....	118
Figure 59 : Spectre de masse MS1(+), MS1(-) et MS2(-) de la vicénine-2.....	120
Figure 60 : Schéma de fragmentations de la flavone prényle .....	122
Figure 61 : Spectres MS1(+), MS1(-) et MS2 (-) de flavone Prényle.....	123
Figure 62 : Chromatogramme (Tic) de HPLC-APCI-QToF-MS/MS (-) de l'extrait AcOEt.....	124
Figure 63 : Schéma de fragmentations de l'acide rosmarinique.....	125
Figure 64 : Spectres MS1 (+), MS1 (-) et MS2 (-) de l'acide rosmarinique.....	126
Figure 65 : Schéma de fragmentations du méthyl ester de l'acide rosmarinique.....	127
Figure 66 : Spectres MS1 et MS2 en mode négatif du méthyl ester de l'acide rosmarinique .....	128
Figure 67 : Schéma de fragmentation de la rhododendrine .....	129
Figure 68 : Spectres MS1(-), MS1(+) Et MS2 (-) de la rhododendrine .....	130
Figure 69 : Schéma de fragmentation de l'acide salvianolique C.....	131
Figure 70 : Spectres MS1(-), MS1(+) et MS2 (-) de l'acide salvianolique C.....	132
Figure 71 : Chromatogramme GC-MS de HE de <i>D. virgatus</i> .....	140
Figure 72 : Structures chimiques des composés majoritaires de l'HE de <i>D. virgatus</i> .....	142
Figure 73 : Teneurs en polyphénols totaux et flavonoïdes des trois extraits étudiés .....	145
Figure 74 : Capacité antioxydante des extraits étudiés et standards par le test DPPH.....	148
Figure 75 : Capacité antioxydante des extraits étudiés et standards par le test ABTS.....	150
Figure 76 : Capacité antioxydante des extraits étudiés et standards par le test du pouvoir réducteur .	151
Figure 77 : Capacité antioxydante des extraits étudiés et standards par le test Cuprac.....	152
Figure 78 : Corrélation entre la teneur totale en phénols (TPC), la teneur totale en flavonoïdes (TFC) et l'activité antioxydante des trois extraits d' <i>O. floribundum</i> .....	153
Figure 79: Effet de piégeage du DPPH de l'HE de <i>D. virgatus</i> (A) et du contrôle positif BHT (B) ..	159
Figure 80: Comparaison des diamètres d'inhibition de l'HE de <i>D. virgatus</i> .....	162
Figure 81 : CMI de HE <i>D. virgatus</i> obtenus contre toutes les souches microbiennes .....	163
Figure 82: Profil de pourcentage d'inhibition des enzymes AChE et BuChE par HE de <i>D. virgatus</i> et Galantamine. ....	166
Figure 83 : Profil de pourcentage d'inhibition de l'enzymes $\alpha$ -Glucosidase par L'HE de <i>D. virgatus</i> et Acarbose .....	167

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Diversité des monoterpènes.....	17
Tableau 2: Structure à partir de la fluorescence sous lumière de Wood.....	31
Tableau 3: Relation entre $R_f$ et structure flavonique.....	32
Tableau 4: Bandes d'absorption en UV-Visible de différents types de flavonoïdes.....	33
Tableau 5: Déplacement chimique et multiplicité des protons du noyau A.....	36
Tableau 6: déplacement chimique et multiplicité des protons du noyau B .....	37
Tableau 7: Composition chimique des huiles essentielles des espèces appartenant au genre <i>Daucus</i> ...	46
Tableau 8: Principaux flavonoïdes et acides phénoliques contenus dans différentes espèces d'origan	56
Tableau 9: Réactifs spécifiques et réactions de caractérisation du criblage phytochimique.....	61
Tableau 10: Résultats de séparation par chromatographie sur colonne de gel de silice de l'extrait dichlorométhane .....	65
Tableau 11 : Fractions Collectées de la colonne de séparation de l'extrait AcOEt.....	69
Tableau 12 : Liste et caractéristiques des souches microbiennes testées.....	80
Tableau 13 : Criblage phytochimique de l'espèce <i>O. floribundum</i> .....	87
Tableau 14 : Caractéristiques des extraits de la plante étudiée .....	88
Tableau 15 : Données de CCM analytique des fractions isolées de l'extrait $CH_2Cl_2$ .....	91
Tableau 16 : Données de CCM analytique des fractions isolées de l'extrait AcOEt.....	92
Tableau 17 : Produits Détectés et identifiés dans les trois extraits par analyse LC-DAD-MS/MS....	134
Tableau 18 : Composition chimique de l'HE de <i>D. virgatus</i> analysée par GC-MS.....	141
Tableau 19 : Teneurs des Phénols totaux et flavonoïdes dans les trois extraits.....	143
Tableau 20 : Potentiel antioxydant et Anti-radicalaires des différents extraits d' <i>O. floribundum</i> ....	146
Tableau 21 : Effet anti-radicalaire de l'HE de <i>D. virgatus</i> .....	159
Tableau 22 : Activité antimicrobienne de l'HE <i>D. virgatus</i> contre les souches microbiennes testées	161
Tableau 23 : Effet inhibiteur de l'HE <i>D. virgatus</i> sur les enzymes (AChE) et (BuChE).....	165
Tableau 24 : Effet inhibiteur de l'HE <i>D. virgatus</i> et Acarbose sur l'enzyme $\alpha$ -Glucosidase.....	168

## LISTE DES ABREVIATIONS

**ABTS** : Acide 2,2'-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique

**AcOH** : Acide acétique

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**BHA** : Butyl Hydroxy Anisole

**BHT** : Butyl Hydroxy Toluene

**C-18** : Diméthyl octadécyl silane (phase inverse)

**CC** : Chromatographie liquide sur colonne ouverte

**CCM** : Chromatographie sur couche mince

**CFU** : Colony Forming Units

**CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>** : Dichlorométhane

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

**COSY** : COrrélation SpectroscopY

**GC** : Gas Chromatography

**CUPRAC** : Capacité antioxydante par réduction de cuivre

**DAD** : Diode Array Detector

**d** : Doublet

**(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO** : Acétone deutérée

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde

**EAG** : Équivalent en acide gallique

**EDTA** : Ethylenediamine Tetraacetic Acid

**EI** : Electronic Impact

**ERO** : Espèces réactives de l'oxygène

**ESI** : Electrospray Ionization

**EtOAc** : Acétate d'éthyle

**FRAP** : Ferric Ion Reducing Antioxidant Parameter

**GC** : Gas Chromatography

**HE: Huile Essentielle**

**HPLC** : High Performance Liquid Chromatography

**HRMS** : High Resolution Mass Spectrometry

**HSQC** : Heteronuclear Single Quantum Correlation

**Hz** : Hertz

**2J** : Constante de couplage entre atomes séparés par 2 liaisons

**3J** : Constante de couplage entre atomes séparés par 3 liaisons

**4J** : Constante de couplage entre atomes séparés par 4 liaisons  
**LC/MS** : Chromatographie Liquide couplée à la spectrométrie de masse  
**m** : Multiplet  
**MeOH** : Méthanol  
**MS<sup>n</sup>** : Spectrométrie de masse en n étapes  
ppm : Partie par million  
**q** : Quadruplet  
**RI** : Indice de rétention  
**RMN** : Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire  
**ROO·** : Radical peroxy  
**RP-HPLC** : Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography  
**s** : Singulet  
**sh.** : Épaulement  
**sp.** : Espèce  
**ssp.** : Sous-espèce  
**t** : Triplet  
**TOF** : Time of Flight

## INTRODUCTION GENERALE

Les molécules d'origine naturelle ont toujours été une source historique et traditionnelle pour la découverte de nouveaux composés bioactifs <sup>(1)</sup>. Malgré les avancées de la chimie de synthèse et de la chimie combinatoire, les plantes conservent leur importance <sup>(2)</sup>. Et c'est ainsi que la phytochimie, en tant que discipline distincte s'est développée ces dernières années.

Les plantes constituent la principale source de médicaments en raison de la richesse de leurs produits du métabolisme secondaire, tels que les terpénoïdes, les polyphénols et les alcaloïdes <sup>(3)</sup>. Ces molécules, souvent complexes sur le plan chimique, ne sont pas produites directement lors de la photosynthèse, mais résultent de réactions chimiques ultérieures. Il est bien établi que les produits naturels présentent une variété de structures chimiques, une diversité moléculaire et une fonctionnalité biologique qui sont essentielles pour la découverte de médicaments et ainsi répondre aux nouvelles cibles thérapeutiques découvertes<sup>(4)</sup>.

Aujourd'hui, la valorisation des ressources naturelles et la recherche de nouvelles molécules à visée thérapeutique sont de plus en plus importantes. De nombreuses sociétés pharmaceutiques, en collaboration avec des centres de recherche, élargissent leurs programmes de recherche en criblant les produits naturels <sup>(5)</sup>. Ces recherches visent à traiter des maladies pour lesquelles les traitements actuels présentent des limites, à aborder les syndromes récents qui demeurent incurables et à remplacer ou potentialiser les molécules devenues inefficaces en raison du développement de souches résistantes à la thérapie <sup>(6,7)</sup>.

La flore algérienne se distingue par sa biodiversité et sa chimiodiversité. Le Tell littoral, en particulier, est une zone d'intérêt majeur en raison de sa richesse biologique et de son endémisme élevé<sup>(8)</sup>. Compte tenu du fait que la plupart de ces plantes n'ont été que superficiellement étudiées, la flore algérienne représente une source prometteuse pour la découverte de nouvelles molécules à des fins thérapeutiques<sup>(9)</sup>. En effet, les études ethnobotaniques et ethnopharmacologiques peuvent guider les chercheurs à découvrir de nouvelles espèces de plantes dignes d'une investigation phytochimique approfondie<sup>(3)</sup>.

Dans ce travail, on se propose de faire des investigations phytochimiques et biologique de deux plantes endémiques d'Algérie, *Daucus virgatus* (Poir.) Maire (Apiacées) et *Origanum floribundum* Munby (Lamiacées), Ce travail a recours à des techniques chromatographiques dont le choix dépend de la nature des composés à séparer. Il nécessite la mise au point de méthodologies d'isolement, de purification, d'identification et de caractérisation des constituants présents dans les plantes.

Le choix de ces plantes a été guidé par leurs indications d'usage traditionnel et par le fait qu'elles n'ont fait l'objet que de très peu d'investigations phytochimiques et biologiques. Leurs appartenances aux familles de plantes Apiacées et Lamiacées très connues pour leurs grandes potentialités métaboliques pour les huiles essentielles d'où le nom de plantes aromatiques. Beaucoup d'espèces de plantes appartenant à la famille des Lamiacées se trouvent être une source non négligeable sinon très importante de composés terpéniques mais aussi de composés flavonoidiques surtout sous leur forme aglyconique où les formes polyméthoxylées d'entre elles sont très abondantes.

Cette thèse vise à valoriser et à développer la recherche sur les ressources naturelles pour mieux comprendre les plantes aromatiques et médicinales d'Algérie. L'objectif est de rechercher et d'isoler des substances actives d'origine végétale, qu'il s'agisse de molécules pures comme les flavonoïdes ou d'extraits d'huiles essentielles, présentant un potentiel pour le développement de nouveaux traitements contre les maladies infectieuses, inflammatoires et le stress oxydatif, une cause majeure de maladies chroniques telles que le diabète, le cancer, les maladies neurodégénératives <sup>(8)</sup>. Ils représentent une alternative aux antioxydants de synthèse, dont l'utilisation dans les domaines agroalimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques a été critiquée en raison de leurs effets tératogènes, mutagènes et cancérigènes à long terme <sup>(10)</sup>.

Dans cette perspective, le premier volet de ce travail consiste en une étude phytochimique approfondie d'*O. floribundum*, avec pour objectif l'isolement des flavonoïdes et la caractérisation des extraits par dérégulation, ainsi que l'élucidation structurale des molécules isolées par des techniques spectroscopiques (UV-Vis, LC.MS/MS et RMN). En parallèle, la corrélation entre le contenu en flavonoïdes, polyphénols totaux et l'activité antioxydante des différents extraits a été explorée.

Le second volet de ce travail consiste à élucider la composition chimique de l'huile essentielle extraite de la plante *D. virgatus*, en utilisant l'analyse GC/MS pour en garantir la qualité et mettre en évidence d'éventuelles spécificités. Les propriétés biologiques de cette huile essentielle, notamment ses effets antimicrobiens, antioxydants in vitro sont également étudiées. De plus, pour la première fois, l'effet de l'huile essentielle de *D. virgatus* sur l'inhibition des enzymes cholinestérases fortement impliquées dans la maladie d'Alzheimer, ainsi que l'inhibition de l'enzyme  $\alpha$ -glucosidase impliqué dans l'hyperglycémie post-prandiale chez les patients diabétiques est exploré.

Pour rendre compte de cette démarche scientifique, ce manuscrit est divisé en deux parties. La première partie concerne une revue bibliographique qui aborde la chimie des substances naturelles, des généralités sur les huiles essentielles et les flavonoïdes, les données

botaniques et pharmacologiques des plantes étudiées, ainsi que les travaux antérieurs effectués sur ces espèces. La deuxième partie du manuscrit présente le matériel et méthodes utilisés lors de l'étude expérimentale, divisés en deux grands chapitres à savoir l'étude phytochimique et biologique. Cette partie englobe les méthodes d'extraction et d'isolement des molécules d'intérêt, les méthodes de caractérisation et d'élucidation structurale ainsi que les méthodes utilisées pour l'évaluation des activités biologiques. La troisième partie concerne la présentation des résultats obtenus en matière d'étude chimique ou biologique et leurs discussions. Enfin, une conclusion générale qui résume l'ensemble des protocoles utilisés ainsi que les résultats essentiels obtenus et met en lumière les perspectives futures de recherche dans ce domaine.

# **PARTIE I**

## **REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **I. Les plantes comme sources de molécules bioactives**

L'intérêt des êtres humains pour les plantes et leur utilisation en médecine remonte à des temps bien antérieurs à l'émergence de la pharmacognosie en tant que discipline scientifique. Les connaissances empiriques accumulées au fil des millénaires ont permis de sélectionner des plantes pour traiter diverses maladies. Certains de ces usages ancestraux sont aujourd'hui confirmés par des études scientifiques et ont conduit à l'isolement de nouveaux principes actifs et/ou à la commercialisation de médicaments à base de plantes ou d'extraits standardisés.

### **I.1. Naissance de la chimie des substances naturelles**

Le terme "phytochimie" est apparu pour la première fois en 1815 dans la littérature et s'est rapidement répandu avec l'essor de la discipline. Par ailleurs, la pharmacognosie a émergé en tant que discipline distincte à cette époque, définie pour la première fois par Schmidt <sup>(11)</sup>. Elle se concentre sur l'étude de la composition et des effets des principes actifs contenus dans les matières premières d'origine naturelle, dans le but de rechercher de nouvelles substances médicamenteuses. En 1818, la première pharmacopée française, le "*Codex medicamentarius seu Pharmacopae gallica*" <sup>(12)</sup>, a été publiée, et en 1821, Megendie a publié un formulaire médical contenant uniquement une liste de substances pures, ouvrant ainsi la voie au remplacement des remèdes phytothérapeutiques par des molécules isolées <sup>(13)</sup>. Les essais pharmacologiques et l'étude des relations structure-activité ont été introduits par Claude Bernard à l'époque de la médecine moderne. Les progrès de la chimie structurale, combinés aux avancées technologiques et à la naissance de techniques spectroscopiques performantes (UV, IR, RX, MS, RMN), ont permis l'identification et la caractérisation des substances actives présentes dans les extraits végétaux, ainsi que l'émergence progressive de la notion de principe actif, dont l'isolement comporte souvent de multiples étapes complexes et l'élucidation structurale peut être parfois difficile.

### **I.2. Développement de médicaments à base de plantes**

La nature représente une source inépuisable de molécules dotées d'activité biologique, que les chimistes peuvent modifier pour développer de nouveaux médicaments. En fin de compte, c'est l'utilisation d'essais biologiques couvrant un large spectre qui permet de sélectionner parmi la diversité infinie des espèces celles qui sont actives. Des processus innovants se sont développés à cet égard, et la recherche poussée dans le secteur

pharmaceutique se concentre sur le développement de nouveaux médicaments à base de plantes. Les médicaments résulteront d'une combinaison d'approches de recherche axées sur les produits naturels et la synthèse. Aujourd'hui, le développement de nouveaux médicaments à partir des plantes peut suivre les étapes suivantes <sup>(14)</sup>:

- Criblage de composés naturels pour leur activité biologique.
- Fractionnement des extraits de plantes guidé par des essais biologiques, suivi de l'isolement et de la purification du principe actif.
- Détermination de la structure et établissement des relations structure-activité (SAR).
- Synthèse d'analogues
- Application des théories des récepteurs.
- Conception et synthèse de nouvelles structures médicamenteuses.

L'intégration de nouvelles méthodes d'identification des composés tête de série en recherche pharmaceutique, telles que le criblage à haut débit et la chimie combinatoire, a récemment accru les chances de succès dans la sélection de candidats précliniques potentiels pour des cibles réputées difficiles. Historiquement, la recherche pharmaceutique se concentrait essentiellement sur les molécules tête de série, qui correspondaient aux principes actifs isolés des plantes <sup>(15)</sup>. Une molécule "tête de série" est sélectionnée en raison de son potentiel thérapeutique élevé, de sa sélectivité envers la cible thérapeutique et de sa faible toxicité. Ensuite, elle est optimisée par des modifications structurales, impliquant la synthèse de plusieurs molécules voisines judicieusement choisies, pour établir une relation structure-activité et découvrir de nouveaux pharmacophores <sup>(14)</sup>. Les produits naturels sont devenus une composante majeure de cet effort de synthèse, avec des chimistes créant littéralement des milliers d'analogues pour améliorer ce que la nature a offert <sup>(15)</sup>.

Les plantes médicinales et aromatiques jouent un rôle essentiel dans la recherche pharmacologique et le développement de médicaments, que ce soit en utilisant directement leurs constituants comme agents thérapeutiques ou en tant que matières premières pour la synthèse de médicaments, tout en servant de modèles pour les composés pharmacologiquement actifs. En outre, ces plantes représentent une ressource naturelle précieuse, tant du point de vue de l'économie régionale que sur les plans thérapeutique et industriel.

### **I.3. Approche de sélection des plantes pour les études phytochimiques et/ou biologiques**

L'exploitation des ressources naturelles, en particulier celles du règne végétal, repose sur trois principales approches pour la sélection des plantes à des fins d'études biologiques ou phytochimiques en laboratoire: l'approche chimiotaxonomique, l'approche ethnopharmacologique et l'approche aléatoire de sélection <sup>(16)</sup>.

La chimiotaxonomie est une discipline scientifique, principalement appliquée aux végétaux, qui vise à les classer en fonction de leur composition chimique <sup>(17)</sup>. Les membres d'un même clade partagent souvent une composition en métabolites secondaires similaire. L'identification des similitudes et des différences dans la composition chimique permet de regrouper différentes plantes au sein d'une même catégorie <sup>(18)</sup>.

L'ethnopharmacologie est une discipline qui étudie les plantes médicinales sur un territoire donné, en relation avec leur utilisation empirique et la médecine traditionnelle locale<sup>(19)</sup>. L'exploitation des connaissances traditionnelles en utilisant des outils d'évaluation biologique modernes contribue à la découverte de nouveaux composés bioactifs <sup>(16)</sup>.

Dans l'approche aléatoire de sélection, des échantillons de parties de plantes sont soumis à l'extraction standard et à des essais biologiques systématiques, sans effectuer de sélection préalable en fonction de connaissances ethnobotaniques ou de données chimiotaxonomiques <sup>(17)</sup>.

En effet, l'activité biologique identifiée pour les plantes médicinales, que ce soit par des méthodes traditionnelles ou par des criblages aléatoires, est étroitement liée à la structure chimique des composés concernés, en relation avec la chimiosystématique de la plante d'origine. Il semble qu'une combinaison de ces trois approches, associée à une analyse approfondie de la littérature, soit la voie à suivre pour la découverte de plusieurs composés biologiquement actifs. "Transmises par l'expérience, validées par l'étude, multipliées par la prospection, les plantes médicinales ont conservé le prestige des plus anciens remèdes et continuent de représenter un potentiel inépuisable" <sup>(20)</sup>.

## II. Les métabolites secondaires : Principes actifs des plantes

### II.1. Les métabolites secondaires

Le métabolisme secondaire des plantes désigne la synthèse et l'identification d'un ensemble de biomolécules aux structures et aux fonctions variées, qui interviennent dans l'interaction des plantes avec leur environnement biotique et abiotique. Un grand intérêt est porté aux métabolites secondaires en raison de leur diversité moléculaire. En plus de leur stéréospécificité<sup>(21)</sup>, ils présentent un grand nombre de centres chiraux et de chénotypes. Les métabolites secondaires des plantes sont regroupés en trois catégories principales en fonction de leur origine biosynthétique <sup>(16,21)</sup>:

- Les terpénoïdes sont des dérivés du composé IPP (isopenténylpyrophosphate), qui se forment soit dans la voie de l'acide mévalonique, soit par la voie du méthylérythritol phosphate (MEP).
- Les composés phénoliques et leurs dérivés proviennent de la phénylalanine ou de la tyrosine, et ils sont synthétisés par la voie de l'acide shikimique ou par celle du malonyl CoA <sup>(22)</sup>.
- Les composés azotés ou alcaloïdes sont principalement issus de la biosynthèse à partir d'acides aminés<sup>(21)</sup>.

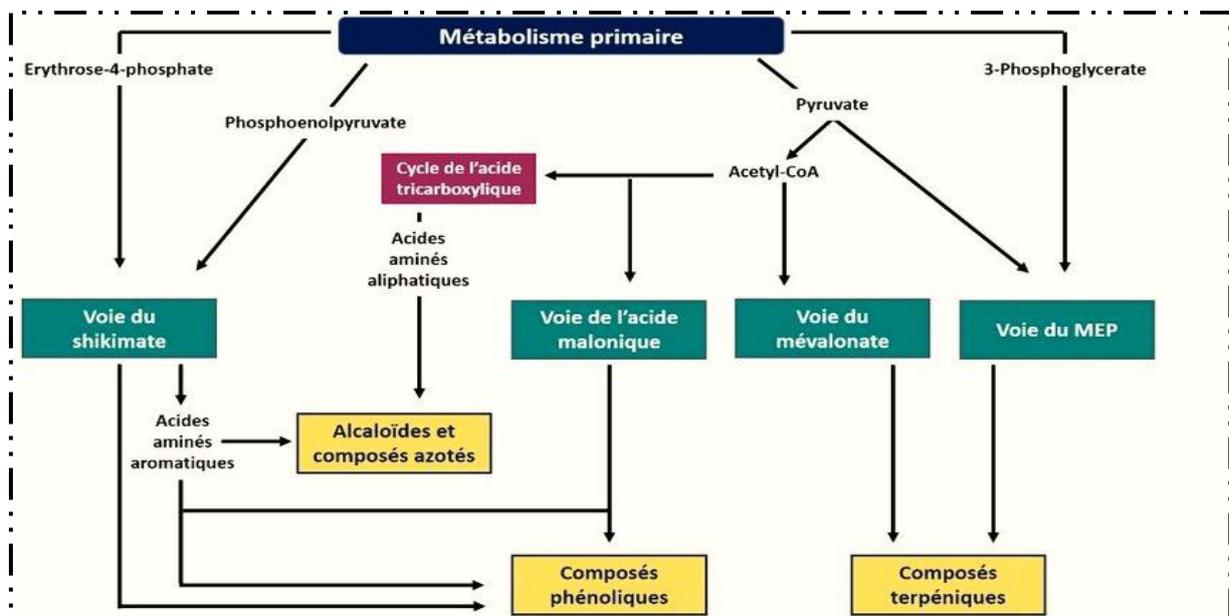


Figure 1: Voies de biosynthèse des principaux métabolites secondaires des plantes <sup>(21)</sup>

## **II.2. Les huiles essentielles**

Les huiles essentielles sont des complexes naturels de molécules volatiles et odorantes, de consistance huileuse, synthétisées par les cellules sécrétrices des plantes aromatiques. L'importance économique des HEs a considérablement augmenté ces dernières années, avec un marché en croissance constante et des domaines d'application directement liés à la consommation humaine. En effet, les HEs possèdent des vertus thérapeutiques qui les rendent adaptées à l'aromathérapie <sup>(23)</sup>. Elles agissent pour réduire l'anxiété, améliorer la mémoire, détendre le corps, soulager l'asthme, réduire l'eczéma et différents types de démangeaisons. L'aromathérapie est un moyen naturel qui aide le corps à retrouver ou à construire un meilleur système immunitaire, à restaurer une situation organique physiologique saine et à favoriser l'auto-guérison de l'organisme, qui sera alors plus fort et en pleine vitalité <sup>(24,25)</sup>.

### **II.2.1. Définition réglementaire des huiles essentielles**

Selon la pharmacopée européenne, une huile essentielle est un "produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition". Les huiles essentielles peuvent subir des traitements ultérieurs appropriés et être modifiées, notamment en étant déterpénées, désesquiterpénées, rectifiées ou privées d'un ou plusieurs constituants <sup>(26)</sup>. En aromathérapie, seules les huiles essentielles et les essences non modifiées obtenues par distillation à la vapeur d'eau ou par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des *Citrus* sont prises en compte <sup>(24)</sup>.

### **II.2.2. Rôle biologique des huiles essentielles dans les plantes**

Le rôle des huiles essentielles n'a pas encore été clairement démontré. Cependant, certains auteurs pensent que les plantes utilisent leurs HE pour repousser les insectes ou, au contraire, pour les attirer et favoriser la pollinisation. D'autres considèrent les huiles essentielles comme une source d'énergie facilitant certaines réactions chimiques. Les essences pourraient servir de source d'énergie lorsque l'activité de photosynthèse n'est plus suffisante <sup>(27)</sup>. Par ailleurs, elles contribuent à maintenir l'humidité nécessaire à la vie des plantes exposées à des climats désertiques et sont impliquées dans des processus allélopathiques et des interactions tritrophiques <sup>(28)</sup>.

### **II.2.3. Répartition et localisation des huiles essentielles**

Les huiles essentielles se trouvent principalement chez les végétaux supérieurs. Elles sont réparties dans une cinquantaine de familles, et les plantes aromatiques, riches en huiles essentielles, appartiennent le plus souvent aux familles suivantes: Lamiacées, Apiacées, Myrtacées, Pinacées, Rutacées et Lauracées <sup>(28)</sup>. Les HEs sont présentes dans différents organes végétaux producteurs, en fonction de la zone du végétal : les sommités fleuries (lavande), les racines ou les rhizomes (vétiver et gingembre), les écorces (cannelle), le bois (camphrier), les fruits (poivre) et les graines (muscade) <sup>(29)</sup>. La synthèse et l'accumulation des HEs sont associées à la présence de structures histologiques spécialisées, qui diffèrent par leur morphologie et leur distribution dans les différents organes végétaux. On peut distinguer plusieurs types de ces cellules sécrétrices <sup>(30)</sup> : les cellules sécrétrices internes, les poches sécrétrices issues de cellules sécrétrices modifiées, les canaux sécréteurs formés de poches sécrétrices allongées, les poils sécréteurs périphériques et les cellules épidermiques.

### **II.2.4. Procédés d'extraction**

Il existe plusieurs méthodes pour extraire les huiles essentielles. Seules la distillation et l'expression à froid permettent d'obtenir des huiles essentielles conformes à la pharmacopée européenne. Ainsi, les principes des techniques traditionnelles et des procédés innovants d'extraction sont cités ci-dessous.

#### **➤ Entraînement à la vapeur d'eau**

La distillation par entraînement à la vapeur est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles. L'un des principaux avantages de cette méthode est la préservation de la qualité de l'essence. De plus, le risque de dégradation par la chaleur est mieux maîtrisé. La génération de la vapeur permet de contrôler sa pression, sa quantité et sa température d'extraction, tout en limitant les phénomènes d'hydrolyse et de solubilisation de certains composés hydrosolubles comme les phénols, qui sont ainsi mieux extraits. De plus, cette technique fonctionne bien avec les HEs contenues dans les glandes situées à la surface du végétal. Cependant, la distillation à la vapeur provenant de parties non superficielles est plus longue et nécessite plus de vapeur <sup>(31)</sup>.

#### **➤ Hydrodistillation**

Le principe de l'hydrodistillation est celui de la distillation des mélanges binaires non miscibles. La distillation peut se faire avec ou sans système de recyclage de la phase aqueuse appelé cohobage. Cette méthode est simple dans son principe et ne nécessite pas un appareillage coûteux, ce qui en fait une méthode d'intérêt. Dans ce procédé, du fait que la matière première baigne dans l'eau, des transformations de l'essence peuvent survenir à haute

température et pendant plusieurs heures. Les hydrocarbures monoterpéniques acycliques et les aldéhydes ont tendance à polymériser, les esters sont en partie hydrolysés. Les phénols ainsi que d'autres composés oxygénés se dissolvent en partie dans l'eau contenue et ne sont donc pas extraits <sup>(32)</sup>.

➤ **Expression à froid**

L'extraction par expression est souvent utilisée pour extraire les huiles essentielles des agrumes. L'intérêt de cette technique réside dans l'obtention d'essence n'ayant pas subi de modification chimique liée à la chaleur <sup>(28, 32)</sup>.

➤ **Autres méthodes d'extraction**

D'autres méthodes d'obtention des extraits volatils sont adoptées, comme l'extraction par solvants et l'extraction par les corps gras (enfleurage). L'extraction sans solvant assistée par micro-ondes et l'extraction par le CO<sub>2</sub> supercritique sont deux procédés innovants dont l'utilisation se généralise. Ces deux dernières techniques constituent un bon exemple d'éco-extraction, car elles conduisent à un faible coût énergétique et un moindre impact sur l'environnement, en réduisant le temps d'extraction et la dépense énergétique par rapport à une méthode conventionnelle <sup>(33, 34)</sup>.

## **II.2.5. Critères de qualité des huiles essentielles**

Utilisées en aromathérapie, les huiles essentielles font l'objet de contrôles rigoureux visant à vérifier la présence de certains composés naturels toxiques, leur origine naturelle ou non, leur source et la présence de certains composés actifs. Cependant, la meilleure carte d'identité qualitative et quantitative d'une huile essentielle reste son profil chromatographique, le plus souvent réalisé par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS). Les critères de qualité suivants permettent d'identifier les points clés de la production d'une huile essentielle de la meilleure qualité possible <sup>(35)</sup>.

### **a- Critères liés au matériel végétal**

Il convient tout d'abord de distinguer les plantes en fonction de leur provenance, qu'elles soient cultivées ou sauvages. Il est essentiel de fournir un maximum d'informations concernant :

- La dénomination botanique scientifique et l'origine géographique.
- Le lieu et les conditions de récolte (altitude, nature du sol),
- La saison et la période du cycle végétatif de la plante,
- Les conditions de stockage, ainsi que les éventuels traitements appliqués à la plante avant l'extraction (séchage, fragmentation).

- La partie de la plante utilisée et l'organe producteur. D'autres critères de qualité se rapportent aux résidus de pesticides, à la présence de métaux lourds et à la qualité microbiologique <sup>(36)</sup>.

#### **b- Critères liés à l'huile essentielle**

Le choix du mode d'obtention et d'extraction de l'huile essentielle conditionne ses caractéristiques, notamment la viscosité, la couleur, la solubilité, la volatilité, l'enrichissement ou l'appauvrissement en certains constituants, ainsi que ses utilisations et applications. L'évaluation de la qualité des huiles essentielles s'effectue grâce à la mesure d'un certain nombre d'indices physiques (densité relative, indice de réfraction, angle de rotation optique, point de solidification, résidu d'évaporation, solubilité dans l'alcool...) et chimiques (indice d'acidité, indice d'esters, indice de peroxyde...) conformément aux référentiels comme la pharmacopée européennes, ISO<sup>(36)</sup> et AFNOR<sup>(37)</sup>.

La caractérisation des huiles essentielles joue un rôle déterminant en vue de leur utilisation<sup>(38)</sup>. Le concept de chémotype ou spécificité biochimique est capital en aromathérapie. Il indique le composant biochimique majoritaire et distinctif présent dans HE. La connaissance des chémotypes et de leur comportement est fondamentale car elle permet d'envisager l'activité pharmacologique, de prévoir la pharmacocinétique et la biodisponibilité<sup>(39)</sup>.

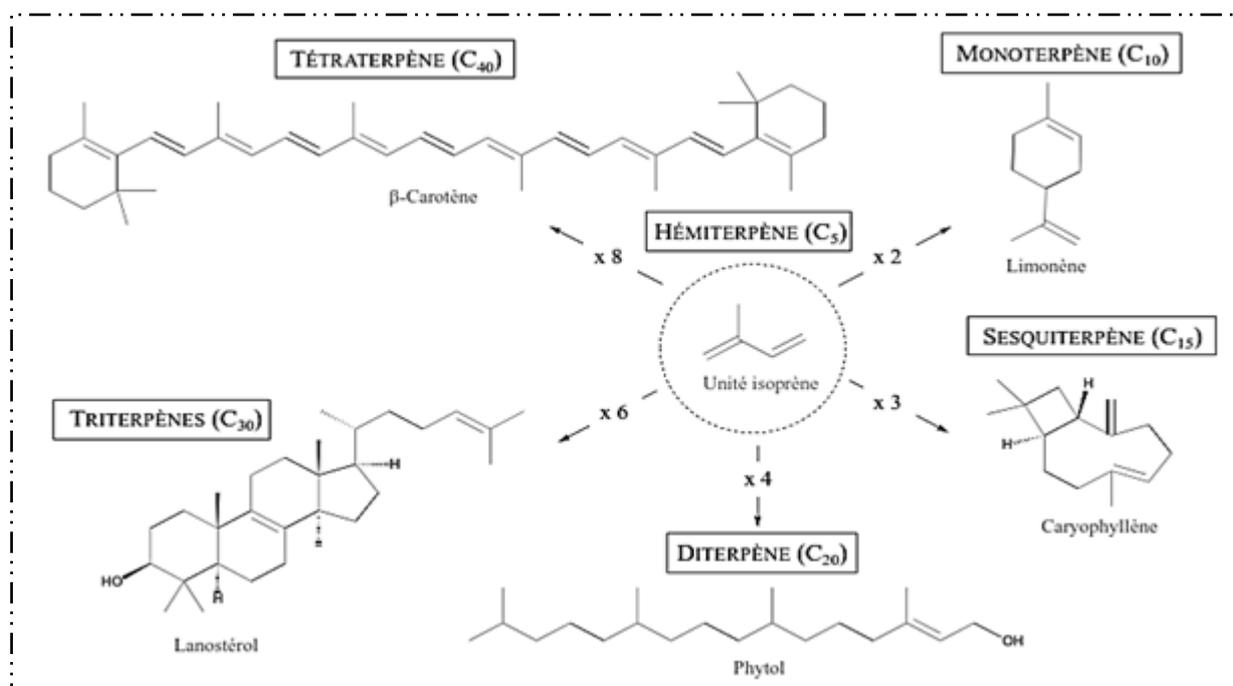
Les conditions de conservation et de stockage revêtent une grande importance, étant donné la relative instabilité des molécules constitutives des HEs. Il est essentiel de les protéger de la chaleur, de la lumière et de l'humidité. En effet, de nombreuses possibilités de dégradation existent (photo-isomérisation, photocyclisation, thermo-isomérisation, coupure oxydative, peroxydation, hydrolyse), pouvant modifier les propriétés et/ou mettre en cause l'innocuité de l'huile essentielle<sup>(40)</sup>. Il est donc nécessaire de respecter tous ces critères de qualité et d'identification afin de garantir une utilisation sécurisée des huiles essentielles.

#### **II.2.6. Composition chimique des huiles essentielles**

Les propriétés de ces huiles essentielles sont étroitement liées à leur composition chimique, d'où l'importance de la connaître avec le plus de précision possible. Les constituants de HE appartiennent principalement à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes: le groupe des terpènes et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane <sup>(41)</sup>.

### II.2.6.1. Les terpènes

Les terpènes représentent la famille biochimique la plus répandue parmi les composants des HEs. Ils sont les constituants principaux de la résine et de l'essence de térébenthine, et ils sont stockés dans les vacuoles des épines, des racines ou des feuilles (28). Bien qu'ils présentent une grande diversité de structures, tous les terpènes sont formés par la répétition d'unités isopréniques  $(C_5H_8)_n$ , ce qui constitue leur motif commun(42). La classification des composés terpéniques se base sur le nombre d'unités isoprène contenues dans leur structure chimique (Figure 2). Dans les huiles essentielles, seules les molécules de faible poids, généralement entre 10 et 20 atomes de carbone, sont présentes. Elles se composent principalement de monoterpènes, de sesquiterpènes et de diterpènes(43). Les terpènes constituent la famille la plus diversifiée de produits naturels sur les plans structurel, stéréochimique et fonctionnel, avec plus de 55000 molécules identifiées à ce jour (44).



**Figure 2** : Classification des terpènes suivant le nombre d'unité isoprène (42)

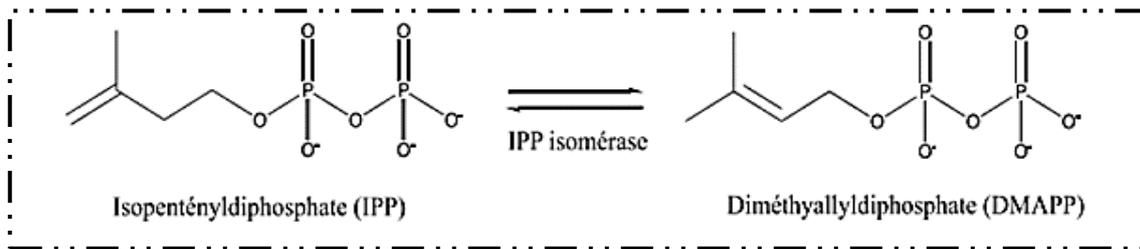
#### ➤ Propriétés pharmacologiques des terpènes

La grande diversité des structures et des fonctions des terpènes a suscité un vif intérêt pour leur utilisation en médecine traditionnelle et moderne, tant en prévention qu'en thérapie de diverses maladies. Ils sont reconnus pour leurs propriétés antifongiques, antimicrobiennes, antiparasitaires, antiseptiques, antivirales, antioxydantes, antiallergiques, antispasmodiques, anti-hyperglycémiques, anti-inflammatoires et immunomodulatrices (45). Certains terpènes sont également considérés comme des nutriments, notamment le rétinaldéhyde, le rétinol, les

caroténoïdes (vitamine A), les tocophérols (vitamine E) et les quinones et ubiquinones (vitamine K). Par exemple, le taxol, extrait de l'écorce, est utilisé comme agent anticancéreux. Il inhibe la division cellulaire en stabilisant la tubuline et le fuseau mitotique (38).

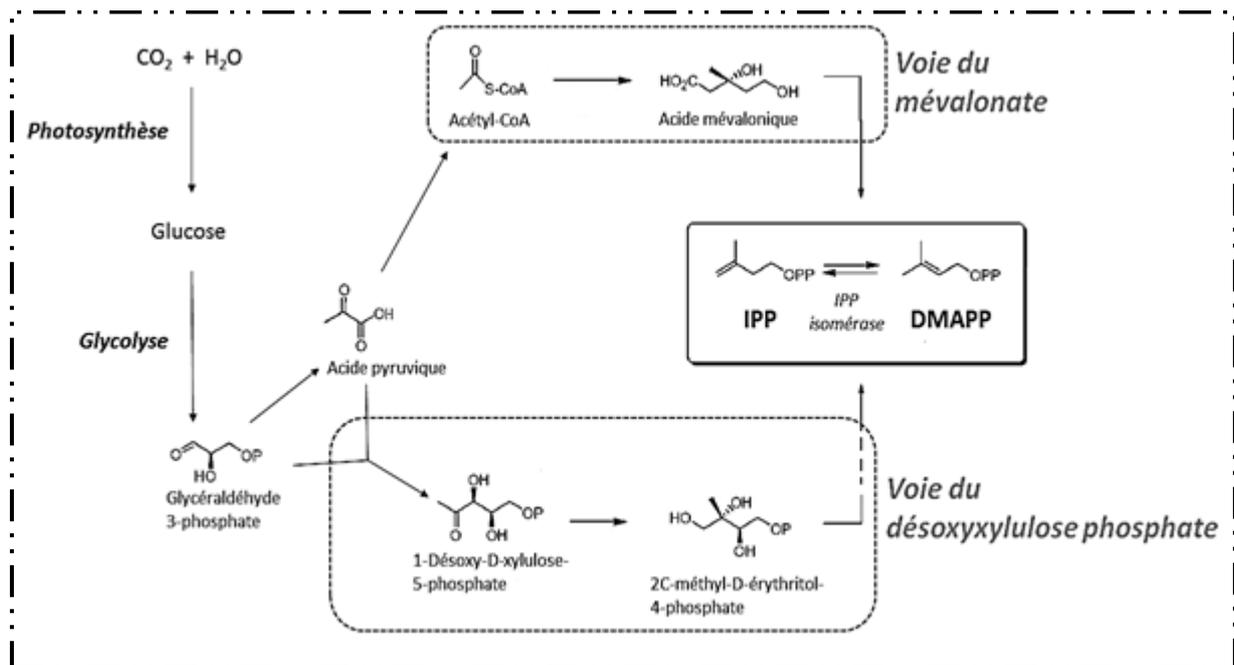
➤ **Biosynthèse des terpènes**

Tous les terpénoïdes sont dérivés de précurseurs simples, comportant cinq atomes de carbone: l'isopentényldiphosphate (IPP) et son isomère, le diméthylallyldiphosphate (DMAPP). La conversion de l'IPP en DMAPP est catalysée par l'enzyme isomérase d'isopentényldiphosphate (IPPisomérase) (Figure 3).



**Figure 3 :** Précurseurs des terpènes

Deux voies distinctes sont actuellement connues pour la biosynthèse des terpènes : la voie classique du mévalonate (MVA) et la voie du méthylérythritol phosphate (MEP), découverte ultérieurement. La voie MVA conduit principalement à la formation des sesquiterpènes, tandis que la voie MEP est responsable de la production des monoterpènes et des diterpènes (Figure 4). Ces deux voies fonctionnent dans deux compartiments subcellulaires différents : le cytosol pour la voie MVA et les plastes pour la voie MEP (46).

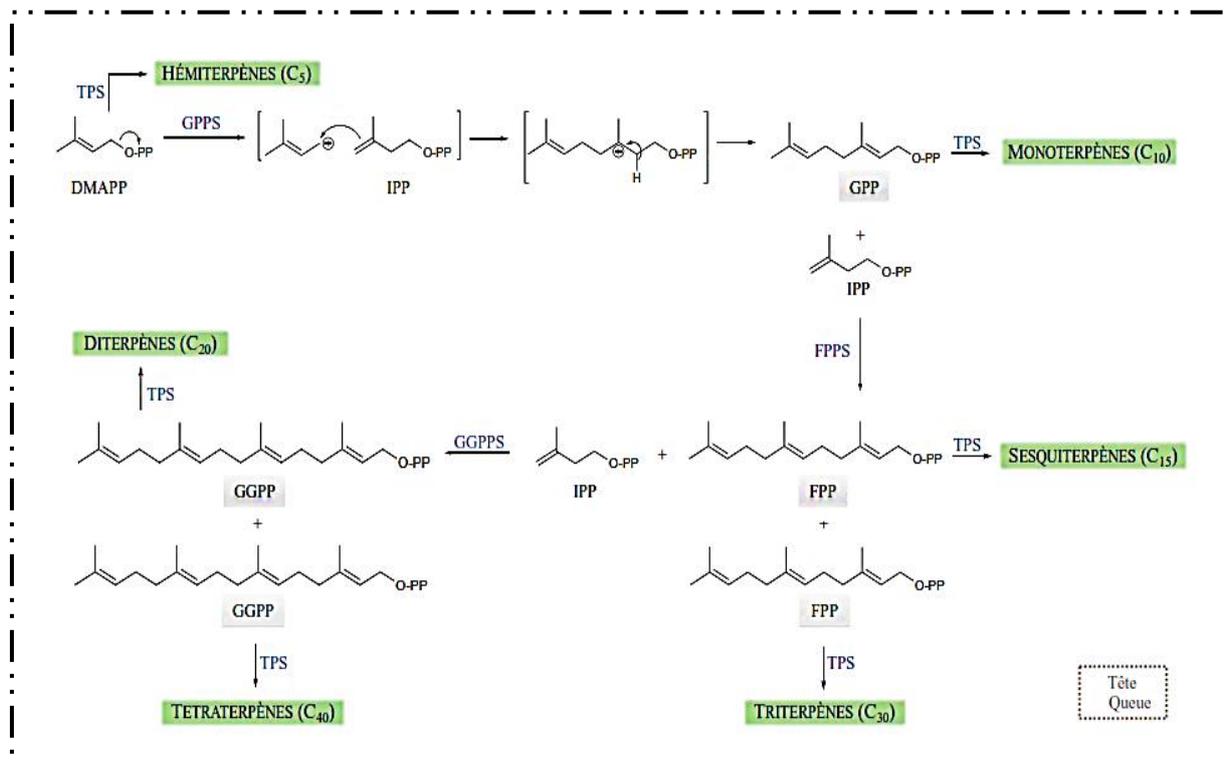


**Figure 4 :** Voies de biosynthèse de l'IPP et du DMAPP (41)

L'assemblage tête-queue de quantités variables d'IPP et de DMAPP marque la première étape de diversification des squelettes carbonés des terpènes. Cela produit des molécules diphosphate d'isoprényles alléniques de longueur croissante, qui sont ensuite transformées en différents composés terpéniques par des terpènes synthases (TPS). L'addition tête-queue s'effectue par l'attachement du carbone portant le groupement phosphate (O-PP) du DMAPP au carbone opposé de celui portant le groupement pyrophosphate de l'IPP (Figure 8). Ces réactions de condensation sont catalysées par des prényltransférases (PT) de la manière suivante :

- La GPP synthase catalyse la réaction de condensation de l'IPP avec le DMAPP pour former le géranyl diphosphate (GPP), précurseur des monoterpènes.
- La FPP synthase ajoute deux molécules d'IPP au DMAPP pour former le farnésyl diphosphate (FPP), précurseur des sesquiterpènes et des triterpènes.
- La GGPP synthase condense trois molécules d'IPP au DMAPP pour former le géranylgeranyl diphosphate (GGPP), précurseur des diterpènes et des tétraterpènes.

L'action des terpènes synthases (TPSs) sur les prényl-PP, GPP, FPP et GGPP constitue la deuxième étape de diversification des squelettes carbonés des terpènes. Ces composés sont ensuite modifiés par les TPSs pour former les monoterpènes (monoTPS), les sesquiterpènes (sesquiTPS) et les diterpènes (diTPS), respectivement (Figure 5).



**Figure 5:** Biosynthèse des différentes classes de terpènes à partir de l'IPP (47)

### **II.2.6.1.1. Les monoterpènes**

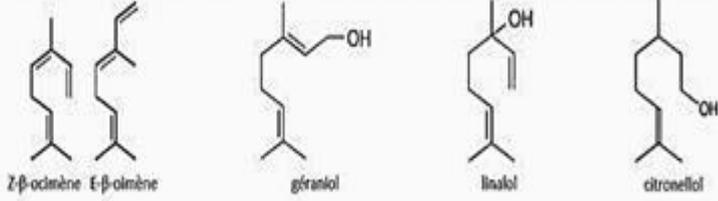
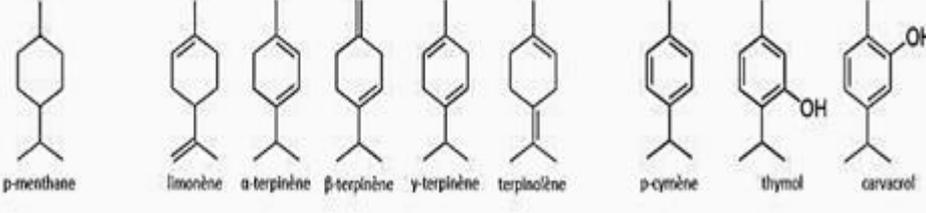
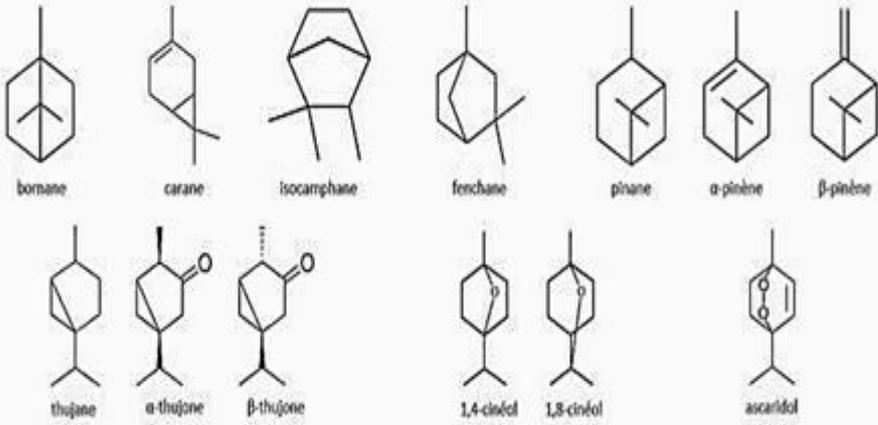
Les monoterpènes sont les principaux composants biochimiques des essences végétales et constituent les principes actifs les plus répandus dans les huiles essentielles, souvent en très grande proportion. Ces substances ont un impact significatif sur les membranes cellulaires, étant suffisamment petites pour s'insérer entre les molécules lipidiques qui constituent la membrane cellulaire. Ils peuvent même la traverser entièrement, affectant ainsi les cibles intracellulaires <sup>(41)</sup>. On trouve les monoterpènes dans plus de 2000 plantes appartenant à soixante familles différentes, chaque variété possédant une activité biologique spécifique.

Le précurseur des monoterpènes (GPP), peut subir des réactions de cyclisation et/ou de fonctionnalisation, mettant en jeu diverses enzymes spécifiques et donnant naissance à un nombre remarquable de structures monoterpéniques possibles. Les monoterpènes peuvent être acycliques, mono-, bi- voire tricycliques et peuvent donner naissance à des alcools, esters, phénols, cétones, lactones, aldéhydes ou encore à des oxydes <sup>(44)</sup>.

Les monoterpènes et leurs dérivés jouent un rôle crucial dans le développement de nouveaux composés biologiquement actifs, comme le démontrent les études sur leurs divers effets biologiques : analgésiques, anti-inflammatoires, anticonvulsifs, antidépresseurs, anti-Alzheimer, antiparkinsoniens, antiviraux et antibactériens<sup>(45)</sup>. Il a été prouvé que les monoterpénoïdes servent de molécules de base pour la synthèse de nouveaux agents thérapeutiques efficaces contre diverses maladies neurodégénératives, ainsi que certaines infections virales et bactériennes <sup>(45)</sup>.

L'intérêt pour les monoterpènes réside dans la puissance de ces composés volatils, leur structure simple, l'influence de leur configuration sur leur activité, leur synthèse aisée et leur rentabilité. Ceci suggère que les dérivés monoterpéniques représentent une source très prometteuse pour la chimie médicinale, dans la recherche de nouveaux médicaments pour traiter diverses pathologies. Ces médicaments peuvent être utilisés sous forme d'inhalateurs, à absorption systémique ou dans le cadre de l'aromathérapie. Les différentes structures de monoterpènes sont illustrées dans le tableau 1.

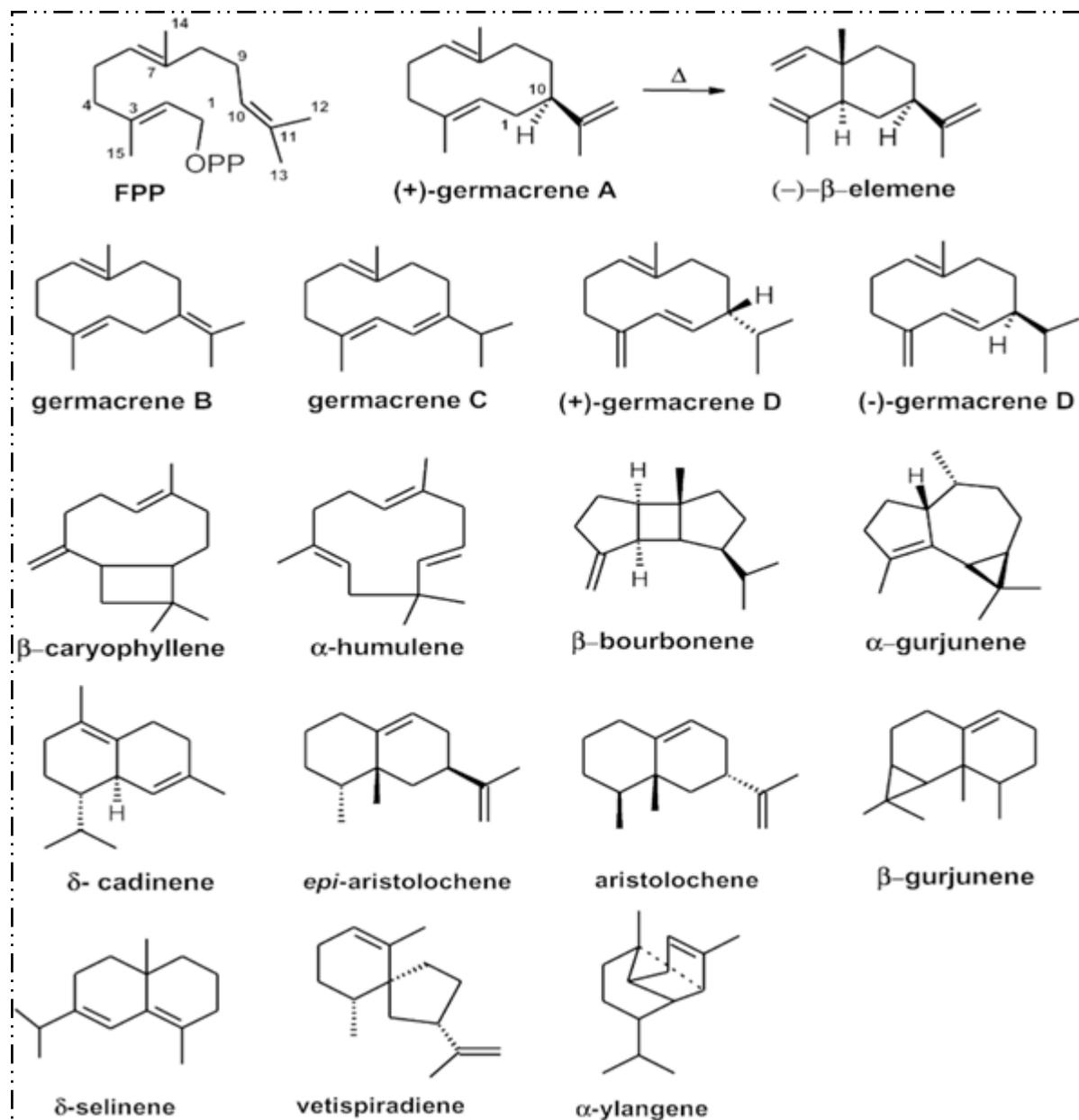
**Tableau 1:** Diversité des monoterpènes <sup>(47)</sup>

Structures acycliques	 <p>Z-<math>\beta</math>-ocimène E-<math>\beta</math>-ocimène geraniol linalol citronellol</p>
Structures monocycliques	 <p>p-menthane limonène <math>\alpha</math>-terpinène <math>\beta</math>-terpinène <math>\gamma</math>-terpinène terpinolène p-cymène thymol carvacrol</p>
Structures bicycliques	 <p>bornane carane isocamphane fenchane pinane <math>\alpha</math>-pinène <math>\beta</math>-pinène thujane <math>\alpha</math>-thujone <math>\beta</math>-thujone 1,4-cinéol 1,8-cinéol ascaridol</p>
Structures tricycliques	 <p>tricyclène</p>

### II.2.6.1.2 Les sesquiterpènes

Les sesquiterpènes constituent le deuxième groupe le plus abondant dans les huiles essentielles (HEs) après les monoterpènes. Ils forment un groupe de composés structurellement diversifiés (Figure 6), avec un précurseur, le FPP, comportant trois doubles liaisons, ce qui favorise la cyclisation et offre davantage de possibilités de variations structurelles par divers réarrangements. Plus de mille composés ont été identifiés, présentant de nombreuses configurations possibles : linéaires, ramifiées, mono-, bi- ou tricycliques <sup>(46)</sup>. Bien que les sesquiterpènes ne traversent pas aussi efficacement la membrane cellulaire que les monoterpènes, leurs structures uniques leur permettent de s'associer aux cavités des

structures protéiques tridimensionnelles, influençant l'activité protéique. Les sesquiterpènes activent divers récepteurs de surface cellulaire et sont reconnus pour leurs propriétés antimicrobiennes, antitumorales, antivirales, immunosuppressives et hormonales (48).



**Figure 6:** Structure chimique des sesquiterpènes (46)

### II.2.6.2. Les phénylpropanoïdes

Les composés aromatiques dérivés du phénylpropane sont moins fréquents dans les huiles essentielles (HE) que les monoterpènes et les sesquiterpènes. Ils peuvent comprendre des phénols (chavicol et eugénol), des aldéhydes (cinnamaldéhyde), des alcools (l'alcool cinnamique), ainsi que des dérivés méthoxy (anéthol et estragol) ou méthylène dioxy (Figure 7). Les phénylpropanoïdes sont des composés volatiles issus de la voie shikimique, un

métabolisme aboutissant à la biosynthèse de certains acides aminés aromatiques. L'acide shikimique est biosynthétisé à partir d'une série de réactions qui convertissent le phosphoénolpyruvate et l'érythrose-4-phosphate en chorismate, précurseur commun d'acides aminés aromatiques tels que la phénylalanine, le tryptophane et la tyrosine. Les métabolites terminaux, importants en thérapeutique, comprennent les acides aromatiques suivants: acides salicylique, cinnamique et benzoïque, ainsi que leurs esters. On y trouve également les coumarines. Quelques grandes familles chimiques de molécules non volatiles, telles que les tannoïdes et les flavonoïdes, sont également incluses dans cette voie (46).

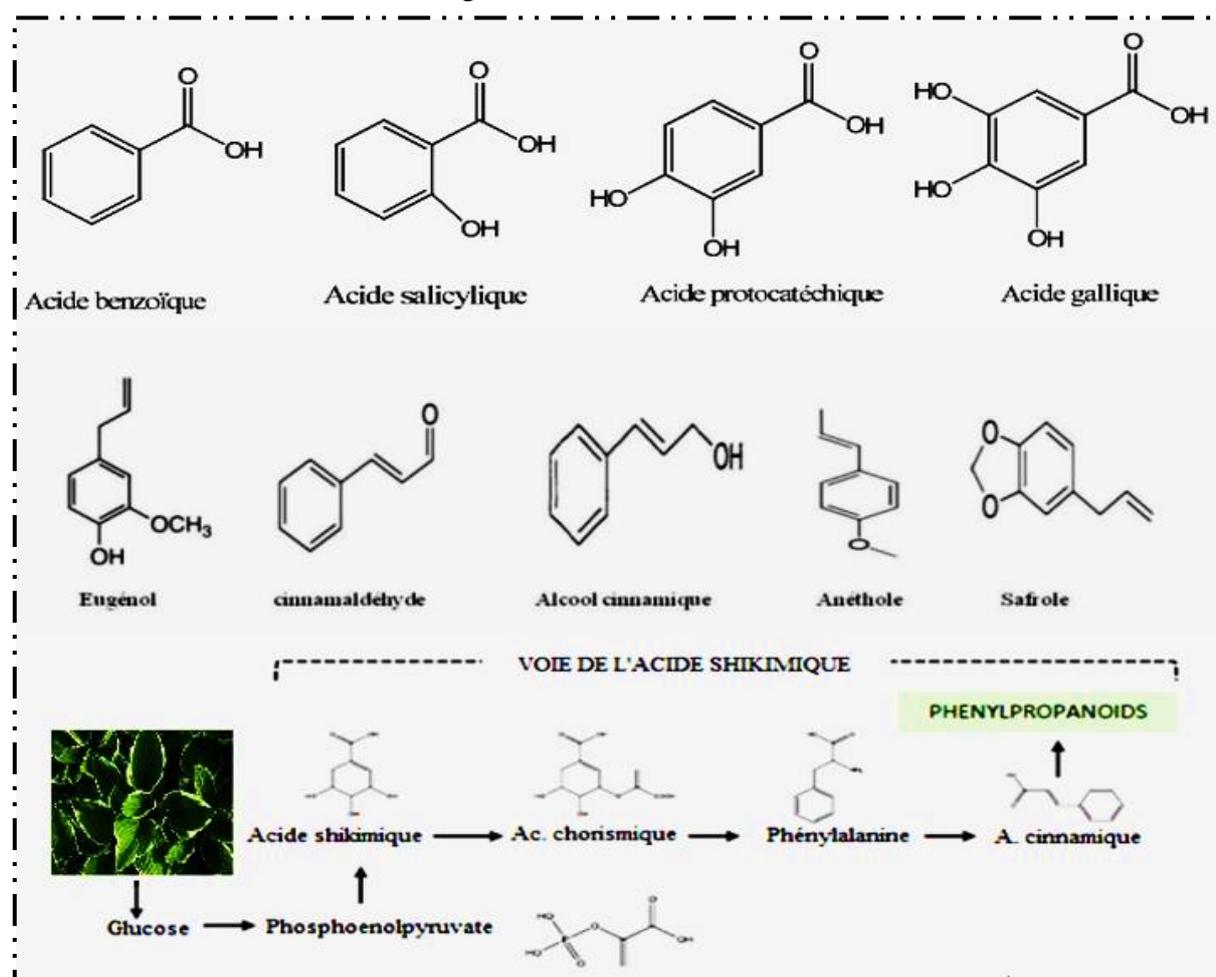


Figure 7: Structure des dérivés de phénylpropane (49)

## II.2.7. Modes d'action des huiles essentielles

Diverses études ont démontré l'efficacité thérapeutique des HEs, que ce soit par voie orale ou cutanée. D'une part, les huiles essentielles pénètrent rapidement dans la circulation sanguine, et leurs principes actifs se dirigent promptement vers les organes cibles. D'autre part, par voie d'inhalation, les molécules volatiles atteignent très rapidement le centre olfactif (28). Les huiles essentielles exercent leur activité de deux manières :

- ✚ À travers une action directe sur des récepteurs nerveux, le système sympathique et parasympathique, une fonction physiologique, biologique ou un métabolisme, ou encore par inhibition d'un microorganisme pathogène.
- ✚ À travers une action indirecte, en intervenant sur des processus biologiques et en stimulant l'immunité pour lutter contre les infections.

Les experts s'accordent sur le fait que l'efficacité des HEs provient de trois aspects, constituant le "ternaire aromatique"<sup>(28)</sup>. L'aromathérapie se distingue par son activité thérapeutique non seulement liée à la structure chimique des molécules aromatiques composant les HEs mais également à leur activité énergétique et à leur fonction informationnelle véhiculée par l'odeur. Ces trois activités agissent en synergie, conférant ainsi toute la spécificité à l'aromathérapie.

### **II.2.8. Différentes utilisations des huiles essentielles**

Les huiles essentielles (HE) sont fréquemment utilisées dans le domaine de la santé. Ce sont de véritables agents antimicrobiens, antiviraux, antifongiques. Dans les médicaments, leur fonction dépasse l'aromatisation et la production d'antiseptiques <sup>(50)</sup>. Le potentiel thérapeutique de ces composés révèle leurs bienfaits dans le traitement de diverses affections telles que le cancer, les problèmes cardiovasculaires, le diabète, et dans la lutte contre le stress oxydatif. Par ailleurs, les propriétés lipophiles des composés aromatiques permettent aux HE de pénétrer la peau, facilitant ainsi l'administration des médicaments par voie transdermique<sup>(51)</sup>. Les médicaments à base d'huiles essentielles doivent respecter la réglementation en vigueur <sup>(50)</sup>. En aromathérapie, les HE et autres extraits comme les absolues sont utilisés pour soigner, atténuer ou prévenir les infections par inhalation ou application cutanée, à travers des massages, pour le traitement du stress, des crampes (lavande), du rhumatisme (thym, basilic), de la douleur (laurier), de la circulation sanguine (menthe, lavande) <sup>(51)</sup>.

Outre leur utilisation médicale, les HEs sont employées dans divers secteurs industriels tel que l'industrie cosmétique, pharmaceutique et agroalimentaire. Par ailleurs, les HEs ont connus une utilisation potentielle en tant qu'insecticides naturels <sup>(52)</sup>. Aussi, suite aux soupçons de toxicité, d'effets tératogènes, mutagènes et cancérigènes des conservateurs synthétiques, l'utilisation des HEs en tant qu'agents conservateurs prend de l'ampleur, grâce à leurs propriétés antioxydantes et antimicrobiennes, augmentant la durée de vie des produits <sup>(53)</sup>.

## **II.3. Les flavonoïdes**

### **II.3.1. Origine des flavonoïdes**

Les flavonoïdes, connus comme étant des composés polyphénoliques, sont largement répandus dans le règne végétal. Ces composés, constituant les pigments colorés des plantes, varient du jaune au rouge, conférant à ces organismes une multitude de couleurs.

Isolés pour la première fois par E. Chervreul en 1814, les flavonoïdes n'ont été réellement révélés qu'en 1937 par le prix Nobel de Albert Szent-Györgyi. Initialement nommés "vitamine P", cette dénomination a été abandonnée après des recherches plus approfondies, pour les distinguer des vitamines<sup>(54)</sup>. En outre, ils entrent dans la composition de divers remèdes à base de plantes utilisés en médecine traditionnelle. À ce jour, les flavonoïdes forment une vaste famille de plus de 9000 composés naturels<sup>(55)</sup>. Ils sont reconnus pour leur puissant pouvoir antioxydant, mais aussi pour leurs nombreuses autres propriétés biologiques: vasculoprotectrices, anti-inflammatoires, antidiabétique, antibactériennes et antitumorales<sup>(56)</sup>.

### **II.3.2. Distribution et localisation**

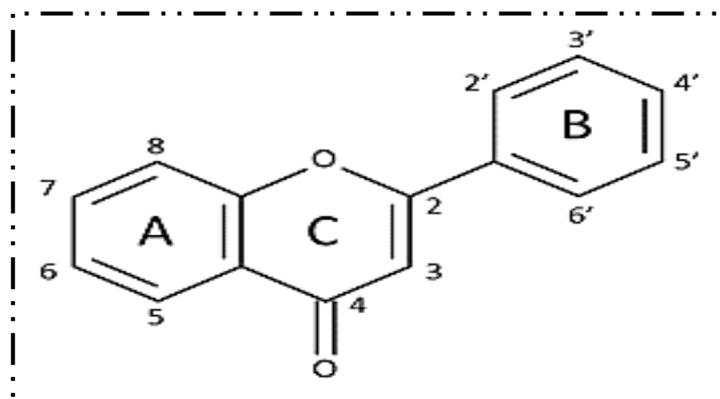
Les flavonoïdes sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs, pouvant être localisés dans divers organes : bois, tiges, racines, feuilles, fruits, graines, pollens<sup>(57)</sup>. Ils s'accumulent dans différentes parties cellulaires et tissulaires de la plante durant l'organogenèse, sous l'influence de plusieurs facteurs stimulants<sup>(58)</sup>. Au niveau cellulaire, ils sont synthétisés dans les chloroplastes, puis migrent et se dissolvent dans les vacuoles. Leur répartition montre des accumulations très localisées, généralement en relation avec une fonction physiologique ou l'interaction de la plante avec son environnement. Les flavonoïdes à localisation épidermique, comme dans le cas des fleurs, jouent un rôle d'écran contre les rayonnements solaires, tandis que ceux impliqués dans les mécanismes de défense se localisent plutôt sous l'épiderme. Les formes hétérosidiques des flavonoïdes, hydrosolubles, s'accumulent dans les vacuoles et, selon les espèces, se concentrent dans l'épiderme. Lorsqu'ils sont présents dans la cuticule foliaire, il s'agit souvent de génines libres dont la lipophilie est accrue par la méthylation partielle ou totale des groupes hydroxyles<sup>(57)</sup>.

### **II.3.3. Chimie des flavonoïdes**

#### **a- Structure chimique**

Les flavonoïdes possèdent un même squelette carboné de 15 atomes de carbone (Figure 8), constitué de deux cycles aromatiques A et B, lesquels sont reliés entre eux par une chaîne en C3, formant ainsi l'hétérocycle oxygéné C<sup>(58)</sup>. Plus de 8000 flavonoïdes ont été identifiés, tous partageant la même structure chimique de base, en raison d'une origine

biosynthétique commune. La structure des flavonoïdes est représentée selon le système C6-C3-C6, de type diphényle propane. Sur les noyaux de cette molécule, des groupements tels que hydroxyles, oxygènes, méthyles ou sucres peuvent être attachés <sup>(59)</sup>.



**Figure 8:** Squelette de base commun aux flavonoïdes <sup>(60)</sup>

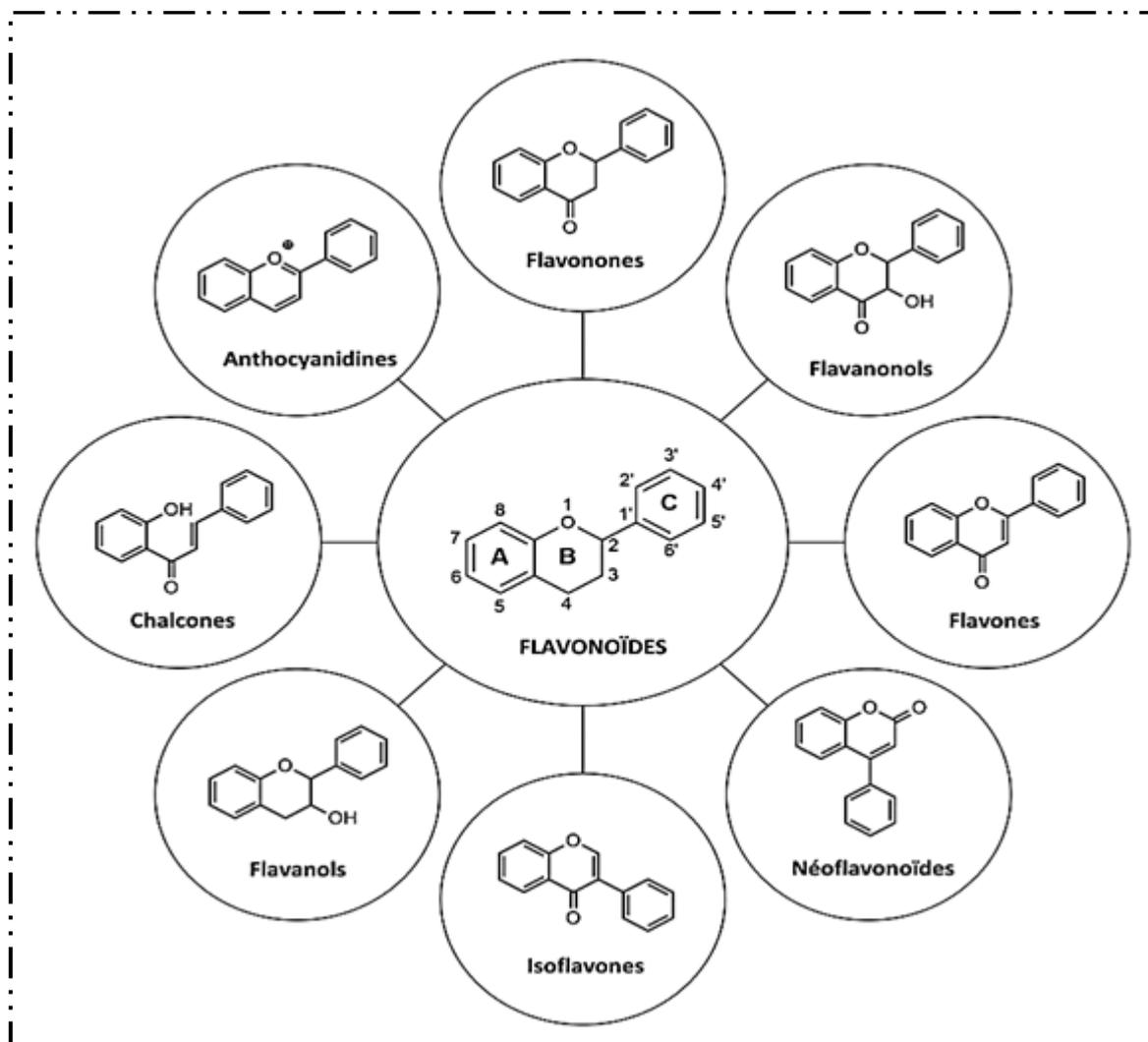
### b- Classification

Les flavonoïdes sont divisés en diverses classes (Figure 9). On distingue : les flavones, les flavonols, les flavanones, les dihydroflavonols, les flavanols, les isoflavones, les anthocyanidines et les chalcones. Ces classes se distinguent par le degré de saturation, d'oxydation et d'hydroxylation de l'hétérocycle central C, ainsi que par la position de la liaison entre les cycles B et C. Au sein d'une même classe, les structures varient en fonction du nombre, de la position et de la nature des substituants (groupements hydroxyles, méthoxyles, etc.) sur les cycles aromatiques A et B, et la chaîne en C3. Naturellement, les flavonoïdes existent souvent sous forme de glycosides, où une ou plusieurs fonctions hydroxyles sont glycosylées. La forme O-hétéroside est plus courante que la forme C-hétéroside. La partie osidique peut être simple, réduite à un monosaccharide ou un oligosaccharide, et parfois porte des groupements acyles, formant des glucuronides <sup>(59)</sup>.

### c- Processus de substitutions du squelette flavonoïque

La biosynthèse des flavonoïdes entraîne la présence fréquente d'au moins trois hydroxyles phénoliques en positions 5, 7 et 4'. Les hydroxyles OH-7 et OH-5, introduits avant la formation du noyau chalcone, sont dits originels<sup>(90)</sup>. L'hydroxylation du noyau B en position 3' survient après la formation du squelette chalcone. La méthylation peut concerner les noyaux A (carbones 5, 6, 7, 8), B (carbones 2', 3', 4', 5') et C (carbone 3) après la formation du noyau chalcone. Généralement, la liaison entre la génine et l'ose se fait surtout via l'hydroxyle en position 7 des flavones et en position 3 des flavonols, en raison de leur grande labilité. D'autres positions, notamment le 4' du cycle B, peuvent également être impliquées. Dans la forme C-hétéroside, la liaison s'établit entre le carbone anomérique de

l'ose et le carbone 6 et/ou 8 de l'aglycone. Les sucres les plus communs sont le D-glucose et le L-rhamnose (59).



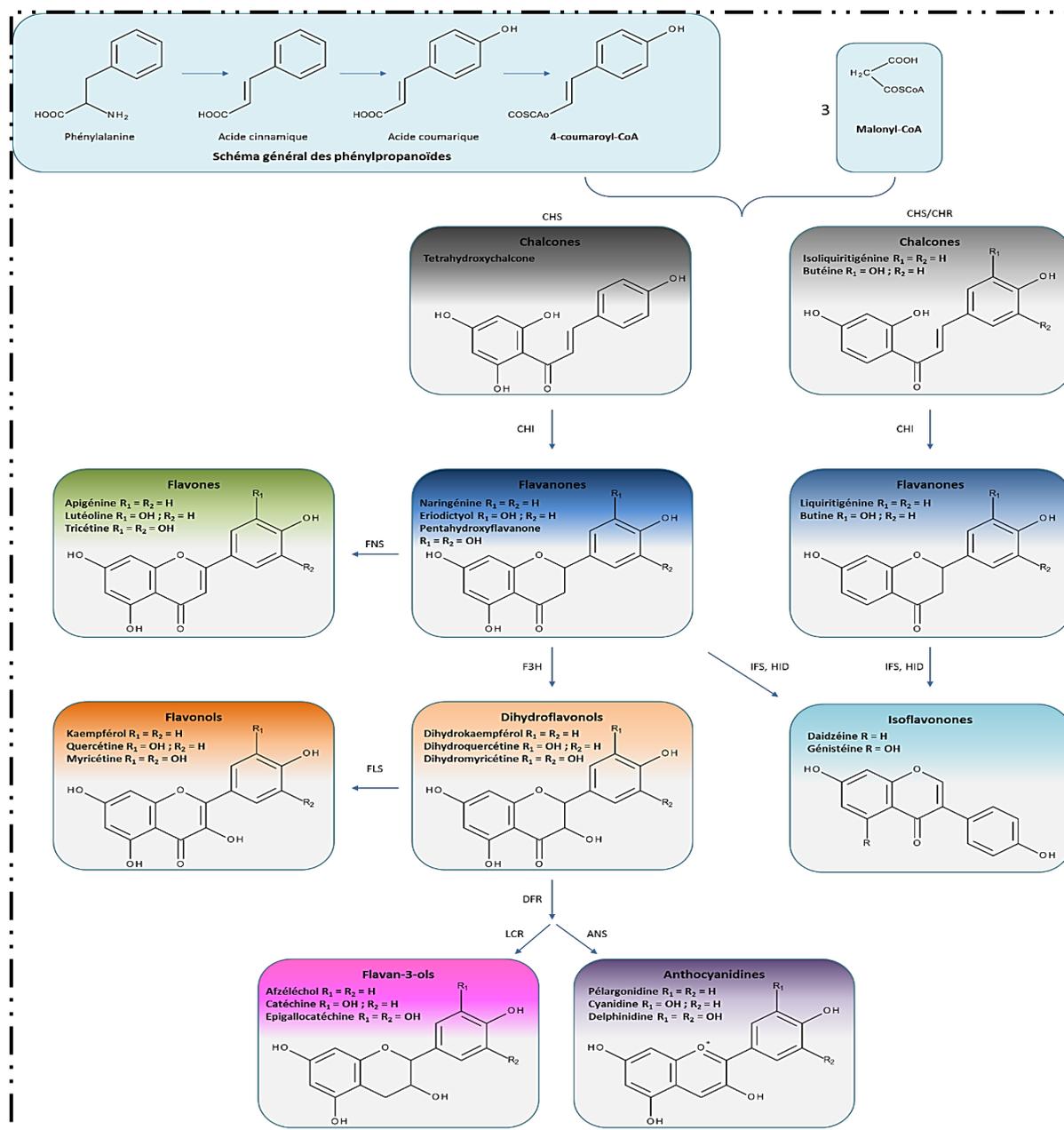
**Figure 9:** Les différentes classes de flavonoïdes

### II.3.4. Biosynthèse des flavonoïdes

La biosynthèse des flavonoïdes se fait à partir d'un précurseur commun qui est la tétrahydroxychalcone (Figure 10). Les flavonoïdes sont synthétisés via la voie des phénylpropanoïdes, transformant la phénylalanine en 4-coumaroyl-CoA<sup>(62)</sup>. Ce thioester joue un rôle clé dans la synthèse des flavonoïdes, réagissant avec 3 molécules de Malonyl-CoA. Cette réaction est catalysée par une enzyme spécifique, la chalcone synthase (CHS), qui induit une réaction enzymatique en chaîne, produisant ainsi un large éventail de flavonoïdes.

L'isomérisation des chalcones par la chalcone isomérase (CHI) conduit à la formation des flavanones. Ces derniers vont subir soit une oxydation par la flavone synthase (FS) et donnent les flavones, soit une réduction par la flavanone réductase (FNR) et donnent

des flavanols. Tandis que l'hydroxylation des flavanones par la flavanone-3-hydroxylase (F3H) donne des dihydroflavonols qui peuvent s'oxyder en flavonols par la flavonol synthase<sup>(63)</sup> (FLS). Le passage de chalcone en flavonoïde se fait par plusieurs étapes comme la méthyoxylation, la glycosylation et l'acylation.



**Figure 10:** Schéma de la biosynthèse des flavonoïdes <sup>(64)</sup>

*Enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse des flavonoïdes.* CHI: chalcone isomerase, CHS: chalcone synthase, DFR: dihydroflavonol 4-reductase, FHT: flavanone 3-hydrolase, FLS: flavonol synthase, FNS1/FNS2: flavone synthase, IFS: isoflavone synthase, LDOX: leucoanthocyanidin dioxygenase, LCR: leucoanthocyanidin reductase, (FNR, ANS, GT): chaîne enzymatique

### **II.3.5. Propriétés biologiques et thérapeutiques des flavonoïdes**

L'importance des flavonoïdes sur la santé a été démontré pour la première fois par leurs effets sur la réduction de la perméabilité des vaisseaux sanguins<sup>(65)</sup>, augmentant ainsi leurs élasticité et leurs étanchéité, ce qui renforce leurs résistance. Les flavonoïdes présentent des effets bénéfiques notables sur la santé en tant qu'antioxydants, anti-allergiques, anti-inflammatoires, anticancéreux, antiulcéreux et antibiotiques<sup>(66)</sup>. Ils contribuent à atténuer les effets du diabète et à protéger la peau contre les rayons ultraviolets en diminuant les dommages causés par le soleil <sup>(60)</sup>. Les polyméthoxyflavones (PMF) ont récemment suscité un grand intérêt en raison de leur large éventail d'activités biologiques, notamment leurs propriétés antioxydantes, antifongique, anticancérigènes et anti-inflammatoires.

#### **➤ II.3.5.a. Effets Antiviraux**

Les propriétés antivirales des flavonoïdes ont été mises en évidence par diverses études. Les travaux de Spedding et al.<sup>(57)</sup> ont révélé l'impact des flavonoïdes sur le rétrovirus VIH, responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). L'activité antivirale des flavonoïdes contre le VIH semble directement liée à leur effet sur les enzymes responsables de la réplication du virus. Une étude *in vivo* a démontré que les flavonoïdes sont capables d'interférer avec la synthèse des protéines virales, offrant ainsi une protection significative à des souris infectées par un virus, après administration quotidienne de 3-O-méthylquercétine à une dose de 20 mg/kg pendant 9 jours <sup>(58)</sup>. D'autres chercheurs <sup>(59)</sup> ont également mis en évidence une corrélation entre l'effet inhibiteur de certains flavonoïdes sur divers virus de l'herpès et leur capacité à augmenter les taux intracellulaires d'AMP cyclique dans des cellules infectées.

#### **➤ II.3.5.b. Effet anticancérigène**

De nos jours, le pouvoir anticancérigène des flavonoïdes est mis en évidence par de nombreuses études expérimentales et épidémiologiques <sup>(67)</sup>. L'étude de Conney et al. <sup>(68)</sup> sur l'administration de thé vert/noir chez des souris atteintes de tumeurs a révélé l'activité anti-tumorale des catéchines. Ces flavonoïdes ont montré leur efficacité contre différents types de cancers, tels que les cancers colorectaux, de l'estomac, des poumons et du sein <sup>(69, 70)</sup>. Par ailleurs, Wenzel et ses collaborateurs <sup>(56)</sup> ont montré que les flavones peuvent induire la mort cellulaire et l'inhibition de la croissance des cellules cancéreuses dans le cancer du côlon. Certaines études montrent que des flavonoïdes, en particulier la lutéoline, la quercétine, le kaempférol, l'apigénine et la taxifoline, inhibent de manière marquée la lipogénèse des cellules cancéreuses<sup>(58,59)</sup>. Certains flavanols, comme l'épigallocatechine-3-gallate, présentent des effets cytotoxiques sur les cellules cancéreuses de la prostate, corrélés à leur capacité à

inhiber des enzymes clés de la lipogenèse, notamment la FAS (Fatty Acid Synthase) <sup>(60)</sup>. Il a été rapporté que la nobilétine et la 5-déméthyl nobilétine inhibent la croissance cellulaire dans le neuroblastome humain.

#### ➤ **II.3.5.c. Effet protecteur vasculaire**

Une production accrue de radicaux libres de l'oxygène peut provoquer différentes pathologies, telles que l'athérosclérose. Cette dernière joue un rôle important dans le développement de maladies coronariennes ainsi que dans les accidents vasculaires cérébraux (AVC). Elle se caractérise par l'accumulation de corps gras, principalement le mauvais cholestérol, lié à la présence de lipoprotéines de basse densité (LDL) dans les artères. Une plaque d'athérome se forme, réduisant le flux sanguin et l'apport en oxygène aux organes irrigués. Des recherches suggèrent que la consommation de flavonoïdes issus de fruits et de légumes est associée à une diminution du risque de maladies cardiovasculaires et peut retarder ou prévenir l'accumulation de LDL dans les artères <sup>(71,72)</sup>. De récentes études indiquent que certains polyphénols, tels que la naringénine, la berbérine et le resvératrol, ont des effets bénéfiques sur la dyslipidémie, notamment la naringénine qui atténue l'athérosclérose et corrige la dyslipidémie. Plusieurs médicaments contenant des produits flavonoïques à base d'Hespéridine ou de Rutine sont disponibles sur le marché. Des médicaments comme Daflon®, Véliten® et Esberiven® sont considérés comme des veinotoniques et protecteurs vasculaires. Ils stimulent la circulation sanguine dans les veines et luttent contre l'altération des vaisseaux capillaires <sup>(73)</sup>.

### **II.3.6. Mécanisme d'action antioxydante des flavonoïdes**

#### **i. Processus du stress oxydant**

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre marqué entre la production des espèces réactives d'oxygène (ERO) et les mécanismes de défense et de détoxification associés. Ce déséquilibre peut résulter d'une déficience des systèmes antioxydants, de troubles de production ou de distribution, ou d'une augmentation des pro-oxydants<sup>(74)</sup>. Les ERO incluent à la fois des dérivés radicalaires de l'oxygène <sup>(76)</sup> ( $\text{OH}\cdot$ ,  $\text{O}\cdot_{2^-}$ ,  $\text{ROO}\cdot$ ,  $\text{RO}\cdot$ ) et d'autres composés non-radicalaires mais très réactifs <sup>(75)</sup> tels que les dérivés oxygénés et peroxydes ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{HOCl}$ ). En concentration anormalement élevée, les ERO causent des dommages cellulaires et sont impliquées dans diverses pathologies, comme l'athérosclérose, les maladies cardiovasculaires, le cancer, la neurodégénérescence, ainsi que dans le processus de vieillissement cellulaire <sup>(77, 78)</sup>. Pour se protéger contre les effets nocifs des radicaux libres et des espèces oxygénées réactives, l'organisme a développé des systèmes de défense qui contrôlent et, parfois, régulent la production des ERO <sup>(79)</sup>. Les antioxydants sont définis

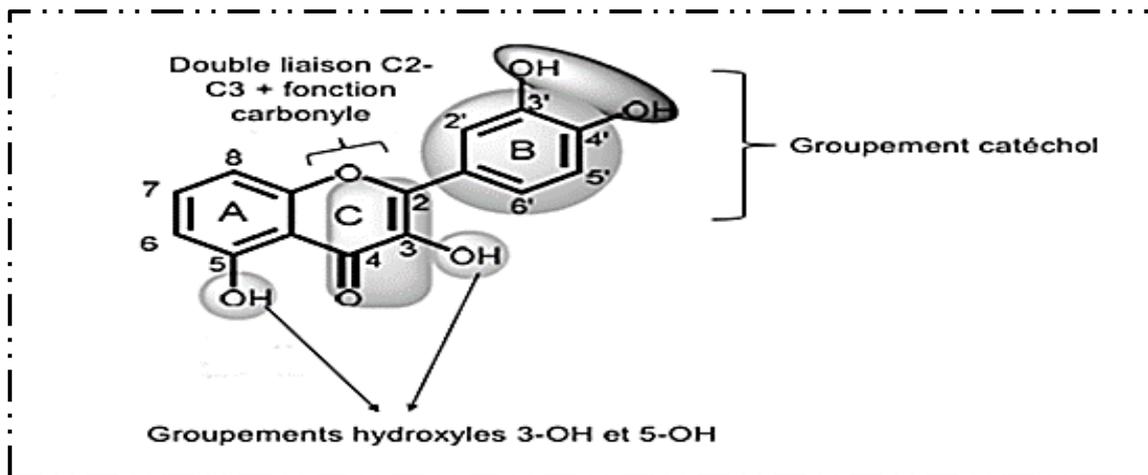
comme toute substance capable de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme, et ils contribuent à maintenir les concentrations de ERO à un niveau non cytotoxique au sein de la cellule <sup>(56)</sup>. Pour rétablir l'équilibre de la balance redox, l'organisme dispose de ses propres mécanismes de défense, principalement sous forme d'enzymes cytosoliques : superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase, glutathion transférase <sup>(79)</sup>. Il existe également des antioxydants non enzymatiques exogènes, tels que le glutathion, les vitamines C et E, les caroténoïdes, les flavonoïdes <sup>(80)</sup>.

## ii. L'effet antioxydants des flavonoïdes

Il est reconnu que la majorité des effets biologiques des flavonoïdes sont liés à leurs activité antioxydante <sup>(81)</sup>. Dans la plupart des cas, que ce soit pour des préparations brutes ou des fractions purifiées, l'action pharmacologique antioxydante des flavonoïdes peut être attribuée à trois mécanismes : la chélation des métaux de transition<sup>(84)</sup>, l'inhibition de l'activité de certaines enzymes responsables de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et, en particulier, la capture directe de radicaux libres <sup>(82)</sup>.

En effet, les flavonoïdes possèdent une structure chimique idéale qui leur confère une capacité à piéger les radicaux libres grâce à leur pouvoir réducteur (Figure 11). Ils sont ainsi considérés parmi les antioxydants les plus efficaces <sup>(83)</sup>. La propriété antiradicalaire des flavonoïdes est étroitement liée en particulier au phénomène de résonance électronique stabilisante exercé par les noyaux aromatiques, le degré d'hydroxylation, autres substitutions, conjugaisons, et degré de polymérisation <sup>(58)</sup>. Les sites responsables de ce piégeage sont <sup>(57)</sup>:

- ✓ La présence de la fonction catéchol sur le cycle B (ortho-dihydroxyphénolique du cycle B 3',4'), qui est le meilleur donneur d'hydrogène.
- ✓ La double liaison entre C2 et C3, ainsi que la fonction carbonyle à la position 4, confèrent à la molécule une délocalisation électronique stabilisante.
- ✓ La présence de groupements hydroxyle en position 3 et 5. Certaines études portant sur la relation structure-activité des flavonoïdes ont révélé, qu'en absence de la fonction catéchol sur le cycle B, le groupement hydroxyle 5-OH du cycle A est capable de compenser cette absence et assurer une meilleure activité antiradicalaire du flavonoïde<sup>(85)</sup>.



**Figure 11:** Eléments structuraux des flavonoïdes essentiels à leur capacité antiradicalaire <sup>(84)</sup>

### iii. Processus de piégeage de radicaux libres

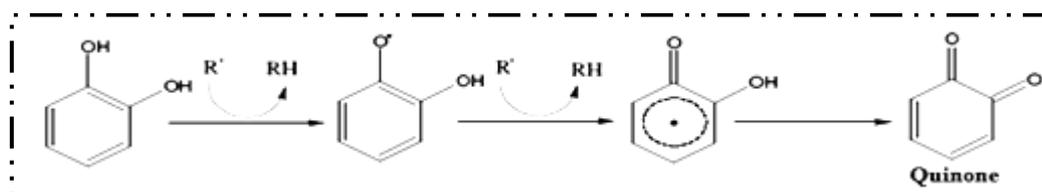
Il existe principalement deux méthodes pour mesurer l'activité antiradicalaire des flavonoïdes. La méthode HAT (Hydrogen Atom Transfer), qui consiste en un mécanisme de transfert d'un atome d'hydrogène <sup>(80)</sup>. Et la méthode SET (Single Electron Transfer), qui implique un transfert d'un électron non apparié du radical libre ( $R\cdot$ ) vers l'antioxydant <sup>(77)</sup>.

#### ❖ Mécanisme par abstraction d'un atome d'hydrogène (HAT) de l'antioxydant

De nombreuses études soutiennent le fait que l'activité antioxydante des flavonoïdes (FL-OH) est essentiellement liée à leur capacité à réduire les radicaux libres par transfert d'hydrogène, selon la réaction de piégeage suivante <sup>(54)</sup> :



Le radical flavoxyle ( $\text{FL-O}\cdot$ ) formé peut réagir avec un autre radical pour former une structure quinone stable (Figure 12).



**Figure 12:** Piégeage des ( $R\cdot$ ) par les flavonoïdes et formation d'une structure stable <sup>(81)</sup>

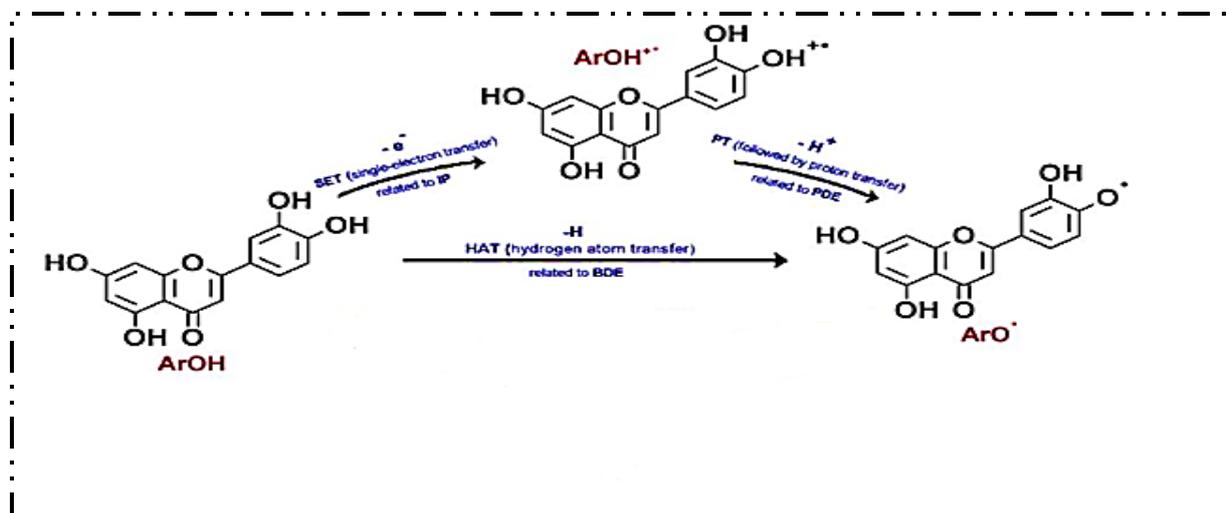
Cette réaction de piégeage produit une molécule stable (RH) et un radical flavoxyle. Ce dernier subira un changement de structure par résonance, avec une redistribution des électrons impairs sur le noyau aromatique, ce qui conduit à la formation de molécules à faible réactivité par rapport aux radicaux  $R\cdot$ . De plus, les radicaux flavoxyles peuvent interagir entre eux pour former des composés non réactifs. La réaction de couplage entre radicaux se déroule comme suit :



L'efficacité de l'antioxydant dépend de la stabilité du radical phénoxy, de son nombre de liaisons hydrogènes, ainsi que des effets de conjugaison et de résonance. L'enthalpie de dissociation de la liaison O-H constitue un paramètre essentiel pour évaluer l'activité antioxydante. En effet, plus cette liaison est faible, plus la réaction avec le radical libre sera favorisée <sup>(80)</sup>.

#### ❖ Mécanisme SET-PT (single-electron transfert followed by proton transfert)

Un transfert électronique de l'antioxydant vers le radical libre conduit à la formation d'un radical cation ( $\text{ArOH}^{+\bullet}$ ). Ensuite, un transfert d'un proton  $\text{H}^+$  aboutit à la formation d'un radical flavonoïde ( $\text{ArO}^\bullet$ ), suivi de la protonation du radical libre  $\text{R}^\bullet$  (Figure 13). Le potentiel d'ionisation est le facteur énergétique le plus significatif pour évaluer l'activité antiradicalaire. En effet, plus cette valeur est basse, plus la réaction sera favorisée <sup>(81, 82)</sup>.



**Figure 13 :** Mécanismes de l'activité antiradicalaire des flavonoïdes <sup>(85)</sup>

### II.3.7. Mode d'obtention et stratégie d'élucidation structurale des flavonoïdes

#### a- Extraction

L'extraction par macération est la méthode la plus ancienne et couramment utilisée pour extraire les composés flavoniques. Cependant, elle exige un temps de contact prolongé entre la matière végétale et le solvant afin d'obtenir une extraction optimale. C'est pourquoi d'autres méthodes alternatives ont été récemment développées, réduisant la consommation de solvant et le temps d'extraction, tout en améliorant les rendements. Des techniques telles que l'extraction assistée par micro-ondes ou ultrasons, l'extraction par solvant pressurisé et l'extraction par fluide supercritique permettent d'extraire davantage d'échantillons avec de meilleures performances qu'une extraction classique par macération. Souvent, cette extraction

est suivie par l'extraction liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante. Une approche plus exhaustive nécessitera ensuite des analyses supplémentaires et un travail d'interprétation plus approfondi <sup>(86)</sup>.

#### **b- Séparations chromatographiques**

L'extrait obtenu peut contenir divers composés, ce qui rend souvent nécessaire leur séparation en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. Cette séparation permet d'obtenir une meilleure compréhension de la composition moléculaire et de la complexité de l'extrait <sup>(93)</sup>.

Il existe plusieurs méthodes de chromatographie, et le choix dépend de l'objectif préalablement fixé et de la faisabilité de la méthode. Nous pouvons distinguer :

- La chromatographie sur colonne (CC), une méthode préparative qui permet la séparation et l'isolement des constituants d'un mélange. Elle comprend la CC de Polyamide SC6, la CC de Silice SiO<sub>2</sub> et la CC de Séphadex LH20.
- La chromatographie sur papier Whatman 3 (CP), qui peut être utilisée en mode monodimensionnel ou bidimensionnel, à des fins analytiques ou préparatives. Elle est utilisée pour séparer les hétérosides qui sont très polaires.
- La chromatographie sur couche mince ou CCM de polyamide DC6 aussi bien en analytique qu'en préparative avec les trois systèmes de solvants spécifiques aux flavonoïdes à savoir DI (ToL/MEC/MeOH :40/30/30) et DI'(EP/ToL/MEC/MeOH :60/30/15/10) comme première dimension ou dimension organique afin de séparer les produits plutôt apolaires et DII (Eau/MEC/MeOH/AcAc : 30/10/15/05) comme seconde dimension ou dimension aqueuse pour les produits polaires. La CCM est une technique particulièrement avantageuse lorsqu'elle est utilisée de manière préparative. Ce processus est rapide et permet d'isoler des produits purs <sup>(86)</sup>.

Les techniques automatisées à l'instar de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) pour les flavonoïdes, tant analytique que préparatives sont de nos jours les méthodes de choix et ce à plus d'un titre et ne peuvent que faciliter toute pratique phytochimique.

#### ➤ **II.3.8. Stratégie d'élucidation structurale des flavonoïdes**

##### ➤ **II.3.8.1. Caractéristiques chromatographiques**

L'identification des flavonoïdes repose sur une série de méthodes qui sont utilisées et appliquées en fonction de la nature de ces composés. Ainsi, la fluorescence du produit en question et les valeurs des R<sub>f</sub> dans différents systèmes de solvants permettent d'obtenir une

première approche structurale, ce qui facilitera grandement les étapes suivantes. Ces deux méthodes sont appliquées de manière systématique pour ce type de produits naturels <sup>(66)</sup>.

- **La fluorescence sous lumière de Wood**

Lorsque les substances flavoniques sont exposées à la lumière de Wood à une longueur d'onde de 365 nm, cela fournit des informations préliminaires sur leur structure chimique. Les flavonoïdes apparaissent sous lumière UV sous forme de taches colorées, certaines d'entre elles étant fluorescentes. Cela permet de distinguer rapidement les différentes classes de flavonoïdes <sup>(81)</sup>. Le tableau suivant illustre la relation entre la fluorescence et la structure chimique <sup>(66)</sup>.

**Tableau 2:** Structure à partir de la fluorescence sous lumière de Wood

Couleur des spots	Structures flavoniques
Noire-violette	Flavones -5, 6,7
	Flavonol substitué en 3
Bleu	Flavone ou flavanol sans OH en 5
	Flavanone avec OH en 3 ou flavanol
	Flavonol avec 3-OH substitué ou sans 5- OH
Jaune ou Jaune terne	Flavonol avec 3-OH, et avec ou sans 5-OH
Orange	Isoflavones
Jaune verte	Aurones
Verte	Chalcones

- **Facteur de retard**

Il s'agit du rapport frontal ( $R_f$ ). Cette valeur varie en fonction du solvant utilisé, du type de support chromatographique (gel de silice, polyamide, cellulose), de la nature du produit lui-même (aglycone ou glycosylé), ainsi que de la disposition des différents substituants sur le squelette flavonique<sup>(87)</sup>. Notons que le  $R_f$  et la fluorescence sont deux propriétés essentielles dans les analyses chromatographiques. Ces propriétés peuvent fournir de précieuses indications pour tout phytochimiste qui s'intéresse à la caractérisation des structures des flavonoïdes. L'influence de la substitution du squelette flavonique sur la valeur du  $R_f$  est présentée dans le Tableau 3.

**Tableau 3:** Relation entre R<sub>f</sub> et structure flavonique <sup>(86)</sup>

Structure flavonique	R <sub>f</sub>
Augmentation des groupes hydroxyles	R <sub>f</sub> diminue dans les systèmes de solvants organiques et augmente dans les systèmes de solvants aqueux
Méthylation des groupements hydroxyles	R <sub>f</sub> augmente dans les systèmes de solvants organiques et diminue dans les systèmes de solvants aqueux
Méthylation d'un OH en C5	R <sub>f</sub> diminue dans un solvant alcoolique
Glycosylation	R <sub>f</sub> diminue dans les systèmes de solvants organiques et augmente dans les systèmes de solvants aqueux.

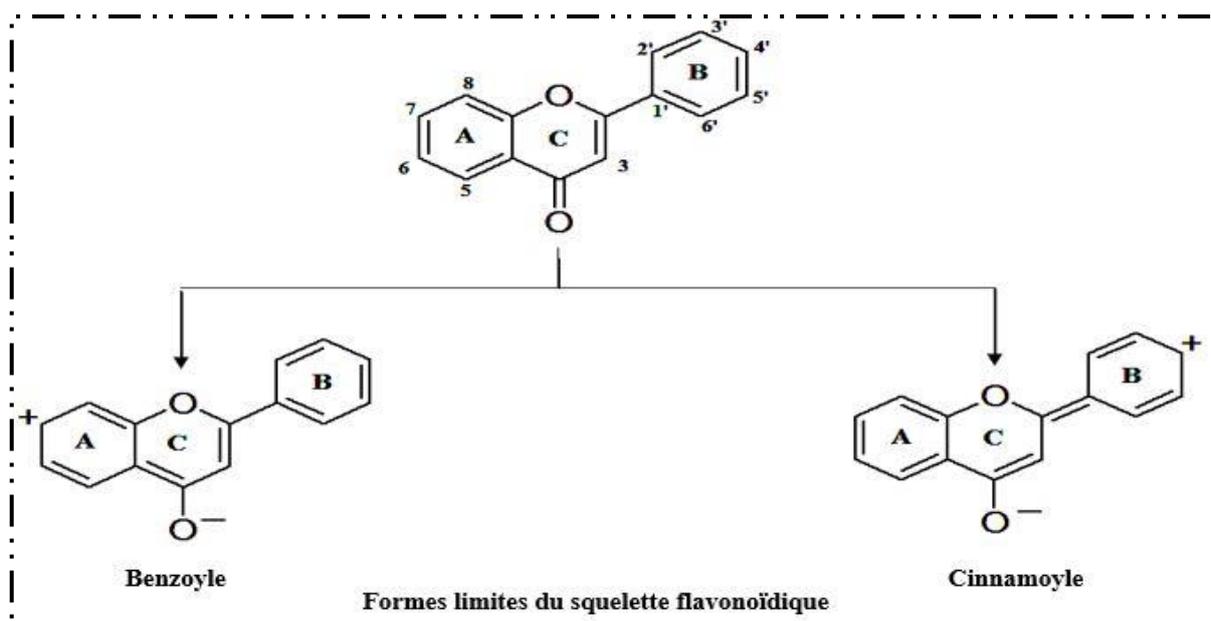
### II.3.8.2. Caractéristiques spectroscopiques

#### a- La spectroscopie UV-visible

La spectrophotométrie UV-Visible est la technique la plus couramment utilisée pour déterminer la structure des composés flavoniques. Cette méthode fournit une multitude d'informations qui aident à identifier divers groupements chimiques, tels que l'hydroxyle et le méthoxyle. Cette technique reposant essentiellement sur des transitions électroniques de types  $n \longrightarrow \pi^*$  et/ou  $\pi \longrightarrow \pi^*$  peut à elle seule si elle est bien utilisée apporter énormément d'indication d'ordre structurale.

L'interprétation des spectres dans le méthanol et/ou en présence de réactifs spécifiques s'appuie sur des règles très connues des flavonistes décrites par Mabry et al.<sup>(87)</sup> et complétées par Voirin et al.<sup>(88)</sup>. Ainsi, la position, le type (H, OH, OR) et le nombre de substituant dans un système flavonoidique peut être connu via les données d'une série spectrale sur la base de deux formes limites : Benzoyle et Cinnamoyle comme indiqué ci-dessous ; ce qui donne lieu à des spectres avec au moins deux bandes (BI et BII).

La BI sur le spectre MeOH se situe entre 300 et 400 nm qui est dûe à la transition électronique du groupe cinnamoyle et c'est lié au cycle B alors que la BII, dûe à celle du Benzoyle, située elle entre 250 et 290 nm et donc liée au cycle A du flavonoïde (Figure14).



**Figure 14:** Schéma des deux formes limites du squelette flavonoïdiques

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 entraîne un déplacement bathochrome des bandes d'absorption vers des longueurs d'onde supérieures, comme l'illustre le Tableau 4.

**Tableau 4:** Bandes d'absorption en UV-visible de différents types de flavonoïdes

Type des flavonoïdes	Bande I (nm)	Bande II (nm)
Flavones	310-350	250-280
Flavonols (3-OH libre)	350-385	250-280
Flavonols (3-OH substitué)	330-360	250-280
Flavanone	300-330	245-275
Isoflavone	310-330 (épaulement)	245-275
Chalcones	340-390	230-270 (Intensité faible)
Aurones	380-430	230-270 (Intensité faible)
Anthocyanes et anthocyanidines	465-560	270-280

L'addition des réactifs spécifiques provoque un changement dans les spectres UV-visible réalisés dans le méthanol<sup>(66)</sup>. Ceci donne des indications sur la localisation des substitutions sur le squelette de base des flavonoïdes, comme illustré dans le Tableau (Annexe 1) qui fournit les données structurales résultant des déplacements en présence des réactifs. Cela permet de localiser les hydroxyles libres sur le squelette flavonique. Ces derniers réagissent avec les réactifs de déplacement, induisant ainsi la formation de sels et de complexes.

## b- La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse s'est imposée depuis une vingtaine d'années comme un outil d'analyse puissant. Par rapport à d'autres techniques, ses avantages résident dans sa versatilité, sa sensibilité et sa capacité à être couplée avec des techniques séparatives. Cette méthode permet de déterminer le pic moléculaire, donnant une idée globale du nombre et de la nature des substituants hydroxyles ou méthoxyles <sup>(89)</sup>.

La possibilité de corrélérer le spectre d'un composé à sa structure et d'identifier les liaisons chimiques est rapidement devenue évidente. La théorie des spectres de masse a permis d'expliquer les mécanismes de rupture des différentes liaisons chimiques (Figure 23). Les objectifs principaux de la spectrométrie de masse analytique sont de prédire ou connaître le comportement d'une molécule après ionisation, de déterminer si elle tend à former certains types d'ions ou à rester sous forme d'ion moléculaire, et d'effectuer des analyses quantitatives <sup>(86)</sup>. Plusieurs techniques sont utilisées en spectrométrie de masse, les plus courantes étant la spectrométrie de masse à impact électronique (EI), à bombardement atomique rapide (FAB), electrospray (ESI) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI). Si le spectre est enregistré avec une technique d'ionisation dure, il comportera en plus du pic Moléculaire, des pics fragments alors que le spectre ne comporte que l'ion Moléculaire (ions pseudomoléculaires  $[M + H]^+$ ,  $[M + Na]^+$ ,  $[2M + Na]^+$ ...) dans le cas d'une ionisation douce comme l'ESI, l'APCI ...etc.

Concernant les flavonoïdes, la spectrométrie de masse constitue la troisième étape de l'identification structurale. Les noyaux A et B conservent leurs structures et ne se fragmentent pas (Figure 15). À l'inverse, le noyau C, considéré comme très faible, favorise le clivage des liaisons à ce niveau <sup>(57)</sup>. Les pics de fragmentation caractéristiques fournissent des informations sur la répartition des substituants entre les noyaux A et B, et déterminent la nature et le site d'attachement des sucres dans les glycosides « O » ou « C » des flavonoïdes. Les mécanismes de fragmentation les plus courants impliquent la coupure entre deux liaisons carbone (C-C) du cycle C <sup>(66)</sup>. Les ions fragments produits sont notés  ${}^i,jA^\pm$  et  ${}^i,jB^\pm$ , où A et B représentent les cycles A et B restés intacts<sup>(66,90)</sup>, et *i* et *j* indiquent les liaisons du noyau C rompues. La fragmentation des flavonoïdes est souvent explicable par des mécanismes rétro-Diels-Alder (RDA). Les réactions de RDA se produisent sur des cycles à 6 carbones contenant au moins une double liaison. Une RDA du cycle C entraîne généralement une coupure entre les liaisons 1 et 3, formant deux ions fragments majoritaires, notés  ${}^{1,3}A^\pm$  et  ${}^{1,3}B^\pm$ . D'autres ruptures de liaisons peuvent survenir en fonction du mode d'ionisation et de la classe de molécules étudiées <sup>(116)</sup>. Dans le cas de pertes neutres, telles que H<sub>2</sub>O ou CO, les ions

produits sont désignés par la combinaison de la nomenclature  $i,j A^\pm$  (ou  $j B^\pm$ ) et de la perte neutre, par exemple  $[^{1,3}A-H_2O]^-$ .

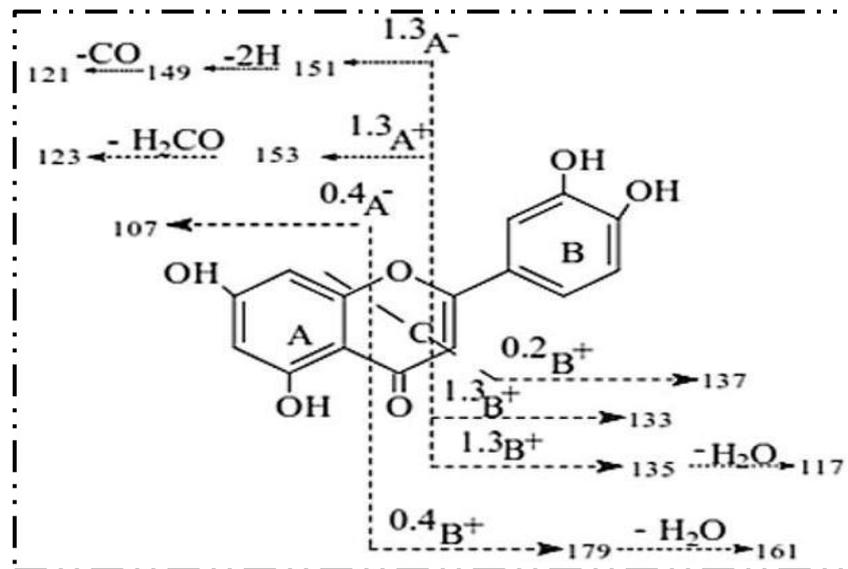


Figure 15 : Schéma de fragmentation de flavonoïde (Lutéoline) <sup>(91)</sup>

Selon Audier (1966), le schéma de fragmentation d'une flavone peut être présenté comme suit :

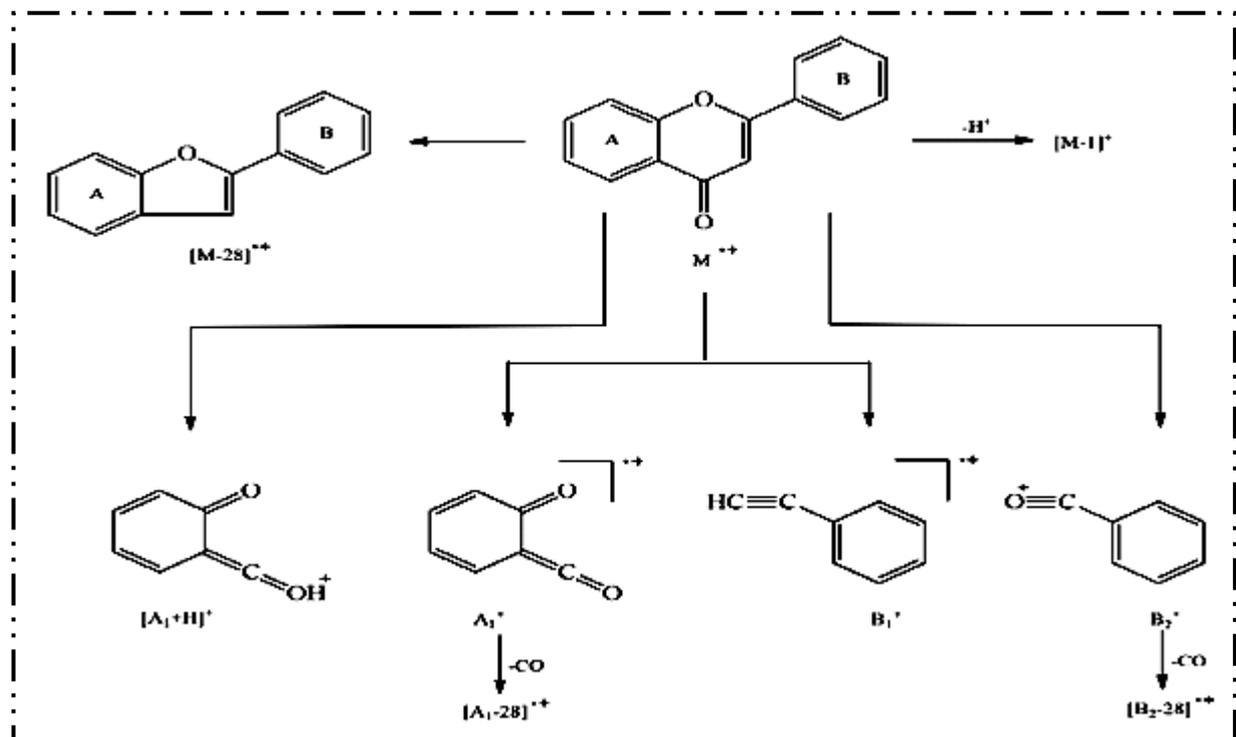


Figure 16 : Schéma de fragmentation d'une flavone

### c- Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Concernant l'analyse des flavonoïdes, la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire de proton (RMN  $^1\text{H}$ ) permet de visualiser les relations existantes entre les protons des différents noyaux et déduire leur degré de substitution. Elle permet également de repérer les groupements méthoxylés, de dénombrer les sucres et d'envisager leur mode de liaison à la génine. Une RMN 2D pourrait compléter les analyses de RMN 1D et ce, par le couplage à travers les liaisons ou l'espace :

- Pour le couplage scalaire ou couplage à 2 ou 3 liaisons: Homonucléaire COSY, TOCSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) et Hétéronucléaire HMBC et HSQC ( $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ ).

- Pour le couplage longue distance ou à travers l'espace : NOESY, ROESY

Pour la RMN  $^{13}\text{C}$  et/ou une carte bidimensionnelle d'une flavone, c'est au besoin qu'elles soient effectuées car en général, les données d'une carte simple RMN  $^1\text{H}$  suffiront à confirmer ou à la limite complétant les propositions basées sur l'UV-Visible et la masse <sup>(92, 93)</sup>.

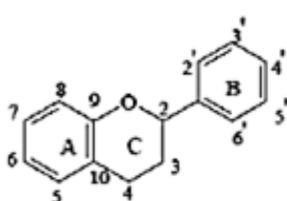
#### ► Analyse des signaux provenant des protons aromatiques des flavones

Les positions relatives des protons sur les noyaux A et B sont facilement déductibles grâce aux valeurs des constantes de couplage.

#### ✚ Protons du noyau A

Selon les substitutions possibles. Les résonances et les multiplicités des protons  $\text{H}_5$ ,  $\text{H}_6$  et  $\text{H}_8$  sont résumées dans le tableau suivant :

**Tableau 5** : déplacement chimique et multiplicité des protons du noyau A <sup>(94)</sup>

	$\text{H}_5$	$\text{H}_6$	$\text{H}_8$
5-7 di-OH	-	6.00-6.20 ppm (d) ( $J=2.5\text{Hz}$ )	6.30-6.50 ppm (d) ( $J=2.5\text{Hz}$ )
5-OH 7-hydroxy, glucoside	-	6.20-6.40 ppm (d) ( $J=2.5\text{Hz}$ )	6.50-7.00 ppm ( $J=2.5\text{Hz}$ )
5, 6, 7-OR (R=H ou sucre) 5, 7, 8-OR	- -	- 6.3 (s)	6.3 (s) -
7-OR (R=H ou sucre)	8.00 ppm (d) ( $J=9.0\text{Hz}$ )	6.70-7.10 ppm (dd) ( $J=9\text{Hz}$ et $J=2.5\text{Hz}$ )	6.70-7.10 ppm (d) ( $J=2.5\text{Hz}$ )

### ✚ Protons du noyau B

Le déplacement chimique est basé sur les substituent dans le noyau B. Quand le noyau B est monosubstitué en 4', les quatre protons H-2', H-3', H-5' et H-6' présentent deux doublets dont les constantes de couplages sont identiques (8.2Hz).

**Tableau 6:** déplacement chimique et multiplicité des protons du noyau B <sup>(94)</sup>

Flavonoïdes	Déplacement chimique (ppm)		
	H2', H6' (J=8.2Hz)	H3', H5' (J=8.2Hz)	
4'-hydroxy Flavone	7.70-7.90 (d)	6.50-7.10 (d)	
4'-hydroxy Flavonol	7.90-8.10 (d)	6.50-7.10 (d)	
3',4',5' tri hydroxy	6.50-7.50 (s)	-	
3',4' dihydroxy	Déplacement chimique (ppm) H6' (8.4 ; 1.2 Hz)	Déplacement chimique (ppm) H2' J=1.7 Hz	Déplacement chimique (ppm) H5' J=8.4 Hz
	7.7 (dd)	7.5 (d)	6.7 (d)

#### • Protons de l'hétérocycle C

S'il s'agit d'une flavone : H<sub>3</sub>, vers 6,2 à 6,4 ppm, 1H, s ou à la limite OMe<sub>3</sub>, vers 3,5 à 4,5 ppm, 3H, s.

#### • Protons aliphatiques ( Protons OMe )

Ils se présentent sous la forme d'un signal singulet dans l'intervalle entre 3.5 et 4.5 ppm.

### II.3.9. Méthodes analytiques pour caractérisation des mélanges complexes

Les techniques séparatives, telles que la chromatographie liquide ou gazeuse, couplées à la spectrométrie de masse simple (LC-MS, GC-MS) ou en tandem (LC-MS/MS, GC-MS/MS), ont révolutionné le domaine de l'analyse des mélanges complexes. Elles sont d'une importance primordiale dans l'analyse par déréplication. Cette dernière est une approche de profilage permettant l'identification rapide de composés dans des extraits. Elle vise à mettre en évidence les molécules connues et déjà décrites dans la littérature. L'identification se focalise ensuite sur les molécules non reconnues, qui peuvent être de nouveaux composés potentiels d'intérêt. Les études par déréplication ont été développées pour identifier des molécules en minimisant les étapes d'isolement. Ceci accélère la recherche de molécules cibles et la rend plus efficace <sup>(95)</sup>.

Depuis son développement dans les années 1990, la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse ou à la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) est devenue une technique complémentaire de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). Utilisée initialement principalement pour l'analyse qualitative et quantitative ciblée d'un nombre limité de composés, la recherche « non ciblée » a ouvert de nouvelles possibilités permettant la détection et la quantification d'un grand nombre de molécules dans un échantillon de composition inconnue <sup>(96)</sup>.

Cette technique a introduit une nouvelle dimension dans l'analyse de mélanges complexes, permettant de déterminer la structure d'un ion sur la base de son profil de fragmentation<sup>(97)</sup>. Lors d'une analyse MS/MS, le spectromètre de masse en tandem sélectionne un ion précurseur avec le premier analyseur qui sera par la suite fragmenté par dissociation induite par collision. Les fragments ainsi formés sont analysés soit en mode basse résolution ou en haute résolution en masse pour obtenir un spectre MS<sup>2</sup>. Ce dernier, composé uniquement d'ions résultant de la fragmentation de l'ion précurseur, est riche en informations structurales. Cela le distingue des spectres MS classiques, où tous les ions intacts sont détectés.

### III. Description botanique, chimique et pharmacologiques des plantes étudiées

L'Algérie est renommée pour sa diversité variétale en plantes médicinales et aromatiques, ainsi que leurs nombreuses utilisations traditionnelles à travers le pays. Elle bénéficie d'une longue tradition médicale et d'un savoir-faire ancestral basé sur l'utilisation de ces plantes, offrant ainsi une gamme de remèdes naturels pour des traitements curatifs et préventifs.

#### III.1. Les zones importantes pour les plantes aromatiques et médicinales en Algérie

La flore algérienne est dotée d'une richesse incontestable, comprenant un large éventail d'espèces classées selon leur degré de rareté : 289 espèces assez rares, 647 rares, 640 très rares, 35 rarissimes et 168 endémiques<sup>(98)</sup>. Ces plantes se trouvent principalement dans des Zones Importantes pour les Plantes (ZIP)<sup>(99)</sup> définies comme des sites naturels ou semi-naturels dotés d'une richesse botanique exceptionnelle et/ou d'une composition remarquable de plantes (Figure 17). Benhouhou et al. ont identifié 14 ZIP en Algérie tellienne<sup>(100)</sup>. Cependant, les informations chronologiques et écologiques sur de nombreuses espèces, notamment les végétaux endémiques stricts d'Algérie, ne sont connues qu'à travers des ouvrages anciens tels que ceux de Maire (1952-1987) et Quézel & Santa (1962-1963)<sup>(101,102)</sup>.

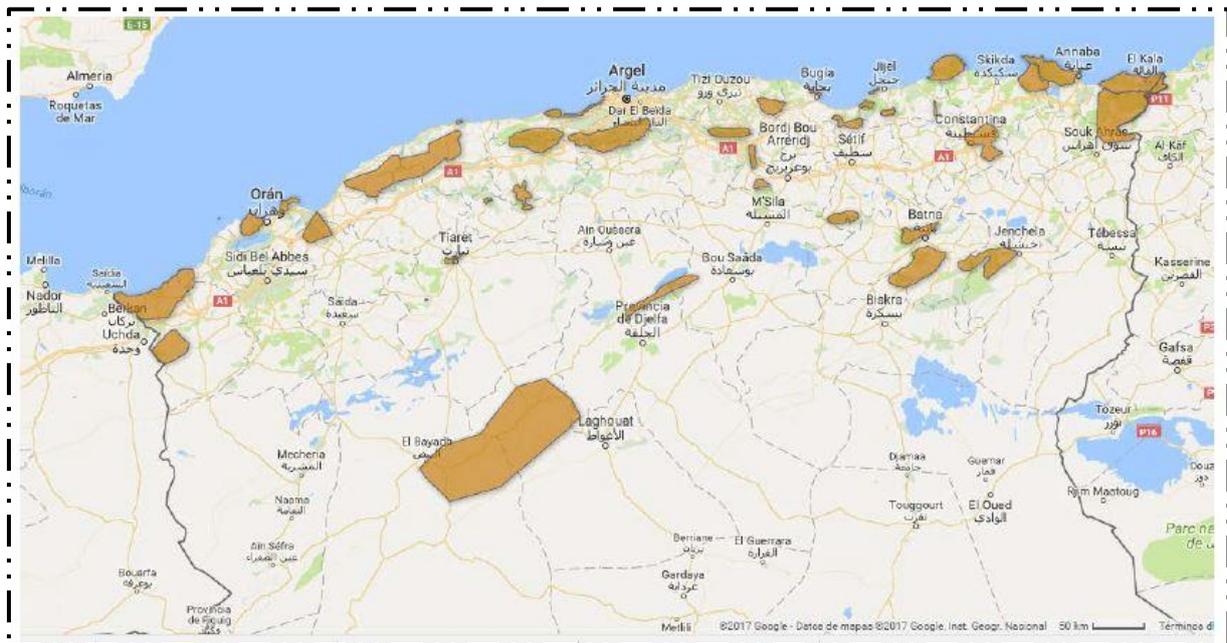


Figure 17: La répartition géographique des ZIP <sup>(103)</sup>

### III.2. Choix des espèces de plantes étudiées

Le choix des plantes utilisées dans cette étude, en tant que matériel végétal, ne relève pas du hasard et n'a pas été effectué aléatoirement. Outre le critère de disponibilité, une recherche bibliographique approfondie autour de ces plantes a suscité l'expectative d'une certaine originalité dans notre travail, indépendamment des résultats obtenus. Nous avons porté notre intérêt sur l'étude de deux espèces endémiques et rares d'Algérie: *Daucus virgatus* (Poir.) Maire (famille des Apiacées) et *Origanum floribundum* Munby (famille des Lamiacées). Ces espèces se développent dans deux zones importantes pour la flore : la péninsule de l'Edough et le Djurdjura.

Les critères de sélection des espèces étudiées étaient multiples :

- ✓ L'importance des zones de récolte des deux espèces ;
- ✓ La pertinence des familles et genres auxquels appartiennent ces espèces, notamment leur richesse en métabolites secondaires et leur usage varié en médecine traditionnelle ;
- ✓ L'endémisme et la rareté de ces deux espèces, originaires d'Algérie ;
- ✓ Les recherches bibliographiques indiquent que la chimie des espèces *Daucus virgatus* et *Origanum floribundum* est peu étudiée et que les études biologiques les concernant sont rares.

La richesse du genre *Daucus* en huiles essentielles et celle du genre *Origanum* en flavonoïdes justifient notre choix pour l'orientation de nos travaux de recherche.

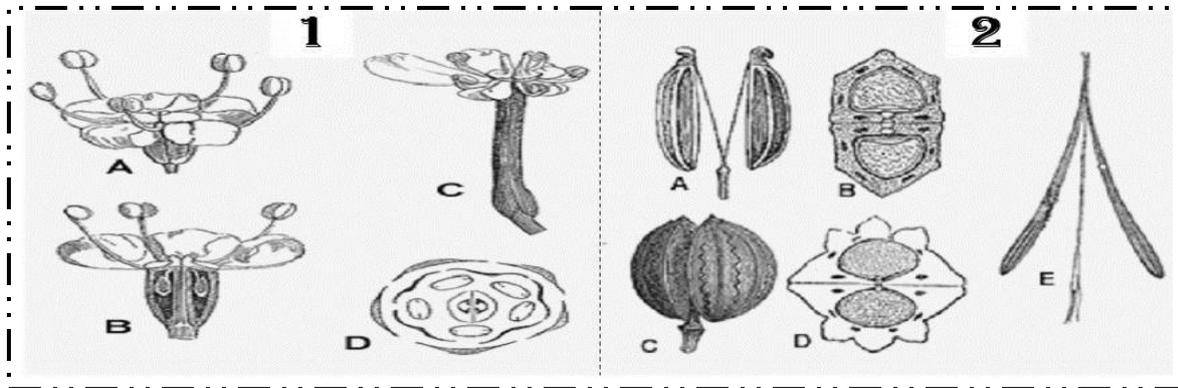
### III.3. Données botaniques et pharmacologiques de l'espèce *D. virgatus* (Poir.) Maire

#### III.3.1. Généralités sur la famille des Apiacées

Autrefois connue sous le nom d'Ombellifères, la famille des Apiacées est remarquablement homogène et facile à reconnaître grâce à ses inflorescences typiques en ombelles, généralement composées<sup>(104)</sup>. Cependant, il peut être parfois difficile de distinguer les espèces entre elles. La famille des Apiacées comprend de nombreuses espèces économiquement importantes, y compris des plantes alimentaires telles que la carotte, le fenouil et le céleri<sup>(105)</sup>. Elle compte environ 300 genres et plus de 2500 espèces<sup>(106)</sup>, réparties principalement dans les régions montagneuses tempérées et relativement rares en zone tropicale<sup>(107)</sup>. En Algérie, cette famille occupe une place significative, représentée par 56 genres, 130 espèces (dont 24 endémiques) et 26 sous-espèces<sup>(108)</sup>.

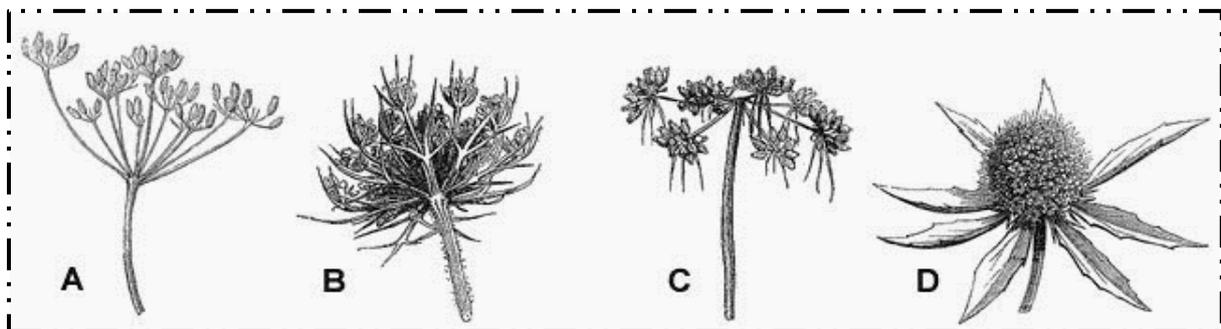
### III.3.2. Description botanique des Apiacées

Les plantes de la famille des Apiacées sont principalement des herbacées annuelles, bisannuelles ou, le plus souvent, vivaces. À quelques exceptions près, elles sont toutes herbacées, rarement ligneuses ou arbustives, avec un plan floral fixe. Leurs fleurs, hermaphrodites et rarement dioïques ou polygames, sont disposées en ombelles et souvent munies, à la base, d'un verticille de bractées (involucre) ou composées de plusieurs ombelles simples (ombellules), presque toujours pourvues de bractéoles (involucelle). Les feuilles, alternes et généralement composées, sont parfois simples. Les pétioles, souvent élargis à leur base, engainent la tige, laquelle est fréquemment creuse, par résorption de la moelle. Certaines espèces présentent une racine tuberculeuse (les carottes) ou même un véritable tubercule, tandis que d'autres possèdent un rhizome (les angéliques).



**Figure 18:** Fleurs et fruits des Apiacées

(1) La fleur des Apiacées: A, B et D- Détail d'une fleur chez le Fenouil commun (*Foeniculum vulgare*) C- Détail d'une fleur chez le Scandix peigne de Vénus (*Scandix pecten-veneris*) (2) Le fruit des Apiacées: A et B- Détail d'un fruit chez *Foeniculum vulgare*, C et D- Détail d'un fruit chez la Petite ciguë *Aethusa cynapium*; E- Détail du fruit chez *Scandix pecten-veneris*.



**Figure 19:** Représentation schématique des ombelles des Apiacées

A- Ombelle et ombellules dépourvues d'involucre et d'involucelle chez *Foeniculum vulgare*; B- Ombelle et ombellules munies d'involucre et d'involucelle chez *Daucus carotta*; C- Ombelle réduite et ombellules munies d'involucelles chez *Aethusa cynapium*; D- Ombelle capituliforme aux rayons nuls chez *Eryngium planum* <sup>(142)</sup>.

### III.3.3. Aspects chimiques et pharmacologiques des Apiacées

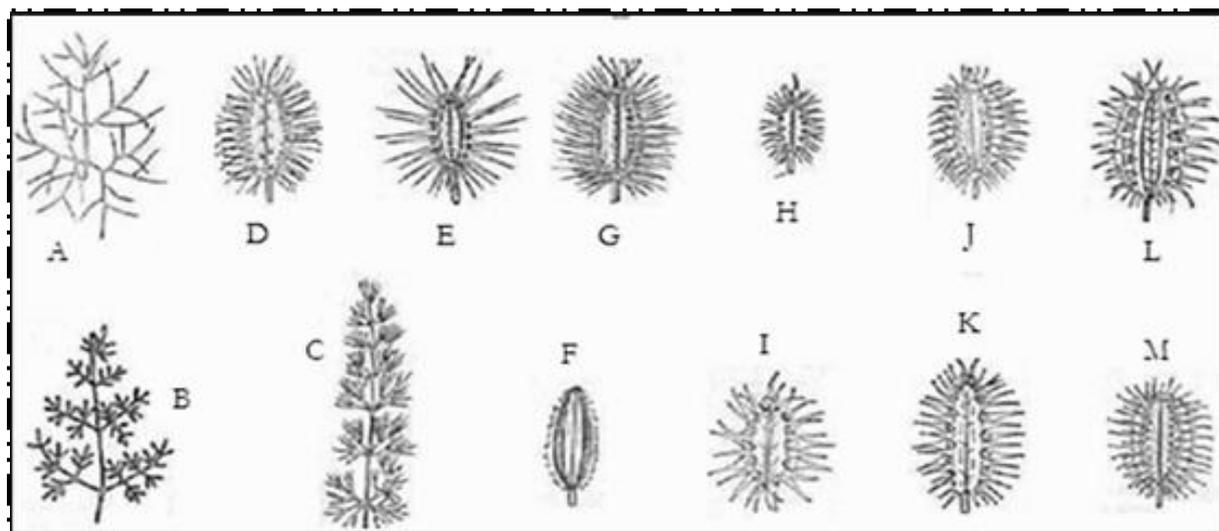
La famille des Apiacées est connue pour sa grande diversité de métabolites secondaires, elle présente des intérêts économiques et médicaux, notamment grâce à ses coumarines, flavonoïdes, composés acétyléniques, lactones sesquiterpéniques, ainsi qu'une abondance d'huiles essentielles présentes dans la quasi-totalité de ses organes anatomiques. Leurs propriétés organoleptiques font que de nombreuses espèces sont largement utilisées comme légumes ou condiments. Les huiles essentielles des Apiacées sont riches en dérivés phénylpropaniques, tels que l'anéthole (*Pimpinella anisum*), l'apiole (*Apium petroselinum*), et la foeniculine (*Foeniculum vulgare*), ainsi qu'en terpènes comme le  $\beta$ -caryophyllène, le limonène ou la carvone. Certaines molécules ont été identifiées pour la première fois dans les huiles essentielles d'Apiacées, comme la carvone, initialement isolée dans l'huile essentielle de *Carum carvi*. L'étude des Apiacées est très intéressante pour les types de produits chimiques qu'elles contiennent, pouvant trouver des applications en médecine traditionnelle ou moderne. Certaines espèces sont utilisées comme toniques, diurétiques, stimulants cardiovasculaires, antibactériens, hépato-protecteurs, vasorelaxants, anti-tumoraux, antioxydants et anti-inflammatoires.

### III.3.4. Présentation du genre *Daucus*

*Daucus* est un genre de plantes herbacées de la famille des Apiacées. Ce genre est représenté sur tous les continents, à l'exception des zones les plus froides du globe. Il comprend environ 30 espèces, annuelles, bisannuelles et vivaces. *Daucus* est considéré comme l'ombellifère le plus difficile à définir parmi les quelque 3000 espèces de cette famille. Il est largement distribué à travers le monde et semble avoir son centre de dispersion dans la région méditerranéenne, en particulier en Afrique du Nord, où une spéciation intense a eu lieu. En Algérie, le genre *Daucus* est représenté par des espèces vivant dans des zones arides et incultes, très répandues le long des côtes est et ouest algériennes <sup>(109)</sup>. L'espèce la plus connue est *Daucus carota*, d'où provient la carotte cultivée <sup>(110)</sup>.

• **Aspect botanique :** Le genre *Daucus* se caractérise par une tige solitaire dressée, ramifiée, hispide gantée en arrière. Les feuilles basales sont pétiolées, devenant sessiles vers le haut. Les ombelles, terminales et axillaires, sont peu composées ; les bractées sont nombreuses, pennées, rarement entières, généralement réfléchies ; les bractéoles sont nombreuses, dentées ou entières ; les ombellules sont fortement fleurées, avec des fleurs centrales généralement stériles et des pétales pourprés élargis. Les pédicelles sont inégaux. Le calice présente des dents obsolètes à remarquables. Les pétales sont blancs ou jaunes, obcordés, avec un apex infléchi ; les pétales extérieurs des fleurs extérieures d'une ombellule

sont élargis et radieux. Le stylopede est conique ; les styles sont courts. Le fruit est ellipsoïde, dorsalement comprimé ; les nervures principales sont filiformes, poilues ; les nervures secondaires sont ailées, avec des ailes épineuses. L'aspect de la graine varie de superficiellement concave à presque plat. Le carpophore est entier ou bifide à l'apex <sup>(108)</sup>. Les feuilles et méricarpes de quelques espèces du genre *Daucus* en Algérie sont représentés ci-dessous (Figure 29).



**Figure 20:** Feuilles et méricarpes de quelques espèces de *Daucus* en Algérie  
(A-C) Feuilles : (A) *D. gracilis*, (B) *D. aureus*, (C) *D. setifolius*. (D-M) Méricarpes : (D) *D. biseriatus*, (E) *D. sahariensis*, (F) *D. virgatus*, (G) *D. gracilis*, (H) *D. carota*, (I) *D. setifolius*, (J) *D. crinitus*, (K) *D. aureus*, (L) *D. muricatus*, (M) *D. durieua* <sup>(143)</sup>.

### III.3.5. Taxonomie et description botanique de l'espèce *Daucus virgatus* (Poir.) Maire

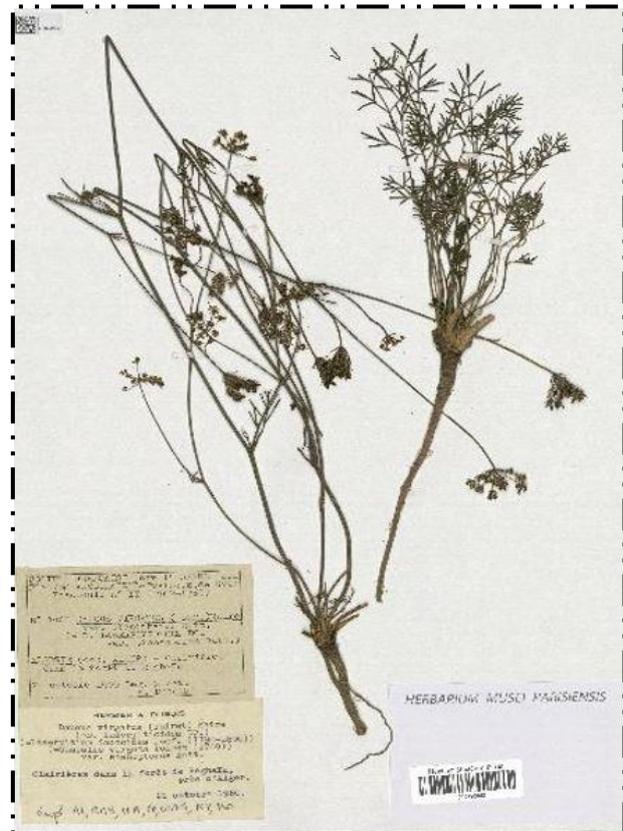
**Synonyme :** *Daucus stenopterus* Batt. et Trab. = *Laserpitium daucoides* Desf. = *Caucalis virgata* Poiret = *Caucalis virgata* Poiret

Appartenant à la famille des Apiacées et au genre *Daucus*, l'espèce étudiée, *Daucus virgatus* (Poir.) Maire, est une espèce aromatique endémique algéro-tunisienne <sup>(102)</sup>. Il s'agit d'une plante annuelle ou biennale qui pousse naturellement au nord-est de l'Algérie. Elle se distingue par des tiges élancées, rigides et solides, mesurant 30 à 70 cm, très fines, dressées et décombantes. Ses feuilles bipennées, avec des folioles pointues de chaque côté, adoptent la forme de segments de lance. Les fleurs, petites et de couleur blanche ou rose, sont regroupées dans de très courtes terminaisons. Les ombelles, courtes et pédiculées, mesurent 2 à 3 cm jusqu'à 10 à 15 cm de largeur <sup>(111)</sup>.

## Classification systématique de l'espèce

### *Daucus virgatus*:

- ✓ Empire : Eukaryota
- ✓ Règne : Plantae
- ✓ Sous-règne : Viridaeplantae
- ✓ Embranchement : Tracheophyta
- ✓ Sous-embranchement : Euphyllophytina
- ✓ Infra-embranchement : Radiatopses
- ✓ Classe : Magnoliopsida
- ✓ Sous-Classe : Cornidae
- ✓ Superordre : Aralianae
- ✓ Ordre : Araliales
- ✓ Famille : Apiaceae
- ✓ Sous-famille : Apioideae
- ✓ Tribu : Caucalideae
- ✓ Genre : *Daucus*
- ✓ Espèce : *Daucus virgatus* (Poir.) Maire



**Figure 21:** Illustration de l'espèce *D. virgatus*

### III.3.6. Travaux antérieurs du genre *Daucus*

*Daucus* est considéré comme l'un des genres les plus importants de la famille des Apiacées <sup>(109)</sup>. Ses principales espèces incluent *D. carota* L. (carotte), dont huit sous-espèces ont été signalées en Algérie <sup>(111)</sup>. De nombreuses recherches se sont intéressées à la composition et aux propriétés biologiques des huiles essentielles obtenues à partir d'espèces et de sous-espèces de *Daucus* provenant de différentes régions du monde, notamment pour leur potentiel antimicrobien et leurs activités antioxydantes <sup>(98, 112)</sup>. Certaines études ont rapporté la composition chimique et les propriétés biologiques des huiles essentielles de certaines espèces du genre *Daucus* d'Algérie, telles que *D. reboudii* <sup>(8)</sup>, *D. muricatus* L. <sup>(106)</sup>, *D. crinitus* Desf <sup>(113)</sup>, et *D. gracilis* <sup>(114)</sup>, riches en hydrocarbures monoterpéniques ( $\beta$ -pinène,  $\alpha$ -pinène, limonène, p-cymène et  $\beta$ -myrcène) et en monoterpènes oxygénés aux propriétés antibactériennes et antifongiques <sup>(8,114)</sup>.

La majorité des études sur l'activité biologique des huiles essentielles du genre *Daucus* ont porté sur leur pouvoir antibactérien, antifongique et antioxydant. Cependant,

quelques travaux se sont concentrés sur leur potentiel insecticide <sup>(115)</sup>, cytotoxique <sup>(116)</sup> ainsi que sur l'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase et du butyrylcholinestérase. Les espèces du genre *Daucus* ont fait l'objet d'intenses investigations phytochimiques dans de nombreux pays, avec une attention particulière portée à la carotte sauvage (*D. carota*), membre le plus connu du genre. Des études antérieures ont révélé la présence de phénylpropanoïdes, de polyacétylènes, de caroténoïdes, et de plusieurs sesquiterpènes, principalement des types daucane, guaiane et eudesmane <sup>(117)</sup>. En Pologne, une étude sur l'huile des ombelles de *D. carota* subsp. a été menée. Sa composition chimique a été caractérisée par l' $\alpha$ -pinène (17-42 %) et la sabinène (19-40 %) comme composants majoritaires, présentant des activités antibactériennes et antifongiques modérées contre des souches de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Candida albicans*.

Le tableau suivant (Tableau 7) résume la composition chimique des huiles essentielles des espèces appartenant au genre *Daucus*.

**Tableau 7 :** Composition chimique des huiles essentielles des espèces appartenant au genre *Daucus*

Especes du genre <i>Daucus</i>	Origine	Organes	Principaux composés	Références
<i>D. maritimus</i>	Tunisie	Fleurs	Sabinene (51.6%), terpinén-4-ol (11.0%)	(118)
		Racines	Myristicine (29.7%), dillapiole (46.6%)	
<i>D. maximus</i>	Egypte	Fruits	Shyobunone (16.8-24.3%), B-cubebene (3.5-12.7%), preisocalamendiol (17.9-32.7%)	(119)
		Fruits	<i>trans</i> -méthylisoeugénol (37,22 %) et $\beta$ -asarone (17,65 %), $\beta$ -bisabolène (34,70 %), bisabolène (3,0 %)	
<i>D. sativus</i>	Liban	Tiges	$\beta$ -cubébène (50 %), $\beta$ caryophyllène (2,15%), $\alpha$ -pinène(4,37 %), limonène (2,09 %)	(120, 121)
		Pologne	Ombelles	
<i>D. sativus</i>	Iran	Feuilles	<i>trans</i> -Anethole (23.5 %), myrcènc (14.5 %),	(122)
		Iran	Feuilles	
<i>D. gummiifer</i>	Espagne	Fruits	Acétate de Geranyl (51.74–76.95%)	(123)

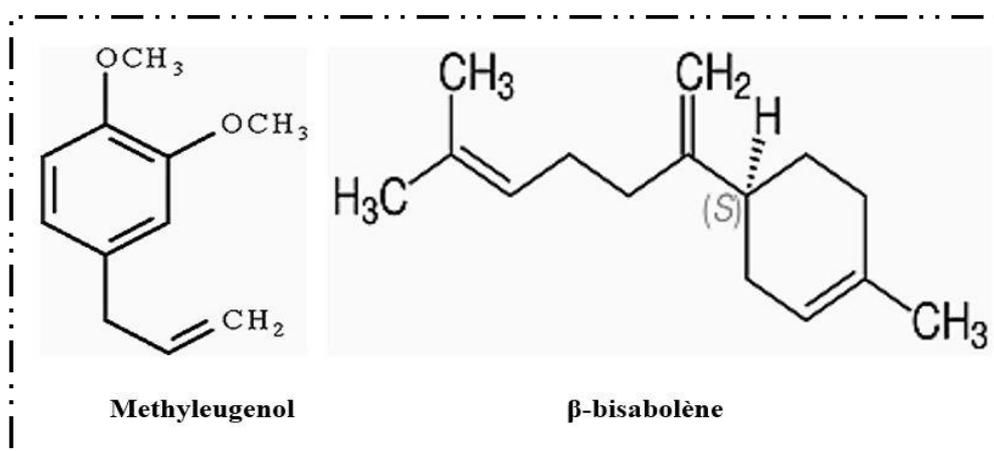
<i>D. halophilus</i>	Portugal	Ombelles fleuries	Sabinène (28.3-33.8%)	(124)
		Ombelles mures	Elemicin (26.0–31.0%), sabinène (27.6-29.0%)	
<i>D. reboudii</i> Coss.	Algérie	Parties aériennes	$\alpha$ -pinène (39,7 %), Isabinène (21,2 %) et $\beta$ -cimène (5,9 %). <i>cis</i> -verbénol (4,7%)	(125)
<i>D. gingidium</i> ssp.	Italie	Feuilles	Sabinène (26,8 %), $\alpha$ -pinène (10,8 %), le germacrène-D	(126)
		Fruits	Sabinène (60,6 %), $\alpha$ -pinène (12,2 %) et du 4-terpinéol (5,4%)	
<i>D. Aureus</i> Desf.	Algérie	Partie aérienne	Germacrene D (11.3–67.2%), caryophyllene oxide (0.9–9.5%), spathulenol (0.6–8.4%), ( <i>Z</i> ) $\alpha$ -santalol (1.4–6.5%), viridiflorol (0.9–5.8%), cadin-4-en-7-ol (1.5–5.6%) et $\alpha$ -cadinol (1.2–5.2%)	(125)
		Racine	( <i>Z</i> )- $\alpha$ -santalol (14.1%), caryophyllene oxide (10.6%), spathulenol (9.8%), nonadecane (6.8%), and tetradecanoicacid (5.2%)	
<i>D. gracilis</i>	Algérie	Feuilles et fleurs	Linalool (22.7%), 2-methylbutyl 2-methylbutyrate (18.9%), 2-methylbutyl isovalerate (13.6%), ammimajane (10.4%), 3-methylbutyl isovalerate (10.3%), ( <i>E</i> )- $\beta$ -ocimene (8.4%) et isopentyl 2-methylbutyrate (8.1%)	(127)

<i>D. aristidis</i>	Algérie	Partie aérienne	$\alpha$ -pinene (74.1%- 43.5% - 53.5% - 55.5%) et $\beta$ -pinene (11.9%- 7.5%-7.8%-8.1%)	(128)
<i>Daucus virgatus</i> (Poir.) Maire	Tunisie	Partie aérienne	Méthyl eugénol (33.0%) et $\beta$ -bisabolène (13.2%)	( 129,130)
	Algérie		$\beta$ -pinène (77.9 %) et l' $\alpha$ -pinène (7.6%)	
	Italie	Ombelles	B-Bisabolène (17.6-51.0%), carotol (2.4-25.1%), Il $\alpha$ (H)-himachal-4-en-1- $\beta$ -ol (9.0-21.6%). methylisoeugénol (1.3-10.0%).	(131)
	Portugal		$\alpha$ -Pinenc (13.0-37.9%), acétate de géranyl (15.0-65.0%).	
	Tunisie	Ombelles	Elemicin (31.5-35.3%), carotol (48.0-55.7%), 11- $\alpha$ -(H) himachal-4-en-1-b-ol (12.7-17.4%), sabinene (12.014.5%), $\alpha$ -selinène (7.4-8.6%)	(132)
<i>D. carota. L</i>	Serbie	Partie Aérienne et racinaire	$\alpha$ - pinène (7.1-51.2%), sabinène (2.7-36.7%)	(125)
	Corse	Partie aérienne	$\alpha$ -Pinène (15.9-24.9%), elemicin (11.4-16.3%), Emethyl-isoeugenol (21.8-33.0%)	(133, 134)

Pologne		$\alpha$ -Pinène (30.0-42.0 %), sabinène (19.5-40.5%),myrcène (2.5-7.0 %)	(135)
	Ombelles		
Lituanie	Graines	Sabinène (28.2-37.5%), $\alpha$ -pinène (16.0-24.5%), terpinèn-4-ol (4.6-7.5%), $\gamma$ -terpinène (2.9-6.0%)	(125)
	Feuilles	$\alpha$ -Pinène (20.9-44.8%), sabinène (14.2-19.5%)	(136)
Grèce	Fruits	$\alpha$ -Pinène (23.5-30.4%), sabinène (21.5-46.6%), acétate de geranyl (3.9-28.1)	
Pologne	ombelles	$\alpha$ -Pinène (16.1-42.7%), sabinène (21.3-45.3%), myrcène (4.0-12.9), limonène (3.55-6.75%)	(137)

---

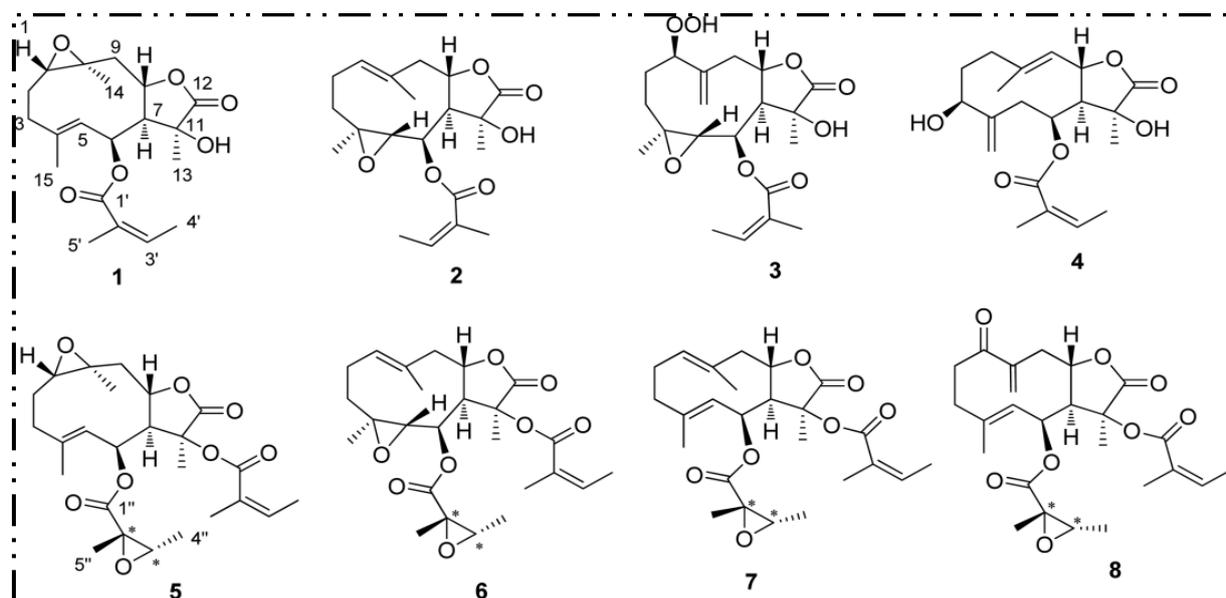
D'après la littérature existante, une seule étude sur l'huile essentielle de *D. virgatus* originaire de Tunisie a été menée auparavant <sup>(129,138)</sup>. Les composés majoritaires de HE sont le méthyl eugénol (33,0 %) et le  $\beta$ -bisabolène (13,2 %). Les propriétés antioxydantes, antimicrobiennes, cytotoxiques et antivirales de *D. virgatus* ont été examinés. Parmi celles-ci, les activités antibactériennes et antifongiques se sont avérées efficaces contre divers agents pathogènes, notamment *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus anthracis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* et *Candida albicans*. Il a été observé que la concentration minimale inhibitrice la plus faible, soit 625  $\mu\text{g/mL}$ , était efficace contre *B. subtilis* et *C. albicans*.



**Figure 22:** Composé majoritaire d'HE de *D. virgatus* de Tunisie

D'autres travaux du même auteur ont rapporté l'isolement de quatre nouveaux germacranolides, nommés daucovirgolides, après des purifications chromatographiques répétées des parties aériennes de la plante tunisienne *Daucus virgatus*. Les structures chimiques des nouveaux composés ont été définies comme mono- ou di-angeloylées, des sesquiterpénoïdes de type germacrane, par des méthodes spectroscopiques, principalement RMN 1D et 2D, et spectrométriques (ESIMS)<sup>(105)</sup>. D'autres travaux ont conduit à l'isolement de huit nouveaux germacranolides, nommés daucovirgolides AH (1–8). Les stéréostructures de ces lactones sesquiterpéniques, décorées par un ou deux groupes angéloyles, ont été déterminées par un couplage MS-RMN. Le daucovirgolide <sup>(139)</sup> s'est avéré être le seul membre de cette famille à posséder une activité inhibitrice marquée (92% à 50  $\mu\text{g/mL}$ ) sur le développement de Plasmodium aux stades sporogoniques précoces, les stades transmissibles non pathogènes des parasites du paludisme, sans présenter de cytotoxicité générale. L'activité sélective du daucovirgolide G indique l'existence d'exigences structurelles strictes pour cette activité de blocage de la transmission et donc d'une cible biologique bien définie, bien

qu'encre non identifiée. Les structures chimiques de daucovirgolides (1–8) isolé de *D. virgatus* sont présentées ci-dessous (Figure23).



**Figure 23:** Structures chimiques de daucovirgolides (1–8) isolé de *D. virgatus*

### III.4. Données botaniques et pharmacologiques de l'espèce *Origanum floribundum*

#### III.4.1. Généralités sur la famille des Lamiacées

Les Lamiacées constituent une grande famille naturelle principalement constituée de plantes herbacées et de sous-arbrisseaux. Reconnue comme la plus homogène de la sous-classe des Gamopétales, la plupart de ses genres sont riches en huiles essentielles. Composée de 187 genres et d'environ 3000 espèces, cette famille est également nommée « Labiées ». Les Labiées jouent un rôle important parmi les familles de végétaux répertoriées. Riches et diversifiées, la plupart de leurs espèces se trouvent principalement dans le nord du pays, notamment dans les régions de haute altitude et à forte pluviométrie <sup>(139)</sup>.

#### III.4.2. Description botanique des Lamiacées

Les tiges, quadrangulaires au moins dans leur jeune âge, portent des rameaux opposés. Les feuilles, également opposées, sont simples, parfois amplexicaules, toujours sans stipule et à limbe penninervé. Les inflorescences, composées de faux verticilles axillaires ou de glomérules, résultent de la fusion de deux cymes bipares. Les fleurs, hermaphrodites ou unisexuées, sont accompagnées de bractéoles et adaptées à la pollinisation par les insectes (entomophilie). Le calice gamosépale et persistant est constitué de 5 sépales soudés. La corolle gamopétale et zygomorphe comprend un tube souvent poilu, droit ou incurvé, et un limbe bilabié divisé en 5 lobes (2 pour la lèvre supérieure, 3 pour l'inférieure). Les étamines

sont au nombre de 4 (2 longues et 2 courtes, sauf chez le genre *Mentha* qui en a 5). Le gynécée, formé de 2 carpelles, crée un ovaire biloculaire surmonté d'un disque glanduleux avec 2 ovules par loge. Chaque loge se subdivise en deux logettes uniovulées. Les ovules anatropes ascendants à raphé interne, et le fruit est un tétrakène composé de 4 nucules secs enveloppés par le calice.

### III.4.3. Aspect chimique et pharmacologique des Lamiacées

Cette famille regroupe de nombreuses plantes aromatiques et condimentaires de la région méditerranéenne. Elle est une source importante d'huiles essentielles, d'infusions et d'antibiotiques naturels pour l'aromathérapie. L'industrie cosmétique utilise aussi les Lamiacées pour leurs propriétés hydratantes et souvent antiseptiques. Un grand nombre de genres de la famille des Lamiacées sont des sources riches en terpénoïdes, flavonoïdes et acides phénoliques, d'où leurs propriétés thérapeutiques antibactériennes, antivirales, antioxydantes et anti-inflammatoires. Selon la littérature, les diterpènes représentent la classe de composés terpéniques la plus présente dans cette famille. Les flavonoïdes, tout comme les diterpènes, jouent un rôle important au sein des Labiées. De nombreux aglycones de flavones très lipophiles ont été isolés et identifiés. C'est pourquoi l'association des flavones polyméthoxylées avec les Labiées est fréquente. Environ 150 structures différentes de flavonoïdes sont répertoriées au sein des Labiées, la majorité étant des flavones (60 %) et des flavanones (20 %). Les flavanols occupent la troisième place avec 16 % des cas, suivis des dihydroflavones, chalcones et isoflavones.

### III.4.4. Présentation du genre *Origanum*

Le genre *Origanum*, couramment appelé "Zâatar" en Algérie, fait partie de la famille des Lamiacées et est originaire du sud-est méditerranéen ainsi que de l'Asie occidentale. Il compte 46 taxons répartis autour du bassin méditerranéen. Parmi les espèces appartenant à ce genre, citons *O. vulgare* (Origan commun ou Marjolaine sauvage), *O. compactum* (Origan compact), *O. majorana* (marjolaine ou Origan des jardins), *O. dictamnus*, *O. onites*, *O. heracleoticum* et *O. syriacum*. En Algérie, deux espèces phylogénétiquement proches représentent le genre : *Origanum glandulosum* Desf (également connu sous le nom d'*Origanum hirtum*), endémique d'Algérie et de Tunisie, et *Origanum floribundum* Munby (également connu sous le nom d'*Origanum cinereum* de Noé), endémique d'Algérie. L'*Origanum floribundum* est principalement présent dans la région de l'Atlas blidéen et la grande Kabylie <sup>(129)</sup>.

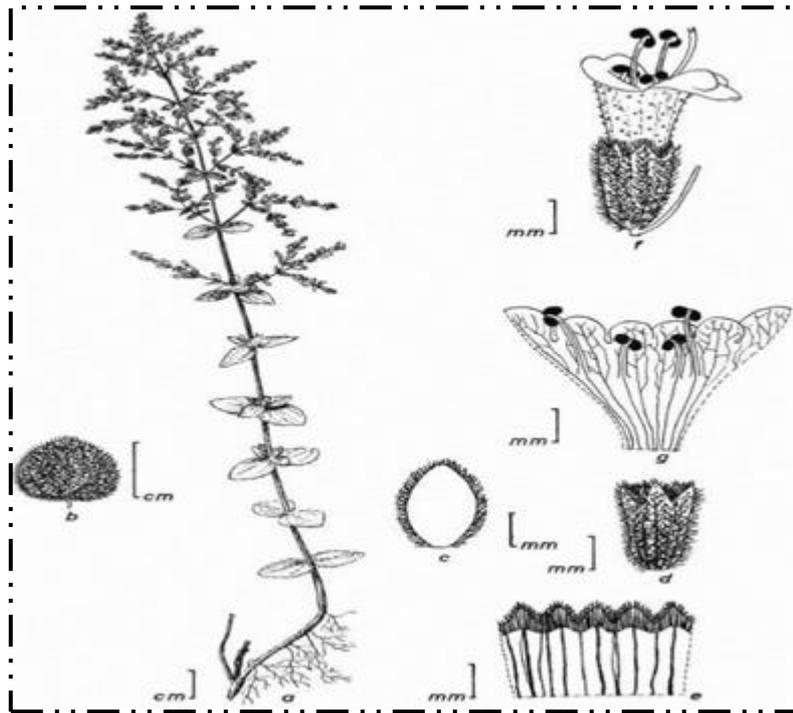
### **Description botanique**

L'*Origanum* est une plante herbacée vivace dont les tiges sont généralement plus courtes et parfois ligneuses. On peut observer plusieurs tiges dressées, de section quadrangulaire ou ramifiées, et ces tiges peuvent persister à l'état sec pendant l'hiver. Elles portent des branches latérales sur le quart ou la moitié supérieure de leur longueur, qui peut varier de 10 à 60 cm. La plupart des tiges sont couvertes de poils, au moins à leur base, dans toutes les espèces, les poils étant simples. Les feuilles sont simples, opposées, ovales et peuvent présenter des poils glandulaires ou non sur leur surface. Elles contiennent des poches sécrétrices sessiles ou pédonculées, ces glandes sécrétrices étant également présentes sur les tiges, les bractées, les calices et les corolles. Chacune des tiges et branches porte des inflorescences, leur aspect en panicule dépendant du nombre de branches. Les bractées peuvent être arrondies, ovales ou lancéolées, les plus petites ressemblant à des feuilles, tandis que les plus grandes sont fines et membraneuses, souvent de couleur pourpre ou jaune-vert. Les caractéristiques fondamentales du genre *Origanum*, telles que résumées ci-dessus, présentent généralement des variations caractéristiques propres à chaque section.

#### **III.4.5. Taxonomie et description botanique de l'espèce *Origanum floribundum***

##### **Description botaniques**

D'un point de vue phylogénétique, *Origanum floribundum* Munby, une espèce vivace herbacée à usage médicinal et condimentaire, appartient au clade des Euangiospermes triaperturées, aux Eudicotylédones, aux Astéridées, à l'ordre des Lamiales et à la famille des Lamiacées<sup>(140)</sup>. Ses caractéristiques morphologiques végétatives se distinguent par une tige prostrée à la base, des jeunes tiges tombantes de section quadrangulaire, et de courts rameaux aux aisselles des feuilles. Les feuilles, simples, opposées, cordiformes ou lancéolées, sont persistantes ou semi-persistantes, de couleur verdâtre et pubescentes. La racine est un rhizome ligneux avec des rejets filamenteux (racines adventives), ce qui lui confère une bonne adhérence, d'où sa présence abondante dans les zones de haute altitude (Figure 24). Pour ce qui est de sa reproduction, les fleurs sont hermaphrodites et se disposent en épis lâches (inflorescence indéfinie), se désintégrant après la floraison. Le calice présente 5 dents courtes, la corolle des lèvres sensiblement égales, confirmant nos observations. Le fruit, un tétrakène ovoïde et lisse, est de couleur noirâtre.



**Figure 24 :** Illustration de l'espèce *Origanum floribundum* Munby

(a. Port général de la plante ; b. Feuille ; c. Bractée intérieure ; d. Calice ; e. Coupe transversale du calice à travers la lèvre inférieure ; f. Fleur avec bractée en vue latérale ; g. Coupe de la corolle à travers la lèvre inférieure).

#### **Taxonomie**

Le polymorphisme existant dans le genre *Origanum* a conduit J.H. Letswaart à réviser sa classification et à le subdiviser en 3 groupes, 10 sections, 43 espèces, 6 sous-espèces, ainsi que 18 hybrides. Selon cette nouvelle nomenclature, l'*Origanum floribundum* appartient à la section *Elongatispica*.

#### **Classification systématique de l'espèce *Origanum floribundum* Munby:**

- ✓ Embranchement : Spermaphytes
- ✓ Sous-embranchement : Angiospermes
- ✓ Classe : Magnoliopsida (Dicotylédones)
- ✓ Sous-classe : Asteridae (Gamopétales)
- ✓ Série : Superovariées tétracycliques
- ✓ Superordre : Tubiflorales
- ✓ Ordre : Lamiales
- ✓ Famille : Lamiaceae
- ✓ Sous-famille : Népétoïdées
- ✓ Genre : *Origanum*
- ✓ Espèce : *Origanum floribundum* Munby

### III.4.6. Travaux antérieurs du genre *Origanum*

L'origan a traditionnellement été utilisé en médecine populaire pour soulager diverses affections telles que l'asthme, la bronchite, la toux, la diarrhée, l'indigestion, les maux d'estomac, les troubles menstruels, les infections, les maladies inflammatoires et le diabète (141). Les bienfaits de l'origan sur la santé humaine ont été attribués à son contenu phytochimique (98, 141). Les composés phytochimiques les plus importants présents dans l'origan sont les huiles essentielles et les composés phénoliques(103).

#### ✚ Flavonoïdes et acides phénoliques de l'origan

Les flavonoïdes et les acides phénoliques de l'origan ont été étudiés en raison de leur potentiel thérapeutique, partiellement attribué à leurs propriétés antioxydantes (98). Des rapports sur différents types d'origan ont montré que les flavones sont le sous-groupe de flavonoïdes le plus abondant, suivi des flavonols. Parmi les acides phénoliques les plus courants dans l'origan, on trouve les dérivés de l'acide hydroxycinnamique et de l'acide hydroxybenzoïque (142). Les principaux composés identifiés dans les espèces d'origan sont l'acide rosmarinique, l'apigénine, la lutéoline, la quercétine, la scutellaréine et leurs dérivés (98, 142). La teneur et la distribution des flavonoïdes et des acides phénoliques dans l'origan peuvent varier en fonction du cultivar, des facteurs géographiques et environnementaux. Il a été indiqué que le profil en flavonoïdes et acides phénoliques de chaque origan peut être utilisé pour différencier les chémotypes d'origan au sein d'une même espèce. Par exemple, il a été rapporté que les flavonoïdes tels que le tricinn-7-O-diglucuronide, le chrysoeriol-7-O-diglucuronide et la lutéoline-7-O-glucuronide peuvent être utilisés pour distinguer trois chémotypes brésiliens de *Lippia alba* (120). De plus, les flavonoïdes et les acides phénoliques identifiés dans les espèces d'origan ont démontré des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et anticancéreuses (123, 143, 144). De manière intéressante, certaines études in vitro, in silico et in vivo ont suggéré une relation entre la structure des flavonoïdes et des acides phénoliques et leurs propriétés biologiques (138). Ainsi, les flavones ont été liées à de nombreuses propriétés pharmacologiques, notamment neuroprotectrices, anti-inflammatoires, antioxydantes, anti-asthmatiques, anti-ulcéreuses, à la réduction du risque de maladies cardiovasculaires, antidiabétiques, anticancéreuses, etc. (123, 145). Les flavonols, par exemple, ont été associés à une réduction du risque de maladies cardiovasculaires (146).

Le tableau suivant présente les principaux flavonoïdes et acides phénoliques trouvés dans les espèces d'origan.

**Tableau 8:** Principaux flavonoïdes et acides phénoliques contenus dans différentes espèces d'origan

Espèces du genre <i>Origanum</i>	Solvants d'extraction	Composition en flavonoïdes	Composition en acide phénols	Références
<i>Origanum majoram</i> L.	Méthanol	Luteolin-7-O-glycoside, luteolin-6,8-C-dihexose, luteolin 7,7'-di-O-glucuronide, luteolin 7-O-glucuronide-3'-O-glucoside, luteolin O-glucuronide, apigenin-O-glucuronide, apigenin-6,8-di-C-hexoside, apigenin-7-glucoside, (+)-catechin, (-)-epicatechin, isoorientin, acacetin, naringenin, sakuranetin, diosmin, kaempferol-O-umbelliferone, rutin, hesperidin, taxifolin, orientin, scutellarein, taxifolin methylether isomer 1, taxifolin methylether isomer 2, dihydrokaempferide, kaempferol-O-glucuronide, dimethylmyricetin, O-methyl-queracetin, 3-O-methyl-catechin, isovitexin.	Les acides caféiques, l'acide dihydroxybenzoïque hexose, l'acide syringique, l'acide vanillique, l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque, l'acide p-coumarique, l'acide chlorogénique, le caféoyl-arbutin, l'acide salvianolique, l'acide rosmarinique, l'acide gallique, l'acide chicorique, l'ériodictyol 6,8-di-C-glucoside et l'ériodictyol 7-O-glucoside	(147)
	Extrait chloroformique	Thymonin, penduletin, axillarin et chrysopterin.	—	
	Eau	Epicatechin, naringenin, catechin, kaempferol, quercetin et chrysin	Acide vanillique, acide protocatéchique, acide syringique, acide gallique, acide cinnamique, acide o-coumarique, acide férulique, acide caféique, acide sinapique et acide rosmarinique.	(148)
	Acétate d'éthyle	Eriodictyol 7-O-rutinoside, sorbifoline, aromadendrine, naringénine, lutéoline, apigénine et cirsimaritrine	Eriodictyol, cirsiol, cirsilinol, xanthomicrol, acide caféique, acide rosmarinique	(149)
<i>Origanum</i>	Méthanol	Chrysin, épicatechine, naringénine, rutine, lutéoline-7-O-	Acide p-coumarique, acide caféique,	(150)

<i>dictamus</i>		glucoside, apigénine-7-O-glucoside, catéchine, génistéine, quercétine	acide chlorogénique, acide rosmarinique, acide vanillique, acide protocatéchique, acide syringique, acide gallique, acide cinnamique	
	Aqueux	Épicatéchine, catéchine, génistéine, apigénine, lutéoline	Acide gallique, acide caféique, acide protocatéchique, et acide rosmarinique	(148)
<i>Origanum. acutidens</i>	Aqueux	—	Acide gallique, acide caféique, 4-hydroxybenzaldéhyde, acide p-coumarique, acide rosmarinique	(151)
<i>Origanum. vulgare</i>	Méthanol	Chrysin, negletein, mosloflavone, (-)-epicatechin, naringenin, lutéoline-7-O-glucoside, kaempferol, apigénine-7-O-glucoside, quercétine, diosmétin, galangine, rétusine, naringenin, taxifolin/dihydroquercétine	Acides caféiques, chicoriques et p-coumariques, acide rosmarinique	(152)
<i>Origanum. microphyllum</i>	Aqueux		Acide p-hydroxybenzoïque, acide protocatéchique, acide syringique, acide caféique, naringénine	(153)
<i>Origanum. glandulosum</i>	Méthanol + Acétate d'éthyle	Lutéoline, 8,4'-dihydroxy-7-O-β-D-arabinopyranosideflavone, apigénine-7-O-α-D-glucoside	Acide caféique, glucoside	(154)

### ✚ Travaux phytochimiques antérieurs de l'espèce *Origanum floribundum*

La majeure partie des travaux de recherche concernant cette espèce a été focalisée sur les huiles essentielles. Il a été observé que l'espèce étudiée dans ces recherches a été récoltée dans la région de Blida ou Chréa, en Algérie. Kerbouche et al.<sup>(155)</sup> ont caractérisé l'huile essentielle d'*O. floribundum*, dont les composés majoritaires sont le thymol (33,6 %), le  $\gamma$ -terpinène (19,9 %) et le p-cymène (15,5 %). Une étude réalisée par Mohamed Hazzit et al.<sup>(156)</sup> a porté sur la caractérisation des huiles essentielles des feuilles et des fleurs. Les composés majoritaires sont respectivement le p-cymène (22,3 % et 9,6 %), le  $\gamma$ -terpinène (17,3 % et 24,3 %) et le thymol (34,4 % et 41,2 %). Zahia Houmaniet al.<sup>(157)</sup> ont effectué l'analyse de l'huile essentielle d'*O. floribundum*, où l'on trouve le p-cymène (31 %), le thymol (9,9 %) et le carvacrol (35,0 %). Mir et al.<sup>(158)</sup> ont rapporté la composition de l'huile essentielle, dont les composés majoritaires sont le thymol (86,9 %) et le p-Cymène (5,1 %). Daoudi et al.<sup>(159)</sup> ont contribué à mettre en évidence l'influence des paramètres écologiques et de la variation des traits morphologiques sur la composition chimique et l'activité antioxydante des huiles essentielles de six populations. Les principaux constituants des huiles sont le carvacrol, le  $\gamma$ -terpinène et le p-cymène, avec une prédominance de carvacrol (31,8 % à 60,8 %).

Quelques études ont été menées sur les extraits méthanoliques par K. H.C. Baser<sup>(160)</sup>. Naima Hadjadj et al.<sup>(161)</sup> ont étudié la composition de l'extrait méthanolique d'*O. floribundum* prélevé à Chréa. L'analyse des extraits par RP-HPLC a abouti à l'identification de dix composés, dont six acides phénoliques (acide gallique, acide caféique, acide férulique, acide salicylique, acide rosmarinique et acide cinnamique) et quatre flavonoïdes (catéchine, vitexine, myricétine et kaempférol). Ksouri, S et al.<sup>(162)</sup> ont analysé la composition de l'huile essentielle d'*O. floribundum*, dont les composés majoritaires sont le thymol (50,47 %) et le p-cymène (24,22 %). L'activité antifongique a été établie. Nasri et al.<sup>(163)</sup> ont présenté une étude visant à évaluer les composés phytochimiques et les propriétés antidiabétiques de l'extrait aqueux d'*Origanum floribundum* collecté à Chréa. La toxicité aiguë de l'extrait a été déterminée. Les résultats obtenus ont montré la détection de divers métabolites secondaires tels que les alcaloïdes, les flavonoïdes, les saponines, les terpénoïdes dans l'extrait. Aucune mortalité n'a été observée au cours des études de toxicité aiguë jusqu'à la dose de 2000 mg/kg.

Les travaux de Skoula et al.<sup>(164)</sup> ont révélé la présence de flavonoïdes dans *O. floribundum*, avec une teneur totale égale à 826 mg/g de matériel végétal sec. Les flavonoïdes identifiés sont: Apigénine ;ladanéine ; pebreillin et des des methoxyflavones.

## **PARTIE 2**

# **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

## Objectifs des travaux de la thèse

L'objet de cette thèse s'inscrit dans le domaine de la phytochimie, mettant principalement l'accent sur la caractérisation et la valorisation des substances naturelles végétales issues de plantes endémiques et natives d'Algérie. Dans le but de cibler les molécules d'intérêt, de les séparer, de les analyser, de les visualiser et d'interpréter les résultats qui génèrent de plus en plus de données. Différentes stratégies méthodologiques ont été adoptées lors de la réalisation de ce travail, s'appuyant sur une panoplie d'outils d'analyse, allant de la caractérisation d'un échantillon complexe d'huile essentielle ou extraits de flavonoïdes à l'analyse structurale des composés isolés (flavonoïdes purs), les méthodes d'obtention qui sont principalement d'ordre chromatographiques et d'identifications structurales, principalement spectroscopiques.

Deux espèces endémiques rarement étudiées, *Origanum floribundum* et *Daucus virgatus* ont fait l'objet de ce travail portant sur l'étude phytochimique et biologique, à savoir l'évaluation des activités antioxydantes, antimicrobienne et inhibition des enzymes cholinestérases et alpha-glucosidase.

Le matériel utilisé pour mener à bien cette thèse, comprenant le matériel végétal, les solvants, les réactifs, les équipements, ainsi que les souches bactériennes et les enzymes, seront tous décrits en détail dans les différentes sections de cette partie. Cette dernière sera divisée en deux volets : un premier chapitre portant sur l'investigation phytochimique, et un deuxième chapitre traitant de l'évaluation des activités biologiques des espèces étudiées. Cette deuxième partie mettra en lumière les travaux personnels réalisés en laboratoire.

## Chapitre I : Investigation phytochimique des espèces étudiées

### I. Étude phytochimique de l'espèce *Origanum floribundum* Munby

#### 1. Récolte et préparation du matériel végétal

La récolte de l'espèce *Origanum floribundum* Munby a été effectuée pendant la période de floraison en Juin 2017 au niveau du parc national de Djurdjura (PND) de Bouira. La préparation de la plante pour l'extraction et toutes les opérations qui suivent ont été réalisées au niveau du Laboratoire de Chimie, Ingénierie des Matériaux et Nanostructures (LCIMN). Avant de procéder à l'extraction, les feuilles ainsi récoltées (environ 1 kg de la plante) seront soigneusement séchées dans un endroit sec et aéré, à l'abri de la lumière. Par la suite, le matériel végétal est réduit en petits morceaux par broyage mécanique afin de faciliter le contact des constituants avec les solvants d'extraction.

#### 2. Screening phytochimique

Le screening ou criblage phytochimique est un moyen pour mettre en évidence la présence des familles chimiques présentes dans une plante donnée. Des tests de caractérisation basés sur l'analyse qualitative, utilisant des réactions de précipitation ou de coloration. Ces tests sont réalisés afin de déterminer de manière préliminaire la nature des différents constituants contenus dans la plante étudiée. La connaissance de la famille chimique des constituants de la plante permet d'orienter la sélection du mode d'extraction et de la méthode d'isolement à adopter. Le mode opératoire de ces tests est rapporté en Annexe 2. Le tableau 9 représente les différents groupes chimiques recherchés et les réactifs spécifiques utilisés.

**Tableau 9:** Réactifs spécifiques et réactions de caractérisation du criblage phytochimique <sup>(165)</sup>

Groupes chimiques	Réactifs et résultats positifs
Alcaloïdes	Mayer (iodomercurate de potassium) → précipité blanc jaunâtre
Flavonoïdes	Reactif à la cyanidine → coloration rouge cerise (flavonols) ou rouge violacé (flavanones) ou orange (flavones)
Tanins	FeCl <sub>3</sub> coloration → bleu verdâtre (tanins catéchiques), brune noirâtre (tanins galliques)
Coumarines	NH <sub>4</sub> OH (25%) → Fluorescence intense sous lumière UV
Dérivés quinoniques	Bornträger (reaction entre cycle quinoniques en milieu NH <sub>4</sub> OH) → Coloration rouge violacée

Stéroïdes et terpènes	Liebermann-Burchard (anhydride acétique et H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) → coloration rose violette
Saponosides	Détermination de l'indice de mousse (IM : indice de mousse)

### 3. Extraction des flavonoïdes

Suivant le protocole d'extraction décrit par Markham et al.<sup>(166)</sup>, 1 kg de matériel végétal broyé est soumis à une extraction par macération dans le mélange Méhanol/eau (80/20 : v/v) pendant 72 heures avec renouvellement de solvant chaque 24 heures et agitation de temps en temps. Les macérats sont filtrés sous-vide, réunis puis évaporés à sec au moyen d'un évaporateur rotatif. Le résidu sec, qui est l'extrait hydroalcoolique, est repris dans 500 ml d'eau distillée bouillante, ce qui permet le dépôt de la chlorophylle. Après une décantation toute une nuit, on récupère la phase aqueuse (surnageant) qui va subir des extraction liquide-liquide par une série de solvants à polarité croissante, le dichlorométhane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), l'acétate d'éthyle (EtOAc) et le *n*-butanol (*n*- BuOH). Les différents solvants sont évaporés, et les extraits obtenus sont dénommés selon le solvant qui a permis leur séparation, puis pesés pour déterminer les rendements d'extraction exprimés par rapport à 100 g de matière sèche. Trois fractions organiques sont obtenues : 5,32 g pour la fraction dichlorométhane, 18,26 g pour la fraction acétate d'éthyle et 36,17 g pour la fraction butanolique.

Le protocole d'extraction est décrit dans la figure 25. Le rendement des différents extraits est exprimé par la relation suivante :

$$R\% = \frac{\text{masse de l'extrait}}{\text{masse de la plante}} \times 100$$

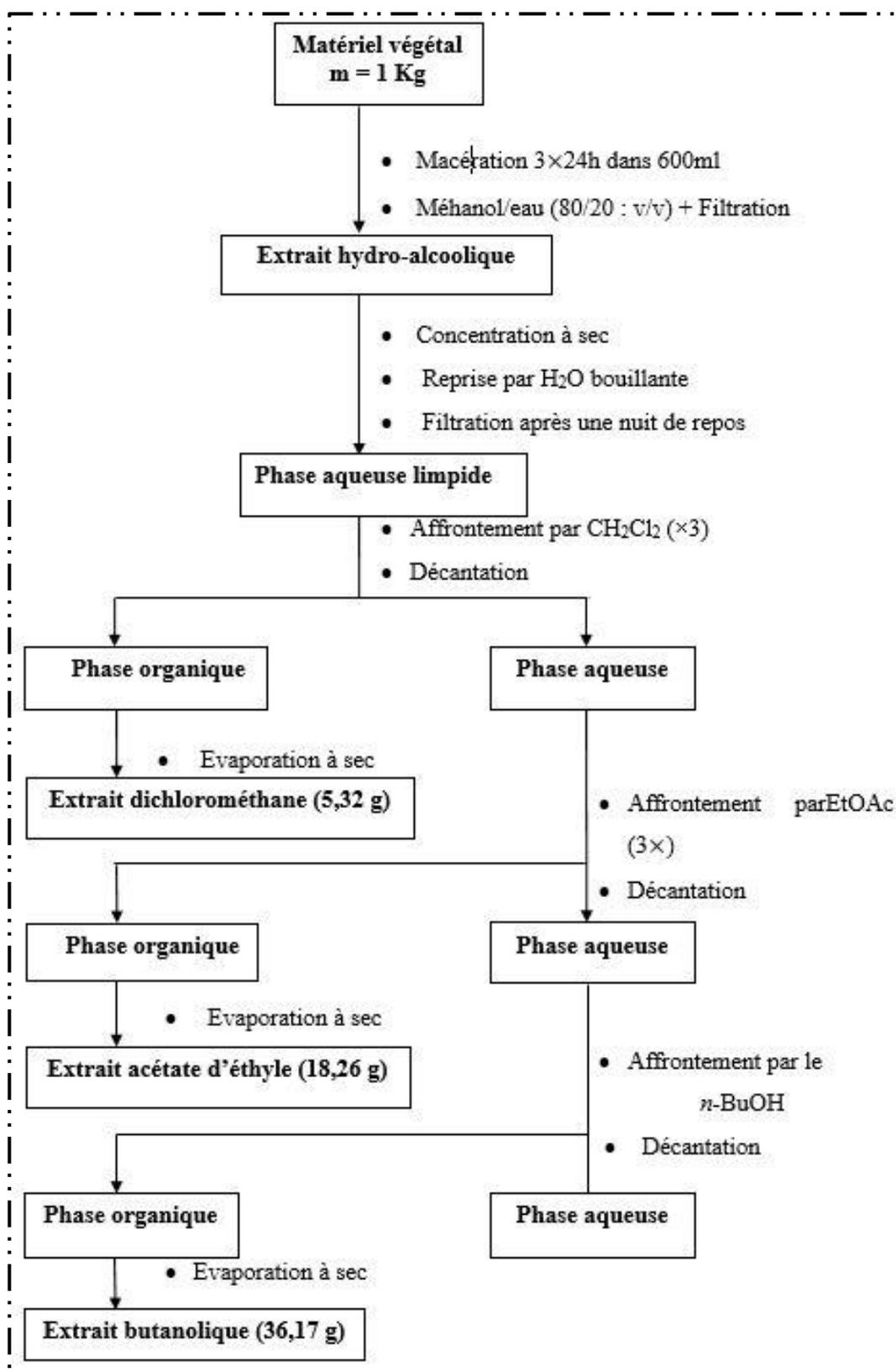


Figure 25 : Schéma du protocole d'extraction des flavonoïdes

#### 4. Essais chromatographiques : CCM bidimensionnelle (2D)

Les trois extraits  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , EtOAc, *n*-BuOH, ont été soumis à une chromatographie bidimensionnelle sur des plaques en verre carrée (20x20) de polyamide (DC6) préparé au laboratoire. La CCM a été réalisée en utilisant le système DI (Tol / MEC / MeOH : 4/ 3/ 3) en première élution et le système DII ( $\text{H}_2\text{O}$  / MEC / MeOH / AcAc : 30/10/15/5) en deuxième élution. Les plaques sont révélées sous les lampes UV (254 et 365 nm).

Le principe de cette technique consiste à analyser le comportement chromatographique des trois extraits vis à vis d'une phase d'élution aqueuse et organique. Ainsi, la coloration et les valeurs  $R_f$  des tâches observées peuvent nous renseigner sur la nature des composés des différents extraits, constituant une approche préliminaire pour analyser le contenu des différents extraits en fonction de leurs polarités croissantes.

#### 5. Fractionnement de l'extrait dichlorométhane $\text{CH}_2\text{Cl}_2$

L'objectif principal de cette étape de travail est principalement d'aboutir à l'isolement des flavonoïdes apolaire notamment les aglycones méthoxylés. Vu que l'approche adoptée dans ce travail, à savoir l'extraction par dichlorométhane, visait dès le début ce genre de produits. Le fractionnement de l'extrait  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a été effectué par chromatographie sur colonne, la phase stationnaire employée est le gel de silice (Silicagel® 230-400 mesh) de granulométrie (40-63  $\mu\text{m}$ ). Le choix optimal du système de séparation, qui constitue la phase mobile pour la colonne de l'extrait dichlorométhane est:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ / AcoEt et AcoEt / MeOH. La séparation sur colonne a été réalisée en mode gradient jusqu'à l'épuisement de l'extrait. 404 fractions sont collectées (Tableau 10). Le suivi de la colonne a été effectué par CCM analytique (Silicagel 60 F<sub>254</sub> Merck), les plaques CCM ont été visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm). L'examen des CCM a permis le regroupement de 43 fractions (Fn) suivant la similitude de leur profil chromatographique par les systèmes suivants :

✚  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ / AcOEt (9:1)

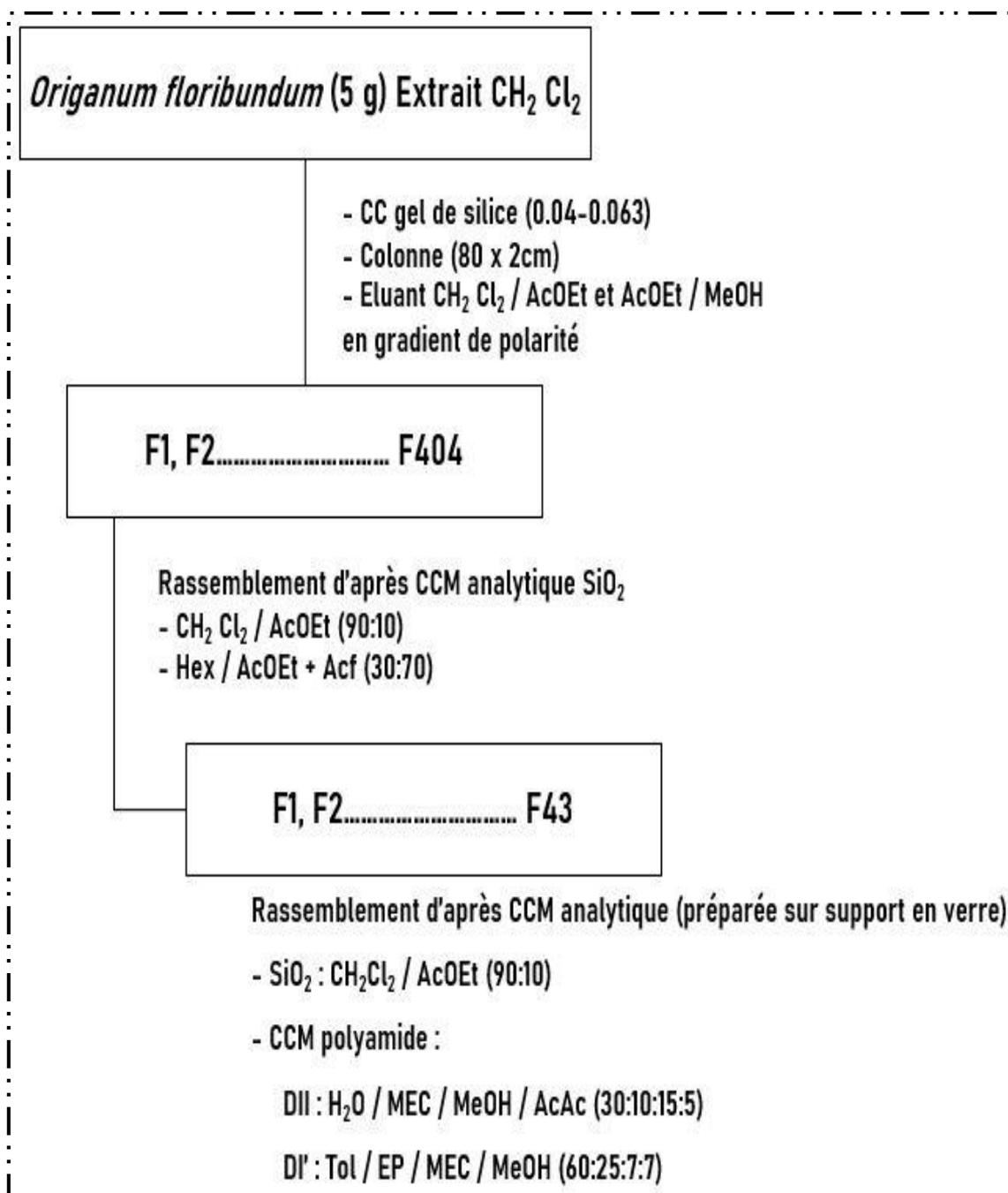
✚ Hex/ EtOAc + Acf (30:70)

Tous les systèmes d'élution adoptés et appliqués pour cet extrait ressortent de la littérature et de l'analyse systématique des flavonoïdes <sup>(86)</sup>.

**Tableau 10:** Résultats de séparation par chromatographie sur colonne de gel de silice de l'extrait dichlorométhane

Fractions (Fn)	Rassemblement des fractions	% d'éluant CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt et AcOEt/ MeOH	Observations
F1	F <sub>1</sub> - F <sub>4</sub>	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Mélange en faible quantité
F2	F <sub>6</sub> - F <sub>9</sub>		
F3	F <sub>10</sub> + F <sub>11</sub>		
F4	F <sub>12</sub> - F <sub>16</sub>	95 : 5	Probable flavonoïde majoritaire en mélange
F5	F <sub>17</sub> - F <sub>27</sub>		
F6	F <sub>28</sub> - F <sub>48</sub>		
F7	F <sub>49</sub> + F <sub>50</sub>	90 :10	Mélange de produits
F8	F <sub>51</sub> - F <sub>63</sub>		
F9	F <sub>64</sub> - F <sub>76</sub>		
F10	F <sub>77</sub> - F <sub>82</sub>		
F11	F <sub>83</sub> - F <sub>89</sub>	80 : 20	Probable flavonoïde majoritaire en mélange
F12	F <sub>90</sub> - F <sub>107</sub>		
F13	F <sub>108</sub> - F <sub>126</sub>		
F14	F <sub>127</sub> - F <sub>158</sub>		
F15	F <sub>159</sub> - F <sub>165</sub>		
F16	F <sub>166</sub> - F <sub>185</sub>	70: 30	Probable flavonoïde majoritaire en mélange
F17	F <sub>186</sub> - F <sub>228</sub>		
F18	F <sub>229</sub> - F <sub>247</sub>		
F19	F <sub>248</sub> + F <sub>249</sub>	50:50	Mélange de produits
F20	F <sub>250</sub> - F <sub>256</sub>		
F21	F <sub>257</sub> + F <sub>258</sub> + F <sub>259</sub>	40: 60	Probable flavonoïde majoritaire en mélange
F22	F <sub>260</sub> - F <sub>267</sub>		
F23	F <sub>268</sub> - F <sub>271</sub>	30:70	Probable flavonoïde majoritaire en mélange
F24	F <sub>272</sub> + F <sub>273</sub> + F <sub>274</sub>		
F25	F <sub>275</sub>		
F26	F <sub>276</sub> - F <sub>283</sub>	20: 80	Probable flavonoïde majoritaire en mélange
F27	F <sub>284</sub>		
F28	F <sub>285</sub> - F <sub>295</sub>		
F29	F <sub>296</sub> + F <sub>297</sub>	100% AcOEt	Mélange de produits
F30	F <sub>298</sub> - F <sub>302</sub>		
F31	F <sub>303</sub> - F <sub>309</sub>		
F32	F <sub>310</sub> - F <sub>319</sub>		
F33	F <sub>320</sub> + F <sub>321</sub>	60:40	Mélange de produits
F34	F <sub>322</sub> - F <sub>329</sub>		
F35	F <sub>330</sub> - F <sub>334</sub>		
F36	F <sub>335</sub> - F <sub>342</sub>	40: 60	Mélange de produits
F37	F <sub>343</sub> - F <sub>353</sub>		
F38	F <sub>354</sub> - F <sub>361</sub>		
F39	F <sub>362</sub> - F <sub>370</sub>	20: 80	Mélange de produits
F40	F <sub>371</sub> - F <sub>384</sub>		
F41	F <sub>385</sub> + F <sub>386</sub> + F <sub>387</sub>	100% MeOH	Mélange de produits
F42	F <sub>388</sub> + F <sub>389</sub> + F <sub>390</sub> + F <sub>391</sub>		
F43	F <sub>392</sub> - F <sub>404</sub>		

Les 43 fractions (Fn) seront regroupées encore une fois en fonction de la similitude de leurs profils chromatographiques, les résultats de CCM (SiO<sub>2</sub>, DC6), conformément aux systèmes d'élution décrits dans la figure 26.

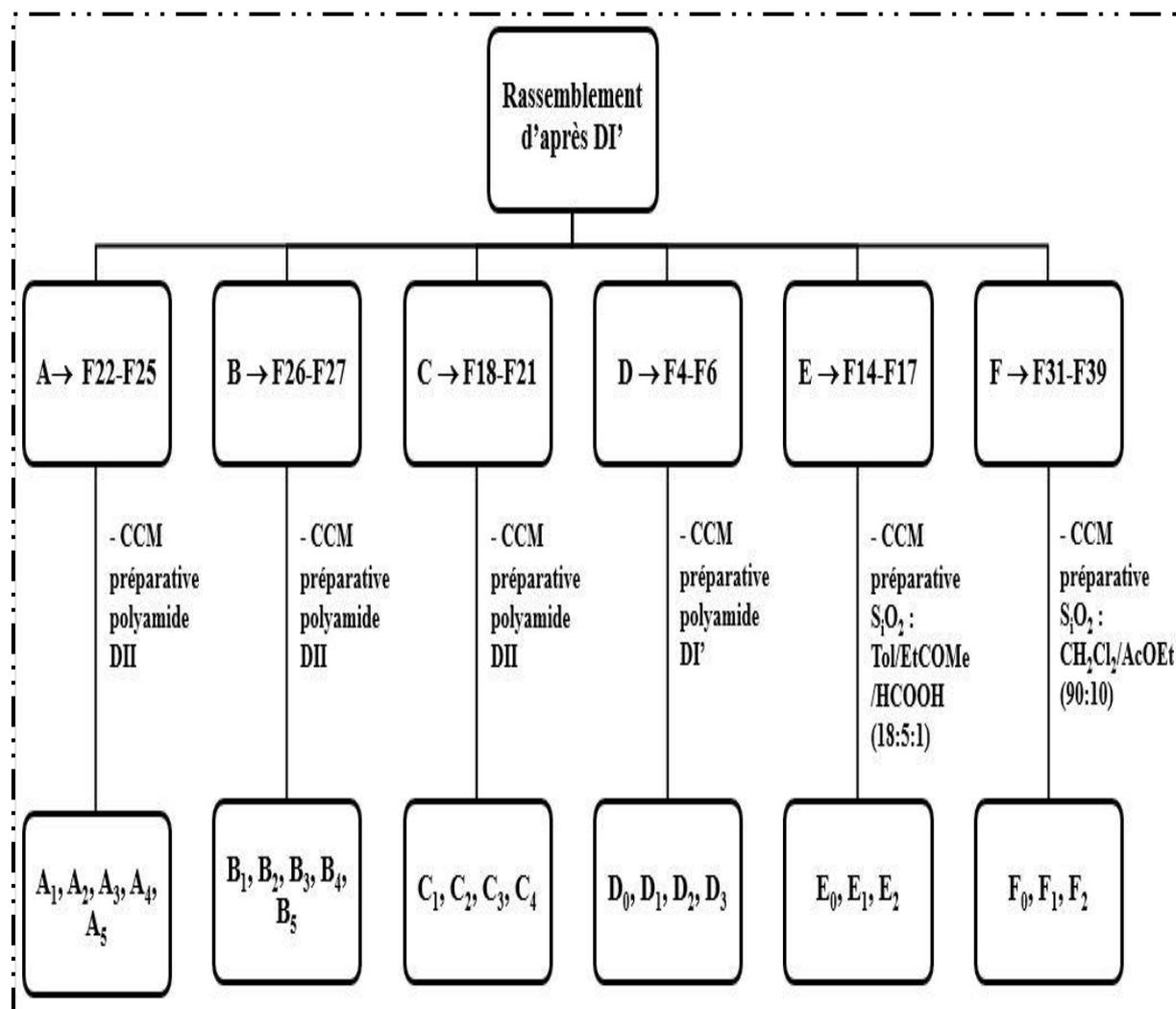


**Figure 26 :** Schéma de séparation sur colonne et rassemblement des fractions

## 6. Étude des fractions de la colonne et isolement des flavonoïdes

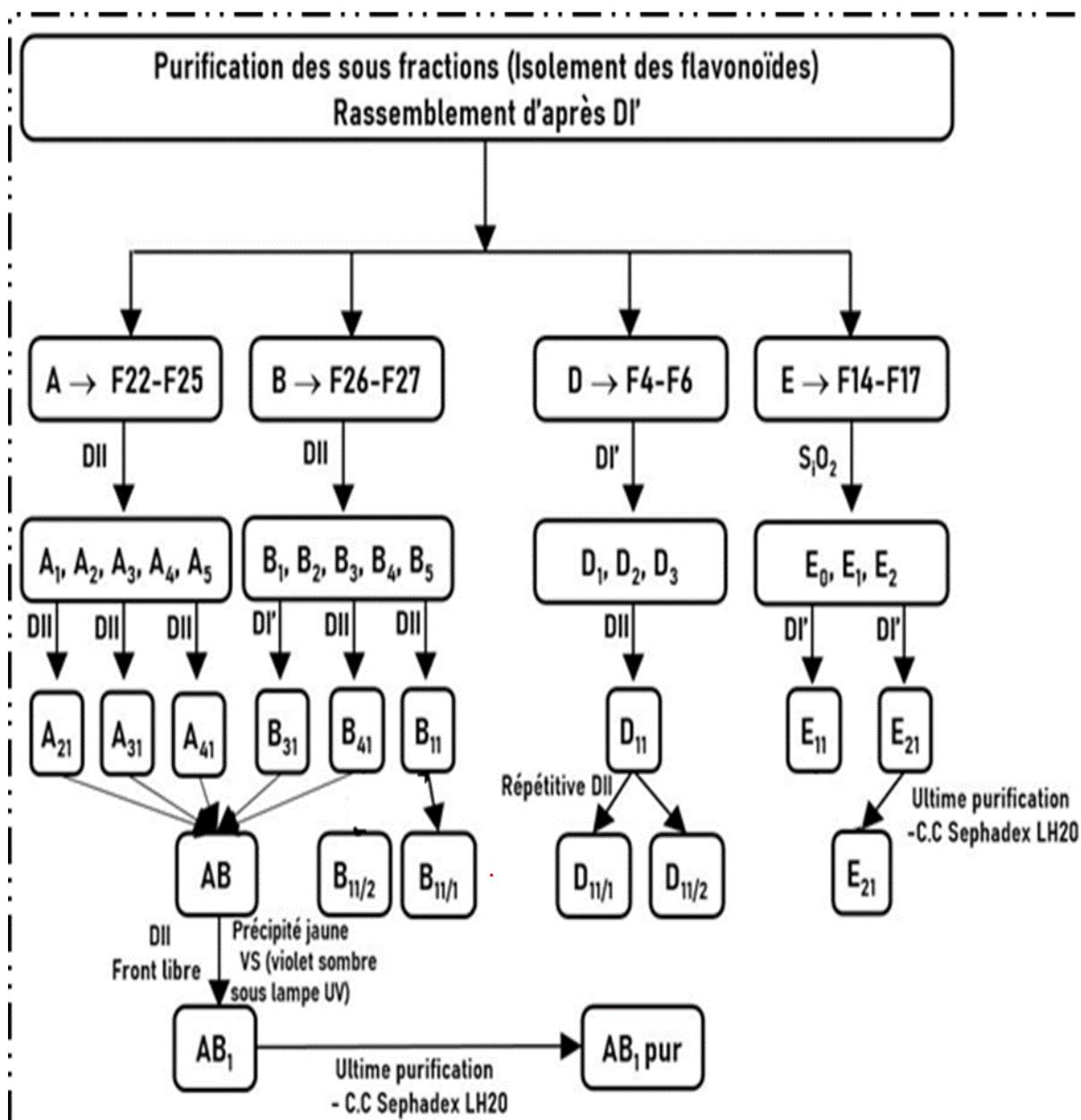
Le rassemblement des fractions a conduit à l'obtention de six sous-fractions A, B, C, D, E et F (Figure 27). Ces dernières vont subir des purifications sur CCM préparative, support en verre en utilisant le polyamide comme adsorbant pour les fractions A, B, C, D et le gel de

silice pour les fractions E, F. Le choix du système d'éluion est directement lié à la nature des flavonoïdes contenus dans ces fractions. Le système chromatographique qui a montré une meilleure séparation des produits est celui de la dimension D'(Tol/EP/MEC/MeOH : 60/25/7/7), une dimension très apolaire ayant une grande affinité avec les composés de ces fractions, assurant ainsi une bonne séparation de ces derniers.



**Figure 27** : Schéma de fractionnement et purification des sous fractions de l'extrait  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$

Quatre fractions (A, B, D, E) passent à la deuxième étape de séparation et purification sur CCM préparative (sur DC6 et  $\text{SiO}_2$ ), ce qui a conduit à la fin à l'isolement de 7 flavonoïdes dont certains d'entre eux ont subi des ultimes purifications sur colonne de Sephadex LH-20. Toutes les étapes de purifications et d'isolement sont résumées dans le schéma présenté dans la figure 28. Les flavonoïdes isolés sont :  $\text{AB}_1$ ,  $\text{B}_{11/1}$ ,  $\text{B}_{11/2}$ ,  $\text{D}_{11/1}$ ,  $\text{D}_{11/2}$ ,  $\text{E}_{11}$ ,  $\text{E}_{21}$ .



**Figure 28 :** Isolement et purification des flavonoïdes de l'extrait CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

La prochaine étape est l'élucidation structurale des produits isolés. Seules trois produits parmi les 7 isolées de l'extrait CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (AB<sub>1</sub>, E<sub>11</sub>, D<sub>11/1</sub>) sont passés à l'analyse structurale (UV-Visible, LC/MS et RMN) et ce pour leurs degrés pureté et de propreté, confirmés par des essais sur CCM analytique et analyse par HPLC.

### 7. Fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle (AcOEt)

Un premier fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle AcOEt (18 g) a été réalisé par chromatographie d'adsorption sur une colonne de polyamide selon un système d'éluion Tol/MeOH à polarité croissante. Les fractions recueillies sont regroupées suivant la similitude

de leur profil chromatographique sur couches minces de gel de silice. Le tableau 11 résume le déroulement de la colonne. Trente-trois fractions ont été collectées puis rassemblées suite aux résultats des CCM analytiques réalisées sur divers systèmes et visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm). Le rassemblement des fractions a été réalisé en fonction des résultats de la CCM sur SiO<sub>2</sub>. Les spots de même composition sont rassemblés, donnant ainsi 9 fractions.

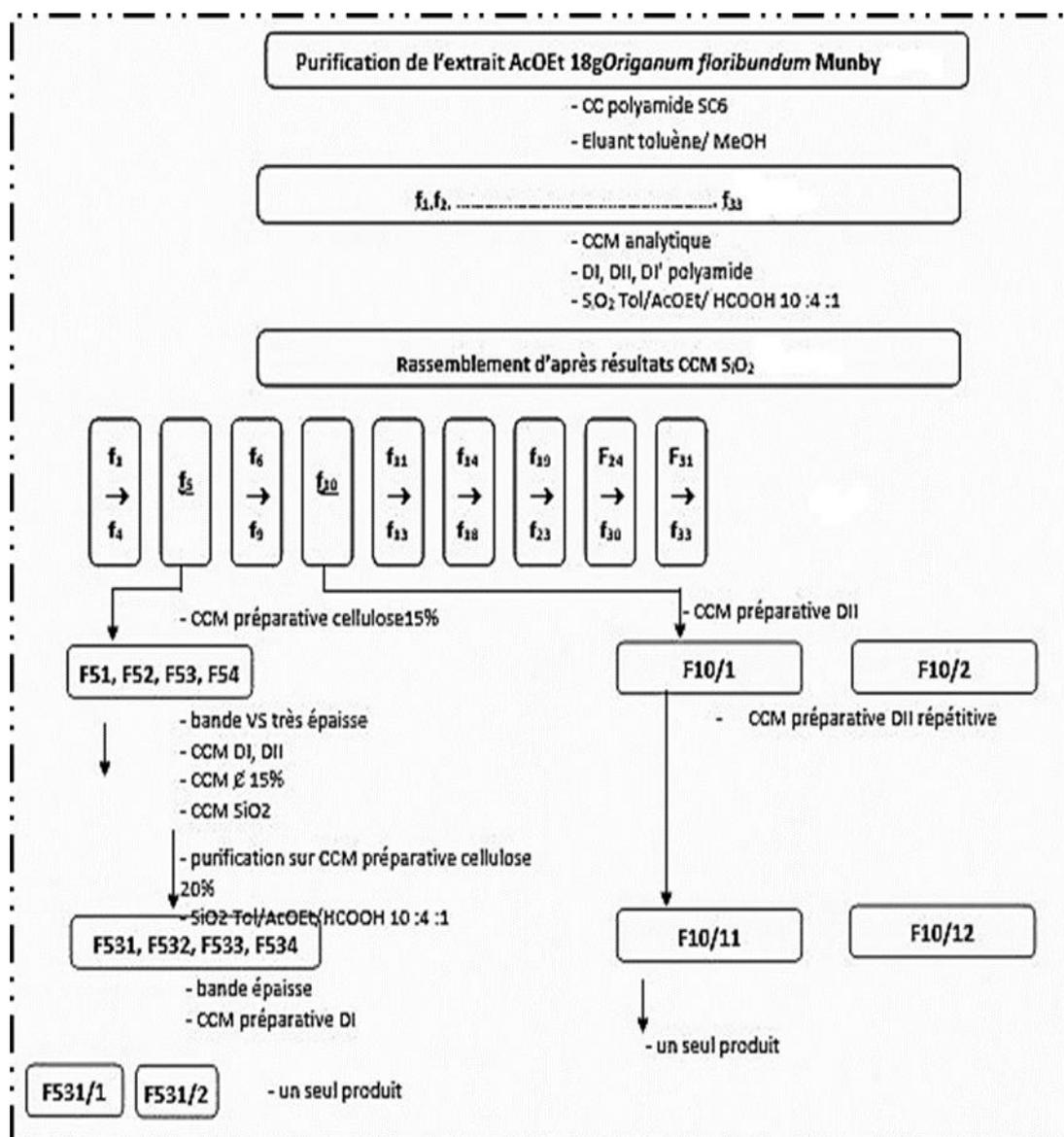
**Tableau 11:** Fractions collectées de la colonne de séparation de l'extrait AcOEt

Fractions	Système d'élution Tol/ MeOH
F <sub>1</sub> -F <sub>4</sub>	100% Tol
F <sub>5</sub>	90 :10
F <sub>6</sub> -F <sub>9</sub>	80 :20
F <sub>10</sub>	70 :30
F <sub>11</sub> -F <sub>13</sub>	60 :40
F <sub>14</sub> -F <sub>18</sub>	50 :50
F <sub>19</sub> -F <sub>23</sub>	40 :60
F <sub>24</sub> -F <sub>30</sub>	20 :80
F <sub>31</sub> -F <sub>33</sub>	100% % MeOH

### Étude des fractions de la colonne et isolement des flavonoïdes

Les deux fractions f5 et f10 ont été soumises aux contrôles chromatographiques sur des plaques analytiques ou semi-préparative sur divers systèmes : DI, DII, SiO<sub>2</sub> et cellulose à 15%. Les plaques ont été révélées sous lampes UV (254 et 365 nm), ce qui permet de choisir le système d'élution qui aura une meilleure séparation.

Sept produits ont été isolés de l'extrait AcOEt. Seuls deux produits F531/2 et F10/11 ont fait l'objet d'élucidation structurale. Le choix est basé sur leurs degrés de pureté et de propreté.



**Figure 29:** Isolement et purification des flavonoïdes de l'extrait AcOEt

## 8. Analyse structurale des flavonoïdes isolés

Afin d'arriver à identifier les produits isolés, une série de méthodes commune et appliquée en fonction de la nature de ces produits. Ainsi, pour les flavonoïdes, rien que les valeurs des  $R_f$  dans des systèmes de solvants connus et la fluorescence du produit en question permettent d'avoir une première approche structurale qui facilitera énormément la suite des opérations. Ces deux opérations sont appliquées d'une manière systématique pour ce genre de produits naturels avant même les analyses physiques proprement dites, qui sont par ordre d'utilisation la spectrophotométrie UV-Visible, la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse LC/MS ou en tandem (LC.MS.MS) et RMN.

## 8.1 Spectroscopie UV-Visible

Les spectres UV des composés flavoniques purifiés enregistrés dans le méthanol permettent de déterminer la classe de flavonoïdes à laquelle ils appartiennent. Ces spectres peuvent être modifiés en présence de réactifs tels que la soude (NaOH), le chlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>), l'acétate de sodium (NaOAc) et l'acide borique (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>). En général, la procédure d'enregistrement des spectres avec addition des réactifs se fait comme suit :

### ▪ Première série spectrale

L'enregistrement du spectre du composé flavonique préalablement purifié dans le méthanol. Puis, 3 gouttes de solution aqueuse de soude (NaOH 0.5 N) sont ajoutées à la solution précédente. Enregistrement immédiat du spectre en présence de soude, puis après 5 min. L'ajout de la soude en tant que base forte va induire la déprotonation de tous les groupements hydroxyles.

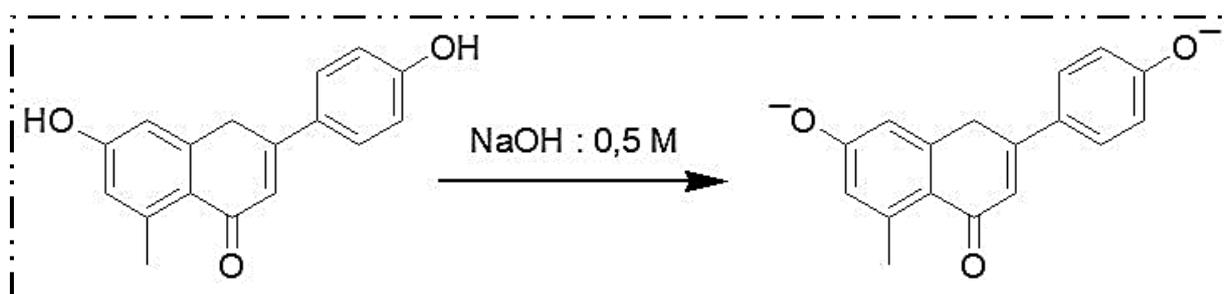
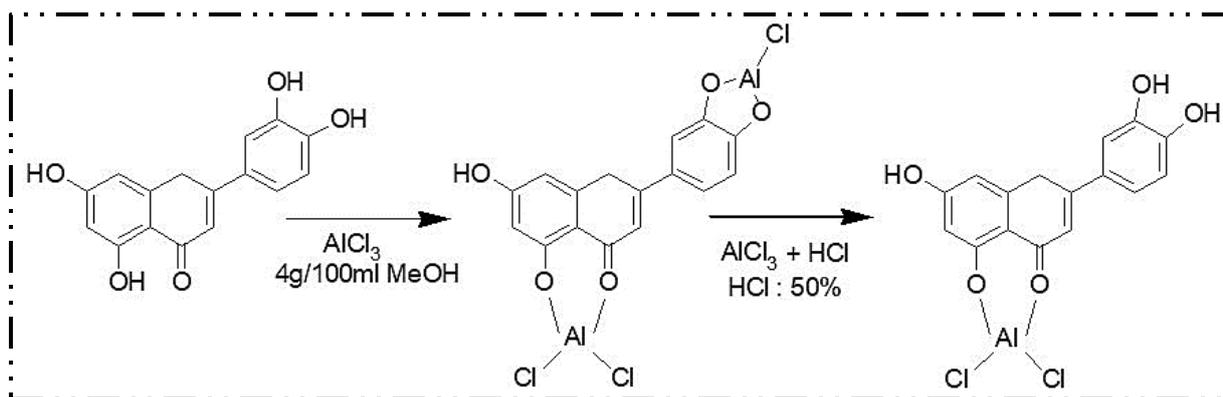


Figure 30 : Réaction du flavonoïde avec le réactif NaOH

### ▪ Deuxième série spectrale

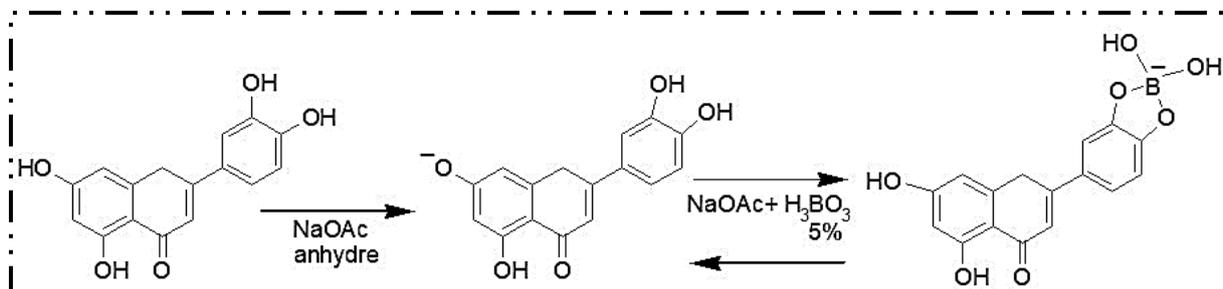
L'enregistrement du spectre du composé flavonique dans le méthanol. Puis, 5 gouttes de chlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) sont additionnées et enregistrement du spectre, et enfin addition à la cuve précédente de 3 à 5 gouttes de HCl puis enregistrement du spectre AlCl<sub>3</sub>+HCl. Ce réactif entraîne la formation de complexes acido-résistants entre les hydroxyles et les cétones voisines, ainsi que des complexes acido-labiles avec les groupes Ortho-dihydroxyles.



**Figure 31** : Réaction du flavonoïde avec le réactif  $\text{AlCl}_3$  et  $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$

### ▪ Troisième série spectral

Enregistrement du spectre du composé flavonique dans le méthanol. Puis, quelques grains d'acétate de sodium NaOAc anhydre sont ajoutés au flavonoïde dilué. Le spectre en présence de NaOAc est enregistré, ce réactif ne déprotone que les groupes hydroxyles les plus acides. Enfin, le spectre NaOAc/ $\text{H}_3\text{BO}_3$  est enregistré après addition de 5 gouttes à de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  et homogénéisation. Ce réactif entraîne la formation de complexes avec les groupements O-dihydroxyles.



**Figure 32** : Réaction du flavonoïde avec le réactif NaOAc et NaOAc +  $\text{H}_3\text{BO}_3$

Chaque flavonoïde a ainsi été caractérisé par six spectres UV, donnant d'importantes informations sur la structure de la molécule. Les schémas (1) et (2) présentés ci-dessous illustrent l'interprétation de l'analyse spectrale. Le schéma (1) présente les actions des réactifs sur la molécule flavonique, tandis que le schéma (2) illustre les différentes incidences sur les allures des spectres UV-Visible.



## 9. Produits détectés suite à l'analyse par couplage LC-DAD-HRMS/MS

Dans le cadre de l'analyse qualitative des extraits ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , AcOEt et *n*-BuOH) de l'espèce *O. floribundum*, la méthode appliquée est la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem.

**Conditions opératoires :** HPLC-DAD (Agilent série 1200) couplé à un spectromètre de masse (Agilent Technologies 6520-Mass Q-ToF) constituent le système d'analyse. L'instrument est contrôlé en utilisant le logiciel Mass Hunter. Le système de séparation par HPLC est équipé d'un dégazeur à vide, un échantillonneur automatique, une pompe binaire et une DAD. La colonne utilisée pour la séparation chromatographique est une Uptisphere Strategy C18 (5  $\mu\text{m}$ , 250mm x 4,6 mm). La phase mobile utilisée consiste en un mélange d'eau et l'acide formique à 0.1% (éluant A) et de l'acétonitrile + l'acide formique à 0.1% (éluant B). Le gradient d'éluant appliqué est comme suit : 0–10 min, 95% A ; 10–40 min, 95–0% A ; 40–50 min, 0% A ; 50–55 min, 0–95% A, et 55–65 min, 95% A. Les échantillons à analyser (10 mg/ml) sont solubilisés dans du méthanol (MeOH) et le volume d'injection est de 0.8  $\mu\text{l}$ .

L'analyse HRMS/MS a été effectuée en utilisant une interface APCI (ionisation chimique à pression atmosphérique) en mode positif et négatif avec les conditions opératoires suivantes pour le mode négatif : température capillaire 250 °C ; température du vaporisateur APCI 400 °C ; débit de gaz de gaine 20 a.u.; débit de gaz auxiliaire 5 a.u. et débit de gaz de balayage 5 a.u. Pour le mode positif : température capillaire 250°C ; température du vaporisateur APCI 400°C ; débit de gaz de gaine 25 a.u. ; débit de gaz auxiliaire 25 a.u. et débit de gaz de balayage 5 a.u. ; courant de décharge de 5  $\mu\text{A}$  ; tension capillaire de 21 V et tension de lentille tubulaire de 75 V. Les chromatogrammes ont été enregistrés entre 200 et 600 nm. Les données de masse précises pour les ions moléculaires ont été traitées à l'aide du logiciel d'analyse de données Agilent Mass Hunter Workstation, qui a généré une liste de formules élémentaires possibles. La visualisation des données a été effectuée grâce au logiciel MZmine 2.53. L'identification putative des composés a été réalisée en calculant la formule brute à partir de la masse exacte de chaque pic. Ensuite, une recherche des composés naturels correspondant à cette formule chimique a été menée dans trois bases de données : Lotus, Dictionary of Natural Products et Reaxys. Après avoir identifié de possibles structures pour chaque formule brute, une comparaison a été effectuée entre les spectres de fragmentation MS/MS expérimentaux et les fragmentations possibles de chaque structure. Les propositions structurales présentées dans le tableau récapitulatif sont les plus probables pour chaque pic identifié.

## II. Etude phytochimique de l'espèce *Daucus virgatus*

### 1. Matériel végétal

L'espèce *Daucus virgatus* est une plante endémique appartenant à la famille des Apiacées. Les parties aériennes de cette espèce utilisées dans le cadre de cette étude ont été récoltées en mois de juillet dans la région montagneuse de Djebel Edough à Annaba. Après élimination des impuretés, le matériel végétal a été séché à température ambiante à l'abri de la lumière, puis réduit en petits morceaux et conservé.

### 2. Extraction des huiles essentielles

Dans notre travail, nous avons utilisé et qui a été soumise à une hydrodistillation sur Clevenger. Une méthode conforme aux recommandations de la pharmacopée européenne pour l'extraction des huiles essentielles. L'extraction de l'huile essentielle à partir de 800 g de la plante séchée est effectuée journalièrement par hydrodistillation au moyen d'un dispositif d'extraction type Clevenger. l'HE obtenue est conservée dans des flacons opaques et bien scellés à une température de 4°C.

Le rendement est calculé à partir du poids de l'huile essentielle par rapport au poids de la plante sèche utilisée dans l'hydrodistillation, soit :

$$R = \frac{M}{M'} \times 100$$

R : Rendement en HE en (%)

M : Masse de l'huile essentielle (g)

M' : Masse de la matière végétale (g)

### 3. Analyse de l'huile essentielle par la technique GC-MS

L'analyse de la composition chimique des huiles essentielles de l'espèce *Daucus virgatus* a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la détection par spectrométrie de masse (GC-MS).

**Conditions opératoires :** L'analyse de HE par GC-MS a été effectuée en utilisant un chromatographe en phase gazeuse (Varian CP-3800) équipé d'une colonne capillaire DB-5 (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm) couplée à un détecteur de masse (Varian Saturn 2000) à trappe d'ions <sup>(29)</sup>, et l'ionisation a été effectuée par impact d'électrons à 70 eV. Les températures de l'injecteur et du détecteur ont été fixées à 220 °C et 240 °C respectivement. La température du four a été programmée de 60 °C à 240 °C à raison de 3 °C/min en utilisant comme gaz vecteur l'hélium avec un flux égal à 1 ml/min. L'injection a été réalisée en mode split avec un rapport de division 1/30. Les constituants des huiles essentielles sont identifiés par comparaison de leurs spectres de masse et de leurs indices de rétention (IR) ou indices de Kovats (KI) à une

série de n-alcanes et avec ceux des substances pures enregistrées dans la littérature <sup>(167)</sup> ainsi qu'à partir des bases de données Wiley, Adams et NIST<sup>(168, 169)</sup>, des bibliothèques commerciales et des bases de données interne de spectres de masse établies à partir de substances pures.

## **Chapitre 2 : Evaluation des activités biologiques des espèces étudiées**

### **I. Évaluation du pouvoir antioxydant de l'espèce *Origanum floribundum***

Dans notre étude, nous nous intéressons à l'évaluation de l'activité antioxydante des trois extraits (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc, *n*- BuOH) de l'espèce *Origanum floribundum* selon quatre méthodes différentes : DPPH, ABTS, CUPRAC et le pouvoir réducteur. Avant cela, le dosage du contenu en polyphénols et flavonoïdes totaux a été réalisé. Ensuite, nous réalisons un test de corrélation entre l'activité antioxydante et le contenu en polyphénols et flavonoïdes des trois extraits. Toutes les mesures sont répétées trois fois et ce pour tous les tests réalisés.

#### **1. Analyse colorimétrique par spectrométrie (UV-visible)**

##### **1.1. Dosage des composés phénoliques par colorimétrie**

**Principe :** La teneur en composés phénoliques des différents extraits (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt, *n*- BuOH) d'*Origanum floribundum* est déterminée par le test de Folin-Ciocalteu, décrite par Singleton et Rossi <sup>(170)</sup>. La réaction repose sur la réduction en milieu alcalin de la mixture de l'acide phosphotungstique (H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) et d'acide phosphomolybdique (H<sub>3</sub>PMO<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) du réactif de Folin par les groupements réducteurs des composés phénoliques, conduisant à la formation d'un produit de couleur bleue. Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 765 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité des polyphénols présents dans l'échantillon. Les solutions des différents extraits à doser et de la gamme étalon sont préparées de la même manière et dans les mêmes conditions.

**Mode opératoire :** A 100 µl de chaque extrait sont ajouté 500 µl de réactif de Folin-Ciocalteu. Trois minutes plus tard, 400 µl de carbonate de sodium (75 mg/ml) sont additionnés au milieu réactionnel. Après 90 minutes d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 765 nm. La quantité des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage établie avec l'acide gallique (0-160µg /ml). Le résultat est exprimé en µg d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait (µg EAG/mg d'extrait).

## 1.2. Dosage des flavonoïdes totaux

**Principe :** La quantification du contenu en flavonoïdes totaux des trois extraits (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc, *n*- BuOH) d'*Origanum floribundum* a été déterminée par la méthode du trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>), en suivant le protocole de Bahroun et al. <sup>(171)</sup>. La formation d'une liaison covalente entre le trichlorure d'aluminium et les groupements hydroxyles (OH) des flavonoïdes produit un complexe de couleur jaune ayant une absorbance maximale à 430 nm.

**Mode opératoire:** Le protocole consiste à ajouter 500 µl d'une solution d'AlCl<sub>3</sub> (2% dans le méthanol) à 500 µl de chaque extrait ou standard (préparés dans le méthanol), puis après 10 minutes de réaction, l'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 430 nm. La courbe d'étalonnage des flavonoïdes est effectuée en utilisant la quercétine à une concentration allant de 0 à 20 µg/ml. La teneur en flavonoïdes dans chaque extrait est déterminée en utilisant l'équation de régression linéaire déduite à partir de la courbe d'étalonnage et exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (µg EQ/mg d'extrait).

## 2. Activité de piégeage du radical DPPH•

**Principe :** L'activité anti-radicalaire a été évaluée à l'aide du protocole rapporté par Blois<sup>(172)</sup>. Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) est un radical libre stable, possédant une coloration violette foncée, il est réduit en présence des antioxydants pour donner la couleur jaune du diphényl picrylhydrazine.

**Mode opératoire :** Le test est réalisé dans des microplaques à 96 puits. Un volume de 160 µl de solution de DPPH préparée (0,4 mM) sont ajoutés à 40 µl d'échantillon dilué dans des solutions de méthanol à des concentrations différentes. Le mélange réactionnel a été incubé dans l'obscurité pendant 30 min et l'absorbance a été enregistrée à 517 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque. Le BHT et BHA ont été utilisés comme contrôles positifs. La diminution de l'absorbance lors de l'ajout d'échantillons à tester par rapport au contrôle a été utilisée pour calculer l'activité antioxydante, exprimée en pourcentage d'inhibition (%I) du radical DPPH, comme suit :

$$\% I = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

Avec : A<sub>0</sub> : Absorbance en absence de l'extrait (contrôle négatif) ; A<sub>1</sub> : Absorbance en présence de l'extrait.

IC<sub>50</sub> est définie comme étant la quantité ou la concentration d'antioxydants (extraits) nécessaire pour inhiber 50% des radicaux. Elle est obtenue à partir de l'équation de la courbe de l'activité antioxydante (%) en fonction de la concentration de l'antioxydant. La capacité antioxydante d'un composé est d'autant plus élevée que son IC<sub>50</sub> est petite.

### 3. Activité de piégeage du radical ABTS•+

**Principe :** Cette méthode est basée sur la capacité des composés à piéger le radical-cationique ABTS•<sup>+</sup>, (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis(3-éthylbenzothiazoline) -6-sulfonique). En réagissant avec le persulfate de potassium (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>), l'ABTS forme le radical ABTS•<sup>+</sup>, de couleur bleue à verte. L'ajout d'un antioxydant va réduire ce radical et provoquer la décoloration du mélange

**Mode opératoire :** L'activité ABTS est déterminée par la méthode de Re et al. <sup>(173)</sup> Une solution aqueuse d'ABTS (7 mM) est mélangée à du persulfate de potassium K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (2.45 mM) et mis à l'abri de la lumière pendant 12 à 16h ; l'absorbance de la solution ainsi obtenue est ajustée à 0.700 (± 0.020) à 734 nm avant l'usage. Ensuite, un volume de 160 µl de la solution d'ABTS•<sup>+</sup> précédemment préparé a été ajouté à 40µl de la solution d'extrait dissout à différentes concentrations. Après 10 minutes, en utilisant un lecteur de microplaques à 96 puits, l'absorbance a été mesurée à 734 nm. Le BHT et BHA ont été utilisés comme contrôles positifs. Les pourcentages d'inhibition ont été calculés pour chaque concentration par rapport à une absorbance à blanc de méthanol.

### 4. Test de la capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC)

**Principe :** La méthode CUPRAC (Cupric ion Reducing Antioxidant Capacity) développée par Apak et al. <sup>(174)</sup>. Le principe de ce test se base sur la conversion des hydroxyles phénoliques en quinones à travers la réduction du complexe Cu<sup>2+</sup>-NC, produisant ainsi un complexe chromogène de Cu<sup>+</sup>-NC qui absorbe à 450 nm.

**Mode opératoire :** Dans une microplaque de 96 puits, un mélange composé de 50 µl de CuCl<sub>2</sub> (10 mM), 50 µl de neocuprine (7,5 mM) et 60 µl de solution tampon d'acétate d'ammonium NH<sub>4</sub>OAc (1 M, pH 7,0) est ajouté. Ensuite, 40 µl d'échantillon dilué dans des solutions de méthanol à des différentes concentrations ont été ajoutées au mélange initial. Les microplaques ont été mises à l'obscurité pendant 1 heure, puis l'absorbance est mesurée à 450 nm. La capacité de réduction des extraits a été comparée à celles du BHA et du BHT. Les résultats ont été calculés à titre de A<sub>0.50</sub> (µg / ml), correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance.

## 5. Test du pouvoir réducteur

**Principe :** Le pouvoir réducteur est un indicateur significatif du potentiel antioxydant d'une substance. Cette méthode est basée sur l'aptitude d'un antioxydant donné à réduire le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) présent dans le complexe ferrocyanure de potassium ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ). La réaction est révélée par le virement de la couleur jaune du fer ferrique à la couleur bleu vert du fer ferreux. L'intensité de cette coloration est mesurée par spectrophotomètre à 700 nm.

**Mode opératoire :** Cette activité est déterminée selon la méthode de Oyaizu <sup>(175)</sup>. Un volume de 10  $\mu\text{l}$  d'échantillon à différentes concentrations est déposé en triplicata sur une microplaque à 96 puits. Ensuite, on ajoute sur chaque puit un volume de 40  $\mu\text{l}$  tampon phosphate (pH 6.6), suivi de 50  $\mu\text{l}$  de ferricyanure de potassium  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  à 1%. L'ensemble est incubé au bain-marie à 50 °C pendant 20 minutes, puis un volume de 50  $\mu\text{l}$  d'acide trichloracétique (TCA) à 10%. Enfin 40  $\mu\text{l}$  d'eau distillée et 10  $\mu\text{l}$  de  $\text{FeCl}_3$  à 0.1% sont rajoutés. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par le méthanol. L'activité du pouvoir réducteur a été exprimée en équivalents de deux solutions d'antioxydants standards, le BHA et le BHT. Les résultats ont été calculés à titre de  $A_{0,50}$  ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance.

## II. Evaluation des activités biologiques de l'espèce *D. virgatus*

### 1. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE de l'espèces *D. virgatus*

La résistance aux antimicrobiens est devenue une menace sérieuse pour la santé publique, constituant l'un des plus importants défis sanitaires mondiaux du 21<sup>ème</sup> siècle. Il est souligné dans la littérature la nécessité de trouver de nouvelles molécules antimicrobiennes ou de nouvelles pistes thérapeutiques afin de remplacer les antibiotiques et antiseptiques actuels auxquels les microorganismes ont développé des résistances. Une demande croissante en ingrédients d'origine naturelle a été observée ces dernières années, favorisant par conséquent la recherche de nouveaux composés bioactifs <sup>(176)</sup>. Dans ce contexte, nous nous sommes attachés à utiliser les différentes méthodologies développées au cours de cette partie dans le but de mettre en évidence le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de l'espèce *D. virgatus* par des méthodes qualitative et quantitative.

### 1.1. Souches microbiennes testées

Toutes les souches microbiennes sont pures et proviennent de l'American Type Culture Collection (ATCC). L'HE de *D. virgatus* a été testée contre six souches bactériennes et une levure obtenue du laboratoire de microbiologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie, Université de Ferhat Abbas Setif1, Algérie. Les cultures des souches ont été systématiquement incubés pendant 24 heures à 37°C dans le bouillon Mueller Hinton (MHB) pour les bactéries et pendant 48 heures à 28°C dans de l'agar Sabouraud-dextrose (SDA) pour les levures <sup>(177)</sup>.

**Tableau 12 :** Liste et caractéristiques des souches microbiennes testées

Souches	N° ATCC	Gram	Famille	Principales infections causées
<i>Staphylococcus aureus</i> ( <i>S. aureus</i> )	25923	+	Micrococcaceae	-Gastroentérites -Infections urinaires -L'ostéomyélite et l'arthrite
<i>Bacillus subtilis</i> ( <i>B. subtilis</i> )	11778	+	Bacillaceae	Gastro-entérites.
<i>Listeria innocua</i> CLIP ( <i>L. innocua</i> )	74915	+	Listeriaceae	-Gastro-entérites -Diarrhées
<i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> )	25922	-	Enterobacteriaceae	-Diarrhées Gastro-entérites.
<i>Salmonella typhimurium</i> ( <i>S. typhimurium</i> )	19430	-	Enterobacteriaceae	Fièvre typhoïde Diarrhées
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ( <i>P. aeruginosa</i> )	27853	-	Pseudomonadaceae	- Crampes abdominales Troubles digestifs.
<i>Candida albicans</i> ( <i>C. albicans</i> ).	1024	levure	Cryptococcaceae	-Lésions cutanées -Infections oesophagiennes -Infections génitales

### 1.2. Méthode de diffusion par disque

La technique utilisée est l'aromatogramme ou la méthode de diffusion en milieu gélosé en utilisant des disques stériles en cellulose. La FDA a approuvé cette méthode comme standard pour le comité national de laboratoire clinique <sup>(173)</sup>. Cette technique, fiable et reproductible, est souvent la plus utilisée pour l'évaluation de l'activité antibactérienne. Elle constitue une étape préliminaire à des études plus approfondies.

**Mode opératoire :** L'activité antimicrobienne de l'HE de *D. virgatus* a été évaluée à l'aide de la méthode de diffusion par disques d'agar, conformément au protocole de Bauer et al.<sup>(28)</sup>. Des inoculums contenant  $2.0 \times 10^6$  CFU/ml de bactéries et  $10^7$  UFC/ml de levure ont été étalées sur des géloses Muller-Hinton et Sabouraud dextrose agar (SDA), respectivement. Des disques stériles de papier absorbant (6 mm de diamètre) ont été imprégnés avec 10 µl de différentes dilutions d'huile (1:2, 1:5 et 1:10 v/v) dans le DMSO (Sigma-Aldrich), puis placés sur la surface inoculée des boîtes de Pétri (90 mm) pré-incubés pendant 30 minutes, permettant une dispersion complète de HE puis l'incubation à 37°C pendant 24 h.

L'activité antimicrobienne a été déterminée en mesurant le diamètre des zones d'inhibition (mm). Le diamètre d'inhibition a été mesuré après 24 h d'incubation à 37 °C pour les bactéries et après 7 jours d'incubation à 28°C pour les champignons <sup>(173)</sup>. La gentamicine (10 µg ml<sup>-1</sup>, Sigma Aldrich) a été utilisée comme contrôle positif pour les souches bactériennes, tandis que la nystatine a été utilisée comme contrôle positif pour la souche fongique. Le DMSO a été utilisé comme contrôle négatif. Tous les tests d'inhibition ont été réalisés en triplicata.

La préparation des milieux de culture, à savoir le milieu Mueller-Hinton pour les bactéries et le milieu Sabouraud gélosé pour les levures, sont présentées en Annexe 4.

### **1.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)**

La concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'huile essentielle de *D. virgatus* a été déterminée par la méthode de macrodilution selon la méthode du Clinical and Laboratory Standards Institute <sup>(173)</sup>. Deux séries de dilutions (1000-15.625 µg.ml<sup>-1</sup>) d'HE ont été préparées. Des inoculums standardisés (0.5 McFarland) ont été préparés. Ensuite, 1 ml d'inoculum ajusté a été ajouté à chaque tube contenant 1 ml de dilutions d'huile essentielle. Un tube de contrôle positif ne contenait que du bouillon inoculé. L'ensemble des tubes inoculés a été incubé à la température optimale de la croissance pour chaque germe. Les résultats ont été déterminés après 24 heures (72 heures pour les levures), et les valeurs de CMI ont été établies comme étant la concentration la plus faible de l'huile capable d'inhiber la croissance visible de chaque microorganisme.

### **2. Activité de piégeage du radical DPPH (2-2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)**

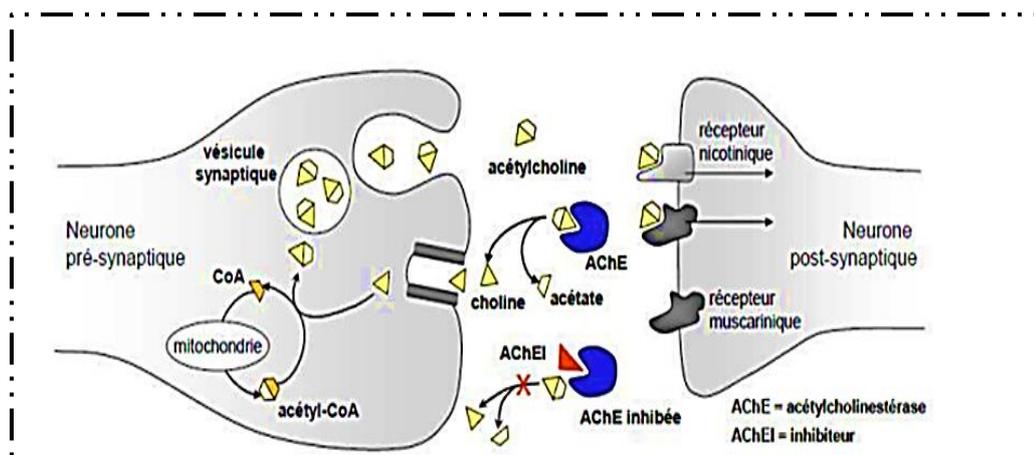
La capacité de l'HE de *D. virgatus* à piéger des radicaux libres a été évaluée selon la méthode légèrement modifiée de Que et al. <sup>(178)</sup>. En bref, 600 µl de diverses dilutions de l'échantillon ont été mélangés avec 600 µl d'une solution méthanolique de DPPH à 0.004%. Après 30 minutes d'incubation dans l'obscurité, l'absorbance est lue à 517 nm. Le butylhydroxytoluène (BHT), a été utilisé comme contrôle positif. Les expériences sont

réalisées en triplicata. La diminution de l'absorbance lors de l'ajout d'échantillons à tester par rapport au contrôle a été utilisée pour calculer l'activité antioxydante, exprimée en pourcentage d'inhibition du radical DPPH. La courbe du pourcentage d'activité de piégeage par rapport à la concentration de l'échantillon a été préparée pour obtenir l'IC50.

### 3. Essai d'inhibition des cholinestérases

L'acétylcholinestérase est une enzyme impliquée dans l'étiologie de la maladie d'Alzheimer. La maladie d'Alzheimer est une pathologie neurodégénérative incurable du tissu cérébral, caractérisée par une perte progressive de neurones, entraînant ainsi une détérioration progressive et irréversible des fonctions cognitives, notamment de la mémoire. Cette maladie est associée à un déficit en l'acétylcholine, un neurotransmetteur du système parasympathique libéré au niveau des jonctions neuromusculaires<sup>(64)</sup>. L'acétylcholinestérase (AChE) est une enzyme catalysant l'hydrolyse rapide de l'acétylcholine en choline et acide acétique, entraînant ainsi son inactivation. Il existe une autre protéine dans le système nerveux central semblable à l'AChE qui est le Butyrylcholinestérase (BChE), initialement identifiée dans le foie. Le rôle biologique de la BChE n'est pas encore bien élucidé, mais il a été suggéré qu'elle protège l'AChE contre les inhibiteurs <sup>(65)</sup>.

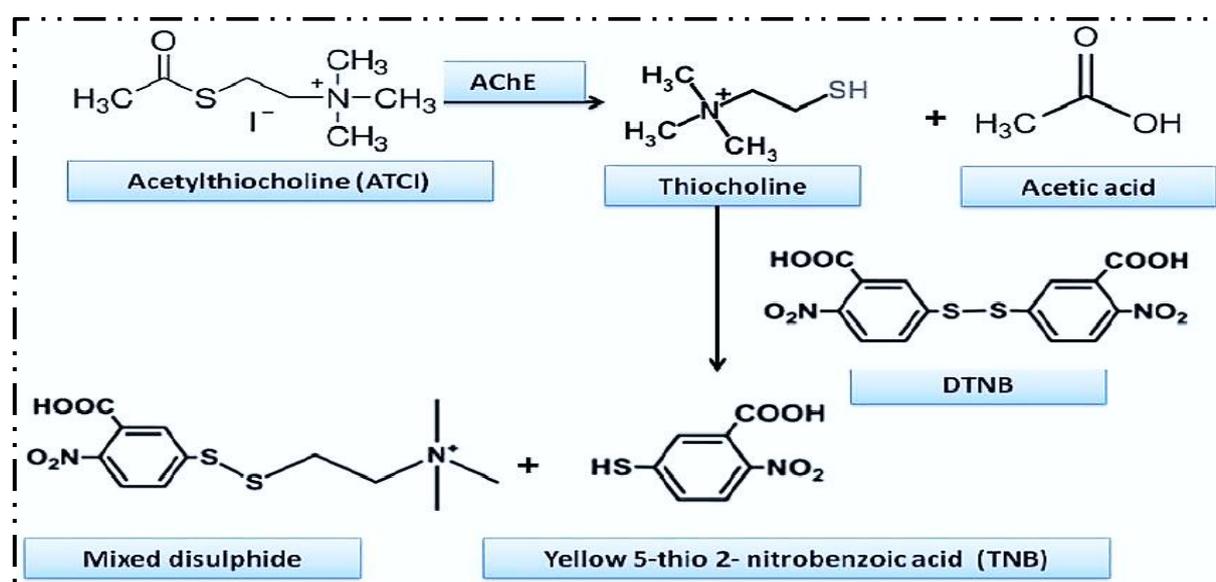
De ce fait, il a été proposé, récemment, de traiter cette affection par des molécules inhibant à la fois l'AChE et la BChE. Actuellement, il n'existe aucun traitement guérissant la maladie d'Alzheimer, ni même permettant d'arrêter son évolution, il existe cependant des traitements permettant d'atténuer les troubles cognitifs, sans empêcher la progression de la maladie, la plupart agissent sur l'activité cholinergique et spécialement les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (AChE) (Figure 34).



**Figure 34 :** Mécanisme d'inhibition de l'acétylcholinestérase

Dans ce travail, nous rapportons pour la première fois l'étude de l'éventuel effet de l'huile essentielle de *D. virgatus* sur l'inhibition des enzymes cholinestérases.

**Principe :** Les activités inhibitrices de l'acétylcholinestérase (AChE) et de la butyrylcholinestérase (BChE) ont été mesurées en utilisant la méthode spectrophotométrique d'Ellman et al. (179). Cette dernière est basée sur le clivage de l'acétylthiocholine par l'AChE ; cette réaction produit alors de la thiocholine qui réagit à son tour, via ses groupements thiols -SH-, avec l'acide 5,5'-dithiobis[2-nitrobenzoïque] (DTNB) pour former un anion de couleur jaune dont l'intensité est fonction de l'activité de l'acétylcholinestérase (Figure 35).



**Figure 35 :** Mécanisme chimique de la méthode d'Ellman

**Moe opératoire :** 150  $\mu\text{l}$  de tampon phosphate de sodium (100 Mm, pH 8,0), 10  $\mu\text{l}$  de l'huile essentielle à différentes concentrations et 20  $\mu\text{l}$  d'AChE ( $5,32 \times 10^{-3}$  U) ou BChE ( $6,85 \times 10^{-3}$  U) ont été mélangés et incubés pendant 15 minutes à 25 °C, puis 10  $\mu\text{l}$  de DTNB (0,5 mM) ont été ajoutés. Ensuite, la réaction a été initiée par l'addition de 20  $\mu\text{l}$  d'iodure d'acétylthiocholine (0,71 mM) ou le chlorure de butyrylthiocholine (0,2 mM). Les hydrolyses de ces substrats ont été suivies par spectrophotométrie par la formation d'une couleur jaune d'anion 5-thio-2-nitrobenzoate de méthyle, résultant de la réaction de DTNB avec la thiocholine, libérée par l'hydrolyse enzymatique de l'iodure d'acétylthiocholine ou du chlorure de butyrylthiocholine, à une longueur d'onde de 412 nm.

Le pourcentage d'inhibition de l'AChE ou de la BChE a été déterminé par comparaison des vitesses de réaction d'échantillons par rapport à l'échantillon témoin (méthanol dans du tampon phosphate, pH 8) en utilisant la formule :  $[(E - S) / E] \times 100$ , où E représente l'activité

de l'enzyme sans échantillon d'essai et S l'activité de l'enzyme avec l'échantillon de test. Les expériences ont été réalisées en triplicata. La galantamine a été utilisée comme composé de référence. Les résultats d'inhibition ont été exprimés sous forme de concentration inhibitrice semi-maximale (IC50).

#### 4. Essai d'inhibition de l' $\alpha$ -Glucosidase

Les alpha-glucosidases est un groupe d'enzymes exo-carbohydrolases. Elles jouent un rôle essentiel dans le métabolisme des glucides et ont une grande capacité à libérer le glucose terminal à partir de l'extrémité non réductrice des polymères de glucides, qui sont leurs substrats. Ces enzymes sont responsables de l'hydrolyse des oligosaccharides et des disaccharides en monosaccharides souhaitables pour l'absorption intestinales<sup>(72)</sup>. L'affinité de l'enzyme varie selon le nombre de monosaccharides, la position de la liaison osidique et la configuration des groupements hydroxyles dans le substrat <sup>(73)</sup>.

L'acarbose (prandase®) est un pseudotétracosaccharides qui diffère des oligosaccharides de notre alimentation par l'attachement d'un groupe aminoglucidique sur le groupe alpha-glucopyranose. Cette molécule se lie sur la bordure des microvillosités de l'intestin grêle, ce qui provoque un ralentissement de l'absorption des sucres <sup>(77)</sup>. La fixation de l'acarbose entraîne une diminution du pic de production d'insuline secondaire à une concentration de glucose postprandiale. Son pic sanguin est atteint au bout d'une heure et sa durée d'action est de deux heures. L'acarbose est habituellement utilisé en combinaison avec l'insuline chez les patients diabétiques de type II.

**Mode opératoire :** L'effet hypoglycémiant post-prandial de l'huile essentielle a été évalué en utilisant le test de l' $\alpha$ - glucosidase. Ce test a été mis au point suite à quelques modifications de la méthode de-Schäfer and Högger<sup>(180)</sup> . Dans cette étude nous avons utilisé l'acarbose comme inhibiteur standard de l' $\alpha$  glucosidase.

##### **Essai :**

- La préparation de l'alpha-glucosidase et de son substrat, le *p*-NPG (*p*-nitrophényl-alpha-D-glucopyranoside, sigma), ont été réalisées selon la méthode de Kim et al.<sup>(34)</sup> avec quelques modifications.
- La solution enzymatique (alpha-D-glucopyranosidase maltase de levure, sigma) a été préparée en solubilisant l'enzyme dans du tampon phosphate (0,1 M, pH= 6,7) pour obtenir une solution mère finale à une concentration de 1 UI/ml. Le substrat, *p*-NPG, a été solubilisé dans le tampon phosphate (0,1 M, pH 6,7) à une concentration de 3 mM pour simuler un modèle de fluide intestinal. Pour chaque essai,

0.075 UI de solution enzymatique a été pré-mélangé avec de l'HE à différentes concentrations et pré-incubée pendant 10 minutes à 37°C. Ensuite, une solution de *p*-NPG (0.95 mM) a été ajoutée et le mélange de réaction enzymatique a été incubé pendant 10 minutes à 37°C. L'inhibition de l'enzyme a été déterminée en mesurant le *p*-nitrophénol libéré par le *p*-NPG à l'aide d'un lecteur de microplaques à 405 nm et comparée à celle du témoin (solution tampon à la place de l'extrait). L'activité inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase a été exprimée en pourcentage d'inhibition et a été calculée comme suit :

$$I (\%) = \frac{A_{\text{Controle}} - A_{\text{Extrait}}}{A_{\text{Controle}}}$$

L'acarbose, un inhibiteur synthétique de l' $\alpha$ -glucosidase, a été utilisé comme standard. Les résultats d'inhibition ont été exprimés sous forme de concentration inhibitrice semi-maximale (IC50).

### III. Analyse statistique

Les analyses ont été menées en triplicata et les résultats ont été présentés sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type. Pour évaluer l'effet du solvant d'extraction sur les variables de l'activité antioxydante (IC<sub>50</sub> et A<sub>0.50</sub>), une analyse univariée (modèle linéaire général univarié) a été réalisée, avec un seuil de signification de 5 %. L'activité antimicrobienne a été évaluée par une analyse de variance à un facteur (ANOVA) afin de tester l'effet des concentrations d'HE de *D. virgatus* sur l'inhibition de toutes les souches microbiennes étudiées. Le test t de Student a été utilisé pour évaluer les différences significatives dans la zone d'inhibition de la souche bactérienne *L. innocua*. Les comparaisons multiples a posteriori ont été effectuées à l'aide du test de Tukey, avec un seuil de signification de P<0,05, pour déterminer les groupes homogènes. Avant d'effectuer les analyses statistiques, les conditions et les hypothèses de validité de l'ANOVA à un facteur ont été vérifiées. Le test de Shapiro-Wilk a été utilisé pour examiner la distribution de l'échantillon, tandis que le test de Levene a été utilisé pour évaluer l'égalité de variance. Le lien entre la teneur totale en phénols, la teneur totale en flavonoïdes et l'activité antioxydante des trois extraits d'Origan a été étudié en calculant les coefficients de corrélation de Pearson. Les valeurs de IC<sub>50</sub> ont été calculées à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 7, en utilisant le modèle qui fournit le meilleur ajustement pour toutes les courbes, avec une valeur de R<sup>2</sup> supérieure à 0,95. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), version 28.0 pour Windows.

**PARTIE III**  
**RÉSULTATS ET DISCUSSION**

## Chapitre 1. Résultats de l'étude phytochimique des espèces étudiées

### I. Résultats de l'étude phytochimique de l'espèce *O. floribundum*

#### 1. Screening phytochimique

L'évaluation qualitative préliminaire par criblage phytochimique des feuilles de l'espèce *O. floribundum* sélectionnée pour cette étude a permis de mettre en évidence la présence de quelques métabolites secondaires représentés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 13:** Criblage phytochimique de l'espèce *O. floribundum*

Métabolite secondaire	Résultat
Alcaloïdes	+
Flavonoïdes	+++
Tanins	+
Coumarines	+
Dérivés quinoniques	-
Stérols et terpènes	+++
Saponosides	+

+++ : Présence confirmée ; ++ : présence modérée ; + : présence en tant que trace ; - : absence.

Le screening phytochimique a révélé la présence de divers constituants bioactifs tels que les alcaloïdes, les flavonoïdes, les tanins catéchiques, les coumarines, les saponosides, les terpènes et les stérols. Cependant, les tests se sont révélés négatifs pour les tanins galliques et les dérivés quinoniques. La présence de certains métabolites secondaires au niveau de la plante étudiée explique son potentiel thérapeutique. Par conséquent, ces résultats justifient la large utilisation de cette plante dans la médecine traditionnelle. Effectivement, les tanins catéchiques, les flavonoïdes, les saponosides, les terpènes et stérols possèdent plusieurs propriétés bénéfiques notamment antimicrobiennes, antioxydantes, anti-inflammatoires, vasculo-protectrices et antiulcéreuses<sup>(163)</sup>. Traditionnellement, la plante entière est utilisée dans le traitement des infections bronchiques pulmonaires, digestives et urinaires et possède des propriétés spasmolytiques, antitussives et expectorantes. La présence des métabolites secondaires tels que : flavonoïdes, terpénoïdes, tanins et saponines suggèrent des potentiels pour la plante en tant que source de phytomédicaments importante. Nos résultats concordent bien avec les travaux de Nasri et al.<sup>(163)</sup> qui ont porté sur le screening phytochimiques de *O. floribundum* collectée dans la région de Blida. Des études antérieures ont indiqué que les espèces du genre *Origanum* étaient bien connues comme médicinales et les herbes culinaires

traditionnellement utilisées comme agent antidiabétique<sup>(87)</sup>. De plus, les constituants naturels auraient pu agir séparément ou en synergie pour induire l'effet hypoglycémiant. Une étude de l'activité antidiabétique de la plante *O. floribundum* a été réalisée<sup>(163)</sup>. Les données obtenues ont montré que l'extrait aqueux présentait la capacité à réduire la glycémie, cet effet est lié directement avec la détection des divers métabolites secondaires tels que les alcaloïdes, flavonoïdes, saponines et terpénoïdes dans l'extrait aqueux d'*O. floribundum*.

## 2. Extraction et calcul de rendement

Étant donné la relation existante entre les composés à extraire et les solvants utilisés, et qui réside dans l'affinité, la solubilité et la polarité, ce qui explique évidemment la notion de partage lors des extractions liquide-liquide. L'utilisation de solvants à polarités différentes permet de séparer les composés de l'extrait brut selon leur degré de solubilité dans le solvant d'extraction. En effet, l'affrontement avec le dichlorométhane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) permet d'obtenir une phase organique contenant les flavonoïdes aglycones et les aglycones méthoxylés. Avec l'acétate d'éthyle (EtOAc), on récupère une phase organique avec quelques flavonoïdes aglycones, mais surtout les mono et les diglycosidiques, et enfin on obtient des flavonoïdes glycosylés avec le *n*-butanol. La masse, la couleur, l'aspect ainsi et les rendements des trois extraits sont résumés dans le tableau 14. Les rendements exprimés en pourcentage, ont été déterminé par rapport au poids du matériel végétal sec.

**Tableau 14 :** Caractéristiques des extraits de la plante étudiée

Extraits	Aspect	Couleur	Masse (g)	Rendement (%)
<b>Hydroalcoolique (brut)</b>	Visqueux	Marron foncé	160,71	16,07
<b>Dichlorométhane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)</b>	Visqueux	Vert foncé	5,32	0,532
<b>Acétate d'éthyle (AcOEt)</b>	Visqueux	Marron jaunâtre	18,26	1,826
<b><i>n</i>-butanol (<i>n</i>- BuOH)</b>	Visqueux	Marron	36,17	3,617

On constate que le meilleur rendement est obtenu avec les solvants les plus polaires, l'extrait hydrométhanolique (16,07%) et l'extrait *n*-butanol (3,617%), suivi par l'extrait acétate d'éthyle (1,826%) moyennement polaire. Le rendement le plus faible a été obtenu avec le solvant apolaire dichlorométhane (0,532%). D'après la littérature, le rendement est

toujours meilleur lorsqu'on utilise les solvants polaires et ceci quel que soit le type d'extraction avec macération ou extraction continue. On peut déduire que la contenance en la fraction polaire est la plus élevée, et ce par rapport au poids sec des feuilles de la plante utilisées pour l'extraction.

### 3. Résultats de CCM bidimensionnelle

Une analyse des trois extraits ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , AcOEt, *n*-BuOH) par CCM bidimensionnelle réalisée sur polyamide (DC6) en utilisant :

- En première élution, la dimension apolaire DI (Tol/MEC/MeOH (4/3/3))
- En deuxième élution, la dimension polaire DII ( $\text{H}_2\text{O}$ /MEC/MeOH/AcAc (13/3/3/1))

La révélation des plaques a été réalisée sur lampes UV (254 et 365 nm).

Cette technique est considérée comme une approche préliminaire d'analyse du contenu des différents extraits en fonction de leurs polarités croissantes. Le but de cette technique est d'analyser le comportement chromatographique des trois extraits vis à vis d'une phase d'élution aqueuse et organique. De ce fait, la coloration ainsi que les  $R_f$  de tâches observées pourraient bien nous informer sur la nature chimique des composés qui constituent les différents extraits. D'après les résultats obtenus, on constate que la fluorescence (sombre, violet et violet foncé) des tâches visualisées sous lampes UV révèlent la présence de flavones dans tous les extraits, on note l'abondance des flavone méthoxylés observée pour l'extrait  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Les composés à fluorescence bleu dans les extraits *n*-BuOH et AcOEt représentent les acides phénoliques.

Les flavonoïdes polaires vont avoir une bonne migration en DII et donc auront  $R_f$  plus élevé, ce qui est bien le cas pour les composants des extraits *n*-BuOH et AcOEt, contrairement aux flavonoïdes apolaires contenus principalement dans l'extrait  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , qui vont migrer dans DI et donc des valeurs élevées de  $R_f$ . Les résultats obtenus confirment éventuellement la nature des différents extraits obtenus par extraction liquide-liquide et dont l'objectif principal étaient d'obtenir des fractions d'extraits de polarités croissante.

### 4. Résultats du fractionnement et purification des extrait dichlorométhane $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ et AcOEt

Suite aux pratiques phytochimiques appliqué sur les extraits dichlorométhane  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  et AcOEt qui ont commencé par la collecte des fractions issues de la séparation sur colonne, suivi de l'isolement et la purification sur des CCM préparative. En effet, l'application des techniques chromatographiques analytique ou préparative, de manière systématique ou sélective permet à coup sûr d'obtenir des produits purs. A ce stade, le degré de pureté est

apprécié par les résultats de différents contrôles chromatographiques effectués sur les produits isolés. Ces contrôles doivent nécessairement être effectués dans au moins deux ou trois systèmes de solvants différents. Ce n'est qu'à ce moment que les produits isolés seront enfin prêts (purs et propres) pour l'opération d'identification structurale.

Les différentes CCM utilisées lors de l'isolement et la purification des produits sont présentées dans l'annexe 4.

Neuf flavonoïdes ont été isolés et ont été purifiées :

- AB<sub>1</sub>, B<sub>11/1</sub>, B<sub>11/2</sub>, D<sub>11/1</sub>, D<sub>11/2</sub>, E<sub>11</sub>, E<sub>21</sub> issues de l'extrait CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>
- F<sub>531/2</sub>, F<sub>10/1</sub> issues de l'extrait AcOEt

La fluorescence et les valeurs de R<sub>f</sub> dans divers systèmes d'élution ont été enregistrés pour les produits isolés de l'extrait CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et sont présentés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 15** : Données de CCM analytique des produits isolés de l'extrait CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

Fractions	Isolement et purification (CCM préparative et CC Sephadex)	Produits isolées Fluorescence sous lampe UV (violet sombre )	Rf		
			DII	DI	DI'
AB	DII:H <sub>2</sub> O/MEC/MeOH /AcAc 30:10:15:5  -Ultime purification CC Sephadex LH20 colonne (35x2.5 cm)	AB1	0,16	0,68	0,35
B11	-DII: H <sub>2</sub> O MEC /MeOH /AcAc 30:10:15:5	B <sub>11</sub> /1	0,5	0,37	0,8
		B <sub>11</sub> /2	-	-	-
D11	-DII: H <sub>2</sub> O/MEC /MeOH /AcAc 30:10:15:5	D <sub>11</sub> /1	0,19	0,44	0,59
		D <sub>11</sub> /2	0,5	0,73	0,40
			-	-	-
E1	DI' Tol/ EP /MEC /MeOH 60:25:7:7	E <sub>11</sub>	0,07	0,7	0,33
E2	DI' Tol/ EP /MEC /MeOH 60:25:7:7  Ultime purification CC Sephadex LH20 colonne (35x2.5 cm)	E <sub>21</sub>	0,07	0,67	0,32

Un tableau récapitulatif de la fluorescence et les valeurs de  $R_f$  dans divers systèmes d'élution des produits isolés de l'extrait AcOEt seront présentés ci-dessous.

**Tableau 16 :** Données de CCM analytique des fractions isolées de l'extrait AcOEt

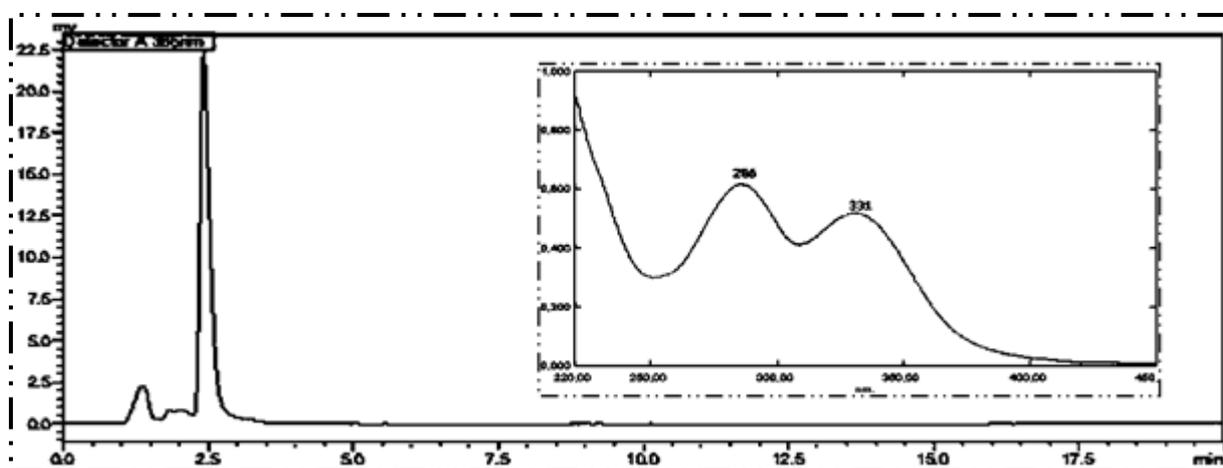
Fractions	Système d'élution	Sous fractions aspect et coloration Et fluorescence sous UV	R <sub>f</sub>				
			DII	DI	DI'	C	
						15%	50%
F5	CCM préparative cellulose 20% (H <sub>2</sub> O : Acf)	-F51 cristaux blanc					
		-F52 bande bleu					
		+BSV sous UV					
		-F53 bande très épaisse VS	-	-	-	-	-
F53	CCM préparative SiO <sub>2</sub> (Tol/AcOEt/HCOOH) 10:4:1	-F54 mélange complexe					
		-F531 bande très épaisse VS					
		-F532	-	-	-	-	-
		-F533					
F531	CCM préparative DI	-F534					
		F531/2 Un seul produit	0,09	0,56	0,073	0,0044	0
F10	CCM préparative DII	F10/1					
F10/1	CCM préparative répétitive DII	F10/11	0,125	0,33	0,024	0,03	0

Les résultats des CCM analytiques réalisés sur les produits isolés révèlent d'après la fluorescence qu'il s'agit bien de produit appartenant à la famille des flavone principalement méthoxylés, ça d'une part. D'autre part, si chacun des produits isolés représente une seule tâche sous lampe UV dans tous les systèmes d'élution utilisés, ceci pourrait confirmer leur pureté. Les valeurs des  $R_f$  nous ont permis de situer les produits les uns par rapport aux autres et par suite leurs incidences sur les structures.

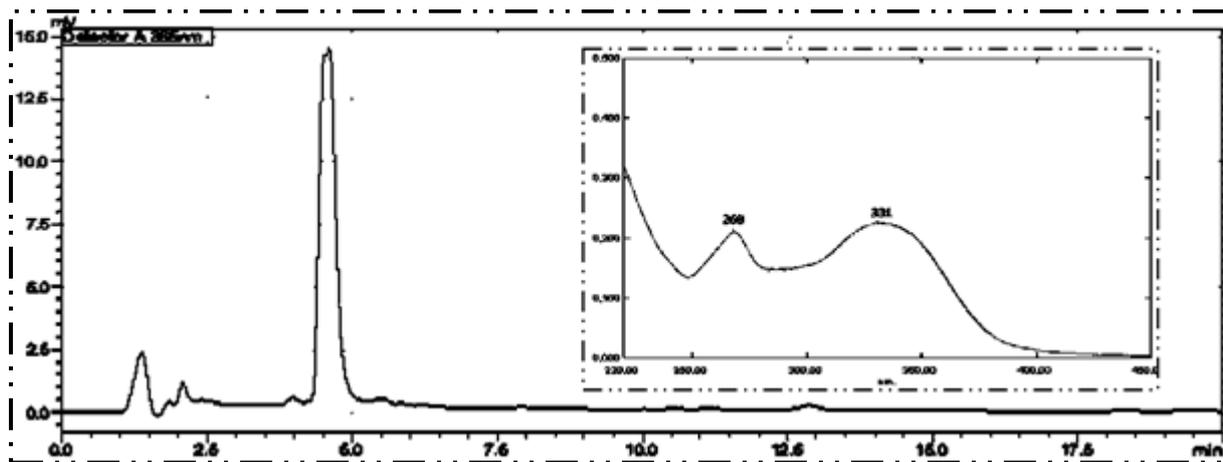
Toutes les fractions isolées ont subi un examen rapide de leurs spectres UV-Visible dans le méthanol, d'où les deux bandes caractéristiques confirment qu'il s'agit bien de flavones. Aussi une analyse sur HPLC réalisée sur tous les produits isolés a été établie afin d'examiner leurs puretés (Figure 36). Les résultats du chromatogramme révèlent la présence d'un seul pic majoritaire. Seuls les composés qui ont montré un grand degré de pureté et de propretés ont subi l'élucidation structurale complète.

Les conditions opératoires de l'analyse par HPLC sont les suivantes :

Colonne Hypersil (120 A°, ODS, 3 $\mu$ , 10 cm), Injection : 3 $\mu$ l, Solvants : A (H<sub>2</sub>O/AcOH : 1000/20); B (ACN / H<sub>2</sub>O / AcOH : 800 / 200 / 20) avec les gradients suivants : de 20 à 80% de B pendant 30 mn, 80% de B pendant 10 mn et de 80 à 100% de B pendant 5 mn.



(1)



(2)

**Figure 2** : Spectre UV et profil HPLC des composés isolé AB<sub>1</sub> (1) et E<sub>11</sub>(2)

## 5. Résultats de l'analyse chimique de l'espèce *O. floribundum*

Autant cette Labiée était riche en flavones aglyconiques et les tests préalables (CCM) l'ont bien confirmé, autant en termes de quantité et à l'instar des autres espèces de ce genre ça laisse à désirer d'autant plus que nous avons pu récolter que l'équivalent de 1Kg et difficilement.

Devant cet état de fait, et suite à une pratique phytochimique, nous sommes arrivés à isoler quelques flavones des extraits CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt et Afin d'arriver à établir la structure des cinq flavonoïdes et plus précisément celle d'aglycone de flavone, on s'est basé sur les données des R<sub>f</sub>, des séries spectrales UV-Visible, des spectres de Masse et de RMN (<sup>1</sup>H, COSY et HSQC).

Dans un deuxième temps, on a pu réaliser une opération couplée HPLC-DAD-HRMS/MS plutôt qualitative mais très concluante effectuée sur les trois extraits CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt et *n*-BuOH avec à chaque fois tenter d'expliquer le mode de formation des différents fragments et ce par l'établissement de schémas de fragmentations possibles.

Dans ce qui suit, on va essayer d'établir la structure des flavonoïdes suivant : E<sub>1</sub>, AB<sub>1</sub> et D<sub>11/1</sub> isolés de l'extrait CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et les flavonoïdes F10/11 et F531/2 isolés de l'extrait AcOEt.

### ➤ Elucidation structurale du flavonoïde E<sub>11</sub>

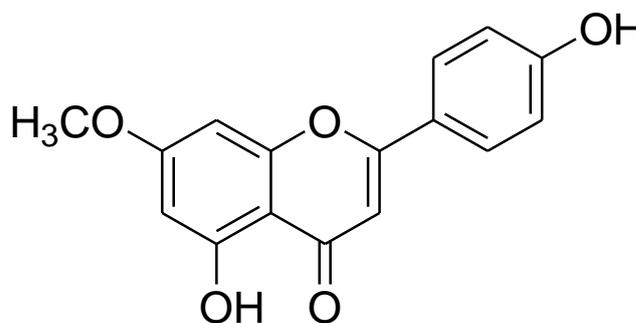
Ce produit représente la première bande large isolé de la fraction E1, de fluorescence violette sombre sous lampe UV 365nm et qui découle suite à une CCM préparative sur Silice (Tol /EtCOMe/ HCOOH) suivi d'une CCM préparative sur DI'.

Ce composé issu de l'extrait CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> avec une fluorescence violette, ne peut être qu'un aglycone de flavone et même méthoxylé au regard de ses différents R<sub>f</sub> (DI : 0,70, DI' : 0,33, DII :0,07).

### ► 5,4' – diOH – 7 – OMe flavone (Genkwanine)

$\lambda_{\max}$  en nm BII → BI

- { MeOH : 268, 328.
- { MeOH + NaOH : 268, 385
- { MeOH + AlCl<sub>3</sub> : 275, 303, 349, 379.
- { MeOH + AlCl<sub>3</sub> + HCl : 275, 298, 338, 375
- { MeOH + NaOAc: 267, 389
- { MeOH + NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> : 268, 335



Les données des séries spectrales UV-Visible peuvent être très concluantes dans ce cas de figure et les travaux de B. Voirin <sup>(88)</sup> ne peuvent que confirmer nos éventuelles propositions pour une ébauche structurale.

Ainsi, le spectre MeOH de E<sub>11</sub> présente une Bande I vers 328 nm indique qu'on est en présence d'un aglycone de flavone de type Apigénine c'est-à-dire avec un cycle latéral B monosubstitué (OH<sub>4'</sub> ou OR<sub>4'</sub>) alors que la Bande II avec un  $\lambda_{\max}$  vers 268 nm nous indique que le cycle A est loin d'être substitué mis à part les positions 5 et 7 et aussi nous confirme la mono substitution du cycle B.

Le spectre NaOH présente une BI vers 385nm : déplacement Bathochrome de cette BI par rapport à son homologue du spectre MeOH ( $\Delta\lambda = +57\text{nm}$ ) bien appréciable; ce qui indique que la position 4' porte un hydroxyle libre (OH<sub>4'</sub>) et l'absence d'une BIII se situant entre BI et BII laisse supposer que la position 7 sur le cycle A est bloquée : possibilité de la présence d'un Méthoxyle (OMe<sub>7</sub>).

L'hydroxyle libre en position 5 est confirmé par le déplacement bathochrome de BII du spectre MeOH + AlCl<sub>3</sub> par rapport au spectre MeOH. Aussi par le positionnement de B II (275 nm) comparé à BII en MeOH (268 nm) alors que l'absence d'un effet hypsochrome accentué de BI du spectre MeOH + AlCl<sub>3</sub> + HCl (375 nm) par rapport à BI du spectre MeOH + AlCl<sub>3</sub> (379 nm) nous indique qu'on est en présence d'un cycle B dépourvu d'un système ortho di hydroxy en B (Ortho – di – OH en 3', 4' ou 5',4').

La dernière série spectrale, en l'occurrence en présence de NaOAc nous confirme la présence de OMe en position 7 sur le cycle A (OMe<sub>7</sub>) puisqu'il n'y a pas d'effet bathochrome de BII par rapport au spectre MeOH comme l'absence du déplacement bathochrome de BI (spectre MeOH + NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) par rapport au spectre MeOH qui ne peut que confirmer l'absence d'un système ortho dihydroxy sur le cycle B.

Toutes ces données peuvent nous orienter vers l'aglycone de flavone ayant la structure : 5,4'-dihydroxy-7-methoxy flavone ou Genkwanine; laquelle structure qu'on doit confirmer avec les données de la spectrométrie de masse et de RMN.

Les résultats donnés par l'opération couplée HPLC/DAD-MS/MS (ESI) confirme ce qui a été proposé.

En effet, le spectre de masse présente un pic quasi moléculaire à  $m/z = 285$  qui correspond au fragment  $[M + H]^+$  alors que celui à  $m/z = 591$  ne peut qu'être celui correspondant à  $[2M + Na]^+$ ; ce qui confirme bien ce qu'on a proposé comme structure rien qu'avec les données UV-Visible. Ainsi, la formule brute pour ce composé est C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub> de masse molaire égale alors à 284 g/mol.

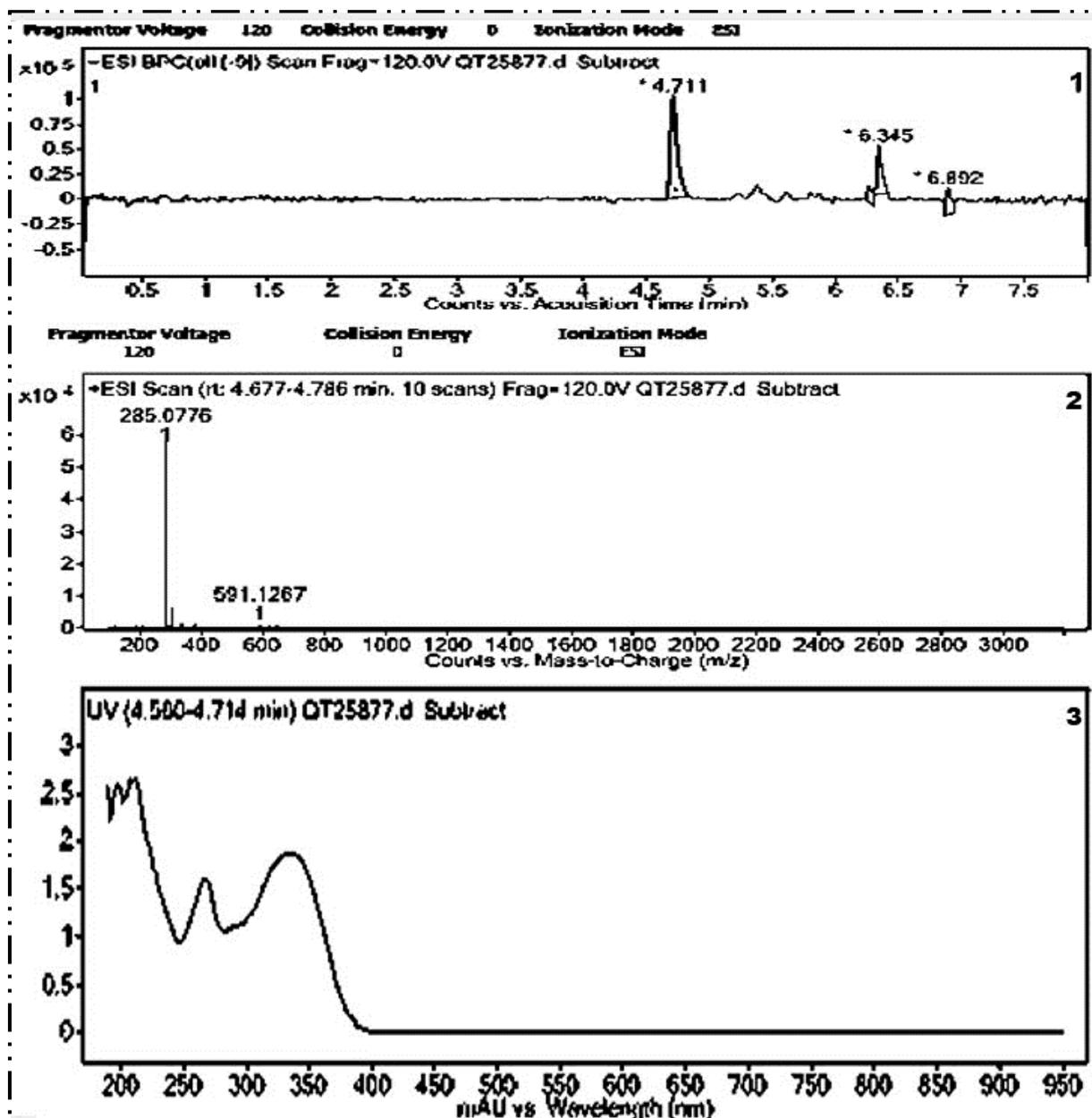


Figure 37 : Résultats de l'analyse HPLC/DAD/MS-ESI<sup>+</sup> de la fraction E<sub>11</sub>

1. Courant ionique total (TIC) ; 2. Spectre de masse et 3. Spectre UV-DAD

Aussi, la proposition de cette structure est confirmée par le spectre RMN <sup>1</sup>H. Nous observons sur le spectre RMN <sup>1</sup>H les signaux suivants :

--- OH<sub>5</sub> : vers 12,9 ppm : 1H, s ---

--- H<sub>2</sub>' et H<sub>6</sub>' : vers 7,9 ppm : 2H, d ---

--- H<sub>8</sub> : vers 6,65 ppm : 1H, d ---

H<sub>3</sub> : vers 6,3 ppm : 1H, s ---

H<sub>3</sub>' et H<sub>5</sub>' : vers 6,9 ppm : 2H, d -

H<sub>6</sub> : vers 6,6 ppm : 1H, d ---

OCH<sub>3</sub> en 7 : vers 3,75 ppm: 3H, s

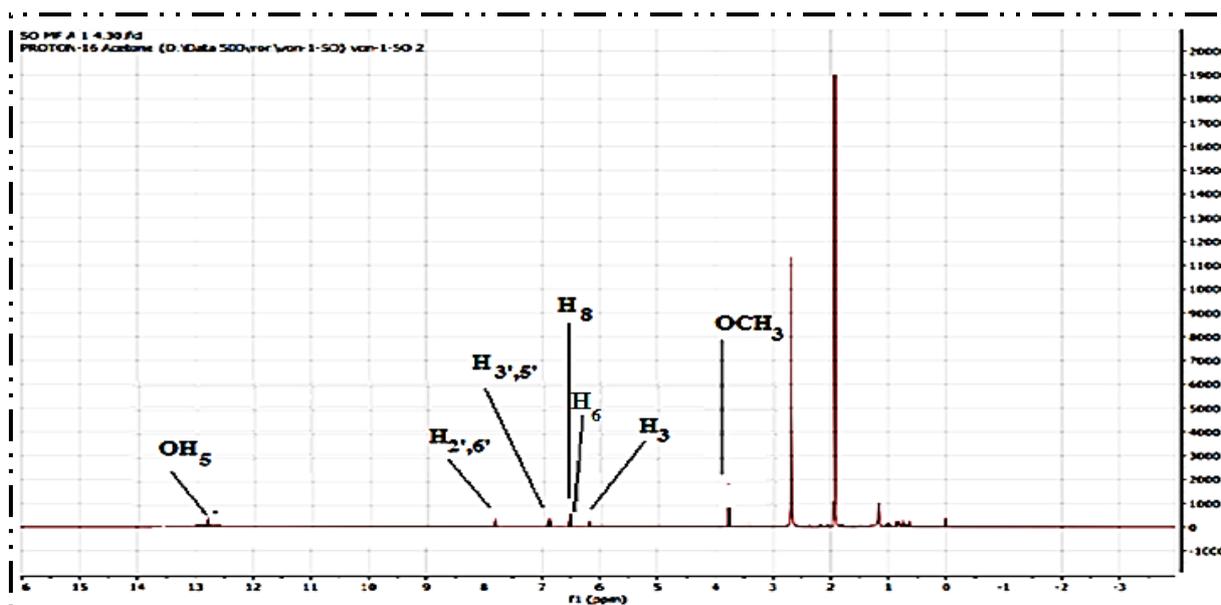


Figure 38 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  de la fraction E<sub>11</sub>

Le signal à 7,9 ppm qui apparaît sous forme de doublet, d'intégration 2H est attribuable à H-2' et H-6'. Le signal à 6,9 ppm qui apparaît sous forme de doublet, d'intégration 2H est attribuable à H-5' et H-3'. Les 2H (3',5') et de (2',6') sont couplés entre eux par un système correspondant à AA' et BB' et qui sont positionné sur le cycle B de la flavone. Un singulet d'intégration 1H (5) à  $\delta$  12,9 ppm. Un singulet d'intégration 3H (7) à  $\delta$  3,75 ppm indiquant la présence d'un groupement méthoxy. Deux doublets à 6,6 et 6,65 ppm intégrant chacun pour 1H (6) et (8) respectivement, couplés entre eux par un système correspondant à AX et qui sont positionné sur le cycle A de la flavone. Un singulet d'intégration 1H à  $\delta$  6,3 ppm attribuable au proton H-3.

#### ➤ Elucidation structurale du flavonoïde AB<sub>1</sub>

Ce produit représente la première bande large isolé de la fraction AB<sub>1</sub>, de fluorescence violette sombre sous lampe UV 365nm et qui découle suite à une CCM préparative en DII conduisant à l'obtention d'un précipité jaune.

Ce composé issu de l'extrait  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  avec une fluorescence violette, ne peut être qu'un aglycone de flavone et même méthoxylé au regard de ses différents  $R_f$  (DI : 0,68, DI' : 0,35 et DII : 0,16).

► **5,6 – di – OH – 7,4' – di – OMe flavone (Ladanéine)**

$\lambda_{\max}$  en nm BII → BI

{ MeOH: 286, 331.

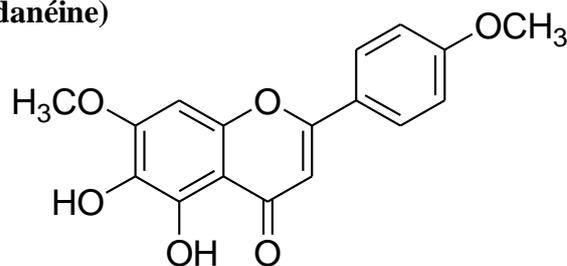
{ MeOH + NaOH : 294, 310.

{ MeOH + AlCl<sub>3</sub> : 263, 290, 365.

{ MeOH + AlCl<sub>3</sub> + HCl : 260, 301, 357.

{ MeOH + NaOAc : 253, 283, 337.

{ MeOH + NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> : 254, 282, 338.



Les données des séries spectrales UV-Visible peuvent être très concluantes dans ce cas de figure et les travaux de B. Voirin (1983) ne peuvent que confirmer nos propositions.

Ainsi, le spectre MeOH de AB<sub>1</sub> présente une Bande I vers 331 nm indique qu'on est en présence d'un aglycone de flavone de type Apigénine ou avec un cycle latéral B monosubstitué (OH 4' ou OR 4') alors que la Bande II avec un  $\lambda_{\max}$  vers 286 nm ne peut que nous indiquer que le cycle A porte un OH en position 6 (OH<sub>6</sub>).

Le spectre NaOH présente une BI vers 310 nm : déplacement Hypsochrome par rapport à son homologue du spectre MeOH, ce qui indique que la position 4' est bloquée (OMe<sub>4'</sub>) et l'absence d'une BIII se situant entre BI et BII peut nous conduire à proposer un OMe<sub>7</sub>.

L'hydroxyle libre en position 5 est confirmé par le positionnement de B II (290 nm) comparé à BII en MeOH (286 nm) alors que l'absence d'un effet hypsochrome accentué de BI du spectre MeOH + AlCl<sub>3</sub> + HCl (357 nm) par rapport à BI du spectre MeOH + AlCl<sub>3</sub> (357 nm) nous indique qu'on est en présence d'un cycle B dépourvu d'un système ortho di hydroxy en B (Or – di – OH en 3', 4' ou 5',4').

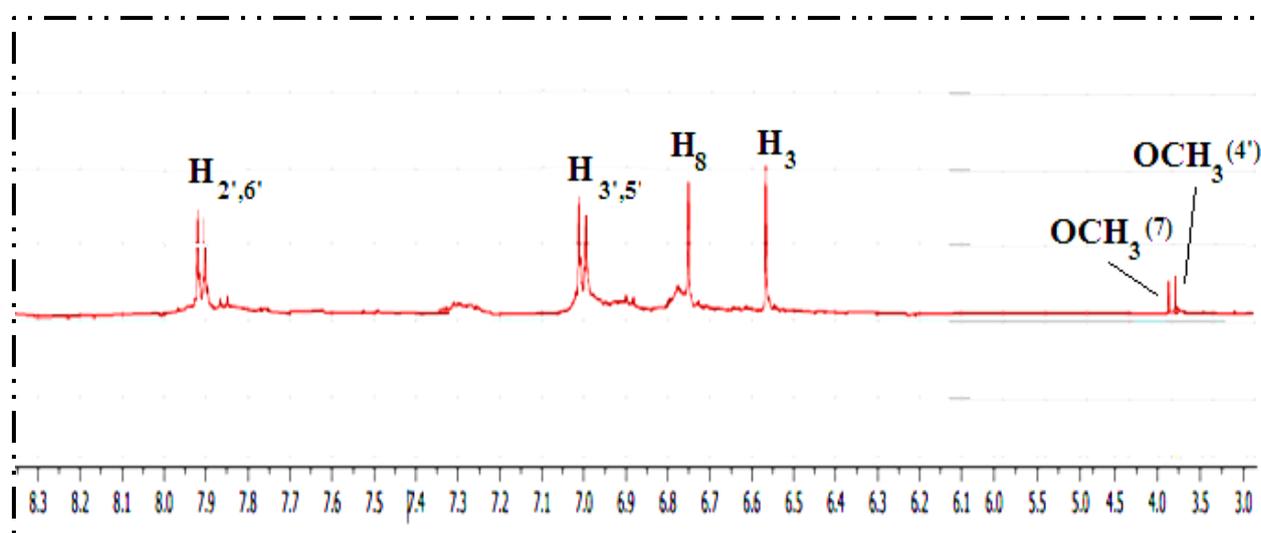
La dernière série spectrale, en l'occurrence en présence de NaOAc nous confirme la présence de OMe en position 7 sur le cycle A (OMe<sub>7</sub>) puisqu'il n'y a pas d'effet bathochrome de BII par rapport au spectre MeOH tout comme comme l'absence du déplacement bathochrome de BI (spectre MeOH + NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) par rapport au spectre MeOH.

Toutes ces données montrent qu'en est en présence de l'aglycone de flavone Ladanéine ayant comme structure : 5,6-dihydroxy -7,4'-diméthoxyflavone; cette structure doit être confirmée avec les données de la spectrométrie de masse et la RMN.

En effet, le spectre de masse de AB<sub>1</sub> obtenu suite à l'opération couplée : HPLC/MS confirme ce qui a été proposé puisqu'il nous donne un pic quasi moléculaire à m/z=315 correspondant à [M + H]<sup>+</sup> en un autre à m/z = 651 correspondant à [2M + Na]<sup>+</sup>; ce qui va avec la formule brute C<sub>17</sub> H<sub>14</sub> O<sub>6</sub> de masse molaire égale alors à 314 g/mol.

Les données du spectre RMN<sup>1</sup>H vont dans le même sens et confirme donc la structure proposée. Nous observons sur le spectre RMN<sup>1</sup>H les différents signaux attribués à leurs protons correspondants :

- **H<sub>2'</sub>** et **H<sub>6'</sub>** : vers 7,9 ppm : 2H, d
- **H<sub>3'</sub>** et **H<sub>5'</sub>** : vers 7,0 ppm : 2H, d
- **H<sub>8</sub>** : vers 6,75 ppm : 1H, s
- **H<sub>3</sub>** : vers 6,55 ppm : 1H, s ---
- **OCH<sub>3</sub>** en 7 : vers 3,70 ppm: 3H, s
- **OCH<sub>3</sub>** en 4' : vers 3,60 ppm: 3H, s ---



**Figure 3** : Spectre RMN<sup>1</sup>H de la fraction AB<sub>1</sub>

Nous observons sur le spectre RMN<sup>1</sup>H:

- Un singulet d'intégration 3H (4') à  $\delta$  3,60 ppm indiquant la présence d'un groupement méthoxyle ( $\delta$  3,60 (s, H-4')).
- Un singulet d'intégration 3H (7) à  $\delta$  3,70 ppm indiquant la présence d'un groupement méthoxyle.  $\delta$  3,70 (s, H-7)
- Deux doublets à 7,0 et 7,9 ppm intégrant chacun pour 2H (3',5') et (2',6') respectivement, couplés entre eux par un système correspondant à AA' et BB' et qui sont positionné sur le cycle B de la flavone.
- Un singulet d'intégration 1H (8) à  $\delta$  6,75 ppm attribuable au proton H-8 .  $\delta$  6,75 (s, H-8)
- Un singulet d'intégration 1H à  $\delta$  6,55 ppm attribuable au proton H-3 .  $\delta$  6,55 (s, H-3)

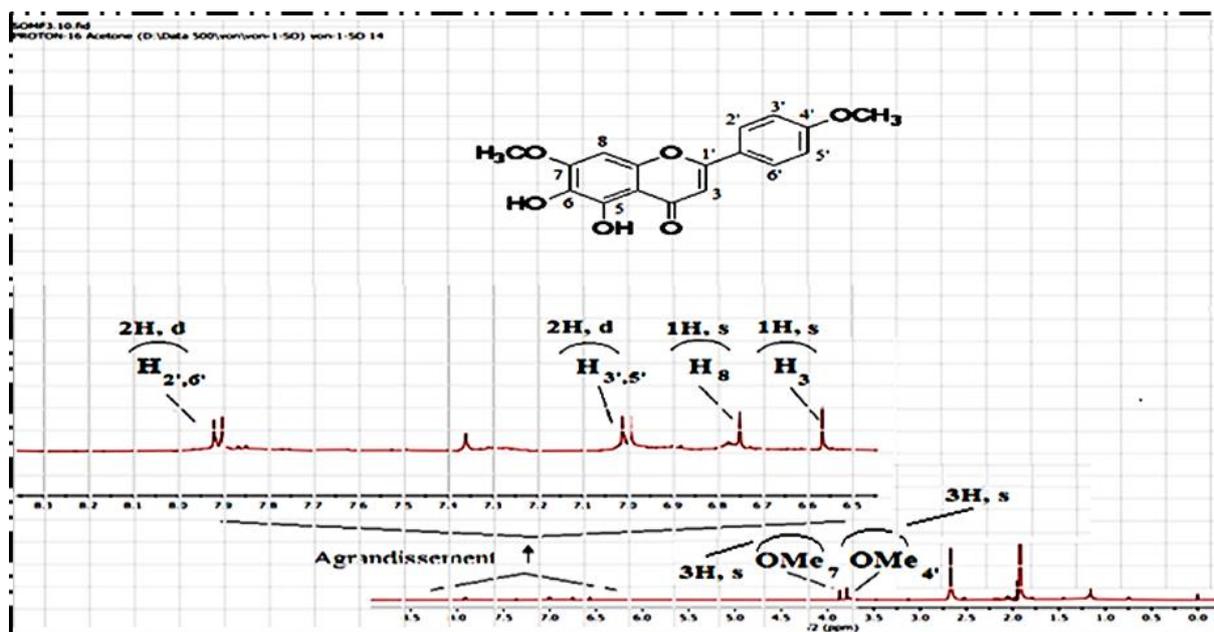


Figure 40 : Spectre RMN <sup>1</sup>H de la fraction AB<sub>1</sub> (avec agrandissement)

Les spectres ci-dessous représentent une carte RMN bidimensionnelle COSY où on peut apercevoir aisément les corrélations de type <sup>n</sup>J<sub>H-H</sub> : H<sub>2',6'</sub> avec H<sub>3',5'</sub> et vice versa et une autre carte bidimensionnelle HSQC, facile à interpréter puisqu'il s'agit que des corrélations <sup>1</sup>J<sub>C-H</sub>. Ces deux cartes confirment la proposition de structure de la flavone Ladanéine.

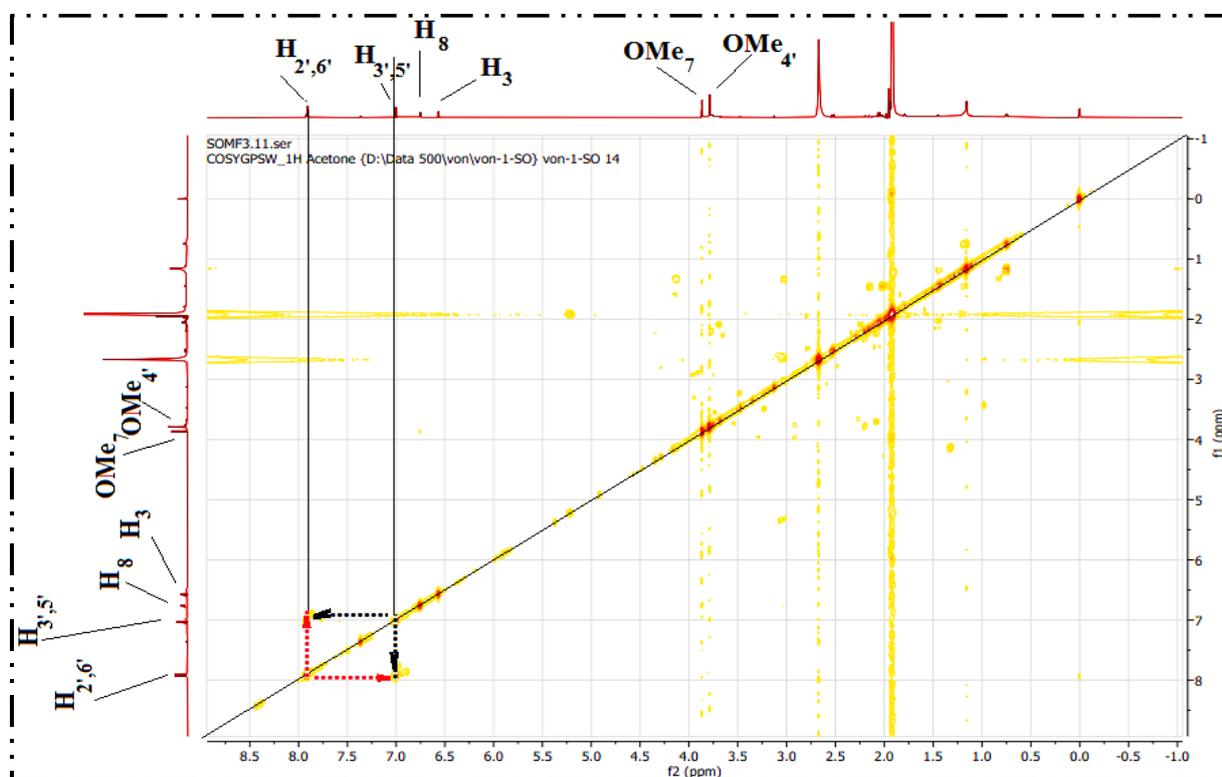


Figure 4 : Carte RMN bidimensionnelle COSY

Les informations de RMN  $H^1$  ont été complétées par d'autres spectres de corrélations hétéronucléaires HSQC pour déterminer l'ensemble des positions des carbones et de leurs protons associés.

Le spectre HSQC met en évidence les corrélations entre les protons et les carbones qui les portent, ces derniers sont repérés comme suit :

- Le signal des protons H-2' et H-6' permet la localisation des C-2' et C-6' à  $\delta_c$  128ppm.
- Le signal des protons H-3' et H-5' permet la localisation des C-3' et C-5' à  $\delta_c$  115ppm.
- Le proton H-8 permet de localiser le C-8 à 90 ppm.
- Les protons des groupement méthoxyle permettent de localiser les carbones C-4' et C-7 à  $\delta_c$  58 et 55 ppm respectivement.

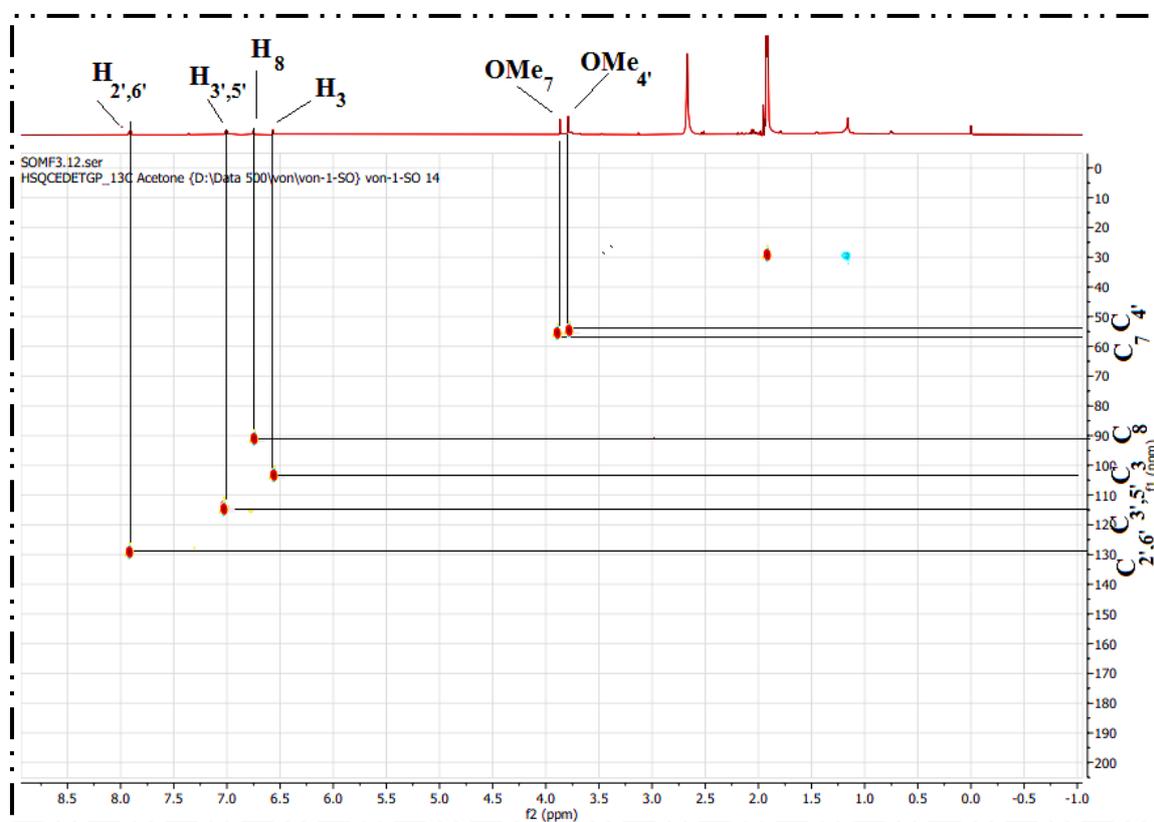
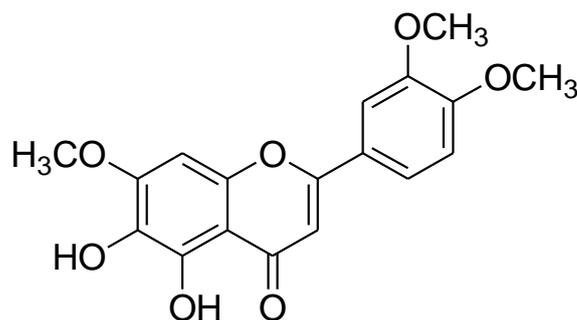


Figure 5 : Carte RMN bidimensionnelle HSQC

### ➤ Elucidation structurale du flavonoïde D<sub>11/1</sub>

#### ▶ 5,6 – di – OH – 7,3',4' – tri – OMe flavone

$\lambda_{max}$  en nm BII → BI



- { MeOH: 283, 339.
- { MeOH + NaOH : 288sh, 320.
- { MeOH + AlCl<sub>3</sub> : 243, 294, 365.
- { MeOH + AlCl<sub>3</sub> + HCl : 243, 298, 362.
- { MeOH + NaOAc : 245 sh, 283, 337.
- { MeOH + NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> : 248, 285, 338.

Ce composé aussi issu de l'extrait CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> avec une fluorescence violette, ne peut être qu'un aglycone de flavone et même méthoxylé au regard de ses différents R<sub>f</sub> (DI : 0,44, DI' : 0,59 et DII : 0,19).

Ainsi, le spectre MeOH de D<sub>11/1</sub> présente une Bande I vers 339 nm à + 8 nm de la BI du composé AB<sub>1</sub> ; ce qui indique qu'on est en présence d'un aglycone de flavone de type Lutéoline c'est à dire avec un cycle latéral B au moins disubstitué en 3',4' alors que la Bande II avec un λ<sub>max</sub> vers 283 nm ne peut tout comme pour le composé AB<sub>1</sub> nous indiquer que le cycle A porte un OH en position 6 (OH<sub>6</sub>).

Pour les autres séries, c'est à peu près les mêmes spectres et donc les mêmes conclusions et on peut proposer donc la structure : 5,6-di-OH -7,3',4'-tri-OMe flavone.

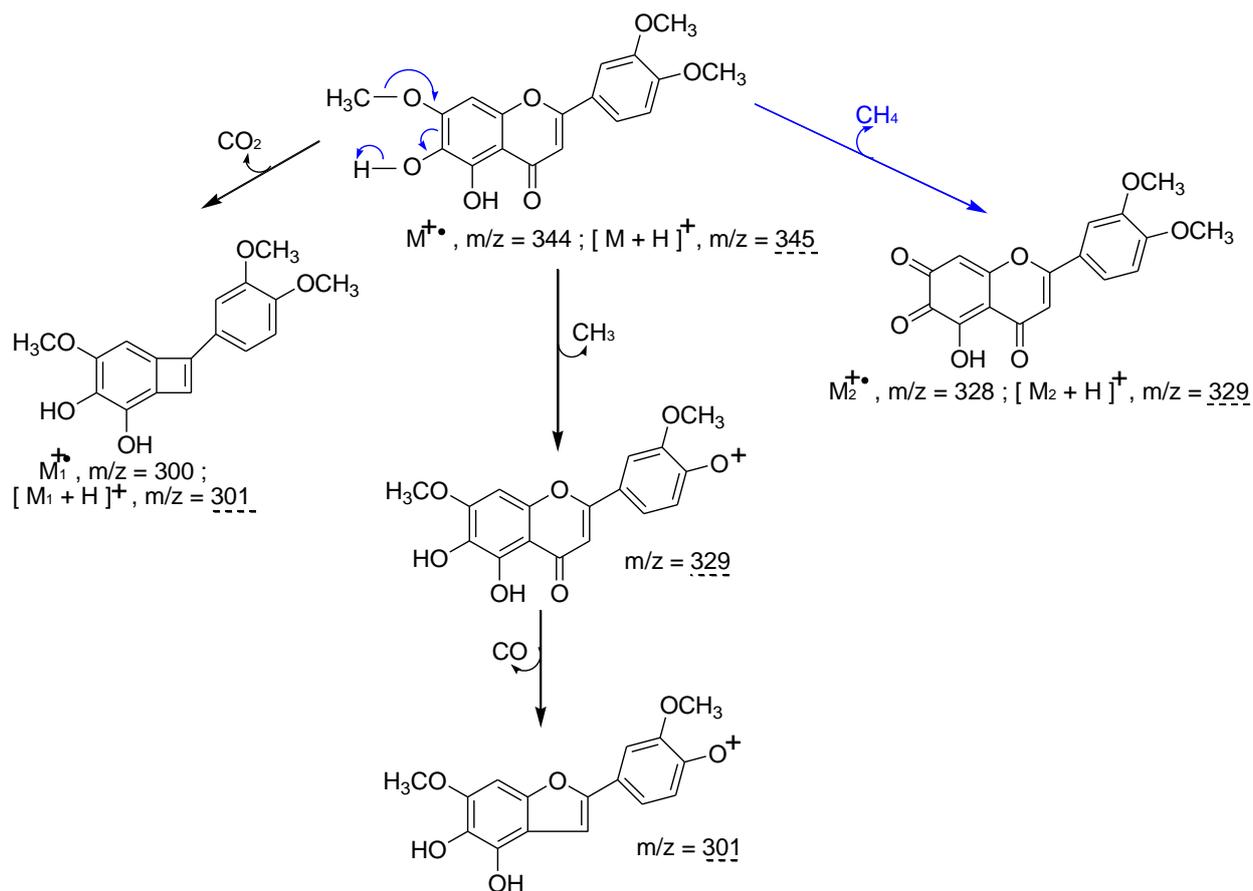
Il faut noter que ce composé a été identifié par analyse LC-DAD-MS/MS de l'extrait CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

Le spectre de masse de D<sub>11/1</sub> obtenu suite à l'opération couplée en mode positif confirme ce qui a été proposé puisqu'il nous donne un pic quazi moléculaire en MS1 à m/z = 345 correspondant à [M + H]<sup>+</sup> et un autre à m/z = 711 (avec adduit) correspondant à [2M + Na]<sup>+</sup> ; ce qui va avec la formule brute C<sub>18</sub> H<sub>16</sub> O<sub>7</sub> de masse molaire égale alors à 344 g/mol.

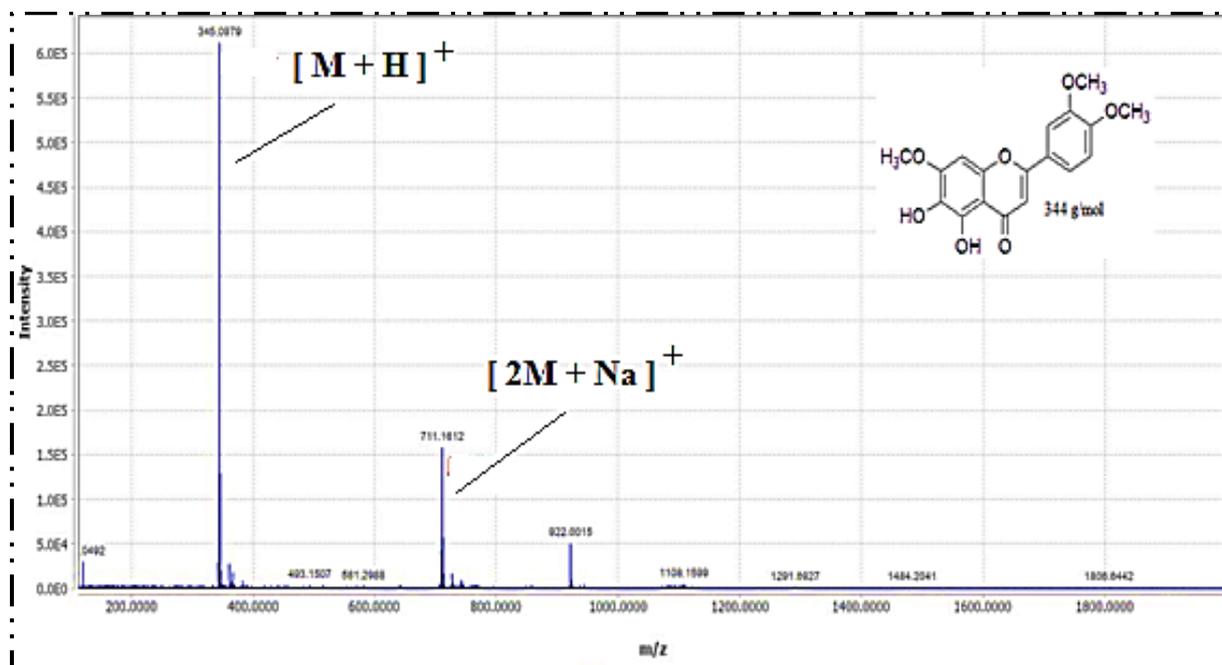
Les autres pics qui apparaissent sur le spectre de masse en MS2 peuvent être le résultat des clivages suivants, à savoir :

- [M - CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> ou [M + H - CH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> à m/z = 329
- [M - CH<sub>3</sub> - CO]<sup>+</sup> ou [M + H - CO<sub>2</sub>]<sup>+</sup> à m/z = 301.

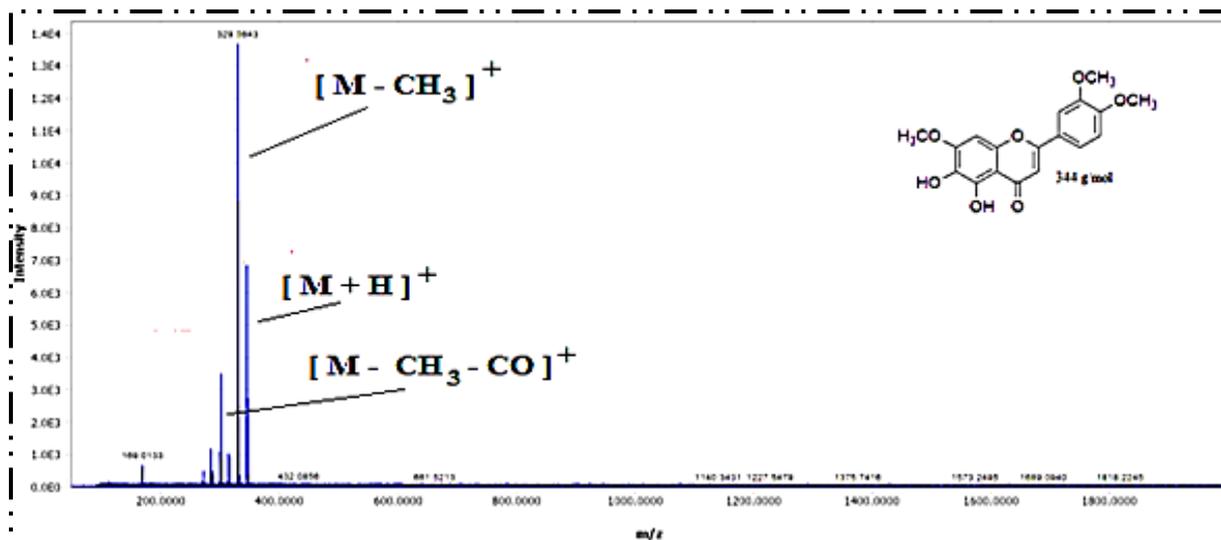
Dans ce qui suit, les schémas de fragmentations probables qui conduisent aux pics fragments comme mentionnés sur les deux spectres de masse du composé D<sub>11/1</sub>.



**Figure 6 :** Schéma de fragmentations de la 5,6 – di – OH – 7,3',4' – tri – OMe flavone



**Figure 7 :** Spectres de masse HR-APCI-MS 1 (+) de la fraction D11/1



**Figure 8 :** Spectres de masse HR-APCI-MS 2 (+) de la fraction D<sub>11/1</sub>

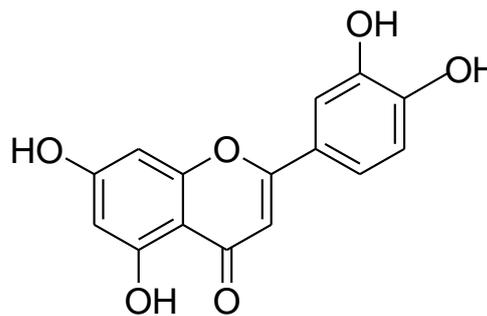
### ➤ Elucidation structurale du flavonoïde F 10/11

Le composé F 10/11 issu de l'extrait AcOEt, présentant une fluorescence violette sous lumière de Wood et un comportement chromatographique sur les différents systèmes (DI :0,33, DII:0,125) font que cet aglycone de flavone est dépourvu de groupement Méthoxyle; chose qu'il faut bien évidemment confirmer avec les données spectrales UV-Visible.

#### ▶ 5,7,3',4' – tetra hydroxyflavone (Lutéoline)

$\lambda_{\max}$  en nm BII → BI

- { MeOH : 254sh, 268, 350
- { MeOH + NaOH : 274, 310sh, 403.
- { MeOH + AlCl<sub>3</sub> : 274, 325, 420.
- { MeOH + AlCl<sub>3</sub> + HCl : 270, 297, 355, 372.
- { MeOH + NaOAc : 270, 365, 400.
- { MeOH + NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> : 250, 265, 373.



• Le spectre UV – Visible dans le MeOH du composé F 10/11 présente une BI vers 350 nm et donc, un cycle B au moins disubstitué et portant même un ou deux hydroxyle libre ; ceci peut aussi expliquer une BII avec 254 sh et 268 nm.

La BII vers 268 nm, ne peut que nous orienter vers un cycle A ne portant d'aucune substitution en position 6 et/ou 8.

L'ajout de NaOH provoque un déplacement bathochrome général des deux bandes et ce par rapport au spectre MeOH : BI vers 420 nm et BII vers 270 nm avec un effet hyperchrome de BI et donc, on est en présence d'un cycle B hydroxylé en position 4' (OH<sub>4'</sub>).

D'autre part, le shoulder vers 310 nm peut éventuellement laisser entendre que la position 7 est aussi hydroxylée (OH<sub>7</sub>); chose qu'il faut confirmer dans le spectre NaOAc.

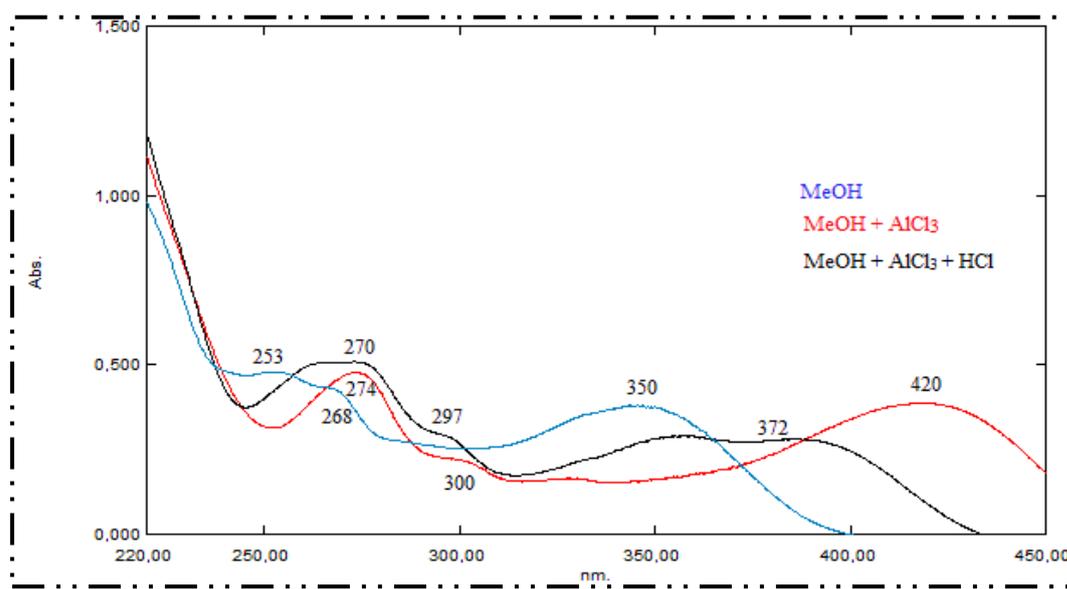
- L'hydroxyle libre en position 5 du noyau B (OH<sub>5</sub>) quoiqu'originel est confirmé par le déplacement bathochrome de la BII du spectre MeOH + AlCl<sub>3</sub> / spectre MeOH.

Le BI du spectre MeOH + AlCl<sub>3</sub> + HCl (372 nm) / à son homologue du spectre MeOH + AlCl<sub>3</sub> (420 nm) et donc un effet hypsochrome bien prononcé, laisse entendre qu'on est en présence d'un cycle B portant un système ortho dihydroxy (ortho – di OH en 3',4').

- Un léger déplacement bathochrome de BI du spectre NaOAc / BI en MeOH (+ 2 nm) suffit pour confirmer la présence d'un OH<sub>7</sub>.

D'autre part, le système ortho – di OH en B est confirmé par le déplacement bathochrome de BI du spectre MeOH + NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> / BI du spectre MeOH (373 / 350 nm).

A travers ces données, on peut donc dire que le composé F 10/11 ne peut être que la flavone 5,7,3',4'– tétra hydroxyflavone ou Lutéoline.



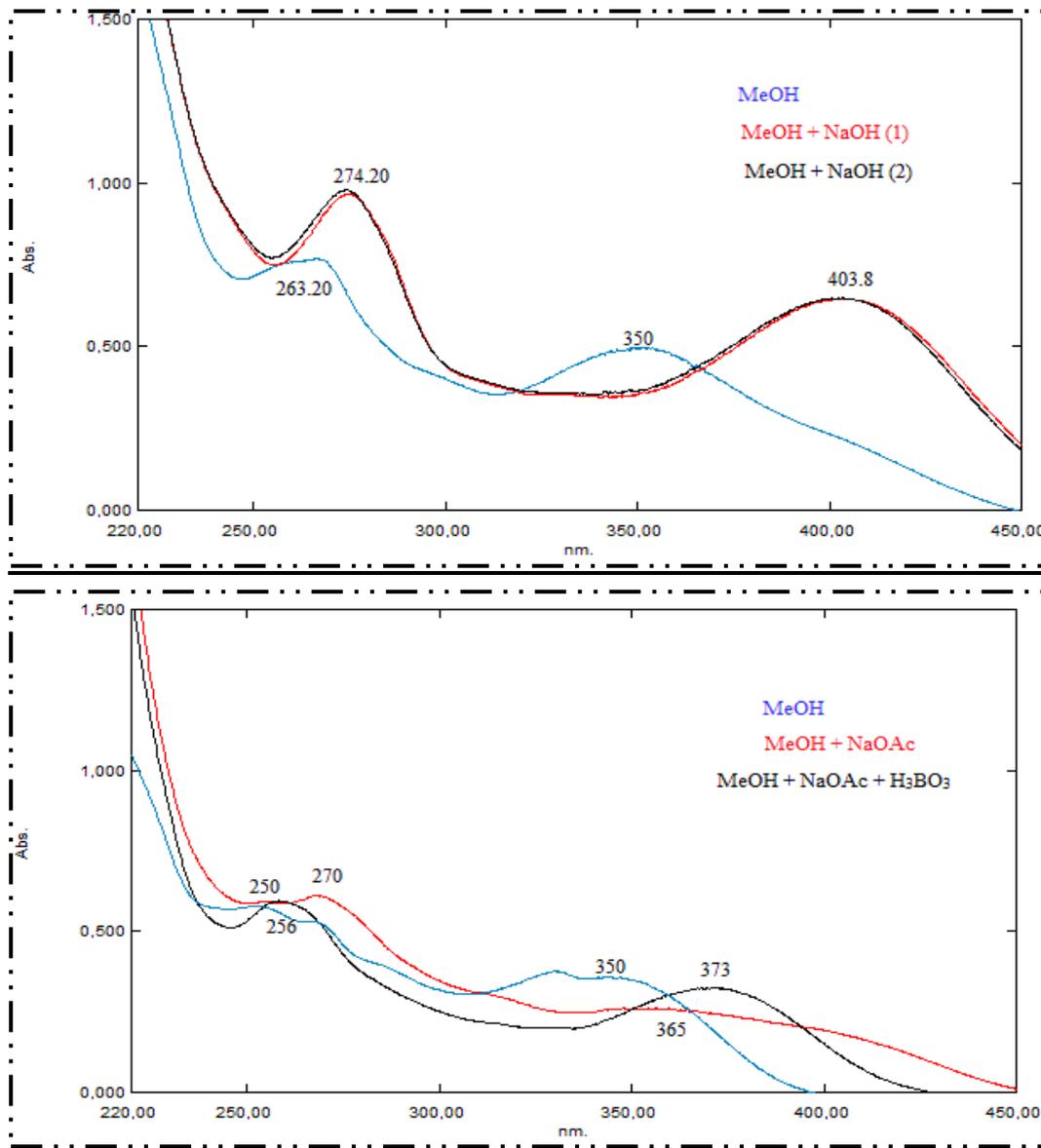


Figure 9 : Série Spectrale UV-Visible de la fraction F10/11

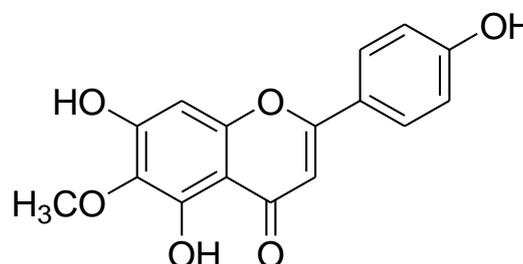
➤ **Elucidation structurale du flavonoïde F 531/2**

Le composé F 531/2 aussi issu de l'extrait AcOEt, présentant une fluorescence violette sous lumière de Wood et un comportement chromatographique sur les différents systèmes (D1: 0,56, D2: 0,09) font que cet aglycone de flavone contient au moins un groupement méthoxyle (OMe); chose qu'il faut bien évidemment confirmer avec les données spectrales UV-Visible.

▶ **5,7,4' – trihydroxy-6-OMethoxyflavone (Hispiduline)**

$\lambda_{\max}$  en nm BII → BI

- { MeOH : 269, 284, 330
- { MeOH + NaOH : 275, 321, 393



- { MeOH + AlCl<sub>3</sub> : 275, 301, 386
- { MeOH + AlCl<sub>3</sub> + HCl : 275, 301, 386
- { MeOH + NaOAc : 275, 348
- { MeOH + NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> : 270, 332

• **Série 1**

• Spectre MeOH :  $\lambda_{\max}$  de la B I vers 330 nm indique qu'il s'agit bien d'une flavone avec un cycle B monosubstitué.  $\lambda_{\max}$  de B II apparait vers 269 nm avec un shoulder (épaulement) vers 284 nm laisse envisager un cycle A polysubstitué avec méthoxyle en position 6 (OMe<sub>6</sub>) ; chose qui va dans le même sens que la valeur du Rf dans D<sub>1</sub>.

• Spectre MeOH + NaOH : Par rapport au spectre MeOH, un déplacement bathochrome général est bien observable et spécialement de la B I ; ce qui indique la présence d'un hydroxyle libre en position 4' sur le noyau B (OH<sub>4'</sub>). D'autre part, la présence d'une nouvelle bande (B III) se situant entre BI et B II indique quant à elle la présence d'un hydroxyle libre en position 7 sur le noyau A (OH<sub>7</sub>) qu'il faut confirmer avec le spectre NaOAc.

• **Série 2**

• Spectre MeOH + AlCl<sub>3</sub> / Spectre MeOH : Un déplacement bathochrome de BI ( $\Delta\lambda_I = 56$  nm) ; ce qui indique la présence de l'hydroxyle libre en position 5 sur le noyau A (OH<sub>5</sub>).

• Spectre MeOH + AlCl<sub>3</sub> + HCl / Spectre MeOH + AlCl<sub>3</sub> : l'absence du déplacement hypsochrome de la BI indique l'absence d'un système Ortho diOH sur le noyau A ou B, ceci sera confirmé avec le spectre MeOH + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>.

• **Série 3**

• Spectre MeOH + NaOAc / Spectre MeOH : le léger déplacement bathochrome de BII ( $\Delta\lambda_{II} = +5$  nm) milite et confirme la présence de l'hydroxyle libre en position 7 (OH<sub>7</sub>).

• Spectre MeOH + NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> / MeOH : l'absence du déplacement bathochrome de BI confirme l'absence du système Ortho diOH en cycle A ou en cycle B.

D'après les résultats des CCM dans divers système, la fluorescence et les résultats de la série spectrale UV-Vis, on propose la 5,7,4'-tri-hydroxy-6-methoxyflavone ( 5,7,4'-tri-OH-6-OMe flavone connue sous le nom de « Hispiduline » de formule brute C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> et de masse molaire égale à 300 g/mole. Ces données bien qu'elles soient nécessaires et même suffisantes, il n'en demeure pas moins qu'afin d'établir cette structure et de la confirmer, il faut effectuer d'autres analyse et en l'occurrence un spectre de masse et au moins un spectre RMN<sup>1</sup>H.

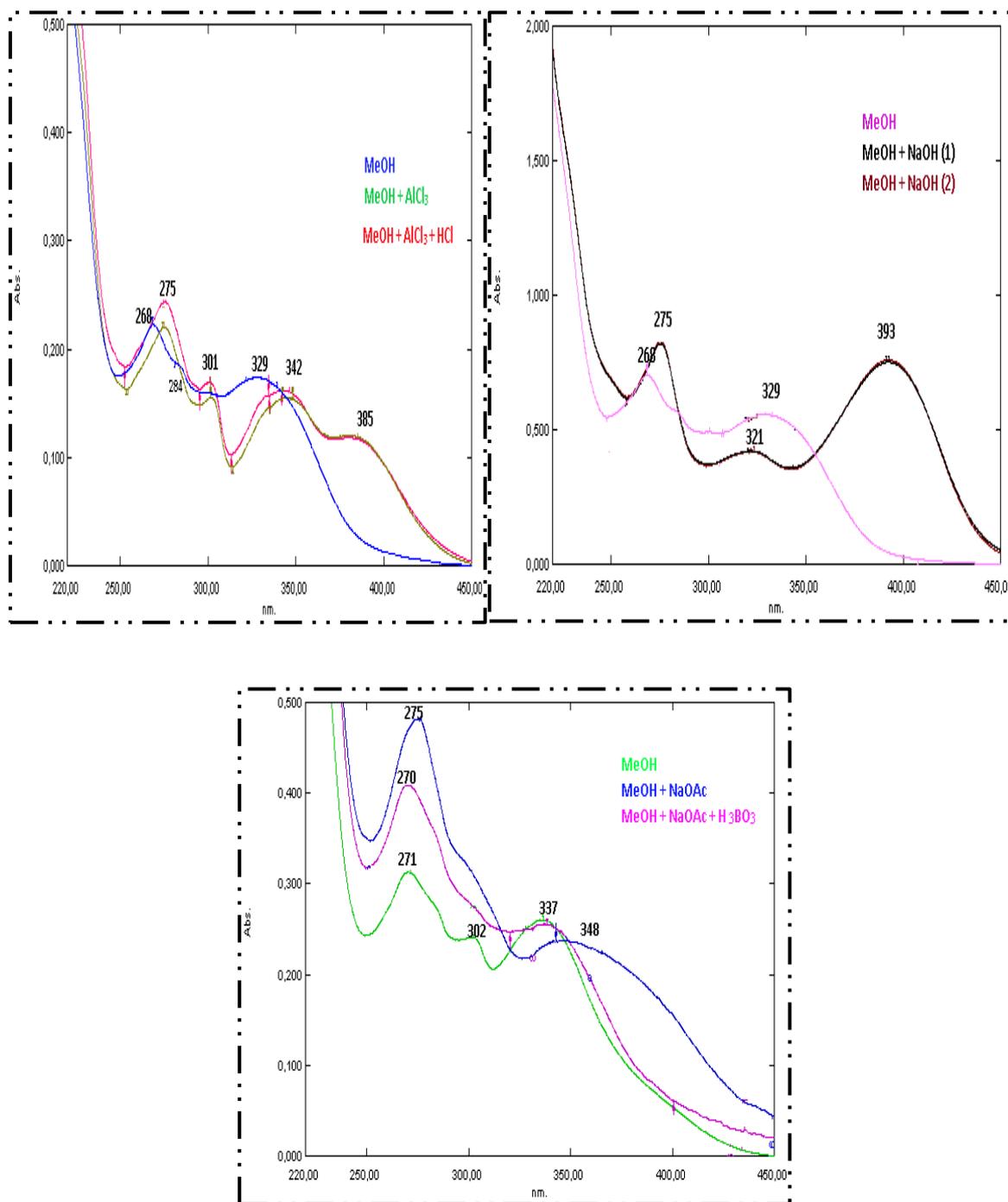


Figure 10 : Série spectrale UV-Visible de la fraction F 531/2

### 5.1. Résultats de l'analyse par couplage LC-DAD-HRMS/MS

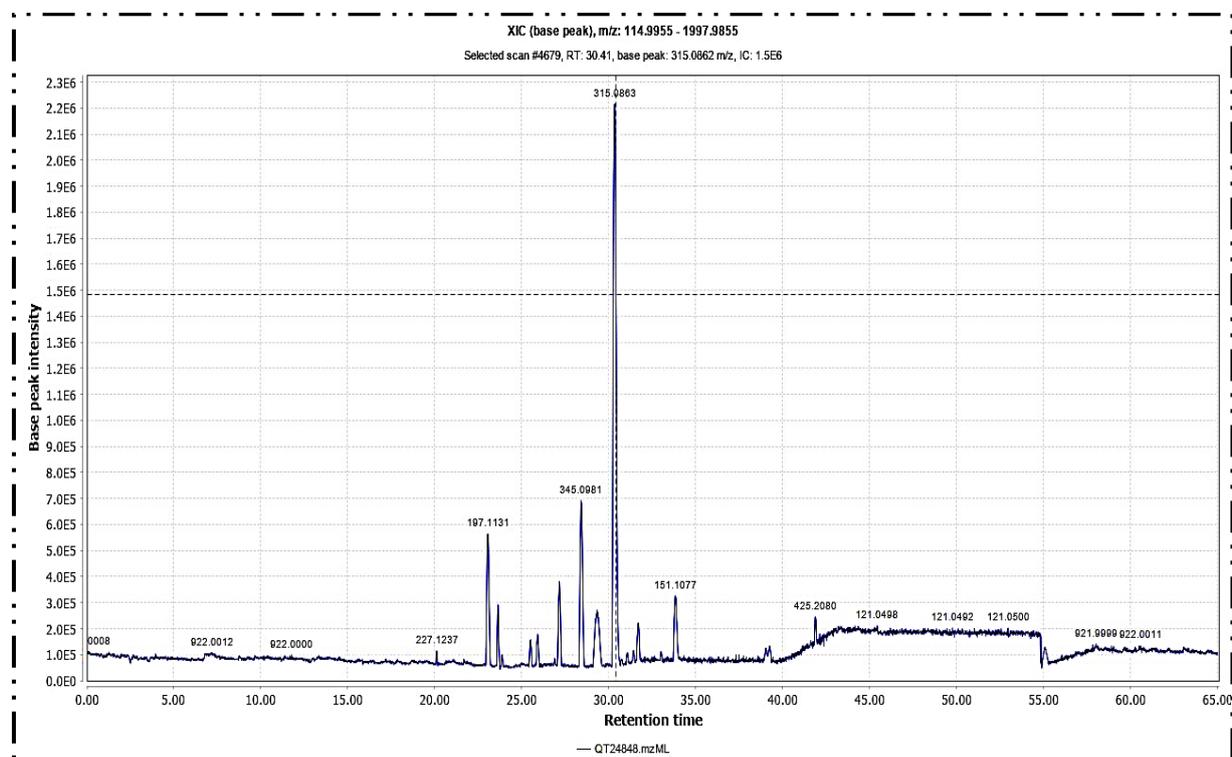
Cette analyse a pour but d'identifier les composés majoritaires dans chaque extrait. Toutes les molécules détectées ont été caractérisées par étude de leur fragmentation obtenue par APCI-MS/MS en mode négatif et positif, en comparant les données obtenues avec ceux de la littérature <sup>(15, 22, 30)</sup> et les bases de données. Le mode négatif s'avère le plus sensible et le plus informatif. Les résultats d'analyse ont permis de révéler la présence de différentes sous

famille phénoliques : di-C-hétéroside de flavone, un aglycone de flavone prénylé, un aglycones de flavones méthoxylées, un aglycone flavanonol ainsi que des acides phénoliques. Comme énoncé au début, on va présenter les composés identifiés dans chaque extrait et établir les schémas de fragmentations des produits détectés.

#### a- Composés identifiés dans l'extrait CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

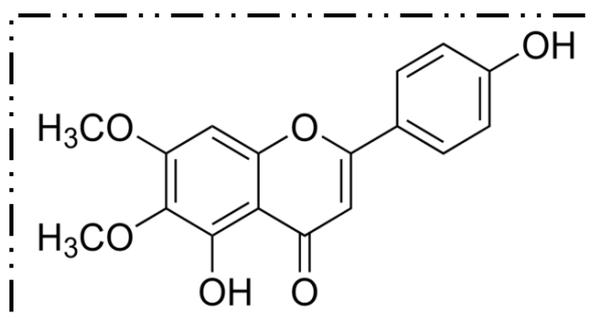
Le chromatogramme de l'analyse HPLC-APCI-QTOF-MS/MS de l'extrait CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> en mode positif révèle la présence des pics quasi moléculaire à m/z = 315 (pic de base) et 345 correspondant à [M + H]<sup>+</sup> et qui concordent avec les composés détectés diméthoxyflavone et triméthoxy flavone à tr égale à 31,19 min et 28min respectivement.

Le composé triméthoxy flavone identifiés par cette analyse correspond au flavonoïde D11/1 isolé et dont l'élucidation structurale a été déjà présenté.



**Figure 11** : Chromatogramme (TIC) de HPLC-APCI-QTOF-MS/MS de l'extrait CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> en mode positif

► 5, 4' – diOH – 6, 7 – diOMe flavone (Cirsimaritine)



Le profil du spectre UV-DAD de ce composé montre des maxima d'absorption  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) à 283 et 331 nm spécifiques des flavones. La BI vers 331nm implique que le cycle B est monosubstitué et le cycle A est polysubstitué (BII= 283 nm). Le spectre de masse du composé obtenu confirme ce qui a été proposé puisqu'il nous donne un pic quasi moléculaire en MS1 à  $m/z = 315$  correspondant à  $[M + H]^+$  et un autre à  $m/z = 651$  (avec adduit) correspondant à  $[2M + Na]^+$  ; ce qui va avec la formule brute  $C_{17} H_{14} O_6$  de masse molaire égale alors à 314 g/mol.

Les autres pics qui apparaissent sur le spectre de masse en MS2 peuvent être le résultat des clivages suivants, à savoir :

- $[M + H - CH_3]^+$  à  $m/z = 300$  ;
- $[M + H - CH_3 - CO]^+$  à  $m/z = 272$ .
- Pic A – CO =  $[M - C_8 H_6 O - CO]^+$  ou  $[314 - 118 - 28]^+$  à  $m/z = 168$ .

Dans ce qui suit, les probables schémas de fragmentations qui conduisent aux pics fragments comme mentionnés sur les deux spectres de masse du composé.

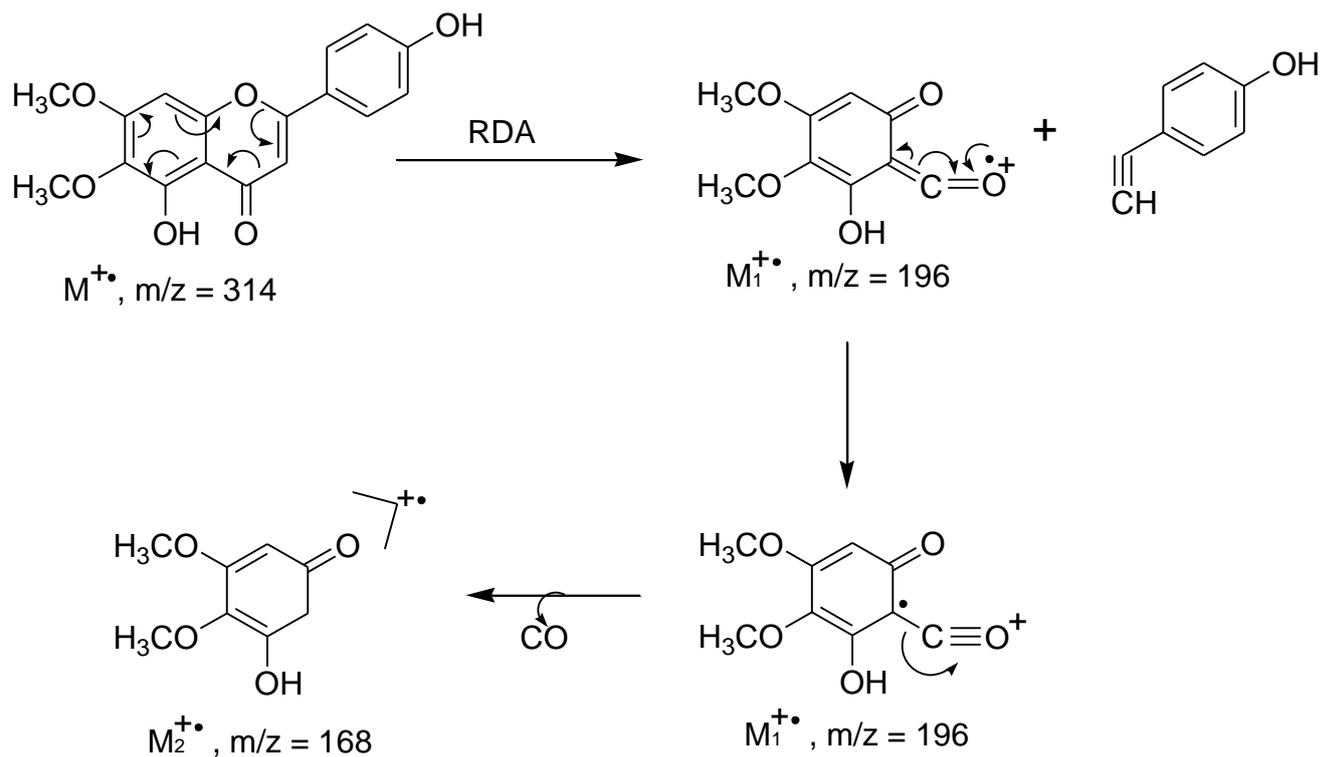


Figure 12 : Schéma de fragmentations de la cirsimaritin

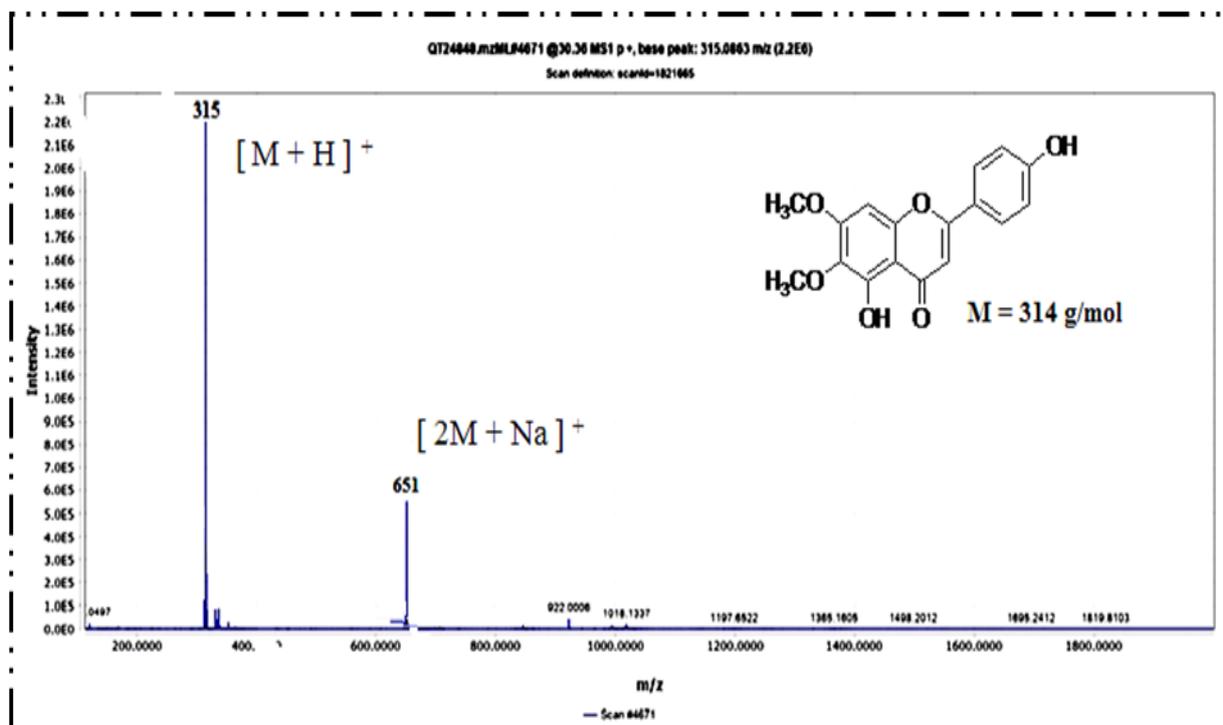


Figure 13 : Spectres de masse HR-APCI-MS 1 (+) de Cirsimaritin

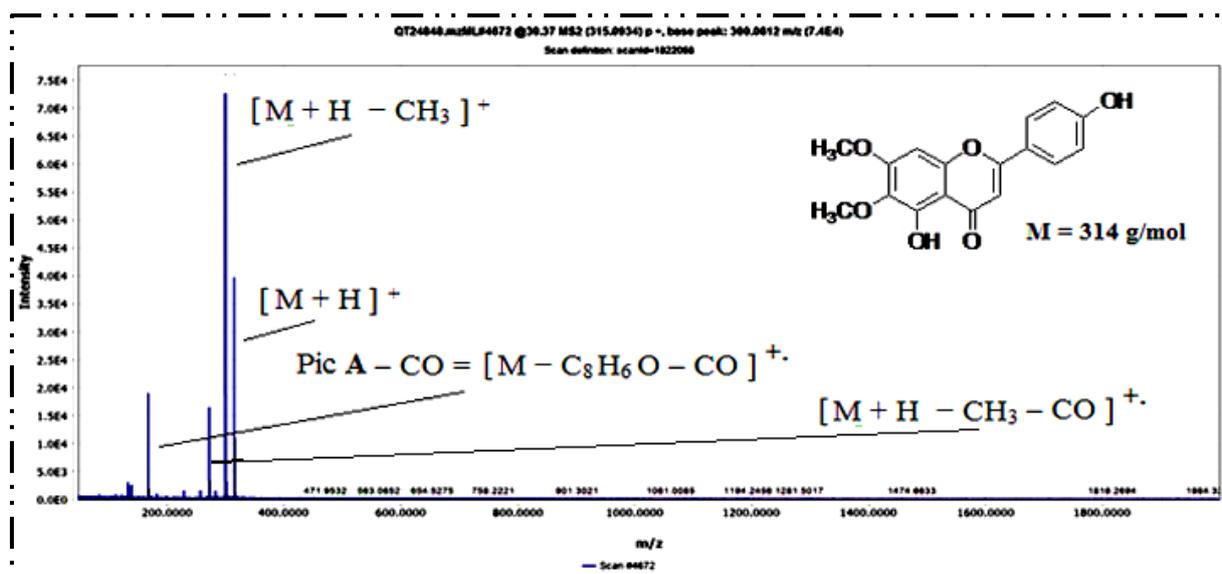


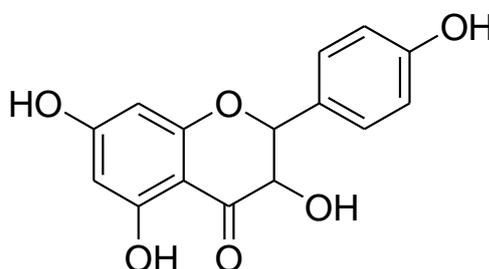
Figure 14 : Spectres de masse HR-APCI-MS 2 (+) de Cirsimaritin

► 3,5,7,4' – tétra – OH – flavanone

(Dihydrokaempférol ou Aromadendrine)

C<sub>15</sub> H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>

M = 288 g / mol



Le Dihydrokaempférol (Aromadendrine) a été détecté dans les trois extraits au temps de rétention 23,83 mn. Le spectre de masse du composé obtenu suite à l'opération couplée : HPLC / MS/MS en mode positif avec l'APCI comme mode d'ionisation révèle un pic quasi moléculaire en MS1 à m/z = 289 correspondant à [M+H]<sup>+</sup>, et un pic quasi moléculaire en MS1 mode négatif à m/z = 287 correspondant à [M-H]<sup>-</sup>. Les fragments générés suite à une MS2 de l'ion parent sont détectés en mode négatif. Pour la formation des fragments caractéristiques de Dihydrokaempférol. Des réactions de clivage des liaisons et réarrangement par la réaction de rétro Diels-Alder ont eu lieu. Les pics sont présentés sur le spectre MS2 (figure 74). On remarque tout de même que pour le spectre de cette flavone, on retrouve le pic A résultant de la fragmentation classique d'une flavone.

● Le mécanisme de fragmentation est représenté dans le schéma suivant:

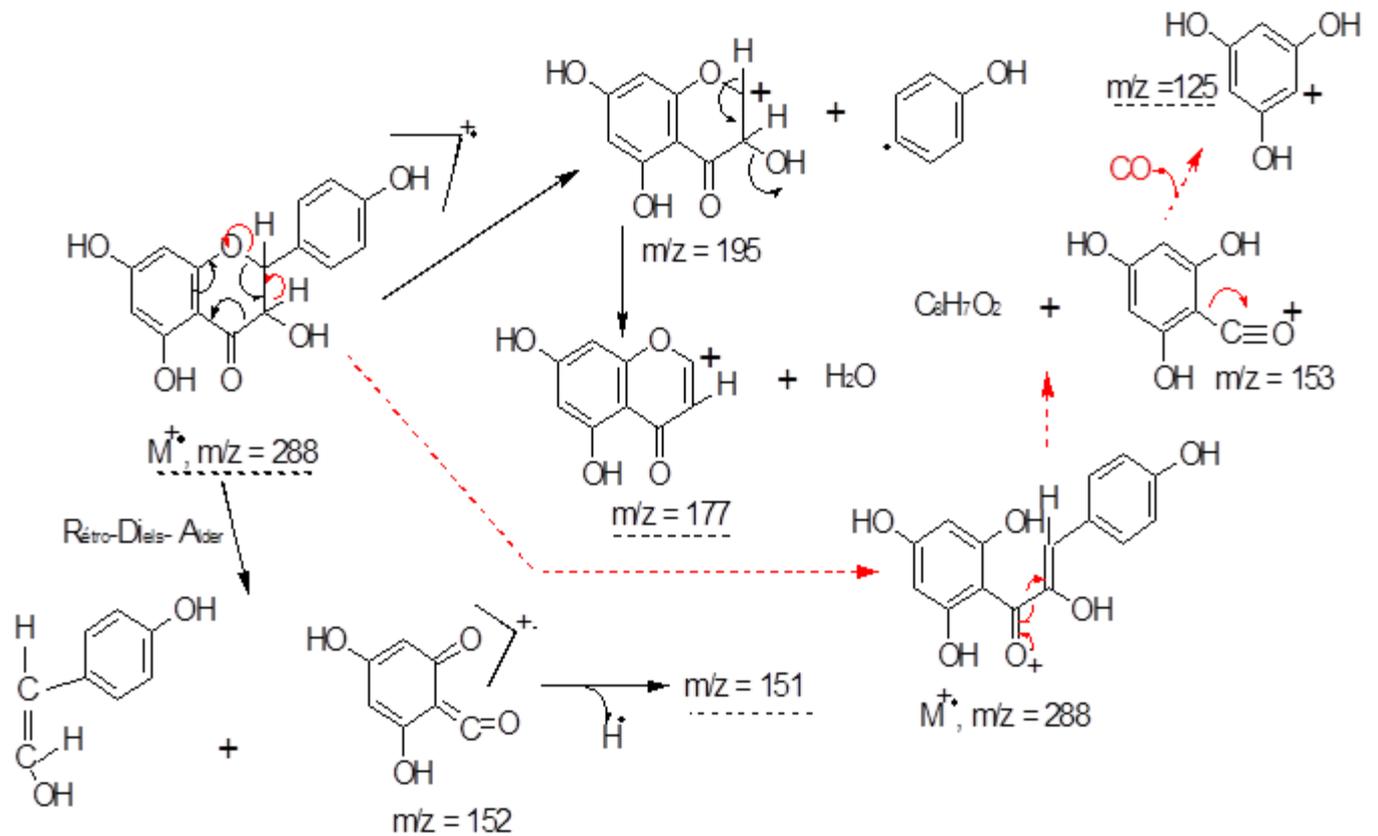


Figure 15 : Schéma de fragmentation de dihydrokaempférol

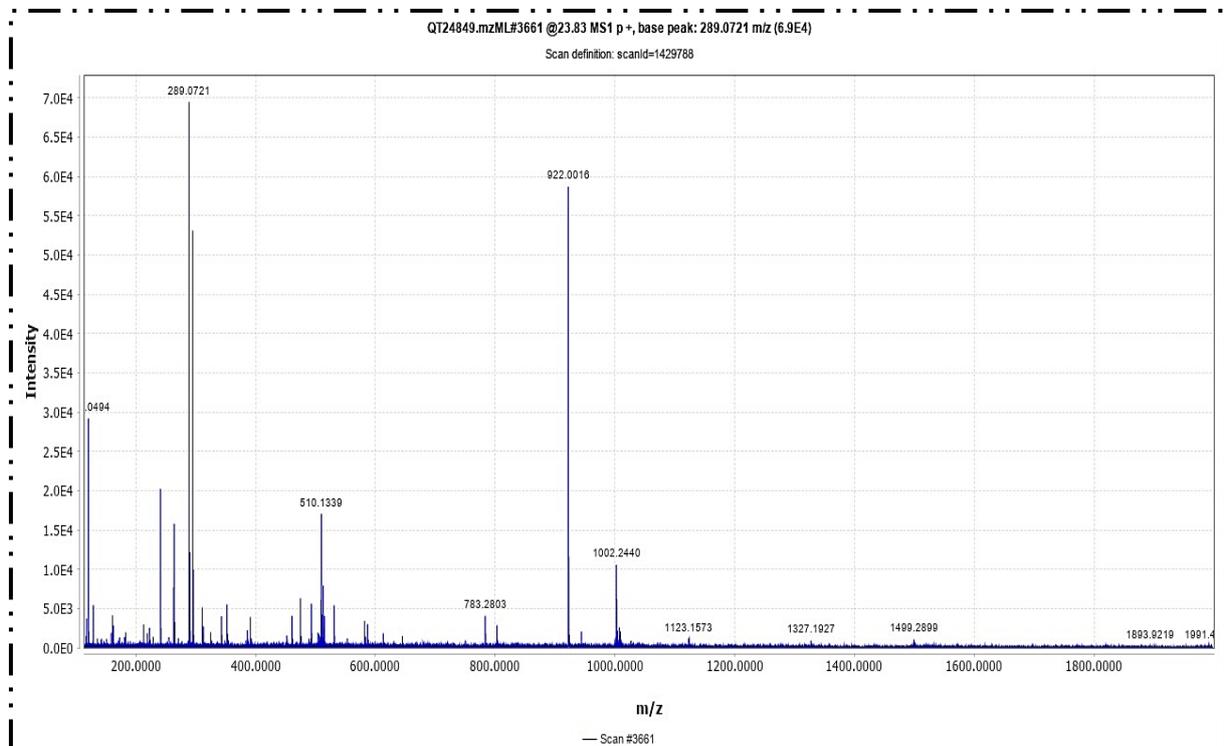
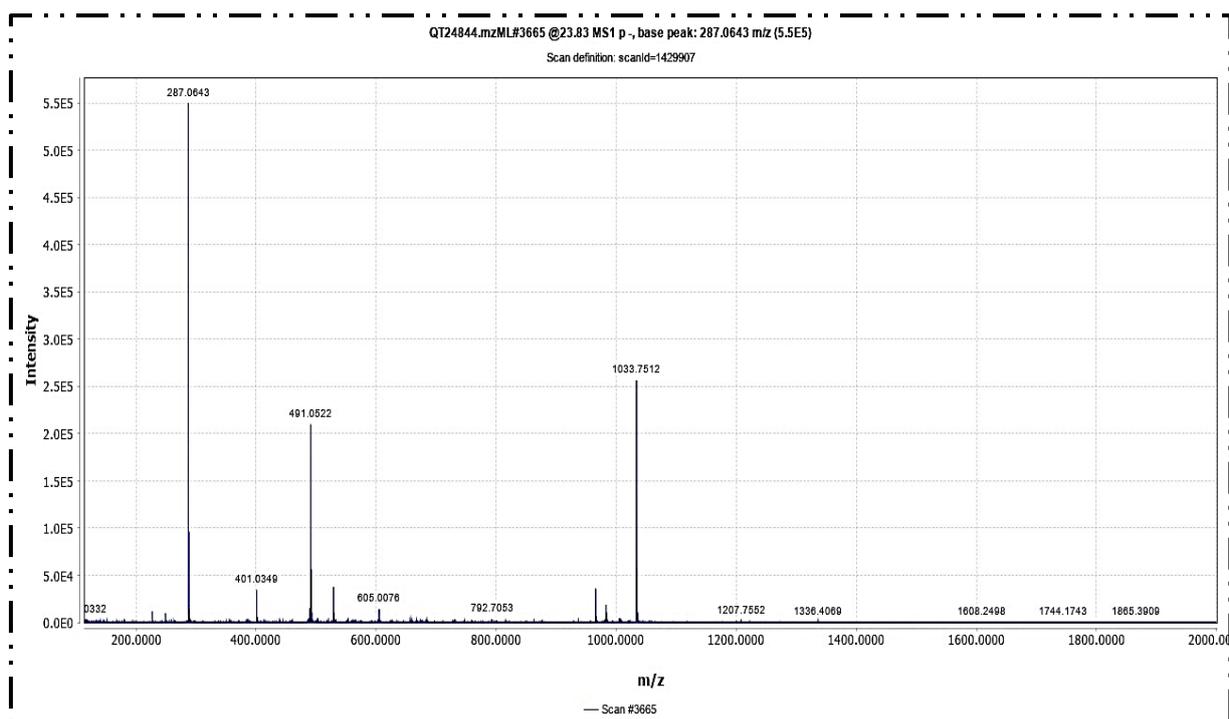
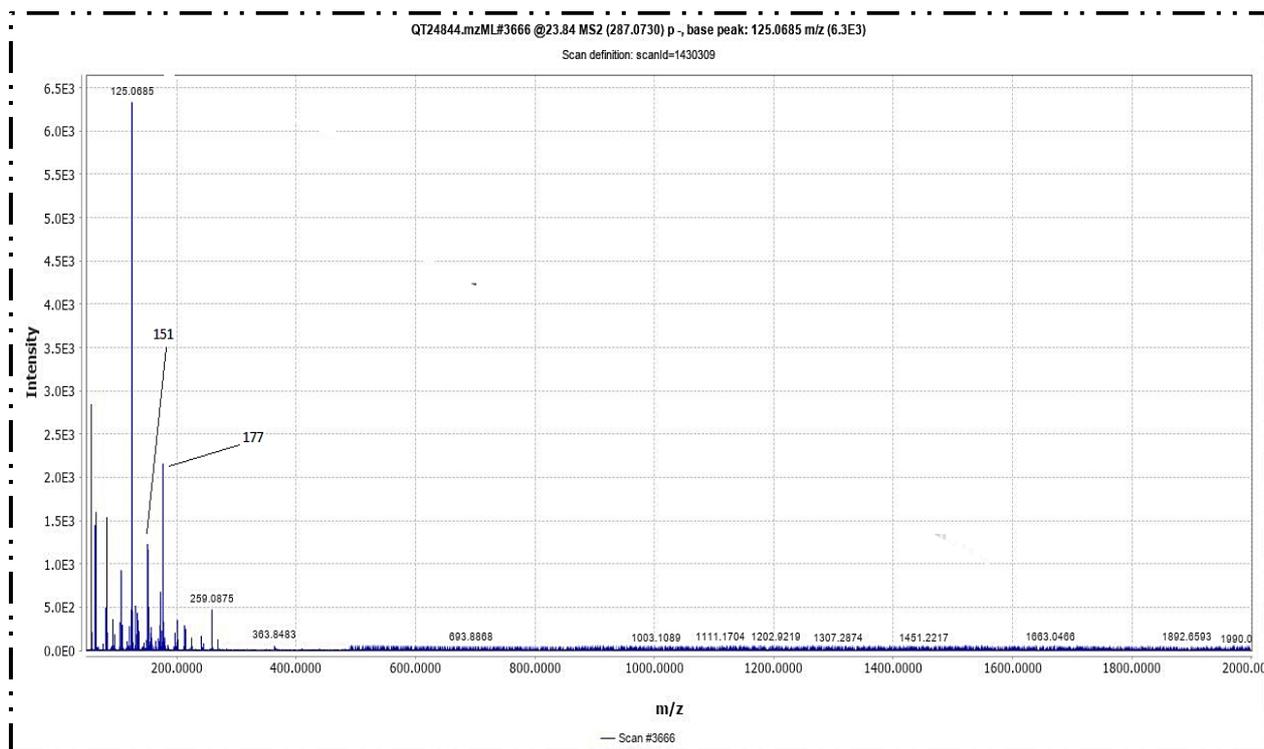


Figure 16 : Spectre de masse MS1 en mode positif ( $[M + H]^+ = 289$ ) de Dihydrokaempférol



**Figure 17** : Spectre de masse MS1 en mode négatif ( $[M-H]^- = 287$ ) de Dihydrokaempférol

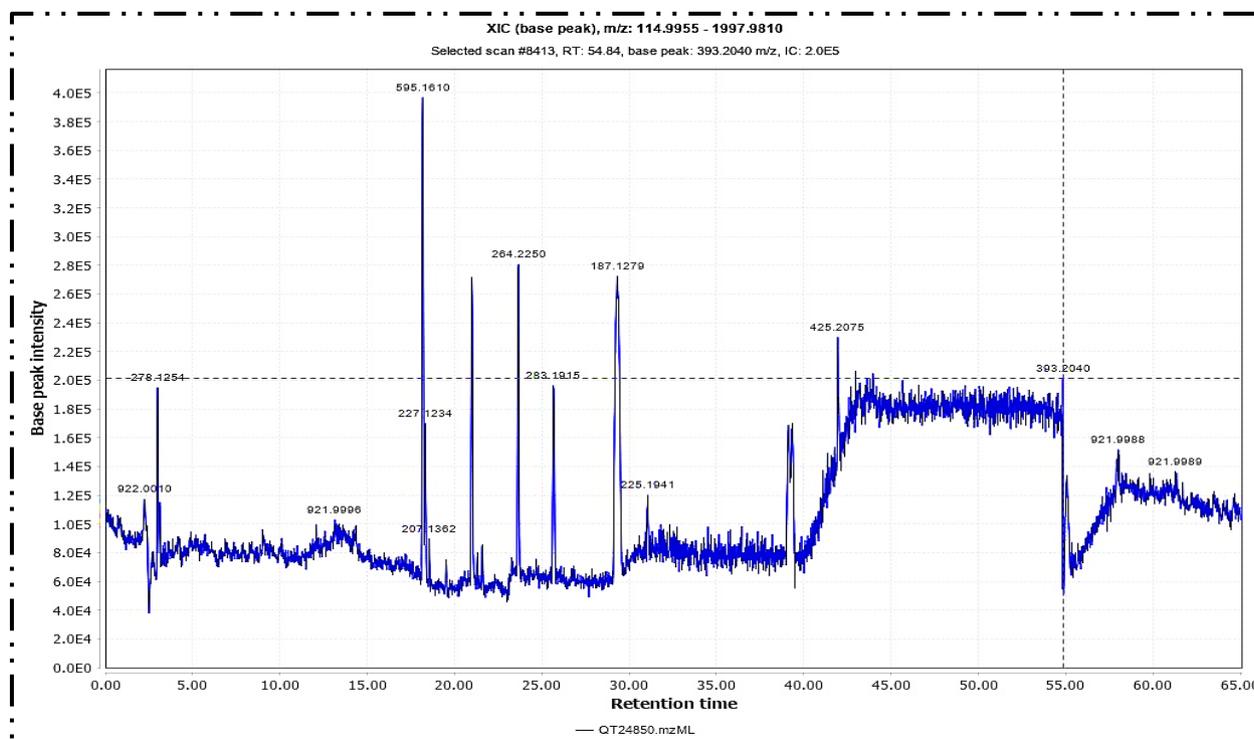


**Figure 18** : Spectre de masse MS2 en mode négatif de dihydrokaempférol

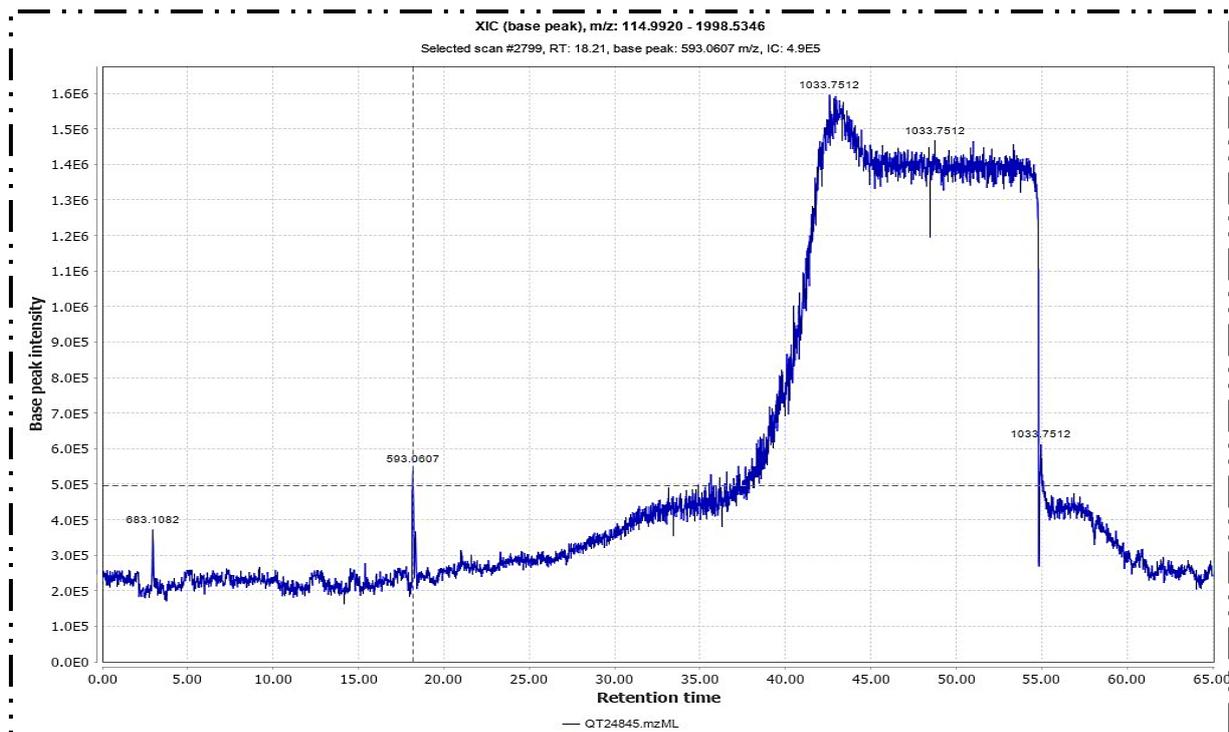
### b- Composés identifié dans l'extrait n-BuOH

Le chromatogramme de l'analyse HPLC-APCI-QTOF-MS/MS de l'extrait n-BuOH en mode positif révèle une richesse en composés majoritaires par rapport au chromatogramme en mode négatif. On constate la présence de l'ion quasi moléculaire à  $m/z = 595$  (pic de base)

et 593 (pic de base) correspondant à  $[M+H]^+$  et  $[M-H]^-$  respectivement et qui concordent avec le composé Vicenine-2, une flavone di-glycosilée détectée à Tr égale à 18,19 minutes. Les composés qui ont été détecté dans cet extrait sont le Dihydrokaempférol déjà présenté, la vicenine 2 et un flavonoïde prénylé de masse 388 g/mol.



**Figure 19** : Chromatogramme (TIC) de HPLC-APCI-QTOF-MS/MS de l'extrait BuOH en mode positif

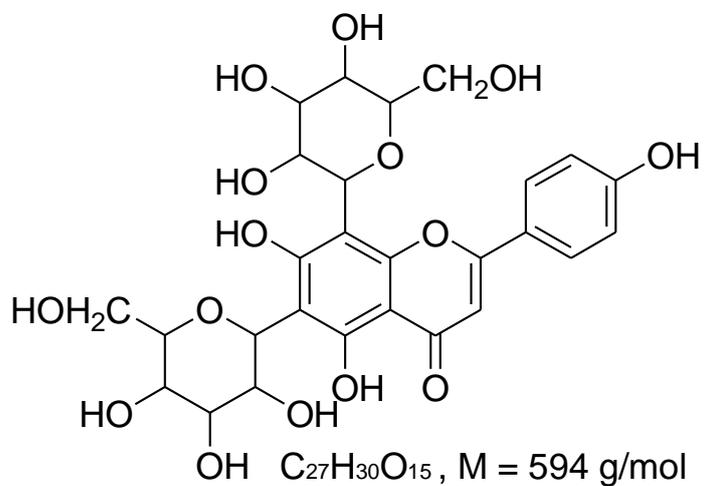


**Figure 20** : Chromatogramme (TIC) de HPLC-APCI-QTOF-MS/MS de l'extrait *n*-BuOH en mode négatif

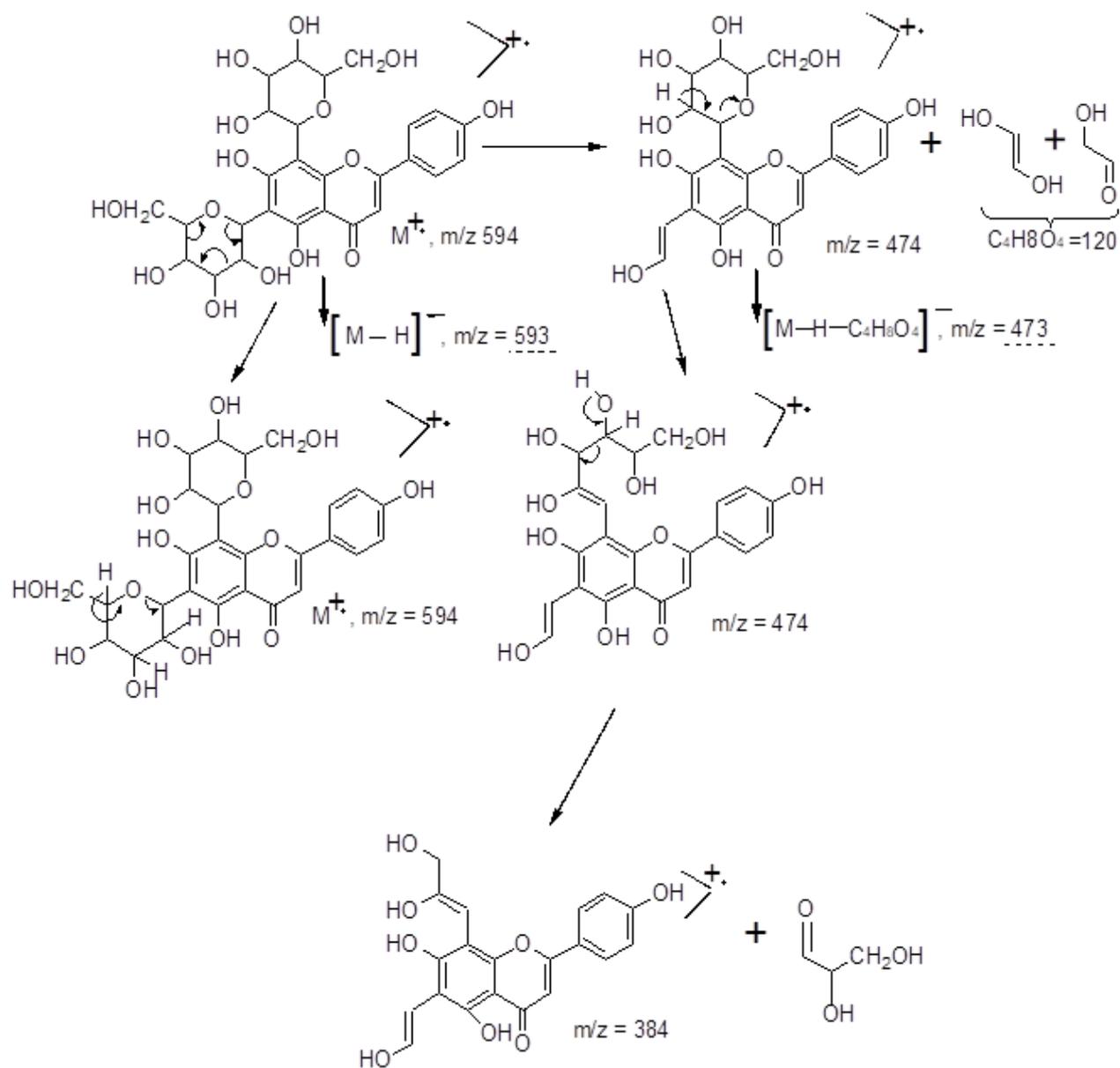
► **Di-C-Glucosyl-6,8-5,7,4'-tri hydroxyflavone (Vicénine-2)**

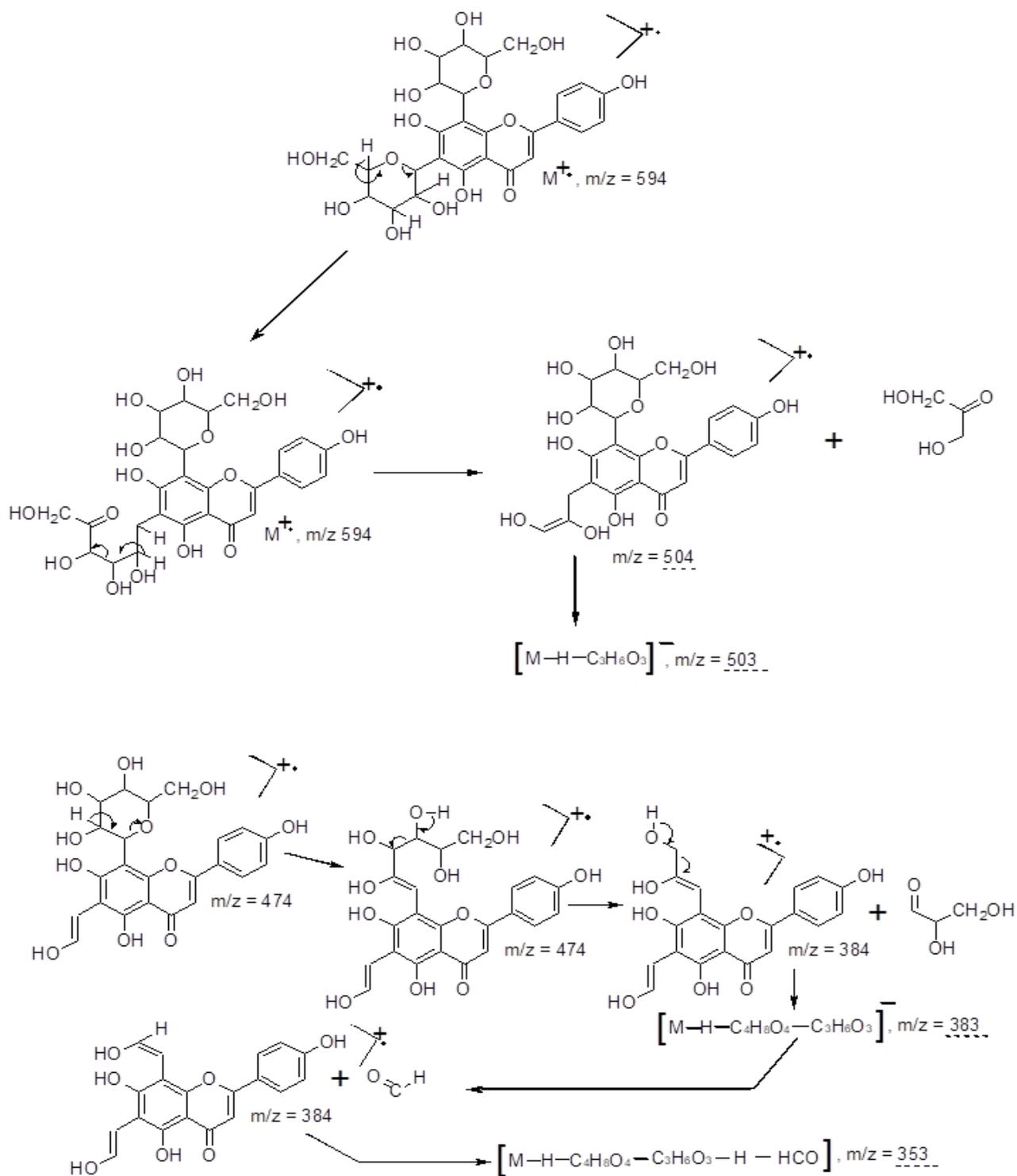
**C<sub>27</sub> H<sub>30</sub> O<sub>15</sub>**

M = 594 g/mol



- Schémas de fragmentations





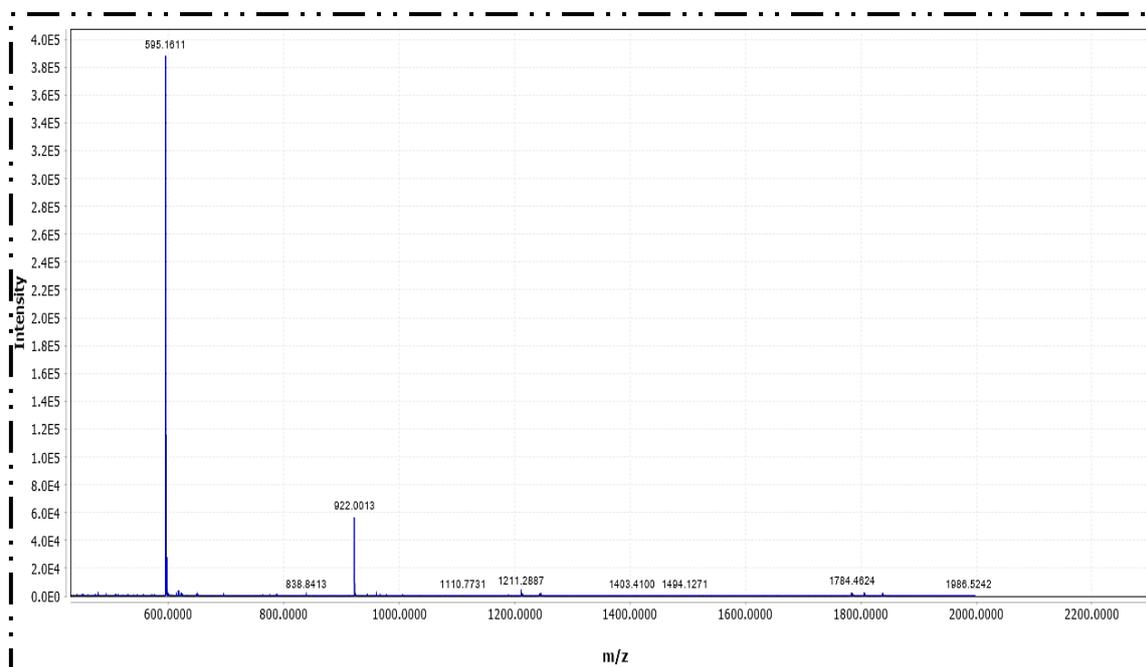
**Figure 21** : Schéma de fragmentations de la vicénine-2

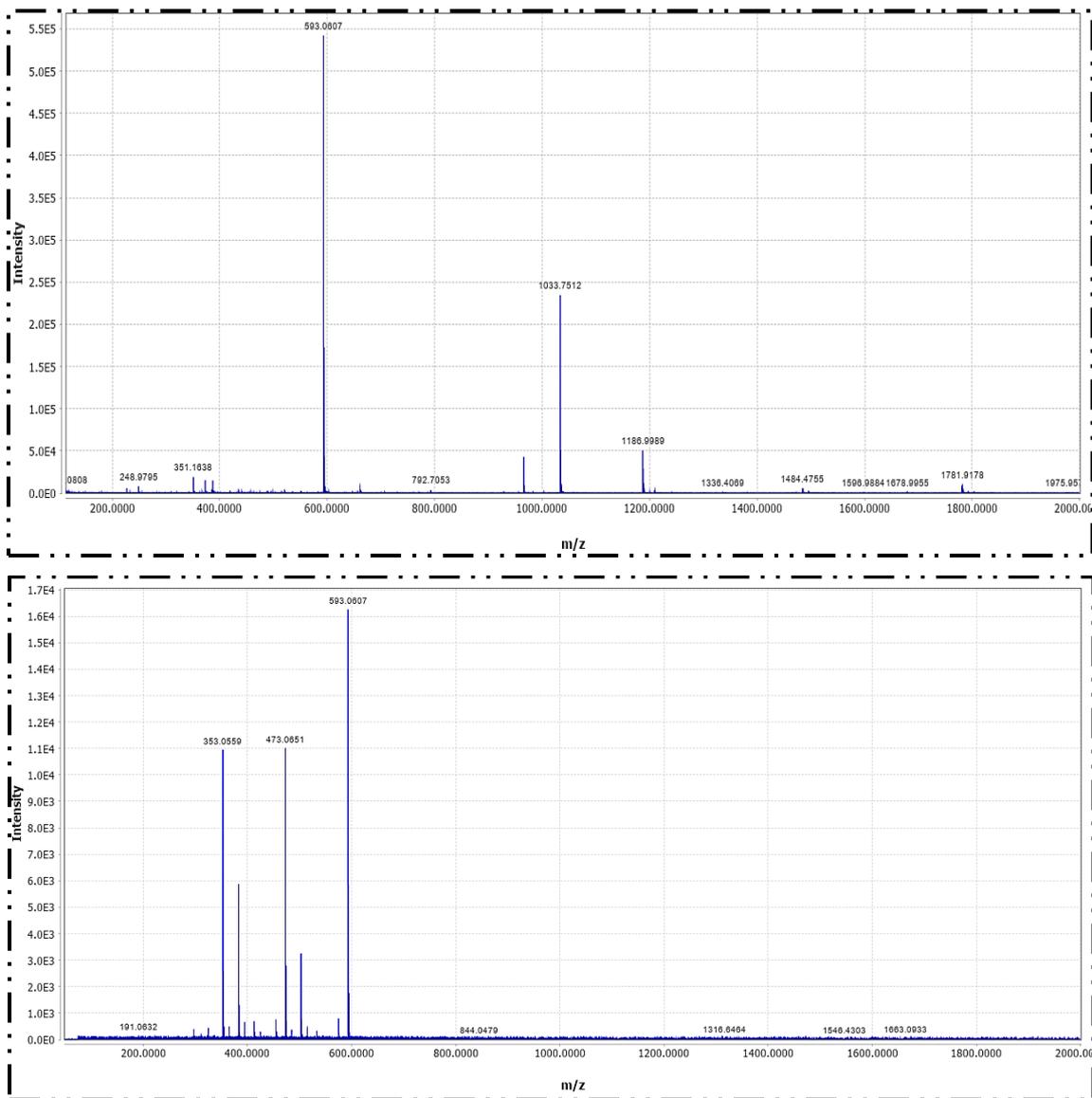
On aperçoit les fragments en MS1 qui correspondent à  $m/z = 595$   $[M+H]^+$  ion quasimoléculaire en mode positif, et à  $m/z = 593$  de l'ion en mode négatif  $[M-H]^-$  ainsi que celui à  $m/z = 1187$  de l'ion en mode négatif  $[2M - H]^-$  et  $[3M - H]^-$  avec  $m/z = 1781$ .

Comme cette molécule flavonoïdique est un Di-C-Hétéroside de l'aglycone de flavone Apigénine (données UV: 270, 332 nm) et parce que l'ionisation utilisée en spectrométrie de masse en l'occurrence l'APCI, technique douce, c'est plutôt la partie osidique aussi bien en 6 qu'en 8 qui sera concernée ou plus facile à la fragmentation.

Ainsi, les différents schémas de fragmentation possibles qui mènent aux différents fragments indiqués sur le spectre de masse sachant qu'on démarre de l'ion quasimoléculaire  $[M-H]^-$  à  $m/z = 593$  (l'ion moléculaire  $M^+$  aurait un  $m/z = 39$ ). C'est les résultats obtenus suite à APCI en mode négatif et tout ce qui provient après, c'est des fragments de types  $[M-H - nMi]^-$  avec la formation de molécules neutres de masse moléculaire de 120 g/mol et/ou de 90 g/mol.

Sur le spectre de masse MS2 en mode négatif, on aperçoit tous les fragment  $m/z = 353; 473; 383; 503$  représentés sur le schéma de fragmentation.





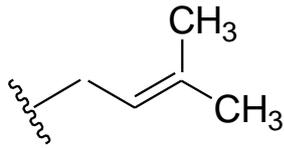
**Figure 22** : Spectre de masse MS1 (+), MS1 (-) et MS2 (-) de la vicénine-2

### ► Flavone Prénylée (Kanzonol E)

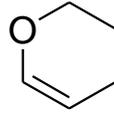
Les flavonoïdes ayant ce genre de structure ne sont pas courants et ils ont été isolés et identifiés que chez certaines espèces et ce comparativement aux autres flavonoïdes. En effet et à titre d'exemple, des aglycones de flavones prénylés ont été détectés chez *Thymus hirtus*, et aussi chez d'autres espèces appartenant à d'autres familles.

En général, le ou les groupes prényl(s), sur un flavonoïde sont en 6 et/ou en 8 du cycle A et parfois ailleurs avec quelques fois un cycle de type dihydro-2H-pyrane.

Les spectres de masse en modes positif et négatif, en MS1 et MS2 du présumé flavonoïde prénylé proposé à travers les résultats du couplage LC/MS-MS explique tant bien que mal ces affirmations.



Groupe Prényl



dihydro - 2H - pyranne

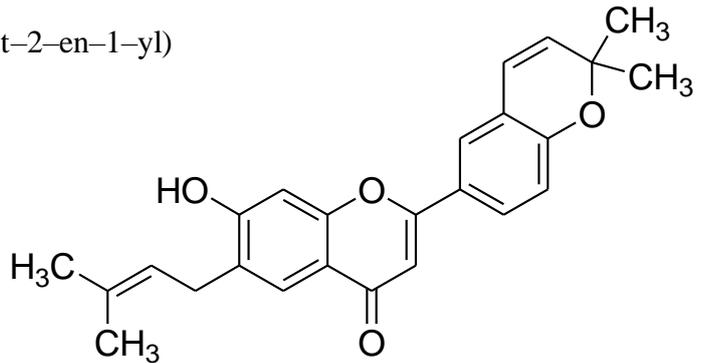
Selon l'IUPAC :

7-hydroxyl-2',2'-diméthyl-6-( 3-méthylbut-2-en-1-yl)

-2'H,4H-[2,6'-bichromen]-4-one

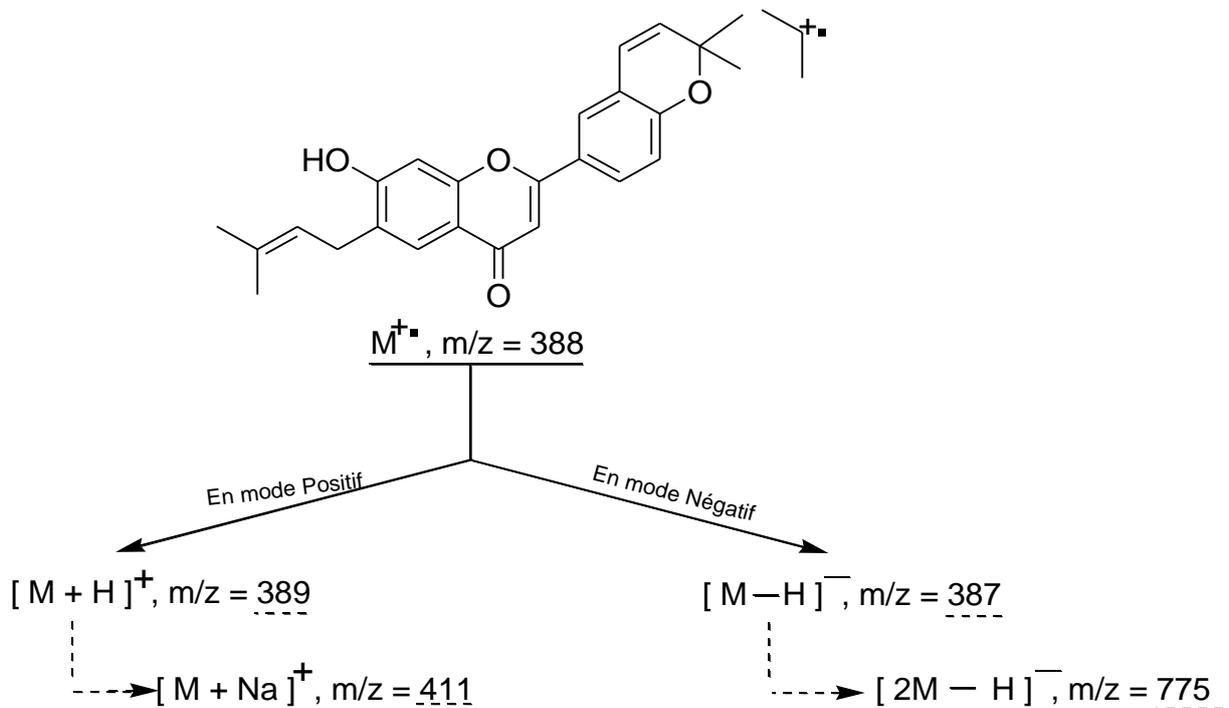
$C_{25}H_{24}O_4$

M = 388 g/mol

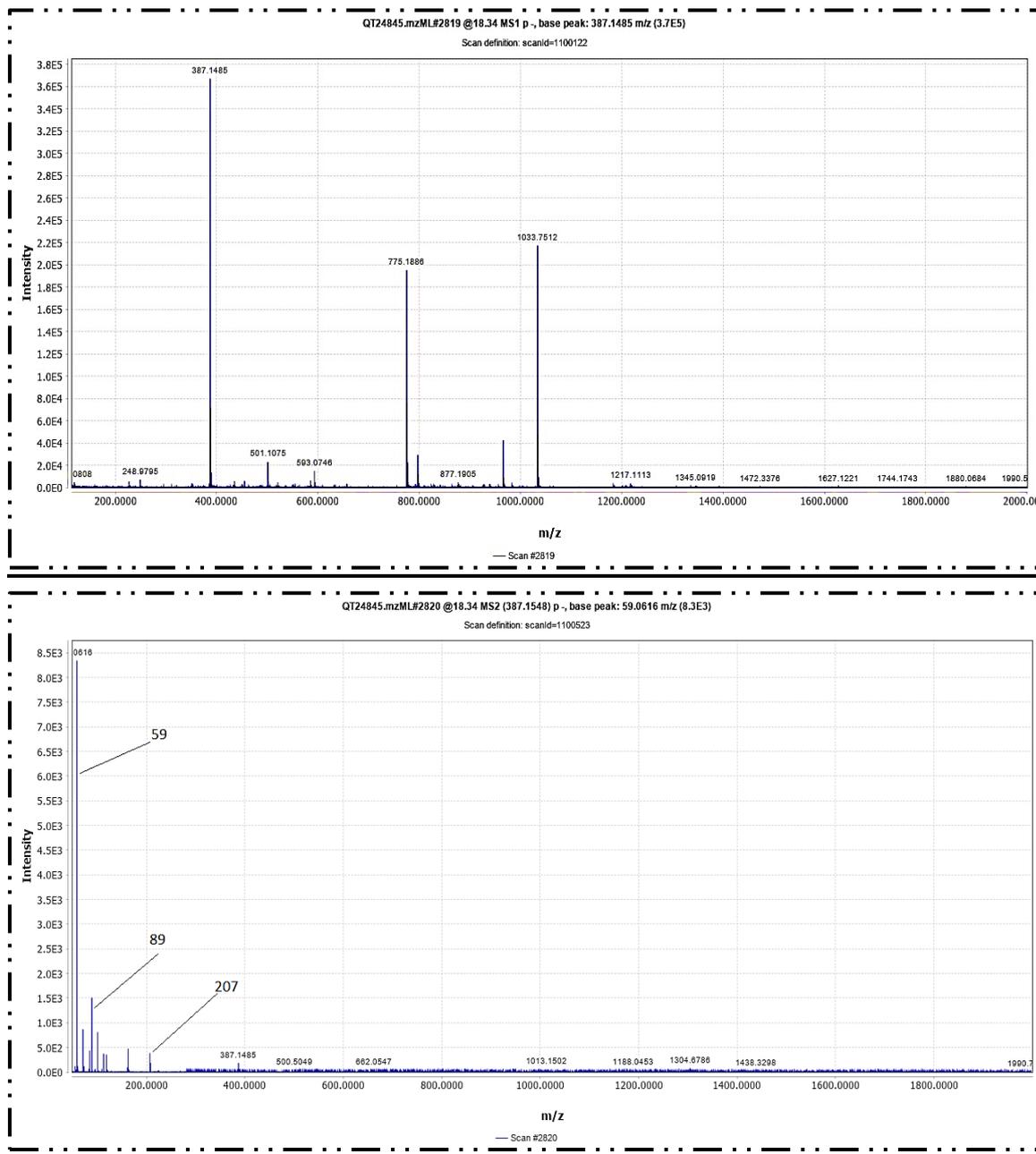


Les données UV de ce produit sont présentées par deux maxima d'absorption à 257 et 335 nm

- Les fragments détectés en mode positif :  $m/z = 411, 389, 277$ .
- Les fragments détectés en mode négatif :  $m/z = 775, 387, 59$ .
- Schémas de fragmentations proposé :



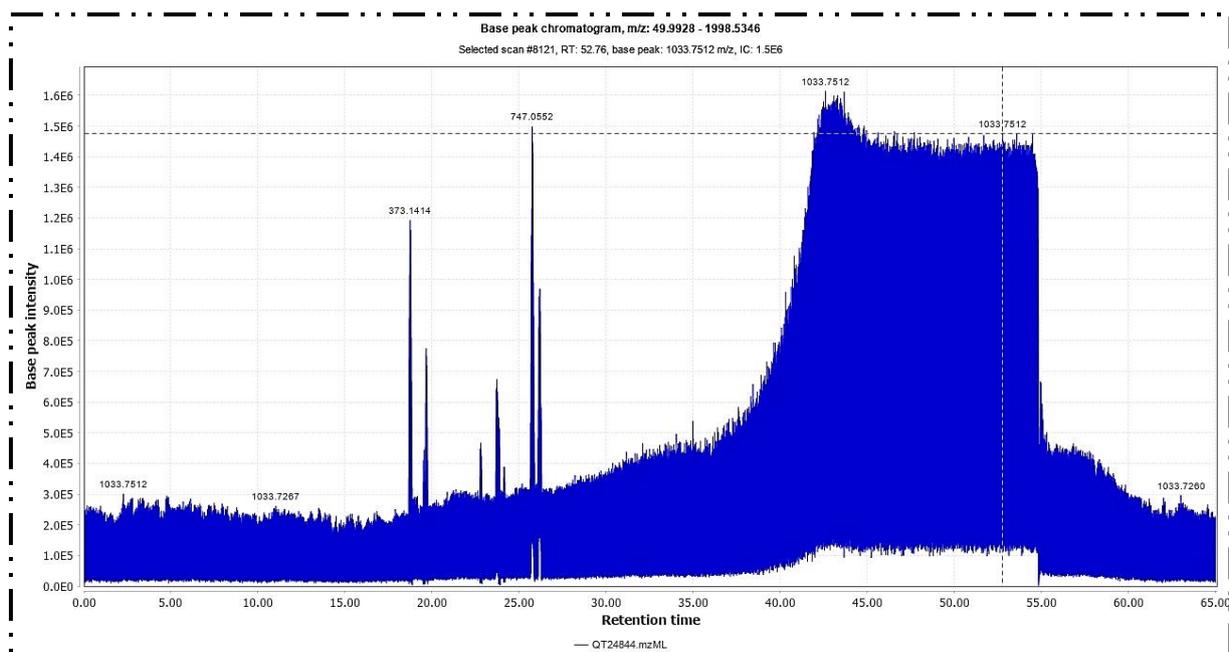




**Figure 24 :** Spectres MS1 (+), MS1 (-) et MS2 (-) de flavone prénylé

### c- Composés identifiés dans l'extrait AcOEt

Le chromatogramme de l'analyse HPLC-APCI-QTOF-MS/MS de l'extrait AcOEt en mode négatif montre un pic fragment  $m/z = 747$  correspondant à  $[2M - H]^-$  qui concorde avec le pic quasi moléculaire du composé dérivé de l'acide méthyl rosmarinique détecté à Tr égale à 25,47min. On constate aussi un pic fragment  $m/z = 373$  correspondant à  $[M+FA - H]^-$  qui concorde avec le pic quasi moléculaire de la Rhododendrine détecté à Tr égale à 19,6 mn.

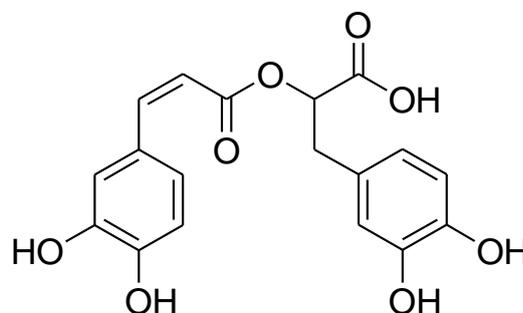


**Figure 25 :** Chromatogramme (TIC) de HPLC-APCI-QTOF-MS/MS de l'extrait AcOEt en mode négatif

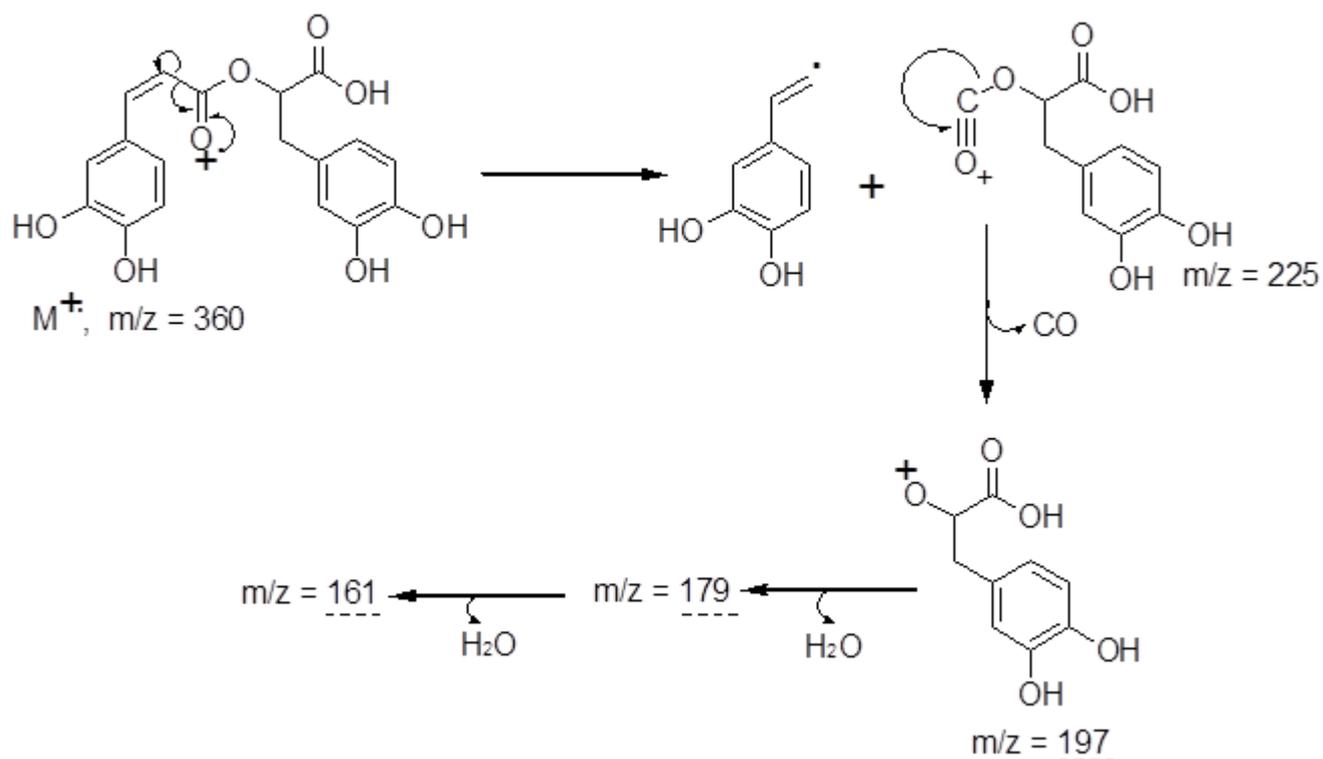
► **Acide rosmarinique**

Selon l'IUPAC :

(2 R)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-[(Z)-3-(3,4-dihydroxyphenyl) prop-2 enoyl] oxypropanoic acid

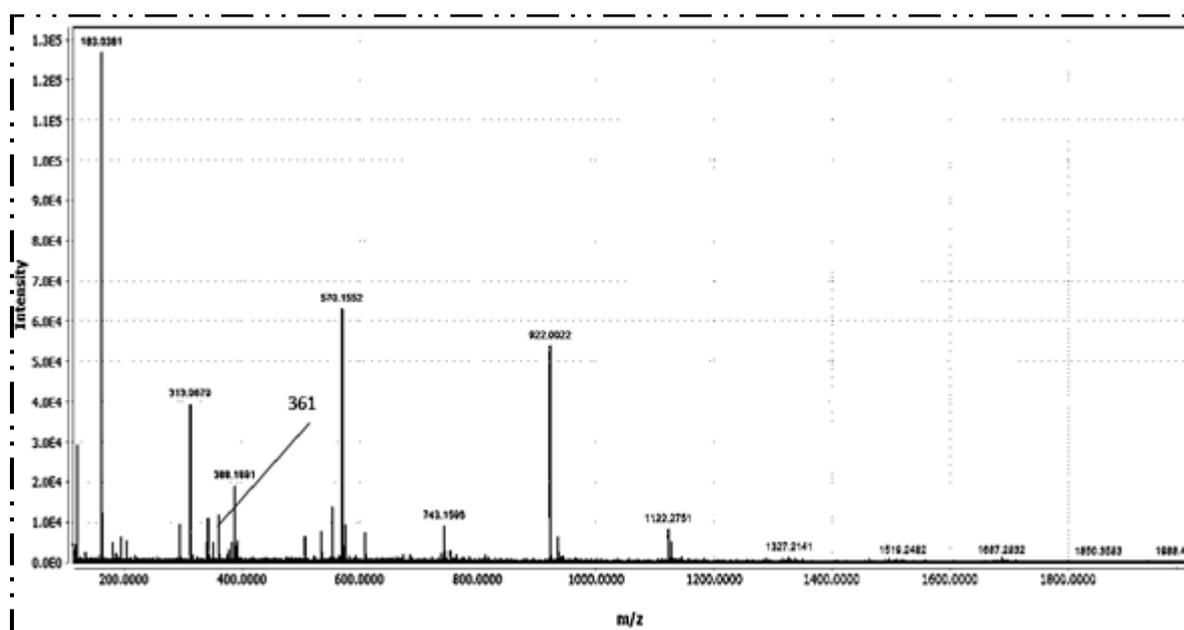


● Schémas de fragmentations



**Figure 26 :** Schéma de fragmentations de l'acide rosmarinique

On aperçoit aussi les fragments à  $m/z = 361$  qui correspond à  $[M+H]^+$ , ion en mode positif et à  $m/z = 359$  de l'ion en mode négatif  $[M-H]^-$  ainsi que celui à  $m/z = 719$  de l'ion en mode négatif  $[2M-H]^-$ .



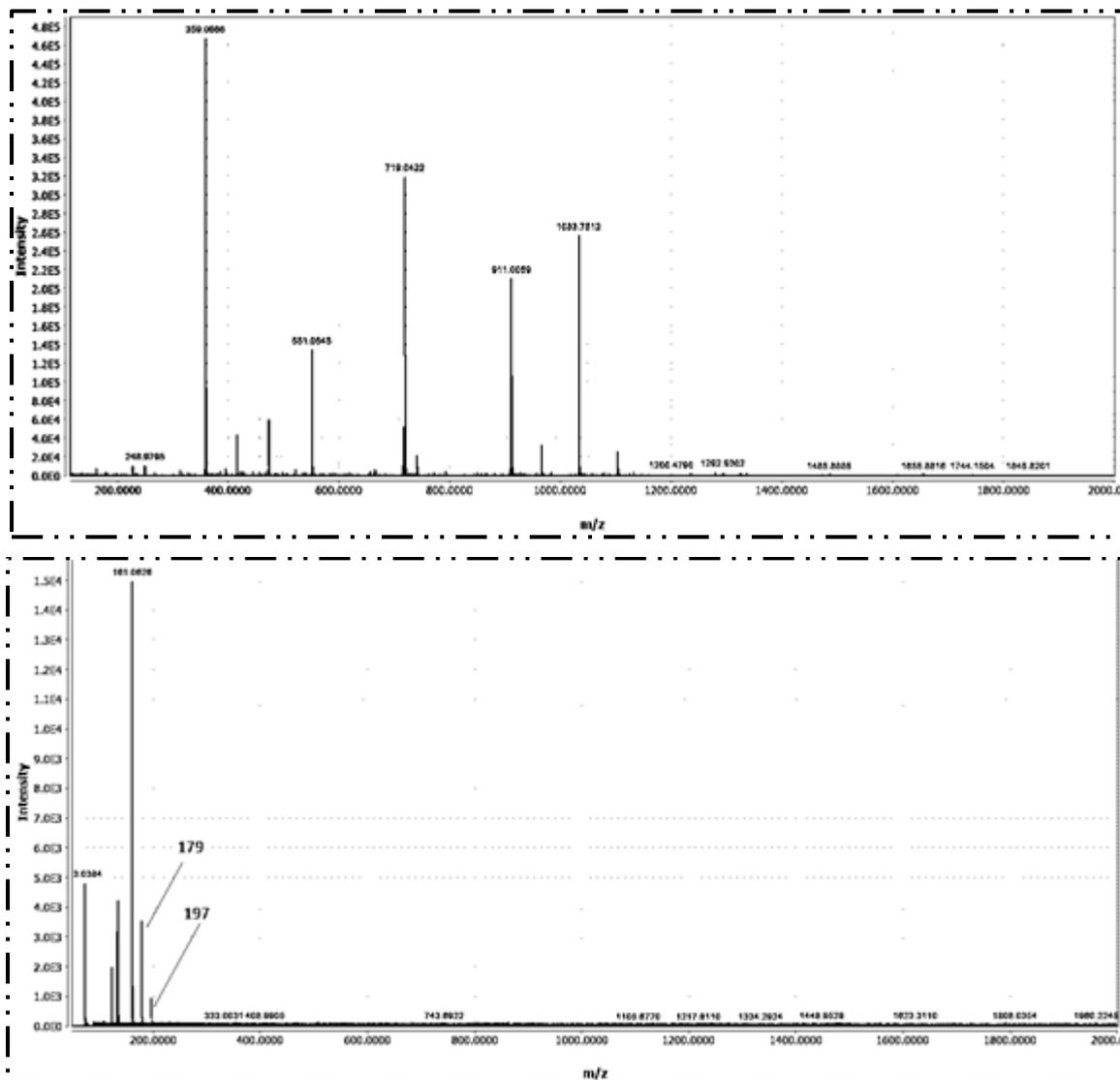
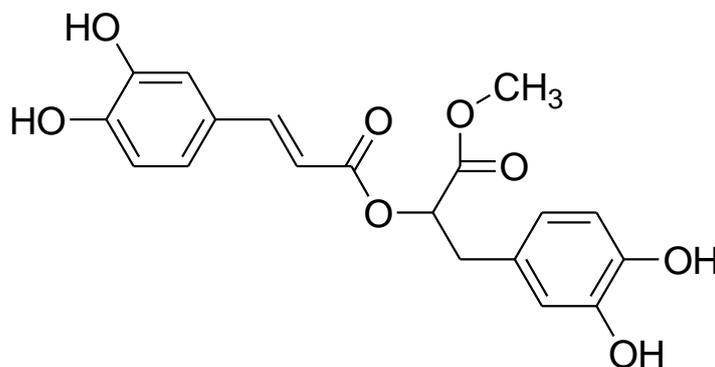


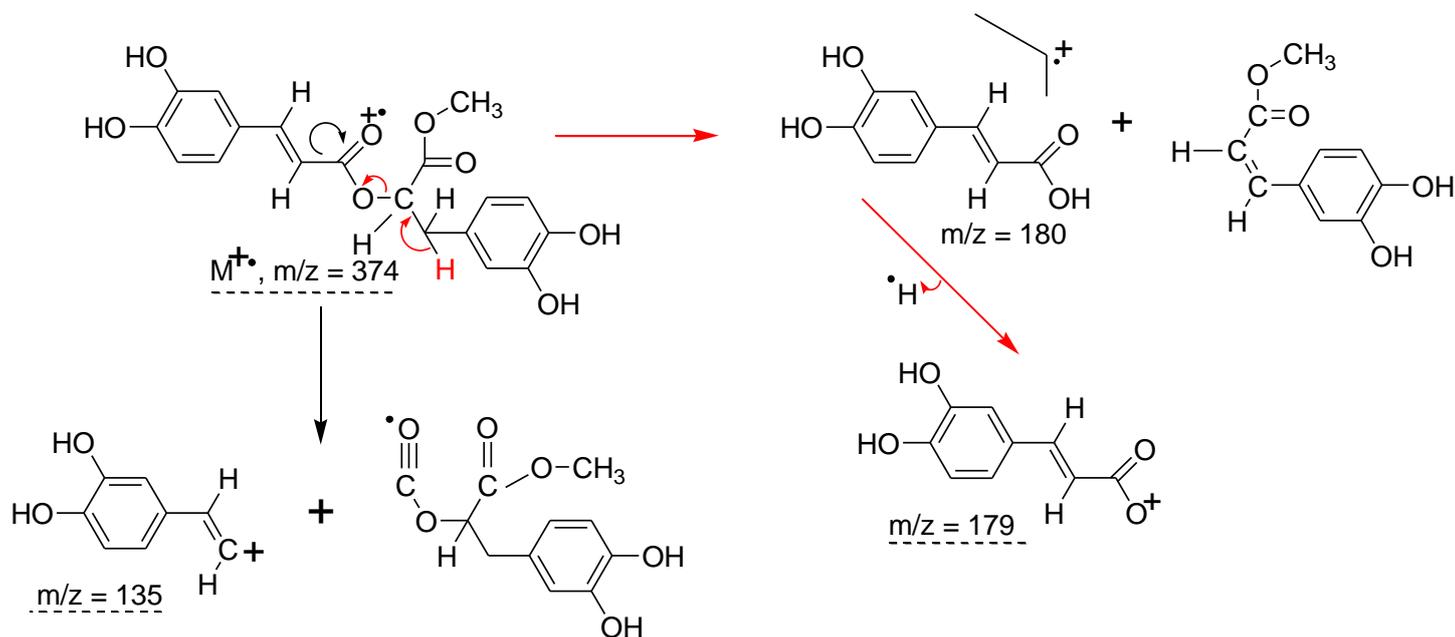
Figure 27 : Spectres MS1(+), MS1 (-) et MS2 (-) de l'acide rosmarinique

### ► Méthyl Ester de l'acide rosmarinique

Selon l'IUPAC : Methyl(2R)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-[3-(3,4-dihydroxyphenyl)prop-2-enolxy] propanoate



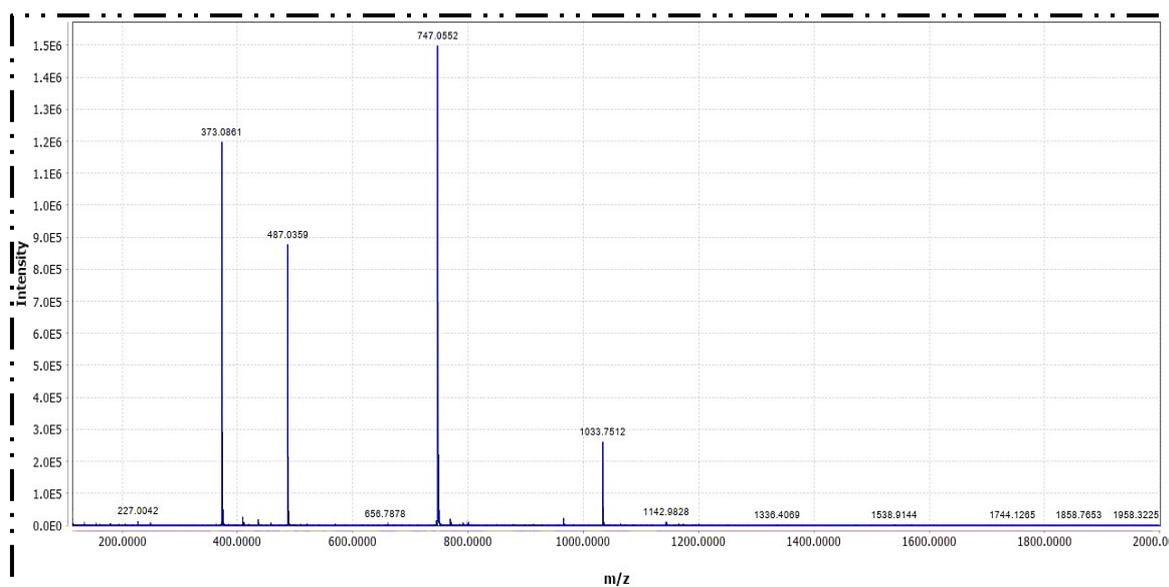
• Schémas de fragmentations

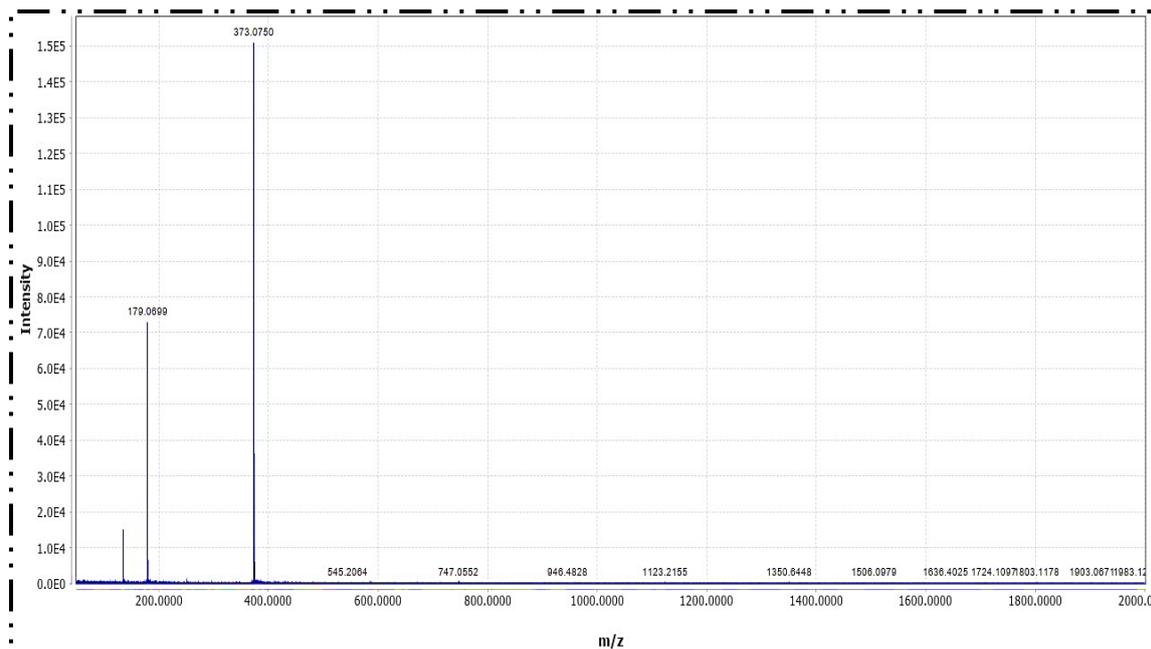


**Figure 28** : Schéma de fragmentation du méthyl ester de l'acide rosmarinique

On aperçoit pour cette molécule les pics qu'on peut attribuer aux fragments :

- En mode négatif à :  $m/z = 373$  de  $[M-H]^-$ ,  $m/z = 747$  de  $[2M-H]^-$
- En mode positif à  $m/z = 375$  de  $[M+H]^+$



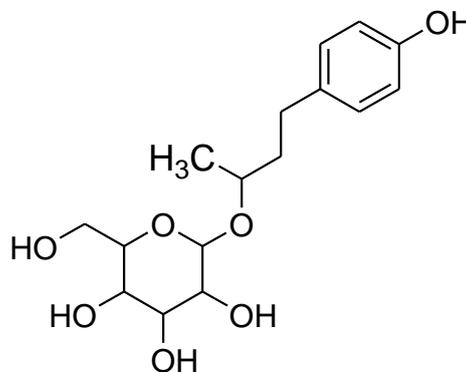
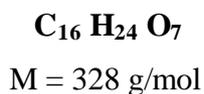


**Figure 29** : Spectres MS1 et MS2 en mode négatif du méthyl ester de l'acide rosmarinique

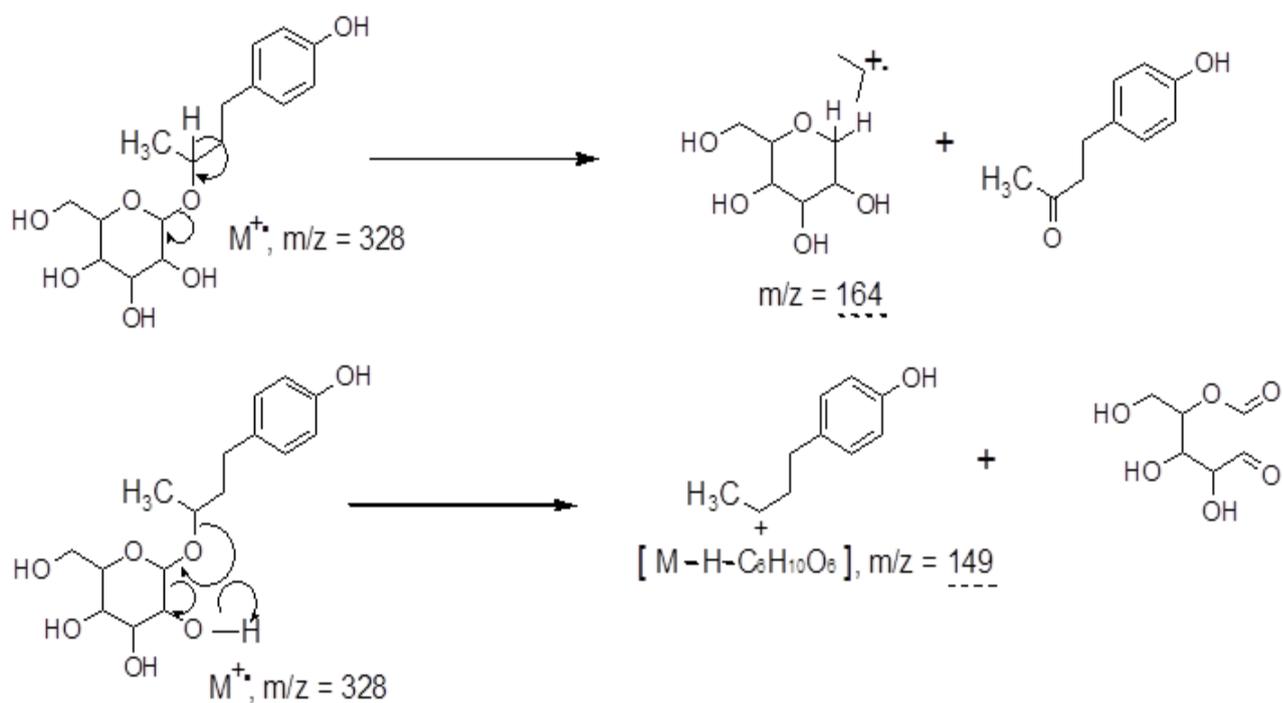
► **Rhododendrine**

Selon l'IUPAC :

(2R, 3S, 4S, 5R, 6R)-2-(hydroxyméthyl)-6-[(2R)-4-(4 hydroxyphényl) butan-2-yl] oxyoxane-3,4,5-triol



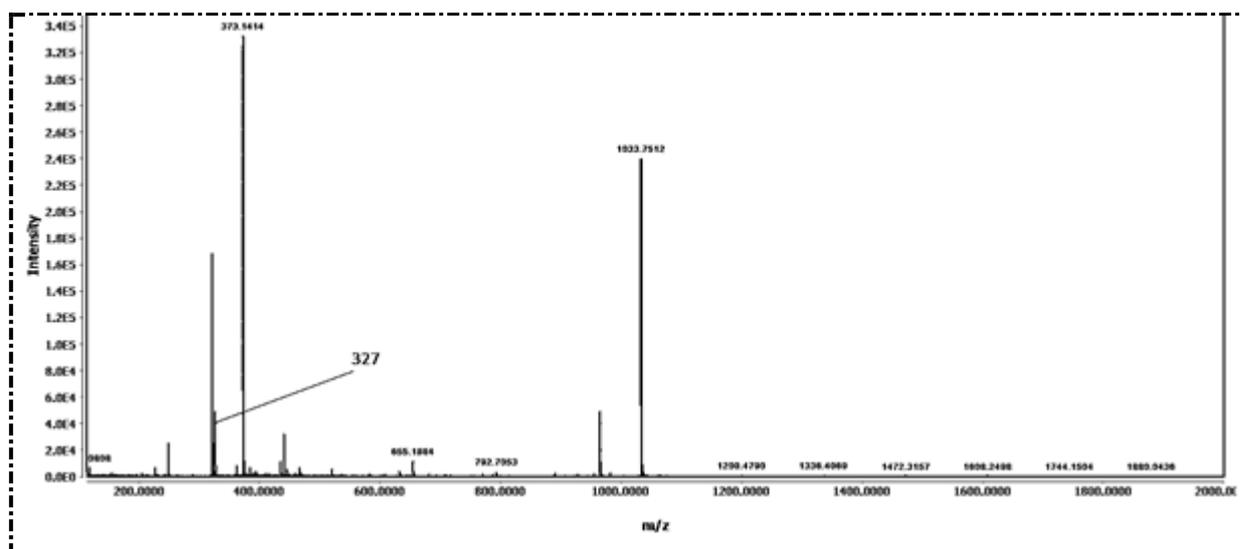
- Schémas de fragmentations

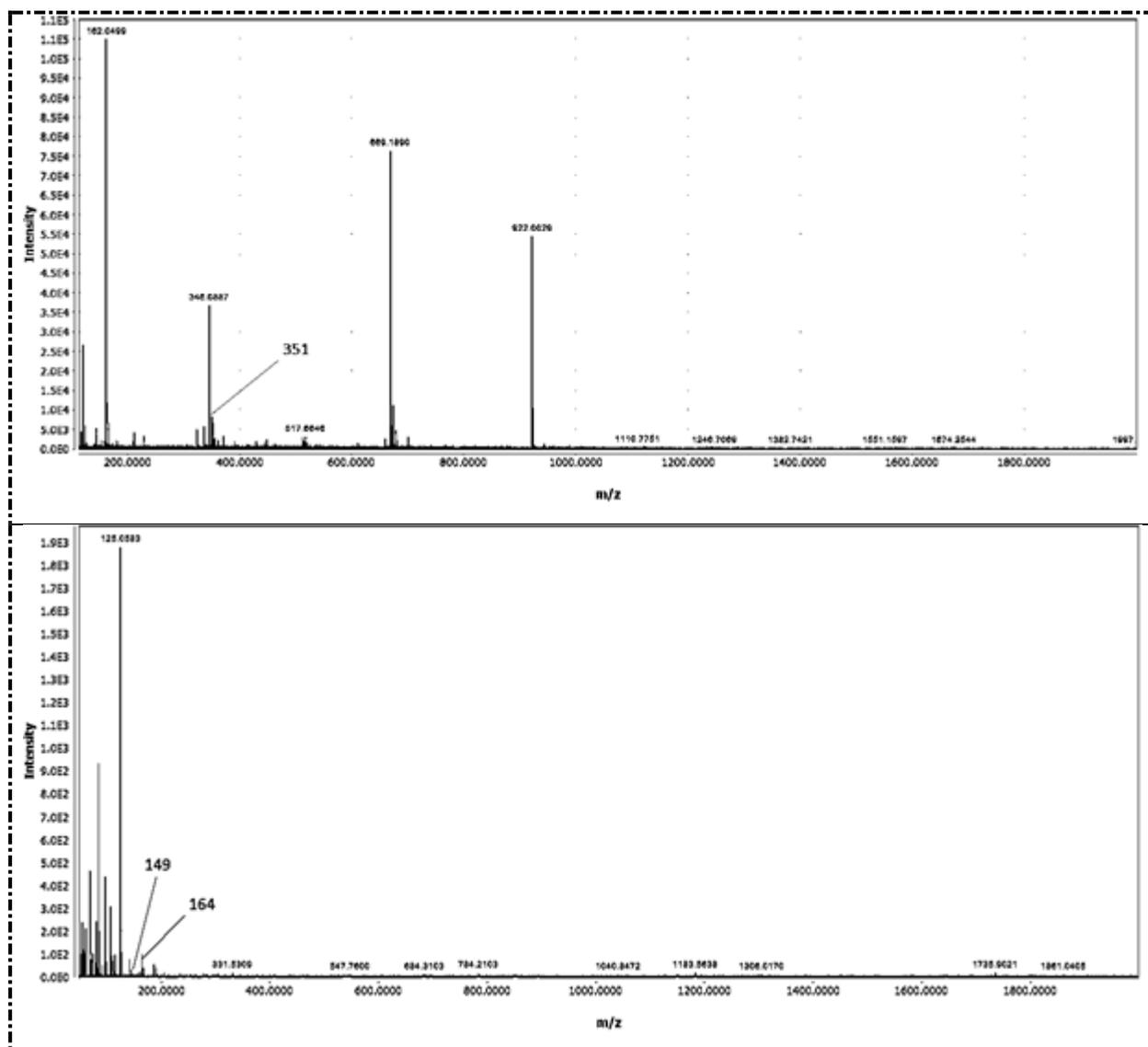


**Figure 67** : Schéma de fragmentation de la Rhododendrine

On aperçoit pour cette molécule les pics qu'on peut attribuer aux fragments :

- En mode négatif à :  $m/z = 327$  de  $[M - H]^-$ ,  $m/z = 655$  de  $[2M - H]^-$
- En mode positif à  $m/z = 351$  de  $[M + Na]^+$ .





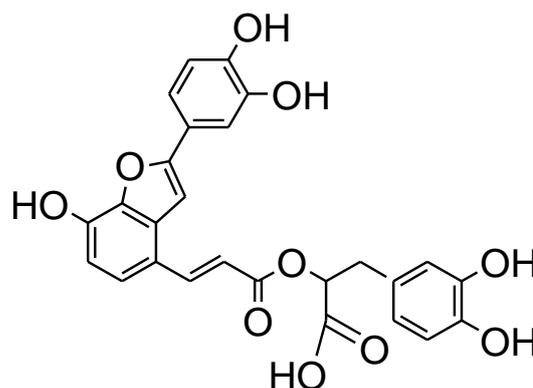
**Figure 30 :** Spectres MS1(-), MS1(+) et MS2 (-) de la Rhododendrine

### ► Acide Salvianolique C

Selon l'IUPAC :

(2R)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-[(E)-3-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)-7-hydroxy-1-benzofuran-4-yl] prop-2-enyle] oxypropanoic acid

$C_{26} H_{20} O_{10}$  (M = 492 g/mol)



• Schéma de fragmentation

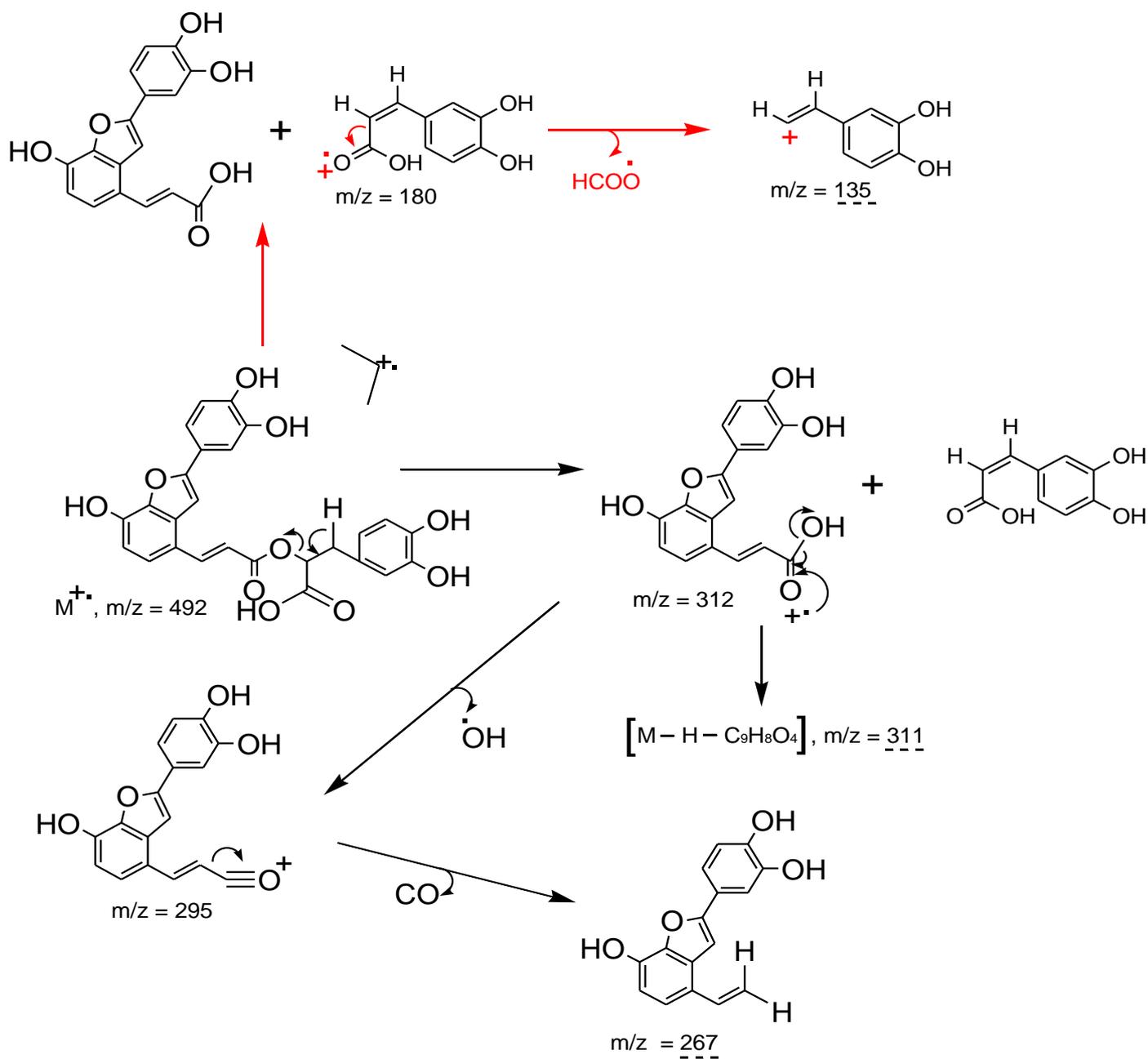


Figure 31 : Schéma de fragmentation de l'acide salvianolique C

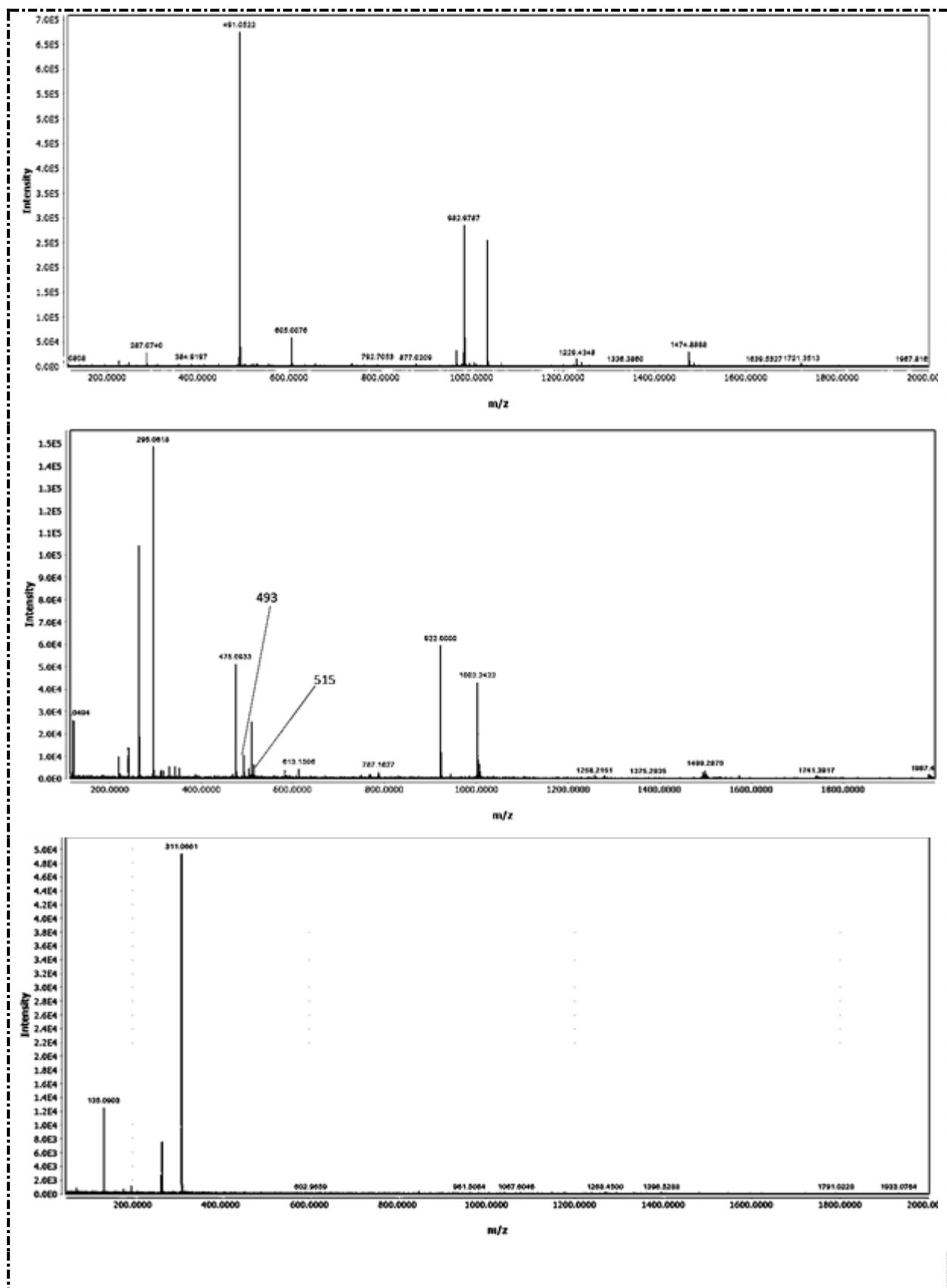
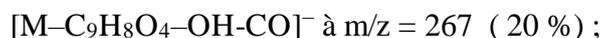
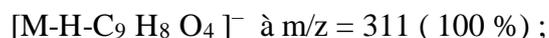
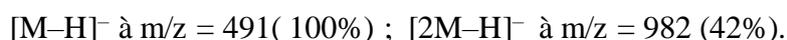


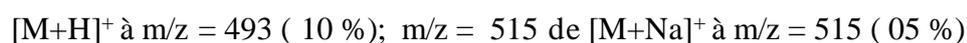
Figure 32 : Spectres MS1(-), MS1(+) et MS2 (-) de l'acide salvianolique C

On aperçoit pour cette molécule les pics issus de SM1 et SM2 qu'on peut attribuer aux fragments suivants :

- En mode négatif :



- En mode positif :



Dans le tableau récapitulatif qui suit, sont regroupés les composés majoritaires identifiés dans les 3 extraits, toutes les données qui concernent les temps de rétention, longueur d'onde d'absorption UV lors de la détection des divers produits, les ions quasi-moléculaire ainsi que les fragments enregistrés pour chacun des produits en mode positif et négatif.

**Tableau 17** : Produits détectés et identifiés dans les trois extraits par analyse LC-DAD-MS/MS

Code	RT [ min ]	$\lambda_{\max}$ UV [ nm ]	Negative Mode		Positive Mode		Formula	Error		Fragments [m/z]	Putative Identification	Distribution		
			m/z	Adduct	m/z	Adduct		ppm	mDa			DCM	AcOEt	BuOH
1	2,95	n.d.	341,1020	[M-H] <sup>-</sup>			C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	-18,72	-6,39		Hexose – Hexose			+
			387,0921	[M+FA-H] <sup>-</sup>										
			683,1082	[2M-H] <sup>-</sup>										
2	18,19	270, 332	593,0607*	[M-H] <sup>-</sup>	595,161	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	-8,9	-5,3	353,0559; 473,0651; 383,0560; 503,0716	Vicenin-2			+
			1186,9989	[2M-H] <sup>-</sup>										
			1781,9178	[3M-H] <sup>-</sup>										
3	18,34	257, 335	387,1485	[M-H] <sup>-</sup>	389,1819	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>4</sub>	-7,85	-3,23	59,0616; 89,0705; 207,1310	Flavonoid Prenylated			+
			775,1886	[2M-H] <sup>-</sup>	411,154*	[M+Na] <sup>+</sup>								
4	18,74	283	327,1430	[M-H] <sup>-</sup>	351,1357	[M+Na] <sup>+</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>24</sub> O <sub>7</sub>	-4,21	-1,38	164,1236; 149,1000	Rhododendrin Derivative			+
			373,1414	[M+FA-H] <sup>-</sup>										
			655,1884	[2M-H] <sup>-</sup>										
5	19,53	n.d.	322,0954*	[M-H] <sup>-</sup>	324,1065	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>7</sub>	8,45	2,72	59,0616; 71,0592; 116,0926	n.i.			+
			645,0941	[2M-H] <sup>-</sup>	346,0886	[M+Na] <sup>+</sup>								
6	20,99	n.d.			403,1918*	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>26</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	2,15	0,87		n.i.			+
					425,1725	[M+Na] <sup>+</sup>								
7	22,81	286	359,0666	[M-H] <sup>-</sup>	361,0894*	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	-8,15	-2,94	161,0626; 179,0699; 197,0810	Rosmarinic Acid			+
			719,0422	[2M-H] <sup>-</sup>										
8	23,05	n.d.			393,226	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>6</sub>	-4,36	-1,71		n.i.		+	
					415,2054	[M+Na] <sup>+</sup>								

9	23,73	260, 322	491,0522 982,9787	[M-H] <sup>-</sup> [2M-H] <sup>-</sup>	493,1127*	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>26</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	-1,57	-0,77	311,0661; 135,0903; 267,0790	Salvianolic Acid derivative		+	
10	23,83	286	287,0643	[M-H] <sup>-</sup>	289,0717*	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	1,68	0,49	125,0685; 177,0897; 151,0441	DihydroKaempferol	+	+	+
11	24,16	n.d.	563,1298 1127,1276	[M-H] <sup>-</sup> [2M-H] <sup>-</sup>	565,2276* 587,2094	[M+H] <sup>+</sup> [M+Na] <sup>+</sup>	C <sub>28</sub> H <sub>36</sub> O <sub>12</sub>	-1,6	-0,9	161,0626; 489,1244; 179,0699	n.i		+	
12	25,74	n.d.	373,0699 747,0552	[M-H] <sup>-</sup> [2M-H] <sup>-</sup>	375,1093	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	3,49	1,31	179,0699; 135,0903	Methyl Rosmarinic Acid Derivative		+	
13	26,20	n.d.	505,0653	[M-H] <sup>-</sup>	507,1239	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>27</sub> H <sub>22</sub> O <sub>13</sub>	-10,3	-5,22	311,0661; 267,0884	n.i.		+	
14	28,40	283, 339			345,0981 711,1615	[M+H] <sup>+</sup> [2M+Na] <sup>+</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	1,95	0,67	329,0639; 345,0982; 301,0640	5,6 – diOH – 7,3',4' – triOMe Flavone	+		
15	30,36	283, 331			315,0863 651,1473	[M+H] <sup>+</sup> [2M+Na] <sup>+</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	-1,79	-0,56	300,0606; 315,0857	5,4' – diOH – 6,7 – diOMe Flavone	+		

## II. Discussion des résultats de l'analyse phytochimique de l'espèce *O. floribundum*

Les travaux faisant l'objet d'investigation phytochimique de la partie aérienne de l'espèce *O. floribundum* ont porté d'une part sur l'isolement des flavonoïdes et leurs élucidations structurales via la méthode classique, et d'autre part, via la méthode moderne, très usitée de nos jours sur l'analyse de la composition chimique des trois extraits CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt, *n*-BuOH par la technique de couplage HPLC-DAD-APCI-MS/MS. Cette dernière permet la caractérisation analytique sans purification ou isolement de produit et donne de nombreuses informations sur les structures des flavonoïdes dans les extraits végétaux bruts ou semi-purifiés à condition que le dispositif utilisé soit muni d'une banque de données permettant de conclure (tr, UV et SM). Cette analyse nous a permis de confirmer les résultats déjà obtenus par analyse préliminaires sur CCM surtout de Polyamide DC6 (D1 et D2) quant à la composition chimique des extraits étudiés.

Cinq flavonoïdes ont été isolés à partir de cette espèce, il s'agit principalement des flavone méthoxylés : Genkwanine, Ladanéine, Hispiduline, 5,6-di-OH-7,3',4'-tri-OMe flavone et la lutéoline. Ces résultats concordent bien avec les données de la littérature et confirment l'association des lamiacées – Aglycones de flavones méthoxylés.

Les résultats de l'analyse couplée par HPLC-DAD-APCI-MS/MS des trois extraits CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt, *n*-BuOH révèlent la présence de 15 produits dont cinq flavonoïdes appartenant à des familles différentes : un di-C-hétéroside de flavone (vicenine-2), un aglycone de flavone prénylé (Kanzonol E), deux aglycones de flavones méthoxylés classiques : la Cirsimaritine et la 5,6-di-OH-7,3',4'-tri-Ome flavone et enfin un aglycone de flavanonol, le dihydrokaempferol (Aromadendrine) pas très détecté au sein des espèces de cette famille.

En outre, quatre acides phénoliques ont été identifiés dans l'extrait AcOEt, il s'agit de la rhododendrine, acide rosmarinique, Méthyl Ester de l'acide rosmarinique et l'acide salvianolique C.

Notons tout de même que les composés rhododendrine et la flavone prénylée Kanzonol E n'ont jamais été identifiés auparavant dans tout le genre *Origanum*; ce qui peut être considéré comme une première citation pour ce genre.

Le Kanzonol E, a été isolé pour la première fois à partir des racines de *Glycyrrhiza eurycarpa* appartenant à la famille des Fabaceae. Sa structure a été élucidée par des méthodes spectroscopiques (UV, RMN) <sup>(181)</sup>. Les flavonoïdes prénylés (PF) sont une classe de dérivés de chromone structurellement distincts correspondant à un large éventail d'activités

biologiques telles que la cytotoxicité, l'inhibition de la tyrosinase et anti-inflammatoires <sup>(182)</sup>. Ils sont connus pour leur abondance chez les familles des Moracées et légumineuses.

La Rhododendrine a été identifiée dans l'extrait hydroalcoolique des espèces *Betula platyphylla*, *Betula pendula* <sup>(183, 184)</sup>. Trois dérivés de Rhododendrine (epirhododendrin, apiosylrhododendrin et apiosylepirhododendrin) ont été isolés de l'espèce *Betula pubescens* <sup>(185)</sup>. Elle a également été isolée de l'espèce *Rhododendron decorum* <sup>(186)</sup>, *Rhododendron brachycarpum* <sup>(187)</sup> et isolée de l'espèce *Abies nephrolepis* de la famille des Pinaceae <sup>(188)</sup>.

Le genre *Origanum* se distingue par une diversité morphologique et biochimique accentuée et il est largement connu pour ses huiles volatiles. L'étude chimiosystématique des mono- et sesquiterpénoïdes trouvés dans le genre et dans l'espèce *O. floribundum* a fait l'objet de plusieurs travaux <sup>(164)</sup>, tandis que les études concernant les flavonoïdes sont rares et aucune étude jusqu'à présent n'a fait l'objet d'isolement de flavonoïdes. En effet, l'espèce *Origanum floribundum* a reçu peu d'attention pour l'étude des extraits non volatils.

Jusqu'au jour d'aujourd'hui, seulement trois études relatives à la composition chimique des extraits alcooliques de cette espèce ont été effectuées. Les travaux de Hadjadj et al. <sup>(161)</sup> qui ont porté sur l'étude de deux échantillons de l'espèce *O. floribundum* collectée sur deux sites différents (Chrèa et Hammam Melouane), ils ont fait l'objet d'analyse RP- HPLC de leurs extraits méthanoliques. Les résultats ont révélé l'identification de dix composés dont six acides phénoliques (gallique, caféique, férulique, salicylique, acide rosmarinique et cinnamique) et quatre flavonoïdes (Catéchine, vitexine, myricétine et kaempférol) par comparaison des temps de rétention de leurs pics avec ceux des standards de référence. Les principaux composés étaient l'acide rosmarinique, l'acide sallysilique et vitexine. Kerbouche et al. <sup>(155)</sup> ont publié une étude qui se limite à la détermination de la teneur en polyphénols et en flavonoïdes totaux de l'extrait éthanolique.

Une étude portant sur les variations qualitatives et quantitatives des flavonoïdes contenus dans les exsudats de feuilles de neuf espèces d'origan a été établie par Skoula et al. <sup>(164)</sup>. Ces travaux révèlent que ces variations des flavonoïdes dans les différents taxons sont relatives aux voies biosynthétiques possibles par lesquelles ces composés sont générés. L'analyse LC.DAD.MS pour l'identification des flavonoïdes dans l'extrait méthanolique de l'espèce *O. floribundum* (Blida), a révélé la présence des six flavones suivantes : Apigénine, ladanéine, 5,6,4' -Trihydroxy-7,3' -diméthoxyflavone, 5,3',4' -Trihydroxy-7-méthoxyflavone, pebrellin, 5,6-Dihydroxy-7,3',4' -triméthoxyflavone. Ainsi que quatre flavanone : naringénine,

eriodictyol, aromadendrine, taxifolin <sup>(164)</sup>. En effet, les résultats de cette étude concordent bien avec les résultats que nous avons obtenu d'où la présence de flavonoïdes communs entre les deux espèces. Aussi, on a constaté la richesse de l'espèce *O. floribundum* en flavone aglyconique méthoxylés, ce qui confirme les données de la littérature affirmons l'abondance des flavones méthoxylés dans la famille des lamiacées notamment le genre *Origanum*. Néanmoins, il a été signalé le manque de la substitution du 6-méthoxy dans le taxon du groupe C dont fait partie l'espèce *O. floribundum*. Ces résultats ne sont pas en accord avec les résultats obtenus dans notre étude et qui révèlent l'identification de la cirsimaritin (OMe en position 6 du cycle A) détectée dans l'extraits dichlorométhane.

En plus de la présence de l'aromadendrine dans l'espèce *O. floribundum*, Skoula et al.<sup>(164)</sup> ont montré que ce composé a été identifié dans huit autres espèces d'origan (*O. calcaratum*, *O. dictamnus*, *O. microphyllum*, , *O. vulgare* subsp. *hirtum*, *O. majorana*, , *O. onites* , *O. Syriacum* et *O. vulgare* subsp. *glandulosum*). Aussi, cette étude a signalé l'absence totale de ladanéine et la 5,6 – di – OH – 7,3',4' – tri – OMe flavone dans les autres espèces sauf chez *O. vulgare* subsp. *hirtum* et *O. vulgare* subsp. *Glandulosum* respectivement, et ce malgré leur présence remarquable dans l'espèce *O. floribundum*.

La luteoline a été isolée et identifiée dans les espèces *Origanum dictamnus*<sup>(105)</sup> de Grèce et *Origanum majoram* L. de Tunisie<sup>(105)</sup>. Cependant, elle n'a pas été identifié dans *O. floribundum* (Blida)<sup>(164)</sup>. La lutéoline a également été isolée à partir de pas mal de plantes d'Asie traditionnellement utilisées en tant que médicaments anticancéreux.

Il a été constaté d'après les travaux de Skoula et al. <sup>(164)</sup> que les deux flavones méthoxylés genkwanine et cisimaritine n'ont pas été identifiées dans l'espèce *O. floribundum* (Blida) et dans *O. vulgare* subsp. *glandulosum*. Néanmoins, il a été constaté la présence de ces deux flavones dans les autres espèces d'origan (*O. calcaratum*, *O. majorana*, *O. dictamnus*, *O. microphyllum*, *O. onites*, *O. syriacum*, et *O. vulgare* subsp. *hirtum*). La genkwanine est connue pour ces propriétés Hypoglicémiantes par inhibition de la xanthine oxydase, d'où l'utilisation traditionnelle de l'origan contre le diabète. En outre, des potentialités dans le cancer colorectal et le cancer du sein ainsi que des propriétés antivirales ont été révélée <sup>(189)</sup>.

Le Dihydrokampferol a été identifié dans les trois extraits de l'espèce étudiée *O. floribundum*; ceci peut être expliqué par le fait que les extractions n'ont pas été effectuées comme il se doit ou à la limite, cette molécule est bien encrée quantitativement au sein de cette espèce. Le Dihydrokampferol a déjà été isolé de l'espèce *Origanum vulgare* <sup>(190)</sup>. Aussi,

il a été identifié dans l'extrait éthanolique de l'espèce *O. floribundum* de (Blida) et l'espèce *O. compactum* <sup>(164)</sup>.

L'hispiduline a été isolé et identifié dans *O. majorana* ainsi que dans les plantes de Lamiacées (*Salvia cavaleriei*, *Salvia bowleyana*, *Salvia prionitis*, *Salvia miltiorrhiza*) <sup>(191)</sup>.

D'après les données de la littérature, la vicénine-2 a été isolée de la partie aérienne de l'extrait butanolique d'*Origanum sanctum* L. <sup>(192)</sup>. Elle a été ainsi isolée de *Marrubium vulgare* et des fleurs de *Lavandula spica* <sup>(193)</sup>, *Teucrium polium* <sup>(194)</sup>, *Salvia officinalis* <sup>(195)</sup>, *Mentha longifolia* et *Origanum vulgare* <sup>(196)</sup>. Il faut noter que la vicénine-2 est détectée pour la première fois dans notre espèce *O. floribundum*.

L'acide salvianolique a été identifié auparavant dans *O. majoram* L. et dans *Origanum vulgare* <sup>(197)</sup>. Récemment, de plus en plus d'études ont démontré que les acides salvianoliques ont également un effet bénéfique sur l'atténuation de la fibrose et le traitement du cancer.

Il faut noter que l'acide rosmarinique est présent dans toutes les espèces du genre *Origanum*, et que l'on trouve dans de nombreuses plantes de Lamiacée. L'acide rosmarinique est un composé bioactif possédant des propriétés pharmacologiques remarquables, notamment anti-inflammatoires, anti-oxydantes, anti-virales et anti-carcinogènes. Le méthyle ester de l'acide rosmarinique a été identifié dans la famille des Lamiaceae (*Salvia miltiorrhiza*, *Melissa officinalis*) et il est connu pour ces capacités antioxydante.

Des flavones libres, des flavonols, des flavanones et des dihydroflavonols ont été identifiés chez de nombreux membres du genre *Origanum*. Comme c'est le cas chez les Lamiacées <sup>(86)</sup>, il y a beaucoup plus de flavones que de flavonols. La combinaison de flavone et flavanone courante a été démontré par rapport à la voie de biosynthèse. Wollenweber et al. <sup>(203)</sup> ont déclaré que la production des génines est corrélée à la production d'autres produits naturels lipophiles, principalement des terpénoïdes, et que cela se produit dans les plantes des régions semi-arides. Comme chez toutes les Lamiacées, les huiles volatiles s'accumulent dans les glandes situées à la surface des feuilles, mais des flavonoïdes libres ont souvent été trouvés autour des trichomes glandulaires ou mélangés aux cires épicuticulaires.

### III. Résultats de l'analyse GC/MS de l'HE de *D. virgatus*

L'analyse de la composition de l'huile essentielle a nécessité l'utilisation d'une technique couplée en l'occurrence la GC/MS qui reste de loin la méthode de choix.

L'huile essentielle obtenue à partir de la partie aérienne de l'espèce *D. virgatus* avec un rendement de 0,39% par hydrodistillation est de couleur jaunâtre, avec une odeur aromatique forte et est très soluble dans le MeOH et DMSO.

L'analyse de la composition chimique de cette HE a permis l'identification de vingt et un composés représentant 98.0 % du total de l'HE de *D. virgatus* (Tableau 19). Le chromatogramme en phase gazeuse est présenté dans la figure 71.

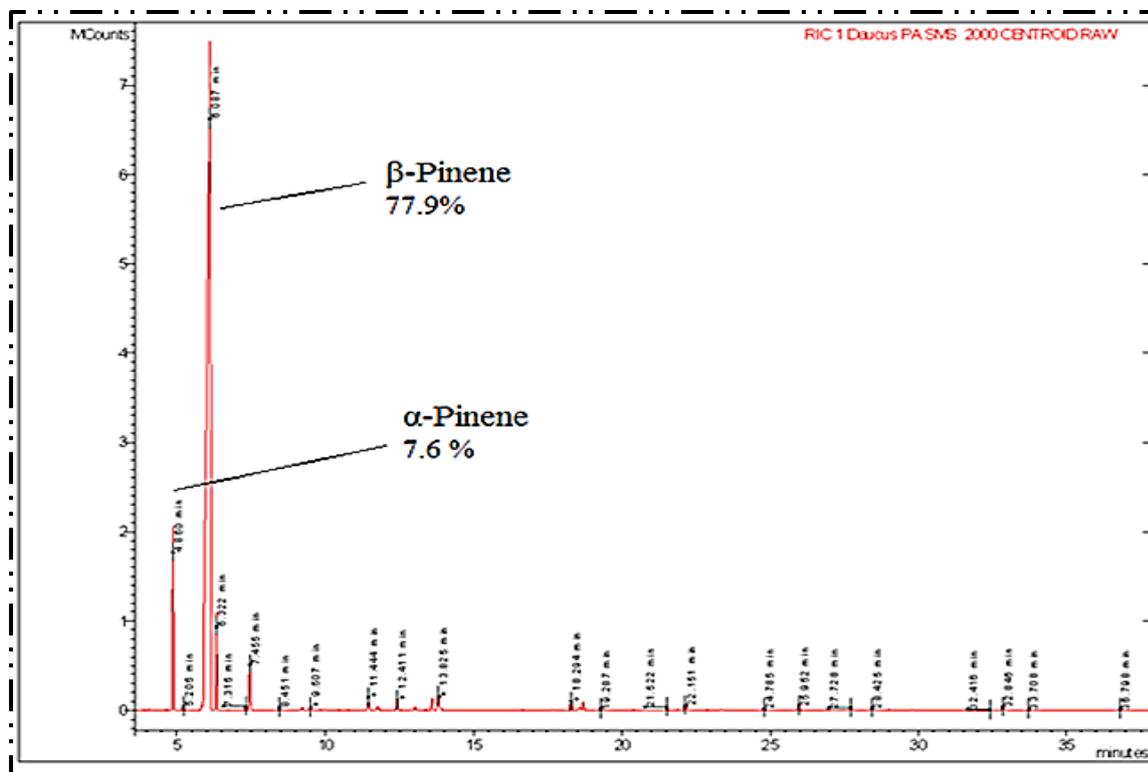


Figure 33 : Chromatogramme GC-MS de l'huile essentielle de *D. virgatus*

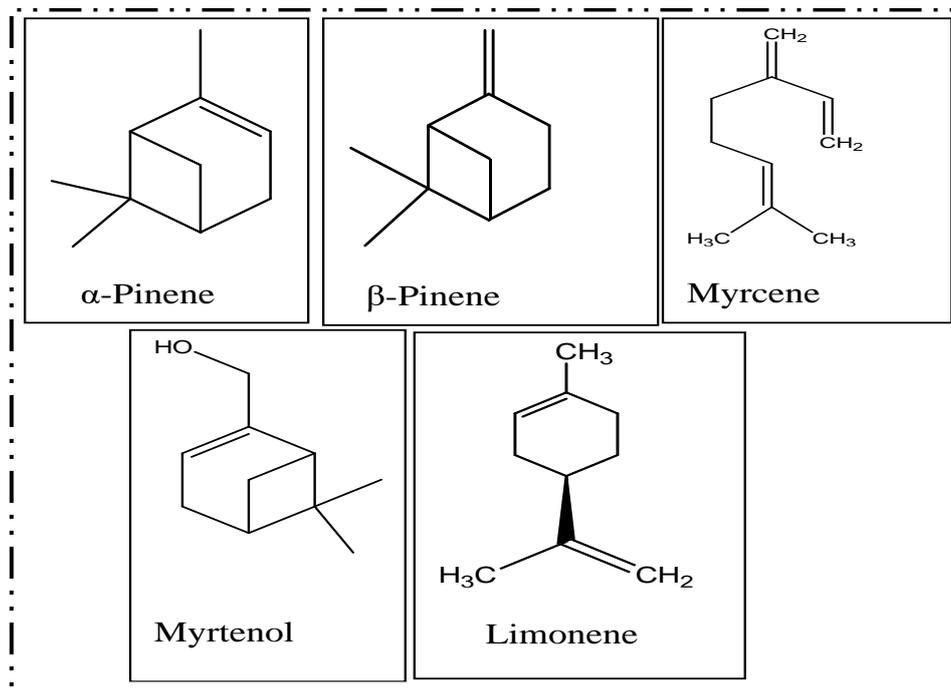
Une lecture exhaustive de la composante de cette HE montre que la famille chimique la plus abondante est représentée par les hydrocarbures monoterpéniques (92,5%), suivis par les monoterpènes oxygénés (4,1%) et les hydrocarbures sesquiterpéniques (1,2%) où les principaux composants étaient :  $\beta$ -pinène (77,9%),  $\alpha$ -pinène (7,6%), myrcène (3,9%), limonène (2,3 %), et myrténol (1,1%) (Tableau 18).

**Tableau 18** : Composition chimique de l'HE de *D. virgatus* analysée par GC-MS

<b>Composés identifiés <sup>a</sup></b>	<b>L.R.I <sup>b</sup></b>	<b>Pourcentage (%)<sup>c</sup></b>
$\alpha$ -Pinene	941	7,6
Camphene	955	0,2
$\beta$ -Pinene	981	77,9
Myrcene	993	3,9
<i>p</i> -Cymene	1028	0,2
Limonene	1032	2,3
$\gamma$ -Terpinene	1063	0,1
1-Nonen-3-ol	1082	0,1
Terpinolene	1090	0,3
<i>trans</i> -Pinocarveol	1140	0,8
Pinocarvone	1164	0,7
4-Terpineol	1178	0,2
$\alpha$ -Terpineol	1192	0,7
Myrtenol	1195	1,1
<i>trans</i> -Pinocarvylacetate	1299	0,6
$\alpha$ -Copaene	1377	0,2
$\beta$ -Cubebene	1390	0,3
$\alpha$ -Humulene	1455	0,1
GermacreneD	1481	0,4
$\delta$ -cadinene	1523	0,2
T-cadinol	1641	0,1
<b>Famille de composés</b>	<b>Nombre de composés</b>	<b>Pourcentage (%)</b>
Monoterpène hydrocarboné	8	92,5
Monoterpène oxygéné	6	4,1
Sesquiterpène hydrocarboné	5	1,2
Sesquiterpenes oxygéné	1	0,1
Dérivés non terpéniques	1	0,1
Total identifiés (%)	21	98,0

<sup>a</sup> Constituants d'huiles essentielles classés par familles chimiques et identifiés par comparaison de leurs temps de rétention avec ceux d'échantillons authentiques, de leurs indices de rétention linéaires par rapport à la série des n-hydrocarbures, ou identifiés par comparaison avec des spectres de masse de bibliothèques commerciales et interne ; <sup>b</sup> L.R.I : Indices de rétention linéaire déterminés sur colonne capillaire DB-5MS par rapport à une série de n-alcane ; <sup>c</sup> Pourcentage calculé par le détecteur de masse GC/piège à ions.

Les structures chimiques des composés majoritaires de l'huile essentielle de *D. virgatus* sont présentés dans la figure ci-dessous.



**Figure 34 :** Structures chimiques des composés majoritaires de l'HE de *D. virgatus*

Selon des études antérieures, le rendement de l'hydrodistillation des autres espèces du même genre a été relativement plus élevé. Le rendement en huile des fruits de *D. carota L.* a été rapporté<sup>(198)</sup> avec une valeur de 1,6 %, tandis que celui des fruits de *D. gingidium* a été égale à 1,21% (p/p)<sup>(199)</sup>. Un rendement de 0,16 % a été rapporté à partir d'une étude réalisée sur l'espèce *D. virgatus* poussant en Tunisie<sup>(129)</sup> et il est relativement inférieur à celui enregistré avec notre espèce (0,39%). En outre, une étude<sup>(127)</sup> a montré que de nombreuses populations de *D. gracilis* qui appartiennent au même genre taxonomique de *D. virgatus* et partagent les mêmes aspects possèdent des rendements similaires, voire inférieurs (entre 0,03% et 0,41%). Plusieurs facteurs peuvent être à l'origine des variations des rendements, comme la période de collecte des plantes, la zone géographique et le climat. De plus, le rendement en huile essentielle et les composants bioactifs des plantes aromatiques et médicinales changent en réponse au stress environnemental auquel les plantes sont confrontées naturellement comme la sécheresse et le stress salin.

Le composé phénylpropanoïde méthyleugénol a été signalé comme le constituant majeur (33,0%) de l'HE de *D. virgatus* tunisienne<sup>(129)</sup>, tandis que les principaux composants de l'HE de notre espèce étaient le  $\beta$ -pinène (77,9 %) et l' $\alpha$ -pinène (7,6%). Bendiabellah et al.<sup>(125)</sup> ont rapporté que la composition de l'huile essentielle de *D. muricatus*, obtenue à partir

des parties aériennes de la plante (feuilles, tiges, fleurs et ombelles) révèlent la présence des principales familles chimiques suivantes: hydrocarbures monoterpéniques (58,5%), notamment le limonène (24%) et l' $\alpha$ -pinène (21,8%). Leur abondance relative était suivie par le sabinène (8,1%) en tiges, feuilles et fleurs, et de l'acétate de trans-sabinyle en ombelles (12,1%).

La composition chimique des espèces *Daucus* rapportée par des études antérieures ont montré que les monoterpènes hydrocarbonés sont les dérivés les plus représentés dont les principaux sont: le sabinène, le  $\beta$ -pinène, l' $\alpha$ -pinène, le  $\beta$ -myrcène, l' $\alpha$ -terpinène, le limonène, le  $\gamma$ -terpinène, le p-cymène, et l' $\alpha$ -terpinolène <sup>(124)</sup>. Ceci est en bon accord avec les résultats obtenus dans la présente étude. Occasionnellement, des phénylpropanoïdes tels que l'apiol, la myristicine et l'isochavicol sont signalés en quantités appréciables <sup>(135)</sup>. Il en va de même pour les hydrocarbures sesquiterpéniques comme le  $\beta$ -caryophyllène, le trans- $\gamma$ -bisabolène.

## Chapitre II : Evaluation des activités biologiques des espèces étudiées

### I. Évaluation du pouvoir antioxydant de l'espèce *Origanum floribundum*

#### 1. Dosage spectrophotométrique

Les résultats du dosage des phénols (TPC) et flavonoïdes totaux (TFC), dans les différents extraits ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , AcOEt, *n*-BuOH) des feuilles de l'espèce *Origanum floribundum* sont illustré dans le tableau 19. Les analyses quantitatives des flavonoïdes et phénols totaux, ont été déterminées à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage, tracée en utilisant la quercétine et l'acide gallique comme standards respectivement. Les courbes d'étalonnages sont illustrées dans l'annexe 7.

**Tableau 19** : Teneurs des phénols totaux et flavonoïdes des trois extraits

Extraits	Phénols totaux*	Flavonoïdes *
	( $\mu\text{g}$ EAG/mg d'extrait)	( $\mu\text{g}$ EQ/mg d'extrait)
<b><math>\text{CH}_2\text{Cl}_2</math></b>	252,1 $\pm$ 1,27 <sup>c</sup>	34,31 $\pm$ 0,66 <sup>a</sup>
<b>EtOAc</b>	446,5 $\pm$ 0,71 <sup>a</sup>	32,48 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>
<b><i>n</i>-BuOH</b>	340,6 $\pm$ 3,39 <sup>b</sup>	17,08 $\pm$ 0,84 <sup>c</sup>

\* Valeurs exprimées en moyennes  $\pm$  Ecart type (n=3). Les moyennes de chaque paramètre (contenu en phénols totaux ou flavonoïdes) accompagnées de lettres distinctes dans une colonne, pour les trois extraits, sont significativement différentes selon ANOVA suivi des tests post hoc-Tukey (p < 0,05).

Selon les résultats d'analyse de variance (ANOVA à un facteur), nous constatons que le type de solvant d'extraction a un effet significatif ( $p < 0.001$ ) sur la teneur totale en composés phénoliques et sur la teneur en flavonoïdes d'*Origanum floribundum*. Ainsi, selon le test de Tukey, les différences entre les moyennes de la teneur totale en composés phénoliques et de la teneur en flavonoïdes des trois extraits étudiés ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , AcOEt, *n*-BuOH) sont statistiquement significatives (Figure 73).

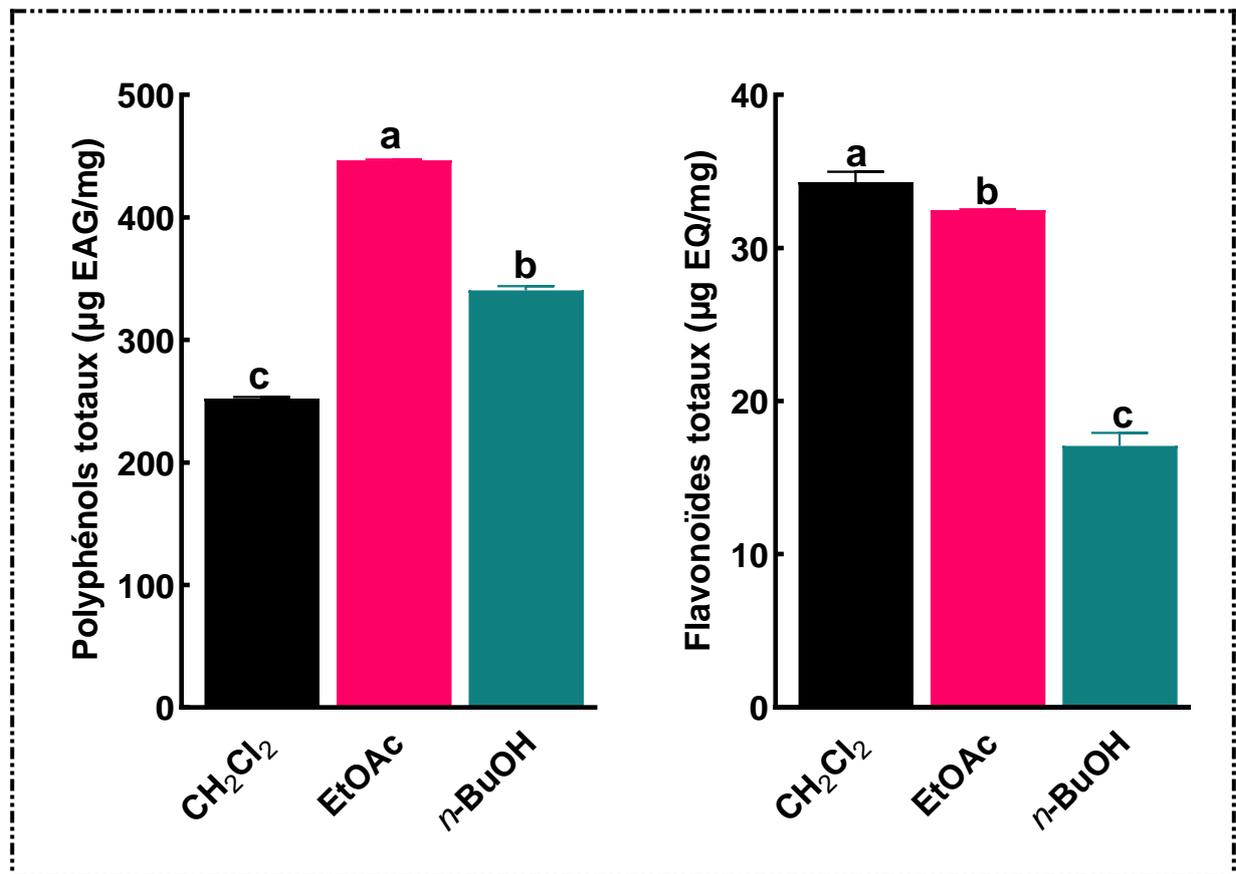
On constate que la teneur en composés phénolique totaux de l'extrait acétate d'éthyle est la plus élevée, avec un taux de 446,5  $\mu\text{g}$  EAG/mg extrait, par rapport aux extraits dichlorométhane et butanolique, où nous enregistrons des teneurs de l'ordre de 252,1 et 340,6  $\mu\text{g}$  EAG/mg extrait respectivement.

D'après ces résultats, on déduit que le contenu phénolique dans les extraits examinés, dépend de la polarité du solvant utilisé pour l'extraction. Les extraits les plus polaires relativement sont ceux qui ont présenté le plus grand taux de polyphénol totaux à savoir, les extraits acétate d'éthyle et butanolique riche éventuellement en acides phénols et les flavonoïdes glycosilés.

Kerbouche et al.<sup>(155)</sup> ont signalé la teneur des composés phénoliques totaux de l'extrait éthanolique d'*O. floribundum* (lakharia) avec un taux de 250 mg GAE/g nettement inférieurs à celui obtenu avec nos extraits. Hadjadj et al.<sup>(161)</sup> ont rapporté la teneur phénolique totale de l'extrait d'*O. floribundum* appartenant à deux régions différentes (Blida) avec des taux allant de 92,3 à 66,4 mg GA/g. Les valeurs TPC sont beaucoup inférieures à ceux obtenus dans la présente étude. En outre, les résultats obtenus avec nos extraits sont nettement supérieurs à ceux obtenus avec l'*Origanum glandulosum* étudié appartenant à une région d'Algérie avec une teneur en polyphénol de 175,33  $\mu\text{g}$  EAG/mg d'extrait sec <sup>(156)</sup>. La teneur en polyphénols totaux obtenus avec l'extrait méthanolique de l'*Origanum vulgare* de Pologne (22,1  $\mu\text{g}$  EAG/mg d'extrait sec) est vingt fois inférieur aux résultats obtenus dans notre travail. Autres études menées sur *O. vulgare* ont rapporté des valeurs de TPC allant de 23,48 à 182 mg GAE/g extrait <sup>(155)</sup>. Aussi, d'après les résultats présentés dans le tableau 20, on constate que les teneurs en flavonoïdes totaux varient considérablement entre les différents extraits. L'extrait dichlorométhane enregistre un maximum de flavonoïdes (34,30  $\mu\text{g}$  EQ/mg), suivi par l'extrait acétate d'éthyle qui renferme des teneurs presque égales à celle du dichlorométhane. Tandis que la plus basse concentration des flavonoïdes a été mesurée dans l'extrait butanolique (17,08  $\mu\text{g}$ EQ/g ES).

Ceci est expliqué par la richesse de l'extrait dichlorométhane en flavone aglyconique, ces résultats concordent bien avec les données de la littérature qui affirme nos résultats.

Karbouche et al.<sup>(155)</sup> ont signalé un taux de flavonoïdes égale à 180 mg QE/g dans l'extrait éthanolique de l'espèce *O. floribundum* (lakhdaria), beaucoup supérieur à celui obtenu avec notre espèce. Ainsi, Hdjadj et al. <sup>(200)</sup> ont signalé une teneur totale en flavonoïdes variant entre 55,3 et 41,2 mg QE/g Extrait, nettement supérieur à nos résultats. Cependant, d'autres études menées sur *O. vulgare* ont rapporté des valeurs de TFC allant de 19.5 à 35,25mg QE/g d'extrait <sup>(162)</sup>, similaires à ceux obtenus avec notre espèce (Figure 92).



**Figure 35 :** Teneurs en polyphénols totaux et flavonoïdes des trois extraits étudiés

[Les barres représentent la moyenne ± Ecart type (n=3). Les moyennes de chaque paramètre (contenu en phénols totaux ou flavonoïdes) accompagnées de lettres distinctes dans une barre pour les trois extraits, sont significativement différentes selon ANOVA suivi des tests post hoc-Tukey (p < 0,05).]

Les différences des taux de polyphénols (TPC) et flavonoïdes (TFC) enregistrés avec notre espèce et ceux des autres espèces du même genre ou la même espèce collectée dans des régions différentes, peuvent s'expliquer par les conditions environnementales du site de collecte et par le stade de croissance, étant donné que les cultures étudiées des échantillons ont été prélevés au stade de la floraison, alors que celui d'autres études était récolté au début de cycle végétatif sachant que la distribution des métabolites secondaires peut varier

pendant les étapes de développement de la plante. Aussi, ça peut être lié à des conditions météorologiques extrêmes (température élevée, exposition au soleil, sécheresse, salinité, etc.). Ces paramètres stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires, tels que les composés phénoliques. La teneur en polyphénol varie également avec la variation de la méthode d'extraction et la nature du solvant.

## 2. Les résultats de l'activité antioxydante

Dans cette section, on présente les résultats du potentiel antioxydant des extraits d'*O. floribundum* sélectionnés pour cette étude. Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation, il apparaît clairement qu'une seule méthode n'est pas suffisante pour caractériser pleinement le potentiel antioxydant des extraits. Il est donc nécessaire de combiner les réponses obtenues à l'aide de différents tests, complémentaires les uns aux autres. L'activité antioxydante des extraits a été mesurée d'une part par leurs capacités à intercepter les radicaux libres par des méthodes de piégeage, d'autre part en évaluant leurs potentiels réducteurs. Dans cette étude, l'activité antioxydante a été évaluée par les tests d'inhibition radicalaire DPPH<sup>·</sup> et ABTS<sup>·+</sup> ainsi que par le pouvoir réducteur du fer et la capacité antioxydante par réduction du cuivre. Les résultats de l'activité antioxydante des extraits analysés par différentes méthodes sont rassemblés dans le tableau 20.

Dans le tableau :

Les valeurs des pourcentages d'inhibition et les activités antioxydantes calculées (IC<sub>50</sub> et A<sub>0.50</sub>) sont exprimées sous la forme moyenne ± écart type (n=3). Pour chaque méthode d'évaluation de l'activité antioxydante parmi les cinq, les différentes lettres d'une colonne indiquent une différence significative entre les valeurs obtenues de IC<sub>50</sub> ou A<sub>0.50</sub> des trois extraits étudiés ainsi que les composés de référence suite à l'analyse de variance à 1 facteur suivie par le test posthoc de Tukey à  $p < 5$ .

BHA = Hydroxyanisole butylé; BHT = hydroxytoluène butylé ; Asc Acid = Acide ascorbique; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> = Extrait dichlorométhane ; EtOAc = Extrait acétate d'éthyle ; *n*-BuOH = Extrait butanolique.

nt = non testé.

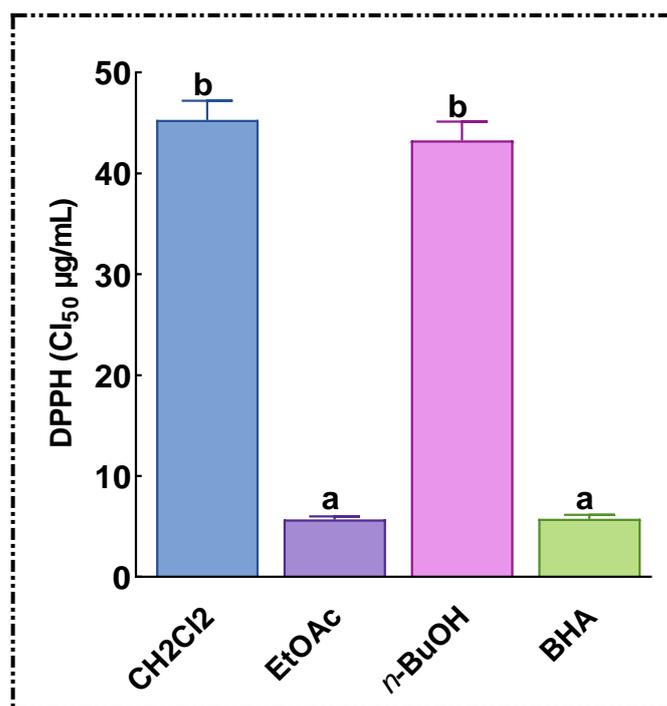
**Tableau 20** : Potentiel antioxydant et anti-radicalaire de trois extraits d'*O. floribundum*

Extraits	Test DPPH (% d'Inhibition)									IC50 (µg/ml)
	0.78125	1.562	3.125	6.25	12.5 (µg/mL)	25	50	100	200	
<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	nt	3,77 ± 2,8	5,23 ± 2,8	8,8 ± 0,5	20,90 ± 1,1	33,96 ± 1,8	57,79 ± 2,8	82,98 ± 0,8	nt	45.3 ± 1.9 <sup>b</sup>
<b>AcOEt</b>	nt	19,23 ± 1,9	35,26 ± 2,0	55,2 ± 1,9	84,34 ± 0,2	84,86 ± 0,4	85,32 ± 0,1	85,69 ± 0,1	nt	5.68 ± 0.3 <sup>a</sup>
<b><i>n</i>-BuOH</b>	nt	4,14 ± 0,9	6,43 ± 1,1	10,9 ± 1,3	20,69 ± 1,3	35,00 ± 1,1	59,15 ± 3,3	85,27 ± 0,2	nt	43.3 ± 1.9 <sup>b</sup>
<b>BHA</b>	nt	22.21 ± 1.2	31.73 ± 1.2	54.9 ± 3.6	67.60 ± 1.1	76.77 ± 0.5	78.67 ± 1.3	79.01 ± 0.8	nt	5.73 ± 0.4 <sup>a</sup>
Test ABTS (% d'Inhibition)										IC50(µg/ml)
<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	nt	nt	48.39 ± 1.2	84.65 ± 1.3	90.95 ± 0.2	91.79 ± 0.1	91.91 ± 0.2	92.03 ± 0.1	92.3 ± 0.2	1.18 ± 0.2 <sup>a</sup>
<b>ACOET</b>	nt	nt	34.72 ± 1.1	63.73 ± 0.7	89.27 ± 1.2	91.31 ± 0.4	91.97 ± 0.1	92.09 ± 0.2	92.3 ± 0.1	5.04 ± 0.2 <sup>c</sup>
<b><i>n</i>-BuOH</b>	nt	nt	27.89 ± 0.8	40.78 ± 1.2	59.36 ± 0.2	81.36 ± 1.4	91.31 ± 0.4	92.09 ± 0.0	92.1 ± 0.1	9.60 ± 0.3 <sup>d</sup>
<b>BHT</b>	nt	nt	59.22 ± 0.5	78.55 ± 3.4	90.36 ± 0.0	92.18 ± 1.3	93.37 ± 0.9	94.87 ± 0.9	96.7 ± 0.3	1.29 ± 0.3 <sup>ab</sup>
<b>BHA</b>	nt	nt	83.42 ± 4.1	93.52 ± 0.1	93.58 ± 0.1	93.63 ± 0.2	93.63 ± 0.9	94.20 ± 0.9	95.4 ± 2.6	1.81 ± 0.1 <sup>b</sup>
Test CUPRAC (% d'Inhibition)										A <sub>0,5</sub> (µg/ml)
<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	nt	0.08 ± 0.01	0.15 ± 0.05	0.18 ± 0.03	0.23 ± 0.08	0.44 ± 0.14	0.94 ± 0.08	1.07 ± 0.21	nt	20.7 ± 3.3 <sup>b</sup>
<b>ACOET</b>	nt	0.19 ± 0.01	0.30 ± 0.03	0.51 ± 0.01	0.87 ± 0.11	1.50 ± 0.12	2.29 ± 0.01	3.17 ± 0.11	nt	6.43 ± 0.4 <sup>a</sup>
<b><i>n</i>-BuOH</b>	nt	0.10 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.23 ± 0.00	0.36 ± 0.04	0.50 ± 0.15	0.91 ± 0.31	nt	42.9 ± 4.9 <sup>c</sup>
<b>BHT</b>	nt	0.11 ± 0.04	0.19 ± 0.01	0.33 ± 0.04	0.66 ± 0.07	1.03 ± 0.07	1.48 ± 0.09	2.04 ± 0.14	nt	9.62 ± 0.9 <sup>a</sup>
<b>BHA</b>	nt	0.23 ± 0.07	0.46 ± 0.00	0.78 ± 0.01	1.34 ± 0.08	2.36 ± 0.17	3.45 ± 0.02	3.76 ± 0.03	nt	3.64 ± 0.2 <sup>a</sup>
Test Pouvoir réducteur (% d'Inhibition)										A <sub>0,5</sub> (µg/ml)
<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	0.07 ± 0.0	0.09 ± 0.0	0.15 ± 0.01	0.38 ± 0.05	0.60 ± 0.08	1.60 ± 0.24	2.62 ± 0.12	nt	nt	9.29 ± 0.4 <sup>a</sup>
<b>AcOEt</b>	0.06 ± 0.0	0.15 ± 0.02	0.24 ± 0.03	0.44 ± 0.02	0.64 ± 0.04	0.94 ± 0.04	2.07 ± 0.03	nt	nt	8.22 ± 0.9 <sup>a</sup>
<b><i>n</i>-BuOH</b>	0.09 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.35 ± 0.01	0.51 ± 0.11	0.75 ± 0.01	1.04 ± 0.00	2.06 ± 0.02	nt	nt	4.50 ± 3.7 <sup>a</sup>
<b>BHA</b>	0.09 ± 0.0	0.11 ± 0.01	0.18 ± 0.02	0.36 ± 0.04	0.78 ± 0.07	1.74 ± 0.07	3.53 ± 0.19	nt	nt	8.41 ± 0.7 <sup>a</sup>
<b>Asc Acid</b>	0.09 ± 0.0	0.11 ± 0.00	0.16 ± 0.01	0.33 ± 0.04	0.76 ± 0.16	2.02 ± 0.23	3.87 ± 0.27	nt	nt	9.01 ± 1.5 <sup>a</sup>

Les résultats obtenus révèlent que les extraits testés possèdent une activité dose-dépendante vis-à-vis de tous les tests réalisés. La présence d'une phase stationnaire signifie une réduction presque totale du radical à sa forme non radicalaire, ou une réduction totale des ions de Fe et de Cu. Tous les extraits étudiés présentent des propriétés antioxydantes intéressantes, voire très puissantes, ce qui se manifeste par de faibles valeurs de IC<sub>50</sub> ou de A<sub>0,50</sub> (Tableau 21). Pour une meilleure illustration, les résultats de l'activité antioxydante des trois extraits, obtenus par différents tests, sont présentés dans les histogrammes (Figure 93, 94, 95, 96), exprimés en termes de concentration inhibitrice à 50 % (IC<sub>50</sub> ou A<sub>0,50</sub>).

### 2.1. Test de Piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•)

D'après les résultats obtenus, on constate bien que le pouvoir antioxydant varie d'un extrait à un autre. Ces différences sont relatives à la composition chimique de chaque extrait. L'extrait d'AcOEt se distingue par son activité antiradicalaire la plus importante comparée avec les autres extraits avec une IC<sub>50</sub> de 5,68 µg/ml, similaire à celle du BHA à 5,73 µg/ml.



**Figure 36 :** Capacité antioxydante des extraits étudiés et standards par le test DPPH

Les résultats obtenus concordent bien avec le taux en polyphénol et flavonoïdes le plus élevée enregistré pour cet extrait. En effet, les propriétés antioxydantes des extraits peuvent être attribuées à la présence des composés phénoliques qui jouent un rôle clé comme piègeurs de radicaux libres, ceci est souligné dans plusieurs rapports <sup>(105)</sup>. La richesse de l'extrait d'acétate d'éthyle en acides phénoliques et en flavonoïdes, révélée par l'analyse LC.MS,

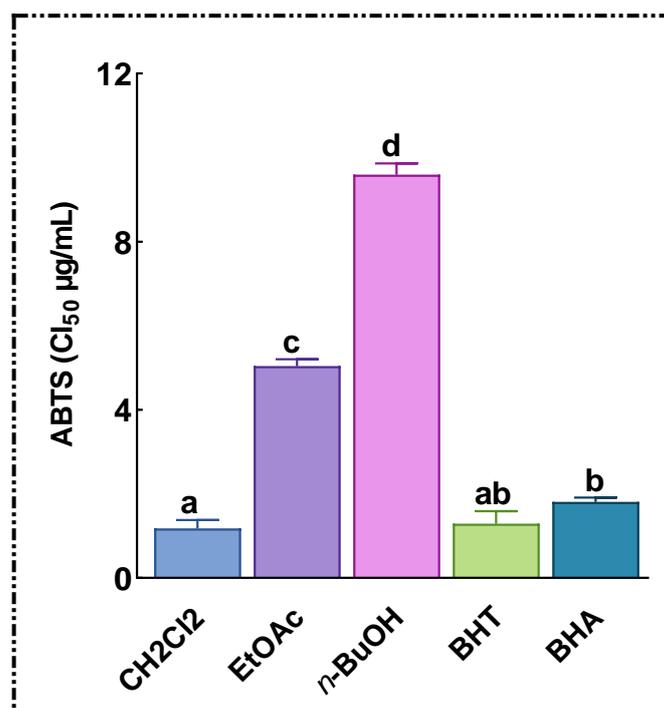
ainsi que la présence de la lutéoline isolée à partir de cet extrait, confère à ce dernier des propriétés antiradicalaires très importante.

Par rapport aux études antérieures, l'inhibition du radical DPPH par l'extrait méthanolique d'*O. floribundum* (Blida), rapportée par Hadjadj et al.<sup>(161)</sup>, est nettement inférieure, avec une IC<sub>50</sub> de 37,9 µg/ml, à celle obtenue avec notre extrait d'acétate d'éthyle, et légèrement supérieure aux extraits de dichlorométhane et de butanol (IC<sub>50</sub> de 45,3 et 43,3 µg/ml respectivement).

Les travaux menés par Kerbouche et al. <sup>(155)</sup> ont rapporté également une inhibition du radical DPPH plus faible (IC<sub>50</sub>= 18.5 µg/ml) avec l'extrait éthanolique d'*O. floribundum*, par rapport à notre extrait d'acétate d'éthyle.

## 2.2. Test ABTS

Dans ce test, l'activité antioxydante des différents extraits est déduite de leur capacité à inhiber le radical ABTS<sup>•+</sup>. Les trois extraits ont montré une activité antiradicalaire très importante vis-à-vis du radical ABTS<sup>•+</sup>. Ces résultats concordent bien avec les taux élevés de polyphénols et de flavonoïdes enregistrés pour ces extraits. L'extrait CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a manifesté la plus forte activité antiradicalaire avec IC<sub>50</sub> de 1,18 µg/ml, surpassant celle des deux autres extraits ainsi que celles des standards BHA et BHT. Les travaux antérieurs ont également indiqué que les flavonoïdes aglycones sont plus puissants en termes de leur activité antiradicalaire que leur forme glycosidique <sup>(105)</sup>. L'extrait acétate a présenté une activité similaire à celle obtenue avec le test DPPH, tandis que l'extrait butanolique a montré une activité antiradicalaire meilleure que celle obtenue avec le test DPPH. L'activité antioxydante mesurée par l'inhibition du radical ABTS<sup>•+</sup> de l'extrait méthanolique d'*O. floribundum* provenant d'une autre région d'Algérie <sup>(155)</sup>, a été rapportée avec une IC<sub>50</sub> de 8,9 µg/ml, des résultats similaires à ceux obtenus avec l'extrait butanolique (IC<sub>50</sub> de 9,6 µg/ml). Cependant, l'activité antioxydante obtenue avec les extraits dichlorométhane et acétate d'éthyle est nettement supérieure.



**Figure 37** : Capacité antioxydante des extraits étudiés et standards par le test ABTS

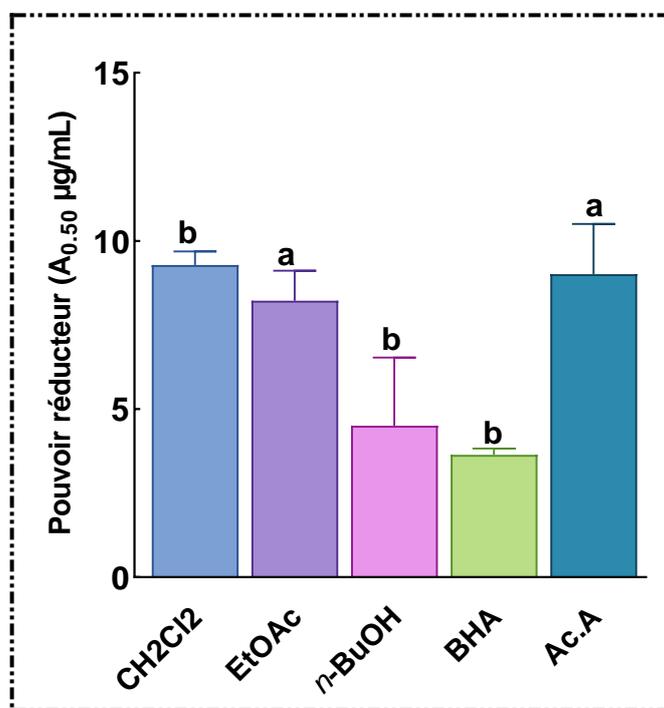
Ces résultats mettent en évidence une activité antiradicalaire significativement plus élevée pour les extraits dichlorométhane et butanolique ( $IC_{50} = 1,18$  et  $9,60 \mu\text{g/ml}$  respectivement) par rapport à celle obtenue avec le test DPPH, bien que les deux méthodes ABTS et DPPH impliquent le même mécanisme de fonctionnement. Il convient de noter que le même composé phénolique peut présenter une cinétique d'oxydation différente selon le test utilisé, ce qui entraîne un comportement différent.

Cependant, l'encombrement stérique du DPPH présente un obstacle au piégeage du radical comparé à la structure de l'ABTS, ce qui suggère que la méthode ABTS est la plus fiable <sup>(201)</sup>. Un des principaux avantages de cette méthode est sa réactivité rapide avec les antioxydants, ainsi que sa capacité à être utilisée sur une gamme de pH étendue. De par sa simplicité d'utilisation, ce test permet d'étudier les capacités antioxydantes de molécules lipophiles et des phases aqueuses <sup>(200)</sup>.

### 2.3. Pouvoir réducteur du fer

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir donneur d'électron et peut servir d'indicateur important de son potentiel d'activité antioxydante (Figure 95). Une augmentation de l'absorbance du mélange réactionnel indique une augmentation de la réduction. L'activité antioxydante des extraits évalués par ce test, a révélé un pouvoir réducteur très important vis-à-vis des ions ferriques, avec une différence significative attribuée au solvant d'extraction. L'extrait butanolique d'*O. floribundum* présente le pouvoir

réducteur le plus élevé ( $A_{0,50} = 4,50 \mu\text{g/ml}$ ), dépassant celui du BHA et de l'acide ascorbique. Les résultats obtenus avec les extraits dichlorométhane et acétate d'éthyle sont similaires à ceux obtenus avec le BHA et l'acide ascorbique. Le pouvoir réducteur de notre espèce est nettement supérieur aux résultats rapportés par Hadjadj et al.<sup>(161)</sup>, qui ont signalé un pouvoir réducteur ( $A_{0,50} = 113,7 \mu\text{g/ml}$ ) pour l'extrait méthanolique d'*O. floribundum*.



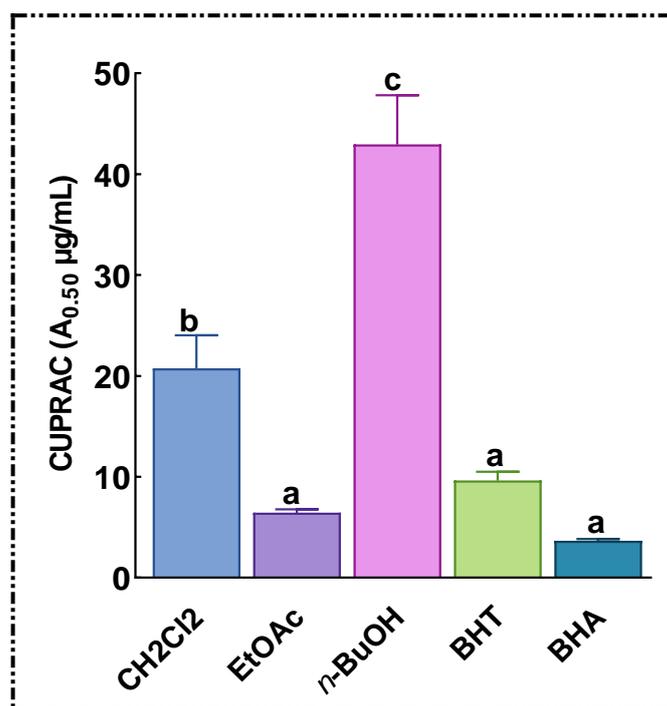
**Figure 38** : Capacité antioxydante des extraits étudiés et standards par le test du pouvoir réducteur du fer

Généralement, le pouvoir réducteur du fer est connu par avoir un mécanisme mixte SET (transfert d'électrons simple) et HAT (transfert d'atomes d'hydrogène), donc sa combinaison avec d'autres méthodes pour diagnostiquer le mécanisme dominant des divers antioxydants est très utile. Il est à noter que la fraction osidique contenue dans l'extrait butanolique est plus élevée que pour les deux autres extraits, ce qui justifie un pouvoir réducteur plus important.

#### 2.4. Test CUPRAC

D'après la Figure 77, le pouvoir réducteur des ions cuivriques par les différents extraits d'*O. floribundum* est dose-dépendant. Nos résultats révèlent que l'extrait d'acétate d'éthyle est le plus actif, avec une  $A_{0,50}$  de l'ordre de  $6,43 \mu\text{g/ml}$ , inférieur à celle enregistrée avec le BHT, suivi par l'extrait dichlorométhane avec une  $A_{0,50}$  de  $20,7 \mu\text{g/ml}$ . Le pouvoir réducteur

du cuivre de l'extrait butanolique est nettement inférieur comparé aux autres extraits et aux standards BHT et BHA.



**Figure 39** : Capacité antioxydante des extraits étudiés et standards par le test CUPRAC

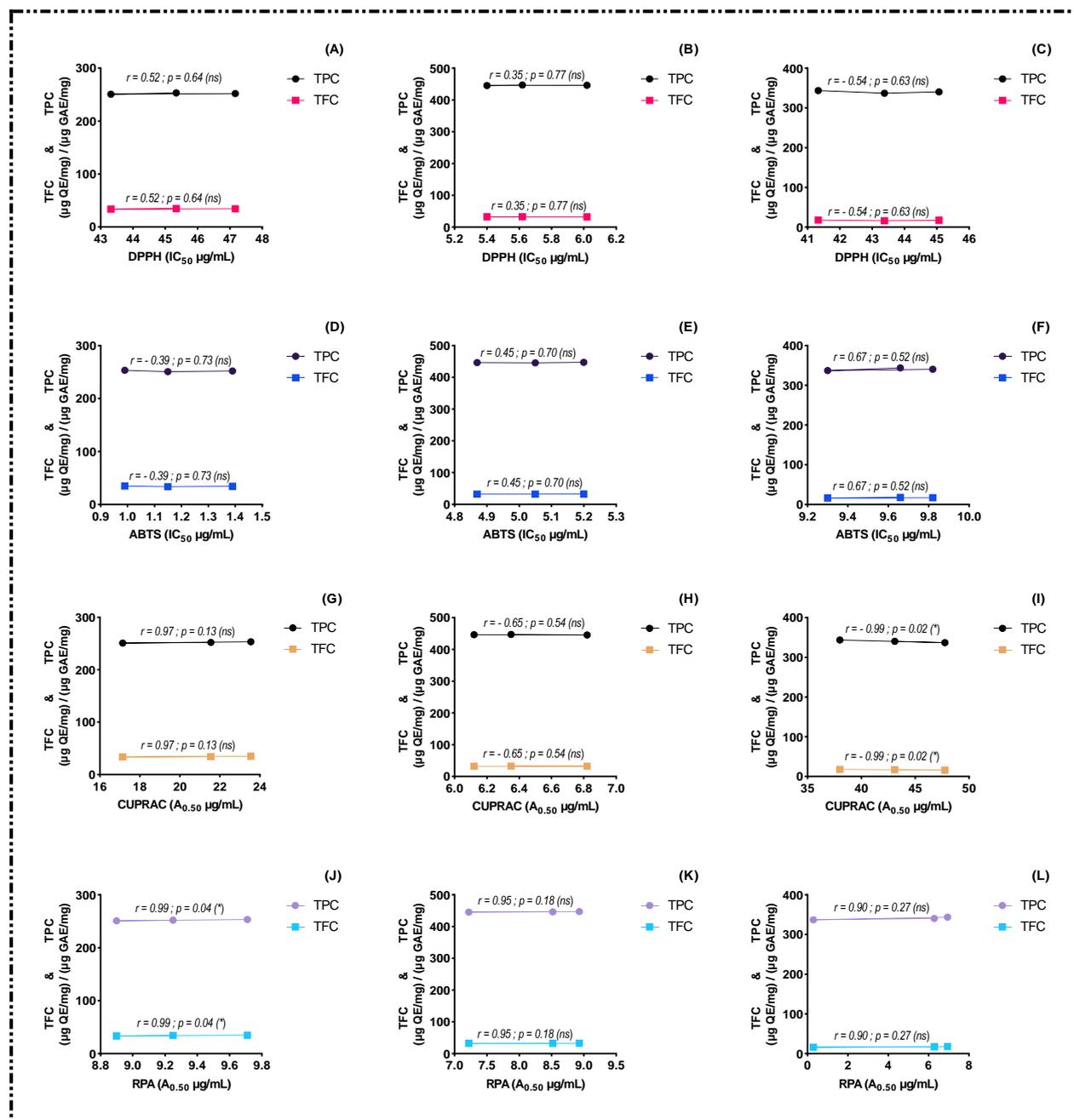
Cette méthode présente l'avantage de mesurer le pouvoir réducteur des antioxydants hydrophiles et hydrophobes. En effet, le chromophore Cu<sup>+1</sup>-néocuproïne est soluble dans l'eau et dans les solvants organiques. De plus, parmi les autres avantages de cette méthode, on note sa réactivité dans des pH physiologiques <sup>(201)</sup>. Cette méthode est similaire à la méthode précédente (pouvoir réducteur du fer), avec l'utilisation de cuivre au lieu du fer. Néanmoins, le réactif de la méthode CUPRAC est plus stable.

### 3. Test statistique de corrélation

Pour éclairer la relation entre la teneur totale en phénols (TPC), la teneur totale en flavonoïdes (TFC) et l'activité antioxydante des trois extraits distincts d'*O. floribundum*, nous avons procédé à une analyse statistique de corrélation. Cette analyse a été réalisée en calculant les coefficients de corrélation de Pearson (R) et en vérifiant que la valeur *p* était inférieure au seuil de signification de 5 %.

Les résultats de cette analyse de corrélation, présentés dans la figure 97, révèlent l'influence notable de la nature des extraits et de la méthode d'évaluation de l'activité antioxydante sur le degré d'association entre la teneur en polyphénols totaux ou en flavonoïdes totaux, et le pouvoir antioxydant (mesuré par les paramètres IC<sub>50</sub> et A<sub>0.50</sub>) de

cette espèce étudiée. Ces constatations suggèrent une relation complexe entre les composés phénoliques et flavonoïdes présents dans les extraits et leur efficacité antioxydante, soulignant ainsi l'importance de considérer à la fois la nature chimique des extraits et la méthode d'évaluation de l'activité antioxydante lors de l'interprétation des résultats.



**Figure 40 :** Corrélation entre la teneur totale en phénols (TPC), la teneur totale en flavonoïdes (TFC) et l'activité antioxydante de trois extraits différents d'*O. floribundum*

(A) = CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/DPPH; (B) = AcOEt/DPPH et (C) = n-BuOH/DPPH;

(D) = CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ABTS; (E) = AcOEt /ABTS et (F) = n-BuOH/ABTS;

(G) = CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CUPRAC; (H) = AcOEt /CUPRAC et (I) =n-BuOH/CUPRAC;

(J)=CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/RPA; (K) =AcOEt/RPA et (L) = n-BuOH/RPA. RPA (reducing power antioxydant)

En examinant la Figure 78, nous observons des corrélations entre le pouvoir antioxydant mesuré par les valeurs de  $IC_{50}$  ou  $A_{0.50}$  de l'extrait dichlorométhane ( $CH_2Cl_2$ ) et les teneurs totales en phénols (TPC) et en flavonoïdes (TFC) pour différents tests. Pour le test DPPH, nous constatons une corrélation moyennement positive ( $r = 0,52$ ) mais non significative ( $p = 0,64$ ) avec la TPC et la TFC. En revanche, pour le test ABTS, nous observons une corrélation faiblement négative ( $r = - 0,39$ ) et non significative ( $p = 0,73$ ). Pour le test CUPRAC, une corrélation très élevée ( $r = 0,97$ ) est relevée, bien que non significative ( $p = 0,13$ ), tandis que pour le test RPA, une corrélation très élevée et significative ( $p < 0,05$ ) est mise en évidence ( $r = 0,99$ ).

D'autre part, l'extrait d'acétate d'éthyle (EtOAc) présente une association positive, bien que faible et non significative, avec la TPC et la TFC dans le cadre des tests DPPH ( $r = 0,35$ ,  $p = 0,77$ ) et ABTS ( $r = 0,45$ ,  $p = 0,70$ ), respectivement. Pour le test CUPRAC, une corrélation moyenne et négative ( $r = -0,65$ ) est notée, bien que non significative ( $p = 0,54$ ), tandis que pour le test RPA, une corrélation très élevée mais non significative ( $p = 0,18$ ) est observée ( $r = 0,95$ ).

Enfin, l'analyse du pouvoir antioxydant de l'extrait butanolique (*n*-BuOH) a révélé des corrélations diverses avec les teneurs totales en phénols (TPC) et en flavonoïdes (TFC) pour différents tests. Pour les tests DPPH et ABTS, le pouvoir antioxydant présente à la fois des corrélations moyennes et non significatives avec la TPC et la TFC ( $r = - 0,54$ ,  $p = 0,63$  /  $r = 0,67$ ,  $p = 0,52$ , respectivement). Cependant, dans le cas du test RPA, cette association devient positive et très élevée mais non significative ( $r = 0,90$ ,  $p = 0,27$ ). En revanche, dans le cadre du test CUPRAC, une corrélation négative très élevée et significative est observée ( $r = - 0,99$ ,  $p < 0,05$ ) entre le pouvoir antioxydant et les teneurs en TPC et TFC.

Sur la base de ces résultats, il semble que les composés phénoliques et flavonoïdes soient responsables d'une partie importante de la capacité antioxydante de cette plante. Par ailleurs, la force et la significativité de cette relation varient considérablement en fonction de la nature de l'extrait et donc de sa composition chimique, ainsi que la méthode d'évaluation du pouvoir antioxydant impliquée. Ce résultat pourrait être justifiés par le fait que l'activité antioxydante n'est pas uniquement dépendante de la teneur des polyphénols et des flavonoïdes, mais plutôt de la structure moléculaire des composés flavonoïdiques et des composés phénoliques présents dans ces extraits.

#### 4. Discussion des résultats sur l'activité antioxydante d'*O. floribundum*

Nous présentons dans ce travail les propriétés antioxydantes des trois extraits, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt et *n*-BuOH, issus du fractionnement de l'extrait hydrométhanolique de l'espèce *O. floribundum*. Peu d'études ont jusqu'à présent évalué les propriétés antioxydantes de cette espèce. D'après les résultats obtenus, on constate que les trois extraits étudiés de l'espèce *O. floribundum* révèlent une activité antioxydante élevée, et ce pour l'ensemble de tous les tests effectués. Néanmoins, les différences parfois observées dans les IC<sub>50</sub>, qui peuvent varier d'un test à l'autre, sont dues à la nature du test ainsi qu'au mécanisme de fonctionnement de l'antioxydant d'une part et à la nature de l'extrait et sa composition qui est en rapport direct avec le pouvoir antioxydant enregistré d'autre part.

En effet, l'extrait acétate d'éthyle révèle le pouvoir antioxydant le plus fort enregistré parmi tous les tests réalisés. Cette activité antioxydante élevée est attribuable à la présence d'acides phénoliques, notamment l'acide salvianolique C et l'acide rosmarinique, reconnus pour leur fort puissant pouvoir antioxydant. De plus, la présence de lutéoline, isolées de cet extrait, lui confère des propriétés antioxydante très importantes.

L'extrait dichlorométhane a révélé une activité antioxydante très forte dans certains tests et modérée dans d'autres. La richesse de cet extrait en flavonoïdes aglycones lui confère ces propriétés antioxydante notamment la Genkwanine (5,4' – diOH – 7 – OMe flavone) et la Ladanéine (5,6 – di – OH – 7,4' – di – OMe flavone).

De même, l'extrait butanolique a montré une activité antiradicalaire importante et un très fort pouvoir réducteur, ceci est dû à la richesse de cet extrait en composés phénoliques, notamment les flavonoïdes tel que la vicénine – 2, l'aromadendrine et la flavone prénylée Kanzonol E.

Le comportement des extraits dans leur capacité à céder le proton ou l'électron pour exprimer les propriétés antioxydantes varie considérablement. Ce constat rejoint celui de Miliauskas et al.<sup>(202)</sup> qui ont démontré qu'un antioxydant efficace dans un test peut ne pas l'être dans un autre. Après toutes les combinaisons effectuées, nous enregistrons parfois l'absence de corrélation entre les techniques du pouvoir antioxydant et les teneurs en polyphénols, une observation largement confirmée dans la littérature<sup>(203)</sup>. Il est désormais largement accepté que ce n'est pas nécessairement la forte teneur en polyphénols qui exhibe une activité antioxydante puissante. L'explication de l'absence de cette corrélation pourrait être dû à la synergie des composés phénoliques présents dans les différents extraits, et que l'activité antioxydante dépend non seulement de la concentration, mais aussi de leurs structures moléculaires. Cette observation est confirmée par notre analyse statistique de

corrélation. Nous en avons déduit que l'activité antioxydante dépend davantage de la nature spécifique des flavonoïdes et des composés phénoliques présents dans les extraits que de leur simple concentration totale.

On remarque que les deux extraits, l'acétate d'éthyle et le dichlorométhane, présentent des teneurs en flavonoïdes relativement comparables, soit environ 32,48 et 34,31 ( $\mu\text{g EQ/mg}$  d'extrait) respectivement, mais peuvent néanmoins afficher des différences notables dans leur activité antioxydante, comme observé dans les tests CUPRAC et DPPH. En revanche, malgré des teneurs en polyphénols totaux différentes pour ces deux extraits, soit environ 446,5 et 252,1 ( $\mu\text{g EAG/mg}$  d'extrait) respectivement, une capacité antioxydante similaire a été observée, notamment dans le test du pouvoir réducteur du fer. De cette constatation, on déduit que l'activité antioxydante de ces deux extraits est principalement attribuable à la présence de flavonoïdes. Cette hypothèse est confirmée par la corrélation très forte enregistrée entre la teneur en flavonoïdes et le pouvoir réducteur du fer pour ces deux extraits. Cette observation souligne l'importance des flavonoïdes dans la manifestation de l'activité antioxydante des extraits, suggérant que d'autres composés présents dans les extraits peuvent également contribuer à cette activité, en synergie avec les flavonoïdes.

Les flavonoïdes et les acides phénoliques présents dans les espèces d'origan ont été largement étudiés en raison de leur potentiel thérapeutique, qui a été en partie attribué à leurs propriétés antioxydantes. Par exemple, il a été rapporté la capacité antioxydante de l'extrait méthanolique de l'espèce *O. glandulosum* par Béjaoui et al. <sup>(204)</sup> présentant une valeur de  $\text{IC}_{50}$  égale à 0,6 mg/ml pour le test DPPH, principalement attribué à la présence de lutéoline et d'acide caféique, reconnus comme des antioxydants puissants. De même, une autre espèce d'origan largement étudiée, *O. majorana*, est caractérisé par sa teneur élevée en acide rosmarinique. La capacité antioxydante de l'extrait méthanolique assisté par micro-ondes des parties aériennes d'*O. majorana* a été analysé par les méthodes CUPRAC, DPPH et TPC, révélant des valeurs élevées attribuées à la présence importante de l'acide rosmarinique<sup>(205)</sup>. Des flavonoïdes tels que l'hispiduline et la cirsimaritrine ont été identifiés dans les extraits méthanoliques d'*O. majorana*, montrant une forte corrélation positive entre les valeurs de TPC et DPPH. Les principaux composés et le TPC ont également présenté une corrélation positive avec les tests DPPH et ABTS<sup>(105)</sup>.

La variation structurelle des flavonoïdes provient en partie du modèle de substitution telle que l'hydroxylation, la méthylation, la prénylation ou la glycosylation. Les flavonoïdes présentent plusieurs fonctions hydroxyles susceptibles de réagir lors de processus chimiques et biochimiques avec des espèces oxydantes, radicalaires et acidobasiques. Le

nombre et/ou la position des groupes hydroxyles sur les noyaux de ces molécules, ainsi que les substitutions sur les cycles B et A, en conjonction la présence de la double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo sur le cycle C, renforcent l'activité antioxydante des flavonoïdes <sup>(206)</sup>. La présence d'un groupe 3-hydroxyle dans l'hétérocycle C augmente également l'activité de piégeage des radicaux, tandis que les groupes hydroxyle ou méthoxyle supplémentaires aux positions 3, 5 et 7 des cycles A et C semblent moins importants. Ces caractéristiques structurelles contribuent à augmenter la stabilité du radical aroxyde. Ainsi, les flavonols et les flavones contenant un groupe catéchol dans le cycle B sont très actifs. En revanche, la présence d'un seul hydroxyle dans le cycle B diminue l'activité antioxydante. Les Flavanonols et flavanones, en raison du manque de conjugaison fournie par la double liaison 2,3 avec le groupe 4-oxo, sont antioxydants faibles. Comme pour les autres classes de flavonoïdes, la glycosylation influence négativement la capacité de piégeage des radicaux<sup>(207)</sup>.

L'étude théorique des flavones aglycones ainsi que leurs formes activées a permis d'obtenir de nouvelles informations sur les propriétés structurales, électroniques et énergétiques de ces systèmes.

Les propriétés électroniques des flavonoïdes et de leurs radicaux ont souvent été utilisées pour corréler la structure à l'activité antioxydante. En effet, la réactivité des groupements hydroxyle peut être classée comme suit : 5-OH < 7-OH < 3'-OH < 4'-OH, ce qui indique que les groupements (-OH) sur le cycle B sont des sites préférés pour le transfert d'hydrogène. Ainsi, la BDE est plus faible dans le cycle B que dans le cycle A. Cette différence est liée à la présence d'une liaison hydrogène entre le groupe 5-OH et le groupe carbonyle C=O.

Pour les flavones en général, les groupements hydroxyles du cycle B appartenant aux positions C3' et C4' sont les sites de déprotonation les plus prédominants et présentent les BDE les plus faibles. Cela est attribué à la présence du fragment catéchol et à sa capacité accrue de délocaliser la paire d'électrons. En outre, des études sur la relation structure-activité (RSA) réalisées sur les flavonoïdes ont mis en évidence l'importance du nombre et de la localisation des groupements hydroxyle (-OH) pour une activité efficace de piégeage des radicaux. Les substitutions suivantes de l'anneau A devraient conférer une RSA appréciable dans les flavones, flavanones, flavonols, dihydroflavonols, catéchines et anthocyanidines : 5,6-diOH, 5,8-diOH, 6,7-diOH, 7,8-diOH, 5,6,7-triOH, 5,6,8-triOH, 5,7,8-triOH, 6,7,8-triOH et 5,6,7,8-tétraOH. En effet, il a été rapporté que les groupements prényle et hydroxyle

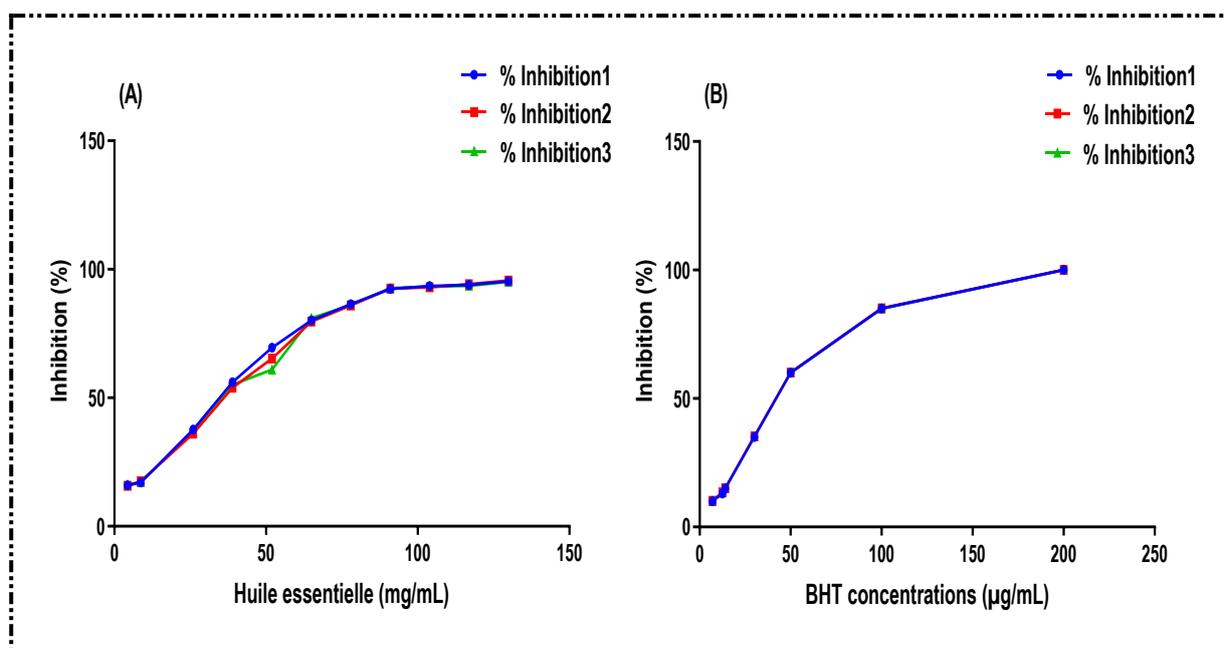
aux extrémités 3', 4' et/ou la position 5' du cycle aromatique B (pyrogallol) des flavonoïdes jouent un rôle important à générer un effet antioxydant intéressant <sup>(208)</sup>.

L'apigénine 6,8-di-C-glycoside (vicenine-2) possède un large éventail d'activités pharmacologiques, notamment antioxydantes, antiinflammatoires, anticancéreux, hépatoprotecteur et antidiabétiques. Selon Cai et al.<sup>(206)</sup>, la C-glycosylation de l'apigénine améliore la capacité d'élimination des radicaux libres, surpassant de 2,51 fois celle des O-glycosides et de l'aglycone. L'analyse de la BDE de la vicenine-2 (di-C-glycosides) révèle clairement que l'espèce radicalaire 7-OH est le site le plus probable pour la puissante activité antioxydante, suivi de 4'-OH et 5-OH. C'est à cause de la présence du groupe 7-OH entre les deux unités glycosidiques aux positions C6 et C8 du cycle A qui augmente la charge négative sur l'atome O du groupe OH et par conséquent, ce qui facilite davantage le transfert de l'atome H <sup>(209)</sup>.

## **II. Résultats de l'évaluation des activités biologiques de l'espèce *D. virgatus***

### **1. Test de piégeage du radical libre DPPH**

Le radical libre DPPH a été utilisé pour estimer l'activité antioxydante. Ce radical synthétique, de couleur violette, vire vers le jaune quand il est capturé par l'huile essentielle (HE). Ce virage de couleur est accompagné par une diminution de l'absorbance (A) qui peut s'exprimer par le pourcentage d'inhibition de DPPH. Conventionnellement, une grande capacité de piégeage des radicaux libres est associée à une activité antioxydante élevée. L'intensité de la couleur jaune reflète la capacité antiradicalaire de l'huile essentielle, laquelle dépend de la nature, de la concentration et de la puissance de composants phytochimiques. Le profil d'activité antiradicalaire de l'huile essentielle de *D. virgatus*, présenté sur la Figure 79, met en évidence un effet dose-dépendant entre l'inhibition du radical DPPH· et les différentes concentrations de l'HE.



**Figure 41** : Effet de piégeage du DPPH' de l'HE de *D. virgatus* (A) et du contrôle positif BHT (B)

Le test DPPH est généralement exprimé par la valeur  $IC_{50}$ . Plus la  $IC_{50}$  est petite, plus la molécule est considérée comme antioxydante. Les résultats obtenus montrent une activité antioxydante modérée, avec une  $IC_{50}$  de l'ordre de  $39,61 \text{ mg.ml}^{-1}$ , nettement supérieure à celle du BHT ( $IC_{50} = 0,046 \text{ mg.ml}^{-1}$ ), utilisé comme contrôle positif (Tableau 21).

**Tableau 21** : Effet anti-radicalaire de l'huile essentielle *D. virgatus*

Echantillon	$IC_{50} \text{ (mg.ml}^{-1}\text{)}^a$
	Essai du piégeage du radical DPPH
HE de <i>D. virgatus</i>	$39,61 \pm 1,15$
BHT <sup>b</sup>	$0,046 \pm 0,001$

<sup>a</sup> Concentration en antioxydant (HE) correspondant à 50% d'inhibition du DPPH

<sup>b</sup> Hydroxytoluènebutylé (BHT), un antioxydant synthétique utilisé comme contrôle positif.

Une étude précédente sur l'activité antioxydante de l'HE de *D. virgatus* tunisienne<sup>(129)</sup>, évaluée par le test DPPH, a montré une  $IC_{50}$  de  $6,23 \text{ mg ml}^{-1}$ , inférieure à celle trouvée dans la présente étude. Cela suggère que l'HE de *D. virgatus* tunisienne présente un effet antioxydant plus prononcé. Cette observation pourrait s'expliquer par la présence prédominante de composés d'hydrocarbures sesquiterpéniques (25,0 %) et de sesquiterpènes

oxygénés (20,1 %) [1]. En général, l'activité antioxydante des huiles essentielles pourrait être attribuée à la présence de composés phénoliques et aux alcools, tels que les mono- et les sesquiterpènes<sup>(141)</sup>. L'HE de *D. virgatus* comporte 4,1 % de monoterpènes oxygénés, cette composante pourrait contribuer à son activité observée. En outre, un effet synergique entre les différents composants de l'huile essentielle ne peut être exclu.

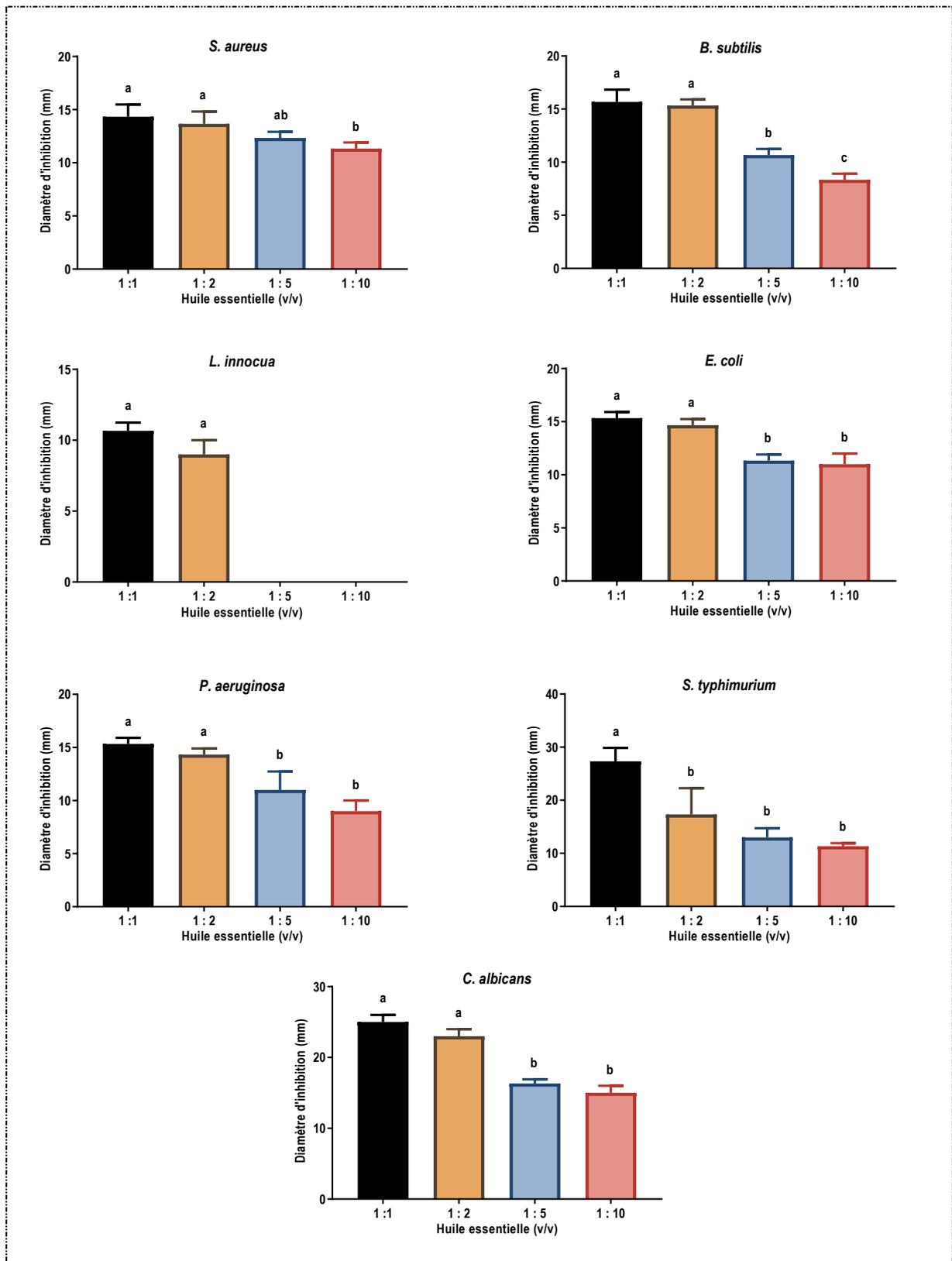
## 2. Activité antimicrobienne

Les résultats sont résumés dans le tableau 22 et la figure 80, illustrant un gradient de sensibilité des souches bactériennes et levuriennes en fonction des concentrations d'huile essentielle. La souche est qualifiée de sensible lorsque la zone d'inhibition est supérieure ou égale à 15 mm, limitée si elle est inférieure à 15 mm, et résistante en l'absence de toute zone d'inhibition. L'inhibition a été induite pour toutes les concentrations d'HE, sauf pour la bactérie *L. innocua*, qui a montré une résistance aux dilutions 1:5 et 1:10 (v/v). Aucun effet antibactérien n'a été observé au-delà d'une concentration de 1:2 (v/v) pour l'HE de *Daucus virgatus* contre *L. innocua*. Le diamètre d'inhibition de toutes les souches microbiennes testées était significativement dépendant des concentrations d'HE de *D. virgatus*, avec une signification extrêmement élevée au niveau de  $P < 0,001$  pour *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* et *C. albicans*,  $P < 0,01$  pour *S. typhimurium* et  $P < 0,05$  pour *S. aureus*. À des dilutions de 1:5 et 1:10 (v/v), une diminution significative du diamètre d'inhibition a été observée pour toutes les souches microbiennes. Cependant, l'effet inhibiteur de l'HE de *D. virgatus* aux concentrations 1:2, 1:1 (v/v) était statistiquement similaire contre toutes les souches microbiennes, à l'exception de *S. typhimurium*. Le meilleur effet antimicrobien a été observé contre *S. typhimurium* avec l'huile essentielle pure, équivalant à 27,33 mm, tandis que la concentration 1:2 (v/v) a montré un effet sensiblement différent sur la zone de diamètre d'inhibition par rapport à la concentration 1:1. La souche fongique *C. albicans* s'est révélée la plus sensible à toutes les concentrations d'HE, avec une zone d'inhibition variant de 25 à 15 mm. En outre, des diamètres d'inhibitions similaires ont été observés aux dilutions 1:2 et 1:1 (v/v) contre *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* et *P. aeruginosa*, allant de 13,66 à 15,66 mm.

**Tableau 22** : Activité antimicrobienne de l'HE de *D. virgatus* contre les souches microbiennes testées

Souches microbiennes	Concentrations HE (v/v)				Control *
	1 :1	1 :2	1 :5	1 :10	
<i>S. aureus</i>	14,33±1,15 a	13,67±1,15 ab	12,33±0,58 ab	11,33±0,5 b	30±0,0
<i>B. subtilis</i>	15,67±1,15 a	15,33±0,58 a	10,67±0,58 b	8,33±0,58 c	35±0,0
<i>L. innocua</i>	10,67±0,58 a	9±1,0 a	-	-	30±0,0
<i>E. coli</i>	15,33±0,58 a	14,67±0,58 a	11,33± 0,58 b	11±1,0 b	28±0,0
<i>P. aeruginosa</i>	15,33±0,58 a	14,33±0,58 a	11±1,73 b	9±1,0 b	27±0,0
<i>S. typhimurium</i>	27,33±2,52 a	17,33±4,93 b	13±1,73 b	11,33±0,58 b	38±0,0
<i>C. albicans</i>	25±1,0 a	23±1,0 a	16,33 ± 0,58 b	15±1,0 b	30±0,0

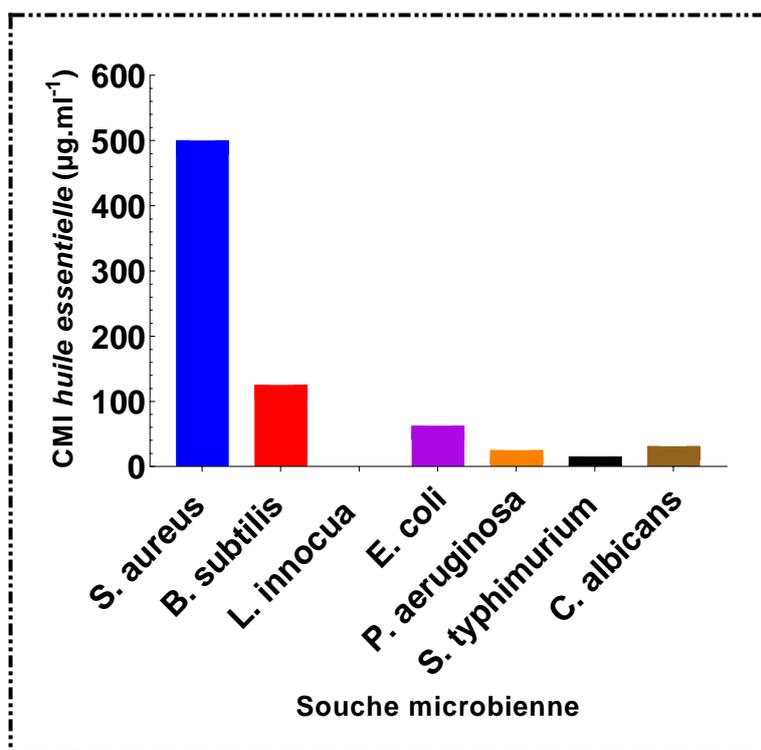
Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart-type. Pour chaque souche microbienne, les moyennes des diamètres d'inhibition (mm) sur une même ligne, sans lettre commune en exposant, indiquent une différence significative à  $p < 0,05$  (tests de Tukey).



**Figure 42 :** Comparaison des diamètres d'inhibition de l'huile essentielle de *D. virgatus*

En utilisant la méthode de macrodilution, les valeurs les plus faibles de la concentration minimale inhibitrice (CMI), variant entre 15,63, 25,0 et 31,25  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , ont été observées

contre les bactéries Gram-négative *S. typhimurium*, *P. aeruginosa* et la souche fongique *C. albicans*, respectivement. Ainsi, l'HE de *D. virgatus* a révélé des valeurs de CMI modérées contre *E. coli* (62,5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). Cependant, les bactéries à Gram-positives *S. aureus* et *B. subtilis* ont présenté les valeurs de CMI les plus élevée (500 et 125  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ). Aucune CMI n'a été obtenue pour *L. innocua* (Figure 81).



**Figure 43 :** CMI de HE de *D. virgatus* obtenus contre toutes les souches microbiennes

Hajji *et al.* <sup>(212)</sup> ont démontré que la présence de monoterpènes oxygénés, des hydrocarbures monoterpéniques et des aldéhydes dans les HEs leur confère la capacité d'inhiber le processus de la respiration, la circulation des ions, et par conséquent, la destruction de la cellule bactérienne. De cet effet, l'activité de l'huile essentielle *D. virgatus* pourrait être attribuée à la présence de  $\beta$ -pinène et  $\alpha$ -pinène (77,9 et 7,6 % respectivement) comme composants majoritaires, reconnus pour leur activité antimicrobienne significative. Il est également probable que cette activité ne soit pas uniquement due à l'action des composants majoritaires seuls, mais aussi à l'effet synergique ou antagoniste des composants majeurs et mineurs, qui doivent être pris en considération dans l'inhibition des microorganismes. Il est aussi reconnu que les souches bactériennes ne présentent pas toutes la même sensibilité face à un agent antibactérien, et au sein d'une population bactérienne, il peut exister des différences individuelles de sensibilité. Ainsi l'action antibactérienne peut parfois être partielle, et après

une diminution du nombre de bactéries, il peut y avoir une reprise de la croissance bactérienne. L'inactivité des souches microbiennes testées peut être dû, d'une part, à l'effet antagoniste de quelques composés présents dans les huiles essentielles, et d'autre part, à la faible concentration de l'huile essentielle utilisée <sup>(210)</sup>. Enfin, il est à noter que le diamètre d'inhibition n'est pas une mesure directe de l'activité antimicrobienne des HEs, car les différents constituants ne diffusent pas tous de la même manière dans le milieu gélosé.

Staniszewska et al <sup>(120)</sup> ont observé une forte activité de l'huile essentielle de *D. carota* subsp. *sativus* sur les bactéries à gram-positives, telles que *B. subtilis* et *S. aureus*. Glisic et al<sup>(133)</sup> ont également démontré l'activité de HE de *D. carota* L. sur des souches Gram-négatives, telles que *E. coli* et *S. typhimurium*. El Kolli et ses collaborateurs<sup>(123)</sup> ont rapporté des zones d'inhibition similaires à nos résultats obtenus contre *S. aureus* et *C. albicans*. En revanche, Snene et al.<sup>(129)</sup> ont trouvé une faible activité antimicrobienne pour l'HE de *D. virgatus* (Tunisie), n'affectant pas *S. aureus* et *E. coli*, mais montrant un meilleur effet antimicrobien contre *C. albicans*<sup>(131)</sup>. Cependant, ces résultats demeurent inférieurs aux nôtres, révélant un effet antifongique élevé contre *C. albicans* (25 mm), probablement lié à sa composition chimique, notamment les pourcentages élevés de  $\beta$ - et  $\alpha$ -pinène (77,9 et 7,6 %, respectivement). Ces composés volatils agissent en inhibant la pompe à protons ainsi que le transport de  $K^+$ , la respiration mitochondriale et contribuent à l'amélioration de la fluidité des membranes<sup>(141)</sup>. Ainsi, ils perturbent la structure de la membrane et inhibent la biosynthèse de l'ergostérol chez les espèces de *Candida*<sup>(140)</sup>. En général, les composés phytochimiques exercent un effet antibactérien considérable sur les souches Gram-positives et Gram-négatives.

L'administration de  $\beta$ -pinène pur a montré une activité antimicrobienne modérée, bien qu'elle se soit révélée inefficace sur les *Pseudomonas spp.* Cependant, lorsqu'il est associé à l' $\alpha$ -pinène, ses propriétés antifongiques sont renforcées. Une étude a montré que de fortes doses de  $\beta$ -pinène peuvent causer un dysfonctionnement mitochondrial chez les levures et endommager la fonctionnalité de la membrane plasmique. En outre, les  $\alpha$ - et  $\beta$ -pinènes ont démontré leur efficacité contre les levures, en particulier *C. albicans*, probablement en raison d'une synergie entre les deux composés. Une étude menée sur les énantiomères des deux isomères du pinène ont révélé que seuls les énantiomères positifs (+)- $\beta$ -pinène et (+)- $\alpha$ -pinène ont pu exercer un effet inhibiteur contre *C. albicans*, tandis que les énantiomères négatifs n'ont pas présenté d'effet antifongique <sup>(73)</sup>. De manière significative, l'énantiomère (+)- $\beta$ -pinène a également réduit l'adhésion au biofilm de *Candida spp.* <sup>(52)</sup>. Par ailleurs,  $\beta$ -pinène et  $\alpha$ -pinène ont considérablement inhibé la croissance et la viabilité de l'endocardite

infectieuse causés par des souches bactériennes de *S. aureus*. Un taux élevé de pinènes confère aux huiles essentielles une grande efficacité contre les bactéries et champignons pathogènes en présentant des effets bactéricides ou bactériostatiques <sup>(51)</sup>. La recherche réalisée par Bakkali et al. <sup>(38)</sup> montre que les HEs agissent généralement sur les bactéries par un mécanisme d'action bactériostatique que bactéricide, ce qui ralentirait probablement leurs processus métaboliques. Contrairement à la plupart des antibiotiques, les huiles essentielles peuvent accéder au périplasma bactérien à travers les porines protéiques de la membrane externe, grâce à l'hydrophobicité de ces substances. Il a été également souligné que la rupture membranaire et la rupture de la force ionique font partie des mécanismes impliqués dans les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles <sup>(25)</sup>.

### 3. Test d'Inhibition des enzymes cholinestérases

Le potentiel de l'HE de *D. virgatus* pour inhiber les enzymes cholinestérases (AChE et BuChE) a été évalué pour la première fois dans le cadre de la présente étude. L'HE a démontré un effet inhibiteur intéressant à la fois sur l'AChE et la BuChE, avec des valeurs de d'IC<sub>50</sub> de 0,3329 et 0,202 mg/ml respectivement. Il a été constaté que L'HE *D. virgatus* semble avoir un effet inhibiteur plus marqué sur la BuChE que sur l'AChE (Tableau 23, Figure 82). Cependant, la galantamine, un médicament reconnu pour son puissant effet inhibiteur sur l'AChE, présente une IC<sub>50</sub> plus importante sur la BuChE que sur l'AChE (IC<sub>50</sub>= 0,015 et 0,025 mg/ml respectivement). La Galantamine, un alcaloïde naturel, est connue pour son efficacité à inhiber de manière significative les enzyme acétylcholinestérase et butyrylcholinestérase, toutes deux impliqués fortement dans la maladie d'Alzheimer <sup>(62)</sup>.

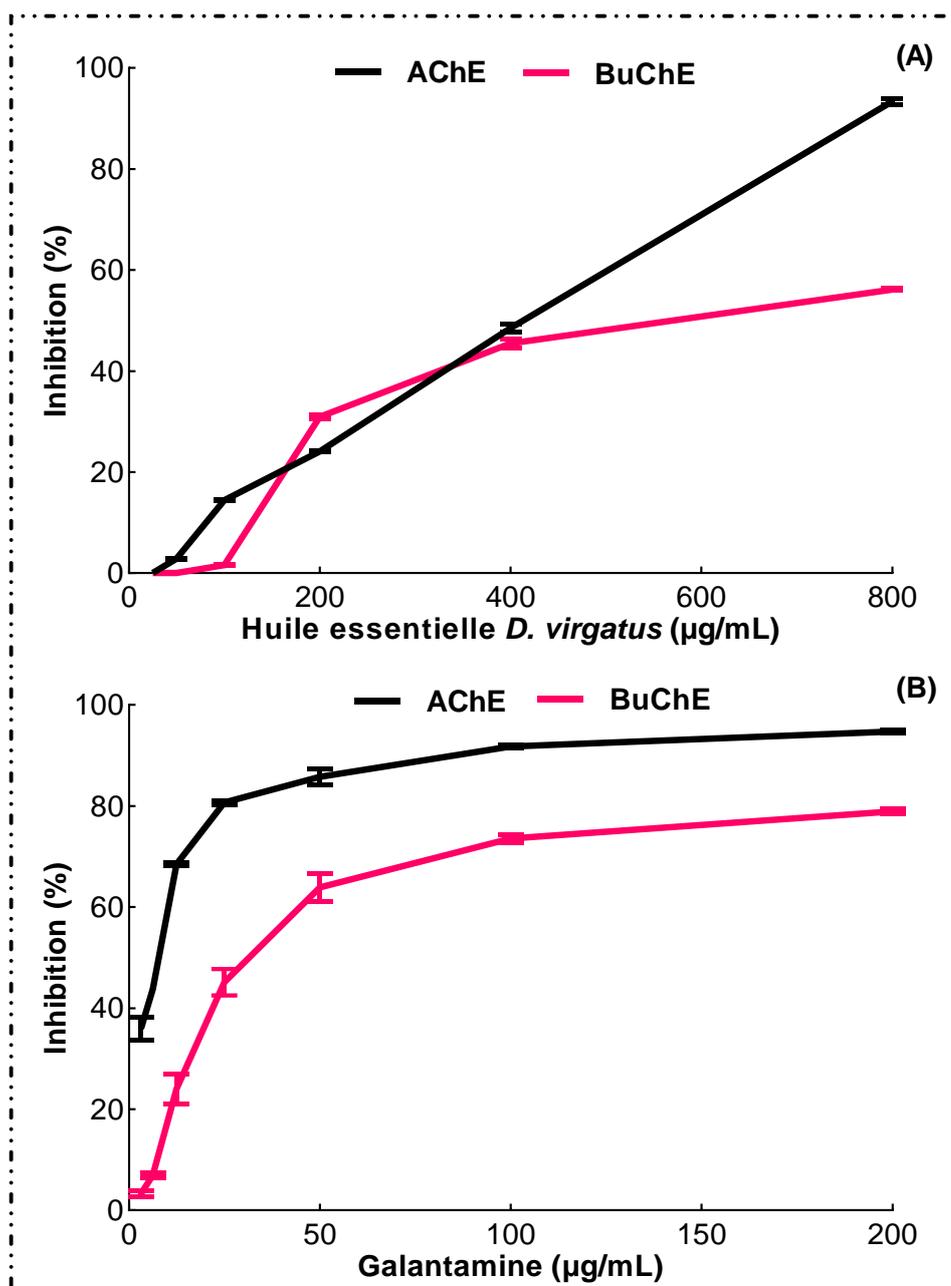
**Tableau 23:** Effet inhibiteur de l'HE *D. virgatus* sur les enzymes (AChE) et (BuChE)

Produits actifs	IC <sub>50</sub> (mg.ml <sup>-1</sup> )	
	Inhibition AChE <sup>a</sup>	Inhibition BuChE <sup>b</sup>
<i>D. virgatus</i> HE	0,329 ± 0,005	0,202 ± 0,003
Galanthamine <sup>c</sup>	0,015 ± 0,001	0,025 ± 0,002

<sup>a</sup> Concentration inhibitrice de 50% de l'enzyme acetylcholinesterase

<sup>b</sup> Concentration inhibitrice de 50% de l'enzyme butyrylcholinesterase

<sup>c</sup> Médicament standard utilisé comme contrôle positif



**Figure 44:** Profil de pourcentage d'inhibition des enzymes AChE et BuChE par HE de *D. virgatus* et galantamine.

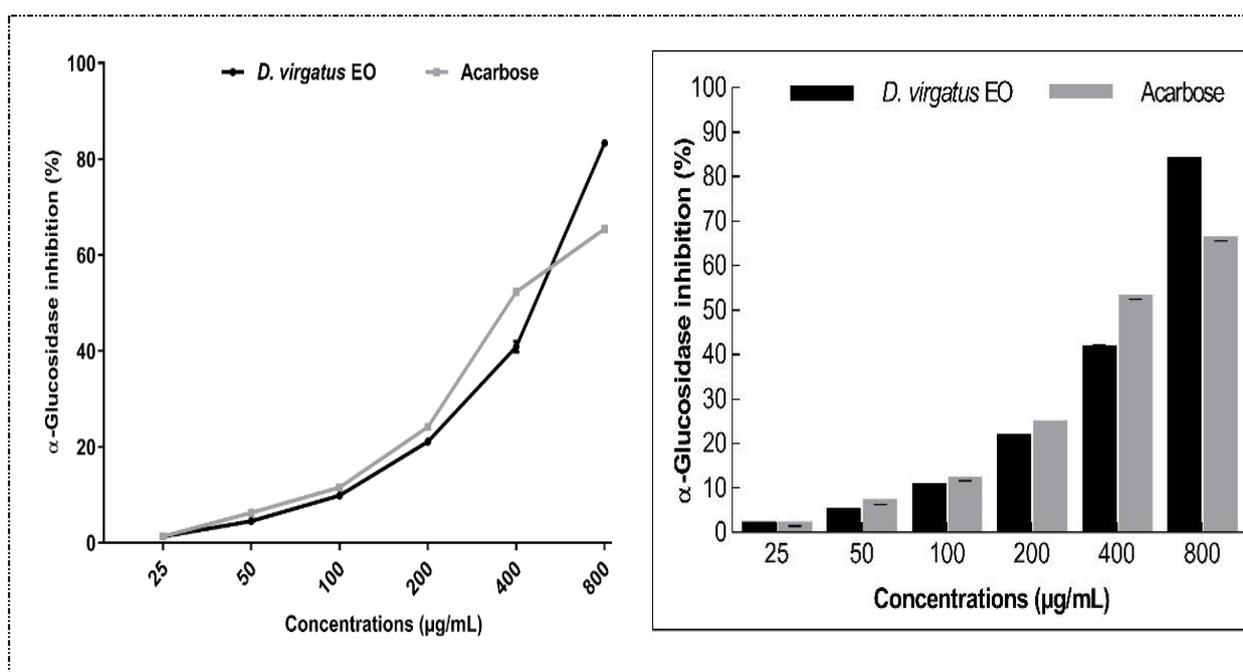
[Pour chaque concentration, (%) d'inhibition exprimée en moyenne  $\pm$  ET (n = 3).]

Des travaux antérieurs ont mis en évidence les propriétés inhibitrices de certains terpènes sur ces enzymes, parmi lesquels l' $\alpha$ -pinène se distingue comme étant le plus actif, avec une  $IC_{50}$  de 0.4 mM<sup>(59)</sup>. Il est intéressant de noter que l'HE de *D. virgatus* contient des pinènes parmi ses principaux constituants. Des études portant sur l'inhibition de HE de *Salvia lavandulifolia* sur l'AChE ont montré que les principaux terpènes de cette huile, à savoir 1,8-

cinéole, l' $\alpha$ -pinène et le camphre, sont responsables de ses propriétés inhibitrices<sup>(62)</sup>. De même, les principaux composés de l'HE d'*Artemisia annua*, tels que le limonène, le 8-cinéole, le bornéol, l' $\alpha$ -terpinéol, le camphre, l' $\alpha$ -pinène, le  $\beta$ -pinène, et l' $\alpha$ -caryophyllène, ont tous été identifiés comme étant responsables de cette activité. Dans une étude de corrélation structure-activité portant sur des composés bicycliques, les monoterpénoïdes contenant un groupe méthyle allyle ont été associés à une forte inhibition de l'AChE. Une confirmation supplémentaire sur la bonne activité inhibitrice de l' $\alpha$ -pinène a été rapportée par Miyazawa et al. <sup>(47)</sup>, qui ont démontré que les  $\alpha$ -pinènes agissent comme des substances actives contre l'AChE de manière non compétitive et réversible, suggérant qu'ils pourraient être bénéfiques dans le traitement des troubles cognitifs et des déficiences liées à la maladie d'Alzheimer <sup>(72)</sup>.

#### 4. Test d'inhibition de l' $\alpha$ -Glucosidase

Les profils de l'activité inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase présentés dans la figure 83, révèlent que l'huile essentielle de *D. virgatus* a un effet dose-réponse dépendant. L'enzyme a été fortement inhibée par l'HE, avec une valeur de IC<sub>50</sub> égale à 0.35 mg.ml<sup>-1</sup>, une valeur comparable à celle de l'acarbose (0.24 mg ml<sup>-1</sup>), comme le montre le tableau 24. L'acarbose agit en inhibant de manière compétitive l'hydrolyse des glucides en monosaccharides absorbables. Ce médicament retarde l'absorption des hydrates de carbone et entraîne une réduction du pic de glycémie postprandiale.



**Figure 45** : Profil de pourcentage d'inhibition de l'enzymes  $\alpha$ -glucosidase par l'HE de *D. virgatus* et acarbose

[Pour chaque concentration, l'inhibition de l' $\alpha$ -glucosidase (%) exprimée en moyenne  $\pm$  ET, n = 3.]

**Tableau 24** : Effet inhibiteur de l'HE de *D. virgatus* et Acarbose sur l'enzyme  $\alpha$ -glucosidase

Produits actifs	IC <sub>50</sub> (mg.ml <sup>-1</sup> )
	Inhibition de $\alpha$ -glucosidase <sup>a</sup>
<i>D. virgatus</i> HE	0,354 $\pm$ 0,005
Acarbose <sup>b</sup>	0,237 $\pm$ 0,001

<sup>a</sup> Concentration inhibitrice de 50% de l'enzyme  $\alpha$ -glucosidase

<sup>b</sup> Médicament standard utilisé comme controle positif

D'autres études antérieures confirment l'utilisation bénéfique des antihyperglycémiantes qui peuvent représenter une importante source de nouvelles molécules bioactives. Les travaux de Benalla et al. <sup>(48)</sup> sur l'inhibition de l' $\alpha$ -glucosidase ont porté sur des extraits bruts ou des composés naturels actifs isolés de plusieurs plantes médicinales. En effet, plusieurs familles de produits naturels ont présenté une forte activité inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase, tels que les alcaloïdes, les myoinositol, les polyphénols, les triterpènes, les acides organiques, les phytostérols et les flavonoïdes <sup>(48)</sup>. Cependant, aucune étude précédente n'a évalué l'effet de l'huile essentielle de *D. virgatus* sur l'inhibition de l' $\alpha$ -glucosidase. Les résultats observés sur l'effet inhibiteur de cette huile essentielle peuvent être attribués à sa teneur élevée en dérivés monoterpéniques, tels que les  $\alpha$ - et  $\beta$ -pinènes. De plus, une éventuelle synergie entre les substances mineures et le  $\beta$ -pinène a été mise en évidence et doit être prise en compte.

# **CONCLUSION GÉNÉRALE**

## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Le présent travail avait pour but de valoriser les connaissances de la flore Algérienne par l'étude phytochimique et la mise en évidence des propriétés pharmacologiques de deux plantes endémiques très peu étudiées : *Daucus virgatus* (Poir.) Maire et *Origanum flribundum* Munby. Une étude bibliographique réalisée sur ces espèces a montré que l'on ne disposait que de peu d'informations chimique et/ou biologique. Pour pallier à ce manque d'informations, l'objectif de cette étude s'est focalisée d'une part, sur une pratique phytochimique de l'espèce *O.flribundum* en vue d'isoler et d'identifier la composante en aglycones flavonoïdique et la compléter par une analyse qualitative LC.DAD.MS/MS des extraits étudiés afin d'établir l'ensemble des composés phénoliques présents dans cette espèce. Une analyse quantitative du contenu en flavonoïdes et polyphénols totaux des extraits étudiés a été réalisée et corrélée par des tests statistiques au pouvoir antioxydant effectué par différentes méthodes. D'autre part, l'étude réalisée sur l'espèce *D. virgatus* vise à contribuer à la valorisation de son huile essentielle, avec la détermination de sa composition chimique par analyse GC.MS et l'évaluations des activités antimicrobienne, antioxydante, antihyperglycémiant et anticholinestérases.

Afin de caractériser les flavonoïdes et autres composés phénoliques dans les extraits et dans le but de faire une élucidation structurale des molécules isolés de l'espèce *O.flribundum*, nous avons appliqué une méthodologie essentiellement basée sur la combinaison de différents modes d'extractions, des méthodes chromatographiques (CCM, CC, HPLC, LC.DAD.MS/MS) et de moyens spectroscopiques (UV-Visible, SM, RMN (<sup>1</sup>H,COSY,HSQC)).

Cinq flavonoïdes ont été isolés à partir de cette espèce, il s'agit principalement des flavone méthoxylés : Genkwanine (5,4'-diOH-7-OMe flavone), Ladanéine (5,6-di-OH-7,4'-di-OMe flavone ), Hispiduline (5,7,4'-tri hydroxy-6-OMethoxyflavone) , 5,6-di-OH-7,3',4'-tri- OMe flavone et la lutéoline (5,7,3',4' -tétra hydroxyflavone). Ces résultats concordent bien avec les données de la littérature et confirment l'association des lamiacées-aglycones de flavones méthoxylés.

Les résultats de l'analyse couplée par HPLC-DAD-APCI-MS/MS des trois extraits CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt et *n*-BuOH révèlent la présence de quinze produits dont 9 ont été identifié. Cinq flavonoïdes appartenant à des familles différentes: un di-C-hétéroside de flavone (vicenine-2 ), un aglycone de flavone prénylé ( Kanzonol E), deux aglycones de flavones

méthoxylées classiques la cirsimaritrine et la 5,6 – diOH –7,3',4'– triOMe flavone et enfin un aglycone flavanonol, le dihydrokaempferol ( Aromadendrine ) pas très détecté au sein des espèces de cette famille. En outre, quatre acides phénoliques ont été identifiés dans l'extrait AcOEt, il s'agit de la rhododendrine, acide rosmarinique, Méthyl Ester de l'acide rosmarinique et l'acide salvianolique C.

Les composés rhododendrine et la flavone prénylée Kanzonol E n'ont jamais été identifiés auparavant dans tout le genre *Origanum*, ce qui peut être considéré comme première citation pour ce genre. Il faut noter que les flavonoïdes prénylés sont connus pour leur large éventail d'activités biologiques telles que la cytotoxicité, l'inhibition de la tyrosinase et anti-inflammatoires. En outre, les composés rhododendrine sont dotés d'un fort pouvoir antidiabétique.

L'analyse quantitative du contenu en polyphénols et en flavonoïdes totaux a révélé une forte teneur en polyphénols enregistré pour les extraits les plus polaires, l'extrait acétate d'éthyle (446,5 µg EAG/mg extrait) suivi de l'extrait butanolique (340,6 µg EAG/mg extrait). Cependant, l'extrait dichlorométhane enregistre une teneur maximum de flavonoïdes (34,30 µg EQ/mg) similaire à celle trouvée avec l'extrait acétate d'éthyle-riches en flavones aglycone hydroxylé et méthoxylés.

L'évaluation de l'activité antioxydante réalisée par différentes méthodes sur les extraits testés présentent des activités antiradicalaire et antioxydante très intéressantes voire très puissante. Notons que l'extrait acétate d'éthyle révèle le pouvoir antioxydant le plus fort enregistré pour tous les tests réalisés à savoir : le piégeage du radical libre DPPH· (IC<sub>50</sub>= 5,68 µg/ml), le piégeage du radical cation ABTS<sup>·+</sup> (IC<sub>50</sub>= 5,04 µg/ml) ainsi que le pouvoir réducteur des ions ferriques (IC<sub>50</sub>= 8,22µg/ml) et la capacité antioxydante par réduction du cuivre (IC<sub>50</sub>= 6,43µg/ml). L'activité antioxydante élevée de cet extrait est dû probablement à sa richesse en acides phénoliques notamment l'acide salvianolique C et l'acide rosmarinique connus pour leurs fort pouvoir antioxydant, en outre, la lutéoline isolées de cet extrait lui confèrent des propriétés antioxydante très importante.

Les extraits testés ont présenté une activité antiradicalaire avec le radical cation ABTS<sup>·+</sup> meilleure que celle enregistrée avec le radical libre DPPH·. La capacité de réduction de fer la plus puissante est celle de l'extrait butanolique (A<sub>0,5</sub>= 4,50 µg/ml), plus importante que celle du BHA et l'acide ascorbique. Cependant, ces dernières sont similaires aux résultats obtenus avec les extraits dichlorométhane et acétate d'éthyle. Les résultats du test CUPRAC montrent que l'extrait d'acétate d'éthyle est le plus actif avec une A<sub>0,5</sub> de l'ordre de 6,43 µg/ml inférieur à celle enregistré avec le BHT, suivi par l'extrait dichloromethane avec une A<sub>0,5</sub> de

20,7µg/ml. Le pouvoir réducteur du cuivre de l'extrait butanolique est nettement inférieur comparé aux autres extraits et aux standards BHT et BHA.

Une corrélation positive entre l'activité antioxydante et la teneur en composés phénoliques totaux (TPC) et en flavonoïdes (TFC) a été établie pour les trois extraits. On déduit que les composés phénoliques et flavonoïdes sont responsables d'une partie importante de la capacité antioxydante de cette plante. D'où une relation linéaire a été établie, les extraits les plus riches en flavonoïdes étant les plus actifs. Par ailleurs, la force et la significativité de cette relation varient de manière très importante en fonction de la nature de l'extrait ainsi que la méthode d'évaluation du pouvoir antioxydant impliquée. On en déduit que l'activité antioxydante dépend non seulement de la concentration mais aussi de la structure des composés phénoliques et flavonoïdes présents dans ces extraits. Ainsi, la relation structure activité des flavonoïdes ont mis en évidence l'importance du nombre et de la localisation des groupement hydroxyle pour une activité efficace de piégeage des radicaux.

L'ensemble de ces résultats a permis d'évaluer les activités antioxydantes de l'espèce *Origanum floribundum* et a permis également de démontrer la richesse de cette plante en flavonoïdes et acides phénoliques potentiellement intéressantes dans le domaine thérapeutique et qu'il serait donc intéressant de valoriser en industrie pharmaceutique. Pour plus d'efficacité, de nombreuses perspectives peuvent être envisagées :

- ✓ Elargir le panel des activités antioxydantes notamment *in vivo* et réaliser d'autres tests biologiques : antitumorale, anti-inflammatoire et antidiabétique.
- ✓ Poursuite des travaux sur les composés isolés afin d'identifier les molécules ayant le plus puissant pouvoirs anti-oxydant, une étude de Docking permettra de comprendre le mécanisme d'action afin de sélectionner le meilleur candidat potentiel offrant une alternative prometteuse aux antioxydants synthétiques.
- ✓ Renforcer les résultats en étudiant d'autres flavonoïdes appartenant à d'autres sous-classe suite aux travaux de fractionnement et purification de l'extrait butanolique.

L'analyse de la composition chimique de l'huile essentielle de l'espèce *Daucus virgatus* par GC/MS a révélé la présence de Vingt et un constituants représentant 98% de l'ensemble des composants identifiés. Cette analyse phytochimique a également mis en évidence la richesse de cette HE en monoterpène hydrocarbonés (92,5%). Le β-pinène (77.9 %) et l'α-pinène (7. 6%) sont les composants majoritaires de l'huile essentielle. L'ensemble des résultats obtenus suite aux activités biologiques de HE, nous amène à avancer les conclusions suivantes :

- ✓ Un fort pouvoir antimicrobien contre *S. typhimurium* et *C. albicans*, qui ont montré une sensibilité élevée, avec des zones d'inhibition variant entre 27,3 et 25 mm; les concentrations minimales inhibitrices étaient 15,63 et de 31,25  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ , respectivement.
- ✓ Effet modéré du piégeage du radical libre DPPH $\cdot$ , avec une valeur IC<sub>50</sub> de l'ordre de 39,61  $\text{mg.ml}^{-1}$ .
- ✓ Un effet inhibiteur puissant contre l'enzyme  $\alpha$ -glucosidase (IC<sub>50</sub> = 0,35  $\text{mg.ml}^{-1}$ ) comparé au contrôle positif Acarbose (IC<sub>50</sub>=0,24  $\text{mg.ml}^{-1}$ )
- ✓ Un effet considérable contre les enzymes cholinestérases, avec des valeurs IC<sub>50</sub> compris entre 0,33 et 0,20  $\text{mg.ml}^{-1}$  pour l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase, respectivement.

L'effet inhibiteur intéressant de l'huile essentielle de *Daucus virgatus* sur l' $\alpha$ -glucosidase et les enzymes cholinestérases évalués pour la première fois dans cette étude, révèle une application potentielle en tant qu'agent antihyperglycémiant et anti-Alzheimer. Ainsi, l'HE de *D. virgatus* pourrait être utilisée comme une source prometteuse de produits naturels ayant un potentiel antimicrobien. Il est également très utile d'étudier le mécanisme pharmacologique des composants bioactifs de l'huile essentielle de *Daucus virgatus* en utilisant des approches *in silico* et *in vivo*. Une étude de la toxicité de cette huile essentielle s'avère nécessaire, ce qui permettrait d'assurer son innocuité pour une utilisation à des fins thérapeutiques.

Ces travaux laissent entrevoir que les deux espèces étudiées offrent un ensemble important de composés bioactifs, qui forment la base de nombreux médicaments thérapeutiques. Ils présentent ainsi une source prometteuse de composés ayant un potentiel anti-oxydant, antimicrobien, anti-Alzheimer et antihyperglycémiant.

**LISTE DES  
RÉFÉRENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Jean B.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e ed.). Lavoisier; 2009.1289 p.
2. **Ortholand JY**, Ganesan A. Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. *Curr Opin Chem Biol.* 2004; 8(3):271-80.
3. **Tabuti JRS**, Lye KA, Dhillon SS. Traditional herbal drugs of Bulamogi, Uganda: plants, use and administration. *J Ethnopharmacol.* 2003; 88(1):19-44.
4. **Chukwuma CI**, Matsabisa MG, Ibrahim MA, et al. Medicinal plants with concomitant anti-diabetic and anti-hypertensive effects as potential sources of dual acting therapies against diabetes and hypertension: a review. *J Ethnopharmacol.* 2019; 235:329-360.
5. **Miranda TG**, Alves RJM, de Souza RF, Maia JGS, Figueiredo PLB, Tavares-Martins ACC. Volatile concentrate from the neotropical moss *Neckeropsis undulata* (Hedw.) Reichardt, existing in the brazilian Amazon. *BMC Chem.* 2021; 15(1):7.
6. **Santos NKA**, Coutinho HDM, Viana GSB, Rodrigues FFG, Costa JGM. Chemical characterization and synergistic antibiotic activity of volatile compounds from the essential oil of *Vanillosmopsis arborea*. *Med Chem Res.* 2011; 20(5):637-41.
7. **Yahi N**, Véla E, Benhouhou S, de Belair G, Gharzouli R. Identifying Important Plants Areas (Key Biodiversity Areas for Plants) in northern Algeria. *J Threat Taxa.* 2012; 4:2753-65.
8. **Bourlière F.** Quezel, P. et Santa, S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I. Editions du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris. *Rev DÉcologie Terre Vie.* 1962;16(4):459-459.
9. **Meghashri S**, Vijay Kumar H, Gopal S. Antioxidant properties of a novel flavonoid from leaves of *Leucas aspera*. *Food Chem.* 2010; 122 (1): 105-110.
10. **Miara MD**, Ait HM, Dahmani W, Negadi M, Djellaoui A. Nouvelles données sur la flore endémique du sous-secteur de l'Atlas tellien Oranais "O3" (Algérie occidentale). *Acta Bot Malacit.* 2018; 43:63-9.
11. **Gunnar S**, Lars B. *Drugs of Natural Origin: A Treatise of Pharmacognosy.* Taylor & Francis Group; 2010. 784 p.
12. **Urdang G.** The development of pharmacopoeias; a review with special reference to the pharmacopoea Internationalis. *Bull World Health Organ.* 1951; 4(4): 577-603.
13. **Gilani AH**, Rahman AU. Trends in ethnopharmacology. *J Ethnopharmacol.* 2005; 100(1-2):43-9.
14. **Wermuth CG.** *The Practice of Medicinal Chemistry.* Elsevier; 2003. 792 p.
15. **Foye W**, Lemke TL, Williams DA. *Foye's Principles of Medicinal Chemistry.* Seventh edition. Wolters Kluwer HealthAdis (ESP); 2012. 1500 p.
16. **Bruneton J**, Poupon E. *Pharmacognosie: Phytochimie, plantes médicinales.* 5e édition. Paris: Tec & Doc Lavoisier; 2016. 1487 p.
17. **Lewis WH.** *Plant Chemosystematics.* J. B. Harborne and B. L. Tumer. *Econ Bot.* 1985; 39(4):430-430.
18. **Bernard M.** *Plantes thérapeutiques: tradition, pratique officinale, science et thérapeutique.* Ed. Tec et Doc; 2003. 692 p.
19. **Schorderet M.** *Pharmacologie: des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques.* Frison-Roche; 1998; 1010 p.
20. **Chabrier JY.** *Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie.* These en Sciences pharmaceutiques. Université Henri Poincaré- Nancy 1; 2010.184p.
21. **LAZAR T.** Taiz, L. and Zeiger, E. *Plant physiology.* 3rd edn. *Ann Bot.* 2003; 91(6):750-1.
22. **DEWIK PM.** *Secondary Metabolism: The Building Blocks and Construction Mechanisms.* In: *Medicinal Natural Products .* John Wiley & Sons, Ltd; 2009. 7-38.
23. **Black HS.** Mechanisms of pro- and antioxidation. *J Nutr.* 2004;134(11):3169S-3170S.

24. **Guerraud M.** Réglementation des huiles essentielles, un besoin de sécurité. *Actual Pharm.* 2018; 57(580):21-5.
25. **Ntezurubanza L.** Les huiles essentielles du Rwanda. *LASEVE*, Québec, Canada 2000:248p.
26. **Pharmacopée Européenne:** Le maintenir des normes de qualité dans un environnement mondialisé et dynamique 9e Édition, 2016. [www.coe.int](http://www.coe.int).
27. **Liu LL**, Yan L, Chen YH, Zeng GH, Zhou Y, Chen HP, et al. A role for diallyl trisulfide in mitochondrial antioxidative stress contributes to its protective effects against vascular endothelial impairment. *Eur J Pharmacol.* 2014; 725:23-31.
28. **Buchbauer KHCB** Gerhard, éditeur. *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*, Second Edition. 2<sup>e</sup> éd. Boca Raton: CRC Press; 2015. 1128 p.
29. **Lawrence BM.** A preliminary report on the world production of some selected essential oils and countries. *Perfum Amp Flavorist.* 2009; 34(1):38-44.
30. **Baudino S**, Caissard JC, Bergougnoux V, Jullien F, Magnard JL, Scalliet G, et al. Production and Emission of Volatile Compounds by Petal Cells. *Plant Signal Behav.* 2007;2(6):525-6.
31. **Gurib-Fakim A.** Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med.* 2006; 27(1):1-93.
32. **Werdin** González JO, Gutiérrez MM, Ferrero AA, Fernández Band B. Essential oils nanofomulations for stored-product pest control - characterization and biological properties. *Chemosphere.* 2014;100:130-8.
33. **Chemat F**, Vian MA, Cravotto G. Green extraction of natural products: concept and principles. *Int J Mol Sci.* 2012; 13(7):8615-27.
34. **Périno-Issartier S**, Ginies C, Cravotto G, Chemat F. A comparison of essential oils obtained from lavandin via different extraction processes: Ultrasound, microwave, turbohydrodistillation, steam and hydrodistillation. *J Chromatogr A.* 2013; 1305:41-7.
35. **Wang Zj**, Song H, Pang H, Ning Y, Dao TD, Wang Z, et al. Photo-assisted methanol synthesis via CO<sub>2</sub> reduction under ambient pressure over plasmonic Cu/ZnO catalysts. *Appl Catal B Environ.* 2019; 250:10-6.
36. **Norme ISO 4720:2002.** Huiles Essentielles-Nomenclature. Disponible sur:<https://www.iso.org/fr/stand/4720.html>
37. **AFNOR.** Huiles essentielles. Echantillonnage et méthodes d'analyse (Tome 1) – Monographies relatives aux huiles essentielles (Tome 2. Volumes 1 et 2); 2000.
38. **Bakkali F**, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils--a review. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc.* 2008; 46(2):446-75.
39. **Khia A**, Ghanmi M, Satrani B, Aafi A, Aberchane M, Quaboul B, et al. Effet de la provenance sur la qualité chimique et microbiologique des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis L.* du Maroc. *Phytothérapie.* 2014;12(6):341-7.
40. **Gupta PD**, Birdi TJ. Development of botanicals to combat antibiotic resistance. *J Ayurveda Integr Med.* 2017;8(4):266-75.
41. **Sun W**, Shahrajabian MH. Therapeutic Potential of Phenolic Compounds in Medicinal Plants—Natural Health Products for Human Health. *Molecules.* 2023; 28(4):1845.
42. **Couic-Marinier F.** Les huiles essentielles en pratique, administration et précautions d'emploi. *Actual Pharm.* 2018; 57(580):26-9.
43. **Safari DS**, Moghaddam M, Chalajour H. Essential oil composition of four *Ocimum* species and varieties growing in Iran. *J Essent Oil Res.* 2014; 26(4):315-21.
44. **Pessôa MG**, Vespermann KAC, Paulino BN, Barcelos MCS, Pastore GM, Molina G. Newly isolated microorganisms with potential application in biotechnology. *Biotechnol Adv.* 2019; 37(2):319-39.

- 45. Paduch R**, Kandefér-Szerszeń M, Trytek M, Fiedurek J. Terpenes: substances useful in human healthcare. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2007; 55(5):315-27.
- 46. Franchomme P**, Jollois R, Pénéol D. L'aromathérapie exactement : encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles : fondements, démonstration, illustration et applications d'une science médicale naturelle. R. Jollois; 1990. 490 p.
- 47. Baudoux D**. Aromathérapie- huiles essentielles. 2e éd. Dunod; 2020. 535 p.
- 48. Benalla W**, Bellahcen S, Bnouham M. Antidiabetic medicinal plants as a source of alpha glucosidase inhibitors. *Curr Diabetes Rev*. 2010; 6(4):247-254.
- 49. Zuzarte M**, Salgueiro L. Essential Oils Chemistry. In: de Sousa DP, éditeur. *Bioactive Essential Oils and Cancer*; 2015; 19-61.
- 50. Guerriaud M**. Réglementation des huiles essentielles, un besoin de sécurité. *Actual Pharm*. 2018; 57(580):21-5.
- 51. Edris AE**. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytother Res PTR*. 2007; 21(4):308-23.
- 52. Porres-Martínez M**, González-Burgos E, Carretero ME, Gómez-Serranillos MP. In vitro neuroprotective potential of the monoterpenes  $\alpha$ -pinene and 1,8-cineole against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in PC12 cells. *Z Naturforschung C J Biosci*. 2016; 71(7-8):191-9.
- 53. Salehi B**, Upadhyay S, Erdogan Orhan I, Kumar Jugran A, L.D. Jayaweera S, A. Dias D, et al. Therapeutic Potential of  $\alpha$ - and  $\beta$ -Pinene: A Miracle Gift of Nature. *Biomolecules*. 2019; 9(11):738.
- 54. Kovač J**, Šimunović K, Wu Z, Klančnik A, Bucar F, Zhang Q, et al. Antibiotic Resistance Modulation and Modes of Action of (-)- $\alpha$ -Pinene in *Campylobacter jejuni*. *PLoS ONE*. 2015; 10(4):e0122871.
- 55. Tajkarimi M**, Ibrahim S, Cliver DO. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*. 2010; 21:1199-218.
- 56. Fernández S**, Wasowski C, Paladini AC, Marder M. Sedative and sleep-enhancing properties of linarin, a flavonoid-isolated from *Valeriana officinalis*. *Pharmacol Biochem Behav*. 2004; 77(2):399-404.
- 57. Agati G**, Azzarello E, Pollastri S, Tattini M. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Sci Int J Exp Plant Biol*. 2012; 196:67-76.
- 58. Leopoldini M**, Russo N, Chiodo S, Toscano M. Iron chelation by the powerful antioxidant flavonoid quercetin. *J Agric Food Chem*. 2006; 54(17):6343-51
- 59. Sharma VK**, Rajak AK, Chauhan NS, Lodhi S, Dixit VK. Review: A Rare Medicinal Herb *Zizyphus xylopyrus* (Retz.) Willd. *Pharmacogn J*. 2011; 3(22):18-23.
- 60. Kumar S**, Pandey AK. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Sci World J*. 2013; 2013:e162750.
- 61. Dharsono HDA**, Putri SA, Kumia D, Dudi D, Satari MH. *Ocimum* Species: A Review on Chemical Constituents and Antibacterial Activity. *Molecules*. 2022; 27(19):6350.
- 62. Laib I**, Barkat M. Optimization of Conditions for Extraction of Polyphenols and the Determination of the Impact of Cooking on Total Polyphenolic, Antioxidant, and Anticholinesterase Activities of Potato. *Foods*. 2018; 7(3):36.
- 63. Harborne JB**. *The Flavonoids Advances in Research Since 1986*. New York: Routledge; 2017. 676 p.
- 64. Wang H**, Zhou G, Gao X, Wang Y. and Yao W. Acetylcholinesterase inhibitory-active components of *Rhodiola rosea* L. *Food Chemistry*. 2007; 105: 24-27.
- 65. Ballard CG**. Advances in the treatment of Alzheimer's disease: benefits of dual cholinesterase inhibition. *European neurology*. 2002; 47: 64-70.
- 66. Markham KR**. 6 - Flavomabrynes, Flavonols and their Glycosides. In: Harborne JB, éditeur. *Methods in Plant Biochemistry* . Academic Press. 1989; 197-235.

- 67. Venturini N.** Contribution chimique a la définition de la qualité: exemples des spiritueux de myrte (*myrtus communis* L.) et de cedrat (*citrus medica* L.) de corse. Thèse de Doctorat en chimie organique, université pascal paoli, 2012. 253 p.
- 68. Lamy S, Lafleur R, Bédard V, Moghrabi A, Barrette S, Gingras D, et al.** Anthocyanidins inhibit migration of glioblastoma cells: structure-activity relationship and involvement of the plasminolytic system. *J Cell Biochem.* 2007;100(1):100-11.
- 69. Burbulis IE, Winkel-Shirley B.** Interactions among enzymes of the Arabidopsis flavonoid biosynthetic pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96(22):12929-34.
- 70. Wasson AP, Pellerone FI, Mathesius U.** Silencing the flavonoid pathway in *Medicago truncatula* inhibits root nodule formation and prevents auxin transport regulation by rhizobia. *Plant Cell.* 2006;18(7):1617-29.
- 71. Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, Albus C, Brotons C, Catapano AL, et al.** European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice. *Eur Heart J.* 2016; 37(29):2315-81.
- 72. Bharatham K, Bharatham N, Park HK, Lee KW.** Binding mode analyses and pharmacophore model development for sulfonamide chalcone derivatives, a new class of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. *Journal of Molecular Graphics and Modelling.* 2008; 26:1202–1212.
- 73. Sobhi W, Khettal B, Belmouhoub M, Atmani D, Duez P, Benboubetra M.** Hepatotoxicity and Langerhans Islets Regenerative Effects of Polar and Neutral Lipids of *Nigella sativa* L. in Nicotinamide/streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Pteridines.* 2011; 22(1): 97-104.
- 74. Defraigne JO, Pincemail J.** Stress oxydant et antioxydants: mythes et réalités. *Rev Med Liège.* 2008; 63: 10-19.
- 75. Narayana K, Reddy M, Chaluvadi M, Devarakonda K.** Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian J Pharmacol.* 2001; 33, 2-16.
- 76. Amić D, Davidović-Amić D, Beslo D, Rastija V, Lucić B, Trinajstić N.** SAR and QSAR of the antioxidant activity of flavonoids. *Curr Med Chem.* 2007;14(7):827-45.
- 77. Shim JY, Doo HK, Ahn SY, Kim YS, Seong JK, Park IS, Min BH.** communication Inhibitory effect of aqueous extract from the gall of *Rhus chinensis* on alpha-glucosidase activity and postprandial blood glucose. *Journal of Ethnopharmacology.* 2003; 85: 283-287.
- 78. Liang N, Kitts DD.** Antioxidant property of coffee components: assessment of methods that define mechanisms of action. *Mol Basel Switz.* 19 nov 2014; 19(11):19180-208.
- 79. Alam MN, Bristi NJ, Rafiquzzaman M.** Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharm J SPJ Off Publ Saudi Pharm Soc.* avr 2013; 21(2):143-52.
- 80. Ioannou I, Chaaban H, Slimane M, Ghoul M.** Origin of the Variability of the Antioxidant Activity Determination of Food Material [Internet]. *Biotechnology. InTech;* 2015. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/60453>
- 81. Ungar Y, Osundahunsi OF, Shimoni E.** Thermal stability of genistein and daidzein and its effect on their antioxidant activity. *J Agric Food Chem.* 2003; 51(15):4394-9.
- 82. Foti MC, Daquino C, Geraci C.** Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH· radical in alcoholic solutions. *J Org Chem.* 2004; 69(7):2309-14.
- 83. Wenzel U, Kuntz S, Brendel MD, Daniel H.** Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Res.* 2000; 60(14):3823-31.
- 84. Nijveldt R, van Nood E, Hoom DEC, Boelens P, Norren K, Leeuwen PAM.** Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr.* 2001; 74:418-25.
- 85. Jacques D, Jean-Louis B, Dominique BR.** Radicaux libres et stress oxydant: Aspects biologiques et pathologiques. *Lavoisier;* 2007. 587 p.

- 86. Zaidi F**, Jay M. La diversité flavonique des Labiées algériennes: Teucrium, Salvia, Etude particulière des genres Mentha. Thèse de Doctorat en chimie organique, Université de Constantine, 2005. 165p.
- 87. Mabry TJ**, Markham KR, Thomas MB. The Systematic Identification of Flavonoids. Berlin, Heidelberg: Springer; 1970. 362 p.
- 88. Voirin B**, Saunois A, Bayet C. Biochem. Syst. Ecol. 1994; **22**:95.
- 89. Zingue S**, Njamen D, Tchoumtchoua J, Halabalaki M, Simpson E, Clyne C, et al. Effects of *Millettia macrophylla* (Fabaceae) extracts on estrogen target organs of female wistar rat. J Pharmacol Sci. 2013; **123**(2):120-31.
- 90. Rietjens IMCM**, Boersma MG, van der Woude H, Jeurissen SMF, Schutte ME, Alink GM. Flavonoids and alkenylbenzenes: mechanisms of mutagenic action and carcinogenic risk. Mutat Res. 2005 ; **574**(1-2):124-38.
- 91. Blaženović I**, Kind T, Ji J, Fiehn O. Software Tools and Approaches for Compound Identification of LC-MS/MS Data in Metabolomics. Metabolites. 2018; **8**(2):31.
- 92. Hufsky F**, Böcker S. Mining molecular structure databases: Identification of small molecules based on fragmentation mass spectrometry data. Mass Spectrom Rev. 2017; **36**(5):624-33.
- 93. Paul M**, Ippisch J, Hermann C, Guber S, Schultis W. Analysis of new designer drugs and common drugs of abuse in urine by a combined targeted and untargeted LC-HR-QTOFMS approach. Anal Bioanal Chem. 2014; **406**(18):4425-41.
- 94. Markham K R** et Geiger H. <sup>1</sup>HNMR spectroscopy of flavonoids and their glycosides, in hexadeuterodimethylsulfoxide. In the flavonoids, 1994, edited by Harborne, J. B. Chapman and Hall, London.
- 95. Mardal M**, Andreassen MF, Mollerup CB, Stockham P, Telving R, Thomaidis NS, et al. HighResNPS.com: An Online Crowd-Sourced HR-MS Database for Suspect and Non-targeted
- 96. Chase MW**, Reveal JL. A phylogenetic classification of the land plants to accompany APG III. Bot J Linn Soc. 2009;**161**(2):122-7. Screening of New Psychoactive Substances. J Anal Toxicol. 2019; **43**(7):520-7.
- 97. Ali A**, Bashmil YM, Cottrell JJ, Suleria HAR, Dunshea FR. LC-MS/MS-QTOF Screening and Identification of Phenolic Compounds from Australian Grown Herbs and Their Antioxidant Potential. Antioxidants. 2021; **10**(11):1770.
- 98. Samraoui B**, de Belair G. The Guerbes-Senhadja wetlands. Part I: An overview. Ecologie. 1997; **28**:233-50.
- 99. Ilbert H**, Hoxha V, Sahi L, Courivaud A, Claude Chailan. Le marché des plantes aromatiques et médicinales : analyse des tendances du marché mondial et des stratégies économiques en Albanie et en Algérie. CIHEAM; 2016. 226 p.
- 100. Benhouhou S.**, De Belair G., Gharzouli R., Véla E, Yahi N. (2010). Zones importantes pour les plantes en Méditerranée méridionale et orientale. Sites priorities pour la conservation. UICN, p 27 -30.
- 101. Quezel, P.** et Santa, S. — Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I, 1962. Editions du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris. Rev d'Écologie Terre Vie 1962;**16**:459–459.
- 102. Alam MN**, Bristi NJ, Rafiqzaman M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharm J*. 2013; **21**(2):143-152.
- 103. Anadón-Irizarry V**, Wege D, Upgren A, Young R, Boom B, León Y, et al. Sites for priority biodiversity conservation in the Caribbean Islands Biodiversity Hotspot. J Threat Taxa. 2012; **04**:2806-44.
- 104. Singletary K.** Oregano: Overview of the Literature on Health Benefits. *Nutr Today*. 2010;**45**:129-38.

- 105. Gutiérrez-Grijalva EP, Picos-Salas MA, Leyva-López N, Criollo-Mendoza MS, Vazquez-Olivo G, Heredia JB.** Flavonoids and Phenolic Acids from Oregano: Occurrence, Biological Activity and Health Benefits. *Plants (Basel)*. 2017;7(1):2.
- 106. Walter KS, Gillett HJ.** (1998). IUCN Red List of Threatened plants. Gland, Switzerland and Cambridge, UK. 1998.
- 107. Mouslim B, Nouel-Kheiter A.** Le Parc national du Djurdjura: Une biodiversité à mieux faire connaître. 2017; 307p.
- 108. Iibert H, Hoxha V, Sahi L, Courivaud A, Chailan C.** Le marché des plantes aromatiques et médicinales : analyse des tendances du marché mondial et des stratégies économiques en Albanie et en Algérie. Montpellier: CIHEAM-IAMM. 2016; 222 p.
- 109. Gray NE, Alcazar Magana A, Lak P, et al.** *Centella asiatica* - Phytochemistry and mechanisms of neuroprotection and cognitive enhancement. *Phytochem Rev*. 2018; 17(1):161-194.
- 110. Wang DD, Liang J, Yang WZ, et al.** HPLC/qTOF-MS-oriented characteristic components data set and chemometric analysis for the holistic quality control of complex TCM preparations: Niu Huang Shangqing pill as an example. *J Pharm Biomed Anal*. 2014;89:130-141.
- 111. Ashihara H, Crozier A.** Biosynthesis and Metabolism of Caffeine and Related Purine Alkaloids in Plants. 1999; 30:117-205.
- 112. Mouillot D, Bellwood DR, Baraloto C, Chave J, Galzin R, Harmelin-Vivien M, et al.** Rare Species Support Vulnerable Functions in High-Diversity Ecosystems. Mace GM, éditeur. *PLoS Biol*. 2013;11(5):e1001569.
- 113. Omar K, Elgamal I.** IUCN Red List and Species Distribution Models as tools for the conservation of poorly known species: a case study of endemic plants *Micromeria serbaliana* and *Veronica kaiseri* in South Sinai, Egypt. *Kew Bull*. 2021; 76(3):477-96.
- 114. Yang FL, Liang GW, Xu YJ, Lu YY, Zeng L.** Diatomaceous earth enhances the toxicity of garlic, *Allium sativum*, essential oil against stored-product pests. *J Stored Prod Res*. 2010;46(2):118-23.
- 115. Tavares AC, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Cruz MT, Lopes MC, Canhoto J, et al.** Essential oil of *Daucus carota* subsp. *halophilus*: Composition, antifungal activity and cytotoxicity. *J Ethnopharmacol*. 2008;119(1):129-34.
- 116. Mansour ES, Maatooq G, Khalil A, Marwan ES, Sallam A.** Essential Oil of *Daucus glaber* Forssk. *Z Für Naturforschung C J Biosci*. 2014;59:373-8.
- 117. Sirignano C, Snene A, Rigano D, Tapanelli S, Formisano C, Luciano P, et al.** Angeloylated Germacranolides from *Daucus virgatus* and Their Plasmodium Transmission Blocking Activity. *J Nat Prod*. 2017;80(10):2787-94.
- 118. Flamini G, Cosimi E, Cioni PL, Molfetta I, Braca A.** Essential-oil composition of *Daucus carota* ssp. *major* (Pastinocello Carrot) and nine different commercial varieties of *Daucus carota* ssp. *sativus* fruits. *Chem. Biodiv*. 2014;11(7):1022-1033.
- 119. Saad HEA, El-Sharkawy SH, Halim AF.** Essential oils of *Daucus carota* ssp. *maximus*. *Pharm Acta Helv*. 1995; 70(1):79-84.
- 120. Staniszewska M, Kula J.** Composition of the Essential Oil from Wild Carrot Umbels (*Daucus carota* L. ssp. *carota*) Growing in Poland. *J Essent Oil Res*. 2001;13(6):439-41.
- 121. Kula J, Izydorczyk K, Czajkowska A, Bonikowski R.** Chemical composition of carrot umbel oils from *Daucus carota* L. ssp. *sativus* cultivated in Poland. *Flavour Fragr J*. 2006; 21(4):667-669.
- 122. Mojab F, Hamed A, Nickavar B, Javidnia K.** Hydrodistilled Volatile Constituents of the Leaves of *Daucus carota* L. subsp. *sativus* (Hoffman.) Arcang. (Apiaceae) from Iran. *J Essent Oil Bear Plants*. 2008; 11(3):271-7.

- 123. El Kolli M**; Laouer H; El Kolli H; Akkal S; Sahli F. Chemical analysis, antimicrobial and anti-oxidative properties of *Daucus gracilis* essential oil and its mechanism of action. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2016; 6(1):8-15.
- 124. Tavares AC**, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Cruz MT, Lopes MC, Canhoto J, et al. Essential oil of *Daucus carota* subsp. *halophilus*: Composition, antifungal activity and cytotoxicity. *J Ethnopharmacol*. 2008;119(1):129-34.
- 125. Bendiabdellah A**, El Amine Dib M, Djabou N, Allali H, Tabti B, Muselli A, et al. Biological activities and volatile constituents of *Daucus muricatus* L. from Algeria. *Chem Cent J*. 2012; 6(1):48.
- 126. Flamini G**, Bader A, Cioni PL, Katbeh-Bader A, Morelli I. Composition of the Essential Oil of Leaves, Galls, and Ripe and Unripe Fruits of Jordanian *Pistacia palaestina* Boiss. *J Agric Food Chem*. 2004; 52(3):572-6.
- 127. Benyelles B**, Allali H, Dib MEA, Djabou N, Paolini J, Costa J. Chemical Composition Variability of Essential Oils of *Daucus gracilis* Steinh. from Algeria. *Chem Biodivers*. 2017;14(6):e1600490.
- 128. Lammamra M**, Laouer H, Amira S, Orhan I, Senol Deniz F, Demirci B, et al. Chemical Composition and Cholinesterase Inhibitory Activity of Different Parts of *Daucus aristidis* Coss. Essential Oils from Two Locations in Algeria. *Rec Nat Prod*. 2017; 11:147-56.
- 129. Snene A**, El Mokni R, Jmii, Jlassi H, Jaïdane I, Falconieri H, Piras D, Dhaouadi A, Porcedda H, Hammami S. *In vitro* antimicrobial, antioxidant and antiviral activities of the essential oil and various extracts of wild (*Daucus virgatus* (Poir.) Maire) from Tunisia. *Industrial Crops and Products*, 2017; 109:109-115.
- 130. AZI M**, Zaidi F, Sobhi W, Flamini G, Bouskout M, Laouer H, et al. Regular Article ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY RESEARCH Chemical Analysis, Antioxidant, Antimicrobial and Enzyme Inhibitory Effects of *Daucus Virgatus* (Poir.) Maire Essential oil from Algeria. 2021; 8:147-62.
- 131. Maxia A**, Marongiu B, Piras A, Porcedda S, Tuveri E, Gonçalves MJ, et al. Chemical characterization and biological activity of essential oils from *Daucus carota* L. subsp. *carota* growing wild on the Mediterranean coast and on the Atlantic coast. *Fitoterapia*. 2009; 80(1):57-61.
- 132. Marzouki H**, Khaldi A, Falconieri D, et al. Essential oils of *Daucus carota* subsp. *carota* of Tunisia obtained by supercritical carbon dioxide extraction. *Nat Prod Commun*. 2010; 5(12):1955-1958.
- 133. Rossi PG**, Bao L, Luciani A, Panighi J, Desjobert JM, Costa J, et al. (E)-Methylisoeugenol and Elemicin: Antibacterial Components of *Daucus carota* L. Essential Oil against *Campylobacter jejuni*. *J Agric Food Chem*. 2007;55(18):7332-6.
- 134. Gonny M**, Bradesi P, Casanova J. Identification of the components of the essential oil from wild Corsican *Daucus carota* L. using <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy. *Flavour Fragr J*. 2004;19(5):424-33.
- 135. Staniszevska M**, Kula J, Wiczorkiewicz M, Kusewicz D. Essential Oils of Wild and Cultivated Carrots-The Chemical Composition and Antimicrobial Activity. *J Essent Oil Res*. 2005; 17(5):579-83.
- 136. Chizzola R**. Composition of the Essential Oil from *Daucus carota* ssp. *carota* Growing Wild in Vienna. *J Essent Oil Bear Plants*. 2010; 13(1):12-9.
- 137. Góra J**, Lis A, Kula J, Staniszevska M, Wołoszyn A. Chemical composition variability of essential oils in the ontogenesis of some plants. *Flavour Fragr J*. 2002; 17(6):445-51.
- 138. González MD**, Lanzelotti PL, Luis CM. Chemical Fingerprinting by HPLC-DAD to Differentiate Certain Subspecies of *Origanum vulgare* L. *Food Anal Methods*. 2017;10(5):1460-8.
- 139. Ghasemzadeh A**, Ashkani S, Baghdadi A, Pazoki A, Jaafar HZE, Rahmat A. Improvement in Flavonoids and Phenolic Acids Production and Pharmaceutical Quality of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.) by Ultraviolet-B Irradiation. *Molecules*. 2016; 21(9):1203.

- 140. Houmani Z**, Azzoudj S, Naxakis G, Skoula M. The Essential Oil Composition of Algerian Zaatar: *Origanum* spp. and *Thymus* spp. *J Herbs Spices Med Plants*. 2002; 9(4):275-80.
- 141. Oussalah A**, Levy J, Berthezène C, Alpers DH, Guéant JL. Health outcomes associated with vegetarian diets: An umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Clin Nutr Edinb Scotl*. 2020; 39(11):3283-307.
- 142. Chatelain C**, Medjahdi B, Benhouhou SS. eFlore du Maghreb, une flore électronique basée sur la Nouvelle flore d'Algérie de P. Quézel et S. Santa / *Ecol Mediterr*. 2018; 44(2):131-6.
- 143. Liu J**, Li X, Lin J, et al. *Sarcandra glabra* (Caoshanhu) protects mesenchymal stem cells from oxidative stress: a bioevaluation and mechanistic chemistry. *BMC Complement Altern Med*. 2016; 16(1):423.
- 144. García-Pérez E**, Noratto GD, García-Lara S, Gutiérrez-Urbe JA, Mertens-Talcott SU. Micropropagation effect on the anti-carcinogenic activity of polyphenolics from Mexican oregano (*Poliomintha glabrescens* Gray) in human colon cancer cells HT-29. *Plant Foods Hum Nutr Dordr Neth*. 2013; 68(2):155-62.
- 145. Rebbas K**, Vela E, Gharzouli R, Djellouli Y, Alatou D, Gachet S. Caractérisation phytosociologique de la **végétation du parc national de Gouraya (Béjaïa, Algérie)**. *Rev DÉcologie Terre Vie*. 2011; 66(3):267-89.
- 146. Alam MA**, Subhan N, Hossain H, Hossain M, Reza HM, Rahman MM, et al. Hydroxycinnamic acid derivatives: a potential class of natural compounds for the management of lipid metabolism and obesity. *Nutr Metab*. 2016; 13(1):27.
- 147. Sahari M**, Berenji Ardestani S. Bio-antioxidants Activity: Their Mechanisms and Measurement Methods. *Appl Food Biotechnol*. 2014; 2(1): 3–8.
- 148. Kaliora AC**, Kogiannou DAA, Kefalas P, Papassideri IS, Kalogeropoulos N. Phenolic profiles and antioxidant and anticarcinogenic activities of Greek herbal infusions; balancing delight and chemoprevention. *Food Chem*. 2014; 142:233-41.
- 149. Tuttolomondo T**, Dugo G, Ruberto G, Leto C, Napoli EM, Cicero N, et al. Study of quantitative and qualitative variations in essential oils of Sicilian *Rosmarinus officinalis* L. *Nat Prod Res*. 2015; 29(20):1928-34.
- 150. Proestos C**, Komaitis M. Analysis of Naturally Occurring Phenolic Compounds in Aromatic Plants by RP-HPLC Coupled to Diode Array Detector (DAD) and GC-MS after Silylation. *Foods Basel Switz*. 2013; 2(1):90-9.
- 151. Koldaş S**, Demirtas I, Ozen T, Demirci MA, Behçet L. Phytochemical screening, anticancer and antioxidant activities of *Origanum vulgare* L. ssp. *viride* (Boiss.) Hayek, a plant of traditional usage. *J Sci Food Agric*. 2015; 95(4):786-98.
- 152. Nile SH**, Nile AS, Keum YS. Total phenolics, antioxidant, antitumor, and enzyme inhibitory activity of Indian medicinal and aromatic plants extracted with different extraction methods. *3 Biotech*. 2017; 7(1):76.
- 153. Kogiannou DAA**, Kalogeropoulos N, Kefalas P, Polissiou MG, Kaliora AC. Herbal infusions; their phenolic profile, antioxidant and anti-inflammatory effects in HT29 and PC3 cells. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc*. 2013; 61:152-9.
- 154. Kaki FA**, Benkiniouar R, Demirtas I, Merzoug A, Touil A. Phytochemical Study of Two Algerian Plants *Origanum vulgare* L. Sbsp. *glandulosum* (Desf) Ietswaart and *Thymus algeriensis* (Boiss. and Reut). *Asian J Chem*. 2019; 31(5):1105-9.
- 155. Kerbouche L**, Hazzit M, Ferhat M A, Baaliouamer A, Miguel GM. Biological Activities of Essential Oils and Ethanol Extracts of *Teucrium polium subsp. capitatum* (L.) Briq. and *Origanum floribundum* Munby. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2015; 18(5 ):1197-1208.

- 156. Hazzit M**, Baaliouamer A, Faleiro ML, Leonor FM, Miguel, MG. Composition of the Essential Oils of *Thymus* and *Origanum* Species from Algeria and Their Antioxidant and Antimicrobial Activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006; 54 (17):6314-6321.
- 157. Houmani Z**, Azzoudj S, Naxakis G, Skoula M. The Essential Oil Composition of Algerian Zaâtar: *Origanum* spp. and *Thymus* spp. *J. Herbs Spices Med. Plants*. 2002; 9(4): 275-280.
- 158. Hazzit M**, Baaliouamer A. Composition of the essential oils of the leaves and flowers of *Thymus pallescens* de Noé and *Origanum floribundum* Munby from Algeria. *J. Essent. Oil Res.* 2009; 21(3): 267-270.
- 159. Daoudi MF**, Hazzit M, Dahmani MM. Influence of morphological variability and habitat on the chemical composition of essential oils of an Algerian endemic *Origanum* species (*Origanum floribundum* Munby). *Chem. Biodivers.* 2016; 13: 1088-1094.
- 160. Başer KHC**, Kurkcuoğlu M, Askun T, Tumen G. Anti-tuberculosis Activity of *Daucus littoralis* Sibth. et Sm. (Apiaceae) From Turkey. *J Essent Oil Res.* 2009; 21(6):572-5.
- 161. Naima H** and Hazzit M. Analysis and Antioxidant Activity of Essential Oils and Methanol Extracts of *Origanum floribundum* Munby. *Journal of Essential Oil*. 2020; 23(1):85-96.
- 162. Ksouri R**, Megdiche W, Falleh H, Trabelsi N, Boulaaba M, Smaoui A, Abdelly C. Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. 2008; 331(11): 10-873.
- 163. Nasri M**, Zaouani M, Mimoune N, Hani F A, Mahdid M, Toumi M. Evaluation of antidiabetic activity of aqueous extract of *Origanum floribundum* Munby leaves in alloxan induced diabetic rats wistar. 2020; 93 (9141):102-106.
- 164. Skoula M**, Grayer R J, Kite GC, Veitch NC. Exudate flavones and flavanones in *Origanum* species and their interspecific variation. 2008; 36(8) : 646-654.
- 165. N'Guessan K**, Kadja B, Zirihi G, Traoré D, Aké-Assi L. Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences & Nature*. 2009; 6(1):1-15.
- 166. Andersen OM**, Markham KR. *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. CRC Press. 2005; 1256p.
- 167. Joulain D**, König WA. *The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons*, EB-Verlag, Hamburg, Germany, 1999.
- 168. Adams RP**. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, 4th ed. Allured Publishing Corporation. 2007; 804 p.
- 169. NIST** (National Institute of Standards and Technology). *WebBook de Chimie NIST [En ligne]*. « Programme de Données de Référence Standard ». URL:<http://webbook.nist.gov/chemistry>.
- 170. Singleton VL**, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidant substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 1999; 299,152 p.
- 171. Bahorun T**, Gressier B, Trotin F, Brunete C, Dine T, Vasseur J, Gazin JC, Pinkas M, Luycky M and Gazin M. Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from Hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. *Drug Research*. 1996; 1-6.
- 172. Blois MS**. Antioxidant determinations by the use of a stable Free Radical. *Nature*. 1958; 4617 (181): 1119-1200.
- 173. CLSI** (Clinical and Laboratory Standards Institute), *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard-ninth Edition*. Wayne, USA, 2012.
- 174. Apak R**, Guclu K, Ozyurek M, Karademir SE. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, Using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004; 52, 7970-7981.

- 175. Oyaizu M.** Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*. 1986 ; 44, 307-315.
- 176. Soković M, Marin PD, Griensven V.** Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of ten aromatic plants against human pathogenic bacteria. *Food*. 2007; 1(2): 220-226.
- 177. Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M.** Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*. 2007; 18(5) : 414-420.
- 178. Que S, Linchun M, Xin P.** Antioxidant activities of five Chinese rice wines and the involvement of phenolic compounds. *Food Res Int*. 2006; 39(5): 581-587.
- 179. Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, FEATHER-STONE RM.** A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*. 1961; 7:88-95.
- 180. Schäfer A, Högger P.** Oligomeric procyanidins of French maritime pine bark extract (Pycnogenol) effectively inhibit  $\alpha$ -glucosidase. *Diabetes. Res. Clin. Pract.* 2007; 77, 41-46.
- 181. Fukai T, Nishizawa J, Nomura T.** Five isoprenoid-substituted flavonoids from *Glycyrrhiza eurycarpa*. 1994; 35(2): 515-519.
- 182. Ye J-B, Ren G, Li W-Y, Zhong G-Y, Zhang M, Yuan J-B, Lu T.** Characterization and Identification of Prenylated Flavonoids from *Artocarpus heterophyllus* Lam. Roots by Quadrupole Time-Of-Flight and Linear Trap Quadrupole Orbitrap Mass Spectrometry. *Molecules*. 2019; 24(24):4591.
- 183. Matsuda H, Ishikado A, Nishida N, Ninomiya K, Fujiwara H, Kobayashi Y, Yoshikawa M.** Hepatoprotective, superoxide scavenging, and antioxidative activities of aromatic constituents from the bark of *Betula platyphylla* var. *japonica*. 1998; 8(21) :2939-2944.
- 184. Fuchino H, Konishi S, Satoh T, Yagi A, Saito K, Tatsumi T, Tanaka N.** Chemical Evaluation of *Betula* Species in Japan. II. Constituents of *Betula platyphylla* var. *japonica*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 1996; 44(5) :1033-1038.
- 185. Hefeng P, Lennart N, Lundgren.** Rhododendrol glycosides and phenyl glucoside esters from inner bark of *Betula pubescens*. 1994; 36(1):79-83.
- 186. Jin HZ, Chen G, Li XF, et al.** Flavonoids from *Rhododendron decorum*. *Chem Nat Compd*. 2009; 45 :85-86.
- 187. Choi JS, Young HS, Park JC, et al.** Further study on the constituents of *Rhododendron brachycarpum*. *Arch. Pharm. Res*. 1987; 10 :169-172.
- 188. Taamalli A, Arráez-Román D, Abaza L, Iswaldi I, Fernández-GutiérrezA, Zarrouk M, Segura-Carretero A.** LC-MS-based metabolite profiling of methanolic extracts from the medicinal and aromatic species *Mentha pulegium* and *Origanum majorana*. *Phytochem. Anal*. 2015; 26 : 320–330.
- 189. Li Y, Hong J, Li H, Qi X, Guo Y, Han M, Wang X.** Genkwanin nanosuspensions: a novel and potential antitumor drug in breast carcinoma therapy. *Drug Deliv*. 2017; 24(1):1491-1500.
- 190. Vekari SA, Oreopoulou V, Tzia C, Thomopoulos CD.** Oregano flavonoids as lipid antioxidants. *J Am Oil Chem Soc*. 1993; 70: 483-487.
- 191. Yinrong Lu, Foo LY.** Polyphenolics of *Salvia*-a review- 2002; 59(2):117–140.
- 192. Skaltsa H, Tzakou O, Singh M.** Note Polyphenols of *Ocimum sanctum* from Suriname, *Pharmaceutical Biology*. 1999; 37:1, 92-94.
- 193. Kurkin VA, Lamrini M.** Flavonoids of *Lavandula spica* flowers. *Chem Nat Compd*. 2007; 43 :702–703.
- 194. Kawashty SA, Gamal El-Din EM, Saleh NAM.** The flavonoid chemosystematics of two *Teucrium* species from Southern Sinai, Egypt. 1999; 27(6):657-660.
- 195. Hakobyan A, Arabyan E, Kotsinyan A, Karalyan Z, Sahakyan H, Arakelov V, Nazaryan K, Ferreira F, Zakaryan H.** Inhibition of African swine fever virus infection by genkwanin. *Antiviral Res*. 2019;13(167):78-82.

- 196. Venkateswara** RG, Mukhopadhyay T, Annamalai T, Radhakrishnan N, Sahoo MR. Chemical constituents and biological studies of *Origanum vulgare* Linn. Pharmacognosy Res. 2011; 3(2) :143-5.
- 197. Wang** X, Song ZJ, He X, Zhang RQ, Zhang CF, Li F, Wang CZ, Yuan CS. Antitumor and immunomodulatory activity of genkwanin on colorectal cancer in the APC (Min/+) mice. Int Immunopharmacol. 2015; 29(2):701-707.
- 198. Remigius** C. Composition of the Essential Oil from *Daucus carota* ssp. *Carota* growing Wild in Vienna. journal of essential oil-bearing plants JEOP. 2010; 13 (1):12-19.
- 199. Mostafa** AA, Al-Askar AA, Almaary KS, Dawoud TM, Sholkamy EN, Bakri MM. Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. Saudi. J. Biol. Sci. 2018; 25(2):361-366.
- 200. Sahari** M, Berenji AS. Bio-antioxidants Activity: Their Mechanisms and Measurement Methods. Appl Food Biotechnol. 2014; 2(1):3-8.
- 201. Çakmak** YS, Aktumsek A, Duran A. Studies on antioxidant activity, volatile compound and fatty acid composition of different parts of Glycyrrhiza echinata L. EXCLI J. 2012; 11:178-187.
- 202. Miliauskas** G, Venskutonis PR, van Beek TA. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. 2004; 85(2):231-237.
- 203. Rahiman** S, Tantry BA, Kumar A. Variation of antioxidant activity and phenolic content of some common home remedies with storage time. Afr J Tradit Complement Altem Med. 2012; 10(1):124-127.
- 204. Mercier** B, Prost J, Prost M. The essential oil of turpentine and its major volatile fraction( $\alpha$ - and  $\beta$ -pinenes): A Review. Int J Occup Med Environ Health. 2009; 22(4):331-42.
- 205. Jian-Ming** Li, Peter HL, Qizhi Y, Changyi C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. 2010; 14(4): 840–860.
- 206. Islam** MN, Ishita IJ, Jung HA, Choi JS. Vicenin 2 isolated from Artemisia capillaris exhibited potent anti-glycation properties. Food Chem Toxicol. 2014; 69:55-62.
- 207. Pietta** PG. Flavonoids as antioxidants. J Nat Prod. 2000; 63(7):1035-1042.
- 208. Xie** H, Li X, Ren Z, et al. Antioxidant and Cytoprotective Effects of Tibetan Tea and Its Phenolic Components. Molecules. 2018; 23(2):179.
- 209. Lespade** L, Bercion S. Theoretical investigation of the effect of sugar substitution on the antioxidant properties of flavonoids. Free Radic Res. 2012; 46(3):346-358.
- 210. Calo** J R, Crandall PG, O'Bryan CA, Ricke SC. Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. Food Control, 2015; 54:111–119.

**LISTE  
DES  
ANNEXES**

**ANNEXE 1 : Données structurales résultant des déplacements en présence des réactifs**

réactifs	déplacement en (nm)		interprétation
	bande I	bande II	
MeOH	310 – 350 352-385 350 – 380	250 - 280 250 - 280 250 – 280	Flavones Flavonols (3-OH substitué) Flavonols (3-OH libre)
MeOH + NaOH	+40 à 60 (BI) avec stabilité d'intensité optique +50 à 60 (BI) avec diminution d'intensité Faible déplacement avec diminution d'intensité Apparition d'une 3eme bande entre BI et BII Absence de bande entre 320 - 335 Transformation de bande I en une inflexion  Décomposition lente		4' - OH 3 OH et 4' OR 4' - OR 7 - OH 7 - OR 5 - OH (Un seul hydroxyle libre) 3,4'-di-OH ou ortho di-OH sur le noyau A (6,7 ou 7,8)
AlCl <sub>3</sub> + MeOH	+20 à 45 (BI) +60 (BI)		5 - OH 3 - OH
AlCl <sub>3</sub> +HCl+ MeOH	-20 à -40(BI) -20 à -25(BI)		Ortho di-OH sur le noyau B Ortho di- OH sur le noyau A (en plus ortho di-OH sur le noyau B)
	+17 à 20(BI) +35 à 55(BI) +50 à 60(BI)		5 - OH(avec 6-oxygénation) 5 - OH flavone et 3-OMe flavone 3 - OH avec ou sans 5- OH
NaOAc + MeOH	+5 à 20 (BII) Déplacement très faible(BII) Diminution d'intensité avec le temps(BII) le spectre se décompose avec le temps(BII)		7 - OH 7 - OR 6,7; 7,8 ou 3',4' di OH 5,6,7 ; 5,7,8 ou 3,3',4' –tri-OH
NaOAc + MeOH + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	+12 à 36 (BI) +5 à 10 (BI)		3',4' di OH 6,7 ou 7,8 di-OH

**ANNEXE 2 : Screening phytochimique**

***Recherche des alcaloïdes :***

Préparation de l'extrait: mettre 5g de matière végétale dans un bêcher, avec 50 mL de HCl (10%) dilué et on porte l'ensemble sur une plaque chauffante pendant 15 minutes, puis on filtre le mélange. A l'extrait acide, on ajoute l'ammoniaque (NH OH (10%) pour alcaliser le milieu et à l'aide d'une ampoule à decanter, on extrait la solution avec 30 mL de chloroforme (CHCl<sub>4</sub>). On évapore la phase organique puis on ajoute 2 ou 3 goûtes du réactif Valser Mayer. L'apparition d'un précipité blanc indique la présence des alcaloïdes.

***Recherche des flavonoïdes:***

Préparation de l'extrait: mettre 5g de matière végétale avec 75 ml d'acide chlorhydrique (HCl) et 10 ml d'éthanol (EtOH). On laisse macérer pendant 1 jours, on filtre le mélange puis on soumet le macéra au test. Les flavonoïdes ont été recherchés par la réaction à la cyanidine. On

ajoute une petite quantité de magnésium (Mg) à l'extrait d'acide chlorhydrique. coloration rouge cerise pour les flavonols, coloration orange pour les flavones, coloration rouge violacée pour les flavanones.

#### ***Recherche des saponosides:***

Leur présence est déterminée quantitativement par le calcul de l'indice de mousse : mettre 3 g de la matière végétale sec et broyée en présence de 100 ml d'eau distillée et on porte l'ensemble sur une plaque chauffante pendant 10 min à une température inférieure à la température d'ébullition. Après refroidissement et filtration, mettre 10 ml de la solution dans un tube à essai, puis on agite fortement pendant une minute et on laisse reposer 30 secondes et on mesure la hauteur de la mousse.

#### ***Recherche des tannins :***

Dans un bêcher, on met 3g de matière végétale avec 20 ml d'éthanol 50%, on chauffe l'ensemble pendant 15 minutes, on filtre le mélange puis soumettre le filtrat aux test suivant: On traite 5 ml de la solution avec quelques 1 à 2 gouttes de solution de FeCl<sub>3</sub> diluée à 1%. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration verdâtre pour les tanins catéchiques ou bleue noirâtre pour les tanins galliques.

#### ***Recherche des coumarines* <sup>[33]</sup> :**

On prend 20 ml de l'extrait éthanolique en présence de 10 ml de HCl (10%), on les porte à reflux pendant 30 minutes. Après refroidissement de la solution, elle subit l'extraction 3 fois avec 10 ml d'éther diéthylique. Dans une capsule, 5 ml d'extrait éthérique est évaporé, puis 2 ml d'eau chaude est ajoutée au résidu. La solution est partagée entre 2 tubes à essais. Au contenu de l'un des tubes, 1 ml est ajouté de NH<sub>4</sub>OH à 25%. La fluorescence est observée sous U.V à 366 nm. Une fluorescence intense dans le tube où il a été ajouté de l'ammoniaque indique la présence de coumarines.

#### ***Stérols et tri terpènes :***

Mettre 5g de matière végétale avec 20 ml d'éthanol, laisser macérer pendant un jours. Après l'évaporation de la solution, on dissout le résidu avec 15 mL de chloroforme (CHCl<sub>3</sub>) et on filtre plusieurs fois (3 fois), Les stérols et les terpènes ont été recherchés par la réaction de Liebermann-Burchard.

#### ***Recherche des anthraquinones :***

Dans un bêcher, on met 1 g d'échantillon de la plante en presence de 10 ml de KOH (0,5 N) auxquels est ajouté 1 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et on porte l'ensemble sur une plaque chauffante pendant 10 min. Après refroidissement du mélange, on le filtre puis on acidifie le filtrat avec l'acide acétique. On extrait la solution acide obtenue avec 10 ml de

benzène. On agite l'extrait benzénique en présence de 5 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Une réaction positive est révélée par la formation d'une couleur rouge au niveau de la couche alcaline. La caractérisation des anthraquinones fait appel à la réaction de Bornträger. Cette réaction n'est positive qu'avec les formes anthraquinoniques libres oxydées (c'est-à-dire les génines anthraquinoniques, qui sont solubles dans le dichlorométhane).

### ANNEXE 3 :

Préparations des adsorbants pour étalement sur des plaques de CCM en verre (20×20)

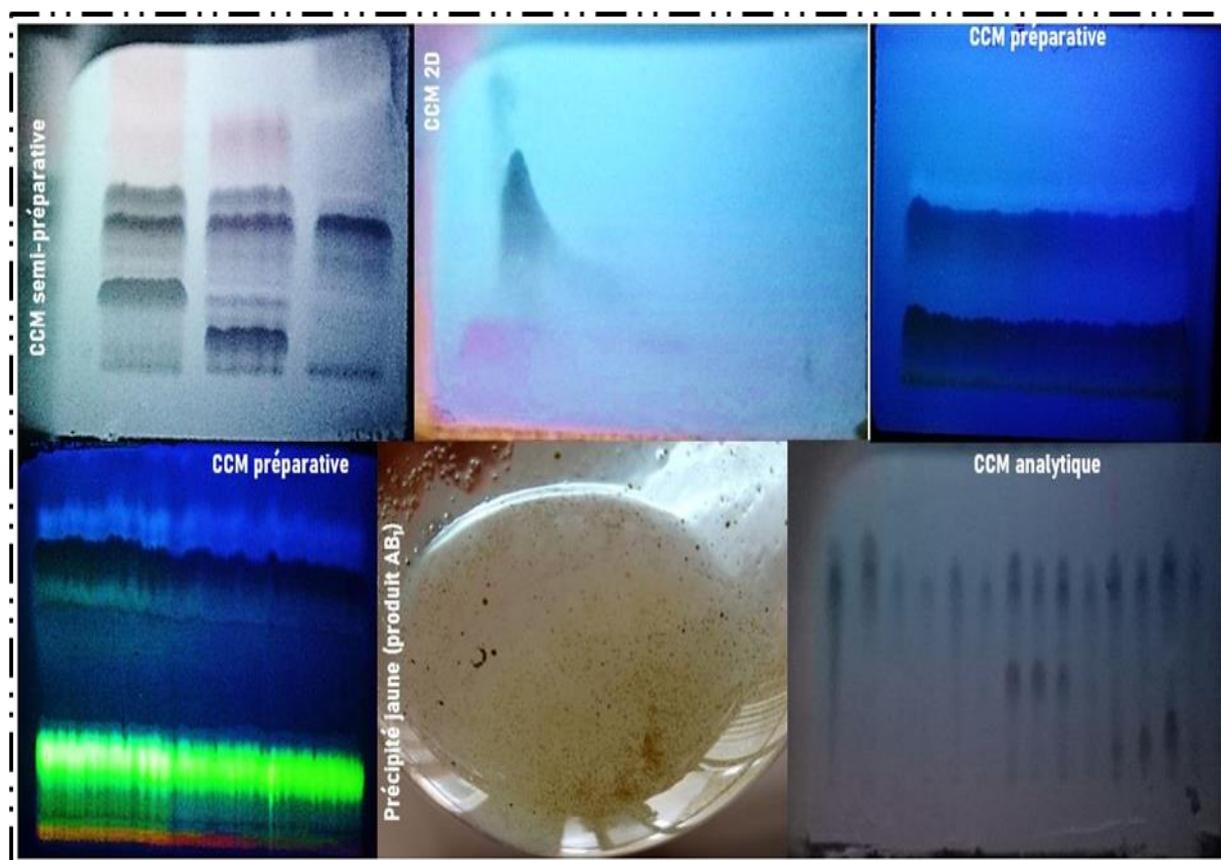
CCM sur gel de silice ( $\text{SiO}_2$ ) : 25 g de gel de silice dissout dans 80ml d'eau

CCM sur gel de polyamide (DC6) : 10g de gel de polyamide dissout dans 55ml de méthanol (MeOH)

CCM sur cellulose microcristalline : 15g de cellulose microcristalline dissoute dans 65ml d'eau

### ANNEXE 4 :

Les différentes CCM utilisées lors de l'isolement et la purification de produits flavonoïdiques



## ANNEXE 5 :

La préparation des milieux de culture, à savoir le milieu Mueller-Hinton pour les bactéries et le milieu Sabouraud gélosé pour les levures

### Milieu de culture : Mueller Hinton. (MH)

Macération de viande de bœuf : 300 ml Hydrolysate : 17,5 g+ Amidon : 1,5 g Agar : 17 g

Pour préparer ce milieu, il faut peser 38 g de poudre et la mélanger avec 1 l d'eau. Il faut par la suite homogénéiser le mélange en le chauffant dans un bain marie pendant quelques minutes. Enfin, il faut stériliser la gélose à l'autoclave à 121°C pendant 15 min. Répartir le milieu dans des boîtes de Pétri.

### Milieu de culture : Milieu Sabouraud

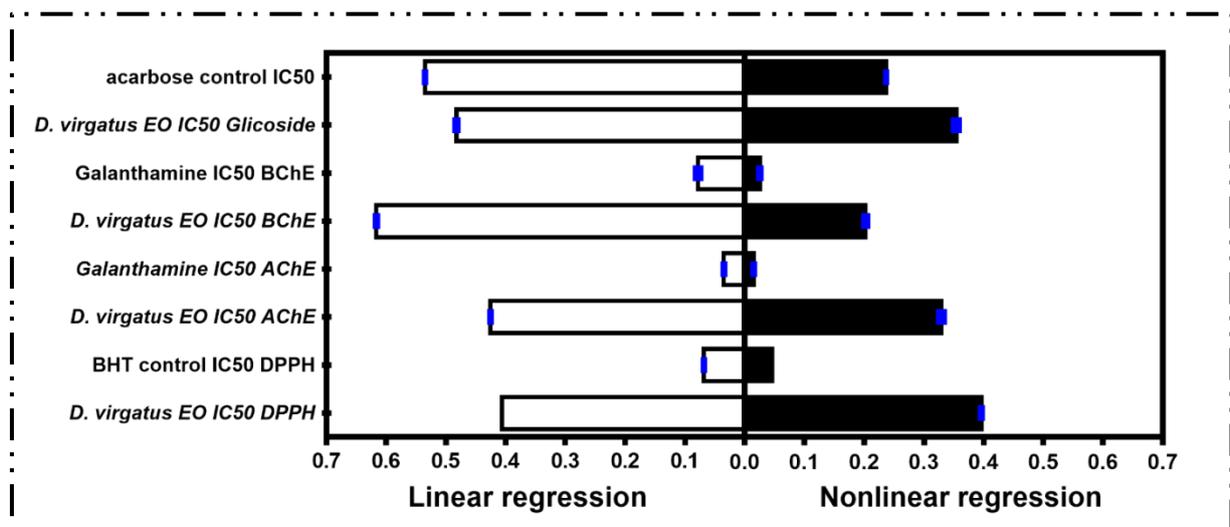
Peptone : 10 g Glucose

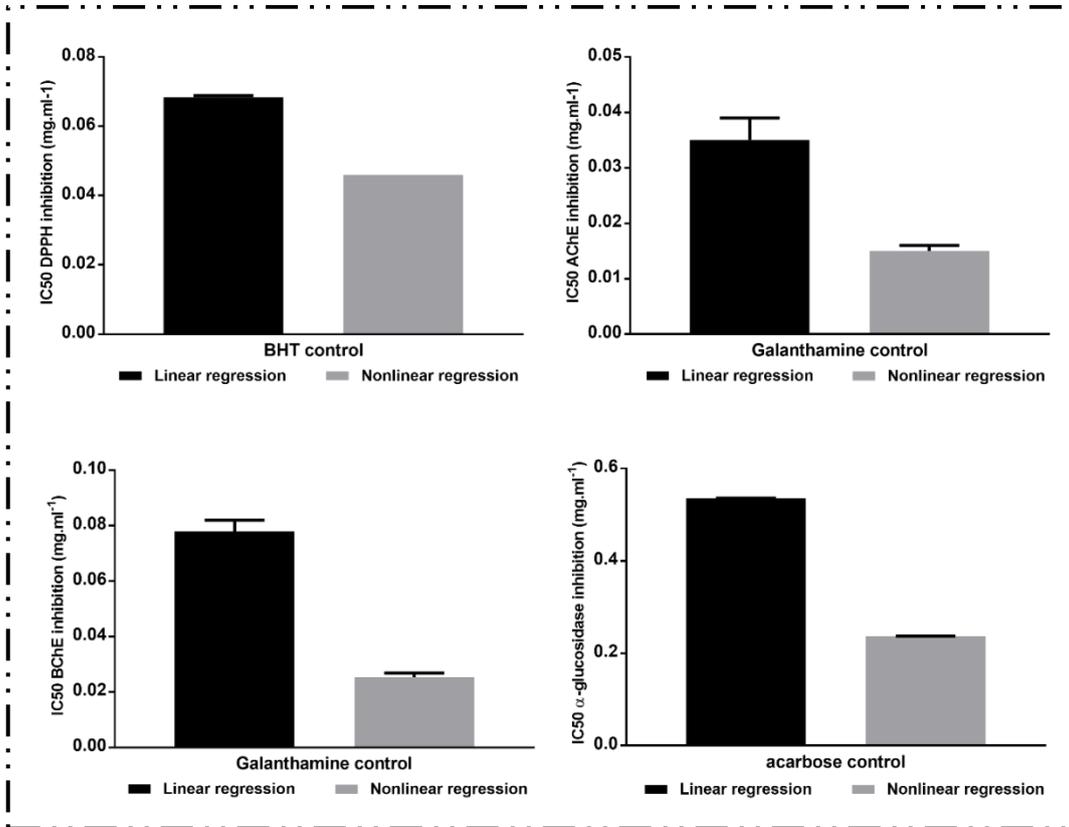
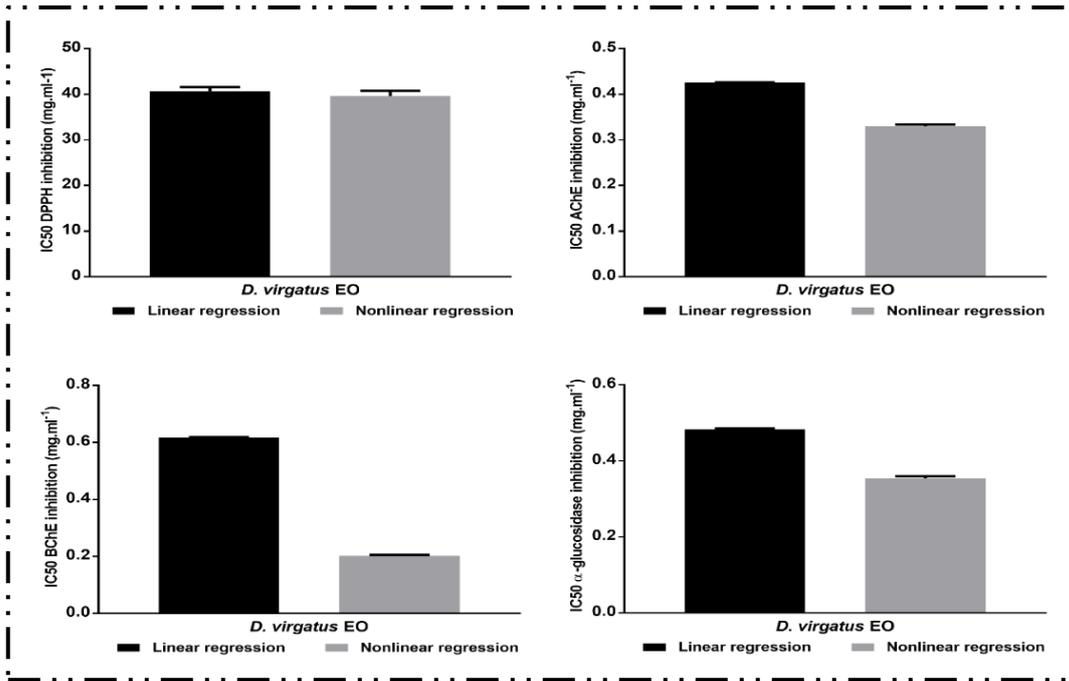
massé : 20 g Agar-agar:15 g

Eau distillée (qsp) : 1000 ml vitamines

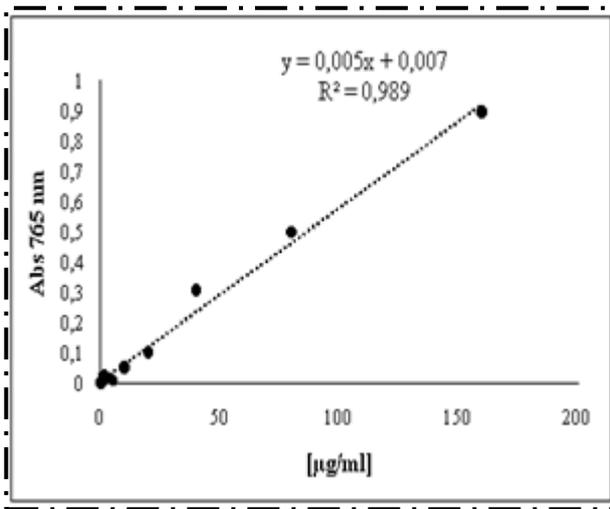
15 g de poudre de Sabouraud gélose sont dissous dans 1 litre d'eau distillée. Il faut par la suite homogénéiser le mélange en le chauffant dans un bain marie pendant quelques minutes. Enfin, il faut stériliser la gélose à l'autoclave à 121°C pendant 15 min. Répartir le milieu dans des boîtes de pétri.

## ANNEXE 6 : Comparaison entre régression linéaire et non linéaire pour les activités appliquées sur l'huile essentielle *D.virgatus*

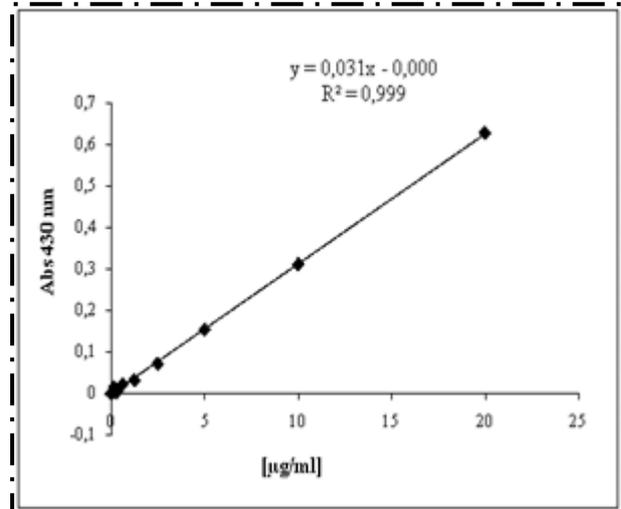




ANNEXE 7 : Courbes d'étalonnages de l'acides gallique (1) et de la quercétine (2)



(1)



(2)



*Anal. Bioanal. Chem. Res.*, Vol. 8, No. 2, 147-162, April 2021.

## Chemical Analysis, Antioxidant, Antimicrobial and Enzyme Inhibitory Effects of *Daucus Virgatus* (Poir.) Maire Essential oil from Algeria

Mouna Azi<sup>a,\*</sup>, Farouk Zaidi<sup>a</sup>, Widad Sobhi<sup>b,c</sup>, Guido Flamini<sup>d</sup>, Mohammed Bouskout<sup>e</sup>, Hocine Laouer<sup>f</sup> and Embarek Bentouhami<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Chemistry, Engineering, Materials and Nanostructure, University of Ferhat Setif 1, 19000, Algeria

<sup>b</sup>Laboratory of Applied Biochemistry, Faculty of Life and Nature Sciences, University of Ferhat Abbas Setif 1, 19000, Algeria

<sup>c</sup>Center for Research in Biotechnology, C.R.Bt, P. O. Box: E73/JUV N 03, Ali Mendjeli Nouvelle Ville. Constantine, 25000, Algeria

<sup>d</sup>Department of Pharmacy, University of Pisa, Via Bonanno 6, 56126 Pisa, Italy

<sup>e</sup>Laboratory of Microbial Biotechnologies, Agrosciences and Environment, Faculty of Sciences Semailia, Cadi Ayyad University, 40000 Marrakesh, Morocco

<sup>f</sup>Laboratory of Natural and Biological Resources Valorization, Faculty of Life and Nature Sciences, University of Ferhat Abbas Setif 1, 19000, Algeria

(Received 17 June 2020 Accepted 31 October 2020)

Essential oils (EO) represent an important source of bioactive molecules and are widely used for their great efficacy relating to their different therapeutic properties. The present study aims to contribute to the valorization of *Daucus virgatus* (Poir.) Maire, an aromatic and native plant spontaneously growing in the North-Eastern regions of Algeria, by analyzing the chemical composition of its essential oil and evaluating the antioxidant and antimicrobial activities, together with the assay of the enzyme inhibitory effects against  $\alpha$ -glucosidase and cholinesterase. *Daucus virgatus* EO was extracted by hydrodistillation and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry analysis (GC-MS). Twenty-one constituents accounting for 98% of the whole components were identified.  $\beta$ -Pinene (77.9%) and  $\alpha$ -pinene (7.6%) were the most abundant components. The antimicrobial activity against the pathogen microorganisms *Listeria innocua*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* was investigated. The best antimicrobial effect was observed against *S. typhimurium* and *C. albicans*, which showed high sensitivity, with inhibition zones ranging between 27.3 and 25 mm; the minimum inhibitory concentrations were 15.63 and 31.25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively. In the DPPH test, the essential oil showed a moderate antioxidant effect, with an  $\text{IC}_{50}$  value of 39.61  $\text{mg mL}^{-1}$ . *D. virgatus* EO exhibited an interesting inhibitory effect against  $\alpha$ -glucosidase enzyme ( $\text{IC}_{50} = 0.35 \text{ mg mL}^{-1}$ ) compared with the positive control Acarbose ( $\text{IC}_{50} = 0.24 \text{ mg mL}^{-1}$ ), and a moderate inhibitory effect against cholinesterases enzymes, with  $\text{IC}_{50}$  values of 0.33 and 0.20  $\text{mg mL}^{-1}$  for acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, respectively. *D. virgatus* EO might be used as a promising source of natural products with potential antimicrobial, antihyperglycemic and anti-Alzheimer effects.

**Keywords:** *Daucus virgatus*, Essential oil, Antimicrobial, Anti-cholinesterases,  $\alpha$ -Glucosidase inhibition, Antioxidant

### INTRODUCTION

There is currently a clear trend towards the use of natural products as alternative compounds to prevent and

treat human diseases. Furthermore, many volatile compounds are currently ingredients in pharmaceutical preparations as antioxidant, bactericidal, antifungal and antiviral agents. These biological proprieties are due to their chemical structures and their functional groups that play a key role in the generation of pharmacological effects [1]. It

\*Corresponding author. E-mail: mouna.azi@univ-setif.dz