

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

UNIVERSITE MENTOURI-CONSTANTINE
FACULTE DES SCIENCES EXACTES
DEPARTEMENT DE CHIMIE

N° d'ordre :

N° de série :

THESE

Présentée pour obtenir le diplôme de
Doctorat en Sciences
Spécialité : Pharmaco-chimie
Option : Pharmaco-chimie

Par

LAGGOUNE SOUHEILA

THEME

ETUDE PHYTOCHIMIQUE ET
BIOLOGIQUE DE PLANTES MEDICINALES
DU GENRE *STACHYS*

Soutenu le : 15/03/2011

Devant la commission d'examen

Pr. Salah AKKAL, U. Mentouri-Constantine
Pr. Zahia KABOUCHE, U. Mentouri-Constantine
Dr. Ouahiba BOUMAAZA, U. Mentouri-Constantine
Pr. Mesbah LAHOUEL, U. Jijel
Pr. Belgacem LEGSEIR, U. Badji-Mokhtar (Annaba)
Dr. Amar ZELLAGUI, U. Larbi Benmhidi (Oum El-Bouaghi)

Président
Rapporteur
Examinatrice
Examineur
Examineur
Examineur

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على رسول الله

قال الله تعالى:

« قُلْ هَلْ يَسْتَوِي الَّذِينَ يَظْمُونَ وَالَّذِينَ لَا يَظْمُونَ إِنَّمَا يَتَنَكَّرُ أُولَئِكَ الْأَلْبَابِ »
«

سورة الزمر الآية « 9 »

DEDICACE

Je dédie ce travail

A mes chers parents qui m'ont encouragée à être ce que je suis, avec tant d'amour.

A mes chers frères et ma Sœur pour leurs encouragements

A tous mes amis et collègues.

REMERCIEMENTS

Cette étude a été réalisée au Laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques (LOST) de la faculté des sciences exactes de l'université Mentouri-Constantine sous la direction du professeur Zahia KABOUCHE, je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance et ma profonde gratitude pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et de m'avoir permis de préparer mon doctorat dans les meilleures conditions. Je tiens à la remercier tout particulièrement pour tous ses efforts et ses encouragements et pour le soutien qu'elle m'a témoigné tout au long de cette étude placée sous sa direction.

Mes vifs remerciements vont également à Monsieur le professeur Salah AKKAL, Professeur à l'université Mentouri-Constantine pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury de ma soutenance de thèse de doctorat.

J'aimerais également remercier vivement Madame le docteur Ouahiba BOUMAAZA, Maître de conférences à l'université Mentouri-Constantine, Monsieur le professeur Masbah LAHOUEL (Université de Jijel), Monsieur le professeur Belgacem LEGSEIR (Université Badji-Mokhtar, Annaba) et Monsieur le docteur Amar ZELLAGUI, Maître de conférences à l'université Larbi Benmhidi (Oum El-Bouaghi) pour avoir accepté de faire partie du jury de thèse.

J'exprime mes remerciements aux :

- Professeur Jaime BERMEJO (*Instituto de Productos Naturales y Agrobiología-C.S.I.C.- Instituto Universitario de Bio-Organica "Antonio González", Universidad de La Laguna, Tenerife, Spain*), je tiens à lui exprimer mes sincères remerciements pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, pour m'avoir fait confiance et m'avoir permis de réaliser ce travail dans de meilleures conditions tout en me laissant une grande liberté. Pour son aide et pour les discussions enrichissantes et fructueuses entretenues durant ma présence dans son laboratoire, qu'il soit assuré de ma profonde gratitude.
- Professeurs Francisco LEON et Ignacio BROUARD, pour leur aide non négligeable dans la réalisation des analyses spectrales et l'interprétation des spectres.

J'exprime mes sincères remerciements aux professeurs Mesbah LAHOUEL (Université de Jijel), Yousria Ahmed MAKLAD et Aida El-AZZOUNY (NRC, Le Caire, Egypte), pour m'avoir accueillie au sein de leurs laboratoires, pour leur aide et disponibilité en me permettant la réalisation de l'activité antioxydante, anti-inflammatoire, antalgique et antiulcéreuse, et au professeur Ahmed KABOUCHE, pour m'avoir aidée dans l'interprétation des spectres et l'élucidation des structures.

TABLE DE MATIERES

REMERCIEMENTS

TABLE DE MATIERES

Introduction générale.....	01
Références bibliographiques.....	03

PARTIE I

PARTIE CHIMIQUE

ETUDE PHYTOCHIMIQUE DU GENRE *STACHYS*

Chapitre I : Aperçu bibliographique sur le genre *Stachys*

I. Introduction bibliographique sur les Lamiales.....	04
I.1. Place dans la classification systématique botanique.....	04
I.2. La famille des Lamiaceae.....	04
I.2.1. Aperçu bibliographique sur le genre <i>Stachys</i>	05
I.3. Propriétés pharmacologiques du genre <i>Stachys</i>	05
I.4. Travaux antérieurs sur le genre <i>Stachys</i>	07
I.4.1. Les flavonoïdes.....	07
I.4.2. Les terpènes.....	29
I.4.3. Les phénylpropanoïdes.....	40
I.5. Conclusion.....	46
Références bibliographiques.....	47

Chapitre II : Description des travaux sur l'espèce *Stachys mialhesie* de Noé.

II. Etude chimique de l'espèce <i>Stachys mialhesie</i> de Noé.....	54
II.1. Etude bibliographique.....	54
II.2. Choix du matériel végétal.....	54
II.3. Classification dans la systématique botanique	54
II.4. Description botanique	54
II.5. Répartition géographique	55
II.6. Protocole expérimental	55
II.6.1. Récolte du matériel végétal	55
II.6.2. Extraction des parties aériennes.....	55
II.6.3. Séparation chromatographique	57
II.7. Caractérisation chimique et élucidation structurale des composés isolés.....	63
II.7.1. Elucidation de la structure du composé SMB1=R141-151.....	63
II.7.2. Elucidation de la structure du composé SMB19.....	75
II.7.3. Elucidation de la structure du composé SMB31.....	87
II.7.4. Elucidation de la structure du composé R9-12.....	97
II.7.5. Elucidation de la structure du composé R15-19.....	106
II.7.6. Elucidation de la structure du composé R30-34.....	116
II.7.7. Elucidation du composé R141-151.....	124
II.8. Conclusion.....	124
Références bibliographiques.....	125

Chapitre III : Description des travaux sur l'espèce *Stachys circinnata* I'Her.

III. Etude chimique de l'espèce <i>Stachys circinnata</i> I'Her.....	127
III.1. Etude bibliographique	127
III.2. Choix du matériel végétal	127
III.3. Description botanique.....	127
III.4. Répartition géographique	128
III.5. Protocole expérimental.....	128
III.5.1. Récolte du matériel végétal	128
III.5.2. Extraction	128
III.5.3. Séparation chromatographique.....	130
III.6. Caractérisation chimique et élucidation structurale des composés isolés.....	134
III.6.1. Elucidation de la structure du composé SCB13-15.....	134
III.6.2. Elucidation de la structure du composé SCB13-15(1).....	140
III.6.3. Elucidation de la structure du composé SCB27-12.....	146
III.6.4. Elucidation de la structure du composé SCB28-29.....	152
III.6.5. Elucidation de la structure du composé SCB30-31.....	158
III.6.6. Elucidation de la structure du composé SCB33-34(2).....	166
III.6.7. Elucidation de la structure du composé SCB33-34(4).....	175
III.6.8. Elucidation de la structure du composé SCB38.....	182
III.6.9. Elucidation de la structure du composé SCB44.....	191
III.6.10. Elucidation de la structure du composé SCD26.....	201
III.6.11. Elucidation de la structure du composé SCD36.....	201
III.6.12. Elucidation de la structure du composé SCD39.....	209
III.6.13. Elucidation de la structure du composé SCD78.....	217
III.6.14. Elucidation de la structure du composé SCD86.....	224
Références bibliographiques.....	231

CHAPITRE IV : Analyse GC/MS de l'huile essentielle de *Stachys circinnata* I'Her.

IV. Introduction.....	234
IV.1. Applications thérapeutiques de l'aromathérapie.....	234
IV.2. Travaux antérieurs sur les huiles essentielles du genre <i>Stachys</i>	236
IV.3. Travaux antérieurs sur les huiles essentielles de l'espèce <i>Stachys circinnata</i> I'Her.....	246
IV.3.1. Matériel végétal.....	246
IV.3.2. Extraction.....	246
IV.3.3. Analyses GC et GC/MS.....	246
IV.3.4. Résultats de l'analyse GC/MS et discussion.....	247
Références bibliographiques.....	250

PARTIE II PARTIE BIOLOGIQUE

Chapitre I : Etude bibliographique

I.1. Les antioxydants.....	253
I.1.1. Les radicaux libres.....	253
I.1.2. Les antioxydants.....	253

I.2. Les antibactériens.....	257
I.2.1. Les principaux germes étudiés.....	257
I.2.2. Rappel sur les infections nosocomiales.....	257
I.2.3. Les germes en cause.....	258
I.2.4. Caractères généraux sur les souches étudiées.....	258
I.3. L'inflammation.....	263
I.3.1. Généralités.....	263
I.3.2. Réactions inflammatoires.....	263
I.3.3. Les médiateurs chimiques de l'inflammation.....	264
I.3.4. Mécanisme de la réaction inflammatoire.....	265
I.3.5. Définition des anti-inflammatoires.....	265
I.3.6. Mécanisme d'action des anti-inflammatoires.....	266
I.3.7. Méthode de test anti-inflammatoire.....	266
I.4. Méthodes d'étude de la Toxicité.....	267
I.4.1. Toxicité par administration unique: Toxicité aiguë.....	267
I.4.2. Toxicité par administration réitérée : Toxicité subaiguë et toxicité chronique.....	267
I.4.3. Détermination de la DL50.....	268
I.5. L'activité antalgique.....	271
I.5.1. La douleur.....	271
I.5.2. Nocicepteurs et substances algogènes.....	271
Références bibliographiques.....	273

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.1. Matériel Végétal.....	276
II.2. Mesure de l'activité antioxydante.....	276
II.2.1. Test d'activité anti DPPH.....	276
II.2.2. Mesure du taux de polyphénols.....	279
II.3. Détermination de l'activité antibactérienne.....	280
II.3.1. Matériel.....	280
II.3.2. Méthode de l'étude bactériologique.....	281
II.3.3. L'antibiogramme par diffusion sur milieu gélosé (Méthode des disques)	281
II.3.4. Détermination de la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice)	283
II.4. Détermination de l'activité anti-inflammatoire, analgésique, antiulcéreuse.....	284
II.4.1. Médicaments et animaux.....	284
II.4.2. Préparation d'extrait de plante.....	285
II.4.3. Détermination de la dose mortelle moyenne (LD₅₀)	285
II.4.4. Etude de l'activité analgésique et anti-inflammatoire.....	285
II.4.5. Détermination de l'activité antiulcéreuse.....	287
II.4.6. Données et analyse statistique.....	288
Références bibliographiques.....	289

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1. Détermination de l'activité antioxydante.....	291
III.1.1. Tests d'activité antioxydante.....	291
III.1.2. Détermination du contenu des extraits en composés phénoliques.....	293
III.1.3. Discussion des résultats.....	293
III.2. Détermination de l'activité antibactérienne.....	294
III.2.1. Résultats de l'antibiogramme.....	294
III.2.2. Détermination de la CMI (Concentration minimale inhibitrice)	265
III.2.3. Discussion des résultats.....	297

III.3. Détermination des activités antalgique, anti-inflammatoire et antiulcéreuse de l'extrait butanolique de <i>S. mialhesi</i> de Noé.....	297
III.3.1. Toxicité Aiguë.....	297
III.3.2. L'activité antalgique.....	298
III.3.3. Effets de l'EBSM sur l'inhibition de l'œdème de la patte des rats à la carraghénin.....	299
III.3.4. Activité d'antiulcéreuse.....	299
III.3.5. Discussion des résultats.....	300
III.4. Conclusion.....	301
Références bibliographiques	302
Conclusion générale	304

Abréviations et symboles

Les abréviations ont généralement été indiquées sous la forme la plus couramment utilisée dans la littérature, elles sont donc souvent issues de terminologie anglo-saxonne.

[1], [2], [3],...désignation des composés mentionnés dans la partie bibliographique

AcOEt	Acétate d'éthyle
AcONa	Acétate de sodium
ADH	Arginine d ihydrolase
ADN	Acide d ésoxyribonucléique
AlCl ₃	Chlorure d'aluminium
AlCl ₃ +HCl	Chlorure d'aluminium acidifié
AINS	Anti-inflammatoires n on stéroïdiens
AIS	Anti-inflammatoires stéroïdiens
APG	Angiosperme p hylogénie g roupe
ATCC	American t ype c ulture c ollection
ATP	Adénosine t riphosphate
CA	Antigène c ommun
CAT	Catalase
CC	Chromatographie sur C olonne
CCM	Chromatographie sur couche m ince
CDCl ₃	Chloroforme d eutééré
CD ₃ OD	Méthanol d eutééré
CH ₂ Cl ₂	Dichlorométhane
CHS	Chalcone synthase
CHU	Centre h ospitalo- u niversitaire
CI ₅₀	Concentration i nhibitrice m oyenne (Concentration permettant d'inhiber 50% du Signal de référence)
CMI	Concentration M inimale I nhibitrice
CNF	Cytotoxic N ecrotizing F actor
COSY	Correlated spectroscopy
COX	Cyclo- o xygénase
CP	Chromatographie sur p apier
DEPT	Distortionless enhancement by p olarization transfer
DHHDP	D ihydrohexahydroxy d iphénique
DL ₅₀	Dose létale m oyenne
DMAPP	D iméthylallyl d iphosphate
DMSO-d ₆	D iméthyle sulfoxyde d eutééré
DO	Densité o ptique
DPPH	D iphényl-2- P ycril- H ydrazyl
DS	Déviat o n standard
EBSC	Extrait b utanolique de <i>Stachys circinnata</i>
EBSM	Extrait b utanolique de <i>Stachys mialhesi</i>
FDP	Farnésyl d iphosphate
GC/MS	Chromatographie en phase g azeuse couplée à la spectrométrie de m asse (Gaz Chromatography-Mass-Spectrometry)
GDP	Géranyl d iphosphate
GGDP	Géranyl g éranyl d iphosphate
GGPP	Géranyl g éranyl p rophosphate
GPx	Gluthation- p eroxydase
H [•]	Atome d' h ydrogène

H₃BO₃	Acide borique
HHDP	Hexahydroxydiphénique
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HMG-CoA	Hydroxyméthylglutaryl-CoA.
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène (Hydrogen peroxide)
H₂S	Sulfure d'hydrogène (Hydrogen sulfide)
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
IL	Interleukine
I.P	Intra-péritonéale
IPP	Isopentényl-diphosphate
LPS	Lypopolysaccharide
MDD	Mévalonate diphosphate décarboxylase
MEC	Méthyléthylcétone
MeOH	Méthanol
MK	Mévalonate kinase
MVA	Mévalonate
NaCl	Chlorure de sodium (Sodium chlorure)
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NaOH	Hydroxide de sodium
NCCLS	National committee for clinical laboratory standard
Ni	Indice d'insaturation
NOS	Nitric oxide synthase (reactive nitrogen species)
ODC	Ornithine décarboxylase
OMS	Organisation mondiale de la santé
ONOO⁻	Peroxynitrite anion
PAF	Acether phosphoglycérade
PAL	Phénylalanine ammoniac lyase
Phe	Phénylalanine
PMK	Phosphomévalonate kinase
PS	Piégeur Spin
R	Rough
R[•]	Radical alkyle
R_f	Rapport frontal (CCM)
Rha	Rhamnosyl
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RMN ¹³C	Résonance magnétique nucléaire du carbone
RMN ¹H	Résonance magnétique nucléaire du proton
ROS	Espèces oxygénées réactives (reactive oxygen species)
R.P.E.	Résonance paramagnétique électronique
S	Smooth
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la mêticilline
SM-EI	Spectrométrie de masse par impact électronique
SM-ESI	Spectrométrie de masse électrospray-ionspray
SOD	Superoxide-dismutase
SS	Stilbène synthase
TNFα	Tumor necrosis factor
Tol	Toluène
U.V	Ultra Violets

Symboles

A'	Spin aduit
Hz	Hertz
J	Constantes de coulage exprimé en Hz
m/z	masse/charge d'un ion
ppm	partie par million
δ	Déplacement chimique exprimé en ppm
λ_{max}	Longueur d'onde d'absorption maximale
nm	nanomètre
mm	millimètre
cm	centimètre
MHz	Mégahertz
Ev	Electron volts
g/l	gramme/litre
ml	millilitre
μl	Microlitre
Msec	Millisecondes
G	Gauss
mW	milliWatt
mp	melting point
GHz	GigaHertz
KHz	KiloHertz
μm	micromètre
mg/kg	milligramme/kilogramme
T°	Température
pH	potentiel hydrogène
PF	Point de fusion
°C	Degré Celsius
d	doublet
dd	doublet dédoublé
M	Mole
Glc	Glucose
m	multiplet
s	singulet
Septer	Septuplet
t	triplet

Liste des schémas

PARTIE I

Schéma I.1. Squelette de base des flavonoïdes.....	08
Schéma I.2. Voie biosynthétique conduisant aux chalcones.....	11
Schéma I.3. Schéma illustrant la biosynthèse des flavonoïdes.....	13
Schéma I.4. Structures chimiques de flavonoïdes isolés du genre <i>Stachys</i>	25
Schéma I.5. Structure d'une unité isoprénique.....	29
Schéma I.6.1. Structures chimiques de terpènes bicycliques de type clérodane isolés du genre <i>Stachys</i>	37
Schéma I.6.2. Structures chimiques de terpènes bicycliques de type labdane isolés du genre <i>Stachys</i>	38
Schéma I.6.3. Structures chimiques de diterpènes tétracycliques de type kaurane, acyclique diterpène et sesquiterpène isolés du genre <i>Stachys</i>	38
Schéma I.6.4. Structures chimiques de triterpènes pentacycliques et stérols isolés du genre <i>Stachys</i>	39
Schéma I.7. La biosynthèse des phénylpropanoïdes.....	41
Schéma I.8. Squelette phénylpropanes.....	41
Schéma I.9. Le métabolisme des phénylpropanoïdes.....	43
Schéma I.10. Structures chimiques de phénylpropanoïdes isolés du genre <i>Stachys</i>	46
Schéma II.1. Protocole d'extraction des parties aériennes de <i>Stachys mialhesi</i> de Noé.....	56
Schéma III.1. Organigramme récapitulatif des étapes d'extraction de l'espèce <i>Stachys circinnata</i> l'Her.....	129

PARTIE II

Schéma II.1. Formule du radical DPPH.....	276
Schéma II.2. Réaction du radical DPPH avec un phénol.....	276
Schéma II.3. Evolution du spectre RPE du radical du DPPH dans l'éthanol en fonction de différentes concentrations de vitamine C.....	277

Liste des figures

Figure II.1. Photographie de <i>Stachys mialhesi</i> de Noé.....	55
Figure II.2. Carte Chromatographique en couche mince bidimensionnelle des extraits acétate d'éthyle et <i>n</i> -butanolique de <i>S. mialhesi</i> de Noé.....	57
Figure III.1. Photographie de <i>Stachys circinnata</i> l'Her.....	128
Figure III.1. Effet inhibiteur d'EBSM sur le radical DPPH.....	292
Figure III.2. Effet inhibiteur de produit pur SLR 1416151 sur le radical DPPH.....	292
Figure III.3. Effet inhibiteur d'EBSC sur le radical DPPH.....	292

Liste des tableaux
PARTIE I

Tableau I.1. Usages et propriétés de quelques espèces du genre <i>Stachys</i>	06
Tableau I.2. Structure de base des différentes classes de flavonoïdes.....	10
Tableau I.3. Les flavonoïdes isolés du genre <i>Stachys</i> sp.....	14
Tableau I.4.1. Les diterpènes bicycliques de type clérodane isolés du genre <i>Stachys</i> sp.	34
Tableau I.4.2. Les diterpènes bicycliques de type labdane isolés du genre <i>Stachys</i> sp.	35
Tableau I.4.3. Les diterpènes tétracycliques de type kaurane isolés du genre <i>Stachys</i> sp.....	35
Tableau I.4.4. Les diterpènes acycliques et sesquiterpènes isolés du genre <i>Stachys</i> sp.	36
Tableau I.4.5. Les triterpènes pentacycliques et oléanane isolés du genre <i>Stachys</i> sp.	36
Tableau I.4.6. Les stérols isolés du genre <i>Stachys</i> sp.....	36
Tableau I.5. Les phénylpropanoïdes isolés du genre <i>Stachys</i> sp.....	44
Tableau II.1. Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait <i>n</i> -butanolique de <i>Stachys mialhesi</i> de Noé.....	58
Tableau II.2. Résultat de séparation de la fraction SMB06.....	58
Tableau II.3. Résultat de séparation de la fraction SMB07	59
Tableau II.4. Résultat de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait des racines de <i>S.mialhesie</i> de Noé.....	60
Tableau II.5. Résultat du rassemblement des fractions de la colonne de l'extrait des racines de <i>S. mialhesi</i> de Noé.....	60
Tableau II.6. Résultats de séparation de la fraction R9-12.....	61
Tableau II.7. Résultats de séparation de la fraction R15-19.....	61
Tableau II.8. Résultats de séparation de la fraction R30-34.....	62
Tableau II.9. Spectre UV du composé R141-151.....	64
Tableau II.10. RMN du ¹ H et du ¹³ C du composé R141-151.....	68
Tableau II.11. RMN du ¹ H et du ¹³ C du composé SMB19.....	78
Tableau II.12. RMN du ¹ H et du ¹³ C du composé SMB19.....	80
Tableau II.13. RMN du ¹ H et du ¹³ C du composé SMB31.....	90
Tableaub II.14. Les valeurs des ions caractéristiques des fragmentations des stérols.	97
Tableau II.15. Données RMN du ¹ H du composé R9-12.....	98
Tableaux II.16. RMN du ¹³ C du composé R9-12.....	100
Tableaux II.17. RMN du ¹³ C du composé stigmastérol.....	101
Tableau II.18. Fragments du composé R15-19 en SM-IE.....	106
Tableau II.19. RMN du ¹ H et du ¹³ C du composé R15-19.....	109
Tableau II.20. RMN du ¹ H et du ¹³ C du composé R30-34.....	118
Tableau III.1. Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de polyamide SC ₆ de l'extrait <i>n</i> -butanolique de <i>Stachys circinnata</i> l'Her.....	130
Tableau III.2. Les résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait dichloromethane.....	132
Tableau III.3. Regroupement des fractions de l'extrait dichlorométhane de <i>Stachys</i> <i>circinnata</i> l'Her.	133
Tableau III.4. RMN du ¹ H et du ¹³ C du composé SCB13-15.....	135

Tableau III.5. RMN du ¹ H et du ¹³ C du composé SCB13-15(1).....	141
Tableau III.6. RMN du ¹ H et du ¹³ C du composé SCB27-12.....	148
Tableau III.7. RMN du ¹ H et du ¹³ C du composé SCB28-29.....	154
Tableau III.8. RMN du ¹ H et du ¹³ C du composé SCB30-31.....	160
Tableau III.9. RMN du ¹ H et du ¹³ C du composé SCB33-34(2).....	168
Tableau III.10. RMN du ¹ H et du ¹³ C du composé SCB33-34(4).....	177
Tableau III.11. RMN du ¹ H et du ¹³ C du composé SCB38.....	184
Tableau III.12. RMN du ¹ H et du ¹³ C du composé SCB44.....	193
Tableau III.13. Fragments du composé SCD36 en SM-IE.	201
Tableau III.14. RMN du ¹ H et du ¹³ C du composé SCD36.....	203
Tableau III.15. Fragments du composé SCD39 en SM-IE.	209
Tableau III.16. RMN du ¹ H et du ¹³ C du composé SCD39.....	211
Tableau III.17. Fragments du composé SCD78 en SM-IE.	217
Tableau III.18. RMN du ¹ H et du ¹³ C du composé SCD78	219
Tableau III.19. RMN du ¹ H et du ¹³ C du composé SCD86	226
Tableau IV.1. Composants majoritaires (%≥5.0) d'huiles essentielles d'espèces <i>Stachys</i> de Croatie	239
Tableau IV.2. Composants majoritaires (%≥5.0) d'huiles essentielles d'espèces <i>Stachys</i> de Grèce.....	240
Tableau IV.2. Composants majoritaires (%≥5.0) d'huiles essentielles d'espèces <i>Stachys</i> de Grèce (Skaltsa <i>et al.</i> , 2003) (La suite).....	241
Tableau IV.3. Composants majoritaires (%≥5.0) d'huiles essentielles d'espèces <i>Stachys</i> de Turquie.....	242
Tableau IV.4. Composants majoritaires (%≥5.0) d'huiles essentielles d'espèces <i>Stachys</i> d'Iran	243
Tableau IV.4. Composants majoritaires (%≥5.0) d'huiles essentielles d'espèces <i>Stachys</i> d'Iran (La suite).....	244
Tableau IV.5. Composants majoritaires (% ≥ 5.0) d'huiles essentielles du genre <i>Stachys</i> ...245	
Tableau IV.6. Composition de l'huile essentielle de <i>Stachys circinnata</i> l'Her.....	248

PARTIE II

Tableau II.1. Les différentes dilutions de la solution mère.....	283
Tableau III.1. CI ₅₀ des extraits butanolique et le produit pur pour le test antioxydant.....	291
Tableau III.2. Taux de composés phénoliques des extraits butanoliques de deux plantes étudiées.....	293
Tableau III.3. Taux de polyphénols et détermination de la CI ₅₀ de <i>Stachys</i> sp.....	294
Tableau III.4. Zones d'inhibition en mm en présence de l'extrait butanolique de <i>S. mialhesi</i> de Noé.....	295
Tableau III.5. Zones d'inhibition en mm en présence de l'extrait butanolique de <i>S. circinnata</i> l'Her.....	295
Tableau III.6. CMI en (µg/ml) de l'extrait butanolique de <i>S. mialhesi</i> de Noé	296
Tableau III.7. CMI en (µg/ml) de l'extrait butanolique de <i>S. circinnata</i> l'Her	296
Tableau III.8. Mortalité des souris en fonction de la dose administrée.....	298
Tableau III.9. Activité analgésique de l'EBSM vis à vis de la douleur provoquée par l'acide acétique.....	298
Tableau III.10. Activité anti-inflammatoire de l'EBSM: Pourcentage d'inhibition de l'œdème.	299

Introduction générale

Les plantes sont depuis toujours une source essentielle de médicaments. Aujourd'hui encore une majorité de la population mondiale, plus particulièrement dans les pays en voie de développement, se soigne avec des remèdes traditionnels à base de plantes. De l'aspirine au taxol, l'industrie pharmaceutique moderne elle-même s'appuie encore largement sur la diversité des métabolites secondaires végétaux pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologiques inédites. Cette source semble inépuisable puisque seule une petite partie des 400000 espèces végétales connues ont été investiguées sur les plans phytochimique et pharmacologique, et que chaque espèce peut contenir jusqu'à plusieurs milliers de constituants différents (Hostettmann *et al.*, 1998).

L'utilisation des plantes en thérapeutique est très ancienne et connaît actuellement un regain d'intérêt. Il est possible d'utiliser les plantes entières ou les produits d'extraction qu'elles fournissent (Marc *et al.*, 2001).

Selon l'organisation mondiale de la santé (O.M.S), la médecine traditionnelle se définit comme l'ensemble de toutes les connaissances pratiques explicables ou non pour diagnostiquer ou éliminer un déséquilibre physique, mental en s'appuyant exclusivement sur l'expérience vécue et l'observation, transmises de génération en génération (oralement ou par écrit) (Adjanohoun *et al.*, 1979). Par ailleurs, selon l'OMS, près de 6377 espèces de plantes sont utilisées en Afrique, dont plus de 400 sont des plantes médicinales qui constituent 90% de la médecine traditionnelle. En 2004, près de 75% de la population africaine a eu recours aux plantes pour se soigner et n'a pas accès aux médicaments dits modernes.

Sachant qu'une plante peut contenir plusieurs milliers de substances différentes, on peut se rendre compte de la richesse naturelle du règne végétal. Dans le contexte socio-économique des pays en voie de développement, l'étude des plantes peut aboutir à l'obtention de réponses thérapeutiques adéquates à de faible prix, joignant à une efficacité scientifique prouvée, une acceptabilité culturelle optimale.

La valorisation scientifique de la médecine traditionnelle doit conduire notamment à la mise au point de médicaments à base de plantes. Aujourd'hui, il a été estimé que les principes actifs provenant des végétaux représentent 25% des médicaments prescrits soit un total de 120 composée d'origine naturelle provenant de 90 plantes différentes (Potterat, 1997).

L'Algérie possède une richesse floristique considérable. On compte environ 3000 espèces de plantes dont 15% sont endémiques (Quezel et Santa, 1963). Ce potentiel de plantes médicinales comporte des milliers d'espèces présentant divers intérêts, est peu exploré du point de vue chimique et pharmacologique, et constituent à notre avis, un axe non négligeable de recherche scientifique, plus particulièrement dans le domaine des substances naturelles.

Dans le cadre de la valorisation de la flore Algérienne, par la recherche de nouveaux composés d'origine végétale à intérêts thérapeutiques, notre laboratoire a entamé un programme de recherche destiné à l'étude chimique et biologique de cette flore. L'endémisme et l'utilisation éventuelle en médecine traditionnelle demeurent nos critères principaux de sélection de plantes en vue d'une investigation chimique.

Dans ce contexte et notamment dans le cadre du programme de recherche lancé par notre laboratoire sur les plantes médicinales, nous nous sommes intéressés à l'étude de deux espèces endémiques, appartenant au genre *Stachys* (Lamiaceae). Nos investigations visent l'étude phytochimique et biologique des espèces *Stachys mialhesi* de Noé. et *Stachys circinnata* l'Her. L'analyse par GC/MS de l'huile essentielle de *Stachys circinnata* l'Her ainsi que l'activité antioxydante et antibactérienne des deux plantes étudiées sera également abordée.

Ainsi, ce manuscrit est divisé en deux parties :

La première partie, consacrée à l'étude phytochimique du genre *Stachys*, comporte quatre chapitres :

Le premier qui est un aperçu bibliographique, comporte une présentation botanique de la famille des Lamiaceae, du genre *Stachys*, en plus des travaux phytochimiques antérieurs relatifs aux métabolites secondaires les plus courants. Il comprend également les résultats relatifs aux activités biologiques et toxiques de ces plantes. Les deuxièmes et troisièmes chapitres sont consacrés à la présentation de nos travaux d'isolement, et de purification des métabolites secondaires et discussion des résultats des espèces étudiées : *Stachys mialhesi* de Noé. & *Stachys circinnata* l'Her. Le quatrième chapitre comprend une étude bibliographique sur les huiles essentielles du genre *Stachys*, suivie de la description des travaux d'analyse GC et GC/MS de l'huile essentielle de l'espèce *Stachys circinnata* l'Her.

La deuxième partie comprend une étude biologique du genre *Stachys*, divisée en trois chapitres :

Le premier est consacré à l'étude bibliographique des différentes activités étudiées, le deuxième traite les différentes techniques utilisées pour la détermination de chaque activité étudiée et le troisième renferme la discussion des résultats obtenus.

Le manuscrit se termine par une conclusion générale.

Références bibliographiques

Adjanohoum, J.E., Aké Assi, L., Floret, J.J., Guinko, S., Koumaré, M., Ahyi, M.R., Raynal, J. 1979. Médecine traditionnelle et Pharmacopée Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au mali. ACCT, Paris. 291.

Hostettmann, K., Potterat, O., Wolfender, J.L. 1998. The potential of higher plants as a source of new drugs. *Chimia*. 52, 10-17.

Marc, T., Gerard, W., Denis, L. 2001. Classification des anti-inflammatoires. Guide pharmacologie. Etudiants et professionnels paramédicaux. 4^{ème} Edition, 426.

Potterat, O. 1997. Antioxidants and free radical scavengers of natural origin. *Current organic chemistry*, 1, 415-440.

Quezel, P., Santa, S. 1963. Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS (Ed.), Paris. Tome 2.

PARTIE I

PARTIE CHIMIQUE

ETUDE PHYTOCHIMIQUE DU GENRE *STACHYS*

CHAPITRE I

APERÇU BIBLIOGRAPHIQUE SUR LE GENRE *STACHYS*

I. Introduction bibliographique sur les Lamiales

I.1. Place dans la classification systématique botanique

La place des Lamiales dans la classification systématique APG II (*Angiosperm Phylogeny Group*) est la suivante (APG, II 2002 ; Bray, 2005) :

Embranchement	Spermatophytae (Plantes à graines).
Sous-embranchement	Angiospermae (graines protégées) ou plantes à fleurs
Classe	Dicotylédonae (<i>Eudicots</i>) ou dicotylédones vrais
Sous Classe	Asteropsidae
Groupe	Euastéridéae
Super-ordre	Lamianeae
Ordre	Lamiale
Famille	Lamiaceae

L'ordre des Lamiales est homogène, nettement monophylétique. Au niveau chimique, il est caractérisé par la présence d'oligosaccharides, tels que le planteose, qui constitue les réserves de la plante à la place de l'amidon, ainsi que de flavones oxygénés en 6. L'ovaire supère contient une forte proportion d'arabinose dans sa paroi. D'un point de vue morphologique, on note la présence fréquente de stomates diacytiques (entourés d'une ou de plusieurs paires de cellules subsidiaires dont les parois communes forment un angle droit avec les cellules de garde), des embryons de type « anagre » (variante *Veronica*), un albumen muni de suçoirs apparents à chaque extrémité. Les analyses génomiques ont, elles, pu montrer une cohérence dans les sites de restriction de l'ADN chloroplastique. La fleur peut être actinomorphe (Oléacées, Tétrachondracées) ou le plus souvent zygomorphe. Dans ce dernier cas, elle est généralement de type 2/3 (deux lobes supérieurs, trois lobes inférieurs). L'ordre comprend environ 17800 espèces, regroupés en vingt familles (Judd *et al.*, 2002 ; Guignard, 2001).

I.2. La famille des Lamiaceae

La famille des Lamiaceae est composée de près de 258 genres et 6970 espèces d'herbes, d'arbustes et d'arbres, à tige quadrangulaire et à inflorescences verticillées. Les feuilles sont généralement opposées ou verticillées, simples ou très rarement pennatiséquées ; il n'y a pas de stipule. Les fleurs sont bisexuées et zygomorphes, les inflorescences sont en cymes bipares puis unipares (Par manque de place). Le calice est synsépale, typiquement 5-mère, parfois bilabié et porte 5 à 15 nervures protubérantes. La corolle est sympétale et typiquement bilabiée, avec deux lobes formant une lèvre supérieure et trois lobes formant la lèvre inférieure. L'androcée peut consister soit en quatre étamines didynames, soit en seulement deux étamines soudées au tube de la corolle ou à la zone périgyne et alternant avec les lobes.

Le gynécée consiste en un ovaire composé de deux carpelles soudés avec fausse cloison et style terminal à gynobasique ; à l'extrémité des styles, les stigmates sont petits et peu apparents. Un disque nectarifère hypogyne et souvent asymétrique est généralement présent entre les étamines et l'ovaire. Le fruit est une drupe avec 1 à 4 noyaux, une gousse indéhiscente à quatre graines ou un schizocarpe (tétrakène lisse) pouvant rarement avoir un aspect charnu ou drupacé. On note le caractère aromatique des plantes de cette famille, la plupart étant riches en huiles essentielles (Carr, 2004 ; Guignard, 2001 ; Quezel et Santa, 1963). La sous famille des Lamioidées est un groupe monophylétique, établi par la constatation de similitudes dans les caractères de L'ADN de différents genres tels que *Lamium*, *Stachys*, *Galeopsis* (Judd *et al.*, 2002).

I.2.1. Aperçu bibliographique sur le genre *Stachys*

I.2.1.1. Aspects botanique du genre *Stachys* L (Epiaire)

Le genre *Stachys* comporte 200-300 espèces de plantes vivaces répandues dans une grande partie du globe, il est considéré comme le plus grand genre de la famille des Lamiaceae (Rechinger et Hedge, 1982).

Le genre *Stachys* représente 14 espèces de plantes vivaces répandues dans l'Algérie, 4 d'entre elles sont endémiques. Plantes annuelles à racines grêles, dépourvues de rejets stériles. Plantes vivaces à souche épaisse émettant en général des rejets stériles (Quezel et Santa, 1963). Leur nom de genre, qui rappelle la forme de leur inflorescence, vient du mot grec *Stachys*, qui signifie « épi » (Rivolier, 1977).

I.3. Propriétés pharmacologiques du genre *Stachys*

La recherche bibliographique menée sur l'intérêt biologique des espèces du genre *Stachys* montre qu'elles ont des propriétés thérapeutiques et sont utilisées en médecine traditionnelle. Dans ce qui suit, nous allons citer quelques exemples d'espèces de très grande importance pharmacologique :

- Les plantes de ce genre ont longtemps été appliquées dans la médecine populaire pour traiter des tumeurs des organes génitaux, des tumeurs inflammatoires, des ulcères et la toux (Duke, 1986).
- Des études pharmacologiques ont confirmé que les extraits de plantes ou de composants appartenant au genre *Stachys* exercent diverses activités : anti-inflammatoire et antinéphrétique (Hayashi *et al.*, 1994a, b; Skaltsa *et al.*, 2000), effet sur la hyaluronidase (Takeda *et al.*, 1985), hypotensive (Takeda *et al.*, 1997), antibactérienne (Skaltsa *et al.*, 1999), anti-inflammatoire, antitoxique (Zinchenko *et al.*, 1981), antihépatique (Savchenko et Khvorostinka, 1978) et anti-anoxie (Yamahara *et al.*, 1990).

L'usage et propriétés de quelques espèces du genre *Stachys* sont résumés dans le tableau I.1.

Tableau I.1. Usages et propriétés de quelques espèces du genre *Stachys*.

Plantes	Usages et propriétés	Référence
<i>S. lavandulifolia</i> Vahl.	Action sur l'insomnie et l'anxiété.	Rabbani <i>et al.</i> , 2003 ; 2005
	Le traitement des troubles immunitaires.	Basaren <i>et al.</i> , 1996
<i>S. alopecuros</i> (L.) Bentham	Traiter les troubles gastriques et l'ulcère gastroduodéal provoqué par <i>Helicobacter pylori</i> .	Stamatis <i>et al.</i> , 2003
<i>S. sieboldii</i> Miq.	Activité anti-anoxie.	Yamahara <i>et al.</i> , 1990
	Activité de la hyaluronidase.	Takeda <i>et al.</i> , 1985
	Activité immunosuppressive.	Nishimura <i>et al.</i> , 1991
<i>S. palustris</i> L. <i>S. sylvatica</i> L.	Antispasmodique et pour le traitement des blessures.	Gruenwald <i>et al.</i> , 2000
<i>S. inflata</i> Benth.	Traiter les infections, l'asthme, les affections rhumatismales et d'autres troubles inflammatoires.	Maleki <i>et al.</i> , 2001
<i>S. officinalis</i>	Antiseptique, astringent, tonique, vermifuge, digestif, légèrement sédatif. Faible capacité de piéger les radicaux libres, mais exposées une forte capacité en vue de réduire les métaux de transition et l'inhibition de l'oxydation des lipides.	Matkowski et Piotrowska., 2006
<i>S. byzanthina</i> C. Koch.	Antinociceptive et anti-inflammatoire.	Khanavi <i>et al.</i> , 2005
<i>S. spruneri</i> , <i>S. alpina</i> , <i>S. officinalis</i> , <i>S. palustris</i> , <i>S. recta</i> subsp. <i>recta</i> , <i>S. recta</i> subsp. <i>subcrenata</i> , <i>S. salviifolia</i> et <i>S. sylvatica</i>	Activité antioxydante.	Couladis <i>et al.</i> , 2003; Vundac <i>et al.</i> , 2007
<i>S. alpina</i> , <i>S. officinalis</i> , <i>S. macrantha</i> , <i>S. recta</i> , <i>S. annua</i> et <i>S. sylvatica</i> L.		Radnai <i>et al.</i> , 2006

Tableau I.1. Usages et propriétés de quelques espèces du genre *Stachys*. (La suite)

<i>S. schtschegleevii</i> Sosn.	La décoction des feuilles de cette plante est utilisée comme un antibiotique, et sert à traiter la grippe et le froid.	Duke, 1986
<i>S. neglecta</i> L.	Stimule la sécrétion biliaire hépatique, augmente la formation de la bile, et de la bilirubine, c-à-d. possède une activité cholérétique.	Pasechnik <i>et al.</i> , 1971.
<i>S. recta</i> L. et <i>S. neglecta</i> L.	Stimulent la capacité de la libération de la bile du foie, diminuant la concentration des acides biliaires et de bilirubine.	Pasechnik, 1969.
<i>S. lanata</i>	Propriétés de contracter les muscles de l'utérus.	Karaev <i>et al.</i> , 1955
<i>S. riederi</i> var. <i>japonica</i> Miq	Effet antiallergique.	Shin, 2004
		Kim <i>et al.</i> , 2003
<i>S. macrantha</i>	- Lymphocytes humains - Effets protecteurs sur les dommages de l'ADN.	Aydin <i>et al.</i> , 2004

I.4. Travaux antérieurs sur le genre *Stachys*

La recherche bibliographique réalisée sur le genre *Stachys* montre sa richesse en composés phénoliques de type flavonique (Tableau I.3), les terpènes (Tableau I.4) et phényléthanoides (Tableau I.5).

I.4.1. Les flavonoïdes

I.4.1.1. Généralités

Les flavonoïdes au sens large sont des pigments quasiment universels des végétaux (Rice-Evans *et al.*, 1996). Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanones, les dihydroflavonols, les isoflavones, les isoflavanones, les chalcones, les aurones, les anthocyanes et les tanins.

Ces diverses structures se rencontrent à la fois sous forme libre (aglycone) ou sous forme de glycosides. On les trouve, d'une manière très générale, dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organes : racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits.

I.4.1.2. Structure chimique et classification

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune ce qui explique le fait qu'ils possèdent le même squelette de base à quinze atomes de carbones, constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en C6 (A et B), reliés par une chaîne en C3 (Schéma I.1) (Bruneton, 1999).

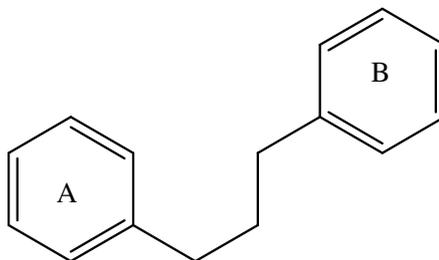


Schéma I.1. Squelette de base des flavonoïdes.

Ils peuvent être regroupés en plusieurs classes selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central : les anthocyanes, les tanins condensés, les isoflavonoïdes et les flavonoïdes au sens strict comprenant les flavones, les flavonols, les dihydroflavonols, les flavanones ainsi que les aures et les chalcones (Tableau I.2) (Bruneton, 1999).

a. Flavones et flavonols

Ces deux groupes de molécules représentent la majorité des flavonoïdes connus.

Le cycle A est, dans plus de 90% des cas, substitué par deux hydroxyles phénoliques en C-5 et en C-7. Ces hydroxyles peuvent être libres ou étherifiés. D'autres substitutions sont possibles avec des fréquences variables: hydroxyles libres ou étherifiés en C-7 et/ou en C-8, méthylation en C-7 ou en C-8, implication du C-6 et/ou C-8 dans une liaison carbone-carbone avec un sucre.

D'autre part, dans plus de 80% des cas, le cycle B est substitué en C-4' ou disubstitué en C-3' et C-4', ou moins fréquemment 3',4',5'-trisubstitué; ces substituants peuvent être des groupes hydroxyles comme peuvent être des méthoxyles. Les autres positions (C-2' et C-6') ne sont qu'exceptionnellement substituées.

En plus, les flavonols se distinguent des flavones par la présence d'un groupement OH en position C-3 (Tableau I.2).

b. Flavanones et dihydroflavonols

Ces molécules sont caractérisées par l'absence de la double liaison C2-C3 et par la présence de centres d'asymétrie. Les variations structurales sont de même nature que celles décrites pour les flavones et les flavonols. Les dihydroflavonols se distinguent des flavanones par l'hydroxylation de la position C-3. Ces composés sont toutefois moins fréquents que leurs homologues insaturés (Tableau I.2).

c. Flavan-3-ols, flavan-3,4-diols et anthocyanidols

Ces trois groupes de molécules sont toujours hydroxylés en position 3 et se caractérisent par l'absence du groupe carbonyle en C-4. Cette position peut être libre (cas des flavan-3-ols et anthocyanidols) ou hydroxylée (cas des flavan-3,4-diols). Les flavan-3-ols et les flavan-3,4-diols sont à l'origine des polymères flavaniques appelés proanthocyanidols ou tanins condensés (Tableau I.2).

Les anthocyanidols les plus fréquents sont le pélargonidol et le cyanidol. Les anthocyanosides sont caractérisés par l'engagement de l'hydroxyle en position 3 dans une liaison hétérosidique (Tableau I.2).

d. Chalcones et aurones

Les chalcones sont dépourvues de l'hétérocycle central, elles sont constituées par deux unités aromatiques reliées par une chaîne tricarbonée, cétonique, α,β -insaturée. Le noyau B est assez fréquemment non substitué, alors que les substitutions sur le cycle A sont le plus souvent identiques à celles des autres flavonoïdes (C-2', C-4', C-6').

Les aurones sont caractérisées par une structure de 2-benzylidène coumaranone.

Pour ces deux types de molécules, la numérotation des positions est différente des autres flavonoïdes décrits précédemment (Tableau I.2).

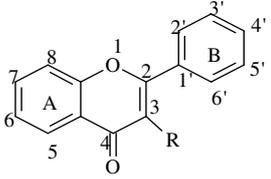
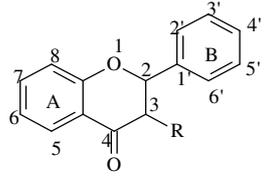
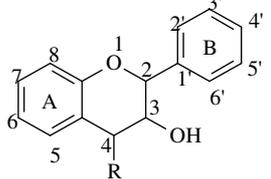
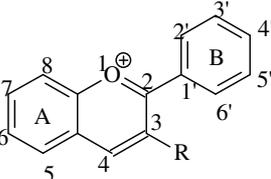
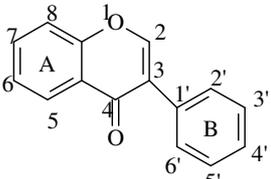
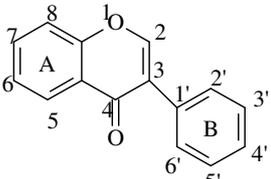
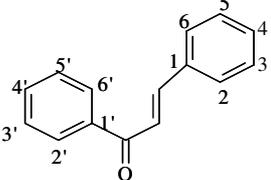
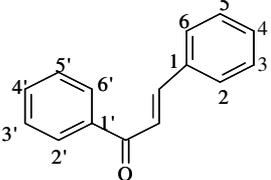
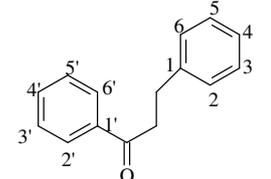
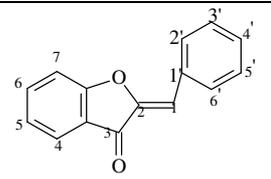
e. Hétérosides flavonoïdiques

Chez ces composés, la partie osidique peut être mono-, di- ou trisaccharidique. La partie osidique de ces molécules peut être formée avec le D-glucose, le D-galactose ou le D-allose mais aussi avec des pentoses (D-apiose, D-arabinose, L-rhamnose, D-xylose) ou avec les acides D-glucuroniques et D-galacturoniques. La liaison entre la génine et l'ose peut se faire par n'importe lequel des hydroxyles phénoliques de la génine mais se fait en règle générale avec l'hydroxyle en C-7 pour les flavones et l'hydroxyle en C-3 des flavonols.

La plupart des flavonoïdes isolés du genre *Stachys* appartiennent à cette classe. 87 composés au total sont répertoriés, toutes ces molécules sont glycosylées: 59 flavones, 04 flavonols glycosylés et un biflavonoïde. Concernant les aglycones, nous avons recensé 12 flavones et 09 flavonols (Tableau I.3).

Seulement deux flavanones sont répertoriées : La naringénine a été isolé de l'espèce *S. aegyptiaca* L. et l'eriodictyol qui a été isolé de l'espèce *S. swainsonii* subsp. *Swainsonii* et subsp. *argolica* (Tableau I.3).

Tableau I.2. Structure de base des différentes classes de flavonoïdes (Bruneton, 1999).

Structure	Type de flavonoïdes	Exemples de molécules	
	R=H Flavone	5, 7, 4'-OH	Apigénine
	R=OH Flavonol	5, 7, 3', 4'-OH	Lutéoline
	R=H Flavanone (Dihydroflavone)	5, 7, 4'-OH	Kaempferol
	R=OH Flavanonol (Dihydroflavonol)	5, 7, 3', 4'-OH	Quercétine
	R=H Catechine (Flavan-3-ol)	5, 7, 3', 4', 5'-OH	Collocatchine
	R=OH Leucoanthocyanidine (Flavan-3,4-diol)	5, 7, 3', 4'-OH	Catechine
	R=OH Flavylum (Anthocyane)	5, 7, 3', 4', 5'-OH	Leucocyanidine
	R=OH Anthocyanidine	5, 7, 3', 4', 5'-OH	Leucodeiphenidine
	R=OH Flavylum (Anthocyane)	5, 7, 3', 4'-OH	Luteolidine
	R=OH Anthocyanidine	5, 7, 3', 4', 5'-OH	Cyanidine
	R=OH Anthocyanidine	5, 7, 3', 4', 5'-OH	Delphinidine
	Isoflavone	5, 7, 4'-OH	Génisteine
	5, 7, 4'-OH	7, 4'-OH	Daidzeine
	5, 7, 3', 4'-OH	Orobol	
	2', 4', 3, 4-OH	Buteine	
	2', 3', 4', 3, 4-OH	Okonine	
	4, 2', 4', 6'-OH	Phlorétine	
	3, 4, 2', 4', 6'-OH	Hydroxyphlorétine	
	6, 3', 4'-OH	Sulphurétine	
	6, 7, 3', 4'-OH	Maritimétine	

I.4.1.3. Biosynthèse des flavonoïdes

Les connaissances actuelles sur la biosynthèse et la production des flavonoïdes catalysée par des enzymes proviennent de plusieurs études réalisées par de nombreux chercheurs (Forkman, 1992). Malgré leur diversité structurale importante, tous les flavonoïdes semblent avoir une voie biosynthétique commune.

L'enzyme clé pour la formation du squelette flavonoïque est la chalcone synthase (CHS) qui catalyse l'étape de condensation de trois unités acétate à partir de malonyl-CoA avec la 4-coumaroyl-CoA pour donner l'intermédiaire en C15, la 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone (Richter, 1993). Cette chalcone est l'intermédiaire caractéristique de la synthèse des différentes classes de flavonoïdes (Schéma I.2).

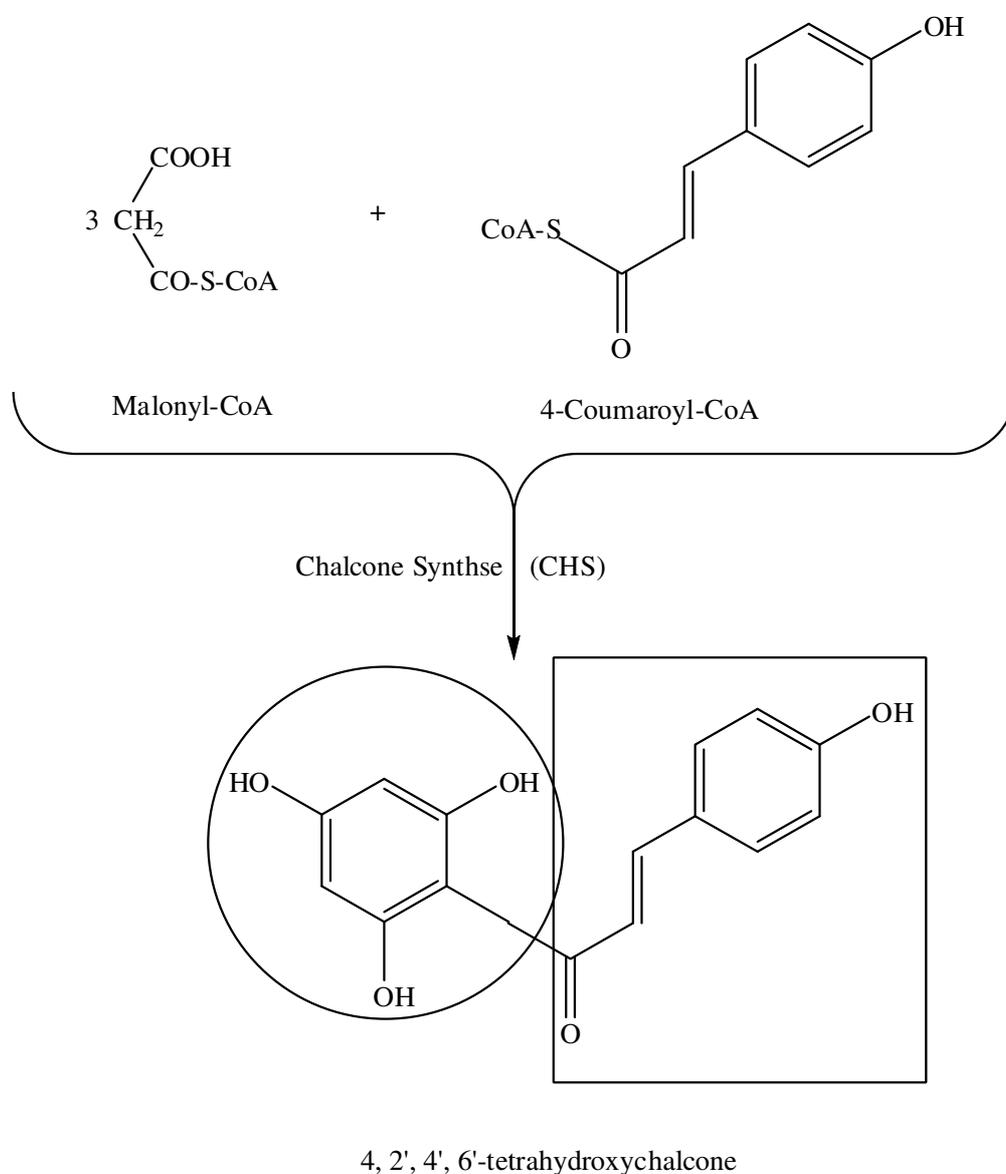


Schéma I.2. Voie biosynthétique conduisant aux chalcones.

La biosynthèse (Schéma I.3) se fait à partir d'un précurseur commun, la 4, 2', 4', 6' - tétrahydroxychalcone. Cette chalcone de couleur jaune est métabolisée sous l'action d'enzyme, la chalcone isomérase, en flavanone (1) : naringénine. C'est sur cette dernière qu'agit ensuite la flavone synthase ou la (2*S*)-flavanone-3-hydroxylase pour donner la formation de la flavone (2) : apigénine ou le dihydroflavonol (3): (2*R*, 3*R*)- dihydrokaempférol, respectivement. Les deux enzymes fonctionnent différemment, la première introduit la double liaison entre les carbones C-2 et C-3, tandis que la deuxième catalyse l'hydroxylation du carbone C-3. Le dihydroflavonol, en présence de la flavonol synthase ou la dihydroflavonol-4-réductase, se métabolise en flavonol (4) : kaempférol ou en flavan-3,4-diol (5) : leucoanthocyanidol, respectivement. Ce dernier semble être le précurseur des flavan-3-ols (6) et anthocyanidols (7). Cependant, les étapes ultimes de leur formation ne sont pas encore élucidées. Le pélargonidol (7), sous l'action de la 3-O-glycosyl-transférase, se transforme en anthocyanoside (8) : pélargonidol-3-glucoside (Bruneton, 1999).

Les composés de chaque sous-classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles, méthoxyles et autres) sur les deux cycles aromatiques A et B et la chaîne en C3 intermédiaire.

A l'état naturel, on trouve très souvent les flavonoïdes sous forme de glycosides. Une ou plusieurs de leurs fonctions hydroxyles sont alors glycosylés. La partie du flavonoïde autre que le sucre est appelée aglycone.

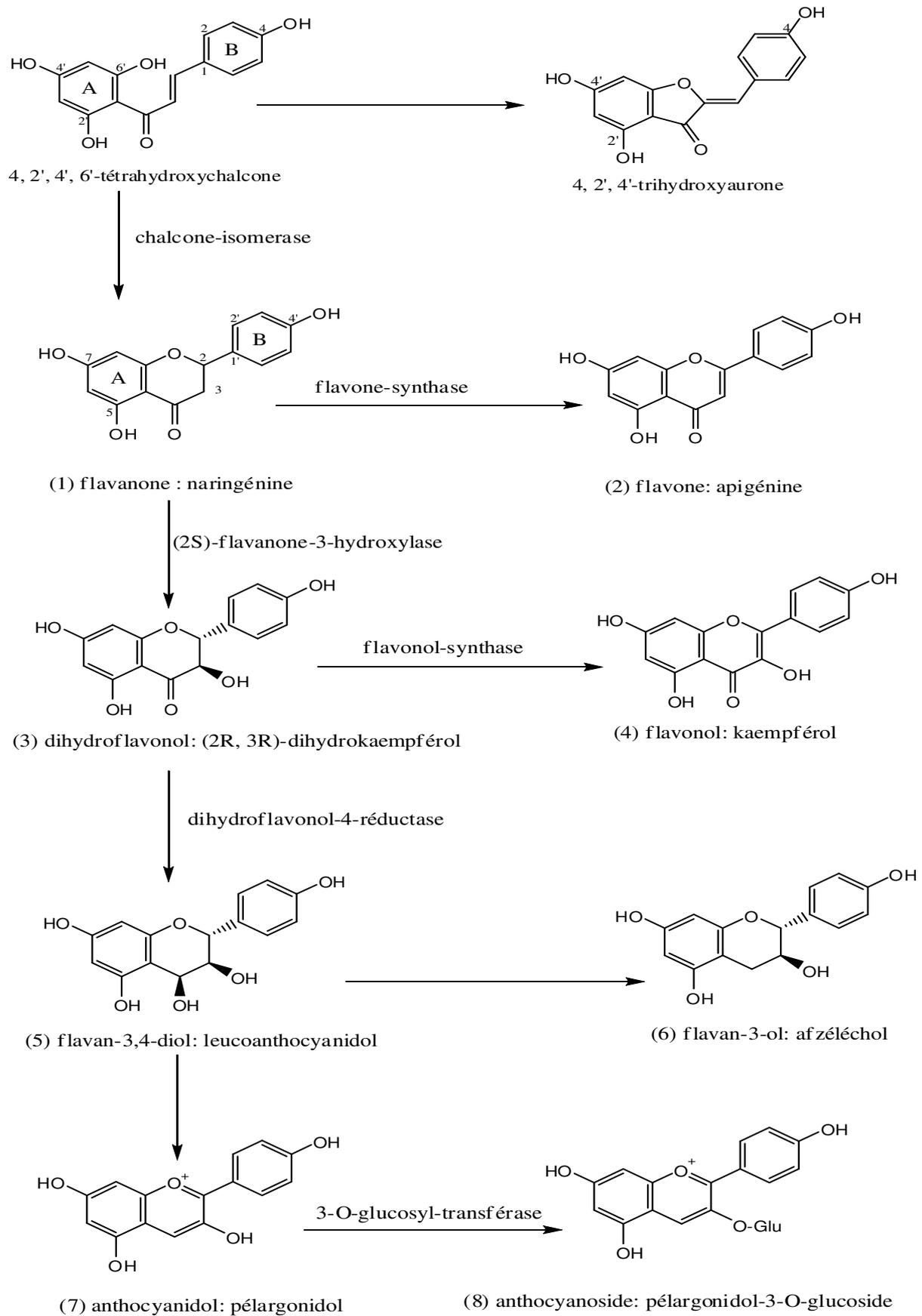


Schéma I.3. Schéma illustrant la biosynthèse des flavonoïdes (Bruneton, 1999).

Tableau I.3. Les flavonoïdes isolés du genre *Stachys* sp.

Flavonoïdes isolés et N° de Structure	Espèces	Référence
Apigénine [1]	<i>S. aegyptiaca</i> L.	El-Ansari <i>et al.</i> , 1991 Sharaf, 1998
	<i>S. ionica</i> Halacsy	Meremeti <i>et al.</i> , 2004
	<i>S. officinalis</i> L.	Kobzar et Nikonov, 1986
	<i>S. neglecta</i> L. [= <i>S. annua</i> L.]	Zinchenko, 1969
	<i>S. swainsonii</i> subsp. <i>swainsonii</i>	Skaltsa <i>et al.</i> , 2006
	<i>S. swainsonii</i> subsp. <i>argolica</i>	Skaltsa <i>et al.</i> , 2006
Lutéoline [2]	<i>S. aegyptiaca</i> L.	El-Ansari <i>et al.</i> , 1991
	<i>S. neglecta</i> L. [= <i>S. annua</i> L.]	Zinchenko, 1969
Chrysoériol [3]	<i>S. aegyptiaca</i> L.	El-Ansari <i>et al.</i> , 1991
	<i>S. candida</i> Bory, & Chaubard, <i>S. chrysantha</i> Boiss. & Heildr.	Skaltsa <i>et al.</i> , 2000
	<i>S. swainsonii</i> subsp. <i>swainsonii</i>	Skaltsa <i>et al.</i> , 2006
	<i>S. swainsonii</i> subsp. <i>argolica</i>	Skaltsa <i>et al.</i> , 2006
Xanthomicrol (=5,4'-dihydroxy-6,7,8-triméthoxyflavone) [4]	<i>S. aegyptiaca</i> L.	El-Ansari <i>et al.</i> , 1991 Sharaf, 1998
	<i>S. ionica</i> Halacsy	Meremeti <i>et al.</i> , 2004
	<i>S. candida</i> Bory, & Chaubard, <i>S. chrysantha</i> Boiss. & Heildr.	Skaltsa <i>et al.</i> , 2000
	<i>S. schtschegleevii</i> Sosn.	Nazemiyeh <i>et al.</i> , 2006
	<i>S. swainsonii</i> subsp. <i>argolica</i>	Skaltsa <i>et al.</i> , 2006
Sideritiflavone (=5,3',4'-trihydroxy-6,7,8-triméthoxyflavone) [5]	<i>S. aegyptiaca</i> L.	El-Ansari <i>et al.</i> , 1991
5,4'-dihydroxy-6,7,8,3'-tétraméthoxyflavone [6]	<i>S. aegyptiaca</i> L.	El-Ansari <i>et al.</i> , 1991

Tableau I.3. Les flavonoïdes isolés du genre *Stachys* sp. (La suite)

5-hydroxy-6,7,8,3',4'-pentaméthoxyflavone [7]	<i>S. aegyptiaca</i> L.	El-Ansari <i>et al.</i> , 1991
5,4'-dihydroxy-7,3',5'-triméthoxyflavone [8]	<i>S. officinalis</i> L.	Kobzar and Nikonov, 1986
Cirsimaritine [9]	<i>S. schtschegleevii</i> Sosn.	Nazemiyeh <i>et al.</i> , 2006
Baikaleine (=5,6,7-trihydroxyflavone) [10]	<i>S. annua</i> L.	Sheremet and Komissarenko, 1972
Salvigénine [11]	<i>S. ionica</i> Halacsy	Meremeti <i>et al.</i> , 2004
	<i>S. swainsonii</i> subsp. <i>argolica</i>	Skaltsa <i>et al.</i> , 2006
Eupatorine (3'-hydroxy-5, 6, 7,-4'-tétraméthoxyflavone) [12]	<i>S. swainsonii</i> subsp. <i>swainsonii</i>	Skaltsa <i>et al.</i> , 2006
	<i>S. swainsonii</i> subsp. <i>argolica</i>	Skaltsa <i>et al.</i> , 2006
Calycoptérine (=5,4'-dihydroxy-3,6,7,8-tétraméthoxyflavone) [13]	<i>S. aegyptiaca</i> L.	El -Ansari <i>et al.</i> , 1991
	<i>S. candida</i> Bory, & Chaubard, <i>S. chrysantha</i> Boiss. & Heildr.	Skaltsa <i>et al.</i> , 2000
Chryso splenetine (=5,4'-dihydroxy-3,6,7,3'-tétraméthoxyflavone) [14]	<i>S. aegyptiaca</i> L.	El-Ansari <i>et al.</i> , 1991
	<i>S. ionica</i> Halacsy	Meremeti <i>et al.</i> , 2004
5-hydroxy-3,6,7,8,4'-pentaméthoxyflavone [15]	<i>S. aegyptiaca</i> L.	El-Ansari <i>et al.</i> , 1991
5,3',4'-trihydroxy-3,6,7,8-tétraméthoxyflavone [16]	<i>S. aegyptiaca</i> L.	El-Ansari <i>et al.</i> , 1991
5,4'-dihydroxy-3,6,7,8,3'-pentaméthoxyflavone [17]	<i>S. aegyptiaca</i> L.	El-Ansari <i>et al.</i> , 1991
5-hydroxy-3,6,7,4'-tétraméthoxyflavone [18]	<i>S. ionica</i> Halacsy	Meremeti <i>et al.</i> , 2004
Casticine [19]	<i>S. ionica</i> Halacsy	Meremeti <i>et al.</i> , 2004
Penduletine (4',5'-dihydroxy-3,6,7-triméthoxyflavone) [20]	<i>S. swainsonii</i> subsp. <i>Swainsonii</i>	Skaltsa <i>et al.</i> , 2006
5-hydroxyauranétine (3,6,7, 8,4'-pentaméthoxyflavone) [21]	<i>S. swainsonii</i> subsp. <i>swainsonii</i>	Skaltsa <i>et al.</i> , 2006
Naringénine [22]	<i>S. aegyptiaca</i> L.	El-Ansari <i>et al.</i> , 1995

Tableau I.3. Les flavonoïdes isolés du genre *Stachys* sp. (La suite)

Eriodictyol [23]	<i>S. swainsonii</i> subsp. <i>Swainsonii</i>	Skaltsa <i>et al.</i> , 2006
	<i>S. swainsonii</i> subsp. <i>argolica</i>	Skaltsa <i>et al.</i> , 2006
Vicénine-2 (=Apigénine 6, 8-di- <i>C</i> -glucoside) [24]	<i>S. aegyptiaca</i> L.	El-Ansari <i>et al.</i> , 1991 Sharaf, (1998)
	<i>S. palustris</i> L.	Marin <i>et al.</i> , 2004
Apigénine-8- <i>C</i> -glucoside (= Vitéxine) [25]	<i>S. officinalis</i> L. Trev.	Marin <i>et al.</i> , 2004
	<i>S. scardica</i> Griseb	Marin <i>et al.</i> , 2004
Lucénine-2 [26]	<i>S. aegyptiaca</i> L.	El-Ansari <i>et al.</i> , 1991 Sharaf, 1998
Apigénine-7- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucoside (= Cosmosiine) [27]	<i>S. aegyptiaca</i> L.	El-Ansari <i>et al.</i> 1991
	<i>S. germanica</i> L.	Marin <i>et al.</i> , 2004
	<i>S. plumosa</i> Griseb	Marin <i>et al.</i> , 2004
	<i>S. neglecta</i> L. [= <i>S. annua</i> L.]	Zinchenko, 1970a
	<i>S. schtschegleevii</i> Sosn.	Nazemiyeh <i>et al.</i> , 2006
Apigenine-7- diglucosides [28]	<i>S. aegyptiaca</i> L.	El-Ansari <i>et al.</i> , 1991
Apigénine-7- <i>O</i> -[6'''- <i>O</i> -acétylallosyl-(1 \rightarrow 2)-glucoside] [29]	<i>S. aegyptiaca</i> L.	El-Ansari <i>et al.</i> , 1991
Apigénine-7- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> - <i>E</i> - <i>p</i> -coumaroyl)- β - <i>D</i> -glucoside [30]	<i>S. aegyptiaca</i> L.	El-Ansari <i>et al.</i> , 1995
	<i>S. ionica</i> Halacsy	Meremeti <i>et al.</i> , 2004
	<i>S. schtschegleevii</i> Sosn.	Nazemiyeh <i>et al.</i> , 2006
	<i>S. alopecuros</i> L. Bentham.	Marin <i>et al.</i> , 2004
	<i>S. officinalis</i> L. Trev.	Marin <i>et al.</i> , 2004
	<i>S. anisochila</i> Vis. & Pancic	Marin <i>et al.</i> , 2004
	<i>S. palustris</i> L.	Marin <i>et al.</i> , 2004
	<i>S. sylvatica</i> L.	Marin <i>et al.</i> , 2004
	<i>S. germanica</i> L.	Marin <i>et al.</i> , 2004

Tableau I.3. Les flavonoïdes isolés du genre *Stachys* sp. (La suite)

	<i>S. plumosa</i> Griseb	Marin <i>et al.</i> , 2004
	<i>S. scardica</i> Griseb	Marin <i>et al.</i> , 2004
Apigénine-7- <i>O</i> -(3"- <i>p</i> -coumaroyl)-glucoside [31]	<i>S. aegyptiaca</i> L.	El-Ansari <i>et al.</i> , 1995
Lutéoline-7- <i>O</i> - β -D-glucoside (= Cynaroside) [32]	<i>S. aegyptiaca</i> L.	El-Ansari <i>et al.</i> , 1991 Sharaf, 1998
	<i>S. alopecuros</i> L. Benth.	Marin <i>et al.</i> , 2004
	<i>S. candida</i> Bory, & Chaubard, <i>S. chrysantha</i> Boiss. & Heildr.	Skaltsa <i>et al.</i> 2000
	<i>S. neglecta</i> L. [= <i>S. annua</i> L.]	Zinchenko, 1970a
	<i>S. plumosa</i> Griseb	Marin <i>et al.</i> , 2004
	<i>S. scardica</i> Griseb	Marin <i>et al.</i> , 2004
	<i>S. swainsonii</i> subsp. <i>swainsonii</i>	Skaltsa <i>et al.</i> , 2006
	<i>S. swainsonii</i> subsp. <i>argolica</i>	Skaltsa <i>et al.</i> , 2006
Lutéoline-7-diglucosides [33]	<i>S. aegyptiaca</i> L.	El-Ansari <i>et al.</i> , 1991
Lutéoline-7- <i>O</i> -[6"- <i>O</i> -acétylallosyl-(1 \rightarrow 2)-glucoside] [34]	<i>S. aegyptiaca</i> L.	El-Ansari <i>et al.</i> , 1991
Lutéoline-6- <i>C</i> -glucoside (= Isoorientine) [35]	<i>S. officinalis</i> L. Trev.	Marin <i>et al.</i> , 2004
	<i>S. scardica</i> Griseb	Marin <i>et al.</i> , 2004
Chrysoériol-7- <i>O</i> - β -D-glucoside [36]	<i>S. aegyptiaca</i> L.	El-Ansari <i>et al.</i> , 1991
	<i>S. candida</i> Bory, & Chaubard, <i>S. chrysantha</i> Boiss. & Heildr.	Skaltsa <i>et al.</i> , 2000
	<i>S. alopecuros</i> L. Benth.	Marin <i>et al.</i> , 2004
	<i>S. swainsonii</i> subsp. <i>swainsonii</i>	Skaltsa <i>et al.</i> , 2006
	<i>S. swainsonii</i> subsp. <i>argolica</i>	Skaltsa <i>et al.</i> , 2006
Chrysoériol-7- <i>O</i> -[6"(<i>E</i>)- <i>p</i> -coumaroyl]- β -D-glucoside [37]	<i>S. schtschegleevii</i> Sosn.	Nazemiyeh <i>et al.</i> 2006

Tableau I.3. Les flavonoïdes isolés du genre *Stachys* sp. (La suite)

Chrysoériol-7- <i>O</i> -β-D-(3"- <i>O</i> - <i>E-p</i> -coumaroyl)-β-D-glucoside [38]	<i>S. candida</i> Bory, & Chaubard, <i>S. chrysantha</i> Boiss. & Heildr.	Skaltsa <i>et al.</i> , 2000
	<i>S. swainsonii</i> subsp. <i>argolica</i>	Skaltsa <i>et al.</i> , 2006
Stachyspinoside (= Chrysoériol-7- <i>O</i> -β-allosyl (1" ^{'''} →2") [6" ^{'''} - <i>O</i> -acétyl-β-glucoside]) [39]	<i>S. spinosa</i> L.	Kotsos <i>et al.</i> , 2001
	<i>S. swainsonii</i> subsp. <i>swainsonii</i>	Skaltsa <i>et al.</i> , 2006
	<i>S. germanica</i> L.	Marin <i>et al.</i> , 2004
Isostachyspinoside (= Chrysoériol-7- <i>O</i> -β-allosyl (1" ^{'''} →2") [6" ^{'''} - <i>O</i> -acétyl-β-glucoside]) [40]	<i>S. spinosa</i> L.	Kotsos <i>et al.</i> , 2007
	<i>S. sylvatica</i> L.	Marin <i>et al.</i> , 2004
	<i>S. plumosa</i> Griseb	Marin <i>et al.</i> , 2004
8-Hydroxychrysoériol-7-allosyl(1→2) monoacétyl glucoside [41]	<i>S. germanica</i> L.	Tomas-Barberan <i>et al.</i> , 1992
8-Hydroxychrysoériol-7-allosyl(1→2) diacétyl glucoside [42]	<i>S. germanica</i>	Tomas-Barberan <i>et al.</i> , 1992
5,6,4'-trihydroxyflavone-7- <i>O</i> -β-D-glucoside [43]	<i>S. officinalis</i> L.	Kobzar and Nikonov, 1986
Stachyflaside (=4',5,6,8-tétrahydroxyflavone-7- <i>O</i> -β-D-glucosyl-(2→1)- <i>O</i> -β-D-mannoside [44])	<i>S. inflata</i> L.	Komissarenko <i>et al.</i> , 1976 Komissarenko <i>et al.</i> , 1978
	<i>S. spectabilis</i> Choisy ex DC.	Derkach <i>et al.</i> , 1980
	<i>S. atherocalyx</i> C. Koch	Komissarenko <i>et al.</i> , 1976 Kostyuchenko <i>et al.</i> , 1982 a
	<i>S. annua</i> L.	Sheremet and Komissarenko, 1971a
Isostachyflaside [45]	<i>S. inflata</i> L.	Komissarenko <i>et al.</i> , 1978
	<i>S. spectabilis</i> Choisy ex DC.	Komissarenko <i>et al.</i> , 1976 Derkach <i>et al.</i> , 1980

Tableau I.3. Les flavonoïdes isolés du genre *Stachys* sp. (La suite)

Acetylisostachyflaside [46]	<i>S. atherocalyx</i> C. Koch	Kostyuchenko <i>et al.</i> , 1982b
Diacetylisostachyflaside [47]	<i>S. atherocalyx</i> C. Koch	Kostyuchenko <i>et al.</i> , 1982 a, b
Diacetylstachyflaside [48]	<i>S. atherocalyx</i> C. Koch	Kostyuchenko <i>et al.</i> , 1981 Kostyuchenko <i>et al.</i> , 1982 a
Diapigénine-7- <i>O</i> -(6''- <i>trans</i> -6''- <i>cis</i> - <i>p,p'</i> -dihydroxy-(μ -truxinyl)-glucoside (= Stachysetine) [49]	<i>S. aegyptiaca</i> L.	El-Ansari <i>et al.</i> , 1995
Scutellareine [50]	<i>S. inflata</i> L.	Komissarenko <i>et al.</i> , 1978
	<i>S. palustris</i> L.	Ross <i>et al.</i> , 1975a
Isoscutellareine [51]	<i>S. inflata</i> L.	Komissarenko <i>et al.</i> , 1978
4'-méthoxyscutellareine [52]	<i>S. annua</i> L.	Sheremet and Komissarenko, 1971d
	<i>S. palustris</i> L.	Ross <i>et al.</i> , 1975a
4'-méthoxyisoscutelellareine [53]	<i>S. inflata</i> L.	Komissarenko <i>et al.</i> , 1978
Isoscutellareine-7- <i>O</i> -glucoside [54]	<i>S. alopecuros</i> L. Benth.	Marin <i>et al.</i> , 2004
Isoscutellareine-7- <i>O</i> - β -D-allosyl-(1 \rightarrow 2)-glucoside [55]	<i>S. aegyptiaca</i> L.	El-Ansari <i>et al.</i> , 1991
Isoscutellareine-7- <i>O</i> -[6'''- <i>O</i> -acétyl- β -D-allosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucoside] [56]	<i>S. angustifolia</i> M.B., <i>S. tetragona</i> Boiss. & Haye	Lenherr <i>et al.</i> , 1984b
	<i>S. beckeana</i> Dörfler & Hayek, <i>S. parolinii</i> Vis.	Lenherr <i>et al.</i> , 1984b
	<i>S. leucoglossa</i> Griseb	Lenherr <i>et al.</i> , 1984b
	<i>S. recta</i> L.	Lenherr <i>et al.</i> , 1984a, b Lenherr <i>et al.</i> , 1987a
	<i>S. labiosa</i> Bertol [= <i>S. recta</i> L., subsp. <i>grandiflora</i> (Caruel), Arcangeli] <i>S. subcrenata</i> Vis. [= <i>S. recta</i> L. subsp. <i>Subcrenata</i> (vis.) Briq.]	Lenherr <i>et al.</i> , 1984b

Tableau I.3. Les flavonoïdes isolés du genre *Stachys* sp. (La suite)

Isoscutellareine-7- <i>O</i> -[6'''- <i>O</i> -acétyl-β-D-allosyl-(1→2)-β-D-glucoside] [56]	<i>S. baldaccii</i> (Maly) Hand-Mazz. [= <i>S. recta</i> L. subsp. <i>baldaccii</i> (K. Maly) Hayek]	Lenherr <i>et al.</i> , 1984b
	<i>S. menthifolia</i> Vis	Lenherr <i>et al.</i> , 1984b
	<i>S. aegyptiaca</i> L.	El-Ansari <i>et al.</i> , 1991
	<i>S. ionica</i> Halacsy	Meremeti <i>et al.</i> , 2004
	<i>S. germanica</i>	Tomas-Barberan <i>et al.</i> , 1992
	<i>S. atherocalyx</i> C. Koch	Lenherr <i>et al.</i> , 1984b
	<i>S. annua</i> L.	Lenherr <i>et al.</i> , 1984b
	<i>S. recta</i> L.	Lenherr <i>et al.</i> , 1984a, b Lenherr <i>et al.</i> , 1987a
	<i>S. anisochila</i> Vis. & Pancic	Lenherr and Mabry, 1987 Marin <i>et al.</i> , 2004
	<i>S. sieboldii</i> Miq.	Takeda <i>et al.</i> , 1985
	<i>S. alpina</i> L.	Marin <i>et al.</i> , 2004
<i>S. plumosa</i> Griseb	Marin <i>et al.</i> , 2004	
Isoscutellareine-7- <i>O</i> -[6'''- <i>O</i> -acetyl- β - D-allosyl-(1→2)-6''- <i>O</i> -acétyl- β - D glucoside] [57]	<i>S. candida</i> Bory, & Chaubard, <i>S. chrysantha</i> Boiss. & Heildr.	Skaltsa <i>et al.</i> , 2000
	<i>S. germanica</i>	Tomas-Barberan <i>et al.</i> , 1992
	<i>S. anisochila</i> Vis. & Pancic	Lenherr and Mabry, 1987
Isoscutellareine-8- <i>O</i> -(6''- <i>trans-p</i> -coumaroyl)-3-β-D-glucoside [58]	<i>S. aegyptiaca</i> L.	Sharaf, 1998
3'-hydroxyisoscuteallareine-7- <i>O</i> -(6'''-acétyloxy)- β - allosyl-(1'''→2'')- β -D-glucoside [59]	<i>S. schtschegleevii</i> Sosn	Nazemiyeh <i>et al.</i> , 2006

Tableau I.3. Les flavonoïdes isolés du genre *Stachys* sp. (La suite)

4'- <i>O</i> - Méthylisoscutezareine-7- <i>O</i> - [(6'''- <i>O</i> -acétyl-β-D-allosyl)- β-D-glucoside] [60]	<i>S. angustifolia</i> M.B., <i>S. tetragona</i> Boiss. & Hayek	Lenherr <i>et al.</i> , 1984b
	<i>S. beckeana</i> Dörfler & Hayek, <i>S. parolinii</i> Vis.	Lenherr <i>et al.</i> , 1984b
	<i>S. leucoglossa</i> Griseb	Lenherr <i>et al.</i> , 1984b
	<i>S. labiosa</i> Bertol [= <i>S. recta</i> L., subsp. <i>grandiflora</i> (Caruel), Arcangeli] <i>S. subcrenata</i> Vis. [= <i>S. recta</i> L. subsp. <i>Subcrenata</i> (vis.) Briq.]	Lenherr <i>et al.</i> , 1984b
	<i>S. baldacii</i> (Maly) Hand-Mazz. [= <i>S. recta</i> L. subsp. <i>Baldacii</i> (K. Maly) Hayek]	Lenherr <i>et al.</i> , 1984b
	<i>S. menthifolia</i> Vis	Lenherr <i>et al.</i> , 1984b
	<i>S. ionica</i> Halácsy	Meremeti <i>et al.</i> , 2004
	<i>S. atherocalyx</i> C. Koch	Lenherr <i>et al.</i> , 1984b
	<i>S. annua</i> L.	Lenherr <i>et al.</i> , 1984b
	<i>S. recta</i> L.	Lenherr <i>et al.</i> , 1984a
	<i>S. anisochila</i> Vis. & Pancic	Marin <i>et al.</i> , 2004
<i>S. sieboldii</i> Miq.	Takeda <i>et al.</i> , 1985	
3'-hydroxy-4'- <i>O</i> - méthylisoscutezareine-7- <i>O</i> - [6'''- <i>O</i> -acétyl- β -D-allosyl- (1→2)- β-D-glucoside] [61]	<i>S. atherocalyx</i> C. Koch	Lenherr <i>et al.</i> , 1984b
	<i>S. annua</i> L.	Lenherr <i>et al.</i> , 1984b
	<i>S. anisochila</i> Vis. & Pancic	Lenherr and Mabry, 1987
	<i>S. leucoglossa</i> Griseb	Lenherr <i>et al.</i> , 1984b
	<i>S. recta</i> L.	Lenherr <i>et al.</i> , 1984a, b
	<i>S. labiosa</i> Bertol [= <i>S. recta</i> L., subsp. <i>grandiflora</i> (Caruel), Arcangeli] <i>S. subcrenata</i> Vis. [= <i>S. recta</i> L. subsp. <i>Subcrenata</i> (vis.) Briq.]	Lenherr <i>et al.</i> , 1984b
	<i>S. menthifolia</i> Vis	Lenherr <i>et al.</i> , 1984b

Tableau I.3. Les flavonoïdes isolés du genre *Stachys* sp. (La suite)

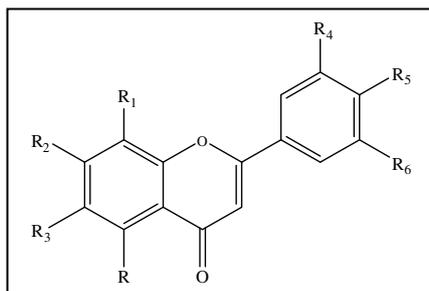
Stachannoside B (= 4'-méthoxyscutellareine-7- <i>O</i> -(2- <i>O</i> -β-D-glucosyl)-β-D-mannoside) [62]	<i>S. annua</i> L.	Sheremet and Komissarenko, 1971
Stachannoaciside (= 4'-méthoxyscutellareine-7- <i>O</i> -β-D-glucosyl-(2 →1)- <i>O</i> -β-D-mannoside - p-hydroxycoumarique acide) [63]	<i>S. annua</i> L.	Sheremet and Komissarenko, 1971b
3'-hydroxy-4'- <i>O</i> -méthylisoscutelellareine-7- <i>O</i> -[6'''- <i>O</i> -acétyl- β -D-allosyl-(1→2)-6''- <i>O</i> -acétyl- β-D-glucoside] [64]	<i>S. anisochila</i> Vis. & Pancic	Lenherr and Mabry, 1987
Cystakhibioside (=p-coumaroyl-7-méthoxyscutellareine-4'- <i>O</i> -β -D-glucosyl-(2→1)- <i>O</i> - β-D-mannoside) [65]	<i>S. annua</i> L.	Sheremet and Komissarenko, 1972
Stachannine A (=5, 6-dihydroxy-4'-méthoxy-7-(<i>O</i> -β-D-glucosyl) flavone) [66]	<i>S. annua</i> L.	Sheremet and Komissarenko, 1971
3-hydroxy-4'- <i>O</i> -méthylisoscutelellareine-7- <i>O</i> -[6'''- <i>O</i> -acétyl-β-D-allosyl-(1→2)- 6''- <i>O</i> -acétyl-β-D-glucoside] [67]	<i>S. anisochila</i> Vis. & Pancic	Lenherr and Mabry, 1987
Hypolaetine-7- <i>O</i> -glucoside [68]	<i>S. alopecuros</i> L. Bentham.	Marin <i>et al.</i> , 2004
	<i>S. scardica</i> Griseb	Marin <i>et al.</i> , 2004
Hypolaetine-7- <i>O</i> -[6'''- <i>O</i> -acétyl- β -D allosyl-(1→2)-3''- <i>O</i> -acétyl]glucoside] [69]	<i>S. aegyptiaca</i> L.	El-Ansari <i>et al.</i> , 1991
	<i>S. germanica</i>	Tomas-Barberan <i>et al.</i> , 1992

Tableau I.3. Les flavonoïdes isolés du genre *Stachys* sp. (La suite)

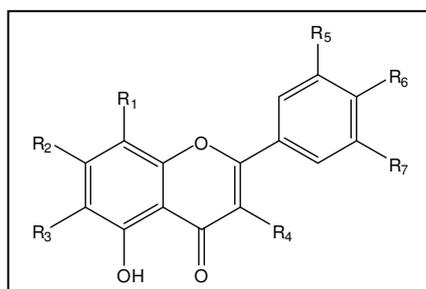
Hypolaetine-7- <i>O</i> -[6'''- <i>O</i> -acetyl- β -D-allosyl-(1→2)-β -D- glucoside] [70]	<i>S. anisochila</i> Vis. & Pancic	Lenherr and Mabry, 1987
	<i>S. germanica</i>	Tomas-Barberan <i>et al.</i> , 1992
	<i>S. alpina</i> L.	Marin <i>et al.</i> , 2004
Hypolaetine-7- <i>O</i> -[6'''- <i>O</i> -acétyl-β-D-allosyl-(1→2)-6''- <i>O</i> -acétyl-β-D- glucoside] [71]	<i>S. anisochila</i> Vis. & Pancic	Lenherr and Mabry, 1987
Hypolaetine-4'- <i>O</i> -méthyl ether-7- acétylallosylglucoside [72]	<i>S. germanica</i> L.	Marin <i>et al.</i> , 2004
	<i>S. alpina</i> L.	Marin <i>et al.</i> , 2004
Spectabiflaside (=4',5,8-trihydroxy-3'-methoxy-7-(<i>O</i> - β -D-glucopyrano-2''- <i>O</i> -β -D-mannosyl)-flavone) [73]	<i>S. spectabilis</i> Choisy ex DC.	Derkach <i>et al.</i> , 1980
	<i>S. atherocalyx</i> C. Koch	Kostyuchenko <i>et al.</i> , 1981 Kostyuchenko <i>et al.</i> , 1982 a
Diacétylspectabiflaside (=4', 5, 8-trihydroxy-3'-méthoxy-7-(<i>O</i> - β -D-glucosyl-2''- <i>O</i> - β -D-mannosyl, diacétyl) flavones) [74]	<i>S. atherocalyx</i> C. Koch	Kostyuchenko <i>et al.</i> , 1981
Acétylspectabiflaside (=5, 8, 4'-trihydroxy-3'-méthoxy-7-(<i>O</i> - β -D-glucopyrano-2''- <i>O</i> - β -D- mannosylacétyl)-flavone) [75]	<i>S. atherocalyx</i> C. Koch	Kostyuchenko <i>et al.</i> , 1982a
Acétyl 4', 5, 8-trihydroxyflavon-7-α-D-glucosyl (2→1) - β -D-glucoside [76]	<i>S. palustris</i> L.	Bishara <i>et al.</i> , 1976
Tricine-7- <i>O</i> -glucoronide [77]	<i>S. alopecuros</i> L. Bentham.	Marin <i>et al.</i> , 2004
	<i>S. officinalis</i> L. Trev.	Marin <i>et al.</i> , 2004
	<i>S. scardica</i> Griseb	Marin <i>et al.</i> , 2004
Tricine-7- <i>O</i> -glucoside [78]	<i>S. alopecuros</i> L. Bentham.	Marin <i>et al.</i> , 2004
	<i>S. officinalis</i> L. Trev.	Marin <i>et al.</i> , 2004
	<i>S. scardica</i> Griseb	Marin <i>et al.</i> , 2004

Tableau I.3. Les flavonoïdes isolés du genre *Stachys* sp. (La suite)

Selgine-7- <i>O</i> -glucoside [79]	<i>S. alopecuros</i> L. Benth.	Marin <i>et al.</i> , 2004
	<i>S. scardica</i> Griseb	Marin <i>et al.</i> , 2004
Tricetine-3',4',5'-triméthyl ether-7- <i>O</i> - β -glucoside [80]	<i>S. officinalis</i> L. Trev.	Marin <i>et al.</i> , 2004
	<i>S. scardica</i> Griseb	Marin <i>et al.</i> , 2004
Stachyfloroside E (= 6,8-dihydroxy-2-(4',5'-dihydroxy)-7[-6- <i>O</i> -acétyl- β -D-galactosyl (1 \rightarrow 2)- β -D-glucosyl oxy]-4H-1-benzopyran [81]	<i>S. parviflora</i>	Ahmed <i>et al.</i> , 2005
Quercetine-3- <i>O</i> -rutinoside [82]	<i>S. palustris</i> L.	Marin <i>et al.</i> , 2004
Isorhamnetine-3- <i>O</i> -glucoside [83]	<i>S. palustris</i> L.	Marin <i>et al.</i> , 2004
Isorhamnetine-3- β -D-glucosyl- (6 \rightarrow 1)-L-rhamnoside [84]	<i>S. swainsonii</i> subsp. <i>swainsonii</i>	Skaltsa <i>et al.</i> , 2006
	<i>S. swainsonii</i> subsp. <i>argolica</i>	Skaltsa <i>et al.</i> , 2006
7- méthoxybaicaleine-6- <i>O</i> -D-acylglucobioside (= Neglectine) [85]	<i>S. neglecta</i> L. [= <i>S. annua</i> L.]	Zinchenko, 1970a
Palustrine (=5-(glucuroglucosyl)-7-méthoxybaicaleine) [86]	<i>S. palustris</i> L.	Zinchenko, 1970b
Palustrinoside (=5-(glucuronosyl)-7-méthoxybaicaleine) [87]	<i>S. palustris</i> L.	Zinchenko, 1970b

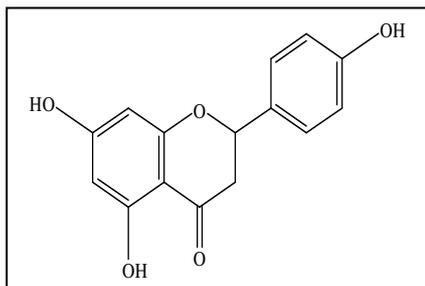


Structure	R	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
[1]	OH	H	OH	H	H	OH	H
[2]	OH	H	OH	H	OH	OH	H
[3]	OH	H	OH	H	OCH ₃	OH	H
[4]	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	OH	H
[5]	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	OH	H
[6]	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	H
[7]	OH	OCH ₃	H				
[8]	OH	H	OCH ₃	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
[9]	OH	H	OCH ₃	OCH ₃	H	OH	H
[10]	OH	H	OH	OH	H	H	H
[11]	OH	H	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃	H
[12]	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	OH	OCH ₃	H

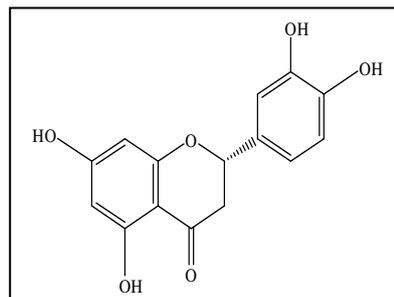


Structure	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
[13]	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	OH	H
[14]	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	H
[15]	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃	H
[16]	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	OH	H
[17]	OCH ₃	OH	H				
[18]	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃	H
[19]	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	OCH ₃	OCH ₃
[20]	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	OH	H
[21]	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃	H

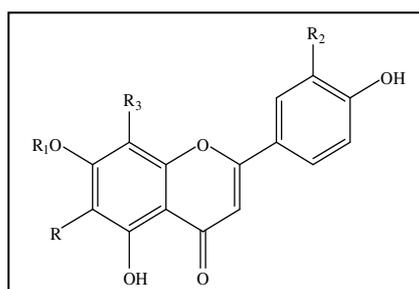
Schéma I.4. Structures chimiques de flavonoïdes isolés du genre *Stachys*.



[22] Naringénine

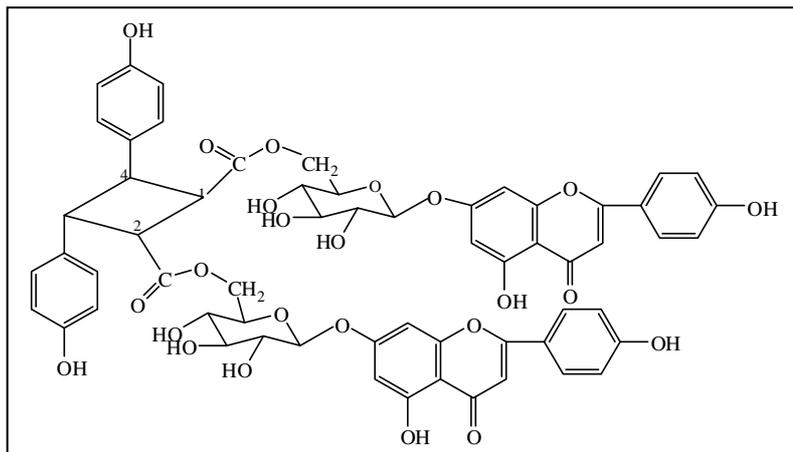


[23] Eriodictyol

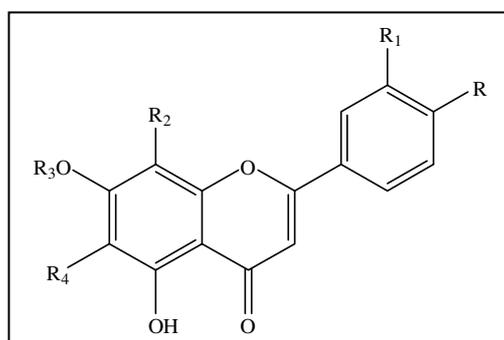


Structure	R	R ₁	R ₂	R ₃
[24]	Glc	H	H	Glc
[25]	H	H	H	Glc
[26]	O-Glc	H	OH	Glc
[27]	H	Glc	H	H
[28]	H	Glc-Glc	H	H
[29]	H	Ac-Allo-Glc	H	H
[30]	H	6''-p-coumaroylglucoside	H	H
[31]	H	3''-p-coumaroylglucoside	H	H
[32]	H	Glc	OH	H
[33]	H	Glc-Glc	OH	H
[34]	H	Ac-Allo-Glc	OH	H
[35]	C-Glc	H	OH	H
[36]	H	Glc	OCH ₃	H
[37]	H	6''-p-coumaroylglucoside	OCH ₃	H
[38]	H	3''-p-coumaroylglucoside	OCH ₃	H
[39]	H	Allo-6'''-Ac-Glc	OCH ₃	H
[40]	H	Allo-6''-Ac-Glc	OCH ₃	H
[41]	H	Allo-Glc-Ac	OCH ₃	OH
[42]	H	Allo-Glc-Ac-Ac	OCH ₃	OH
[43]	OH	Glc	H	H
[44]	OH	Glc-Manno	H	OH
[45]	OH	H	H	Glc-Manno
[46]	OH	H	H	Ac-Glc-Manno
[47]	OH	H	H	Ac-Ac-Glc-Manno
[48]	OH	Ac-Ac-Glc-Manno	H	OH

Schéma I.4. Structures chimiques de flavonoïdes isolés du genre *Stachys*. (La suite)

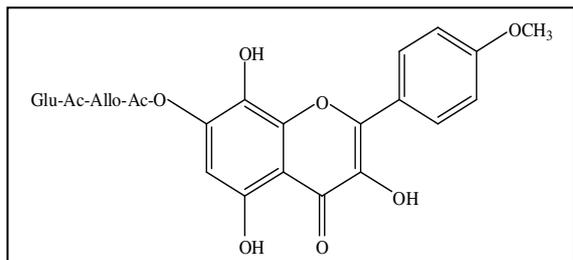


[49] Stachysetine

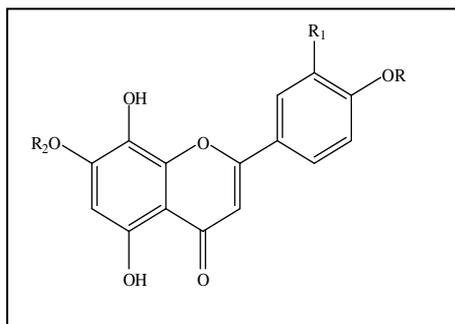


Structure	R	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
[50]	OH	H	H	H	OH
[51]	OH	H	OH	H	H
[52]	OCH ₃	H	H	H	OH
[53]	OCH ₃	H	OH	H	H
[54]	OH	H	OH	Glc	H
[55]	OH	H	OH	Allo-Glc	H
[56]	OH	H	OH	6'''-O-Ac-Allo-Glc	H
[57]	OH	H	OH	6'''-O-Ac-Allo-6''-O-Ac-Glc	H
[58]	OH	H	<i>p</i> -coumarylglucoside	H	H
[59]	OH	OH	OH	Acetyloxy-Allo-Glc	H
[60]	OCH ₃	H	OH	6'''-Ac-Allo-Glc	H
[61]	OCH ₃	OH	OH	6'''-O-Ac-Allo-Glc	H
[62]	OCH ₃	H	H	Glc-Manno	OH
[63]	OCH ₃	H	H	Glc-Manno-acide <i>p</i> -hydroxycoumarique	OH
[64]	OCH ₃	OH	OH	6'''-Ac-Allo-6''-Ac-Glc	H
[65]	Glc-Manno	H	H	<i>p</i> -coumaroyl-OCH ₃	OH
[66]	OCH ₃	H	H	Glc	OH

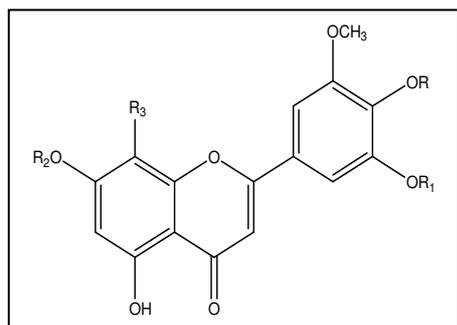
Schéma I.4. Structures chimiques de flavonoïdes isolés du genre *Stachys*. (La suite)



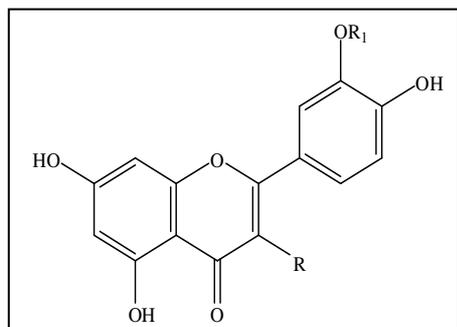
[67]3-hydroxy-4'-O-méthylisoscuteollareine-7-O- [6'''-O-acétyl-β-D-allosyl-(1→2)-6''-O-acétyl-β-D-glucoside]



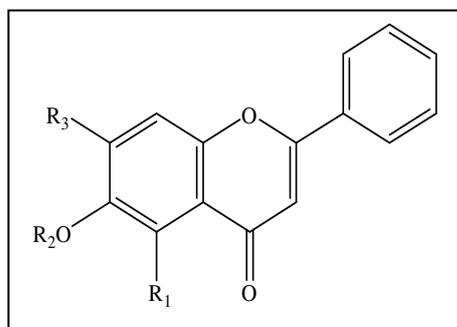
Structure	R	R ₁	R ₂
[68]	H	OH	Glc
[69]	H	OH	6'''-Ac-Allo-3''-Ac-Glc
[70]	H	OH	Ac-Allo-Glc
[71]	H	OH	6'''-Ac-Allo-6''-Ac-Glc
[72]	CH ₃	OH	6'''-Ac-Allo-Glc
[73]	H	OCH ₃	Glc-Manno
[74]	H	OCH ₃	Glc-Manno-diAc
[75]	H	OCH ₃	Glc-Manno-Ac
[76]	H	H	Glc- Glc



Structure	R	R ₁	R ₂	R ₃
[77]	H	CH ₃	GlcA	H
[78]	H	CH ₃	Glc	H
[79]	H	H	Glc	H
[80]	CH ₃	CH ₃	Glc	H
[81]	H	H	Ac-Gal-Glu	OH



Structure	R	R ₁
[82]	O-Rut	H
[83]	O-Glc	CH ₃
[84]	O-Glc-Rha	CH ₃



Structure	R ₁	R ₂	R ₃
[85]	OH	acylglucobioside	OCH ₃
[86]	Glucuroglucosyl	H	OCH ₃
[87]	Glucuronosyl	H	OCH ₃

Schéma I.4. Structures chimiques de flavonoïdes isolés du genre *Stachys*. (La suite)

I.4.2. Les terpènes

I.4.2.1. Généralités sur les terpènes

Les terpènes (= Terpénoïdes) sont des constituants habituels des cellules végétales, impliqués ou non dans des fonctions métaboliques essentielles. L'étude de leur métabolisme connaît un regain d'intérêt par suite du développement des méthodes analytiques auxquelles est venu s'ajouter l'outil moléculaire (Paris et Moysse, 1965).

Ce sont des métabolites secondaires résultant de la condensation d'unités isopréniques à 5 atomes de carbone (Schéma I.5) (Bruneton, 1999 ; Dey et Harborne, 1991 ; Manitto, 1981). A ce jour, avec plus de 30000 molécules identifiées, les terpènes constituent l'une des plus polymorphes et des plus grandes familles de composés naturels. La dénomination des différentes classes de molécules terpéniques repose sur le nombre de motifs isoprènes constituant leur squelette. Ainsi on rencontre :

- Monoterpènes qui comptent deux unités isoprènes soit 10 atomes de carbone
- Sesquiterpènes qui contiennent 3 unités isoprènes soit 15 atomes de carbone
- Diterpènes qui comportent 4 unités isoprènes soit 20 atomes de carbone
- Sesterpènes qui comptent 25 atomes de carbone
- Triterpènes qui comportent 30 atomes de carbone
- Tétraterpènes qui contiennent 40 atomes de carbone.



Schéma I.5. Structure d'une unité isoprénique.

I.4.2.2. Monoterpènes

Ces terpènes proprement dits sont des hydrocarbures en $C_{10}H_{16}$. Ils peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques (Bruneton, 1987) :

Terpènes acycliques : Hydrocarbures, ils ont tendance à se cycliser, d'où leur mode habituel de représentation. A ces terpènes se rattachent un certain nombre de produits naturels à fonctions chimiques spéciales, surtout alcool et aldéhyde.

Terpènes monocycliques : On distingue les dérivés des hydrocarbures en $C_{10}H_{16}$ contenant deux doubles liaisons. Ils sont tous liquides.

Terpènes bicycliques: Ils sont présents dans un grand nombre d'essences surtout chez les conifères.

I.4.2.3. Diterpènes

Les diterpènes constituent un grand groupe de composés en C-20 issus du métabolisme du 2*E*, 6*E*, 10*E*-géranylgeranylpyrophosphate (GGPP). On dénombre plus de 1200 produits diterpéniques répartis en une centaine de squelettes. On les rencontre dans certains insectes et divers organismes marins, ils sont surtout répandus chez les végétaux particulièrement dans les espèces des familles Lamiaceae, Asteraceae et Fabaceae. Ils peuvent être acycliques, monocycliques, tricycliques ou tétracycliques (Dey et Harborne., 1991 ; Bruneton, 1999).

I.4.2.4. Sesquiterpènes

Ce sont des hydrocarbures de formule $C_{15}H_{24}$, soit une fois et demie (sesqui) la molécule des terpènes vrais (en $C_{10}H_{16}$). Ils peuvent être acycliques, monocycliques, bicycliques ou tricycliques.

Composés acycliques : On peut citer le farnésène et le farnésol (alcool correspondant du farnésène, essence de Tilleul, (baumes du Pérou et de Tolu). Le nérolidol, isomère du farnésol (essence de Néroli, baume du Pérou).

Composés monocycliques : Le zingibérène (du Gingembre), L'humulène (du Houblon).

Composés bicycliques : Le cadinène (du goudron de Cade).

Composés tricycliques : Les santalènes (du Santa), Les santalols, alcools correspondants des santalènes.

On peut rattacher aux sesquiterpènes, en raison de leur structure, des lactones comme la santonine, l'hélinine, substances non volatiles mais sublimables. Ces composés, non saturés, sont constitués par deux cycles penta- et heptacarbonés ; on trouve dans ce groupe le guaïazulène (du Gaïac), les vétivazulènes, le chamazulène (des essences de Chamomille et de Matricaire) (Bruneton, 1987).

I.4.2.5. Triterpènes

Ces composés en C30 sont très répandus, notamment dans les résines, à l'état libre, estérifiés ou sous forme hétérosidique. Ils peuvent être aliphatique, tétracycliques ou pentacycliques.

Composés aliphatiques : Le squalène, surtout rencontré dans le règne animal, se trouve également dans l'insaponifiable d'huiles végétales (Olive, Lin, Arachide). C'est un intermédiaire dans la biogenèse des triterpènes cycliques et des stéroïdes.

Composés tétracycliques : L'euphol, l'euphorbol dans les résines d'*Euphorbia resinifera* Berg. Le butyrospermol de beurre de Karité, dans l'insaponifiable de graisses, les acides éburicoïque, polyporénique chez des champignons (Polypores). Le lanostérol du suint de mouton, retrouvé sous le nom de cryptostérol dans la Levure de bière.

Composés pentacycliques : Ils sont très fréquents chez les plantes. On les classe en trois groupes suivant les alcools en $C_{30}H_{50}O$ dont ils dérivent.

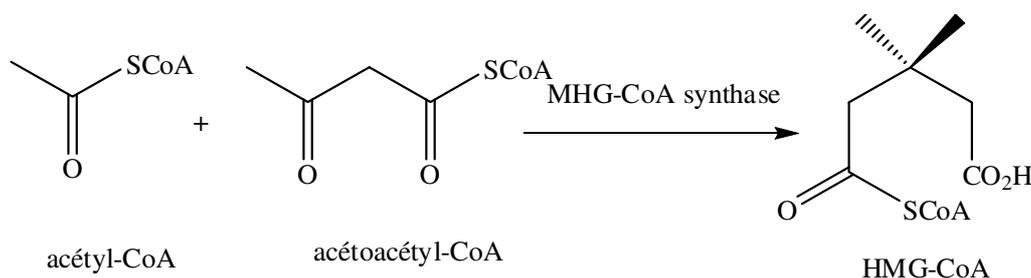
I.4.2.6. Biosynthèse des terpènes

Les terpènes constituent une famille de composés largement répandus dans le règne végétal. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'une unité isoprénique à 5 atomes de carbone (C_5H_8) reconnue par Wallach dès 1887. Cet isoprène est à la base du concept de la "règle isoprénique" énoncée en 1953 par Ruzicka et complétée par Lynen *et al.* (Lynen *et al.*, 1958) et Bloch. (Bloch *et al.*, 1959).

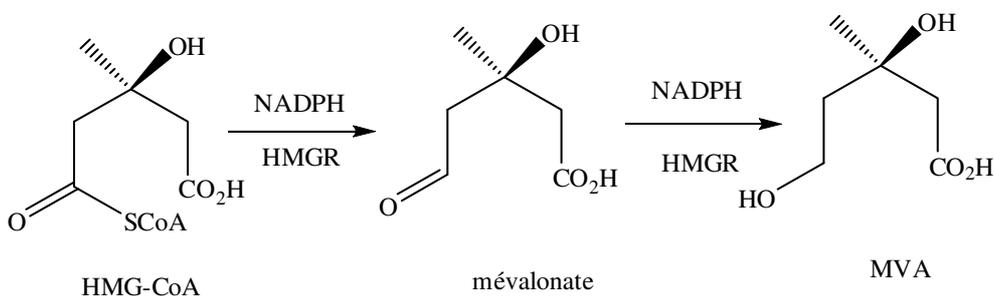
- Les réactions principales qui aboutissent à la formation des terpénoïdes (Bruneton, 1999 ; Dey et Harborne, 1991 ; Manitto, 1981) sont les suivantes :
- Formation de l'unité de base isopentényl-diphosphate (IPP) " l'isoprène actif " à partir de l'acétate, par l'intermédiaire de l'acide mévalonique.
- Couplage tête-à-queue des unités isopréniques conduisant à la formation des mono-, sesqui-, di, sester- et polyterpènes.
- Couplage queue-à-queue des unités en C-15 et C-20 permettant l'élaboration des triterpènes et carotènes.

Les terpènes ne sont pas vraiment formés dans la nature à partir de l'isoprène, qui n'a jamais été détecté dans un organisme vivant. Le véritable précurseur universel de tous les terpènes est l'acide mévalonique.

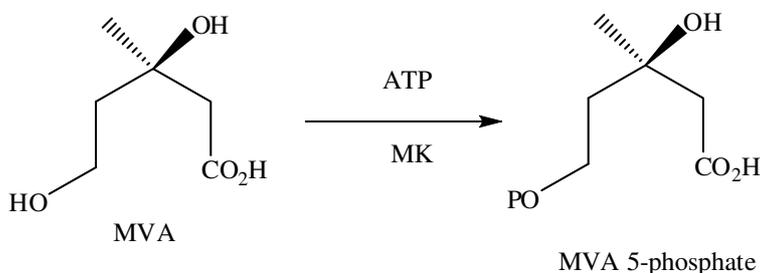
Dans l'étape initiale de la biosynthèse, deux molécules d'acétyl-CoA se condensent grâce à une β -cétotriolase pour former l'acétoacétyl-CoA qui, à son tour, réagit sur une troisième molécule d'acétoacétyl-CoA pour former le 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA (HMG-CoA). Cette réaction est catalysée par un enzyme condensant 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme synthase (MHG-CoA synthase). Deux formes de cet enzyme sont connues chez les mammifères, l'une cytosolique, point de départ de la voie de l'acide mévaloïque, et l'autre, mitochondriale qui associe à l'HMG-CoA lyase est impliquée dans la synthèse des corps cétoniques (Dewick, 1999).



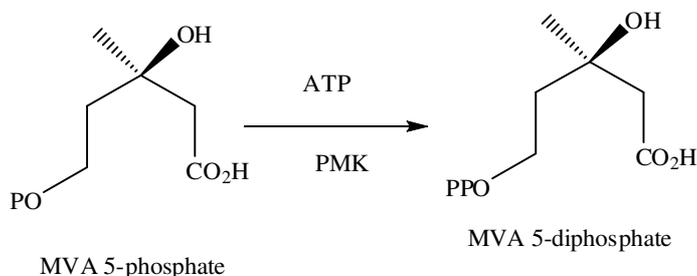
La réduction du carbonyle, combiné au CoA en alcool (déacétylation de l'HMG-CoA), conduisant au mévalonate (MVA) par l'intermédiaire du mévaldate. Elle est catalysée par une enzyme réductase (HMG-CoA réductase) et en présence de NADPH.



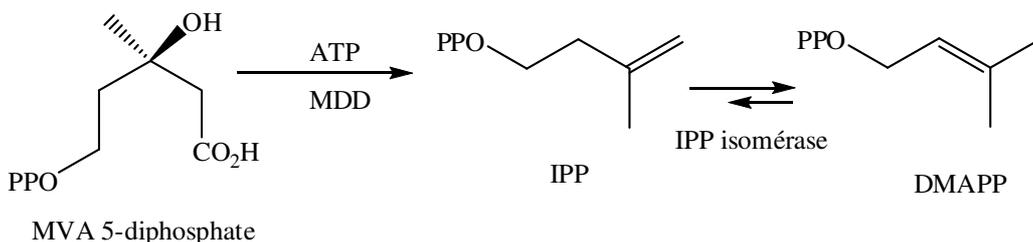
L'acide mévalonique subit une phosphorylation par l'ATP, en présence de la mévalonate kinase (MK). Cet enzyme transforme le mévalonate en mévalonate-5-phosphate (Dewick, 1999).



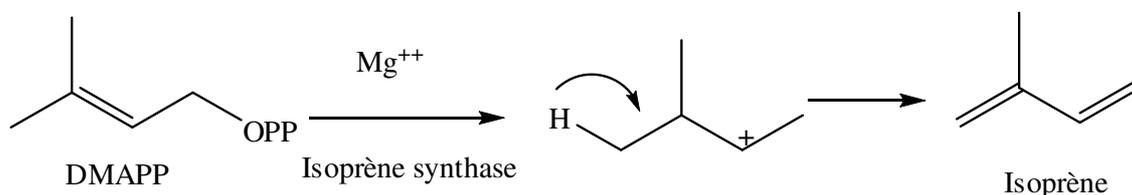
Puis, par l'intermédiaire de la phosphomévalonate kinase (PMK), le mévalonate 5-phosphate est à nouveau phosphorylé conduisant au mévalonate 5-diphosphate (Schulte *et al.*, 1999).



L'ensemble de ces réactions conduit enfin à la formation de l'isopentényldiphosphate (IPP) et du diméthylallyl diphosphate (DMAPP), considérés comme étant des unités isoprènes biogénétiques. L'enzyme intervenant dans la production de l'IPP est la mévalonate 5-diphosphate décarboxylase (MDD). Enfin, un α/β métallo-enzyme, l'isopentényl diphosphate diméthylallyldiphosphate isomérase, encore appelé IPP isomérase localisé dans le cytosol catalyse le réarrangement convertissant l'IPP en DMAPP (Bonanno *et al.*, 2001).



Pour finir, l'isoprène synthase, un enzyme en marge de ce processus biosynthétique localisé au niveau des chloroplastes catalyse l'élimination du motif diphosphate du DMAPP en le transformant en isoprène, un hémiterpène émis par les plantes et qui a une action protectrice (Sharkey et Yeh, 2001).



Après l'isomérisation de l'IPP en DMAPP, cette dernière molécule est condensée avec une, deux ou trois unités d'IPP, par l'intermédiaire de prényltransférase et aboutit respectivement à la formation de :

- Géranyl diphosphate (**GDP** : C-10)
- Farnésyl diphosphate (**FDP** : C-15)
- Géranylgéranyl diphosphate (**GGDP** : C-20).

Ces trois prényl-diphosphates acycliques subissent de nombreux réarrangements pour conduire aux squelettes carbonés parents de chaque classe de terpénoïdes. Ainsi, le GDP permet la formation des monoterpènes. Le FDP conduit aux sesquiterpènes et triterpènes et enfin le GGDP aux diterpènes et tétraterpènes (Bruneton, 1999 ; Dey et Harborne, 1991).

Les transformations catalysées par des terpénoïdes synthases font appel à des mécanismes réactionnels électrophiles particuliers. Les grandes variétés de réactions carbocationiques (cyclisation, réarrangement, déplacement par hybridation,...) expliquent la grande diversité des métabolites terpéniques (Bohlmann *et al.*, 1998).

Trente-six terpènes sont répertoriés dans le genre *Stachys*, ceux-ci peuvent être classés en trois classes : les diterpènes, les triterpènes et stérols. La plupart des terpènes isolés du genre *Stachys* appartiennent aux diterpènes bicycliques.

- Les diterpènes bicycliques sont divisés en deux types ; 15 composés de type clérodane (Tableau I.4.1), et 06 composés de type labdane (Tableau I.4.2).
- Six diterpènes de type kaurane sont répertoriés dans le tableau I.4.3.
- Jusqu'à présent, le seul diterpène acyclique a été isolé de l'espèce *S. byzanthina* C. Koch, et le seul sesquiterpène, a été isolé de l'espèce *S. ionica* Halacsy (Tableau I.4.4).
- Seulement quatre triterpènes pentacycliques (Tableau I.4.5) et trois stérols sont répertoriés dans le genre *Stachys* (Tableau I.4.6).

Tableau I.4.1. Les diterpènes de type clérodane isolés du genre *Stachys* sp.

Diterpènes isolés et N° de Structure	Espèces	Référence
Stachysolone [1]	<i>S. aegyptiaca</i> L.	Melek <i>et al.</i> , 1992
	<i>S. annua</i> L.	Orgiyan and Popa, 1969 Popa <i>et al.</i> , 1972 Popa and Orgiyan, 1972 Popa <i>et al.</i> , 1974 Orgiyan, 1970
3-acetylstachysolone [2]	<i>S. aegyptiaca</i> L.	Melek <i>et al.</i> , 1992
7-Acetylstachysolone [3]	<i>S. recta</i> L.	Adinolfi <i>et al.</i> , 1984
13-acetylstachysolone [4]	<i>S. recta</i> L.	Adinolfi <i>et al.</i> , 1984
7, 13-diacetylstachysolone[5]	<i>S. recta</i> L.	Adinolfi <i>et al.</i> , 1984
Stachysolone derivatives. I, II, et III [6]	<i>S. recta</i> L.	Adinolfi <i>et al.</i> , 1983
Roseostachenone (=2-oxo-13-hydroxy- <i>neo</i> -cleroda-3,14-diene) [7]	<i>S. rosea</i> Boiss.	Fazio <i>et al.</i> , 1992 Fazio <i>et al.</i> , 1994b
Roseostachone (=3-oxo-13-hydroxy-4 α - <i>neo</i> -cleroda-14-ene)cleroda-3,14-diene [8]	<i>S. rosea</i> Boiss.	Fazio <i>et al.</i> , 1992 Fazio <i>et al.</i> , 1994b
Roseostachenol (=2 α ,13-dihydroxy- <i>neo</i> -cleroda-3,14- diene) [9]	<i>S. rosea</i> Boiss.	Fazio <i>et al.</i> , 1994b
Roseotetrol (=2 α ,3 α ,4 β ,13-tétrahydroxy- <i>neo</i> -clérod-14-ene) [10]	<i>S. rosea</i> Boiss.	Fazio <i>et al.</i> , 1994b
Stachylone [11]	<i>S. annua</i> L.	Popa and Orgiyan, 1974 Orgiyan, 1970
Stachone (7,13-dihydroxy-14-(2-clerodanone) [12]	<i>S. annua</i> L.	Popa and Orgiyan, 1974 Orgiyan, 1970
Annuanone [13]	<i>S. annua</i> L.	Popa <i>et al.</i> , 1974 Orgiyan, 1970
Betonicoside A [14]	<i>S. officinalis</i> L.	Miyase <i>et al.</i> , 1996
Betonicolide [15]	<i>S. officinalis</i> L.	Miyase <i>et al.</i> , 1996

Tableau I.4.2. Les diterpènes de type labdane isolés du genre *Stachys* sp.

Diterpènes isolés et N° de Structure	Espèces	Référence
Ribénone (=3-keto-13- <i>epi-ent</i> -manoyl oxide) [16]	<i>S. mucronata</i> Sieb.	Fazio <i>et al.</i> , 1994a
Ribénol (=3 β -hydroxy-13- <i>epi-ent</i> -manoyl oxide) [17]	<i>S. mucronata</i> Sieb.	Fazio <i>et al.</i> , 1994a
(+)6-Desoxyandalusol (=8 α , 18-dihydroxy-labd-13(16)-14-diene) [18]	<i>S. distans</i> Benth.	Piozzi <i>et al.</i> , 2002
	<i>S. ionica</i> Halácsy	Piozzi <i>et al.</i> , 2002
	<i>S. plumosa</i> Griseb.	Paternostro <i>et al.</i> , 2000
13- <i>epi</i> -Sclaréol [19]	<i>S. rosea</i> Boiss.	Fazio <i>et al.</i> , 1994b
(+)-13- <i>epi</i> -jabugodiol (=16,18-dihydroxy-13- <i>epi</i> -manoyloxide) [20]	<i>S. plumosa</i> Griseb.	Paternostro <i>et al.</i> , 2000
(+)-plumosol (=15-acetoxy-labd-13-ene-8 α ,18-diol) [21]	<i>S. plumosa</i> Griseb.	Paternostro <i>et al.</i> , 2000

Tableau I.4.3. Les diterpènes de type kaurane isolés du genre *Stachys* sp.

Diterpènes isolés et N° de Structure	Espèces	Référence
Acide <i>ent</i> -3 β -Acetoxykaur-16-en-19-oïque [22]	<i>S. lanata</i> Jacq.	Piozzi <i>et al.</i> , 1980
<i>ent</i> -3 β ,19-dihydroxykaur-16-ene [23]	<i>S. lanata</i> Jacq.	Piozzi <i>et al.</i> , 1980
Acide <i>ent</i> -3 β -hydroxykaur-16-en-19-oïque [24]	<i>S. lanata</i> Jacq.	Piozzi <i>et al.</i> , 1980
Acide stachysic (6 β -acetoxy(-)-kaur-16-en-18 β -oïc acid) [25]	<i>S. silvatica</i> L.	Popa and Pasechnik, 1974a
6-hydroxykaurene [26]	<i>S. silvatica</i> L.	Popa and Pasechnik, 1974a
6,18-dihydroxykaurene [27]	<i>S. silvatica</i> L.	Popa and Pasechnik, 1974a

Tableau I.4.4. Les diterpènes acycliques et sesquiterpènes isolés du genre *Stachys* sp.

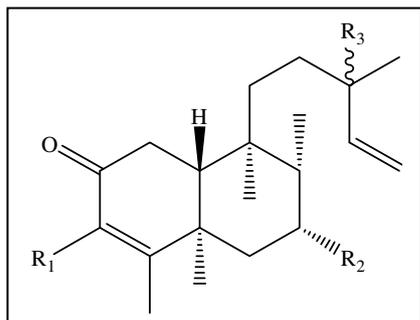
Diterpènes isolés et N° de Structure	Espèces	Référence
Phythyl nonadecanoate [28]	<i>S. byzanthina</i> C. Koch.	Khanavi <i>et al.</i> , 2005
(-)-8 α -hydroxyelemol [29]	<i>S. ionica</i> Halacsy	Meremeti <i>et al.</i> , 2004

Tableau I.4.5. Les triterpènes pentacycliques isolés du genre *Stachys* sp.

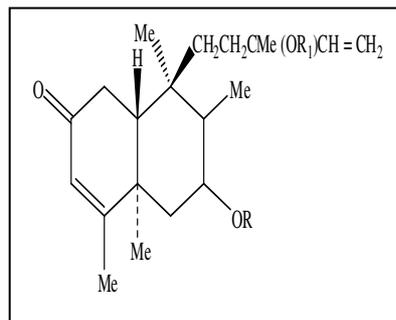
Triterpènes isolés et N° de Structure	Espèces	Référence
α -Amyrine [30]	<i>S. palustris</i> L.	Ross and Zinchenko, 1975b
Acide oleanolique [31]	<i>S. spinosa</i> L.	Kotsos <i>et al.</i> , 2007
Acide ursolique [32]	<i>S. sylvatica</i> L. <i>S. officinalis</i> (L.) Trevis.	Janicsák <i>et al.</i> , 2006
Stachyssaponins I–VIII [33]	<i>S. riederi</i> Chamisso	Yamamoto <i>et al.</i> , 1994

Tableau I.4.6. Les stérols isolés du genre *Stachys* sp.

Stérols isolés et N° de Structure	Espèces	Référence
Stigmastérol [34]	<i>S. byzanthina</i> C. Koch.	Khanavi <i>et al.</i> , 2005
	<i>S. spinosa</i> L.	Kotsos <i>et al.</i> , 2007
β -sitostérol [35]	<i>S. palustris</i> L.	Ross and Zinchenko, 1975b
	<i>S. spinosa</i> L.	Kotsos <i>et al.</i> , 2007
Lawsaritol (24 β -ethylcholest-4-en-3 β -ol) [36]	<i>S. byzanthina</i> C. Koch.	Khanavi <i>et al.</i> , 2005

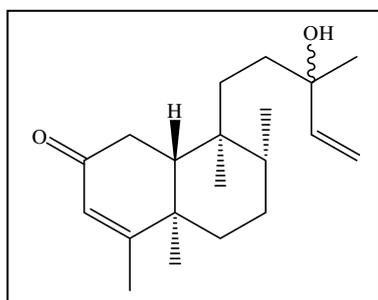


- [1] $R_1 = H, R_2 = OH, R_3 = OH$ (Stachysolone)
- [2] $R_1 = OAc, R_2 = OH, R_3 = OH$ (3-acetylstachysolone)
- [3] $R_1 = H, R_2 = OAc, R_3 = OH$ (7-Acetylstachysolone)
- [4] $R_1 = H, R_2 = OH, R_3 = OAc$ (13-Acetylstachysolone)
- [5] $R_1 = H, R_2 = OAc, R_3 = OAc$ (7, 13-diacetylstachysolone)

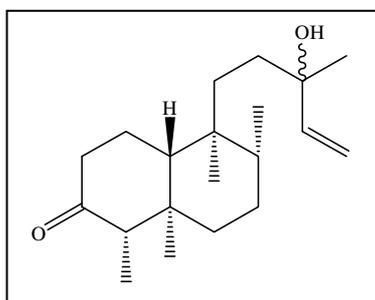


- 1 $R = R_1 = Ac$ (Stachysolone derivatives. I)
- 2 $R = Ac, R_1 = H$ (Stachysolone derivatives II)
- 3 $R = H, R_1 = Ac$ (Stachysolone derivatives. III)

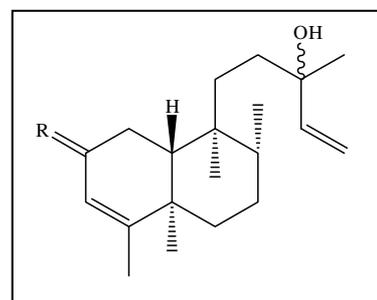
[6]



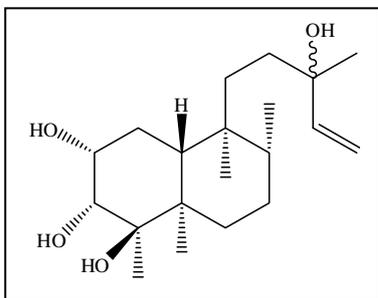
[7] Roseostachenone



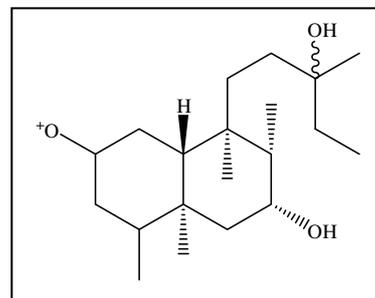
[8] Roseostachone



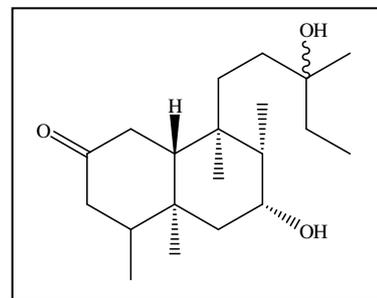
[9] Roseostachenol
R α -OH, β -H



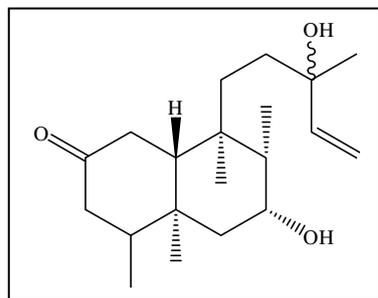
[10] Roseotétrol



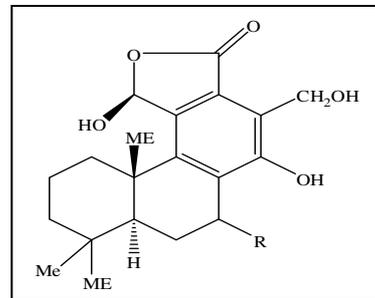
[11] Stachylone



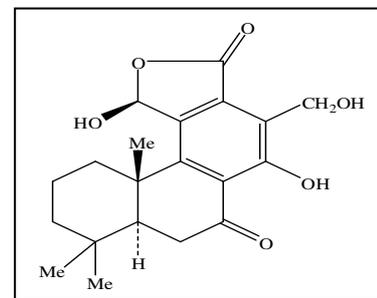
[12] Stachlone



[13] Annuanone



[14] Betonicoside A
(R = β -D-glucosyl)



[15] Betonicolide

Schéma I.6.1. Structures chimiques de diterpènes de type clérodane isolés du genre *Stachys*.

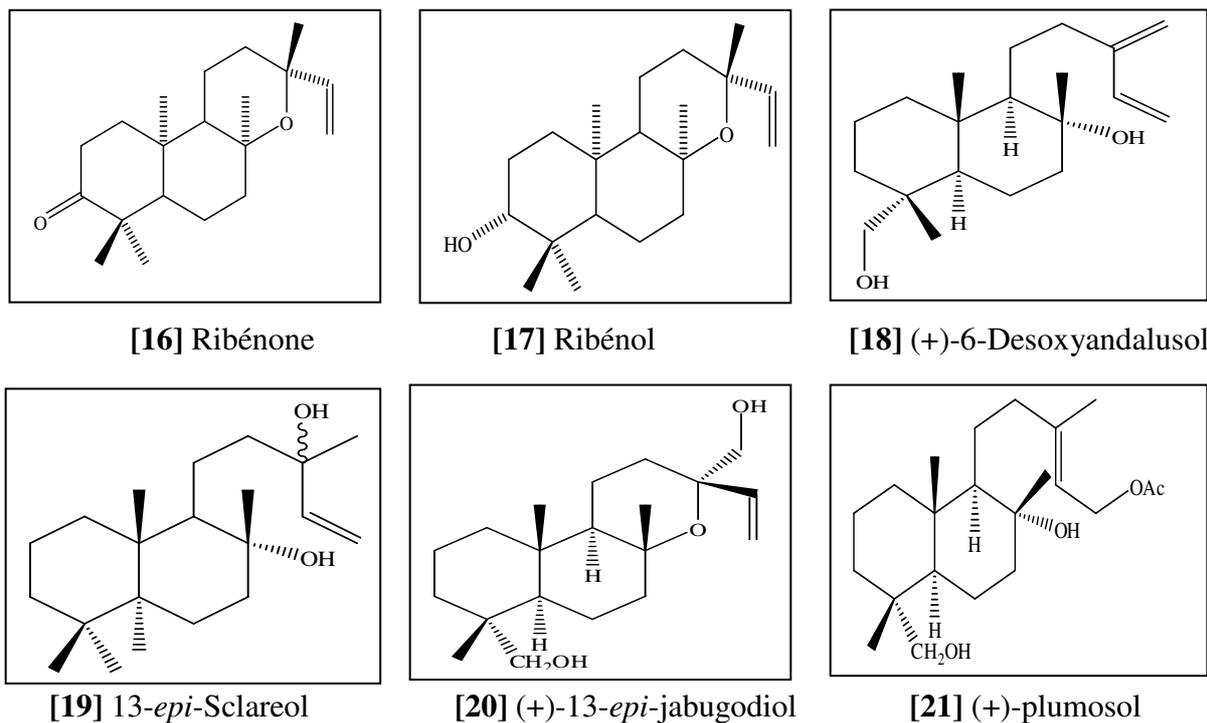


Schéma I.6.2. Structures chimiques de diterpènes de type labdane isolés du genre *Stachys*.

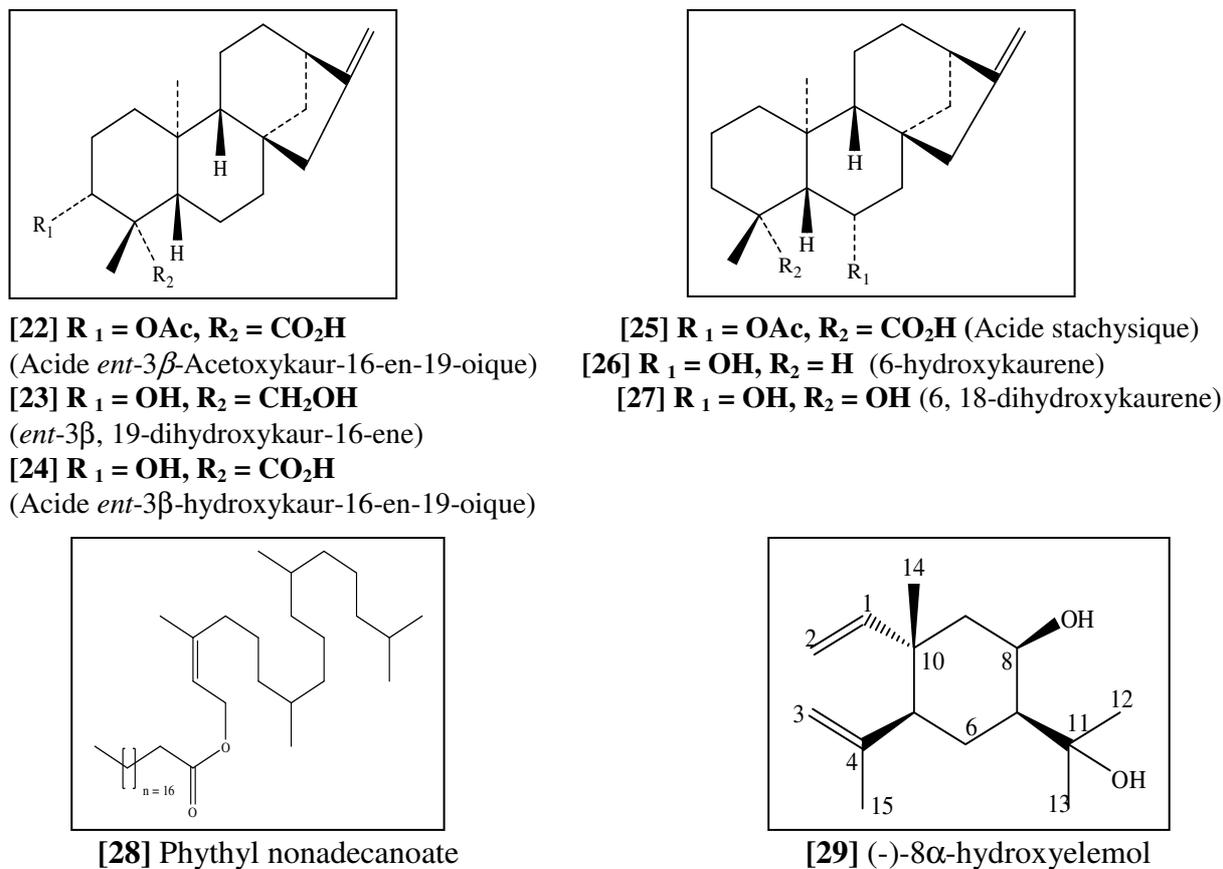
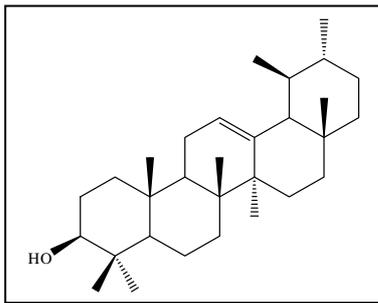
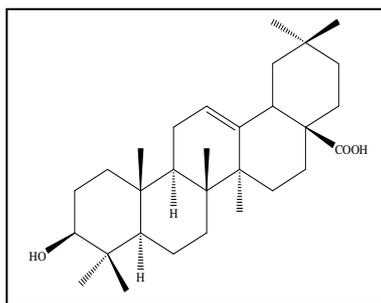


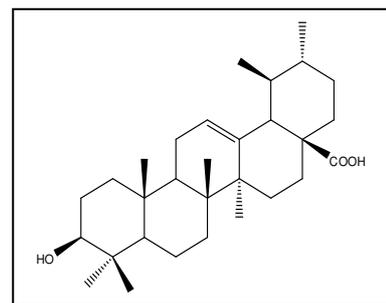
Schéma I.6.3. Structures chimiques de diterpènes de type kaurane, acyclique et sesquiterpène diterpène isolés du genre *Stachys*.



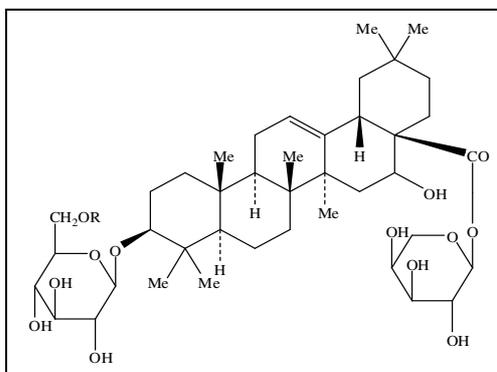
[30] α -Amyrine



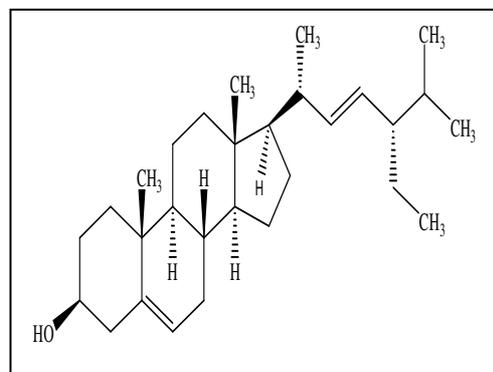
[31] Acide oléanolique



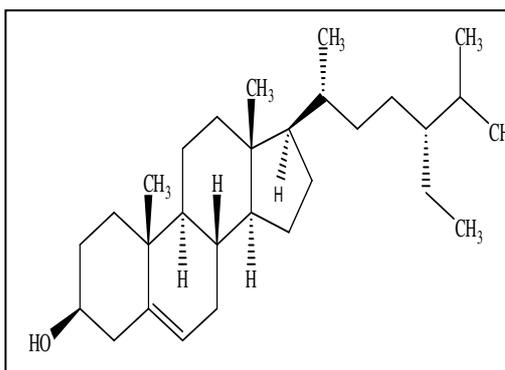
[32] Acide ursolique



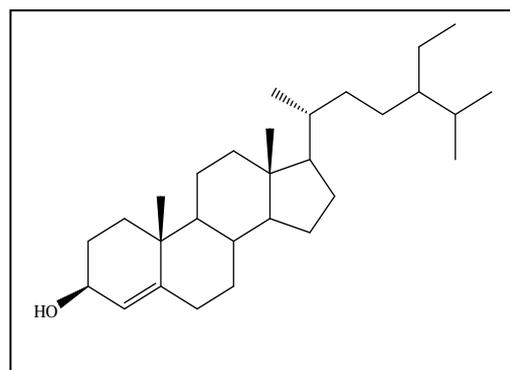
[33] Stachyssaponins
R = α -L-arabinopyranosyl



[34] Stigmasterol



[35] β -Sitostérol



Lawsaritol [36]

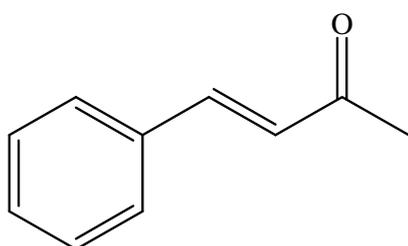
Schéma I.6.4. Structures chimiques de triterpènes pentacycliques et stérols isolés du genre *Stachys*.

I.4.3. Les phénylpropanoïdes

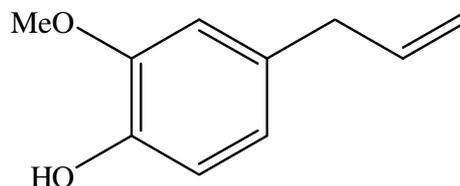
I.4.3.1. Définition des phénylpropanoïdes

Les phénylpropanoïdes sont des composés aromatiques avec une chaîne latérale de propyle attaché avec le cycle de benzène, qui peut être dérivée directement de la phénylalanine.

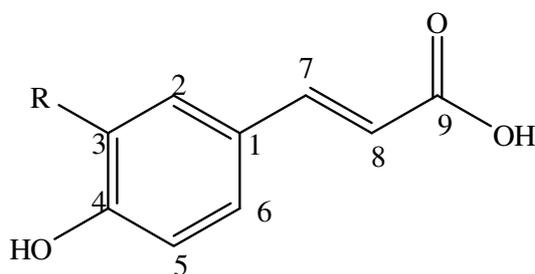
Naturellement les phénylpropanoïdes contiennent souvent des substituant oxygénés, par exemple, OH, OMe ou méthylènedioxy, sur le noyau benzénique. Les phénylpropanoïdes avec substituant hydroxyle(s) sur le noyau benzénique appartient au groupe de composés phénoliques, par exemple, l'acide caféique et l'acide coumarique (Satyajit et Lutfun, 2007).



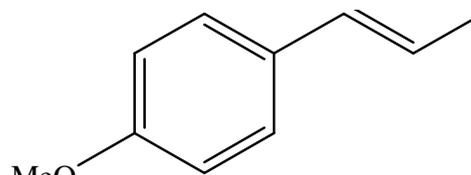
Cinnamaldehyde



Eudenol



Coumaric acid R = H
Caffeic acid R = OH



Anethole

Les phénylpropanoïdes sont très répandus chez les plantes supérieures, en particulier dans les plantes qui produisent des huiles essentielles, par exemple, les plantes de la famille, Apiaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae et Rutaceae. Par exemple, baume de Tolu (*Myroxylon balsamum* Harms, famille des Fabacées), produit une forte concentration de l'acide ester cinnamique, de la cannelle (*Cinnamomum verum*, famille Lauraceae) produit cinnamaldéhyde, du fenouil (*Foeniculum vulgare* (Mill.) Gaerthn. famille Apiaceae) est une bonne source de l'eugénol et l'anis étoilé (*Illicium verum*, famille Illiaceae) produit des quantités élevées de l'anéthol. La biosynthèse des phénylpropanoïdes suit la voie de l'acide shikimique, et le précurseur immédiat de l'acide cinnamique est phénylalanine. Autres les phénylpropanoïdes, un certain nombre d'autres composés phénoliques, par exemple, coumarines, de flavonoïdes et les lignanes, proviennent de l'acide cinnamique (Schéma I.7) (Satyajit et Lutfun, 2007).

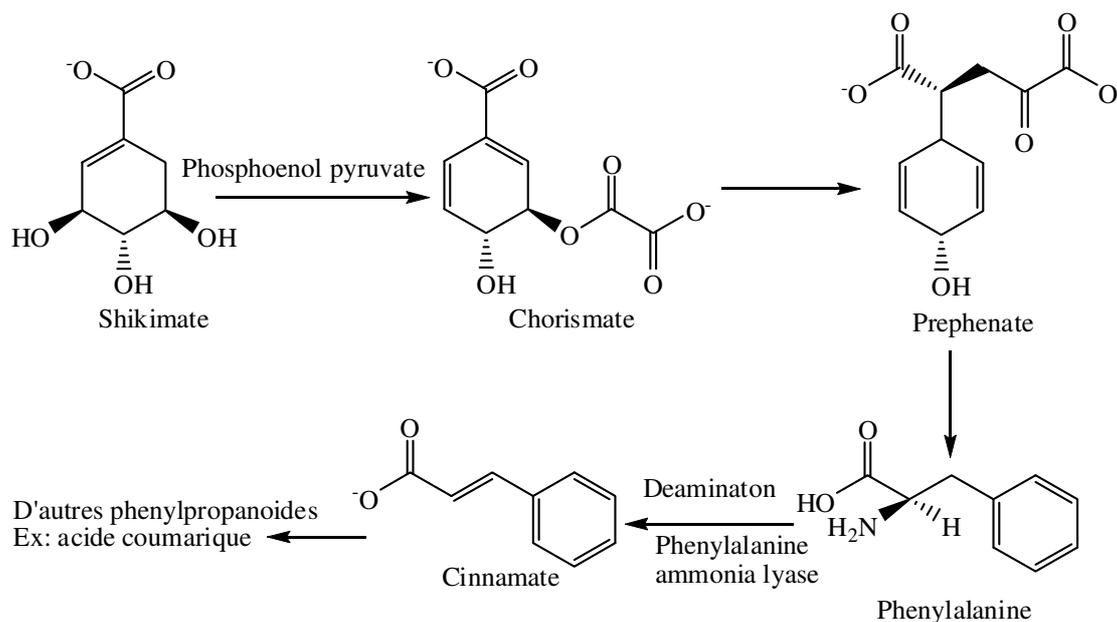


Schéma I.7. La biosynthèse des phénylpropanoïdes (Satyajit et Lutfun, 2007).

I.4.3.2. Le métabolisme des phénylpropanoïdes

Le métabolisme des phénylpropanoïdes est un métabolisme secondaire, spécifique du règne végétal. Il conduit, à partir de la phénylalanine (Phe), à la synthèse d'une multitude de composés dont la nature peut varier suivant les espèces végétales. L'ensemble des composés phénylpropanoïdes dérive de l'acide *t*-cinnamique, le premier phénylpropane formé à partir de la Phe grâce à l'action de la Phénylalanine Ammoniac Lyase (PAL) (Schéma I.9). La PAL est l'enzyme constituant le point de branchement entre le métabolisme primaire du shikimate, qui conduit aux acides aminés aromatiques, et le métabolisme secondaire des phénylpropanoïdes. Ces composés secondaires sont impliqués dans des fonctions diverses telles que la fertilité, la pigmentation, la lignification, la protection contre des agents biotiques ou abiotiques, ou encore la signalisation (Hahlbrock et Scheel, 1989). Les dérivés phénylpropanes possèdent tous le même squelette carboné issu de la Phe : un noyau aromatique et une chaîne latérale de trois carbones (C6-C3) (Schéma I.8) (Kaufman *et al.*, 1999).

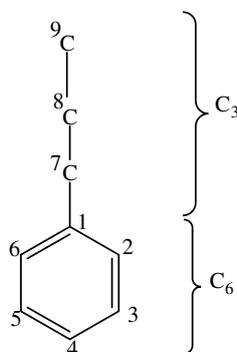


Schéma I.8. Squelette phénylpropanes.

La phénylalanine est d'abord transformée en acide cinnamique par l'action de l'enzyme phénylalanine ammonia-lyase (PAL). Une série d'hydroxylations et de méthylations enzymatiques conduit à l'acide paracoumarique, l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide 5-hydroxyférulique et à l'acide sinapique. L'estérification de ces acides produit une partie des composés volatiles qui composent le parfum des plantes et des fleurs. Ces esters, comme le cinnamate d'éthyle, ont de multiples fonctions, comme par exemple attirer les pollinisateurs. (Schéma I.9) (Hahlbrock et Scheel, 1989).

Un grand nombre de phénylpropanoïdes sont des dérivés d'un squelette carboné à 15 carbones dont la synthèse débute par la condensation du *p*-coumaroyl-CoA et de trois molécules de malonyl-CoA. Cette réaction est catalysée par la chalcone synthase (CHS). Le produit de cette réaction va conduire à toute une panoplie de molécules aux propriétés antioxydants (les flavonoïdes), antimicrobiennes (les isoflavonoïdes comme la medicarpine; et toxiques pour les herbivores (les tannins condensés). Ces produits interviennent dans de nombreux processus physiologiques tels que la pigmentation des fleurs ou des fruits (anthocyanines), les relations symbiotiques (flavonoïdes) ou la protection des tissus aux rayonnements U.V. (Kaempférol). Certaines espèces végétales codent également pour la stilbène synthase (SS) qui utilise les mêmes substrats que la CHS et conduit à la synthèse des stilbènes, des composés aux propriétés anti-oxydantes ou antimicrobiennes tels que le resvératrol (Schéma I.9) (Hahlbrock et Scheel, 1989).

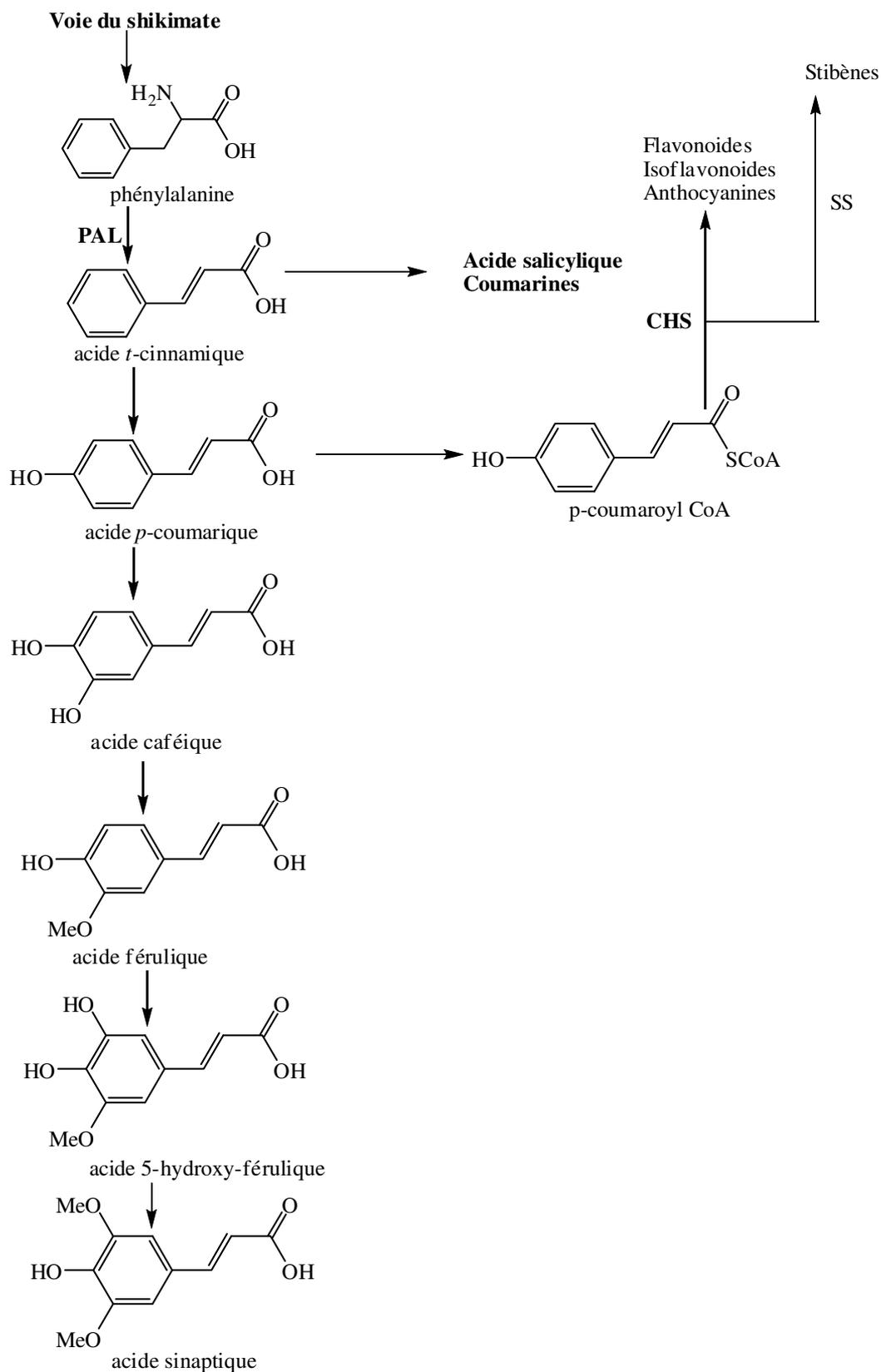


Schéma I.9. Le métabolisme des phénylpropanoïdes (Hahlbrock et Scheel, 1989).

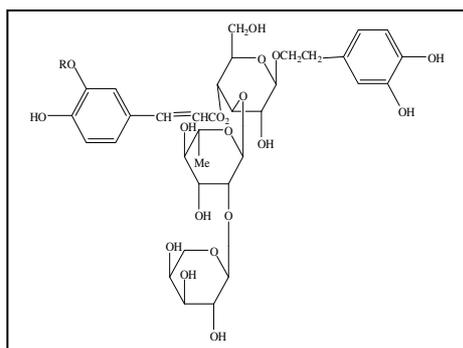
18 phénylpropanoïdes ont été isolés à partir des différentes espèces du genre *Stachys* (Tableau I.5.)

Tableau I.5. Les phénylpropanoïdes isolés du genre *Stachys* sp.

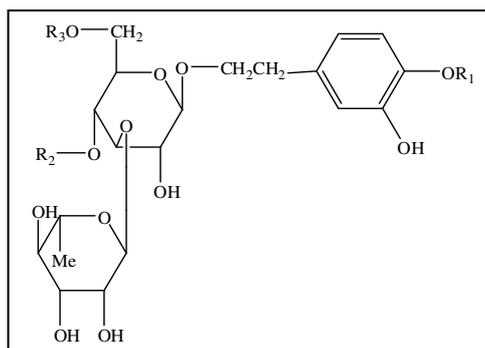
Phénylpropanoïdes et N° de structure	Espèces	Référence
Stachyosides B (=2-(3,4-dihydroxyphenyl)éthyl- <i>O</i> - α -L-arabinopyranosyl-(1→2)- α -L-rhamnopyranosyl-(1→3)-4- <i>O</i> - <i>E</i> -feruloyl- β -D-glucoside) [1]	<i>S. sieboldii</i> Miq.	Miyase <i>et al.</i> , 1990 Nishimura <i>et al.</i> , 1991
Stachyosides C (=2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)éthyl- <i>O</i> - α -L-arabinopyranosyl-(1→2)- α -L-rhamnopyranosyl-(1→3)-4- <i>O</i> - <i>E</i> -feruloyl- β -D-glucoside) [2]	<i>S. sieboldii</i> Miq.	Miyase <i>et al.</i> , 1990 Yamahara <i>et al.</i> , 1990 Nishimura <i>et al.</i> , 1991
Decaffeoylacteoside [3]	<i>S. sieboldii</i> Miq.	Nishimura <i>et al.</i> , 1991
Verbascoside (= Acteoside) [4]	<i>S. macrantha</i> C. Koch	Calis <i>et al.</i> , 1992 Aydin <i>et al.</i> , 2004
	<i>S. officinalis</i> L.	Miyase <i>et al.</i> , 1996a
	<i>S. sieboldii</i> Miq.	Yamahara <i>et al.</i> , 1990 Nishimura <i>et al.</i> , 1991 Takeda <i>et al.</i> , 1985
	<i>S. byzantina</i> C. Koch	Takeda <i>et al.</i> , 1997
	<i>S. schtschegleevii</i> Sosn.	Nazemiyeh <i>et al.</i> , 2006
<i>cis</i> -Acteoside [5]	<i>S. sieboldii</i> Miq.	Nishimura <i>et al.</i> , 1991
Acteoside isomère [6]	<i>S. sieboldii</i> Miq.	Nishimura <i>et al.</i> , 1991
	<i>S. officinalis</i> L.	Miyase <i>et al.</i> , 1996a
Leucosceptoside A [7]	<i>S. macrantha</i> C. Koch	Calis <i>et al.</i> , 1992 Aydin <i>et al.</i> , 2004
	<i>S. sieboldii</i> Miq.	Nishimura <i>et al.</i> , 1991

Tableau I.5. Les phénylpropanoïdes isolés du genre *Stachys* sp. (La suite)

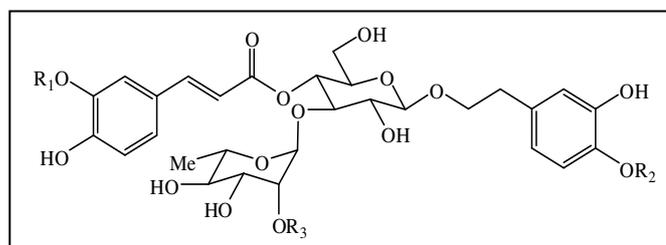
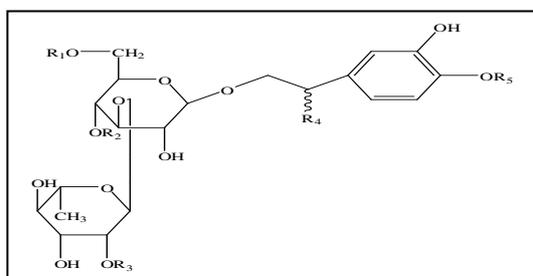
Martynoside [8]	<i>S. macrantha</i> C. Koch	Calis <i>et al.</i> , 1992 Aydin <i>et al.</i> , 2004
	<i>S. sieboldii</i> Miq.	Nishimura <i>et al.</i> , 1991
Campneosides II [9]	<i>S. officinalis</i> L.	Miyase <i>et al.</i> , 1996a
Betonyosides A [10]	<i>S. officinalis</i> L.	Miyase <i>et al.</i> , 1996a
Betonyosides B [11]	<i>S. officinalis</i> L.	Miyase <i>et al.</i> , 1996a
Betonyosides C [12]	<i>S. officinalis</i> L.	Miyase <i>et al.</i> , 1996a
Forsythoside B [13]	<i>S. officinalis</i> L.	Miyase <i>et al.</i> , 1996a
Leucosceptoside B [14]	<i>S. officinalis</i> L.	Miyase <i>et al.</i> , 1996a
Betonyosides D [15]	<i>S. officinalis</i> L.	Miyase <i>et al.</i> , 1996a
Betonyosides E [16]	<i>S. officinalis</i> L.	Miyase <i>et al.</i> , 1996a
Betonyosides F [17]	<i>S. officinalis</i> L.	Miyase <i>et al.</i> , 1996a
	<i>S. schtschegleevii</i> Sosn.	Nazemiyeh <i>et al.</i> , 2006
Lavandulifolioside (= β -(3,4-dihydroxyphenyl)-Et-O- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-4-O-caffeoyl- β -D-glucopyranoside) [18]	<i>S. macrantha</i> C. Koch	Calis <i>et al.</i> , 1992 Aydin <i>et al.</i> , 2004
	<i>S. lavandulifolia</i> Vahl.	Basaran <i>et al.</i> , 1988



- [01] $R = H$ (Stachysosides B)
 [02] $R = Me$ (Stachysosides C)



- [03] $R_1 = R_2 = R_3 = H$ (Decaffeoylacteoside)
 [04] $R_1 = R_3 = H, R_2 = E\text{-caffeoyl}$ (Acteoside)
 [05] $R_1 = R_3 = H, R_2 = Z\text{-caffeoyl}$ (*cis*-Acteoside)
 [06] $R_1 = R_2 = H, R_3 = E\text{-caffeoyl}$ (Isoacteoside)
 [07] $R_1 = R_3 = H, R_2 = E\text{-feruloyl}$ (Leucosceptoside A)
 [08] $R_1 = Me, R_2 = E\text{-feruloyl}, R_3 = H$ (Martynoside)



- [18] $R_1 = R_2 = H, R_3 = Ara$ (Lavandulifolioside)

- [09] $R_1 = H, R_2 = \text{caffeoyl}, R_4 = OH, R_3 = R_5 = H$ (Campneosides II)
 [10] $R_1 = H, R_2 = \text{feruloyl}, R_4 = OH, R_3 = R_5 = H$ (Betonyosides A)
 [11] $R_1 = \text{feruloyl}, R_2 = R_3 = R_5 = H, R_4 = OH$ (Betonyosides B)
 [12] $R_1 = \text{feruloyl}, R_2 = R_3 = R_5 = H, R_4 = OH$ (Betonyosides C)
 [13] $R_1 = \text{Api}, R_2 = \text{caffeoyl}, R_3 = R_4 = R_5 = H$ (Forsythoside B)
 [14] $R_1 = \text{Api}, R_2 = \text{feruloyl}, R_3 = R_4 = H, R_5 = Me$ (leucosceptoside B)
 [15] $R_1 = \text{Api}, R_2 = \text{cis-feruloyl}, R_3 = R_4 = H, R_5 = Me$ (Betonyosides D)
 [16] $R_1 = \text{Api}, R_2 = \text{feruloyl}, R_3 = R_5 = H, R_4 = OH$ (Betonyosides E)
 [17] $R_1 = H, R_2 = \text{caffeoyl}, R_3 = \text{Api}, R_4 = R_5 = H$ (Betonyosides F)

Schéma I.10. Structures chimiques de phénylpropanoïdes isolés du genre *Stachys*.

I.5. Conclusion

Les différentes études phytochimiques réalisées sur diverses espèces du genre *Stachys* ont permis de référencer 141 composés qui se répartissent en trois groupes, celui des composés phénoliques regroupe la majorité des composés dont la plupart sont des flavonoïdes (87 flavonoïdes, parmi ces composées, nous avons recensé 23 aglycones et 64 glycosides), des terpènes (36 terpènes classées en 5 types : 27 diterpènes bicycliques, un diterpène acyclique, un sesquiterpène, 4 triterpènes pentacycliques et 3 stérols) et des phénylpropanoïdes (18 composées ont été recensés).

Références bibliographiques

- Adinolfi, M., Barone, G., Lanzetta, R., Laonigro, G., Parrilli, M., Mangoni, L. 1983. Diterpene components of *Stachys recta* L. Rendiconto dell'Accademia delle Scienze Fisiche e Matematiche, Naples, 50(2), 285-287.
- Adinolfi, M., Barone, G., Lanzetta, R., Laonigro, G., Mangoni, L., Parrilli, M. 1984. Diterpenes from *Stachys recta*. J. Nat. Prod., 47(3), 541–543.
- Ahmad, V.U., Arshad, S., Bader, S., Iqbal, S., Tareen, R.B. 2005. Stachyfloroside E: A new acylated flavone glycoside from *Stachys parviflora*. Polish J. Chem., 79(8), 1295-1300.
- APG (Angiosperm Phylogeny Group). 2002. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants, APG II. Bot. J. Linn. Soc., 141, 399-436.
- Aydin, S., Basaran, A.A., Basaran, N. 2004. The protective effects of some phenylethanoid glycosides on the mitomycin C induced DNA strand breakage. Hacettepe Universites: Eczacilik Fakultesi Dergisi, 24(1), 01-11.
- Basaran, A.A., Calis, I., Anklin, C., Nishibe, S., Sticher, O. 1988. Lavandulifolioside: A new phenylethanoid glycoside from *Stachys lavandulifolia*. Helv. Chim. Acta., 71(6), 1483-1490.
- Basaran, A.A., Yu, T.W., Plewa, M.J., Anderson, D. 1996. In investigation of some Turkish herbal medicines in *Salmonella typhimurium* and in the COMET assay in human lymphocytes. Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis, 16(2), 125-138.
- Bishara, Samir A.R., Zinchenko, T.V., Nikonov, G.K., Borzuno, E.E. 1976. New acylated flavonoid from marsh betony. Borzunov, E. E. Ukr. Khim. Zh. (Russ. Ed.), 42(3), 284-288.
- Bloch, K., Chaykin, S., Phillips, A.H., Waard, A. 1959. Mevalonic acid pyrophosphate and isopentenyle-pyrophosphate. J. Biol. Chem., 234, 2595-2604.
- Bohlmann, J., Meyer-Gauen, G., Croteau, R., 1998. Plant terpenoid synthases : molecular biology and phylogenetic analysis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 95, 4126-4133.
- Bonanno, J.B., Edo, C., Eswar, N., Pieper, U., Romanowski, M.J., Ilyin, V., Gerchman, S.E., Kycia, H., Studier, F.W., Sali, A., Burley, S.K., 2001. Structural genomics of enzymes involved in sterol/isoprenoid biosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 98, 12896-12901.
- Bray, L. 2005. Phylogénie des Angiospermes. <http://www.Botanique.org>. consulté le 21/10/05.
- Bruneton, J. 1987. Eléments de phytochimie et de pharmacognosie, Technique & Documentation Lavoisier, Paris.
- Bruneton, J. 1999. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, (3ème éd.). Paris: Editions médicales internationales, éditions Tec & Doc Lavoisier, p. 1120.
- Calis, I., Basaran, A., Saracoglu, I., Sticher, O. 1992. Iridoid and phenylethanoid glycosides from *Stachys macrantha*. Phytochemistry, 31(1), 167–169.

Carr, G. 2004. Vascular plant family access page <http://www.Botany.hawaii.edu/faculty/carr/pfamilies.htm>. Site du département de botanique de l'université de hawaii, consulté le 27/06/05.

Couladis, M., Tzakou, O., Verykokidou, E., Harvala C. 2003. Screening of some Greek aromatic plants for antioxidant activity. *Phytotherapy Research*, 17(2), 194-195.

Derkach, A.I., Komissarenko, N.F., Gordienko, V.G., Sheremet, I.P., Kovalem, I.P., Pakaln, D.A. 1980. Flavonoids from *Stachys spectabilis*. *Khim. Prir. Soedin*, 2, 172-174.

Dewick, P.M., 1999. The biosynthesis of C5-C25 terpenoid compound. *Nat. Prod. Rep.*, 16, 97-130.

Dey, P.M., Harborne, J.B., 1991. *Methods in plant biochemistry*. Volume 7, Terpenoids. Academic press.

Duke, A. J. 1986. *Handbook of Medicinal Herbs*, CRC Press, Boca Raton, p. 457.

El-Ansari, M.A., Barron, D., Abdalla, M.F., Saleh, N.A.M., Le Quere, J.L. 1991. Flavonoid constituents of *Stachys aegyptiaca*. *Phytochemistry*, 30(4), 1169-1173.

El-Ansari, M.A., Nawwar, M.A., Saleh, N.A.M. 1995. Stachysetin, a diapigenin-7-glucoside-*p*, *p'*-dihydroxytruxinate from *Stachys aegyptiaca*. *Phytochemistry*, 40(5), 1543-1548.

Fazio, C., Passannanti, S., Paternostro, M.P., Piozzi, F. 1992. neo-Clerodane diterpenoids from *Stachys rosea*. *Phytochemistry*, 31(9), 3147-3149.

Fazio, C., Passannanti, S., Paternostro, M.P., Arnold, N. 1994a. Diterpenoids from *Stachys mucronata*. *Planta Med.*, 60(5), 499.

Fazio, C., Paternostro, M.P., Passannanti, S., Piozzi, F. 1994b. Further neo-clerodane diterpenoids from *Stachys rosea*. *Phytochemistry*, 37(2), 501-503.

Forkman, G. 1992. Structure and biosynthesis of flavonoids. *Proceedings International Conference of Group Polyphenol*. V. 16(1), 19-27.

Gruenwald, J., Brendler, T., Jaenicke, C., et al. 2000. *PDR for herbal Medicines*, 2nd ed. Medical Economics Company, Montvale, NJ, p. 832.

Guignard, J.L. 2001. *Botanique systématique moléculaire*. Masson. Paris.

Hahlbrock, K., Scheel, D. 1989. Physiology and Molecular Biology of Phenylpropanoid Metabolism », dans *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40, 347-69

Hayashi, K., Nagamatsu, T., Ito, M., Hattori, T., Suzuki, Y. 1994a. Acteoside, a component of *Stachys sieboldii* MIQ, may be a promising antinephritic agent (1): effect of acteoside on crescentic-type anti-GBM nephritis in rats. *Japanese J. Pharma.*, 65(2), 143-51.

Hayashi, K., Nagamatsu, T., Ito, M., Hattori, T., Suzuki, Y. 1994b. Acteoside, a component of *Stachys sieboldii* MIQ, may be a promising antinephritic agent (2): Effects of acteoside on leukocyte accumulation in the glomeruli of nephritic rats. *Japanese J. Pharma.*, 66(1), 47-52.

- Janicsák, G., Veres, K., Kakasy, A.Z., Máthé, M. 2006. Study of the oleanolic and ursolic acid contents of some species of the Lamiaceae. *Biochem. Syst. Ecol.*, 34(5), 392-396.
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Stevens, P. 2002. Botanique systématique – une perspective phylogénétique. De Bocck Université, Paris et Bruxelles.
- Karaev, A. I., Aliev, R. K., Yuzbashinskaya, P. A. 1955. The chemical composition of the woolly hedge-nettle grass and water-mint leaves and effect of its compounds on the contracting properties of uterus muscles. *Dokl. Akad. Nauk Azerb. SSR.*, 11(3), 187-193.
- Kaufman, P.B., Cseke, L.J., Warber, S., Duke, J.A., Brielmann, H.L. 1999. *Natural Products from Plants*. CRC Press. Boca Raton New York London Tokyo.
- Khanavi, M., Sharifzadeh, M., Hadjiakhoondi, A., Shafiee, A. 2005. Phytochemical investigation and anti-inflammatory activity of aerial parts of *Stachys byzanthina* C. Koch. *J. Ethnopharm.*, 97(3), 463-468.
- Kim, S.H., Kim, D.K., Eom, D.O., Park, J.S., Lim, J.P., Kim, S.Y., Shin, H.Y., Kim, S.H., Shin, T.Y. 2003. Anti-allergic effect of aqueous extract of *Stachys riederi* var. *japonica* Miq. *in vivo* and *in vitro*. *Nat. Prod. Sci.*, 9(1), 44-48.
- Kobzar, A.Ya., Nikonov, G.K. 1986. Flavonoids from the aerial parts of *Betonica officinalis*. *Khim. Prir. Soedin*, 5, 636-637.
- Komissarenko, N.F., Sheremet, I.P., Derkach, A.I., Pakaln, D.A. 1976. Stachyflaside from *Stachys inflata* and *St. atherocalyx*. *Khim. Prir. Soedin*, 1, 98.
- Komissarenko, N.F., Derkach, A.I., Sheremet, I.P., Kovalev, I.P., Gordienko, V.G., Pakaln, D.A. 1978. Flavonoids of *Stachys inflata*. *Khim. Prir. Soedin*, 4, 521-523.
- Kostyuchenko, O.I., Komissarenko, N.F., Zinchenko, T.V., Derkach, A.I. 1981. Diacetylstachyflaside from *Stachys atherocalyx*. *Khim. Prir. Soedin*, 3, 389-390.
- Kostyuchenko, O.I., Komissarenko, N.F., Kovalev, I.P., Derkach, A.I., Gordienko, V.G. 1982a. Acetylspectabiflaside from *Stachys atherocalyx*. *Khim. Prir. Soedin*, 97(2), 187-189.
- Kostyuchenko, O.I., Komissarenko, N.F., Zinchenko, T.V., Derkach, A.I., Gordienko, V.G. 1982b. Diacetylisostachyflaside and acetylisostachyflaside from *Stachys atherocalyx*. *Khim. Prir. Soedin*, 2, 254-255.
- Kotsos, M.P., Aligiannis, N., Mitakou, S., Skaltsounis, A.L., Charvala, C. 2001. Chemistry of plants from Crete: Stachyspinoside, a new flavonoid glycoside and iridoids from *Stachys spinosa*. *Nat. Prod. Lett.*, 15(6), 377-386.
- Kotsos, M.P., Aligiannis, N., Mitakou, S. 2007. A new flavonoid diglycoside and triterpenoids from *Stachys spinosa* L. (Lamiaceae). *Biochem. Syst. Ecol.*, 35, 381-385.
- Lenherr, A., Lahloub, M.F., Sticher, O. 1984a. Three flavonoid glucosides containing acetylated allose from *Stachys recta*. *Phytochemistry*, 23(10), 2343-2345.

- Lenherr, A., Meier, B., Sticher, O. 1984b. Modern HPLC as a tool for chemotaxonomical investigations: iridoid glucosides and acetylated flavonoids in the group of *Stachys recta*. *Planta Med.*, 50(5), 403–409.
- Lenherr, A., Mabry, T.J. 1987. Acetylated allose-containing flavonoid glucosides from *Stachys anisochila*. *Phytochemistry*, 26(4), 1185–1188.
- Lenherr, A., Mabry, T.J., Gretz, M.R. 1987a. Differentiation between glucose, mannose, allose and galactose in plant glycosides by high performance liquid chromatographic analysis. *J. Chrom.*, 388(2), 455–458.
- Lynen, F., Eggerer, H., Henning, U., Kessel, I. 1958. Farnesylpyrophosphat und 3-Methyl-3-butenyl-1-pyrophosphat, diebiologischen Vorstufen des Squalens. Zur Biosynthese der Terpene. III. - *Angew. Chem.*, 70, 738-742.
- Maleki, N., Garjani, A., Nazemiyeh, H., Nilfouroushan, N., Eftekhar Sadat, A.T., Allameh, Z., Hasannia, N. 2001. Potent anti-inflammatory activities of hydroalcoholic extract from aerial parts of *Stachys inflata* on rats. *J. Ethnopharm.*, 75(2-3), 213–218.
- Manitto, P., 1981. Biosynthesis of natural products. John Wiley & Sons. New york.
- Marin, P.D., Grayer, R.J., Grujic-Jovanovic, S., Kite, G.C., Veitch, N.C. 2004. Glycosides of tricetin methyl ethers as chemosystematic markers in *Stachys* subgenus *Betonica*. *Phytochemistry*, 65(9), 1247–1253.
- Matkowski, A., Piotrowska, M. 2006. Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae. *Fitoterapia*, 77, 346–353.
- Melek, F.R., Radwan, A.S., El-Ansari, M.A., El-Gindi, O.D., Hilal, S.H., Genenah, A.A. 1992. Diterpenes from *Stachys aegyptiaca*. *Fitoterapia*, 63(3), 276.
- Meremeti, A., Karioti, A., Skaltsa, H., Heilmann, J. Sticher, O. 2004 . Secondary metabolites from *Stachys ionica*. *Biochem. Syst. Ecol.*, 32(2), 139–151.
- Miyase, T., Ueno, A., Kitani, T., Kobayashi, H., Kawahara, Y., Yamahara, J. 1990. Studies on *Stachys sieboldii* Miq. Isolation and structures of new glycosides. *Yagugaku Zasshi*, 110(9), 652–657.
- Miyase, T., Yamamoto, R., Ueno, A. 1996. Betonicosides A–D and betonicolide, diterpenoids from the roots of *Stachys officinalis*. *Chem. Pharm. Bull.*, 44(8), 1610–1613.
- Miyase, T., Yamamoto, R., Ueno, A. 1996a. Phenylethanoid glycosides from *Stachys officinalis*. *Phytochemistry*, 43(2), 475 -479.
- Nazemiyeh, H., Shoeb, M., Movahhedineh, N., Kumarasamy, Y., Talebpour, A-H., Delazar, A., Nahar, L., Sarker, S-D. 2006. Phenolic compounds and their glycosides from *Stachys schtschegleevii* (Lamiaceae). *Biochem.Syst. Ecol.*, 34, 721-723.
- Nishimura, H.N., Sasaki, N.H., Inagaki, N., Chin, M., Mitsuhashi, H. 1991. Nine phenethyl alcohol glycosides from *Stachys sieboldii*. *Phytochemistry*, 30(3), 965-969.

- Orgiyan, T.M., Popa, D.P. 1969. Diterpenoids of *Stachys annua*. Khim. Prir. Soedin, 5(1), 07–10.
- Orgiyan, T.M. 1970. Structure of the by-product diterpenoids of hedge-nettle betony. Aktual. Probl. Izuch. Efirnomalish. Rast. Efir. Masel., 160-161.
- Paris, R.R., Moyses, H. 1965. Précis de matière médicale, Tome 1, Masson et Cie, Editeurs
- Pasechnik, I. Kh. 1969. Choleric properties of medicinal agents obtained from hedge nettle. Farmakol. Toksikol. (Moscow), 32(5), 575- 577.
- Pasechnik, I. Kh., Zinchenko, T.V., Garbarets, M. A., Gorodinskaya, V. Ya. 1971. Choleric properties of flavonoids of *Stachys recta* and *Stachys neglecta*. Farm. Zh. (Kiev), 26(3), 64-69.
- Paternostro, M.P., Maggio, A.M., Piozzi, F., Servettaz, O. 2000. Labdane diterpenes from *Stachys plumosa*. J. Nat. Prod., 63 (8), 1166–1167.
- Piozzi, F., Savona, G., Hanson, J.R. 1980. Kaurenoid diterpenes from *Stachys lanata*. Phytochemistry, 19(6), 1237–1238.
- Piozzi, F., Paternostro, M.P., Servettaz, O., Arnold, N.A. 2002. Occurrence of (+)-6-desoxyandalusol in *Stachys ionica* and *Stachys distans*. Biochem. Syst. Ecol., 30(9), 887–889.
- Popa, D.P., Orgiyan, T.M. 1972. Stereochemistry of stachysolone. Khim. Prir. Soedin, 78(6), 735–738.
- Popa, D.P., Orgiyan, T.M., Samek, Z., Dolejs, L. 1972. Structure of stachysolone. Khim. Prir. Soedin, 3, 295–299.
- Popa, D.P., Orgiyan, T.M. 1974. Minor diterpenoids of *Stachys annua*. Khim. Prir. Soedin, 3, 406.
- Popa, D.P., Orgiyan, T.M., Kharitov, K.S. 1974. Structure of annuanone. Khim. Prir. Soedin, 3, 324–330.
- Popa, D.P., Pasechnik, G.S., Orgiyan, T.M. 1974. Dynamics of diterpenoid accumulation in some Labiatae family plants. Rastil Resur., 10(3), 365-367.
- Popa, D.P., Pasechnik, G.S. 1974a. Structure of stachsic acid, a new diterpenoid of the kaurane series. Khim. Prir. Soedin, 4, 447–451.
- Quezel, P., Santa, S. 1963. La nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II, Ed. CNRS, Paris, p. 360-361.
- Rabbani, M., Sajjadi, S.E., Zarei. H.R. 2003. Anxiolytic effects of *Stachys lavandulifolia* Vahl on the elevated plus-maze model of anxiety in mice. J. Ethnopharm., 89(2-3), 271–276.
- Rabbani, M., Sajjadi, S.E., Jalali, A. 2005. Hydroalcohol extract and fractions of *Stachys lavandulifolia* Vahl: Effects on spontaneous motor activity and elevated plus-maze behaviour. Phytotherapy Research, 19, 854–858.

- Radnai, E.H., Czige, Sz., Zupkó, I., Falkay, Gy., Mathe, I. 2006. Comparison of antioxidant activity in enzyme-independent system of six *Stachys* species. *Fitoterapia*, 31, 21.
- Rechinger KH, Hedge IC. 1982. *Flora Iranica*. Akademische Druck Verlagsanstalt, Graz Austria, 360-361.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. 1996. Structure-antioxydant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol. Med.*, 20(7), 933-956.
- Richter, G. 1993. *Métabolisme des végétaux (Physiologie et Biochimie)*. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lansanne CH-1015.
- Rivolier, C. 1977. *Secrets et vertus des plantes médicinales*. Selection du Reader's Digest, S.A.
- Ross, S.A., Zinchenko, T.V., Borzunov, E. E. 1975a. Chemical structure of flavonoids. *Ukr. Khim. Zh (Russ Ed)*, 41(10), 1108-1111.
- Ross, S.A., Zinchenko, T.V. 1975b. Triterpenoids and steroids from *Stachys palustris*. *Farm. Zh.*, 30(3), 91-92.
- Satyajit, D.S., Lutfun, N. 2007. *Chemistry for Pharmacy Students, General, Organic and Natural Product Chemistry*. John Wiley & Sons Ltd, England.
- Savchenko, V.M., Khvorostinka, V.M., 1978. Effects of a preparation from *Stachys inflata* on the course of experimental hepatitis in rats. *Farm-Zh-Kiev*, 33(4), 50–53.
- Schulte, A.E., Van der Heijden, R., Verpoorte, R., 1999. Microplate enzyme-coupled assays of mevalonate and phosphomevalonate kinase from *Catharanthus roseus* suspension cultured cells. *Anal. Biochem.*, 269, 245-254.
- Sharkey, T.D., Yeh, S., 2001. Isoprene emission from plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.*, 52, 407-436.
- Sharaf, M. 1998. Isoscutellarein-8-*O*-(6"-*trans-p*-coumaroyl)- β -D-glucoside from *Stachys aegyptiaca*. *Fitoterapia*, 69(4), 355–357.
- Sheremet, I.P., Komissarenko, N.F. 1971. Flavonol glucosides of *Stachys annua*. *Khim. Prir. Soedin*, 5, 583–587.
- Sheremet, I. P., Komissarenko, N. F. 1971a. Stachyflaside, flavonol glycoside of *Stachys annua*. *Khim. Prir. Soedin*, 7(6), 721-723.
- Sheremet, I. P., Komissarenko, N. F. 1971b. Stachannoaciside from *Stachys annua*. *Khim. Prir. Soedin*, 7(6), 845-846.
- Sheremet, I. P., Komissarenko, N. F. 1971d. 4'-Methoxyscutellarein from *Stachys annua*. *Khim. Prir. Soedin*, 7(3), 373-374.
- Sheremet, I. P., Komissarenko, N. F. 1972. Flavonoids of *Stachys annua*. *Khim. Prir. Soedin*, 5, 646-647.

- Shin, T.Y. 2004. *Stachys riederi* inhibits mast cell-mediated acute and chronic allergic reactions. *Immunopharm. immunotoxicol.*, 26(4), 621-30.
- Skaltsa, H.D., Lazari, D.M., Chinou, I.B., Loukis, A.E., 1999. Composition and antibacterial activity of the essential oils of *Stachys candida* and *S. chrysantha* from southern Greece [letter]. *Planta Med.*, 65(3), 255–256.
- Skaltsa, H., Bermejo, P., Lazari, D., Silvan, A.-M., Skaltsounis, A.-L., Sanz, A., Abad, M.J. 2000. Inhibition of prostaglandin E₂ and leukotriene C₄ in mouse peritoneal macrophages and thromboxane B₂ production in human platelets by flavonoids from *Stachys chrysantha* and *Stachys candida*. *Biol. Pharm. Bull.*, 23(1), 47–53.
- Skaltsa, H., Georgakopoulos, P., Lazari, D., Karioti, A., Heilmann, J., Sticher, O., Constantinidis, T. 2006. Flavonoids as chemotaxonomic markers in the polymorphic *Stachys swainsonii* (Lamiaceae). *Biochem. Syst. Ecol.*, 01-04.
- Stamatis, G., Kyriazopoulos, P., Golegou, S., Basayiannis, A., Skaltsas, S., Skaltsa, H. 2003. In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of Greek herbal medicines. *J. Ethnopharm.*, 88(2-3), 175–179.
- Takeda, Y., Fujita, T., Satoh, T., Kakegawa, H. 1985. On the glucosidic constituents of *Stachys sieboldii* Miq. and their effects on hyaluronidase activity. *Yakugaku Zasshi*, 105(10), 955–959.
- Takeda, Y., Zhang, H., Masuda, T., Honda, G., Otsuka, H., Sezik, E., Yesilada, E., Sun, H. 1997. Megastigmane Glucosides From *Stachys Byzantina*. *Phytochemistry*, 44(7), 1335-1337.
- Tomas-Barberan, F.A., Gil, M.I., Ferreres, F., Tomas-Lorente, F. 1992. Flavonoid *p*-coumaroylglucosides and 8-hydroxyflavone allosylglucosides in some Labiatae. *Phytochemistry*, 31(9), 3097–3102.
- Vundac, V.B., Brantner, A.H., Plazibat, M. 2007. Content of polyphenolic constituents and antioxidant activity of some *Stachys* taxa. *Food Chemistry*, 104, 1277–1281.
- Yamahara, J., Kitani, T., Kobayashi, H., Kawahara, Y. Studies on *Stachys sieboldii* MIQ. II. 1990. Antianoxic activity and active constituents. *Kyoto Pharm. Univ.*, Kyoto, Japan. *Yakugaku Zasshi*, 110(12), 932-935.
- Yamamoto, R., Miyase, T., Ueno, A. 1994. Stachysaponins I–VIII, new oleanane-type triterpene saponins from *Stachys riederi*. *Chem. Pharm. Bull.*, 42(6), 1291–1296.
- Zinchenko, T.V. 1969. Flavonoids of *Stachys neglecta*. *Farm. Zh.*, 24(5), 78–79.
- Zinchenko, T.V. 1970a. Flavonoid glycosides of *Stachys neglecta*. *Farm. Zh.*, 25(4), 81–82.
- Zinchenko, T.V. 1970b. Phenolic compounds of *Stachys palustris*. *Khim. Prir. Soedin*, 6(2), 266–267.
- Zinchenko, T. V., Voitenko, G. N., Lipkan, G. N. (1981). Antiinflammatory, antitoxic and hypoazothemic effects of the drug stachyrene from *Stachys recta*. *Farmakologiyai Toksikologiya (Moscow)*, 44(2), 191-194.

CHAPITRE II

DESCRIPTION DES TRAVAUX SUR L'ESPECE *STACHYS MIALHESIE* DE NOE

II. Etude chimique de l'espèce *Stachys mialhesi* de Noé.

II.1. Etude bibliographique

La recherche bibliographique, que nous avons menée sur le genre *Stachys*, a montré sa richesse en flavonoïde, terpénoïdes et phénylpropanoïdes.

II.2. Choix du matériel végétal

Pour notre étude, plusieurs critères ont guidé notre choix, parmi lesquels :

L'endémisme de l'espèce *S. mialhesi* de Noé. du nord algérien, dont le climat et le type d'écosystème offre des caractéristiques et des spécificités non négligeables à la végétation,
Notre intérêt prononcé au genre *Stachys* pour sa capacité d'accumulation de molécules à activité biologique potentielle.

II.3. Classification dans la systématique botanique

Royaume	Plantae
Sous-royaume	Tracheobiontae
Embranchement	Spermatophytae
Sous-embranchement	Angiospermae
Classe	Dicotylédonae
Sous-classe	Asteropsidae
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Genre	<i>Stachys</i>
Espèce	<i>Stachys mialhesi</i> de Noé.

II.4. Description botanique

D'après Quezel et Santa (1963), *S. mialhesi* de Noé. est une plante endémique du Nord à feuilles molles, lâchement hérissées de poils raides blanchâtres. Epis florifères très lâches, à verticillastres disjoints jusque dans le haut. Corolle blanchâtre maculée de rose, à anneau de poils interne complet (Voir photo II.1).

II.5. Répartition géographique

Elle est localisée dans le nord algérien est surtout (ou spécifiquement) dans la wilaya de Constantine.



Figure II.1. Photographie de *Stachys mialhesi* de Noé.

II.6. Protocole expérimental

II.6.1. Récolte du matériel végétal

La plante a été récoltée de la région de Constantine (Djebel El-Ouahch), au mois de mai 2005. Elle a été identifiée par le Professeur Gérard De Bélair (faculté des sciences, Université Badji-Mokhtar, Annaba). Un échantillon a été déposé au Musée botanique de la Ville d'Angers (France) sous la référence MBAng2005.10. Après séchage dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires, les parties aériennes ont été pulvérisées et pesées (1000g).

II.6.2. Extraction des parties aériennes

1000g de la partie aérienne de la plante pulvérisée sont mis à macérer dans un mélange hydroalcoolique (méthanol/Eau ; 70:30 ; v/v) pendant 3 jours à la température ambiante.

Le premier extrait récupéré est concentré sous pression réduite à une température modérée (environ 45°C). La macération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant et dure dans chaque cas de 24 à 48 heures.

Les trois extraits hydroalcooliques récupérés sont réunis et concentrés. A la solution concentrée obtenue, on ajoute 300ml d'eau. La solution ainsi obtenue est laissée au repos à froid pendant une nuit pour décantation. Cette décantation permet le dépôt de la chlorophylle, des cires, du sable, etc.... Après filtration on obtient une solution aqueuse claire. Cette phase aqueuse subit une extraction de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par l'éther de pétrole, puis le dichlorométhane, puis l'acétate d'éthyle et en dernier le *n*-butanol.

Les trois phases organiques récupérées sont séchées, concentrées sous pression réduite à sec et pesées. On obtient 1.8g d'extrait pour la phase éther de pétrole, 2.7g d'extrait pour dichlorométhane, 3.5g d'extrait pour la phase acétate d'éthyle.

Durant la concentration de la phase *n*-butanolique, nous avons constaté la formation d'un précipité jaune que nous avons récupéré par filtration. Le filtrat est concentré pour donner un extrait *n*-butanol de 40g.

L'organigramme N° II.1 montre les différentes étapes du processus d'extraction.

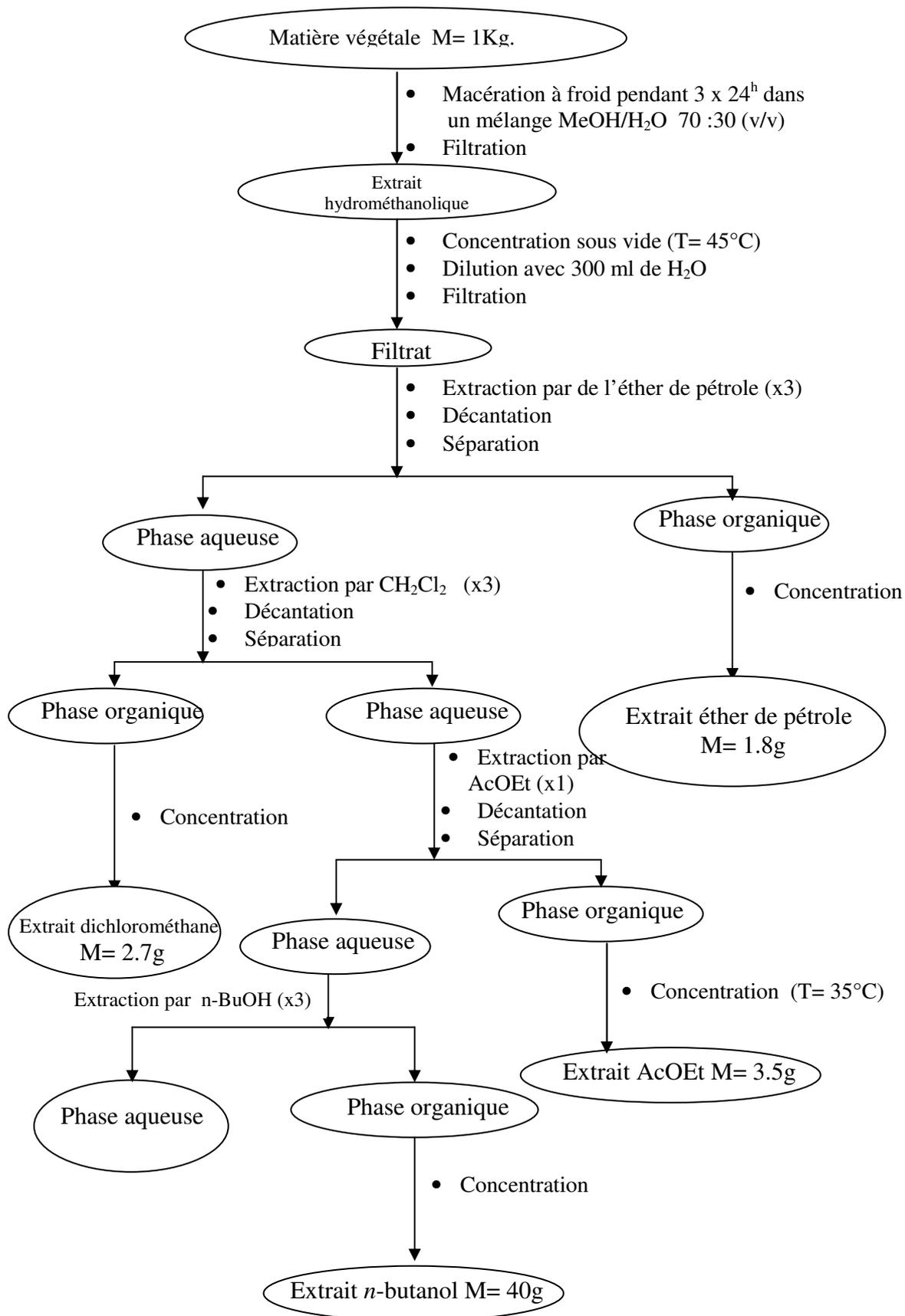


Schéma II.1. Protocole d'extraction des parties aériennes de *Stachys mialhesi* de Noé.

II.6.3. Séparation chromatographique

Pour l'ensemble des extraits, nous avons débuté le traitement par une chromatographie analytique sur couche mince pour mettre au point l'éluant ou le système d'éluant qui donnerait les meilleurs résultats.

II.6.3.1. Séparation et purification des composés de l'extrait *n*-butanolique

Avant d'entamer la séparation par chromatographie sur colonne de cet extrait, nous avons procédé à des tests chromatographiques sur couche mince de gel de silice déposée sur une feuille d'aluminium et polyamide, qui a montré que la phase acétate et *n*-butanolique sont très proches. Pour cela, notre choix s'est basé sur la phase *n*-butanolique.

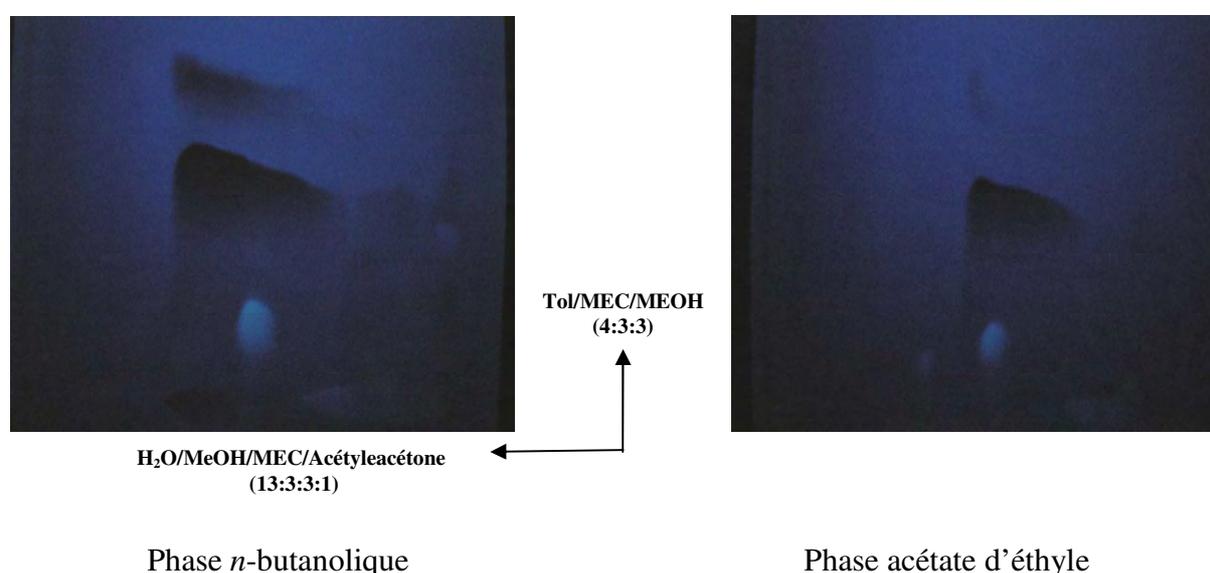


Figure II.2. Carte Chromatographique en couche mince bidimensionnelle des extraits acétate d'éthyle et *n*-butanolique de *S. mialhesi* de Noé.

Séparation sur colonne

Une masse d'environ 10g d'extrait *n*-butanolique sont déposée sur une colonne de gel polyamide SC₆ préparée dans le toluène. L'éluant est réalisé par un gradient de polarité du système toluène-méthanol en commençant par le toluène pur et en terminant par le méthanol pur. Le suivi de ces fractions est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support d'aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365nm) puis révélées avec un mélange de vaniline et d'acide sulfurique dans l'éthanol ou l'anisaldehyde additionné à l'acide sulfurique. La progression de cette colonne est rassemblée dans le tableau II.1.

Tableau II.1. Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait *n*-butanolique de *Stachys mialhesi* de Noé.

Lot de fractions	N° de la fraction	Système d'éluion		Observation
		% Toluène	% Méthanol	
1-19	SMB01	100	0	/
20-55	SMB02	98	2	Mélange complexe
56-99	SMB03	96	4	Mélange séparable
100-110	SMB04	92	8	Mélange séparable
111-132	SMB05	88	12	Mélange complexe
133-140	SMB06	85	15	Mélange séparable
141-158	SMB07	80	20	Mélange séparable
159-174	SMB08	75	25	Mélange complexe
175-178	SMB09	70	30	Mélange complexe
179-182	SMB10	65	35	Mélange complexe
183-188	SMB11	55	45	Mélange complexe
189-193	SMB12	45	55	Mélange complexe
194-203	SMB13	20	80	Mélange complexe
204-212	SMB14	0	100	Mélange complexe

Après rassemblement selon les résultats du suivi analytique, les fractions sont testées dans deux systèmes différents: sur polyamide DC6 éluées par le système organique (4/3/3) (Toluène/Méthyléthylcétone/MeOH) et le système aqueux (13:3 :3 :1) (Eau/Méthanol/Méthyléthylcétone/Acétylcétone) et sur gel de silice éluées par le système CH₂Cl₂/MeOH avec différentes proportions.

Le regroupement final des fractions issues de la colonne chromatographique de l'extrait *n*-butanolique de *S. mialhesi* de Noé. est très difficile, cela est du à la présence d'un composé majoritaire dans presque toutes les fractions qui masque l'observation.

Parmi les 14 fractions obtenues, on a procédé à la séparation des fractions SMB06 et SMB07 et à cause, soit de leur simplicité soit de leur poids relativement important. Pour la fraction SMB07, la séparation a été effectuée sur colonne, quant à la fraction SMB06, nous avons procédé à une autre séparation sur couche mince.

Fractionnement de la fraction SMB06

La fraction SMB06 de masse 100mg a subi une séparation sur plaque de gel de silice, en utilisant comme système d'éluion : CH₂Cl₂/MeOH (8:2), les résultats obtenus sont reportés sur le tableau II.2.

Tableau II.2. Résultat de séparation de la fraction SMB06.

Sous fractions	Remarques
SMB18	(10mg), produit bleu pur (phtalate identifié)
SMB19	(25mg), produit pur de fluorescence violette sous 365 nm
SMB31	(07mg), produit pur de fluorescence jaune sous 365 nm

Fractionnement de la fraction SMB07

De masse 1g, la fraction SMB07 a subi une séparation sur colonne de gel de silice avec le même système d'élution que la fraction SMB06, CH₂Cl₂/MeOH (8:2), les sous-fractions obtenues sont données dans le tableau II.3.

Tableau II.3. Résultat de séparation de la fraction SMB07.

Sous fractions	Remarques
SMB	(15mg), produit pur de fluorescence violette sous 365 nm

Comme signalé précédemment, au cours de la concentration de la phase *n*-butanolique, nous avons constaté la formation d'un précipité jaune que nous avons récupéré, filtré et rincé au méthanol additionnée de quelques gouttes de l'eau pour obtenir un produit pur (SMB1) sous forme d'une poudre jaune (les différentes fractions ont permis de récolter 03g).

En conclusion, l'extrait *n*-butanolique de l'espèce *S. mialhesi* de Noé. a permis l'obtention de 03 produits purs.

II.6.3.2. Extraction et séparations chromatographiques des racines de *Stachys mialhesi* de Noé.

Macération

Les racines de *Stachys mialhesi* de Noé. (180g) ont été séchées à l'ombre pendant quelques jours puis broyées jusqu'à obtention d'une poudre qui a été, extraite au Soxhlet. L'extraction solide-liquide a été effectuée par l'acétone durant deux semaines. La solution jaune obtenue est évaporée à sec, sous vide, conduisant à un résidu solide visqueux de masse 4.9g.

Séparation sur colonne

L'extrait est dissous dans le dichlorométhane et méthanol puis additionné à quelques grammes de gel de silice puis évaporé à sec afin d'obtenir un solide sous forme de poudre. Le mélange est déposé sur une colonne de gel de silice (70-230 mesh, Merck). L'élution est réalisée initialement par le cyclohexane dont on augmente la polarité par l'addition de l'acétate d'éthyle, puis par un gradient de méthanol.

A l'issue de ce fractionnement, 180 fractions de 100ml ont été recueillies. La séparation par chromatographie sur colonne a été suivie par un contrôle des fractions sur des plaques CCM analytiques de gel de silice en utilisant divers systèmes d'élution. L'examen des plaques est réalisé sous lumière UV à 254nm et 365nm et après révélation par la vanilline sulfurique. Les fractions similaires ont été regroupées, évaporées et pesées. La progression de cette colonne est rassemblée dans le tableau II.4.

Tableau II.4. Résultat de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait des racines de *S. mialhesi* de Noé.

Lot de fractions	Système d'élution		
	% Cyclohexane	% Acétate d'éthyle	% Méthanol
1-2	100	0	/
3-5	98	2	/
6-8	96	4	/
9-15	94	6	/
16-24	90	10	/
25-32	88	12	/
33-42	86	14	/
43-54	82	18	/
55-58	80	20	/
59-64	76	24	/
65-81	70	30	/
82-92	60	40	/
93-108	50	50	/
109-112	40	60	/
113-116	80	80	/
117-122	0	100	/
123-140	/	95	5
141-151	/	90	10
152-163	/	85	15
164-172	/	80	20
173-180	/	75	25

L'examen à la lumière UV aux longueurs d'onde 254 et 365nm et révélation à la vanilline sulfurique et chauffage à 120°C permettent de regrouper les fractions ayant la même constitution, fournissant ainsi 21 fractions (voir tableau II.5).

Tableau II.5. Résultat du rassemblement des fractions de la colonne de l'extrait des racines de *S. mialhesi* de Noé.

Fractions	Observations
R1-5	Graisses et cires
R6-8	Mélange de cires et de cristaux
R9-12	Cristaux blancs
R13-14	Mélange complexe
R15-19	Mélange séparable
R20-29	Mélange séparable
R30-34	Mélange complexe
R35-62	Mélange complexe
R55-58	Mélange complexe
R59-64	Mélange complexe
R65-81	Mélange séparable
R82-92, R93-108,	Mélange séparable
R109-112, R113-116,	Mélange séparable
R117-122, R123-140,	Mélange séparable
R141-151, R152-163,	Mélange séparable
R164-172, R173-180.	Mélange séparable

Séparation sur couche mince

Pour des raisons de quantité, seules les fractions R9-12, R15-19, R30-34 et R141-151 ont été traitées.

Fractionnement et isolement de la fraction R9-12

Cette fraction a subi une séparation sur couche mince en utilisant comme système éluant l'hexane/Acétate d'éthyle (9.5:0.5). Les résultats sont donnés dans le tableau II.6

Tableau II.6. Résultats de séparation de la fraction R 9-12.

Sous fractions	Remarques
R9-12	(44mg), mélange de deux produits
R9-12(1)	(08mg), produit pur (phtalate identifié)
R9-12(2)	(10mg), produit pur (phtalate identifié)

Fractionnement et isolement de la fraction R15-19

La fraction R15-19 est soumise à une chromatographie sur colonne de gel de silice (70-230 mesh, Merck), éluée avec un mélange de solvant Hexane/acétate d'éthyle (4:1). Des fractions de 10ml sont recueillies et regroupées selon leur profil en CCM en phase normale effectuée dans le système d'éluion Hexane/Acétate d'éthyle (4:1), pour conduire aux composés R15-19 (03mg), R15-19(1) (4.4mg), R15-19(2) (06mg).

Les résultats relatifs à cette séparation sont rassemblés dans le tableau II.7

Tableau II.7. Résultats de séparation de la fraction R15-19.

Sous fractions	Remarques
R15-19	(06mg), produit pur
R15-19(1)	(4.4mg), mélange de deux produits
R15-19(2)	(03mg), mélange de trois produits

Fractionnement et isolement de la fraction R30-34

Avec le même système d'éluion Hexane/Acétate d'éthyle, mais avec la proportion (7:3), nous avons procédé à une séparation sur plaque CCM. Le tableau II.8 montre le résultat de la séparation :

Tableau II.8. Résultats de séparation de la fraction R30-34.

Sous fractions	Remarques
R30-34	(05mg) produit pur
R30-34(1)	(2,1mg), mélange des produits
R30-34(2)	(2.2mg) produit pur (phtalate identifié)
R30-34(3)	(1,8mg), mélange de deux produits

Fractionnement et isolement de la fraction R141-151

Une chromatographie sur colonne de gel de silice dans différents systèmes d'élution et les spectres de RMN ^1H ont permis de constater que SMB1 et R141-151 sont identiques.

Concernant cette partie de l'extrait des racines de *S. mialhesi* de Noé., nous avons pu isoler à l'état pur quatre produits qui sont R9-12, R15-19, R30-34, R141-151. R141-151 se trouve être le même que SMB1, isolé précédemment sous forme de poudre jaune, déjà isolé de l'extrait *n*-butanolique des parties aériennes. Le produit SMB1 a été collecté dans toutes les fractions (Poids total = 3g).

II.7. Caractérisation chimique et élucidation structurale des composés isolés

Les composés isolés ont été identifiés par les analyses spectroscopiques (RMN ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC) ainsi que la spectrométrie de masse.

II.7.1. Elucidation de la structure du composé SMB1=R141-151

II.7.1.1. Analyses physico-chimiques

- Le composé R141-151 se présente sous forme de poudre jaune.
- Fluorescence sous lampe Wood : violette, caractéristique aux flavones.
- $R_f = 0.41$ dans le système (Toluène/MEC/MeOH 4:3:3) et $R_f = 0.5$ dans le système ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}/\text{MEC}/\text{Acétylacétone}$ 13:3:3:1).

II.7.1.2. Analyses spectroscopiques

L'analyse par spectrométrie de masse, réalisée à haute résolution en mode électrospray positif (HR-SMESI), du composé R141-151 (Spectre N°01), montre la présence d'un ion pseudomoléculaire $[\text{M}+\text{Na}]^+$ à $m/z = 675.1547$, suggérant une masse moléculaire de 652. Cette masse est compatible avec la formule brute $\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{O}_{17}$.

L'étude de la série spectrale UV du composé R141-151 (Spectre N°11) montre :

- Le maximum d'absorption de la bande I à ($\lambda_{\text{max}} = 326\text{nm}$) dans le spectre enregistré dans le méthanol indique qu'il s'agit d'un flavone.
- L'addition de NaOH provoquant un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = +76\text{nm}$) avec l'augmentation de l'intensité lumineuse indique la présence d'un OH libre en position 4'. L'absence d'une nouvelle bande entre 320-335nm suggère une substitution de l'hydroxyle en position 7. Ce qui est confirmé par l'absence de déplacement bathochrome de la bande II après addition de NaOAc par rapport à celle du spectre enregistré dans le méthanol.
- L'absence du déplacement hypsochrome de la bande I en comparant les spectres $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ et AlCl_3 laisse prévoir l'absence d'un système orthodihydroxylé sur le cycle B.
- Le déplacement bathochrome de la bande I enregistré dans le milieu ($\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$) comparativement à celui enregistré dans le méthanol $\Delta\lambda = +14\text{nm}$ indique la présence d'un OH libre en 5.

L'ensemble des données de la série spectrale UV est reporté dans le Tableau II.9.

Ces données permettent la proposition de la structure partielle suivante :

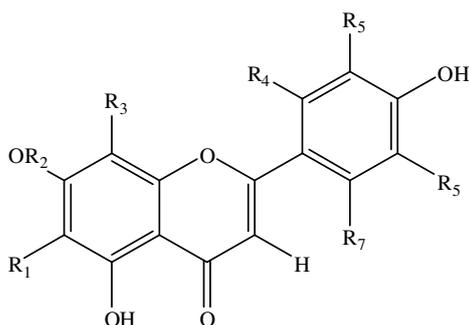


Tableau II.9. Spectre UV du composé R141-151 seul, avec NaOH, AlCl₃, AlCl₃+HCl, NaOAc, NaOAc+H₃BO₃ dans le MeOH, observation et interprétation.

Réactif de déplacement	λ_{\max} (nm)				
	Bande I	Autres bandes	Bande II	Déplacement ($\Delta\lambda$)	Interprétation
R141-151 + MeOH	308, 326	-	277	-	Flavone.
R141-151 + NaOH	384	-	275	+ 76	OH libre en 4' OH substitué en 7
R141-151 + AlCl ₃	322, 345, 421	-	283	Un petit déplacement de la bande I (+ 14 nm)	OH en 5 libre. Absence de 3', 4'-di-OH sur le cycle B.
R141-151 + (AlCl ₃ + HCl)	322, 343, 420	-	283	la bande II reste la même λ (283 nm)	
R141-151 + NaOAc	309, 388	-	276	-	OH substitué en 7
R141-151 + (NaOAc + H ₃ BO ₃)	309, 327	-	276	-	Absence de 3', 4'-di-OH sur le cycle B.

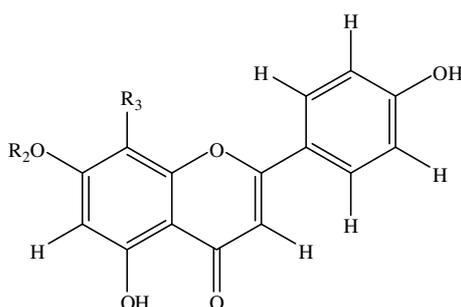
L'examen du spectre RMN ¹H étalé, enregistré dans le DMSO-*d*₆ (Spectre N°03) montre :

- Un doublet qui apparaît à $\delta_{\text{H}} = 6.89$ ppm avec une constante de couplage ($J = 8.8$ Hz) permettant l'attribution de ce signal d'intégration 2H à H-3' et H-5', de même la constante de couplage ($J = 8.8$ Hz) du doublet qui apparaît à $\delta_{\text{H}} = 7.95$ ppm permet l'attribution de ce signal d'intégration 2H à H-2' et H-6'.

- Un singulet à $\delta_{\text{H}} = 6.76$ ppm correspond au proton qui est corrélé à l'atome de carbone dont le signal apparaît à $\delta_{\text{C}} = 102.6$ ppm (Spectre HSQC étalé, N°08) ne peut être attribué qu'au proton H-3.

- Un singulet à $\delta_{\text{H}} = 6.63$ ppm correspond soit au proton H-6 ou au proton H-8, toutefois le spectre HSQC étalé, (Spectre N°08) montre que ce proton est corrélé au carbone dont le signal apparaît à $\delta_{\text{C}} = 99.4$ ppm, il ne peut être donc attribué qu'au carbone 6 (Lenherr *et al.*, 1984).

L'ensemble de ces attributions conduit à la structure partielle suivante.



Les spectres HSQC (Spectre N°07-08) et HMBC (Spectre N°09-10) permettent de compléter l'attribution des carbones de cette structure partielle.

Position	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
2	-	164.1
3	6.76 s (1H)	102.6
4	-	182.3
5	-	152.2
6	6.63 s (1H)	99.4
7	-	150.5
8	-	127.5
9	-	143.7
10	-	105.5
1'	-	121.1
2', 6'	7.95 d ($J= 8.8$ Hz, 2H)	128.6
3', 5'	6.89 d ($J= 8.8$ Hz, 2H)	115.9
4'	-	161.3

L'examen du spectre de RMN 1H étalé (Spectre N°03) de la partie osidique de composé R141-151 a permis d'observer deux doublets, l'un à $\delta_H= 5.01$ ppm avec une constante de couplage ($J= 7.5$ Hz) et l'autre à $\delta_H= 4.87$ ppm avec une constante de couplage ($J= 8.0$ Hz) attribuables a deux protons anomériques et ils sont liés à des carbones résonnant respectivement à $\delta_C= 100.0$ ppm et $\delta_C= 102.5$ ppm (Spectre HSQC étalé N°08). Les valeurs des constantes de couplages indiquant des jonctions β (Lenherr et Mabry, 1987).

Le spectre Cosy (H, H) (Spectre N°06) permet de relier le proton H-1'' dont le signal apparait à $\delta_H= 5.01$ ppm à 6 autres protons du 1^{er} hexose.

Le 2^{ème} proton anomérique H-1''' ($\delta_H= 4.87$ ppm) permet également de relier 6 autres protons d'un deuxième hexose.

L'examen des plaques CCM après l'hydrolyse acide a permis de montrer que l'un des hexoses est un glucose et l'autre et l'allose.

La tache de corrélation correspondant au proton résonnant à $\delta_H= 5.01$ ppm et au proton résonnant à $\delta_H= 3.53$ ppm sous forme de triplet avec une constant de couplage de ($J= 9.0$ Hz) montre que les protons H-1'', H-2'', H-3'' sont axiales, cela permet de deduire que le 1^{er} hexose est le glucose et le second est l'allose.

Les attributions des carbones liés aux protons sont faites à l'aide du spectre HSQC étalé (Spectre N°07).

Glucose	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
G₁''	5.01 <i>d</i> (<i>J</i> = 7.5 Hz, 1H)	100.0
G₂''	3.53 <i>t</i> (<i>J</i> = 9.0 Hz)	82.5
G₃''	3.39 <i>m</i>	77.1
G₄''	3.20 <i>m</i>	69.2
G₅''	3.45 <i>m</i>	75.5
G_{6a}'' et G_{6b}''	(3.43, 3.68) <i>m</i>	60.5
Allose	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
A₁'''	4.87 <i>d</i> (<i>J</i> = 8.0 Hz, 1H)	102.5
A₂'''	3.20 <i>m</i>	70.7
A₃'''	3.39 <i>m</i>	77.1
A₄'''	3.36 <i>m</i>	66.8
A₅'''	3.80 <i>t</i>	71.5
A_{6a}''' et A_{6b}'''	3.98 <i>m</i>	63.5

Détermination des points de jonction des différents fragments :

- Le signal à une valeur déblindée ($\delta_C = 82.5$ ppm) correspondant au carbone 2 du glucose, indique que ce dernier est attaché à l'aglycone et que l'allose est attaché au carbone 2 du glucose, ce qui serait confirmé par l'examen du spectre HMBC étalé (Spectre N°10), ou on distingue d'une part une tache de corrélation entre le proton anomérique du glucose ($\delta_H = 5.01$ ppm) et le carbone C-7 de l'aglycone $\delta_C = 150.5$ ppm, montrant la glycosylation en C-7, et d'autre part une tache de corrélation entre le proton anomérique de l'allose ($\delta_H = 4.87$ ppm) et le carbone 2 du glucose ($\delta_C = 82.5$ ppm).
- Le spectre de RMN¹³C (Spectre N°04-05) présentant le signal du carbone 6 de l'allose à une valeur déblindée dans le champ faible de 3 ppm à celle qui est prévue ($\delta_C = 63.5$ ppm à la place de $\delta_C = 60$ ppm), indique une acétylation à ce niveau.
- Les signaux des protons A_{6a}''' et A_{6b}''' et A₅''' observés à des champs faibles ($\delta_H = 3.98$ - 3.80 ppm) confirme l'acétylation au niveau du carbone 6.
- L'observation de deux signaux, l'un à $\delta_C = 170.3$ ppm et l'autre $\delta_C = 20.4$ ppm, sont attribuables au carbonyle et au méthyle de l'acétyle de l'allose (Markham et Chari, 1982).

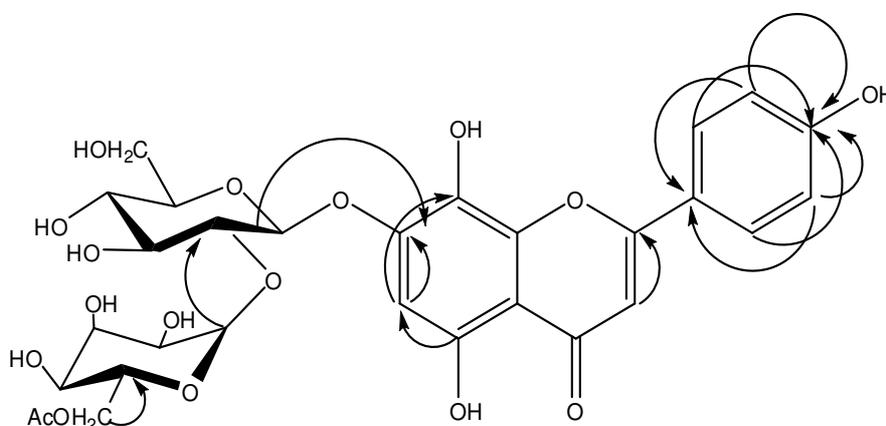
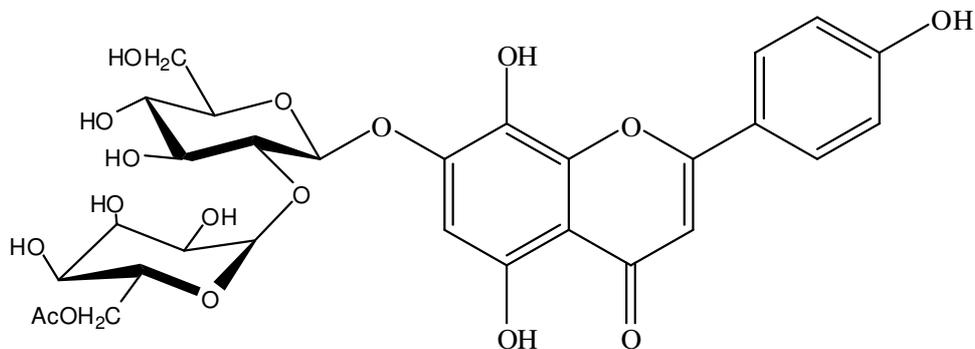


Fig.I.3. Corrélations HMBC du composé R141-151 (C → H).

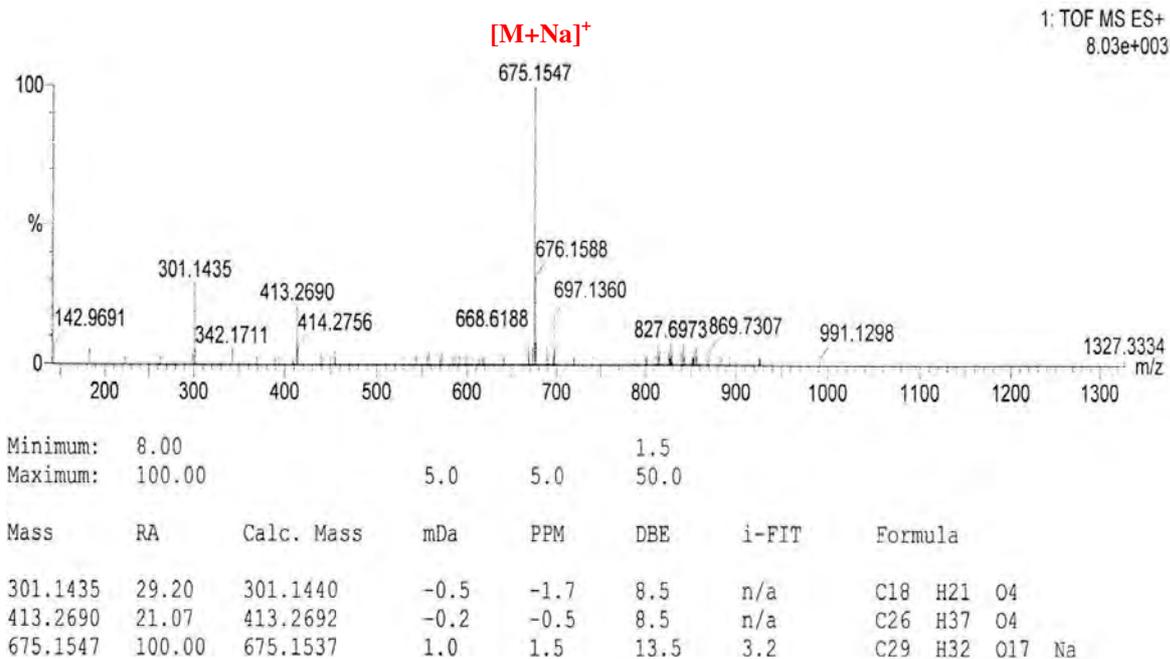
La structure du composé R141-151 a donc pu être établie comme étant l'isoscutellareine-7-*O*-(6'''-*O*-acétyl- β -D-allosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucoside. Cette molécule a été isolée pour la première fois de *Stachys recta* (Lenherr *et al.*, 1984). Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN du ^1H et du ^{13}C dans le DMSO-*d*6 sont présentés dans le tableau II.10, avec leurs attributions et ceux trouvés dans la littérature (Lenherr et Mabry, 1987).



Isoscutellareine-7-*O*-(6'''-*O*-acétyl- β -D-allosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucoside

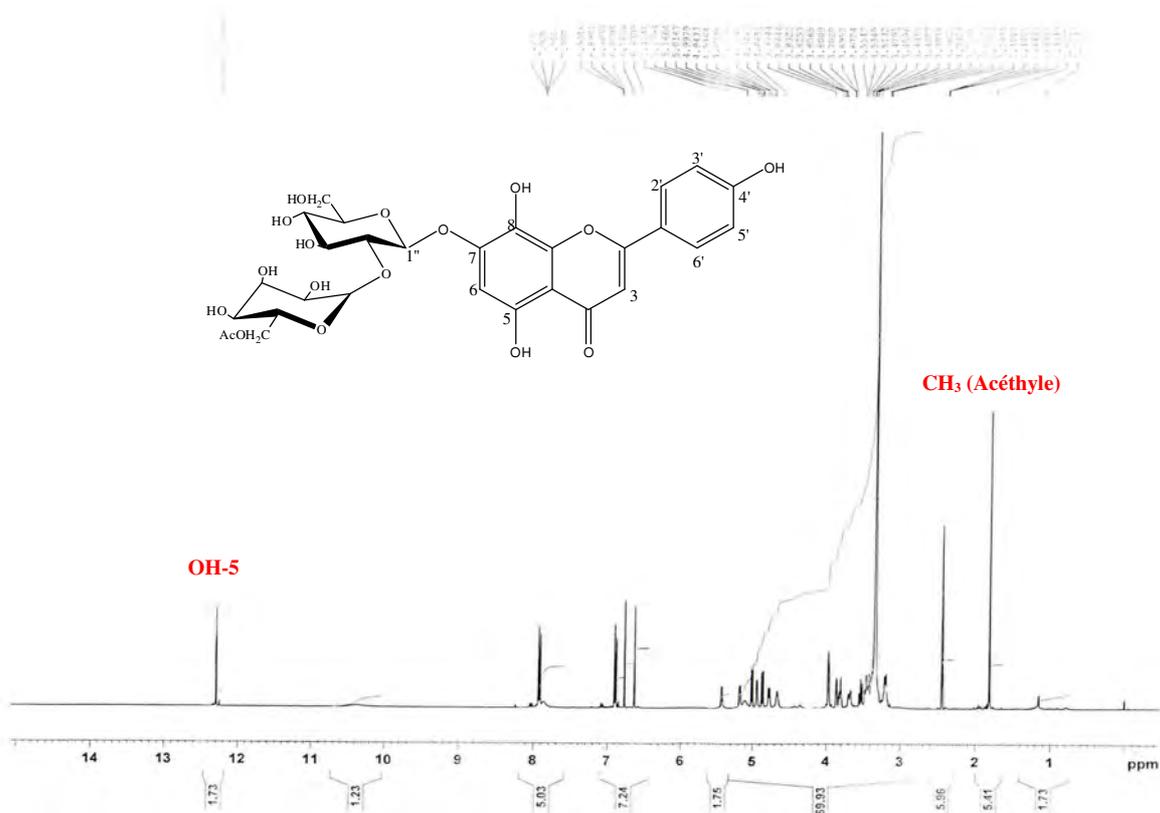
Tableau II.10. RMN du ^1H et du ^{13}C (400 MHz, δ , J , en Hz ; 125 MHz, δ) du composé R141-151 et du isoscutellareine-7-*O*-(6'''-*O*-acétyl- β -D-allosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucoside (500 MHz, δ , J , en Hz ; 100 MHz, δ) dans le DMSO-*d*₆.

	Composé R141-151		Isoscutellareine-7- <i>O</i> -(6'''- <i>O</i> -acétyl- β -D-allosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucoside	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
apigénine	δ (ppm)			
2	-	164.1	-	164.0
3	6.76 <i>s</i> (1H)	102.6	6.84 <i>s</i>	102.6
4	-	182.3	-	182.3
5	-	152.2	-	150.3
6	6.63 <i>s</i> (1H)	99.4	6.70 <i>s</i>	100.0
7	-	150.5	-	152.1
8	-	127.5	-	127.4
9	-	143.7	-	143.6
10	-	105.5	-	105.5
1'	-	121.1	-	121.1
2'	7.95 <i>d</i> ($J= 8.8$ Hz, 2H)	128.6	7.98 <i>d</i> ($J= 8.8$ Hz)	128.6
3'	6.89 <i>d</i> ($J= 8.8$ Hz, 2H)	115.9	6.95 <i>d</i> ($J= 8.8$ Hz)	115.9
4'	-	161.3	-	161.3
5'	6.89 <i>d</i> ($J= 8.8$ Hz, 2H)	115.9	6.95 <i>d</i> ($J= 8.8$ Hz)	115.9
6'	7.95 <i>d</i> ($J= 8.8$ Hz, 2H)	128.6	7.98 <i>d</i> ($J= 8.8$ Hz)	128.6
OH-5	12.29 <i>s</i> (1H)	-	12.37 <i>s</i>	-
G₁''	5.01 <i>d</i> ($J= 7.5$ Hz, 1H)	100.0	5.10 <i>d</i> ($J= 7.4$ Hz)	99.3
G₂''	3.53 <i>t</i> ($J= 9.0$ Hz)	82.5	3.60 <i>t</i>	82.5
G₃''	3.39 <i>m</i>	77.1	3.53 <i>m</i>	75.5
G₄''	3.20 <i>m</i>	69.2	3.28 <i>m</i>	69.2
G₅''	3.45 <i>m</i>	75.5	3.50-3.53 <i>m</i>	77.1
G_{6a}'' et G_{6b}''	(3.43, 3.68) <i>m</i>	60.5	3.76 <i>d</i>	60.5
A₁'''	4.87 <i>d</i> ($J= 8.0$ Hz, 1H)	102.5	4.94 <i>d</i> ($J= 8.0$ Hz)	102.5
A₂'''	3.20 <i>m</i>	70.7	3.28 <i>m</i>	71.4
A₃'''	3.39 <i>m</i>	77.1	3.92 <i>m</i>	70.7
A₄'''	3.36 <i>m</i>	66.8	3.43 <i>m</i>	66.7
A₅'''	3.80 <i>t</i>	71.5	3.88 <i>dt</i>	71.4
A_{6a}''' et A_{6b}'''	3.98 <i>m</i>	63.5	5.05 <i>d</i>	63.4
Me(Acétyle)	1.81 <i>s</i> (3H)	20.4	1.89 <i>s</i>	20.4
$\begin{array}{c} \text{—C—} \\ \\ \text{O} \end{array}$	-	170.3	-	170.2

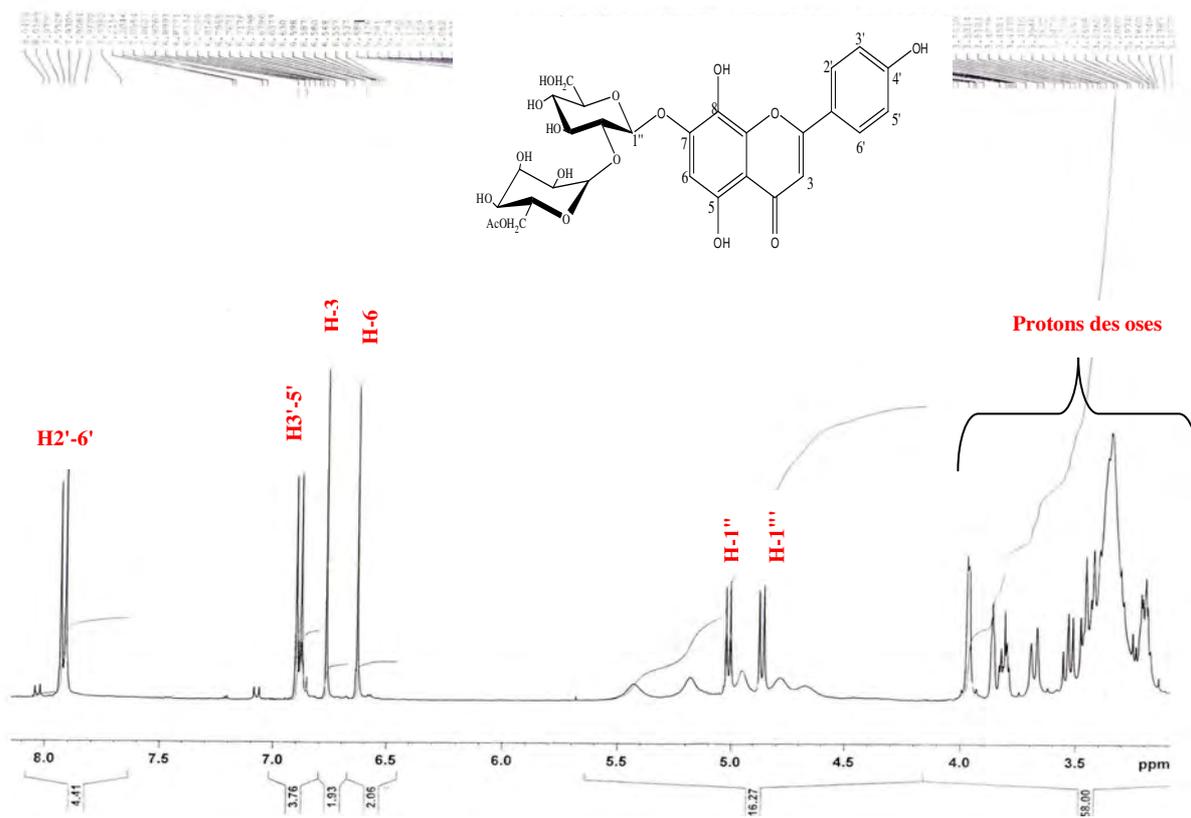


6

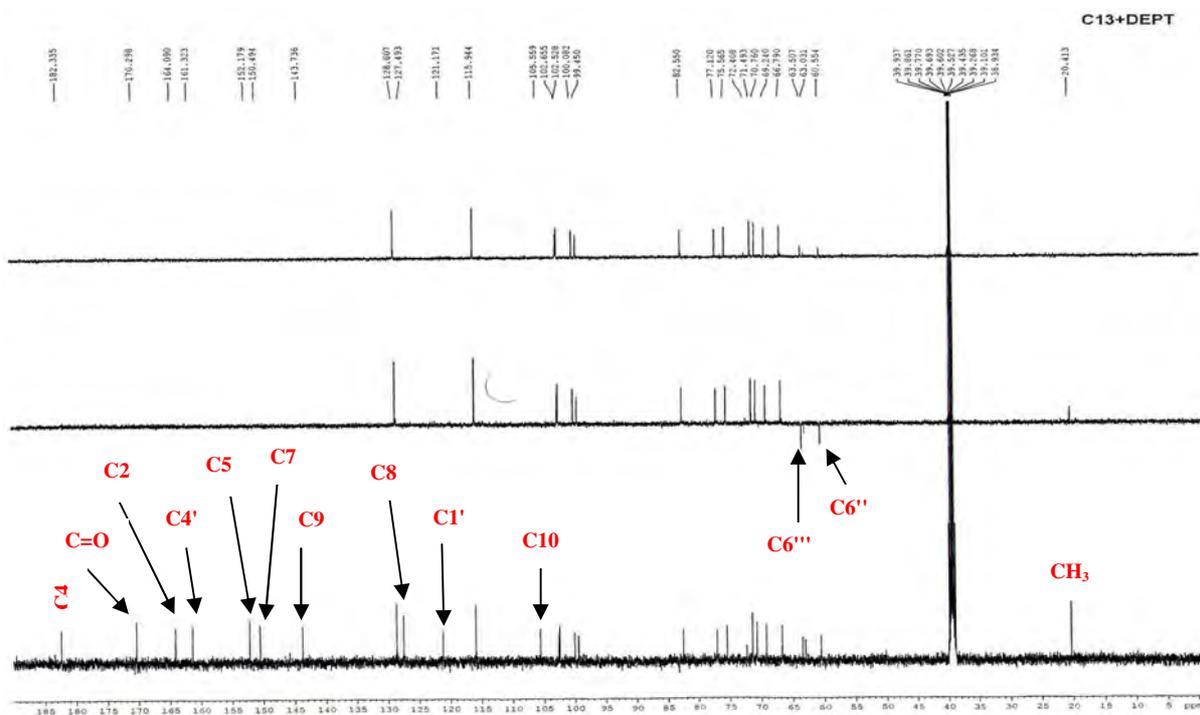
Spectre N°01. Spectre de masse en mode électrospray du composé R141-151.



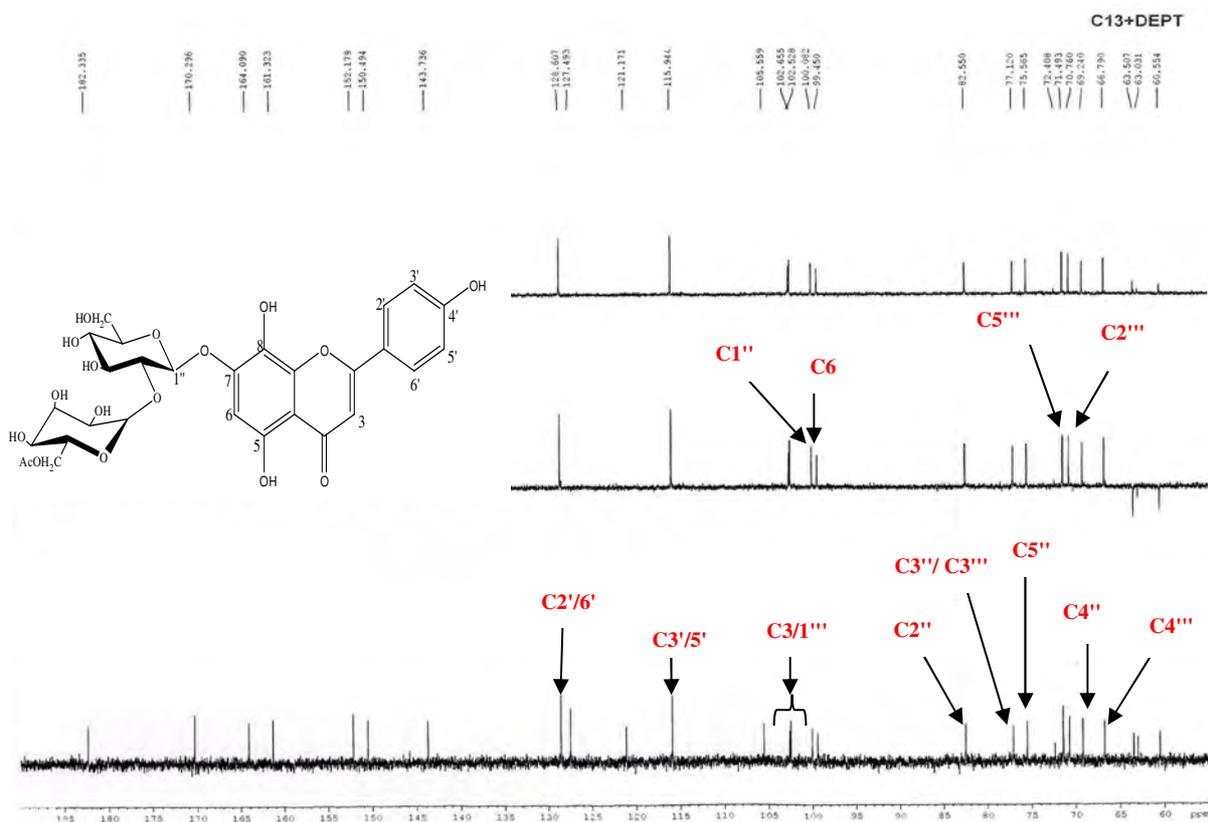
Spectre N°02. Spectre RMN ¹H du composé R141-151 (400 MHz).



Spectre N°03. Spectre RMN ^1H étalé (3.0 à 8.0 ppm) du composé R141-151 (400 MHz).

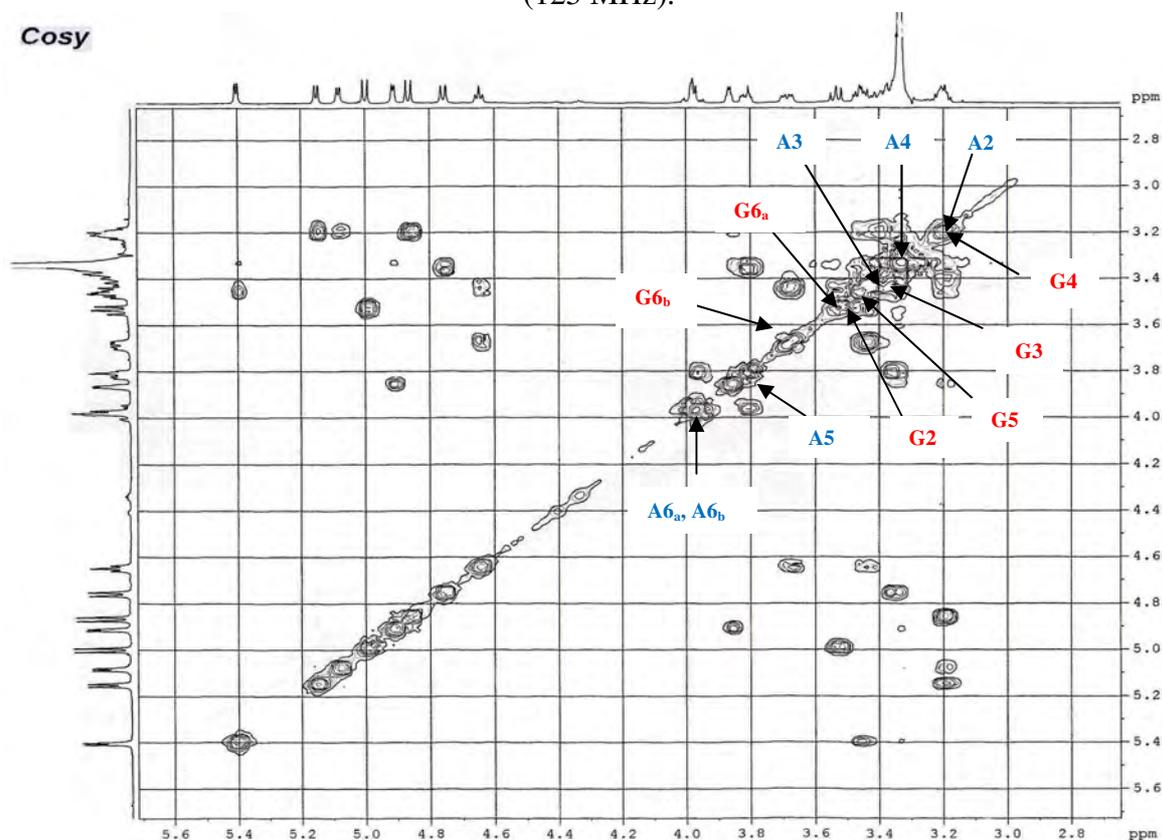


Spectre N°04. Spectre RMN ^{13}C DEPT 135 du composé R141-151 (125 MHz).

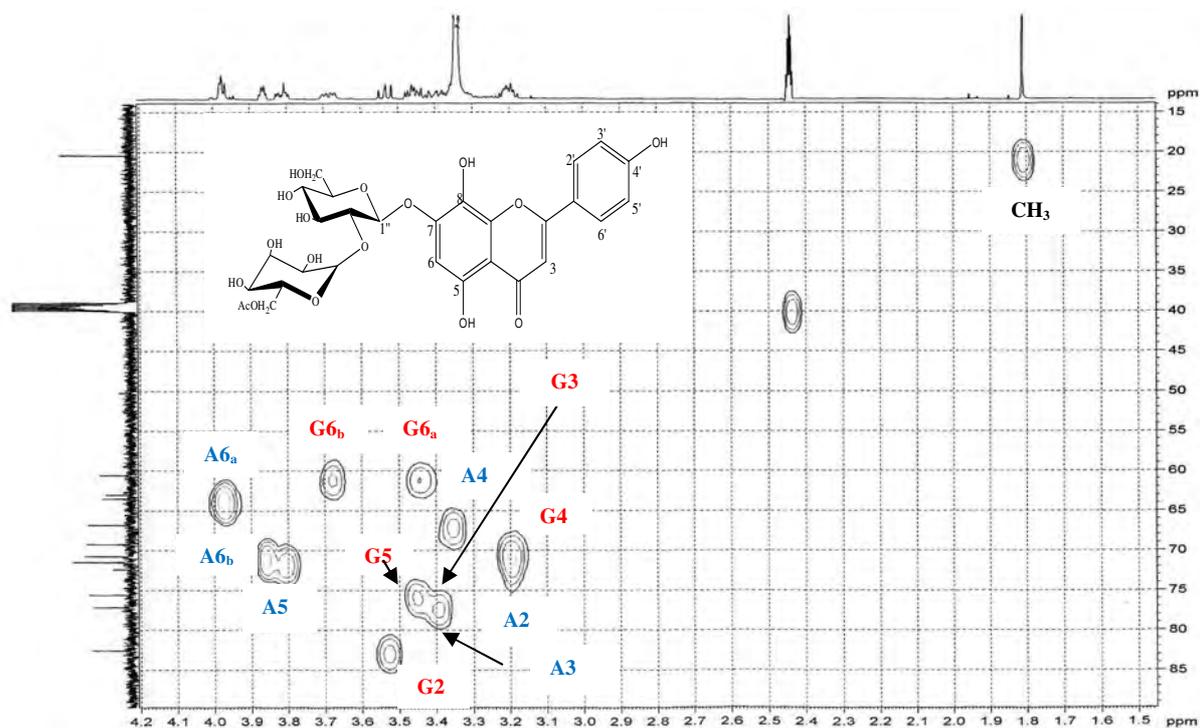


Spectre N°05. Spectre RMN ^{13}C DEPT 135 étalé (55 à 185 ppm) du composé R141-151 (125 MHz).

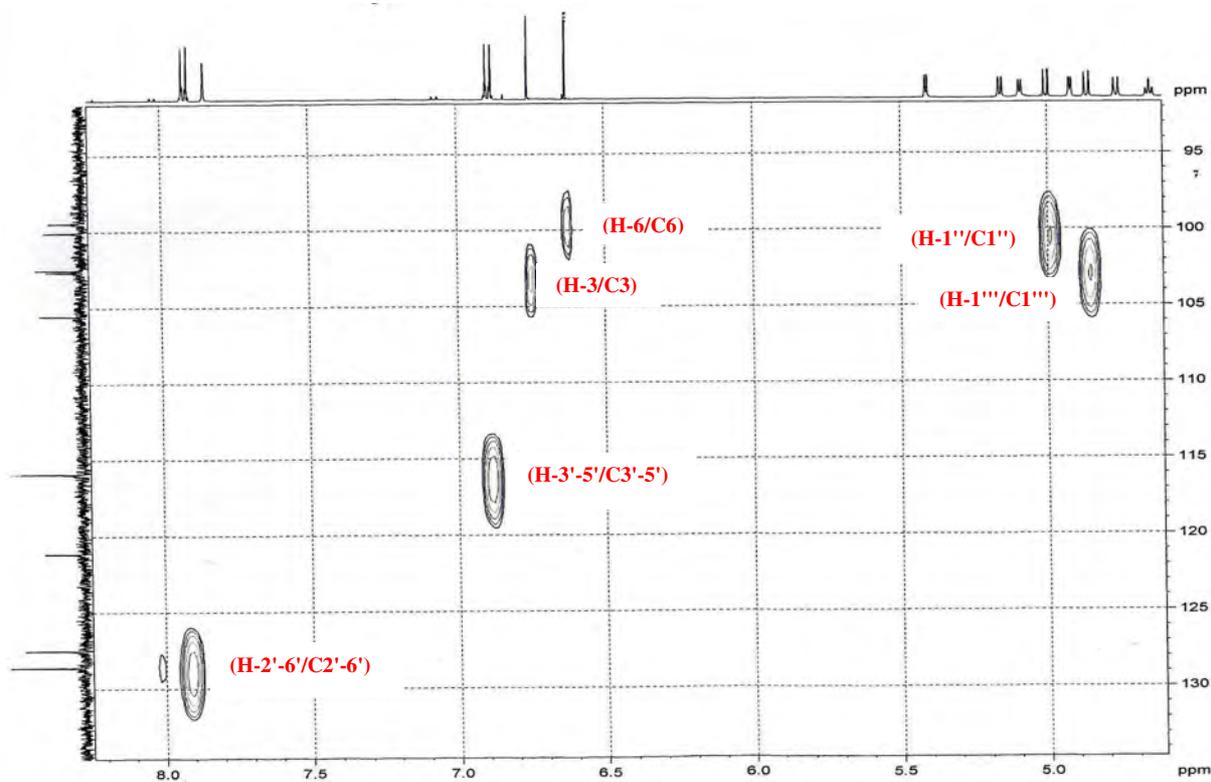
Cosy



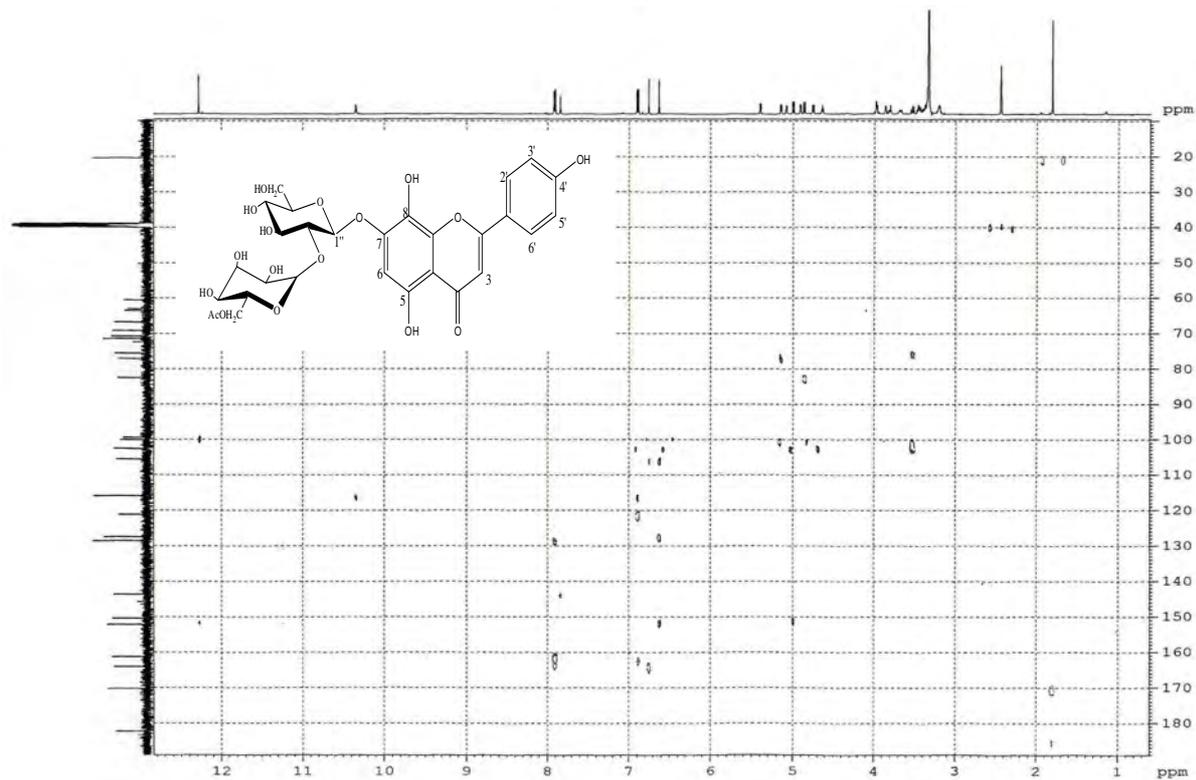
Spectre N°06. Spectre Cosy étalé (2.8 à 5.6 ppm) du composé R141-151 (500 MHz).



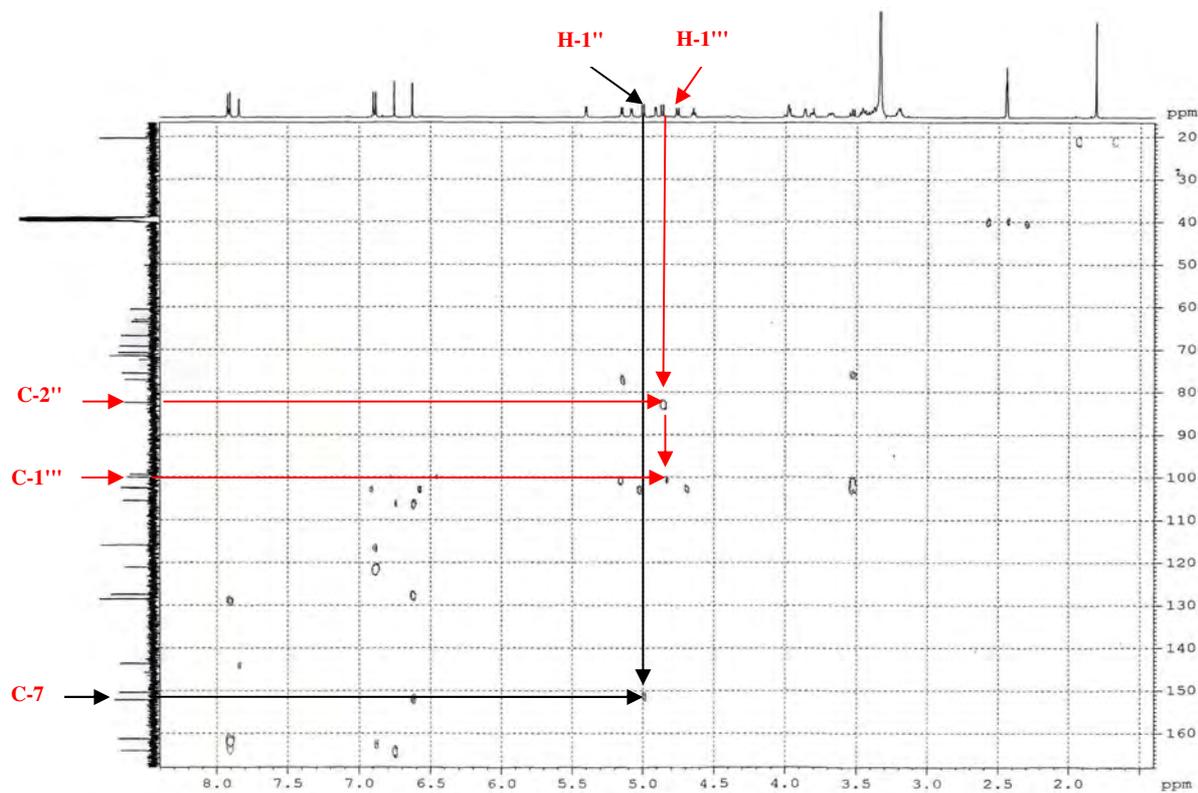
Spectre N°07. Spectre HSQC étalé (15 à 85 ppm) du composé R141-151 (500 MHz).



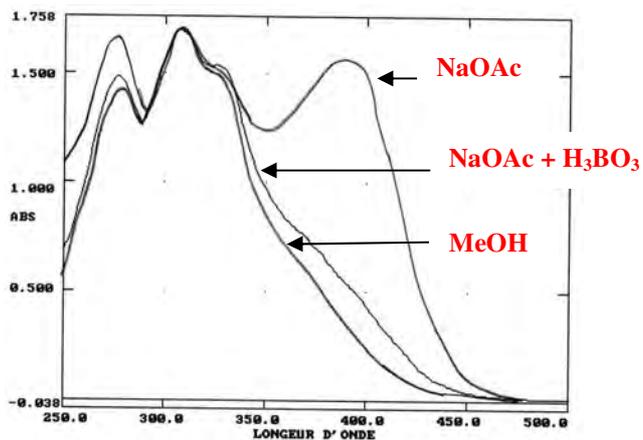
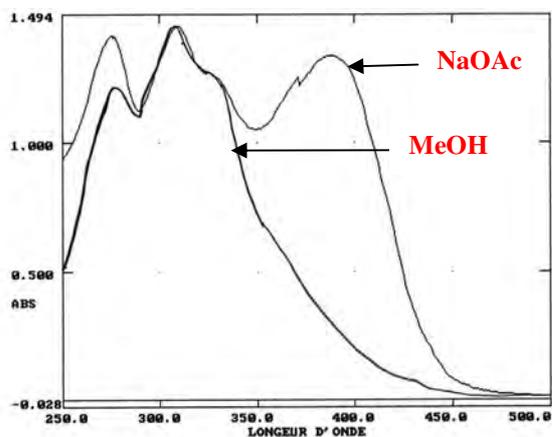
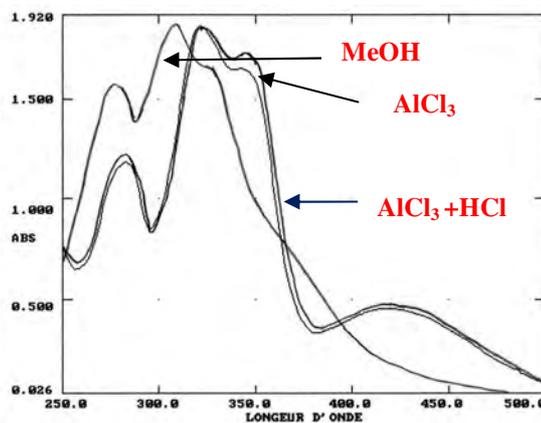
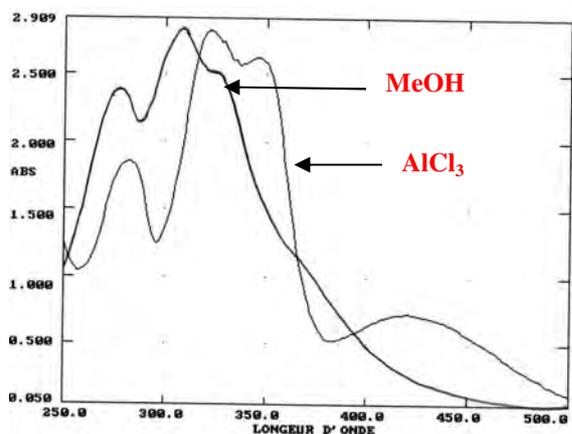
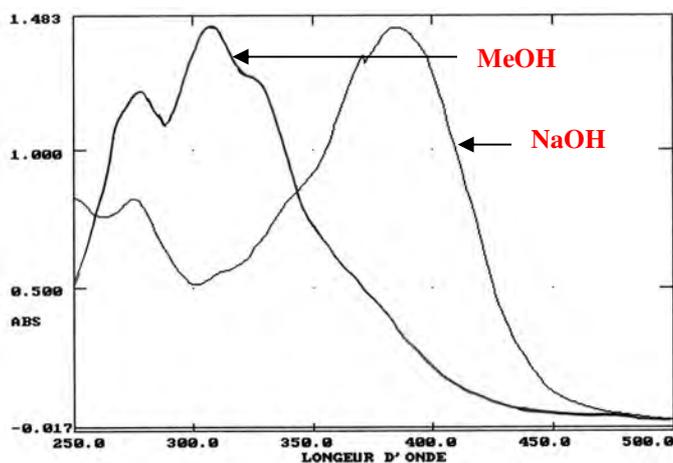
Spectre N°08. Spectre HSQC étalé (95 à 130 ppm) du composé R141-151 (500 MHz).



Spectre N°09. Spectre HMBC du composé R141-151 (500 MHz).



Spectre N°10. Spectre HMBC étalé (20 à 160 ppm) du composé R141-151 (500 MHz).



Spectre N°11. Série spectrale UV-visible du composé R141-151.

II.7.2. Elucidation de la structure du composé SMB19 :

II.7.2.1. Analyses physico-chimiques

- Le composé SMB19 se présente sous forme de poudre jaune.
- Fluorescence sous lampe Wood : violette, caractéristique aux flavones.
- $R_f = 0.21$ dans le système (Toluène/MEC/MeOH 4:3:3) et $R_f = 0.44$ dans le système (H₂O/MeOH/MEC/Acétylacétone 13:3:3:1).

II.7.2.2. Analyses spectroscopiques

L'analyse par spectrométrie de masse réalisée à haute résolution en mode électrospray positif (HR-SMESI), du composé SMB19 (Spectre N°12), permet d'observer un ion pseudomoléculaire $[M+Na]^+$ à $m/z = 601.1328$, suggérant une masse moléculaire de 579, ce qui est compatible avec la formule brute C₃₀H₂₆O₁₂.

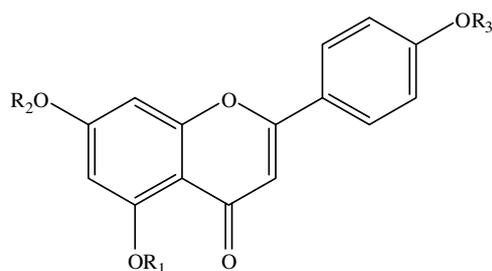
Dans le spectre RMN du proton enregistré dans le DMSO-*d*₆ du composé SMB19 (Spectre N°13-15), on observe de nombreux pics entre $\delta_H = 6.3$ ppm et $\delta_H = 8.0$ ppm, ce qui laisse présager la présence de plusieurs noyaux aromatiques dans la molécule. Entre $\delta_H = 3.2$ ppm et $\delta_H = 5.5$ ppm, la simplicité du spectre notamment la présence d'un seul signal susceptible de correspondre à un proton anomérique à $\delta_H = 5.17$ ppm (d, $J = 7.8$ Hz) semble qu'un seul ose est présent, ce qui est confirmé par la présence dans le spectre de RMN du ¹³C (Spectre N°16-17) de 5 signaux ($\delta_C = 73.3$ ppm, $\delta_C = 76.6$ ppm, $\delta_C = 70.3$ ppm, $\delta_C = 74.2$ ppm, $\delta_C = 63.8$ ppm) caractéristiques des carbones d'un sucre (Fragment A).

Le spectre de RMN du proton étalé (Spectre N°14) présente des déplacements chimiques compatibles avec ceux observés pour l'apigénine (Fragment B). D'une part: on observe un système AA'XX' à $\delta_H = 6.93$ ppm (2H, d, $J = 9.0$ Hz) et $\delta_H = 7.95$ ppm (2H, d, $J = 8.4$ Hz) attribués respectivement aux protons H-3'-5' et H-2'-6' du noyau B, témoignant ainsi une substitution en 4'.

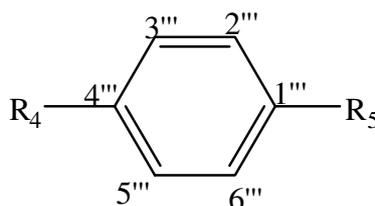
Un singulet $\delta_H = 6.85$ ppm, deux doublets $\delta_H = 6.48$ ppm (d, $J = 2.0$ Hz); $\delta_H = 6.82$ ppm (d, $J = 2.0$ Hz) correspondant aux protons H-3, H-6 et H-8 du cycle C et A respectivement. D'autre part on observe un 2^{ème} système AA'XX' $\delta_H = 6.67$ ppm (2H, d, $J = 9.0$ Hz) et à $\delta_H = 7.38$ ppm (2H, d, $J = 8.4$ Hz) d'un noyau aromatique para disubstitué (fragment C).

On observe également deux doublets à $\delta_H = 6.34$ ppm (d, $J = 16.2$ Hz); $\delta_H = 7.50$ ppm (d, $J = 16.2$ Hz) indiquant la présence de deux protons vicinaux d'une double liaison de configuration trans. Leurs déplacements chimiques déblindés pourraient être dus à une conjugaison de la double liaison avec un carbonyle (Fragment D).

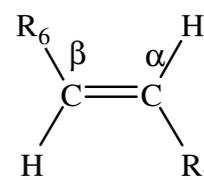
Fragment A : L'ose



Fragment B



Fragment C



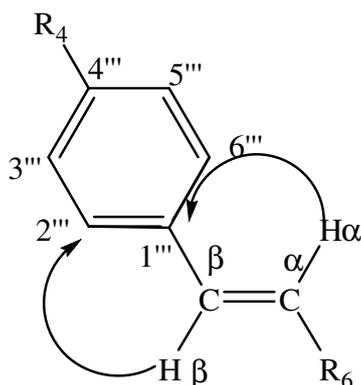
Fragment D

A partir des structures partielles déterminées par une analyse du spectre RMN ^1H et du carbone ^{13}C , on peut déduire les attributions du carbone à partir des spectres Cosy (H, H), (Spectre N°23) HSQC étalé (Spectre N°19-20) et HMBC étalé (Spectre N°21-22).

Position	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
2	-	164.6
3	6.85 s (1H)	103.4
4	-	182.4
5	-	161.8
6	6.48 d ($J= 2.0$ Hz, 1H)	99.8
7	-	163.1
8	6.82 d ($J= 2.0$ Hz, 1H)	95.1
9	-	157.3
10	-	105.8
1'	-	121.4
2'-6'	7.95 d ($J= 8.4$ Hz, 2H)	128.9
3'-5'	6.93 d ($J= 9.0$ Hz, 2H)	116.4
4'	-	161.5
1'''	-	125.3
2'''-6'''	7.38 d ($J= 8.4$ Hz, 2H)	130.6
3'''-5'''	6.67 d ($J= 9.0$ Hz, 2H)	116.1
4'''	-	160.2

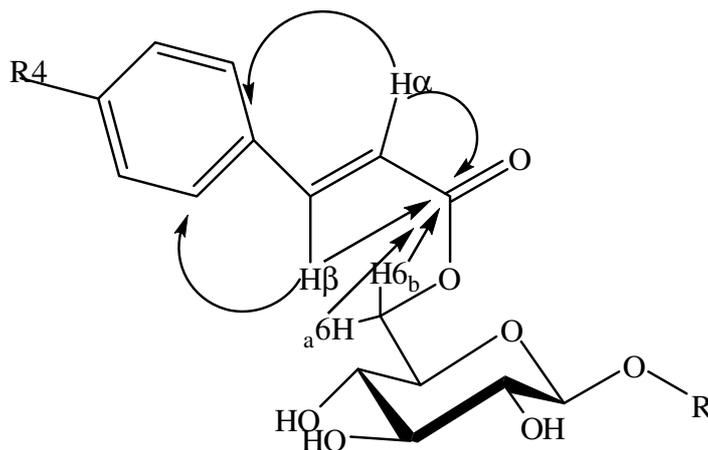
Le spectre RMN ^1H étalé (Spectre N°15), permet facilement d'attribuer les signaux à $\delta_{\text{H}}= 3.85$ ppm (td, $J= 1.8$ Hz, $J=7.2$ Hz), $\delta_{\text{H}}= 4.16$ ppm (dd, $J= 7.2$ Hz et $J= 12.0$ Hz) et $\delta_{\text{H}}= 4.46$ ppm (dd, $J= 1.8$ Hz et $J= 11.4$ Hz) aux protons H-5'', H-6_a'' et H-6_b'' d'un sucre acétylé en 6. Les signaux qui apparaissent à $\delta_{\text{H}}= 3.32$ ppm, $\delta_{\text{H}}= 3.36$ ppm et $\delta_{\text{H}}= 3.25$ ppm (Spectre N°19 HSQC étalé) ont été attribués respectivement aux protons H-2'', H-3'' et H-4'' d'un glucose conformément à ceux de la littérature (Agrawal, 1989).

Le spectre HMBC étalé (Spectre N°21-22) permet d'établir les liaisons entre les différents fragments A, B, C, D déterminés. En effet le spectre HMBC du composé SMB19 montre d'une part une tache de corrélation correspondant au doublet à $\delta_{\text{H}}= 7.50$ ppm attribué à H- β et au signal à $\delta_{\text{C}}= 130.6$ ppm attribué aux carbones C-2''' et C-6''' et d'autre part une tache de corrélation correspondant au doublet à $\delta_{\text{H}}= 6.34$ ppm attribué à H- α et au signal à $\delta_{\text{C}}= 125.3$ ppm attribué au carbone quaternaire C-1''', cela permet de lier le fragment C au fragment D.



On peut aussi distinguer deux taches de corrélations correspondant aux protons α , β couplés au carbone quaternaire résonnant à un champ faible à $\delta_C = 166.9$ ppm, indiquant qu'il s'agit d'un carbone d'un carbonyle d'une fonction ester.

Le carbone en question est également corrélé aux protons résonnant à $\delta_H = 4.16$ ppm et $\delta_H = 4.46$ ppm correspondant aux protons H-6_a'' et H-6_b'' confirmant ainsi le carbone acétylé du glucose (Fragment A).



Finalement on peut déterminer la position de la jonction de ce fragment avec l'apigénine à travers une tache de corrélation correspondant au proton anomérique couplé au carbone dont le signal apparaît à $\delta_C = 163.1$ ppm indiquant une glycosylation en position 7.

Le de compte du nombre d'atomes d'oxygène et d'hydrogène et l'absence de d'autre signaux dans le spectre RMN 1H permet d'identifier R_4 a un hydroxyle.

L'hydrolyse acide du composé SMB19 a donné le glucose, identifié par la chromatographie sur couche mince en gel de silice et par comparaison à des échantillons de référence.

Tableau II.11. Comparaison des déplacements chimiques des signaux des groupements polyphénoliques du composé SMB19 en RMN du ^1H et du ^{13}C (600 MHz, δ , J en Hz ; 150 MHz, δ) avec ceux trouvée dans la littérature pour les mêmes groupements dans le chrysoéryol-7-*O*- β -D-(3''-*E*-*p*-coumaroyl)-glucoside et l'apigénine-7-*O*- β -D-glucoside.

	Composé SMB19 (DMSO- <i>d</i> 6)		Chrysoéryol-7- <i>O</i> - β -D- (3''- <i>E</i> - <i>p</i> -coumaroyl)- glucoside (DMSO- <i>d</i> 6)		Apigénine-7- <i>O</i> - β -D- glucoside	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H (DMSO- <i>d</i> 6)	^{13}C (D ₂ O)
génine	δ (ppm)					
2	-	164.6	-	-	-	164.7
3	6.85 <i>s</i> (1H)	103.4	-	-	6.85 <i>s</i>	102.7
4	-	182.4	-	-	-	182.5
5	-	161.8	-	-	-	160.4
6	6.48 <i>d</i> ($J= 2.0$ Hz, 1H)	99.8	-	-	6.48 <i>d</i> ($J= 2.1$ Hz)	100.0
7	-	163.1	-	-	-	162.8
8	6.82 <i>d</i> ($J= 2.0$ Hz, 1H)	95.1	-	-	6.86 <i>d</i> ($J= 2.1$ Hz)	96.0
9	-	157.3	-	-	-	156.9
10	-	105.8	-	-	-	106.0
1'	-	121.4	-	-	-	121.1
2'-6'	7.95 <i>d</i> ($J= 8.4$ Hz, 2H)	128.9	-	-	7.96 <i>d</i> ($J= 8.8$ Hz)	128.4
3'-5'	6.93 <i>d</i> ($J= 9.0$ Hz, 2H)	116.4	-	-	6.96 <i>d</i> ($J= 8.8$ Hz)	116.1
4'	-	161.5	-	-	-	160.4
<i>p</i>-(<i>E</i>)- coumaroyle						
α	6.34 <i>d</i> ($J= 16.2$ Hz, 1H)	114.1	6.45 <i>d</i> ($J= 16.0$ Hz)	114.7	-	-
β	7.50 <i>d</i> ($J= 16.2$ Hz, 1H)	145.3	7.60 <i>d</i> ($J= 16.0$ Hz)	144.4	-	-
1'''	-	125.3	-	125.2	-	-
2'''-6'''	7.38 <i>d</i> ($J= 8.4$ Hz, 2H)	130.6	7.60 <i>d</i> ($J= 9.0$ Hz)	130.1	-	-
3'''-5'''	6.67 <i>d</i> ($J= 9.0$ Hz, 2H)	116.1	6.96 <i>d</i> ($J= 8.7$ Hz)	115.7	-	-
4'''	-	160.2	-	159.6	-	-
CO	-	166.9	-	-	-	-

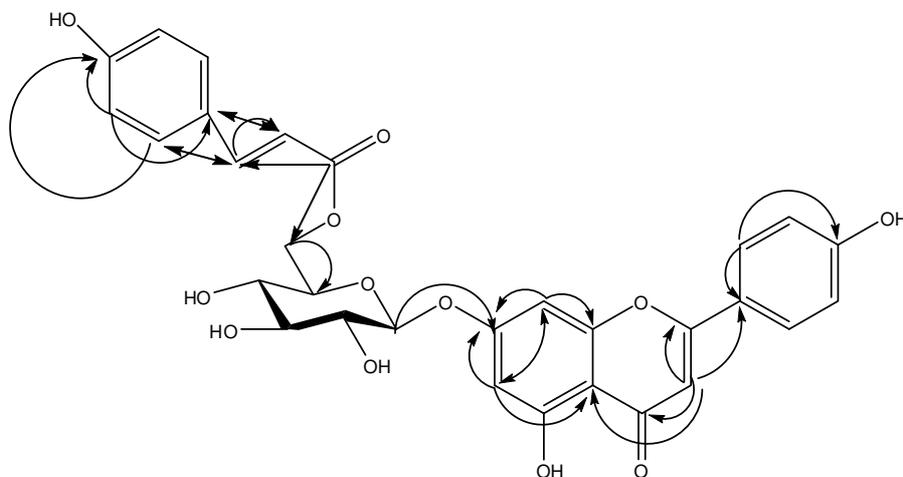
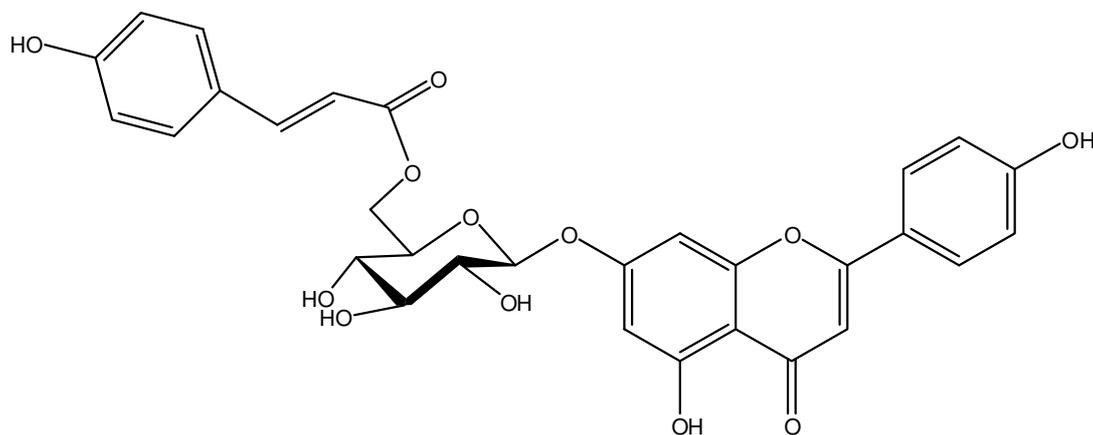


Fig I.4. Corrélations HMBC du composé SMB19 (C → H).

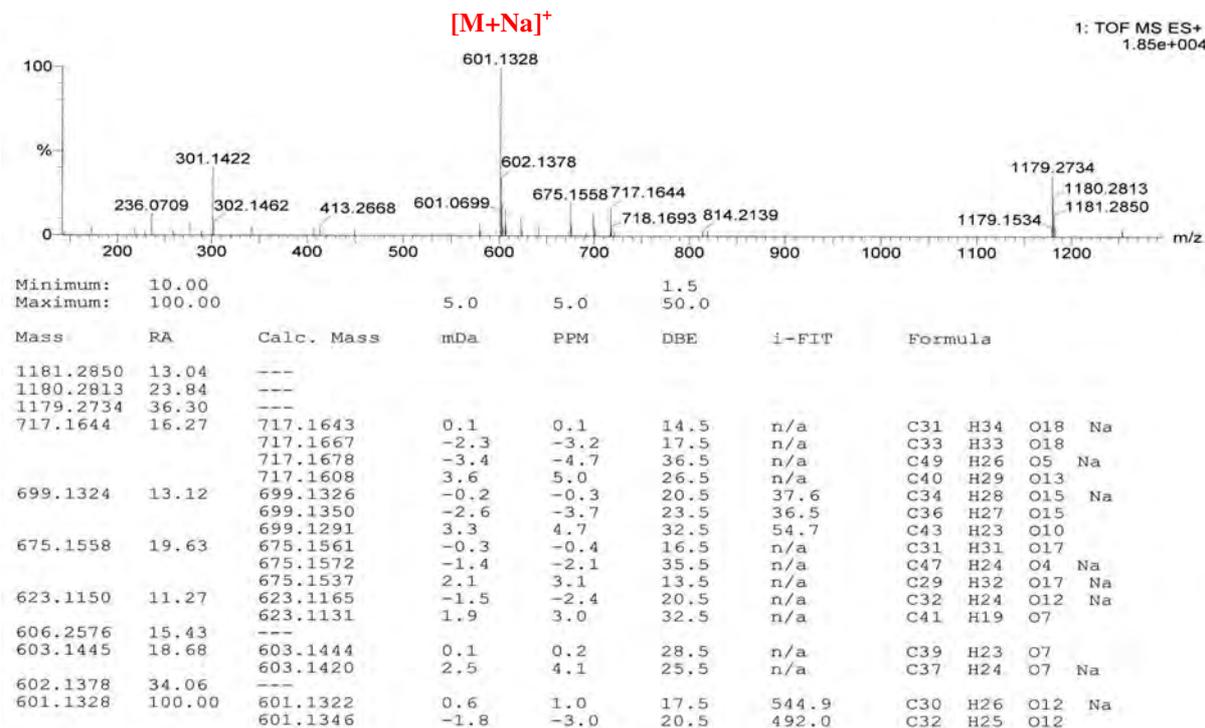
La structure du composé SMB19 est donc établie comme étant l'apigénine-7-*O*-β-D-(6''-*O*-*E*-*p*-coumaroyl)-glucoside. Ce composé est connu, il a été isolé pour la première fois de *Clematis terniflora* DC.var. *robusta* (Carrière) Tamura (Renonculaceae) sous le nom de terniflorine (Aritomi, 1963). Les déplacements chimiques observés en RMN du ^1H et du ^{13}C sont présentés dans le tableau II.12 et confrontés avec des données de RMN du ^{13}C trouvés dans la littérature (Agrawal, 1989).



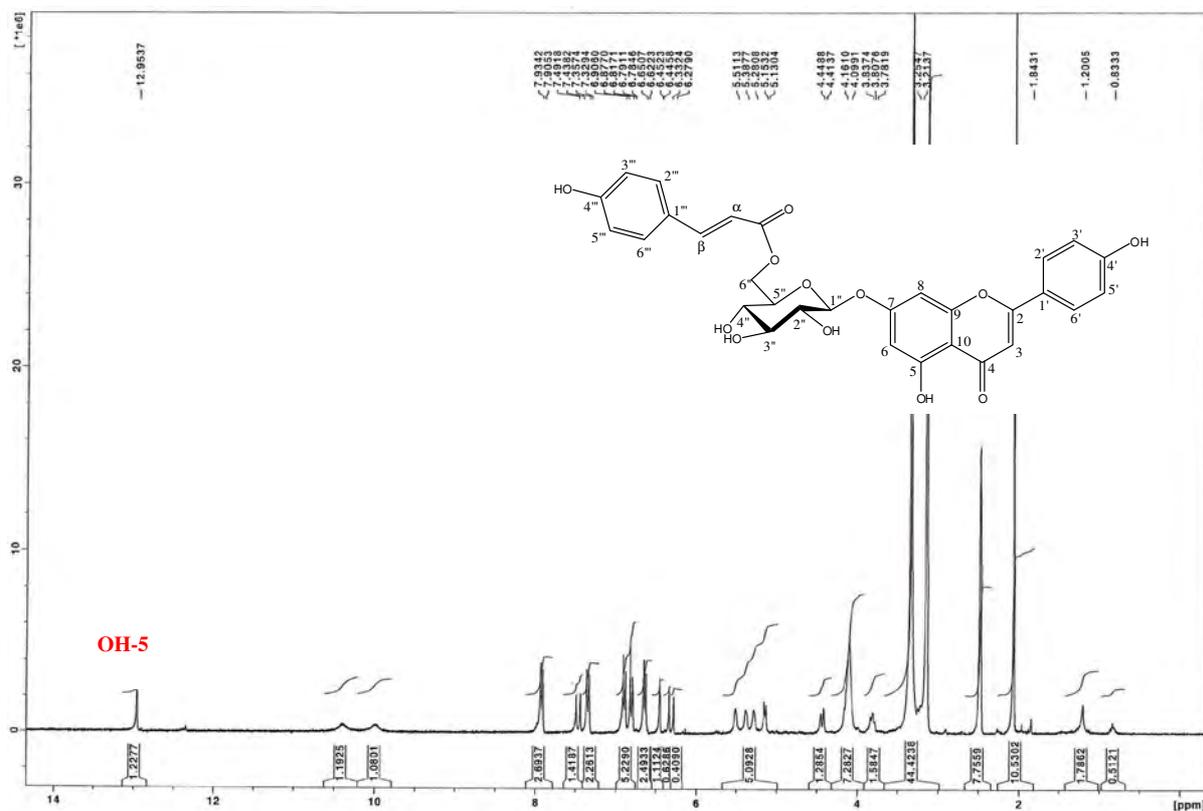
L'apigénine-7-*O*-β-D-(6''-*E*-*p*-coumaroyl)-glucoside

Tableau II.12. RMN du ^1H et du ^{13}C (600 MHz, δ , J en Hz ; 150 MHz, δ) du composé SMB19, RMN du ^{13}C de l'apigénine-7-*O*- β -D-(6''-*E*-*p*-coumaroyl)-glucoside dans le DMSO-*d*₆.

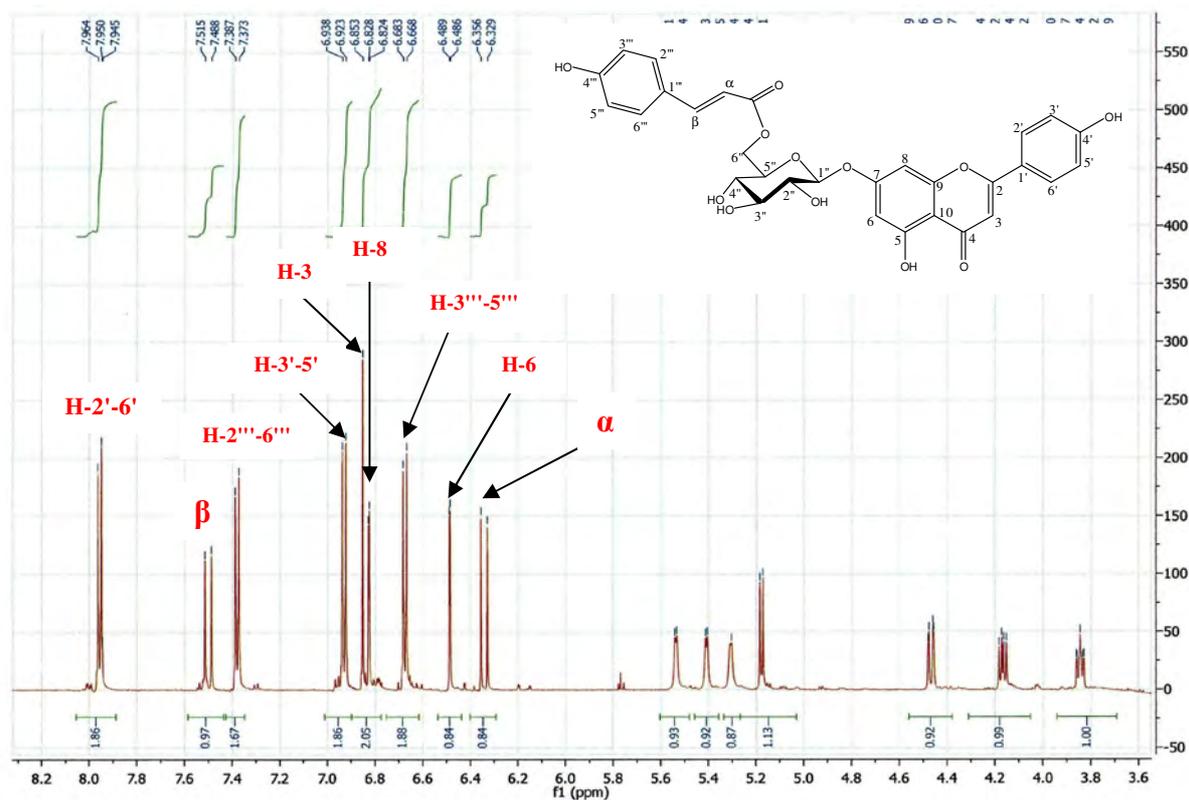
	Composé SMB19		Apigénine-7- <i>O</i> - β -D-(6''- <i>E</i> - <i>p</i> -coumaroyl)-glucoside
	^1H	^{13}C	^{13}C
apigénine	δ (ppm)		
2	-	164.6	162.7
3	6.85 <i>s</i> (1H)	103.4	103.0
4	-	182.4	181.9
5	-	161.8	156.8
6	6.48 <i>d</i> ($J= 2.0$ Hz, 1H)	99.8	99.5
7	-	163.1	164.3
8	6.82 <i>d</i> ($J= 2.0$ Hz, 1H)	95.1	94.7
9	-	157.3	161.3
10	-	105.8	105.3
1'	-	121.4	121.0
2'-6'	7.95 <i>d</i> ($J= 8.4$ Hz, 2H)	128.9	128.5
3'-5'	6.93 <i>d</i> ($J= 9.0$ Hz, 2H)	116.4	116.0
4'	-	161.1	161.1
HO-5	12.95 <i>s</i> (1H)	-	-
Glucose			
1''	5.17 <i>d</i> ($J= 7.8$ Hz, 1H)	99.9	99.5
2''	3.32 <i>m</i>	73.3	73.0
3''	3.36 <i>m</i>	76.6	76.3
4''	3.25 <i>m</i>	70.3	70.0
5''	3.85 <i>td</i> ($J= 1.8$ Hz, $J=7.2$ Hz, 1H)	74.2	73.8
6''	a : 4.16 <i>dd</i> ($J= 12.0$, $J=7.2$ Hz, 1H) b : 4.46 <i>dd</i> ($J= 1.8$ Hz, $J= 11.4$ Hz, 1H)	63.8	63.4
<i>p</i>-(<i>E</i>)- coumaroyl			
α	6.34 <i>d</i> ($J= 16.2$ Hz, 1H)	114.1	113.7
β	7.50 <i>d</i> ($J= 16.2$ Hz, 1H)	145.3	144.9
1'''	-	125.3	124.9
2'''-6'''	7.38 <i>d</i> ($J= 8.4$ Hz, 2H)	130.6	131.7
3'''-5'''	6.67 <i>d</i> ($J= 9.0$ Hz, 2H)	116.1	115.7
4'''	-	160.2	159.7
CO	-	166.9	166.4



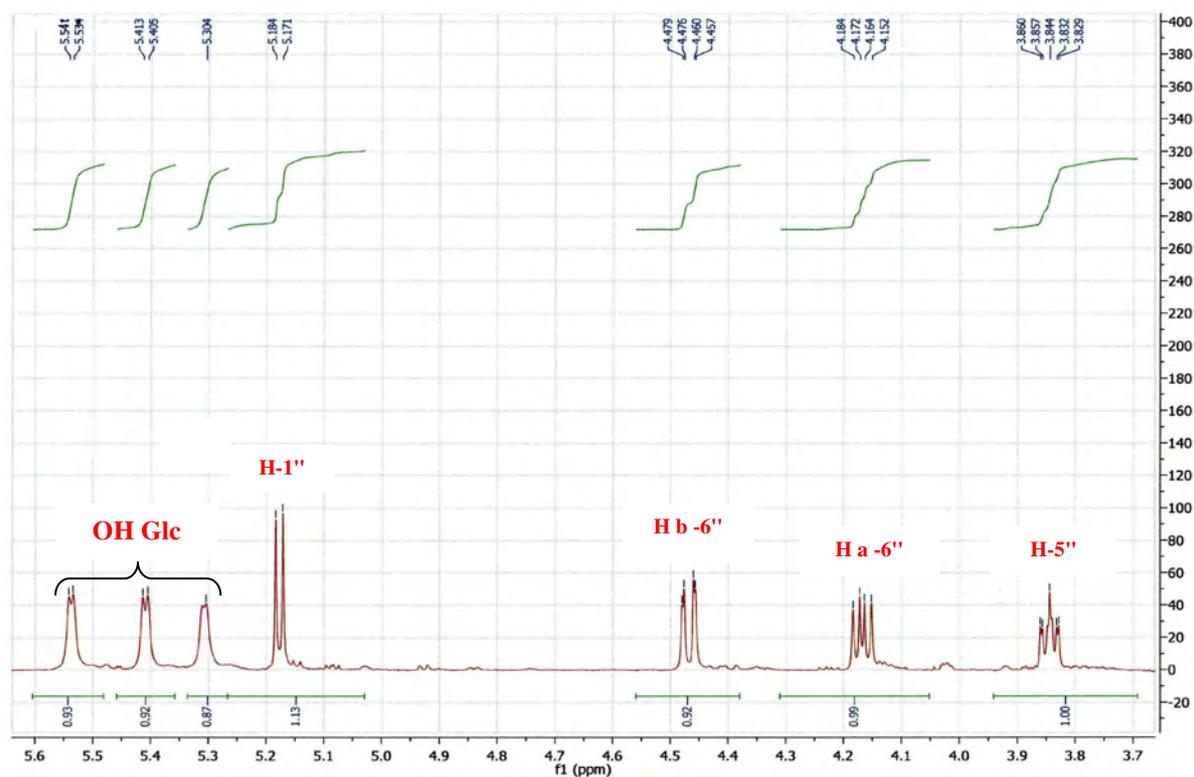
Spectre N°12. Spectre de masse en mode électrospray du composé SMB19.



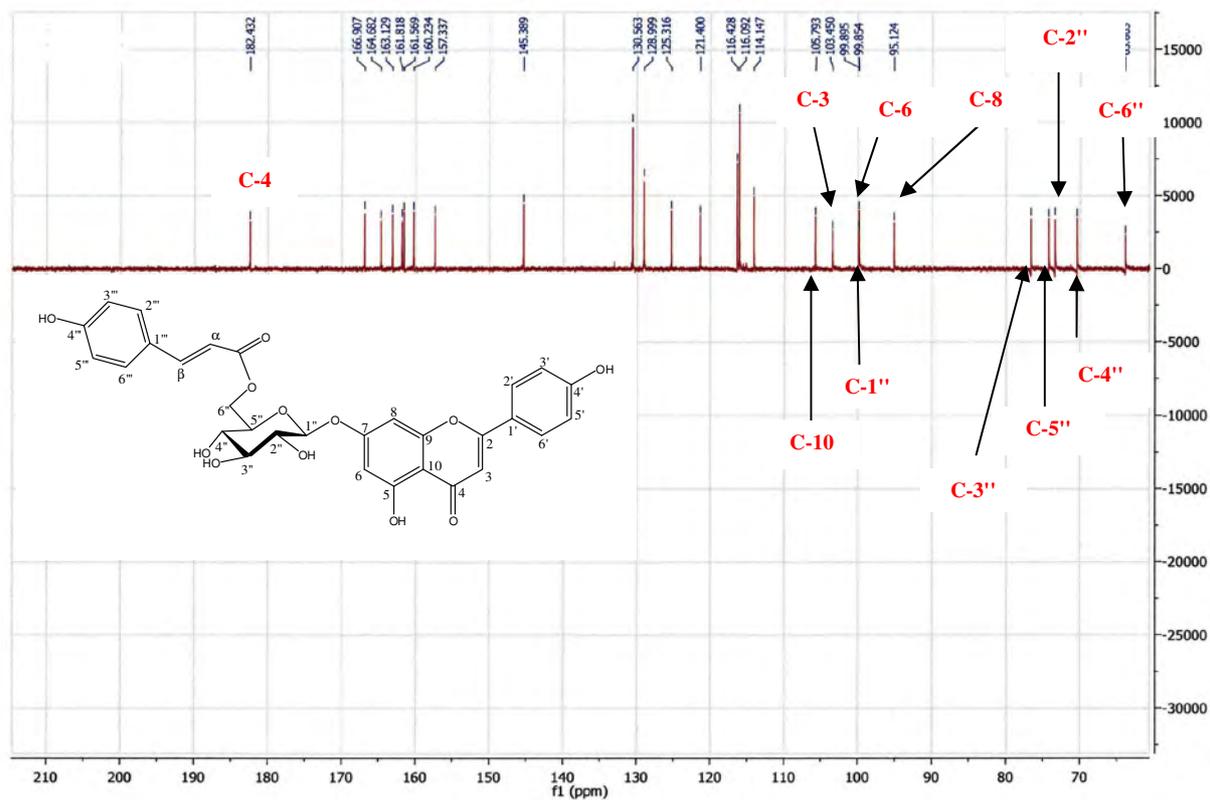
Spectre N°13. Spectre RMN ¹H du composé SMB19 (400 MHz).



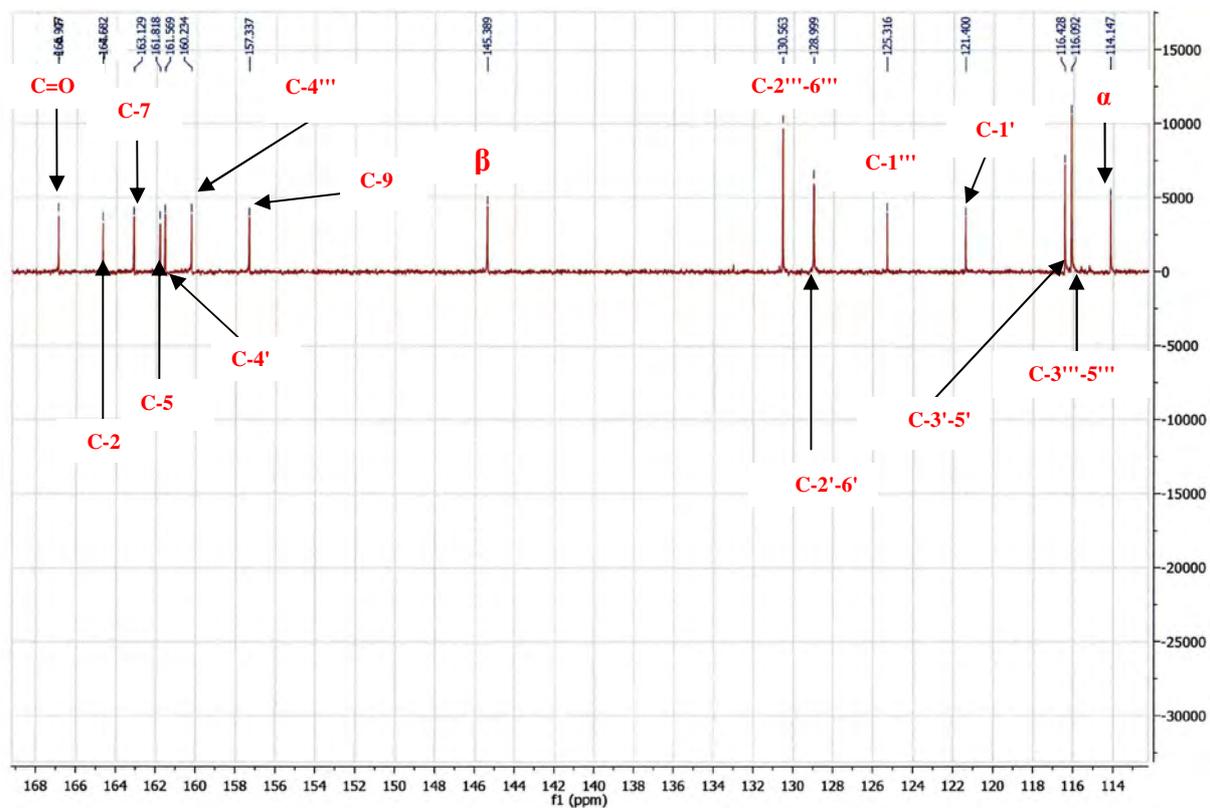
Spectre N°14. Spectre RMN ^1H étalé (3.6 à 8.2 ppm) du composé SMB19 (600 MHz).



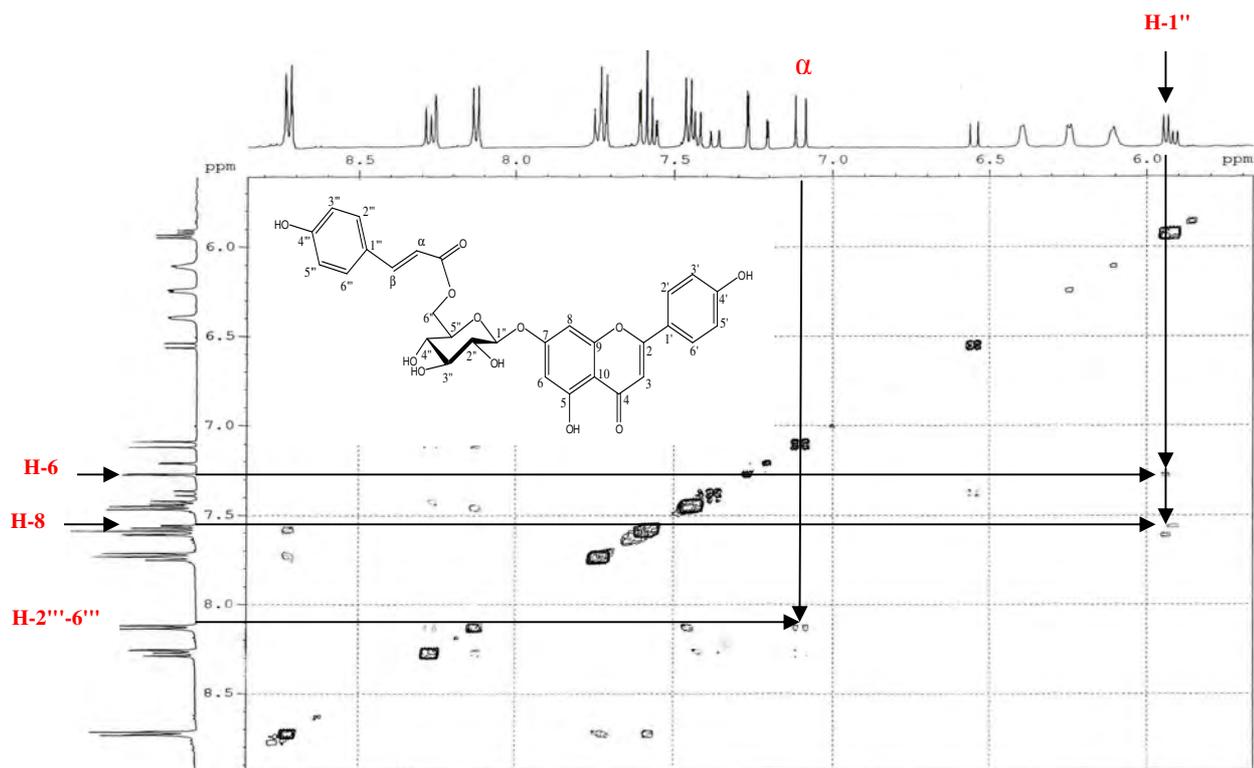
Spectre N°15. Spectre RMN ^1H étalé (3.7 à 5.6 ppm) du composé SMB19 (600 MHz).



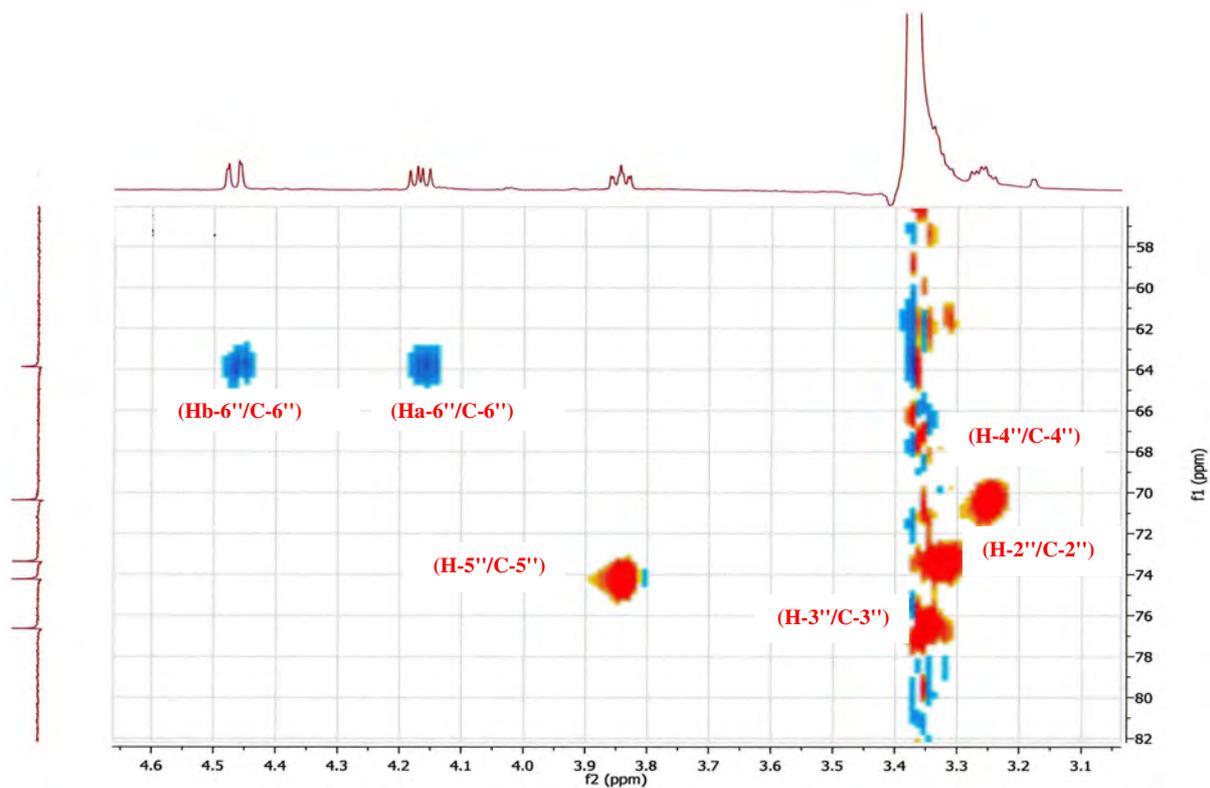
Spectre N°16. Spectre RMN ^{13}C du composé SMB19 (150 MHz).



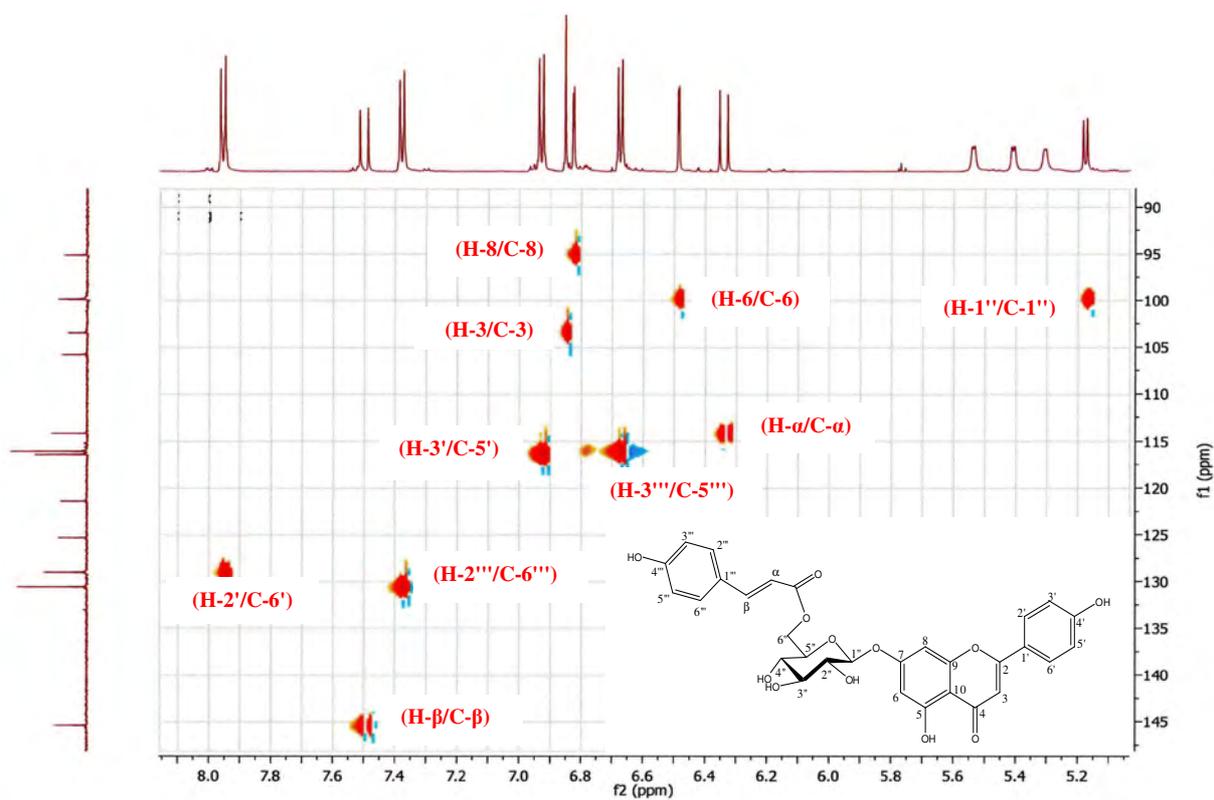
Spectre N°17. Spectre RMN ^{13}C étalé (114 à 168 ppm) du composé SMB19 (150 MHz).



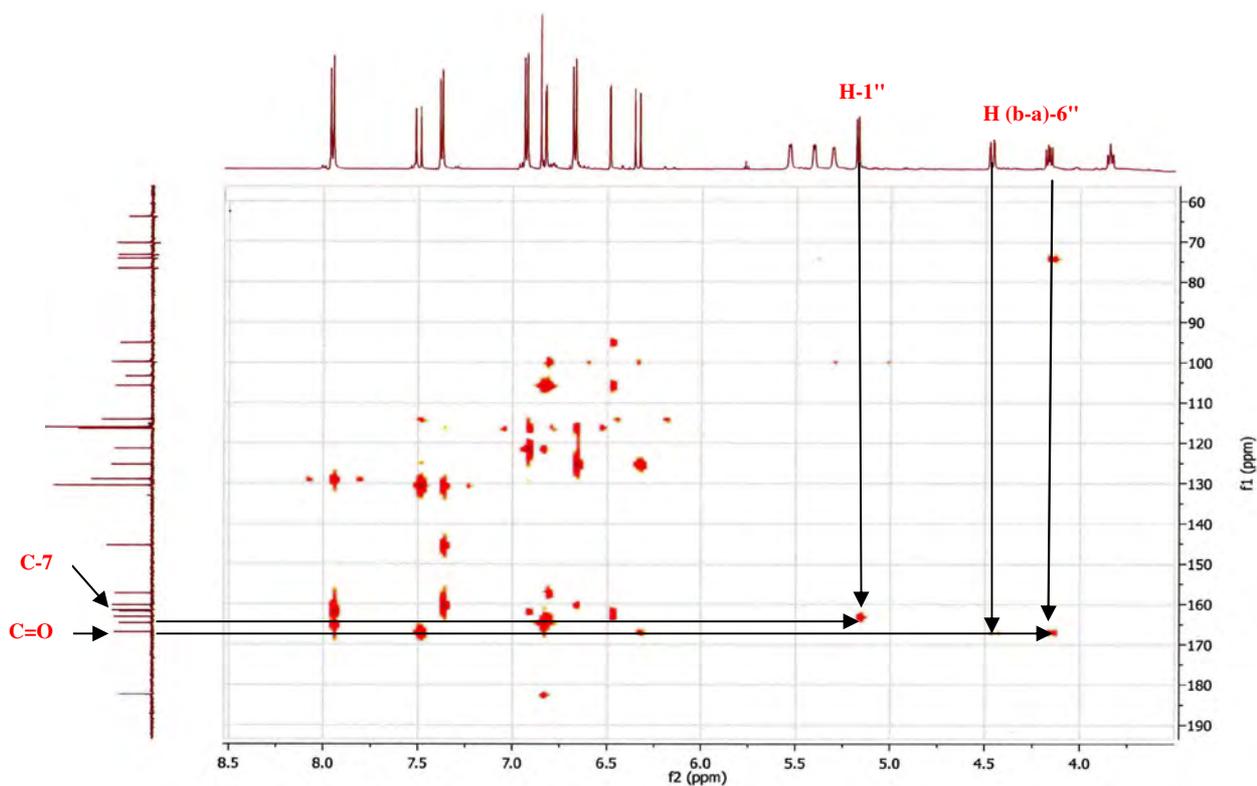
Spectre N°18. Spectre Roesy (5.0 à 9.0 ppm) du composé SMB19 (500 MHz).



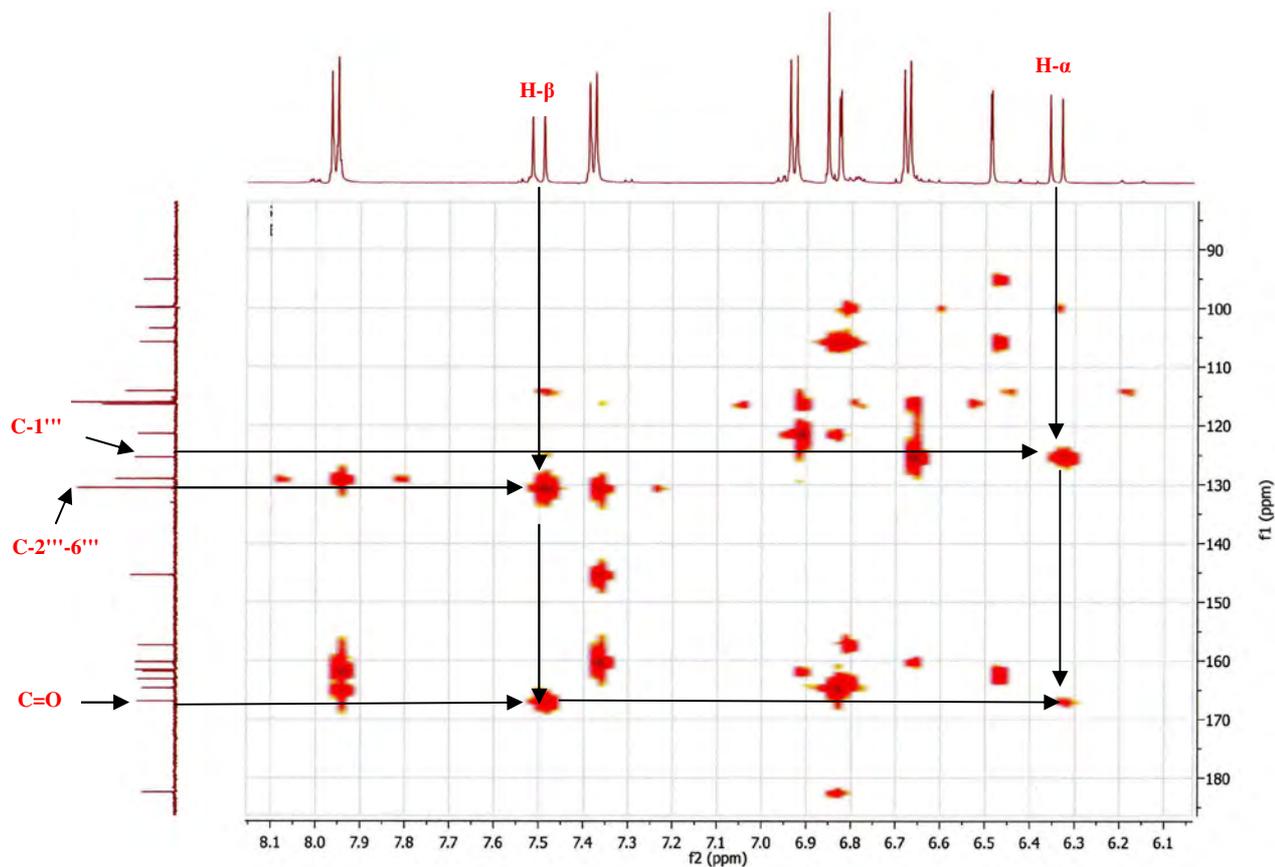
Spectre N°19. Spectre HSQC étalé (58 à 82 ppm) du composé SMB19 (600 MHz).



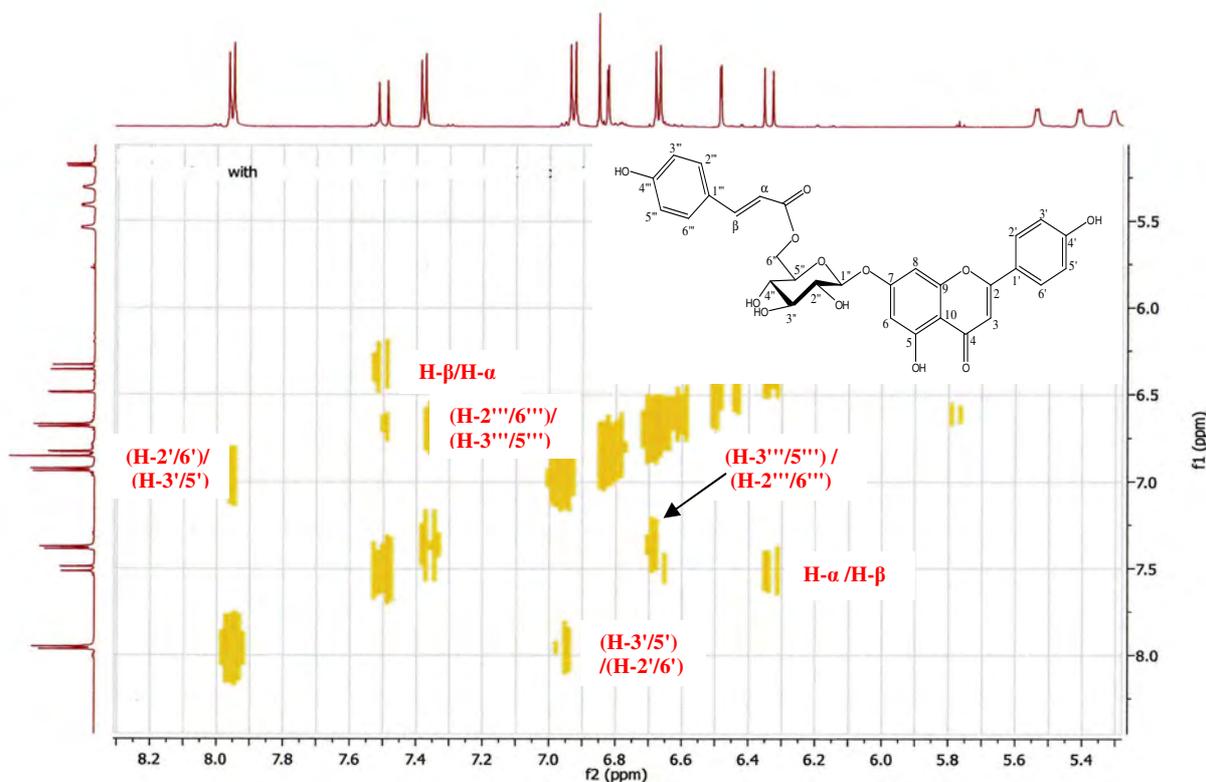
Spectre N°20. Spectre HSQC étalé (90 à 150 ppm) du composé SMB19 (600 MHz).



Spectre N°21. Spectre HMBC étalé (60 à 190 ppm) du composé SMB19 (600 MHz).



Spectre N°22. Spectre HMBC étalé (90 à 190 ppm) du composé SMB19 (600 MHz).



Spectre N°23. Spectre COSY étalé (5.0 à 9.0 ppm) du composé SMB19 (600 MHz).

II.7.3. Elucidation de la structure du composé SMB31

II.7.3.1. Analyses physico-chimiques

- Le composé SMB31 a été obtenu sous forme de cristaux jaune. Soluble dans le chloroforme.
- La couleur de ce composé après révélation à la vanilline (H₂SO₄) est violette.

II.7.3.2. Analyses spectroscopiques

L'analyse du composé SMB31 par spectrométrie de masse à haute résolution en mode impact électronique en (HR-SMIE) (Spectre N°24-25), montre un ion moléculaire [M]⁺ à $m/z = 332.1980$, ce qui est compatible avec la formule brute C₂₀H₂₈O₄ qui est en accord avec les données de la RMN ¹³C (Spectre N°28-29) qui confirme la présence de 20 carbones.

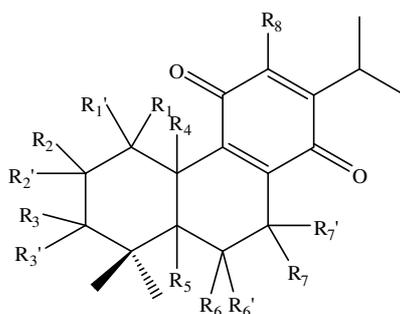
La formule moléculaire permet de déterminer un indice d'insaturation de 7.

$$Ni = \frac{(2n + 2 + nN - nX) - nH}{2} = \frac{(2 \times 20 + 2 + 0 - 0) - 28}{2} = 7$$

Les spectres RMN ¹³C et le DEPT (Spectre N°30) montrent clairement 4 carbones quaternaires d'hybridation sp² (δ_C= 123.2 ppm, δ_C= 142.2 ppm, δ_C= 146.8 ppm et δ_C= 150.0 ppm) formant deux doubles liaisons et 2 carbones quaternaires à δ_C= 182.8 ppm et δ_C= 188.1 ppm indiquant la présence de deux carbonyles, il reste trois insaturations qui seront dûes évidemment à 3 cycles.

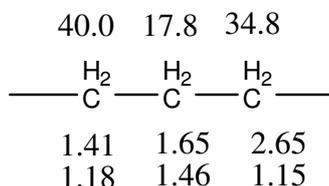
Le spectre RMN ¹³C et le DEPT montrent cinq signaux à champs très fort indiquant la présence de 5 groupements méthyles, ce qui est confirmé par le spectre RMN ¹H (Spectre N°26-27) présentant trois singulets s'intégrant 3H et 2 doublets de constante de couplage ($J = 7.0$ Hz) à δ_H= 1.18 ppm et δ_H= 1.21 ppm qui sont corrélés au signal valant un proton à δ_H= 3.15 ppm qui apparaît sous forme d'un septuplet avec une constante de couplage ($J = 7.1$ Hz) mettant ainsi en évidence la présence d'isopropyle.

Ces données nous permettent de proposer un squelette préliminaire d'un diterpène de type paraquinone.



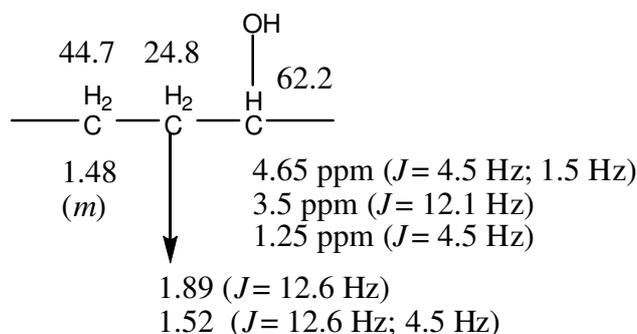
Les spectres Cosy (Spectre N°31-32) et HSQC (Spectre N°33-34) permettent de déterminer rapidement les connectivités suivantes :

- En prenant comme point de départ le proton dont le signal apparaît à $\delta_H = 2.65$ ppm et qui est lié au carbone qui apparaît à $\delta_C = 34.8$ ppm (HSQC).



Fragment 1

- En prenant comme point de départ le proton dont le signal apparaît à $\delta_H = 4.65$ ppm dans le spectre RMN ¹H est lié au carbone qui apparaît à $\delta_C = 62.2$ ppm (ces valeurs indiquent que carbone est attaché à un atome d'oxygène).



Fragment 2

Si on ajoute les informations fournies par le spectre HMBC (Spectre N°35) qui montre à travers les taches de corrélations entre les méthyles portés par le même carbone dont les signaux apparaissent à $\delta_H = 0.83$ ppm et $\delta_H = 0.91$ ppm dans le spectre RMN ¹H avec les signaux de carbone qui apparaissent à $\delta_C = 40.0$ ppm et $\delta_C = 44.7$ ppm.

On confirme la structure proposée et on identifie les protons du fragment 1 à ($\delta_{R1} = 2.65$ ppm, $\delta_{R1} = 1.15$ ppm), ($\delta_{R2} = 1.65$ ppm ; $\delta_{R2} = 1.46$ ppm), ($\delta_{R3} = 1.41$ ppm ; $\delta_{R1} = 1.18$ ppm) et les protons du fragment 2 à ($\delta_{R5} = 1.48$ ppm), ($\delta_{R6} = 1.89$ ppm ; $\delta_{R6} = 1.52$ ppm), ($\delta_{R7} = 4.65$ ppm).

R₇' est donc un groupement hydroxyle.

Les carbones qui résonnant aux champs faible sont tous quaternaires, alors le substituant R₈ ne peut être qu'un groupement hydroxyle. D'ailleurs le proton d'hydroxyle qui se présente sous forme d'un singulet n'est corrélé à aucun carbone

La stéréochimie du carbone C-7 est déterminé par analogie avec les travaux de Kupchan et al (Kupchan *et al.*, 1968), qui ont comparé le signal du H-7 β de l'horminone avec celui du H-7 α du taxoquinone son épimère.

Ils ont conclu, qu'à une fréquence de 60 MHz, le proton H-7 α apparaît sous forme d'un multiplet avec $W_{1/2} = 20$ Hz, tandis que le signal du H-7 β est un large singulet avec $W_{1/2} = 8$ Hz.

Selon ces résultats notre produit enregistré à une fréquence de 500 MHz apparaît sous forme de doublet de doublet avec des constantes de couplage de ($J = 1.5$ Hz et $J = 4.0$ Hz) aurait une orientation β .

L'attribution des autres signaux a été établie à l'aide des spectres HSQC, HMBC.

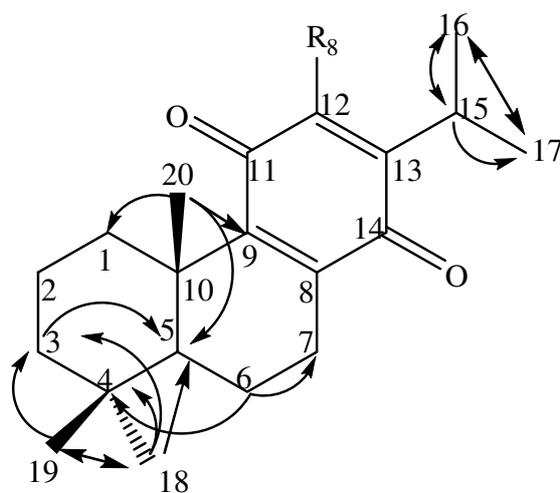
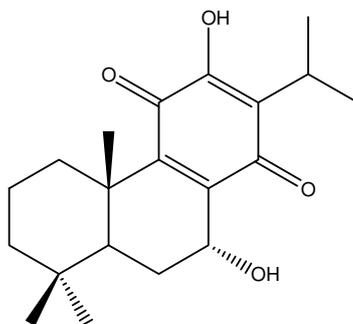


Fig I.5. Corrélations HMBC du composé SMB31 (C \rightarrow H).

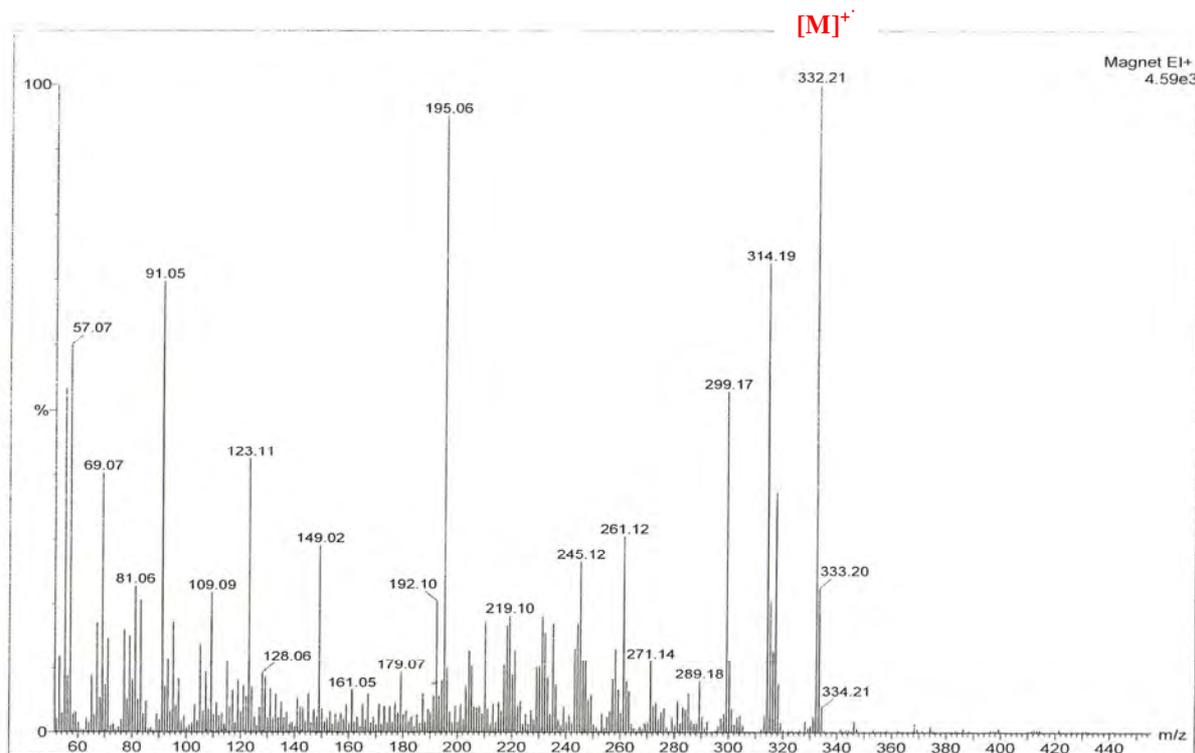
La structure du composé SMB31 est donc établie comme étant l'horminone (7 α , 12-dihydroxy-812-abietadiène 11, 14-dione). Ce composé est connu, il a été isolé pour la première fois de *Hormium pyrenaicum* L. (Lamiaceae), (Janot et Potier, 1964). Ce diterpène est isolé pour la 1^{ère} fois du genre *Stachys*. Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN du ^1H et du ^{13}C sont présentés dans le tableau II.13 avec leurs attributions et ceux trouvés dans la littérature (Jonathan *et al.*, 1989).



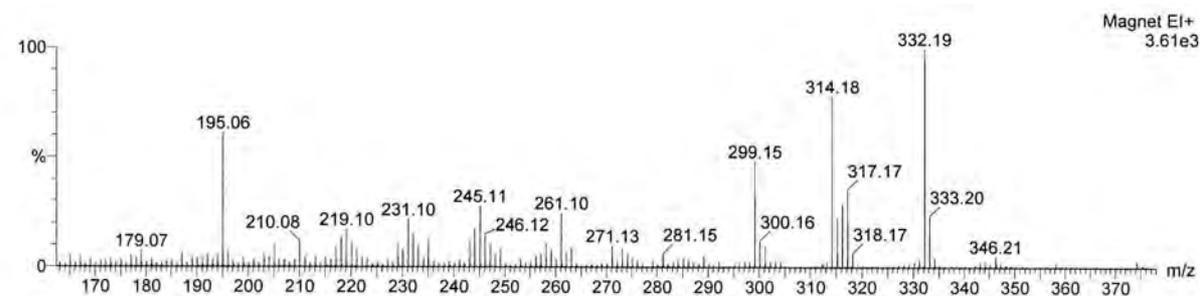
L'Horminone

Tableau II.13. RMN du ^1H et du ^{13}C du composé SMB31 (300 MHz, δ , J en Hz ; 125 MHz, δ) et de l'Horminone (300 MHz, δ , J en Hz ; 90.8 MHz, δ) dans le CDCl_3d .

Position	Composé SMB31		Horminone	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
	δ (ppm)			
1β	2.65 <i>ddd</i> (1H, $J= 4.0$ Hz, $J= 4.0$ Hz, $J= 12.0$ Hz)	34.8	2.69 <i>ddd</i> ($J= 4.0$ Hz, $J= 4.0$ Hz, $J=$ 12.0 Hz)	35.7
1α	1.15 <i>m</i> (1H)		1.1-1.2 <i>m</i>	
2β	1.65 <i>m</i> (1H)	17.8	1.72 <i>m</i>	18.8
2 α	1.46		1.2-1.3	
3α, β	1.18-1.41 <i>m</i> (1H)	40.0	1.5-1.7 <i>m</i>	41.0
4	-	38.1	-	39.1
5	1.48 <i>m</i> (1H)	44.7	1.55 <i>m</i>	45.7
6α	1.89 <i>d</i> (1H, $J= 12.6$ Hz)	24.8	1.96 <i>d</i> ($J= 11.0$ Hz)	25.7
6 β	1.52 <i>dd</i> (1H, $J= 12.6$ Hz, $J= 4.5$ Hz)		1.4-1.5 <i>m</i>	
7β	4.65 <i>dd</i> (1H, $J= 4.5$ Hz, $J= 1.5$ Hz)	62.2	4.73 <i>dd</i> ($J= 4.0$ Hz, $J= 1.5$ Hz)	63.2
8	-	142.2	-	143.1
9	-	146.8	-	147.8
10	-	32.0	-	33.0
11	-	182.8	-	183.8
12	-	150.0	-	151.1
13	-	123.2	-	124.1
14	-	188.1	-	189.0
15	3.15 <i>septer</i> (1H, $J= 7.1$ Hz)	22.9	3.16 <i>septer</i> ($J= 7.0$ Hz)	23.9
Me-16	1.18 <i>d</i> (1H, $J= 7.0$ Hz)	18.7	1.21 <i>d</i> ($J= 7.0$ Hz)	19.7
Me-17	1.21 <i>d</i> (1H, $J= 7.0$ Hz)	18.8	1.22 <i>d</i> ($J= 7.0$ Hz)	19.8
Me-18	0.97 <i>s</i> (3H)	32.1	0.98 <i>s</i>	33.1
Me-19	0.89 <i>s</i> (3H)	20.7	0.90 <i>s</i>	21.7
Me-20	1.20 <i>s</i> (3H)	17.3	1.22 <i>s</i>	18.3
7-OH	3.01 <i>s</i> (1H)		3.04 <i>s</i> (D_2O ex-changable)	
12-OH	7.28 <i>s</i> (1H)			

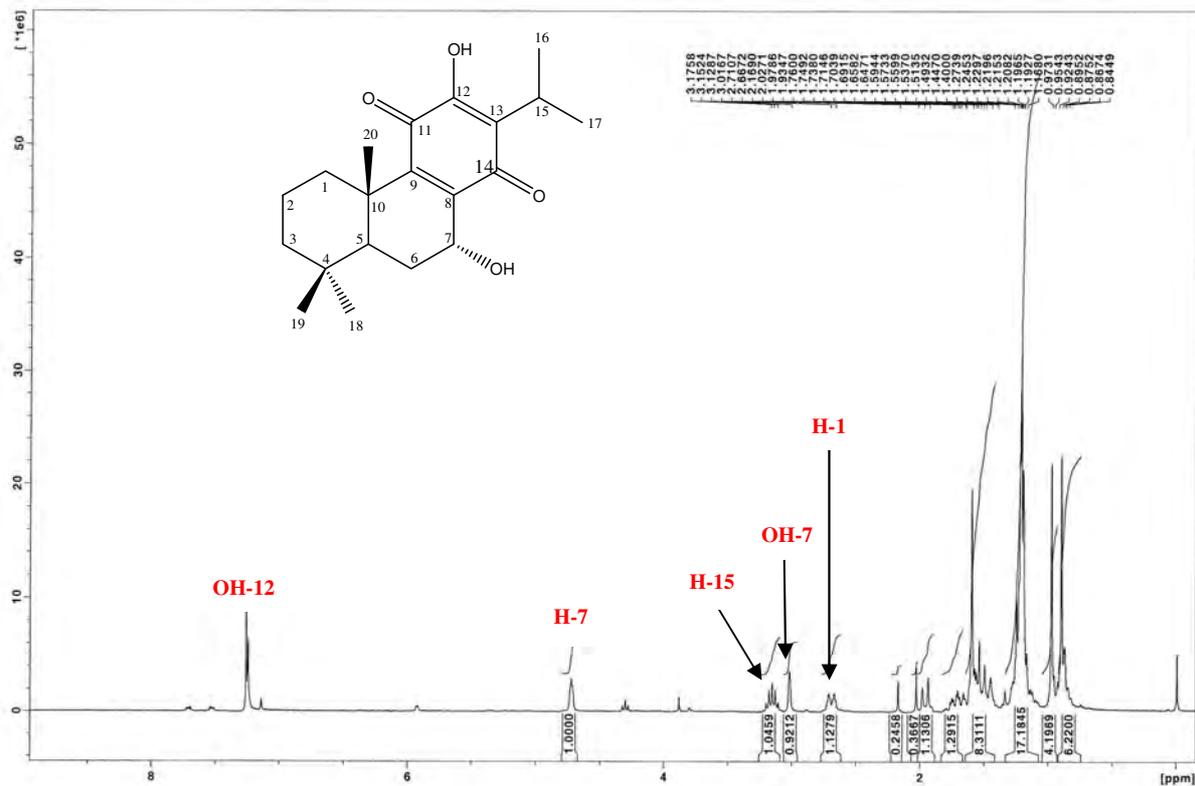


Spectre N°24. Spectre de masse en mode impact électronique du composé SMB31.

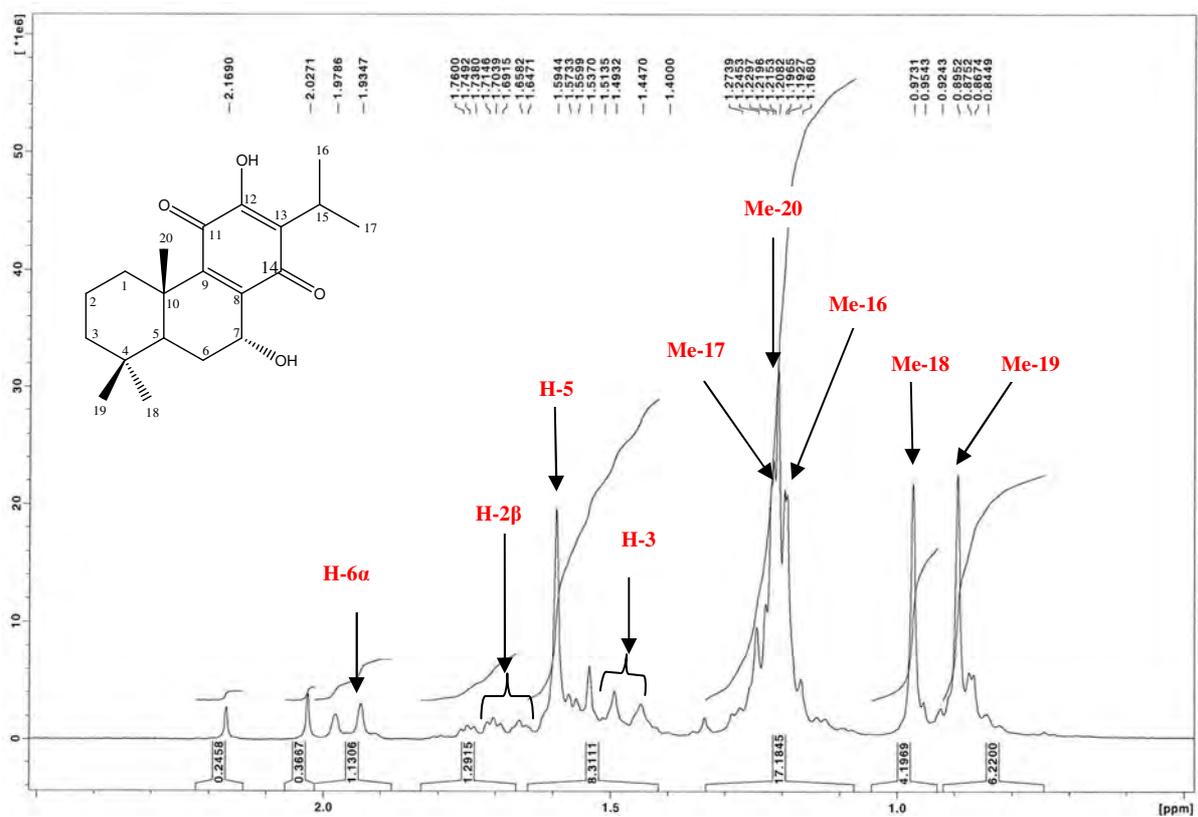


Mass	RA	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula
316.2201	7.79	316.2191	1.0	3.2	11.0	C24 H28
316.2237	6.10	316.2250	-1.3	-4.0	2.0	C17 H32 O5
317.1557	20.72	317.1542	1.5	4.9	12.5	C22 H21 O2
317.1593	25.54	317.1600	-0.7	-2.3	3.5	C15 H25 O7
317.1739	31.67	317.1753	-1.4	-4.4	7.5	C19 H25 O4
317.1921	14.25	317.1905	1.6	4.9	11.5	C23 H25 O
317.1958	11.12	317.1964	-0.6	-1.9	2.5	C16 H29 O6
318.1635	5.80	318.1620	1.5	4.8	12.0	C22 H22 O2
318.1672	6.02	318.1679	-0.7	-2.1	3.0	C15 H26 O7
318.1818	5.46	318.1831	-1.3	-4.1	7.0	C19 H26 O4
332.1560	7.27	332.1565	-0.5	-1.5	17.0	C26 H20
332.1636	16.86	332.1624	1.2	3.7	8.0	C19 H24 O5
332.1789	68.03	332.1776	1.3	3.8	12.0	C23 H24 O2
332.1827	78.73	332.1835	-0.8	-2.4	3.0	C16 H28 O7
332.1980	91.65	332.1988	-0.8	-2.3	7.0	C20 H28 O4

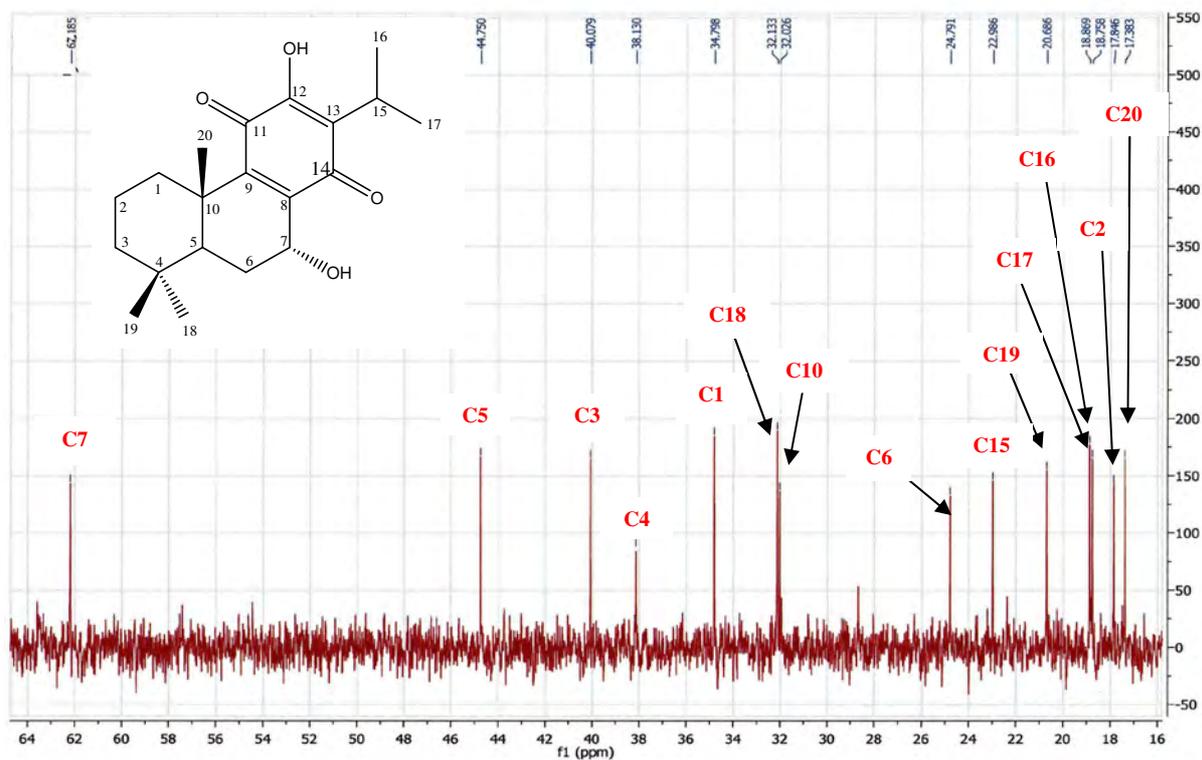
Spectre N°25. Spectre de masse en mode impact électronique étalé du composé SMB31.



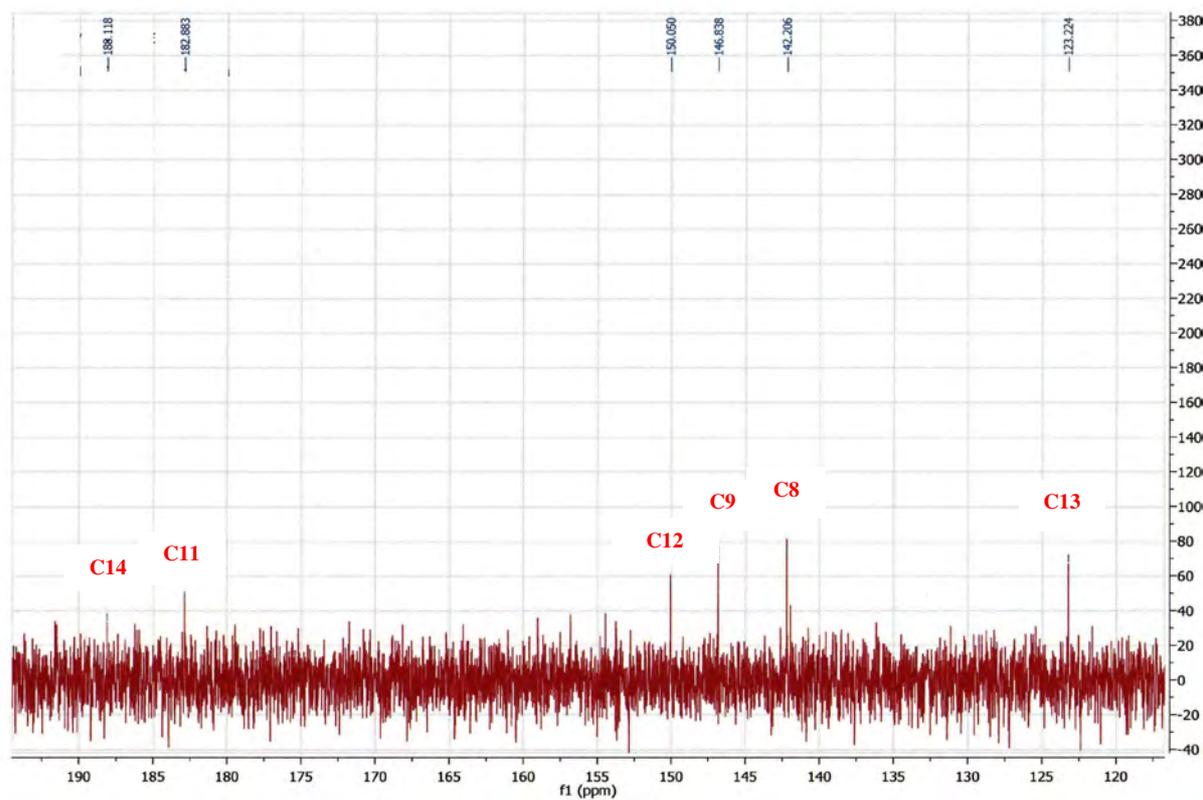
Spectre N°26. Spectre RMN ¹H du composé SMB31 (300 MHz).



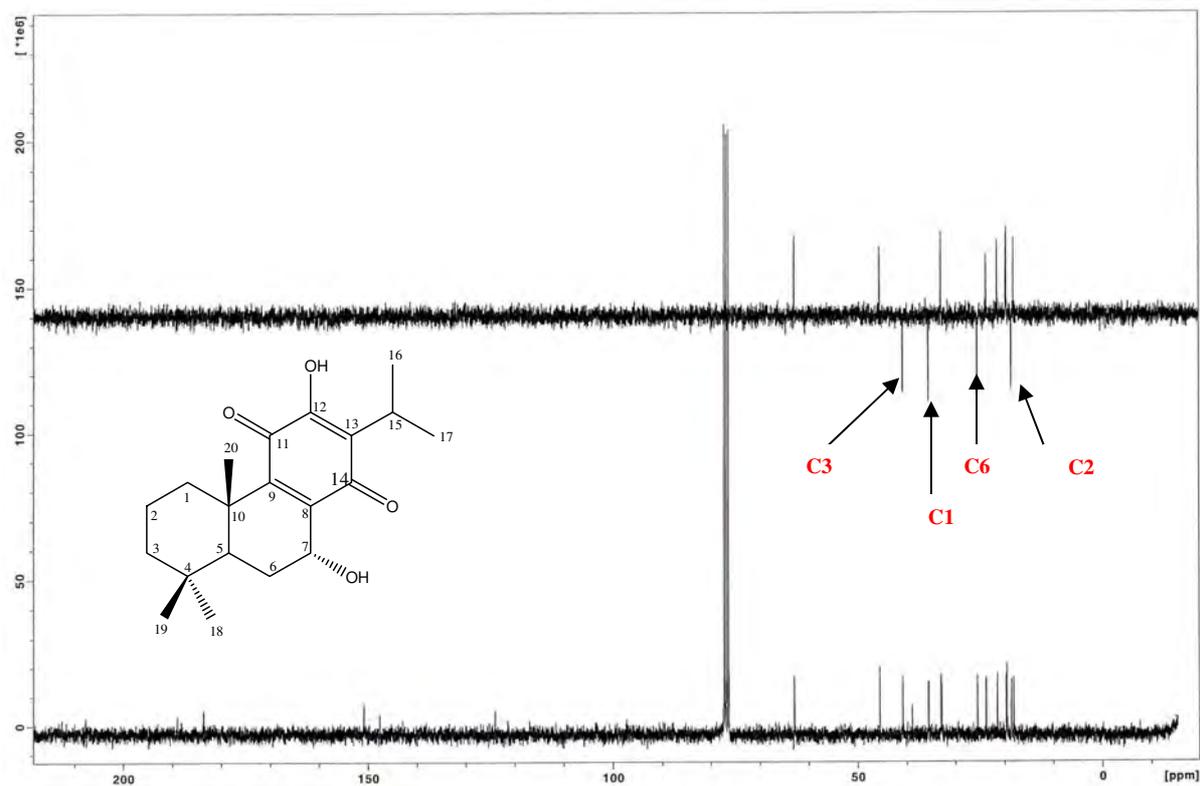
Spectre N°27. Spectre RMN ¹H étalé (0.0 à 2.5 ppm) du composé SMB31 (300 MHz).



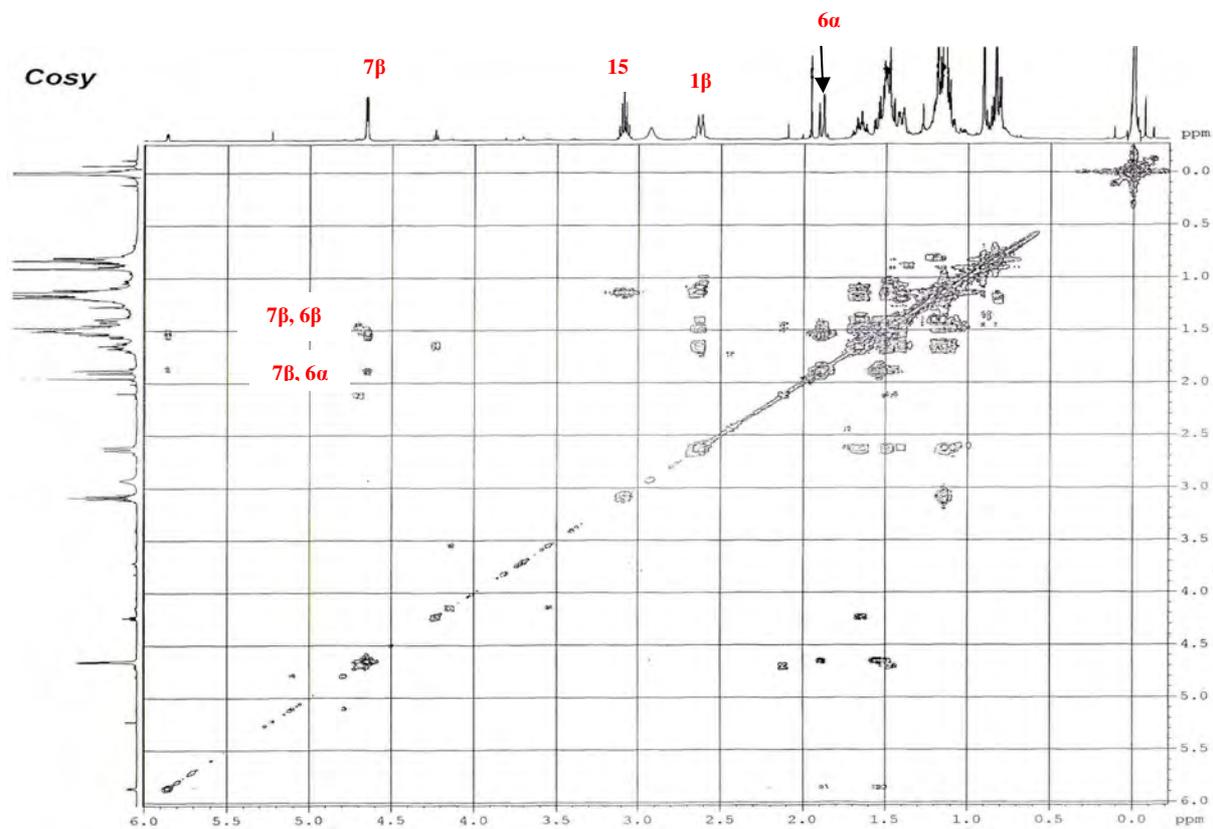
Spectre N°28. Spectre RMN ^{13}C étalé (16 à 64 ppm) du composé SMB31 (125 MHz).



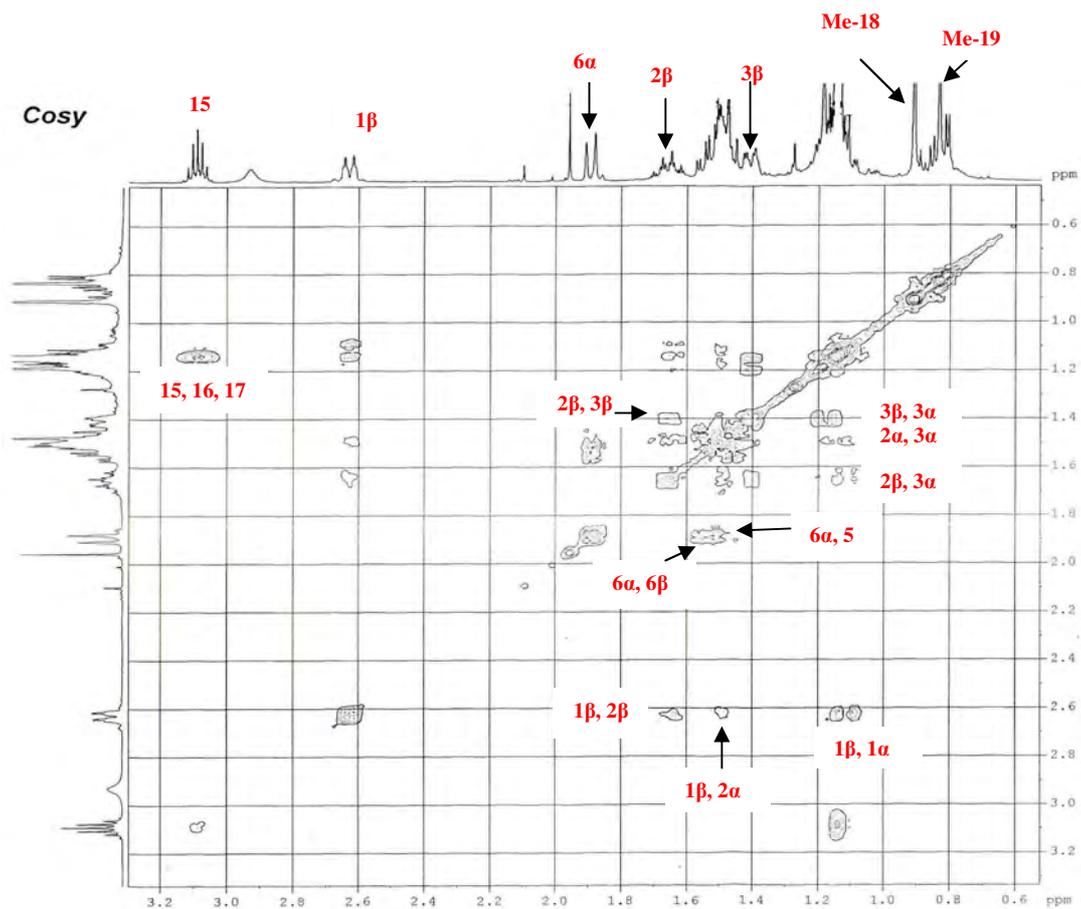
Spectre N°29. Spectre RMN ^{13}C étalé (120 à 200 ppm) du composé SMB31 (125 MHz).



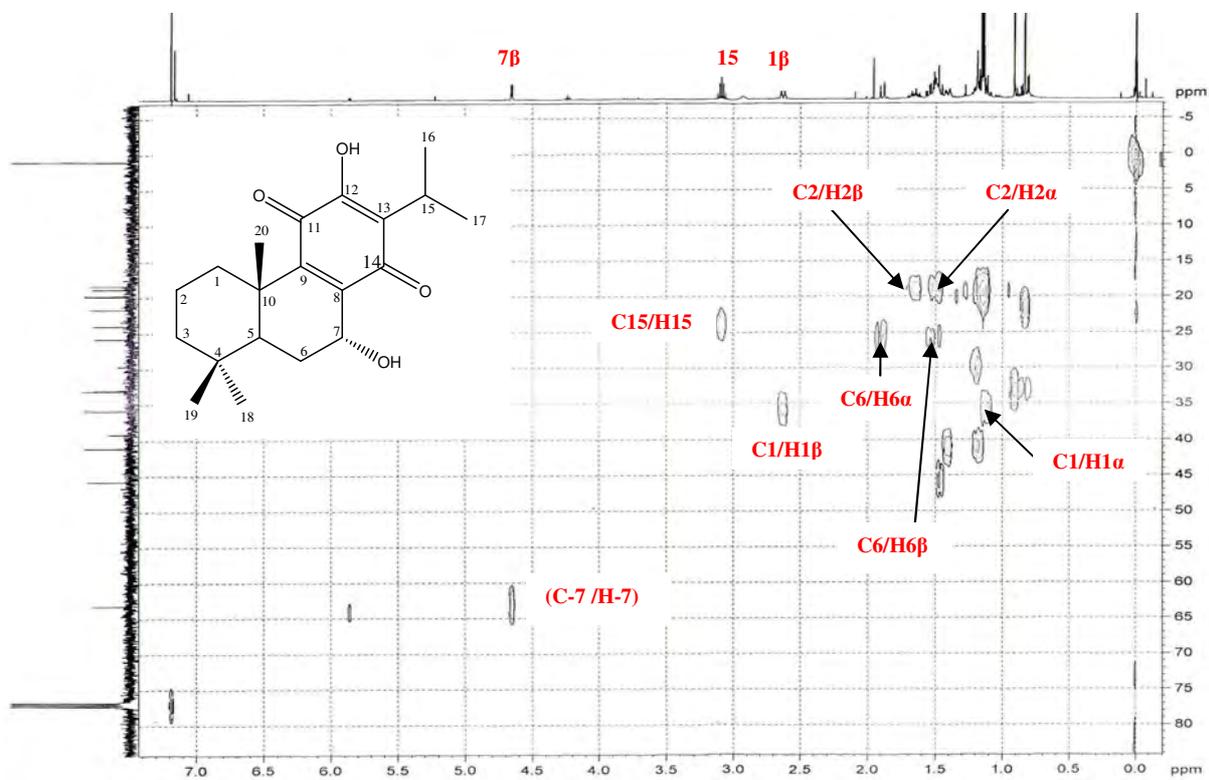
Spectre N°30. Spectre RMN ¹³C DEPT du composé SMB31 (75 MHz).



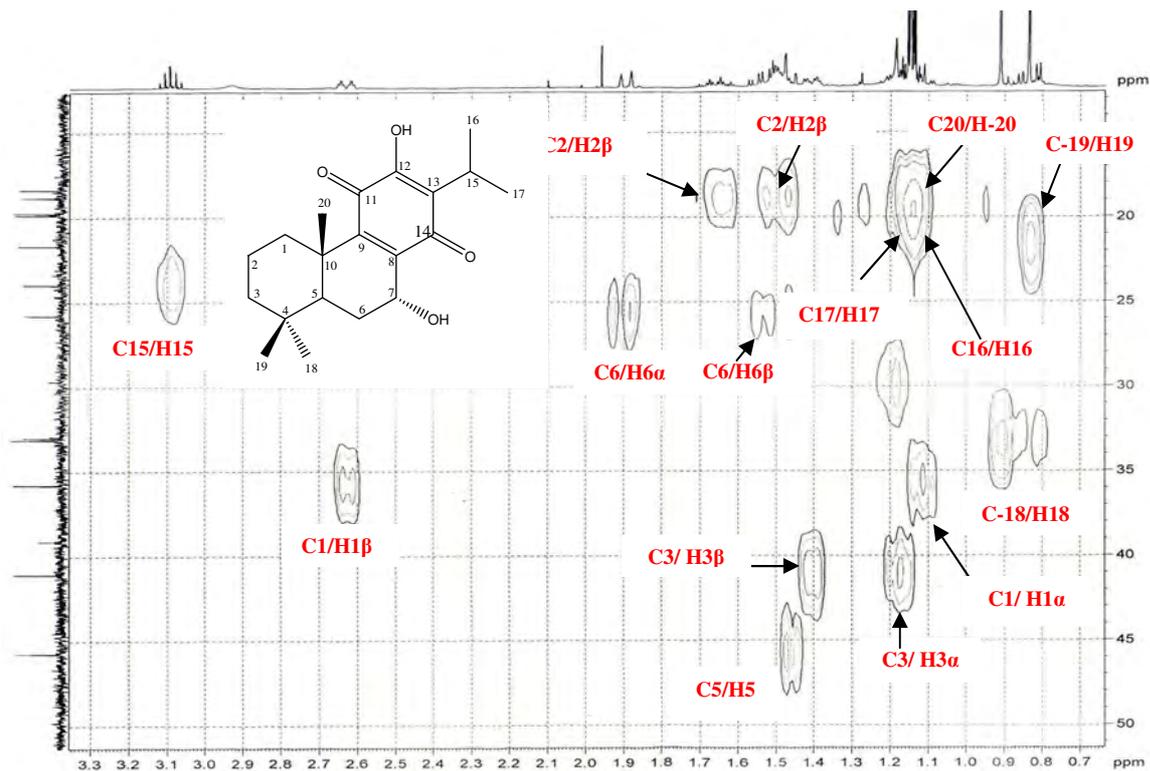
Spectre N°31. Spectre Cosy du composé SMB31 (500 MHz).



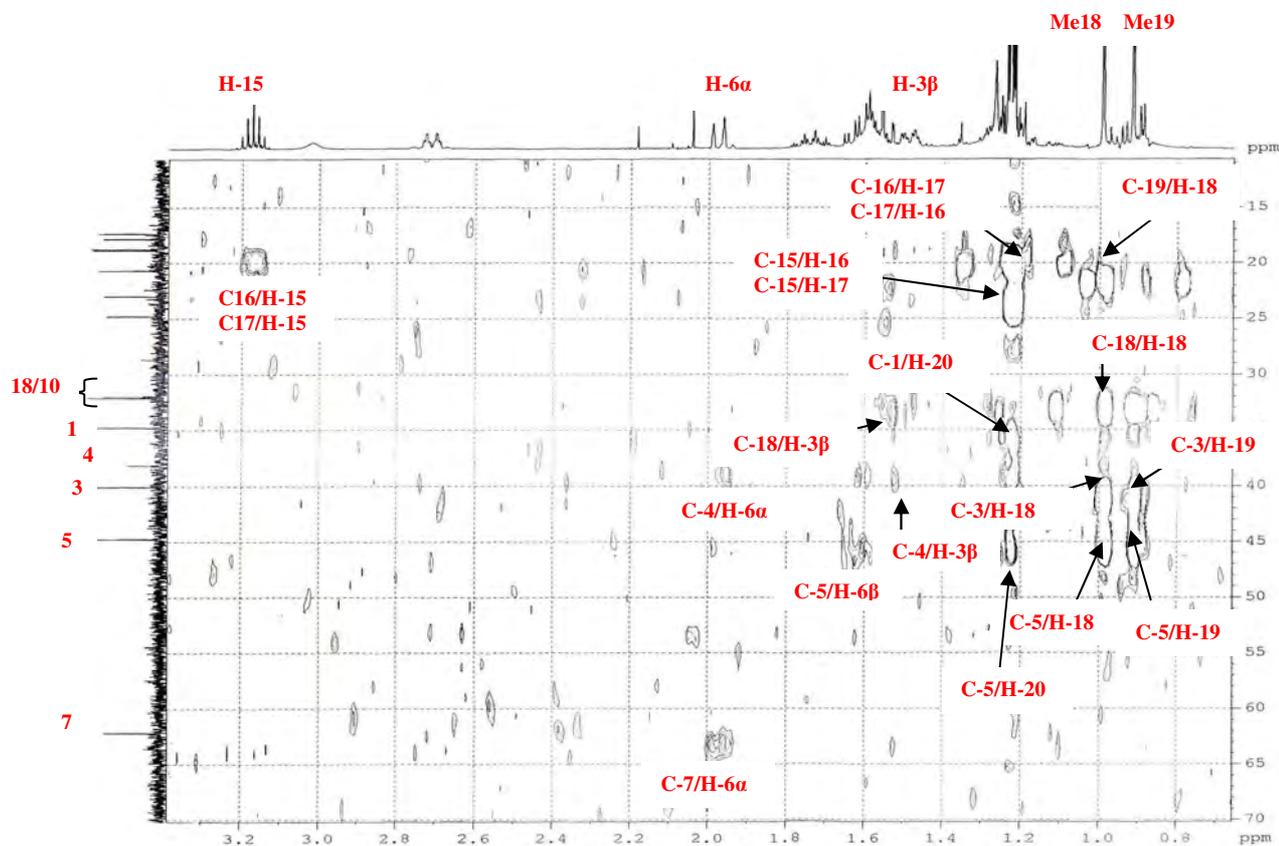
Spectre N°32. Spectre Cosy étalé (0.6 à 3.2 ppm) du composé SMB31 (500 MHz).



Spectre N°33. Spectre HSQC du composé SMB31 (500 MHz).



Spectre N°34. Spectre HSQC étalé (15 à 50 ppm) du composé SMB31 (500 MHz).



Spectre N°35. Spectre HMBC étalé (10 à 70 ppm) du composé SMB31 (500 MHz).

II.7.4. Elucidation de la structure du composé R9-12

II.7.4.1. Analyses physico-chimiques

- Le composé R9-12 a été obtenu sous forme de cristaux Blanc (Invisible sous la lumière UV (254nm et 366nm). Il a répondu positivement au test de Liebermann-Buchard relatif à la mise en évidence des stérols et des triterpènes. En effet, l'addition de CHCl_3 et d'une même quantité d'anhydride acétique à quelques milligrammes de ce produit, et après une bonne agitation et addition de quelques gouttes d'acide sulfurique concentré, le mélange au début incolore a viré brutalement au vert, ceci indique que ce composé est un hydrocarbure de type stéroïdique.
- La couleur de ce composé après révélation à la vanilline sulfurique (H_2SO_4) est rose foncée.

I.7.4.2. Analyses spectroscopiques

Le spectre de masse du composé R9-12, obtenu à haute résolution en mode impact électronique (HR-SMIE) (Spectre N°36-37), présente un pic moléculaire $[\text{M}]^+$ à $m/z= 414.3831$ (42%) correspondant à la formule brute $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$, soit un composé à cinq insaturations.

Ce spectre montre également la présence d'un pic à $m/z= 396$ (15%) correspondant au à la perte d'une molécule d'eau confirmant ainsi la présence d'un groupement hydroxyle libre dans la molécule. Cet ion se fragmente à son tour pour donner un pic à $m/z= 381$ correspondant au départ d'un radical méthyle, ce qui est attendu pour les stérols.

La structure stérol est appuyée par le signal à $m/z= 273$ (19%) correspondant à la perte de la chaîne latérale ($\text{C}_{10}\text{H}_{21}$) par l'ion moléculaire ce qui est connue pour les stérols. Cette rupture est suivie par la perte d'une molécule d'eau, confirmant la présence de la fonction alcool sur la partie polycyclique.

Les valeurs des ions caractéristiques des fragmentations des stérols sont résumées dans le tableau II.14.

Tableau II.14. Les valeurs des ions caractéristiques des fragmentations des stérols.

Fragment	m/z	Pourcentage %
$[\text{M}]^+$	414	42
$[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$	396	15
$[\text{M}-\text{Me}-\text{H}_2\text{O}]^+$	381	11
$[\text{M}-\text{C}_{10}\text{H}_{21}]^+$	273	19
$[\text{M}-\text{C}_{10}\text{H}_{21}-\text{H}_2\text{O}]^+$	255	29

Le spectre RMN ^1H (Spectre N°38-39) du composé R9-12 indique un ensemble de signaux méthyliques qui oriente aussi vers une structure de type stérol.

Le spectre enregistré à 500 MHz dans le CDCl_3d présente les signaux suivants:

- Un doublet large à $\delta_H = 5.34$ ppm d'intégration 1H caractéristique d'un proton éthylénique connue avec la numérotation H-6.
- Un multiplet d'intégration 1H à $\delta_H = 3.50$ ppm correspondant à un proton sur un carbone oxygéné, notamment le H-3 d'un stérol.
- Deux singulets résonnant à $\delta_H = 1.01$ ppm et $\delta_H = 0,68$ ppm d'intégration 3H chacune, attribuable respectivement aux méthyles en position 18 et 19.
- Deux doublets et un triplet superposés d'intégration 9H à $\delta_H = 0.82$ ppm, $\delta_H = 0.84$ ppm et $\delta_H = 0.86$ ppm correspondant aux deux méthyles isopropyliques qui sont diastéréotopiques et par conséquent magnétiquement non équivalents et aux méthyles du groupement éthyle respectivement.

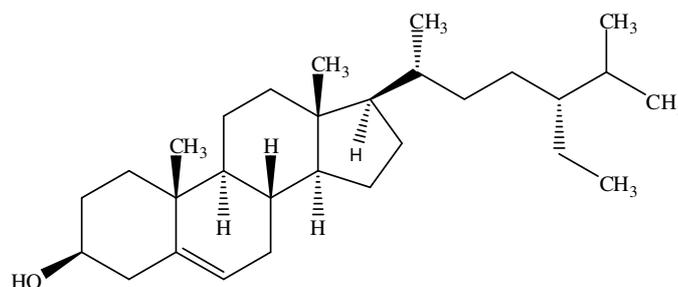
Ces données sont caractéristiques d'un phytostérol qui porte un groupement hydroxyle (OH) sur le carbone 3 et une double liaison en $\text{C}_5\text{-C}_6$.

Le tableau II.15 rassemble les données de la RMN du ^1H du composé R9-12.

Tableau II.15. Données RMN du ^1H (500 MHz, δ , J en Hz) du composé R9-12 dans le CDCl_3d .

Composé R9-12	
^1H	δ (ppm)
3	3.50 <i>m</i> (1H)
4	2.23 <i>d</i> ($J = 6.7$ Hz, 1H)
6	5.34 <i>d</i> ($J = 5.2$ Hz, 1H)
19	0.68 <i>s</i> (3H)
18	1.01 <i>s</i> (3H)
21	0.91 <i>d</i> ($J = 6.8$ Hz, 3H)
26	0.84 <i>d</i> ($J = 7.0$ Hz, 3H)
27	0.82 <i>d</i> ($J = 6.8$ Hz, 3H)
29	0.86 <i>t</i> ($J = 6.0$ Hz, 3H)

L'ensemble de ces données spectrales concorde bien avec la structure de β -sitostérol.



β -Sitostérol

Le spectre de masse HR-SMIE obtenu par impact électronique montre aussi un pic à $m/z= 412.3722$, ce qui est compatible avec la formule brute $C_{29}H_{48}O$.

β -Sitostérol : le spectre RMN ^{13}C et les séquences DEPT135 (Spectre N°40-41) confirment la présence de la double liaison trisubstituées par les signaux à $\delta_C= 140.7$ ppm, relatif à un carbone éthylénique quaternaire (C-5) et à $\delta_C= 121.6$ ppm relatif à un CH éthylénique (C-6), ainsi que la présence d'un CH oxygéné à $\delta_C= 71.7$ relatif au C-3 portant la fonction alcool.

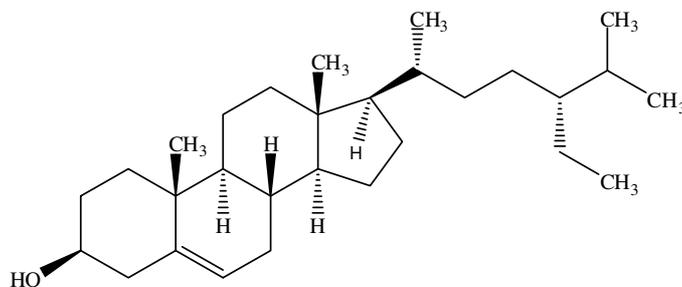
Stigmastérol : Le spectre RMN ^{13}C présente des signaux de 29 carbones avec en particulier celui à $\delta_C= 140.7$ ppm attribuable à un carbone éthylénique quaternaire(C-5'), trois carbones à $\delta_C= 121.7$ ppm, $\delta_C= 129.3$ ppm et $\delta_C= 138.3$ ppm correspondant à des CH vinyliques (C-6', C-23', C-22', respectivement), un signal à $\delta_C= 71.7$ ppm attribuable à un carbone porteur d'un groupement OH(C-3').

Ces données ont permis de déterminer que le produit R9-12 est un mélange de deux stérols : le β -sitostérol et le stigmastérol. Ces structure ont été confirmées par les spectres RMN du ^{13}C avec ceux trouvés dans la littérature (Akihisa *et al.*, 1987).

Les déplacements chimiques observés en RMN du ^{13}C sont présentées dans le tableau II.16 et II.17 et confrontés avec des données de RMN du ^{13}C trouvés dans la littérature (Akihisa *et al.*, 1987).

Tableaux II.16. Les déplacements chimiques des signaux méthyliques du composé R9-12 en RMN du ^{13}C (125 MHz, δ) et de β -sitostérol dans le CDCl_3d (Akihisa *et al.*, 1987).

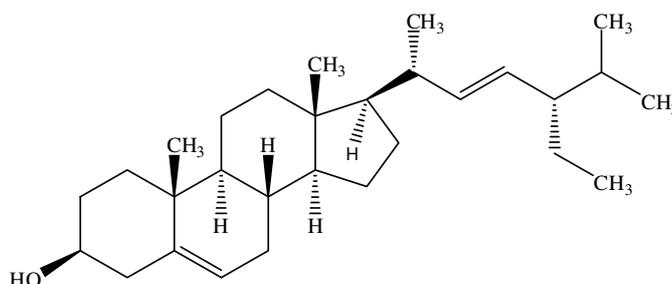
	Composé R9-12	β -Sitostérol
Position	^{13}C δ (ppm)	
CH ₂ -1	37.3	37.1
CH ₂ -2	31.6	30.2
CH-3	71.7	71.7
CH ₂ -4	42.3	42.2
C-5	140.7	140.7
CH-6	121.6	121.6
CH ₂ -7	31.6	31.6
CH-8	31.8	31.8
CH-9	50.1	50.1
C-10	36.1	35.4
CH ₂ -11	21.0	21.0
CH ₂ -12	39.6	38.8
C-13	42.3	42.0
CH-14	56.7	56.7
CH ₂ -15	24.3	24.2
CH ₂ -16	28.2	28.2
CH-17	56.0	56.0
CH ₃ -18	11.9	11.9
CH ₃ -19	19.3	19.3
CH-20	36.1	36.1
CH ₃ -21	18.7	18.7
CH ₂ -22	33.9	33.9
CH ₂ -23	26.1	26.0
CH-24	45.8	45.8
CH-25	29.1	29.1
CH ₃ -26	19.8	19.7
CH ₃ -27	19.0	19.0
CH ₂ -28	23.0	23.0
CH ₃ -29	11.8	11.8

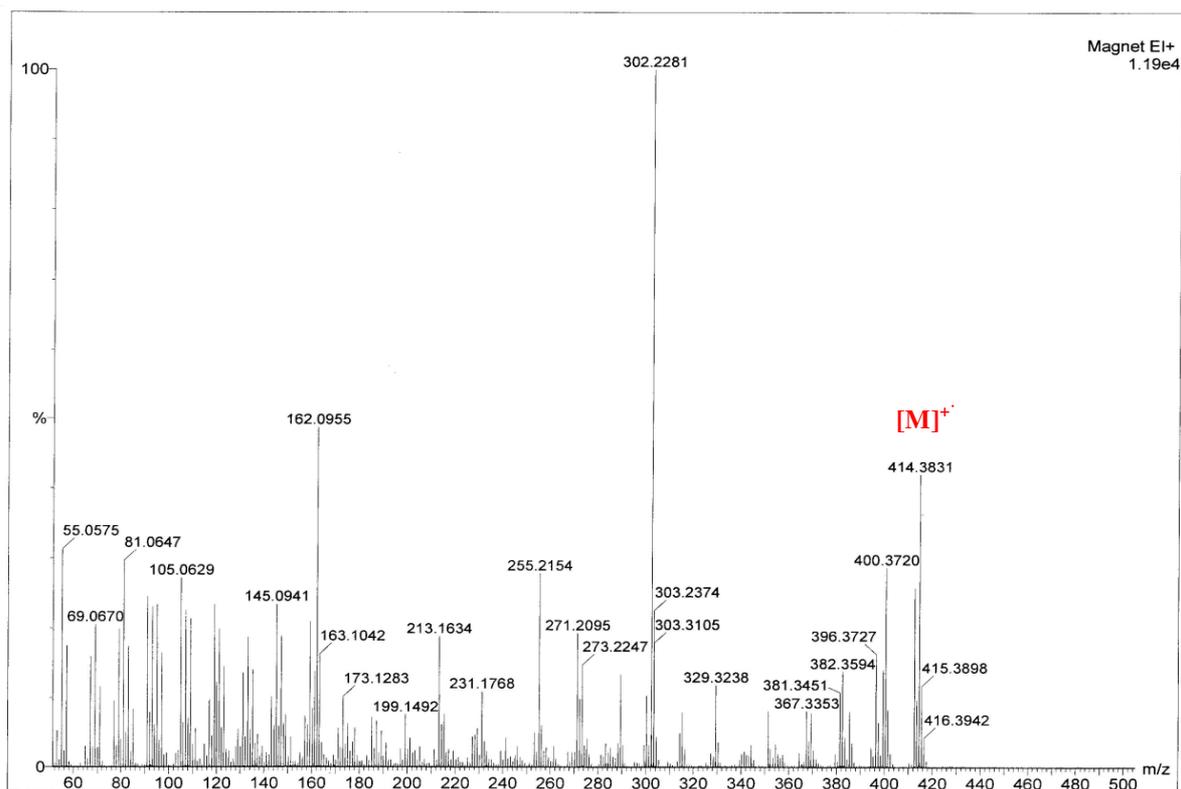
 **β -Sitostérol**

Tableaux II.17. Les déplacements chimiques des signaux méthyliques du composé R9-12 en RMN du ^{13}C (125 MHz, δ) et de stigmastérol dans le CDCl_3d (Akihisa *et al.*, 1987).

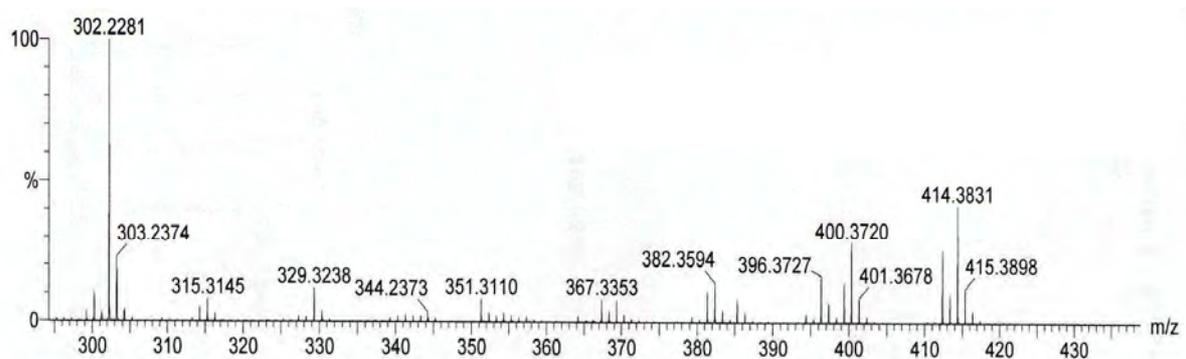
Position	^{13}C δ (ppm)	
	Composé R9-12	Stigmastérol
CH ₂ -1'	37.3	37.3
CH ₂ -2'	31.8	31.8
CH-3'	71.7	70.2
CH ₂ -4'	42.3	42.5
C-5'	140.7	140.7
CH-6'	121.7	121.7
CH ₂ -7'	31.6	31.9
CH-8'	32.4	31.8
CH-9'	51.2	50.1
C-10'	36.1	36.5
CH ₂ -11'	21.2	21.1
CH ₂ -12'	39.8	39.7
C-13'	42.3	42.5
CH-14'	56.8	56.8
CH ₂ -15'	24.4	24.4
CH ₂ -16'	28.9	29.0
CH-17'	55.9	56.0
CH ₃ -18'	12.0	12.0
CH ₃ -19'	19.0	19.5
CH-20'	40.5	40.5
CH ₃ -21'	20.2	21.2
CH ₂ -22'	138.3	139.2
CH ₂ -23'	129.3	130.0
CH-24'	51.2	51.2
CH-25'	36.1	36.0
CH ₃ -26'	19.9	18.9
CH ₃ -27'	18.7	19.0
CH ₂ -28'	25.4	25.6
CH ₂ -29'	12.2	12.2

La structure du composé R9-12 a donc pu être établie comme étant : le stigmastérol et le β -sitosérol. Ces composées sont anciennement connues. La plus ancienne référence que nous ayons pu trouver le mentionnant remonte à 1976 (Rubinstein *et al.*, 1976).

**Stigmastérol**

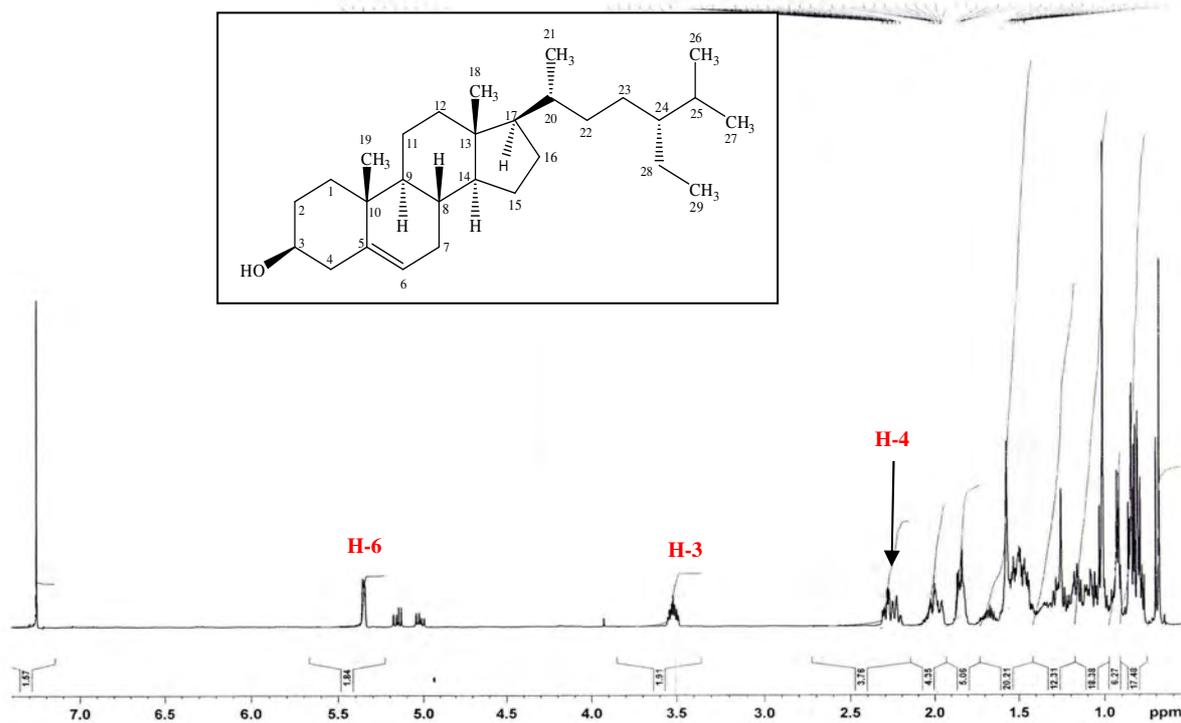


Spectre N°36. Spectre de masse en mode impact électronique du composé R9-12.

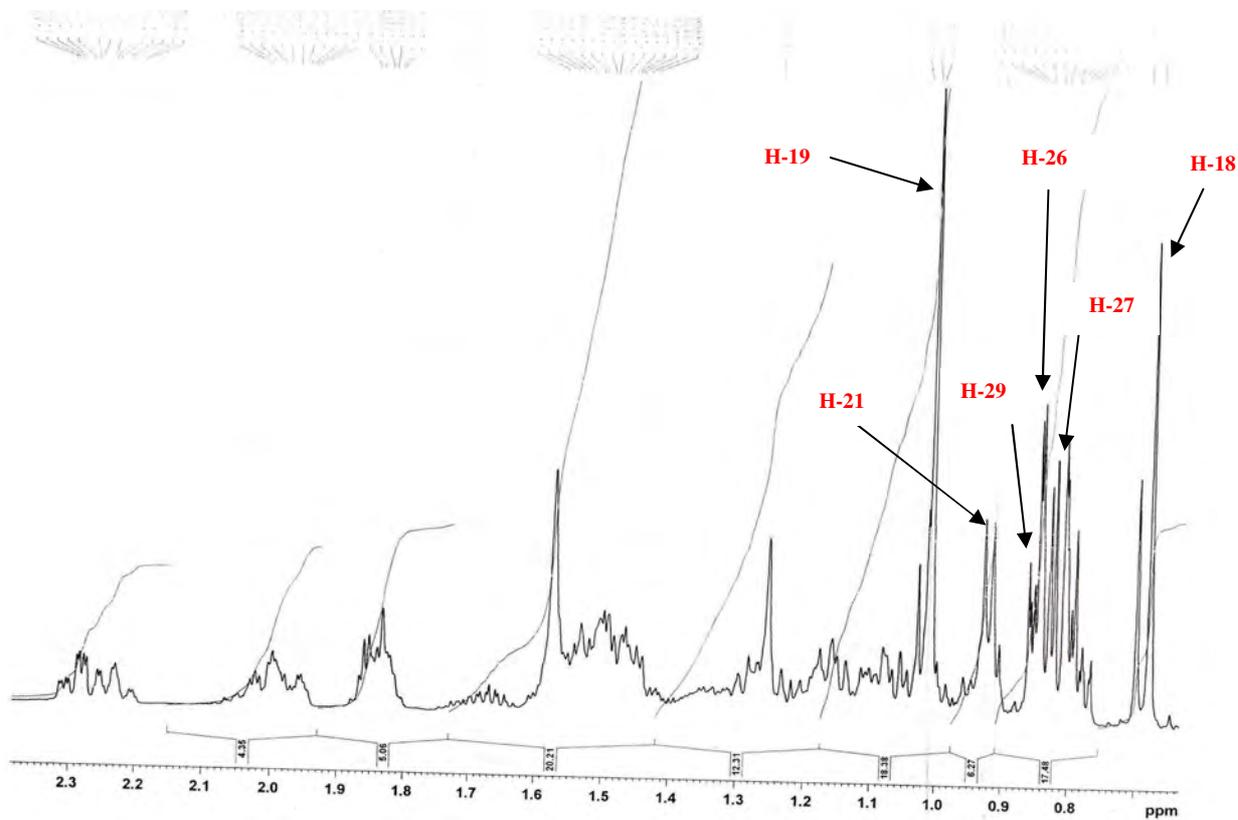


Mass	RA	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula
415.3946	11.67	415.3940	0.6	1.5	4.5	C29 H51 O
414.4212	8.30	414.4226	-1.4	-3.3	4.0	C30 H54
414.3878	41.58	414.3862	1.6	3.9	5.0	C29 H50 O
414.3497	9.12	414.3498	-0.1	-0.2	6.0	C28 H46 O2
413.3788	8.69	413.3783	0.5	1.1	5.5	C29 H49 O
413.3645	8.18	413.3631	1.4	3.4	1.5	C25 H49 O4
412.3722	25.83	412.3705	1.7	4.1	6.0	C29 H48 O

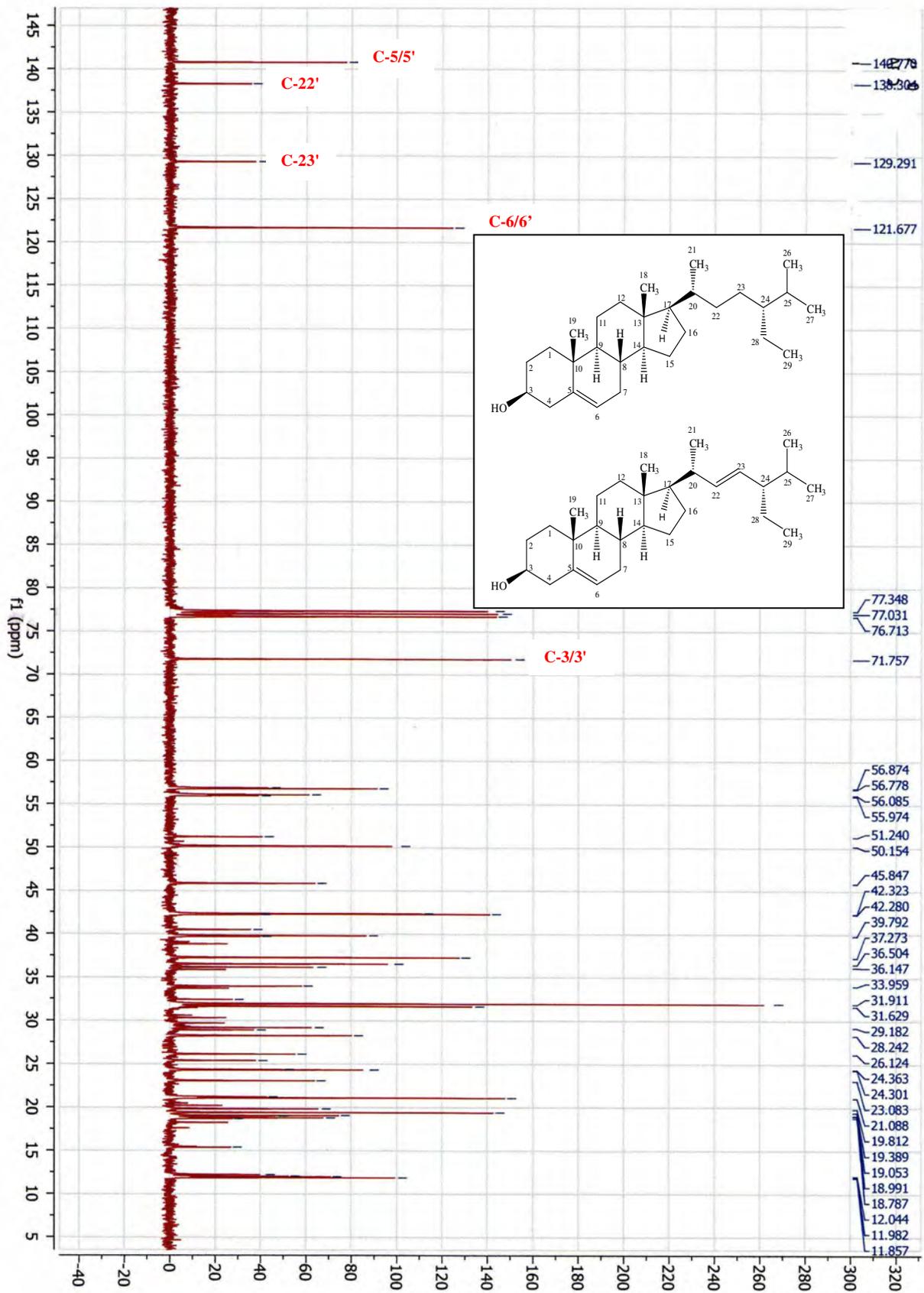
Spectre N°37. Spectre de masse HR-SMIE étalé du composé R9-12.

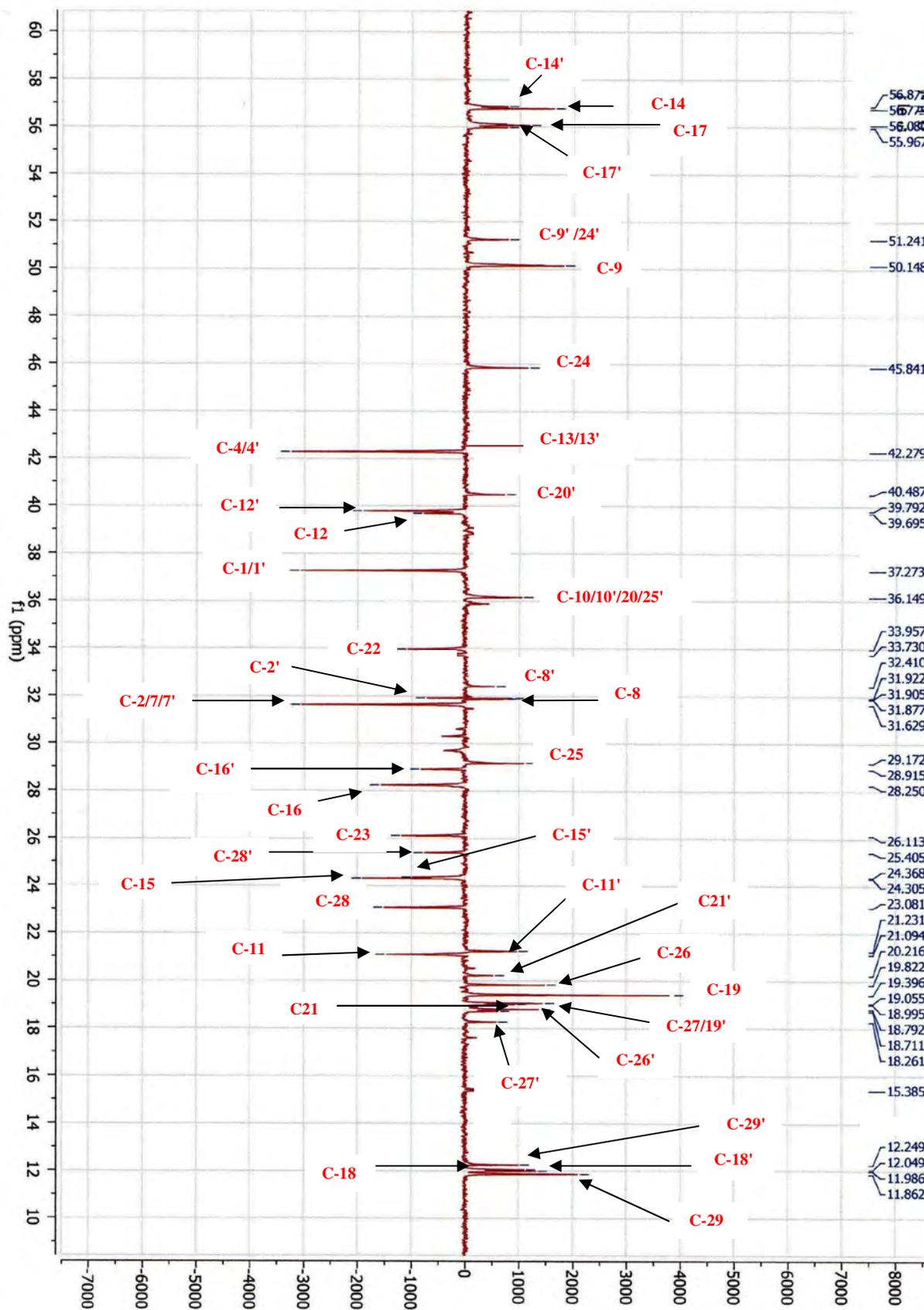


Spectre N° 38. Spectre RMN ^1H du composé R9-12 (500 MHz).



Spectre N°39. Spectre RMN ^1H étalé (0.6 à 2.4 ppm) du composé R9-12 (500 MHz).

Spectre N°40. Spectre RMN ¹³C du composé R9-12 (125 MHz).



Spectre N°41. Spectre RMN ^{13}C DEPT 135 étalé (10 à 60 ppm) du composé R9-12 (125 MHz).

II.7.5. Elucidation de la structure du composé R15-19

II.7.5.1. Analyses physico-chimiques

- Le composé R15-19 a été obtenu sous forme de cristaux roses ; $[\alpha]_{D589\text{ nm}}^{25} = +63$,
- Point de fusion = 127-129°C.

II.7.5.2. Analyses spectroscopiques

L'analyse du composé R15-19 (Spectre N°42-43), par HR-SMIE montre un ion moléculaire $[M]^+$ à $m/z = 354.1110$, ce qui est compatible avec la formule brute $C_{20}H_{18}O_6$.

La formule moléculaire permet de déterminer un indice d'insaturation de 12 :

$$Ni = \frac{(2 \times 20 + 2 + 0 - 0) - 18}{2} = 12$$

La fragmentométrie SM-IE permet de mettre en évidence la perte successive des ions caractéristiques de la molécule.

Tableau II.18. Fragments du composé R15-19 en SM-IE.

Fragment	m/z	Pourcentage %
$[M]^+$	354	88.72
$[M-ArCHO]^+$	204	08.81
$[M-ArCHO-H]^+$	203	24.57
$[ArCH=CHCH_2]^+$	161	42.25
$[ArCHO]^+$	150	29.00
$[ArCO]^+$	149	100.00
$[ArCH_2]^+$	135	42.41
$[Ar]^+$	122	21.62

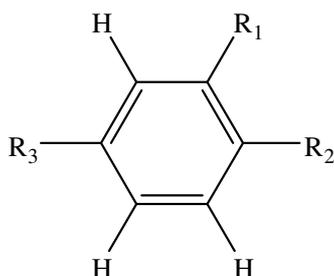
Le spectre RMN ^{13}C (Spectre N°47-48) montre seulement dix signaux. Ce qui permet de recenser dix carbones et révélant ainsi que cette molécule est symétrique.

Le spectre de RMN ^{13}C en modalité DEPT montre la présence de cinq CH, deux CH_2 et trois carbones quaternaires (en réalité dix CH, quatre CH_2 et six carbones quaternaires à cause de la symétrie de la molécule).

Les déplacements chimiques des trois carbones quaternaires et de trois carbones liés à un seul proton indique la présence d'un noyau aromatique qui est équivalent à un nombre d'insaturation est égale à quatre, les deux autres insaturations ne peuvent être dues qu'à la présence de deux cycles. Comme la molécule est symétrique, donc possédant deux noyaux aromatiques et quatre cycles, ce qui correspond à un nombre d'insaturation égal douze (12).

En effet, le spectre RMN ^1H étalé (Spectre N°45) confirme la présence d'un noyau aromatique à partir de la résonance de trois protons de $\delta_{\text{H}}= 6.70$ ppm à $\delta_{\text{H}}= 6.77$ ppm. L'un des protons apparaît sous forme d'un doublet à $\delta_{\text{H}}= 6.70$ ppm avec une constante de couplage ($J= 8.0$ Hz), indiquant un couplage ortho, le deuxième sous forme de doublet de doublet à $\delta_{\text{H}}= 6.72$ ppm avec des constantes de couplage ($J= 8.0$ Hz, $J= 1.5$ Hz) indiquant des couplages ortho et méta et le troisième résonne sous forme de doublet à $\delta_{\text{H}}= 6.77$ ppm avec une constante de couplage ($J= 1.5$ Hz).

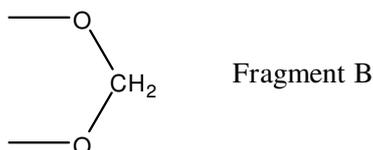
Ces couplages indiquant que le noyau aromatique est trisubstitué.



Fragment A

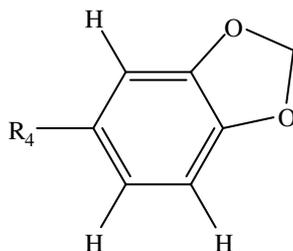
Le spectre DEPT montre un signal à $\delta_{\text{C}}= 101.0$ ppm attribué à un carbone méthylénique CH_2 . Le spectre HSQC (Spectre N°50-51) permet de le corrélérer au signal très déblindé qui apparaît sous forme d'un singulet à $\delta= 5.88$ ppm attribué aux protons méthyléniques. Les valeurs des déplacements chimiques δ_{H} et δ_{C} révèlent un méthylène lié à deux atomes d'oxygènes (acétal formaldéhyde).

Soit :



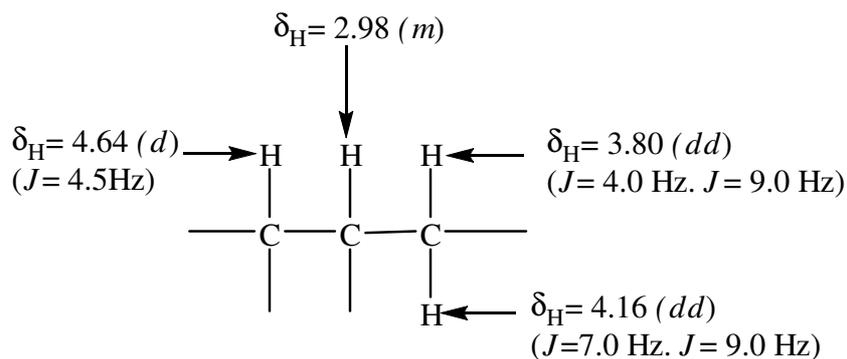
Fragment B

On peut supposer que le fragment A et le fragment B sont liés, ce qui explique les valeurs de déplacements chimiques très déblindés de deux carbones quaternaires $\delta_{\text{C}}= 147.1$ ppm et $\delta_{\text{C}}= 147.9$ ppm, on aura :



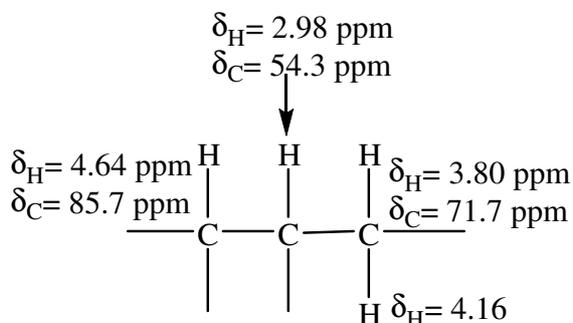
Le spectre Cosy (Spectre N°49) permet de déterminer les connectivités suivantes :

- En prenant comme point de départ le proton dont le signal apparaît à $\delta_H = 4.64$ ppm :

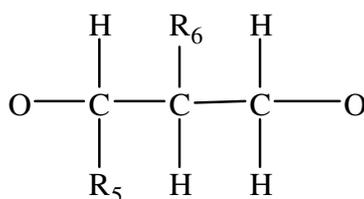


Fragment C

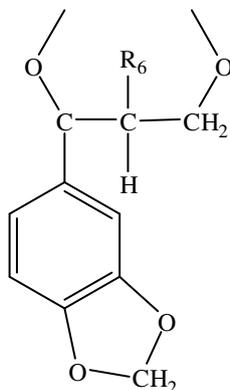
Le spectre HSQC (Spectre N°50) permet de déterminer les déplacements chimiques pour chacun de ces carbones :



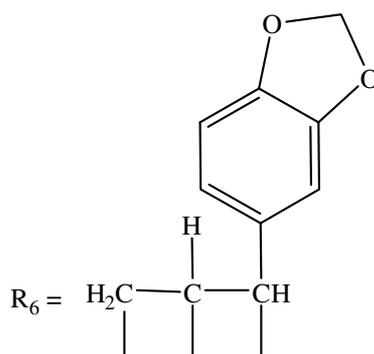
Les valeurs des déplacements chimiques des protons et des carbones externes indiquent que ces carbones sont liés à des oxygènes. Le fragment C devient donc :



Vu le déplacement chimique très déblindé du carbone lié à R5 on peut supposer que R5 est le noyau aromatique disubstitué.



Dans cette structure partielle tous les signaux du spectre RMN ^1H et RMN ^{13}C sont attribués, ce qui implique que R_6 représente le fragment symétrique qui comporte (10C, 9H, 2O₂).



La jonction des deux parties symétriques donne la molécule qui a pour nom le sésamine.

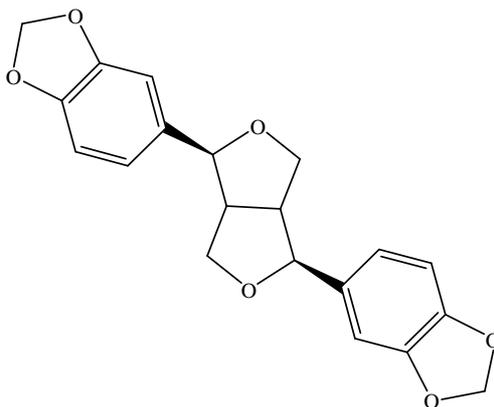
Les attributions de tous les signaux des spectres du proton et du carbone du composé R15-19 sont présentés dans le tableau II.19, avec les valeurs des déplacements chimiques trouvés dans la littérature dans le CDCl_3d (RMN du ^1H : Greger et Hofer, 1980 ; Li *et al.*, 2000 et RMN du ^{13}C : Alvarez, 2007).

Tableau II.19. RMN du ^1H et du ^{13}C du composé R15-19 (500 MHz, δ , J en Hz ; 125 MHz, δ) et du (+)-Sésamine (600 MHz, δ , J en Hz ; 199 MHz, δ) dans le CDCl_3d .

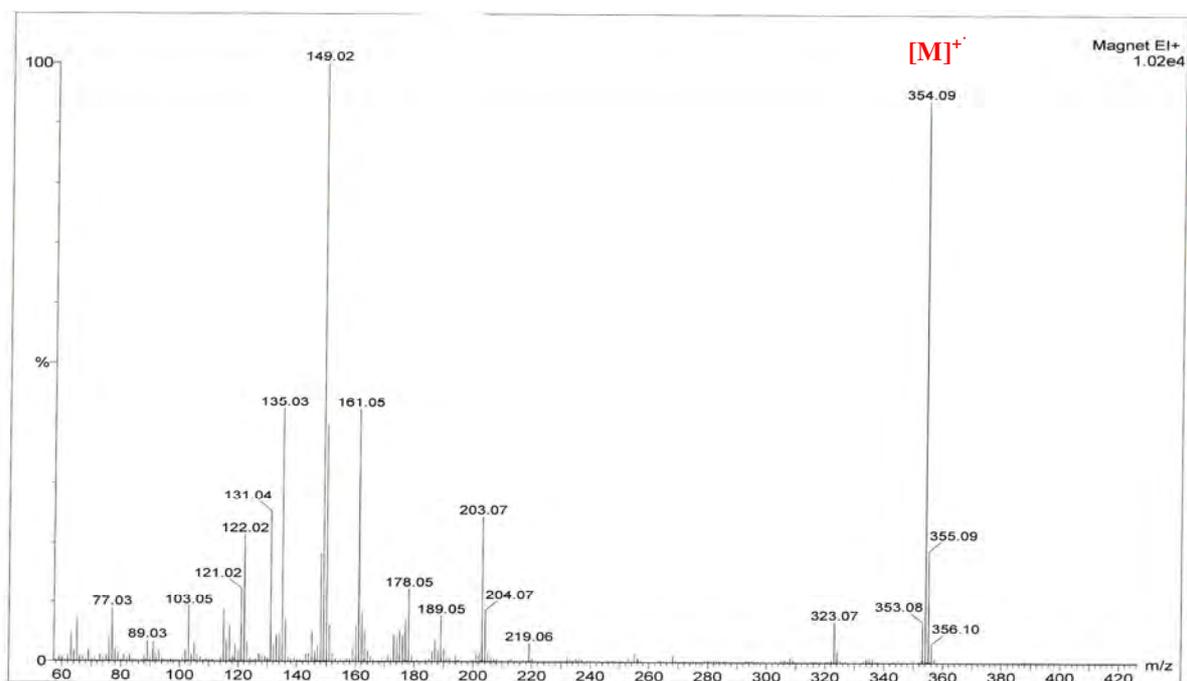
	Composé R15-19 δ ppm		(+)-Sésamine	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
Position	δ (ppm)			
1/5	2.98 <i>m</i> (2H)	54.3	3.11 <i>m</i> (2H)	54.2
2/6	4.64 <i>d</i> ($J= 4.5$ Hz, 2H)	85.7	4.69 <i>d</i> ($J= 4.8$ Hz, 2H)	85.7
4/8	4.16 <i>dd</i> ($J= 7.0$ Hz, $J= 9.0$ Hz, 2H) 3.80 <i>dd</i> ($J= 4.0$ Hz, $J= 9.0$ Hz, 2H)	71.7	4.21 <i>dd</i> ($J= 6.7$ Hz, $J= 9.0$ Hz, 2H) 3.82 <i>dd</i> ($J= 4.0$ Hz, $J= 9.0$ Hz, 2H)	71.6
1'/1''	-	135.0	-	135.0
2'/2''	6.77 <i>d</i> ($J= 1.5$ Hz, 2H)	106.4	6.87 <i>d</i> ($J= 1.5$ Hz, 2H)	107.3
3'/3''	-	147.9	-	147.9
4'/4''	-	147.1	-	147.0
5'/5''	6.70 <i>d</i> ($J= 8.0$ Hz, 2H)	108.1	6.77 <i>d</i> ($J= 8.1$ Hz, 2H)	108.7
6'/6''	6.72 <i>dd</i> ($J= 8.0$ Hz, $J= 1.5$ Hz, 2H)	119.3	6.84 <i>dd</i> ($J= 8.1$ Hz, $J= 1.5$ Hz, 2H)	120.1
[(-O-CH ₂ -O)-2]	5.88 <i>s</i> (4H)	101.0	5.91 <i>s</i> (4H)	101.8

L'ensemble de ces données, ainsi la comparaison des déplacements chimiques des signaux observés dans le spectre de RMN ^{13}C du composé R15-19 avec ceux fournis par la littérature pour une lignane déjà isolé, le (+) sésamine.

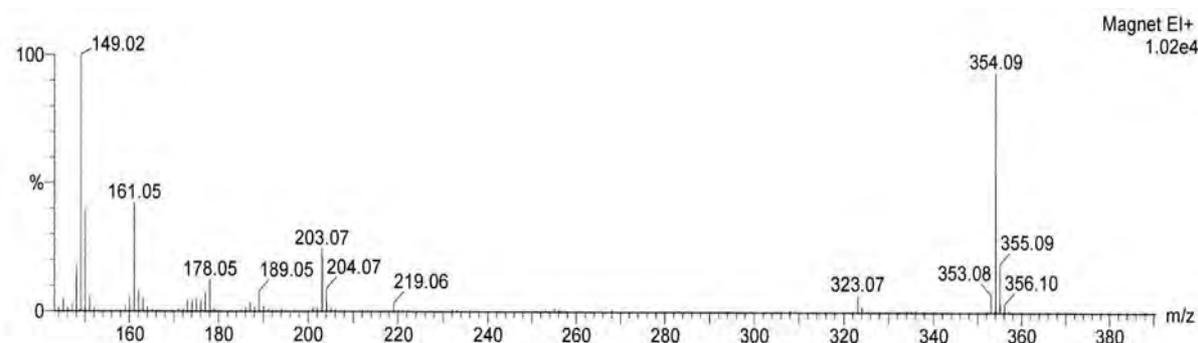
La structure du composé R15-19 a donc pu être établie comme le (+)-sésamine. Cette molécule isolée pour la première fois de *Sesamum indicum* L en 1890 (Hearon et MacGregor, 1955). Cette lignane isolé pour la 1^{ère} fois du genre *Stachys*.



(+)-sésamine

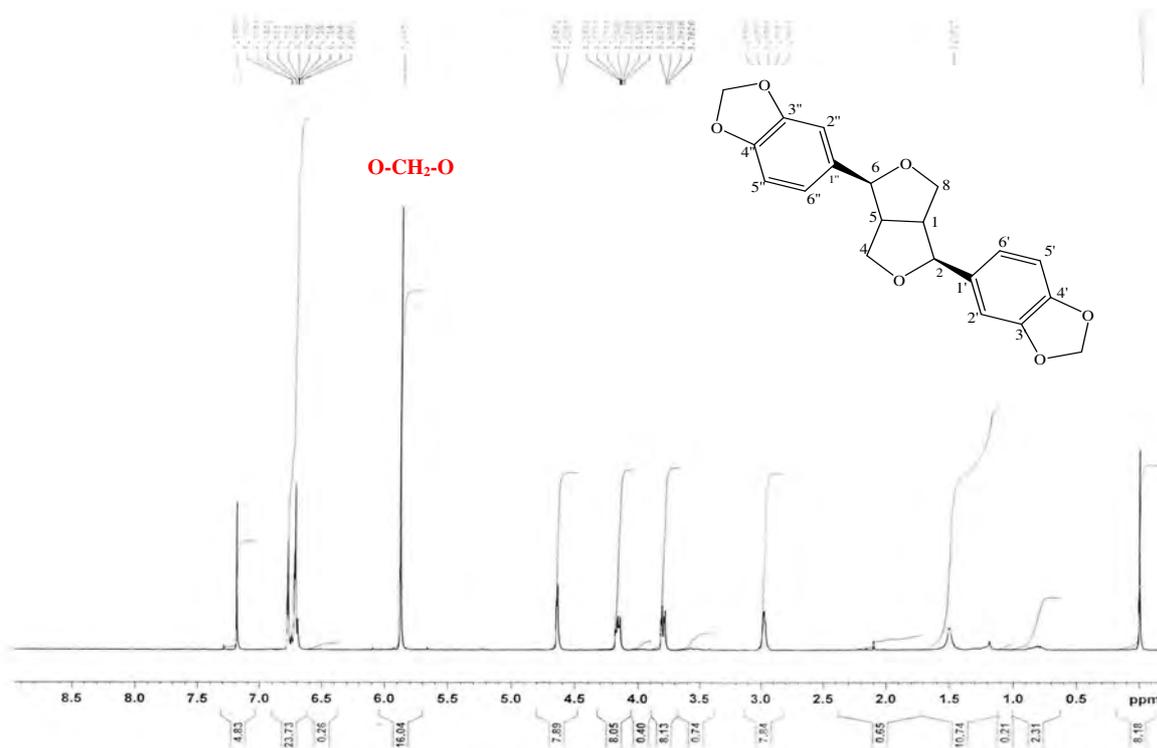


Spectre N° 42. Spectre de masse en mode impact électronique du composé R15-19.

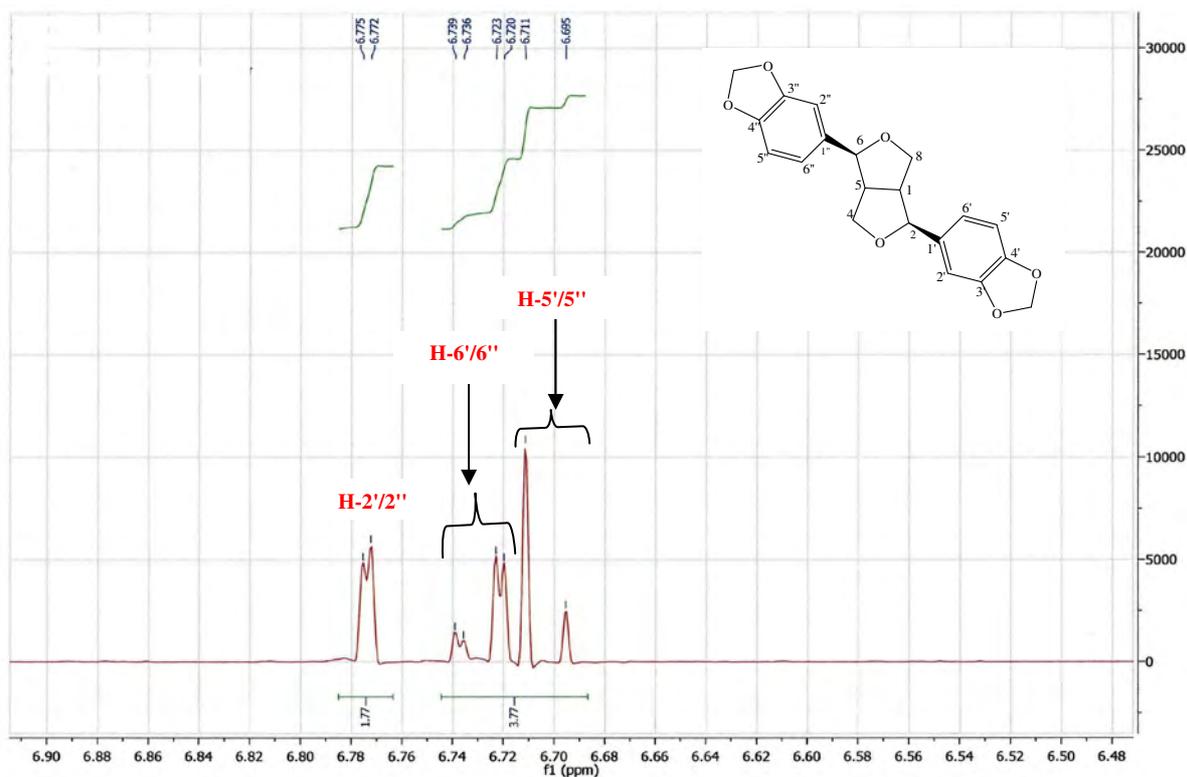


Mass	RA	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula
355.1180	6.14	355.1182	-0.2	-0.5	11.5	C20 H19 O6
355.1139	8.66	355.1123	1.6	4.5	20.5	C27 H15 O
355.1017	15.27	355.1029	-1.2	-3.4	7.5	C16 H19 O9
355.0976	16.07	355.0970	0.6	1.6	16.5	C23 H15 O4
355.0894	18.86	355.0877	1.7	4.9	3.5	C12 H19 O12
355.0813	15.90	355.0818	-0.5	-1.3	12.5	C19 H15 O7
355.0772	13.27	355.0759	1.3	3.6	21.5	C26 H11 O2
354.1313	10.58	354.1315	-0.2	-0.5	7.0	C17 H22 O8
354.1273	15.87	354.1256	1.7	4.8	16.0	C24 H18 O3
354.1151	47.75	354.1162	-1.1	-3.1	3.0	C13 H22 O11
354.1110	59.19	354.1103	0.7	1.9	12.0	C20 H18 O6

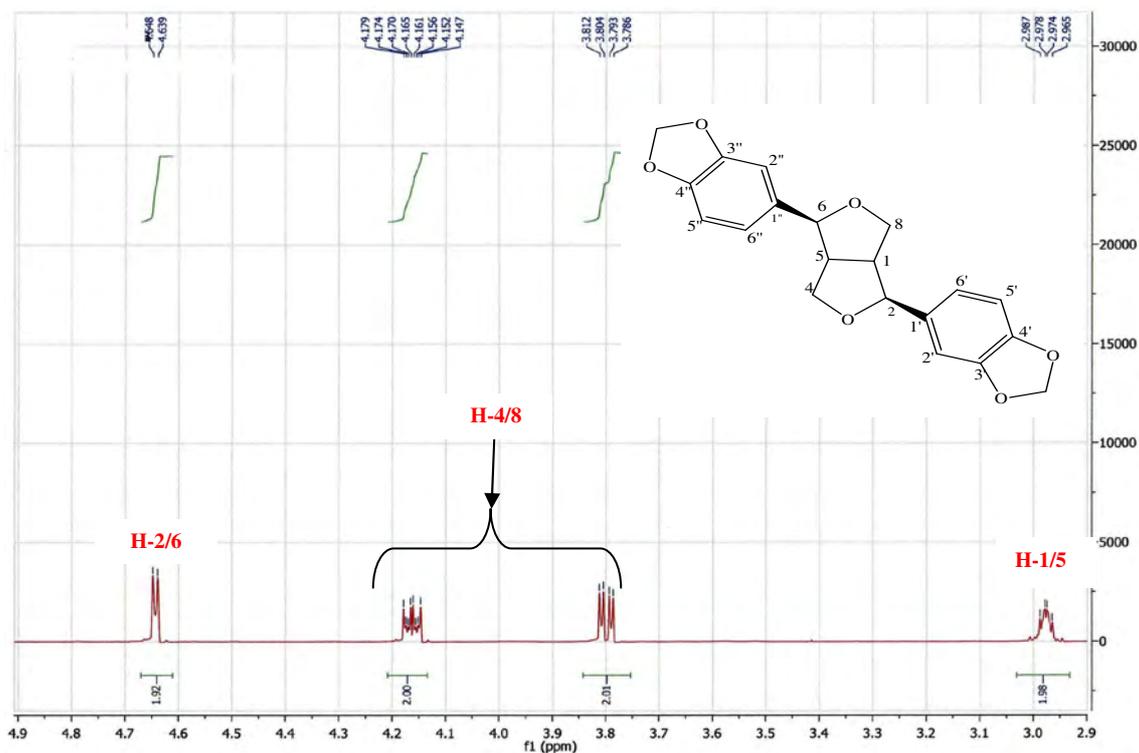
Spectre N°43. Spectre de masse HR-SMIE étalé du composé R15-19.



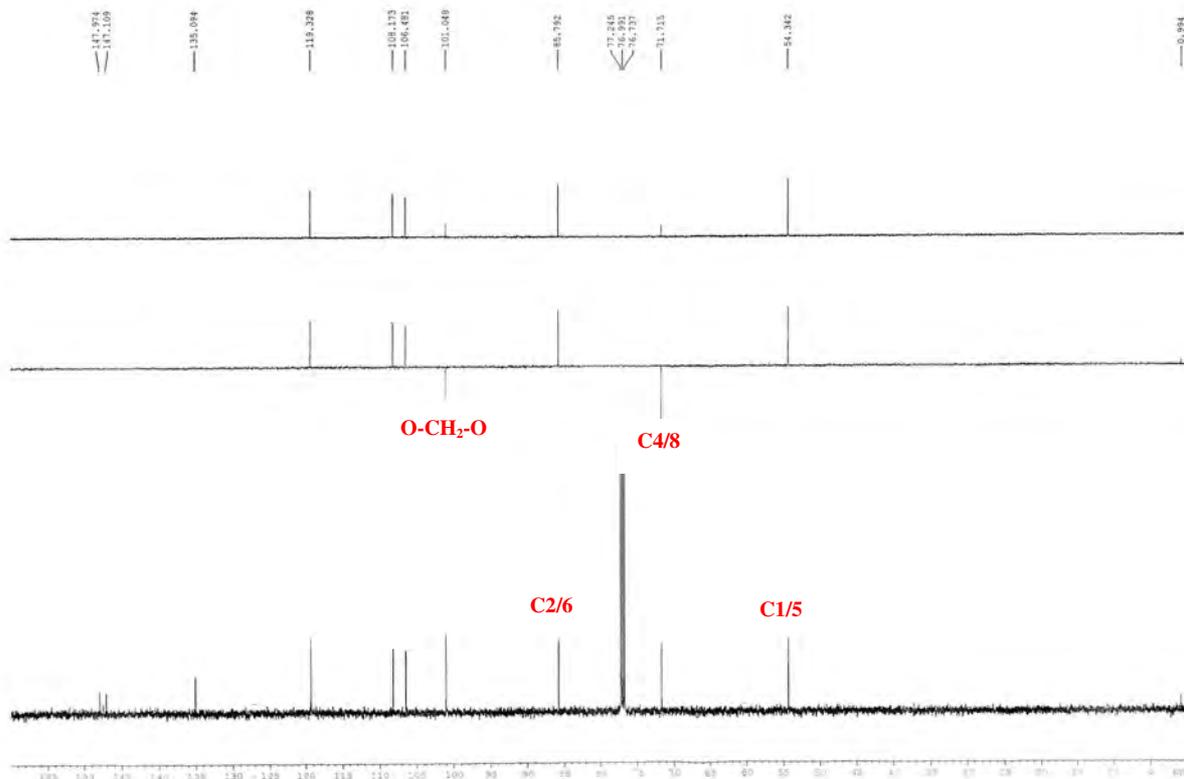
Spectre N°44. Spectre RMN ^1H du composé R15-19 (500 MHz).



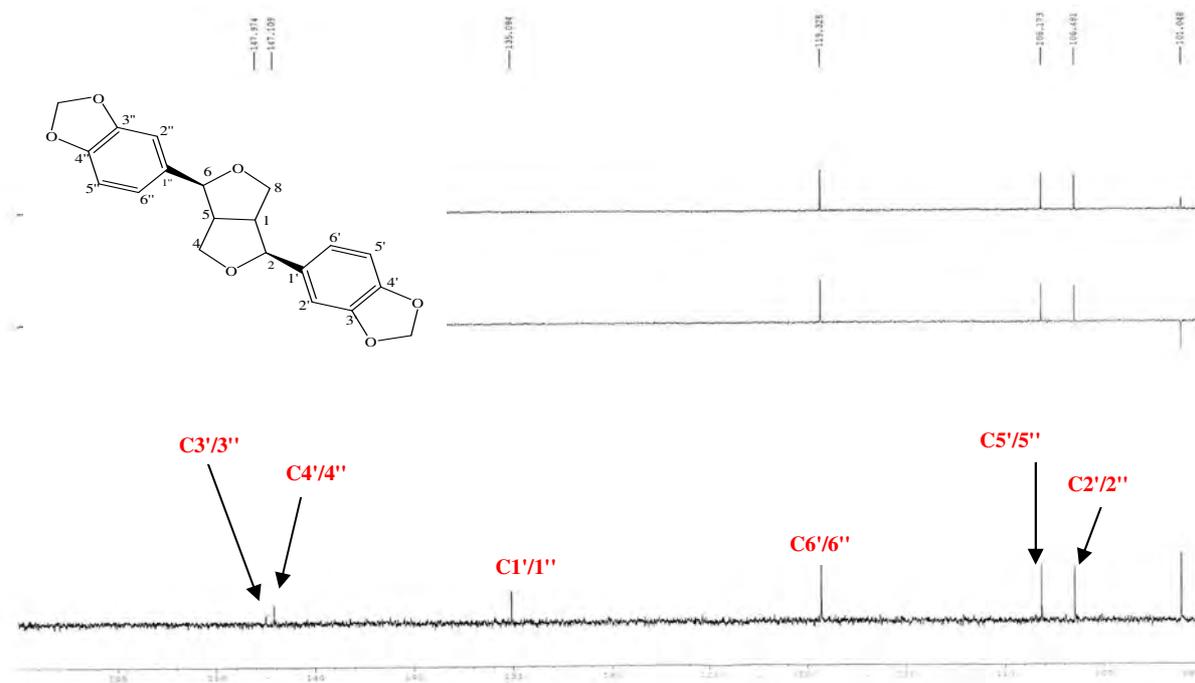
Spectre N°45. Spectre RMN ^1H étalé (6.48 à 6.90 ppm) du composé R15-19 (500 MHz).



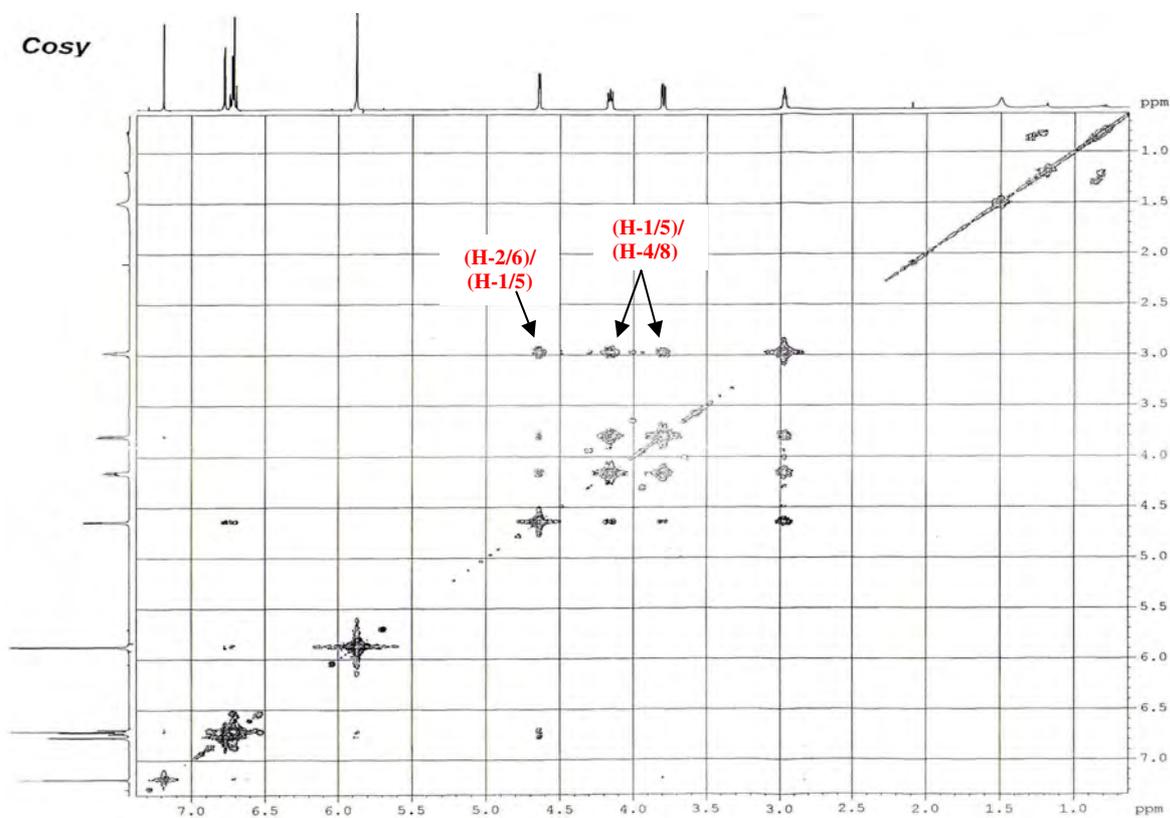
Spectre N°46. Spectre RMN ^1H étalé (2.9 à 4.90 ppm) du composé R15-19 (500 MHz).



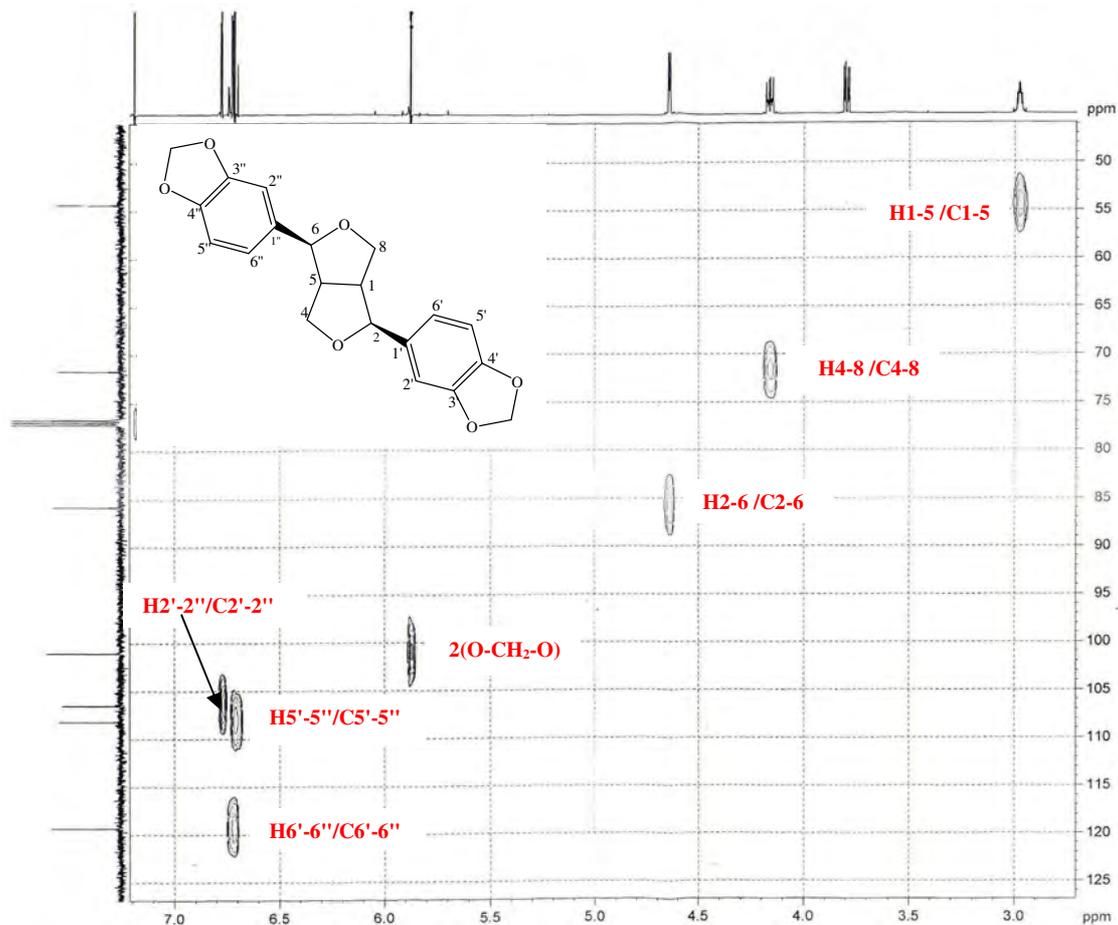
Spectre N°47. Spectre RMN ^{13}C du composé R15-19 (125 MHz).



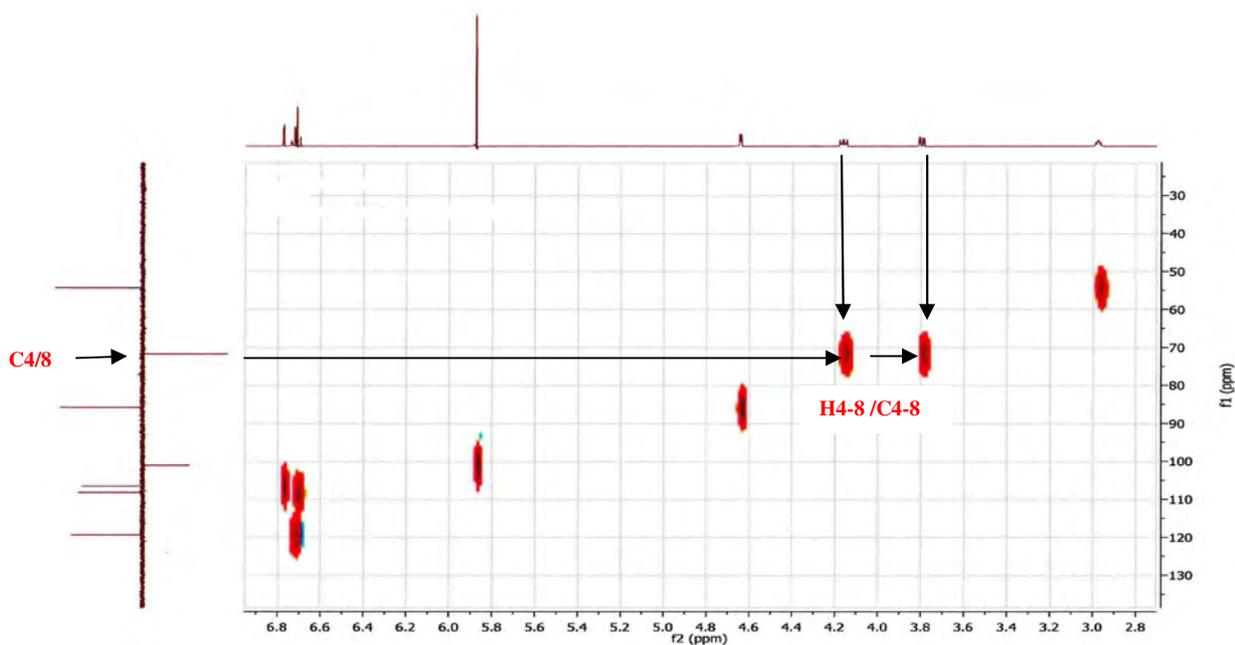
Spectre N°48. Spectre RMN ^{13}C étalé (100 à 160 ppm) du composé R15-19 (125 MHz).



Spectre N°49. Spectre Cosy du composé R15-19 (500 MHz).



Spectre N°50. Spectre HSQC du composé R15-19 (500 MHz).



Spectre N°51. Spectre HSQC étalé (30 à 130 ppm) du composé R15-19 (500 MHz).

II.7.6. Elucidation de la structure du composé R30-34

II.7.6.1. Analyses physico-chimiques

Le composé R30-34 a été obtenu sous forme de cristaux rose, mp= 80-84 °C.

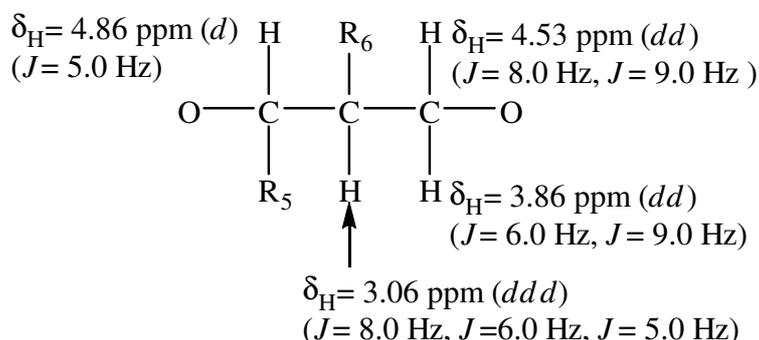
II.7.6.2. Analyses spectroscopiques

L'analyse du composé R30-34 (Spectre N°52-53), par HR-SMIE montre un ion moléculaire $[M]^+$ à $m/z= 370.1044$, ce qui est compatible avec la formule brute $C_{20}H_{18}O_7$.

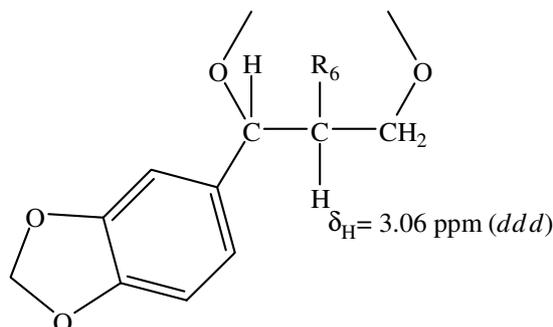
Le spectre de RMN 1H (Spectre N°54-56) du produit R30-34, permet d'observer une grande ressemblance avec le produit R15-19 identifié comme étant le sésamine. En effet, on remarque d'une part que les trois signaux de la zone aromatique qui s'intègre deux protons pour chaque signal de la sésamine sont dédoublés en six signaux qui s'intègre un proton pour chaque signal. D'autre part le singulet correspondant aux quatre protons des deux méthylènes compris entre les atomes d'oxygène résonnants à $\delta_H= 5.88$ ppm de sésamine est dédoublé dans ce produit en deux singulets s'intégrant chacun deux protons à $\delta_H= 6.00$ ppm et $\delta_H= 5.97$ ppm.

Le dédoublément des signaux indique manifestement une perte de la symétrie dans la molécule.

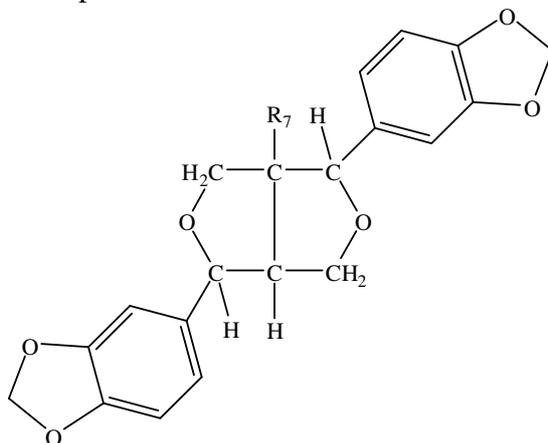
De plus, l'analogie du point de vue multiplicité et déplacement chimique est également constaté pour les quatre signaux qui apparaissent à $\delta_H= 4.86$ ppm (d) ; $\delta_H= 4.53$ ppm (dd) ; $\delta_H= 3.86$ ppm (dd) et $\delta_H= 3.06$ ppm (ddd). Mais que cette fois-ci, il s'intègrent un proton pour chaque signal, toutefois, dans ce produit les protons attribués à ces signaux sont plus déblindés. Il est à remarquer que le dernier signal est moins complexe que celui de sésamine qui apparait à $\delta_H= 2.98$ ppm sous forme de multiplet, Ces remarques indiquent la présence d'un fragment analogue au fragment C de sésamine mais qui n'est pas dédoublé.



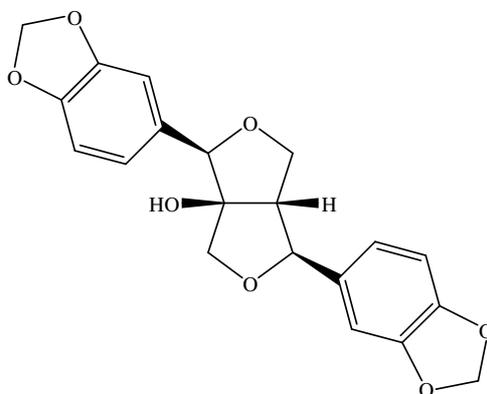
La multiplicité du proton résonnant à $\delta_H= 4.86$ ppm ainsi que la valeur du déplacement chimique et par comparaison avec le sésamine conduit à identifier R_5 comme étant le noyau benzénique disubstitué, on a donc :



De plus, le point le plus important est l'apparition de 3 nouveaux signaux s'intégrant chacun un proton. Notamment un singulet à $\delta_{\text{H}} = 4.83 \text{ ppm}$ (dont la valeur $\delta_{\text{H}} = 4.86 \text{ ppm}$) est proche à celle du doublet du proton du carbone portant le noyau aromatique et deux doublets d'un système AB avec une constante de couplage de ($J = 9.5 \text{ Hz}$), l'un à $\delta_{\text{H}} = 4.06 \text{ ppm}$ et l'autre à $\delta_{\text{H}} = 3.93 \text{ ppm}$ attribués aux deux protons géminés indiquant l'absence de proton voisins et finalement le proton résonnant à $\delta_{\text{H}} = 3.06 \text{ ppm}$ sous forme de doublet de doublet de doublet indique que le carbone directement lié au carbone qui le porte est primaire, ce qui permet de suggérer la structure partielle.



A partir de la formule moléculaire on peut déduire que R_7 est le groupement hydroxyle et qui est bien confirmé par le spectre RMN ^{13}C (Spectre N°57-58) en modulation DEPT ou on observe un pic à $\delta_{\text{C}} = 90.7 \text{ ppm}$ attribué à un carbone quaternaire.



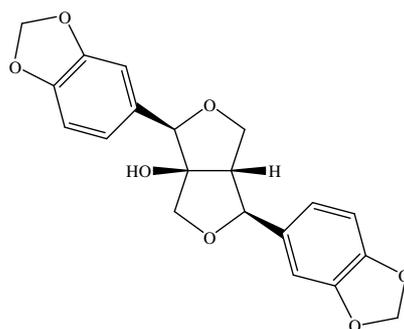
Le spectre Cosy (Spectre N°59) confirme cette structure, le spectre HSQC (Spectre N°60-61) permet l'attribution des signaux aux autres atomes de carbone. Elles sont bien confirmées à celle de littérature, les valeurs sont dressées dans le tableau ci-dessous.

Les attributions en RMN du ^1H et du ^{13}C que nous avons faites sont identiques à celles proposées dans la littérature (Angle *al.*, 2008), tableau II.20.

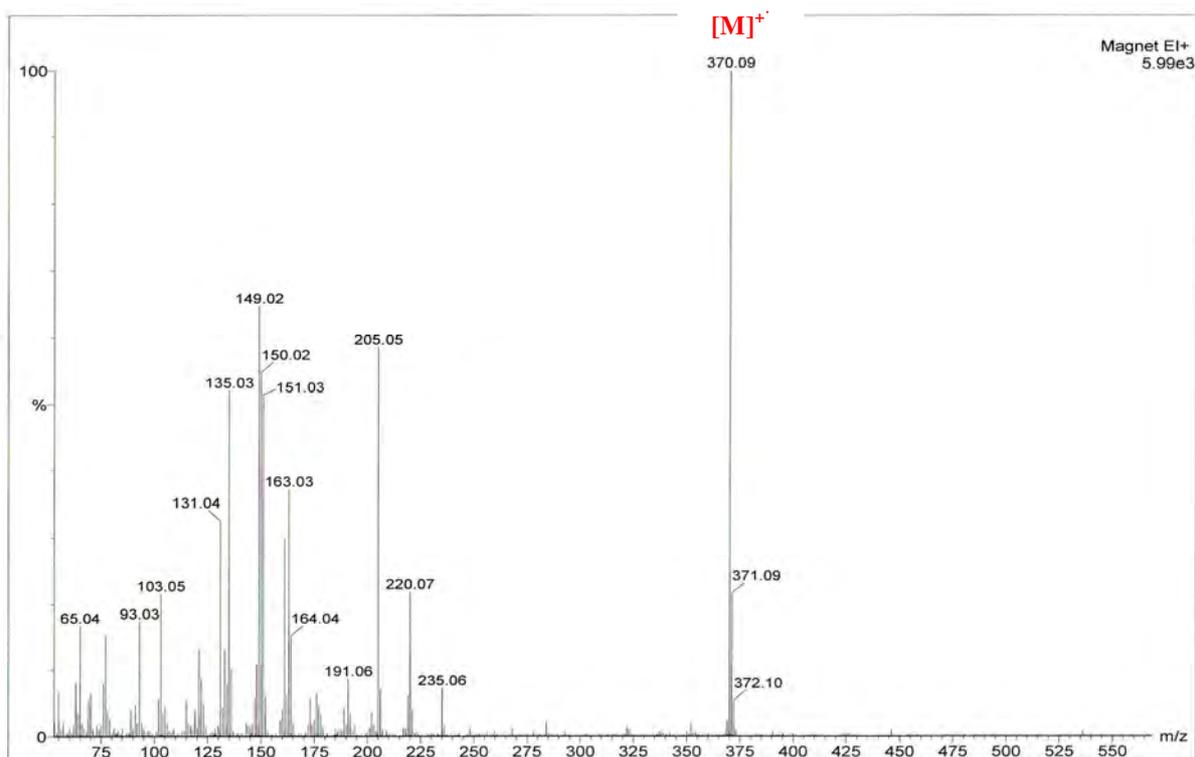
Tableau II.20. RMN du ^1H et du ^{13}C du composé R30-34 (500 MHz, δ , J en Hz ; 125 MHz, δ) et de (\pm)-Paulownine (300 MHz, δ , J en Hz ; 75 MHz, δ) dans le CDCl_3d .

Position	Composé R30-34		(\pm)-Paulownine		
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	
	δ (ppm)				
1	3.06 <i>ddd</i> ($J= 8.0$ Hz, $J= 6.0$ Hz, $J= 5.0$ Hz, 1H)	59.4	3.06 (<i>m</i> , 1H)	60.5	
4a	4.06 <i>d</i> ($J= 9.5$ Hz, 1H)	73.8	4.06 <i>d</i> ($J= 9.8$ Hz, 1H)	74.9	
4b	3.93 <i>d</i> ($J= 9.5$ Hz, 1H)		3.92 <i>d</i> ($J= 9.8$ Hz, 1H)		
8a	4.53 <i>dd</i> ($J= 9.0$ Hz, $J= 8.0$ Hz, 1H)	70.6	4.53 <i>dd</i> ($J= 9.2$ Hz, $J= 8.2$ Hz, 1H)	71.7	
8b	3.86 <i>dd</i> ($J= 9.0$ Hz, $J= 6.0$ Hz, 1H)		3.86 <i>dd</i> ($J= 9.2$ Hz, $J= 6.2$ Hz, 1H)		
2	4.86 <i>d</i> ($J= 5.0$ Hz, 1H)	84.8	4.85 <i>d</i> ($J= 5.1$ Hz, 1H)	87.5	
6	4.83 <i>s</i> (1H)	86.5	4.83 <i>s</i> (1H)	85.8	
5	-	90.7	-	91.7	
CH₂ (a)	5.97 <i>s</i> (2H)	100.1	5.97 <i>s</i> (2H)	101.1	
CH₂ (b)	6.00 <i>s</i> (2H)	100.2	6.00 <i>s</i> (2H)	101.2	
2'	6.93 <i>d</i> ($J= 1.5$ Hz, 1H)	105.9	6.97-6.79 <i>m</i> (6H)	106.9	
2''	6.96 <i>d</i> ($J= 1.5$ Hz, 1H)	106.4		107.4	
6'	6.88 <i>dd</i> ($J= 8.0$ Hz, $J= 1.5$ Hz, 1H)	107.2		108.2	
6''	6.89 <i>dd</i> ($J= 8.0$ Hz, $J= 1.5$ Hz, 1H)	107.6		108.6	
5'	6.81 <i>d</i> ($J= 8.0$ Hz, 1H)	118.8		119.7	
5''	6.86 <i>d</i> ($J= 8.0$ Hz, 1H)	119.0		120.0	
1'	-	128.1		-	129.1
1''	-	133.6		-	134.6
4'	-	146.3	-	147.2	
4''	-	146.9	-	147.9	
3'	-	147.0	-	147.9	
3''	-	147.2	-	148.1	
OH	1.5 <i>s</i> (2H)		1.61 <i>s</i> (1H)		

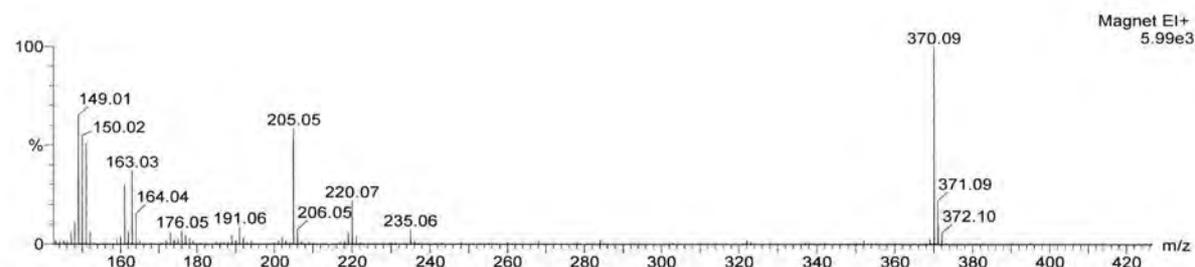
L'ensemble de ces données qui sont en accord avec celle indiquées dans la littérature, nous permettent d'établir la structure de R30-34 comme étant : le (\pm)-Paulownine, qui a été rapporté une seule fois dans la littérature, en 1963 par Takahashi, qui l'ont isolé de l'espèce *Paulownia tomentosa* (kiri) (Takahashi *et al.*, 1963).



(\pm)-Paulownine

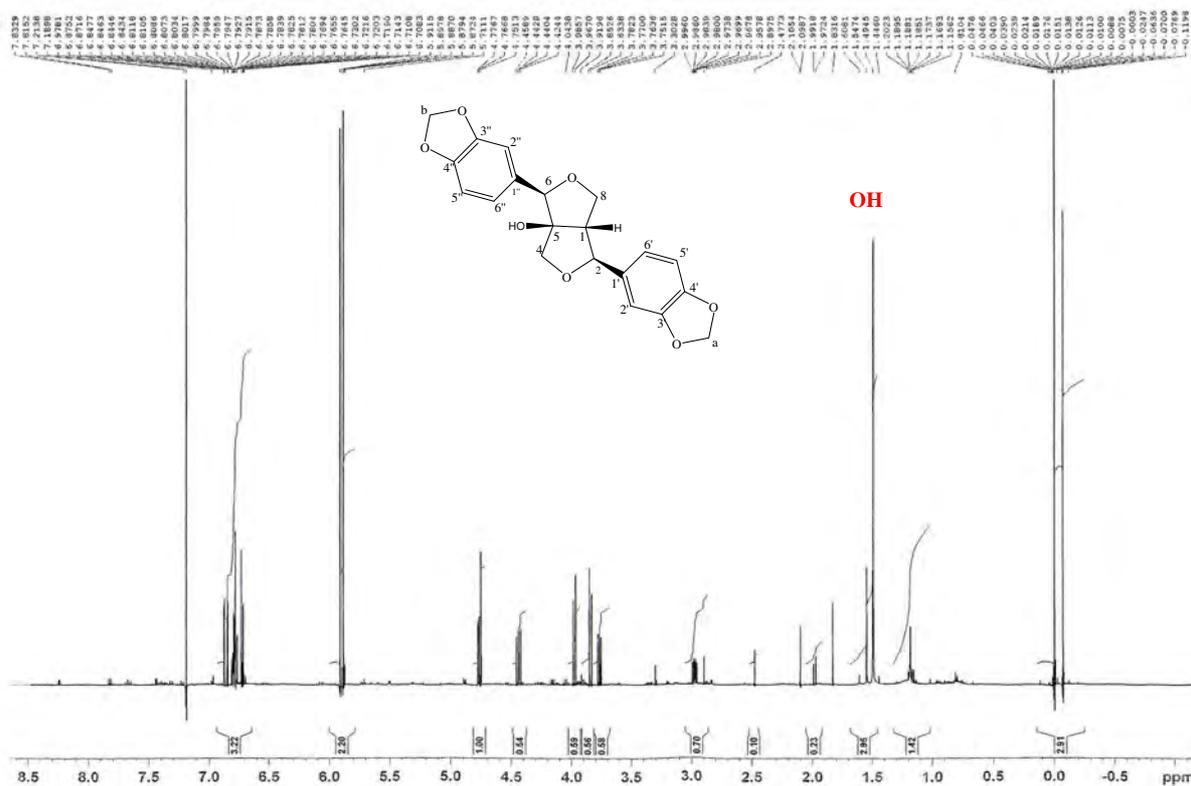


Spectre N°52. Spectre de masse en mode impact électronique du composé R30-34.

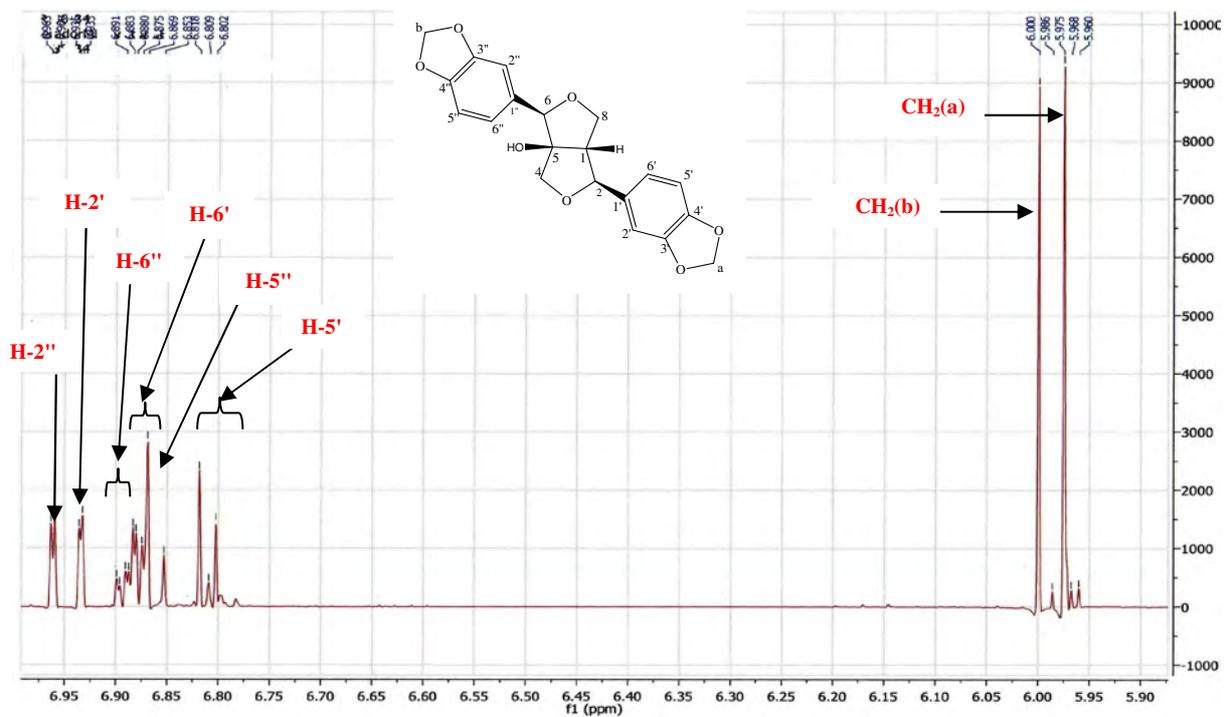


Mass	RA	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula
370.1256	20.18	370.1264	-0.8	-2.1	7.0	C17 H22 O9
370.1341	7.46	370.1358	-1.7	-4.5	20.0	C28 H18 O
371.0715	9.33	371.0708	0.7	1.8	21.5	C26 H11 O3
371.0758	12.77	371.0767	-0.9	-2.4	12.5	C19 H15 O8
371.0843	17.98	371.0826	1.7	4.7	3.5	C12 H19 O13
		371.0861	-1.8	-4.8	25.5	C30 H11
371.0929	21.59	371.0919	1.0	2.6	16.5	C23 H15 O5
371.0971	19.62	371.0978	-0.7	-1.9	7.5	C16 H19 O10
371.1057	16.76	371.1072	-1.5	-4.1	20.5	C27 H15 O2
371.1142	12.09	371.1131	1.1	3.0	11.5	C20 H19 O7
371.1184	8.60	371.1190	-0.6	-1.5	2.5	C13 H23 O12
370.1044	80.28	370.1053	-0.9	-2.3	12.0	C20 H18 O7
370.1128	58.38	370.1111	1.7	4.5	3.0	C13 H22 O12
370.1214	29.33	370.1205	0.9	2.4	16.0	C24 H18 O4

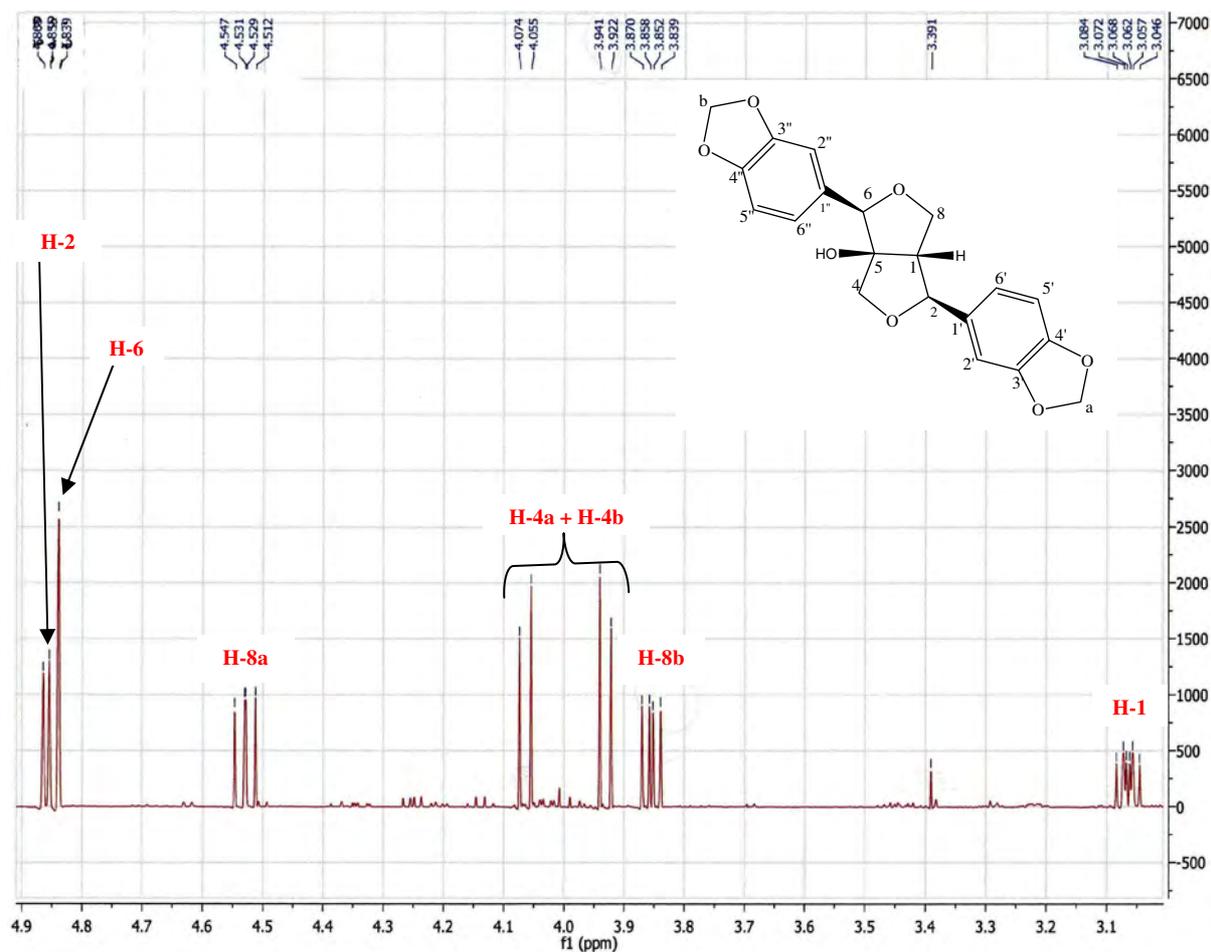
Spectre N°53. Spectre de masse HR-SMIE étalé du composé R30-34.



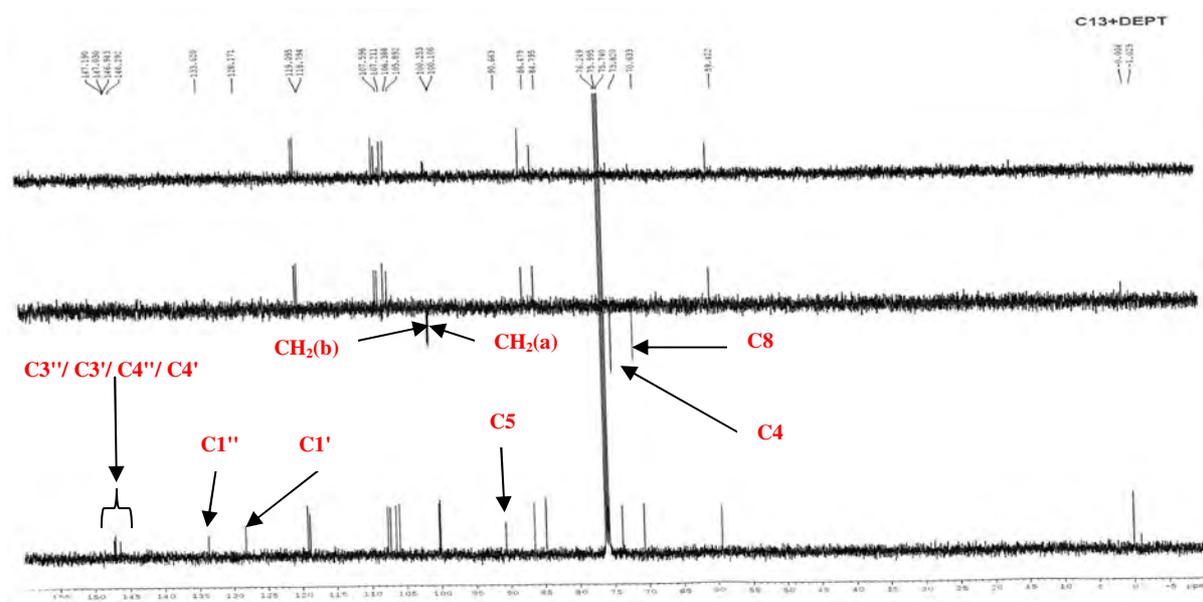
Spectre N°54. Spectre RMN ^1H du composé R30-34 (500 MHz).



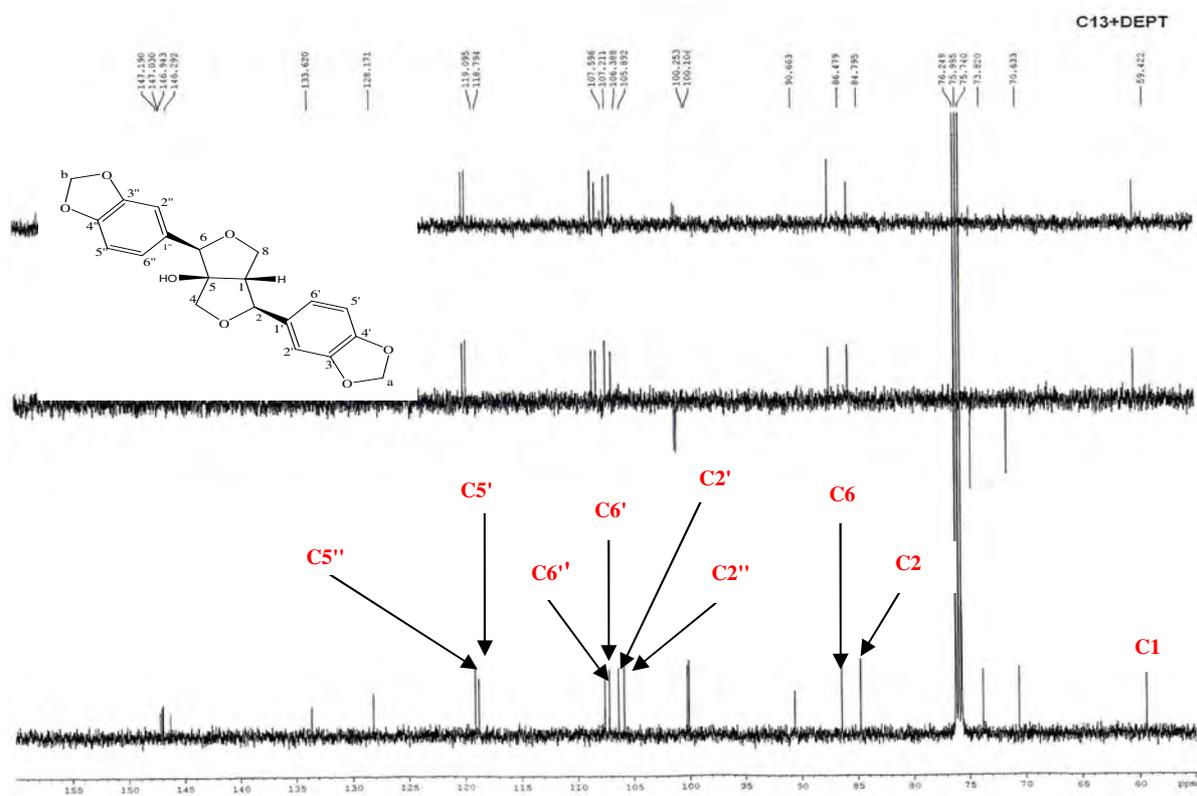
Spectre N°55. Spectre RMN ^1H étalé (5.9 à 7.0) du composé R30-34 (500 MHz).



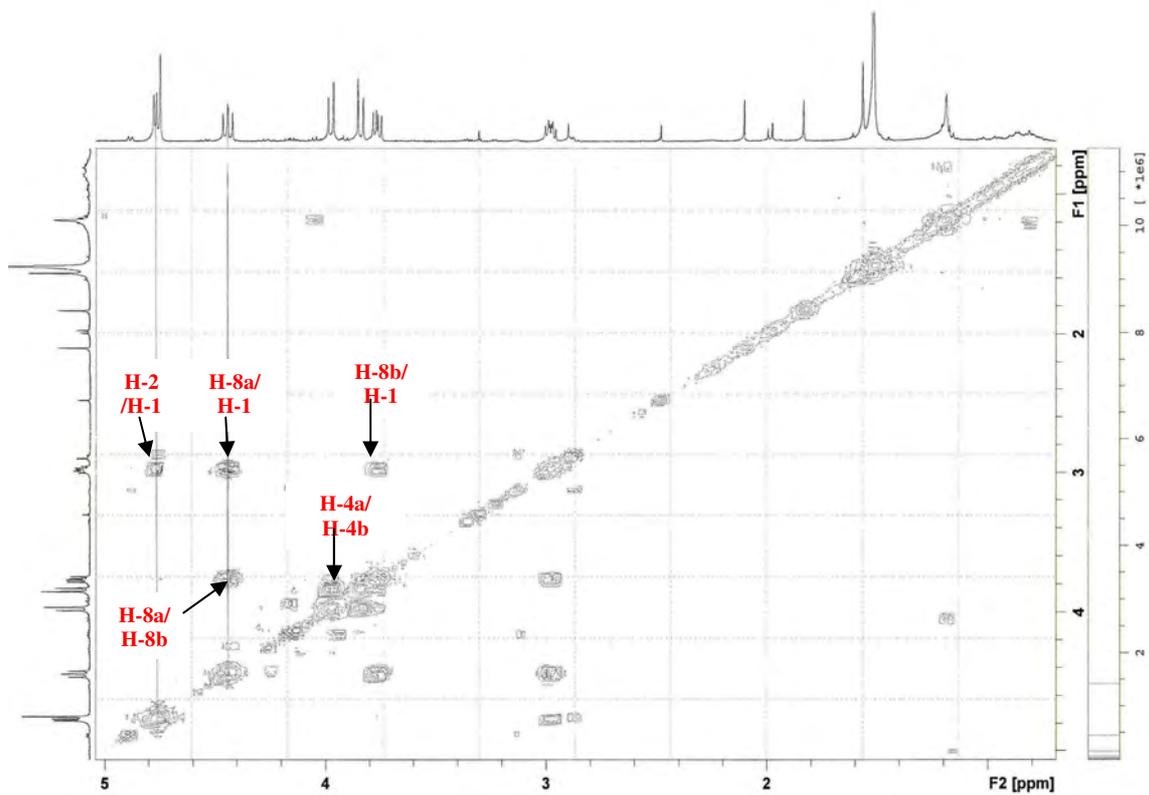
Spectre N°56. Spectre RMN ^1H étalé (3.0 à 4.9) du composé R30-34 (500 MHz).



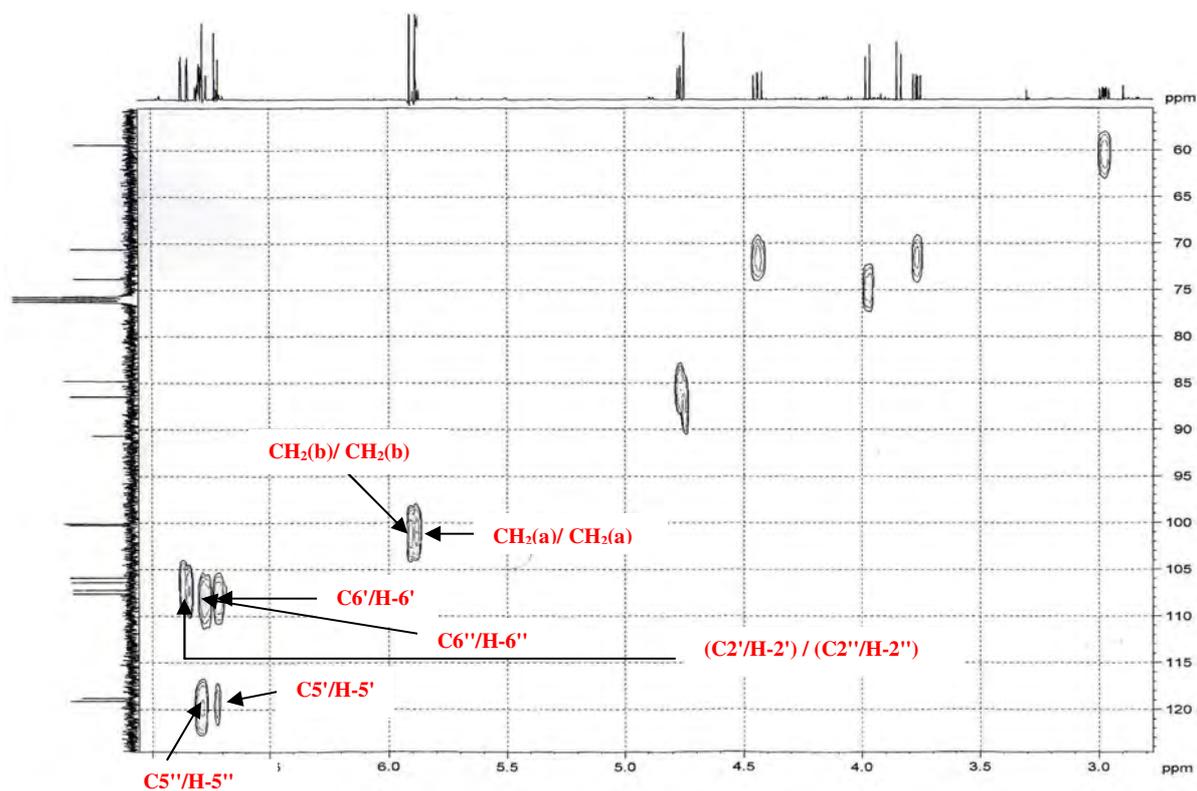
Spectre N°57. Spectre RMN ^{13}C DEPT 135 du composé R30-34 (125 MHz).



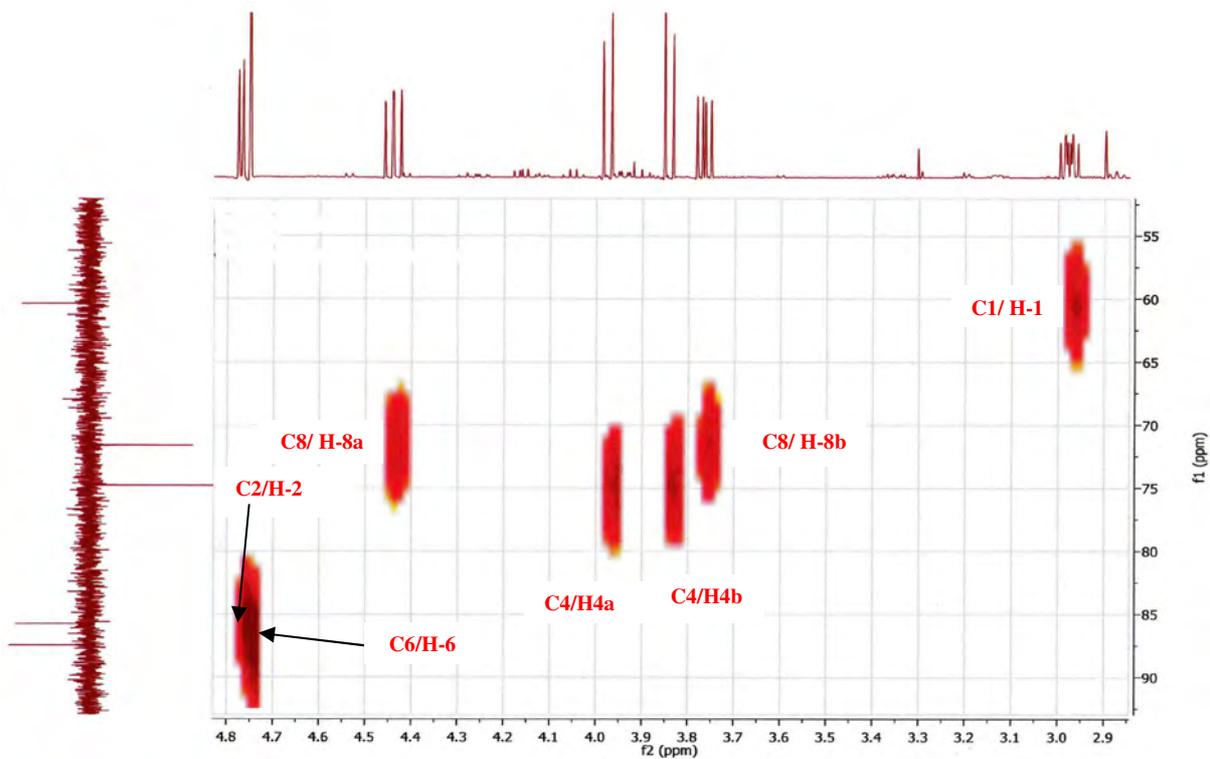
Spectre N°58. Spectre RMN ^{13}C DEPT 135 étalé (50 à 160 ppm) du composé R30-34 (125 MHz).



Spectre N°59. Spectre Cosy du composé R30-34 (400 MHz).

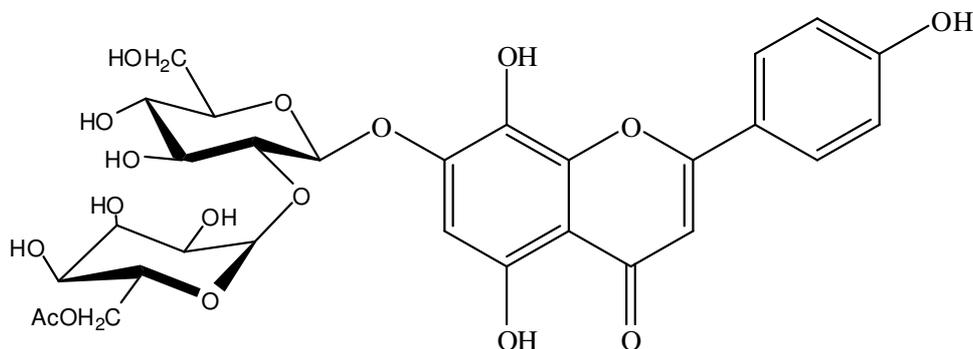


Spectre N°60. Spectre HSQC étalé (60 à 120 ppm) du composé R30-34 (500 MHz).



Spectre N°61. Spectre HSQC étalé (55 à 90 ppm) du composé R30-34 (500 MHz).

II.7.7. Elucidation du composé R141-151

**Isoscutellareine-7-O-(6''-O-acétyl- β -D-allosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucoside**

La structure de ce composé a été établie comme étant le isoscutellareine-7-O-(6''-O-acétyl- β -D-allosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucoside. Ce composé étant strictement identique au produit SMB1 déjà décrit (page 63), sa détermination structurale n'est pas redétaillée ici. De même, pour les données de RMN du ^1H et du ^{13}C , on pourra se reporter au tableau II.10 (page 68).

II. 8. Conclusion

En résumé, d'après nos résultats, nous pouvons dire que l'espèce *S. mialhesi* de Noé. est riche en métabolites secondaires. Son étude phytochimique a permis l'obtention de 7 produits purs. Parmi les sept produits, le SMB1 se trouve être le mieux accumulé par cette espèce, en effet, il faut noter l'obtention d'une quantité d'environ 6g.

Références bibliographiques

Agrawal, P.K. 1989. Carbon-13 NMR of flavonoids. Central Institute of Medical and Aromatic Plants, India. Edition Elsevier, New York.

Akihisa, T., Shimizu, N., Ghosh, P., Thakur, S., Rosenstein, F.U., Tamura, T., Matsumoto, T. 1987. Sterols of the Cucurbitaceae. *Phytochemistry*, 26, 1693-1706.

Alvarez, J.K. 2007. Aislamiento, purificación e identificación de sesamina a partir de lodos de microfiltrado en la fabricación del aceite virgen de *Sesamum indicum* L. (ajonjolí), *Rev. Col. Cienc. Quim. Farm.*, 36(1), 5-10.

Angel, S.R., Choi, I., Tham, F.S. 2008. Stereoselective synthesis of 3-alkyl-2-aryltetrahydrofuran-4-ols: total synthesis of (±)-Paulownin, *J. Org. Chem.*, 73, 6268-6278.

Aritomi, M. 1963. Terniflorin, a new flavonoid compound in flowers of *Clematis terniflora* var. *robusta*. *Chem. Pharm. Bull.*, 11, 1125-1228.

Greger, H., Hofer, O. 1980. New unsymmetrically substituted tetrahydrofurofuran lignans from *Artemisia absinthium*, *Tetrahedron*, 36, 3551-3558.

Hearon, W.M. and MacGregor, W.S. 1955. The naturally occurring lignans. *Chem. Rev.*, 55, 957-1068.

Jonathan, L.T., Che, C.T., Pezzuto, J.M., Fong, H.S., Farnsworth, N.R. 1989. 7-O-Methylhorminone and other cytotoxic diterpene quinone from *Lepechinia bullata*. *J. Nat. Prod.*, 52(3), 571-575.

Jonot, M.M., Potier, P. 1964. Identification of a quinone isolated from *Horminella: Horminum pyrenaicum* L. (labiatae) with 7-hydroxyroyleanone. *Ann. Pharm. Fr.*, 22, 387-395.

Kupchan, S.M., Karim, A., Marck, C. 1968. Tumor inhibitors. XXXIV. Taxodione and taxodone, two novel diterpenoid quinone methide tumor inhibitors from *Taxodium distichum*. *J. American Chem. Soc.*, 90(21), 5923-5942.

Lenherr, A., Lahloub, M.F., Sticher, O. 1984. Three flavonoid glucosides containing acetylated allose from *Stachys recta*. *Phytochemistry*, 23(10), 2343-2345.

Lenherr, A., Mabry, T.J. 1987. Acetylated allose-containing flavonoid glucosides from *Stachys anisochila*. *Phytochemistry*, 26(4), 1185-1188.

Li, Y., Ye, M., Liu, H.W., Ji, X.H., Yan, Y.N. 2000. Identification and determination of (+)-sesamin in *Semen cuscutae* by capillary GC and GC-MS. *Chinese Chem. Letts.*, 11(12), 1076-1076.

Markham, K.R., Chari, V.M. 1982. Carbon-13 NMR spectroscopy of flavonoids. In: *The Flavonoids: Advances in Research* (Harborne, J.B., Mabry, T.J.). Chapman & Hall, London.

Quezel, P., Santa, S. 1963. La nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II, Ed. CNRS, Paris, p. 360-361.

Rubinstein, I., Goad, L.J., Clague, A.D.H., Mulheirn, J.L. 1976. The 220 MHz NMR spectra of phytosterols. *Phytochemistry*, 15(1), 195-200.

Takahashi, K., Tanabe, Y., Kobayashi, K., Nakagawa, T. 1963. Constituents of medical plants. IV. Structure of paulownin, a component of wood of *Paulownia tomentosa*. *American Chem. Soc.*, 83, 1101-1105.

CHAPITRE III

DESCRIPTION DES TRAVAUX SUR L'ESPECE *STACHYS* *CIRCINNATA* L'HER

III. Etude chimique de l'espèce *Stachys circinnata* I'Her

III.1. Etude bibliographique

L'étude bibliographique menée sur le genre *Stachys*, a montré sa richesse en flavonoïde, terpenoïdes et phénylpropanoïdes.

III.2. Choix du matériel végétal

Pour l'ensemble de nos études et de celle-ci en particulier notre choix est guidé par :

L'endémisme de *Stachys circinnata* I'Her. au nord algérien.

L'utilisation des parties aériennes d'une espèce du genre *Stachys* en médecine traditionnelle en Iran.

Notre intérêt prononcé, comme signalé précédemment, au genre *Stachys* pour leur capacité d'accumulation de molécules à activité biologique potentielle.

III.3. Description botanique

D'après Quezel et Santa (1963), *Stachys circinnata* I'Her. est une plante endémique du Nord algérien, à feuilles épaisses ± réticulées gaufrées, revêtues d'un épais tomentum de poils courts. Epis florifères disjoints dans le bas, très dense dans le haut. Corolle rosée à anneau de poils oblique et incomplet (Voir figure III.1).

III.4. Répartition géographique

Elle est commune en Algérie et surtout en montagne.



Figure III.1. Photographie de *Stachys circinnata* I'Her.

III.5. Protocole expérimental

III.5.1. Récolte du matériel végétal

La plante a été récoltée dans la région de Constantine (Djebel El-ouahch), au mois de mai 2005. Elle a été identifiée par le Professeur Gérard De Bélair (faculté des sciences, Université Badji-Mokhtar, Annaba). Un échantillon a été déposé au Musée botanique de la Ville d'Angers (France) sous la référence MBAng2005.09. Après séchage dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires, les parties aériennes ont été pulvérisées et pesées (1000g).

III.5.2. Extraction

Les parties aériennes pulvérisées de *Stachys circinnata* I'Her. (M= 1000g) sont mises à macérer dans un mélange MeOH/H₂O (70:30 ; v/v) pendant 3 x 24^h.

Après filtration, concentration à une température n'excédant pas 45°C, on ajoute 300ml de H₂O distillée et le mélange est filtré. Le filtrat ainsi obtenu formant la phase aqueuse est épuisé une fois par de l'éther de pétrole, la phase organique est concentrée à sec donnant 2.3g d'extrait éther de pétrole.

La phase aqueuse est reprise et épuisée successivement par le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle, puis le *n*-butanol. Les trois phases organiques sont séchées et concentrées à sec donnant les extraits :

- dichlorométhane (09g).
- acétate d'éthyle (05g).
- *n*-butanol (25g).

L'organigramme N° III.1 montre les différentes étapes d'extraction de l'espèce *Stachys circinnata* I'Her.

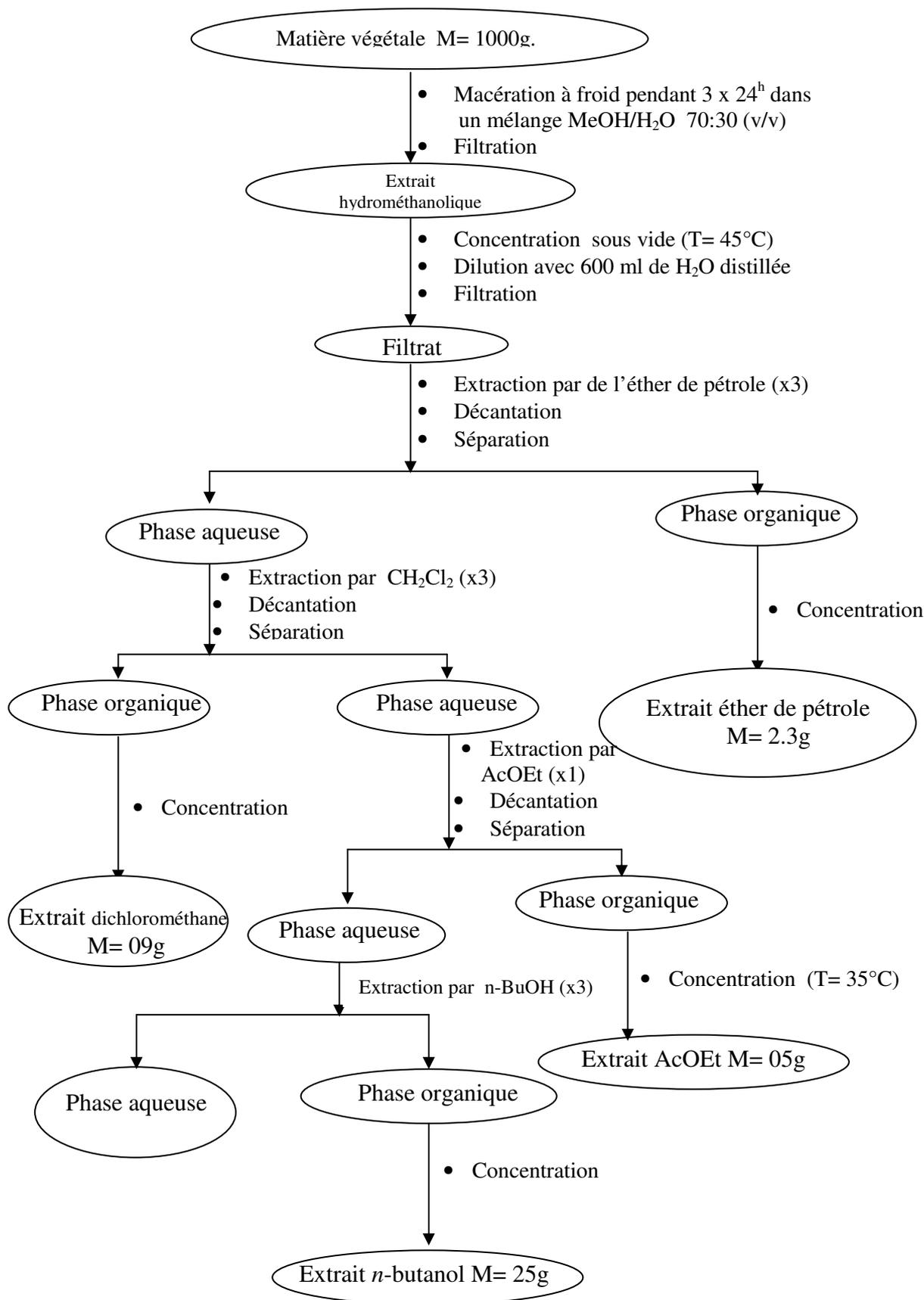


Schéma III.1. Organigramme récapitulatif des étapes d'extraction de l'espèce *Stachys circinnata* I'Her.

III.5.3. Séparation chromatographique

III.5.3.1. Séparation et purification des composés de l'extrait *n*-butanolique

Environ 10g de l'extrait *n*-butanolique sont déposés sur une colonne de polyamide SC₆. L'élution est réalisée par le système Toluène/méthanol de polarité croissante. Le fractionnement a été fait tous les 150ml. Le suivi des fractions a été effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support d'aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365nm), révélées par un mélange de vanilline et d'acide sulfurique dans l'éthanol ou l'anisaldéhyde additionné à l'acide sulfurique. Le rassemblement des pots effectués sur la base des données analytiques des plaques a permis l'obtention de 18 fractions. Le tableau III.1 regroupe la progression de cette colonne.

Tableau III.1. Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de polyamide SC₆ de l'extrait *n*-butanolique de *Stachys circinnata* l'Her.

N° du lot	Nom de la fraction	Système d'élution		Observations
		Toluène	Méthanol	
1	SCB01	100	0	/
2-8	SCB2-8	98	2	/
09-12	SCB09-12	98	2	Mélange complexe
13-15	SCB13-15	96	4	Mélange séparable
16-25	SCB16-26	92	8	Mélange séparable
26-27	SCB27	88	12	Mélange séparable
28-29	SCB28-29	85	15	Mélange séparable
30-31	SCB30-31	85	15	Mélange séparable
32	SCB32	85	15	Mélange séparable
33-34	SCB33-34	80	20	Mélange complexe
35	SCB35	80	20	Mélange complexe
36-37	SCB36-37	75	25	Mélange complexe
38	SCB38	75	25	Mélange séparable
39	SCB39	75	25	Mélange séparable
40-43	SCB40-43	70	30	Mélange complexe
44	SCB44	70	30	Mélange séparable
45-50	SCB45-50	65	35	Mélange complexe
51-58	SCB51-58	0	100	Mélange complexe

Fractionnement de la fraction SCB13-15

La fraction SCB13-15 a subi une chromatographie sur colonne de gel de silice avec un système d'éluant Isopropanol/Dichlorométhane (8:2).

Le produit majoritaire SCB13-15 (15mg) et, récolté, et la sous-fraction SCB13-15(1) est chromatographiée sur colonne de gel de silice, élue par l'acétate d'éthyle/dichlorométhane (3:2). Ainsi on a récolté le produit SCB13-15(1) (12mg).

Fractionnement de la fraction SCB27

La fraction SCB27, montre en CCM, sur gel de silice élue avec le système Acétate d'éthyle: Eau: Méthanol (10:1:1), un composé majoritaire de coloration violette sous UV.

Enfin, 14mg du produit SCB27-12 ont été récoltés.

Fractionnement de la fraction SCB28-29

La fraction SCB28-29 a été soumise à une chromatographie sur colonne de gel de silice. L'élution est réalisée par le système Acétate d'éthyle/Eau/Méthanol (10:1:1), les fractions ont été chromatographiées sur plaques préparatives de gel de silice avec le système Dichlorométhane/Méthanol (9:1) et a permis d'obtenir le composé SCB28-29 (09mg).

Fractionnement de la fraction SCB30-31

La recherche des conditions optimales de séparation de fraction SCB30-31 nous a orientés vers l'utilisation du papier Whatman N°3 et le système acide acétique (15%). Trois bandes (SCB30-31, SCB30-31-1, SCB30-31-2) ont été récupérées dans le méthanol, puis évaporées à sec.

La fraction SCB30-31 issue de la séparation précédente montre en CCM sur gel de silice élué avec le système Acétate d'éthyle/Eau/Méthanol (10:1:1) et après révélation à la lumière UV (254 et 365nm) et à la vanilline sulfurique une tache violette bien distincte correspondant au produit majoritaire. Cette fraction est soumise à une chromatographie sur plaques CCM préparatives conduisant au produit SCB30-31 (30mg).

Fractionnement de la fraction SCB33-34

La fraction SCB33-34 a subi une chromatographie sur colonne de gel de silice avec le système d'éluant Acétate d'éthyle/Eau/Méthanol (10:1:1).

Les sous-fractions obtenues sont analysées par chromatographie sur couche mince en utilisant différents systèmes. Le système Acétate d'éthyle/Eau/Méthanol (10:2:1) a permis d'isoler le produit pur SCB33-34(2) (30mg) ; alors que le système Acétate d'éthyle/Eau/Méthanol (8:1:1), a permis d'obtenir 40mg du produit SCB33-34(4).

Fractionnement de la fraction SCB38

La fraction SCB38 est soumise à une chromatographie sur colonne de gel de silice avec le système d'élution : Acétate d'éthyle/Eau/Méthanol (10:2:1).

Après analyse des fractions récoltées par chromatographie sur couche mince CCM, en utilisant le système : Acétate d'éthyle/Eau/Méthanol (10:2:1), on a récolté 25mg du composé SCB38.

Fractionnement de la fraction SCB44

La fraction SCB44 a été mise à chromatographie sur colonne de gel de silice. L'élution a été réalisée en utilisant le système Acétate d'éthyle/Eau/Méthanol (10:2:1).

Les fractions recueillies sont analysées par chromatographie sur couche mince, en utilisant le système Acétate d'éthyle/Eau/Méthanol (10:1:1) à double élution pour donner 50mg du produit SCB44.

En résumé, d'après nos résultats, nous pouvons dire que l'espèce *S. circinnata* est assez riche en métabolites secondaires. L'étude phytochimique a permis l'obtention de neuf produits purs.

III.5.3.2. Séparation et purification des composés de l'extrait dichlorométhane

Malgré l'affrontement à l'éther de pétrole, l'extrait dichlorométhane était de couleur vert sombre témoignant de la présence de la chlorophylle. Ainsi les tests chromatographiques réalisés sur cet extrait ont confirmé la présence de chlorophylle qui'a été éliminée à l'aide du charbon actif. Et le choix du système d'élution : Cyclohexane/AcOEt en gradient de polarité.

Séparation sur colonne

L'extrait dichlorométhane (09g) a subi une chromatographie sur colonne de gel de silice 60 (70-230 mesh) avec le système d'éluant Cyclohexane/AcOEt à gradient croissant.

Le suivi de ces fractions a été effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support d'aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365nm) puis révélées avec de l'acide sulfurique et chauffées pendant 1min à 100°C. Les résultats de cette colonne sont rassemblés dans le tableau III.2.

Tableau III.2. Les résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait dichloromethane.

Lots	Système d'élution	
	% Cyclohexane	% Acétate d'éthyle
1-2	100	0
3-5	98	2
6-8	96	4
9-15	94	6
16-24	90	10
25-32	88	12
33-44	86	14
45-54	82	18
55-58	80	20
49-64	76	24
65-81	70	30
82-92	60	40
93-108	50	50
109-112	40	60
113-116	80	80
117-172	0	100

Le regroupement des fractions a été effectué selon les données de la chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support d'aluminium, les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365nm), puis révélées avec l'acide sulfurique et chauffées à 100°C pendant 1min (voir tableau III.3).

Tableau III.3. Regroupement des fractions de l'extrait dichlorométhane de *Stachys circinnata* I'Her.

N° du lot	Non de la fraction	Observations
1-20	SCD1-20	Graisses et cires
21-25	SCD21-25	Mélange complexe
26	SCD26	Mélange de deux produits
27-35	SCD27-35	Graisses et cires
36	SCD36	Mélange complexe
37-38	SCD37-38	Mélange séparable
39	SCD39	Mélange complexe
40-48	SCD40-48	Mélange séparable
49	SCD49	Mélange complexe
50-60	SCD50-60	Mélange de deux produits
61-77	SCD61-77	Mélange complexe
78-85	SCD78-85	Graisses et cires
86-94	SCD86-94	Mélange complexe
95-100	SCD95-100	Mélange séparable
101-120	SCD101-120	Mélange séparable
121-140	SCD121-140	Mélange séparable
141-172	SCD141-172	Mélange complexe

Parmi les fractions recueillies, seules, les fractions SCD26, SCD36, SCD39, SCD78-85, SCD86-94 ont été étudiées jusqu'à la détermination structurale des principaux composés présents.

La fraction SCD26 et recristallisés avec l'acétate d'éthyle jusqu'à l'obtention des cristaux blancs, pour donner le composé SCD26 (mélanges de deux stérols) (30mg),

Les fractions SCD36 (60mg), SCD39 (100mg), SCD78-85 (180mg), SCD86-94 (90mg) ont été chromatographiées sur colonne de gel de silice 60 (70-230 mesh). L'élution est réalisée par le système Hexane/acétate d'éthyle (1:1), puis les sous-fractions obtenus sont recueillies et analysées par chromatographie sur couche mince en utilisant différents systèmes d'élution (Hexane/EtOAc et CH₂Cl₂/MeOH) avec différentes proportions.

Cette séparation a permis d'obtenir 4 triterpènes sous forme de poudre blanc ; SCD36 (10mg), SCD39 (12mg), SCD78 (18mg) et SCD86 (08mg).

En conclusion la phase dichlorométhane a permis de séparer 6 produits purs : 2 stérols et 4 triterpènes.

III.6. Caractérisation chimique et élucidation structurale des composés isolés

Les composés isolés ont été identifiés par les analyses spectroscopiques, particulièrement la RMN du ^1H , ^{13}C , Cosy, HSQC, HMBC ainsi que la spectroscopie de masse.

III.6.1. Elucidation de la structure du composé SCB13-15

III.6.1.1. Analyses physico-chimiques

- Fluorescence sous lampe Wood : bleu fluorescent, caractéristique aux acides phénoliques.
- $R_f = 0.54$ dans le système (Toluène/MEC/MeOH 4:3:3) et $R_f = 0.35$ dans le système ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}/\text{MEC}/\text{Acétylacétone}$ 13:3:3:1).

III.6.1.2. Analyses spectroscopiques

Le spectre de masse du composé SCB13-15 (Spectre N°01), obtenu à haute résolution en mode électrospray positif (SM-ESI), donne un ion pseudomoléculaire $[\text{M}+\text{Na}]^+$ à $m/z = 397.0908$, suggérant une masse moléculaire de 374. Cette masse est compatible avec la formule brute $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_8$.

Le spectre de RMN du ^1H enregistré dans le CD_3OD (Spectre N°02-04) montre la présence de 2 systèmes ABX à $\delta_{\text{H}} = 6.95$ ppm (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-2), $\delta_{\text{H}} = 6.86$ ppm (1H, dd, $J = 8.2$ Hz, $J = 2.1$ Hz, H-6), $\delta_{\text{H}} = 6.68$ ppm (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5) et à $\delta_{\text{H}} = 6.61$ ppm (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-2'), $\delta_{\text{H}} = 6.59$ ppm (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5'), $\delta_{\text{H}} = 6.47$ ppm (1H, dd, $J = 8.1$ Hz, $J = 2.1$ Hz, H-6'). On observe également deux doublets à $\delta_{\text{H}} = 7.45$ ppm (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7), $\delta_{\text{H}} = 6.16$ ppm (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8), indiquant la présence de deux protons vicinaux (les protons oléfiniques), d'une double liaison de configuration trans. Leurs déplacements chimiques déblindés pourraient être dus à une conjugaison de la double liaison avec un carbonyle. De plus on observe aussi, un proton oxygéné à $\delta_{\text{H}} = 5.09$ ppm (1H, dd, $J = 7.6$ Hz, $J = 5.2$ Hz, H-8'), des protons méthylènes à $\delta_{\text{H}} = 2.98$ ppm (1H, m, H-7') et les protons de méthyle à $\delta_{\text{H}} = 3.60$ ppm sous forme d'un singulet.

Le spectre RMN du ^{13}C (Spectre N°05-06) confirme la présence de 19 carbones, permettant de distinguer 1 carbone secondaire, 8 quaternaires, 9 carbones tertiaires et un groupement méthoxyle. Parmi eux, quatre ont des déplacements chimiques caractéristiques indiquant qu'il s'agit de carbones phényle oxygénés $\delta_{\text{C}} = 148.5$ ppm (C-4), $\delta_{\text{C}} = 145.4$ ppm (C-3), $\delta_{\text{C}} = 144.8$ ppm (C-3'), $\delta_{\text{C}} = 144.0$ ppm (C-4'), deux carbones ester à $\delta_{\text{C}} = 170.8$ ppm (C-9'), $\delta_{\text{C}} = 167.0$ ppm (C-9), un carbone oléfinique conjugué à $\delta_{\text{C}} = 146.6$ ppm (C-7). (Woo et Piao, 2004).

La RMN du ^{13}C montre aussi la présence du signal ($\delta_{\text{C}} = 113.9$ ppm) qui correspond au carbone insaturé en α qui corrélé avec les protons *trans*-oléfiniques. Ces données confirment la présence d'un groupe caféoyle (Wang *et al.*, 2000).

Les signaux à $\delta_{\text{H}} = 2.98$ ppm (2H, m), $\delta_{\text{H}} = 5.09$ ppm (1H, dd, $J = 7.6$ Hz, $J = 5.2$ Hz), sont attribuées aux $-\text{OCH}(\text{CO})\text{CH}_2-$. (Wang *et al.*, 2000).

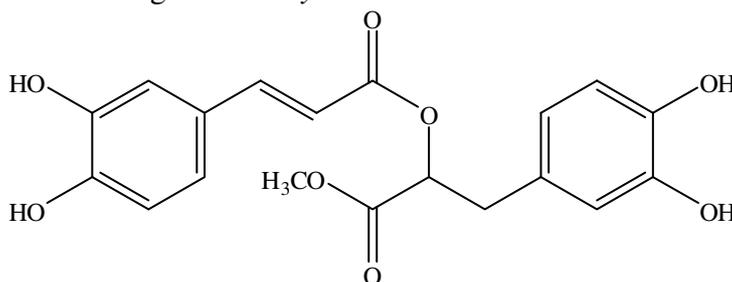
L'ensemble de ces données permet d'attribuer à l'acide phénolique considéré la structure : du rosmarinat de méthyle.

Les déplacements chimiques observés en RMN du ^1H et du ^{13}C sont présentés dans le tableau III.4 et confrontés avec des données de RMN du ^1H et RMN du ^{13}C trouvés dans la littérature (Wang *et al.*, 2000; Woo et Piao, 2004).

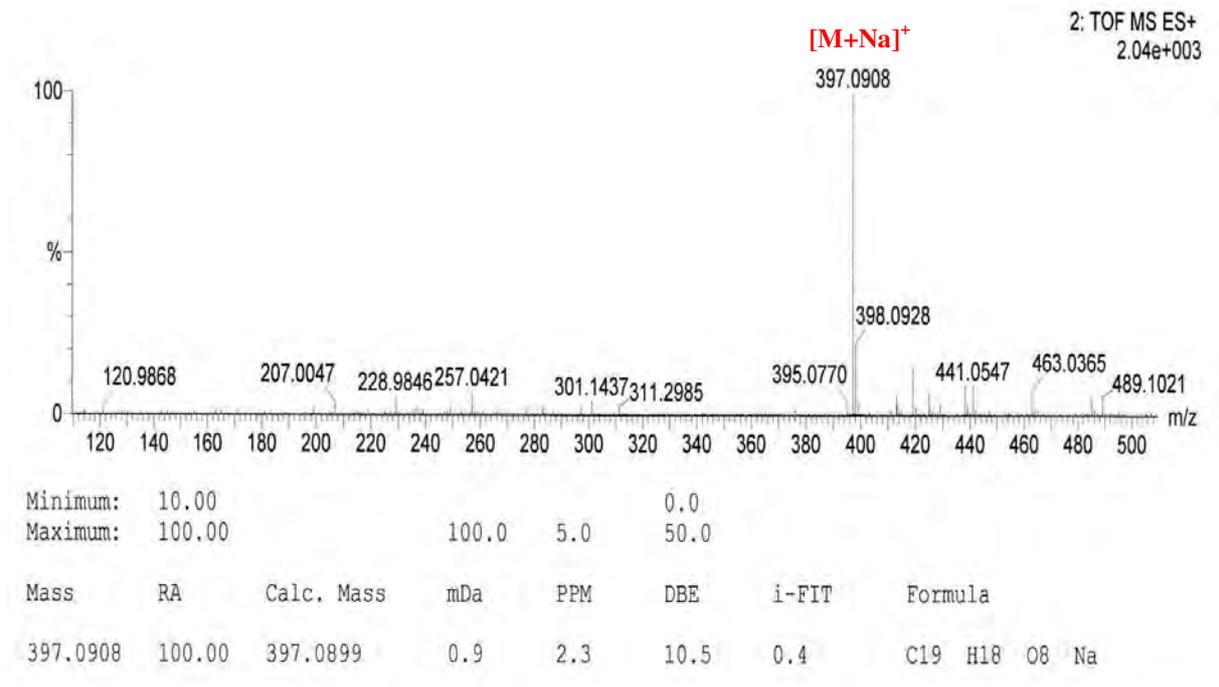
Tableau III.4. RMN du ^1H et du ^{13}C du composé SCB13-15 (500 MHz, δ , J en Hz ; 125 MHz, δ) et du rosmarinate de méthyle dans le CD_3OD (500 MHz, δ , J en Hz ; 125 MHz, δ).

Position	Composé SCB13-15		Rosmarinate de méthyle	
	^1H (δ ppm)	^{13}C	^1H (δ ppm)	^{13}C
1	-	126.2	-	125.3
2	6.95 <i>d</i> ($J=2.1$ Hz, 1H)	112.8	7.06 <i>d</i> ($J=2.0$ Hz, 1H)	112.9
3	-	145.4	-	145.5
4	-	148.5	-	148.6
5	6.68 <i>d</i> ($J=8.2$ Hz, 1H)	115.0	6.77 <i>d</i> ($J=8.0$ Hz, 1H)	115.4
6	6.86 <i>dd</i> ($J=8.2$ Hz, $J=2.1$ Hz, 1H)	121.8	7.01 <i>dd</i> ($J=8.0$ Hz, $J=2.0$ Hz, 1H)	121.8
7	7.45 <i>d</i> ($J=15.9$ Hz, 1H)	146.6	7.48 <i>d</i> ($J=16.0$ Hz, 1H)	146.2
8	6.16 <i>d</i> ($J=15.9$ Hz, 1H)	113.9	6.26 <i>d</i> ($J=16.0$ Hz, 1H)	114.8
9	-	167.0	-	165.8
1'	-	127.4	-	126.6
2'	6.61 <i>d</i> ($J=2.1$ Hz, 1H)	116.2	6.64 <i>d</i> ($J=2.0$ Hz, 1H)	116.6
3'	-	144.8	-	144.9
4'	-	144.0	-	144.0
5'	6.59 <i>d</i> ($J=8.1$ Hz, 1H)	115.2	6.61 <i>d</i> ($J=8.0$ Hz, 1H)	115.7
6'	6.47 <i>dd</i> ($J=8.1$ Hz, $J=2.1$ Hz, 1H)	120.4	6.49 <i>dd</i> ($J=8.0$ Hz, $J=2.0$ Hz, 1H)	120.0
7'	2.98 <i>m</i> (2H)	36.5	2.95 <i>m</i> (2H)	36.1
8'	5.09 <i>dd</i> ($J=7.6$ Hz, $J=5.2$ Hz, 1H)	73.3	5.12 <i>dd</i> ($J=7.5$ Hz, $J=5.2$ Hz, 1H)	72.7
9'	-	170.8	-	169.8
OCH ₃	3.60 <i>s</i> (3H)	51.3	3.63 <i>s</i> (3H)	51.9

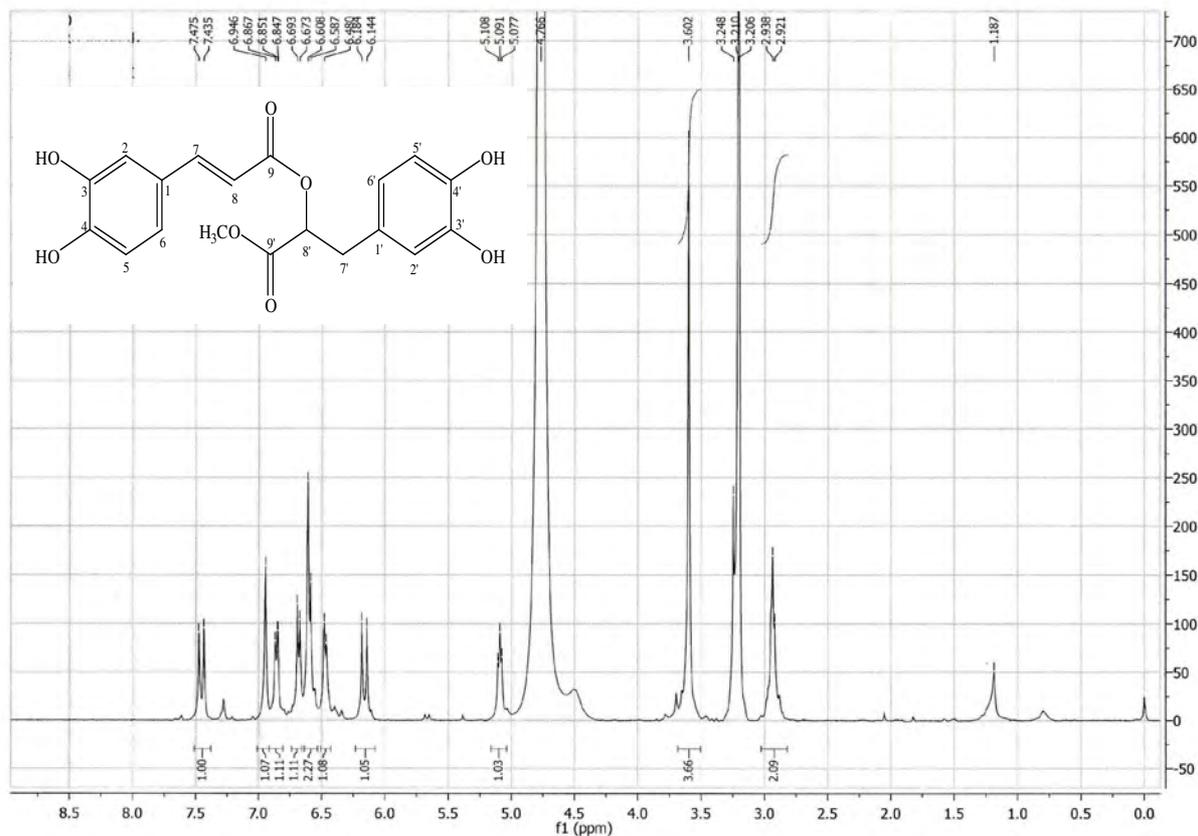
La structure du composé SCB13-15 est donc établie comme étant le rosmarinate de méthyle ou 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-hydroxypropanoic acide 2-*O*-(3,4-dihydroxyphenyl-2*E*-cinnamoyl) méthyle ester. Ce composé est connu, il a été isolé pour la première fois de *Clinopodium laxiflorum* (Lamiaceae) (Pfeffer *et al.*, 1979), l'acide rosmarinique a été isolé pour la première fois de *Rosmarinus officinalis* (Scarpati et oriente, 1958). Ce composé est isolé pour la première fois du genre *Stachys*.



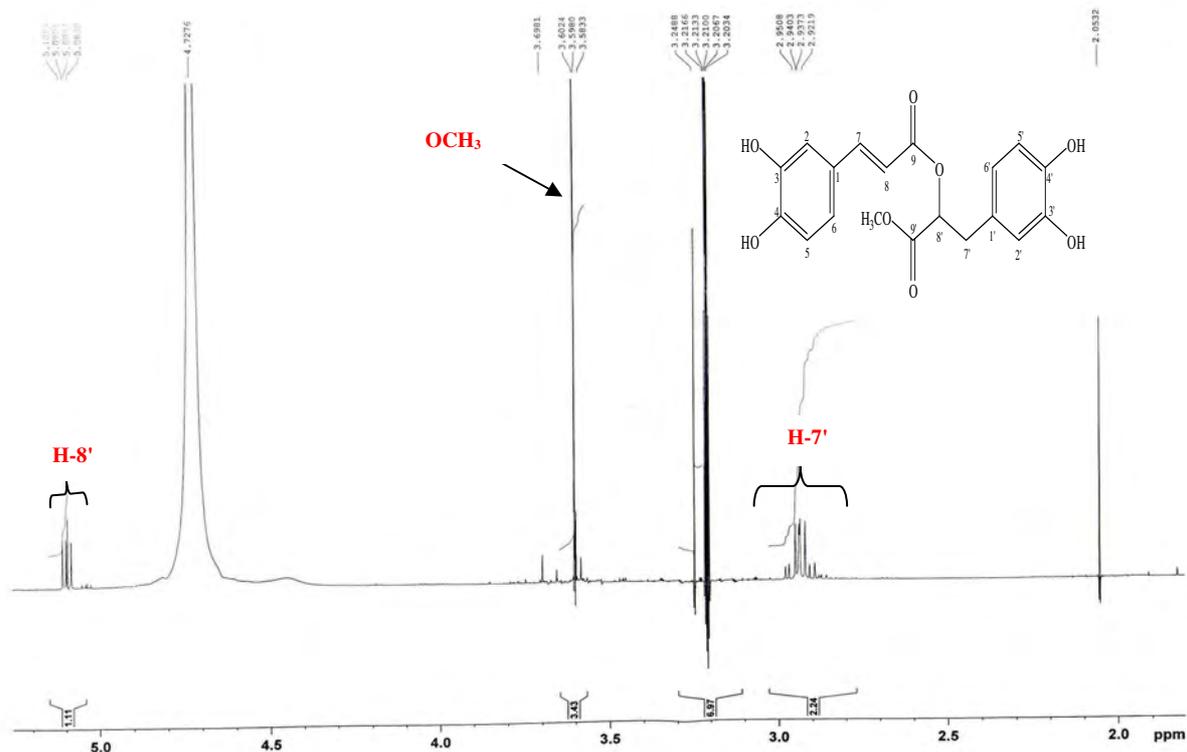
Le rosmarinate de méthyle



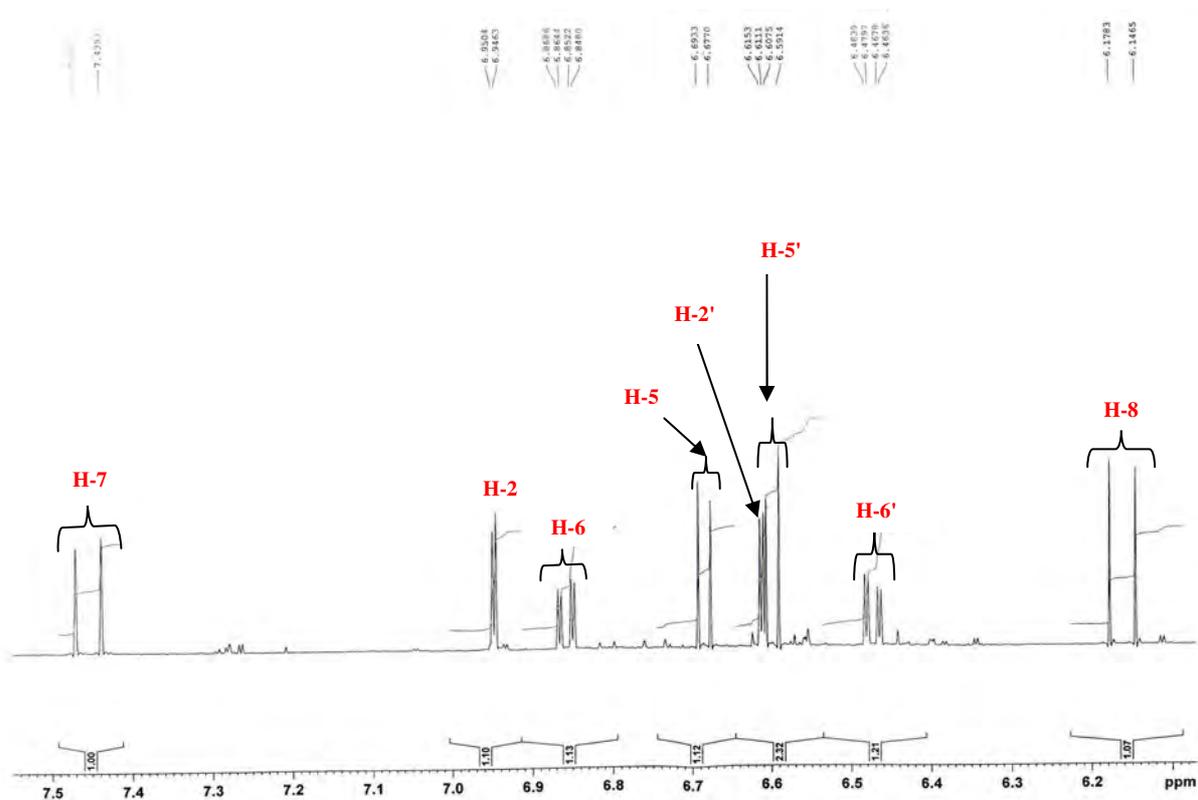
Spectre N°01. Spectre de masse en mode électrospray du composé SCB13-15.



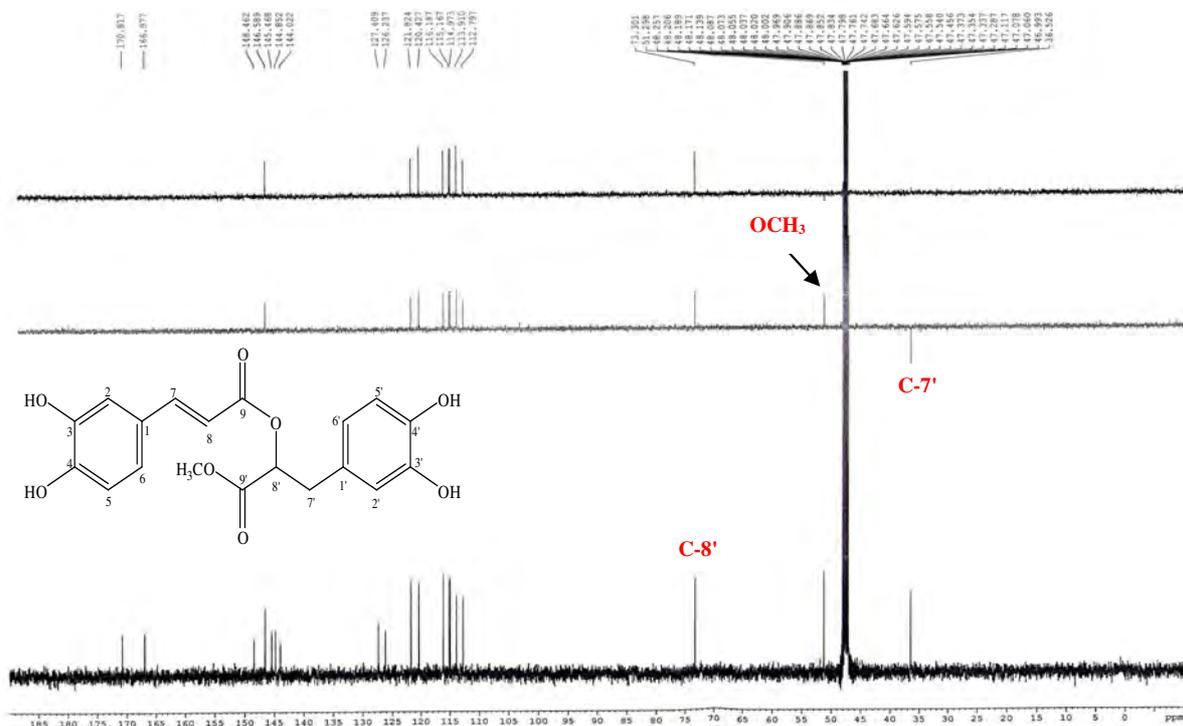
Spectre N°02. Spectre RMN ¹H du composé SCB13-15 (400 MHz).



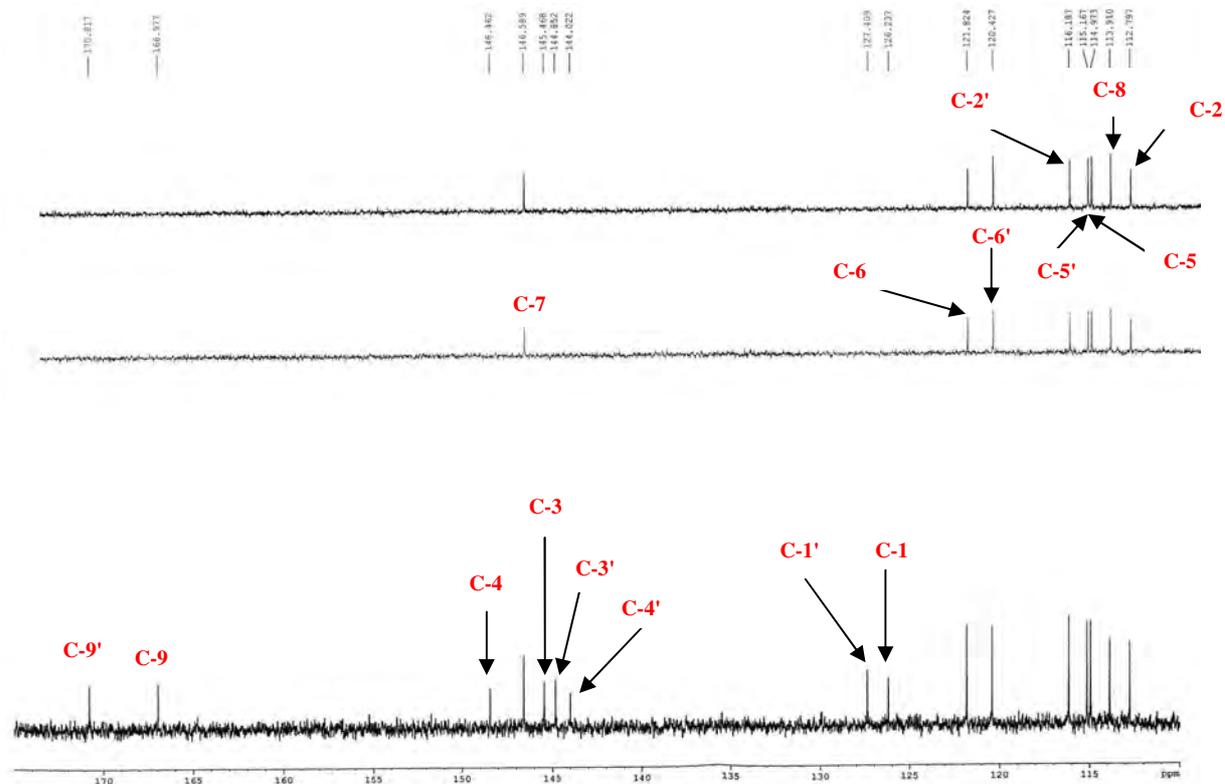
Spectre N°3. Spectre RMN ^1H étalé (2.0 à 5.5 ppm) du composé SCB13-15 (500 MHz).



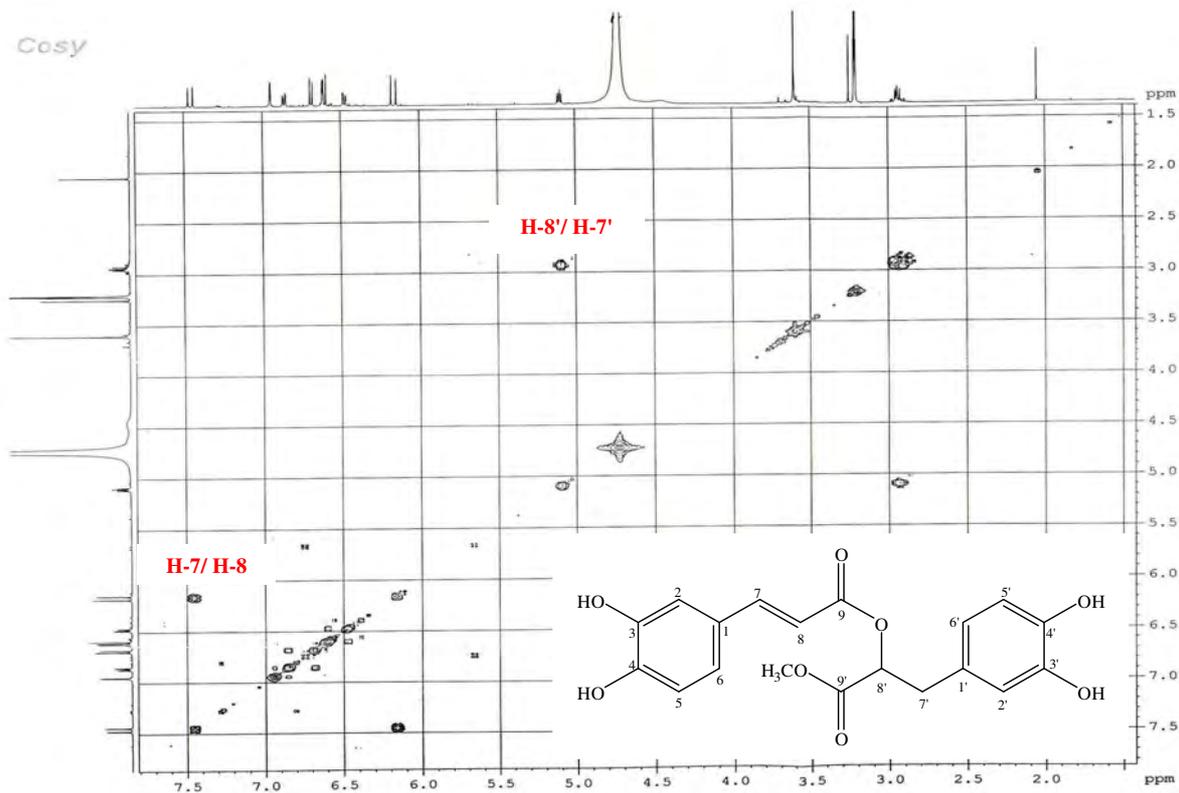
Spectre N°04. Spectre RMN ^1H étalé (6.1 à 7.5 ppm) du composé SCB13-15 (500 MHz).



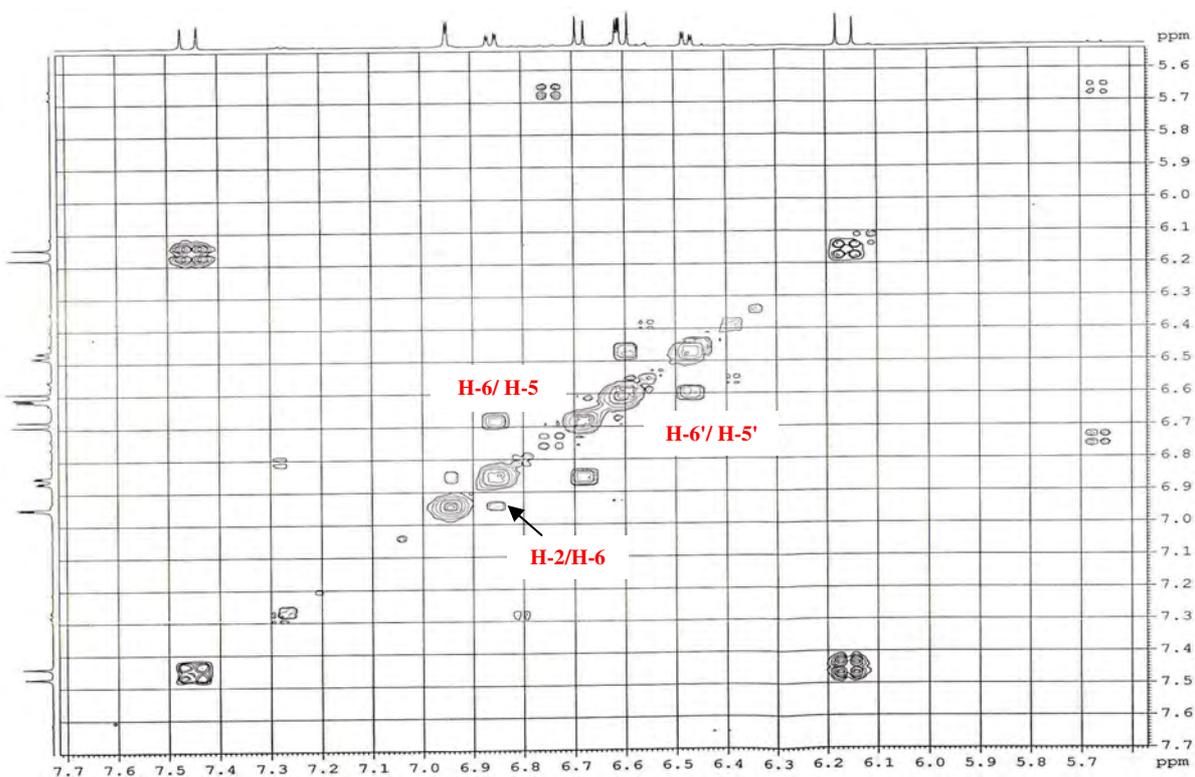
Spectre N°05. Spectre RMN ¹³C du composé SCB13-15 (125 MHz).



Spectre N°06. Spectre RMN ¹³C étalé (100 à 175 ppm) du composé SCB13-15 (125 MHz).



Spectre N°07. Spectre Cosy du composé SCB13-15 (500 MHz).



Spectre N°08. Spectre Cosy étalé (5.6 à 7.7 ppm) du composé SCB13-15 (500 MHz).

III.6.2. Elucidation de la structure du composé SCB13-15(1)

III.6.2.1. Analyses physico-chimiques

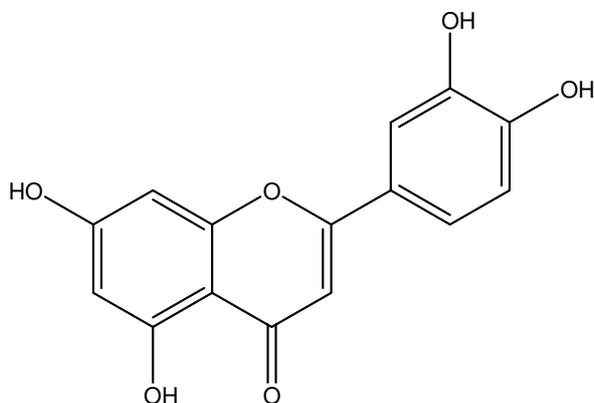
- Fluorescence sous lampe Wood : violette.
- $R_f = 0.24$ dans le système (Toluène/MEC/MeOH 4:3:3) et $R_f = 0.11$ dans le système (H₂O/MeOH/MEC/Acétylacétone 13:3:3:1).

III.6.2.2. Analyses spectroscopiques

La spectrométrie de masse enregistré à haute résolution en mode d'ionisation chimique du composé SCB13-15(1) (Spectre N°09-10) permet d'observer le pic moléculaire $[M]^+$ à $m/z = 286.0410$, compatible avec la formule brute C₁₅H₁₀O₆. Cette dernière est confirmée par le spectre RMN du ¹³C (Spectre N° 13-14) qui présente effectivement 15 signaux.

Ce produit présente un aspect plus simple en RMN du ¹H (Spectre N°11 - 12). Dans la région des aromatiques, deux doublets résonnant à $\delta_H = 6.44$ ppm ($J = 2.0$ Hz) et $\delta_H = 6.18$ ppm ($J = 2.0$ Hz) attribués respectivement à H-8 et H-6. Le singulet observé à $\delta = 6.65$ ppm est dû à la résonance de H-3. En revanche, on observe la présence de système ABX du cycle B : $\delta_H = 6.89$ ppm (d, $J = 8.5$ Hz, H-5'); $\delta_H = 7.40$ ppm (dd, $J = 8.0$ Hz, $J = 2.0$ Hz, H-6') ; $\delta_H = 7.42$ ppm (d, $J = 2.0$ Hz, H-2'). Ceci indique une disubstitution du cycle B en 3' et 4'. Un signal à $\delta_H = 12.98$ ppm confirmant la présence d'un OH en 5. La génine serait donc le lutéolol (ou la lutéoline).

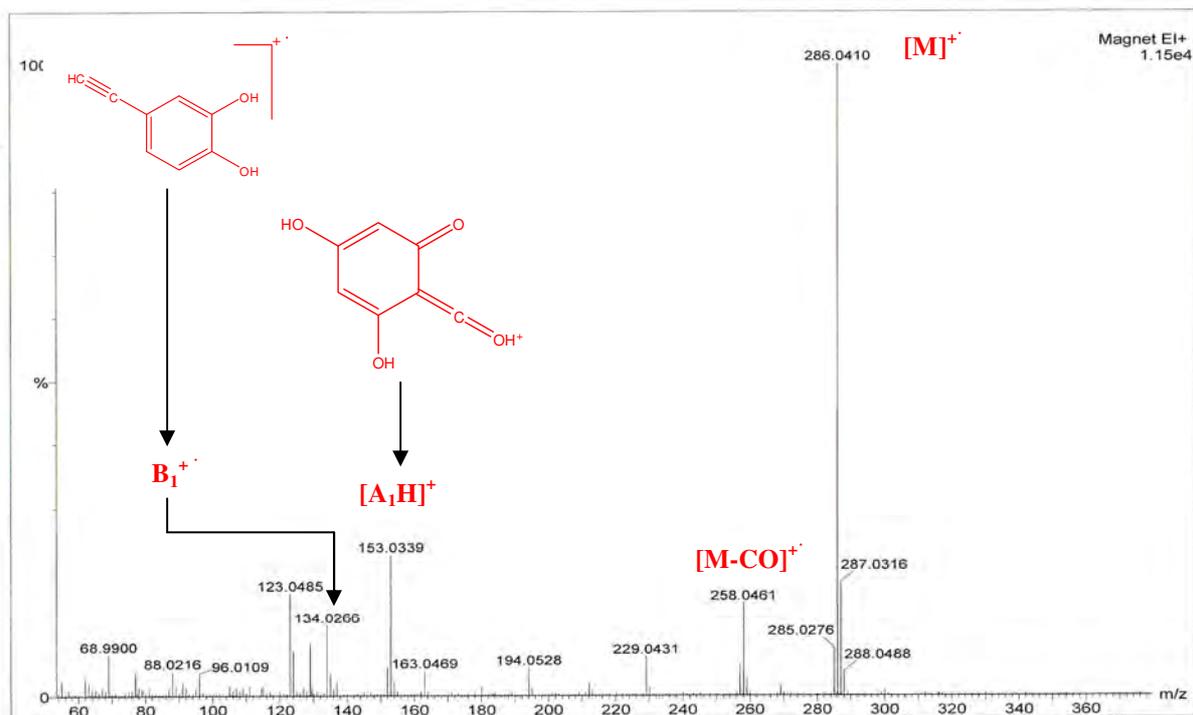
La structure du composé SCB13-15(1) a donc pu être établie comme étant le 5, 7, 3', 4'-tétrahydroxyflavone, généralement appelé lutéolol. Ce composé est anciennement connu, a été signalé dans l'espèce *Hieracium pilosella* (Haag-berrurier et Duquenois, 1962). Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN du ¹H et du ¹³C sont présentés dans le tableau III.5 avec leurs attributions et ceux trouvés dans la littérature (Harborne, 1994, Agrawal, 1989).



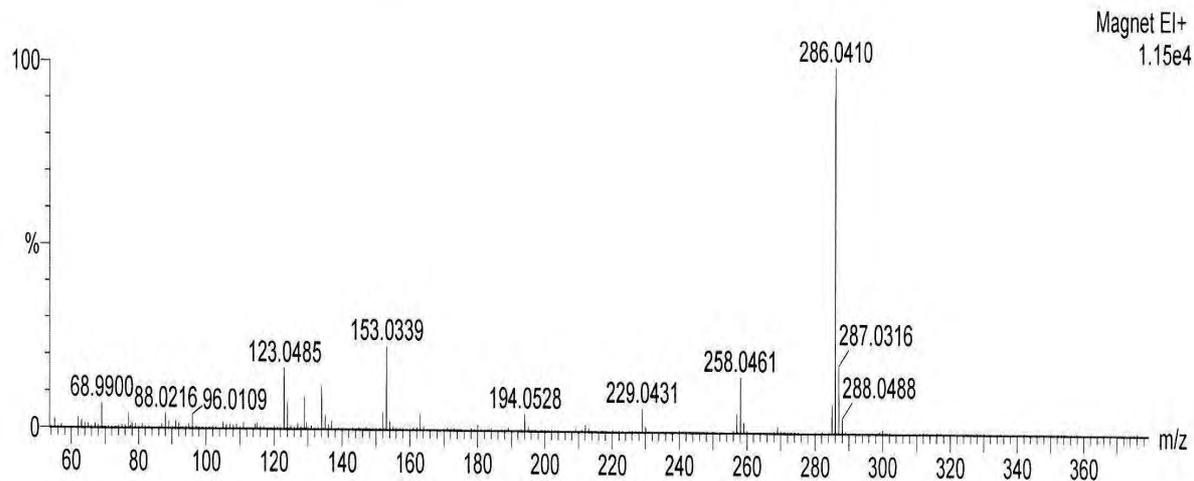
Lutéoline

Tableau III.5. RMN du ^1H et du ^{13}C du composé SCB13-15(1) (500 MHz, δ , J en Hz ; 125 MHz, δ) et de la lutéoline dans le DMSO- d_6 (500 MHz, δ , J en Hz ; 75 MHz, δ).

	Composé SCB13-15(1)		Lutéoline	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
Lutéoline	δ (ppm)			
2	-	164.3	-	163.2
3	6.65 <i>s</i> (1H)	103.3	6.75 <i>s</i>	103.5
4	-	182.1	-	182.2
5	-	161.9	-	161.0
6	6.18 <i>d</i> ($J= 2.0$ Hz, 1H)	99.4	6.45 <i>d</i> ($J= 2.1$ Hz)	99.9
7	-	164.8	-	164.8
8	6.44 <i>d</i> ($J= 2.0$ Hz, 1H)	94.3	6.79 <i>d</i> ($J= 2.1$ Hz)	95.3
9	-	157.8	-	157.3
10	-	104.1	-	105.7
1'	-	121.9	-	121.7
2'	7.42 <i>d</i> ($J= 2.0$ Hz, 1H)	113.8	7.45 <i>d</i> ($J= 2.1$ Hz)	113.7
3'	-	146.2	-	145.9
4'	-	150.2	-	150.0
5'	6.89 <i>d</i> ($J= 8.5$ Hz, 1H)	116.5	6.92 <i>d</i> ($J= 8.2$ Hz)	116.4
6'	7.40 <i>dd</i> ($J= 8.0$ Hz, $J= 2.0$ Hz, 1H)	119.6	7.43 <i>dd</i> ($J= 8.1$ Hz, $J= 2.1$ Hz)	119.6
HO-5	12.98 <i>s</i> (1H)		12.95 <i>s</i>	-

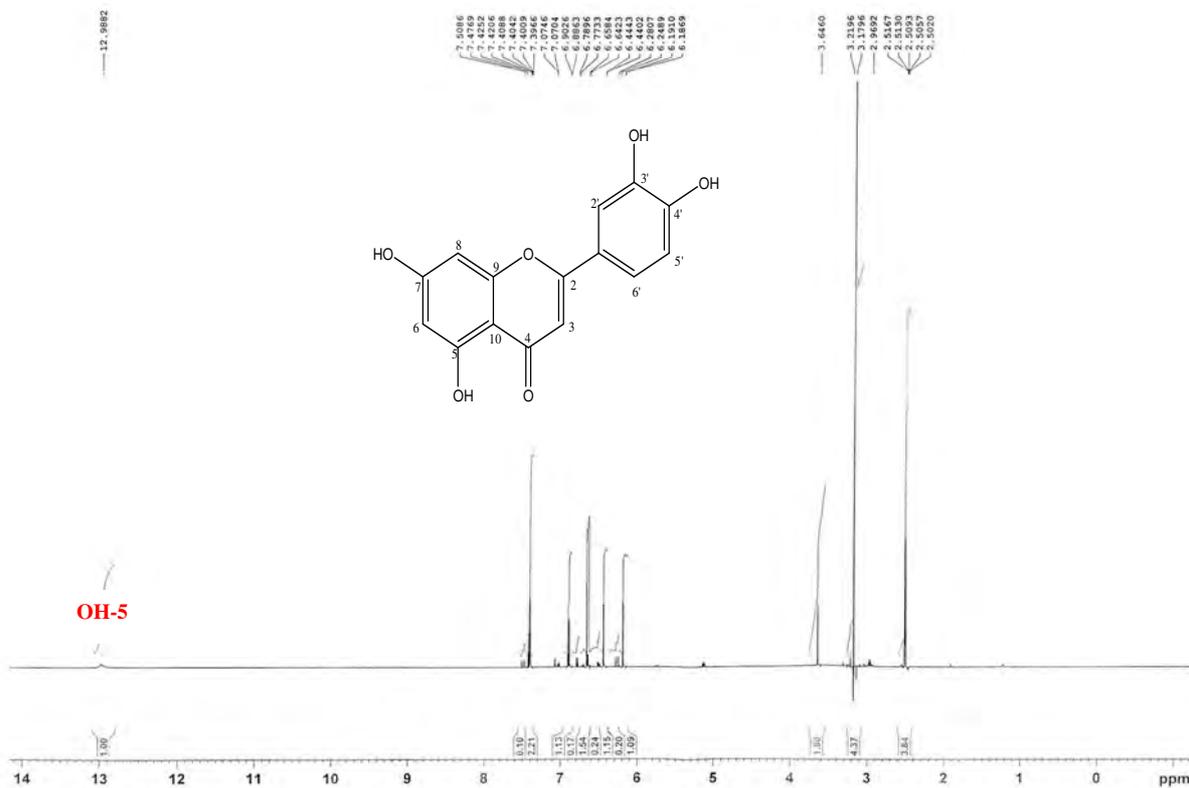


Spectre N°9. Spectre de masse en mode impact électronique du composé SCB13-15(1).

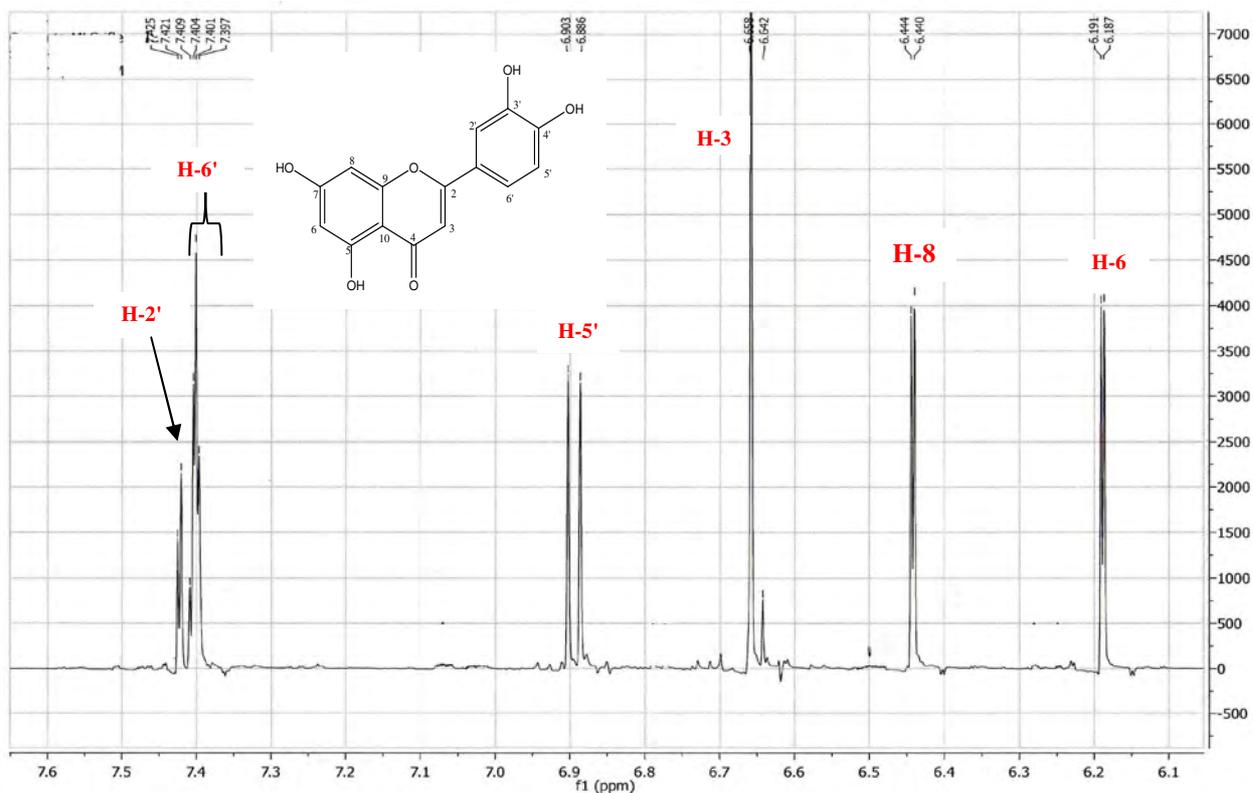


Mass	RA	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula
286.0640	48.69	286.0630	1.0	3.5	15.0	C19 H10 O3
286.0541	78.48	286.0536	0.5	1.7	2.0	C8 H14 O11
286.0476	94.34	286.0477	-0.1	-0.5	11.0	C15 H10 O6

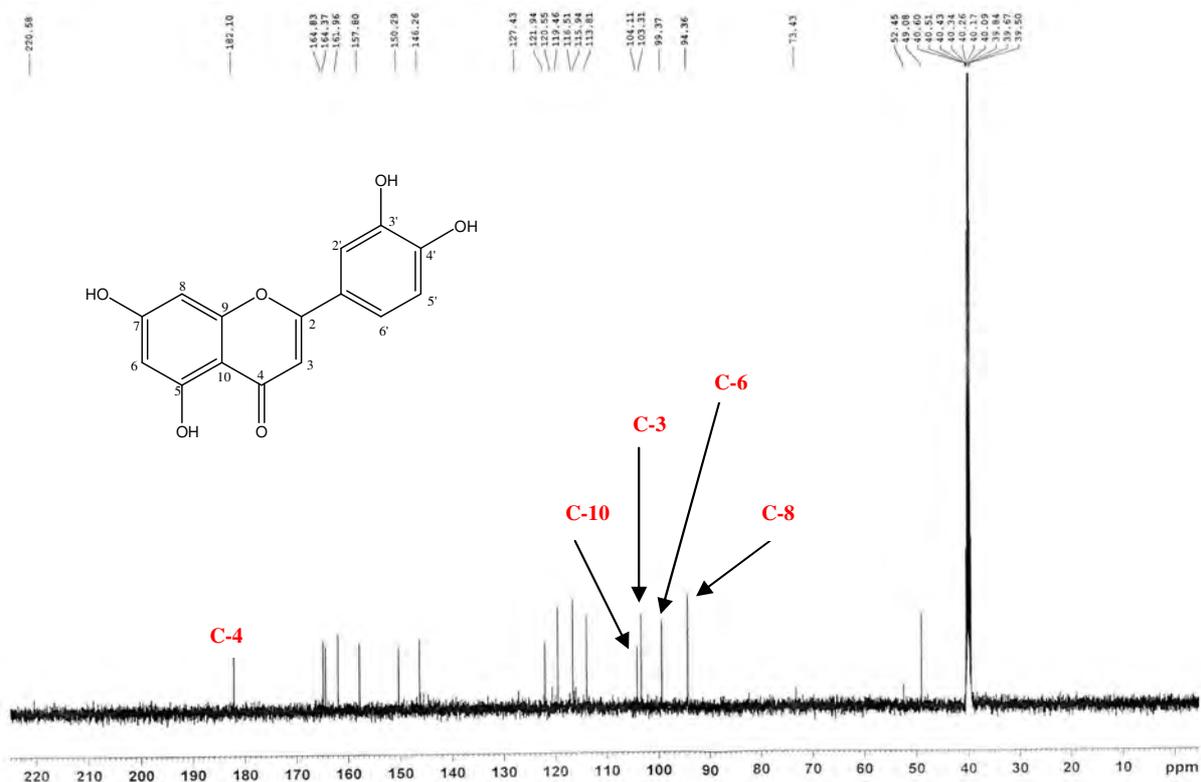
Spectre N°10. Spectre de masse HR-SMIE étalé du composé SCB13-15(1).



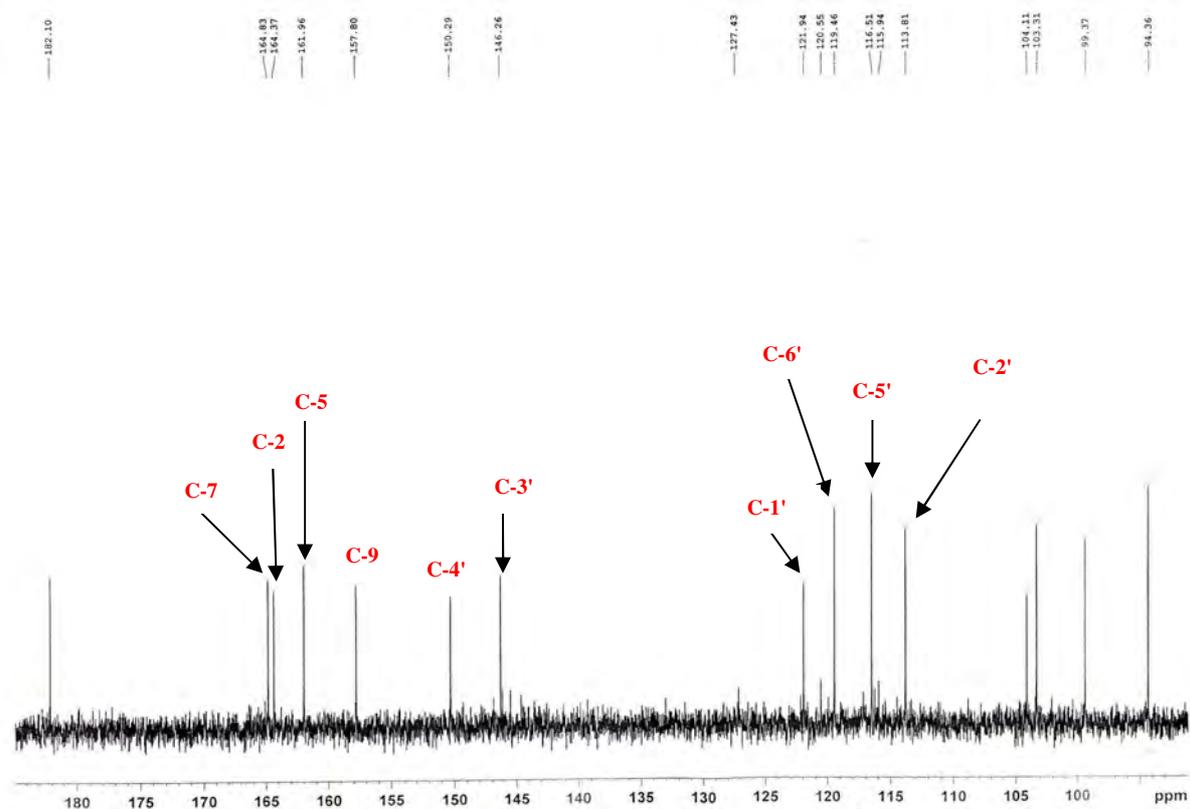
Spectre N°11. Spectre RMN ^1H du composé SCB13-15(1) (500 MHz).



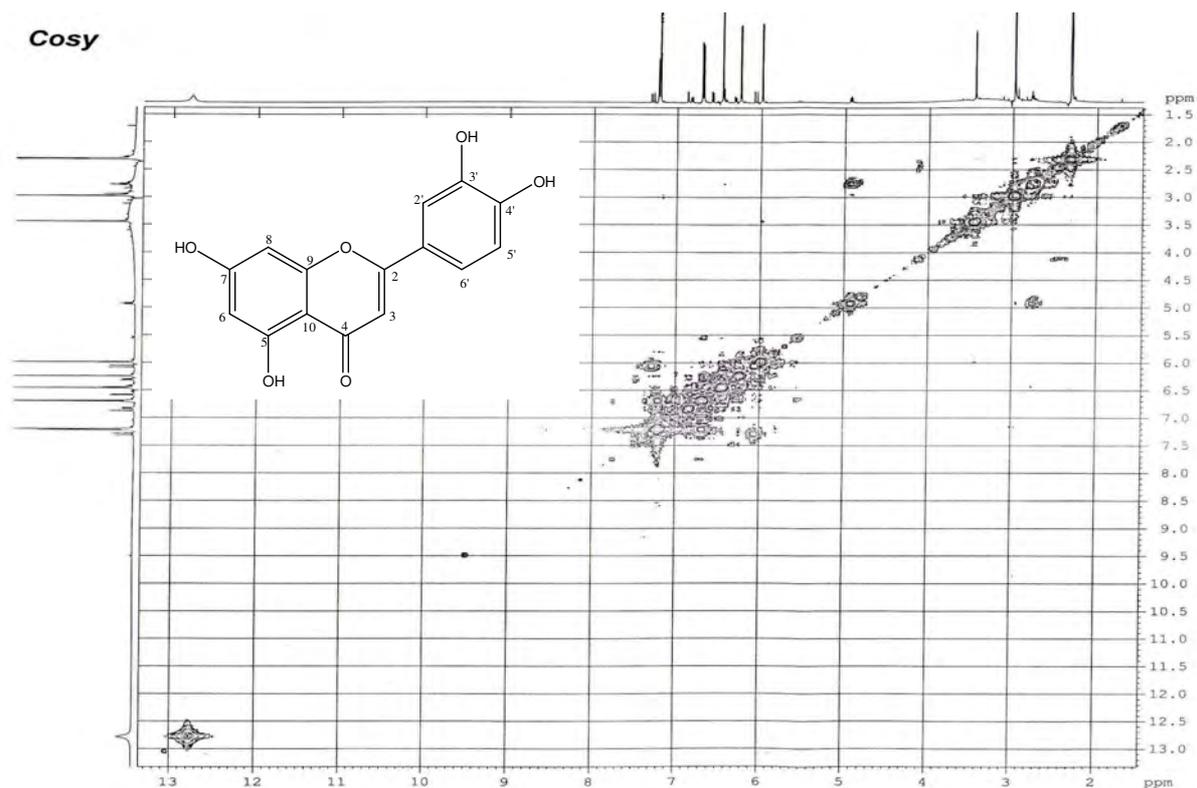
Spectre N°12. Spectre RMN ^1H étalé (6.1 à 7.6 ppm) du composé SCB13-15(1) (500 MHz).



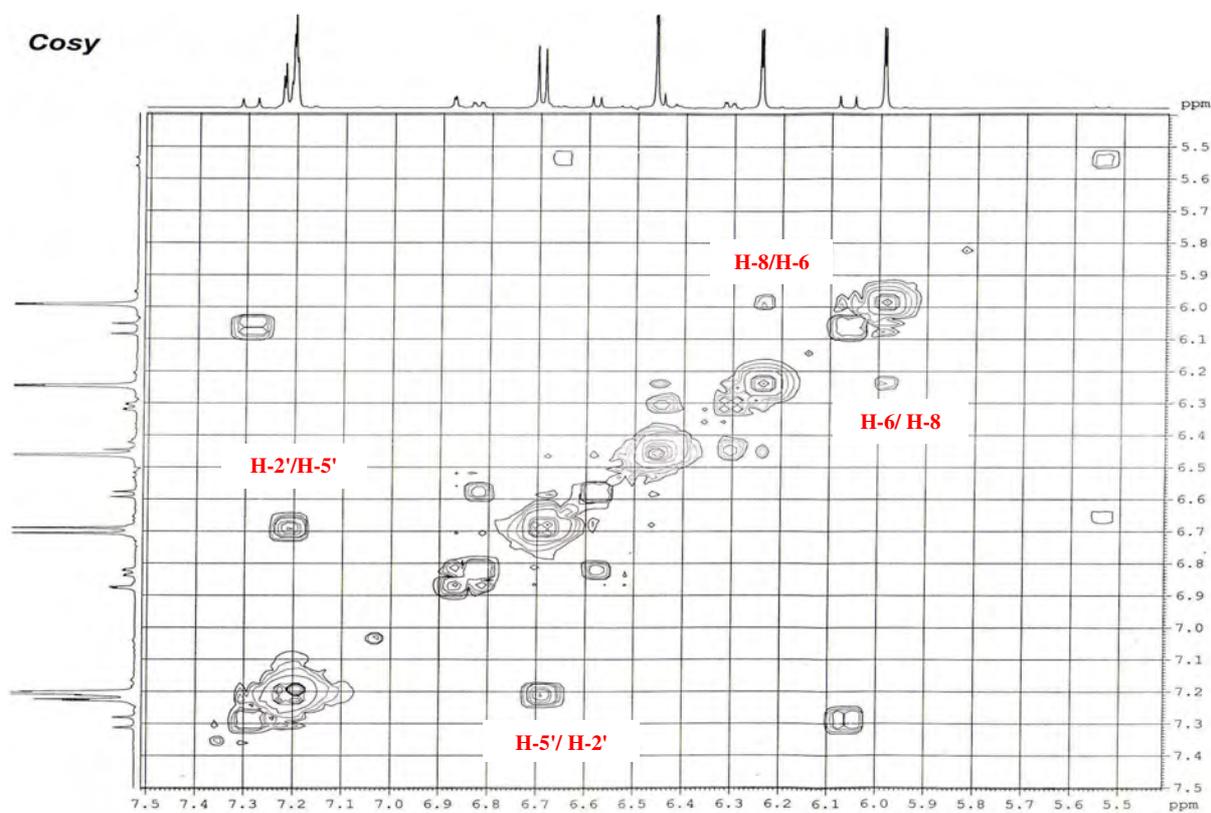
Spectre N°13. Spectre RMN ¹³C du composé SCB13-15(1) (125 MHz).



Spectre N°14. Spectre RMN ¹³C étalé (100 à 180 ppm) du composé SCB13-15(1) (125 MHz).



Spectre N°15. Spectre Cosy du composé SCB13-15(1) (500 MHz).



Spectre N°16. Spectre Cosy étalé (5.5 à 7.5 ppm) du composé SCB13-15(1) (500 MHz).

II.6.3. Elucidation de la structure du composé SCB27-12

III.6.3.1. Analyses physico-chimiques

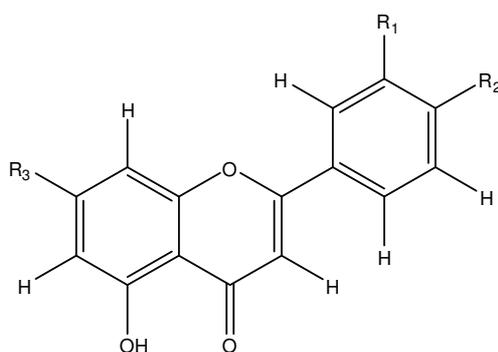
- Fluorescence sous lampe Wood : violette.
- $R_f = 0.16$ dans le système (Toluène/MEC/MeOH 4:3:3) et $R_f = 0.21$ dans le système (H₂O/MeOH/MEC/Acétylacétone 13:3:3:1).

III.6.3.2. Analyses spectroscopiques

L'analyse du composé SCB27-12 (Spectre N°17), par (HR-SMESI), donne un ion pseudomoléculaire $[M+Na]^+$ à $m/z = 471.0907$, compatible avec la formule brute C₂₁H₂₀O₁₁. Le spectre RMN du ¹³C (Spectre N°21), présente effectivement 21 signaux.

Ce produit présente également un aspect plus simple en RMN du ¹H (Spectre N°18-19), permettant d'envisager la substitution d'un noyau 2-phénylchromone par un seul hexose. Dans la région des aromatiques, six signaux sont observables. L'apparition de deux doublets résonant à $\delta_H = 6.45$ ppm ($J = 2.2$ Hz) et $\delta_H = 6.79$ ppm ($J = 2.2$ Hz), attribués respectivement à H-6 et H-8. Le singulet observé à $\delta_H = 6.74$ ppm est dû à la résonance de H-3. En revanche, on observe la présence de système ABX du cycle B : $\delta_H = 6.90$ ppm (d, $J = 8.3$ Hz, H-5') ; $\delta_H = 7.43$ ppm (d, $J = 2.3$ Hz, H-2') ; $\delta_H = 7.46$ ppm (dd, $J = 2.3$ Hz, $J = 8.3$ Hz, H-6'). Ceci indique une disubstitution du cycle B en 3' et 4'. Un signal à $\delta_H = 12.99$ ppm confirmant la présence d'un OH en 5.

Ces données permettent de suggérer le squelette général suivant pour le produit SCB27-12.



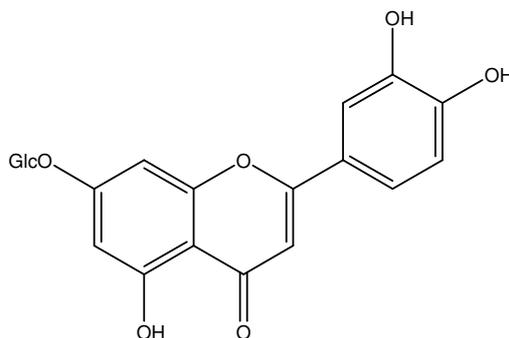
L'apparition d'un doublet à $\delta_H = 5.08$ ppm ($J = 7.4$ Hz) caractéristique d'un proton anomérique et de signaux entre $\delta_H = 3.27$ ppm et $\delta_H = 3.72$ ppm indiquent la présence d'un sucre lié à la génine par le carbone C-7. La constante de couplage ($J = 7.4$ Hz) observée pour le proton anomérique de SCB27-12, suggère une liaison de configuration β entre le sucre et la génine (Agrawal 1989).

Concernant la nature et la position de l'ose substituant la génine, la comparaison des déplacements chimiques (en RMN du ^1H et du ^{13}C) et de la constante de couplage de la fonction hémiacétalique avec les données recueillies dans la littérature tend à indiquer qu'il s'agirait d'un glucose branché sur la fonction hydroxyle en 7 de la génine. Ceci est confirmé par la corrélation du proton anomérique H-1" ($\delta_{\text{H}} = 5.08$ ppm) lors de l'expérience de corrélation Roésy (Spectre N°22) qui montre la corrélation entre les protons H-8 ($\delta_{\text{H}} = 6.79$ ppm) et H-6 ($\delta_{\text{H}} = 6.45$ ppm) du cycle A.

Le de compte du nombre d'atomes d'oxygène et d'hydrogène et l'absence de d'autre signaux dans le spectre RMN ^1H permet d'identifier R₁, R₂, a des hydroxyles.

Les attributions réalisées sont également confirmées par les expériences de résonance magnétique nucléaire bidimensionnelles classiques (Cosy, Roésy).

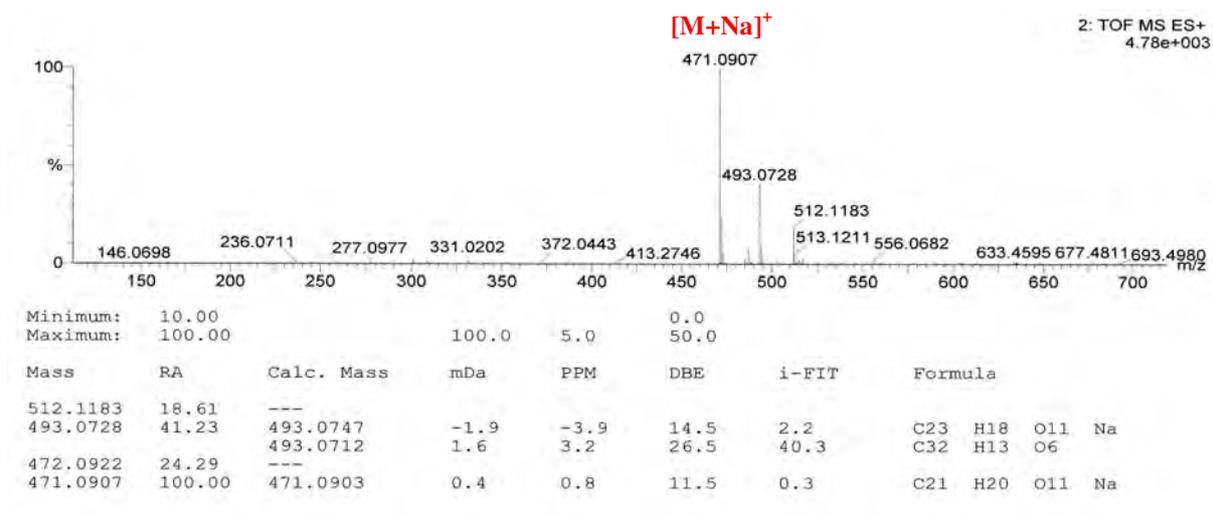
La structure du composé SCB27-12 à donc pu être établie comme étant le 5,3',4'-trihydroxyflavone-7-O- β -D-glucoside, généralement appelé lutéoline-7-O- β -glucoside, mais pour lequel on peut trouver les noms glucolutéoline, lutéoloside, cynaroside ou digitoflavonoside. Ce composé est anciennement connu. La plus ancienne référence que nous ayons pu trouver le mentionnant remonte à 1943 (Sevin). Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN du ^1H et du ^{13}C sont présentés dans le tableau III.6 avec leurs attributions et ceux trouvés dans la littérature (Harborne 1994, Agrawal 1989).



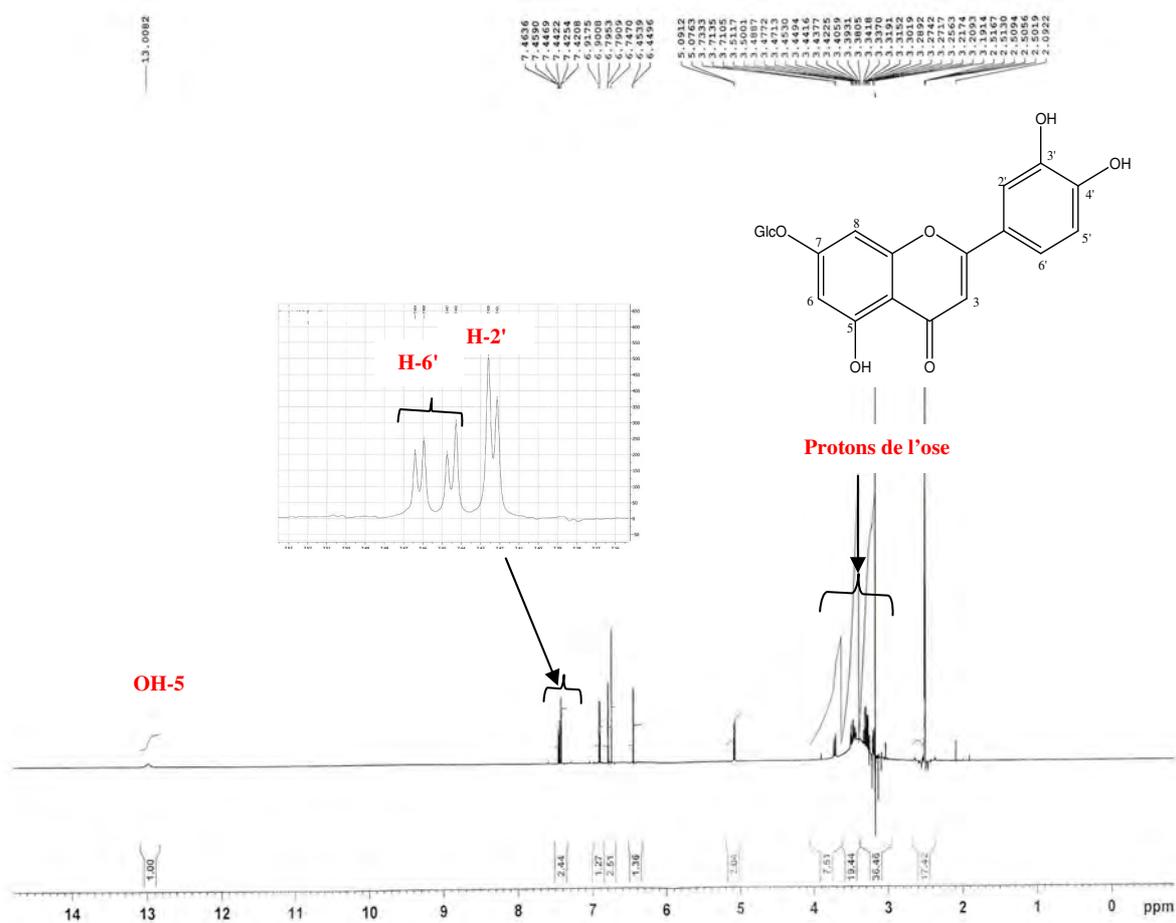
Lutéoline-7-O- β -glucoside

Tableau III.6. RMN du ^1H et du ^{13}C du composé SCB27-12 (500 MHz, δ , J en Hz ; 125 MHz, δ) et de la lutéoline-7-*O*- β -glucoside dans le DMSO-*d*₆ (500 MHz, δ , J en Hz ; 75 MHz, δ).

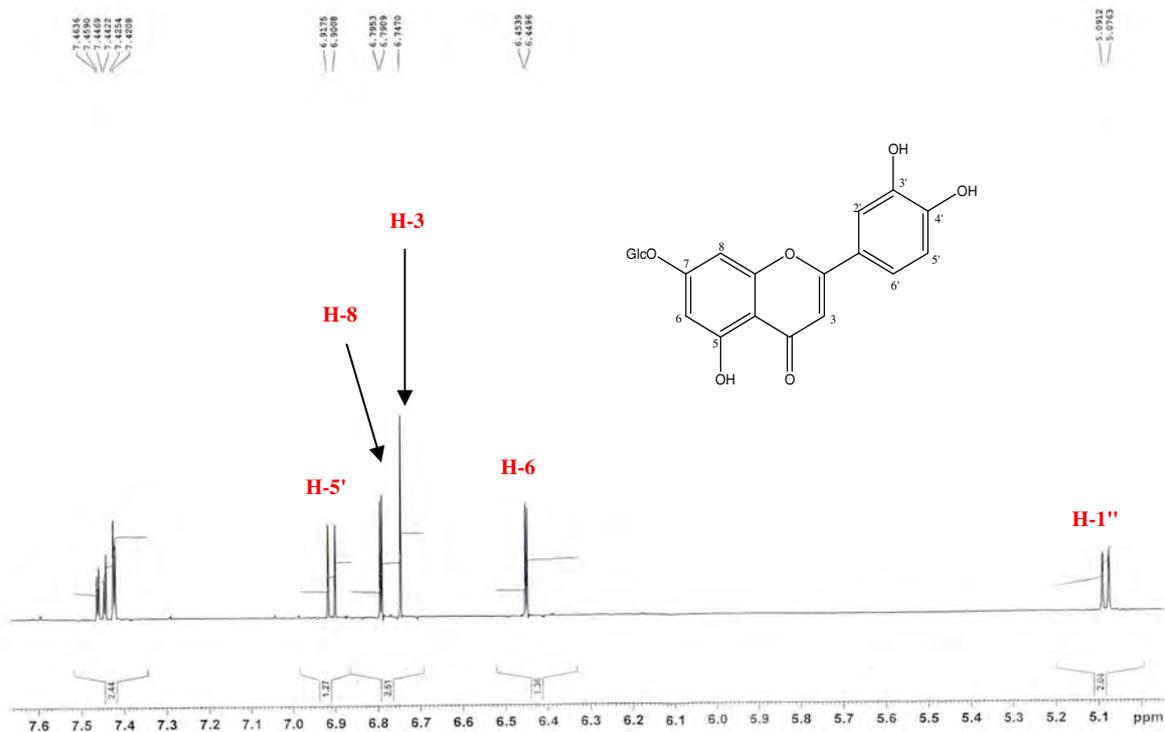
	Composé SCB27-12		Lutéoline-7- <i>O</i> - β -glucoside	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
Lutéoline	δ (ppm)			
2	-	163.4	-	163.2
3	6.74 <i>s</i> (1H)	103.6	6.75 <i>s</i>	103.5
4	-	182.3	-	182.2
5	-	161.6	-	161.0
6	6.45 <i>d</i> ($J= 2.2$ Hz, 1H)	100.0	6.45 <i>d</i> ($J= 2.1$ Hz)	99.9
7	-	164.9	-	164.8
8	6.79 <i>d</i> ($J= 2.2$ Hz, 1H)	95.2	6.79 <i>d</i> ($J= 2.1$ Hz)	95.3
9	-	157.4	-	157.3
10	-	105.8	-	105.7
1'	-	121.7	-	121.7
2'	7.43 <i>d</i> ($J= 2.3$ Hz, 1H)	114.0	7.43 <i>d</i> ($J= 2.1$ Hz)	113.7
3'	-	146.3	-	145.9
4'	-	150.5	-	150.0
5'	6.90 <i>d</i> ($J= 8.3$ Hz, 1H)	116.4	6.92 <i>d</i> ($J= 8.2$ Hz)	116.4
6'	7.46 <i>dd</i> ($J= 8.3$ Hz, $J= 2.3$ Hz, 1H)	119.6	7.45 <i>dd</i> ($J= 8.1$ Hz, $J= 2.1$ Hz)	119.6
HO-5	12.99 <i>s</i> (1H)	-	12.95 <i>sl</i>	-
glucose				
1''	5.08 <i>d</i> ($J= 7.4$ Hz, 1H)	100.4	5.05 <i>d</i> ($J= 7.2$ Hz)	100.3
2''	3.20 <i>t</i> ($J= 8.4$ Hz)	73.6	3.1-3.5 <i>m</i>	73.3
3''	3.45 <i>m</i>	76.9		76.4
4''	3.27 <i>m</i>	70.0		69.9
5''	3.31 <i>m</i>	77.6		77.3
6''	3.72 <i>d</i>	61.1		3.71 <i>d</i>



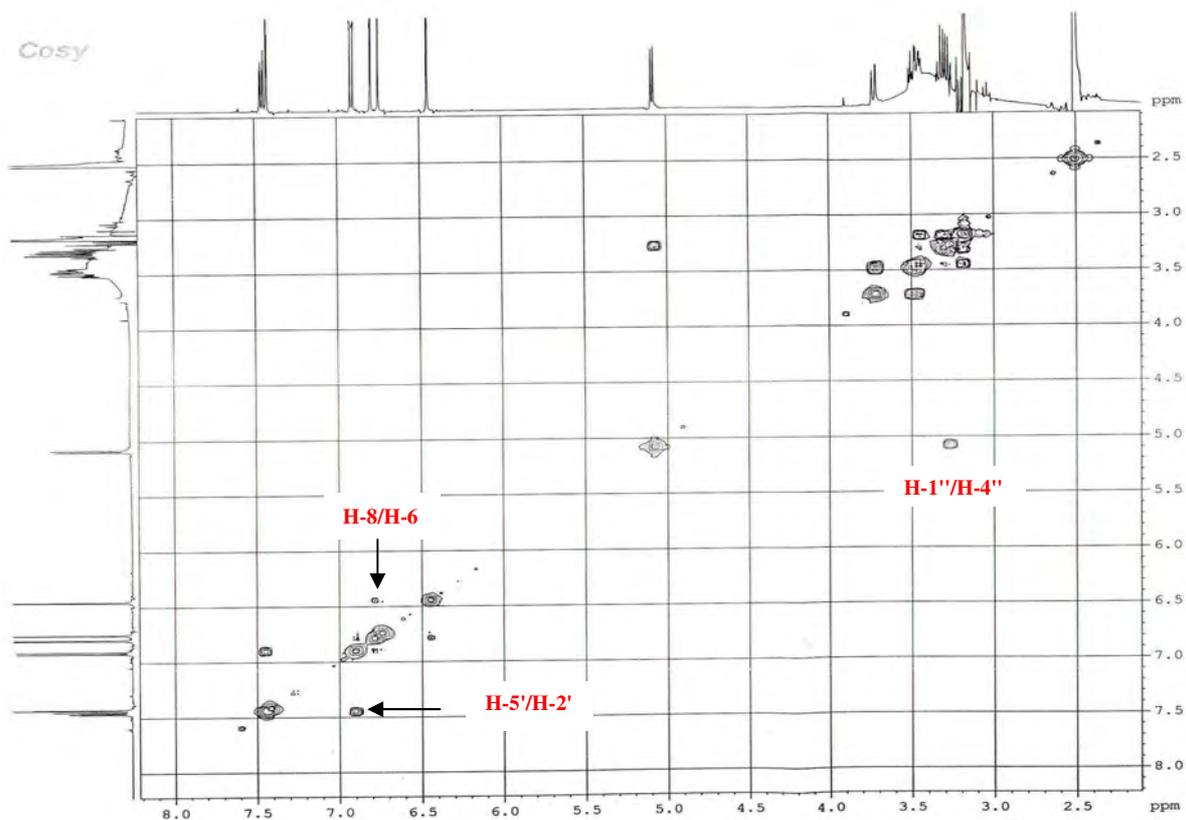
Spectre N°17. Spectre de masse en mode électrospray du composé SCB27-12.



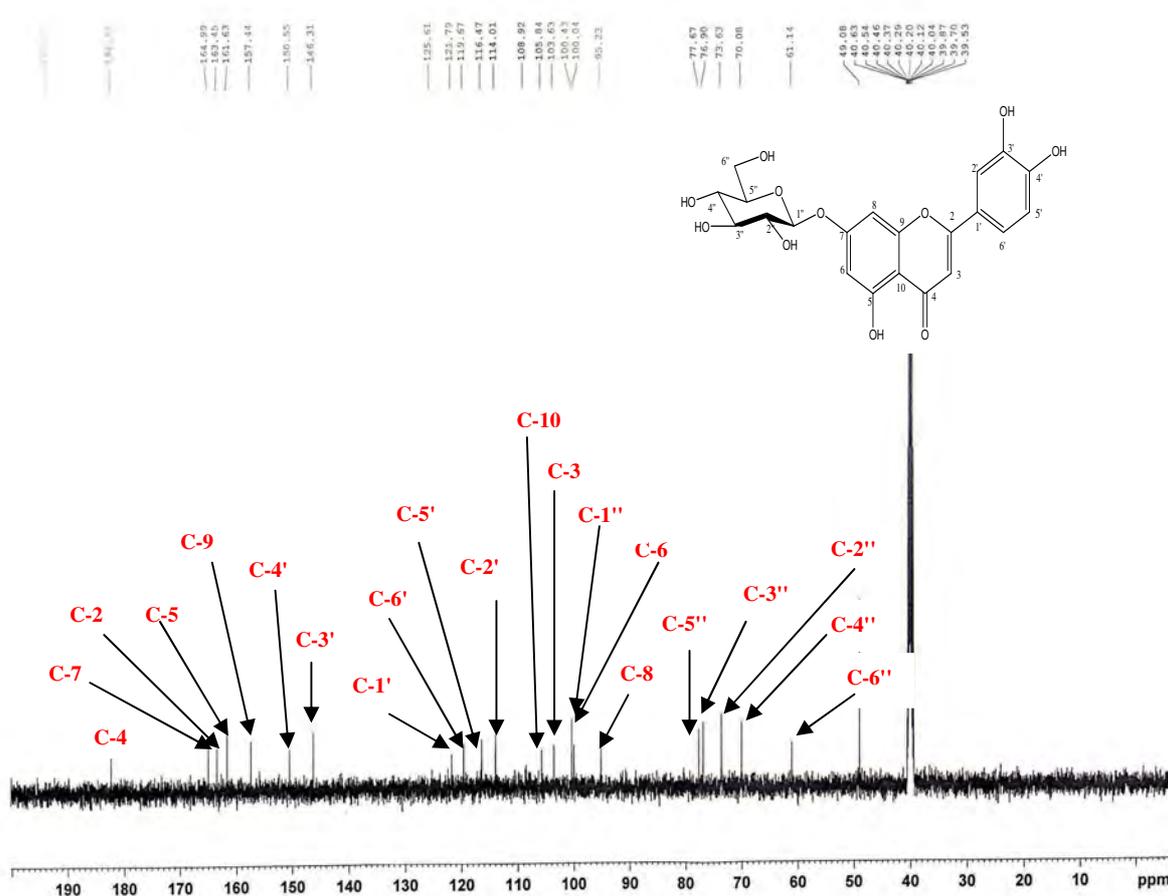
Spectre N°18. Spectre RMN ¹H du composé SCB27-12 (500 MHz).



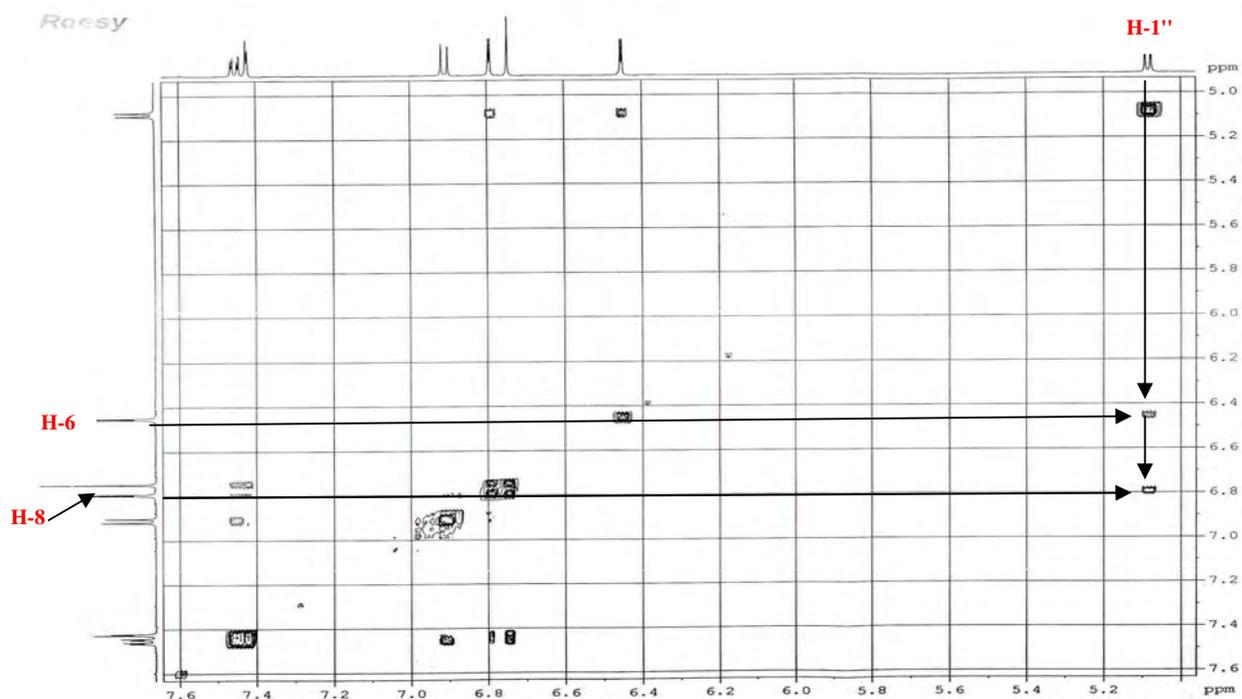
Spectre N°19. Spectre RMN ^1H étalé (5.1 à 7.6 ppm) du composé SCB27-12 (500 MHz).



Spectre N°20. Spectre Cosy étalé (2.5 à 8.0 ppm) du composé SCB27-12 (500 MHz).



Spectre N°21. Spectre RMN ¹³C du composé SCB27-12 (125 MHz).



Spectre N°22. Spectre Roesy étalé (5.2 à 7.6 ppm) du composé SCB27-12 (500 MHz).

III.6.4. Elucidation de la structure du composé SCB28-29

III.6.4.1. Analyses physico-chimiques

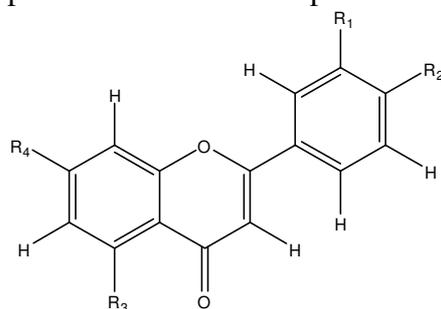
- Fluorescence sous lampe Wood : violette.
- $R_f = 0.46$ dans le système (Toluène/MEC/MeOH 4:3:3) et $R_f = 0.27$ dans le système (H₂O/MeOH/MEC/Acétyleacétone 13:3:3:1).

III.6.4.2. Analyses spectroscopiques

L'analyse par spectrométrie de masse à haute résolution en mode électrospray positif du composé SCB28-29 (Spectre N°23), montre un ion pseudomoléculaire $[M+Na]^+$ à $m/z = 485.1053$, ce qui est compatible avec la formule C₂₂H₂₂O₁₁.

Au niveau du spectre de RMN du ¹H (Spectre N°24-25), on observe un système ABX : $\delta_H = 6.70$ ppm (d, $J = 8.4$ Hz, H-5') ; $\delta_H = 7.31$ ppm (d, $J = 2.0$ Hz, H-2') ; $\delta_H = 7.41$ ppm (dd, $J = 8.4$ Hz, $J = 2.0$ Hz, H-6'). Ceci indique une disubstitution du cycle B en 3' et 4'. La présence d'un méthoxyle est caractérisée par l'apparition d'un singulet à $\delta_H = 3.81$ ppm, cela est confirmé par la RMN du ¹³C (Spectre N°26), par l'apparition d'un carbone à $\delta_C = 55.0$ ppm et d'un groupement glucosyle dont le proton anomérique est observé sous forme de doublet à $\delta_H = 4.98$ ppm ($J = 7.2$ Hz). L'apparition de deux doublets résonnant à $\delta_H = 6.38$ ppm ($J = 2.0$ Hz), $\delta_H = 6.72$ ppm ($J = 2.0$ Hz) attribués respectivement à H-6 et H-8 du cycle A.

Ces données permettent la proposition de la structure partielle suivante :



Quant au spectre de RMN du ¹³C, il permet de distinguer les signaux correspondant au glucose et ceux de la génine. Le déplacement chimique vers les champs faibles à $\delta_C = 73.3$ ppm (C-2''), $\delta_H = 76.4$ ppm (C-3''), $\delta_H = 69.9$ ppm (C-4''), $\delta_H = 77.0$ ppm (C-5'') et $\delta_H = 61.0$ ppm (C-6'') confirme la présence d'un seul ose, le glucose (Markham *et al.*, 1975).

Concernant la nature et la position de l'ose substituant la génine, la comparaison des déplacements chimiques (en RMN du ¹H et du ¹³C) et de la constante de couplage de la fonction hémiacétalique avec les données recueillies dans la littérature tend à indiquer qu'il s'agit d'un glucose branché sur la fonction hydroxyle en 7 de la génine. Ceci est confirmé par l'expérience de corrélation hétéronucléaire à longue distance HMBC (Spectre N°28) qui montre la corrélation du carbone 7 ($\delta_C = 163.3$ ppm) avec le proton H-1'' ($\delta_H = 4.98$ ppm), aussi l'expérience de corrélation Roézy (Spectre N°27) qui montre la corrélation entre les protons H-8 ($\delta_H = 6.72$ ppm) et H-6 ($\delta_H = 6.38$ ppm) du cycle A avec le proton anomérique H-1''. De plus, le signal du méthoxyle à $\delta_H = 3.81$ ppm est corrélé avec le signal C-3' à $\delta_C = 149.9$ ppm du cycle B, indiquant que le groupement méthoxyle est attaché à la position C-3' lors de l'expérience de corrélation hétéronucléaire à longue distance HMBC. La génine serait donc le chrysoériol.

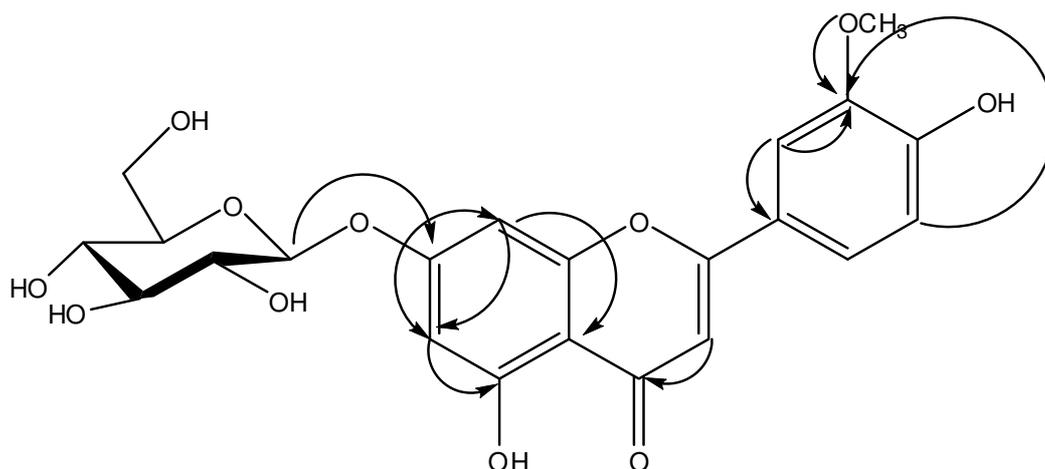
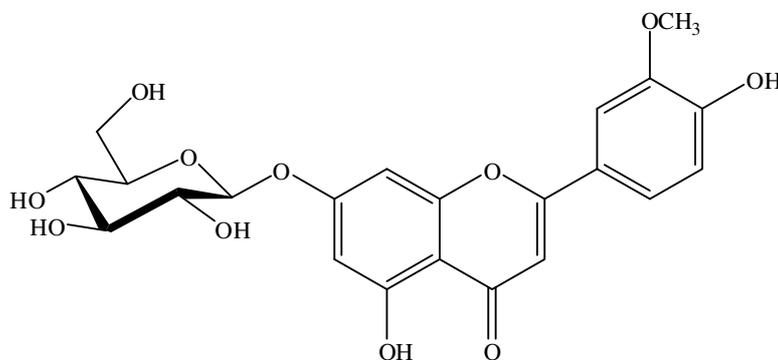


Fig.II.2. Corrélations HMBC du composé SCB28-29 (C → H).

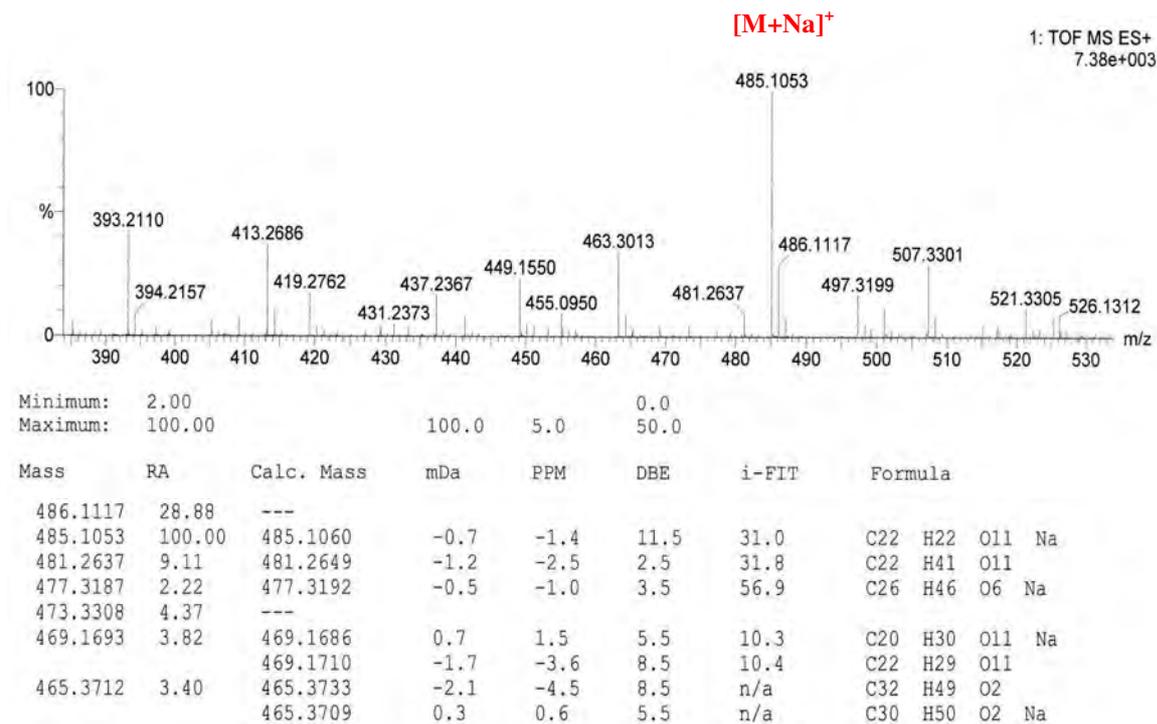
La structure du composé SCB28-29 a donc pu être établie comme étant le Chrysoériol-7-*O*-β-glucoside. Cette molécule a été isolée pour la première de *Sedum formosanum* (Cheng *et al.*, 1976). Les données de RMN du ^1H et du ^{13}C sont présentés dans le tableau III.7 avec celles trouvés dans la littérature (Sarkhail *et al.*, 2006).



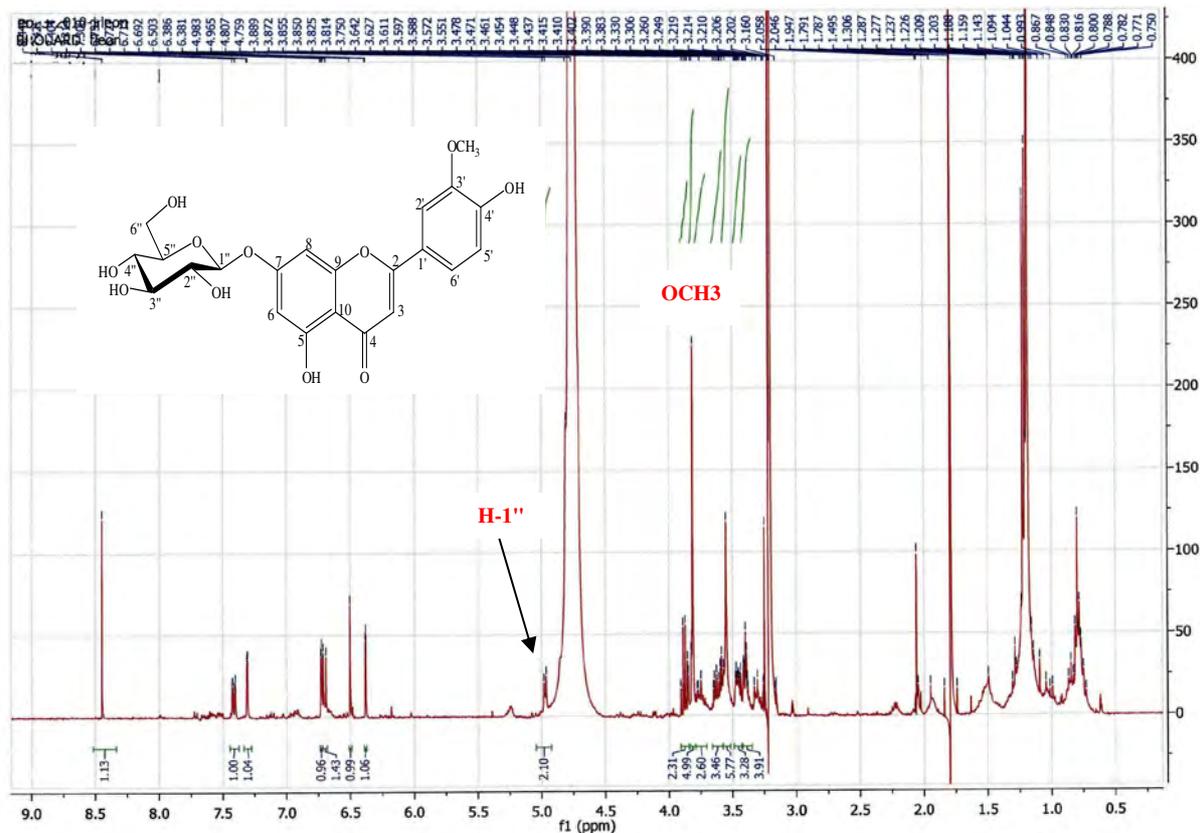
Chrysoériol-7-*O*-β-glucoside

Tableau III.7. RMN du ^1H et du ^{13}C du composé SCB28-29 (400 MHz, δ , J , en Hz ; 125 MHz, δ) dans le CD_3OD et du Chrysoériol-7- O - β -glucoside dans le $\text{DMSO-}d_6$ (400 MHz, δ , J , en Hz ; 100 MHz, δ).

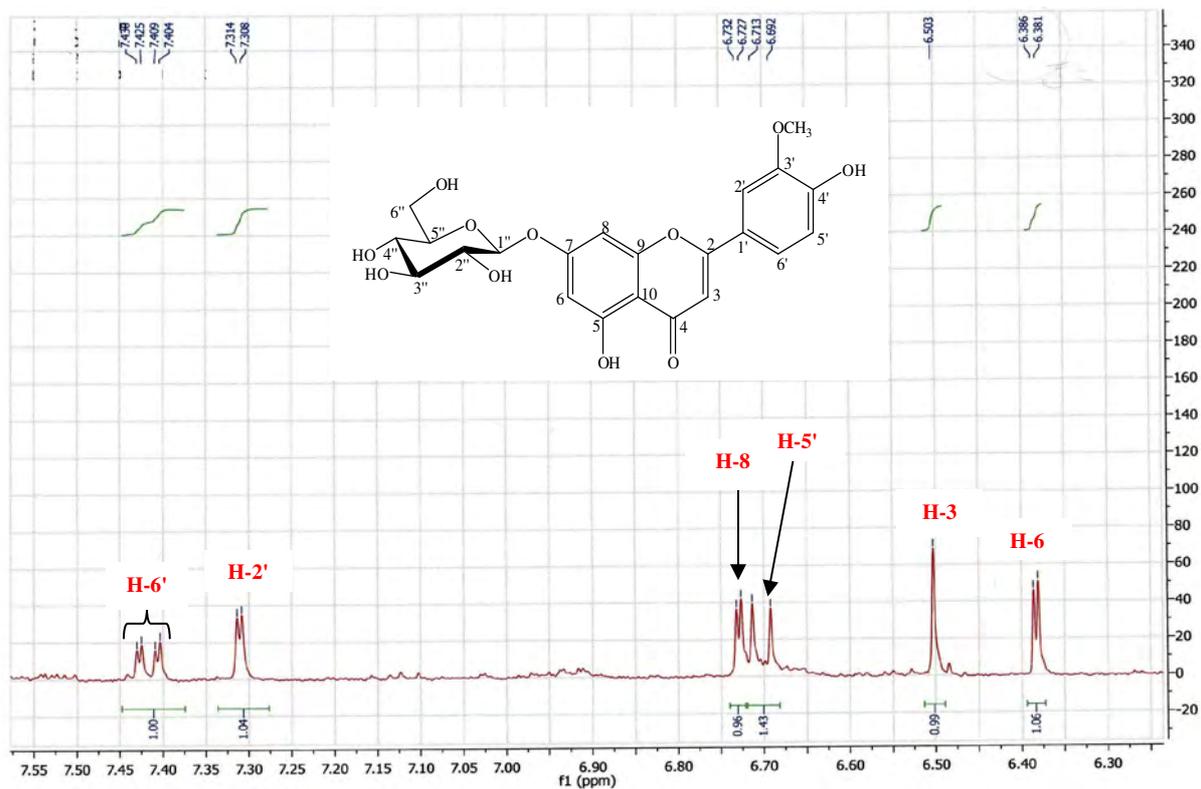
génine	Composé SCB28-29		Chrysoériol-7- O - β -glucoside	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
	δ (ppm)			
2	-	166.3		164.1
3	6.50 <i>s</i> (1H)	-	6.95 <i>s</i> (1H)	103.4
4	-	182.5		182.0
5	-	161.5		161.1
6	6.38 <i>d</i> ($J= 2.0$ Hz, 1H)	99.7	6.46 <i>d</i> ($J= 2.0$ Hz, 1H)	99.5
7	-	163.3		163.0
8	6.72 <i>d</i> ($J= 2.0$ Hz, 1H)	94.7	6.90 <i>d</i> ($J= 2.0$ Hz, 1H)	95.0
9	-	157.7		156.9
10	-	105.5		105.3
1'	-	121.4		121.3
2'	7.31 <i>d</i> ($J= 2.0$ Hz, 1H)	108.8	7.58 <i>d</i> ($J= 2.0$ Hz, 1H)	110.3
3'	-	149.9		148.0
4'	-	-		151.1
5'	6.70 <i>d</i> ($J= 8.4$ Hz, 1H)	116.8	6.97 <i>d</i> ($J= 8.4$ Hz, 1H)	115.8
6'	7.41 <i>dd</i> ($J= 8.4$ Hz, $J= 2.0$ Hz, 1H)	-	7.61 <i>dd</i> ($J= 8.4$ Hz, $J= 2.0$ Hz, 1H)	120.4
OCH₃	3.81 <i>s</i> (3H)	55.0	3.89 <i>s</i> (3H)	60.4
Glucose				
1''	4.98 <i>d</i> ($J= 7.2$ Hz)	100.3	5.05 <i>d</i> ($J= 7.2$ Hz, 1H)	100.0
2''	3.3-3.72 <i>m</i>	73.3	3.25 <i>d</i> ($J= 9.2$ Hz)	73.1
3''		76.4	3.29 <i>dd</i> ($J= 8.8$ Hz, $J= 5.2$ Hz)	76.4
4''		69.9	3.17 <i>t</i> ($J= 8.7$ Hz)	69.6
5''		77.0	3.48	77.2
6''		61.0	3.48 <i>dd</i> ($J= 10.4$ Hz, $J= 5.1$ Hz) 3.71 <i>d</i> ($J= 10.1$ Hz)	62.8



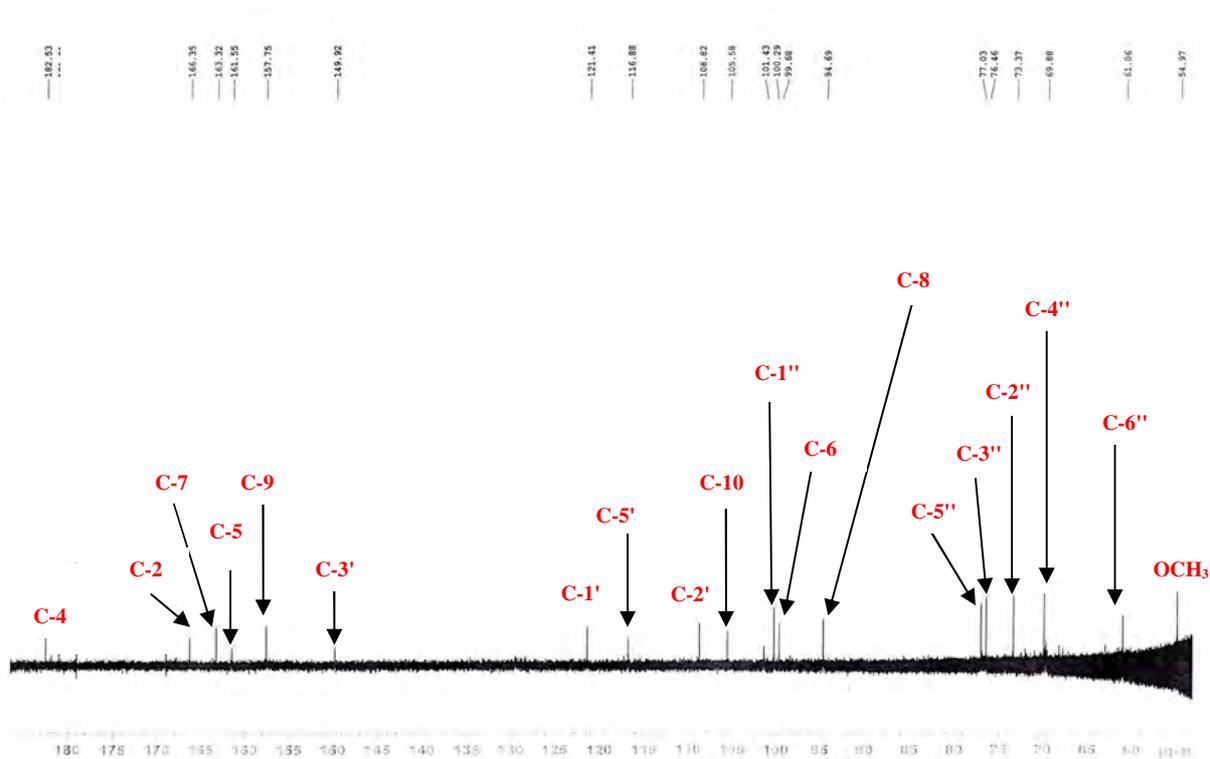
Spectre N°23. Spectre de masse en mode électrospray du composé SCB28-29.



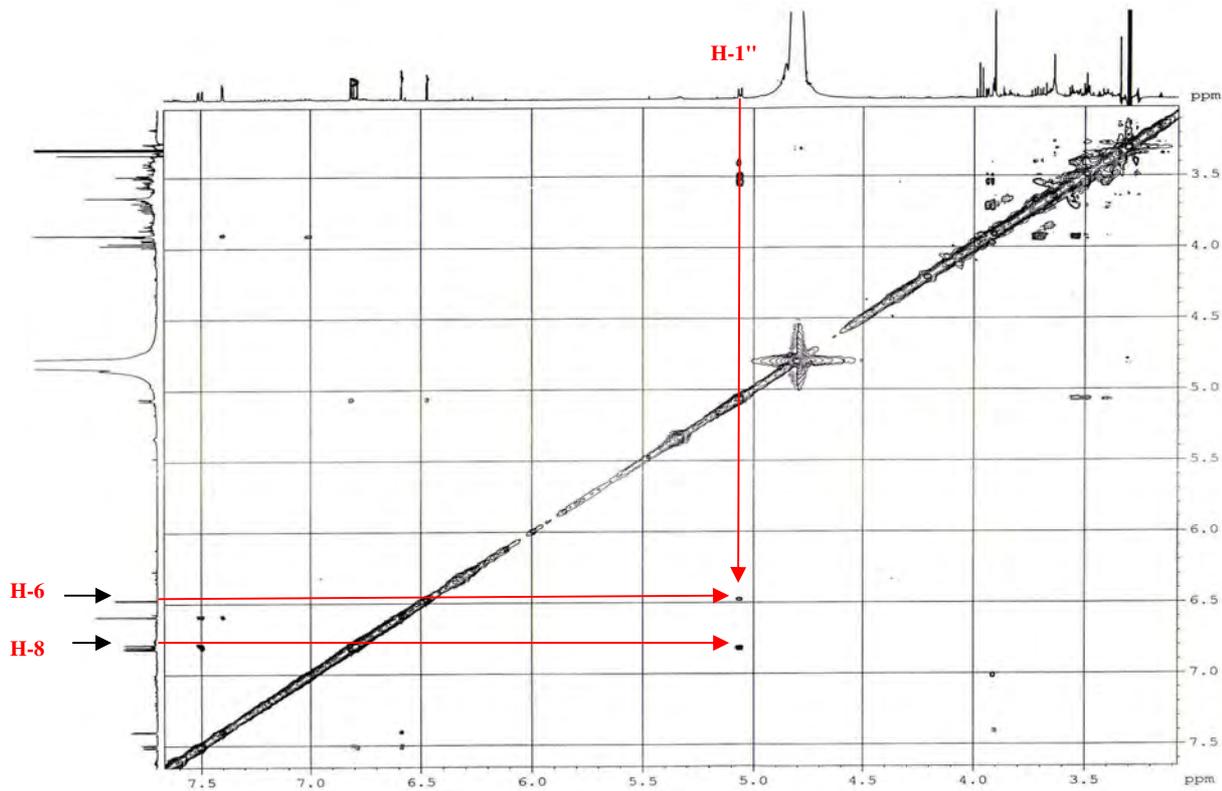
Spectre N°24. Spectre RMN ¹H du composé SCB28-29 (400 MHz).



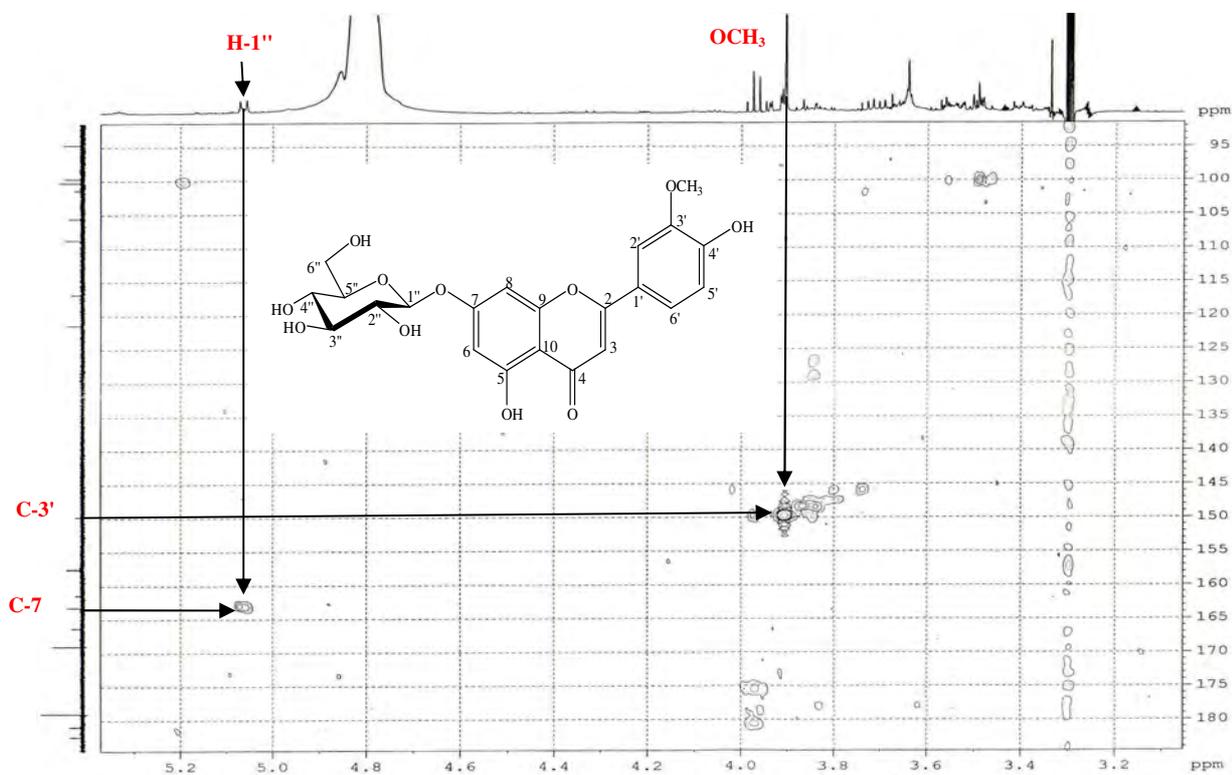
Spectre N°25. Spectre RMN ¹H étalé (6.30 à 7.55 ppm) du composé SCB28-29 (400 MHz).



Spectre N°26. Spectre RMN ¹³C du composé SCB28-29 (125 MHz).



Spectre N°27. Spectre Roesy du composé SCB28-29 (500 MHz).



Spectre N°28. Spectre HMBC étalé (95 à 185 ppm) du composé SCB28-29 (500 MHz).

III.6.5. Elucidation de la structure du composé SCB30-31

III.6.5.1. Analyses physico-chimiques

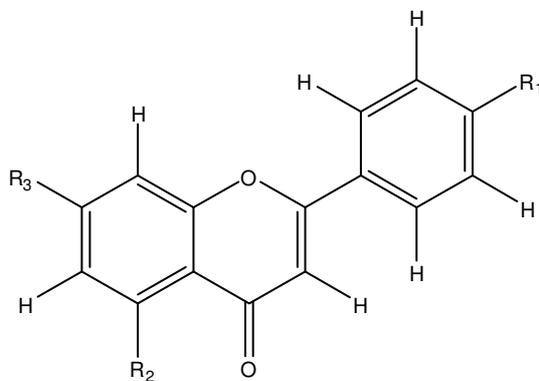
- Fluorescence sous lampe Wood : violette.
- $R_f = 0.33$ dans le système (Toluène/MEC/MeOH 4:3:3) et $R_f = 0.23$ dans le système (H₂O/MeOH/MEC/Acétylacétone 13:3:3:1).

III.6.5.2. Analyses spectroscopiques

Le spectre de masse du composé SCB30-31 (Spectre N°29), obtenu à haute résolution en mode électrospray (ESI), a permis d'observer un ion pseudomoléculaire $[M+Na]^+$ à $m/z = 455.0956$, compatible avec la formule brute C₂₁H₂₀O₁₀.

Le spectre de RMN du ¹H, réalisé dans le DMSO-*d*₆ (Spectre N°30-31), permet d'observer des signaux compatibles avec la structure d'une flavone dans la région des aromatiques, et un doublet susceptible de correspondre au proton anomérique d'un ose. On observe un singulet $\delta_H = 6.77$ ppm (s, H-3), deux doublets couplés avec une faible constante correspondant aux protons du cycle A : $\delta_H = 6.42$ ppm (d, $J = 1.5$ Hz, H-6), $\delta_H = 6.80$ ppm (d, $J = 1.5$ Hz, H-8) et deux doublets couplés plus fortement, typiques de la substitution en *para* du cycle B : $\delta_H = 6.86$ ppm (d, $J = 8.7$ Hz, H3'-5') ; $\delta_H = 7.89$ ppm (d, $J = 8.7$ Hz, H2'-6').

Ces premiers résultats permettent de suggérer le squelette général suivant pour le produit SCB30-31.



La présence du groupement glucosyle est confirmée par la RMN du ¹³C (Spectre N°32), qui permet de distinguer les signaux suivants : $\delta_C = 73.6$ ppm (C-2''), $\delta_C = 77.6$ ppm (C-3''), $\delta_C = 70.0$ ppm (C-4''), $\delta_C = 76.9$ ppm (C-5'') et $\delta_C = 61.1$ ppm (C-6''), et le proton anomérique à $\delta_C = 100.4$ ppm, en plus des signaux caractéristiques des carbones flavonique.

L'expérience HMBC (Spectre N°37-38) permet de déterminer la position de constituant de la molécule. Le signal à $\delta_H = 5.05$ ppm (H-1'') de proton anomérique de glucose et corrélé avec le signal à $\delta_C = 162.8$ ppm (C-7) de l'aglycone, indique que la position C-7 est glycosylé ; aussi l'expérience Roesy (Spectre N°34) montre que le signal à $\delta_H = 5.05$ ppm de proton anomérique de glucose et corrélé avec le signal à $\delta_H = 6.80$ ppm (H-8), et à $\delta_H = 6.42$ ppm (H-6) indiquant que le glucose est attaché à C-7 de l'apigénine.

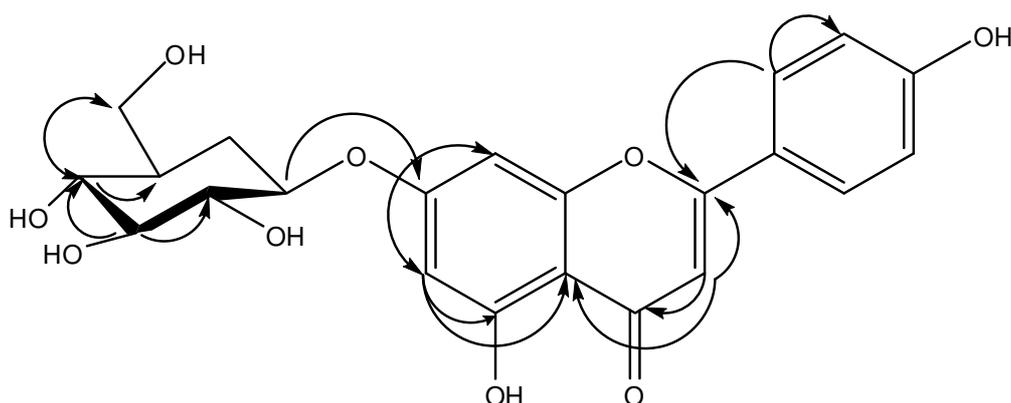
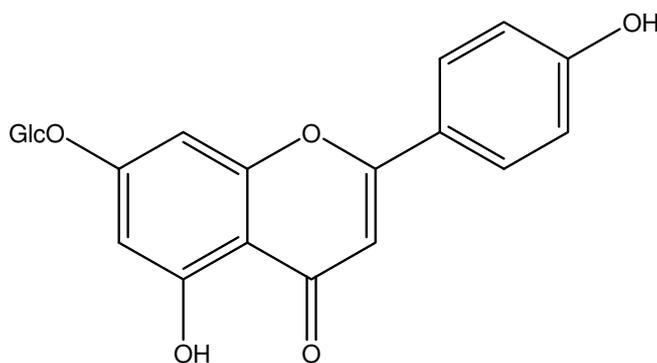


Fig II.3. Corrélations HMBC du composé SCB30-31 (C → H).

Les attributions réalisées sont également confirmées par les expériences de résonance magnétique nucléaire bidimensionnelle classiques (Cosy, HSQC, HMBC).

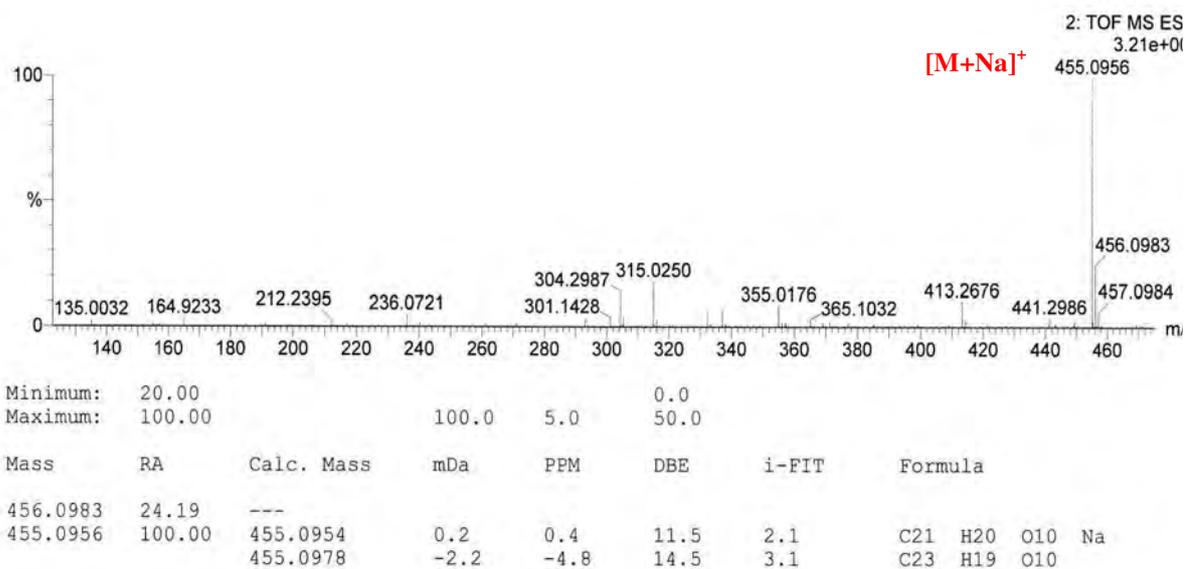
La structure du composé SCB30-31 a donc pu être établie comme étant le 5, 4'-dihydroxyflavone-7-*O*-β-D-glucoside, généralement appelé apigénine-7-*O*-β-glucoside ou cosmosiine, qui a été isolé pour la première fois de *Cosmos bipinnatus* Cav. (Asteraceae) (Nakaoki, 1935). Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN du ^1H et du ^{13}C sont présentés dans le tableau III.8 avec leurs attributions et ceux trouvés dans la littérature (Oyama, 2004 ; Agrawal, 1989).



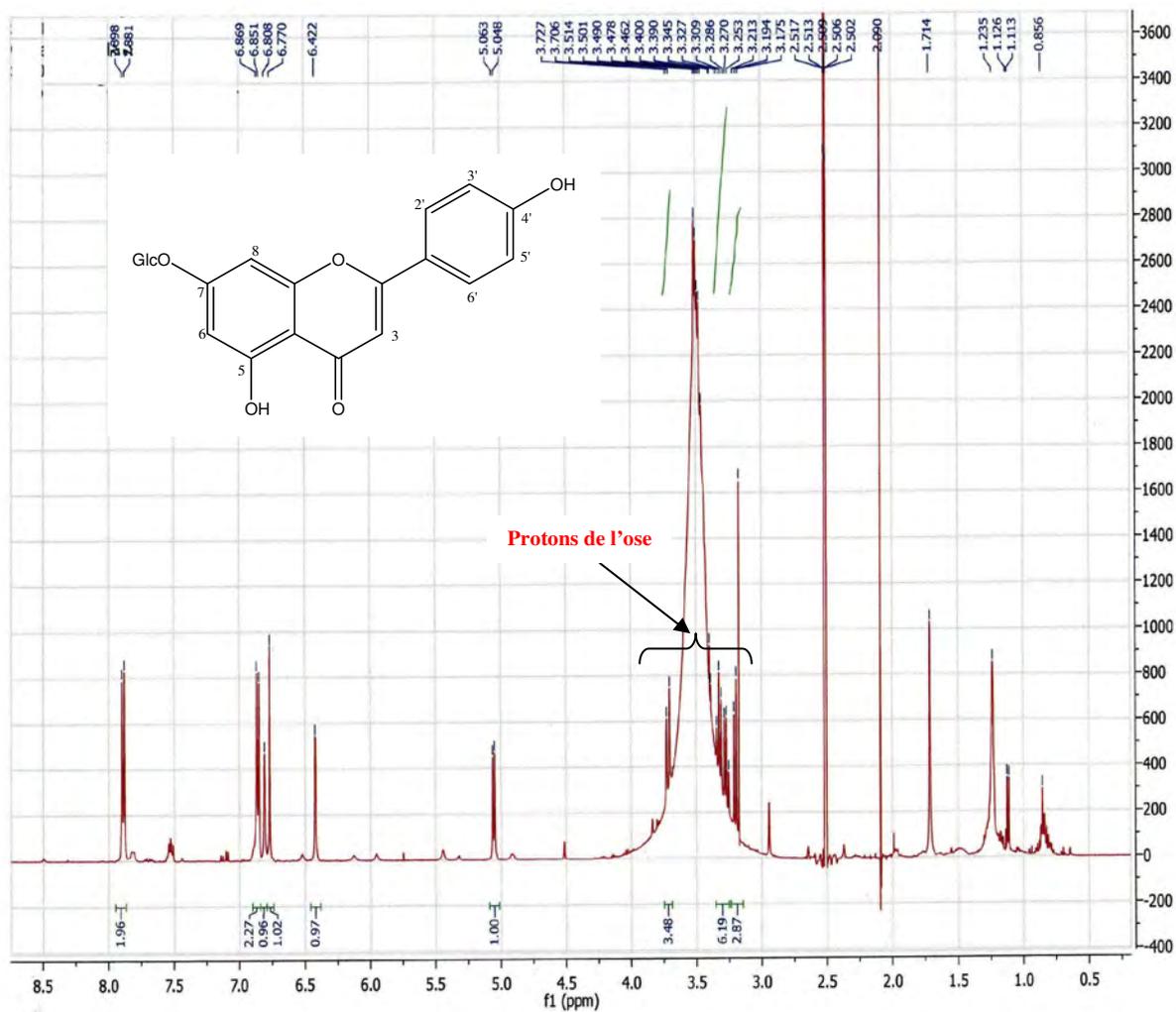
Apigénine-7-*O*-β-glucoside

Tableau III.8. RMN du ^1H et du ^{13}C du composé SCB30-31 (400 MHz, δ , J , en Hz ; 125 MHz, δ) et de l'apigénine-7- O - β -glucoside dans le DMSO- d_6 (300 MHz, δ , J en Hz ; 75 MHz, δ).

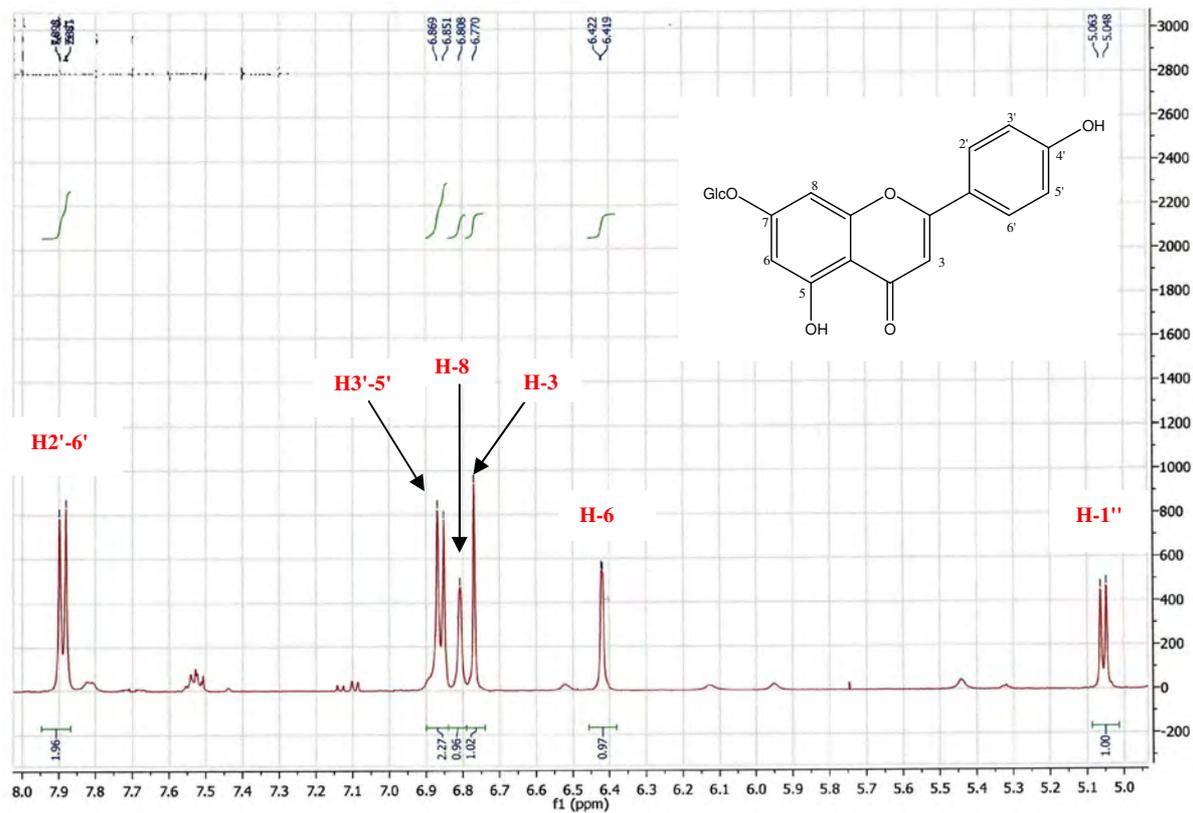
	Composé SCB30-31		Apigénine-7- O - β -glucoside	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
apigénine	δ (ppm)			
2	-	163.3	-	164.2
3	6.77 <i>s</i> (1H)	103.0	6.86 <i>s</i>	103.0
4	-	182.3	-	181.6
5	-	161.0	-	161.0
6	6.42 <i>d</i> ($J= 1.5$ Hz, 1H)	99.6	6.44 <i>d</i> ($J= 2.2$ Hz)	99.6
7	-	162.8	-	162.8
8	6.80 <i>d</i> ($J= 1.5$ Hz, 1H)	95.0	6.82 <i>d</i> ($J= 2.2$ Hz)	94.9
9	-	156.8	-	156.8
10	-	105.8	-	105.3
1'	-	-	-	121.1
2'-6'	7.89 <i>d</i> ($J= 8.7$ Hz, 2H)	129.0	7.95 <i>d</i> ($J= 8.8$ Hz)	128.1
3'-5'	6.86 <i>d</i> ($J= 8.7$ Hz, 2H)	117.2	6.93 <i>d</i> ($J= 8.8$ Hz)	115.8
4'	-	-	-	160.9
Glucose				
1''	5.05 <i>d</i> ($J= 7.5$ Hz, 1H)	100.4	5.05 <i>d</i> ($J= 7.3$ Hz)	100.3
2''	3.25 <i>m</i>	73.6	3.1-3.2 <i>m</i> ; 3.4-3.5 <i>m</i>	73.1
3''	3.43 <i>m</i>	77.6		77.0
4''	3.20 <i>m</i>	70.0		69.9
5''	3.33 <i>m</i>	76.9		76.4
6''	3.48-3.72 <i>m</i>	61.1	3.6-3.7 <i>m</i>	60.8



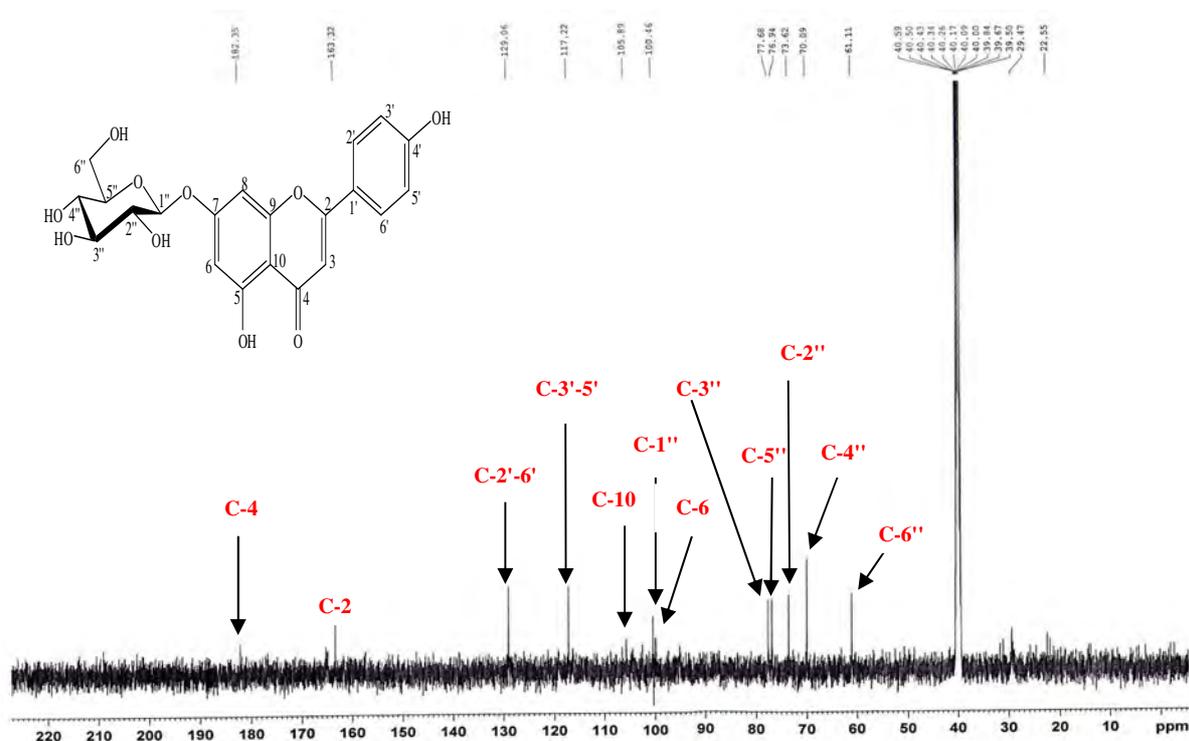
Spectre N°29. Spectre de masse en mode électrospray du composé SCB30-31.



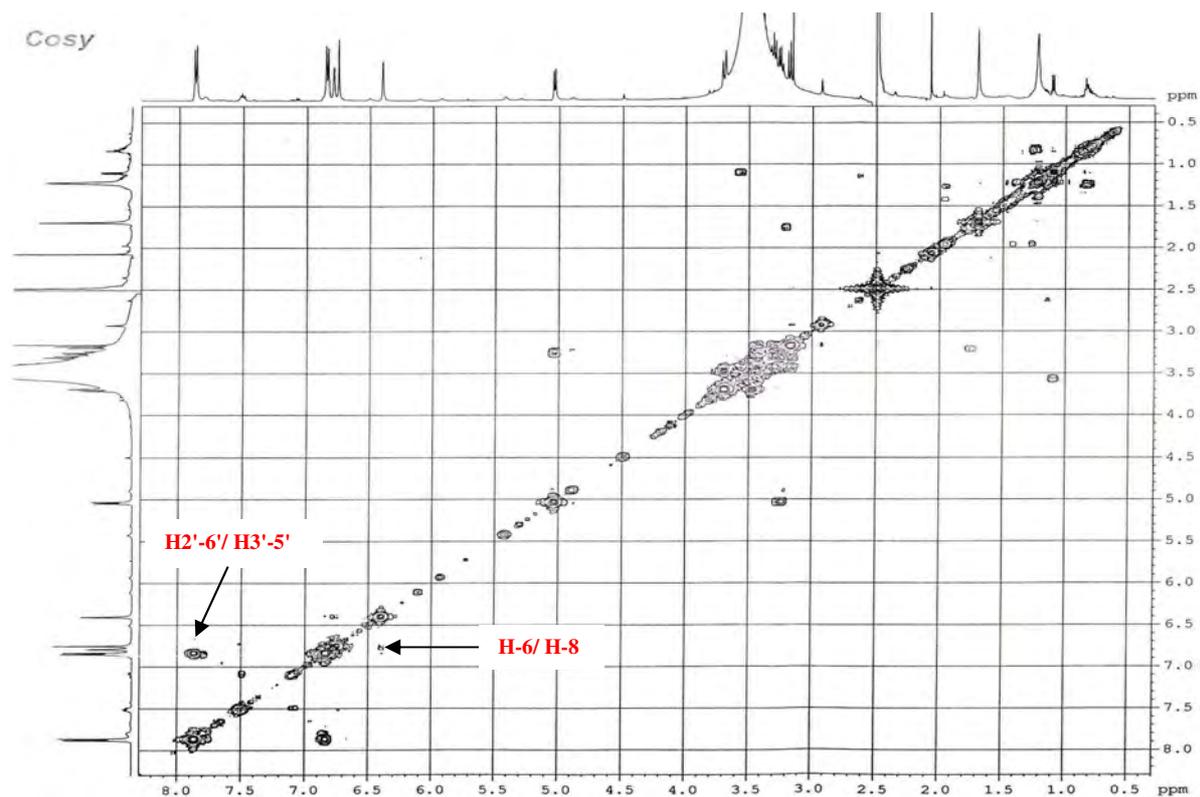
Spectre N°30. Spectre RMN ¹H du composé SCB30-31 (400 MHz).



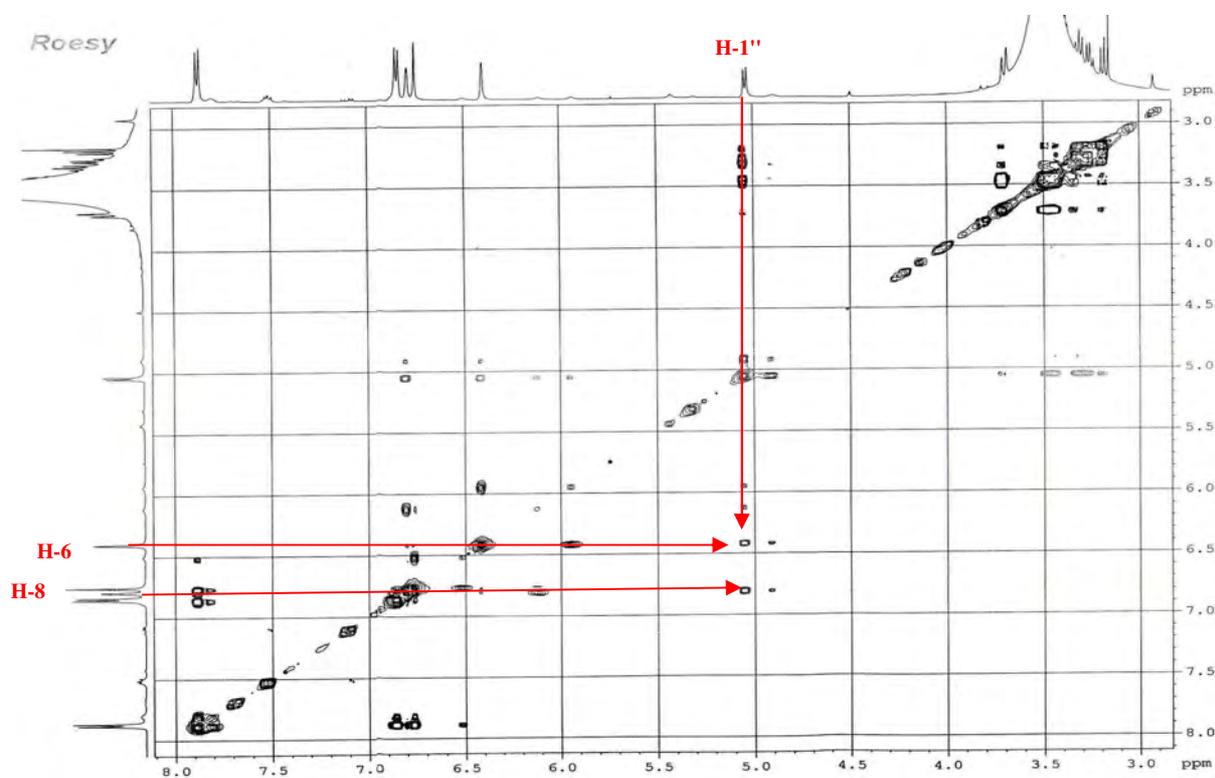
Spectre N°31. Spectre RMN ^1H étalé (5.0 à 8.0 ppm) du composé SCB30-31 (400 MHz).



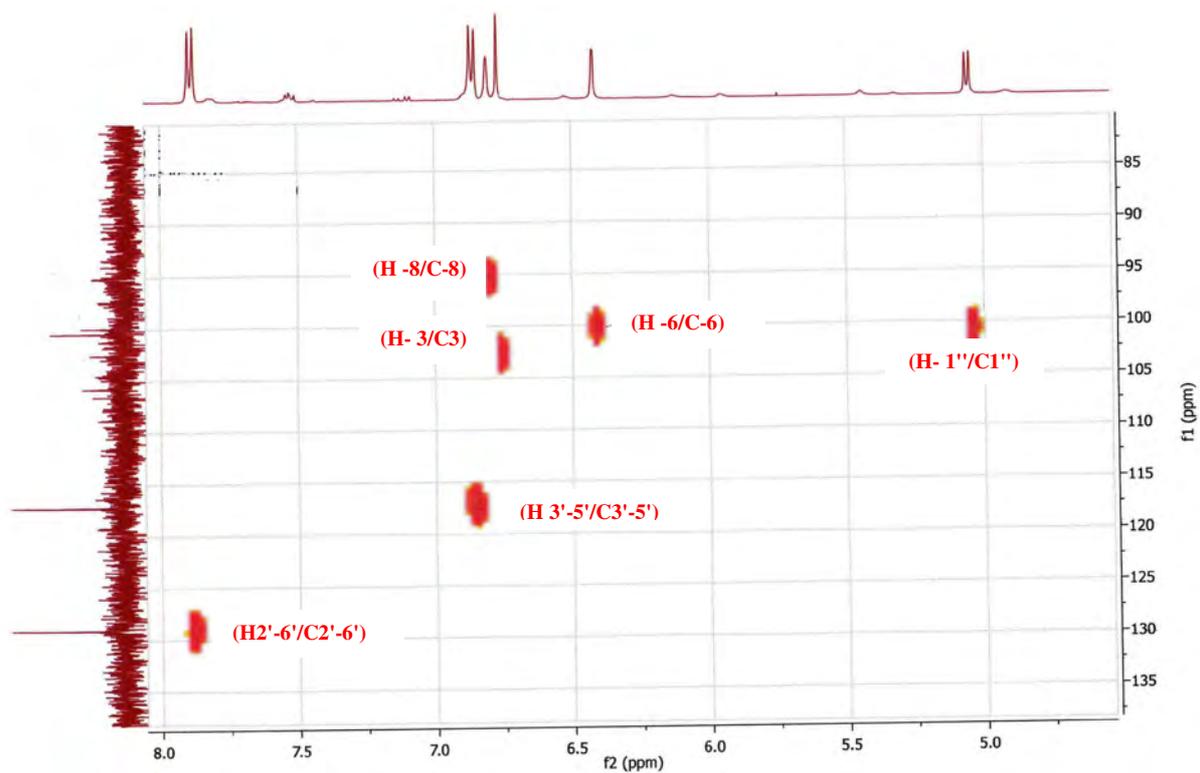
Spectre N°32. Spectre RMN ^{13}C du composé SCB30-31 (125 MHz).



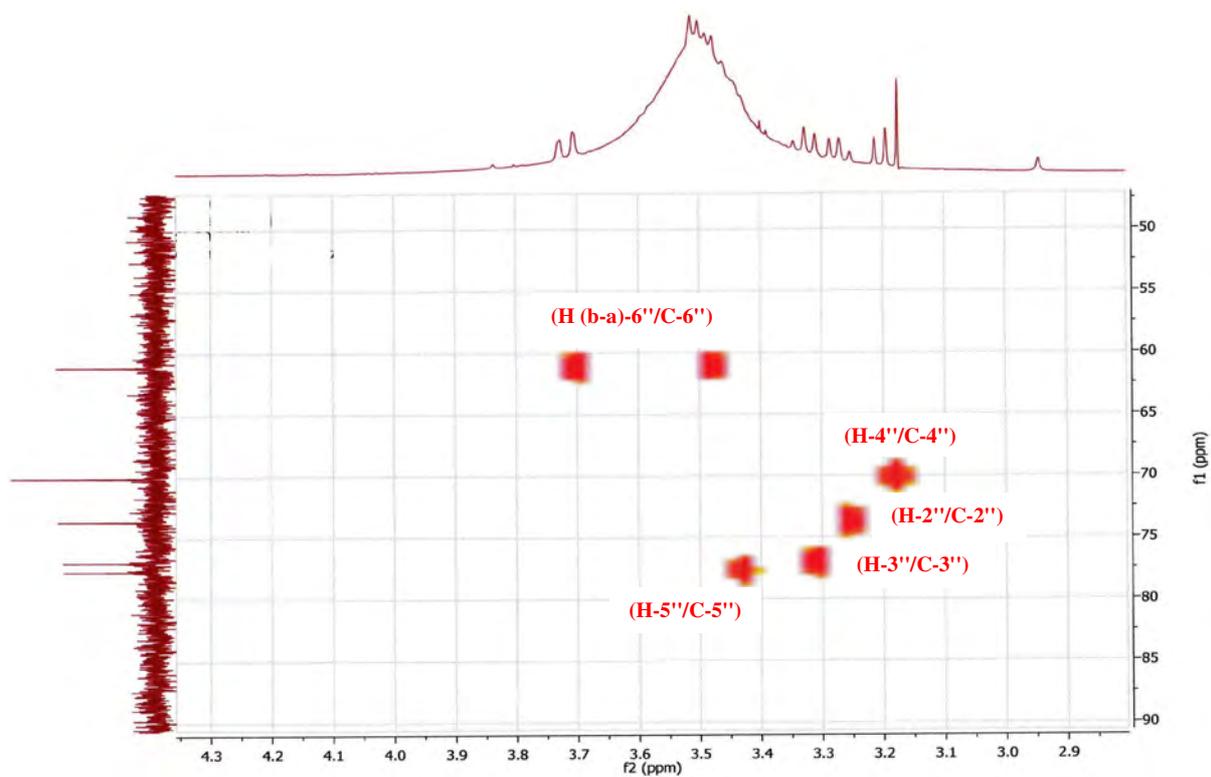
Spectre N°33. Spectre Cosy du composé SCB30-31 (500 MHz).



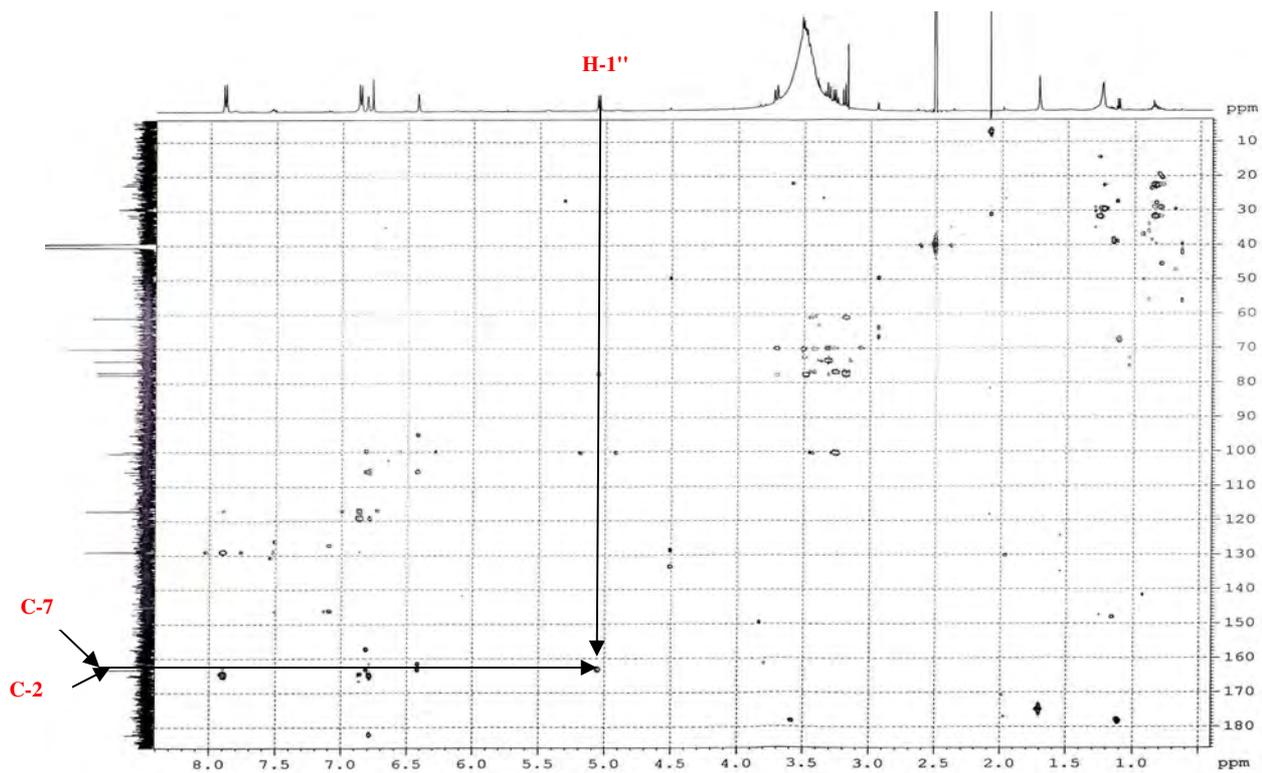
Spectre N°34. Spectre Roesy étalé (3.0 à 8.0 ppm) du composé SCB30-31 (500 MHz).



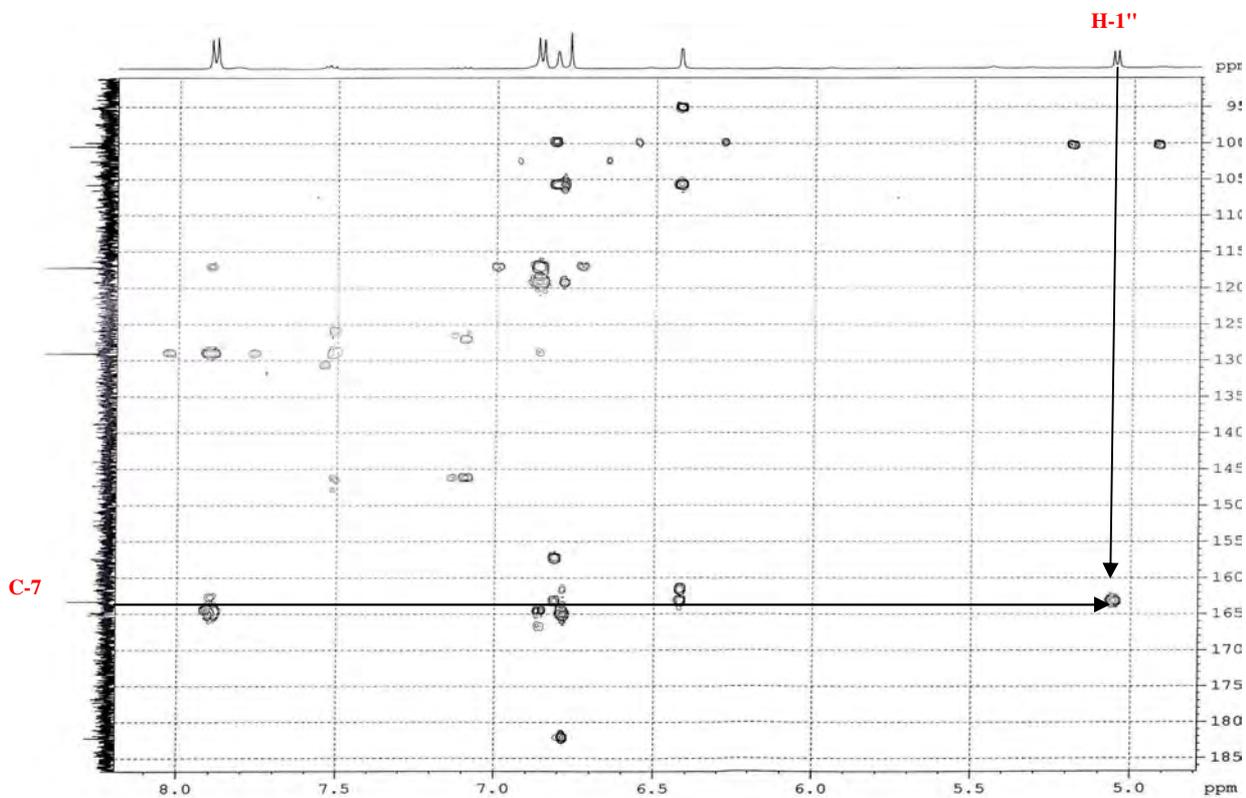
Spectre N°35. Spectre HSQC étalé (85 à 135 ppm) du composé SCB30-31 (600 MHz).



Spectre N°36. Spectre HSQC étalé (50 à 90 ppm) du composé SCB30-31 (600 MHz).



Spectre N°37. Spectre HMBC du composé SCB30-31 (600 MHz).



Spectre N°38. Spectre HMBC étalé (95 à 185 ppm) du composé SCB30-31 (600 MHz).

III.6.6. Elucidation de la structure du composé SCB33-34(2)

III.6.6.1. Analyses physico-chimiques

- Le composé SCB33-34(2) se présente sous forme de poudre jaune.
- Fluorescence sous lampe Wood : violette.
- $R_f = 0.24$ dans le système (Toluène/MEC/MeOH 4:3:3) et $R_f = 0.43$ dans le système (H₂O/MeOH/MEC/Acétylacétone 13:3:3:1).

III.6.6.2. Analyses spectroscopiques

Le spectre de masse, obtenu à haute résolution en mode électrospray (HR-SMESI) du composé SCB33-34(2) (Spectre N°39), montre la présence d'un ion pseudomoléculaire $[M+Na]^+$ à $m/z = 647.1586$ en ionisation positive, suggérant une masse moléculaire de 624. Cette masse est compatible avec la formule brute C₂₈H₃₂O₁₆.

Le spectre de RMN du ¹H enregistré dans le DMSO-*d*₆ (Spectre N°40-42) indique que le composé SCB33-34(2) est un flavonoïde diglycosylé : on observe un système ABX : les signaux $\delta_H = 6.91$ ppm (d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), $\delta_H = 7.51$ ppm (dd, $J = 2.2$ Hz, $J = 8.4$ Hz, H-6') et $\delta_H = 7.85$ ppm (d, $J = 2.2$ Hz, H-2') correspondant aux trois protons aromatiques du cycle B. Les protons à $\delta_H = 6.14$ ppm (d, $J = 2.1$ Hz), $\delta_H = 6.36$ ppm (d, $J = 2.1$ Hz) sont attribués aux protons H-6 et H-8 du cycle A des flavonoïdes. Le signal à $\delta_H = 12.52$ ppm confirme la présence d'un OH en 5.

Dans le spectre de RMN du ¹H, on observe deux signaux correspondant à des protons anomériques à $\delta_H = 4.42$ (d, $J = 1.5$ Hz) et $\delta_H = 5.41$ (d, $J = 7.5$ Hz) avec des constantes de couplage caractéristiques de α et β -configuration, respectivement (Lee *et al.*, 2003). Le rhamnose est identifié par son proton anomérique qui résonne à $\delta_H = 4.42$ ppm avec une constante de couplage faible et le signal du méthyle situé à $\delta_H = 0.99$ ppm (3H, $J = 6.2$ Hz). Les autres protons des sucres sont situés entre 3.22 ppm et 3.71 ppm. Le singulet résonnant à $\delta_H = 3.86$ ppm, intégrant pour trois protons, est typique d'un groupe méthoxyle.

Le spectre du ¹³C montre bien la présence d'un dioside dont la majorité de ses carbones résonne entre 67 ppm et 76 ppm. Le spectre permet l'observation des signaux à $\delta_C = 101.9$ ppm et $\delta_C = 101.4$ ppm correspondant aux carbones anomériques de glucose et rhamnose respectivement (Agrawal, 1989). Le carbone C-6''' à $\delta_C = 18.2$ ppm est caractéristique du méthyle du rhamnose.

L'analyse du spectre DEPT 135 a fourni plus d'indications. Ce spectre nous a permis de distinguer un CH₂ et par déduction dix carbones quaternaires. Par ailleurs, les 28 signaux dénombrés ont permis de confirmer la formule brute C₂₈H₃₂O₁₆, qui en accord avec les résultats fournis par les expériences MS.

Les techniques HSQC, Cosy et HMBC permettent l'attribution de tous les signaux de RMN du ¹H et du ¹³C pour le produit naturel SCB33-34(2).

L'expérience HMBC (Spectre N°49-50) permet de déterminer les positions respectives des trois constituants de la molécule. Le signal à $\delta_H = 67.3$ ppm de C-6'' et avec comparaison avec le glucose indique que C-6'' est le site glycosylé. Le signal $\delta_H = 4.42$ ppm (H-1''') montre une corrélation avec le signal $\delta_H = 67.3$ ppm (C-6'') du glucose. C'est-à-dire le rhamnose est attaché à C-6'' du glucose.

Le signal à $\delta_H = 5.41$ ppm (H-1'') du proton anomérique du glucose et corrélé avec le signal à $\delta_C = 133.4$ ppm (C-3) de l'aglycone, indique que la position C-3 de l'aglycone est glycosylée. De plus, le signal du méthoxyle à $\delta_H = 3.86$ ppm est corrélé avec le signal C-3' à $\delta_C = 147.4$ ppm du cycle B, indiquant que le groupement méthoxyle est attaché au carbone C-3'.

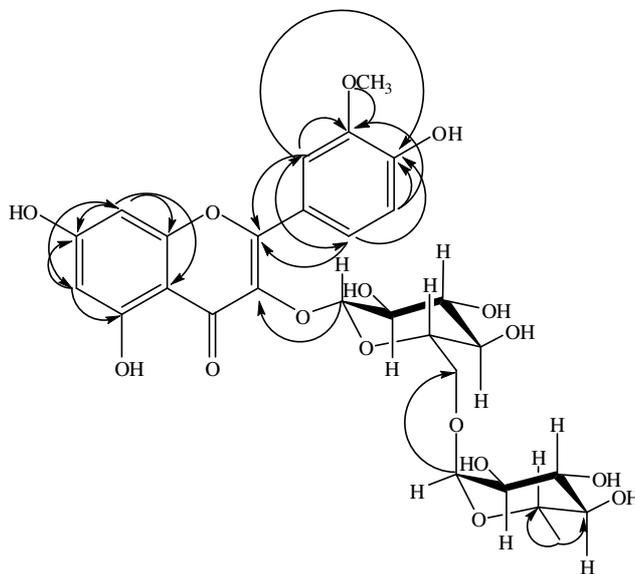
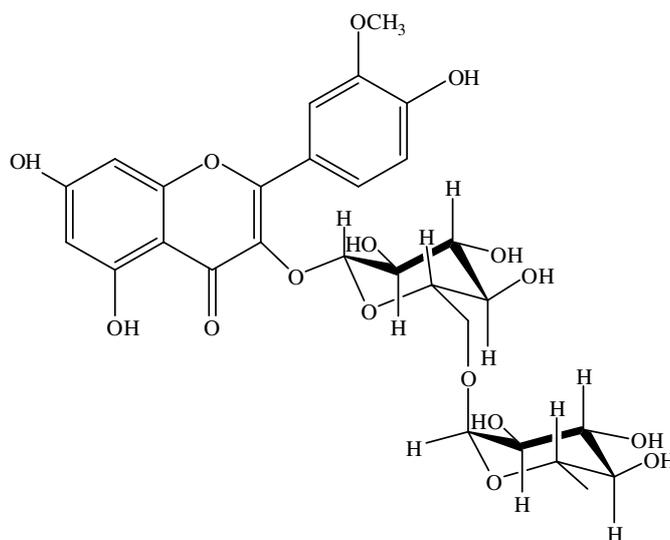


Fig II.4. Corrélations HMBC du composé SCB33-34(2) (C \rightarrow H).

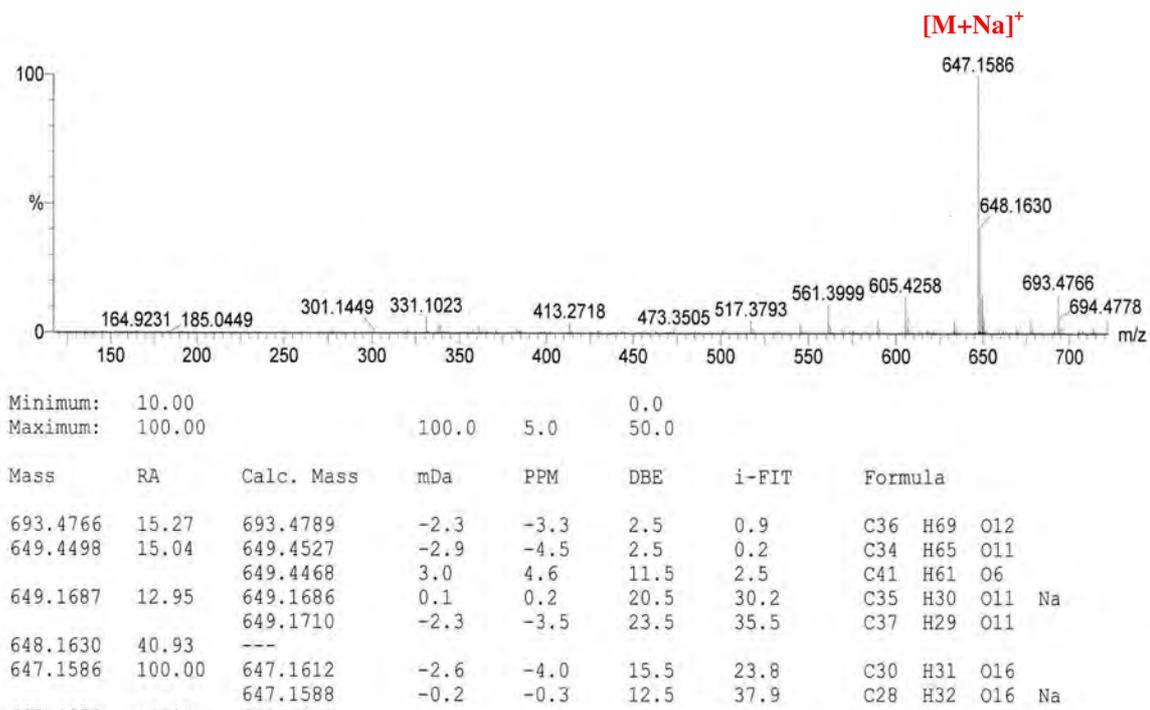
A partir de toutes ces données, la structure du composé SCB33-34(2) a donc pu être établie comme étant le 3'-O-Méthylquercitine-3-rutinoside ou isorhamnetine-3-O- β -D-glucosyl- (6 \rightarrow 1)-L-rhamnoside ou narcissine, isolé pour la première fois des corolles, sépales et paracorolle ou des fleurs du *Narcissus tazetta* (Kubota et Hase, 1956) et du pollen de *Lilium auratum* (Kotake et Arakawa, 1956). Les attributions de tous les signaux observés en RMN du ^1H et du ^{13}C dans le DMSO-*d*₆ sont présentés dans le tableau III.9 et confrontés à celles trouvés dans la littérature (Olszewska, 2005 ; Lee *et al.*, 2003).



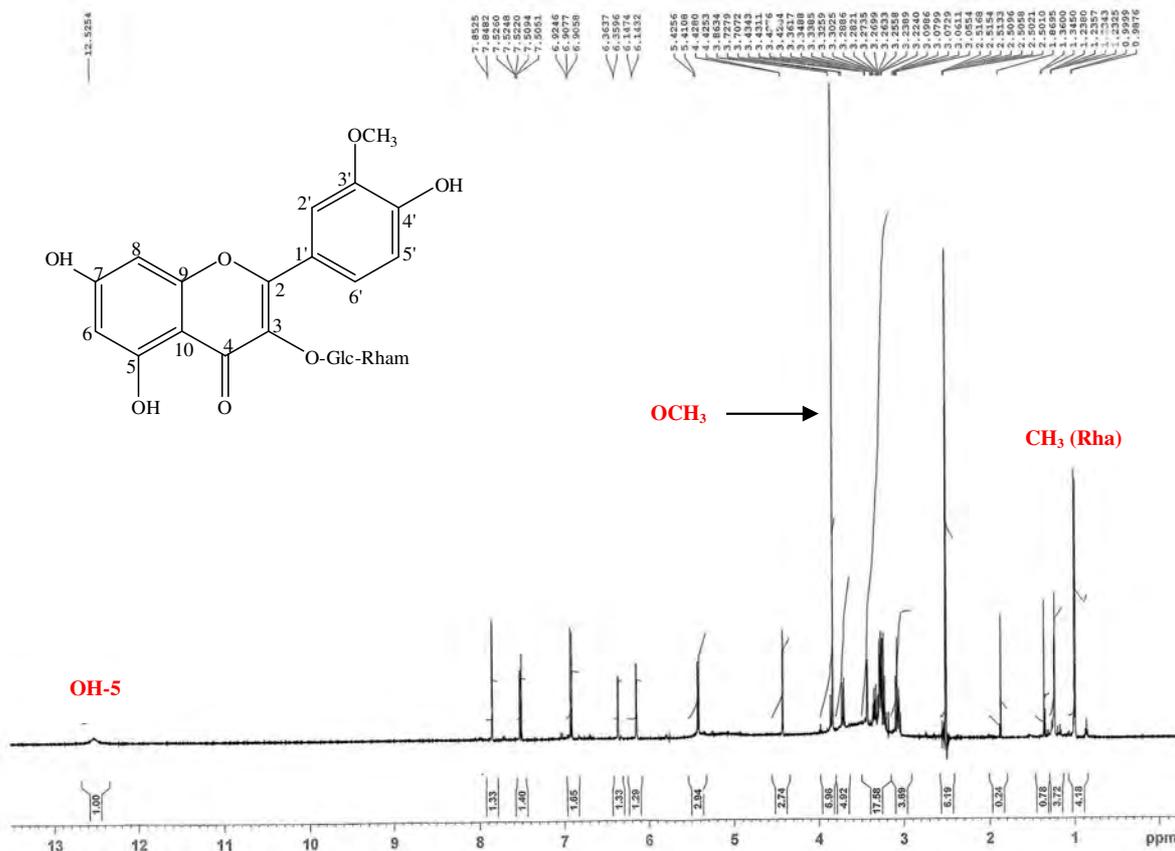
Isorhamnetine-3-O- β -D-glucosyl- (6 \rightarrow 1)-L-rhamnoside

Tableau III.9. RMN du ^1H et du ^{13}C du composé SCB33-34(2) (500 MHz, δ , J , en Hz ; 125 MHz, δ) et de la Narcissine (500 MHz, δ , J , en Hz ; 125 MHz, δ) dans le DMSO- d_6 .

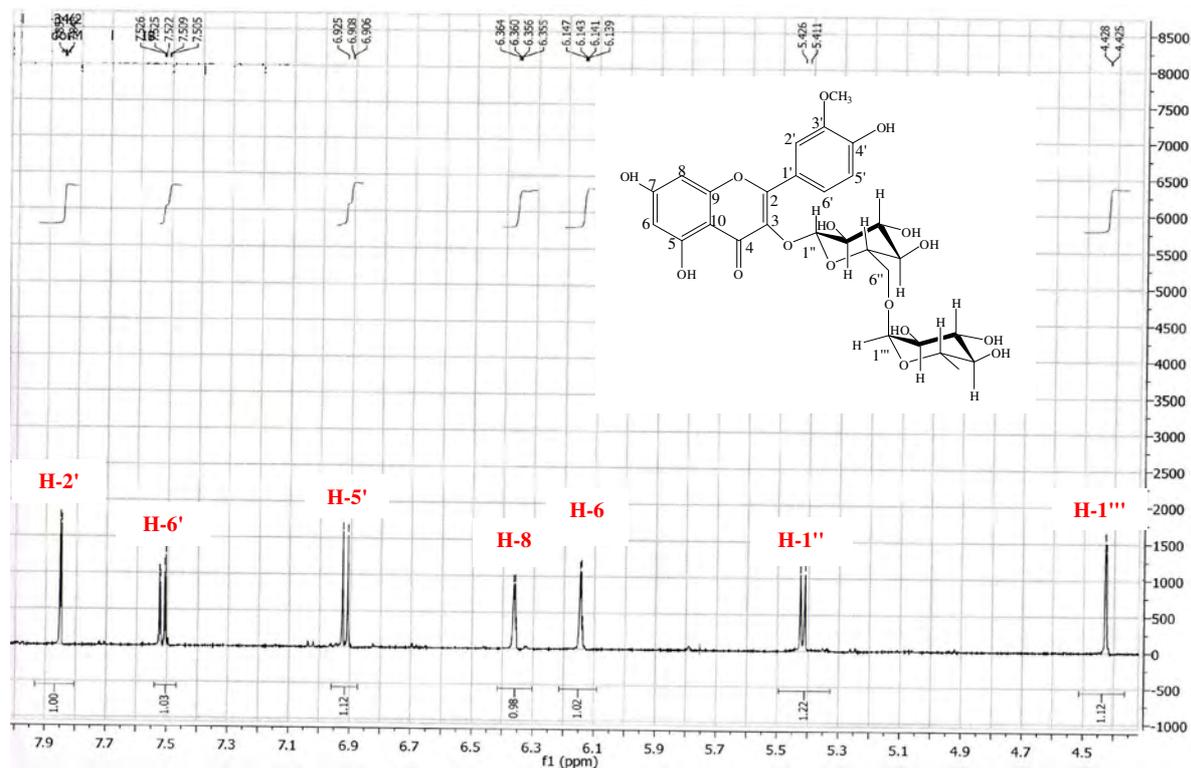
	Composé SCB33-34(2)		Narcissine	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
génine	δ (ppm)			
2	-	157.1	-	157.3
3	-	133.4	-	133.5
4	-	177.5	-	177.9
5	-	161.6	-	161.6
6	6.14 <i>d</i> ($J= 2.1$ Hz, 1H)	99.7	6.18 <i>d</i> ($J= 1.6$ Hz, 1H)	99.4
7	-	166.4	-	164.6
8	6.36 <i>d</i> ($J= 2.1$ Hz, 1H)	94.5	6.40 <i>d</i> ($J= 1.6$ Hz, 1H)	94.5
9	-	156.5	-	157.1
10	-	104.0	-	104.6
1'	-	121.5	-	121.6
2'	7.85 <i>d</i> ($J= 2.2$ Hz, 1H)	113.7	7.84 <i>d</i> ($J= 1.7$ Hz, 1H)	113.7
3'	-	147.4	-	147.4
4'	-	150.0	-	149.8
5'	6.91 <i>d</i> ($J= 8.4$ Hz, 1H)	115.7	6.90 <i>d</i> ($J= 8.4$ Hz, 1H)	115.8
6'	7.51 <i>dd</i> ($J= 8.4$ Hz, $J= 2.2$ Hz, 1H)	122.7	7.50 <i>dd</i> ($J= 8.4$ Hz, $J= 1.7$ Hz, 1H)	122.9
OCH ₃	3.86 <i>s</i> (3H)	56.1	3.82 <i>s</i> (3H)	56.3
OH-5	12.52 <i>s</i> (1H)		12.56 <i>s</i> (1H)	
glucose				
1''	5.41 <i>d</i> ($J= 7.5$ Hz, 1H)	101.9	5.42 <i>d</i> ($J= 7.2$ Hz, 1H)	101.7
2''	3.22-3.43 <i>m</i>	74.8	3.15-3.40 <i>m</i>	74.7
3''	3.22-3.43 <i>m</i>	76.9	3.15-3.40 <i>m</i>	76.8
4''	3.22-3.43 <i>m</i>	70.5	3.15-3.40 <i>m</i>	70.7
5''	3.22-3.43 <i>m</i>	76.4	3.15-3.40 <i>m</i>	76.3
6''	3.71 <i>d</i> ($J= 10.3$ Hz, 1H)	67.3	3.69 <i>br d</i> ($J= 11.0$ Hz, 1H)	67.5
rhamnose				
1'''	4.42 <i>d</i> ($J= 1.5$ Hz, 1H)	101.4	4.40 <i>d</i> ($J= 1.5$ Hz, 1H)	101.4
2'''	3.05-3.09 <i>m</i>	70.8	2.97-3.07 <i>m</i>	70.8
3'''		71.1		71.1
4'''		72.3		72.3
5'''		68.7		68.8
6''' CH ₃ (Rha)	0.99 <i>d</i> ($J= 6.2$ Hz, 3H)	18.2	0.96 <i>d</i> ($J= 6.2$ Hz, 3H)	18.1



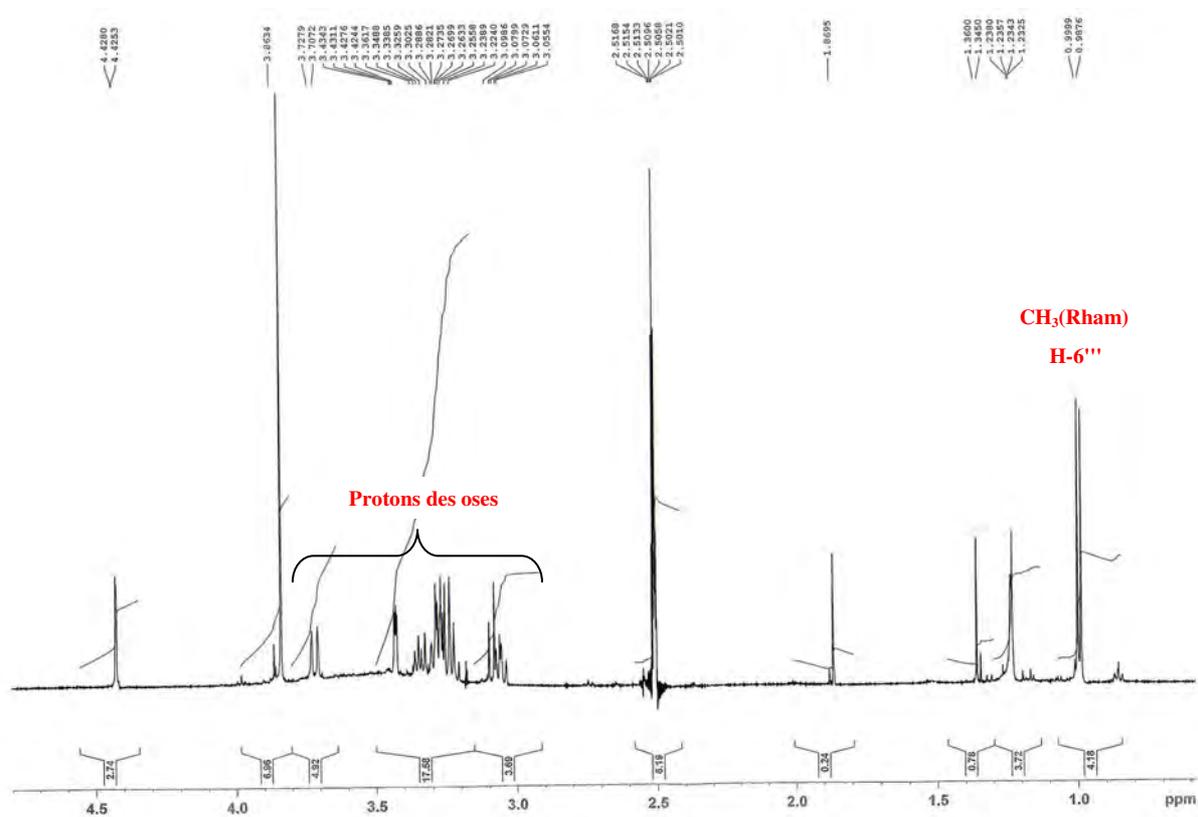
Spectre N°39. Spectre de masse en mode électrospray du composé SCB33-34(2).



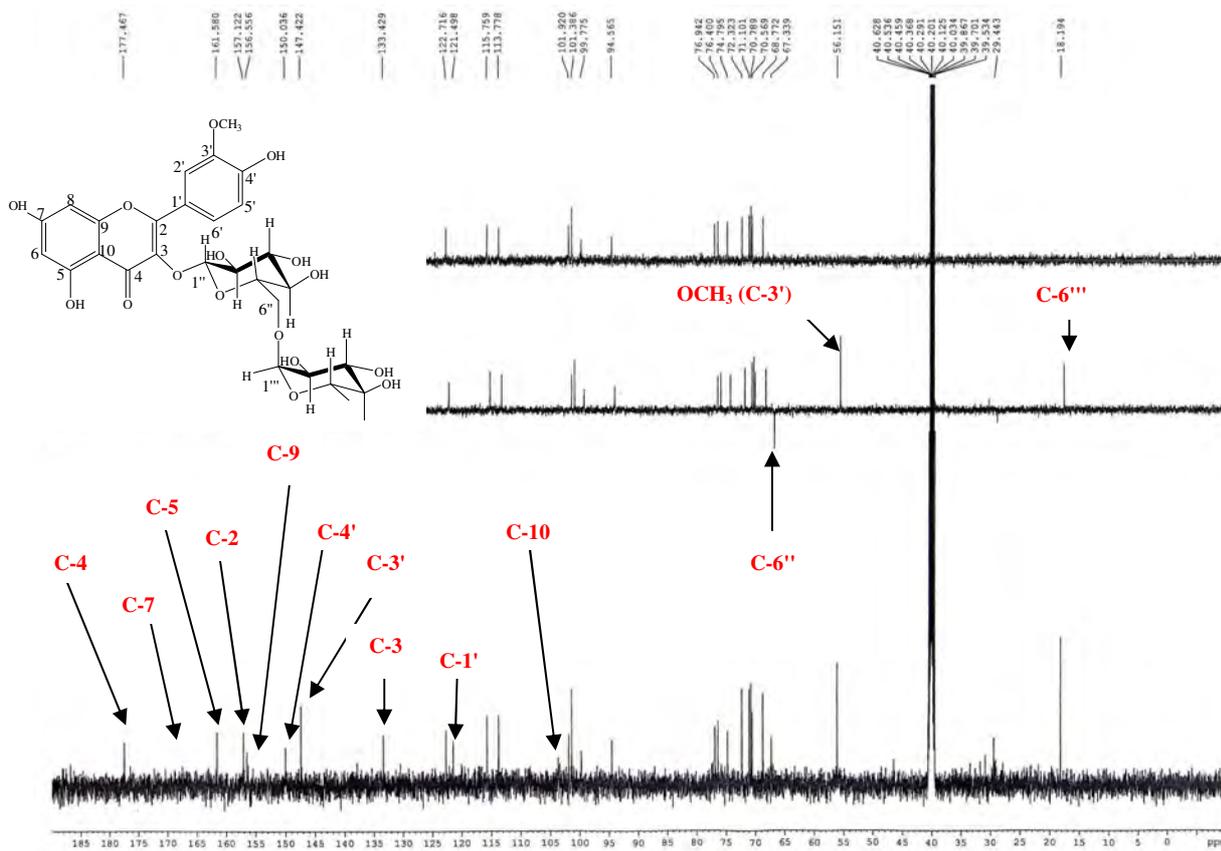
Spectre N°40. Spectre RMN ¹H du composé SCB33-34(2) (500 MHz).



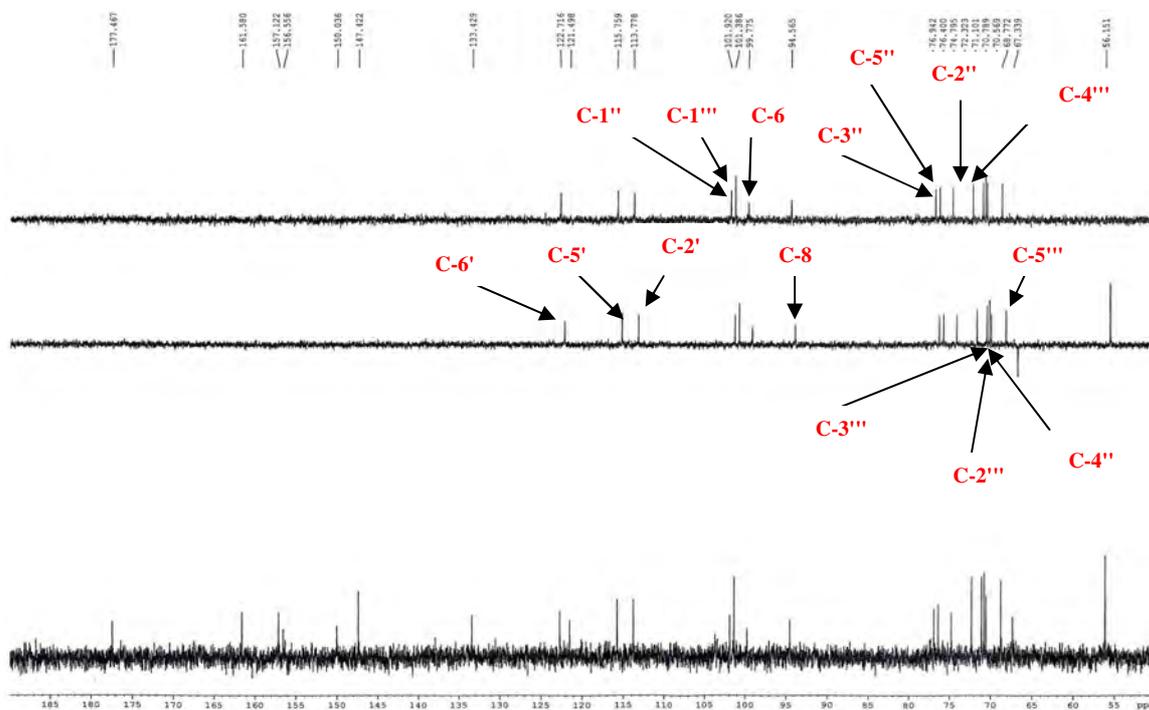
Spectre N°41. Spectre RMN ¹H étalé (4.4 à 7.9 ppm) du composé SCB33-34(2) (500 MHz).



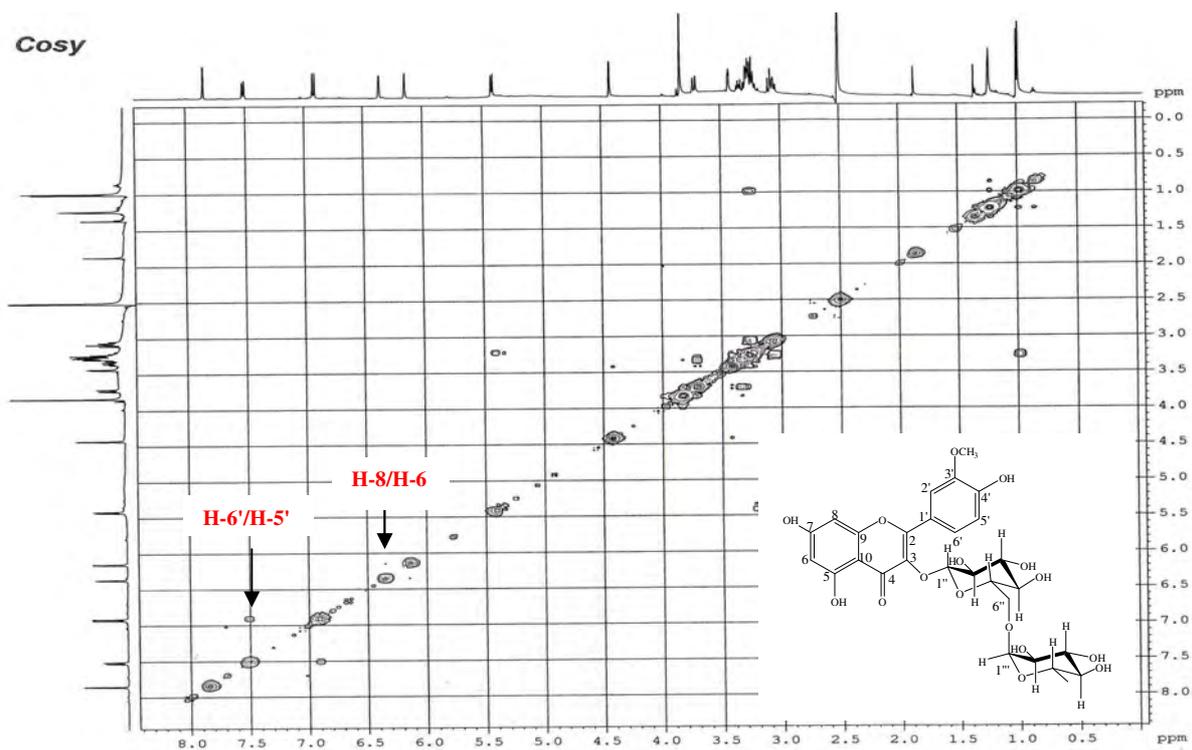
Spectre N°42. Spectre RMN ¹H étalé (1.0 à 4.5 ppm) du composé SCB33-34(2) (500 MHz).



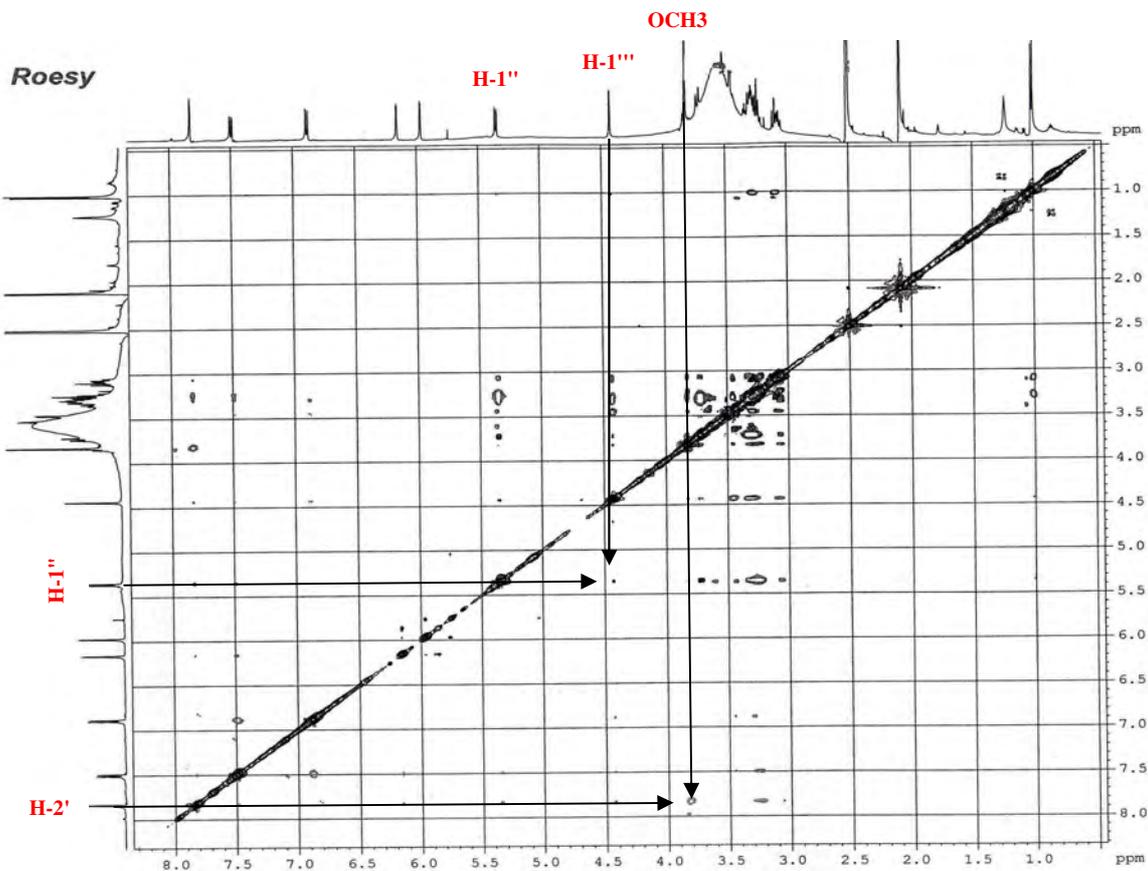
Spectre N°43. Spectre RMN ¹³C du composé SCB33-34(2) (125 MHz).



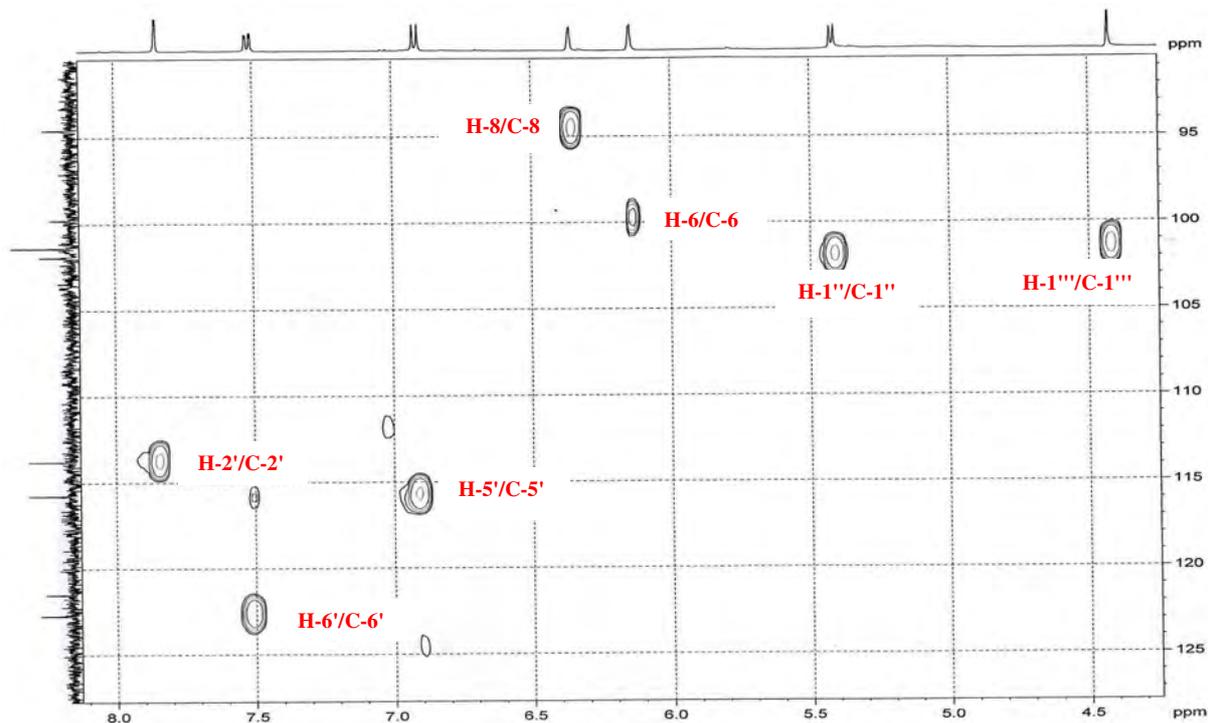
Spectre N°44. Spectre RMN ¹³C étalé (55 à 185 ppm) du composé SCB33-34(2) (125 MHz).



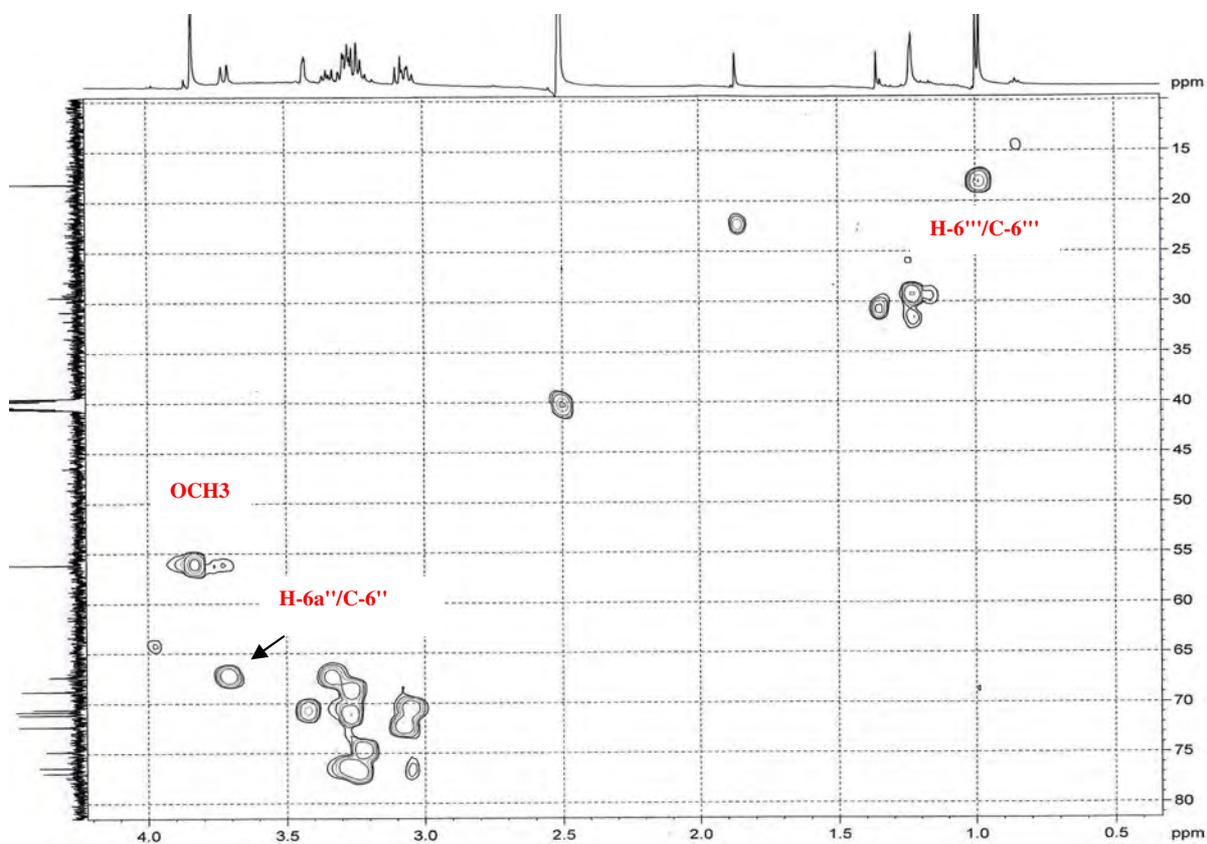
Spectre N°45. Spectre Cosy du composé SCB33-34(2) (500 MHz).



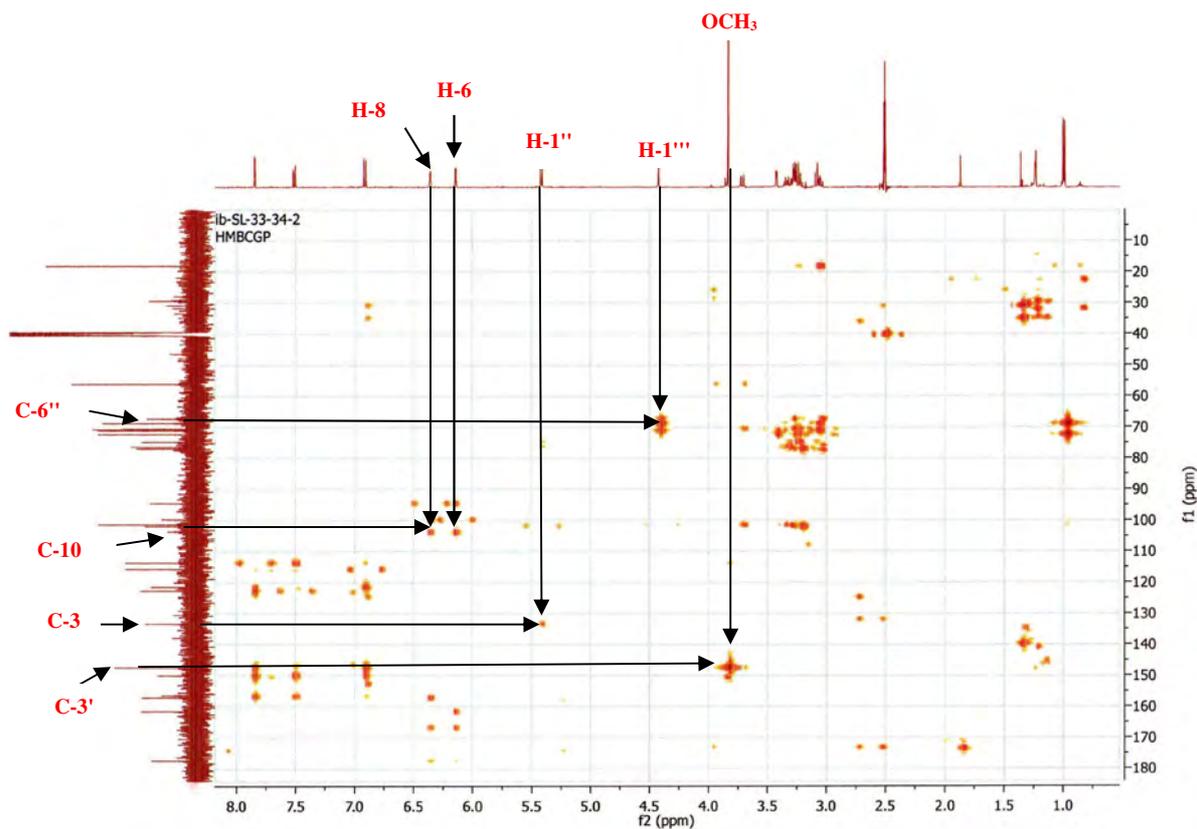
Spectre N°46. Spectre Roesy du composé SCB33-34(2) (500 MHz).



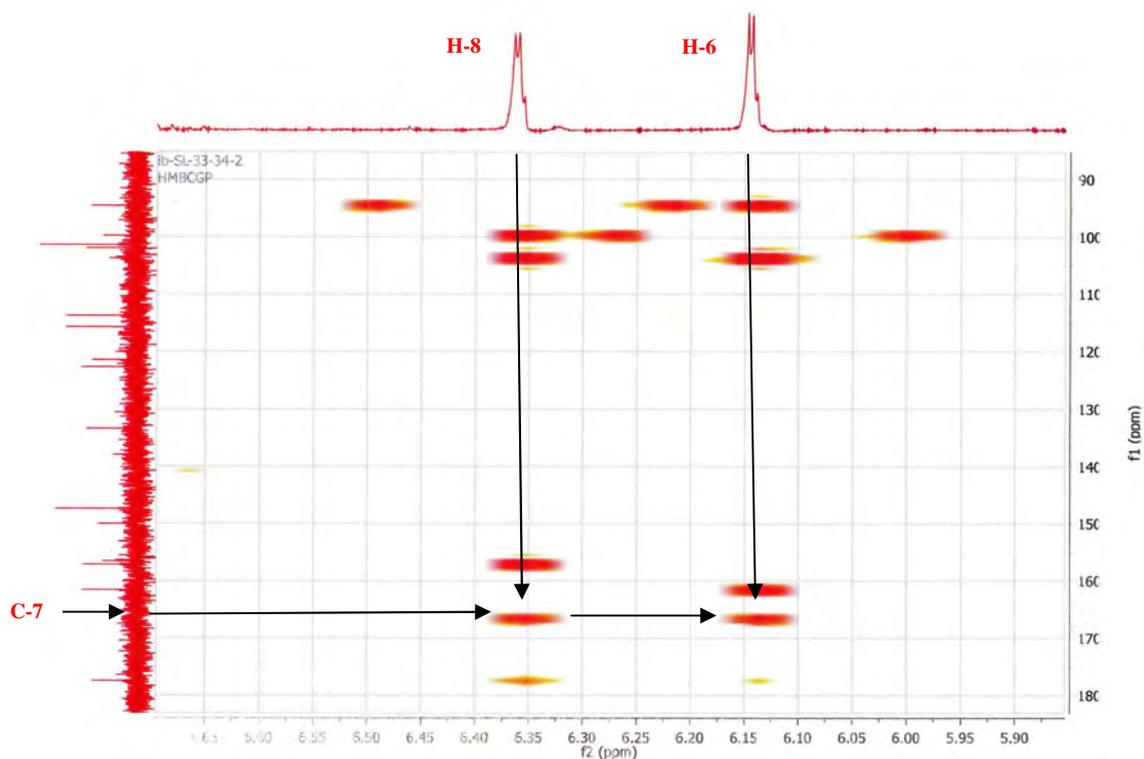
Spectre N°47. Spectre HSQC étalé (4.0 à 8.0 ppm) du composé SCB33-34(2) (500 MHz).



Spectre N°48. Spectre HSQC étalé (0.5 à 4.0 ppm) du composé SCB33-34(2) (500 MHz).



Spectre N°49. Spectre HMBC du composé SCB33-34(2) (600 MHz).



Spectre N°50. Spectre HMBC étalé (90 à 180 ppm) du composé SCB33-34(2) (600 MHz).

III.6.7. Elucidation de la structure du composé SCB33-34(4)

III.6.7.1. Analyses physico-chimiques

- Le composé SCB33-34(4) se présente sous forme de poudre jaune.
- Fluorescence sous lampe Wood : violette.
- $R_f = 0.28$ dans le système (Toluène/MEC/MeOH 4:3:3) et $R_f = 0.44$ dans le système (H₂O/MeOH/MEC/Acétylacétone 13:3:3:1).

III.6.7.2. Analyses spectroscopiques

L'analyse par spectrométrie de masse réalisée à haute résolution en mode électrospray positif du composé SCB33-34(4) (Spectre N°51), montre la présence d'un ion pseudomoléculaire $[M+Na]^+$ à $m/z = 501.0996$, suggérant une masse moléculaire de 478. Cette masse est compatible avec la formule brute C₂₂H₂₂O₁₂.

Le spectre de RMN du ¹H enregistré dans CD₃OD (Spectre N°52-53) suggère la présence d'une génine flavonique semblable à celles du composé SCB33-34(2) : on observe un système ABX : les signaux $\delta_H = 7.89$ ppm (d, $J = 2.0$ Hz), $\delta_H = 7.60$ ppm (dd, $J = 2.0$ Hz, $J = 8.4$ Hz) et $\delta_H = 6.88$ ppm (d, $J = 8.4$ Hz) correspondants respectivement aux protons H-2', H-6' et H-5' du cycle B. La présence d'un méthoxyle est caractérisée par l'apparition d'un singulet à $\delta_H = 3.94$ ppm est confirmée par la RMN du ¹³C par l'apparition d'un carbone à $\delta_H = 55.4$ ppm.

La RMN du ¹H montre deux signaux à $\delta_H = 6.03$ ppm (d, $J = 2.0$ Hz) et $\delta_H = 6.17$ ppm (d, $J = 2.0$ Hz), qui sont correspondants respectivement aux protons H-6 et H-8 du cycle A de flavonoïde. Dans le spectre de RMN du ¹H, on observe un signal correspondant à un proton anomérique à $\delta_H = 5.18$ ppm (d, $J = 7.6$ Hz).

Le spectre du ¹³C (Spectre N°54-55) permet notamment l'observation d'un signal à $\delta_C = 102.7$ correspondant au proton anomérique de glucose. La présence de cinq carbones en RMN du ¹³C à $\delta_C = 74.5$ ppm (C-2"), $\delta_C = 77.1$ ppm (C-3"), $\delta_C = 70.1$ ppm (C-4"), $\delta_C = 76.7$ ppm (C-5") et $\delta_C = 61.2$ ppm (C-6"), permet de confirmer la présence d'un seul sucre, notamment le glucose (Agrawal, 1989).

L'expérience HMBC (Spectre N°58) permet de déterminer les positions des constituants de la molécule. Le signal à $\delta_H = 5.18$ ppm (H-1") de proton anomérique du glucose est corrélé avec le signal à $\delta_C = 133.9$ ppm (C-3) de l'aglycone, indiquant que la position C-3 de l'aglycone est glycosylé. De plus, le signal du méthoxyle à $\delta_H = 3.94$ ppm est corrélé avec le signal C-3' à $\delta_C = 147.0$ ppm du cycle B, indiquant que le groupe méthoxyle est attaché à la position C-3'.

Les attributions réalisées sont également confirmées par les expériences de résonance magnétique nucléaire bidimensionnelles classiques (HSQC, HMBC).

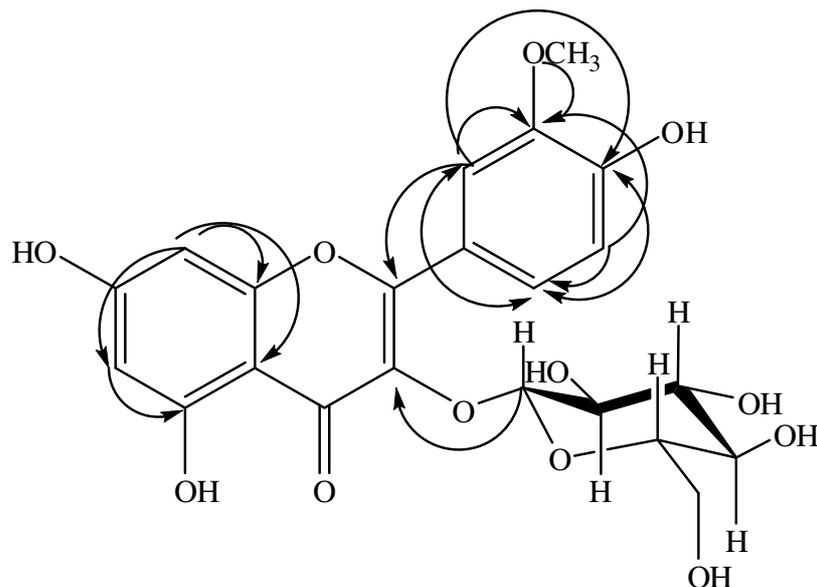
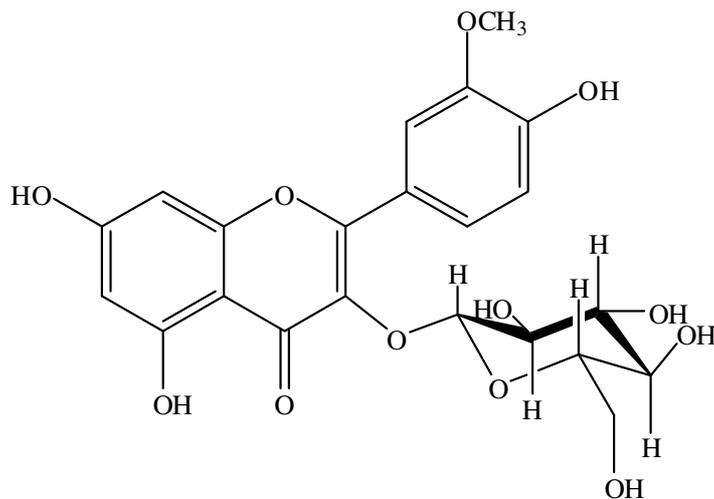


Fig II.5. Corrélations HMBC du composé SCB33-34(4) (C → H).

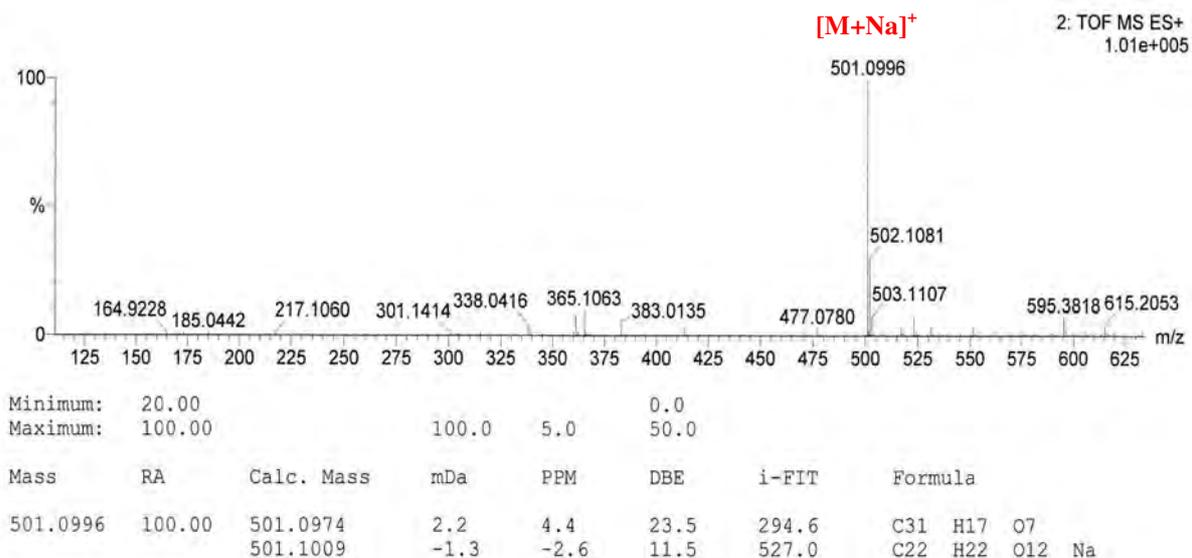
Ces données ont permis d'établir la structure du composé SCB33-34(4) comme étant le 4',5,7-trihydroxy-3'-methoxy-3-O-glucosylflavone ou isorhamnetine-3-O-β-glucoside, isolé pour la première fois des fleurs d'*Argemone Mexicana* Linn. (Rahman et Ilyas, 1962) et *Calendula officinalis* L. (Friedrich, 1962). Les attributions de tous les signaux des spectres du proton et du carbone du composé SL33-34(4) sont présentés dans le tableau III.10 avec les valeurs des déplacements chimiques trouvés dans la littérature (Olszewska, 2005 ; Beck et haberlein, 1999 ; Gutzeit *et al.*, 2007) .



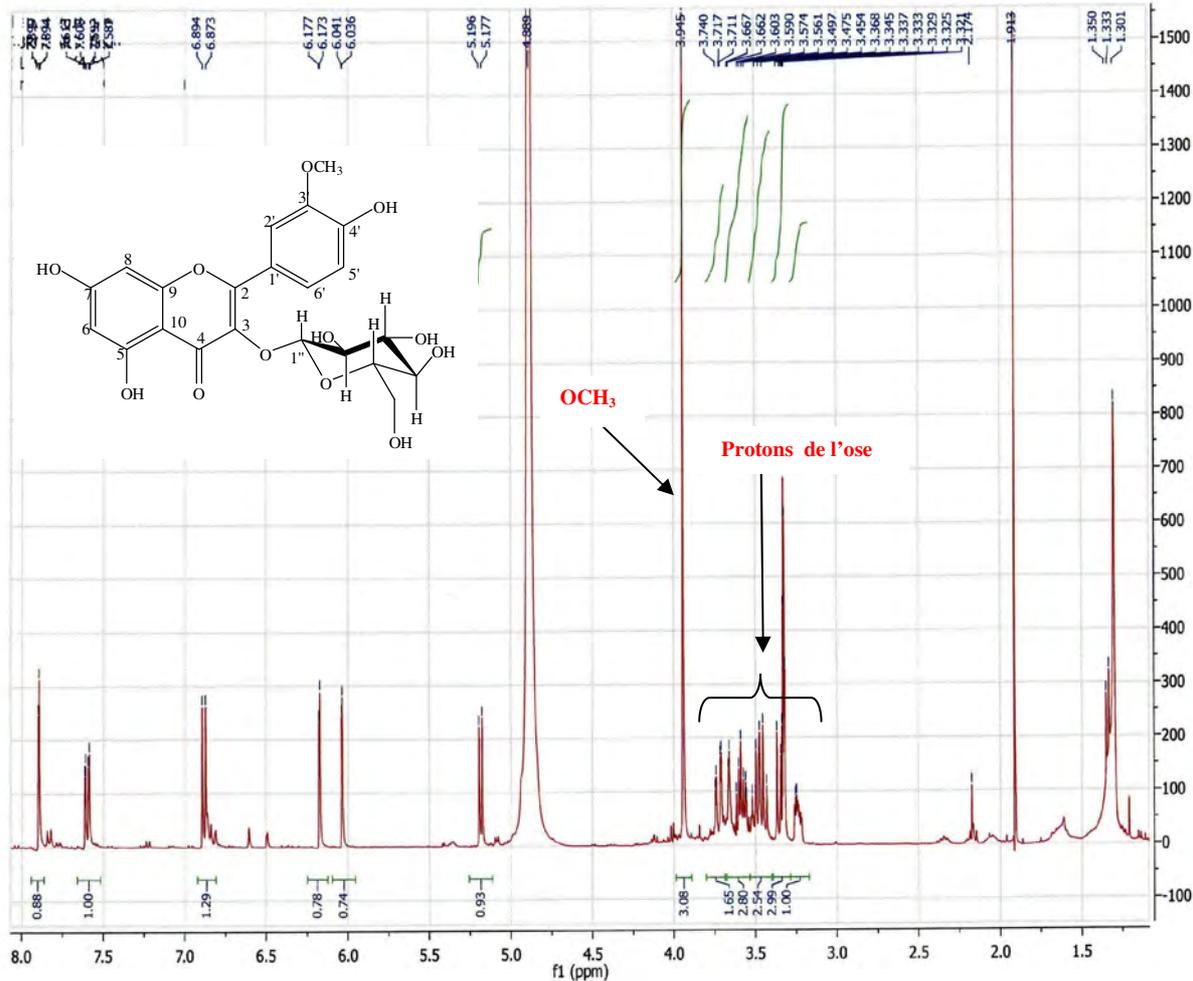
Isorhamnetine-3-O-β-glucoside

Tableau III.10. RMN du ^1H et du ^{13}C du composé SCB33-34(4) (400 MHz, δ , J , en Hz ; 125 MHz, δ) et de l'isorhamnetine-3- O - β -glucoside (300 MHz, δ , J , en Hz ; 125 MHz, δ) dans le CD_3OD .

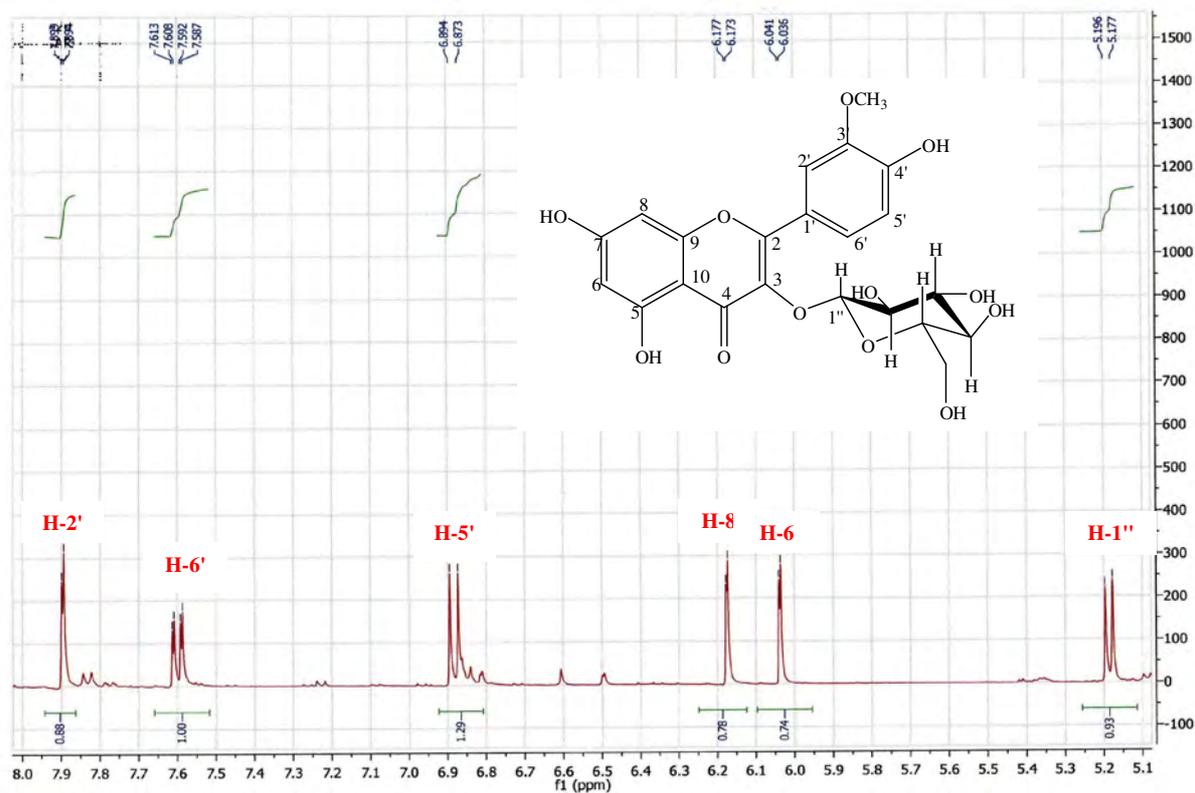
	Composé SCB33-34(4)		Isorhamnetine-3- O - β -glucoside	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
génine	δ (ppm)			
2	-	157.1		157.3
3	-	133.9		133.5
4	-	177.7		177.9
5	-	161.4		161.6
6	6.03 <i>d</i> ($J= 2.0$ Hz, 1H)	99.8	6.20 <i>d</i> ($J= 2.0$ Hz, 1H)	99.4
7	-	166.8		166.7
8	6.17 <i>d</i> ($J= 2.0$ Hz, 1H)	94.0	6.38 <i>d</i> ($J= 2.0$ Hz, 1H)	94.5
9	-	157.0		157.1
10	-	103.7		104.6
1'		121.6		121.6
2'	7.89 <i>d</i> ($J= 2.0$ Hz, 1H)	113.0	7.91 <i>d</i> ($J= 2.0$ Hz, 1H)	113.7
3'	-	147.0		147.4
4'	-	149.5		149.8
5'	6.88 <i>d</i> ($J= 8.4$ Hz, 1H)	114.6	6.89 <i>d</i> ($J= 8.0$ Hz, 1H)	115.8
6'	7.60 <i>dd</i> ($J= 8.4$ Hz, $J= 2.0$ Hz, 1H)	122.5	7.59 <i>dd</i> ($J= 8.0$ Hz, $J= 2.0$ Hz, 1H)	122.9
OMe	3.94 <i>s</i> (3H)	55.4	3.94 <i>s</i> (3H)	56.3
glucose				
1''	5.18 <i>d</i> ($J= 7.6$ Hz, 1H)	102.7	5.38 <i>d</i> ($J= 7.6$ Hz, 1H)	101.7
2''	3.43-3.49 <i>m</i>	74.5	3.45-3.48 <i>m</i>	75.9
3''	3.43-3.49 <i>m</i>	77.1	3.45-3.48 <i>m</i>	78.5
4''	3.32 <i>m</i>	70.1	3.35 <i>m</i>	71.5
5''	2.05 <i>m</i>	76.7	3.22 <i>m</i>	78.1
6''	a: 3.59 <i>dd</i> ($J= 11.6$ Hz, $J= 5.2$ Hz, 1H)	61.2	a: 3.55 <i>dd</i> ($J= 12.0$ Hz, $J= 5.0$ Hz, 1H)	62.5
	b: 3.72 <i>dd</i> ($J= 11.6$ Hz, $J= 2.4$ Hz, 1H)		b: 3.72 <i>dd</i> ($J= 12.0$ Hz, $J= 2.5$ Hz, 1H)	



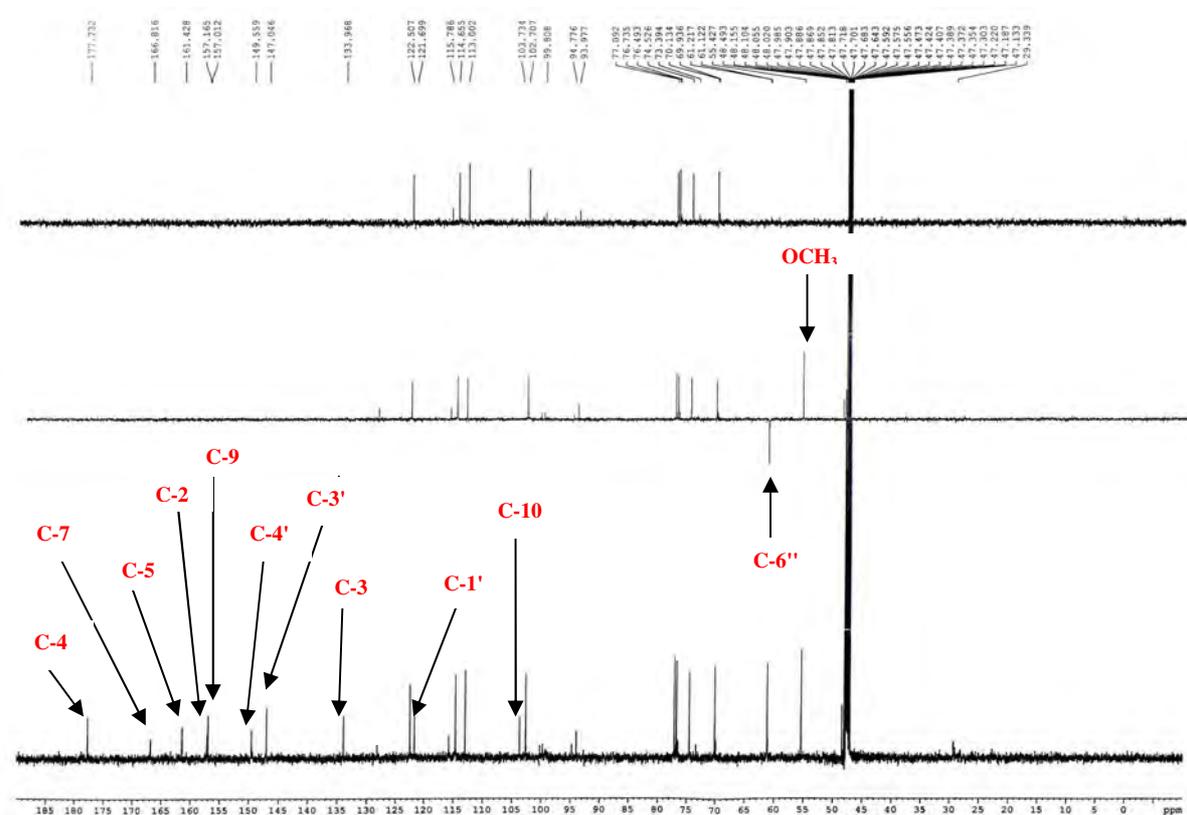
Spectre N°51. Spectre de masse en mode électrospray du composé SCB33-34(2).



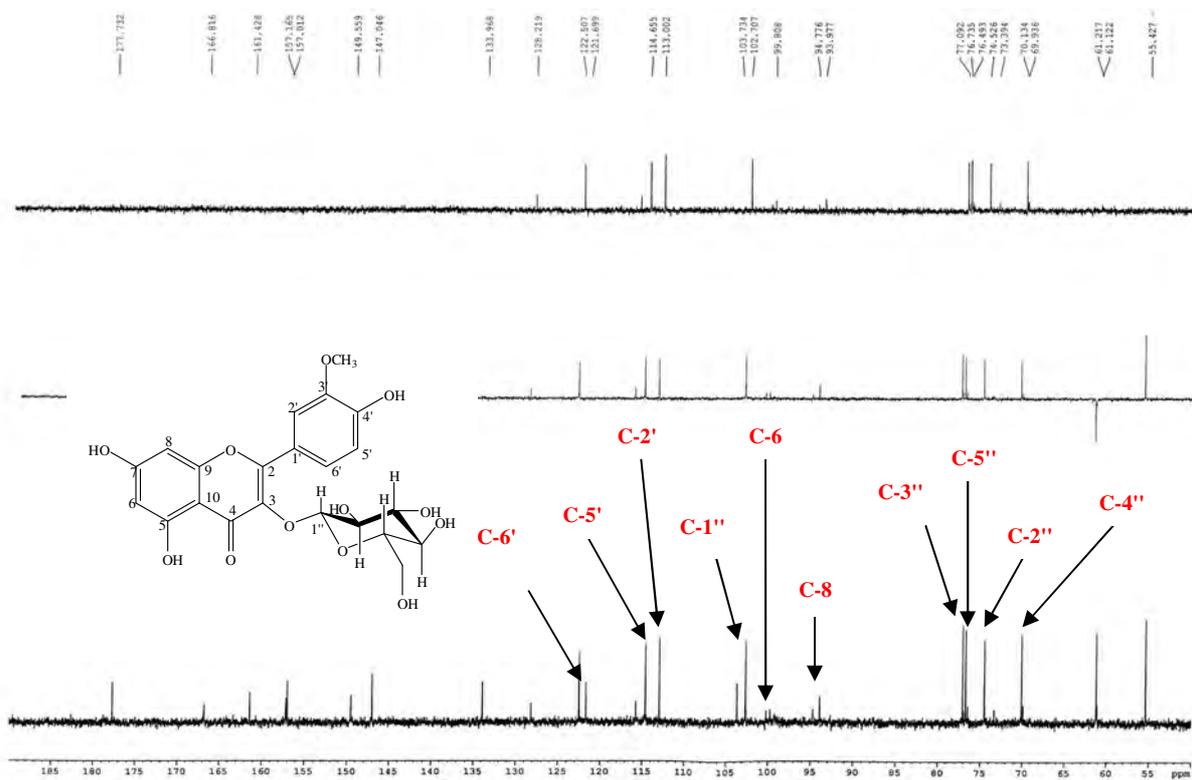
Spectre N°52. Spectre de masse du composé SCB33-34(4) (400 MHz).



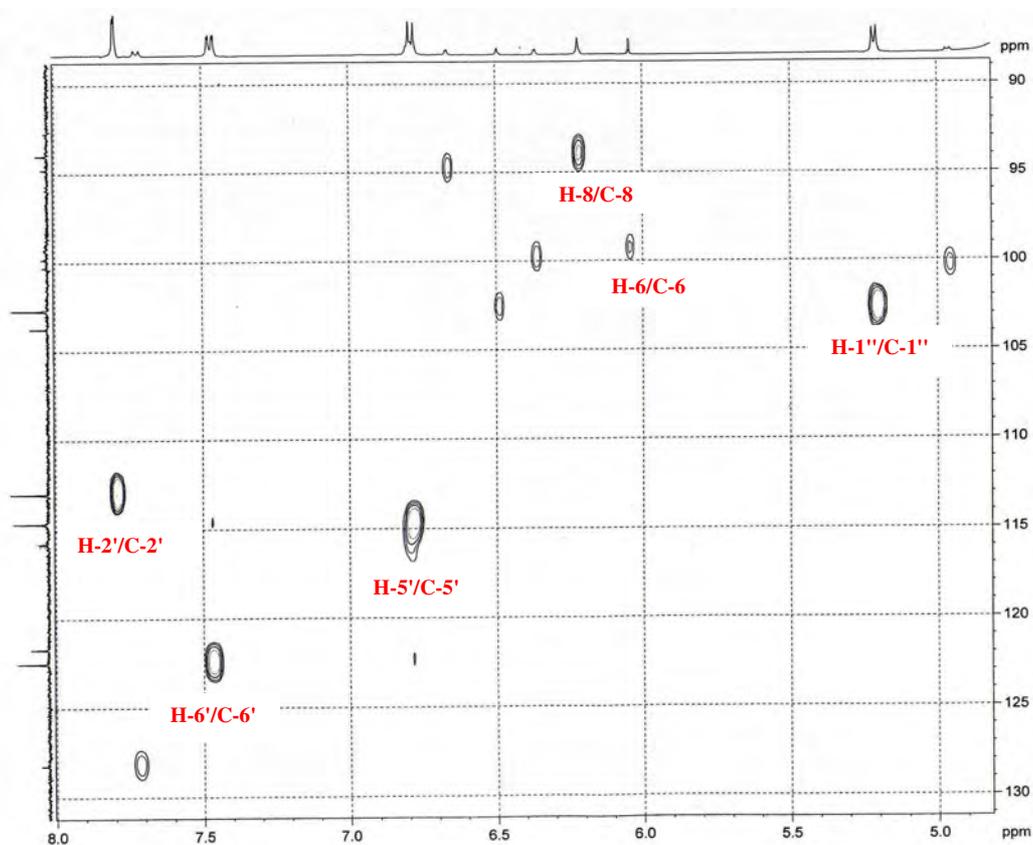
Spectre N°53. Spectre RMN ¹H étalé (5.1 à 8.0 ppm) du composé SCB33-34(4) (400 MHz).



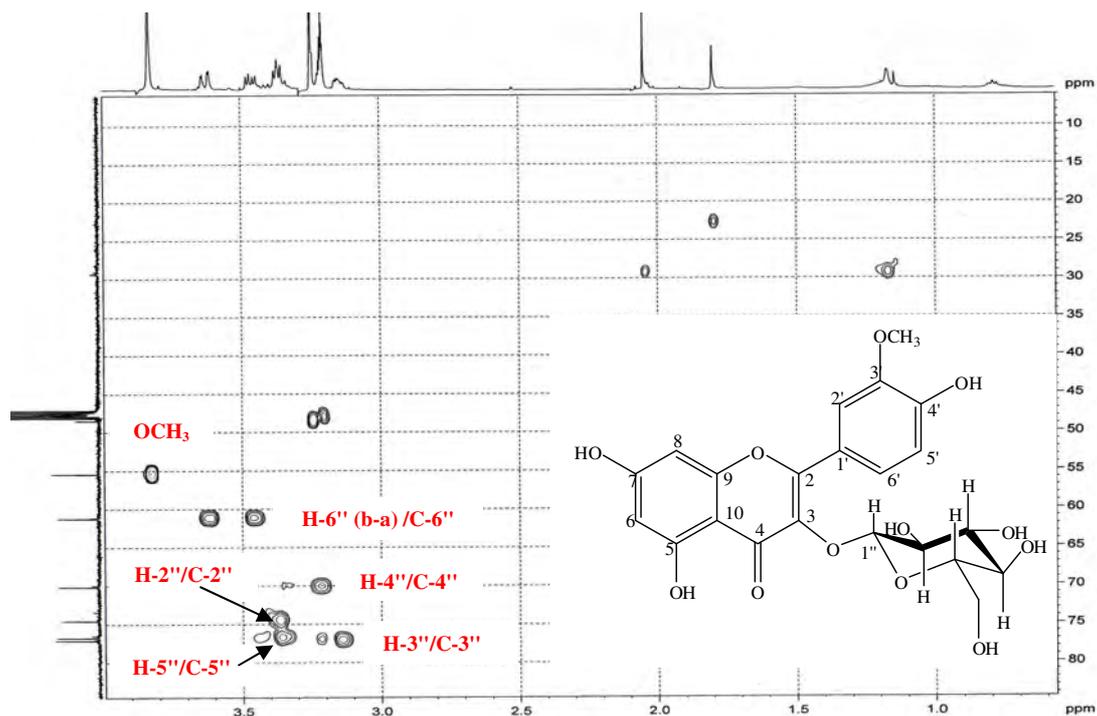
Spectre N°54. Spectre RMN ¹³C du composé SCB33-34(4) (125 MHz).



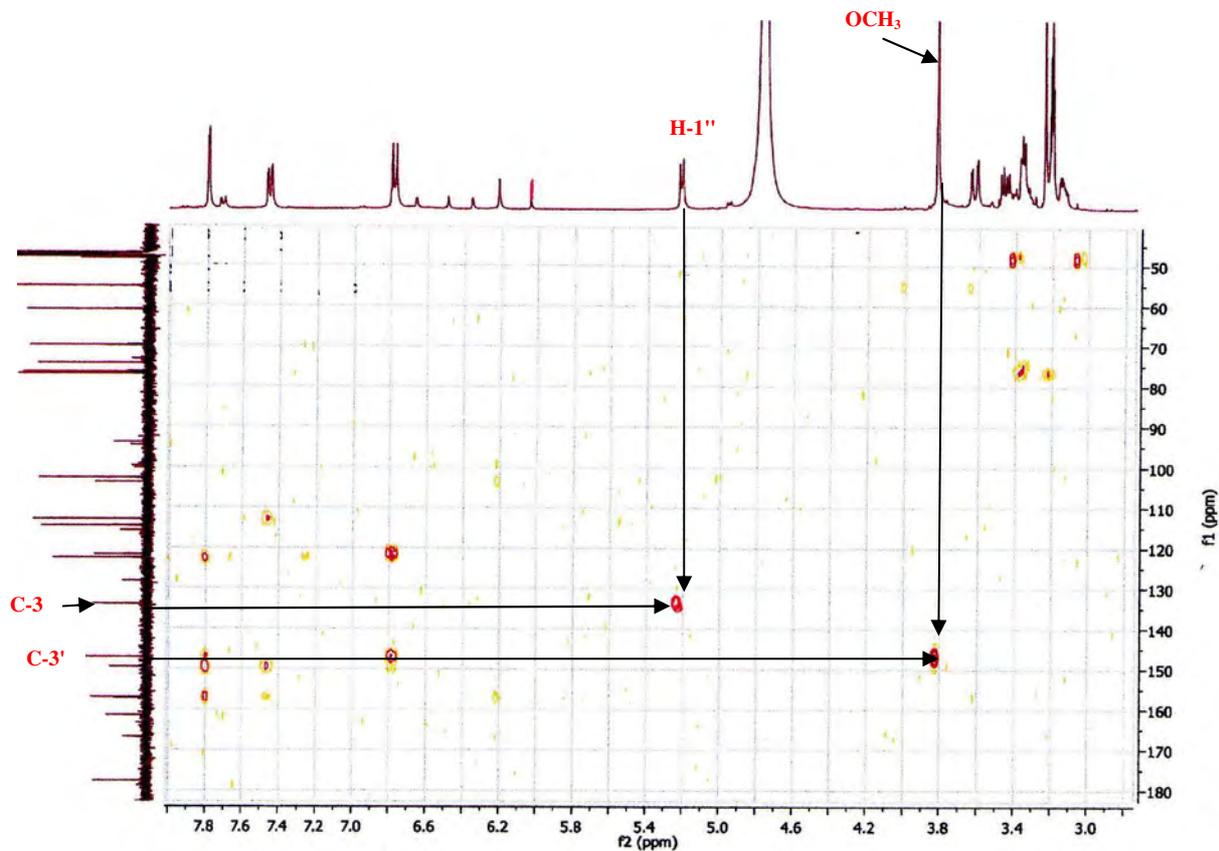
Spectre N°55. Spectre RMN ¹³C étalé (50 à 180 ppm) du composé SCB33-34(4) (125 MHz).



Spectre N°56. Spectre HSQC étalé (90 à 130 ppm) du composé SCB33-34(4) (500 MHz).



Spectre N°57. Spectre HSQC étalé (10 à 80 ppm) du composé SCB33-34(4) (500 MHz).



Spectre N°58. Spectre HMBC étalé (50 à 180 ppm) du composé SCB33-34(4) (600 MHz).

III.6.8. Elucidation de la structure du composé SCB38

III.6.8.1. Analyses physico-chimiques

- Le composé SCB38 se présente sous forme de poudre jaune.
- Fluorescence sous lampe Wood : violette.
- $R_f = 0.17$ dans le système (Toluène/MEC/MeOH 4:3:3) et $R_f = 0.31$ dans le système (H₂O/MeOH/MEC/Acétylacétone 13:3:3:1).

III.6.8.2. Analyses spectroscopiques

Le spectre de masse du composé SCB38 (Spectre N°59), obtenu à haute résolution en mode électrospray positif (ESI), a permis d'observer un ion pseudomoléculaire $[M+Na]^+$ à $m/z = 633.1447$, suggérant une masse moléculaire de 610. Cette masse est compatible avec la formule brute C₂₇H₃₀O₁₆.

Sur le spectre de RMN du ¹H enregistré dans le DMSO-*d*₆ (Spectre N°60-61), l'observation de la région des aromatiques nous montre que ce composé appartient à la même série que certains composés isolés du genre *Stachys*. En effet, les déplacements chimiques et couplages des signaux observés dans cette région sont très proches de ceux que nous avons donnés pour le composé R141-151. Dans la région des aromatiques, les signaux à $\delta_H = 6.95$ ppm (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3'/5') et $\delta_H = 7.98$ ppm (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2'/6'), formant un système AA'XX', montrent la présence d'un seul substituant sur le cycle B, c'est-à-dire en position 4', deux singulets : $\delta_H = 6.83$ ppm (s) ; $\delta_H = 6.65$ ppm (s) correspondant aux protons 3 et 6 ou 8 du cycle A et C respectivement.

Dans le spectre de RMN du ¹H, on observe aussi deux signaux correspondant à des protons anomériques à $\delta_H = 5.1$ ppm et $\delta_H = 4.9$ ppm, attribuables à des protons anomériques de deux sucres, ainsi qu'un ensemble de signaux entre $\delta_H = 3.2$ ppm et $\delta_H = 3.9$ ppm qui correspond aux protons des oses.

Le spectre du ¹³C (Spectre N°62-63), permet l'observation des signaux à $\delta_C = 100.1$ ppm et $\delta_C = 102.2$ ppm correspondant aux protons anomériques de glucose et allose respectivement (Lenherr et Mabry, 1987). La présence de dix carbone en RMN du ¹³C à $\delta_C = 81.7$ (C-2''), $\delta_C = 76.2$ (C-3''), $\delta_C = 69.8$ (C-4''), $\delta_C = 77.5$ (C-5'') et $\delta_C = 61.0$ (C-6''), et $\delta_C = 72.0$ (C-2'''), $\delta_C = 71.5$ (C-3'''), $\delta_C = 67.7$ (C-4'''), $\delta_C = 75.1$ (C-5''') et $\delta_C = 61.5$ (C-6'''), permet de confirmer la présence de deux sucres qui pourraient être le glucose et l'allose respectivement. La masse proposée de 610 correspond parfaitement à la présence dans la molécule d'une génine apigénine et de deux acides glucuroniques.

L'hydrolyse acide en présence des sucres témoins a permis d'identifier le glucose et l'allose.

L'expérience HMBC (Spectre N°70) permet de déterminer les positions respectives des constituants de la molécule. Le signal à $\delta_H = 5.10$ ppm (H-1'') de proton anomérique de glucose et corrélé avec le signal à $\delta_C = 152.9$ ppm (C-7) de l'aglycone, indique que la position C-7 est glycosylée. Cette hypothèse est confirmée par l'expérience Roesy (Spectre N°66) qui montre la présence d'une corrélation entre le proton anomérique de glucose qui résonne à $\delta_H = 5.10$ ppm et le proton H-6 à $\delta_H = 6.65$ ppm ; aussi l'expérience HMBC montre que le signal à $\delta_H = 4.9$ ppm de proton anomérique de l'allose est corrélé avec le signal à $\delta_C = 81.7$ ppm (C-2''), indiquant que l'allose est attaché à C-2'' du glucose.

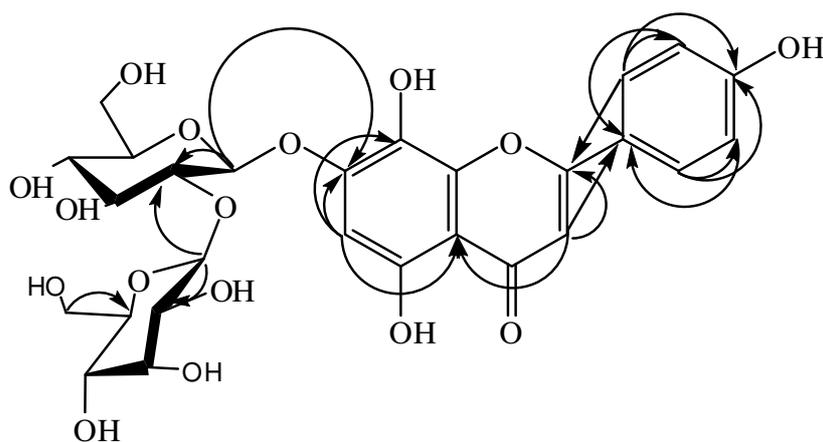
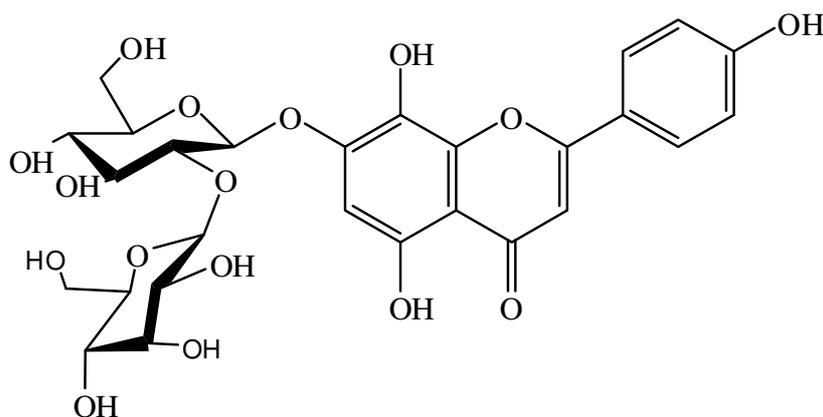


Fig.II.6. Corrélations HMBC du composé SCB38 (C → H).

C'est ensuite l'expérience COSY (Spectre N°64-65) qui permet le plus efficacement l'attribution précise des signaux correspondant à chacun des atomes dans les deux acides uroniques.

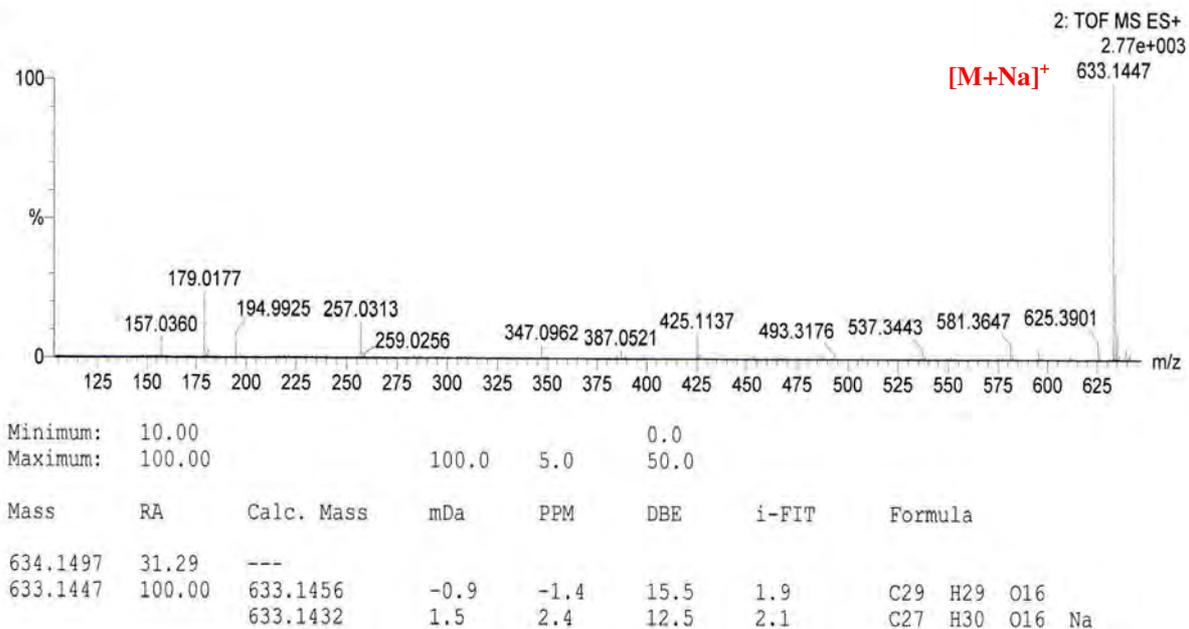
La structure du composé SCB38 a donc pu être établie comme étant l'ioscutellareine-7-*O*-β-D-allosyl-(1→2)-glucoside. Cette molécule a été isolée pour la première fois de *Stachys recta* (Lenherr *et al.*, 1984). Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN du ^1H (Lenherr *et al.*, 1984) et du ^{13}C (El-Ansari *et al.*, 1991), sont présentés dans le tableau III.11. avec leurs attributions et ceux trouvés dans la littérature.



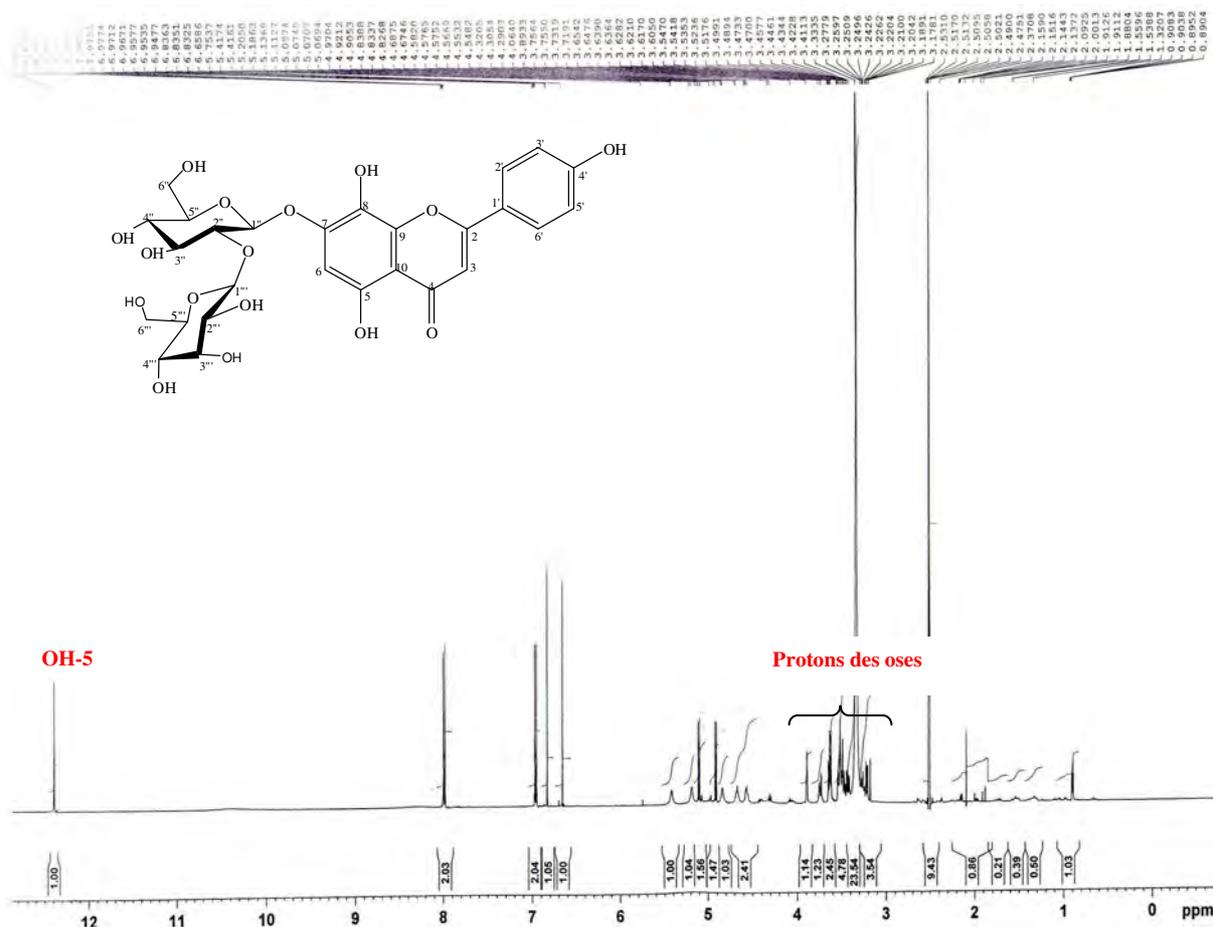
Isoscutellareine-7-*O*-β-D-allosyl-(1→2)-glucoside

Tableau III.11. RMN du ^1H et du ^{13}C du composé SCB38 (400 MHz, δ , J , en Hz ; 125 MHz, δ) et le Ioscutellareine-7-*O*- β -D-allosyl-(1 \rightarrow 2) glucoside (500 MHz, δ , J , en Hz ; 100 MHz, δ) dans le DMSO-*d*₆.

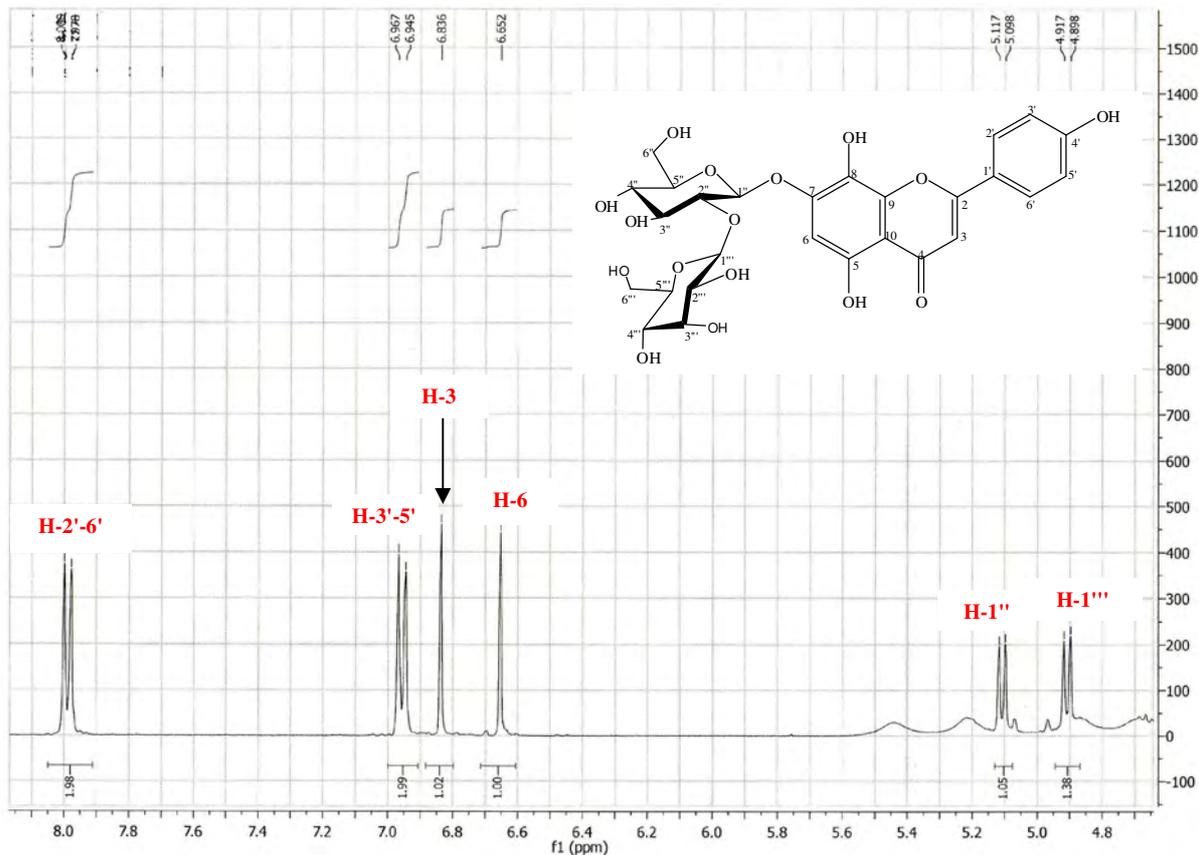
	Composé SCB38		Ioscutellareine-7- <i>O</i> - β -D-allosyl-(1 \rightarrow 2) glucoside	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
apigénine	δ ppm			
2	-	164.6	-	164.0
3	6.83 <i>s</i> (1H)	103.1	6.81 <i>s</i>	102.5
4	-	182.8	-	182.3
5	-	151.7	-	151.1
6	6.65 <i>s</i> (1H)	99.3	6.70 <i>s</i>	101.7
7	-	152.9	-	152.3
8	-	127.6	-	127.1
9	-	144.8	-	144.3
10	-	105.7	-	105.2
1'	-	121.7	-	121.1
2'-6'	7.98 <i>d</i> ($J= 8.8$ Hz, 2H)	129.1	7.98 <i>d</i> ($J= 8.8$ Hz)	128.5
3'-5'	6.95 <i>d</i> ($J= 8.8$ Hz, 2H)	116.5	6.95 <i>d</i> ($J= 8.8$ Hz)	115.9
4'	-	161.8	-	161.3
OH-5	12.39 <i>s</i> (1H)	-	12.37 <i>s</i>	-
glucose				
G1''	5.10 <i>d</i> ($J= 7.6$ Hz, 1H)	100.1	5.05 <i>d</i> ($J= 7.3$ Hz)	99.6
G2''	3.64 <i>t</i> ($J= 8.9$ Hz)	81.7	3.60 <i>t</i>	81.2
G3''	3.52 <i>m</i>	76.2	3.53 <i>m</i>	75.6
G4''	3.26 <i>m</i>	69.8	3.28 <i>m</i>	69.2
G5''	3.48 <i>m</i>	77.5	3.50-3.53 <i>m</i>	77.0
G6''	3.47-3.54 <i>m</i> 3.73 <i>dd</i> ($J= 12.2$ Hz, $J= 6.4$ Hz)	61.0	3.76 <i>d</i>	60.5
allose				
A1'''	4.90 <i>d</i> ($J=7.6$ Hz, 1H)	102.2	4.93 <i>d</i> ($J= 8.0$ Hz)	102.5
A2'''	3.21 <i>m</i>	72.0	3.28 <i>m</i>	71.5
A3'''	3.89 <i>m</i>	71.5	3.92 <i>m</i>	70.9
A4'''	3.33 <i>m</i>	67.7	3.43 <i>m</i>	67.1
A5'''	3.64 <i>t</i> ($J= 8.9$ Hz)	75.1	3.88 <i>dt</i>	74.6
A6'''	3.41- 3.44 <i>m</i>	61.5	5.05 <i>d</i>	61.0



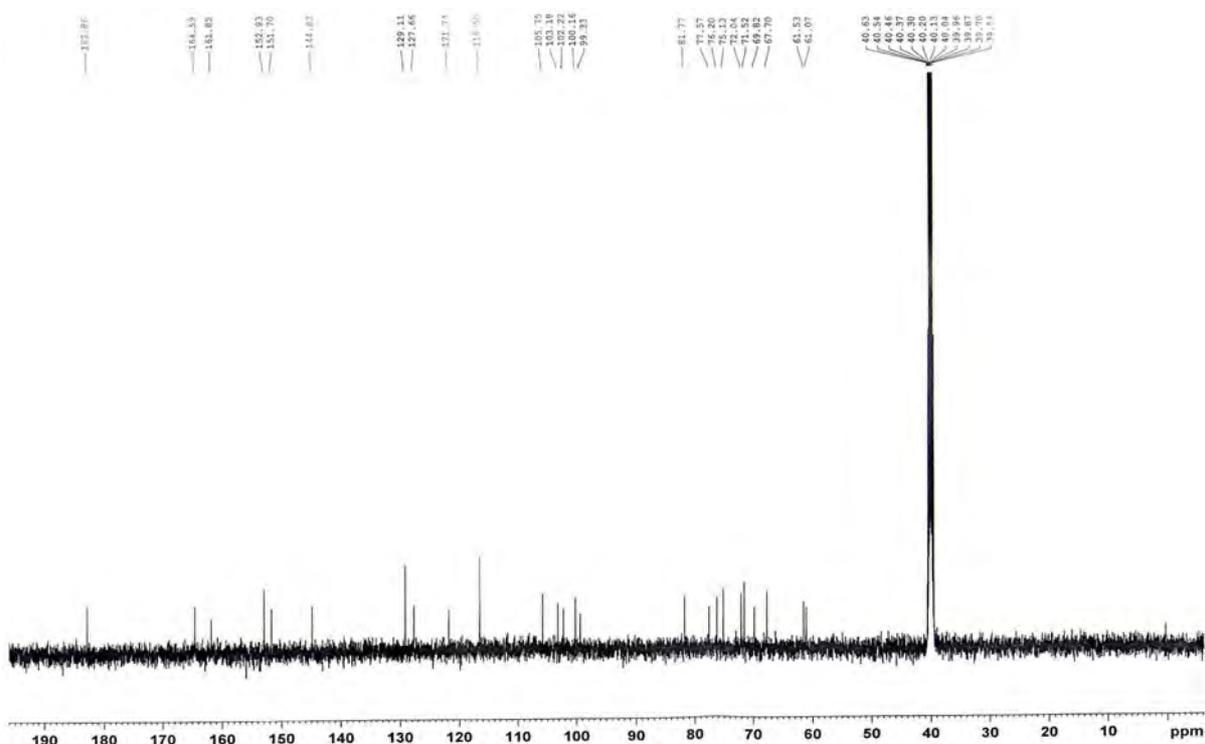
Spectre N°59. Spectre de masse en mode électrospray du composé SCB38.



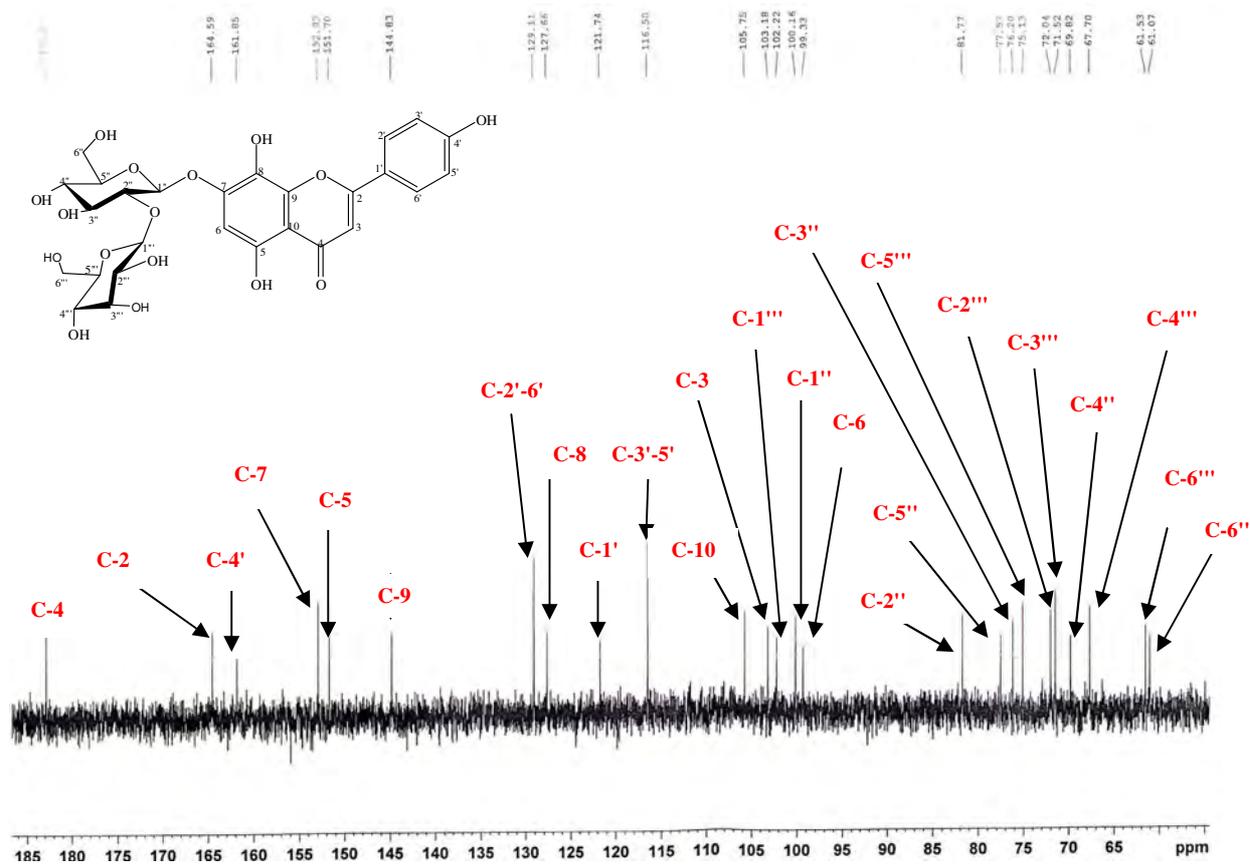
Spectre N°60 Spectre RMN ¹H du composé SCB38 (500 MHz).



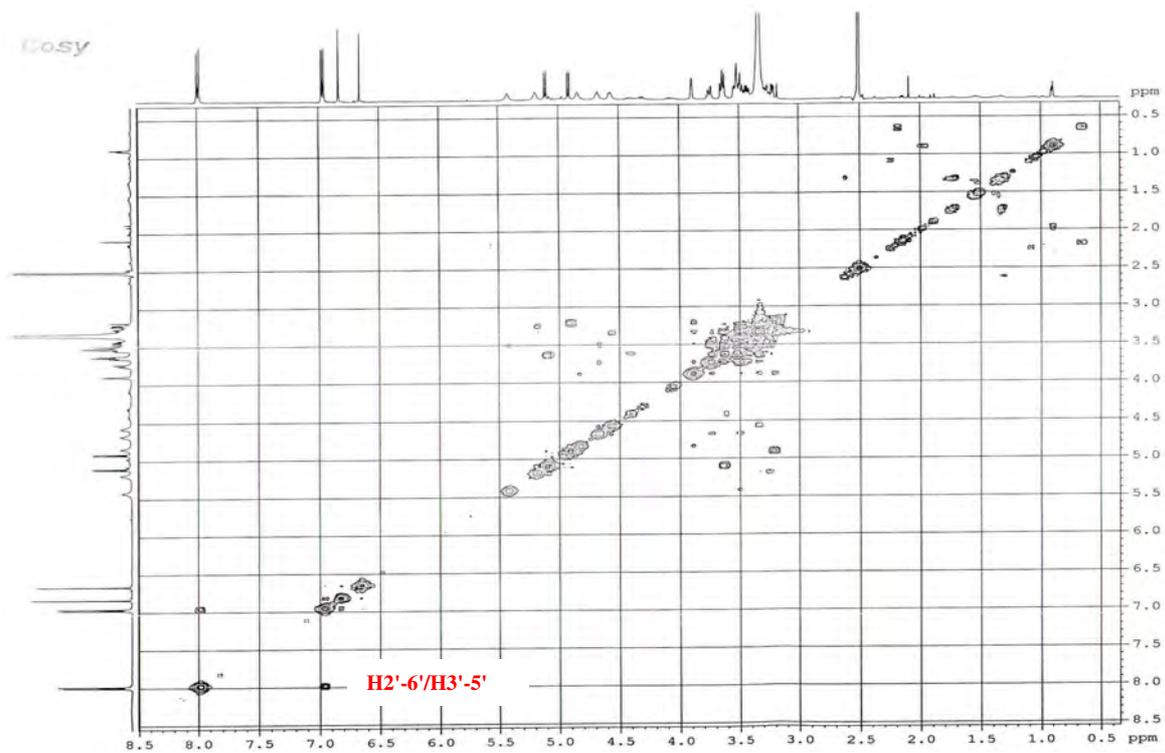
Spectre N°61. Spectre RMN ¹H étalé (4.8 à 8.1 ppm) du composé SCB38 (400 MHz).



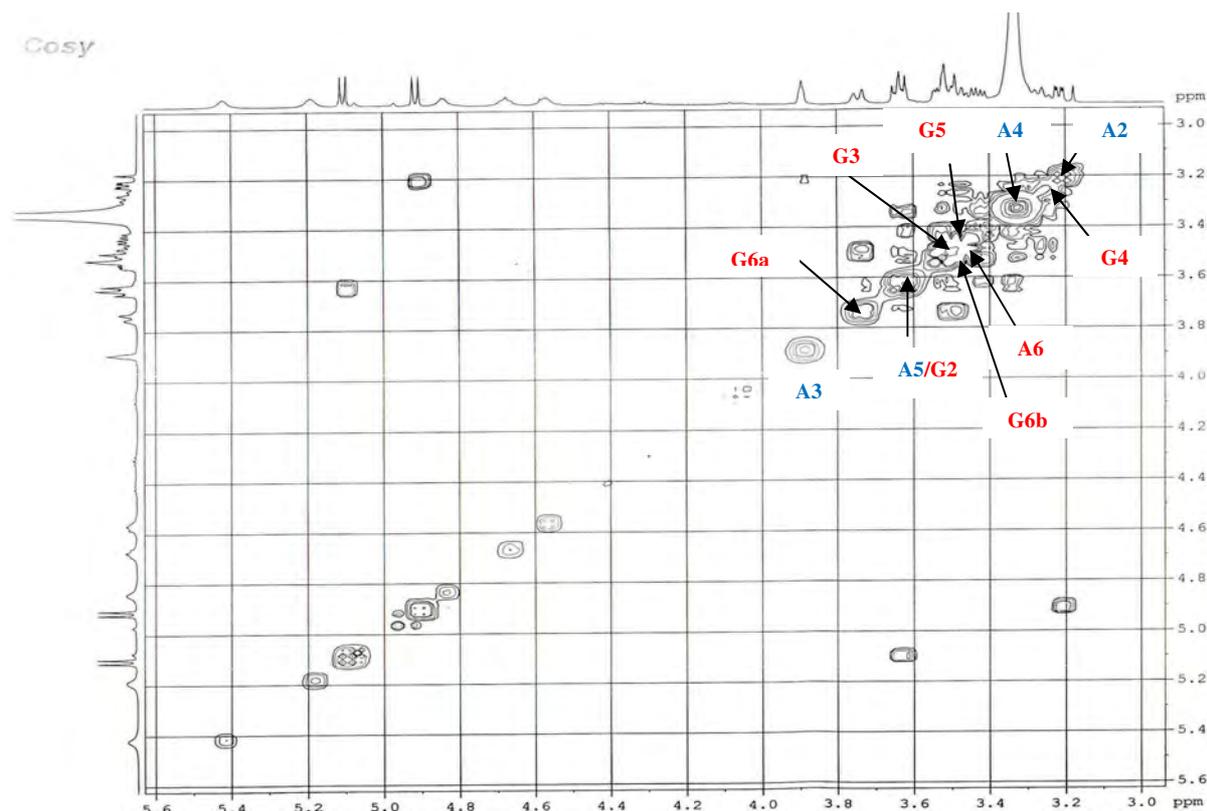
Spectre N°62. Spectre RMN ¹³C du composé SCB38 (125 MHz).



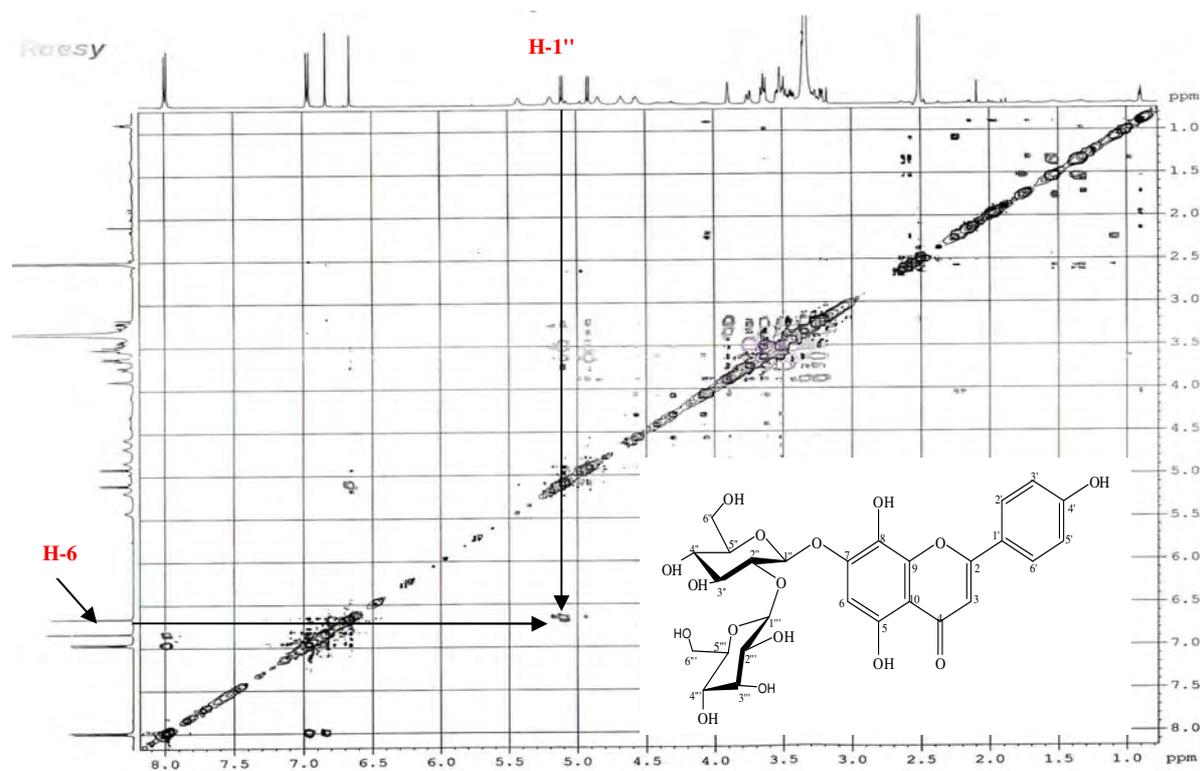
Spectre N°63. Spectre RMN ¹³C étalé (50 à 185 ppm) du composé SCB38 (125 MHz).



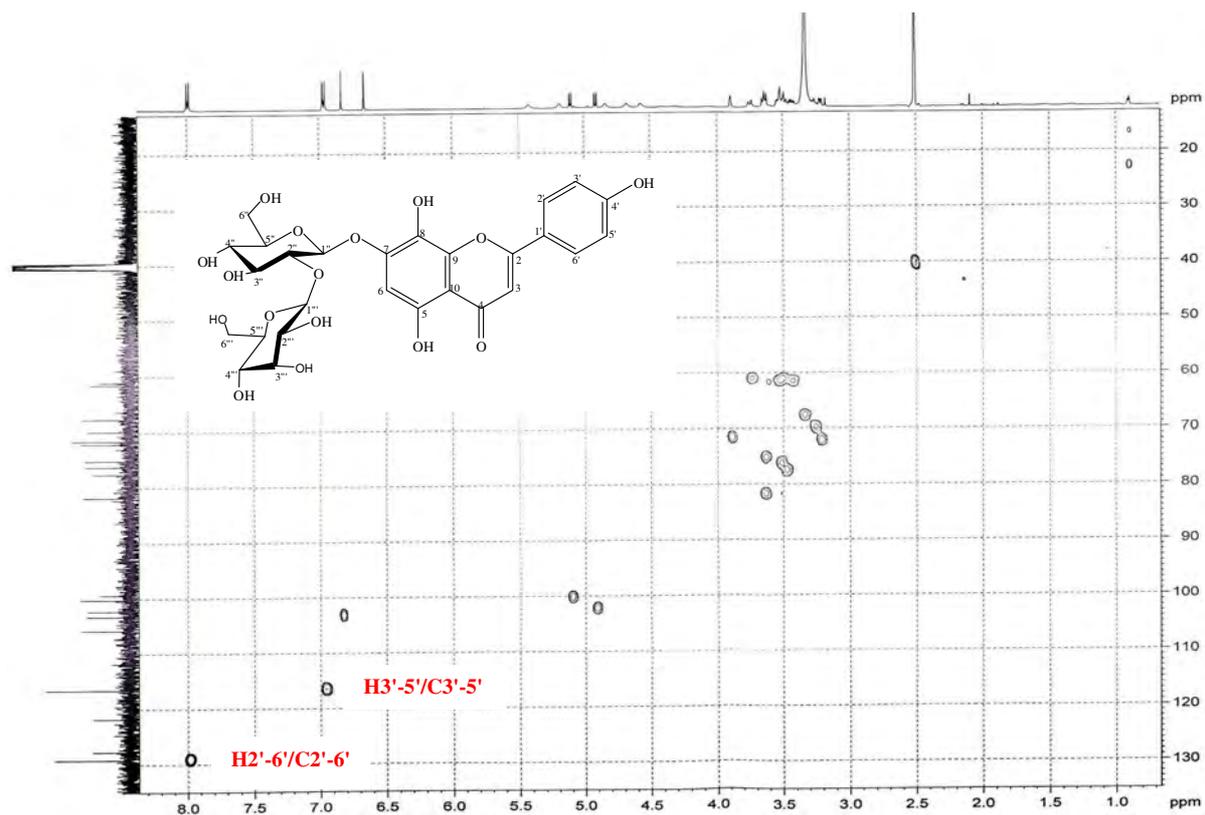
Spectre N°64. Spectre Cosy du composé SCB38 (500 MHz).



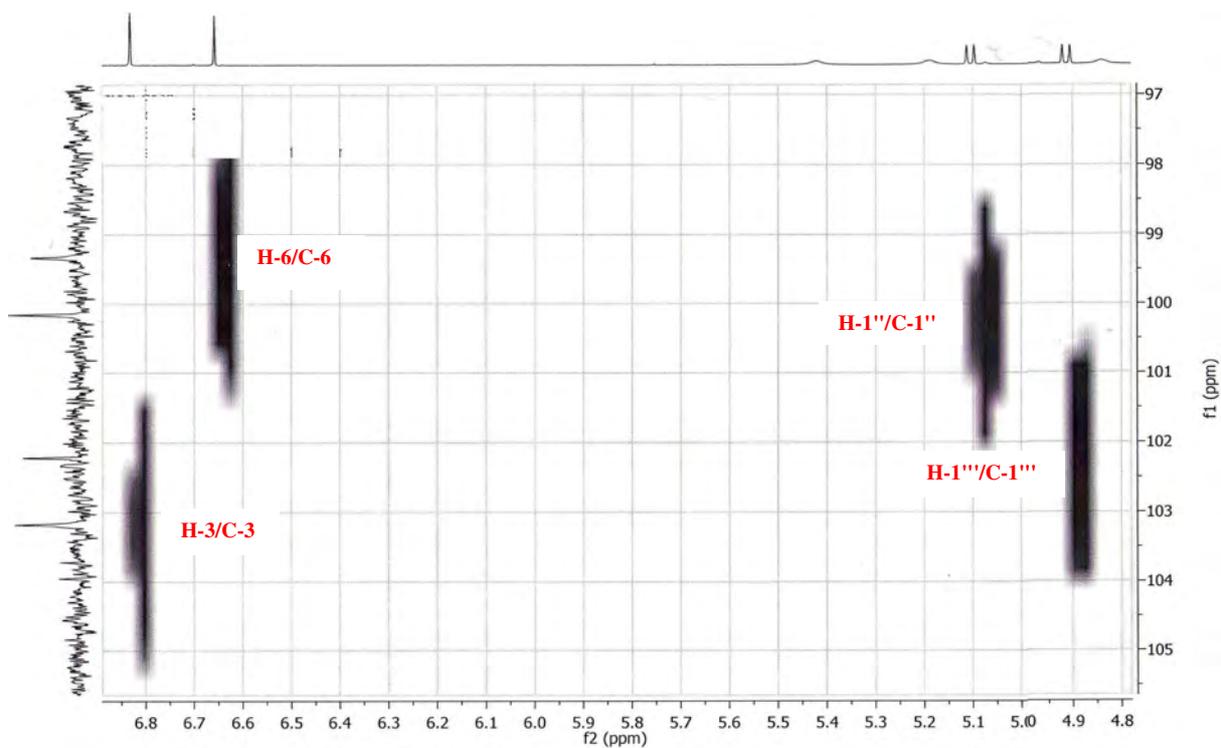
Spectre N°65. Spectre Cosy étalé (3.0 à 5.6 ppm) du composé SCB38 (500 MHz).



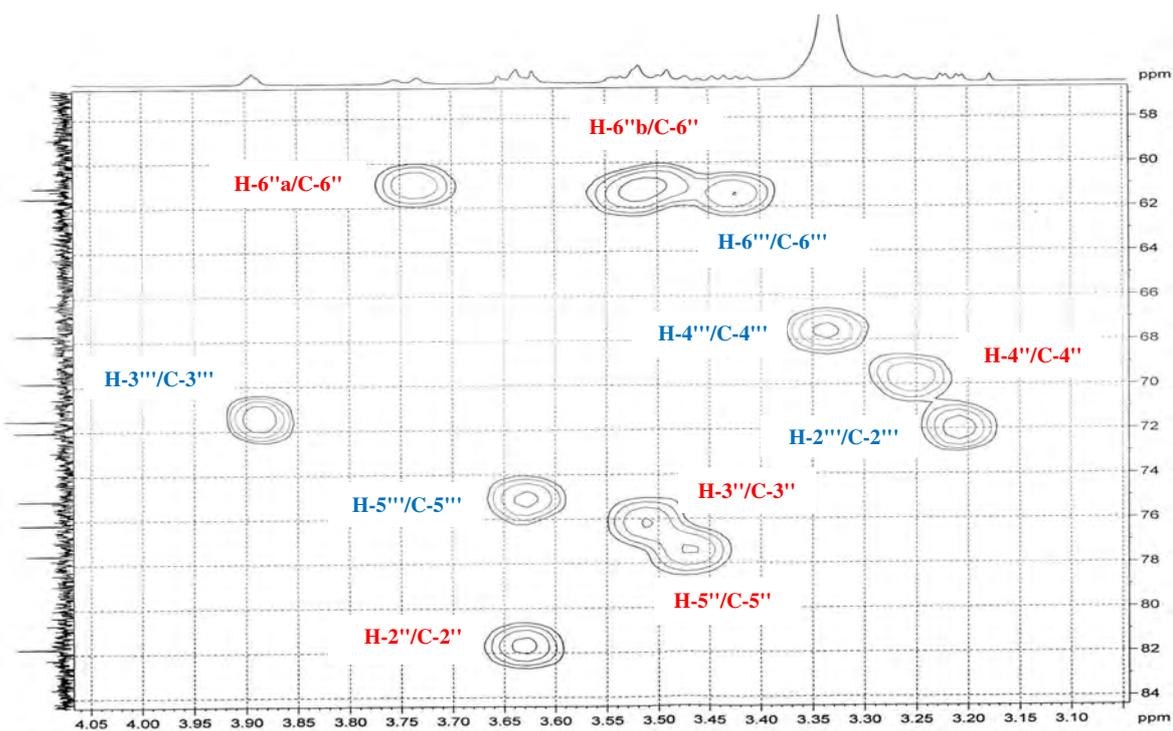
Spectre N°66. Spectre Roesy étalé (3.0 à 5.3 ppm) du composé SCB38 (500 MHz).



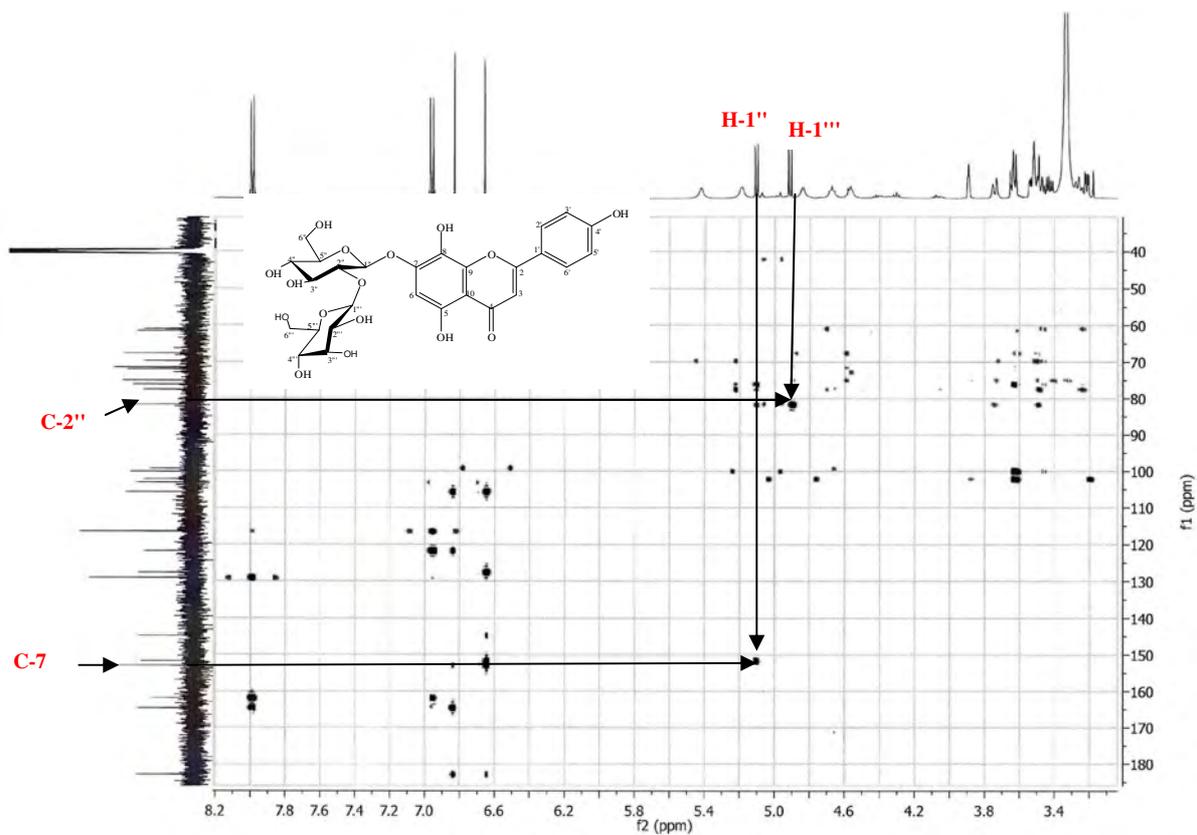
Spectre N°67. Spectre HSQC du composé SCB38 (500 MHz).



Spectre N°68. Spectre HSQC étalé (97 à 105 ppm) du composé SCB38 (500 MHz).



Spectre N°69. Spectre HSQC étalé (58 à 84 ppm) du composé SCB38 (500 MHz).



Spectre N°70. Spectre HMBC du composé SCB38 (600 MHz).

III.6.9. Elucidation de la structure du composé SCB44

III.6.9.1. Analyses physico-chimiques

- Le composé SCB44 se présente sous forme d'une huile.
- Fluorescence sous lampe Wood : bleu fluorescent.
- $R_f = 0.18$ dans le système (Toluène/MEC/MeOH 4:3:3) et $R_f = 0.45$ dans le système (H₂O/MeOH/MEC/Acétylacétone 13:3:3:1).

III.6.9.2. Analyses spectroscopiques

L'analyse par spectrométrie de masse réalisée à haute résolution en mode électrospray positif (SM-ESI) du composé SCB44 (Spectre N°71), montre la présence d'un ion pseudo-moléculaire $[M+Na]^+$ à $m/z = 647.1959$, compatible avec la formule brute C₂₉H₃₆O₁₅.

Le spectre de RMN du ¹H (Spectre N°72-74), permet d'observer des signaux de protons aromatiques indiquant que ce composé appartient à la même série que certains composés isolés du genre *Stachys*. On retrouve ici les deux doublets éthyléniques : $\delta_H = 6.30$ ppm ($J = 15.6$ Hz) et $\delta_H = 7.61$ ppm ($J = 15.6$ Hz) et le système ABX : $\delta_H = 7.08$ ppm (d, $J = 2.0$ Hz), $\delta_H = 6.97$ ppm (dd, $J = 8.0$ Hz, $J = 2.0$ Hz), $\delta_H = 6.80$ ppm (d, $J = 8.0$ Hz) correspondant à l'acide (*E*)-caféique (acide 3',4'-dihydroxycinnamique) d'une part ; le système ABX : $\delta_H = 6.72$ ppm (d, $J = 2.0$ Hz), $\delta_H = 6.70$ ppm (d, $J = 8.0$ Hz), $\delta_H = 6.58$ ppm (dd, $J = 8.0$ Hz, $J = 2.0$ Hz) caractéristique de l'hydroxytyrosol (3,4-dihydroxyphényléthanol) d'autre part. Le triplet observé à $\delta_H = 2.80$ ppm est un autre signal révélateur de la présence de l'hydroxytyrosol. Il correspond aux deux protons situés en β de l'oxygène.

Entre $\delta_H = 3.32$ ppm et $\delta_H = 3.96$ ppm, on a un ensemble de signaux correspondant probablement à l'ensemble des protons adjacents aux fonctions alcooliques (secondaires ou primaires) des oses, certains pouvant d'ailleurs se superposer.

La partie du spectre allant de $\delta_H = 4.3$ ppm à 5.2 ppm est plus informative. On peut dire que les doublets observés à $\delta_H = 4.39$ ppm ($J = 8.0$ Hz) et à $\delta_H = 5.21$ ppm ($J = 1.7$ Hz) correspondent respectivement aux protons anomériques du β -D-glucose et de l' α -L-rhamnose (Sarkhail *et al.*, 2006 ; Andary *et al.*, 1982). La présence de ce dernier est par ailleurs confirmée par la présence d'un doublet très caractéristique du méthyle (position 6''') de cet ose ($\delta_H = 1.11$ ppm, 3H, $J = 6.0$ Hz). Le signal observé à $\delta_H = 4.93$ ppm correspond au proton 4'' du glucose, dont la fonction hydroxyle est estérifiée par l'acide caféique.

Il est tout à fait probable, compte tenu de la masse moléculaire du composé SCB44 et des informations obtenues par le spectre de RMN du ¹H, que le composé isolé soit constitué de deux génines (acide (*E*)-caféique et hydroxytyrosol) et de deux oses (β -D-glucose et α -L-rhamnose) et que le glucose est substitué en 1 par l'hydroxytyrosol, en 3 par le rhamnose et en 4 par l'acide caféique, ceci est confirmé par L'expérience HMBC (Spectre N°83-84) qui montre la présence d'une corrélation entre le proton anomérique H-1''' du rhamnose qui résonne vers $\delta_H = 5.21$ ppm et le carbone C-3'' du glucose, une tâche de corrélation entre le proton H-4'' du glucose et le groupement C=O, et une tâche de corrélation entre le proton anomérique du glucose H-1'' et le carbone α .

Le spectre RMN du ^{13}C en modulation DEPT (Spectre N°75-76) confirme la présence de 29 carbones, les informations supplémentaires fournies par l'expérience de corrélation directe ^1H - ^{13}C HSQC, permettent de distinguer 3 carbones secondaires, 7 quaternaires et 19 tertiaires. Il permet l'observation des signaux à $\delta_{\text{C}} = 104.5$ ppm et $\delta_{\text{C}} = 103.4$ ppm correspondant aux protons anomériques de glucose et rhamnose respectivement (Sarkhail *et al.*, 2006 ; Andary *et al.*, 1982). La présence d'un signal tertiaire vers $\delta_{\text{C}} = 18.9$ ppm, correspond aux méthyle du rhamnose, le signal vers $\delta_{\text{C}} = 168.8$ ppm, correspond aux carbonyle, la présence de dix carbone en RMN du ^{13}C à $\delta_{\text{C}} = 76.6$ ppm (C-2''), $\delta_{\text{C}} = 82.1$ ppm (C-3''), $\delta_{\text{C}} = 70.7$ ppm (C-4''), $\delta_{\text{C}} = 76.3$ ppm (C-5'') et $\delta_{\text{C}} = 62.7$ ppm (C-6''), et $\delta_{\text{C}} = 72.7$ ppm (C-2'''), $\delta_{\text{C}} = 72.5$ ppm (C-3'''), $\delta_{\text{C}} = 74.2$ ppm (C-4'''), $\delta_{\text{C}} = 70.8$ ppm (C-5''') et $\delta_{\text{C}} = 18.9$ ppm (C-6'''), permet de déterminer que les deux oses sont le glucose et rhamnose respectivement.

La structure de cette molécule correspondrait donc à l'actéoside, composé assez couramment rencontré. Les déplacements chimiques de tous les signaux en RMN du ^1H sont identiques à ceux donnés dans la littérature (Owen, 2003). Les signaux des protons des oses sont attribués précisément par comparaison avec un spectre très détaillé réalisé à 500 MHz (Owen, 2003).

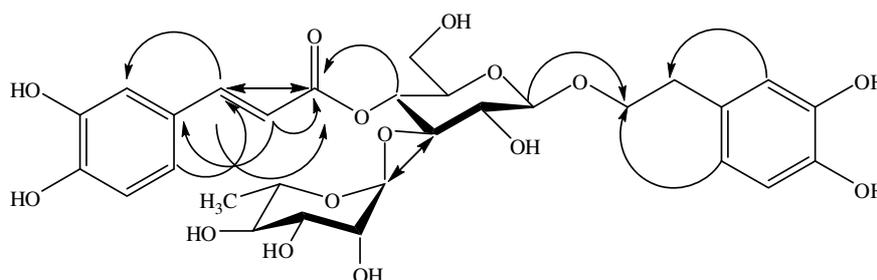
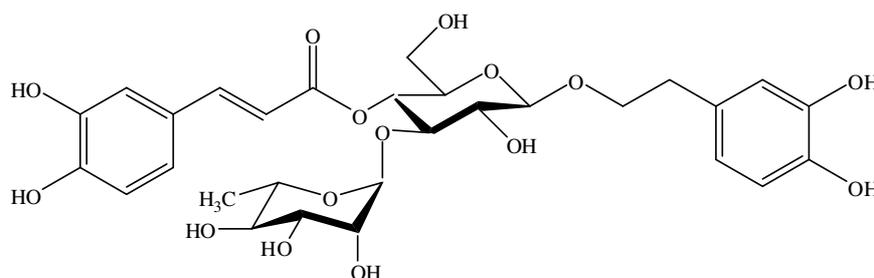


Fig II.7. Corrélations HMBC du composé SCB44 (C → H).

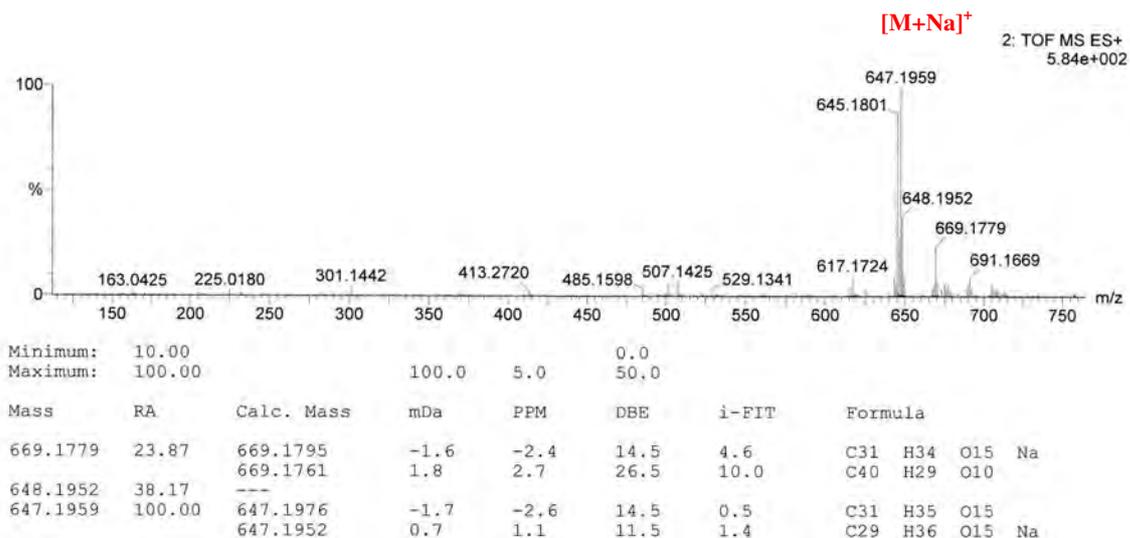
La structure du composé SCB44 a donc pu être établie comme étant le 3,4-dihydroxy- β -phényléthoxy-*O*-[α -L-rhamnosyl-(1→3)]-4-*O*-(*E*)-caféyl- β -D-glucoside, couramment appelé actéoside, verbascoside ou kusagenine, qui a été identifié pour la première fois dans l'espèce *Verbascum sinuatum* L. (Scrophulariacées) (Scarpati et Delle Monache, 1963). Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN du ^1H et du ^{13}C sont présentés dans le tableau III.12 avec leurs attributions et ceux trouvés dans la littérature (Kirmizibekmez *et al.*, 2004).



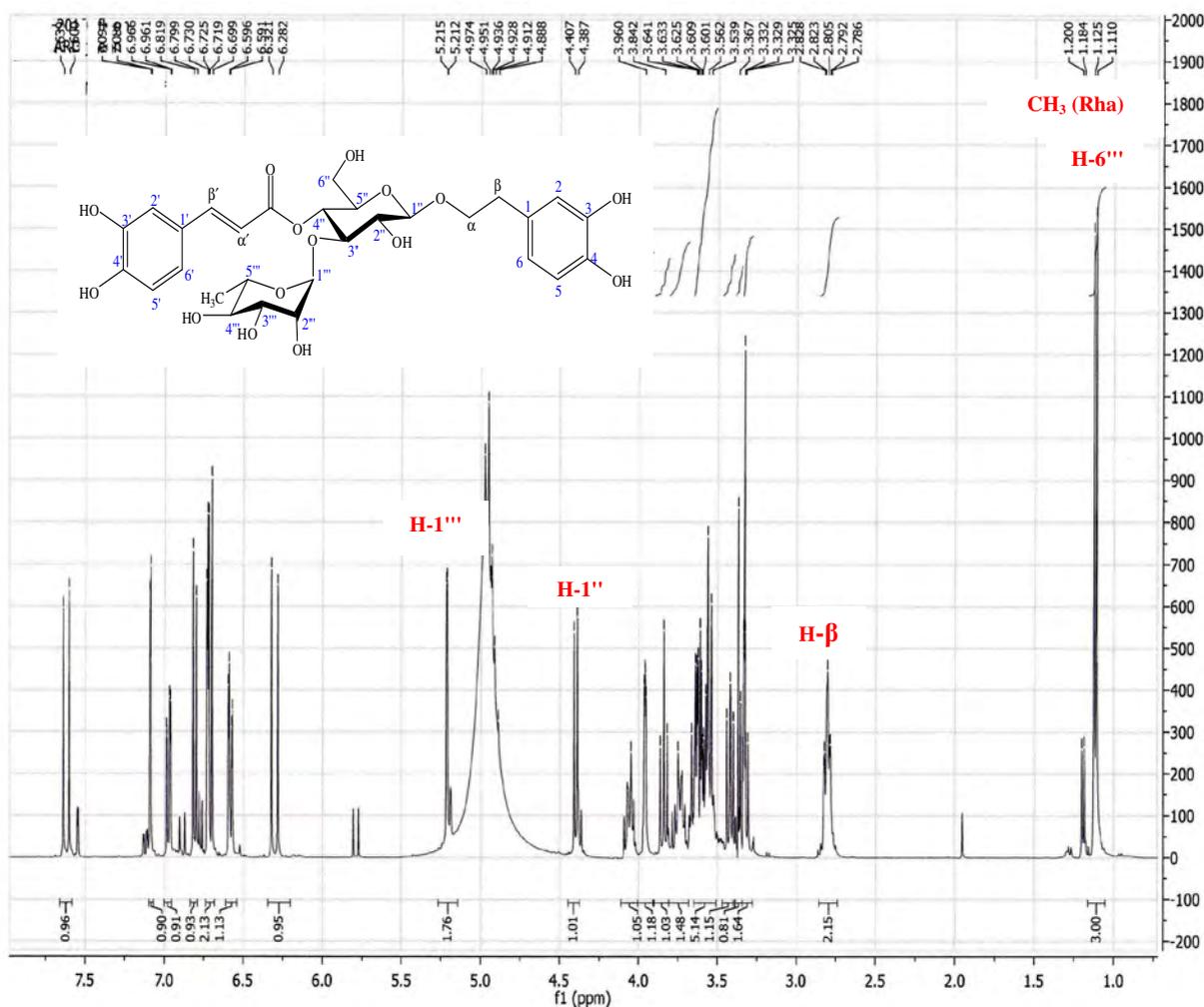
Actéoside

Tableau III.12. RMN du ^1H et du ^{13}C du composé SCB44 (400 MHz, δ , J , en Hz ; 100 MHz, δ) et de l'actéoside (300 MHz, δ , J , en Hz ; 75 MHz, δ) dans le CD_3OD .

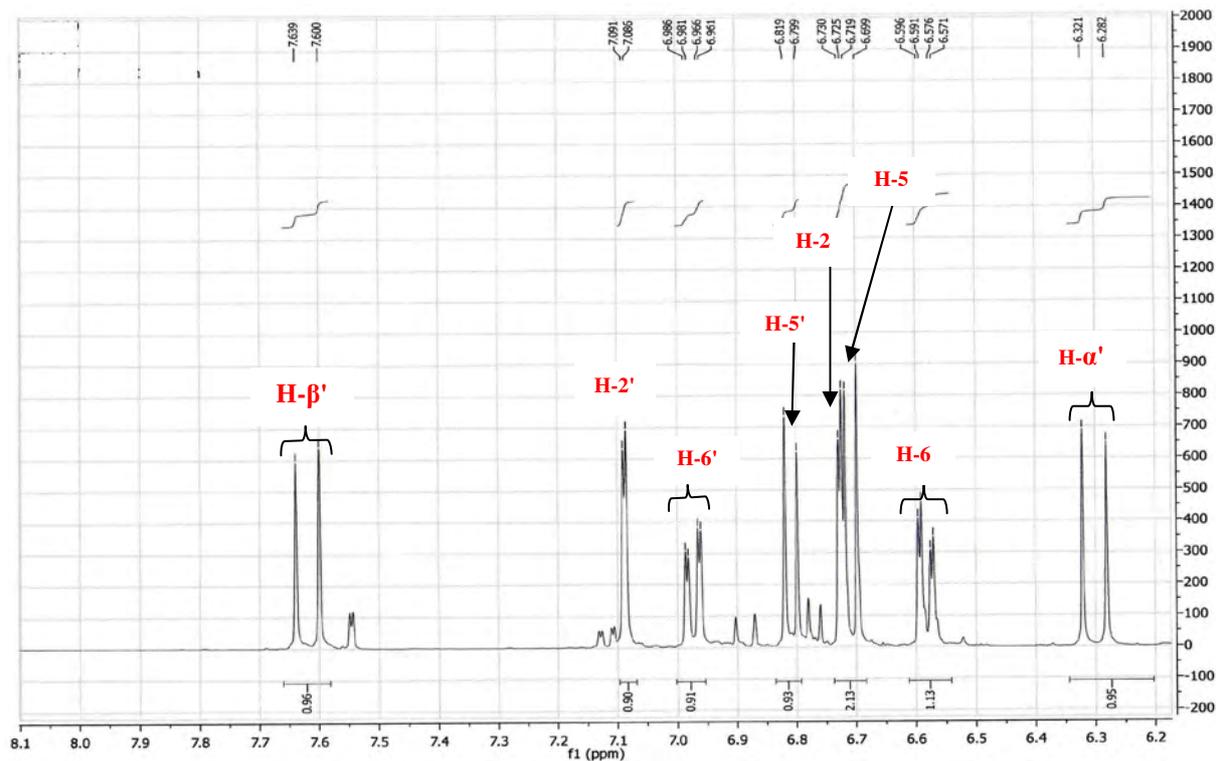
	Composé SCB44		Actéoside	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
hydroxytyrosol	δ (ppm)			
1		131.9	-	131.4
2	6.72 <i>d</i> ($J= 2.0$ Hz, 1H)	117.6	6.69 <i>d</i> ($J= 1.8$ Hz)	117.1
3		146.5	-	146.1
4		145.0	-	144.7
5	6.70 <i>d</i> ($J= 8.0$ Hz, 1H)	116.8	6.68 <i>d</i> ($J= 8$ Hz)	116.3
6	6.58 <i>dd</i> ($J= 2.0$ Hz, $J=8.0$ Hz, 1H)	121.7	6.56 <i>dd</i> ($J= 1.8$ Hz, $J= 8$ Hz)	121.2
α_a	3.62 <i>dd</i> ($J= 6.0$ Hz, $J= 13.6$ Hz)	72.6	3.72-4.04 <i>m</i>	72.3
α_b	3.94 <i>dd</i> ($J= 7.6$ Hz, $J= 13.2$ Hz)		4.04 <i>dd</i> ($J= 7.8$ Hz, $J= 16.3$ Hz)	
β	2.80 <i>t</i> ($J= 7.6$ Hz)	36.9	2.80 <i>t</i> ($J= 7.6$ Hz)	36.3
Acide caféique				
1'	-	128.1	-	127.6
2'	7.08 <i>d</i> ($J= 2.0$ Hz, 1H)	115.7	7.05 <i>d</i> ($J= 1.8$ Hz)	115.2
3'	-	147.2	-	146.8
4'	-	150.2	-	149.8
5'	6.80 <i>d</i> ($J= 8.0$ Hz, 1H)	117.0	6.78 <i>d</i> ($J= 8.2$ Hz)	116.5
6'	6.97 <i>dd</i> ($J= 2.0$ Hz, $J=8.0$ Hz, 1H)	123.7	6.96 <i>dd</i> ($J= 1.8$ Hz, $J= 8.2$ Hz)	123.2
α'	6.30 <i>d</i> ($J= 15.6$ Hz, 1H)	115.1	6.27 <i>d</i> ($J= 15.9$ Hz)	114.7
β'	7.61 <i>d</i> ($J= 15.6$ Hz, 1H)	148.5	7.59 <i>d</i> ($J= 15.9$ Hz)	148.0
CO	-	168.8	-	168.3
glucose				
1''	4.39 <i>d</i> ($J= 8.0$ Hz, 1H)	104.5	4.37 <i>d</i> ($J= 7.8$ Hz)	104.2
2''	3.30 <i>t</i> ($J=10.0$ Hz)	76.6	3.39 <i>dd</i> ($J= 7.8$ Hz, $J=9$ Hz)	76.2
3''	3.72 <i>t</i> ($J= 11.0$ Hz)	82.1	3.81 <i>t</i> ($J= 9$ Hz)	81.6
4''	4.93 <i>t</i> ($J= 9.2$ Hz)	70.7	4.95 <i>t</i> ($J= 9$ Hz)	70.4
5''	3.40 <i>m</i>	76.3	3.50 <i>m</i>	76.0
6'' (α et β)	3.43 <i>d</i> ($J= 7.2$ Hz) 3.55 <i>m</i>	62.7	3.64 <i>m</i>	62.3
rhamnose				
1'''	5.21 <i>d</i> ($J= 1.7$ Hz, 1H)	103.4	5.16 <i>d</i> ($J= 1.7$ Hz)	103.0
2'''	3.83 <i>dd</i> ($J= 1.6$ Hz, $J= 2.4$ Hz)	72.7	3.91 <i>dd</i> ($J= 1.7$ Hz, $J=3.4$ Hz)	72.3
3'''	3.50 <i>dd</i> ($J= 2.8$ Hz, $J= 8.0$ Hz)	72.5	3.58 <i>dd</i> ($J= 3.4$ Hz, $J= 9.4$ Hz)	72.0
4'''	3.20 <i>t</i> ($J= 9.6$ Hz)	74.2	3.29 <i>t</i> ($J= 9.4$ Hz)	73.8
5'''	3.42 <i>m</i>	70.8	3.65 <i>m</i>	70.5
CH₃ (Rha)6'''	1.11 <i>d</i> ($J= 6.0$ Hz, 3H)	18.9	1.09 <i>d</i> ($J= 6.8$ Hz)	18.5



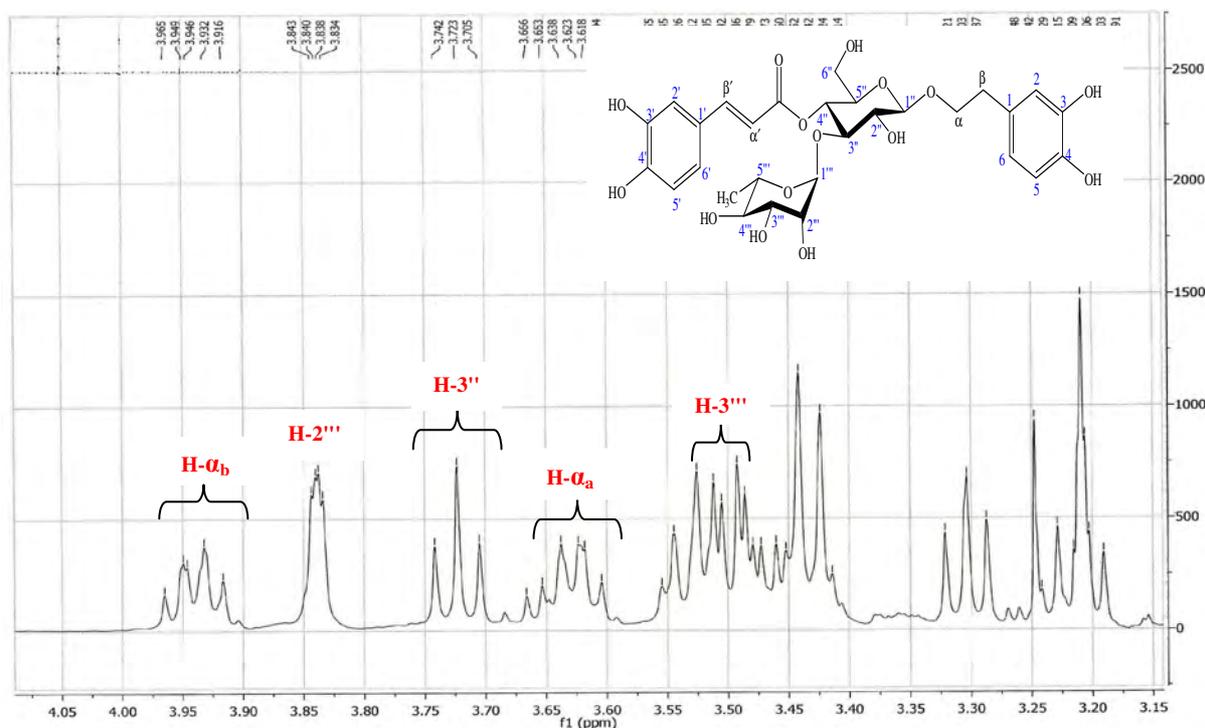
Spectre N°71. Spectre de masse en mode électrospray du composé SCB44.



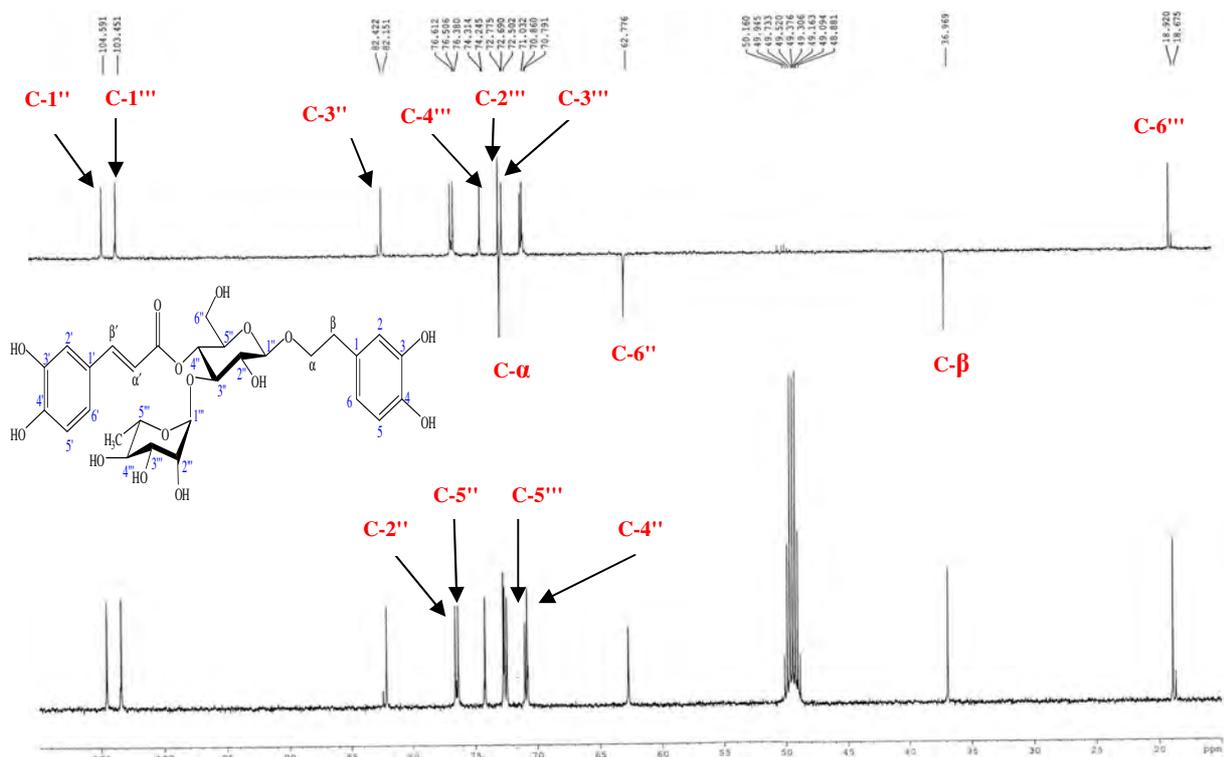
Spectre N°72. Spectre RMN ¹H du composé SCB44 (400 MHz).



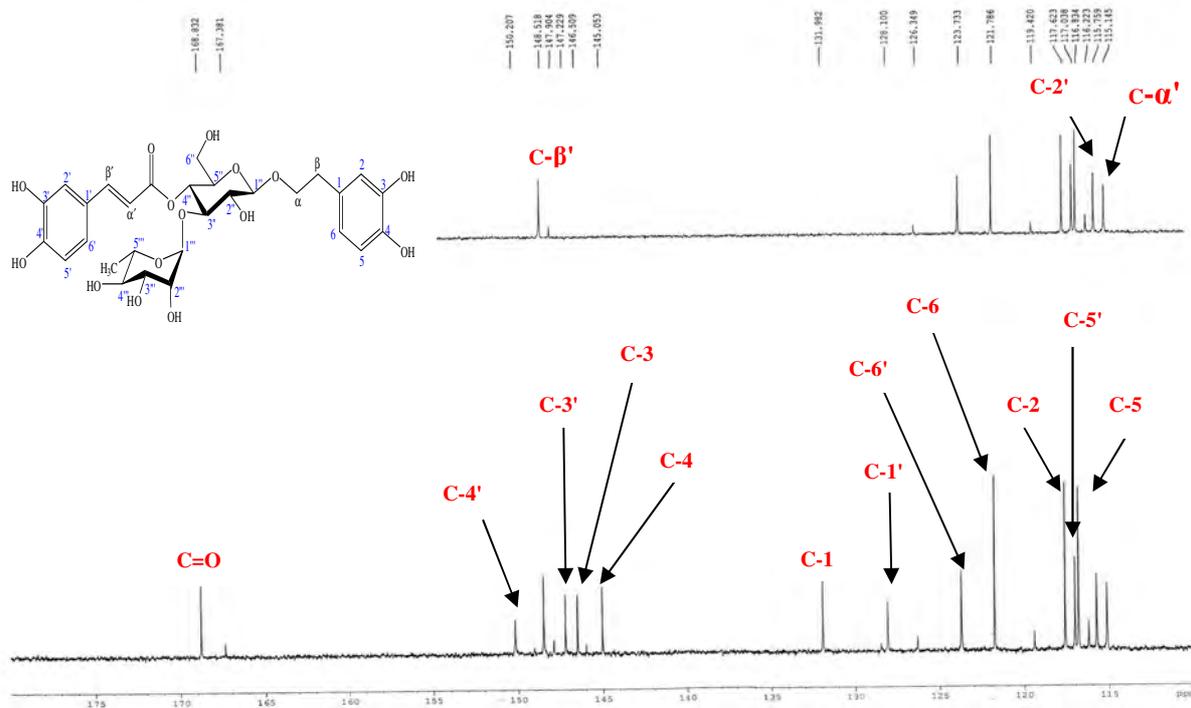
Spectre N°73. Spectre RMN ^1H étalé (6.2 à 8.1 ppm) du composé SCB44 (400 MHz).



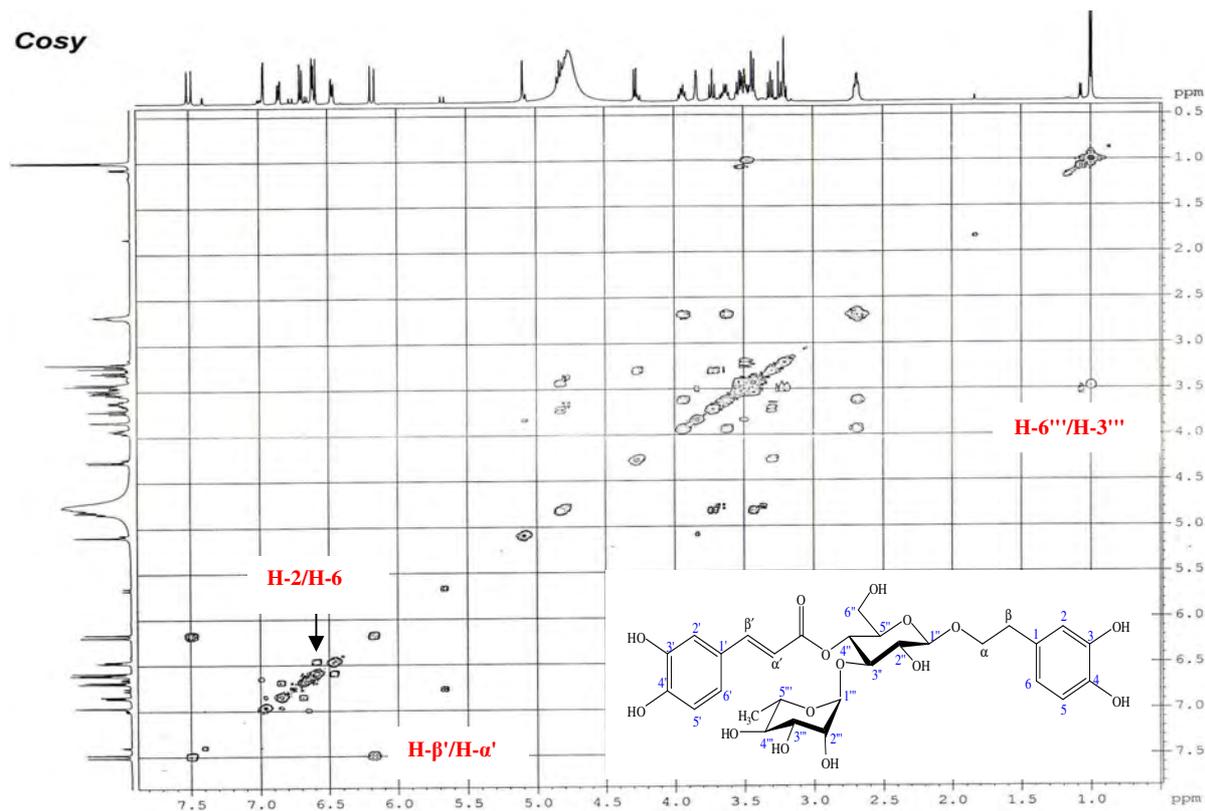
Spectre N°74. Spectre RMN ^1H étalé (3.15 à 4.05 ppm) du composé SCB44 (400 MHz).



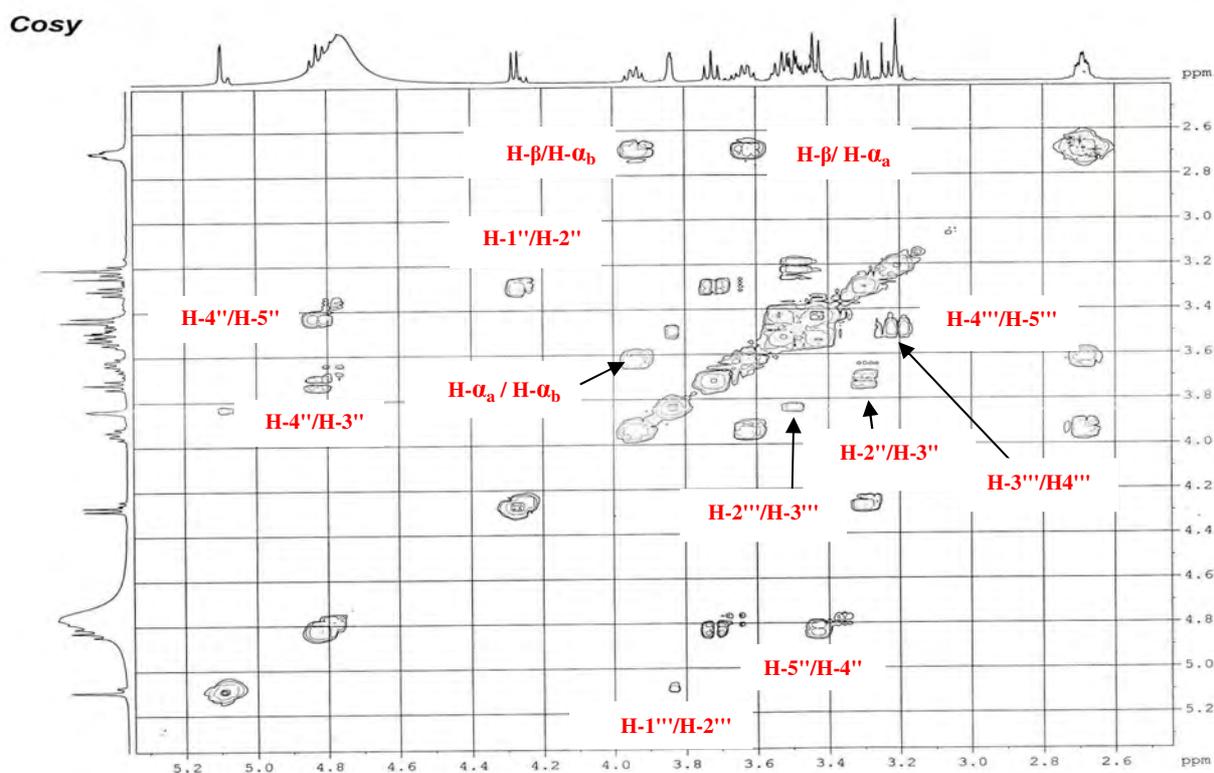
Spectre N°75. Spectre RMN ¹³C DEPT étalé (20 à 105 ppm) du composé SCB44 (100 MHz).



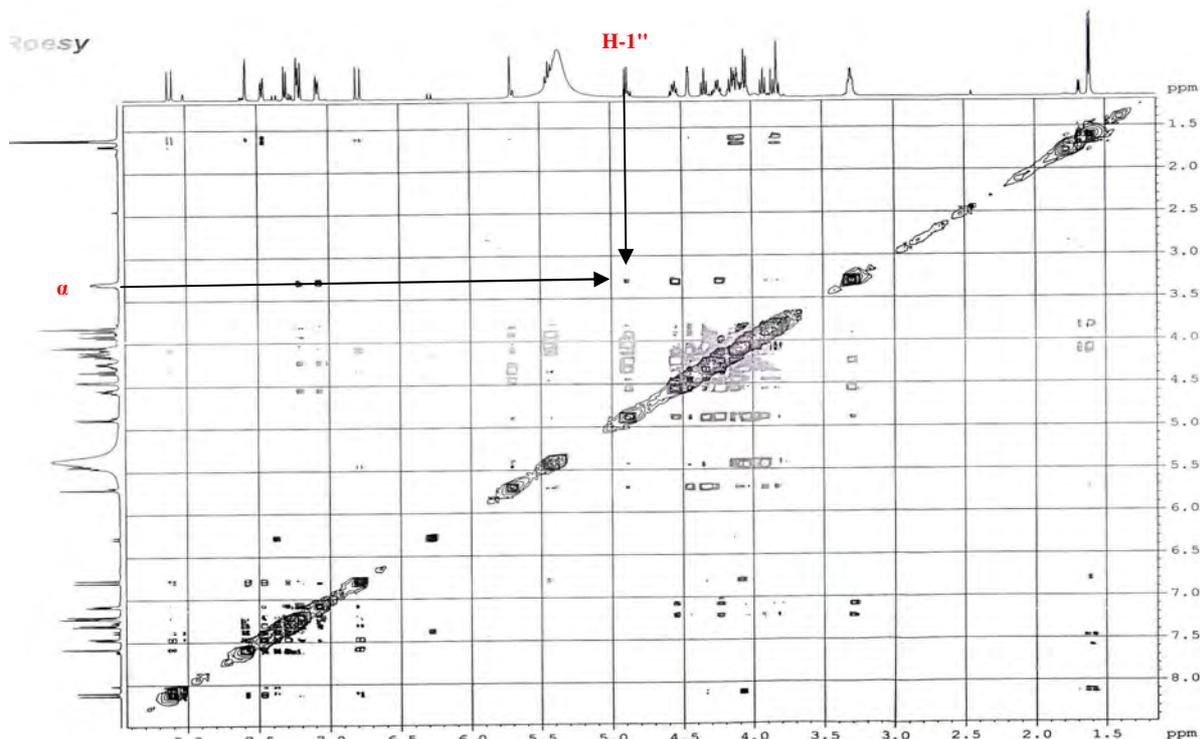
Spectre N°76. Spectre RMN ¹³C DEPT étalé (115 à 175 ppm) du composé SCB44 (100 MHz).



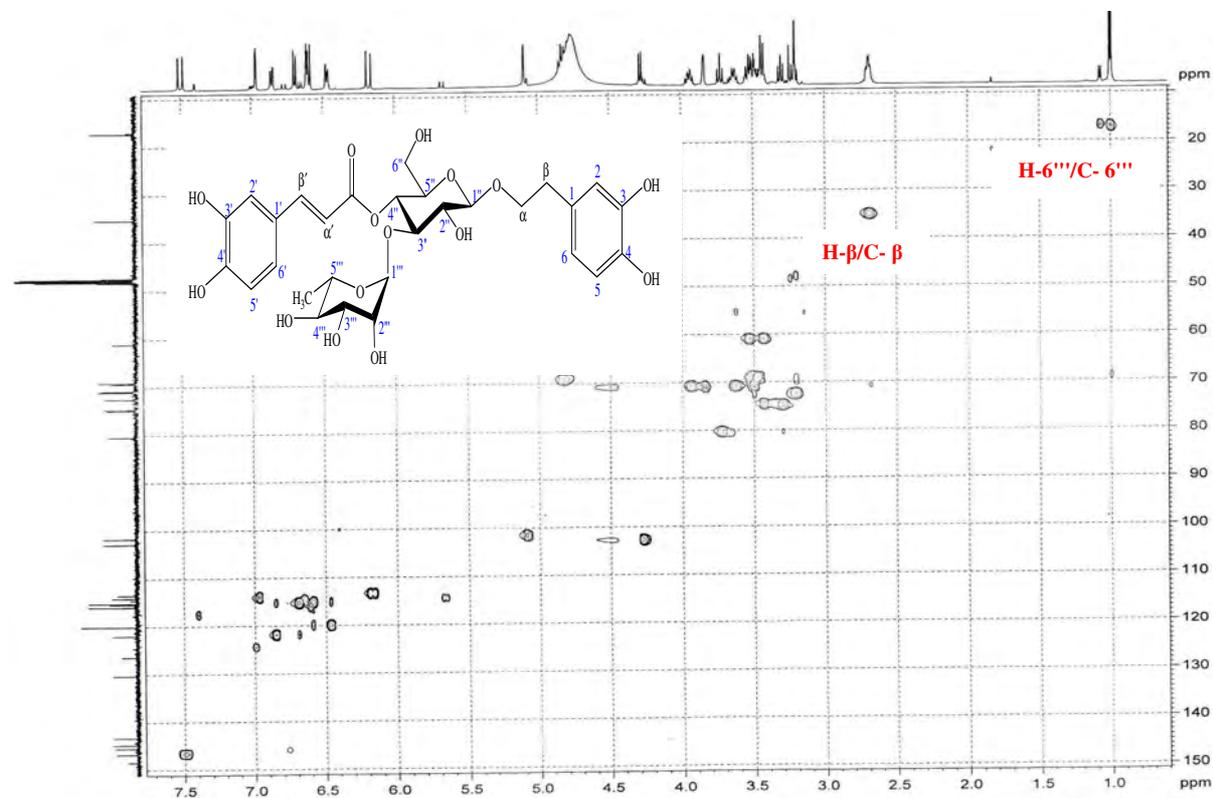
Spectre N°77. Spectre Cosy du composé SCB44 (500 MHz).



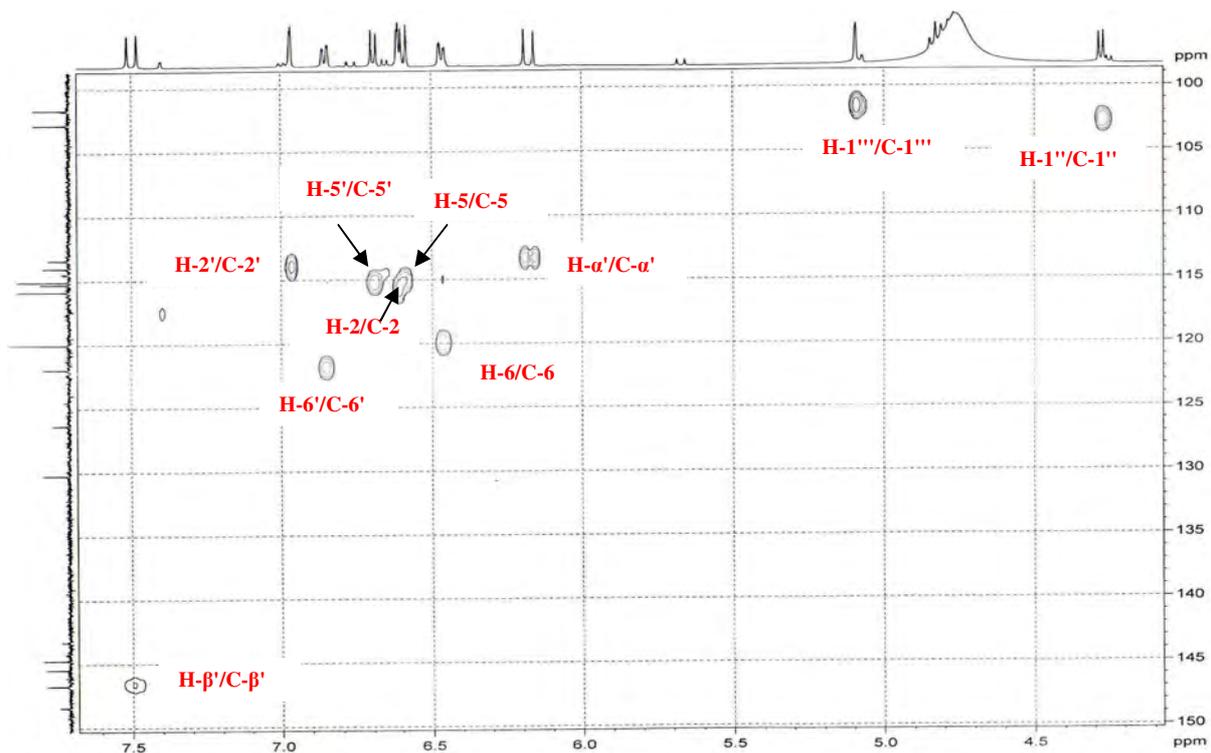
Spectre N°78. Spectre Cosy étalé (2.6 à 5.2 ppm) du composé SCB44 (500 MHz).



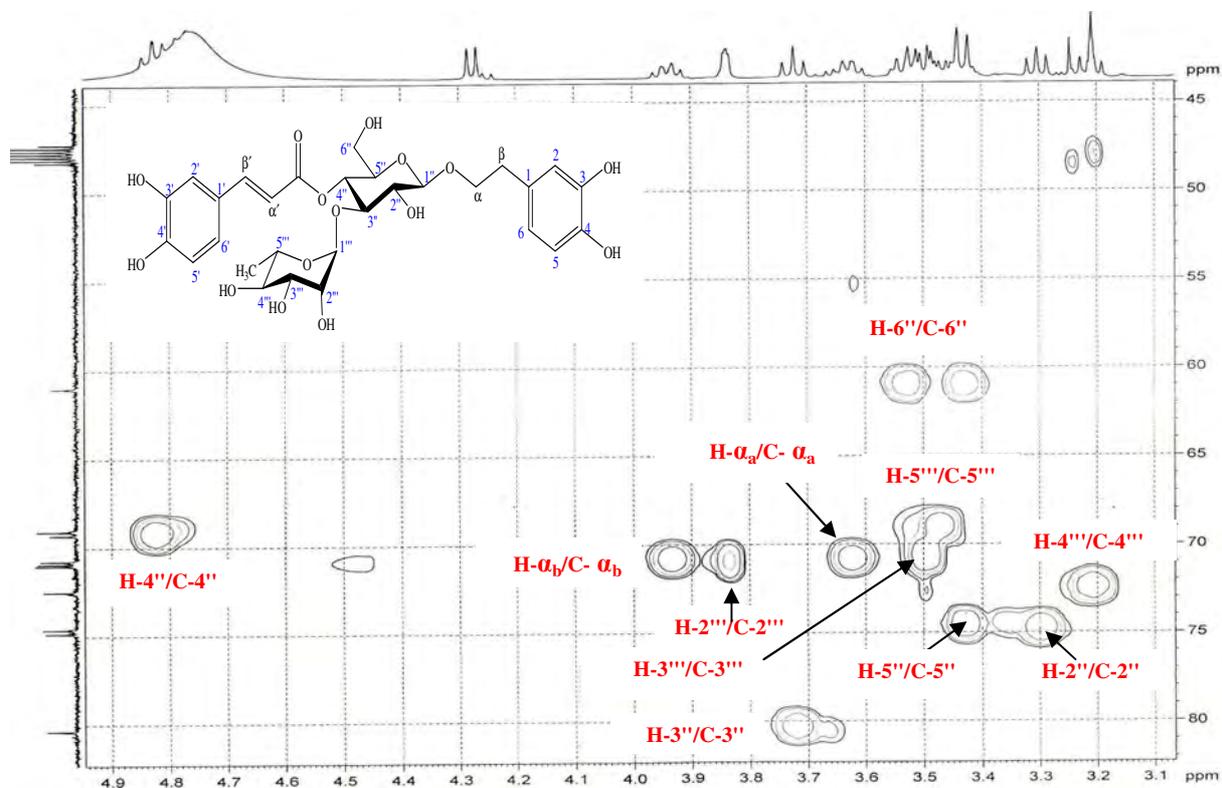
Spectre N°79. Spectre Roesy du composé SCB44 (500 MHz).



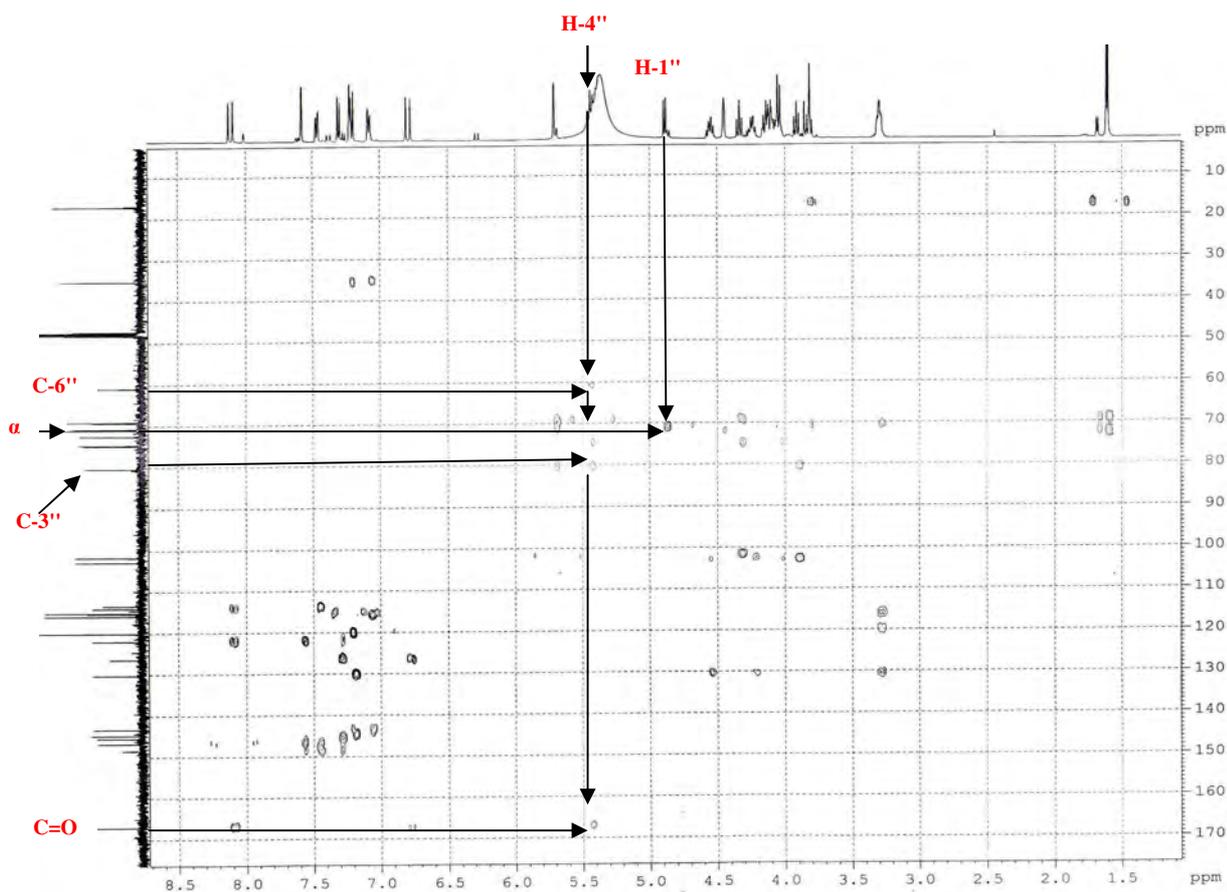
Spectre N°80. Spectre HSQC du composé SCB44 (500 MHz).



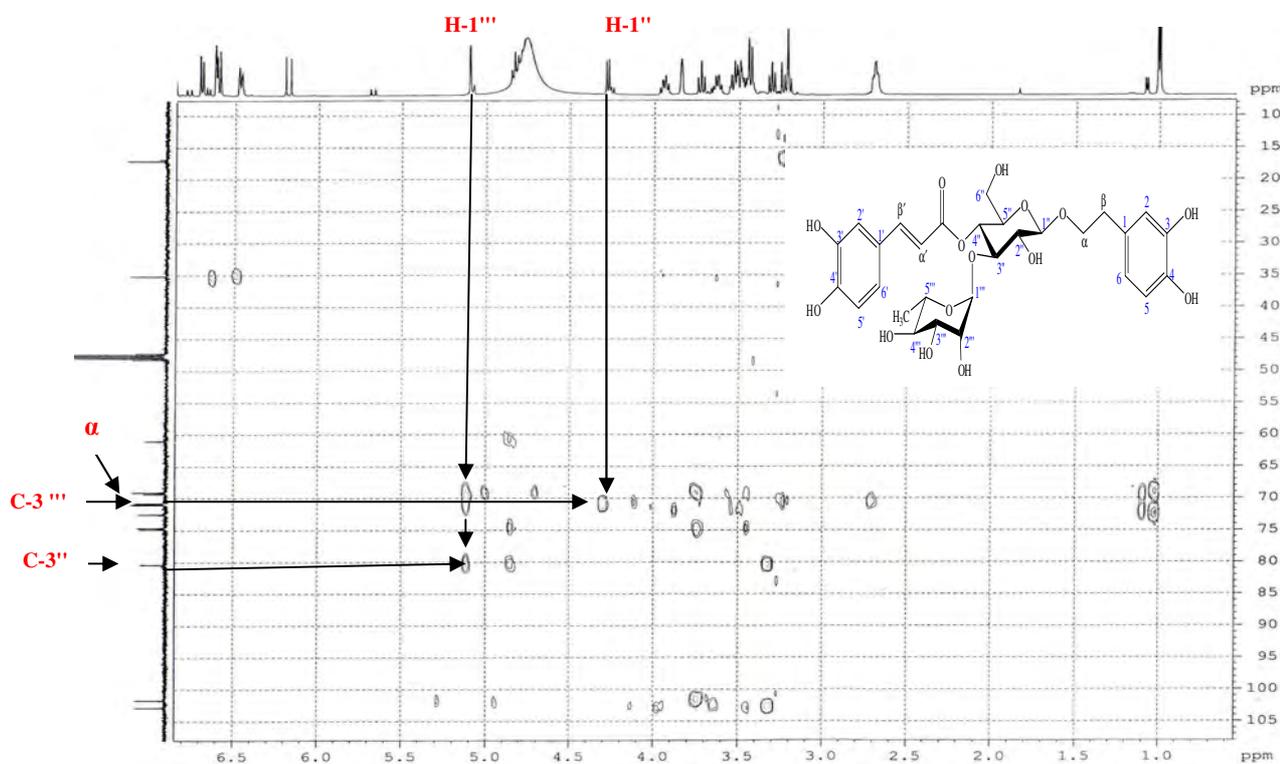
Spectre N°81. Spectre HSQC étalé (100 à 150 ppm) du composé SCB44 (500 MHz).



Spectre N°82. Spectre HSQC étalé (45 à 80 ppm) du composé SCB44 (500 MHz).



Spectre N°83. Spectre HMBC étalé (100 à 175 ppm) du composé SCB44 (500MHz).



Spectre N°84. Spectre HMBC étalé (10 à 105 ppm) du composé SCB44.

III.6.10. Elucidation de la structure du composé SCD26

La structure de ce composé a été établie comme étant le β -sitostérol et sigmastérol. Ce composé étant strictement identique au produit R9-12 déjà décrit (page 97), sa détermination structurale n'est pas redétaillée ici. De même, pour les données de RMN du ^1H et du ^{13}C , on pourra se reporter au tableau II.15 (page 98), tableau II.16 et tableau II.17 (page 100, 101).

III.6.11. Elucidation de la structure du composé SCD36

III.6.11.1. Analyses physico-chimiques

- Le composé SCD36 a été obtenu sous la forme d'une poudre blanche, soluble dans le chloroforme et dans les solvants polaires. Le test de Liebermann-Buchard relatif à la mise en évidence des triterpènes, s'avère positif pour cette molécule. En effet, après addition de CHCl_3 et d'une même quantité d'anhydride acétique à quelques milligrammes de ce produit, et après une bonne agitation et addition de quelques gouttes d'acide sulfurique concentré, le mélange au début incolore a vire brutalement au rose cerise, ceci indique que ce composé est de type triterpénique (Boiteau *et al.*, 1964).
- PF= 316-318°C.
- Le spectre IR (Spectre N°87) montre des bandes d'absorption à 3413 cm^{-1} (OH), 1690 cm^{-1} (C=O) et 1681 cm^{-1} (C=C).

III.6.11.2. Analyses spectroscopique

Le spectre de masse enregistrée en mode impact électronique (HR-SMIE) (Spectre N°85-86), montre un ion moléculaire $[\text{M}]^+$ à m/z 456.3619. Ce qui est compatible avec la formule brute $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$. Le spectre RMN ^{13}C (Spectre N°91-93) confirme la présence de 30 carbones. Caractéristiques d'un triterpène. La présence des fragments suivantes : $m/z= 206-208$, $163-210$ et $m/z= 189$ indiquent la présence de triterpène de type lupane (Yun *et al.*, 2003).

La fragmentométrie SM-IE permet de mettre en évidence la perte successive des ions caractéristiques de la molécule sont présentées dans le tableau III.13.

Tableau III.13. Fragments du composé SCD36 en SM-IE.

Fragment	m/z	Pourcentage %
$[\text{M}]^+$	456	32.47
$[\text{M} - \text{H}_2\text{O}]^+$	438	26.52
$[\text{M} - (\text{H}_2\text{O} + \text{CH}_3)]^+$	423	12.67
$[\text{M} - \text{COOH}]^+$	410	6.77
$[\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_2]^+$	248	26.56
$[\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{O}]^+$	219	17.01
$[\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{O}]^+$	207	47.77
$[\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{O} - \text{H}_2\text{O}]^+$	189	100.0

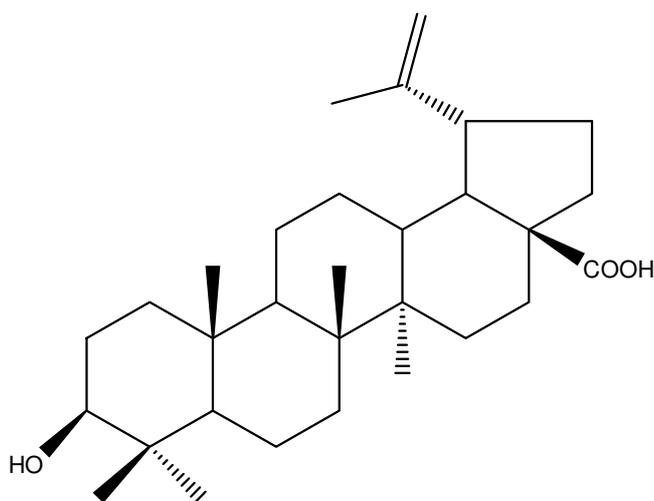
La formule moléculaire permet de déterminer un indice d'insaturation de 7.

Le spectre RMN ^{13}C (Spectre N°91) montre la présence d'un carbone qui résonne à $\delta_{\text{C}} = 179.3$ ppm attribué au carbonyle, qui pourrait être celle d'un groupe acide. La présence aussi de deux carbones d'hybridation sp^2 ($\delta_{\text{C}} = 150.4$ ppm et $\delta_{\text{C}} = 109.7$ ppm) et un oxyméthine à $\delta_{\text{C}} = 79.0$ ppm, suggère que le composé est un triterpène contient une fonction acide de type lupane.

Le spectre RMN ^{13}C en modulation DEPT (Spectre N°92-93) du produit SCD36 montre dans la région blindée, 6 signaux entre $\delta_{\text{C}} = 14.7$ ppm et $\delta_{\text{C}} = 28.0$ ppm, correspondants aux six méthyles d'un squelette triterpénique pentacyclique et dans la région déblindée, trois signaux résonnant à $\delta_{\text{C}} = 109.7$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 150.4$ ppm et $\delta_{\text{C}} = 179.3$ ppm attribuables respectivement à un carbone secondaire (CH_2) et à deux carbones quaternaires.

Le spectre RMN ^1H (Spectre N°88-90) présente à champ fort six signaux singulets fins attribuables aux groupements méthyles résonnant à $\delta_{\text{H}} = 0.68$ ppm (3H, *s*, H-24), $\delta_{\text{H}} = 0.75$ ppm (3H, *s*, H-25), $\delta_{\text{H}} = 0.87$ ppm (3H, *s*, H-23), $\delta_{\text{H}} = 0.89$ ppm (3H, *s*, H-26), $\delta_{\text{H}} = 0.91$ ppm (3H, *s*, H-27), $\delta_{\text{H}} = 1.62$ ppm (3H, *s*, H-30), et un massif de protons résonnant entre $\delta_{\text{H}} = 0,60$ ppm à $\delta_{\text{H}} = 1,95$ ppm correspondant aux -CH et -CH₂ des cinq cycles. Il montre aussi à champ faible, deux signaux résonnant sous forme de doublet dédoublé à $\delta_{\text{H}} = 3.11$ ppm et sous forme de doublet à $\delta_{\text{H}} = 4.67$ ppm et $\delta_{\text{H}} = 4.53$ ppm, correspondant respectivement à un proton oxyméthine (H-3) et aux protons éthyléniques (H-29). La multiplicité de H-3 (*dd*, $J = 11.5$ Hz, $J = 5.0$ Hz) implique qu'il est α -axial (David *et al.*, 2006).

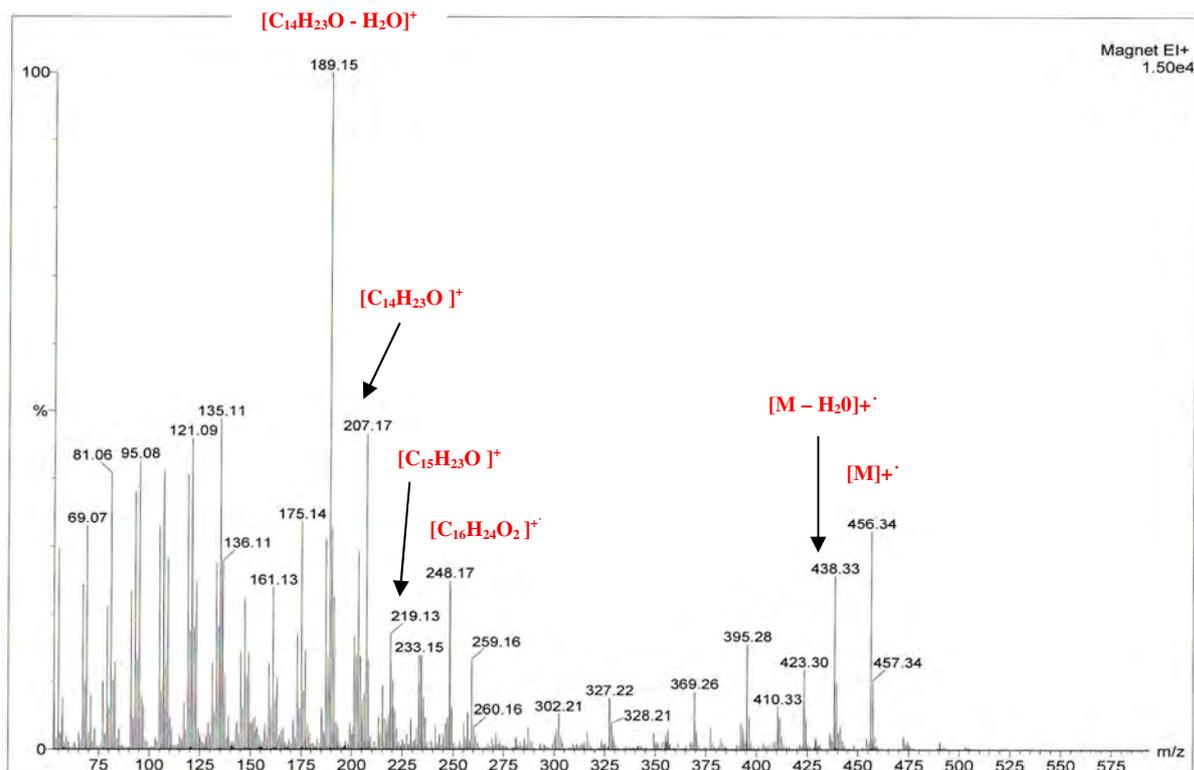
La structure du composé SCD36 a donc pu être établie comme étant l'acide bétulinique ou l'acide (+)-(3 β)-3-Hydroxylup-20(29)-en-28-oïc. Cette molécule a été isolée pour la première fois de l'arbuste africain *Ziziphus mauritianazam* Lam. (Rhamnaceae), (Simonsen *et al.*, 1957), puis en 1976 de l'arbuste de *Vanquelinia coymbosa* (Trumbull *et al.*, 1976), ou on peut l'acquérir de l'écorce du platane (*Platanus hispanica*), (Urban *et al.*, 2004). Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN du ^1H et du ^{13}C dans le CDCl_3 du produit SCD36, avec ceux trouvés dans la littérature (RMN ^1H ; Yun *et al.*, 2003 ; RMN ^{13}C ; David *et al.*, 2006) sont présentés dans le tableau III.14. Ce composé est isolé pour la première fois du genre *Stachys*.



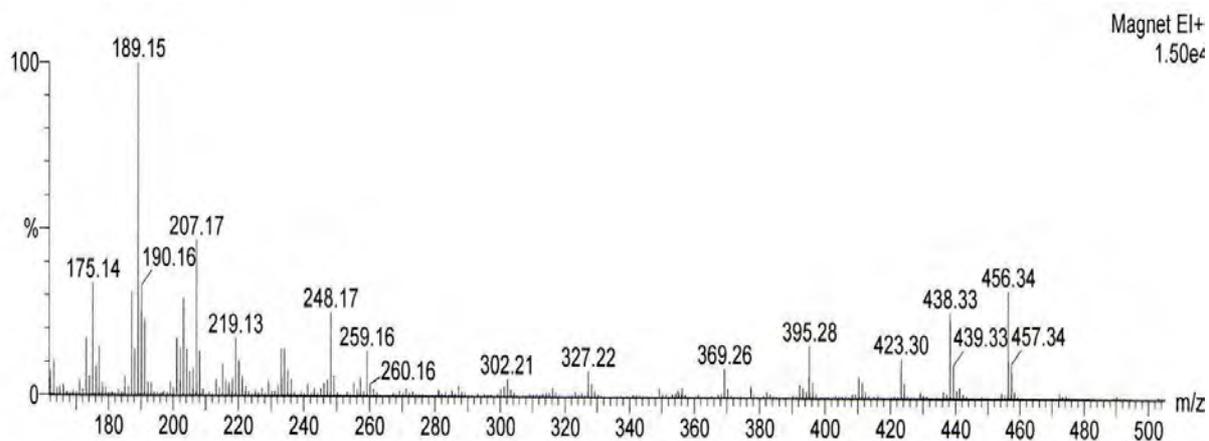
L'acide bétulinique

Tableau III.14. RMN du ^1H et du ^{13}C du composé SCD36 (500 MHz, δ , J , en Hz ; 125 MHz, δ) dans le CDCl_3 et de l'acide bétulinique (RMN du ^{13}C : 75 MHz, δ , dans le piridine- d_5 ; RMN du ^1H : 300 MHz, δ , J en Hz dans le DMSO).

Position	Composé SCD36		L'acide bétulinique	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
	$(\delta \text{ ppm})$			
1	-	38.9	-	39.5
2	-	27.4	-	28.1
3 α	3.11 <i>dd</i> ($J= 11.5 \text{ Hz}, J= 5.0 \text{ Hz}, 1\text{H}$)	79.0	3.19 <i>dd</i> ($J= 10.6 \text{ Hz}, J= 4.5 \text{ Hz}, 1\text{H}$)	78.6
4	-	38.4	-	38.1
5	-	55.3	-	56.2
6	-	18.3	-	19.0
7	-	34.3	-	35.1
8	-	40.7	-	39.9
9	-	50.5	-	51.2
10	-	37.2	-	38.0
11	-	20.9	-	21.4
12	-	25.5	-	26.4
13	-	38.7	-	38.9
14	-	42.4	-	43.4
15	-	29.7	-	30.5
16	-	32.1	-	33.1
17	-	56.2	-	57.2
18	-	49.3	-	50.0
19	2.92 <i>td</i> (1H)	46.0	3.01 <i>m</i> (1H)	48.0
20	-	150.4	-	151.8
21	-	30.5	-	31.4
22	-	37.0	-	37.8
23	0.87 <i>s</i> (3H)	28.0	0.95 <i>s</i> (3H)	28.9
24	0.68 <i>s</i> (3H)	16.1	0.77 <i>s</i> (3H)	16.8
25	0.75 <i>s</i> (3H)	16.0	0.83 <i>s</i> (3H)	16.7
26	0.89 <i>s</i> (3H)	15.3	0.97 <i>s</i> (3H)	16.6
27	0.91 <i>s</i> (3H)	14.7	0.98 <i>s</i> (3H)	15.2
28	-	179.3	-	179.7
29a	4.53 <i>d</i> ($J= 2.0 \text{ Hz}, 1\text{H}$)	109.7	4.62 <i>br s</i> (1H)	110.3
29b	4.67 <i>d</i> ($J= 2.0 \text{ Hz}, 1\text{H}$)		4.74 <i>br s</i> (1H)	
30	1.62 <i>s</i> (3H)	19.3	1.70 <i>s</i> (3H)	19.8

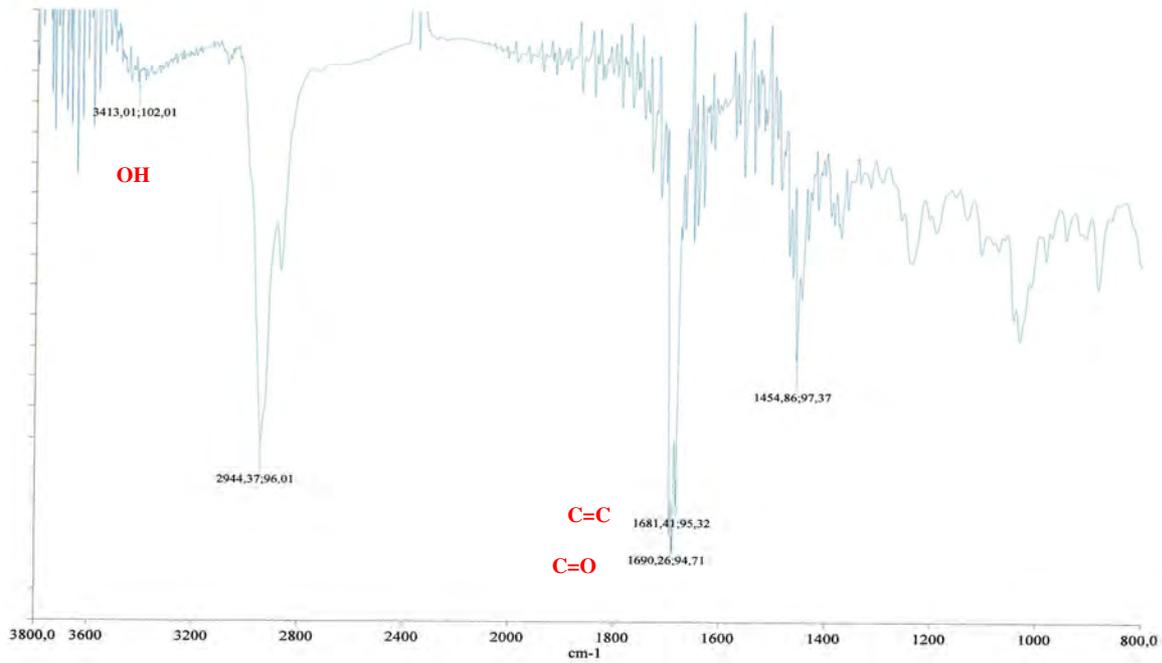


Spectre N°85. Spectre de masse en mode impact électronique du composé SCD36.

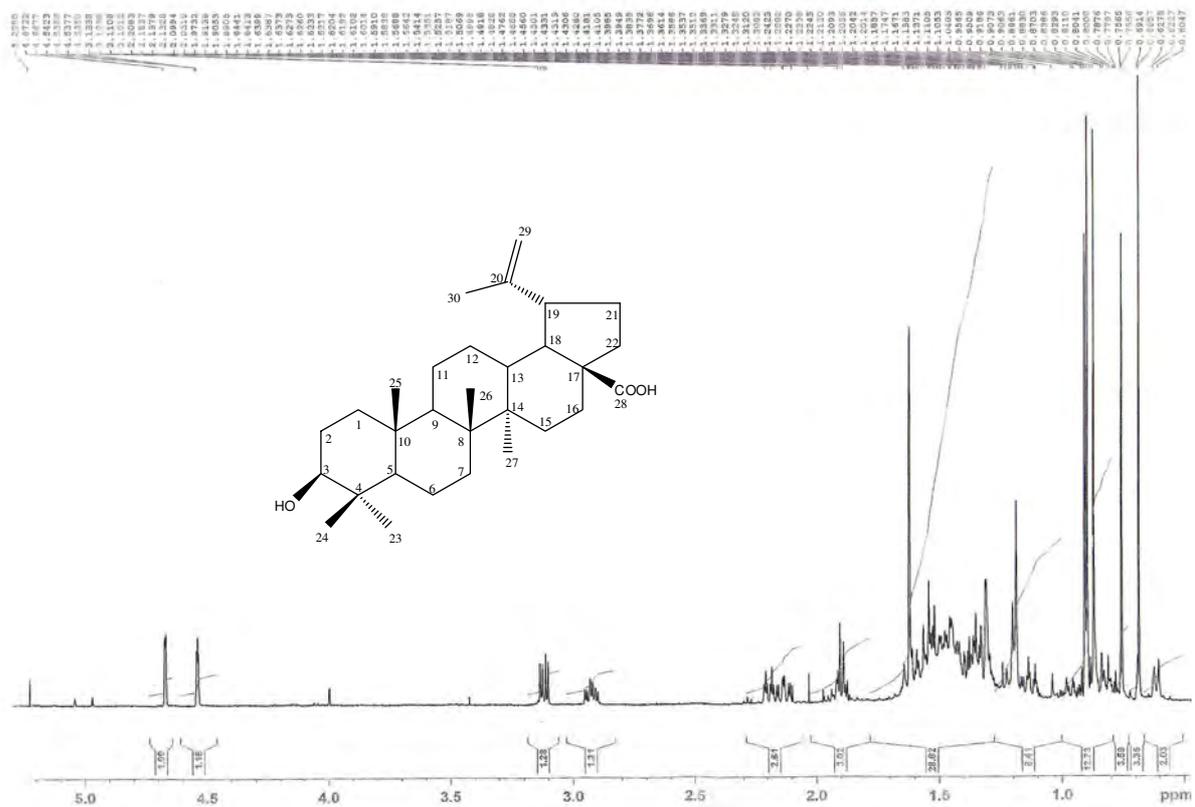


Mass	RA	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula
456.3619	13.07	456.3603	1.6	3.4	7.0	C30 H48 O3

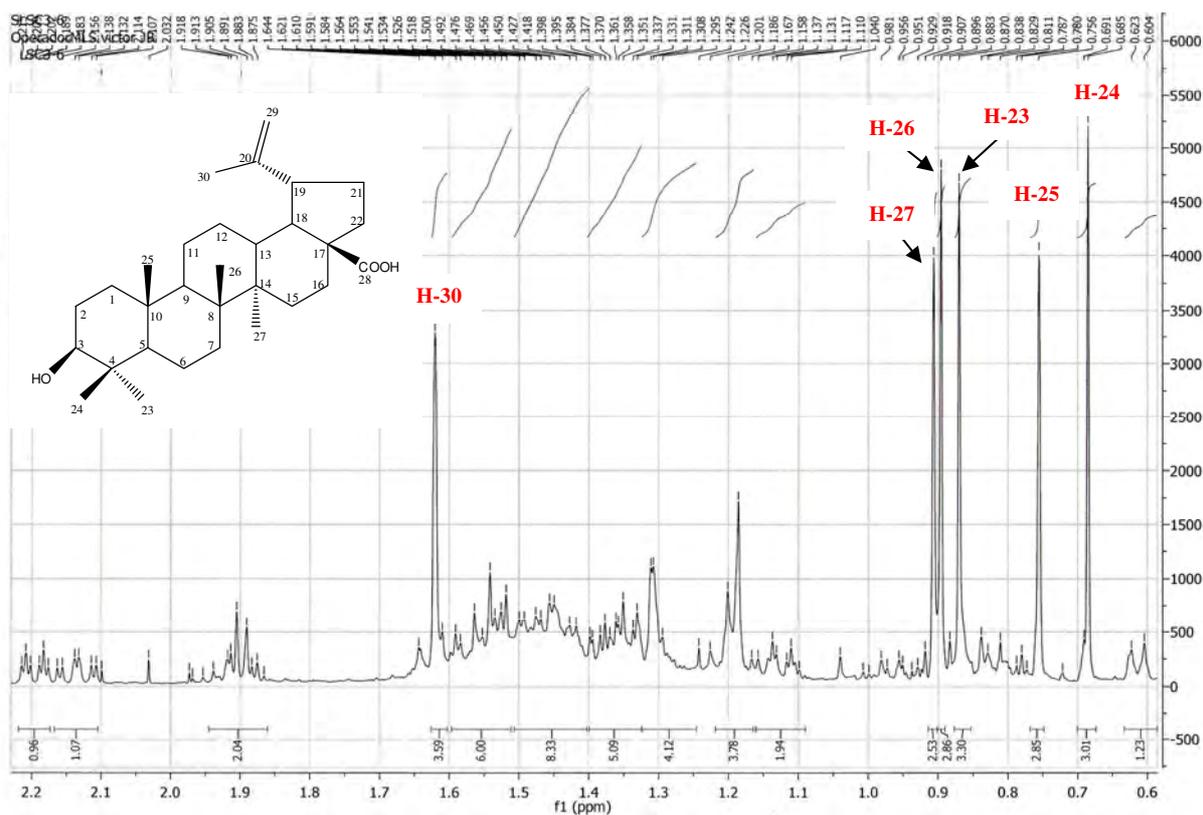
Spectre N°86. Spectre de masse HR-SMIE étalé du composé SCD36.



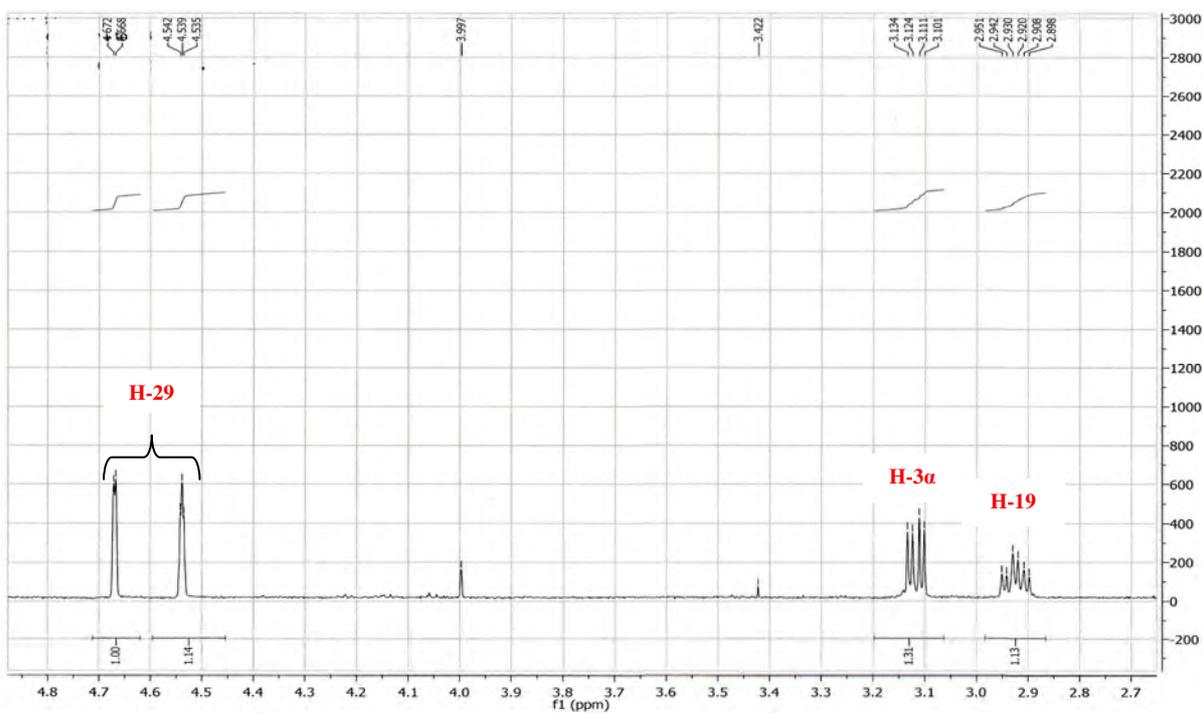
Spectre N°87. Spectre IR du composé SCD36.



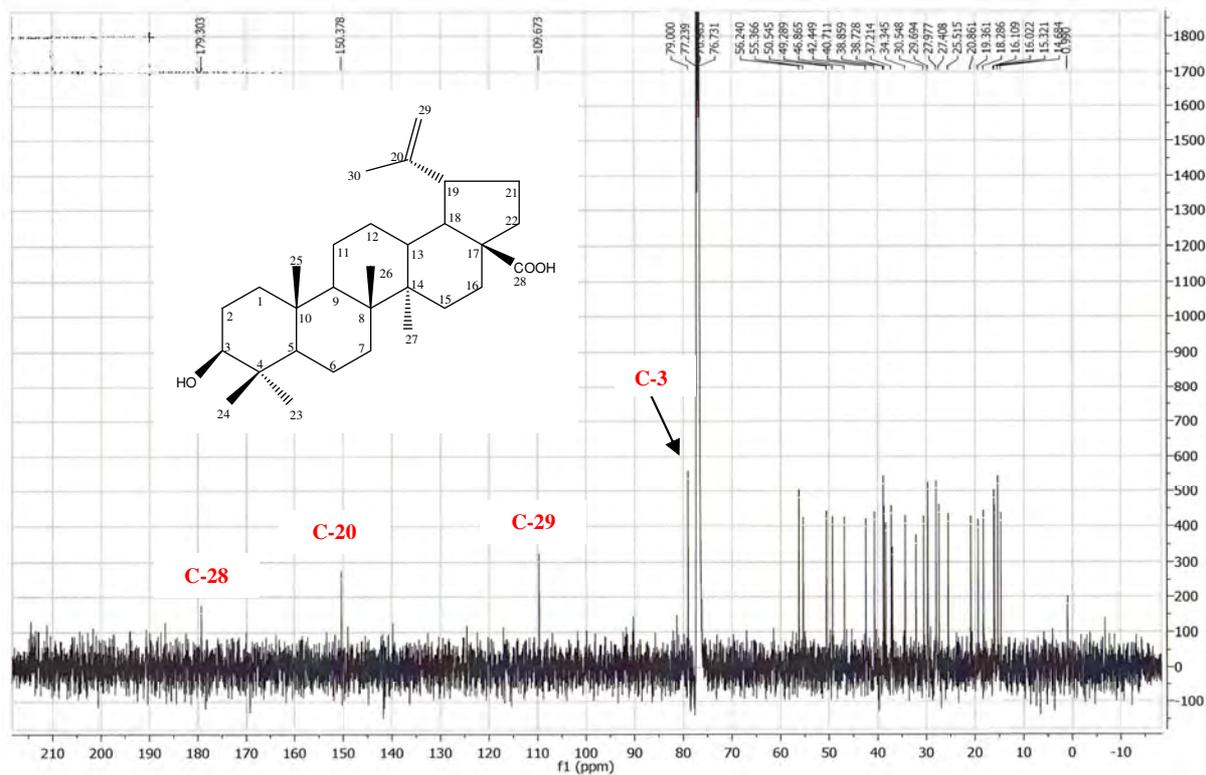
Spectre N°88. Spectre RMN ¹H du composé SCD36 (500 MHz).



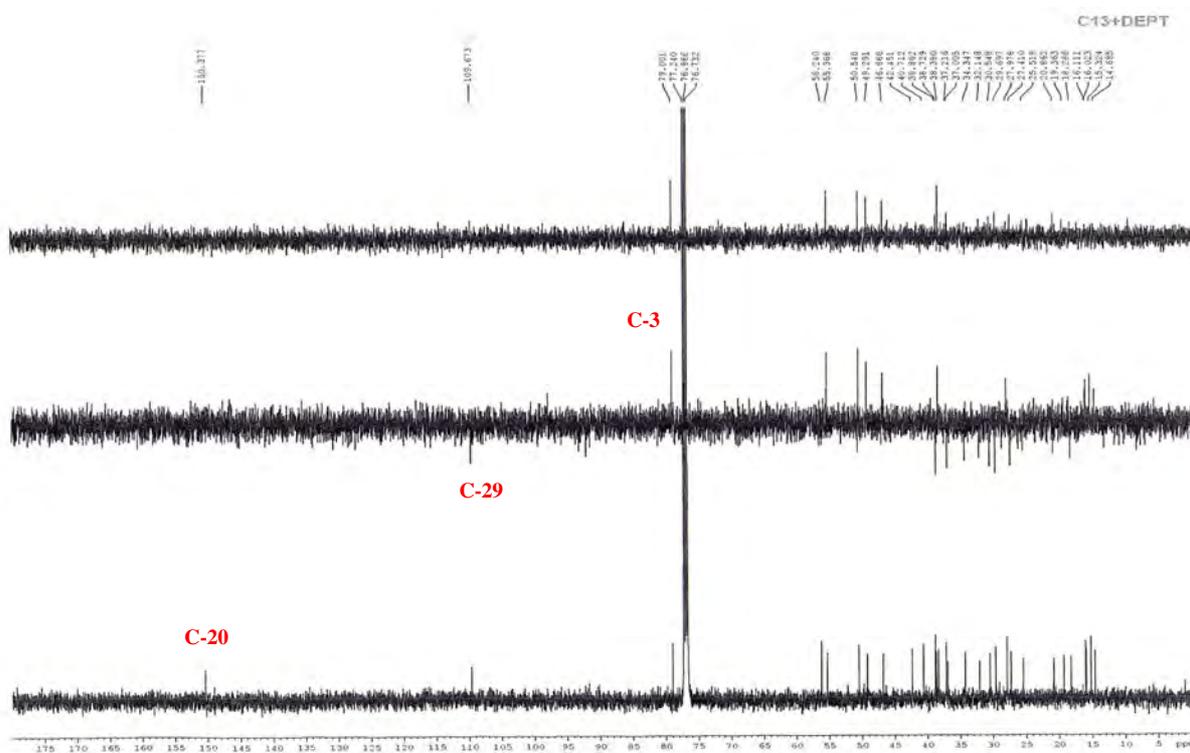
Spectre N°89. Spectre RMN ^1H étalé (0.6 à 2.2 ppm) du composé SCD36 (500 MHz).



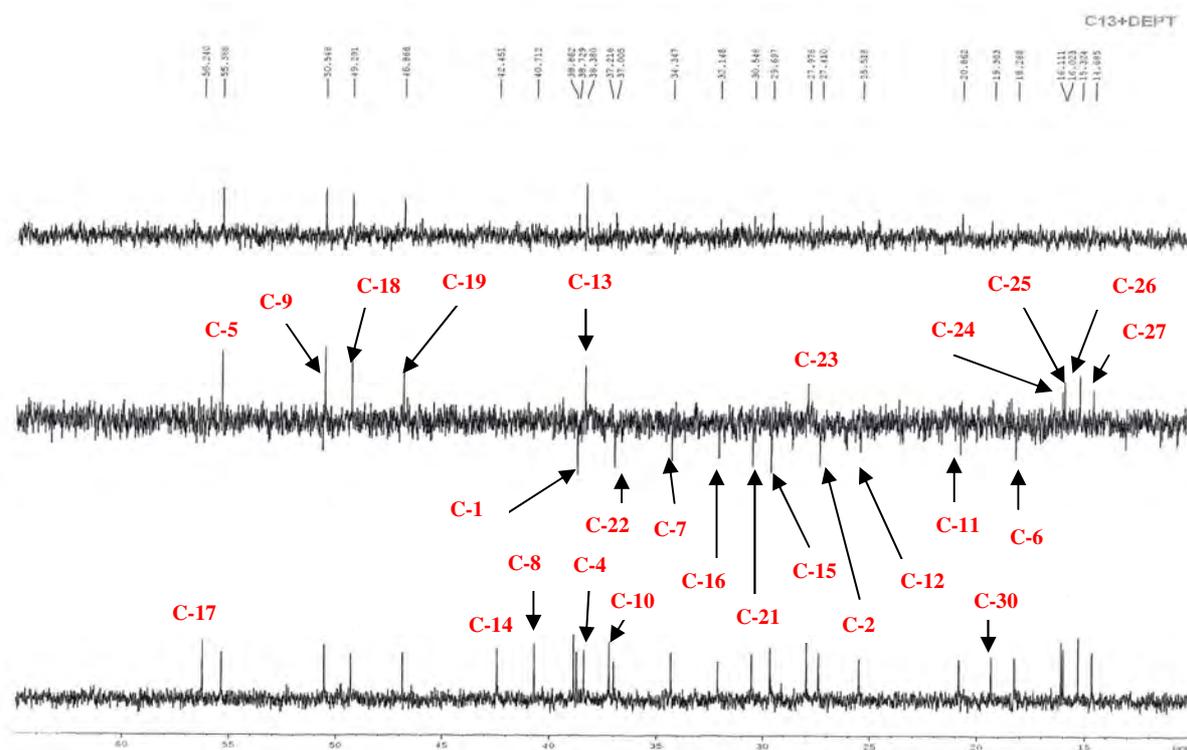
Spectre N°90. Spectre RMN ^1H étalé (2.7 à 4.8 ppm) du composé SCD36 (500 MHz).



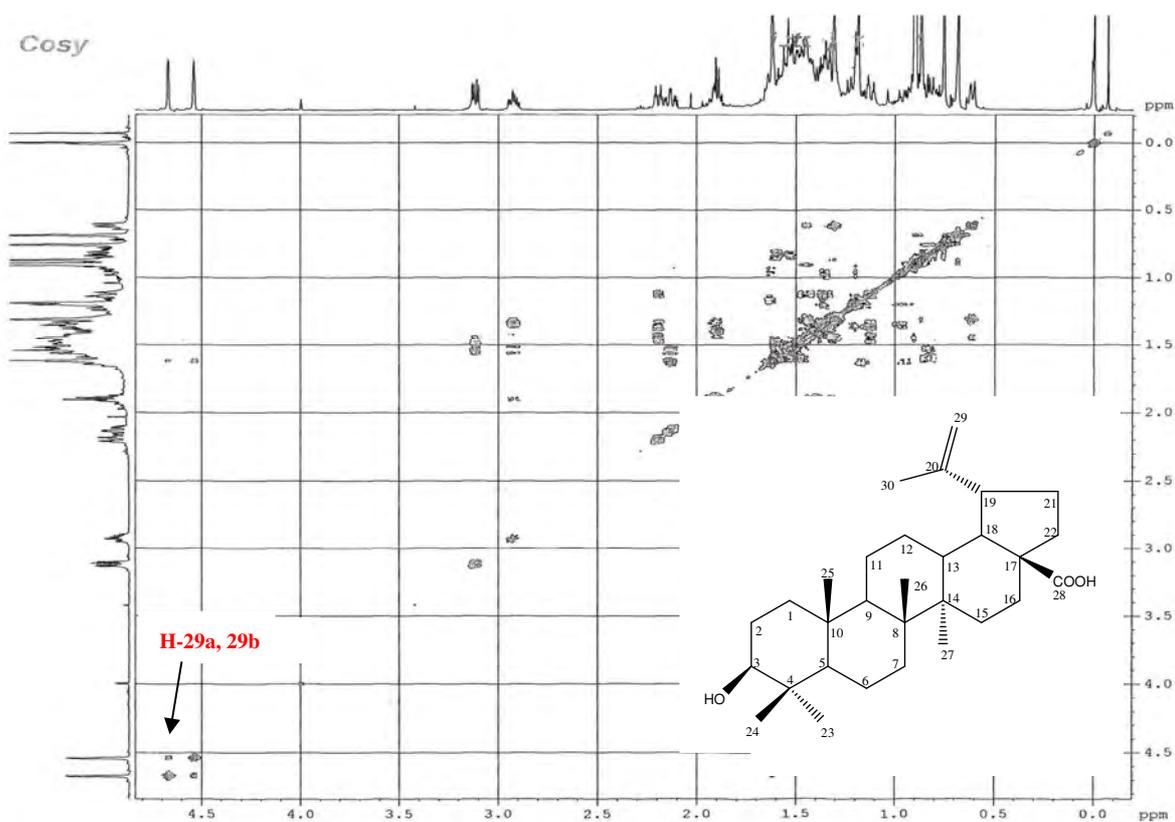
Spectre N°91. Spectre RMN ¹³C du composé SCD36 (125 MHz).



Spectre N°92. Spectre RMN ¹³C étalé (5 à 175 ppm) du composé SCD36 (125 MHz).



Spectre N°93. Spectre RMN ^{13}C étalé (10 à 60 ppm) du composé SCD36 (125 MHz).



Spectre N°94. Spectre Cosy du composé SCD36 (500 MHz).

III.6.12. Elucidation de la structure du composé SCD39

III.6.12.1. Analyses physico-chimiques

- Le composé SCD39 se présente sous la forme d'une poudre blanche. Ce composé prend une coloration rose après révélation en CCM par la vanilline sulfurique et une coloration violette au réactif de Liebermann-Burchard suggérant un composé de type triterpénique.
- $[\alpha]_D = +60^\circ$ dans le chloroforme, PF= 282-284°C.
- Le spectre IR (Spectre N°96) montre des bandes d'absorption à 3437 cm^{-1} (OH), 1731 cm^{-1} (C=O) et 1686 cm^{-1} (C=C).

III.6.12.2. Analyses spectroscopiques

Le spectre de masse du composé SCD39 enregistré en mode impact électronique (HR-SMIE) (Spectre N°95), montre un ion moléculaire $[M]^+$ à m/z 456.3499. Ce qui est compatible avec la formule brute $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$, soit une molécule à six insaturations. Le spectre RMN ^{13}C (Spectre N°100-102) confirme la présence de 30 carbones. Caractérisants un triterpène.

La fragmentométrie SM-IE permet de mettre en évidence la perte successive des ions caractéristiques de la molécule, ils sont présentés dans le tableau III.15.

Tableau III.15. Fragments du composé SCD39 en SM-IE.

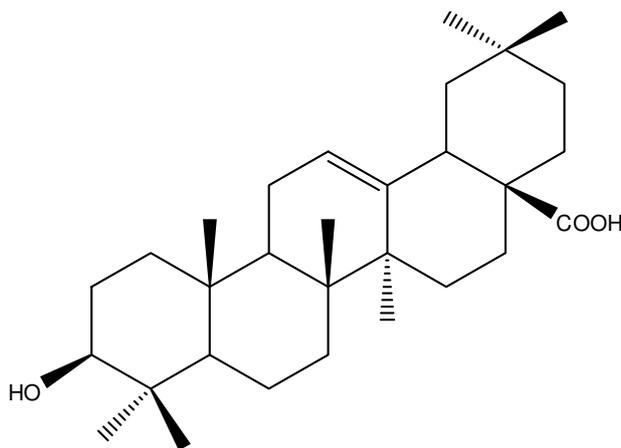
Fragment	m/z	Pourcentage %
$[M]^+$	456	32.47
$[M - 18]^+$	438	90.52
$[M - (18 + 15)]^+$	423	35.29
$[M - 46]^+$	410	24.82
$[\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_2]^+$	248	100.0
$[\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_2 - \text{COOH}]^+$	203	60.75

La RMN ^{13}C et celle du DEPT du composé SCD39 (Spectre N°100-102), montrent la présence de 30 carbones, un signal à $\delta_{\text{C}} = 182.0$ ppm relatif à un carbonyle d'un acide, sept carbones quaternaires ($\delta_{\text{C}} = 145.2$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 47.7$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 42.9$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 40.6$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 39.9$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 38.2$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 31.7$ ppm), cinq carbones tertiaires ($\delta_{\text{C}} = 123.6$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 79.8$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 56.7$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 48.8$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 42.7$ ppm), dix carbones secondaires ($\delta_{\text{C}} = 47.3$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 39.9$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 35.0$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 34.1$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 33.8$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 28.9$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 27.9$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 24.6$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 24.2$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 19.6$ ppm) et sept méthyles carbones ($\delta_{\text{C}} = 29.00$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 16.5$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 16.1$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 17.9$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 26.7$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 33.8$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 24.3$ ppm), toutes ces informations suggèrent que le produit isolé est un triterpène pentacyclique possédant un groupement hydroxyle en position 3.

Les signaux relatifs au carbone quaternaire et au carbone secondaires résonnant respectivement à $\delta_{\text{C}} = 145.2$ ppm et $\delta_{\text{C}} = 123.6$ ppm suggèrent la présence de la double liaison dans la molécule et le signal qui apparaît à $\delta_{\text{C}} = 79.8$ ppm, indique la présence de carbone lié à l'oxygène (carbone oxyméthine).

La RMN ^1H du composé SCD39 (Spectre N°97-99) enregistré dans le CD_3OD , montre sept signaux résonnant à champ fort entre $\delta_{\text{H}} = 0.68$ ppm et $\delta_{\text{H}} = 1.94$ ppm, s'intégrant pour 3H chacun, attribuables à des méthyles de triterpène pentacyclique. La présence de large singulet à $\delta_{\text{H}} = 5.15$ ppm d'intégration 1H et d'un doublet de doublet à $\delta_{\text{H}} = 2.75$ ppm d'intégration 1H correspondant aux protons d'hydrogène 12 et 18 de $^{12}\Delta$ squelette oléanane. De plus la présence d'un doublet de doublet à $\delta_{\text{H}} = 3.06$ ppm attribuable au proton 3 du carbone porteur d'un hydroxyle.

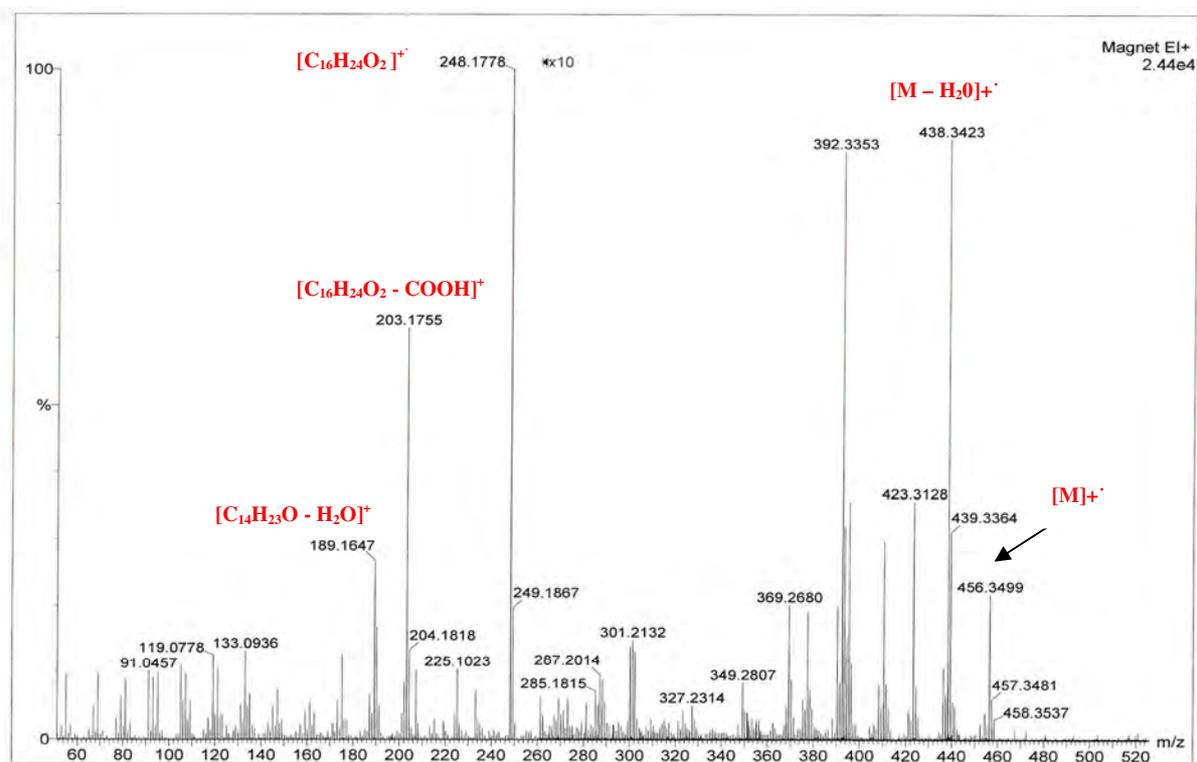
La comparaison de la RMN du ^1H et celle du ^{13}C du composé SCD39 et les modèles de la littérature (Mahato et Kundu, 1994 ; Son *et al.*, 1998 ; Seebacher *et al.*, 2003 ; Pinto *et al.*, 2008) a permis d'identifier le composé SCD39. La structure du composé SCD39 est donc établie comme étant le 3- β -hydroxyolean-12-en-28-oïque acide, appelé aussi l'acide oléanolique. Ce composé est connu, il a été isolé pour la première fois de genre *Richardia* (Rubiaceae) (Pinto *et al.*, 2008). Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN du ^1H et du ^{13}C dans le CD_3OD sont présentés dans le tableau III.16, avec leurs attributions et ceux trouvés dans la littérature (Mahato et Kundu, 1994 ; Son *et al.*, 1998 ; Seebacher *et al.*, 2003 ; Pinto *et al.*, 2008).



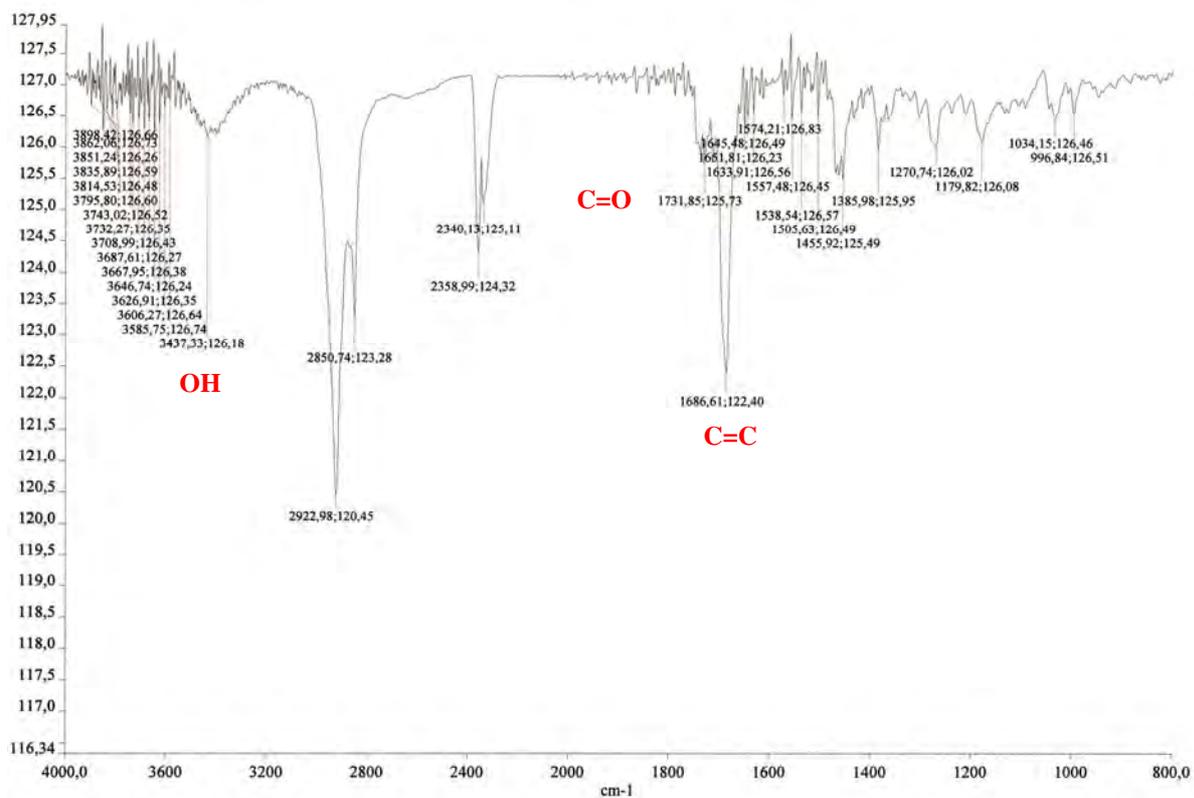
L'acide oléanolique

Tableau III.16. RMN du ^1H et du ^{13}C du composé SCD39 (500 MHz, δ , J , en Hz ; 125 MHz, δ) dans le CD_3OD et de l'acide oléanolique (500 MHz, δ , J , en Hz ; 125 MHz, δ).

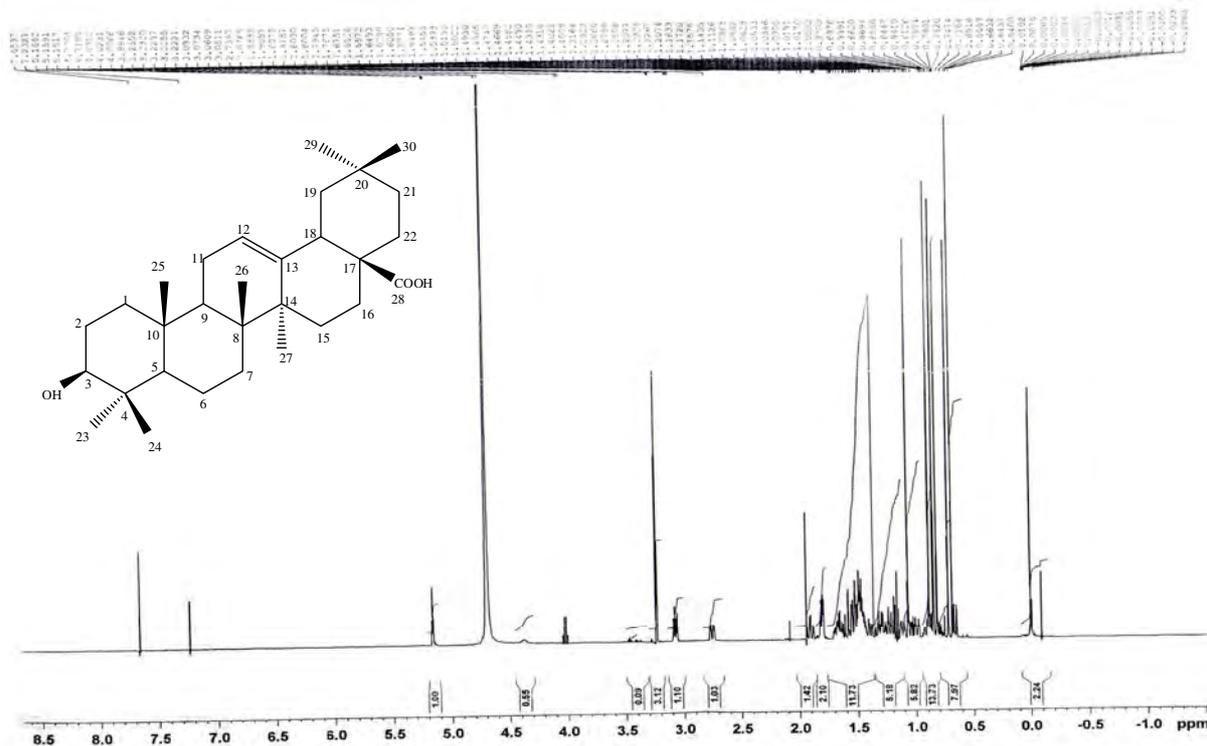
Position	Composé SCD39		L'acide oléanolique	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
	$(\delta \text{ ppm})$			
1	-	39.9	α 1.02 β 1.57	38.9
2	-	27.9	1.82 1.82	28.0
3 α	α 3.08 <i>dd</i> ($J= 5.0 \text{ Hz}$, $J= 11.5 \text{ Hz}$, 1H)	79.8	α 3.19 <i>dd</i> ($J= 5.7 \text{ Hz}$, $J= 9.7 \text{ Hz}$, 1H)	79.0
4	-	39.9	-	39.9
5	-	56.7	α 0.88 <i>d</i>	55.8
6	-	19.6	α 1.58 β 1.39	18.8
7	-	34.1	α 1.53 β 1.36	33.2
8	-	40.6	-	39.7
9	-	48.8	α 1.71 <i>tr</i>	48.1
10	-	38.2	-	37.3
11	-	24.2	1.96 1.96	23.7
12	5.14 <i>t</i> ($J= 3.6 \text{ Hz}$, 1H)	123.6	5.25 <i>brs</i> (1H)	122.6
13	-	145.2	-	144.8
14	-	42.9	-	42.1
15	-	28.9	α 1.22 β 2.19	28.3
16	-	24.6	α 2.12 <i>tr</i> β 1.96	23.8
17	-	47.7	-	46.7
18	2.75 <i>dd</i> ($J= 4.0 \text{ Hz}$, $J= 13.5 \text{ Hz}$, 1H)	42.7	β 2.80 <i>dd</i> ($J= 4.0 \text{ Hz}$, $J= 13.4 \text{ Hz}$, 1H)	42.0
19	-	47.3	α 1.83 β 1.32	46.5
20	-	31.7	-	30.9
21	-	35.0	α 1.46 β 1.23	34.2
22	-	33.8	α 1.82 β 2.04	33.2
23	0.88 <i>s</i> (3H)	29.00	α 1.24 <i>s</i>	28.7
24	0.81 <i>s</i> (3H)	16.5	β 1.02 <i>s</i>	16.5
25	0.68 <i>s</i> (3H)	16.1	β 0.93 <i>s</i>	15.5
26	0.84 <i>s</i> (3H)	17.9	β 1.04 <i>s</i>	17.5
27	1.06 <i>s</i> (3H)	26.7	α 1.30 <i>s</i>	26.1
28	-	182.0	-	183.2
29	0.71 <i>s</i> (3H)	33.8	α 0.97 <i>s</i>	33.2
30	0.81 <i>s</i> (3H)	24.3	β 1.02 <i>s</i>	23.7



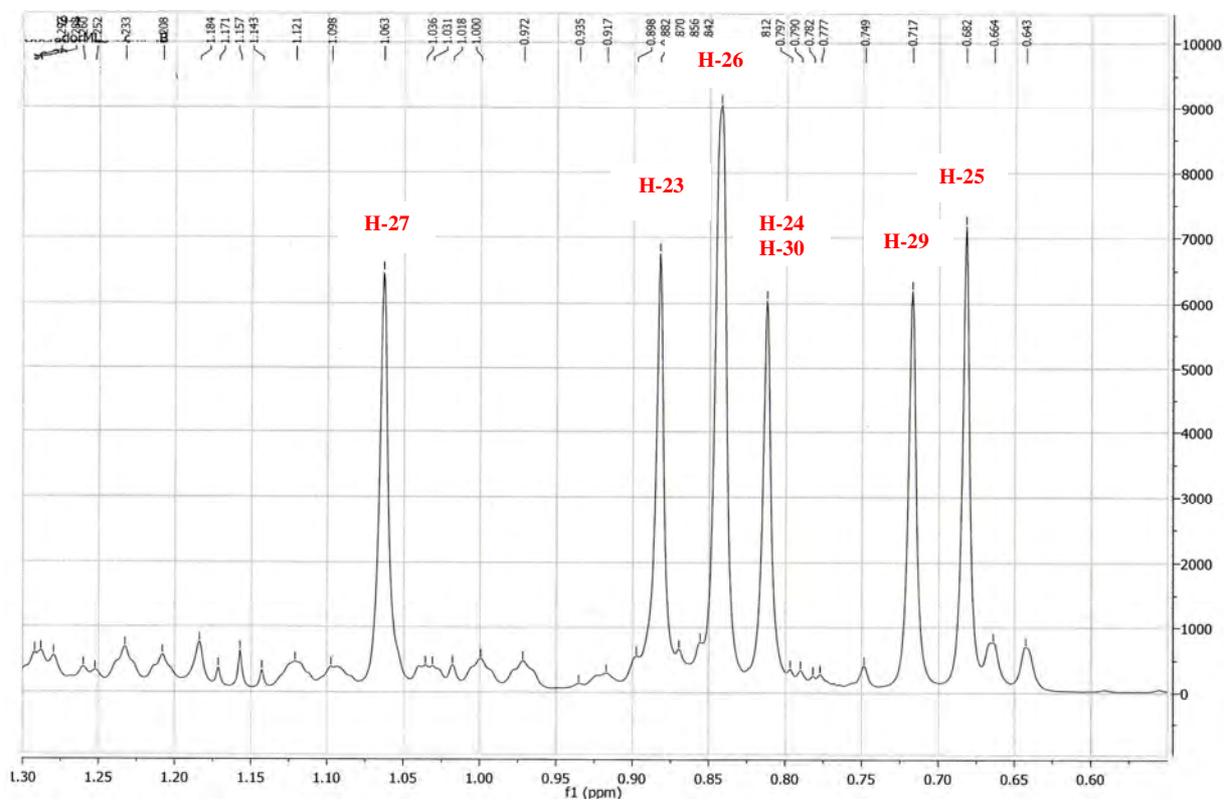
Spectre N°95. Spectre de masse en mode impact électronique du composé SCD39.



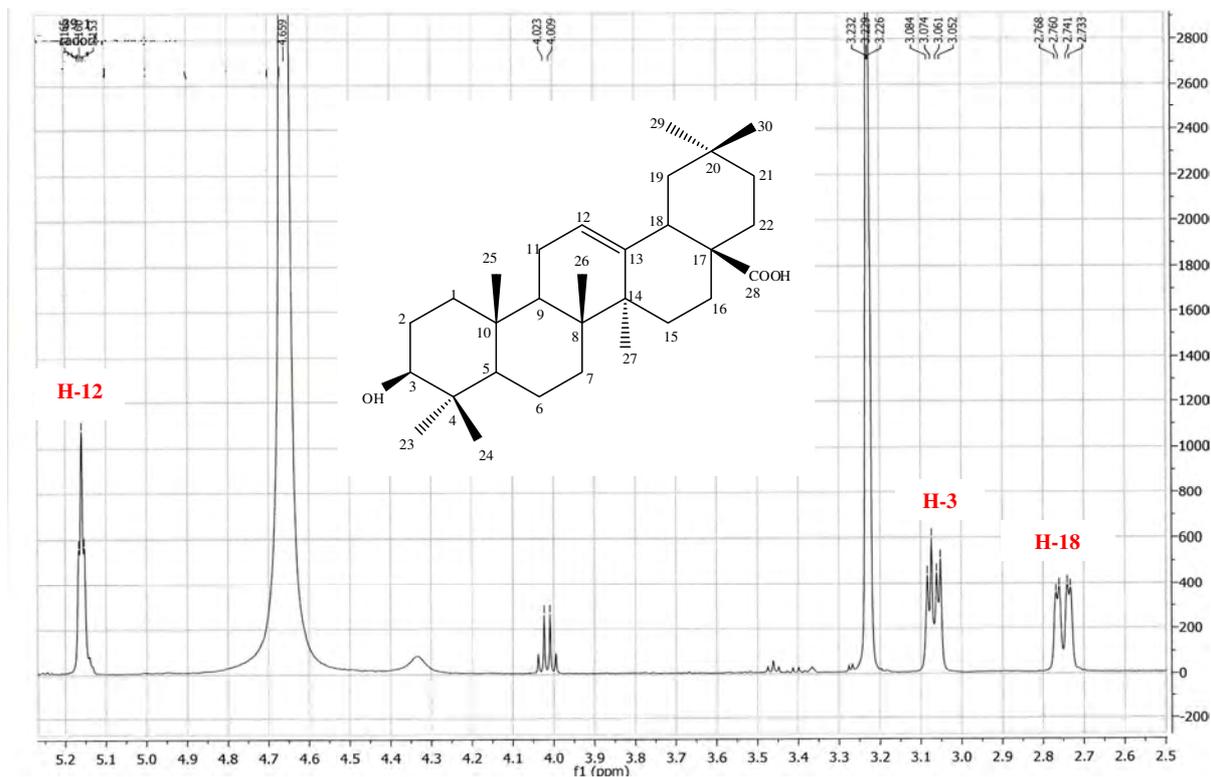
Spectre N°96. Spectre IR du composé SCD39.



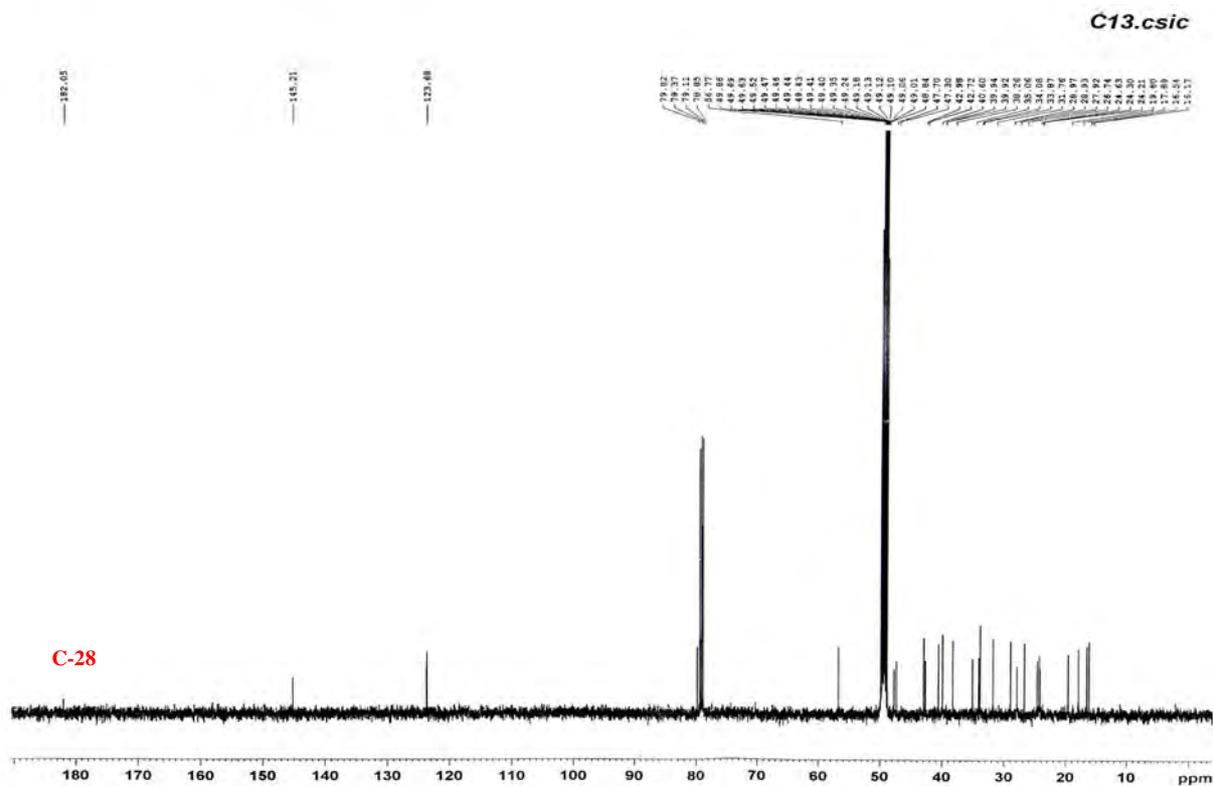
Spectre N°97. Spectre RMN ¹H du composé SCD39 (500 MHz).



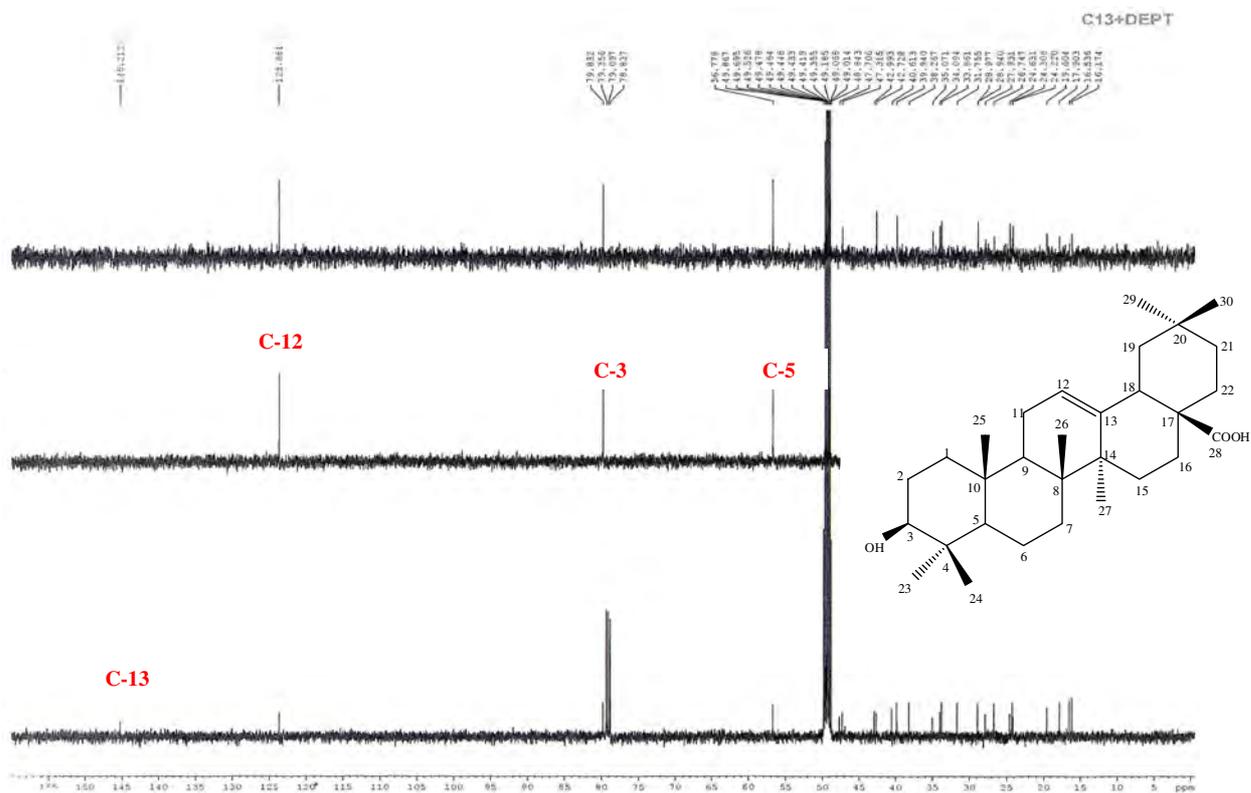
Spectre N°98. Spectre RMN ¹H étalé (0.6 à 1.3 ppm) du composé SCD39 (500 MHz).



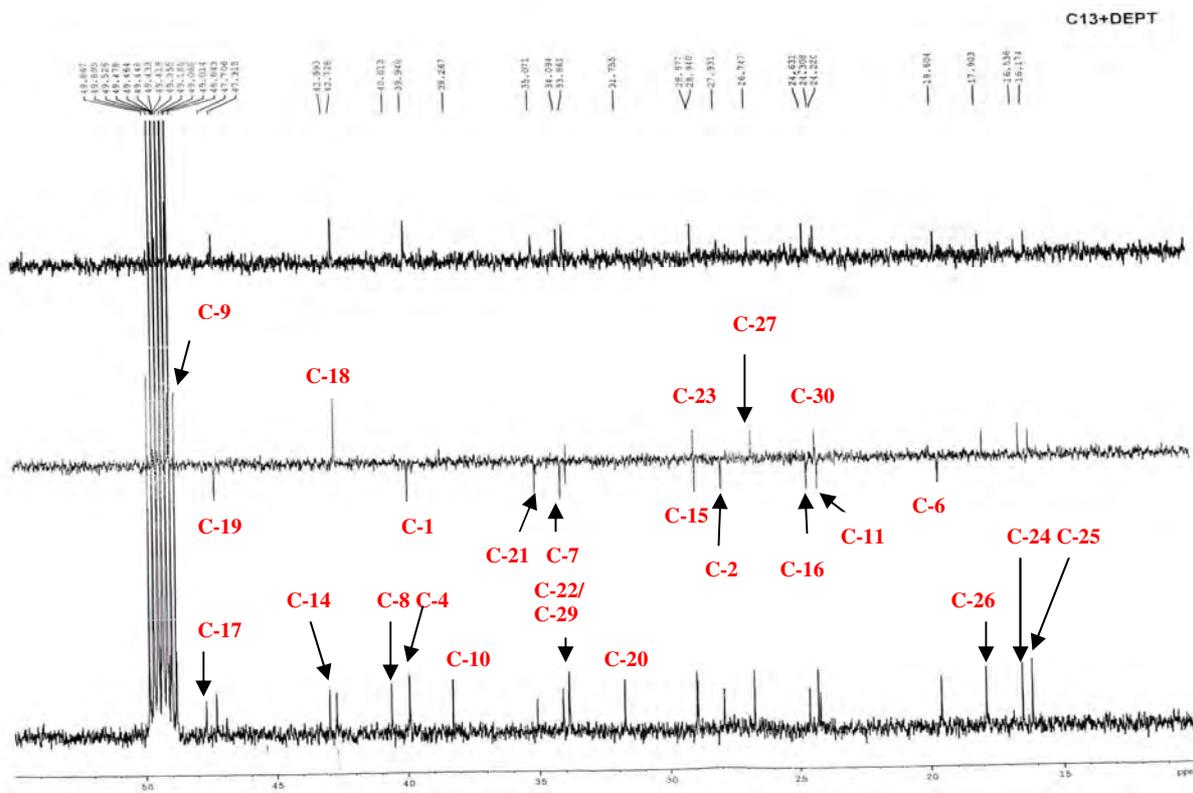
Spectre N°99. Spectre RMN ^1H étalé (2.5 à 5.3 ppm) du composé SCD39 (500 MHz).



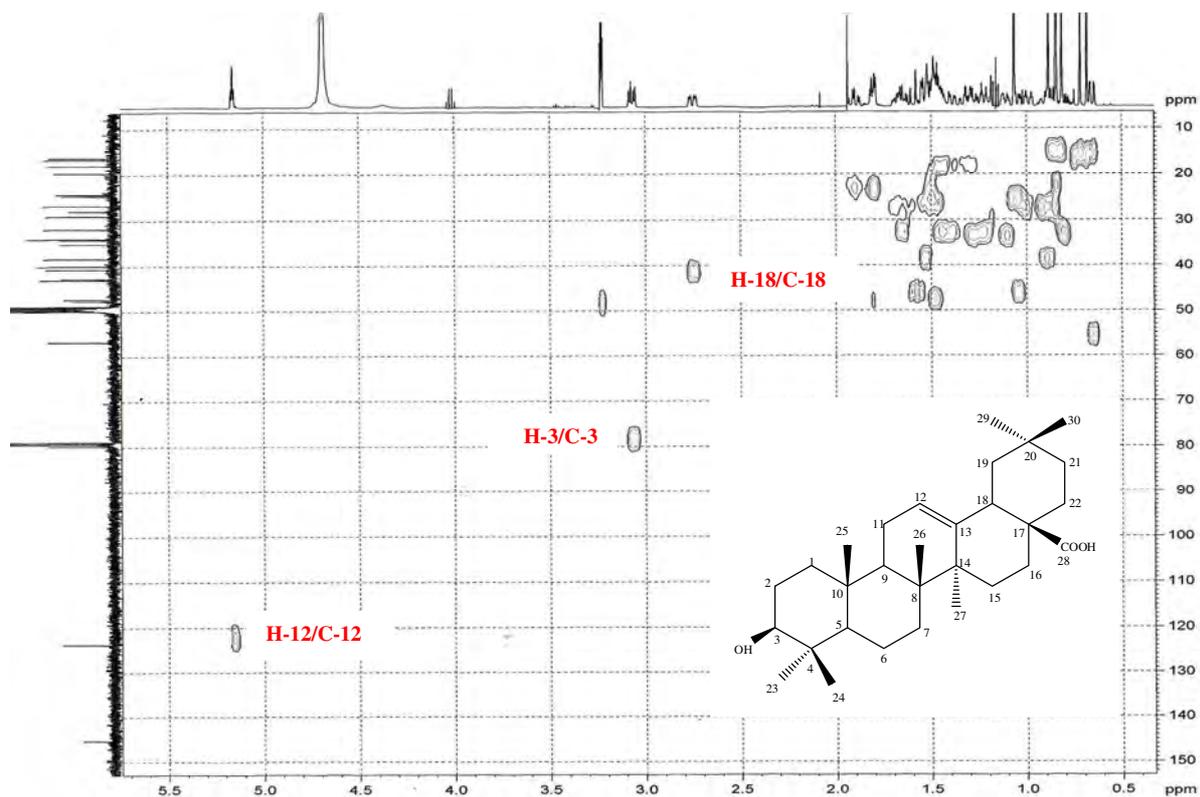
Spectre N°100. Spectre RMN ^{13}C du composé SCD39 (125 MHz).



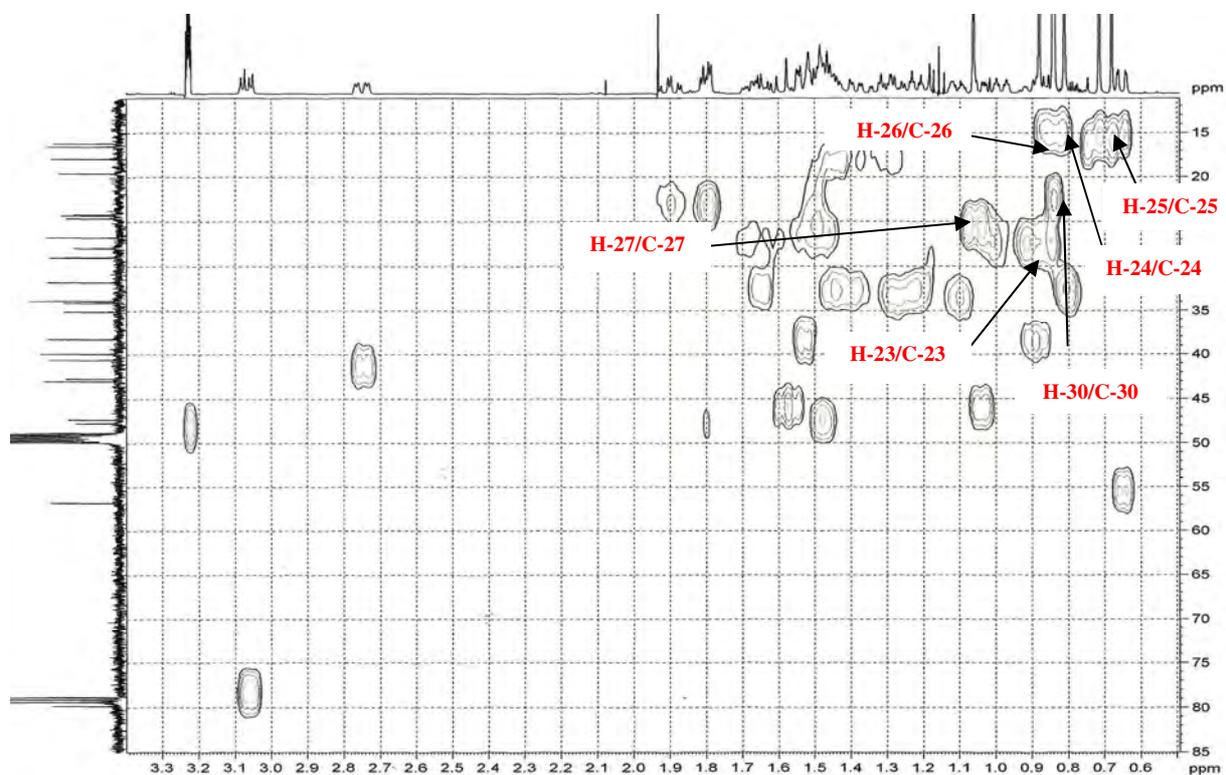
Spectre N°101. Spectre RMN ^{13}C étalé (0 à 155 ppm) du composé SCD39 (125 MHz).



Spectre N°102. Spectre RMN ^{13}C étalé (20 à 55 ppm) du composé SCD39 (125 MHz).



Spectre N°103. Spectre HSQC du composé SCD39 (500 MHz).



Spectre N°104. Spectre HSQC étalé (15 à 85 ppm) du composé SCD39 (500 MHz).

III.6.13. Elucidation de la structure du composé SCD78

III.6.13.1. Analyses physico-chimiques

- Le composé SCD78 se présente sous la forme d'une poudre blanche. Le test de Liebermann-Burchard a révélé la présence d'un triterpène.
- $[\alpha]_D = + 58^\circ$ dans le chloroforme, PF= 223°C.
- Le spectre IR (Spectre N°107) montre des bandes d'absorption à 3510 cm^{-1} (OH), 1739 cm^{-1} (C=O) et 1682 cm^{-1} (C=C).

III.6.13.2. Analyses spectroscopiques

Le spectre de masse du composé SCD78 enregistré en mode impact électronique (HR-SMIE) (Spectre N°105-106), montre un ion moléculaire $[M]^+$ à m/z 456.3559. Ce qui est compatible avec la formule brute $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$. Le spectre présente également des ions résultants de la fragmentation de la molécule, notamment l'ion $m/z= 411$ qui est caractéristique de la perte d'une fonction carboxyle, de plus le cation radicalaire à $m/z= 248$ $[\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_2]^+$ qui représente la fragmentation de Rétro-Diels-Alder, typique de Δ^{12} de type ursane avec COOH en position 17, et finalement la fragmentation $m/z= 203$ caractéristique de la perte de la fonction carboxyle à partir du fragment $m/z= 248$, toutes ces informations préliminaires orientent vers une structure d'un triterpène pentacyclique.

La fragmentométrie SM-IE permet de mettre en évidence la perte successive des ions caractéristiques de la molécule sont présentées dans le tableau III.17.

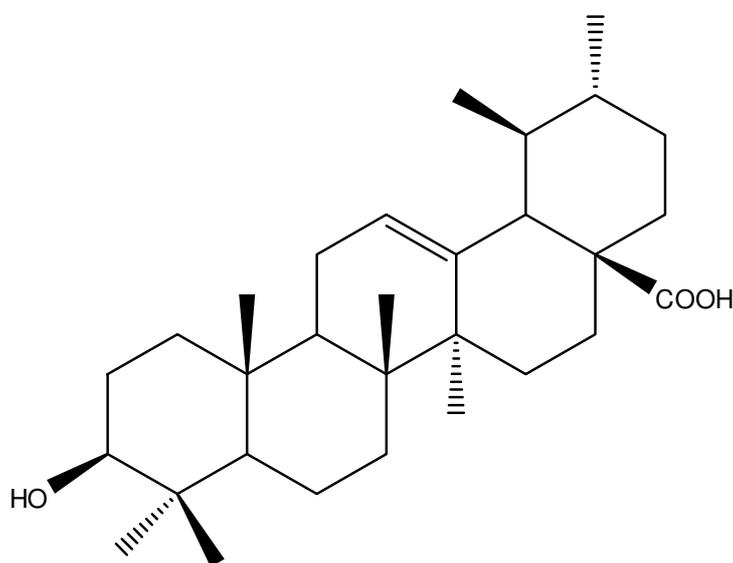
Tableau III.17. Fragments du composé SCD78 en SM-IE.

Fragment	m/z	Pourcentage %
$[M]^+$	456	38.47
$[M-46]^+$	410	33.33
$[\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_2]^+$	248	100.00
$[\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{O}]^+$	207	28.14
$[\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_2\text{-COOH}]^+$	203	48.81

La RMN ^{13}C du composé SCD78 (Spectre N°110-112), montre la présence de 30 carbones, un signal à $\delta_C= 179.9$ ppm relatif à un carbonyle d'un acide, Les signaux qui résonnant à $\delta_C= 139.3$ ppm et $\delta_C= 125.7$ ppm suggérant la présence de la double liaison dans la molécule et le signale à $\delta_C= 78.2$ ppm, indique la présence de carbone oxyméthine. Toutes ces informations suggèrent que le produit isolé est un triterpène pentacyclique possédant un groupement hydroxyle en position 3.

Le spectre RMN ^1H du composé SCD78 (Spectre N°108-109) enregistré dans le CD_3OD , montre sept signaux résonnant à champ fort entre $\delta_{\text{H}}= 0.91$ ppm et $\delta_{\text{H}}=1.25$ ppm, s'intégrant chacun pour 3H attribuables à des méthyles de triterpène pentacyclique, cinq apparaissent sous forme de singulet ($\delta_{\text{H}}= 0.91$ ppm, $\delta_{\text{H}}= 1.03$ ppm, $\delta_{\text{H}}= 1.07$ ppm, $\delta_{\text{H}}= 1.24$ ppm, $\delta_{\text{H}}= 1.26$ ppm) et deux sous forme de doublet ($\delta_{\text{H}}= 0.97$ ppm ($J= 6.5$ Hz), $\delta_{\text{H}}= 1.02$ ppm ($J= 6.0$ Hz)) typique de squelette ursane. La présence de large singulet à $\delta_{\text{H}}= 5.51$ ppm d'intégration 1H et un doublet à $\delta_{\text{H}}= 2.65$ ppm d'intégration 1H correspondant respectivement à des protons d'hydrogène 12 (oléfinique) et 18 de $^{12}\Delta$ squelette ursane. De plus la présence d'un doublet de doublet de un proton à $\delta_{\text{H}}= 3.45$ ppm attribuable au proton porté par le carbone 3. La multiplicité de H-3 (dd , $J= 6.0$ Hz, $J= 10.5$ Hz, 1H) implique qu'il est de configuration α -axial (Seebacher *et al.*, 2003).

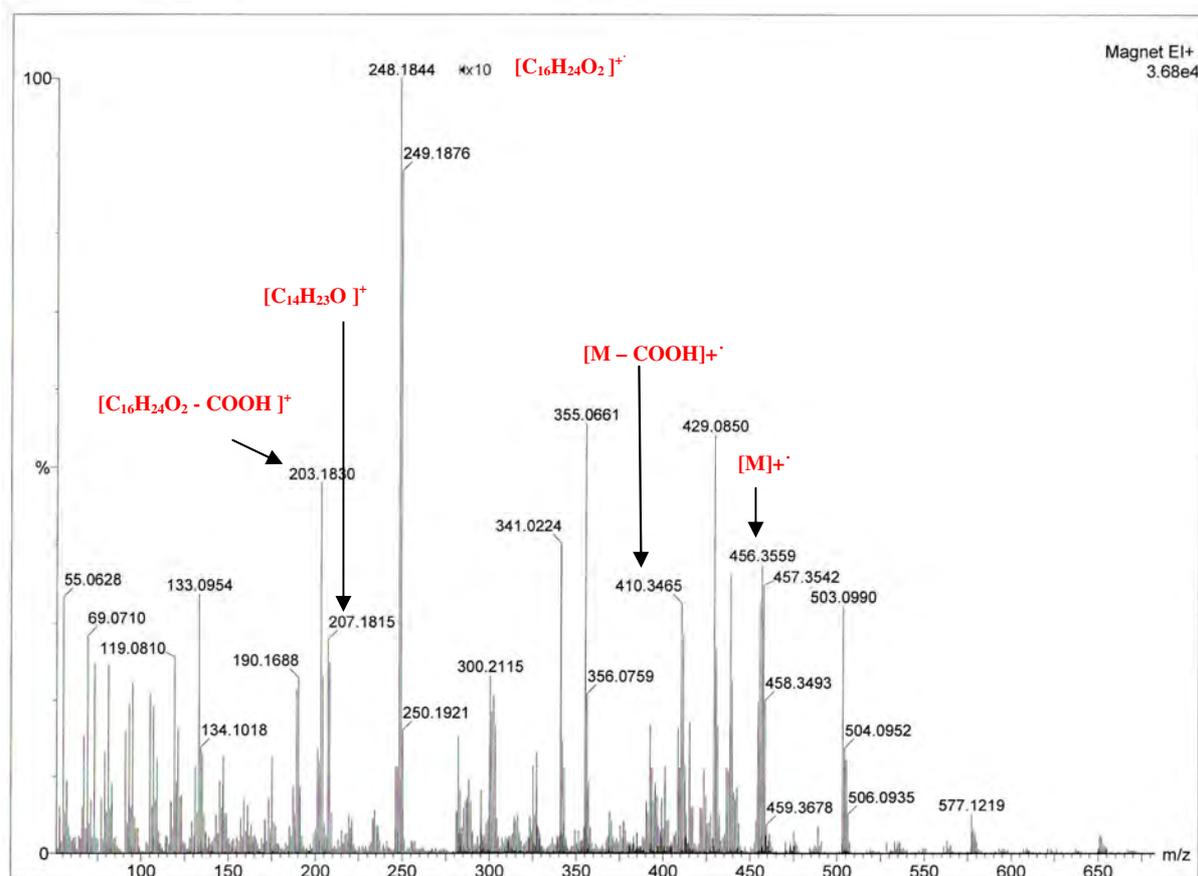
La comparaison des spectres de la RMN du ^1H et RMN du ^{13}C du composé SCD78 aux modèles de littérature (Seebacher *et al.*, 2003) permet d'identifier le composé SCD78. La structure du composé SCD78 est donc établie comme étant l'acide 3- β -hydroxyurs-12-en-28-oïc, appelé aussi l'acide ursolique. Ce composé est connu, il a été isolé pour la première fois à partir de la poudre de feuilles de busserole (*Arctostaphylos uva-urisi* L.) (Éricaceae) (Bilham *et al.*, 1942). Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN du ^1H et du ^{13}C dans le CD_3OD sont présentés dans le tableau III.18, avec leurs attributions et ceux trouvés dans la littérature (Seebacher *et al.*, 2003).



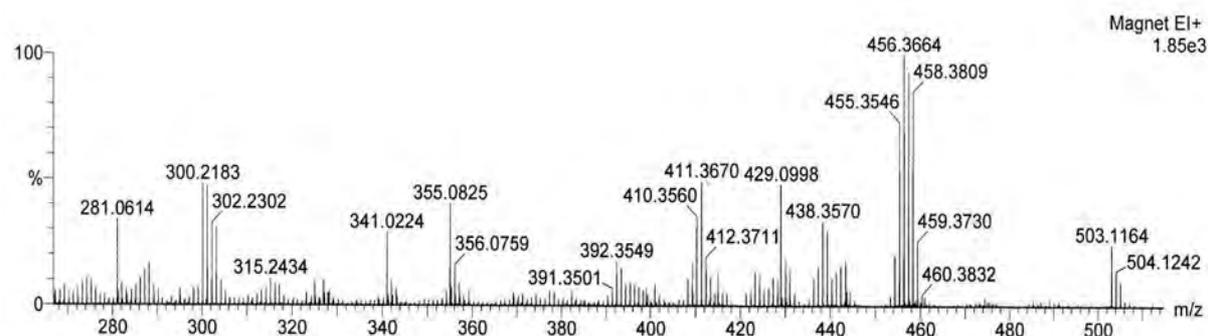
L'acide ursolique

Tableau III.18. RMN du ^1H et du ^{13}C du composé SCD78 (500 MHz, δ , J , en Hz ; 125 MHz, δ) dans le CD_3OD et de l'acide ursolique (500 MHz, δ , J , en Hz ; 125 MHz, δ) dans la pyridine $-d_5$.

Position	Composé SCD78		L'acide ursolique	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
(δ ppm)				
1	-	39.2	α 1.00 β 1.58	39.2
2	-	28.2	1.81 1.81	28.2
3 α	α 3.45 <i>dd</i> ($J= 6.0$ Hz, $J= 10.5$ Hz, 1H)	78.2	α 3.44 <i>dd</i>	78.2
4	-	39.6	-	39.6
5	-	55.9	α 0.88 <i>d</i>	55.9
6	-	18.8	α 1.58 β 1.39	18.8
7	-	33.7	α 1.59 β 1.39	33.7
8	-	40.1	-	40.1
9	-	48.1	α 1.65	48.1
10	-	37.5	-	37.5
11	-	23.7	1.96 1.96	23.7
12	5.51 <i>br s</i> (1H)	125.7	5.49 <i>s</i> (1H)	125.7
13	-	139.3	-	139.3
14	-	42.6	-	42.6
15	-	28.9	α 1.22 β 2.33 <i>tr</i>	28.8
16	-	25.0	α 2.14 <i>tr</i> β 2.01	25.0
17	-	48.1	-	48.1
18	2.65 <i>d</i> ($J= 11.0$ Hz, 1H)	53.6	β 2.63 <i>d</i>	53.6
19	-	39.5	α 1.49	39.5
20	-	39.4	β 1.05	39.4
21	-	31.1	α 1.40 β 1.49	31.1
22	-	37.4	1.97 1.97	37.4
23	1.24 <i>s</i> (3H)	28.8	α 1.24 <i>s</i>	28.8
24	1.03 <i>s</i> (3H)	16.6	β 1.02 <i>s</i>	16.5
25	0.91 <i>s</i> (3H)	15.7	β 0.92 <i>s</i>	15.7
26	1.07 <i>s</i> (3H)	17.5	β 1.06 <i>s</i>	17.5
27	1.26 <i>s</i> (3H)	24.0	α 1.27 <i>s</i>	24.0
28	-	179.9	-	179.7
29	1.02 <i>d</i> ($J= 6.0$ Hz, 3H)	17.5	β 1.02 <i>d</i>	17.5
30	0.97 <i>d</i> ($J= 6.5$ Hz, 3H)	21.4	α 0.97 <i>d</i>	21.4



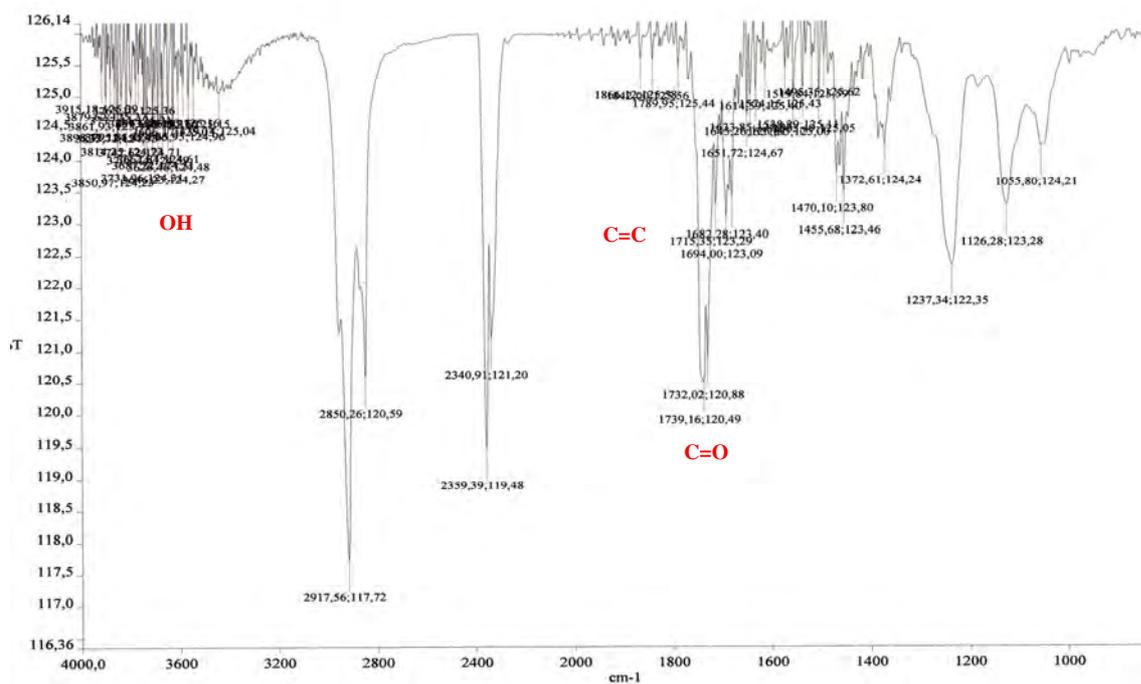
Spectre N°105. Spectre de masse en mode impact électronique du composé SCD78.



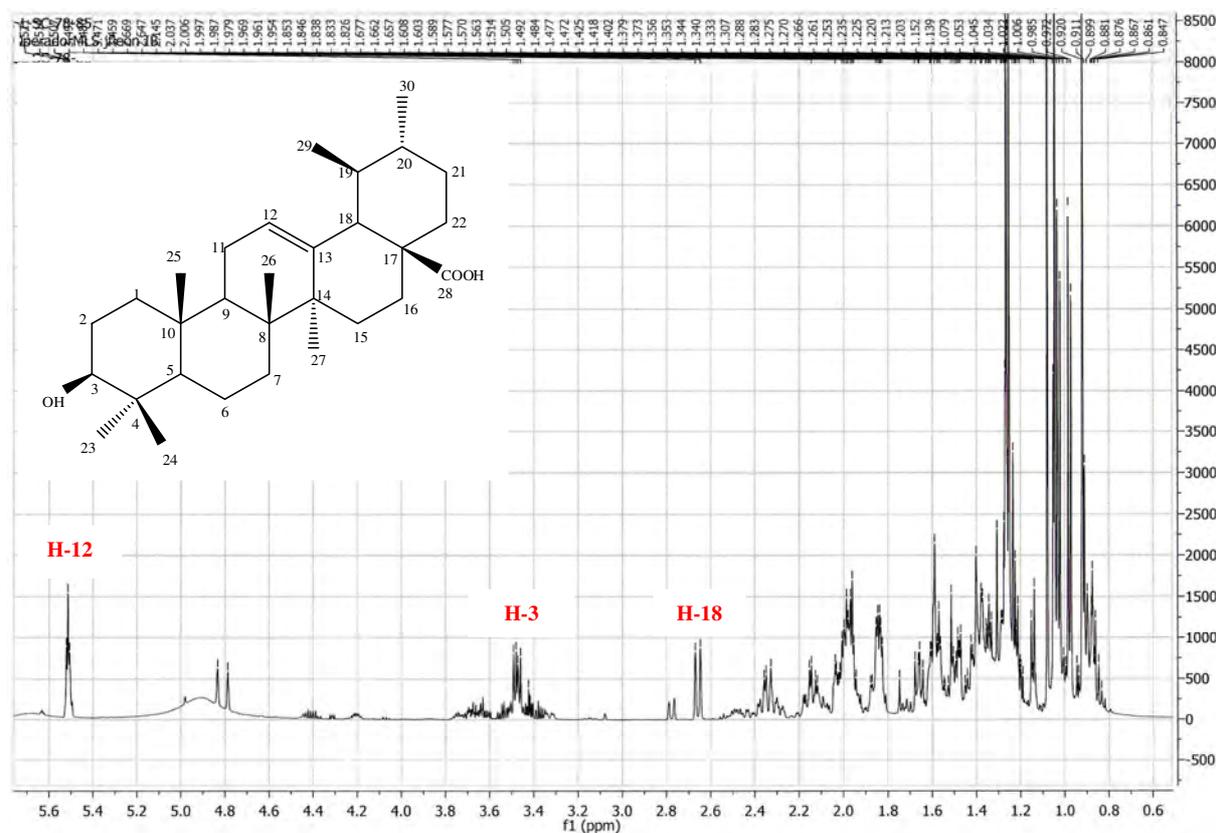
Minimum: 10.00
Maximum: 100.00

Mass	RA	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula
459.3836	22.29	459.3838	-0.2	-0.5	5.5	C30 H51 O3
458.4126	18.56	458.4124	0.2	0.5	5.0	C31 H54 O2
458.3757	80.63	458.3760	-0.3	-0.6	6.0	C30 H50 O3
458.3388	18.51	458.3396	-0.8	-1.8	7.0	C29 H46 O4
457.4067	17.42	457.4046	2.1	4.7	5.5	C31 H53 O2
457.3699	92.53	457.3682	1.7	3.8	6.5	C30 H49 O3
457.3331	24.57	457.3318	1.3	2.9	7.5	C29 H45 O4
456.3978	30.52	456.3967	1.1	2.3	6.0	C31 H52 O2
456.3611	93.72	456.3603	0.8	1.7	7.0	C30 H48 O3

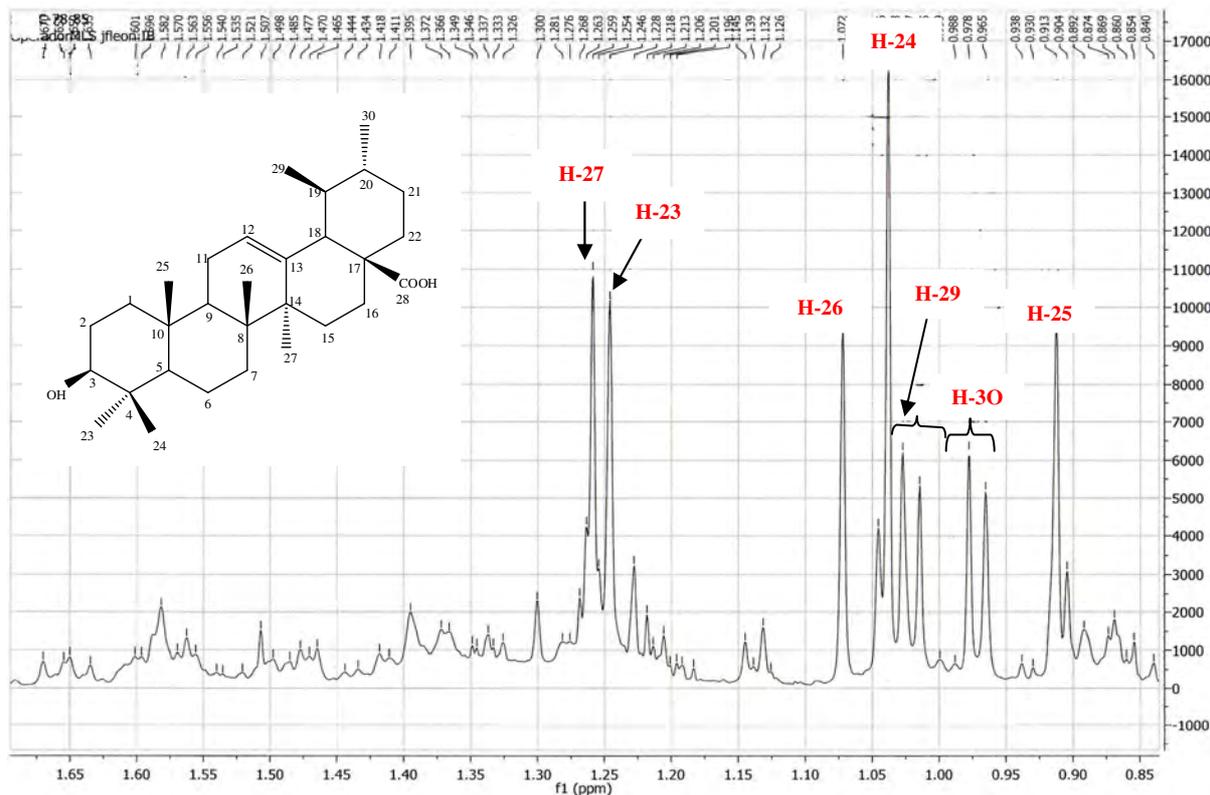
Spectre N°106. Spectre de masse HR-SMIE étalé du composé SCD78.



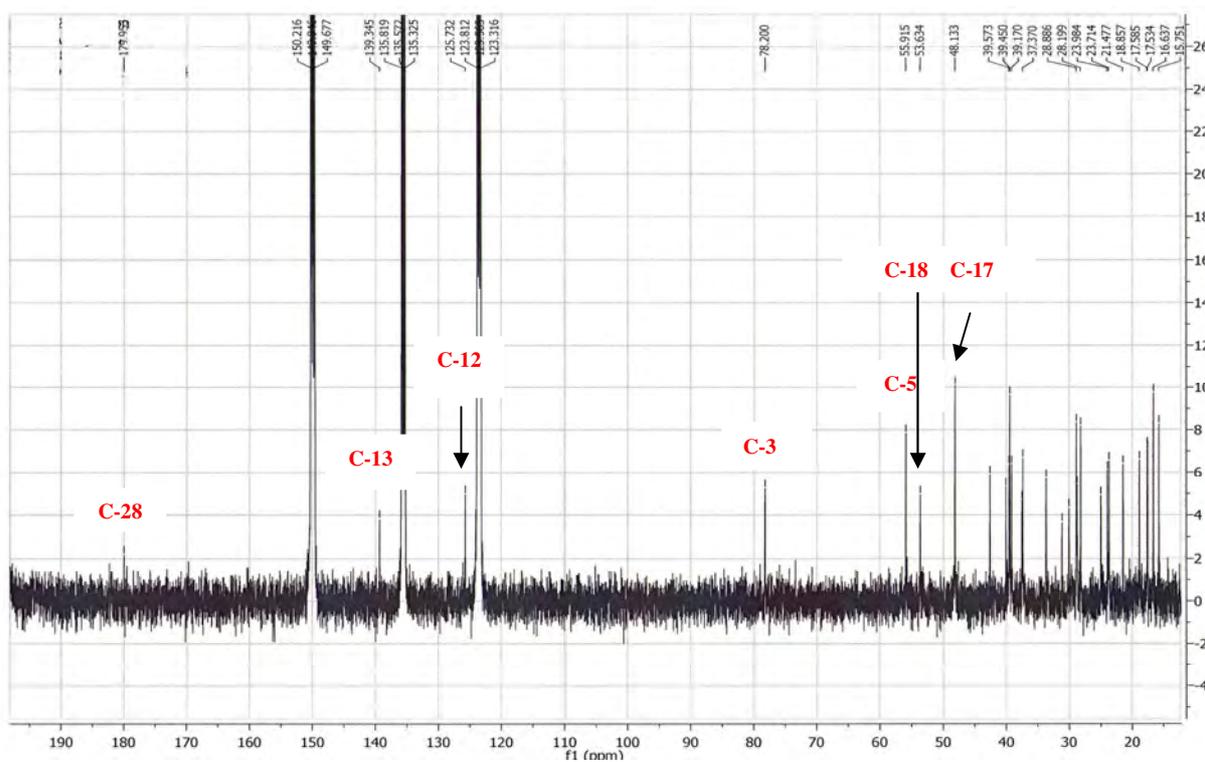
Spectre N°107. Spectre IR du composé SCD78.



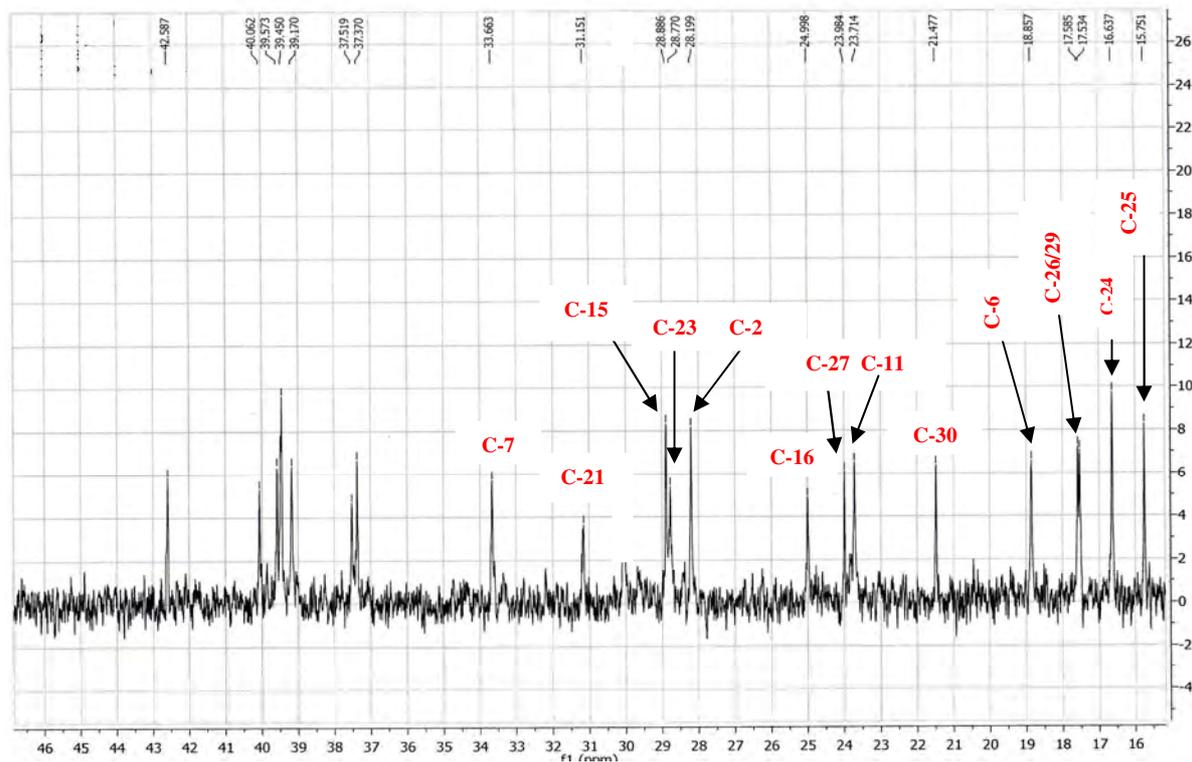
Spectre N°108. Spectre RMN ¹H du composé SCD78 (500 MHz).



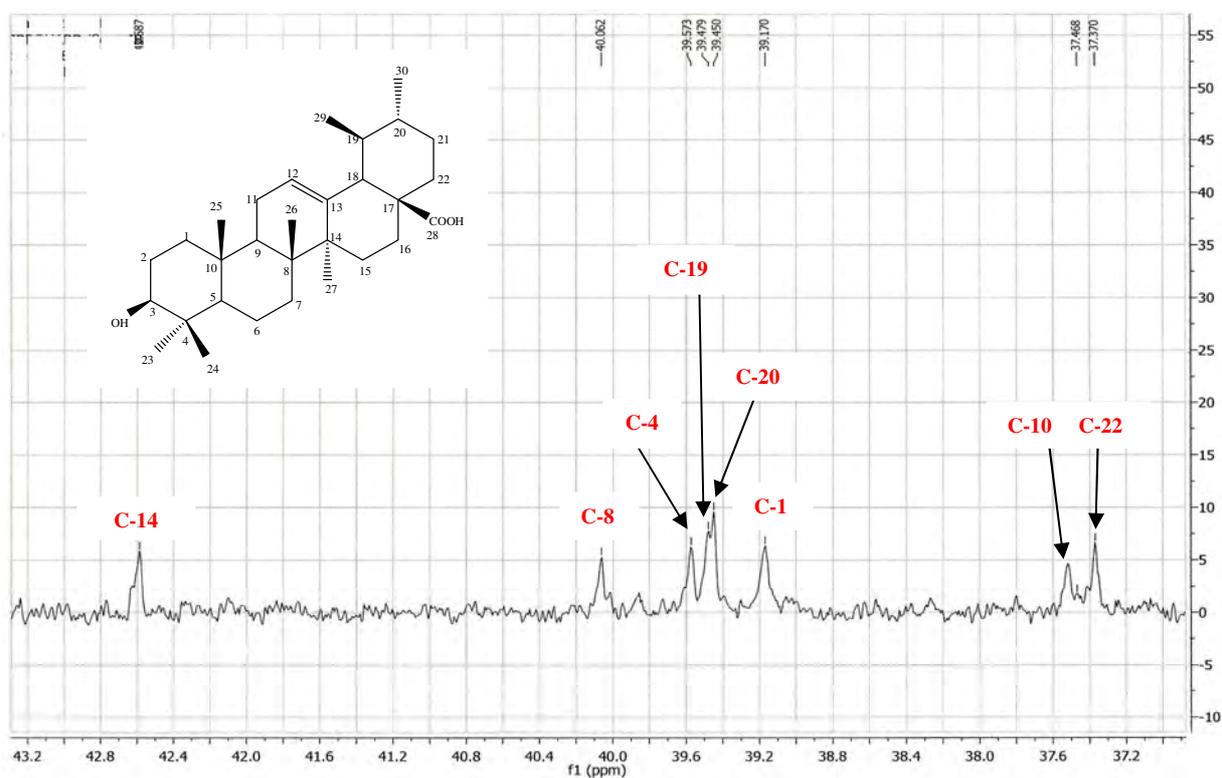
Spectre N°109. Spectre RMN ^1H étalé (0.85 à 1.65 ppm) du composé SCD78 (500 MHz).



Spectre N°110. Spectre RMN ^{13}C étalé (0 à 155 ppm) du composé SCD78 (125 MHz).



Spectre N°111. Spectre RMN ^{13}C étalé (15 à 46 ppm) du composé SCD78 (125 MHz).



Spectre N°112. Spectre RMN ^{13}C étalé (37.1 à 43.2 ppm) du composé SCD78 (125 MHz).

III.6.14. Elucidation de la structure du composé SCD86

III.6.14.1. Analyses physico-chimiques

- Le composé SCD86 se présente sous la forme d'une poudre blanche, soluble dans le chloroforme et dans les solvants polaires. Ce composé prend une coloration violette après révélation en CCM par la vanilline sulfurique et une coloration rose cerise au réactif de Liebermann-Burchard suggérant un composé de type triterpénique.
- Le spectre IR (Spectre N°115) montre des bandes d'absorption à 3387 cm^{-1} (OH).

III.6.14.2. Analyses spectroscopiques

La mesure du spectre de masse en ionisation par impact électronique (HR-SMIE) (Spectre N°113-114) montre un ion à $m/z= 426.3876$ qui correspond à l'ion moléculaire $[M]^+$. Ce qui est compatible avec la formule brute $C_{30}H_{50}O$ qui est en accord avec les données de la RMN ^{13}C (Spectre N°119-120) confirmant la présence de 30 carbones. Le spectre du composé présente également des ions résultants de la fragmentation de la molécule, notamment l'ion à $m/z= 207$ ($C_{14}H_{23}O$), qui est caractéristique des cycles A et B d'un triterpène ; la perte par cet ion d'une molécule d'eau indique que les cycles A et B portent un groupement hydroxyle, très probablement en position 3 pour des raisons biosynthétique. Le réarrangement interne avec clivage du cycle C de l'ion moléculaire aboutit à un cation radicalaire majoritaire à $m/z= 218$ ($C_{15}H_{22}O$) typique des triterpènes pentacycliques.

La formule moléculaire permet de déterminer un indice d'insaturation de 6.

Les spectres RMN ^{13}C en modulation DEPT (Spectre N°119-120) montrent clairement 2 carbones d'hybridation sp^2 ($\delta_C= 154.6$ ppm et $\delta_C= 107.1$ ppm) formant une double liaison, il reste cinq insaturations qui seront dues évidemment à 5 cycles.

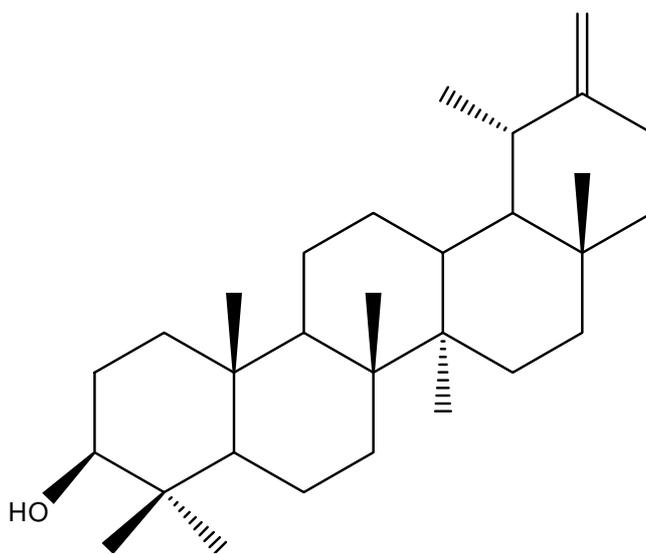
La majorité des signaux du spectre RMN du 1H enregistré dans le $CDCl_3$ du composé SCD86 (Spectre N°116-118) est observée dans des champs forts indiquant la présence de protons aliphatiques. Parmi ceux-ci, le spectre présente un profil triterpénique avec la présence de sept signaux singulets fins attribuables aux groupements méthyles résonnant à : $\delta_H= 0.76$ ppm (3H, *s*, H-23, H-24), $\delta_H= 0.85$ ppm (3H, *s*, H-28), $\delta_H= 0.93$ ppm (3H, *s*, H-27), $\delta_H= 0.97$ ppm (3H, *s*, H-25), $\delta_H= 1.01$ ppm (3H, *s*, H-26), $\delta_H= 1.25$ ppm (3H, *d*, H-29) et un massif de protons résonant entre $\delta_H= 0.76$ ppm à $\delta_H= 2.44$ ppm correspondant aux -CH et -CH₂ des cinq cycles. Il montre aussi à champ faible, deux signaux résonant à : $\delta_H= 3.21$ ppm et $\delta_H= 4.60$ ppm, correspondants respectivement à un proton oxyméthine (proton d'hydroxyle) (H-3) à et des signaux de deux protons éthyléniques.

La RMN ^{13}C montre outre les signaux des carbones méthyliques cités ci dessus :

- un signal à $\delta_C= 79.02$ ppm correspondant à un carbone porteur d'une fonction alcool (C-3).

Le spectre RMN ^{13}C en modulation DEPT (Spectre N°119-120) du composé SCD86 montre dans la région blindée, 7 signaux entre $\delta_{\text{H}}= 14.7$ ppm et $\delta_{\text{H}}=27.9$ ppm correspondant aux sept méthyles d'un squelette triterpénique pentacyclique et dans la région déblindée, deux signaux résonnant à $\delta_{\text{C}}= 107.1$ ppm et $\delta_{\text{C}}= 154.6$ ppm attribuables respectivement à deux carbones oléfiniques.

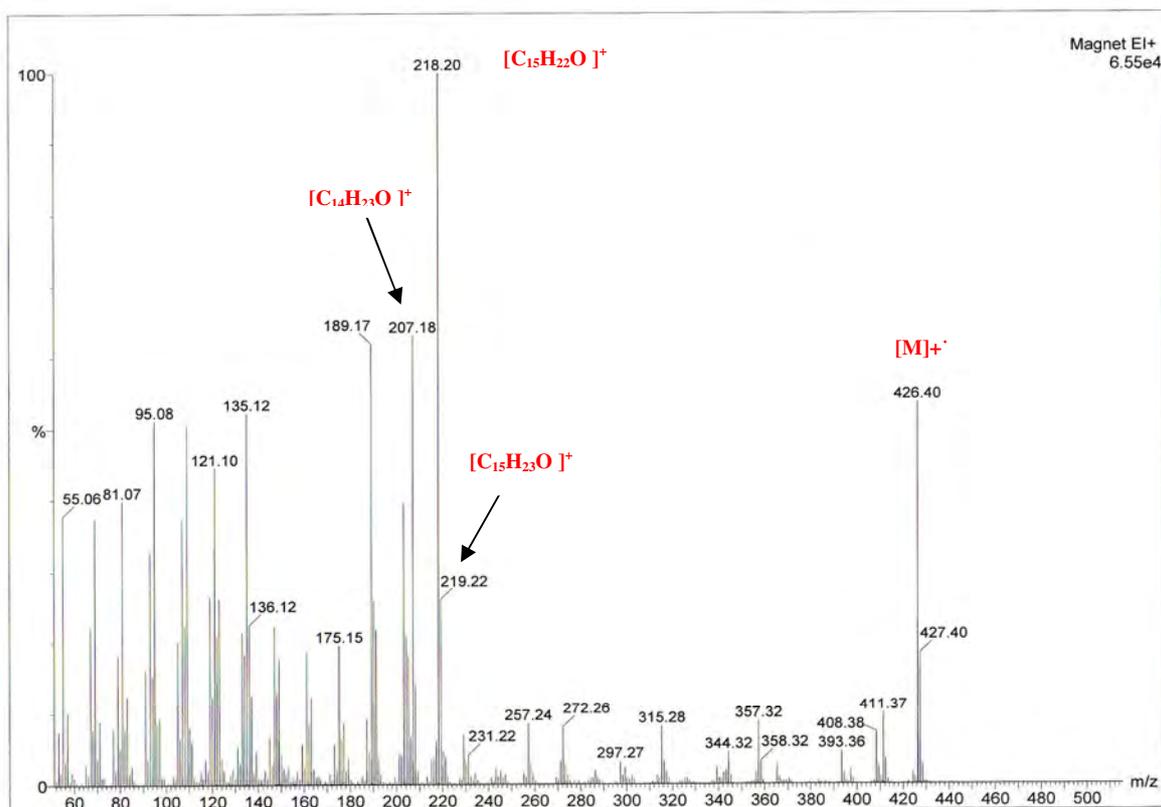
Toutes ces informations provenant des différentes méthodes spectroscopiques. Confrontées aux données de la littérature nous permettent de proposer la structure d'un composé triterpénique pentacyclique suivant : le taraxastérol ou (3 β ,18 α ,19 α)-Urs-20(30)-en-3-ol ou taraxast-20(30)-en-3 β -ol. Ce composé est connu, il a été isolé pour la première fois de *Taraxacum officinale* (Asteraceae) (Power et Browning, 1912). Ce composé est isolé pour la première fois du genre *Stachys*. Les déplacements chimiques observés en RMN du ^1H et du ^{13}C avec ceux de la littérature (Reynolds *et al.*, 1985 ; Petrovic *et al.*, 1999) sont présentés dans le tableau III.19.



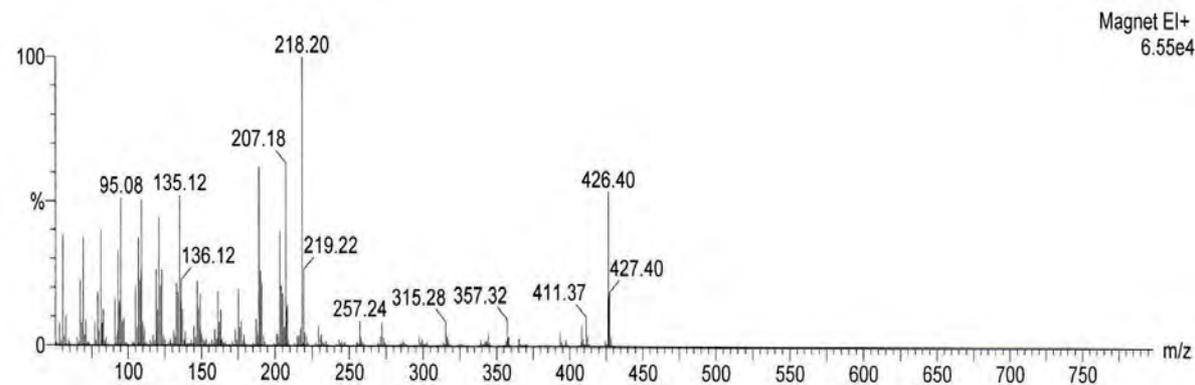
Taraxastérol

Tableau III.19. RMN du ^1H et du ^{13}C du composé SCD86 (500 MHz, δ , J , en Hz ; 125 MHz, δ) dans le CDCl_3 et du Taraxastérol dans le CDCl_3 (600 MHz, δ , J en Hz ; 150 MHz, δ).

Position	Composé SCD86-94		Taraxastérol	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
(δ ppm)				
1	-	38.7	-	38.7
2	-	27.4	-	27.3
3 α	3.20 <i>dd</i> ($J= 4.8$ Hz, $J= 11.3$ Hz, 1H)	79.0	3.19 <i>dd</i> ($J= 4.0$ Hz, $J= 11.3$ Hz)	79.0
4	-	38.8	-	38.8
5	-	55.4	-	55.4
6	-	18.2	-	18.2
7	-	34.0	-	34.0
8	-	40.9	-	40.8
9	-	50.5	-	50.5
10	-	37.1	-	37.1
11	-	21.4	-	21.4
12	-	26.1	-	26.1
13	-	39.2	-	39.2
14	-	42.0	-	42.0
15	-	26.6	-	26.6
16	-	38.3	-	38.3
17	-	34.5	-	34.5
18	-	48.7	-	48.7
19	2.09 <i>dd</i> ($J= 6.85$ Hz, $J= 6.85$ Hz)	39.4	2.10 <i>dd</i> ($J= 7.0$ Hz, $J= 7.1$ Hz)	39.4
20	-	154.6	-	154.5
21	-	25.6	-	25.6
22	-	38.9	-	38.9
23	0.76 <i>s</i> (3H)	27.9	0.96 <i>s</i> (3H)	28.0
24	0.76 <i>s</i> (3H)	15.3	0.76 <i>s</i> (3H)	15.3
25	0.97 <i>s</i> (3H)	16.2	0.84 <i>s</i> (3H)	16.7
26	1.01 <i>s</i> (3H)	15.8	1.01 <i>s</i> (3H)	15.8
27	0.93 <i>s</i> (3H)	14.7	0.94 <i>s</i> (3H)	14.7
28	0.85 <i>s</i> (3H)	19.4	0.76 <i>s</i> (3H)	19.4
29	1.25 <i>d</i> (3H)	25.5	1.20 <i>d</i> (3H)	25.5
30	4.60 <i>d</i> ($J= 2.3$ Hz, 2H)	107.1	4.61 <i>d</i>	107.1



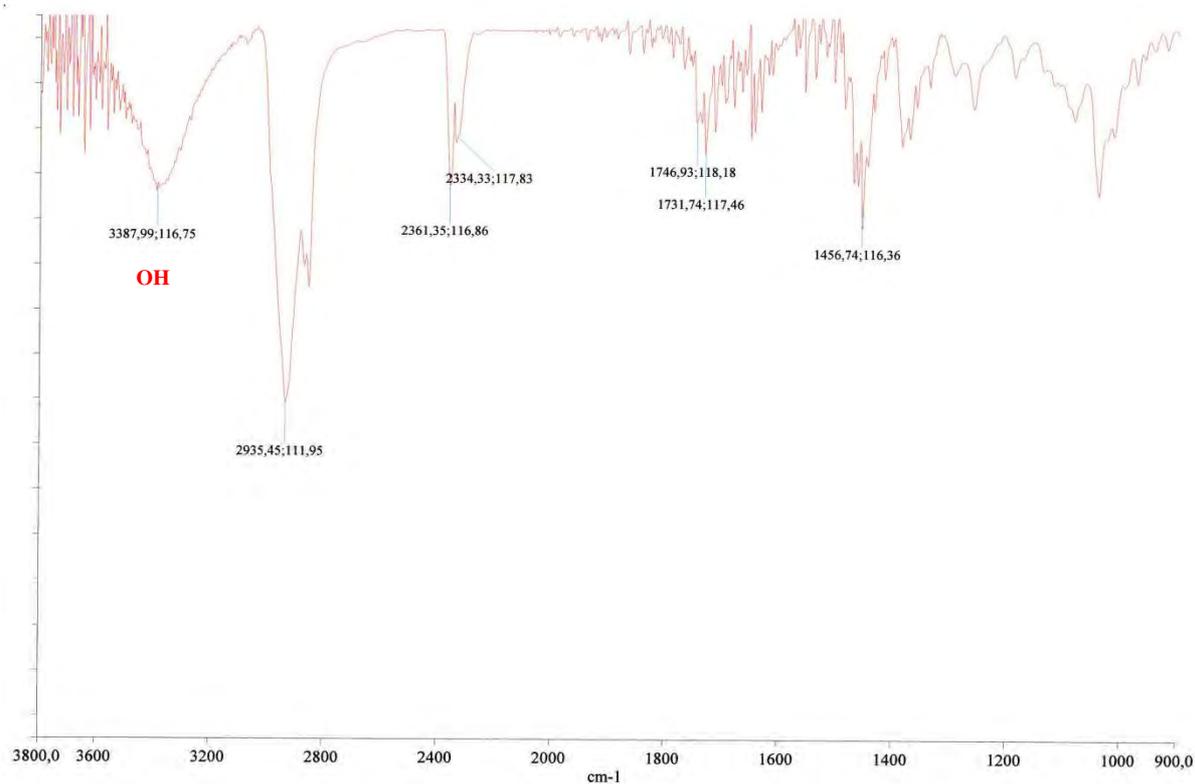
Spectre N°113. Spectre de masse en mode impact électronique du composé SCD86.



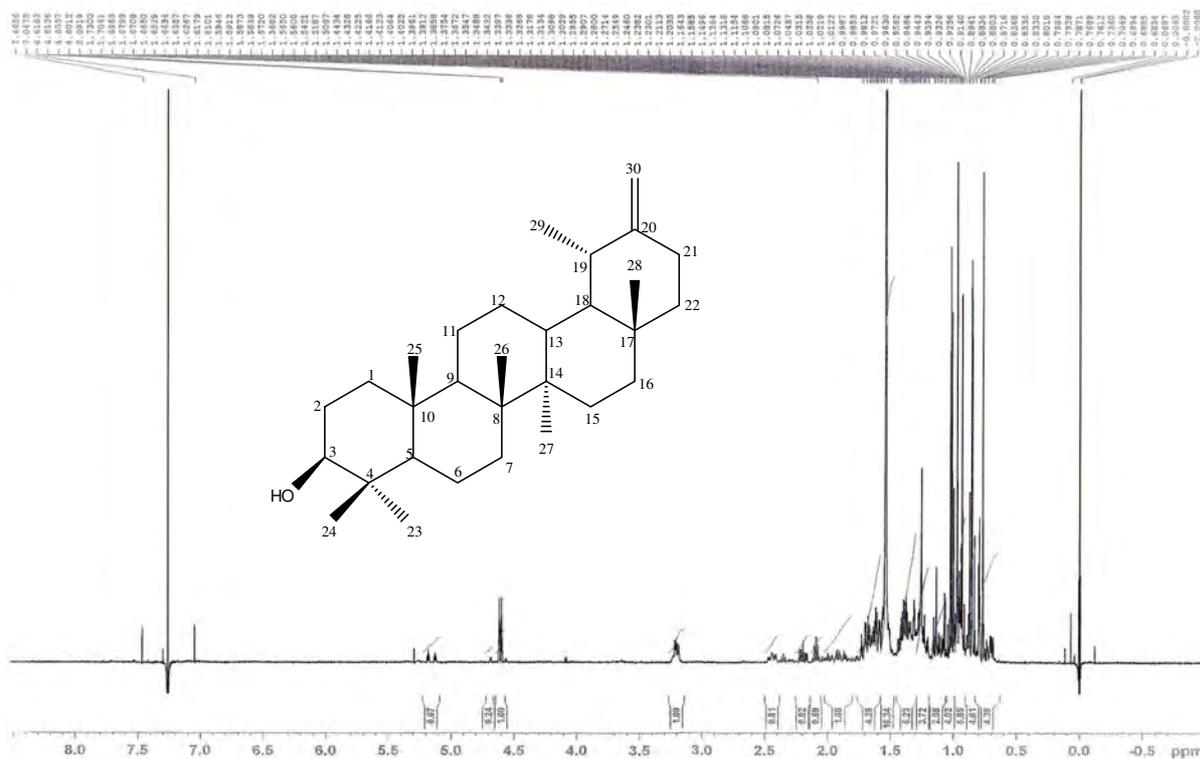
Mass	RA	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula
426.3876	50.58	426.3862	1.4	3.4	6.0	C30 H50 O

Minimum: 8.00
Maximum: 100.00

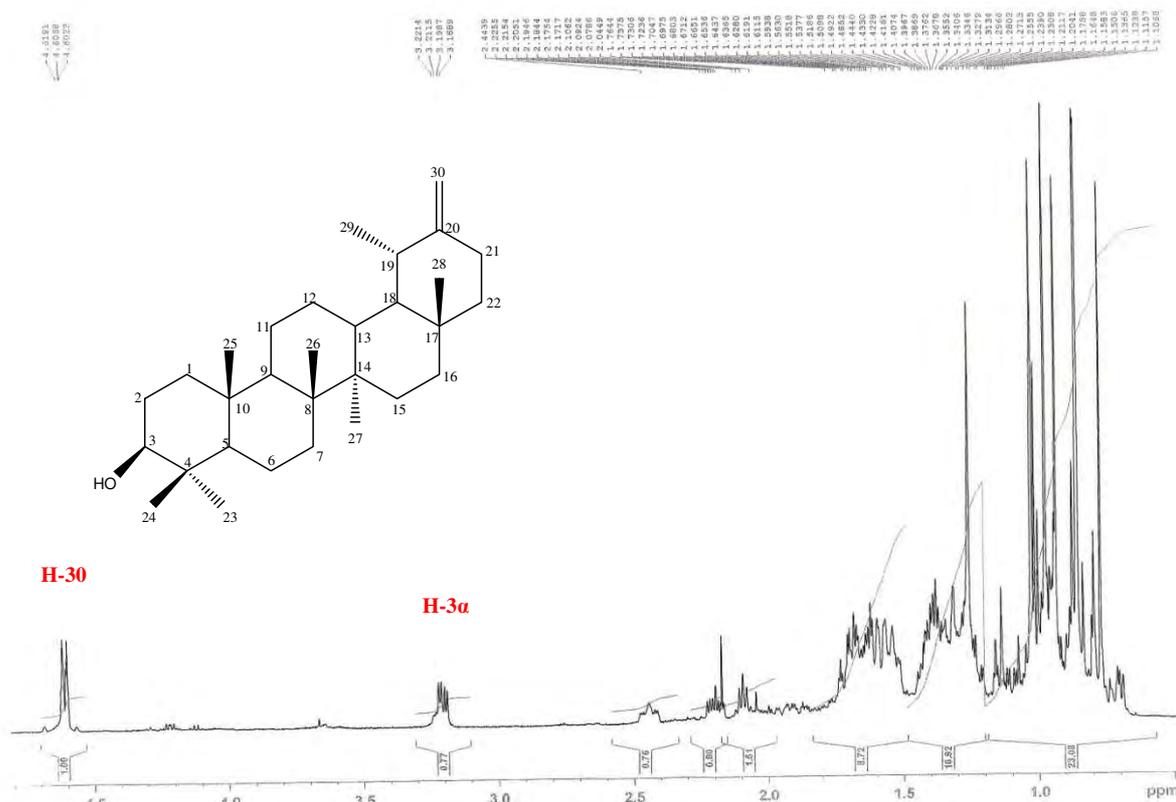
Spectre N°114. Spectre de masse HR-SMIE étalé du composé SCD86.



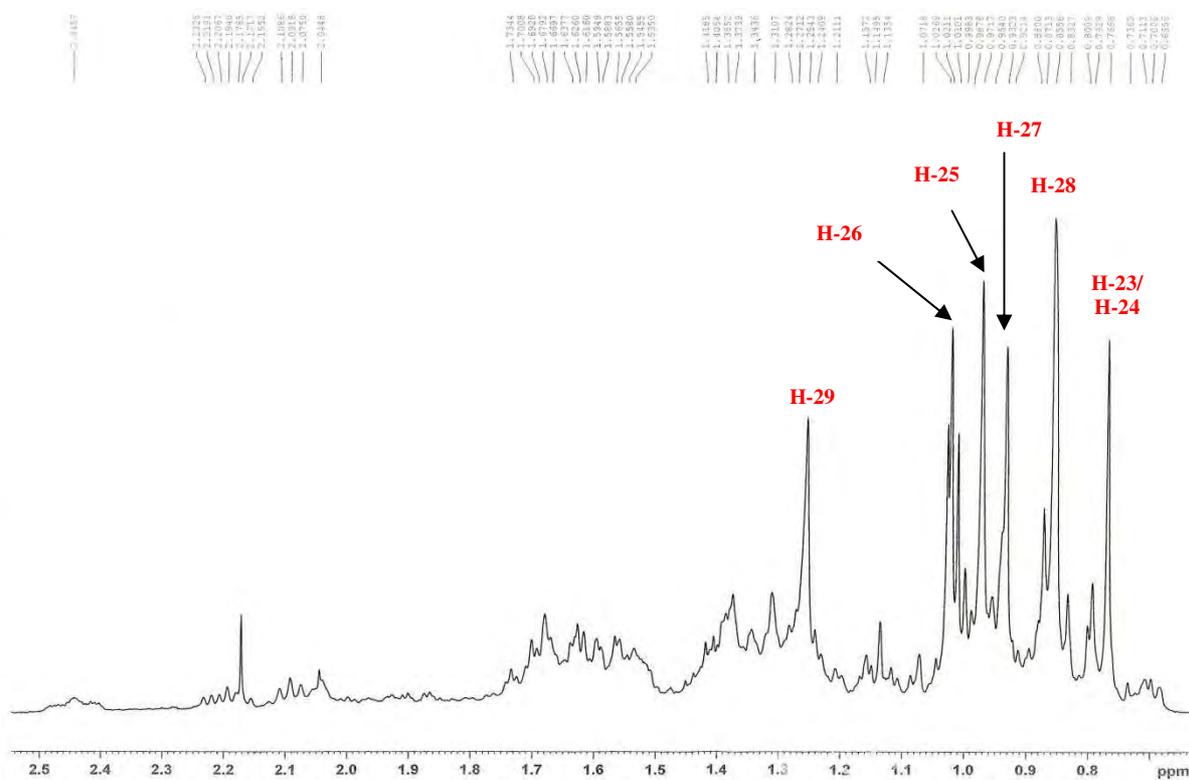
Spectre N°115. Spectre IR du composé SCD86.



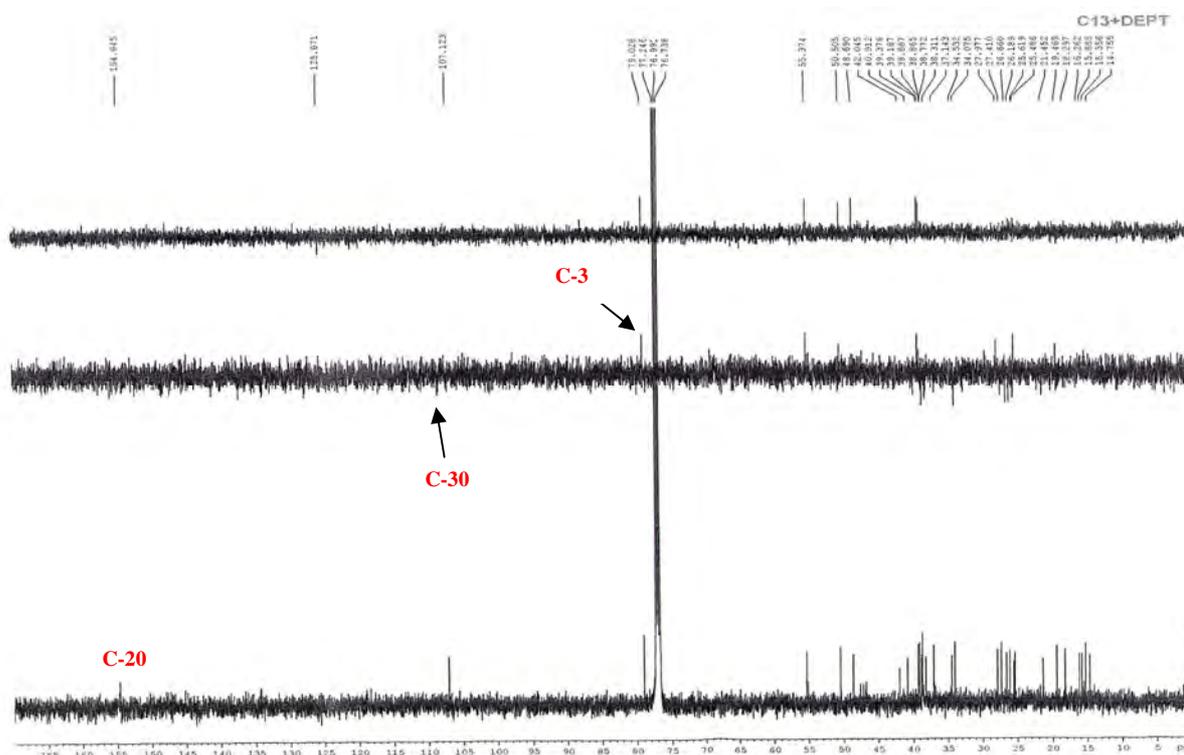
Spectre N°116. Spectre RMN ¹H du composé SCD86 (500 MHz).



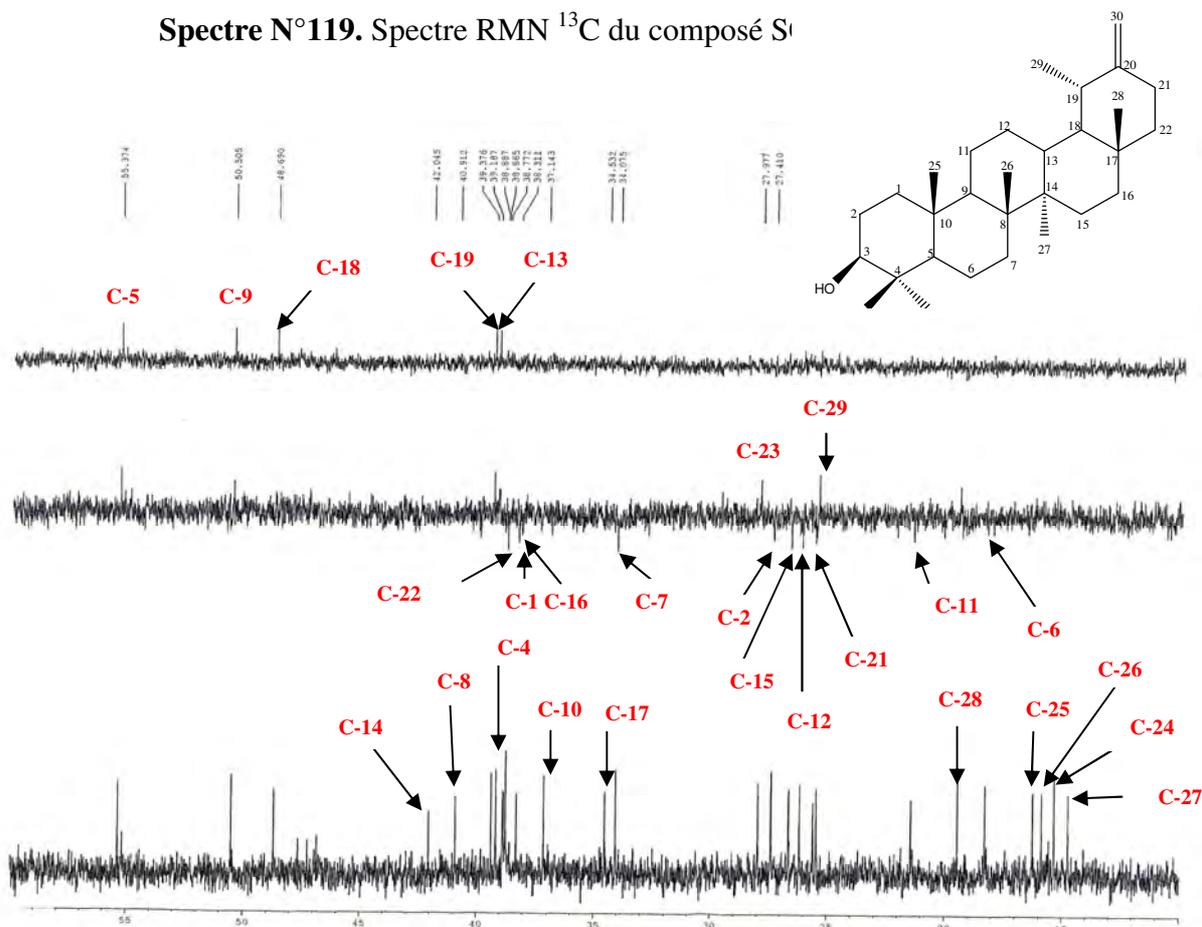
Spectre N°117. Spectre RMN ^1H étalé (0.5 à 4.5 ppm) du composé SCD86 (500 MHz).



Spectre N°118. Spectre RMN ^1H étalé (0.7 à 2.5 ppm) du composé SCD86 (500 MHz).



Spectre N°119. Spectre RMN ¹³C du composé S1



Spectre N°120. Spectre RMN ¹³C étalé (10 à 60 ppm) du composé SCD86 (125 MHz).

Références bibliographiques

- Agrawal, P.K. 1989. Carbon-13 NMR of flavonoids. Central Institute of Medical and Aromatic Plants, India. Edition Elsevier, New York.
- Andary, C., Wylde, R., Laffite, C., Privat, G., Winternitz, F. 1982. Structures of verbascoside and orobanchoside, caffeic acid sugar esters from *Orobanche rapum-genistae*. *Phytochemistry*, 21(5), 1123-1127.
- Beck, M.A., Haberlein, H. 1999. Flavonol glycosides from *Eschscholtzia californica*. *Phytochemistry*, 50, 329-332.
- Bilham, P., Kon, G.A.R., Ross, W.C.J. 1942. Sapogenins XII. The position of the carboxyl groupe in certain triterpene acids. *J. Chem. Soc.*, 35-42.
- Boiteau, P., Pasich, B., Ratsimamanga, A.R. 1964. Les triterpènes en physiologie végétale et animale. Ed. Gautier-Villars. Paris.
- Cheng, J.C., Ching, B.W., Lung, C.L. 1976. Chrysoeriol 7-O- rhamnoside from *Sedum formosanum*. *Phytochemistry*, 15, 1420.
- David, J.M., Sauza, J.C., Silva Guedes, M.L., David, J.P. 2006. Estudo fitoquímico de *Davilla rugosa* : flavonoides e terpenoides. *Rev. Bras. Farmacog.*, 16(1), 105-108.
- El-Ansari, M.A., Barron, D., Abdalla, M.F., Saleh, N.A.M., Le Quere, J.L. 1991. Flavonoid constituents of *Stachys aegyptiaca* L. *Phytochemistry*, 30(4), 1169-1173.
- Friedrich, H. 1962. Studies on the isorhamnetin glycosides from the leaves of *Calendula officinalis* L. *Arch. Pharm., Berl.*, 295(67), 464-471.
- Gutzeit, D., Wray, V., Winterhalter, P., Jerz, G. 2007. Preparative isolation and purification of flavonoids and protocatechuic acid from sea buckthorn juice concentrate (*Hippophae rhamnoides* L. ssp. *rhamnoides*) by high-speed counter-current chromatography. *Chromatographia*, 65(1-2), 01-07.
- Haag-berrurier, M., Duquenois, P. 1962. Extraction and physicochemical characterization of the luteolin in the flowers of the hawkweed *Hieracium pilosella* L.C.R. *Hebd. Seances Acad. Sci.*, 7(254), 3419-21.
- Harborne, J.B. 1994. The flavonoids Advances in research since 1986. Editions Chapman & Hall. Cambridge
- Kirmizibekmez, H., Piacente, S., Pizza, C., Doenmez, A.A., Calis, I. 2004. Iridoid and phenylethanoid glycosides from *Phlomis nissolii* and *P. capitata*. *Chem. Sci.*, 59(5), 609-613.
- Kotake, M., Arakawa, H. 1956. Narcissin (Isorhamnetin-3-rutinosid) aus den Pollen von *Lilium auratum* Lindle. *Die Naturwissenschaften.*, 43(14), 327-328.

- Kubota, T., Hase, T. 1956. J. Chem. Soc. Japan, 77, 1059.
- Lenherr, A., Lahloub, M.F., Sticher, O. 1984. Three flavonoid glucosides containing acetylated allose from *Stachys recta*. Phytochemistry, 23(10), 2343–2345.
- Lee, E.H., Kim, H.J., Song, Y.S., Jin, C., Lee, K.T., Cho, J., Lee, Y.S. 2003. Constituents of the stems and fruits of *Opuntia ficus-indica* var. saboten. Arch. Pharm. Res., 26(12), 1018-1023.
- Mahato, S.B., Kundu, A.P. 1994. ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids – A compilation and some salient features. Phytochemistry, 37, 1517-1575.
- Markham, K.R., Marbry, T.J., Marbry, H. 1975. In *The flavonoids*. (Harborne, J.B., Marbry, T.J. and Marbry, H). Chapman and Hall. London .
- Nakaoki, T. 1935. Glucoside of the flavone of the white flower. IV. Constituents of *Cosmos bipinnatus*, Cav. Yakugaku Zasshi, 55, 967-978.
- Olszewska, M. 2005. Flavonoids from *Prunus serotina* ehrh. Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Res., 62(2), 127-133.
- Oyama, K., Kondo, T. 2004. Total synthesis of 7, 4'-di-*O*-β-D-glucopyranoside, a component of blue flower pigment of *Salvia patens*, and seven chiral analogues. Tetrahedron, 60, 2025-2034.
- Owen, R.W., Haubner, R., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W.E., Spiegelhalder, B., Bartsch, H. 2003. Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. Food and Chem. Toxicol., 41, 703-717.
- Petrovic, S.D., Gorunovic, M.S., Wray, V., Merfort, I. 1999. A taraxasterol derivative and phenolic compounds from *Hieracium gymnocephalum*. Phytochemistry, 50(2), 293-296.
- Pfeffer, P.E., Valentine, K.M., Parrish, F.W. 1979. Deuterium-induced differential isotope shift carbon-13 NMR. 1. Resonance assignments of mono- and disaccharides. J. Amer. Chem. Soc., 101(5), 1265-1274.
- Pinto, D.S., Tomaz, A.C.A., Tavares, J.F., Tenório-Souza, F.H., Silva Dias, C.S., Braz-Filho, R., Cunha, E.V.L. 2008. Secondary metabolites isolated from *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae). Rev. Bras. Farmacog., 18(3), 367-371.
- Power, F.B., Browning, H. J. 1912. J. Chem. Soc., 101, 2411.
- Quezel, P., Santa, S. 1963. La nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II, Ed. CNRS, Paris, p. 360-361.
- Rahman, W., Ilyas, M. 1962. Flower Pigments. Flavonoids from *Argemone mexicana* linn. (Papaveraceae). J. Org. Chem., 27(1), 153–155.

Reynolds., W.F., Sawyer, J.F., Enriquelz, R.G., Escobar, L.I., Chaveez, M.A., Shoolery, J.N. 1985. Total assignment of the ^{13}C spectrum of taraxasteryl acetate by ^{13}C - ^{13}C connectivity experiments and determination of the stereochemistry of taraxasterol by X-ray diffraction. *Can. J. Chem.*, 63, 1048-1054.

Sarkhail, P., Monsef-Esfehani, H.R., Amin, G., Surmaghi, M.H.S., Shafiee, A.. 2006. Phytochemical study of *Phlomis olivieri* Benth. and *Phlomis persica* Boiss. *Daru.*, 14(3), 115-121.

Scarpati, M., Oriente, G. 1958. Isolation and constitution of rosmarinic acid from *Rosmarinus officinalis*. *Ric. Sci.*, 28, 2329-2333.

Scarpati, M.L., Delle Monache, F. 1963. Isolation from *Verbascum sinatum* of two new glucosides, verbascoside and isoverbascoside. *Annal. Chim.*, 53, 356-367.

Sevin, A. 1943. Comparative activity of different polyhydroxy derivatives of flavones on the capillary resistance of the normal and scorbutic guinea pig. *Comp. Rend.*, 216, 505-507.

Seebacher, W., Simic, N., Weis, R., Saf, R., Kunert, O. 2003. Spectral assignments and reference data. *Magn. Reson. Chem.*, 41, 636-638.

Simonsen, J., Ross, W.C.J. 1957. *The Terpenes*. V, Cambridge Univ. Press, London.

Son, K.H., Kwon, S.Y., Kim, H.P., Chang, W.H., Kang, S.S. 1998. Constituents from *Syzygium aromaticum* Merr. & Perry. *Nat. Prod. Scic.*, 4(4), 263-267.

Trumbull, E.R., Bianchi, E., Eckert, D.J., Wiedhopf, R.M., Cole, J.R. 1976. Tumor inhibitory agents from *Vauquelinia corymbosa* (Rosaceae). *J. Pharm. Sci.*, 65, 1407.

Urban, M., Sarek, J., Klinot, J., Korinkova, G., Hajduch, M. 2004. Synthesis of A seco derivatives of betulinic acid with cytotoxic activity. *J. Nat. Prod.*, 67, 1100-1105.

Wang, Z.J., Zhao, Y.Y., Wang, B., Min AI, T., CHEN, Y.Y. 2000. Depsides from *Prunella vulgaris*. *Chin. Chem. Lett.*, 11(11), 997-1000.

Woo, E.R., Piao, M.S. 2004. Antioxidative constituents from *Lycopus lucidus*. *Arch. Pharm. Res.*, 27(2), 173-176.

Yun, Y., Han, H., Park, E., Yim, D., Lee, S., Lee, C.K., Cho, K., Kim, K. 2003. Immunodulatory activity of betulinic acid by producing pro-Inflammatory cytokines and activation of macrophages. *Arch. Pharm. Res.*, 26(12), 1087-1095.

CHAPITRE IV

ANALYSE GC/MS DE L'HUILE ESSENTIELLE DE *STACHYS* *CIRCINNATA* L'HER.

IV.I. Introduction

Le terme " Aromathérapie " a été proposé en 1928 par un pharmacien français, René-Maurice Gattefossé. Il désigne l'utilisation des aromates c'est-à-dire des plantes aromatiques dont on extrait les huiles essentielles.

L'huile essentielle est une substance odorante volatile produite par certaines plantes et pouvant être extraite sous forme de liquide. Bien qu'on les appelle huiles, ces substances ne contiennent aucun corps gras : une goutte déposée sur un papier s'évaporerait sans laisser de trace contrairement à une huile végétale.

Le règne végétal compte plusieurs centaines de milliers d'espèces dont 4000 d'entre elles fabriquent des essences aromatiques; toutefois, seulement quelques centaines le font en quantité suffisante pour qu'on puisse les extraire. Aujourd'hui, l'extraction se fait surtout selon trois procédés.

Pression à froid, pour les zestes d'agrumes comme l'orange ou le citron.

Extraction supercritique, le dioxyde de carbone, surtout pour les fleurs fragiles.

Distillation à la vapeur, et le plus utilisé aujourd'hui.

Depuis des milliers d'années, les huiles essentielles sont utilisées couramment en cuisine, en médecine, en parfumerie et dans l'industrie cosmétique. Mais, c'est à la fin du XIX^e siècle, en France, que commence l'histoire moderne de l'aromathérapie, au moment où l'on prouvait scientifiquement la capacité des huiles essentielles à neutraliser les bactéries (vers la même époque, on découvrait les antibiotiques, ce qui a eu pour effet d'écartier l'aromathérapie du champ de la médecine). On doit à René-Maurice Gattefossé, en 1928, la première utilisation du terme aromathérapie. On voit aussi, mais rarement, parfumothérapie.

IV.1. Applications thérapeutiques de l'aromathérapie

Les Français, chefs de file de l'aromathérapie scientifique contemporaine, ont identifié plus de 80 propriétés s'appliquant à la quarantaine d'huiles essentielles courantes d'antalgique à vermifuge en passant par hypotenseur et stimulant gastrique (Valnet, 2001). Il n'y a toutefois que peu ou pas de confirmations de ces effets par la voie de véritables recherches cliniques. En effet, la plupart des études ont plutôt été faites en laboratoire ou sur des animaux.

Pour l'instant, les résultats d'études cliniques soulignent surtout les effets relaxants de l'aromathérapie, qui permettent, par exemple, de réduire l'anxiété ou l'agitation. La difficulté d'établir des études à l'aveugle, puisque la présence d'huile essentielle se détecte par l'odeur (Lehrner et Marwinski, 2005), crée un problème méthodologique important.

Diminuer l'anxiété

En 2000, une revue systématique, incluant 6 études cliniques aléatoires, concluait que l'aromathérapie semblait avoir un effet bénéfique sur la réduction à court terme de l'anxiété (Lehrner et Marwinski, 2005). Depuis, d'autres études cliniques aléatoires ont évalué l'efficacité de l'aromathérapie pour diminuer l'anxiété et améliorer l'humeur de personnes hospitalisées ou devant subir un stress important (Lehrner et Marwinski, 2005; Dunn *et al.*, 1995 ; Wiebe, 2000; McCaffrey *et al.*, 2009; Kim et Wajda, 2006; Muzzarelli *et al.*, 2006).

Réduire l'anxiété et la dépression des personnes atteintes de cancer

En 2007, une étude a été menée auprès de 285 patients atteints de cancer (Wilkinson et Love, 2007). L'efficacité d'une combinaison aromathérapie/massage/soins usuels (soutien psychologique) a été évaluée. Durant 4 semaines, un groupe recevait ces 3 thérapies, tandis qu'un autre recevait seulement le soutien psychologique. Les résultats révèlent que les thérapies combinées n'apportaient pas davantage de bénéfices à long terme (après 10 semaines) que le soutien psychologique seul. Par contre, les bénéfices de l'aromathérapie/massage/soutien psychologique survenaient plus rapidement que ceux des soins usuels seuls, soit dès la 2^{ème} semaine.

Réduire les symptômes de la démence

En 2008, une revue systématique de 11 études cliniques a évalué l'aromathérapie pour le traitement des symptômes psychologiques et comportementaux des patients atteints de démence.

Toutefois, un essai clinique aléatoire plus récent (Fujii et Hatakeyama, 2008) a comparé, chez 28 patients atteints de démence modérée à grave, l'efficacité de l'huile essentielle de lavande durant 4 semaines. Les patients ont été placés au hasard dans un groupe expérimental recevant 3 fois par jour 2 gouttes d'huile sur les vêtements ou dans un groupe témoin sans traitement actif. Les résultats révèlent un effet positif en faveur de l'aromathérapie en ce qui concerne l'agitation et les symptômes neuropsychiatriques.

Réduire la pelade (perte de cheveux par plaques)

Dans une étude clinique aléatoire à double insu (Hay *et al.*, 1998), 86 patients ont été divisés en 2 groupes : massage avec aromathérapie (huiles essentielles de thym, lavande, romarin et cèdre), et massage à l'huile végétale (jojoba et pépins de raisin). Tous les participants devaient se masser le cuir chevelu quotidiennement pendant 7 mois. Quoique variable, le traitement actif s'est avéré supérieur au placebo. Une amélioration notable a été observée chez 44% des patients du groupe aromathérapie comparativement à 6% pour le groupe témoin.

Diminuer les démangeaisons causées par l'hémodialyse (prurit)

Une petite étude pilote aléatoire (Ro et Ha, 2002), a comparé pendant 4 semaines l'efficacité d'un massage avec aromathérapie (huiles de lavande et de melaleuca) à un massage à l'huile d'amande douce et de jojoba. Les démangeaisons ont diminué significativement plus pour le groupe aromathérapie comparativement au groupe huile végétale.

Améliorer les conditions de vie des enfants prématurés

Une étude a évalué l'effet de la stimulation olfactive sur la fréquence et la gravité de l'apnée du sommeil chez les enfants prématurés (Marlier *et al.*, 2005). Quatorze bébés nés prématurément ont été exposés à une odeur agréable (vanilline) durant 24 heures dans leur incubateur. L'efficacité du traitement a été évaluée en comparant la fréquence et la gravité des crises d'apnée avant et après l'intervention. Une réduction de 36% des apnées fut mesurée chez plus de 85% des bébés. Les auteurs concluent que l'exposition à une odeur agréable pourrait être une approche à considérer pour le traitement des apnées des prématurés ne répondant pas bien aux traitements classiques.

Par ailleurs, un essai clinique aléatoire a évalué l'effet de l'inhalation d'une odeur familière sur la détresse comportementale au moment d'une prise de sang (Goubet et Rattaz, 2003). Parmi 51 bébés prématurés devant subir une prise de sang sur la main (peu douloureuse) ou sur le talon (plus douloureuse), certains ont été préalablement familiarisés avec une odeur de vanille qui leur a ensuite été présentée au moment de la prise de sang; d'autres n'ont été exposés à cette odeur qu'au moment de l'intervention; et d'autres, enfin, n'ont reçu ni familiarisation ni odeur. Les résultats indiquent que la détresse des bébés (pleurs et grimaces) pouvait être réduite par une odeur agréable avec laquelle les bébés étaient déjà familiers. Mais cet effet ne s'est manifesté que dans le cas d'une intervention engendrant une douleur légère.

Traiter l'insomnie légère

Une petite étude préliminaire réalisée en 2005 démontre que l'huile essentielle de lavande, appliquée par massage, pourrait être un traitement efficace contre l'insomnie légère (Lewith *et al.*, 2005). Pendant 4 semaines, 10 patients souffrant de troubles du sommeil se sont massés avant le coucher, en alternant d'une semaine à l'autre soit avec un traitement actif (huile d'amande douce et lavande), soit avec un placebo (huile d'amande douce). Les résultats révèlent une tendance vers une meilleure qualité de sommeil chez les patients s'étant massés à l'huile de lavande.

Une autre étude souligne l'effet sédatif de l'huile essentielle de lavande (Goel *et al.*, 2005). 31 participants ont dormi pendant 3 nuits dans un laboratoire expérimental. La première nuit consistait en une période d'adaptation. Au cours de la seconde, on a diffusé de l'huile essentielle de lavande pendant le sommeil des participants. La 3^{ème} nuit, ils ont reçu une stimulation placebo (eau distillée). Une mesure des ondes cérébrales a permis de constater que la stimulation à la lavande augmentait les périodes de sommeil profond et diminuait les mouvements rapides des yeux durant le sommeil.

Réduire les symptômes de la ménopause

Quinze femmes ont participé à une étude pilote non aléatoire sur l'effet thérapeutique de l'aromathérapie contre les symptômes de ménopause (Murakami et Shirota, 2005). Elles ont reçu une première séance d'aromathérapie en massage (huile essentielle de lavande diluée à 1% dans l'huile de noix de macadamia), puis ont été invitées à pratiquer l'automassage pendant 1 mois, de 3 à 4 fois par semaine. La comparaison des résultats avant et après le traitement indique une réduction de la gravité des symptômes chez toutes les patientes. Toutefois, étant donné l'absence de groupe témoin, et sachant que l'effet placebo peut expliquer au moins 30 % de l'effet observé, aucune conclusion formelle ne peut découler de cette petite étude.

IV.2. Travaux antérieurs sur les huiles essentielles du genre *Stachys*

Les huiles essentielles du genre *Stachys* ont fait l'objet d'un grand nombre d'études. Nous avons classé ces huiles en fonction de leurs origines. Nous avons distingué 3 groupes principaux (Tableaux IV.1-6). Le premier groupe comprend les huiles de Croatie, le deuxième groupe est représenté par les huiles de Grèce, le troisième groupe est représenté par les huiles de Turquie, le quatrième groupe concerne les huiles d'Iran. Le cinquième groupe est représenté par les huiles essentielles de France, Serbie et Italie. Seuls les composés majoritaires (ayant une teneur supérieure à 5%) sont mentionnés dans ces tableaux.

D'après le tableau IV.1, on remarque que les huiles sont constituées par des mélanges de produits. Alors que, les terpènes et les sesquiterpènes hydrocarbonés sont les constituants majoritaires de toutes les huiles à l'exception de *S. alpina* qui est riche en sesquiterpènes oxygénés. *S. alpina* et *S. palustris* sont composées en fraction d'aldéhyde et alcools. *S. recta* subsp. *recta* aussi est riche en aldéhyde et cétones (Vundac *et al.*, 2006).

Le germacrène-D et le (*E*)-Caryophyllène se trouvent en pourcentage le plus élevé dans toutes les huiles et surtout dans *S. officinalis* (L.) Trevis (20.1% et 14.6% respectivement) (Tableau IV.1), et l'absence totale de ces deux produits dans les huiles de Serbie (Chalchat *et al.*, 2000), (Tableau IV.5).

Dans *S. sylvatica* L. d'Italie (Tableau IV.5), le germacrène-D est présent en grande proportion (55.2%) (Tirillini *et al.*, 2004), alors que *S. sylvatica* L. de Croatie est riche en monoterpènes hydrocarbonés où le α -Pinène (21.4%), β -Pinène (12.3%) sont les plus abondantes, en plus du germacrène-D (13.6%) (Tableau IV.1) (Vundac *et al.*, 2006).

Le 1-Octen-3-ol et le (*E*)-Nérolidol sont les constituants majoritaires de l'huile essentielle de *S. palustris* L. (24 %), et *S. alpina* L. (22.1 %), respectivement (Tableau IV.1).

La composition de l'huile essentielle de *S. recta* L. de Serbie (Chalchat *et al.*, 2000) est très proche de celle de l'huile essentielle de Turquie (Cakir *et al.*, 1997), avec dominance de 1-octen-3-ol (19.7%, 33.0% respectivement) (Tableau IV.3 ; IV.5). Le linalool est présent dans l'huile essentielle de Grèce en grand pourcentage (33.9%) (Skaltsa *et al.*, 2003) alors que dans les huiles essentielles de Turquie et de Serbie, il est présent en faible pourcentage.

Le (+)-(*E*)-Caryophyllène et le δ -Cadinène représentent les constituants majoritaires de toutes les huiles.

D'après le tableau IV.2, on remarque que les compositions des huiles essentielles de Grèce sont similairement à celles des huiles de Croatie par la prédominance des terpènes et sesquiterpènes hydrocarbonés.

S. germanica ssp. *heldreichii* et *S. spinulosa* Sm. sont riches en aldéhydes alors que *S. spinulosa* Sm. et *S. euboica* Rech. sont majoritairement constituées d'acides gras et d'esters aliphatiques (Skaltsa *et al.*, 2003).

Comme dans les huiles de Croatie, le germacrène D et le (-)-(*E*)-Caryophyllène sont présents dans presque toutes les huiles, plus particulièrement le germacrène D, est majoritairement trouvé dans les huiles essentielles de *S. cretica* L. ssp. *cretica* (33.5%) et *S. germanica* L. ssp. *heldreichii* (Boiss.) Hayek (21.3%) qui est riche aussi en (-)-(*E*)-Caryophyllène (18.4%), aussi présent dans *S. obliqua* L. (25.4%) de Turquie (Harmandar *et al.*, 1997) (Tableau IV.3). Le (+)- α -Pinène est le constituant principal de l'huile essentielle de *S. scardica* (Griseb.) Hayek (19.7%) et *S. balansae* L. (16.0%) de Turquie (Cakir *et al.*, 1997).

Comme il a été mentionné précédemment, les sesquiterpènes constituent les composants majoritaires des huiles essentielles d'espèces *Stachy*.

L'espèce *S. spruneri* est caractérisée par la présence majoritaire de (+)-Limonène (17.3%) (+)-(*E*)-Caryophyllène (15.0%), α -Selinène (11.0%), et (+)- α -Pinène (8.0%) (Skaltsa *et al.*, 2001).

D'après le tableau IV.3, on remarque qu'il y a des marqueurs caractéristiques pour chaque huile essentielle d'espèce *Stachys* de Turquie. Le β -caryophyllène (24.3%), le β -pinène (24.1%) et l' α -pinène (16.0%) sont les composants majoritaires de *S. balansae* L. (Cakir *et al.*, 1997). Le linalyl acétate est le constituant majoritaire de l'huile essentielle de *S. iberica* subsp. *stenostachya* avec le pourcentage le plus élevé (42.2%), suivie du linalool (18.9%). Le 1-Octen-3-ol (33.0%) et le linalool (13.0%) sont les principaux composants de l'huile essentielle *S. recta* L. (Kaya *et al.*, 2002).

Le germacrène-D est majoritairement trouvé dans les huiles essentielles de *S. obliqua* L. (25.4%) (Harmandar *et al.*, 1997) et *S. aleurites* (9.6%) (Flamini *et al.*, 2005), alors que le sesquiterpène hydrocarboné β -caryophyllène est le composant principal des huiles essentielles de *S. aleurites* (33.7%) et *S. balansae* L. (24.3%). Le phytol (17.9%) et le nonacosane (17.9%) sont les composants les plus dominants des huiles essentielles de *S. laetivirens* Kotschy & Boiss. ex Rech. Fil (Duman *et al.*, 2005).

Similairement aux huiles essentielles d'espèces *Stachys* Turquie, les huiles essentielles d'espèces iraniennes (Tableau IV.4) sont caractérisées par les marqueurs spécifiques. Le germacrène-D, le β -caryophyllène et l' α -pinène sont présents en pourcentages les plus élevés dans presque toutes les huiles.

Le myrtenyl acétate est le composé majoritaire des huiles essentielles de *S. ixodes* Boiss. & Hausskn. ex Boiss (48.7%) (Sefidkon *et al.*, 2003) et *S. pilifera* Benth (47.4%) (Sefidkon et Shaabani, 2004).

En conclusion, on distingue quatre classes d'espèces *Stachys* selon les différents types de compositions de leurs huiles :

- Les espèces qui produisent principalement les sesquiterpènes hydrocarbonés sont : *S. officinalis* (Vundac *et al.*, 2006), *S. cretica* L. ssp. *cretica*, *S. menthifolia*, *S. germanica* L. ssp. *heldreichii*, *S. euboica*, *S. scardica* (Skaltsa *et al.*, 2003) ; *S. swainsonii* subsp. *melangavica*, *S. swainsonii* subsp. *argolica*, *S. swainsonii* subsp. *swainsonii*, *S. swainsonii* subsp. *scyronica* (Skaltsa *et al.*, 2001), mais l'espèce *S. lavandulifolia* et riche par les deux types (Feizbakhsh *et al.*, 2003).
- Les espèces qui produisent principalement les monoterpènes oxygénés comme: *S. iberica* subsp. *stenostachya* (Kaya *et al.*, 2002), *S. pilifera* Benth (Sefidkon et Shaabani, 2004).
- Les espèces qui sont riches en monoterpènes et sesquiterpènes hydrocarbonés et monoterpènes et sesquiterpènes oxygénés comme: *S. officinalis* (L.), *S. sylvatica* L. (Vundac *et al.*, 2006), *S. germanica*, *S. alopecuros*, *S. spinulosa* (Skaltsa *et al.*, 2003) *S. byzantina* (Khanavi *et al.*, 2003), *S. balansae* L. (Cakir *et al.*, 1997), *S. obliqua* L. (Harmandar *et al.*, 1997).
- Les espèces qui produisent des alcools non-terpéniques et les terpènes oxygénés comme : *S. recta* L. (Cakir *et al.*, 1997 ; Chalchat *et al.*, 2000).

Tableau IV.1. Composants majoritaires (% ≥ 5.0) d'huiles essentielles d'espèces *Stachys* de Croatie (Vundac *et al.*, 2006).

Composé (%)	<i>S. alpina</i> L.	<i>S. officinalis</i> (L.) Trevis.	<i>S. palustris</i> L.	<i>S. recta</i> L. subsp. <i>recta</i>	<i>S. recta</i> L. subsp. <i>subcrenata</i> (Vis.) Briq.	<i>S. salviifolia</i> Ten.	<i>S. sylvatica</i> L.
(<i>E</i>)-2-Hexenal	-	-	16.3	-	-	-	-
α-Pinène	-	-	-	-	-	-	21.4
β-Pinène		-	-	-	-	-	12.3
1-Octèn-3-ol	8.7	-	24.5	-	-	-	-
Nonanal	9.8	-	-	-	-	-	-
β-Elemène	-	-	-	-	-	9.4	-
Dodécanal	9.7	-	-	-	-	-	-
(<i>E</i>)-Caryophyllène	-	14.6	6.5	5.4	7.3	-	9.9
α-humulène	-	6.7	-	-	-	-	-
γ -Muuroolène	-	-	-	-	-	-	6.4
Germacrène-D	5.9	20.1	-	-	19.7	22.3	13.6
β-Ionone	-	-	-	9.2	-	-	-
δ-Cadinène	-	-	-	6.9	-	-	-
(<i>E</i>)-Nérolidol	22.1	-	-	-	-	-	-
Acide dodécanoïque	-	-	-	7.0	-	-	-
Caryophyllène oxyde	-	7.9	16.2	-	-	-	-
α-Cadinol	-	-	-	-	9.5	-	-
Valeranone	-	-	-	-	-	5.3	-
6, 10, 14-Triméthyl pentadécan-2-one	-	-	-	7.0	-	-	-

Tableau IV.2. Composants majoritaires (% ≥ 5.0) d'huiles essentielles d'espèces *Stachys* de Grèce (Skaltsa *et al.*, 2001).

Composé (%)	<i>S. spruneri</i>	<i>S. swainsonii</i> subsp. <i>melangavica</i>	<i>S. swainsonii</i> subsp. <i>argolica</i>	<i>S. swainsonii</i> subsp. <i>swainsonii</i>	<i>S. swainsonii</i> subsp. <i>scyronica</i>	<i>S. ionica</i>
(+)- α -Pinène	8.0	-	-	-	-	-
(+)-Limonène	17.3	-	-	-	-	-
(+)- β -Linalool	-	-	8.2	-	-	-
α -Copaène	-	9.4	-	-	-	-
β-Elemène	5.1	18.8	-	-	8.4	8.0
(+)-(E)-Caryophyllène	15.0	7.3	16.3	12.8	8.4	-
γ -Muuroolène	-	-	7.4	-	-	-
β -Selinène	-	-	6.1	-	-	-
Viridiflorène	-	10.6	5.8	-	7.3	-
α -Selinène	11.0	-	-	5.4	-	-
Eremophilène	-	8.1	-	-	-	-
δ-Cadinène	5.8	13.7	6.5	-	8.5	6.3
(E)-Nérolidol	-	-	-	-	-	14.9
Spathulénol	7.4	6.2	-	7.8	-	8.0
(+)-Caryophyllène oxyde	-	-	7.1	15.4	16.3	-
Viridiflorol	-	-	-	11.4	-	-
<i>epi</i> - α -Muurolol= T-Muurolol	-	-	-	-	7.2	-
Torreyol	-	-	-	-	-	7.9
α-Cadinol	-	-	-	-	9.9	13.1
(E, E)-Farnésol	-	-	-	-	-	8.0
α -Sinensal	-	-	-	-	-	10.5
Sclarène	-	-	-	-	5.7	7.0
Manoyl oxyde	-	-	-	7.7	-	-
Abietatriène	7.6	-	-	-	-	-

Tableau IV.2. Composants majoritaires (% ≥ 5.0) d'huiles essentielles d'espèces *Stachys* de Grèce (Skaltsa *et al.*, 2003) (La suite).

Composé (%)	<i>S. alopecuros</i> (L.) Bentham	<i>S. scardica</i> (Griseb.) Hayek	<i>S. spinulosa</i> Sm.	<i>S. cretica</i> L. ssp. <i>cretica</i>	<i>S. germanica</i> L. ssp. <i>heldreichii</i> (Boiss.) Hayek	<i>S. recta</i> L.	<i>S. euboica</i> Rech.	<i>S. menthifolia</i> Vis.
(+)- α -Pinène	-	19.7	-	-	-	-	-	-
(+)-Limonène	-	-	-	-	-	-	6.1	-
(-)-β-Linalool	-	-	-	-	-	33.9	-	-
Dihydroedulan I	-	-	-	-	-	15.9	-	-
(-)- α -Copaène	-	-	-	-	6.6	-	12.5	-
β -Bourbonène	-	5.6	-	-	-	-	-	-
Dodécanal	-	-	-	-	5.3	-	-	-
(-)-(<i>E</i>)-Caryophyllène	7.6	-	-	-	18.4	-	9.8	-
(<i>E</i>)- β -Farnésène	-	-	-	-	-	-	6.3	-
γ -Muuroloène	-	10.3	-	-	-	-	-	-
Germacrène D	-	19.9	-	33.5	21.3	-	-	-
δ -Cadinène	-	10.5	-	-	6.8	-	8.7	-
α -Calacorène	13.4	-	-	-	-	-	-	-
Spathuléol	-	-	10.8	-	-	-	-	-
(+)-Caryophyllène oxyde	8.9	1.6	3.7	-	5.9	-	6.7	-
<i>epi</i> -Cedrol	5.0	-	-	-	-	-	-	-
Di- <i>epi</i> -cedrenoxide	6.0	-	-	-	-	-	-	-
β -Bisabolol	6.8	-	-	-	-	-	-	-
Pimaradiène	-	-	-	18.6	-	-	-	-
13-<i>epi</i>-Manoyl oxyde	-	-	-	-	-	-	-	7.5
Kaurène	-	-	-	-	-	-	-	9.0
Abietatriène	-	-	-	-	-	-	-	13.7

Tableau IV.3. Composants majoritaires (% ≥ 5.0) d'huiles essentielles d'espèces *Stachys* de Turquie.

Composé (%)	<i>S. iberica</i> subsp. <i>stenostachya</i> (Kaya <i>et al.</i> , 2002)	<i>S. balansae</i> L. (Cakir <i>et al.</i> , 1997)	<i>S. recta</i> L. (Cakir <i>et al.</i> , 1997)	<i>S. obliqua</i> L. (Harmandar <i>et al.</i> , 1997)	<i>S. aleurites</i> (Flamini <i>et al.</i> , 2005)	<i>S. lavandulifolia</i> Vahl var. <i>lavandulifolia</i> . (Sezik et Basaran, 1985)	<i>S. laetivirens</i> Kotschy & Boiss. ex Rech. Fil. (Duman <i>et al.</i> , 2005)
α-pinène	-	16.0	-	-	8.4	-	-
β-pinène	-	24.1	7.5	-	-	-	-
1-Octen-3-ol	-	-	33.0	-	-	-	-
Limonène	-	-	-	6.2	-	-	-
1.8-cineole	-	-	-	-	-	8.7	-
Linalool	18.9	-	13.0	-	-	-	-
Linalyl acétate	42.2	-	-	-	-	-	-
α-terpinéol	5.3	-	-	-	-	-	-
Thymol	-	-	-	16.4	-	-	-
Geranyl acétate	8.2	-	-	-	-	-	-
β-caryophyllène		24.3	-	-	33.7	11.3	-
Germacrène-D	-	-	-	25.4	9.6	-	-
Bicyclogermacrène	-	-	-	-	14.5	-	-
Nonacosane	-	-	-	-	-	-	23.1
Phytol	-	-	-	-	-	-	17.9

Tableau IV.4. Composants majoritaires (% \geq 5.0) d'huiles essentielles d'espèces *Stachys* d'Iran.

Composé (%)	<i>S. byzantina</i> C. Koch (Khanavi <i>et al.</i> , 2003)	<i>S. lavandulifolia</i> Vahl. (Feizbakhsh <i>et al.</i> , 2003)	<i>S. lanata</i> Jacq (Mirza et Baher, 2003)	<i>S. setifera</i> C. A. Mey ssp. iranica (Javidnia <i>et al.</i> , 2003)	<i>S. inflata</i> Benth (Sajjadi et Smae, 2004)
α-thujone	-	-	25.9	-	-
α-pinène	-	20.1	-	-	11.3
β -pinène	-	12.1	-	-	5.6
β -Phellandrène	-	-	-	-	9.8
Pulegone	-	-	-	26.5	-
Bicycloelemène	-	-	-	-	6.6
β -cubebène	12.6	-	-	-	-
α -terpinyl acétate	-	-	-	11.2	-
α -copaène	16.5	-	-	-	-
α-humulène	-	-	24.9	-	-
β-caryophyllène	14.3	-	12.6	-	-
Germacrène-D	-	-	-	-	16.9
Bicyclogermacrène	-	-	-	-	16.6
Spathulénol	16.1	7.2	-	-	-
Viridiflorol	-	-	10.5	-	-
Piperitenone oxyde	-	-	-	17.4	-

Tableau IV.4. Composants majoritaires ($\% \geq 5.0$) d'huiles essentielles d'espèces *Stachys* d'Iran (La suite).

Composé (%)	<i>S. schtschegleevii</i> Sosn. (Norouzi-Arasi <i>et al.</i> , 2004)	<i>S. schtschegleevii</i> (Sonboli <i>et al.</i> , 2005)	<i>S. ixodes</i> Boiss. & Hausskn. ex Boiss. (Sefidkon <i>et al.</i> , 2003)	<i>S. pilifera</i> Benth. (Sefidkon et Shaabani, 2004)
α-pinène	27.4	36.4	-	-
β -pinène	10.5	-	-	-
Limonène	-	8.2	-	-
Piperitone	-	6.2	-	-
β-phellandrène	14.7	-	-	-
Myrteny acétate	-	-	48.7	47.4
ar-curcumène	-	-	-	6.8
Germacrène-D	14.1	18.6	-	-
Spathulénol	-	-	5.7	-
Globulol	-	-	13.4	-
Caryophyllène oxyde	-	-	5.9	-

Tableau IV.5. Composants majoritaires (% ≥ 5.0) d'huiles essentielles du genre *Stachys*.

Composé (%)	<i>S. glutinosa</i> L. Corse (France) (Mariotti <i>et al.</i> , 1997)	<i>S. milanii</i> Petrović (Serbie) (Palic <i>et al.</i> , 2006)	<i>S. recta</i> L. (Serbie) (Chalchat <i>et al.</i> , 2000)	<i>S. sylvatica</i> L. (Italie) (Tirillini <i>et al.</i> , 2004)
α-pinène	10.1	-	-	-
1-octen-3-ol	-	-	19.7	-
Camphore	-	7.1	-	-
β-phellandrène	6.8	-	-	-
γ-terpinène	6.1	-	-	-
Bornéol	-	49.5	-	-
Terpinén-4-ol	13.1	13.2	-	-
Myrténol	-	5.0	-	-
α-terpinéol	8.4	-	-	-
(<i>E</i>)-β-Farnésène	-	-	-	9.1
Germacrène-D	-	-	-	55.2
Spathuléol	8.9	-	-	-
n-tétracosane	-	-	-	6.9

IV.3. Travaux antérieurs sur les huiles essentielles de l'espèce *Stachys circinnata* I'Her.**IV.3.1. Matériel végétal**

La plante a été récoltée de la région de Constantine (Djebel El-Ouahch), au mois de mai 2005. La plante a été identifiée par le Professeur Gérard De Bélair (Faculté des sciences, Université Badji-Mokhtar, Annaba). Un échantillon a été déposé au Musée botanique de la Ville d'Angers (France) sous la référence MBAng2005.09. Après séchage dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires, les parties aériennes ont été coupées en petits morceaux et pesées (1000g).

IV.3.1.1. Description de la plante

Le genre *Stachys* est représenté par 14 espèces de plantes vivaces répandues en Algérie, 4 d'entre elles sont endémiques. Plantes annuelles à racines grêles, dépourvues de rejets stériles. Plantes vivaces à souche épaisse émettant en général des rejets stériles (Quezel et Santa, 1963).

D'après Quezel et Santa (1963), *Stachys circinnata* I'Her. est une plante endémique du Nord algérien, à feuilles épaisses ± réticulées gaufrées, revêtues d'un épais tomentum de poils courts. Epis florifères disjoints dans le bas, très dense dans le haut. Corolle rosée à anneau de poils oblique et incomplet.

IV.3.2. Extraction

200g de la partie aérienne fraîche de *Stachys circinnata* I'Her. sont hydrodistillés dans un Clevenger, conformément à la « british pharmacopeia », durant 3h. L'huile essentielle obtenue (0.5%), de couleur jaune claire et d'odeur agréable, est conservée à 4°C jusqu'à son analyse en GC et GC/MS.

IV.3.3. Analyses GC et GC/MS**IV.3.3.1. Analyse GC**

Les analyses GC ont été effectuées sur un chromatographe Finnigan SSQ 7000 équipé d'une colonne de silice de type DB-5 (5% méthylphénylpolysiloxane) de (30 m x 0.25 mm i.d., épaisseur de film 0.25 µm). La température du four étant programmée de 40 à 250°C à une vitesse de 3°C min⁻¹, avec une température d'injection et de détection de 280°C, et un volume injecté de 0.1 µl. Le gaz vecteur étant l'Hélium avec un débit de 1 mL/min.

IV.3.3.2. Analyse GC/MS

Les analyses GC/MS ont été effectuées sur un appareil Finnigan SSQ 7000 muni d'un détecteur masse couplé du type thermo trace GC 2000, équipé d'une colonne de silice du type DB-5 (5 % méthylphénylpolsiloxane), de (30 m x 0.25 mm i.d. épaisseur de film 0.25 µm). Les conditions opératoires sont les mêmes pour les analyses GC ; la température de four étant programmées de 40°C (3 min), puis à une vitesse de 3°C lorsque la température atteint 250°C. Les paramètres MS étant :

- Température de trappe d'ions : 200°C
- Rapport split : 1 :10
- Potentiel d'ionisation : 70 ev
- Bande de scans : 40-400 u
- Temps de scan : 5s
- Résolution : 1000

Les composants de l'huile essentielle ont été identifiés par comparaison de leurs indices de rétention (RI) relatifs aux n-alcanes C9-C17 et à leurs MS avec les données (Librairies NIST et WILEY) correspondantes ainsi qu'aux spectres donnés par la littérature (McLafferty et Stauffer, 1991 ; Adams, 1995 ; Swigar et Silverstein, 1981).

Le pourcentage relatif aux composés identifiés a été calculé à partir des chromatogrammes par intégrateur informatisé.

IV.3.4. Résultats de l'analyse GC/MS et discussion

27 composants, représentant 98.6 % de l'huile essentielle de *Stachys circinnata* l'Her. ont été identifiés. Cette huile est majoritairement composée de globulol (40.3%), α -cadinol (16.2 %), spathuléol (12.7%) et de T-muurolol (6.3 %) (Tableau IV.6). La prédominance de composés phénoliques est en accord avec les résultats obtenus pour les huiles dont les composants majoritaires sont rassemblés dans les tableaux précédents.

Les composés obtenus, listés selon leur ordre d'élution dans la colonne, sont résumés dans le tableau IV.6

Tableau IV.6. Composition de l'huile essentielle de *Stachys circinnata* l'Her.

Composés	Pourcentage	Indice de rétention
α -Thujène	1.5	924
α -Pinène	0.3	932
Bicycloélémane	0.5	1330
δ -Élémane	0.4	1338
Bourbonène	0.1	1382
Thymol	0.6	1293
β -Gurjunène	0.2	1432
β -Caryophyllène	0.2	1416
α -Humulène	2.0	1452
(E)- β -Farnésène	2.3	1458
Aristolène	0.9	1460
allo-Aromadendrène	0.2	1464
Bicyclogermacrène	1.9	1500
Germacrène B	4.5	1554
Spathuléol	12.7	1577
Globulol	40.3	1588
Isoaromadendrène oxide	0.4	1595
α-Cadinol	16.2	1643
T-Muurolol	6.3	1656
α -Bisabolol	3.7	1682
6,10,14-Triméthyl-pentadecan-2-one	1.2	1842
Méthyl hexadecanoate	0.2	1908
Farnesyl acétone	1.1	1915
Méthyl oléate	0.3	2120
Acide linoléique	0.3	2197
Docosane	0.1	2200
Tricosane	0.2	2300

Il faut noter qu'à notre connaissance, basée sur une étude bibliographique complète et très actualisée, l'huile essentielle du *Stachys circinnata* l'Her. présente les plus hauts pourcentages en globulol, α -cadinol et spathuléol (40.3%, 16.2%, 12.7% respectivement), ces pourcentages n'ont jamais été observés dans une huile essentielle de genre *Stachys*.

Comparativement à l'huile de *S. circinnata* l'Her, les huiles essentielles du *S. ixodes* Boiss. et Hausskn. ex Boiss. d'Iran, contiennent le globulol (13.4%) et le spathuléol (5.7%) comme composants majoritaires (Sefidkon *et al.*, 2003). Ce dernier est aussi présent comme produit majoritaire de l'huile de *S. spruneri* (7.4%), *S. swainsonii* subsp. *melangavica* (6.2%), *S. swainsonii* subsp. *swainsonii* (7.8%), *S. ionica* (8.0%) (Skaltsa *et al.*, 2001), *S. spinulosa* Sm. (10.8%) (Skaltsa *et al.*, 2003), *S. byzantina* C. Koch (16.1%) (Khanavi *et al.*, 2003), *S. lavandulifolia* Vahl. (7.2%) (Feizbakhsh *et al.*, 2003) et *S. glutinosa* L. Corse (8.9%) (Mariotti *et al.*, 1997).

L' α -cadinol se trouve dans *S. swainsonii* subsp. *scyronica* (9.9%), *S. ionica* (13.1%) (Skaltsa *et al.*, 2001) et *S. recta* L. subsp. *subcrenata* (Vis) Briq. (9.5%) (Vundac *et al.*, 2006).

T-muurolol (7.2%) est aussi un composant majoritaire de *S. swainsonii* subsp. *scyronica* (Skaltsa *et al.*, 2001).

Références bibliographiques

- Adams, R.P. 1995. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. Allured Publ. Corp., Carol Stream, IL.
- Cakir, A., Duru, M.E., Harmandar, M., Izumi, S., Hirata, T. 1997. The volatile constituents of *Stachys recta* L. and *Stachys balansae* L. from Turkey. *Flav. Fragr. J.*, 12(3), 215-218.
- Chalchat, J.C., Petrovic, S.D., Maksimovic, Z.A., Gorunovic, M.S. 2000. Essential oil of the herb of *Stachys recta* L., Lamiaceae from Serbia. *J. Essent. Oil Res.*, 12(4), 455-458.
- Duman, H., Kartal, M., Altun, L., Cemirci, B., Can Baser, K.H. 2005. The essential oil of *Stachys laetivirens* Kotschy & Boiss. ex Rech. Fil., endemic in Turkey. *Flav. Fragr. J.*, 20, 48-50.
- Dunn, C., Sleep, J., Collett, D. 1995. Sensing an improvement: an experimental study to evaluate the use of aromatherapy, massage and periods of rest in an intensive care unit. *J. Adv. Nurs.*, 21(1), 34-40.
- Feizbakhsh, A., Tehrani, M.S., Rustaiyan, A., Masoudi, S. 2003. Composition of the essential oil of *Stachys lavandulifolia* Vahl. from Iran. *J. Essent. Oil Res.*, 15(2), 72-73.
- Flamini, G., Cioni, P.L., Morelli, I., Celik, S., Gokturkc, R.S., Una, O. 2005. Essential oil of *Stachys aeurites* from Turkey. *Biochem. Syst. Ecol.*, 33, 61-66.
- Fujii, M., Hatakeyama, R. 2008. Lavender aroma therapy for behavioral and psychological symptoms in dementia patients. *Geriatr. Gerontol. Int.*, 8(2), 136-138.
- Goel, N., Kim, H., Lao, R.P. 2005. An olfactory stimulus modifies nighttime sleep in young men and women. *Chronobiol. Int.*, 22(5), 889-904.
- Goubet, N., Rattaz, C. 2003. Olfactory experience mediates response to pain in preterm newborns. *Dev. Psychobiol.*, 42(2), 171-180.
- Harmandar, M., Duru, M. E., Cakir, A., Hirata, T., Izumi, S. 1997. Volatile constituents of *Stachys obliqua* L. (Lamiaceae) from Turkey. *Flav. Fragr. J.*, 12(3), 211-213.
- Hay, I.C., Jamieson, M., Ormerod, A.D. 1998. Randomized trial of aromatherapy. Successful treatment for alopecia areata. *Arch. Dermatol.*, 134(11), 1349-1352.
- Javidnia, K.; Miri, R.; Azarpira, A.; Tabaei, S. M. H. 2003. Composition of the essential oil of *Stachys setifera* C. A. Mey ssp. *iranica* growing in Iran. *Flav. Fragr. J.*, 18(4), 299-300.
- Kaya, A., Demirci, B., Baser, K.H.C. 2002. The composition of the essential oil of *Stachys iberica* subsp. *stenostachya* growing in Turkey. *Chem. Nat. Comps.*, 37(4), 326-328.
- Khanavi, M., Hadjiakhoondi, A., Shafiee, A., Masoudi, S., Rustaiyan, A. 2003. Chemical composition of the essential oil of *Stachys byzanthin* C. Koch. from Iran. *J. Essent. Oil Res.*, 15(2), 77-78.

Kim, J.T., Wajda, M. 2006. Evaluation of aromatherapy in treating postoperative pain: pilot study. *Pain Pract.*, 6(4), 273-277.

Lehrner, J., Marwinski, G. 2005. Ambient odors of orange and lavender reduce anxiety and improve mood in a dental office. *Physiol. Behav.*, 86(1-2), 92-95.

Lewith, G.T., Godfrey, A.D., Prescott, P. 2005. A single-blinded, randomized pilot study evaluating the aroma of *Lavandula augustifolia* as a treatment for mild insomnia. *J. Altern. Complement Med.*, 11(4), 631-637.

Mariotti, J. P., Costa, J., Bianchini, A., Bernardini, A.F., Casanova, J. 1997. Composition and variability of the essential oil of *Stachys glutinosa* L. from Corsica (France). *Flav. Fragr. J.*, 12(3), 205-209.

Marlier, L., Gaugler, C., Messer, J. 2005. Olfactory stimulation prevents apnea in premature newborns. *Pediatrics.*, 115(1), 83-88.

McLafferty, F.W., Stauffer, D.B. 1991. *The Important Peak Index of the Registry of Mass Spectral Data*. John Wiley & Son, New York, NY.

McCaffrey, R., Thomas, D.J., Kinzelman, A.O. 2009. The effects of lavender and rosemary essential oils on test-taking anxiety among graduate nursing students. *Holist. Nurs. Pract.*, 23(2), 88-93.

Mirza, M., Baher, Z.F. 2003. Essential oil of *Stachys lanata* Jacq from Iran. *J. Essent. Oil Res.*, 15(1), 46-47.

Murakami, S., Shirota, T. 2005. Aromatherapy for outpatients with menopausal symptoms in obstetrics and gynecology. *J. Altern. Complement Med.*, 11(3), 491-494.

Muzzarelli, L., Force, M., Sebold, M. 2006. Aromatherapy and reducing preprocedural anxiety: A controlled prospective study. *Gastroenterol. Nurs.*, 29(6), 466-471.

Norouzi-Arasi, H., Yavari, I., Alibabaeii, M. 2004. Chemical constituents of the essential oil of *Stachys schtschegleevii* Sosn. From Iran. *J. Essent. Oil Res.*, 16(3), 231-232.

Palić, R., Lazarević, J., Stojanović, G., Randelović, V. 2006. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Stachys milanii* Petrović. *J. Essent. Oil Res.*, 18, 290-292.

Quezel, P., Santa, S. 1963. *La nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Tome II, Ed. CNRS, Paris, p. 360-361.

Ro, Y.J., Ha, H.C. 2002. The effects of aromatherapy on pruritus in patients undergoing hemodialysis. *Dermatol. Nurs.*, 14(4), 231-234, 237-238, 256; quiz 239.

Sajjadi, S.E., Smae, M. 2004. Chemical composition of the essential oil of *Stachys inflata* Benth. from Iran. *Chem. Nat. Comps.*, 40(4), 378-380.

Sefidkon, F., Nik, A.N., Bagaii, P., Javidtash, I. 2003. Analysis of the essential oil of *Stachys ixodes* Boiss. & Hausskn. ex Boiss. from Iran. *Flav. Fragr. J.*, 18(4), 301-302.

Sefidkon, F., Shaabani, A. 2004. The essential oil of *Stachys pilifera* Benth. from Iran. *J. Essent. Oil Res.*, 16(3), 229-230.

Sezik, E., Basaran, A. 1985. Phytochemical investigations on the plants used as folk medicine and herbal tea in Turkey. II. Essential oil of *Stachys lavandulifolia* Vahl var. *lavandulifolia*. *J. Facul. Pharm. Istanbul Univ.*, 21, 98-107.

Skaltsa, H.D., Mavrommati, A., Constantinidis, T. 2001. A chemotaxonomic investigation of volatile constituents in *Stachys* subsect. *Swainsonianae* (Labiatae). *Phytochemistry*, 57, 235-244.

Skaltsa, H.D., Demetzos, C., Lazari, D., Sokovic, M. 2003. Essential oil analysis and antimicrobial activity of eight *Stachys* species from Greece. *Phytochemistry*, 64(3), 743-752.

Sonboli, A., Salehi, P., Nejad Ebrahimi, S. 2005. Essential oil composition and antibacterial activity of the leaves of *Stachys schtschegleevii* from Iran. *Chem. Nat. Comps.*, 41(2), 171-174.

Swigar, A.A., Silverstein, R.M. 1981. *Monoterpenes- Infrared, Mass, Proton-NMR, Carbon-NMR Spectra and Kovats Indices*. Aldrich Chemical Company Inc., Madison, WI.

Tirillini, B., Pellegrino, R., Bini, L.M. 2004. Essential Oil composition of *Stachys sylvatica* L. from Italy. *Flav. Fragr. J.*, 19(4), 330-332.

Valnet, J. 2001. *Aromathérapie*, Vigot, France, 470-471.

Vundac, V.B., Pfeifhofer, H.W., Brantner, A.H., Males, Z., Plazibat, M. 2006. Essential oils of seven *Stachys* taxa from Croatia. *Biochem. Syst. Ecol.*, 34, 875-881.

Wiebe E. 2000. A randomized trial of aromatherapy to reduce anxiety before abortion. *Eff. Clin. Pract.*, 3(4), 166-169.

Wilkinson, S.M., Love, S.B. 2007. Effectiveness of aromatherapy massage in the management of anxiety and depression in patients with cancer: a multicenter randomized controlled trial. *J. Clin. Oncol.*, 25(5), 532-539.

PARTIE II

PARTIE BIOLOGIQUE

CHAPITRE I

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Les antioxydants

I.1.1. Les radicaux libres

L'oxygène moléculaire (O_2) est à la fois toxique et indispensable à la vie. L'Homme ainsi que tous les organismes aérobies le tolèrent car, en contrepartie, ce gaz permet, en tant qu'accepteur final d'électrons au niveau de leur chaîne respiratoire, de stocker de l'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP). L'oxygène permet aussi de faire fonctionner certains systèmes enzymatiques. Toutefois, cette utilisation de l'oxygène entraîne la formation d'espèces chimiques extrêmement réactives que sont les radicaux libres oxygénés. Ces espèces oxygénées réactives (ROS) sont utiles mais peuvent devenir toxiques quand elles sont produites de manière excessive. Cette toxicité peut être aggravée, par la présence de façon naturelle dans l'organisme, de certains ions métalliques tels que le fer et le cuivre. Ces composés peuvent entraîner des dommages le plus souvent irréversibles au niveau de tous les composés présents dans les cellules. Ils causent des dommages au niveau des lipides qui sont un des éléments constitutifs essentiels des membranes cellulaires, des protéines et aussi au niveau des acides nucléiques présents dans la cellule et notamment l'ADN, tant au niveau nucléaire qu'au niveau mitochondrial. C'est pour cette raison que notre organisme, lors de son évolution, a développé en parallèle des systèmes de défense afin de le protéger contre cet effet toxique de l'oxygène (Halliwell, 1997).

Au niveau des atomes ou des molécules, les électrons sont généralement associés par paires. Chaque paire se déplace dans une région de l'espace bien définie, située autour du noyau. Cette région de l'espace est appelée orbitale. Chaque électron d'une paire possède un spin de valeur égale à $+1/2$ pour l'un et $-1/2$ pour l'autre. Un radical libre est une espèce chimique ayant un ou plusieurs de ses électrons non appariés, c'est à dire qu'au moins un de ses électrons se trouve seul sur une orbitale (Halliwell, 1997).

Par convention, on représente un radical libre par un point situé en haut et à droite du symbole de l'atome. Le radical le plus simple est l'atome d'hydrogène : H^\bullet

I.1.2. Les antioxydants

Les défenses cellulaires antioxydantes peuvent être classées en deux types de défenses ; les systèmes de défenses primaires et secondaires. Le système de défense primaire est constitué de systèmes enzymatiques spécifiques tels que la superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase ainsi que par une grande variété de petites molécules antioxydantes. Le système de défense secondaire est formé, d'une part par des enzymes lipolytiques et protéolytiques qui vont éviter l'accumulation de composés oxydés résultant d'une attaque radicalaire et d'autre part, par les systèmes de réparation de l'ADN (Halliwell *et al.*, 1995).

Parmi les molécules antioxydantes spécialement les «petites» molécules antioxydantes telles les vitamines (α -tocophérol, acide ascorbique, etc...) mais également sur de nombreux composés naturels extraits de plantes, notamment des composés polyphénoliques (flavonoïdes...) (Halliwell *et al.*, 1995).

Un antioxydant est toute substance qui, présente à faible concentration par rapport à celle d'un substrat oxydable, retarde ou évite l'oxydation de ce substrat (Halliwell *et al.*, 1995).

Le terme «substrat oxydable» englobe toutes les substances se trouvant dans les cellules vivantes comme les protéines, les lipides, les composés hydrogène-carbonés et les acides nucléiques.

L'antioxydant peut agir par de nombreux mécanismes différents qui peuvent être l'élimination directe de l'oxygène, le piégeage des espèces oxygénées ou azotées réactives (ROS et NOS), l'inhibition de la formation de ces ROS et NOS, la chélation des ions métalliques nécessaires à la génération des ROS ou la stimulation des défenses antioxydantes endogènes (Halliwell, 1997).

Les termes espèces oxygénées et azotées réactives incluent tous les radicaux proprement dits contenant de l'oxygène ou de l'azote, mais aussi certains composés non radicalaires qui sont des agents oxydants et/ou qui sont très faciles à transformer en espèces radicalaires. Cette deuxième catégorie comprend notamment le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le peroxyde d'azote ($ONOO^-$).

I.1.2.1. Familles de molécules présentant une activité antioxydante

Les systèmes cellulaires de défense contre les attaques radicalaires sont constitués des enzymes spécifiques (CAT, SOD, GPx), ainsi que de « petites » molécules apportées par l'alimentation telles que la vitamine E et la vitamine C. En plus de ces molécules, il existe d'autres composés apportés par l'alimentation qui présentent une activité antioxydante intéressante. Parmi ces composés, les plus connus sont les caroténoïdes et les composés phénoliques dont font partie les acides phénoliques, et les flavonoïdes.

a. Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des colorants naturels présents dans les plantes. Ces pigments sont largement répandus dans la nature. Ils s'accumulent dans les chloroplastes de tous les tissus photosynthétiques. Ils sont présents dans les feuilles de presque tous les végétaux, ils s'accumulent dans les pétales de certaines fleurs (souci, pensée, œillet d'Inde).

On en trouve aussi dans les fruits (lycopène dans la tomate, β -criptoxanthine dans le citron) et dans certaines racines (β -carotène de la carotte) ainsi qu'au niveau de « graines » de céréales (zéaxanthine du maïs). Les caroténoïdes sont utilisés, du fait de leur absence de toxicité, comme colorants naturels dans les industries agro-alimentaires et pharmaceutiques (Polyakov *et al.*, 2001).

b. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques peuvent donc être définis comme des dérivés non azotés dont le ou les cycles aromatiques sont principalement issus du métabolisme de l'acide shikimique et/ou de celui d'un polyacétate.

Les principaux composés phénoliques connus pour leur activité antioxydante sont les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins.

Les acides-phénols

Le terme d'acide-phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. En phytochimie, l'emploi de cette dénomination est réservé aux seuls dérivés des acides benzoïque et cinnamique (Bruneton, 1999).

Les flavonoïdes

Présents dans la plupart des plantes, leur nombre est très important puisque l'on en connaît plus de 4000 différents. Plus ou moins hydrosolubles, ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. C'est le cas notamment des flavonoïdes jaunes dont font partie les chalcones, les aurones et les flavonols jaunes mais aussi des anthocyanosides qui peuvent être de couleur rouge, bleue ou violette. Quand ils ne sont pas directement visibles, ils contribuent à la coloration en jouant le rôle de co-pigments. Ces co-pigments sont notamment des flavones ainsi que des flavonols incolores. Certaines de ces molécules absorbent dans une zone proche de l'ultraviolet. La coloration de ces molécules n'est alors perçue que par les insectes qui, étant attirés par ces couleurs, vont permettre la pollinisation des végétaux et assurer ainsi la survie de l'espèce.

Les flavonoïdes sont également présents dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques des feuilles au niveau desquelles ils assurent la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement solaire (Bruneton, 1999).

Les tanins

Chez les végétaux supérieurs, on distingue habituellement deux groupes de tanins différents. Ces composés diffèrent non seulement par leur structure mais aussi par leur origine biogénétique. Il s'agit des tanins hydrolysables et des tanins condensés.

Les tanins hydrolysables sont des oligo- ou polyesters d'un sucre et d'un nombre variable d'acide-phénol. Le sucre est généralement le glucose. L'acide-phénol est soit l'acide gallique dans le cas des tanins galliques, soit l'acide hexahydroxydiphénique (HHDP) et ses dérivés d'oxydation (déhydrohexahydroxydiphénique = DHHDP ou acide chébulique) dans le cas des tanins ellagiques.

Les tanins condensés ou proanthocyanidols sont des polymères flavaniques. Ils sont constitués d'unités de flavan-3-ols liés entre elles par des liaisons carbone-carbone. Ces composés ont été identifiés dans tous les groupes végétaux (Bruneton, 1999).

I.1.2.2. Mécanismes d'action responsables de l'activité antioxydante des composés phénoliques

Le mécanisme d'action des antioxydants se fait pour empêcher la formation de ROS. Cette propriété est due à des phénomènes d'inhibition enzymatique ou à des mécanismes de complexation des métaux impliqués dans la génération des ROS (Bors *et al.*, 1997).

I.1.2.3. Méthodes d'études du piégeage des radicaux libres

Parmi les techniques mises au point pour mesurer l'activité antioxydante de composés, l'utilisation de la Résonance Paramagnétique Electronique (R.P.E.) est satisfaisante, spécialement lorsque des mécanismes radicalaires sont mis en jeu. En effet, l'analyse du spectre obtenu en R.P.E. est spécifique du radical étudié.

a. Mesures de l'activité antioxydante par RPE

La RPE, outre le fait qu'elle permette l'identification du radical étudié, a la capacité de détecter les radicaux libres dès les plus faibles concentrations (seuil de sensibilité $\sim 10^{-8}$ M). Sa précision en fait un des outils de choix pour l'étude de l'activité antioxydante de composés biologiques ou de molécules (Rimbach *et al.*, 1999). Les mesures effectuées en R.P.E. se basent sur deux techniques différentes, le « spin-labelling » et le « spin-trapping ».

1. Le «spin-labelling»

L'échantillon à étudier est un composé qui est un radical en lui-même (spin-label). Ce composé radicalaire va présenter la particularité d'être stable au cours du temps et donner un spectre caractéristique en RPE.

La mesure de l'activité antioxydante d'un composé est déterminée par la capacité du composé à capter le radical du «spin label» en le transformant en un composé non radicalaire sans réponse en RPE. La réduction du «spin label» se caractérise alors par une diminution de l'amplitude du signal mesuré. Lors de notre étude, le radical que nous avons utilisé est le 1,1-Diphényl-2-Pyrryl-Hydrazyl (DPPH). Ce radical est stable et facilement détectable par R.P.E. Il présente de plus l'avantage de pouvoir être utilisé en présence de tous les solvants employés dans notre étude. Dans ce cas, le spin-label est utilisé comme simple marqueur d'activité antioxydante et permet d'obtenir une information quantitative sur l'activité du composé à étudier. Il est à noter que ce test utilisant le DPPH est aussi développé par spectrophotométrie visible, en suivant la décoloration du DPPH (de couleur violette) à 517 nm lorsqu'il est réduit par un composé antioxydant. Les concentrations, et donc la quantité des échantillons utilisés, sont toutefois supérieures à celles nécessaires en R.P.E. (Jost et Griffith, 1984).

2. Le «spin-trapping» ou piégeage de spin

Du fait de leur extrême instabilité, les radicaux libres, notamment les radicaux oxygénés, ont une durée de vie très courte ($\frac{1}{2}$ vie $O_2^{\cdot -} = 10^{-6}$ s, $\frac{1}{2}$ vie $OH^{\cdot} = 10^{-9}$ s à 37°C) (Rimbach, 1999). Cette très faible durée de vie ne leur permet pas d'atteindre la concentration nécessaire à leur détection ultérieure par RPE. Afin de pallier ce problème, l'équipe du professeur Janzen a introduit en 1968 une nouvelle technique dite de «spin trapping» ou piégeage de spin (Halliwell, 1997). Cette méthode consiste à ajouter dans le milieu d'étude, un composé organique appelé piègeur de spin (PS). Ce dernier va réagir rapidement avec les radicaux libres (R^{\cdot}) formés pour donner un nouveau composé appelé spin adduit » (A^{\cdot}), dont la durée de vie sera supérieure à celle du radical qu'il a capté, et qui le rendra détectable par RPE. Le processus de piégeage de spin est représenté par l'équation ci-dessous (Janzen *et al.*, 1985).



I.2. Les antibactériens

Une définition précise des bactéries permet actuellement d'établir les limites du mode bactérien, elle fait intervenir tous les caractères structuraux et métaboliques qui leur donnent une individualité parmi les microorganismes et permettent de les distinguer d'une part des champignons inférieurs et des protozoaires, d'autre part (Loiseau-Marollean, 1968).

Les bactéries sont connues depuis 1676 (Leeuwenhoek), il s'agit des microorganismes unicellulaires classés parmi les procaryotes, car ils ne possèdent pas de membrane nucléaire (Ferron, 1976).

De façon résumée, la cellule bactérienne se distingue de la cellule animale par sa petite taille, par la présence d'une paroi rigide contenant un polymère particulier, le peptidoglycane, par le caractère haploïde de son génome et par l'absence des mitochondries.

La coloration de Gram permet de séparer les bactéries en deux catégories dont la paroi est de structure différente. Certaines espèces bactériennes peuvent posséder des capsules (Guiraud et Galzy, 1980).

I.2.1. Les principaux germes étudiés

Au cours de notre étude consacrée à l'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits butanoliques de *S. mialhesi* de Noé et *S. circinnata* l'Her, nous avons utilisé :

Deux souches de références provenant de l'institut Pasteur à Alger, qui sont :

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Deux souches qui sont isolées de différents prélèvements de malades du CHU (centre Hospitalo-universitaire) : pus, ponction pleurales, ponction d'ascites et gorge.

Ces souches ont été récupérées du laboratoire de microbiologie du CHU Benbadis de Constantine :

- *Escherichia coli*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Staphylococcus aureus*
- *Klebsiella pneumoniae*

Ce sont des bactéries nosocomiales incriminées dans des infections acquises en milieu hospitalier (Celles qui apparaissent plus de 48 heures après l'admission).

I.2.2. Rappel sur les infections nosocomiales

Les infections nosocomiales sont définies comme les accidents infectieux contractés par le malade au cours de son hospitalisation (Carbonelle *et al.*, 1987). Elles sont préoccupantes en raison de leur morbidité importante, de la mortalité associée et de l'émergence des bactéries multirésistantes.

Les localisations les plus fréquentes des infections nosocomiales sont les voies urinaires (sur sonde), les plaies opératoires, l'appareil respiratoire et les cathéters intra-vasculaires (Nausiel, 2000).

I.2.3. Les germes en cause

Les bactéries les plus souvent en cause sont par ordre décroissant :

- *Escherichia coli*
- *Staphylococcus aureus*
- *Pseudomonas aeruginosa*

Certaines de ces bactéries posent avant tout le problème des multirésistances aux antibiotiques, en particulier le *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM).

I.2.4. Caractères généraux sur les souches étudiées

I.2.4.1. Généralité sur la famille des Enterobacteriaceae

La famille des Enterobacteriaceae est la plus grande famille de la section 5 du Bergey's manuel. Elle contient des bacilles ou coccobacilles, asporulés Gram négatif ayant en commun les caractères suivants : Aérobie-anaérobie facultatif, mobile ; par cils péritriches (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*) ou immobiles (*Klebsiella pneumoniae*), utilisent le glucose par métabolisme fermentatif, avec ou sans production de gaz, réduisent les nitrates en nitrites, oxydase (-), cultivées sur milieux ordinaires (Guiraud et Galzy, 1980).

La famille des Enterobacteriaceae regroupe plusieurs espèces dont la plupart sont des commensales de tube digestif de l'homme et des animaux (l'intestin). Mais ce caractère écologique n'est pas exclusif (peuvent être isolées à partir du sol et des végétaux) (Ferron, 1976).

a. Caractères culturels

Les Enterobacteriaceae se développent bien sur bouillon ou sur gélose ordinaire incubés pendant 18h à 37°C. Sur milieu gélosé, les colonies d'Entérobactéries sont habituellement lisses, brillantes, de structure homogène de 2 à 3 mm de diamètre (type «Smooth» ou S), cet aspect peut évoluer après cultures successives pour donner des colonies à surface sèche et rugueuse (type « Rough » ou R) (Ferron, 1976).

- Les colonies muqueuses sont habituelles avec les *Klebsiella*. Leur diamètre peut dépasser 10 mm ; elle a une tendance à la confluence ;
- Les colonies naines s'observent avec des souches déficientes dans certaines de leurs chaînes métaboliques. Elles ne sont pas exceptionnelles chez les *E. coli* isolées d'infection urinaires (Avril *et al.*, 1992).

b. Caractères antigéniques

Les Enterobacteriaceae possèdent un antigène commun (CA) encore appelé antigène de kunin. Son existence chez certains groupes de germes comme *Yersinia*, les *Erwinia* ont permis de confirmer leur appartenance à la famille des Enterobacteriaceae.

On peut distinguer en outre :

- Des antigènes de paroi ou antigène O, toujours présents; thermostable (résistants 2h à un chauffage à 100°C), alcoostables et très toxiques.
- Des antigènes de capsule ou d'enveloppe, appelés antigène K.
- Des antigènes flagellaires ou antigènes H (Ferron, 1976).

c. Le pouvoir pathogène des Entérobactéries

Le pouvoir pathogène des Entérobactéries concerne les syndromes digestifs, les infections viscérales, les infections du tractus urinaire, et une maladie très particulière la peste, la dysenterie bacillaire, la fièvre typhoïde et diverses septicémies. N'oublions pas que les Entérobactéries sont aussi des phytopathogènes (Ferron, 1976).

Les principaux genres appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* sont : *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Proteus*.

I.2.4.2. Les bacilles à Gram négatif

I.2.4.2.1. *Escherichia coli* (*E. coli*)

Les colibacilles ou *Escherichia coli* ont été découverts par Escherich en 1885 (Ferron, 1976). *E. coli* est un bacille à Gram négatif, cette bactérie est connue depuis longtemps comme banale du tube digestif et pathogène pour l'appareil urinaire (Nausiel, 2000).

Escherichia coli est une espèce commensale de tube digestif de l'homme et des animaux (Dans l'intestin). La présence d'*E. coli* dans l'eau est le témoin d'une contamination fécale récente (Avril *et al.*, 1992).

a. Pouvoir pathogène

E. coli peut provoquer plusieurs types d'infections avec de syndromes polymorphes :

- Les infections abdominales ; suppurations péritonéales.
- Les infections bactériennes (bactériémies) : Elles sont dues au pouvoir invasif et leur résistance à la phagocytose et à l'action du complément.
- Méningites de nouveau nées ou nourrisson et les syndromes diarrhéiques (Ferron, 1976).

b. Propriétés antigéniques

Il existe plus de 170 antigènes somatiques, 52 antigènes flagellaires et 70 antigènes capsulaires permettant de les classer en sérotypes (Jack et Jack, 1995).

c. Facteurs de virulence

- Présence d'endotoxine, liée au LPS (Lypopolysaccharide).
- Adhésines : très nombreuses, responsables d'attachement aux cellules uroépithéliales et aux entérocytes.
- Hémolysines et facteurs cytotoxiques (CNF Cytotoxic Necrotizing Factor).
- Résistance à l'activité bactéricide du sérum (Jack et Jack, 1995).

I.2.4.2.2. *Klebsiella pneumoniae* (Bacille de Friedlander)

Entrevu par klebs en 1880, décrit en 1882 par Friedlander dans les crachats de sujets atteints de pneumonie, le pneumo bacille à été considéré comme l'agent de pneumonie (Fasquelle, 1974).

a. Caractères bactériologiques

Habitat : Répandu dans la nature, il est des hôtes normaux du tube digestif (Ferron, 1976), il peut être trouvé dans le rhinopharynx, la salive des sujets sains, sur les muqueuses normales de l'œsophage et des bronches, sur les téguments, dans la terre, les poussières, les eaux ; il paraît capable d'y mener une vie saprophytique (Fasquelle, 1974).

Morphologie et caractères culturels : Dans les produits pathologiques : Gros bacille, Gram négatif, coloration souvent bipolaire, entouré d'une capsule souvent volumineuse.

En milieu liquide : Dépôt glaireux et collerette ; sur gélose : grosses colonies bombées, opaques, visqueuses "en goutte de miel" (Berche *et al.*, 1987).

b. Pouvoir pathogène

La souris est l'animal de choix pour l'étude du pouvoir pathogène de *K. pneumoniae*, la virulence pour les souris paraissant le fait de *Klebsiellas* responsables d'infections pulmonaires.

Par voie sous-cutanée, on détermine un abcès, puis une septicémie avec splénomégalie. Dans le Sang du cœur et les frottis de viscères, *Klebsiella pneumoniae* apparaissent munis d'une fort belle capsule. La voie intrachéale détermine une série de foyers, d'alvéolite oedémateuse, compliqués ultérieurement de septicémie ; la voie péritonéale : une péritonite suivie de septicémie (Fasquelle, 1974).

c. Toxines

Dans le cadre des toxines élaborées par *Klebsiella*, il semble qu'on peut faire entrer l'effet inhibiteur, signalé par les anciens auteurs. Cet effet observé *in vitro*, et retrouvé *in vivo* chez le lapin qui survit plus longtemps s'il reçoit, en injection, un mélange de bactéries et de pneumobacilles qu'une culture de seules bactériidies (Fasquelle, 1974).

I.2.4.2.3. *Pseudomonas aeruginosa*

C'est le bacille du pus bleu de l'ancienne pourriture d'hôpital, isolé en 1882 par Gessard (Ferron, 1976).

a. Caractère bactériologiques

Habitat : *Pseudomonas aeruginosa* ou bacille pyocyanique est un bacille à Gram(-), aérobie strict, très mobile par ciliature mono triche, ubiquitaire, présent dans les sites naturels humides : Eau, sol, végétaux, dans la partie initiale du tube digestif et dans la peau et les muqueuses de l'homme et des animaux (Dabena, 1997).

Transmission : Les infections à bacilles pyocyaniques surviennent surtout en milieu hospitalier, les germes sont apportés aux malades soit par l'environnement (fleurs), soit par l'alimentation (légumes) soit par les soins médicaux (antiseptiques et les matériels souillés) (Ferron, 1976).

b. Caractères cultureux et pigments

Sa culture est facile à des températures comprises entre 10 et 42°C. Les colonies sont transparentes, à bords circulaires. Le bacille pyocyanique élabore deux pigments hydrosolubles ; la pyocyanine (pigment bleu soluble dans le chloroforme), et la pyoverdine (pigment jaune-vert fluorescent, non soluble dans le chloroforme). Avec certaines souches peu ou pas pigmentées (en particulier certaines souches résistantes aux antibiotiques), on devra rechercher les pigments caractéristiques sur des milieux d'épreuve sensibles (milieu A et B de King par exemple). La culture a une odeur particulière et caractéristique (Ferron, 1976).

c. Pouvoir pathogènes

Pseudomonas aeruginosa est l'exemple type de la bactérie pathogène opportuniste, il est impliqué dans diverses infections parmi lesquelles : Les infections cutanées, broncho-pneumopathies, oculaires, digestives, infections méningées et dans des septicémies, sans oublier les infections urinaires (Avril *et al.*, 1992).

Les malades particulièrement sensibles sont les nourrissons, les diabétiques et surtout les cancéreux (Avril *et al.*, 1992). Toutefois, *P. aeruginosa* dispose d'un nombre important de facteurs de virulence liés soit à sa structure (LPS), soit à l'élaboration d'exo produits : Enzymes (protéase, phospholipase C...), exotoxines (Dabena, 1997).

I.2.4.3. Les Cocci à Gram positif : Les staphylocoques

Découverts par Pasteur en 1880, Ces germes ont été dénommés staphylocoques par Ogston en 1881 en raison de la morphologie particulière de leur groupement (Ferron, 1976).

I.2.4.3.1. *Staphylococcus aureus*

a. Caractères bactériologiques

Habitat : Le *S. aureus* est très répandu dans la nature (Eau, air, sol,...), il vit souvent à l'état commensal sur la peau et les muqueuses des organismes humains et animaux (nez, main, gorge, selle ...) (Ferron, 1976).

Morphologie et caractères culturels : Dans le pus, *S. aureus* se présente sous l'aspect de cocci en diplocoques en petits amas et en courtes chaînettes mesurant 0,8 à 1µm. Sur milieu solide, il se dispose en « grappes de raisin ». Il est immobile, non sporulé et habituellement ne possède pas de capsule (Avril *et al.*, 1992 ; Leclerc, 1975).

S. aureus est une bactérie aérobie-anaérobie facultative. Il se cultive facilement sur milieux ordinaires et pousse en présence de forte concentration saline (milieu sélectif de Chapman à 7,5% de NaCl). Il s'accommode à de grandes variations de T° (de 10 à 45°C) et de pH. Avec une T° optimale de 37°C et un pH optimal à 7,5 (Avril *et al.*, 1992 ; Ferron, 1976).

En bouillon, la culture déjà visible au bout de 5-6 heures, est très abondante après 24h (Leclerc, 1975). Sur milieu gélosé, les colonies bien développées au bout de 24 h. Elles sont lisse, bombées et habituellement pigmentées en jaune doré, la production de ce pigment est souvent associée avec d'autres caractères de pathogénicité (Avril *et al.*, 1992, Leclerc, 1975).

Transmission : La transmission inter humaine s'opère généralement par contact direct (manu portage). Elle peut aussi être indirecte par les vêtements, la literie ou les aliments (Guiraud et Galzy, 1980).

b. Caractères biochimiques

S. aureus possède un équipement enzymatique très complet qui le rend capable d'agir sur de nombreux hydrates de carbone, lipides, protéines. Les caractères biochimiques qui permettent le diagnostic rapide de genre sont: La présence d'une catalase, l'utilisation du glucose en anaérobiose. Le diagnostic d'espèce fait intervenir la fermentation du mannitol et la recherche de certaines enzymes essentiellement la coagulase (Ferron, 1976).

c. Substances élaborées :

Elles sont particulièrement nombreuses chez les *S. aureus*, on a les toxines et les enzymes :

v Les toxines

- Staphylolysine (Staphylocoagulase) : La principale est la Staphylolysine α (pouvoir nécrotique).
- Leucocidine : Pouvoir toxique vis-à-vis des leucocytes.
- Exfoliatine : Toxine épidermolytique (Avril *et al.*, 1992).
- Enterotoxines : Responsable de manifestations pathologiques digestives ; intoxications alimentaire et entérocolites aiguës (Ferron, 1976).

v Les enzymes

- La coagulase : Exoenzyme capable de coaguler le plasma d'homme ou de lapin.
- La fibrinolysine.
- Les hyaluronidase.
- Lipases et estérases, capable de métaboliser les graisses cutanées.
- Bêta – lactamases (Ferron, 1976).

d. Pouvoir pathogène

Les *S. aureus* sont responsable des :

- Infections cutané–muqueuses (abcès).
- Agents de septicémies.
- Agents d'intoxication alimentaire et entérocolites aiguës.
- Syndromes de choc toxique (Avril *et al.*, 1992).

I.3. L'inflammation

I.3.1. Généralités

L'inflammation est une réaction des êtres vivants à une lésion ou une stimulation cellulaire excessive ou normale due à une agression tissulaire d'origine: mécanique ou physique (radiations, électricité, froid, chaleur, piqure, coupure, contusion), chimique (acide, base, substances minérales diverses) et immunologique ou biologiques (virus, bactéries, parasite, champignon et les antigènes) et certains produits comme le venin, le pollen et les toxines (Schorderet et Dayer., 1992).

I.3.2. Réactions inflammatoires

La réaction inflammatoire est la réponse normale de l'organisme à des agressions d'origine immunitaire ou non. C'est aussi une réaction du tissu conjonctif et des vaisseaux (Touitou, 1997). Le déclenchement et le déroulement de l'inflammation sont gouvernés par des réflexes nerveux et surtout par des médiateurs chimiques endogènes (histamine, sérotonine) (Grünfeed, 1994).

I.3.2.1. Les différentes réactions inflammatoires

Il existe deux types d'inflammations:

Les inflammations primaires et les inflammations secondaires. Les premières ont une cause immédiate, localisée. Les secondes sont des réactions systémiques qui se développent à distance. L'inflammation secondaire est due à une réaction immunitaire (Bourin *et al.*, 1993).

I.3.2.2. Phase de l'inflammation

La réaction inflammatoire comporte une suite coordonnée d'événements:

- **Phase précoce ou phase vasculaire**

Lorsqu'un tissu subit une agression, des cellules spécialisées, les mastocytes, libèrent de l'histamine et de la sérotonine qui stimulent la vasodilatation dans la partie affectée ce qui provoque rougeur et chaleur. Les capillaires (surchargés) laissent échapper du liquide qui s'infiltré dans les tissus, y entraînant un gonflement et causant une sensation douloureuse.

- **Phase secondaire ou phase cellulaire**

La migration extra vasculaire (diapédèse) des leucocytes et la libération de cytokine qui sont à l'origine de l'activation cellulaire et de la libération de médiateurs. Il se forme alors des tissus de granulation: granulome. Dès lors une succession d'évènements au sein de la lésion inflammatoire entraîne :

- La phagocytose d'agents extérieurs
- La captation et la présentation d'antigènes
- La production de radicaux libres

Les cytokines en outre agissent au niveau systémique pour augmenter la défense de l'hôte sous forme de fièvre.

- **Phase terminale ou phase de régénérescence**

Cette phase correspond à la sclérose du tissu par élimination des débris cellulaires et tissulaires par un mécanisme de phagocytose et de pinocytose. (Cohen, 1981; Bourin *et al.*, 1993).

I.3.3. Les médiateurs chimiques de l'inflammation

Beaucoup d'éléments cellulaires interviennent dans l'inflammation. Il s'agit des:

Cellules comme les polynucléaires neutrophiles, les phagocytes mononuclées, les lymphocytes, polynucléaires éosinophiles, les mastocytes, les cellules endothéliales, les fibroblastes, les plaquettes etc (Capron, 1998).

Les médiateurs cellulaires comme les amines vasoactives il s'agit de :

- La sérotonine, stockée dans les plaquettes sanguines et dans les cellules chromaffines de la muqueuse intestinale.
- L'histamine, dont la première source est les mastocytes est libérée par d'autres cellules comme les phagocytes (polynucléaires neutrophiles et basophiles, macrophage), les cellules sanguines (plaquettes, hématies). Elle est retrouvée au niveau de l'épiderme de la muqueuse gastro-intestinale et du système nerveux (Capron, 1998).
- Les éicosanoïdes : Ce sont des composés à vingt acides aminés dérivés de l'acide arachidonique. Les uns sont de structures linéaires, les leucotriènes et les autres de structure cyclique, les prostaglandines, prostacyclines et thromboxanes.
- Les cytokines : Les monokines et lymphokines forment un groupe de protéines jouant un rôle essentiel dans les communications intercellulaires et notamment entre les acteurs du processus inflammatoire. Elles sont sécrétées par les lymphocytes, les macrophages, les fibroblastes, les cellules endothéliales, les plaquettes et d'autres types cellulaires tels que les cellules épithéliales.
- Les cytokines pro-inflammatoires sont essentiellement l'interleukine (IL)-1 qui est produit par les phagocytes mononucléés sous l'influence de divers facteurs inducteurs, son action majeure est de promouvoir la sécrétion de l'IL-2 ; l'IL-6 induit la sécrétion d'anticorps par les lymphocytes B et favorisent la synthèse par les hépatocytes des protéines de l'inflammation aiguë ; l'IL-8 favorise la chimiotaxie des neutrophiles ; le *tumor necrosis factor* TNF α .
- Le PAF acether, phosphoglycérade issu de la dégradation des phospholipides membranaires, est vasodilatateur et augmente la perméabilité capillaire.

Les médiateurs plasmatiques il s'agit :

- des kinines : polypeptides plasmatiques phlogogènes, les kinines dont la plus active est la bradykinine ont divers effets sur l'inflammation, elles entraînent entre autre une activation de la phospholipase A2, une irritation des fibres sensorielles au niveau lésionnel, la bradykinine favorise en plus une vasoconstriction à la base de la stase intra capillaire.
- du système du complément, il intervient dans le phénomène inflammatoire comme dans l'immunité par l'activation des deux voies (classique et alterne) et entraîne la fixation sur la particule cible de C3 responsable de l'opsonisation et de C5, C6, C7 et C8 responsables de la lyse avec libération de fragments peptidiques, les anaphylatoxines provoquant une inflammation locale.
- Les facteurs de la coagulation, la fibrine qui sédimente dans le site de l'inflammation à la phase aiguë est le résultat de l'activation de la fibrinogénèse (Capron, 1998).

I.3.4. Mécanisme de la réaction inflammatoire

En réponse à une perturbation physique ou chimique, il se produit une activation de la phospholipase A2 qui hydrolyse les liaisons esters des phospholipides membranaires et libère des dérivés de l'acide arachidonique, ce dernier à son tour est métabolisé selon deux voies possibles :

- La voie de la lipooxygénase qui le transforme en leucotriène.

- La voie de la cyclooxygénase qui le transforme principalement en prostaglandine.

Les leucotriènes augmentent la perméabilité capillaire et exercent une chimioattractivité sur les polynucléaires.

Les prostaglandines produisent une vasodilatation locale, favorisent l'œdème et l'afflux leucocytaire, en outre, ils dépriment certains mécanismes immunitaires et potentialisent les effets algogènes de la bradykinine.

Les thromboxanes stimulent les mécanismes de l'agrégation plaquettaire.

I.3.5. Définition des anti-inflammatoires

Les anti-inflammatoires sont des médicaments capables d'atténuer ou de supprimer le processus inflammatoire.

On distingue deux grands groupes:

I.3.5.1. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

C'est une classe pharmaceutique qui possède des propriétés antalgiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires.

I.3.5.2. Les anti-inflammatoires stéroïdiens ou glucocorticoïdes (AIS)

Les glucocorticoïdes constituent une classe thérapeutique qui a des propriétés anti-inflammatoires, antiallergiques et immunosuppressives.

Ils sont représentés par la cortisone et l'hydrocortisone qui sont des produits naturels sécrétés par la corticosurrénale et les produits synthétiques (Bourin *et al.*, 1993).

I.3.6. Mécanisme d'action des anti-inflammatoires

I.3.6.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Les AINS ont une similitude dans leurs effets thérapeutiques liés à l'inhibition de la synthèse des prostaglandines en bloquant la synthèse de la cyclo-oxygénase (COX) qui catalyse la formation des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique (Fattorusso et Ritter, 2001). Ils entraînent une diminution de la migration cellulaire et des actions des tissus conjonctifs (glycoprotéine, collagène) (Bourin *et al*, 1993).

I.3.6.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens ou glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes empêchent la formation de glycéro-phospholipides membranaires en acides arachidoniques par la production d'enzyme lipocortine. Ils diminuent la migration des polynucléaires, monocytes, macrophages vers les sites de l'inflammation et la production de médiateurs comme la sérotonine, histamine les cytokines (Bourin *et al*, 1993).

I.3.7. Méthode de test anti-inflammatoire

Les méthodes d'étude des anti-inflammatoires sont très nombreuses. Après avoir créé l'inflammation sur les animaux de laboratoire, les effets sur les différentes phases de l'inflammation sont recherchés.

I.3.7.1. L'inflammation locale de l'oreille

Ce principe consiste à provoquer une inflammation au niveau de l'oreille du rat, par application locale d'huile de croton. Cette inflammation peut être réduite par application locale de substance anti-inflammatoire (Cohen, 1981).

I.3.7.2. Arthrite à l'adjuvant de Freund

Il s'agit de réduire l'arthrite chronique par certaines substances anti-inflammatoires l'inflammation provoquée par injection intra-articulaire dans la patte postérieure du rat de l'adjuvant de Freund (émulsion d'eau et d'huile, parfois additionné de bacilles de Koch tués), (Cohen, 1981).

I.3.7.3. Œdème de la patte de rat à la carrhagénine

Cette méthode consiste à vérifier l'action inhibitrice des médicaments anti-inflammatoires préventifs sur l'œdème provoqué par injection de carrhagénine sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure de rat (Winter *et al.*, 1962).

I.3.7.4. Perméabilité capillaire chez le lapin

L'essence de térébenthine ou de l'huile de croton est appliquée sur la peau épilée du lapin albinos. Une exsudation plasmatique est mise en évidence par l'injection intraveineuse de bleu Trypan ou de bleu Evans qui se lie aux protéines plasmatiques. L'étendue de la tache bleue cutanée est proportionnelle à la perméabilité capillaire. L'étendue de la diffusion du bleu dans la substance fondamentale du derme est réduite en présence d'anti-inflammatoires (Cohen, 1981).

I.3.7.5. Erythème aux rayons ultraviolets chez le cobaye

Il s'agit d'apprécier l'intensité de la coloration rouge de la peau épilée du dos du cobaye soumis aux rayons ultraviolets, en absence puis en présence s'anti-inflammatoires. Ce test peut être effectué sur la souris (Cohen, 1981).

I.4. Méthodes d'étude de la Toxicité

I.4.1. Toxicité par administration unique: Toxicité aiguë

C'est l'étude qualitative et quantitative des phénomènes toxiques qu'il est possible de rencontrer après administration unique de la ou des substances actives contenues dans le médicament. L'étude sur l'animal de laboratoire doit être effectuée sur un nombre égal d'animaux mâles et femelles. La durée de l'observation des animaux est précisée par l'expérimentateur.

L'étude de la toxicité aiguë permet d'exprimer la dose qui tue 50% des animaux d'expérience (DL_{50} = dose létale moyenne). La DL_{50} est exprimée en masse de substance étudiée par unité de poids corporel de l'animal soumis à l'expérimentation (mg/kg) (Ruckebusch, 1981).

I.4.2. Toxicité par administration réitérée : Toxicité subaiguë et toxicité chronique

Ces épreuves ont pour objet de mettre en évidence les altérations fonctionnelles et/ou pathologiques consécutives aux administrations répétées de la substance active examinée et d'établir les conditions d'apparition de ces altérations en fonction de la posologie. Le mode et le rythme des administrations ne sont pas codifiés strictement mais doivent être clairement indiqués ainsi que la durée des essais. Il est utile de choisir la dose la plus élevée de façon à faire apparaître des effets nocifs, les doses inférieures permettent alors de situer la marge de tolérance du nouveau produit chez l'animal. L'appréciation des effets toxiques est faite sur la base de l'examen du comportement, de la croissance, de la formule sanguine et des épreuves fonctionnelles particulièrement celles qui se rapportent aux organes extérieures ainsi que la base des comptes rendus nécropsiques, accompagnées des examens histologiques qui s'y rattachent (Ruckebusch, 1981).

I.4.3. Détermination de la DL50

I.4.3.1. Définition

La DL50 est la dose minimale tuant 50% des animaux inoculés.

I.4.3.2. Différentes méthodes de détermination

- a. Méthode de Dragstedt et Lang ;
- b. Méthode de Behrens et Karber;
- c. Méthode de Miller et Tainter ;
- d. Méthode de Litchfield et Wilcoxon.

a. Méthode de Dragstedt et Lang

Deux postulats:

- Tout animal ayant survécu à une dose donnée aurait survécu à toute dose inférieure à celle-ci si elle lui avait été injectée.
- Tout animal ayant succombé à une dose déterminée aurait succombé à n'importe laquelle des doses supérieures si elle lui avait été administrée.

On peut ainsi pour chaque dose de la substance, totaliser tous les morts déjà observés aux doses inférieures et tous les vivants encore observés aux doses supérieures. Elle permet de calculer le pourcentage de mortalité à chaque dose sur un plus grand nombre d'animaux que celui qui a réellement reçu cette dose. On fait ensuite la courbe représentant les pourcentages de mortalité en fonction de la dose. Si au voisinage de la DL_{50} la courbe est une droite on pourra déterminer ce point d'après l'équation de la courbe en utilisant la formule suivante:

$$DL_{50} = \frac{50 (X_2 - X_1) + X_1 Y_2 - Y_1 X_2}{Y_2 - Y_1} \quad (\text{Dragstedt et Lang, 1957})$$

X2: dose supérieure encadrant la DL_{50}

X1: dose inférieure encadrant la DL_{50}

Y1: pourcentage de mortalité correspondant à X1

Y2: pourcentage de mortalité correspondant à X2.

b. Méthode de Behrens et Karber

Principe: On administre des doses croissantes de substance à des lots de souris de masses uniformes.

La dose administrée est exprimée en mg/kg de masse corporelle.

La différence entre les doses voisines doit être constante.

Pour chaque lot, on note le pourcentage de mortalité dans l'heure qui suit ou au bout du temps imparti.

La DL50 est obtenue par la formule:

$$DL_{50} = D_m - \frac{\sum (z \cdot d)}{n} \quad (\text{Behrens et Karber, 1935})$$

Où

D_m = la plus haute dose tuant tous les animaux

z = la moyenne de la somme des morts à deux doses consécutives

d = la différence entre de deux doses consécutives

n = nombre d'animaux utilisés par lot.

Manipulation

- On pèse chaque animal
- On administre un volume correspondant de solution
- Après chaque administration on marque l'animal suivant le code indiqué
- On suit le comportement des animaux et on note les symptômes observés
- On relève le nombre de morts au bout du temps imparti.

c. Méthode de Miller et Tainter

On dispose d'un papier logarithme-probabilité sur lequel on porte en abscisse (échelle logarithme) les doses et en ordonnée (échelles probits) les pourcentages de mortalité.

En général il se trouve dans chaque série d'essais une dose assez faible pour laisser en survie tous les animaux et une dose assez élevée pour tuer tous les animaux dans les lots assignés respectivement à chacune des doses. Pour ces deux résultats la valeur des probits est infiniment grande. On convient alors suivant la suggestion de Bartlett, de remplacer 0 par 0.25 au numérateur de la fraction $0/n$ représentant le résultat obtenu avec la <<dose maximum supportée>> (aucun animal mort sur les n animaux employés) et de même de remplacer n' par $n' - 0.25$ au numérateur de la fraction n'/n qui représente le résultat obtenu avec la dose 100 % mortelle.

Les deux points définis par ces coordonnées sont inscrits sur le graphique en regard des doses correspondantes. On trace alors à vue une <<droite de régression provisoire>> s'ajustant au mieux avec les points expérimentaux et les deux résultant de la correction effectuée ci-dessus pour les pourcentages 0 et 100 %. Ce faisant, on accordera une valeur plus grande aux points situés au voisinage du pourcentage 50 (probits = 5) qu'à ceux qui ont des coordonnées supérieures à 84 (probit = 6) ou inférieures à 16 (probit = 4). Le point correspondant au pourcentage 100 doit être situé au dessus.

La dose DL50 est alors lue directement sur l'abscisse du point d'ordonnée 50 pour l'estimation de l'écart type de la DL50, on lit sur le graphique les doses correspondant respectivement à 16 % et 84 % de mortalité (probits 4 et 6); en soustrayant le premier du second, on obtient la valeur $2S$ qui est l'accroissement de dose nécessaire pour accroître de 2 probits la réponse. L'écart type approché est donné par:

$$E = 2S / \text{Racine de } N'$$

(Miller et Tainter, 1944)

N' : étant le nombre total d'animaux dans les groupes qui ont donné des pourcentages de mortalité compris entre 6,7 et 93,3 % (soit en probit: 3,5 et 6,50).

d. Méthode de Litchfield et Wilcoxon

Principe: La méthode de Litchfield et Wilcoxon permet, grâce à l'utilisation d'un test de signification statistique, appelé test X^2 (ki deux) de Pearson, de tracer la droite de régression dose- mortalité la plus probable et de déterminer d'une façon simple, les deux valeurs: DL_{50} et intervalle de confiance sur la DL_{50} .

Méthode : Dans un tableau de 6 colonnes, noter les valeurs suivantes:

Première colonne (di): données expérimentales

Soit K le nombre de doses choisies et $n = K - 2$ le nombre de degrés de liberté.

Deuxième colonne: r_i/n_i $\frac{\text{Nombre d'animaux morts}}{\text{Nombre d'animaux testés}}$
--

Troisième colonne: pourcentage de réponse ($100 p_i$) correspondant à chaque dose. Sur papier logarithme- probabilité, noter chacun des points ($100 p_i$) pour chaque dose (di), en ne tenant pas compte des effets 0 et 100 %. Tracer une droite passant au mieux à travers tous les points.
 Quatrième colonne: les pourcentages théoriques ($100 p_i$) sont lus sur la droite tracée, pour chaque dose testée.

Cinquième colonne: inscrire la différence entre les pourcentages observés et théoriques.

Sixième colonne: noter la contribution au X^2 qui peut être calculée par la formule:

$$X^2 = \frac{(p_i - \hat{p}_i)^2}{p_i (1 - \hat{p}_i)}$$

Le nomogramme I de Litchfield et Wilcoxon donne très simplement la contribution au X^2 : la droite passant par les valeurs correspondantes de p_i et $(p_i - \hat{p}_i)$ coupe la ligne située à droite en un point qui est la contribution au X^2 pour un \hat{p}_i donné.

Faire la somme des différentes valeurs inscrites dans cette sixième colonne. Pour obtenir une valeur approchée du X^2 , on multiplie la somme précédente par N/K soit X^2_0 .

Le résultat obtenu. Relever dans la table la valeur de $X^2_{0,05}$ pour le nombre n de degrés de liberté. Comparer $X^2_{0,05}$ et X^2_0 . Deux cas sont possibles:

. $X^2_0 < X^2_{0,05}$

On peut admettre que la droite tracée est bien ajustée aux données expérimentales.

. $X^2_0 > X^2_{0,05}$

Il faut essayer de diminuer X^2_0 en traçant une autre droite plus proche des conditions de l'expérience (Litchfield et Wilcoxon, 1949).

I.5. L'activité antalgique

I.5.1. La douleur

I.5.1.1. Définition

La douleur est une sensation désagréable et de malaise qui prend naissance par stimulation des terminaisons nerveuse suivie de leur intégration psychique. C'est une douleur nociceptive.

La douleur nociceptive peut être superficielle (cutanée, somatique) consciente ou parfaitement localisée ou profonde (viscérale) mettant en cause le système nerveux autonome (Pieri et Kirkiacharian, 1992).

Activation des nocicepteurs : Il peut s'agir d'activation directe (mécanique, chimique, thermique) ou d'activation par des substances chimiques (ions H⁺, K⁺, histamine, sérotonine, bradykinine, ATP, prostaglandines, etc) (Pieri et Kirkiacharian, 1992).

I.5.1.2. Les antalgiques

Les antalgiques ou analgésiques sont des médicaments de la douleur utilisés dans le but de diminuer les sensations douloureuses (Touitou, 1997).

I.5.2. Nocicepteurs et substances algogènes

Notion de nocicepteurs : les terminaisons nerveuses libres jouent le rôle de nocicepteur. Chez l'homme au niveau des nerfs cutanés il existe une corrélation entre l'activité d'un groupe de fibre et le type de sensation évoqué.

Substances algogènes : les nocicepteurs sont activés par de nombreuses stimulations. Les stimulations chimiques constituent une voie finale commune d'activation des fibres nociceptives à la suite d'une lésion tissulaire. Les médiateurs de l'inflammation représentent l'essentiel de ces stimulations chimiques (bradykinine, histamine, prostaglandine, sérotonine). Ses substances ne sont pas algogènes mais sensibilisent les nocicepteurs.

Les analgésiques : les origines et les manifestations de la douleur étant multiples, il n'est pas étonnant que les médicaments reconnus capables de la soulager soient également très divers. Certains s'attaquent à sa cause même (antispasmodique, antinéoplasique, anti-inflammatoire, anti-infectieux), d'autres sont purement symptomatiques, et n'agissent que transitoirement.

C'est à eux que l'on réserve l'appellation d'analgésique ou d'antalgique. On les divise en deux catégories : les analgésiques morphiniques, toxicomanogènes, réservés aux douleurs intenses et les analgésiques non morphiniques, non toxicomanogènes utilisés pour combattre les douleurs mineurs (Lechat *et al.*, 1982).

I.5.2.1. Méthodes d'étude de l'activité antalgique

a. Test de Haffner

Il consiste à provoquer un stimulus mécanique en pinçant la base de la queue d'une souris qui se retourne et se mord. Sous l'effet de l'analgésique la réaction n'apparaît pas (Bianchi et Franceschini, 1954 ; Haffner, 1929).

b. Test de Randall et Selitto

La patte du rat est soumise à une pression mesurée et ce dernier réagit par un cri. L'animal analgésié ne réagit pas (Randall et Selitto, 1957).

c. Test de Siegmund

Une solution de phényl benzoquinone ou d'acide acétique à 3% est injectée par voie intra péritonéale à la souris ou au rat. L'animal présente un phénomène de torsion du corps. La paroi abdominale est parcourue de contractures : C'est le Writing test. Sur des groupes d'animaux, la dose empêchant le phénomène de torsion à la douleur est recherchée (Siegmund *et al.*, 1957).

d. Test Wolf et Mc Donald

La souris est placée sur une plaque à la température de 56°C. Si elle n'est pas analgésiée, elle se lèche les pattes en moins de 8 secondes. Les réactions sont comparées à celles de souris naïves (Lechat *et al.*, 1982).

e. Test de l'Amour et Smith

Un rayon lumineux calorique est focalisé sur la queue de la souris qui déplace celle-ci en moins de 6 secondes. L'analgésié ne répond pas au bout de 16 secondes (Lechat *et al.*, 1982).

f. Test de Koll et Refert

La stimulation électrique de la pulpe dentaire du lapin entraîne chez ce dernier un frémissement des babines, un mâchonnement ou un recul de la tête selon l'intensité du stimulus. Après administration de l'analgésique, il faut rechercher l'intensité du courant qui ramène le réflexe de mâchonnement pour apprécier la durée de l'action analgésique (Lechat *et al.*, 1982).

g. Test de Linn

La bradykinine est injectée par voie intraveineuse au chien. Le chien aboie. La dose d'analgésique abolit le réflexe d'aboiement (Lechat *et al.*, 1982).

Références bibliographiques

- Avril, J.L., Dabernat, H., Denis, F., Moteil, H. 1992. Bactériologie clinique. 1^{ère} édition. Ed. Marketing, Paris, p. 14-15, 125, 167, 266.
- Behrens, B., Kerber, J. 1935. Wie sind reihenversuche für biologische auswertungen am zweckmassigsten anzuordnen. J. Arch. Exp. Pathol. Pharmako., 177, 379-388.
- Berche, P., Gaillard, J.L., Simonet, M. 1989. Bactériologie médicale : les infections humaines. 1^{ère} édition. Ed. Flammarion, Paris, France, 54.
- Bianchi, C., Franceschini, J. 1954. Experimental observations of Hafner's method for testing analgesic drugs. Brit. J. Pharma., 9, 280-284.
- Bors, W., Michel, C., Stettmaier, K. 1997. Antioxydant effects of flavonoids. Biofactors, 6, 399-402.
- Bourin, M., Lèvre, M., Hervé, A. 1993. Cours de pharmacologie. Ellipses, 3^{ème} édition, Paris, 351.
- Bruneton, J. 1999. Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales, (3^{ème} ed.), Editions médicales internationales, éditions Tec & Doc.
- Capron, F. 1998. Forme anatomo-clinique de l'inflammation, in trouble de la mortalité et la sensibilité digestive. Revue du praticien, 20, 2273-2276.
- Carbonelle, B., Denis, F., Marmonier, A., Pinon, G., Varguas, R. 1987. Bactériologies médicales : techniques usuelles. Edition SIMEP (2^{ème} tirage), France.
- Cohen, Y. 1981. Les anti-inflammatoires, in Abrégé de pharmacologie. 4^{ème} édition Masson, Paris, 355, 465.
- Dabena, H. 1997. Infectiologie de A à Z. Ed. Arnette, France, 500-502.
- Dragstedt, A., Lang, B. 1957. Etude de la toxicité par administration unique d'un nouveau médicament. Annal. Pharmac. Française, 11.
- Fasquelle, R. 1974. Elément bactériologiques médicales. 9^{ème} édition. Ed. Flammarion médecine, Paris, 108, 111.
- Fattorusso, W., Ritter, O. 2001. Vademecum cliniques, Du diagnostique au traitement. 16^{ème} édition Masson, Italie, 1915.
- Ferron, A. 1976. Bactériologie médicale à l'usage des étudiants en médecine. 8^{ème} édition. Ed. Groun et Roques.
- Grünfeld, J. 1994. Dictionnaire de Médecine. Flammarion. 5^{ème} édition, Paris, 1010.

Guiraud, J., Galzy, P. 1980. L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Ed. de l'usine, France.

Haffner, F. 1929. Experimentelle Prüfung Schmerzstillender mittel. Deutsche. Medizinische. Wochenschrift, 55, 731-733.

Halliwell, B., Aeschbach, R., Löliger, J., Aruoma, O.I. 1995. The characterization of antioxidants. Food. Chem. Toxicol., 33(7), 601-617.

Halliwell, B. 1997. Antioxydants : The basics – What they are and how to evaluate them. Adv. Pharmacol., 38, 3-20.

Jack, A., Jack, M. 1995. Les maladies infectieuses. Ed. Vigot, paris, 540.

Janzen, E.G., Stronks, H.J., Dobosse, C.M., Poyer, J.L, McCay, P.B. 1985. Chemistry and biology of spin-trapping radicals associated with holocarbon metabolism *in-vitro* and *in-vivo*. Environ. Health. Persp., 64, 151-170.

Jost, P.C., Griffith, O.H. 1984. The spin-labeling technique. Method. Enzymol., 105, 369-418.

Lechat, P., Langer, G., Rouveix, P., Vincens, W. 1982. Pharmacologie médicale. 4^{ème} Ed. Masson, 764.

Leclerc, H. 1975. Microbiologie générale. Ed. DOIN.

Litchfield, J.T., Wilcoxon, F. 1949. A. Simplified Method of Evaluating Dose - Effet Experiments. J. Pharmacol. Exp. Ther., 96, 99-113.

Loiseau-Marollean, M.L. 1968. Bactériologie à l'usage des infirmiers. 10^{ème} édition. Ed. Groun et Roques, France, Paris, 14, 20, 26.

Miller, L.C., Tainter, M.L. 1944. Estimation of ED₅₀ and Its Error by means of Logarithmic Probit Graph paper. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 57, 261-264.

Nausiel, C. 2000. Bactériologie médicale. 2^{ème} édition. Ed. Masson, France, 389.

Pieri, F., Kirkiacharian, S. 1992. Pharmacologie et Thérapeutique, 2^{ème} édition Marketing, Paris, 443.

Polyakov, N.E., Kruppa, A.I., Leshina, T.V., Konovalova, T.A., Kispert, L.D. 2001. Carotenoids as antioxydants : Spin trapping EPR and optical study. Free Radical Biol. Med., 31(1), 43-52.

Randall, L.O., Selitto, J.J. 1957. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther., 111, 409-419.

Rimbach, G., Höhler, D., Fischer, A., Roy, S., Virgili, F., Pallauf, J., Packer, L. 1999. Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems. Arch. Anim. Nutr., 52, 203-222.

Ruckebusch, Y. 1981. Physiologie, pharmacologie, thérapeutique animales, 2^{ème} Edit. Moloine S.A. Paris.

Schorderet, M., Dayer, J.M. 1992. Physiopathologie de la fièvre, de la douleur et de l'inflammation ; Analgésiques, Antipyrétiques anti-inflammatoires et immuno supprimeurs (dans pharmacologie des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques) Slatkine, Paris-Genève, 932.

Siegmund, E., Cadmus, R., Lu, G. 1957. A method for evaluating both non-narcotic and narcotic analgesics. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 95, 729-731.

Toutou, Y. 1997. Pharmacologie Diplôme d'état d'infirmier, Professionnel. 8^{ème} édition, Masson, Paris, 388.

Winter, C.A, Ristey, E.A, Nuss, G.W. 1962. Carrageenan-induced oedema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 111, 544–547.

CHAPITRE II

MATERIELS ET METHODES

II.1. Matériel Végétal

Durant cette étude, nous avons travaillé sur les deux extraits butanoliques de plantes étudiées (*S. mialhesi* de Noé. et *S. circinnata* l'Her.) ainsi que le produit majoritaire pur (Isoscutellareine-7-O-(6'''-O-acetyl-β-D-allosyl-(1→2)-β-D-glucoside) de la phase butanolique et les racines de *S. mialhesi* de Noé.

II.2. Mesure de l'activité antioxydante

II.2.1. Test d'activité anti DPPH

II.2.1.1. Principe

Le test présenté dans ce chapitre va nous permettre d'évaluer l'activité antioxydante des extraits butanoliques des deux plantes et le produit majoritaire (Isoscutellareine-7-O-(6'''-O-acetyl-β-D-allosyl-(1→2)-β-D-glucoside) isolé de l'espèce *S. mialhesi* de Noé. Le principe est de mesurer leur capacité à inhiber le radical stable 1,1-Diphényl-2-Picryl-Hydrazyl ou DPPH (Schéma II.1).

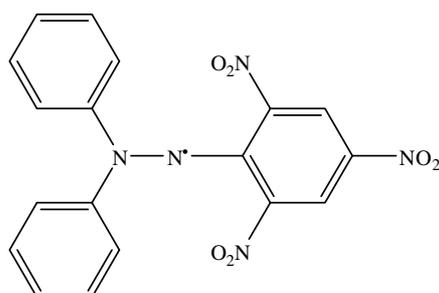


Schéma II.1. Formule du radical DPPH

Ce radical est souvent utilisé pour estimer l'activité antioxydante de nombreux composés, dont les composés phénoliques.

La première étape de la réaction est la capture d'un atome d'hydrogène du composé phénolique par le radical DPPH, pour donner du diphénylpicrylhydrazine et un radical phénoxy (Schéma II.2). Cette étape est la première d'une série de réactions telles que des fragmentations, additions ou autres qui peuvent éventuellement influencer les résultats obtenus, notamment les cinétiques de la capture du DPPH par le composé testé.

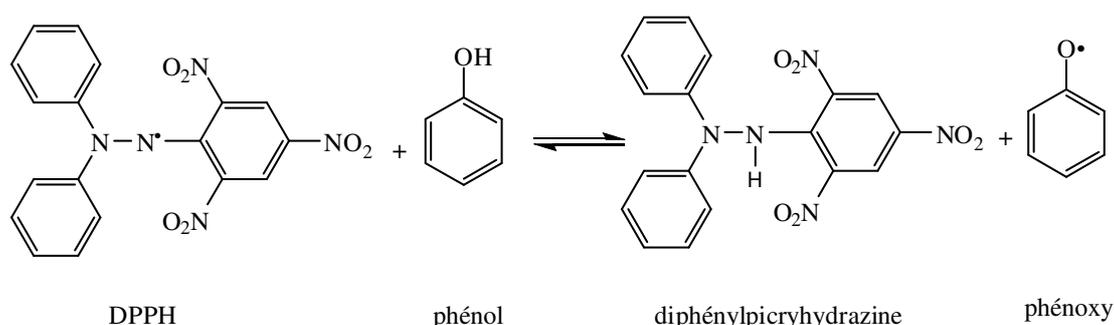


Schéma II.2. Réaction du radical DPPH avec un phénol.

L'utilisation du DPPH présente plusieurs avantages :

Il forme un spectre caractéristique en RPE qui est facilement détectable.

Il est stable au cours du temps.

Il est compatible avec tous les solvants utilisés lors de notre étude.

Le signal de réaction est obtenu en mélangeant, à volume égal, une solution éthanolique du radical DPPH ($5 \cdot 10^{-4} \text{M}$) avec le solvant des fractions étudiées. La double intégrale du signal obtenu est proportionnelle à la quantité de radicaux libres présents dans la solution. Une nouvelle mesure, effectuée avec la solution du radical DPPH et l'extrait à tester (1:1), a pour effet de diminuer le nombre de radicaux libres et entraîner donc une baisse du signal (Schéma II.3). Une nouvelle mesure de la double intégrale du signal permet la quantification de l'activité antioxydante (Gao *et al.*, 1999 ; Ogata *et al.*, 2000).

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition du signal de référence. Il est déterminé par la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(\text{ref-extrait})}{(\text{ref-bdf})}$$

Dans cette formule, **ref** : représente la double intégrale du signal de référence composé du mélange DPPH et du solvant. **extrait** : est la double intégrale du signal correspondant à la mesure qui se compose de DPPH et de l'extrait de plante. **bdf** : est la mesure du bruit de fond occasionné par le solvant seul (sans DPPH).

Chaque mesure est effectuée à trois reprises.

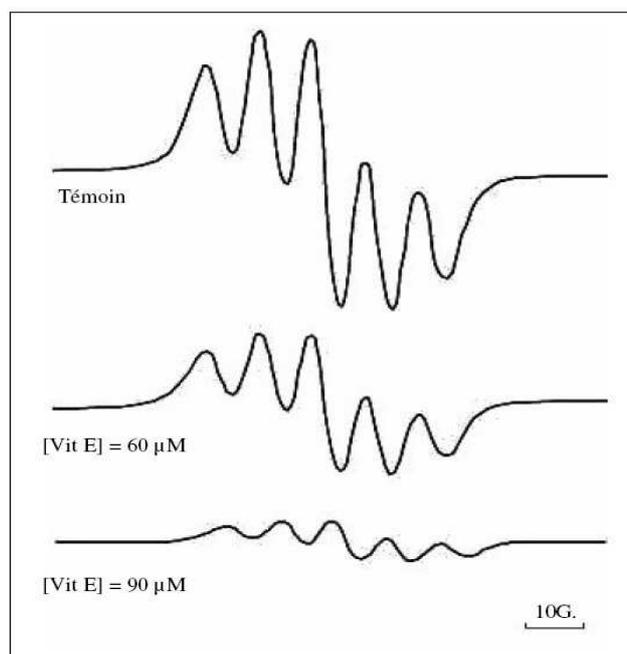


Schéma II.3. Evolution du spectre RPE du radical du DPPH dans l'éthanol en fonction de différentes concentrations de vitamine C.

Lorsque cette manipulation est effectuée à différentes concentrations d'extraits étudiés, la trace d'une courbe % inhibition en fonction de la concentration permet la détermination de la CI_{50} , concentration permettant l'inhibition de 50% du signal de référence.

L'erreur relative sur la détermination de l'inhibition est calculée à partir de la formule suivante :

$$\frac{\Delta I}{I} = \frac{E-B}{(R-E)(R-B)} \times \frac{\Delta R}{R} + \frac{E}{R-E} \times \frac{\Delta E}{E}$$

$\Delta I/I$, $\Delta R/R$, $\Delta E/E$ sont les précisions respectives sur l'inhibition, la référence l'extrait. **I** est la mesure de l'inhibition, **E** celle de l'extrait, **R** celle de la référence, **B** celle du bruit de fond.

La réduction du radical DPPH induit un changement de couleur du violet au jaune, qui peut être suivi facilement par spectrophotométrie en mesurant la décroissance de l'absorption à 517 nm (Brand-Williams *et al.*, 1995 ; Soares *et al.*, 1997 ; Tseng *et al.*, 1997). Toutefois, malgré la précision de cette technique, les mesures faites par RPE restent plus sensibles et permettent de travailler avec des quantités plus faibles de produits.

II.2.1.2. Mode opératoire

a. Réaction

Nous mélangeons 50 μ l de solution éthanolique de DPPH ($5 \cdot 10^{-4}$ M) et 50 μ l d'extrait de plantes à concentrations variables (solvant différent selon l'extrait). Le mélange est agité vigoureusement à l'aide d'un agitateur pendant 5 secondes, introduit dans un microtube en quartz de 100 μ l puis placé dans la cavité de mesure de la RPE. La mesure est effectuée 3 minutes après que les réactifs aient été mis en présence.

b. Mesure

Le spectre RPE caractéristique du radical DPPH est mesuré à l'aide du spectromètre ESP300E Bruker. Les paramètres de mesures sont les suivants :

- modulation de fréquence : 100 kHz
- fréquence micro-onde : 9,78 GHz
- puissance micro-onde : 4 mW
- modulation d'amplitude : 1,97 G
- temps de conversion : 5,12 msec
- constante de temps : 11 msec

Le gain doit être modifié en fonction des solvants utilisés. Les mesures sont effectuées à température ambiante. Le spectre obtenu est la somme de deux balayages successifs, ceci afin d'augmenter le rapport signal/bruit.

II.2.2. Mesure du taux de polyphénols

Afin de déterminer la quantité de polyphénols totaux présents dans les extraits butanoliques de plantes étudiées, nous avons utilisé la méthode de Folin-Ciocalteu (Kujala *et al.*, 2000 ; Sanchez-Moreno *et al.*, 2000).

II.2.2.1. Principe

Les polyphénols, mis en présence du carbonate de sodium, conduisent à une forme ionisée, l'ion phénolate. Par ajout du réactif de Folin-Ciocalteu ou réactif phosphomolybdotungstique (mélange d'acides phosphotungstique et phosphomolybdique) l'ion phénolate est oxydé puis simultanément réduit en donnant une solution colorée bleue dont on détermine l'absorbance.

II.2.2.2. Mode opératoire

Pour effectuer ces mesures, nous avons suivi le protocole décrit dans la Pharmacopée Européenne 2001. Cette méthode de mesure va nous permettre d'évaluer la quantité de polyphénols totaux, contenus dans les extraits étudiés. Le taux de ces composés est déterminé par rapport à une solution témoin de pyrogallol.

Pour chaque extrait de plante, nous avons préparé 25ml de solution mère contenant environ 50 mg ($m_1/10$) d'extrait.

Rq : La méthode que nous avons utilisée est basée sur un mode de calcul prenant en compte la concentration massique des composés à doser. Afin de diminuer les quantités de produit nécessaire à ce dosage, nous avons réalisé les solutions mères dans un volume dix fois inférieur à celui préconisé par le protocole original. Pour cette raison, nous devons, lors du calcul final, multiplier par dix les masses d'extraits initialement pesées.

a. Détermination de l'absorbance des polyphénols totaux

Afin de déterminer le taux de polyphénols totaux, il faut dans un premier temps réaliser une dilution au 1/5 de la solution mère d'extrait de plante. Puis, 2ml de cette solution sont prélevés et introduits dans une fiole. On ajoute à cette solution 1ml de réactif phosphomolybdotungstique (Folin-Ciocalteu) et 10ml d'eau distillée. Pour finir, on ajoute au mélange 12 ml d'une solution de carbonate de sodium à 290g/l réalisée dans l'eau distillée. Après agitation, le mélange est laissé au repos à l'abri de la lumière pendant 30 minutes. Au bout de ces 30 minutes, l'absorbance (A_{TX}) de la solution est mesurée à 760nm au spectrophotomètre en utilisant l'eau comme liquide de compensation.

b. Mesure de l'absorbance du témoin pyrogallol

La première étape consiste à réaliser une solution mère de pyrogallol à 50mg de pyrogallol (m_2) dans 100ml d'eau distillée. Cette solution mère est ensuite diluée au 1/20. On mélange ensuite dans une fiole 2ml de la solution de pyrogallol (au 1/20), 1ml de réactif de Folin-Ciocalteu, 10ml d'eau distillée et 12ml de solution de carbonate de sodium à 290g/l.

Le mélange est agité puis son absorbance (A_p) est mesurée à 760nm après 30 minutes de repos à l'abri de la lumière.

II.2.2.3. Mode de calcul

Une formule prenant en compte la masse des extraits de plante utilisée ainsi que la masse et les caractéristiques physico-chimiques du pyrogallol va nous permettre de calculer directement le pourcentage de chacun des éléments recherchés.

Le pourcentage de polyphénols totaux présents dans un extrait exprimé en équivalent pyrogallol est calculé par la formule suivante :

$$\text{Polyphénols totaux (\%)} = \frac{(62.5 \times A_{TX} \times m_2)}{(A_p \times m_1)}$$

Dans cette formule les masses m_1 et m_2 sont exprimées en grammes.

II.3. Détermination de l'activité antibactérienne

L'étude de l'activité antibactérienne des extraits butanoliques de *S. mialhesi* de Noé. et *S. circinnata* l'Her. a été effectuée au laboratoire de microbiologie de l'université, Abdelhak Benhamouda de Jijel, sur les souches bactériennes suivantes : *Esherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*.

II.3.1. Matériel

II.3.1.1. Matériel bactériologique

Les souches utilisées proviennent de l'institut Pasteur à Alger et de prélèvements de malades du CHU.

II.3.1.2. Matériel végétal

Les phases étudiées sont les phases butanoliques des deux plantes étudiées.

II.3.1.3. Les milieux de culture

Les milieux de culture utilisés (Leur composition: voir annexe) sont les suivants :
Gélose Héктоen : pour l'isolement des souches : *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*.
Gélose Chapman : pour *S. aureus* (même but).
Gélose M-H (Mueller-Hinton) : pour tester l'effet des extraits testés sur les souches étudiées.
Bouillon nutritif.
Eau distillée stérile : pour faire le test l'antibiogramme.

I1.3.2. Méthode de l'étude bactériologique

I1.3.2.1. Revivification des souches

Dans cette opération on réalise des repiquages sur milieux liquides (Bouillon nutritif), milieux solides sélectif (Chapman pour *S. aureus*, Héктоen pour les souches restées) dans le but à l'obtention des souches jaunes.

NB : Le repiquage des souches se fait après chaque semaine.

I1.3.2.2. Identification biochimique

Les souches testées sont des souches identifiées, les souches de référence (ATCC), et les autres sont identifiées au niveau de centre hospitalo-universitaire de Constantine (CHU).

Cette étude à été réalisée en deux étapes :

I1.3.3. L'antibiogramme par diffusion sur milieu gélosé (Méthode des disques)

I1.3.3.1. Définition de l'antibiogramme

L'antibiogramme est un examen de laboratoire permettant d'apprécier la sensibilité d'une bactérie prélevée chez un malade vis-à-vis de divers antibiotiques (Dabena, 1997).

La technique utilisée dans notre travail est la technique NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard) (NCCLS, 1985 ; Comité OMS, 1977). Cette méthode diffère selon que la bactérie soit exigeante ou non. Dans notre étude les souches bactériennes utilisées sont des bactéries non exigeantes.

Les conditions techniques suivantes doivent être respectées :

Milieu

- Le milieu standard utilisé est le Mueller-Hinton. L'épaisseur de la gélose doit être strictement de 4mm répartie uniformément.
- Les boîtes sont pré-séchées avant l'emploi (Ericsson et Sherris, 1971 ; Le minor et Veron, 1989).

Préparation des disques

Nous avons utilisé le papier Whatman N°3 coupé en disques de 6 mm. Ces derniers doivent avoir un contour régulier pour donner une zone d'inhibition facile à mesurer. Les disques, une fois préparés, sont placés dans un tube à essai contenant 10ml d'eau distillée et autoclavé 20 min à 120°C (Le minor et Veron, 1989).

I1.3.3.2. Méthodev **Inoculum**

- L'inoculum doit être de 2 à 3. 10⁶ bactéries/ml pour obtenir des colonies confluentes. Il est obtenu à partir d'une culture pure de 18 à 24 heures sur milieu d'isolement. Puis on racle cinq colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- On décharge l'anse dans 10ml d'eau distillée stérile à 0,9%.
- On homogénéise la suspension bactérienne. Son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Farland ou à des DO de 0,08 à 0,1 lue à 625nm.
- L'inoculum peut être ajusté en ajoutant de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique s'il est trop fort.
- L'ensemencement doit se faire dans les 15 minutes qui suivent la préparation de l'inoculum (Ericsson et Sherris, 1971).

v **Ensemencement**

- On trempe un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- On l'essore en le pressant fermement sur la paroi interne du tube, afin de décharger au maximum.
- On frotte l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.
- Dans le cas où on ensemence plusieurs boîtes de pétri, on recharge l'écouvillon à chaque fois.
- Préparation des dilutions utilisées pour l'antibiogramme (même dilution utilisée pour la CMI)
- Application immédiate des disques (Ericsson et Sherris, 1971).

v **Pré-incubation**

Les boîtes sont laissées pendant 15 min à température ambiante (sur la paille) (Ericsson et Sherris, 1971).

v **Incubation**

- L'incubation à l'étuve pendant 18 à 24 heures à 37°C (Ericsson et Sherris, 1971).

v **La lecture**

- Pour chaque disque, on mesure le diamètre de la zone d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse ou d'une règle
- Les diamètres ainsi mesurés sont comparés à des diagrammes de référence.
- On classe les bactéries dans l'une des catégories : sensibles, intermédiaires ou résistantes.

Une fois l'antibiogramme réalisé et les diamètres des zones d'inhibition mesurés avec précision, on passe à la deuxième étape de l'étude de l'activité antibactérienne ; il s'agit de la détermination de la CMI (Ericsson et Sherris, 1971).

I1.3.4. Détermination de la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice)

I1.3.4.1. Définition

On peut définir la CMI par la concentration minimale inhibitrice ou bien la plus faible concentration d'un antibiotique capable d'inhiber dans un milieu (soit milieu liquide soit milieu solide), toute culture visible de la souche étudiée (Ferron, 1976 ; Le Minor et Veron, 1989).

I1.3.4.2. Réalisation

La solution a été préparée en solubilisant 20mg de l'extrait butanolique de chaque plante dans une solution de 10ml d'eau distillée et on appelle cette solution, la solution mère.

A partir de la solution mère on réalise une série des dilutions (Tableau II.1).

Tableau II.1. Les différentes dilutions de la solution mère (Carbonelle *et al.*, 1987 ; Courvalin *et al.*, 1988).

Concentration initiale en $\mu\text{g/ml}$	Volume en ml	Volume d'eau distillée en ml	Concentration finale en $\mu\text{g/ml}$
2000	6,4	3,6	1280
1280	2	2	640
	1	3	320
	0,5	3,5	160
	0,5	7,5	80
80	2	2	40
	1	3	20
	0,5	3,5	10
	0,5	7,5	5
5	2	2	2,5
	1	3	1,25
	0,5	3,5	0,63
	0,5	7,5	0,32

Pour avoir la concentration de 1280 $\mu\text{g/ml}$ à partir de la solution de 2000 $\mu\text{g/ml}$, on prend 6,4 ml de cette dernière à laquelle on ajoute 3,6 ml d'eau distillée.

II.3.4.3. Procédé

- On prépare une culture en phase exponentielle en milieu liquide de la bactérie à étudier.
- On repique 0,1 (bacille à Gram négatif), 0,3 ml (Staphylocoque, *P. aeruginosa*) de la culture de 18 heures dans 10ml de bouillon M-H. (Ou autre bouillon adéquat pour la bactérie à étudier).
- On met à l'étuve à 37°C pendant 3 à 5heurs, jusqu'à l'apparition d'une légère opalescence.
- On ajoute 1 ml de ce bouillon à 10 ml de bouillon M-H, préalablement chauffé à 37°C.
- On met 2ml de chaque dilution de la gamme de l'extrait déjà préparé dans une boîte de pétri, en allant de la concentration la plus forte vers la concentration la plus faible.
- On ajoute 18ml de la gélose M-H chauffé à 45°C, bien mélangée aux boîtes de pétri.
- On laisse les boîtes de pétris quelques minutes sur la paille pour que la gélose se solidifie.
- On sèche Les boîtes pendant 30 minutes à l'étuve à 37°C.
- On ensemence en strie, à l'aide d'une anse de platine ou à la pipette rodée, sur toutes les boîtes contenant l'huile essentielle sans oublier la boîte témoin.
- On incube les boîtes pendant 18 à 37°C (Carbonelle *et al.*, 1987 ; Courvalin *et al.*, 1988).

II.3.4.4. Lecture

On Lire les concentrations minimales inhibitrices (CMI) : concentration d'antibiotique (l'extrait butanolique de chaque plante dans notre étude) pour laquelle il n'y a pas de culture bactérienne visible (Carbonelle *et al.*, 1987 ; Courvalin *et al.*, 1988).

II.4. Détermination de l'activité anti-inflammatoire, analgésique, antiulcéreuse

II.4.1. Médicaments et animaux

Produits chimiques. Indométacine (Sigma, USA), acide acétylsalicylique (El Vasr Co., l'Egypte), carraghénine (BDH, l'Angleterre), Tween 80 (Sigma, l'Allemagne), Eau physiologique (=saline) (Sigma, l'Allemagne).

Tous les produits chimiques et les réactifs utilisés avaient le plus haut degré de pureté.

Animaux. Les animaux ont été fournis de l'animalerie du Centre National de Recherche (N.R.C), Le Caire, Egypte.

Nous avons travaillé sur des souris albinos (la souche Swiss NMRI), adultes des deux sexes pesant de (20-25g) et des rats albinos (la souche Wistar) mâles adultes pesant de (120-150g), ces animaux ont été utilisés pour la détermination de la dose mortelle moyenne (LD₅₀), l'activité analgésique, anti-inflammatoire et l'effet anti-ulcère, respectivement. Les animaux ont été gardés dans les conditions normales de laboratoire : l'humidité, la température (25 ± 1°C) et la lumière (12 jours : 12 nuits h) et accès libre à l'eau de robinet et nourriture.

II.4.2. Préparation d'extrait de plante

L'extrait butanolique de la plante *S. mialhesi* de Noé a été dissous dans le Tween-80 (la solution aqueuse de 7%) comme le véhicule. Les activités biologiques étudiées d'extrait évalué ont été comparées avec la norme de référence aussi bien que les commandes injectées avec le véhicule de 0.2 ml (7% Tween 80).

II.4.3. Détermination de la dose mortelle moyenne (LD₅₀)

Pour l'étude de la toxicité aiguë, des groupes de 5 souris des deux sexes (20-25g) ont été utilisés, un groupe injecté par un volume correspondant à 0.2ml du véhicule (Tween 80) et qui a servi pour le contrôle et l'extrait évalué a été oralement administré avec des doses croissantes de 1000-10000mg/kg masse corporelle. Les animaux ont été observés et les taux de mortalité ont été enregistrés dans les premières 24 heures après l'administration de l'extrait. La LD₅₀ a été déterminée selon la méthode de Behrens et Kerber (1935).

La LD₅₀ est obtenus par la formule :

$$LD_{50} = D_m - \frac{\sum (z \times d)}{n}$$

Où

D_m = la plus haute dose tuant tous les animaux

z = la moyenne de la somme des morts à deux doses consécutives

d = la différence entre deux doses consécutives

n = nombre d'animaux utilisés par lot

II.4.4. Etude de l'activité analgésique et anti-inflammatoire

Nous avons vérifié l'action inhibitrice de l'extrait butanolique de *S. mialhesi* de Noé, sur la douleur provoquée chez la souris par l'injection intra-péritonéale (I.P) d'une solution diluée d'acide acétique (Test de torsion) et l'activité anti-inflammatoire sur l'œdème provoqué par la carraghénine dans la patte de rat.

II.4.4.1. Activité antalgique vis à vis de la douleur chimique provoquée par l'acide acétique «test de torsion»

Les animaux ont été répartis au hasard en lots de six souris des deux sexes (20-25g) chacun :

- Un lot témoin recevant par voie orale 0.1ml de l'eau physiologique servant de contrôle.
- Trois lots expérimentaux de 6 souris chacun recevant par voie orale l'extrait butanolique étudié à la dose de 5-10g/Kg masse corporelle.
- Deux lots de 6 souris ont reçu par la même voie une solution de l'acide acétylsalicylique (200mg/kg).

30 minutes après les différents traitements, une injection d'une solution fraîche à 2% d'acide acétique (2 % P/v dans l'eau physiologique; pH = 2.7; 10ml/kg. Masse corporelle) dans l'eau physiologique a été faite dans le péritoine de chaque souris selon la méthode de Koster (Koster *et al.*, 1959). Le syndrome douloureux se caractérise par des mouvements d'étirement des pattes postérieures et de torsion de la musculature dorso-abdominale.

Les animaux ont été alors placés immédiatement à l'individu dans une boîte en plastique transparente. Après l'injection de la solution d'acide acétique et un temps de latence de 5 minutes. Nous avons compté pour chaque souris le nombre de torsions pour les 20 minutes suivantes.

L'acide acétylsalicylique (200mg/kg) a été utilisé comme un médicament de référence pour lequel l'extrait de test a été comparé.

L'activité antalgique est exprimée en pourcentage d'inhibition de la douleur pour chaque groupe traité par l'extrait, l'Acide acétyle salicylique et l'eau physiologique.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne (M) des torsions effectuées dans chaque groupe \pm déviation standard (DS).

Le pourcentage d'inhibition de la douleur est calculé selon la formule suivante:

[(Moyenne du nombre de torsions groupe témoin)- (Moyenne du nombre de torsions groupe traité)/ (Moyenne du nombre de torsions groupe témoin)] x 100.

II.4.4.2. Activité anti-inflammatoire: test d'inhibition de l'œdème de la patte des rats à la carraghénine

L'action inhibitrice de l'extrait étudié sur l'œdème provoqué par l'injection d'une solution de carraghénine à 1% dans l'eau physiologique (NaCl 0.9%) à la dose de 0,1ml/patte de rats a été évaluée selon la méthode de Winter *et al.*, 1962.

Des rats albinos masculins adultes pesant (110-130g) avec l'accès libre à l'eau mais ayant été jeûnés au cours de la nuit (18h) ont reçu une injection sous plantaire de 0.1ml de suspension de 1% de carraghénine dans l'eau physiologique dans le tissu plantaire dans la patte postérieure. Un volume égal de l'eau physiologique a été injecté dans l'autre patte, servant de contrôle.

Les mesures des volumes de la patte postérieure droite de chaque rat ont été effectuées avant l'induction de l'œdème et 4h après l'injection de la carraghénine.

Une heure avant l'injection de la carraghénine, les différents lots de rats ont reçu, par voie orale, les différents traitements:

- Le lot témoin de 6 rats a reçu 0.1ml de l'eau physiologique;
- Trois lots expérimentaux de 6 rats chacun a reçu l'extrait étudié à la dose de 5000mg de l'extrait par kg de poids corporel;
- Deux lots de 6 rats ont reçu par voie orale l'indométacine comme produit de référence à la dose de 5mg/kg.

Quatre heures après l'administration d'extrait et l'eau physiologique, les animaux ont été sacrifiés et la patte était rapidement excisée. Le volume de la patte a été mesuré et les différences entre des animaux traités et le groupe témoin ont été exprimées en même temps après l'injection de la carraghénine.

Pour chaque lot traité, nous avons calculé le pourcentage d'inhibition (% INH) de l'œdème des pattes traitées par rapport au lot témoin, en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ INH} = \frac{\% \text{ AUG témoin} - \% \text{ AUG traité}}{\% \text{ AUG témoin}}$$

Ce % INH exprime le pouvoir d'inhibition de l'œdème par une substance, donc l'activité anti-inflammatoire de cette substance.

Le pourcentage d'augmentation du volume de la patte (% AUG) enflammée pour chaque rat est donné par la formule suivante :

$$\% \text{ Aug} = \frac{V_t - V_0}{V_0} \times 100$$

%Aug : Pourcentage d'augmentation de la patte

V_0 : Volume initial de la patte avant de provoquer l'œdème (sans traitement)

V_t : Volume de la patte après l'injection de carraghénine et traitement

L'activité anti-inflammatoire est exprimée en variation de volume ($V_t - V_0$) \pm DS (déviatoin standard) et en pourcentage d'inhibition de l'œdème pour chaque groupe traité par l'eau physiologique, l'extrait et l'Indométacine.

Les moyennes des groupes traités par l'extrait et l'Indométacine ont été comparées avec celles du groupe témoin traité par l'eau physiologique. Le calcul du pourcentage d'inhibition de l'inflammation est donné par la formule suivante:

% Inhibition = 100 [(pourcentage moyen d'augmentation du volume de la patte du lot témoin - pourcentage moyen d'augmentation du volume de la patte du lot traité)/ pourcentage moyen d'augmentation du volume de la patte du lot témoin].

II.4.5. Détermination de l'activité antiulcéreuse

Les groupes de rats albinos masculins adultes de six animaux chacun (110-150g) ont été jeûnés la nuit, oralement donné l'extrait évalué à un niveau de dose de 5 g/kg Poids corporel et l'indométacine 5mg/kg, pendant quatre jours consécutifs. Quatre heures après le dernier dosage, les animaux ont été sacrifiés, leur estomac a été excisée, ouvert le long de la courbure et les nombres d'ulcères ont été évalués en adoptant la méthode de Correll et al (1979).

II.4.6. Données et analyse statistique

Les résultats ont été exprimés par la moyenne \pm DS, la comparaison statistique entre des différents groupes ont été faites par l'analyse des variations (ANOVA) suivie par des essais comparatifs multiples (Post hoc Dunnett's). On a considéré des différences avec $p < 0.05$ entre des groupes expérimentaux et des animaux de contrôle statistiquement significatifs (Marija J, Norusis/ SPSSINC).

Références bibliographiques

- Behrens, B., Kerber, J. 1935. Wie sind reichenversuche für biologische auswertungen am zweckmassigsten anzuordnen. J. Arch. Exp. Pathol. Pharmako., 177, 379-388.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm. Wiss. Technol., 28, 25-30.
- Carbonelle, B., Denis, F., Marmonier, A., Pinon, G., Vargas, R. 1987. Bactériologies médicales : techniques usuelles. Edition SIMEP (2^{ème} tirage), France.
- Caurvalin, P., Flandrois, J.P., Goldstein, F., Philippon, A., Sirot, J. 1988. L'antibiogramme automatisé mpc-vigt, Paris.
- Comité OMS d'experts de la standardisation biologique. 1977. 28^{ème} édition, série de rapport technique n°610, OMS, Genève, 106, 138.
- Correl, T., Jensen, K.M., Splawinski, J. 1979. Interaction of salicylates and other non-steroidal anti-inflammatory agents in rats as shown by gastro-ulcerogenic and anti-inflammatory activities, and plasma concentrations. Acta. Pharmacol. Toxicol., 45, 225-231.
- Dabena, H. 1997. Infectiologie de A à Z. Ed. Arnette, France, 500-502.
- Ericsson, H.M., Sherris, J.C. 1971. Antimicrobial susceptibility testing-Report of an international collaborative study. Acta Pathol. Microbiol. Scand., Sect. B. Suppl., 217, 1-90.
- Ferron, A. 1976. Bactériologie médicale à l'usage des étudiants en médecine. 8^{ème} édition. Ed. Groun et Roques, France.
- Gao, Z., Huang, K., Yang, X., Xu, H. 1999. Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi. Biochem. Biophys. Acta., 1472, 643-650.
- Koster, R., Anderson, M., De Beer, E.J. 1959. Acetic acid for analgesic screening. Federation Proceedings, 18, 412-417.
- Kujala, T.S., Loponen, J.M., Klika, K.D., Pihlaja, K. 2000. Phenolic and betacyanins in red beetroot (*Beta vulgaris*) root : distribution and effect of cold storage on the content of total phenolics and three individual compounds. J. Agric. Food Chem., 48, 5338-5342.
- Le minor, L., Veron, M. 1989. Bactériologie médicale. 2^{ème} édition. Ed. Flammarion. Paris.
- Marija J, Norusis/ SPSSINC «SPSS for windows «SPSS INC Marketing department. Attn: Microsoft ware products Manager, 444 N. Michigan Avenue, Chicago. 60611.
- NCCL Standard for antimicrobial susceptibility testing by diffusion methods NCCLS. 1985. Documents, 5:4.

Ogata, M., Hoshi, M., Urano, S., Endo, T. 2000. Antioxidant activity of eugenol and related monomeric and dimeric compounds. *Chem. Pharm. Bull.*, 48(10), 1467-1469.

Sanchez-Moreno, C., Satué-Garcia, M.T., Frankel, E.N. 2000. Antioxidant activity of selected spanish wines in corn oil emulsions. *J. Agri. Food Chem.*, 48, 5581-5587.

Soares, J.R., Dinis, T.C.P., Cunha, A.P., Almeida, L.M. 1997. Antioxidant activities of some extracts of *Thymus zygis*. *Free Rad. Res.*, 26, 469-478.

Tseng, T.H., Kao, E.S., Chu, C.Y., Chou, F.P., Lin, Wu, H.W., Wang, C.J. 1997. Protective effect of dried flower extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. against oxidative stress in rat primary hepatocytes. *Food Chem. Toxicol.*, 35, 1159-1164.

Winter, C.A, Ristey, E.A, Nuss, G.W. 1962. Carrageenan-induced oedema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 111, 544–547.

CHAPITRE III

RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Détermination de l'activité antioxydante

Le premier test consiste à mesurer la capacité des extraits et le produit pur (Isoscutellareine-7-*O*-(6'''-*O*-acétyl- β -D-allosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucoside) à inhiber le radical stable DPPH. Il permet de mesurer le pouvoir réducteur des extraits. La mesure est effectuée par RPE, 3 minutes après que le mélange de l'extrait étudié et d'une solution éthanolique de DPPH ait été réalisé. Les résultats sont exprimés en termes de CI_{50} , concentration permettant d'inhiber 50% du signal de référence. Le signal de référence est la mesure du signal obtenu lors du mélange de la solution de DPPH et du solvant dans lequel les extraits et le produit pur ont été solubilisés (ici, l'eau distillée).

Le second test consiste à déterminer la teneur en composés phénoliques des extraits butanoliques de plantes. Cette mesure a été effectuée par la méthode de Folin-Ciocalteu. Les valeurs mesurées sont exprimées en g/100g d'extraits et sont déterminées par rapport à un composé de référence, le pyrogallol.

III.1.1. Tests d'activité antioxydante

III.1.1.1. Inhibition du radical DPPH

Nous avons déterminé la CI_{50} de ces extraits et le produit pur R141-151. D'une part, nous pourrions ainsi comparer leurs activités avec les molécules de référence, quercétine et vitamine E. D'autre part, nous allons essayer d'établir une relation entre l'activité antioxydante et le taux de composés phénoliques.

Les valeurs des CI_{50} sont présentées dans le tableau III.1. Les CI_{50} de la quercétine, et de la vitamine E, sur le test DPPH, sont également données sur ce tableau.

Tableau III.1. CI_{50} des extraits butanolique et le produit pur pour le test antioxydant

	CI_{50} DPPH (μg/ml)
Extrait butanolique de <i>Stachys mialhesi</i> de Noé. (EBSM)	47.9 \pm 4.8
Extrait butanolique de <i>Stachys circinnata</i> l'Her. (EBSC)	71 \pm 5
Le composé pur R141-151	66 \pm 0.002
Quercétine	12
Vitamine E	25

L'EBSM est le plus efficace sur le radical DPPH (47.9 μ g/ml) (Figure III.1), il n'est que légèrement moins (2 fois) actif que la vitamine E (CI_{50} = 25) et quatre fois moins actif que la quercétine (CI_{50} = 12 μ g/ml) sur le radical DPPH. Il est suivi par le produit pur (Isoscutellareine-7-*O*-(6'''-*O*-acétyl- β -D-allosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucoside) (66 μ g/ml) (Figure III.2) et finalement par l'EBSC (71 μ g/ml) (Figure III.3).

Pour ce test, des composés de référence comme, la vitamine E ou la quercétine ont une CI_{50} de 0,025 mg/ml et 0,012 mg/ml respectivement.

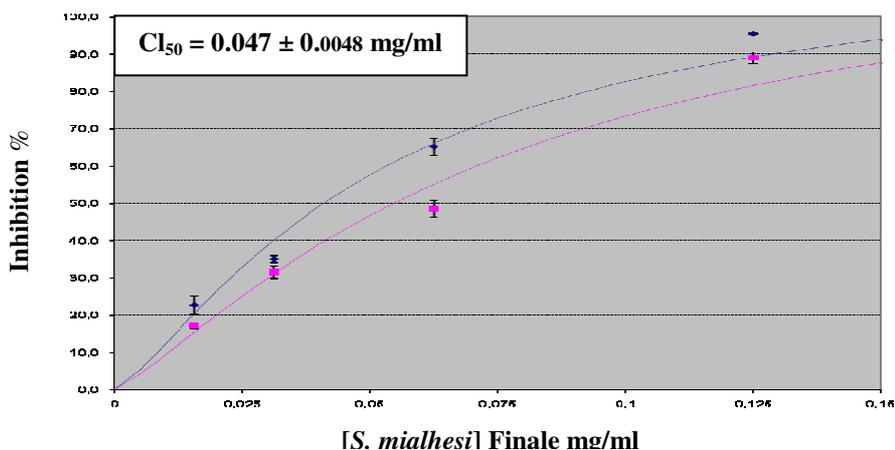


Figure III.1. Effet inhibiteur d'EBSM sur le radical DPPH.

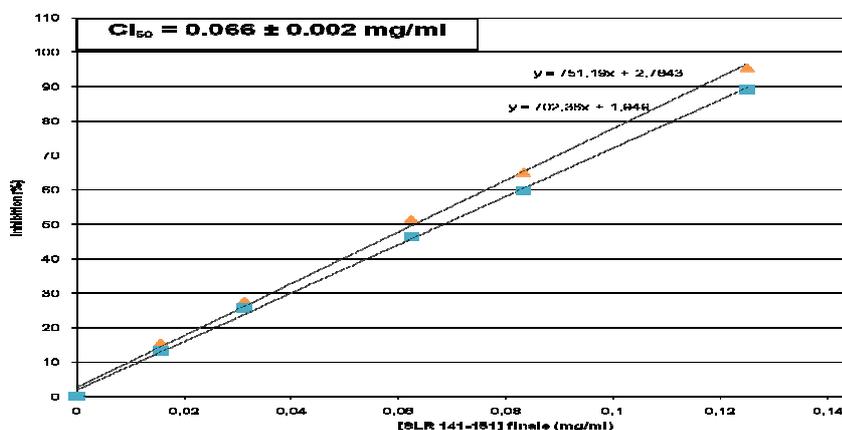


Figure III.2. Effet inhibiteur de produit pur R1416151 sur le radical DPPH.

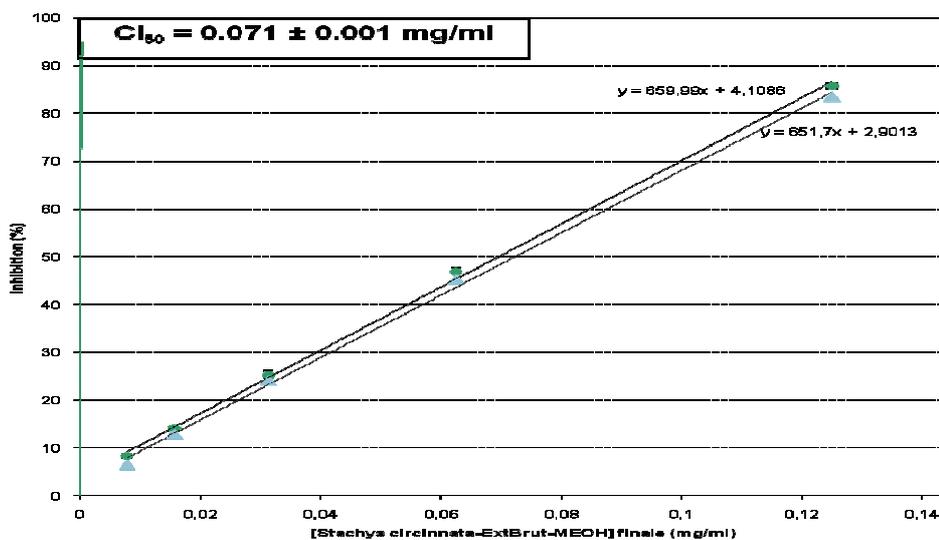


Figure III.3. Effet inhibiteur d'EBSC sur le radical DPPH.

III.1.2. Détermination du contenu des extraits en composés phénoliques

Ce taux a été déterminé par la méthode de Folin-Ciocalteu, en utilisant comme standard le pyrogallol.

Les résultats de ces mesures sont répertoriés dans le tableau III.2.

Tableau III.2. Taux de composés phénoliques des extraits butanoliques de deux plantes étudiées.

Extrait	Composés Phénoliques (g/100g équiv.Pyrogallol)
EBSM	17.9 ± 0.1
EBSC	14.5 ± 0.1

Le tableau III.2 nous montre la quantité de composés phénoliques des extraits. Ce taux varie de 14.5 à 17.9 g/100g (*Stachys circinnata* l'Her. et *Stachys mialhesi* de Noé, respectivement). Ces taux confirment la relation entre le taux de composés phénoliques et l'activité antioxydante des extraits. L'activité est inversement proportionnelle à la CI₅₀.

L'activité antioxydante des extraits de plantes est généralement attribuée à la présence de composés phénoliques. L'EBSM est le plus actif. L'activité antioxydante de ces extraits est bien due principalement aux composés phénoliques puisque, lorsque l'on regarde leur composition en composés phénoliques totaux, nous pouvons constater qu'ils sont principalement concentrés dans ces deux extraits.

III.1.3. Discussion des résultats

Pour cette étude, nous avons émis l'hypothèse que les plantes étudiées pouvaient être une source potentielle d'antioxydants naturels. Les résultats observés lors des tests antioxydants ont confirmé cette hypothèse. Nous avons observé que ces extraits et le flavonoïde sont capables d'inhiber le radical stable DPPH. Les plus efficaces d'entre eux présentent une activité très proche, à certains antioxydants de référence tels que la vitamine E ou la quercétine.

Nous avons aussi émis l'hypothèse que cette activité antioxydante était due à la présence de composés phénoliques. Nous avons confirmé la présence de ces composés dans ces extraits (Tableau III.2). Le contenu en composés phénoliques totaux varie de 14.5 pour l'EBSC à 17.9 g/100g pour celui de *Stachys mialhesi* de Noé.

Les polyphénols sont un groupe important de composés pharmacologiquement actifs. Possédant une activité antioxydante (Bors *et al.*, 2001).

D'une manière générale, ces résultats sont en accord avec ce que rapporte la littérature, par la méthode R.P.E. L'extrait méthanolique de *S. officinalis* montre un grand effet scavenger du radical DPPH plus actif que les molécules de référence avec une CI_{50} (3.00 $\mu\text{g/ml}$) et un taux de polyphénol de 132 ± 10 (Matkowski et Piotrowska., 2006).

Les travaux de Vundac et Coll. montrent bien la relation entre l'activité antioxydante et les différents produits et la relation entre CI_{50} et le taux de polyphénols (Tableau III.3).

Tableau III.3. Taux de polyphénols et détermination de la CI_{50} de *Stachys* sp (Vundac et al., 2007).

	MeOH	EtOH	CH ₂ Cl ₂	Polyphénols
<i>S. alpina</i>	5.20 \pm 0.1	46.6 \pm 0.1	112 \pm 0.5	5.74 \pm 0.17
<i>S. officinalis</i>	10.6 \pm 0.2	13.8 \pm 0.1	387 \pm 0.3	6.75 \pm 0.20
<i>S. palustris</i>	2.67 \pm 0.03	5.42 \pm 0.29	168 \pm 0.5	10.8 \pm 0.32
<i>S. recta subsp. recta</i>	1.96 \pm 0.86	6.37 \pm 0.68	212 \pm 0.5	13.8 \pm 0.41
<i>S. recta subsp. subcrenata</i>	5.97 \pm 92	23.0 \pm 0.6	142 \pm 0.9	6.65 \pm 0.20
<i>S. salvifolia</i>	10.7 \pm 0.23	9.87 \pm 0.08	680 \pm 0.4	6.75 \pm 0.20
<i>S. sylvatica</i>	16.1 \pm 0.4	21.9 \pm 0.1	172 \pm 0.3	3.37 \pm 0.10

Le tableau III.3 nous montre que les extraits polaires ont manifesté une activité plus forte que celle des extraits non polaires. L'extrait méthanolique est le plus efficace pour l'inhibition du radical DPPH. Les valeurs de CI_{50} de *S. recta subsp. recta* (1.96 $\mu\text{g/ml}$) et *S. palustris* (2.67 $\mu\text{g/ml}$) de la phase methanolique sont supérieures à celle de la référence (rutine, 3.01 $\mu\text{g/ml}$). Les extraits éthanolique sont légèrement moins efficaces, comparés aux extraits méthanolique, avec CI_{50} varies de 5.42 $\mu\text{g/ml}$ (*S. palustris*) à 46.6 $\mu\text{g/ml}$ (*S. alpina*). Les extraits dichloromethane ont manifesté l'activité antioxydante la plus faible, avec des valeurs d' IC_{50} qui varient de 112 $\mu\text{g/ml}$ (*S. alpina*) à 680 $\mu\text{g/ml}$ (*S. salvifolia*) (Vundac et al., 2007).

Ainsi Vundac et Coll. confirment qu'il y a une relation inversement proportionnelle entre le taux de polyphénols et la CI_{50} .

III.2. Détermination de l'activité antibactérienne

III.2.1. Résultats de l'antibiogramme

Après 24^h d'incubation à 37°C, on a récupéré les boîtes et on a mesuré les diamètres des zones d'inhibition par additions des extraits butanoliques de *S. mialhesi* de Noé. et *S. circinnata* l'Her. sur les différentes souches bactériennes testées, les résultats obtenus sont dressés dans les tableaux III.4 et III.5.

Tableau III.4. Zones d'inhibition en mm en présence de l'extrait butanolique de *S. mialhesi* de Noé.

Souches bactériennes	Diamètres en mm/[] µg/ml			
	128	64	32	16
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	10	10	10	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	12	12	10	10
<i>Escherichia coli</i>	10	10	08	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	10	08	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	18	14	10	10
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	08	08	08

Tableau III.5. Zones d'inhibition en mm en présence de l'extrait butanolique de *S. circinnata* l'Her.

Souches bactériennes	Diamètres en mm/[] µg/ml			
	128	64	32	16
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	10	08	08	08
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	10	10	10	10
<i>Escherichia coli</i>	12	10	10	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12	12	10	08
<i>Staphylococcus aureus</i>	20	14	14	12
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	10	08	-

III.2.2. Détermination de la CMI (Concentration minimale inhibitrice)

Les résultats de la CMI des l'extraits butanoliques de *S. mialhesi* de Noé. et *S. circinnata* l'Her. figurent dans le tableau III.6 et III.7, respectivement.

Tableau III.6. CMI en ($\mu\text{g/ml}$) de l'extrait butanolique de *S. mialhesi* de Noé.

Souches bactériennes	CMI en ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	128
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	128
<i>Escherichia coli</i>	> 256
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	> 256
<i>Staphylococcus aureus</i>	64
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	256

Tableau III.7. CMI en ($\mu\text{g/ml}$) de l'extrait butanolique de *S. circinnata* l'Her.

Souches bactériennes	CMI en ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	256
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	128
<i>Escherichia coli</i>	64
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	64
<i>Staphylococcus aureus</i>	32
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	> 256

NB :

- Pour chaque souche testée la CMI est déterminée trois fois pour nous assurer que les résultats sont reproductibles.
- La CMI peut être déterminée soit en milieu solide soit en milieu liquide. Nous avons choisi la première méthode parce qu'elle est plus facile à réaliser.

III.2.3. Discussion des résultats

Nous avons réalisé un antibiogramme et déterminé la CMI des extraits butanoliques des espèces *S. mialhesi* de Noé. et *S. circinnata* l'Her. vis-à-vis de plusieurs souches (souches de références et germes isolés à partir de prélèvements pathologiques).

Quelque soit la souche bactérienne et/ou la nature (origine) des germes utilisées dans ce travail, concernant l'étude de l'effet antibactérienne des extraits butanoliques, les présents résultats indiquent la présence d'une action antibactérienne faible.

L'étude de l'activité antibactérienne de l'extrait butanolique de *S. mialhesi* de Noé. et *S. circinnata* l'Her., sur différents germes (Gram (+) et (Gram (-)) par la méthode de l'antibiogramme donne des diamètres qui varient en fonction de la souche testée. Nous constatons des valeurs importantes de diamètres d'inhibition qui expriment une action inhibitrice maximale sensiblement augmentée surtout pour les cocci Gram (+) : *Staphylococcus aureus* avec une zone d'inhibition de 20 et 18 mm respectivement, et les bacilles Gram (-) surtout : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* avec une inhibition moyenne de 12mm.

Pour le reste des souches testées, on constate une action inhibitrice très faible par rapport aux autres, ceci traduit probablement une sensibilité relativement différente des bactéries et/ou par la présence d'une activité antibactérienne éventuellement sélective de nos extraits.

Dans la deuxième partie de notre travail, nous avons déterminé les concentrations minimales inhibitrices chez les différentes souches bactériennes utilisées. Les résultats obtenus révèlent la présence de deux groupes ou deux niveaux de réponse ; un premier groupe sensible *Staphylococcus aureus* aux doses relativement fortes de l'ordre de 32 à 64 µg/ml chez *S. mialhesi* de Noé. et *S. circinnata* l'Her. respectivement, et un deuxième groupe qui a été déterminé comme des résistants de nos extraits.

D'une manière générale, ces résultats sont en accord avec ce que rapporte la littérature, l'extrait éthanolique de *S. byzantina* K. Koch ne possède pas une activité anti-*Candida* (levure) c'est-à-dire une activité anti fongique (Teixeira Duarte *et al.*, 2005), mais l'extrait aqueux 70% méthanol de *S. alopecuros* possède une activité anti *Helicobacter pylori* (Stamatis *et al.*, 2003).

III.3. Détermination des activités antalgique, anti-inflammatoire et antiulcéreuse de l'extrait butanolique de *S. mialhesi*

III.3.1. Toxicité Aiguë

Après administration par gavage de l'extrait *n*-butanolique de *S. mialhesi* de Noé. (EBSM) aux différents lots de souris à des concentrations variables (de 1000 à 10000mg/kg) aucun signe clinique particulière et aucun mort n'a été détecté durant les 24^h après l'administration et l'observation pendant quinze jours.

Le tableau III.8 présente le taux de mortalité des souris en fonction de la dose administrée.

Tableau III.8. Mortalité des souris en fonction de la dose administrée

Différents lots	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nombre de souris	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Dose administrée (mg/kg)	1000	2000	3000	4000	5000	6000	7000	8000	9000	10000
Nombre de morts	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

L'absence de souris mortes et de signes cliniques durant les 24^h après l'administration et durant les quinze jours d'observation, indique que l'extrait butanolique administré par voie orale est dépourvu de toxicité aiguë chez les différents lots de souris. Cette absence de toxicité aiguë observée avec l'extrait *n*-butanolique de *S. mialhesi* de Noé, est aussi observée avec d'autres plantes de la pharmacopée traditionnelle iranienne telle que *S. byzanthina* C. Koch. (Khanavi *et al.*, 2005) et *S. inflata* (Maliki *et al.*, 2001).

III.3.2. L'activité antalgique

L'extrait butanolique de *S. mialhesi* de Noé, a présenté un effet protecteur vis-à-vis de la douleur provoquée par l'acide acétique. L'extrait butanolique de plantes étudiées a donné la meilleure protection contre la douleur chimique avec un résultat significatif avec $P < 0,05$ (Tableau III.9). Les pourcentages d'inhibition sont dépendants de la dose et sont de 58.22% et 77.11% pour la dose 5000 et 10000 (mg/kg) respectivement. L'acide acétylsalicylique à la dose de 200 mg/kg inhibe la douleur de 72.99%.

Ainsi, les résultats obtenus de l'effet analgésique du BESM ont révélé l'existence d'une propriété analgésique périphérique (Lee *et al.*, 1994).

Tableau III.9. Activité analgésique de l'EBSM vis à vis de la douleur provoquée par l'acide acétique.

Lots	Dose (mg/Kg)	le nombre de torsions ^b X ± DS	% Inhibition
Contrôle	-	24.33 ^a ± 1.86	-
Acide Acétylsalicylique	200	6.57* ± 0.87	72.99
EBSM	5000	10.17* ^a ± 0.87	58.22
EBSM	10000	5.57* ± 1.23	77.11

* Différence significative entre l'EBSM et l'acide acétylsalicylique (200mg/Kg) à $p < 0.05$.

^a Différence significative entre l'EBSM et le contrôle à $p < 0.05$.

^b Chaque valeur représente la moyenne (le nombre de torsions) ± DS du nombre d'animaux dans chaque groupe (n = 6).

III.3.3. Effets de l'EBSM sur l'inhibition de l'œdème de la patte des rats à la carraghénine

Pour le test de l'activité anti-inflammatoire, le volume de l'œdème augmente avec le temps, cette augmentation est plus importante chez le lot traité par l'eau que chez les lots traités avec l'extrait de plante et l'indométacine (Tableau III.10).

L'EBSM administré par voie intra-gastrique, une heure avant l'injection de la carraghénine, réduit l'œdème à la 4^{ème} heure. Ces résultats sont significatifs par rapport au lot témoin ($P < 0,05$). Les pourcentages d'inhibition à la quatrième heure après la carraghénine sont de 52.03% pour EBSM, dans les mêmes conditions, l'indométacine à la dose de 5mg/kg à un pourcentage d'inhibition de 83,36 % à la 4^{ème} heure (Tableau III.10). L'activité élevée de l'indométacine s'explique par le fait que c'est une molécule pure contrairement à l'EBSM. Cependant, l'activité anti-inflammatoire de l'EBSM peut s'expliquer en partie par la présence des composés polyphénoliques comme les tanins et les flavonoïdes dont la présence a été révélée par le dosage des polyphénols et par la chromatographie sur couche mince (Bruneton, 1993).

Tableau III.10. Activité anti-inflammatoire de l'EBSM: Pourcentage d'inhibition de l'œdème.

Lots	Dose (mg/Kg)	% d'augmentation du volume ^b des pattes (g) X ± DS	% d'inhibition de l'œdème
Contrôle	-	71.94 ^a ± 3.28	-
Indométacine	5	11.97* ± 3.23	83.36
EBSM	5000	34.51 ^{*a} ± 4.41	52.03

* Différence significative entre l'indométacine et l'EBSM à $p < 0.05$.

^a Différence significative entre l'EBSM et le contrôle à $p < 0.05$.

^b Chaque valeur représente la moyenne (% d'augmentation du volume) ± DS du nombre d'animaux dans chaque groupe (n = 6)

III.3.4. Activité d'antiulcéreuse

L'extrait testé administré à la dose de 5000mg/kg (masse corporelle) montre l'absence d'ulcérrogénicité comparé à l'indométhacin (5mg/kg masse corporelle) utilisé comme le médicament de référence (Makhlouf *et al.*, 2002).

III.3.5. Discussion des résultats

Pour l'évaluation des activités pharmacologiques de l'EBSM, nous avons passé en revue la littérature scientifique existante sur le genre. Des études phytochimiques, ont été effectuées sur les différentes parties des plantes: Les études phytochimiques sur le genre de *Stachys* ont montré la présence de différentes classes de composés naturelles comme les flavonoïdes (El-Ansari *et al.*, 1995), diterpènes (Paternostro *et al.*, 2000; Fazio *et al.*, 1994), triterpènes et stéroïdes (Ross et Zinchenko, 1975), phényléthanoïdes glycosides (Nishimura *et al.*, 1991; Miyase *et al.*, 1996) et saponines (Yamamoto *et al.*, 1994).

Pour ce qui est des résultats de nos travaux expérimentaux, l'EBSM exerce un effet protecteur vis-à-vis de la douleur provoquée par l'acide acétique. Les effets analgésiques obtenus concordent avec ceux d'autres auteurs et comparables à ceux de l'acide acétylsalicylique testé dans les mêmes conditions (Khanavi *et al.*, 2005).

L'injection de la carraghénine dans la patte de rat provoque une douleur locale et aiguë réaction inflammatoire, qui est une méthode appropriée pour évaluer les agents anti-inflammatoires (Winter *et al.*, 1962).

L'œdème provoqué par la carraghénine dans la patte de rat comporte trois phases distinctes: une première phase qui fait intervenir l'histamine et la 5-hydroxytryptamine bradykinins et des produits cyclooxygénase qui favorisent la vasodilatation, la transsudation plasmatique et l'œdème (Dawson *et al.*, 1991, Salvemini *et al.*, 1996, Boughton-Smith *et al.*, 1999); une seconde phase qui fait appel aux kinines comme médiateurs augmentent la perméabilité vasculaire et une troisième phase dont le médiateur est supposé être la prostaglandine (Lindsey *et al.*, 1999) associée à la migration leucocytaire dans la zone enflammée. Les prostaglandines interviennent dans les processus inflammatoires aigus ou chroniques. Les médicaments anti-inflammatoires interviennent en général en s'opposant à l'effet de ces médiateurs chimiques : histamine, sérotonine, kinines et prostaglandines. Les propriétés antalgiques et anti-inflammatoires d'EBSM peuvent être justifiées par la présence de certains de ces constituants solubles dans l'eau.

Nos résultats concordent avec ceux déjà trouvés par d'autres auteurs sur les extraits de plantes du genre *Stachys*.

Les résultats obtenus à l'issue des tests anti-inflammatoires montrent que l'extrait méthanolique de la partie aérienne de *S. inflata*, l'extrait acétone et méthanolique des parties aériennes de *S. byzantina* C. Koch, réduisent de façon appréciable l'œdème induit par la carraghénine. Ces extraits possédant un effet antinociceptif (Khanavi *et al.*, 2005 ; Maliki *et al.*, 2001).

Les phényléthanoïdes glycosides, triterpènes et flavonoïdes sont considérés comme des composés actifs responsables des activités biologiques du genre *Stachys* (Zinchenko, 1970; EL-Ansari *et al.*, 1991; Yamamoto *et al.*, 1994; Miyase *et al.*, 1996). Cependant, l'effet anti-inflammatoire du genre *Stachys*, n'a pas été assez investigué. Il a été trouvé que acteoside, un phényléthanoïde glycoside isolé de *Stachys sieboldii*, montre un effet suppressif sur l'accumulation de leucocytes dans le glomérule néphrétique par la prévention de l'uprégulation de molécules d'adhésion (Hayashi *et al.*, 1994). La non-conformité entre l'effet inhibiteur des basses doses et l'inefficacité de la plus haute dose de l'extrait pourrait expliquer par cette hypothèse qu'un peu de constituants actifs de *Stachys mialhesi* de Noé. à de hautes concentrations peut exercer une activité pro-inflammatoire.

Il est aussi probable que les composants de l'extrait peuvent posséder des propriétés anti et pro-inflammatoire (Maleki *et al.*, 2001). Les résultats présentés dans cette étude devraient être pris comme une base pour la nouvelle enquête sur le mode exact d'action des constituants individuels de l'extrait.

III.4. Conclusion

Le test antioxydant nous a permis de conclure que les extraits butanoliques de *S. mialhesi* de Noé. et *S. circinnata* l'Her. sont actifs sur le radical DPPH. L'EBSM, plus riche en substance anti-radicalaire que isoscutellareine-7-O-(6'''-O-acétyl-β-D-allosyl-(1→2)-β-D-glucoside et l'EBSC, a manifesté une meilleure activité antioxydante.

En ce qui concerne l'activité antibactérienne, il apparaît que les extraits butanoliques de *S. mialhesi* de Noé. et *S. circinnata* l'Her. possèdent des propriétés antibactériennes acceptables.

Les résultats obtenus indiquent que l'EBSM inhibe la douleur provoquée par l'acide acétique chez la souris et réduit l'œdème provoqué dans la patte de rat sans provoquer d'ulcère chez les rats.

Références bibliographiques

- Bors, W., Michel, C., Stettmaier, K. 2001. Structure-activity relationships governing antioxidant capacities of plant polyphenols. *Methods in Enzymologie*, 335, 166-180.
- Boughton-Smith, N.K., Deakin, A.M., Follenfant, R.L., Whittle, B.J.R., Coarland, L.G. 1999. Role of oxygen radicals and arachidonic acid metabolites in the reverse passive arthus reaction and carrageenin paw oedema in the rat. *British J. Pharm.*, 110, 896-902.
- Bruneton, J. 1993. *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*, (2^{ème} éd). Technique et documentation Lavoisier, Paris, 914.
- Dawson, J., Sedgwick, A.D, Edwards, J.C, Lees, P.A. 1991. Comparative study of the cellular, exudative and histological responses to carrageenan, dextran and zymosan in the mouse. *Int. J. Tissue. React.*, 13, 171-185.
- EL-Ansari, M.A., Barron, D., Abdalla, M.F., Saleh, N.A.M., LE Quere, J.L. 1991. Flavonoid constituents of *Stachys aegyptica*. *Phytochemistry*, 30(4), 1169-1173.
- El-Ansari, M.A., Nawwar, M.A., Saleh, N.A.M. 1995. Stachysetin, a diapigenin-7-glucoside-*p*, *p'*-dihydroxytruxinate from *Stachys aegyptiaca*. *Phytochemistry*, 40(5), 1543-1548.
- Fazio, C., Passannanti, S., Paternostro, M.P., Arnold, N. 1994. Diterpenoids from *Stachys mucronata*. *Planta Med.*, 60(5), 499.
- Hayashi, K., Nagamatsu, T., Ito, M., Hattori, T., Suzuki, Y. 1994. Acteoside, a component of *Stachys sieboldii* MIQ, may be a promising antinephritic agent (1): effect of acteoside on crescentic-type anti-GBM nephritis in rats. *Japanese J. Pharm.*, 65(2), 143-51.
- Khanavi, M., Sharifzadeh, M., Hadjiakhoondi, A., Shafiee, A. 2005. Phytochemical investigation and anti-inflammatory activity of aerial parts of *Stachys byzanthina* C. Koch. *J. Ethnopharm.*, 97(3), 463-468.
- Lee, S.J., Back, H.J., Lee, C.H., Kim, H.P. 1994. Anti-inflammatory activity of isoflavonoids from *Pueraria radisc* and biochanin- A derivatives. *Arch. Pharm. Res.* (Seoul), 17, 31-35.
- Lindsey, K., Jager, A.K, Raidoo, D.M, Van Staden 1. 1999. Screening of plants used by South African traditional healers in the treatment of dysmenorrhoea for prostaglandin synthesis inhibitors and uterine relaxing activity. *J. Ethnopharm.*, 64(1), 9-14.
- Makhlouf, A.A, Maklad, Y.A, Ahmed, A.E. 2002. Synthesis and analgesic-anti-inflammatory activities of some 1, 2, 4-triazine derivatives. *New Egypt. J. Med.*, 26, 213.
- Maleki, N., Garjani, A., Nazemiyeh, H., Nilfouroushan, N., Eftekhari Sadat, A.T., Allameh, Z., Hasannia, N. 2001. Potent anti-inflammatory activities of hydroalcoholic extract from aerial parts of *Stachys inflata* on rats. *J. Ethnopharm.*, 75(2-3), 213-218.

- Matkowski, A., Piotrowska, M. 2006. Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae. *Fitoterapia*, 77, 346–353.
- Miyase, T., Yamamoto, R., Ueno, A. 1996. phenylethanoid glycosides from *stachys officinalis*. *Phytochemistry*, 43(2), 475–479.
- Nishimura, H.N., Sasaki, N.H., Inagaki, N., Chin, M., Mitsuhashi, H. 1991. Nine phenethyl alcohol glycosides from *Stachys sieboldii*. *Phytochemistry*, 30(3), 965–969.
- Paternostro, M.P., Maggio, A.M., Piozzi, F., Servettaz, O. 2000. Labdane diterpenes from *Stachys plumosa*. *J. Nat. Prod.*, 63(8), 1166–1167.
- Ross, S.A., Zinchenko, T.V. 1975. Triterpenoids and steroids from *Stachys palustris*. *Farm. Zh.*, 30(3), 91–92.
- Salvemini, D., Wang, Z.Q., Wyatt, D.M., Bourdon, M.H., Marino, P.T., Currie, MG. 1996. Nitric oxide: A key mediator in the early and late phase and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *British J. Pharma.*, 118, 829–838.
- Stamatis, G., Kyriazopoulos, P., Golegou, S., Basayiannis, A., Skaltsas, S., Skaltsa, H. 2003. In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of Greek herbal medicines. *J. Ethnopharm.*, 88(2-3), 175–179.
- Teixeira Duarte, M.C., Figueria, G.M., Sartoratto, A., Garcia Rehder, V.L., Delarmelina, C. 2005. Anti-*Candida* activity of brazilian medicinal plants, *J. Ethnopharm.*, 97, 305–311.
- Vundac, V.B., Brantner, A.H., Plazibat, M. 2007. Content of polyphenolic constituents and antioxidant activity of some *Stachys* taxa. *Food Chem.*, 104, 1277–1281.
- Winter, C.A, Ristey, E.A, Nuss, G.W. 1962. Carrageenan-induced oedema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 111, 544–547.
- Yamamoto, R., Miyase, T., Ueno, A. 1994. Stachysaponins I–VIII, new oleanane-type triterpene saponins from *Stachys riederi*. *Chem. Pharm. Bull.*, 42(6), 1291–1296.
- Zinchenko, T.V. 1970. Flavonoid glycosides of *Stachys neglecta*. *Fármatsévtichnii Zhurnal*. 25(4), 81–82.

Conclusion générale

L'étude, que nous avons présentée dans cette thèse, portée sur l'investigation chimique et biologique des parties aériennes et racines de deux plantes algériennes *Stachys mialhesi* de Noé. et *Stachys circinnata* l'Her., plantes endémique, ainsi que l'analyse par GC/MS de l'huile essentielle de *Stachys circinnata* l'Her. Ces deux espèces, appartiennent au genre *Stachys* (Lamiaceae) dont un grand nombre sont utilisées en médecine traditionnelle. D'après la recherche bibliographique exhaustive, cette investigation est considérée comme la première étude chimique entreprise sur ces deux plantes.

Cette étude réalisée sur les extraits butanoliques des deux espèces *S. mialhesi* de Noé. et *S. circinnata* l'Her., la phase dichlorométhane de *S. circinnata* l'Her. et sur les racines de *S. mialhesi* de Noé., a permis d'isoler vingt produits appartenant à cinq classes de métabolites secondaires :

- Flavonoïdes
- Diterpènes
- Triterpènes
- Stérols
- Phénylpropanoïdes.

Les structures des produits isolés ont été établies par les méthodes d'analyses spectroscopiques RMN 1D ^1H et ^{13}C , RMN 2D (COSY H-H, HSQC, HMBC et ROESY), spectrométrie de masse à haute résolution HR-ESI-MS et HR-EI-MS, spectroscopies IR et UV, par comparaison avec les données de la littérature.

L'étude phytochimique menée sur les parties aérienne de l'espèce *S. mialhesi* de Noé. a permis l'obtention de trois produits purs :

Deux flavonoïdes

- **isoscutellareine-7-O-(6'''-O-acétyl- β -D-allosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucoside**
- **apigénine-7- β -D-(6''-E-p-coumaroyl)-glucoside**

Un diterpène isolé pour la 1^{ère} fois du genre :

- **l'horminone**

L'étude phytochimique portée sur les parties aérienne de l'espèce *S. circinnata* l'Her. nous a permis d'isoler et identifier quinze produits purs :

Sept flavonoïdes :

- **lutéoline**
- **lutéoline-7-O- β -glucoside**
- **apigénine-7-O- β -glucoside**
- **isorhamnetine-3-O- β -glucoside**
- **narcissine**
- **chrysoériol-7-O- β -glucoside**
- **isoscutellareine-7-O- β -D-allosyl-(1 \rightarrow 2)-glucoside**

Un phénylpropanoïde

- **le verbascoside**

Un acide phénolique isolé pour la 1^{ère} fois du genre :

- **le rosmarinate de méthyle**

Deux stérols

- **β-sitostérol**
- **stigmastérol**

Quatre triterpènes (les deux premiers produits sont isolés pour la première fois du genre *Stachys*)

- **l'acide bétulinique**
- **le taraxastérol**
- **l'acide oléanolique**
- **l'acide ursolique**

Nos travaux d'extraction continue au Soxhlet, dans l'acétone à reflux, des racines de l'espèce *S. mialhesi* de Noé., nous ont permis d'isoler et d'identifier quatre produits :

Deux stérols

- **β-sitostérol**
- **stigmastérol**

Deux lignanes

- **(+)-Sésamine**, isolé pour la 1^{ère} fois du genre *Stachys*.
- **(±)-Paulownine**, isolé pour la deuxième fois du règne végétal.

L'analyse GC et GC/MS de l'huile essentielle de l'espèce endémique *Stachys circinnata* d'Her. a montré que l'huile est majoritairement composée de : **globulol** (40.3 %), **α-cadinol** (16.2 %), **spathuléol** (12.7 %) et **T-muurolol** (6.3 %). Ces pourcentages n'ont jamais été observés dans une huile essentielle du genre *Stachys*.

Les extraits butanoliques des deux espèces étudiées ont manifesté une excellente activité antioxydante et une activité antibactérienne acceptable. En outre, la phase butanolique de *Stachys mialhesi* de Noé. a montré une bonne activité anti-inflammatoire, antalgique et antiulcéreuse.

RESUME

14 espèces du genre *Stachys* sont distribuées en Algérie ; 4 d'entre elles sont endémiques, nos travaux ont concerné les espèces endémiques *Stachys mialhesi* de Noé. et *Stachys circinnata* l'Her.

L'étude phytochimique des parties aériennes de l'espèce endémique *Stachys mialhesi* de Noé. a permis, après des séparations successifs sur différents supports chromatographiques, d'isoler et d'identifier trois composés :

- deux flavonoïdes : **isoscutellareine-7-O-(6'''-O-acétyl-β-D-allosyl-(1 → 2)-β-D-glucoside** et **apigénine-7-β-D-(6''-E-p-coumaroyl)-glucoside**.
- un diterpène isolé pour la 1^{ère} fois du genre : **l'horminone**.

Le traitement analogue des parties aériennes de l'espèce endémique *Stachys circinnata* l'Her. a conduit à la séparation et à l'identification de :

- sept flavonoïdes : **lutéoline**, **lutéoline-7-O-β-glucoside**, **apigénine-7-O-β-glucoside**, **isorhamnétine-3-O-β-glucoside**, **narcissine**, **chrysoériol-7-O-β-glucoside**, **isoscutellareine-7-O-β-D-allosyl-(1→2)-glucoside**.
- un phénylpropanoïde : **le verbascoside**.
- un acide phénolique isolé pour la 1^{ère} fois du genre : **le rosmarinate de méthyle**.
- deux stérols : le **β-sitostérol** et le **stigmastérol**.
- quatre triterpènes : **l'acide bétulinique**, **le taraxastérol** sont isolés pour la première fois du genre *Stachys* en plus de **l'acide oléanolique** et **l'acide ursolique** qui ont été rapportés pour le genre.

Nos travaux d'extraction des racines de l'espèce *Stachys mialhesi* de Noé, suivie de séparations chromatographiques (CC, CCM), nous ont permis d'isoler et d'identifier quatre produits :

- deux stérols : le **β-sitostérol** et le **stigmastérol**.
- deux lignanes : le **(+)-Sésamine**, isolé pour la 1^{ère} fois du genre et le **(±)-Paulownine**, isolé pour la deuxième fois du règne végétal.

L'analyse GC et GC/MS de l'huile essentielle de l'espèce endémique *Stachys circinnata* l'Her. a montré que celle-ci est majoritairement composée de : **globulol** (40.3 %), **α-cadinol** (16.2 %), **spathuléol** (12.7 %) et **T-muurolol** (6.3 %). Ces pourcentages n'ont jamais été observés dans une huile essentielle du genre *Stachys*.

Les extraits butanoliques des deux espèces étudiées ont manifesté une excellente activité antioxydante et une activité antibactérienne acceptable. En outre, la phase butanolique de *Stachys mialhesi* de Noé a montré une bonne activité anti-inflammatoire, antalgique et antiulcéreuse.

Mots clés: *Stachys*; flavonoïdes; terpènes; lignanes; activité biologique; huile essentielle.

ABSTRACT

In Algeria, there are 14 *Stachys* species from which 4 are endemic. Our works have concerned endemic species namely, *Stachys mialhesi* de Noé. and *Stachys circinnata* I'Her.

The phytochemical study of the aerial parts of the endemic species *Stachys mialhesi* de Noé allowed, after successive separation on various chromatographic supports, the isolation and identification of three compounds:

- two flavonoïds : **isoscuteallarein-7-O-(6'''-O-acetyl- β -D-allosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucoside** and **apigenin-7- β -D-(6''-E-p-coumaroyl)-glucoside**.
- one diterpenoid, isolated for the first time from *Stachys* genus: **horminone**.

The analogue treatments of the aerial parts of the endemic species *Stachys circinnata* I'Her. led to the separation and identification of :

- seven flavonoïds : **luteolin**, **luteolin-7-O- β -glucoside**, **apigenin-7-O- β -glucoside**, **isorhamnetin-3-O- β -glucoside**, **Narcissin**, **Chrysoeriol-7-O- β -glucoside**, **isoscuteallarein-7-O- β -D-allosyl-(1 \rightarrow 2)-glucoside**.
- one phenylpropanoïd : **verbascoside**.
- one phenolic acid isolated for the first time from the *Stachys* genus: **Methyl rosmarinate**.
- two sterols: **β -sitosterol** and **stigmasterol**.
- four triterpenoid : **betulinic acid**, **taraxasterol**, isolated for the first time from *Stachys* besides **oleanolic acid** and **ursolic acid**, previously reported from the genus.

The extraction of the roots of *Stachys mialhesi* de Noé, followed by chromatographic separations (CC, TLC) permitted the identification of four compounds:

- two sterols: **β -sitosterol** and **stigmasterol**.
- two lignans: **(+)-Sesamin**, isolated for the first time from the *Stachys* genus and **(\pm)-Paulownin**, isolated for the second time from a natural source.

GC and GC/MS analysis of the essential oil of the endemic species *Stachys circinnata* I'Her. showed that the oil is mainly represented with: **globulol** (40.3 %), **α -cadinol** (16.2 %), **spathulenol** (12.7 %) and **T-muurolol** (6.3 %). These values have never been observed in any essential oil of *Stachys*.

The butanolic extracts of the two studied species exhibited an excellent antioxidant activity and an acceptable antibacterial activity. In addition, the butanolic extract of *Stachys mialhesi* de Noé. showed a good antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic effects.

Key words: *Stachys*; flavonoids; terpenoids; lignans; biological activity; essential oil.

الملخص

يوجد في الجزائر 14 نوع من جنس *Stachys*، حيث 4 منها أصلية (مستوطنة). وقد تركزت دراستنا علي الأنواع الأصلية *Stachys mialhesi* de Noé و *Stachys circinnata* I'Her.

أدت الدراسة الفيتوكيميائية للأجزاء الهوائية للنوع *Stachys mialhesi* de Noé بعد عمليات الفصل باستخدام مختلف الطرق الكروماتوغرافية إلى عزل وتحديد البنية الجزيئية لثلاث مركبات:

- 2 فلافونويد: **isoscutellareine-7-O-(6'''-O-acétyl-β-D-allosyl-(1→2)-β-D-glucoside** و **apigénine-7-β-D-(6''-E-p-coumaroyl)-glucoside**.
- تربين ثنائي، عزل لأول مرة من الجنس *Stachys*: **horminone**.

سمحت الدراسة المماثلة للأجزاء الهوائية للنوع *Stachys circinnata* I'Her. بفصل وتحديد:

- سبعة فلافونويدات: **lutéoline, lutéoline-7-O-β-glucoside, apigénine-7-O-β-glucoside, Isorhamnetine-3-O-β-glucoside, Narcissine, Chrysoeriol-7-O-β-glucoside, isoscutellareine-7-O-β-D-allosyl-(1→2)-glucoside**.
- واحد فينيل بروبانويد: **verbascoside**.
- حمض فينولي عزل لأول مرة من الجنس *Stachys*: **le rosmarinate de méthyle**.
- ستيرولين: **β-sitostérol** و **stigmastérol**.
- أربعة تربينات ثلاثية، اثنين تعزل لأول مرة من الجنس *Stachys*: **l'acide oléanolique و l'acide ursolique, l'acide bétulinique, le taraxastérol**.

مكن استخلاص جذور *Stachys mialhesi* de Noé و الفصل الكروماتوغرافي المتتالي (عمود، طبقة رقيقة) إلى عزل و التعرف على أربعة مركبات:

- ستيرولين: **β-sitostérol** و **stigmastérol**.
- إثنين لينيان: **(+)-sésamine** يعزل لأول مرة من الجنس *Stachys*، **(±)-Paulownine** و قد بينت الدراسات البيولوجية أن هذا المركب يعزل لثاني مرة من المملكة النباتية.

بينت التحاليل باستخدام كروماتوغرافية الطور الغازي GC و كروماتوغرافيا الطور الغازي مع مطيافية الكتلة GC/MS للزيت الطيار للنبته *Stachys circinnata* I'Her، بأن الزيت الأساسي يحتوي أساسا علي المركبات التالية:

لأول مرة عند الجنس *Stachys*: **globulol (40.3 %)**، **α-cadinol (16.2 %)**، **spatulénol (12.7 %)** و **T-muurolol (6.3 %)**، هذه النسب تسجل

أظهر المستخلص البوتانولي للنبتين قيد الدراسة فعالية جيدة مضادة للأكسدة و فعالية مقبولة مضادة للبكتيريا، كما أظهر المستخلص البوتانولي للنبته *Stachys mialhesi* de Noé. فعالية جيدة مضادة للإلتهاب، مسكن للألم، مضادة للقرحة المعدية.

الكلمات المفتاحية: *Stachys*؛ فلافونويدات؛ تربينات؛ لينيان؛ فعالية بيولوجيا؛ الزيت الطيار.