

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

**UNIVERSITE DES FRERES MENTOURI-CONSTANTINE
FACULTE DES SCIENCES EXACTES
DEPARTEMENT DE CHIMIE**

N° d'ordre :
Série :

**THESE: Présentée en vue de l'obtention du diplôme du
Doctorat en Sciences**

Spécialité: Chimie organique

INTITULÉ:

**ETUDE PHYTOCHIMIQUE ET ÉVALUATION DES
ACTIVITÉS BIOLOGIQUES DES ESPÈCES : *Mentha
aquatica, Stachys guyoniana et Thymus dreatensis*
(LAMIACEAE)**

**Par
FERHAT MARIA**

Devant le jury :

Pr. Ahmed KABOUCHE	(U. des frères Mentouri-Constantine)	Président
Pr. Zahia KABOUCHE	(U. des frères Mentouri-Constantine)	Rapporteur
Pr. Salah AKKAL	(U. des frères Mentouri-Constantine)	Examineur
Pr. Amar ZELLAGUI	(U. Larbi Ben M'hidi - Oum El-Bouaghi)	Examineur
Pr Abdelmalik BELKHIRI	(U. Constantine 3)	Examineur
Dr. Nadji BOULEBDA	(U. Mohamed Chérif-Messaadia-Souk-Ahras)	Examineur

10/10/2016

Remerciements

En préambule, je souhaite rendre grâce à Dieu, le Clément et Miséricordieux de m'avoir donné la force, le courage et la patience de mener à bien ce modeste travail.

Ce travail de thèse a été réalisé entre le Laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques, Département de Chimie, Faculté des Sciences Exactes de l'Université des Frères Mentouri-Constantine, sous la direction du Professeur **Zahia KABOUCHE**.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et profonde Madame le Professeur **Zahia KABOUCHE** ma directrice de thèse pour m'avoir accueillie dans le laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques, et surtout pour la confiance qu'elle m'a accordée dans la réalisation de ce travail, sa disponibilité, ses conseils éclairés et son concours constant dans cette thèse.

Je tiens à adresser mes remerciements et exprimer ma gratitude aux membres de Jury qui ont accepté de juger ce travail malgré leurs multiples occupations :

Professeur Ahmed KABOUCHE (Université des frères Mentouri-Constantine), en qualité de président.

Professeur Salah AKKAL (Université des frères Mentouri-Constantine), en qualité d'examineur.

Professeur Ammar ZELLAGUI (Université Larbi Ben M'hidi - Oum El-Bouaghi), en qualité d'examineur.

Professeur Abdelmalik BELKHIRI (Université des frères Mentouri-Constantine), en tant qu'examineur.

Docteur Nadji BOULEBDA (Université Mohamed Chérif-Messaadia-Souk-Ahras), en qualité d'examineur.

Je tiens à remercier plus particulièrement :

Monsieur le Professeur **Hiroshi ARAYA**

Université Meiji-Japon, en m'accueillant dans son équipe, pour sa disponibilité, ses conseils, et pour m'avoir donné l'opportunité et d'avoir dirigé une partie de ce travail.

Monsieur le Professeur **Mehmet ÖZTÜRK**

Université Sitki Koçman-Turquie, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, afin de réaliser la partie biologique de ma thèse.

Je remercie mes amis de Turquie Ebru et Yunus, du Japon Naoko, Yoshiko, Higashiyama, Masahuro et Suzuna qui ont rendu cette belle aventure plus agréable. Un grand merci pour les bons moments partagés, votre bonne humeur, votre disponibilité, votre aide et soutien moral.

L'ensemble de mes collègues du laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques trouvera ici l'expression de toute ma sympathie, pour avoir su me soutenir et m'encourager au cours de ce travail.

Finalement, toute ma gratitude va à mes parents qui n'ont jamais douté de moi et qui m'ont aidée et encouragée tout au long de mes études, à mes frères et sœurs pour leur patience et leur soutien pendant la période ardue qu'est la rédaction.

A l'issue de ce travail, j'ai l'immense plaisir de remercier tous ceux qui ont permis sa réalisation dans des conditions exceptionnelles.

Cette thèse est dédiée...

À mes chers parents

À mes sœurs Radhia et Ikram

À mes frères Mohamed et Radhouane

À mon neveu Kossai

À tous mes amis et collègues

Maria

TABLE DE MATIÈRES

Introduction générale.....	2
Partie 1 : Revue Bibliographique.....	4
Chapitre 1 : Aperçu bibliographique sur le genre <i>Mentha</i>	5
1.1. Introduction.....	6
1.2. Position systématique de la famille des Lamiaceae.....	6
1.3. Présentation du genre <i>Mentha</i> et de l'espèce <i>Mentha aquatica</i> L.....	6
1.4. Utilisation en médecine traditionnelle du genre <i>Mentha</i>	7
1.5. Activités biologiques reconnues du genre <i>Mentha</i>	10
1.6. Métabolites isolés du genre <i>Mentha</i>	12
1.7. Métabolites secondaire de l'espèce <i>Mentha aquatica</i> L.....	19
Chapitre 2 : Aperçu bibliographique sur le genre <i>Stachys</i>.....	22
2.1. Introduction.....	23
2.2. Caractéristiques botanique de <i>Stachys guyoniana</i>	23
2.3. Utilisation en médecine traditionnelle du genre <i>Stachys</i> de Noé.....	23
2.4. Activités biologiques reconnues du genre <i>Stachys</i>	24
2.5. Métabolites secondaire principaux du genre <i>Stachys</i>	26
2.5.1. Flavonoïdes.....	26
2.5.2. Iridoïdes.....	27
2.5.3. Terpénoïdes.....	29
2.5.4. Triterpénoïdes.....	33
Chapitre 3 : Aperçu bibliographique sur les huiles essentielles du genre <i>Thymus</i>.....	34
3.1. Introduction	35
3.2. Caractéristiques botanique de <i>Thymus dreatensis</i> Batt.....	35
3.3. Utilisation en médecine traditionnelle du genre.....	35
3.4. Activités biologiques reconnues du genre <i>Thymus</i>	35
3.5. Travaux antérieurs sur les huiles essentielles du genre <i>Thymus</i>	36
3.5.1. Généralités sur les huiles essentielles.....	43
3.5.2. Méthodes d'extractions.....	43
3.5.2.1. L'hydrodistillation.....	43
3.5.2.2. Extraction par micro-ondes.....	44

3.5.2.3. Extraction par le gaz supercritique.....	45
3.5.2.4. Extraction assistée par ultrasons.....	45
3.5.2.5. Extraction par solvants volatils.....	46
Chapitre 4 : Activités biologiques.....	47
4. Introduction.....	48
4.1. Radicaux libres.....	48
4.2. Activité antioxydante.....	49
4.2.1. Les antioxydants	49
4.2.1.1. Les antioxydants naturels.....	49
4.2.1.2. Les antioxydants de synthèse.....	53
4.2.2. Les méthodes les plus fréquemment utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante.....	54
4.2.2.1. Méthode du DPPH'	54
4.2.2.2. Piégeage de l'ABTS ⁺	55
4.2.2.3. Méthode du CUPRAC.....	56
4.2.2.4. Chélation des ions métalliques.....	56
4.2.2.5. Blanchissement du β-carotène.....	57
4.3. Dosage des polyphénols.....	57
4.4. Screening chimique.....	57
4.5. Activité Anticholinestérase.....	57
4.6. Activité Antibactérienne.....	60
4.6.1. Technique de diffusion en milieu gélosé (antibiogramme).....	60
4.6.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	60
Partie 2 : Matériel et Méthodes.....	62
Chapitre 1 : Matériel végétal, Séparations-Extractions et analyses.....	63
1.1. Matériel végétal	63
1.1.1. Récolte de la plante <i>Mentha aquatica</i>	63
1.1.2. Récolte de la plante <i>Thymus dreatensis</i>	63
1.1.3. Récolte de la plante <i>Stachys guyoniana</i>	63
1.2. Extraction et séparation de la plante <i>Mentha aquatica</i>	63
1.2.1. Extraction	63

1.2.2. Matériel chromatographique.....	64
1.2.2.1. Chromatographie sur couche mince CCM.....	64
1.2.2.2. Chromatographie sur colonne ouverte CC.....	65
1.2.2.3. Chromatographie liquide haute performance CLHP.....	65
1.2.3. Purification	65
1.2.3.1. Fractionnement et purification de la fraction chloroforme des parties aériennes de l'espèce <i>M. aquatica</i>	65
1.2.3.2. Fractionnement et purification de la fraction Acétone des racines de l'espèce <i>M. aquatica</i>	67
1.3. Extraction de la plante <i>Stachys guyoniana</i>	70
1.4. Hydrodistillation de l'huile essentielle de <i>Thymus dreatensis</i>	70
1.5. Analyses.....	70
1.5.1. Chimie structurale.....	70
1.5.1.1. Spectrophotométrie UV.....	70
1.5.1.2. Spectrométrie de Masse.....	70
1.5.1.3. Spectrométrie RMN.....	70
1.5.1.4. Pouvoir rotatoire.....	71
1.5.2. Analyses GC et GC/M.....	71
1.5.2.1. Analyse GC.....	71
1.5.2.2. Analyse GC/MS.....	71
1.5.2.3. Identification des composants de l'huile essentielle de <i>Thymus</i> <i>dreatensis</i> Batt.....	72
Chapitre 2 : Activités biologiques.....	73
2.1. Activité antioxydante.....	74
2.1.1. Blanchissement du β -carotène.....	74
2.1.2. Activité antiradicalaire DPPH.....	76
2.1.3. Essai de décoloration de radical cation ABTS.....	76
2.1.4. La réduction cuprique (CUPRAC).....	77
2.1.5. Chélation des ions ferreux.....	77
2.2. Détermination des phénols totaux.....	77
2.3. Screening chimique.....	78
2.4. Activité anticholinestérase.....	79

2.5. Activité antibactérienne	79
Partie 3: Résultats et Discussion.....	81
Chapitre 1 : Identification des produits isolés de <i>Mentha aquatica</i> L.....	81
1.1. Caractérisation des produits obtenus de l'extrait CHCl ₃ des parties aériennes.....	82
1.1.1. Elucidation structurale du composé P1	83
1.1.2. Elucidation structurale du composé P2	85
1.1.3. Elucidation structurale du composé P3	89
1.1.4. Elucidation structurale du composé P4	92
1.1.5. Elucidation structurale du composé P5	97
1.1.6. Elucidation structurale du composé P6	106
1.1.7. Elucidation structurale du composé P7	110
1.2. Caractérisation des produits obtenus de l'extrait acétone des racines.....	115
1.2.1. Elucidation structurale du composé P8	115
1.2.2. Elucidation structurale du composé P9	115
1.2.3. Elucidation structurale du composé P10	115
1.2.4. Elucidation structurale du composé P11	115
1.2.5. Elucidation structurale du composé P12	123
1.2.6. Elucidation structurale du composé P13	128
1.2.7. Elucidation structurale du composé P14	131
1.2.8 Elucidation structurale du composé P15	138
1.2.8 Elucidation structurale du composé P16	142
Chapitre 2 : Analyse GC et GC/MS de l'huile essentielle de <i>Thymus dreatensis</i> Batt	151
2.1. Composition chimique l'huile essentielle analysée.....	152
2.1. Discussion	153
Chapitre 3 : Activités biologiques de <i>Mentha aquatica</i>, <i>Stachys guyoniana</i> et analyse	155
GC/MS de l'huile <i>Thymus dreatensis</i>.....	
3.1. Dosage des polyphénols	156
3.2. Screening chimique.....	157
3.3. Activité antioxydante de l'huile essentielle de <i>Thymus dreatensis</i>	158
3.4. Activité antioxydante des extraits de <i>S. guyoniana</i> et <i>M. aquatica</i>	158

3.4.1. Activité de blanchissement du β -carotène.....	159
3.4.2. Activité antiradicalaire DPPH*.....	160
3.4.3. Essai de décoloration de radical cation ABTS ^{•+}	161
3.4.4. La réduction cuprique (CUPRAC).....	162
3.4.5. Chélation des ions ferreux.....	163
3.5. Activité anticholinestérase.....	165
3.6. Activité antibactérienne.....	167
Conclusion générale.....	170
Références bibliographiques.....	172

Liste des Figures

Figure 1	Espèce <i>Mentha aquatica</i>	7
Figure 2	L'hydrodistillation.....	44
Figure 3	Extraction par micro-onde.....	44
Figure 4	Extraction de l'huile par CO ₂ supercritique.....	45
Figure 5	Extraction par Soxhlet.....	46
Figure 6	Structures des dérivés de la vitamine E.....	50
Figure 7	Structure de l'acide ascorbique.....	51
Figure 8	Structure du β-carotène.....	51
Figure 9	Structures de quelques flavonoïdes.....	52
Figure 10	Mécanisme d'action antioxydante des composés phénoliques.....	52
Figure 11	Structure des antioxydants synthétiques.....	54
Figure 12	Piégeage du radical DPPH [•] avec l'antioxydant (AH).....	54
Figure 13	Oxydation de l'ABTS avec K ₂ S ₂ O ₈ et génération du ABTS ^{•+}	55
Figure 14	Réduction du complexe chromogène de Cu ⁺² -Nc.....	56
Figure 15	Structure chimique du Ferrozine.....	56
Figure 16	Mécanisme chimiques de la méthode d'Ellman's.....	58
Figure 17	Schéma général d'extraction des parties aériennes de l'espèce <i>M.aquatica</i>	63
Figure 18	Isolement des composés de l'extrait CHCl ₃ des parties aériennes de l'espèce <i>M.aquatica</i>	65
Figure 19	Isolement des composés de l'extrait acétone des racines de l'espèce <i>M. aquatica</i>	67
Figure 20	Spectre RMN ¹ H des méthyles du composé P1	83
Figure 21	Spectre RMN ¹ H du composé P1	84
Figure 22	Spectre RMN ¹ H des méthyles du composé P2	85
Figure 23	Spectre RMN ¹ H du composé P2	86
Figure 24	Spectre RMN ¹³ C du composé P2	86
Figure 25	Spectre RMN ¹³ C étalé du composé P2	87
Figure 26	Spectre RMN ¹ H des méthyles du composé P3	89
Figure 27	Spectre RMN ¹ H du composé P3	90
Figure 28	Spectre RMN ¹³ C du composé P3	90
Figure 29	Spectre RMN ¹³ C étalé du composé P3	91
Figure 30	Spectre RMN ¹ H du composé P4	93
Figure 31	Spectre RMN ¹³ C du composé P4	93
Figure 32	Spectre HMQC du composé P4	94
Figure 33	Corrélations HMBC des protons éthyléniques géminés.....	94
Figure 34	Corrélations HMBC du composé P4	95
Figure 35	Spectre RMN ¹ H du composé P5	97
Figure 36	Spectre RMN ¹ H des méthyles du composé P5	97
Figure 37	Spectre RMN ¹³ C du composé P5	98
Figure 38	Spectre HMQC du composé P5	98
Figure 39	Spectre COSY du composé P5	99
Figure 40	Couplages COSY des cycles A, C et E.....	100
Figure 41	Spectre HMQC du composé P5	100
Figure 42	Spectre HMBC du composé P5 (partie des méthyles).....	101
Figure 43	Corrélations HMBC des Me-23,24 et Me-25 du composé P5	102
Figure 44	Spectre COSY du composé P5	102
Figure 45	Couplages des protons H-5, H-6 et H-7.....	103
Figure 46	Couplages HMBC méthyles 26 et 27.....	103
Figure 47	Stéréochimie des carbones asymétriques.....	104
Figure 48	Spectre HMBC du composé P5	104
Figure 49	Spectre RMN ¹ H du composé P6	106
Figure 50	Spectre RMN ¹ H des méthyles du composé P6	107
Figure 51	Spectre RMN ¹³ C des méthyles du composé P6	107
Figure 52	Spectre RMN ¹ H du composé P7	110
Figure 53	Spectre RMN ¹³ C du composé P7	111

Figure 54	Spectre HMQC du composé P7	111
Figure 55	Spectre HMBC du composé P7	112
Figure 56	Corrélations HMBC des méthyles du composé P7	113
Figure 57	Spectre RMN ¹ H étalé entre 0.8 et 3.5 ppm du composé P11	116
Figure 58	Spectre RMN ¹ H du composé P11	116
Figure 59	Spectre du groupement benzoyle du composé P11	117
Figure 60	Spectre HMQC du composé P11	117
Figure 61	Spectre RMN ¹³ C du composé P11	118
Figure 62	Corrélation HMBC qui montre la position du groupement benzoyle.....	118
Figure 63	Spectre HMBC du composé P11	119
Figure 64	Corrélations HMBC de la partie benzoyle du composé P11	119
Figure 65	Spectre COSY du composé P11	120
Figure 66	Corrélations HMBC et COSY du composé P11	121
Figure 67	Spectre HMBC du composé P11	121
Figure 68	Spectre RMN ¹ H du composé P12	124
Figure 69	Spectre RMN ¹ H des méthyles du composé P12	124
Figure 70	Spectre HMQC du composé P12	125
Figure 71	Spectre RMN ¹³ C du composé P12	125
Figure 72	Spectre HMQC du composé P12	126
Figure 73	Spectre RMN ¹³ C étalé du composé P12	126
Figure 74	Spectre RMN ¹ H du composé P13	129
Figure 75	Spectre RMN ¹ H du composé P13	129
Figure 76	Spectre RMN ¹ H du composé P14	132
Figure 77	Spectre RMN ¹³ C du composé P14	132
Figure 78	Spectre HMQC du composé P14	133
Figure 79	Spectre HMBC des méthyles du composé P14	134
Figure 80	Corrélation HMBC au niveau du cycle A.....	134
Figure 81	Corrélations HMBC au niveau des méthyles Me-26 et 27.....	135
Figure 82	Spectre HMBC du composé P14	135
Figure 83	Corrélations HMBC du composé P14	136
Figure 84	Corrélations HMBC du cycle E.....	136
Figure 85	Voie biogénétique du composé P13 et P14	137
Figure 86	Spectre RMN ¹ H du composé P15	139
Figure 87	Spectre RMN ¹³ C du composé P15	140
Figure 88	Spectre RMN ¹³ C étalé du composé P15	140
Figure 89	Spectre RMN ¹ H du composé P16	142
Figure 90	Spectre RMN ¹ H des méthyles du composé P16	143
Figure 91	Spectre RMN ¹³ C du composé P16	143
Figure 92	Spectre HMQC du composé P16	144
Figure 93	Corrélations HMBC du proton H-12.....	145
Figure 94	Spectre HMBC du composé P16	145
Figure 95	Spectre HMQC du composé P16	146
Figure 96	Spectre HMBC du composé P16	147
Figure 97	Spectre COSY du composé P16	148

Liste des Tableaux

Tableau 1	Flavonoïdes isolés des deux espèces <i>Mentha x piperita</i> et <i>Mentha spicata</i>	16
Tableau 2	Quelques flavonoïdes isolés du genre <i>Stachys</i>	26
Tableau 3	Les iridoïdes isolés du genre <i>Stachys</i>	27
Tableau 4	Les diterpènes isolés du genre <i>Stachys</i>	29
Tableau 5	Triterpénoides isolés du genre <i>Stachys</i>	33
Tableau 6	Huiles essentielles riches en thymol et/ou carvacrol.....	36
Tableau 7	Huiles essentielles riches <i>p</i> -cymène et/ou γ -terpinène.....	37
Tableau 8	Huiles essentielles riches en β -phéllandréne.....	39
Tableau 9	Huiles essentielles riches en α -terpinéol.....	39
Tableau 10	Huiles essentielles riches en linalool (1).....	40
Tableau 11	Huiles essentielles riches en linalool (2).....	40
Tableau 12	Huiles essentielles riches en bornéol et / ou 1,8-cinéole.....	41
Tableau 13	Huiles essentielles riches α -terpinène, β - <i>O</i> -cymène.....	42
Tableau 14	Huiles essentielles riches en camphre.....	42
Tableau 15	Huiles essentielles riches en géraniol.....	42
Tableau 16	Espèces réactives oxygénées.....	48
Tableau 17	Espèces réactives azotées.....	49
Tableau 18	Classification des acides phénoliques.....	53
Tableau 19	Déplacements chimiques en RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé P1	84
Tableau 20	Déplacements chimiques en RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé P2	87
Tableau 21	Déplacements chimiques en RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé P3	91
Tableau 22	Déplacements chimiques en RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé P4	95
Tableau 23	Déplacements chimiques en RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé P5	105
Tableau 24	Déplacements chimiques en RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé P6	107
Tableau 25	Déplacements chimiques en RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé P7	113
Tableau 26	Déplacements chimiques en RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé P11	122
Tableau 27	Déplacements chimiques en RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé P12	127
Tableau 28	Déplacements chimiques en RMN ^1H (300 MHz) du composé P13	130
Tableau 29	Déplacements chimiques en RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé P14	138
Tableau 30	Déplacements chimiques en RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé P15	140
Tableau 31	Déplacements chimiques en RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé P16	144
Tableau 32	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Thymus dreatensis</i>	153
Tableau 33	Composition chimique de quelques huiles essentielles poussant en Algérie.....	152
Tableau 34	Composition chimique de quelques huiles essentielles avec thymol/ γ -terpinène.....	153
Tableau 35	Teneur en phénols totaux des plantes <i>S. guyoniana</i> et <i>M. aquatica</i>	156
Tableau 36	Screening chimique de <i>S. guoyoniana</i> et <i>M. aquatica</i>	157
Tableau 37	Pouvoir d'inhibition IC_{50} des extraits étudiés sur le β -carotène/acide linoléique... ..	159
Tableau 38	Pouvoir d'inhibition IC_{50} des extraits étudiés sur le DPPH.....	160
Tableau 39	Pouvoir d'inhibition IC_{50} des extraits étudiés sur l'ABTS $^{+}$	161
Tableau 40	Inhibition du CUPRAC par les extraits étudiés.....	162
Tableau 41	Pouvoir d'inhibition IC_{50} des extraits étudiés sur les ions chélates.....	163
Tableau 42	Inhibition de l'acétylcholinestérase et buthylcholinestérase par les extraits étudiés.....	166
Tableau 43	Résultats de l'activité antibactérienne des extraits étudiés.....	167
Tableau 44	Résultats des CMI de l'activité antibactérienne des extraits étudiés.....	168

Liste des abréviations

Solvants et réactifs :

AcOEt	acétate d'éthyle
CD ₃ OD	méthanol deutéré
Pyridine- <i>d</i> ₅	pyridine deutéré
isoPro	isopropanol
MeCN	acétonitrile
SiO ₂	silice normale

Techniques de chromatographie :

CCM	chromatographie sur Couche Mince
CLHP	chromatographie Liquide Haute Performance
CPP	chromatographie sur Plaque Préparative
L	litre
mL	millilitre
min	minute
Rdt	rendement

Détermination structurale :

COSY	COrelated SpectroscopY
<i>d</i>	doublet
<i>dd</i>	doublet de doublets
<i>ddd</i>	doublet de doublets de doublets
<i>dl</i>	doublet large
<i>dt</i>	doublet de triplets
HMBC	Heteronuclear Multiple Bonding Connectivity
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Connectivity
<i>J</i> (Hz)	constante de couplage exprimée en Hertz
<i>m</i>	multiplet
ppm	parties par million
<i>q</i>	quadruplet
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RMN ¹³ C	Résonance Magnétique Nucléaire du carbone
RMN ¹ H	Résonance Magnétique Nucléaire du proton
<i>s</i>	singulet
<i>sl</i>	singulet large
<i>t</i>	triplet
<i>td</i>	triplet de doublets
HR-FAB-MS	High Resolution Fast-Atom Bombardment Mass Spectroscopy;
<i>m/z</i>	masse/charge électrique
UV	Ultra-Violet
[α] _D	Pouvoir rotatoire spécifique

Activités biologiques :

IC ₅₀	Inhibition Concentration (Concentration inhibitrice à 50%)
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice

Codes des extraits

EBSG	Extrait Butanol de <i>Stachys guyoniana</i>
EASG	Extrait acétate d'éthyle de <i>Stachys guyoniana</i>

ECSG	Extrait chloroforme de <i>Stachys guyoniana</i>
EMMA	Extrait méthanol (partie aérienne) de <i>Mentha aquatica</i>
ECMA	Extrait chloroforme (partie aérienne) de <i>Mentha aquatica</i>
EMRMA	Extrait méthanol (racines) de <i>Mentha aquatica</i>
EARMA	Extrait acétone (racines) de <i>Mentha aquatica</i>

Introduction générale

Introduction générale

Malgré l'utilisation de médicaments à base de plantes pendant de nombreux siècles, seul un nombre relativement petit d'espèces de plantes ont été étudiées pour d'éventuelles applications médicales. Les données relatives à l'innocuité et à l'efficacité sont disponibles pour un nombre encore plus restreint de plantes, leurs extraits et principes actifs et les préparations qui les contiennent (Heide, 1991).

Aujourd'hui encore une majorité de la population mondiale, plus particulièrement dans les pays en voie de développement, se soigne surtout avec des remèdes traditionnels à base de plantes. Cette source semble inépuisable puisque seuls près de 400.000 espèces végétales connues ont été investiguées sur les plans chimique et pharmacologique, et que chaque espèce peut contenir jusqu'à plusieurs centaines de constituants différents (Hostettmann *et al.*, 1998).

C'est dans le cadre d'une valorisation des matières végétales en vue des utilisations thérapeutiques que l'étude des trois espèces de la famille des Lamiaceae est présentée ici. Une large variété de produits naturels caractérise les espèces de cette famille, les plus rencontrés sont les flavonoïdes, iridoïdes, sesquiterpènes, diterpènes et triterpènes. Les espèces de la famille des Lamiaceae sont connues pour leurs utilisations en médecine traditionnelle à cause de leurs diverses activités comme : anti-inflammatoire, analgésique, antipyrétique, cardioactive, antifongique, antituberculoses, antitumorale et antioxydante (Fraga *et al.*, 2005). Ainsi que le potentiel anticholinestérase, grâce à leurs compositions riches en terpénoïdes, polyphénols et flavonoïdes rapportés comme médicaments potentiels dans le traitement de la maladie d'Alzheimer. En plus, de nombreux composés naturels, peuvent aider à piéger les radicaux libres générés lors de l'initiation et la progression de la maladie d'Alzheimer (Topçu & Kusman, 2014).

Le présent travail consiste à effectuer :

- ♣ L'extraction, l'isolement et l'identification des métabolites secondaires de la plante *Mentha aquatica* ainsi que les activités biologiques de la plante : *Mentha aquatica* L. de la famille des Lamiaceae.
- ♣ Les activités biologiques de l'espèce *Stachys guyoniana* de Noé.
- ♣ L'activité antioxydante de l'huile essentielle de la plante *Thymus dreatensis*

Le manuscrit comprend 3 parties :

- ♣ La première a été consacrée à des généralités et données bibliographiques, comportant une présentation botanique et phytochimique de la famille des Lamiaceae, du genre *Mentha* et *Stachys* et sur les huiles essentielles du genre *Thymus*.
- ♣ La deuxième partie décrit le matériel et les méthodes utilisées dans nos travaux d'extraction, d'isolement et de purification des métabolites secondaires de l'espèce *Mentha aquatica*, des tests biologiques effectués sur les deux espèces *Stachys* et *Mentha*, ainsi que pour l'huile essentielle du genre *Thymus*.
- ♣ La troisième partie comprend les résultats et discussion des résultats de l'étude phytochimique de la plante *Mentha aquatica* ainsi que les composés identifiés par analyse GC/MS de l'huile essentielle la plante *Thymus dreatensis* et d'étude des activités antioxydante, anticholinestérase et antibactérienne des deux plantes *Mentha* et *Stachys* et l'activité antioxydante de l'huile essentielle de *Thymus dreatensis*.

PARTIE 1

Revue bibliographique

CHAPITRE 1

Aperçu bibliographique sur le genre *Mentha*

1.1. Introduction

Le genre *Mentha* appartient à la famille Lamiaceae (labiées) qui comporte environ 200 genres et 6000 espèces distribuée dans les régions tempérées dans le monde entier (Govaerts, 2012). Les plantes qui la composent se rencontrent abondamment dans les régions tropicales et subtropicales (Piozzi *et al.*, 2011).

1.2. Position systématique de la famille des Lamiaceae

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

Embranchement	Spermatophytæ (Plantes à graines)
Sous-embranchement	Angiospermae (griantes protégées) ou plantes à fleurs
Classe	Dicotylédonae (<i>Eudicots</i>) ou Dicotylédone vrai
Sous-classe	Asteropsidae
Groupe	Euastéridéae
Super-ordre	Lamianeae
Ordre	Lamiale
Famille	Lamiaceae

1.3. Présentation du genre *Mentha* et de l'espèce *M. aquatica* L.

Le genre *Mentha* représente environ 30 espèces de plantes vivaces originaire d'Europe, cultivées aux USA, Canada, l'Europe, l'Asie, l'Australie et le Sud-américain (Deschamps *et al.*, 2008; McKay & Blumberg, 2006). D'après la bibliographie, ce genre montre une source importante de la production des huiles essentielles dans le monde (Baser *et al.*, 1997; Guido *et al.*, 1997). Les Menthes sont des plantes très odorantes. Les feuilles sessiles ou sub-sessiles. A Calice tubuleux ou en cloche à 5 dents subégales. La corolle blanche rosée ou violet pâle à 4 lobes subégaux, velue à la gorge. Les fleurs en épis cylindriques, en têtes sphériques terminales ou en verticillastres à l'aisselle des feuilles (Quezel & Santa, 1962).

Nos travaux phytochimique concernent l'espèce *Mentha aquatica* (**Figure 1**), c'est une plante hispide de 30 à 80 centimètres de hauteur. Calice à dents égales et symétriques. Inflorescences en têtes capituliformes terminales (Quezel & Santa, 1962).



Figure 1 : Espèce *Mentha aquatica* (Disponible sur :

https://www.google.com/search?q=mentha+aquatica&client=opera&biw=1366&bih=602&tbm=isch&imgil=81Qc63KqK9K3xM%253A%253BsIX1O441MWT77M%253Bhttp%25253A%25252F%25252Fwww.naturespot.org.uk%25252Fspecies%25252Fwatermint&source=iu&pf=m&fir=81Qc63KqK9K3xM%253A%252CsIX1O441MWT77M%252C_&usg=__Haxm4-hfG9CyuCxvMAbk8g5JRA8%3D&ved=0ahUKEwiDt4vG2OTPAhXF1hoKHe5oCwkQyjcIgE&ei=zEIGWIOhFsWta-7RrUg#imgrc=1yKG48yRHqSC9M%3A, consulté le 15/01/2016).

1.4. Utilisation en médecine traditionnelle du genre

La plupart des espèces végétales qui poussent dans le monde entier possèdent des vertus thérapeutiques. Les plantes de la famille des Lamiaceae sont largement et universellement utilisées en médecine populaire pour guérir bon nombre de maladies, et le genre *Mentha* a montré des propriétés thérapeutiques en médecine traditionnelle.

Les espèces du genre *Mentha* sont généralement connues sous le nom de « na'na » et « pooneh » en Iran (Mozaffarian, 1996), elles sont utilisées pour leurs propriétés : antimicrobiennes, insecticides, antivirales, aromatiques, utilisées comme stimulant et carminatif, l'infusion des feuilles est également employée pour soigner le rhumatisme et l'indigestion. Les menthes sont appréciés pour leurs diverses utilisations en produits

pharmaceutiques, cosmétiques ainsi que pour aromatiser les aliments, les boissons et le tabac (Johnson *et al.*, 2011).

Des travaux sur des espèces du genre ont montré *Mentha* qu'elles possèdent des activités : l'anti-inflammatoires, l'antispasmodiques, l'antiulcéreux, cytoprotecteur , hépatoprotecteur, légèrement anesthésique (Shah *et al.*, 2008), antiseptiques, pour traiter les rhumes, sinusites, choléra, bronchites, tuberculoses, antitussif, diurétiques et pour la menstruation (Newall *et al.*, 1996), antitussifs, expectorants, anti-flatulents et antioxydants (Kamkar *et al.*, 2010; Mckay *et al.*, 2006).

Beaucoup de plantes du genre *Mentha* ont des propriétés thérapeutiques remarquables, et sont utilisées en médecine traditionnelle. Dans ce qui suit, nous allons citer quelques exemples d'espèces de très grande importance thérapeutique.

M. aquatica L. : Au sud d'Afrique, les feuilles séchées de *M. aquatica* avec *Tagetes minuta* sont brûlées, la fumée inhalée prescrit pour le traitement des maladies mentales par le peuple de Venda (Arnold *et al.*, 1984). Cette plante est utilisée aussi en médecine traditionnelle au sud d'Afrique pour le traitement des rhumes, des problèmes respiratoires ainsi que pour la protection contre les mauvais esprits (Pooley, 2005).

M. lavandulacea Wild.: Plante médicinale utilisée en usage externe pour les maladies de la peau aussi comme carminatif (Jain, 1968).

Mentha x villosa Hudson : Plante largement cultivée au Brésil, utilisée pour ces effets bénéfiques pour soulager les troubles d'estomac, contre les douleurs menstruelles, utile comme tranquillisant et antiparasitaire (Alencastro *et al.*, 1965).

M. arvensis L. : Plante médicinale importante de la famille des Lamiaceae, appelée communément « Mint » en anglais et « Pudina » en Tamil (Inde). Elle est aromatique et connue pour ses effets stimulants et carminatifs (Gupta, 1991). Cette espèce est distribuée à travers l'Himalaya occidental, et cultivée dans le monde entier pour son utilisation comme légume (Akram *et al.*, 2011). Elle est utile comme carminatif, antispasmodique et contre l'ulcère peptique (Kowati *et al.*, 2010). Le Menthol constitue 70-90% de cette plante (Rastogi *et al.*, 1999), pour ses effets de fraîcheur, il est inclus dans la production des

dentifrices, haleine fraîche. Elle est également introduite dans l'industrie cosmétique : les savons, les détergents et les parfums (Alvi *et al.* 2001).

M. suaveolens ssp. *suaveolens* (L) Hudson : Plante synonyme de *M. rotundifolia* (L) Hudson, cette espèce était utilisée en médecine traditionnelle pour sa gamme très vaste d'actions : tonique, stimulante, stomachique, carminatif, analgésique, cholérétique, antispasmodique, anti-inflammatoire, sédatif, hypotensif, insecticide et comme condiment (Il Idrisi, *et al.*, 2006; Moreno, *et al.*, 2002).

M. longifolia L. : Largement utilisée en phytothérapie et particulièrement bénéfique dans la stimulation du système immunitaire et la lutte contre les infections secondaires. Elle est employée pour le traitement de la toux, les rhumes et pour l'usage externe des blessures et les glandes enflées (Van Wyk *et al.*, 1997). Au Sud d'Afrique, les feuilles de la même espèce sont largement utilisées en alimentation, pour raison de leurs arômes, couleurs et saveurs. Elle entre dans la préparation des aliments pour améliorer le goût (Hutchings *et al.*, 1994). Le frottement de cette plante sur le corps et la literie, mène au dégagement d'une forte odeur qui repousse les moustiques (Philips, 1990). L'huile essentielle de cette plante responsable des effets antispasmodique, antibiotique, décongestionnant (Van Wyk *et al.*, 1997).

M. longifolia L. ssp *longifolia* : Les feuilles, fleurs et tiges de *Mentha* ssp. sont fréquemment utilisées dans les tisanes et comme additifs des mélanges d'épices commerciales pour de nombreux aliments pour améliorer l'arôme et la saveur (Kothari *et al.*, 1995 ; Moreno, *et al.*, 2002). En outre, cette espèce a été utilisée comme un remède populaire pour le traitement des nausées, les bronchites, les flatulences, l'anorexie, la colite ulcéreuse et les plaies de foie en raison de ses effets anti-inflammatoire, carminative, antiémétique, sudorifique, antispasmodique, analgésique, stimulant, emménagogue et anticatharrhal (Cowan, 1999; Iscan, *et al.*, 2002; Moreno, *et al.*, 2002).

M. pulegium L. : Les parties aériennes et les fleurs sont utilisées en médecine traditionnelles pour leurs effets antiseptiques, le traitement des rhumes, les sinusites, le choléra, pour l'intoxication alimentaire, bronchites et tuberculose (Zargar, 1990), et aussi comme anti-flatulence, carminatif, expectorant, diurétique et antitussif (Newall, 1996).

M. piperita : L'huile essentielle de *M. piperita* est utilisée en médecine traditionnelle pour les problèmes respiratoires comme expectorant et anti-congestif (Corrêa *et al.*, 1998; Ody, 2000; Vieira, 1992), antispasmodiques et pour le système vasculaire (Ody, 2000).

M. cervina L. : Plante aromatique utilisée en médecine traditionnelle au Portugal pour la prévention des différents troubles gastriques et l'inflammation des voies respiratoires (Monteiro *et al.*, 2007, Póvoa *et al.*, 2006, Rodrigues *et al.*, 2008).

1.5. Activités biologiques reconnues du genre *Mentha*

Le genre *Mentha* a fait l'objet de nombreux travaux scientifiques mettant en évidence des activités variées. Plusieurs études ont montré que la famille des Lamiaceae est une source naturelle d'antioxydants (Ghoshdury *et al.*, 2006).

Expérimentalement, l'huile essentielle de *Mentha piperita* a été décrite pour l'activité antibactérienne (Sartoratto *et al.*, 2004), sa faible toxicité par voie orale chez le rat (Nair, 2001) et spécialement son effet sur le système gastro-intestinal. D'autres études sur la même espèce ont montré qu'elle soulage les symptômes du côlon irritable chez les humains (Grigoleit *et al.*, 2005) et présente des effets antispasmodiques gastro-intestinal chez les rats par le mouvement du calcium à travers la membrane cellulaire au-delà de l'interférence du menthol (Grigoleit, *et al.*, 2005). Singh et ses collaborateurs ont étudié l'espèce *M. piperita* L., et ont montré que l'huile essentielle montre une excellente activité antibactérienne et antioxydante (Singh *et al.*, 2011). Une autre étude effectuée sur l'huile essentielle de *Mentha piperita* L. a révélé d'une bonne activité antifongique contre les champignons suivants : *Aspergillus flavus*, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Colletotrichum gloesporioides*, *Colletotrichum musae*, *Fusarium oxysporum* et *Fusarium semitectum* (Freire *et al.*, 2012). *Mentha piperita* L., espèce Iranienne, a fait l'objet d'une investigation biologique en vue de mettre en évidence d'éventuelles propriétés antimicrobiennes et antioxydantes. Les résultats ont révélé que l'huile essentielle a une excellente activité antimicrobienne contre les souches : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*, ainsi qu'une remarquable activité antioxydante avec le DPPH et le β -carotène (Yadegarinia *et al.*, 2006). Une étude similaire sur la même plante a révélé des résultats similaires, sauf que l'activité antioxydante a été effectuée avec le DPPH et la réduction ferrique (Singh *et al.*, 2011). Pedro et ses collaborateurs ont mis en évidence le

potentiel antispasmodique de l'huile essentielle du *Mentha piperita* chez les rats (Sydney *et al.*, 2010).

L'huile essentielle de *M. pulegium* présente plusieurs activités biologiques spécialement antimicrobienne (Marzouk *et al.*, 2008), antifongique (Bouchra *et al.*, 2003), insecticide (Pavela, 2005), antiparasitaire, spasmodique et anti-oxydante (Larousse, 2001). Une étude biologique *in vivo* sur l'extrait EtOH de la même plante a montré une activité antioxydante comme elle peut être utilisée dans la protection des tissus contre le stress oxydatif (Sachin *et al.*, 2012). L'investigation biologique de la même plante Iranienne, a révélé que l'huile essentielle a un potentiel antimicrobien sur les bactéries Gram positif (Mohaddese *et al.*, 2008). Une autre étude effectuée a montré l'activité antioxydante des extraits aqueux, MeOH et l'huile essentielle possèdent une activité antioxydante avec le DPPH et le β -carotène (Kamkar *et al.*, 2010). La même plante poussant au Maroc a montré une activité antibactérienne sur les bactéries : *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus aureus* et *Micrococcus luteus* avec grande zone d'inhibition (Derwich *et al.*, 2010).

Une étude biologique sur la plante *Mentha longifolia* (L.) Hudson subsp. *longifolia* poussant en Turquie, a révélé que sa composition chimique comprenant la lutéoline et ses dérivés possède un potentiel anti-mutagénétique (Furkan, *et al.*, 2012). L'extrait aqueux et EtOAc de la même plante a subi une investigation biologique pour évaluer l'activité antibactérienne. Les résultats ont révélé que ses extraits sont très actifs contre les souches Gram positif (*Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella dysenteriae*, *Klebsiella pneumonia*, *Salmonella typhi*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*) et négatif (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus saprophyticus* et *Staphylococcus aureus*) (Saeide *et al.*, 2014). Une autre étude a montré que cette plante possède des composés avec des propriétés antimicrobienne et antioxydante (Gulluce *et al.*, 2007). L'huile essentielle a montré une excellente activité antimicrobienne contre les 30 bactéries testées, où l'extrait MeOH a révélé d'une bonne activité antioxydante avec le DPPH et le le β -carotène (Gulluce *et al.*, 2007).

Une étude biologique effectuée sur la plante *Mentha arvensis* a montré que les extraits CHCl_3 , EtOH et l'extrait aqueux des parties aériennes de cette espèce présentent des effets hépatoprotecteurs chez les rats (Kalpana *et al.*, 2012). L'extrait EtOH présente des effets antioxydant, antibactérien, cytotoxique et analgésique (Nripendra *et al.*, 2014).

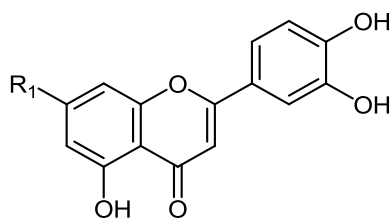
Une étude biologique effectuée sur l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia* L. poussant en Tunisie, a montré une activité antioxydante remarquable avec le DPPH et le β -carotène. De plus, cette étude a montré que cette huile possède une bonne activité antibactérienne sur les bactéries : *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* (Riahi *et al.*, 2013).

Une étude récente a évalué les propriétés antioxydante et anti-tyrosinase de 3 espèces du genre *Mentha* récoltés en Algérie : *Mentha spicata*, *M. pulegium* et *M. rotundifolia*. Les extraits n-hexane et EtOH ont révélé une richesse en composés phénoliques, notamment *M. spicata*, riche en phénolique élevée et possèdent une activité anti-radicalaire supérieure (DPPH, ABTS^{•+} et super oxyde). Les flavonoïdes se sont avérés être les principaux composés de *M. rotundifolia*, qui contribuent sans doute à l'activité anti-tyrosinase observée (Brahmi *et al.*, 2015).

1.6. Métabolites secondaire du genre *Mentha*

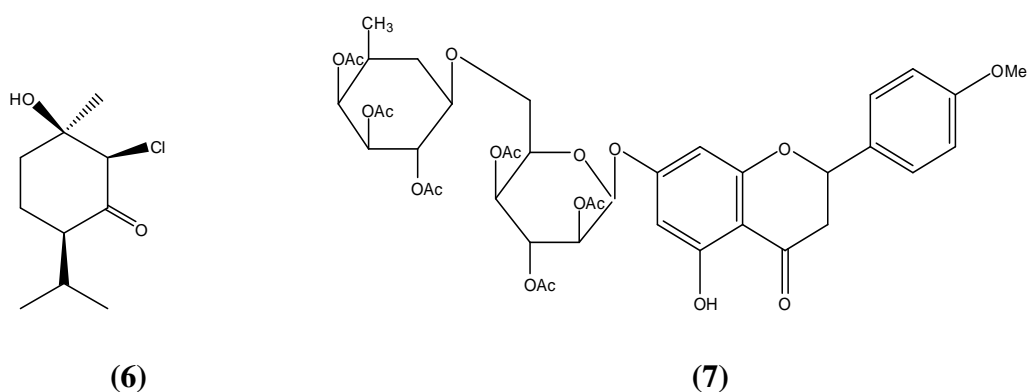
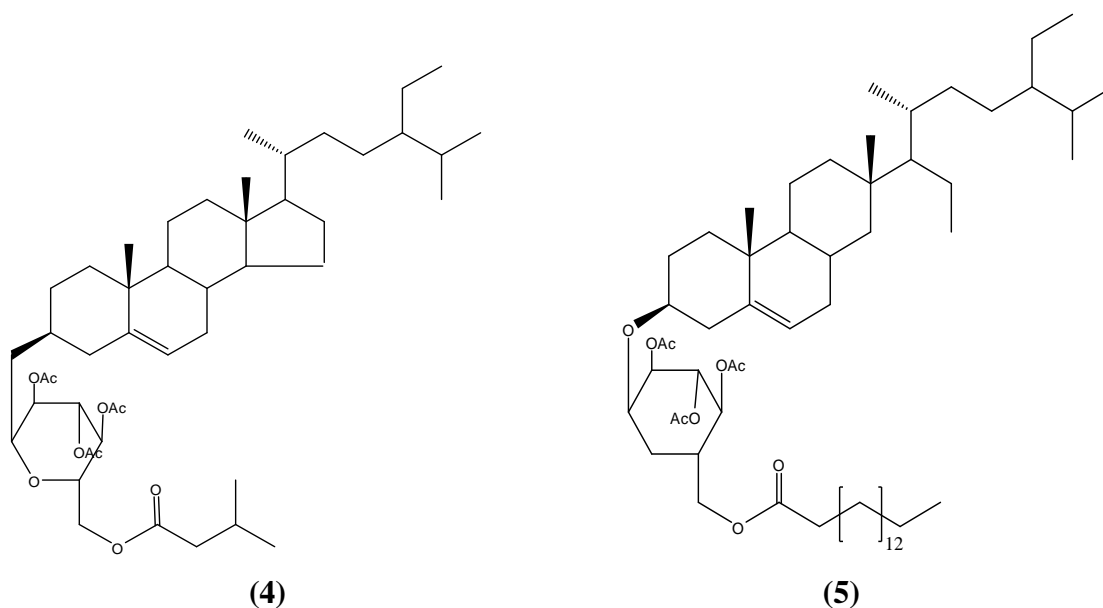
Les plantes du genre *Mentha* ont fait l'objet de nombreuses investigations phytochimiques et pharmacologiques. Il ressort de ces investigations que les principaux métabolites secondaires du genre sont constitués de flavonoïdes et de terpènes.

Une étude chimique réalisée sur l'extrait n-BuOH de *M. longifolia* (L.) Hudson subsp. *longifolia*, a permis d'identifier 3 flavonoïdes glycosilés : lutéoline 7-O-glucoside (**1**), lutéoline 7-O-rutinoside (**2**), lutéoline 7-O-glucuronide (**3**) (Furkan *et al.*, 2012).

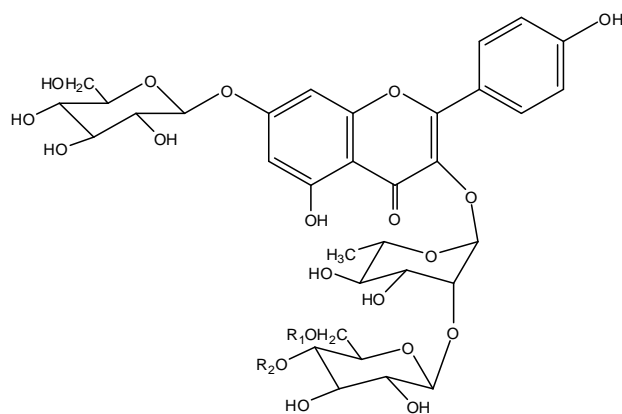


(1)	R ₁ = Glucose
(2)	R ₁ = Rutinose
(3)	R ₁ = Glucuronide

L'espèce *M. longifolia* a également fait l'objet d'une investigation chimique qui a abouti à l'isolement de 2 stérols : longiside A (**4**), longiside B (**5**), d'un monoterpène chloré : longifone (**6**) et d'un flavonoïde : logitine (**7**) (Shaiq Ali *et al.*, 2002).

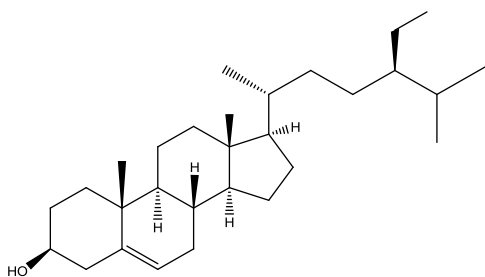
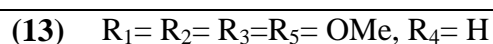
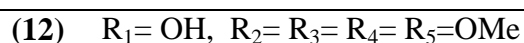
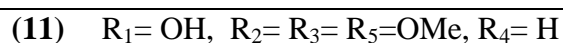
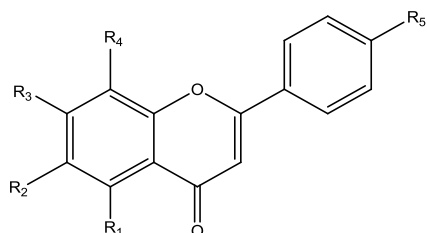
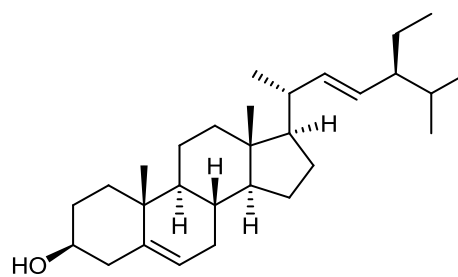
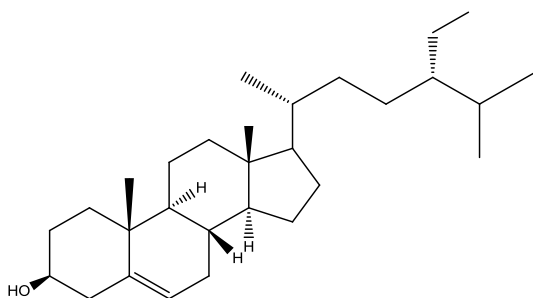
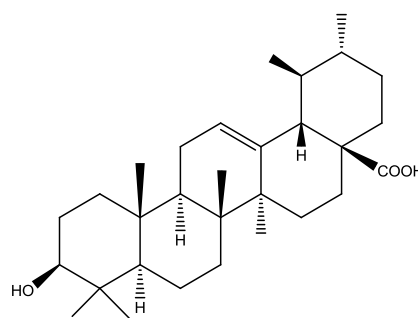
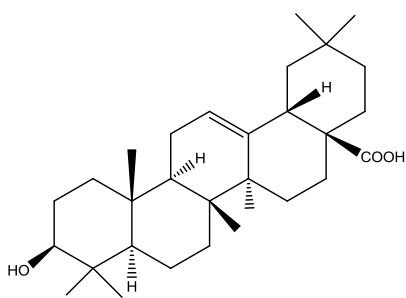
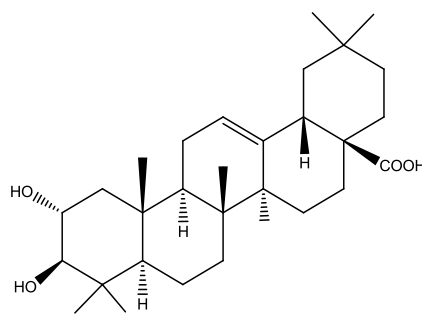


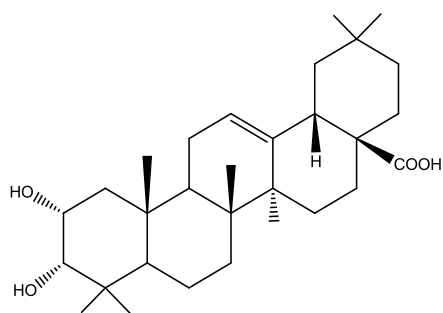
Trois flavonoïdes glucosylés : Kampferol 3-*O*-β-*D*-glucosyl-(1→2)-β-*L*-rhamnoside-7-*O*-β-glucoside (**8**), Kampferol 3-*O*-(6'''-*p*-coumarolyglucosyl)-(1→2)-rhamnoside-7-*O*-glucoside (**9**), Kampferol 3-*O*-(4'''-*p*-coumarolyglucosyl)-(1→2)-rhamnoside-7-*O*-glucoside (**10**), ont été isolés à partir de l'extrait méthanolique de *M. lavandulaceae* (El-Desoky *et al.*, 2001).



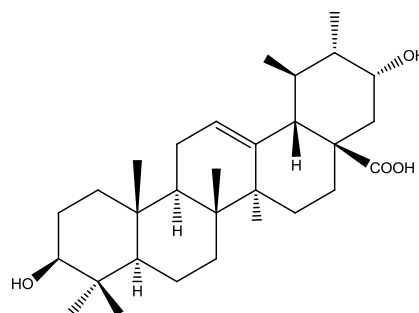
(8)	R ₁ = H	R ₂ = H
(9)	R ₁ = <i>p</i> -coumaroyl	R ₂ = H
(10)	R ₁ = H	R ₂ = <i>p</i> -coumaroyl

Une étude phytochimique des parties aériennes de *Mentha citrata* (Passannanti *et al.*, 1990) a conduit à l'identification de 3 flavonoïdes : salvigénine (**11**), 5-*O*-desméthyltangérétine (**12**), 4',5,7,6-tetraméthoxyflavone (**13**) ainsi que 3 stérols : sitostérol (**14**), stigmastérol (**15**), Campesterol (**16**) ainsi que 7 acides triterpéniques : ursolique (**17**), oléanolique (**18**), maslinique (**19**), 3-épi-maslinique (**20**), 21- α -hydroxy-oléanolique (**21**) et tormentique (**22**).

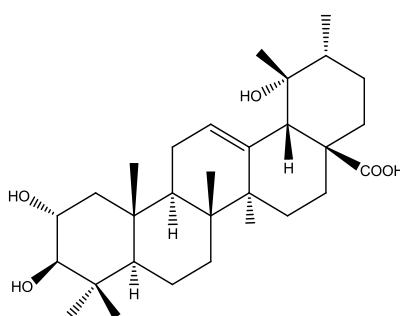
**(14)****(15)****(16)****(17)****(18)****(19)**



(20)

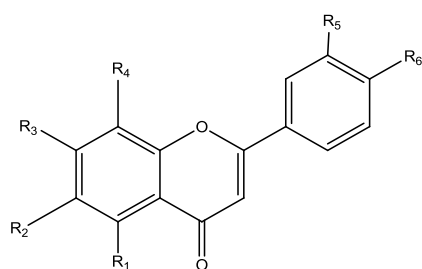


(21)



(22)

Une autre étude effectuée sur *Mentha citrata* (Bernard *et al.*, 1999) à partir des feuilles a permis d'isoler 8 flavonoïdes : 5,6-dihydroxy-7,8,3',4'-tetraméthoxyflavone (23), 5-*O*-désmethylnobiletine (24), apigénine (25), acacétine (26), xanthomicrol (27), pebréline (28), salvigénine (14) et gardénine B (29).

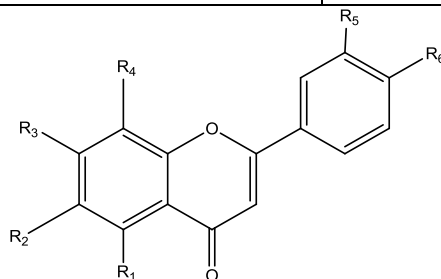


(23)	$R_1 = R_2 = \text{OH}, R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = \text{OMe}$
(24)	$R_1 = \text{OH}, R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = \text{OMe}$
(25)	$R_1 = \text{OH}, R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = \text{H}$
(26)	$R_1 = \text{OH}, R_5 = \text{CH}_3, R_2 = R_4 = R_5 = R_6 = \text{H}$
(27)	$R_1 = R_6 = \text{OH}, R_2 = R_3 = R_4 = \text{OMe}$
(28)	$R_1 = R_2 = \text{OH}, R_3 = R_4 = R_5 = \text{OMe}$
(29)	$R_1 = \text{OH}, R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = \text{OMe}$

Bernard *et col.* (Bernard *et al.*, 1999) ont étudié deux espèces du genre *Mentha*, *Mentha x piperita* et *Mentha spicata*. Plusieurs flavonoïdes ont été mise en évidence, le tableau suivant récapitule tous les flavonoïdes isolés (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Flavonoïdes isolés des deux espèces *Mentha x piperita* et *Mentha spicata*

Flavonoïdes	Espèces	
5,6-dihydroxy-7,8,3',4'-tetraméthoxyflavone (23)	<i>M. x piperita</i>	<i>M. spicata</i>
5-O-desmethylnobiletine (24)	<i>M. x piperita</i>	<i>M. spicata</i>
Apigénine (25)	<i>M. x piperita</i>	<i>M. spicata</i>
Acacétine (26)	<i>M. x piperita</i>	<i>M. spicata</i>
Xanthomicrol (27)	<i>M. x piperita</i>	-
Pebréline (28)	<i>M. x piperita</i>	-
Salvigénine (14)	<i>M. x piperita</i>	-
Gardénine B (29)	<i>M. x piperita</i>	-
Sorbifoline (31)	<i>M. x piperita</i>	<i>M. spicata</i>
Lutéoline (32)	<i>M. x piperita</i>	<i>M. spicata</i>
Thymusine (33)	<i>M. x piperita</i>	<i>M. spicata</i>
Thymonine (34)	<i>M. x piperita</i>	<i>M. spicata</i>
5,6-dihydroxy-7,3',4'-triméthoxyflavone (35)	<i>M. x piperita</i>	<i>M. spicata</i>
Sideritoflavone (36)	<i>M. x piperita</i>	<i>M. spicata</i>
5,4' -dihydroxy-6,7,8,3'-tetraméthoxyflavone (37)	<i>M. x piperita</i>	<i>M. spicata</i>
Ladaneine (38)	<i>M. x piperita</i>	-
Gardénine D (39)	<i>M. x piperita</i>	-
Cirsilineole (40)	-	<i>M. spicata</i>
5-hydroxy-6,7,3',4'-tetraméthoxyflavone (41)	-	<i>M. spicata</i>
5,6,4'-tetrahydroxy-7,3'-diméthoxyflavone (42)	-	<i>M. spicata</i>

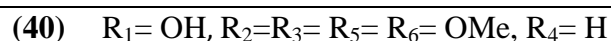
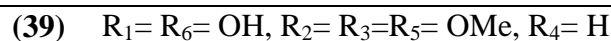
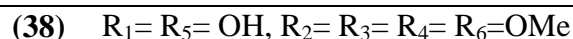
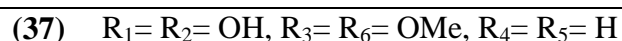
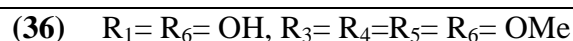


(31) $R_1 = R_2 = R_6 = \text{OH}$, $R_3 = \text{OMe}$, $R_4 = R_5 = \text{H}$

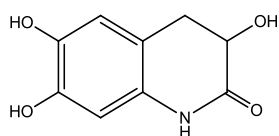
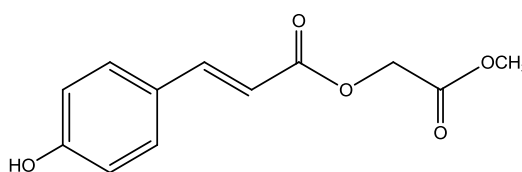
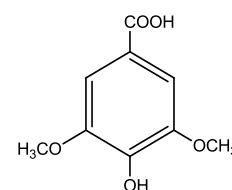
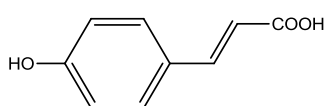
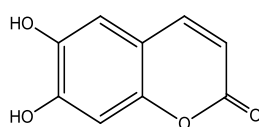
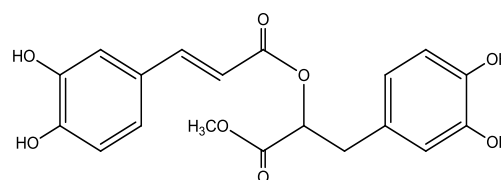
(33) $R_1 = R_2 = R_6 = \text{OH}$, $R_3 = R_4 = R_5 = \text{OMe}$,

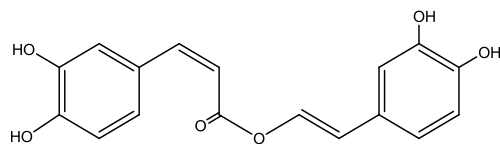
(33) $R_1 = R_2 = R_6 = \text{OH}$, $R_3 = R_4 = R_5 = \text{OMe}$

(34) $R_1 = R_2 = \text{OH}$, $R_3 = R_5 = R_6 = \text{OMe}$, $R_4 = \text{H}$

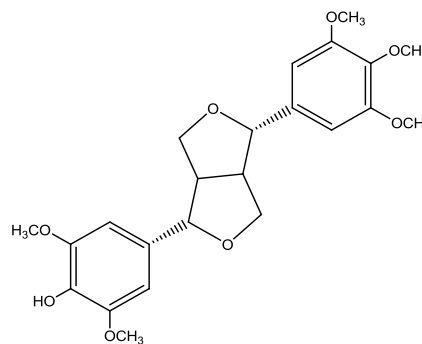


Un dérivé quinolique et des dérivés phénoliques ont été isolés de l'espèce *Mentha canadensis* (Mingliang *et al.*, 2013) : 3,4-dihydro-3,6-trihydroxy-2(1H)-quinoline **(42)**, (E)-2-methoxy-2-oxethyl-3-(4-hydroxyphenyl) acrylate **(43)** acide syringique **(44)**, acide *p*-coumarique **(45)**, esculetine **(46)**, rosmarinat de méthyl **(47)**, népétoïdine **(48)**, syriengaresinol **(49)**, acide méthyl ester glycolique cafféol **(50)**, 2'', 3''-diacéthylmartynoside **(51)**, bracteanolide **(52)** et acide cis-3-2-1-(3,4-dihydroxyphényl)-1-hydroxyméthyl-1,3-benzodioxol-5-yl (E)-2-propénoïque **(53)**.

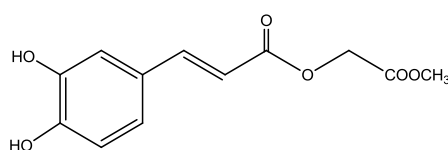
**(42)****(43)****(44)****(45)****(46)****(47)**



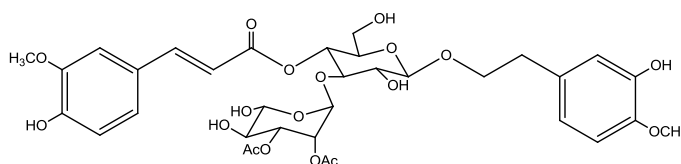
(48)



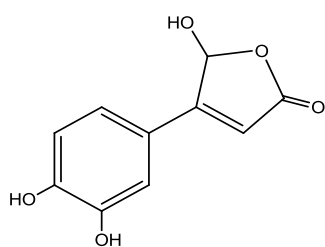
(49)



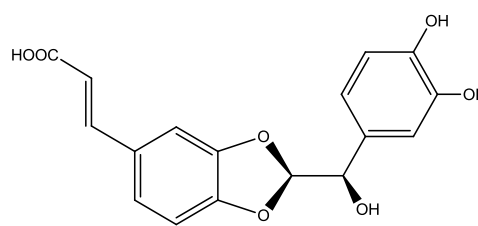
(50)



(51)

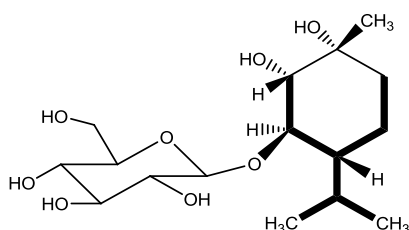


(52)

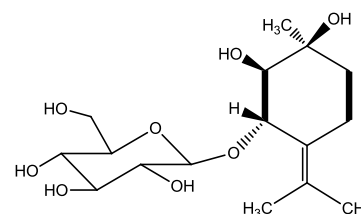


(53)

Une étude de la plante *Mentha haplocalyx* Briq a permis d'isoler deux nouveaux monoterpènes glucosylés d'extrait acétone aqueux, *rel*-(1*R*,2*S*,3*R*,4*R*) *p*-menthane-1,2,3-triol 3-O- β -D-glucopyranoside (**54**) et *rel*-(1*S*,2*R*,3*S*) terpinolène-1,2,3-triol 3-O- β -D-glucopyranoside (**55**) (Gai-Mei S. *et al.*, 2012).



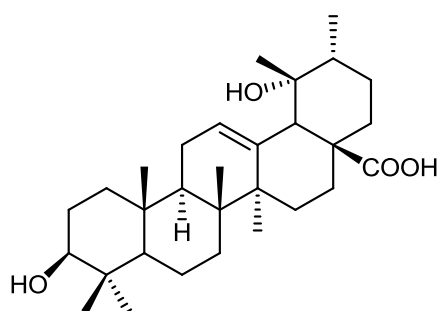
(54)



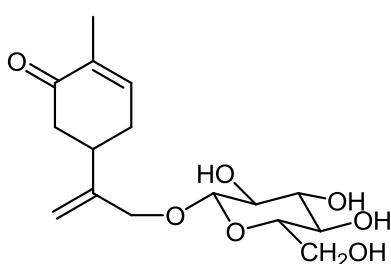
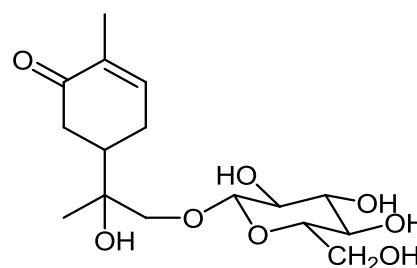
(55)

Une autre étude effectuée sur *Mentha arvensis* var. *piperascens* MAL, *M. spicata* et *M. rotundifolia* (Karasawa *et al.*, 1980) montre l'existence des 3 acides triterpéniques :

oléanolique (**18**), ursolique (**17**) et pomolique (**56**) dans les espèces étudiées. Ainsi que maslinique (**19**) existe dans l'espèce *Mentha arvensis* var. *piperascens* MAL.

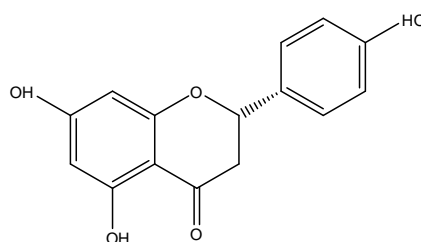
**(56)**

Deux autres monoterpènes ont été isolés de *Mentha spicata* à partir de la plante entière, spicatoside A (**57**) et spicatoside B (**58**) (Jian *et al.*, 2003).

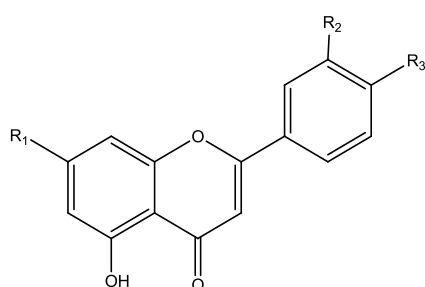
**(57)****(58)**

1.7. Métabolites secondaire de l'espèce *Mentha aquatica* L.

Une recherche bibliographique a montré que l'espèce *M. aquatica* n'a pas été largement étudiée chimiquement. Une étude phytochimique mentionnée réalisé par Jäger et ces collaborateurs, a abouti à la mise en évidence un flavonoïde: (S)-naringenine (**59**) (Jäger *et al.*, 2007), et l'étude effectuée sur l'extrait EtOH de *M. aquatica* L. poussant en Afrique du Sud, a permis d'isoler et de caractériser le même flavonoïde (Helle *et al.*, 2008).

**(59)**

Zdzislawa et al. ont étudié l'espèce *Mentha aquatica* L. Herb qui a abouti à l'identification de 12 flavonoïdes, de type flavone et flavanone à partir de l'extrait MeOH (Zdzislawa et al., 1977) qui sont des flavones: apigénine (**25**), acacétine (**26**), lutéoline (**32**), lutéoline 7- α -L-rhamnosyl- β -D-glucopyranoside (**60**), acacétine 7- β -D-rutinoside (**61**), lutéoline 7- β -D-glucopyranoside (**62**), apigénine 7- α -L-rhamnosyl- β -D-glucopyranoside (**63**), 4',5,7-trihydroxyflavone-7- β -D-glucopyranoside (**64**) et des flavanones : 3',5,7-trihydroxy-4'-méthoxyflavanone-7- α -L-rhamnosyl- β -D-glucopyranoside (**65**), hespértine 7- β -D-glucopyranoside (**66**), ériocitrine (**67**), ériodyctiol 7- α -L-rhamnosyl- β -D-glucopyranoside (**68**).



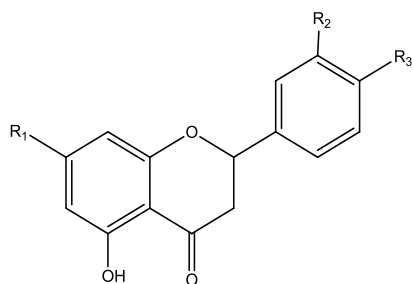
(60) R₁= Rutinose, R₂=R₃= OH

(61) R₁= Rutinose, R₂=H, R₃=OMe

(62) R₁= Glucose, R₂= R₃=OH

(63) R₁= Rutinose, R₂= H, R₃= OH

(64) R₁= Glucose, R₂= H, R₃= OH



(65) R₁= Rutinose, R₂= OH, R₃= CH₃

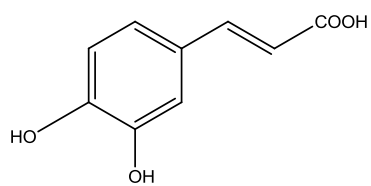
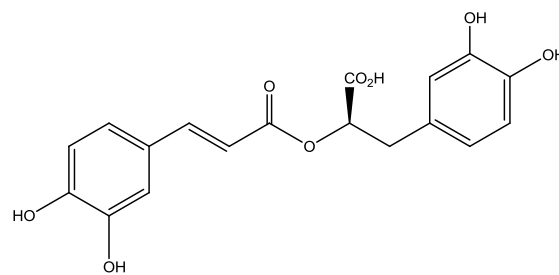
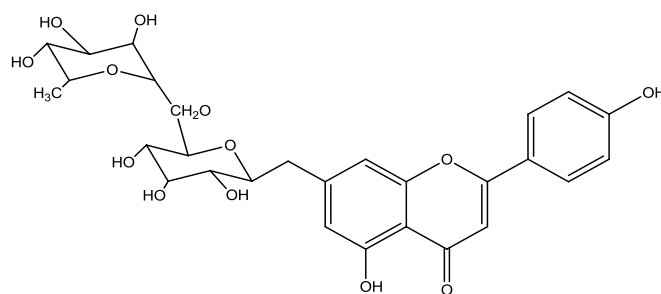
(66) R₁= Glucose, R₂= OH, R₃= CH₃

(67) R₁= Glucose, R₂=R₃= OH

(68) R₁= Rutinose, R₂=R₃= OH

D'autres flavonoïdes ont été détectés dans les feuilles de l'espèce *Mentha aquatica*, qui sont : Xanthomicrol (**27**), pebréline (**28**), salvigénine (**14**) et la gardénine B (**29**). (Bernard et al., 1999).

Une autre étude phytochimique de la plante *Mentha aquatica* effectuée par Müberra et col. (Muberra et al., 2004) a abouti à l'identification de 5 composés : l'acide cafféique (**69**), l'ériocitrine (**67**), la luteoline-7-O-glucoside (**1**), l'acide rosmarinique (**70**) et l'isorhoifoline (**71**).

**(69)****(70)****(71)**

CHAPITRE 2

Aperçu bibliographique sur le genre *Stachys*

2.1. Introduction

Avec près de 450 espèces, le genre *Stachys* est considéré comme le plus grand genre de la famille des Lamiaceae (Govaerts, 2012). Le genre *Stachys* représente 14 espèces de plantes vivaces répandues en Algérie, 4 d'entre elles sont endémiques. Les plantes de ce genre sont annuelles à racines grêles, dépourvues de rejets stériles. Plantes vivaces à souche épaisse émettant en général des rejets stériles (Quezel & Santa, 1963). Leur nom de genre, qui rappelle la forme de leur inflorescence, vient du mot grec *Stachys*, qui signifie « épi » (Rivolier, 1977).

2.2. Caractéristiques botanique de *Stachys guyoniana* de Noé

Les plantes du genre *Stachys* sont des plantes à calice campanulé à dents triangulaires lancéolées et étalées, égalant au moins le 1/4 de la longueur du tube. Anthères et ovaire dépourvus de glandes. L'espèce *S. guyoniana* de Noé akènes grisâtres, fortement rugueux. Plantes à tiges prostrées flexueuses. Feuilles longues au plus de 3-4 cm. Calices fructifères régulièrement campanulacés (Quezel & Santa, 1963).

2.3. Utilisation en médecine traditionnelle

Le genre *Stachys* est le plus connu de la famille Lamiaceae. Il inclut plusieurs espèces réputées pour leurs effets thérapeutiques : cytotoxique, antimicrobien, antioxydant et antifongique (Conforti *et al.*, 2009). Il en ressort que la plupart des espèces constituant le genre *Stachys* sont utilisées en médecine traditionnelle pendant des siècles pour traiter les tumeurs génitales, la sclérose de la rate, les inflammations, la toux, les ulcères, les plaies infectées (Kumar *et al.*, 2013), la diarrhée, la fièvre, les maux de gorge, la faiblesse cardiaque, l'hémorragie interne, la migraine, névralgie et la sclérose de la rate (Conforti *et al.*, 2009 ; Hartwell, 1982 ; Háznagy-Radnai *et al.*, 2006; Matkowski & Piotrowska, 2006; Ritchason, 1995; Vundác *et al.*, 2005).

Plusieurs espèces de ce genre sont utilisées comme «Thé de montagne », aussi dans la préparation de yaourt, la gelée et traditionnellement comme aromes et assaisonnements (Conforti *et al.*, 2009). Les thés préparés à partir de la plante entière ou de feuilles sont utilisés en phytothérapie pour leurs propriétés: sédatif, antispasmodique, diurétique et emmenagogue (Duke, 1986; Goren *et al.*, 2011; Lewis, 1977).

La variété *Stachys* marqué comme plantes alimentaires et appliquée pour l'amélioration du goût dans la préparation de yaourt et utilisée comme arôme et assaisonnements (Conforti *et al.*, 2009).

En Turquie (Anatolie), plusieurs espèces du genre *Stachys* sont utilisées comme remède sous forme du « thé sauvage ». La décoction ou l'infusion de *Stachys* été appliqué autant que tonique pour traiter la peau et les troubles d'estomac (Öztürk *et al.*, 2009).

Les parties aériennes de *Stachys inflata* Benth (Turquie) sont utilisées en médecine traditionnelle Iranienne pour les infections, asthme, rhumatisme et les troubles inflammatoires (Khanavi *et al.*, 2005 ; Maleki *et al.*, 2001). L'espèce *S. recta* poussant en Turquie, a été employée comme agent de guérison des plaies, une autre espèce *S. lavandulifolia* (Turquie) est utilisée pour les troubles digestives (Khanavi *et al.*, 2005, Öztürk *et al.*, 2009).

Stachys inflata Benth est l'une des espèces endémiques d'Iran, leurs parties aériennes utilisées par voie orale comme tisane dans le traitement de diverses infections, asthme, rhumatisme et d'autres troubles inflammatoires (Zargari, 1990).

Dans la médecine traditionnelle Hongrois, *S. officinalis*, *S. recta*, *S. sylvatica* et *S. palustris* sont employées pour leurs propriétés : anti-inflammatoire, anti-rhumatisme et antibactérienne, antiphlogistique, spasmolytique, diurétique, sédative et pour le traitement des maladies tumorales (Duke, 2002, Háznagy-Radnai *et al.*, 2006, Heinrich *et al.*, 2004, Hiller *et al.*, 2000). *S. officinalis* a des propriétés 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 & Piotrowska, 2006).

Stachys lavandulifolia Vahl espèce a été utilisé comme anxiolytique et sédative en médecine traditionnelle Iranienne (Amin, 1991).

L'espèce *S. neglecta* L. connu pour l'action de stimuler la sécrétion biliaire et hépatique, augmenter la formation de la bile, et de la bilirubine, qui signifie qu'elle possède une activité cholérétique (Pasechnik *et al.*, 1971).

2.4. Activités biologiques reconnues du genre *Stachys*

Il est bien prouvé que les produits naturels sont une excellente source de structures chimiques dotées d'une large diversité d'activités biologiques. Au cours des dernières années,

des études pharmacologiques effectuées sur différents espèces du genre *Stachys* ont montrés certains effets comme : anti-inflammatoire, antibactérien, antioxydant et cytotoxique (Conforti *et al.*, 2009). Autres études biologiques montrent considérable activités antibactérienne, anti-inflammatoire, antitoxique, anti-néphrétique, anti-hépatique et anti-anoxie pour quelques espèces du genre *Stachys* (Hayashi *et al.*, 1994 a,b, Savchenko *et al.*, 1978, Skaltsa *et al.*, 1999, Yamahara *et al.*, 1990, Zinchenko *et al.*, 1981).

Des études biologiques récentes effectuées *in vitro* et *in vivo* sur plusieurs extraits et composés isolés des espèces du genre *Stachys*, notamment antimicrobienne, antioxydant, anxiolytique et anti-inflammatoire. *Stachys alpina*, *S. germanica* and *S. recta* ont subi des investigations biologiques en vue de mettre en évidence d'éventuelles propriétés anti-inflammatoires remarquables (Tundis *et al.*, 2014). Des iridoïdes isolés des plantes cité précédemment, l'aucubine et l'harpagoside ont démontré des effets anti-inflammatoires. Des études conduits à la conclusion que les iridoïdes doivent être impliqué dans l'activité anti-inflammatoire (Recio *et al.*, 1994).

Maleki-Dijazi *et al.* ont mis en évidence le potentiel anti-inflammatoire de l'extrait hydro-alcoolique de *S. schtschegleevii* (Maleki-Dijazi *et al.* 2008). Dans ce contexte, cette activité est liée à la présence phénylétanoïdes glucosilés : l'actéoside et bétonyoside F, ainsi d'autres six flavonoïdes : apigénine-7-O- β -glucopyranoside, apigénine-7-O-[6''(E)-*p*-coumaroyl]- β -D-glucopyranoside, chrysoériol-7-O-[6''(E)-*p*-coumaroyl]- β -D-glucopyranoside, cirsimaritrine, 3'-hydroxy-isoscutellareine-7-O-(6'''-acétyloxy)-*b*-allopyranosyl-(1''' \rightarrow 2'')- β -D-glucopyranoside, xanthomicrol (Nazemiyeh *et al.*, 2006). La majorité d'entre eux concernent surtout des effets anti-inflammatoires et anti-nociceptive *in vivo* (Küpeli *et al.*, 2007).

D'autre étude effectuée sur les deux extraits acétone et méthanol de *S. byzantina* montre que cette plante joue un rôle important dans l'inhibition des douleurs ainsi dans le processus inflammatoire (Khanavi *et al.*, 2005).

L'extrait hydro-alcoolique de *S. inflata* révèle action anti-inflammatoire et anti-nociceptive chez les rats (Maleki *et al.*, 2001).

Les feuilles de *S. sylvatica* collectée de plusieurs régions à Kosovo révèlent une activité anti-oxydante avec le DPPH' (Tundis *et al.*, 2014).

L'extrait aqueux de *S. iberica* montre une activité anti-oxydante *in vitro* (Tepe *et al.*, 2011). Cette plante révèle une bonne activité anti-oxydante avec l'acide linoléique (88,14%)

à la concentration de 2 mg/mL, par contre elle a montré une activité moins avec la méthode de chelation des ions ferreux (46,63% à 1,0 mg/mL et 33,14% à 2 mg/mL respectivement) (Tundis *et al.*, 2014).

Des études antérieures ont montré la présence de phényléthanoïdes glucosilés tels que actéoside, martinoside et forsithoside B comme les principaux constituants de *S. plumosa* (Bankova *et al.*, 1999). Ces composés se sont révélés d'être de puissants antioxydants (Aligianis *et al.*, 2003).

L'activité anti-oxydante *in vitro* de l'extrait méthanolique obtenue des parties aériennes de *S. spruneri* a été étudié avec 20 autres plantes appartenant à la famille des Lamiacées et trouvé d'être actif en tant que le α -tocophérol (Couladis *et al.*, 2003).

En médecine traditionnelle Iranienne, *S. lavandulifolia* a été utilisé en tant que anxiolytique et sédatif et que l'extrait hydro-alcoolique de cette dernière possède une activité anxiolytique accompagnée par une diminution de l'activité sédatif (Rabbani *et al.*, 2005).

2.5. Métabolites secondaire du genre *Stachys*

La recherche bibliographique réalisée sur le genre *Stachys* montre sa richesse en composés phénoliques de type flavonique (**Tableau 2**), iridoïdes (**Tableau 3**) terpénique (**Tableau 4 et 5**).

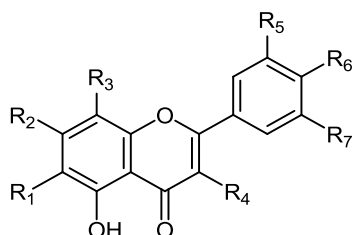
2.5.1. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés largement répandus dans le genre *Stachys*, ce sont des marqueurs chimiotaxonomiques, leur importance biologique a été largement démontrée. Le tableau suivant (**Tableau 2**) résume quelques flavonoïdes isolés de plusieurs espèces du genre *Stachys*.

Tableau 2 : Quelques flavonoïdes isolés du genre *Stachys*

Flavonoïdes	Espèces	Référence
Apigénine (25)	<i>S. aegyptiaca</i> L. <i>S. ionica</i> <i>S. officinalis</i> L.	El-Ansari <i>et al.</i> , 1991 Meremeti <i>et al.</i> , 2004 Kobzar & Nikonov, 1986
Lutéoline (31)	<i>S. aegyptiaca</i> L. <i>S. neglecta</i> L.	El-Ansari <i>et al.</i> , 1991 Zinchenko, 1969
Salvigénine (14)	<i>S. ionica</i> Halacsy <i>S. swainsonii</i> subsp. <i>argolica</i>	Meremeti <i>et al.</i> , 2004 Skaltsa <i>et al.</i> , 2006
Xanthomicrol (27)	<i>S. schtschegleevii</i> Sosn. <i>S. swainsonii</i> subsp. <i>argolica</i>	Nazemiyeh <i>et al.</i> , 2006 Skaltsa <i>et al.</i> , 2006

Cirsimaritine (71)	<i>S. schtschegleevii</i> Sosn.	Nazemiyeh <i>et al.</i> , 2006
Casticine (72)	<i>S. ionica</i> Halacsy	Meremeti <i>et al.</i> , 2004
Penduletine (73)	<i>S. swainsonii</i> subsp. <i>Swainsonii</i>	Skaltsa <i>et al.</i> , 2006
Naringénine (59)	<i>S. aegyptiaca</i> L.	El-Ansari <i>et al.</i> , 1995
Vicénine-2 (74)	<i>S. aegyptiaca</i> L. <i>S. palustris</i> L.	El-Ansari <i>et al.</i> , 1991 Marin <i>et al.</i> , 2004



(71) R₁= R₂= OMe, R₃= R₄=R₅=R₆=H

(72) R₁= R₂= R₄= R₆= R₇= OMe, R₃=H, R₅= OH

(73) R₁= R₂= R₄= OMe, R₃=R₅= R₇= H, R₆=OH

(74) R₁= R₃= Glc, R₂=R₆=OH, R₄= R₅= R₇=H

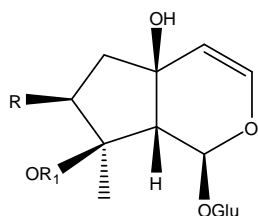
2.5.2. Iridoïdes :

Les iridoïdes appartiennent à la classe des monoterpènes, la plupart des terpènes isolés du genre *Stachys* sont des diterpènes bicycliques. Le tableau suivant (**Tableau 3**) résume les iridoïdes isolés du genre *Stachys*.

Tableau 3 : Les iridoïdes isolés du genre *Stachys* (Tundis *et al.*, 2014).

Iridoïde	Plante	Référence
Harpagide (75)	<i>S. alpina</i> <i>S. corsica</i> <i>S. germanica</i> <i>S. germanica</i> subsp. <i>salvüfolia</i> <i>S. glutinosa</i> <i>S. grandidentata</i> <i>S. palustris</i> <i>S. recta</i> <i>S. spinosa</i>	Háznagy-Radnai <i>et al.</i> , 2012 Serrilli <i>et al.</i> , 2005 Háznagy-Radnai <i>et al.</i> , 2006 Venditti <i>et al.</i> , 2013a Serrilli <i>et al.</i> , 2006 Muñoz <i>et al.</i> , 2001 Háznagy-Radnai <i>et al.</i> , 2008 Háznagy-Radnai <i>et al.</i> , 2012 Kotsos <i>et al.</i> , 2001
7-β-Hydroxy-harpagide (76)	<i>S. germanica</i> subsp. <i>salvüfolia</i>	Venditti <i>et al.</i> , 2013a
Ajugol (77)	<i>S. germanica</i> subsp. <i>salvüfolia</i> <i>S. grandidentata</i> <i>S. spinosa</i>	Venditti <i>et al.</i> , 2013a Muñoz <i>et al.</i> , 2001 Kotsos <i>et al.</i> , 2001
5-Allosylloxy-aucubine (78)	<i>S. germanica</i> subsp. <i>salvüfolia</i> <i>S. glutinosa</i> <i>S. lavandulifolia</i>	Venditti <i>et al.</i> , 2013a Serrilli <i>et al.</i> , 2006 Delazar <i>et al.</i> , 2011
Ajugoside (79)	<i>S. alpina</i> <i>S. germanica</i> <i>S. recta</i>	Háznagy-Radnai <i>et al.</i> , 2012 Háznagy-Radnai <i>et al.</i> , 2006 Háznagy-Radnai <i>et al.</i> , 2012
Aucubine (80)	<i>S. alpina</i>	Háznagy-Radnai <i>et al.</i> , 2012

	<i>S. germanica</i> <i>S. palustris</i> <i>S. recta</i>	Háznagy-Radnai <i>et al.</i> , 2006 Háznagy-Radnai <i>et al.</i> , 2008 Háznagy-Radnai <i>et al.</i> , 2008
Acetylharpagide (81)	<i>S. alpina</i> <i>S. corsica</i> <i>S. germanica</i> <i>S. glutinosa</i> <i>S. recta</i>	Háznagy-Radnai <i>et al.</i> , 2012 Serrilli <i>et al.</i> , 2005 Háznagy-Radnai <i>et al.</i> 2006, 2012 Serrilli <i>et al.</i> , 2006 Háznagy-Radnai <i>et al.</i> , 2012
Harpagoside (82)	<i>S. alpina</i> <i>S. germanica</i> <i>S. recta</i>	Háznagy-Radnai <i>et al.</i> , 2012 Háznagy-Radnai <i>et al.</i> , 2006 Háznagy-Radnai <i>et al.</i> , 2012
Monomelittoside (83)	<i>S. glutinosa</i> <i>S. grandidentata</i>	Serrilli <i>et al.</i> , 2006 Muñoz <i>et al.</i> , 2001
Catalpol (84)	<i>S. grandidentata</i>	Muñoz <i>et al.</i> , 2001
Stachyoside E (85)	<i>S. lanata</i>	Murata <i>et al.</i> , 2008
Stachyoside F (86)	<i>S. lanata</i>	Murata <i>et al.</i> , 2008
Stachyoside G (87)	<i>S. lanata</i>	Murata <i>et al.</i> , 2008
Stachyoside H (88)	<i>S. lanata</i>	Murata <i>et al.</i> , 2008
Acide 7-O-Acetyl-8-épi-loganique (89)	<i>S. spinosa</i>	Kotsos <i>et al.</i> , 2001
Allobetonoside (90)	<i>S. glutinosa</i> <i>S. macrantha</i>	Serrilli <i>et al.</i> , 2006 Çalis <i>et al.</i> 1992

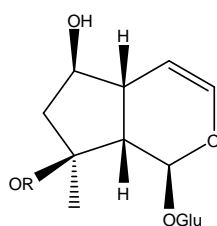


(75) R=H, R₁=H

(76) R=OH, R₁=H

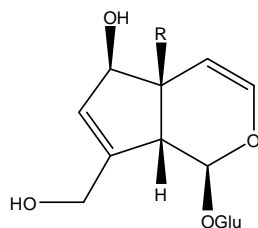
(81) R=H, R₁=Ac

(82) R=H, R₁=cinnamoyl



(77) R=H

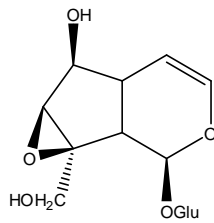
(79) R=Ac



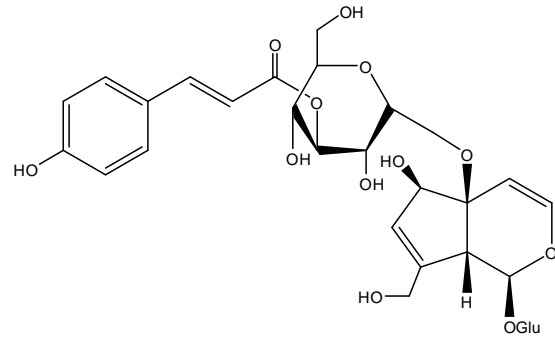
(80) R=H, R₁=H

(78) R=OH, R₁=H

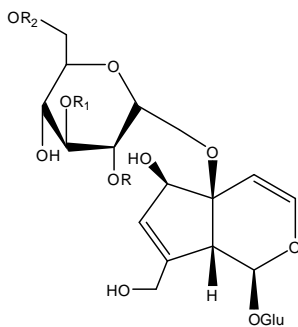
(83) R=H, R₁=Ac



(84)



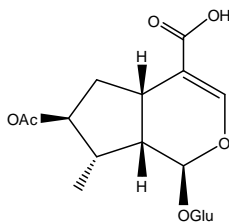
(85)



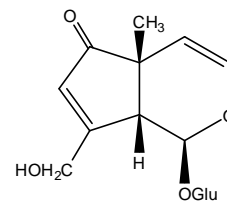
(86) R=R₂=H, R₁=*O-p-(Z)-coumaroyl*

(87) R=R₁=H, R₂=*O-p-(E)-coumaroyl*

(88) R= *O-p-(E)-coumaroyl*, R₁= R₂=H



(89)



(90)

2.5.3. Terpénoïdes :

Le tableau suivant (**Tableau 4**) résume quelques diterpénoïdes isolés du genre *Stachys*.

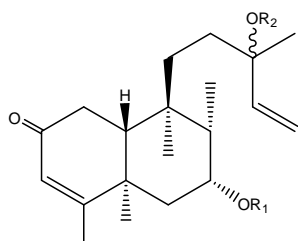
Tableau 4 : Les diterpènes isolés du genre *Stachys*.

Diterpènes	Espèces	Référence
Stachysolone (91)	<i>S. annua</i> <i>S. aegyptiaca</i>	Orgiyan <i>et al.</i> , 1969, Popa <i>et al.</i> , 1972a, Popa <i>et al.</i> , 1972b Melek <i>et al.</i> , 1992
Diacetyl-stachysolone (92)	<i>S. annua</i> <i>S. recta</i>	Popa <i>et al.</i> , 1972a Adinolfi <i>et al.</i> , 1984
7-monoacetyl-stachysolone (93)	<i>S. annua</i> <i>S. recta</i>	Popa <i>et al.</i> , 1972a Adinolfi <i>et al.</i> , 1984
13-monoacetyl-stachysolone (94)	<i>S. annua</i> <i>S. recta</i>	Popa <i>et al.</i> , 1972a Adinolfi <i>et al.</i> , 1984

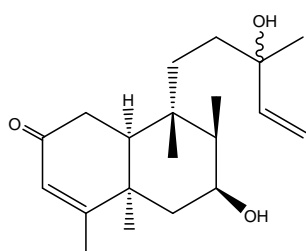
Aperçu bibliographique sur le genre *Stachys*

Annuanone (95)	<i>S. annua</i> <i>S. atherocalix</i> <i>S. balansae</i> <i>S. iberica</i> <i>S. inflata</i> <i>S. palustris</i> <i>S. silvatica</i>	Orgiyan <i>et al.</i> , 1970, Popa <i>et al.</i> , 1974a, Derkach, 1998 Derkach, 1980 Derkach, 1980 Derkach, 1980 Derkach, 1980 Derkach, 1980 Derkach, 1980
Stachylone (96)	<i>S. annua</i> <i>S. atherocalix</i> <i>S. balansae</i> <i>S. iberica</i> <i>S. inflata</i> <i>S. palustris</i> <i>S. silvatica</i>	Orgiyan <i>et al.</i> , 1970; Popa <i>et al.</i> , 1974b; Derkach, 1998 Derkach, 1980 Derkach, 1980 Derkach, 1980 Derkach, 1980 Derkach, 1980 Derkach, 1980
Stachone (97)	<i>S. annua</i> <i>S. atherocalix</i> <i>S. iberica</i> <i>S. inflata</i> <i>S. palustris</i> <i>S. silvatica</i>	Orgiyan <i>et al.</i> , 1970; Popa <i>et al.</i> , 1974b; Derkach, 1998 Derkach, 1980 Derkach, 1980 Derkach, 1980 Derkach, 1980 Derkach, 1980
Acide stachysique (98)	<i>S. silvatica</i>	Popa <i>et al.</i> , 1974c
6 β -hydroxy- <i>ent</i> -kaur-16-ène (99)	<i>S. silvatica</i>	Popa <i>et al.</i> , 1974c
6 β ,18-dihydroxy- <i>ent</i> -kaur-16-ène (100)	<i>S. silvatica</i>	Popa <i>et al.</i> , 1974c
Acide 3 α -acetoxy-19-kaur-16-èn-oïque (101)	<i>S. lanata</i>	Piozzi <i>et al.</i> , 1980
Acide 3 α -hydroxy-19-kaur-16-èn-oïque (102)	<i>S. lanata</i>	Piozzi <i>et al.</i> , 1980
3 α ,19-dihydroxy- <i>ent</i> -19-kaur-16-ène (103)	<i>S. lanata</i>	Piozzi <i>et al.</i> , 1980
Bétolide (104)	<i>S. officinalis</i> <i>S. germanica</i> <i>S. silvatica</i> <i>S. thracica</i> <i>S. plumosa</i>	Tkachev <i>et al.</i> , 1987, Miyase <i>et al.</i> , 1996 Bankova <i>et al.</i> , 1999 Bankova <i>et al.</i> , 1999 Bankova <i>et al.</i> , 1999 Bankova <i>et al.</i> , 1999
Bétonicolide (105)	<i>S. officinalis</i>	Miyase <i>et al.</i> , 1996
Bétonicoside A (106)	<i>S. officinalis</i>	Miyase <i>et al.</i> , 1996
Bétonicoside B (107)	<i>S. officinalis</i>	Miyase <i>et al.</i> , 1996
Bétonicoside C (108)	<i>S. officinalis</i>	Miyase <i>et al.</i> , 1996
Bétonicoside D (109)	<i>S. officinalis</i>	Miyase <i>et al.</i> , 1996
Roséostachénone (110)	<i>S. rosea</i>	Fazio <i>et al.</i> , 1992
Roséostachone (111)	<i>S. rosea</i>	Fazio <i>et al.</i> , 1992
Roséostachénol (112)	<i>S. rosea</i>	Fazio <i>et al.</i> , 1994a
Roséotétrol (113)	<i>S. rosea</i>	Fazio <i>et al.</i> , 1994a
13- <i>épi</i> -sclaréol (114)	<i>S. rosea</i>	Fazio <i>et al.</i> , 1994a
Ribénone (115)	<i>S. mucronata</i>	Fazio <i>et al.</i> , 1994b
Ribéol (116)	<i>S. mucronata</i>	Fazio <i>et al.</i> , 1994b
(+)-6-déoxyandalusol (117)	<i>S. plumosa</i> <i>S. ionica</i>	Paternostro <i>et al.</i> , 2000 Piozzi <i>et al.</i> , 2002

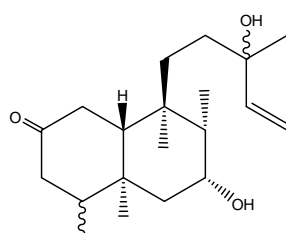
	<i>S. distans</i>	Piozzi <i>et al.</i> , 2002
(+)-13-épijbugodiol (118)	<i>S. plumosa</i>	Paternostro <i>et al.</i> , 2000
(+)-plumosol (119)	<i>S. plumosa</i>	Khanavi <i>et al.</i> , 2005
Phytol nonadécanoate (120)	<i>S. byzantina</i>	Buil <i>et al.</i> , 1981



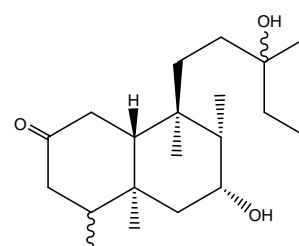
- | | |
|------|------------------|
| (91) | $R_1=H, R_2=H$ |
| (92) | $R_1=Ac, R_2=Ac$ |
| (93) | $R_1=Ac, R_2=H$ |
| (94) | $R_1=H, R_2=Ac$ |



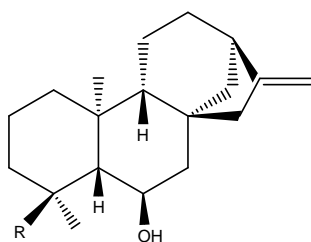
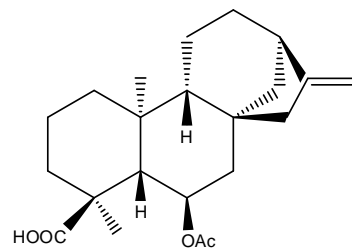
(95)



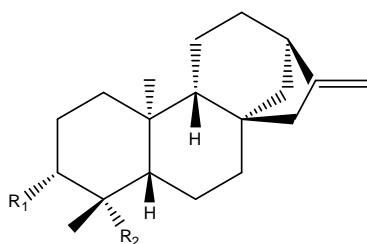
(96)



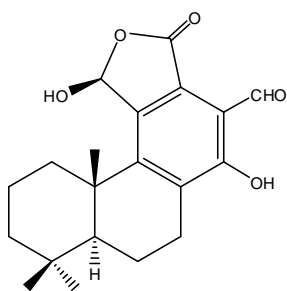
(97)

(99) $R=CH_3$, (100) $R=CH_2OH$ 

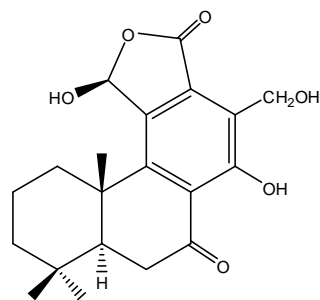
(98)



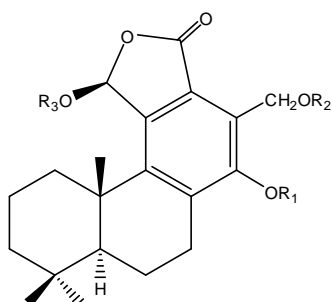
- | | |
|-------|----------------------|
| (101) | $R_1=OAc, R_2=COOH$ |
| (102) | $R_1=OH, R_2=COOH$ |
| (103) | $R_1=OH, R_2=CH_2OH$ |



(104)



(105)

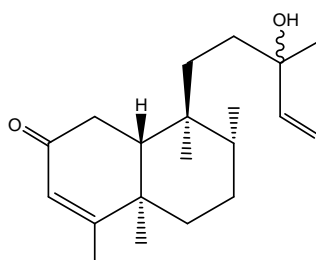


(106) $R_1=\text{Glu}, R_2=\text{H}, R_3=\text{Glu}$

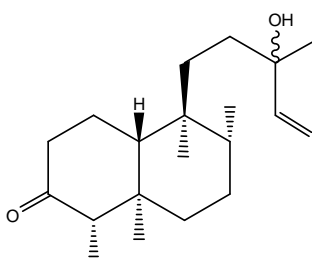
(107) $R_1=\text{Glu}, R_2=\text{H}, R_3=\text{H}$

(108) $R_1=\text{H}, R_2=\text{H}, R_3=\text{Glu}$

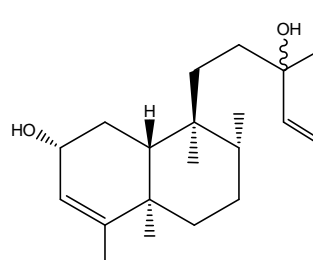
(109) $R_1=\text{H}, R_2=\text{Glu}, R_3=\text{H}$



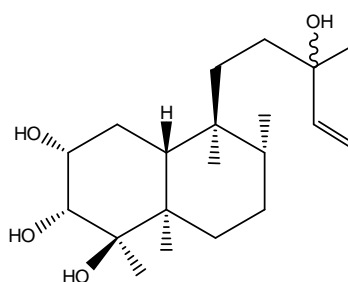
(110)



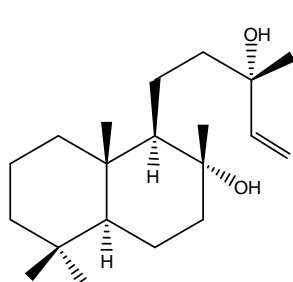
(111)



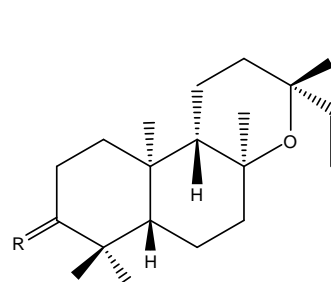
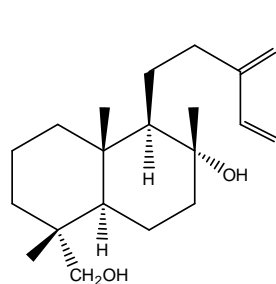
(112)



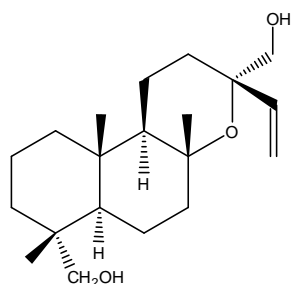
(113)



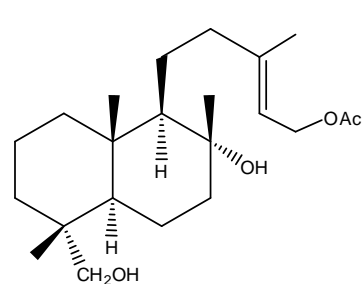
(114)

(115) $R=\text{O}$, (116) $R=\alpha\text{OH}, \beta\text{H}$ 

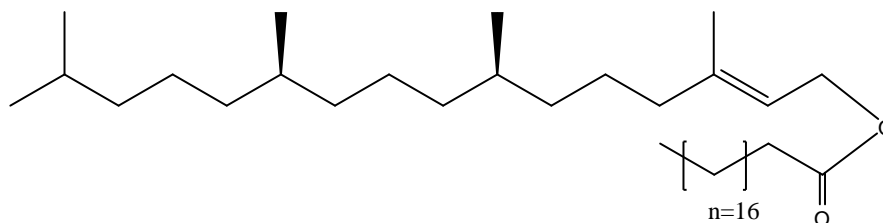
(117)



(118)



(119)



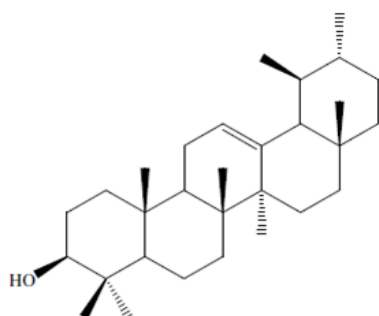
(120)

2.5.4. Triterpénoïdes :

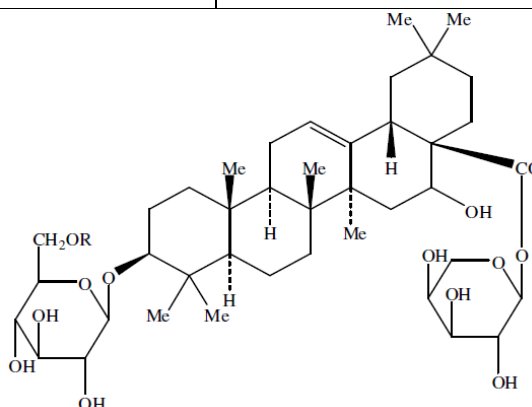
Quelques triterpènes sont répertoriés dans le genre *Stachys* (**Tableau 5**).

Tableau 5 : Triterpénoïdes isolés du genre *Stachys*

Triterpènes	Espèces	Référence
α -Amyrine (121)	<i>S. palustris</i> L.	Ross & Zinchenko, 1975
Acide oléanolique (18)	<i>S. spinosa</i> L.	Kotsos <i>et al.</i> , 2007
Acide ursolique (17)	<i>S. sylvatica</i> L. <i>S. officinalis</i> (L.) Trevis	Janicsák <i>et al.</i> , 2006
Stachyssaponins (122)	<i>S. riederi</i> Chamisso	Yamamoto <i>et al.</i> , 1994



(121)

R = α -L-arabinopyranosyl (122)

CHAPITRE 3

Aperçu bibliographique sur les huiles essentielles du genre *Thymus*

3.1. Introduction

La famille des Lamiaceae est très répondeuse en Algérie. Le genre *Thymus* contient plus de 400 espèces réparties dans la Méditerranée et en Iran ; 26 espèces poussent en Algérie (Quezel & Santa, 1962). Il regroupe un grand nombre d'espèces, sous-espèces et variétés de plantes sauvages. Plusieurs de ces espèces sont caractéristiques de l'aire méditerranéenne. Leurs huiles essentielles sont largement utilisées dans la médecine alternative grâce à leurs propriétés antiseptiques, antispasmodiques et antimicrobiennes (Panizzi *et al.*, 1993, Van Den Broukce *et al.*, 1981).

3.2. Caractéristiques botanique de *Thymus*

Les plantes du genre *Thymus* sont sous-ligneuses, odorantes, avec des feuilles contractées, calice tubuleux à 2 lèvres, la supérieure à 3 et l'inférieure à 2 dents, ciliées dentées. L'espèce *Thymus dreatensis* Batt. est très gazonnante avec des rameaux florifères courts et des fleurs roses. Les tiges prostrées longuement rampantes. Leurs feuilles sont ovoïdes, moins de 2 fois plus longues (Quezel & Santa, 1962).

3.3. Utilisation en médecine traditionnelle du genre

Les plantes du genre *Thymus* sont utilisées en médecine traditionnelle pour leurs propriétés biologiques et pharmacologiques. Les feuilles et les fleurs de ce genre sont largement utilisées pour leurs propriétés : tonique, antiseptique, antitussif et carminatif aussi bien que pour le traitement des rhumes (Amin, 2005; Zargari, 1990). Les huiles essentielles et les extraits du genre *Thymus* ont des utilisations pharmaceutiques, cosmétologiques, l'industrie de parfumerie ainsi que dans l'assaisonnement et dans la préservation de plusieurs aliments (Bauer *et al.*, 1997). Ce genre est connu localement sous le nom de : Zaatar, il est utilisé en médecine traditionnelle algérienne comme expectorant, antitussif, anti-bronchiolite, antispasmodique, anthelminthique, carminatif et diurétique (Kabouche *et al.*, 2005).

3.4. Activités biologiques reconnues du genre *Thymus*

Plusieurs études réalisées sur le genre *Thymus* ont montré leurs activités antiseptique, carminatif, antimicrobienne et antioxydante (Baranauskiene *et al.*, 2003; Stahl-Biskup *et al.*, 2002; Stahl-Biskup *et al.*, 2004). Des études récentes ont montré que les espèces du genre

Thymus ont une forte activité antibactérienne, antifongique, antivirale, antiparasitaire, spasmolytique et antioxydante (Stahl-Biskup *et al.*, 2002).

3.5. Travaux antérieurs sur les huiles essentielles du genre *Thymus*

Un grand nombre d'espèces de *Thymus* ont fait, à ce jour, l'objet d'études chimiques sur les huiles essentielles. Le thymol et le carvacrol sont les principaux composés phénoliques trouvés dans les huiles essentielles de ce genre, ainsi que le *p*-cymène, le 1,8-cinéole, le linalool et d'autres monoterpènes. Les espèces peuvent être regroupées selon des chémotypes le thymol et son isomère le carvacrol avec d'autres composés.

- **Chémotype 1** : Huile riche en thymol et/ou carvacrol.
- **Chémotype 2** : Huile riche en *p*-cymène et/ou γ -terpinène.
- **Chémotype 3** : Huile riche en β -phéllandrène.
- **Chémotype 4** : Huile riche en α -terpinéol.
- **Chémotype 5** : Huile riche en linalool.
- **Chémotype 6** : Huile riche en bornéol/1,8-cinéole.
- **Chémotype 7** : Huile riche en α -terpinène, β -O-cymène.
- **Chémotype 8** : Huile riche en camphre.
- **Chémotype 9** : Huile riche en géraniol.

La recherche bibliographique réalisée sur les huiles essentielles du genre *Thymus* montre les chémotypes thymol ou carvacrol et autres (**Tableaux 6-14**).

Chémotype 1 : Huiles riches en thymol et/ou carvacrol.

Il est intéressant de noter que le thymol et le carvacrol sont les composés les plus communs dans plusieurs espèces de ce genre. Ces espèces (**Tableau 6**), collectés des différents pays du monde montrent des concentrations de thymol variant de 13 à 80 % et celle du carvacrol de 6 à 82 %.

Tableau 6 : Huiles essentielles riches en thymol et/ou carvacrol.

Espèces (Origine)		Thymol	Carvacrol
<i>T. ciliatus</i> (Algérie)	Bousmaha-Marroki <i>et al.</i> , 2007	-	80.3
<i>T. kotshyanus</i> (Iran)	Jamshidi <i>et al.</i> , 2006	13.9	82.0

Aperçu bibliographique sur les huiles essentielles du genre *Thymus*

	Kizil <i>et al.</i> , 2006	41.6	-
<i>T. lanceolatus</i> (Algérie)	Nouasri <i>et al.</i> , 2015	80.2	6.2
<i>T. marshallianus</i> (Russie)	Durnova <i>et al.</i> , 2014	54.6	-
<i>T. algeriensis</i> (Lybie)	Giweli <i>et al.</i> , 2013	38.5	-
<i>T. praeocox</i> (Turquie)	Avci <i>et al.</i> , 2011	48.1	22.2
<i>T. pulegiodes</i> (Espagne)	Salas <i>et al.</i> , 2011	13.9	-
<i>T. quinquecristatus</i> (Chine)	Yang <i>et al.</i> , 2004	28.5	11.4

Chémotype 2 : Huiles riches en *p*-cymène et/ou γ -terpinène.

Un très grand nombre des espèces du genre *Thymus* se composent au moins de 2 sur 4 composés suivants : thymol et/ou Carvacrol et *p*-cymène et/ou γ -terpinène. Les 36 espèces (**Tableau 7**) du genre *Thymus* se répartissent comme suit dans le monde :

- Algérie : 7 espèces.
- Espagne : 5 espèces
- Iran : 4 espèces.
- Chine : 3 espèces.
- Turquie et Inde : 2 espèces.
- Italie, Tunisie, Grèce, Roumanie, Maroc, Estonie, Allemagne, Cuba, Yémen : 1 espèce.

La présence du thymol est grande dans la plupart des plantes par rapport à son isomère le carvacrol. On trouve que les 6 espèces suivantes : *T. numidicus*, *T. palloscens*, *T. capitatus*, *T. pulegiodes*, *T. capitatus* et *T. pallescens* (Algérie, Espagne et Roumanie) ont comme composé majoritaire le carvacrol. En outre, toutes ces plantes paraissent riches en *p*-cymène sauf les 3 espèces : *T. vulgaris* et *T. migricus* poussant en Iran et *T. capitatus* (Espagne).

Tableau 7 : Huiles essentielles riches en *p*-cymène et/ou γ -terpinène

Espèces (Origine)		Thymol	Carvacrol	<i>p</i> -Cymène	γ -Terpinène
<i>T. numidicus</i> (Algérie)	Laouer <i>et al.</i> , 2009	68.0	-	5.8	8.5
	Hazzit <i>et al.</i> , 2007	-	28.1	8.0	-
<i>T. fontanesii</i>	Dob <i>et al.</i> , 2006	29.3	-	15.9	21.7

Aperçu bibliographique sur les huiles essentielles du genre *Thymus*

(Algérie)	Kabouche <i>et al.</i> , 2005	67.8	-	13.0	15.0
<i>T. palloscens</i> (Algérie)	Hazzit <i>et al.</i> , 2009	-	65.0	15.1	17.4
<i>T. ciliatus</i> (Algérie)	Kabouche <i>et al.</i> , 2009	79.1	-	5.6	-
<i>T. daenensis</i> (Iran)	Barazandeh <i>et al.</i> , 2007	51.3	9.2	7.6	10.1
<i>T. carmanicus</i> (Iran)	Nejad Ebrahimi <i>et al.</i> , 2008	6.0	68.0	8.9	8.0
<i>T. munbyanus</i> (Algérie)	Chikhouné <i>et al.</i> , 2015	52.0	5.2	8.5	11.0
<i>T. capitatus</i> (Espagne)	Casiglia <i>et al.</i> 2015	-	81.2	22.8	34.4
<i>T. pallescens</i> Italie)	Benchabane <i>et al.</i> , 2015	7.5	68.2	10.3	9.1
<i>T. numidicus</i> (Algérie)	Kouch <i>et al.</i> , 2014	77.5	-	10.1	6.3
<i>T. cappadocicus</i> (Turquie)	Albayrak <i>et al.</i> , 2013	70.8	-	9.5	9.2
<i>T. capitatus</i> (Tunisie)	Mkaddem <i>et al.</i> , 2010	89.1	-	5.0	-
<i>T. longiculis</i> (Turquie)	Sarikurku <i>et al.</i> , 2010	27.6	-	19.3	27.8
<i>T. linearis</i> (Inde)	Verma <i>et al.</i> , 2010	66.6	-	21.6	12.4
<i>T. zygoides</i> (Grèce)	Tzakou <i>et al.</i> , 2008	19.5	-	19.4	17.2
<i>T. pulegiodes</i> (Roumanie)	Pavel <i>et al.</i> , 2010	-	62.2	7.1	9.9
<i>T. broussonetti</i> (Maroc)	El-ouariachi <i>et al.</i> , 2014	60.5	-	8.5	9.5
<i>T. vulgaris</i> (Iran)	Alizadeh <i>et al.</i> , 2013	45.2	5.1	-	12.9
<i>T. guyoni</i> (Algérie)	Lehbili <i>et al.</i> , 2013	19.5	55.5	6.2	-
<i>T. pulegiodes</i> (Espagne)	Miao <i>et al.</i> , 2011	25.6	-	16.4	31.7
<i>T. quinquecostatus</i> (Chine)	Borai <i>et al.</i> , 2010	20.8	16.5	15.6	-
<i>T. vulgaris</i> (Estonie)	Mkaddem <i>et al.</i> , 2010	30.6	41.1	11.2	9.5
<i>T. vulgaris</i> (Espagne)	Laouer <i>et al.</i> , 2009	47.5	-	27.8	16.8
<i>T. marschallianus</i> (Espagne)	Jia <i>et al.</i> , 2010	28.0	-	7.7	18.0
<i>T. proximus</i> (Espagne)		32.9	-	25.4	22.4
<i>T. vulgaris</i> (Allemagne)	Gerhard <i>et al.</i> , 2008	49.6	-	16.4	8.0
<i>T. vulgaris</i> (Cuba)	Martinez-Perez <i>et al.</i> , 2007	37.0	-	62.1	-
<i>T. ciliatus</i> (Algérie)	Ghorab <i>et al.</i> , 2013	54.9	-	6.6	11.3
<i>T. capitatus</i> (Espagne)	Concurso <i>et al.</i> , 2013	-	72.8	-	6.4
<i>T. pallescens</i> (Algérie)	Hazzit <i>et al.</i> , 2013	-	44.0	11.0	10.5
<i>T. vulgaris</i> (Iran)	Moghtader 2012	32.6	8.3	16.6	12.6
<i>T. vulgaris</i> (Yémen)	Almaqtari <i>et al.</i> , 2011	51.3	-	18.3	-
<i>T. migricus</i> (Iran)	Yavari <i>et al.</i> , 2010	55.6	-	-	16.7

Aperçu bibliographique sur les huiles essentielles du genre *Thymus*

<i>T. sperillum</i> (Inde)	Verma <i>et al.</i> , 2010	36.6	-	12.5	13.4
<i>T. proximus</i> (Chine)	Jia <i>et al.</i> , 2010	32.9	-	25.4	22.4
<i>T. marschallianus</i> (Chine)		28.0	-	7.7	18.0

Chémotype 3 : Huiles riches en β -phéllandrène.

D'après le **Tableau 8** qui résume les espèces de *Thymus* riches en β -phéllandrène, on peut observer que les plantes poussant en Iran: *T. persicuss*, *T. x-prolock*, *T. eriocalyx* et *T. longicaulis* (Kosovo) sont riches en hydrocarbure monocyclique le β -phéllandrène. Ainsi que ces huiles sont constituées du thymol qui existe dans toutes ces plantes.

Tableau 8 : Huiles essentielles riches en β -phéllandrène.

Espèces (Origine)		Thymol	Carvacrol	β -Phéllandrène	γ -Terpinène	1,8-Cinéole	Linalool
<i>T. persicuss</i> (Iran)	Meshkatalasadat <i>et al.</i> 2006	10.3	25.7	11.6	5.6	5.2	-
<i>T. x-prolock</i> (Iran)	Rasooli <i>et al.</i> , 2005	31.7	-	38.7	-	-	
<i>T. x-prolock</i> (Iran)		63.8	-	13.3	-	-	
<i>T. longicaulis</i> (Kosovo)	Hatipi <i>et al.</i> , 2013	15.2	12.6	19.1	-	14.2	9.2

Chémotype 4 : Huiles essentielles riches en α -terpinéol.

Les huiles essentielles de quelques espèces de ce genre sont riches en alcool monocyclique le : α -terpinéol, on trouve que l'espèce *T. caespititus* poussant en Chine a comme composant majoritaire le α -terpinéol (41.1%) par contre les autres espèces, contient d'autres composants comme le thymol qui est présent dans *T. pubescens* (19.1%) et *T. vulgaris* (41.3%), le carvacrol se trouve dans une seule espèce *T. pubescens* (32.1%) (**Tableau 9**).

Tableaux 9 : Huiles essentielles riches en α -terpinéol.

Espèces (Origine)		Thymol	Carvacrol	α -Terpinéol	<i>p</i> -Cymène	Géraniol
<i>T. pubescens</i> (Iran)	Morteza-Semnani <i>et al.</i> , 2006	19.1	32.1	14.6	6.1	-
<i>T. vulgaris</i> (Grèce)	Miladi <i>et al.</i> , 2013	41.3	-	24.1	-	-
<i>T. daenensis</i> (Iran)	Sabahi <i>et al.</i> , 2013	-	-	10.1	-	63.7
<i>T. caespititus</i> (Chine)	Miao <i>et al.</i> , 2011	-	-	41.1	-	-

Chémotype 5 : Huiles essentielles riches en linalool.

Un autre alcool monterpénique le linalool, présent dans 3 espèce de *T. numidicus* collecté du Nord algérien (5.4%, 11.5% et 17.2%), ainsi que le thymol (54.1%, 68.2% et 23.9%) (**Tableau 10**).

Tableau 10 : Huiles essentielles riches en linalool (1).

Espèces (Origine)		Thymol	Carvacrol	Linalool	<i>p</i> -Cymène
<i>T. numidicus</i> (Algérie)	Kabouche A <i>et al.</i> , 2005	68.2	16.9	11.5	-
<i>T. numidicus</i> (Algérie)	Benayache <i>et al.</i> , 2014	54.1	-	5.4	15.3
<i>T. vulgaris</i> (Iran)	Abedini <i>et al.</i> , 2014	10.6	57.3	11.8	-

Le grand pourcentage du linalool (63.7%) a été observé dans l'huile essentielle de la plante *T. fedisehenkoi* (Iran), suivis par la même espèce : *T. zygis* d'Ibérie (30.0%), et d'Espagne (30.0%). On observe dans le tableau 7, l'huile essentielle de la même espèce *T. zygis* d'Espagne et d'Ibérie ont la même composition : thymol (20.8%, 23.8%), carvacrol (22.0%, 25.0%), linalool (25.0%, 30.0%), géraniol (10.8%, 19.8%) et acétate de géranyl (15.8%, 20.9%) respectivement.

Tableau 11 : Huiles essentielles riches en linalool (2).

Espèces (Origine)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>T. citriodorus</i> (Chine)	Wu <i>et al.</i> , 2013	14.4	-	28.8	8.2	5.1	8	-	-	-	-	-
<i>T. numidicus</i> (Algérie)	Zeghib <i>et al.</i> , 2013	23.9	6.0	-	17.2	-	-	11.4	-	-	-	-
<i>T. zygis</i> (Espagne)	Goncalves <i>et al.</i> , 2010	20.8	22.0	-	25.0	-	-	-	10.8	15.8	-	-
<i>T. zygis</i> (Ibérie)	Goncalves <i>et al.</i> , 2010	23.8	25.0	-	30.0	-	-	-	19.8	20.8	-	-
<i>T. comphoratus</i> (Italy)	Miguel <i>et al.</i> , 2005	-	-	-	17.0	-	-	-	-	-	11.0	-
<i>T. fedisehenkoi</i> (Iran)	Khorshidi <i>et al.</i> , 2014	-	-	-	63.7	-	-	-	-	-	-	10.2

1: Thymol, 2: Carvacrol, 3: Bornéol, 4: Linalool, 5: Camphre, 6: 1-méthyl-4[α -hydroxyisopropyl]cyclohexene, 7: *O*-Cymène, 8: Géraniol, 9: Acétate de géranyl, 10: 1,8-Cinéole, 11: α -Terpinéol.

Chémotype 6 : Huiles essentielles riches en bornéol et / ou 1,8-cinéole.

D'après le tableau 13, on trouve 3 espèces riches en bornéol : *T. quinquecstatus* (12.1%), *T. vulgaris* (6.6%), *T. algeriensis* (23.5%), et 3 d'autres espèces riches en 1,8-

Aperçu bibliographique sur les huiles essentielles du genre *Thymus*

cinéole : *T. mastichina* (15.3%), *T. persicuss* (21.1%), *T. eriocalyx* (9.8%). Les autres huiles essentielles sont constituées du bornéol et le 1,8-cinéole.

Tableau 12 : Huiles essentielles riches en bornéol/1,8-cinéole.

Espèces (Origine)		Thymol	Carvacrol	Bornéol	1,8-Cinéole	<i>p</i> -Cymène	γ -Terpinène	<i>O</i> -Cymène	α -Pinène
<i>T. quinquecstatu</i> <i>s</i> (Chine)	Chen <i>et al.</i> , 2009	12.2	9.0	12.1	-	17.4	-	-	-
<i>T. eriocalyx</i> (Turquie)	Kucukbay <i>et al.</i> , 2010	79.0	-	11.9	9.8	-	-	-	-
<i>T. mastichina</i> (Italie)	Bentes <i>et al.</i> , 2009	-	75.0	-	15.3	-	-	-	-
<i>T. kotschyanus</i> (Iran)	Ahmadi <i>et al.</i> , 2015	6.7	50.4	6.4	8.0	-	-	-	-
<i>T. palludis</i> (Maroc)	Elbouchttaoui <i>et al.</i> , 2014	10.3	25.7	36.6	5.6	5.2	-	-	-
<i>T. vulgaris</i> (Iran)	Nezhadali <i>et al.</i> , 2012	45.4	-	6.6	-	-	6.9	13.4	-
<i>T. daenensis</i> (Iran)	Teimour <i>et al.</i> , 2012	29.8	13.6	6.8	5.8	11.3	-	-	-
<i>T. algeriensis</i> (Maroc)	Ait-ouazzou <i>et al.</i> , 2011	-	-	23.5	-	-	-	-	-
<i>T. persicuss</i> (Iran)	Ben et hadj <i>et al.</i> , 2012	-	-	-	21.1	-	-	-	21.3
<i>T. eriocalyx</i> (Turquie)	Kuchkbay <i>et al.</i> , 2010	47.8	-	-	9.8	-	-	-	-
<i>T. Capitellatus</i> (Italie)	Salgueiro <i>et al.</i> , 2006	-	-	19.5	47.5	-	-	-	-
<i>T. linearis</i> (Inde)	Zhigzhitzhapova <i>et al.</i> , 2008	-	28.3	13.3	-	27.8	14.3	-	-

Chémotype 7 : Huiles essentielles riches en α -terpinène, β -*O*-cymène.

L' α -terpinène, β -*O*-cymène sont présent dans les huiles essentielles (**Tableau 13**), on remarque que les 2 espèces poussant au Maroc ont identiques, *T. ciliatus* et *T. zygis*. Les grands pourcentages (22.9% à 44.2 %) ont été obtenus pour le thymol dans les 4 espèces.

Tableau 13 : Huiles essentielles riches en α -terpinène, β -*O*-cymène.

Espèces (Origine)		Thymol	Carvacrol	α -Terpinène	β - <i>O</i> -Cymène	<i>p</i> -Cymène	<i>O</i> -Cymène
<i>T. capitatus</i> (Maroc)	Hazzit <i>et al.</i> , 2009	22.9	50.2	20.2	-	-	-
<i>T. ciliatus</i> (Maroc)	El Ajjouri <i>et al.</i> , 2010	44.2	-	12.3	25.8	-	-
<i>T. zygis</i> (Maroc)	Amarti <i>et al.</i> , 2011	33.0	-	12.3	25.8	-	-
<i>T. pracox</i> (Turquie)	Ozen <i>et al.</i> , 2010	40.3	25.7	36.6	5.6	5.2	13.6

Chémotype 8 : Huiles essentielles riches en camphre.

La cétone bicyclique : le camphre, a été remarqué dans quelques espèces, ces dernières ont été cultivées au Nord d'Afrique, en Algérie : *T. algeriensis* et au Maroc : *T. ciliatus*, avec d'autres composant.

Tableau 14 : Huiles essentielles riches en camphre

Espèces (Origine)		α -Pinène	Camphre	Nérol	Néral	Bornéol	Camphène	Nérolidol	Viridiflorol
<i>T. algeriensis</i> (Maroc)	El Ajjouri <i>et al.</i> , 2010	20.5	27.5	8.3	9.3	-	-	-	-
<i>T. algeriensis</i> (Algérie)	Hamdani <i>et al.</i> , 2015	-	15.7	-	-	28.0	20.9	-	-
<i>T. ciliatus</i> (Algérie)	Chibani <i>et al.</i> , 2013	8.7	7.5	-	-	-	-	6.9	16.0

Chémotype 9 : Huiles essentielles riches en géraniol.

Le grand pourcentage du géraniol a été observé dans l'espèce *T. glarescens* de Roumanie (55.5%) suivis par *T. ciliatus* d'Algérie (45.5%). L'espèce *T. algeriensis* (Algérie) ressemble à celle d'Iran, *T. daenensis*, ou le nérol et néral sont absent dans la première.

Tableau 15: Huiles essentielles riches en géraniol.

Espèces (Origine)		Géraniol	Acétate de Géranyl	Nérol	Néral	Géranial	Acétate de néryl	β -Bisabolène
<i>T. algeriensis</i> (Maroc)	Pavel <i>et al.</i> , 2010	5.5	-	8.3	9.3	-	-	-
<i>T. algeriensis</i> (Algérie)	Hashemi <i>et al.</i> , 2010	37.2	18.7	-	-	11.2	-	-
<i>T. citrodorus</i> (Iran)	Omidbaigi <i>et al.</i> , 2005	45.5	-	5.2	10.1	13.9	-	-
<i>T. daenensis</i> (Iran)	Hashemi <i>et al.</i> , 2010	37.2	18.7	8.3	9.3	11.2	-	-

<i>T. glarescens</i> (Roumanie)	(Pavel <i>et al.</i> , 2010).	55.5	-	-	-	-	11.1	6.7
------------------------------------	----------------------------------	-------------	---	---	---	---	------	-----

2.5. 1. Généralités sur les huiles essentielles

Les médications traditionnelles et l'utilisation des plantes en médecine empirique ont souvent été à l'origine de recherches scientifiques de haut niveau. Dans la plupart des cas, ces recherches aboutissent à la découverte de substances présentant un intérêt thérapeutique considérable (Zhiri & Baudoux 2005). De nombreuses plantes produisent des huiles essentielles qui leur donnent leur parfum et jouent un rôle important dans la préservation de la plante.

Les huiles essentielles sont des arômes composées par des molécules aromatiques d'origines végétales présentant une très grande diversité de structure. Leurs compositions essentiellement de monoterpènes et de sesquiterpènes et leur dérivés oxygénés, ayant un point d'ébullition compris entre 150 à 300 °C (Geed *et al.*, 2014). Les huiles essentielles se trouvent dans l'écorce, les fruits, les fleurs, les feuilles, les racines, les graines, ou le bois des plantes. Cependant, ces huiles essentielles sont obtenues avec des rendements très faibles (de l'ordre de 1%) ce qui en fait des substances fragiles. Elles sont un mélange complexe de composants chimiques synthétisés par les plantes durant leur croissance et relâchées par la plante sur une période de temps plus ou moins longue, lui conférant son odeur caractéristique.

L'homme a pu obtenir ces composants aromatiques par l'extraction des huiles essentielles. Tout procédé d'extraction est basé sur la différence de solubilité des substances d'un mélange dans un solvant. Le mélange à extraire peut être solide ou liquide et le solvant liquide ou fluide supercritique. Aussi, plusieurs techniques d'extraction peuvent être mises en œuvre pour extraire les principes actifs des plantes, toujours très recherchés pour toutes sortes d'application en alimentaire, cosmétique et pharmacie. Parmi les techniques conventionnelles, on trouve :

3.5. 2. Méthodes d'extractions

3.5.2.1. L'hydrodistillation

L'hydrodistillation est une méthode d'extraction dont le rôle est d'entraîner les composés volatiles des produits naturels avec la vapeur d'eau. Ce procédé est aussi appelé « entraînement à la vapeur ». Selon l'étymologie du mot, composé de hydro- en grec « eau »

et de - distillation qui vient du latin stilla, « goutte » et de distillare (latin savant), « tomber goutte à goutte », il semble donc que cette technique soit très ancienne.

L'hydrodistillation consiste à récupérer les huiles essentielles contenues dans les végétaux par de la vapeur d'eau. La matière première aromatique naturelle est mise dans un alambic rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition. Sous l'action de la chaleur, les cellules végétales éclatent et libèrent les molécules odorantes qui sont entraînées par la vapeur d'eau formée. Elles passent dans un réfrigérant pour y être condensées par refroidissement. La séparation de l'eau et de l'huile essentielle se fait par différence de densité (décantation).

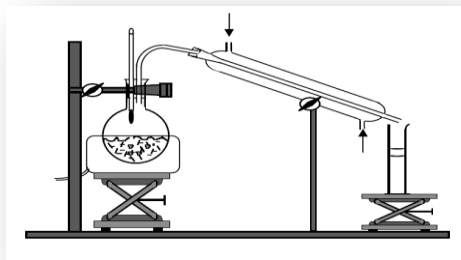


Figure 2 : L'hydrodistillation

3.5.2.2. Extraction par micro-ondes

La chauffe par micro-ondes s'effectue de l'intérieur vers l'extérieur. Cette particularité entraîne une extraction des principes actifs végétaux par surpression interne et effet osmotique, ce qui permet une extraction très efficace, très rapide, avec un très haut rendement d'extraction, sans solvant et une grande concentration des extraits. L'extraction par micro-ondes peut être directe ou assistée à la vapeur, à l'eau ou à un solvant, sous pression ou sous vide, sous atmosphère contrôlée (azote). Cette extraction peut prendre quelques minutes au lieu des heures (Li *et al.*, 2014).

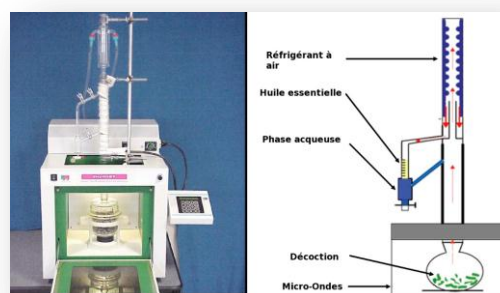


Figure 3 : Extraction par micro-onde.

3.5.2.3. Extraction par le gaz supercritique

L'extraction avec un fluide supercritique en utilisant du CO₂ en tant que solvant est aussi appelé la « technologie propre » ou « la technologie verte » durant le dernier siècle, qui a montré un intérêt croissant dans l'extraction de molécules bioactives naturelles de plantes en utilisant le gaz supercritique comme solvant alternatif. Le CO₂ supercritique présente de nombreux avantages, sa température abordable et sa stabilité permettent d'assurer la qualité du produit. Cette technique permet d'effectuer l'extraction à température voisine à l'ambiante, empêchant ainsi dénaturation thermique des substances (Sukhdev *et al.*, 2008).

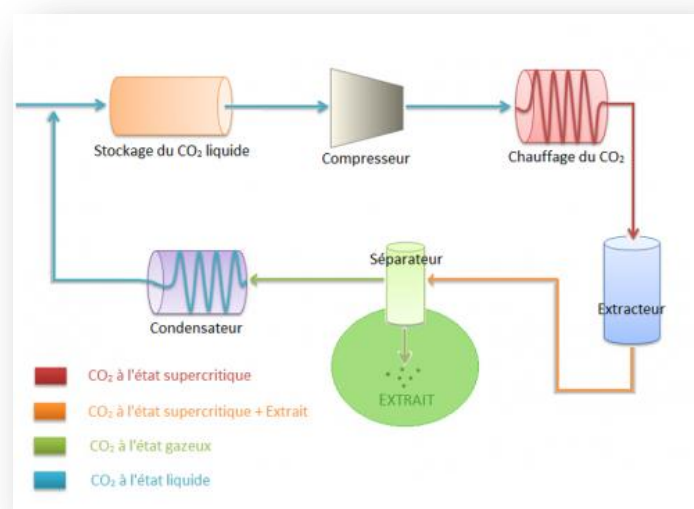


Figure 4 : Extraction de l'huile par CO₂ supercritique.

3.5.2.4. Extraction assistée par ultrasons

L'action des ultrasons dans les milieux liquides repose sur le phénomène de cavitation : création, croissance et implosion de bulles formées lorsqu'un liquide est soumis à une onde de pression. Il en résulte un choc de pression au voisinage de la bulle et la formation d'un microréacteur thermochimique à l'intérieur de la bulle.

Dans le but d'améliorer le rendement de ce type d'extraction et la faible consommation d'énergie, l'extraction assistée par ultrasons a mis au point pour améliorer l'efficacité et réduire le temps d'extraction. L'effondrement des bulles de cavitation générée pendant l'extraction conduit à la destruction des glandes des huiles essentielles d'une manière à faciliter la libération de cette huile végétale (Li *et al.*, 2014).

En plus de l'amélioration du rendement, les huiles essentielles obtenus par l'extraction assistée par ultrasons ont montrés moins de dégradation thermique avec une haute qualité et une bonne saveur (Li *et al.*, 2014).

3.5.2.5. Extraction par solvants volatils

La technique d'extraction par solvant, c'est une méthode classique pour l'extraction solide-liquide : extraction par Soxhlet : L'échantillon entre rapidement en contact avec une portion de solvant pur, ce qui aide à déplacer l'équilibre de transfert vers le solvant. De plus, elle ne nécessite pas de filtration après extraction et peut être utilisée quelque soit la matière végétale. Ses inconvénients les plus significatifs sont la durée importante d'extraction et la grande quantité de solvant consommée (devant être ultérieurement évaporé), ce qui limite sa rentabilité économique. Il n'y pas de possibilité de travailler à froid, ce qui peut être gênant avec des substances sensibles à la chaleur.

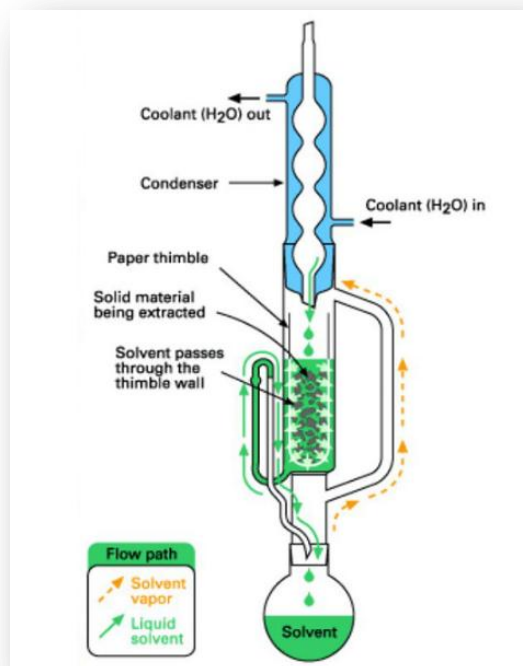


Figure 5 : Extraction par Soxhlet

CHAPITRE 4

Activités biologiques

4. Introduction

Parmi les activités biologiques des plantes médicinales, ces dernières années l'attention s'est portée sur l'activité antioxydante en raison du rôle qu'elle joue dans la prévention des maladies chroniques telles que les pathologies du cœur, le cancer, le diabète, l'hypertension, et la maladie d'Alzheimer en combattant le stress oxydant (Cole *et al.*, 2005; Liu, 2003; Riboli & Norat 2003). Certaines études ont aussi montré que les antioxydants peuvent retarder la progression de la maladie d'Alzheimer qui est fréquemment observée chez les personnes âgées (Howes *et al.*, 2003). Beaucoup de plantes ont été utilisées pour leurs effets antibactériens en médecine traditionnelle dans le monde entier depuis longtemps. Ces dernières années les études ont été effectuées sur les plantes médicinales pour trouver des agents antibactériens en raison de la construction de la résistance des micro-organismes pathogènes contre les antibiotiques (Kalyoncu, *et al.*, 2006).

4.1. Radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique possédant un électron célibataire, par exemple :

- La molécule de l'oxygène O_2 , qui possède deux électrons célibataires : $O \cdot - \cdot O$.
- L'oxyde d'azote NO, un radical peut réactif ne possédant qu'un seul électron sur ses orbitales. Il est synthétisé à partir d'un atome d'azote et d'une molécule d'oxygène.

Les radicaux libres interviennent dans les phénomènes du stress oxydant, par la présence d'un électron célibataire sur un atome d'oxygène ou d'azote, ceci leur confère la dénomination d'espèces réactives :

Les espèces réactives de l'oxygène :

On distingue 2 groupes de molécules réactives : des espèces radicalaires et non-radicalaires (**Tableaux 16**).

Tableaux 16 : Espèces réactives oxygénées.

Espèces oxygénées réactives radicalaires	Espèces oxygénées réactives non-radicalaires
O_2^- : Anion radical superoxyde	1O_2 : Oxygène singulet
$HO_2 \cdot$: Radical perhydroxyle	H_2O_2 : Peroxyde d'hydrogène
$HO \cdot$: Radical hydroxyl	$HOCl$: Acide hypochlorique
$RO_2 \cdot$: Radical peroxyde	
$RO \cdot$: Radical secondaire alkoxyle	

Les espèces réactives azotées :**Tableaux 17 :** Espèces réactives azotées.

Espèces azotées réactives radicalaires	Espèces azotées réactives non-radicalaires
NO [•] : Monoxyde d'azote	NO ₂ : Dioxyde d'azote
	N ₂ O ₃ : Trioxyde d'azote
	NO ₂ ⁻ : Ion nitrate
	ONOO ⁻ : Peroxynitrite

4.2. Activité antioxydante

L'utilisation des molécules antioxydantes de synthèse est actuellement remise en cause en raison des risques toxicologiques potentiels. Désormais, de nouvelles sources végétales d'antioxydants naturels sont recherchées (Suhaj, 2006; Tadhani *et al.*, 2007). En effet, les polyphénols sont des composés naturels largement répandus dans le règne végétal qui ont une importance croissante notamment grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé (Koechlin-Ramonatxo 2006). Leur rôle d'antioxydants naturels suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires et cardiovasculaires (Vârban 2009); ils sont également utilisés comme additifs en industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique (Suhaj 2006).

4.2.1. Les antioxydants

Un antioxydant est une molécule capable d'empêcher l'oxydation d'autres molécules. Selon Halliwell est toute substance qui, en faible concentration par rapport au substrat susceptible d'être oxydé, prévient ou ralentit l'oxydation de ce substrat (Halliwell & Gutteridge 1989; Halliwell, 1995; Sies, 1993).

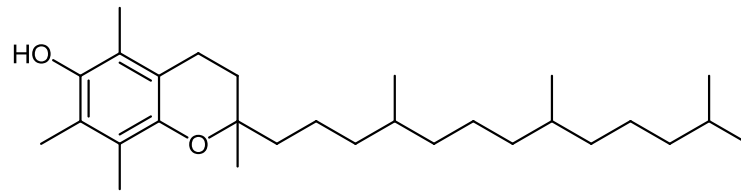
4.2.1.1. Les antioxydants naturels

Certains aliments sont particulièrement riches en composés qui possèdent des activités antioxydantes. Ces antioxydants sont :

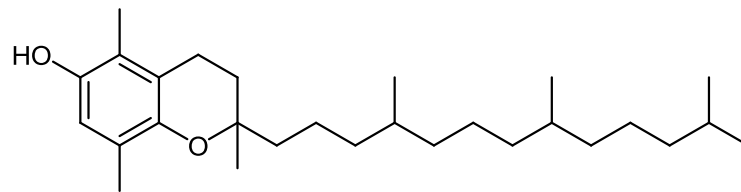
Vitamine E :

La vitamine E est une vitamine liposoluble recouvrant un ensemble de huit molécules organiques, quatre tocophérols (α , β , γ , δ -tocophérol) et quatre tocotriénols. L' α -tocophérol est

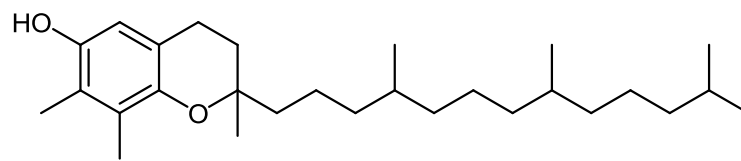
la forme biologiquement la plus active, ainsi que γ -tocophérol est la plus abondante dans l'alimentation.



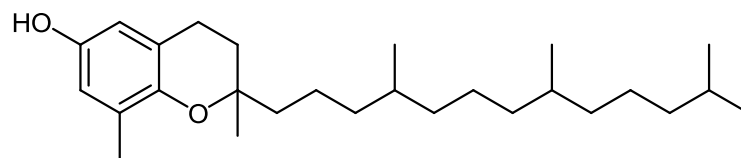
α -tocophérol



β -tocophérol



γ -tocophérol



δ -tocophérol

Figure 6 : Structures des dérivés de la vitamine E

Vitamine C :

L'acide ascorbique (vitamine C) est considérée comme étant l'un des antioxydants naturels puissants et moins toxiques (Bendich *et al.* 1986; Weber *et al.* 1996). Il est hydrosoluble et se trouve avec des concentrations élevées dans plusieurs aliments. En générale, l'acide ascorbique réagit avec les oxydants il peut mettre fin à la chaîne des réactions radicalaires par transfert d'électrons par le transférer d'un seul électron.

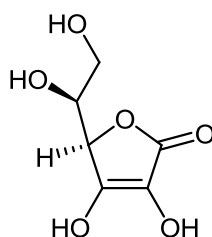


Figure 7 : Structure de l'acide ascorbique

Vitamine A :

La vitamine A est une vitamine liposoluble, elle existe sous deux formes : la forme active de la vitamine A : le rétinol et ses dérivés d'origine animale et les caroténoïdes d'origine végétale. La vitamine A est un antioxydant moins puissant que les autres caroténoïdes (Mortensen & Skibsted 1997).

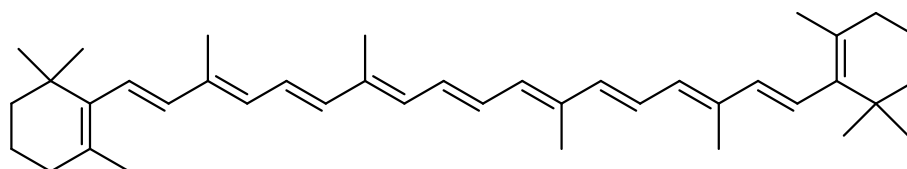
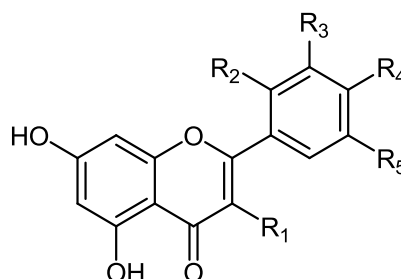


Figure 8 : Structure du β -carotène

Flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont des composants présents dans la plupart des plantes. Plus de 8000 polyphénoliques, y compris plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés dans diverses plantes, et ce nombre est encore en croissance (Beecher, 1999; Harborne *et al.* 1999). Il a été rapporté que les flavonoïdes peuvent agir comme des antioxydants par piégeage des radicaux tels que les radicaux : superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) (Hu *et al.* 1995; Robak & Gryglewski 1988), hydroxyle (OH^{\cdot}) (Husain *et al.*, 1987) et l'oxygène singulet (1O_2) (Takahama 1984).

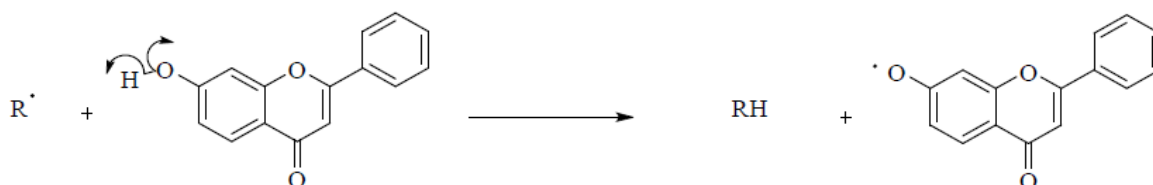


	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Apigénine	H	H	H	OH	H
Lutéoline	H	H	OH	OH	H
Quercétine	OH	H	OH	OH	H
Kamphérol	OH	H	H	OH	H

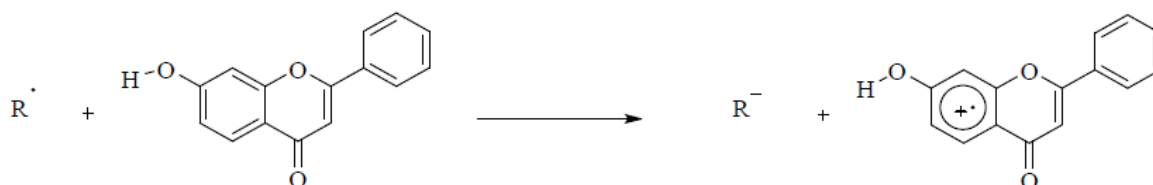
Figure 9 : Structures de quelques flavonoïdes

De façon générale, l'activité biologique des flavonoïdes est fortement dépendante de la nature et de la position des substituants, en particulier du nombre de groupement hydroxyles (Schroeter *et al.*, 2002).

Transfert de proton :



Transfert d'électron :



Chélation des ions métaux de transition :

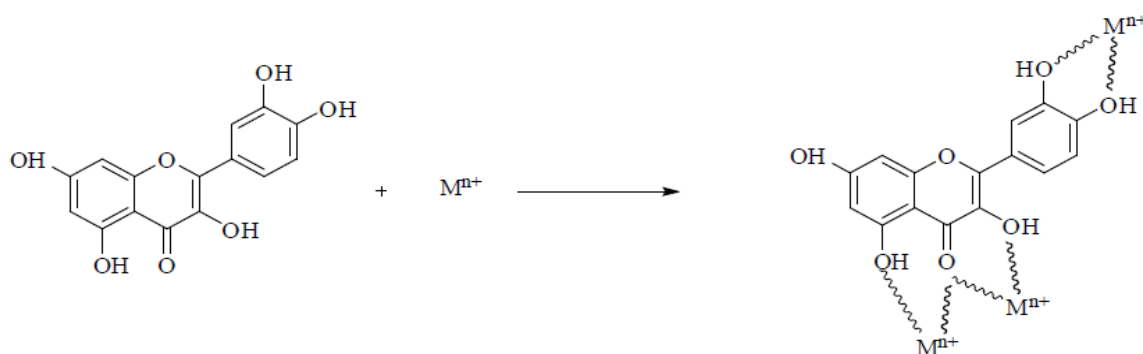


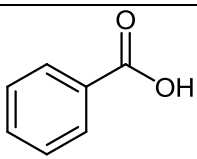
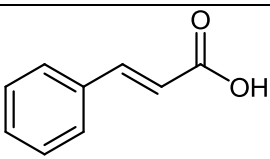
Figure 10 : Mécanisme d'action antioxydante des composés phénoliques (Leopoldini *et al.*, 2011).

Acides phénoliques :

Les acides phénoliques sont tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Les deux groupes essentiels des acides phénoliques sont l'acide benzoïque et l'acide cinnamique (**Tableau 18**), (Gulçin 2012).

L'activité antioxydante des acides phénoliques et leurs dérivés dépend du nombre et de la position des groupements hydroxyles liés au cycle aromatique et le type de substituant (Rice - Evans *et al.*, 1996, Sroka & Cisowski 2003) .

Tableau 18 : Classification des acides phénoliques.

Acides Phénoliques	
 <p>Dérivés d'acide benzoïque</p>	 <p>Dérivés d'acide cinnamique</p>
Acide gallique	Acide caféique
Acide <i>p</i> -benzoïque	Acide <i>p</i> -coumarique
Acide -dihydrobenzoïque	Acide rosmarinique
Acide vanillique	Acide ferulique
Acide synergique	Acide sinapique
Acide protocatechique	Acide chlorogénique

4.2.1.2. Les antioxydants de synthèse

Les antioxydants de synthèse les plus connus sont les composés phénoliques tels que : Hydroxyanisole butylé (BHA), Hydroxytoluène butylé (BHT), *tert*-butylhydroquinone (TBHQ) et Gallate de propyle (GP) (**Figure 11**). Les antioxydants synthétiques sont toujours substitués par un alkyle pour améliorer leurs solubilité dans les graisses et les huiles (Hudson, 1990).

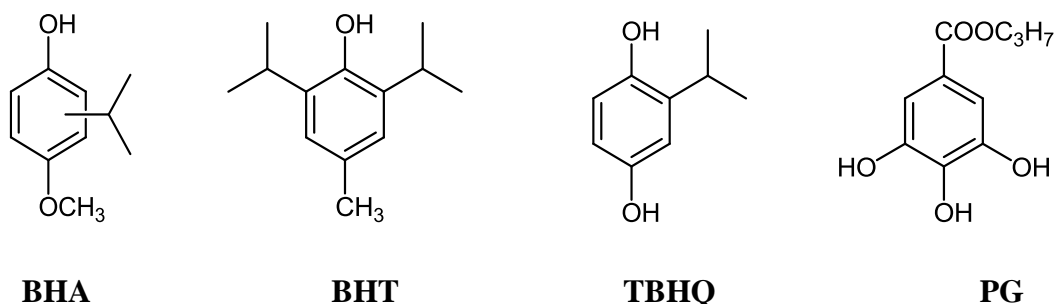


Figure 11 : Structure des antioxydants synthétiques.

4.2.2. Les méthodes les plus fréquemment utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante

Il existe plusieurs méthodes qui ont été mises au point pour l'estimation *in vitro* du pouvoir antioxydant d'un échantillon.

4.2.2.1. Méthode du DPPH[•]

Les principales méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant d'un produit ont été rassemblées selon leurs principes. Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]) est un radical stable et coloré, qui est centré sur l'azote, de couleur violette en solution (Gülçin , 2012). Ce radical est réduit en présence d'une substance réductrice pour donner la couleur jaune du diphényl- picrylhydrazine (Blois, 1958). Le maximum de son absorption dans le visible se situe vers 515-517 nm dans le méthanol et l'éthanol. La réduction du radical par un donneur d'atome H (AH) conduit à la 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine incolore (DPPH-H) et au radical (A[•]).

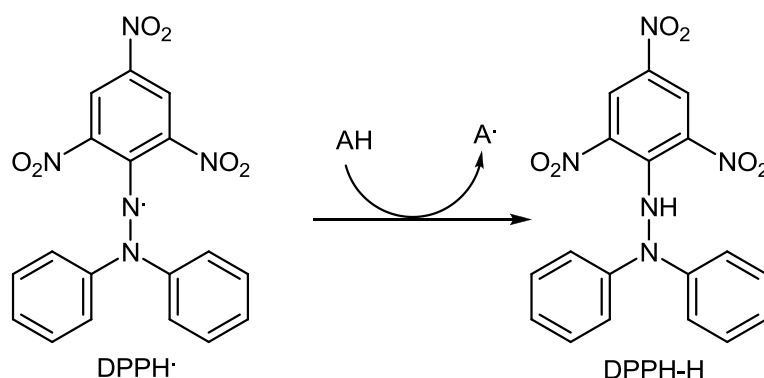


Figure 12 : Piégeage du radical DPPH[•] avec l'antioxydant (AH).

4.2.2.2. Piégeage de l'ABTS^{•+}

La méthode ABTS est la plus utilisée pour déterminer la concentration des radicaux libres, elle est déterminée selon la méthode de Re et ses collaborateurs (Re et al., 1999). Cette activité d'une molécule est déduite de sa capacité à inhiber le radical ABTS^{•+}, obtenu à partir de l'ABTS [sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)]. La génération du cation radical ABTS^{•+} est la base de l'une des méthodes spectrophotométrique qui ont été appliquées pour mesurer l'activité antioxydante totale des substances pures, aqueuse ou des mélanges (Gülçin 2009).

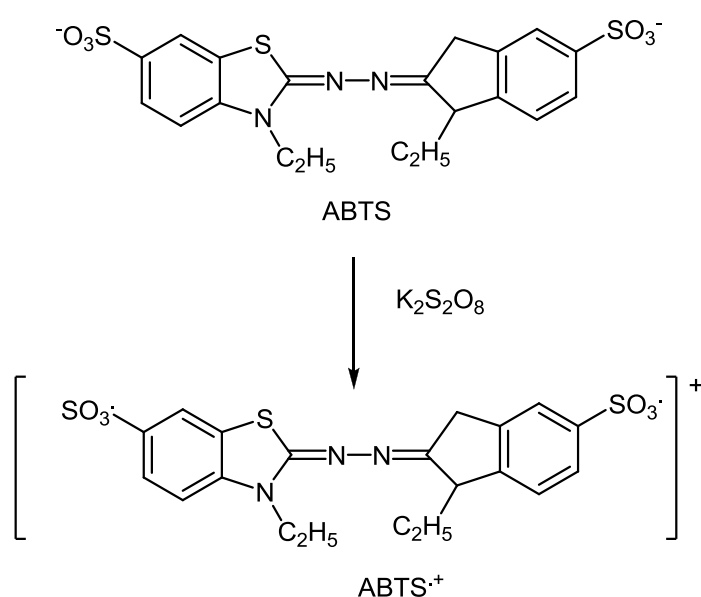


Figure 13 : Oxydation de l'ABTS avec $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ et sa génération

4.2.2.3. Méthode du CUPRAC

La méthode CUPRAC (Apak *et al.*, 2004) (cupric ion Reducing Antioxidant Capacity) est utilisée pour la réduction du Cu (II) suivi par le traitement du Cu (I) avec un réactif chromogène Néocuproïne (NC) (2,9 -diméthyl- 1,10-phénanthroline) (Gouda et al., 2010).

Ce test est basé sur la conversion des hydroxyles phénoliques en quinones à travers la réduction du complexe $\text{Cu}^{+2}\text{-Nc}$, produisant ainsi un complexe chromogène de $\text{Cu}^{+2}\text{-Nc}$ qui absorbe à 450 nm.

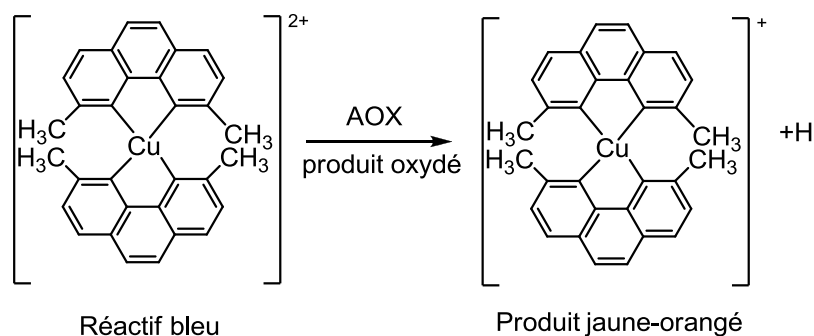
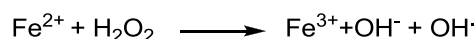


Figure 14 : Réduction du complexe chromogène de Cu^{+2} -Nc

4.2.2.4. Chélation des ions métalliques

L'efficacité des ions ferreux (Fe^{2+}) permis la protection contre les méfaits oxydatifs par l'élimination du fer, ce dernier participe autrement à la génération du HO^\cdot dans la réaction Fenton (réaction d'oxydation aboutissant à la formation du radical hydroxyle) (Gülçin 2009).



Cette méthode est basée sur la mesure d'absorbance de la formation du complexe Fe(II)-Ferrozine après le traitement des échantillons avec les ions Fe^{2+} , elle est déterminée selon la méthode de Decker et Welch (Decker & Welch, 1990).

Les ions libre Fe^{2+} et Ferrozine forment un complexe [Ferrozine - Fe^{2+}] qui donne un chromophore rouge qui absorbe à λ 562 nm (Gülçin 2009).

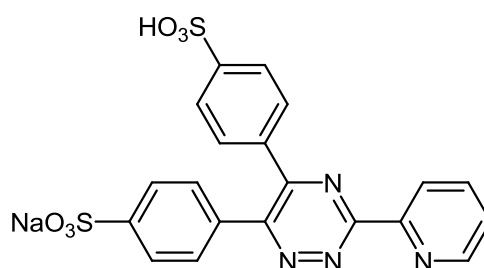
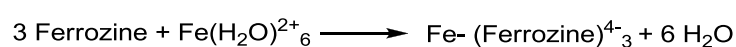


Figure 15 : Structure chimique du Ferrozine.



4.2.2.5. Blanchissement du β -carotène

Dans ce test, l'activité est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydatif du β -carotène (décoloration) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique selon la méthode décrite par Miller (Miller 1971). Consiste à mesurer, à 470 nm, la décoloration du β -carotène résultant de son oxydation par les produits de décomposition de l'acide linoléique. Cette méthode est sensible, rapide et simple.

4.3. Dosage des polyphénols

Les flavonoïdes sont présents presque partout dans les plantes et ils peuvent être reconnus comme pigments responsables de la couleur des feuilles (Swarnlata *et al.*, 2007). Les phénols totaux sont des métabolites secondaires synthétisés par les plantes pendant leur développement (Harborne 1982; Pridham 1960) mais aussi comme réponse aux conditions de stress tels que infections, blessures, radiation UV (Beckman *et al.*, 2000; Nicholson *et al.*, 1992) . Les phénols possèdent un large spectre d'activités biochimiques comme des effets antioxydants, des effets antimutagéniques et des effets anticancérigènes (Nakamura *et al.*, 2003; Tapiero *et al.*, 2002). La détermination de la teneur en phénols totaux des extraits bruts des plante *S. guyoniana* et *M. aquatica* a été faite en utilisant la méthode colorimétrique (Folin-Ciocalteux).

4.4. Screening chimique

Le screening phytochimique est un ensemble des méthodes et techniques de préparation et d'analyse des substances organiques naturelles de la plante. Le but final de l'étude des plantes médicinales est souvent d'isoler un ou plusieurs constituants responsables de l'activité particulière de la plante. Le screening phytochimique a été effectué pour les deux plantes *S. guyoniana* et *M. aquatica* avec les tests : Shinoda, Clorrure ferrique et Liebermann pour les flavonoïdes, stéroïdes et triterpénoïdes.

4.5. Activité Anticholinesterase

La maladie d'Alzheimer (MA) est la forme de démence qui affecte plus de 35 millions de personnes dans le monde, et ce nombre est estimé pour atteindre 65,7 millions d'ici 2030 (Singhal *et al.*, 2012). MA est devenu la quatrième cause principale de décès chez les personnes âgées (plus de 65 ans) suite aux différentes voies biochimiques (Abou-Donia *et al.*, 2014; Koedam *et al.*, 2010). On prévoit que le nombre de personnes atteintes de la MA

d'augmenter sensiblement dans les années à venir, la proportion de la population âgée de 65 ans ou plus augmente fortement (Vinutha *et al.*, 2007). Cette maladie est à l'origine d'un important déficit cholinergique, neurotransmetteur particulièrement impliqué dans la mémorisation et dans l'attention. Une cholinestérase est une enzyme qui catalyse la réaction d'hydrolyse d'un ester de la choline (acétylcholine, butyrylcholine) en choline et en acide acétique.

La détermination de l'activité acétylcholinestérase est devenue un outil important dans la découverte des médicaments, ainsi que dans la médecine et de la toxicologie. Une grande variété de méthodes ont été développées au cours des dernières décennies pour la quantification de l'activité inhibitrice AChE (Abou-Donia *et al.*, 2014; Miao *et al.*, 2010; Pohanka 2011).

Les activités inhibitrices de l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE) ont été mesurées en modifiant légèrement la méthode spectrophotométrique d'Ellman *et al.* (1961). Les enzymes AChE de l'anguille électrique et BChE de sérum de cheval ont été utilisés, tandis que l'iodure d'acétylthiocholine et le chlorure butyrylthiocholine ont été utilisés comme substrats de la réaction (AChE et BChE respectivement). Le DTNB (Acide 5,5'-dithio-bis 2-nitrobenzoïque) utilisé pour la mesure de l'activité anticholinestérase, ainsi que la Galanthamine étaient utilisés comme référence (Gülşen *et al.*, 2010).

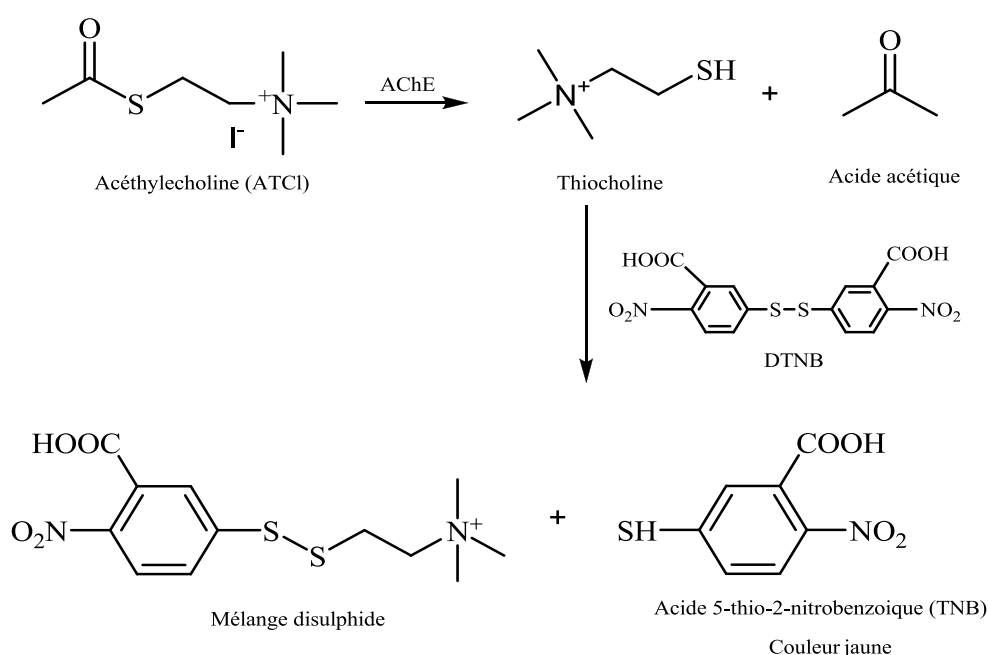


Figure 16 : Mécanisme chimique de la méthode d'Ellman's

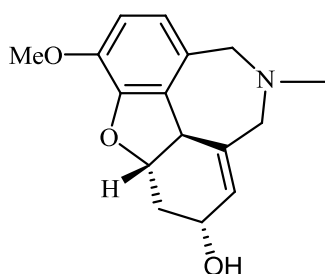
Évaluation de l'activité inhibitrice AChE en utilisant la méthode d'Ellman :

L'activité inhibitrice AChE est basée sur la méthode d'Ellman, le principe chimique de la réaction est représenté sur la **Figure 16**. L'enzyme hydrolyse le substrat ATCI pour donner la thiocholine et l'acide acétique. La thiocholine est autorisée à réagir avec le DTNB, et cette réaction donne une coloration jaune (Ali-Shtayeh *et al.*, 2014).

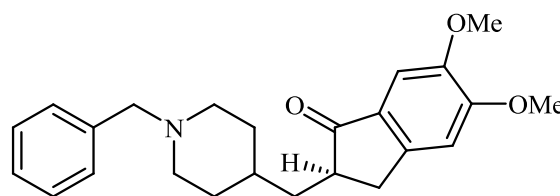
La perte ou la dégradation de l'acétylcholine (ACh) joue un rôle vital dans la perturbation de mémoire chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer. L'acétylcholine est une molécule organique libérée au niveau des terminaisons nerveuses comme un neurotransmetteur. Elle est produite par la choline acétyltransférase qui utilise acétylcoenzyme A et la choline en tant que substrats pour la formation de l'acétylcholine dans les cellules spécifiques appelées neurones cholinergiques (Greenblatt 1999).

La précoce thérapie de la MA est donc basée principalement sur les inhibiteurs AChE tels que la galanthamine (synthétique) et le donépézil (isolé à partir de bulbes de narcisses) (Shah *et al.*, 2008). Cependant, ces médicaments sont connus pour leur courte vie et des effets secondaires défavorables (y compris les troubles gastro-intestinaux) et les problèmes liés à la biodisponibilité (Wszelaki *et al.*, 2010; Sung *et al.*, 2002; Knapp *et al.*, 1994), ce qui nécessite l'intérêt à trouver d'autres inhibiteurs AChE des ressources naturelles (Nicolson 2003).

La galantamine inhibe de façon réversible et compétitive l'acétylcholinestérase. Elle potentialise l'action de l'acétylcholine en empêchant sa dégradation.



Galantamine



Donépézil

4.6. Activité Antibactérienne

Les antibiotiques sont des produits élaborés par des micro-organismes, mais on inclut généralement parmi eux les dérivés semi-synthétiques et les produits entièrement synthétiques. La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques qui inhibent sélectivement certaines voies métaboliques des bactéries, sans exercer habituellement d'effets toxiques pour les organismes supérieurs. Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont été focalisées sur l'évaluation des propriétés antimicrobienne des polyphénols. Les études du pouvoir inhibiteur des flavonoïdes sur la croissance bactérienne ont démontré que de nombreux composés flavoniques (apigénine, kaempferol et d'autres) sont doués d'un effet important sur différentes souches bactériennes à Gram négatif (*Escherichia coli*) et Gram positif (*Staphylococcus aureus*) (Ulanowska et al., 2007).

4.6.1. Technique de diffusion en milieu gélosé (antibiogramme)

L'évaluation de l'activité antibactérienne (Bauer *et al.*, 1966; NCCLS, 1993) a été déterminée par la technique de diffusion sur gélose (Mueller-Hinton). L'activité antibactérienne est évaluée par la mesure de la zone de clarification en millimètres tout autour des disques.

4.6.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Le paramètre le plus souvent utilisé pour évaluer l'effet d'un antibiotique est la CMI. Elle correspond à la concentration minimale d'antibiotique qui inhibe la croissance visible du germe en 24 H. Le but le plus souvent recherché est l'inhibition de la prolifération bactérienne, dans la mesure où l'organisme est capable de se défendre contre les bactéries

La détermination des CMI des extraits de plantes, vis-à-vis des souches bactériennes, est réalisée selon la méthode standardisée de macro-dilution NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard) en milieu solide.

PARTIE 2

Matériel et méthodes

CHAPITRE 1

Matériel végétal, extractions-séparations et analyses

1.1. Matériel végétal

1.1.1. Récolte de la plante *Mentha aquatica* L.

Mentha aquatica a été récoltée en Mai 2012, en période de floraison à Grarem, Mila (Nord-Est Algérien). Après séchage dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires, les parties aériennes (2 kg) et les racines (460 g) ont été séparées.

1.1.2. Récolte de la plante *Thymus dreatensis* Batt.

La plante *Thymus dreatensis* a été récoltée en Mai 2012 à Djelfa. 200 g des parties aériennes de la plante fraîche ont été hydrodistillé pour obtenir l'huile essentielle.

1.1.3. Récolte de la plante *Stachys guyoniana* de Noé

La plante *Stachys guyoniana* a été récoltée en Mai 2010 à Constantine. Après séchage dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires, les parties aériennes ont été coupées en petits morceaux et pesées (400 g).

Les 3 plantes ont été identifiées par le Professeur Gérard De Bélair (Université d'Annaba).

1.2. Extraction et séparation de la plante *Mentha aquatica*

1.2.1. Extraction :

L'extraction de 2 kg des parties aériennes séchées et broyées de l'espèce *Mentha aquatica*, a été réalisée en utilisant des solvants de polarité croissante : CHCl_3 , ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$: 50 :50) et MeOH. Chaque macération a été effectuée pendant 24 heures à température ambiante (x3). Les extraits obtenus ont été évaporés à sec. La procédure est détaillée dans la **Figure 17**.

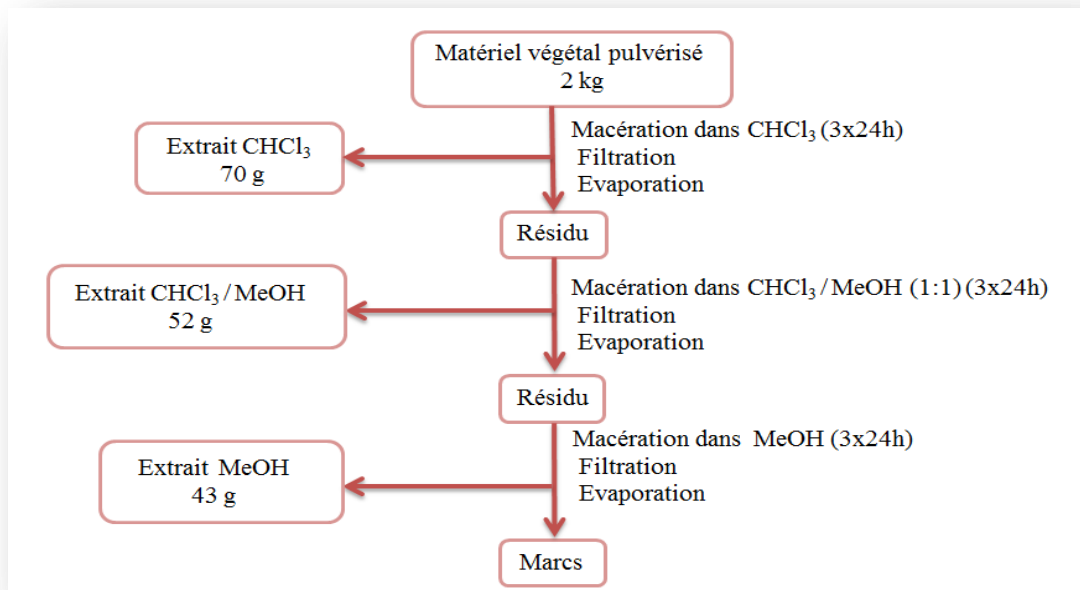


Figure 17 : Schéma général d'extraction des parties aériennes de l'espèce *M. aquatica*

Notre choix d'étudier l'extrait CHCl_3 est justifié par la comparaison des profils CCM en phase normale des trois extraits obtenus précédemment dans différents systèmes d'élution, hexane-chloroforme (95:5 et 70:30), hexane-acétone (97:3 et 85:15) et chloroforme-méthanol (99:1, 90:10), confirme bien la richesse de l'extrait CHCl_3 en métabolites secondaires.

L'extraction de 460 g des racines de la plante *M. aquatica* a été effectuée dans le soxhlet avec l'acétone, pendant 3 heures (3 fois). L'extrait obtenu est d'une couleur verte et d'une odeur très agréable et de masse 5.8 g

1.2.2. Matériel chromatographique

1.2.2.1. Chromatographie sur couche mince CCM

Les chromatographies par CCM analytique ont été effectuées sur des plaques en verre aluminium recouvertes de silice. Support verre en phase normale, 60 F₂₅₄ (Merck 1.05715.0001 ou 1.05744.0009, 20 x 20 cm). Le révélateur utilisé est phosphomolybdate de sodium à 5% dans l'éthanol.

1.2.2.2. Chromatographie sur colonne ouverte CC

Pour les chromatographies sur colonnes ouvertes, la phase normale a été mise en œuvre dans des colonnes en verre. La phase stationnaire utilisée en phase normale est une silice Silica gel 60 N (Kanto Chemical Co., LTD, Spherical, neutral, 100-210 μm or 40-50 μm). La taille et le diamètre de la colonne sont choisis en fonction de la quantité d'échantillon à purifier.

1.2.2.3. Chromatographie liquide haute performance CLHP

L'appareillage utilisé au laboratoire pour l'analytique CLHP est constitué d'une pompe Hitachi L-6000 avec un dégazeur Shimadzu DGU-12A, d'un détecteur Hitachi L-4200 UV-VIS et d'un chromato-intégrateur Hitachi D-2500.

La CLHP préparative est constituée d'une pompe FROM intelligent pump AI-12, d'un détecteur Hitachi L-4200H UV-VIS, et un intégrateur Hitachi D-2500. La détection a été effectuée avec 215 nm. 3 types de colonnes ont été utilisées, toutes de type C₁₈ (phase inverse) :

- Inertsil ODS 3-5 μm (GL Sciences Ltd., ϕ 4.6 mm i.d. x 250mm, ϕ 20 mm i.d. x 250 mm).
- Inertsil PH 3-5 μm (GL Sciences Ltd., ϕ 4.6 mm i.d. x 250mm, ϕ 20 mm i.d. x 250 mm).
- Cosmosil Cholesterol (Nakalai Tesque Ltd., ϕ 4.6 mm i.d. x 150mm, ϕ 10 mm i.d. x 250 mm).

1.2.3. Purification :

1.2.3.1. Fractionnement et purification de la fraction chloroforme de l'espèce *M. aquatica*

L'extrait CHCl₃ (20 g) des parties aériennes de *M. aquatica* ont été fractionnés par chromatographie sur colonne gel de silice CC avec l'éluant Hexane/Toluène de (100:0 à 0:100) Toluène/EtOAc (100:0 à 0:100). Les plaques CCM ont été examinées à la lumière UV et révélées à l'acide sulfurique à 50% puis chauffées à 100 °C, 12 fractions ont été récoltées après rassemblement des fractions présentant des similitudes. Ces dernières sont soumises par la suite à des opérations de purification. Ainsi, 15 composés ont été isolés (**Figure 18**).

L'utilisation des différentes méthodes chromatographiques : sur colonne de gel de silice normale (CC), sur plaque préparative (CPP) a permis la purification de ce nombre de composés. Ainsi que la purification avec la CLHP préparative a permis de séparer plusieurs

composés de nature triterpénique, présentant des similitudes structurales et des polarités voisines.

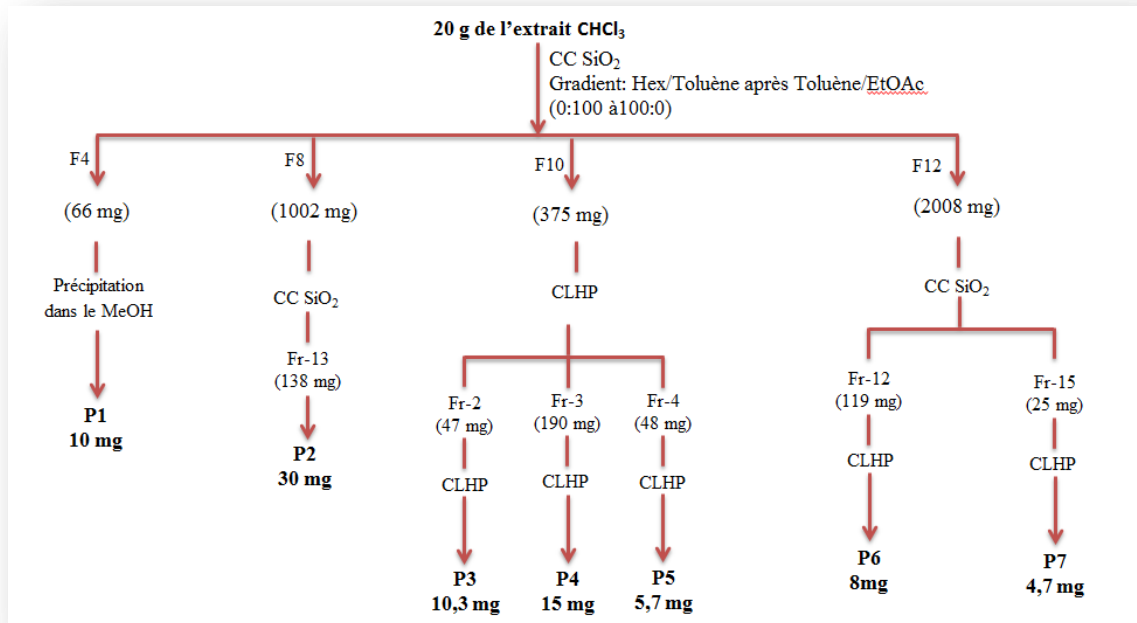


Figure 18 : Isolement des composés de l'extrait CHCl_3 des parties aériennes de l'espèce *M. aquatica*

➤ **Etude de la fraction F₄**

La fraction F₄ (66 mg) est purifiée avec précipitation dans le MeOH, pour obtenir le composé **P1** (10 mg) à l'état pur.

➤ **Etude de la fraction F₈**

La fraction F₈ (1002 mg) est chromatographiée sur une colonne de gel de silice avec un gradient d'éluant Toluène: AcOEt (200 :0, 200 :15, 200 :20, 200 :30, 200 :45, 200 :70, 150 :90, 100 :100, 0 :200) pour donner 14 sous fractions.

- La sous fraction F₁₄₋₁₃ contient un précipité blanc, on a pu l'obtenir à l'état pur après plusieurs lavages par MeOH, c'est le composé **P2** (30 mg).

➤ **Etude de la fraction F₁₀**

La fraction F₁₀ (375 mg) a été séparée par CLHP en utilisant comme éluant MeCN : H₂O (10 :1), pour donner 4 sous fractions.

- Les sous fractions F₄₋₁ et F₄₋₃ ont été purifiées sur CLHP préparative en utilisant le MeOH : H₂O (15:1) pour f₂ et MeCN : H₂O (15 :1) pour f₃. Cette purification a abouti à l'isolement du composé **P3** (10.3 mg) et le composé **P4** (15 mg) respectivement.
- La sous fraction F₄₋₄ (15 mg) contient un précipité blanc dans l'acétone, 5.7 mg du composé **P5** ont été obtenus de cette fraction.

➤ **Etude de la fraction F₁₂**

La fraction F₁₂ est chromatographiée sur colonne de gel de silice en utilisant comme éluant CHCl₃/MeOH (500 :0, 450 :10, 400 :15, 350 :20, 300 :25, 300 :36, 300 :45, 300 :60, 300 :150, 150 :150, 0 :300) pour obtenir 12 sous fractions

- La sous fraction F₁₂₋₈ (340 mg) qui fait l'objet à son tour d'une purification sur colonne de gel de silice. L'élution réalisée par CHCl₃/MeOH (60 :0, 30 :0.3, 30 :0.6, 30 :0.75, 30 :1, 30 :1.5, 30 :2, 30 :3, 30 :6, 15 :15) pour obtenir 15 sous fractions. 4 sous fractions semblent intéressantes, F₁₅₋₈, F₁₅₋₁₂, F₁₅₋₁₃ et F₁₅₋₁₅. La fraction F₁₅₋₁₂ (119 mg) subi une purification avec CLHP préparative en utilisant MeCN : H₂O (15 :1) comme éluant, pour donner le composé **P6** (8 mg) à l'état pur.
- La fraction F₁₅₋₁₅ (25 mg) a été purifiée des mêmes conditions pour F₁₅₋₁₂ pour obtenir le composé **P7** (4.7 mg).

1.2.3.2. Fractionnement et purification de la fraction acétone de l'espèce *M. aquatica*

L'extrait acétone (5.8 g) des racines de *M. aquatica* ont été fractionnés par chromatographie sur colonne gel de silice CC avec l'éluant Toluène/CHCl₃ (100:0 à 0:100). 302 fractions ont été collectées. 12 fractions ont été récoltées après rassemblement des fractions présentant des similitudes en CCM. Ces dernières sont soumises par la suite à des opérations de purification. Ainsi, 9 composés ont été isolés (**Figure 19**).

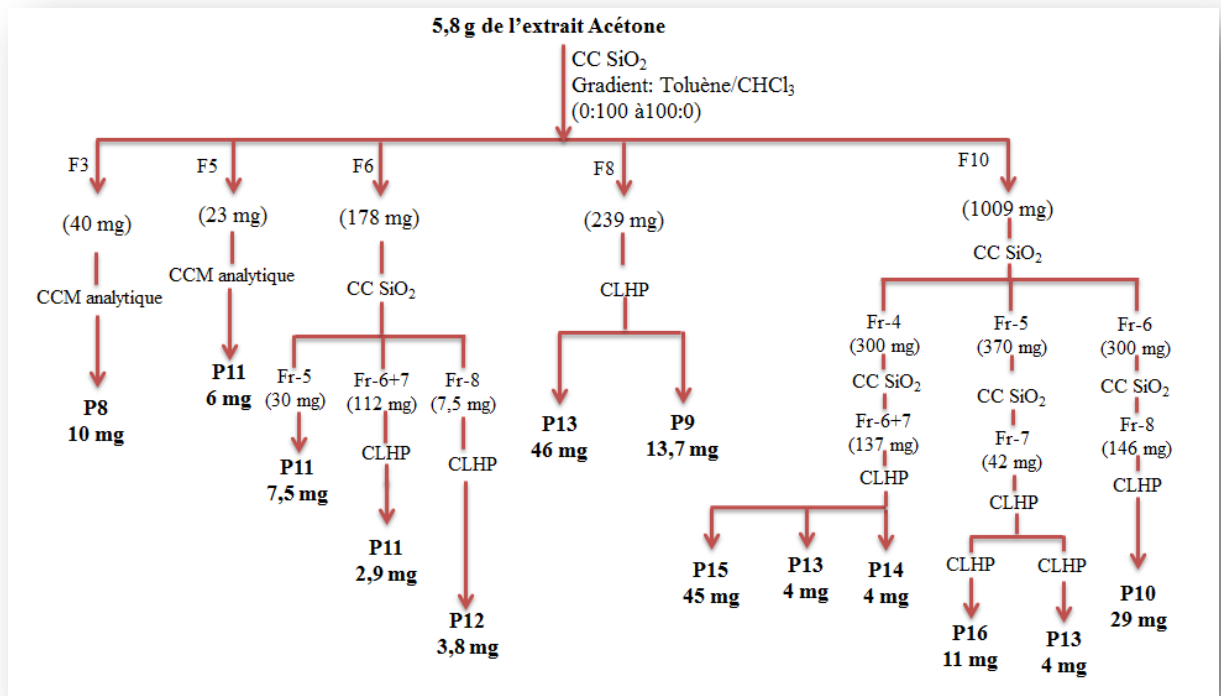


Figure 19: Isolement des composés de l'extrait acétone des racines de l'espèce *M. aquatica*

➤ **Etude de la fraction F₃**

La fraction F₃ (40 mg) soumise à une purification sur plaques analytiques de silice normale dans le système d'éluion CHCl₃/MeOH (4:1) a abouti au composé **P8** (10 mg).

➤ **Etude de la fraction F₅**

La fraction F₅ (23 mg) a été purifiée en utilisant des plaques analytiques de silice normale dans le système d'éluion CHCl₃-Propanol (20:1) conduisant au composé **P11** (6 mg).

➤ **Etude de la fraction F₆**

Cette fraction de 178 mg est purifiée sur colonne de gel de silice SiO₂ et éluee avec un gradient de solvant CHCl₃/MeOH (80 :0, 40 :0.3, 40 :0.6, 40 :0.75, 40 :1, 40 :1.5, 40 :2, 40 :3, 40 :6, 20 :20), pour conduire à 10 sous fractions.

- La fraction F₁₀₋₅ (7.5 mg) contient un seul composé qui est **P11**.
- La fraction F₁₀₋₆ et F₁₀₋₇ (112 mg) a été purifiée par CLHP préparative avec l'éluant MeCN/H₂O (5 :1) pour donner deux composés à l'état pur **P11** (2.9 mg).

- La fraction F₁₀₋₈ (7.5 mg) a été purifiée par CLHP préparative avec l'éluant MeCN/H₂O (5 :1) pour donner le composé **P12** (3.8 mg).
- **Etude de la fraction F₈**

La fraction F₈ a été purifiée par CLHP préparative en utilisant comme éluant MeCN/H₂O (4 :1) permettant d'obtenir 3 composés à l'état pur : **P13** (46 mg) et **P9** (13.7 mg).
- **Etude de la fraction F₁₀**

La fraction F₁₀ (1009 mg) a été purifiée sur une colonne SiO₂ en utilisant l'éluant CHCl₃/MeOH (140 :0, 70 :1, 70 :2, 64 :4, 56 :7, 60 :15, 50 :25, 35 :35) pour donner 7 sous fractions.

 - La fraction F₇₋₄ (300 mg) a été purifiée sur colonne de gel de silice avec l'éluant Hexane/Et₂O (32 :4, 24 :6, 20 :10, 15 :15, 10 :20, 6 :24, 4 :32, 0 :30) après CHCl₃/MeOH (30 :0, 40 :1, 30 :1.5, 30 :3, 25 :0) pour donner 9 sous fractions. Les deux sous fractions F₉₋₆ et F₉₋₇ (137 mg) ont été purifiées par CLHP préparative avec l'éluant MeOH/H₂O (9 :1) permettant d'obtenir **P15** (45 mg) et **P14** (4 mg). La fraction F₉₋₅ (350 mg) a été purifiée comme la précédente F₇₋₄ pour donner 8 sous fractions. La sous fraction F₈₋₇ (42 mg) a été soumise à son tour à une purification par CLHP avec le système d'élution MeOH/H₂O (5 :1) pour conduire à 2 fractions F₈₋₇₋₃ (40 mg) et F₈₋₇₋₅ (42 mg), chacune subit une autre purification avec CCM analytiques, F₈₋₇₋₃ avec l'éluant CHCl₃/1-Propanol (15 :1) conduisant au composé **P16** (11 mg), et F₈₋₇₋₅ avec le système CHCl₃/MeOH (15 :1) pour obtenir le composé **P13** (4 mg).
 - La fraction F₇₋₆ (300 mg) a été chromatographiée sur une colonne de gel de silice avec un gradient d'élution CHCl₃/MeOH (60 :0, 30 :0.3, 30 :0.6, 30 :0.75, 30 :1, 30 :1.5, 30 :2, 30 :3, 30 :6, 15 :15) permettant d'obtenir 13 sous fractions. La fraction F₁₃₋₈ (146 mg) subit une purification par CLHP avec le gradient MeOH/H₂O (5 :1) pour avoir le composé **P10** (29 mg) déjà isolé des parties aériennes.

1.3. Extraction de la plante *Stachys guyoniana* de Noé

Le matériel végétal de masse 200 g a subi une macération dans un mélange hydro-alcoolique (MeOH/H₂O ; 80 :20 ; V/V) 3× 24 heures. Le résidu récupéré après évaporation à

sec. L'extrait brut obtenu est dilué avec de l'eau distillée puis laissé au repos pour décantation, cette dernière permet d'éliminer les impuretés. Après, on filtre pour obtenir une solution aqueuse. Cette dernière subit des extractions liquide-liquide par des solvants de polarité croissante : l'éther de pétrole, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le *n*-butanol successivement. Les quatre fractions organiques récupérées sont concentrées et pesés conduisant à 0.3 g pour l'extrait éther de pétrole, 1.0 g pour l'extrait chloroforme, 2.8 g pour l'extrait acétate d'éthyle et 40 g pour l'extrait butanol.

1.4. Hydrodistillation de l'huile essentielle de *Thymus dreatensis* Batt.

Les parties aériennes fraîches (200 g) de *Thymus dreatensis* sont hydrodistillées dans un Clevenger, durant 3 heures. L'huile essentielle obtenue est conservée à +4°C jusqu'à son analyse GC et GC/MS.

1.5. Analyses

1.5.1. Chimie structurale

1.5.1.1. Spectrophotométrie UV-visible

Le dosage des polyphénols totaux a été mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre Thermo Electron corporation (Nicolet evolution 100).

1.5.1.2. Spectrométrie de Masse

Le spectre de masse HR-FAB-MS était obtenu sur spectromètre Agilent 6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS.

1.5.1.3. Spectrométrie RMN

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone (RMN-¹H et ¹³C) ont été enregistrés à 500 et 125 MHz sur un appareil JEOL ECP-500 (¹H à 500 MHz and ¹³C à 125 MHz). Les échantillons ont été solubilisés dans les solvants deutérés CDCl₃, Pyridine-*d*₆ et CD₃OD. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS), les constantes de couplage sont exprimées en Hz. Le logiciel de traitement des données (JEOL) ou ACD/RMN Processor V12 Free (ADC/Labs).

1.5.1.4. Pouvoir rotatoire

Le pouvoir rotatoire spécifique a été mesuré sur un polarimètre de type JASCO DIP-370 à la longueur d'onde de la raie D du sodium ($\lambda = 589$ nm) dans une cuve quartz ($\phi 3.5$ mm i.d. x 50 mm). Le solvant de solubilité et la concentration sont indiqués dans chaque cas.

1.5.2. Analyses GC et GC/MS

1.5.2.1. Analyse GC

L'huile essentielle de l'espèce *Thymus dreatensis*, a été analysée sur un chromatographe en phase gazeuse de type Hewlett Packard 6890, équipé du FID et d'une colonne capillaire HP-5MS (5% phénylméthylpolysiloxane) de (30m x 0.25 mm ; épaisseur de film 0.25 μ m). La température du four étant programmée de 60–275°C à une vitesse de 4°C/min, avec une température d'injection et détection de 280°C, et un volume injecté de 0,1 mL. Le gaz vecteur étant l'Hélium avec un débit de 2 mL/min. le mode d'injection est un mode split (rapport de fuite : 1/50).

1.5.2.2. Analyse GC/MS

L'analyse GC/MS a été effectuée sur un appareil Hewlett Packard 6890 muni d'un détecteur masse couplé du type Hewlett Packard 6890, équipé du FID et d'une colonne capillaire du type HP-5MS (5 % méthylphénylpolysiloxane), de (30 m x 0.25 mm. épaisseur de film 0.25 μ m). Les conditions opératoires sont les mêmes pour les analyses GC (la colonne, la température du four, le débit et le gaz vecteur). Les paramètres MS étant :

- Potentiel d'ionisation : 70 eV.
- Résolution : 1000.
- Température de trappe d'ions : 200°C.

1.5.2.3. Identification des composants de l'huile essentielle de *Thymus dreatensis* Batt.

Les composants de l'huile essentielle de *Thymus dreatensis* ont été identifiés en comparant leurs indices de rétention (IR), relatifs aux n-alcane C₉-C₁₇, avec des composés de

références dans la littérature, et confirmés par GC-MS en comparant leurs spectres de masse avec ceux des substances de référence (Mclafferty *et al.*, 1991, Adams, 2007).

CHAPITRE 2

Activités biologiques

2.1. Activité Antioxydante

L'activité antioxydante de l'huile essentielle de l'espèce *Thymus dreatensis* a été évaluée par le Test de blanchissement du β -carotène (Miller 1971).

L'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes. Ces radicaux libres vont par la suite oxyder le β -carotène qui entraîne la disparition de sa couleur rouge, qui est suivie par spectrophotométrie. Cependant, la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique, donc, prévenir l'oxydation et le blanchissement du β -carotène (Kartal *et al.*, 2007).

2.1.1. Blanchissement du β -carotène

Blanchissement du β -carotène de l'huile essentielle de *Thymus dreatensis*

Cette activité est déterminée selon la méthode de Miller 1971 (Miller 1971). Une masse de 0.5 mg de β -carotène est dissoute dans 1 mL de chloroforme et ajoutée à 25 μ L d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40 (mixture émulsifiante). Le chloroforme a été complètement évaporé sous vide. 100 mL d'eau distillée saturée en oxygène a été ajouté au mélange précédent, et rigoureusement agitée. 4 mL de cette mixture a été transféré dans différents tubes-test, contenant différentes concentrations de l'huile essentielle. Dès que l'émulsion est ajoutée dans chaque tube, l'absorbance était mesurée à 470 nm au temps zéro, en utilisant un spectrophotomètre. Le système d'émulsion a été incubé 2h de temps à 50 °C. La Vitamine E a été utilisée comme standard. Le taux de blanchissement de β -carotène (**R**) était calculé selon l'équation suivante : **R** = $\ln(a/b)/t$

- ln : log naturel
- a : l'absorbance au temps 0
- b : l'absorbance au temps t (120 mn)

L'activité antioxydante (**AA**) a été calculée en termes de pourcentage d'inhibition relatif au contrôle, utilisant l'équation suivante :

$$AA \% = \frac{A_{\text{Contrôle}} - A_{\text{Extrait}}}{A_{\text{Contrôle}}} \times 100$$

L'activité antioxydante des différents extraits de *Stachys guyoniana* et *Mentha aquatica* a été testé par 5 méthodes : piégeage du radical libre DPPH, Piégeage de l'ABTS, méthode CUPRAC, Chélation des ions métalliques, et blanchissement du β -carotène.

Préparation des échantillons :

Les concentrations préparées sont utilisées pour toutes les méthodes La concentration des solutions mères de chaque échantillon est exprimée en ppm.

$$\text{ppm} = \text{Partie Par Million} = 1 \text{ mg/L} = 10^{-6} \text{ mg}/\mu\text{L}.$$

La masse utilisée pour chaque extrait est : $m = 1 \text{ mg}$, et pour préparer une concentration de 4000 ppm à partir de cette masse de l'échantillon, on a :

$$1 \text{ ppm} = 10^{-6} \text{ mg}/\mu\text{L}, \text{ donc : } 4000 \text{ ppm} = 1 \times 10^{-6} \text{ mg}/V \mu\text{L}$$

$$V = 1 \times 10^{-6} / 4000 = 2000 \mu\text{L}, \text{ alors le volume de la solution mère est de } 2000 \mu\text{L}.$$

Les dilutions effectuées dans l'EtOH ou le DMSO, avec 7 concentrations différentes de l'échantillon en ordre décroissant.

La solution mère S1 on effectue une dilution au 1/2 pour donner S2 (S2 au 1/2).

La solution S2, subit une dilution au 1/2 pour donner S3 (S3 au 1/4).

La solution S3, subit une dilution au 1/2 pour donner S4 (S4 au 1/8).

La solution S4, subit une dilution au 1/2 pour donner S5 (S5 au 1/16).

La solution S5, subit une dilution au 1/2 pour donner S6 (S6 au 1/32).

La solution S6, subit une dilution au 1/2 pour donner S7 (S7 au 1/64).

De la même manière on prépare les différentes concentrations de l'antioxydant standard (α -tocophérol).

Blanchissement du β -carotène de plantes *S. guyoniana* et *M. aquatica*

L'activité de blanchissement du β -carotène des extraits des deux plantes a été évaluée en utilisant la méthode décrite par Miller (Miller, 1971). Une masse de 0.5 mg de β -carotène dissoute dans 1 mL de chloroforme puis ajouté à un volume de 25 μL d'acide linoléique et de 200 mg de Tween 40, en donnant un mélange émulsifiant. Après l'évaporation du chloroforme, 100 mL d'eau distillée saturée en oxygène, ont été ajoutés en agitant. L'absorbance de la solution du β -carotène doit être comprise entre 0.8 -0.9 nm et mesurée à

470 nm en utilisant un lecteur microplaque. Le BHA et l' α -tocophérol comme standards. Cette activité a été calculée en utilisant l'équation suivante:

$$Inhibition \% = \frac{A_{Contrôle} - A_{Extrait}}{A_{Contrôle}} \times 100$$

$A_{Contrôle}$ est l'absorbance de la réaction ne contenant que les réactifs.

$A_{Extrait}$ est l'absorbance de la réaction contenant les réactifs et l'extrait

2.1.2. Activité antiradicalaire DPPH

Cette activité est déterminée selon la méthode de Blois (1958) avec une légère modification (Öztürk *et al.*, 2011). Un volume de 40 μ L de différentes concentrations de chaque échantillon ainsi que l'antioxydant standard (α -tocophérol, BHA), est déposé en triplicata sur une microplaque à 96 puits, en ajoutant sur chaque puits un volume de 160 μ L d'une solution méthanolique de DPPH (0,4mM). Le contrôle négatif est préparé en parallèle, en mélangeant 40 μ L du méthanol avec 160 μ L d'une solution méthanolique de DPPH, à la même concentration utilisée.

Après incubation à température ambiante à l'obscurité pendant 30 min, la microplaque est insérée dans le spectrophotomètre (SpectraMax 340PC384 : lecteur de microplaques à 96 puits/logiciel PRO v5.2 software) pour mesurer l'absorption à 517nm. La capacité à piéger le radical DPPH a été calculée selon l'équation suivante :

$$Inhibition \% = \frac{A_{Contrôle} - A_{Extrait}}{A_{Contrôle}} \times 100$$

$A_{Contrôle}$ est l'absorbance de la réaction ne contenant que les réactifs.

$A_{Extrait}$ est l'absorbance de la réaction contenant les réactifs et l'extrait

2.1.3. Essai de décoloration de radical cation ABTS^{•+}

Le radical cation ABTS est généré en mélangeant 7 mM d'une solution aqueuse d'ABTS avec 2,45 mM de persulfate de potassium, le tout est conservé à l'abri de la lumière et à la température ambiante durant 16 h avant utilisation. Avant l'utilisation du radical ABTS^{•+}, la solution obtenue est diluée avec l'éthanol pour obtenir une absorbance de $0,7 \pm 0,025$ à 734 nm. 160 μ l de cette solution fraîchement préparée sont ajoutés à 40 μ l de différentes concentrations de chaque échantillon, ainsi que l'antioxydant standard α -tocophérol déposés déjà en triplicata sur une microplaque à 96 puits. Le contrôle négatif est

préparé en parallèle suivant le même protocole en remplaçant l'échantillon par le solvant qui le dissous.

Après 10 min, l'absorbance a été mesurée à 734 nm. Le BHA et le α -tocophérol ont été utilisés comme des normes antioxydantes pour la comparaison de l'activité des extraits. La capacité de piégeage des L'ABTS•+ a été calculée en utilisant l'équation suivante:

$$\text{Inhibition \%} = \frac{A_{\text{Contrôle}} - A_{\text{Extrait}}}{A_{\text{Contrôle}}} \times 100$$

2.1.4. La réduction cuprique (CUPRAC)

L'activité antioxydante par réduction cuprique des extraits a été déterminée par la méthode CUPRAC (Apak *et al.*, 2004). Dans les plaques de 96 unités des solutions ont été ajoutées: 50 μ l de Cu(II) (10 mM), 50 μ l de neocuproïne (7.5 mM), 60 μ l de tampon NH₄Ac (1 M, pH = 7), et 40 μ L de l'extrait à différentes concentrations.

Après une heure du temps et à l'aide d'un lecteur de microplaques, l'absorbance a été enregistrée à 450 nm. Les résultats ont été calculés à titre de A_{0,5} (μ g / mL) correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance.

2.1.5. Chélation des ions ferreux

L'activité de chélation des ions Fe²⁺ a été mesurée en utilisant le Ferrin (Decker et Welch, 1990). La solution des extraits à différentes concentrations (40 μ l) a été ajoutée à 40 μ l EtOH, 40 μ L FeCl₂ (0.2 mM) et 80 μ L Ferène (0.5 mM). L'absorbance a été mesurée après 10 min à 562 nm.

Les résultats ont été donnés en pourcentage d'inhibition et l'activité a été calculée en utilisant l'équation suivante:

$$\text{Inhibition \%} = \frac{A_{\text{Contrôle}} - A_{\text{Extrait}}}{A_{\text{Contrôle}}} \times 100$$

II.2. Détermination des phénols totaux

Le contenu phénolique total des extraits étudiés est mesuré par la méthode décrite par Singleton *et al.* (1977).

0.5 mL de l'extrait est ajouté à 5 ml d'eau distillée et agité avec le vortex pendant 1 minute.

Ensuite, 1 mL du réactif de Folin Ciocalteu est ajouté à chaque tube et bien mélangé. Après 5 min, 1 ml d'une solution de carbonate de sodium à 7.5% est ajouté et agité à nouveau au vortex. L'échantillon est laissé une heure à l'obscurité pour développer sa couleur. L'absorbance est mesurée à 640 nm en utilisant le spectrophotomètre.

Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique/100g d'extrait, en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

$$\text{Absorbance} = 5.5771 \text{ Acide gallique (mg)} - 0.0306 \quad (R^2 = 0.995)$$

II.3. Screening chimique

Test de Shinoda des flavonoïdes

Quelques morceaux de magnésium et des gouttes d'HCl concentré ont été mélangées avec 0,5 g de chaque extraits étudiés dissous dans de l'éthanol. Au bout de quelques minutes, l'apparition d'une couleur pourpre rose, orange ou rouge indique la présence de flavonoïdes (Trease & Evans, 2002).

Test de chlorure ferrique des flavonoïdes

0,5 g de chaque extrait avec de l'eau distillée sont mis jusqu'au point d'ébullition, puis on filtre. On prend 2 mL du filtrat avec quelques gouttes d'une solution de chlorure ferrique à 10% ont été ajoutés. Une coloration verte-bleue ou violette indique la présence des flavonoïdes (Trease & Evans, 2002).

Test des stéroïdes et triterpénoïdes (Liebermann Burchard)

1 mg de chaque extrait qui a été dissout avec quelques gouttes de chloroforme ont été mélangés avec 3 mL d'acide acétique anhydride et 3 mL d'acide acétique glacial. La solution a été ensuite réchauffée et refroidi sous l'eau du robinet, puis des gouttes d'acide sulfurique concentré ont été ajoutées lentement. La formation de couleur bleu-vert indique la présence de stéroïdes et triterpènes (Sofowora 1993).

II.4. Activité Anticholinestérase

Les activités inhibitrices de l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE) ont été mesurées en modifiant légèrement la méthode spectrophotométrique d'Ellman et al. (1961).

Les enzymes AChE de l'anguille électrique et BChE de sérum de cheval ont été utilisés, ainsi que l'iodure d'acétylthiocholine et le chlorure butyrylthiocholine ont été utilisés comme substrats de la réaction (AChE et BChE respectivement) avec l'acide 5,5'-dithio-bis 2-nitrobenzoïque (DTNB), pour la mesure de l'activité anticholinestérase. Pour mesurer l'activité inhibitrice AChE, un volume de: 130 μL du tampon de phosphate de sodium (100 mM, pH = 8), 10 μL de l'extrait à différentes concentrations, et 20 μL de l'enzyme AChE (5.32×10^{-3} U), ont été incubés pendant 15 min à 25°C, puis 20 μL de DTNB (0.5 mM) ont été ajoutés. La réaction est ensuite initiée par l'addition de 20 μL d'iodure d'acétylthiocholine (0.71 mM). L'analyse de l'activité inhibitrice BChE a été déterminée suivant les mêmes étapes de celles de l'AChE, en utilisant l'enzyme BChE (6.85×10^{-3} U) et le substrat chlorure butyrylthiocholine (0.2 mM). L'hydrolyse de ces substrats a été surveillée par spectrophotométrie de la coloration jaune de 5-thio-2-nitrobenzoate formé par la réaction de DTNB avec la thiocholine, libérée par l'hydrolyse enzymatique de l'iodure d'acétylthiocholine ou de chlorure de butyrylthiocholine. L'absorbance a été mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaque à une longueur d'onde de 412 nm.

Le pourcentage d'inhibition de l'AChE ou BChE a été déterminé par comparaison des vitesses de réaction d'échantillons par rapport à l'échantillon témoin (éthanol dans du tampon phosphate, pH 8) en utilisant la formule :

$$\text{Inhibition \%} = \frac{A_{\text{Contrôle}} - A_{\text{Extrait}}}{A_{\text{Contrôle}}} \times 100$$

où : $A_{\text{Contrôle}}$ est l'activité de l'enzyme sans échantillon d'essai,

A_{Extrait} , est l'activité de l'enzyme avec l'échantillon de test.

II.5. Activité Antibactérienne

L'étude de l'activité antibactérienne des différents extraits de *S. guyoniana* de Noé. et *M. aquatica* a été effectuée par la méthode de diffusion sur disque sur les souches bactériennes suivantes : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC

43300, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella heidelberg* (SH), *Klebsiella pneumonia* (SH), *Enterobacter aerogenes* (SH) and *Morganella morganii* (SH). Les souches de références (ATTC) utilisées proviennent de l'institut Pasteur à Alger et de prélèvements de malades (SH) du CHU (hôpital Benbadis, de Constantine).

Chaque bactérie a étéensemencée sur le milieu de culture Mueller-Hinton. La sensibilité des souches aux différents extraits de : *S. guyonina* et *M. aquatica* a été évaluée par la méthode de dilution en gélose; différentes concentrations des extraits ont été inclus dans des boîtes de gélose Mueller-Hinton (CMI sensible $\leq 32 \mu\text{g} / \text{mL}$) sur des disques (6 mm). Après incubation à 37°C pendant 18 à 24 h, des zones d'inhibition ont été mesurées à l'aide d'un pied à coulisse ou d'une règle.

PARTIE 3

Résultats et discussion

CHAPITRE 1

**Identification des produits
isolés de *Mentha aquatica* L.**

1.1. Caractérisation des produits obtenus de l'extrait CHCl_3 des parties aériennes de *Mentha aquatica*

Les produits isolés de l'extrait CHCl_3 des parties aériennes de la plante *Mentha aquatica* ont été caractérisés par les méthodes d'analyse spectroscopiques RMN 1D du proton et du carbone, RMN 2D (COSY, HMQC, HMBC), et par comparaison avec les données de la littérature. Cette étude a abouti à l'isolement de 7 composés.

1.1.1. Elucidation structurale du composé P1

Le composé **P1** est isolé sous forme des cristaux blancs. Il a été identifié comme le β -sitostérol en comparant les données spectrales avec celle de la littérature (Luhata & Munkombwe 2015).

L'observation du spectre RMN ^1H (**Figures 20, 21**) confirme sa nature triterpénique. En effet, il présente :

- 2 singulets d'intensité 3H correspondant aux 2 méthyles CH_3 -18 à 0.68 ppm et le CH_3 -19 à 1.01 ppm.
- 3 doublets d'intensité 3H des 3 méthyles CH_3 -21 à 0.92 ppm ($d, J = 6.6$ Hz), CH_3 -26 à 0.86 ppm ($d, J = 7.3$ Hz), CH_3 -27 à 0.81 ppm ($d, J = 7.0$ Hz) et le triplet du méthyle CH_3 -29 à 0.82 ppm ($t, J = 7.0$ Hz).
- Un signal multiplet résonant à δ_{H} 3.53 attribuable au proton H-3.
- Un doublet résonant à δ_{H} 5.35 ($d, J = 5.1$ Hz) attribuable à un proton éthylénique le H-6.
- Un signal résonant à δ_{H} 1.58 attribuable pour le proton H-25.

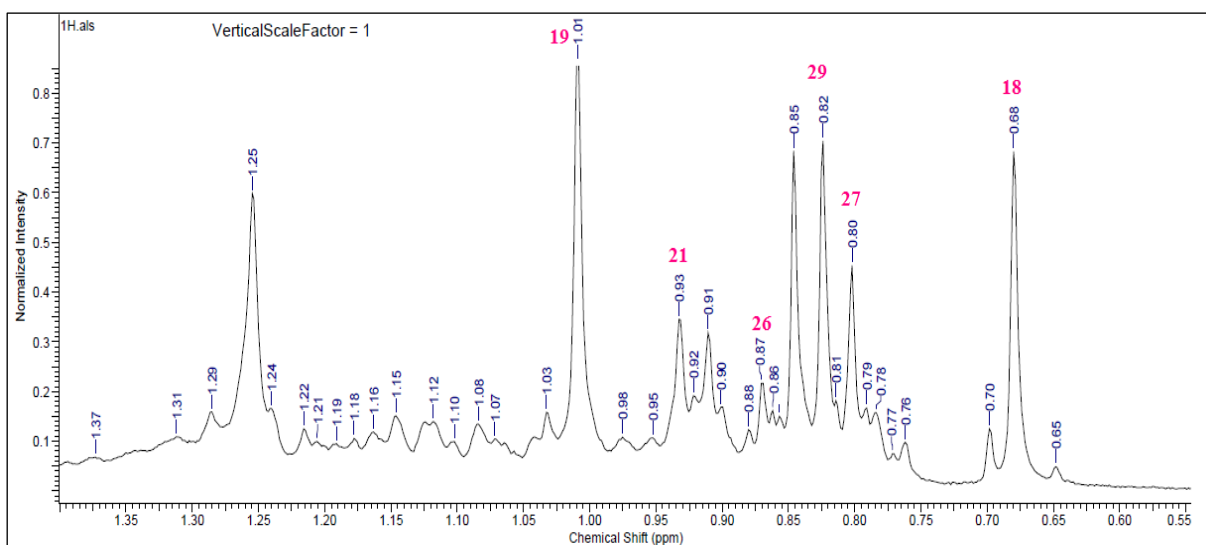


Figure 20: Spectre RMN ^1H des méthyles du composé P1

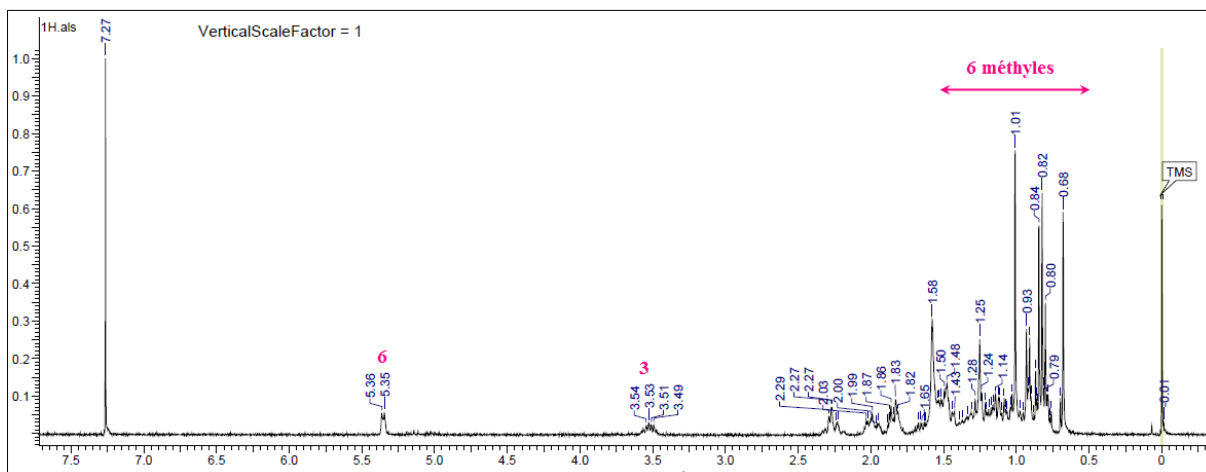
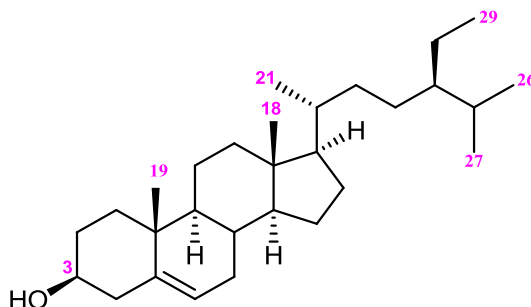


Figure 21: Spectre RMN ^1H du composé **P1**

Tableau 19: Déplacements chimiques en RMN ^1H (300 MHz) du composé **P1**.

Position	δ_{H} m J (Hz)	β -sitostérol (Luhata & Munkombwe, 2015)
3	3.52 (m)	3.51 (tdd)
6	5.35 (d, 5.1)	5.38 (s)
18	0.68 (s)	1.03 (d)
19	1.01 (s)	0.71 (d)
21	0.92 (d, 6.6)	0.91 (d)
22	-	4.98 (m)
23	-	5.14 (m)
24	2.03 (m)	-
25	1.58 (m)	-
26	0.86 (d, 7.3)	0.80 (d)
27	0.81 (d, 7.0)	0.82 (d)
29	0.82 (t, 7.0)	0.83 (t)

L'ensemble des données spectroscopiques (**Tableau 19**) du composé **P1** s'identifient au β -sitostérol, métabolite secondaire commun à toutes les plantes, qui a été isolé de l'espèce *Mentha longifolia* (Shaiq Ali *et al.*, 2002). Le β -sitostérol a fait l'objet de nombreuses études pharmacologiques qui ont montré qu'il possède des propriétés antibactérienne, antitumorale (Singh *et al.*, 2002), antipyrétique, immunomodulatrice et anti-inflammatoire (Dae-Sup *et al.*, 2004).

Composé **P1** : β -sitostérol

1.1.2. Elucidation structurale du composé **P2**

Le composé **P2** est obtenu sous forme d'une poudre blanche, soluble dans le méthanol. Il est invisible sous la lumière UV (254 et 366 nm).

L'analyse du spectre RMN ^1H (**Figure 22**) de ce composé, enregistré dans la Pyridine- d_5 , montre dans la région blindée sept singulets fins, s'intégrant pour trois protons chacun, attribuables aux méthyles résonant à δ_{H} 1.24 (Me-23), 0.88 (Me-24), 1.02 (Me-25), 0.95 (Me-26), 1.28 (Me-27), 1.00 (Me-29) et 1.02 (Me-30) correspondant aux sept méthyles angulaires d'un squelette triterpénique pentacyclique (Kyeon *et al.*, 2014).

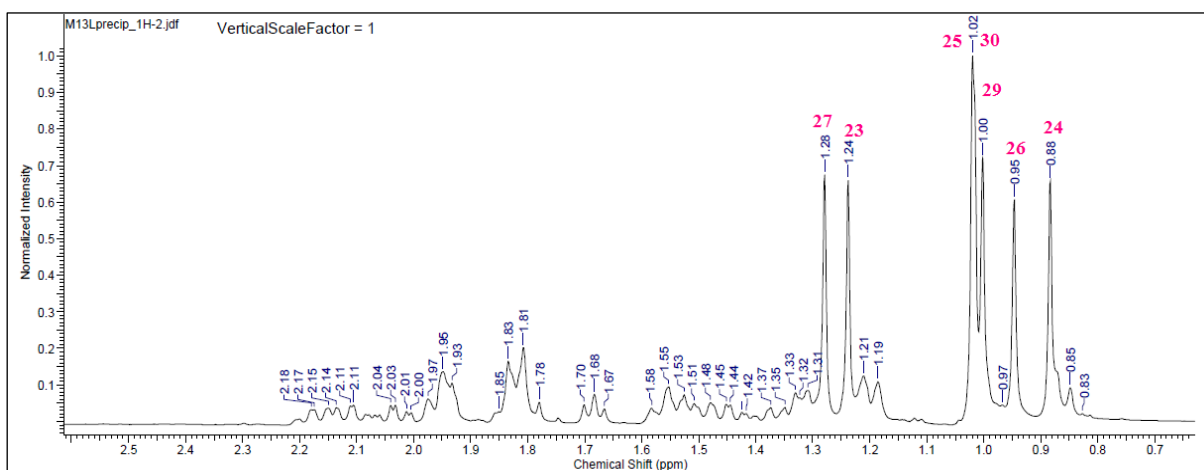


Figure 22: Spectre RMN ^1H des méthyles du composé **P2**

De plus, on observe un massif de protons (**Figure 23**) résonant entre 0.83 à 2.17 ppm correspondant aux CH et CH₂, et trois signaux déblindés à δ_{H} 5.49, 3.44 (*dd*, $J = 10.6, 5.5$ Hz) et 3.30 (*dd*, $J = 13.7, 3.6$ Hz) attribuables respectivement au proton éthylénique H-12, et aux protons oxyméthine H-3 et méthine H-18, des triterpènes pentacycliques de type oléan-12-

ène. Le déplacement chimique du proton H-18 (δ_H 3.30) est significatif de la présence d'une fonction acide en C-28 (COOH).

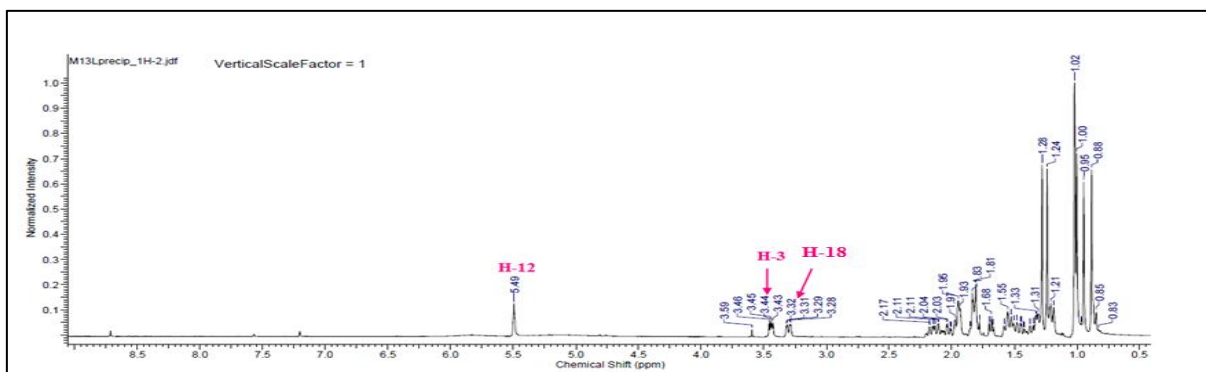


Figure 23: Spectre RMN ^1H du composé **P2**

Sur le spectre RMN ^{13}C (**Figures 24, 25**), les signaux des carbones suivants sont observés:

- Sept méthyles résonant à δ_C 15.4, 16.5, 17.3, 23.7, 26.1, 28.7 et 33.1. La présence seulement de sept méthyles suppose l'oxydation d'un des huit méthyles constituant habituellement le squelette oléanane. L'observation d'un signal au-delà de 170 ppm sur le spectre RMN ^{13}C , laisse supposer que ce carbone est probablement oxydé en carbonyle.
- Un ensemble de carbones résonant entre 20 et 56 ppm, attribuables aux CH_2 , CH et C quaternaires.
- Les carbones éthyléniques C-12 et C-13 de la double liaison sortent respectivement vers δ_C 122.4 et 144.7.
- Un carbonyle à δ_C 180.1 attribuable à un acide libre.
- Le carbone de l'oxyméthine à $\delta_C = 77.9$ attribuable à C-3.

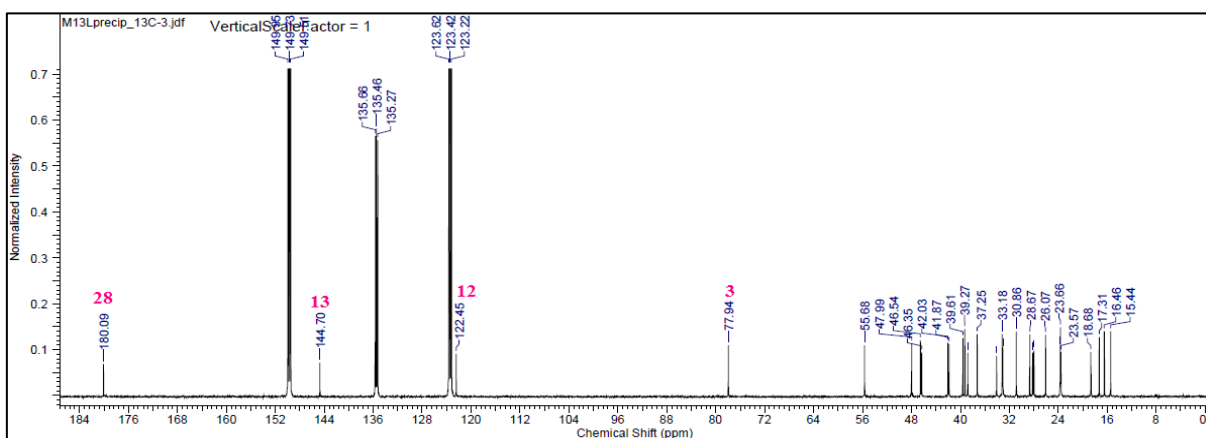


Figure 24: Spectre RMN ^{13}C du composé **P2**

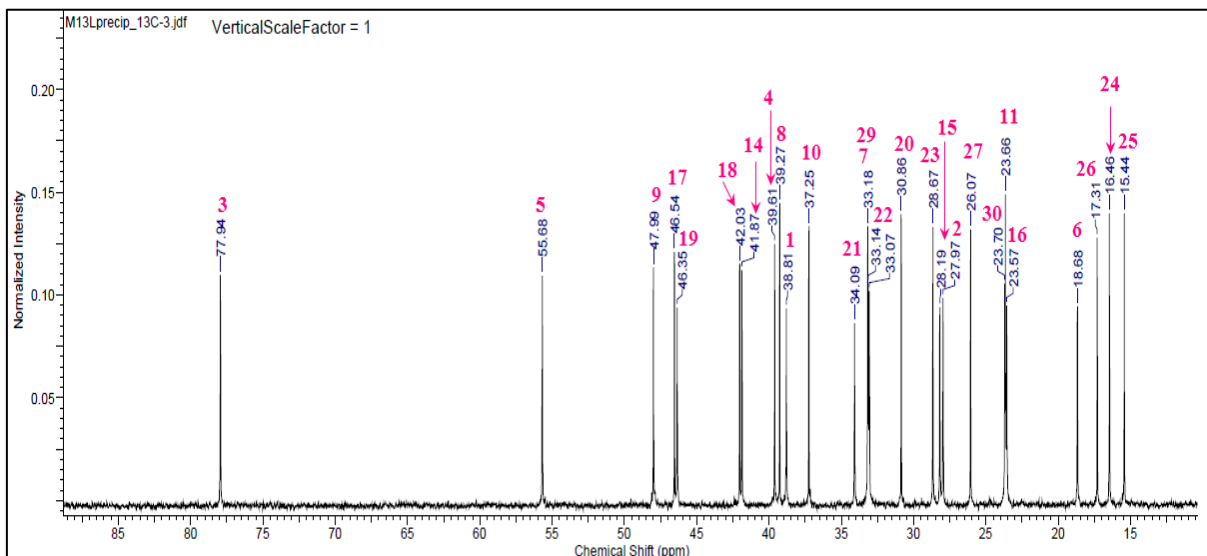


Figure 25: Spectre RMN ^{13}C étalé du composé **P2**

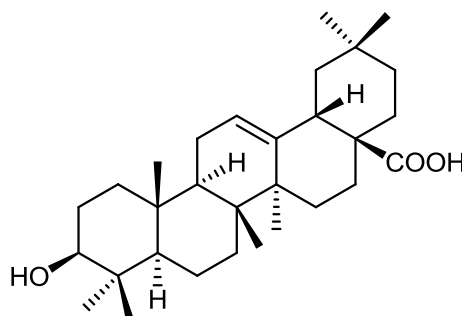
Tableau 20: Déplacements chimiques en RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé **P2**

Position	δ_{H} m J (Hz)	δ_{C}	Acide Oléanolique (Kyeong <i>et al.</i> , 2014)
1	-	38.8	38.7
2	-	28	27.8
3	3.44 (<i>dd</i> , 10.6, 5.5)	77.9	77.8
4	-	39.6	39.1
5	0.85 (<i>m</i>)	55.7	55.5
6	-	18.7	18.7
7	-	33.1	33.0
8	-	39.3	39.5
9	-	48.0	49.4
10	-	37.3	37.1
11	-	23.7	23.6
12	5.49 (<i>s</i>)	122.4	122.3
13	-	144.7	144.6
14	-	41.9	41.9
15	-	28.2	28.1
16	-	23.6	23.6
17	-	46.5	47.9

Identification des produits isolés de *Mentha aquatica*

18	3.30 (<i>dd</i> , 13.7, 3.6)	42.1	41.8
19	1.68 (<i>t</i> , 9.2)	46.3	46.2
20	-	30.9	30.7
21	-	34.1	34.0
22	-	33.1	32.9
23	1.24 (<i>s</i>)	28.7	28.5
24	0.88 (<i>s</i>)	16.5	16.6
25	1.02 (<i>s</i>)	15.4	15.4
26	0.95 (<i>s</i>)	17.3	17.7
27	1.28 (<i>s</i>)	26.1	25.9
28	-	180.1	180.0
29	1.00 (<i>s</i>)	33.2	33.0
30	1.02 (<i>s</i>)	23.7	23.6

L'ensemble de ces données (**Tableau 20**) ainsi que la comparaison avec celles de la littérature (dans le même solvant Pyridine-*d*₅) (Kyeong *et al.*, 2014, Werner *et al.*, 2003), conduisent à l'identification du composé **P2** comme étant l'acide Oléanolique. Ce composé a été antérieurement isolé de plusieurs espèces du genre *Mentha*: *M. citrata* (Passannanti *et al.*, 1990), ainsi que les 3 espèces suivante : *M. arvensis* var. *piperascens* MAL, *M. spicata* et *M. rotundifolia* (Karasawa *et al.*, 1980). Il est connu pour ses activités antibactérienne (Jing *et al.*, 2015), Antidiabétique, anti VIH, anti-inflammatoire et pour la protection du foie (Jin *et al.*, 2016).

Composé **P2** : Acide Oléanolique

1.1.3. Elucidation structurale du composé P3

Le composé **P3** est obtenu sous forme d'une poudre blanche, invisible à la lumière UV (254 et 366 nm). L'analyse du spectre RMN ^1H (**Figure 26**) de ce composé, enregistré dans la Pyridine- d_5 , montre dans la région blindée sept signaux, dont six singulets et un doublet correspondant aux méthyles angulaires d'un squelette tri terpénique pentacyclique. Ces signaux singulets résonnent à δ_{H} 1.24 (Me-23), 1.03 (Me-24), 0.91 (Me-25), 1.11 (Me-26), 1.73 (Me-27), 1.45 (Me-29) et le signal à 1.13 ppm sous forme d'un doublet attribuable au (Me-30), caractéristiques des triterpènes pentacycliques de type ursane.

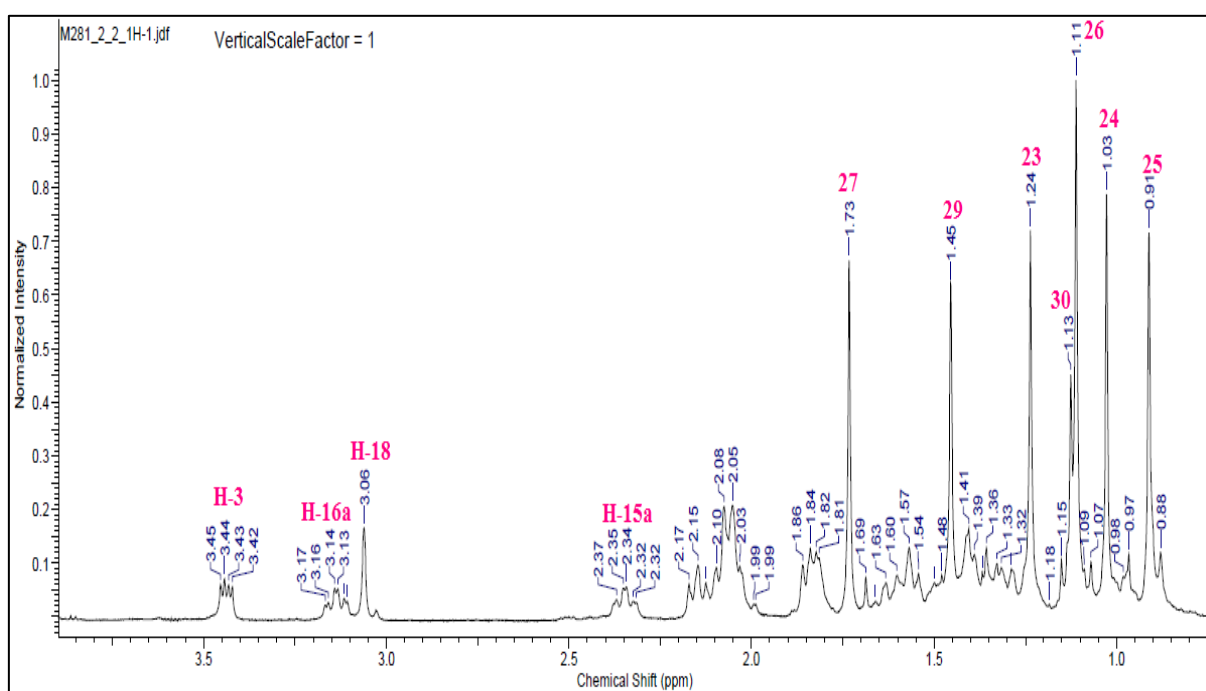


Figure 26: Spectre RMN ^1H des méthyles du composé **P3**

De plus, on observe un massif de protons (**Figure 27**) résonnant entre 0.88 à 2.37 ppm correspondant aux CH et CH₂, et trois signaux à δ_{H} 5.61 sous forme d'un singlet large, 3.44 sous forme d'un doublet dédoublé (*dd*, $J = 10.5, 5.2$ Hz) et 3.06 sous forme d'un singlet, attribuables respectivement au proton éthylénique H-12, et aux protons oxyméthine H-3 et méthine H-18. Le déplacement chimique du proton H-18 à 3.06 ppm est significatif de la présence d'une fonction acide en C-28 (COOH).

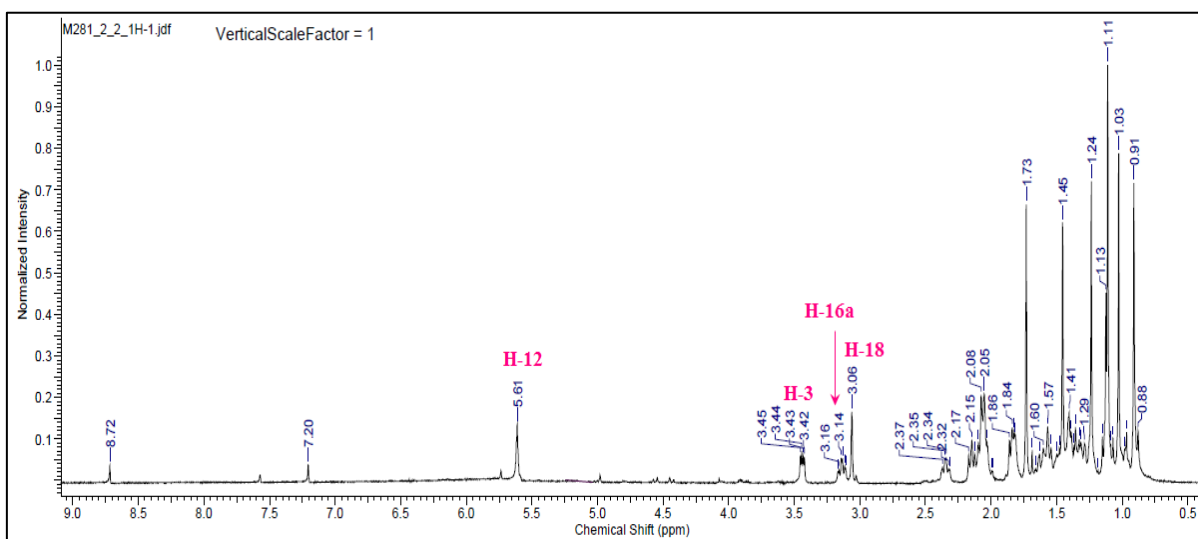


Figure 27: Spectre RMN ^1H du composé **P3**

Le spectre RMN ^{13}C (**Figures 28, 29**) révèle la présence de 30 signaux, les carbones caractéristiques répartis comme suit :

- Six méthyles quaternaires.
- Deux signaux apparaissant à δ_{C} 127.9 et 139.8 correspondent aux carbones éthyléniques C-12 et C-13 respectivement.
- Un signal d'un carbone correspondant au groupement acide à δ_{C} 180.7 attribuable à C-28
- Un ensemble de carbones résonant entre 20 et 56 ppm, attribuables aux $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}$ et C quaternaires.

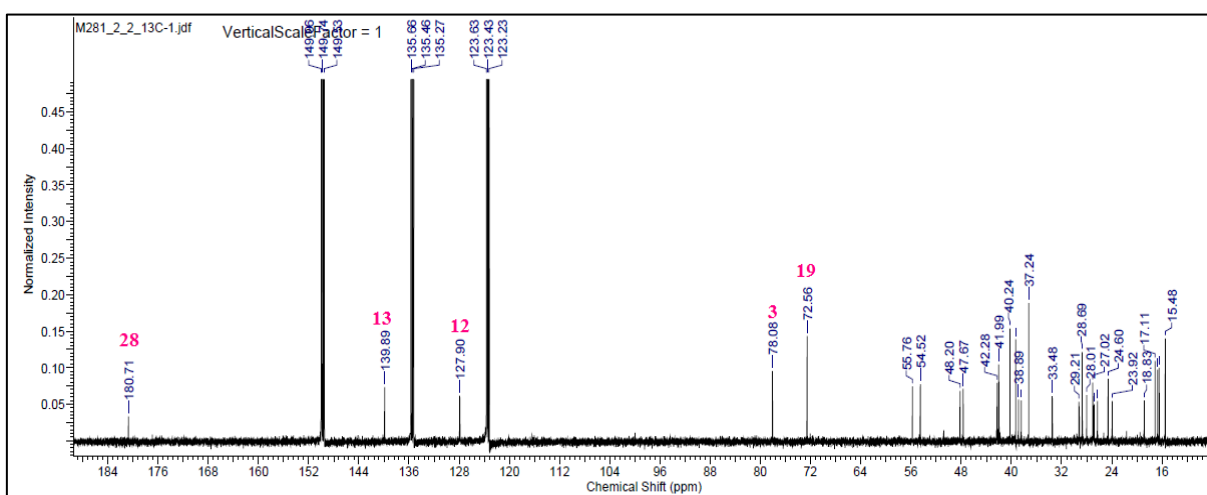
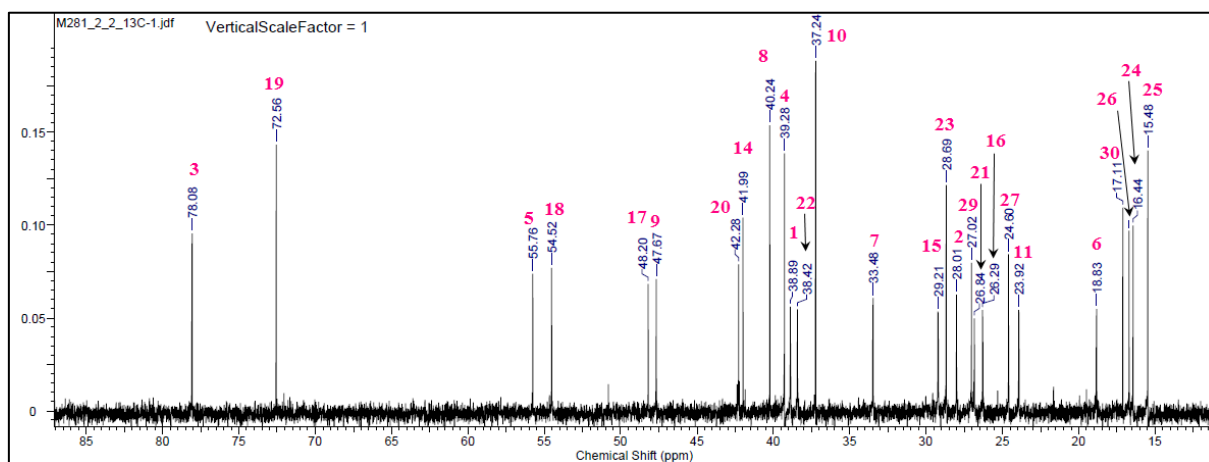


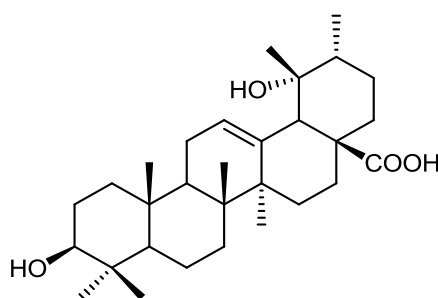
Figure 28: Spectre RMN ^{13}C du composé **P3**

Identification des produits isolés de *Mentha aquatica*Figure 29: Spectre RMN ^{13}C étalé du composé **P3**Tableau 21: Déplacements chimiques en RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé **P3**

Position	δ_{H} m J (Hz)	δ_{C}	Acide Pomolique (Sidjui <i>et al.</i> , 2015)
1	H-1a 1.60 (<i>m</i>) ; H-1b 0.97 (<i>m</i>)	38.9	39.5
2	H-2a 1.99 (<i>m</i>) ; H-2b 1.84 (<i>m</i>)	28.0	28.6
3	3.44 (<i>dd</i> , 10.5, 5.2)	78.1	78.7
4	-	39.3	39.9
5	0.88 (<i>m</i>)	55.8	56.3
6	H-6a 1.63 (<i>m</i>) ; H-6b 1.41 (<i>m</i>)	18.8	19.4
7	H-7a 1.82 (<i>m</i>) ; H-7b 1.41 (<i>m</i>)	33.5	34.1
8	-	40.2	40.8
9	1.86 (<i>m</i>)	47.7	48.3
10	-	37.2	37.8
11	H-11a 2.10 (<i>m</i>) ; H-11b 2.05 (<i>m</i>)	23.9	24.5
12	5.61 (<i>sl</i>)	127.9	128.5
13	-	139.8	140.4
14	-	42.0	42.6
15	H-15a 2.34 (<i>td</i> , 13.2, 4.1) ; H-15b 1.10 (<i>m</i>)	29.2	29.8
16	H-16a 3.43 (<i>td</i> , 12.9, 4.2) ; H-16b 2.10 (<i>m</i>)	26.3	26.9
17	-	48.2	48.8
18	3.06 (<i>s</i>)	54.5	55.1
19	-	72.6	73.2

20	1.54 (m)	42.3	42.8
21	H-21a 2.15 (m); H-21b 1.36 (m)	26.8	27.4
22	H-22a 2.17 (m) ; H-22b 2.10 (m)	38.4	39.0
23	1.24 (s)	28.7	17.0
24	1.03 (s)	16.4	29.3
25	0.91 (s)	15.5	16.0
26	1.11 (s)	16.7	17.2
27	1.73 (s)	24.6	25.2
28	-	180.7	181.1
29	1.45 (s)	27.0	27.6
30	1.12 (d, 7.3)	17.1	17.4

L'attribution des autres signaux (**Tableau 21**) a été faite par comparaison avec des structures similaires et dans le même solvant (Sidjui *et al.*, 2015). Toutes ces données spectrales nous permettent d'identifier le produit **P3** à l'acide pomolique. Isolé antérieurement des espèces suivantes : *Mentha arvensis* var. *piperascens* MAL, *Mentha spicata* et *Mentha rotundifolia* (Karasawa *et al.*, 1980). Ce composé est connu comme antiagrégant plaquettaire (Alvarado-Castillo *et al.*, 2012).



Composé **P3** : Acide pomolique

1.1.4. Elucidation structurale du composé P4

Le composé **P4** est obtenu sous forme d'une poudre blanche. Le spectre RMN ^1H de ce composé ressemble à celui du composé **P2**, ils ont le même squelette triterpénique oléan-12-ène. Le spectre RMN ^1H de ce composé enregistré dans la Pyridine- d_5 (**Figure 30**) montre dans la région blindée six signaux fins, attribuables aux méthyles résonnant à δ_{H} 1.21 (s, Me-

Identification des produits isolés de *Mentha aquatica*

23), 1.02 (s, Me-24), 0.87 (s, Me-25), 0.99 (s, Me-26), 1.21 (s, Me-27) et 0.94 (d, $J = 6.0$ Hz, Me-29) correspondant aux six méthyles angulaires d'un squelette triterpénique pentacyclique.

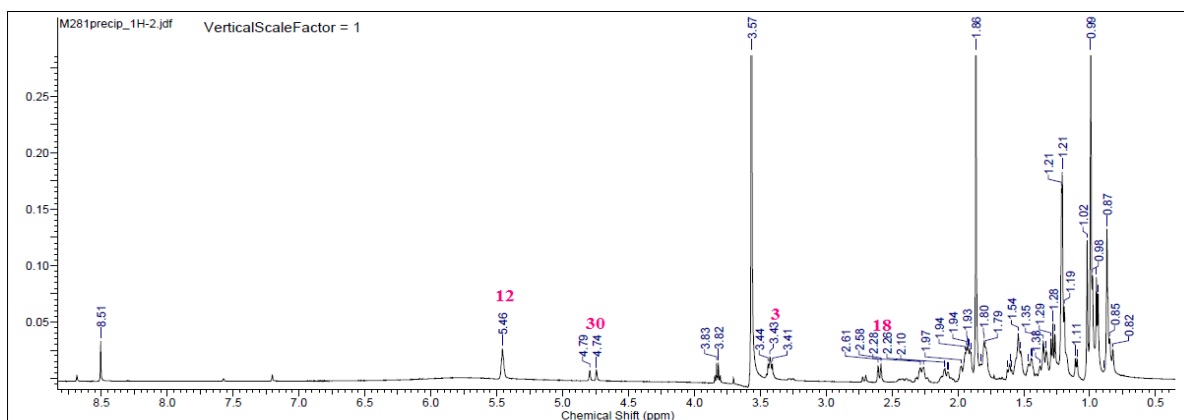


Figure 30 : Spectre RMN ^1H du composé **P4**

Un massif de proton résonant à δ_{H} 0.85 à 2.26 correspondant aux $-\text{CH}$, $-\text{CH}_2$ et C quaternaire des cinq cycles et d'autres signaux repérés à :

- Un signal doublet à δ_{H} 2.59 ($J = 11.0$ Hz) correspondant au proton H-18, cette valeur du déplacement chimique est significatif de la présence d'une fonction acide en C-28 (COOH).
- Un signal triplet à δ_{H} 3.43 ($J = 8.0$ Hz) attribuable au proton H-3.

Le spectre RMN ^{13}C (**Figure 31**) du composé **P4** montre dans la région blindée 3 signaux des carbones éthyléniques correspondant aux carbones C-12 (δ_{C} 125.5), C-13 (δ_{C} 139.1) et un carbone repéré à 104.7 ppm.

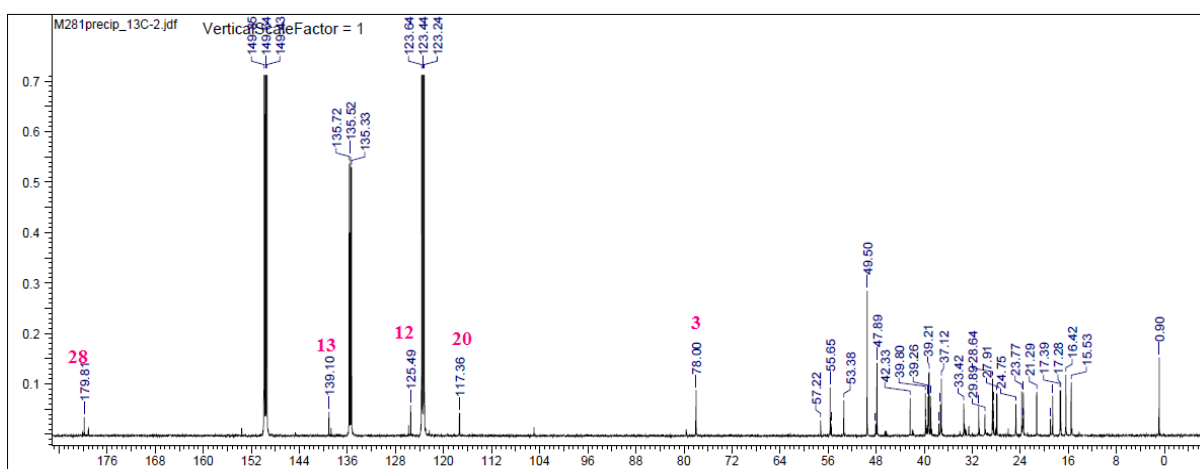


Figure 31 : Spectre RMN ^{13}C du composé **P4**

Le spectre RMN ^1H montre également deux signaux sous forme de singulet large à δ_{H} 4.79 et 4.74 attribuable aux protons éthyléniques méthylène exocyclique. L'analyse des couplages hétéronucléaire $^1J_{\text{H-C}}$ visualisé sur le spectre HMQC (**Figure 32**) permet de déterminer le déplacement chimique de leurs carbones à δ_{H} 104.7 (C-30).

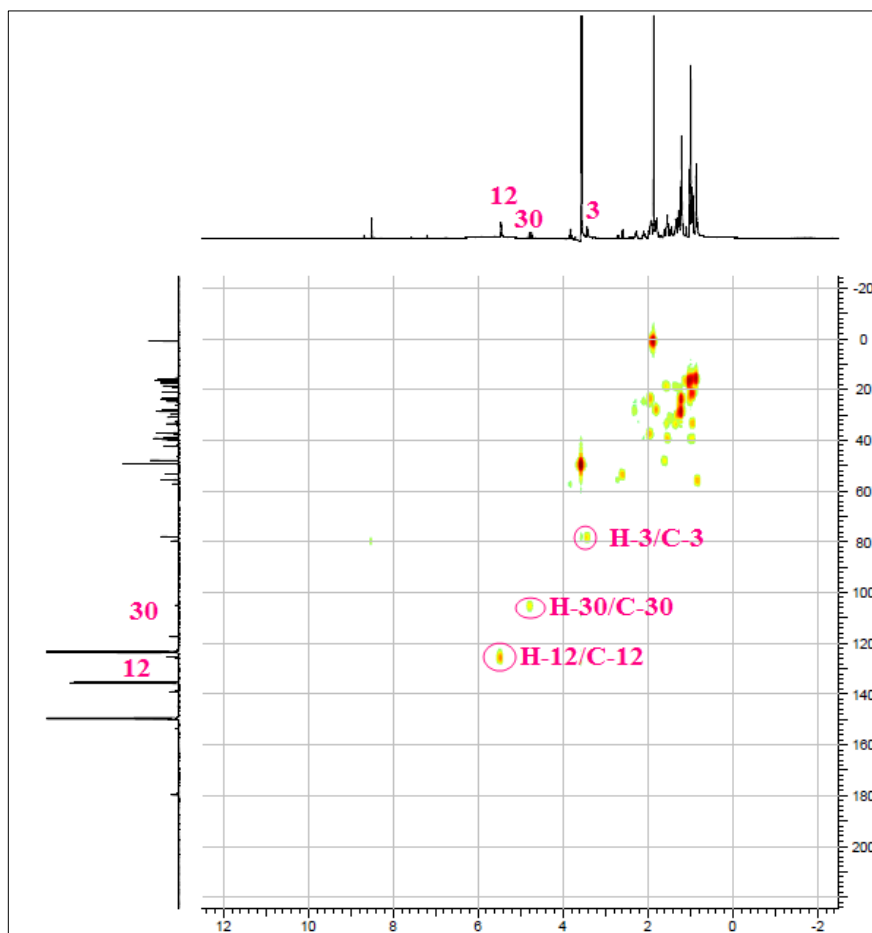


Figure 32 : Spectre HMQC du composé **P4**

Les protons géminés du groupement méthylène corrélient en HMBC (**Figure 33**) avec les deux carbones C-19 et C-21.

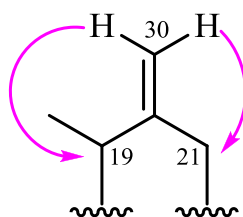


Figure 33 : Corrélations HMBC des protons éthyléniques géminés

Identification des produits isolés de *Mentha aquatica*

L'expérience HMQC permet de détecter les protons portés par ces carbones apparaissant à δ_H 2.10 (*m*, H-19), 2.23 (*m*, H-21a), 2.61 (*m*, H-21b), ainsi que les carbones C-3 (δ_C 78.0), C-12 (δ_C 125.5) et C-18 (δ_C 53.4).

L'élucidation structurale du composé **P4** est initiée à partir des carbones déjà attribués, l'expérience HMBC montre les corrélations présentées dans la figure suivante (**Figure 34**):

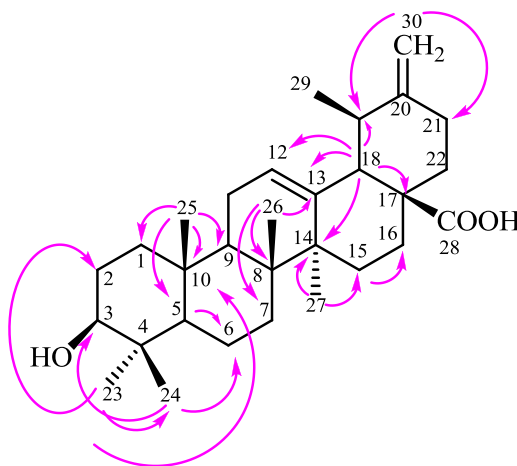


Figure 34 : Corrélations HMBC du composé **P4**

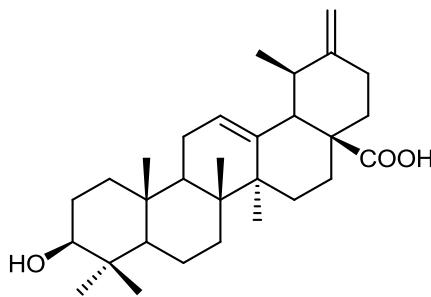
Tableau 22: Déplacements chimiques en RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé **P4**

Position	δ_H <i>m</i> <i>J</i> (Hz)	δ_C	Acide micromérique (Gianmario <i>et al.</i> , 2007)
1	H-1a 1.54 (<i>m</i>) ; H-1b 1.00 (<i>m</i>)	39.2	39.9
2	1.80 (<i>m</i>)	28.6	28.5
3	3.43 (<i>t</i> , 8.0)	78.0	80.3
4	-	39.2	39.9
5	0.82 (<i>m</i>)	55.6	56.7
6	1.10 (<i>dl</i> , 6.4)	16.4	18.3
7	H-7a 1.54 (<i>m</i>) ; H-7b 1.35 (<i>m</i>)	33.4	34.2
8	-	38.9	40.7
9	1.61 (<i>t</i> , 8.7)	47.9	48.8
10	-	39.8	38.2
11	1.92 (<i>m</i>)	23.8	24.6
12	5,46 (<i>sl</i>)	125.5	127.7
13	-	139.1	138.0

Identification des produits isolés de *Mentha aquatica*

14	-	42.3	43.3
15	H-15a 1.38 (m) ; H-15b 1.28 (t, 7.3)	29.9	29.1
16	H-16a 2.10 (m) ; H-16b 1.79 (m)	28.6	25.6
17	-	49.5	48.0
18	2.59 (d, 11.0)	53.4	56.1
19	2.10 (m)	38.9	38.7
20	-	117.4	152.8
21	H-21a 2.23 (m) ; H-21b 1.61 (m)	33.3	33.5
22	H-22a 2.28 (m) ; H-22b 2.26 (m)	39.2	40.1
23	1.21 (s)	27.9	29.4
24	1.02 (s)	17.3	16.9
25	0.87 (s)	15.5	16.6
26	0.99 (s)	16.4	18.3
27	1.21 (s)	23.5	24.6
28	-	179.8	177.9
29	1.10 (d, 6.4)	21.3	17.3
30	H-30a 4.79 (sl), H-30b 4.74 (sl)	104.7	106.5

Les expériences HMQC, HMBC combinées, permettent d'assigner sans difficulté tous les déplacements chimiques des protons et des carbones (**Tableau 22**) ainsi la comparaison avec celle de la littérature (dans le CD₃OD) (Gianmario *et al.*, 2007) et d'attribuer sans ambiguïté à ce composé **P4**, la structure de l'acide 3-β-hydroxy-ursan-12.20(30)-dièn-28-oïque ou l'acide micromérique. Il a été isolé de l'espèce *Rosmarinus officinalis* (Labiatae) et il possède une activité anti-inflammatoire significative (Gianmario *et al.*, 2007).

Composé **P4** : Acide micromérique

1.1.5. Elucidation structurale du composé P5

Le composé **P5** est obtenu sous forme d'une poudre blanche, il est invisible sous la lampe UV aux longueurs d'onde 254 et 366 nm. L'analyse du spectre RMN ^1H (**Figure 35**) de ce composé, enregistré dans la Pyridine- d_5 , montre dans la région blindée cinq singulets fins et deux doublets fins (**Figure 36**), s'intégrant pour trois protons chacun, attribuables aux méthyles résonant à δ_{H} 1.24 (CH₃-23), 1.02 (CH₃-24), 0.88 (CH₃-25), 1.05 (CH₃-26), 1.23 (CH₃-27) et 1.00 (CH₃-29, *d*, *J*= 6.4 Hz) et 0.94 (CH₃-30, *d*, *J*= 6.0 Hz) correspondant aux sept méthyles angulaires d'un squelette triterpénique pentacyclique.

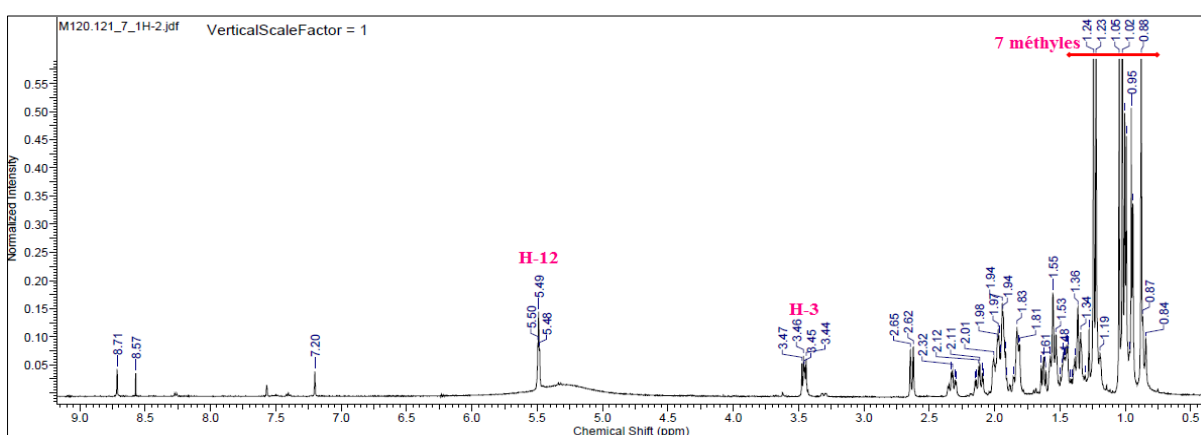


Figure 35: Spectre RMN ^1H du composé **P5**

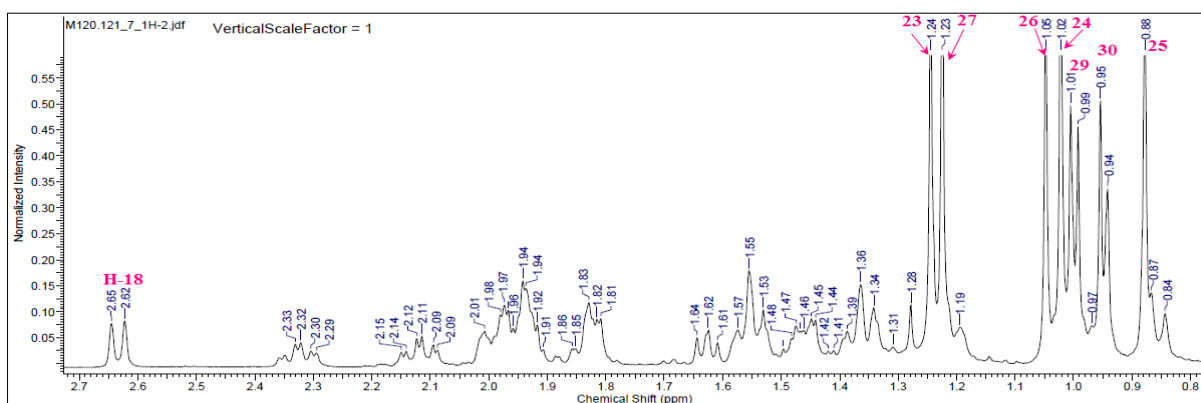


Figure 36: Spectre RMN ^1H des méthyles du composé **P5**

Le squelette de base de type triterpène pentacyclique renferme 8 méthyles angulaires mais l'observation uniquement de sept groupements méthyles indique que l'un d'entre eux a été oxydé. Ceci est supporté par la présence sur le spectre RMN ^{13}C d'un carbonyle acide à δ_{C} 179.8 (**Figure 37**).

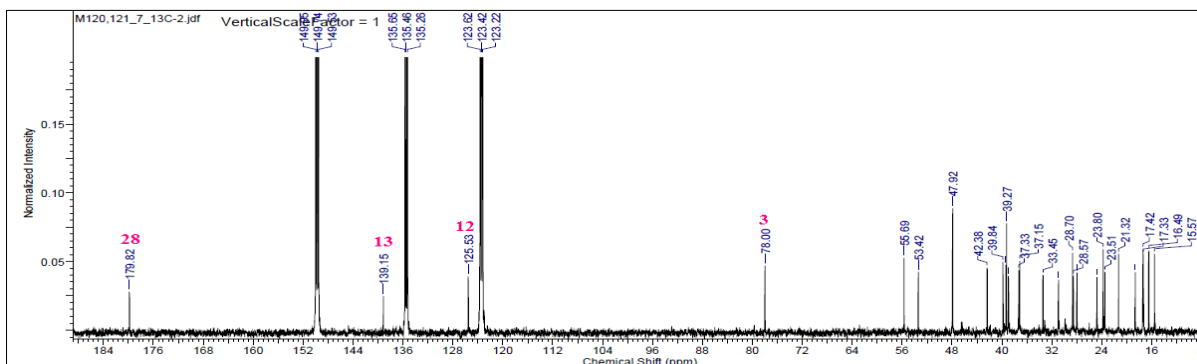


Figure 37: Spectre RMN ^{13}C du composé **P5**

De plus, on observe un massif de protons résonant entre 0.84 à 2.32 ppm correspondant aux CH et CH₂, et trois signaux à δ_{H} 5.49 (1H, *t*, $J = 3.4$ Hz), 3.45 (1H, *dd*, $J = 10.1, 6.4$ Hz) et 2.63 (1H, *d*, $J = 11.4$ Hz) attribuables respectivement au proton éthylénique H-12, et aux protons oxyméthine H-3 et méthine H-18, caractéristiques des triterpènes pentacycliques de type urs-12-ène. Le déplacement chimique du proton H-18 (δ_{H} 3.63, *d*, $J = 11.4$ Hz) est significatif de la présence d'une fonction acide en C-28 (COOH).

L'analyse des couplages hétéronucléaires $^1J_{\text{H-C}}$ visualisés sur le spectre HMQC (**Figure 38**) permet d'identifier les carbones C-12 (δ_{C} 125.5), C-3 (δ_{C} 78.0) et C-18 (δ_{C} 53.4).

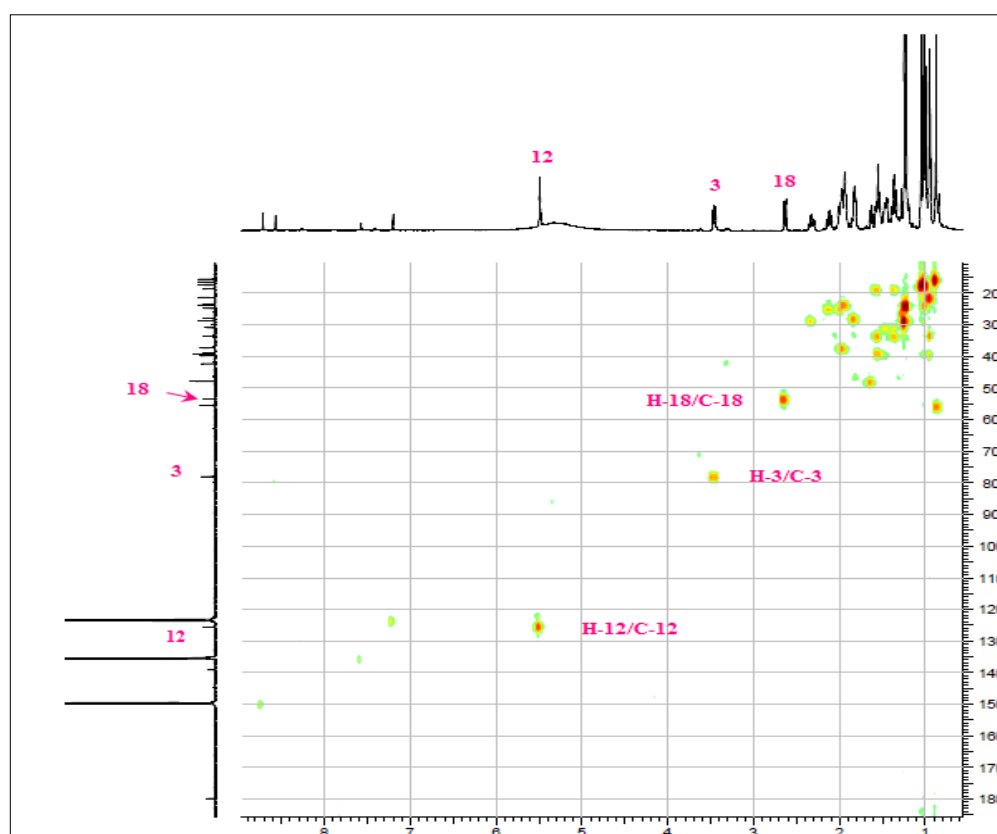


Figure 38: Spectre HMQC du composé **P5**

Le spectre RMN ^{13}C (**Figure 37**) révèle nombreux signaux correspondant à 7 méthyles, 9 méthylènes, 7 méthines et 7 carbones quaternaires, soit au total 30 atomes de carbone, confirmant ainsi la nature triterpénique de ce composé.

A partir des protons caractéristiques identifiés précédemment, l'expérience COSY H-H (**Figure 39**) permet de localiser les déplacements chimiques de plusieurs protons du squelette triterpénique pentacyclique. On reconnaît entre autres:

- Le proton H-3 (δ_{H} 3.45) connu avec les deux protons H-2 (δ_{H} 1.83).
- Les protons H-2 avec un autre proton résonant à δ_{H} 0.94 attribuable au proton H-1b, et l'autre H-1a à 1.55 ppm.
- Les deux protons H-11 (δ_{H} 1.94) à partir de leurs couplages avec le proton éthylénique H-12.
- Le proton H-9 à δ_{H} 1.62 (*t*, $J = 7.8$ Hz) corrélant avec les protons H-11.
- Les protons H-18 (δ_{H} 2.63) couplant avec un autre proton H-19.

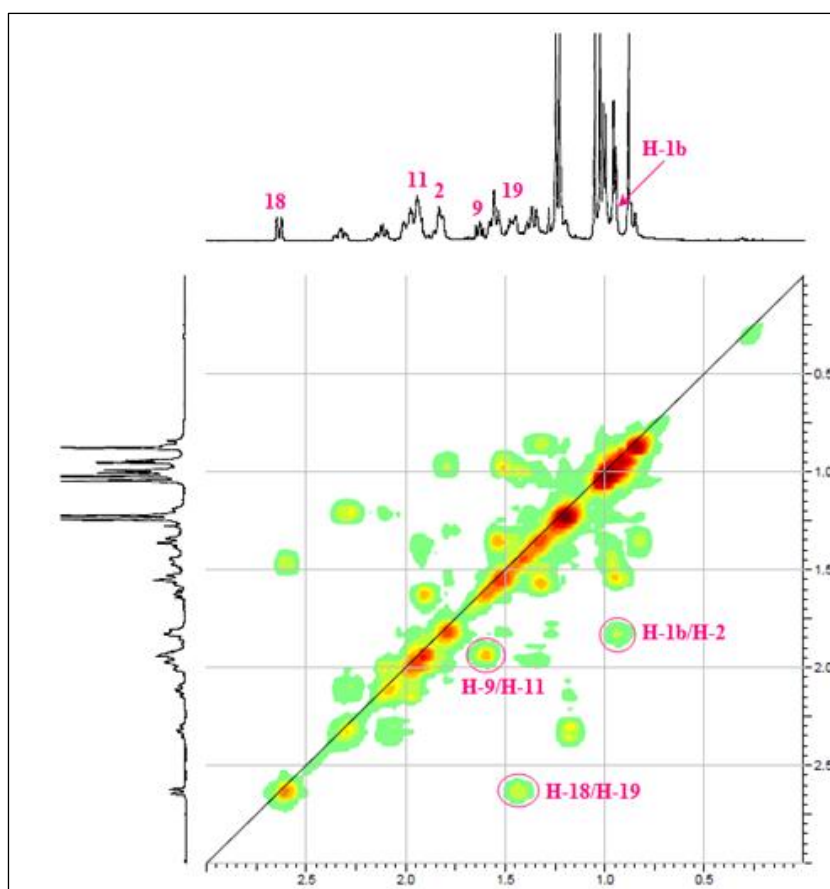


Figure 39: Spectre COSY du composé **P5**

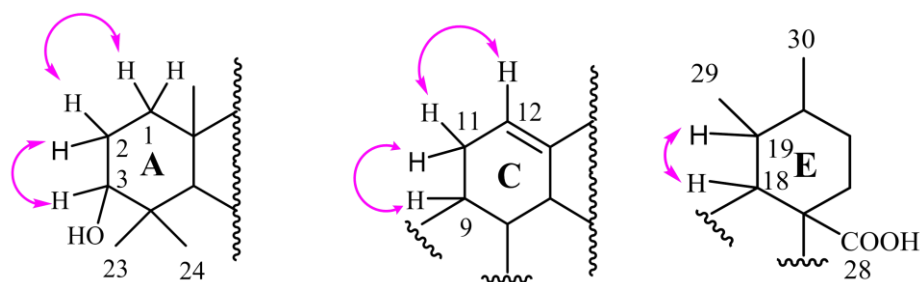


Figure 40 : Couplages COSY des protons des cycles A, C et E

L'expérience HMQC (**Figure 41**) permet d'attribuer les déplacements chimiques des carbones C-1, C-2, C-9, C-11 et C-19 aux δ_C 39.3, 28.0, 47.9, 23.5 et 39.3 respectivement.

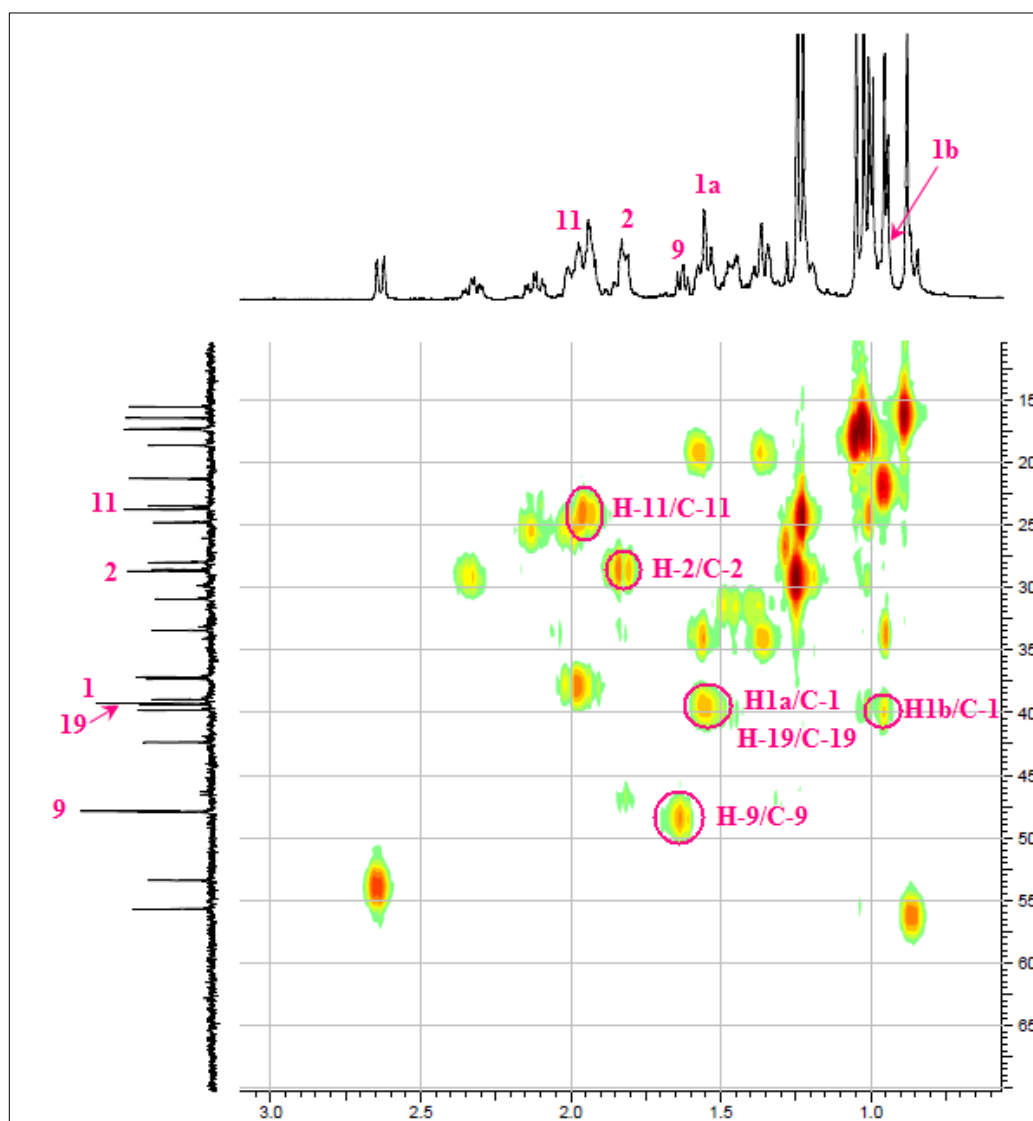


Figure 41: Spectre HMQC du composé **P5**

Le spectre de RMN HMBC permet, par le jeu des couplages longue distances hétéronucléaires, d'attribuer la position COOH sur le cycle D/E et de confirmer l'ensemble des déplacements chimiques.

L'élucidation structurale du composé **P5** est initiée à partir du carbone C-3 connu. En effet, les protons méthyliques CH₃-23 (δ_H 1.24) et CH₃-24 (δ_H 1.02) sont repérés suite aux corrélations qu'ils présentent sur le spectre HMBC (**Figure 42**) avec le carbone oxyméthine C-3. Ces protons méthyliques corréleront à leurs tours avec 2 carbones détectés à δ_C 55.7 et 39.3 correspondant aux carbones C-5 et C-4 respectivement.

Les protons méthyliques CH₃-25 (δ_H 0.88) couplent avec les carbones C-1, C-5 déjà assignés et avec deux autres carbones un C-9 connu et un quaternaire C-10 (δ_C 37.2), supportant ainsi l'attribution aux protons CH₃-25. Le spectre HMQC permet d'attribuer le proton H-5 à δ_H 0.87 sous forme d'un doublet large ($J = 11.9$ Hz).

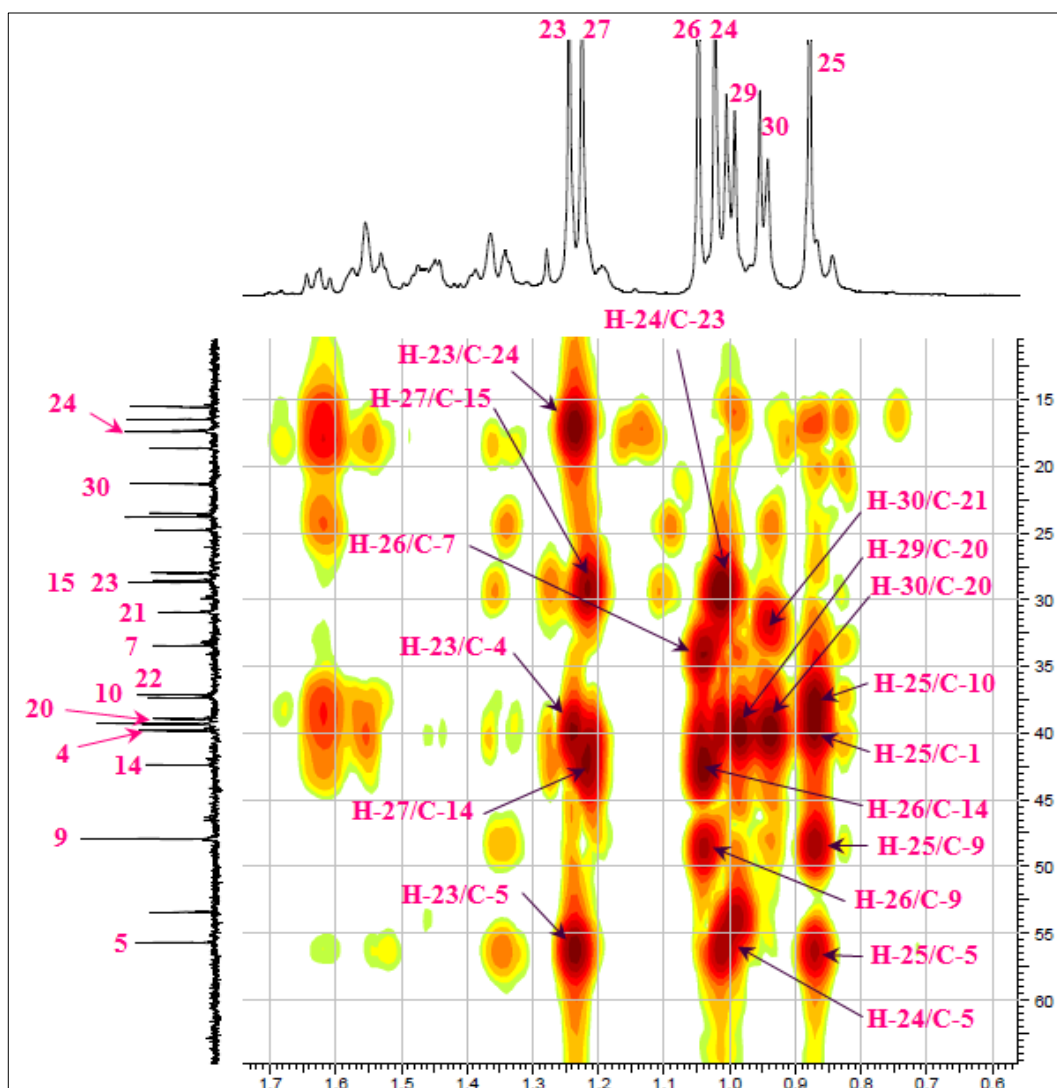


Figure 42: Spectre HMBC du composé **P5** (partie des méthyles)

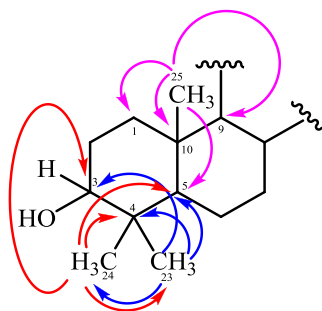


Figure 43: Corrélations HMBC des Me-23,24 et Me-25 du composé **P5**

A partir du proton H-5, le spectre COSY (**Figure 44**) montre les corrélations entre le proton H-5 et le proton H-6b (δ_{H} 1.36). Ce dernier corrèle à son tour avec le proton géminé et le proton voisin résonant à δ_{H} 1.36 ne pouvant être que les deux protons H-6a et H-7b, dont les carbones sont assignés à δ_{C} 18.6 (C-6) et 33.4 (C-7) selon le spectre HMQC.

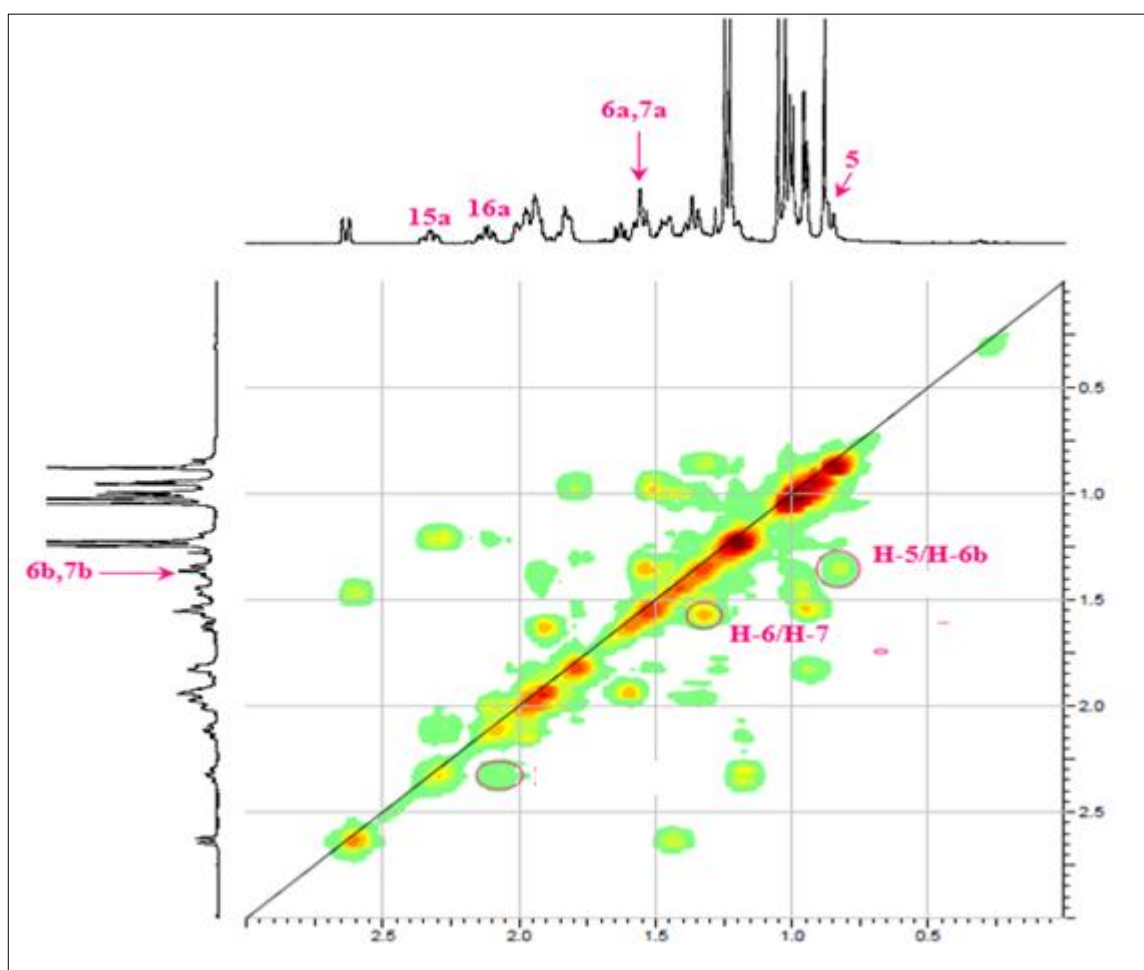


Figure 44: Spectre COSY du composé **P5**

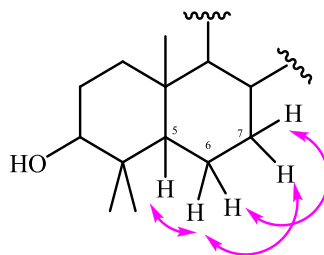


Figure 45: Couplages des protons H-5, H-6 et H-7.

Le Me-26 (δ_H 1.05) est identifié suite aux couplages (**Figure 46**) qu'ils présentent sur le spectre HMBC avec les carbones C-7 et C-9 déjà attribués, et un autre carbone quaternaire C-14 (δ_C 42.4). Le carbone C-14 identifié suite à la corrélation qu'il présente en HMBC avec le proton H-12, corréle avec un autre groupement méthyle correspondant au méthyle Me-27 (δ_H 1.23). Ce dernier couple avec les carbones aliphatiques C-8, C-15 ainsi qu'avec le carbone éthylénique C-13. Ces carbones résonnent à δ_C 39.8 (C-8), δ_C 28.6 (C-15) et 139.1 (C-13).

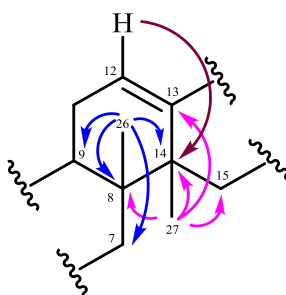


Figure 46: Couplages HMBC méthyles 26 et 27.

Le singulet attribué au méthyle Me-26 forme également plusieurs taches de corrélation avec les carbones d'un groupement méthine, un carbone quaternaire et d'un groupement méthylène. Compte-tenu de la structure de ce triterpène, ces groupements se voient naturellement assignés au CH-9 (47.9 ppm), C-8 (39.8 ppm) et au CH₂-7 (33.4 ppm).

A partir du carbone C-19, on peut caractériser les deux méthyles Me-29 (1.00 ppm) et Me-30 (0.94 ppm). Ces méthyles corrélaient aussi avec le carbone C-20 (38.9 ppm), cependant le carbone corrélaient avec le Me-30 à (δ_C 30.9) est attribuable au carbone C-21. Parmi les protons H₂-21 (δ_H 1.45; 1.39) localisés par analyse du spectre HMQC, le proton résonnant à 1.39 ppm couple en COSY avec un proton à 1.97 ppm correspondant au proton H-22b, son carbone est repéré par l'expérience HMQC à 37.3 ppm.

La stéréochimie des carbones asymétriques est déterminée par l'analyse des valeurs des constantes de couplage calculées à partir du spectre RMN ¹H. A titre d'exemple la

stéréochimie α -axiale du proton H-3 est indiqué par la valeur de constante de couplage $^3J_{3ax-2ax} = 10.1$ Hz et celle du β -axiale du proton H-18 est déduite par la grande constante de couplage $^3J_{18ax-19ax} = 11.0$ Hz (**Figure 47**).

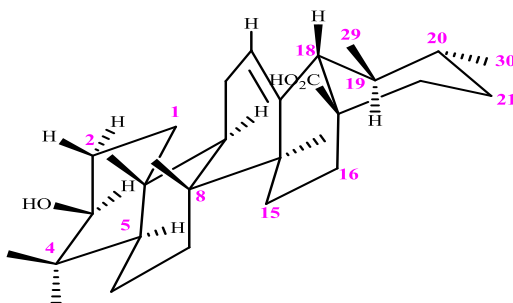


Figure 47: Stéréochimie des carbones assymétrique **P5**

Le spectre COSY montre les corrélations entre les protons H-15 (δ_H 2.32, 1.20) et les deux protons H-16 résonant à δ_H 2.12, 1.97. Leurs carbones repérés à 28.6 ppm (C-15) déjà assigné et 24.8 ppm (C-16) grâce à l'analyse du spectre HMQC. Ce dernier corrèle avec les protons H-18, H-15b et H-22b sur le spectre HMBC (**Figure 48**).

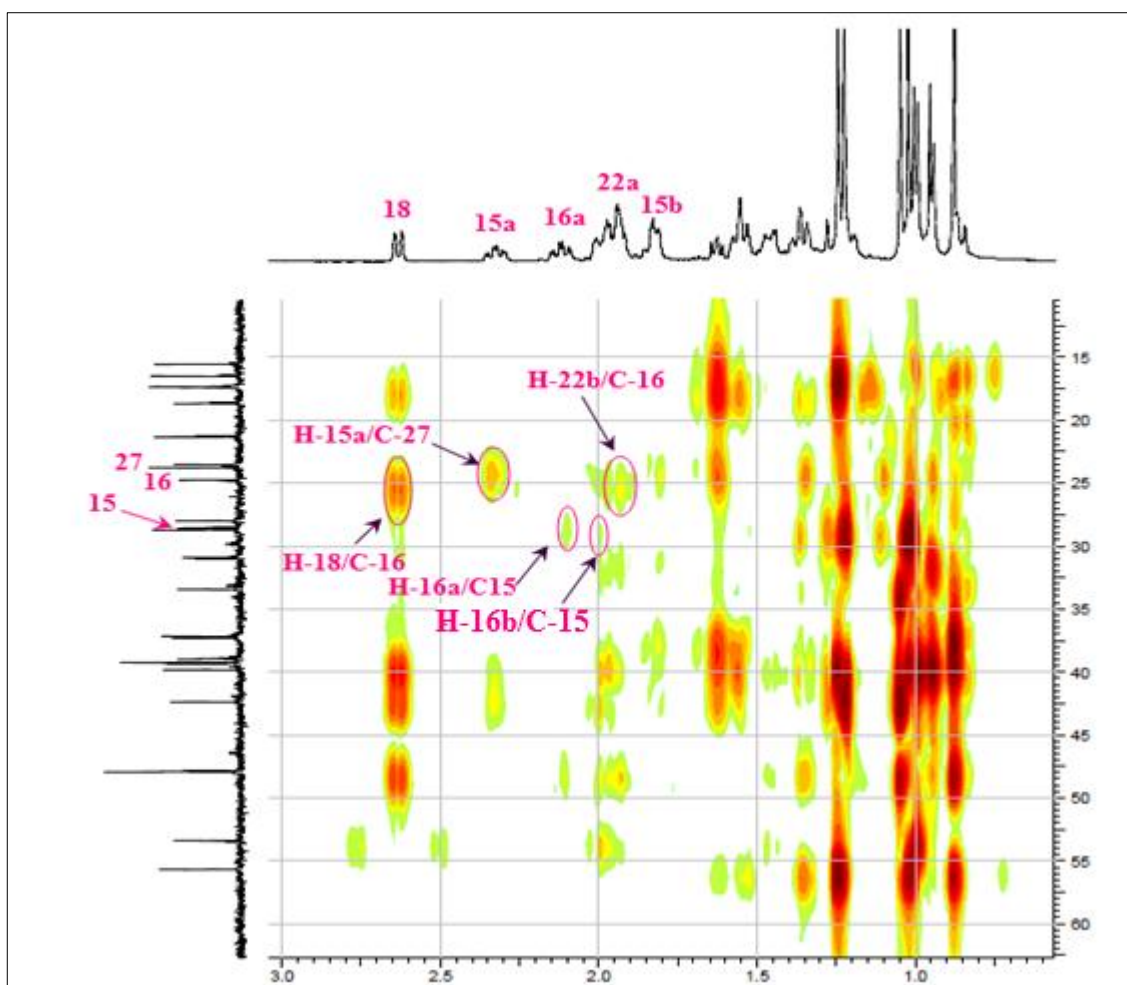


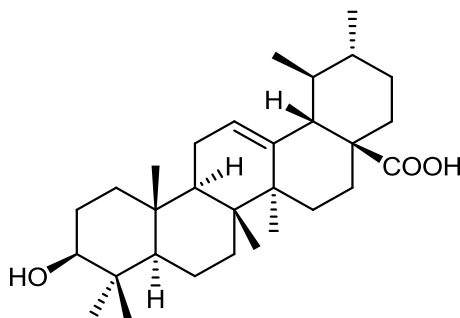
Figure 48: Spectre HMBC du composé **P5**

Tableau 23: Déplacements chimiques en RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé **P5**

Position	δ_{H} <i>m J</i> (Hz)	δ_{C}	Acide Ursolique (Kyeong <i>et al.</i> , 2014)
1	H-1a 1.55 (<i>m</i>) ; H-1b 0.94 (<i>m</i>)	39.3	40.3
2	1.83 (<i>m</i>)	28.0	29.4
3	3.45 (<i>dd</i> , 10.1, 3.4)	78.0	79.4
4	-	39.4	40.6
5	0.87 (<i>dl</i> , 11.9)	55.7	57.1
6	H-6a 1.55 (<i>m</i>) ; H-6b 1.36 (<i>m</i>)	18.6	19.9
7	H-7a 1.55 (<i>m</i>) ; H-7b 1.36 (<i>m</i>)	33.4	34.8
8	-	39.8	41.2
9	1.62 (<i>t</i> , 7.5)	47.9	49.3
10	-	37.2	38.5
11	1.94 (<i>m</i>)	23.5	24.9
12	5.49 (<i>t</i> , 3.4)	125.5	126.9
13	-	139.1	140.5
14	-	42.4	43.7
15	H-15a 2.32 (<i>td</i> , 13.0, 3.5) ; 13.0 H-15b 1.20 (<i>m</i>)	28.6	29.9
16	H-16a 2.12 (<i>td</i> , 13.2, 4.1) ; 13.2, H-16b 1.99 (<i>m</i>)	24.8	26.2
17	-	47.9	49.3
18	2.63 (<i>d</i> , 11)	53.4	54.8
19	1.46 (<i>m</i>)	39.3	40.7
20	1.00 <i>m</i>	38.9	40.6
21	H-21a 1.45 (<i>m</i>) ; H-21b 1.39 (<i>m</i>)	30.9	32.3
22	H-22a 2.01 (<i>m</i>) ; H-22b 1.97 (<i>m</i>)	37.1	38.7
23	1.24 (<i>s</i>)	28.7	30.1
24	1.02 (<i>s</i>)	16.5	17.5
25	0.88 (<i>s</i>)	15.6	16.4
26	1.05 (<i>s</i>)	17.4	18.5
27	1.23 (<i>s</i>)	23.8	25.5

28	-	179.8	181.2
29	1.00 (<i>d</i> , 6.4)	17.3	18.6
30	0.94 (<i>d</i> , 6.0)	21.3	22.3

Considérant l'ensemble des informations recueillies et analysées (**Tableau 23**) avec comparaison de la littérature (dans le même solvant : la pyridine-*d*₅) (Kyeong *et al.*, 2014), nous avons ainsi établi que la molécule **P5** est l'acide ursolique. Isolé antérieurement de plusieurs espèces du genre *Mentha* telles que : *M. arvensis* var. *piperascens* MAL, *M. spicata* et *M. rotundifolia* (Karasawa *et al.*, 1980), ainsi que l'espèce *Mentha citrata* (Passannanti *et al.*, 1990). Ce triterpène est connu pour ses activités antibactérienne, antioxydante (Patrícia *et al.*, 2014), anti-inflammatoire et anticancéreuse (Rahul *et al.*, 2012).



Composé **P5** : Acide ursolique

1.1.6. Elucidation structurale du composé P6

Le composé **P6** est obtenu sous forme de poudre blanche soluble dans le méthanol. Il est invisible sous la lampe UV aux longueurs d'onde 254 et 366 nm.

Le spectre RMN ¹H (**Figure 49**) du composé **P6** est voisin à celui du composé **P3** élucidé précédemment. Il permet de reconnaître entre autre :

- Les protons H-3, H-12 et H-18 caractéristique des squelettes triterpéniques pentacycliques résonant à δ_H 3.37 (*d*, 9.6 Hz), 5.56 (*sl*) et 3.02(*s*).
- Un massif de protons repéré entre 0.85 à 2.31 ppm, correspondant aux méthines et méthylènes des cinq cycles.
- Les méthyles repérés entre 0.98 et 1.69 ppm (**Figure 50**).

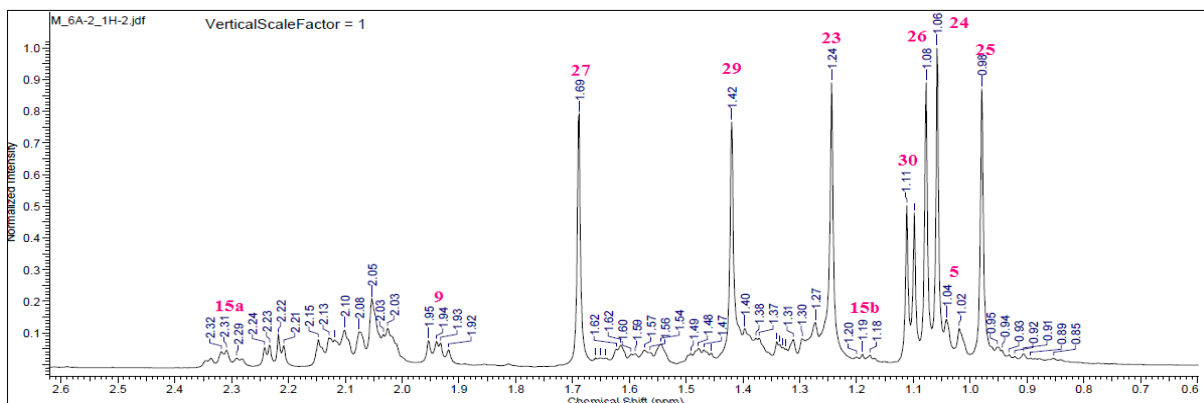
Identification des produits isolés de *Mentha aquatica*

Figure 50 : Spectre RMN ^1H des méthyles du composé **P6**

Les méthyles observés sur le spectre RMN ^1H (**Figure 50**) sont répartis comme suit :

- Six signaux singulets résonant à δ_{H} 0.98, 1.06, 1.08, 1.24, 1.42 et 1.69 attribuable aux méthyles M-25, Me-24, Me-26, Me-23, Me-29 et Me-27.
- Un signal sous forme d'un doublet apparaît à 1.10 ppm ($J = 6.4$ Hz) correspond au méthyle Me-30.

La différence par rapport au composé **P3** réside en la présence d'un signal sous forme d'un triplet de doublets (*td*, 11.0, 4.3 Hz) correspondant à un proton oxyméthine résonant à 4.08 ppm.

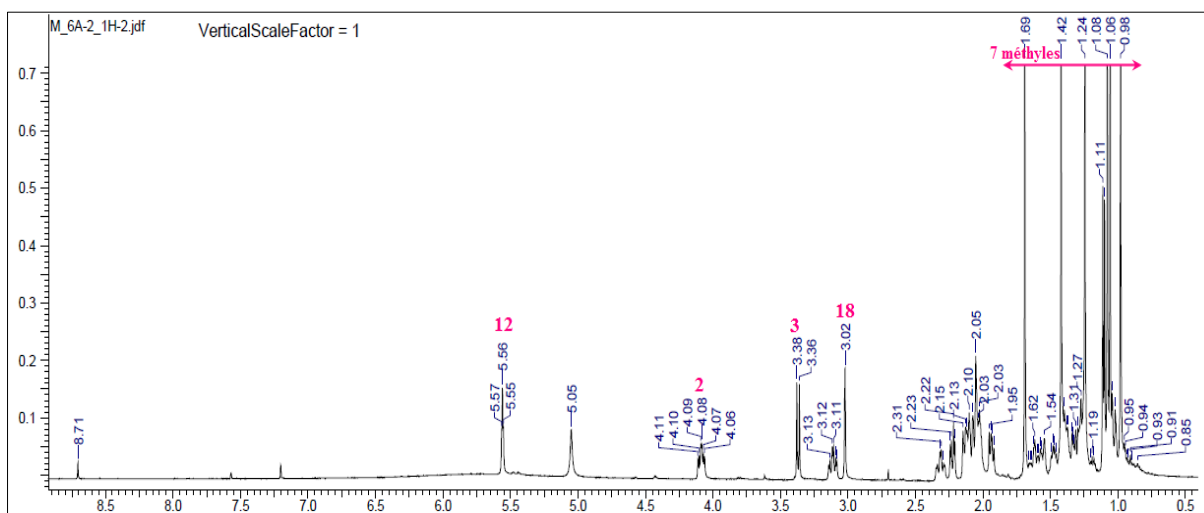


Figure 49 : Spectre RMN ^1H du composé **P6**

Le spectre RMN ^{13}C (**Figure 51**) paraît similaire à celui du composé **P3**. Cependant, on observe l'apparition d'un signal déblindé à δ_{C} 68.5 et le déblindage d'un autre signal à δ_{C} 83.7 correspondant aux carbone C-2 et C-3 respectivement.

Identification des produits isolés de *Mentha aquatica*

Le déblindage du déplacement chimique du carbone C-2 confirme sa substitution par un hydroxyle, ce qui influe sur le carbone C-3.

La constante de couplage du proton H-3 ($J = 9.6$ Hz) indique qu'il est orienté axialement de même pour la plus grande constante de couplage du proton H-2 confirme que ce dernier est orienté axialement.

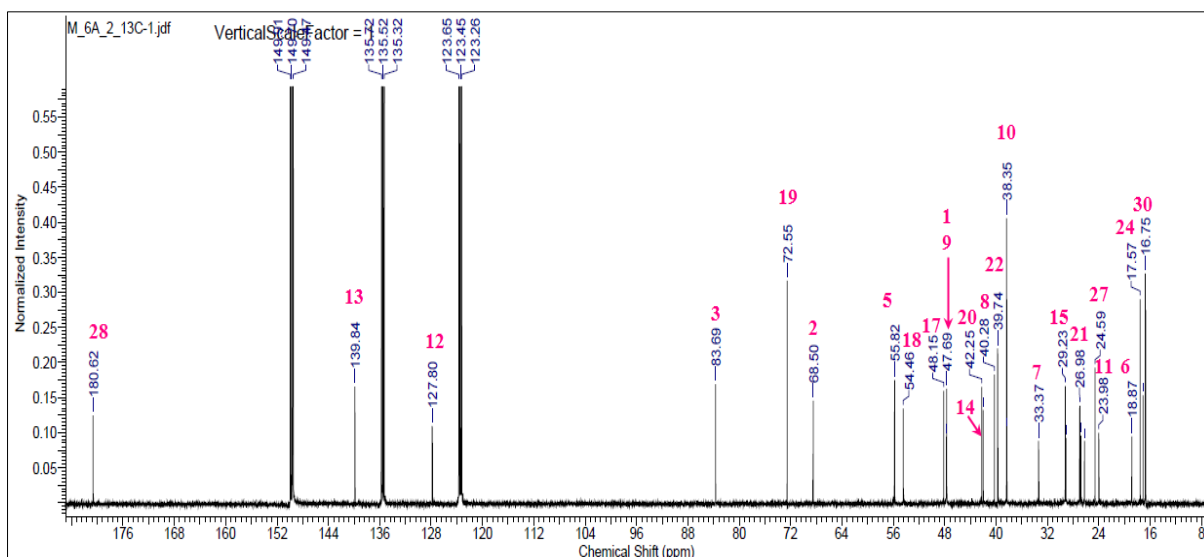


Figure 51 : Spectre RMN ^{13}C du composé **P6**

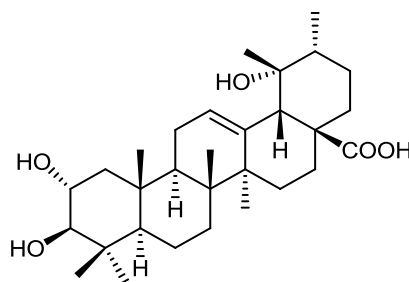
Tableau 24: Déplacements chimiques en RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé **P6**

Position	δ_{H} m J (Hz)	δ_{C}	Acide tormentique (Kyeong <i>et al.</i> , 2014)
1	H-1a 2.22 (<i>dd</i> , 12.3, 4.6) ; H-1b 1.33 (<i>m</i>)	39.7	48.0
2	4.08 (<i>td</i> , 11.0, 4.3)	68.5	68.3
3	3.37 <i>d</i> 9.6	83.7	83.6
4	-	47.7	39.8
5	1.04 (<i>m</i>)	55.8	55.7
6	H-6a 1.59 (<i>m</i>) ; H-6b 1.40 (<i>m</i>)	18.9	18.9
7	H-7a 1.66 (<i>m</i>) ; H-7b 1.45 (<i>m</i>)	33.4	33.2
8	-	40.3	40.1
9	1.94 (<i>td</i> , 10.6, 6.8)	47.7	48.1
10	-	38.4	38.5
11	H-11a 2.15 (<i>m</i>) ; H-11b 2.10 (<i>m</i>)	24.0	24.5

Identification des produits isolés de *Mentha aquatica*

12	5.56 (t, 3.4)	127.8	127.7
13	-	139.8	144.6
14	-	42.0	42.1
15	H-15a 2.31 (td, 13.3, 4.6); H-15b 1.19 (m)	29.1	29.1
16	H-16a 3.12 (td, 12.9, 4.6) ; H-16b 2.05 (m)	26.2	26.1
17	-	48.1	48.5
18	3.02 (s)	54.5	54.3
19	-	72.5	72.4
20	1.54 (m)	42.2	42.6
21	H-21a 2.11 (m); H-21b 1.37 (m)	26.8	26.7
22	H-22a 2.15 (m); H-22b 2.08 (m)	38.4	38.5
23	1.24 (s)	29.2	29.2
24	1.06 (s)	17.6	17.5
25	0.98 (s)	16.8	16.7
26	1.08 (s)	17.1	17.1
27	1.69 (s)	24.6	24.6
28	-	180.6	180.4
29	1.42 (s)	27.0	26.8
30	1.10 (d, 6.4)	17.1	16.4

Ce composé a été identifié comme étant l'acide tormentique (**Tableau 24**) en comparant ses données de RMN ^1H et ^{13}C à celles de la littérature (Kyeong *et al.*, 2014). Ce triterpène acide a été isolé par Passannanti et ses collaborateurs dans l'espèce *Mentha citrata* (Passannanti *et al.*, 1990). Ce composé a été connu pour ses activités anticancéreuse (René *et al.*, 2012), anti-inflammatoire (Chang *et al.*, 2011).

Composé **P6** : Acide tormentique

1.1.7. Elucidation structurale du composé P7

Le composé **P7** est obtenu sous forme d'une poudre blanche, il est invisible sous la lumière UV (254 et 366 nm).

L'observation du spectre RMN ^1H du composé **P7** (**Figure 52**) révèle une grande parenté avec le composé **P5** (l'acide ursolique). On note la présence de :

- Sept méthyles dans la zone 0.88 et 1.40 ppm.
- Le proton éthylénique H-12 résonant à δ_{H} 5.53 sous forme d'un triplet ($J = 3.4$ Hz).
- Le proton H-18 résonant à 2.77 sous forme d'un doublet ($J = 11.4$ Hz).
- Un signal sous forme de doublet dédoublé repéré à δ_{H} 3.46 ($J = 9.6, 6.9$ Hz) attribuable au proton H-3, le déblindage de ce dernier indique qu'il est lié à un groupement attracteur qui est un hydroxyle.

Toutefois, ce spectre présente 2 signaux supplémentaires à δ_{H} 2.67 ($dd, J = 4.6, 13.3$ Hz) et 3.85 ($td, J = 11.5, 4.6$ Hz) attribuable aux protons H-22 et H-21. Le déblindage de ce dernier confirme qu'il est lié à un groupement attracteur (hydroxyle).

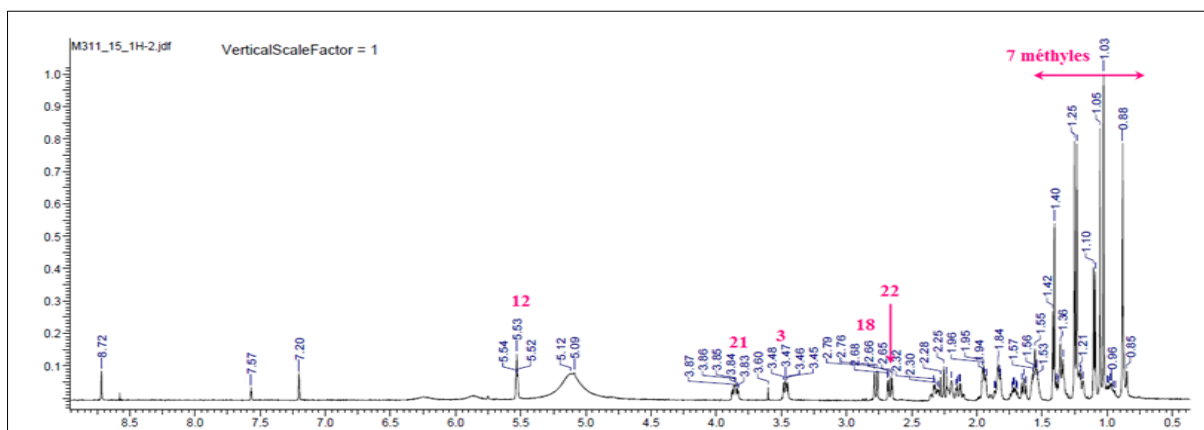


Figure 52 : Spectre RMN ^1H du composé **P7**

L'analyse du spectre RMN ^{13}C (**Figure 53**) en apporte la confirmation de la nature triterpénique à squelette ursa-12-ène de ce composé. La différence par rapport au composé **P5** apparait pour le signal blindé repéré à δ_{C} 70.4 attribuable à un carbone substitué par un hydroxyle qui est le C-21. Un autre signal à δ_{C} 78.0 attribuable au carbone C-3.

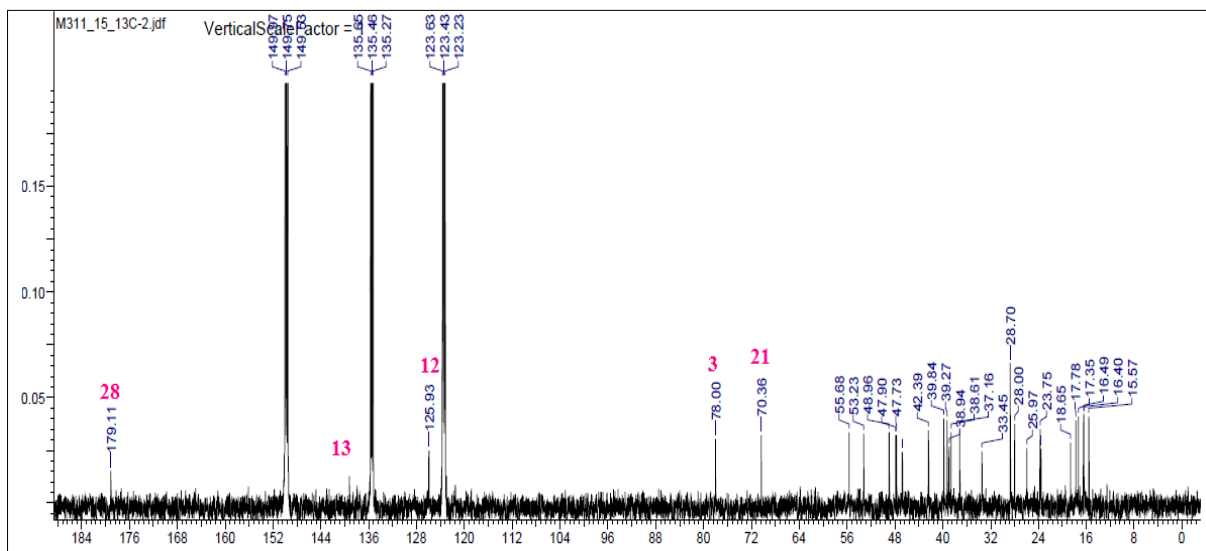


Figure 53: Spectre RMN ^{13}C du composé P7

L'examen du spectre HMQC (Figure 54) conduit à visualiser tous les protons déjà signalés leurs carbones sont attribués aux C-12 (125.9 ppm), C-18 (53.2 ppm), C-3 (78.0ppm), C-22 (46.8 ppm) et), C-21 (70.4 ppm).

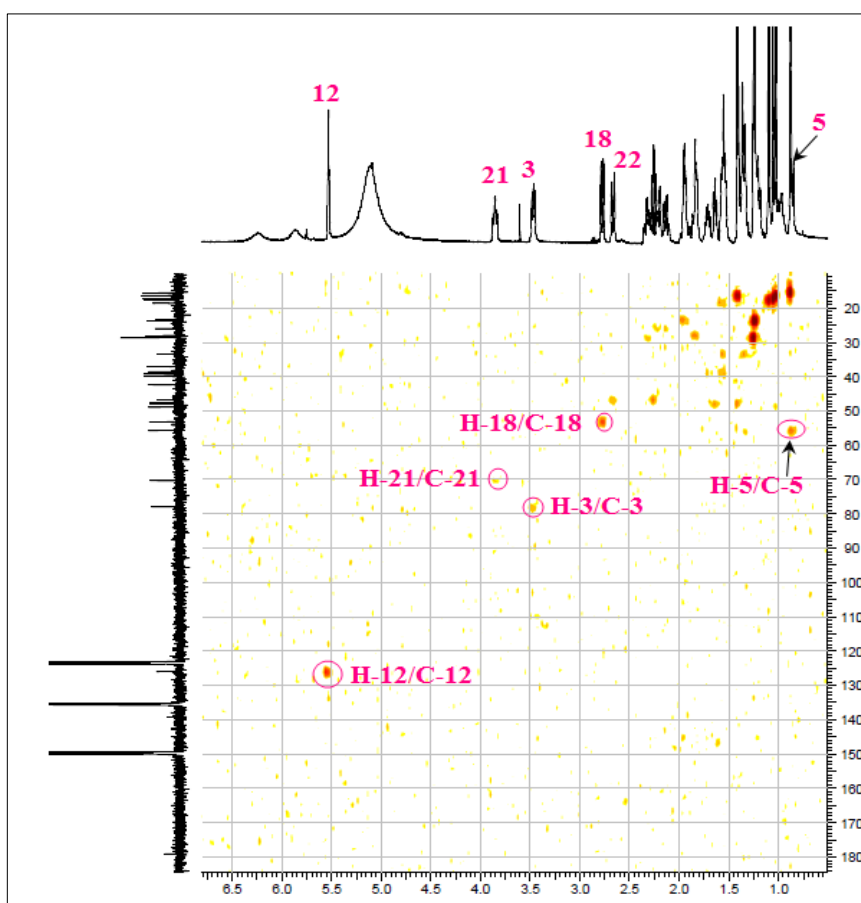


Figure 54 : Spectre HMQC du composé P7

L'analyse du spectre HMBC (**Figures 55, 56**) montre des plusieurs corrélations entre :

- Le méthyle Me-25 (0.88 ppm) avec les carbones C-4 (δ_C 39.3), C-10 (δ_C 38.6), C-8 (δ_C 39.8) et C-9 (δ_C 47.7).
- Le méthyle Me-24 (1.03 ppm) corrèle avec les carbones C-23 (δ_C 28.7), C-3 (δ_C 78.0), C-4 (δ_C 39.3) et C-5 (δ_C 55.7).
- Le méthyle Me-26 (1.05 ppm) montre des corrélations avec les deux carbones C-7 (δ_C 33.4), C-9 (δ_C 47.7) et C-14 (δ_C 42.4).
- Le méthyle Me-27 (1.25 ppm) corrèle avec les carbones C-15 (δ_C 28.7), C-14 (δ_C 42.4) et C-8 (39.8 ppm).
- Le méthyle Me-30 (1.41 ppm) couple avec les carbones C-19 (δ_C 38.9), C-20 (δ_C 47.7) et C-21 (δ_C 70.4).

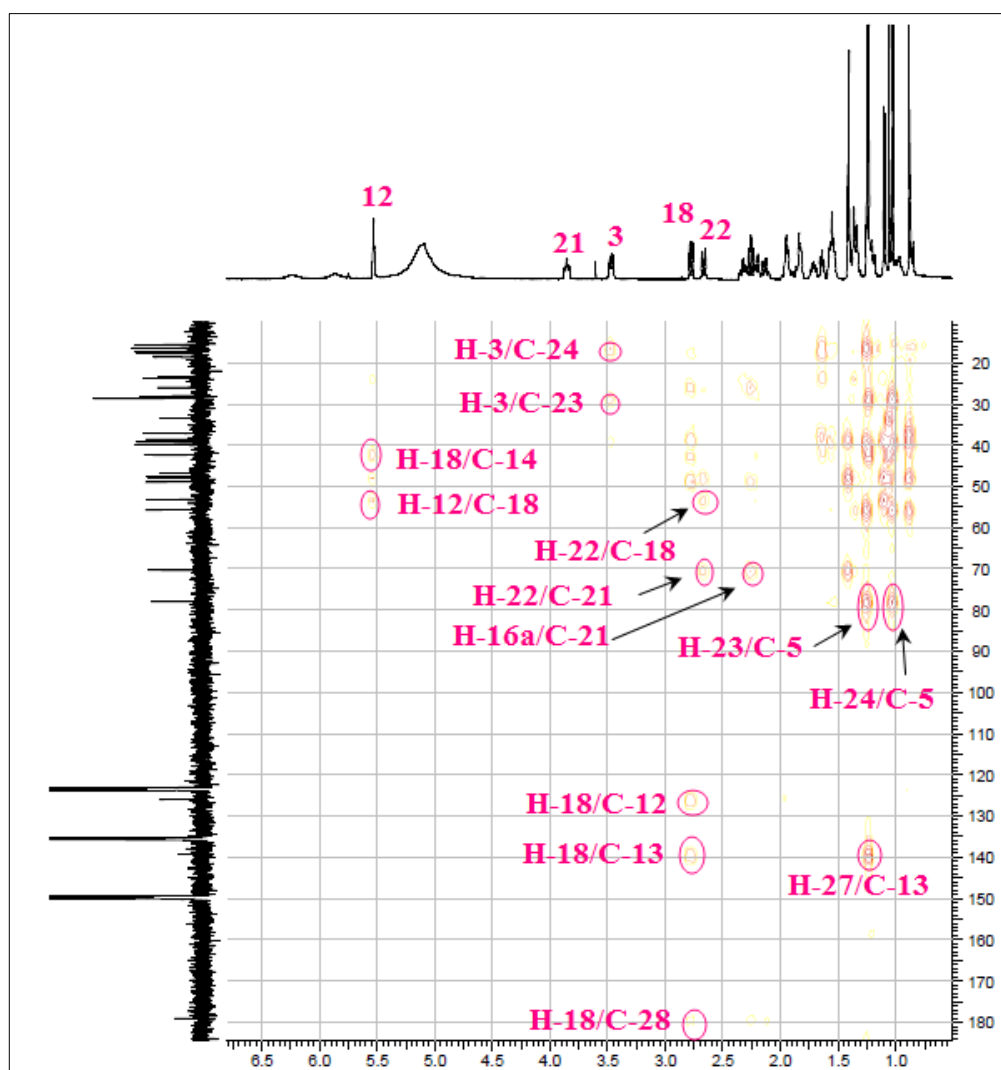


Figure 55 : Spectre HMBC du composé **P7**

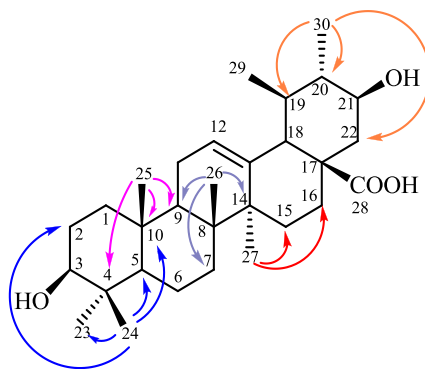


Figure 56 : Corrélations HMBC des méthyles du composé **P7**

La multiplicité des signaux correspondant aux protons H-21 et H-22 ainsi que leurs constantes de couplage respectives indiquent que H-21 est orienté axialement donc l'hydroxyle est équatorial.

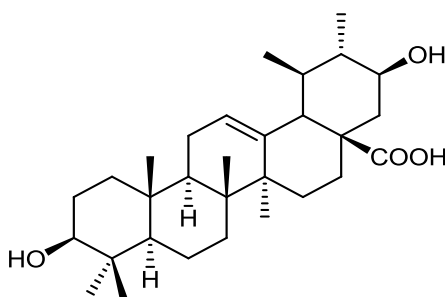
Tableau 25 : Déplacements chimiques en RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé **P7**

Position	δ_{H} <i>m J</i> (Hz)	δ_{C}	Acide 21 α -hydroxy-ursolique (Tsasi <i>et al.</i> , 2016)
1	H-1a 1.55 (<i>m</i>) ; H-1b 0.97 (<i>td</i> , 12.0, 6.0)	37.2	38.1
2	1.82 (<i>m</i>)	28.0	26.9
3	3.46 (<i>dd</i> , 9.6, 6.9)	78.0	78.7
4	-	38.3	38.5
5	0.85 (<i>m</i>)	55.7	55.2
6	H-6a 1.55 (<i>m</i>) ; H-6b 1.35 (<i>m</i>)	18.6	18.6
7	H-7a 1.55 (<i>m</i>) ; H-7b 1.36 (<i>m</i>)	33.4	33.1
8	-	39.8	39.1
9	1.64 (<i>t</i> , 7.8)	47.7	47.2
10	-	38.6	37.8
11	1.95 (<i>m</i>)	23.6	23.2
12	5.53 (<i>t</i> , 3.4)	125.9	126.1
13	-	140.0	137.2
14	-	42.4	42.2
15	H-15a 2.31 (<i>td</i> , 13.3, 5.1); H-15b 1.21 (<i>m</i>)	28.7	28.3

Identification des produits isolés de *Mentha aquatica*

16	H-16a 2.21 (<i>m</i>); H-16b 2.14 (<i>td</i> , 13.3, 4.1)	26.0	-
17	-	48.9	47.5
18	2.78 (<i>d</i> , 11.4)	53.2	52.6
19	1.71 (<i>m</i>)	38.9	32.0
20	2.20 (<i>m</i>)	47.9	42.2
21	3.85 (<i>td</i> , 11.5, 4.6)	70.4	71.5
22	H-22a 2.67 (<i>d</i> , 13.3, 4.6); H-22b 2.25 (<i>t</i> , 11.9)	46.8	42.6
23	1.25 (<i>s</i>)	28.7	27.8
24	1.03 (<i>s</i>)	16.5	15.6
25	0.88 (<i>s</i>)	15.8	15.5
26	1.05 (<i>s</i>)	17.3	16.1
27	1.23 (<i>s</i>)	23.7	22.7
28	-	179.1	-
29	1.10 (<i>d</i> , 6.4)	17.8	16.5
30	1.41 (<i>d</i> , 6.5)	16.4	23.7

L'analyse combinée des différents spectres de corrélations HMQC et HMBC, ainsi la comparaison avec celle de littérature (dans le CDCl_3) (Tsasi *et al.*, 2016) permet d'assigner les déplacements chimiques (**Tableau 25**) de tous les protons et carbones de ce composé. Ce composé a été identifié comme étant : l'acide 21 β -hydroxy-ursolique, il a été isolé de l'espèce *M. citrata* (Piozzi *et al.*, 1986).



Composé **P7** : Acide 21 β -hydroxy-ursolique

1.2. Caractérisation des produits obtenus de l'extrait Acétone

L'élucidation structurale des produits isolés de l'extrait acétone des racines de la plante *Mentha aquatica* a été réalisée grâce à l'analyse des spectres RMN 1D et 2D, et à la comparaison avec les données de la littérature.

Les produits caractérisés appartiennent en général à la classe de métabolites secondaires triterpènes peu présents dans le genre *Mentha*. Cette étude a abouti à l'isolement de 9 composés de nature triterpénique.

1.2.1. Elucidation structurale du composé P8:

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C du composé **P8** révèlent des signaux identiques à ceux du composé **P1** déjà élucidé auparavant : β -sitostérol.

1.2.2. Elucidation structurale du composé P9:

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C du composé **P9** révèlent des signaux identiques à ceux du composé **P5** déjà élucidé auparavant : l'acide ursolique.

1.2.3. Elucidation structurale du composé P10:

Il s'agit d'un triterpène à squelette ursane, il est invisible sous la lumière UV. Ce composé est identifié à l'acide tormentique, déjà isolé des parties aériennes **P10**. Sa structure moléculaire a été établie par comparaison des spectres RMN ^1H et ^{13}C avec les données de la littérature.

1.2.4. Elucidation structurale du composé P11:

Le composé **P11** est obtenu sous forme d'une poudre blanche. Le spectre RMN ^1H de ce composé enregistré dans la Pyridine- d_5 , montre dans la région blindée six signaux singulet et un signal sous forme de doublet (**Figure 57**) attribuables aux méthyles résonants à δH 1.04 (Me-23), 0.95 (Me-24), 1.19 (Me-25), 1.15 (Me-26), 1.74 (Me-27), 1.42 (Me-29) et 1.12 (d, $J= 6.9$ Hz).

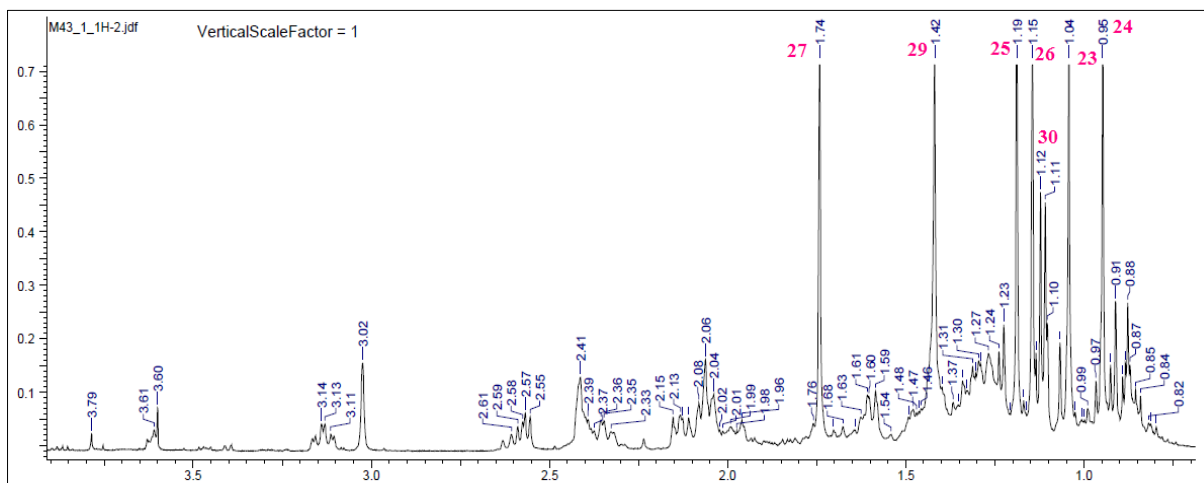
Identification des produits isolés de *Mentha aquatica*

Figure 57 : Spectre RMN ^1H étalé entre 0.8 et 3.5 ppm du composé **P11**

De plus, on observe un massif de protons (**Figure 58**) résonnant entre 0.82 à 2.61 ppm correspondant aux $-\text{CH}$ et $-\text{CH}_2$, et 5 signaux à δ_{H} 3.02 (1H, s), 4.94 (1H, d, $J = 13.8$ Hz), 5.14 (1H, d, $J = 14$ Hz), 5.57 (1H, sl) et 5.65 (1H, s) attribuables respectivement aux protons H-18, H-1b, H-1a, et les protons éthyléniques H-12 et H-3, des triterpènes pentacycliques. Le déplacement chimique du proton H-18 (δ_{H} 3.02) est significatif de la présence d'une fonction acide en C-28 (COOH).

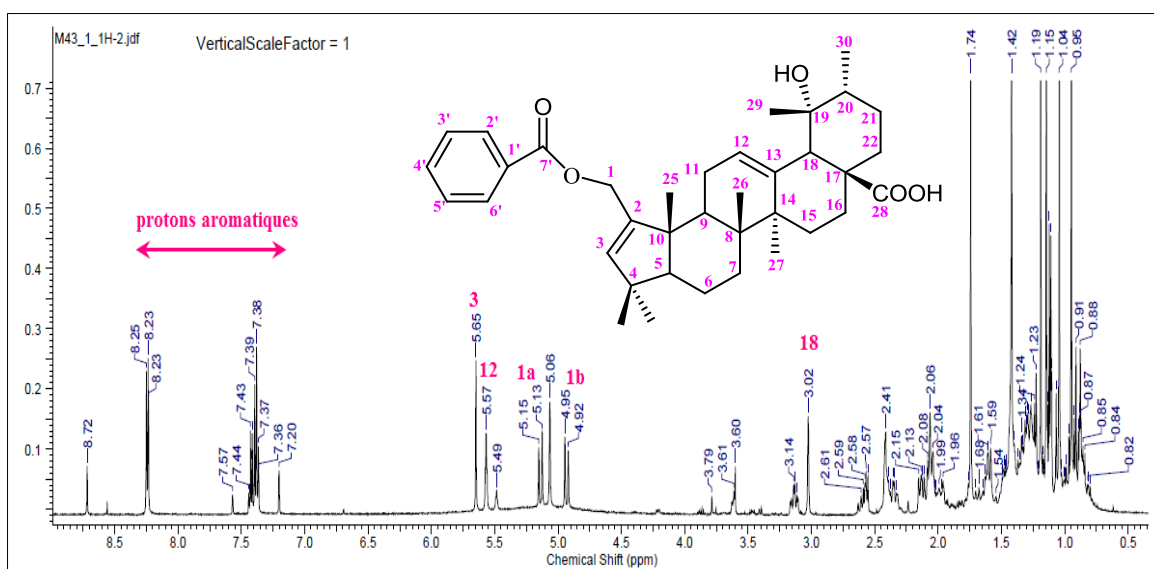


Figure 58 : Spectre RMN ^1H du composé **P11**

Dans la région déblindée (**Figure 59**) on observe plusieurs signaux correspondant aux protons aromatiques, 7.38 ppm sous forme d'un triplet ($J = 7.3$ Hz) correspondant aux protons

Identification des produits isolés de *Mentha aquatica*

H-3' et H-5', un autre signal résonnant à 7.43 ppm sous forme d'un multiplet attribuable au proton H-4' et le signal doublet à 8.24 ppm correspondant à H-2' et H-6'.

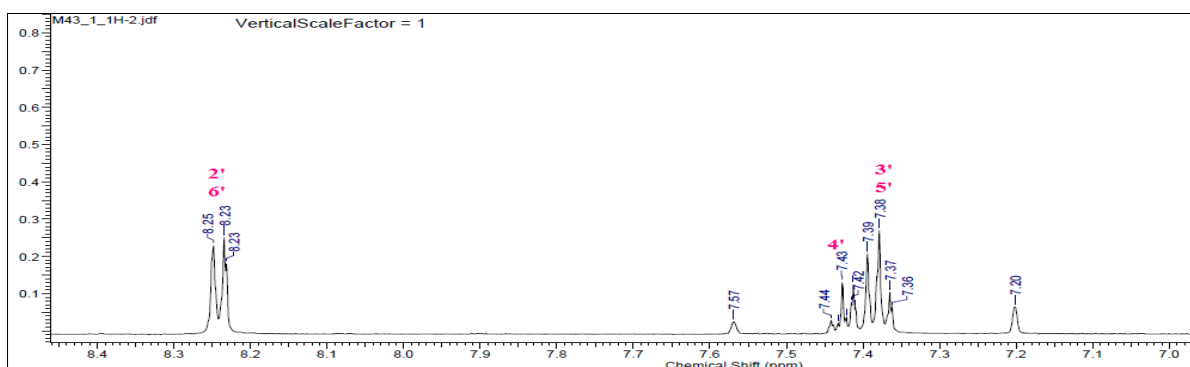


Figure 59 : Spectre du groupement benzoyle du composé P11

L'analyse des couplages hétéronucléaires $^1J_{C-H}$ visualisés sur le spectre HMQC (Figure 60) permet d'identifier des carbones C-1, C-3, C-12, C-13 et les carbones aromatiques, C-2', C-3', C-4', C-5', C-6'. Le déblindage du déplacement du carbone C-3 indique la présence d'une double liaison entre C-3 et C-2.

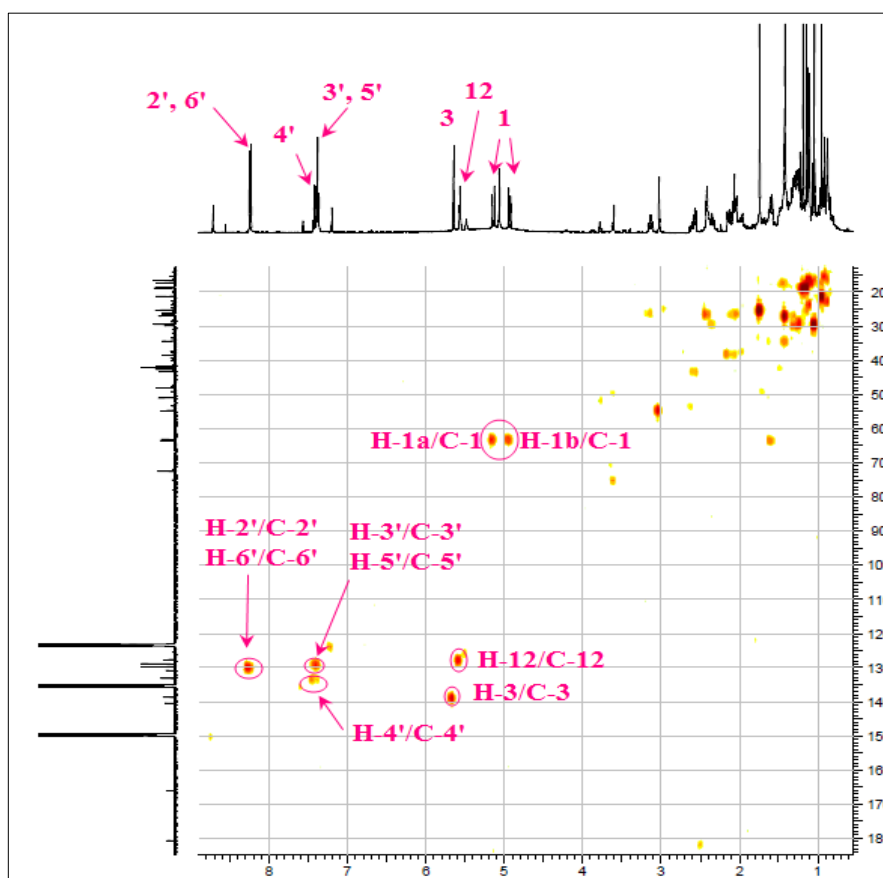


Figure 60 : Spectre HMQC du composé P11

Le spectre RMN ^{13}C (**Figure 61**) révèle nombreux signaux correspondant à 37 atomes de carbone, confirmant ainsi la présence d'un cycle aromatique. Parmi ces signaux on observe plusieurs signaux déblindés résonant à :

- 180.6 ppm attribuable à un acide libre C-28.
- 166.1 ppm caractéristique d'un carbonyle d'une fonction ester.
- Plusieurs signaux entre 127 et 140 ppm, attribuables aux protons éthyléniques, et aromatiques à δ_{C} 140.4 (C-13), 127.6 (C-12), 133.2 (C-4'), 130.8 (C-1'), 129.7 (C-2', C-6') et à 128.9 (C-3', C-5').

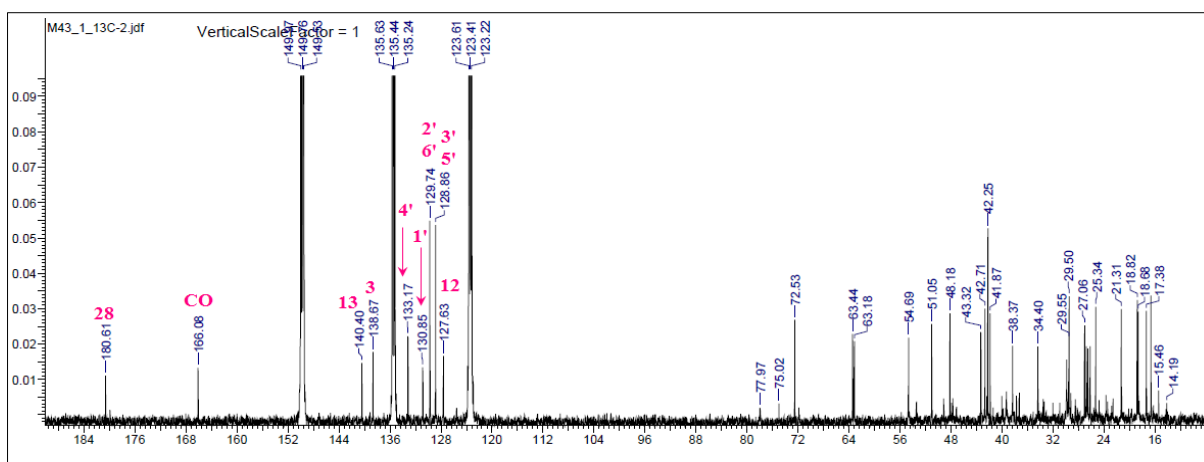


Figure 61: Spectre RMN ^{13}C du composé **P11**

A partir des protons H-1a/b, le spectre HMBC (**Figure 60**) montre des corrélations avec les carbones résonants à 166.1 ppm déjà identifié comme étant un carbonyle d'une fonction ester CO, ce qui confirme la position du substituant au niveau du carbone C-1 (**Figure 62**). On observe aussi d'autres taches de corrélations entre les protons H-1/b et deux carbones repérés à δ_{C} 149.8 et 138.7 correspondant au carbones C-2 et C-3 respectivement. Ceci confirme l'existence d'un autre carbone éthylénique C-2, l'absence de son corrélation sur le spectre HMQC indique qu'il est un carbone quaternaire.

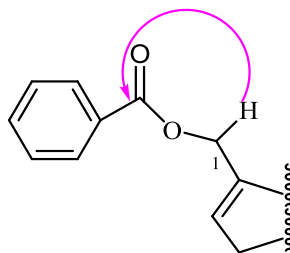


Figure 62 : Corrélation HMBC qui montre la position du groupement benzoyle

Sur le spectre HMBC (**Figures 63, 64**) on observe aussi les corrélations entre :

Identification des produits isolés de *Mentha aquatica*

- Les protons H-3'/H-5' avec plusieurs carbones : C-1' (δ_C 130.8) et C-2' (δ_C 129.7).
- Le proton H-4' et les carbone C-2' et C-6'.
- Les protons H-2'/H-6' avec les carbones : C-3' et C-5' (δ_C 128.9), C-4' (δ_C 133.2) et avec le CO (δ_C 166.1).

Le carbone C-13 couple avec un proton résonnant à 2.41 ppm sous forme de multiplet attribuable au proton H-11.

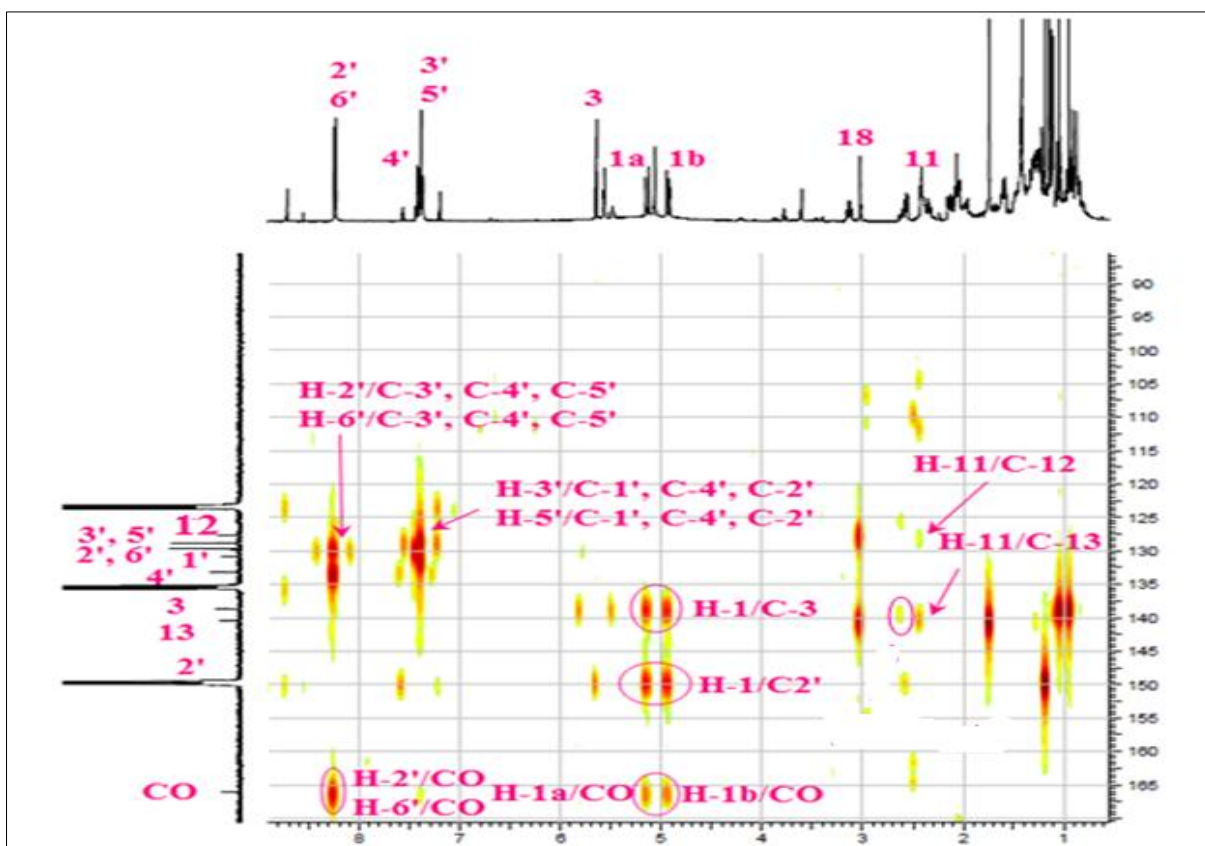


Figure 63 : Spectre HMBC du composé P11

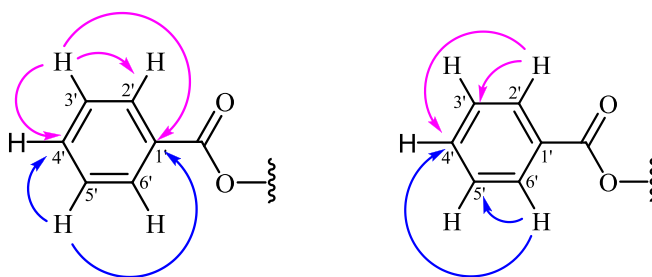


Figure 64 : Corrélations HMBC de la partie benzoyle du composé P11

L'attribution du proton H-11 (2.41 ppm) est confirmée sur le spectre COSY (**Figure 65**) par un couplage avec le proton résonnant à δ_H 5.57 caractéristique du proton H-12. D'autres couplages sont observés sur le spectre COSY, entre les protons du groupement benzoyle (H-3'/H-2' et H-5'/H-6'), ainsi les protons H-1a/b avec le proton H-3.

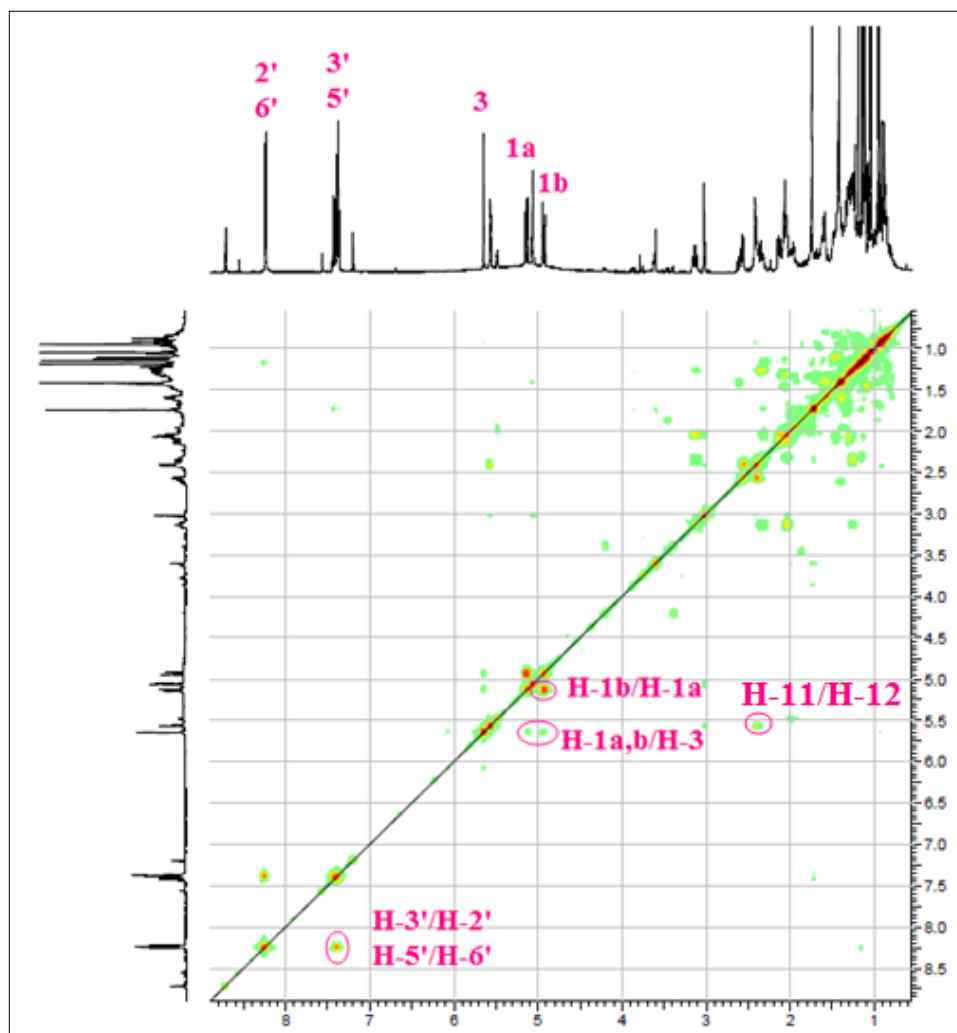


Figure 65 : Spectre COSY du composé **P11**

Le proton H-18 (δ_H 3.02) corrèle avec 3 atomes de carbones (**Figure 66**) résonants à δ_C 27.1, 41.9 et 48.2 attribuables aux carbones C-29 (Me-29), C-14 et C-17 respectivement. Le proton H-9 déjà identifié, montre plusieurs taches de corrélations avec deux méthyles à δ_C 18.7 et 18.8 correspondant aux méthyles Me-26 et Me-25 respectivement. Il couple aussi avec un carbone repéré à 51.0 ppm ne peut être que pour le carbone C-10.

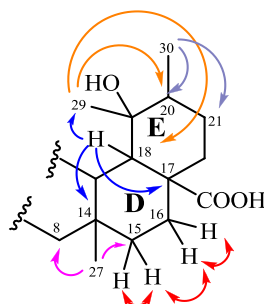


Figure 66 : Corrélations HMBC et COSY du composé **P11**

Les deux méthyles Me-29 (δ_C 27.1) et Me-30 (δ_C 16.7) corrént avec un carbone résonant à δ_C 42.2 attribuable au carbone C-20. Le méthyle Me-30 corréle aussi avec un carbone à δ_C 26.6 correspondant au carbone C-21 (**Figure 67**).

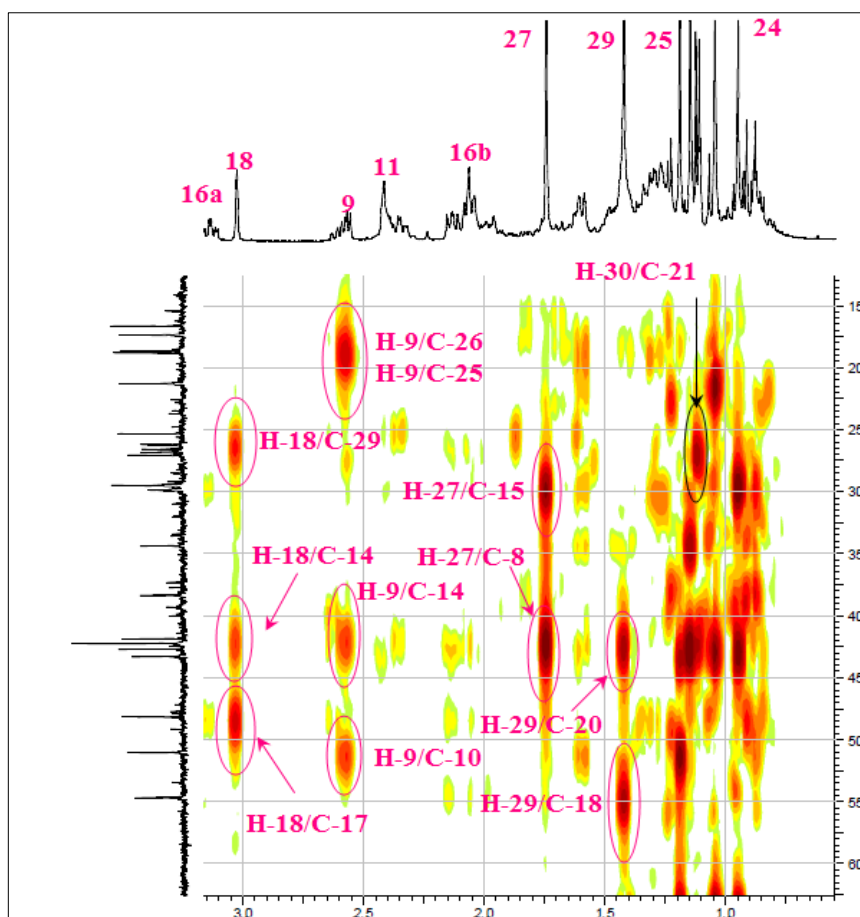


Figure 67 : Spectre HMBC du composé **P11**

Le méthyle Me-27 corréle avec deux carbones repérés à 42.2 ppm et 29.5 ppm attribuables aux carbones C-8 et C-15. Les protons de ce dernier sont identifiés à l'aide de l'expérience HMQC à δ_H 2.35, 1.27 sous forme de multiplet correspondants aux protons H-15a

Identification des produits isolés de *Mentha aquatica*

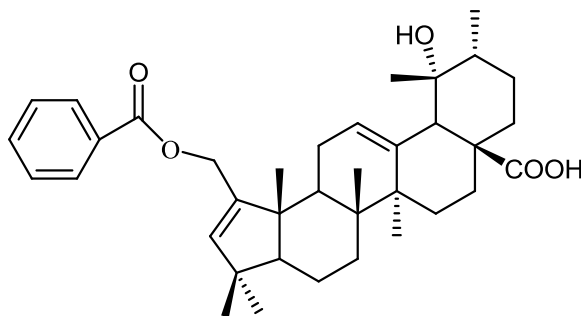
et H-15b respectivement. A partir de ces protons H-15a/b, le spectre COSY montre une corrélation avec un autre proton résonant à 3.14 ppm attribuable au proton H-16a. Il est facile de caractériser le proton H-16b (δ_{H} 2.06) à partir du spectre COSY.

Tableau 26: Déplacements chimiques en RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé **P11**

Position	δ_{H} <i>m J</i> (Hz)	δ_{C}
1	H-1a 5.14 (<i>d</i> , 14.0) ; H-1b 4.94 (<i>d</i> , 13.8)	63.2
2	-	149.8
3	5.65 (<i>s</i>)	138.7
4	-	42.7
5	1.59 (<i>m</i>)	63.4
6	1.46 (<i>m</i>)	17.4
7	H-7a 1.59 (<i>m</i>) ; H-7b 1.42 (<i>m</i>)	34.4
8	-	42.2
9	2.58 (<i>m</i>)	43.3
10	-	51.0
11	2.41 (<i>m</i>)	26.8
12	5.57 (<i>sl</i>)	127.6
13	-	140.4
14	-	41.9
15	H-15a 2.35 (<i>m</i>) ; H-15b 1.27 (<i>m</i>)	29.5
16	H-16a 3.14 (<i>td</i> , 12.9, 8.3) ; H-16b 2.06 (<i>m</i>)	26.2
17	-	48.2
18	3.02 (<i>s</i>)	54.7
19	-	72.5
20	1.54 <i>m</i>	42.2
21	H-21a 2.05 (<i>m</i>), H-21b 1.23 (<i>m</i>)	26.6
22	H-22a 2.13 (<i>m</i>), H-22b 2.04 (<i>m</i>)	38.4
23	1.04 (<i>s</i>)	29.5
24	0.95 (<i>s</i>)	21.3
25	1.19 (<i>s</i>)	18.8

26	1.15 (s)	18.7
27	1.74 (s)	25.3
28	-	180.6
29	1.42 (s)	27.1
30	1.12 (d, 6.9)	16.7
Benzoyle en C-1		
1'	-	130.8
2'	8.24 (d, 6.8)	129.7
3'	7.38 (t, 7.3)	128.9
4'	7.43 (m)	133.2
5'	7.38 (t, 7.3)	128.9
6'	8.24 (d, 6.8)	129.7
7'	-	166.1

L'ensemble de ces données spectroscopiques (**Tableau 26**) permettent d'attribuer pour le composé **P11** la structure suivante : acide 1-O-benzoyl-hyptadiénique.



Composé **P11** : Acide 1-O-benzoyl hyptadiénique

1.2.5. Elucidation structurale du composé **P12**:

Le composé **P12** est obtenu sous forme d'une poudre blanche, il est soluble dans le méthanol. Les spectres RMN (^1H , ^{13}C) de ce composé sont presque identiques à ceux du composé précédent **P5**, ce qui permet de conclure que ces deux composés présentent une petite différence dans leurs structures.

Il est observé sur le spectre RMN ^1H (**Figure 68**) de ce composé, un ensemble de signaux à δ_{H} 5.48 (1H, *sl*), 3.61 (1H, *s*), .2.62 (1H, *d*, $J = 11.5$ Hz) attribuables respectivement aux protons H-12, H-3 et H-18 des triterpènes pentacycliques de type urs-12-ène.

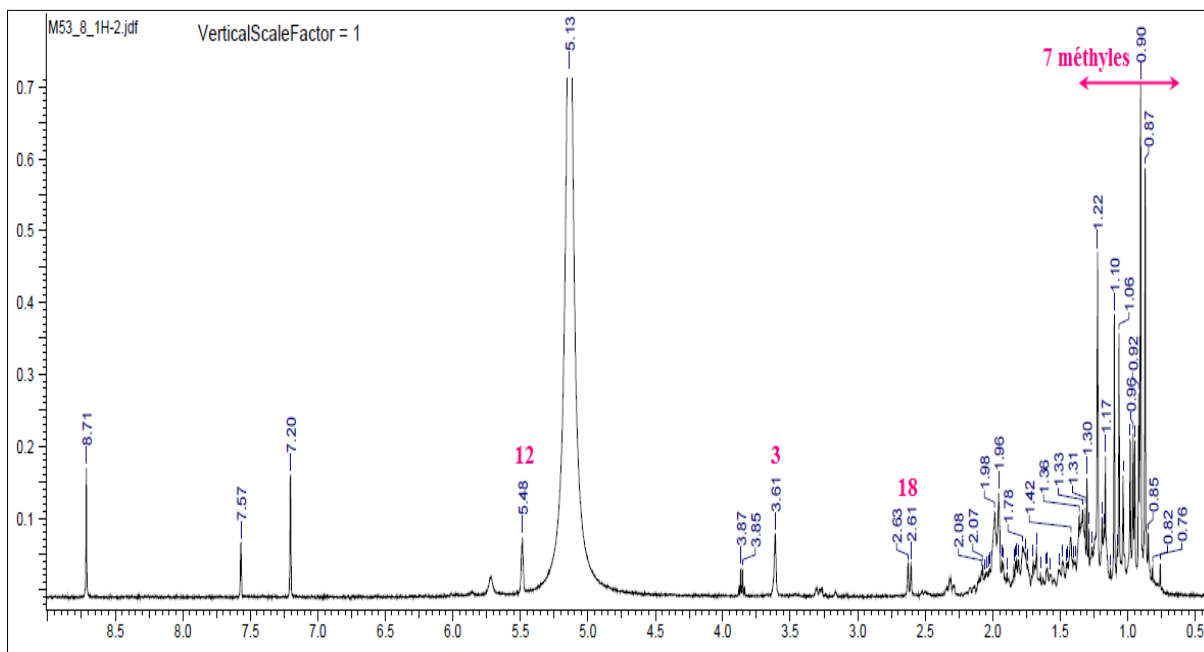


Figure 68 : Spectre RMN ^1H du composé **P12**

De plus, sept signaux sont visualisés entre 0.87 et 1.22 ppm (**Figure 69**), attribuables aux sept méthyles de ce composé : Me-23 (δ_{H} 1.22, *s*), Me-24 (δ_{H} 0.87, *s*), Me-25 (δ_{H} 0.90, *s*), Me-26 (δ_{H} 1.06, *s*), Me-27 (δ_{H} 1.10, *s*), Me-29 (δ_{H} 0.95, *d*, $J = 6.9$ Hz) et Me-30 (δ_{H} 0.91, *d*, $J = 6.9$ Hz).

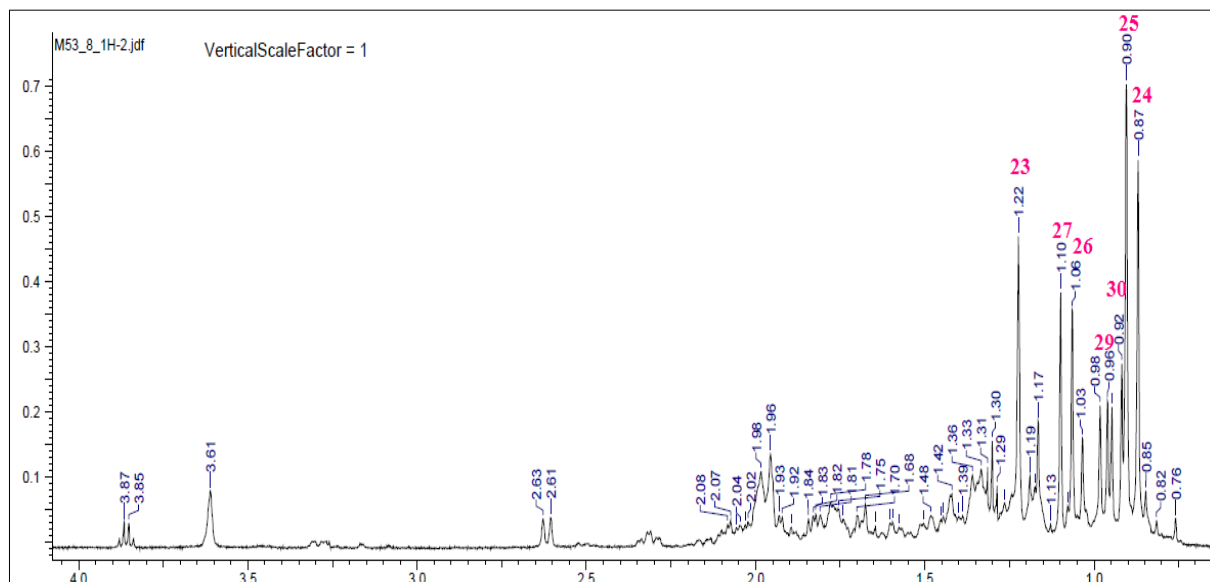


Figure 69 : Spectre RMN ^1H des méthyles du composé **P12**

Sur le spectre HMQC (**Figure 70**), ces méthyles résonnent à δ_{H} 29.2 (Me-23), 22.6 (Me-24), 15.4 (Me-25), 17.4 (Me-26), 23.7 (Me-27), 17.4 (Me-29) et 21.3 (Me-30).

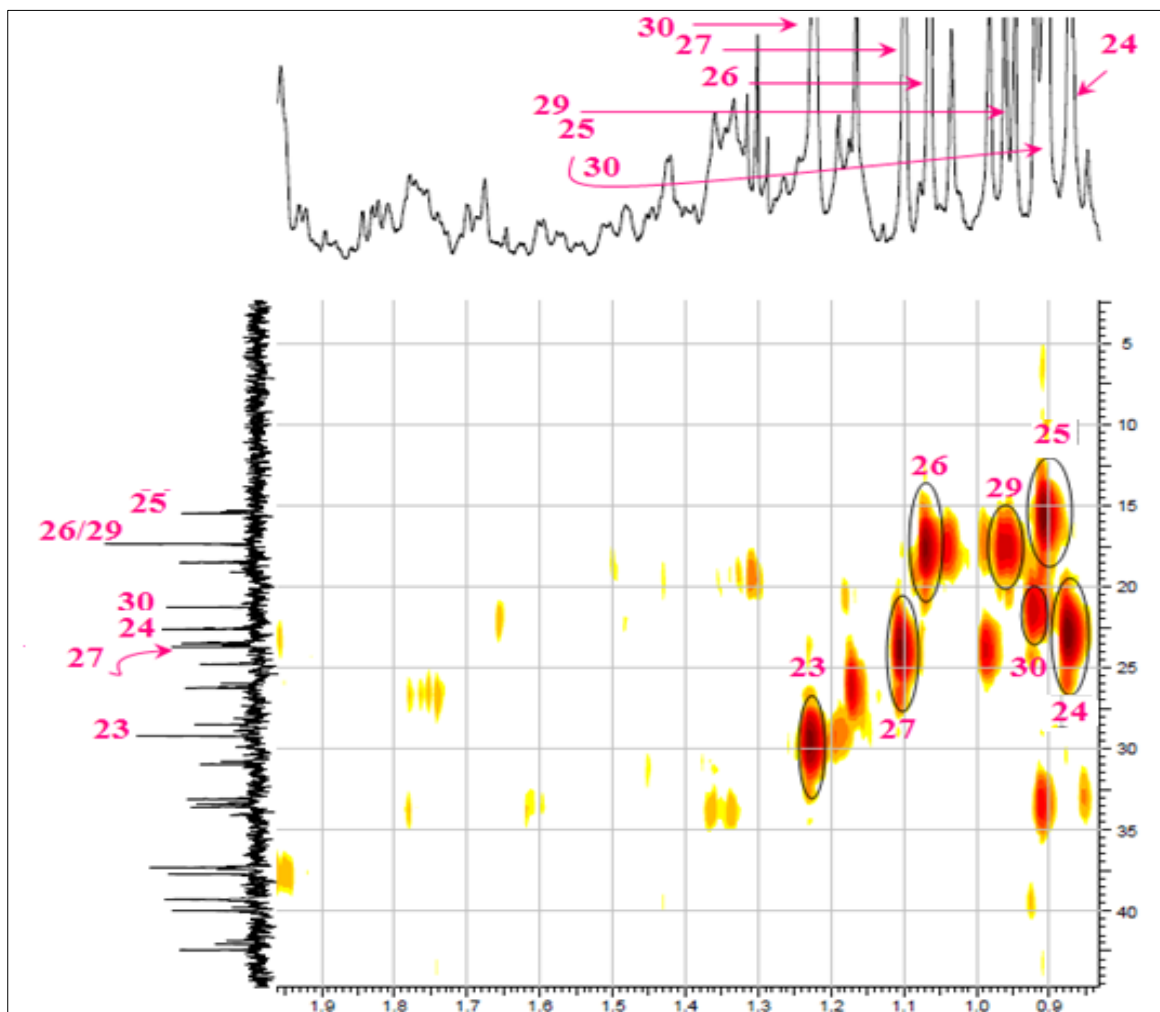


Figure 70 : Spectre HMQC du composé **P12**

Le spectre HMQC, RMN ^{13}C (**Figure 71**) permettent d'attribuer les déplacements chimiques des carbones C-3, C-12 et C-13 à δ_{C} 75.0, 125.6 et 139.1 respectivement.

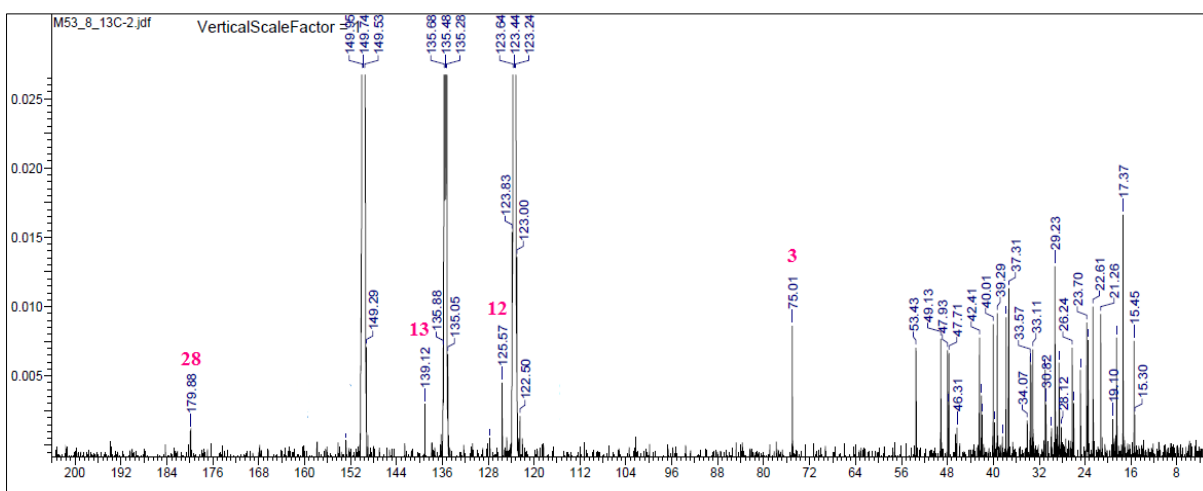


Figure 71 : Spectre RMN ^{13}C du composé **P12**

Identification des produits isolés de *Mentha aquatica*

L'analyse combinée des spectres HMQC, HMBC (Figure 72) et RMN ^{13}C (Figure 73) permet d'assigner les déplacements chimiques de tous les protons et carbones de ce composé (Tableau 26).

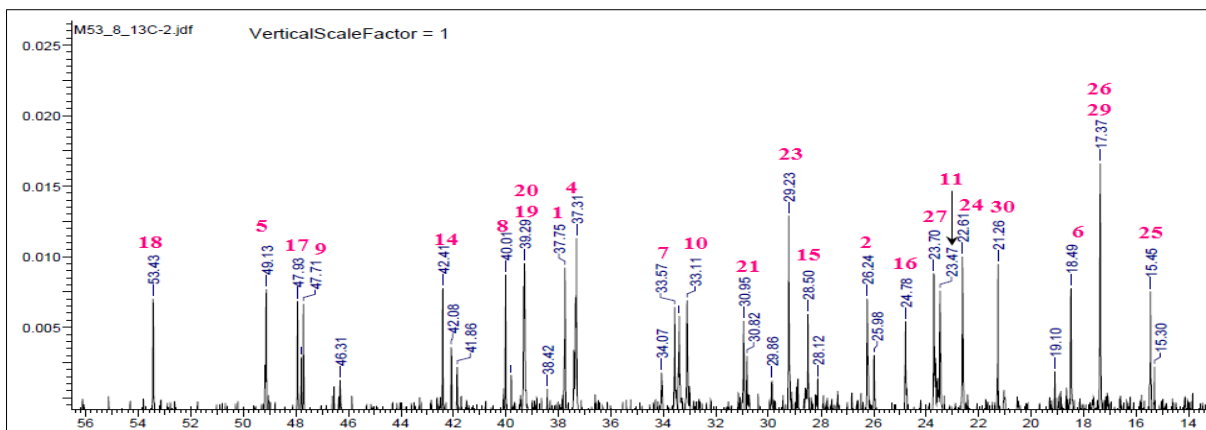


Figure 73 : Spectre RMN ^{13}C étalé du composé P12

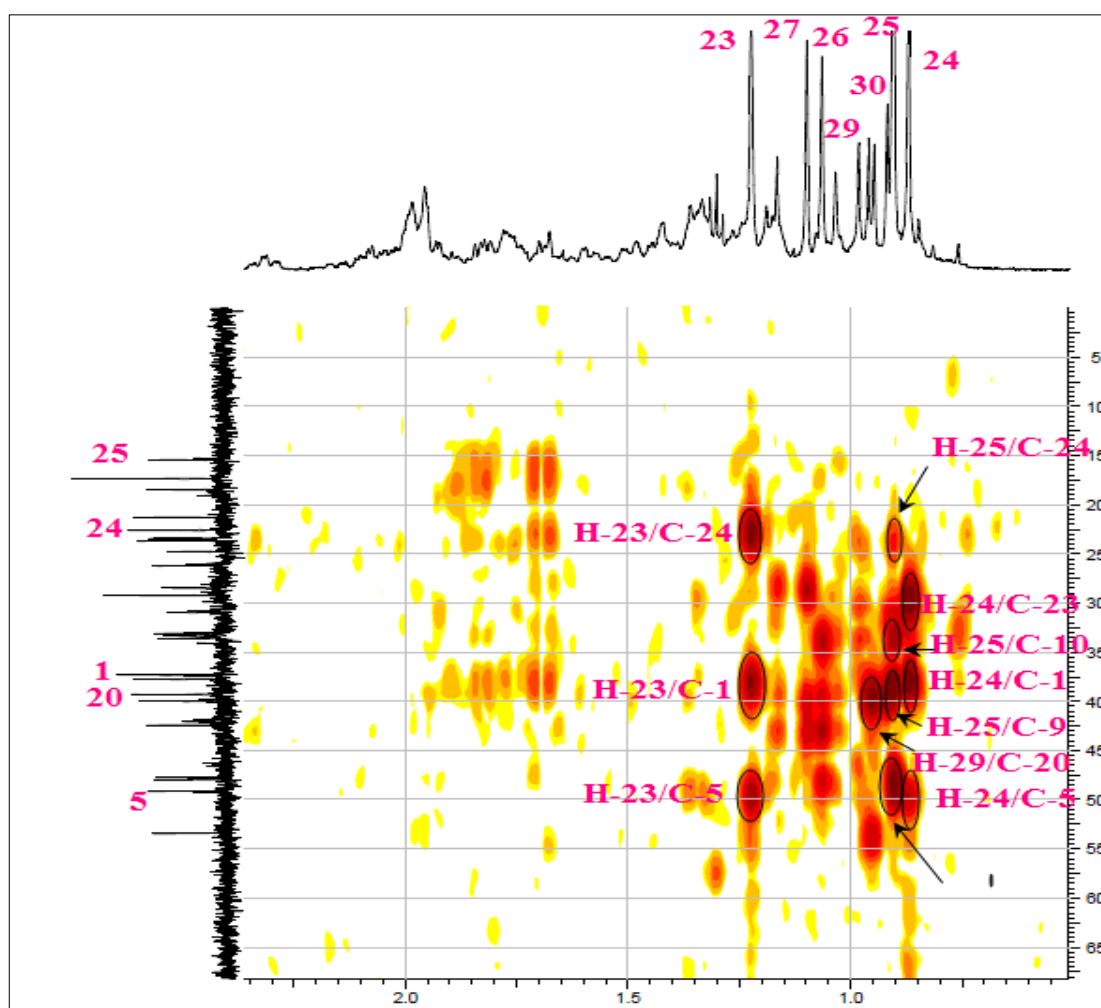


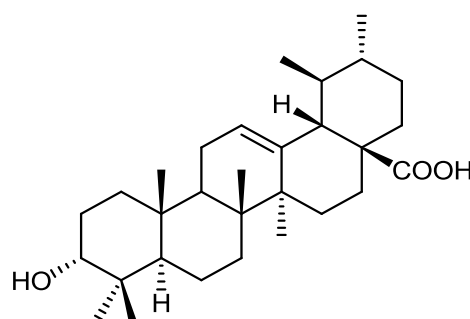
Figure 72 : Spectre HMBC du composé P12

Tableau 27: Déplacements chimiques en RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé **P12**

Position	δ_{H} <i>m J</i> (Hz)	δ_{C}	Acide 3-épi-ursolique (Nateq <i>et al</i> , 2016)
1	H-1a 1.97 (<i>m</i>), H-1b 1.93 (<i>m</i>)	37.8	38.9
2	H-2a 1.98 (<i>m</i>), H-2b 1.75 (<i>m</i>)	26.2	28.1
3	3.61 (<i>sl</i>)	75.0	78.2
4	-	37.3	39.0
5	1.69 (<i>m</i>)	49.1	55.8
6	H-6a 1.48 (<i>m</i>); H-6b 1.36 (<i>m</i>)	18.5	18.8
7	H-7a 1.70 (<i>m</i>); H-7b 1.36 (<i>m</i>)	33.6	33.5
8	-	40.0	39.9
9	1.82 (<i>m</i>)	47.7	48.0
10	-	33.1	37.3
11	1.98 (<i>m</i>)	23.5	23.6
12	5.48 (<i>sl</i>)	125.6	125.6
13	-	139.1	139.2
14	-	42.4	47.5
15	H-15a 2.32 (<i>m</i>); H-15b 1.20 (<i>m</i>)	28.5	28.6
16	H-16a 2.07 (<i>m</i>); H-16b 1.98 (<i>m</i>)	24.8	24.9
17	-	47.9	48.1
18	2.62 (<i>d</i> , 11.5)	53.4	53.5
19	1.45 (<i>m</i>)	39.3	39.3
20	0.94 (<i>m</i>)	39.3	39.5
21	H-21a 1.44 (<i>m</i>); H-21b 1.36 (<i>m</i>)	30.9	31.1
22	H-22a 1.75 (<i>m</i>); H-22b 1.36 (<i>m</i>)	33.6	37.4
23	1.22 (<i>s</i>)	29.2	29.3
24	0.87 (<i>s</i>)	22.6	16.2
25	0.90 (<i>s</i>)	15.4	15.6
26	1.06 (<i>s</i>)	17.4	17.6
27	1.10 (<i>s</i>)	23.7	23.6
28	-	179.8	179.8
29	0.95 (<i>d</i> , 6.9)	17.4	17.6

30	0.91 (d, 6.9)	21.3	21.8
----	---------------	------	------

La différence essentielle avec le produit **P5** est constatée au niveau des déplacements chimiques des protons H-3 et des carbones C-3. L'apparition du signal correspondant à H-3 sous forme d'un singulet large indique qu'il est orienté équatorialement. Les données spectroscopiques (**Tableau 27**) montrent que ce composé est l'épimère du produit **P5** par comparaison avec les données de la littérature de l'acide 3-épi-ursolique (Nateq *et al*, 2016). Il a été isolé de l'espèce *Lavandula officinalis* (Lamiaceae) (Nateq *et al*, 2016). Ce composé a été caractérisé pour la première fois dans le genre *Mentha*.



Composé **P12** : Acide 3-épi-ursolique

1.2.6. Elucidation structurale du composé **P13**:

Le composé **P13** est obtenu sous forme d'une poudre blanche, soluble dans le méthanol. Le spectre RMN ^1H (**Figure 74**) présente à champ fort 6 signaux singulets fins attribuables aux méthyles résonant à δ_{H} 1.06 (Me-23), 0.95 (Me-24), 1.13 (Me-25), 1.10 (Me-26), 1.65 (Me-27), 1.39 (Me-29) et un signal sous forme de doublet à δ_{H} 1.09 ($J = 7.0$ Hz) correspondant au méthyle Me-30.

Un massif de protons repéré entre 0.87 à 2.47 ppm correspondant aux -CH et -CH₂ des 5 cycles est observé sur ce spectre. On observe aussi à champ faible plusieurs signaux :

- Un signal singulet à δ_{H} 5.70 attribuable au proton éthylénique H-3.
- Un proton éthylénique résonant à δ_{H} 5.55 sous forme d'un singulet large correspondant au proton H-12.
- Deux doublets repérés à δ_{H} 4.52 ($J = 14.9$ Hz) et 4.40 ($J = 14.9$ Hz) attribuables aux protons oxyméthylène H-1.
- Un signal singulet résonant à δ_{H} 2.98, correspondant au proton H-18.

Identification des produits isolés de *Mentha aquatica*

Mis à part, les déplacements chimiques des protons H-1 plus blindés que ceux de produit **P11**, les autres déplacements chimiques sont quasiment similaires.

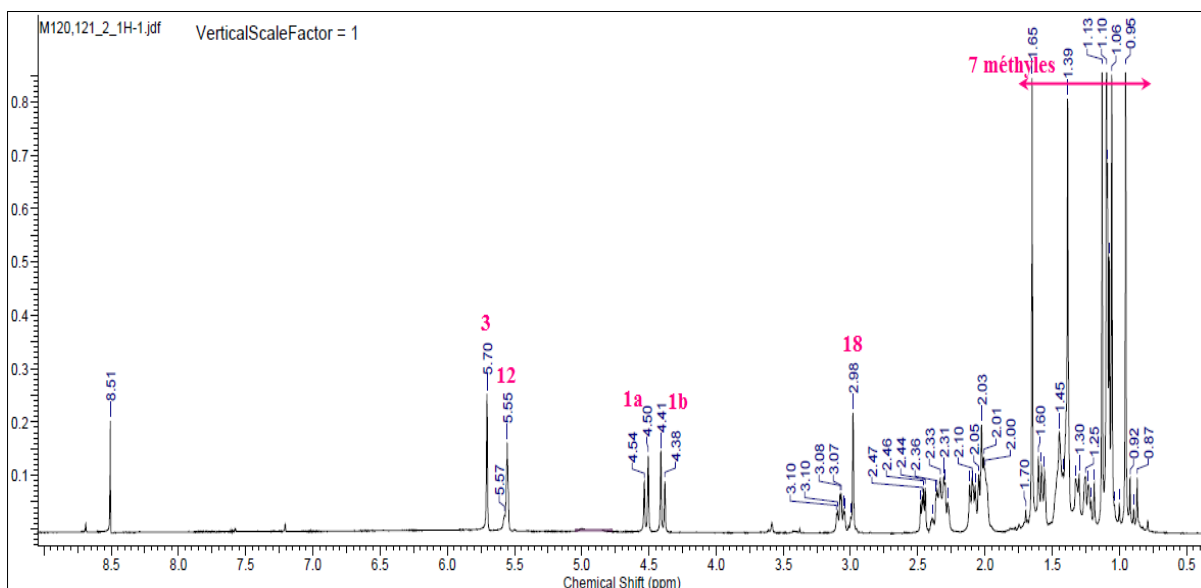


Figure 74 : Spectre RMN ^1H du composé **P13**

Le spectre RMN ^{13}C (Figure 75) du produit **P13** montre dans la région blindée, des signaux correspondant à 7 méthyles angulaires, résonant entre 17 et 30 ppm. Dans la région déblindée, on observe 4 carbones éthyléniques : 127.9 ppm (C-12), 140.1 ppm (C-13), les deux autres carbones résonants à δ_{C} 133.4 et 156.6 ne peuvent être que pour les carbones C-3 et C-2. Les attributions des protons et des carbones du produit ont été établies par comparaison avec le produit **P11** avec l'acide hyptadiénique (Tableau 28).

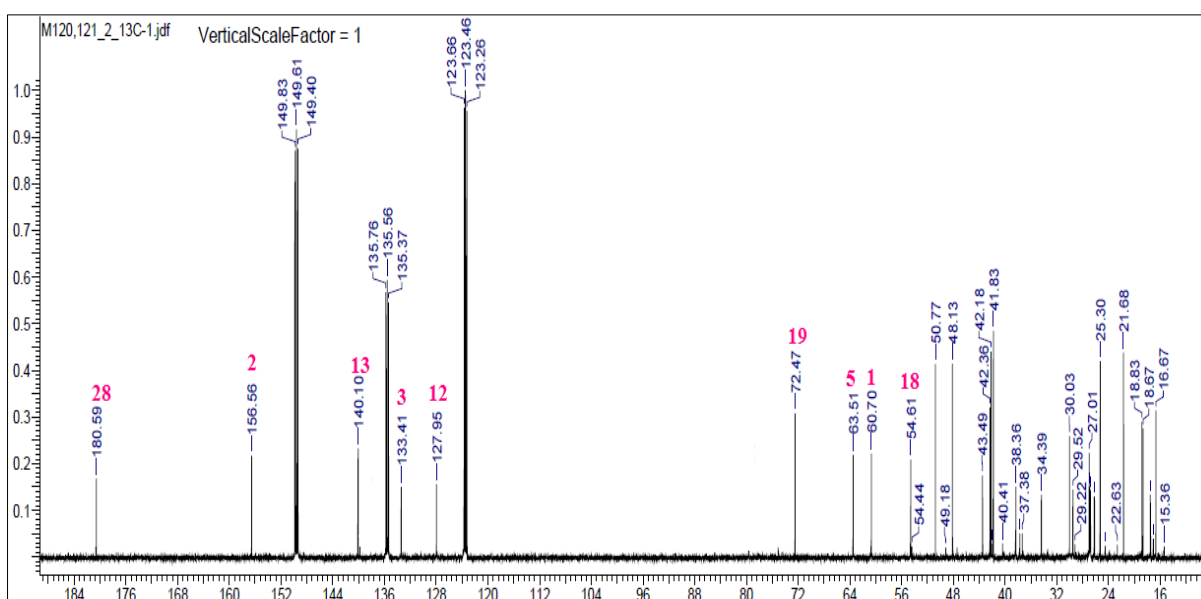


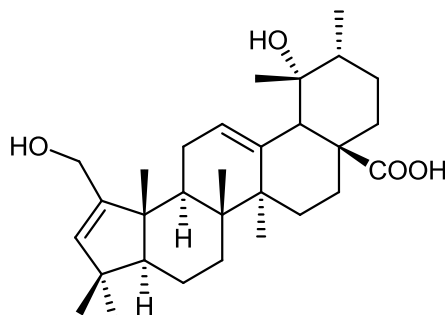
Figure 75 : Spectre RMN ^{13}C du composé **P13**

Tableau 28 : Déplacements chimiques en RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé **P13**

Position	δ_{H} <i>m J</i> (Hz)	δ_{C}	Acide hyptradiénique (Jérémie <i>et al.</i> , 2016)
1	H-1a 4.52 (<i>d</i> , 14.9); H-1b 4.40 (<i>d</i> , 14.9)	60.7	61.3
2	-	156.6	157.2
3	5.70 (<i>sl</i>)	133.4	134.0
4	-	41.8	42.4
5	1.57 (<i>d</i> , 11.5)	63.5	63.1
6	1.45 (<i>m</i>)	17.5	18.1
7	H-7a 1.60 (<i>m</i>); H-7b 1.42 (<i>m</i>)	34.4	35.0
8	-	42.3	42.9
9	2.46 (<i>d</i> , 11.0, 6.4)	43.5	44.1
10	-	50.8	51.3
11	2.32 (<i>m</i>)	26.9	27.1
12	5.55 (<i>sl</i>)	127.9	128.6
13	-	140.1	140.7
14	-	42.3	42.8
15	H-15a 2.36 (<i>m</i>); H-15b 1.30 (<i>m</i>)	29.5	30.1
16	H-16a 3.08 (<i>td</i> 12.9,4.2); H-16b 2.03 (<i>m</i>)	26.9	26.8
17	-	48.1	48.7
18	2.98 (<i>s</i>)	54.6	55.2
19	-	72.5	73.0
20	1.45 (<i>m</i>)	42.2	42.8
21	H-21a 2.03 (<i>m</i>); H-21b 1.24 (<i>m</i>)	26.9	27.4
22	H-22a 2.10 (<i>m</i>), H-22b 2.01 (<i>m</i>)	38.4	38.9
23	1.06 (<i>s</i>)	30.1	30.5
24	0.95 (<i>s</i>)	21.7	22.2
25	1.13 (<i>s</i>)	18.8	19.4
26	1.10 (<i>s</i>)	18.7	19.3
27	1.65 (<i>s</i>)	25.3	25.8
28	-	180.6	181.6
29	1.39 (<i>s</i>)	27.0	27.5

30	1.09 (d, 7.0)	16.7	17.2
----	---------------	------	------

L'acide hyptadiénique été isolé pour la première fois dans le genre *Mentha*. Ce triterpène a été connu pour son activité anti-inflammatoire (Banno *et al.*, 2004).



Acide hyptadiénique **P13**

1.2.7. Elucidation structurale du composé P14:

Le composé **P14** a été obtenu sous forme d'une poudre blanche, invisible sous la lampe UV et soluble dans le méthanol.

Le spectre de masse HR-FAB-MS montre un pic d'ion pseudomoléculaire à m/z 488 $[M-H]^+$ indiquant que la masse moléculaire est 489 uma compatible avec la formule moléculaire $C_{30}H_{49}O_5$.

Il est observé sur le spectre RMN 1H (**Figure 76**) 7 signaux de protons de groupement méthyles résonant à δ_H 1.05 (CH_3 -23, s), 0.79 (CH_3 -24, s), 1.16 (CH_3 -25, s), 1.20 (CH_3 -26, s), 1.71 (CH_3 -27, s), 1.44 (CH_3 -29, s) et 1.12 (CH_3 -30, d, $J = 6.8$ Hz).

Ce spectre montre aussi plusieurs signaux entre 3 et 6 ppm, un signal repéré à δ_H 5.48 (1H, dd, $J = 5.1, 9.6$ Hz) avec un autre signal déblindé résonant à δ_H 5.63 sous forme d'un singulet large correspondant au proton oléfinique H-12. Deux autres signaux sous forme de doublets à δ_H 4.25 et 3.24 avec la même constante de couplage ($J = 12.9$ Hz) correspondant aux protons H-3, un signal singulet résonant à 3.05 ppm attribuable au proton H-18. Toutes ces données attestent que ce composé a une nature triterpénique.

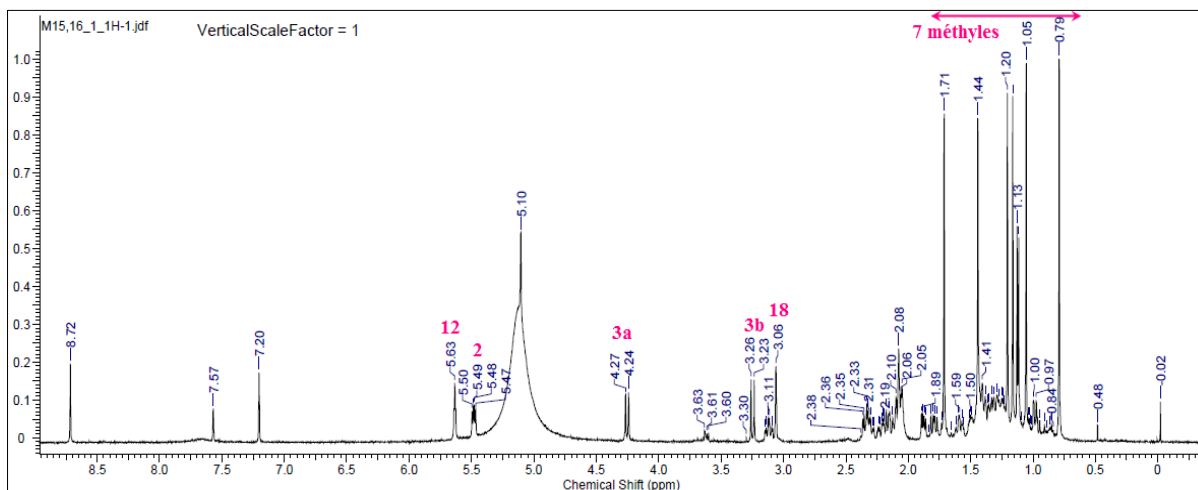


Figure 76 : Spectre RMN ^1H du composé **P14**

L'analyse du spectre RMN ^{13}C (**Figure 77**) confirme la nature triterpénique de ce composé, et cela par l'observation des signaux :

- Plus de 20 carbones $-\text{CH}$, $-\text{CH}_2$ et $-\text{CH}_3$ localisé dans l'intervalle de 14 à 60 ppm.
- Deux carbones oxydés apparaissent à δ_{C} 70.4 et 72.5, suggérant que deux carbones C-3 et C-19 sont oxydés.
- Deux carbones éthyléniques, l'un est tertiaire repéré à δ_{C} 128.5 et l'autre quaternaire à δ_{C} 139.6.
- Un signal déblindé résonant à 180.7 ppm attribuable à un acide libre.
- Un signal repéré à 93.7 indique la présence d'un acétal dans ce triterpène, porté par le carbone C-2.

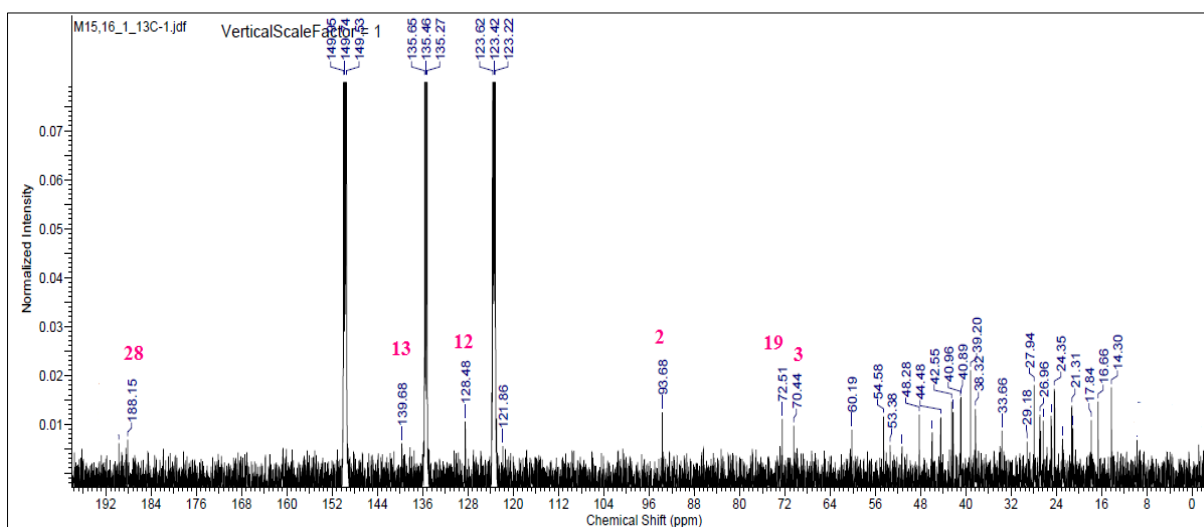


Figure 77 : Spectre RMN ^{13}C du composé **P14**

L'identification de la structure du composé **P14** repose principalement sur l'examen conjoint des spectres HMQC et HMBC. L'expérience HMQC (**Figure 78**) conduit à repérer les carbones C-2, C-3, C-12 et C-18.

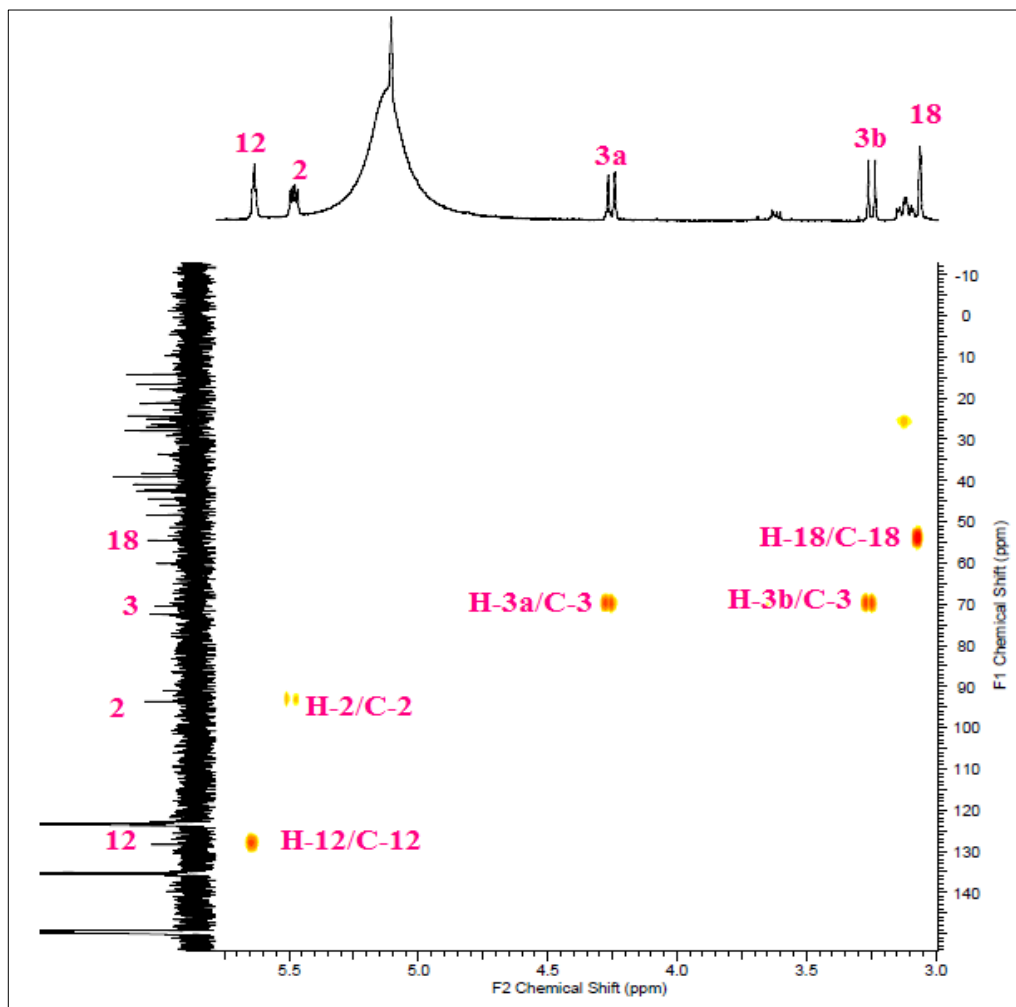


Figure 78 : Spectre HMQC du composé **P14**

Les protons méthyliques Me-23 et Me-24 repérés respectivement à δ_H 0.79 et 1.05, sont caractérisés suite aux corrélations qu'ils présentent avec le carbone C-3 déjà identifié. Ces méthyles corrélerent en 2J avec un carbone quaternaire C-4 (δ_C 38.2) et en 3J avec un carbone C-5 (δ_C 60.2). Ce dernier montre plusieurs taches de corrélations en HMBC (**Figure 79**) avec :

- Deux protons sous forme de multiplets résonant à δ_H 2.35 et 1.79 attribuables aux protons H-1a et H-1b respectivement.
- Un autre méthyle qui correspond au Me-25 à δ_H 1.16.

Le méthyle Me-23 corrèle avec un carbone résonant à 21.3 ppm correspond au carbone C-24. Le Me-25 montre aussi plusieurs taches de corrélations, il corrèle avec les carbones C-1, C-4 et C-5 précédemment, et deux autres carbones, un carbone quaternaire et un méthine résonant à δ_C 41.0 et 44.5 correspondant aux carbones C-10 et C-9 respectivement.

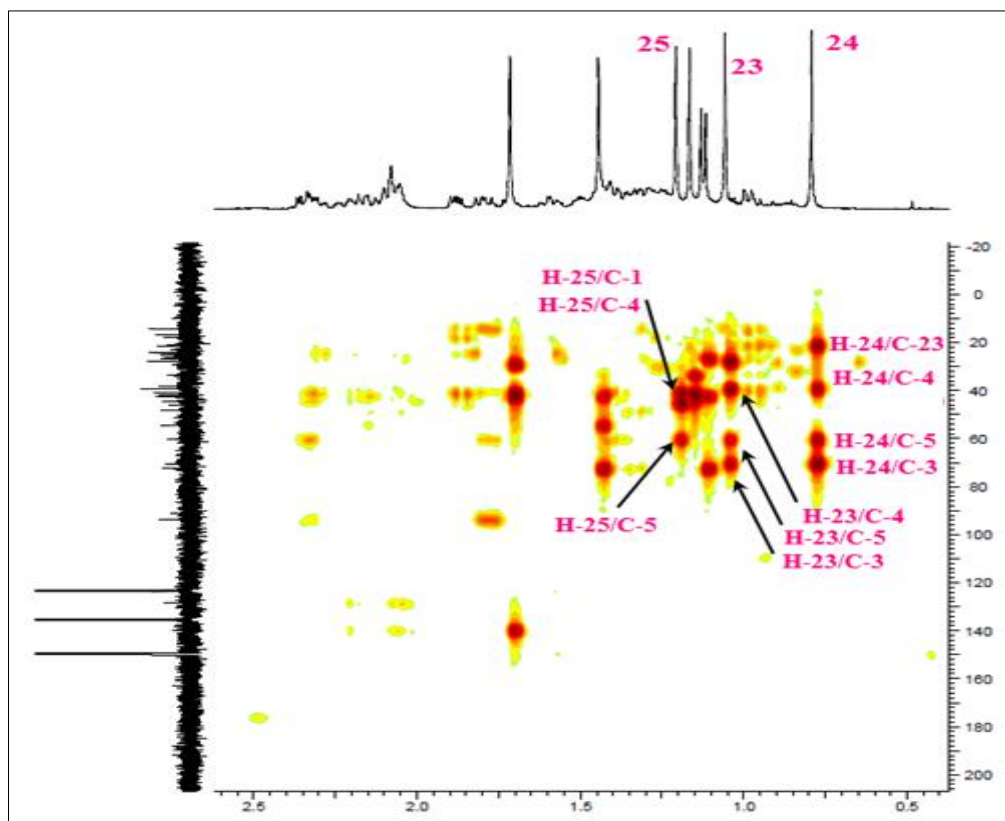


Figure 79 : Spectre HMBC des méthyles du composé **P14**

L'analyse du spectre HMQC permet d'attribuer les déplacements chimiques des protons H-1, H-5 et H-9. Le carbone C-2 montre 3 taches de corrélations sur le spectre HMBC, ces protons sont les deux protons H-3 et un proton H-1 (**Figure 80**).

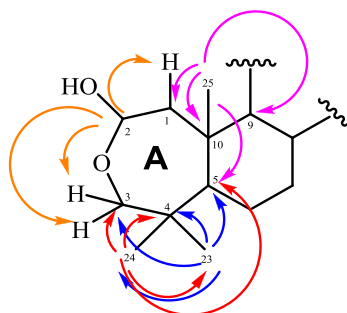


Figure 80 : Corrélation HMBC au niveau du cycle A.

Le carbone C-9 couple avec deux groupements méthyles à δ_H 1.16 (Me-25) et 1.20 (Me-26). Ce dernier corrèle à son tour avec un carbone résonant à 33.7 ppm qui est le carbone secondaire C-7, ainsi avec deux autres carbones quaternaires C-8 (δ_C 40.9) et C-14 (δ_C 42.5). Le carbone C-14 couple aussi avec un autre méthyle à 1.71 ppm attribuable au M-27. Ce dernier méthyle montre deux taches de corrélations sur le spectre HMBC avec deux carbones repérés à δ_C 40.9 identifié déjà en tant que le carbone C-8 et à δ_C 29.3 attribuable au carbone C-15 (**Figure 81**). Les protons des carbones sont détectés selon l'expérience HMQC.

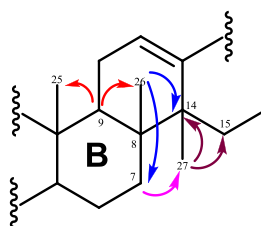


Figure 81 : Corrélations HMBC au niveau des méthyles Me-26 et 27.

A partir du proton H-18, il est visualisé sur le spectre HMBC (**Figure 82**) plusieurs corrélations avec les carbones éthyléniques C-12 (128.5 ppm) et C-13 (139.7 ppm), et avec un carbone résonant à 48.3 ppm attribuable au carbone C-17 porteur de la fonction acide à cause de son déblindage. Une autre tâche de corrélation à δ_C 42.5 attribuable au carbone quaternaire C-14. Ce proton corrèle aussi avec un autre carbone déblindé à 72.5 ppm, correspondant au carbone porteur d'un oxygène qui est le C-19.

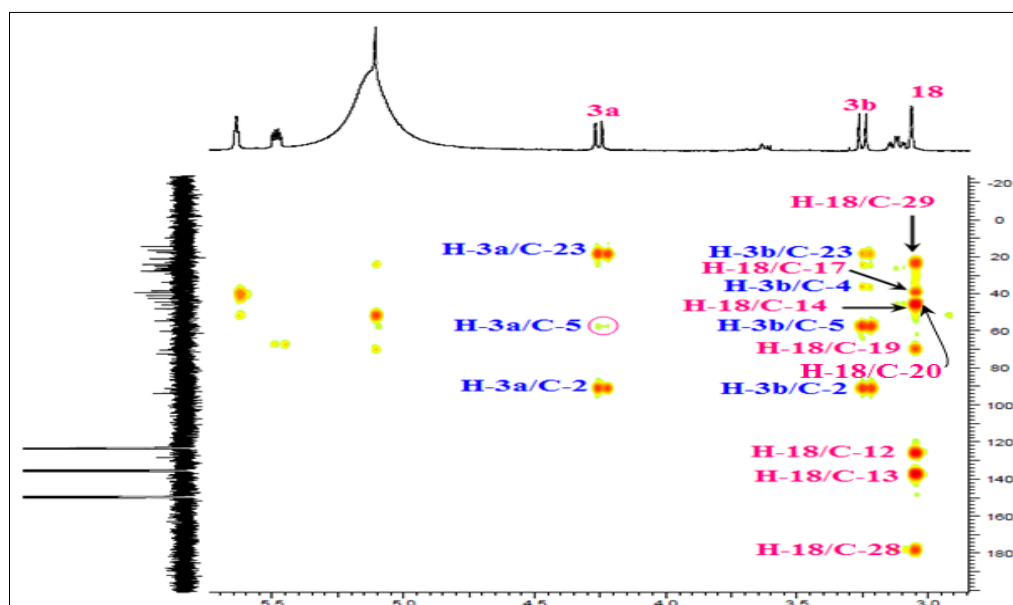


Figure 82 : Spectre HMBC du composé **P14**

D'après le couplage du carbone C-19 sur le spectre HMBC, il corrèle avec le proton H-18 avec deux autres groupements méthyles résonant à δ_H 1.44 sous forme d'un singulet correspondant à Me-29, et avec un doublet ($J= 6.8$ Hz) attribuable au méthyle Me-30 (**Figure 83**).

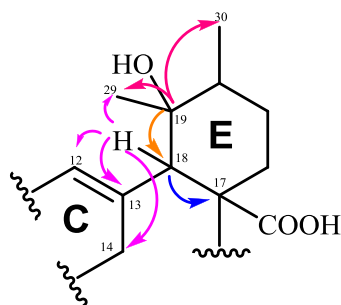


Figure 83 : Corrélations HMBC du composé **P14**

Le proton H-18 montre une tache de corrélation sur le spectre HMBC avec un carbone résonant à 40.9 ppm, attribuable au carbone C-20. Ce dernier corrèle avec des protons repérés à δ_H 2.18 et 2.26 attribuable aux protons H-22b et H-22a.

A partir du carbone C-17 (**Figure 84**), il est observé sur le spectre HMBC le couplage avec deux signaux sous forme de multiplet à δ_H 2.00 et 1.33 attribuables aux protons H-21a et H-21b.

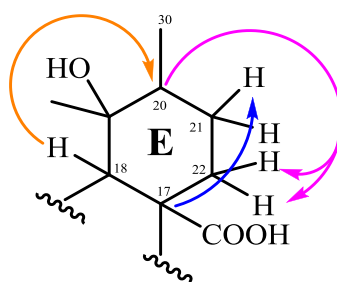


Figure 84 : Corrélations HMBC du cycle E.

Le cycle A de ce triterpène est différente des autres composés isolés de cette plante, la voie cette, mais dérive de celle de l'acide tormentique **P6** probablement selon la voie biogénétique suivante (**Figure 85**).

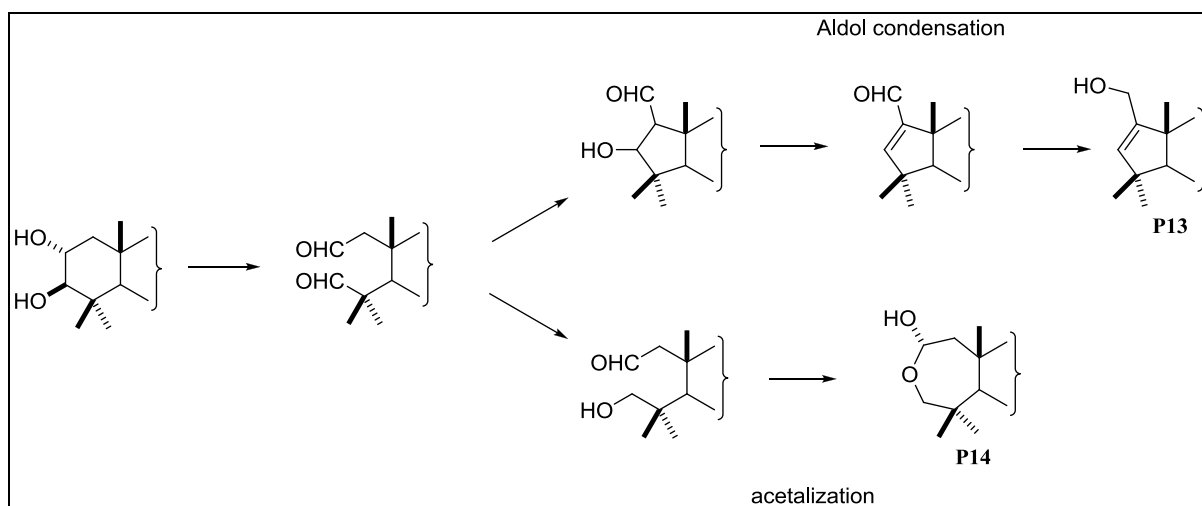


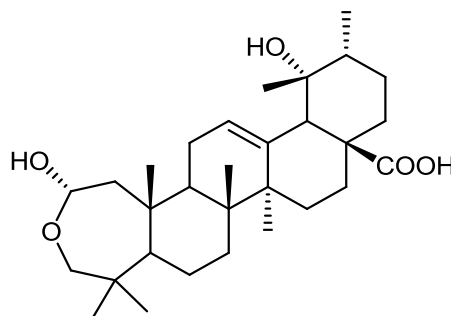
Figure 85 : Voie biogénétique du composé **P13** et **P14**

Tableau 28 : Déplacements chimiques en RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé **P14**

Position	δ_{H} <i>m J</i> (Hz)	δ_{C}
1	H-1a 2.34 (<i>dd</i> 15.1, 5.0); H-1b 1.79 (<i>dd</i> 14.7, 9.7)	46.0
2	5.48 (<i>dd</i> , 14.7, 9.6)	93.7
3	H-3a 4.25 (<i>d</i> , 12.9) ; H-3b 3.25 (<i>d</i> , 12.8)	70.4
4	-	38.2
5	0.99 (<i>dl</i> , 11.5)	60.2
6	H-6a 1.79 (<i>m</i>) ; H-6b 1.43 (<i>m</i>)	21.1
7	H-7a 1.59 (<i>m</i>); H-7b 1.41(<i>m</i>)	33.7
8	-	40.9
9	1.88 (<i>dd</i> , 11.0, 6.0)	44.5
10	-	41.0
11	H-11a 2.16 (<i>m</i>); H-11b 2.10 (<i>m</i>)	27.0
12	5.63 (<i>sl</i>)	128.5
13	-	139.7
14	-	42.5
15	H-15a 2.31 (<i>td</i> 13.3, 4.5); H-15b 1.32 (<i>m</i>)	29.3
16	H-16a 3.11 (<i>td</i> 4.2, 13.3) ; H-16b 1.26 (<i>m</i>)	26.9
17	-	48.3
18	3.06 (<i>s</i>)	54.6

19	-	72.5
20	1.49 (m)	42.3
21	H-21a 2.06 (m); H-21b 1.32 (m)	26.3
22	H-22a 2.26 (m); H-22b 2.10 (m)	39.2
23	0.79 (s)	27.9
24	1.05 (s)	21.3
25	1.16 (s)	14.3
26	1.20 (s)	17.8
27	1.71 (s)	24.3
28	-	180.7
29	1.44 (s)	24.9
30	1.12 (d, 6.8)	16.6

La mesure du pouvoir rotatoire ($[\alpha]_D = +61.2^\circ$, $C = 0.0045$ g/mL, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 1 :1), ainsi que les données spectrales (**Tableau 29**) ont permis d'attribuer la structure d'un nouveau triterpène qu'on désigne par l'acide maquatique.



Composé P14 : Acide maquatique

1.2.8. Elucidation structurale du composé P15:

Le composé **P15** est obtenu sous forme d'une poudre blanche soluble dans le méthanol et invisible sous lampe UV.

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C du composé **P15** sont très voisins de ceux du composé **P2** élucidé précédemment. Il permet de reconnaître entre autres :

Identification des produits isolés de *Mentha aquatica*

- Les protons H-3, H-12 et H-18 caractéristiques d'une molécule de nature triterpénique pentacyclique résonant à δ_H 3.75 (*sl*), 5.44 (*sl*) et 3.24 (*dd*, $J=4.1, 13.3$ Hz).
- Un massif de protons repéré entre 0.85 à 2.06 ppm, correspondant aux $-CH$ et $-CH_2$ des cinq cycles.
- Les méthyles détectés sous forme de sept singulets fins entre 0.87 et 1.25 ppm.

La différence majeure par rapport au composé **P2**, réside en la présence d'un signal sous forme de doublet large correspondant à un proton oxyméthine résonant à δ_H 4.27 ($J = 2.8$ Hz) (**Figure 86**).

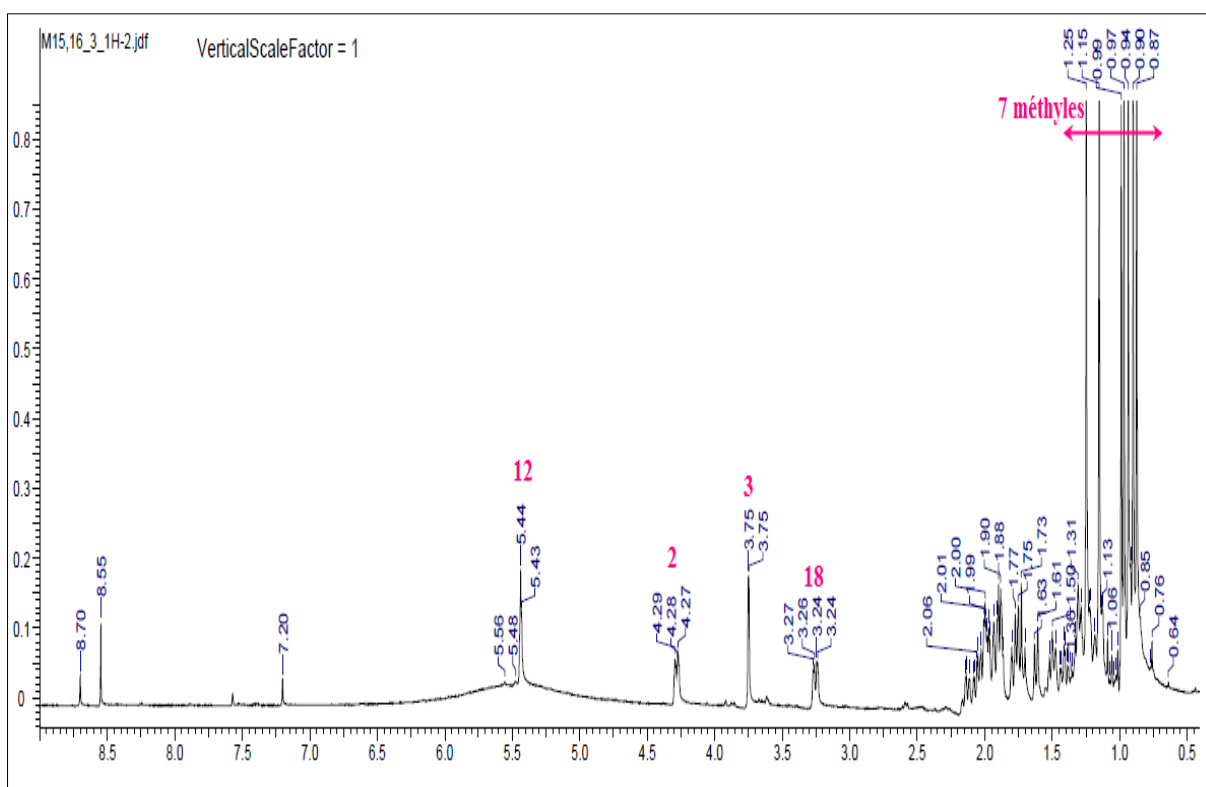
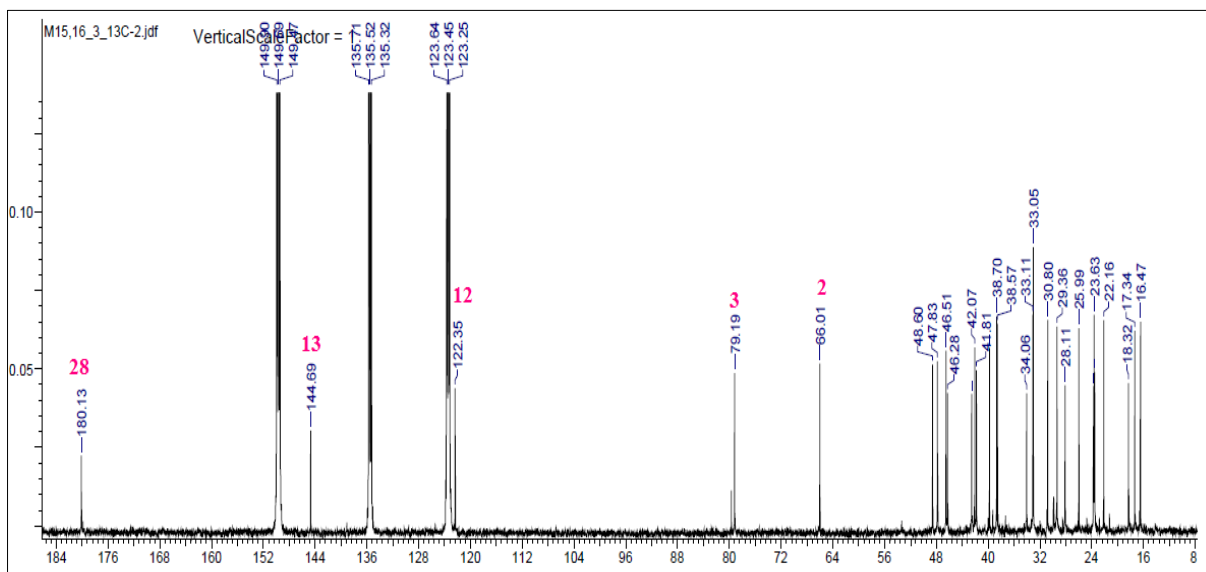
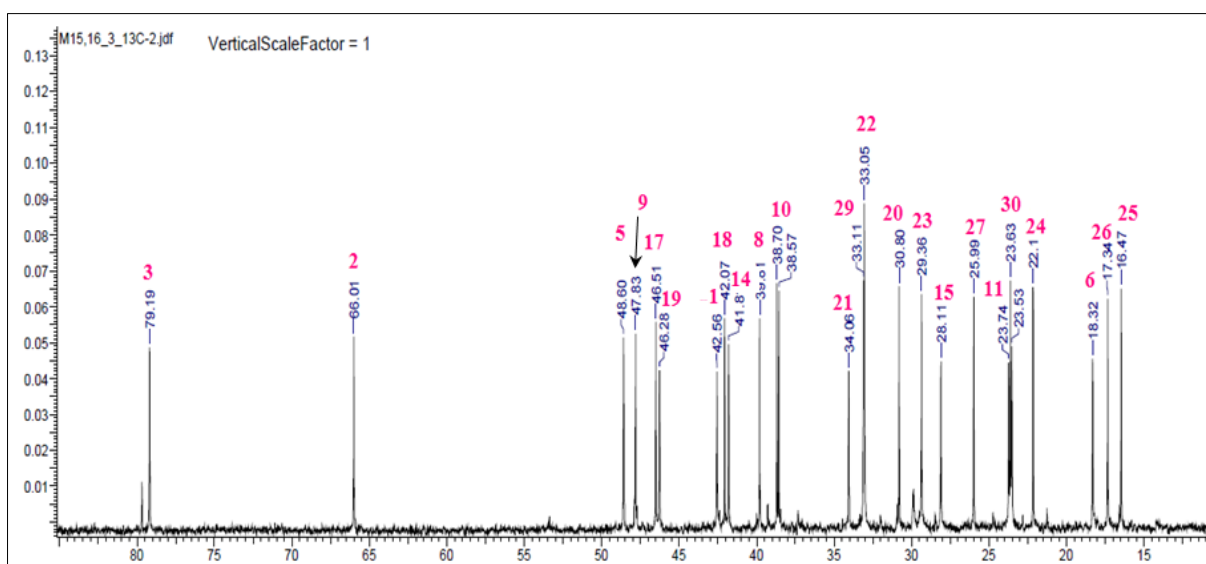


Figure 86 : Spectre RMN 1H du composé **P15**

Dans le spectre RMN ^{13}C (**Figures 87, 88**), les déplacements chimiques des signaux sont proches de ceux du composé **P2** précédent. Néanmoins, on note l'apparition du carbone résonant à 66.1 ppm d'un oxyméthine correspondant au carbone C-2.

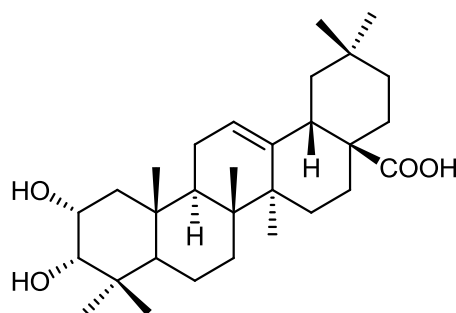
Figure 87 : Spectre RMN ^{13}C du composé **P15**Figure 88 : Spectre RMN ^{13}C étalé du composé **P15**Tableau 30 : Déplacements chimiques en RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé **P15**

Position	δ_{H} m J (Hz)	δ_{C}	Acide 3-épi-maslinique (Amani 2009)
1	H-1a 1.89 (<i>dl</i> , 12.8); H-1b 1.73 (<i>t</i> , 13.7)	42.6	41.3
2	4.28 (<i>dd</i> , 10.6, 2.8)	66.0	66.3
3	3.75 (<i>d</i> , 3.2)	79.2	77.5
4	-	38.6	38.3
5	1.62 (<i>dl</i> , 11.5)	48.6	48.8

Identification des produits isolés de *Mentha aquatica*

6	H-6a 1.50 (m), H-6b 1.31 (m)	18.3	18.0
7	H-7a 1.52 (m); H-7b (td, 13.7, 3.2)	33.1	29.7
8	-	39.8	39.4
9	1.97 (m)	47.8	48.1
10	-	38.7	38.2
11	2.0 (m)	23.7	22.9
12	5.44 (sl)	122.3	122.2
13	-	144.7	143.8
14	-	41.8	41.8
15	H-15a 2.14 (m); H-15b 1.22 (m)	28.1	27.7
16	H-16a 2.11 (m); H-16b 1.22 (d, 11.5)	23.5	23.2
17	-	46.5	47.3
18	3.24 (dd, 13.3, 4.1)	48.2	41.1
19	H-19a 1.77 (t, 13.3); H-19b 1.31 (m)	46.3	46.4
20	-	30.8	30.7
21	H-21a 1.48 (m); H-21b 1.22 (m)	34.1	33.9
22	H-22a 2.05 (m); H-22b 1.88 (m)	33.1	32.5
23	1.15 (s)	29.4	21.9
24	0.87 (s)	22.2	28.5
25	0.94 (s)	16.5	16.3
26	0.90 (s)	17.3	16.9
27	1.25 (s)	26.0	26.0
28	-	180.1	181.7
29	0.99 (s)	33.1	33.1
30	0.97 (s)	23.6	23.6

Les déplacements chimiques des protons et carbones (**Tableau 30**), ont été déterminés par comparaison avec celle de la littérature (enregistré dans un mélange $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) (Amani 2009). Cette analyse spectroscopique permet d'attribuer la structure suivante pour ce composé : Acide 2α , 3α - dihydroxy-oléan-12-èn-28-oïque appelé également Acide 3-épi-maslinique. Il a été isolé antérieurement de l'espèce *M. citrata* (Passannanti *et al.*, 1990).

Acide 3-épi-maslinique **P15**

1.2.9. Elucidation structurale du composé **P16**:

Le composé **P16** isolé sous forme de poudre blanche, il est invisible sur CCM sous la lumière UV (254 et 366 nm) et soluble dans le méthanol. Le spectre RMN ^1H (**Figure 89**) de ce composé ressemble à celui du composé déjà isolé des racines de la même plante le produit **P14**. Il présente à champ fort sept signaux fins attribuables aux groupements méthyles résonnant à δ_{H} 1.25 (Me-23), 0.88 (Me-24), 0.96 (Me-25), 1.08 (Me-26), 1.62 (Me-27), 1.40 (Me-29) et 1.10 (Me-30) et un massif de protons résonnant entre 0.88 à 2.34 ppm correspondant aux $-\text{CH}$ et $-\text{CH}_2$ des cinq cycles (**Figure 90**). Il montre aussi à champ faible, 4 signaux résonnant à δ_{H} 3.75, 4.29, 5.56 et 3.02 ppm correspondant respectivement aux deux protons oxyméthine H-3, H-2, un proton éthylénique H-12 et un proton méthyne H-18.

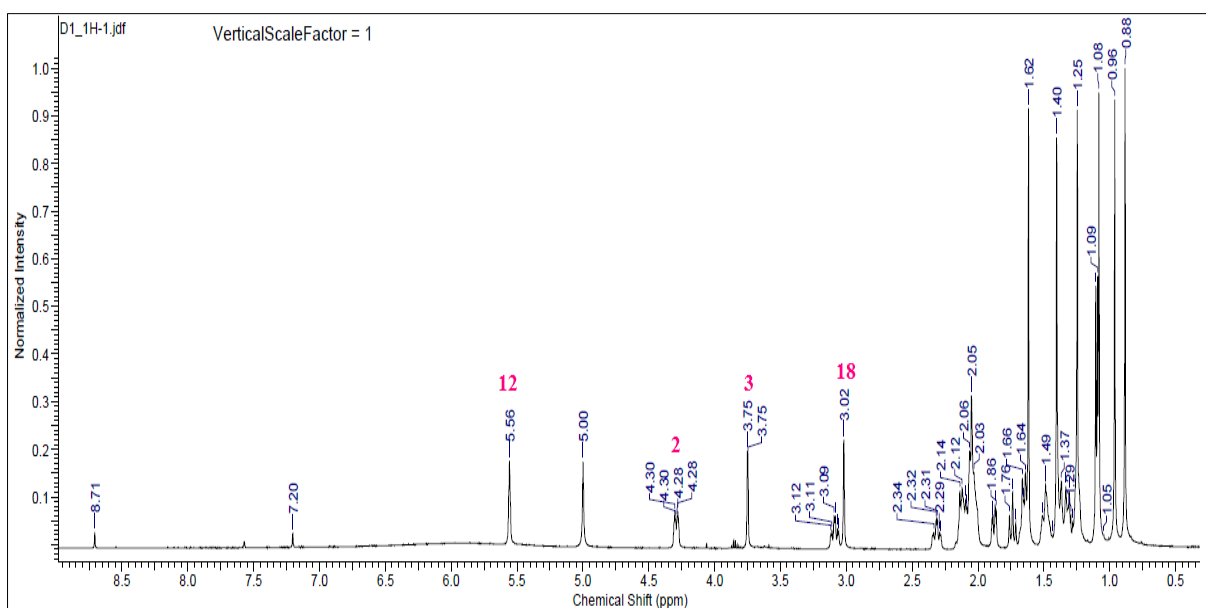


Figure 89: Spectre RMN ^1H du composé **P16**

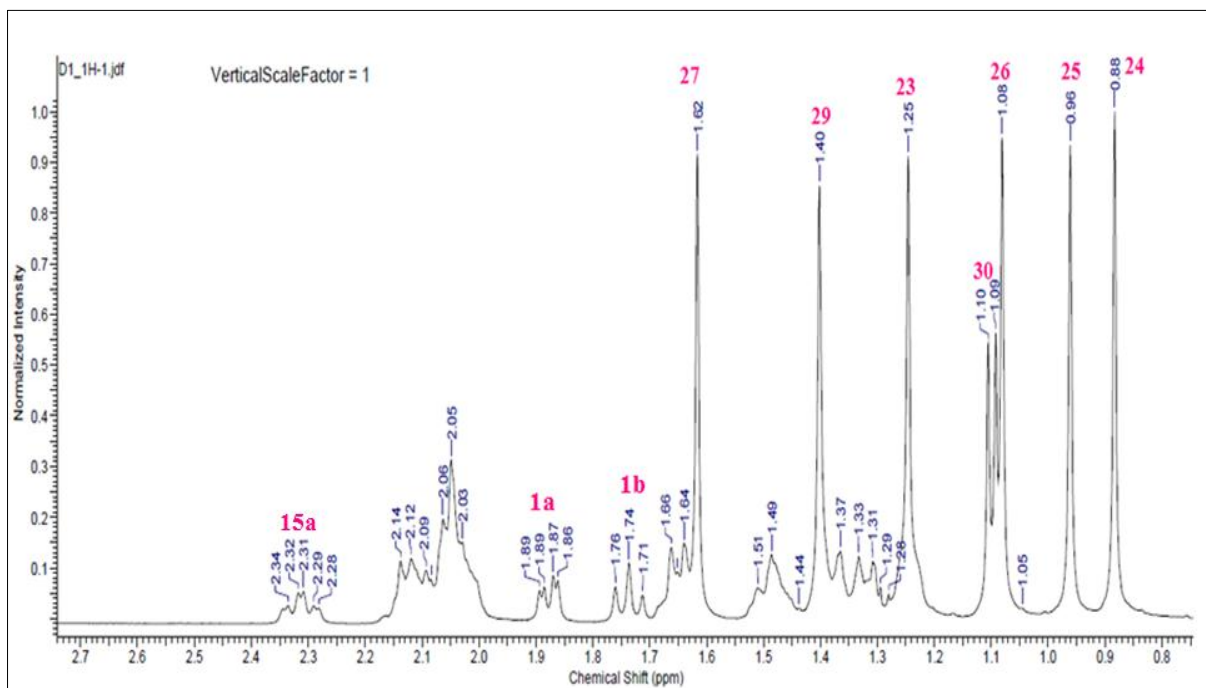


Figure 90 : Spectre RMN ^1H des méthyles du composé **P16**

Le spectre RMN ^{13}C (**Figure 91**) du produit **P16** est presque superposable avec celui de l'acide tormentique **P6**. En effet, montre dans la région blindée, 7 signaux entre 16.5 et 29.3 ppm correspondant aux sept méthyles d'un squelette triterpénique pentacyclique et dans la région déblindée, trois signaux résonnant à 127.8, 139.9 et 180.8 ppm attribuables respectivement aux carbones éthyléniques (CH-12), (CH-13) et le carbone du carbonyle C-28.

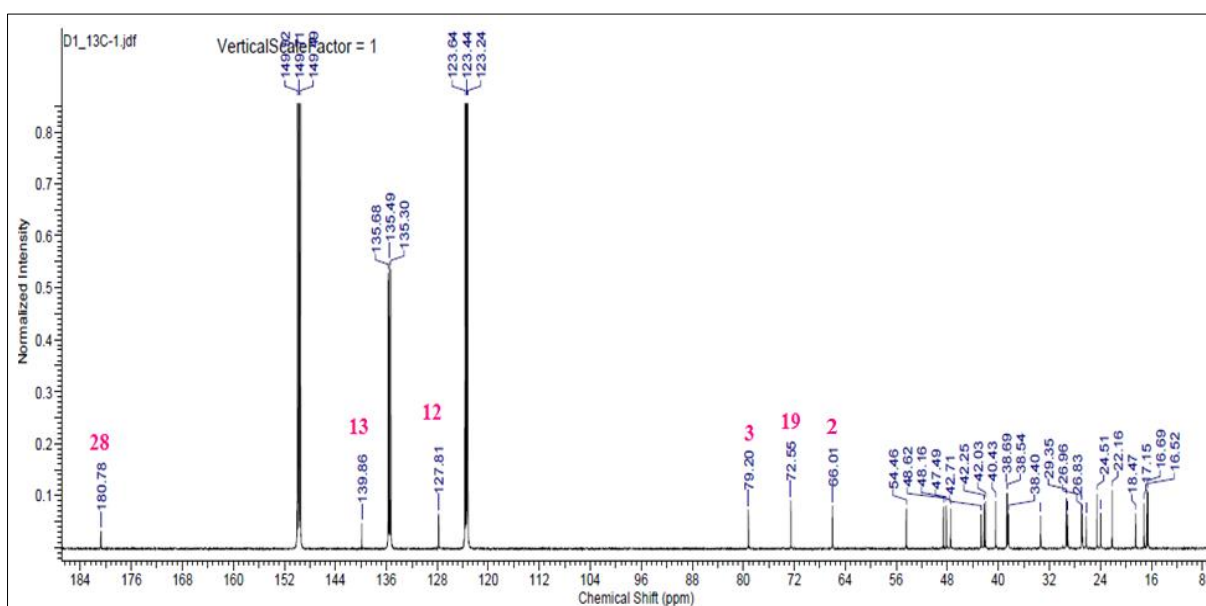


Figure 91: Spectre RMN ^{13}C du composé **P16**

A partir du proton caractéristique H-2 identifié précédemment, l'expérience COSY (**Figure 92**) montre des corrélations entre le proton H-2 avec les deux protons vicinaux H-1a et H-1b résonnant à δ_H 1.88 et 1.74 respectivement.

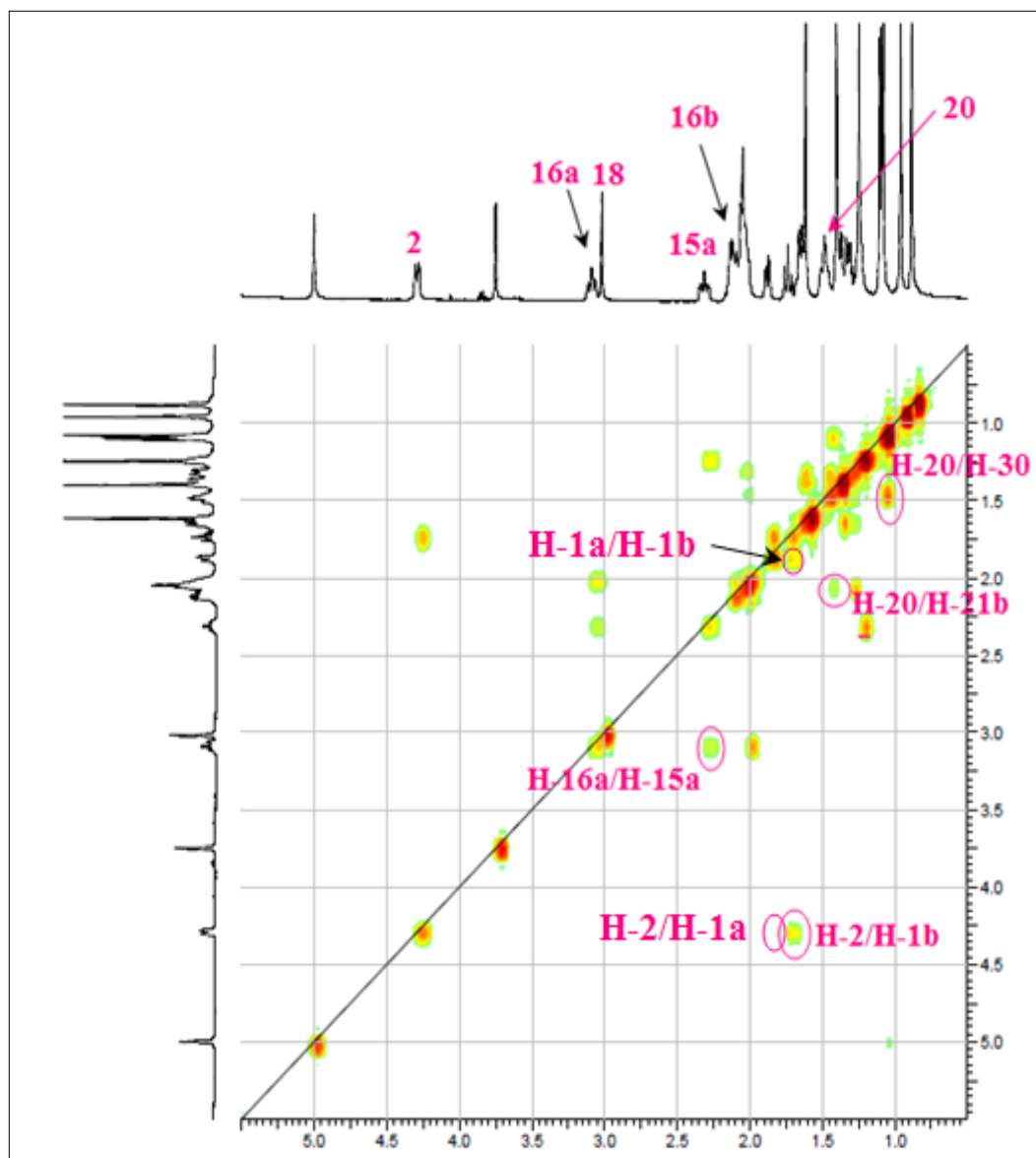


Figure 92 : Spectre COSY du composé **P16**

L'analyse des couplages hétéronucléaires $^1J_{H-C}$ les protons caractéristiques déjà signalés visualisés sur le spectre HMQC (**Figure 93**) permet d'attribuer les déplacements chimiques des carbones (**Tableau 31**) qui les portent (C-1, C-2, C-3 et C-18).

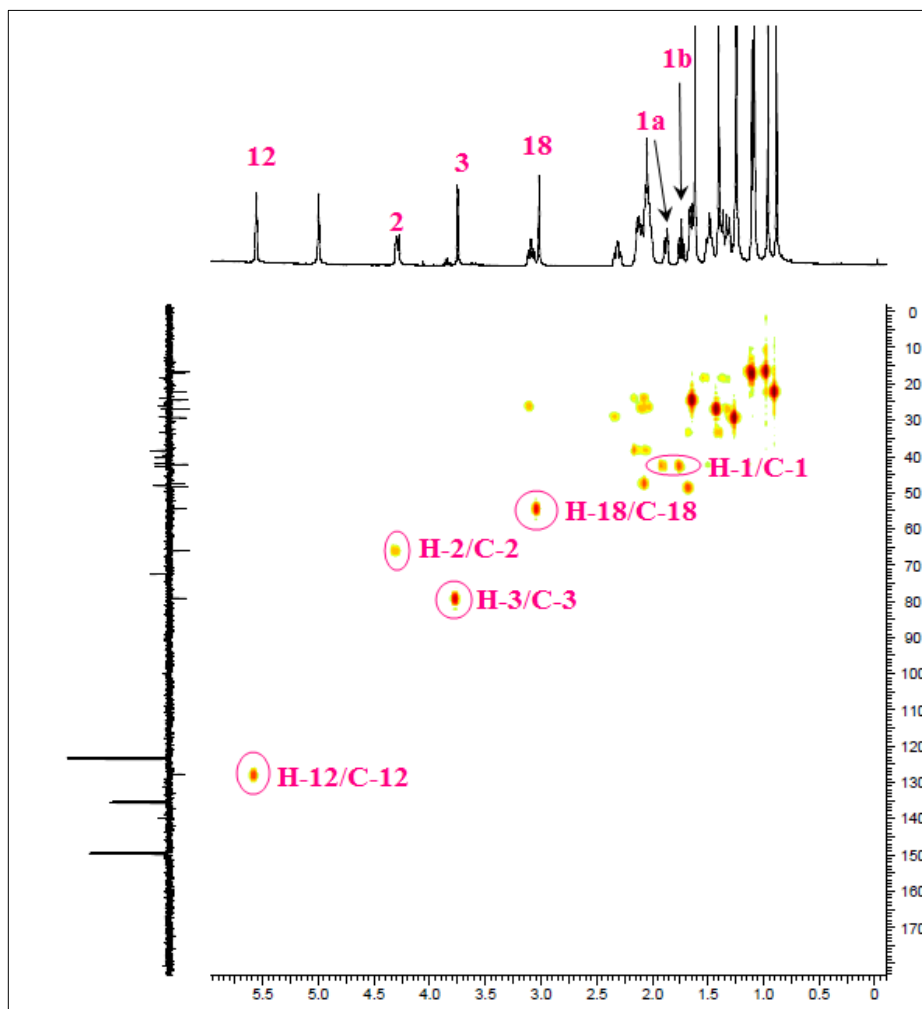


Figure 93 : Spectre HMQC du composé **P16**

L'analyse des spectres HMQC et HMBC ainsi que la comparaison avec les données spectrales de l'acide tormentique **P6** permettent d'assigner les autres protons.

A partir du proton éthylénique H-12, on observe les corrélations avec 4 carbones (**Figure 94**), résonant à δ_C 24.0, 42.0, 47.5 et 54.5 attribuable aux carbones C-11, C-14, C-9 et C-18 respectivement.

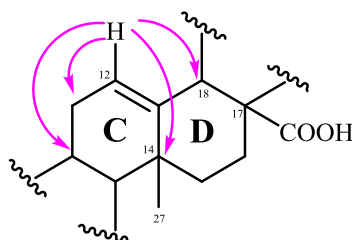


Figure 94 : Corrélations HMBC du proton H-12.

Identification des produits isolés de *Mentha aquatica*

A partir du proton H-3, on peut visualiser sur le spectre HMBC les couplages avec les carbones repérés à δ_C 22.2, 29.3, 38.5, 42.7, 48.6 et 66.0 correspondant aux carbones suivant : Me-24, Me-23, C-4, C-1, C-5 et C-2. D'autres carbones sont repérés à l'issue du spectre HMBC (**Figure 95**), C-16 (δ_C 26.2), C-20 (δ_C 42.2), C-17 (δ_C 48.2) C-19 (δ_C 72.5), C-12 (δ_C 127.9) et C-13 (δ_C 139.9) corrélient avec le proton H-18.

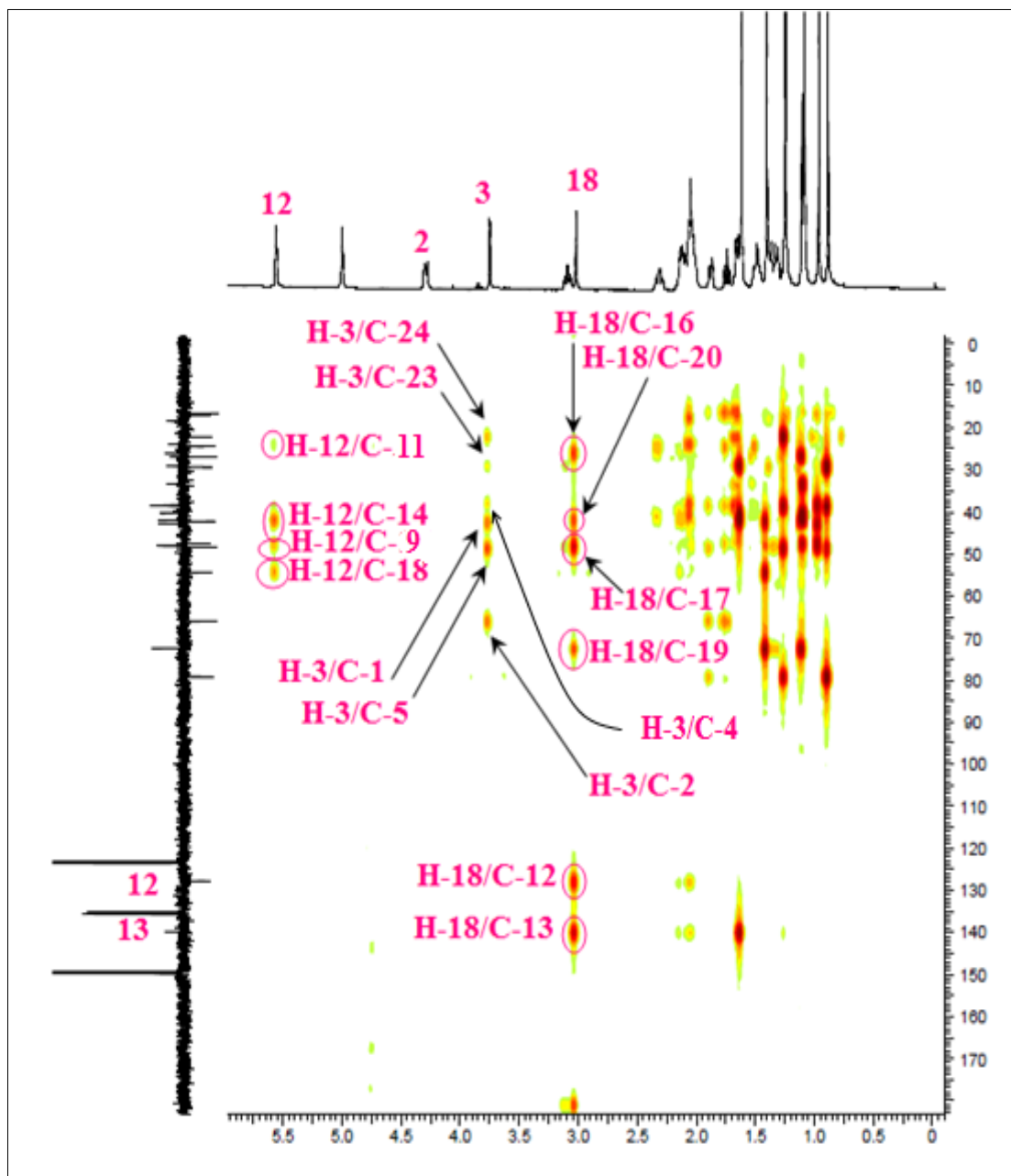


Figure 95 : Spectre HMBC du composé P16

L'analyse du spectre HMQC (**Figure 96**) permet à partir du carbone C-16 d'attribuer les protons H-16 et l'expérience COSY permet de localiser les protons H-15 puis leur carbone C-15 correspondant par analyse de leur corrélation sur le spectre HMQC.

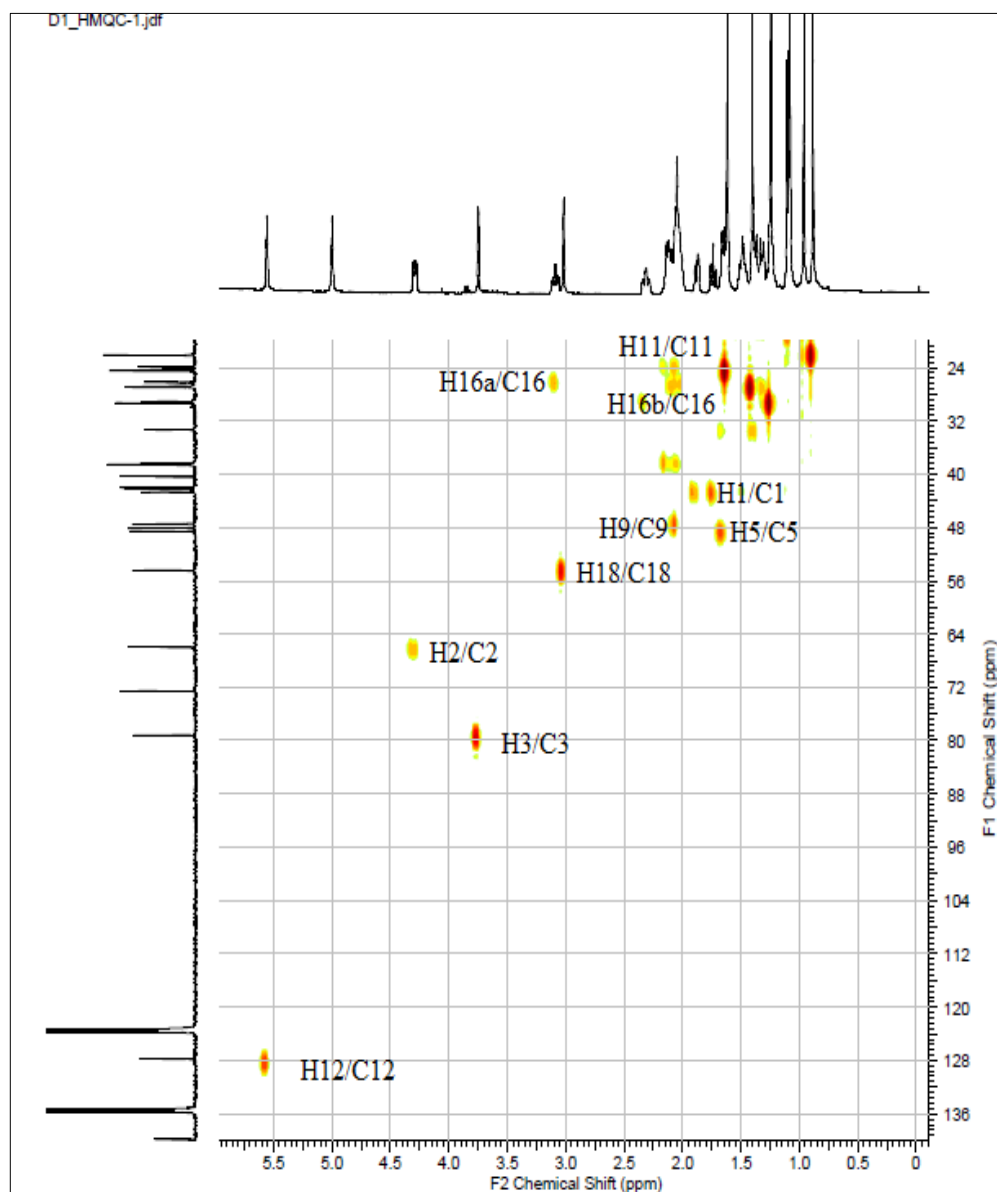


Figure 96: Spectre HMQC du composé **P16**

L'analyse de l'expérience HMBC (**Figure 97**), qui visualise les couplages entre protons et carbones distants de deux ou trois liaisons ($^2J_{H-C}$, $^3J_{H-C}$), permet l'attribution des méthyles et les autres carbones de la génine.

Dans cette expérience, les protons méthyléniques corréleront au maximum avec quatre carbones constituant le socle de la base carbonée qui les porte. Ainsi les méthyles 23 et 24 corréleront avec le carbone C-3. Ces méthyles couplent également avec le carbone quaternaire C-4 (38.5 ppm), le carbone C-5 (48.6 ppm) qui corréle aussi avec les protons méthyliques en Me-23, Me-24 et Me-25. Le carbone C-5 corréle sur le spectre HMQC avec son proton H-5 qui permet de localiser les protons H-6 et H-7 sur le spectre COSY et leurs carbones respectifs.

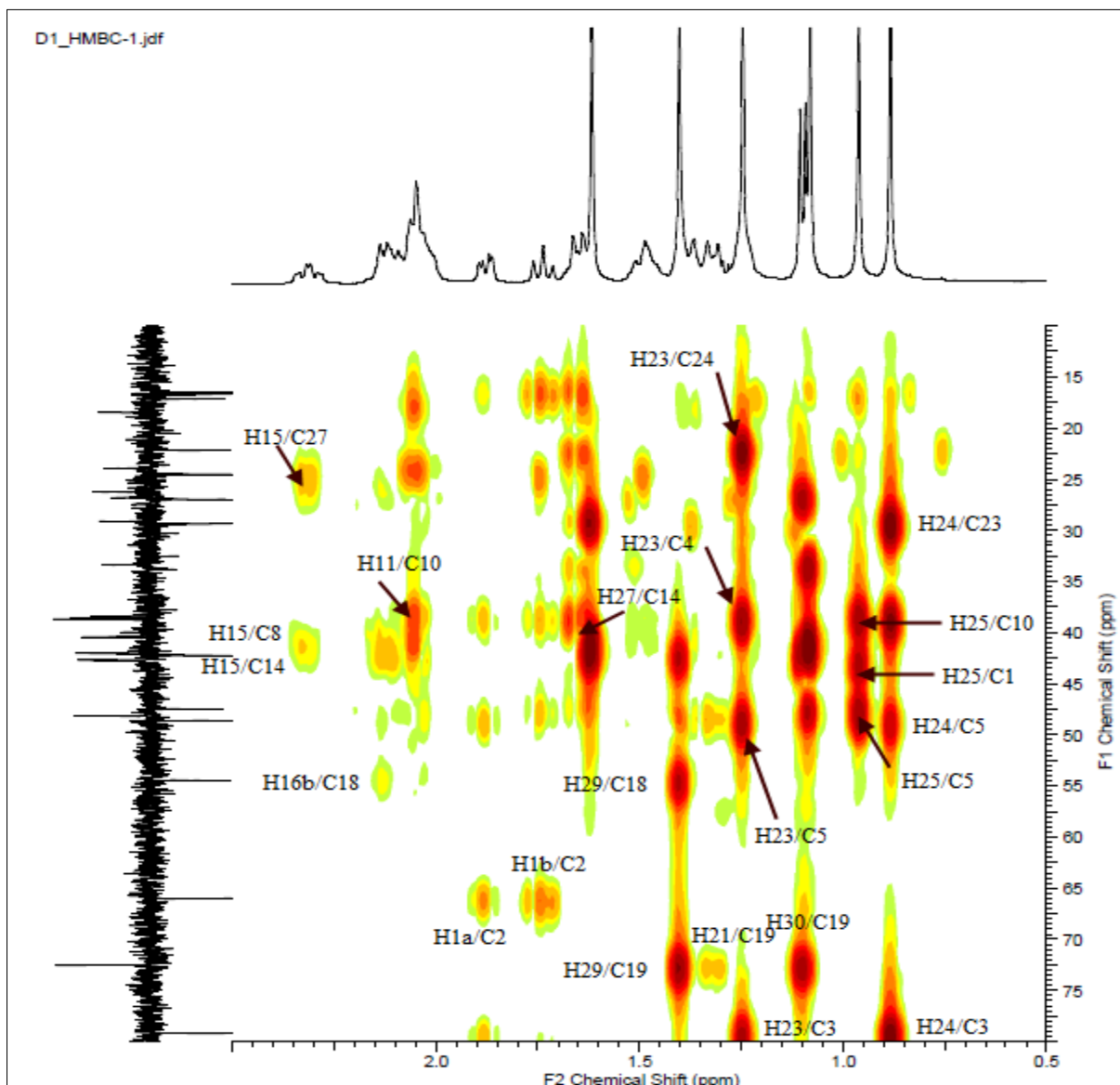


Figure 97: Spectre HMBC du composé **P16**

Le méthyle 25 couple avec les carbones C-1 (42.7 ppm), C-10 (38.7 ppm) et C-5 (48.6 ppm). La corrélation en $^3J_{H-C}$ observée toujours sur le spectre HMBC entre le méthyle-26 et le carbone C-9 (47.5 ppm), le carbone C-14 (42.0 ppm) et le carbone C-7 (33.4 ppm).

L'expérience HMBC montre les corrélations des carbones C-9 et C-10 avec un proton résonant à 1.74 ppm (t , $J = 11.9$ Hz) attribué au proton H-1. Une autre corrélation entre le proton H-15 avec deux carbones résonnant à 42.0 ppm et 24.5 ppm attribuable respectivement aux carbones C-14 et C-27.

A partir de carbone C-19 déjà identifié, on observe des corrélations sur le spectre HMBC avec des protons repérés à 1.32 ppm, 1.40 ppm et 1.10 ppm attribuables aux protons

Identification des produits isolés de *Mentha aquatica*

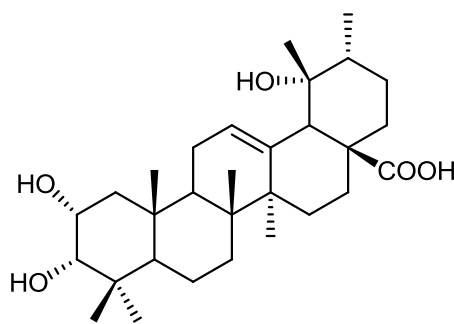
H-21b Me-29 et Me-30. D'après le spectre COSY (**Figure 92**) on peut voir la corrélation entre les protons H-21b et H-22a (δ_{H} 2.09).

Tableau 31: Déplacements chimiques en RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé **P16**

Position	δ_{H} m J (Hz)	δ_{C}	Acide 3-épi-tormentique (Kyeong <i>et al.</i> , 2014).
1	H-1a 1.88 (<i>dd</i> , 11.9, 4.1); H-1b 1.74 (<i>t</i> , 11.9)	42.7	42.0
2	4.29 (<i>dd</i> 2.0, 3.2)	66.0	66.7
3	3.75 (<i>d</i> , 2.3)	79.2	79.6
4	-	38.5	39.0
5	1.66 (<i>m</i>)	48.6	48.8
6	H-6a 1.49 (<i>m</i>); H-6b 1.37 (<i>m</i>)	18.5	18.8
7	H-7a 1.64 (<i>m</i>); H-7b 1.41 (<i>m</i>)	33.4	33.6
8	-	40.4	40.8
9	2.05 (<i>m</i>)	47.5	47.8
10	-	38.7	39.4
11	H-11a 2.09 (<i>m</i>); H-11b 2.05 (<i>m</i>)	24.0	24.2
12	5.56 (<i>sl</i>)	127.9	128.6
13	-	139.9	138.9
14	-	42.0	42.2
15	H-15a 2.31 (<i>td</i> , 13.8, 4.6); H-15b 1.23 (<i>m</i>)	29.1	29.2
16	H-16a 3.09 (<i>td</i> , 13.3, 4.6); H-16b 2.03 (<i>m</i>)	26.2	26.9
17	-	48.2	48.7
18	3.02 (<i>s</i>)	54.5	54.8
19	-	72.5	73.3
20	1.49 (<i>m</i>)	42.2	42.6
21	H-21a 2.12 (<i>m</i>), H-21b 1.32 (<i>m</i>)	26.8	26.3
22	H-22a 2.09 (<i>m</i>), H-22b 2.05 (<i>m</i>)	38.4	38.7
23	1.25 (<i>s</i>)	29.3	28.7
24	0.88 (<i>s</i>)	22.2	16.4
25	0.96 (<i>s</i>)	16.5	16.4
26	1.08 (<i>s</i>)	16.7	17.2

27	1.62 (s)	24.5	24.5
28	-	180.8	183.7
29	1.40 (s)	27.0	26.8
30	1.10 (d, 6.4)	17.1	16.2

Cette analyse spectroscopique (**Tableau 31**) permet d'attribuer la structure suivante pour ce composé : Acide 3-épi-tormentique ou acide euscaphique (Kyeong *et al.*, 2014). Il a été trouvé pour la première fois dans le genre *Mentha*. Il a été isolé de l'espèce *Perilla frutescens* var. *acuta* (Labiatae), il est connu pour son activité anticancéreuse (Kyeong *et al.*, 2014).



Composé **P16**: Acide 3-épi-tormentique

CHAPITRE 2

**Analyse GC et GC/MS de
l'huile essentielle *Thymus
dreatensis* Batt.**

Remerciements

En préambule, je souhaite rendre grâce à Dieu, le Clément et Miséricordieux de m'avoir donné la force, le courage et la patience de mener à bien ce modeste travail.

Ce travail de thèse a été réalisé entre le Laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques, Département de Chimie, Faculté des Sciences Exactes de l'Université des Frères Mentouri-Constantine, sous la direction du Professeur **Zahia KABOUCHE**.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et profonde Madame le Professeur **Zahia KABOUCHE** ma directrice de thèse pour m'avoir accueillie dans le laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques, et surtout pour la confiance qu'elle m'a accordée dans la réalisation de ce travail, sa disponibilité, ses conseils éclairés et son concours constant dans cette thèse.

Je tiens à adresser mes remerciements et exprimer ma gratitude aux membres de Jury qui ont accepté de juger ce travail malgré leurs multiples occupations :

Professeur Ahmed KABOUCHE (Université des frères Mentouri-Constantine), en qualité de président.

Professeur Salah AKKAL (Université des frères Mentouri-Constantine), en qualité d'examineur.

Professeur Ammar ZELLAGUI (Université Larbi Ben M'hidi - Oum El-Bouaghi), en qualité d'examineur.

Professeur Abdelmalik BELKHIRI (Université des frères Mentouri-Constantine), en tant qu'examineur.

Docteur Nadji BOULEBDA (Université Mohamed Chérif-Messaadia-Souk-Ahras), en qualité d'examineur.

Je tiens à remercier plus particulièrement :

Monsieur le Professeur **Hiroshi ARAYA**

Université Meiji-Japon, en m'accueillant dans son équipe, pour sa disponibilité, ses conseils, et pour m'avoir donné l'opportunité et d'avoir dirigé une partie de ce travail.

Monsieur le Professeur **Mehmet ÖZTÜRK**

Université Sitki Koçman-Turquie, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, afin de réaliser la partie biologique de ma thèse.

Je remercie mes amis de Turquie Ebru et Yunus, du Japon Naoko, Yoshiko, Higashiyama, Masahuro et Suzuna qui ont rendu cette belle aventure plus agréable. Un grand merci pour les bons moments partagés, votre bonne humeur, votre disponibilité, votre aide et soutien moral.

L'ensemble de mes collègues du laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques trouvera ici l'expression de toute ma sympathie, pour avoir su me soutenir et m'encourager au cours de ce travail.

Finalement, toute ma gratitude va à mes parents qui n'ont jamais douté de moi et qui m'ont aidée et encouragée tout au long de mes études, à mes frères et sœurs pour leur patience et leur soutien pendant la période ardue qu'est la rédaction.

A l'issue de ce travail, j'ai l'immense plaisir de remercier tous ceux qui ont permis sa réalisation dans des conditions exceptionnelles.

2.1. Composition chimique de l'huile essentielle de *Thymus dreatensis* Batt.

La GC et GC/MS de l'huile essentielle a été analysée par chromatographie gazeuse selon la méthode précédemment expliquée. Au total 35 composés ont été identifiés, ce qui correspond à un pourcentage de 97,4% par rapport à l'ensemble des constituants. D'après le **Tableau 32**, on peut observer que l'huile essentielle de *Thymus dreatensis* est principalement constituée de :

- Monoterpène phénolique: le thymol (28.1%).
- Monoterpène monocyclique hydrocarboné: le γ - terpinène (18.7%).
- Composé aromatique: le *p*- cymène (8.8%).
- Ether : Thymyl méthyl éther (10.9%).
- Alcool acyclique : le linalol (5.0%).

Tableau 32 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Thymus dreatensis* Batt.

Composé	RRI	%
α -Thujène	929	0.1
α -Pinène	938	1.8
Camphene	951	1.4
Sabinène	974	0.3
β -Pinène	977	0.6
3-Octanone	985	0.3
β -Myrcène	989	1.3
3-Octanol	991	0.1
α -Phellandrène	1003	0.5
δ -3-Carène	1009	0.1
α -Terpinène	1016	3.0
<i>p</i>-Cymène	1025	<u>8.8</u>
Limonène	1030	1.1
1,8-Cinéol	1032	0.4
γ-Terpinène	1064	<u>18.7</u>
<i>Trans</i> -Sabinene hydrate	1095	0.8
Linalool	1100	<u>5.0</u>
<i>Trans</i> -Pinocarveol	1141	0.1
Camphor	1147	0.4
Bornéol	1169	4.1
4-Terpinéol	1181	0.5
<i>p</i> -Cymèn-8-ol	1189	0.1
α -Terpinéol	1192	1.0
<i>Cis</i> -Dihydrocarvone	1200	0.1
Thymyl méthyl éther	1241	<u>10.9</u>
Carvacrol méthyl éther	1249	0.2
Thymol	1294	<u>28.1</u>

Carvacrol	1303	2.9
β -Caryophyllène	1410	2.8
β -Silinène	1491	0.1
β -Bisabolène	1514	0.8
δ -Cadinène	1531	0.2
Caryophyllène oxide	1592	0.4
β -Eudesmol	1661	0.1
α -Cadinol	1671	0.2

RRI : relative retention indices

2.2. Discussion

Il apparaît que le thymol est un marqueur du genre *Thymus* puisqu'il est trouvé en quantité majoritaire dans un très grand nombre d'espèces citées dans l'aperçu bibliographique précédemment décrit (Partie 1, Chapitre 3).

Les huiles essentielles de plusieurs espèces du genre *Thymus* poussant en Algérie sont regroupées dans le tableau 33.

Tableau 33 : Composition chimique de quelques huiles essentielles poussant en Algérie

Composé (%)	<i>T. fontanesii</i> Kabouche <i>et al.</i> , 2005	<i>T. ciliatus</i> Kabouche <i>et al.</i> , 2009	<i>T. ciliatus</i> Ghorab <i>et al.</i> , 2013	<i>T. numidicus</i> Kabouche A <i>et al.</i> , 2005	<i>T. numidicus</i> Zeghib <i>et al.</i> , 2013	<i>T. guyoni</i> Lehbili <i>et al.</i> , 2013	<i>T. numidicus</i> Zellagui <i>et al.</i> , 2014
Thymol	67.8	79.1	54.9	68.2	23.9	19.5	41.2
Carvacrol	-	-	-	16.9	6.0	55.5	
<i>p</i> -Cymène	13.0	5.6	6.6	-	-	6.2	
γ -Terpinène	15.0	-	11.3	-	-	-	
Linalool				11.5	17.2	-	10.7
O-Cymène					11.4	-	
β -Cymène							12.9
Chlorocresol							11.2

La composition de la présente huile est proche de l'espèce *Thymus* poussant à Constantine, *T. numidicus* (Kabouche *et al.*, 2005) qui est majoritairement composée du thymol (68.2%, 54.9%), carvacrol (16.9%,) suivis par le linalool (11.5 %). *T. ciliatus* (Ghorab *et al.*, 2013) et *T. fontanesii* (Kabouche *et al.*, 2005) sont riches en thymol, *p*-cymène et γ -terpinène. L'espèce *T. numidicus* (Kabouche *et al.*, 2005; Zeghib *et al.*, 2013; Zellagui *et al.*, 2014) contient du linalool (11.5%, 17.2 %, 10.7% respectivement) par rapport aux autres espèces.

D'autre part, il faut signaler que le thymyl méthyl éther paraît être exclusif, comme composant majoritaire. Le thymol et le γ -terpinène sont les constituants principaux de l'huile

essentielle de *T. dreatensis*, ces composés sont présent dans plusieurs huiles essentielles du genre *Thymus*. Plusieurs espèces du genre *Thymus* sont caractérisées par la présence de thymol et γ -terpinène, le tableau 34 regroupe quelques espèces :

Tableau 34 : Composition chimique de quelques huiles essentielles avec thymol/ γ -terpinène

Composé (%)	<i>T. numidicus</i> (Louer <i>et al.</i> , 2009)	<i>T. fontanessi</i> (Dob <i>et al.</i> , 2006)	<i>T. daenensis</i> (Barazandeh <i>et al.</i> , 2007)	<i>T. persicus</i> (Meshkatsadat <i>et al.</i> , 2006)	<i>T. carmanicus</i> (Nejad <i>et al.</i> , 2008)	<i>T. linearis</i> (Verma <i>et al.</i> , 2010)	<i>T. zygoides</i> (Tzakou <i>et al.</i> , 2008)
Thymol	68.0	29.3	51.3	10.3	6.0	66.6	19.5
Carvacrol	-	-	9.2	25.7	68.0	-	-
<i>p</i> -cymène	5.8	15.9	7.6	-	8.9	21.6	19.4
γ -terpinène	8.5	21.7	10.1	5.6	8.0	12.4	17.2

D'après le tableau 34, la composition des différentes huiles essentielles provenant de pays différents, de l'Algérie (*T. numidicus*, *T. fontanessi*), d'Iran (*T. daenensis*, *T. persicus*, *T. carmanicus*), d'Inde (*T. linearis*) et de la Grèce (*T. zygoides*), peuvent être identiques.

L'étude comparative des compositions des huiles essentielles de genre *Thymus* permet de conclure que le thymol est un marqueur du genre.

CHAPITRE 3

Dosage des polyphénols, screening chimique et activités biologiques

3.1. Dosage des polyphénols

La détermination de la teneur en phénols totaux des extraits bruts de *S. guyoniana* et *M. aquatica* a été faite en utilisant la méthode colorimétrique (Folin-Ciocalteux). La teneur en polyphénols des extraits : *n*-butanol (EBSG), acétate d'éthyle (EASG) de la plante *S. guyoniana*, méthanol (MEMA), méthanol (racines) (EMRMA) de l'espèce *M. aquatica* varie entre 45.77 ± 0.80 et 354.91 ± 1.70 mg/g de matière sèche (**Tableau 35**). Les résultats montrent que tous les extraits de la plantes *S. guyoniana* sont riches en polyphénols en comparant avec ceux de *M. aquatica*. En effet, les extraits EBSG et EASG de *S. guyoniana* sont les plus riches en polyphénols (300.50 ± 0.90 mg/g, 354.91 ± 1.70 mg/g).

Tableau 35 : Teneur en phénols totaux des plantes *S. guyoniana* et *M. aquatica*

Plantes	Extraits	Teneur en phénols totaux (mg /g) ^a
<i>Stachys guyoniana</i> Partie aérienne	EBSG	354.91 ± 1.70
	EESG	300.50 ± 0.90
<i>Mentha aquatica</i> Partie aérienne	EMMA	58.05 ± 2.20
<i>Mentha aquatica</i> (racines)	EMRMA	45.77 ± 0.80
Thé vert (Sun <i>et al.</i> , 2011)		400

On retrouve amplement les polyphénols dans notre régime alimentaire (Manach *et al.*, 2004), ce sont également des antioxydants les plus abondants dans notre alimentation (Tapiero *et al.*, 2002). Les fruits, les légumes, les noix, le vin, les oignons et le thé sont des sources importantes (Motilva *et al.*, 2013). Les feuilles de thé vert contiennent environ 36% de polyphénols (Perva-Uzunalic *et al.*, 2006) qui sont des flavanols et des flavonols. Ils constituent 16 à 30% du poids sec de la feuille fraîche. Parmi les flavanols, les flavan-3-ol, qui sont également connus sous le nom de catéchines, représentent les constituants polyphénoliques majoritaires (Komes *et al.*, 2010). Le thé vert contient 30% de flavonoïdes et le thé noir en contient 10% dans les feuilles sèches (Wang *et al.*, 2000). Il apparaît que *Stachys guyoniana* a une teneur en phénols totaux plus proche de celle du thé vert.

Une étude sur plusieurs espèces du genre *Stachys* des extraits méthanol, présente la richesse en polyphénols de l'espèce *S. trinervis* (430.58 mg/g) et *S. fruticulosa* (4450.36 mg/g) (Khanavi *et al.*, 2009). Ces deux valeurs sont supérieures à celle de *S. guyoniana*.

L'extrait acétate d'éthyle de *Mentha pulegium* L. semble être le plus riche en polyphénols (191.99 µg/g) en comparant avec les extraits MeOH et CHCl₃ (183.45 µg/g, 119,73 µg/g respectivement) (Khennouf *et al.*, 2013). D'après les valeurs de ce dosage la plante étudiée *Mentha aquatica* est plus riche en polyphénols que *Mentha pulegium* L.

3.2. Screening chimique

Le screening chimique que nous avons effectué sur les deux plantes étudiées (**Tableau 36**) a montré la présence de flavonoïdes dans les extraits polaires EBSG et EASG de la plante *S. guyoniana* alors que les extraits de *M. aquatica* et l'extrait CHCl₃ de *S. guyoniana* (ECSG) ont donné un résultat négatif avec ce test. Cependant, *M. aquatica* semble être riche en stéroïdes et triterpènes dans les extraits méthanol des parties aériennes (EMMA), l'extrait acétone des racines (EARMA) et l'extrait chloroforme des parties aériennes (ECMA).

Tableau 36 : Screening chimique de *S. guoyoniana* et *M. aquatica*

Extraits	Flavonoïdes	Stéroïdes et triterpènes
	Test chlorure ferrique	Test de Liebermann Burchard
EBSG	++	+
EASG	++	+
ECSG	ND ^a	++
EMMA	ND	++
ECMA	ND	++
EMRMA	ND	++
EARMA	ND	++

^a: non détecté

Par ailleurs, l'étude phytochimique a conduit à l'isolement de plusieurs composés triterpéniques purs à partir des parties aériennes et racines de *M. aquatica*. De plus, ce screening est en accord avec le taux des polyphénols de la plante *S. guyoniana* par sa richesse en flavonoïdes. Les plantes du genre *Stachys* sont connues pour leurs métabolites secondaires comme : flavonoïdes, diterpènes, phényléthanoides glucosylés (Lakhal *et al.*, 2011) ce qui a été confirmé par les test des flavonoïdes.

D'autre part, d'après les investigations des principaux métabolites secondaires du genre *Mentha*, ce dernier est constitué de flavonoïdes (Furkan *et al.*, 2012, El-Deosky *et al.*, 2001) et terpènes (Passannanti *et al.*, 1990).

3.3. Activité Antioxydante de l'huile essentielle de *Thymus dreatensis* Batt.

Dans les plantes de la famille des Lamiaceae, la présence du thymol est généralement accompagnée par son isomère carvacrol, qui sont biologiquement actifs (Menphini *et al.*, 1993). D'après les résultats de l'activité antioxydante obtenus, l'huile essentielle de *Thymus dreatensis* montre une grande activité inhibitrice 75.9% (2 mg/mL) et 82.64% (4 mg/mL) qui est supérieure à celle du standard (vitamine E) 73.9% (2 mg/mL) et 80.5% (4 mg/mL) avec le β -carotène/acide linoléique. L'huile essentielle est majoritairement composée de thymol (28,1%), γ -terpinène (18,7%), de thymyl méthyl éther (10,9%) et de linalool (5,0%). Il a été prouvé que le thymol (Marina *et al.*, 2014), le thymyl méthyl éther (Kim-Chung *et al.*, 2012) et le linalool (Guen-Hye *et al.*, 2016) ont un potentiel antioxydant. On peut attribuer cette activité antioxydante au thymol et au γ -terpinène représentant les composés majeurs de l'huile essentielle de *Thymus dreatensis* et, d'autre part, à l'effet de synergie de composés polaires minoritaires.

L'huile essentielle de *Thymus numidicus* Poiret (Zeghib *et al.*, 2013) poussant en Algérie (Constantine) est caractérisée par la présence de thymol (23.9%), linalool (17.2%), O-cymène (11.4%), γ -terpinène (10.8%), thymol méthyl éther (6.7 %) et du carvacrol (6.1%). Cette huile essentielle a présenté une activité antioxydante avec la méthode de blanchissement du β -carotène. Une autre huile essentielle de l'espèce *Thymus guyonii* de Noë (Lehbili *et al.*, 2013) a présenté une activité antioxydante avec le β -carotène, avec sa composition riche en carvacrol (55.5%), thymol (19.5 %) et *p*-cymène (6.2%). la composition de ces huiles est proche de celle de l'huile étudiée. Par ailleurs, l'huile essentielle de l'espèce *T. caramanicus* Jalas, majoritairement composée de carvacrol (85.9%), présente une activité antioxydante (IC₅₀: 79.03 \pm 0.54 μ g/mL) proche de celle du standard BHT (IC₅₀: 98.26 \pm 0.80 μ g/mL) (Safaei-Ghomi *et al.*, 2009). On peut conclure que l'activité antioxydante des huiles essentielles du genre *Thymus* est liée à l'effet des composants majoritaires: thymol, carvacrol, *p*-cymène,... et à des effets de synergie.

3.4. Activité antioxydante des extraits de *Stachys guyoniana* de Noé et *Mentha aquatica* L.

Il existe plusieurs méthodes pour déterminer l'activité antioxydante. Dans cette étude, les propriétés antioxydantes des extraits EBSG, EASG, ECSG, EMMA, ECMA, EMRMA,

et EARMA ont été déterminées par cinq essais complémentaires, à savoir, le blanchissement du β -carotène, l'inhibition des radicaux DPPH[•] et ABTS^{•+} et le test de réduction CUPRAC et par chélation des ions ferreux. Les résultats, sauf pour le dosage CUPRAC, ont été enregistrés à la concentration 50% d'inhibition (IC₅₀). L'activité antioxydante des extraits testés a été comparée à celles des standards (α -tocophérol, le BHA et de l'EDTA).

3.4.1. Activité de blanchissement du β -carotène

Les résultats de blanchissement du β -carotène sont représentés par les valeurs de la concentration d'inhibition de 50% (**Tableau 37**). Les valeurs des IC₅₀ exprimées en $\mu\text{g}/\text{mL}$ calculées graphiquement à partir des droites de régression obtenues, représentent les pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de chaque extrait testé. L' α -tocophérol et le BHA sont utilisés comme standard.

Tableau 37 : Pouvoir d'inhibition IC₅₀ des extraits étudiés sur le β -carotène/acide linoléique.

Plantes	Extraits	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	IC ₅₀ de l' α -tocophérol ^a ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	IC ₅₀ du BHA ^a ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
<i>Stachys guyoniana</i>	EBSG	ND ^b	2.10±0.08	1.34±0.04
	EASG	3.15±0.75		
	ECSG	2.3±1.27		
<i>Mentha aquatica</i>	EMMA	ND		
	ECMA	8.69±0.7		
	EMRMA	ND		
	EARMA	9.28±0.32		

^a : Standard, BHA : butylatedhydroxyl anisole, ^b : Non déterminé.

Les extraits testés EBSG, EMMA et EMRMA n'ont montré aucune activité de blanchissement du β -carotène, par contre l'ECSG était plus actif avec une IC₅₀= 2.3±1.27 $\mu\text{g}/\text{mL}$ qui est proche de celle du standard le BHA (IC₅₀=2.10±0.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Le classement des autres extraits selon leur activité est le suivant : EASG (IC₅₀= 3.15±0.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$) > ECMA (IC₅₀= 8.69±0.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$) > EARMA (IC₅₀= 9.28±0.32 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Mentha pulegium a montré une activité antioxydante de blanchissement du β -carotène de l'extrait aqueux (91.67 %) et méthanol (60.38%) en comparant avec le BHT (89.35%) (Kamkar *et al.*, 2010).

L'extrait éthanol de l'espèce *S. glutinosa* L. possède une activité antioxydante modérée avec la méthode de blanchissement du β -carotène de l'ordre ($IC_{50} = 0.12 \pm 0.03$ mg) (Leporini *et al.*, 2014).

D'après les tests du blanchissement du β -carotène, effectués sur les deux genres *Stachys* et *Mentha*, comparativement à nos résultats, on peut conclure que les extraits de *S. guyoniana* (EASG, ECSG) ont un potentiel plus antioxydant que les extraits de *M. aquatica* (ECMA, EARMA).

3.4.2. Activité anti-radicalaire DPPH'

Tous les extraits de la plante *S. guyoniana* ont un pouvoir anti-radicalaire vis-à-vis du DPPH' (Tableau 38). L'extrait EBSG a présenté une meilleure activité antiradicalaire ($IC_{50} = 2.91 \pm 0.14$ $\mu\text{g/mL}$), même supérieure à celle du standard l' α -tocophérol ($IC_{50} = 7.31 \pm 0.17$ $\mu\text{g/mL}$). L'extrait EASG a aussi manifesté une bonne activité en comparant avec l' α -tocophérol. Par contre, *Mentha aquatica* n'a montré aucune activité anti-radicalaire vis à vis du DPPH'.

Tableau 38 : Pouvoir anti-radicalaire (DPPH') des extraits étudiés

Plantes	Extraits	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	IC_{50} de l' α -tocophérol ($\mu\text{g/mL}$)	IC_{50} du BHA ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Stachys guyoniana</i>	EBSG	2.91 ± 0.14	7.31 ± 0.17	45.37 ± 0.47
	EASG	5.53 ± 1.02		
	ECSG	35.76 ± 1.06		
<i>Mentha aquatica</i>	EMMA	ND		
	ECMA	ND		
	EMRMA	ND		
	EARMA	ND		

Les concentrations d'inhibition du radical DPPH révèlent que l'extrait EBSG possède des propriétés antioxydantes intéressantes.

D'autres espèces du genre *Stachys* ont été testées pour leur pouvoir anti-radicalaire vis à vis du DPPH', *S. anisochila*, *S. beckeana*, *S. plumosa* et *S. alpina* ssp. *dinarica*, leurs IC_{50} sont respectivement : 17.90 $\mu\text{g/mL}$, 20.90 $\mu\text{g/mL}$, 101.61 $\mu\text{g/mL}$ et 26.14 $\mu\text{g/mL}$. Tous les extraits ($IC_{50} < 50$ $\mu\text{g/mL}$) ont montré une activité antioxydante à l'exception de *S. plumosa* (Kukic *et al.*, 2006). Par ailleurs, *Stachys inflata* a manifesté un pouvoir "scavenger" du

DPPH[•] des deux extraits polaires, aqueux (IC₅₀: 32.1±0.15 %) et méthanol (IC₅₀: 48.3±0.15 %) (Eghdami *et al.*, 2011).

D'autre part, le potentiel antioxydant de *Mentha pulegium* des extraits aqueux (IC₅₀= 5.5 µg/mL) et méthanol (IC₅₀= 6.1 µg/mL) a été comparé avec celui du standard BHT (IC₅₀= 4.9 µg/mL), montrant la forte activité de l'extrait aqueux de cette plante, due à la richesse des plantes du genre *Stachys* en polyphénols (Kamkar *et al.*, 2010).

L'évaluation du potentiel antioxydant des espèces du genre *Mentha* vis à vis du DPPH[•] montre que l'espèce *M. piperita* a le plus grand pouvoir antioxydant (IC₅₀= 13.12 µg/mL) suivie par *M. pulegium* (IC₅₀= 17.92 µg/mL), *M. rotundifolia* (IC₅₀= 21.71 µg/mL), *M. longifolia* (IC₅₀= 24.07 µg/mL) et *M. spicata* (IC₅₀= 87.89 µg/mL) (Nickavar *et al.*, 2008).

3.4.3. Essai de décoloration du radical cation ABTS^{•+}

L'extrait EARMA (IC₅₀: 4.21±0.28 µg/mL) a montré une excellente activité d'inhibition du radical ABTS, qui est proche de celle de l'α-tocophérol et du BHA et est supérieure à celles des extraits ECMA (IC₅₀: 5.38±0.14 µg/mL) et ECGS (IC₅₀: 7.29±0.23 µg/mL). Cependant, les autres extraits : EMMA, EMRMA, EBSG et AESG ont manifesté une activité inhibitrice du radical ABTS inférieure à celle des deux standards (17 fois pour EMMA, 15 fois pour EMRMA, 7 fois pour EBSG et 5 fois pour EASG) (**Tableau 39**).

Les résultats obtenus montrent que seul extrait le plus actif est celui des racines EARMA suivi par ECMA de la plante *Mentha aquatica*. Par ailleurs, l'étude phytochimique de *M. aquatica* a conduit à l'isolement de plusieurs triterpènes à partir de l'extrait EARMA. Ces triterpènes sont des acides : ursolique, tormentique, hyptadiénique,... De même, l'extrait ECMA contient les triterpènes acides: ursolique, oléanolique et d'autres. La composition des deux extraits est presque identique, ce qui a donné une activité similaire avec l'essai de décoloration du radical cation ABTS^{•+}.

Tableau 39 : Pouvoir d'inhibition de l'ABTS^{•+} par les extraits étudiés

Plantes	Extraits	IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ de l'α-tocophérol (µg/mL)	IC ₅₀ du BHA (µg/mL)
<i>Stachys guyoniana</i>	EBSG	29.08±1.29	4.31±0.10	4.10±0.06
	EASG	21.57±1.43		
	ECSG	7.29±0,23		
<i>Mentha aquatica</i>	EMMA	68.99±0.15		

	ECMA	5.38±0.14		
	EMRMA	51.07±0.85		
	EARMA	4.21±0.28		

L'espèce *M. pulegium* (Alposy *et al.*, 2011) a une activité moyenne avec l'ABTS malgré sa composition en polyphénols, cette activité n'est pas spécifique à ces composés, qui peuvent réagir avec les réactifs pour donner des concentrations élevées des composés phénoliques (Prior *et al.*, 2005).

3.4.4. La réduction cuprique (CUPRAC)

L'extrait EBSG a manifesté une forte activité inhibitrice du CUPRAC ($A_{0.50} = 0.15 \pm 0.05 \mu\text{g/mL}$) qui est meilleure que celle des deux standards utilisés. Le classement des extraits testés comparativement avec les deux témoins, l' α -tocophérol et le BHA selon leur activité antioxydante par ordre décroissant est comme suit :

EBSG ($0.15 \mu\text{g/mL}$) > EMRMA ($0.49 \mu\text{g/mL}$) > EASG ($2.28 \mu\text{g/mL}$) > ECSG ($3.85 \mu\text{g/mL}$) (Tableau 40).

Tableau 40 : Inhibition du CUPRAC par les extraits étudiés

Plantes	Extraits	$A_{0,5}$ ($\mu\text{g/mL}$)	$A_{0,5}$ de l' α -tocophérol ($\mu\text{g/mL}$)	$A_{0,5}$ du BHA ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Stachys guyoniana</i>	EBSG	0.15 ± 0.05	0.54 ± 0.01	1.41 ± 0.7
	EASG	2.28 ± 0.01		
	ECSG	3.85 ± 0.20		
<i>Mentha aquatica</i>	EMMA	ND		
	ECMA	ND		
	EMRMA	0.49 ± 0.01		
	EARMA	ND		

$A_{0.50}$: la concentration à l'absorbance 0,5.

D'après ce classement, on remarque que l'extrait EMRMA a une activité meilleure que celles des extraits EASG et ECSG. L'extrait EMRMA est très riche en triterpène par contre l'extrait EASG est riche en polyphénols. Les triterpènes présents dans *M. aquatica* sont probablement responsables de l'inhibition du CUPRAC.

M. pulegium (Alposy *et al.*, 2011) et *S. thymphaea* (Tusevski *et al.*, 2014) ont manifesté une activité antioxydante moyenne (2.26 ± 0.01 mmol/g, 130.30 ± 1.43 μ mol/g respectivement) dans le test du CUPRAC.

3.4.5. Chélation des ions ferreux

La capacité à la chélation des métaux pour les extraits étudiés a été évaluée par rapport aux valeurs de la concentration d'inhibition du standard EDTA (**Tableau 41**).

Un seul extrait parmi les 7 extraits étudiés a montré une activité de chélation du métal, c'est l'EBSG.

Tableau 41: Pouvoir d'inhibition IC_{50} des extraits étudiés sur les ions chélates

Plantes	Extraits	IC_{50} (μ g/mL)	IC_{50} de l'EDTA ^a (μ g/mL)
<i>Stachys guyoniana</i>	EBSG	0.48 ± 1.71	92.5 \pm 1.4
	EASG	ND	
	ECSG	ND	
<i>Mentha aquatica</i>	EMMA	ND	
	ECMA	ND	
	EMRMA	ND	
	EARMA	ND	

^a: Ethylenediaminetetraacetic acid

La capacité à la chélation des métaux pour l'extrait méthanol de *Mentha arvensis* L. peut être attribuée à des agents de chélation qui sont généralement des phénols (Oresh *et al.*, 2005; Senevirathne *et al.*, 2006). Cette activité est de l'ordre de 9.93 % à 100 μ g/mL alors que celle du standard (acide ascorbique) est de 39.0 % à la concentration de 500 μ g/mL (Dar *et al.*, 2014).

Par ailleurs, *Stachys mardinensis* a présenté un taux élevé de composés phénoliques (225.1 mg/g) et une bonne capacité à la chélation des métaux avec une $IC_{50} = 6.68$ mg/mL (Karaboduk *et al.*, 2014).

Cependant, contrairement à ces résultats l'EBSG possède une très faible activité de chélation du métal, malgré sa richesse en polyphénols, ceci peut être lié à la nature des polyphénols.

Activités biologiques, dosage des polyphénols et screening chimique

De ces résultats d'étude de l'activité antioxydante, par les 5 méthodes complémentaires, il apparaît que :

- ✓ **Avec le test du β -carotène/acide linoléique:** l'activité la plus élevée a été présentée par l'ECSG (IC_{50} : $2.3 \pm 1.27 \mu\text{g/mL}$) suivi de l'EASG (IC_{50} : $3.15 \pm 0.75 \mu\text{g/mL}$).
- ✓ **Avec le DPPH^{*}:** les extraits de *M. aquatica* étaient tous inactifs cependant, *S. guyoniana* présentait une excellente activité où les extraits EBSG et EASG (IC_{50} : 2.91 ± 0.14 et IC_{50} : $5.53 \pm 1.02 \mu\text{g/mL}$, respectivement) ont montré une activité plus élevée que le standard α -tocophérol (IC_{50} : $7.31 \pm 0.17 \mu\text{g/mL}$). L'extrait le moins actif, ECSG (IC_{50} : $35.76 \pm 1.06 \mu\text{g/mL}$), était plus actif que le standard BHA (IC_{50} : $45.37 \pm 0.47 \mu\text{g/mL}$). Les extraits polaires de *S. guyoniana* EBSG ($354.91 \pm 1.70 \text{ mg/g}$) et l'EASG ($300.50 \pm 0.90 \text{ mg/g}$) ont été trouvés les plus riches en polyphénols qui sont probablement responsables du taux élevé d'inhibition du radical DPPH^{*}, contrairement aux extraits de *M. aquatica* (EMMA: $58.05 \pm 2.20 \text{ mg/g}$ et EMRMA: $45.77 \pm 0.80 \text{ mg/g}$) qui présentent une teneur plus faible en polyphénols. Il n'est pas à démontrer que le rôle d'antioxydants naturels des polyphénols suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement d'autres maladies (Vârban *et al.*, 2009).
- ✓ **Avec le test de l'ABTS^{*+}:** *M. aquatica* était plus active que *S. guyoniana* où l'EARMA était le plus actif (IC_{50} : $4.21 \pm 0.28 \mu\text{g/mL}$), plus proche du standard, l' α -tocophérol (IC_{50} : $4.31 \pm 0.10 \mu\text{g/mL}$) suivi de ECMA (IC_{50} : $5.38 \pm 0.14 \mu\text{g/mL}$), alors que la meilleure activité de *S. guyoniana* a été manifestée par l'ECSG (IC_{50} : $7.29 \pm 0.23 \mu\text{g/mL}$). Les extraits riches en triterpénoïdes de *M. aquatica* (EARMA et ECMA) et *S. guyoniana* (ECSG) possèdent une activité antioxydante remarquable.
- ✓ **Avec la méthode CUPRAC,** les extraits EBSG et EMRMA présentaient la meilleure activité ($A_{0.50}$: $0.15 \pm 0.05 \mu\text{g/mL}$ et $A_{0.50}$: $0.49 \pm 0.04 \mu\text{g/mL}$) qui est supérieure à celles des standards α -tocophérol ($A_{0.50}$: $0.54 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$) et BHA ($A_{0.50}$: $1.41 \pm 0.7 \mu\text{g/mL}$).
- ✓ **Avec la méthode de chélation par les ions ferreux:** contrairement aux autres extraits, l'extrait EBSG était actif avec la méthode de chélation par les ions ferreux à 48% d'inhibition à $100 \mu\text{g/mL}$ mais qui est inférieure à la moitié de l'inhibition

Activités biologiques, dosage des polyphénols et screening chimique

présentée par les ions ferreux EDTA (96,5%), utilisé comme standard. Cette activité exclusive à l'EBSG peut être expliquée par la richesse de cet extrait en polyphénols. Selon les résultats enregistrés, L'extrait EASG n'était pas actif malgré sa composition en polyphénols, ainsi que l'EBSG, suggèrent que la chélation dépend de la nature des flavonoïdes qui est différentes dans ces extraits.

Ainsi, les extraits issus de l'espèce *S. guyoniana* possèdent une bonne activité antioxydante, il s'agit d'extraits bruts contenant un grand nombre de composés : flavonoïdes et polyphénols.

Les extraits de *M. aquatica* sont riches en stéroïdes et triterpénoïdes qui peut peuvent explique leur bonne activité avec les tests de l'ABTS et du CUPRAC. D'après le screening chimique de *S. guyoniana*, la richesse de l'ECSG en stéroïdes et triterpénoïdes peut être responsable du pouvoir d'inhibition des radicaux ABTS qui est supérieur à celui des extraits EBSG et EASG, moins riches en triterpénoïdes.

3.5. Activité anticholinestérase

Le tableau 42 montre que seul l'EBSG et l'EARMA présentent une activité d'inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE). L'activité de l'EBSG ($IC_{50} : 5.8 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$) est proche de celle de la galantamine ($IC_{50} : 5.01 \pm 0.10 \mu\text{g/mL}$), utilisée comme médicament contre la maladie d'Alzheimer alors que les autres extraits testés n'ont manifesté aucune activité d'inhibition de l'acétylcholinestérase.

Les extraits EARMA, ECMA et EBSG possèdent un pouvoir inhibiteur de la butyrylcholinestérase (BChE) ($IC_{50} : 19.23 \pm 1.42 \mu\text{g/mL}$, $IC_{50} : 20.7 \pm 2.11 \mu\text{g/mL}$, $IC_{50} : 39.1 \pm 1.41 \mu\text{g/mL}$, respectivement), meilleur que celui du standard ($IC_{50} : 53.90 \pm 0.56 \mu\text{g/mL}$) (**Tableau 42**).

Tableau 42: Inhibition de l'acétylcholinestérase et de la butyrylcholinestérase par les extraits étudiés

Plantes	Extraits	Inhibition de l'AChE IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	IC_{50} de la Galantamine ($\mu\text{g/mL}$)	Inhibition de la BChE IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	IC_{50} de la Galantamine ^a ($\mu\text{g/mL}$)

<i>Stachys guyoniana</i>	EBSG	5.78±0.01	5.01±0.10	39.10±1.14	53.90±0.56
	EASG	ND		NA	
	ECSG	ND		NA	
<i>Mentha aquatica</i>	EMMA	ND		NA	
	ECMA	ND		20.18±0.55	
	EMRMA	ND		NA	
	EARMA	20.7±2.11		19.23±0.56	

^a : Standard

Des tests d'activité anticholinestérase, effectués sur les extraits : éther de pétrole, acétone et méthanol de la plante *M. longifolia* subsp. *noeana*, ont montré que ces extraits ne possèdent aucune capacité d'inhibition de l'AChE ni de la BChE (Ertaş *et al.*, 2015).

Une étude effectuée sur l'espèce *Stachys lavandulifolia* Vahl a montré que l'extrait hexane possède une bonne activité contre l'AChE (IC₅₀: 13.7 µg/mL) alors que l'extrait dichlorométhane était moins actif contre la BChE (IC₅₀: 143.9 µg/mL) (Tundis *et al.*, 2015).

Plusieurs flavonoïdes connus tels que : l'apigénine, lutéoline, quercétine, kampférol et d'autres ont montré une efficacité inhibitrice de l'AChE et/ou de la BChE (Dominik 2015). Une autre étude effectuée par Kim *et al.* (Kim *et al.*, 2014) sur des polyphénols, suggère que ces composés pourraient être utiles dans le traitement de la maladie d'Alzheimer.

A la lumière de ces résultats bibliographiques, on peut expliquer l'excellente activité inhibitrice de la BChE par l'extrait butanolique de *S. guyoniana* (EBSG) par sa grande richesse, en flavonoïdes et polyphénols. Cependant, l'extrait d'acétate d'éthyle de la même plante (EASG) semble inactif contre l'AChE, bien qu'il soit riche en flavonoïdes, ce qui suggère un mode d'action différent sur chaque enzyme et qui peut aussi dépendre de la nature même des flavonoïdes en action.

Il est à noter que les extraits de *Mentha aquatica* (EARMA et ECMA), qui sont riches en stéroïdes et triterpénoïdes, ont montré une meilleure inhibition de la BChE, tandis que l'EBSG, qui est riche en polyphénols, a manifesté la meilleure activité contre l'AChE ce qui montre que l'affinité des enzymes est différente.

3.6. Activité Antibactérienne

Nous avons étudié, *in vitro*, le pouvoir antibactérien des extraits des deux plantes *S. guyoniana* et *M. aquatica*, par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé Mueller-Hinton. L'activité antibactérienne des extraits a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les extraits à tester vis-à-vis de 7 germes pathogènes, dont 3 souches de références et 4 souches hospitalières.

L'EBSG a présenté la meilleure activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* (18±1.20 mm) et *Enterobacter aerogenes* (18±0.90 mm), tandis que *Escherichia coli* ATCC (16±0.40 mm), *Staphylococcus aureus* (15±1.50 mm) et *Salmonella heidelberg* (15±1,10 mm) étaient les souches les plus inhibées par le ECSG. Cependant, le EMMA était plus actif contre *Morganella morganii* (15±1.10 mm) alors que l'extrait EMRMA a manifesté la meilleure activité antibactérienne contre *Salmonella heidelberg* (15±1.20 mm) et *Klebsiella pneumoniae* (15±0.80 mm) (**Tableau 43**).

Tableau 43: Activité antibactérienne (zone d'inhibition) des extraits étudiés

Microorganisme	Zone d'inhibition (mm)				
	EBSG ^a	ECSG ^a	EMMA ^a	EMRMA ^a	Ampicilline ^b
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	12±1.40	16±0.40	-	13±0.90	18±1.50
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	18±1.20	15±1.50	12±0.60	10±1.30	30±0.40
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	10±1.40	13±0.40	-
<i>Salmonella heidelberg</i> (SH) ^c	12±0.80	15±1.10	13±01.50	15±1.20	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (SH) ^c	11±1.60	13±1.30	13±1.40	15±0.80	14±1.10
<i>Enterobacter aerogenes</i> (SH) ^c	18±0.90	14±1.60	14±1.00	12.5±0.90	20±0.60
<i>Morganella morganii</i> (SH) ^c	-	-	15±1.10	12±1.70	-

^a : 128 µg/mL, ^b : 30 µg/mL, ^c : Souche hospitalière.

Les valeurs de la CMI varient entre 32-128 µg/mL (**Tableau 44**). Les plus faibles valeurs (32 µg/mL) ont été obtenues contre les souches *Staphylococcus aureus* et *Enterobacter aerogenes* avec l'extrait EBSG, en accord avec les résultats de zones d'inhibition les plus considérables. Une valeur de CMI de 64 µg/mL a été observée avec les extraits suivants (contre les bactéries respectives) : ECSG (*Escherichia coli*), EMMA (*Morganella morganii*) et EMRMA (*Salmonella heidelberg* et *Klebsiella pneumoniae*).

Tableau 44 : Résultats des CMI de l'activité antibactérienne des extraits étudiés

Microorganisme	CMI ($\mu\text{g/mL}$)				
	EBSG ^a	ECSG ^a	EMMA ^a	EMRMA ^a	Ampicilline ^b
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	128 \pm 1.20	64 \pm 0.60	-	128 \pm 0.40	8 \pm 0.40
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	32 \pm 0.90	128 \pm 1.10	128 \pm 1.30	128 \pm 0.80	4 \pm 0.10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	128 \pm 0.50	128 \pm 1.60	-
<i>Salmonella heidelberg</i> (SH) ^c	128 \pm 1.10	128 \pm 0.80	128 \pm 0.90	64 \pm 0.70	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (SH) ^c	128 \pm 1.00	128 \pm 0.60	128 \pm 2.00	64 \pm 1.00	32 \pm 0.40
<i>Enterobacter aerogenes</i> (SH) ^c	32 \pm 0.70	128 \pm 1.00	128 \pm 1.40	128 \pm 0.80	32 \pm 0.60
<i>Morganella morganii</i> (SH) ^c	-	-	64 \pm 1.40	128 \pm 0.90	-

^a : 128 $\mu\text{g/mL}$, ^b : 30 $\mu\text{g/mL}$, ^c : Souche hospitalière.

Par ailleurs, il a été rapporté que les extraits méthanol des espèces : *S. byzantina*, *S. inflata*, *S. lavandulifolia* et *S. laxa* possèdent une activité antibactérienne vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aspergillus niger* et *Candida albicans* (Saeedi *et al.*, 2008).

Comme les parties aériennes du genre *Stachys* sont riches en flavonoïdes, ces derniers peuvent être responsable de l'activité antibactérienne (Saeedi *et al.*, 2008) observée vis à vis des souches testées.

Une autre étude effectuée par Ayena (Ayena *et al.*, 2014) a montré des propriétés antimicrobiennes des extraits hydroéthanoliques des feuilles de *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae), *Psidium guajava* L. (Myrtaceae) et *Pterocarpus santalinoides* L. (Papilionadeae) sur les souches d'*Escherichia coli*, *Klebsiella ozareae*, *Salmonella typhi* et *Staphylococcus aureus* qui est due à la richesse de ces extraits en flavonoïdes, tanins, triterpènes et stéroïdes. Ces composés chimiques présents dans ces extraits seraient à l'origine des effets antibactériens enregistrés et justifient leur usage (Ayena *et al.*, 2014).

Ces résultats bibliographiques viennent conforter nos résultats d'effet antibactériens des extraits ECSG et EBSG (riches en flavonoïdes et triterpènes) vis à vis des souches testées (particulièrement, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*).

Conclusion générale

Conclusion générale

L'étude phytochimique des parties aériennes et des racines de *Mentha aquatica* L. a permis d'isoler, par des techniques chromatographiques (CCM, CCM analytique et HPLC), **16** composés. La détermination de structure de ces composés a été réalisée à l'aide des méthodes spectroscopiques de RMN mono- et bidimensionnelles, homo- et hétéronucléaires et masse à haute résolution HR-FAB-MS et par la comparaison avec les données de la littérature.

7 triterpènes ont été isolés des parties aériennes de l'espèce *Mentha aquatica* :

- ♣ **β -sitostérol**
- ♣ **Acide oléanolique**
- ♣ **Acide pomolique**
- ♣ **Acide micromérique** (isolé pour la première fois du genre *Mentha*)
- ♣ **Acide ursolique**
- ♣ **Acide tormentique**
- ♣ **Acide 21 β -hydroxy-ursolique** (isolé pour la première fois du genre *Mentha*)

9 composés dont un nouveau ont été isolés de l'extrait acétone de *Mentha aquatica* :

- ♣ **β -sitostérol**
- ♣ **Acide ursolique**
- ♣ **Acide tormentique**
- ♣ **Acide 1-O-benzoylhyptadiénique** (isolé pour la première fois du genre *Mentha*)
- ♣ **Acide 3-épi-ursolique**
- ♣ **Acide hyptadiénique** (isolé pour la première fois du genre *Mentha*)
- ♣ **Acide maquatique (inédit)**
- ♣ **Acide 3-épi-maslinique**
- ♣ **Acide 3-épi-tormentique** (isolé pour la première fois du genre *Mentha*)

L'huile essentielle de l'espèce *Thymus dreatensis* Batt., obtenue à partir de l'hydrodistillation des parties aériennes, a été caractérisée pour la première fois. 35 Composés organiques volatils ont été identifiés et constituent 97,4 % de la composition chimique totale de l'huile essentielle. Cette huile est majoritairement composée de thymol (28,1%) suivi de γ -terpinène (18,7%), de thymyl méthyl éther (10,9%) et de linalool (5,0%). D'un point de vue chimiotaxonomique, le chemotype « thymol » de l'huile essentielle *T. dreatensis* est en parfait accord avec les plantes du genre *Thymus*.

Le potentiel antioxydant de *Stachys guyoniana* de Noé et *Mentha aquatica* L. a été déterminé par 5 méthodes différentes : β -carotène/acide linoléique, DPPH, ABTS, CUPRAC et par la méthode de chélation par des ions ferreux. La plante *Stachys guyoniana* possède une bonne activité antioxydante grâce à sa composition riche en flavonoïdes et polyphénols, révélée par le screening chimique et par le dosage des polyphénols totaux. Les extraits de *M. aquatica*, riches en stéroïdes et triterpénoïdes, ont montré une bonne activité d'inhibition de l'ABTS et du CUPRAC. Comparé aux autres extraits testés, l'extrait *n*-butanol de *Stachys guyoniana* a manifesté la meilleure activité anticholinestérase.

L'extrait *n*-butanol de *S. guyoniana* a présenté la meilleure activité antibactérienne contre *S. aureus* et *E. aerogenes*, tandis que *E.coli* ATCC, *S. aureus* et *Salmonella heidelberg* étaient les souches les plus inhibées par l'extrait chloroforme de la même plante. Cependant, l'extrait méthanol des parties aériennes de *M. aquatica* était plus actif contre *Morganella morganii*, tandis que l'extrait méthanol des racines a présenté la meilleure activité antibactérienne contre *Salmonella heidelberg* et *Klebsiella pneumoniae*.

Références bibliographiques

Références

[NCCLS] National Committee for Clinical Laboratory Standards. M100-S13(M2). Disk Diffusion Supplemental Tables. Wayne, PA: NCCLS; 2003.

Abedini S., Sahebkar A., Hassanzadeh-Khayyat M., 2014. Chemical Composition of the Essential Oil of *Thymus vulgaris* L. Grown in Iran. *J. Essent. Oil Bear. Pl.*, 17, 538-543.

Abou-Donia A.H., Darwish F.A., Toaima S.M., Shawky E., Takla S.S., 2014. A new approach to develop a standardized method for assessment of acetylcholinesterase inhibitory activity of different extracts using HPTLC and image analysis. *J. Chromatogr. B*, 955, 50-57.

Adams R.P., 2007. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass spectromerty*, 4th Ed. Allured Publishing Co. Carlo Stream, Illinois.

Adinolfi M., Barone G., Lanzetta R., Laonigro G., Mangoni L., Parrilli M., 1984. Triiterpenes from Bulbs of *Muscari comosum*, 4. The structure of further novel nortriterpene components. *J. Nat. Prod.*, 47, 721-723.

Ahmadi R., Alizadeh A., Ketabchi S., 2015. Antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus kotschyanus* grown wild in Iran. *Int. J. Biosc.*, 6, 239-248.

Ait-Ouazzou A., Loran S., Bakkali M., Laglaoui A., Rota C., Herrera A., Pagan R., Conchello P., 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Thymus algeriensis*, *Eucalyptus globulus* and *Rosmarinus officinalis* from Morocco. *J. Sci. Food Agric.*, 91, 2643-2651.

Akram M., Uzair M., Sarwer N., Asif H.M., 2011. *Mentha arvensis* Linn. A review article. *J. Med. Plants Res.*, 5, 4499-503.

Al Maqtari M.A.A., Alghalibi S.M., Alhamzy E.H., 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Thymus vulgaris* from Yemen. *Turk Biyokimya Dergisi*, 36, 342-349.

Albayrak S., Aksoy A., 2013. Essential oil composition and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of *Thymus cappadocicus* Boiss. *J. Food Process Preserv.*, 37, 605-614.

Alencastro F.M.M.R., Scatone Z., Prisco JT., Laboriau L.F.G., 1965. Contribuição para uma bibliografia do gênero *Mentha* L. Campinas, *Assoc. Bras. Pesq. PA.Oleos Essenciais*, 354.

Aligiannis N., Mitaku S., Tsitsa-Tsardis E., Harvala C., Tsaknis I., Lalas S., Haroutounian S., 2003. Methanolic extract of *Verbascum macrurum* as a source of natural preservatives against oxidative rancidity. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 7308–7312.

Ali-Shtayeh M.S., Jamous R.M., Abu Zaitoun Y.S., Qasem I.B., 2014. *In-vitro* screening of acetylcholinesterase inhibitory activity of extracts from Palestinian indigenous flora in relation to the treatment of Alzheimer's disease. *Funct. Foods Health Dis.*, 4, 381-400.

Alizadeh A., 2013. Essential oil constituents, phenolic content and antioxidant activity in Iranian and British *Thymus vulgaris* L. *Int. J. Agric. Crop. Sci.*, 6, 213-218.

Alpsoy L., Sahin H., Karaman S. 2011. Anti-oxidative and anti-genotoxic effects of methanolic extract of *Mentha pulegium* on human lymphocyte culture. *Toxicol. Ind. Health.*, 27, 647-654.

Alvarado-Castillo C., Estrada O., Carvajal E., 2012. Pomolic acid, triterpenoid isolated from *Licania pittieri*, as competitive antagonist of ADP-induced aggregation of human platelets. *Phytomedicine*, 19, 484-487.

Alvi M.N., Ahmad S., Rehman K., 2001. Preparation of menthol Crystals from Mint (*Mentha arvensis*). *Int. J. Agric. Biol.*, 3, 527-8.

Amani M.M., 2009. Hepatoprotective Triterpenes from Hairy Root Cultures of *Ocimum basilicum* L.Z. *Naturforsch.*, 64, 201-209.

Amarti F., Ajjouri, M., Ghanmi M., Satrani B., Aafi A., Farah A., Khia A., Guedira A., Rahouti M., Chaouch A. 2011. Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of essential oils from *Thymus zygis* of Morocco. *Phytotherapie*, 9, 149-157.

Amin G., 1991. Popular medicinal plants of Iran. Iranian Research Institute of Medicinal Plants, Tehran, 80.

Amin G., 2005. Popular medicinal plants of Iran. Tehran, Iran. Tehran university of medicinal sciences press.

Apak R., Güçlü K., Özyürek M., Karademir, S.E., 2004. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine : CUPRAC method. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 7970-7981.

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.

Arnold H.J., Gulumian M., 1984. Pharmacopoeia of traditional medicine in Venda. *J. Ethnopharmacol.*, 12, 35-74.

Avci A.B., 2011. Chemical variation on the essential oil of *Thymus praecox* ssp. *scorpilii* var. *laniger*. *Int. J. Agric. Biol.*, 13, 607-610.

Ayena A.C., Agassounon Djikpo Tchibozo M., Adoukonou-Sagbadja H., Karou S., Anani K., De Souza C., 2014. Activités antimicrobiennes des extraits de trois plantes médicinales utilisées dans le traitement traditionnel des toxi-infections alimentaires au Sud du Bénin. *J. Rech. Sci. Univ. Lomé*, 16, 23-31.

Bankova V., Koeva-Todorovska J., Stambolijska T., Ignatova-Groceva M.D., Todorova D., Popov S., 1999. Polyphenols in *Stachys* and *Betonica* species (Lamiaceae), *Z. Naturforsch. C*, 54, 876-880.

Banno N., Akihisa T., Tokuda H., Yasukawa K., Higashihara H., Ukiya M., Watanabe K., Kiumura Y., Hasegawa J.I., Nishino H., 2004. Triterpene acids from leaves of *Perilla frutescens* and their antiinflammatory and antitumor-promoting effects. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68, 85-90.

Baranauksiene R., Venskutonis P.R., Viskelis P., Dambrauskiene E., 2003. Influence of nitrogen fertilizers on the yield and composition of thyme (*Thymus vulgaris*). *J. Agric. Food Chem.*, 51, 7751-7758.

Barazandeh M.M., Bagherzadeh K., 2007. Investigation of chemical compositions of *Thymus daenensis* oil collected from Isfahan. *J. Medi. Plants*, 23, 15-19.

Baser K.H.C., Nuriddinov K.R., Nigmatullaev A.M., Aripov K.N., 1997. Essential oil of *Mentha asiatica* from Uzbekistan. *J. Essent.Oil. Res.* 9, 453-454.

Bauer AW, Kirby W.M., Sherris J.C., Turck M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45, 493-496.

Bauer K.D., Garbe H., Surburg H., 1997. Common fragrance and flavor materials. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag.

Beckman C.H., 2000. Phenolic-storing cells : keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 57, 101-110.

Beecher G.R., 1999. In antioxidant food supplements in human health. In: Packer L, Hiramatsu M, Yoshikawa T (eds) Academic Press, New York.

Ben El Hadj A.I., Boussaid M., 2012. Oil composition variability among populations in relationship with their natural habitats in Tunisian *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. *Tunis. J. Med. Pl. Nat. Prod.*, 8, 1-8.

Ben El Hadj Ali I., Chaouachi M., Bahri R., Chaieb I., Boussaid M., Harzallah-Skhiri F., 2015. Chemical composition and antioxidant, antibacterial, allelopathic and insecticidal activities of essential oil of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. *Ind. Crops Prod.*, 77, 631-639.

Benayache, F., Chalard, P., Figueredo, G., Benayache, F., Benayache, S., 2014. Chemical composition of the essential oil of *Thymus numidicus* Poiret. *Pharm. Lett.*, 6, 182-185.

Benchabane O., Hazzit M., Mouhouche F., Baaliouamer A., 2015. Influence of extraction duration on the chemical composition and biological activities of essential oil of *Thymus pallescens* de Noé. *Arab. J. Sci. Eng.*, 40, 1855-1865.

Bendich A., Machlin L.J., Scandurra O., Burton G.W., Wayner D.D.M., 1986. The antioxidant role of vitamin C. *Free Radic. Bio. Med.*, 2, 419-444.

Bentes J., Miguel M.G., Monteiro I., Costa M., Figueired A.C., Barroso J.G., Pedro L.G., 2009. Antioxidant activities of the essential oils and extracts of portuguese *Thymbra capitata* and *Thymus mastichina*. *Int. J. Food Sci.*, 21, 183-195.

Bernard V., Christine B., Olivier F., Frederic J. 1999. Free flavonoid aglycones as markers of parentage in *Mentha aquatica*, *M. citrata*, *M. spicata* and *M. x piperita*. *Phytochemistry*, 50, 1189-1193.

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

Borai P., Puni L., 2010. Composition of essential oil from wild *Thymus serpyllum* L. collected from Chakrata, Dehradun Uttarakhand. *Indian Perfumer*, 54, 26-28.

Bouchra C.M., Achouri M., Idrissi L., Hassani L.I., Hmamouchi M., 2003. Chemical composition antimicrobial activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea*, *J. Ethnopharmacol.*, 89, 165-169.

Bousmaha L., Atik-bekkara F., Tomi F., Casanova J., 2007. Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. ssp. *eu-ciliatus* Maire from Algeria. *J. Essent. Oil Res.*, 19, 490-493.

Bouzouita N., Kachouri F., Ben Halima M., Chaabouni M.M., 2008. Composition chimique et activité antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*. *J. Soc. Chim. Tunisie*, 10, 119-125.

Brahmi F., Hauchard D., Guendouze N., Madani K., Kiendrebeogo M., Kamagaju L., Stévigny C., Chibane M., Duez P., 2015. Phenolic composition, *in vitro* antioxidant effects and tyrosinase inhibition activity of three Algerian *Mentha* species: *M. spicata* (L.), *M. pulegium* (L.) and *M. rotundifolia* (L.) Huds (Lamiaceae). *Ind. Corps Prod.*, 74, 722-730.

Brantner A.H., Pfeifhofer H.W., Ercegovac O., Males Z., Plazibat M., 2005. Essential oil composition and antioxidant activity of *Thymus bracteosus* Vis. Ex Benth. *Flavour Frag. J.*, 20, 596-600.

Bray L., 2005. Phylogénie des Angiospermes. [http://www. Botanique.org](http://www.Botanique.org). consulté le 21/10/05.
Buil P., Gamero J., Joulain D., 1981. Higher terpenoids from the jasmine flowers oil absolute, *Rivista Italiana EPPOS*, 63, 282-285.

Buil P., Gamero J., Joulain D., 1981. Higher terpenoids from the jasmine flowers oil absolute, *Rivista Italiana EPPOS*, 63, 282-285.

Çalis I., Basaran A.A., Saracoğlu I., Stcher O., 1992. Iridoid and phenylpropanoidglycosides from *Stachys macrantha*. *Phytochemistry*, 31, 167–169.

Casiglia S., Bruno M., Scandolera E., Senatore F., Senatore F., 2015. Influence of harvesting time on composition of the essential oil of *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns. & Link. Growing wild in northern Sicily and its activity on microorganisms affecting historical art crafts. *Arabian J.Chem.*, In press. CDRI, 51.

Chang C.T., Huang S.S., Lin S.S., Amagaya S., Ho H.Y., Hou W.C., Shie P.H., Wu J.B., Huang G.J., 2011. Anti-inflammatory activities of tormentic acid from suspension cells of *Eriobotrya japonica* *ex vivo* and *in vivo*. *Food Chem.*, 127, 1131-1137.

Chen G., Tang Y., Zhang Q., Mu S., 2009. Study on the chemical components of essential oil of *Thymus quinquecostatus* Celak from Shandong Yimeng. *Jingxi Huagong Zhongjianti*. 39, 70-72.

Chibani S., Ghorab H., Kabouche A., Semra Z., Ghannadi A., Sejjadi E. B., Kabouche Z., 2013. Biological activities and composition of the essential oil of *Thymus ciliatus* subsp. *coloratus* from Bir Chouhada (Algeria). *Pharm. Lett.*, 5, 280-284.

Chikhoun A., Stouvenel L., Iguer-Ouada M., Hazzit M., Schmitt Al., Lores P., Wolf J.P., Aissat K., Auger J., Vaiman D., 2015. *In-vitro* effects of *Thymus munbyanus* essential oil and thymol on human sperm motility and function. *Reprod. Bio. Med.*, 31, 411-420.

Cole G.M., Lim G.P., Yang F., Teter B., Begum A., Ma Q., Harris-White M.C. Frautschy A., 2005. Prevention of Alzheimer's disease: omega-3 fatty acid and phenolic antioxidant interventions. *Neurobiol. Aging*, 26, 133 –136.

Condurso C., Verzera A., Ragusa S., T., Gianluca D.G., 2013. Volatile composition of Italian *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns. et Link leaves. *J. Essent. Oil Res.*, 25, 239-243.

Conforti F., Menichini F., Formisano C., Rigano D., Senatore F., Arnold N.A., Piozzi F., 2009. Comparative chemical composition, free radical-scavenging and cyto-toxic properties of essential oils of six *Stachys* species from different regions of the Mediterranean Area. *Food Chem.*, 116, 898–905.

Corrêa A.D., Batista R.S., Quintas L.E.M., 1998. Plantas medicinais do cultivo à terapêutica, first ed. Vozes, Petrópolis, Brazil.

Couladis M., Tzakou O., Verykokidou E., Harvala C., 2003. Screening of some Greek aromatic plants for antioxidant activity. *Phytother. Res.*, 17, 194–195.

Cowan M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.*, 12, 564–582.

Dae-sup P., Choi S.Z. Ran K.K., Mee L.S., Ro L.K., 2004. Immunomodulatory activity of triterpenes and phenolic of compounds from *Viscum album* L. *J. Appl. Pharmacol.*, 11, 1-4.

Dar M.A., Masoodi M., Wali A.F., Shapooob N.S. 2014. Antioxidant potential of methanol root extract of *Mentha arvensis* L. from Kashmir region. *J. App. Pharm. Sci.*, 4, 050-057.

Decker E.A., Welch B., 1990. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *J. Agr. Food Chem.*, 38, 674-677.

Delazar A., Delnavazi M.R., Nahar L., Moghadam S.B., Mojarab M., Gupta A., Williams A.S., Rahman M.M., Sarker S.D., 2011. Lavandulifolioside B: a newphenylethanoid glycoside from the aerial parts of *Stachys lavandulifolia* Vahl. *Nat. Prod. Res.*, 25, 8–16.

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

Derwich E., Benziane Z., Boukir A., 2010. GC/MS analysis and antibacterial activity of essential oil of *Mentha pulegium* grown in Morocco. *Res. J. Agric. & Biol. Sci.*, 6, 191-198.

Deschamps C., Zanatta J.L., Bizzo H.R., Oliveira M.C., Roswalka L.C., 2008. Seasonal evaluation of essential oil yield of mint species. *Ciênc. Agrotec.*, 32, 725-730.

Dob T., Dahmane D., Benabdelkader T., Chelghoum C., 2006. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus fontanesii*. *Pharm. Biol.*, 44, 607-612.

Dominik S., 2015. Anticholinesterase activity of selected phenolic acids and flavonoids – interaction testing in model solutions. *Ann. Agric. Environ. Med.*, 22, 690–694.

Duke A.J., 2002. Handbook of medicinal herbs. Boca Raton: CRC Press, 792-800.

Durnova N.A., Romanteeva Y.V., Kovtun A.N., 2014. The chemical composition of the essential oil of *Thymus marshallianus* Willd. and *Thymus pallasianus* H. Br. growing in the Saratov region. *Khimiya Rastitel'nogo Syrya*, 2, 115-119.

Eghdami A., Sohi S.M.H., Sadaghi F., 2011. Antioxidant activity and high performance liquid chromatography analysis of methanolic and aqueous extract of *Stachys inflata*. *Org. Chem. J.*, 1, 36-43.

El Ajjouri M., Ghanmi M., Satrani B., Amarti F., Rahouti M., Aafi A., Ismaili M.R., Farah A., 2010. Chemical composition and antifungal activity of *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. and *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. Essential oil against wood-rotting fungi. *Acta Bot. Gallica*, 157, 285-294.

El Ouariachi E.M., Hamdani I., Bouyanzer A., Hammouti B., Majidi L., Costa J., Paolini J., Chetouani A., 2014. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils of *Thymus broussonetii* Boiss. and *Thymus algeriensis* Boiss. from Morocco. *Asian Pac. J. Trop. Dis.*, 4, 281-286.

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, 1169-1173.

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

Elbouchtaoui M. C., Anejjar A., Salghi R., Chebli B., Idrissi Hassani L. M., Hmamouchi M., Hammouti B., 2014. Inhibition of steel corrosion in 1 M HCl by the essential oil of *Thymus pallidus*. *Der Pharma Chemica*, 6, 406-414.

El-Desoky S.K., El-Ansari M.A., El-Negoumy S.I., 2001. Flavonol glycosides from *Mentha lavandulacea*. *Fitoterapia*, 72, 532-537.

Ellman GL., Courtney KD., Andres V., Featherston RM., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7, 88-95.

Ertaş A., Gören A.C., Haşimi N., Tolan V., Kolak U. 2015. Evaluation of antioxidant, cholinesterase inhibitory and antimicrobial properties of *Mentha longifolia* subsp. *noeana* and its secondary metabolites. *Rec. Nat. Prod.*, 9, 105-115.

Fan L., Yang H., 2014. Study on the components and antibacterial activity of *Thymus monoglicus* ronn essential. *Dangdai Huagong*, 43, 701-703.

Fazio C., Passannanti S., Paternostro M.P., Piozzi F., 1992. Neo-clerodane diterpenoids from *Stachys rosea*. *Phytochemistry*, 31, 3147-3149.

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

Fazio, C., PassannantiS., PaternostroM.P., Arnold N.A., 1994b. Diterpenoids rom *Stachys mucronata*. *Planta Medica*, 60,499.

Fraga B.M., Diaz C.E., Guadano A., Gonzalez-Coloma A., 2005. DiterpenesfromSalviabroussonettiroots and theirinsecticidalactivity. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 5200-5206.

Freire M.M., Jham G.N., Dhingar O.D., Jardim C.M., Barcelos R.C., Valente V.M.M., 2012. Composition, antifungal activity and main fungitoxic components of the essential oil of *Mentha piperita* L. *J. Food Saf.*, 32, 29-36.

Furkan O, Özlem B., Derya Y., Tuğba Zuh al G., Medine G., 2012. Isolation of some luteolin derivatives from *Mentha longifolia* (L.) Hudson subsp. *Longifolia* and determination of their genotoxic potencies. *Food Chem.*, 135, 764-769.

Gai-Mei S., Chao X., Bin L. 2012. New monocyclic monoterpenoid glycoside from *Mentha haplocalyx* Briq. *Chem.Cent. J.*, 6, 37.

Geed S.R., Singh R.P., Rai B.N., 2014. Recent Development of Extraction Processes and Extraction of Essential Oil from Coriander by Clean Technology. *Int. J. Eng. Adv. Tech.*, 3, 58,63.

Gerhard Krastanov A., Stoyanova A., Schimdt E., Jirovetz L., 2008. Chemical composition, olfactory evaluation and antioxidant effects of an essential oil *Thymus vulgaris* L. from Germany. *Nat. Prod. Commun.*, 3, 1047-1050.

Geun-Hye S., Purum K., Hui S.L., Geun H.S.S., 2016. Antioxidant activity of linalool in patients with carpal tunnel syndrome. *B.M.C. Neurology*, 16-17.

Ghorab H., Kabouche A., Semra Z., Ghannadi A., Sajjadi E. B., Touzani R., Kabouche Z., 2013. Biological activities and compositions of the essential oil of *Thymus ciliatus* from Algeria. *Der Pharmacia Lettre*, 5, 28-32.

Ghoushury P., Kumar R., Grag A.N., 2006. Analysis of Indian mint (*Mentha spicata*) for essential, trace and toxic elements and its antioxidant behaviour. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 41, 825-832.

Gianmario A., Silvio S., Rita P.A., Teresa M., Roberto D.L., Aurelia T., 2007. Characterization of topical antiinflammatory compounds in *Rosmarinus officinalis*. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 1718-1723.

Giweli AA., Dzamic A.M., Sokovic M.D., Ristic M.S., Marin P.D., 2013. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of *Thymus algeriensis* wild-growing in Libya. *Cent. Eur. J. Biol.*, 8, 504-511.

Goncalves M.J., Cruz M.T., Cavaleiro C., Lopes M.C., Salgueiro L., 2010. Chemical antifungal and cytotoxic evaluation of the essential oil of *Thymus zygis* subsp. *Sylvestris*. *Ind. Corps Prod.*, 32, 70-75.

Goren A.C., Piozzi F., Akçiçek E., Kiliç T., Çarıkçı S., 2011. Essential oil composition of twenty-two *Stachys* species (mountain tea) and their biological activities. *Phytochem Lett.*, 4, 448–53.

Gouda A.A., Amin A.S., 2010. Copper (II)–neocuproine reagent for spectrophotometric determination of captopril in pure form and pharmaceutical formulations. *Arabian J. Chem.*, 3, 159-165.

Govaerts R., 2012. World checklist of *Stachys* L. facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Published on the Internet <http://apps.kew.org/wcsp/>.

Grassmann J., 2005. Vitamins and Hormones : Terpenoids as plants antioxidants. Volume 72, Elsevier Inc. 1-31. Graz, Austria, 360–361.

Greenblatt H.M., Kryger G., Lewis T., Silman I., Sussman J.L., 1999. Structure of acetylcholinesterase complexed with (-)-galanthamine at 2.3 resolution. *Febs. Lett.*, 463, 321-326.

Grigoleit H.G., Grigoleit P., 2005. Peppermint oil in irritable bowel syndrome. *Phytomedicine*, 12, 601–606.

Guido S., Alessandra B., Guido F., Luigi C.P., Emilio T.P., 1997. Variability of essential oil composition of *Mentha aquatica* collected in tow different habitats of North Tuscany, Italy.

Gülçin İ., 2012. Antioxydant activity of food constituents : an overview. *Arch. Toxicol.*, 86, 345-391.

Gülçin İ., Elias R., Gepdiremen A., Taoubi K., Köksal E., 2009. Antioxidant secoiridoids from fringe tree (*Chionanthus virginicus*L.). *Wood Sci. Technol.*, 43, 195–212.

Gülçinİ., 2012. Antioxidant activity of food constituents : An overview. *Arch. Toxicol.*, 86, 345-391.

Gulluce M., Sahin F., Sokmen M., Ozer H., Daferera D., Sokmen A., Polissiou M., Adiguzel A., Ozkan H., 2007. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanolextract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*, *Food Chem.*, 4, 1449-1456.

Gülşen T., Mehmet Ö., Mehmet E.D., Mansur H., Gülaçti T., 2010. Chemical composition of the essential oil and hexane extract of *Salvia chionantha* and their antioxidant and anticholinesterase activities. *Food Chem. Toxicol.*, 48, 3189-3193.

Gupta R., 1991. Agrotechnology of medicinal plants. In: Wijesekera R.O.B. The medicinal plant industry. Boca Raton: CRC press, 43-57.

Halliwell B. Gutteridge J.M.C., 1989. Free radicals in biology and medicine, 2nd edn. Clarendon Press, Oxford.

Halliwell B., 1995. Antioxidant characterization; methodology and mechanism. *Biochem. Pharmacol.*, 49, 1341-1348.

Hamdani I., El Ouariachi E., Mokhtari O., Salhi A.; Chahboun N., ElMahi B., Bouyanzer A., Zarrouk A., Hammouti B. Costa J., 2015. Chemical constituents and corrosion inhibition of mild steel by the essential oil of *Thymus algeriensis* in 1.0 M hydrochloric acid solution. *Der Pharma Chemica*, 7, 252-264.

Harborne J.B., 1982. Introduction to Ecological Biochemistry, 2nd edition, Academic Press, New York.

Harborne J.B., Baxter H., Moss G.P., 1999. Phytochemical dictionary: handbook of bioactive compounds from plants, 2nd edn. Taylor and Francis, London.

Hartwell J.L., 1982. Plants Used Against Cancer: A Survey. Quarterman Publications, Massachusetts, 274-278.

Hashemi P., Abolghasemi M.M., Hassanvand H., Ahmadi S., 2010. Headspace solvent microextraction of volatile components of *Thymus daenensis*. *J. Essent. Oil Res.*, 22, 365-368.

Hatipi I.M., Papajani V., Cavar S., Matevski V., 2013. GC/MS analysis of the essential oil of *Thymus longicaulis* Presl. From Kosovo. *Glasnik hemičara i tehnologa. Bosne i Hercegovine*, 41, 6-10.

Hayashi K., Nagamatsu T., Ito M., Hattori T., Suzuki Y., 1994 a. Acteoside, a component of *Stachys sieboldii* MIQ, may be a promising antinephritic agent (1): Effects of acteoside on crescentic-type anti-GBM nephritis in rats. *Jpn. J. Pharmacol.*, 65, 143-151.

Hayashi K., Nagamatsu T., Ito M., Hattori T., Suzuki Y., 1994 b. 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. *Jpn. J. Pharmacol.*, 66, 47-52.

Háznagy-Radnai E., Balogh Á., Czigle S., Máthé I., Hohman J., Gábor B., 2012. Antiinflammatory activities of Hungarian *Stachys* species and their iridoids. *Phytother. Res.*, 26, 505–509.

Háznagy-Radnai E., Czigle S., Janicsak G., Mathe I., 2006. Iridoids of *Stachys* species growing in Hungary. *J.Pl. Chromatogr.- Modern TLC*, 19, 187–190.

Háznagy-Radnai E., Czigle S., Zupkó I., Falkay G., Máthé I., 2006. Comparison of antioxidant activity in enzyme-independent system of six *Stachys* species. *Fitoterapia*, 77, 521–524.

Háznagy-Radnai E., Rethy B., Czigle S., Zupko I., Weber E., Martinek T., Falkay Gy., Máthé I., 2008. Cytotoxic activities of *Stachys* species. *Fitoterapia*, 79, 595–597.

Hazzit M., Baaliouamer A., 2007. Essential oil composition of *Thymus algeriensis* Boiss. Et Reut. And *Thymus numidicus* Poiret from Algeria. *Riv. Ital. EPPOS*, 43, 11-18.

Hazzit M., Baaliouamer A., 2009. Variation of essential oil yield and composition of *Thymus palloscens* de Noé from Algeria. *J. Essent. Oil Res.*, 21, 162-165.

Hazzit, M., Baaliouamer, A., Douar-Latreche, S., 2013. Effect of heat treatment on the chemical composition and the antioxidant activity of essential oil of *Thymus pallescens* de Noe from Algeria. *J. Essent. Oil Res.*, 25, 308-314.

Heide L., 1991. Traditionelle Arzneipflanzen in der Gesundheitsversorgung der drittenwelt-Möglichkeiten und Grenzen. *Zeitschrift für Phytoterapie*, 12, 1-8.

Heinrich M., Barnes J., Gibbons S., Williamson E.M., 2004. Fundamentals of pharmacognosy & phytotherapy. Edinburgh: Churchill Livingstone, 80-1. 236-264.

Helle T.O., Gary I.S., Johannes V.S., Søren B.C., Anna K.J., 2008. Isolation of the MAO-inhibition naringenin from *Mentha aquatica* L., *J. Ethnopharmacol.*, 117, 500-502.

Hiller K., Melzig M.F., 2000. Lexikon der arzneipflanzen und drogen L bis berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 443.

Hostettmann K., Marston A., Hostettmann M., 1998. Preparative chromatography techniques : Applications in natural products isolation, 2nded. Springer Verlag. Berlin Heidelberg.

Howes M.J.R. Perry N.S.L., Houghton P.J., 2003. Plants with traditional uses and activities relevant to the management of Alzheimer's disease and other cognitive disorders, *Phytother. Res.*, 17, 1-18.

https://www.google.com/search?q=mentha+aquatica&client=opera&biw=1366&bih=602&tbm=isch&imgil=81Qc63KqK9K3xM%253A%253BIX1O441MWT77M%253Bhttp%25253A%25252F%25252Fwww.naturespot.org.uk%25252Fspecies%25252Fwatermint&source=iu&pf=m&fir=81Qc63KqK9K3xM%253A%252CIX1O441MWT77M%252C_&usg=__Haxm4-hfG9CyuCxvMAbk8g5JRA8%3D&ved=0ahUKEwiDt4vG2OTPAhXF1hoKHe5oCwkQyjcIggE&ei=zEIGWIOhFsWta-7RrUg#imgrc=1yKG48yRHqSC9M%3A

Hu J.P., Calomme M., Lasure A., De Bruyne T., Peters L., Vlietinck A., Van den Berghe D.A., 1995. Structure-activity relationship of flavonoids with superoxide scavenging activity. *Biol. Trace Element. Res.*, 47, 327-331.

- Huang D., Ou B., Prior R.L., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1841–1856.
- Hudson J.F., 1990. Food antioxidants. Elsevier Applied Science, London.
- Husain S.R., Cillard J., Cillard P., 1987. Hydroxyl radical-scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry.* 26, 2489–2491.
- Hutchings, A., Van Staden, J., 1994. Plants used for stress-related ailments in traditional Zulu, Xhosa and Sotho medicine. Part 1: plants used for headaches. *J. Ethnopharmacol.*, 43, 89–124.
- Idrissi A., Bellakhdar J., 1989. Etude chimiotaxonomique de diverse populations de *Mentha suaveolens* E. H. du Maroc. *J. Rev. Maroc. Pharm.* 5, 79-88.
- Iscan G., Kirimer N., Kurkcuoglu M., Baser K.H. C., Demirci F., 2002. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 3943–3946.
- Jäger A.K., Almqvist J.P., Vangsøe S.A.K., Stafford G.I., 2007. Compounds from *Mentha aquatica* with affinity to the GABA-benzodiazepine receptor. *S. Af. J. Bot.*, 73, 518-521.
- Jain S.K., 1968. Medicinal plants. New Delhi, India: National book trust, Caxton press private limited.
- Jalal K., Reza R.A., 2011. Comparison of essential oil components of *Thymus daenensis* celak. And *T. fedtschenkoi* in flowering stage. *Elixir Online Journal*, 2273-2275.
- Jamshidi A.M., Aminzadeh M., Azarnivand H., Abedi M., 2006. Effect of evaluation for quality and quantity of essential oil of *Thymus kotschynus* (damavand-tar). *Faslnamah-iGiyahan-i Daruyi*, 5, 17-22.
- 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, 392-396.

Jérémie N., Laurent P., Sofia O.R., Cédric D., Véronique F., Léonard H., Caroline S., Pierre D., 2016. *Plastotoma rotundifolium* aerial tissue extract has antibacterial activities. *Ind. Crops Prod.*, 86, 301-310.

Jia H.L., Ji Q. L., Xing S. L., Zhang P. H., Zhu G. L., Wang X.H., 2010. Chemical composition and antioxidant, antimicrobial activities of the essential oils of *Thymus marschallianus* Will. and *Thymus proximus* Serg. *J. Food Sci.*, 75, 59-65.

Jian Z., Li-Yun W., Lu Z., Bin W., Ai-Hua S. 2003. Two new monoterpenoid glycosides from *Mentha spicata* L. *J. Asian Nat. Prod. Res.*, 5, 69-73.

Jin K.C., Sung-Wan K., Duk-Sil K., Jong Y.L., Soyoung L., Hyun-Mee O., Yeong S.H., Jeongsoo Y., Pil-Hoon P., Tae-Yong S., Taeg K.K., 2016. Oleanolic acid acetate inhibits rheumatoid arthritis by modulating T cell immune responses and matrix-degrading enzymes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 290, 1-9.

Jing W., Hui R., Qiao-Lin X., Zhong-Yu Z., Ping W., Xiao-Yi W., Yong C., Xue-Xiang C., Jian-Wen T., 2015. Antibacterial oleanane-type triterpenoids from pericarps of *Akebia trifoliata*. *Food Chem.*, 168, 623-629.

Johnson M., Wesely E.G., Kavitha M.S., Uma V., 2011. Antibacterial activity of leaves and inter-nodal callus extracts of *Mentha arvensis* L. *Asian Pac. J. Trop. Med.*, 4, 196-200.

Juntachote T., Berghofer E., Siebenhandl S., Bauer F., 2007. Antioxidative effect of added dried Holy basil and its ethanolic extracts on susceptibility of cooked ground pork to lipid oxidation. *Food Chem.*, 100, 129-135.

Kabouche A., Ghannadi A., Kabouche Z., 2009. The highest thymol containing essential oil of the genus *Thymus ciliatus*, *Nat. Prod. Commun.*, 4, 1251-1252.

Kabouche A., Kabouche Z., Bruneau C., 2005. Analysis from the essential oil of *Thymus numidicus* (poiret) from Algeria. *Flavour Frag. J.*, 20, 235-236.

- Kabouche Z., Boutaghane N., Laggoune S., Kabouche A., Ait-kaki Z., Benlabed K., 2005. Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria. *Int. J. Aromatherapy*, 15, 129-133.
- Kalpana P., Alka M., 2012. Hepatoprotective activity of *Mentha arvensis* Linn. leaves against CCl₄ induced liver damage in rats. *Asian Pac. J. Trop. Biol.*, 223-226.
- Kalyoncu F., Cetin B., Saglam H., 2006. Antimicrobial activity of common madder (*Rubia tinctorum* L.). *Phytother. Res.*, 20, 490-492.
- Kamkar A., Javan A.J., Asadi F., Kamalinejad M., 2010. The antioxidative effect of Iranian *Mentha puegium* extracts and essential oil in sunflower oil. *Food Chem. Toxicol.*, 48, 1796-1800.
- Karaboduk K., Karabacak O., Yiyit Dogan S., Karaboduk H., Gunduzer E., Tekinay T., 2014. Comparison of antimicrobial, antioxidant capacities and HPLC analysis of three *Stachys* species in Turkey. *J. Environ. Prot. Ecol.*, 15, 1293–1302.
- Karasawa D., Shimizu S., 1980. Triterpene acids in Callus Tissues from *Mentha arvensis* var. *piperascens* Mal. *Agric. Biol. Chem.*, 44, 1203-1205.
- Kartal N., Sokmen M., Tepe B.D., Polissiou M., Sokmen A., 2007. Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. *Food Chem.*, 100, 584-589.
- Kennouf S., Benchiekh D., Djidel S., Dahamna S., Amira S., 2013. Polyphenols and antioxidant properties of extracts from *Mentha pulegium* L. and *Matricaria chamomilla* L. *Pharmacognosy communications*. 3, 35-40.
- Khanavi M., Hajimahmoodi M., Cheraghi-Niroomand M., Kargar Z., Ajani Y., Hadjiakhoondi A., Oveisi M.R., 2009. Comparison of the antioxidant activity and total phenolic contents in some *Stachys* species. *Afr. J. Biotechnol.* 8, 1143-1147.

- Khanavi M., Sharifzadeh M., Hadjiakhoondi A., Shafiee A., 2005. Phytochemical investigation and anti-inflammatory activity of aerial parts of *Stachys byzantine*, *J. Ethnopharmacol.*, 97, 463-468.
- Khorshidi J., Rasouli M., Rustaiee A.R., Mohamadparast B., 2014. Chemical Composition of the Essential Oil of *Thymus fedtschenkoi* Growing Wild in Iran. *J. Essent. Oil Bear. Pl.*, 17, 173-175.
- Kim H.K., Kim M., Kim S., Kim M., Chung J.H., 2004. Effects of Green Tea Polyphenol on Cognitive and Acetylcholinesterase Activities. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68, 1977-1979.
- Kim-Chung T.P., Gyo-Nam K., Hae-Dong J., 2012. *In vitro* and intracellular antioxidant capacity of thymyl methyl ether as a major component in *Blumea lanceolaria* (Roxb.) Druce leaf oil. *Food Chem. Toxicol.*, 50, 1583–1588.
- Kizil S., Uyar F., 2006. Antimicrobial activities of some thyme (*Thymus*, *Satureja*, *Origanum* and *Thymbora*) species against important plant pathogens. *Asian J. Chem.*, 18, 1455-1461.
- Knapp M.J., Knopman D.S., Solomon P.R., Pendlebury W.W., Davis C.S., Gracon S.I., Apter J.T., Lazarus C.N., Baker K.E., Barnett M., 1994. A 30-week randomized controlled trial of high-dose tacrine in patients with Alzheimer's disease. *J. Am. Med. Assoc.*, 271, 985-991.
- Kobzar A.Y., Nikonov G.K., 1986. Flavonoids from the aerial parts of *Betonica officinalis*. *Khim. Prir. Soedin.*, 5, 636-637.
- Koehlin-Ramonatxo C., 2006. Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or another way for nutrition in respiratory diseases. *Nutr. Clin. Métabol.*, 20, 165-177.
- Koedam E.L.G.E., Lauffer V., Van der Vlies A.E., Van der Flier W.M., Scheltens P., Pijnenburg Y.A.L., 2010. Early-versus late-onset Alzheimer's disease: more than age alone. *J. Alzheimers Dis.*, 19, 1401-1408.

Komes D., Horžić D., Belščak A., Kovačević Ganić K., Vulić I., 2010. Green Tea Preparation and Its Influence on the Content of Bioactive Compounds. *Food Res. Int.*, 43, 167–76.

Kothari S. K., Sing U. B., 1995. The effect of row spacing and nitrogen fertilization on scotch spearmint (*Mentha gracilis* Sole). *J. Essent. Oil Res.*, 7, 287–297.

Kotsos M., Aligiannis N., Mitaku 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, 377–386.

Kotsos M.P., Aligiannis N., Mitakou S., 2007. A new flavonoid diglycoside and triterpenoids from *Stachys spinosa* L. (Lamiaceae). *Biochem. Sys. Ecol.*, 35, 381-385.

Kouch M., Bennadja S., Djahoudi A., Aouadi S., 2014. Antipseudomonal activity of the essential oil of *Thymus numidicus* Poiret. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 25, 149-153.

Kowati R., Satish B.P., Harsha R., Dinesha R., Hareesh A.R., 2010. In vitro antioxidant activity of leaves of *Mentha arvensis* Linn. *J. Pharm. Res.*, 3, 1951-4.

Kuchkbay, F.Z., Kuyumcu, E., 2010. Essential oil composition of *Thymus eriocalyx* (Ronniger) Jasas Turkey. *Asian J. Chem.*, 22, 3615-3621.

Kukic J., Petrovic S., Niketic M., 2006. Antioxidant activity of four endemic *Stachys* taxa. *Biol Pharm Bull.*, 29, 725-729.

Kumar D., Ali Bhat Z., Kumar V., Raja W.Y., Shah M.Y., 2013. Anti-anxiety activity of *Stachys tibetica* Vatke. *Chinese J. Nat. Med.*, 11, 0240-0244.

Küpeli E., Sahin F.P., Yesilada E., Calis I., Ezer N., 2007. In vivo anti-inflammatory and antinociceptive activity evaluation of phenolic compounds from *Sideritis stricta*. *Z. Naturforsch. C.*, 62, 519–525.

Kyeong W.W., Ji W.H., Sang U.C., Ki H.K., Kang R.L., 2014. Triterpenes from *Perilla frutescence* var. *acuta* and their cytotoxic activity. *Nat. Prod. Sci.*, 20, 71-75.

- Lakhal H., Boudiar T., Kabouche A., Laggoune S., Kabouche Z., Topçu G., 2011. Antioxidant activity and flavonoids from *Stachys ocymastrum*. *Chem. Nat. Comp.*, 46, 964-965.
- Laouer H., Boulaacheb N., Akkal S., Meierhenrich U.J., Baldovini N., Prado S., 2009. Composition and in vitro antimicrobial activities of the essential oils of two populations of *Thymus numidicus* Poiret. *J. Essent. Oil Res.*, 21, 374-377.
- Larousse, 2001. Encyclopédies des plantes médicinales. Larousse/VUEF, 234.
- Lazare S.S, Raduis M., Valérie M.L., Gaëtan H., Alembert T.T., Evelyne O., Gabriel N.F. 2015. Triterpenes and Lignans from *Kigelia africana*. *J. App. Pharm. Sci.*, 5, 001-006.
- Lehbili M., Chibani S., Kabouche A., Semra Z., Smati F., Abuhamdah S., Touzani R., Kabouche Z., 2013. Composition, antibacterial and antioxidant activity of the essential oil of *Thymus guyonii* de Noe from Algeria. *Der Pharmacia Lettre*, 5, 306-310.
- Leopoldini M., Russo N., Toscano M., 2011. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chem.*, 125, 288-306.
- Leoporini L., Menghini L., Foddai M., Petretto G.L, Chessa M, Tirillini B, Pintore G. 2015. Antioxidant and antiproliferative activity of *Stachys glutinosa* L. ethanol extract. *Nat. Prod. Res.*, 29, 899-907.
- Lewis WH, Elvin-Lewis MPF. Medical botany.Plants affecting man'shealth. New York: Wiley, 1977.
- Li Y., Fabiano-Tixier AS., Chemat F., 2014. Essential oil as reagent in green chemistry. Springer Briefs in Green Chemistry for Sustainability, 9-20.
- Liu R.H., 2003. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *Am. J. Clin. Nutr.*, 78, 517 –520.

- Luhata L.P., Munkombwe M., 2015. Isolation and characterisation of stigmasterol and β -sitosterol from *Odontonema strictum* (Acanthaceae). *J. Innov. Pharm. Biol. Sci.*, 2, 88-95.
- MacDonald-Wicks L.K., Wood L.G., Garg M.L., 2006. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *J. Sci. Food Agric.*, 86, 2046–2056.
- Maleki N., Garjani A., Nazemiyah 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. Ethnopharmacol.*, 75, 213–218.
- Maleki-Dizaji, N., Nazemiyeh, H., Maddah, N., Mehmani, F., Garjani, A., 2008. Screening of extracts and fractions from aerial parts of *Stachys schtschegleevii* Sosn. for anti-inflammatory activities. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 21, 338–343.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L., 2004. Polyphenols: Food Sources and Bioavailability. *Am. J. Clin. Nut.*, 79, 727–47.
- 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 *Betonia*. *Phytochemistry*, 65, 1247-1253.
- Marina R., Ana B., Mercedes P., Artur J.M.V., María del Carmen G., 2014. Release and antioxidant activity of carvacrol and thymol from polypropylene active packaging films. *Food Sci. Technol.* 58, 470-477.
- Martinez-Perez Y., Quijano-Celis C.E., Pino J.A., 2007. Volatile constituents of Cuban thyme oil (*Thymus vulgaris* L.). *J. Essent. Oil Bear. Pl.*, 10, 179-183.
- Marzouk B., Ben hadj Fredj M., Chraief I., Mastouri M., Boukef K., Marzouk Z., 2008. Chemical composition antimicrobial activity of essential oils from Tunisian *Mentha pulegium* L. *J. Food Agric. & Envi.*, 6, 78-82.

Matkowski A., Piotrowska M., 2006. Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae. *Fitoterapia*, 77, 346–353.

McKay D.L., Blumberg J.B., 2006. A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). *Phytother. Res.*, 20, 519–530.

McLafferty F.W., Stauffer D.B., 1991. *The Important Peak Index of the Registry of Mass Spectral Data*, John Wiley & Son, New York, NY.

Melek F.R., Radwan A.S., El-Ansari M.A., El-Gindi O.D., Hilal S.H., Genenah A.A., 1992. Diterpenes from *Stachysaegyptiaca*. *Fitoterapia*, 63, 276.

Menphini A., Pagiotti R., Capuccella, M., 1993. Antifungal activity of carvacrol chemotypes of winter savory harvested in Italy. Riv. Ital. EPPOS 4 (Spec. NUM.). *Chem. Abstr.*, 123, 566-571.

Meremeti A., Karioti A., Skaltsa H., Heilmann J. Sticher O., 2004. Secondary metabolites from *Stachys ionica*. *Biochem. Sys. Ecol.*, 32, 139-151.

Meshkatalatdat M.H., Sarabi R.S., Amiri H., Piraei M., 2006. GC/MS analysis of the essential oil of *Thymus persicus* leaves. *Asian J. Chem.*, 18, 2385-2387.

Miao Y., Tang Y., Wu Y., Li C., 2011. Study on the chemical components of essential oil of *Thymus quinquecostatus* Celak. Chunye. *Shizhen Guoyi Guoyao*, 22, 305-306.

Miao Y., He N., Zhu J.J., 2010. History and new developments of assays for cholinesterase activity and inhibition. *Chem. Rev.*, 110, 5216-5234.

Miguel M.G., 2010. Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. *Flavour Fragr. J.*, 25, 291–312.

Miguel M.G., Falcato-Simoes M., Figueiredo A.C., Goncalves Barroso J.M., Pedro L.G., Carvalho L.M., 2005. Evaluation of the antioxidant activity of *Thymus capitata*, *Thymus mastichina* and *Thymus camphoratus* essential oils. *J. Food Lipids*, 12, 181-197.

Miladi H., Ben Slama R., Mili D., Zouari S., Bakhrouf A., Ammar E., 2013. Essential oil of *Thymus vulgaris* L. and *Rosmarinus officinalis* L.: Gas chromatography-mass spectrometry analysis, cytotoxicity and antioxidant properties and antibacterial activities against foodborne pathogens. *Nat. Sci.*, 5, 729-739.

Miller H.M., 1971. A simplified method for the evaluation of antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 45, 91.

Mingliang L., Lingyu X., Zhenlin L., Shihui Q., Minjian Q., 2013. Chemical constituents from *Mentha canadensis*. *Biochem. Syst. Ecol.*, 49, 144-147.

Miyase T., Yamamoto R., Ueno A., 1996. Betonicosides A-D and betonicolide from the roots of *Stachys officinalis*. *Chem. Pharm. Bull.*, 44, 1610-1613.

Mkaddem M.G., Romdhane M., Ibrahim H., Ennajar M., Lebrihi A., Mathieu F., Bouajila J., 2010. Essential oil of *Thymus capitatus* Hoff. Et Link. From Matmata, Tunisia : Gas chromatography-mass spectrometry analysis and antimicrobial and antioxidant activities. *J. Med. Food*, 13, 1500-1504.

Moghtader M., 2012. Antifungal effects of the essential oil from *Thymus vulgaris* L. and comparison with synthetic thymol on *Aspergillus Niger*. *J. Yeast Fungal Res.*, 3, 83-88.

Mohaddese M., Ghasem H., 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. *J. Ethnopharmacol.*, 119, 325-327.

Monteiro A., Póvoa O., Marinho S., Rodrigues L., Monteiro P., 2007. *Mentha pulegium* e *Mentha cervina*, Os Poejos na boa Cozinha Portuguesa. ISA Press, Lisboa.

Moreno L., Bello R., Primo-Yúfera E., Esplugues J., 2002. Pharmacological properties of the methanol extract from *Mentha suaveolens* Ehrh. *Phytotherapy*, 16, 10-13.

Mortensen A., Skibsted L.H., 1997. Importance of carotenoid structure in radical scavenging reactions. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 2970– 2977.

Morteza-Semmani K., Rostami B., Akbazadeh M., 2006. Essential oil composition of *Thymus kotschyanus* and *Thymus pubescens* from Iran. *J. Essent. Oil Res.*, 18, 272-274.

Motilva M.J., Serra A., Macià A., 2013. Analysis of Food Polyphenols by Ultra High Performance Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry: An Overview., State-of-the art of (UHP)LC-MS(-MS) techniques and their practical application. *J. Chromatogr. A*, 1292, 66–82.

Mozaffarian V., 1996. A dictionary of Iranian plant names. Farhang Moaser Publishers, Tehran.

Müberra K., Damien D.H.J., Husnu C.B., Raimo, H. 2004. Screening of free radical scavenging compounds in water extracts of *Mentha* samples using a postcolumn derivatization method. *J. Agri. Food. Chem.*, 52, 5004-5010.

Muñoz O., Pena R.C., Montenegro G., 2001. Iridoids from *Stachys grandidentata* (Labiatae). *Z. Naturforsch. C.*, 56, 902–903.

Murata T., Endo Y., Miyase T., Yoshizaki F., 2008. Iridoid glycoside constituents of *Stachys lanata*. *J. Nat. Prod.*, 71, 1768–1770.

Nair B., 2001. Final report on the safety assessment of *Mentha piperita* (peppermint) oil, *Mentha piperita* (peppermint) leaf extract, *Mentha piperita* (peppermint) leaf and *Mentha piperita* (peppermint) leaf water. *Int. J. Toxicol.*, 20, 61–73.

Nakamura Y., Watanabe S., Miyake N., Kohno H., Osawa T., 2003. Dihydrochalcones: evaluation as novel radical scavenging antioxidants. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 3309-3312.

Nateq A.H., Zaid M.N., 2016. Isolation and elucidation of some chemical constituents of *Lavandula officinalis*. *J. Chem. Pharm. Res.*, 8, 394-401.

- Nateq A.H., Zaid M.N., 2016. Isolation and elucidation of some chemical constituents of *Lavandula officinalis*. *J. Chem. Pharma. Res.*, 8, 394-401.
- Nazemiyeh H., Shoeb M., Movahhedine 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.
- Nejad-Elibrahimi S., Hadian J., Mirjalili M.H., Sonboli A., Yousefzadi M., 2008. Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymus carmanicus* at different phenological stages. *Food Chem.*, 110, 927-931.
- Newall C.A., Anderson L.A., Philipson J.D., 1996. Herbal medicines a guide for health care professional. 1st Ed. Tpp, London, 208.
- Nezhadali A., Nabavi M., Rajabian M., 2012. Chemical composition of the essential oil of *Thymus vulgaris* L. from Iran. *J. Essent. Oil Bear. Pl.*, 15, 368-372.
- Nicholson R.L., 1992. Hammerschmidt R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 30, 369-389.
- Nickavar B., Alinaghi A., Kamalinejad M. 2008. Evaluation of the Antioxidant Properties of Five *Mentha* Species. *Iran. J. Pharm. Res.*, 7, 203-209.
- Nicolson G.L., 2003. Lipid replacement as an adjunct to therapy for chronic fatigue, anti-aging and restoration of mitochondrial function. *J. Am. Nutraceutical Assoc.*, 6, 22-28.
- Nouasri A., Dob T., Toumi M, Dahmane D. Krimat S., Lamari L., Chelgoume C., 2015. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus lanceolatus* Desf., an endemic thyme from Algeria, *J. Essent. Oil Bear. Pl.*, 18, 1246-1252.
- Nripendra N.B., Subarna S., Mohammed K.A., 2014. Antioxidant, antimicrobial, cytotoxic and analgesic activities of ethanolic extract of *Mentha arvensis* L. *Asian Pacific J. Trop. Biomed.*, 4, 792-797.

Ody P., 2000. O guia completo das plantas medicinais, first ed. Dorling Kindersley/Civilização, Portugal.

Omidbaigi R., Sefidkon M.H., 2005. Essential oil composition of *Thymus citriodorus* L. cultivated in Iran. *Flav. Frag. J.*, 20, 237-238.

Orech F.O., Akenga T., Ochora J., Friis H., Aagaard-Hansen J., 2005. Potential Toxicity of some traditional leafy vegetables consumed in Nyang'oma division, Western Kenya. *Afri. J. Food Nutri.Sci.*, 5, 1,13.

Orgiyan T. M., 1970. Titolo del lavoro: Structure of the by-product diterpenoids of hedge-nettle betony, *Aktual. Probl. Izuch. Ef. Rast. Efim. Masel*, 160-161.

Orgiyan T.M, Popa D.P., 1969. Diterpenoids from *Stachys annua*. *Chem. Nat. Comp.*, 5, 5-6.

Ozen T., Demirtas I., Aksit H., 2010. Determination of antioxidant activities of various extracts and essential oil compositions of *Thymus praecox* subsp. *skorpilii* var. *skorpilii*. *Food Chem.*, 124, 58-64.

Öztürk M., Duru M.E., Aydogmus-Ozturk F., Harmandar M., Mahlicli M., Kolak U., Ulubelen A., 2009. GC-MS analysis and antimicrobial activity of essential oil of *Stachys cretica* subsp. *smyrnaea*. *Nat. Prod. Commun.*, 4, 109-114.

Öztürk M., Kolak U., Topcu G., Oksuz S., Choudhary M. I. 2011. Antioxidant and anticholinesterase active constituents from *Micromeria cilicica* by radical-scavenging. *Food Chem.*, 126, 31-38.

Panizzi L., Flamini G., Cioni P.L., Morelli I., 1993. Composition and antimicrobial activity of essential oils of four mediterranean Lamiaceae. *J. Ethnopharmacol.*, 39, 167-170.

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, 64-69.

Passannanti S., Paternostro M., Piozzi F., 1990. Tormentic acid and other components from *Mentha citrata*. *Fitoterapia*, 61, 54-56.

Paternostro M.P., Maggio A.M., Piozzi F., Servettaz O., 2000. Labdane diterpenes from *Stachys plumose*, *J. Nat. Prod.*, 63, 1166-1167.

Patrícia G.G.D.N., Telma L.G.L., Ayla M.C.B., Ângela M.C.A., Daniele A.F., Gilvandete M.P.S., Raimundo B.F., José G.M.C., 2014. Antibacterial activities of ursolic acid and derivatives. *Molecules*, 19, 1317-1327.

Pavel M., Ristic M., Stevic T., 2010. Essential oil of *Thymus pulegioides* and *Thymus glabrescens* from Romania : chemical composition and antimicrobial activity. *J. Serb. Chem. Soc.*, 75, 27-34.

Pavela R., 2005. Insecticidal activity of some essential oils against larvae of *Spodoptera littoralis*. *Fitoterapia*, 76, 691-696.

Perva-Uzunalić A., Škerget M., Knez Z., Bernd W., Otto F., Grüner S., 2006. Extraction of Active Ingredients from Green Tea (*Camellia Sinensis*): Extraction Efficiency of Major Catechins and Caffeine. *Food Chem.*, 96, 597–605.

Phillips R., Foy N., 1990. Herbs. London: Pan Books Ltd. Pooley E., 2005. A Field Guide to Wild Flowers KwaZulu-Natal and the Eastern Region, First edition. Natal Flora Publications Trust, second impression.

Piozzi F., Bruno M., 2011. Diterpenoids from roots and aerial parts of the genus *Stachys*. *Rec. Nat. Prod.*, 5, 1-11.

Piozzi F., Paternostro M., Passannanti S., Gracs-Baitz E., 1986. Triterpenes from *Amaracus dictamnus*. *Phytochemistry*, 25, 539-541.

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, 887-889.

Piozzi F., Savona G., Hanson J.R., 1980. Kaurenoid diterpenes from *Stachys lanata*. *Phytochemistry*, 19, 1237-1238.

Pohanka M., 2011. Alzheimer's disease and related neurodegenerative disorders: implication and counteracting of melatonin. *J. Appl. Biomed.*, 9, 185-196.

Pooley E., 2005. A Field Guide to Wild Flowers KwaZulu-Natal and the Eastern Region, First edition. Natal Flora Publications Trust, second impression.

Popa D.P., Orgiyan T.M., Kharitov Kh.Sh., 1974a. Structure of annuanone. *Chem. Nat. Comp.*, 10, 324-330.

Popa D.P., Orgiyan T.M., Samek Z., Dolejs L., 1972a. Structure of stachysolone. *Chem. Nat. Comp.*, 8, 292-295.

Popa D.P., Orgiyan T. M., 1972a. The stereochemistry of stachysolone. *Chem. Nat. Comp.*, 8, 717-719.

Popa D.P., Orgiyan T.M., 1974b. Minor diterpenoids of *Stachys annua*. *Chem. Nat. Comp.*, 10, 410.

Popa D.P., Pasechnik G.S., 1974c. Structure of stachysic acid. A new diterpenoid of kaurane series, *Chem. Nat. Comp.*, 10, 454-45.

Póvoa O., Farinha N., Marinho S., Nunes P., Godinho D., Mata F., Rodrigues L., Monteiro A., 2006. Pennyroyal (*Mentha pulegium* L.) and Hart's Pennyroyal (*Mentha cervina* L.) biodiversity in Alentejo. *Acta Hort.*, 723, 91-97.

Pridham J.B., 1960. *Phenolics in Plants in Health and Disease*. Pergamon Press, New York.

Prior R.L., Wu X.L., Schaich K., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53, 4290-4302.

Prior R.L., Wu X.L., Schaich K., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 4290-4302.

Quezel P., Santa S., 1962. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Paris : C.N.R.S. 786.

Quezel P., Santa S., 1962. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Paris : C.N.R.S, 805.

Quezel P., Santa S., 1962. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Paris : C.N.R.S. 816.

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 behavior. *Phytother. Res.*, 19, 854–858.

Rahul C., Santosh K.S., Deepak S., Raghavendra S. P., Jayakumar S., Vineet K., Gautam S., Bharat B.A., Krishna B.S., 2014. Potent Anti-Inflammatory Activity of Ursolic Acid, a Triterpenoid Antioxidant, Is Mediated through Suppression of NF- κ B, AP-1 and NF-AT. *Plos One*, 7, 313-318.

Rahul C., Santosh K.S., Deepak S., Raghavendra S.P., Jayakumar S., Vineet K., Gautam S., Bharat B. A., Krishna B.S., 2012. Potent Anti-Inflammatory Activity of Ursolic Acid, a Triterpenoid Antioxidant, Is Mediated through Suppression of NF- κ B, AP-1 and NF-AT. *PLoS One*, 7, 313-318.

Rasooli I., Owlia P., 2005. Chemoprevention by thyme oils *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. *Phytochemistry*, 66, 2851-2856.

Rastogi R.P., Mehrotra B.N., 1999. Compendium of Indian Medicinal Plants. Lucknow: Vol 1, New Delhi, India.

Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C., 1999. Antioxydant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.*, 26, 1231-1237.

Rechinger H., 1986. Flora Iranica, Lamiaceae, vol. 150. Akademische Druck Verlagsantalt,

Recio M.C., Giner R.M., Mánez S., Ríos J.L., 1994. Structural consideration on theiridoids as anti-inflammatory agents. *Planta Med.*, 60, 232–234.

René C., Bianka S., Christian D., Renate S., 2012. Tormentic acid derivatives : synthesis and apoptotic activity. *Eur. J. Med. Chem.*, 56, 237-245.

Riahi L., Elferchichi M., Ghazghazi H., Jebali J., Ziadi S., Aouadhi C., Chograni H., Zoghalmi N., Mliki A., 2013. Phytochemistry, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils of *Mentha rotundifolia* L. in Tunisia. *Ind. Corps Prod.*, 49, 883-889.

Riboli E. Norat T., 2003. Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. *Am. J. Clin. Nutr.*, 78, 559 –569.

Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Bio. Med.*, 20, 933–956.

Ritchason J., 1995. The Little Herb Encyclopedia: The Handbook of Natures Remedies for a Healthier Life, 3rd ed. Woodland Health Books, USA, 254.

Rivolier, C. 1977. Secrets et vertus des plantes médicinales. Selection du Reader's Digest,

S.A. Robak J., Gryglewski R.J., 1988. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol.*, 37, 837–841.

Robak J., Gryglewski R.J., 1998. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol.*, 1, 37, 837-841.

Rodrigues L., Monteiro P., Póvoa O., Teixeira G., Moldão M., Figueiredo A.C., Monteiro A., 2008. Morphology of secretory structures and essential oil composition in *Mentha cervina* L. from Portugal. *Flavour Fragr. J.*, 23, 340–347.

Ross S.A., Zinchenko T.V., 1975. Triterpenoids and steroids from *Stachys palustris*. *Farm. Zh.*, 30, 91-92.

Sabahi Z., Zarshenas M.M., Farmani F., Faridi P., Moein S., Moein M., 2013. Essential oil composition and in vitro antioxidant activity of ethanolic extract of *Thymus daenensis* celak from Iran. *Global J. Pharmacol.*, 7, 153-158.

Sachin J., Dinesh K.J, Neelam B., 2012. *In-Vivo* antioxidant avticity of ethanolic extract of *Mentha pulegium* leaf against CCl₄ induced toxicity in rats. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 737-740.

Saeedi M., Morteza-Semnani K., Mahdavi M.R., Rahimi F., 2008. Antimicrobial studies on extracts of four species of *Stachys*. *Indian J. Pharm. Sci.*, 70, 403-406.

Saeide S., Kazem H., Mehdi G., Mohammad H., Ramezan A.T., Ali M., Gholamreza F., 2014. Antibacterial activity of ethyl acetate and aqueous extracts of *Mentha longifolia* L. and hydroalcoholic extract of *Zataria multiflora* Boiss. plants against important hman pathogens. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 7, 186-189.

Safaei-Ghomi J., Ebrahimabadi A.E., Djafari-Bidgoli Z., Batooli H., 2009. GC/MS analysis and in vitro antioxidant activity of essential oil and methanol extracts of *Thymus caramanicus* Jalas main constituent carvacrol. *Food Chem.*, 115, 1524-1528.

Salas J.B., Tellez T. R., Pardo F.M.V., Alonso M. J. P., Capdevilla M.A.C., 2011. Study of the essential oil of three species of thyme in their limit of distribution in Spain. *Acta Bot. Gallica*, 158, 251-262.

Salgueiro L.R., Pinto E., Goncalves M.J., Costa I., Palmeira A., Cavaleiro C., Pina-Vaz C., Rodrigues A.G., Martinez-de-Oliveira J., 2006. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus capitellatus* against *Candida aspergillus* and dermatophyte strains. *Flav. Fragrance J.*, 21, 749-753.

Sarikurkcu C., Sabih O.M., Eskici M., Tepe B., Can S., Mete E., 2010. Essential oil composition and antioxidant activity of *Thymus longicaulis* C. Presl subsp. *longicaulis* var. *longicaulis*. *Food Chem. Toxicol.*, 48, 1801-1805.

Sartoratto A., Machado A.L., Delarmelina C., Figueira G.M., Duarte M.C., Rehder Shah P., D'Mello P., 2004. A review of medicinal uses and pharmacological effects of *Mentha piperita*. *Nat. Prod. Radiance*, 3, 214–221.

Savchenko V.M., Khvorostinka V.M., 1978. Effects of a preparation from *Stachys inflata* on the course of experimental hepatitis in rats. *Farmatsevtichnii-Zhurnal*, 33, 50-53.

Schroeter H., Boyd C., Spencer J.P.E., Williams R.J., Cadenas E., Rice-Evans C., 2002. MAPK signaling in neurodegeneration: Influences of flavonoids and of nitric oxide. *Neurobiol. Aging*, 23, 861-880.

Senevirathne M., Kim S., Siriwardhana N., Ha J., Lee K., Jeon Y., 2006. Antioxidant potential of *Ecklonia cava* on reactive oxygen species scavenging, metal chelating, reducing power and lipid peroxidation inhibition. *Food Sci. Tech. Int.*, 12, 27-38.

Serrilli A.M., Ramunno A., Piccioni F., Serafini M., Ballero M., 2005. Flavonoids and iridoids from *Stachys corsica*. *Nat. Prod. Res.*, 19, 561–565.

Serrilli A.M., Ramunno A., Piccioni F., Serafini M., Ballero M., Bianco A., 2006. Monoterpenoids from *Stachys glutinosa* L. *Nat. Prod. Res.*, 20, 648–652.

Shah R.S., Lee H.G., Xiongwei Z., Perry G., Smith M.A., Castellani R.J., 2008. Current approaches in the treatment of Alzheimer's disease. *Biomed. Pharmacother.*, 62, 199-207.

Shahnazi S., Khalighi-Sigaroodi F., Ajani Y., Yazdani D., Ahvazi M., Taghiazad-Farid R., 2007. Study on chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus trautvetteri* Klokov & Djes.-Shost. *Fasnamah-i Giyahan-i Daruyi*. 6, 80-88.

Shaiq ali M., Saleem M., Ahmed W., Parvez M., Yamdagni R., 2002. A chlorinated monoterpene ketone, acylated β -sitosterol glycosides and a flavanone glycoside from *Mentha longifolia* (Lamiaceae). *Phytochemistry*, 59, 889-895.

Sidjui S.L., Melong R., Mahiou-Leddel V., Herbette G., Tchinda T.A., Ollivier E., Folefoc G.N., 2015. Triterpenes and lignans from *Kigelia africana*. *J. App. Pharm. Sci.*, 5, 001-006.

Sies H., 1993. Strategies of antioxidant defence. *Eur. J. Biochem.*, 215, 213–219.

Singh B., Sahuand P.M., Sharma M.K., 2002. Anti-inflammatory and antimicrobial activities of triterpenoids from *Strobilanthes callosus* Nees. *Phytomedicine*, 9, 355-359.

Singh R., Shushni M.A.M., Belkheir A., 2011. Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. *Arabian J. Chem.*, 8, 322-328.

Singhal A.K., Naithani V., Bangar O.P., 2012. Medicinal plants with a potential to treat Alzheimer and associated symptoms. *Int. J. Nutr. Pharmacol. Neurol. Dis.*, 2, 84-91.

Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299, 152-178.

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.

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. *Planta Med.*, 65, 5-256.

Slavkovska V.N., Lakusic B.S., Jancic R.B., Mimica-Dukic N.A., Vujcic D.S., 2006. Chemical composition of the essential oil of *Thymus bracteosus* Vis ex Bentham (Lamiaceae). *J. Essent. Oil Res.*, 18, 310-311.

Slinkard K., Singleton V.L., 1977. Total phenol analyses : Automation and comparison with manual methods. *Am. J. Enol. Vitic.*, 28, 49-55.

Sofowora A., 1993. Medicinal plants and traditional medicinal in Africa. 2nd Ed. Sunshine House, Ibanan, Nigeria, Spectrum Books Ltd, Screening plants for bioactive agents.

Sohi S.M.H., Eghdami A., Sadeghi F., 2011. Antioxidant activity and high performance liquid chromatography analyzation of methanolic and aqueous extract of *Stachys inflata*. *Org. Chem. J.*, 1, 36-43.

Sroka Z., Cisowski W., 2003. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food Chem. Toxicol.*, 41, 753–758.

Stahl-Biskup E, Venskutonis R.P., 2004. Handbook of herbs and spices. In K.V. Peter (Ed). NY. NJ: CRC Press. Thyme, 2, 304-328.

Stahl-Biskup E., Sáez F., 2002. Thyme the genus *Thymus*. NY, NJ: Taylor & Francis.

Suhaj M., 2006. Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. *J. Food Comp. Anal.*, 19, 531–537.

Sukhdev SH., Sumit PSK., Gennaro L., Dev DR., 2008. Extraction Technology for Medicinal and Aromatic Plants, 155-177.

Sun G., Miao Y., Gu X., Shi J., 2014. Microwave assisted extraction, chemical components and antibacteria activity study of *Thymus monoglicus* Ronn essential oil. *Appl. Mech. Mat.*, 440, 127-130.

Sun J., Chen P., Lin L.Z., Harnly J.M., 2011. A non-targeted approach to chemical discrimination between green tea dietary supplements and green tea leaves by HPLC/MS. *J. Assoc. Offic. Agric. Chem.*, 94, 103-108.

Sung S.Y., Kang S.Y., Lee K.Y., Park M.J., Kim J.H., 2002. (+)- α -Viniferin, a stilbene Trimer from Caranga chamlague inhibits acetylcholinesterase. *Biol. Pharm. Bull.*, 25, 125-127.

Swarnlata S., Mahendra S.A., Shaileendra S., 2007. Flavanoids : A Nutrition Protection against oxidative and UV induced cellular damages. *Pharmacogn. Rev.*, 1, 30-40.

Sydney de Sousa A.A., Gomes Soares P.M., Saldanha de Almeida A.N., Rufino Maia A., Prata de Souza E., Sampaio Assreuy A.M., 2010. Antispasmodic effect of *Mentha piperita* oil on tracheal smooth muscle of rats. *J. Ethnopharmacol.*, 130, 433-436.

Tadhani M.B., Patel V.H., Subhash R., 2007. *In vitro* antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. *J. Food Comp. Anal.*, 20, 323-329.

Takahama U., 1984. Hydrogen peroxide dependent oxidation of quercetin by intact spinach chloroplasts. *Plant Physiol.*, 74, 852-857.

Tapiero H., Tew K. D., Nguyen Ba G., Mathé G., 2002. Polyphenols: Do They Play a Role in the Prevention of Human Pathologies. *Biomed. Pharmacother.*, 56, 200-207.

Teimouri M., 2012. Antimicrobial activity and essential oil composition of *Thymus daenensis* Celak from Iran. *J. Med. Pl. Res.*, 6, 631-635.

Tepe B., Degerli S., Arslan S., Malatyali E., Sarikurkcü C., 2011. Determination of chemical profile, antioxidant, DNA damage protection and antiamebic activities of *Teucrium polium* and *Stachys iberica*. *Fitoterapia*, 82, 237-246.

Tkachev V.V., Nikonov G.K., Atovmyan L.O., Kobzar A.Ya., Zinchenko T.V., 1987. Chemical and X-ray structural investigation of a new diterpene lactone betolide, *Chemistry of Natural Compounds*, 23, 673-678.

Topçu G., Kusman T., 2014. Lamiaceae family plants as a potential anticholinesterase source in the treatment of Alzheimer's disease. *Bezmialem Sci.*, 1, 1-25.

Tozaka A., Soltyka P., Ostapczuk P., Fijaleka Z., 2002. Determination of selected trace elements in herbs and their infusion. *Sci. Total Environ.*, 289, 33-40.

Trease G.E., Evans W.C., 2002. *Pharmacognosy*. 15th Ed. London: Saunders Publishers.

Tsasi G., Samara P., Tsitsilonis O., Jürgenliemk G., Skaltsa H., 2016. Isolation, identification and cytotoxic activity of triterpenes and flavonoids from green walnut (*Juglans regia* L.) pericarps. *Rec. Nat. Prod.*, 10, 83-92.

Tundis R., Bonesi M., Pugliese A., Nadjafi F., Menichini F. Loizzo M.R., 2015. Tyrosinase, Acetyl- and Butyryl-Cholinesterase Inhibitory Activity of *Stachys lavandulifolia* Vahl (Lamiaceae) and Its Major Constituents. *Rec. Nat. Prod.*, 9, 81-93.

Tundis R., Peruzzi L., Menichini F., 2014. Phytochemical and biological studies of *Stachys* species in relation to chemotaxonomy: Review. *Phytochemistry*, 102, 7 -39.

Tusevski O., Kostovska A., Iloska A., Trajkovska L., Simic S.G. 2014. Phenolic production and antioxidant properties of some Macedonian medicinal plants. *Cent. Eur. J. Biol.*, 9, 888–900.

Tzakou, O., Couladis, M., 2008. Essential oil of *Thymus zygioides* var. *lycaonicus* from Greece. *J. Essent. Oil Res.*, 20, 442-443.

Ulanowska K., Majchrzyk A., Moskot M., Jak bkiewicz-Banecka J., W Âgrzyn G., 2007. Assessment of antibacterial effects of flavonoids by estimation of generation times in liquid bacterial cultures. *Biologia*, 62,132-135.

Van Den Broucke C.O, Lemli J.A., 1981. Pharmacological and chemical investigation of Thymue liquid extracts. *Planta Med.*, 41, 129-135.

Van Wyk B., Outdtshoorn B., Gericke N., 1997. *Medicinal plants of South Africa*. Pretoria: Briza Publications, 174.

Vârban D.I., Duda M., Vârban R., et Muntean S., 2009. Research Concerning the Organic Technology for *Satureja Hortensis* L. Culture. *Bulletin UASVM Agriculture*. 66, 225- 229.

Venditti A., Bianco A., Nicoletti M., Quassinti L., Bramucci M., Lupidi G., Vitali L.A., Petrelli D., Papa F., Vittori S., Lucarini D., Maleci Bini L., Giuliani C., Maggi F., 2013. Phytochemical analysis, biological evaluation and micromorphological study of *Stachysalopecurus* (L.) Benth. subsp. *divulsa* (Ten.) Grande endemic to central Apennines, Italy. *Fitoterapia*, 90, 94–103.

Verma R.S., Padalia R.C., Chanotiya C.S, Chauhan A., 2010. Chemical investigation of the essential oil of *Thymus linearis* (Benth. Ex Benth) from western Himalaya, India. *Nat. Prod. Res.*, 24, 1890-1896.

Vieira L.S., 1992. *Fitoterapia da Amazônia: Manual de Plantas Mediciniais (Farmácia de Deus)*, second ed. Agronômica Ceres, São Paulo.

Vinutha B., Prashanth D., Salma K., Sreeja S.L., Pratiti D., Padmaja R., Radhika S., Amit A., Venkateshwarlu K., Deepak M., 2007. Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *J. Ethnopharmacol.*, 109, 359-363.

Vundač V.B., Maleš Ž., Plazibat M., Golja P., Cetina-Čižmek B., 2005. HPTLC determination of flavonoids and phenolic acids in some Croatian *Stachys* taxa. *J. Planar Chromatogr.*, 18, 269–273.

Wang H., Provan G.J., Helliwell K., 2000. Tea flavonoids their functions, utilization and analysis. *Trends Food Sci. Tech.*, 11, 152-160.

Weber P., Bendich A., Schalch W., 1996. Vitamin C and human health review of recent data relevant to human requirements. *Int. J. Vit. Nut. Res.*, 66, 19–30.

Werner S., Nebojsa S., Robert W., Robert S., Olaf K., 2003. Spectral assignments and reference data : Complete assignments of ¹H and ¹³C NMR resonances of oleanolic acid, 18 α -oleanolic acid, ursolic acid and their 11-oxo derivatives. *Magn. Reson. Chem.*, 41, 636-638.

Wolska K.I., Grudniak A.M., Fiecek B., Kraczkiewicz-Dowjat A., Kurek A., 2010. Antibacterial activity of oleanolic and ursolic acids and their derivatives. *Cent. Eur. J. Biol.*, 5, 543-553.

Wszelaki N., Kuciun A., Kiss A., 2010. Screening of traditional European herbal medicines for acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity. *Acta Pharmaceutica*, 60, 119-128.

Wu S., Wei F.X., Li H.Z., Liu X.G., Zhang J.H., Liu J.X., 2013. Chemical composition of essential oil from *Thymus citriodorus* and its toxic effect on liver cancer cells. *Zhongyaocai*, 36, 756-759.

Yadegarinia D., Gachkar L., Rezaei M.B., Taghizadeh M., Asrtaneh S.A., Rasooli I., 2006. Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. *Phytochemistry*, 67, 1249-1255.

Yamahara J., Kitani T., Kobayashi H., Kawahara Y., 1990. Studies on *Stachys sieboldii* MIQ. II. Anti-anoxia action and the action and the active constituents. *Yakugaku Zasshi*, 110, 923-935.

Yamamoto R., Miyase T., Ueno A., 1994. Stachysaponins I–VIII, new oleanane-type triterpene saponins from *Stachys riederi*. *Chem. Pharm. Bull.*, 42, 1291–1296.

Yang M., Hao F., Han J., 2004. Study on the chemical components of essential oil of *Thymus quinquecostatus* in Ningxia Guyuan by GC-MS. *Ningxia Daxue Xuebao, Ziran Kexueban*, 25, 353-355.

Yavari A., Nazeri V., Sefidkon F., Hassani M.E., 2010. Chemical composition of the essential oil of *Thymus migricus* Klokov & Desj.-Shost. from Iran. *J. Essent. Oil Bear. Pl.*, 13, 385-389.

Zargari A., 1990. Medicinal plants. Tehran, Iran. Tehran university of medicinal sciences press. 4, 28-42.

Zdislawa B.H., Halina R.B., Waleria O.S., 1977. Isolation and identification of flavonoid compounds of *Mentha aquatica* L. HERB., *Ann. Soc. Chim. Polonorum*, 51, 701.

Zeghib A., Laggoune S., Kabouche A., Semra Z., Smati, F., Touzani R., Kabouche Z., 2013. Composition, antibacterial and antioxidant activity of the essential oil of *Thymus numidicus* Poiret from Constantine (Algeria). *Der Pharmacia Lettre*, 5, 206-210.

Zellagui A., Boutellaa S., Arab Y., Gherraf N., 2014. GC/MS Analysis and Antioxidant Activity of the Essential Oil leaves *Thymus numidicus* Poiret. growing in Mila. *J. New Technol. Mater.*, 4, 155-160.

Zhigzhitzhapova S.V., Rabzhaeva A.N., Zvontsov I.V., Radnaeva L.D., 2008. Chemical composition of essential oil of *Thymus baicalensis* Serg. from Transbaikalia region. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 1, 73-76.

Zhiri A., Baudoux D., 2005. Huiles essentielles chémotypées et leurs synergies. Edition Inspir Development - rue Goethe, 1 - L-1637 Luxembourg, 3.

Zinchenko T., Voitenko G.N., Lipkan G.N., 1981. Anti-inflammatory, antitoxic and hypoazotemic effect of a *Stachys recta* preparation, stachyrene. *Farmakologiya and Toksikologiya*, 44, 191-194.

Zinchenko T.V., 1969. Flavonoids of *Stachys neglecta*. *Farm. Zh.*, 24, 78-79.

Résumé

Ce travail est consacré à l'étude phytochimique et biologique de trois plantes Algériennes de la famille des Lamiaceae : *Mentha aquatica* L., *Stachys guyoniana* de Noé et *Thymus dreatensis* Batt. Les séparations et les purifications chromatographiques des extraits des parties aériennes et racines de *Mentha aquatica* ont permis d'isoler et d'identifier 16 composés dont un triterpène inédit et 5 acides triterpéniques nouveaux dans le genre.

Les structures moléculaires des composés isolés ont été élucidées principalement par l'utilisation des techniques de RMN 1D et 2D (^1H , ^{13}C , COSY H-H, HMQC et HMBC), par la spectrométrie de masse haute résolution (ESI-MS) et par la comparaison avec les données de la littérature.

L'analyse GC et GC/MS de l'huile essentielle de l'espèce *T. dreatensis*, a montré que cette huile est majoritairement composée de thymol (28,1%), γ -terpinène (18,7%), de thymyl methyl éther (10,9%) et de linalool (5,0%). Cette huile a montré une bonne activité antioxydante avec le test de blanchissement du β -carotène.

5 méthodes ont été utilisées pour évaluer l'activité antioxydante de *Mentha aquatica* et *Stachys guyoniana*. Cette dernière a montré une bonne activité avec les 4 méthodes : β -carotène, DPPH, ABTS et la méthode de chélation par des ions ferreux alors que *Mentha aquatica* a manifesté une activité modérée avec les tests du CUPRAC et de l'ABTS. L'extrait *n*-butanol de *Stachys guyoniana* a montré la meilleure activité anticholinestérase par rapport aux autres extraits testés. Les deux plantes possèdent un bon pouvoir antibactérien vis-à-vis de certaines souches bactériennes, par la méthode de diffusion en milieu gélosé et de détermination de la CMI.

Mots clés : Lamiaceae, *Mentha aquatica*, *Stachys guyoniana*, *Thymus dreatensis*, Triterpènes, Huile essentielle, Activités biologiques, RMN 1D et 2D.

Abstract

This present work concerns the phytochemical and biological study of three Algerian plants belonging to the Lamiaceae family : *Mentha aquatica* L., *Stachys guyoniana* de Noé and *Thymus dreatensis* Batt. Chromatographic separations and purifications of extracts from the aerial parts and roots of *Mentha aquatica* led to the isolation and identification of 16 compounds, including one new triterpene and 5 triterpene acids which are new for the genus.

The structures of isolated compounds were particularly established by the use of NMR 1D and 2D (^1H , ^{13}C , COSY H-H, HMQC and HMBC), high resolution mass spectrometry (ESI-MS and HR-ESI-MS) and by comparison with literature data.

GC and GC/MS analyses of *T. dreatensis* essential oil showed that it was mainly represented by thymol (28.1%) followed by γ -terpinene (18.7%), thymyl methyl ether (10.9%) and linalool (5.0%). This oil showed a good antioxidant activity by the bleaching of β -carotene.

5 methods were used to evaluate the antioxidant activity of *Mentha aquatica* and *Stachys guyoniana*. The latter showed a good activity with 4 methods: β -carotene, DPPH, ABTS and metal chelating whereas *Mentha aquatica* exhibited a moderate activity with CUPRAC and ABTS tests. Compared with the other tested extracts, the *n*-butanol extract of *Stachys guyoniana* showed the highest anticholinesterase activity.

The two plants showed an antibacterial potential against some bacterial strains, by the use of agar diffusion method and MIC's determination.

Keywords : Lamiaceae, *Mentha aquatica*, *Stachys guyoniana*, *Thymus dreatensis*, Triterpenoids, Essential oil, biological activities, NMR 1D and 2D.

ملخص

خصص هذا العمل للدراسة الفيتوكيميائية لثلاث نباتات من عائلة: Lamiaceae: *Thymus dreatensis* Batt. *Stachys guyoniana* de Noé, *Mentha aquatica* L. العزل الكروماتوغرافي لمستخلصات الطبقة الهوائية و الجذور ل *Mentha aquatica* : من عزل 16 مركب، من بينهم 6 أحماض تربينية جديدة في النوع و تربين جديد. تم تحديد البنية الجزيئية للمركبات المعزولة بالاعتماد على تقنية الرنين النووي المغناطيسي أحادية و ثنائية لبعد، مطيافية الكتلة، و على المقارنة مع المعطيات البيبليوغرافية بينت التحاليل باستخدام كروماتوغرافيا الطور الغازي GC و كروماتوغرافيا الطور الغازي المتزاوجة مع مطيافية الكتلة GC/MS للزيت الطيار للنبته *Thymus dreatensis* بأنه يحتوي على المركبات الأساسية (28.1%) thymol، (10.9%) thymyl methyl ether، (18.7%) γ -terpinene و (5.0%) linalool. كما بين هذا الزيت نشاط جيد مضاد للأكسدة باستخدام طريقة β -carotène. واستخدمت 5 طرق لتقييم فعالية ضد الأكسدة للنبتين: *Stachys guyoniana*، *Mentha aquatica*. كانت *Stachys guyoniana* فعالة ضد الأكسدة باستخدام 4 طرق مختلفة : β -carotène ، DPPH ، CUPRAC ، ABTS. أما النبتة *Mentha aquatica* لديها نشاط معتدل مع الطريقتين: CUPRAC و ABTS. مستخلص البوتانول للنبته بين فعالية ممتازة في تثبيط فعالية anticholinestérase أفضل من باقي المستخلصات. كلتا النبتتين لهما فعالية مضادة للبكتيريا.

كلمات مفتاحية: Lamiaceae، *Stachys guyonina*، *Thymys dreatensis*، *Mentha aquatica*، تقنية الرنين النووي المغناطيسي، تربينات، نشاطات بيولوجية، زيوت طيارة