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

UNIVERSITE MENTOURI-CONSTANTINE
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE CHIMIE

THESE

PRESENTEE A L'UNIVERSITE MENTOURI- CONSTANTINE POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME DE

DOCTORAT en SCIENCES

SPECIALITE: CHIMIE ORGANIQUE

OPTION: PHYTOCHIMIE



Présentée PAR

Zaabat Nabila



THEME

DETERMINATION STRUCTURALE ET EVALUATION BILOGIQUE DE SUBSTANCES NATURELLES DE DEUX ESPECES DE LA FAMILLE DES LAMIACEES : *Marrubium deserti* de Noé . et *Phlomis bovei* de Noé.

Directeurs de thèse: Pr. **Salah Akkal** et Pr. **M-G Dijoux –Franca**

Soutenue devant la commission d'examen:

K. Medjroubi	Prof. U. de Constantine Mentouri	Président
S. Akkal	Prof. U. de Constantine Mentouri	Rapporteur
M-G. Dijoux-Franca	Prof. U. de Lyon 1	Rapporteur
H. Dendougui	M. C. U. de Ouargla	Examinateur
R. Benkiniouar	M. C. U.de Constantine Mentouri	Examinateur
A. Zellagui	M. C U. d'Oum-El Baouaghi	Examinateur

Remerciements

Les travaux présentés dans cette thèse ont été menés au sein du laboratoire d'Ecologie Microbienne à la Faculté de Médecine et Pharmacie à Lyon dirigé par Madame le professeur Marie-Geneviève Dijoux-Franca.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Madame Dijoux de m'avoir accueilli dans son équipe et à diriger mes travaux de recherche avec conviction. C'est à la fois un privilège et une expérience exceptionnelle d'avoir pu bénéficier de ses conseils, et de ses qualités pédagogiques et de son enthousiasme communicatif dont elle sait faire preuve et son optimisme tout au long de ces 5 années. Cette thèse doit beaucoup à son soutien, sa grande générosité et à ses encouragements. Merci.

Je remercie aussi Monsieur le Professeur Salah Akkal pour m'avoir proposé ce sujet de thèse, et pour son soutien et sa confiance au long de ces années. Merci beaucoup.

J'adresse de sincères remerciements à Michelle Carrier pour sa bienveillance, sa gentillesse et ses encouragements, ses conseils mais aussi son humour ont été fort utiles tout au long de mon travail. Merci beaucoup.

Je ne sais pas comment vous remercier pour tout ce que vous avez fait pour moi Stéphane Achard, pour tes conseils et ton précieux soutien moral surtout pendant des périodes difficiles et ton encouragement. Vous étiez vraiment mon ange gardien tout au long de cette thèse.

J'exprime ma reconnaissance à Nicole Darbour, pour son soutien et pour le temps qu'elle a pu me consacrer pour m'aider dans mon travail.

Je remercie infiniment Madame Christine Bayet de m'avoir aidé à comprendre les principes et les techniques de différentes appareillages utilisés en analyses et en purification des composés isolés de deux plantes et sa disponibilité durant la réalisation de ce travail . Merci pour les encouragements.

Je veux également remercier Madame Hay-Anne pour le temps qu'elle a pu consacrer pour les corrections et la mise en page de ce manuscrit, merci pour les encouragements et les conseils techniques, et qui m'a énormément soutenue et guidée.

J'adresse également mes remerciements au Docteur Serge Michalet, pour ses conseils fréquents et avisés en particulier concernant la partie activité biologique.

Je remercie également Monsieur H. Laouar Maître de conférences à l'Université de Sétif d'avoir accepté de me donner les deux plantes. Merci.

J’ai eu l’opportunité, durant ce travail, de réaliser les tests biologique en collaborations avec d’autre laboratoire.

Pour cela, Je suis très reconnaissante envers le Professeur Leila Guedira et le Professeur Kamel Guedira ainsi que toute l’équipe de ce laboratoire, pour m’avoir accueillie dans leurs laboratoires en Tunisie pour faire une partie des tests biologiques qui concerne l’activité génotoxique et antigénotoxique

Je remercie également Iness Skandrani pour avoir partagé avec moi ses connaissances au sujet de l’activité génotoxique et antigénotoxique et pour le temps qu’elle a pu me consacrer pour que je puisse réaliser ses tests moi même, et pour son soutien moral durant son stage en France.

C’est grâce à Madame A. Doléans-Jordheim et à son équipe que l’activité antibactérien ont pu être réalisés. Merci.

Une pensée pour tous mes amis en France, en Algérie et en Tunisie qui m’ont soutenu au cours de ces années son oublier moussa de Tchad et Noufou de Burkina-Faso et spécialement pour Karima et Safa pour leur amitié et pour leur soutien qui fut très important pour moi.

Je remercie chaleureusement N. Mezache, S. Bicha et ouahiba pour leurs soutien et encouragements durant ces années de travail.

A notre jury de thèse :
Mes remerciements vont également à Monsieur le Professeur Kamel Medjroubi de l’Université de Constantine, pour avoir accepté d’assurer la présidence de ce jury de thèse malgré ses multiples obligations.

Je souhaite remercier Monsieur le professeur Houcine Dendougui de l’université d’Ouargla pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse, Monsieur R. Benkiniouar, Maitre de conférence de l’université de Constantine et Monsieur A. Zellagui Maitre de conférence de l’université d’Oum-El Baouaghi pour m’avoir fait l’honneur de juger mon travail de thèse en tant que rapporteurs.

Table des matières

Introduction générale..... 1

Chapitre I : Introduction

I.1.1 Généralités sur la famille des Lamiacées 2

I.1.1 Généralités 2

I.1.2 Caractéristiques botaniques 3

I.1.3 Classification de la famille des Lamiacées..... 3

I.2 Principaux métabolites secondaires des Lamiacées..... 6

I.2.1 Les terpènes 6

I.2.1.1 Les diterpènes **..... 6**

I.2.2 Les composés phénoliques.....10

I.2.2.1 Les flavonoïdes **.....10**

I.3 Utilisations traditionnelles des Lamiacées 13

I.4 Le genre *Marrubium* et *Marrubium deserti* de Noé 15

I.4.1 Présentation botanique du genre *Marrubium* 15

I.4.2 Présentation de l'espèce *Marrubium deserti* de Noé ex Coss.....16

I.4.2.1 Synonymes **.....17**

I.4.2.2 Noms vernaculaires **.....17**

I.4.2.3 Répartition géographique **.....18**

I.4.2.4 Utilisation traditionnelle **.....18**

I.4.3 Etudes phytochimiques antérieures sur le genre *Marrubium*.....18

I.4.3.1 Les diterpènes **.....18**

I.4.3.2 Les flavonoïdes **.....23**

I.4.3.3 Les phénylpropanoïdes **.....27**

I.4.4 Etudes phytochimiques antérieures sur l'espèce *Marrubium deserti* de Noé 29

I.4.4.1 Les diterpènes **..... 29**

I.4.4.2 Les flavonoïdes **.....29**

I.4.5 Etudes biologiques antérieures 30

I.4.5 L'usage traditionnels **..... 30**

I.4.5.2 Etudes pharmacologiques..... **31**

I.5 Le genre *Phlomis* et l'espèce *Phlomis bovei* de Noé 31
I.5.1 Etude botanique du genre *Phlomis* 31
I.5.2.1 Classification 33
I.5.2.2 Distribution 34
I.5.2.3 Synonyme 34
I.5.2.4 Nom vernaculaire 34
I.5.2.5 Utilisations traditionnelles 34
I.5.3 Travaux antérieurs sur Phlomis Bovei 34
I.5.3.1 Les diterpènes 34
I.5.3.2 Les flavonoïdes 35
I.5.3.3 Les phénylpropanoïdes 38
I.5.3.4 Autres composés 42
I.5.4 Etudes biologiques antérieures 42
I.5.4.2 Etudes pharmacologiques 43
I.6 Conclusion.....44
I.7 Références 45

Chapitre II : Matériels et méthodes

II.1 Matériel d'étude 61
II.1.1 Matériel biologique 61
II.1.2 Milieux de culture 61
II.2 Méthode de purification 62
II.2.1 Chromatographie sur couche mince 62
II.2.2 Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrophotométrie ultraviolet/visible (HPLC-UV/VIS)……62
II.2.4 Chromatographie sur plaque CCM préparative……..……..63
II.2.5 Chromatographie liquide sur colonne ouverte (CC)……63
II.2.6 Chromatographie liquide sous vide (VLC) ……63
II.2.7 Chromatographie liquide à moyenne pression (MPLC) ……63
II.2.8 Chromatographie d'extraction en phase solide (SPE)……63

II.3 Méthodes physico-chimique 64
II.3.1 Le pouvoir rotatoire.....64
II.3.2 Spectres ultraviolets (UV).....64
II.3.3 Spectres de masse (MS).....64
II.3.4 Spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN).....64
II.4 Extraction et purification de *Marrubium deserti* de Noé 66
II.4.1 Matériel végétal 66
II.4.2 Extraction 66
II.4.3 Protocole de purification des extraits issus de *Marrubium deserti* de Noé 67
II.4.3.1 Etude de l'extrait dichlorométhane A 67
*II.4.3.2 Fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle **C*** 72
II.4.3.3 Fractionnement de l'extrait butanolique D 75
II.5 Extraction et purification de *Phlomis bovei* de Noé 76
II.5.1 Matériel végétal 76
II.5.2 Extraction 76
II.5.3 Protocole de purification des extraits 79
II.5.3.1 Fractionnement de l'extrait méthanolique (H) 79
II.6 Conclusion sur l'investigation phytochimique 82
II.7 Essais biologiques 83
II.7.1 Méthode d'étude de l'activité génotoxique à l'aide du SOS chromotest 83
II.7.1.1 Principe 83
II.7.1.2 Méthode d'étude de l'activité génotoxique « SOS chromotest » 83
II.7.2 Test antioxydant 84
II.7.2.1 Test DPPH 84
II.7.2.2 Test ABTS..... 85
II.7.2.3 Test CUPRAC..... 86
II.7.3 Test antibactérien 86
II.7.3.1 Activité bactériostatique 86
II.7.3.2 La modulation de la résistance bactérienne 87
II.4 Références 88

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1 Identification des composés isolés de *Marrubium deserti* **90**

III.1.1 Les diterpènes **90**

III.1.1.1 Composé MD1 : Marrubiine **90**

III.1.1.2 Composé MD2: Marrulibacétal A **94**

III.1.1.3 Composé MD3 : Marrulibacétal **99**

III.1.1.4 Composé MD4 : Désertine **99**

III.1.1.5 Composés MD5a et MD5b **:** 9,13-époxy-7-hydroxylabdan-6, 19 ; 15,16-diolide et 9,13-époxy-7, 14-dihydroxylabdan-6, 19 ;15,16-diolide **103**

III.1.1.6 Composé MD 6: Marrulactone **107**

III.1.1.7 Composé MD8 : Cyllénine A et 15-épi-cylléline A **111**

III.1.2 Les stérols **113**

III.1.2.1 Composé MD7 : Stigmastérol **113**

III.1.3 Les composés phénoliques **115**

III.1.3.1 Les flavonoïdes **115**

III.1.3.1 a Composé MD15 : Apigénine **115**

III.1.3.1 b Composé MD13: Apigénine-7-O- glucoside **115**

III.1.3.1 b Composé MD18 : Apigénine-7-O-glucuronide **120**

III.1.3.1 c Composé MD9 : Apigénine 7-O-néohesperidoside **122**

III.1.3.1 d Composé MD 14 : Terniflorine **126**

III.1.3.2. Les phénylpropanoïdes **131**

III.1.3.2 a Composé MD10: Actéoside **131**

III.1.3.2 b Composé MD11 : Forsythoside B **133**

III.2. Identification des composés isolés de *Phlomis bovei* de Noe **135**

III.2.1 Composé PB1a/PB1b : Chrysoériol 7-O-(3’’-(*E* et *Z*)-*p*-coumaroyl)-β-glucopyranoside **135**

III.2.2. Composé PB2: identique à MD13 ..... **137**

III.2.3 Composé PB3 : Hydroxy 4-cinnamate de méthyle **137**

III.2.4 Composé PB4 ..... **138**

III.2.4.1 Composé PB4a : (molécule 1, PB4a)= ***MD 14*** **138**

III.2.4.2 Composé PB4b : Apigénine-7-O-(5’’’ OMe, 6’’-coumaryl) glucoside (deuxième molécule) **139**

III.2.5 Composé PB5 : Apigénine-7-O-(3’’-p-coumaryl) glucoside **141**

III.2.6. Composé PB6 ..... **142**
III.2.6.1 Composé PB6a : Hispiduline-7-O-glucuronide *(1ére molécule)* **142**
III.2.6.2 Composé PB6b : Acide chlorogénique (*2éme molécule)* **144**
III.3 Analyse HPLC des extraits polaires de deux plantes **147**
III.4 Conclusion **149**
III.5 Références **151**

Chapitre IV : Essais biologiques

IV.1 Les propriétés des flavonoïdes **156**
IV.2 Les propriétés des diterpènes **159**
IV.3 Activité antibactérienne **160**
IV.3.1 Concentration Minimale Inhibitrice **160**
IV.3.2 Etudes antérieures **161**
IV.3.3 Résultats et discussion **163**
IV.3.3.2 L'échiquier **166**
IV.4 Activité antiradicalaire **173**
IV.4.1 Introduction **173**
IV.4.1.1 Qu'est ce qu'un radical libre **173**
IV.4.1.2 Relation structure-activité **174**
IV.4.1.3 Mesures du pouvoir antioxidant **176**
IV.4.2 Résultats et discussion **176**
IV.5 Génotoxicité et antigénotoxicité **180**
IV.5.1 La génotoxicité **180**
IV.5.2 SOS chromotest **180**
IV.5.3 Relations structure-activité **181**
IV.5.4 Résultats et discussion **182**
IV.5.4.1 Génotoxicité **182**
IV.5.4.2 Anti-génotoxicité **184**
IV.6 Conclusion **187**
IV.7 Références **188**

Chapitre V : Annexe

ANNEXE I : les diterpènes de la famille des Lamiacées 199

ANNEXE II : flavonoïdes de la famille des *Lamiaceae* 225

ANNEXE III 231

A.III.1 Données physiques et spectroscopiques pour les composés isolés 231

A.III.1.a Composés isolés de *Marrubium deserti* 231

A.III.1.b Composés isolés de *Phlomis bovei* 249

Annexe.IV : L'activité Antioxydante 257

V. Références 270

VI. Conclusions et perspectives 280

Table des figures

Chapitre I

Fig. 1 : Carte de répartition géographique de la famille des Lamiacées 2
Fig. 2 : Les caractéristiques morphologiques d'une Lamiacées 3
Fig. 3 : Poils sécréteurs 3
Fig. 4 : squelette de base des flavonoïdes 10
Fig. 5 : Les différentes sous-classes des flavonoïdes 11
Fig. 6 : présentation de *Marrubium deserti* de Noé 17
Fig. 7 : Présentation des parties aériennes de *Phlomis bovei* 33

Chapitre II

Fig. 8 : Organigramme d'extraction des parties aériennes de *Marrubium déserti* de Noé 66
Fig. 9 : Schéma de fractionnement de l'extrait dichlorométhane **(A)** 67
Fig. 10 : Schéma de séparation de la fraction **A4** 68
Fig. 11 : Schéma de séparation de la fraction **A4.6** 69
Fig. 12 : Schéma de séparation de la fraction **A4.2** 70
Fig. 13 : Schéma de séparation de la fraction **A4.2.4.1a** 70
Fig. 14 : Schéma de séparation de la fraction **1a.11** 71
Fig. 15 : Schéma de fractionnement de la phase acétate d'éthyle **(C)** 72
Fig. 16 : Schéma de fractionnement de **C7.2** 73
Fig. 17 : Schéma de fractionnement de **C8** 73
Fig. 18 : Schéma de fractionnement de **C9** 74
Fig. 19 : Schéma de fractionnement de **C16** 74
Fig. 20 : Schéma de fractionnement de **C17** 75
Fig. 21 : Schéma de fractionnement de la phase butanol **(D)** 75
Fig. 22 : Organigramme d'extraction des feuilles de *Phlomis bovei* de Noé 76
Fig. 23 : Organigramme d'extraction des fleurs de *Phlomis bovei* de Noé 77
Fig. 24: CCM bidimensionnelle de polyamide DC6 de l'extrait MeOH des feuilles de *P. Bovei* visualisée sous lampe UV à 365 nm 78

Fig. 25: CCM bidimensionnelle de polyamide DC6 de l'extrait MeOH des fleurs de *P. Bovei* visualisée sous lampe UV à 365 nm 78
Fig. 26 : Schéma de fractionnement de l'extrait méthanolique **(H)** 79
Fig. 27 : Schéma de séparation de **H3.8** 80
Fig. 28 : Schéma de séparation de **H3.10** 81
Fig. 29 : Schéma de séparation de **H10.10** 81
Fig. 30: Schéma de fractionnement de **H3.20**..... 82

Chapitre III

Fig . 31 : Spectre de masse IE (impact électronique) du composé **MD1**($CHCl_3$) 90
Fig. 32 : Spectre RMN-^{13}C de **MD1** ($CDCl_3$, 75 MHz) 91
Fig. 33: Spectre DEPT 135 de **MD1** ($CDCl_3$, 75 MHz) 91
Fig. 34 : Spectre RMN-^{1}H de **MD1** ($CDCl_3$, 300 MHz) 92
Fig. 35 : Spectre HMBC de **MD1** ($CDCl_3$, 300 MHz) 93
Fig. 36 : Agrandissement du spectre HMBC du composé **MD1** ($CDCl_3$, 300 MHz) 93
Fig. 37 : Spectre de masse HR-IE$^-$ de **MD2** dans $CHCl_3$ 95
Fig. 38: Spectre RMN-^{13}C de **MD2** ($CDCl_3$, 75 MHz) 95
Fig. 39: Spectre RMN-^{1}H de **MD2** ($CDCl_3$, 300 MHz) 96
Fig. 40 : Spectre HSQC de **MD2** ($CDCl_3$, 300 MHz) 97
Fig. 41 : Corrélations HMBC du composé **MD2**..... 97
F**ig. 42** : Spectre HMBC de **MD2** ($CDCl_3$, 300 MHz) 98
Fig. 43 : Spectre de masse HR-IE$^+$ de **MD3** 99
Fig. 44 : Spectre de masse HR-IE$^+$ de **MD2** 99
F**ig. 45** : Spectre de masse HR/EI$^+$ de **MD4** dans $CHCl_3$ 100
Fig. 46 : Spectre RMN-^{1}Hde **MD4** ($CDCl_3$, 400 MHz) 100
Fig. 47 : Spectre RMN-^{13}C de **MD4** ($CDCl_3$, 100 MHz) 101
Fig. 48 : Spectre NOESY de **MD4** ($CDCl_3$, 500 MHz) 102
Fig. 49 : a) Spectre RMN-^{1}H de **MD5** ($CDCl_3$, 300 MHz) ; b) agrandissement de la zone des méthyles 103
Fig. 50 : a, b) Spectres RMN-^{13}C et agrandissements de **MD5** ($CDCl_3$, 75 MHz) ; c) Spectre DEPT 135 de **MD5**..... 104
Fig. 51 : Spectre de masse du composé EI$^+$ **MD5a** et **MD5b** dans $CHCl_3$ 105
Fig. 52 : Spectres HSQC de **MD5** ($CDCl_3$, 300 MHz) 106
Fig. 53 : Spectres HMBC de **MD5** ($CDCl_3$, 300 MHz) 107

Fig. 54 : Spectre de masse IE^+-HR de **MD6** dans $CHCl_3$ 108
Fig. 55 : Spectres RMN ^1H de **MD6** ($CDCl_3$, 125 MHz) 108
Fig. 56 : Spectres RMN ^{13}C de **MD6** ($CDCl_3$, 500 MHz) 109
Fig. 57: Spectres HMBC de **MD6** ($CDCl_3$, 500 MHz) 110
Fig. 58 : Spectres NOESY de **MD6** ($CDCl_3$, 500 MHz) 111
Fig. 59 : Spectres RMN ^1H de **MD8** ($CDCl_3$, 500 MHz) 112
Fig. 60 : Spectres RMN-^{13}C de **MD8** ($CDCl_3$, 500 MHz) 112
Fig. 61 : Spectres RMN ^1H de **MD7** ($CDCl_3$, 300 MHz) 114
Fig. 62 : Spectres RMN ^1H de **MD13** (DMSO, 300 MHz) 115
Fig. 63 : Série spectrale RMN ^1H de **MD13** (DMSO, 300 MHz) 116
Fig. 64 : Spectres RMN ^1H de **MD13** (DMSO, 300 MHz) 117
Fig. 65 : Spectres RMN ^{13}C de **MD13 (**DMSO, 75 MHz) 118
Fig. 66 : Spectres HSQC de **MD13** (DMSO, 300 MHz) 119
Fig. 67 : Spectres HMBC de **MD13** (DMSO, 300 MHz) 119
Fig. 68 : Spectres RMN ^1H de **MD18** (CD_3OD+ acétone, 300 MHz) 121
Fig. 69 : Spectres RMN ^{13}C de **MD18** (CD_3OD+ acétone, 75 MHz) 121
Fig. 70 : Spectre de masse IE^+ du composé **MD9** ($CHCl_3$) 122
Fig. 71 : Spectres RMN ^1H de **MD9** (CD_3OD+ acétone-d_6, 400 MHz) 124
Fig. 72 : Spectres RMN ^{13}C de **MD9** (CD_3OD+ acétone-d_6, 100 MHz) 124
Fig. 73 : Spectres HMBC de **MD9** (CD_3OD+ acétone-d_6, 400 MHz) 125
Fig. 74 : Spectres RMN ^1H de **MD14** (DMSO-d_6, 400 MHz) 127
Fig. 75 : Spectres RMN ^{13}C de **MD14** (DMSO-d_6, 100 MHz) 128
Fig. 76 : Spectre de masse ISE^- de **MD14** dans le DMSO 128
Fig. 77: Spectre HSQC de **MD14** (DMSO-d_6, 400 MHz) 129
Fig. 78 : Spectre HMBC de **MD14** (DMSO-d_6, 400 MHz) 130
Fig. 79 : Spectres RMN ^1H de **MD10** (CD_3OD, 400 MHz) 131
Fig. 80 : Spectre HMBC de **MD10** (CD_3OD, 400 MHz) 132
Fig. 81 : Spectre RMN ^1H de **MD11** (CD_3OD, 400 MHz) 133
Fig. 82 : Spectre HMBC de **MD11** (CD_3OD, 400 MHz) 134
Fig. 83 : Spectres RMN ^1H de **PB1** (acétone-d_6, 400 MHz) 135
Fig. 84 : Spectres COSY de **PB1** (CD_3OD, 400 MHz) 136
Fig. 85 : Spectres RMN ^1H de **PB3** (CD_3OD, 400 MHz) 138
Fig. 86 : Spectre de masse IE^-/HR de **PB4** dans l'acétone 139
Fig. 87 : Spectre RMN^1H de **PB4** (acétone-d6+ D_2O, 400MHz) 140
Fig.88 : Spectre HSQC de **PB4** (acétone-d_6 +D_2O, 400MHz) 140

Fig. 89 : Spectres RMN ^{1}H de **PB5** (CD_3OD, 400 MHz) 141
Fig. 90 : Spectre de masse HR-ESI de **PB6a et PB6b** dans (MeOH) 142
Fig. 91 : Spectres RMN ^{1}H de **PB6a** (CD_3OD, 400 MHz) 143
Fig. 92 : Spectres HSQC de **PB6a** (CD_3OD, 400 MHz , 100MHz) 143
Fig. 93 : Spectres RMN ^{1}H de **PB6b** (CD_3OD, 400 MHz) 145
Fig. 94 : Spectres RMN ^{13}C de **PB6b** (CD_3OD, 100 MHz) 146
Fig. 95 : Profils chromatographiques HPLC/UV à 254 nm des extraits MeOH, ACOEt et BuOH 147
Fig. 96 : Profils chromatographiques HPLC/UV à 254 nm de l'extraits ACOEt et les composés isolés 148
Fig. 97 : Profils chromatographiques HPLC/UV à 310 nm de l'extraits MeOH et ses composés isolés 149

Chapitre IV :

Fig. 98: Relations structure- activité des flavonoïdes 158
Fig. 99 : Relation entre la structure des flavonoïdes et leurs capacités à piéger des radicaux libres 174
Fig. 100 : Les éléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes 174
Fig. 101 : Structures de la catéchine et la quercétine 175
Fig. 102 : Principe du « SOS Chromotest » (d'après Quillardet et Hofnung, 1985) 181

Table des tableaux

Chapitre I

Tableau 1 : L'évolution de la classification de la famille des Lamiacées Les sub-divisions au-dessus de l'ordre n'ont pas d'appellation précise, on parle de « Clades » 4
Tableau 2 : Répartition de la famille des Lamiacées selon APGII..... 5
Tableau 3 : Répartition des différents squelettes dans les sous-familles des lamiacées 9
Tableau 4 : La distribution des flavonoïdes (*P*-coumaroylglucoside et 8-hydroxyflavone allosylglucoside) dans quelques espéces de la famille des Lamiacées..... 12
Tableau 5 : Utilisations traditionnelles des diverses *Lamiaceae*..... 14
Tableau 6 : Répartition et distribution du genre *Marrubium* en Algérie 16
Tableau 7 : Les diterpènes isolés du genre *Marrubium*..... 19
Tableau 8 : Les flavonoïdes isolés du genre *Marrubium* 23
Tableau 9 : Structures chimiques des flavonoïdes isolés du genre *Marrubium*..... 24
Tableau 10 : Structures chimiques des flavonoïdes isolés du genre *Marrubium*..... 25
Tableau 11 : Les phenylpropanoïdes isolés du genre *Marrubium* 28
Tableau 12 : Structures chimiques des phenylpropanoïdes isolés du genre *Marrubium* 28
Tableau 13 : La distribution du genre *Phlomis* par pays ou région 32
Tableau 14: Les flavonoïdes isolés du genre *Phlomis*..... 36
Tableau 15 : Les phénylpropanoïdes isolés du genre *Phlomis* 39

Chapitre III

Tableau 16 : Effets NOESY observés pour **MD4**..... 101
Tableau 17 : Effets NOESY du composé **MD6**..... 110

Chapitre IV

Tableau 98: Evaluation de la CMI des composés **MD1, 2, 5, 6, 10** et **11** sur différents souches pathogènes..... 164

Tableau 19 : Evaluation de la CMI du composé **MD11** sur différents souches de bactéries à Gram + ... 165
Tableau 20: Evaluation de la diminution de la CMI de la norfloxacine (potentialisation) par association avec les composés **MD1, 2, 5, 6, 10** et **11** sur différents souches de pathogènes 165
Tableau 21 : Représentation de l'antibiogramme de l'association **MD11**/ Oxacilline (Ox) sur une Souche **SA 29213** 167
Tableau 22 : Représentation de l'antibiogramme de l'association **MD11**/Vancomycine sur une souche **SA 29213** 167
Tableau 23 : Représentation de l'antibiogramme de l'association **MD11**/Oxacilline sur une souche **VISA** 168
Tableau 24 : Représentation de l'antibiogramme de l'association **MD11**/Vancomycine 168
Tableau 25 : Représentation de l'antibiogramme de l'association **MD11** avec la Vancomycine sur une souche **SARM** 169
Tableau 26 : Représentation de l'antibiogramme de l'association **MD5** avec Ciprofloxacine sur une Souche **Pyo A30**..... 170
Tableau 27 : Représentation de l'antibiogramme de l'association **MD5** avec Ciprofloxacine sur une souche **SA1199** 170
Tableau 28 : Représentation de l'antibiogramme de l'association **MD5** avec Ciprofloxacine sur une souche **SA1199b** 171
Tableau 29 : Représentation de l'antibiogramme de l'association **MD5** avec Ciprofloxacine sur une souche **1199b** 171
Tableau 30 : Activités antioxydantes des extraits de *Marrubium deserti* et *Phlomis bovei*, par les tests ABTS, CUPRAC et DPPH..... 177
Tableau 31 : Résultats des activités antioxydantes des composés purifiés de M. deserti et P. bovei via les tests DPPH, CUPRAC, ABTS 178
Tableau 32 : Activité génotoxique des extraits et des composés purifiés de *M. deserti* et de *P. bovei* par le SOS chromotest 183
Tableau 33 : Activité antigénotoxique vis-à-vis de la nitrofurantoïne des extraits et des composés purifiés de *M. deserti* et de *P. bovei* par le SOS chromotest 186

.

Abréviation

ABTS	acide2,2'-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique
AcOEt	acétate d'éthyle
ADN	acide désoxyribonucléotidique
Ara	arabinose
BUOH	butanol
CCM	Chromatographie sur couche mince
CC	chromatographie sur Colonne ouverte
CH	dichlorométhane
$CHCl_3$	chloroforme
$CDCl_3$	chloroforme deutéré
CD_3OD	méthanol tétradeutéré
CFU	*Colony Forming Unit*
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
COSY	*COrrelated SpectroscopY*
CUPRAC	capacité antioxydante de réduction de cuivre
d	doublet
DCM	CH_2Cl_2
Dept	*Distorsionless Enhancement by polarization transfer*
DMSO	diméthyl sulfoxyde
DMSO-d6	diméthylsulfoxyde hexadeutéré
DO	densité optique
DPPH	radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle
EC_{50}	concentration inhibitrice à 50%
E. Coli	Esherichia coli
EI :	ionisation par impact électronique (*Electron Impact ionization*)
ESI :	ionisation par électrospray (*ElectroSpray Ionization*)
Et_2O	éther diéthylique
FAB :	ionisation par bombardement d'atomes rapides (*Fast Atom Bombardment*
Glc :	glucose
Gluc :	glucuronide
Hex	hexane
HPLC	high performance liquid chromatography
HMBC	*heteronuclear Multiple Bond Correlation*
HR	*haute résolution*
HSQC	*heteronuclear Single Quantum Coherence*
Hz	hertz
H_2O :	eau distillée

J	constante de couplage
LB	milieu bouillon Luria
MEC	méthyle éthyle cétone
MeOH :	méthanol
m	multiplet
MH2	milieu Mueller-Hinton
MPLC	chromatographie liquide à moyenne pression
MS :	spectrométrie de masse
Na_2CO_3	carbonate de sodium
NOESY :	Nuclear Overhauser Enhancement SpectroscopY
ONPG	*O*-Nitro-Phényl-β-*D*-Galactopyranoside
PNPP	*p*-Nitro-Phényl-Phosphate
PNPP	*p*-Nitro-Phényl-Phosphate
Prep	préparative
ppm :	unité de δ (partie par million)
RMN-^{1}H	résonance magnétique nucléaire du proton
Rha :	rhamnose
s :	singulet
SiO_2	gel de silice
SPE	
t :	triplet
TFA	acide trifluoroacétique
t_R :	temps de rétention
Trolox	acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique
TEAC	trolox Equivalent Antioxidant Capacity
Tol	toluéne
V	volume
VLC	chromatographie liquide sous vide
Xyl	xylose
$[\alpha]_D$	Pouvoir rotatoire
Δ	déplacement chimique (RMN)
λ	longueur d'onde maximale d'absorption (UV)

INTRODUCTION GENERALE

LES PLANTES, SOURCE DE VIE...

Depuis que l'homme est sur terre, il utilise les plantes qui poussent autour de lui pour se nourrir et se soigner. Il est temps de redécouvrir ces végétaux trop longtemps oubliés, dont nous pouvons mettre à profit les multiples vertus dans notre vie quotidienne.

Au cours des siècles, les anciens ont accumulé un véritable savoir sur les vertus médicinales des plantes. Tout le monde a entendu parler des remèdes de nos grands-mères : ail, choux,... sous forme de cataplasmes ou de décoctions.

Au Maroc, en Algérie et en Tunisie, la phytothérapie est utilisée depuis toujours dans le secteur de la médecine traditionnelle. Les pharmacopées régionales s'inspirent principalement de la médecine arabe classique et de l'expérience locale des populations en matière de soins. Elles reflètent à la fois l'histoire des Maghrébins et les spécificités de leur environnement naturel. Aujourd'hui les plantes jouent encore un rôle très important dans les traditions médicales et la vie des habitants de cette région du monde, mais les règles de leur utilisation manquent parfois de rigueur et ne tiennent pas compte des nouvelles exigences de la thérapeutique moderne. L'approfondissement des connaissances des plantes de ces pays est capital, afin d'optimiser leurs utilisations.

En effet, le règne végétal est une source jugée inépuisable de molécules pouvant présenter un intérêt thérapeutique. Dans ce contexte, une grande partie de l'intérêt des recherches actuelles porte sur l'étude des métabolites secondaires qui constituent souvent des principes actifs des plantes médicinales et l'évaluation de la valeur thérapeutique de ces métabolites sur laquelle l'industrie pharmaceutique s'appuie largement pour le développement de nouveaux médicaments.

Notre travail porte sur l'étude de deux plantes algériennes appartenant à la famille des Lamiacées *Marrubium deserti et Phlomis bovei*. Il s'articule selon deux axes principaux : le premier est l'identification structurale, le deuxième est l'étude des activités biologiques liées aux molécules isolées. Les genres *Marrubium et Phlomis* ont été étudiés en raison des propriétés thérapeutiques que leur attribuait la médecine traditionnelle en Algérie et l'importance de leur famille (les Lamiacées) pour sa richesse en métabolites secondaires (diterpènes, polyphénols, flavonoïdes, …).

Dans une première partie nous présenterons la description botanique et l'étude bibliographique de la famille, des genres et des espèces étudiés.

La deuxième partie sera consacrée à l'étude phytochimique de Marrubium deserti de Noé et de Phlomis bovei.

Dans la troisième partie, nous nous intéresserons à la détermination structurale des différents flavonoïdes, diterpénoïdes et phénylpropanoïdes extraits à partir de ces deux plantes en utilisant les différentes techniques UV, SM, RMN mono et bidimensionnelles.

En dernière partie, nous exposerons les différentes activités étudiées de tous les extraits et de certaines molécules isolées : activités antibactériennes, antiradicalaires (DPPH, ABTS, CUPRAC), génotoxique, antigénotoxique et cytotoxique.

CHAPITRE I :

INTRODUCTION

I.1 Généralités sur la famille des Lamiacées

I.1.1 Généralités

Les Labiées ou Lamiacées constituent une importante famille de plantes angiospermes dicotylédones herbacées ou légèrement ligneuses et comprennent, selon les auteurs, de 233 à 263 genres (Heywood et al., 2007) et de 6900 à 7200 espèces (Heywood *et al*., 2007 ; Grayer *et al*., 2003) qui se répartissent sur tout le globe (**Fig. 1**). C'est une famille très importante en Algérie, représentée par 28 genres et 146 espèces.
La plupart des plantes de cette famille sont partiellement ligneuses, formant des arbustes (très rarement des arbres). C'est la famille des aromatiques utilisées tant en cuisine qu'en parfumerie ou en pharmacie également, comme par exemple la ballote, le basilic, la bugle, l'hysope, la lavande, la marjolaine, la mélisse, …). Il s'agit d'une vaste famille, très typique du monde végétal, et qui possède une importance économique due à la production des huiles essentielles (Guignard *et al*., 2001) et de miel (les miels de lavande, et de romarin sont réputés). Cette famille est très répandue dans les régions tempérées et surtout méditerranéennes (Guignard *et al*., 2004).



Fig. 1 : Carte de répartition géographique de la famille des Lamiacées (en rouge)

I.1.2 Caractéristiques botaniques

Ce sont des herbes à tiges quadrangulaires souvent renflées aux nœuds et se multipliant, en une même saison, à l'aide de rejets aériens : (stolons) ou souterrains : (rhizomes).
Leurs feuilles sont toujours simples et opposées sans stipules, ou verticillées. Les feuilles, velues, ont un limbe à surface réduite, épais et souvent enroulé par dessous. Elles possèdent des stomates enfoncés (protection contre l'évaporation) et un hypoderme collenchymateux très développé.
Les fleurs sont hermaphrodites, elles sont regroupées à l'aisselle des feuilles supérieures, en glomérules, eux-mêmes souvent regroupés en épis plus ou moins denses. Leur calice persistant est formé de 5 sépales diversement soudés et a souvent 2 lèvres (**Fig. 3**).
La corolle possède un tube plus ou moins long et généralement à 2 lèvres, ce qui a donné son nom à la famille (en latin *labia* = lèvre) : 2 pétales forment une lèvre supérieure et 3 autres pétales, une lèvre inférieure.
Les étamines sont au nombre de 5, mais l'une d'elles est presque toujours avortée : 2 des 4 étamines fertiles sont plus longues et 2 plus courtes (l'androcée est dit didyname). L'ovaire est supère ; les 2 carpelles sont

profondément lobés, le style sort de la base des lobes (style gynobasique). Le fruit est le plus souvent un schizocarpe (tétrakène lisse) mais a parfois un aspect charnu ou drupacé (**Fig. 2**).

Les Lamiacées ont un épiderme très riche en poils tecteurs et en poils sécréteurs. Ces deux catégories de poils se retrouvent au niveau de tous les organes aériens (**Fig. 3**).

Ce sont des plantes à essences dont l'odeur se dégage au simple toucher : en effet la localisation des huiles essentielles est très externe, elles se forment dans des poils à essence et se localisent sous la cuticule qui se soulève.

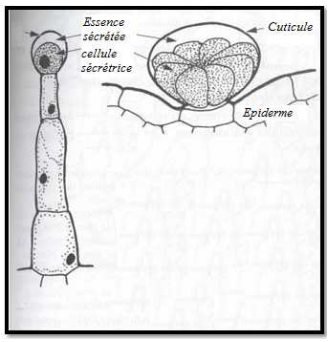


Fig. 3 : Poils sécréteurs

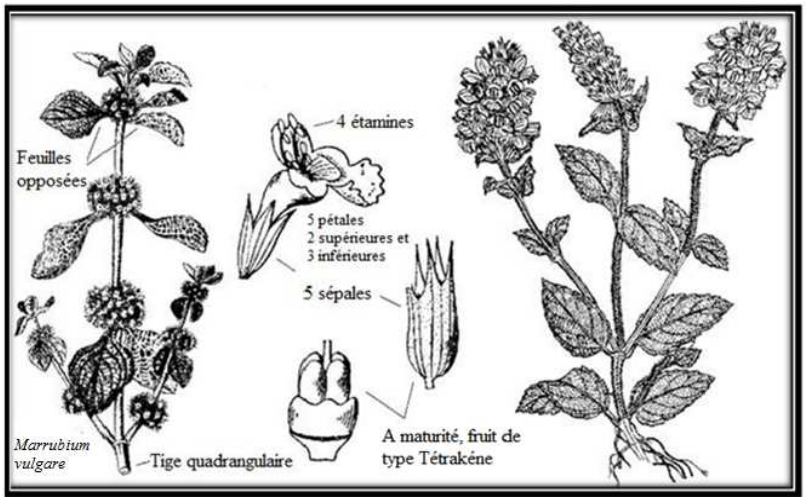


Fig. 2 : Les caractéristiques morphologiques d'une Lamiacées (Skafia-Crete, 2010)

I.1.3 Classification de la famille des Lamiacées

La famille des Lamiacées possède une distribution cosmopolite et des caractères morphologiques caractéristiques. En 1789 de Jussieu a nommé la famille Lamiacées, la classification de la majorité des sous-familles a été faite par Bentham en 1876 et la révision a été présentée par Briquet en 1895. La classification de ce dernier a longtemps été la plus utilisée pour cette famille de plantes. En 1992, 21 genres de Verbénacées ont été transférés aux Lamiacées (Cantino, 1992).

Ancienne Classification

Embranchement	**Spermaphytes (plantes à graines)**
Sous embranchement	**Angiospermes (plantes à ovaire)**
Classe	**Dicotylédones**
Sous-classe	**Gamopétales (pétales soudés)**
Série	**Superovariées Tétracycliques (ovaire supère, 1 seul verticalle d'étamines)**
Ordre	**Lamiales**
Famille	**Lamiaceés (*Lamiaceae*)**

Cependant, les rapports récents de la biologie moléculaire et le développement de la systématique moléculaire basée sur l'analyse des séquences de gènes, ont bouleversé les classifications usuelles et ont proposé en 1998 une nouvelle classification ordinale des plantes (APG., 1998).

Classification selon l'APG (Angiosperm Phylogeny Group)

Régne : Plantae

Angiospermes ou Magnoliaphyta

Euangiospermes

Eudicotylédones

Eudicotylédone Supérieures gamopétales : Astéridées

Ordre : Lamiales

Famille : *Lamiaceae*

La **classification APG** est la classification scientifique des Angiospermes la plus récente établie selon les travaux d'un groupe de chercheurs, the ***A**ngiosperm **P**hylogeny **G**roup. Elle* traduit les efforts faits en systématique pour que les systèmes de classification reflètent au mieux la phylogénie des familles mise en lumière par les avancées constantes de la génétique (Spichiger *et al.*, 2000).

Cette classification, révisée en 2003 (APG, 2003) et basée en grande partie sur les analyses des gènes chloroplastiques, introduit, même au niveau des familles, des changements notables avec la classification classique. Par exemple, l'ancienne famille des Liliacées est maintenant éclatée en une dizaine de familles. Le tableau ci-dessous présente l'évolution de la classification de la famille des Lamiacées.

Tableau 1 : L'évolution de la classification de la famille des Lamiacées Les sub-divisions au-dessus de l'ordre n'ont pas d'appellation précise, on parle de « Clades »

Position de la famille dans les systèmes de classifications évolutives						
	Engler 1877-1924	Cronquist 1957-1988	Dahlgren 1981-1983	Thorne 1992	Takhtajan 1997	APG II 2003
						Eudicots
Classe	*Dicotyledonae*	*Magnoliopsidae*	*Magnoliopsidae*	*Magnoliopsidae*	*Magnoliopsidae*	Tricolpées évoluées
Sous-classe	*Sympetalae*	*Asteridae*	*Magnoliidae*	*Magnoliidae*	*Lamiidae*	*Asteridae*
Super-ordre			*Lamianae*	*Gentiananae*	*Lamianae*	Euastéridées I
Ordre	*Tubiflorae*	Lamiales	Lamiales	Scrophulariales	Lamiales	Lamiales
Sous-ordre	*Verbenineae*					
Famille	*Labiateae*	*Lamiaceae*	*Lamiaceae*	*Lamiaceae*	*Lamiaceae*	*Lamiaceae*

Selon la répartition de Cantino en 1992 la famille des Lamiacées est divisée en 8 sous-familles : *Viticoïdeae, Teucrioideae, Chloanthoïdeae, Ajugoïdeae, Scutellarïoideae, Lamioïdeae, Pogostemoïdeae, Nepetoïdeae*.
Harley *et al.,* selon la nouvelle classification **APGII** des Lamiacées, ont reconnu 7 sous-familles ; une nouvelle sous-famille a été créée Symphorematoïdeae (*Symphorementaceae*) ; 2 sous-familles ont été supprimées (*Teucrioïdeae et Pogostemoïdeae) (*Harley *et al*., 2004). Le tableau suivant montre l'organisation des Lamiacées selon APGII.

Tableau 2 : Répartition de la famille des Lamiacées selon APGII

Sous-Famille	Tribu	Sous-tribu	Exemples d'espèces
I. Symphorematoïdées			*Congea tomentosa* Roxb
II. Viticoïdées			*Vitex agnus-castus*
III. Prostantheroïdées (Chloanthoïdées)			
IV. Ajugoïdées			*Ajuga reptans*
V. Scutellarioïdées			*Scutellaria columnae*
VI. Lamioïdées			*Marrubium vulgare et Phlomis bovei*
VII. Népétoïdées	1. *Elholtzieae*		*Perilla frutescens*
	2. *Mentheae*		*Mentha spicata, Thymus mastichina*
	3. *Lavanduleae*		*Lavandula angustifolia*
	4. *Ocimeae*	a. *Hyptidinae*	*Hyptis pectinata*
		b. *Ociminae*	*Ocimum americanum*
		c. *Plectranthinae*	*Plectranthus amboinicus*

I.2 Principaux métabolites secondaires des Lamiacées

La famille des Lamiacées est connue pour la grande diversité des métbolites secondaires qu'elle contient et notamment pour ceux des huiles essentielles. Dans le cadre de ce travail nous avons choisi de ne pas aborder les terpènes volatiles dans la mesure où ces composés n'ont pas été abordés lors du travail expériemental que nous avons réalisé.

Cette famille est donc une source impotante des terpénoïdes, et plus particulièrement de diterpènes dont les noyaux sont de type clérodane, kaurane, labdane, pimarane, abiétane et autres (Menezes *et al*., 1993). On y trouve également un nombre important de flavonoïdes (Tomas-Barberan *et al*., 1990) et des phénylpropanoïdes (Jiménez, 1994).

I.2.1 Les terpènes

Les terpènoïdes constituent une classe de substances naturelles extrêmement abondante. Ils sont présents chez tous les organismes vivants et peuvent avoir des rôles physiologiques marqués. Ils constituent l'une des classes de composés naturels les plus polymorphes. Plus de 30000 composés ont été répertoriés dans le règne végétal (De Luca, 2000).

I.2.1.1 Les diterpènes

Parmi les terpènes, les diterpènes (molécules en C20) sont particulièrement étudiés (aux côtés des monoterpènes) dans la famille des Lamiacées.

Ils appartiennent à une classe de métabolites secondaires qui possèdent une grande diversité de structures. Les squelettes diterpéniques sont majoritairement présents chez les Angiospermes et plus particulièrement chez les Astéracées (Seaman *et al*., 1990) et les Lamiacées (Menezes *et al*., 1993 ; Demetzos, 2001) où ils ont été utilisés comme des marqueurs chimiotaxonomiques. L'étude de l'évolution des Angiospermes (Figueiredo et al., 1995 ; Fraga et al., 1995 ; Menezes *et al*., 1995) a montré que ce type de composé peut être également utilisé dans les études phytogéographiques (Cole *et al*., 1992 ; Esquivel *et al*., 1996) ou encore pour différencier des variétés au sein d'une même espèce (Kubo, 1982).

Dans le but de construire une base de données sur les squelettes diterpéniques isolés des Lamiacées et la corrélation entre les caractéristiques structurales et l'origine botanique, une étude de la littérature montrent que les diterpènes peuvent être divisés en 91 squelettes (Vestri Alvarenga *et al*., 2001).

Treize squelettes diterpéniques sont plus fréquemment isolés de cette famille et regroupent 87,8% des composés de ce type identifiés dans le règne végétal. La distribution de ces squelettes dans les différents genres est groupée par sous-familles et présentée dans le **Tableau 3**.

Les résultats de cette étude indiquent que la majorité des labdanes se retrouve dans la sous-famille des *Lamioïdeae* et représente 42,5 % des diterpènes isolés de cette sous-famille.

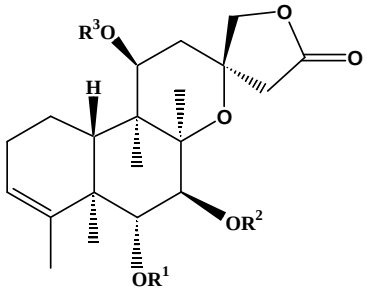
La sous-famille *Nepetoïdeae* est caractérisée par la présence de la majorité des squelettes de type l'abiétane. Ces substances représentent 47,7% des diterpènes répertoriés dans cette sous- famille. Dans cette dernière, la majorité des diterpènes a été isolée des genres *Salvia, Plectranthus et Isodon.*

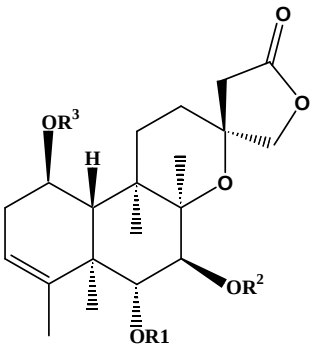
Plus de 600 diterpènes ont été isolés d'un seul genre *Isodon* et sont principalement de type ent-kaurane (Sun *et al.*, 2001 ; 1997 ; Han *et al*., 2004) depuis la première investigation en 1910, on peut citer comme exemple le Maoecrystal Z (6,7:8,15-di-seco-7,20-olide-6,8-cyclo-ent-kaurane), un nouvel ent- kaurane isolé de *Isodon eriocalyx* (Han *et al*., 2006).

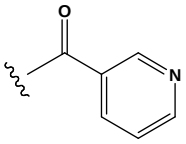
La composition phytochimique des plantes du genre *Salvia* est étudiée depuis longtemps en raison de son utilisation en médecine traditionnelle.

Des études phytochimiques réalisées sur les parties aériennes et les racines des espèces Européene et Asiatique du genre *Salvia* ont permis d'isoler différents types de diterpénoïdes en particulier de type abiétane (Rodriguez-Hahn *et al*., 1996): on peut citer comme exemple ceux isolés des espèces turques de *Salvia* (sous genre : *Salvia*, *Aleonia* et *Sclarea*) qui présentent une grande diversité structurale (Ulubelen *et al*., 1998).

Les sous-familles *Ajugoideae* et *Scutellariodeae* présentent une grande homogénéité car un seul type de squelette diterpénique est rencontré. Il s'agit du clérodane où les substituants sont le plus souvent observés sur le cycle B ; seuls les C-7 et C-8 différent. Récemment, dans le but d'investigation phytochimique de plantes vietnamiennes pour rechercher des composés biologiquement actifs, l'étude de *Scutellaria barbata,* une plante largement utilisée en médecine traditionnelle au Vietnam, en Chine et en Corèe comme anti-inflammatoire et anti-tumorale, a permis d'isoler 4 nouveaux diterpènes néo-clérodane, barbatine A **4**, barbatine B **1**, barbatine C **2**, et barbatine D **3** (Nguyen *et al*., 2009).





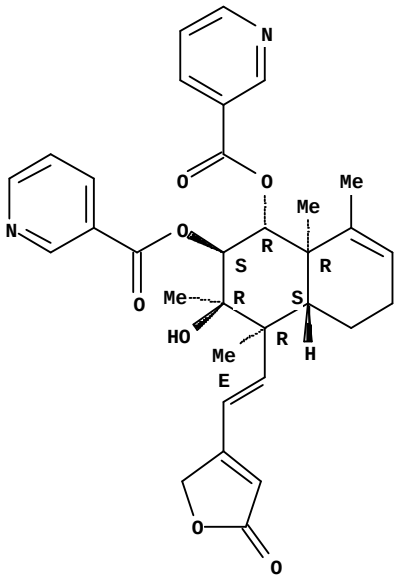


= nicotinoyle

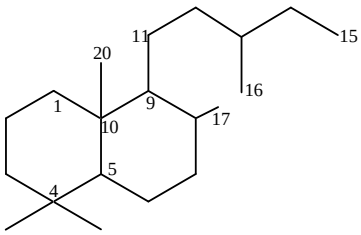
R^1=R^3= nicotinoyle , R^2=Ac barbatine B **1**

R^1= R^2=R^3=nicotinoyle barbatine C **2**

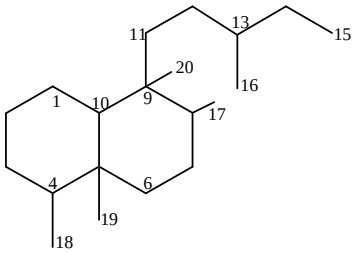
R^1=R^2 =Ac , R^2= nicotinoyle barbatine D **3**



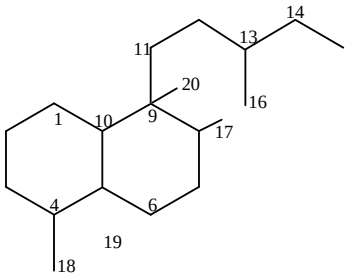
barbatine A **4**



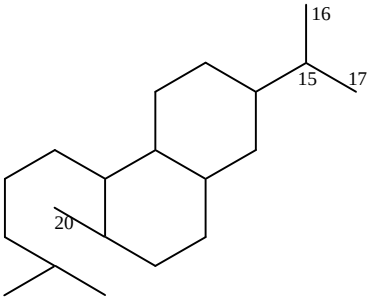
Labdane **5**



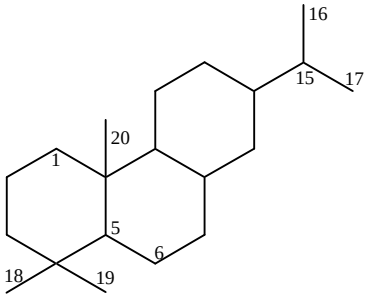
Clerodane **6**



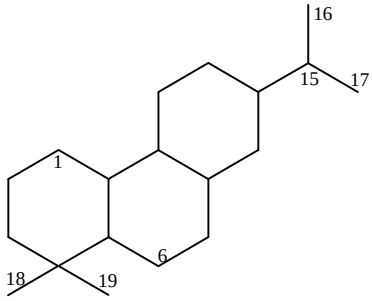
19-Norclerodane **7**



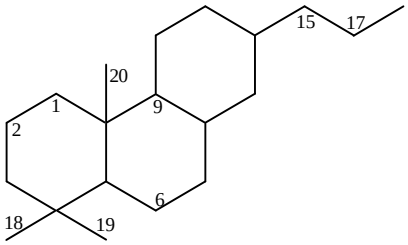
4,5-seco-20(10→5)abeoabietane **8**



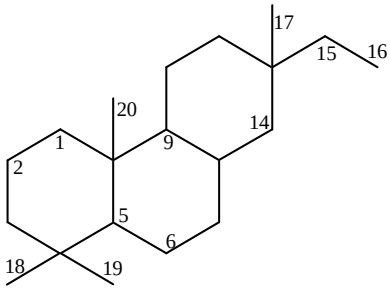
Abietane **9**



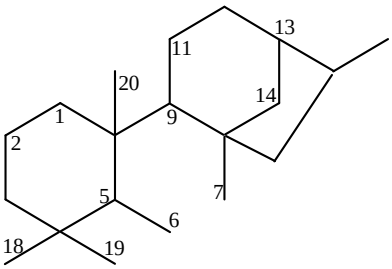
20-Nor-abietane **10**



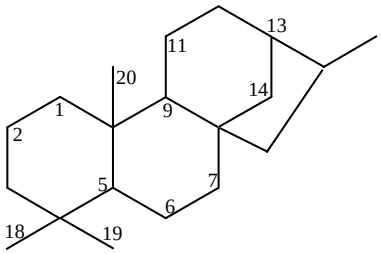
17(15→16)abeoabietane **11**



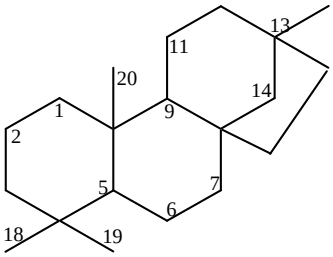
Pimarane **12**



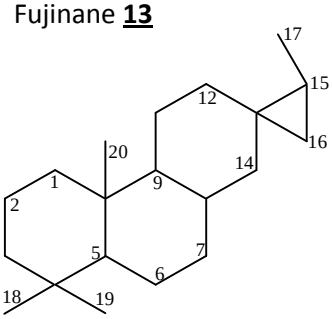
Fujinane **13**



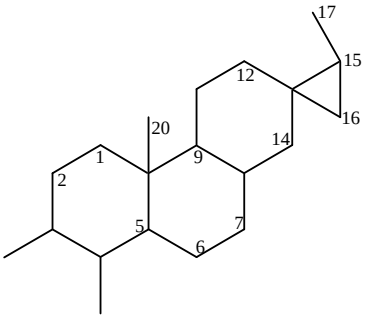
Kaurane **14**



Beyerane **15**



13(16)-Cyclopropylabietane **16**



13 (16)-Cyclopropyltriptolidane **17**

Le tableau ci-dessous présente la répartition des différentrs types de structures des ditérpénes isolées des sous famille de la famille des lamiacées.

Tableau 3 : Répartition des différents squelettes dans les sous-familles des lamiacées

Sous-familles	Genre	Types de squelettes												
		5	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**
Lamioideae	*Ballota*	26	2											
	Leonotis	20												
	Leucas	4				1			4					
	Leonurus	21	6											
	Marrubium	**37**												
	Sideritis	71				1			1		130	35		
	Stachys	1	10								4			
	Phlomis	**8**							1		1			
Viticoideae	*Callicarpa*		4			1			1		2			
	Pygmaepremna					1								
	Vitex	11	1			4		1						
	Premna	2	2			2			3					
Chloanthoïdeae	*Cyanostegia*		1											
	Tectona	9												
	Pityrodia		1											
Scutellarioideae	*Scutellaria*		38											
Ajugoideae	*Ajuga*		32											
	Teucrium	1	29	67		1		10						
	Clerodendrum		11			1		1						
	Caryopteris		6					1						
Nepetoideae	*Salvia*	7	27		33	27	37		25		5			
	Coleus	20				31		2					16	5
	Isodon					3				23	20			
	Nepeta Lycopus	1	1			10			17					
	Orthosiphon								10					
	ptectranthus								11					
	Zhumeria					28		24			8		17	12
		1			1	2								

Les études réalisées sur les différents genres de la famille des Lamiacées ont permis de répértoriés une grande variété structurale. Ces différentes structures sont présentées dans le **Tableau (Annexe I).**

Dans notre étude expérimentale, nous avons isolé un seul type de diterpènes. Ils appartiennent tous au groupe des labdanes.

I.2.2 Les composés phénoliques

Les composés phénoliques des végétaux constituent un groupe d'une extrême diversité, et dont les flavonoïdes font partie. Plusieurs milliers de molécules ont été identifiées.

I.2.2.1 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des produits largement distribués dans le règne végétal et sont couramment consommés quotidiennement dans l'alimentation. Ils sont retrouvés également dans les plantes médicinales.

Ces composés constituent un groupe de plus de 8000 composés naturels. Ils possèdent un même squelette de base, la 2-phenyl chromone à quinze atomes de carbones, deux cycles en C6 (A et B), reliés par un hétérocycle en C3 (**Fig. 2)** (Bruneton, 1999 ; Pietta *et al*., 2000). Ils sont divisés en plusieurs classes qui incluent les flavones, flavonols, flavanones, flavanols, anthocyanidines) et isoflavones (**Fig. 4**). (Heim, 2002 ; Hendrich *et al*., 2006).

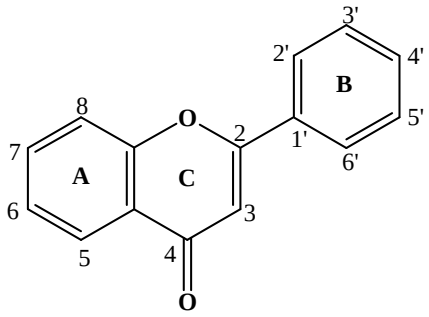
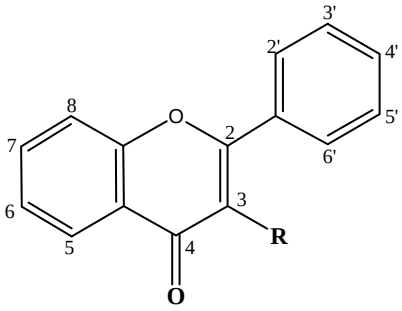
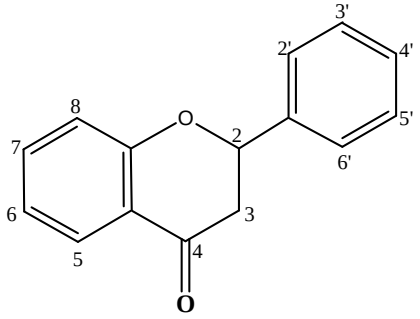


Fig. 4 : squelette de base des flavonoïdes

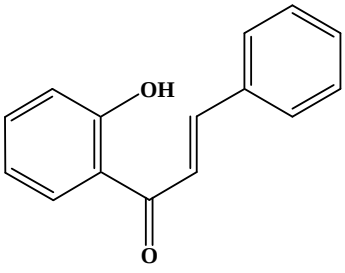


R=H, flavones

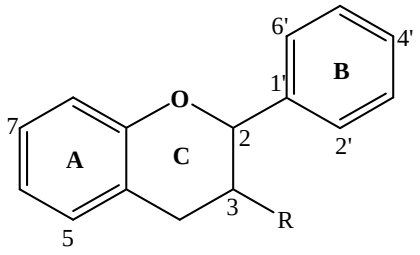
R=OH, flavonol



flavanone



chalcone



R= H, flavane

R=OH, flavanol



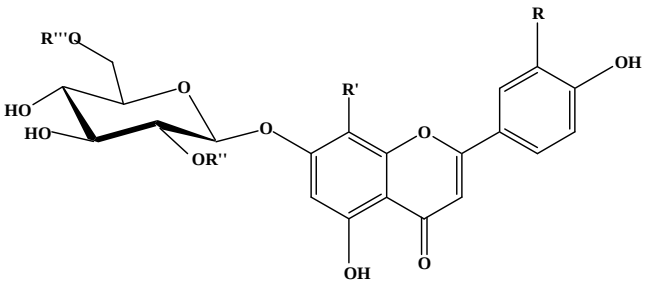
Isoflavone **anthocyanidine**

Fig. 5 : Les différentes sous-classes des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont souvent hydroxylés en positions 3, 5, 7, 3', 4' et parfois 5'. Un ou plusieurs de ces groupes hydroxylés sont fréquemment méthylés, acétylés, prénylés ou sulfatés. Dans les plantes, les flavonoïdes sont souvent présents sous forme *C*- ou *O*-glycosylée. Les *O*-glycosides, de loin les plus fréquents, portent leurs substituants sur les groupements hydroxyles de la génine, alors que pour les C-glycosides (il en existe plus de 350), la liaison s'établit entre le carbone anomérique du sucre et le carbone C-6 et/ou C-8 de la génine.

Un grand nombre de composés polyphénoliques a été répertorié chez les Lamiacées (Thomas-Barberan *et al*., 1990). Plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés, et parmi eux 70% des aglycones appartiennent au groupe des flavones : l'apigénine et la lutéoline sont les plus fréquemment rencontrées. Les flavanones sont représentées particuliérement par la naringénine et correspondent à 10% des aglycones. Enfin, les flavonols représentent également 10% des composés caractérisés (Regnault-roget, 2004).
Les flavonoïdes glycosylés quant à eux, sont fréquemment des flavones-7-*O*-glycosylées. Des isoflavones ont été également identifiées, comme le 8-méthoxygénistéine-7-*O*-α-L-rhamnoside, 4'-*O*-β-D-glucoside isolée du genre *Salvia mais sont plus rares*.
Lorsqu'on analyse la répartition de ces composés dans les différentes sous-familles on constate que les *Lamioideae* sont très riches en apigénine, lutéoline et chrysoeriol substitués en 7 le plus souvent, mais aussi en 8, par un groupement *O*-glucosyl ou *O*-glucuronyl (Tomas-Barberan et al., 1988). Des *C*-glycosides de flavones ont été répertoriés plus spécifiquement dans la sous-famille des *Nepetoïdeae,* et plus particulièrement dans *Teucrium pilosum* (Husein *et al*., 1981).

Divers travaux ont rapportés la présence de flavone *p*-coumarylglucosides (A) comme l'apigénine (Rao *et al*., 1983 ; Nawwar, 1989; Tomas-Barbaran *et al*., 1986 ; Itokawa *et al.,* 1981) et les flavones 8-hydroxy-7-allosylglucosides (B) (Lenherr *et al*., 1987 ; 1984 ; Al-Ansari *et al*., 1991 ; Tomas-Barberan *et al*., 1991 ; Marin *et al*., 2004) dans les *Lamioideae* (tribu : Stachydeae). Généralement on ne trouve pas ces deux types de composés dans la même espèce. Ainsi les flavonoïdes *p*-coumarylglucosides sont présents dans toutes les espèces étudiées des genres *Ballota*, *Phlomis* et *Marrubium*. Ils sont systématiquement présents dans les sous-genres *Marrubiastrum* de *Sideritis*, dans sous-genre *Galeopsis* et dans la section *Betonica* du genre *Stachys*.



A : R = R’ = R’’ = H, R’’’= *p*-coumaryle

B : R = R’ = OH, R’’= 6-acetyloxy-allopyranosyl

R’’’= H

Les dérivés de l’apigénine -*p*-coumarylglucoside sont les plus fréquemment rencontrés dans un grand nombre d’espèces de la famille des Lamiacées mais ceux de la lutéoline, du chrysoeriol, du kaempferol et de l’isorhamnetine glycosylés ont été également détectés.

Le tableau ci-dessous montre la répartition de ces structures dans quelques espéces des Lamiacées.

Tableau 4 : La distribution des flavonoides (*p*-coumarylglucoside et 8-hydroxyflavone allosylglucoside) dans quelques espéces de la famille des Lamiacées (Tomas-Barberan, 1992)

Espèce	**Flavone 8-hydroxy allosylglucoside**	**Flavonoïde *p*-coumaryl glucoside**
Phlomis lychnitys	-	**+**
Phlomis herba-venti	-	**+**
Phlomis crinita Cav	-	**+**
Phlomis cretica C.Presl	-	**+**
Phlomis purpurea	-	**+**
Marrubium vulgare	-	**+**
Marrubium supinum	-	**+**
Marrubium peregrinum	-	**+**
Sideritis angustifolia Lag	+	**-**
Sideritis leucantha Cav	+	**-**
Sideritis incana	+	**-**
Sideritis hirsuta	+	**-**
Teucrium chamaedrys	+	**-**

Les flavones, les flavones glycosylées, les flavones glycosylées coumarylées (Tomas-Barberan *et al*., 1992) et l’actéoside (type phenyléthanoïdes) (Pedersen, 2000) sont des marqueurs chimiotaxonomiques des *Lamioideae* dont le genre *Marrubium* et *Phlomis* fait partie. Ils sont rarement isolés de la sous-famille *Nepetoideae*. Les flavones 5, 6, 7, 4’ tetra-*O*-substitée comme ladanéine sont spécifiques des genres *Marrubium* et *Ballota*. En effet, aucune de ces structures n’a été rencontrée dans d’autres genres de cette sous-famille (comme par exemple *Phlomis*) (Valant-vetschera *et al*., 2003).

Les flavonoides décrits dans la famille des Lamiacées sont regroupés dans **le Tableau (Annexe II**) : où sont précisés le genre, l’espéce de la plante, le nom de la molécule et la référence bibliographique.

I.3 Utilisations traditionnelles des Lamiacées

La famille des Lamiacées regroupe un grand nombre d'espèces d'intérêt économique majeur (Guignard, 2004) et dont les applications sont très variées, comme la parfumerie, la cuisine, la phytothérapie et l'aromathérapie :

En parfumerie : même si les parfums de synthèse tendent à remplacer ces essences, la parfumerie de luxe continue à utiliser ces plantes en les distillant, afin d'en extraire le précieux parfum qu'elles contiennent et de perdurer la qualité de ses produits : on y utilise les fleurs de la lavande (*Lavandula angustifolia)*, de patchouli (*Pogostemon patchouly*), par exemple.

En cuisine : de nombreuses herbes aromatiques sont des Lamiacées : basilic, menthe, thym, romarin, sauge...

En phytothérapie et aromathérapie : cette famille est une importante source d'huiles essentielles, d'infusion et antibiotiques naturels pour l'aromathérapie, l'industrie des cosmétiques. D'autres huiles sont utilisées également pour leurs propriétés hydratantes.

Cette famille posséde également un effet répulsif contre les insectes indésirables, on peut citer comme exemple l'utilisation de *Melissa officinalis* contre les moustiques.

Selon Quezel et Santa (1963), les Lamiacées constituent une famille très importante dans la flore algérienne représentée par 28 genres et 146 espèces contre 8 genres et 12 espèces décrites par Ozenda (1991) dans toute le Sahara.

Thymus vulgaris est une des plantes aromatiques les plus populaires dans le monde. Cette plante est traditionnellement utilisées lors de congestions nasales, de rhume, pour le traitement des petites plaies, pour soulager les piqûres d'insectes, les douleurs rhumatismales et en bain de bouche (Poletti *et al*., 1988 ; Bruneton, 1999).

En Turquie parmi les espéces étudiées par leurs activités biologiques utilisées par la population dans différents domaines, on peut citer :

l'origanum, satureja, thymbra, et thymus sont connus sous le nom kekik en Turquie et largement utilisés en médecine traditionnelle (satil *et al*., 2005) pour soigner les maux de ventre et le rhume. Les espèces du genre *Origanum* sont utilisées comme herbe pour faire le thé et leur poudre est utilisée pour l'obtention de l'huile essentielle (oregano) et l'eau aromatique qui est riche en carvacrol, il lutte contre les maladies gastro-intestinalles, réduit le cholestérol et la glycémie. Il possède aussi des propriétés antispasmodiques (Baser *et al*., 2002) et antibactériennes (Lambert *et al*., 2001).

Le genre *Sideritis* connu sous le nom de « dagcayi » en Turquie est largement distribué dans le monde avec 150 espèces ; 46 espèces sont présentes en Turquie, dont 42 sont endémiques. Ce genre est utilisé comme anti-inflammatoire (Yeşilada *et al*., 1989), antispasmodique (Ezer, 1992), antimicrobien (Ezer, 1994 ; Akcos *et al*., 1998). Il est utilisé sous forme de thé pour soigner le rhume.

Depuis l'Antiquité, Romains, Grecs, Egyptiens et Arabes, l'ont toujours utilisée comme compresse contre les morsures de serpents, et mélangée à la graisse d'ours par certaines tribus amérindiennes, pour guérir les problèmes de peau et les verrues. Les Chinois l'échangeaient même contre leurs meilleures feuilles de thé et les «anciens» avaient l'habitude d'en faire une cure d'une semaine.

Anisomeles est un genre de la famille L*amiaceae* compris environ 8 espéces, ces derniéres sont très utilisées en medecine traditionnelle dans les régions sud et tropical de l'Asie (Huang *et al*., 2003). En particulier *Anisomeles indica* Kuntze, trouvée seulement à Taiwan, est utilisée pour traiter différentes maladies tels que les maladies inflammatoires (Rao *et al*., 2009), les maladies gastro-intestinales, l'hypertention, et les maladies qui touchent le systéme immunitaire (Kao *et al*., 1985 ; Huang *et al*., 2003).

*Teucrium polium aurasiacum***,** une plante de l'Atlas saharien (Hoggar), est utilisée en médecine traditionnelle pour ses propriétés diurétique diaphorétique, antipyrétique, antispasmodique, anti-inflammatoire, antihypertensive, antinociceptive et hypolipidémiante (Galati *et al*., 2000 ; Tariq, 1989 ; Suleiman *et al*., 1998; Abdollahl *et al*., 2003 ; Rasekh *et al*., 2001). Les huilles essentielles de cette plante présentent des activités antimicrobiennes (Thoppil *et al*., 2001) et antispasmodiques (Hassan *et al*., 1979).

Tableau 5 : Utilisations traditionnelles des diverses *Lamiaceae*

Espèce	**Utilisation traditionnel**	**Partie utilisée**	**Mode d'utilisation**
Callamintha Origanifolia Vis	L'hypertention, antimicrobien	Les huiles	Infusion
Marrubium radiatum Devile ex Benth	Contre le diabète, l'hypertension	Parties aériennes	Décoction
Salvia acetabulosa	Dépression, l'anxiété, insomnie, cardiovasculaire, hypertension	Parties aériennes	Décoction
Satureja thymbra	Hypertension, antimicrobien	Feuilles	Infusion
Sideritis perfoliata	Antidiabétique, antihypertensive, antimicrobienne, astringent, décongestionnante, asthme	Feuilles	Infusion
Mentha longifolia Huds	Carminative, antispasmodique septique, névralgique, analgésique	Partie aérienne	Infusion, sirop
Rosmanirus officinalis	Stomachique, antispasmodique, anti-inflammatoire, astringent	Fleurs, feuilles	Infusion, décoction,
Lavandula Dentata var Typica	Les maux d'estomac, hépatite, infection microbienne, la toux, l'asthme, le balonnement.	Parties aériennes	Décoction
Mentha Suaveolens	Palpitation de l'aorte, tonifiant	Parties aériennes	Infusion
Salvia Verbenaca	Les spasmes et coliques, l'anxiété, grippe, pharyngite, angines.	Feuilles	Décoction
Salvia ifficinales	Fiévre, indigestion	Feuilles	Infusion

Autres usages :

Des travaux effectués sur des extraits méthanoliques et éthanoliques de : *Leonurus sibiricus* L., *Pogostemon cabinbenth* et *Ocimum basilicum* L ont permis de mettre en evidence leurs utilisations pour préparer différents produits cosmétiques et médicinaux. Ces composés possédent des effets immunosuppressifs, ils sont utilisés pour traiter les allérgies.

L'utilisation de certaines espéces en infusion ou en décoction en médecine traditionnelle est dûe à leurs diverses actions pharmacologiques. L'activité observée des extraits aqueux de cette famille est attribuée à la quantité importante des flavonoides glycosylés isolés.
Au Vietnam, en Chine, et en Corée, *Scutellaria barbata* est largement utilisée en medicinale traditionnelle comme anti-inflammatoire et antitumorale (Do *et al*., 2005 ; Tan *et al*., 2004 ; Lee *et al*., 2004). Une étude plus récente sur les extraits de cette plante a montré leurs efficacité à l'arrêt du dévelopement des cellules cancéreuses en phase G1, et à diminuer la taille des tumeurs solides (Yin, 2004).

I.4 Le genre *Marrubium* et *Marrubium deserti* de Noé

Classification :

Ancienne classification		Classification selon APG II	
Embranchement	Spermaphytes (Plantes à graines)	Régne	*Plantae*
Sous embranchement	Angiospermes (Plantes à ovaire)	Angiospermes ou Magnoliaphyta	Enangiosperme
Classe	Dicotylédone	Supérieures gamopétales	Astéridées
Sous classe	Gamopétales		
Ordre	Lamiales	Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceés (*Lamiaceae*)	Famille	*Lamiaceae*
Tribu	Stachrydées (selon Deyssam)	Sous famille	*Lamoideae* Harley
Genre	*Marrubium*	Genre	*Marrubium* L
Espèce	*Marrubium deserti* de Noe ex Coss	Espèce	*Marrubium deserti* de Noe ex Coss

I.4.1 Présentation botanique du genre *Marrubium*

Le genre *Marrubium* comprend environ 75 espèces répandues dans une grande partie du globe : l'Europe, la Méditerranée et l'Asie ; 50 espèces poussent sur le portour de la Méditerranée (Greuter *et al*., 1986).
Le nom *Marrubium* dérive du mot hébreu *marrob* (jus amer), en anglais *horehound*, en italien *Marrubio* (Bonnier, 1909).
L'aspect général de la plante est tomenteux, laineux (Coste, 1998). Les feuilles sont crénelées et dentelées. Les fleurs sont blanches, petites, disposées en verticilles axillaires et munies de bractéoles *(*Bonnier, 1909).

Le calice est tubuleux à 10 ou 20 dents (plus rarement de 5) (Quezel et Santana, 1962-1963). La corolle comprend un tube inclus, une lèvre supérieure dressée, bilobée et presque plane et une lèvre inférieure à trois lobes étalés dont le médian est plus grand. Les quatre étamines sont toutes de même longueur (courtes) et sont renfermées dans le tube de la corolle. Leurs anthères sont à loges complètement divariquées et opposées bout à bout et toutes fertiles. Le fruit, un tétrakéne, a ses quatre parties arrondies au sommet.

En Algérie, il existe 7 espèces du genre *Marrubium* (Quezel, 1963) : *Marrubium vulgare, M. spinum, M. peregrinum, M. alysson, M. alyssoides*, *M. willkommu* et *M. deserti* qui fait l'objet de la deuxiéme partie de notre travail. Ozenda ne décrit qu'une seule espèce du genre *Marrubium* dans sa flore du Sahara : *M. deserti* De Noé, c'est une espèce endémique décrite par Ozenda en 1991 (Ozenda, 1991).

Tableau 6 : Répartition et distribution du genre *Marrubium* en Algérie (Quezel, 1963).

Espèces	**Abondance**	**Distribution en Algérie**	**Répartition**
M. vulgare	Très commun	Dans toute l'Algérie	Cosmopolite
M. supinum	Rare	Atlas Saharien oranais et Algérois, hauts plateaux Algérois et Oranais	Ibéro-Mauritanien
M. peregrinum	Très rare	Atlas Tellien	Euro – Méditerranéen
M.alysson	Très commun	Partout sauf sur le lithoral Algéro-constantinois	Ibéro-Mauritanien
M .alyssoides pomel	Rare	Plaines lithorale et Atlas Tellien	Endémique
M. deserti De Noé	Commun	Sahara septentrionale et Central	Sahara

I.4.2 Présentation de l'espèce *Marrubium deserti* de Noé ex COSS

C'est un arbrisseau blanchâtre très rameux, à poils laineux appliqués. Les épis sont grêles et lâches interrompus, larges de 12-15 mm. Le calice de 4-6 mm, forme un tube rétréci à son sommet.
Feuilles petites en coin à la base et portant quelques dents au sommet. Les fleurs sont disposées au dessus de chaque paire de feuilles en couronne autour de la tige. Les fleurs rose pâle en tube sont entourées par un calice vert qui s'agrandit au fur et à mesure de la fructification pour former comme une collerette **(**
Fig. 6).





a : Détail de l'inflorescence de *M. deserti*



B : Parties aériennes de *M. deserti*

Fig. 6 : présentation de *Marrubium deserti* de Noé

I.4.2.1 Synonymes

Marrubium déserti de Noé (Clarendoniano, 1894)

Ballota deserti (de Noé)

Maropsis deserti (de Noé) Pomel

Sideritis deserti de Noé

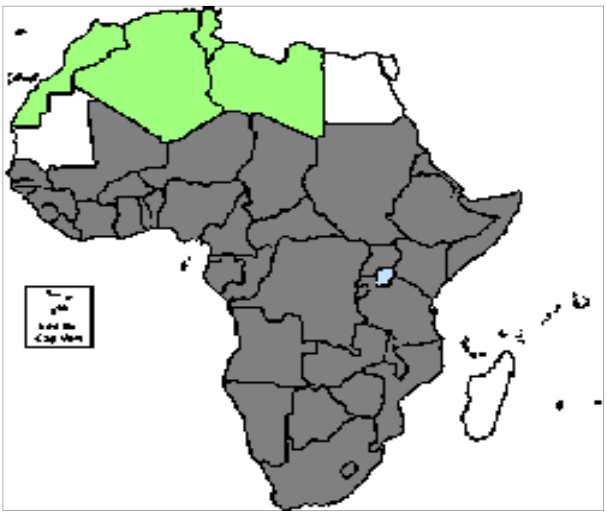
Maropsis deserti Pomel.

I.4.2.2 Noms vernaculaires

Djaida, Djaada ou marrube du désert.

I.4.2.3 Répartition géographique

Marubium deserti de Noé est une plante qui se trouve sur les pâturages désertiques de l'Algérie.



Zones de répartitions de *M. deserti de Noé*.

I.4.2.4 Utilisation traditionnelle

L'espèce Marrubium *deserti* de Noé est largement utilisée en médecine traditionnelle en Algérie. L'infusion, la macération et la poudre des feuilles et rameaux servent de remède contre la toux, les dysménorrhées, les troubles digestifs (coliques, helminthiase). En usage externe, la plante est utilisée contre les piqûres de scorpions et les allergies (Maiza, 1993). Les feuilles, seules, sont employées sous forme d'infusion en usage interne contre la fièvre et les problèmes respiratoires (Hammiche et Maiza, 2006).

I.4.3 Etudes phytochimiques antérieures sur le genre *Marrubium*

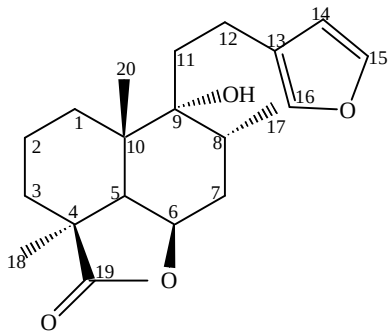
Les principaux constituants chimiques trouvés dans le genre *Marrubium* sont les diterpènoides, les flavonoïdes et les phénylpropanoïdes (Çalis *et al*., 1992; Iidia *et al*., 1995; Takeda *et al*., 2000).

I.4.3.1 Les diterpènes

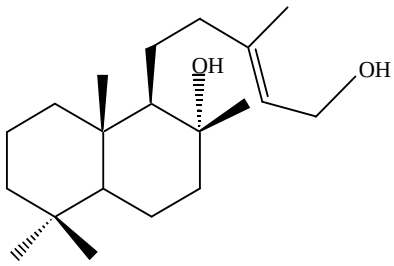
Les différentes études réalisées jusqu'à maintenant sur la phytochimie du genre *Marrubium* ont mis en évidence la présence caractéristique de diterpène furanolabdane. La marrubiine est le premier diterpène labdane isolé en 1842 de *M. vulgare,* le plus connu et le constituant principal du genre *Marrubium.*
Depuis plusieurs études phytochimiques ont été faites sur les différentes espèces : les squelettes diterpèniques isolés sont représentés dans le tableau ci-aprés.

Tableau 7 : Les diterpènes isolés du genre *Marrubium*

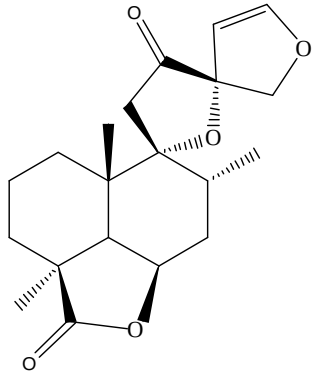
Espèces	**Structures**	**Références**
M. alysson	**18**	(Savona *et al.,* 1979)
M. anisodon	**18**, **19**, **56**, **57**	(Sagitdinova *et al*., 1996) (Popa *et al*., 1968 ; 1975) (Ajaz *et al*., 2010)
M. astracanicum	**20**, **21**	(Iidia *et al*., 1995)
M. ayardii	**22**, **23**	(Piozi *et al*., 2006)
M. catarilifolium	**24**	(Salei *et al*,. 1966 ; 1967)
M. cylleneum	**18**, **25**, **26**, **55**	(Karioti *et al*., 2005, 2007)
M. friwalskiyanum	**27**, **28**	(Savona *et al*., 1984)
M. globosum ssp libanoticum	**29** **25**, **26**,, **30**, **31**, **32**, **33**, **51**, **52**, **53**, **54**, **55**	(Rigano *et al*., 2006_a) (Rigano *et al*., 2006_b) (Rigano *et al*., 2009)
M. globosum ssp globosum	**18**, **20**, **34**	(Tekeda *et al*., 2000)
M. heterocladum	**18**	(Piozi *et al*., 2006)
M. incanum	**18**, **27**	(Canonica *et al*., 1968)
M. leunuroides	**24**	(Popa *et al*., 1973)
M. *parviflorum*	**35**	(Habtemariam *et al.,* 1994)
M. peregrinum	**24**, **27**, **36**	(Salei *et al*., 1966 ; 1970_a) Salei *et al*., 1966 ; 1970_b)
M. polyodon	**20**	(Hatam et Porzel, 1995)
M. praecox	**24**	(Popa *et al*., 1973)
M. propinqutum	**24**	(Salei *et al*., $1970)_a$
M. sericeum	**18**, **37**, **38**, **39**	(Savona *et al*., 1979)
M. supinum	**18**, **37**, **40**, **41**	(Savona *et al*., 1979)
M. trachyticum	**18**	(Citoglu *et al*., 2002)
M. velutinum	**27**, **20**, **25**, **26**, **42**, **43**, **44**, **45**, **46**	(Karioti *et al*., 2005)
M. vulgare	**18**, **22**, **23**, **37**, **19**, **24**, **25**, **26**	(Gordin, 1908 ; Fulke *et al*., 1968) (Laonigro *et al*., 1979) (Fulke *et al*., 1968) (Popa *et al*., 1968; Popa *et al*., 1975) (Salei *et al*., 1966) (Fulke *et al*., 1968 ; Laonigro *et al*., 1979)
M. thessalum	**27**, **42**, **43**, **28**, **47**, **48**, **49**, **50**	(Argyropoulou, 2009)



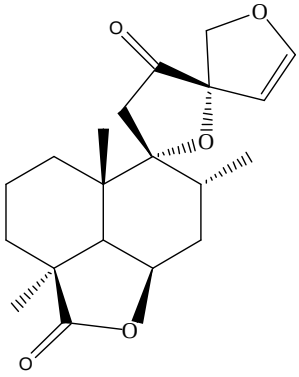
marrubiine **18**



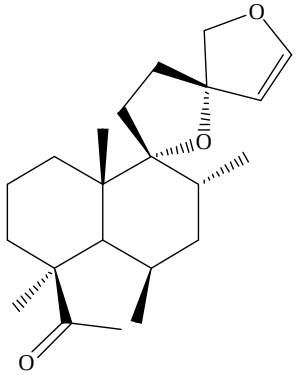
vulgarol **19**



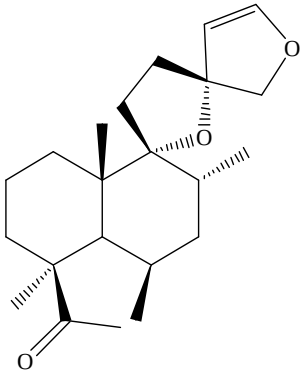
polyodonine **20**



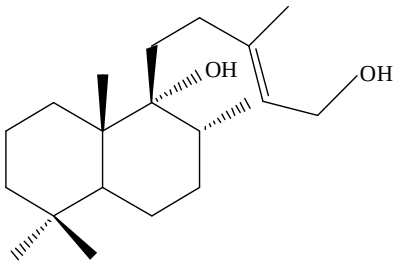
marrubinoneA **21**



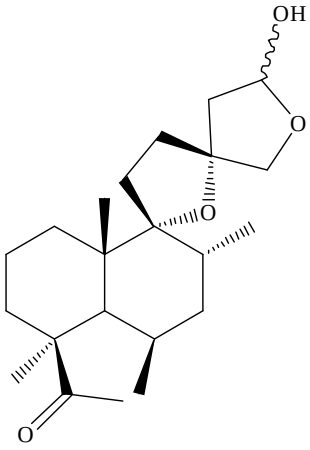
13R-premarrbiine **22**



13S-premarrbiine **23**

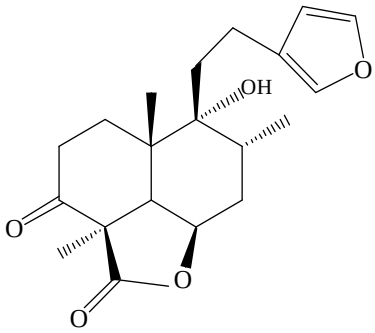


peregrinol **24**

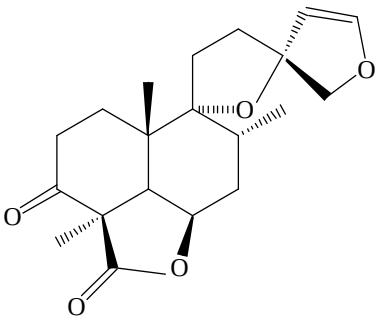


15α-OH cyllenine A **25**

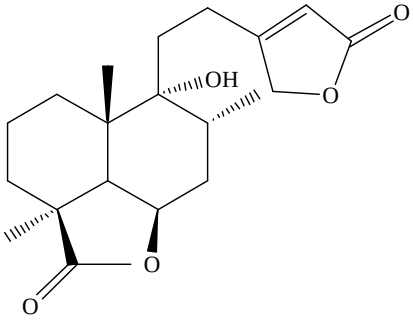
15β-OH 15 epi-cyllenine A **26**



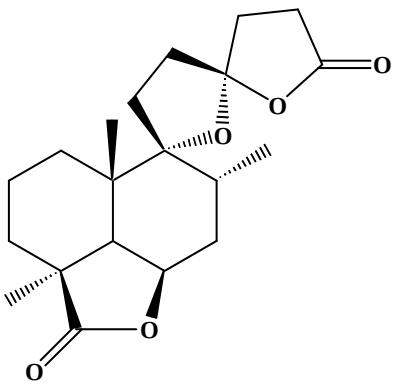
peregrinine **27**



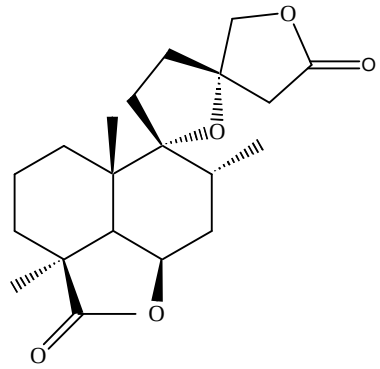
13R –preperegrinine **28**



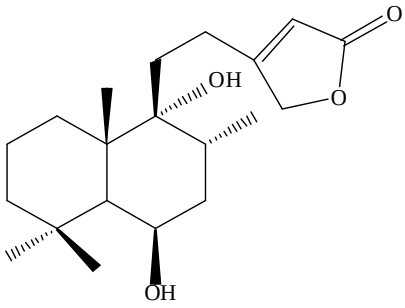
marrulibanoside **29**



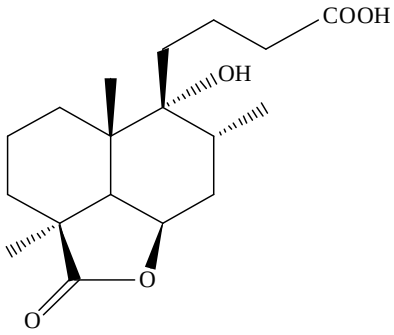
(13S)-9α,13α-époxylabda-6β(19),16(15)-diol dilactone **30**



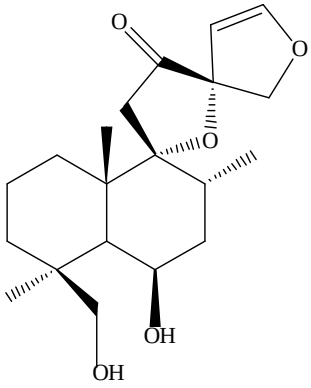
(13R)-9α,13α-époxylabda-6β(19),16(15)-diol dilactone **31**



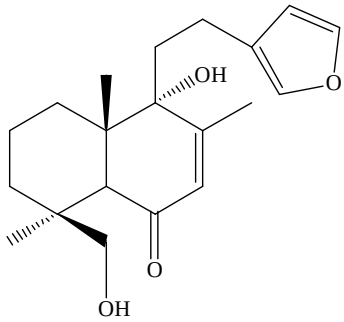
6-deacétyl-vitexilactone **32**



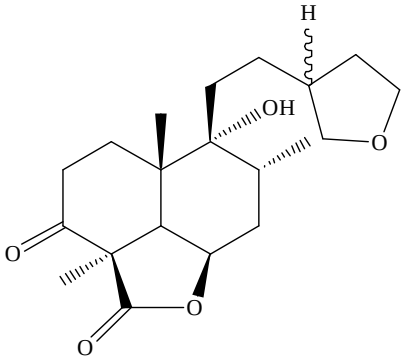
acide marrulanique **33**



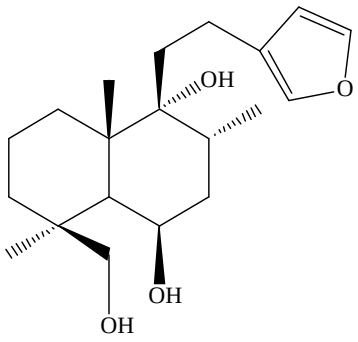
marrubiglobosin **34**



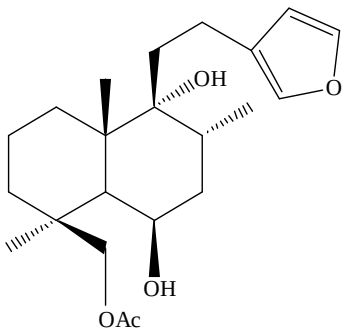
anatolione **35**



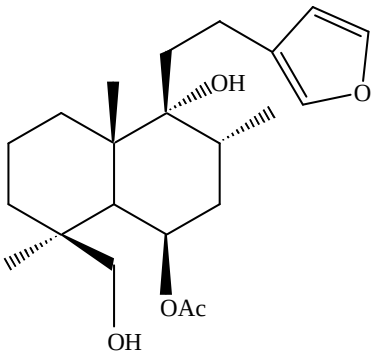
tetrahydroperegrinine **36**



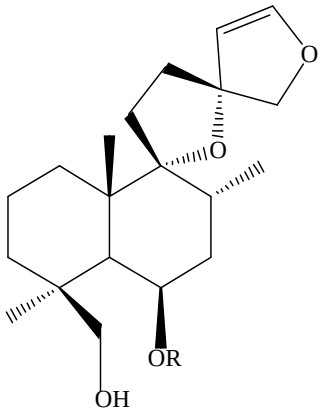
marrubenol **37**



19-acétyl-marrubenol **38**

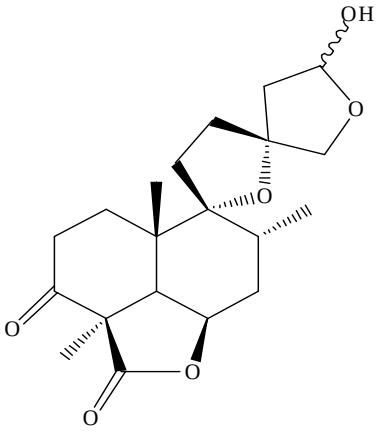


6-acétyl-marrubenol **39**



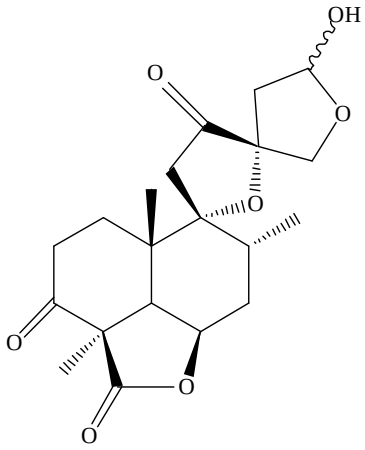
R=H, premarrubenol **40**

R=Ac, 6-acétyl-premarrubenol **41**



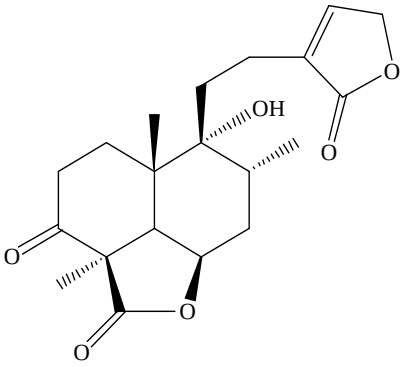
9α,13R-15,16-bisépoxy-15α- hydroxyl-3-oxo-labdan-6β,19-olide **42**

9α,13R-15,16-bisépoxy-15β- hydroxyl-3-oxo-labdan-6β,19-olide **43**

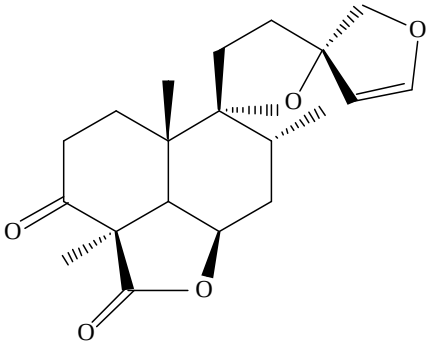


15α-OH, velutine B **44**

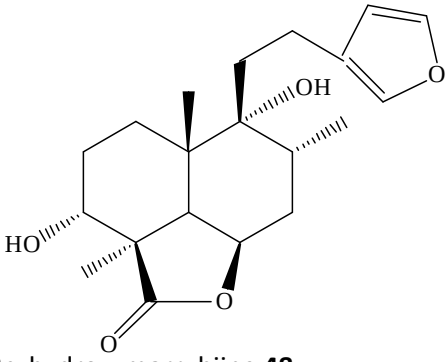
15β- OH, 15-epi- velutine B **45**



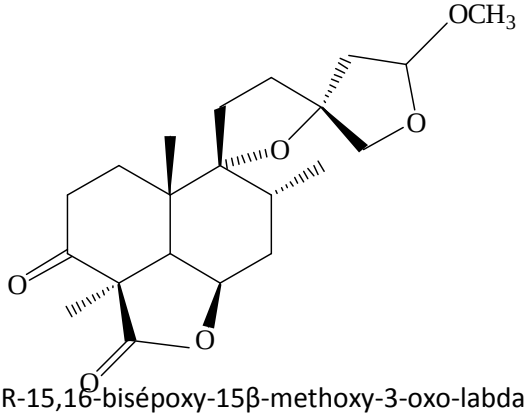
velutine C **46**



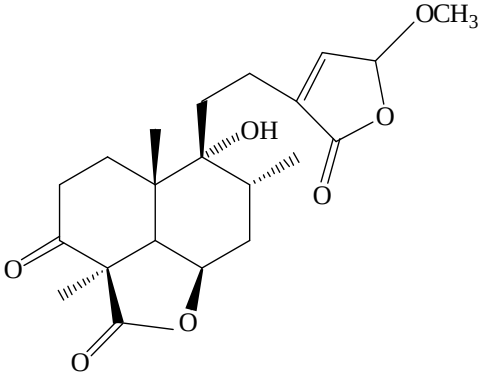
13S-preperegrinine **47**



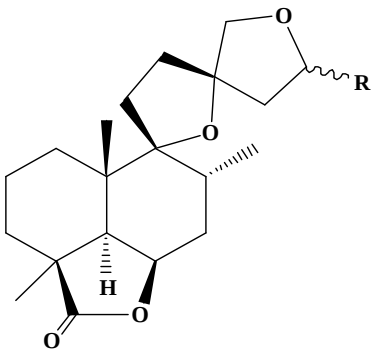
3α-hydroxymarrubiine **48**



9α,13R-15,16-bisépoxy-15β-methoxy-3-oxo-labdan-6β,19-olide **49**

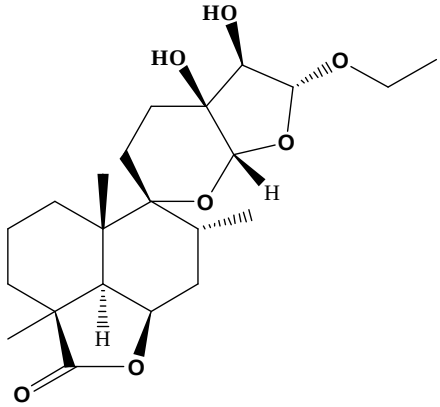


15-méthoxyvelutine C **50**

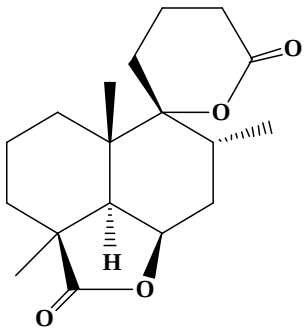


R=α-OH 13-epicyllenine A **51**

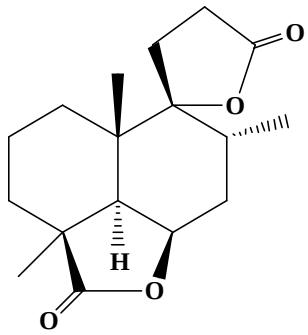
R=β-OH 13,15-diepicyllenine A **52**



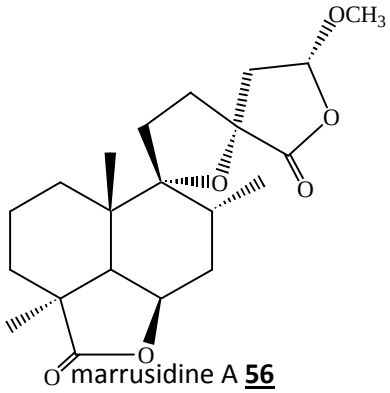
marrulibacetal **53**



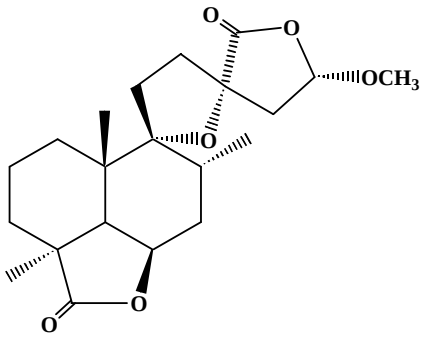
marrulactone **54**



cyllenine C **55**



marrusidine A **56**



marrusidine B **57**

I.4.3.2 Les flavonoïdes

D'après la littérature les flavonoïdes de type flavones, flavonols et leurs dérivés *O*-glycosylés et/ou *O*-coumaroyl glycosylés sont les plus isolés dans le genre *Marrubium.* (**Tableau 8**).

Une étude phytochimique de l'extrait méthanolique des parties aériennes de *M. velutinum Sibth et Sm,* une plante native du centre et sud de la Grèce, a donné un nouveau flavonoïde acétylé, le chrysoériol 7-*O*-(3'', 6''-di-*O*-*P*-coumaryl)-β-D-glycosylé et 10 flavonoïdes connus (Karioti *et al*., 2003).

D'autres flavonoïdes ont été isolés du genre *Marrubium et* sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 8 : Les flavonoïdes isolés du genre *Marrubium*

Espèces	**Structures**	**Références**
M. alysson	**58, 59, 60, 62, 65, 74, 76, 79, 80, 81, 82**	(Saleh *et al*., 1981 ; 1982) (Mohamed *et al*., 2010)
M. parviflorum	**59**	(Bal, 1989)
M. vulgare	**62, 72, 73, 101, 104, 105, 106, 107, 108, 109** **58, 59, 66, 67, 74, 75,**	(Nawwar *et al*., 1989) (Kowalewski et Aksit., 1978)
M. trachyticum	**64**	(Citoglu *et al*., 2002)
M. friwaldskyanum	**64**	(Savona *et al*., 1984)
M. cylleneum	**58, 85, 83, 68, 78, 77, 102, 63**	(Michelis *et al*., 2002)
M. velutinum	**58, 62, 70, 64, 84, 91, 92, 93, 96, 100, 99, 98, 97, 94, 66, 88, 90, 62, 89**	(Karioti *et al*., 2007) (Karioti *et al*., 2003)
M. globosum ssp. Libanoticum	**90, 91, 103, 88, 89, 66, 98, 87, 59**	(Rigano *et al*., 2006_a)
M. cylleneum	**71, 65, 75, 87, 93, 95, 98**	(Karioti *et al*., 2007)
Marrubium peregrinum	**70, 58, 59, 75, 86, 64, 69, 101**	(Salei *et al*., 1969) (Nagy *et al*., 1996) (Hennebelle *et al*., 2007)
Marrubium anisodon	**61, 87**	(Hussain *et al*., 2009)

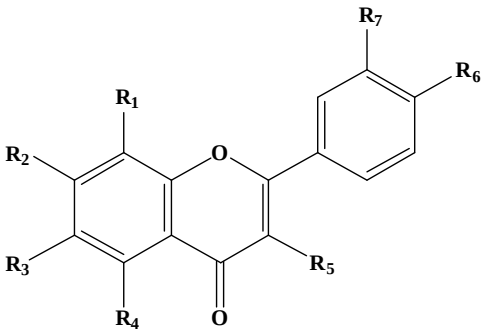


Tableau 9 : Structures chimiques des flavonoïdes isolés du genre *Marrubium*

	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6	R_7	
apigénine	H	OH	H	OH	H	OH	H	**58**
apigénine 7-*O*-glucoside	H	OGlu	H	OH	H	OH	H	**59**
apigénine 7-*O*-arabinose	H	OAra	H	OH	H	OH	H	**60**
apigénine 4'-*O*-glucoside	H	OH	H	OH	H	OGlu	H	**61**
chrysoériol	H	OH	H	OH	H	OH	OCH_3	**62**
chrysoériol 7-*O*-glucoside	H	OGlu	H	OH	H	OH	OCH_3	**63**
ladanéine	H	OCH_3	OH	OH	H	OCH_3	H	**64**
quercétine	H	OH	H	OH	OH	OH	OH	**65**
quercétine 3-*O*-glucoside	H	OH	H	OH	OGlu	OH	OH	**66**
quercétine 3-rhamnoglucoside	H	OH	H	OH	RhamGlu	OH	OH	**67**
pectolinaringénine	H	OH	OCH_3	OH	H	OCH_3	OH	**68**
5, 7, 4'-trimethylscutellaréine	H	OCH_3	OH	OCH_3	H	OCH_3	H	**69**
5, 6, 7, 4'-tétraméthoxyflavone	H	OCH_3	OCH_3	OCH_3	H	OCH_3	H	**70**
5, 6, 7, 8, 4'-pentahydroxyflavone	OCH_3	OCH_3	OCH_3	OCH_3	H	OCH_3	H	**71**
vitexine	OGlu	OH	H	OH	H	OH	H	**72**
vicénine II	OGlu	OH	OGlu	OH	H	OH	H	**73**

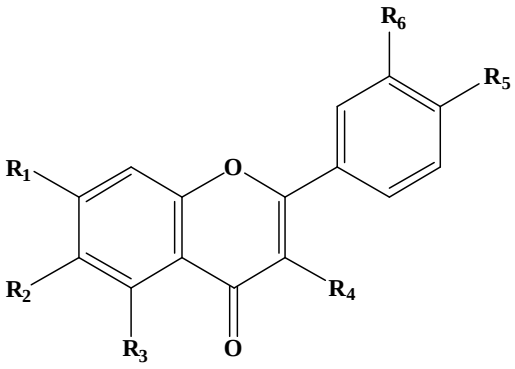
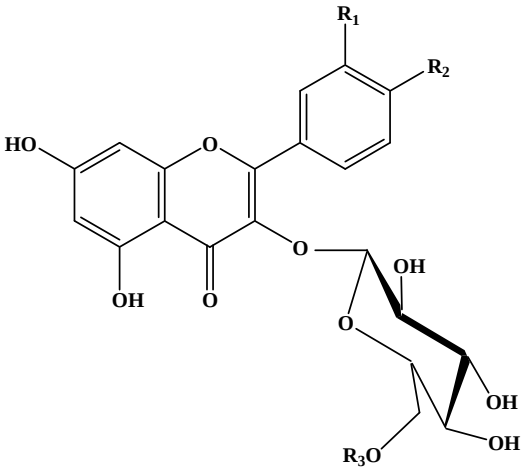
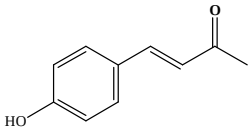
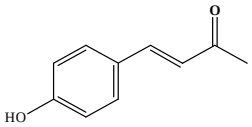
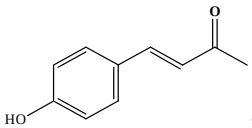
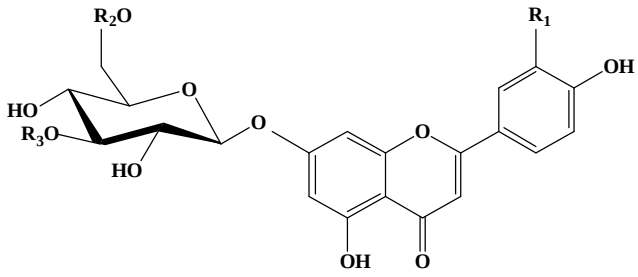


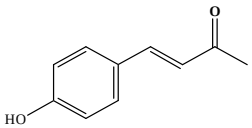
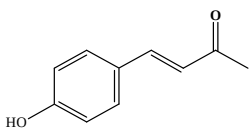
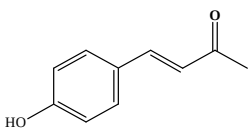
Tableau 10 : Structures chimiques des flavonoïdes isolés du genre *Marrubium*

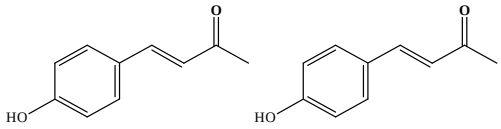
	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6	
lutéoline	OH	H	OH	H	OH	OH	**74**
lutéoline-7-*O*-glucoside	OGlu	H	OH	H	OH	OH	**75**
lutéoline-7-*O*-rutinoside	ORut	H	OH	H	OH	OH	**76**
7-méthoxy, 6-hydroxylutéoline	OCH_3	OH	OH	H	OH	OH	**77**
7',4' diméthyl lutéoline	OCH_3	H	OH	H	OCH_3	OH	**78**
diosmétine	OH	H	OH	H	OCH_3	OH	**79**
diosmétine-7-*O*-rhamnoside	ORham	H	OH	H	OCH_3	OH	**80**
acacétine	OH	H	OH	H	OH	H	**81**
acacétine-7-*O*-glucoside	OGlu	H	OH	H	OH	H	**82**
salvigénine	OCH_3	OCH_3	OH	H	OCH_3	H	**83**
nikotiflorine	OH	H	OH	ORut	OH	H	**84**
gengkwanine	OCH_3	H	OH	H	OH	H	**85**
kaempferol	OH	H	OH	OH	OH	H	**86**
kaempferol-3-*O*-glucoside	OH	H	OH	OGlu	OH	H	**87**
kaempferol-3-*O*-rutinoside	OH	H	OH	ORut	OH	H	**88**
isorhamnétine-3-*O*-glucoside	OH	H	OH	OGlu	OH	OCH_3	**89**
isorhamnétine-3-*O*-rutinoside	OH	H	OH	ORut	OH	OCH_3	**90**
quercétin-3-*O*-rutinoside	OH	H	OH	ORut	OH	OH	**91**
6-OH-kaempferol-3-*O*-rutinoside	OH	OH	OH	ORut	OH	H	**92**

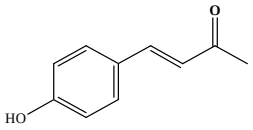


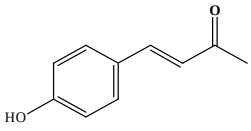
	R1	R2	R3
kaempferol-3-*O*-(6''-*E*-P-coumaryl)-glucoside **93**	H	OH	
quercétine-3-*O*-(6''acétyl)-glucopyranoside **94**	OH	OH	Ac
quercétine-3-*O*-(6''-*E*-*P* coumaryl)-glucoside **95**	OH	OH	
isorhamnétine -3-*O*-(6''-OAC)-glucoside **96**	OCH_3	OH	OAc-
isorhamnétine -3-*O*-(6''-*E*-*P*-coumaryl)-glucoside **97**	OCH_3	OH	 -

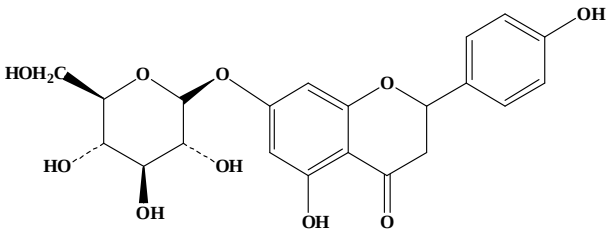


	R1	R2	R3
apigénine-7-*O*-(3''-*E*-*P*-coumaryl)glucopyranoside **98**	H	H	
apigénine-7-*O*-(3'', 6''-di-*E*-*P*-coumaryl)-glucoside **99**	H		

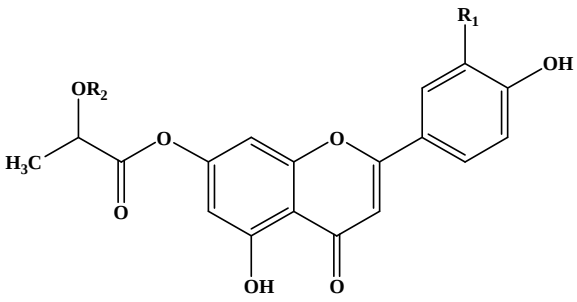
chrysoériol-7-*O*-(3'', 6''-di-*E*-*P*-coumaryl)-glucoside **100** OCH_3 

apigénine-7-*O*-(6''-*E*-*P*-coumaryl)-glucopyranoside **101** H  H

chrysoériol-7-*O*-*β*-*D*-(3''-*E*-*P*-coumaroyl)-glucopyranoside **102** OCH_3 H 



naringénine 7-*O*-glucoside **103**



	R1	R2	
apigénine-7-lactate	H	H	**104**
apigénine7-(2-glucuronosyllactate)	H	Glucu	**105**
apigénine7-(2-glucosyllactate)	H	Glu	**106**
lutéolin-7-lactate	OH	H	**107**
lutéoline7-(2-glucuronosyllactate)	OH	Glu	**108**
lutéoline7-(2-glucucosyllactate)	OH	Glu	**109**

I.4.3.3 Les phénylpropanoïdes

Parmi les phénylpropanoides, l'actéoside et le forsythoside B sont les plus rencontrés dans le genre *Marrubium.* Une étude réalisée sur l'extrait méthanolique des parties aériennes de *Marrubium peregrinum* a conduit à l'identification de 4 phénylpropanoïdes : actéoside **110** (Wu et al., 2003), forsythoside B **116** (Hennebelle *et al*., 2007), ballotetroside **125** (Seidel *et al*., 1997), arenarioside **126** (Andary et Privat., 1985).
Le **Tableau** ci-aprés présente les principales sructures des phénylpropanoïdes isolées du genre *Marrubium.*

Tableau 11 : Les phénylpropanoïdes isolés du genre *Marrubium*

Espéces	**Structures**	**Références**
M. alysson	**110**, **111**, **112**, **113**, **116**, **117**	(Çalis *et al*., 1992)
M. vulgare	**110**, **116**, **126**, **125**, **127**	(Sahpaz *et al*., 2002_a) (Sahpaz *et al*., 2002_b)
M.velutinum	**110**, **111**, **114**, **116**, **117**, **122**, **123** **113**, **115**, **118**, **119**, **120**, **121**, **124**, **128**	(Karioti *et al*., 2003) (Karioti *et al*., 2007)
M. cylleneum	**115**	(Karioti *et al*., 2007)
M. globosum ssp. libanoticum	**110**	(Rigano *et al*., 2007)
M. peregrinum	**110**, **116**, **125**, **126**	(Hennebelle *et al*., 2007)

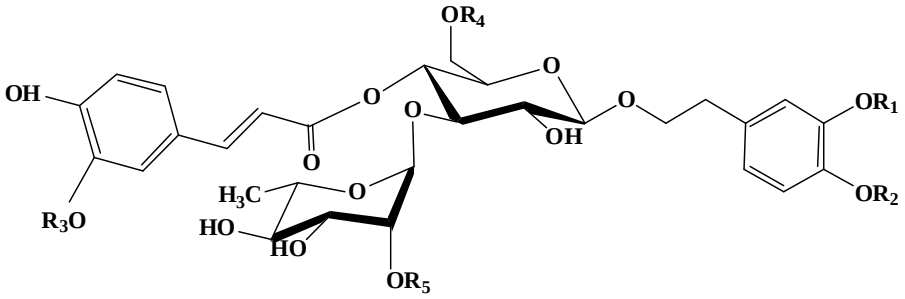
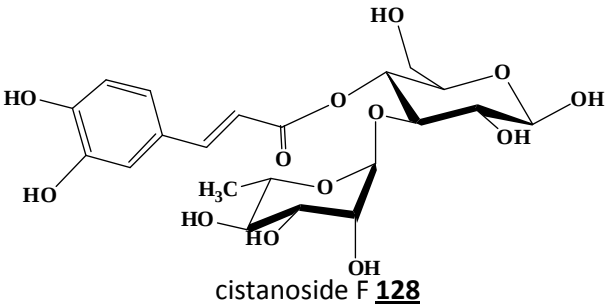


Tableau 12 : Structures chimiques des phenylpropanoïdes isolés du genre *Marrubium*

	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	
actéoside	H	H	H	H	H	**110**
leucoscptoside A	H	H	CH_3	H	H	**111**
leucoscptoside B	H	CH_3	CH_3	Apio	H	**112**
Martynoside	H	CH_3	CH_3	H	H	**113**
Echinacoside	H	H	H	Glu	H	**114**
6'-glucosyl-martynoside	H	CH_3	CH_3	Glu	H	**115**
forsythoside B	H	H	H	Apio	H	**116**
Alyssonoside	H	CH_3	CH_3	Apio	H	**117**
lavandulifolioside	H	H	H	H	Ara	**118**
stachysoside D	H	CH_3	CH_3	H	Ara	**119**
lamiophlomiside A	CH_3	H	CH_3	Apio	H	**120**
velutinoside IV	CH_3	H	CH_3	H	Ara	**121**
velutinoside I	H	H	H	Glu	Ara	**122**
velutinoside II	H	H	CH_3	Glu	Ara	**123**
velutinoside III	H	CH_3	CH_3	Glu	Ara	**124**
ballotetroside	H	H	H	Apio	Ara	**125**
Arenarioside	H	H	H	Xylo	H	**126**
marruboside	H	H	H	Apio	Apio	**127**

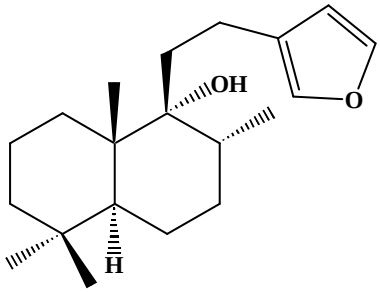


cistanoside F **128**

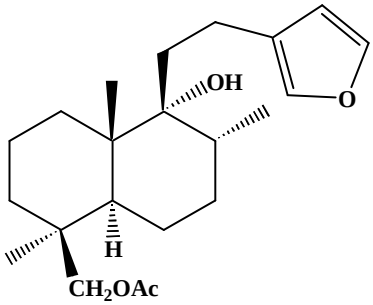
I.4.4 Etudes phytochimiques antérieures sur l'espèce *Marrubium de Noé*

I.4.4.1 Les diterpènes

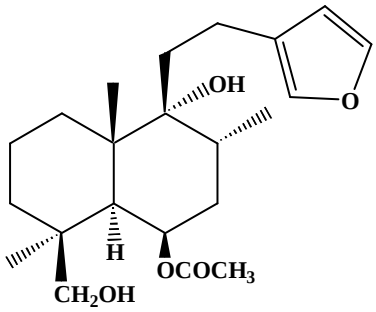
Récemment, quatre diterpénes ont été isolés de l'extrait chloroformique des parties aériennes (fleurs+feuilles) *de Marrubium deserti* de Noé. Il s'agit d'un nouveau diterpène, le 6-dehydroxy-19-acétyl-marrubenol **130** et trois autres connus: 15,16-époxy-9-hydroxylabda-13(16),14-diène **129,** 6-acétylmarrubenol **131, et** 19-acétylmarrubenol **132** (Dendougui *et al*., 2011). Ces deux derniéres molécules **(131 et 132)** ont été déjà isolées du genreMarrubium (Savona *et al*., 1979).



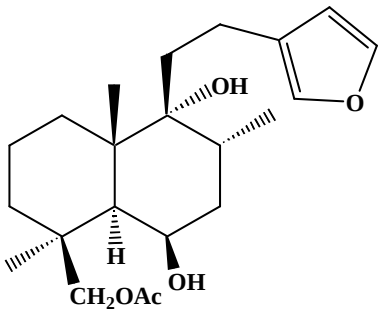
15, 16-époxy-9-hydroxylabda-13(16),14-diène **129**



6-dehydroxy-19-acétylmarrubenol **130**



6-acétylmarrubenol **131**



19-acétylmarrubenol **132**

I.4.4.2 Les flavonoïdes

Sept flavonoïdes ont été isolés de l'extrait BuOH des parties aèriennes de *Marrubium deserti* de Noé: l'apigénine -7-*O*- glucoside **59**, l'apigénine-7-*O*-(3''-E-P-coumaryl)glucoside **98**, l'apigénine-7-*O*-(3'', 6''-di-E-P-coumaryl)-glucoside **99**, l'apigénine-7-*O*-(6''-E-P-coumaryl)-glucoside **101**, ladanéine **64**, et la vicénine II **73** (Touil A., 2009). Ces Flavonoïdes ont déja été isolés du genre Marrubium (Saleh *et al*., 1981; Rigano *et al*., 2006_a; Karioti *et al*., 2003; Nawwar *et al*., 1989; Savona *et al*., 1984)

I.4.5 Etudes biologiques antérieures

I.4.5.1 Usages traditionnels

Dans la littérature plusieurs espèces du genre *Marrubium* sont largement utilisées en médecine traditionnelle pour guérir un bon nombre de maladies (Walt, 1962 ; Lewis, 1977 ; Meyre-Silva *et al*., 2010)
En Europe, les extraits aqueux des espèces *Marrubium* sont utilisés en médecine traditionnelle pour soigner la toux, les voies digestives et biliaires, les infections respiratoires, les congestions pleuro-pulmonaire (Wichtl *et al.*, 1999). Ils présentent aussi une activité neurosedative et anti-inflammatoire (Mascolo *et al*., 1987; Girre, 2000).
Marrubium alyson (en arabe est hashisha Rabiah)*,* une plante Egyptienne et indigène de El-Salloum au Rafah et aussi dans le désert de Sinaï, est utilisée sous forme de décoction comme remède pour l'asthme et diurétique (Tackholm, 1996). En Afrique du nord elle est utilisée comme agent de saveur.
Marrubium vulgare est largement utilisé en médecine traditionnelle dans plusieurs pays dans le traitement de nombreuses affections telles que les maladies du type inflammatoire, gastroentérique et respiratoire (asthme) (Balmé, 1982 ; Newal *et al*., 1996 ; Molina-Salinas *et al*., 2006). Cette espèce possède également des propriétés hypotensives (El Bardai *et al*., 2001), antioxydantes (Vanderjagt *et al*., 2002) insecticides (Pavela, 2004) et analgésiques (De Souza *et al*., 1998).

Au Maroc, la décoction de la plante est employée comme antidiabétique, seule, ou associée au thym, au miel ou au raisin sec (Novak *et al*., 1966) ; la décoction est prescrite également dans le traitement des ictéres, de la typhoïde, de diarrhées, comme fébrifuge, tonique et stimulant. En Europe, cette espèce est utilisée comme condiment. En Tunisie, le décocté préparé à partir de la plante entière est utilisé contre l'hypertension, les hémorroïdes, les rhumatismes, les maladies cardiaques et respiratoires. Il sert aussi à traiter les ulcéres, en bain de bouche et en application externe comme traitement des brulûres (Bellakhdar, 1997 ; Blumenthal, 1998 ; Bradley, 1992 ; PDR, 2000). Il est réputé pour purifier le lait des femmes qui allaitent.

Au Brésil, *M. vulgare* est connu sous le nom de « maromba ou marroio » est fréquemment utilisée en tant que remède pour ses effets hypoglycémiques, analgésiques et antispasmodiques (Novaes et al., 2001 ; De Souza *et al*., 1998 ; Schlemper *et al*., 1996). Au sud de l'Italie, cette plante est utilisée pour soigner le pied d'athlète, les infections de la peau et de la bouche, et pour soigner la malaria, et en particulier comme hepatoprotecteur (Pieroni *et al*., 2002 ; 2005).

La décoction ou l'infusion des fleurs et des feuilles de *M. globosum ssp. libanoticum* connu dans le nord du Liban sous le nom de ''hashiashat el kelb'', est utilisée par voie orale contre l'hyperglycémie (diabète), fébrifuge (malaria) et comme antispasmodique (coliques) ; et en application externe contre les morsures de serpent et comme cicatrisant (Arnold, 1993 ; Wichtl et Anton., 1999).

I.4.5.2 Etudes pharmacologiques

Une étude réalisée sur l'extrait hydroalcoolique de *M. vulgare* montre que cet extrait a un puissant effet antispasmodique (Schlemper *et al.*, 1996), une importante action antinociceptive (De souza *et al*., 1998) et un effet antidiabétique (Novaes *et al*., 2001). Les extraits aqueux de cette espèce ont utilisés depuis longtemps en médecine traditionnelle pour guérir plusieurs maladies. Les anciens égyptiens (Bown, 1995) l'ont utilisé dans le traitement de la toux et des morsures de chiens (Tyler, 1993).
Le traitement des rats génétiquement hypertendus par l'extrait aqueux des parties aériennes de *M. vulgare* a conduit à une chute de tension significtive engendré par l'effet vasodilatateur démontré *ex vivo* et *in vitro* (El Bardai *et al*., 2001).

L'extrait méthanolique ou éthanolique de *M. vulgare*, présente une activité antibactériene très importante sur les bactéries *B. subtilis, S. epidermidis* and *S. aureus* (Gram positive) et une activité modérée sur les bactéries *P. vulgaris* et *E. coli, pas d'activité sur les bactéries P. aeruginosa* (Gram négative) (Mubashir *et al*., 2008 ; Al-Bakri et Afifi, 2007) *et sur Mycobacterium tuberculosis* (Molinas Salinas *et al*., 2006).

En 2007**,** Rigano et al ont étudié l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique des parties aériennes de *Marrubium globosum* contre les microorganismes impliqués dans les infections urinaires, respiratoires, gastrointestinales, et les maladies de la peau (Rigano *et al*., 2007).

Une recherche récente sur l'activité antiinflammatoire de l'extrait à l'acétone des parties aériennes de M. vulgare par Rigano a signalé un effet significatif sur l'oedème des pattes de rat induit par la carraghénine (Rigano *et al*., 2006_a)

I.6 Le genre *Phlomis* et l'espèce *Phlomis bovei* de Noé

I.6.1 Etude botanique du genre *Phlomis*

Le genre *Phlomis*, herbe vivace, comprend plus de 100 espèces distribuées en Afrique, en Asie et en Europe 12 espèces (Katayoun *et al*., 2004) avec deux centres de diversification : l'Anatolia en Turquie et l'Iran. En Algérie, il existe 4 espéces : *Phlomis herba-venti* et trois espèces endémiques : *Phlomis bovei*, *P. caballeroi* et *P. crinita* (Quezel et Santa, 1963). Le nom *Phlomis* vient du grec « phlox » qui signifie flamme car les feuilles de ces plantes servaient à la fabrication de mèches de bougies. Ce genre est divisé en deux sections *Phlomis* et *Phlomoides* (Moench, 1794 ; Albaladejo *et al*., 2005). La section *Phlomoides* est rencontrée principalement au centre de l'Asie et en Chine, alors que la section *Phlomis* se trouve principalement dans la région méditerranéenne (Hedge, 1986) (**Tableau 9**).

Tableau 13 : La distribution du genre *Phlomis* par pays ou région (d'après Li *et al*., 2010)

Région ou pays	espèces	Régions	espèces
Islandes (Egée)	3	Iran	31
Afghanistan	8	Israël et Jordanie	6
Albanie	2	Italie	4
Algérie	6	Kashmir	3
Islandes (Baléares)	1	Corée	1
Bulgarie	2	Liban et Syrie	26
Chine	72	Lybie	1
Crete et Karpathos	8	Maroc	8
Crimea	4	Pakistan	4
Chypre	7	Portugal	3
Egypte	2	Sardinia	1
France	2	Sinai	3
Grèce	6	Espagne	11
Inde	5	Tunisie	5
Iraque	15	Turquie	49
Ex-Yugoslavie	4	Ex-USSR	52

Ce sont soit des plantes herbacées soit des arbrisseaux, généralement très velues, à feuilles opposées simples et ridées. Chaque paire de feuilles forme un angle droit par rapport à la précédente persistante (chez les espèces ligneuses). Les fleurs, jaunes, roses, blanches, violacées ou pourprées, sont groupées en verticilles plus ou moins denses. Le calice est tubuleux ou campanulé, généralement plissé, à 5 dents. La corolle a deux lèvres : la supérieure, légèrement échancrée au sommet, forme un casque ; la lèvre inférieure est trilobée à lobes plus ou moins apparents. On compte quatre étamines. Le fruit est formé de quatre akènes inclus dans le calice persistant (**Fig. 7**).

I.6.2 Phlomis bovei



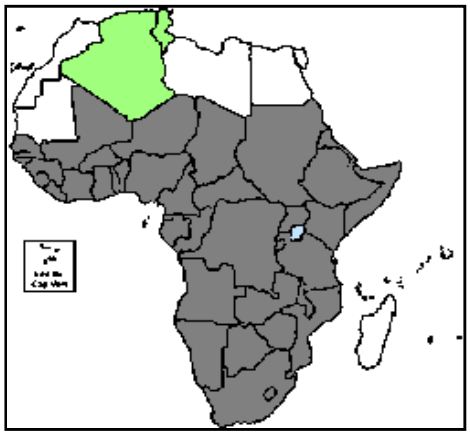
Fig. 7 : Présentation des parties aériennes de *Phlomis bovei*

I.6.2.1 Classification

Ancienne classification		**Classification selon APG II**	
Embranchement	Spermaphytes (Plantes à graines)	Règne	Plantae
Sous embranchement	Angiospermes (Plantes à ovaire)	Angiospermes ou Magnoliaphyta	Enangiosperme
Classe	Dicotylédone	Supérieures gamopétales	Astéridées
Sous classe	Gamopétales		
Ordre	Lamiales	Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceés (*Lamiaceae*)	Famille	*Lamiaceae*
Tribu	Stachrydées (selon Deyssam)	Sous famille	*Lamoideae* Harley
Genre	*Phlomis*	Genre	*Phlomis* L
Espèce	*Phlomis Bovei*	Espèce	*Phlomis Bovei De* Noé
Sous-espèce	*Phlomis bovei subsp. bovei*	Sous-espèce	*Phlomis bovei subsp. bovei*

I.6.2.2 Distribution

Zones de répartitions de *P. bovei (en vert)*



P. *bovei* est une espèce rare et endémique algérienne. C'est l'une des 9 plantes endémiques enregistrées dans le rapport National sur la diversité biologique en Algérie (Quezel, 1963). On trouve deux sous-espèces : *P*. *bovei* De Noé subsp *bovei* et *P. bovei* De Noé subsp *maroccana* Maire.

I.6.2.3 Synonyme

Phlomis samia Desfontaines

I.6.2.4 Nom vernaculaire

Kayat El Adjarah, Faseouan, Tarseouan, Iniji, R'ilef et Azaref

I.6.2.5 Utilisations traditionnelles

Cette plante est utilisée en tant que colle, comme cicatrisante pour traiter les brûlures, les lésions et les infections de peau et les allergies (Liolios et al., 2007).

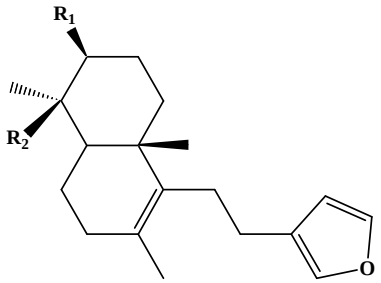
I.6.3 Travaux antérieurs sur *Phlomis Bovei de* Noé

Une des propriétés typiques du genre *Phlomis* est sa richesse en différentes classes des composés naturels, 151 composés ont été isolés jusqu'à présent. On y trouve, en effet, des flavonoïdes (El-Negoumy et al., 1986; Tomas-Barberan et *al*, 1986), des phénylpropanoïdes (Çalis *et al*., 1991 ; Saracoglu *et al*., 1995), des phényléthanoïdes (Saracoglu *et al*., 1998), des diterpénoïdes (Tanaka *et al*., 1983 ; 1985; Katagiri *et al*., 1994) et des iridoïdes (El-Naggar et Beal., 1980 ; Çalis *et al*., 1991 ; Kamel *et al*., 2000 ; Mohajer *et al*., 2006).

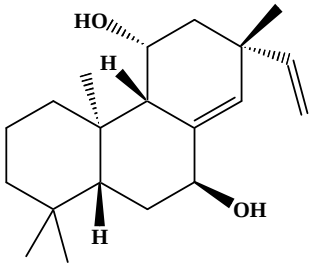
I.6.3.1 Les diterpènes

Jusqu'à présent 12 diterpènes ont été cités dans le genre *Phlomis* dont 8 labdanes, 2 diterpènes glycosylés, un kaurane et un pimarane (Li *et al*., 2010).

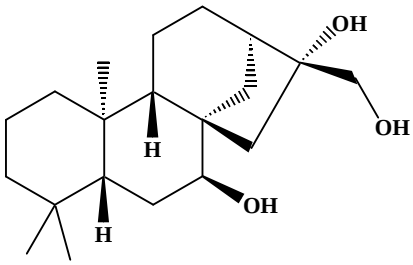
Plante	**diterpènes**	**Ref**
P. younghusbandii et *P. medicinalis*	**133**, **134** ,**135**	(Katagiri *et al*., 1994) (Yu *et al*., 2006)
P. umbrosa	**137**, **138**, **139**	(Zhao *et al*., 1999)
P. amanica	**136**	(Yalçin *et al*., 2006)
P. bracteosa	**18**	(Hussain *et al*., 2011)



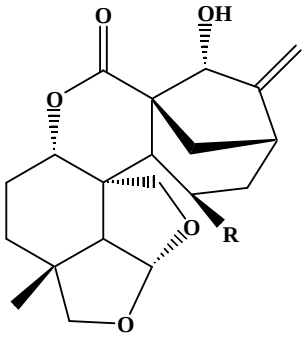
R1	R2		
OGlc(2) Rha	Me	phlomisoside I	**133**
H	COOGlc(2) → Xyl	phlomisoside III	**134**
H	COOGlc(2) → Rha	phlomisoside IV	**135**



amanicadol **136**



ent-7α,16β, 17-trihydroxy-kaurane **137**



R=H : sculponéatine A **138**

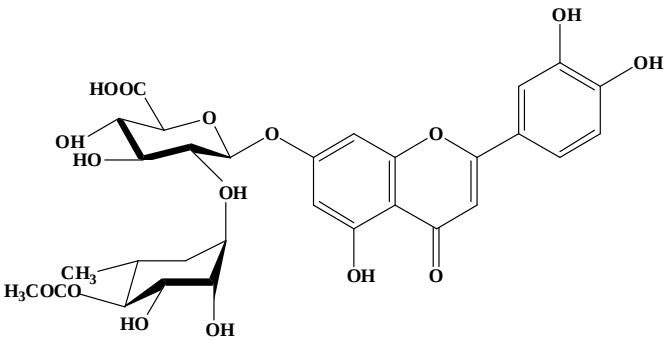
R=OH : sculponéatine C **139**

I.6.3.2 Les flavonoïdes

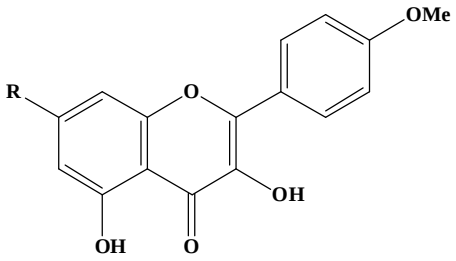
Plus de 40 flavonoïdes ont été identifiés dans le genre *Phlomis* (Çalıs *et al*., 2004 ; Kabouche *et al*., 2005; Takeda *et al*., 2001). La majorité des flavonoïdes identifiés fréquemment dans ce genre est de type flavones, flavonols et leurs derivés 7- ou 3-*O*-glycosylés. Les composés les plus isolés sont la lutéolin-7-*O*-β-glucopyranoside, le chrysoériol-7-*p*-coumarylglucoside et chrysoériol-7-*O*-glucoside (Limem-Ben Amor *et al*., 2009 ; Li *et al*., 2010). On peut trouver aussi des flavones C-glycoside comme la vicénine-2, et les flavanones comme la naringénine et l'ériodictyol (Azizian et Culte., 1986 ; Tomas-Barberan *et al*., 1986$_{b)}$.

Tableau 14 : Les flavonoïdes isolés du genre *Phlomis*

Plante	**Structure**	**Réf**
Phlomis lunariifolia	**140**, **75**, **63**	(Çalıs *et al*., 2004)
Phlomis pungens	**58**, **74**, **85**	(Nedonoskova *et al*., 1976)
Phlomis samia	**58**, **62**, **141**	(Kyriakopoulou *et al.,* 2001)
Phlomis herba-venti	**58**, **59**, **74**, **75**	(Kabouche *et al* ., 2004_a)
Phlomis crinita	**74**, **75**, **102**	(Kabouche *et al*., 2004_a)
Phlomis caucasica	**142**, **145**, **87**, **63**, **143**	(Delazar *et al*., 2008)
Phlomis aurea	**59**, **63, 73**, **75**, **76, 103**, **145**, **139, 151, 152, 155**, **154,101,150** **82**, **63,**	(El-Negoumy *et al*., 1986) (Mohamed *et al*., 2000)
Phlomis floccosa	**59**, **152**, **153**, **102**, **58**, **75, 76**, **150**, **73**, **63**, **145**	(El-negoumy *et al*., 1986)
Phlomis spectabilis	**87**, **93**, **156**	(Kumar *et al.,* 1985)
Phlomis Nissolii	**62**, **144**, **75**, **76**, **74**, **157**, **158**	(Bucar *et al*., 1998)
Phlomis lychnitys	**102**, **74**, **58**, **62**, **63**, **75**, **59**, **98**	(Tomas-Barberan *et al.*, 1986_a)
Phlomis spinidens	**159**, **160**, **161**, **162**	(Takeda *et al*., 2001)
Phlomis fruticosa	**62**, **63**, **144, 75**, **164, 143, 149**, **73**,	(Marin *et al*., 2007)
Phlomis tuberosa	**164**	(Glyzin *et al.,* 1972)
Phlomis cashmeriana	**146**, **147**, **148**, **163**	(Hussain *et al*., 2010)

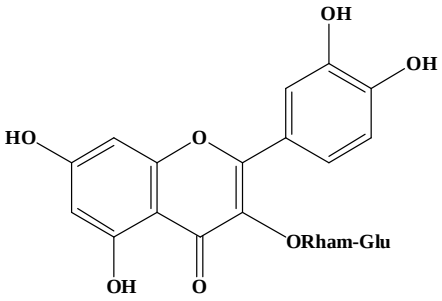


Lutéoline-7-O-[2''-O-(4'''-O-acetyl-α-L-rhamnopyranosyl)]-β-D-glucuronopyranoside **140**

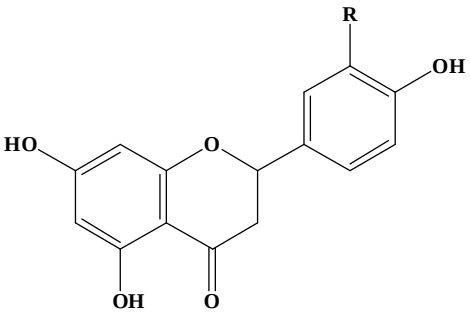


R= OH, ermanine **141**

R=OMe, kaempferol 7,4'diméthyl éther **156**

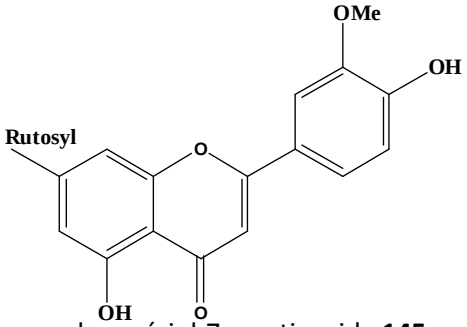


rutine **142**

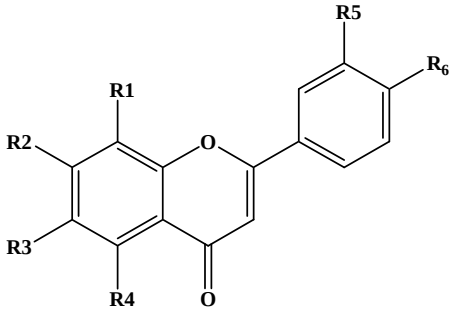


R= H, naringénine **143**

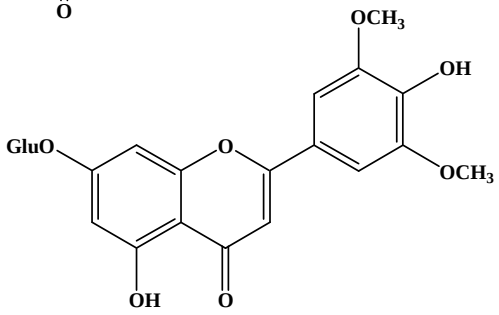
R= OH, ériodictyol **144**



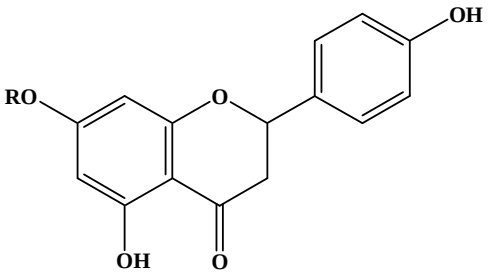
chrysoériol-7-*o*-rutinoside **145**



	R1	R2	R3	R4	R5	R6	
7,4'-diméthoxy apigénine	H	OMe	H	OH	H	OMe	**146**
7-méthoxy lutéoline	H	OMe	H	OH	OH	OH	**147**
bitalgénine	OH	OH	OH	OH	OH	OH	**148**

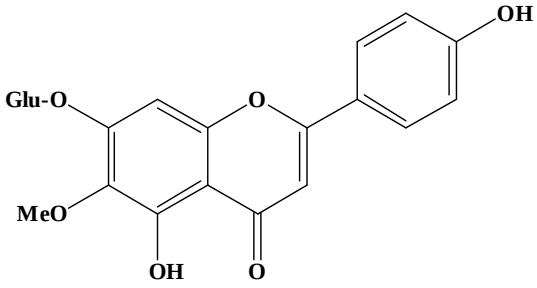


tricin-7-*O*-glucoside **149**

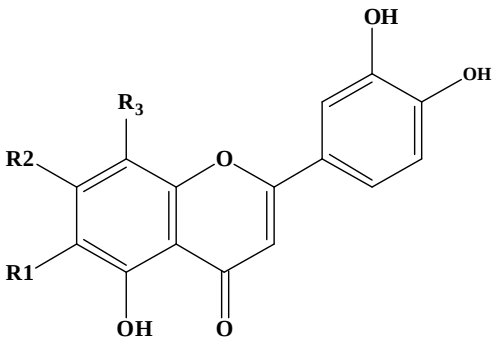


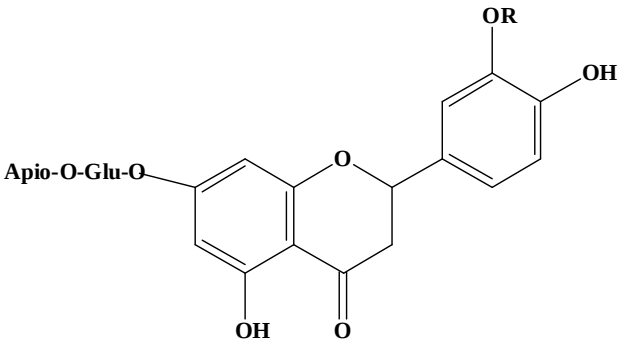
R=Ru, naringénine-7-*O*-rutinoside **150**

R= *P*-coumaryl-Glc, naringénine -7-*O*-coumaroyl **151**



hispidulin7-*O*-glucoside **155**





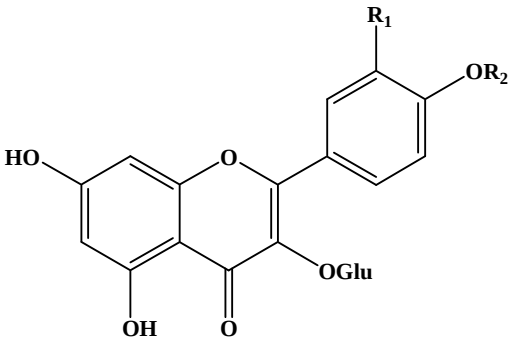
R=**CH_3**, chrysoériol 7-(6''apiofuranosy) glucopyranoside **157**

R1=R3 = **Glu**, R2= **OH**, lucénine 2 **152** R**=H,** lutéoline 7- (6''apiofuranosy) glucopyranoside **158**

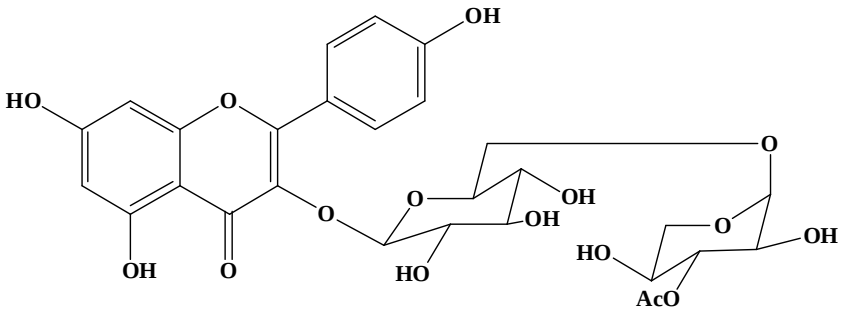
R1=R3 =**H**, R2 = **ORu**, apigénine -7-O- rutinoside **153**

R1=R3=**H**, R2= **diglu**, lutéoline-7-O-diglucoside **154**

R1= R3=**H**, R2= **glucuronide**, lutéoline-7-*O*-glucuronide **164**



	R_1	R_2	
phlomisflavosides A	OH	Api	**159**
phlomisflavosides B	H	Api	**160**
astragaline	H	H	**161**
isoquercitrine	OH	H	**162**



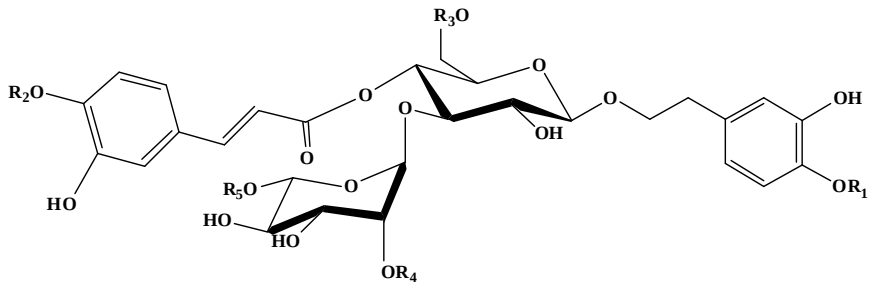
kaempferol 3-*O*-3'''-acétyl-α-Larabinopyranosyl-(1'''-6''')-β-D-glucopyranoside **163**

I.6.3.3 Les phénylpropanoïdes et les phénylethanoïdes

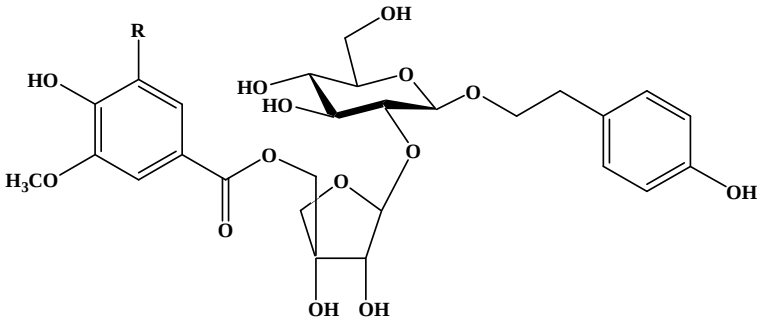
Les phényléthanoides sont un caractère taxonomique important du genre *Phlomis*. L'actéoside est le composé le plus isolé qui se trouve dans 14 espéces.

Tableau 15 : Les phénylpropanoïdes isolés du genre *Phlomis*

Espèces	**Structures**	**Références**
Phlomis lunariifolia	**110, 116**, **167**, **117**,	(Çalıs *et al*., 2004)
Phlomis grandiflora	**116 , 117** **166**, **110**, **165**	(Ersöz *et al.,* 2002_b) (Takeda *et al*., 1999)
Phlomis pungens	**165**, **116**, **117**, **168**	(Saragoglu *et al*.,1998)
Phlomis samia	**110, 177,** 169 **113**	(Kyriakopoulou *et al*., 2001) (Yalçin *et al*., 2003)
Phlomis linearis	**170**, **171**, **172**, **173**, **174**, **110**, **111**, **113**	(Çalis *et al*., 1991 ; 1990)
Phlomis herba-venti	**110**	(Kabouche *et al.,* 2004_a)
Phlomis lanceolata	**116**, **172**, **110**	(Nazemiyeh *et al*., 2008)
Phlomis crinita	**110**	(Kabouche *et al*., 2005)
Phlomis caucasica	**110, 116**	(Delazar *et al*., 2008)
Phlomis umbrosa	**178**, **179**, **110**, **184**, **175**, **180**	(Liu *et al*., 2009 ; 2007)
Phlomis aurea	**116,** **110**	(Aboutable *et al.,* 2002) (Mohamed *et al*., 2000)
Phlomis armeniaca	**110, 111, 113, 116, 171**, **172**	(Saracoglu *et al.,* 1995)
P. carica	**110**	(Yalçin *et al*., 2003)
Phlomis sintenisii	**181**, **110, 113, 116**	(Çalis *et al*., 2002)
Phlomis sieheana	**111, 110, 116, 113**	(Ersöz *et al*., 2002a)
Phlomis integrifolia Hub.-Mor	**182, 183**, **117**	(Saracoglu et al., 2003)
Phlomis angustissima	**176, 117**, **177**,	(Yalçin *et al*., 2005)
Phlomis spinidens	**116**	(Takeda *et al*., 2001)
Phlomis physocalyx	**172**, **174**, **185, 184**, **110**, **111**, **113**, **116**	(Yalçın *et al*., 2006) (Ersöz *et al*., 2003)
Phlomis fruticosa	**116**, **117**, **110**	(Ersöz *et al*., 2002b)
Phlomis brunneogaleata	**186, 116, 110**	(Kirmizibekmez *et al*., 2004)

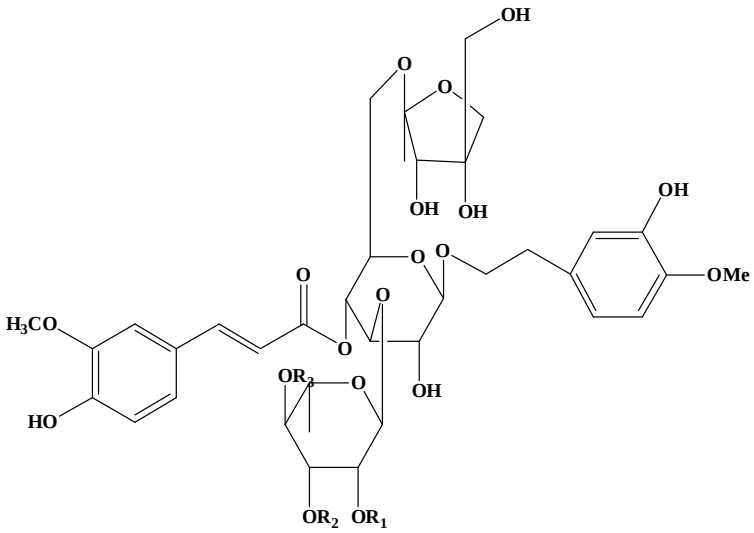


	R1	R2	R3	R4	R5	
lunariifolioside	Me	Me	H	H	H	**167**
leucosceptosideB	Me	Me	Apio	H	H	**168**
samioside	H	H	H	H	Apio	**169**
phlinoside A	H	H	H	Glu	H	**170**
phlinoside B	H	H	H	Xylo	H	**171**
phlinoside C	H	H	H	Rham	H	**172**
phlinoside D	H	Me	H	Xyl	H	**173**
phlinoside E	H	Me	H	Rham	H	**174**
allyssonoside	H	Me	Apio	H	H	**175**
phlinoside F	Me	Me	H	Xyl	H	**176**
samioside	H	H	H	H	Apio	**177**



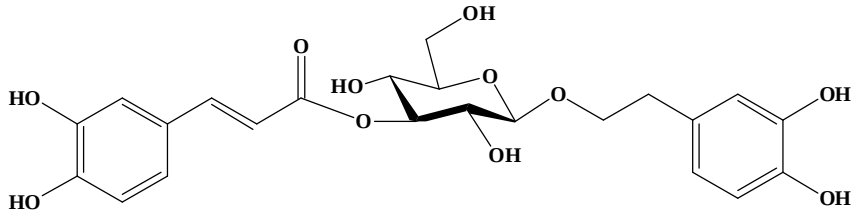
R=OMe, hattushoside **165**

R=H, phlomisethanoside **166**

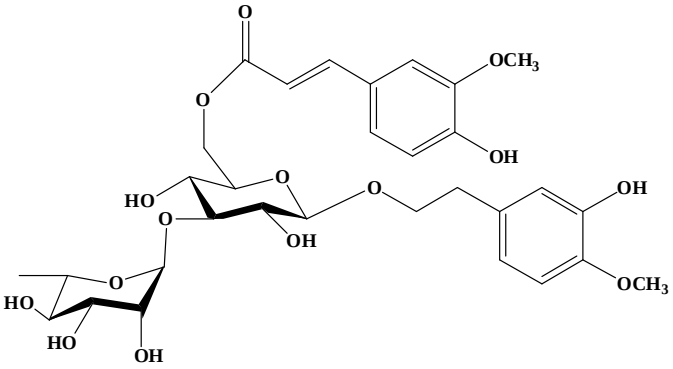


R_1 = R_2=Ac, R_3=H 2''', 3'''-di-acétyl-O- betonyoside D **178**

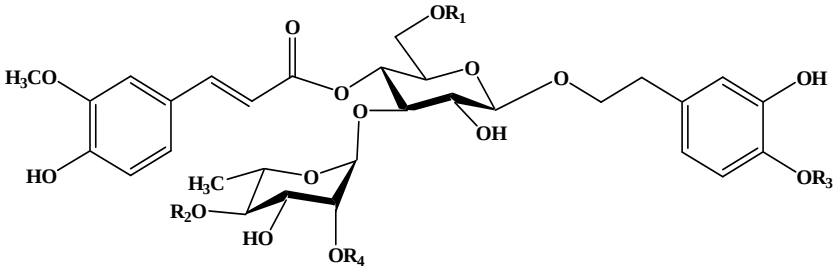
R_1=H, R_2=R_3=Ac 3''', 4'''-di-acétyl-O-betonyoside D **179**



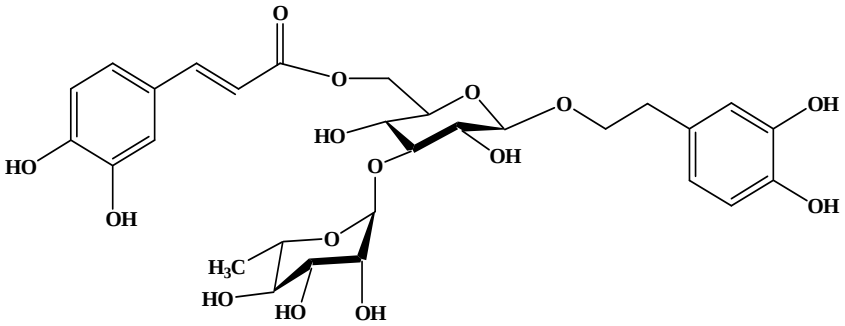
calcélarioside B **180**



Isomartynoside **181**



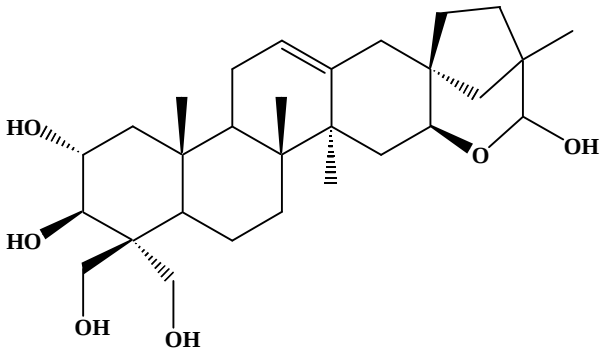
R1	R2	R3			
H	Apiose	H	H	integrifoliosides A	**182**
H	Apiose	Me	H	integrifoliosides B	**183**
Glucose	H	H	H	wiedemannioside C	**184**
Glucose	H	Me	Rham	physocalycoside	**185**



Isoverbascoside **186**

I.6.3.4 Autres composés

Phlomis umbrosa Turcz est une plante qui pousse au nord de la Chine, utilisé en médecine traditionnelle pour traiter la grippe, les maux d'estomac et les ballonnements. Il possède également des propriétés anti-inflammatoires et de détoxification (Jiang, 1977 ; Guo *et al*., 2001). Un nouveau nortriterpènes **183** a été isolé de cette plante (Liu *et al*., 2010**)**.



(2α,3β,16β,17*R*)-19(18→ 17)-abeo-16,30-époxy-28-norolean-12-ene-2,3,23,24,30-pentaol **183**

I.6.4 Etudes biologiques antérieures

I.6.4.1 Usages traditionnels

Le genre *Phlomis* est très utilisé en médecine traditionnelle dans de nombreuses régions.
En Algérie le genre *Phlomis* est utilisé en médecine traditionnelle pour soigner les inflammations et les rhumatismes (Kabouche *et al*., 2004_a).

En Turquie, la plupart des *Phlomis* est utilisée comme tonique ou stimulant (Baytop, 1999).
En Chine, 43 espèces ont été enregistrées, particulièrement dans les provinces du Sichuan et du Yunnan. Ce sont les herbes les plus populaires en Chine grâce à leurs propriétés aromatiques et médicinales. Ces propriétés sont dues a leurs constituants volatils. En effet les analyses des huiles essentielles de ces espèces font l'objet de plusieurs publications (Zhang *et al*., 2008).

Dans la flore iranienne le genre *Phlomis* est représenté par 17 espèces dont 10 sont endémiques ; elles bénéficient d'un grand nombre d'utilisations en médecine traditionnelle notamment comme stimulants, toniques, pour guérir les blessures, soulager les douleurs et contre le diabète (Mohajer *et al*., 2005 ; Sarkhail *et al*., 2005). L'huile essentielle de ce genre joue également un rôle important au niveau nutritionnel et en fabrication des médicaments (Zargari, 1960).

En général, les différentes espèces du genre *Phlomis* sont utilisées en médecine traditionnelle comme stimulant, tonique et cicatrisant (Couladis *et al*., 2000), anti-inflammatoire, immunosuppresseur (Parisa et al., 2004) antidiabétique (Sarkhail, 2005), antipyrétique, antidiarhéque, anti-allergique (Opredelitel, 1987) antiulcérogène (Gürbüz *et al*., 2003), antimicrobien (Risti *et al*., 2000 ; Mangena et Muyima, 1999)

antimutagène (Parisa *et al.,* 2004 ; Sokovic *et al.,* 2002), antioxydant (Ismailoglu *et al.,* 2002). On peut citer comme exemple *Phlomis umbrosa* Turcz une plante connue en Koré sous le nom de Sok-dan, utilisée en médecine traditionnelle pour traiter les hémorrhagies, les bronchites et les fractures (Lee, 1966 ; But *et al*., 1997 ; Zu, 1998).

I.6.4.2 Etudes pharmacologiques

L'investigation biologique des extraits et des constituants chimiques du genre *Phlomis* a montré qu'ils possèdent diverses activités biologiques. On peut citer comme exemple les composés isolés de *P. brunneogaleata* qui ont montré une activité antiparasitaire contre le *Leishmania donovani, Plasmodium falciparum* et *Trypanosoma brucei rhodesiense*. Alors que l'extrait chloroformique de P. *kurdica* a montré une activité anti-leishmanie, anti-trypanosome et anti-plasmodium mais l'extrait de P. *leucophrata* empêche seulement le dévelopement de trypanosome (Tasdemir *et al*., 2005).

Le diabète est l'une des cinq principales maladies causant un nombre important de décés dans le monde (Gipsen *et al*., 2000 ; Rahimi *et al*., 2005). Certaines espèces du genre *Phlomis* sont utilisées en médecine traditionnelle pour traiter cette maladie. Une étude a été faite par Sakhail et Coll sur les effets de l'extrait MeOH des parties aériennnes de *P. anisodonta* sur des rats et l'apparition du diabète, provoqué par La streptozotocine. L'administration orale des doses de 100, 200 et 400 $mg.Kg^{-1}$ pendant 10 jours a permis d'obtenir une réduction signifiante du glucose dans le sang et une diminution des doses d'insuline (Sarkhail *et al.*, 2007).

En Turquie, en Espagne, en Iran, en Syrie, en Grèce et au Portugal, l'infusion et la décoction préparée à partir des espèces de *Phlomis* sont habituellement utilisées pour faciliter la digestion, pour traiter les ulcéres gastriques et les douleurs. Les effets gastroprotecteurs de ces espèces ont été analysés par deux différentes études. La première : le traitement des rats par l'extrait aqueux et l'extrait méthanolique de *Phlomis grandiflora* chez lesquels l'ulcérogénèse était déclanchée par l'ethanol a montré après l'examination histopatologique que ces deux extraits ont un effet de protection gastrique plus important que le misoprostol (le médicament de référence) (Gürbüz *et al*., 2003).
La deuxième : Limem-Ben Amor, en 2009, a évalué l'activité gastroprotectrice de l'extrait aqueux de *Phlomis crinita*. Le test a été réalisé par le déclanchement de l'ulcère par l'alcool à 50°. Le rat a été traité par cet extrait à une dose de 300 $mg.kg^{-1}$; la comparaison des résultats obtenus avec la référence (la cimetidine) a montré une réduction de l'ulcérogénèse de 90% contre 71% pour la cimetidine. Ces travaux ont permis de confirmer l'utilisation de ces espèces comme plantes gastroprotectrices.

Il est intéressant de noter également que Sarkhail et al en 2003 à démontré l'existance des propriétés antinociceptive sur des extraits de certaines espèces tel que *Phlomis olivieri*, *P. anisodonta* à une dose de 150 $mg.kg^{-1}$ et de *Phlomis persica* à une dose de 100 $mg.kg^{-1}$ comparable à l'indomethacine (Sarkhail et al., 2003). Deux ans plus tard Mohajer et al en 2005 à présenté les propriétés analgesiques des extraits de *Phlomis lanceolata* (extrait ether diethylique, acetate d'ethyl, n-butanol et extrait aqueux) (Mohajer *et al*., 2005).

Enfin, des travaux ont été effectués sur l'activité biologiques des huilles essentielles de différentes *Phlomis et ont* montré un effet antibactérien très important vis-à-vis de bactéries pathogénes notamment *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* (Morteza-Semnani *et al*., 2006).

I.7 Conclusion

D'après les recherches bibliographiques effectuées sur la famille des Lamiacées, le genre *Marrubium* et le genre *Phlomis* possèdent pratiquement le même profil de diversité structurale des métabolites secondaires (diterpènes, flavonoïdes et phénylpropanoïdes). Les diterpènes de types labdanes sont majoritairement présents dans genre *Marrubium*, alors que dans le genre *Phlomis* les flavonoïdes et les phénylpropanoïdes sont plus abondants que les diterpènes.

Après cette première partie consacrée à la description botanique, phytochimique et pharmacologique de la famille du genre et d'espéce de deux plantes, la deuxiéme partie présente les travaux personnels.

I.8 Références

A

Abdollahl M., Karimpour H., Monsef-Esfehani H. R., 2003. Antinociceptive effects of *Teucrium polium* total extract and essential oil In mouse writhing test. *Pharmacology Research*, 48(1), 31-35.

Aboutable A., Meselhy M. R., Afifi M. S., 2002. Iridoids from *Phlomis aurea* decne growing in Egypt. *Pharmazie*, 57 (9), 646-647.

Ajaz H., Perveen S., Malik A., Khan A. N., Tareen B. R., 2010. Marrusidins A and B, new epimeric labdane diterpenes from *Marrubium anisodon*. *Helvetica Chimica Acta,* 93, 1101-1104.

Akcos Y., Ezer N., Özçlik B., Abbasolu U., 1998. Iridoid glucosides from *Sideritislycia Boiss* et Heldr and its antimicrobial activities. FABAD *Journal of Pharmaceutical Science*, 23, 99-103.

Al-Ansari M. A., Barron D., Abdalla M. F., Saleh N. A. M., Le Quéré J. L., 1991. Flavonoid constituents of *Stachys aegyptiaca*. *Phytochemistry*, 30, 1169-1173.

Al-Bakri A. G., Afifi F. U., 2007. Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration. *Journal of Microbiological Methods* 68 (1), 19-25.

Albaladejo R. G., Aguilar J. F., Aparicio A., Gonzalo N., 2005. Contrasting nuclear-plastidial phylogenetic patterns in the recently diverged Iberian *Phlomis crinita* and *P. lychnitis* lineages (*Lamiaceae*). 54(4), 987-998.

Andary C., Privat G., 1985. Pheliposide et arenarioside, deux nouveaux esters heterosidiques de l'acide cafeique isolés de *Orobanche arenaria. Journal of Natural Product, 48 (5), 778-783.*

Argyropoulou C., Karioti A., Skaltsa H., 2009. Labdane diterpenes from *Marrubium thessalum*. *Phytochemistry*, 70, 635–640.

Arnold N. A., 1993. Conservatoire des Plantes du Nord de la France, Bailleul, France, 14.

APG., 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 141, 399-436.

Azizian D., Cutle D. F., 1986. Anatomical, cytological and phytochemical studies on *Phlomis L*. and *Eremostachys Bunge* (*Labiatae*). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 85, 249‑281.

B

Bal Y., 1989. Terpenoids and a flavone from Marrubium parviflorum. *Marmara Pharmaceutical Journal,* 5 (1), 89-91.

Balmé F., 1982. Plantas medicinais. Ed. Hemus Ltda, S˜ao Paulo

Baser K. H. C., 2002. The Turkish Organum species In Oregana, The Genere *Origanum* and *Lippia*. Ed, S. E. Kintzios, Taylor and Francis, UK, 109-126.

Baytop T., 1999. Therapy with medicinal plants in Turkey (past and present), second ed. Nobel Tip Kitapevleri, Istanbul. 193.

Bellakhdar J., 1997. Médecine arabe ancienne et savoirs populaires, la Pharmacopée marocaine traditionnelle , Ibs Press, 341.

Bentham G., 1876. *Labiatae.* In: Bentham G., Hooker J. D. (Eds), Genera Plantarum, Reeve and Co, London, 2, 1160–1223.

Bentley R. H., 1880. Trimen medicinal plants, Churchill, London, 1123.

Blumenthal M., 1998. The complete German commission E monographs. American Botanical Council TX, Austin, 148

Bonnier G., de Layens G., 1909, Flore compléte, la végétation de la France, Suisse et Belgique.

Bown D., 1995. Encyclopedia of herbs and their uses. New York, DK publishing, Inc.

Bradley P. R., 1992. British Herbal Compendium. British Herbal Medicine Association, Bournemouth, 1, 218-220.

Briquet J., 1895–1897. *Labiatae*. In: Engler, A., Prantl, K. (Eds.), Die naturlichen Pflanzenfamilien, Teil 4, Abt. 3a, W. Engelmann, *Leipzig*, 183–375.

Bucar F. , Ninov S., Ionkova I. , Kartinig T. , Schubert-Zsilavecz M. , Asenov I. , Konuklugil B., 1998. Flavonoids from *Phlomis nissolii*. *Phytochemistry*, 48 (3), 573-578.

But P. P. H., Kimura T., Guo J. X., Han B. H., 1997. International collation of traditional and folk medicine (2). World Scientific Publishing: New Jersey, 137.

Bruneton J., 1999. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales 3. e. édition Tec et Doc. Paris.

C

Çalis I., Hosny M., Khalifa T., Rüedi P., 1992. Phlinosides A, B and C, 3 phenylpropanoid glycosides from *Phlomis Linearis. Phytochemistry*. 29, 4, 1257.

Çalis I., Basaran A. A., Saracoglu I., Sticher O., Rüedi P., 1991. Phlinosides D and E, phenylpropanoid glycosides and iridoids from *Phlomis linearis*. *Phytochemistry*, 30, 3073-3075.

Çalis I., Kirmizibekmez H., Ersoz T., Saracoglu I., Donmez A. A., Handjieva N., Popov S., 2002. Iridoid, phenylethanoid and flavonoid glycosides from *Phlomis sintenisii*. *Acta Pharmaceutica Turcica* , 44, 195-203.

Çalis I., Kırmızıbekmez H., 2004. Glycosides from *Phlomis lunariifolia*. *Phytochemistry*, 65, 2619–2625.

Çalis I., Hosny M., Khalifa T., Rüedi P., 1992. Phenylpropanoid glycosides from *Marrubium alysson*. *Phytochemistry*, 31 (10), 3624 -3626.

Çalis I., Basaran A. A., Saracoglu I., Sticher O., Ruedi P., 1990. Phlinosides A, B and C, three phenylpropanoid glycosides from *Phlomis linearis. Phytochemistry*, 29, 1253-1257.

Çalis I., Basaran A. A., Ahmet A., Saracoglu I., Sticher O., Ruedi P., 1991. Phlinosides D and E, Phenylpropanoid glycosides and iridoids from *Phlomis linearis*. *Phytochemistry,* 30, 3073-3075.

Canonica L., Rindone B., Scolastico C., Ferrari G., Casagrande C., 1968. A new diterpenoid with labdane skeleton. *Tetrahedron Letters*, 3149-3152.

Cantino P. D., Harley R. M., Wagstaff S. J., 1992. Genera and Classification. In Harrley, R.M. Reynolds,T. (eds) Advences in Labiate Science. Royal Botanic Gardens, Kew, 511-522.

Citoglu G. S., Aksit F., 2002. Occurrence of marrubiin and ladanein in *Marrubium trachyticum* Boiss. B*iochemical Systematics and Ecology,* 30, 885-886.

Clarendoniano E. P., 1894. Index Kewensis *Plantarum Phanerogamarum*. 170.

Cole M. D., 1992. The significance of the terpenoids in the *Labiateae*. In Harley R. M., Reynolds, T. (eds). *Advances in Labiatea Science*. Royal Botanic Gardens, Kew, 315-324.

Coste H., 1998. Flore descriptive et illustrée de la france, de la corse et des contrées limitrophes. Librairie scientifique et technique Albert Blanchard , Paris.

Couladis M., Tanimauidis A., Tazakou O., Chinou IB., Harvaia C., 2000. Essential oil of *Phlomis lanata* growing in Greece: chemical composition and antimicrobial activity. *Planta Medica*, 66, 670–672.

D

Delazar A., Sabzevari A., Mojarrab M., Nazemiyeh H., Esnaashari S., Nahar L., Razavi S. M., Sarker S. D., 2008. Free-radical-scavenging principles from *Phlomis caucasica*. *Journal of Natural Medicines*, 62, 464–466.

De Luca V., Pierre B. St., 2000. The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. Trends in Plant Science, 5, 349-364.

Demetzos C., Dimas K. S., 2001. Labdane-type diterpenes: Chemistry and biological activity. *Studies in Natural Products Chemistry,* F, 235-292.

Dendougui H., Seghir S., Belloum Z., Benayache F., Leon F., Brouard I., Bermejo J., Benayache S., 2011. A New Labdane Diterpene and Other Constituents from Marrubium deserti Noe ex coss. Records of Natural Products, 5 (4), 300-304.

De Souza M. M., De Jessus R. A. P., Cechinel-Filho V., Schlemper V., 1998. Analgesic profile of alcoholic extract obtained from *Marrubium Vulgare*. *Phytomedicine*, 5, 103-107.

Do T. T., Trinh T. T. V., Nguyen Q. C., Nguyen V. H., 2005. *Journal of Medicinal (Vietnamese)* , *11*, 10–13.

E

El Bardai S., Lyoussi B., Wibo M., Morel N., 2001. Pharmacological evidence of hypotensive activity of *Marrubium vulgare* and *Foeniculum vulgare* in spontaneously hypertensive rat. *Clinical and Experimental Hypertension*, 23, 329–343.

El-Naggar L., Beal J., 1980. Iridoids a review. *Journal of Natural Products*. 43, 649-707.

El-negoumy S. I., Abdalla M. F., Saleh N. A. M., 1986. Flavonoids of *Phlomis aurea* and *P. floccosa. Phytochemistry*, 25(3), 172-774.

Ersöz T., Alipieva K. I., Yalçin F. N., Akbay P., Handjieva N., Dönmez A. A., Popov S., Çalis I., 2003. Physocalycoside, a new phenylethanoid glycoside from *Phlomis physocalyx* Hub.-Mor. *Journal of Biosciences,* 58(7/8), 471-476.

Ersöz T., Harput Ü. Ş., Çalış I., Dönmez A. A., 2002a. Iridoid, Phenylethanoid and monoterpene glycosides from *Phlomis sieheana*. *Turkish Journal of Chemistry*, 26, 1-8.

Ersöz T., Saracoglu I., Harputü S., Çalis I., Dönmez A. A., 2002_b. Iridoid and phenylpropanoid glycosides from *Phlomis grandiflora* var.mbrilligera and *Phlomis fruticosa*. *Turkish Journal of Chemistry*, 26, 171 -178.

Esquivel B., Calderon J. S., Sanchez A. A., Ramamoorthy T. P., Flores E. A., Dominguez R. M., 1996. Recent advances in phytochemisrty and biological activity of Mexican *Labiatea*. *Rev Latinoamer Quimica*, 24 (2), 44-64.

Ezer N., Sezik E., Erol K., Özdemir M., 1992. The spazmotic activity of some Sideritis species. Proceedings of the 9^{th} Symposium on the Plant Drugs. Eskişehir, 16-19 May 1991. Proceedings book (ed. Başer K. H. C) *Anadou Univ Pub*, 641, 88-93.

Ezer N., Usluer G., Güneş E. K., 1994. Antibacterial activity of some *Sideritis* species. *Fitoterapia*, 65, 549-551.

F

Figueiredo M. R., Kaplan M. A. C., Gottlieb O. R., 1995. Diterpenes Taxanomic Markers. *Plant Systematics and Evolution*, 195, 149-158.

Fraga B. M., Hernandez M. G., Santana J. M. H., Terrero D., Galvan M. F., 1995. A chemotaxonomical study of *Sideritis massoniana* taxa. *Biochemical Systematcs and Ecology*, 23 (7/8), 835-842.

Fulke J. W. B., Henderson M. S., Mc Crindle R., 1968. Some reactions of the diterpene marrubiin and its congeners. *Journal of the Chemical Society* (C), 807-810.

G

Galati E. M., Mondello M. R., D'Aquino A., Micell N., Sanogo R., Tzakou O., 2000. Effects of *Teucrium divaricatum* Heldr.ssp. divaricatum decoction on experimental ulcer in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 72,337-342.

Gispen W. H., Biessels G. J., 2000. Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends Neurosci* 23, 542–549.

Girre L., 2000. *Infusions et Plantes de Santé en France*. Ouest- France: Tours, 60.

Glyzin V. I., Peshkova V. A., Khokhrina T. A., 1972. Luteolin 7-β-D-glucuronide from *Phlomis tuberose*. *Khimiya Prirodnykh Soedinenii,* 6, 802-803.

Gordin H. M., 1908. Marrubiin. *Journal of the American Chemical Society*, 30, 265-271.

Grayer R. J., Eckert M. R., Veitch N. C., Kite G. C., 2003. The chemotaxonomic significance of two bioactive caffeic acid esters, Nepetoidins A and B, in the *Lamiaceae*. *Phytochemistry*, 64, 519-528.

Greuter W., Burdet H.M., Long G., Eds. Med-Chechlist; Conservatoire et Jardins Botaniques: Genéve , 1986, 3, 292-295.

Guo S. J., Gao L. M., Cheng D. L., 2001. Iridoids from *Phlomis umbrosa*. *Pharmazie,* 2, 178—180.

Guignard J. L., Pelt J. M., 2001. Botanique Systématique moléculaire.12^{e} édition. Masson, Paris

Guignard J. L., Dupont F., 2004.Botanique Systématique moléculaire. 13e édition. Masson, Paris

Gürbüz I., Üstün O., Yesilada E., Sezik E., Kutsal O., 2003. Antiulcerogenic activity of some plants used as remedy in Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, 88, 93–97.

H

Habtemariam S., Gray A. I., Waterman P. G., 1994. Diterpenes from the leaves of *Leonotis ocymifolia* var. raineriana. *Journal of Natural Products*, 57, 1570-1574.

Hammiche V., Maiza K., 2006. Traditional medicine in Central Sahara: pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. *Journal of Ethnopharmacology*, 105(3), 58-67.

Han Q. B., Zhang J. X., Zhao A. H., Sun H. D., Lu Y., Wu Y. S., Zheng Q. T., 2004. Two novel tricyclic diterpenoids from *Isodon rubescens* var. taihangensis. *Tetrahedron*, 60, 2373-2377.

Han Q. B., Cheung S., Tai J., Qiao C.-F., Song J.-Z., Tso T.-F., Sun H.-D., Xu H.-X., 2006. Maoecrystal Z, a cytotoxic diterpene from *Isodon eriocalyx* with a unique skeleton. *Organic Letters,* 8 (21), 4727-4730.

Harley R. M., Atkins S., Budantsev A., Cantino P. D., Conn B., Grayer R. J., Harley M. M., de Kok R. P. J., Krestovskaja T., Morales A., Paton A. J., Ryding O., Upson T., 2004. *Labiatae*. In Kadereit J. W. (ed), The Families and Genera of Vascular Plants, 7, 167-275.

Hassan M. M. A., Muhtadi F. J., Al-Badr A., 1979. Antispasmodic GLC-mass spectrometry of *Teucrium polium* essential oil. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 68, 800-801.

Hatam N. A. R., Porzel A., Seifert K., 1995. Polyodonine, a prefuranic labdane diterpene from *Marrubium polyodon*. *Phytochemistry*, 40, 1575-1576.

Hedge I. C., 1986. Labiatae of South-West Asia: diversity, distribution and endemism. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh*, 89B, 23-35.

Heim K. E., Tagliaferro A. R., Bobilya D. J., 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572-584.

Hendrich A. B., 2006. Flavonoid-membrane interactions: possible consequence for biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta Pharmacologica Sinica*, 27, 27-40.

Hennebelle T., Sahpaz S., Skaltsounis A. L., Bailleul F., 2007. Phenolic compounds and diterpenoids from *Marrubium peregrinum*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35(9), 624-626.

Heywood V. H., Brumitt R. k., Culham A., Seberg O. 2007. Flowering plant families of the world. Royal botanic Gardens,Kew.

Huang T. C., 2003. In: Huang T. C., Hsieh C. F., Boufford D. E., Kuoh C. S., Ohashi H., Peng C. I., Tsai J. L., Yang K. C., Hsiao A., Tsai J. M. (Eds.), Flora of Taiwan, 2nd ed. National Science Council of the Republic of China, Taipei, 437–448.

Husein S. Z., Markham K. R., 1981. The glycoflavone vicenin-2 its distribution in related genera within the *labiatae*. *Phytochemistry,* 20, 1171.

Hussain A., Perveen S., Malik A., Afza N., Iqbal L., Tareen R. B., 2009. Urease inhibitory flavone glucosides from *Marrubium anisodon*. *Polish Journal of Chemistry*. 83(7), 1329-1335.

Hussain J., Bukhari N., Hussain H., Bano N., Naeem A., Gree I. R., 2010. Flavonoids and Terpenoids from *Phlomis cashmeriana* and their Chemotaxonomic significance. *Records of Natural Products,* 4(4), 242-249.

Hussain J., Ullah R., Khan A. U., Mabood F., Shah M. R., Al-Harrasi A., Hassan Gilani A., 2011. Antispasmodic and Ca++ antagonist potential of marrubiin, a labdane type diterpene from *Phlomis bracteosa*. *Journal of Pharmacy Research,* 4(1),178-180

Itokawa H., Suto K., Takeya K., 1981, Studies on a novel pcoumaroyl glucoside of apigenin and on other flavonoids isolated from Patchouli (*Labiatae*). *Chemistry of Pharmaceutical Bulletin*, 29, 254–256.

Ismailoglu U. B., Saracoglu I., Harput U. S., Sahin-Erdemli I., 2002. Effects of phenylpropanoid and iridoid glycosides on free radical-induced impairment of endothelium-dependent relaxation in rat aortic ring. *Journal of Ethnopharmacology*, 79, 193.

J

Jiang S., New Medical College, 1977. "Dictionary of Chinese Materia Medica," Shanghai Scientific and Technical Publishing House, Shanghai.

Jiménez C., Riguera R., 1994. Phenylpropanoid glycosides in Plants: Structure and biological activity. *Natural Product Reports*, 11, 591-606.

K

Kabouche A., Kabouche Z., Seguin E., Tillequin F., Bruneau C., 2004_a. Comparative phytochemical study of the butanolic extracts of two Algerian *Phlomis* species. *Chemistry of Natural Compounds*, 40, 188-189.

Kabouche A., Kabouche Z., Seguin E., Tillequin F., Bruneau C., 2004_b. Chemical Composition of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* cultivated in the Algerian sahara. *Chemistry of Natural Compounds*, 1, 28.

Kabouche A., Kabouche Z., Seguin E., Tillequin F., Bruneau C., 2005. A phenylethanoid glycoside and flavonoids from *Phlomis crinita* (*Lamiaceae*). *Biochemical Systematics and Ecology*, 33(8), 813-816.

Kamel M. S., Mohamed K. M., Hassanean H. A., Ohtani K., Kasai R., Yamasaki K., 2000. Iridoid and megastigmane glycosides from *Phlomis aurea*. *Phytochemistry*, 55, 353-357.

Kao M. T., 1985. Popular Herbal remedies of Taiwan. SMC, Publishing Inc, Taipei.

Katayoun M. S., Mohammed A., Afsaneh G., 2004. The essential oils composition of *Phlomis herba-venti* L. leaves and flowers of Iranian origin. J Flav Fragr, 19, 29–31.

Karioti A., Heilmann J., Skaltsa H., 2005. Labdane diterpenes from *Marrubium velutinum* and *Marrubium cylleneum*. *Phytochemistry*, 66, 1060-1066.

Karioti A., Skaltsa H., Heilmann J., Sticher O., 2003. Acylated flavonoid and phenylethanoid glycosides from *Marrubium velutinum*. *Phytochemistry,* 64(2), 655-660.

Karioti A., Skopeliti M., Tsitsilonis O., Heilmann J., Skaltsa H., 2007. Cytotoxicity and immunomodulating characteristics of labdane diterpenes from *Marrubium cylleneum* and *Marrubium velutinum*. *Phytochemistry*, 68, 1587–1594.

Karioti A., Protopappa A., Megoulas N., Skaltsa H., 2007. Identification of tyrosinase inhibitors from *Marrubium velutinum* and *Marrubium cylleneum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(7), 2708-2714.

Katagiri M., Ohtani K., Kasai R., Yamasaki K., Yang C.-R., Tanaka, O., 1994. Diterpenoid glycosyl esters from *Phlomis young- husbandii* and *P. medicinalis* roots. *Phytochemistry*, 35, 439-442.

Katayoun M. S., Mohammed A., Afsaneh G., 2004. The essential oils composition of *Phlomis herba-venti* L. leaves and flowers of Iranian origin. Flavour and *Fragrance Journal.*, 19, 29–31.

Kirmizibekmez H., Calis I., Perozzo R., Brun R., Donmez A., Linden A., Ruedi P., Tasdemir D., 2004. Inhibiting activities of the secondary metabolites of *Phlomis brunneogaleata* against parasitic protozoa and plasmodial enoyl-ACP Reductase, a crucial enzyme in fatty acid biosynthesis. *Planta Medica*, 70, 711-717.

Kowalewski Z., Matlawska I., Akad Med., Poznan P., 1978. Flavonoid compounds in the herb *Marrubium vulgare*. *Herba Polonica*, 24(4), 183-6.

Kubo I., Ganjian I., Kubota T., 1982. Chemotaxonomic significance of ent-kaurene diterpenes in *Rabdosia umbrosus* varieties. *Phytochemistry*, 21 (1), 81-83.

Kumar R., Bhan S., Kalla A. K., Dhar K. L., 1985. Flavonol glycosides of *Phlomis spectabilis*. Phytochemistry, 24, 1124-1125.

Kyriakopoulou I., Magiatis P., Skaltsounis A. L., Aligiannis N., Harvala C., 2001. Samioside, a New Phenylethanoid Glycoside with Free-Radical Scavenging and Antimicrobial Activities from *Phlomis samia. Journal of Natural Products*, 64, 1095-1097.

L

Lambert R., Skandamis *Three flavonoid glycosides containing acetylated allose from* P. N., Coote P. J., Nychas G. J., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of aregano essential oil, Tymol, and carvacrol. *Journal Application Biology*, 91, 453-462.

Laonigro G., Lanzetta R., Parrilli M., Adinolfi M., Mangoni L., 1979. The configuration of the diterpene spiroethers from *Marrubium vulgare* and from *Leonotis leonurus*. *Gazzetta Chimica Italiana*, 109, 145-150.

Lee S. J., 1966. Korean Folk Medicine. Publishing Center of Seoul National University: Seoul, 119.

Lee T. K., Lee D. K., Kim D. I., Lee Y. C., Chang Y. C., Kim C. H., 2004. Inhibitory effects of Scutellaria barbata D. Don on human uterine leiomyomal smooth muscle cell proliferation through cell cycle analysis. *International Immunopharmacology*. 4, 447–454.

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

Lenher A., Lahloub M. F., Sticher O., 1984. *stachys recta. Phytochemistry*, 23, 2343-2345.

Lewis H. W., 1977. Medical Botany, Plants Affecting Man's Health. Jhon Wiley, New York.

Li M. X., Shang X. F., Jia Z. P., Zhang R. X., 2010. Phytochemistry and biological studies of plants from the genus *Phlomis*. *Chemistry and Biodiversity*, 7, 283-301.

Lida A., Tanaka Y., Mihara T., Tabata M., Honda G., Shingu T., Takeda Y., Takaishi Y., Yesilada E., Sezik E., Fujita T., 1995. Marrubinones A and B from *Marrubium astracanicum*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 43, 1454-1457.

Liolios C., Laouer H., Boulaacheb N., Gortzi O., Chinou I., 2007. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Algerian *Phlomis bovei* De Noe subsp. Bovei, *Molecules*, 12, 772‑781.

Limem-Ben Amor I., Skandrani I., Boubaker J., Ben Sghaier M., Neffati A., Bhouri W., Bouhlel I., Chouchane N., Soumaya Kilani S., Guedon E., Ghoul M., Ghedira K., Chekir-Ghedira L., 2009. Investigation of biological activity of polar extracts isolated from *Phlomis crinita* Cav ssp. mauritanica Munby. *Drug and Chemical Toxicology*, 32, 38–46.

Liu P., Takaishi Y., Duan H. Q., 2007. Two new phenylethanoid glycosides from the roots of *Phlomis umbrosa*. *Chinese Chemical Letters*, 18 (2), 155-157.

Liu P., Deng R., Duan H.-Q., Yin W., Zhao T.-Z., 2009. Phenylethanoid glycosides from the roots of *Phlomis umbrosa*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 11 (1), 69 - 74.

Liu P., Deng R., Yin W., 2010. A new nortriterpenoid from *Phlomis umbrosa*. *Chemistry of Natural Compounds*, 46 (4).

M

Maiza K., De la Perrière R. A., Hammiche V., 1993. Pharmacopée traditionnelle saharienne: Sahara septentrional. *Médicaments et aliments: l'approche ethnopharmacologique, 169.*

Mangena T., Muyima N. Y. O., 1999. Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of Artemisia afra, Pteronia incana and Rosmarinus officinalis on selected bacteria and yeast strains. *Letters in Applied Microbiology*, 28, 291–296.

Mascolo N*., Autore G., Capasso F., Menghini A., Fasulo M. P. 1987. Biological screening of Italian medicinal plants for anti-inflammatory activity. Phytotherapy Research, 1, 28–31.*

Marin P. D., Grayer R. J., Grujic-Jovanovic S., Kite G. C. Veitch N. C., 2004. Glycosides of tricetin methyl ethers as chemosystematic markers in *Stachys* subgenus *Betonica*. *Phytochemistry*, 65, 1247-1253.

Marin P. D., Veitch N. C., Grayer R. J., Kite J. C., Sokovic M., Janackovic P., 2007. Flavonoids from *Phlomis fruticosa* (*Lamiaceae*) growing inMontenegro. *Biochemical and Systematic Ecology*, 35, 462–466.

Mascolo N., Autore G., Capasso F., Menghini A., Fasulo M. P., 1987. Biological screening of Italian medicinal plants for anti-inflammatory activity. *Phytotherapy Research,* 1, 28–31.

Menezes F. S., Kaplan M. A. C., 1993. Ocorrências de diterpenoides na familia *Lamiaceae*. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 74 (2), 45-46.

Menezes F. S., Kaplan M. A. C., 1995. Chemoevolutionary polarization in the *Lamiiflorae.* An Acad Bras Ci, 67, 455-460.

Meyere-Silva C., Cechinel-Filho V., 2010. A review of the chemical and pharmacological aspects of the genus *Marrubium*. *Current Pharmaceutical Design*, 16(31), 3503-3518.

Michelis F., Tiligada E., Skaltsa H., Lazari D., Skaltsounis A. L., Delitheos A., 2002. Effects of the pillion isolated from *Marrubium cylleneum* on Mitogen-induced Lymphocyte transformation. *Pharmaceutical Biology,* 40(4), 245-248.

Moench C., 1794. *Methodus plantas Horti botanici et agri Marburgensis, a straminum situ describendi*. Marburgi Cattorum, Marburg, Germany.

Mohajer M., Sarkhail P., Hajarolasvadi N., Zamani M. J., Khorasani R., Shafiee A., Amin G., Abdollahi M., 2005. Antiinflammatory and analgesic effects of Phlomis lanceolata Boiss and Hohen, Extracts and examination of their components. *International Journal of Pharmacology*, 2, 50–54.

Mohamed S. K., Khaled M. M., Hashim A. H., Kazuhiro O., Ryoji K., Kazuo Y., 2000. Iridoid and megastigmane glycosides from *Phlomis aurea*. *Phytochemistry* ,55, 353-357.

Mohamed N. H., Awaad A. S., Govil J. N., Singh V. K., 2010. Anticancer activity of *Marrubium alysson* L. and its phenolic constituents. *Recent Progress in Medicinal Plants*, 27, 185-193.

Molina-Salinas G. M., Ramos-Guerra M. C., Vargas Villarreal J., Mata-Cardenas B.D., Becerril-Montes P., Said-Fernandez S., 2006. Bactericidal Activity of Organic Extracts from *Flourensia cernua* DC against Strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Archives of Medical Research*, 37, 45–49.

Morteza-Semnani K., Saeedi M., Mahdavi M., Rahimi F., 2006. The essential oils composition of *Phlomis herba*-venti L. leaves and flowers of Iranian origin. *Pharmaceutical Biology*, 44, 426–429.

Mubashir H. M., Bahar A., Zargar I. M., Khan S. A., Khan S., Singh P., 2008. Antibacterial activity of whole plant extract of *Marrubium vulgare. African Journal of Biotechnology* , 7 (2), 086-087.

N

Nagy M., Gergel D., Grancai D., Novomesky P., Ubik K., 1996. Activity of some phenolic constituents from *Marrubium peregrinum* L. *Farmaceuticky Obzor*, 65(12), 283-285.

Nawal M. H. Awaad Amani S., Govil J. N., Singh V. K., 2010. Anticancer activity of *Marrubium alysson* L. and its phenolic constituents. *Recent Progress in Medicinal Plants*, 27, 185-193.

Nawwar Mahmoud A. M., El-Mousallamy Amany M. D., Barakat H. H., Buddrus J., Linscheid M., 1989. Flavonoid lactates from leaves of *Marrubium vulgare*. *Phytochemistry*, 28(11), 3201-6.

Nazemiyeh H., Rahman M. M., Gibbons S., Nahar L., Delazar A., Ghahramani M. A., 2008. Assessment of the antibacterial activity of phenylethanoid glycosides from *Phlomis lanceolata* against multiple-drug-resistant strains of *Staphylococcus aureus. Journal of Natural Medicines*, 62(1), 91-5.

Nedonoskova N. A., Kompantsev V. A., Dzhumyrko S. F., Samokish I. I., 1976. Flavonoids of *Phlomis pungens. Chemistry of Natural Compounds*, 10 (5), 679.

Newall C. A., Anderson L. A., Phillipson J. D., 1996. *Herbal Medicines.* The Pharmaceutical Press: London.

Nguyen V. H., Pham V. C., Nguyen T. T. H., Tran V. H., Doan T. M. H., 2009. Novel Antioxidant neo-Clerodane Diterpenoids from *Scutellaria barbata*. *European Journal of Organic Chemistry*, 5810–5815.

Novak I., Buzas G., Minker E., Kolfai M., Szendrei K., 1966. Untersuchung der wirktoffe der Ruta graveolens II. *Planta Medica*, 14 (1), 57-61.

Novaes A. P., Rossi C.,Poffo C., Pretti junior E., Oliveira A. E.,Schlemper V., Niero R., Cechinel-Filho V., 2001. Preliminary evaluation of the hypoglycemic effect of some Brazilian medicinal plants. *Therapie*, 56, 427- 430.

O

Opredelitel R. S. A., 1987. (Key for determining plants of Middle Asia)," ed. by Adylov J. A., IX, Fan, Tashkent, 110.

Ozenda P., 1991. Flore et végétation du Sahara(2^{e} éd). Paris, France, CNRS, 662.

P

Parisa S., Gholamerza A., Abbas S., 2004. Composition of the essential oil of *Phlomis persica* Boiss and *Phlomis chorassanica* Bunge from Iran. *Flavour and Fragrance Journal*, 19,538–540.

Pavela R., 2004. Insecticidal activity of certain medicinal plants. *Fitoterapia,* 75, 745–749.

PDR For Herbal Medicines., 2000.The information standard for complementary medicine, sec ed. Medical Economics Company, Montvale, NJ., 401-403.

Pedersen J. A., 2000. Distribution and Taxonomic implications of some phenolics in the family Lamiaceae determined by ESR Spectroscopy. *Biochemical and Systematics Ecology*, 28, 229-253.

Pieroni A., Quave C., Nebel S., Heinrich M., 2002. Ethnopharmacy of the ethnic Albanieans (Arbëreshë) of northern Basilicata, Italy. *Fitoterapia,* 73, 217-241.

Pieroni A., Quave C. L., 2005. Traditional pharmacopoeias and medicines among Albanians and Italians in southern Italy , a comparison. *Journal of Ethnopharmacology*, 101, 258-270.

Pietta P.-G., 2000. Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63, 1035-1042.

Piozzi F., Bruno M., Rosselli S., Maggio A., 2006. The diterpenoids of the Genus Marrubium (Lamiaceae). Natural product communication, 1(7), 585-592.

Poletti A., 1988. Fleurs et plantes médicinales 2^{éme} Ed Delachaux et Nistlé S A Suisse , 103-131.

Popa D. P., Pasechnik G. S., Phan T. A., 1968. Marrubiol- A new diterpenoid from *Marrubium vulgare*. *Khimiya Prirodnykh Soedinenii,* 4, 345-348.

Popa D. P., Salei L. A., 1973. Diterpenoids of the genus *Marrubium*. Rastitel'nye Resursy, 9, 384-387.

Popa D. P., Pasechnik G. S., 1975. The structure of vulgarol – A new diterpenoid from *Marrubium vulgare*. Khimiya Prirodnykh Soedinenii, 11, 752-756.

Q

Quezel F., Santana S., Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions Désertiques Méridionales, 1.2 , 801-802 Ed CNRS, Paris France 1962-1963.

Quezel F., Santana S., 1963. Nouvelle flore d'Algérie, C.N.R.S., Paris

R

Rahimi R., Nikfar S., Larijani B., Abdollahi M., 2005. A revew on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. *Biomedicine and pharmacotherapy*, 59:365-373.

Rao L. J. M., Kumari G. N. K., Rao N. S. P., 1983. Two further acylated flavone glucosides from *Anisomeles ovata*. *Phytochemistry*, 22 (4), 1058.

Rao Y. K., Fang S.-H., Hsieh S.-C., Yeh T.-H. Tzeng Y.-M**.,** 2009. The constituents of *Anisomeles indica* and their anti-inflammatory activities, *Journal of Ethnopharmacology*, 121 (2), 292-296**.**

Rasekh H. R. K., Khoshnood M. J., Kamalinejad M., Shafaghl M., Khadem G., 2001. Hypolipidemic effects of *Teucrium polium* in rats. *Fitoterapia*, 72, 937-939.

Regnault-Roger C., Ribodeau M., Hamraoui A., Bareau I., Blanchard P.,Gil-Munoz M-I., Barberan F. T., 2004. Polyphenolic compounds Host choice of insects 41 of Mediterranean *Lamiaceae* and investigation of orientational effects on *Acanthoscelides obtectus* (Say). *Journal of Stored Products Research*, 40(4), 395-408.

Risti M. D., Duletic-Lausevic S., Knezevic-Vukcevic J., Marin P. D., Simic D., Vukojevic J., Janackovic P., Vajs V., 2000. Antimicrobial activity of essential oil and ethanol extract of *Phlomis fruticosa* L. (*Lamiaceae*). *Phytotherapie Research,* 14, 267–271.

Rigano D., Grassia A., Borrelli F., Aviello G., Piozzi F., Bruno M., Arnold N. A., Capasso R., Senatore F., 2006_a. Phytochemical and Pharmacological studies on the acetonic extract of *Marrubium globosum* ssp. Libanoticum. *Planta Medica*, 72, 575-578.

Rigano D., Grassia A., Bruno M., Rosselli S., Piozzi F., Formisano C., Arnold N. A., Senatore F., 2006_b. Labdane diterpenoids from *Marrubium globosum* subsp. *libanoticum*. *Journal of Natural Product*, 69, 836-838.

Rigano D., Apostolides A. N., Bruno M., Formisano C., Grassia A., Piacente S., Piozzi F., Senatore F., 2006_b. Phenolic compounds of *Marrubium globosum* ssp. libanoticum from Lebanon. *Biochemical Systematics and Ecology,* 34(3), 256-258.

Rigano D., Formisano C., Basile A., Lavitola A., Senatore F., Rosselli S., Bruno M., 2007. Antibacterial Activity of Flavonoids and Phenylpropanoids from *Marrubium globosum* ssp*. Libanoticum. Phytotherapie Research,* 21, 395–397.

Rigano D., Grassia A., Bruno M., Formisano C., Rosselli S., Capasso R., Senatore F., Izzo A. A., Borrelli F.,2009. Antispasmodic Effects and Structure-Activity Relationships of Labdane Diterpenoids from *Marrubium globosum* ssp. *Libanoticum, Journal of Natural Product, 72,* 1477–1481.

Rodriguez-Hahn L., 1992. The Distribution of Diterpenoids in *Salvia*. In R.M. Harley and T. Reynolds (Editors). Advances in Labiate Science. 335-347. Royal Botanic Gardens, Kew

Rodriguez-Hahn L., Esquivel B., Cardenas J., 1996. In secondary metabolites from Mexican plants: Chemistry and biological properties, Ed. L. Rodriguez-Hahn, Research Sign Post, India, 19.

S

Sagitdinova G. B., Makhmudov M. K., Tashkhodzhaev B., Maltsev II., 1996. Labdanoids of *Marrubium anisodon*. *Khimiya Prirodnykh Soedinenii* , 32, 43-46.

Sahpaz S., Garbacki N., Tits M., Bailleul F., 2002_a. Isolation and pharmacological activity of phenylpropanoid esters from *Marrubium vulgare.* *Journal of Ethnopharmacology* 79 (3), 389-392.

Sahpaz S., Garbacki N., Tits M., Bailleul F., 2002_b. Marruboside, a new phenylethanoid glycoside from *Marrubium vulgare* L. *Natural Product Letters*, 16(3), 195–199.

Saleh M. R. I., Sarg T. M., Metwally A. M., Rakha A. A., 1982. A pharmacognostic study of *Marrubium alysson* L. I. Isolation and identification of chemical constituents. *Egyptian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21 (3-4), 383-7.

Saleh M. R. I., Sarg, T. M., Metwally A. M., Rakha A. A., 1981. Chemical constituents from *Marrubium alysson*. *Planta Medica*, 41(2), 202-3.

Salei L. A., Popa D. P., Lazur'evskii G. V., 1969. 4',5,6,7-Tetramethoxyflavone from *Marrubium peregrinum*. *Khimiya Prirodnykh Soedinenii*, 5(3), 182-3.

Salei L. A., Popa D. P., Lazurevskii G. V., 1966. Diterpenoids from *Marrubium peregrinum*. *Khimiya Prirodnykh Soedinenii*, 2, 200-201.

Salei L. A., Popa D. P., Doleish L., Lazurevskii G. V., 1967. The structure of peregrinol, aditerpenoid from *Marrubium peregrinum*. *Khimiya Prirodnykh Soedinenii*, 3, 75-78.

Salei L. A., Andrushchenko O. P., Reinbold A. I., Popa D. P., 1970a. Chemical characteristics of the extractive substances of some *Marrubium* species. Aktual Probl Izuch Efirnomaslich Rast Efirm Masel 164.

Salei L. A., Popa D. P., Lazurevskii G. V., 1970b. The structure of *Marrubium peregrinum*. Khimiya Prirodnykh Soedinenii, 6, 202-205.

Saracoglu I., Inoue M., Çalis I., Ogihara Y., 1995. Studies on constituents with cytotoxic and cytostatic activity of two Turkish medicinal plants *Phlomis armeniaca* and *Scutellaria salviifolia*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin,* 18(10), 1396-400.

Saracoglu I., Kojima K. , Harputu S. , Ogihara Y., 1998. A new phenylethanoid glycoside from *Phlomis pungens* Willd. var. pungens. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 46(4), 726-727.

Saracoglu I., Kojima K., Harput U. S., Ogihara, Y., 1998. A new phenylethanoid glycoside from *Phlomis pungens* Willd. var. pungens. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 46, 726-727.

Saracoglu I., Varel M., Hada J., Hada N., Takeda T., Donmez A. A., Calis I., 2003. Phenylethanoid glycosides from *Phlomis integrifolia* Hub.-Mor. *Journal of Biosciences*, 58(11/12), 820-825.

Saracoglu I., Inoue M., Çalis I., Ogihara Y., 1995. Studies on constituents with cytotoxic and cytostatic activity of two Turkish medicinal plants *Phlomis armeniaca* and *Scutellaria salviifolia*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin,* 18(10), 1396-400.

Sarkhail P., Abdollahi M., Shafiee A., 2003. Antinociceptive effect of Phlomis olivieri Benth., *Phlomis anisodonta* Boiss. and *Phlomis persica* Boiss. total extracts. *Pharmaceutical Research,* 48, 263–266.

Sarkhail P., Amin G., Surmaghi M. H. S., Shafiee A., 2005. Composition of the volatile oils of *Phlomis lanceolata* Boiss. & Hohen., *Phlomis anisodonta* Boiss and *Phlomis bruguieri* Desf from Iran. Flavour Fragrance J, 20, 327–329.

Sarkhail P., Rahmanipour S., Fadyevatan S., Mohammadirad A., Dehghan G., Amin G., Shafiee A., Abdollahi M., 2007. Antidiabetic effect of *Phlomis anisodonta*: effects on hepatic cells lipid peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes. *Pharmaceutical Research,* 56(3), 261-266.

Satil F., Kaya A., Bicakci A., Ozatli S., Tumen G., 2005. Comparative morphological-anatomical and palynological studies on two species grown in East Anatolia Thymus migricus klokov and des.-shost *Thymus fedtschenkoi* ronniger var. handelii (ronniger) jalas. *Pakistan Journal of Botany*, 37, 531-549.

Savona G., Bruno M., Rodriguez B., 1984. Preperegrinine, a prefuranic labdane diterpene from *Marrubium friwaldskyanum, Phytochemistry*, 23, 191-192.

Savona G., Piozzi F., Aranguez L. M., Rodriguez B., 1979. Diterpenes from *Marrubium sericeum*, *M. supinum* and *M. alysson*. *Phytochemistry*, 18, 859-860.

Schlemper V., Ribas A., Nicolau M., Cechinel-Filho V., 1996. Antispasmodic effectsof hydroalcoholic extract of *Marrubium Vulgare* on isolated tissues. *Phytomedicine,* 3, 211-216.

Seaman F., Bohlmann F., Zdero C., Mabry T. J., 1990. Diterpenes of flowering plants- *Compositeae* (*Asteraceae*). Springer-erlag, New York.

Seidel V., Bailleul F, Libot F., Tillequin F., 1997**.** A phenylpropanoid glycoside from *Ballota nigra. Phytochemistry, 44 (4), 691-693.*

Skafia-Crete.com*,* site internet http://www.sfakia-crete.com/sfakia-crete/herbs-plants-flora-crete.html, consulté le 1 mars 2010.

Sokovic M. D., Marin P. D., Simic A., Knezevic-Vukcevic J., Vajs V., Petrovic S., 2002. Antimutagenic activity of essential oil and crude extract of *Phlomis fruticosa* L (*Lamiaceae*). *Pharmaceuyical Biology*, 40, 311-314.

Spichiger R. E., Savolainen V. V., Figeat M., 2000. *Botanique Systématique des Plantes à Fleurs*. Presses polytechniques et universitaires romandes. Lausanne.

Suleiman M. S., Abdelghanl A. S., EI-Khalil S., Amin R., 1998. Effect of *Teucrium polium* boiled extract on Intestinal motility and blood pressure. *Journal of Ethnopharmacology*, 72(22), 111-116.

Sun H. D., Qiu S. X., Lin L. Z., Zhang R. P., Zhou Y., Zheng Q. T., Johnson M. E., Fong H. H. S., Farnsworth N. R., Cordell G. A., 1997. Crystal Structure of a 1:1 Complex of Natural Diterpenoids: Absolute Configurations and Unambiguous NMR Spectral Assignments of Neoangustifolin and Epinodosinol. *Journal of Natural Products,* 60, 203-206.

Sun H. D., Yu, Y. C., Jiang, B. 2001. Diterpenoids from *Isodon* species; Science Press: Beijing, China.

T

Tackholm V., 1996. Student Flora of Egypt. Anglo-Egyptian, Cairo

Tan B. K. H., Vanitha J., 2004. Immunomodulatory and antimicrobial effect of some traditional Chinese medicinal herbs. *Current* Medicinal *Chemistry*, 11, 1423-1430.

Tanaka T., Tanaka O., Lin Z.-W., Zhou J., 1985. Sweet and bitter principles of the Chinese plant drug, Bai-Yun-Shen: revision of the assignment of the source plant and isolation of two new diterpene glycosides. *Chemical Pharmaceutical Bulletin,* 33, 4275-4280.

Tanaka T., Tanaka O., Lin Z.-W., Zhou J., Ageta H., 1983. Sweet and bitter glycosides of the Chinese plant drug, Bai-Yun-Shen (roots of *Salvia digitaloides*). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 31, 780-783.

Tariq M., Ageel A. M., Al-Yahia M. A., Mossa J. S., Al-Said M. S., 1989. Anti-inflammatory activity of *Teucrium polium*. *International Journal of Tissue Reactants*, 11, 185-188.

Tasdemir D., Brun R., Perozzo R., Dönmez A. A., 2005. Evaluation of antiprotozoal and plasmodial enoyl-ACP reductase inhibition potential of Turkish medicinal plants*. Phytotherapy Research*, 19, 162–166.

Tekeda Y., Yanagihara K., Masuda T., Otsuka H., Honda G., Takaishi Y., Sezik E., Yesilada E., 2000. Labdane diterpenoids from *Marrubium globosum* ssp. *Globosum. Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 48, 1234-1235.

Takeda Y., Kinugawa M., Masuda T., Honda G., Otsuka H., Sezik E., Yesilada E., 1999. Phlomisethanoside, a phenylethanoid glycoside from *Phlomis grandiflora* var. *grandiflora*. *Phytochemistry* , 51, 323-325.

TakedaY., Isai N., Masuda T., Honda G., Takaishi Y., Ito M., Otsuka H., Ashurmetov O. A., Khodzhimatov O. K., 2001. Phlomisflavosides A and B, New Flavonol Bisglycosides from *Phlomis spinidens. Chemistry and Pharmaceutical Bulletin,* 49(8), 1039—1041.

Talebpour A. H., Sarker S. D., 2008. Assessment of the antibacterial activity of phenylethanoid glycosides from *Phlomis lanceolata* against multiple-drug-resistant strains of Staphylococcus aureus. *Journal of Natural Medicines,* 62, 91–95.

Thoppil J. E., Minija J., Tajo A., Deena M. J., 2001. Antimicrobial activity of *Teucrium plectranthoides* Gamble essential oil. *Journal of Natural Remedies*, 1, 155-157.

Tomas F., Nieto J. L., Barberan F. A. T., Ferreres F., 1986. Flavonoids from *Phlomis lychnitys*. *Phytochemistry*, 25, 1253-1254.

Tomas-Barberan F. A., 1986. The flavonoid compounds from the *Labiatae*. *Fitoterapia,* 57, 67-95.

Tomas-Barberan F. A., Renée J., Grayer-Barkmeijer G. M. I., Harborne J. B., 1988. *Phytochemistry*, 27 (8), 2631-2645.

Tomas-Barberan F., Gil Munoz M. I., 1990. *Labiatae* flavonoids: chemical, chemotaxonomical, economical and ecological aspects. *Revista Latinoamericana Quimica*, 21(3-4), 134–139.

Tomas-Barberan F. A., Gil M. I., Ferreres F., Tomas-Lorente F., 1991. Correlations between flavonoid composition and infrageneric taxonomy of some European *Galeopsis* species. *Phytochemistry*, 30, 3311-3314.

Tomas-Barberan F. A., Gil M. I., 1992. Chemistry and natural distribution of flavonoid in the Labiatae. In: Harley, R.M., Raynolds, T. (Eds.), Advances in Labiatae Science. Royal Botanic Gardens, Kew, 299–305

Touil A., 2009. Etude des métabolites secondaires de quelques plantes du plateau du Hoggar. Thèse de doctorat.

Tyler C. A., The honest herbal: A sensible guide to the use of herbs and related remedies, 3rded. New York, Pharmaceutical Products Press.

U

Ulubelen A., Topcu G., 1998. Chemical and biological investigation of some *Salvia* species growing in Turkey In Atta-ur-Rahman. *Studies in Natural Products Chemistry*, 20, 659-718.

V

Valant-Vetschera K. M., Roitman J. N., Wollenweber E., 2003. Chemodiversity of exudate flavonoids in some members of the *Lamiaceae*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31 (11), 1279–1289.

VanderJagt T. J., Ghattas R., VanderJagt D. J., Crossey M., Glew R. H., 2002. Comparison of the total antioxidant content of 30 widely used medicinal plants of New Mexico. *Life Sciences*, 70, 1035–1040

Vestri Alvarenga S. A., Gastmans J. P., do Vale Rodrigues G., Maureno P. R. H., de Paulo Emerenciano V., 2001. A computer-assisted approach for chemotaxonomic studies- diterpenes in *Lamiacea*. *Phytochemistry*, 56, 583-595.

W

Walt J. M., Breyer-Brandwizk M. G., 1962. The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa, 2nd Edn. E and S Livingstone, Edinburgh.

Wichtl M., Anton R., 1999. *Plantes Thèrapeutiques*. Tec & Doc: Paris, 341.

Wu J., Zhang S., Xiao Q., Li Q., Huang J., Long L., Huang L., 2003. Phenylethanoid and aliphatic alcohol glycosides from *Acanthus ilicifolius*. *Phytochemistry*, 63, 491–495.

Y

Yalçin F. N., Ersöz T., Akbay P., Calis I., Dönmez A. A., Sticher O., 2003. Iridoid and phenylpropanoid glycosides from *Phlomis samia*, *P. monocephala* and *P. carica*. *Turkish Journal of Chemistry*, 27(3), 295-305.

Yalçın F. N., Ersöz T., Saracoğlu İ., Dönmez A. A., Çalıs İ., 2006. Further Phenylethanoid Glycosides from *Phlomis physocalyx* Hub.-Mor. *Journal of faculty of Pharmacy*, 26(1), 13-21.

Yalçin F. N., Ersoz T., Bedir E., Sahpaz S., Bailleul F., Khan I. A., 2005. Phlinoside F, a new phenylethanoid glycoside from *Phlomis angustissima*. *Turkish Journal of Chemistry*, 29(4), 417-423.

Yeşilada E., Ezer N., 1989. Antiinflammatory activity of some Sideritis species growing in Turkey. *International Journal Crude Drugs Research*, 27, 38-40.

Yin X., Zhou J., Jie C., Xing D., Zhang Y., 2004. Anticancer activity and mechanism of *Scutellaria barbata* extract on human lung cancer cell line A549. *Life Science*, 75, 2233-2244.

Yu Z. X., Wang G. L., BianBa C. R., Lin R. C., 2006. Studies on chemical constituents in root of *Phlomis medicinalis* L. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 31, 656–658.

Z

Zargari A., 1960. Medicinal plants 4. Clarendon, Oxford, 449.

Zhang Y., Wang Z. Z., 2008. Comparative analysis of essential oil components of three *Phlomis* species in Qinling Mountains of China. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47 (1), 213-217.

Zhao J., Yang X. W., Fu H. Z., 1999. Chin Trad Herb Drugs, 30, 90.

Zu Y. P., 1998. Chinese Materia Medica. World Scientific Publishing: New Jersey, 606–608.

CHAPITRE II :

MATERIELS ET METHODES

II.1 Matériel d'étude :

II.1.1 Matériel biologique

Nous avons testé l'activité antibactérienne des composés diterpéniques obtenue à partir *Marrubium deserti* vis-à-vis de cinq souches de références :

Staphylococcus aureus: ATCC 29213

Enterococcus faecalis : ATCC 29212

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la Méthicilline

Pseudomonas aeruginosa: ATTC15442

Klebsiella oxytoca: ATTC700324

Enterococcus faecalis : ATCC 29212

Staphylococcus aureus: 1199B(surexprime NorA)

Les milieux de culture bactérien, Mueller Hinton (MH), Bactotryptone, l'extrait de levure ainsi que la gélose nutritive et l'Agar-Agar proviennent respectivement de Diagnostic Pasteur (Paris), Hisplanlab S.A. (Espagne) et Fluka (Suisse).

Lors de l'étude des activités génotoxiques et antigénotoxiques à l'aide du SOS chromotest, les souches utilisées étaient

***Escherichia coli* PQ37 :** souche bactérienne génétiquement modifiée qui dérive d'une souche originale *E. coli* K12. *E. coli* PQ37 contient différentes mutations qui permettent d'augmenter sa sensibilité à l'agression génotoxique.

II.1.2 Milieux de culture

Tampons utilisés pour le SOS chromotest :

- **Tampon B :**

Le tampon B est formé à partir d'un mélange contenant du Na_2HPO_4 (112,7 mM), du NaH_2PO_4, $7H_2O$ (45,8 mM), du KCl (10 mM), du $MgSO_4$ $7H_2O$ (0,1 mM), du sodium dodecyl sulfate (SDS) (3,46 mM) et 2.7 ml/l de β-mercaptoethanol. Le pH est ajusté à 7.

- **Tampon P :**

Le tampon P est formé à partir d'un mélange contenant du TRIS (1 M) et du sodium dodecyl sulfate (SDS) (3,46 mM). Le pH est ajusté à 8,8.

II.2 Méthodes de purification

II.2.1 Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les analyses par chromatographie sur couche mince ont été effectuées sur plaques de Silicagel 60 F254 sur feuille d'aluminium (Merck), ou RP-18 sur feuille d'aluminium F254 S (Merck), ou diol F254 S ou polyamide sur feuilles d'aluminium 11F254.
Les CCM sont analysées en lumière visible et sous U.V. (254 et 356 nm), avant et après révélation par des réactifs appropriés. L'utilisation de différents réactifs permet de comparer les profils des fractions séparées et de les rassembler en fonction de leurs similitudes.
Les principaux réactifs utilisés sont :

- **Réactif à la vanilline sulfurique**,

Solution composée de 1 g de vanilline, 2 ml d'acide sulfurique et 100 ml d'éthanol. Après pulvérisation, la plaque est chauffée à l'étuve quelques minutes à 110°C.

- **Réactif au DBA**

Préparer une solution A de 1 g d'acide amino-2-éthyldiphénylborique et de 100 mL de méthanol et une solution B composée de 5 g de PEG 4000 et de 100 ml d 'éthanol.
Pulvériser un mélange de solution A et de solution B (préalablement mélangées avant pulvérisation). Chauffer la plaque CCM à 110 °C pendant 2 minutes environ. Observés en lumière UV à 365 nm, les flavonoïdes apparaissent sous forme de taches fluorescentes jaunes, vertes ou orange.

II.2.2 Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrophotométrie ultraviolet/visible (HPLC-UV/VIS)

Les analyses HPLC sont réalisées sur un système Agilent Technologies série 1200 composé d'un dégazeur (degasser G132A), de pompes quaternaires (Quat Pump G1311A), d'un passeur d'échantillons (ALS G1329A) et d'un détecteur à barrettes de diodes (DAD G1315B). La colonne Purospher Star (125mm/ 4mm), est constituée de silice greffée en C18. Le volume d'échantillon injecté dans la colonne est de 5 µL avec une détection UV entre 200 et 400 nm. Quatre longueurs d'onde particulières sont utilisées pour la visualisation des chromatogrammes : 254, 280, 320 et 350 nm. Le solvant d'élution est un gradient de MeOH dans l'eau avec 0,1% d'acide formique (H_2O-MeOH : 90-10 à 0-100 en 25') pour l'extrait MeOH de *Phlomis bovei*, et 90-10 à 0-100 en 30 min pour l'extrait MeOH et les phases ACOEt et BuOH. Le débit 1 mL.min^{-1}.

II.2.4 Chromatographie sur plaque CCM préparative

Ce type de séparation est utilisé pour la purification des composés, Les plaques CCM préparatives utilisées sont : Gel de silice 60 RP-18, F254 S, 20 x 20 cm, Merck, G1600 polyamide Schleicher et Shull , 20x20 cm, Polyamide DC6, 11 F_{254}, 20x20 cm.

II.2.5 Chromatographie liquide sur colonne ouverte (CC)

Des colonnes ouvertes sur silicagel 60 (70-200 µm ou 35-70 µm, SDS) ont été utilisées dans la première ou seconde étape de fractionnement des extraits CH_2Cl_2, MeOH et les phases AcOEt, BuOH. La taille des colonnes, la granulométrie de la phase solide, le débit de la phase mobile et la taille des fractions ont été adaptés à la quantité et à la nature (extrait, fraction) des échantillons à séparer. L'extrait ou la phase à fractionner peut être déposé en phase liquide concentrée (dans un solvant peu éluant) ou en phase solide (adsorption sur silice).

II.2.6 Chromatographie liquide sous vide (VLC)

Cette technique est utilisée pour obtenir une séparation grossière mais rapide. Les fractionnements ont été effectués sur Büchner, sous vide fourni par une pompe à vide.

II.2.7 Chromatographie liquide à moyenne pression (MPLC)

La chromatographie liquide sous moyenne pression permet de réaliser des séparations de bonne résolution avec un débit élevé.
Elle est réalisée à l'aide d'un système constitué d'une pompe équipée d'un détecteur Gilson SP1000, d'un enregistreur et d'une colonne de chromatographie moyenne pression Büchi (D=3,6 cm ; h=46 cm) remplies soit avec de la silice phase normale, soit avec de la silice de type RP-18, et les fractions récoltées par un collecteur automatique. L'échantillon est introduit sous forme solide adsorbé à la phase stationnaire ou sous forme liquide suivant sa solubilité dans l'éluent de départ. Les systèmes d'élution employés sont généralement des mélanges binaires ou ternaires dans des proportions variables au cours de l'élution. La colonne est éluée avec un débit d'environ 10 mL/min et la pression est en moyenne de 2 bar.

II.2.8 Chromatographie d'extraction en phase solide (SPE)

Ces cartouches, associées à une unité de filtration sous vide autorisent un réglage de débit précis à l'aide d'une molette et d'un manomètre, sous vide contrôlé.

II.3 Méthodes physico-chimique

II.3.1 Le pouvoir rotatoire

Le pouvoir rotatoire a été mesuré sur un polarimètre de type Perkin-Elmer 241 à la longueur d'onde de la raie D du sodium (λ= 589 nm) dans une cuve de 1 cm à température ambiante.
Le pouvoir rotatoire spécifique [α]D, exprimé en degré, est calculé à partir de la formule suivante :
$[\alpha]D = 1000 . \alpha / l . c$
(α : angle de rotation, en degré, lu sur le polarimètre, l : longueur, en dm, de la cuve de mesure, c : concentration de la molécule en solution en g/L).

II.3.2 Spectres ultraviolets (UV)

Le spectre UV des composés est mesuré en solution (MeOH) à l'aide d'un spectrophotométre de type UV-Vis Shimadzu, double faisceau. Les mesures sont effectuées dans des cuves de quartz.

II.3.3 Spectres de masse (MS)

Différentes sources et modes d'ionisations sont utilisés : l'electrospray (ESI), l'impact électronique (IE) sur un appareil Thermo LCQ Advantage. Les spectres de masse haute résolution sont effectués en electrospray sur un appareil Thermo LCQ Advantage.

II.3.4 Spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres de résonance magnétique nucléaire sont enregistrés sur un appareil de type Bruker Avance DRX 500 MHz (fréquences de 500 (1H) et 125 MHz (13C)) ou Bruker Avance DRX 400 Brucker (fréquences de 400 (1H) et 100 MHz (13C)), ou Bruker Avance DRX 300 (fréquences de 300 (1H) et 75 MHz (13C)). Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS) ; les constantes de couplage sont exprimées en Hz.

Les expériences bidimensionnelles réalisées sont :

II.3.4a Corrélations homonucléaires

- **COSY (1H – 1H) :** cette expérience fournit des informations sur les couplages homonucléaires 2J et 3J (protons séparés par deux ou trois liaisons) entre les protons voisins et ceux qui sont Adjacents.
- **NOESY (1H – 1H) :** cette technique permet d'observer, dans l'espace, les corrélations entre protons (effets Overhauser) d'une même molécule.

II.3.4b Corrélations hétéronucléaires

- **HMBC (2JH–C, 3JH–C) :** cette technique permet la détection des couplages longue distance 2JH-C et 3JH–C. La valeur de la constante pour 2JCH ou de 3JCH était standardisée à 8 Hz.

- **HSQC (1JH–C) :** cette technique permet d'observer les couplages chimiques entre les carbones et les protons directement liés entre eux.

II.4 Extraction et purification de *Marrubium deserti* de Noé

II.4.1 Matériel végétal

Les parties aériennes de *Marrubium deserti* de Noé ont été récoltées en mai 2007 dans la région de Msila (Algérie). L'espèce a été identifiée par le professeur Hocine Laouer (Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Ferhat Abbas, Sétif, Algérie). Elles ont été séchées dans un endroit aéré à l'abri des rayons solaires.

II.4.2 Extraction

Après broyage, toutes les parties aériennes (tiges+feuilles+fleurs) (1,5 kg) ont été extraites par du dichlorométhane (CH_2Cl_2) (6 L) sous agitation mécanique à température ambiante pendant 24 heures. Après filtration, cette opération est renouvelée 3 fois. Les filtrats ont été ensuite réunis et évaporés à sec sous vide à une température inférieure à 35 °C donnant ainsi l'extrait CH_2Cl_2 (**A**) (30 g).

La plante ainsi partiellement épuisée fut ensuite extraite par du méthanol (MeOH) (4x6 L) à température ambiante. Un extrait MeOH (150 g) a été obtenu. La couleur verte très foncée des extraits CH_2Cl_2 et MeOH signe une proportion significative de pigments apparentés à la chlorophylle. L'extrait méthanolique mis en solution dans l'eau chaude complétée par du MeOH (1/4 v/v), a été soumis à un partage liquide-liquide avec des solvants de polarité croissante (CH_2Cl_2, acétate d'éthyle (AcOEt), n-butanol (n-BuOH), conduisant à l'obtention de 4 phases CH_2Cl_2 (**B** 7,4 g), AcOEt (**C** 6,5g), n-BuOH (**D** 12,0 g) et aqueuse (**E** 26,0g) (**Fig. 8).**

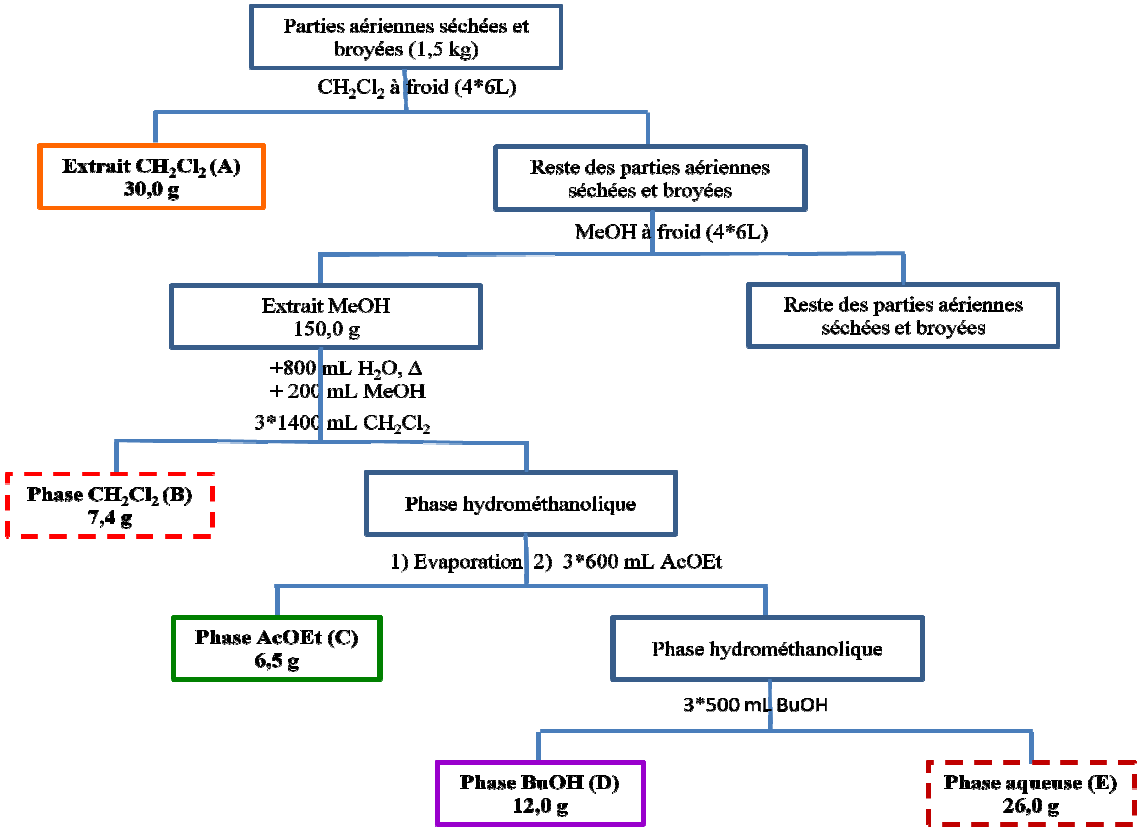


Fig. 8 : Organigramme d'extraction des parties aériennes de *Marrubium déserti* de Noé

II.4.3 Protocole de purification des extraits issus de *Marrubium deserti* de Noé

*II.4.3.1 Etude de l'extrait dichlorométhane **A***

Un premier fractionnement de l'extrait CH_2Cl_2 (**A**) (15 g) a été réalisé par chromatographie liquide sous vide (VLC) (h=4,5 cm, r=7 cm) en phase normale SiO_2 avec les gradients d'élution suivants : Hexane-CH_2Cl_2, CH_2Cl_2-AcOEt et AcOEt-MeOH, pour conduire à 9 fractions (A1-A9). A4 (10 g) alors reprise par du CH_2Cl_2 a subi une extraction de partage liquide-liquide avec 100mL H_2O puis 100mL MeOH-H_2O (50-50) pour obtenir deux parties : la première contenant les produits apolaires ($A4_{CH2Cl2}$) et la deuxième contenant les produits polaires (A4' et A4'') (**Fig. 9**).

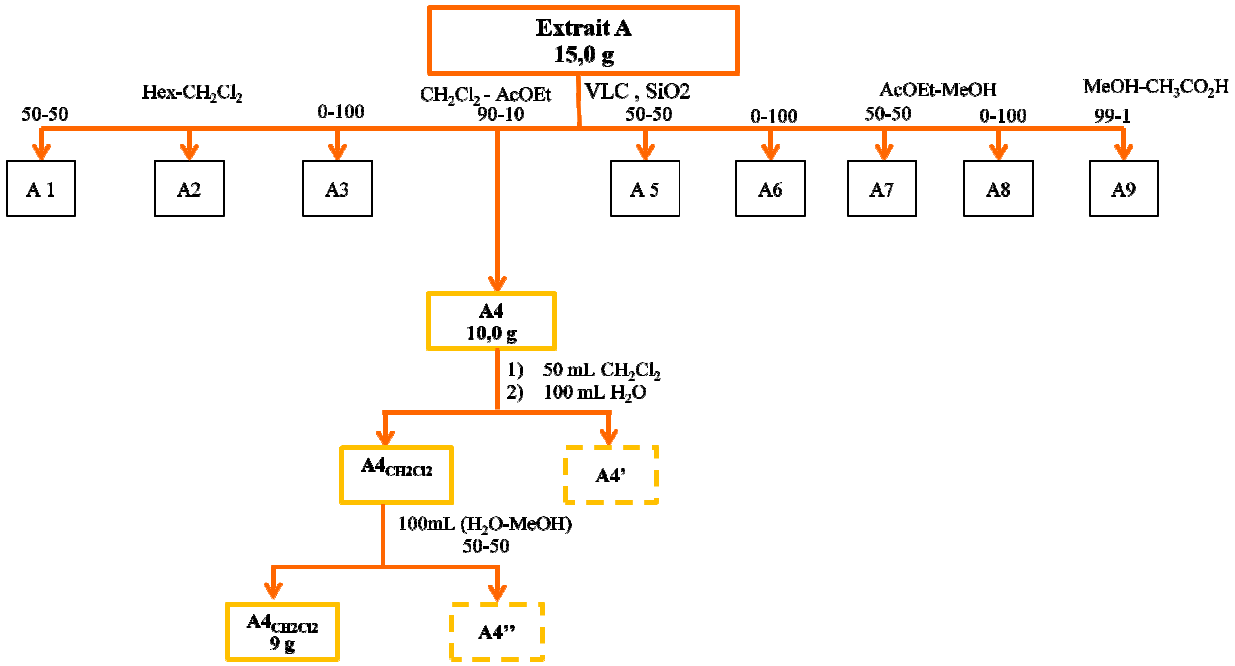


Fig. 9 : Schéma de fractionnement de l'extrait dichlorométhane **(A)**

La fraction $A4_{CH2Cl2}$ (9 g) fut ensuite passée sur une colonne (h= 59 cm, r= 2 cm) de Sephadex LH20 pour donner 13 fractions (A4.1 à A4.13). La fraction A4.3 (1 g) a été lavée plusieurs fois par quelques ml d'éther diéthylique pour éliminer la chlorophylle, puis a été purifiée sur une colonne de Sephadex LH20 en utilisant le CH_2Cl_2 comme éluant. Le composé **MD1** (132 mg) a été obtenu (**Fig. 10**).

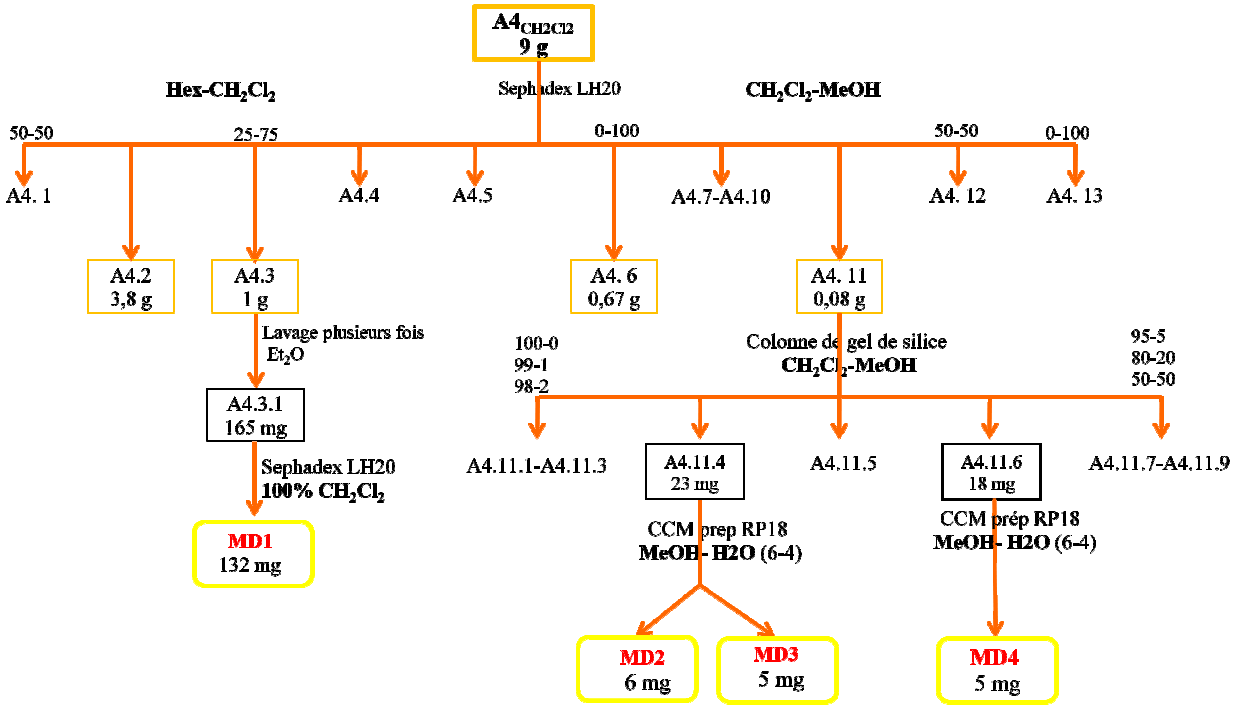


Fig. 10 : Schéma de séparation de la fraction **A4**

La fraction A4.11 (80 mg) fut soumise à une chromatographie sur colonne de gel de silice (SiO_2). L'élution a été effectuée par CH_2Cl_2 dont on augmente progressivement la polarité par addition de MeOH, conduisant à 9 fractions (A4.11.1 à A4.11.9).

La fraction A4.11.4 (23 mg) a montré sur CCM (RP 18) deux taches de couleur violet noir après révélation par de la vanilline sulfurique. La séparation de ces deux taches a été effectuée sur chromatographie sur couche mince préparative RP18 pour obtenir les composés **MD2** (6 mg) et **MD3** (5 mg).

Le composé **MD4** (5 mg) a été isolé de A4.11.6 par CCM préparative RP18 en utilisant l'éluant H_2O-MeOH (6-4). (**Fig. 10**)

La fraction A4.6 (**Fig. 11**) a été soumise à des fractionnements successifs par chromatographie d'adsorption sur colonne (h=43 cm, r=1,5 cm) de gel de silice, éluée par des gradients Hex-AcOEt puis AcOEt-MeOH (fractions A4.6.1 à A4.6.13). La fraction A4.6.7, éluée par Hex-AcOEt (65-35) a été séparée par CCM préparative en phase inverse RP18, suivie d'une colonne de Sephadex LH20 permettant ainsi d'obtenir le composé **MD5** (11 mg)**.** Le fractionnement sur SPE (h=8 cm ; r=0,75 cm) en phase inverse RP18 de A.4.6.11 a été réalisé par un gradient MeOH-H_2O pour donner 7 fractions (A4.6.11a à A4.6.11g). A4.6.11c très riche en composé ciblé, a été purifiée par une première chromatographie sur colonne de Sephadex LH20, éluée par un mélange CH_2Cl_2-MeOH puis par une deuxième colonne de Sephadex LH20 éluée par un gradient Hex-CH_2Cl_2 pour donner le composé **MD6** (7,8 mg).

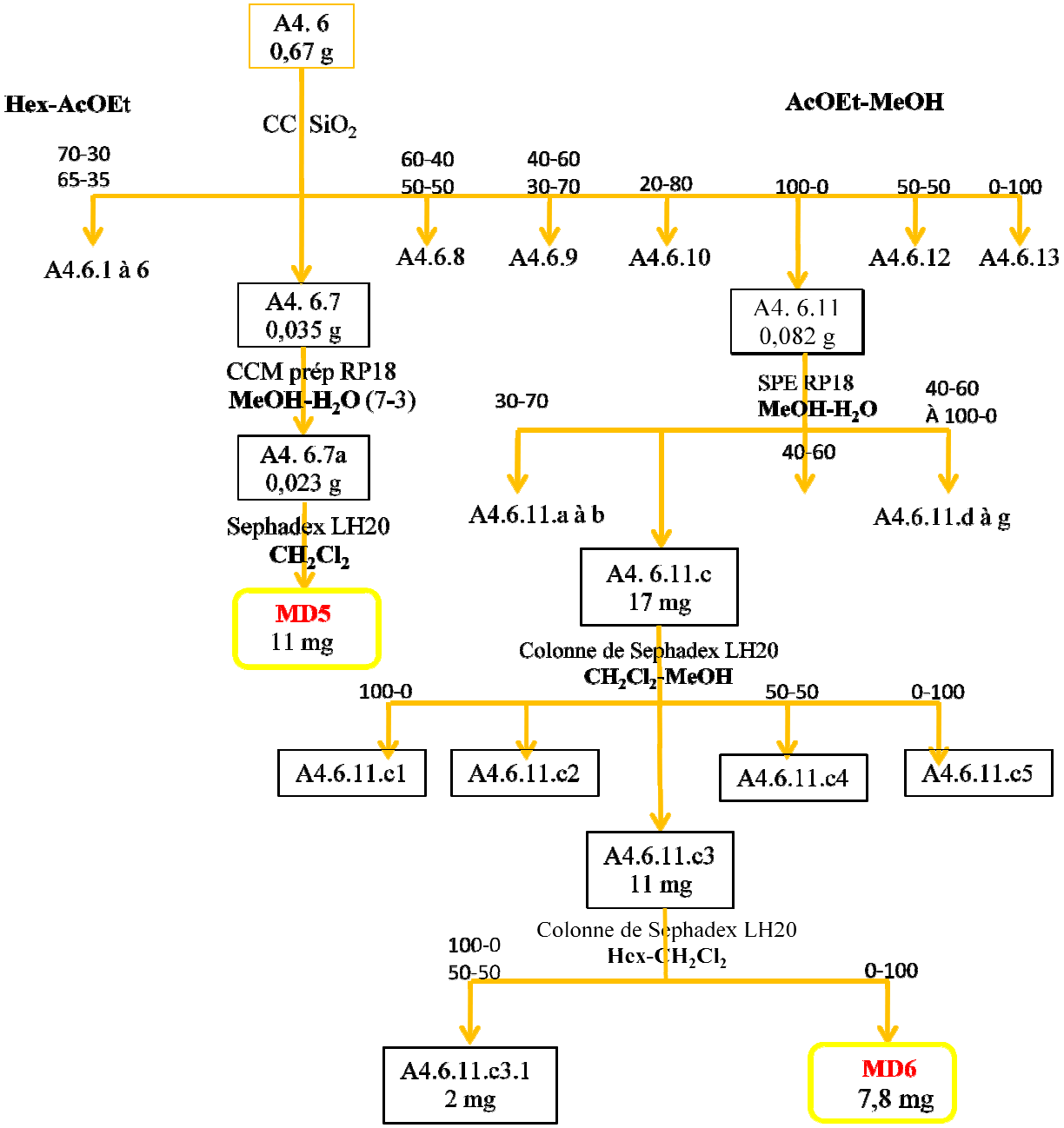


Fig. 11 : Schéma de séparation de la fraction **A4.6**

La fraction A.4.2 (**Fig. 12**) a été traitée par une VLC (h= 3,4 cm ; r=4,75 cm) en SiO_2 phase normale. 14 fractions furent obtenues (A4.2.1 à A4.2.14) (**Fig. 12**); la sous fraction A4.2.4 a été fractionnée sur une colonne de Sephadex LH20 (A4.2.4.1 à A4.2.4.5) La sous fraction A4.2.4.1 fut filtrée sur charbon pour éliminer la chlorophylle et obtenir la fraction A4.2.4.1a. Cette dernière a été chromatographiée sur une colonne (h=39 cm ; r= 1,5 cm) de silice, en utilisant un mélange de gradients Hex-CH_2Cl_2, CH_2Cl_2-AcOEt puis AcOEt-MeOH pour obtenir 14 fractions (A4.2.4. 1a.1 à A4.2.4. 1a.14). (**Fig. 13)**. Nous avons obtenu 15mg du produit **MD7** après purification de A4.2.4.1a sur SPE (h= 3,5 cm ; r= 0,7 cm) en phase normale en utilisant un mélange CH_2Cl_2+une goutte de MeOH, comme éluant (1a.1 à 1a.14).

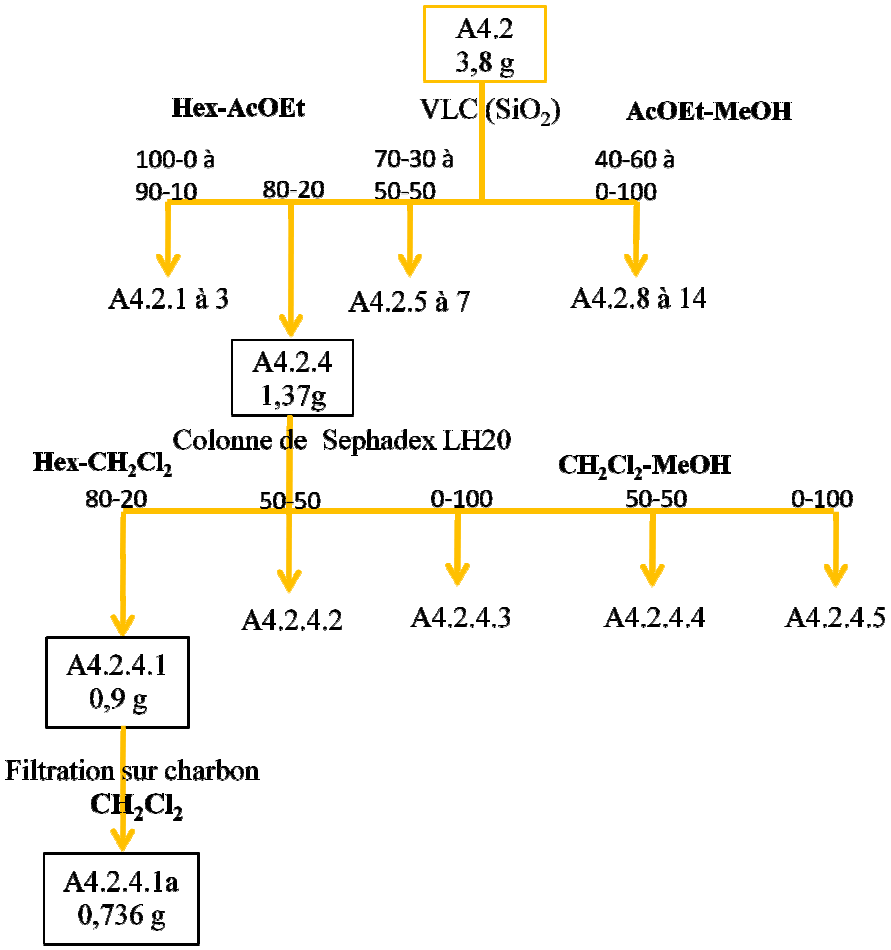


Fig. 12: Schéma de séparation de la fraction **A4.2**

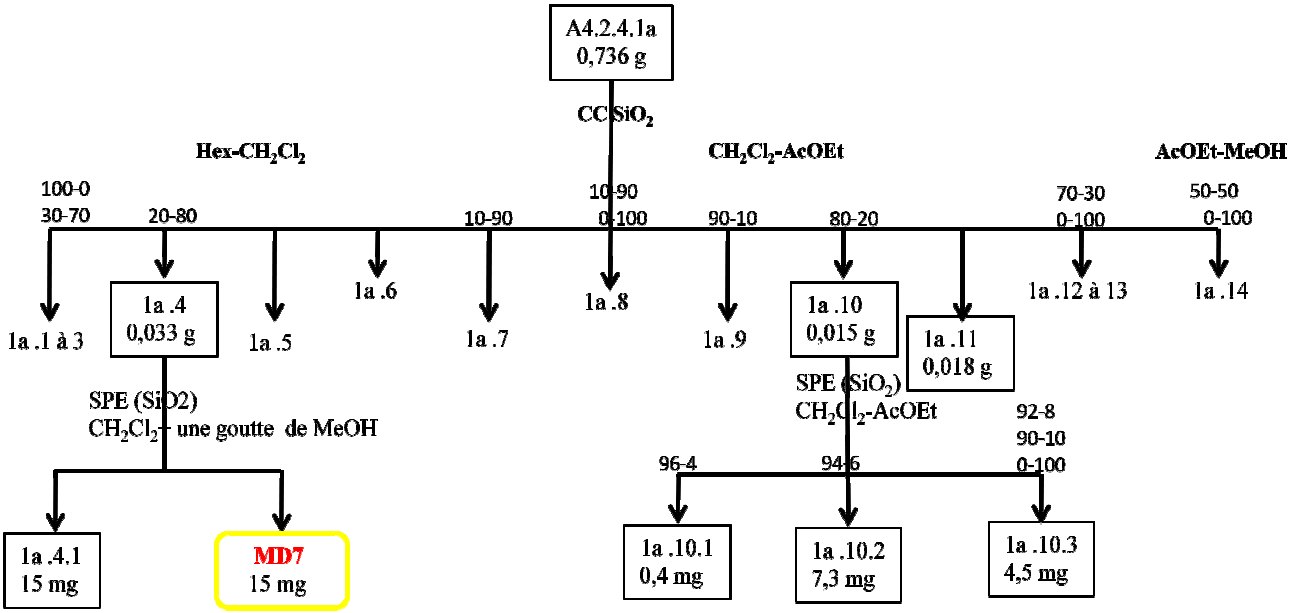


Fig. 13 : Schéma de séparation de la fraction **A4.2.4.1a**

Le produit **MD8** a été obtenu par purification de 1a.10 et 1a.11 sur une SPE (h=3,5 cm ; r=0,7 cm) en phase normale éluée par un gradient CH_2Cl_2-AcOEt. (**Fig. 14**).

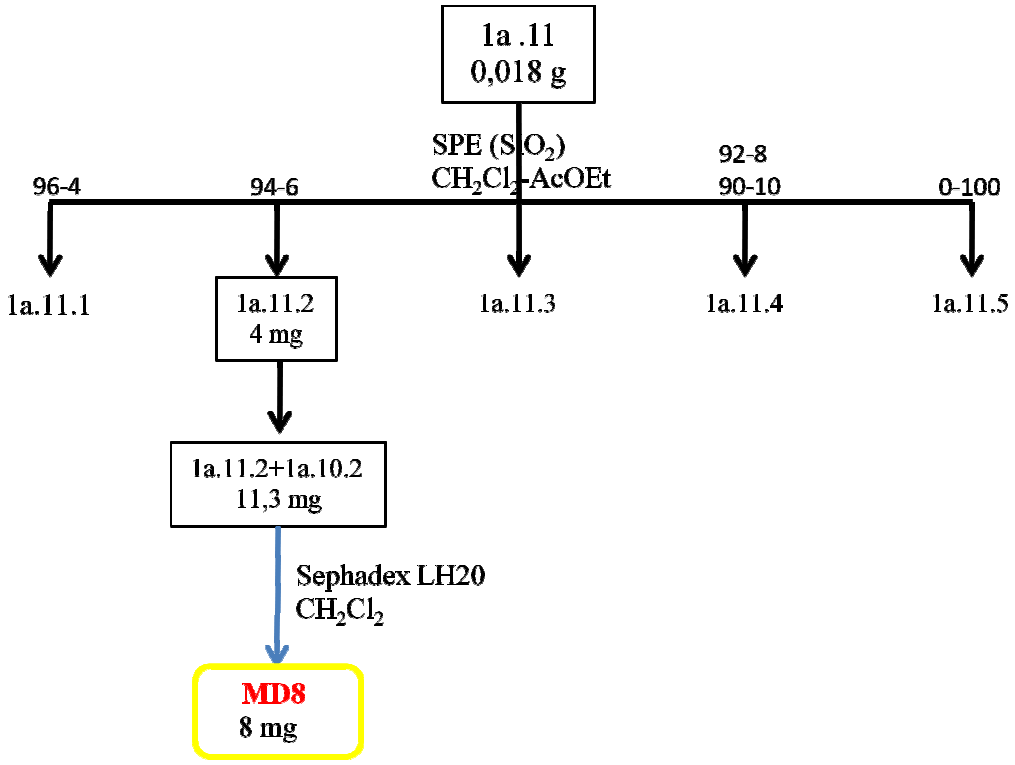


Fig. 14 : Schéma de séparation de la fraction **1a.11**

*II.4.3.2 Fractionnement de la phase acétate d'éthyle **C***

Un premier fractionnement de la phase AcOEt (**C**) (6 g) a été réalisé par chromatographie sur colonne (h=63 cm ; r=2,5 cm) de Sephadex LH20 avec un mélange isocratique MeOH-H_2O (9-1) pour donner 18 fractions (C1 à C18). La fraction C7 a été partagée en deux : (précipité + solution), le précipité a été obtenu sous forme d'une poudre blanche, qui précipite dans un mélange de solvant MeOH-H_2O (9-1). La séparation de la fraction C7.1 (143,4mg) par SPE (h=5 cm ; r=0,8 cm) en phase inverse (RP18) en utilisant comme éluant un mélange de polarité croissante (MeOH-H_2O) a donné le composé **MD9** (22mg) avec 6 autres fractions (**Fig. 15**).

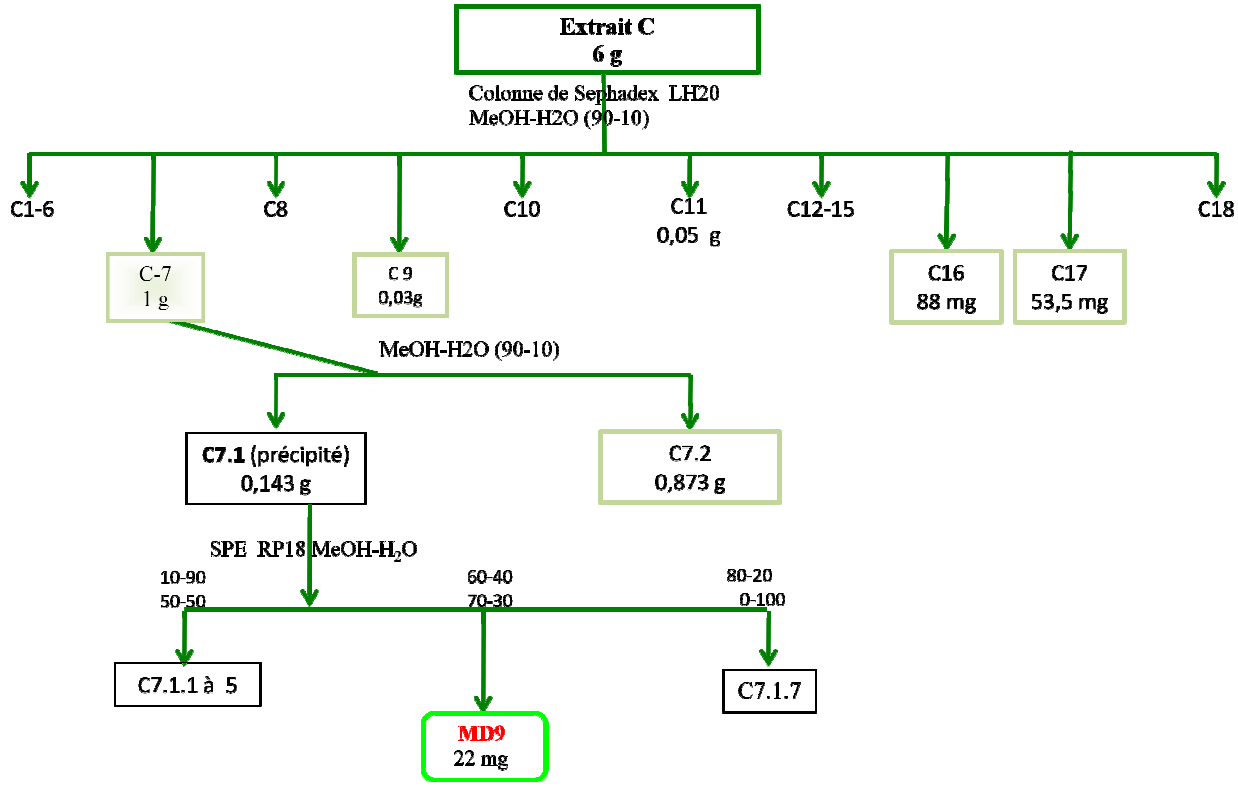


Fig. 15 : Schéma de fractionnement de la phase acétate d'éthyle **(C)**

La fraction C7.2 (873mg) a été fractionnée successivement par chromatographie liquide moyenne pression CLMP en phase inverse (RP18) avec un mélange MeOH-H_2O. Ensuite, la sous fraction obtenue C7.2.6 a été purifiée par chromatographie sur couche mince (polyamide DC6). Le composé MD10 (24 mg) a été isolé et purifié de la fraction C7.2.6.1 par chromatographie sur colonne (h=30cm, r=0,8 cm) de Sephadex LH20 suivie d'une SPE en phase inverse (RP18).

La CCM SiO_2 de la sous fraction C7.2.6.2 issue de la fraction C7.2.6 montre deux taches bleu-blanc. L'une correspondant au produit **MD10**, l'autre ayant été identifiée grâce à une séparation par CCM préparative sur polyamide suivie d'une colonne (h=30 cm, r=0,8 cm) de Sephadex LH20 et d'une SPE en phase inverse (RP18) **(Fig. 16)**.

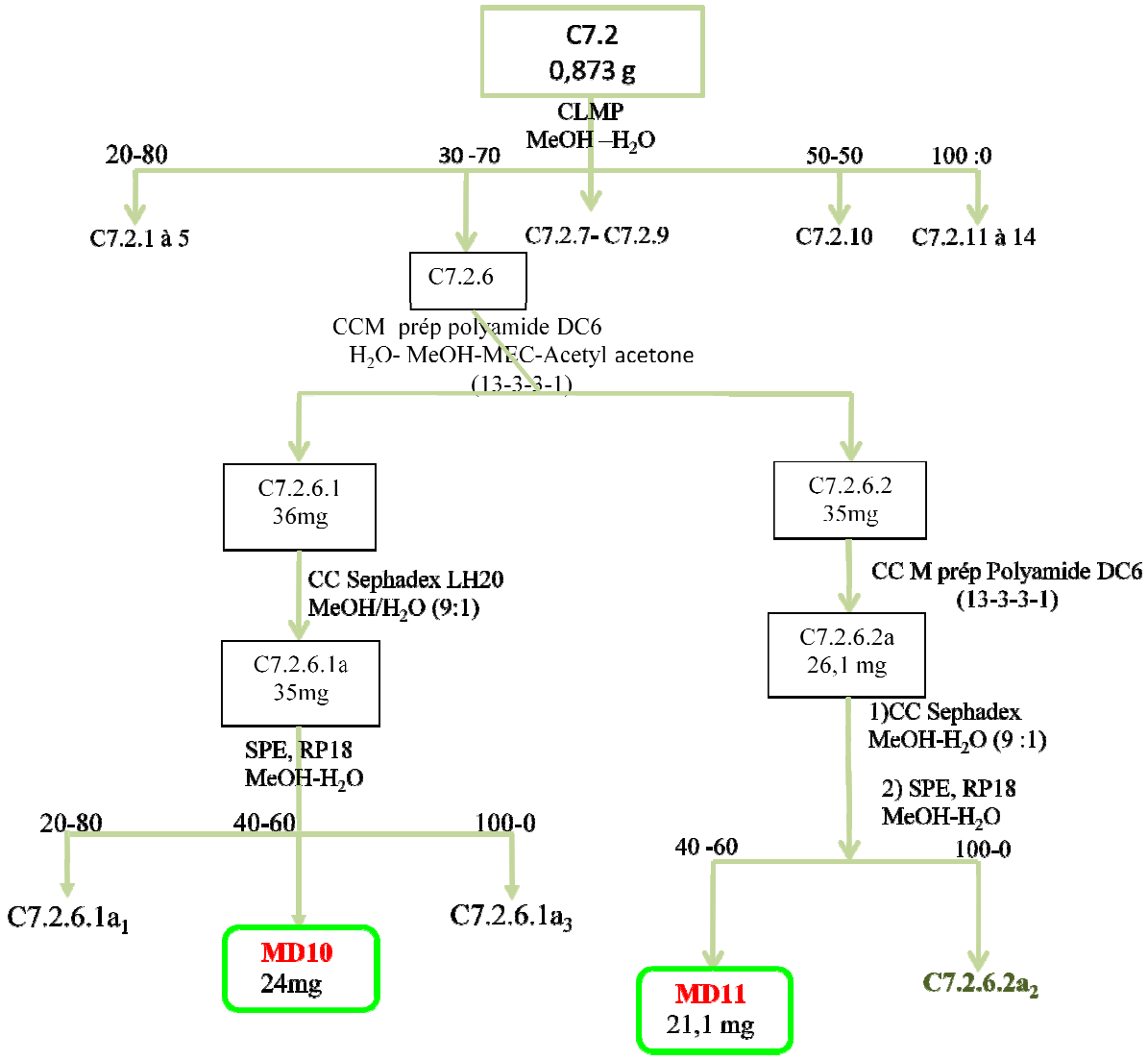


Fig. 16 : Schéma de fractionnement de **C7.2**

Le composé **MD12** (5 mg) a été obtenu par chromatographie sur colonne (h=4,5 cm, r=0,8 cm) en phase inverse (RP18) de la fraction C8 (0,05 g) en utilisant le mélange (MeOH-H_2O) (**Fig. 17**)

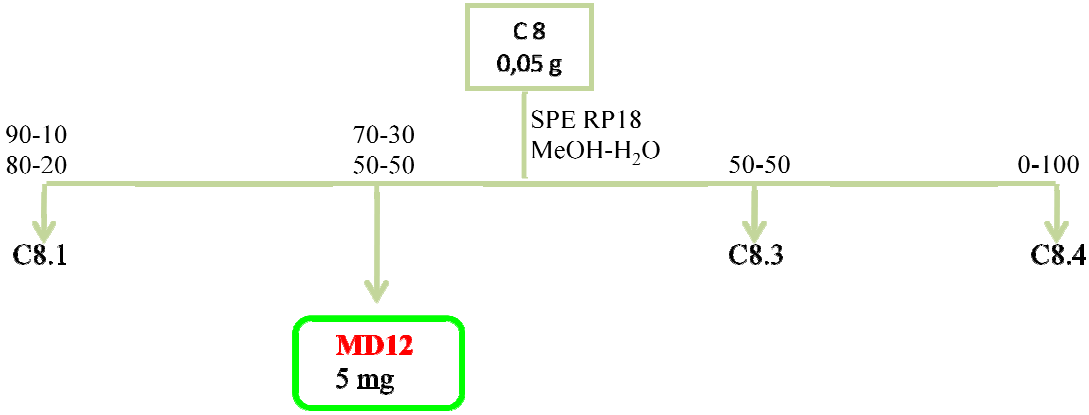


Fig. 17 : Schéma de fractionnement de **C8**

Le composé **MD13** (15mg) a été obtenu directement de la fraction C9 par chromatographie sur colonne (h=28 cm ; r=0,75 cm) de gel de silice. L'élution a été réalisée par CH_2Cl_2-MeOH. **(Fig.** 18**).**

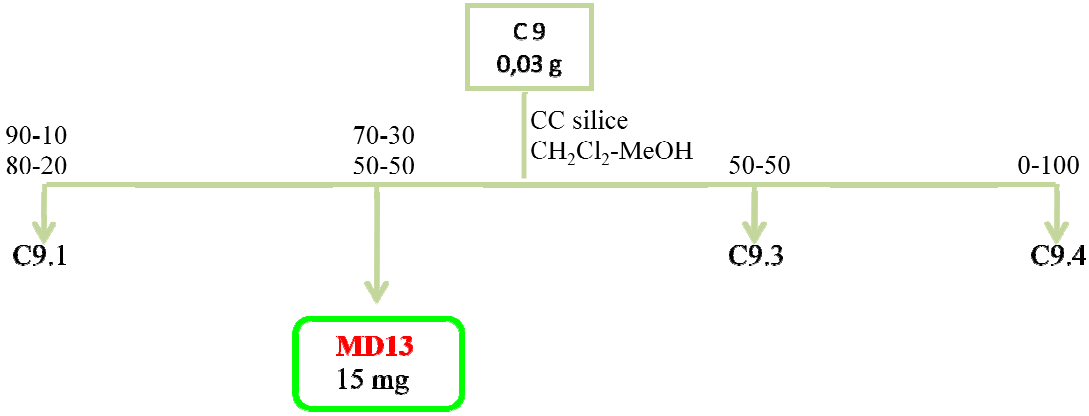


Fig. 18 : Schéma de fractionnement de **C9**

Le composé **MD14** (15mg) a été obtenu par centrifugation de la fraction C16 (88mg) et le surnageant (23mg) a subi une SPE (h=4,5 cm ; r=0,85 cm) sur diol. L'élution a été réalisée par CH_2Cl_2-MeOH pour obtenir le composé **MD15** (5 mg). (**Fig. 19**)

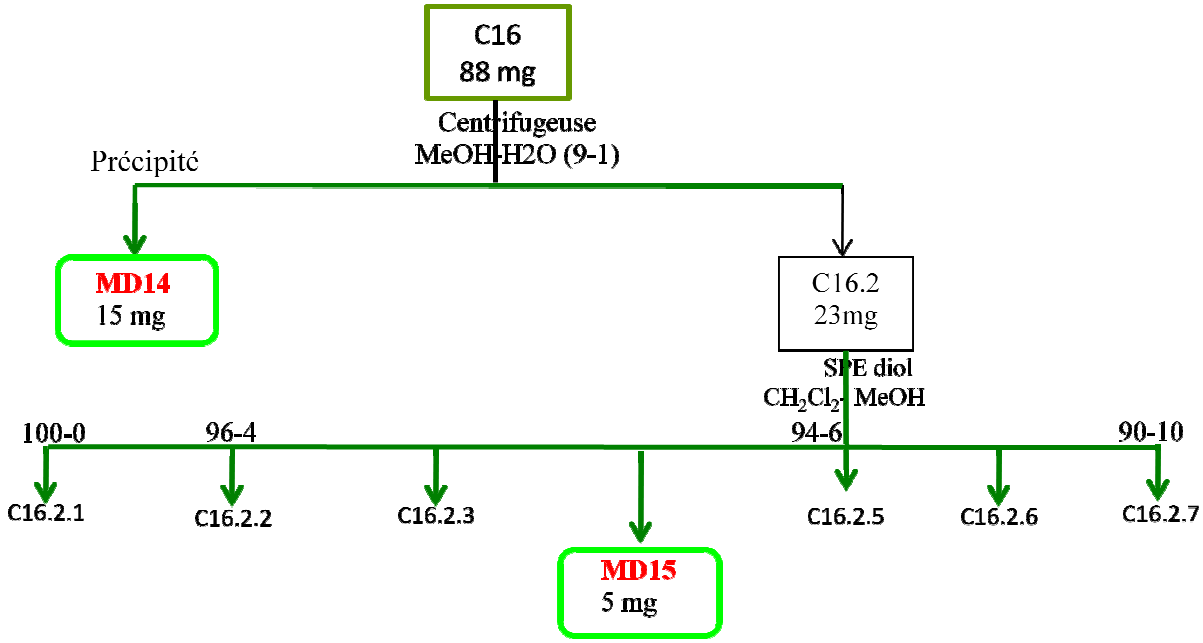


Fig. 19 : Schéma de fractionnement de **C16**

L'étude de la fraction C17 issue de la première colonne de Sephadex LH20 de la phase AcOEt débute par une SPE (h=13 cm ; r=1 cm) (RP18) (MeOH-H_2O), qui a permis d'isoler le composé **MD14** (=**MD16**) (10mg) (**Fig. 20**).

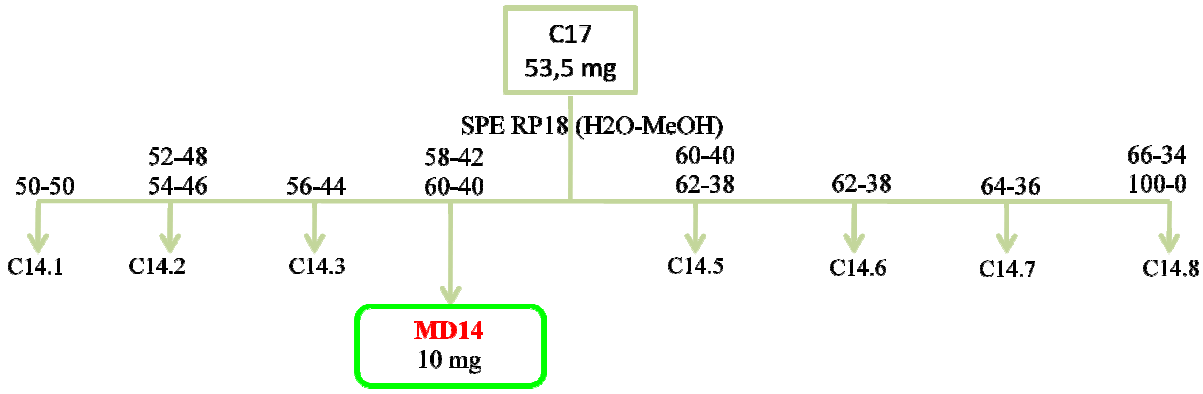


Fig. 20 : Schéma de fractionnement de **C17**

*II.4.3.3 Fractionnement de l'extrait butanolique **D***

Un premier fractionnement de la phase butanolique BuOH (**D**) (9g) a été réalisé par chromatographie sur colonne (h=80 cm, r=3 cm) de Sephadex LH20 pour donner 15 fractions (D1 à D15). La fraction D8 a été chromatographiée sur CCM préparative de gel de silice pour obtenir le composé **MD9 (=MD17)** (10 mg). Le composé **MD18** (=**MD12**) (7mg) a été isolé de la fraction D15 après une purification sur une colonne (h=30 cm, r=0,8 cm) de Sephadex LH20 en utilisant un système isocratique (MeOH-H_2O : 50-50) (**Fig. 21**).

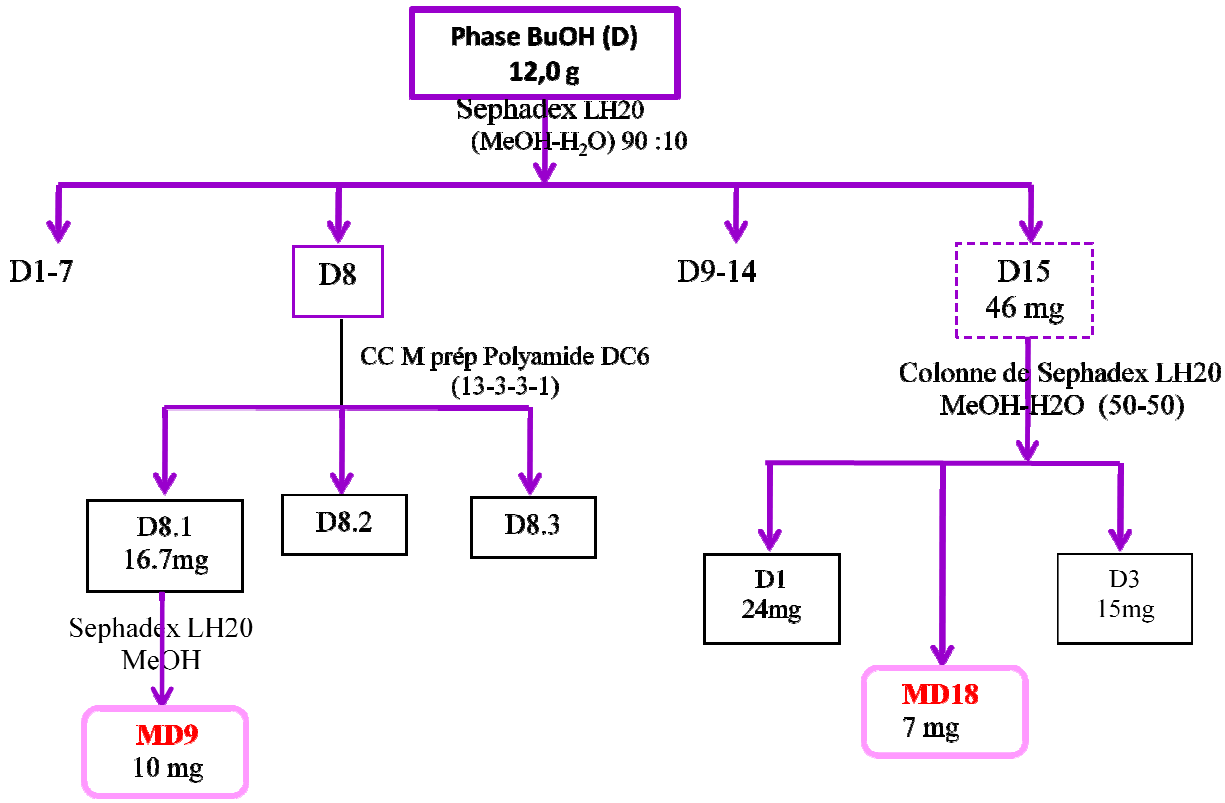


Fig. 21 : Schéma de fractionnement de la phase butanol **(D)**

II.5 Extraction et purification de *Phlomis bovei* de Noé

II.5.1 Matériel végétal

Les feuilles et les fleurs de *Phlomis bovei* de Noé aont été récoltées au mois de mai 2006 dans une région de l'est Algérien sur les montagnes Megriss à 1550 m d'altitude (Algérie). L'espèce a été identifiée par le professeur Hocine Laouer (Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Ferhat Abbas, Sétif, Algérie). Après séchage dans un endroit sec et à l'abri de la lumière, les feuilles et les fleurs ont été séparées et pesées.

II.5.2 Extraction

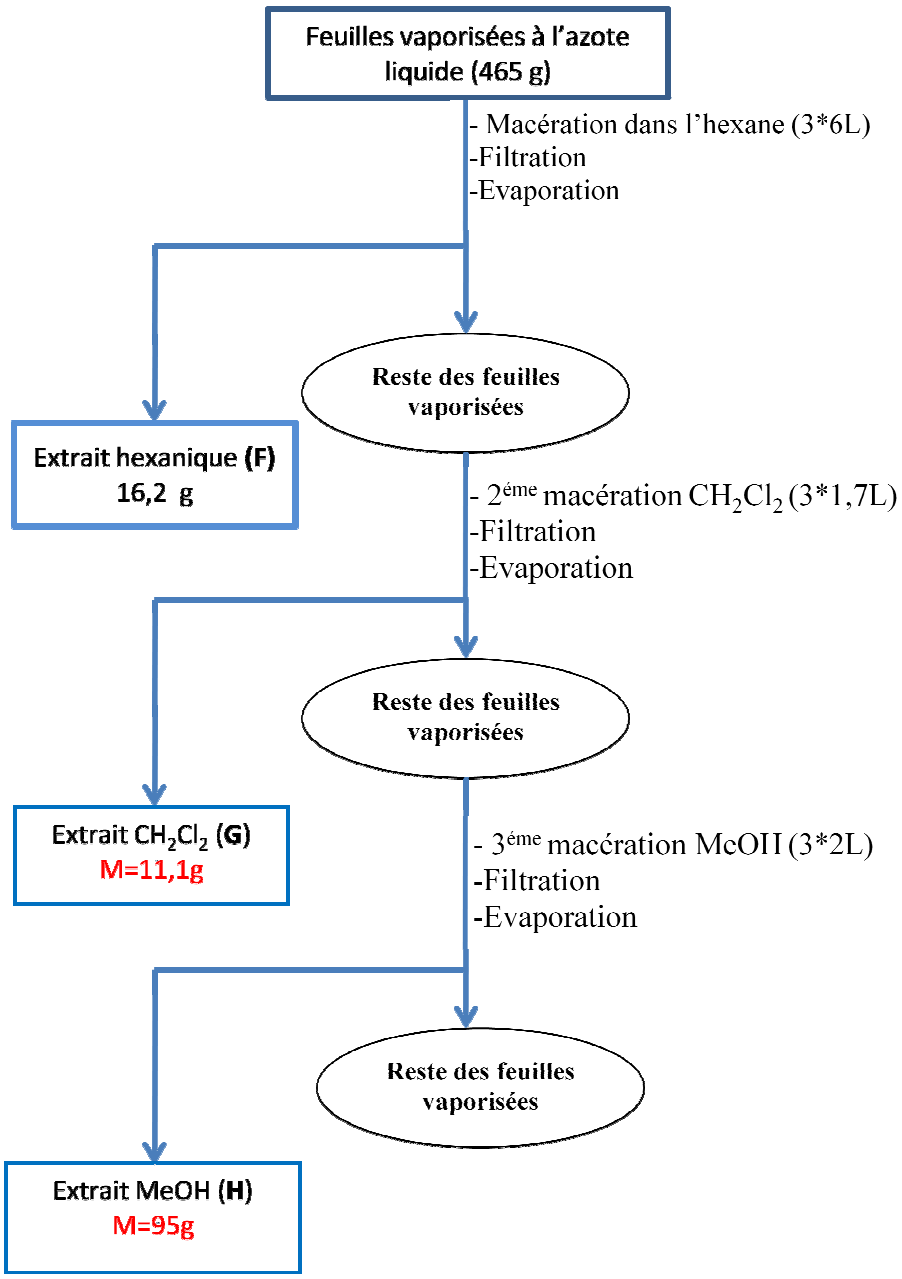


Fig. 22: Organigramme d'extraction des feuilles de *Phlomis bovei* de Noé

La quantité de feuilles obtenues (465 g) a été vaporisée à l'azote liquide et broyée. La première macération a été réalisée en utilisant l'hexane pendant 24h sous agitation mécanique et à température ambiante. Cette opération a été renouvelée 3 fois (3x6L). Après filtration, les extraits hexaniques ont été réunis et concentrés à sec sous pression réduite et une température modérée (environ 35°C). 16,2g ont été obtenus soit un rendement de 3,5%.(**F**)

Le résidu obtenu a été ensuite extrait trois fois par CH_2Cl_2 suivant le même protocole décrit précédemment donnant ainsi 11,1 g d'extrait CH_2Cl_2 (**G**). Le rendement a été de 2,4%. Les marcs furent ensuite repris par deux litres de méthanol, après filtration et évaporation du solvant, 95g d'extrait MeOH (**H**) ont été obtenus, soit un rendement de 20,4%.(**Fig. 22)**

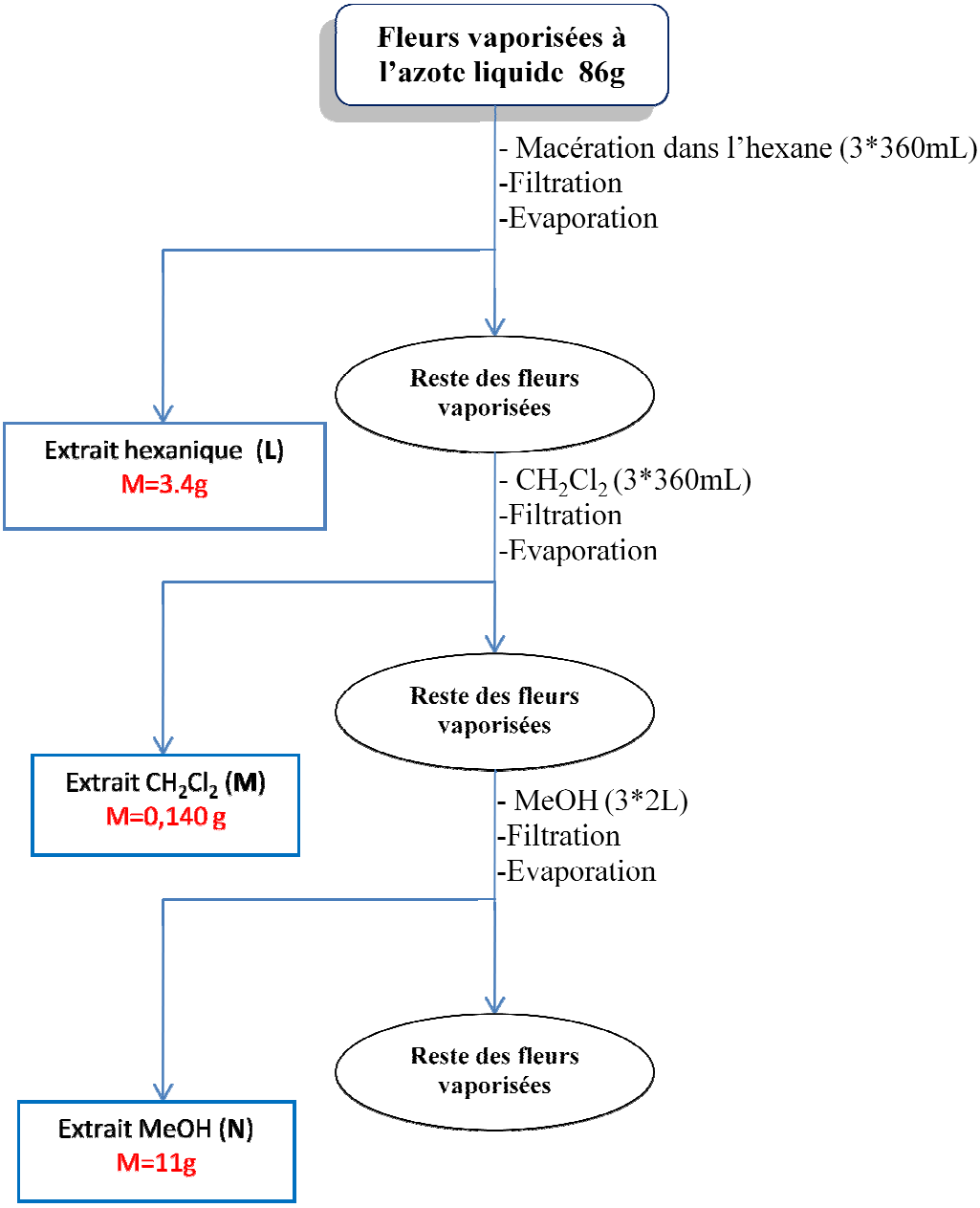


Fig. 23 : Organigramme d'extraction des fleurs de *Phlomis bovei* de Noé

86g des fleurs ont été séchées et ont été vaporisées à l'azote et ont été broyées puis mise à macérer pendant 24 heures dans l'hexane (360ml), la macération a été répétée 3 fois avec renouvellement du solvant. Après filtration et concentration, 3.4 g de l'extrait hexanique (**L**) ont été obtenus soit un rendement de 4,0%.

Les marcs ont été mis de nouveau à macérer dans le dichlorométhane. La filtration du mélange et la concentration de la solution obtenue ont donné 140 mg de l'extrait dichlorométhane CH_2Cl_2 (**M**), soit un rendement de 0.2%. Enfin la macération dans le méthanol du résidu issu de l'étape précédente, puis la filtration et l'évaporation à sec du filtrat, à permis d'obtenir 11 g de l'extrait méthanolique MeOH (**N**), soit un rendement de 12.8%.

Après comparaison des profiles de CCM de l'extrait MeOH des deux parties fleurs et feuilles de *phlomis bovei* montrent que les composés présents sont identiques, raison pour laquelle on a étudié l'extrait MeOH des feuilles.

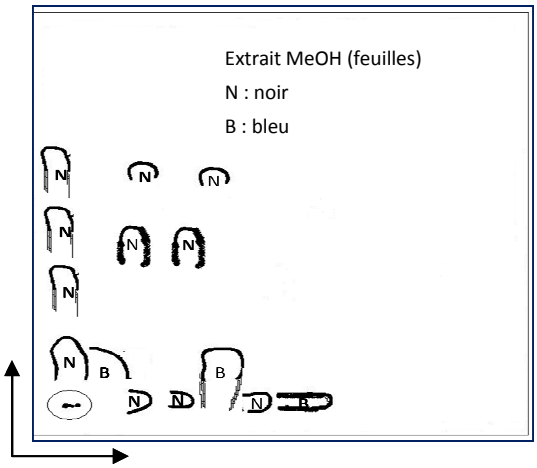
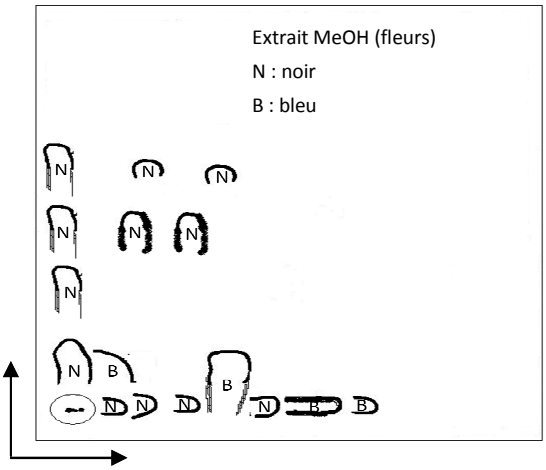


Fig. 24: CCM bidimensionnelle de polyamide DC6 de l'extrait MeOH des feuilles de *P. bovei* visualisée sous lampe UV à 365 nm



4-3-3

Toluène-MeOH-MEC

Fig. 25: CCM bidimensionnelle de polyamide DC6 de l'extrait MeOH des fleurs de *P. bovei* visualisée sous lampe UV à 365 nm

II.5.3 Protocole de purification des extraits

*II.5.3.1 Fractionnement de l'extrait méthanolique **(H)***

Une masse de 95g d'extrait méthanolique des feuilles (**H**) ont été soumises à une chromatographie sur une VLC de gel de silice. L'élution a été initialement effectuée par CH_2Cl_2 dont on augmente progressivement la polarité par addition du MeOH puis par un gradient de MeOH-H_2O, 8 fractions ont été obtenues. Les fractions H3 et H4 ont été réunies et fractionnées sur une colonne (h=54 cm, r=3 cm) de gel de silice. L'élution a été réalisée par CH_2Cl_2-AcOEt et AcOEt-MeOH pour obtenir 8 fractions. (**Fig. 26**).

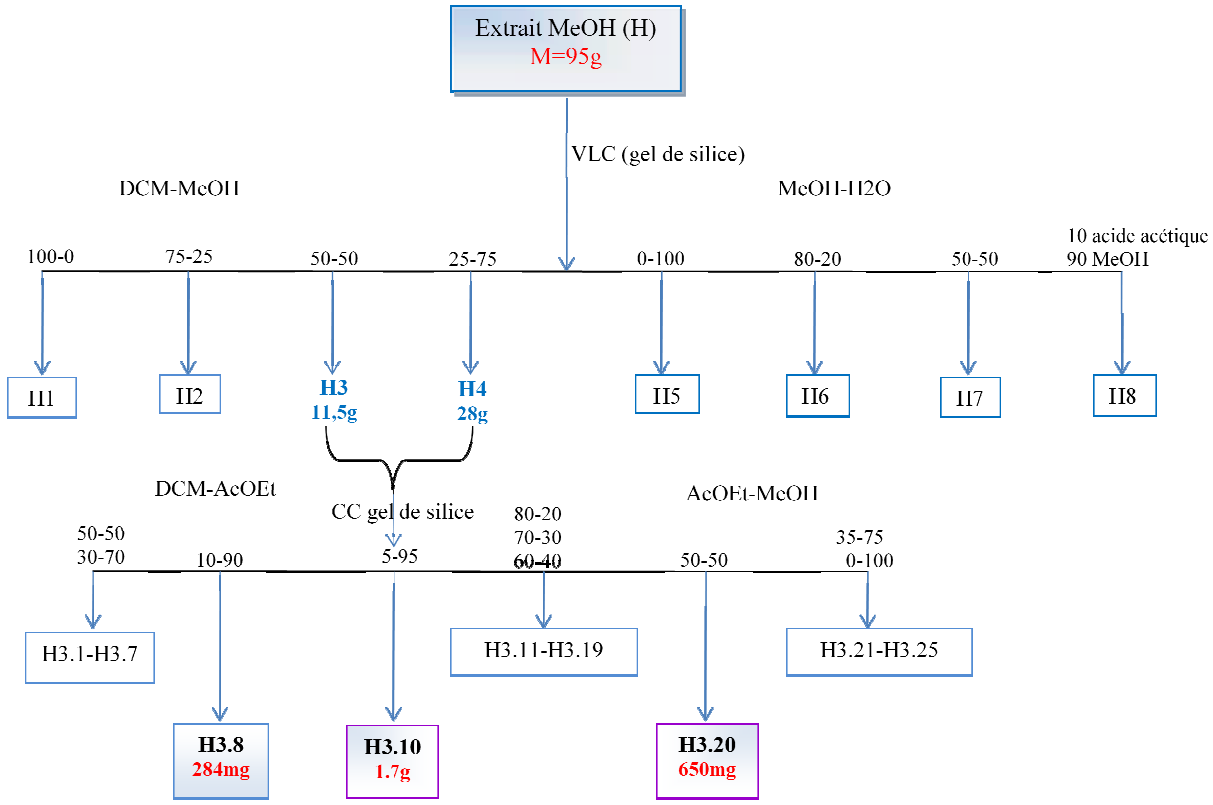


Fig. 26 : Schéma de fractionnement de l'extrait méthanolique **(H)**

Le composé **PB1** (6,4mg) a été isolé de la fraction H3.8 (284 mg) grâce a une SPE (h=8 cm, r=0,75 cm) en phase inverse RP18 suivie d'une colonne (h=24,5 cm, r=0,5 cm) de Sephadex puis une purification par chromatographie sur couche mince (plaque de polyamide en utilisant comme système d'élution 3-1-1 (toluène-MeOH-Méthyle éthyle cétone) (**Fig. 27**).

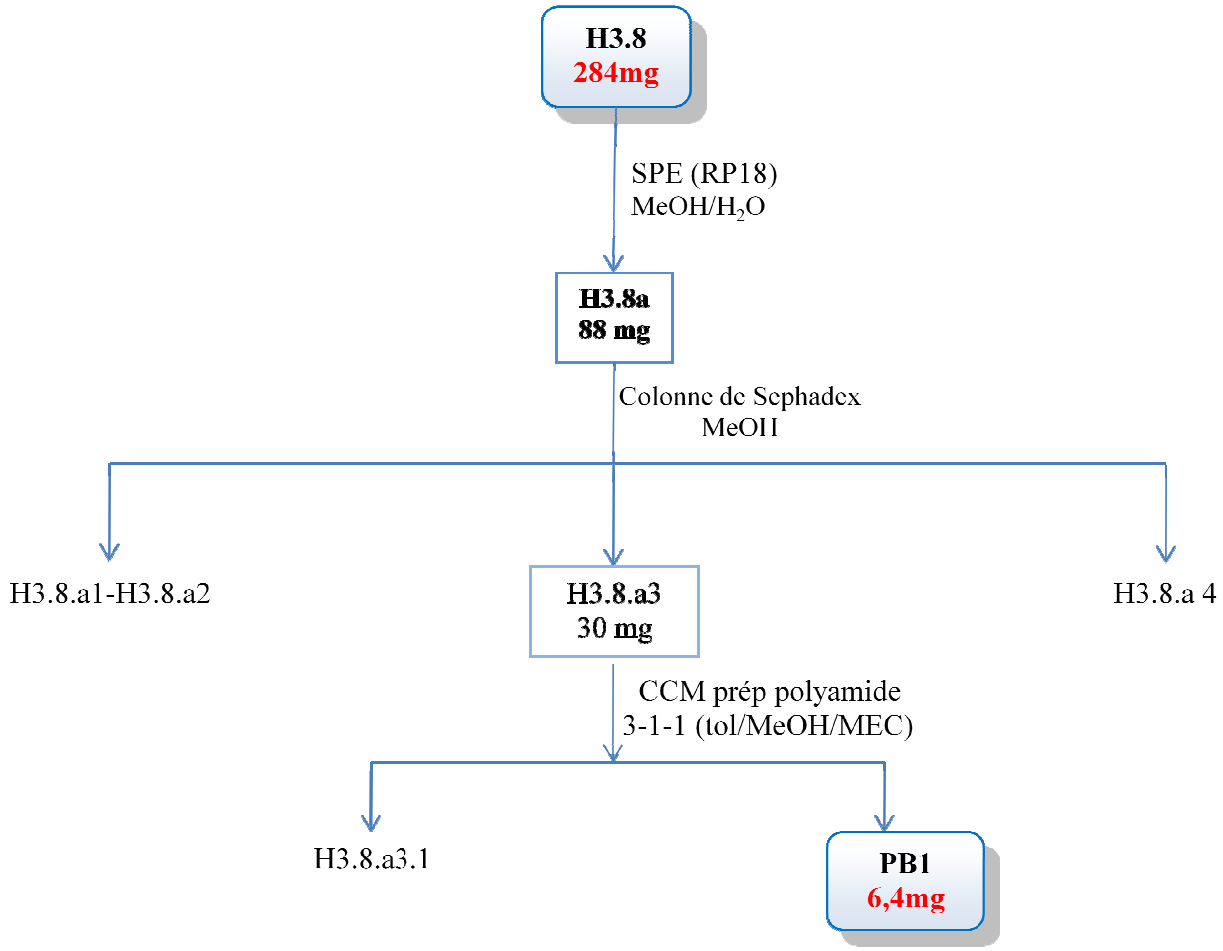


Fig. 27 : Schéma de séparation de **H3.8**

La fraction H3.10 de masse 1,7g a subi une séparation par MPLC en phase inverse RP18, les fractions présentant des similitudes ont été réunies donnant ainsi 12 fractions. La fraction H3.10.2 (18mg) a été purifiée par une colonne (h=37 cm, r=0,5 cm) de Sephadex, en utilisant le MeOH comme solvant, pour donner le composé **PB2 = MD13** (3mg). La fraction H3.10.9 (112mg) a été passée tout d'abord sur une SPE (h= 6,5 cm, r=0,75 cm) en phase inverse en utilisant un gradient de solvant (H_2O-MeOH) puis a été suivie d'une purification sur plaques préparatives de gel de silice dans un mélange (CH_2Cl_2- MeOH). Cette opération à permis d'obtenir le composé **PB3** (3.5mg) (**Fig. 28).**

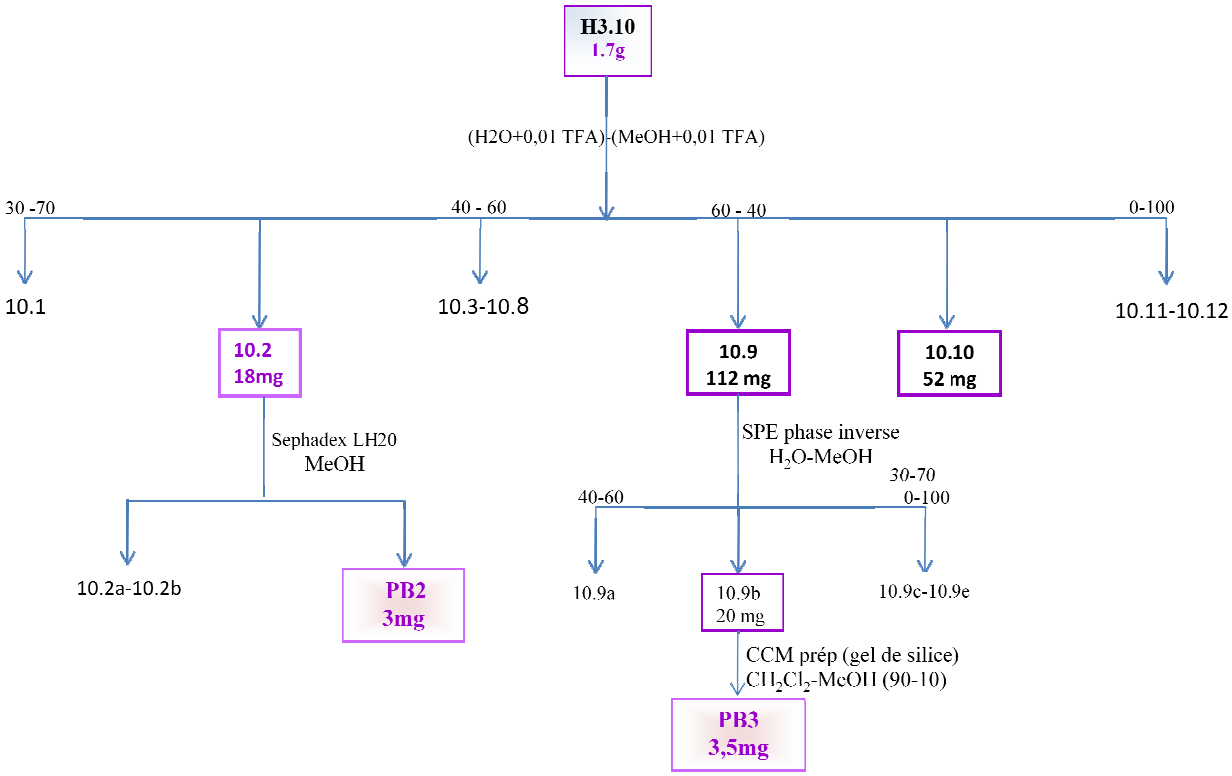


Fig. 28: Schéma de séparation de **H3.10**

La H10.10 (52 mg) a été soumise à des fractionnements successifs sur colonne SPE (h=4,6 cm, r=0,80 cm) en phase inverse RP18 avec un gradient MeOH-H_2O puis par une deuxième colonne SPE éluée avec MeOH-H_2O suivie d'une troisième colonne (h=28 cm, r=0,75 cm) de Sephadex éluée avec MeOH-H_2O en isocratique (80-20) permettant ainsi d'obtenir le composé **PB4** (**=MD14** et **PB4a** en mélange) et le composé **PB5** (**Fig. 29)**.

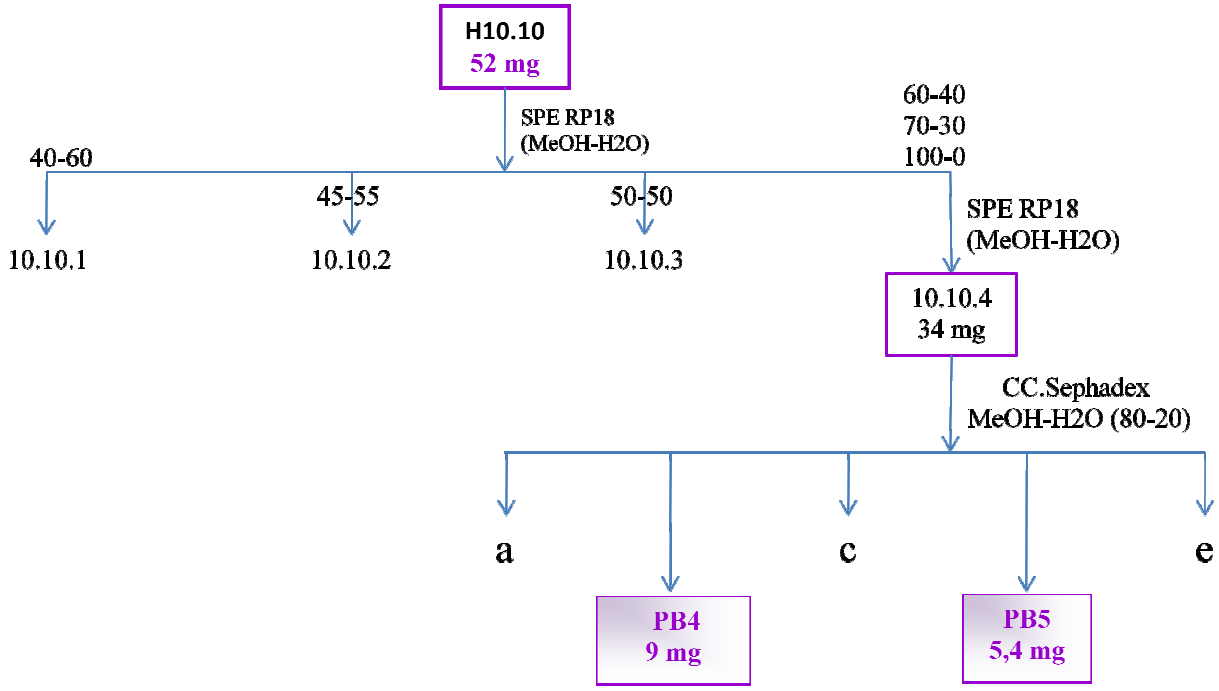


Fig. 29 : Schéma de séparation de **H10.10**

L'étude de la fraction H3.20 (650 mg) issue de la MPLC RP18 a débuté par une colonne (h=43 cm, r=1,5 cm) de Sephadex LH-20 a été éluée avec un mélange isocratique (MeOH-H_2O). La fraction H3.20.2 a été obtenue est purifiée par une deuxième colonne de Sephadex dans le MeOH. Cette chromatographie nous a permis d'isoler le composé **PB6** (**PB6a** et **PB6b** en mélange) (5mg) (**Fig. 30**).

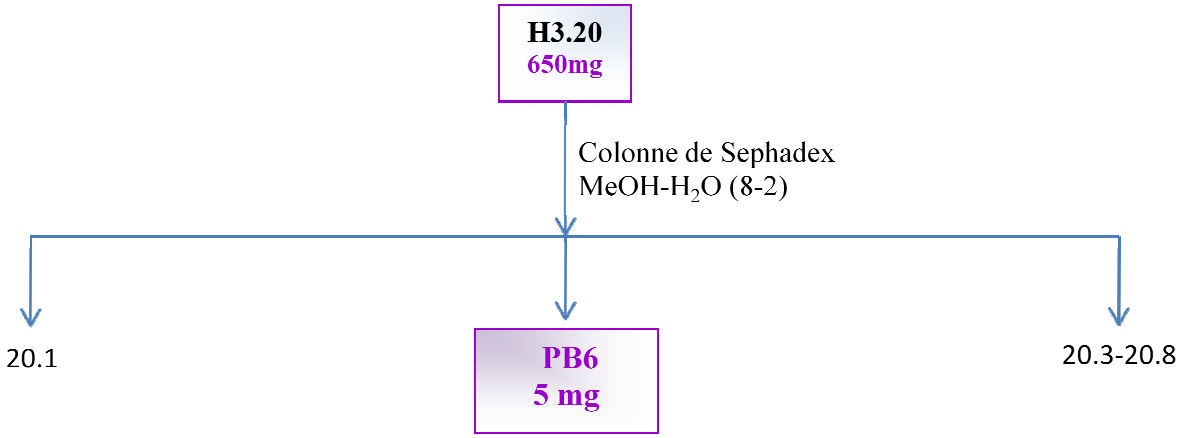


Fig. 30: Schéma de fractionnement de **H3.20**

II.6 Conclusion sur l'investigation phytochimique

L'étude chimique de *Marrubium deserti* de Noé a permis d'isoler 16 composés purs : 8 diterpènes, un sterol, 2 phénylpropanoïdes et 5 flavonoïdes. Alors que l'étude phytochimique de *Phlomis bovei* de Noé a conduit à l'isolement de 8 composés : 6 flavonoïdes, un acide chlorogénique et un 4-hydroxy-cinnamate de méthyle.

II.7 Essais biologiques

II.7.1 Méthode d'étude de l'activité génotoxique à l'aide du SOS chromotest

II.7.1.1 Principe

Le test de génotoxicité «SOS chromotest» permet de déceler rapidement les agents génotoxiques en utilisant une souche bactérienne *E.coli* PQ37 porteuse du gène *SfiA* où a été inséré le gène *Lac Z* responsable de la synthèse de la β-galactosidase (Huisman *et al.,* 1981).

II.7.1.2 Méthode d'étude de l'activité génotoxique « SOS chromotest »

La souche *E. coli PQ37* utilisée est celle décrite par Quillardet et Hofnung (1985). Cette souche est incubée pendant une nuit à 37°C dans le milieu bouillon Luria (LB) supplémenté d'ampicilline, puis diluée 8 fois dans le même milieu et incubée de nouveau pendant 2 heures à 37 °C (Tomas Bartos *et al.,* 2005). 300µl de cette 2ème culture sont dilués 9 fois en présence du LB pour l'étude de l'activité génotoxique. Pour le SOS chromotest, les concentrations testées pour des extraits sont de 250, 50 et 10µg/essai et pour les composés de 50, 10 et 2µg/essai.

Aux 300 µl de cette 2^{éme} dilution, on ajoute 10 µl de l'extrait et de la phase ou 10µl du composé que l'on souhaite tester à la concentration choisie, et on incube le tout pendant 2 heures, sous agitation continue à 37°C .

- ✓ **Dosage de la β-galactosidase**

60 µl du mélange (culture bactérienne + extrait ou composé) sont dilués 10 fois dans le tampon B et incubés pendant 5 à 10 minutes à 37°C. 120µl du substrat *o*-Nitro-Phényl-β-*D*-Galactopyranoside (ONPG) est alors additionné au mélange à une concentration de 4 mg/ml permettant ainsi, le développement d'une coloration jaune en présence de β-galactosidase, qui peut apparaître au bout de 10 à 90 minutes d'incubation. La réaction est stoppée par 400µl d'une solution de Na_2CO_3 (1M) et l'intensité de la coloration est suivie par la lecture de l'absorbance à 405 nm.

- ✓ **Dosage de la phosphatase alcaline**

60 µl du mélange, culture bactérienne et extrait ou composé, sont dilués 10 fois dans le tampon P et incubés pendant 5 à 10 minutes à 37°C. 120µl du substrat *p*-Nitro-Phényl-Phosphate (PNPP) est alors additionné au mélange à une concentration de 4 mg/ml, permettant ainsi le développement d'une coloration jaune, en présence de la phosphatase alcaline, qui peut apparaître au bout de 10 à 90 minutes d'incubation. La réaction est stoppée par 200 µl d'une solution de HCl (2,5 M). 5 minutes après, on ajoute une solution de Tris (2 M) (Quillardet *et al.,* 1982). L'intensité de la coloration est suivie par la lecture de l'absorbance à 405 nm.

Quatre témoins sont réalisés : Deux blancs (blanc positif et blanc 0) : le premier ne renferme que les bactéries et le second que le LB. Deux témoins positifs : le premier renferme le milieu LB avec la nitrofurantoïne, un agent mutagène, les bactéries avec la nitrofurantoïne.

Le facteur d'induction de l'activité génotoxique est calculé selon le rapport : $\mathbf{IF=R_c/R_0}$

✓ **Méthode d'étude de l'activité antigénotoxique à l'aide du SOS chromotest**

La méthode utilisée pour cette étude est similaire à celle utilisée pour l'étude de l'activité génotoxique. Cependant une étape d'incubation de la souche en présence de l'extrait et de l'agent mutagène (nitrofurantoïne) simultanément est rajoutée. Le pourcentage de l'antigénotoxicité est calculé par la formule :

$\%AG=100-(IF_1-IF_0/IF_2-IF_0)X100$

IF_1 : facteur d'induction en présence des composés testés .

IF_2 : facteur d'induction en absence des composés testés.

IF_0 : facteur d'induction du témoin négatif.

II.7.2 Test antioxydant

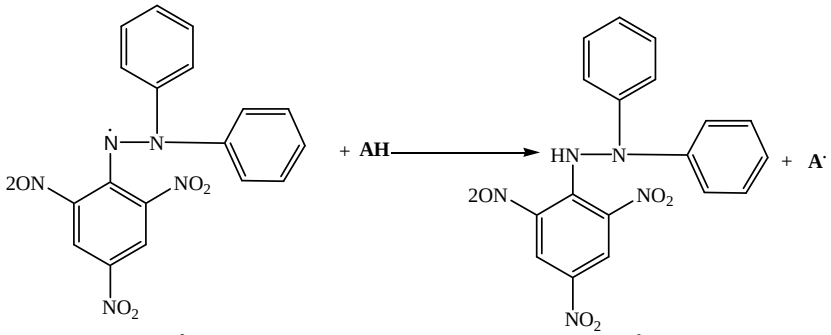
L'évaluation du pouvoir antioxydant a été effectuée avec trois tests : DPPH, CUPRAC et ABTS.

II.7.2.1 Test DPPH

✓ **Principe :**

L'activité antiradicalaire vis-à-vis du radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl ($DPPH^{\bullet}$) a été évaluée à température ambiante. La solution de DPPH est obtenue en dissolvant 4 mg de la poudre dans 50 mL de MeOH. La solution de référence est le Trolox (acide 6-hydroxy-2, 5,7, 8-tétraméthyl-chroman-2-carboxylique). Cinq solutions de concentration différentes sont préparées à partir de la solution mère (50mg dans 10ml de MeOH) en suivant un protocole adapté de Brand-Williams (Brand-Williams *et al*., 1995).

Le radical $DPPH^{\bullet}$ présente une coloration violette intense qui vire au jaune en présence de capteurs de radicaux libres et se réduit en 2,2-diphenyl-1- picrylhydrazine.



$DPPH^{\bullet}$ (Violette) DPPH-H + $A^{\bullet}$ (Incolore)

La diminution de l'intensité de la coloration est suivie par spectrophotométrie à λ= 515 nm. Elle rend ainsi compte du pouvoir piégeur des molécules étudiées vis-à-vis du $DPPH^{\cdot}$ (Iren *et al.*, 2000).Elle permet de déterminer ainsi l'EC_{50}, concentration à laquelle 50% de la coloration est perdue soit 50% des radicaux piégés.

Les résultats sont exprimés par rapport à ceux obtenus par le Trolox pris comme antioxydant de référence. Toutes les analyses ont été réalisées en triplicat.

✓ **Méthode**

Cinq dilutions 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 de chaque extrait et chaque composé ont été préparées a partir d'une solution mère (10mg/1mL), (1mg/1mL) respectivement. Sur une plaque de 96 puits. Dans les puits on place des différentes concentrations auxquelles sont additionnés 200µL DPPH. L'absorbance du mélange est mesurée à 515 nm par un lecteur de microplaque ; la lecture se fait toutes les minutes pendant 45 minutes.

L'activité des extraits, des phases et des produits est évaluée par rapport à la solution 100 % qui renferme le méthanol absolu (blanc réactif) et par rapport à la solution 100% de DPPH (Lim *et al.,* 2001 ; Song *et al.*, 2003 ; Tapiaa *et al.,* 2004 ; Naik *et al.*, 2004).

Le pourcentage d'inhibition PI de la formation des radicaux DPPH libres est calculé selon la formule suivante : $PI = (1-(DO_{extrait}/DO_{100\%})) \times 100$, où :

$DO_{extrait}$ = absorbance de la solution contenant une dilution de l'extrait ou du produit pur en présence du DPPH.

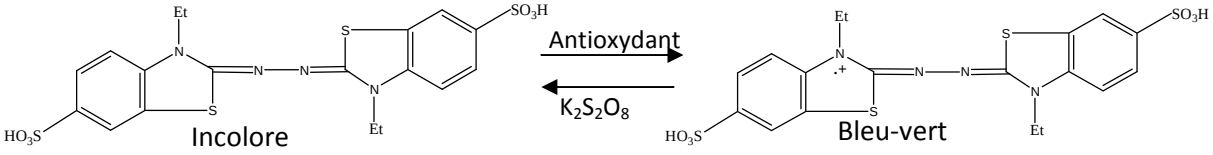
$DO_{100\%}$ = absorbance de la solution 100% contenant uniquement la solution de DPPH.

II.7.2.2 Test ABTS

✓ **Principe :**

Le test ABTS utilisé est basé sur la description originale de Re et al. en 1999 (Re., 1999) avec les modifications apportées par Arts et al. en 2002 (Arts *et al.*, 2002).

Ce test est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique $ABTS^{\cdot+}$ de coloration bleu-verte en le transformant en $ABTS^{+}$ incolore, par piégeage d'un proton par l'antioxydant.



✓ **Méthode**

La solution ABTS est préparée de la manière suivante : 19,2mg d'ABTS dissout dans 5 ml d'H_2O, puis ajouter 3,3 mg $K_2S_2O_8$. On laisse la solution reposer entre 12 et 16 heures à l'obscurité et à température ambiante avant utilisation.

Cinq dilutions ont été préparées à partir d'une solution mère pour chaque extrait (10mg/ml) et de chaque composé (1mg/mL): 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 et 1/32. Sur une plaque de 96 puits, 20µL des dilutions sont répartis, auxquels sont additionnés 200µL ABTS. L'absorbance du mélange est mesurée à 734 nm par un lecteur de microplaque. La lecture se fait chaque minute pendant 45 minutes. Le blanc est constitué par 220 µL de MeOH.

Une comparaison est faite avec la capacité du Trolox (analogue structural hydrosoluble de la vitamine E) à capturer l'$ABTS^{\cdot+}$. La décroissance de l'absorbance causée par l'antioxydant reflète la capacité de capture du radical libre. La capacité antioxydante exprimée en équivalent Trolox (TEAC), correspond donc à la

concentration de Trolox ayant la même activité que la substance à tester à une concentration. Le résultat est donné en µg ou mg d'équivalent Trolox par g de produit ou par mL s'il s'agit d'un liquide.
La détermination du pourcentage d'ABTS restant est calculée selon la formule suivante :

$$\% = DO_{ABTS restant} \times 100 / DO_{ABTS+solvant}$$

II.7.2.3 Test CUPRAC (CUPric ion Reducing Antioxidant Capacity)

- ✓ **Principe :**

Le test CUPRAC (CUPric ion Reducing Antioxidant Capacity) a été décrit par Apak *et al.* (Apak *et al.,* 2004). Cette technique repose sur la mesure de la capacité d'une molécule à réduire le cuivre (II) complexé par la néocuproïne selon la réaction suivante :

$$2nCu(Nc)_2^{2+} + Ar(OH)_n = 2nCu(Nc)_2^{+} + Ar(=O)_n + 2nH^{+}$$

Bleu Jaune

Cette réaction se manifeste par l'apparition d'une coloration suivie par spectrophotométrie à 450 nm.
La formation du complexe est suivie par la lecture de l'absorbance qui est proportionnelle au potentiel antioxydant de la molécule, et dépend de différents paramètres tels que la concentration de la solution, le temps de mesure ou la température.

- ✓ **Méthode**

Cinq dilutions de chaque extrait (10mg/ml) et de chaque produit (1mg/ml) ont été préparées à partir de la solution mère : 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 et 1/32. Sur une plaque de 96 puits, 50µL des dilutions sont répartis, auxquels sont additionnés 50 µL H_2O, 50µL $CuCl_2$ (dissoudre 0.8524 g de $CuCl_2$ dans 50ml H_2O), 50µL tampon acétate (3.854g de NH_4Ac dissout dans 50ml H_2O, PH=7) et 50µL de néocuproïne (0.039g dissout dans 25ml H_2O), les solutions sont ensuite incubées à 25°C pendant 60 minutes.
L'absorbance est mesurée à 450 nm par un lecteur de microplaques. La capacité antioxydante est calculée en équivalents Trolox:

$$TEAC_{molaire} = \varepsilon_{produit} / \varepsilon_{Trolox}$$

ε : (coefficient d'extinction molaire) si la concentration est exprimée en mol/L

II.7.3 Test antibactérien

II.7.3.1 Activité bactériostatique

Cinq souches utilisées pour le test

- *Staphylococcus aureus* ATCC : 29213
- *Enterococcus faecalis* : ATCC : 29219
- *Pseudomonas aeruginosa :* ATCC 27855
- *Klebsielle oxytoca* : ATCC 700324
- *Souche SARM* (*Staphylococcus aureus* résistant)

Ce test est utilisé pour déterminer la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI). La méthode utilisée est décrite par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM) (SOUSSY ., 2007). Elle est réalisée en milieu liquide, sur microplaque de 96 puits. Le composé à tester est tout d'abord dissout dans du DMSO (300µg/mL) puis dilué dans du milieu de culture MH2 (milieu Mueller-Hinton) ajusté en ions Ca^{2+} et Mg^{2+} (solution « mère »). Une dilution en série de cette solution « mère », également dans du milieu MH2, permet d'obtenir diverses solutions « filles » (réalisation d'une gamme de concentrations, 1, 1/2, 1/4, 1/8,1/16, 1/32, 1/64, 1/128).

Les concentrations finales en DMSO en contact avec les bactéries doivent être inférieures à 3% afin d'éviter l'effet toxique du solvant. A partir d'une pré-culture de bactéries (24 h à 37°C) sur milieu gélosé MH2, une suspension bactérienne contenant 10^6 CFU/mL est réalisée. Chaque puits mélangé contient alors : 100 µL de la suspension bactérienne, 50 µL d'une solution de la gamme de dilution du composé testé et 50 µL de MH2 (Les concentrations finales en produit à tester vont de 256 à 0,5 µg/mL). Après 18-24 h d'incubation à 37°C, les concentrations bactériennes pour lesquelles il n'y a aucun développement bactérien (absence de trouble du milieu de culture) sont déterminées. On détermine la CMI comme étant la concentration la plus faible inhibant la croissance des bactéries.

II.7.3.2 La modulation de la résistance bactérienne

Ces essais sont identiques au précédent à l'exception du fait que l'on associe l'antibiotique (la norfloxacine) au composé à tester. La CMI de l'antibiotique seule est également déterminée. Une diminution de la CMI de l'antibiotique sera observée lorsque les extraits ou composés présentent une activité de modulation. Les composés sont généralement testés à 100µg/mL. Cependant, si une activité antibactérienne est détectée à 100µg/mL, la concentration prise en compte correspondra à CMI/2 pour les essais de modulation afin de s'affranchir de l'effet antibiotique intrinsèque.

II.8 Références

A

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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7970-7981.

Arts M. J. T. J., Haenen G. R. M., Wilms L. C., Beetstra S. A. J. N., Heijnen C.G. M., Voss H. P., Bast A ., 2002. Interactions between flavonoids and proteins: Effect on the total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 50, 1184-1187.

B

Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C., 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 28, 25–30.

H

Huisman O., d'Ari R., 1981. An induced DNA replication-cell division coupling méchanism in *E.coli*. *Nature.* 290, 797-799.

I

Iren P., Carles C., Christos P., Panagiotis K., 2000. Evaluation of scavenging activity assessed by Co(II)/EDTA-induced luminol chemiluminescence and DPPH$^{\cdot}$(2,2-diphenyl-L-picrylhydrazyl)free radical assy. *Journal of Pharmacoogical and Toxicological Methods*, 44, 507-512.

L

Lim K. T., Hu C., Kitts D. D. 2001. Antioxydant activity of a Rhus verniciflua stokes ethanol extract. *Food and Chemical Toxicology*. 39, 229-237.

N

Naik G. H., Priyadarsinia K. I., Naika D. B., Gangabhagirathib R., Mohana H., 2004. Studies on the aqueous extract of *Terminalia chebula* as a potent antioxidant and a probable radioprotector. *Phytomedicine*. 11, 530–538.

Q

Quillardet P.,Huisman O., D'Ari R.,Hofnung M., 1982. SOS Chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity. *Proceedings of National Academy of Sciencesof the USA*, 79, 5971-5975.

Quillardet P., Hofnung M., 1985. The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. *Mutation Research*, 147, 65-78.

R

Re R., Pellegrina N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evens C., 1999. Antioxydant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.

S

Song Y. S., Kim S. H., Sa J. H., Changbae J., Limd C. J., Park E. H., 2003. Anti-angiogenic, antioxidant and xanthine oxidase inhibition activities of the mushroom *Phellinus linteus. Journal of Ethnopharmacol*. 88, 113-116.

Soussy C. J., Recommandations 2007. Comité de L'abtibiogramme de la société Française de Microbiologie (CASFM). Edition de Janvier.

T

Tapiaa A., Rodriguezb J., Theodulozb C., Lopezd S., Feresinc EG., Hirschmanna GS., 2004. Free radical scavengers and antioxidants from *Baccharis grisebachii. Journal of Ethnopharmacology*. 95, 155-161.

Tomas-Bartos T., Škarek M., Cupr P., Kosubová P., Holoubek I., 2005. Genotoxic activity of a technical toxaphene mixture and its photodegradation products in SOS genotoxicity tests. *Mutation Research*, 565, 113-120.

CHAPITRE III :

Résultats et discussions

III.1 Identification des composés isolés de *Marrubium deserti*

III.1.1 Les diterpènes

*III.1.1.1 Composé **MD1 :** Marrubiine*

Le composé **MD1** a été isolé sous la forme d'une poudre blanche amorphe. Le spectre de masse (SM-IE) du composé **MD1 (Fig. 31)** montre le pic de l'ion moléculaire à *m/z* 332 $[M^+]^{\cdot}$, qui est compatible avec la formule brute $C_{20}H_{28}O_4$ avec un degré d'insaturation de 7.

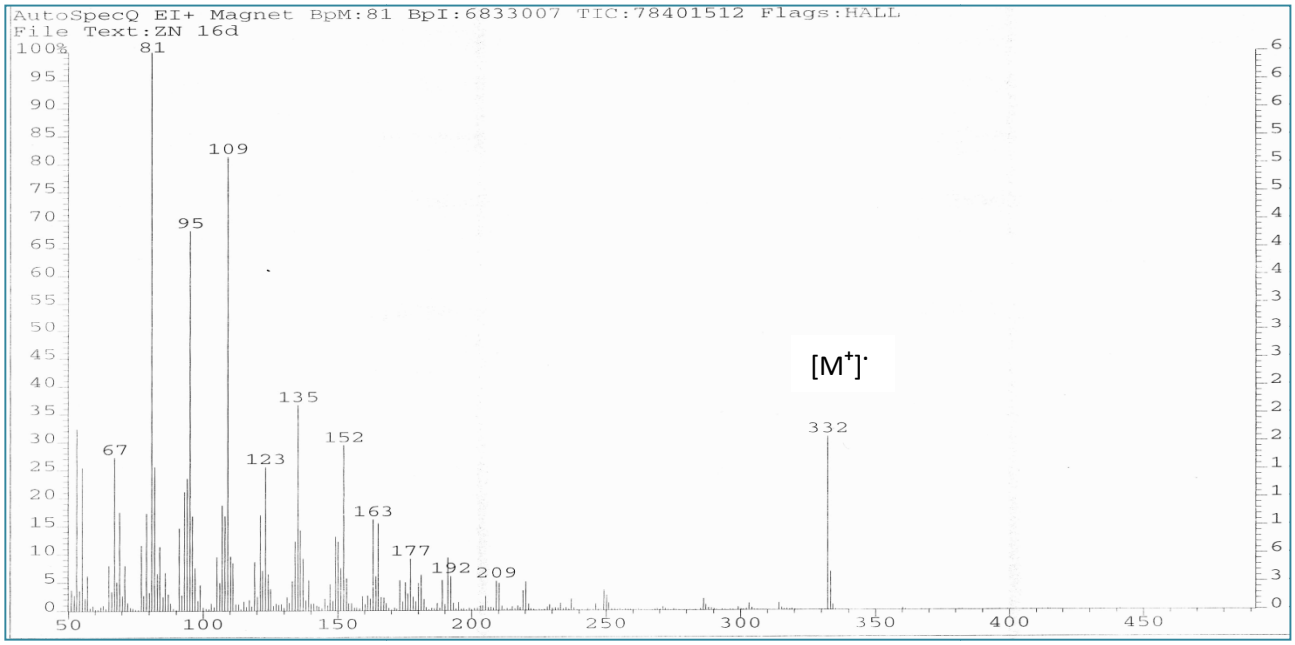


Fig . 31 : Spectre de masse IE (impact électronique) en mode positif du composé **MD1** ($CHCl_3$)

Le spectre RMN-^{13}C (**Fig. 32**, **Tableau 1**(annexe III.1.**a, p 232**)) montre la présence de 20 carbones.
Les informations supplémentaires fournies par l'expérience DEPT 135 (**Fig. 33**) et le spectre 2D, $^1J_{(^1H\text{-}^{13}C)}$ HSQC permettent de distinguer :
6 groupements CH_2
5 carbones quaternaires, dont un signal très déblindé à δ 183,9 correspondant au CO d'un cycle γ lactonique (C-19).
9 signaux qui peuvent être attribués à des carbones primaires ou tertiaires. Parmi eux, trois ont des déplacements chimiques caractéristiques de méthyles (δ 16,5 ; 22,2 ; 22,9) et deux correspondant à des carbones tertiaires aliphatiques (δ 32,3 ; 44,8). La présence d'une lactone permet également d'expliquer le déplacement chimique du carbone tertiaire à δ 76,2 : ce signal est attribué au C-6.

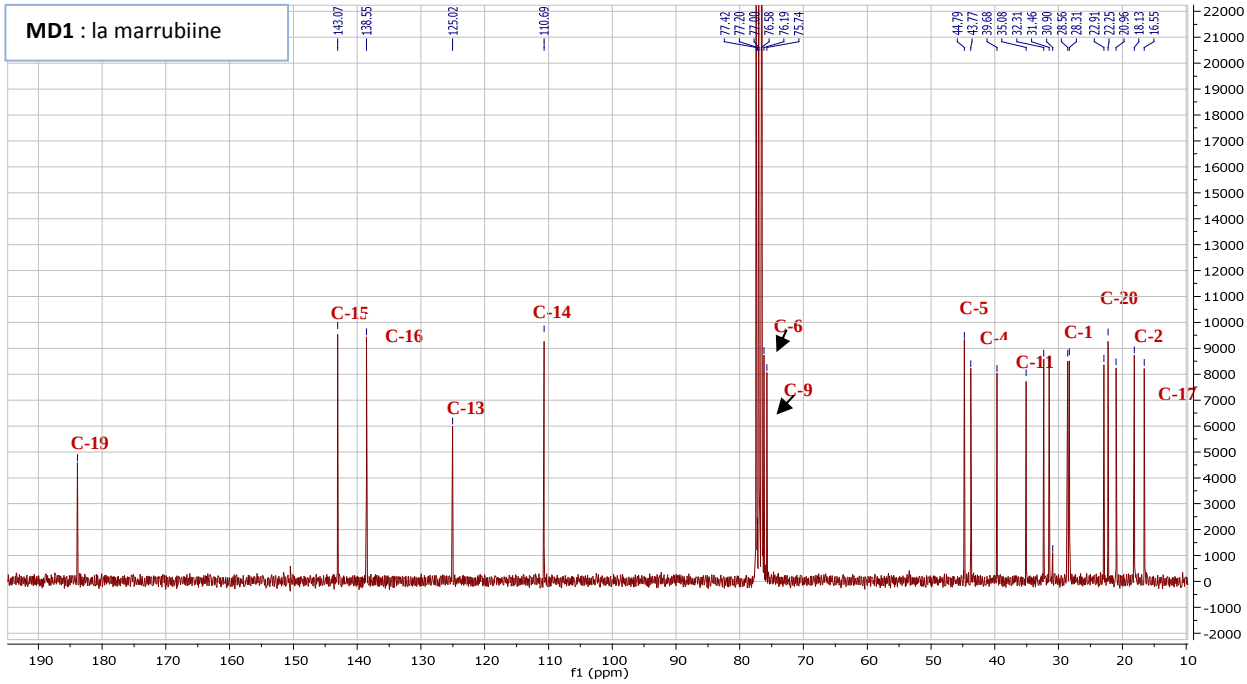


Fig. 32: Spectre RMN-^{13}C de **MD1** ($CDCl_3$, 75 MHz)

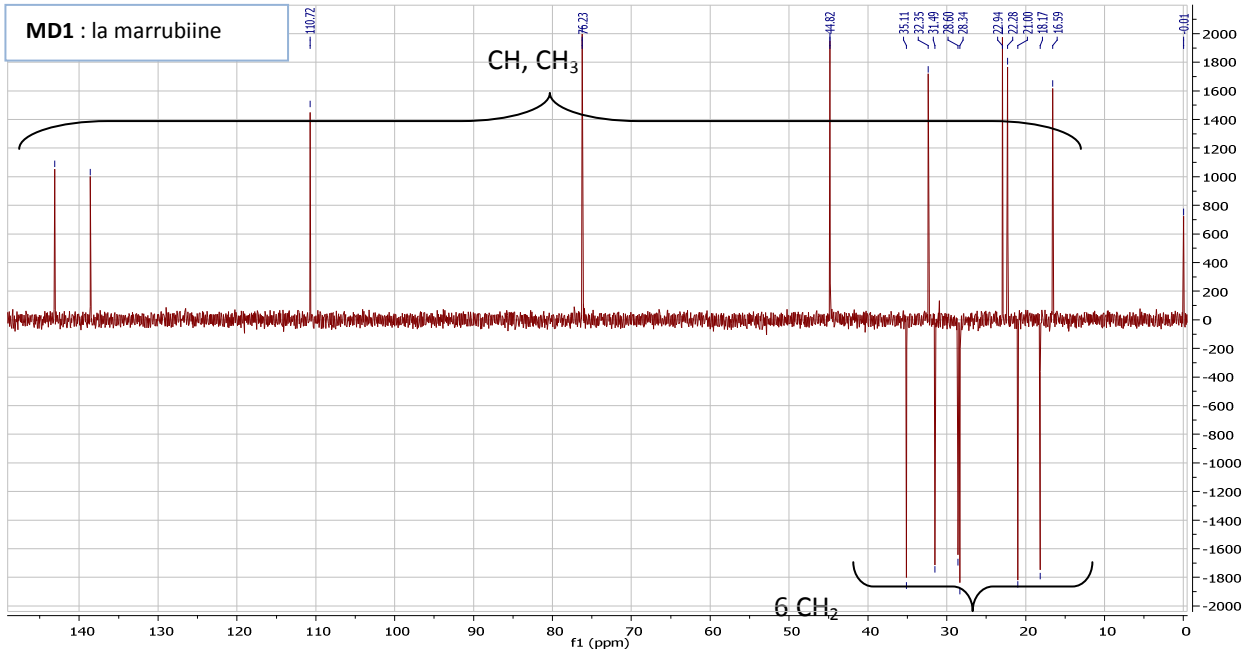


Fig. 33: Spectre DEPT 135 de **MD1** ($CDCl_3$, 75 MHz)

Ces différents éléments font penser à un diterpène renfermant une lactone.

Le spectre RMN-^{1}H apporte des données complémentaires (**Fig. 34, Tableau 1 (**Annexe III.1.a, p232)):

- 2 singulets larges et 1 triplet à 7,36, 7,23 et 6,28 ppm respectivement, indiquant la présence des CH d'un cycle de type furane.
- 1 doublet à 0,96 ppm correspondant au proton H-17 avec la constante de couplage J = 6,4 Hz.
- 2 singulets à 1,06 et 1,29 ppm correspondant aux protons H-20 et H-18 respectivements.
- 1 doublet à 2,24 ppm correspondant au proton H-5, avec la constante de couplage $J_{H5\text{-}H6}$= 5,0 Hz.
- 1 triplet à 4,75 ppm avec la constante de couplage J = 5,0 Hz correspondant au proton H-6.

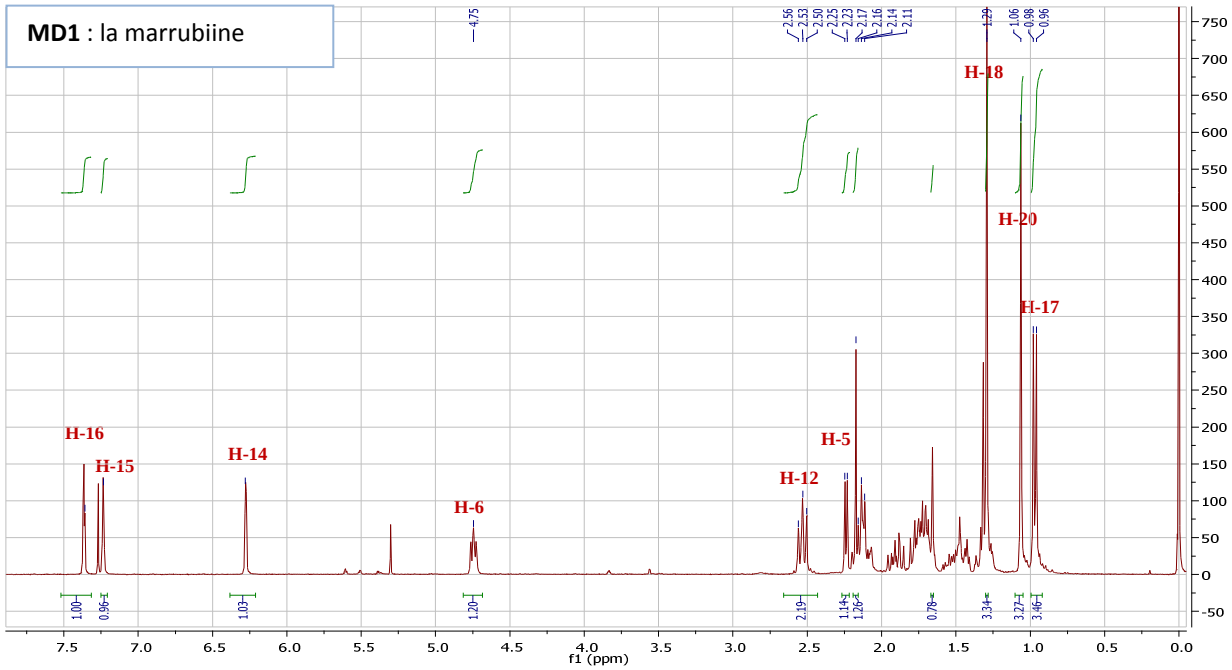


Fig. 34: Spectre RMN-^{1}H de **MD1** ($CDCl_3$, 300 MHz)

L'expérience de corrélation COSY (^{1}H-^{1}H) permet de visualiser les couplages des protons entre eux :

- H-12 (δ 2,53) / H-11 (δ 1,90-1,76)
- H-14 (δ 6,28) et H-15 (7,36)
- H-1a / H-1b, H-2a / H-2b, H-3a / H-3b, H-6 / H-7a, H-6 / H-7b, H-8 / H-7b : ce sont des protons qui appartiennent au système bicyclique.
- et H-8 (2,13 ppm) / H-17 (0,96 ppm).

Enfin, la structure peut être déterminée après l'analyse des données de l'expérience HMBC qui permet de visualiser les couplages de type $^{2}J_{(^{1}H-^{13}C)}$ et $^{3}J_{(^{1}H-^{13}C)}$ (**Fig. 35** et **36).**

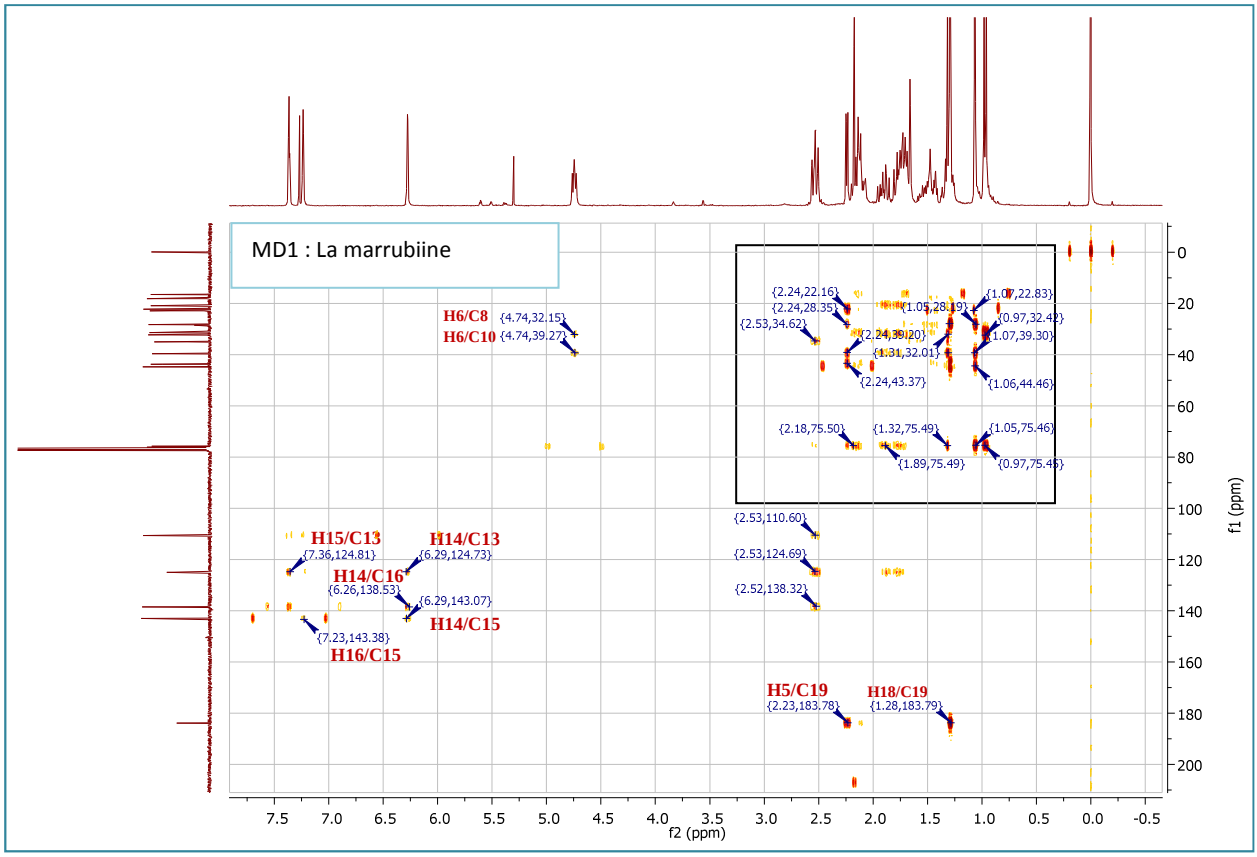


Fig. 35: Spectre HMBC de **MD1** ($CDCl_3$, 300 MHz)

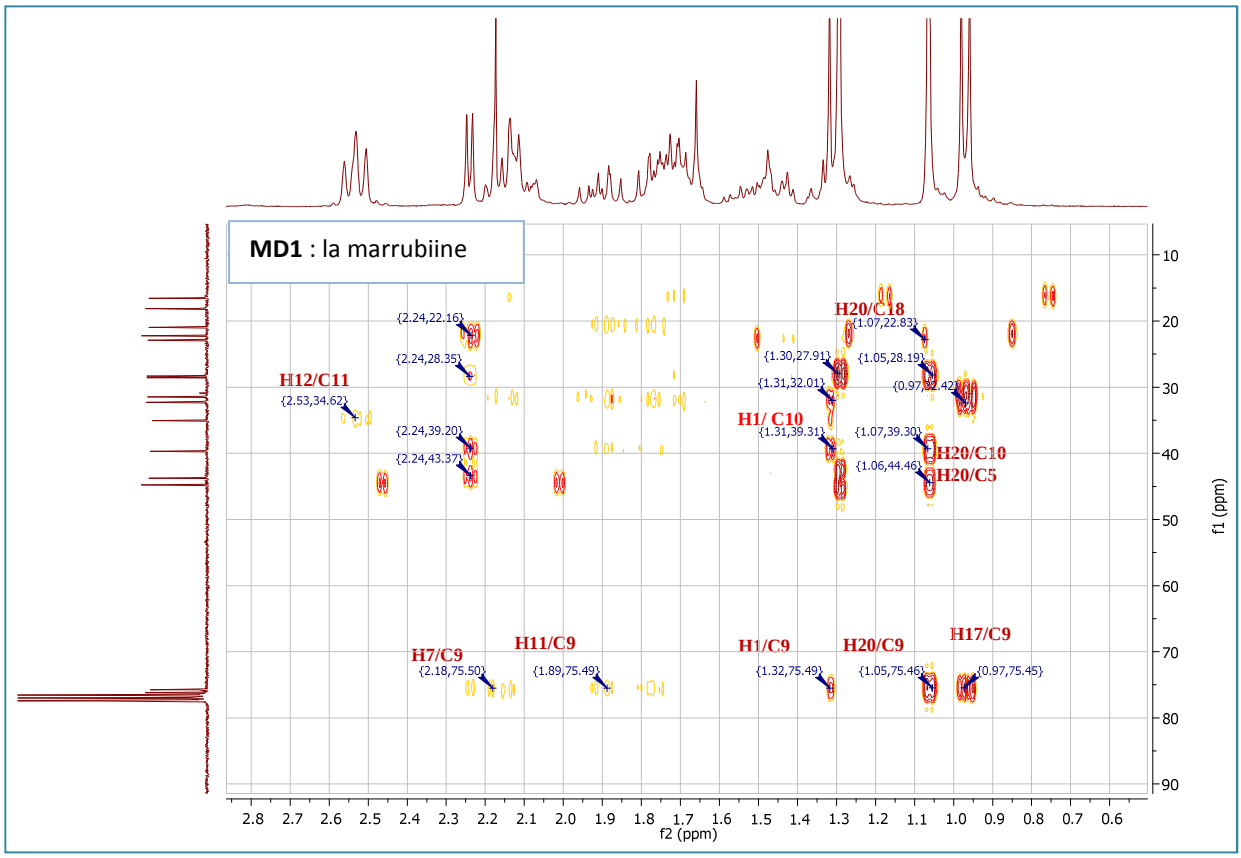
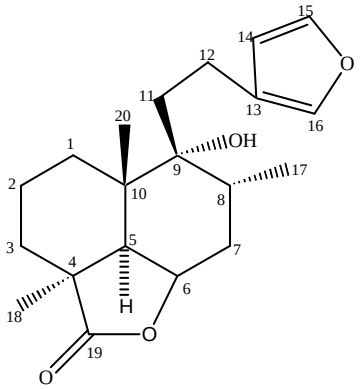


Fig. 36: Agrandissement du spectre HMBC du composé **MD1** ($CDCl_3$, 300 MHz)

L'ensemble de ces données spectrales indique que le composé **MD1** a la structure de base d'un diterpène de type furanolabdane. Sa structure finale peut être ainsi établie comme étant le 9α-hydroxy-15,16-époxylabda-13(16), 14-diéne-6β, 19-olide, connue sous le nom de marrubiine.

Les données RMN-^{1}H et ^{13}C présentent une grande similitude avec celle de la littérature (Hussein *et al.,* 2003; Rigano *et al.,* 2009). Les attributions de tous les signaux sont présentées dans le (**Tableau 1** (Annexe III.1.a, p 232)**)** aux côtés de celles de la littérature.



Plusieurs études ont déjà porté sur la stéréochimie de la marrubiine (Mangoni *et al*., 1968 ; Stephens *et al.,* 1970). Son pouvoir rotatoire est $[\alpha]_D$=39° à 25°C.

La marrubiine est le premier diterpène isolé du genre *Marrubium* en 1842 (*M. vulgare*). Il s'agit du composé le plus connu et le constituant principal (Savona *et al.,* 1979 ; Popa *et al.,* 1968 ; Karioti *et al.,* 2005). Ce composé a été isolé de différentes Lamiacées. Plus récemment, cette molécule a été isolée pour la première fois du genre *Phlomis* et en particulier de l'espèce *bractèosa* (Hussain, 2011).

Plusieurs propriétés pharmacologiques sont associées à ce composé : il a été décrit comme antinutritif (Taboada *et al.,* 1994), vasorelaxant (El Bardai *et al.,* 2003), antioedémateux (Stulzer *et al.,* 2006), cytotoxique (Karioti *et al.,* 2007), analgésique (Meyre-Silva, 2005), antinociceptif (De Jesus *et al*., 2000) et cholérétique (Krejci *et al.,* 1959).

*III.1.1.2 Composé **MD2**: Marrulibacétal A*

Le composé **MD2** a été isolé sous forme d'une poudre blanche amorphe. L'analyse du spectre HR -SM- IE montre un ion moléculaire à *m/z* 419,2053 $[M+Na]^+$ (**Fig. 37**) (calc : 419,2045)soit une masse exacte (calculée) de 396,2148 g/mol, correspondant à la formule brute $C_{21}H_{32}O_7$ avec un degré d'insaturation de 6.

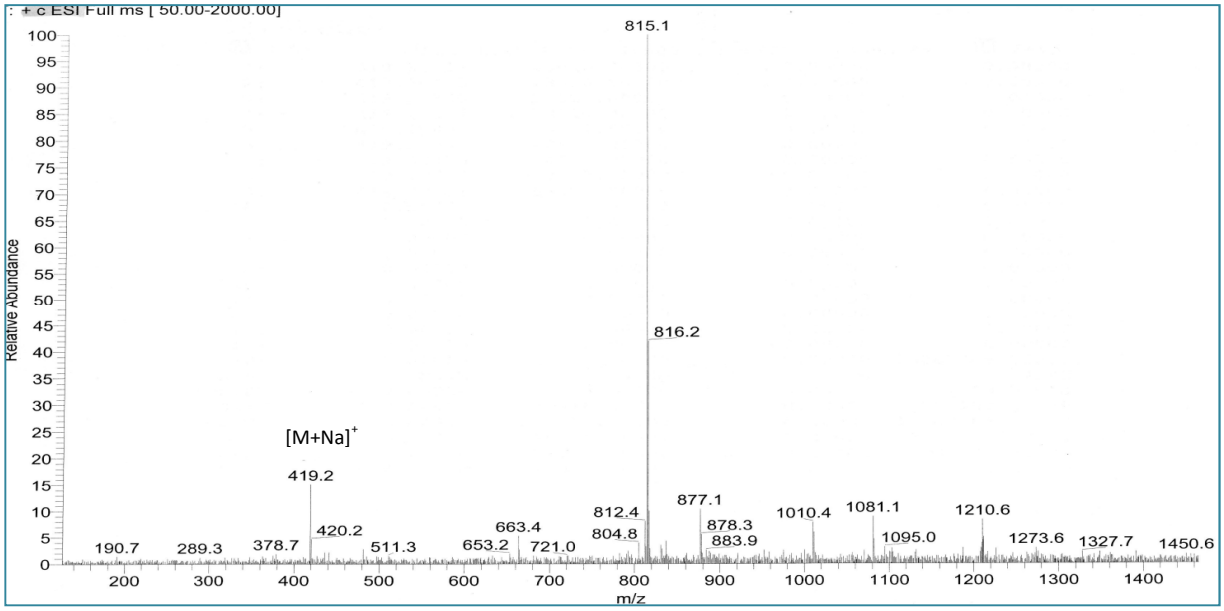


Fig 37 : Spectre de masse HR-IE$^+$ de **MD2** dans $CHCl_3$

Sur les spectres RMN-^{1}H et ^{13}C, on remarque la concordance de nombreux signaux avec ceux du composé **MD1** (les carbones de C-1 à C-8 ainsi que C-10 et C-17 à C-19 qui représentent la partie décaline dans la structure des labdanes) (**Fig. 38** et **39**, **Tableau 2** (Annexe III.1.a, p 233)).

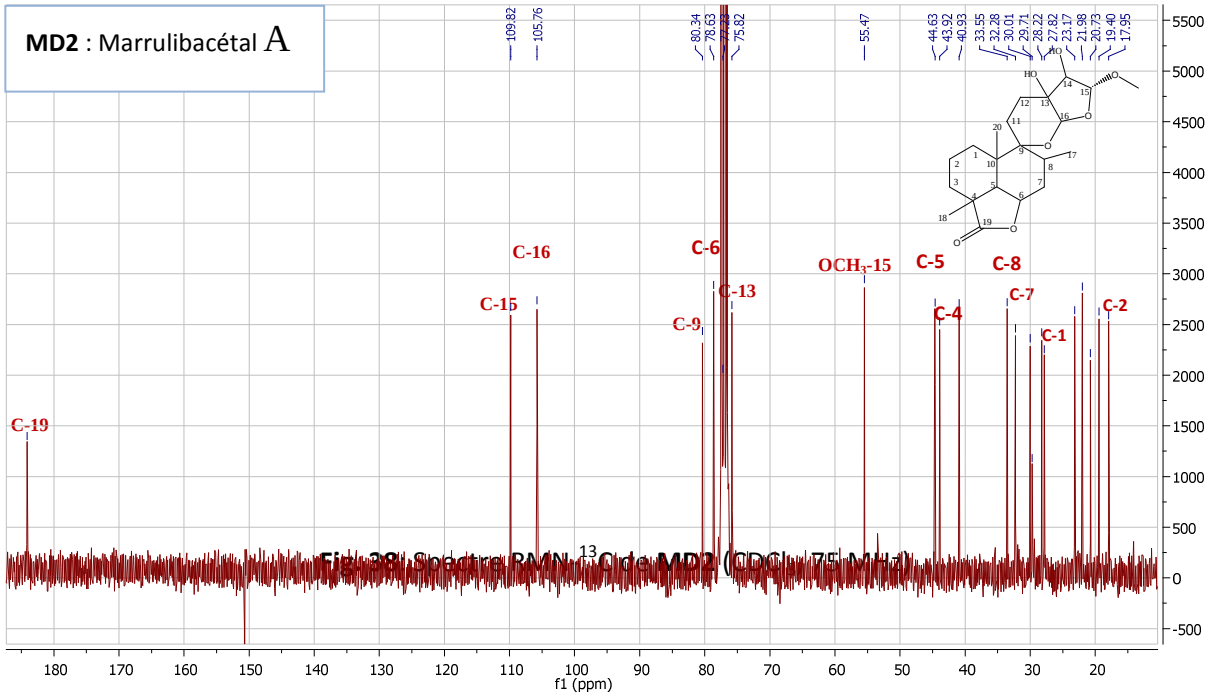


Fig. 38: Spectre RMN-^{13}C de **MD2** ($CDCl_3$, 75 MHz)

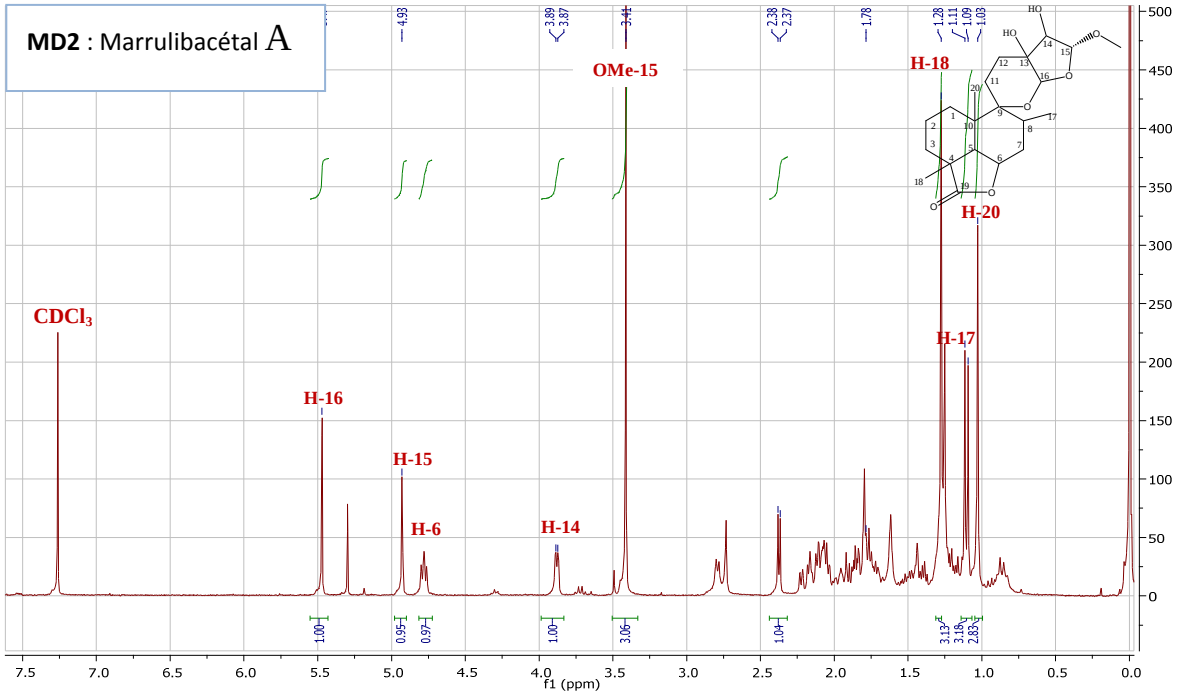


Fig. 39: Spectre RMN-^{1}H de **MD2** ($CDCl_3$, 300 MHz)

Le déplacement chimique du carbone 9 à 80,3 ppm indique la présence d'un noyau *spiro* avec 5 carbones, fermé par un groupement (9,16)-époxy. Ceci confirme la présence d'un noyau tetrahydrofurane, décrit pour la première fois par Rigano *et al.*, en 2009 dans *Marrubium globosum* ssp**.** *libanoticum* (Rigano *et al*., 2009).

L'existence des signaux suivants :

- un singulet à 5,47 ppm attribué à H-16 et son carbone à 105,7 ppm ;

- un doublet à 4,93 ppm attribué à H-15 et son carbone à 109,8 ppm ;

- un carbone quaternaire oxygéné à 75,8 ppm ;

- et un CH oxygéné à 3,88 ppm attribué à H-14 et son carbone à 78,6 ppm

confirme la présence de deux groupements acétals.

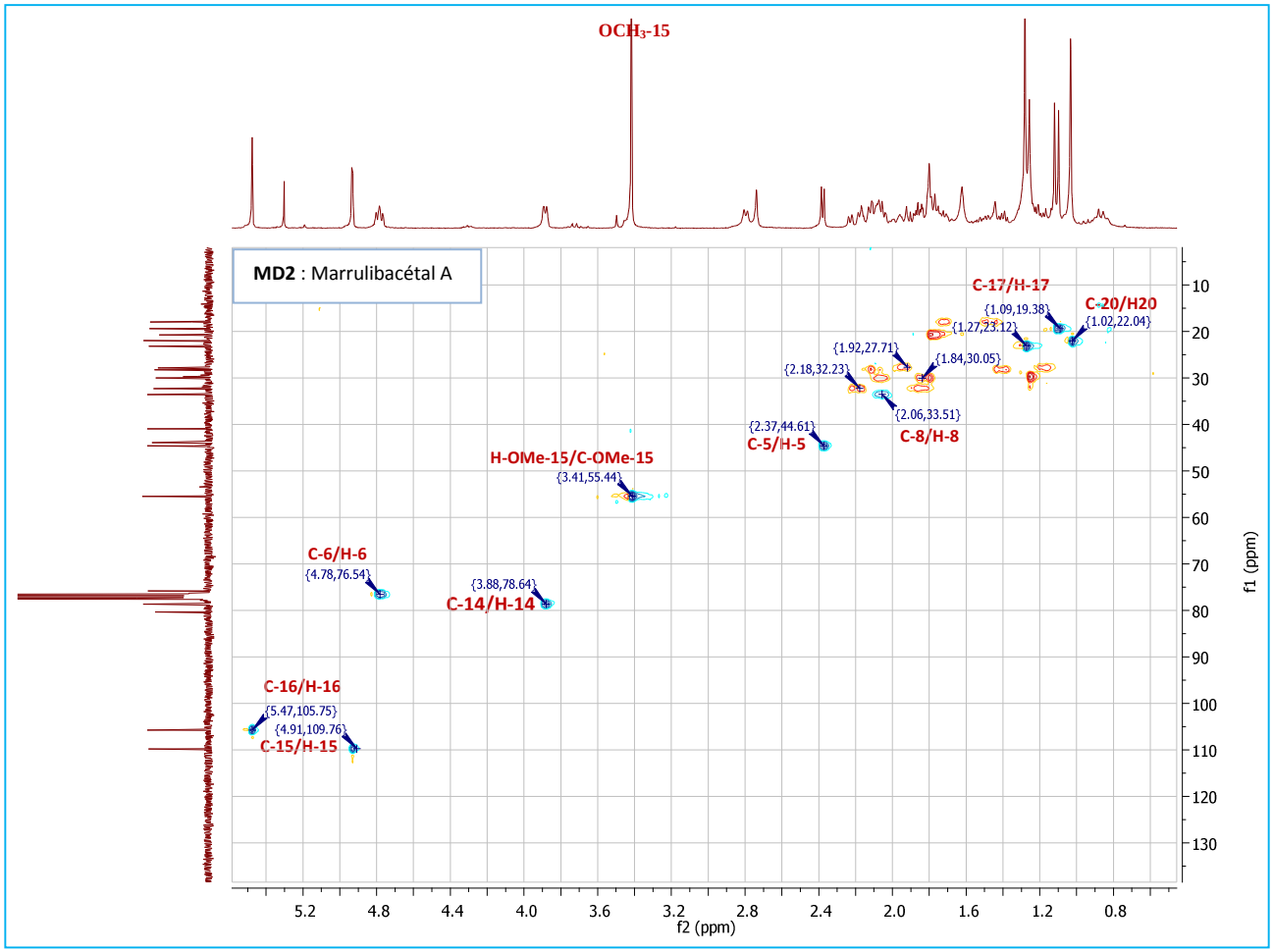
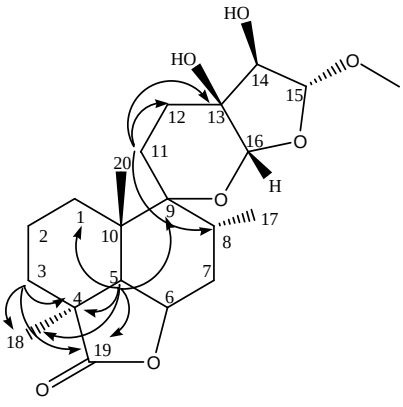


Fig. 40 : Spectre HSQC de **MD2** ($CDCl_3$, 300 MHz)



Par ailleurs, l'expérience HMBC montre, entre autres (**Fig.41 et 42**, **Tableau 2** (Annexe III.1.a, p 233)), des corrélations entre le proton H-11 (1,77 ppm) et C-12 (30,0 ppm), C-13 (75,8 ppm), et C-8 (33,5 ppm). Ces corrélations confirment la présence du cycle pyrane sur le carbone 9. Les corrélations entre H-16 et C-14/ C-15, H-12 et C-14, H-14 et C-12, H-15 et C-13 permettent quant à elles de justifier la position des substituants du cycle furane ainsi que sa jonction avec le cycle pyrane.

Fig. 41 : Corrélations HMBC du composé **MD2**

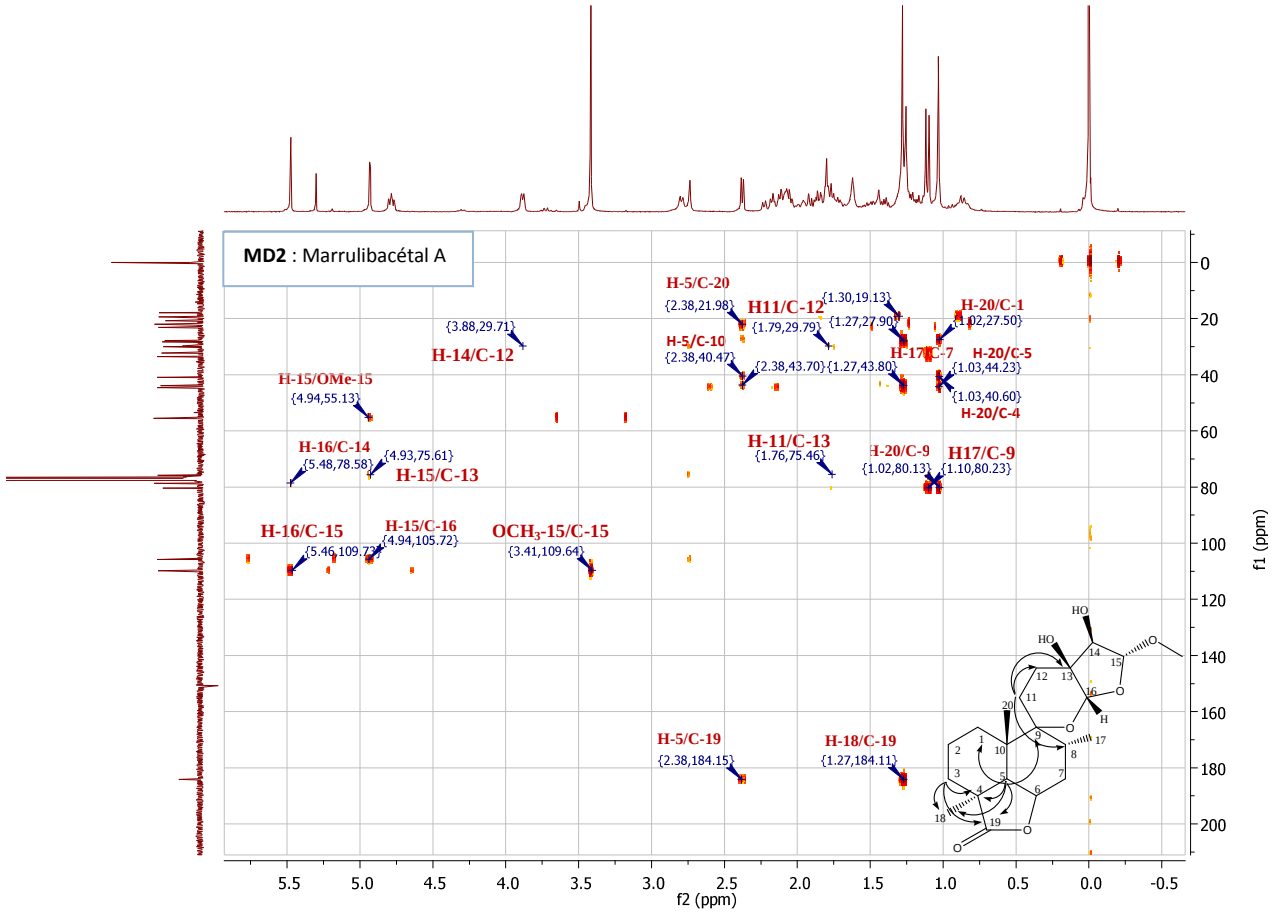
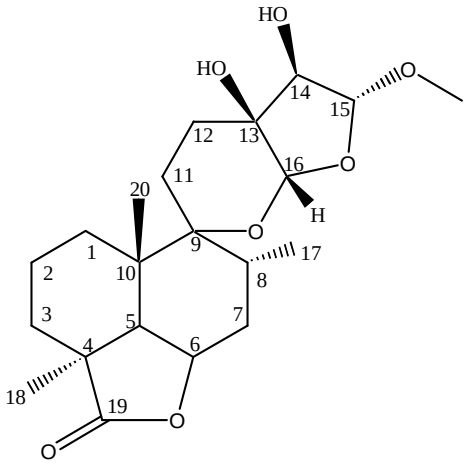


Fig. 42: Spectre HMBC de **MD2** ($CDCl_3$, 300 MHz)

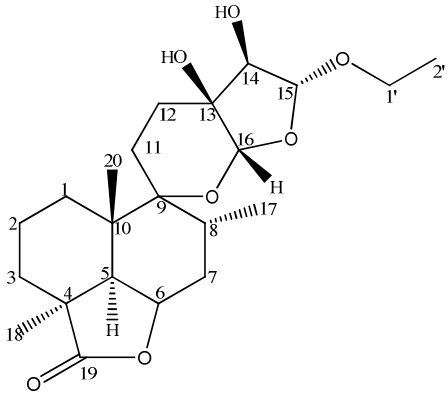
L'ensemble de ces éléments, ainsi que la littérature, a permis de conclure à l'identité du composé **MD2** comme étant le marrulibacétal A (Rigano *et al.*, 2009). Ce composé est décrit pour la première fois dans le règne végétal.



Marrulibacétal A

*III.1.1.3 Composé **MD3** : Marrulibacétal*

L'analyse du spectre de masse HR-ESI-MS révèle un ion pseudomoléculaire $[M+Na]^+$ à m/z 433,2169 uma, une masse molaire de 410 (m/z calc : 410.2304) correspondant à une formule brute de $C_{22}H_{34}O_7$. La différence de 14 uma entre la masse du composé **MD2** et celle de **MD3** suggère la présence d'un CH_2 supplémentaire. Ceci est confirmé, sur le spectre RMN-^{1}H, par la présence de deux signaux : le premier à 3,81 ppm (dq, *J* = 16,3 et 7,0 Hz) et le deuxième à 3,51 ppm (dq, *J* = 16,3 et 7,0 Hz) **(Tableau 3** (Annexe III.1.a, p234)**)**.



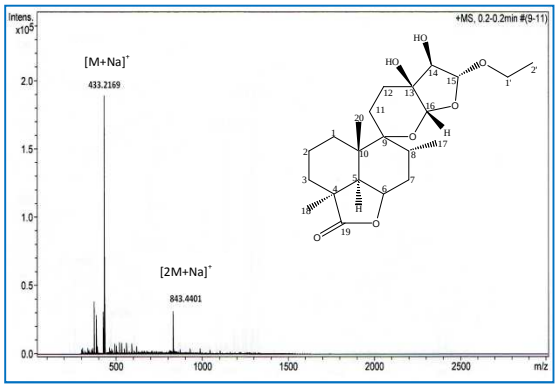


Fig. 43 : Spectre de masse HR-IE$^+$ de **MD3**

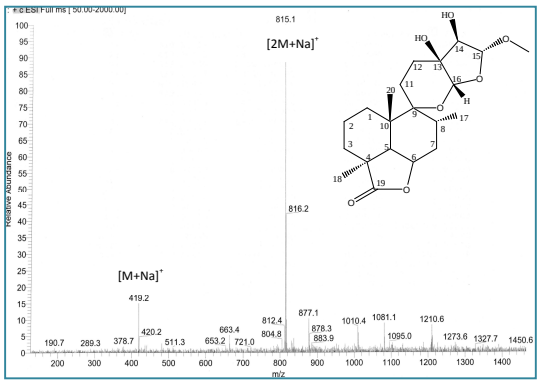


Fig. 44 : Spectre de masse HR-IE$^+$ de **MD2**

L'analyse des expériences HSQC et HMBC, et la comparaison des données de la littérature permettent d'identifier le composé **MD3** comme étant le (16*S*)-(9*R*-16*R*),(15-16*R*)-diepoxy-13,14-dihydroxy-15*R*-ethoxylabdan-6-(19)-olide. Cette molécule été isolée pour la première fois en 2009 par D. Rigano, de *Marrubium globosum ssp. Libanoticum et* a montré une importante activité antispasmodique exercée par ce composé qui est dû essentiellement à la présence de deux groupements acétals à C-16 et C-15 (Rigano *et al*., 2009).

*III.1.1.3 Composé **MD4** : Désertine*

Le spectre de masse haute résolution obtenu par impact électronique SM-HR-IE montre un ion pseudomoléculaire $[M+Na]^+$ à 451,2300 **(Fig. 45)** correspondant à une masse molaire de 428 g/mol (*m/z* calc : 428,2410) pour la formule brute $C_{22}H_{36}O_8$ et donc 5 insaturations. Par rapport a la formule

brute de la marrubiine $C_{20}H_{28}O_4$, un écart de 96 uma est observé et peut correspondre à un groupement $C_2H_8O_4$ (2 OCH_3 et 2 OH).

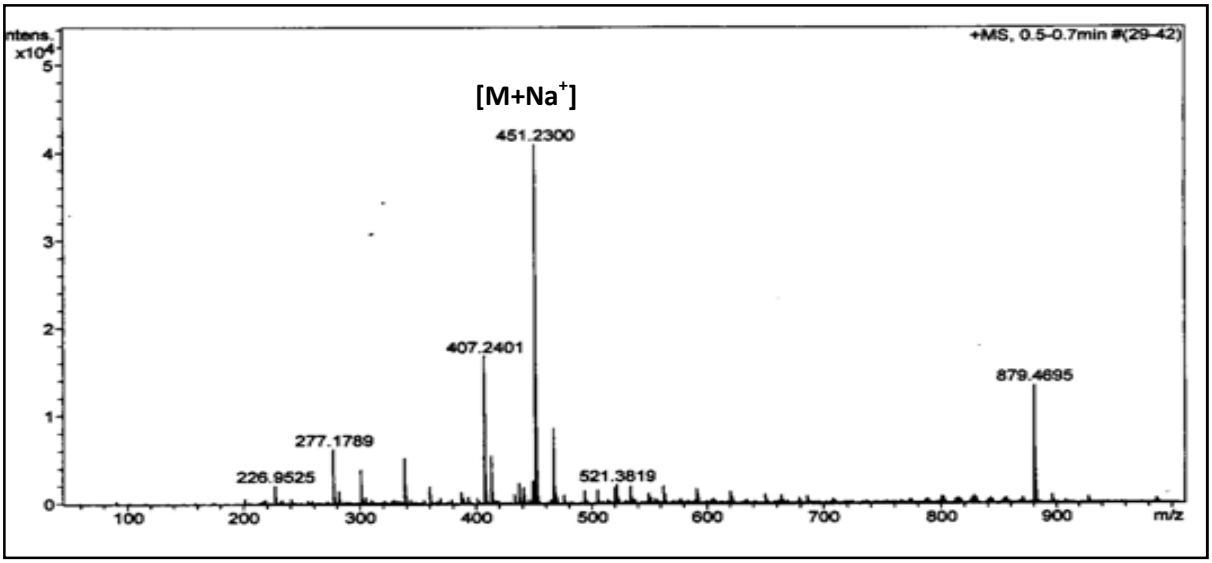


Fig. 45: Spectre de masse HR-IE en mode positif de **MD4** dans $CHCl_3$

De plus, par comparaison des spectres RMN ^1H avec la marrubiine **MD1** (**Fig. 46**), on observe que les signaux des protons H-1 à H-8 sont identiques. Ceci suggère la présence d'un noyau décaline avec trois singulets à 0,92; 1,28; 1,04 caractéristiques des méthyles 17, 18 et 20 respectivement.

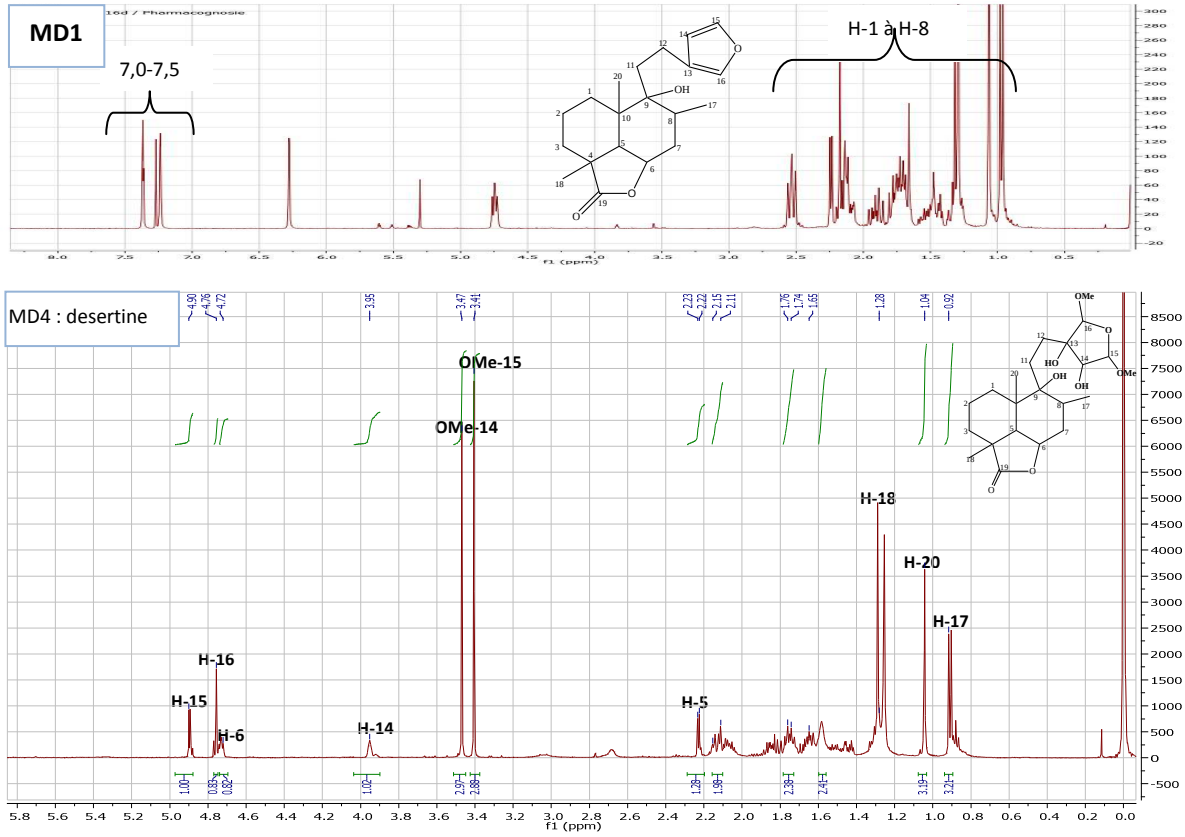


Fig. 46 : Spectre RMN-^1H de **MD4** ($CDCl_3$, 400 MHz)

L'analyse du spectre RMN-^{13}C permet d'identifier un pic à δ_C 183,9 ppm, caractéristique de C-19, lorsqu'il est impliqué dans une liaison de type lactone.

Le carbone quaternaire à δ_C 75,3 ppm identique à la valeur du C-9 de la marrubiine (**MD1**) signe l'absence d'un cycle furanique en *spiro* sur cette position.

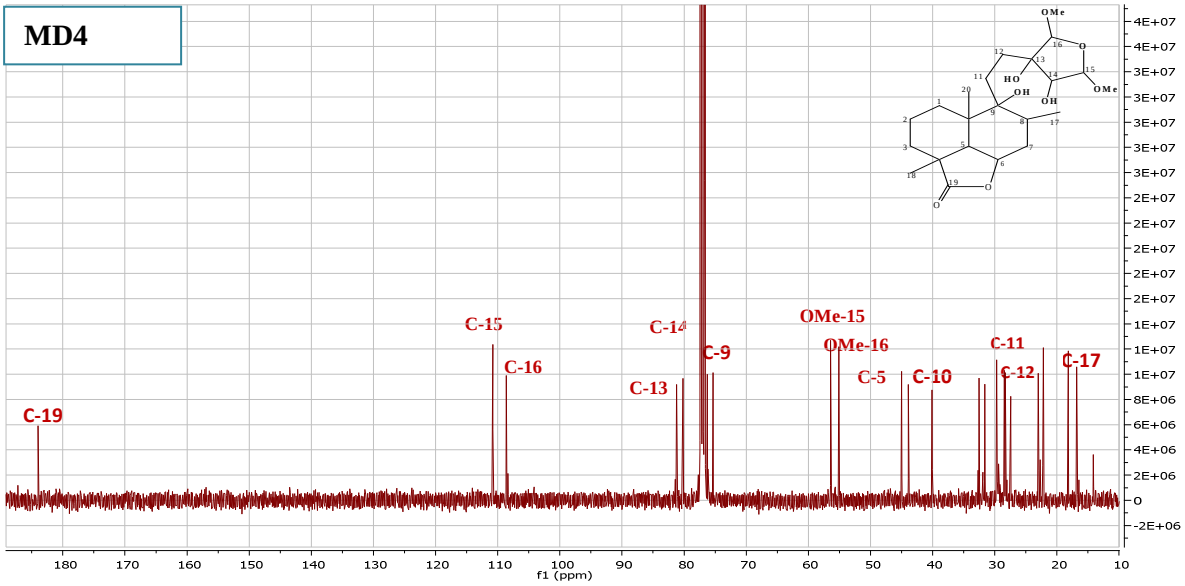


Fig. 47 : Spectre RMN-^{13}C de **MD4** ($CDCl_3$, 100 MHz)

Par ailleurs, **MD4** ne renferme aucun carbone éthylénique contrairement à **MD1**. Les signaux restant à attribuer correspondent à 2 CH_2, (29,7 (C-11), et 27.4 (C-12)), un carbone quaternaire C-OR (81.2 (C-13)) et trois CH-OR (80.2 (C-14), 110.8 (C-15), 108.6 (C-16)).

Les corrélations HMBC **(Tableau 4** (Annexe III.1.a, p 235)**)** ont permis de les attribuer sans ambigüité et d'émettre l'hypothèse d'une structure (formule ci-contre).

L'analyse des corrélations NOESY (**Fig. 48**) a permis de compléter cette hypothèse avec quelques informations sur la stéréochimie, comme montré ci-dessous.

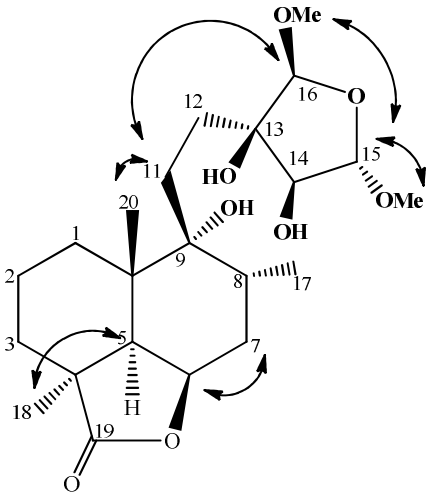


Tableau 16 : Effets NOESY observés pour **MD4**

n° ^{1}H	Effets NOESY observés avec les protons :
6	5, 7α, 18
12	17, 20, 16
14	1α, 16, OMe-15
16	14, OMe-15, H-12α
18	5, 6
20	2β, 8, 11

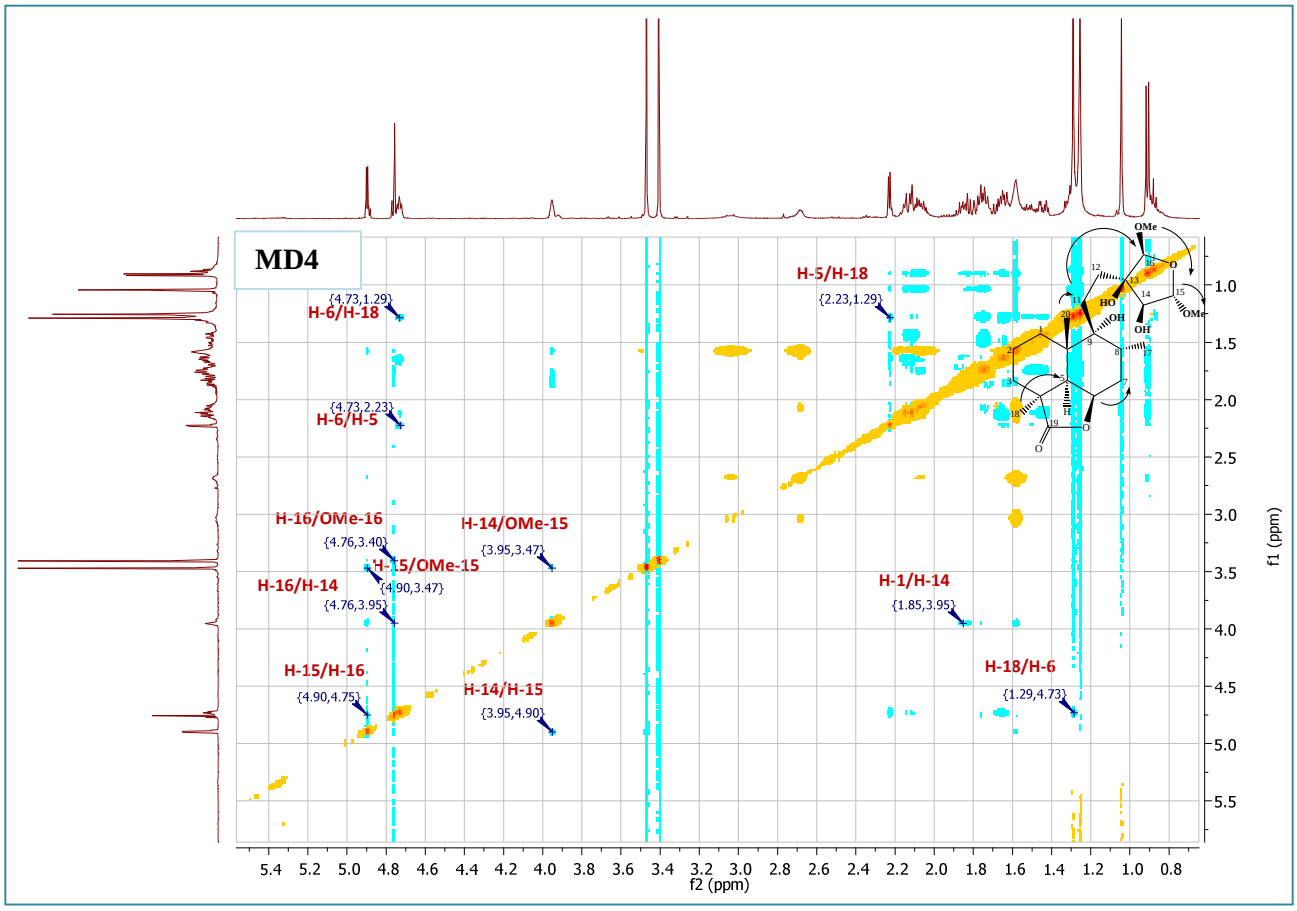
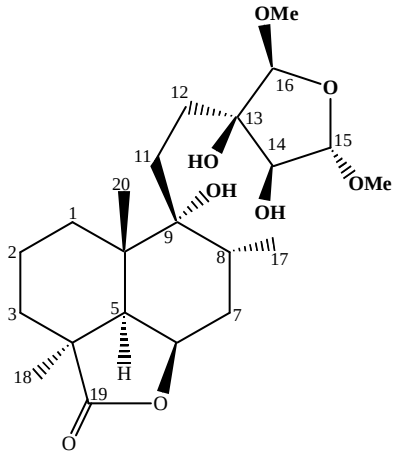


Fig. 48 : Spectre NOESY de **MD4** ($CDCl_3$, 500 MHz)

Ainsi cette molécule a été identifiée au 9α,13β, 14β-trihydroxy-15α, 16β dimetoxy15,16-epoxylabdane-6β, 19-olide, ou encore la désertine. Elle est originale dans le règne végétal.



9a,13b,14b-trihydroxy-15a, 16b-diméthoxy-15, 16-époxylabdane, 6b, 19 olide

ou Désertine

*III.1.1.4 Composés **MD5a** et **MD5b :** 9,13-époxy-7-hydroxylabdan-6, 19 ; 15,16-diolide et 9,13-époxy-7, 14-dihydroxylabdan-6, 19 ;15,16-diolide*

Le spectre RMN-^{13}C de **MD5** compte 20 signaux, montrant là encore la présence d'un noyau diterpénique de type labdane avec les signaux caractérisant la décaline et le cycle lactonique contenant C-19 (de 17,4 à 183,9 ppm) **(Tableau 5** (Annexe III.1.a, P 236)**)**. Les spectres RMN-^{1}H du composé **MD5** révèle un mélange de deux composés avec le rapport (1:2) (**Fig. 49 a et 49 b**). Nous observons néanmoins, les signaux des trois méthyles sont aisément repérés à *δ* 0.90 (C-17, d), *δ* 1,28 (C-18, s), *δ* 1,06 (C-20, s), dont deux méthyles angulaires **(Fig. 49a et 49b).**

Les signaux supplémentaires de ceux de la décaline seront attribués à un chaînon comportant 6 carbones dont 3 ou 4 CH_2, 0 ou 1 CH et 2 C quaternaires.

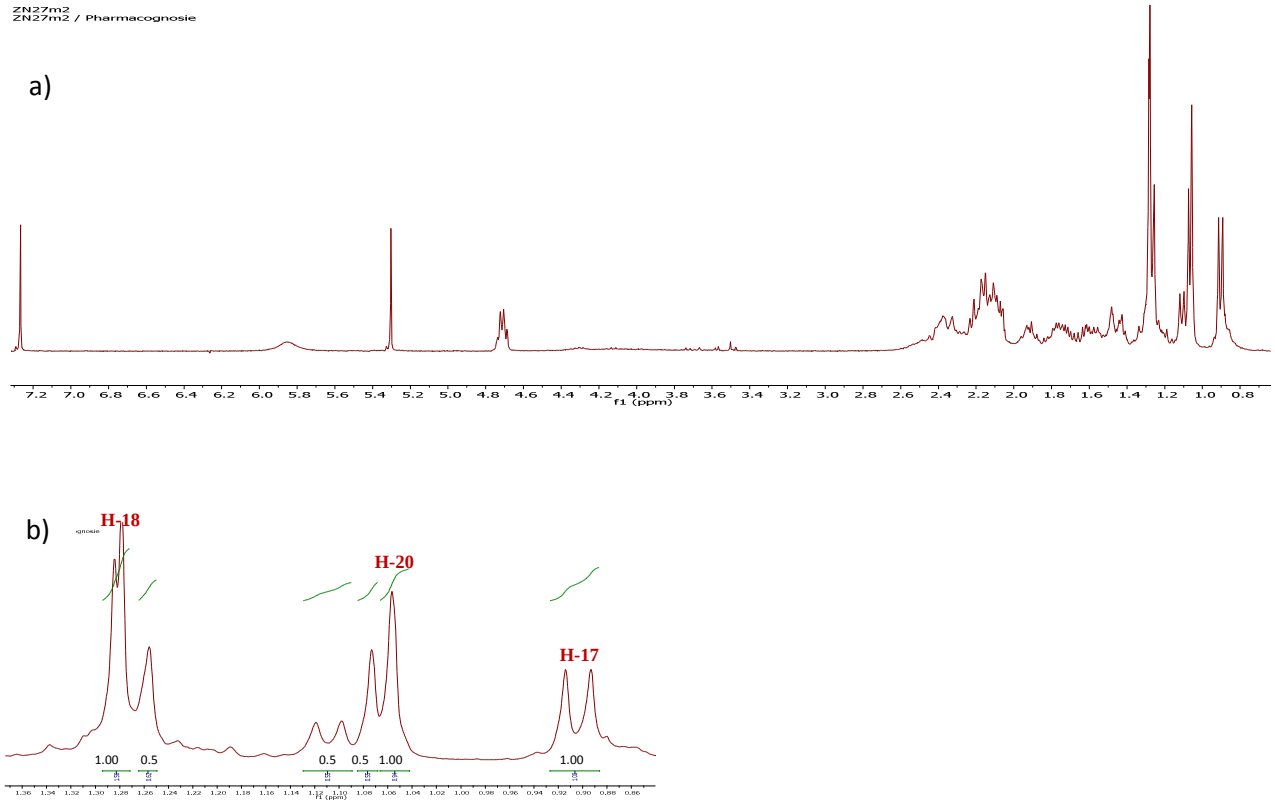


Fig. 49 : a) Spectre RMN-^{1}H de **MD5** ($CDCl_3$, 300 MHz) ; b) agrandissement de la zone des méthyles

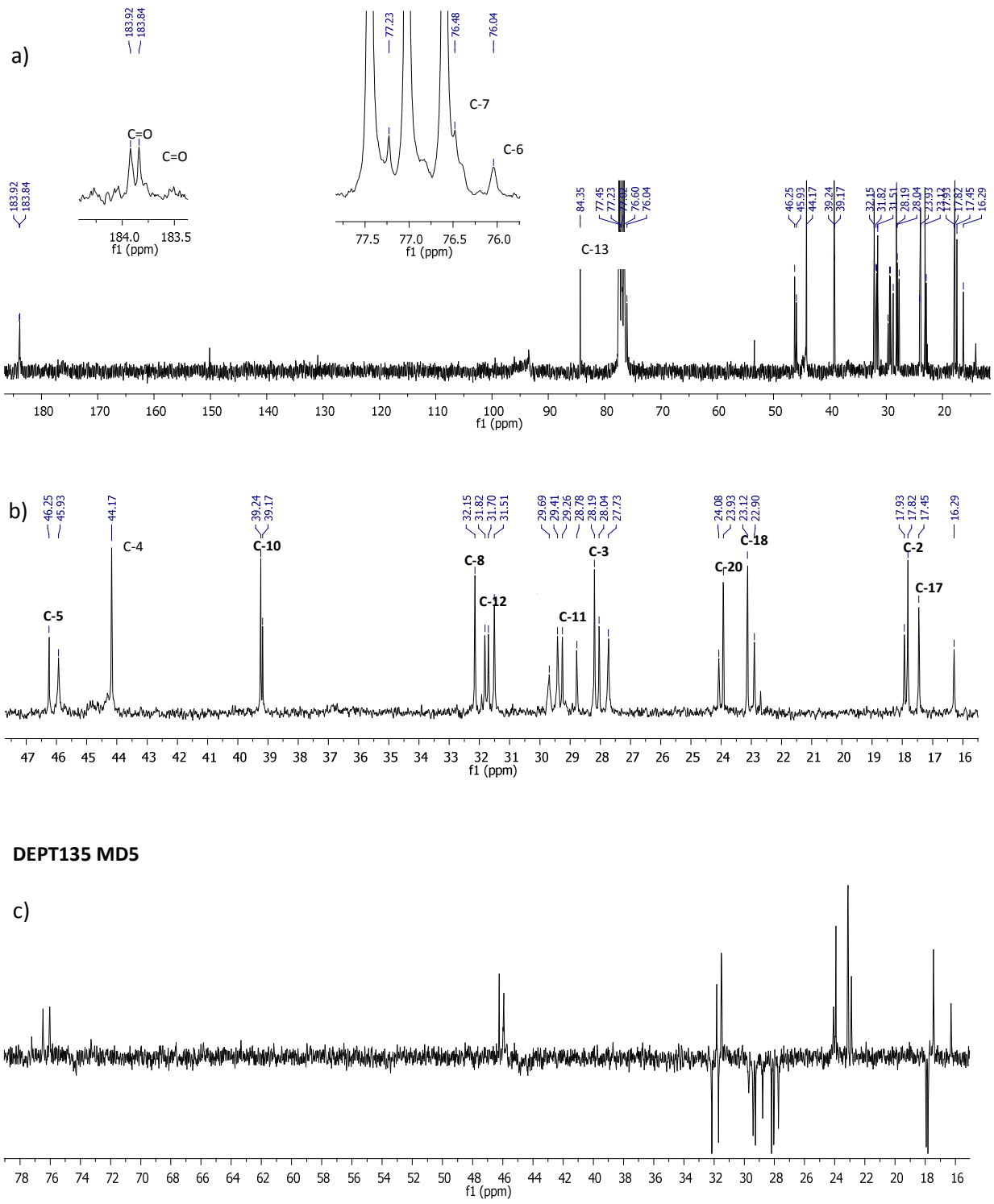


Fig. 50 : a, b) Spectres RMN-^{13}C et agrandissements de **MD5** ($CDCl_3$, 75 MHz) ; c) Spectre DEPT 135 de **MD5**

Le mélange remarque est confirmé sur les spectres ^{13}C (**Fig. 50a et 50b)** où on dénombre plus de 20 carbones dont un certain nombre de pics sont de plus faible intensité.

L'analyse des spectres 2D s'est d'abord portée sur les signaux majoritaires, afin d'identifier le composé **MD5a**. Les corrélations HSQC **(Fig. 52)** permettent d'attribuer de façon précise les carbones aux protons, en parallèle avec le spectre DEPT 135. Les données sont regroupées dans **le Tableau 5** (Annexe-III.1.a, p 236). Les signaux minoritaires correspondent à la deuxième molécule **MD5b** dans lequel le carbone 14 est lié à un OH d'après les corrélations HSQC et HMBC (**Fig. 52, Fig. 53**).

Le spectre de masse confirme la présence des deux molécules dans le mélange. En effet, nous observons deux pics pseudomoléculaires à m/z= 364,9 qui correspond à $[M+H]^+$ et m/z= 419,0 ce dernier pic correspond à $[M'+K]^+$. La différence entre les deux masses (M-M') suggère la présence d'un OH supplémentaire dans **MD5b**.

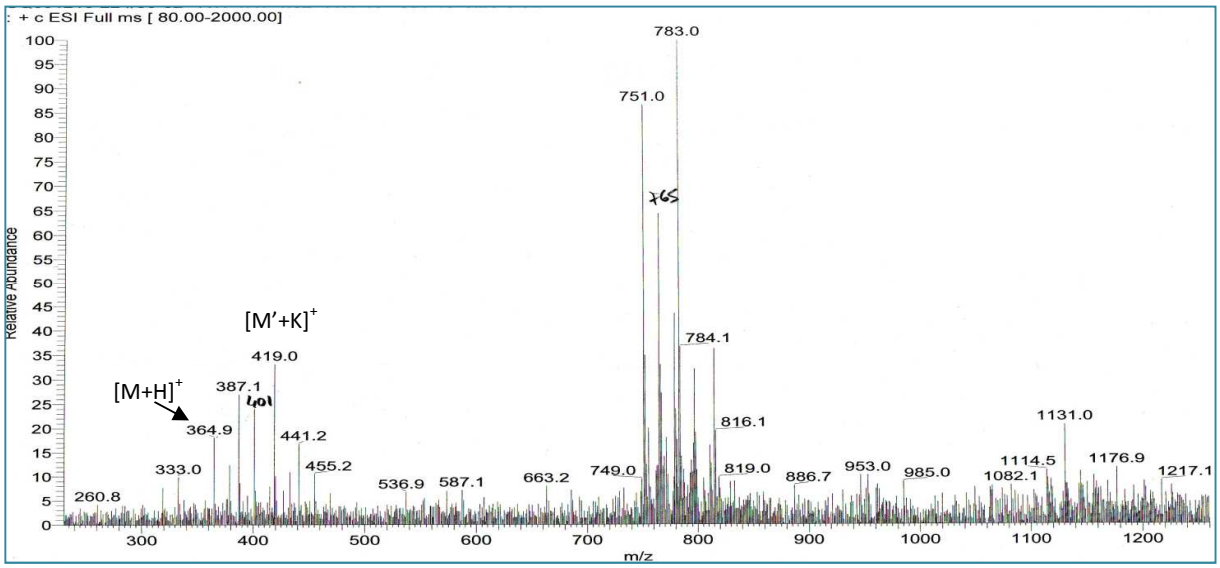


Fig.51 : Spectre de masse HR-ESI en mode positif du composé **MD5a et MD5b** dans $CHCl_3$

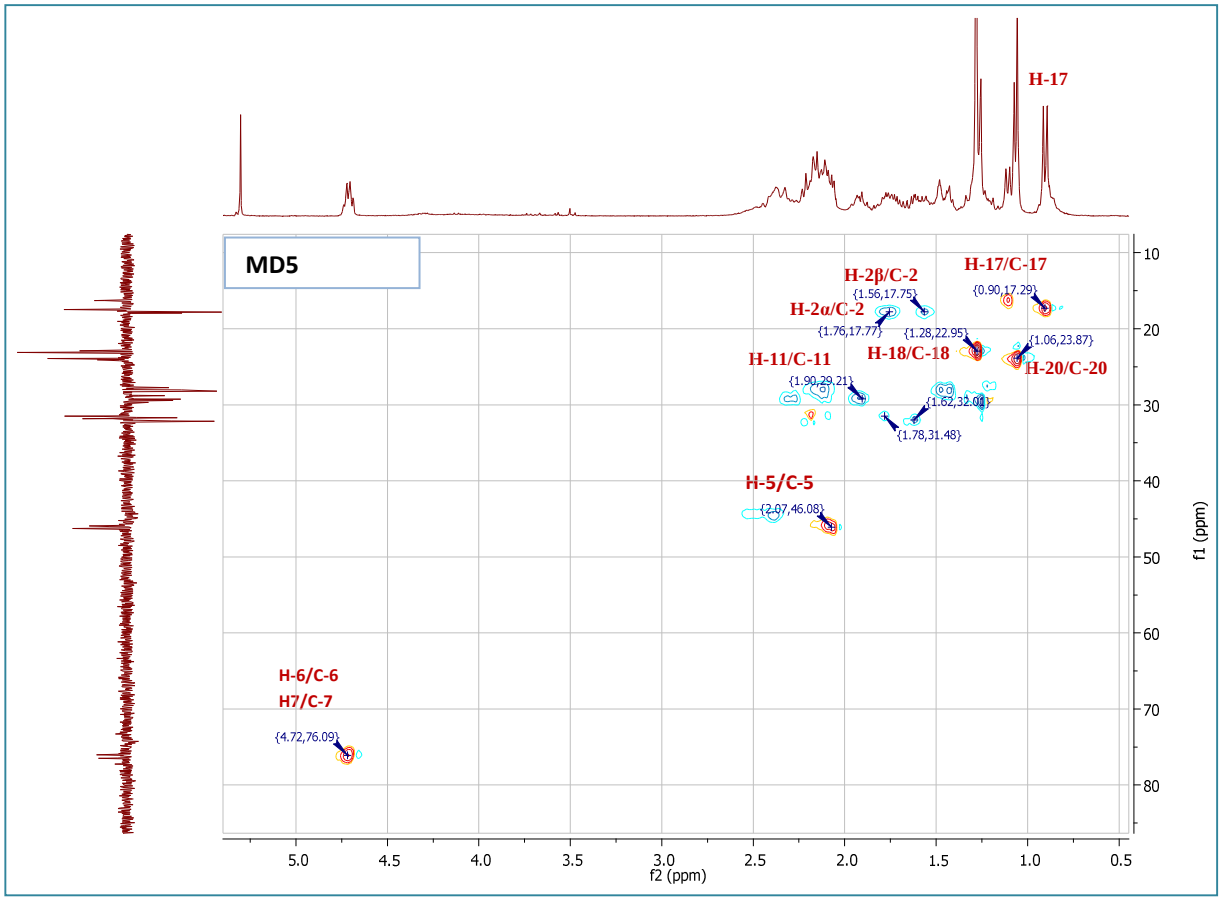
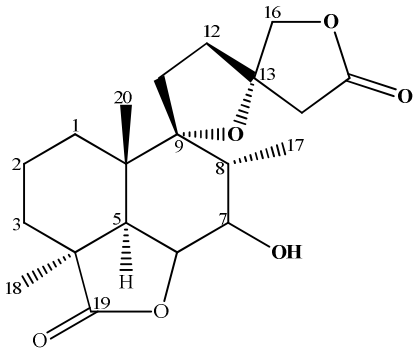


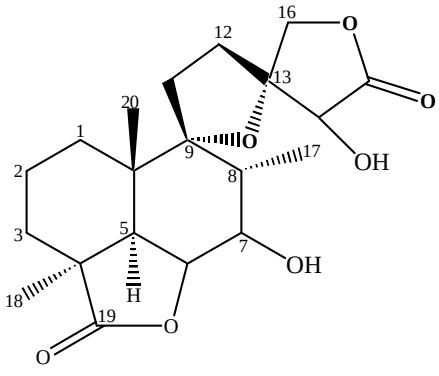
Fig. 52: Spectres HSQC de **MD5** ($CDCl_3$, 300 MHz)

Ces deux molécules sont le 9,13-époxy-7-hydroxylabdan-6, 19 ; 15,16-diolide et le 9,13-époxy-7, 14-dihydroxylabdan-6, 19 ; 15, 16-diolide. Il s'agit de deux nouvelles structures.



MD5a

9,13-époxy-7-hydroxylabdan-6, 19 ; 15,16-diolide



MD5b

9,13-époxy-7, 14-dihydroxylabdan-6, 19 ;15,16-diolide

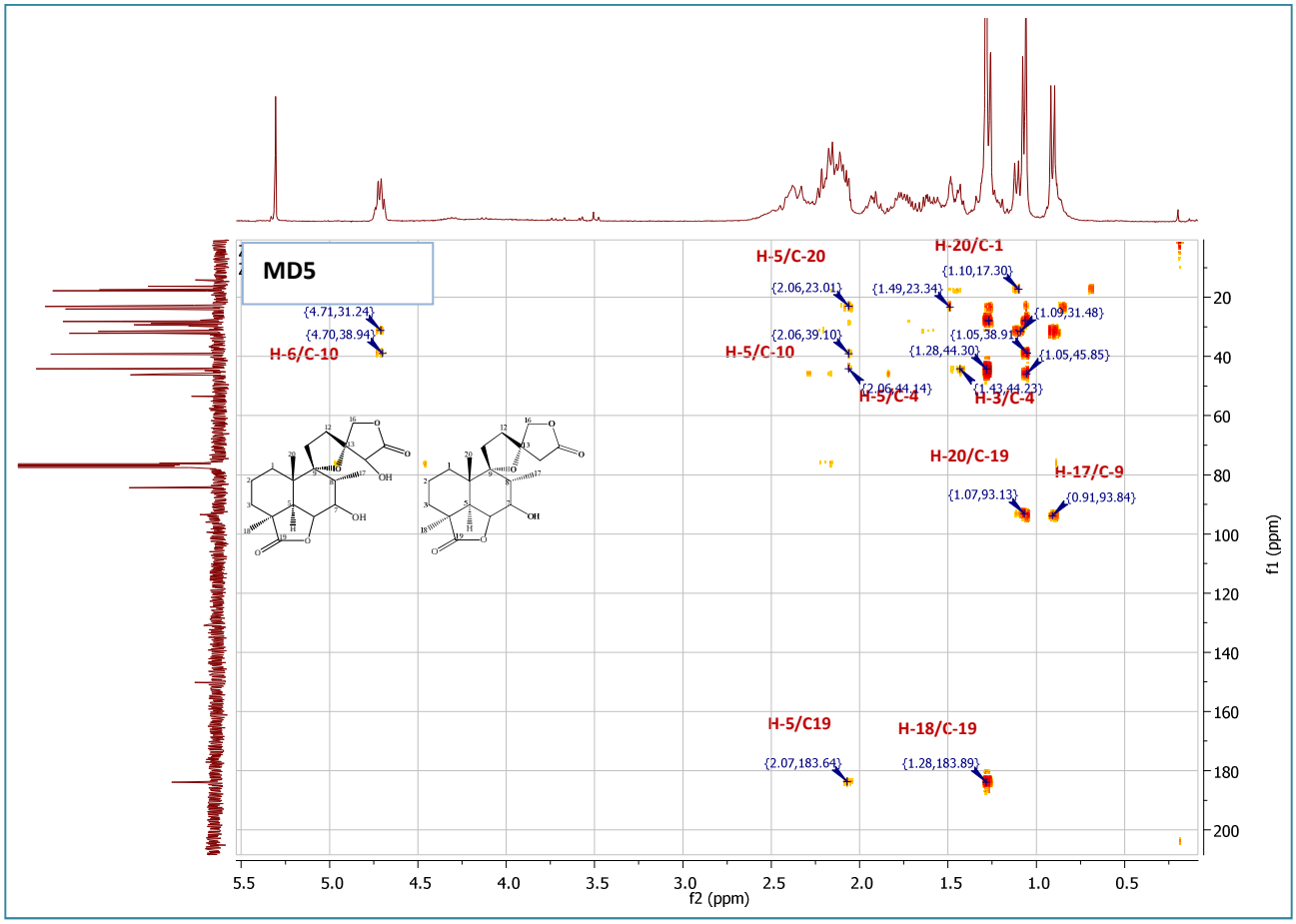


Fig.53 : Spectres HMBC de **MD5** ($CDCl_3$, 300 MHz)

*III.1.1.5 Composé **MD6:** Marrulactone*

Le composé **MD6** a été isolé également sous la forme d'une poudre blanche amorphe. Le spectre de masse en impact électronique, montre un ion pseudo-moléculaire à *m/z* 329,1723 $[M+Na]^+$ correspondant à la formule brute $C_{18}H_{26}O_4$ (m/z calc : 306,1831).

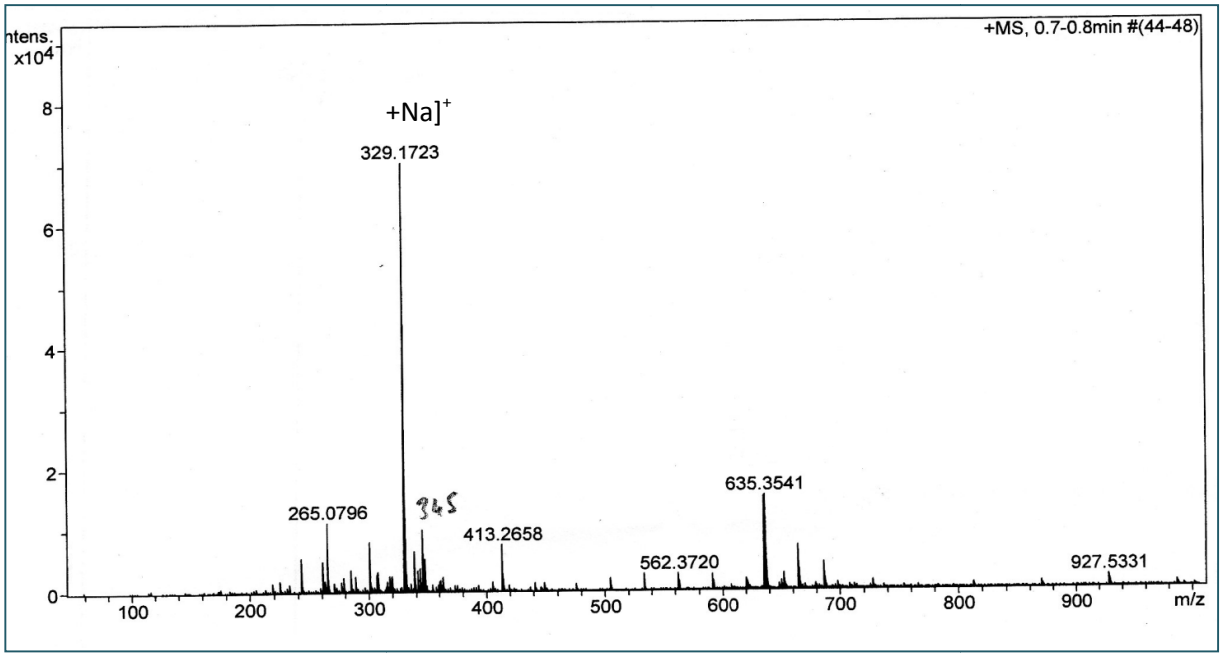


Fig. 54 : Spectre de masse HR- ISE en mode positif de **MD6** dans $CHCl_3$

Les spectres RMN-^{1}H et ^{13}C, plus simples que ceux dont nous venons de parler, montrent cependant des signaux communs à ceux des composés **MD2** et **MD3** correspondant à la présence du noyau labdane avec la partie décaline et la lactone impliquant C-19 **(Tableau 6** (Annexe-III.1.a, p 237)**)**, (**Fig. 55 et 56).**

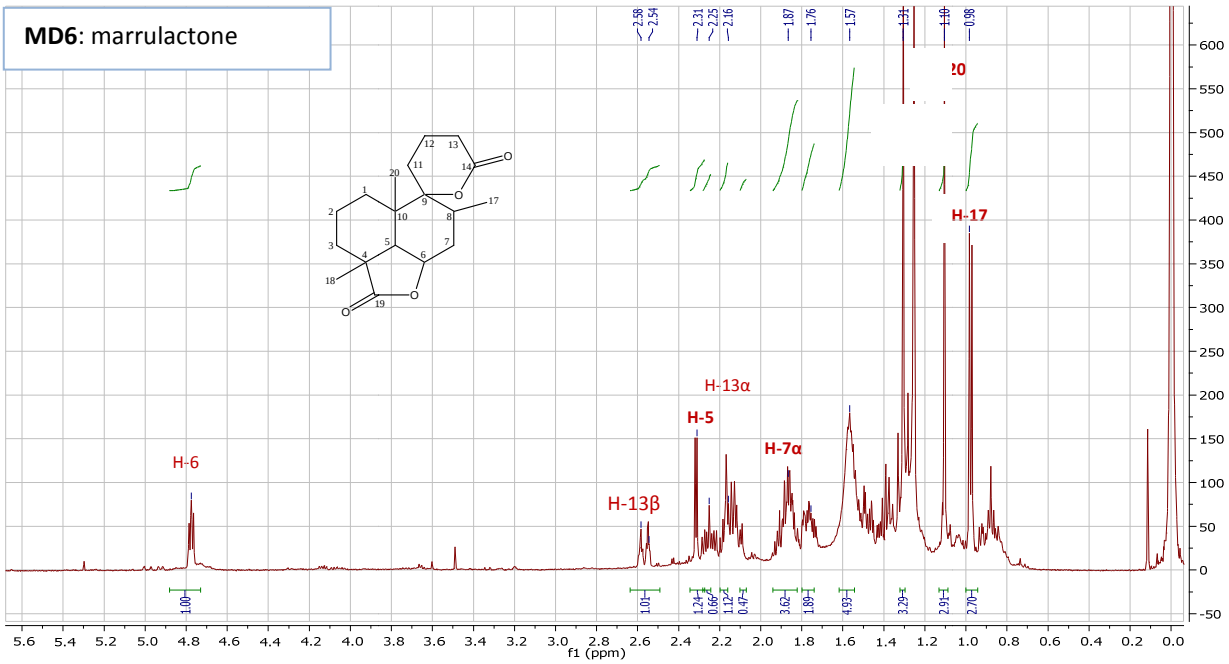


Fig. 55 : Spectres RMN-^{1}H de **MD6** ($CDCl_3$, 125 MHz)

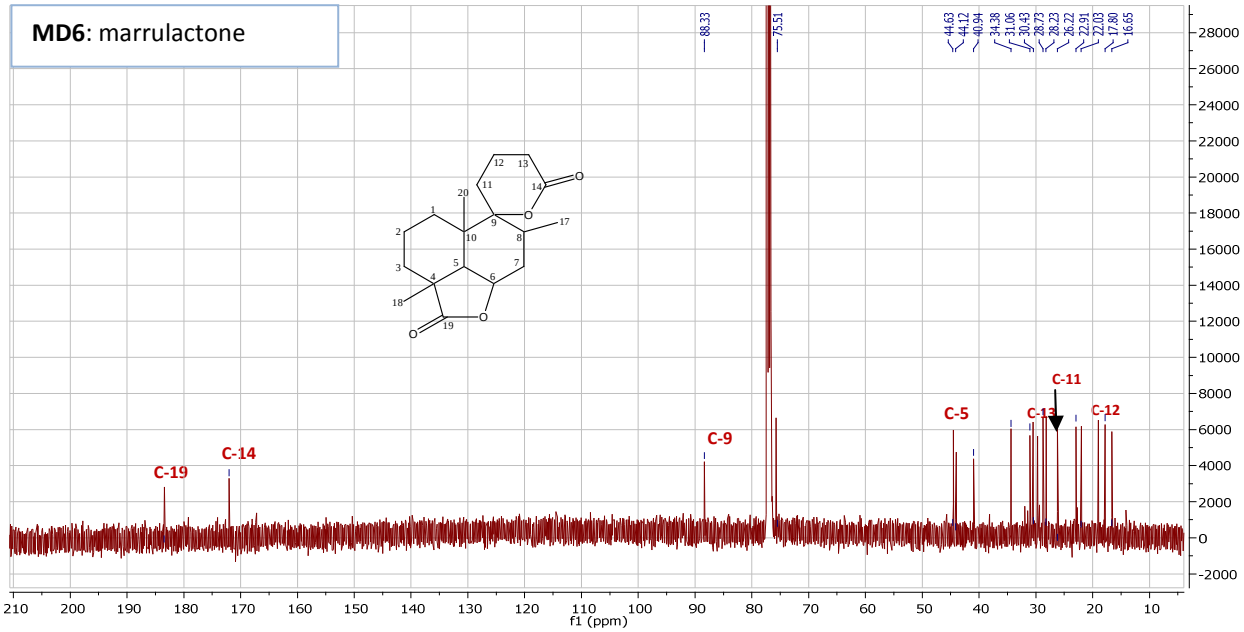


Fig. 56 : Spectres RMN-^{13}C de **MD6** ($CDCl_3$, 500 MHz)

Par ailleurs, le déplacement chimique du carbone C-9 (88,3 ppm) suggère, selon la littérature, que ce carbone oxygéné est impliqué dans une structure cyclique (Piozzi *et al*., 2006). Ce cycle est représenté par les signaux de 4 carbones : 3 CH_2 (δ 26,2, C-11 ; δ 19,0 C-12 ; δ 30,4, C-13), et un carbonyl (lactone) (δ 172,0, C-14).

Les corrélations HMBC (**Fig. 57**) observées entre le proton H-13 (2,25) et C-12 (19,0), le proton H-13 (2,25ppm) et C-14 (172,0), le proton H-9 et C-11 confirment la position du cycle pyrane.

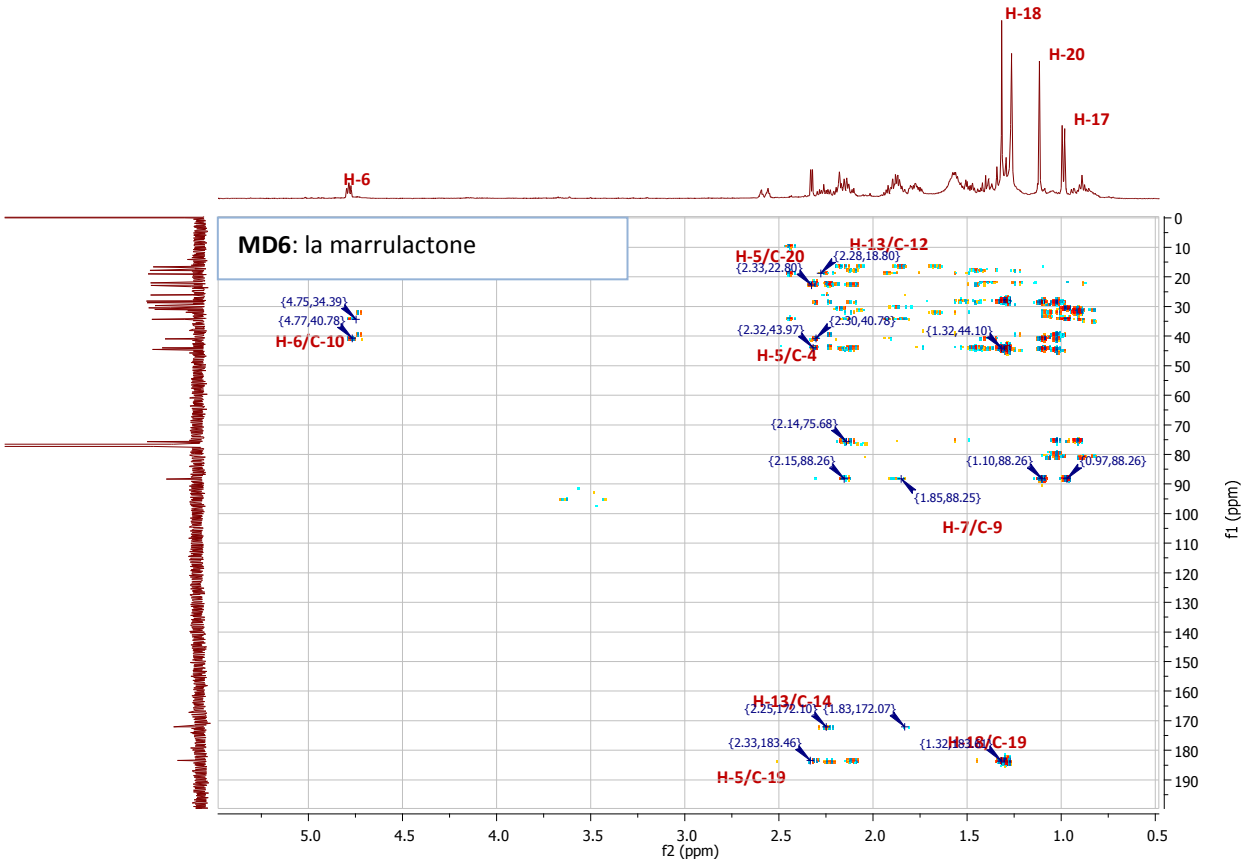


Fig. 57: Spectres HMBC de **MD6** ($CDCl_3$, 500 MHz)

Ces différentes informations nous permettent de proposer que **MD6** est la marrulactone. Ce composé est cité une seule fois, par Rigano *et coll.* (2009), et a été isolé de *Marrubium globosum* ssp. *libanoticum.* La comparaison des données RMN, SM a confirmé l'hypothèse de structure émise. **(Tableau 6** (Annexe III.1.a, p 237)**)**.

La stéréochimie relative déterminée grâce aux effets NOESY est présentée dans le tableau, la structure suivante ainsi que la (**Fig. 58**).

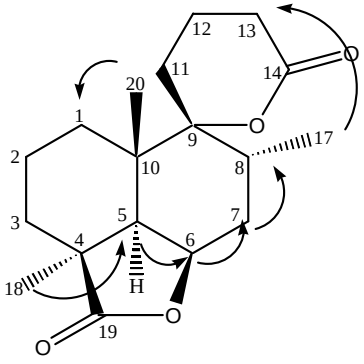


Tableau 17 : Effets NOESY du composé **MD6**

n° ^{1}H	**Effets NOESY observés avec les protons**
5	18, 6, 1, 2
6	5, 7, 18
7	20, 17, 6
8	7β
13	17, 7
20	1

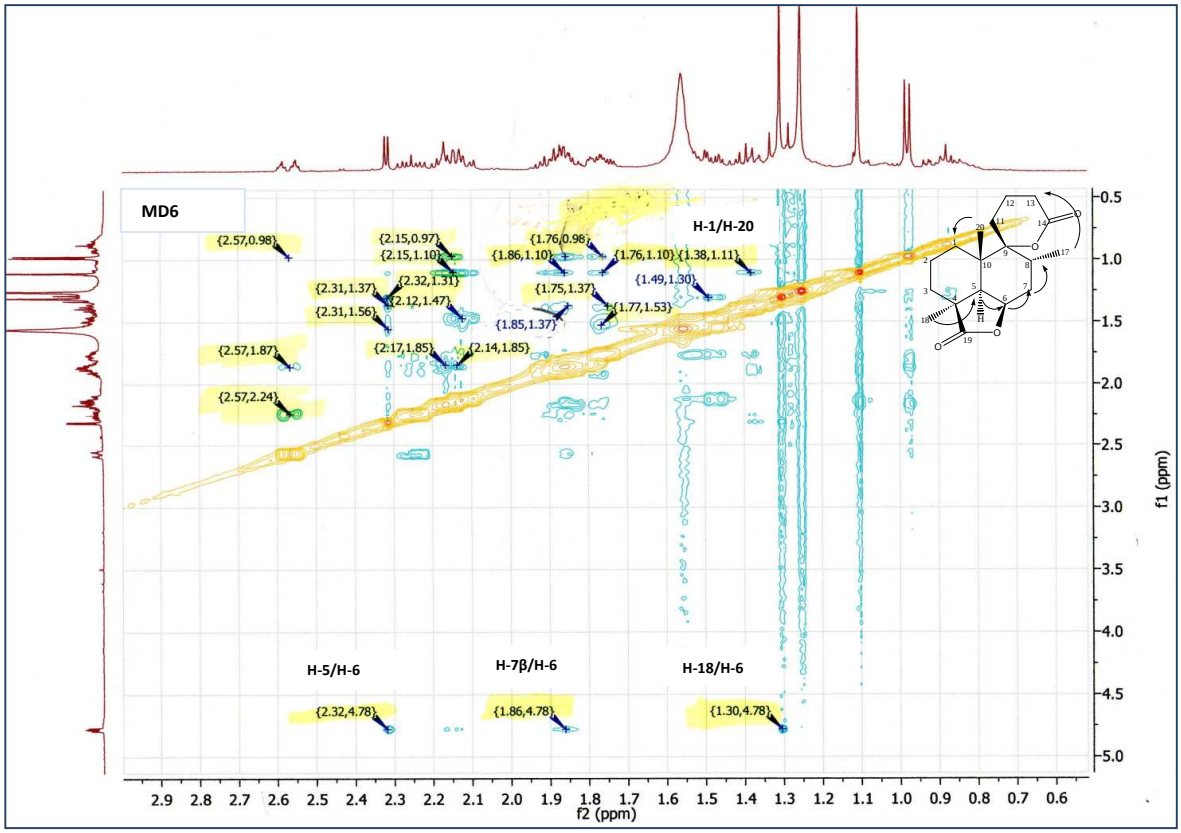


Fig. 58: Spectres NOESY de **MD6** ($CDCl_3$, 500 MHz)

*III.1.1.6 Composé **MD8** : Cyllénine A et 15-épi-cylléline A*

Les spectres RMN-^{1}H et ^{13}C (**Fig. 59, Fig. 60**) du composé **MD8**, montre des signaux qui apparaissent dédoublés. Ce phénomène suggère la présence de deux stéréo-isomères en mélange racémique, non séparables par les méthodes chromatographiques les plus fréquemment utilisées et apparaissent donc sous la forme d'une seule tache sur CCM.

Une comparaison avec les données spectrales du composé **MD1**, la marrubiine, montre que la structure du composé **MD8** est très proche**,** renfermant deux cycles saturés à six atomes la décaline rattachés à un cycle lactonique à cinq sommets ; le tout formant le noyau labdane.

La différence par rapport à la marrubiine est la disparition d'une part de signaux du carbone oléfiniques (C-13, C-16, C-14, et C-15 à 125,0, 138,5, 110,7, 143,1 ppm respectivement) ce qui exclut la présence d'un furane. Par contre, les signaux supplémentaires de la décaline rappellent deux noyaux *spiro*, dont l'un est fixé sur la décaline au niveau du carbone C-9 (92,4) et l'autre fixé au premier sur le carbone C-13 (90,1). Le déplacement chimique du C-9 est en accord avec la littérature pour ce type de structure (Karioti., 2005 ; Rigano *et al*., 2006, Piozzi *et al*., 2006).

L'existence, enfin des signaux de deux cycles époxy est repérée grâce aux signaux des carbones C-11 à C-16 (C-11 résonant à 29,2 ppm ; C-12 à 34,5 ppm; C-13 à 90,1 ppm ; C-14 à 46,2 ; et C-15 à 99,3 ppm et C-16 à 77,4 ppm) et d'un signal à 92,4 correspondant au carbone C-9 caractéristique d'un cycle *spiro* éther fermé en 9.

L'attribution de tous les signaux ^{13}C et ^{1}H peut donc être réalisée par comparaison avec les valeurs trouvées dans la littérature **(Tableau 8 (**Annexe III.1.a, p 239**))** et les expériences HSQC et HMBC permettent de confirmer toutes les attributions réalisées.

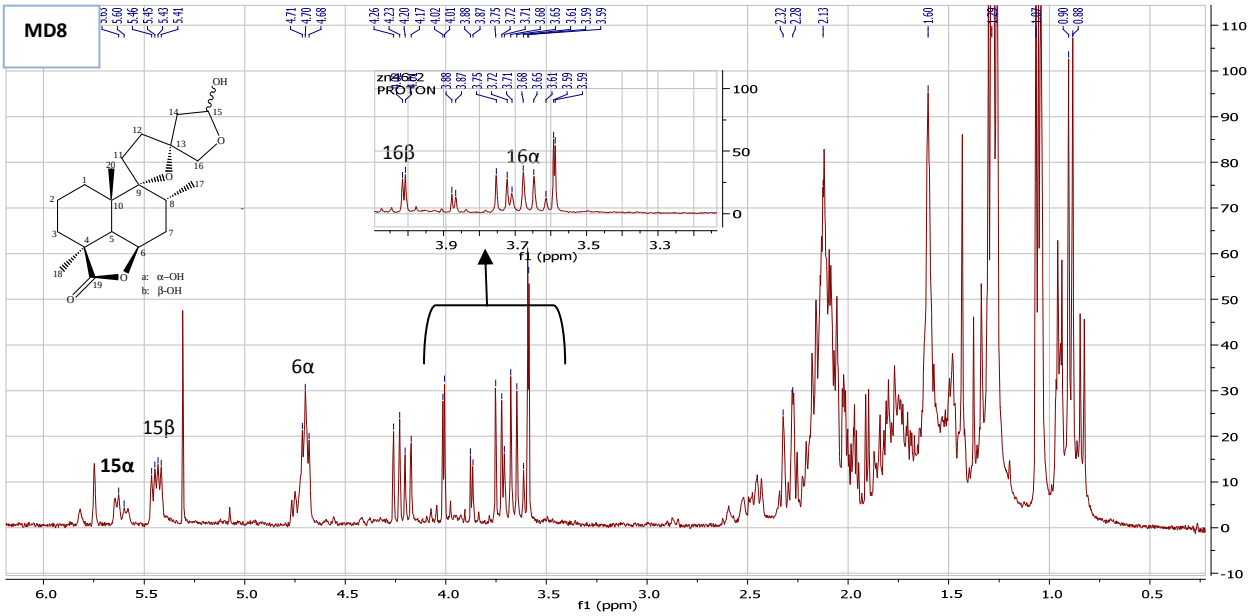


Fig. 59 : Spectres RMN-^{1}H de **MD8** ($CDCl_3$, 500 MHz)

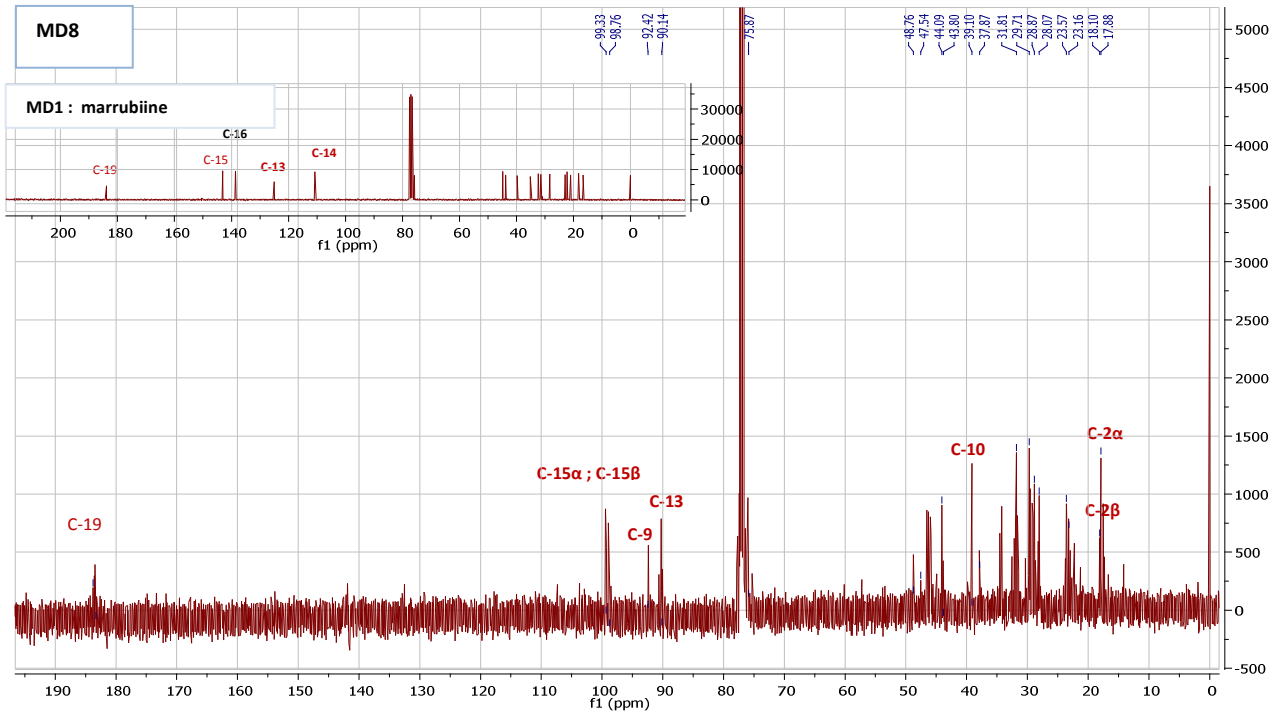
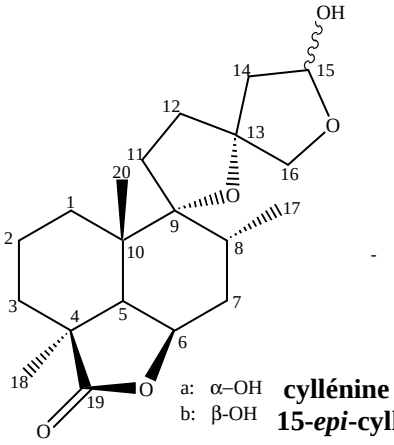


Fig. 60 : Spectres RMN-^{13}C de **MD8** ($CDCl_3$, 500 MHz)

La structure du composé **MD8** est ainsi établie comme le 9, 13 ; 15,16-diépoxylabdan-15-hydroxy-6, 19-olide. Ce diterpène a été isolé pour la première fois de *Marrubium vulgare* en 1968 (Fulke, 1968). Plus récemment Karioti a isolé cette molécule de *Marrubium cylleneum*, et ont établi la stéréochimie des deux isoméres en C-15 à l'aide de l'expérience ROESY (les autres centres étant identiques à ceux de la marrubiine). Ces composés ont été alors nommés Cyllénine A et 15-épi-cyllénine A (Karioti, 2005).

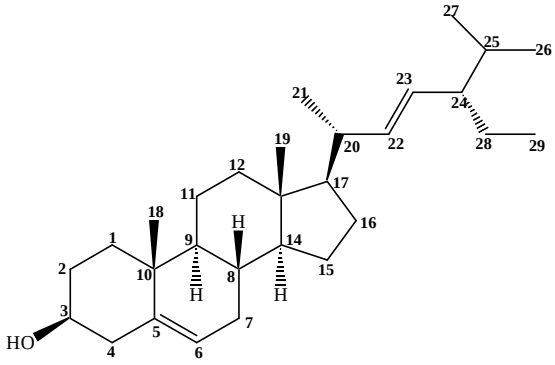


cyllénine A
15-*epi*-cyllénine A

Ce composé a montré lors de tests de cytotoxicité, un effet significatif vis-à-vis les cellules cancéreuses leucémiques (Karioti, 2007). Par ailleurs, la molécule ne présente aucune activité antispasmodique, cela est dû à la configuration R du C-13 du noyau *spiro* (Rigano *et al*., 2009).

III.1.2 Les stérols

*III.1.2.1 Composé **MD7** : Stigmastérol*



Ce composé a été identifié au stigmastérol par comparaison avec un échantillon témoin sur CCM. Après purification, les données RMN ^{1}H et ^{13}C en apportent la confirmation (Jamal *et al*., 2009 ; Marsan, 1996) **(Tableau 7** (Annexe III.1.a, p238)**)**.

Ce métabolite secondaire est communément isolé des plantes. Le rôle des stérols dans les plantes est équivalent à celui du cholestérol chez l'homme. Il s'agit de maintenir la structure et de garantir le bon fonctionnement de la membrane cellulaire. Chez l'homme, le bêta-sitostérol réduit notamment le taux de cholestérol dans le sang (Wong *et al*., 2001). Il a été également évalué dans le traitement de l'hyperplasie bénigne de la prostate (Klippel, 1997). Dans ces études cliniques il a

montré une amélioration significative et persistante dans le temps, des fonctions urinaires chez les patients ayant eu le traitement.

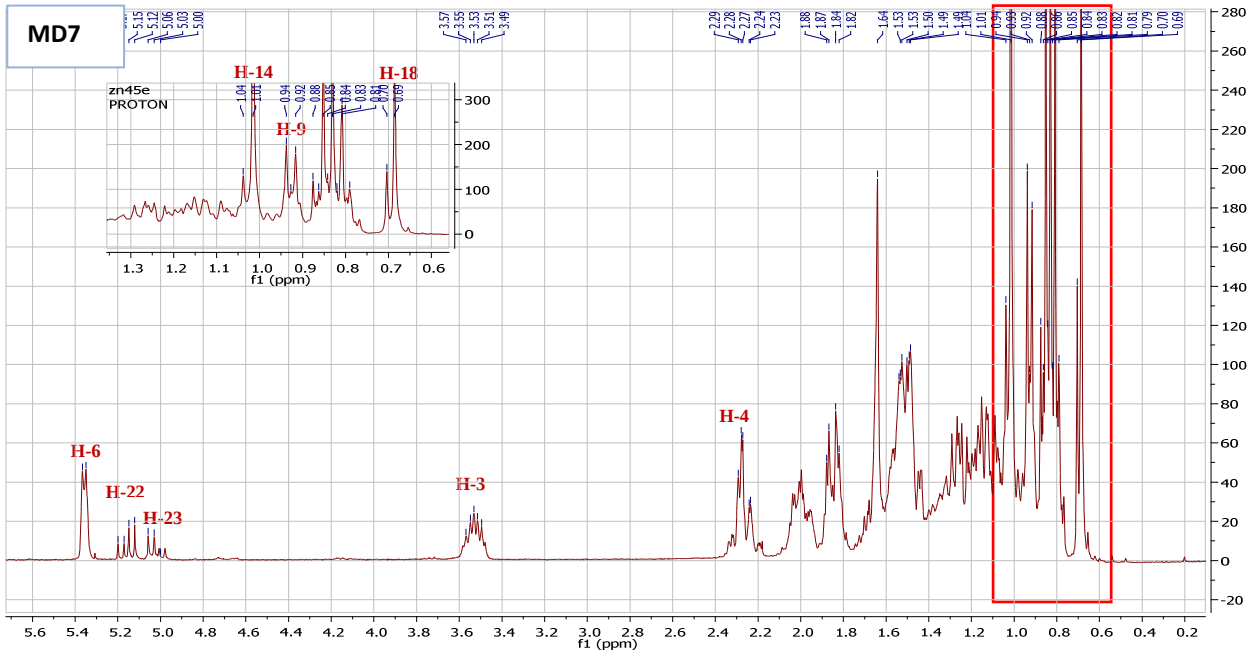
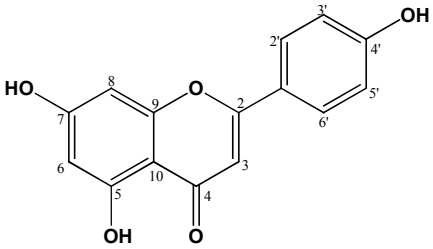


Fig. 61: Spectres RMN-^{1}H de **MD7** ($CDCl_3$, 300 MHz)

III.1.3 Les composés phénoliques

III.1.3.1 Les flavonoïdes

*III.1.3.1 a Composé **MD15** : Apigénine*



Le spectre de masse enregistré à haute résolution SM-HR-ISE montre un ion pseudo-moléculaire à *m/z* 271,0601 $[M+H]^+$. La comparaison du spectre RMN-^{1}H avec les données de la littérature (Van Loo et *al*, 1986) **(Tableau 17** (Annexe III.1a, p 248) a permis d'identifier le composé **MD15** comme étant l'apigénine. Cette unité structurale sera retrouvée dans un bon nombre des flavonoïdes isolés au cours de ce travail.

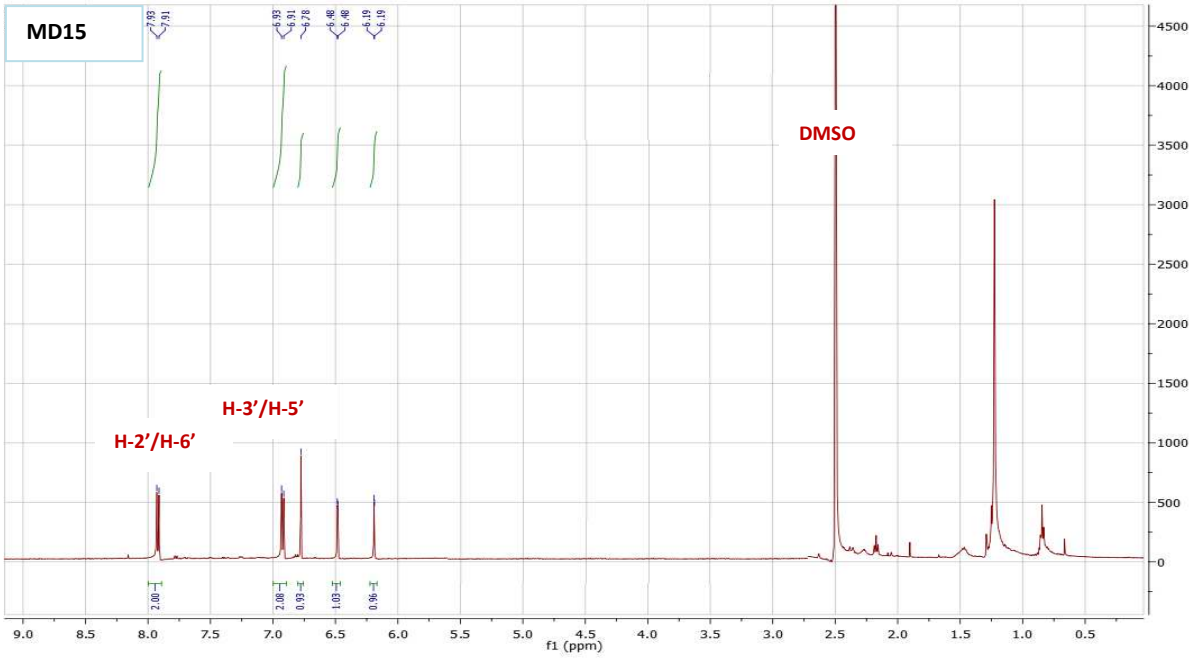
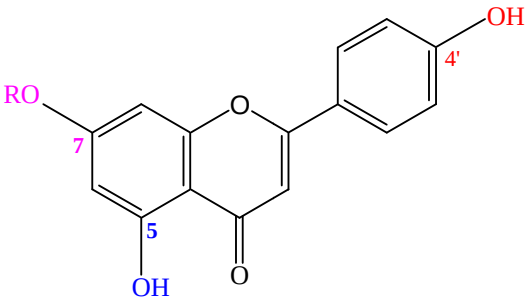


Fig. 62 : Spectres RMN-^{1}H de **MD15** (DMSO, 400 MHz)

*III.1.3.1 b Composé **MD13:** Apigénine-7-O- glucoside*

La fluorescence violette sur CCM de polyamide sous UV à 365 nm du composé et la valeur de la longueur d'onde de la bande I dans le méthanol indique qu'il s'agit d'un flavonoïde de type flavone.



- L'ajout de NaOH induit un déplacement bathochromique de la bande I de +59 avec augmentation de l'intensité d'absorption par rapport au spectre enregistré dans le MeOH ce qui nous oriente vers un OH libre en position 4'.
- L'apparition d'une nouvelle bande à 377nm observé avec le réactif $AlCl_3$ est révélateur d'un déplacement bathochrome induit par un OH en position 5, l'addition de HCl ne montre pas de différence significative (absence du déplacement hypsochrome) ce qui confirme la présence d'un seul groupe hydroxyle sur le cycle B.
- Le spectre UV obtenu avec le NaOAc n'induit pas de déplacement bathochrome de la bande II par rapport au spectre enregistré dans le MeOH, ce qui signifie qu'il n'y a pas de groupe hydroxyle libre en 7.

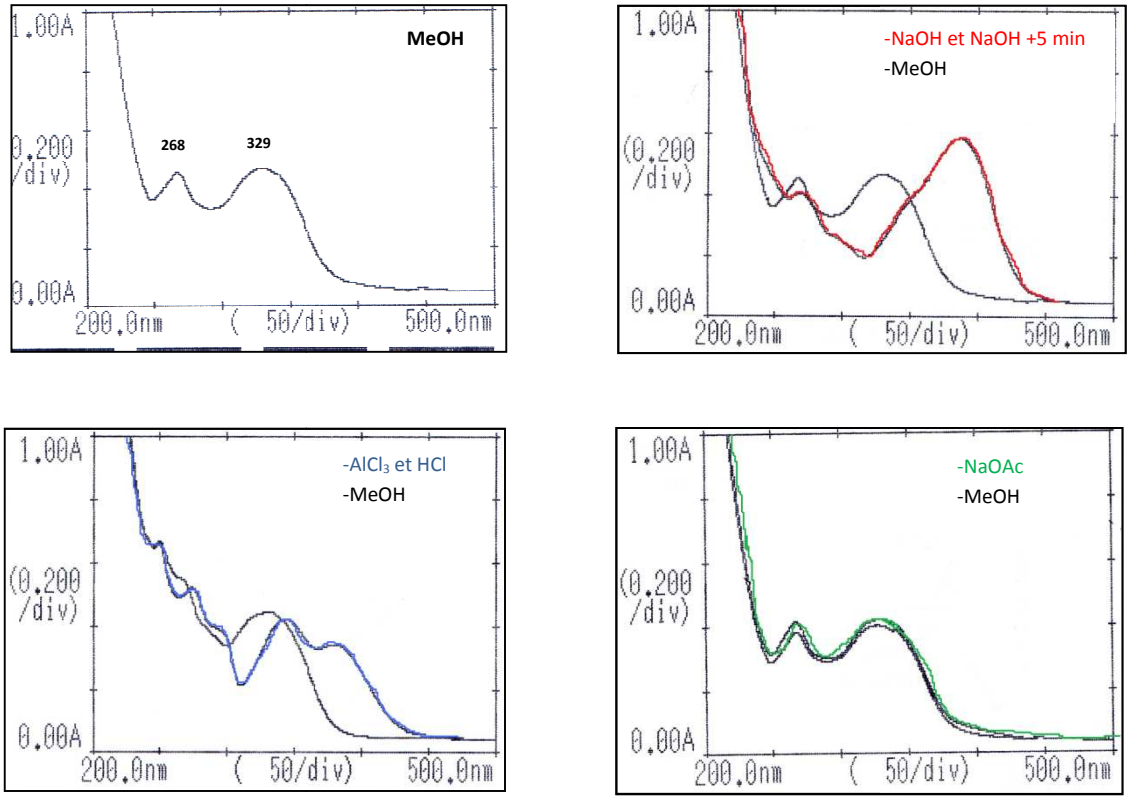


Fig.63 : Série spectrale UV de **MD13**

Le spectre RMN enregistré dans le DMSO présente effectivement les signaux compatibles avec la structure d'une flavone, l'apigénine :

Par ailleurs, On observe sur le spectre RMN-^{1}H (**Fig. 64**) un doublet avec un déplacement chimique de 5,06 ppm et une constante de couplage 7,35 Hz correspond au proton anomérique d'un sucre.

Les cinq signaux restant sur le spectre (entre 3,1 et 5,07 ppm) appartiennent à un hexose ce qui confirme la présence d'un glucose, la liaison β-*O*-glucosidique est confirmée par la valeur de constante de couplage du proton anomérique (δH 5.06, *J* = 7.35 Hz).

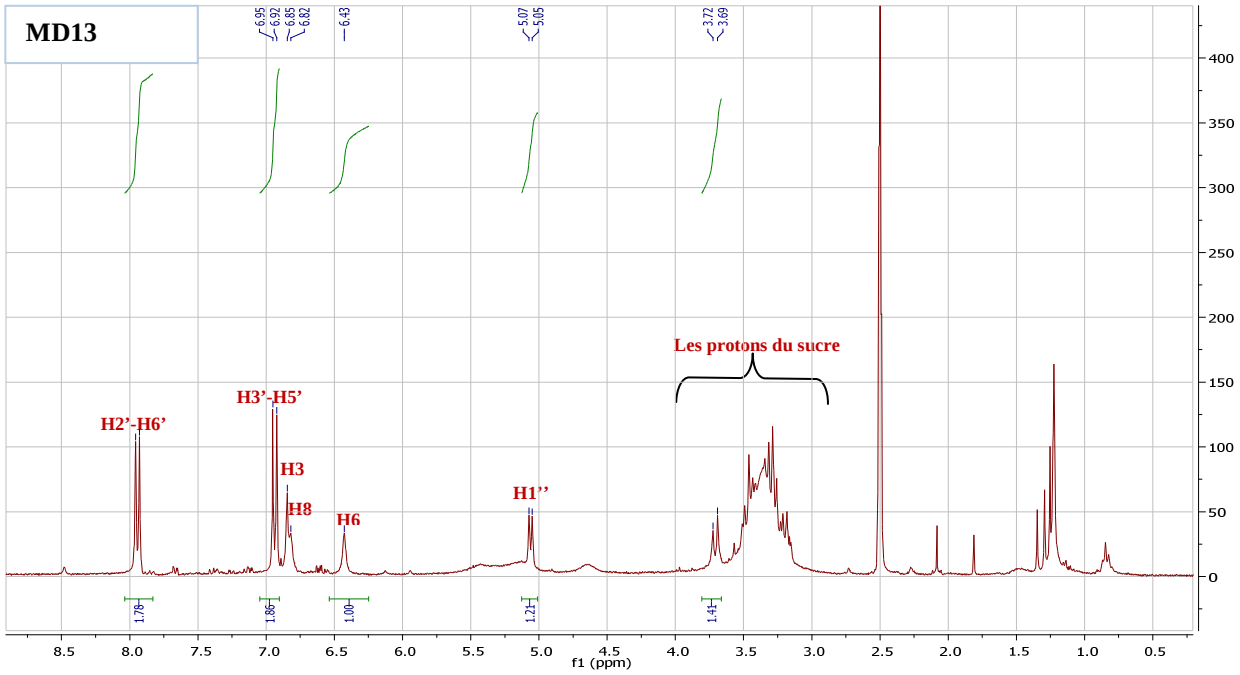


Fig. 64 : Spectres RMN-^{1}H de **MD13** (DMSO, 300 MHz)

Le spectre RMN-^{13}C (**Fig. 65**) montre 19 signaux dont 13 signaux en dehors de la région des sucres confirme la structure de l'apigénine.

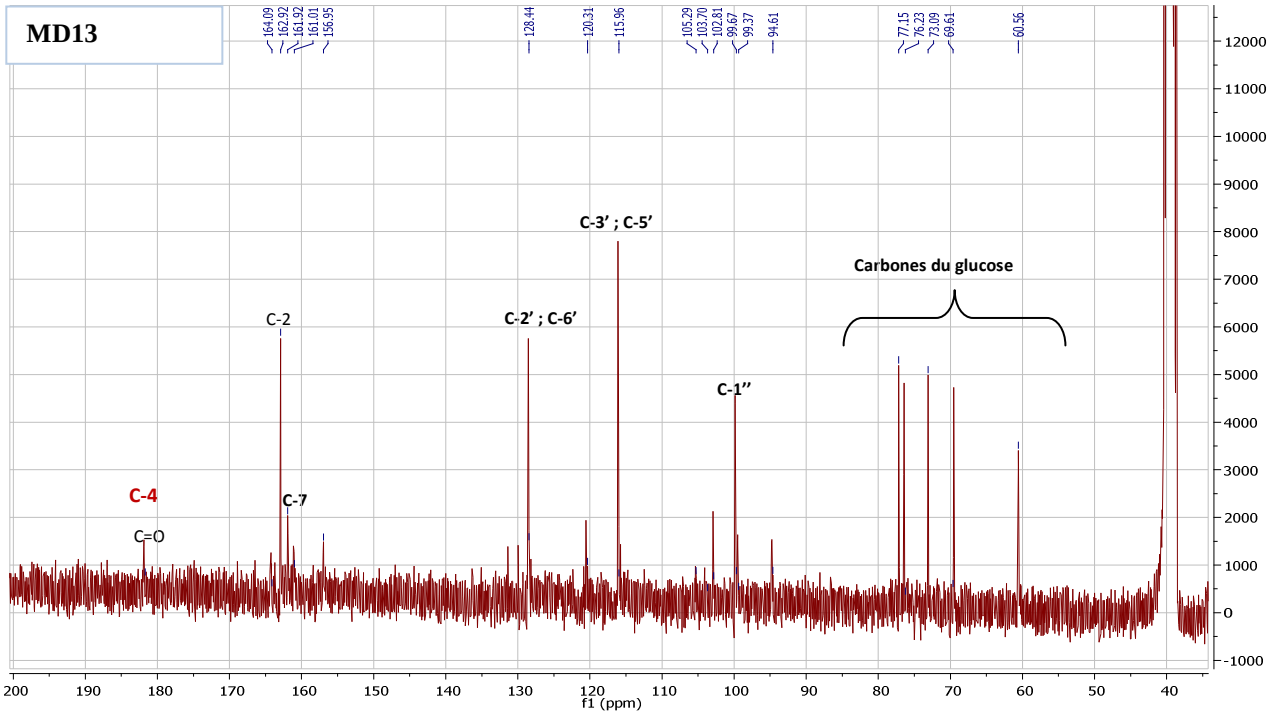


Fig. 65 : Spectres RMN-^{13}C de **MD13 (**DMSO, 75 MHz)

Les attributions réalisées sont également confirmées par les expériences de résonance magnétique nucléaire bidimensionnelles HMBC et HSQC.

Par ailleurs la corrélation observée lors de l'expérience HMBC entre le carbone C-7 à 162,9 avec le proton 1'' à 5,06 a permis de montrer la position du branchement du glucose sur la fonction hydroxyle en 7 de la génine.

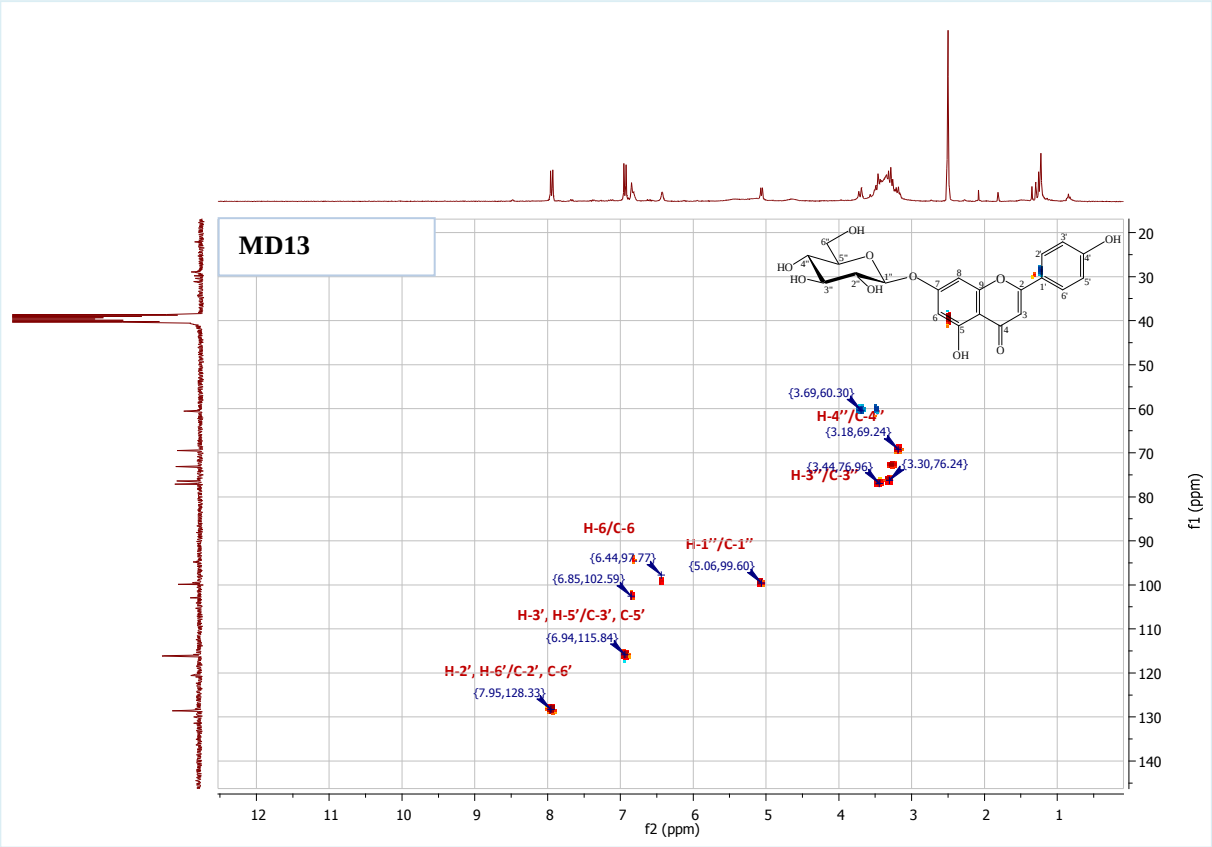


Fig. 66 : Spectres HSQC de **MD13** (DMSO, 300 MHz)

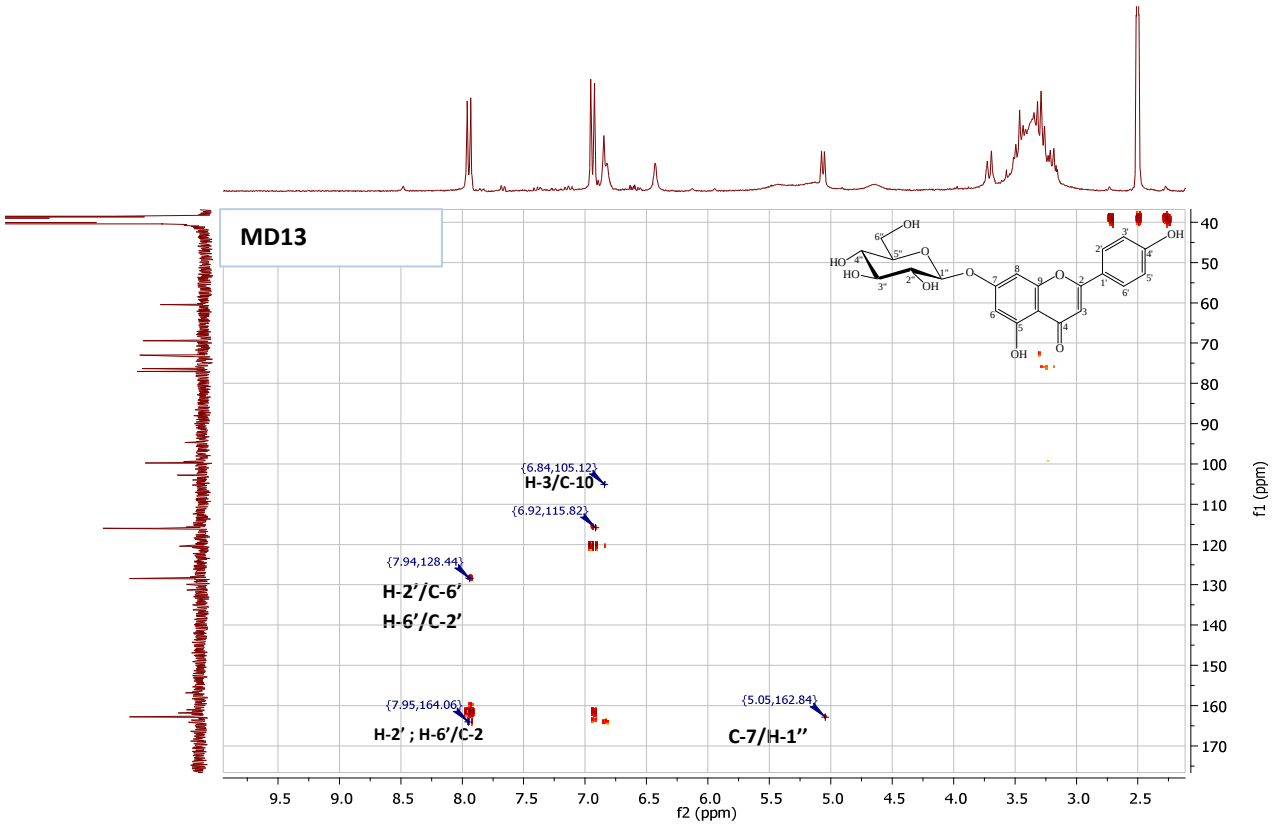
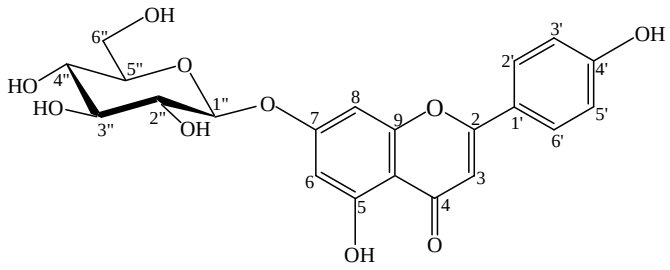


Fig. 67 : Spectres HMBC de **MD13** (DMSO, 300 MHz)

La structure du composé a donc pu être établie comme étant le 5,7,4' trihydroxyflavone-7-*O*-β-D-glucopyranoside généralement appelé apigénine-7-*O*-glucoside qui a été identifiée pour la première fois dans *Cosmos bipinnatus* Cav. (Astéracées) (Nakaoki *et al*., 1935). Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN-^{1}H et du ^{13}C sont présentés dans le tableau avec leurs attributions et ceux trouvés dans la litérature (Redaelli *et al*., 1980) **(Tableau 13** (annexes III.1a, p245)**).**



*III.1.3.1 b Composé **MD18** : Apigénine-7-O-glucuronide*

Le spectre RMN du ^{1}H dans le (MeOH+acétone) évoque celui des hétérosides des flavonoïdes. En particulier les signaux entre 6,00 et 8,00 ppm sont quasiment identiques à ceux du composé **MD13** où on observe deux doublets couplés avec une faible constante de couplage correspondant aux protons du cycle A (δ=6,44, d, J=2,2 Hz, H-6 ; δ=6,84, d, J=2,2Hz, H-8). le spectre UV confirme que l'apigénine est bien présente dans la structure de la molécule et qu'elle est substituée en position 7.

Au niveau du spectre RMN-^{13}C, les signaux correspondant à la partie osidique de la molécule sont un peu différents de ceux observés pour le composé **MD13**; cinq signaux correspondant à des carbones tertiaires sont présents entre 101,1 et 77,2, ce qui est comparable à ceux du glucose dans **MD13**. Mais l'observation d'un carbone quaternaire à 175,2 ppm correspondant à une fonction carboxylique oriente l'identité du sucre vers un acide uronique.

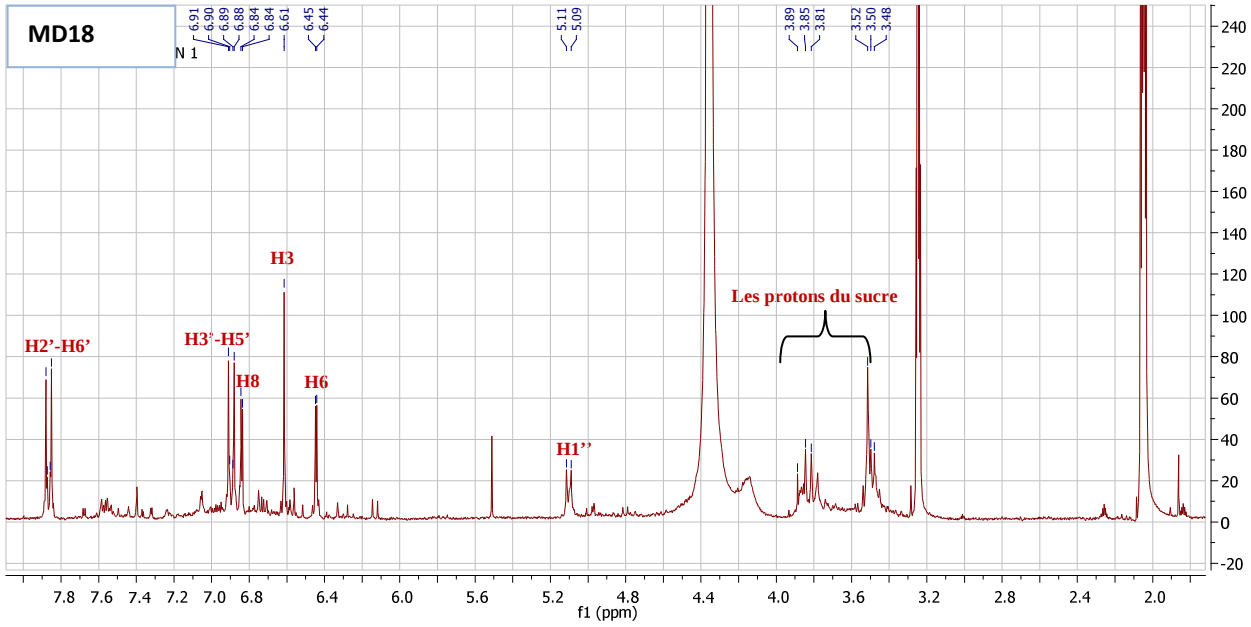


Fig. 68 : Spectres RMN-^{1}H de **MD18** (CD_3OD+ acétone-d_6, 300 MHz)

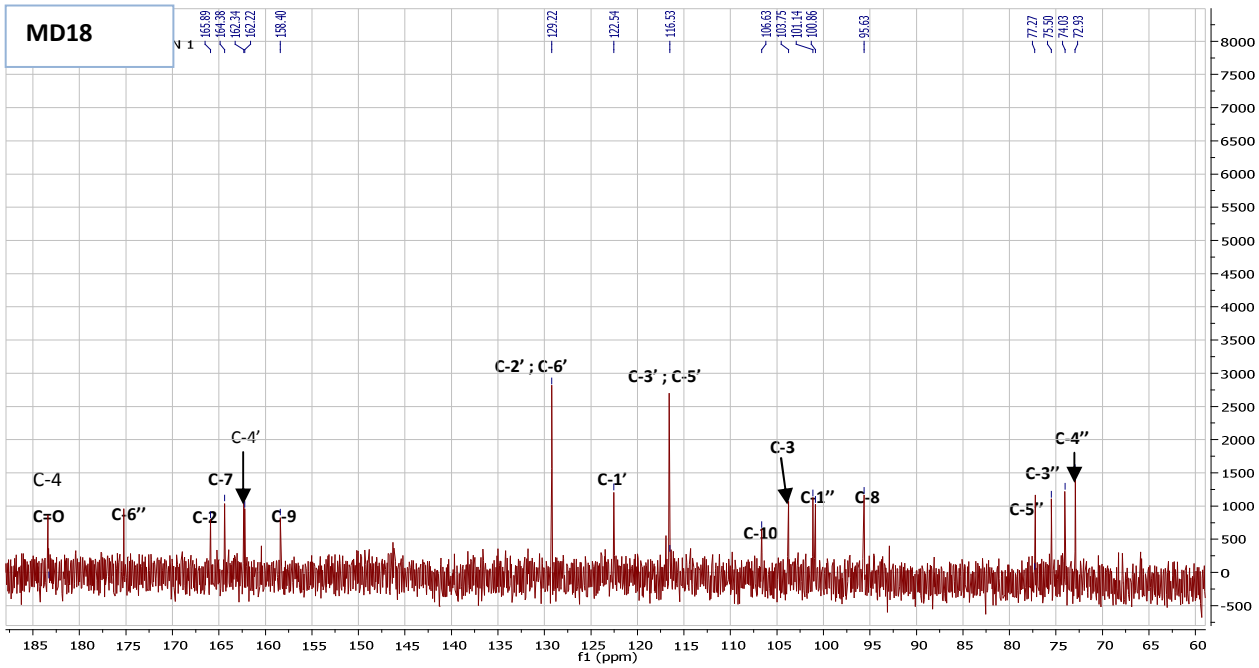
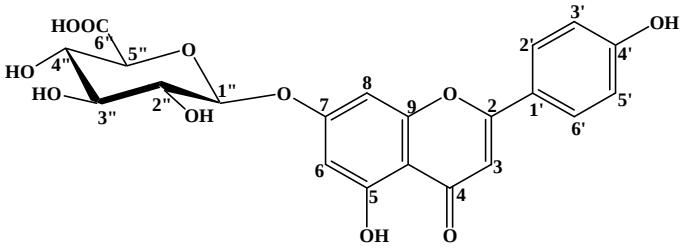


Fig. 69: Spectres RMN-^{13}C de **MD18** (CD_3OD+ acétone-d_6, 75 MHz)

La structure du composé **MD18** a donc pu être établie comme étant 5, 4'-dihydroxyflavone -7-*O*-β-D-glucopyranuronide, composé connu généralement appelé apigénine-7-glucuronide et isolé pour la première fois d'*Erigeron annuus* (L.) Desf. (Astéracées) (Imai *et al*., 1953).

Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN du ^{1}H et du ^{13}C sont présentés dans **le Tableau 12** (Annexe III.1.a, p 244) avec leurs attributions et comparés aux données de la littérature (Has *et al*., 1995).



apigénine-7-O-glucuronide

*III.1.3.1 c Composé **MD9** : Apigénine 7-O-néohesperidoside*

Le composé **MD9** se présente sous forme d'une poudre jaune. Le spectre de masse enregistré en SM-ESI (**Fig. 70**), en mode positif, montre un ion pseudo-moléculaire à *m/z* 579,0 $[M+H]^+$ indicatif d'une masse molaire de 578 et d'une formule brute $C_{27}H_{30}O_{14}$.

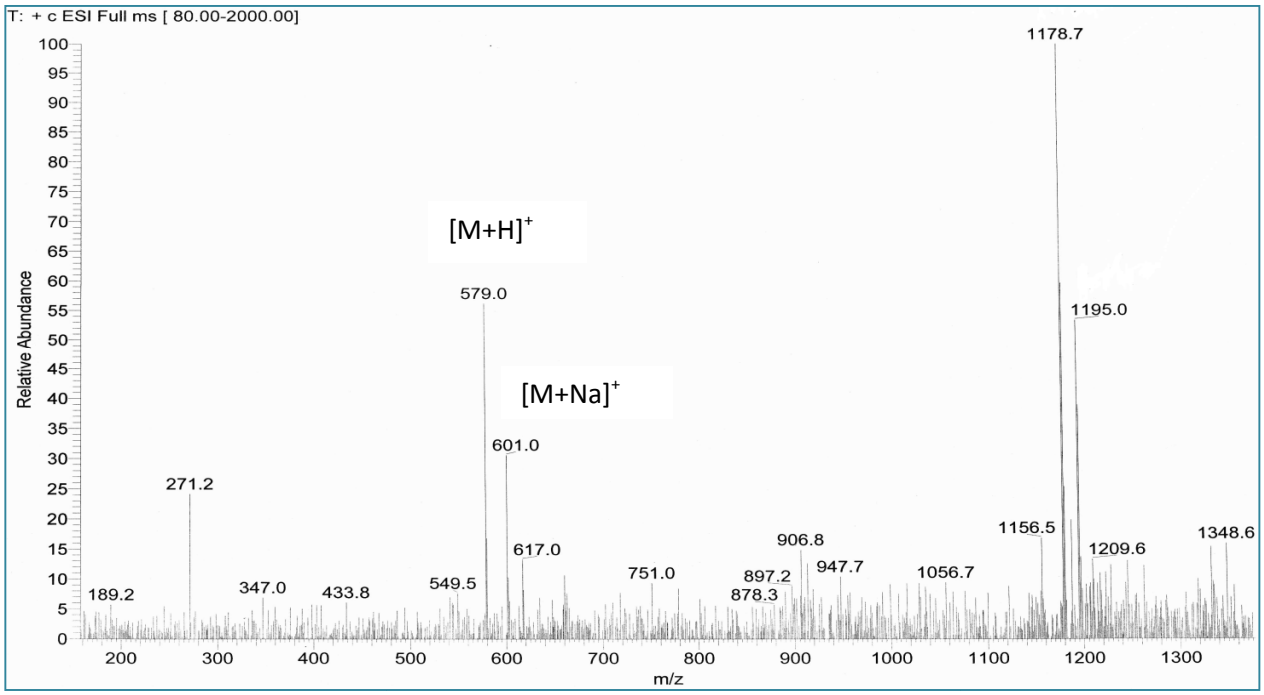


Fig. 70 : Spectre de masse ESI^+ du composé **MD9** ($CHCl_3$)

Les signaux présents sur le spectre RMN-^{1}H dans la région de protons aromatiques sont les suivants :

- Un doublet à 6,78 avec une constante de couplage de 2,0 Hz correspondant à H-8,
- Un singulet large à 6,46 ppm correspondant au proton H-6

- un singulet à 6,66 correspondant au proton H-3 ;
- deux doublets, intégrant pour 2 protons chacun, à 7,88 (*J*=8,3 Hz) et à 6,93 (*J*=8,3Hz) caractérisent les protons équivalents H-2'/H-6' et H-3'/H-5'. Cela signifie une substitution en C-4'.

Tous ces éléments sont en accord avec la structure d'une flavone dont le cycle A est substitué en position 5 et 7 et dont le noyau B ne porte qu'un seul hydroxyle en 4'.

Cette hypothèse est confirmée par la série spectrale UV (Annexe III.1.a, p 241). La fluorescence violette du composé sur CCM de polyamide sous UV à 365 nm et la longueur d'onde des bandes I et II dans le méthanol à 267,5 et 332,5 nm respectivement, indiquent qu'il s'agit bien d'un flavonoïde de type flavone.

De plus :

- l'ajout de NaOH induit un déplacement bathochromique de la bande I de +59 nm avec augmentation de l'intensité d'absorption par rapport au spectre enregistré dans le MeOH. Ceci oriente vers un OH libre en position 4'.
- l'apparition d'une nouvelle bande à 377 nm observée avec le réactif $AlCl_3$ est révélatrice d'un déplacement bathochrome induit par la chélation d'un OH et d'une cétone ou de deux OH en ortho. L'addition de HCl ne montre pas de différence significative (absence du déplacement hypsochrome) ce qui confirme la présence d'un seul groupe de type cétone α-hydroxylée, correspondant à un OH en position 5.
- Le spectre UV obtenu avec le NaOAc n'induit pas de déplacement bathochrome de la bande II par rapport au spectre enregistré dans le MeOH, ce qui signifie que l'hydroxyle en 7 est substitué.

Sur le spectre RMN-^{1}H, on observe la présence des signaux de deux protons anomériques de sucre à 5,21 et 5,31 ppm. Les attributions précises ont été possibles grace à la combinaison des données des spectres COSY ^{1}H-^{1}H ; HSQC et et HMBC.

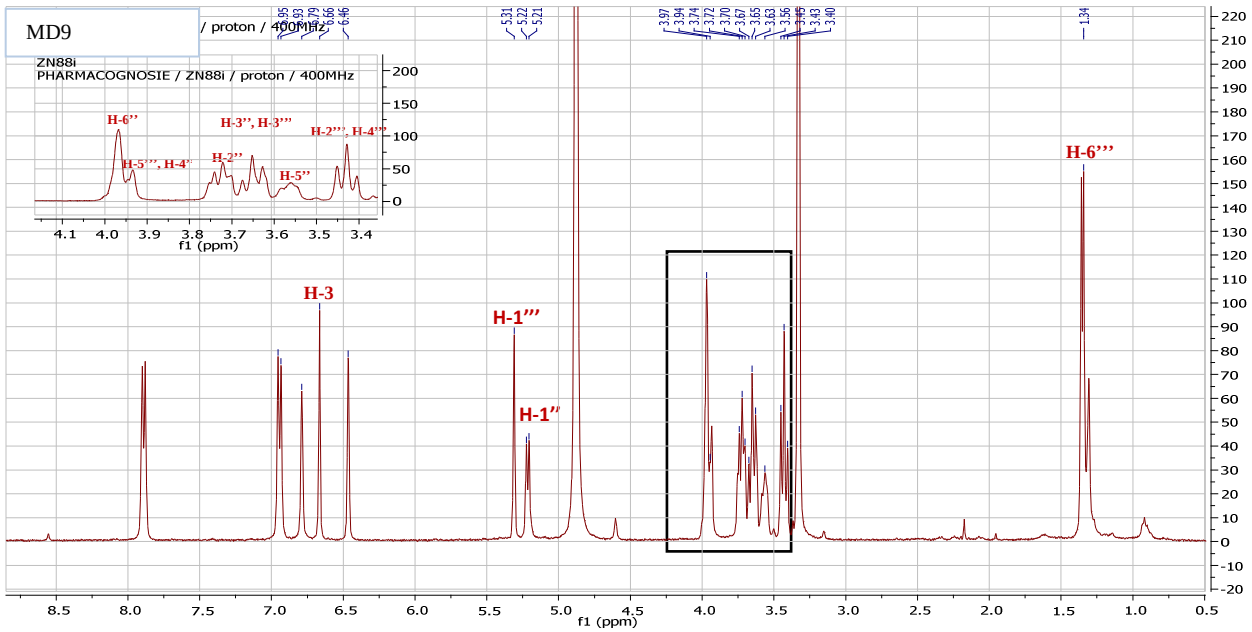


Fig. 71 : Spectre RMN ^{1}H de **MD9** (CD_3OD+ acétone-d_6, 400 MHz)

Le déplacement RMN-^{13}C dans la région des sucres sont caractéristiques d'une part d'un glucopyranose (C-2'', C-3'', C-4'', C-5'', et C-6'' respectivement à 79,0 ; 79,0 ; 72,2 ; 78,3 ; 62,4 ppm) dont on note la configuration β grâce à la constante de couplage typique du proton anomérique (*J*= 7,3 Hz) et d'autre part d'un rhamnopyranose (C-2''', C-3''', C-4''', C-5''', C-6''' respectivement à 71,4 ; 72,2 ; 73,9 ; 70,0 et 18,3 ppm) de configuration α, d'après la litérature la constante de couplage du proton anomérique H-1''' (*J*= 1,3 Hz) (Markham et Ternai, 1976 ; Senatore *et al.*, 2000), mais dans le spectre RMN^{1}-H **(Fig . 72)** le signal et sous forme d'un singulet large.

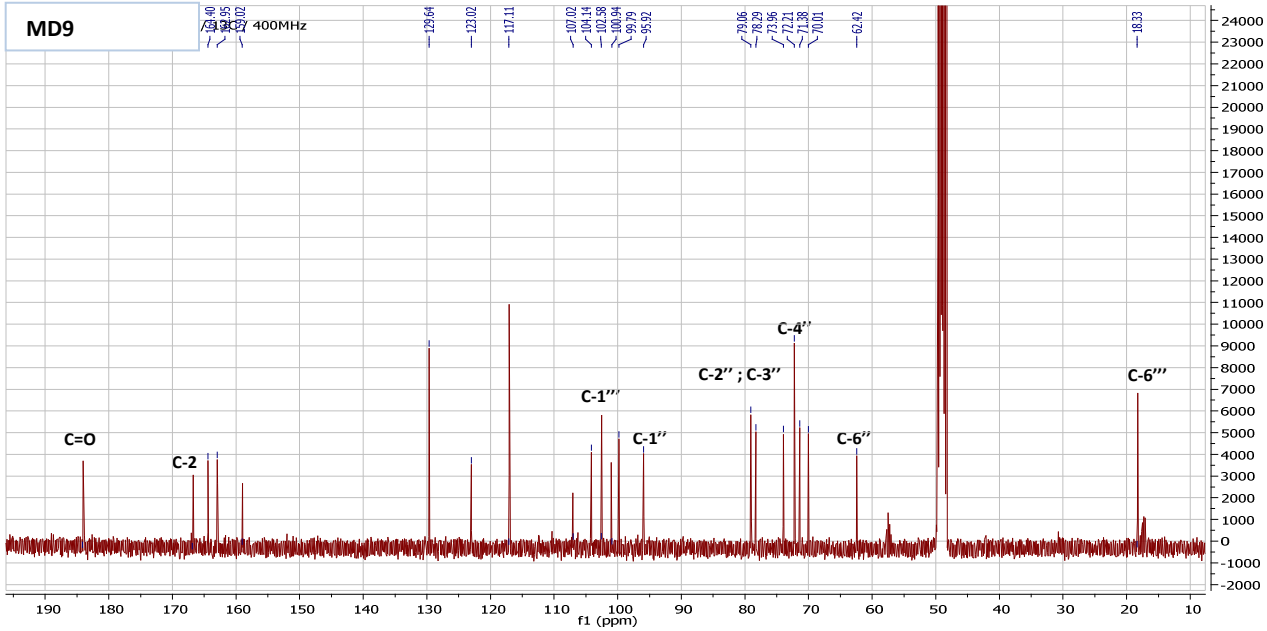


Fig. 72 : Spectres RMN-^{13}C de **MD9** (CD_3OD+ acétone-d_6, 100 MHz)

Par ailleurs, les corrélations HMBC observées entre le proton à δH 5,31 ppm (H-1’’’) et le carbone situé à δC 79,0 ppm (C-2’’ ou C-3’’) ont permis de montrer que les deux sucres sont liés en 1’’’→2’’ ou en 1’’’→3’’, le déplacement chimique du proton H-2’’ (3,72 ppm) et plus déblindé que H-3’’ ce qui indique que le proton anomérique du rhamnose est lié en position 2’’du glucose.

Le glucose est fixé sur la génine apigénine en position 7 comme l’atteste la corrélation HMBC entre le carbone C-7 à 164,4 ppm et le proton anomérique du glucose à 5,21 ppm.

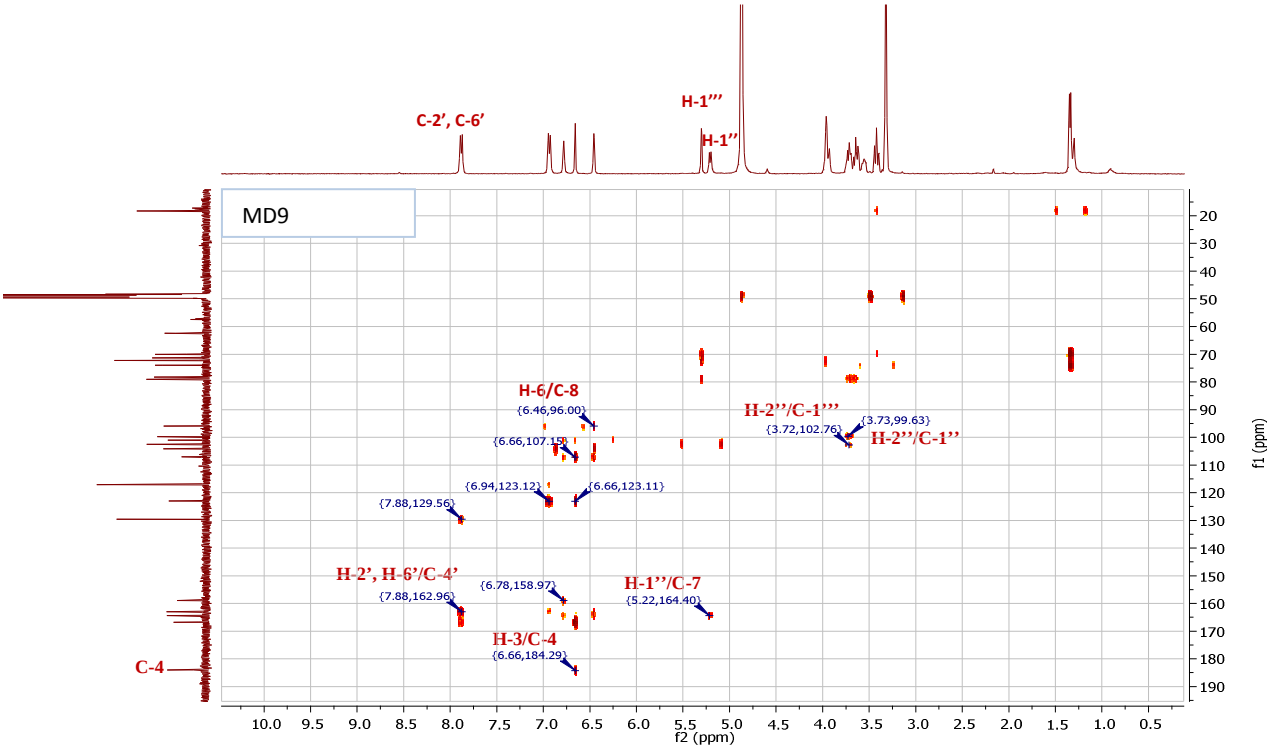
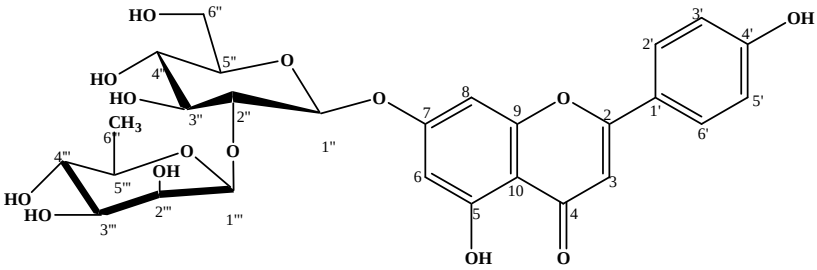


Fig. 73: Spectres HMBC de **MD9** (CD_3OD+ acétone-d_6, 400 MHz)

Le composé **MD9** est ainsi identifié comme étant l’apigénine-7-*O*-néohesperidoside. Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN-^{1}H et du ^{13}C sont présentés dans le tableau avec leurs attributions et ceux trouvés dans la littérature (Rao *et al.*, 1982).

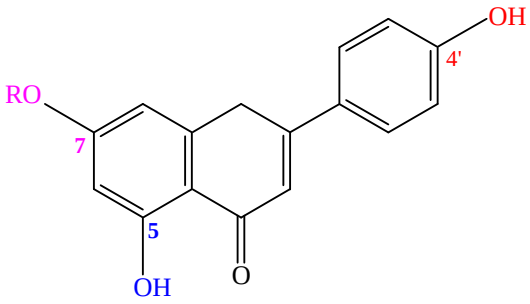


apigénine-7-O-néohesperidoside

*III.1.3.1 d Composé **MD 14** : Terniflorine*

Le composé se présente sous forme d'une poudre blanche soluble dans le DMSO. Ce composé est d'une fluorescence violet noir sur CCM de polyamide sous UV à 365nm et jaune après révélation au DBA laissant envisager une structure de type flavone ou flavonol 3-*O* substitué.

- Le spectre enregistré dans le MeOH (Annexe III.1.a, p 247) montre deux bandes d'absorption la bande II à 269 nm et la bande I à 320 nm caractéristique d'une flavone.
- L'addition de NaOH au spectre MeOH (annexe, p) provoque le déplacement bathochrome de la bande I (Δλ=+54) sans diminution de l'intensité est significatif d'un 4' OH, la stabilité du spectre enregistré après 5minutes par rapport à celui du MeOH prévoir l'absence d'un système ortho dihydroxylé sur le cycle B.
- L'effet bathochrome de la bande I (Δλ=+60) en présence de $AlCl_3$ par rapport au spectre dans le MeOH indique la présence d'un OH en position 5.
- Pas de déplacement de la bande II après l'addition de NaOAc par rapport au spectre enregistré dans le MeOH confirme la présence d'un OR en position7.



L'examen du spectre RMN-^{1}H montre :

- deux doublets entre 6,50 et 7,00 ppm caractéristiques des protons du cycle A (Mabry *et al.*, 1970). Dans cette zone, nous observons deux protons aromatiques couplant entre eux avec la même constante de couplage formant deux doublets à δ_H 6,46 et 6,79 ppm (J = 2.0 Hz), typiques d'un couplage en *meta* sur le cycle aromatique A attribués au proton H-6 et H-8 respectivement (Markham, 1982). Un singulet à 6,79 ppm est attribuable au proton en position 3 caractéristique d'une flavone.

Les protons du cycle B sont visibles sur un spectre RMN-^{1}H entre 6,7 et 7,9 ppm (Mabry *et al.*, 1970). Nous observons sur le spectre RMN-^{1}H la présence de deux doublets d'intégrations 2 H à δ_H 7,91 ppm (d, J =8,7 Hz), 6,90 ppm (d, J = 8.8Hz) ces protons sont respectivement attribués au H-2' ; H-6' et H-3' ; H-5'.

La présence d'un doublet à δ_H 5,16 ppm (J = 7,0 Hz) correspondre à un proton anomérique indique qu'un seul ose, le déplacement chimique et la constante de couplage du proton anomérique est en faveur d'un β-D glucose substituant la flavone en 7.

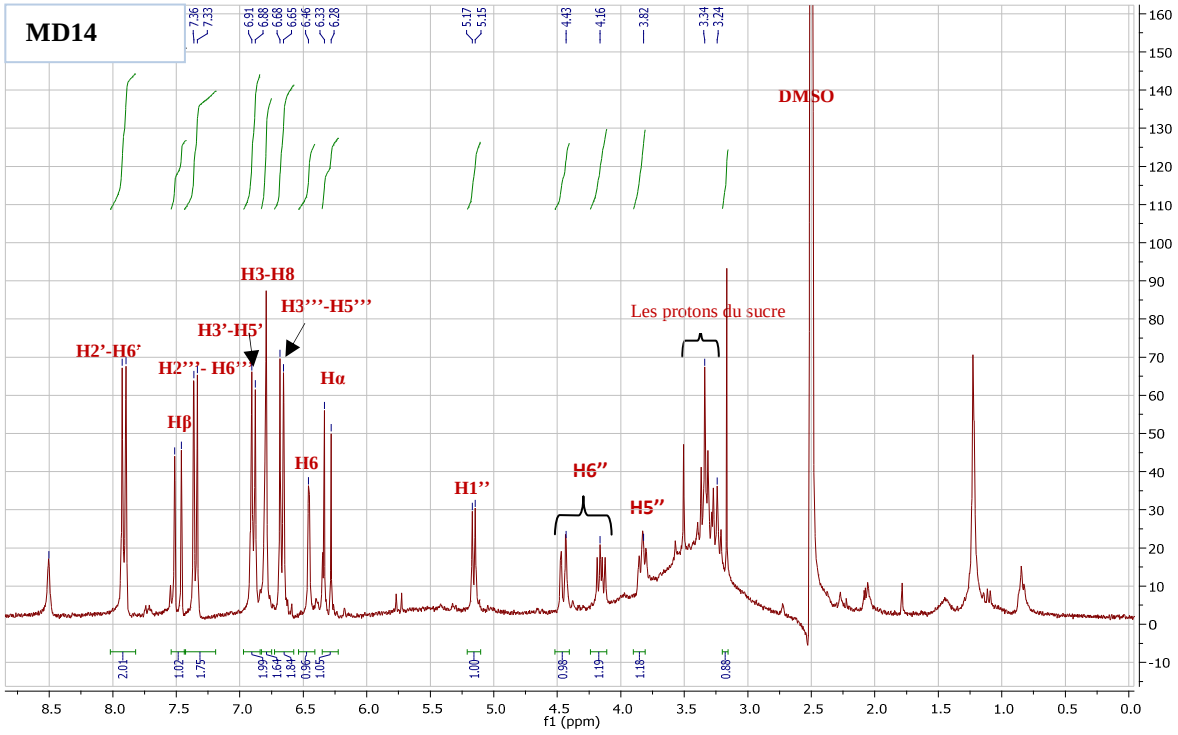


Fig. 74: Spectres RMN-^{1}H de **MD14** (DMSO-d_6, 400 MHz)

Le spectre RMN^{13}C présente 26 signaux dont 6 correspondant aux signaux d'un glucose est un groupement ester du coumaryle.

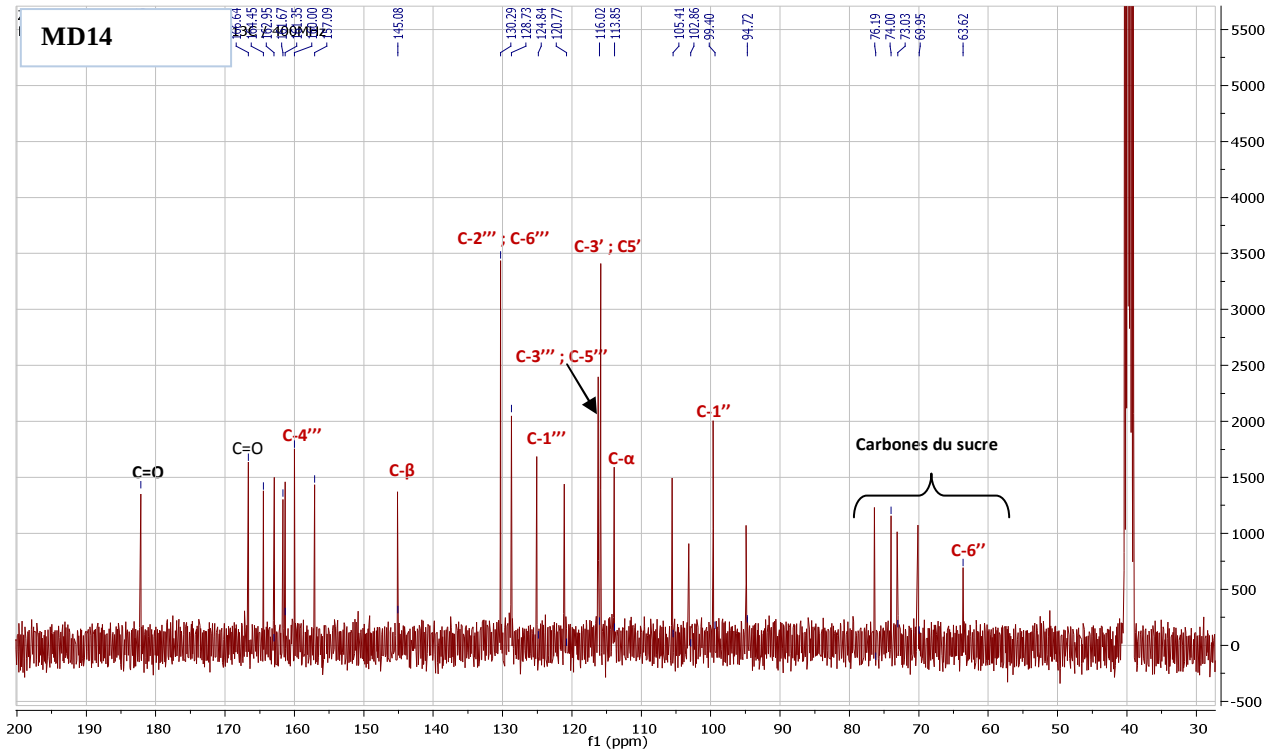


Fig. 75 : Spectres RMN ^{13}C de **MD14** (DMSO-d_6, 100 MHz)

Le spectre de masse enregistré en mode positif et négatif donne une masse $[M+H]^+$ de 579 uma et $[M-H]^-$ de 577,1 uma pour la formule brute $C_{30}H_{26}O_{12}$.

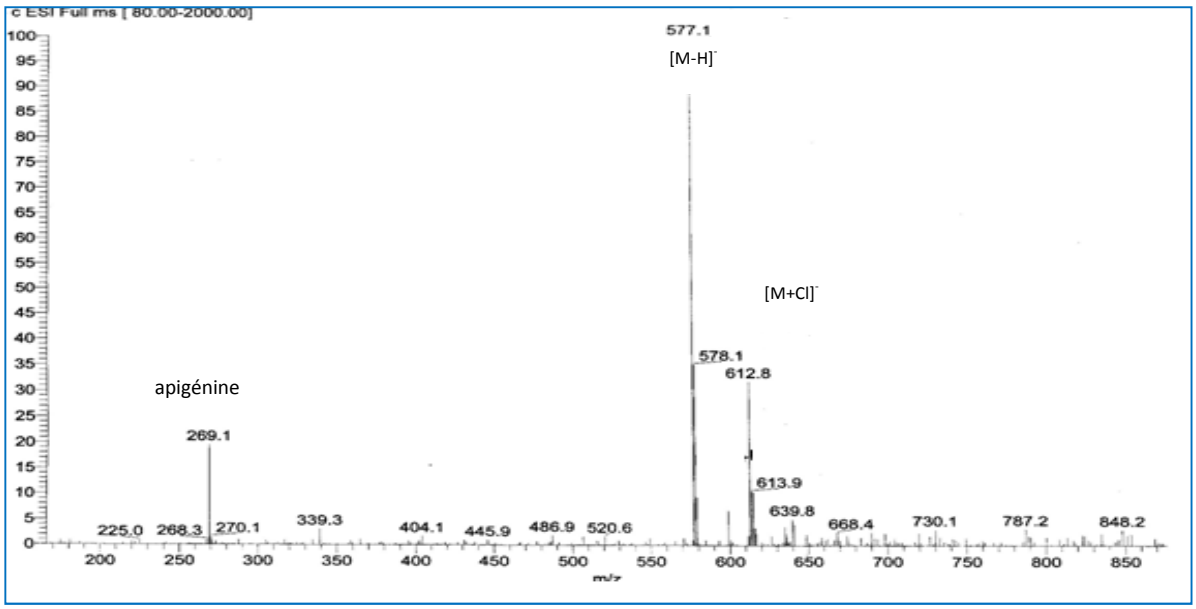


Fig. 76 : Spectre de masse ESI^- de **MD14** dans le DMSO

En effet on observe en mode négatif, la fragmentation *m/z* 269 correspondant à la perte du coumaryle glucopyranoside donc ce composé présente une génine de masse 269,1 de type apigénine.

L'expérience HMBC permet d'observer une tache de corrélation entre le doublet du proton anomérique et le pic du carbone 7. Ce qui confirme l'hypothèse formulée.

La dernière information nécessaire à l'établissement de la structure du composé **MD14** est la position de substitution du groupement coumaryle sur le glucose. L'expérience HSQC **(Fig. 77)** montre que le carbone 6'' à 63,6 est corrélé avec 4,16 et 4,45 du spectre RMN-^{1}H qui se trouve plus déblindé parmi le proton du sucre indique qu'il existe une acylation au niveau de la fonction alcoolique secondaire en 6 du glucose.

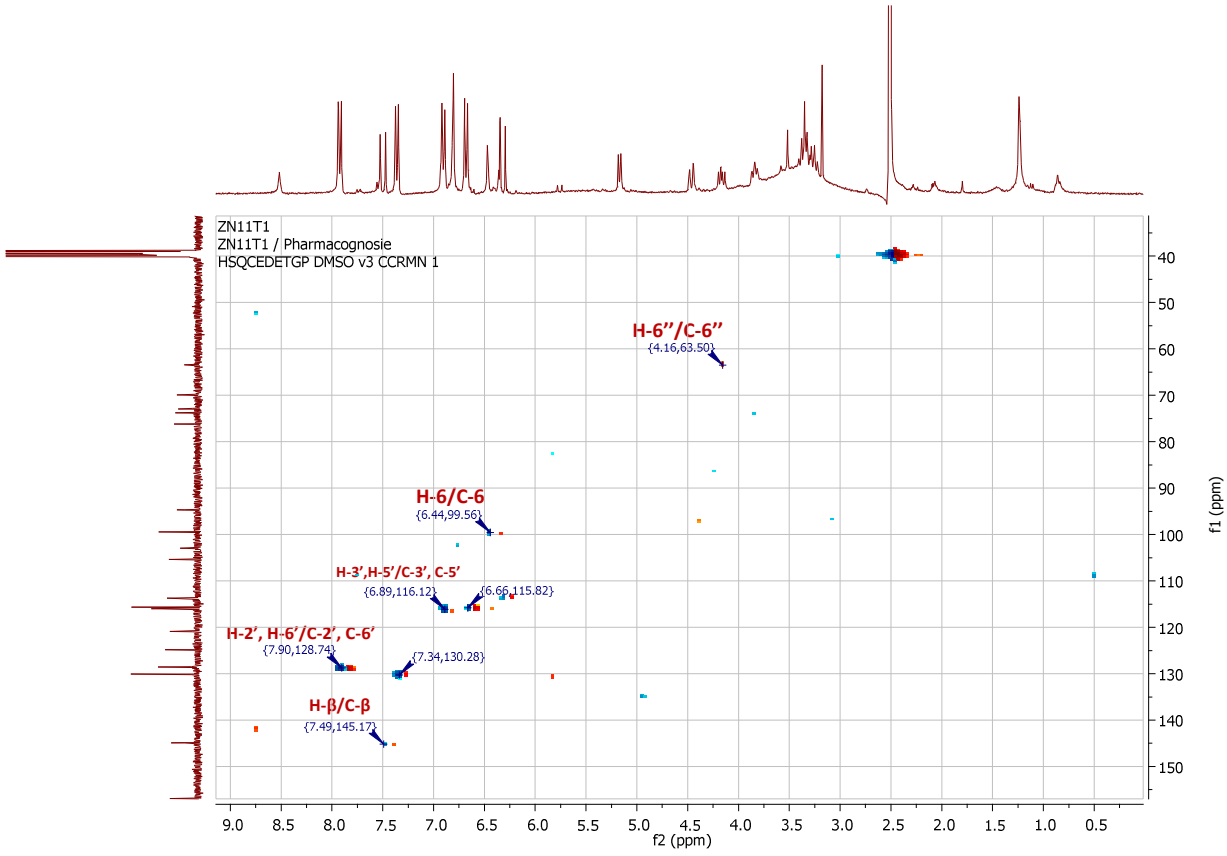


Fig. 77: Spectre HSQC de **MD14** (DMSO-d_6, 400 MHz)

L'expérience HMBC permet de confirmer ceci par l'observation de taches de corrélation entre le proton en 6 du glucose et le carbone de la fonction ester du coumaryle (à δ 166,5).

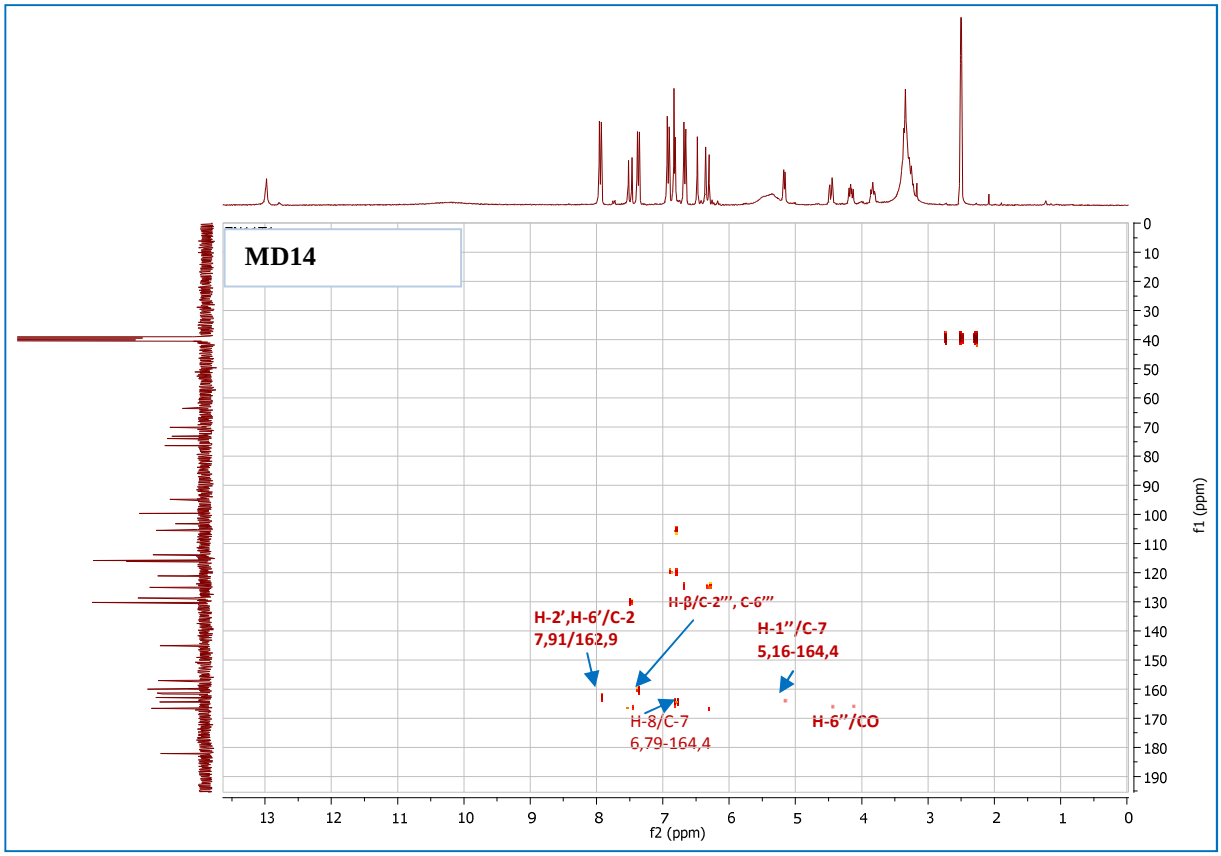
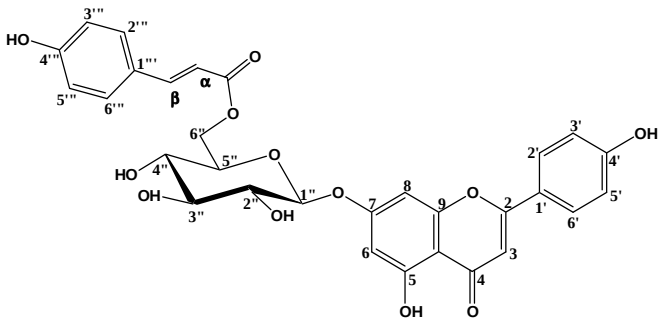


Fig. 78: Spectre HMBC de **MD14** (DMSO-d_6, 400 MHz)

La structure du composé est donc établie comme étant l'apigénine -7-β-D-*O*-(6''-*O*-*E*-*p*-coumaryl) glucopyranoside connue sous le nom de terniflorine.



Ce composé a été isolé pour la première fois de *Clematis terniflora* DC. var. *robusta* (Renonculacées) sous le nom de terniflorine (Artitomi *et al.,* 1963).

Tous les protons et les carbones ont été attribués d'après l'analyse des spectres de RMN 2D de homonucléaire COSY et hétéronucléaires HSQC et HMBC ainsi qu'en comparant ces données avec celles de la littérature (Agrawal, 1989).

III.1.3.2. Les phénylpropanoïdes

*III.1.3.2 a Composé **MD10**: Actéoside*

L'analyse du spectre RMN-^{1}H **(Fig. 79)** montre des signaux caractéristiques correspondant à des groupements E-caféyl (trois protons aromatiques à 6,78 ; 6,96 ; 7,06 formant un système ABX et deux protons trans oléfiniques à 6,27 ppm et 7,60 ppm caractérisés par une constante de couplage de 15,9 et 15,8 Hz) et 3,4- dihydroxyphényléthanol (trois protons aromatiques à 6,67 ; 6,57 et 6,70 formant également un système ABX et deux signaux méthyléniques) ce qui confirme qu'il s'agit d'un phénylpropanoïdes.

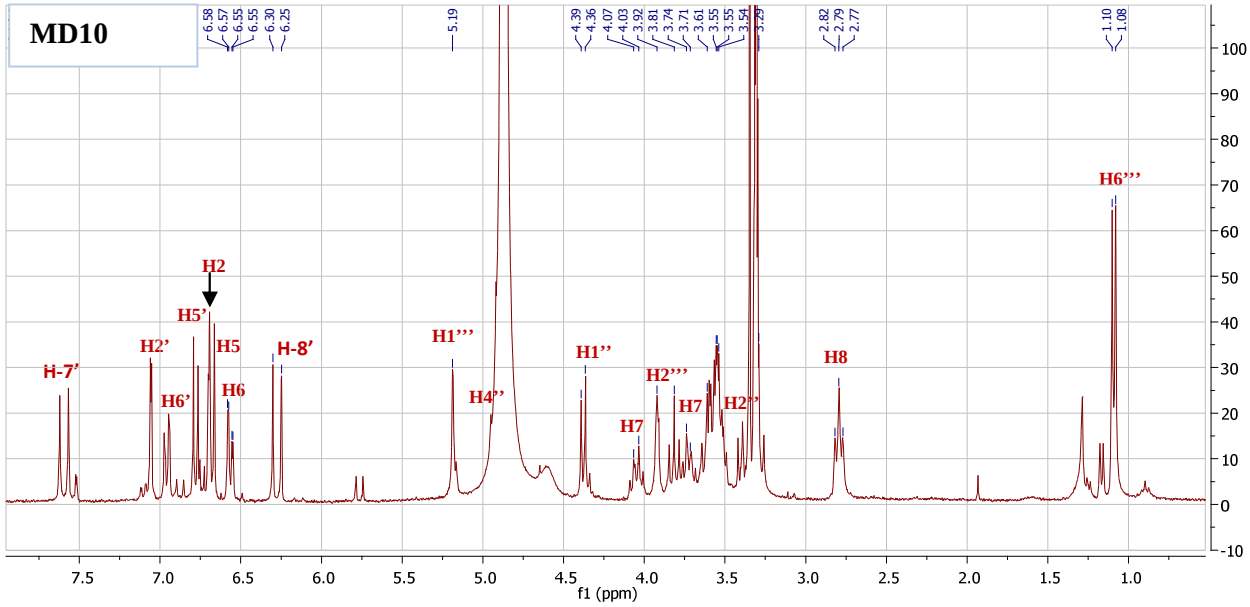


Fig. 79: Spectre RMN-^{1}H de **MD10** (CD_3OD, 400 MHz)

La partie du spectre allant de 3,0 à 5,5 correspondants aux protons des oses. Les doublés observés à 4,38 (J=7,8 Hz) et 5,19 (J= 1,5 Hz) correspondent respectivement aux protons anomériques du β-D-glucose et de l'α- L-rhamnose. La présence de ce dernier est confirmée par la présence d'un doublet très caractéristique du méthyle (position 6''') de cet ose (1,09 ppm, 3H, *J*=6,03 Hz). D'après la littérature le siganl à 4,92 est sous forme d'un triplet avec une *J*= 9,6 Hz correspond au proton 4'' du glucose dont la fonction hydroxyle est estérifiée par l'acide caféique dans le spectre RMN -^{1}H **(Fig. 79)** ce signal est masqué par le pic du solvant.

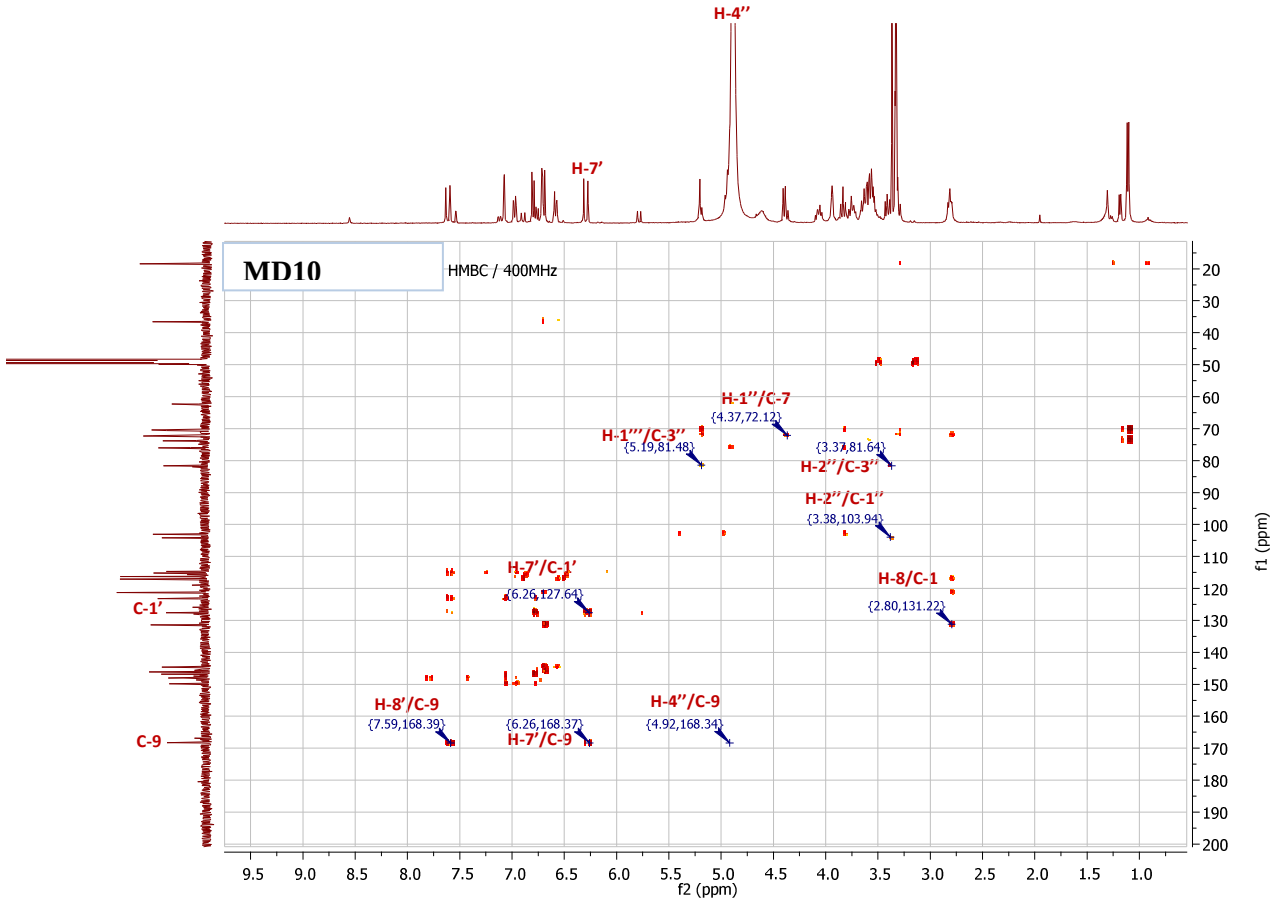
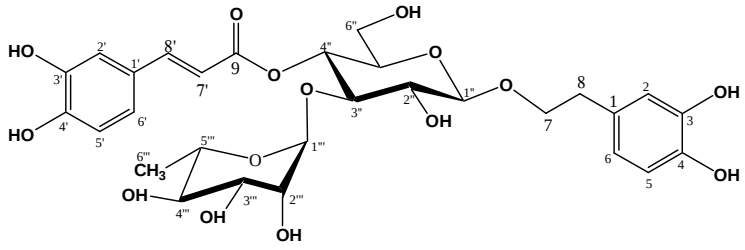


Fig. 80: Spectre HMBC de **MD10** (CD_3OD, 400 MHz)

La présence des taches de corrélation par l'expérience HMBC **(Fig. 80)** entre le proton H-4'' du glucose et le carbone C-9 de la fonction ester de la partie hydroxytyrosol, entre le proton anomérique du rhamnose H-1''' et le carbone C-3'' du glucose, et entre le proton H-1'' du glucose et le carbone C-7 de l'acide caféique nous permet de déterminer les branchements des différents éléments de la molécule (hydroxytyrosol, acide caféique, glucose, rhamnose).

Il en résulte que ce composé a pour structure 3,4-dihydroxy-β-phényléthoxy-*O*-[α-L-rhamno-pyranosyl-(1→3)]-4-*O*-(*E*)-caféyl-*β*-D-glucopyranoside couramment appelé actéoside ou verbascoside. Par ailleurs, les déplacements chimiques de tous les signaux en RMN-^{1}H et ^{13}C sont identiques à ceux donnés dans la littérature (Wu *et al*., 2003) **(Tableau 10** , Annexe III.1.a, p 242)**)**.

Cette molécule a été isolée pour la première fois dans l'espèce *Verbascum sinuatum* L. (Scrophulariacées) (Scarpati, 1963).



*III.1.3.2 b Composé **MD11** : Forsythoside B*

L'analyse du spectre RMN-^{1}H du composé **MD11** montre que la région des aromatiques appartient à la même série que le précédent **MD10**. Les déplacements chimiques et les couplages des signaux observés dans cette région sont très proches de ceux que nous avions donnés pour l'actéoside.

En plus des deux signaux des protons anomériques de l'actéoside présentent dans cette molécules **MD11** (à 4,39 (d, *J*=8 Hz) et 5,15 ppm, on observe un signal à 4,86 ppm, une recherche bibliographique sur des composés de le même série qui correspond peut être à un proton anomérique du β-D-apiose (seidel *et al*., 1999). les informations obtenues par le spectre RMN-^{1}H que le composé est constitué d'une chaîne trisaccharidique (glucose, rhamnose, et apiose) substituée par un acide-*E*-caféique et un hydroxytyrosol.

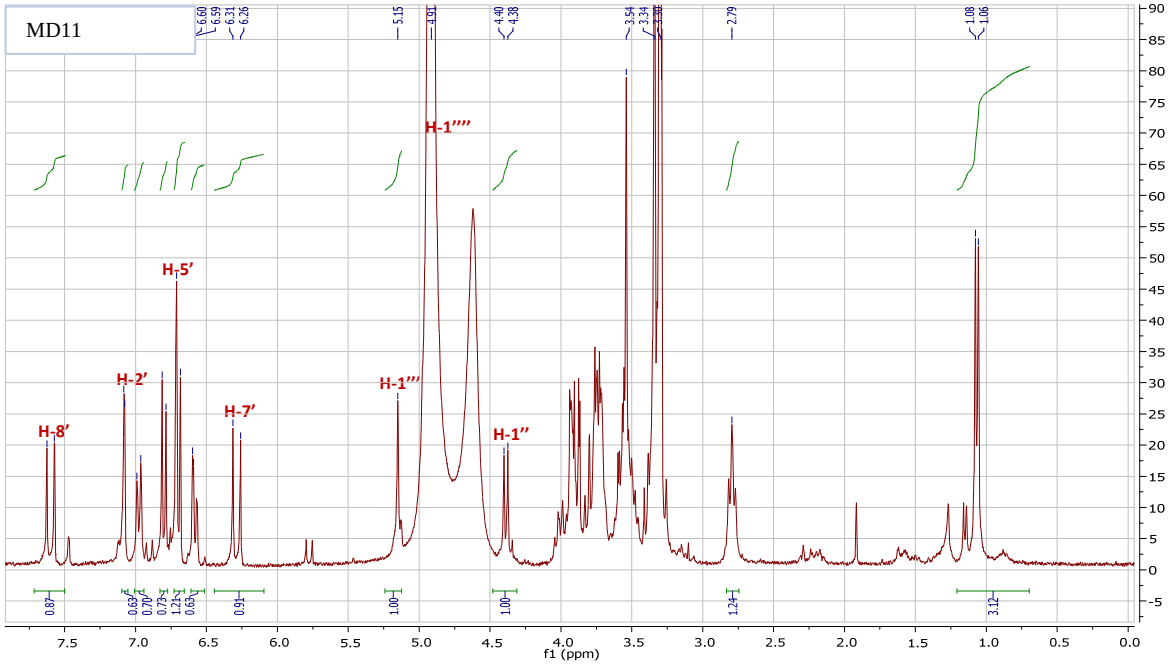


Fig. 81 : Spectre RMN-^{1}H de **MD11** (CD_3OD, 400 MHz)

L'expérience de corrélation hétéronucléaire à longue distance HMBC **(Fig. 82)** permet de déterminer les positions exactes des signaux appartenant aux cinq éléments de la molécule (glucose, rhamnose, apiose, acide-*E*-caféique et hydroxytyrosol) et d'après le spectre HMBC on peut constater que le branchement des quatre éléments présents dans l'actéoside sont également dans cette molécule et avec les mêmes branchements, l'acide caféique estérifie le glucose en 4'', l'hydroxytyrosol est engagé dans une liaison de type acétalique avec la fonction OH en 1''de ce même ose, ce dérnier est lié au proton anomérique du rhamnose et de l'apiose en 3''et en 6''. Le glucose est donc en position centrale : le rhamnose, l'apiose , le dihydroxyphényléthanol et l'acide caféique sont substitués sur quatre de ces hydroxyles.

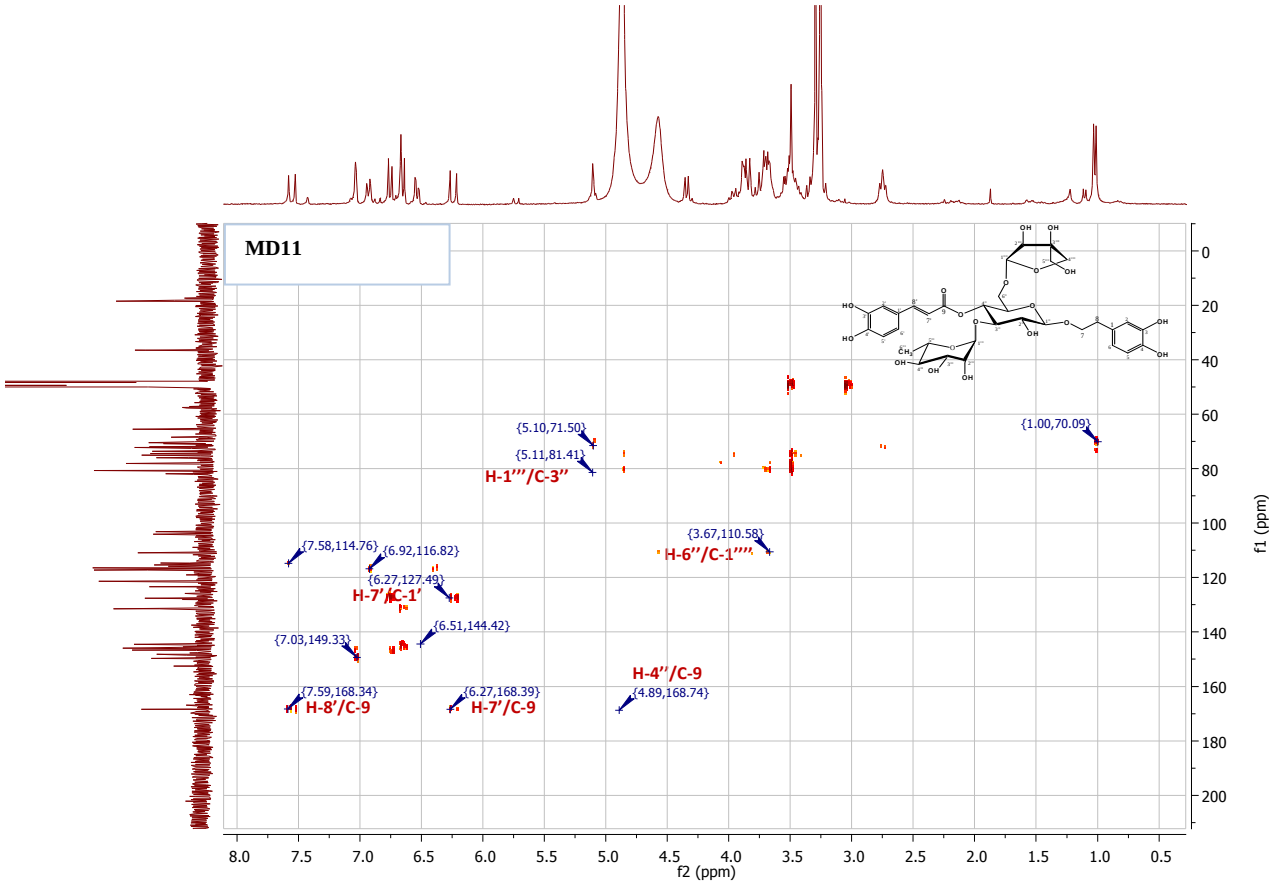
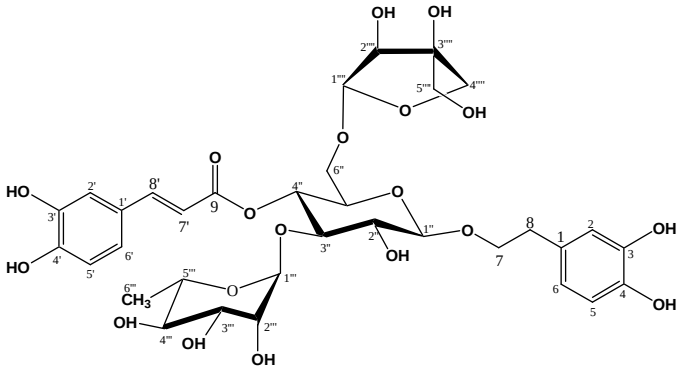


Fig. 82 : Spectre HMBC de **MD11** (CD_3OD, 400 MHz)

La structure du composé **MD11** est ainsi déterminée comme le 3,4-dihydroxy-*O*-[α-L-rhamno-pyranosyl-(1→3)]-*O*-[β-D-apiofuranosyl-(1→6)]-4-*O*-*E*-caféyl-D-glucopyranoside ou forsythoside B par comparaison avec celles proposées dans la littérature (Hennebelle, 2007). Cette molécule connue a été isolée pour la première fois de *Forsythia koreana Nakai* (Oléacées) (Endo, 1982).



forsythoside B

III.2. Identification des composés isolés de *Phlomis bovei* de Noe

III.2.1 Composé PB1a/PB1b : Chrysoériol 7-*O*-(3''-(*E* et *Z*)-p-coumaryl)-β-glucopyranoside

En comparant le spectre RMN-^{1}H de ce composé avec celui de **MD14,** on observe un dédoublement de certaines raies et l'existence d'un singulet supplémentaire à 3,94 ppm caractéristique d'un groupement -OCH_3. En ce qui concerne les signaux du cycle B, on observe 3 signaux au lieu de deux qui correspondent aux 3 protons non équivalents H-2', H-5', H-6' ; la position 3' étant substituée par le méthoxy. On constate également la présence des signaux correspondant au glucose mais la présence d'un signal à 5,22 et l'absence des signaux à 4,16 et 4,45 témoignaient de l'acylation en 6'' du glucose, nous suggère un profil de substitution différent à partir des mêmes éléments de base. Ce multiplet pourrait correspondre à une coumarylation en 2'', 3'' ou 4''.

Les signaux dédoublés et d'intensités différentes sont le reflet de la présence d'un mélange d'isomères. En effet, entre 7,71 ppm et 5,83ppm on retrouve les signaux attribués à des unités *p*-coumaroyl, dont l'isomère Z est majoritaire.

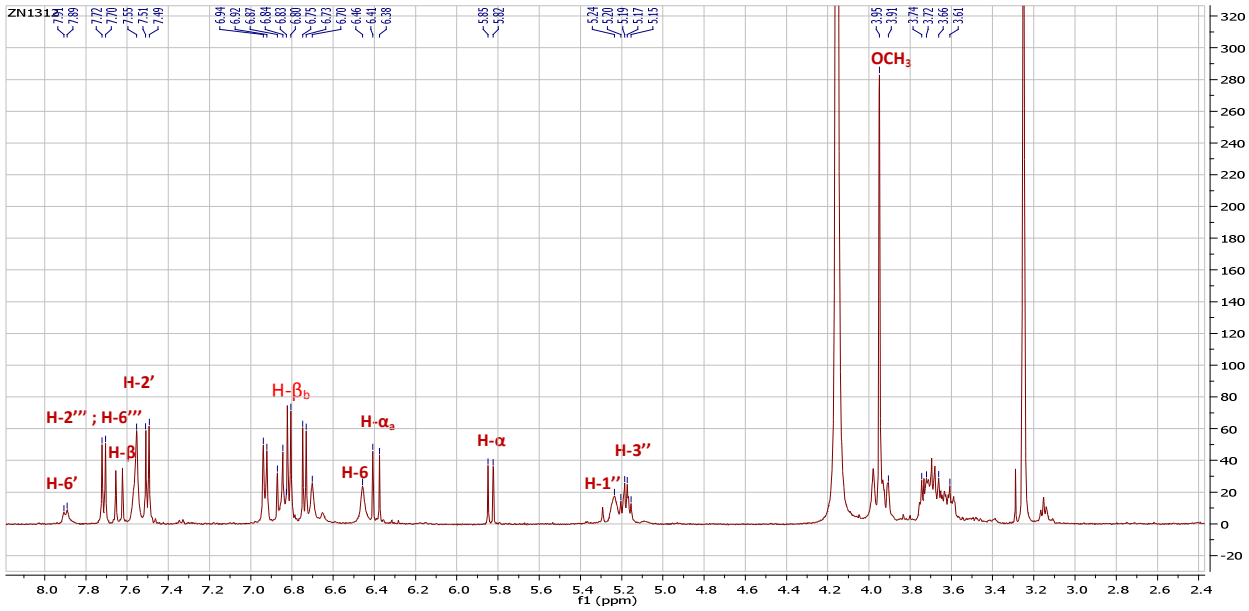


Fig. 83 : Spectres RMN-^{1}H de **PB1** (acétone-d_6, 400 MHz)

La réalisation de l'expérience COSY **(Fig. 74)** permet d'obtenir la position d'acylation, le multiplet à 5,22 correspondant au point d'acylation de la molécule ne présente pas de corrélation avec le proton anomérique du glucose, mais tout deux sont corrélés avec un même signal à 3,66 qui correspond au proton 2''. Le point d'acylation ne peut être que l'hydroxyle en 3''du glucose.

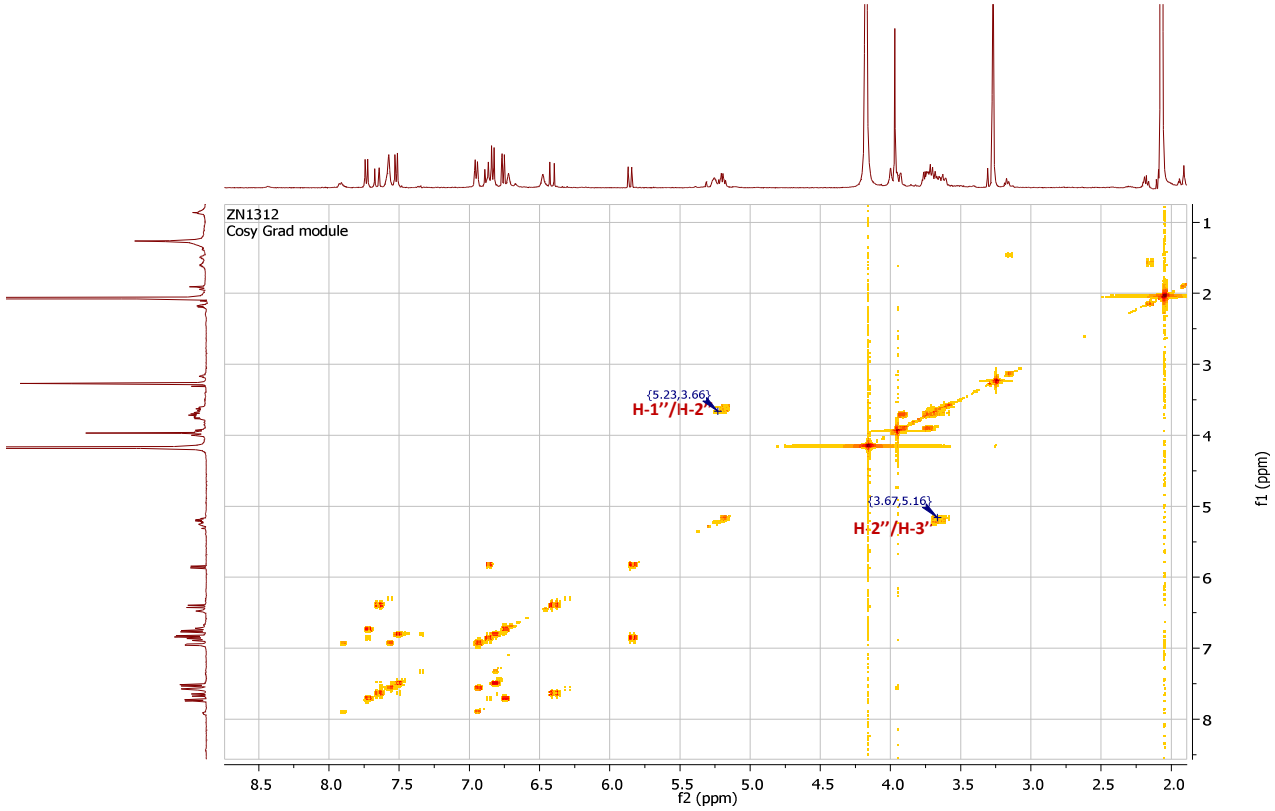
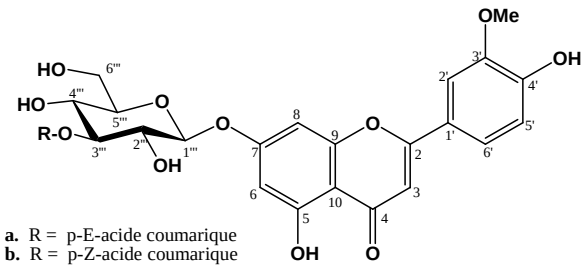


Fig. 84 : Spectres COSY de **PB1** (CD_3OD, 400 MHz)

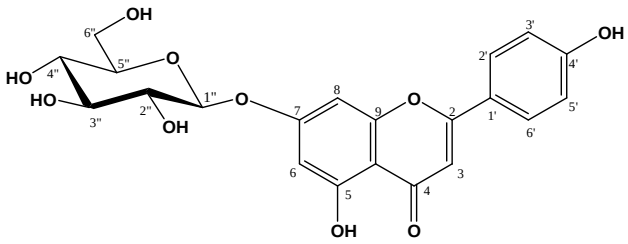
D'après la littérature ce composé est le Chrysoeriol 7-*O*-(3''-(E et Z)-p-coumaryl)-β-glucopyranoside (Marin *et al*., 2007).



a. R = p-E-acide coumarique
b. R = p-Z-acide coumarique

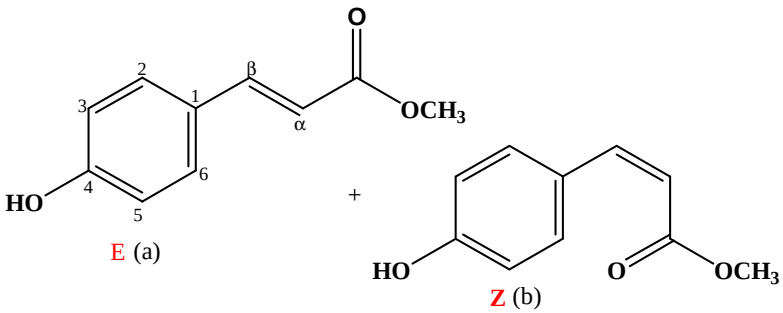
L'attribution de tous les signaux en RMN du ^{13}C et RMN-^{1}H a pu être réalisée par comparaison avec les valeurs trouvées dans la littérature qui sont présentés dans le **Tableau 19** (annexe III.1.b, p 249).

III.2.2. Composé PB2: identique à **MD13**



La comparaison des spectres RMN-^{1}H et ^{13}C du composé **PB2** et **MD13**, a montré que ces deux composés étaient identiques. Il s'agit de l'apigénine-7-*O*-glucoside.

III.2.3 Composé PB3 : 4-Hydroxy-cinnamate de méthyle.



Le spectre proton montre deux singulets (2x3H) à 3,77 et 3,71 ppm attribuables à deux méthoxyles. Les deux doublets à 7,36 et 6,68 ppm correspondent à des protons aromatiques, les constantes de couplage est de 9Hz nous permettre de penser à un noyau aromatique para substitué. Deux autres doublets à 7,58 et 6,19 caractéristique à des protons éthyléniques avec une constante de couplage *J*= 15 Hz, cette information suggére une double liaison *trans*. Le dédoublement des signaux nous laisse penser que ce composé est un mélange stéréoisomérique cis/ trans (Z/E) à des pourcentages de 33% et de 67% respectivement.

Les informations précédentes ainsi que celle présenté dans le **Tableau 21** (annexe III.1.b, p 251) confirme que **PB3** est identifié comme étant (*Z/E*) 4-hydroxy-cinnamate de méthyle ou para-hydroxy-cinnamate de méthyle.

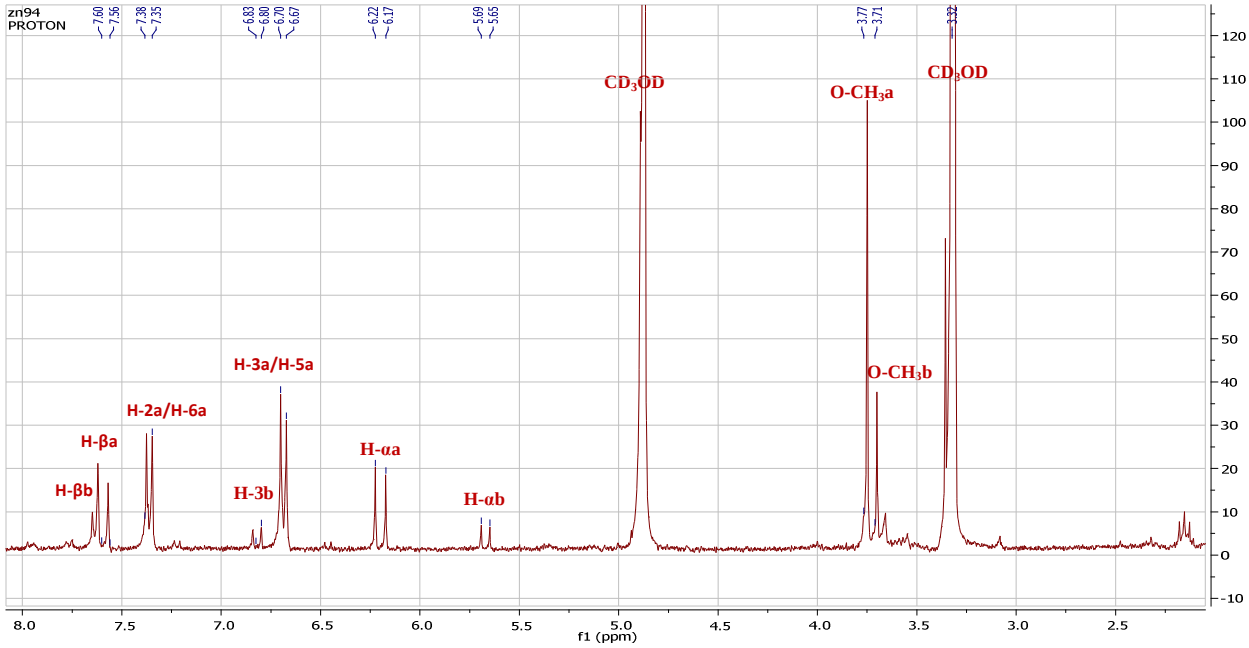
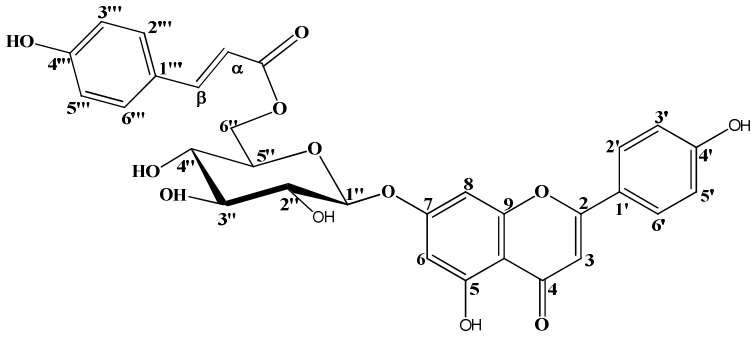


Fig. 85 : Spectres RMN-^{1}H de **PB3** (CD_3OD, 400 MHz)

III.2.4 Composé PB4

*III.2.4.1 Composé **PB4a** : (molécule 1, PB4a)= MD 14*



Le spectre de masse enregistré en mode positif à haute résolution montre deux pics pseudomoléculaire le premier $[M_1\text{-}H]^-$ à *m/z* 577 correspondant à la formule brute $C_{30}H_{26}O_{12}$ et le deuxième $[M_2\text{-}H]^-$ à m/z 607 correspondant à la formule brute $C_{31}H_{28}O_{13}$, ce qui signifie que ce produit est un mélange de deux composés .

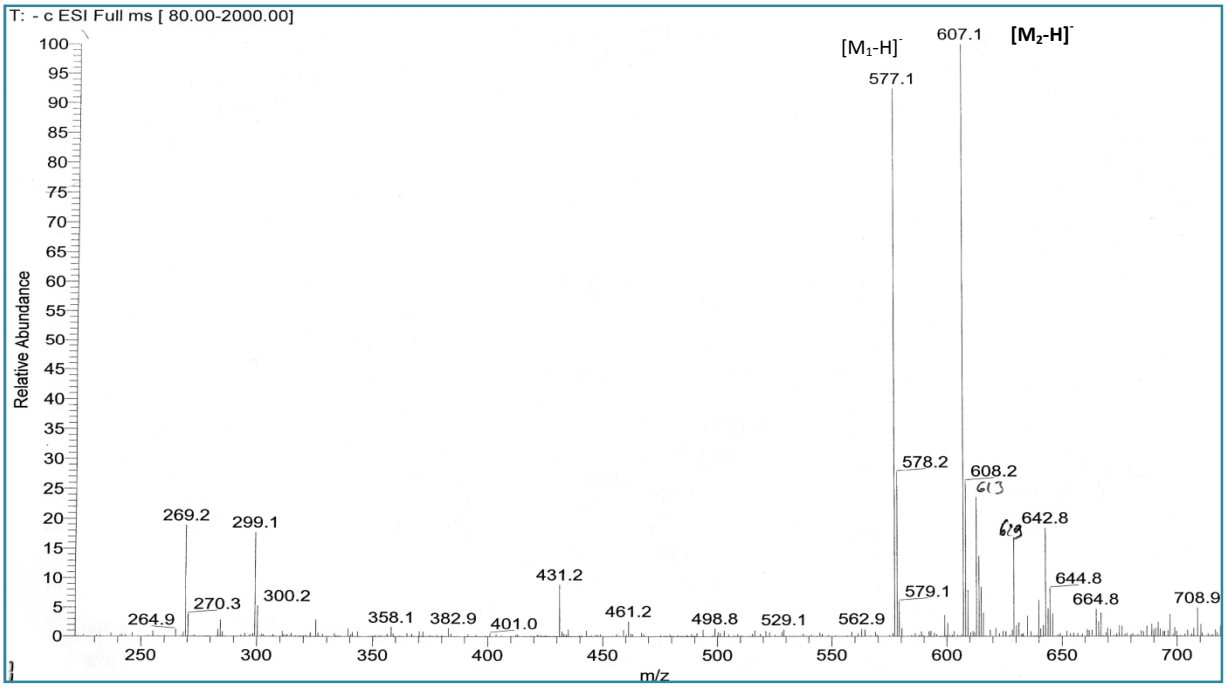
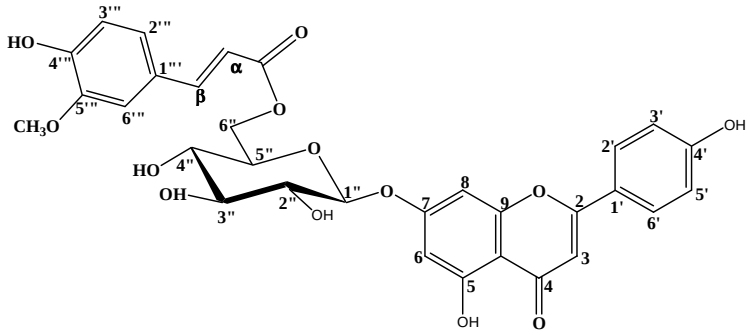


Fig. 86 : Spectre de masse HR-ESI en mode négatif de **PB4** dans (l'acétone+ H_2O)

L'analyse du spectre proton de la première molécule est similaire à celle du composé **MD14** isolé de *Marrubium deserti* et identifié sous le nom de terniflorine.

*III.2.4.2 Composé **PB4b** : Apigénine-7-O-(6''-(5''' methoxy-coumaryl) glucoside (deuxième molécule)*

Comparativement à la formule brute et à la masse de la première molécule, cette deuxième molécule contient 30 unités supplémentaires**.**



L'analyse du spectre RMN-^{1}H et ^{13}C de cette molécule notamment au niveau du coumaryle permet de distinguer la différence entre ces deux molécules. Tous les signaux sont identiques sauf on observe la disparition d'un doublet à 6,68 d (*8,5 Hz*) correspond au carbone 113,2 ppm, et l'apparition d'un singulet à 3,89 ppm correspond à OCH_3. L'expérience HSQC permet d'identifier son carbone C-5''' à 107,3 ppm. Cette flavone glycosylé coumarylée est originale (nouveau composé).

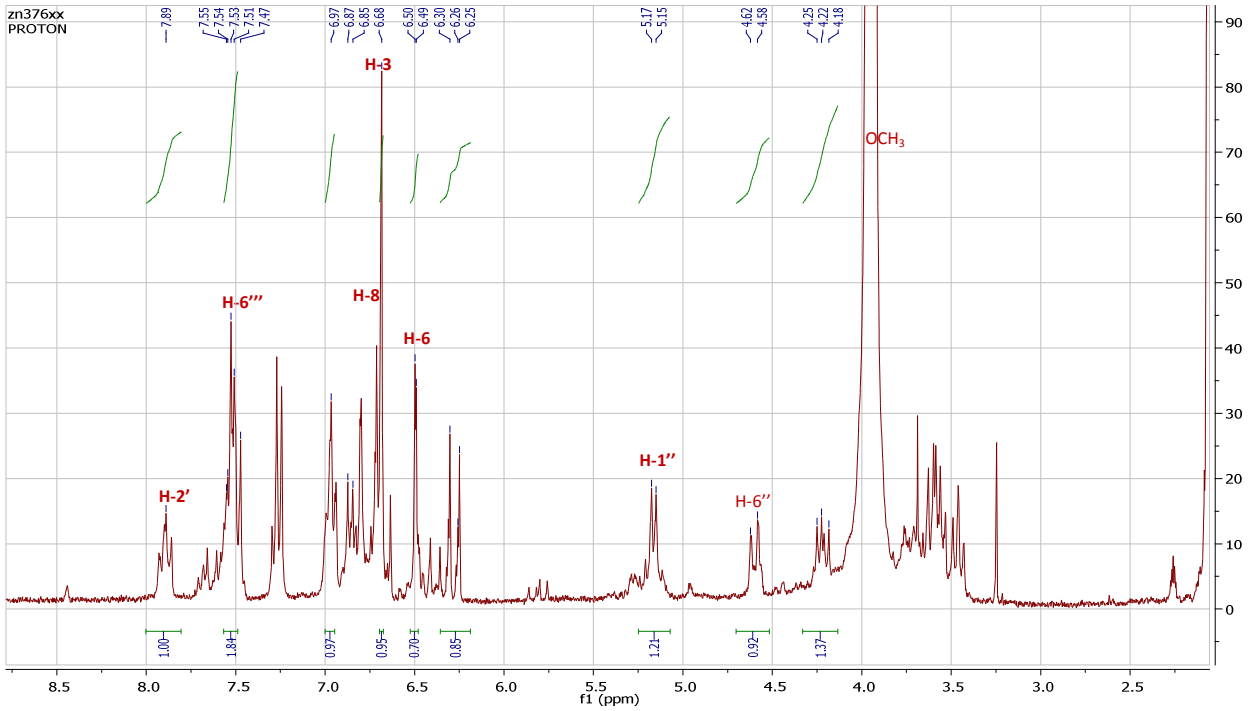


Fig.87 : Spectre RMN-^{1}H de **PB4** (acétone-d_6 +D_2O, 400MHz)

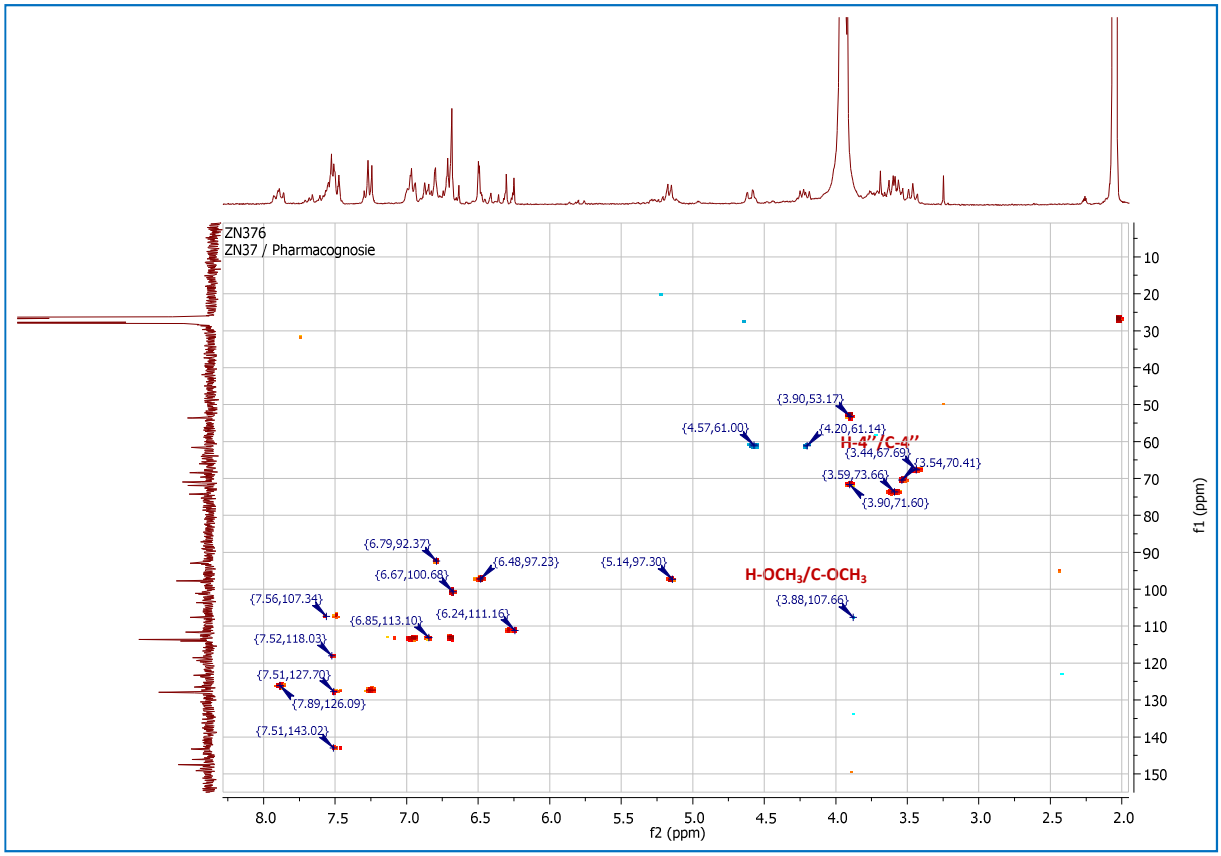


Fig.88 : Spectre HSQC de **PB4** (acétone-d_6 +D_2O, 400MHz)

III.2.5 Composé PB5 : Apigénine-7-*O*-(3''-p-coumaryl) glucoside

Sur le spectre RMN-^{1}H du composé **PB5**, on retrouve les mêmes caractéristiques majeures que pour le composé **PB1** : on observe des signaux correspondant à l'acide *p*-coumarique. On constate également la présence d'un doublet à 5,28 (*J* =6,3Hz) caractéristique du proton anomérique d'un sucre, la présence d'un triplet à 5,18 (*J*=8,0 Hz) qui témoignaient de l'acylation en 3'' du glucose, mais ce qui concerne les signaux du cycle B de la génine, on observe deux signaux (doublets) au lieu de trois dans **PB1** qui correspondent aux deux protons équivalents H-2', H-6' et H-3' , H-5' et l'absence du singulet à 3,95 ppm caractéristique d'une substitution en *para* du cycle B. La génine serait donc l'apigénine.

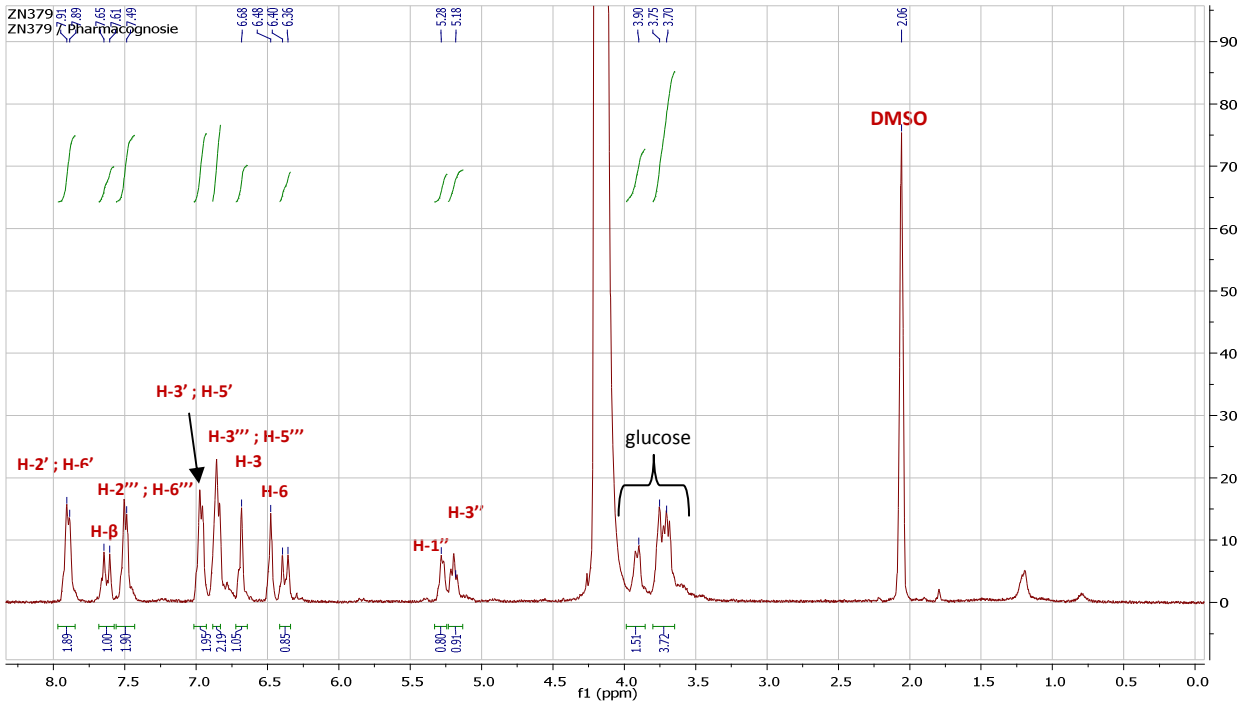
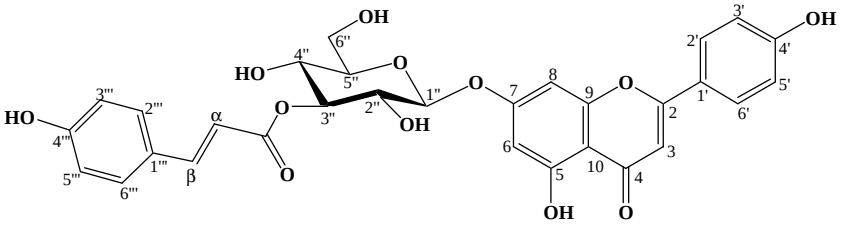


Fig. 89 : Spectres RMN-^{1}H de **PB5** (CD_3OD, 400 MHz)

Ces données, nous ont permis d'identifier la molécule comme étant l'apigénine -7-β-D-*O*-(3''-*O*-*p*-coumaryle) glucopyranoside un isomére de position du composé **MD14**, et isolée pour la première fois de *Stachys aegyptica* Pers (Lamiaceés) (Al-Ansari, 1995). Les données RMN du ^{1}H et du ^{13}C sont présentées dans le tableau avec celles trouvées dans la littérature (Al-Ansari, 1995).



III.2.6. Composé PB6

*III.2.6.1 Composé **PB6a** : Hispiduline-7-O-glucuronide (1ére molécule)*

Le spectre de masse obtenu par impact électronique en mode négatif montre un ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ à *m/z* 475 (calculé 476,095 uma) qui correspond à la formule brute $C_{22}H_{20}O_{12}$ et donc une masse moléculaire supérieure à celle du composé **MD18** de 30 unités soit un OCH_3 en plus.

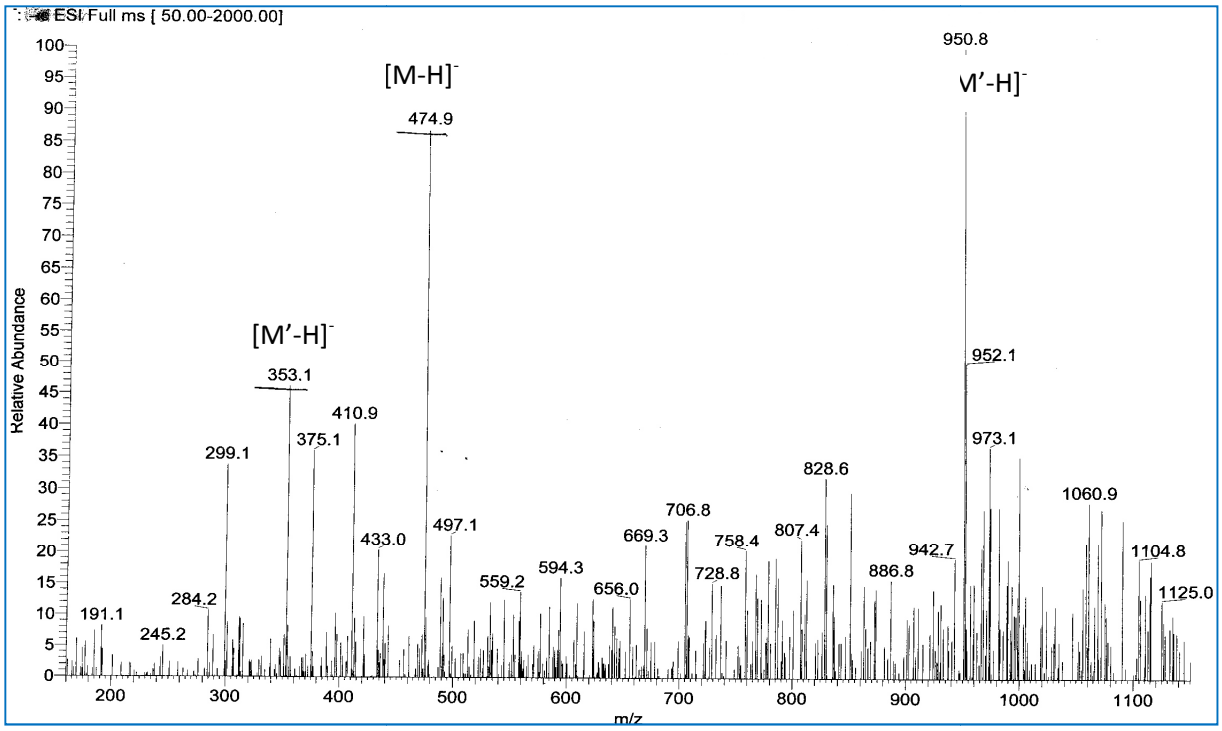


Fig. 90 : Spectre de masse HR-ESI en mode négatif de **PB6a et PB6b** dans (MeOH)

Les déplacements chimiques des protons dans le spectre RMN ^1H du composé **PB5** sont voisins à ceux du composé **MD18**. La seule différence dans la disparition d'un doublet à 6,44 (*J*=2,2 Hz) et l'apparition d'un signal déblindé résonant à 3,89 ppm sous forme d'un singulet attribuable à un méthoxyle (CH_3O). L'expérience HSQC permet d'identifier son carbone C-6 (cycle A).

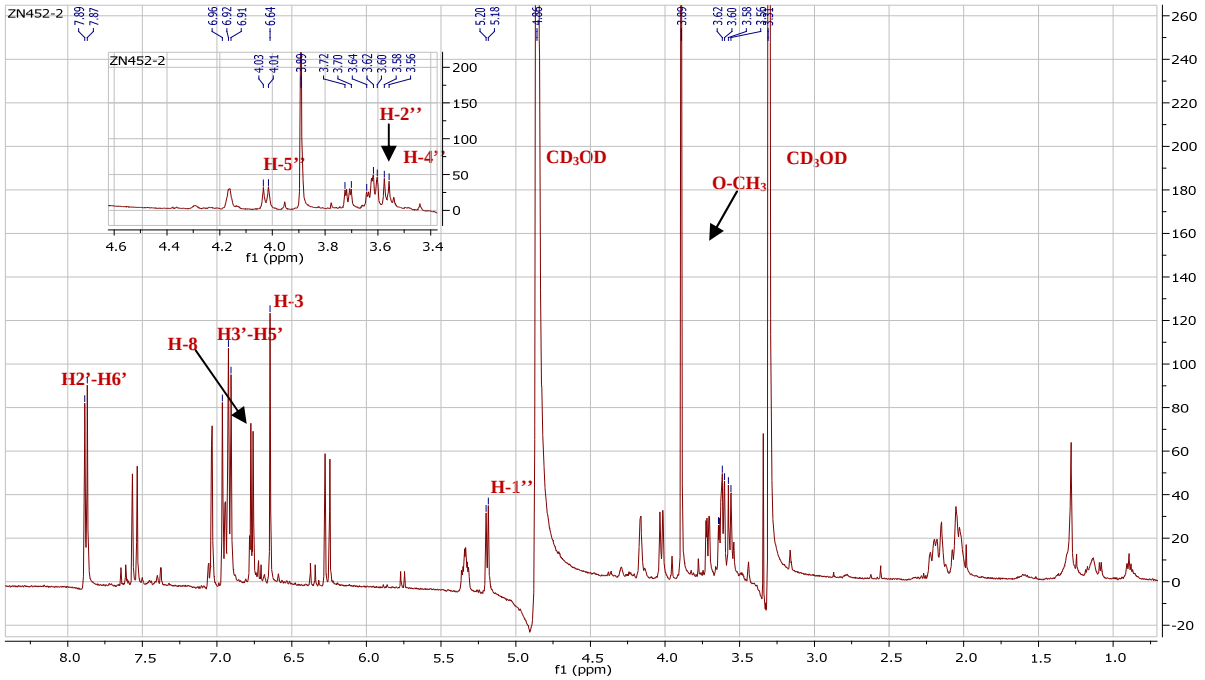


Fig. 91 : Spectres RMN-^{1}H de **PB6a** (CD_3OD, 400 MHz)

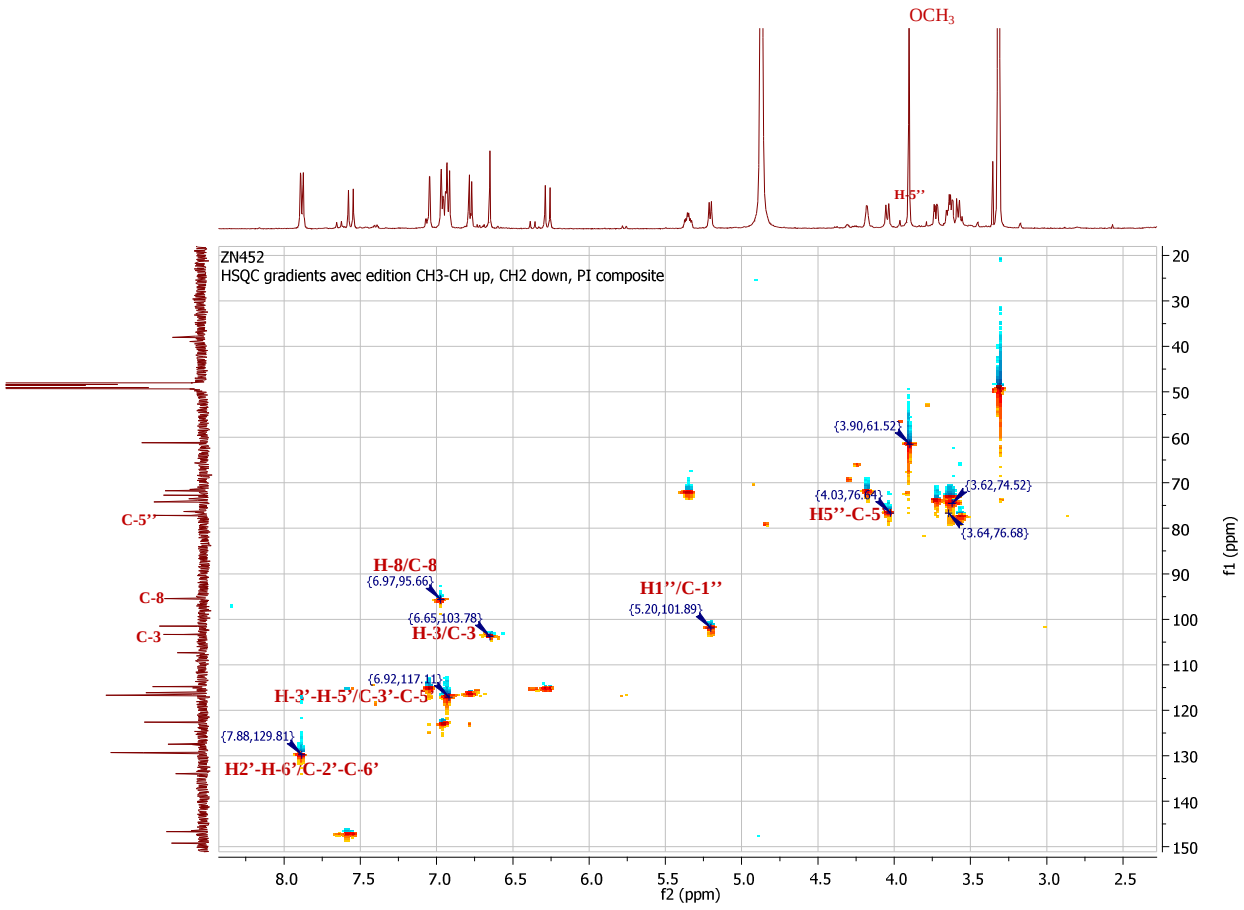
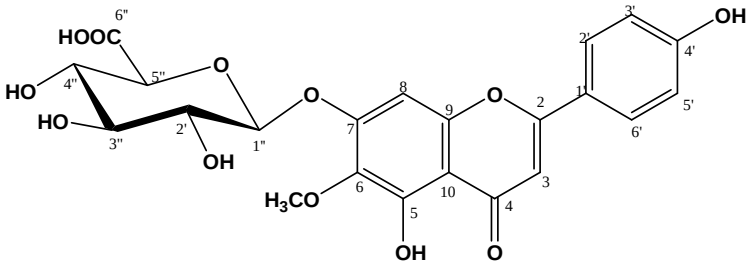
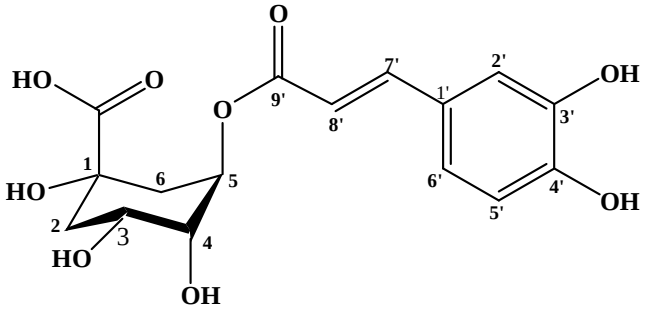


Fig. 92 : Spectres HSQC de **PB6a** (CD_3OD, 400 MHz)

L'analyse combinée des spectres HMBC, HSQC, conduit à attribuer tous les déplacements chimiques des protons et de carbones. La structure a été établie comme étant *:* Hispiduline-7-*O*-glucuronide. Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN du ^{1}H et du ^{13}C sont présentés dans **le Tableau 25** (annexe III.1.b, p 255) avec leurs attributions et ceux trouvés dans la littérature (Xia *et al*., 2007).



*III.2.6.2 Composé **PB6b** : Acide chlorogénique (2éme molécule)*



Le spectre de masse obtenu précédemment par impact électronique en mode négatif montre un deuxième ion pseudomoléculaire à *m/z* 353 (calculé 354.095 uma) qui correspond à la formule brute $C_{16}H_{18}O_{9.}$

Dans le spectre RMN-^{1}H en plus des signaux de la première molécule, nous observons d'autres signaux qui renforcent l'hypothèse de la présence d'une deuxième molécule :

-Les signaux apparaissant entre 7,60 et 6,01 ppm correspondent à des protons aromatiques et éthyléniques, dont trois doublets à 7,03, 6,94 et 6,77 ppm avec une constante de couplage de 1,9, de 1,9 et de 8,2 Hz respectivement caractéristiques à un noyau aromatique para et métha substitués. Les deux doublets à 7,55 et 6,29 ppm avec des constantes de couplage de 15,7 et de 16,1 Hz respectivement caractéristiques à une double liaison *trans* l'ensemble de ces informations nous oriente vers la présence d'un groupement *E*-caféyl.

Les cinq autres signaux se situent dans la zone des protons cyclique. Nous observons deux massifs entre 2,02 et 2,20 ppm caractéristiques à deux CH_2.

Sur le spectre RMN-^{13}C on observe la présence de :

- Un signal à 173,8 caractéristiques à la présence d'un COOH
- l'analyse des 3 signaux apparaissant entre 71, 9 ; 73,7 ; et 72,1 indique une forte similitude avec celui de l'acide glucuronide présenté dans la première molécule. La comparaison des déplacements chimiques des protons et des carbones avec celle de la littérature nous permet d'établir la structure de la PB6b comme étant l'acide chlorogénique.

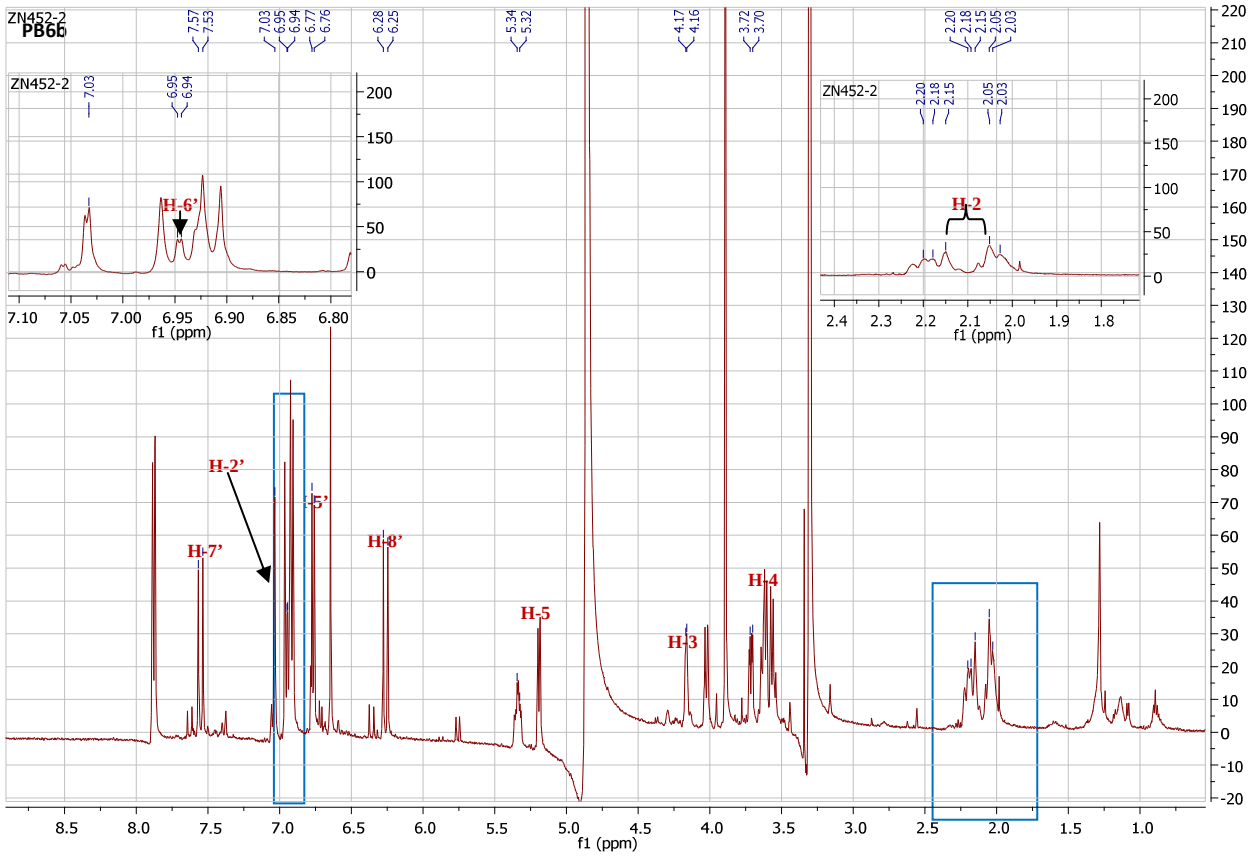


Fig. 93: Spectres RMN-^{1}H de **PB6b** (CD_3OD, 400 MHz)

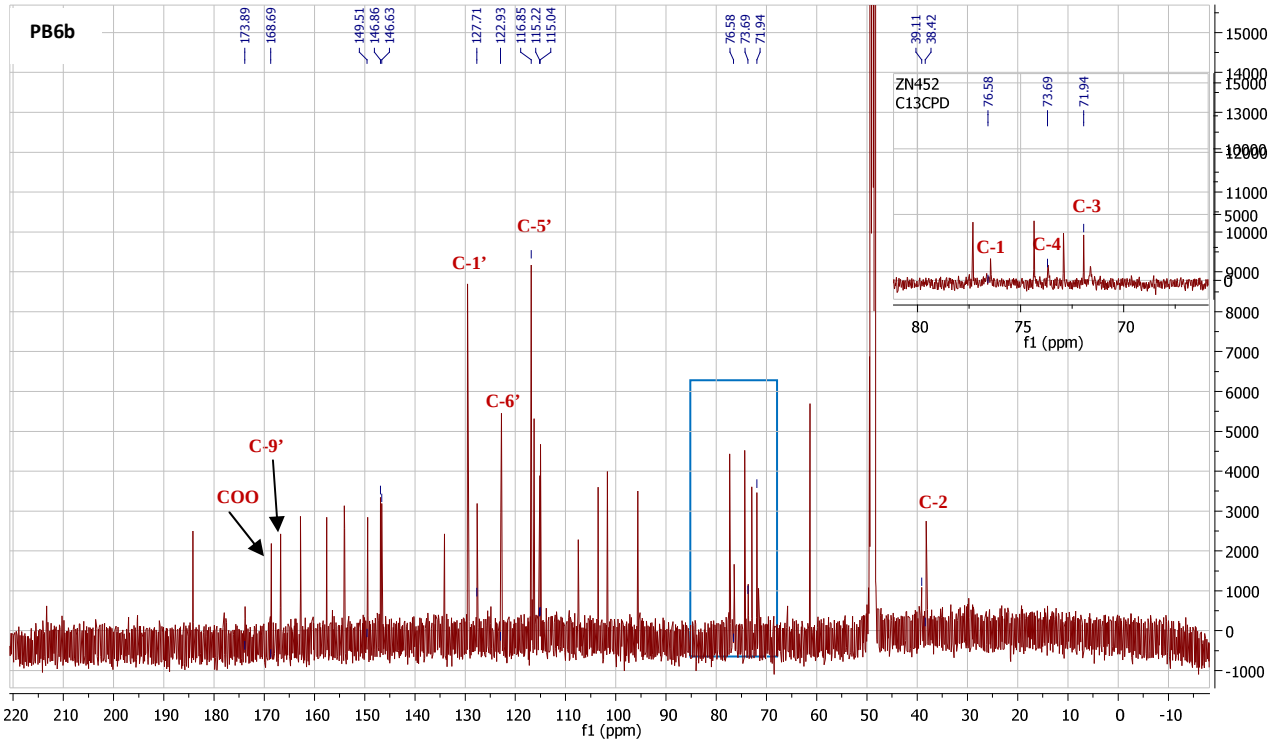


Fig. 94 : Spectres RMN-^{13}C de **PB6b** (CD_3OD, 100 MHz)

III.3 Analyse HPLC des extraits polaires des deux plantes

L'extrait MeOH, les phases AcOEt, BuOH de *Marrubium deserti* de Noé et L'extrait MeOH de *Phlomis bovei* ont été analysés par HPLC/ DAD-UV afin de comparer leurs profils chromatographiques et d'obtenir une information sur le nombre des composés à identifier. Attention, revois tes termes « extraits » et « phases » tu mélanges tout entre ton texte et la figure !!!

Les chromatogrammes des trois extraits sont présentés dans la Fig. 95:

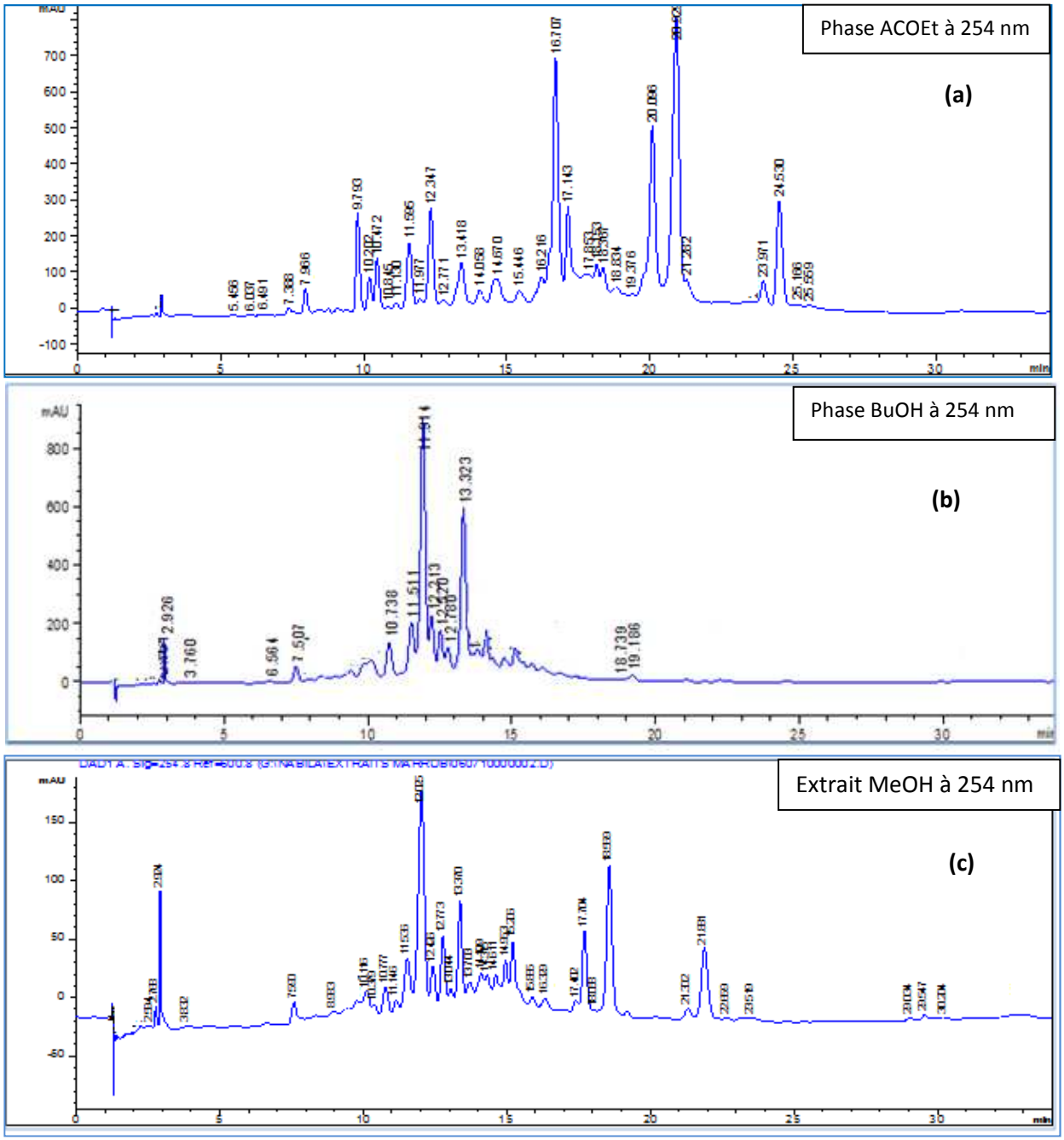


Fig. 95 : Profils chromatographiques HPLC/UV à 254 nm de l' extrait MeOH (c) , la phase ACOEt (a)et la phase BuOH (b). Colonne Purospher Star RP-18 (125mm/ 4mm). Gradient H2O-MeOH + 0.1% de AF : 90-10 à 0-100 en 30. Débit 1 mL.min-1.

Les trois extraits présentent quelques pics chromatographiques paraissant être identiques.
En ce qui concerne la phase AcOEt , nous constatons en premier lieu qu'elle est plus riche en composés polaires que la phase BuOH. Deux pics UV-majoritaires observés dans l'extrait BuOH présentant un t_R= 11,9 min et t_R= 13,9 min, sont retrouvés également dans la phase AcOEt et leurs spectres UV sont identiques.

La comparaison des pics majoritaires présents dans la phase AcOEt par rapport à ceux de l'extrait MeOH montre que ces pics sont présents dans ce dernier mais en quantité moins importante.

Tous les composés isolés de la phase AcOEt de *Marrubium deserti* de Noé et de l'extrait MeOH et de *Phlomis bovei* sont présentés dans les deux chromatogrammes ci-dessous (**Fig. 96, Fig. 97**):

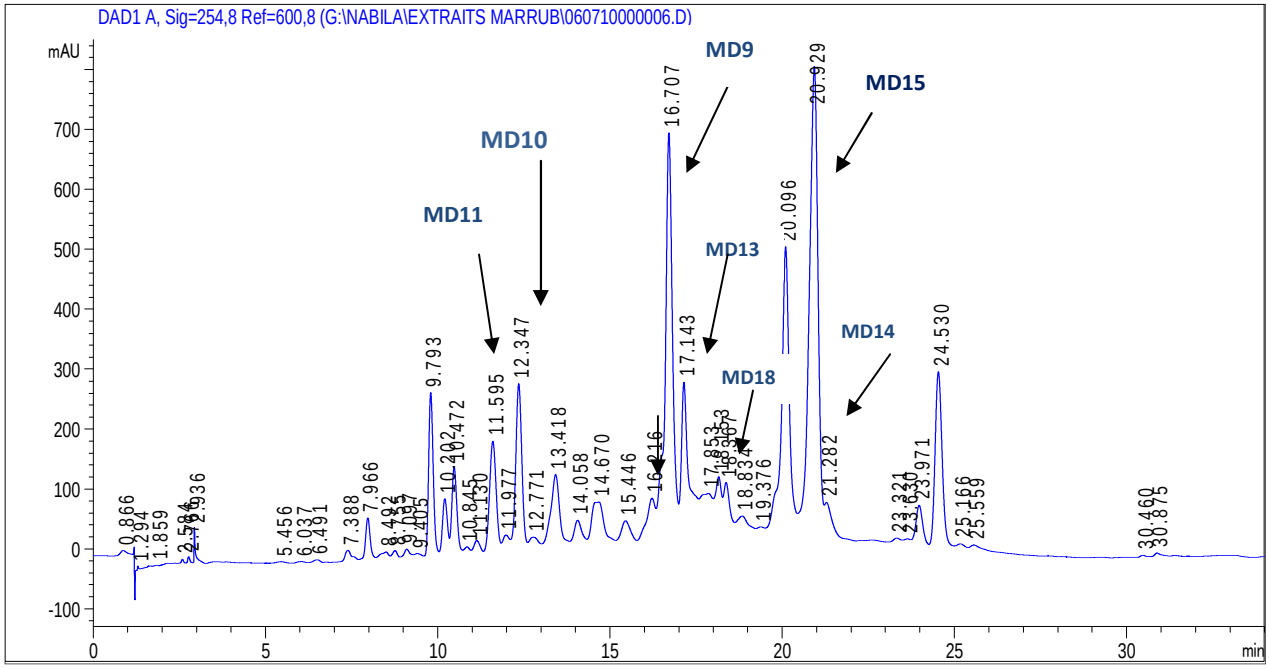


Fig. 96 : Profils chromatographiques HPLC/UV à 254 nm de la phase ACOEt et les composés isolés, Colonne Purospher Star RP-18 (125mm/ 4mm). Gradient H_2O-MeOH + 0.1% de AF : 90-10 à 0-100 en 30 min. Débit 1 mL.min^{-1}

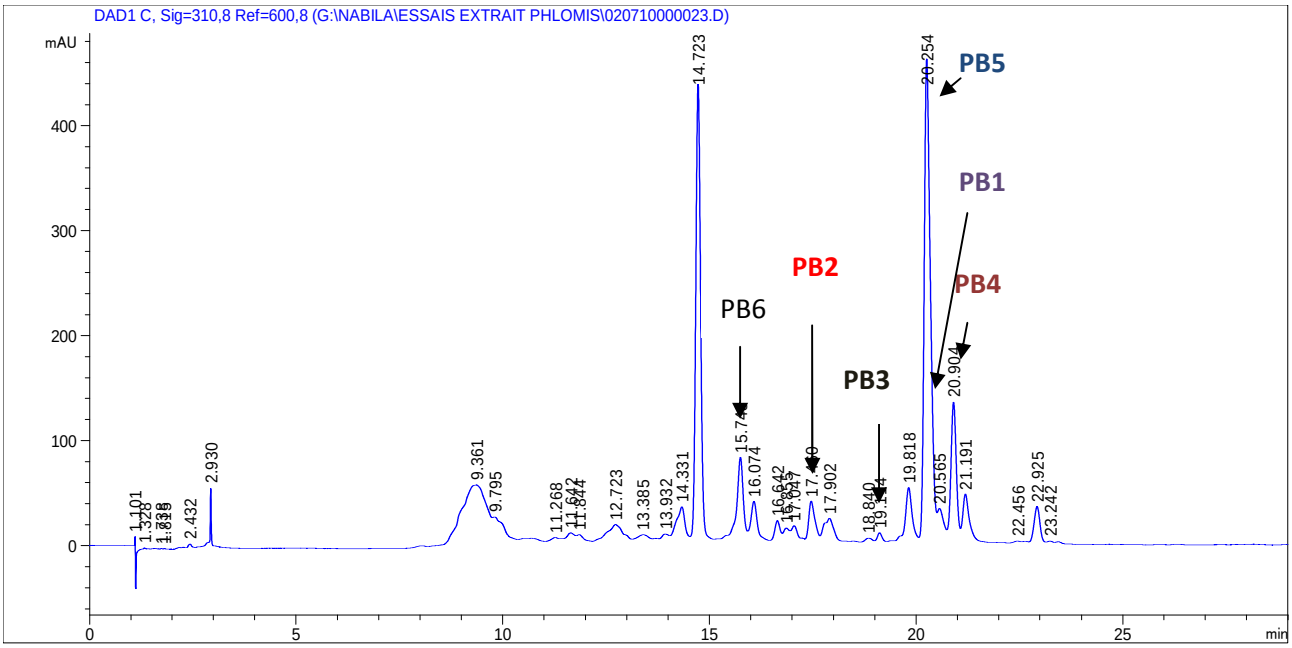


Fig. 97 : Profils chromatographiques HPLC/UV à 310 nm de l'extraits MeOH et ses composés isolés, Colonne Purospher Star RP-18 (125mm/ 4mm). Gradient H2O-MeOH + 0.1% de AF : 90-10 à 0-100 en 25 min. Débit 1 mL.min^{-1}

III.4 Conclusion

L'étude de l'extrait CH_2Cl_2 de *Marrubium deserti* de Noé nous a permis d'identifier 8 diterpénes de types labdane lactonique dont 4 sont de nouvelles molécules : le Marrulibacétal A (**MD2)**, la désertine (**MD4)**, la 13*S*-9α,13α-epoxy-7-hydroxy-labda-6β(19),16(15)-diol dilactone (**MD5a)**, et la 13*S*-9α,13α-epoxy-7,14-dihydroxy-labda-6β(19),16(15)-diol dilactone (**MD5b**). Ces structures originales sont notamment caractérisées par la substitution des carbones C-15, C-14, C-16, C-13, et C-7, ainsi que 4 structures connus : la marrubiine, le marulibacétal, la marrulactone , et le mélange des deux isoméres en C-15 la cylenine A et 15-epi-cylenine A.

Le marrulibacetal (**MD6**), et la marrulactone (**MD3**) ont été identifiés pour la première fois en 2009. D'après la littérature, il existe une grande similitude de la composition de l'extrait dichlorométhane de *Marrubium deserti* de Noé (marrubiine, marrulibacetal, marrulactone, cylénineA , epi-cyllénineA, désertine, Marrulibacétal A) et l'extrait chloroformique de *Marrubium globosum* ssp. *Libanoticum* (cyllénine A, 15-*epi*-cyllénine A, (13*R*)-9R,13R-epoxylabda-6*β*(19),16(15)-diol dilactone, marrulibacetal, et marrulactone) (Rigano *et al*., 2006 ; Rigano *et al*., 2009)
Comme nous l'avons mentionné précédemment dans la partie introduction, les diterpénes de type Labdane lactonique sont des métabolites secondaires caractéristiques de la famille des Lamiacées.
Notons aussi que ces diterpénes isolés appartenant à la série normale ou la configuration de C-5 ; C-9 ; et C-10 est opposée à ceux de la série *ent.*

L'investigation phytochimique des extraits polaires de *Marrubium deserti* de Noé a permis de renforcer la connaissance phytochimique de cette plante, Les composés isolés appartiennent à la classe des polyphénoliques en général et en particulier au flavonoïdes et phénylpropanoïdes.

Les flavonoïdes isolés sont constitués principalement de l'apigénine comme génine. Les dérivées glycosylés et coumarylés identifiés sont l'apigénine-7-*O*- glucoside, terniflorine, l'apigénine-7-*O*-glucuronide, apigénine, et l'apigénine néohesperidoside, ce dernier est isolé pour la premiére fois dans ce genre.

Les phénylpropanoïdes identifiés dans cette espèce est connu sous le nom actéoside et forsythoside B, et sont présents dans presque tout les genres de cette famille de plante.

L'extrait MeOH de *Phlomis bovei* de Noé nous a permis la détermination de quatre flavonoïdes glycosylés et coumaroylés : hispiduline-7-*O*-glucuronide, chrysoeriol 7-*O*-(3''-(E et Z)-*p*-coumaryl)-β-glucopyranoside, apigénine-7-*O*-(3''-p-coumaryl) glucoside, apigénine-7-*O*-glucoside, la terniflorine,une nouvelle structure flavonique dérivée de la terniflorine (originalité due à la présence d'un OCH_3 en position 5'' de la partie coumaryle), un *para*- hydroxy-cinnamate de méthyle et un acide chlorogénique.

Enfin, dans la dernière partie de ce travail nous allons aborder l'étude des activités biologiques : antibactérienne, antioxydante, génotoxique et antigénotoxique des molécules isolées durant cette étude et des extraits de *Marrubium deserti* de Noé et *Phlomis bovei* de Noé.

III.5 Références

A

Al-Ansari M. A., Nawwar M. A., Saleh N. A. M., 1995. Stachysetine, a diapigenin-7-glucoside-p, p'-dihydroxy-truxinate from *Stachys Aegyptiaca*. *Phytochemistry,* 40(5), 1543-1548.

Agrawal P. K. , 1972. Carbon-13 NMR of flavonoids, Editions Elsevier, New York.

Aritomi M., 1963. Terniflorin, a new flavonoid compound in flowers *of Clematis terniflora* var. robusta. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 11, 1225-1228.

D

De Jesus R. A., Cechinel-Filho V., Oliveira A. E., Schlemper V., 2000. Analysis of the antinociceptive properties of marrubiin isolated from *Marrubium vulgare*. *Phytomedicine*,7, 111-115.

E

Endo K., Takahashi K., Abe T., Hikino H., 1982. Structure of forsythoside B, an antibacterial principe of *Forsythia koreana* stems. *Heterocycles*, 19, 261-264.

El Bardai S., Morel N., Wibo M., Fabre N., Liabres G., Lyoussi B., Quetin-Leclercq J., 2003. The vasorelaxant activity of Marrubenol and marrubiin from *Marrubium vulgare*. *Planta Medica*, 69, 75-77.

F

Fulke J. W. B., Henderson M. S., Mc Crindle R., 1968. Some reactions of the diterpene marrubiin and its congeners. *Journal of Chemical Society*, (C), 807-810.

H

Habtemariam S., Gray A. I., Waterman P. G., 1994. Diterpenes from the Leaves of *Leonotis ocymifolia* Var. Raineriana. *Journal of Natural Product*, 57 (11), 1570–1574.

Han T., Li H., Zhang Q., Zheng H., Qin L., 2006. New thiazinediones and other components from *Xanthium strumarium*. *Chemistry of Natural Compounds*, 42(5) 567-570.

Hase T., Ohtani K., Kasai R., Yamasaki K., Picheansoonthon C., 1995. Revised structure for Hortensin, A flavonoid from *Millingtonia Hortensis*. *Phytochemistry*, 40(1), 287-290.

Henebelle T., Sahpaz S., Skaltsounis A. L., Bailleul F., 2007. Phenolic compounds and diterpenoids from *Marrubium peregrinum* . *Biochemical Systematics and Ecology*, 35(9),624-626.

Huisman O., d'Ari., 1981. An induced DNA replication-cell division coupling méchanism in *E.coli*. *Nature*, 290, 797-799.

Hussain J., Ullah R., Khan A.-U., Mabood F., Shah M. R., AlHarasi A., Gilani A. H., 2011. Antispasmodic and Ca++ antagonist potential of marrubiin, a labdane type diterpene from *Phlomis bracteosa. Journal of Pharmacy Research*, 4(1), 178-180.

Hussein A. A., Meyer M. J. J., Rodriguez B., 2003. Spectral Assignments and reference data. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 41, 147-151.

I

Imai K., Mayama T., 1953. Chemical constituents of Erigeron species (*Compositae*) II Erigeron annus 2. *Yakuku Zasshi*, 73, 131-134.

J

Jamal A. K., Yaacob W. A, Din L. B., 2009. Achemical study on Phyllanthus columnaris. *European Journal of Scientific Research*, 28(1), 76-81.

K

Karioti A., Heilmann J., Skaltsa H., 2005. Labdane diterpenes from *Marrubium velutinum* and *Marrubium cylleneum*. *Phytochemistry*, 66, 1060–1066.

Karioti A., Skopeliti M., Tsitsilonis O., Heilmann J., Skaltsa H., 2007. Cytotoxicity and immunomodulating characteristics of labdane diterpenes from *Marrubium cylleneum* and *Marrubium velutinum*. *Phytochemistry*, 68, 1587-1594.

Klippel K. F ., Hiltl D. M., Schipp B., 1997. A multicentrique placebo-controlled, double-blind clinical trial of beta-sitosterol for the treatment of benign prostate hyperplasia. *British Journal of Urology*, 80,427-432.

Krejci I., Zadina R., 1959. Choleretic action of marrubiin and of marrubic acid. *Planta Medica*, 7, 1-7.

M

Mangoni L., Adinolfi M., 1968. Sulla stereochimica della marrubina. *Gazzetta Chimica Italiana*, 98, 122-138.

Marsan M . P., Warnock W., Muller I., Nakatani Y., Ourisson G., Milon A., 1996. Synthesis of deuterium-Labeled plant sterols and analysis of their Side-Chain mobility by solid state deuterium NMR. *Journal of Organic Chemistry*, 61, 4252-4257.

Marin P. D., Veitch N. C., Grayer J. R., Kite G. C., Sokovic M., Janackovic P., 2007. Flavonoids from *Phlomis fruticosa* (*Lamiaceae*) growing in Montenegro. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35, 462-466.

Markham K. R., Ternai B. (1976) Carbon-13 NMR of flavonoids-II: Flavonoids other then flavone and flavonol aglycones. *Tetrahedron*, 32, 2607-2612.

Markham K. R., Geiger H., 1994. ^{1}H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Flavonoids and their Glycosides in Hexadeuterodimethylsulfoxide. In The Flavonoids. *Advances in Research* since 1986 (ed. J. B. HARBORNE), pp. 676. Chapman & Hall, London.

Meyre-Silva C., Yunes R. A., Shlemper V., Campos-Buzzi F., Cechinel-Filho V., 2005. Analgesic potential of marrubiin derivatives, a bioactive diterpene present in *Marrubium vulgare* (*Lamiaceae*). *II Farmaco*, 60, 321-326.

N

Nakaoki T., 1935. Glucoside of flavones of the white flower IV constituent of *Cosmos bipinnatus*, Cav Yakugaku Zasshi, 55, 967-978.

P

Piozzi F., Bruno M., Rosselli S., Maggio A., 2006. The diterpenoids of the genus *Marrubium* (*Lamiaceae*). *Natural Product Communication*, 1 (7), 585-592.

R

Rao G. V., Rao P. S., 1982. A phytochemical study of *Heylandia latebrosa*. Fitoterpia, 53, 21.

Ravn H., Nishibe S., Sasahara M., Xuebot L.,1990. Phenolic Compounds from *Plantago Asitica*. *Phytochemistry*, 29(11), 3627-3631.

Redaelli C., Formentini L., Santaniello E., 1980. Apigenin 7-glucoside and its 2'' and 6''-acetate from ligulate flowers of *Matricaria Chamomilla*. *Phytochemistry,* 19, 985-986.

Rigano D., Grassia A., Bruno M., Rosselli S., Formisano C., Apotoside Arnold N., Senator F., 2006. Labdane Diterpenoids from *Marrubium globosum* ssp.*libanoticum*. *Journal of Natural Product*, 69, 836-838.

Rigano D., Aviello G., Bruno M., Formisano C., Rosselli S., Capasso R., Senatore F., Izzo A.A., Borrelli F., 2009. Antispasmodic Effects and Structure-Activity Relationships of Labdane Diterpenoids from *Marrubium globosum ssp libanoticum. Journal of Natural Product*, 72, 1477-1481.

S

Scarpati M. L., Delle Monache F., 1963. Isolation from *Verbascum sinuatum* of two new glucosides, verbascoside and isoverbascoside. *Annal Chim*, 53, 356-367.

Seifert K., Lien N.T., Schmidt J., Johne S., Popu S., Porzel A., 1989. Iridoide from *Verbascum pulverulentum*. *Planta Medica*, 55,470-473.

Senatore F., D'Agostino M., Dini I., 2000. Flavonoid Glycosides of *Barbarea vulgaris* L. (*Brassicaceae*). Journal *of Agricultural and Food Chemistry,* 48(7), 2659-2662.

Silva A. M. S., Alkorta I., Elguero J., Silva V. L. M., 2001. A13C RMN study of the structure of four cinnamic acids and their methyl ester. *Journal of Molecular Structure*, 595, 1-6.

Skalta H., Bermejo P., Lazari D., Silvan A. M., Skaltsounis A. L., Sanz A., Abad M. J., 2000. Inhibition of Prostaglondin E2 and Leukotrien C4 in mouse peritoneal Macrophage and thromboxane B2 production in human platelets by flavonoids from *Stachys chrysantha* and *Stachys candida*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 23 (1).

Stephens L. J., Wheeler D. M. S., 1970. Synthesis of diterpenoid acids – X. Stereochemistry of marrubiin, the C8 and C9 positions. *Tetrahedron*, 26, 1561-1567.

Stulzer H. K., Tagliari M. P., Zampirolo J. A., Cechinel-Filho V., Schlemper V., 2006. Antioedematogenic effect of marrubiin obtained from *Marrubium vulgare*. *Journal of Ethnopharmacology*, 108, 379-384.

T

Taboada J., Camino M., Gil N. M., Campos E., Guerrero C., 1994. Antifeedant activity of marrubiin and reduced marrubin. *Revista Latinoamericana de Quimica*. 23, 120-125.

W

Wong N. C., 2001. The beneficial effect of plant sterols on serum cholesterol, The *Canadian Journal of Cardiology*, 17(6),715-721.

Wu J., Zhang S., Xiao Q., Li Q., Huang J., Long L., Huang L., 2003. Phenylethanoid and aliphatic alcohol glycosides from *Acanthus ilicifolius*. *Phytochemistry*, 63, 491–495.

X

Xia H. J., Qiu F., Zhu S., Zhang T.Y., Qu G., Yao X. S., 2007. Isolation and Identification of ten metabolites of Breviscapine in Rat Urine. *Biological and Pharmaceutical Bulletin,* 30(7), 1308-1316.

CHAPITRE IV :

Essais biologiques

"L'effet thérapeutique ne peut être imputé à un seul constituant chimique ou à un groupe de molécules. C'est l'ensemble des substances présentes dans le végétal qui détermine l'activité de la plante, par un effet de synergie, mais parfois aussi d'antagonisme" Pr Jean-Marie Pelt.

L'activité d'une préparation à base de plante est rattachée à la présence du constituant majoritaire qu'elle renferme. Ce n'est pas toujours ce constituant majoritaire qui est responsable de l'effet thérapeutique, ni le marqueur choisi, comme par exemple l'hypéricine dans *Hypericum perforatum* (le millepertuis) qui est photo sensibilisante et antivirale alors que c'est l'ensemble (hypéricine, hyperforine et xanthones) qui participe à l'effet antidépresseur. Il convient de prescrire la plante dans sa globalité, en vue d'une efficacité maximale, plus importante que celle du principe actif isolé. Il module souvent les effets, tels ceux de la caféine associés aux tanins dans le thé, c'est l'ensemble des constituants chimiques du végétal, générant un profil pharmacologique spécifique, qui lui confère son activité thérapeutique.
En fait, la plante est dans certains cas aussi puissante que les produits d'origine synthétique parce qu'elle contient de nombreux éléments pouvant agir en synergie. De plus, la plante est parfois mieux tolérée par l'organisme, car généralement moins « brutale » dans ses effets que le médicament de synthèse. Le système immunitaire, non affaibli par l'irruption d'un remède insuffisant en qualité et excessif en quantité, dispose alors d'une énergie supplémentaire pour intervenir.

Les plantes constituent un réservoir immense de nouveaux composés médicinaux potentiels, présentant l'avantage d'une grande diversité de structures chimiques telles que les terpénoïdes, les polyphénols ou les alcaloïdes… et d'activités biologiques telles qu'antioxydantes, anti-inflammatoires, anticancéreuses...

L'objectif général du présent projet était d'évaluer les activités antibactérienne, antioxydante, génotoxique et antigénotoxique des extraits et des produits isolés de deux plantes médicinales de la flore Algérienne : *Marrubium deserti* de Noé et *Phlomis bovei*.

IV.1 Les propriétés des flavonoïdes

Les flavonoïdes présentent de nombreuses activités présentant un intérêt en thérapeutique telles que : antioxydante, hépatoprotectrice, diurétique, antibactérienne, chimioprotectrice, antidiabétique, antiallergique (Sharma, 2008 ; Mercader *et al.,* 2008, Cushnie et Lamb, 2005) et certains ont démontré des effets cardioprotecteurs importants (Hooper, 2008 ; Lotito et Frei, 2006).
Ils sont capables de protéger la muqueuse gastrique contre divers agents ulcérogènes : on peut citer comme exemple la 8-glucosyl hypolaetine, un flavonoïde présent dans diverses espèces du genre *Sideritis* (Lamiacées), qui possède une activité anti-ulcérogène significative (Villar, 1987). Une étude réalisée sur la naringénine et la quercétine, a montré que ces deux composés exercent également une activité anti-ulcérogène mise en évidence chez le rat dont l'ulcère gastrique a été induit par l'éthanol (Martin *et al*., 1994).
La majorité des activités biologiques des flavonoïdes est due à leur pouvoir antioxydant. Plusieurs études ont montré qu'un régime alimentaire riche en flavonoïdes peut avoir des effets bénéfiques sur la santé. De plus, un apport élevé en flavonoïdes peut diminuer la mortalité associée aux maladies coronariennes et réduit les risques d'incidence de ces maladies de 38% chez les femmes ménopausées (Yochum, 1999). De nombreux

travaux indiquent que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires *(*Da Silva *et al.*, 1994 ; Galati et al., 1994 ; Read, 1995) et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire (Middleton, 1996). Parmi eux, la taxifoline, isolée *de Madhula longifolia* possèderait une activité anti-inflammatoire significative et similaire à l'hydrocortisone (Gupta *et al.,* 1971).

Des recherches récentes nous démontrent que les flavonoïdes, et notamment les flavanols du cacao tels que la quercétine, l'isoquercitrine ou l'hyperoside peuvent aussi prévenir la douleur musculaire, en accélérant la réparation des tissus au niveau moléculaire. Spécifiquement, ils inhibent la synthèse de l'oxyde nitrique, déclencheur chimique de l'inflammation. On a également démontré que d'autres flavonoïdes comme l'eriocitrine, l'eriodictyol, la naringénine et l'apigénine inhibaient la sécrétion des mastocytes impliqués dans les phénomènes inflammatoires (Ayumi T., 1995).

Sous l'action, de la cyclooxygénase et de la lipooxygénase, l'acide arachidonique (acide gras) se métabolise respectivement en prostaglandine+thromboxane et en leucotriènes, molécules fortement impliquées dans le processus inflammatoire. *In vitro,* plusieurs flavonoïdes sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique plaquettaire (Middletton , 1998 ; Pelzer *et al*., 1998 ; Yeon *et al.,* 2001).

Des études récentes ont également montré que certains flavonoïdes, en particulier les dérivés de flavones comme l'apigénine, exercent leur activité anti-inflammatoire au moins en partie par la modulation de l'expression des gènes pro-inflammatoires comme la cyclooxygénase-2, l'oxyde nitrique synthase inductible, et plusieurs cytokines pivot. En raison de ces mécanismes d'action uniques, les flavonoïdes sont considérés comme des candidats raisonnables en tant que nouveaux médicaments anti-inflammatoires (Hyun, 2004).

Un petit nombre de flavonoïdes sont anti-cancérigènes et inhibiteurs de la croissance des cellules tumorales. I*n vitro,* ils peuvent interagir avec les enzymes du métabolisme des xénobiotiques, avoir des effets anti-initiateurs, et/ou anti-promoteurs ou encore être cytostatiques (cytotoxiques) (Bruneton, 2009).

L'apigénine, une flavone trouvée dans de nombreux fruits et légumes possède des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et anticancéreuses. Récemment, Shukla & Gupta ont évalué l'efficacité de cette molécule en épidémiologie, puisque la consommation d'aliments riches en ce composé diminue le risque de développer certains cancers en particulier le cancer du sein, de la prostate, du system digestif ou de la peau (Shukla *et al.,* 2010).

L'effet anticancéreux de la quercétine a été évalué *in vivo* sur des cellules cancéreuses et a montré qu'elle possède une activité antiproliférative qui se traduit par l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1.

Les relations structure-activité des flavonoïdes sont présentées dans le schéma suivant :

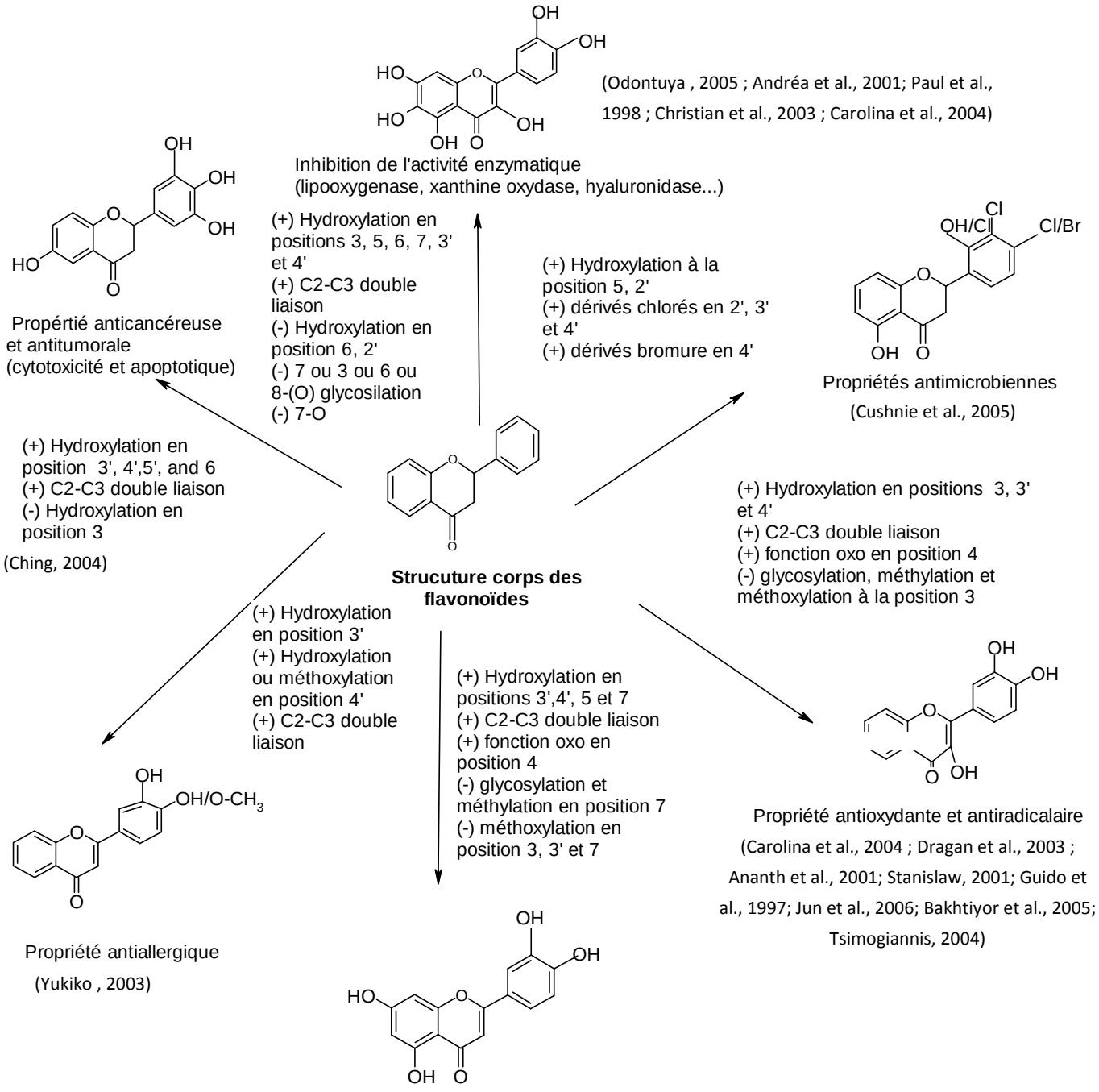


Fig. 98: Relations structure- activité des flavonoïdes

IV.2 Les propriétés des diterpènes

Les diterpènes suscitent un grand intérêt. Certains sont très connus tels que le taxol isolé en 1962 de *Taxus brevifolia* qui constitue une nouvelle arme cliniquement approuvée très efficace contre le développement des tumeurs cancéreuses chez l'Homme (Wani *et al.,* 1971 ; Rowinsky et al., 1992).

Les diterpènes possèdent diverses potentialités thérapeutiques telles que des propriétés antihypertensives (Odek-Ogunde *et al*., 1994), antitumorales (Chang *et al*., 2005), antifongiques (Bouaicha *et al*., 1993), cytotoxiques (Darias *et al*., 1990 ; Dimas *et al.,* 1998 ; Santos *et al* 2009), anti-inflammatoires et antimicrobiennes (Zheng *et al.*, 2010 ; de Carvalho *et al*., 2011; Porto *et al*., 2009). Il y a lieu de signaler également l'intérêt des quinones diterpéniques dans le traitement de plusieurs affections myocardiques et la toxicité des amides diterpéniques à l'égard des insectes (Lewis *et al*., 1977).

L'investigation phytochimique de *Salvia cinnabarina* (Lamiacées) à permis d'isoler un diterpène de type pimarane, l'acide 3, 4-secoisopimara-4(18), 7, 15-trien-3-oique qui possède des propriétés antispasmodiques, hypotensives et antibactériennes (Bisio *et al.,* 2007).
Les analyses *in vitro* de 5 nouveaux seco-abietanes isolés de *Callicarpa pilosissima* (Verbénacées) sur des mycobactéries (*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv) a prouvé que ces produits exercent une activité antituberculeuse (Chen *et al*., 2009).

L'évaluation biologique de la marrubiine, un diterpène labdanique très connu isolé du genre *Marrubium* (Lamiacées) a montré la présence d'une activité antinutritive (Taboada et al*.,* 1994), antinociceptive, vasorelaxante (De Jesus et al*.,* 1999; El Bardai *et al.,* 2003). En 2005, une étude menée par Meyre-Silva sur l'effet analgésique de la marrubiine et ses dérivés synthétiques (le marrubenol, l'acide marrubiinique et ses deux dérivés estérifiés) a permis de démontrer l'effet analgésique de la marrubiine et de ses dérivés notamment, l'acide marrubiinique. Ils ont également mis en valeur la possibilité d'utiliser ces composés comme modèle pour obtenir de nouveaux agents analgésiques plus puissants (Meyre-silva *et al.,* 2005). Une autre étude basée sur la recherche des propriétés antioedematogéniques de la marrubiine à été établie par Hellen *et al.* en 2006 et a montré un effet significatif. Le résultat de ce travail a confirmé et justifié l'utilisation de *Marrubium vulgare* en médecine traditionnelle dans le traitement des maladies inflammatoires (Stulzer, 2006).
L'oridonine et la ponicidine sont deux constituants majeurs d' *Isodon rubescens* (Lamiacées). Récemment, des chercheurs ont observé l'activité antiangiogénique de ces deux molécules et ils ont suggéré que ces composés peuvent fortement contribuer à l'efficacité de l'effet clinique démontré pour traiter le cancer de prostate (Meade-Tollin et al*.,* 2004). Ainsi, l'effet inhibiteur de l'oridonine sur la prolifération de plusieurs cellules cancéreuses humaines et leurs mécanismes ont été décrits (Liu *et al.,* 2004 ; Ikezoe *et al.,* 2003).

D'après la littérature, les diterpènes de type labdanes possèdent diverses activités biologiques (Seto, 1986 ; De Souza *et al.,* 1983 ; Fragoso-Serrano *et al.,* 1999 ; Rigano *et al.,* 2009) tels que antibactérienne (Qais *et al*., 1998, Dantas da Silva et al., 2008) antivirale, cytotoxique (Kittakoop *et al*., 2001) et algicide (Cangiano *et al.,* 2002).

IV.3 Activité antibactérienne

Il y a encore peu de temps, on croyait que la santé de l'Homme ne serait bientôt plus menacée par des maladies infectieuses telles que la tuberculose, la pneumonie ou autres infections bactériennes grâce à l'administration d'un des nombreux antibiotiques d'origine naturelle, de synthèse ou d'hémisynthèse disponibles sur le marché. Mais l'apparition de plus en plus fréquente de souches bactériennes resistantes aux antibiotiques telles que *Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus* ou d'espèces du genre *Enterococcus*, responsables de pneumonie ou d'infections nosocomiales a conduit de nombreux spécialistes à réagir à cette menace en recherchant de nouvelles molécules actives contre les bactéries, ou inhibitrices de leurs mécanismes de résistance afin de restaurer ainsi l'activité des antibiotiques existants (Karchmer *et al.,* 2000).

Avec les progrès de la chimie médicinale, la plupart des antibiotiques sont maintenant semi-synthétiques modifiés chimiquement à partir de composés d'origine naturelle, comme c'est le cas avec les bêta-lactamines (qui incluent les pénicillines , produites par des champignons du genre *Penicillium*, les céphalosporines et les carbapénèmes). Certains antibiotiques sont encore produits et isolés à partir d'organismes vivants, tels que les aminosides, et d'autres sont obtenus par des moyens purement synthétiques: les sulfamides , les quinolones et les oxazolidinones. En plus de cette classification fondée sur l'origine naturelle, semi-synthétique ou synthétique, les antibiotiques peuvent être divisés en deux grands groupes selon leurs effets sur les micro-organismes: ceux qui tuent les bactéries sont des agents bactéricides, alors que ceux qui ne compromettent que la croissance bactérienne sont connus comme des agents bactériostatique (Euzéby, 2005).
Les agents antibactériens sont classés selon leurs cibles bactériennes. Ils comprennent six groupes qui se différencient par leur mécanisme d'action :

- Inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne
- Inhibition de la synthèse des protéines
- Inhibition de la membrane cytoplasmique
- Inhibition de la synthèse des acides nucléiques
- Altération de la membrane cytoplasmique
- Activité antimétabolique ou antagoniste compétitif

L'activité antibactérienne est évaluée par la mesure de la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice).

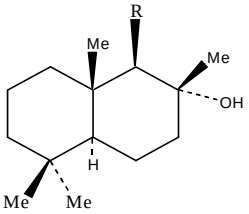
IV.3.1 Concentration Minimale Inhibitrice

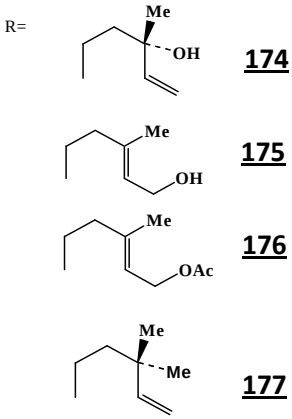
L'évaluation de la CMI consiste à déterminer la plus faible concentration d'un agent antibactérien nécessaire pour inhiber la croissance d'une souche de microorganisme donnée. La CMI est déterminée par l'utilisation d'une gamme de dilution de l'agent antibactérien, additionné à un milieu de culture liquide, de composition convenable pour la croissance des organismes étudiés. Après incubation, la CMI est définie comme étant la concentration à partir de laquelle aucune croissance microbienne n'est constatée.

IV.3.2 Etudes antérieures

Plusieurs études se sont focalisées à évaluer les propriétés antibactériennes des différents classes de produits naturels isolés des plantes : terpénoides, flavonoïdes, alcaloïdes et autres.

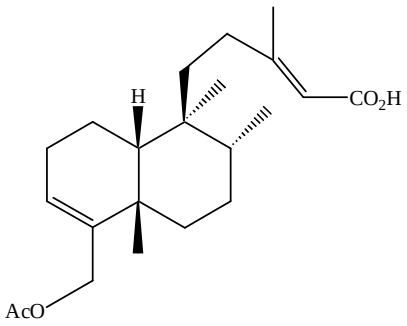
Des tests antibactériens ont été efféctués *in vitro* sur 4 labdanes diterpéniques bicycliques : le 13-episclareol **174**, le labdan-14-ène-8,13-diol **175**, le 5R,8R,9R,10R-labdan-13(E)-en-8a,15-diol **176** et le 5R,8R,9R,10R-labdan-13(E)-8a-ol-15-yl acétate **177** isolés des feuilles de *Cistus incanus* (*Cistaceés*)(Chinou*,* 1994), une plante méditéranéene utilisée en médecine traditionnelle. Leur activité a pu être évaluée sur des souches à Gram + (*Staphylococcus aureus* et *S. epidermis*) et à Gram – (*Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli*). Les antibiotiques de références utilisés sont l'ampicilline, la netilmicine, la ceftazidine et le ceftriaxone. Ces diterpèneses ont été testés à une concentration de 100 µg/mL et ont montré des activités supérieures à celle de l'ampiciline sur la croissance de ces bactéries (Meenakshi*,* 1998).





L'exploration des relations entre la structure et l'activité des agents antibactériens est étudiée au moyen de la chimie médicinale et de la biologie moléculaire : elle constitue une phase importante du développement d'une molécule. Cette détermination va conditionner son activité antibactérienne, y compris les mécanismes de résistance bactérienne, et elle sert de support à la détermination de la meilleure tolérance potentielle du futur médicament pour les risques connus.

De nombreux travaux ont montré que l'activité antibactérienne de certains extraits de plantes est attribuée à la présence des diterpénoïdes (Chen*,* 1996 ; Chinou, 1994; Habibi*,* 2000; Wachter*,* 1999). On peut citer comme exemple l'activité antibactérienne des exsudats de *Haplopappus deserticola*, attribuée à la présence de l'acide 18-acetoxy-*cis*-cleroda-3,13-*Z*-dien-15-oique **178** (Tojo*,* 1999).



acide 18-acetoxy-*cis*-cleroda-3,13-*Z*-dien-15-oique **178**

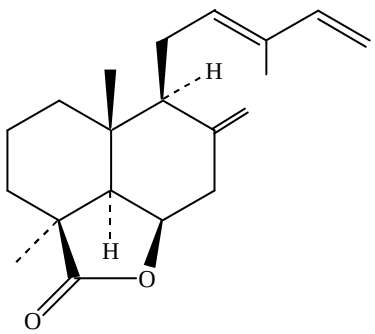
Urzúa *et al.* (2008), au cours d'études des propriétés antibactériennes de 15 diterpènes bicycliques isolés de plantes du Chili, ont démontré que ces structures sont dotées d'un effet important sur différentes souches bactériennes à Gram positif mais sont inactives sur les souches bactériennes à Gram négatif (Mendoza *et al.,* 1997; 2002 ; Urzúa *et al.,* 1998; 2003; 2006). Bien que les mécanismes d'action de ces composés puissent varier et qu'ils ne soient élucidés pour seulement quelques-uns (Haraguchi *et al.,* 1996 ; Tapia *et al.,* 2004), il a été suggéré que l'activité antibactérienne des diterpènes est liée à leur capacité d'endommager les membranes cellulaires bactériennes (Aranda *et al.,* 1997 ; Villalain *et al.,* 1997 ; Micol et al*.,* 2001 ; Barnabeu *et al.,* 2002, Kyrikou *et al.,* 2005 ; Matsingou *et al.,* 2005). Les relations structure-activité dans ces études reposent sur deux critères :

- d'une part, la présence du système décalinique dans la structure de la molécule qui facilite l'insertion dans la région lipophilique de la membrane.
- d'autre part, la présence d'une interaction entre la partie hydrophile de la structure et (un groupement donneur) et le groupement accepteur de la membrane cellulaire via une liaison hydrogène (Urzúa *et al.,* 2008).

Des études plus récentes sur le genre *Podocarpus* utilisé en médecine traditionelle pour soigner la fièvre, l'asthme, le rhume et le choléra ont montré que le taxol, également présent chez *Podocarpus gracilior pourrait être* un agent antibactérien potentiel (Abdillahi *et al.,* 2010).

Plusieurs types de labdanes ont été testés pour leurs activités antibactériennes : on peut citer comme exemple les labdanes bicycliques, qui sont décrits comme très actifs sur *K. pneumoniae*, *S. aureus* et *P. aeruginosa* alors que les dérivés glycosylés sont plutôt actifs uniquement sur les Gram + (*S. aureus* et *S. epidermis*) (Meenakshi *et al.,* 1998).

Le 8(17),12*E*,14-labdatrien-6,19-olide, un nouveau labdane diterpénique isolé de *Salvia leriaefolia* (Lamiacées)testé sur des souches bactériennes à Gram + et à Gram-, a révélé un effet antibactérien vis-à-vis de *S. aureus* à une concentration de 0.4 mM mais une activité d'inhibition modérée sur les bactéries Gram - comme *E. coli* ou *P. aeruginosa* (Habibi *et al.,* 2000).



8(17),12*E*,14-labdatrien-6,19-olide **179**

IV.3.3 Résultats et discussion

Les composés isolés de *Marrubium deserti* de Noé marrubiine **MD1**, marrulibacétal A **MD2**, 9,13-époxy-7-hydroxylabdan-6, 19 ; 15,16-diolide et 9,13-époxy-7, 14-dihydroxylabdan-6 **(MD5a et MD5b)**,19 ;15,16-diolide, marrulactone (**MD6)**, actéoside (**MD10)** et forsythoside B (**MD11**) ont été testés pour leur activité antibactérienne vis-à-vis de bactéries à Gram + et à Gram -.

Bactéries Gram+: Les bactéries Gram positif ont une structure qui s'organise en trois grandes parties : (de l'extérieur vers l'intérieur) :

- La couche de peptidoglycane composant la paroi cellulaire
- L'espace périplasmique
- La membrane plasmique

La couche de peptidoglycane des bactéries à *Gram positif* est très épaisse contrairement à celle des bactéries à Gram négatif.

Staphylococcus aureus : ou ***le staphylocoque doré*** est l'espèce la plus pathogène du genre *Staphylococcus,* fréquemment impliqué dans les infections nosocomiales et possède une grande capacité à donner des mutants résistants aux antibiotiques.

Enterococcus faecalis : Possède un haut niveau de résistance naturelle aux antibiotiques et peut causer des infections mortelles chez l'Homme (plus particulièrement dans un environnement hospitalier) comme des infections de la vessie, de la prostate ou de l'épididyme. Les infections du système nerveux sont plus rares (Schleifer, 1984).

Souche SARM : est un *Staphylococcus aureus* caractérisé par sa résistance à un antibiotique, la méticilline. Les infections au SARM ne sont plus seulement hospitalières (nosocomiales). Actuellement aux Etats-Unis, plus de 58% des infections graves au SARM sont communautaires et associées aux soins de santé (Klevens Monina, 2007)

Bactéries Gram- : Les bactéries Gram négatif ont une structure qui s'organise en trois grandes parties, soit, de l'extérieur vers l'intérieur :

- La membrane externe,
- L'espace périplasmique
- La membrane plasmique.

La membrane externe est en contact direct avec le milieu extérieur.

Pseudomonas aeruginosa : autrement connue sous le nom de **bacille pyocyanique,** elle est pathogène, très résistante et (avec d'autres bactéries à gram-négatif) de plus en plus souvent responsable d'infections nosocomiales. C'est l'une des bactéries les plus difficiles à traiter cliniquement. Le taux de mortalité atteint 50% chez les patients vulnérables (immunodéprimés).

klebsiella oxytoca : Ce sont des bactéries ubiquitaires présentes dans le tube digestif et dans l'appareil respiratoire des Hommes et des animaux. Elles sont responsables d'infections respiratoires.

L'interprétation des résultats obtenus dans le **Tableau 18** indique qu'aucun des diterpènes testés (**MD1**, **MD2**, **MD5**, **MD6**) ne présente d'activité antibactérienne sur les souches testées, que ce soit des bactéries à Gram positif ou à Gram négatif.

Tableau 18 : Evaluation de la CMI des composés **MD1**, **2**, **5**, **6**, **10** et **11** sur différents souches pathogènes

Composé	**Concentration (µg/mL)**	**Bactéries à Gram +**			**Bactéries à Gram -**	
		S. aureus	*E. faecalis*	SARM	*P. aeruginosa*	*K. oxytoca*
		ATCC 29213	ATCC 29212		ATCC 15442	ATCC 700324
MD1	85.2	-	-		-	-
MD2	46.2	-	-		-	-
MD5	57.2	-	-		-	-
MD6	40.7	-	-		-	-
MD10	162.5	-	-		-	-
MD11	**130**	**+**	**+**		-	-

-: inactif ; + : actif

Des travaux ont montré que l'activité antibactérienne de composés de type labdanes lactonique est due au système décaline et au noyau oxygéné lié au carbone C-6 qui peut être fermé ou ouvert (le noyau lactonique). Notre étude est la première concernant des diterpènes de type labdane pentacyclique, avec la présence d'un ou deux noyaux de type *spiro* éther. Une comparaison entre les molécules présentées précédemment dans l'étude antérieure de l'activité antibactérienne et les composés testés montre :

Que les molécules les plus actives sont les labdanes bicycliques **174** à **178** qui possédant un squelette bicyclique dans le premier cas et un clérodane dans le deuxiéme cas et dans le troisième cas le squelette de base est de type labdane lactonique tricyclique **179**. On peut suggérer que l'absence d'activité antibactérienne de ces molécules (**MD1**, **MD2**, **MD5**, **MD6**) est en partie due à la présence particulière de ce noyau *spiro* éther.

Le composé **MD11** (forsythoside B) présente une activité antibactérienne significative vis-à-vis des bactéries à Gram + (*Staphylococcus. aureus, Enterococcus. faecalis* et *SA*RM) avec une CMI de 130 µg/mL (**Tableau 1**8). Cette activité a été évaluée plusieurs fois sur les bactéries Gram + afin de vérifier sa reproductibilité (**Tableau 19)**. On ne retient que la concentration maximale à laquelle un effet bactériostatique a été observé, c'est-à-dire 130 µg/mL pour les différentes souches testées. Il est intéressant de noter que ce composé présente une CMI identique que ce soit sur une souche de référence du staphylocoque doré (ATCC 29213) ou sur une souche résistante comme le SARM qui présente différents mécanismes de résistance aux antibiotiques notamment aux β-lactamines.

Tableau 19 : Evaluation de la CMI du composé **MD11** sur différents souches de bactéries à Gram +

	M1 (µg/mL)	M2 (µg/mL)	M3 (µg/mL)	M4 (µg/mL)	M5 (µg/mL)	M6 (µg/mL)
S. aureus **(ATCC 29213)**	130	130	65	32,5	130	130
E.faecalis **(ATCC 29212)**	65-130	65	130	-	-	-
Souche SARM	130	-	-	-	-	-

- : non testé

IV.3.3.1 Activité de potentialisation de la norfloxacine

Une recherche d'activité de potentialisation de la norfloxacine a été évaluée sur différentes souches de bactéries à Gram + et à Gram – (**Tableau 20**). Ce test consiste à évaluer la CMI de la norfloxacine en présence des composés à tester afin d'observer un effet de potentialisation ou non. Parmi les souches testées, on trouve des souches de références de différents pathogènes (*S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* et *K. oxytoca*) et également une souche de staphylocoque doré (*S. aureus* 1199B) dite MDR (MultiDrug-Resistant) car surexprimant le transporteur NorA qui est une pompe à efflux impliquée dans la résistance à la norfloxacine.

Tableau 20 : Evaluation de la diminution de la CMI de la norfloxacine (potentialisation) par association avec les composés **MD1**, **2**, **5**, **6**, **10** et **11** sur différents souches de pathogènes

Composés	Concentration Maximale testée (µg/mL)	Bactéries à Gram +			Bactéries à Gram -	
		S. aureus	*S. aureus*	*E. faecalis*	*P. aeruginosa*	*K. oxytoca*
		ATCC 29213	1199B	ATCC 29212	ATCC 15442	ATCC 700324
MD1	85.2	=1 = 1	=1 =1 =1	=1 /2	/2 /2	= 1 = 1
MD2	46.2	=1 =1	1 1 1	=1 /2	/2 /2	/2 =1
MD5	57.2	/2 =1	/2 /2 /2	=1 /2	/2 /2	=1 =1
MD6	40.7	=1 =1	=1 = 1 = 1	=1 /2	/2 /2	=1 /0,5
MD10	162.5	=1 =1	=1 =1 =1	/2 /2	/2 /2	/2 /0,5
MD11	8.125	=1 =1	- - -	=1 /2	=1 = 1	/2 = 1
MD11	130	- -	/2	- -	- -	- -
MD11	65	- -	=1	- -	- -	- -

- :non testé

Nous pouvons remarquer que dans l'ensemble, les activités sont peu significatives (diminution au mieux de 2 fois la CMI de la norfloxacine). Cependant, tous les composés sauf **MD 11** (forsythoside) présentent une activité de potentialisation de la norfloxacine sur *P. aeruginosa* aux concentrations testées, ce qui laisse supposer un effet plus marqué pour cette souche, même s'il est peu significatif. Par ailleurs, le composé **MD11** présentant une activité bactériostatique (**Tableau 18** et **Tableau 19**), il a été testé à une concentration 4 fois inférieure à la CMI minimale mesurée (soit 32,5 µg/mL – **Tableau 19**) afin de s'affranchir de l'effet bactériostatique intrinsèque à ce composé.

Parmi les activités de potentialisation, une des possibilités est l'inhibition des pompes à efflux qui limitent l'action des antibiotiques substrats de ces pompes. Cette activité pourra être plus particulièrement évaluée

avec la souche SA1199B car elle surexprime le transporteur NorA, ce qui multiplie par 4 la CMI de la norfloxacine sur cette souche par rapport à la souche de référence. Si une molécule restaure la CMI de la norfloxacine sur cette souche, il y a de fortes chances pour que cela se fasse *via* l'inhibition de NorA et donc que cette molécule soit un inhibiteur des pompes à efflux (IPE). Et donc pour le composé MD11 on ne peut pas dire que c'est un inhibiteur des pompes à efflux vu qu'il possède une activité bactériostatique. Le composé MD5 possède un effet de potentialisation peu significatif vis-vis la souche *S. aureus* 1199B.

Parmi les molécules testées, seule **MD5** semble être dotée d'une telle activité, mais à un faible niveau si on la compare à un inhibiteur de référence comme la réserpine qui entraîne une diminution de 8 fois la CMI de la norfloxacine sur cette souche SA1199B et à une concentration de 20 µg/mL.

IV.3.3.2 L'échiquier

Dans le but d'avoir de la recherche d'une action bactéricide additive ou synergique, d'un moindre risque de sélection de mutants résistants, et d'une diminution de la durée du traitement et/ou des posologies il est possible d'associer des antibiotiques. La méthode utilisée dans ce cas est l'échiquier.

L'échiquier est une technique qui utilise le croisement de dilutions d'une molécule à tester d'une part, avec un antibiotique d'autre part. L'objectif de ce test est de vérifier si le mécanisme d'action du composé à tester est additif, synergique ou différent de celui de l'antibiotique de référence.

Les différentes concentrations de chaque antibiotique sont associées 2 à 2. Chaque concentration d'un antibiotique est associée à chaque concentration de l'autre antibiotique. Après ensemencement avec la bactérie à étudier on note les concentrations pour lesquelles se produit une inhibition de la croissance.

Cette activité est mesurée par le calcul du FIC (Indice de Fraction de la Concentration inhibitrice) qui exprime le degré de synergie pour l'association d'un antibiotique avec un composé en mesurant pour chacun la réduction de sa CMI lorsqu'il est associé à l'autre.

FIC = (CMI du composé associé à l'antibiotique / CMI du composé) + (CMI de l'antibiotique associé au composé / CMI de l'antibiotique**)**

L'effet d'une association positive d'antibiotiques se remarque quand la concentration de chacun des antibiotiques au point le plus favorable est au moins 4 fois inférieure à la CMI de chacun des antibiotiques utilisés seuls.

Plus le FIC est faible (<0.5), plus la synergie est importante.

La synergie du forsythoside B (**MD11**) a été vérifiée en association avec deux antibiotiques : l'oxacilline et la vancomycine, ce sur trois souches de staphylocoque doré : celle de référence (SA29213), et deux souches résistantes : la souche VISA (Vancomycine Intermediate resistant *Staphylococcus aureus*) et le MRSA.

Tableau 21 : Représentation de l'antibiogramme de l'association **MD11**/ Oxacilline (Ox) sur une Souche **SA 29213**

Ox. (µg/mL) / MD11 (µg/mL)	2	1	0,5	0,25	0,125	0,063	0,031	0,016	0
300	-	-	-	-	-	-	-	-	-
150	-	-	-	-	-	-	-	-	-
75	-	-	-	-	-	-	-	**(2)** -	+/-
37,5	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	+
18,8	-	-	-	-	-	-	+	+	+
9,4	-	-	-	-	-	**(1)** -	+	+	+
4,7	-	-	-	-	-	+/-	+	+	+
0	-	-	-	-	-	+	+	+	+

- = pas de croissance bactérienne / + = croissance bactérienne

Tableau 22 : Représentation de l'antibiogramme de l'association **MD11**/Vancomycine sur une souche **SA 29213**

Vancomycine (µg/mL) / **MD11 (µg/mL)**	**20**	**10**	**5**	**2,5**	**1,25**	**0,63**	**0,31**	**0,16**	**0**
300	-	-	-	-	-	-	-	-	-
150	-	-	-	-	-	-	-	-	-
75	-	-	-	-	-	-	-	**(3)** -	-
37,5	-	-	-	-	-	+/-	+/-	+/-	+/-
18,8	-	-	-	-	-	+	+	+	+
9,4	-	-	-	-	-	+	+	+	+
4,7	-	-	-	-	-	+	+	+	+
0	-	-	-	-	-	+	+	+	+

- = pas de croissance bactérienne / + = croissance bactérienne

Tableau 23 : Représentation de l'antibiogramme de l'association **MD11**/Oxacilline sur une souche **VISA** :

Ox. (µg/mL) / MD11 (µg/mL)	2	1	0,5	0,25	0,125	0,063	0,031	0,016	0
300	-	-	-	-	-	-	-	-	-
150	-	-	-	-	+/-	+/-	+	+	+
75	-	-	-	-	+/-	+	+	+	+
37,5	-	-	-	-	+	+	+	+	+
18,8	-	-	-	-	+	+	+	+	+
9,4	-	-	-	-	-	+	+	+	+
4,7	-	-	-	-	-	+	+	+	+
0	-	-	-	-	-	+	+	+	+

- = pas de croissance bactérienne / + = croissance bactérienne

Tableau 24 : Représentation de l'antibiogramme de l'association MD11/Vancomycine sur une souche **VISA** :

Vancomycine (µg/mL) / MD11 (µg/mL)	20	10	5	2,5	1,25	0,63	0,31	0,16	0
300	-	-	-	-	-	-	-	-	+
150	+	+/-	-	+	+/-	+/-	+	+	+
75	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	+	+	+
37,5	+	+	-	+	+	+	+	+	+
18,8	+	+	-	+	+	+	+	+	+
9,4	+	+	-	+	+	+	+	+	+
4,7	+	+	-	+	+	+	+	+	+
0	+	+	+	+	+	+	+	+	+

- = pas de croissance bactérienne / + = croissance bactérienne

Tableau 25 : Représentation de l'antibiogramme de l'association **MD11** avec la Vancomycine sur une souche **SARM** :

Vancomycine (µg/mL) / MD11 (µg/mL)	20	10	5	2,5	1,25	0,63	0,31	0,16	0
300	-	-	-	-	-	+	+	-	-
150	-	-	-	-	-	+	+	+/-	-
75	-	-	-	-	-	+	+	+	+
37,5	-	-	-	-	+	+	+	+	+
18,8	-	-	-	-	+	+	+	+	+
9,4	-	-	-	-	-	+	+	+	+
4,7	-	-	-	-	-	+	+	+	+
ligne H → 0	-	-	-	-	-	+/-	+/-	+	+

- = pas de croissance bactérienne / + = croissance bactérienne

Pour la souche SA29213, les CMI de l'oxacilline et de la vancomycine sont de 0,25 µg/mL et 1,25 µg/mL respectivement, alors que pour la souche VISA la CMI de la vancomycine est supérieure à 20 µg/mL et celle de l'oxacilline et de 0,25 µg/mL. Pour la souche SARM, seule l'association avec la vancomycine a été testée, et la CMI de cette dernière est équivalente à celle observée sur la souche de référence soit 1,25 µg/mL (ligne **H**).

La CMI de **MD11** est d'environ 150 µg/mL pour les souches SA29213 et SARM, alors qu'elle est supérieure ou égale à 300 µg/mL pour la souche VISA.

D'après ces échiquiers, il apparaît que seulement pour la souche SA 2913, un effet additif de **MD11** avec les antibiotiques testés peut être mis en évidence. Pour calculer le degré de synergie de ce composé avec l'oxacilline sur la souche SA29213 on calcule le FIC tel que suit :

$$Fic_i = Fic_{oxo} + Fic_{MD11}$$

(1)= (0,063/0,125) + (9,4/150)= 0,504+0,0625=0,567

(2)= (0,016/0,125) + (75/150)=0,128+0,5=0,628

De même pour le degré de synergie avec la vancomycine:

$$Fic_i = Fic_{vanco} + Fic_{MD11}$$

(3)= (0,156/1,25) + (75/75)= 0,1248+1=1,1248

D'après les calculs, on observe que le FIC est supérieur à 0,5 pour l'association avec chaque antibiotique sur la souche de référence, donc le composé **MD11** ne présente pas d'effet synergique, mais cependant un effet additif avec l'oxacilline peut être souligné.

Lors de cette étude, le composé **MD5** a également été testé sur une souche Gram - : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 et deux souches de *Staphylococcus aureus* : SA1199 et SA1199b. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau suivant.

Tableau 26 : Représentation de l'antibiogramme de l'association **MD5** avec la **Ciprofloxacine** sur une souche **Pyo A30**

MD5 (µg/mL) / Cipro (µg/mL)	100	50	25	0	100	50	25	T
0.5	-	-	-	-	+	+	+	+
0.2	-	-	-	-	+	+	+	+
0.1	-/+	-/+	-/+	-	+	+	+	+
0.06	-/+	-/+	-/+	-/+	+	+	+	-
0.03	+	+	+	+				-
0.01	+	+	+	+				-
0.007	+	+	+	+				
0.003	+	+	+	+				

Tableau 27 : Représentation de l'antibiogramme de l'association **MD5** avec la **Ciprofloxacine** sur une Souche **SA1199**

MD5 (µg/mL) / Cipro (µg/mL)	100	50	25	0	100	50	25	T
0.5	-	-	-	-	+	+	+	+
0.2	-	-	-	-	+	+	+	+
0.1	-	-	-	-/+	+	+	+	+
0.06	-/+	-/+	-/+	+	+	+	+	-
0.03	+	+	+	+				-
0.01	+	+	+	+				-
0.007	+	+	+	+				
0.003	+	+	+	+				

Tableau 28 : Représentation de l'antibiogramme de l'association **MD5** avec la **Ciprofloxacine** sur une souche **SA1199b**

MD5 (µg/mL) / Cipro (µg/mL)	100	50	25	0	100	50	25	T
16	-	-	-	-	+	+	+	+
8	-	-	-	-	+	+	+	+
4	-	-	-	-	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	-
1	+	+	+	+				-
0.5	+	+	+	+				-
0.2	+	+	+	+				
0.1	+	+	+	+				

Tableau 29 : Représentation de l'antibiogramme de l'association **MD5** avec la **Ciprofloxacine** sur une souche **1199b**

MD5 µg/mL) / Cipro (µg/mL)	250	125	63	31	0	250	125	63	31	T
16	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
8	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
4	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+					-
1	+	+	+	+	+					-
0.5	+	+	+	+	+					-
0.2	+	+	+	+	+					
0.1	+	+	+	+	+					

Ces échiquiers sont un peu différents des précédents : sur une partie de la plaque 96 puits un échiquier est réalisé comme précédemment en faisant varier les concentrations en antibiotiques et en composés à tester afin d'évaluer une éventuelle synergie entre les deux composés (colonnes 1 à 4 (bleu)). La colonne 5 (rouge) permet de connaître la CMI de l'antibiotique sur la souche testée (elle correspond en effet à l'antibiotique

testé seul). L'autre moitié de la plaque (colonnes 6 à 9 (noir)) représente l'évaluation de la CMI du composé à tester seul, en faisant varier sa concentration (de 100 à 25 µg/mL ou de 250 à 31 g/mL).

On observe que le composé MD5 ne présente aucun effet additif ou synergique avec la ciprofloxacine sur *Pseudomonas aeruginosa* ou sur *Staphyloccocus aureus*.

Puisque la CMI est supérieure à250 µg/mL pour la souche SA 1199B et supérieure à 100 µg/mL pour les souches SA 1199 et PA 15442, alors le composé ne présente aucun effet antibiotique sur ces bactéries à Gram + et à Gram **-** aux différentes concentrations testées.

IV.4 Activité antiradicalaire

IV.4.1 Introduction

L'intérêt porté aux antioxydants naturels ces 10 dernières années et notamment aux substances naturelles de type polyphénolique ne cesse d'augmenter. Dans le domaine de la nutrition, il s'agit d'étudier de nouvelles molécules pour la prévention de nombreuses pathologies et le traitement de certaines maladies telles que celles liées au vieillissement, les maladies cardio-vasculaires, les cancers, les maladies inflammatoires et la dégénérescence du système immunitaire (Guinebert *et al.,* 2005). Un antioxydant est une molécule qui possède une capacité à capter où à piéger les radicaux libres produits spontanément et d'une façon continue dans l'organisme vivant.

IV.4.1.1 Qu'est ce qu'un radical libre

Ce sont des atomes ou des molécules dotés d'une forte énergie. Ils sont produits dans notre organisme sous l'action de radiations ionisantes, de rayons UV, ou au cours des réactions enzymatiques. Ce mécanisme peut mener à un désordre dans les structures moléculaires, en oxydant les lipides membranaires, les protéines cellulaires, les acides nucléiques, provoquant ainsi la mort cellulaire avant d'être neutralisés (Markaf*,* 2003).
Par ailleurs, les radicaux libres se forment tout à fait normalement dans notre organisme. Ils sont rigoureusement contrôlés par des antioxydants. Dans certaines situations, en raison d'une surproduction radicalaire (tabac, alcool, pollution…) ou d'une diminution des capacités antioxydantes (insuffisance des micronutriments antioxydants, inactivation enzymatiques), un déséquilibre de la balance Oxydants/Antioxydants (entre production de radicaux libres et système de défense) produit le stress oxydatif (Sohal *et al.,* 2002). Ce phénomène est responsable du dommage cellulaire lié au vieillissement, aux maladies cardio-vasculaires, au cancer, aux rhumatismes, à la maladie d'Alzheimer et à la plupart des maladies dégénératives (Montagnier*,* 1998).

On distingue deux types de système de défense très efficaces dans notre organisme : les antioxydants primaires et les antioxydants secondaires.

- Les antioxydants primaires ou enzymatiques :
  C'est un système de défense primaire composé d'enzymes et de substances antioxydantes. Ces substances auront comme fonction d'empêcher l'initiation ou la propagation des réactions radicalaires.
- Les antioxydants non enzymatiques :

L'action protectrice enzymatique est complétée par différents réducteurs qui se comportent comme des piégeurs de radicaux libres. C'est une deuxième ligne de défense contre les radicaux.

Une grande partie des recherches actuelles porte sur l'étude de molécules antioxydantes comme les vitamines, les caroténoïdes ou les polyphénols. De nombreux travaux publiés ces dernières années ont démontré que les hydroxyflavones possèdent un pouvoir antioxydant encore plus puissant que la vitamine C.

Ce sont des substances faisant partie intégrante de notre nourriture journalière. Elles ont été décrites comme ayant un grand nombre de propriétés biologiques : antioxydantes, anti-inflammatoires, antiallergiques et anti-carcinogènes (Sharma, 2008 ; Da silva *et al.,* 1994 ; Cushni *et al.,* 2005). Les hydroxyflavones ont été longuement étudiées pour leur activité antioxydante leur permettant de capter les radicaux libres, à l'origine de différents états pathologiques et par extension, du vieillissement des cellules.

IV.4.1.2 Relation structure-activité

L'activité antioxydante des flavonoïdes est liée à leurs capacités à piéger les radicaux libres : le radical hydroxyle *OH*$^{\cdot}$, l'anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$, l'oxyde nitrique *NO*$^{\cdot}$) (Rajendran *et al.,* 2004 ; Nagai *et al.,* 2005 ; Krishnamachari , 2002 ; Mc Phail *et al.,* 2003]. Ils sont naturellement produits dans l'organisme.

Plusieurs travaux ont mis en évidence des relations structure-activité au sein des flavonoïdes (Rice-evans *et al.,* 1996 ; Van Acker *et al.,* 1996 ; Harborne, 2000 ; Woodman, 2005 ; Khlebnikov *et al.*, 2007). Ces études permettent d'avoir une idée sur les activités antioxydantes de ces molécules en fonction de leurs caractéristiques structurales à partir du nombre et de la position de leurs groupements fonctionnels (Di Majo, 2005) (**Fig. 99**).

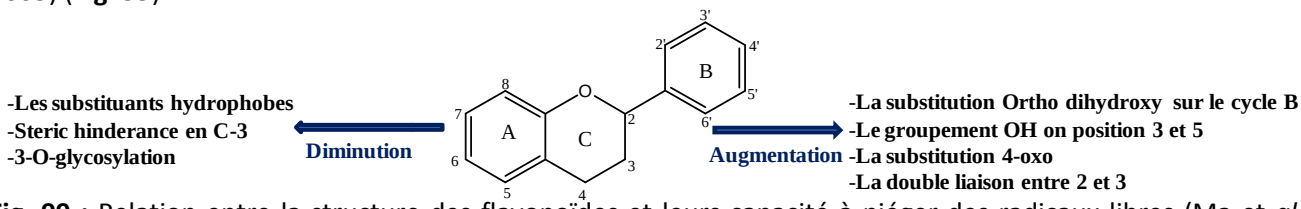


Fig. 99 : Relation entre la structure des flavonoïdes et leurs capacité à piéger des radicaux libres (Ma et *al.*, 2007).

Les éléments structuraux nécessaires à l'obtention d'une activité antioxydante optimale ont pu être établis par plusieurs auteurs (Wolfe *et al.*, 2008 ; Mercader *et al.,* 2008 ; Van Acker *et al.,* 1996 ; Sroka *et al.,* 2005) (**Fig. 100)**. Il s'agit de :

- La présence d'une fonction catéchol sur le cycle B (Van Acker *et al.*, 1996)
- La présence d'un motif énone dans le cycle C
- La présence de groupement hydroxyle en position 3 pour les flavones et en position 5 pour les isoflavones (Heim *et al.,* 2002 ; Firuzi *et al.,* 2005).
- La présence d'une double liaison entre le carbone 2 et le carbone 3 (Pietta, 2000).

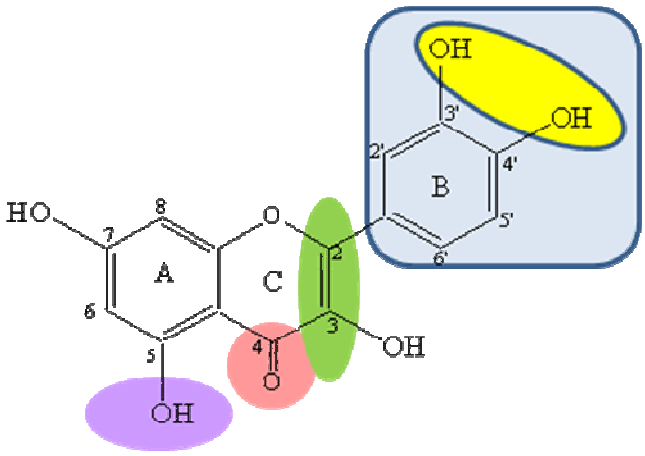


Fig. 100 : Les éléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes

Il a de plus été montré que plus le degré d'hydroxylation du flavonoïde est important, plus le pouvoir antioxydant est élevé (Cao *et al.,* 1997).
In vitro, les flavonols sont plus actifs que les flavanols, eux mêmes plus actifs que les flavanones (Carolina et *al.,* 2004 ; Dragan *et al.,* 2003).
En ce qui concerne la glycosylation, plusieurs travaux ont montré que les flavonoïdes glycosylés limitent l'activité anti-oxydante *in vitro* (Cai *et al.*, 2006). Une étude a été faite sur la relation structure-activité de la quercétine (Heim, 2002) : La présence d'un deuxième hydroxyle phénolique en position *ortho* du cycle B augmente considérablement l'activité de capture des radicaux libres alors que sa présence en position méta ou para donne un effet inverse et la présence d'une fonction acide carboxylique diminue cette activité.

La comparaison des activités respectives de la quercétine et de la dihydroquercétine (taxifoline) suggère que la fonction carbonyle et la double liaison en C2-C3 permettent une meilleure activité antioxydante (Burda *et al.,* 2001; Rice-Evens *et al.,* 2006; Van Acker et al., 1996). La majorité des recherches effectuées indiquent que les molécules possédant ces deux éléments de structure sont plus actives que celles qui sont dénuées de l'une ou de l'autre ou des deux (Rice-Evens *et al.,* 1996 ; Sekher *et al.*, 2001). Ces résultats s'expliquent par la conjugaison des cycles A et B qui permet la résonance du noyau aromatique. On peut citer comme exemple l'activité antioxydante de la quercétine qui est deux fois plus importante que celle de la catéchine (Rice-Evens *et al.,* 1996) (**Fig. 101**).

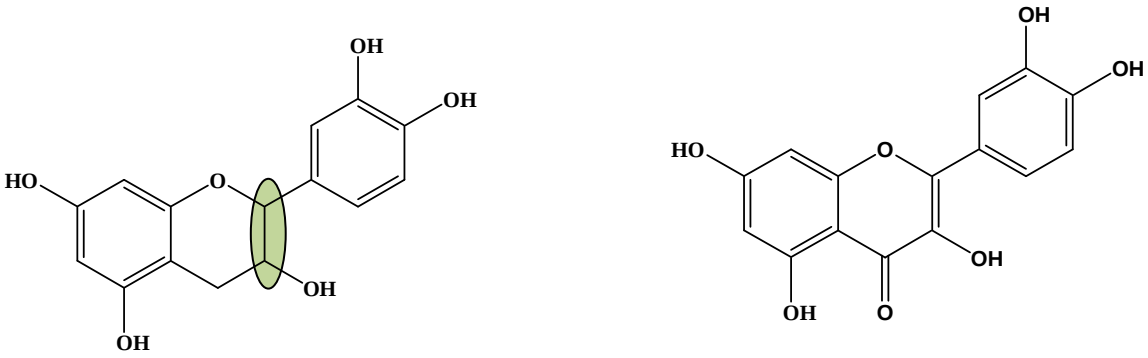


Fig. 101 : Structures de la catéchine et la quercétine

La glycosylation ou la méthylation de l'hydroxyle en position 3 des flavonols conduit à une diminution importante de l'activité antioxydante. Cet effet est moins marqué lorsque les autres groupements phénoliques sont substitués. La présence d'un groupement hydroxyle en position 3 renforce donc les propriétés antioxydantes dans le cas où le cycle C est insaturé. La présence d'un groupe hydroxyle en position 5 peut aussi contribuer à l'effet antioxydant dans le cas des isoflavones (Heim*,* 2002).

Le pouvoir antioxydant d'une molécule est le plus souvent évalué par le biais d'une méthode spectrophotométrique. On distingue principalement 3 techniques : DPPH, ABTS et CUPRAC.

IV.4.1.3 Mesures du pouvoir antioxidant

- ✓ **Radical DPPH :**

Le pouvoir antioxydant peut être mesuré par la capacité du composé testé à piéger le radical DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle). Il s'agit d'un radical stable possédant une couleur violette en solution (maximum d'absorbance à une longueur d'onde de 517 nm) et virant au jaune lorsqu'il est capturé par un antioxydant. La méthode est généralement standardisée par rapport au trolox (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylique).

- ✓ **Radical $ABTS^+$**

Cette technique permet de déterminer la capacité d'une molécule à piéger le radical $ABTS^+$ 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate). Ceci entraine la disparition de la couleur bleue intense et une comparaison peut être faite par rapport à un antioxydant de référence, le trolox. L'activité antiradicalaire est exprimée selon un indice TEAC (Trolox Equivalent Antioxydant Capacity). Plus cet indice est élevé, plus la molécule possède une activité antioxydante importante.

- ✓ **CUPRAC : (Cupric ion Reducing Antioxidant Capacity)**

De nombreuses réactions d'oxydoréduction dans la cellule sont impliquées dans la régulation de plusieurs fonctions cellulaires. Par leur effet oxydant naturel, les EOA (les espèces oxygénées activées) influencent cet état redox et peuvent être responsables d'un effet oxydant ou antioxydant.

La méthode CUPRAC est basée sur l'absorbance accrue en raison de la formation du complexe Néocuproïne-cuivre [Nc -Cu^{2+}] en présence d'un agent antioxydant.

$$Cu(Nc)_2^{2+} + ArOH \rightarrow Cu(Nc)_2^{+} + Ar{=}O + H^+$$

L'activité antioxydante est définie comme la capacité d'un système à piéger des radicaux libres ou à réguler le système redox défendant ainsi l'organisme contre la dégradation oxydative.

L'étude de l'activité antioxydante de nos extraits et des molécules purifiées a été réalisée selon ces trois méthodes.

IV.4.2 Résultats et discussion

L'activité antioxydante des extraits de *Marrubium deserti* et de *Phlomis bovei* a été évaluée par leur activité inhibitrice de la formation des radicaux DPPH et $ABTS^+$ puis par le test CUPRAC. La substance de référence était le trolox. Ces tests ont été réalisés systématiquement au moins 3 fois pour chaque échantillon.

Tableau 30 : Activités antioxydantes des extraits de *Marrubium deserti* et *Phlomis bovei*, par les tests ABTS, CUPRAC et DPPH

Plante	Extrait	Phase	ABTS			CUPRAC		DPPH		
			IC_{50}	ARP	TEAC	E‰	TEAC	IC_{50}	ARP	TEAC
	DCM		1.24	0.8	0.03	0.01	0.04	3.56	0.28	0.03
	MeOH		0.43	2.32	0.09	0,03	0.14	1.61	0.62	0.07
M. deserti		DCM	0.25	4.0	0.16	0.01	0.04	4.19	0.23	0.03
		AcOEt	0.34	2.94	0.12	0.16	0.8	0.45	2.22	0.27
		BuOH	0.13	7.69	0.31	0.06	0.28	0.38	2.63	0.32
		H_2O	0.64	1.56	0.06	0.02	0.09	2.28	0.44	0.05
	DCM		3,08	0.32	0.01	0.01	0.04	>476	-	-
	H_2O		0.40	2.5	0.1	0.04	0.19	1.49	0.67	0.08
P. bovei	**MeOH**		0.23	4.34	0.17	0.03	0.14	0.26	3.85	0.46
	H_2O+MeOH		0.23	4.34	0.17	0.05	0.23	0.24	4.17	0.50

IC_{50ABTS}: $(g/l_{antiox})/(g/l_{ABTS^{\cdot+}})$; IC_{50DPPH}: $(g/l_{antiox})/(g/l_{DPPH^{\cdot}})$; E‰ $_{CUPRAC}$: (L/g/cm).). ARP (Anti Radical Power) = $1/IC_{50}$ ou 1/E‰. TEAC (Trolox Equivalent Antioxydant Capacity) = $ARP_{extrait}/ARP_{Trolox}$.

On constate que les phases BuOH et AcOEt de *M. deserti* présentent une activité antiradicalaire significative vis-à-vis du radical DPPH avec un TEAC de 0.32 et 0.27 respectivement. Cette activité est un peu moins marquée vis-à-vis du radical ABTS pour la phase AcOEt, mais cette dernière semble présenter une bonne activité antioxydante mesurée avec le test CUPRAC. Pour *P. bovei*, ce sont les extraits méthanoliques et hydrométhanoliques qui présentent les activités antiradicalaires les plus significatives.
Alors que les résultats montrent que les autres extraits des deux plantes présentent une activité antiradicalaire faible puisque les TEAC sont inférieurs à 0.2 que ce soit avec le DPPH, l'ABTS ou le CUPRAC.

On peut conclure qu'en ce qui concerne les extraits de *M. deserti* et *P. bovei,* c'est la phase BuOH provenant de l'extrait MeOH de *M. deserti* qui présente les activités antioxydantes les plus intéressantes car elles sont significatives et homogènes dans les 3 types de tests. L'importance de l'activité antioxydante de cette phase pourrait être attribuée à la richesse en molécules à haut potentiel antioxydant telles que des flavonoïdes.

Tableau 31 : Résultats des activités antioxydantes des composés purifiés de *M. deserti* et *P. bovei via* les tests DPPH, CUPRAC, ABTS

	ABTS			CUPRAC		DPPH		
	IC_{50}	ARP	TEAC	E‰ (L/g/cm)	TEAC	IC_{50}	ARP	TEAC
Trolox	0.16	6.1	1.0	0.22	1.00	0.42	2.4	1.0
Rutine	0.34	2.9	0.11	0.66	3.3			
Ac. chlorogénique						0.28	3.6	0.35
MD9	>0.50	-	-	0.01	0.06	Oxydant ou Prooxydant	-	-
MD10	0.10	10.6	**1.6**	0.28	**2.62**	0.39	2.6	**1.1**
MD11	0.09	11.4	**1.9**	0.51	**2.59**	0.42	2.4	**1.0**
MD13	>0.5	-	-	0.01	0.05	>0.86	-	-
MD14	0.79	1.3	0.08	0.79	**3.68**	Oxydant ou Prooxydant	-	-
MD18	0.19	5.3	**0.9**	0.14	0.64	1.02	1.0	0.4
MD12	>0.50	-	-	0.003	0.01	>0.5	-	-
PB1	0.29	3.4	**0.13**	0.03	0.14	>0.5	-	-
PB5	0.52	1.9	0.07	0.01	0.04	>0.5	-	-
PB3	0.99	1.0	0.04	0.007	0.03	>0.5	-	-
PB4	0.21	4.8	**0.19**	0.13	0.05	>0.5		

IC_{50ABTS}: $(g/l_{antiox})/(g/l_{ABTS}^{\cdot+})$; IC_{50DPPH}: $(g/l_{antiox})/(g/l_{DPPH}^{\cdot})$; $E‰_{CUPRAC}$: (L/g/cm).). ARP (Anti Radical Power) = $1/IC_{50}$ ou 1/E‰. TEAC (Trolox Equivalent Antioxydant Capacity) = $ARP_{extrait}/ARP_{Trolox}$.

L'évaluation de l'activité antioxydante des composés purs isolés de *Marrubium deserti* et *Phlomis bovei via* les tests DPPH, ABTS et CUPRAC est représenté dans le tableau 28.

Les dérivés de l'apigénine 7-*O* mono et di glycosylés : Apigénine 7-*O*-néohesperidoside (**MD9)**, apigénine-7-*O*-glucoside (**MD13**) ne présentent aucune activité dans les trois méthodes utilisées. Une activité plus significative est cependant observée pour un autre dérivé de l'apigénine : l'apigénine-7-*O*- glucuronide (**MD18**) avec un TEAC proche de celui du trolox vis-à-vis du radical ABTS. Cela peut être du à la présence de l'acide glucuronique ; cette hypothèse est confirmée par Montoro *et al.* (2005), qui a rapporté que la *O*-glycosylation en position 7 de l'apigénine diminue le pouvoir anti-radicalaire, alors que l'effet du dérivé 7-*O*-glucuronide est plus important que celui de la génine ($TEAC_{7\text{-}O\text{-}glucuronide}$ = 0.9 , $TEAC_{genine}$ = 0.6).

La comparaison entre l'activité antioxydante de l'apigénine 7-*O* glycosylé (**MD9**) et ses dérivés 7-*O* glycosyl coumarylés (**MD14** et **PB5**) montre que le TEAC de ces derniers mesuré avec le test CUPRAC révèle de fortes disparités : **MD14** est presque 4 fois plus actif que le trolox, alors que **PB5** présente une activité peu significative. Ces résultats concordent en un sens avec ceux décrits par Apak *et al*. (2004), qui attribuent un effet important à la présence d'une forte structure conjuguée comme dans les dérivés de l'acide cinnamique (Ar-CH=CH-COO), qui ne peuvent alors pas être attaqués par l'ion cuprique. Cependant, nos résultats montrent que ceci peut être nuancé en fonction de la position du groupement coumaryle sur le sucre (**MD14** *versus* **PB5**) et que la présence d'isomères *Z*/*E* semble fortement diminuer cette activité si on en juge des activités de **PB3** ou de **PB1**. Il en est de même pour la substitution par un méthoxy en *méta* du noyau *para*-coumaryle (**PB4**). Cependant, la présence d'un groupement *trans* caffeoyl (avec deux hydroxyles en *méta* et en *para*) comme dans l'actéoside (**MD10**) ou le forsythoside B **(MD11)** semble présenter un effet similaire à celui observé avec le groupement *trans para*-coumaryle. Ces phenylethanoïdes l'activité anti-oxydante la plus marquée, égale (dans le cas du test DPPH) ou de 1,5 à 3 fois supérieure (pour les tests ABTS et CUPRAC respectivement) à celle du trolox.

La marrubiine (**MD1**) ainsi que les composés : chrysoériol 7-*O*-(3''-(*E* et *Z*)-*p*-coumaryl)-β-glucopyranoside (**PB1**), apigénine-7-*O*-(3''-*p*-coumaryl) β-glucopyranoside **(PB5)** et **(PB4)**, hydroxy-4 cinnamate de méthyle (**PB3**) ne présentent pas d'activité antioxydante significative dans les trois méthodes utilisées.

IV.5 Génotoxicité et antigénotoxicité

Plusieurs dizaines de milliers de métabolites secondaires ont été identifiés chez les végétaux. Ces composés sont naturellement présents pour assurer entre autre un rôle de défense contre différentes agressions comme par exemple celles provoquées par les espèces réactives de l'oxygène qui peuvent affecter différents constituants cellulaires en particulier le patrimoine génétique (l'ADN) provoquant ainsi la mort des cellules ou l'initiation d'un processus cancéreux. Les effets des composés impliqués dans la défense face à ces agressions sont directs (piégeage des radicaux libres par exemple) ou indirects (stimulation des mécanismes enzymatiques impliqués dans la défense ou la réparation de l'ADN par exemple). La cellule possède en effet des systèmes de réparation. Parmi eux, certains réparent en totalité l'ADN et ne laissent aucune trace de "l'attaque"; d'autres assurent la survie de la cellule quand les premiers sont débordés, mais dans ce cas la réparation de l'ADN n'est pas totale et peut conduire à des mutations. Nous avons précédemment évalué les effets antioxydants des extraits et des composés purifiés de *M. deserti* ou de *P. bovei* (effets directs), d'où l'intérêt d'effectuer également l'évaluation de l'anti-génotoxicité (effets indirects) de ces extraits et composés.

IV.5.1 La génotoxicité

Différents agents sont potentiellement génotoxiques et peuvent créer des lésions au niveau de la double hélice de l'ADN (cassures des brins de l'ADN, ajouts de pont entre les brins, …etc) : c'est le cas des rayons UV, des rayons ionisants (radioactivité) et de divers produits chimiques ou de polluants de l'atmosphère qui aboutissent parfois à l'initiation de processus cancéreux. De ce fait, il existe des tests permettant d'évaluer le potentiel génotoxique de nouvelles molécules. En effet, la génotoxicité d'un produit chimique est une caractéristique chimique intrinsèque dérivée du potentiel électrophile du produit, c'est-à-dire de son aptitude à se lier, dans les macromolécules cellulaires, à des sites nucléophiles tels que l'ADN, porteur de l'information génétique.

Actuellement, il existe plusieurs tests de génotoxicité susceptibles de révéler différents types de lésions ou de mutations tels que le SOS chromotest, l'inductest ou le test des comètes. Dans notre travail, nous avons utilisé le SOS Chromotest.

IV.5.2 SOS chromotest

Le test SOS chromotest est un test de toxicologie génétique qui permet d'évaluer de façon colorimétrique et quantitative l'aptitude d'un agent à induire une augmentation de l'expression du gène *Sfi A* contrôlant la filamentation cellulaire et par conséquent, son aptitude à endommager l'ADN (Walker *et al.,* 1979). La quantification de l'induction du gène *Sfi A* a été rendue possible grâce à la mise au point d'une souche *E. coli PQ37* chez laquelle le gène *lac Z* qui gouverne la synthèse de la β-galactosidase a été placé par fusion génétique sous le contrôle de l'opéron *Sfi A* (Huisman *et al.,* 1981). Ainsi, l'induction de l'opéron *Sfi A* va se traduire par la production de la β-galactosidase quantifiable au moyen d'un dosage colorimétrique à 420 nm (Quillardet*,* 1982). **(Fig. 90)**

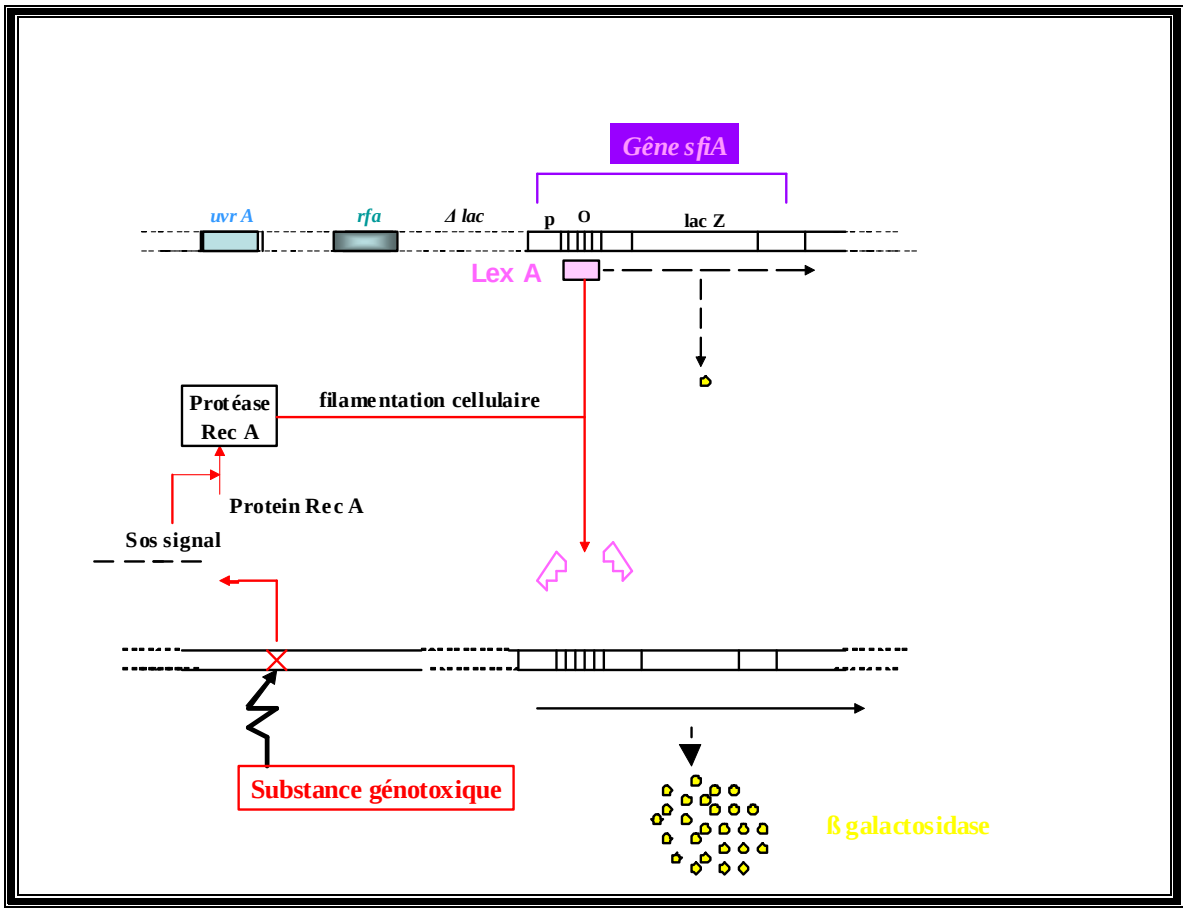


Fig. 102 : Principe du « SOS Chromotest » (d'après Quillardet et Hofnung, 1985)

En parallèle, un dosage de la phosphatase alcaline est nécessaire pour s'assurer de la synthèse normale des protéines et par conséquent de l'état normal de la cellule.

Une substance est considérée comme

- non génotoxique si le facteur d'induction (IF) est inférieur à 1,5 ;
- faiblement génotoxique pour des valeurs d'IF comprises entre 1,5 et 2
- génotoxique si les IF dépassent la valeur 2 (Kevekordes *et al.,* 1998).

En effet, plusieurs extraits et molécules issus des plantes médicinales testés avec le SOS chromotest s'avèrent génotoxiques (de Carvalho *et al.,* 2003).

IV.5.3 Relations structure-activité

Des études ont été réalisées sur les relations structure-activité antigénotoxique des flavonoïdes ont été établie par L. Kriz kola *et al.,* en 1998 et plus tard par Edenharder et al en 2003 (Edenharder *et al* ., 2003). Ces études ont montré les éléments structuraux nécessaires pour l'obtention d'une activité antigénotoxique optimale, Il s'agit de :

- la présence d'hydroxyles en position 3' et 4' sur le noyau B et en position 5 et 7 sur le noyau A.
- la présence d'une double liaison entre C-2 et C-3
- la présence de la fonction cétone sur le cycle A en position C-4

Alors que la présence de 3 hydroxyles sur le cycle B en position 3', 4' et 5' ; la méthylation de l'hydroxyle en position 3' ; la glycosylation ou la méthylation de l'hydroxyle en position 7 diminuent l'effet antigénotoxique.
Il a été aussi reporté que les flavones sont plus actifs que les flavonols ou les flavanones (Lee *et al.,* 1994).

IV.5.4 Résultats et discussion :

IV.5.4.1 Génotoxicité

Les résultats de l'activité génotoxique des différents composés et extraits obtenus de *Marrubium deserti* et *Phlomis bovei* sont représentés dans **le Tableau 29.**

La phase AcOEt est évalué comme étant marginalement génotoxique aux différentes concentrations. La phase BuOH s'avère génotoxique à 250 µg/essai et non génotoxique à 50 µg/essai. L'effet génotoxique de l'extrait MeOH est plus modéré que celui des deux extraits précédent, avec un effet marginalement génotoxique présenté par une seule concentration de 50 µg/essai (IF=1,5) et non génotoxique pour les autres concentrations (250 et 10 µg/essai).
Les composés terniflorine **MD14**, forsythoside **MD11** sont considérés comme non génotoxiques (IF<1,5) aux différentes concentrations testées. Quant aux composés apigénine 7-*O*-néohesperidoside **MD9** (10 µg/essai), actéoside **MD10** (2 µg/essai), apigénine-7-*O*-glucoside **MD13** (10 et 2 µg/essai), apigénine-7-*O*-glucuronide **MD18** (50 et 10 µg/essai), chrysoériol 7-*O*-(3''-(*E* et *Z*)-*p*-coumaryl)-β-glucopyranoside **PB1** (10 µg/essai), **PB2** apigénine-7-*O*-glucoside (10 et 2 µg/essai), **PB4** (50 µg/essai), ils sont présentés comme étant marginalement génotoxiques aux concentrations indiquées. Par conséquent l'ADN n'est pas considéré comme une cible pour ces extraits et ces composés.

L'absence d'activité génotoxique pour la majorité des composés et des extraits obtenus à partir de *Marrubium deserti* n'est pas caractéristique de tous les produits naturels, puisque d'autres études ont révélé des effets génotoxiques chez d'autres plantes médicinales (Hyun et al., 1987 ; Sohni et al., 1995).

Les résultats obtenus pour l'activité génotoxicité nous a conduits à rechercher si ces extraits et ces composés possèdent le pouvoir d'inhiber ou de réduire la génotoxicité de certains agents génotoxiques de références.

Tableau 32 : Activité génotoxique des extraits, des phases et des composés purifiés de *M. deserti* et de *P. bovei* de Noé par le SOS chromotest.

Extraits/Composés	Doses (µg/essai)	β-gal (U)	AP (U)	R	IF
NC		3.00	21.40	0.14	
NF		70.5	15.32	4.60	32.8
MeOH	250	3.44	17.80	0.19	1.4
	50	3.46	16.3	0.21	1.5
	10	3.66	18.38	0.19	1.4
EtOAc	250	3.48	14.52	0.23	**1.7**
	50	3.34	14.83	0.22	**1.6**
	10	3.59	17.55	0.20	1.5
BuOH	250	4.81	15.55	0.30	**2.2**
	50	3.80	15.16	0.25	**1.8**
	10	2.94	15.33	0.19	1.4
MD10	50	3.17	16.88	0.18	1.3
	10	2.9	16.38	0.17	1.3
	2	4.69	18.38	0.25	**1.8**
MD11	50	2.64	14.5	0.18	1.3
	10	2.95	14.83	0.19	1.4
	2	3.05	17.55	0.17	1.2
MD14	50	2.09	15.5	0.13	1.0
	10	2.28	15.16	0.15	1.1
	2	2.36	15.33	0.15	1.1
MD9	10	3.20	12.94	0.23	**1.7**
	2	3.14	14.85	0.16	1.2
	0.5	3.10	15.50	0.12	0.9
MD18	50	3.42	15.16	0.22	**1.6**
	10	4.02	15.33	0.26	**1.9**
	2	3.17	16.88	0.18	1.3
MD13	50	2.68	14.8	0.18	1.3
	10	3.83	17.55	0.21	1.6
	2	2.42	15.55	0.22	1.6
PB2	50	2.68	14.83	0.18	**1.2**
	10	3.1	17.55	0.21	1.5
	2	3.1	15.55	0.22	1.5
PB1	50	2.81	16.88	0.16	**1.1**
	10	4.43	18.38	0.24	**1.7**
	2	1.77	14.52	0.12	0.8
PB4	50	4.03	14.83	0.27	1.9
	10	3.10	17.55	0.17	**1.2**
	2	3.03	15.55	0.19	**1.4**

R=inhibition de la génotoxicité, IF=facteur d'induction, NC=control négatif, NF=control positif (nitrofurantoïne), AP=phosphate alcaline

V.5.4.2 Anti-génotoxicité

L'utilisation du SOS chromotest a permis de montrer que la majorité des extraits et molécules de *Marrubium deserti de Noé* ne provoquent pas des dommages au niveau de l'ADN. Ils pourraient donc également reverser une mutation préexistante. Sachant que des métabolites secondaires tels que les flavonoïdes sont connus pour leurs activités antigénotoxiques voire anticarcinogènes (Schimmer, 1992 ; Kun-Young *et al.,* 2004 ; Ramos et al*.,* 2003 ; Edenharder et al., 2003), l'activité antigénotoxique des extraits et des molécules a été entreprise en utilisant la nitrofurantoÏne comme agent génotoxique.

Pour cette étude, nous avons utilisé la souche *E. coli* PQ37 sensible aux effets génotoxiques de la nitrofurantoïne (NF). Pour cela nous avons utilisé la méthode de pré-incubation décrite par Quillardet et Hofnung (Quillardet, 1985).

La dose de 10 µg/essai de NF a été choisie puisque qu'elle n'est pas toxique pour la cellule mais elle incite une réponse significative du système SOS. Les résultats sont présentés dans **le Tableau 33**.

Tous les extraits et les molécules de *Marrubium deserti* et *Phlomis bovei* possèdent une activité antigénotoxique dose dépendante vis-à-vis de la NF à 10 µg/essai, à l'exception de l'extrait MeOH pour lequel le pourcentage d'inhibition est d'environ 89 % à toutes les doses. Alors que les phases AcOEt et BuOH de *Marrubium deserti* , à une même dose de 50 µg/mL diminuent significativement la génotoxicité induite par la NF de 94,3 et 96,2 respectivement.

Pour les molécules purifiées, certains flavonoïdes apigénine-7-*O*-glucoside (**MD13)**, terniflorine **MD14**, chrysoériol 7-*O*-(3''-(*E* et *Z*)-*p*-coumaryl)-β-glucopyranoside **PB1** et hydroxy-4-cinnamate de méthyle (**PB2**) diminuent la génotoxicité induite par le NF de façon modérée (IF de 69,5 %, 64,6 %, 86,6 % et 69,5%, respectivement). D'autres (**MD9**, **MD18**, et **PB4**) ont un effet plus important (IF de 91,1%, 92,5 % et 96,9 % respectivement) à la plus forte dose testée de 50 µg/essai. **PB4** étant le composé qui montre l'activité la plus marquée, puisqu'elle reste proche de 90% d'inhibition à à faible dose (2 µg/essai).

L'activité antigénotoxique des phényléthanoïdes (actéoside **MD10** et forsythoside **MD11**) est importante à la dose de 50 µg/essai (IP= 97,1 et 95,7 % respectivement), mais plus faible à 10 et 2 µg/essai. Les flavonoïdes et les phényléthanoïdes possèdent un effet antigénotoxique important qui peut être relié à leurs caractéristiques structurales.

Pour les phényléthanoïdes, aucune étude n'a été réalisée dans ce domaine mais on peut suggérer que le nombre de sucres liés à l'acide caféique et l'hydroxytyrosol influencent l'activité antigénotoxique : en effet l'actéoside **MD10** est plus actif que le forsythoside **MD11.**

L'antigénotoxicité pourrait être corrélée avec la présence de composés polyphénoliques tels que des flavonoïdes, des phénylpropanoïdes. La question s'est donc posée quant à l'origine de cette activité ainsi qu'au mécanisme par lequel les extraits et les composés agissent. Ont-ils un pouvoir piégeur des radicaux libres formés lors de métabolisation de l'agent génotoxique? L'étude des activités antiradicalaire et antioxydante de différents extraits polaires et des composés issus de marrubium deserti *et de Phlomis bovei* nous a permis d'affirmer que ces extraits et ces composés sont des piégeurs plus ou moins efficaces des radicaux tels que le DPPH, l'ABTS et le CUPRAC (**Tableaux 30 et 31**).

La richesse des extraits, des phases en métabolites secondaires tels que les flavonoïdes connus pour leurs propriétés antigénotoxique, et antioxydante significatives permet d'émettre l'hypothèse qu'une forte corrélation existe entre la composition chimique des extraits et les activités détectées. Les effets antigénotoxiques pourraient être la conséquence des pouvoirs antioxydant et antiradicalaire des extraits et des composés testés dans la mesure ou les espèces réactives à l'oxygène ou les radicaux libres font partie des principaux acteurs qui contribuent aux dommages oxydants dans les macromolécules biologiques. Ces espèces réactives à l'oxygène instables sont à l'origine d'une variété de maladies.

Tableau 33 : Activité antigénotoxique vis-à-vis de la nitrofurantoïne des extraits et des phases de *M. deserti* et des composés purifiés de *M. deserti* et de *P. bovei* par le SOS chromotest.

Extraits/Composés	Doses (µg/essai)	β-gal (U)	AP (U)	IF	IP (%)
NC		3.40	17.9		
NF		15.35	5.4	14.95	
MeOH	50	7.71	16.73	2.42	**89.8**
	10	7.5	16.26	2.43	**89.7**
	2	8.37	16.7	2.62	**88.3**
AcOEt	50	5.90	17.30	1.79	**94.3**
	10	9.56	16.0	3.13	**84.7**
	2	20.27	16.36	3.34	**83.2**
BuOH	50	4.95	16.97	1.53	**96.2**
	10	9.62	16.20	3.13	**84.7**
	2	20.27	16.36	6.51	60.5
MD13	50	16.22	16.25	5.24	69.5
	10	30.36	15.00	10.63	30.9
	2	32.7	17.40	9.88	36.3
MD9	50	4.80	16.89	1.68	**91.1**
	10	8.14	15.07	2.83	**86.8**
	2	22.08	16.10	7.20	55.5
MD18	50	6.53	16.82	2.04	**92.5**
	10	18.63	17.91	5.46	68.0
	2	23.31	18.16	6.74	58.8
MD14	50	20.31	17.9	5.93	64.6
	10	19.44	16.94	6.02	63.9
	2	20.10	16.58	6.37	61.5
MD10	50	4.01	15.00	1.40	**97.1**
	10	11.29	16.26	3.64	**81.0**
	2	20.70	16.28	6.68	59.3
MD11	50	5.12	16.88	1.59	**95.7**
	10	19.89	16.42	6.36	61.5
	2	21.16	16.54	6.72	59.0
PB2	50	16,22	16.25	5.24	69.5
	10	30.36	15.00	10.63	30.9
	2	32.73	17.40	9.88	36.3
PB1	50	9.10	16.71	2.86	**86.6**
	10	10.53	16.02	3.45	**82.4**
	2	11.00	16.50	3.50	**82.0**
PB4	50	4.70	17.40	1.42	**96.9**
	10	6.69	16.20	2.17	**91.5**
	2	8.45	16.00	2.77	**87.2**

R= inhibition de la génotoxicité, IF= facteur d'induction, NC=control négatif, NF=control positif (nitrofontoine) AP=phosphate alcaline, IP=inhibition de la génotoxicité

IV.6 Conclusion

Les résultats apportés par des différents tests ont montré que : en général les bactéries gram + et gram- ne sont pas sensibles à l'action de nos composés.

L'activité antiradicalaire des extraits et des phases polaires de *Marrubium deserti* et de *phlomis bovei* dépend du type du radical à piéger. Mais ces extraits et ces phases présentent un effet chélateur d'où une activité antioxydante.
Par contre les extraits apolaires ne présente aucun effet antioxydant (antiradicalaire/ chélation des métaux).
Cette différence d'activités serait liée à la composition chimique des deux types d'extraits. Cela est confirmés par les résultats obtenus sur les composés testés, pour le diterpène isolé de l'extrait CH_2Cl_2 de *Marrubium deserti* ne présente aucune activité antioxydante vis-à-vis des trois méthodes utilisés. Alors que les polyphénols en général et les flavonoïdes en particulier sont connus comme étant de puissants piégeurs de radicaux libres et antioxydants cette classe de composés serait donc responsable de l'activité antiradicalaire et antioxydante des extraits polaires testés. Pour les composés isolés de *Phlomis bovei* on a remarqué que la pluparts de composés flavonoïques ne présentent pas d'activité antioxydante significative par rapport au composé isolés de *Marrubium,* on suggère que cela peut être dû au type de génine attaché au sucre et à la position du coumaroyl greffé sur le sucre.

Une corrélation entre les activités antigénotoxique et antiradicalaire a été établie par (**Park et al., 2005)**. Cela nous a mené a testés les extraits, les phases et les produits des deux plantes. Les résultats obtenus montrent en général l'absence totale de la génotoxicité pour l'extrait MeOH aux différentes concentrations testées, alors que pour les phases AcOEt et BuOH à une seule concentration 10 µg/essai. Parmi les composés testés, seuls **MD11** et **MD14** ne présentent pas d'effet génotoxique aux différentes concentrations.

Par contre le test antigénotoxique nous a permis de mettre en évidence l'importance de nos extraits, phases et composés à inhiber la genotoxicité du nitrofurantoïne. L'effet antigénotoxique des extraits et des produits pourrait être expliquée également par :

-Un effet antagoniste : Dans ce cas l'extrait, la phase ou le produit serait capable de provoquer des altérations au niveau de l'ADN qui annulerait ou corrigeraient l'effet provoquer par l'agent mutagéne, cela serait vrai si l'extrait testé agit directement au niveau de l'ADN. Ce qui n'est pas le cas pour la plus part des extraits et des produits qui n'ont pas montrés une génotoxicité significative.

-L'extrait, la phase ou le produit pourraient former un complexe avec l'agent mutagéne, de tel façon que cet agent devient inoffensif vis-à-vis de l'ADN.

IV.7 Références

A

Abdillahi H. S., Stafford G. I., Finnie J. F., Van Staden J., 2010. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Podocarpus sensu* latissimo. *South African Journal of Botany*, 76(1), 1-24.

Afanas'ev I. B., Ostrakhovitch E. A., Mikhal'chik E. V., Ibragimova G. A., Korkina L. G., 2001. Enhancement of antioxidant and anti-inflammatory activities of bioflavonoid rutin by complexation with transition with transition with transition metals. *Biochemical Pharmacology*, 61, 677-684.

Ananth S. P., Tom S. C., Peter J. O. B., Catherine A. R. E., 2001. Flavonoid B-Ring Chemistry and Antioxidant Activity: Fast Reaction Kinetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications,* 282, 1161-1168.

Andréa C. P., Tânia T., Elisângela C. C., Walter V., Suely V. S., José R. G., Eliane C. A., 2001. A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. *Toxicon*, 39, 1495-1504.

Aranda *F*. J., Villalain J., *1997. The interaction of abietic acid with phospholipid membranes. Biochimica et Biophysica Acta, 1327, 171-180.*

B

Bakhtiyor F. R., Nasrulla D. A., Vladimir N. S., Jerzy L., 2005. A Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) Study of the Antioxidant Activity of Flavonoids. *QSAR and Combinatorial Science*, 24(9), 1056 - 1065.

Bankova V., Marcucci M.C., Simova S., Nikolova N., Ujumgiev A., Popova M., 1996. Antibacterial diterpenic acids from Brazilian propolis. *Zeitschrift für Naturforschung [C*], 51, 277-280.

Bernabeu A., Shapiro S., Villalain J. 2002. A MAS-NMR study of the location of (+)-totarol, a diterpenoid bioactive molecule, in phospholipid model membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 119, 33-39.

Bisio A., Pagano B., Romussi A., Bruno O., de Tommasi N., Romussi G., Mattia C. A., 2007. Relative stereochemistry of a diterpene from *Salvia cinnabarina*. *Molecules,* 12(10), 2279-2287.

Bouaicha N., Tringali C., Pesando D., Mallea M., Roussakis C., Verbist J. F., 1993. Bioactive Diterpenoids Isolated from *Dilophus ligulatus*. *Planta Medica*, 59, 256-258.

Bruneton J., 2009. Pharmacognosie , Phytochimie Plantes médicinales. 4éme édition.

Burda S., Oleszek W., 2001. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 49, 2774-2779.

C

Cao G., Sofic E., Prior R. L., 1997. Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure-Activity Relationships. *Free Radical Biology and Medicine***,** 22 (5), 749-760.

Cai Y. Z., Sun M., Xing J., Luo Q., Corke H., 2006. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Science*, 25, 2872-2888.

Cangiano T., Dellagreca M., Fiorentino A., Isidori M., Monaco P., Zarrelli A., 2002. Effect of ent-labdane diterpenes from *Potamogetonaceae* on *Selenastrum capricornutum* and other aquatic organisms. *Journal of Chemistry and Ecology*, 28, 1091-1102.

Carolina A., Eduardo A. L., 2004. Comparison of the free radical scavenger activities of quercetin and rutin. *An experimental and theoretical study Canadian Journal of Chemistry,* 82(12), 1668-1673.

Carvalho T. C., Simão M. R., Ambrósio S. R., Furtado N. A. J. C., Veneziani R. C. S., Heleno V. C. G., Da Costa F. B., Gomes B. P. F. A., Souza M. G. M., Borges dos Reis E., Martins C. H. G., 2011. Antimicrobial Activity of Diterpenes from *Viguiera arenaria* against *Endodontic* Bacteria. *Molecules,* 16(1), 543-551.

Chang C. I, Chang J. Y, Kuo C. C, Pan W. Y, Kuo Y. H., 2005. Four new 6-nor5 (6-->7)abeo-abietane type diterpenes and antitumoral cytotoxic diterpene constituents from the bark of *Taiwania cryptomerioides*. *Planta Medica*, 71(1), 72-6.

Chen H., Tan R. X., Liu Z. L., Zhang Y., Yang L., 1996. Antibacterial neoclerodane diterpenoids from *Ajuga lupulina*, *Journal of Natural Products*, 59, 668-670.

Chen J.-J., Wu H.-M., Peng C.-F., Chen I.-S., Chu S.-D., 2009. seco-Abietane diterpenoids, a phenylethanoid derivative, and antitubercular constituents from *Callicarpa pilosissima*. *Journal of Natural Products*, 72(2), 223-228.

Ching H. K., Shing-Chuan S., Yen C. C., 2004. Hydroxylation at C4'or C6 is essential for apoptosis-inducing activity of flavanone through activation of the caspase-3 cascade and production of reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(7), 897 - 910.

Chinou I., Demetzos C., Harvala C., Roussakis C., Verbist J. F., 1994. Cytotoxic and antibacterial labdane-type diterpenes from the aerial parts of *Cistus incanus* subsp. *creticus*. *Planta Medica, 60*, 34-36.

Christian D. S., Helmut S., Trankred S., 2003. Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids: structure–activity relations and mode of action. *Biochemical Pharmacology*, 65 (5), 773-781.

Cushnie T. P. T., Lamb A. J., 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, 343-356.

D

Dantas da Silva L. L., Nascimento M. S., Cavalheiro A. J., Silva D. H. S., Castro-Gamboa I., Furlan M., Bolzani V. ., 2008. Antibacterial activity of labdane diterpenoids from *Stemodia foliosa*. *Journal of Natural Products*, 71(7), 1291-1293.

Darias V., Bravo L., Rabanal R., Sanchez-Mateo C.C., Martin-Herrera D.A., 1990. Cytostatic and Antibacterial activity of some compounds isolated from several *Lamiaceae* species from the Canary Islands. *Planta Medica*, 56, 70–2.

Da Silva E. J. A., Oliveira A. B., Lapa A. J., 1994. Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, and the isoflavonoids, duartin and claussequinone, in rats and mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology,* 46(2), 118-122.

de Carvalho M. C. R. D., Barca F. N. T. V., Agnez-Lima L. F., de Medeiras S. R. B., 2003. Evaluation of mutagenic activity in an extract of pepper tree stem bark (*Schinus terebinthifolius Raddi*). *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 42, 185–191.

De Jesus R. A. P., Cechinel-FilhoV., Oliveira A. E., Schlemper V., 1999. Analysis of the antinociceptive properties of marrubiin isolated from *Marrubium vulgare*, *Phytomedicine*, 7, 111-115.

De Souza N. J., Dohadwaal A. N., Reden J., 1983. Forskolin: a labdane diterpenoid with antihypertensive, positive inotropic, platelet aggregation inhibitory, and adenylate cyclase activating properties. *Journal of Medical Research Reviews,* 3, 201-219.

Di Majo D., Giammanco M., La Guardia M., Tripoli E., Giammanco S., Finotti E., 2005. Flavanones in citrus fruit: structure-anti-oxydant activity relationships. *Food Research International*, 38, 1161-1166.

Dimas K., Demetzos C., Marsellos M., Sotiriadou R., Malamas M., Kokkinopoulos D., 1998. Cytotoxic activity of labdane type diterpenes against human leukemic cell lines *in vitro*. *Planta Medica*, 64, 208-211.

Dragan A., Duank D. A, Drago B., Nenad T., 2003. Structure-Radical Scavenging Activity Relationships of Flavonoids. *Croatica Chemica Acta,* 76 (1), 55-61.

Dimas K., Demetzos C., Marsellos M., Sotiriadou R., Cytotoxic activity of ent-13-epi-manoyl oxide and its Malamas M. and Kokkinopoulos D., 1998. Cytotoxic activity of labdane type diterpenes against Human leu- kemic cell lines in vitro. *Planta Medica*, 64, 208-211.

E

Edenharder R., Grünhage D., 2003. Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by *tert*-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutation Research*, 540, 1–18.

El Bardai S., Morel N., Wibo M., Fabre N., Liabres G., Lyoussi B., Quetin-Leclercq J., 2003. The vasorelaxant activity of marrubenol and marrubiin from *Marrubium vulgare. Planta Medica*, 69, 75-77.

Euzéby J., O 2005, Abégé de bactériologie général et médicale, 104, 7859.

F

Firuzi O., Lacanna A., Petrucci R., Marrosu G., Saso L., 2005. Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by “Ferric Reducing Antioxydant Power “Assay and and Cyclic Voltammetry . *Biochimica et Biophysica Acta*. 1721, 174-184

Fragoso-Serrano M., Gonzalez-Chimeo E., Pereda-Miranda R., 1999. Novel Labdane Diterpenes from the Insecticidal Plant *Hyptis spicigera*. *Journal of Natural Products*, 62, 45-50.

G

Galati E. M., Monforte M. T., Kirjavainen S., Forestieri A. M., Trovato A., Tripodo M. M., 1994. Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid. (Note I) anti-inflammatory and analgesic activity. *Farmaco*, 40 (11), 709-12.

Guido R. M. M. H., Jos B. G. P., Ronald E. M. K., Aalt B., 1997. Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 236, 591-593.

Guinebert E., Durand P., Prost M., Grinand R., Bernigault R., 2005. Mesure de la résistance aux radicaux libres. *Sixièmes Journées de la Recherche Avicole*, 554-558.

Gupta M. B., Bhalla T. N., Gupta G. P., Mitra C. R., Bhargava K. P., 1971. Anti-inflammatory activity of taxifolin. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 21(3), 377-82.

H

Habibi Z., Eftekhar F., Samiee, K., Rustaiyan A*.,* 2000**.** Structure and antibacterial activity of a new labdane diterpenoid from *Salvia leriaefolia. Journal of Natural Products, 63*, 270-271.

Haraguchi H., Oike S., Muroi H., Kubo I., 1996. Mode of action of totarol, a diterpene from *Podocarpus nagi*. *Planta Medica*, 62, 122-125.

Harborne J. B., Williams C. A., 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55, 481-504.

Heim K. E., Tagliaferro A. R., Bobilya D. J., 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry,* 13, (10), 572-584.

Hooper L., Kroon P. A., Rimm E. B., Cohn J. S., Harvey I., Le Cornu K. A., Ryder J. J., Hall W. L., Cassidy A., 2008. Flavonoids, flavonoid-rich foods and cardiovascular risk ameta-analysis of randomized controlled trials. *The American Journal of Clinical Nutrition,* 88, 38-50.

Huisman O., d'ari R., 1981. An inducible DNA replication –cell division coupling mechanism in *E. coli*. *Nature*, 290, 797-799.

Hyun K. P.**,** Kun H. S., Hyeun W. C., Sam S. K., 2004. Anti-inflammatory Plant Flavonoids and Cellular Action Mechanisms. Journal of Pharmacological Sciences, 96 (3), 229-245.

I

Ikezoe T., Chen S. S., Tong X. J., Heber D., Taguchi H., Koeffler H. P., 2003. Oridonin induces growth inhibition and apoptosis of a variety of human cancer cells. *International Journal of Oncology*, 23, 1187-93.

J

Jun N., Jun K., 2006. DPPH Radical Scavenging Reaction of Hydroxy- and Methoxychalcones. *Bioscience and Biotechnology Biochemistry*, 70, 193-202.

K

Kanashiro A., Kabeya L. M., Polizello A. C. M., Lopes N. P., Lopes J. L. C., Lucisano-Valim Y. M., 2004. Inhibitory activity of flavonoids from Lychnophora sp. on generation of reactive oxygen species by neutrophils upon stimulation by immune complexes. *Phytotherapy Research*, 18, 61 – 65.

Karchmer A. W., 2000. Nosocomial bloodstream infections: Organisms, risk factors, and implications. *Clinical Infectious Diseases*, 31(suppl 4), S139-S143.

Kevekordes S., Mersch-Sundermann V., Diez M., Bolten C., Dunkelberg H., 1998. Genotoxicity of polycyclic musk fragrances in the sisterchromatid exchange test. *Anticancer Research*, 18, 449-452.

Khlebnikov A. I., Schepetkin I. A., Domina N. G., Kirpotina L. N., Quinn M. T., 2007. Improved quantitative structure-activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular system. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 15, 1749-1770.

Kittakoop P., Wanasith S., Watts P., Kramyu J., Tanticharoen M. Thebtaranonth Y., 2001. Potent antiviral potamogetonyde and potamogetonol, new furanoid labdane diterpenes from *Potamogeton malaianus*. *Journal of Natural Product*, 64, 385-388.

Klevens Monina R., Morrison M. A., Nadle J., Gershman K., 2007. Invasive Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in United States. *The Journal of the American Medical Association*, 298 (15), 1763-1771.

Krishnamachari V., Levine L. H., Pare P. W., 2002. Flavonoid Oxidation by the Radical Generator AIBN: A Unified Mechanism for Quercetin Radical Scavenging*, The Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 4357-4363.

Kun-Young P., Gean-OK J., Kyung-tael L., Jongwon C., Moo-Young C., Gab-Tae K., Hyun-Ju J., Hee-Juhn P., 2004. Antimutagenic activity of flavonoids from the heartwood of Rhus verniciflura, *Journal of Ethnopharmacology,* 90, 73-79.

Kyrikou I., Georgopoulos A., Hatziantoniou S., Mavromoustakos T., Demetzos C. A., 2005. Comparative study of the effects of cholesterol and sclareol, a labdane type diterpene, on phospholipid bilayers. *Chemistry and Physics of Lipids*, 133, 125-134.

L

Lee H., Wang H. W., Su H. Y., Hao N. J., 1994. The structure-activity relationships of flavonoids as inhibitors of cytochrome P-450 enzymes in rat liver microsomes and the mutagenicity of 2-amino-3-methyl-imidazo [4,5-f]quinoline. Mutagenesis, 9(2), 101-106.

Lewis H. W. 1977, Medical Botany, Plants Affecting Man's Health . Jhon Wiley, New York.

Liu J. J., Huang R. W., Lin D. J., Peng J., Wu X. Y., Pan X. L., Li M. Q., Lin Q., 2004. Anti-proliferative effects of oridonin on SPC-A-1 cells and its mechanism of action*. The Journal of International Medical Research*, 32 (6), 617-625

Liu J. J., Wu X. Y., Peng J., Pan X. L., Lu H. L., 2004. Antiproliferation effects of oridonin on HL-60 cells. *Annals of Hematol,* 83(11), 691-695.

Liu J. J., Huang R. W., Lin D. J., Wu X. Y., Lu H. L., Pan X. L., Peng J., Li M. Q. Lin Q., 2004. Oridonin-induced apoptosis of Jurkat cells and its mechanism. *Comparative Clinical Pathology*, 13(2), 65-69.

Lotito S. B., Frei B., 2006. Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: Cause, consequence, or epiphenomenon?. *Free Radical Biology and Medicine*, 41, 1727-1746.

M

Ma X. M., Liu Y., Shi Y. P, 2007. Phenolic derivatives with free-radical- scavenging activities from Ixeridium gracile(DC) SHIH. *Chemistry and Biodiversity*, 4, 2172-2181.

Mac Phail D. B., Hartley R. C., Gardner P. T., Duthie G. G., 2003. Kinetic and Stoichiometric Assessment of the Antioxidant Activity of Flavonoids by Electron Spin Resonance Spectroscopy. *The Journal of Agriculture and Food Chemistry,* 51, 1684-1690.

Marfak A. 2003. Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de dépsides. Thèse de doctorat de l'université de limoges.

Martin M. J., Marhuenda E., Perez-guerrero C., 1994. Antiulcer effect of naringin on gastric lesions induced by ethanol in rats. *Pharmacology*, 49(3), 144-150.

Matsingou C., Hatziantoniou S., Georgopoulos A., Dimas K., Terzis A., Demetzos C., 2005. Labdane-type diterpenes : themal effects on phospholipid bilayers, incorporation into liposomes and biological activity. *Chemistry and Physics Lipids*, 138, 1-11.

Meade-Tollin L. C., Wijeratne E. M. K., Cooper D., Guild M., Jon E., Fritz A., Zhou G. X., Whitesell L., Liang J. Y., Gunatilaka A. A. L., 2004. Ponicidin and Oridonin Are Responsible for the Antiangiogenic Activity of *Rabdosia rubescens*, a Constituent of the Herbal Supplement PC SPES. *Journal of Natural Products*, 67 (1), 2-4.

Meenakshi S., Mahesh P., Sharma R. P., 1998. Biological Acivity of the Labdane Diterpenes. *Planta Medica*, 65, 2-8.

Mendoza L., Wilkens M., Urzúa A., 1997. Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from *Chilean Pseudognaphalium* (*Asteracea*). *Journal of Ethnopharmacology, 58*, 85-88.

Mendoza L., Tapia L., Wilkens M., Urzúa A., 2002. Antibacterial activity of 13-*epi*-sclareol, a labdane type diterpene isolated from *Pseudognaphalium heterotrichium* and *P. cheiranthifolium* (*Asteraceae*). *Boletin de la Sociedad Chilena de Química*, *47*, 91-98.

Mercader A. G., Duchowicz P. R., Fernandez F. M., Castro E. A., Bennardi D. O., Autino J. C., Romanelli G. P., 2008. QSAR prediction of inhibition of aldose reductase for flavonoids. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 16, 7470-7476.

Meyre-Silva C., Yunes R. A., Schlemper V., Campos-Buzzi F., Cechinel-Filho V., 2005. Analgesic potential of marrubiin derivatives, a bioactive diterpene present in *Marrubium vulgare* (*Lamiaceae*). *II Farmaco*, 60, 321-326.

Micol V., Mateo C. R., Shapiro S., Aranda F. J., Vilallain J., 2001. Effect of (+) –totarol, a diterpenoid antibacterial agent, on phospholipid model membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1511, 281-290.

Middleton E. J., 1996. Biological properties of plant flavonoids an overview. International Journal of Pharmacology, 34(5), 344-348.

Middleton E. J., 1998. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 439, 175-182.

Montagnier L., Olivier R., Pasquier C., 1998. Oxidative stress in cancer, AIDS and neurodegenerative diseases, Marcel Dekker, New York.

N

Nagai S., Ohara K., Mukai K., 2005. Kinetic Study of the Quenching Reaction of Singlet Oxygen by Flavonoids in Ethanol Solution. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109, 4234-4240.

O

Odek-Ogunde M., Rajab M. S., 1994. Antihypertensive effect of the clerodane diterpene ajugarin I on experimentally hypertensive rats. *East African Medical Journal*, 71(9), 587-90.

Odontuya G., Hoult J. R. H., Houghton P. J., 2005. Structure-activity relationship for antiinflammatory effect of luteolin and its derived glycosides. *Phytotherapy Research*, 19, 782-786.

P

Pelzer L. E., Guardia T., Juarez A. O., 1998. Acute and chronic anti-inflammatory effects of plant flavonoids. *Farmaco*, 53 (6), 421-424.

Pietta P. G, 2000. Flavonoids as antioxydants. *Journal of Natural Products*, 63, 1035-1042.

Park E., Jeon K. I., Byun B. H., 2005. Ethanol extract of *Inonotus obliquus* Shows antigenotoxic effect on hydrogen peroxide induced DNA damage in human lymphocytes. *Cancer Prevention Research*. 2005, 10, 54-59.

Paul C., Li Y., Mario C., Jia P. H., Kanyanga C., Bart V. P., Luc P., Arnold J. V., Dirk V. B., 1998. Structure-Activity Relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of Natural Product*, 61(1), 71 - 76.

Porto T. S., Rangel R., Furtado N. A. J. C., de Carvalho T. C., Martins C. H. G., Veneziani R. C. S., Da Costa F. B., Vinholis A. H. C., Cunha W. R., Heleno Vladimir C. G., Ambrosio S. R., 2009. Pimarane-type diterpenes: antimicrobial activity against oral pathogens. *Molecules*, 14, 191-199.

Q

Qais N., Mandal M. R., Rashid M. A., Jabbar A., Koshino H., Nagasawa K. Nakata T., 1998. A Furanoid labdane diterpene from *Potamogeton nodosus*. *Journal of Natural Product*, 61, 156-157.

Quillardet P., Huisman O., D'Ari R.,Hofnung M., 1982. SOS Chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in Escherichia coli K-12 to measure genotoxicity. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA,* 79, 5971-5975.

Quillardet P., Hofnung M., 1985. The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. *Mutation Research,* 147, 65-78.

R

Rajendran M., Manisankar P., andhidasan R., Murugesan R., 2004. Free Radicals Scavenging Efficiency of a Few Naturally Occurring Flavonoids : A comparative Study. *Journal of Agriculture of Food Chemistry*, 52, 7389-7394.

Ramos A., Visozo A., Piloto J., Garcia A., Rodriguez R., Riviero R., 2003. Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 87, 241–246.

Read M. A., 1995. Flavonoids naturally occurring anti-inflammatory agents vascular. *American Journal of Pathology*, 147(2), 235-237.

Rice-Evens C. A., Miller N. J, Paganga G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933-356.

Rigano D., Aviello G., Bruno M., Formisano C., Rosselli S., Capasso R., Senatore F., Izzo A. A., Borrelli F., 2009. Antispasmodic effects and structure-activity relationships of labdane diterpenoids from *Marrubium globosum ssp libanoticum. Journal of Natural Products*, 72, 1477-1481.

Rowinsky E. K., Onetto N., Canetta R. M., Arbuck S. G., 1992. Taxol-the 1st of the texanes, an important new class of anti-tumor agents. *Seminars in Oncology*, 19, 646-62.

S

Santos H. S., Barros F. W., Albuquerque M. R., Bandeira P. N., Pessoa C, Braz-Filho R., Monte F. J., Leal-Cardoso J. H., Lemos T. L. 2009. Cytotoxic diterpenoids from *Croton argyrophylloides*. *Journal of Natural Product*, 72(10), 1884-7.

Sharma B., Viswanath G., Salunke R., Roy P., 2008. Effects of flavonoid-rich extract from seeds of *Eugenia jambolana* (L) on carbohydrate and lipid metabolism in diabetic mice. *Food Chemistry*, 110, 697-705.

Shukla S., Gupta S., 2010. Apigenin: A Promising Molecule for Cancer Prevention. *Pharmaceutical Research*, 27 (6), 962-978.

Seto C., Araie S., Matsamuto S., Tekase M., 1986. Acute effects of topical forskolin on aqueous humor dynamics in man. *Japanese Journal of Ophtalmology*, 30(3), 238-242.

Sekher P. A., Chan T. S., O'Brien P. J., Rice-Evans C. A., 2001. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 282, 1161-1168.

Schimmer O., Lindenbaum M., 1992. Tannins antimutagenic propertiesin the herb of Alchemilla species and Potentilla anserine. *Planta Medica*, 47, 466-467.

Schleifer K. H., Kilpper-Balz R., 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis and Streptococcus faecium to the genus Enterococcus nom. rev. as Enterococcus faecalis comb. nov. and Enterococcus faecium comb. nov."*. *International Journal of Systematic Bacteriology,* 34, 31–34.

Sohal R. S., Mockett R. J., Orr W. C., 2002. Mechanisms of aging: an apparaisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radical Biology and Medicine,* 33 (5), 575.

Sroka Z., 2005. Antioxidative and antiradical properties of plant phenolics. *Zeitschrift für Naturforschung C ,* 60, (11-12), 833-843.

Stanislaw B., Wieslaw O., 2001. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6), 2774–2779.

Stulzer H. K., Tagliari M. P., Zampirolo J. A., Cachinel-Filho V., Schlemper V., 2006. Antioedematogenic effect of marrubiin obtained from *Marrubium vulgare*. *Journal of Ethnopharmacology*, 108, 379-384.

T

Taboada J., Camino M., Gil N. M., Campos E., Guerrero C., 1994. Antifeedant of marrubiin and reduced marrubiin. *Revista Latinoamericana de Quimica*, 23 (3), 120-125.

Tapia L., Torres J., Mendoza L., Urzúa A., Wilkens M., 2004. Effect of 13-epi-cslareolon the bacterial respiratorychain. *Planta Medica*, 70, 1058-1063.

Tojo E., Rial M. E., Urzúa A., Mendoza L., 1999. Clerodane diterpenes from *Haplopappus deserticola*. *Phytochemistry*, *52*, 1531-1533.

Tsimogiannis I., Oreopoulou V., 2004. The contribution of flavonoid C-ring on the DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3',4'-hydroxy substituted members. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5, 523- 528.

U

Urzúa A., Caroli M., Vasquez L., Mendoza L., Wilkens M., Tojo E., 1998. Antimicrobial study of the resinous exudate and of diterpenoids isolated from *Eupatorium salvia* (*Asteraceae*). *Journal of Ethnopharmacology, 62*, 251-254.

Urzúa A., Torres R., Mendoza L., Delle Monache F., 2003. Antibacterial new clerodane diterpenes from the surface of *Haplopappus foliosus*. *Planta Medica, 69*, 675-677.

Urzúa A., Jara F., Tojo E., Wilkens M., Mendoza L., Rezende M. C.2006. A new antibacterial clerodane diterpenoid from the resinous exudates of *Haplopappus uncinatus. Journal of Ethnopharmacology*, *103*, 297-301.

V

Van Acker S. A. B. E., Van Den Berg D.-j., Tromp M. N. J. L., Griffioen D. H., Van Bennekom W. P., Van Der Vijgh W. J. F., Bast A., 1996. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine,* 20(3), 331-342.

Van Acker S. A. B. E., Van Deu Berg D. J., Tromp M. N. J. L., Griffioen D. H., Van Bennekom W. P., Van Der Vijgh W. J. F., Bast A., 1996. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine,* 20, 331-342.

Villar A., Gasco M. A, Alcaraz M. J., 1987. Some aspects of the inhibitory activity of hypolaetin-8-glucoside in acute inflammation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 39(7), 502-7.

Villalain J*., 1997. Location of the toxic molecule abietic acid in model membranes by MAS- NMR. Biochim Biophys Acta, 1328, 281-289.*

Von Nussbaum F., 2006. "Medicinal Chemistry of Antibacterial Natural Products – Exodus or Revival?". *Angew.* "Pharmacochimie des antibactériens produits naturels - Exodus ou reprise?". *Angewandte Chemie International Edition,* **45**(31), 5072–5129.

W

Wachter G. A., Matooq G., Hoffmann J. J., Maiese W. M., 1999. Antibacterial diterpenoid acids from *Azorella compacta*. *Journal of Natural Products, 62*, 1319-1321.

Wani M. C., Taylor H. L., Wall M. E., Coggon P., McPhail A. T., 1971. Plant anti-tumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel anti-leukemic and anti-tumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society*, 93, 2325-27.

Wen-Hsin H., An-Rong L., Ching-Huey Y., 2006. Antioxidative and Anti-Inflammatory Activities of Polyhydroxyflavonoids of *Scutellaria baicalensi*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 70 (10), 2371-2380.

Wolf J. T., Liu R. H., 2008. Structure-activity relationships of flavonoids in the cellular antioxidant activity assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 8404-8411.

Woodman O. L., Meeker W. F., Boujaoude M., 2005. Vasorelaxant and Antioxidant Activity of Flavonols and Flavones: Structure-Activity Relationships. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 46 (3), 302-309.

Y

Yeon S. C., Hyon G. J., Kun H. S., 2001. Effects of naturally occurring prenylated flavonoids on enzymes metabolizing arachidonic acid, Cyclooxygenases and lipoxygenases. *Biochemical Pharmacology*, 62, 1185-1191.

Yochum L., Kushi L. H., Meyer K., Folsom A. R., 1999. Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal woman. *American Journal of Epidemiology*, 149, 943-949.

Yuko T. I., Masao G., Kohji Y., 2003. Inhibitory effects of several flavonoids on E-selectin expression on human umbilical vein endothelial cells stimulated by tumor necrosis factor-α. *Phytotherapy Research*, 17, 1224-1227.

Yukiko M.,Tadashi Y., Akiko S., Atsuko I., Izumi H., Mitoshi A., Yoshihiro N., 2003. Anti-allergic Substances Contained in the Pollen of Cryptomeria japonica Possess Diverse Effects on the Degranulation of RBL-2H3 Cells. *Journal of Pharmacology Science*, 92, 291 - 295.

Z

Zheng C.-J., Huang B.-K., Wang Y., Ye Q., Han T., Zhang Q.-Y., Zhang H., Qin L.-P., 2010. Anti-inflammatory diterpenes from the seeds of *Vitex negundo*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18(1), 175–181.

CHAPITRE V :

ANNEXES

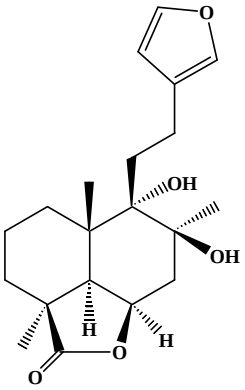
ANNEXE I : les diterpènes de la famille des Lamiacées

Sous familles	genres	Espèces	Molécules	références
Labdanes				
Lamioidaea	*Leonotis*	*ocymifolia*	**1**, **2**, **3**	(Hussein *et al*., 2003.
	leonurus	*Heterophyllus*	**4**, **5**, **6**, **7**, **8**, **9**, **10**, **11**, **12**	Giang *etal*.,2005.
	leonurus	*Heterophyllus*	**9**, **12**, **13**, **14**, **15**, **16**, **17**, **18**, **19**, **20**, **21**, **22**, **23**, **24**	Phan *et al*.,2005
	Eremostachys	*glabra*	**25**,**26**	Delazar *et al*., 2006
	Eremostachys	**laciniata.**	**25** , **26** , **27**	Delazar et al., 2008
Viticoideae	*Vitex*	*hemsleyi*	**28**, **29**	Gomez *et al*., 2009
	Vitex	***rotundifolia***	**30**, **31**	Ono *et al*., 2002, Ko *et al*., 2001
	Vitex	*agnus-castus*	**32**, **33**, **34**	Ono *et al*., 2009
	Vitex	*cauliflora Moldenke*	**35**	Rasamison *et al* ., 2010
	Vitex	***negundo.***	**36**, **37**, **38**, **39**, **40**, **41**	Zheng *et al.,* 2010
Nepetoideae	*Coleus*	*forskohlii*	**42**, **43**, **44**, **45**, **46**	Shan, 2008; Badmaev, 2002
	Salvia	*palaestina* Bentham	**291**	Vassallo *et al.,* 2008
Ajugoideae	*Ajuga*	*chamepitys* ssp. *laevigata*	**47**	Topcu, 2004
		Nor-labdanes		
Viticoideae	*Vitex*	Rotundifolia	**48**, **51**, **49**, **50**	Ono *et al*., 2002
	Callicarpa	pedunculata	**52**	Hu *et al*., 2002
Kauranes				
lamioidaea	*Sideritis*	*libanotica*	**53**, **54**	Bruno *et al*., 2005
	Sideritis	*erythrantha*	**54**	
	Sideritis	*perfoliata*	**53**, **54**, **55**	
	Sideritis	*arguta*	**56**, **57**, **58**, **59**	Ertas , 2009
Nepetoideae	*Rabdosia*	*rosthornii*	**60**, **61**, **62**, **63**, **64**, **65**	Kubo, 2004.

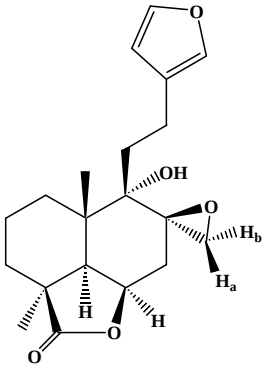
	Isodon	*eriocalyx*	**66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73**	Han ,2006; Shen *et al*., 2005; Li *et al.*,2010
	Isodon	*Pseudo-irrorata*	**74, 75**	Zhang *et al.*, 2002
	Isodon	*irrorata*	**76**	Sun *et al*., 2001
	Isodon	henryi	**73, 289, 290**	Li *et al*., 2002
	Isodon	*enanderianus*	**77, 78, 90, 84,82, 83, 85, 86, 87, 88, 89, 91, 79, 80, 81**	Zhi *et al*., 2002
	Isodon	Xerophilus	**92, 93**	Weng *et al*., 2007
Viticoideae	*Callicarpa*	pedunculata	**94**	Hu *et al*., 2002
Abietanes				
Nepetoideae	*Isodon*	*glutinosa*	**95**	Xuemei *et al*., 2002
	Isodon	*xerophilus*	**65, 77, 80, 85, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123,124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 132.**	Weng *et al*., 2007, Niu *et al.*, 2004. Li *et al*., 2007
	Plectranthus	*barbatus*	**133, 134, 135**	De Albuquerque *et al*., 2007
	Hyptis	*Martiusii*	**136, 138, 139, 140**	da Cruz Arau´ jo *et al*., 2006
	Salvia	*phlomoides*	**141**	Rodriguez *et al*., 2003
	Salvia	*miltiorrhiza*	**142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153**	Nguyen *et al.*, 2007
	Salvia	*cilicica*	**154,155, 156, 157, 158**	Tana *et al*., 2002
	Dorystoechas	*hastate*	**154, 159**	Ulubelen *et al.*, 2004
	Salvia	*prionitis*	**160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170**	Chang *et al*., 2005 ; Chen X., 2002
	Salvia	*prionitis*	**171, 172, 173**	Xu *et al*., 2006
	perovskia	*abrotanoides*	**174, 175, 136, 137, 176, 177, 178, 179, 180**	Aoyagi *et al*., 2006
	Isodon	*Xerophilus*	**96**	Weng *et al.*, 2007
	Salvia	*palaestina*	**174, 154, 181 , 182, 183, 185,**	Vassallo *et al*., 2008

			184 **186**	
	Hyptis	*verticillata*	**187**, **188**, **189**, **190**, **192**	Porter *et al.*, 2009 ; Bakir *et al*., 2006
	Salvia	**barrelieri**	**191**, **189**, **192**, **193**, **194**, **155,**	Kabouche *et al*., 2007
	Teucrium	**lanigerum**	**195**, **196**, **197**, **198**, **199**	Rodriguez *et al.*, 2009
Viticoideae	*Callicarpa*	*pedunculata*	**200, 201, 202**	Liu *et al*., 2006, Hu *et al.*, 2002
	Vitex	**negundo**	**203 , 204**	Zhang *et al.*, 2010
Abeo-norabietanes				
	Schnabelia	**tetradonta**	**205,206, 207, 208, 209**	Dou *et al*., 2003 Dou *et al*., 2004
Viticoideae	**Vitex**	**rotundifolia**	**210**	Ono *et al*., 2002
Clerodanes				
Nepetoideae	*Salvia*	*gesneraeflora*	**211, 212, 213**	Esquivel *et al*., 2001
	Salvia	*divinorum*	**214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231**	Harding *et al*., 2005 ; Shirota *et al*.,2006 ; Medana *et al*., 2006
	Salvia	*leucantha*	**232, 233**	Aoyagi *et al*., 2008
	Salvia	*gregii*	**211, 234**	Kawahara *et al.*, 2003
	Salvia	*fulgens*	**235, 236, 237, 238, 239, 240**	Narukawa *et al.* , 2006
	Nepeta	**suavis**	**241**	Hussein *et al.*, 2008
Scutelarrioideae	*Scutellaria*	*barbata*	**242**	Nguyen *et al.*, 2009
	Scutellaria	parvula	**243**	Bruno *et al.*, 2004
Ajugoideae	*Teucrium*	*chamaedrys*	**244, 245, 246**	Fiorentino *et al.*, 2009
	Teucrium	*chamaedrys*	**247**	Bedir *et al*., 2003
	Teucrium	*fruticans*	**253, 248, 249, 254, 252, 250, 251**	Coll *et al.,* 2004 ; 2005
	Ajuga	*turkestanica*	**255, 256, 257, 258, 259, 260**	Grace *et al*., 2008
	Ajuga	*chamepitys* ssp.	**261**	Topcu *et al.,*

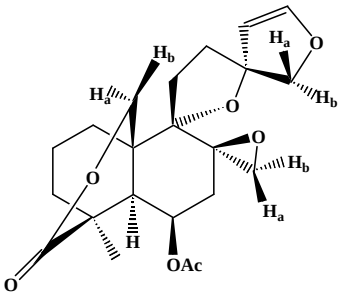
		laevigata		2004
	Ajuga	*remota*	**262**, **263**, **266**, **264**, **268**, **269**, **271**, **270** , **267**, **272**, **273**	Coll *et al.,*2005
	Ajuga	**reptans**	**274**, **275**, **276**,**277**, **278**	Carbonell *et al*., 2001
Lamioidaea	**Ballota**	**limbata**	**279**, **280**, **281**	Ahmad *et al.,* 2004
viticoideae	**Vitex**	rotundifolia	**282**	Ono *et al.,* 2002
Diterpènes acycliques				
Nepetoideae	Nepeta	crassifolia	**282**	Ibrahim *et al.,* 2007
Icetexana				
Nepetoideae				
	Perovskia	abrotanoides	**283**	Aoyagi *et al.,* 2006
Pimaranes				
Lamioideae	*Phlomis*	*amanica*	**284**	Yalcin *et al.,* 2006
Viticoideae	*Vitex*	**negundo**	**285**	Zheng *et al*.,2010
	Callicarpa	**pedunculata**	**286**	Hu *et al*.,2002
Nepetoideae	**Salvia**	**gregii**	**287**, **288**	Kawahara *et al*., 2003



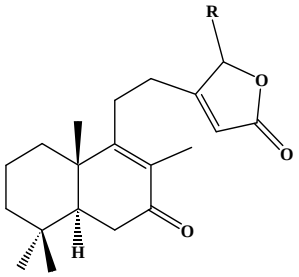
Leonotine **1**



leonotinine **2**

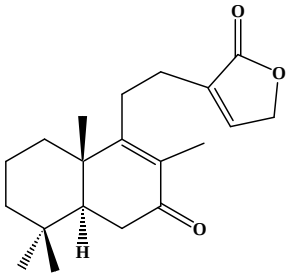


nepetaefoline **3**

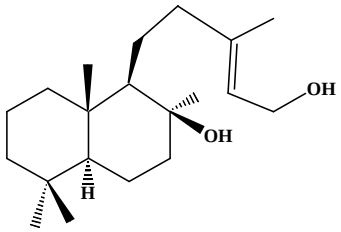


R=OH leohétéronine A **4**

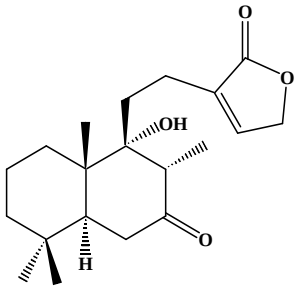
R=H leohétéronine C **6**



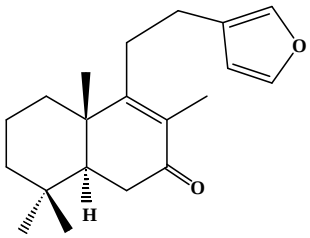
leohétéronine B **5**



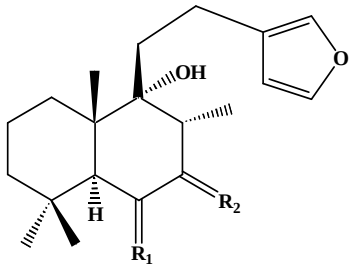
leohétéronine D **7**



Leohétéronine E **8**

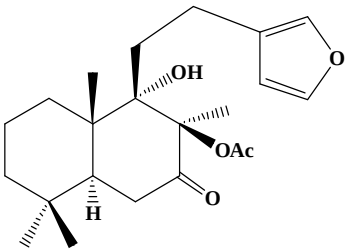


hispanone **9**

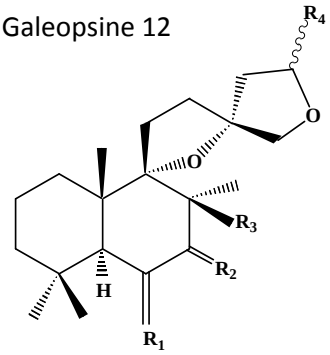


R_1= O, R_2=β-OH,α-H leohétérine **10**

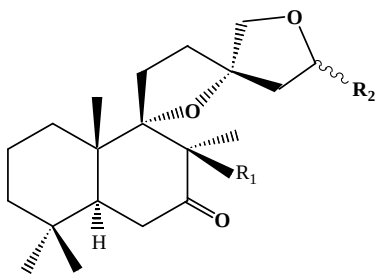
R_1=H_2, R_2=O hispanolone **11**



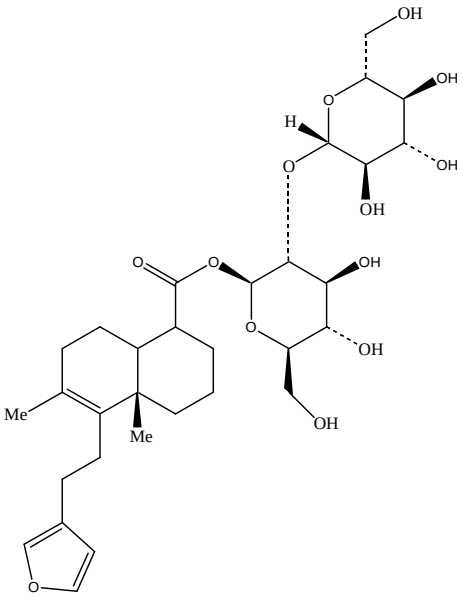
Galeopsine 12



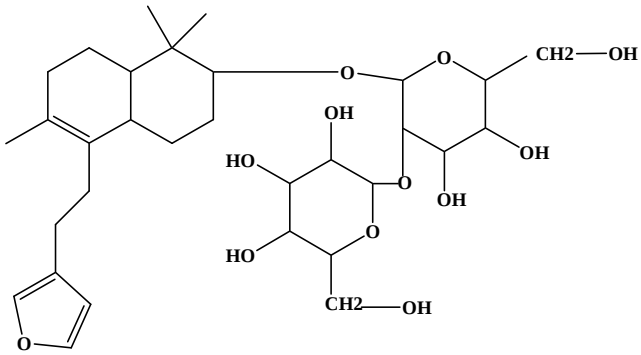
R_1	**R_2**	**R_3**	**R_4**		
H_2	O	OAc	β-OH	leopersin B	**13**
H_2	O	OAc	α-OH	15-epileopersin B	**14**
H2	O	OAc	α-OMe	leohétéronones A	**15**
O	β-OH, α-H	H	β-OH	leopersine C	**16**
O	β-OH, α-H	H	α-OH	15-epileopersine C	**17**
H2	O	H	β-OH	leohétéronones B	**18**
H2	O	H	α-OH	15-epileohétéronones B	**19**



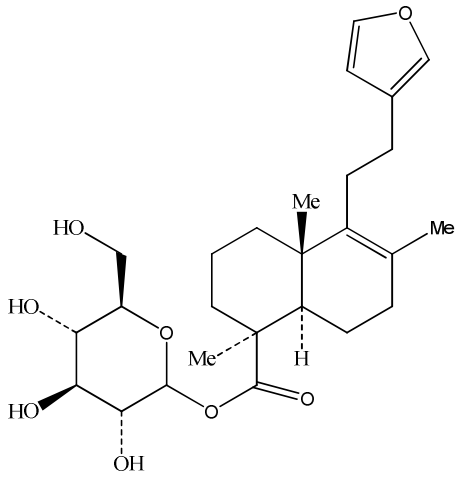
R_1	R_2		
OAc	α-OMe	Leohétéronone C	**20**
H	β-OH	Leohétéronone D	**21**
OAc	β-OH	Leohétéronone E	**22**
H	α-OH	15-epileohétéronone D	**23**
OAc	α-OH	15-epileohétéronone E	**24**



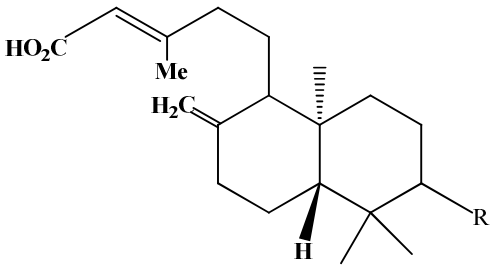
eremostachiine **25**



phlomisosideII **26**

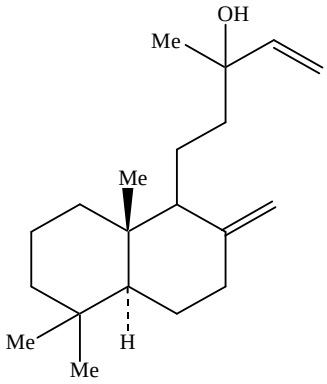


acide **β**-D-glucopyranosyl ester Phlomisoique **27**

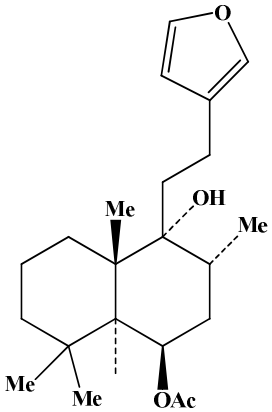


R=α-OH, acide 3β-Hydroxyanticopalique **28**

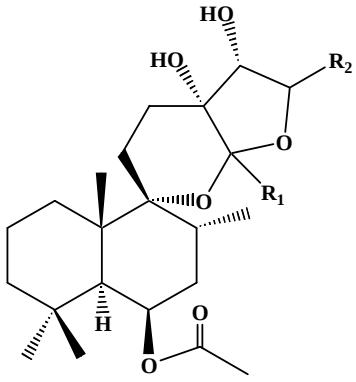
R=H, acide anticopalique **29**



vitexifoline A **30**

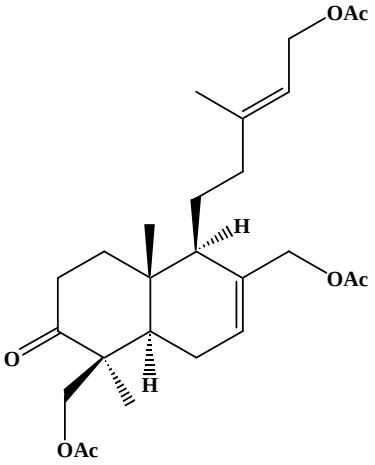


Rotundifurane **31**

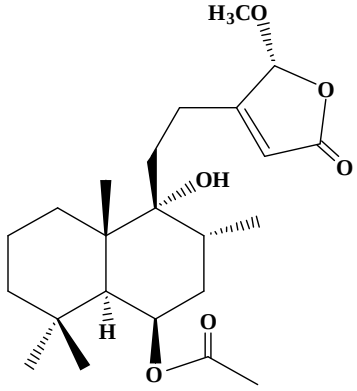


R1=α-H, R2=β-OCH_3 viteagnusins F **32**

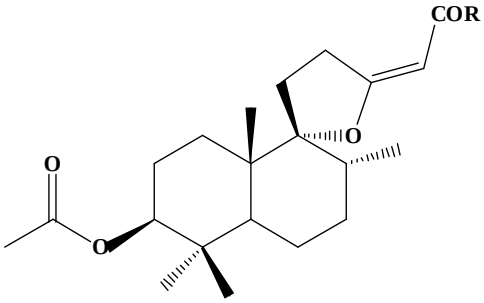
R2=β-H, R2=α-OCH3 viteagnusins G **33**



viteagnusins H **34**



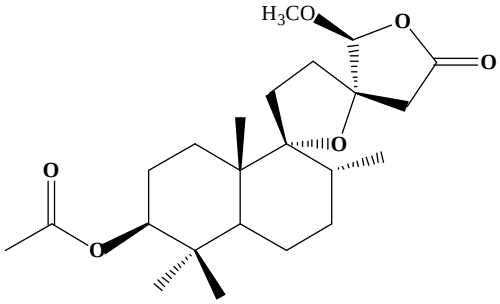
3-oxo,15,17,18-triacetoxy-labda-7,13 diéne **35**



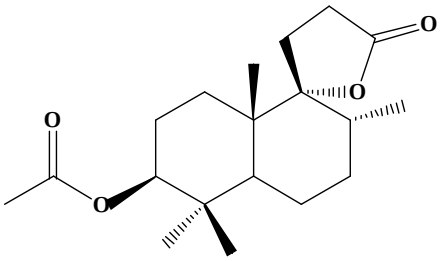
R=OCH_3 negundoine A **36**

R=OH negundoine B **37**

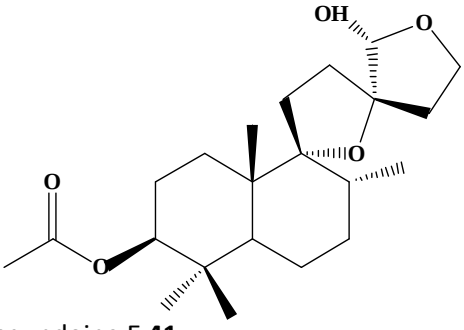
R=H negundoine C **38**



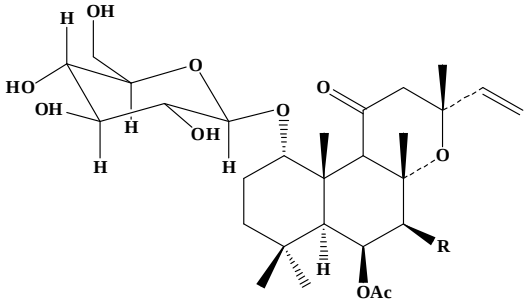
negundoine D **39**



vitedoine B **40**



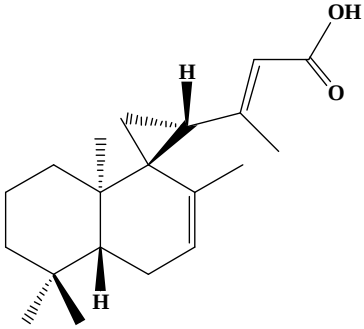
negundoine E **41**



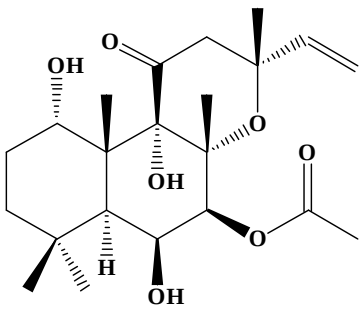
R=OH forskoditerpènoside C **42**

R=OAc forskoditerpènoside D **43**

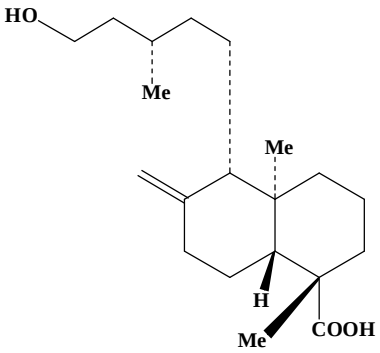
R=H forskoditerpènoside E **44**



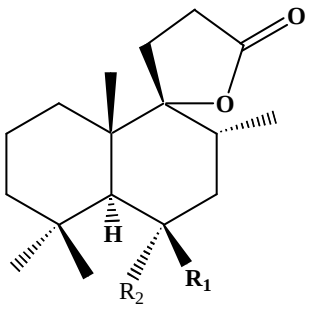
forskoditerpène A **45**



foskoline **46**



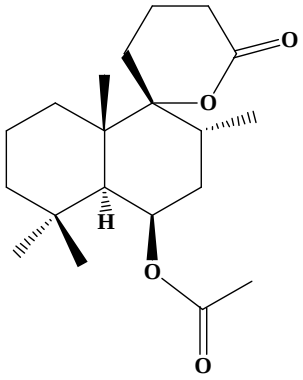
acide (13S)-15-hydroxylabd-8(17)-en-19-oïque **47**



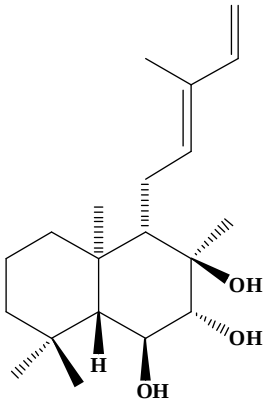
R_1=H, R_2=OAc vitexifolin D **48**

R_1= OAc, R_2= H trisnor-γ-lactone **49**

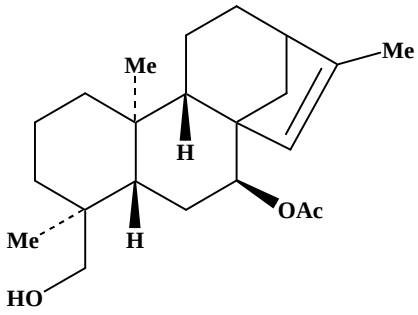
R_1=H, R_2=H isoambreinolide **50**



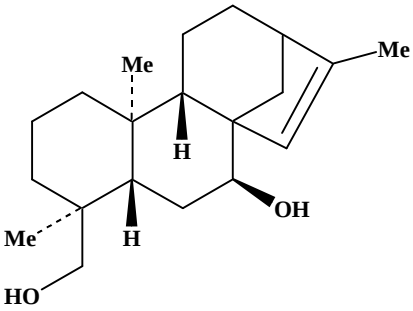
vitexifoline E **51**



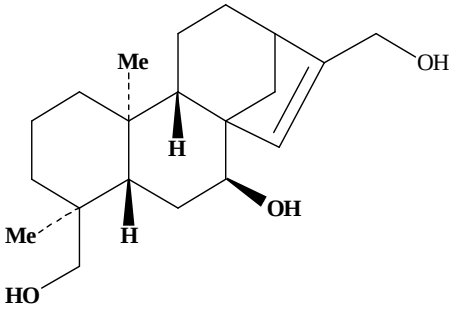
6α-hydroxynidorellol **52**



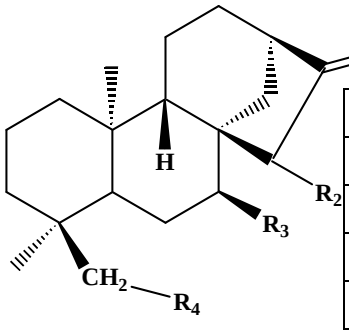
siderol **53**



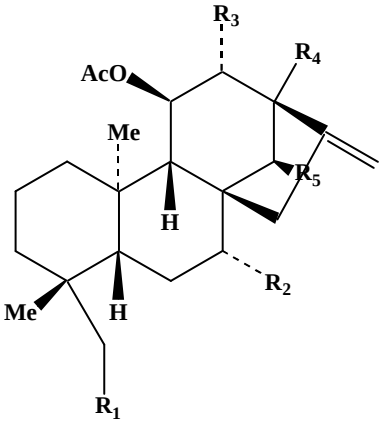
sideridiol **54**



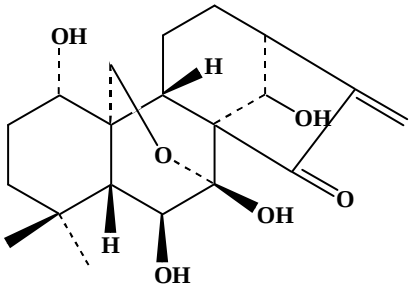
sideritriol **55**



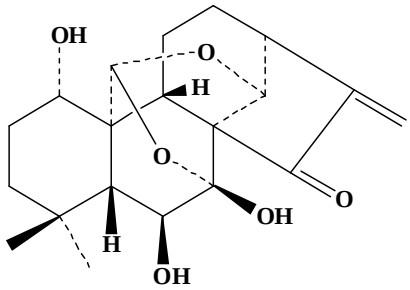
R_1	R_2	R_3	R_4		
CH_3, α-OH	H_2	β-$OCOCH_3$	$OCOCH_3$	diacétyldistanol	**56**
CH_2	β-OH	β-$OCOCH_3$	OH	15-epi-eubol	**57**
CH_2	α-OH	β-$OCOCH_3$	OH	eubol	**58**
CH_2	β-OH	β-OH	OH	7-epi-candicandiol	**59**



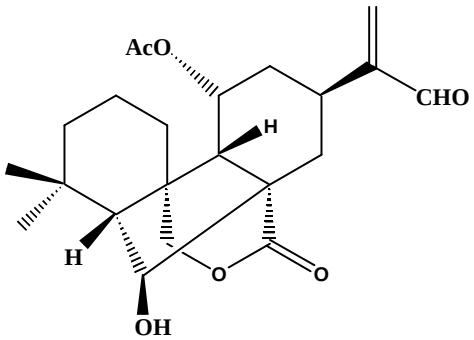
R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	rosthornine	
OH	H	H	OH	H	A	**60**
OAc	OH	H	OH	H	B	**61**
OH	OH	H	OH	H	C	**62**
H	OH	OH	H	OH	D	**63**



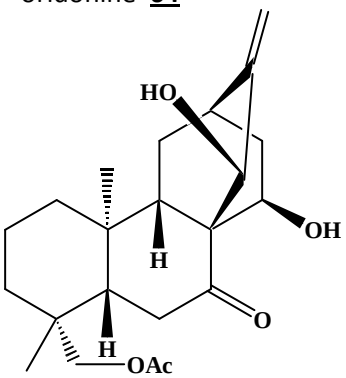
oridonine **64**



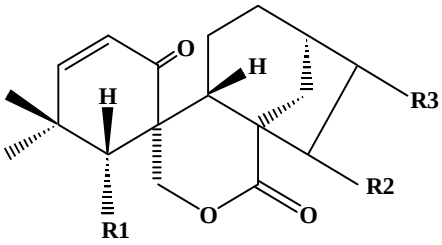
ponicidine **65**



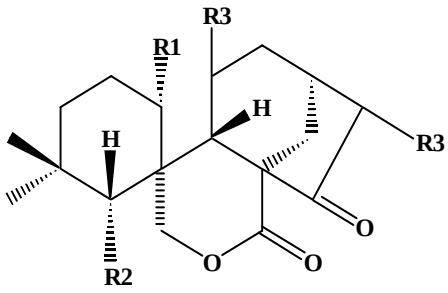
maoecrystal Z **66**



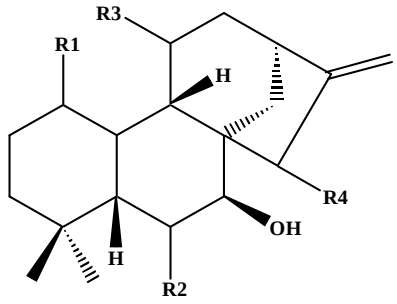
eriocatisin A **67**



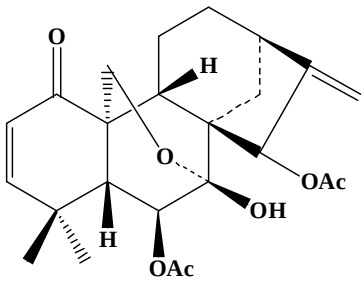
R1	R2	R3	
COOH,	=O,	β-Me,	epi-maoecrystal N **68**
CHO,	β-OH,	α-Me,	eriocalyxin G **69**



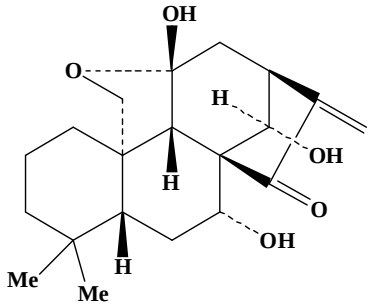
maoecrystal W **70**



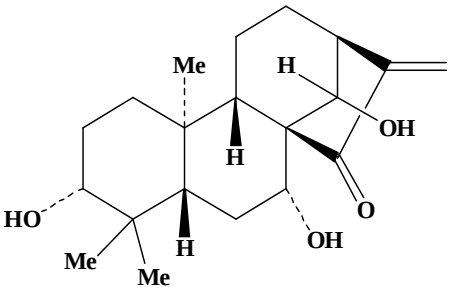
R1	R2	R3	R4	
α-OH,	β-OH,	H,	β-AcO,	maoecrystal X **71**
α-OH,	β-AcO,	α-OH,	β-AcO,	maoecrystal Y **72**



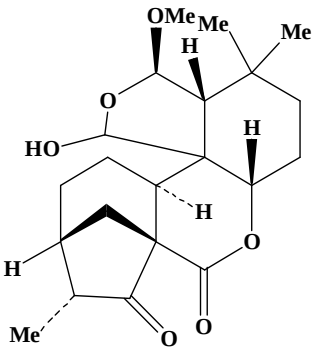
odonicine **73**



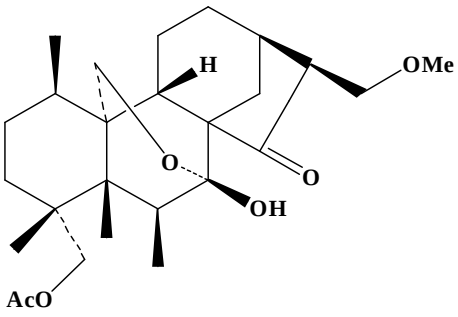
pseudoirroratine A **74**



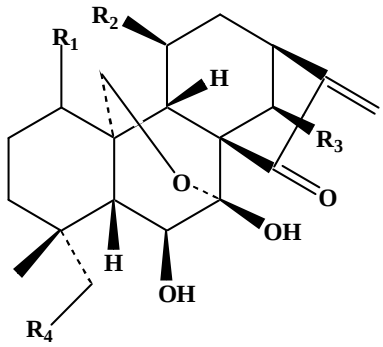
pseurata A **75**



irroratine A **76**



enanderinanine G **82**



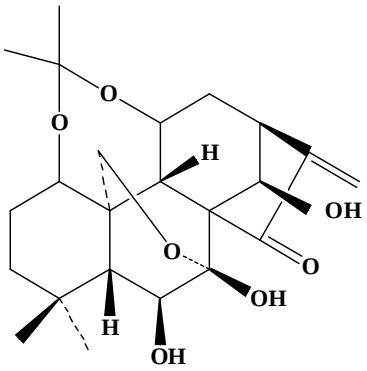
R_1=H, R_2=α-OH, R_3=H, R_4=OAc longikaurineD **77**

R_1=H, R_2=α-OAc, R_3=H, R_4=OAc longikaurineF **78**

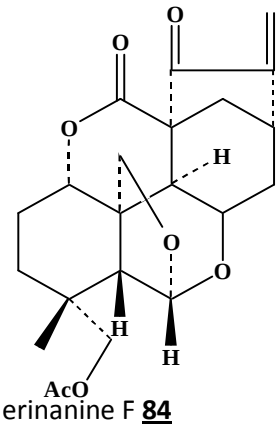
R_1=β-OH, R_2=α-OH, R_3=H, R_4=OAc enanderinanine B **79**

R_1=β-OH, R_2=H, R_3=OH, R_4=OAc xerophilusineG **80**

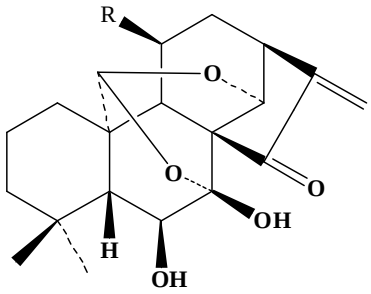
R_1=α-OAc, R_2=α-OAc, R_3=H, R_4=H Shikokianine **81**



enanderinanine H **83**

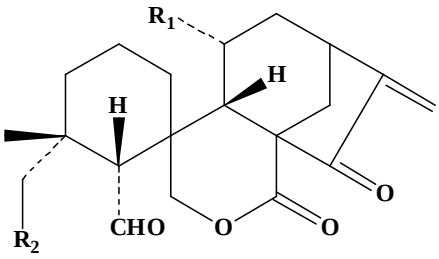


enanderinanine F **84**



R=OH, macrocaline B **85**

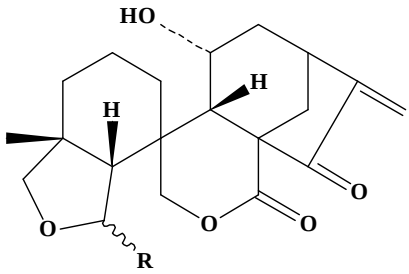
R=OAc, xerophilusineA **86**



R_1=OH, R_2=H trichorabdal A **87**

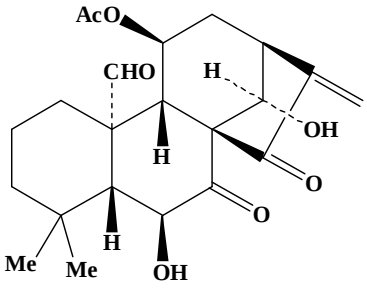
R_1=OH, R_2=OAc trichorabdal B **88**

R_1=H, R_2=OAc effusine **89**

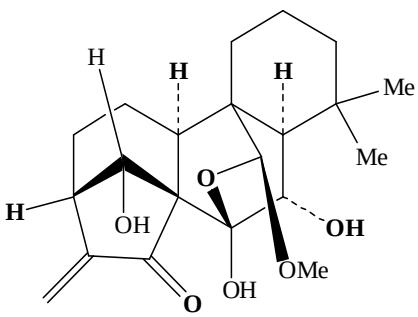


R=α-OCH_3 6-epiangustifoline **90**

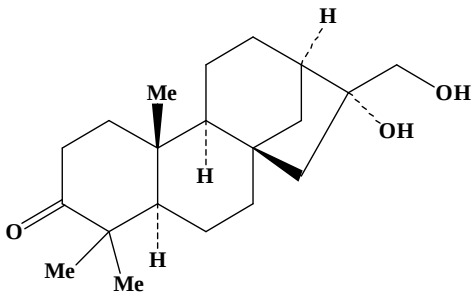
R=β-OCH_3 angustifoline **91**



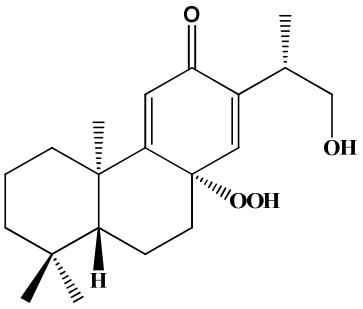
xerophinoide A **92**



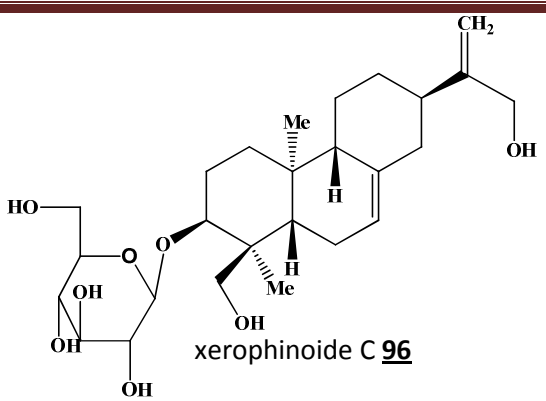
xerophinoide B **93**



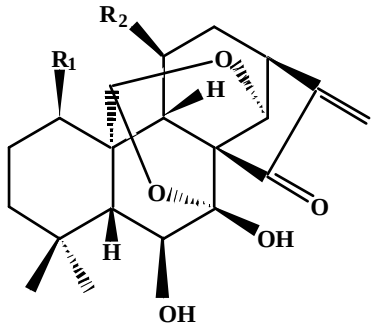
calliterpenone **94**



glutinosine C **95**

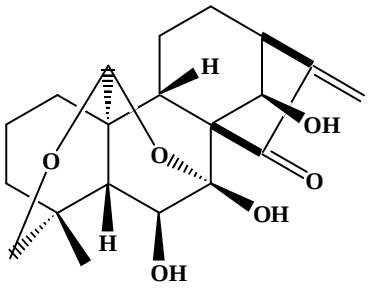


xerophinoide C **96**

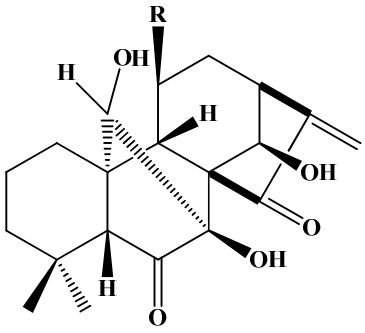


R_1=R_2=H xerophilusine B **97**

R_1=H, R_2=OAc xerophilusine A **98**

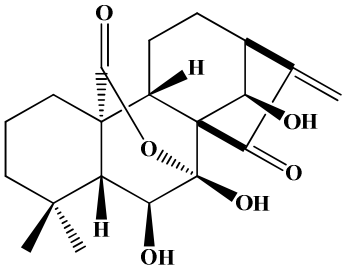


xerophilusine D **99**

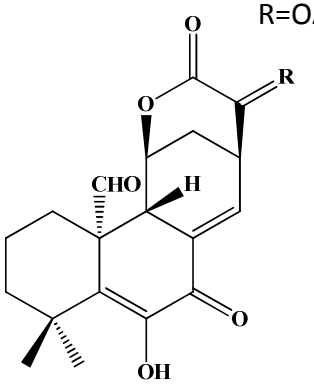


R=OH phyllostachysine A **100**

R=OAc xerophilusine F **101**

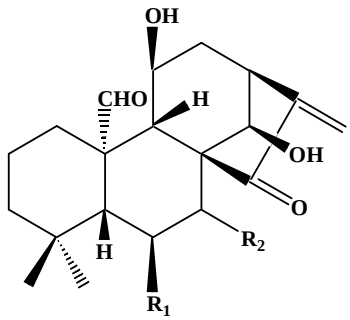


xerophilusine N **102**



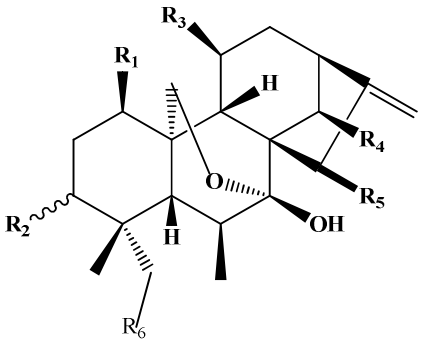
R=O xerophilusine R **103**

R=α-CH_2OH xerophilusine S **104**

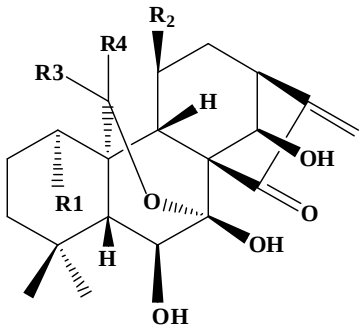


R_1=O, R_2=OH xerophilusine I **105**

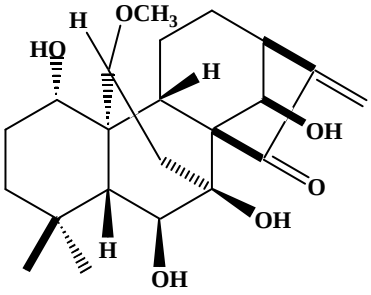
R_1=OH, R_2=O xerophilusine II **106**



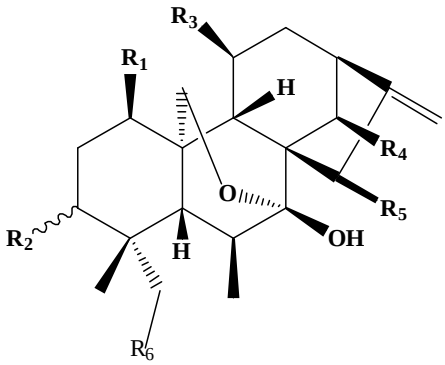
R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6		
OH	H	H	OH	O	H	xerophilusine III	**107**
H	H	H	OH	O	H	xerophilusine IV	**108**
OH	H	H	OH	OH	H	xerophilusine V	**109**
OH	H	β-OH	OH	O	Ac	xerophilusine VI	**110**
OH	α-OH	H	OH	O	Ac	xerophilusine VII	**111**
OH	α-OH	α-OH	H	O	Ac	xerophilusine VIII	**112**
OH	H	H	H	O	Ac	xerophilusine H	**113**
H	H	H	OH	O	Ac	longikaurine B	**114**
OH	β-OH	H	H	=O	Ac	naocrystal	**115**

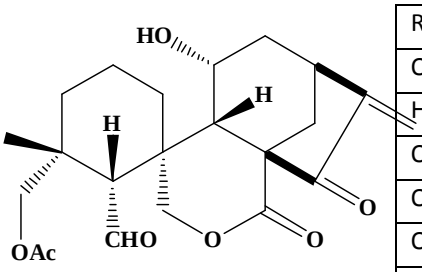


R_1	R_2	R_3	R_4		
H	OH	H	OCH_3	xerophilusine XII	**116**
OH	H	H	OCH_3	xerophilusine XIII	**117**
OH	H	H	OCH_3	hebeirubescensine G	**118**
OH	H	OH	H	hebeirubescensineH	**119**
OH	H	OCH_3	H	rabdoternine E	**120**



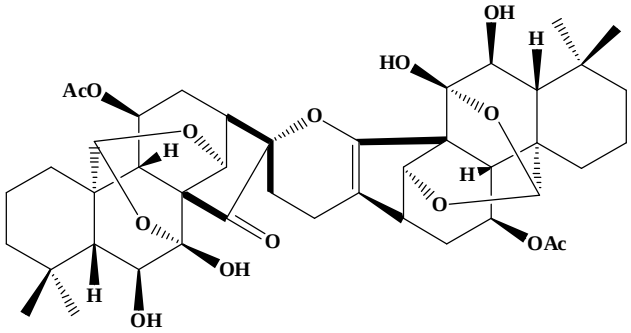
rabdoternine F **121**



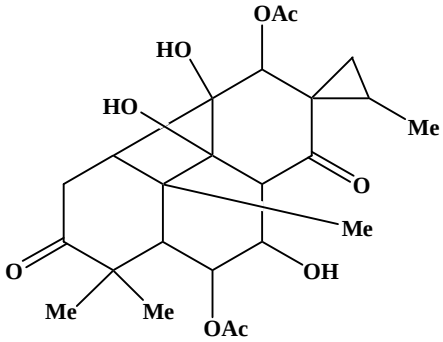


trichorabdal B **130 b**

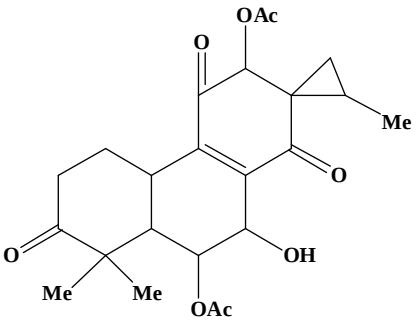
R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6		
OH	H	H	OH	O	H	xerophilusine III	**122**
H	H	H	OH	O	H	xerophilusine IV	**123**
OH	H	H	OH	OH	H	xerophilusine V	**124**
OH	H	β-OH	OH	O	Ac	xerophilusine VI	**125**
OH	α-OH	H	OH	O	Ac	xerophilusine VII	**126**
OH	α-OH	α-OH	H	O	Ac	xerophilusine VIII	**127**
OH	H	H	H	O	Ac	xerophilusine H	**128**
H	H	H	OH	O	Ac	longikaurine B	**129**
OH	β-OH	H	H	O	Ac	naocrystal	**130a**



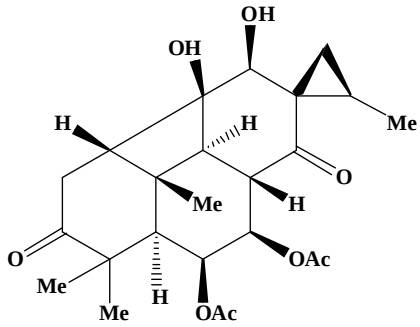
enanderinanine J **131**



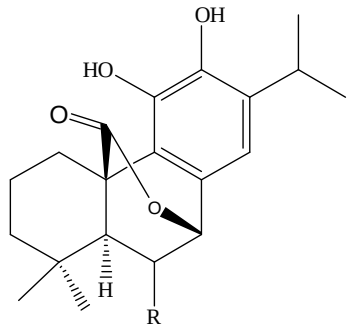
cyclobutatusine **132**



barbatusine **134**

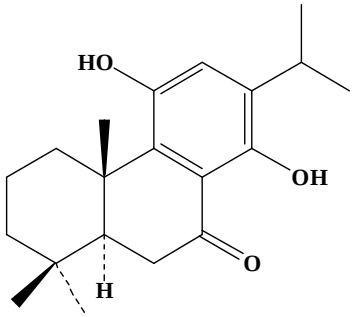


7**β**-acétyl-12-deacétoxycyclobutatusine **135**

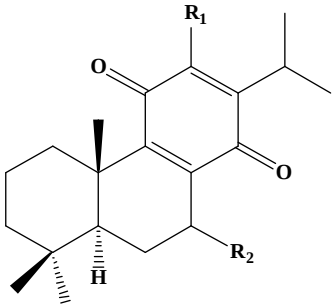


R= H Carnasol **136**

R=α-OH isorosmanol **137**

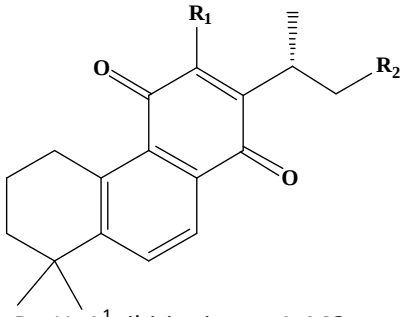


11,14-dihydroxyabieta-8,11,13-trien-7-one **138**



R_1=H, R_2=β-OH 7β-hydroxy-11,14-dioxoabieta-8,12-diene **139**

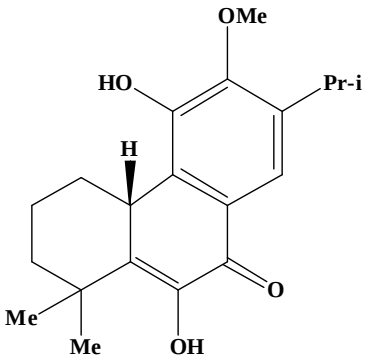
R_1=OH, R_2=α-OAc, 7α-acétoxyroyleanone **140**



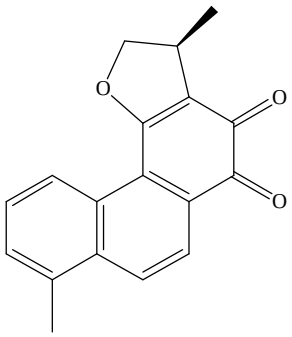
R_1=R_2=H, Δ^1 sibiriquinone A **142**

R_1=R_2=H sibiriquinone **143**

R_1=R_2=OH néocryptotanshinone **144**

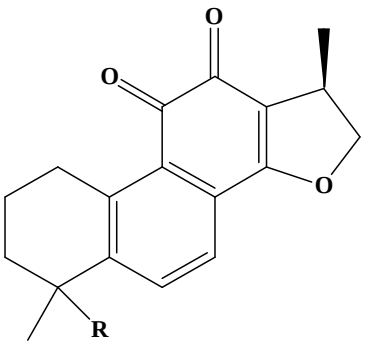


6,11-dihydroxy-12-méthoxy-5,8,11,13-abietatetraen-7-one **141**



dihydroisotanshinone II **145**

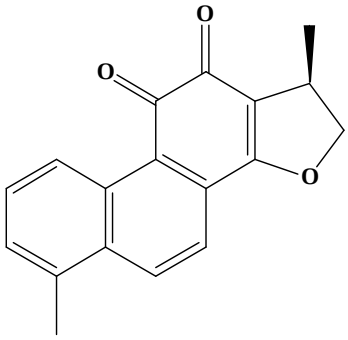
Δ^{15}, Isotanshinone II **146**



R=CH_3 cryptotanshinone **147**

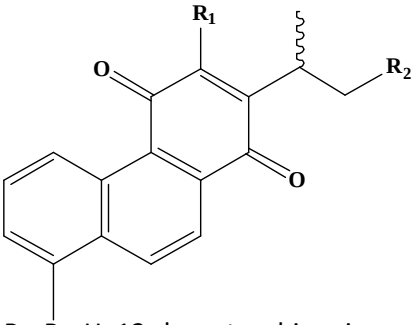
R=$COOCH_3$ Δ^{15} méthyl tanshinonate **148**

R=CH_3, Δ^{15}tanshinone IIA **149**



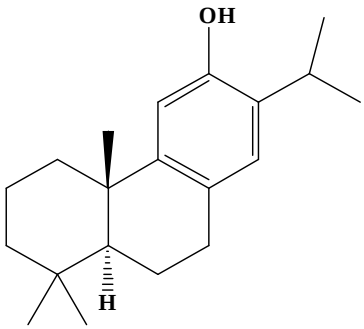
dihydrotanshinone **150**

tanshinone I, Δ^{15} **1151**

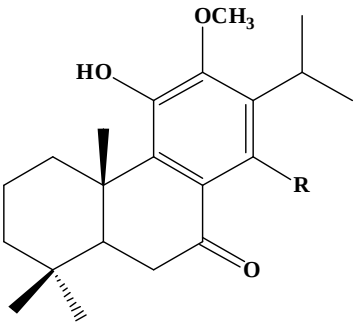


R_1=R_2=H, 12-deoxytanshinquinone B **152**

R_1=R_2= OH, danshenxinkun A **153**

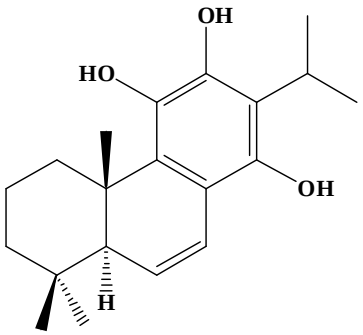


ferruginol **154**

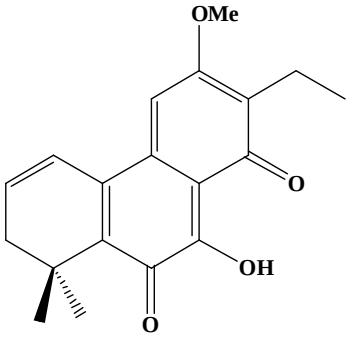


R=OH, inutoxyroyleanone **155**

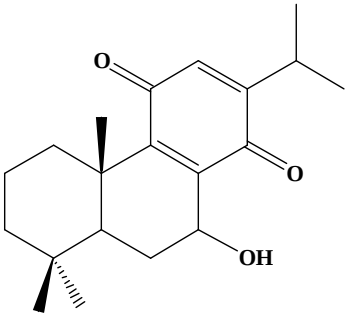
R=H, cryptojaponol **194**



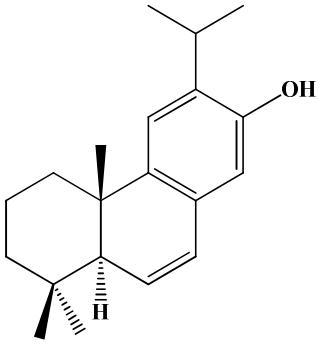
7,9,12-pentaen-6,14-dione **156**



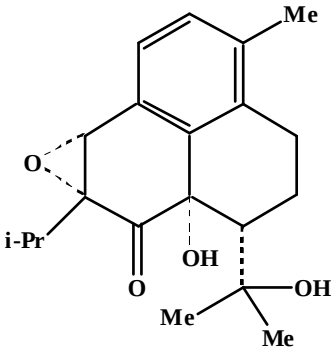
7-hydroxy-12-méthoxy-20-nor-abieta-1,5(10)-12-deoxyroyleanone **157**



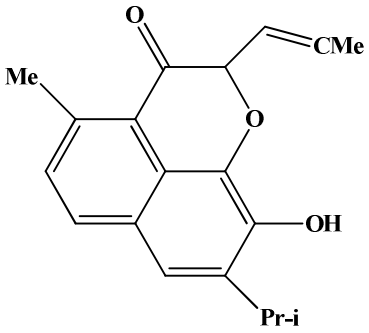
cryptanol **158**



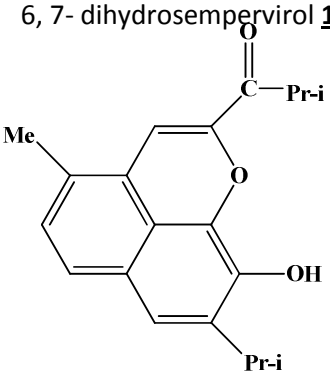
6, 7- dihydrosempervirol **159**



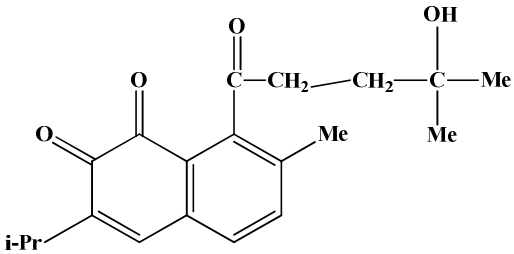
prionoide A **160**



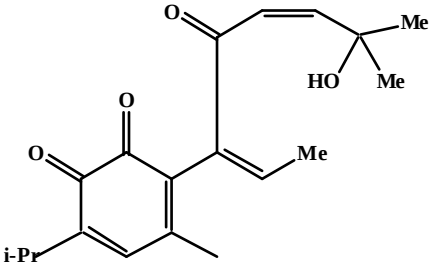
prionoide B **161**



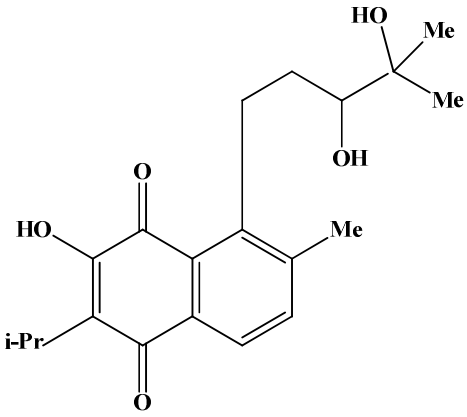
prionoide C **162**



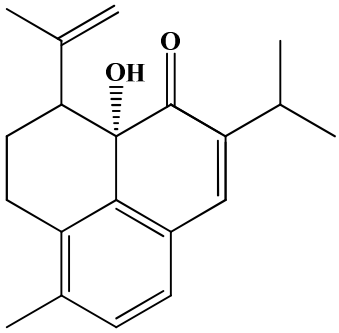
prionoide D **163**



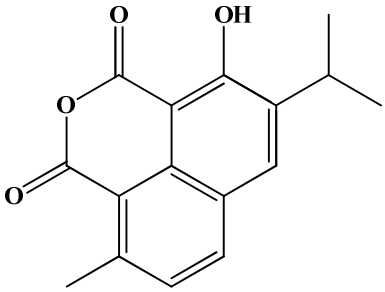
prionoide E **164**



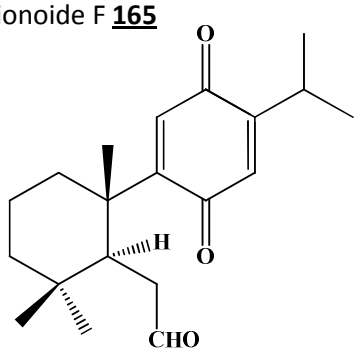
prionoide F **165**



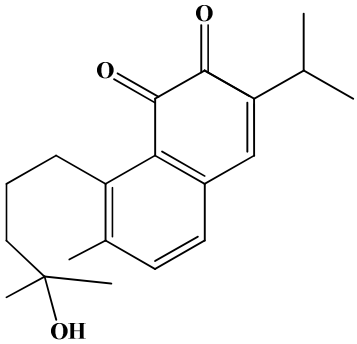
saprirearine **166**



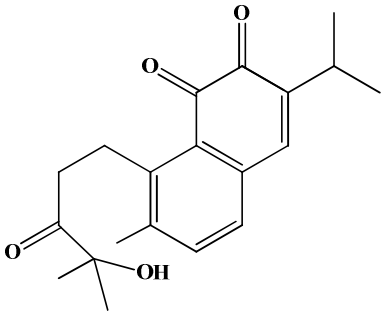
saprionide **167**



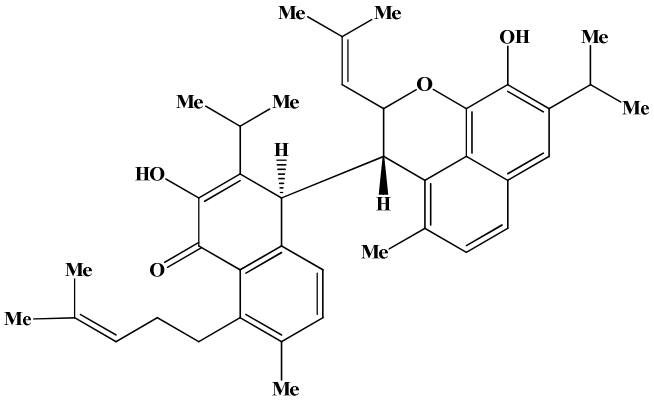
7,8-*seco-para*-ferruginone **168**



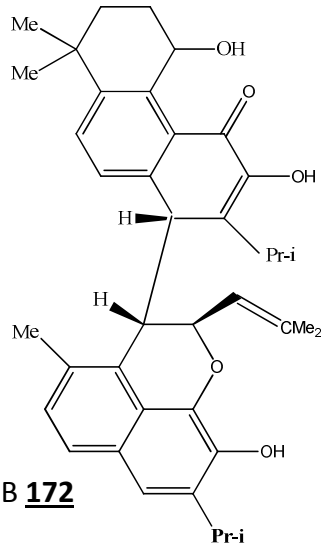
4-hydroxysaprorthoquinone **169**



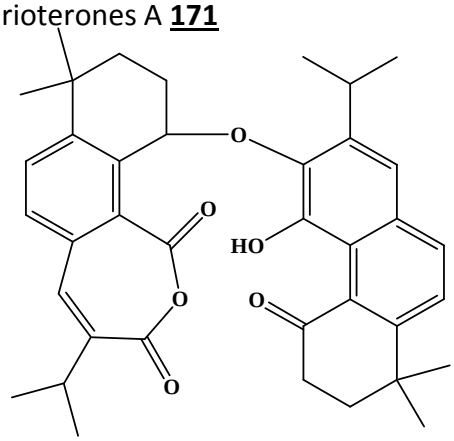
3-ceto-4-hydroxysaprorthoquinone **170**



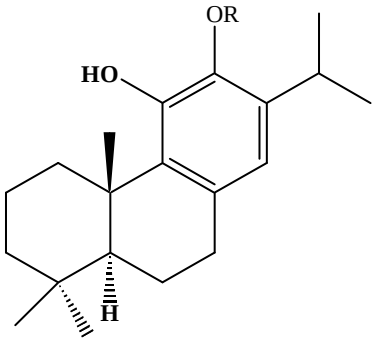
bisprioterones A **171**



isprioterones B **172**

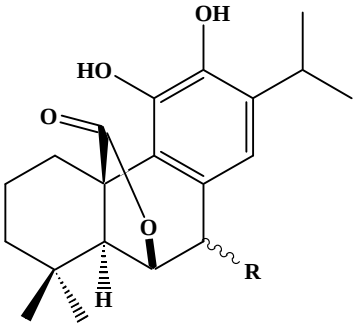


bisprioterones C **173**



R= H acide carsonique **174**

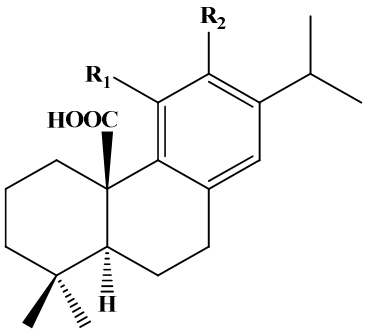
R=CH_3 acide12-O-méthylcarnosique **175**



R=α-OH rosmanol **176**

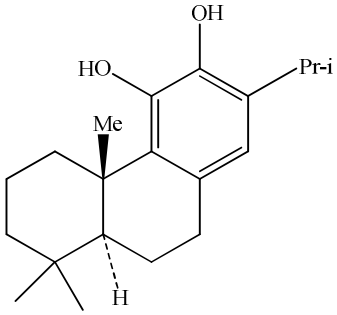
R= α-OCH_3 7-*O*-méthylrosmanol **177**

R = β-OCH_3 7-epi-7-*O*-méthylrosmanol **178**

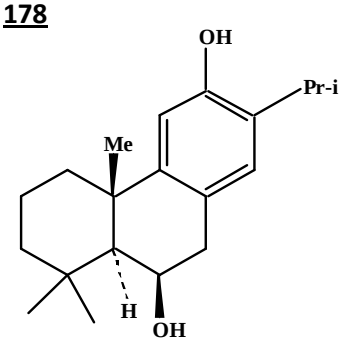


R_1=OH, R_2=OAc 12-*O*-acétylcarnosique **179**

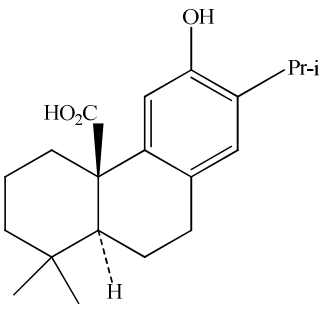
R_1=OAc, R_2=OH 11-*O*-acétylcarnosique **180**



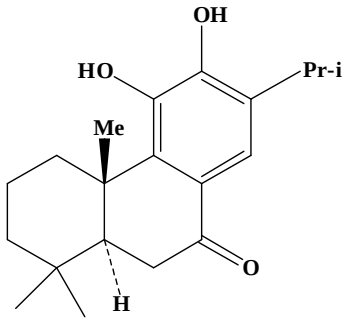
dehydroabietane-11,12-diol **181**



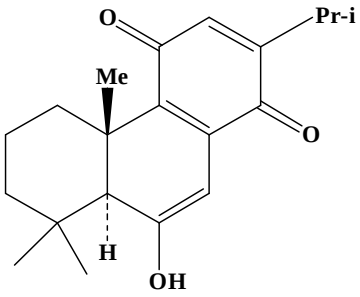
6**β**-hydroxyferruginol **182**



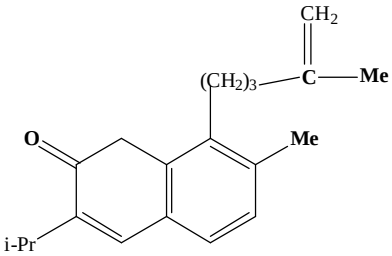
acide pisiferique **183**



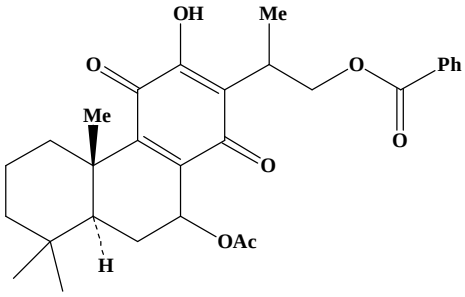
12-*O*-deméthylcryptojaponol **184**



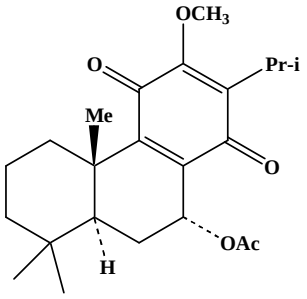
12-Deoxy-6-hydroxy-6,7-dehydroroyleanone **185**



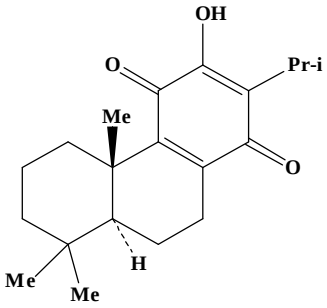
aethiopinone **186**



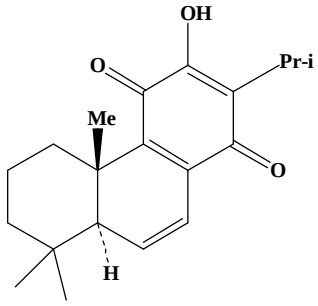
7-acétoxy-16-benzoxy-12-hydroxyabieta-7-acétyl-12-8,12-diene-11,14-dione **187**



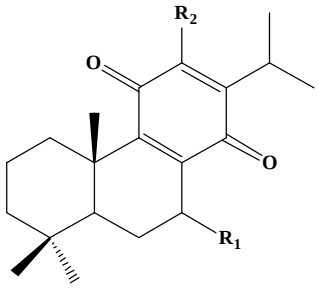
méthoxyhorminone **188**



royleanone **189**



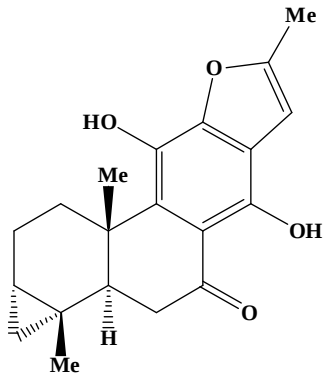
7,6-dehydroroyleanone **190**



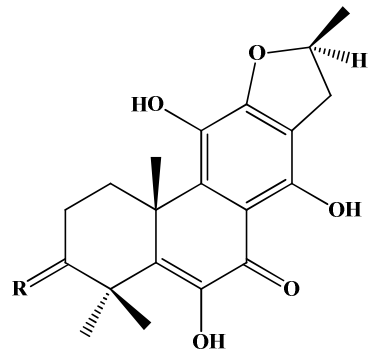
R_1=α-$OCOCH_3$, R_2=OCH_3, 12-méthyl éther -7α-acétoxyroyleanone **191**

R_1=α-OH, R_2=OH, horminone **192**

R_1=α-OCOCH3, R_2=OH, 7-acétylhorminone **193**

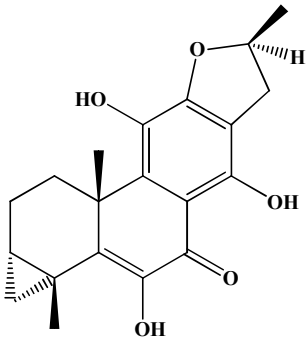


teuvincenone J **195**

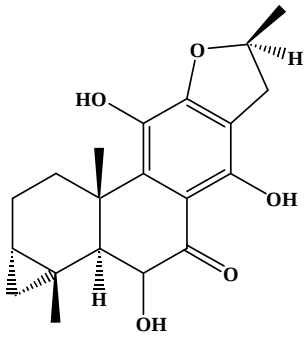


R=O, teuvincenone A **196**

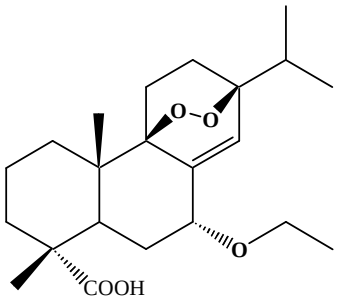
R=H_2, teuvincenone B **197**



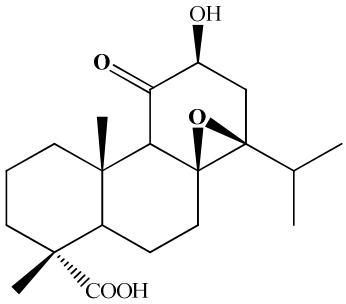
teuvincenone C **198**



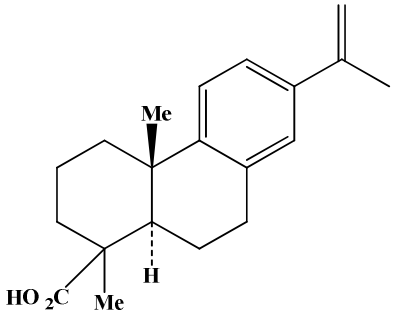
teuvincenone D **199**



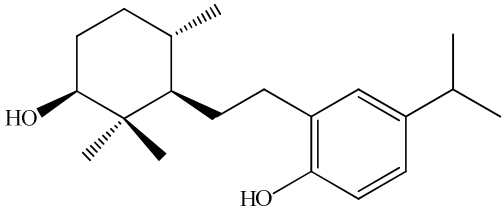
acide pedunculatique A **200**



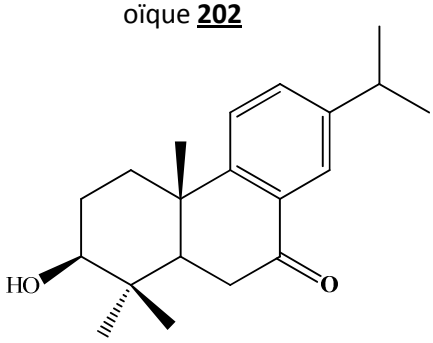
acide pedunculatique B **201**



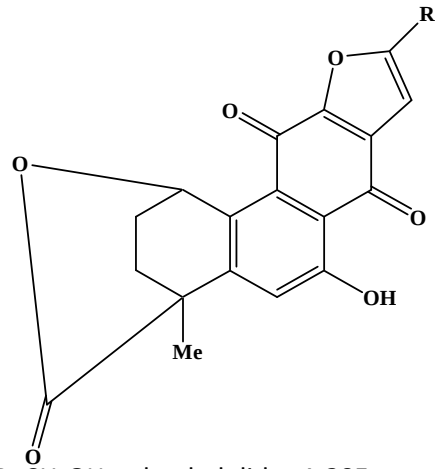
acide abieta-8,11,13,15-tetraen-18-oïque **202**



negundoine F **203**

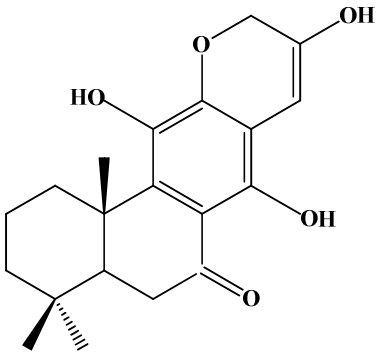


3β-hydroxy-abieta-8,11,13 triene-7-one **204**

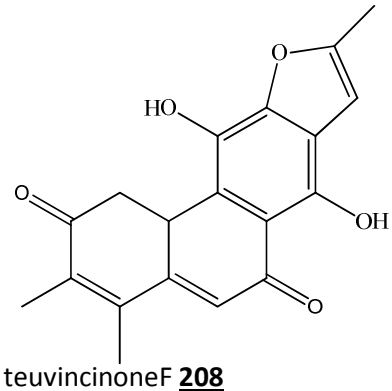


R=CH_2OH, schnabelolides A **205**

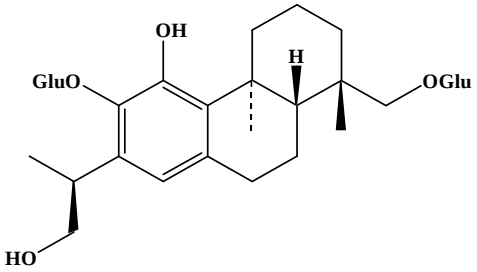
R=Me, schnabelolides B **206**



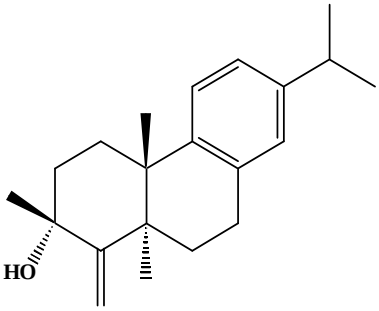
12,17-epoxy-11,14,16-trihydroxy-17(15_16)-abeo abieta-8,11,13,15-tetraen-7-one **207**



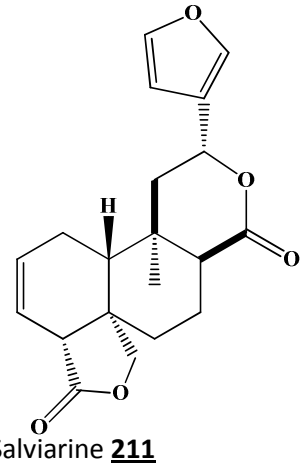
teuvincinoneF **208**



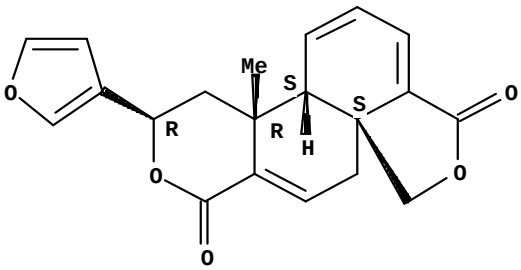
Ajugaside A **209**



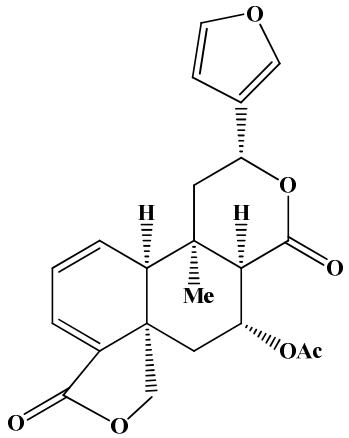
vitexifoline C **210**



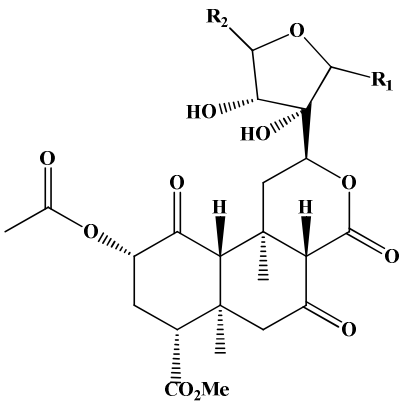
Salviarine **211**



Gensnerofoline B **212**

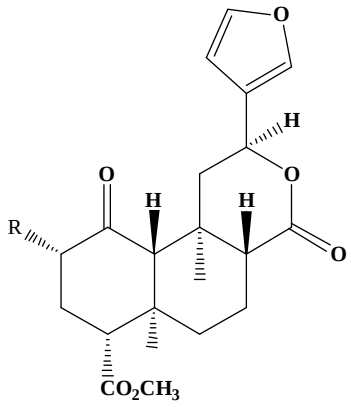


7α-acétoxy-7,8α-dihydrogensnerofoline **213**



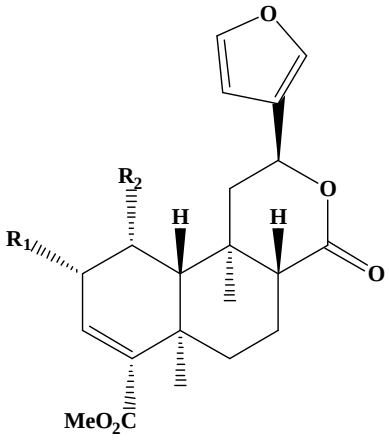
R_1=R_2=β-OMe,salvinicines A **214**

R_1=R_2=α-OMe, salvinicine B **215**



R=OAc salvinorine A **216**

R=OH salvinorine B **217**



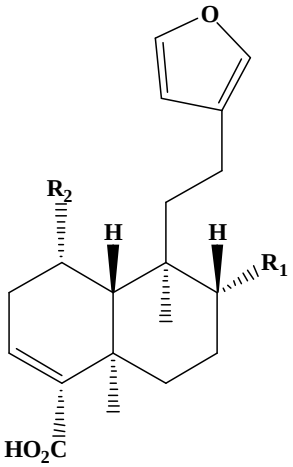
salvinorine

C, R_1=$COCH_3$, R_2=$COCH_3$ **218**

D, R_1=H, R_2=$COCH_3$ **219**

E, R_1=$COCH_3$, R_2=OH **220**

F, R_1=H, R_2=OH **221**

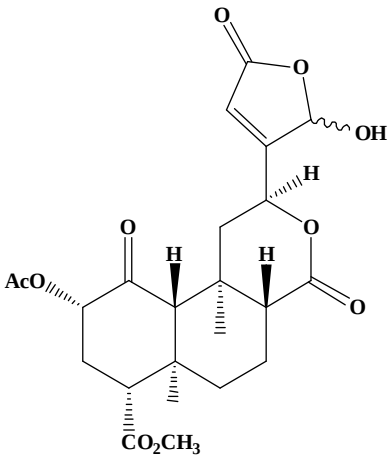


divinatorine

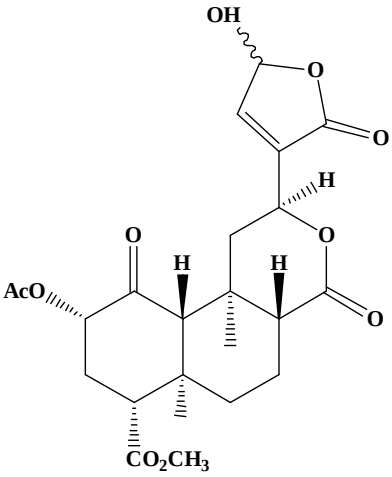
A, R_1=CH_3, R_2=OH **222**

B, R_1=CH_2OH, R_2=OH **223**

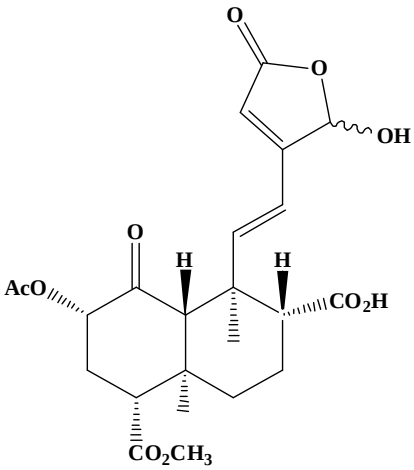
C, R_1=CH_2OCOCH_3, R2=H **224**



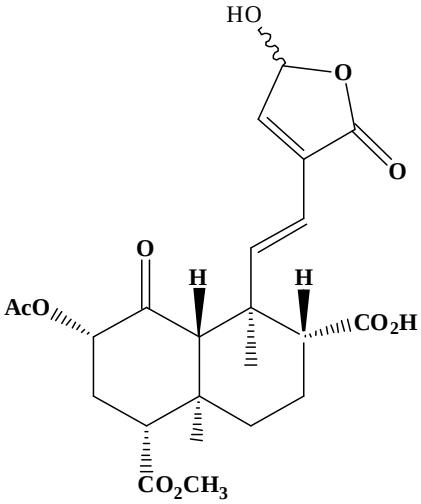
salvidivine A **225**



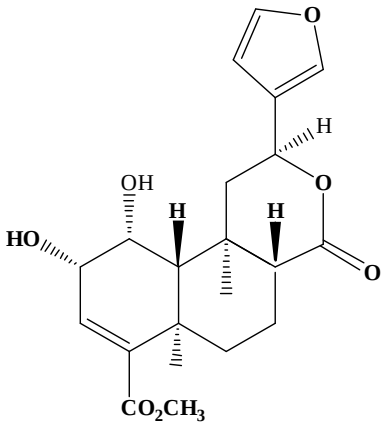
salvidivine B **226**



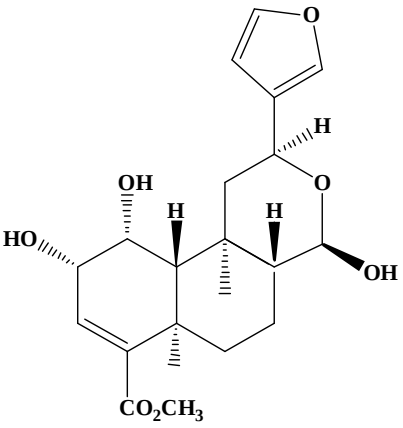
salvidivine C **227**



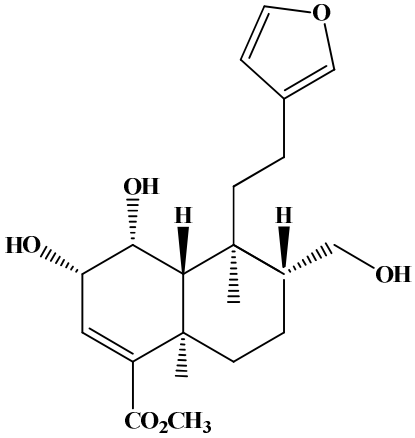
salvidivine D **228**



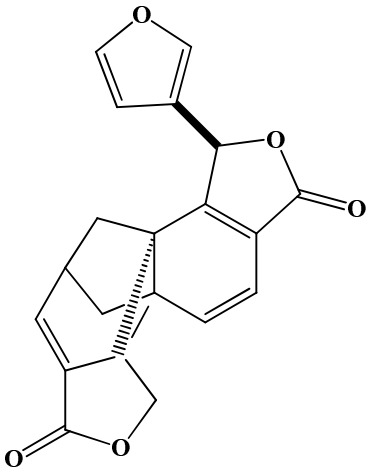
salvinorine H **229**



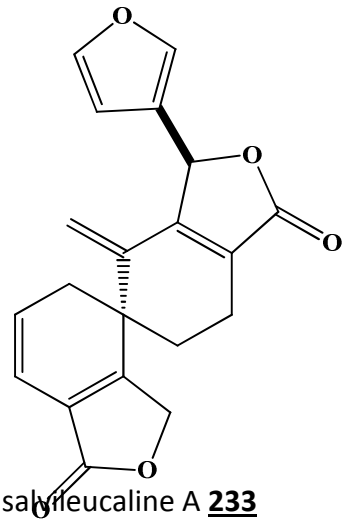
salvinorines I **230**



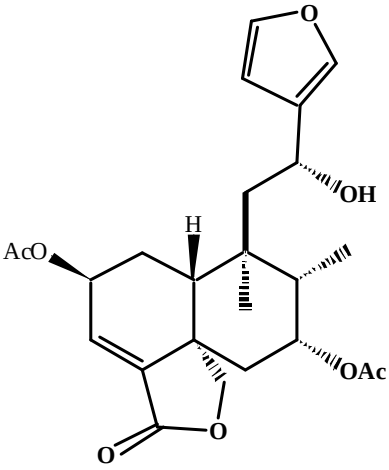
divinorine F **231**



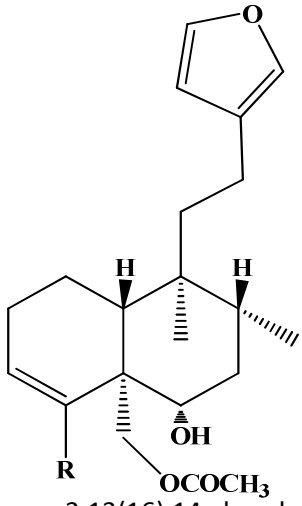
salvileucaline B **232**



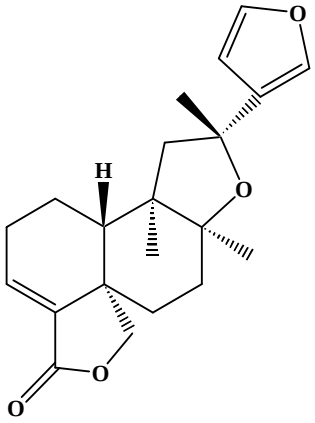
salvileucaline A **233**



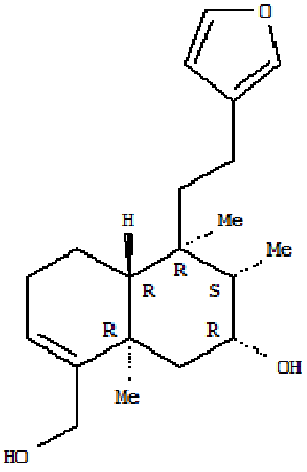
salvigresine **234** R=CH_2OH ent-19-O-acétoxy-15,16-epoxy-3,13(16),14-clerodatrien-6,18-diol **235**



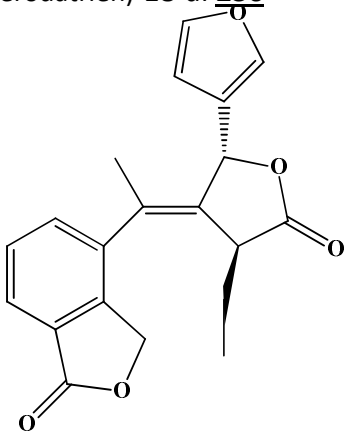
R=CHO ent-19-O-acétoxy-15,16-epoxy-6-hydroxy-3,13(16,14-clerodatrien)-18-al **236**



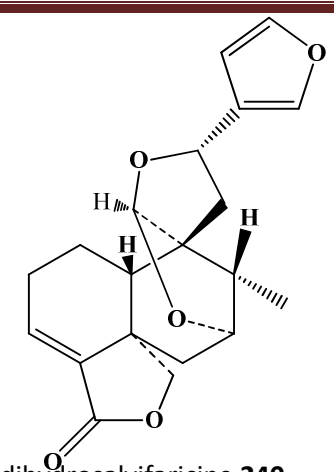
dehydrokerline **237**



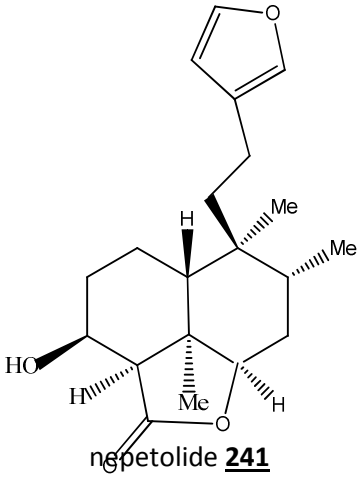
10β-hydroxybacchotricuneatine **238**



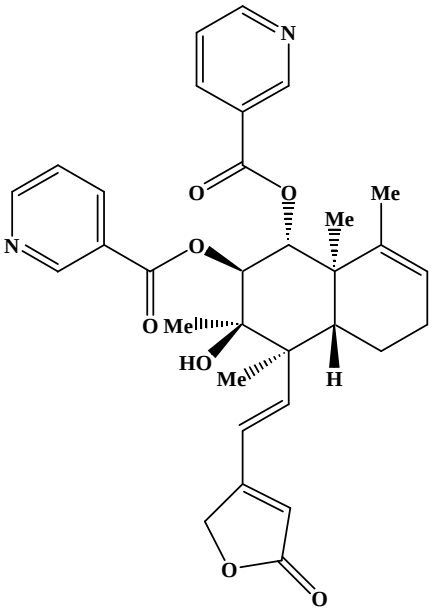
salvifulgenolide **239**



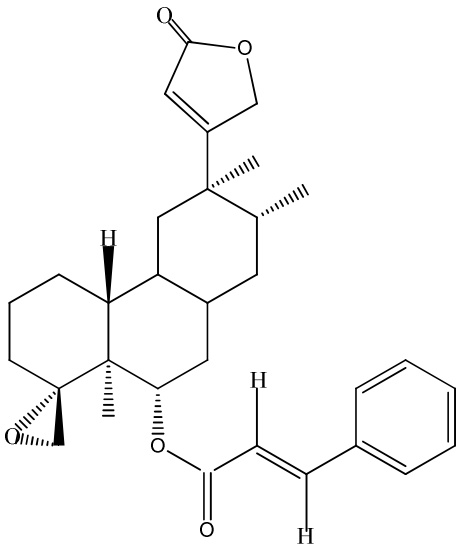
trans-1,2dihydrosalvifaricine **240**



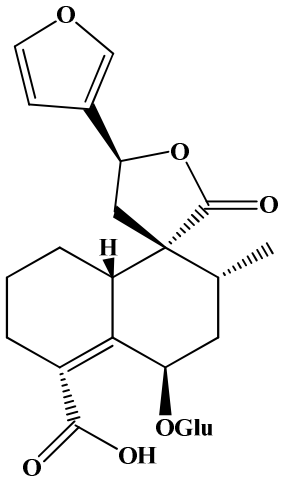
nepetolide **241**



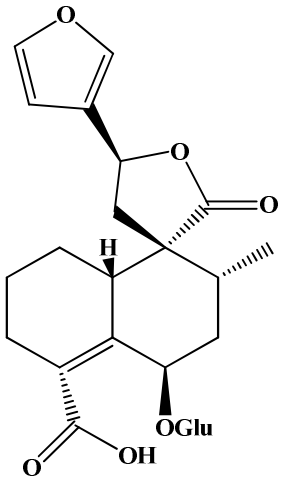
Scutebarbatine **242**



scuteparvine **243**

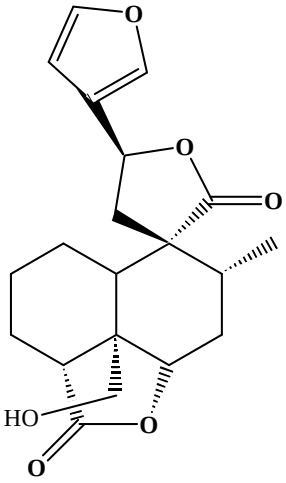


chamaedryoside A **244**

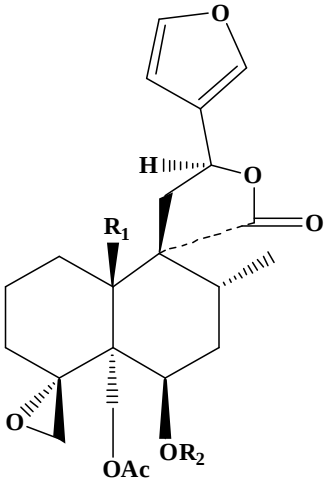


α-glc chamaedryoside B **245**

β-glc chamaedryoside C **246**



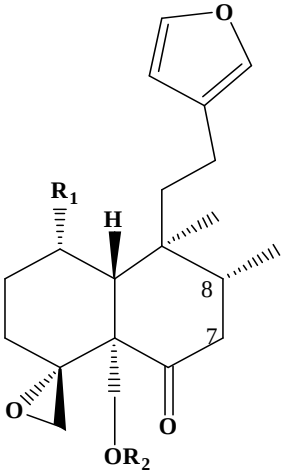
12(S)-15,16-époxy-19-hydroxy-neo-cleroda-13 (16),14-dien-18,6:20,12-diolide **247**



R_1=Ac, R_2=OH 6-Acétyl-10-hydroxy-teucjaponine **248**

R_1=Ac, R_2=H 6-Acétylteucjaponine B **249**

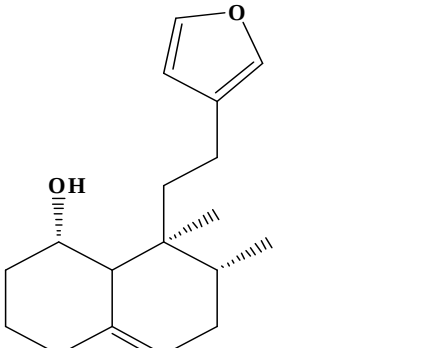
R_1=H, R_2=OH 10-Hydroxyteucjaponine B **250**



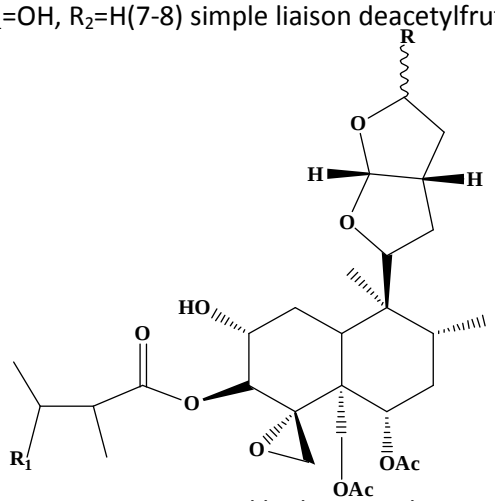
R_1=OH,R_2=Ac(7=8) double liaison didehydrofruticolone **251**

R_1=H, R_2=Ac (7-8) simple liaison deoxyfruticolone **252**

R_1=OH, R_2=H(7-8) simple liaison deacetylfruticolone **253**

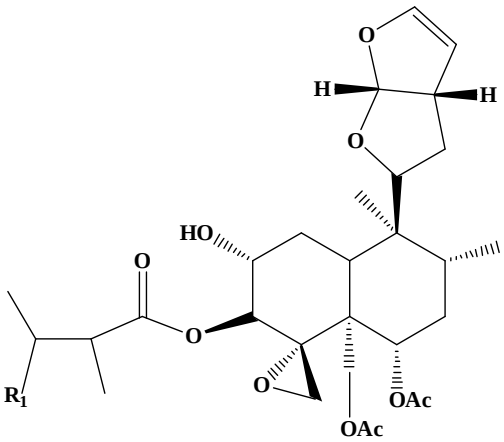


difuranofruticol **254**



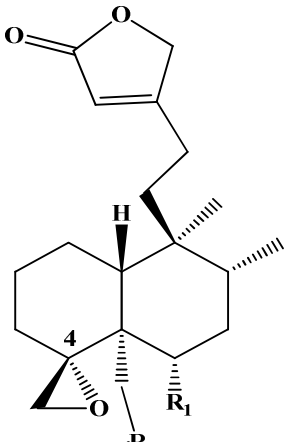
R=H_2, R_1=OAc 14,15-dihydroajugachine **255**

R=H, OCH_3, R_1=OAc 14-hydro-15-méthoxyajugachine **256**



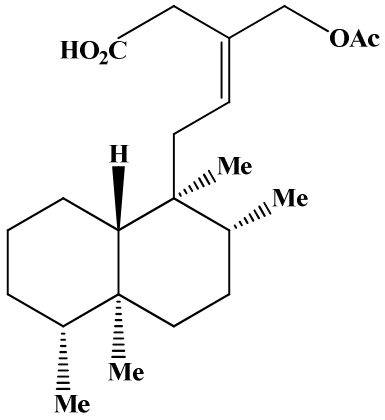
R_1= OAc ajugachine B **259**

R_1=H ajugapitine **260**

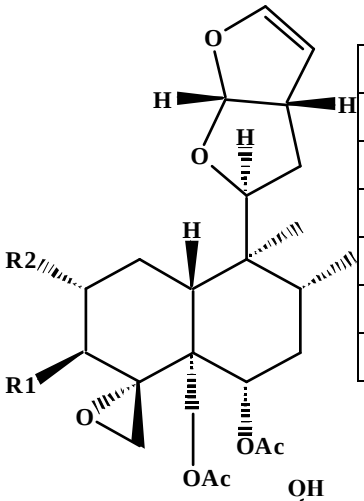


R=H, R1=OAc chamaepitine **257**

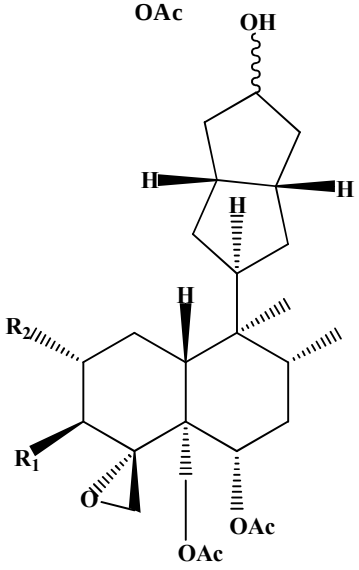
R=OCH_3, R_1=H lupuline A **258**



acide ajugalaevigatique **261**

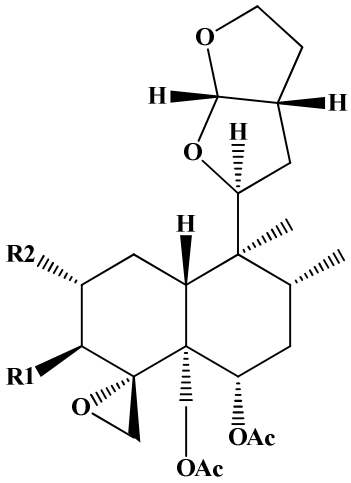


R_1	R_2	C_4		
OAc	OAc		Ajugarine I	**262**
OH	OAc		Ajugarine II	**263**
OAc	H		Ajugarine V	**264**
OAc	OAc	α-OH, β-CH_2OH	Ajugarine III	**265**
OAc	H	α-COOMe, β-H	AjugarineIV	**266**
OH	H	α-COOMe, β-H	deacetylajugarineIV	**267**



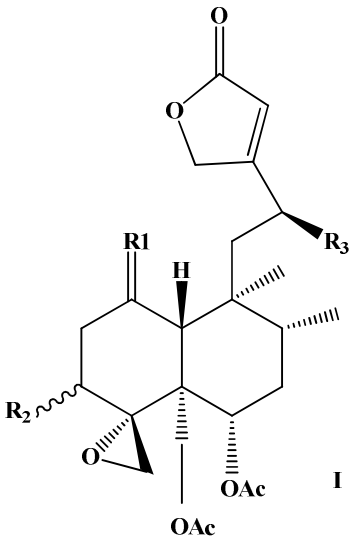
R_1=R_2=H dihydrocerodine **270**

R_1=OMeBu, R_2=OH dihydroajugapitine **271**

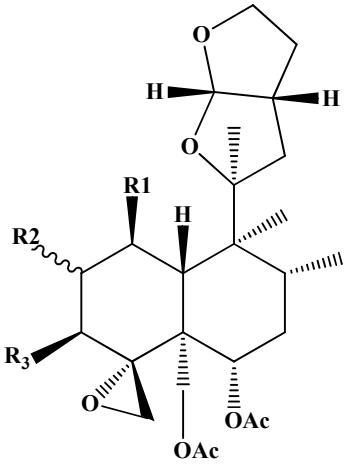


R_1=R_2=H 14-hydro-15-hydroxyclerodine **272**

R_1=OMeBu, R_2=OH 14-hydro-15-hydroxyclerodine **273**

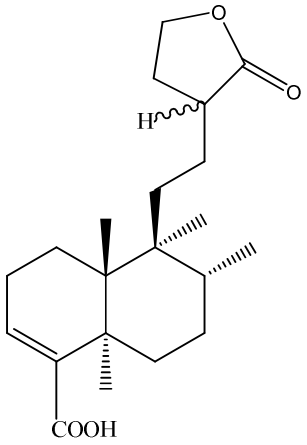


I

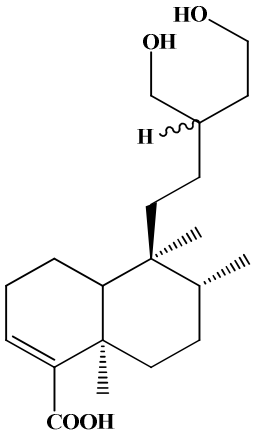


II

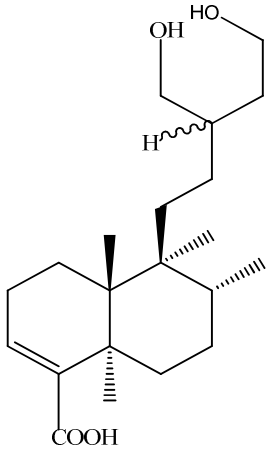
I	α-H,β-OH	β-OMeBu	H	AjugatansineA	**274**
	H_2	β-OH	OMeBu	AjugatansineB	**275**
	O	βOMeBu	H	AjugatansineD	**276**
II					
	OTig	B-OH	OMeBu	Ajugavensine A	**277**
	OMeBu	H	H	AjugareptansoneA	**278**



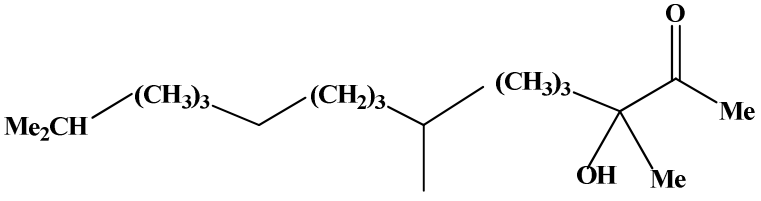
acide ballotenique **279**



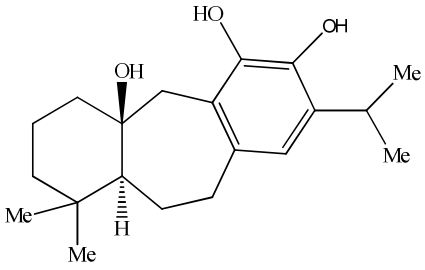
acide ballodiolique **280**



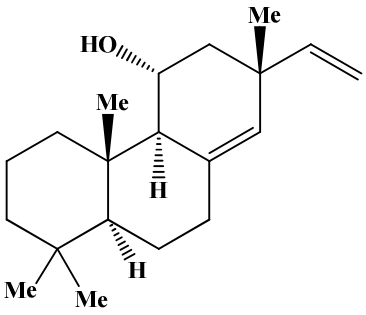
ballatenolide A **281**



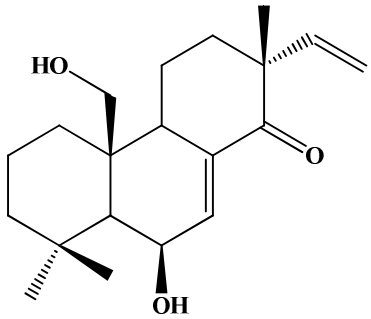
crassifol **282**



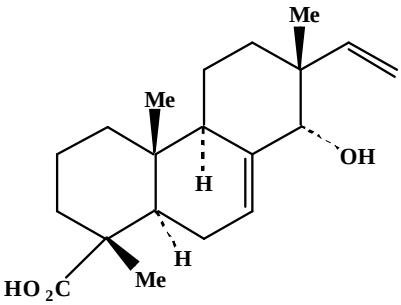
demethylsalvicanol **283**



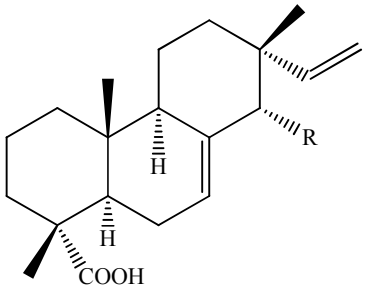
amanicadol **284**



negundoine G **28**

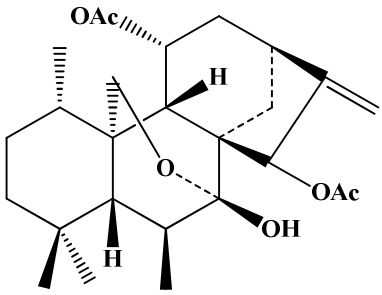


acide 14-hydroxy-7,15- isopimaradien-18-oïque **286**

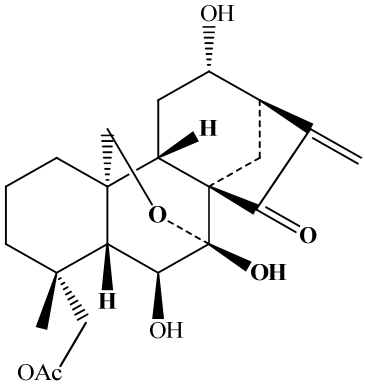


R=H acide isopimarique **287**

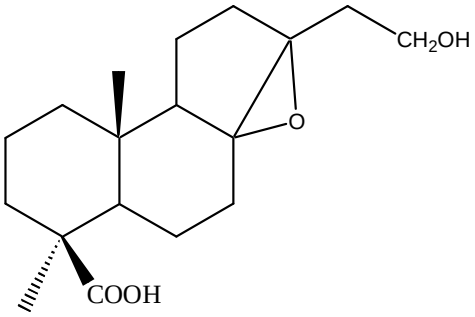
R=OH acide14α-hydroxy isopimarique **288**



rabdosianin B **289**



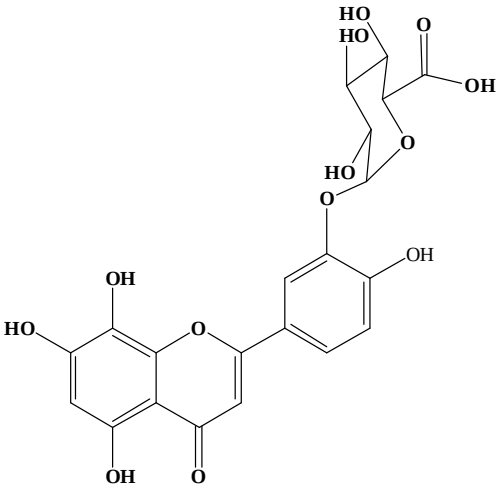
wikestroemioidin C **290**



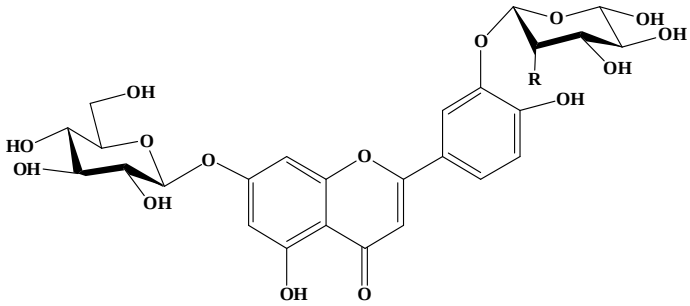
acide 15-hydroxy-8,13-époxylabdan-18-oïque **291**

ANNEXE II: FLAVONOÏDES DE LA FAMILLE DES *LAMIACEAE*

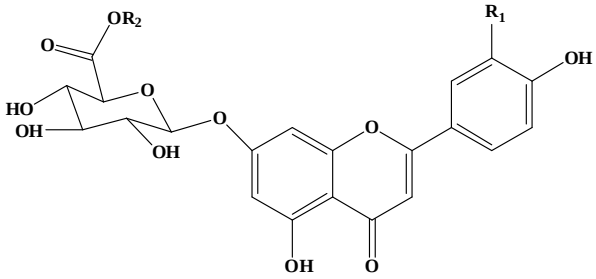
Sous-famille	Genres	Espèces	Nom des molécules	Références
Nepetoideae	*Melissa*	*Officinalis*	**74**, **315**, **59**, **307** , **308**	Patora J, 2002
Nepetoideae	*Nepeta*	*cataria*	**309, 310, 311, 315, 59, 58**, **74**	Modnicki D.,2007
Scutellarioideae	*Scutellaria*	*baicalensis*	**312**, **313, 314, 315**, , **316**, **317**	Yuming D., 2009; Ye F., 2004; Wang C. Z., 2007
Lamioideae	*Sideritis*	*ozturkii*	**318**, **319**, **320**	Pınar Sahin F.; 2004.
Nepetoideae	*Salvia*	*moorcroftiana Wall*	**321**, **322, 333**, **307**, **324**	Zahid M., 2002. Ahmad V.U., 2000.
Lamioideae	*Galeopsis*	*ladanum*	**325**, **326**, **327**, **328**, **329**, **330**	Uriarte-Pueyo I., 2010
Nepetoideae	*Salvia*	*Officinalis folium*	**vicenineII,** **307**, **332**, **331**, **333**, **334**, **335**	Fecka I, 2007 Lu Y., 2000
Lamioideae	*Stachys*	*Spinosa*	**336**	Kotsos M. P., 2007
Nepetoideae	*Hyptis*	*fasciculata,*	**337**, **338**, **339**	Isobe T., 2006 Amado N.G.,2009
	Lamium	*amplexicaule*	**340**, **341**	Nugroho A., 2009
Nepetoideae	*Salvia*	*elegans*	**342**	Marquina S.,2008
	Wiedemannia	*orientalis*	**59**, **343**, **90**, **91**, **101**	Guvenalp Z., 2006
Lamioideae	*Stachys*	*bombycina*	**101**	Delazar A ., 2005
	Teucrium	arduini	**63**, **344**, **338**	Valant-Vetschera K. M., 2003
Nepetoideae	*Isodon*	*enanderianus*	**345**, **348**, **338**	Zhi N., 2002
	Satureja	*atropatana Bonje*	**346**, **348, 347**	Gohari A. R., 2009.



lutéoline-3'-O-Glucoside **292**



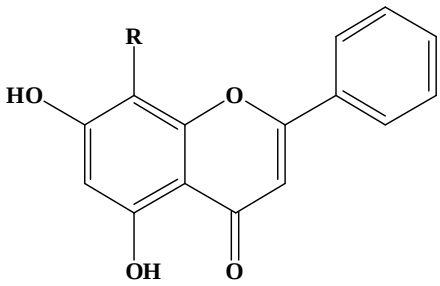
R=COOH lutéolin7-O-glucopyranoside-3'-O-glucuronopyranoside **293**



R_1=OH, R_2=H lutéoline-7-O-glucuronide **294**

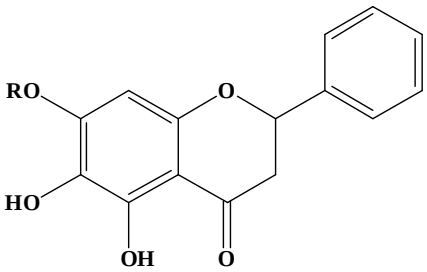
R_1=OH, R_2=Glu lutéoline-7-O-glucurono-(1-6)-glucoside **295**

R=H apigénine-7-O-glucuronide **296**



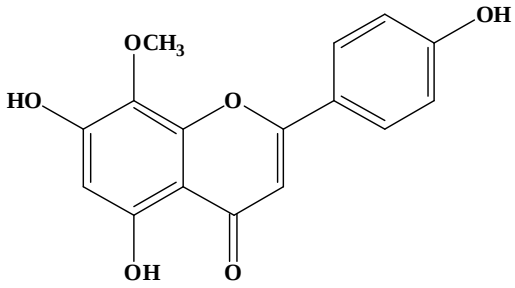
R=OCH_3 wogonine **297**

R=H chrysine **298**

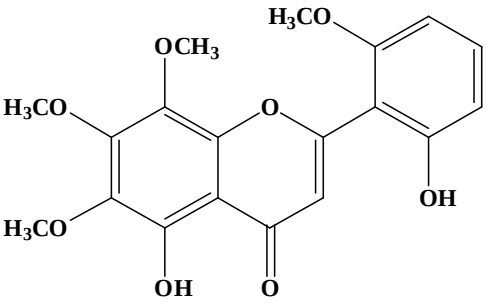


R= OH baicaleine **299**

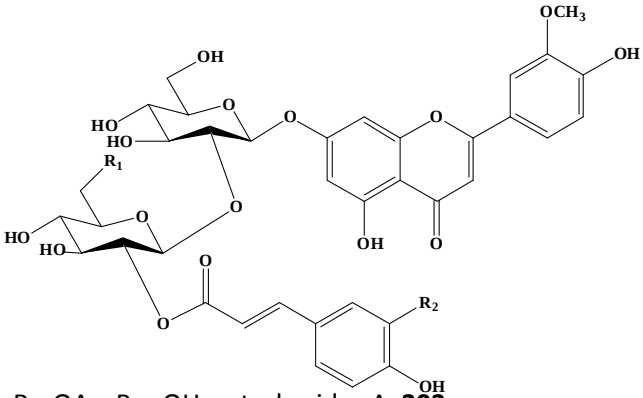
R= O-Glucuronide baicaline **300**



5,7,4'-trihydroxy-8-methoxyflavone **301**



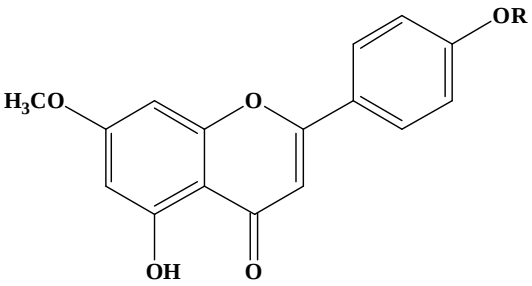
skullcapflavone II **302**

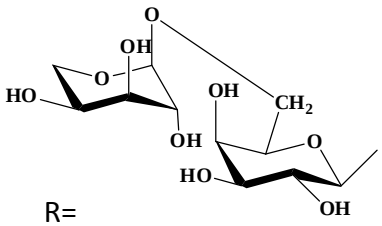


R_1=OAc, R_2= OH ozturkosides A **303**

R_1=OH, R_2=OH ozturkosides B **304**

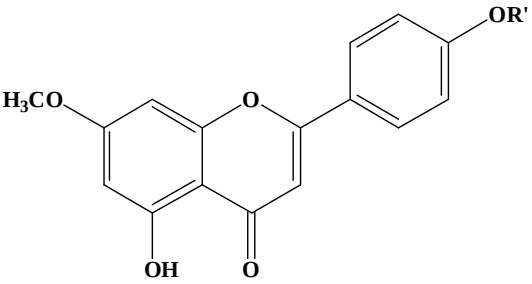
R_1=OAc, R_2=H ozturkosides C **305**

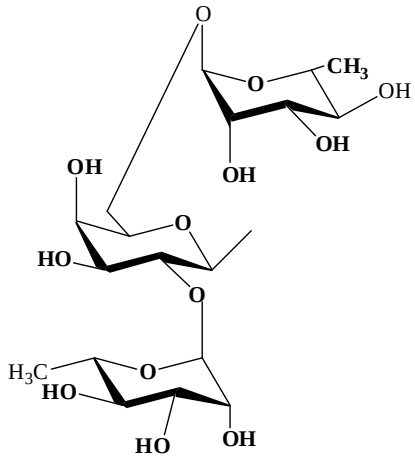




R=

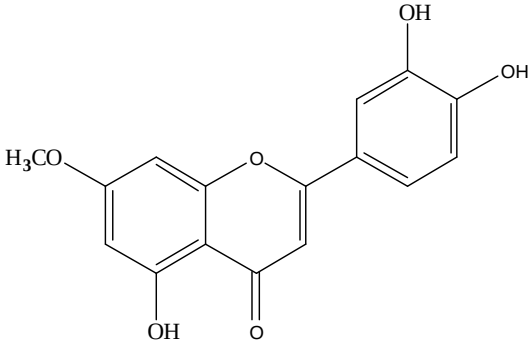
genkwanin 4-*O*-L-arabinopyranosyl-(1,6)-D-galactopyranoside **306**



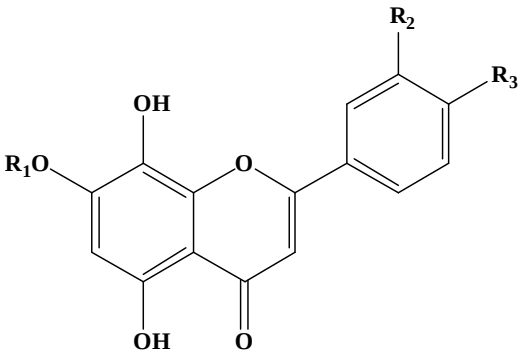


R'=

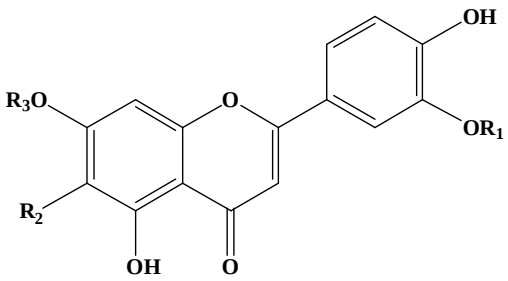
genkwanine 4'-*O*-L-rhamnopyranosyl-(1,2)-L-rhamnopyranosyl-(1,6)]-D-galactopyranoside **307**

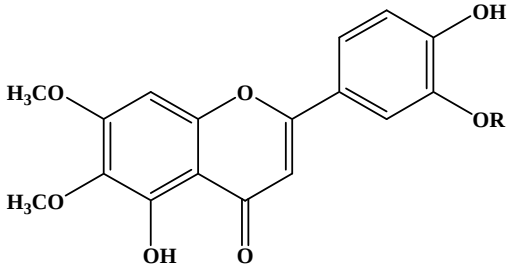


5,3',4'-trihydroxy-7-methoxyflavone **308**



R_1	R_2	R_3		
(2''allosyl)Glu Ac	H	OH	isoscutéllarein-7-(2''allosyl)-glucoside monoacetylé	**309**
2''allosyl)Glu diAc	H	OH	isoscutéllarein-7-(2''allosyl)-glucoside diacetylé	**310**
(2''allosyl)Glu Ac	H	OCH_3	isoscutéllarein-4'-methyl ether-7-(2''allosyl)-glucoside monoacetylé	**311**
(2''allosyl)Glu Ac	OH	OH	hypolaetine-7-(2''allosyl)-glucoside monoacetylé	**312**
(2''allosyl)Glu Ac	OH	OCH_3	hypolaetine-7-4'-methyl ether (2''allosyl)-glucoside monoacetylé	**313**
2''allosyl)Glu diAc	OH	OCH_3	hypolaetine-7-4'-methyl ether (2''allosyl)-glucoside diacetylé	**314**





R_1=H, R_2=H, R_3=Glu lutéoline7-O-glucoside **315**

R_1=H, R_2=H, R_3=Glucu lutéoline 7-O-glucuronide **316**

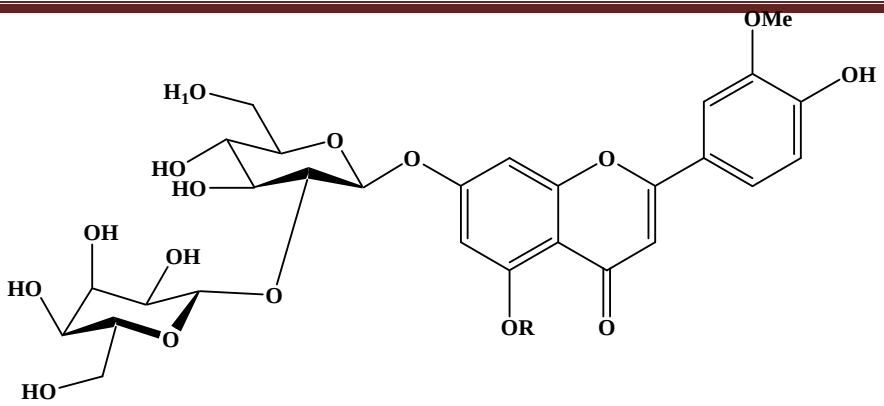
R_1=Glucu, R_2=H, R3=H lutéoline 3'-O-glucuronide **317**

R_1=H, R_2=OH, R_3=Glu 6-hydroxylutéoline 7-O-glucoside **318**

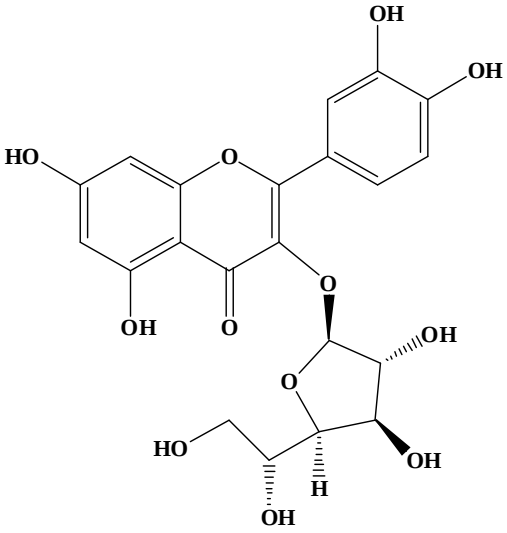
R_1=H, R_2=OH, R_3=Glucu 6-hydroxylutéoline 7-O-glucuronide **319**

R=CH_3 cirsilineol **321**

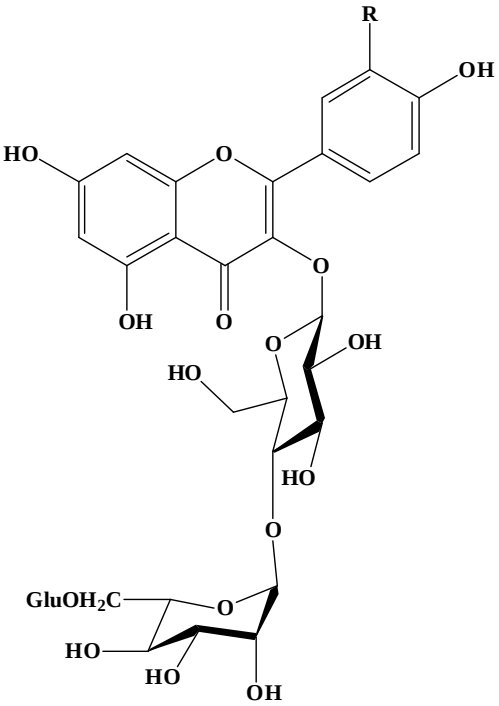
R=H cirsimaritine **322**



R=H, R_1=Ac chrysoériol 7-O-b-allopyranosyl (1''-2'')[6''-O-acetyl-b-glucopyranoside) **320**

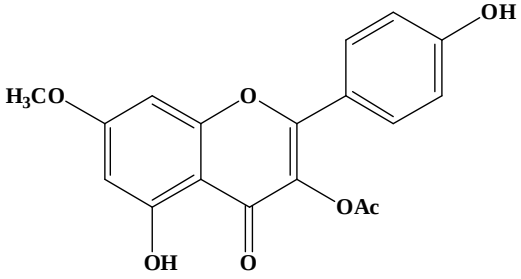


isoquercitrine **323**

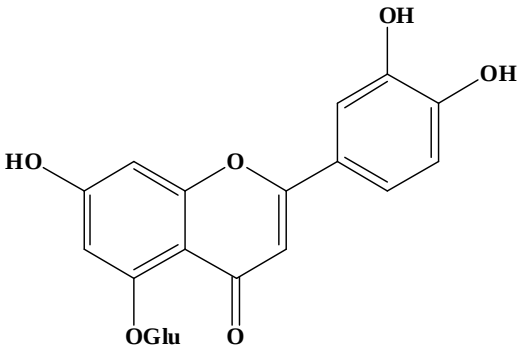


R=H, kaempferol 3-O-[β-D-glucopyranosyl-(1→4)][α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)]-β-D-glucopyranoside **324**

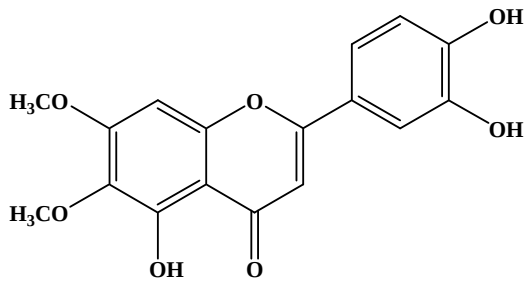
R=OH, quercetin 3-O-[β-D-glucopyranosyl-(1→4)][α-L- rhamnopyranosyl-(1→6)]-β-D-glucopyranoside **325**



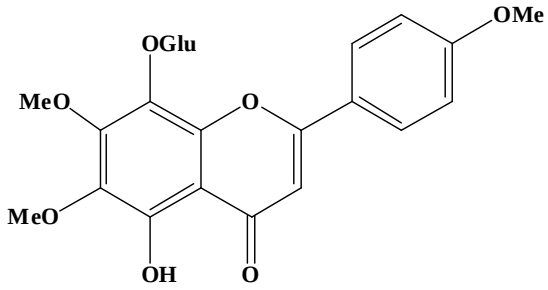
R=H 3-acetoxy-7-methoxyflavone **326**



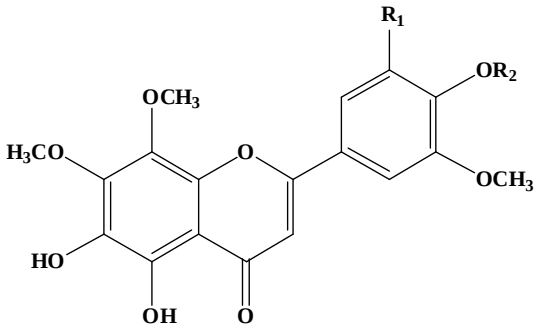
lutéoline-5-O- glucopyranoside **327**



Cirsiliol **328**



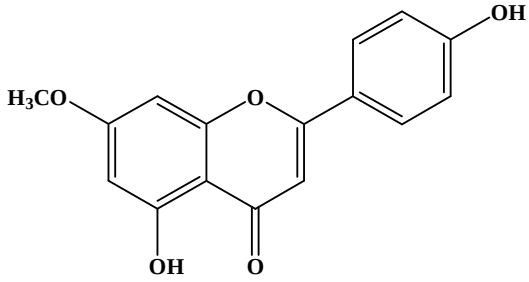
5,8-dihydroxy-4',6,7-trimethoxyflavone 8-O-(R)-D-glucopyranoside **329**



R_1= H, R_2=CH_3 5-desméthoxynobiletine **330**

R_1=R_2=H thymonine **331**

R_1=OH, R_2=CH_3, 5,6,3'-trihydroxy-7,8,4'-triméthoxyflavone **332**



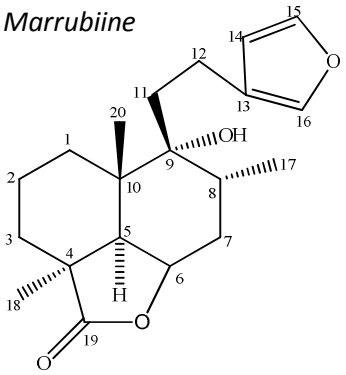
Genkwanine **333**

ANNEXE III

A.III.1 Données physiques et spectroscopiques pour les composés isolés

A.III.1.a Composés isolés de *Marrubium deserti*

Composé MD1: *Marrubiine*



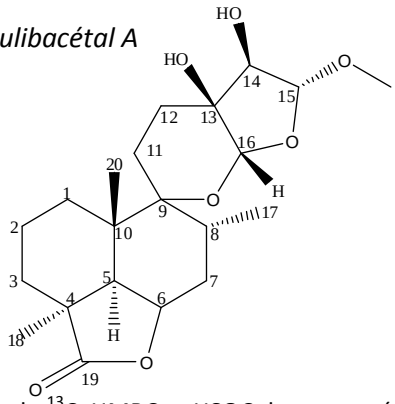
$C_{20}H_{28}O_4$,
Masse exacte calc. 332.198760 uma
Poids moléculaire (SM-IE) $[M^+]^{\cdot}$ 332,0 uma
Nom (IUPAC) : 9α-hydroxy-15,16-époxylabda-13(16), 14-diéne-6β,19-olide
Aspect: cristaux blancs
$[\alpha]_D$= +39 ° à 25°C
$[\alpha]_D$= +35 ° à 20°C (Henebelle *et al.*,2007)

Tableau 1 : RMN du ^1H et du ^{13}C du composé MD1 (300 MHz. δ. J en Hz : 75 MHz) et de la marrubiine dans le $CDCl_3$

	$CDCl_3$		$CDCl_3$ (Hussein *et al.*, 2003 ; Henebelle *et al.*,2007)	
	δ_H multiplicité (*J*)	**δ_C**	**δ_H multiplicité (*J*)**	**δ_C**
1α **1β**	1,31 m 1,69 m	28,6	1,29 m 1,68 m	28,7
2α **2β**	1,51 m 1,74 m	18,1	1,50 m 1,72 m	18,2
3α **3β**	1,45 m 2,11 m	28,3	1,45 m 2,11 m	28,4
4	-	43,8	-	43,8
5	2,24 d (5,0 Hz)	44,8	2,21 d (5,0 Hz)	44,9
6	4,75 t (5,0 Hz)	76,2	4,72 t (5,0 Hz)	76,2
7α **7β**	2,13 m 2,18 m	31,4	1,68 m[¥] 2,13 m[¥]	31,6
8	2,13 m	32,3	2,12 m	32,4
9	-	75,7	-	75,8
10	-	39,7	-	39,8
11α **11β**	1,76 m 1,90 m	35,1	1,74 m 1,88 m	35,2
12	2,53 t (9,0 Hz)	21,0	2,51 m	21,0
13	-	125,0	-	125,0
14	6,28 sl	110,7	6,25 s	110,7
15	7,36 t (1,5 Hz)	143,1	7,35 t (1,5 Hz)	143,1
16	7,23 sl	138,5	7,21 s	138,6
17	0,96 d (6,4 Hz)	16,5	0,95 d (6,5 Hz)	16,6
18	1,29 s	22,9	1,27 s	23,0
19	-	183,9	-	183,8
20	1,06 s	22,2	1,04 s	22,3

[¥]signaux interchangeables, sl : singulet large

***Composé MD2*:** *Marrulibacétal A*



$C_{21}H_{32}O_7$

Masse exacte calc. 396.2148 uma

Poids moléculaire (SM-HR-IE) $[M+Na]^+$ 419,2053 uma

Nom (IUPAC) : (16s)-(9α-16α), (15α-16α)-dipoxy-13β,14β-dihydroxy-15α-methoxylabdan-6β(19)-olide

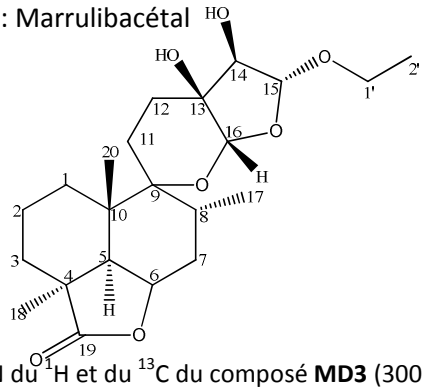
Aspect: solide amorphe

$[\alpha]_D$=10,77°C à 25°C

Tableau 2: RMN du ^1H, du ^{13}C, HMBC et HSQC du composé MD2 (300 MHz. δ. J en Hz : 75 MHz) dans le $CDCl_3$

	$CDCl_3$			
	δ_H multiplicité (*J*)	**δ_C**	**HMBC**	**NOE**
1	1,96 m	27,8		
2α **2β**	1,72 m 1,44 m	17,9		
3α **3β**	2,12 m 2,06 m	28,2	C-4 ; C-18; C-19	
4	-	43,9		
5	2,38 d (*5,0* Hz)	44,6	C-1 ; C-4 ; C-9 ; C-18 ; C-19	
6	4,78 t (*5,0* Hz)	76,6	C-8 ; C-10	H-18
7α **7β**	2,22 m 2,18 m	32,3	C-5 ; C-8 ; C-9 ; C-19	
8	2,07 m	33,5	C-7	
9	-	80,3		
10	-	40,9		
11	1,77 m	20,7	C-12, C-13	
12α **12β**	2,08 m 1,86 m	30,0	C-13 ; C-14	
13	-	75,8		
14	3,88 s	78,6	C-12 ; C-16	
15	4,93 d (*1,5* Hz)	109,8	C-OMe ; C-13 ; C-16	
16	5,47 s	105,7	C-14 ; C-15	H-17 ; H-12
17	1,10 d (*6,8* Hz)	19,4	C-7 ; C-9	
18	1,28 s	23,2	C-3 ; C-5 ; C-19	
19	-	184,1		
20	1,03 s	22,0	C-1 ; C-5 ; C-9 ; C-10	
OH-13		-		
OH-14		-		
OMe-15	3,41 s	55,5		

Composé **MD3** : Marrulibacétal

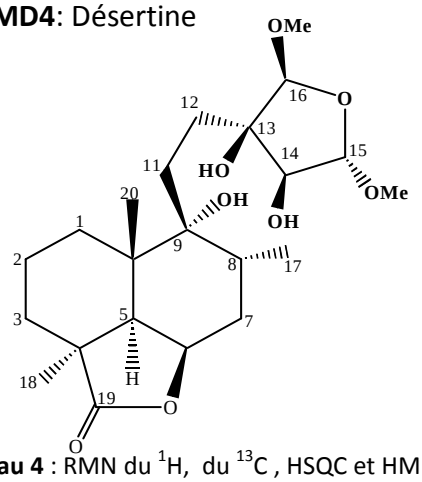


$C_{22}H_{34}O_7$,
Masse exacte calc. 410,2304 uma
Poids moléculaire (SM-ESI) $[M+Na]^+$ 433,2169 uma
Nom IUPAC : (16s)-(9α-16α), (15α-16α)-dipoxy-13β,14β-dihydroxy-15α-ethoxylabdan-6β(19)-olide
Aspect: solide amorphe
$[\alpha]_D$= 13,1°C à 25°C (Rigano D., 2009)

Tableau 3 : RMN du ^1H et du ^{13}C du composé **MD3** (300 MHz. δ. J en Hz : 75 MHz) et de la marrubiine dans le $CDCl_3$

	$CDCl_3$		$CDCl_3$ (Rigano *et al.,* 2009)	
	δ_H multiplicité (*J*)	**δ_C**	**δ_H multiplicité (*J*)**	**$\delta_{C\ c}$**
1α	1,98 m	27,8	1,97m	27,9
1β	1,20 m		1,18m	
2α	1,72 m	17,9	1,73m	17,9
2β	1,50 m		1,50m	
3α	2,12 m	28,2	2,10 m	28,2
3β	1,45 m		1,42m	
4	-	43,8		43,9
5	2,37 d (4,06 Hz)	44,6	2,35 d (4,5 Hz)	44,7
6	4,78 dd (5,2 Hz ; 5,5 Hz)	76,8	4,77 dd (5,3 Hz ; 4,5 Hz)	76,5
7α	2,16	32,3	2,17	32,3
7β	1,86		1,87	
8	2,08	33,6	2,08	33,7
9	-	80,5	-	80,4
10	-	40,9	-	40,9
11α	1,75	21,1	1,80	21,1
11β	1,53		1,75	
12α	2,08	29,6	2,08	29,6
12β	1,85		1,85	
13	-	76,5	-	75,6
14	3,94 s	78,5	3,94 s	78,5
15	5,03 d (*1,5* Hz)	108,7	5,03 d (*1,7* Hz)	108,7
16	5,45 s	105,4	5,45 s	105,4
17	1,10 d (*6,8* Hz)	19,5	1,10 d (*6,5* Hz)	19,5
18	1,28 s	23,1	1,26 s	23,2
19	-	184,0	-	183,9
20	1,03 s	22,1	1,02 s	22,0
1'a	*3,81 dq (16,3* Hz *;* 7,0 Hz*)*	63,9	3,81 dq (14,2 Hz; 7,0 Hz)	63,9
1'b	*3,51 dq (*16,3 Hz *;* 7,0 Hz*)*		3,50 dq (14,2 Hz ; 7,0 Hz)	
Me-2'	1,21 t (7,0 Hz)	15,0	1,20 t (7,0 Hz)	15,0
OH-13	-	-	2,80 s	-
OH-14	3,94 s	-	2,73 s	-

Composé **MD4**: Désertine

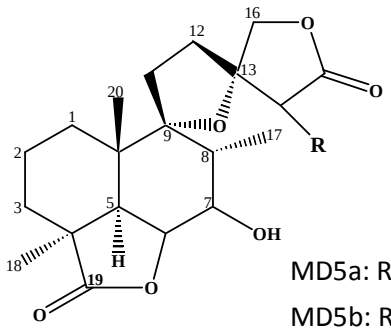


$C_{22}H_{36}O_8$,
Masse exacte calc. 428,2410 uma
SM-HR-IE (mode positif), $[M+Na]^+$ 451,2300 uma
Nom IUPAC: 9α,13β, 14β trihydroxy-15α, 16β dimétoxy15,16 epoxy labdane, 6β, 19 olide
Aspect: solide amorphe
$[\alpha]_D$= -56,6à 25°C

Tableau 4 : RMN du ^1H, du ^{13}C , HSQC et HMBC (400 MHz. δ. J en Hz : 100 MHz) du composé **MD4**

	$CDCl_3$			
	δ_H multiplicité (*J*)	**δ_C**	**HMBC**	**NOE**
1α **1β**	1,65 m 1,84 m	28,4	C-2 ; C-20	-
2α **2β**	1,74 m 1,51 m	18,2	-	H-20
3α **3β**	2,11 m 1,45 m	28,3	C-18 ; C-4	H-20 ; H-3β
4	-	43,9	-	-
5	2,23 d (7,5 Hz)	45,0	C-4 ; C-18 ; C-10 ; C-19 ; C-20	H-18
6	4,73 m	76,3	C-8 ; C-10	H-18 ; H-7α
7	2,15 m	31,6	C-5 ; C-6 ; C-8, C-9	H-17 ; H-20 ; H-3β
8	2,06 m	32,6	C-7	H-17 ; H-20 ; H-3β
9	-	75,3	-	-
10	-	40,1	-	-
11	1,29 s	29,7	-	-
12	1,75 m	27,4	-	H-17 ; H-20
13		81,2	-	-
14	3,95 s	80,2	C-11 ; C-16	H-16 ; OMe-15 ; H-1
15	4,89 d (*3*,5 Hz)	110,8	C-14 ; C-16, OMe-15	OMe-16
16	4,75s	108,6	C-13 ; C-14 ; OMe-16	OMe-15 ; H-11
17	0,92 d (6,0 Hz)	16,8	C-7 ; C-9	H-5
18	1,28 s	23,0	C-3 ; C-4 ; C-5 ; C-19	H-5 ; H-3
19	-	183,9	-	-
20	1,04 s	22,2	C-1 ; C-5 ; C-9 ; C-10	H-12 ; H-11 ; H-8 ; H-2
OMe-15	3,47 s	56,4	C-15	H-14
OMe-16	3,41 s	55,2	C-16	H-1

Composé **MD5** : **MD5a** et **MD5b**



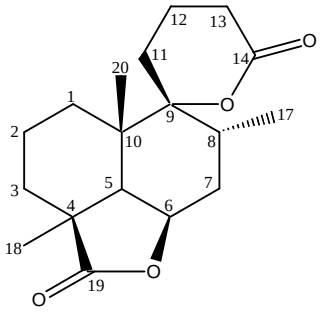
$C_{20}H_{28}O_6$
Masse exacte calc. 364.1885 uma, SM-HR-ESI$^+$, $[M+H]^+$ uma 364,9 uma
Nom IUPAC:13*S*-9α,13α-époxy-7-hydroxy-labda-6β(19),16(15)-diol dilactone
$C_{20}H_{27}O_7$,
Masse exacte cal 379.1756 uma
SM-HR-ESI, $[M'+K]^+$ 419,0 uma
Nom IUPAC: 13*S*-9α,13α-époxy-7,14-dihydroxy-labda-6β(19),16(15)-diol dilactone
Aspect: solide amorphe
$[\alpha]_D$= +4,0°C à 25°C

Tableau 5: RMN du ^1H, ^{13}C (400 MHz. δ. J en Hz : 100 MHz) HSQC et HMBC du composé **MD5a** et **MD5 b**

	$CDCl_3$			
	δ_H multiplicité (*J*)	**δ_C**	**HMBC**	**NOESY**
1α **1β**	1,23 1,19	27.7		H-20
2α **2β**	1,76 1,57	17.8		H-3
3α **3β**	1,48 1,43	28.2	C-18 ; C-4	Me-18
4	-	44.2	C-18	
5	2,07	46.2	C-10 ; C-4 ; C-19 ; C-20	H-6 ; H-7
6	4,71¥	76.05¥		
7	4,71¥	76.2¥¥		
8	2,14	32.1		
9	-	93.4		
10	-	39.2	-	
11α **11β**	1,91 1,93	29.2		
12α **12β**	1,83 2,15	31.7	C-5	
13	-	84.3		
14α **14β**	1,62 2,22	32.2	C-12	
15		*183.9*		
16α **16β**	4,71	76.05		
17	0,90 d (*6.1 Hz*)	17.4	C-6 ; C-8 ; C-9	H-14
18	1.28 s	23.1	C-1 ; C-4 ; C-19	
19	-	183.9		
20	1.06 s	23.9	C-1 ; C-10 ; C-5 ; C-9	H-2

¥ et ¥¥ : signaux interchangeables

Composé MD6: Marrulactone



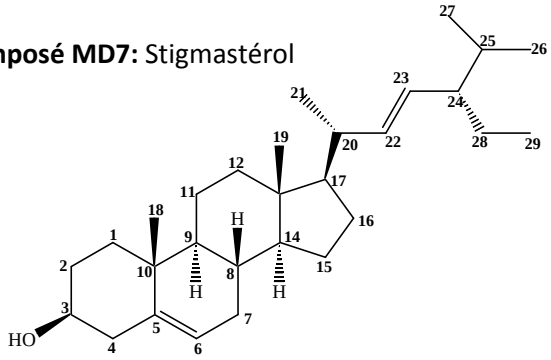
$C_{18}H_{26}O_4$
Masse exacte calc. 306.1831uma
SM-HR/ISE$^+$ $[M+Na]^+$ 329,1723 uma
Nom IUPAC:Labda-6 (19), 9 (14)-diolide
Aspect: solide amorphe
$[\alpha]_D$= -23,80°C **25°C** (Rigano *et al.*, 2009)

Tableau 6 : RMN du ^1H et du ^{13}C (500 MHz. δ. J en Hz : 125 MHz) du composé **MD6** et de la marrulactone

	$CDCl_3$		$CDCl_3$ (Rigano *et al.*, 2009)	
	δ_H multiplicité (*J*)	**δ_C**	**δ_H multiplicité (*J*)**	**δ_C**
1	1,37 m	28,7	np	28,8
2	1,76 m 1,54 m	17,8	np	18,4
3	2,12 m 1,47 m	28,2	np	28,5
4	-	44,0	-	44,1
5	2,32 m	44,5	2,32 d (4,4 Hz)	45,0
6	4,77 dd (*5,0*Hz ; 4,0 Hz)	75,8	4,78 dd (5,4 et 4,4 Hz)	75,7
7	2,15 m 1,86 m	31,0	**np**	31,7
8	2,16 m	34,4	**np**	32,4
9	-	88,3	-	88,3
10	-	40,9	-	39,9
11	1,90 m 1,77 m	26,2	**np**	34,5
12	1,86 m	19,0	**np**	20,5
13	2,25 m 2,57 m	30,4	2,58 dt (17,4 ; 3,9 Hz)	34,4
14	-	172,0	-	172,1
17	0,98 d (6Hz)	16,6	0,98 d (6,3 Hz)	16,8
18	1,31s	22,9	1,31 s	23,1
19	-	183,5	-	183,4
20	1,10 s	22,0	1,11 s	22,6

np : non précisé

Composé MD7: Stigmastérol



$C_{29}H_{48}O$

Poids moléculaire (MS- ISE) $[M]^+$ 412,0 uma

Nom IUPAC: (3*S*,8*S*,9*S*,10*R*,13*R*,14*S*,17*R*)-17-[(*E*,2*R*,5*S*)-5-ethyl-6-methylhept-3-en-2-yl]-10,13-diméthyl-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1*H*-cyclopenta[*a*]phenanthren-3-ol

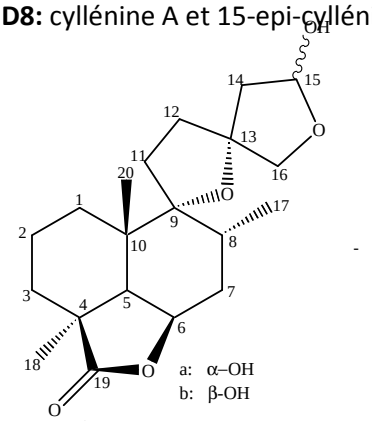
Aspect: poudre blanche

$[\alpha]_D$=-56,5 à 25°C (Kwon *et al*., 2008)

Tableau 7 : RMN du ^1H et du ^{13}C (300 MHz. δ. J en Hz : 75 MHz) du composé **MD7** et de la stigmastérol

	$CDCl_3$		$CDCl_3$ (Jamal *et al.*, 2009 ; Marsan*,1996*)	
	δ_H multiplicité (*J*)	**δ_C**	**δ_H multiplicité (*J*)**	**δ_C**
1	1,08m-1,86m	37,2	1,07-1,84	37,4
2		31,6	1,50-1,83	28,4
3	3,52 m	71,8	3,53 m	72,0
4	2,24 m-2,28 m	42,3	2,24-2,28	42,5
5	-	140,7	-	140,9
6	5,35 d (5,16 *Hz*)	121,7	5,36 t (5,4 *Hz*)	121,9
7		31,9	1,97	31,9
8			1,45	32,1
9	0,93s	50,1	0,93s	50,3
10	-	36,5	-	36,7
11		21,0	1,50	21,3
12	1,16 m-2,01m	39,8	1,16m -2,00 m	39,8
13		42,2	-	42,4
14	1,03s	56,8	1,02	57,0
15	1,08m-1,51m	24,3	1,56	24,5
16		28,9	1,84	29,2
17	1,11m	56,0	1,11m	56,1
18	0,69s	12,0	0,71 s	12,1
19	1,00s	11,8	1,01 s	19,1
20	2,03 m	40,5	2,04 m	40,7
21	1,02 d (7,8 Hz)	21,2	1,02 d (6,6 Hz)	21,4
22	5,15m	138,3	5,15 s	138,5
23	5,03 m	129,3	5,01 s	129,5
24		51,2	1,54	51,4
25		29,1	1,45	32,0
26	0,84 s	19,8	0,80 s	19,6
27	0,80 s	19,0	0,86 s	20,0
28	1,42 m	25,4	1,16-1,41	25,6
29	0,82 s	12,2	0,81	12,2

Composé **MD8:** cyllénine A et 15-epi-cyllénine A



-

$C_{20}H_{30}O_5$

Masse exacte calc 350.2093 uma

Poids moléculaire SM/ESI $[M+H]^+$ 351,0 uma

Nom IUPAC: 9,13 ;15,16-diépoxylabda-15-hydroxy-6,19-olide

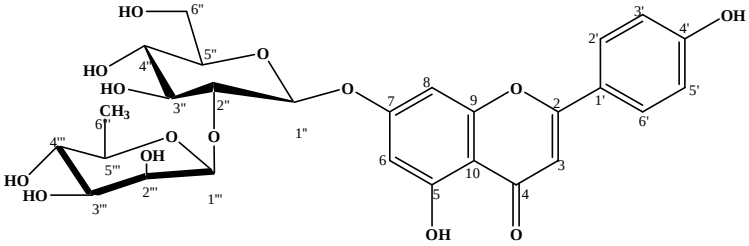
Aspect: solide amorphe

$[\alpha]_D$=np

Tableau 8 : RMN du ^{13}C et du ^{1}H (MHz. δ. *J* en MHz) du composé **MD8** et de la cyllénine A et 15-*epi*-cyllénineA

	$CDCl_3$		$CDCl_3$ (Rigano *et al.*, 2006)	
	δ_H multiplicité (*J*)	**δ_C**	**δ_H multiplicité (*J*)**	**δ_C**
1α **1β**	1,60m 1,34m	29,0_a/28, 9_b	1,52 m 1,28 m	28,9_a/28,8_b
2α **2β**	1,75 m 1,53 m	17,9_a/ 18,1_b	1,70 m 1,48 m	17,8_a/ 18,0_b
3α **3β**	2,13 m 1,44 m	28,1	2,10 m 1,42 m	28,0_a/28,1_b
4		44,1		44,0
5	1,90 d (4,4 Hz)	46,6	1,91 d (3,6 Hz)	46,4
6α	4,70 t (5Hz)	76,0	4,68 dd (4,4 Hz ; 3,6 Hz)	75,5_a/ 76,0_b
7α **7β**	2,11 m 1.63 m	31,7	2,08m 1,62m	31,7
8β	2,10 m	32,5	2,08 m	31,8
9		92,4		92,1_a /90,5_b
10		39,1		39,1_a/38,9_b
11α **11β**	2,08 m 1,78 m	29,2	2,08 m 1,78 m	29,4_a/29,6_b
12α **12β**	2,10 m 2,04 m	34,5	2,09m_a ;1,92 m_a 2,18m_b ; 2,09 m_b	34,6_a/37,7_b
13		90,1		90,1_a / 90,0_b
14α **14β**	2,28m-2,12m	46,2	2,26d_a(12,0 Hz) /2,09 m_a 2,29dd_b (12,0 Hz ; 4,4Hz)/1,95 m_b	45,8_a/48,6_b
15α **15β**	5,62 d (4,0 Hz) 5,42 d (4,0 Hz)	99,3	5,61 d (4,4 Hz)$_a$ 5,42 m_b	99,3_a/99,1_b
16α **16β**	4,24 d (9,1Hz)-3,67 d (9,1 Hz) 4,01 d (6,02)	77,4	4.21 d_a (7,2Hz), 3.71 d_a (7,2Hz) 3.99 d_b (7,2Hz), 3.97 d_b (7,2Hz)	77,2_a 77,6_b
17	0,96 s	17,5	0.87 d_a (6,0 Hz), 0.81 d_b (6,0 Hz)	17,4_a/17,2_b
18	1,29 s	23,1	1.26 $s_{a,b}$	23,1_a/22,9_b
19	-	183,8	-	183,4_a/183.8_b
20	1,06 s	23,6	1,04 s_a/1,02s_b	23,4_a ; 23,6_b

Composé **MD9 :** Apigénine 7-*O*-néohesperidoside



$C_{27}H_{30}O_{14}$
Masse exacte calc. 578.163560 uma
Poids moléculaire SM-ESI $[M+H]^+$ 579,0 uma
Nom: Apigénine-7-*O*-néohesperidoside
Aspect: poudre jaune
$[\alpha]_D$= -23,5° à 27° [Rao *et al*., 1982]

Tableau 9 : RMN du ^{13}C et du ^{1}H (300 MHz. δ. *J. 75* MHz) du composé **MD9** et de l'apigénine 7-*O*-néohesperidoside

	CD_3OD		CD_3OD (Rao *et al.*, 1982)	
	δ_H multiplicité (*J*)	**δ_C**	**δ_H multiplicité (*J*)**	**δ_C**
Apigénine				
2	-	166,7	-	164,0
3	6,66 s	104,1	6,85 s	103,0
4	-	184,0	-	181,7
5	13,00 s	162,9	12,95 s	160,9
6	6,46 sl	101,0	6,35 d (2,0 Hz)	99,2
7	-	164,4	-	162,3
8	6,78 d (2,0 Hz)	95,9	6,78 d (2,0 Hz)	94,4
9	-	158,9	-	156,8
10	-	107,0	-	105,3
1'	-	123,0	-	120,7
2'-6'	7,88 d (8,3 Hz)	129,6	7,92 d (8,8 Hz)	128,4
3'-5'	6,93 d (8,3 Hz)	117,0	6,92 d (8,8 Hz)	115,9
4'	-	162,9	-	161,3
Glucosyl				
1''	5,21 d (7,3 Hz)	99,8	5,21 d (7,3 Hz)	97,7
2''	3,72 t (7,3 Hz)	79,0	3,5 t (7,0 Hz)	76,2
3''	3,64 t (9,06 Hz)	79,0	3,2/3,5	77,1
4''	3,96	72,2		69,6
5''	3,55	78,3		76,9
6''α **6''β**	3,73 3,95	62,4	3,5 3,8	60,4
Rhamnosyl				
1'''	5,31 sl	102,5	5,11 s	100,3
2'''	3,41	71,4	3,7	70,4
3'''	3,64	72,2	3,3	70,5
4'''	3,42	73,9	3,21	71,8
5'''	3,96	70,0	3,74	68,3
6'''	1,34 d (6,0 Hz)	18,3	1,18 d (*6,2 Hz*)	18,1

sl : singulet large

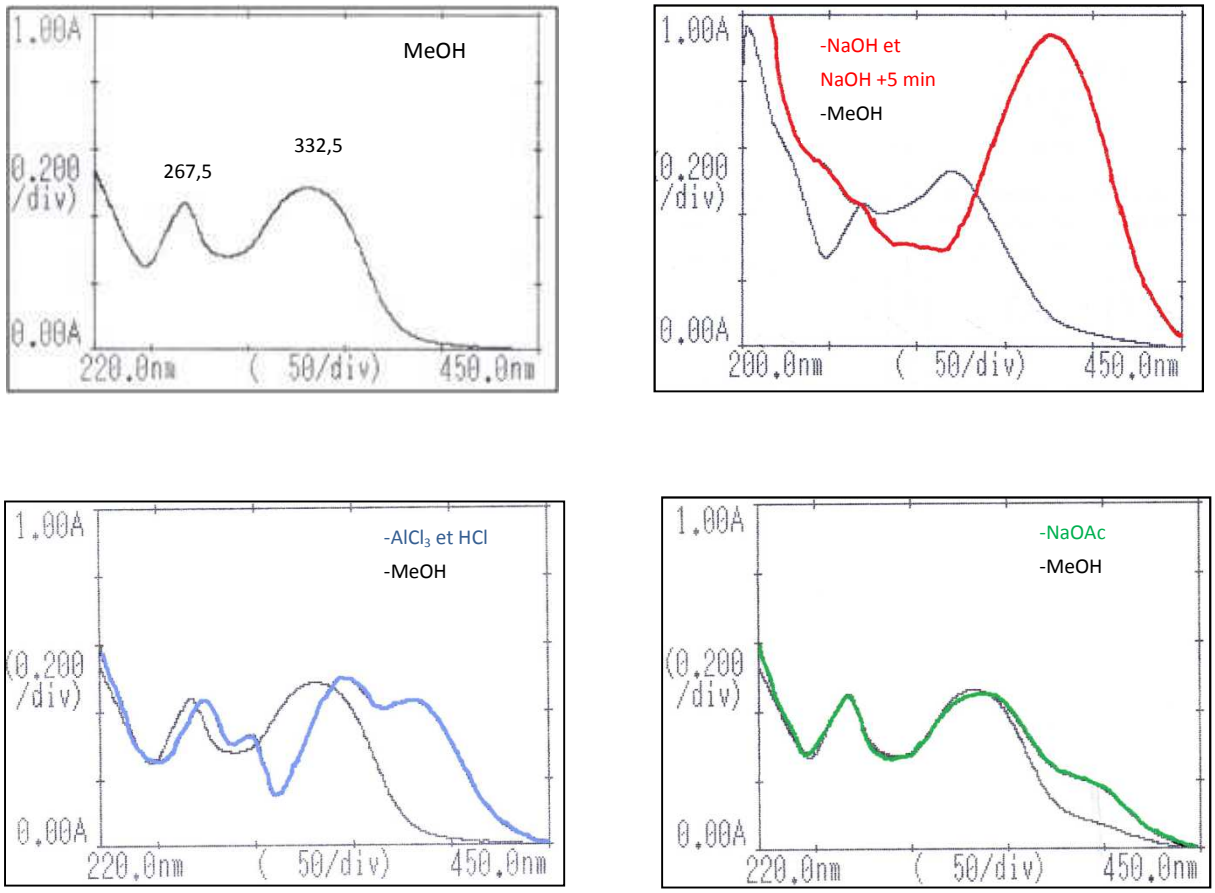
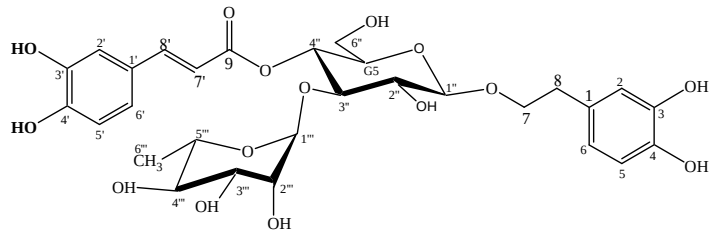


Fig.1 : Série spectrale UV de **MD9**

Composé **MD10**: Actéoside



$C_{29}H_{36}O_{15}$

Poids moléculaire (SM-FAB) $[M+Na]^+$ 647,0 uma (H. RAVN et al 1990)

Nom: 3,4-dihydroxy-β-phényléthoxy-*O*-[α-L-rhamnopyranosyl-(1→3)]-4-*O*-*E*-caféyl-β-D-glucopyranoside

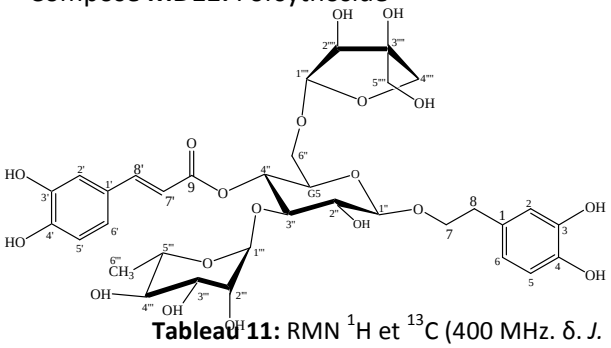
Aspect: solide amorphe

$[\alpha]_D$= -66,5° à 20 °C (RAVN *et al*., 1990)

Tableau 10: RMN ^1H et ^{13}C du composé **MD10** (400 MHz. δ. *J.* 100 MHz) et l'actéoside

	CD_3OD		CD_3OD (Wu, 2003 ; Ravn *et al.,* 1990)	
	δ_H multiplicité (*J*)	**δ_C**	**δ_H multiplicité (*J*)**	**δ_C**
Hydroxytyrosol				
1	-	131,4	-	131,5
2	6,70 d (2,07 Hz)	117,1	6,68 d (2,0 Hz)	116,3
3	-	146,0	-	146,1
4	-	144,0	-	144,6
5	6,67 d (8,0 Hz)	116,3	6,66 d (8,0Hz)	117,1
6	6,57 dd (1,89 Hz ; 8,0 Hz)	121,2	6,54 dd (2,0Hz, 8,0 Hz)	121,2
7	3,72-4,05 m	72,2	3,62-4,05m	72,0
8	2,79 t (7,3 Hz)	36,5	2,76 m	36,5
acide caféique				
1'	-	127,6	-	127,6
2'	7,06 d (1,8 Hz)	115,2	7,05 d (1,8Hz)	115,2
3'	-	146,8	-	146,8
4'	-	149,8	-	149,7
5'	6,78 d (8,2 Hz)	116,5	6,76 d (8,2Hz)	116,5
6'	6,96 dd (2,07 Hz ; 8,2 Hz)	123,2	6,94 dd (1,8Hz ; 8,2Hz)	123,2
7'	7,60 d (15,8 Hz)	114,6	7,57 d (*16Hz*)	114,7
8'	6,27 d (15,9 Hz)	148,0	6,25 d (16Hz)	148,0
9	-	168,3	-	168,3
Glucosyl				
1''	4,38 d (7,8 Hz)	104,2	4,35 d (8Hz)	104,2
2''	3,38	76,0	3,39 dd (7,8 Hz; 9,0 Hz)	76,2
3''	3,81	81,6	3,80 t (9,6 Hz)	81,6
4''	4,92	70,5	4,91 t (9,6 Hz)	70,6
5''	3,53	76,2	Np	76,0
6''	3,60 m	62,3	Np	62,3
Rhamnosyl				
1'''	5,19 d (1,5 Hz)	103,0	5,17 d (1,7 Hz)	103,0
2'''	3,92 m	72,3	Np	72,3
3'''	3,57 m	72,0	Np	72,2
4'''	3,29 m	73,7	Np	73,8
5'''	3,56 m	70,5	Np	70,4
6'''	1,09 d (*6,03 Hz*)	18,4	1,08d (*6,0 Hz*)	18,4

Composé **MD11:** Forsythoside



$C_{34}H_{44}O_{19}$

Poids moléculaire (SM-HR-FAB) $[M+Na]^+$ 779,2375 uma (Nazemiyeh H., 2008)

Nom : 3,4-dihydroxy-β-phényléthoxy-*O*-[α-L-rhamnopyranosyl-(1→3)]-*O*-[β-D-apiofuranosyl-(1→6)]-4-*O*-(*E*)-caféyl-β-D-glucopyranoside

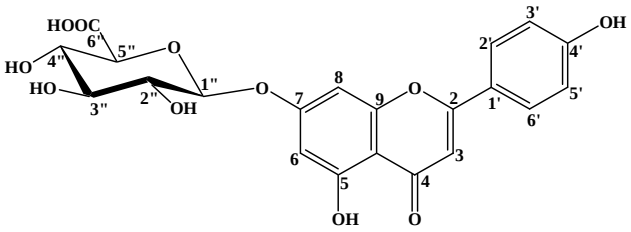
Aspect: solide amorphe

$[\alpha]^{20}{}_D$= np

Tableau 11: RMN ^1H et ^{13}C (400 MHz. δ. *J.* 100 MHz) du composé **MD11**et le forsythoside

	$CD_3OD + D_2O$		$CD_3OD + D_2O$ (Hennebelle *et al.,* 2007 ; Çalis, 1992)	
hydroxytyrosol	**δ_H multiplicité (*J*)**	**δ_C**	**δ_H multiplicité (*J*)**	**δ_C**
1	-	131,5	-	131,4
2	6,66 d (2,0 Hz)	117,2	6,72 d (*2,0* Hz)	117,1
3	-	145,0	-	146,0
4	-	144,5	-	144,5
5	6,64 d (8,0 Hz)	116,4	6,70 d (*8,0* Hz)	116,5
6	6,53 dd (2,0 Hz ; 8,0 Hz)	121,4	6,60 dd (*2,0* Hz*; 8,0* Hz)	121,3
A	3,72 m	72,4	3,80 m	72,3
B	2,74 t (7,17 Hz)	36,5	2,81 t (*7,0* Hz)	36,6
acide caféique				
1'	-	127,6	-	127,6
2'	7,03	115,3	7,10 d (*2,0* Hz)	115,2
3'	-	146,7	-	146,8
4'	-	149,7	-	149,8
5'	6,75 d (8,2 Hz)	116,6	6,80 d (8,0 Hz)	116,3
6'	6,93 dd (8,1 Hz)	123,4	7,00 dd (2, 0 Hz ; 8,0 Hz)	123,2
α'	6,24 d (15,9 Hz)	114,6	6,30 d (16,*0* Hz)	114,7
β'	7,55 d (15,8 Hz)	148,2	7,65 d (16,0 Hz)	148,0
CO	-	168,4	-	168,2
Glucosyl				
1''	4,39 d (8,0 Hz)	104,1	4,39 d (*9,*0 Hz)	104,2
2''	3,33	76,0	3,40	76,1
3''	3,75	81,8	3,75	81,6
4''	4,90	70,8	4,90	70,4
5''	3,65	74,4	3,65	74,5
6''α **6''β**	3,45 3,68	68,4	3,55 3,90	68,5
Rhamnosyl				
1'''	5,15 d (2,0 Hz)	103,1	5,20 d (2,0 Hz)	103,0
2'''	3,88	72,2	3,85	72,3
3'''	3,53	71,9	3,50	72,0
4'''	3,26	73,6	3,30	73,8
5'''	3,48	70,4	3,45	70,5
6'''	1,02 d (6,0 Hz)	18,4	1,16 d (6,0 Hz)	18,4
Apiosyl				
1''''	4,86	110,9	4,90 d (2,0 Hz)	111,0
2''''	3,83	78,0	3,90	78,1
3''''	-	80,6	-	80,6
4''''	3,69-3,87	75,0	3,70-3,90	75,0
5''''	3,49	65,4	3,55	65,6

Composé **MD18** : Apigénine-7-*O*-glucuronide



$C_{21}H_{18}O_{11}$

Masse exacte calc. 446.084915 uma

SM-IE, $[M-H]^-$ = 445, 0 uma

Nom: Apigénine-7-*O*-glucuronide

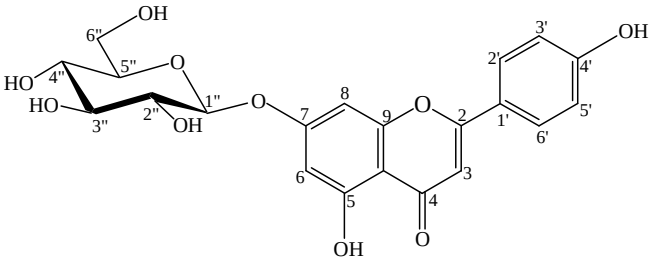
Aspect: solide jaune

$[\alpha]_D$= -30° à 17°C (Has *et al*, 1995)

Tableau 12 : RMN ^1H et ^{13}C (300 MHz. δ. 75 MHz) du composé **MD18** et l'apigénine-7-*O*-glucuronide

	$CD_3OD + CD_3COCD_3$		CD_3OD (Has *et al.*, 1995)	
	δ_H multiplicité (*J*)	**δ_C**	**δ_H multiplicité (*J*)**	**δ_C**
Apigénine				
2	-	165,8	-	164,3
3	6,61 s	103,7	6,87 s	103,2
4	-	183,3	-	182,0
5	-	162,2	-	161,4
6	6,44 d (*2,2 Hz*)	100,8	6,47 d (*2,2 Hz*)	99,4
7	-	164,3	-	162,5
8	6,84 d (*2,2 Hz*)	95,5	6,86 d (*2,2 Hz*)	94,7
9	-	158,4	-	156,9
10	-	106,6	-	105,4
1'	-	122,5	-	121,0
2'-6'	7,86 d (*8,9 Hz*)	129,2	7,96 d (*8,8 Hz*)	128,6
3'-5'	6,90 d (*8,8 Hz*)	116,5	6,94d (*8,8 Hz*)	116,0
4'	-	162,3	-	161,2
OH-5		-	12,98 s	-
Glucuronidyl				
1''	5,10 d (*7,1 Hz*)	101,1	5,27 d (*7,1 Hz*)	99,2
2''	3,48	74,0	3,26	72,7
3''	3,52	75,5	3,4	75,4
4''	3,50	72,9	3,4	71,2
5''	3,82 d (*9,3 Hz*)	77,2	4,05 d (*9,5 Hz*)	75,6
6''		175,2	10,42	170,0

Composé **MD13:** Apigénine-7-*O*-glucoside



$C_{21}H_{20}O_{10}$

Masse exacte calc. 432.105649 uma

Poids moléculaire (SM-ESI) $[M+H]^+$ 433,0 uma

Nom: Apigénine-7-*O*- glucoside

Aspect: poudre jaune

$[\alpha]_D$= -80° à 25°C (Itokawa *et al*., 1981)

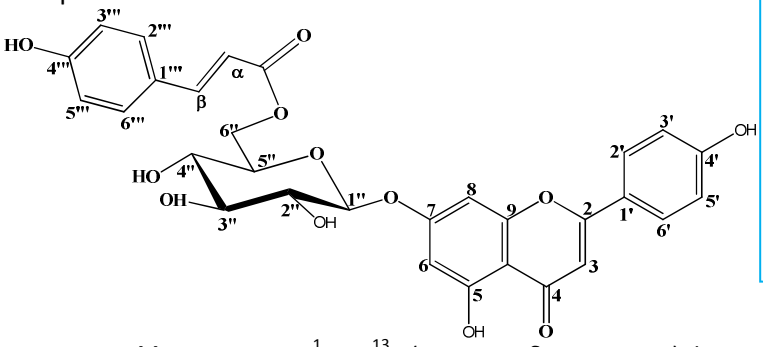
Tableau 13: RMN ^1H et ^{13}C (300 MHz. δ. 75 MHz) du composé **MD13** et l'apigénine -7-*O*-glucoside

	DMSO-d6		DMSO-d6 (Redaelli *et al*., 1980)	
Apigénine	**δ_H multiplicité (*J*)**	**δ_C**	**δ_H multiplicité (*J*)**	**δ_C**
2	-	164,0	**-**	164,0
3	6,85 s	102,8	6,85 s	102,8
4	-	181,6	-	181,6
5	-	161,0	-	161,0
6	6,43 sl	99,3	6,43 d (2,0 Hz)	99,7
7	-	162,9	-	162,7
8	6,82 d (8,8 Hz)	94,6	6,82 d (8,8 Hz)	94,6
9	-	156,9	-	156,6
10	-	105,2	-	105,1
1'	-	120,3	-	120,7
2'-6'	7,94 d (8,8 Hz)	128,4	7,95 d (8,8 Hz)	128,3
3'-5'	6,93 d (8,8 Hz)	115,9	6,93 d (8,8 Hz)	115,7
4'	-	161,9	-	160,8
5-OH	12,20 s	-	12,95 s	-
Glucosyl				
1''	5,06 d (7,3 Hz)	99,6	5,05 d (7,3 Hz)	99,3
2''	3,27 m	73,0	3,1-3,2 m	73,0
3''	3,45 m	77,1	3,4 m 3,5 m	77,0
4''	3,18 m	69,6		69,4
5''	3,31 m	76,2		76,3
6''	3,48-3,70 m	60,5	3,6-3,7	60,5

Tableau14 : Les données spectrales UV-Vis du composé MD13

Réactifs	**Bande I**	**Bande II**	**Commentaires**
MeOH	328	268	Flavone
NaOH	387	269-206	OH libre en 4'
NaOH+5mn	387	268-206	Spectre stable
$AlCl_3$	379-343	249-249	OH libre en 5 Pas de ortho di-OH sur le cycle B
$AlCl_3$/HCl	377-339	249-275	
NaOAC	328	267	OR en 7

Composé **MD 14 :** Terniflorine



$C_{30}H_{26}O_{12}$

Masse exacte calc. 578.142430 uma

Poids moléculaire (MS-ESI) $[M-H]^-$ 577,1 uma

Nom IUPAC: Apigénine7- β-D-*O*-[6''-E-p-*O* coumaryl] D-glucopyranoside

Aspect: poudre blanche

$[\alpha]_D$= -135° à 25°C (Itokawa *et al.,* 1981)

Tableau 15 : RMN ^1H et ^{13}C (400 MHz. δ. *J*. 100 MHz) du composé **MD14** et de la térniflorine

	DMSO-d6		DMSO-d6 (Amer *et al.*, 2004)	
	δ_H multiplicité (*J*)	**δ_C**	**δ_H multiplicité (*J*)**	**δ_C**
Apigénine				
2	-	162,9	-	162,7
3	6,79 s	102,8	6,84 s	103,0
4	-	182,2	-	181,9
5	-	161,3	-	156,8
6	6,46 d (2,0 Hz)	99,4	6,48 d (2,0 Hz)	99,5
7	-	164,4	-	164,3
8	6,79 d (2,0 Hz)	94,7	6,82 d (2,0 Hz)	94,7
9	-	150,8	-	161,3
10	-	105,4	-	105,3
1'	-	120,7	-	121,0
2'-6'	7,91 d (8,7 Hz)	128,7	7,94 d (8,8 Hz)	128,5
3'-5'	6,90 d (8,8 Hz)	116,0	6,93 d (8,8 Hz)	116,0
4'	-	161,6	-	161,1
OH-5	12,97	-	12,98	-
glucosyl				
1''	5,16 d (7,0 Hz)	99,4	5,16 d (7,0 Hz)	99,5
2''	3,34 m	73,0	3,30 m	72,9
3''	3,33 m	76,1	3,36m	76,2
4''	3,25 m	69,9	3,32 m	70,0
5''	3,83 m	74,0	3,84 m	73,8
6''	4,16 dd-4,45 dl	63,6	4,17 m	63,4
coumaroyle				
α	6,31 d (16,0 Hz)	113,8	6,33 d (16,0 Hz)	113,7
β	7,48 d (16,0 Hz)	145,0	7,49 d (16,0 Hz)	144,9
1'''	-	124,5	-	124,9
2'''-6'''	7,35 d (8,5 Hz)	130,2	7,37d (8,5 Hz)	131,7
3'''-5'''	6,67 d (8,5 Hz)	115,7	6,68 d (8,5 Hz)	115,7
4'''	-	160,0	Np	159,7
CO	-	166,5	Np	166,4

dl : doublet large

Tableau16 : Les données spectrales UV-Vis du composé **MD14**

Réactifs	Bande I	Bande II	Commentaires
MeOH	320	269	Flavone
+ NaOH	374-310	297	OH libre en 4’
+NaOH+5mn	374-310	297	
+$AlCl_3$	380-327	299-277	OH libre en 5
+$AlCl_3$/HCl	378-327	298-278	
+NaOAC	317	269	OR en 7
+H_3BO_3	317	268	

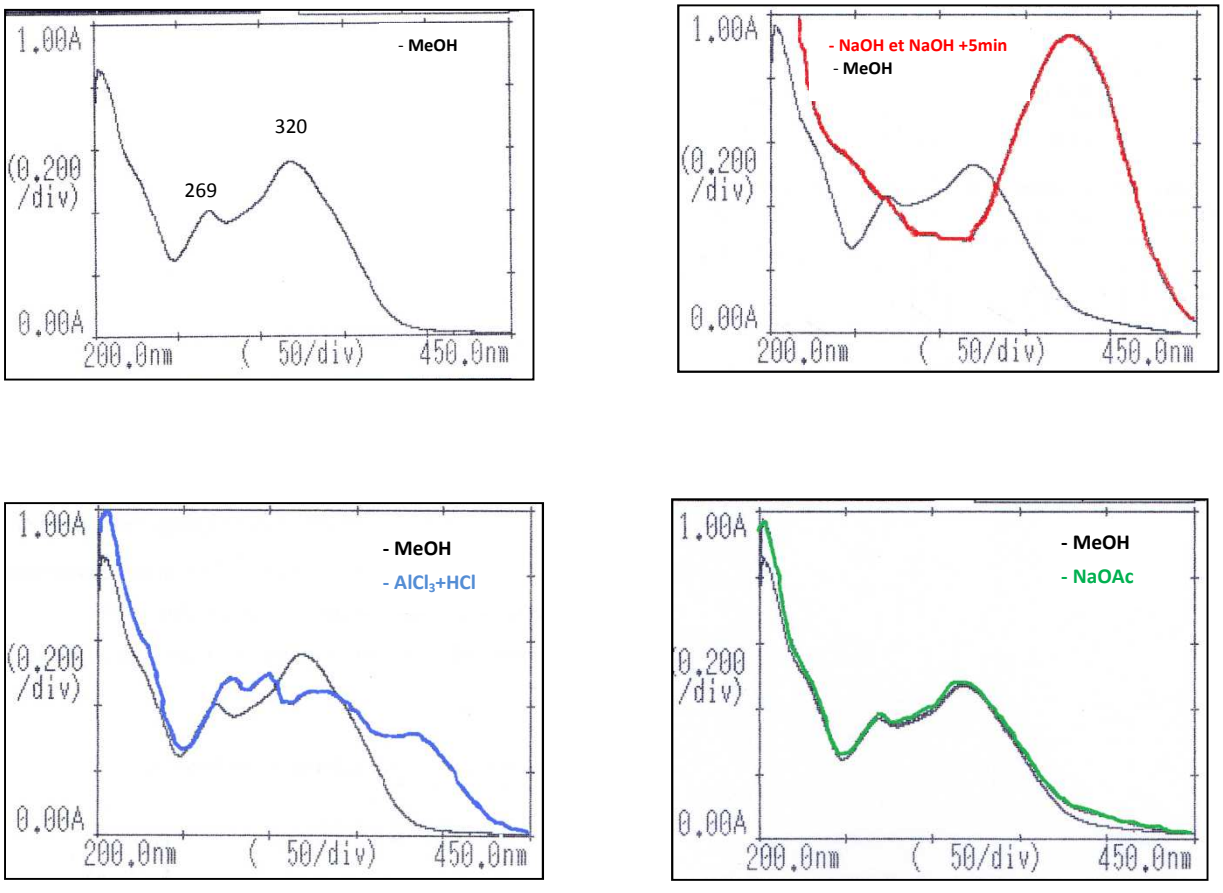
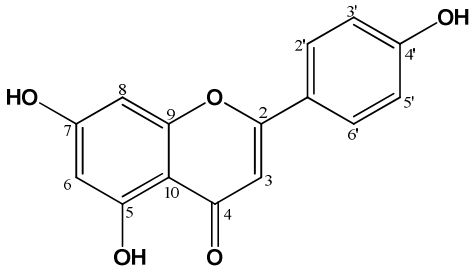


Fig. 2 : Série spectrale UV de **MD14**

Composé **MD15**: Apigénine



$C_{15}H_{10}O_5$
Masse exacte calc 270.0528 uma
Poids moléculaire (HR-ESI) $[M+H]^+$ 271,0601 uma
Nom IUPAC: 5,7,4'-trihydroxyflavone
Aspect: poudre jaune

Tableau 17: RMN ^1H et ^{13}C (400MHz. δ. *J*. 100 MHz) du composé **MD15** et de l'apigénine

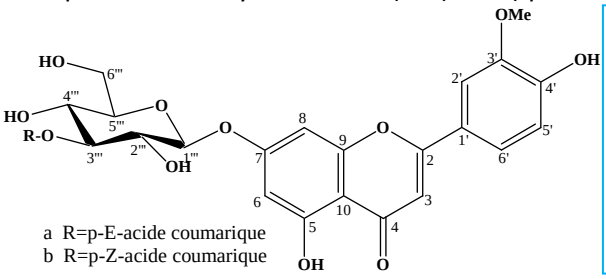
	DMSO-d_6		DMSO-d_6 (Van Loo *et al.*, 1986)	
	δ_H multiplicité (*J*)	**δ_C**	**δ_H multiplicité (*J*)**	**δ_C**
1		-		-
2	-	164.2		165,3
3	6,61s	103.2	6,64 s	103,7
4	-	182.0	-	183,0
5	-	161.4	-	162,6
6	6.19 d (2.0 Hz)	99.5	6,21 d (2,1Hz)	99,7
7	-	164.2	-	165,2
8	6.48 d (2.0 Hz)	94.5	6,47 d (2,1 Hz)	94,7
9	-	157,0	-	158,7
10	-	102.8	-	104,9
1'	-	121.8	-	122,7
2'/6'	7.92 d (8.8Hz)	128.6	7,87 d (8,6 Hz)	129,1
3'/5'	6.92 d (8.8Hz)	116.4	6,94 d (8,6 Hz)	116,7
4'	-	161.4	-	162,1

Tableau18 : Les données spectrales UV-Vis du composé **MD15**

Réactifs	**Bande I**	**Bande II**	**Commentaires**
MeOH	329	267	Flavone
NaOH	391-326	275-225	OH libre en 4' OH libre en 7
NaOH+5mn	391-326	275-222	Spectre stable
$AlCl_3$	380-340	299-275	OH libre en 5
$AlCl_3$ /HCl	377-339	299-276	
+NaOAC	335	268-222	Confirmation de la présence d'un OH en 7
H_3BO_3	334	268-220	

A.III.1.b Composés isolés de *Phlomis bovei*

Composé **PB1 :** Chrysoériol 7-O-(3''-(*E* et *Z*)-*p*-coumaroyl)-β-glucopyranoside



a R=p-E-acide coumarique
b R=p-Z-acide coumarique

$C_{31}H_{28}O_{13}$

Poids moléculaire (SM-ESI) $[M+H]^+$= 609,0 uma (Kabouche *et al.*, 2004)

Nom: Chrysoériol7-(3''-(*E* et Z)-*P*-coumaroyl)-β-D-glucopyranoside

Aspect: poudre jaune

Tableau 19: RMN ^1H et ^{13}C du composé **PB1** et de la chrysoériol 7-O-(3''-(*E* et *Z*)-*p*-coumaroyl)-β-glucopyranoside

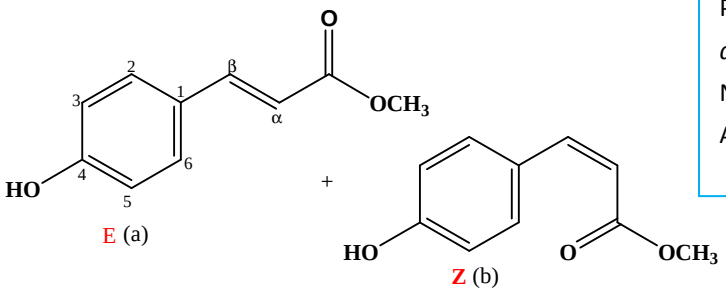
	$CD_3COCD_3+D_2O$		DMSO (Marin *et al.*, 2007 ; Skalta *et al.*, 2000)	
	δ_H multiplicité (*J*)	**δ_C**	**δ_H multiplicité (*J*)**	**δ_C**
Chrysoeriol				
2	-	164,3	-	163,25
3	6,70 s	102,7	6,87 s	102,2
4	-	177,6	-	182,65
5	-	156,2	-	157,55
6	6,45 m	99,1	6,46 d (*2,1* Hz)	99,1
7	-	165,4	-	165,27
8	6,84 s	94,1	6,87 d (*2,1* Hz)	94,6
9	-	150,2	-	159,86
10	-	101,6	-	105,74
1'	-	121,4	-	122,02
2'	7,55 m	119,9	7,52 d (*2,0* Hz)	110,1
3'	-	147,4	-	150,9
4'	-	160,6	-	148,1
5'	6, 93 d (8,8 Hz)	114,8	6,86 d (8,3 Hz)	115,9
6'	7,90 d *(*7,85 Hz*)*	127,7	7,56 dd (8,3 ; 2,0 Hz)	120,7
OMe-3'	3,94 s	54,8	3,87 s	55,6
glucose				
1''	5,22 m	99,5	5,25 d (7,6 Hz)$_a$ 5,23 d (7,6 Hz)$_b$	99,4
2''	3,66 m	71,1	3,52 dd (9,4 Hz ; 7,7 Hz)$_a$ 3,47 (m)$_b$	71,0
3''	5,18 m 5,16 m	76,6 76,9	5,06 t (9,5 Hz)$_a$ 5,04 t (9,5Hz)$_b$	76,9
4''	3,63	67,5	3,48 t (9,5 Hz)$_a$ 3,43 t (9,5Hz)$_b$	67,3
5''	3,70 m	76,3	3,62 ddd (9,8 Hz ; 5,4 Hz ; 1,9Hz)$_a$ 3,61 m$_b$	76,7
6''	3,92 3,72m	60,3	3,74 d (11,9 Hz) 3,55 dd (11,9. 5,4 Hz)	60,1
Coumaryle				
α	6,39 d *(*15,7Hz)$_a$ 5,83 d (12,9Hz)$_b$	113,9$_a$ 115,2$_b$	6,42 d (15,9 Hz)$_a$ 5,82 d (12,9 Hz)$_b$	114,4$_a$ 115,7$_b$
β	7,63 dd (15,7Hz)$_a$ 6,86 dd (12,9Hz)$_b$	144,2$_a$ 142,4$_b$	7,59 d (15,9 Hz)$_a$ 6,86 d (12,9 Hz)$_b$	144,1$_a$ 142,0$_b$
1'''	-	125,1$_a$ 125,6$_b$	-	125,8

2''', 6'''	7,71 dd (8,5Hz)$_a$ 7,50 dd (8,5Hz)$_b$	129,2$_a$ 132,0$_b$	7,55 d (8,6 Hz)$_a$ 7,68 d (8,3 Hz)$_b$	129,8$_a$ 132,1$_b$
3''', 5'''	6,81 d (8,5Hz)$_a$ 6,74 d (8,5Hz)$_b$	114,9$_a$ 113,8$_b$	6,81 d (8,6 Hz)$_a$ 6,75 d (8,5 Hz)$_b$	115,5$_a$ 114,5$_b$
4'''	-	159,2$_a$ 158,0$_b$	-	161,47$_a$
COO	166,2 165,4	166,2$_a$ 165,4$_b$	-	167,27$_a$ np

Tableau 20: Les données spectrales UV-Vis du composé **PB1**

Réactifs	**Bande I**	**Bande II**	**Commentaires**
MeOH	316	269-(255)	Flavone
NaOH	367	305-209	OH libre en 4'
NaOH+5mn	318	202	Spectre stable
$AlCl_3$	384-(320)	298-278-(260)	OH libre en 5 Pas de ortho di-OH sur le cycle B
$AlCl_3$/HCl	384-(355)-(320)	298-280-(260)	
+NaOAC	318	235-267	OR en 7
H_3BO_3	318	235-267	

Composé **PB3** : 4-hydroxy-cinnamate de méthyle



E (a) Z (b)

$C_{10}H_{10}O_3$

Poids moléculaire (SM-ESI) $[M]^+$ = **178,**0 uma (Hooper *et al.*, 1984)

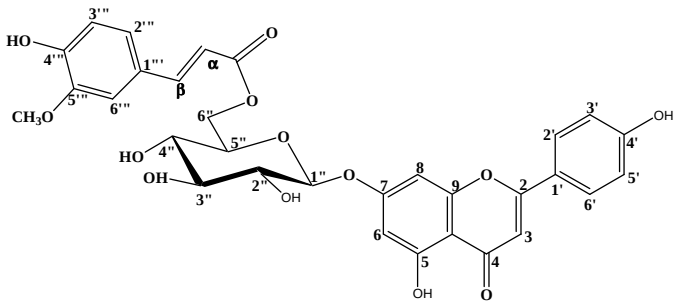
Nom: 4-hydroxy-cinnamate de méthyle

Aspect: solide amorphe

Tableau 21: RMN ^1H et ^{13}C (400 MHz. δ. *J*. 100 MHz) du composé **PB3** et de 4-hydroxy-cinnamate de méthyle

	CD_3OD		DMSO (Hooper *et al.*, 1984 ; Silva *et al.*,2001)	
	δ_H multiplicité (*J*)	**δ_C**	**δ_H multiplicité (*J*)**	**δ_C**
	^1H	**^{13}C**	**^1H**	**^{13}C**
1	-	124,9a 126,6b	-	$125,1_a$
2	$7,36_a$ d (9,0 Hz) $7,6_b$	131,3a 133,9b	$7,4_a$	$130,5_a$
3	$6,68_a$ d (9,0 Hz) $6,81_b$	118,3a 116,7b	$6,82_a$	$115,9_a$
4	-	166,0a 162,8b	-	$160,0_a$
5	$6,68_a$ d (9,0 Hz)	118,3a 116,7b	$6,82_a$	$115,9_a$
6	$7,36_a$ d (9,0 Hz) $7,6_b$	131,3a 133,9b	$7,4_a$	$130,5_a$
α	$6,19_a$ d (15,0 Hz) $5,67_b$	112,8a 114,9b	6,27 d (16 *Hz*)$_a$	$114,0_a$
β	$7,58_a$ d (15,0 Hz)	147,4a 145,6b	6,82 d (16 *Hz*)$_a$	$144,9_a$
COO	-	170,4a 169,0b	-	$167,2_a$
CH_3	$3,77_a$ s $3,71_b$ s	51,6a 51,4b	$3,77\ s_a$	$51,4_a$

Composé **PB4b : Nouveau (dérivé de MD14) :** *Apigénine-7-O-(6''-(5''' methoxy-coumaryl*) glucoside



$C_{31}H_{28}O_{13}$

Masse exacte calc. 608.152995uma

Poids moléculaire (SM-HR-ESI) $[M-H]^-$ 607,1531 uma

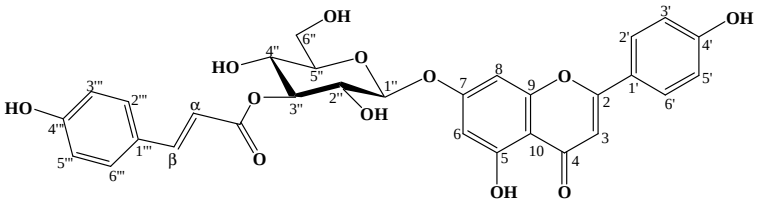
Nom IUPAC: Apigénine-7-O-(5''' OMe, 6''-coumaryl) glucoside

Aspect: poudre blanche

Tableau 22: RMN ^1H, ^{13}C et HMBC (400MHz. δ. J. 100 MHz) du composé **PB4b**

	DMSO-d_6			
	δ_H multiplicité (*J*)	**δ_C**	**HMBC**	**(Seifert, 1989)**
apigénine				
2	-	162,4		
3	6,68 s	100,7	C-2, C-3	
4	-	180,0		
5	-	154,9		
6	6,49 d (2,0 Hz)	97,3	C-10	
7	-	164,7		
8	6,79 d (2,0 Hz)	92,6	C-10, C-5	
9	-	158,8		
10	-	103,3	C-6	
1'	-	122,9		
2'	7,89 d (8,7 Hz)	126,1	C-4'	
3'	6,96 d (8,8 Hz)	116,3		
4'	-	163,2		
5'	6,84 d (8,8 Hz)	113,4		
6'	7,49 d (8,8 Hz)	127,7		
OH-5	-	-		
glucosyl				
1''	5,16 d (7,0 Hz)	97,4	C-8, C-7	
2''	3,54 m	70,6		
3''	3,60 m	73,9		
4''	3,44 m	68,0		
5''	3,90 m	71,6		
6''	4,59 m- 4,22 m	61,3		
coumaryle				
A	6,26 d (16,0 Hz)	111,3		115,4
B	7,47 d (16,0 Hz)	143,0		147,6
1'''	-	124,2		128,8
2'''	7, 55 s	107,3		114,9
3'''	-	145,7		148,1
4'''	-	148,6		151,7
5'''	-	107,3		112,7
6'''	7,52 s	118,2		123,0
CO	-	180,0		167,9
OCH_3	3,89 s	53,3	C-3'''	56,6

Composé **PB5:** Apigénine-7-O-(3''-*p*-coumaryl) glucopyranoside



$C_{30}H_{25}O_{12}$,
SM-FAB (negative), $[M-H]^-$ 577,0 uma Al-Ansari *et al*, 1995)
Nom: Apigénine-7-*O*-(3''-*O*-*p*-coumaryl) glucoside
Aspect: poudre jaune
$[\alpha]_D$ =np

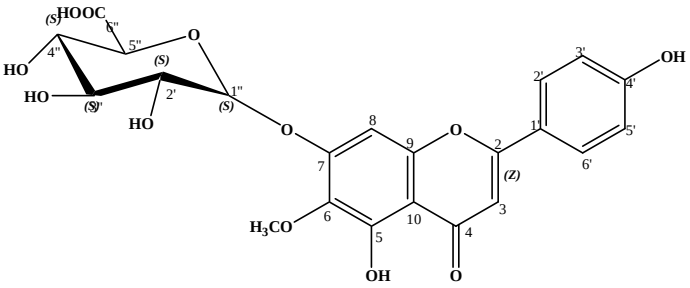
Tableau 23: RMN ^1H et ^{13}C du composé **PB5** et de l'apigénine -7-O-(3''-*p*-coumaryl) glucopyranoside

	Solvant : $CD_3COCD_3+D_2O$		Solvant : DMSO-d_6 (Al-Ansari *et al*., 1995)	
apigénine	**δ multiplicité (*J*)**	**δ_C**	**δ_H multiplicité (*J*)**	**δ_C**
2	-	165,5	-	162,7
3	6,69 s	103,2	6,75 s	103,1
4	-	182,8	-	182,2
5	-	161,8	-	157,5
6	6,47 s	100,2	6,48 d (2,5 Hz)	99,5
7	-	163,4	-	164,8
8	6,83 d (7,8Hz)	95,4	6,78 d (8,0 Hz)	94,7
9	-	157,7	-	161,2
10	-	106,0	-	105,3
1'	-	121,7	-	121,0
2', 6'	7,91 d (7,8Hz)	128,9	7,97 d (8,0Hz)	128,4
3', 5'	6,98 d (7,5Hz)	116,3	6,95 d (8,0Hz)	116,1
4'	-	163,4	-	159,9
glucose				
1''	5,28 d (*6,3Hz*)	100,3	5,28 d (8,0Hz)	99,5
2''	3,70 t (8,0 Hz)	71,8	3,50 t (8,0Hz)	72,0
3''	5,18 t (8,0Hz)	77,4	5,10 t (8,0Hz)	76,9
4''	3,67 m	68,3	3,55 m	68,3
5''	3,75 m	77,0	3,6-3,8 m	76,7
6''	3,89-3,74	61,1	3,6-3,8 m	61,1
coumaryle				
α	6,37 d (15,8Hz)	114,6	6,43 d (16,0Hz)	114,7
β	7,62 d (15,8Hz)	145,6	7,60 d (16,0Hz)	144,9
1'''	-	126,0	-	125,2
2''', 6'''	7,51 d (7,3Hz)	130,4	7,55 d (8,0 Hz)	131,1
3''', 5'''	6,83 d (7,8Hz)	116,1	6,80 d (8,0 Hz)	115,7
4'''	-	160,0	-	159,9
COO	-	167,6	-	167,5

Tableau 24: Les données spectrales UV-Vis du composé **PB1**

Réactifs	Bande I	Bande II	Commentaires
MeOH	317	270	Flavone
NaOH	364	270	OH libre en 4’
NaOH+5mn	364	270	Spectre stable
$AlCl_3$	382-325	299-280	OH libre en 5 Pas de ortho di-OH sur le cycle B
$AlCl_3$/HCl	380-323	299	
+NaOAC	317	270	OR en 7

Composé **PB6a :** Hispiduline-7-*O*-glucuronide



$C_{22}H_{20}O_{12}$

Masse exacte calc. 476,095480 uma

Poids moléculaire (SM-ESI) $[M-H]^-$ = 474,9uma

Nom: 6-*O*-méthyl-scutellarine

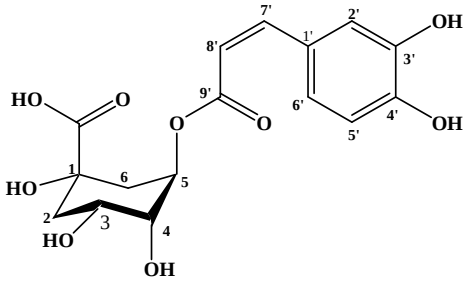
Aspect: poudre jaune

$[\alpha]_D$= np

Tableau 25 : RMN ^1H et ^{13}C (400 MHz. δ. *J*. 100 MHz) du composé **PB6a** et de l'hispiduline-7-*O*-glucuronide

	CD_3OD		DMSO-d_6 (Xia *et al.*, 2007)	
	δ_H multiplicité (*J*)	**δ_C**	**δ_H multiplicité (*J*)**	**δ_C**
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
Apigénine				
2	-	166,9	-	164,3
3	6,65 s	103,7	6,79 s	102,5
4	-	184,4	-	182,3
5	-	154,1	-	152,5
6	-	134,3	-	132,5
7	-	157,7	-	156,5
8	6,97 s	95,8	6,95 s	94,2
9	-	154,1	-	152,2
10	-	107,7	-	105,7
1'	-	123,1	-	120,7
2'-6'	7,88 d (8,5Hz)	129,7	7,87 d (8,0Hz)	128,4
3'-5'	6,92 d (8,8 Hz)	117,0	6,89 d (8,0Hz)	116,0
4'	-	162,9	-	161,8
OCH_3	3,89 s	61,5	3,77 s	60,3
glucosyl				
1''	5,20 d (7,5Hz)	101,8	5,15 d (7,3Hz)	99,7
2''	3,61	74,5	3,26	73,0
3''	3,59	77,5	3,33	76,7
4''	3,62	73,1	3,26	72,0
5''	4,03 d (9,4 Hz)	76,6	3,71d (10,7 Hz)	74,1
6''	-	174,0	-	172,4

Composé **PB6b :** Acide chlorogénique



$C_{16}H_{18}O_9$

Masse exacte 354.095085 uma

Poids moléculaire (SM-ESI) $[M-H]^+$ 353,1 uma

Nom: Acide 5-*O*-caféylquinique

Aspect: poudre jaune

Tableau : RMN ^{1}H et ^{13}C de l'acide chlorogénique, et du composé **Pb6b**

	CD_3OD		DMSO-d_6 (Han T., 2006)	
	δ_H multiplicité (*J*)	**δ_C**	**δ_H multiplicité (*J*)**	**δ_C**
	^{1}H	**^{13}C**	**^{1}H**	**^{13}C**
1	-	76,8	-	73,6
2	2,16m-2,02 m	38,4	1,98 d (5,0 Hz*)*	36,5
3	4,18	71,9	3,94	70,9
4	3,72	73,7	3,55 d (4,0 Hz)	70,6
5	5,32 d (3,8 Hz)	72,1	5,08 d (5,0 Hz)	68,3
6	2,20-2,06 m	39,3	1,7-2,1 m	37,2
1'	-	127,8	-	125,6
2'	7,03 d (1,9 Hz)	115,2	7,03 d (2,0 Hz)	114,7
3'	-	146,8	-	145,5
4'	-	149,6	-	148,3
5'	6,77 d (8,2 Hz)	116,5	6,77 d (8 ,0 Hz)	115,7
6'	6,94 d (1,9 Hz)	123,0	6,98 dd (2,0 Hz, 8,0 Hz)	121,2
7'	7,55 d (15,75 Hz)	147,0	7,42 d (16,0 Hz)	144,8
8'	6,29 d (16,1 Hz)	115,3	6,15 d (16,0 Hz)	114,3
9'	-	168,8	-	165,7
COO	-	173,8	-	174,9

Annexe.IV : L'activité Antioxydante

A-IV.1 Activité antioxydante des extraits et des composés isolés de *Marrubium deserti* et du Trolox vis-à-vis du radical DPPH

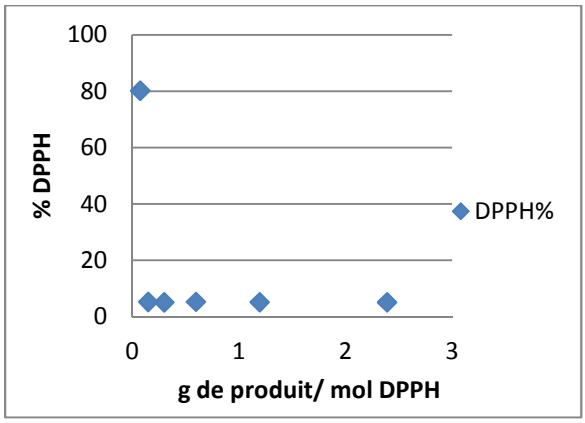


Fig. 1 : activité A.O du Trolox vis-à-vis DPPH DPPH

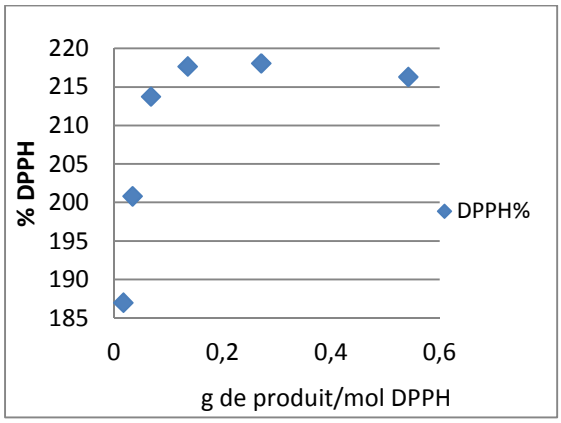


Fig. 2 : Activité A. O du composé **MD13** vis-à-vis DPPH

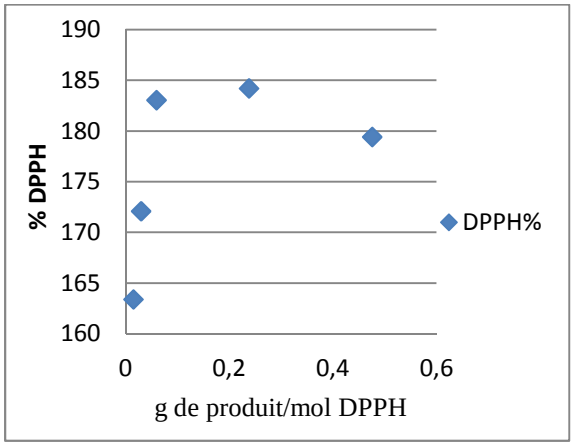


Fig. 3 : Activité du composé **MD9** vis-à-vis DPPH DPPH

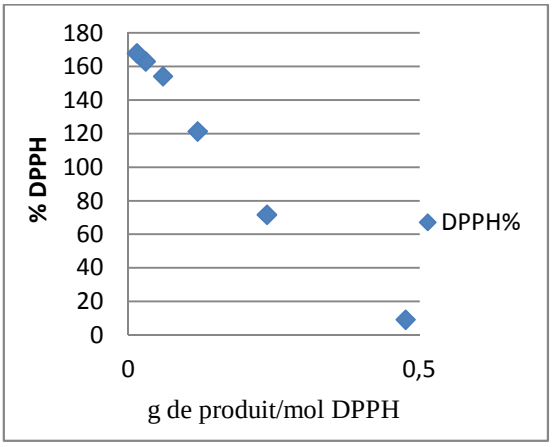


Fig. 4 : activité A. O du composé MD11 vis-à-vis DPPH

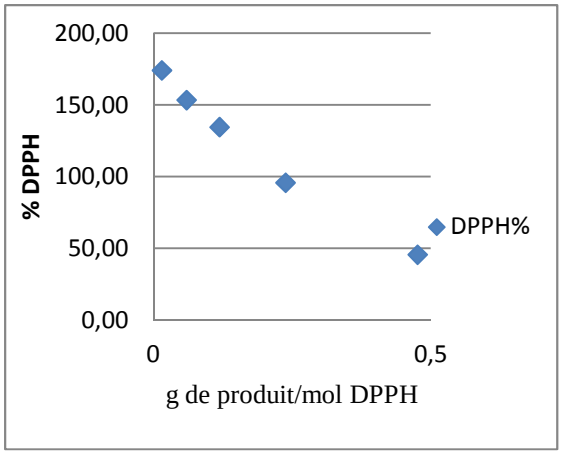


Fig.5 : activité A.O du composé **MD12** vis-à-vis DPPH DPPH

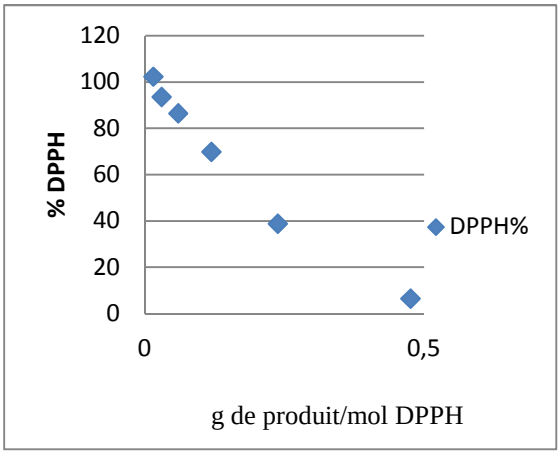


Fig. 6 : activité A. O du composé **MD10** vis-à-vis

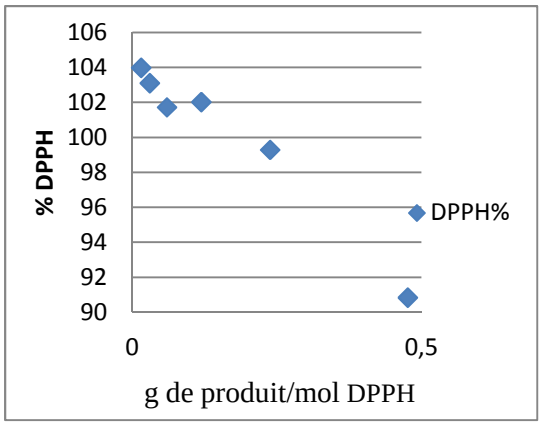


Fig. 7 : activité A.O du composé **MD14** vis-à-vis DPPH

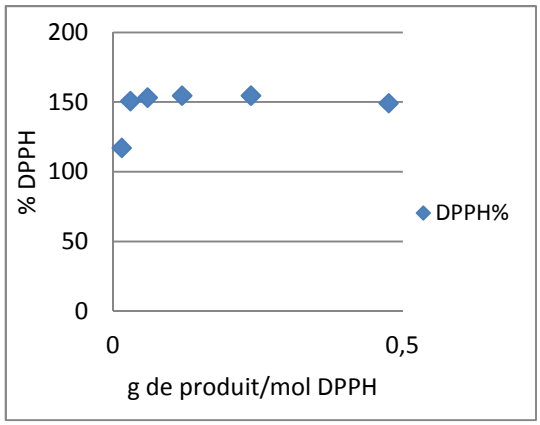


Fig. 8 : activité A.O du composé **MD1** vis-à-vis DPPH

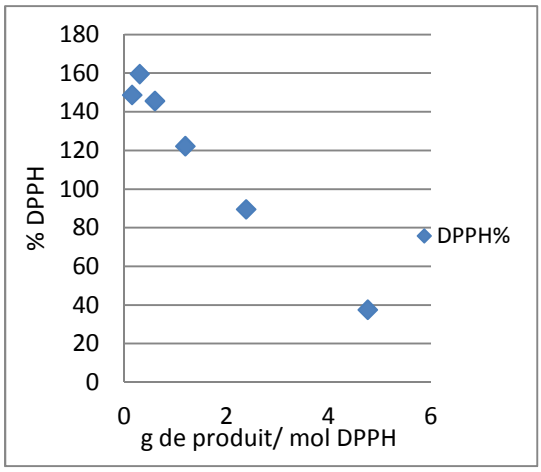


Fig. 9 : activité A.O de la phase **B** vis-à-vis DPPH

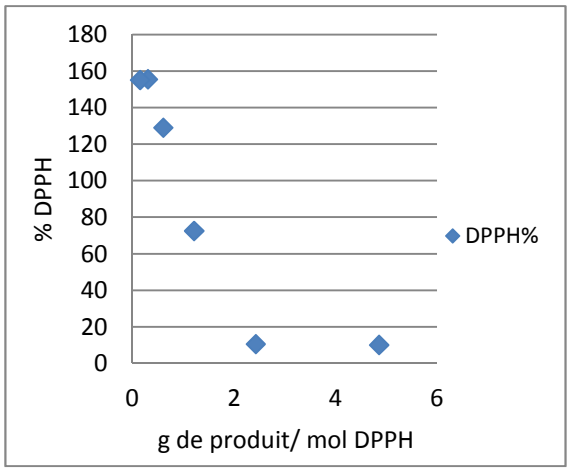


Fig. 10 : activité A.O de l'extrait **A** vis-à-vis DPPH

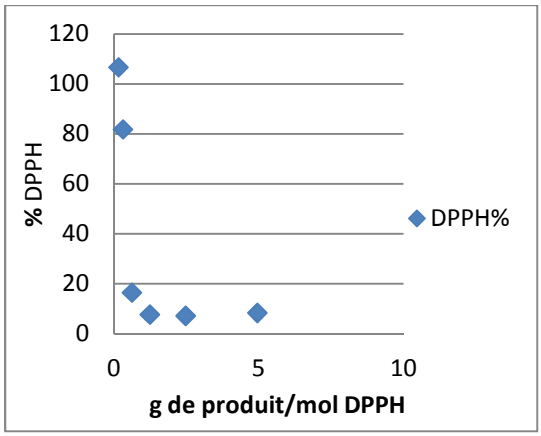


Fig. 11 : activité A.O de la phase **C** vis-à-vis DPPH

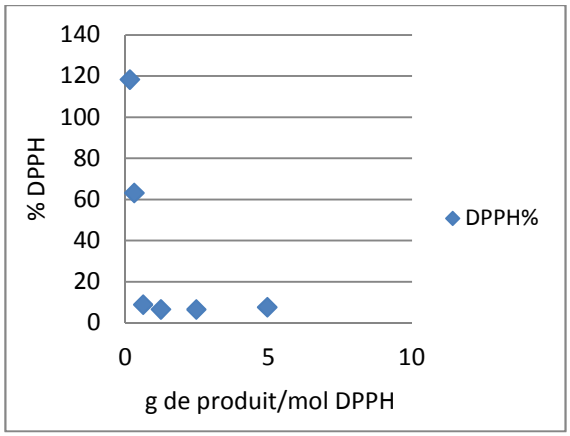


Fig. 12 : activité de la phase **D** vis-à-vis DPPH

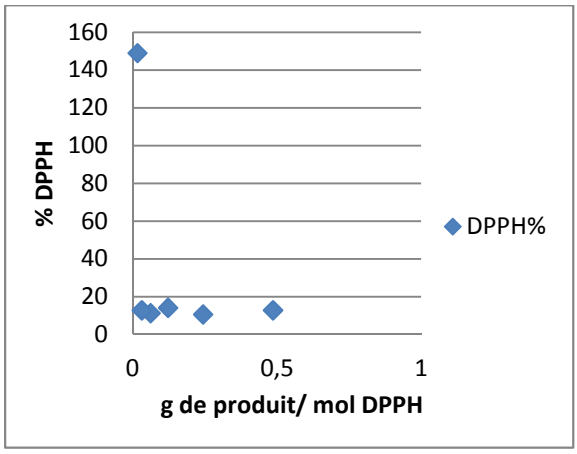


Fig. 13 : activité A.O de l'extrait MeOH vis-à-vis DPPH

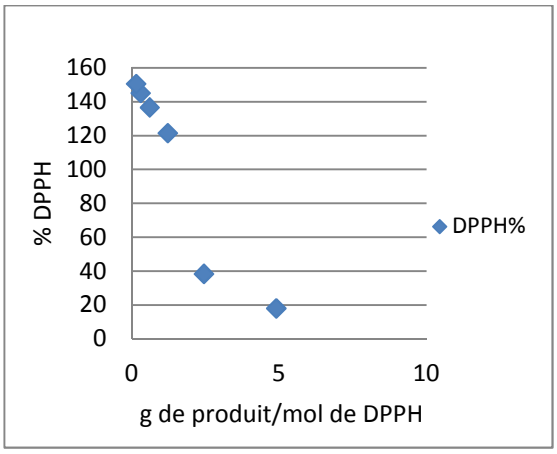


Fig. 14 : activité A.O de la phase E vis-à-vis DPPH

A.IV.2 Activité antioxydante des extraits et des composés isolés de *Phlomis bovei* et du Trolox

vis-à-vis du radical DPPH

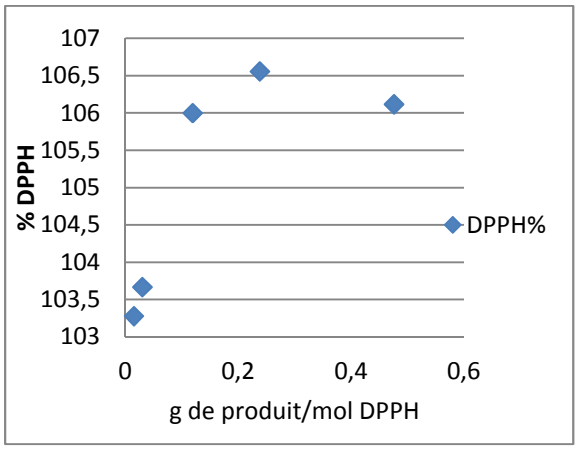


Fig. 15 : activité A.O du Composé **PB1** vis-à-vis DPPH

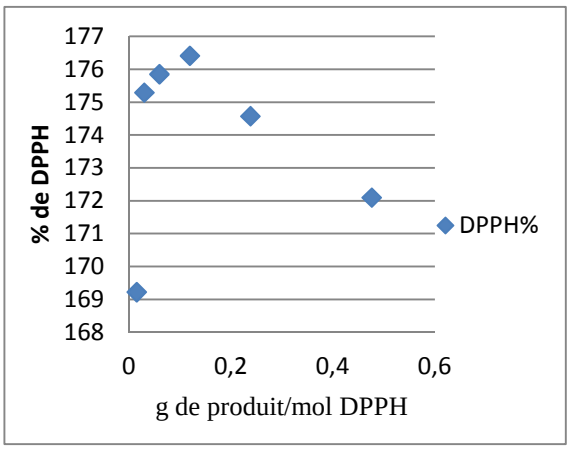


Fig. 16 : activité A.O du Composé **PB5** vis-à-vis DPPH

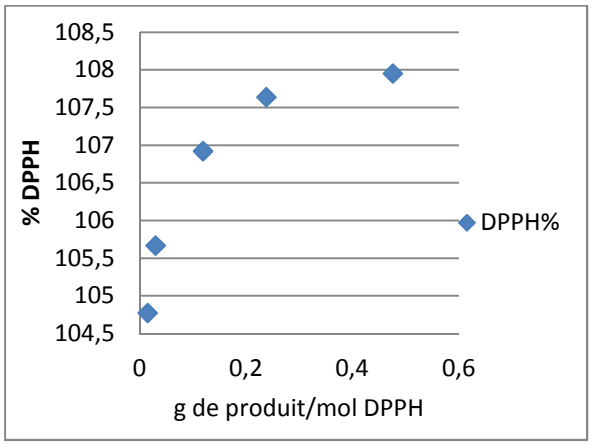


Fig. 17 : activité A.O du Composé **PB3** vis-à-vis DPPH

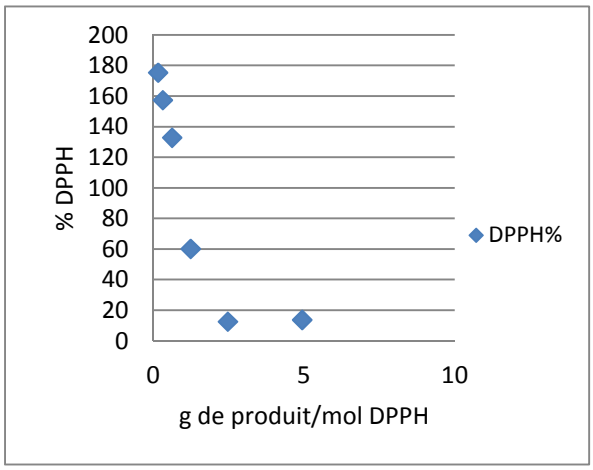


Fig. 18 : activité A.O de l'extrait **H_2O** vis-à-vis DPPH

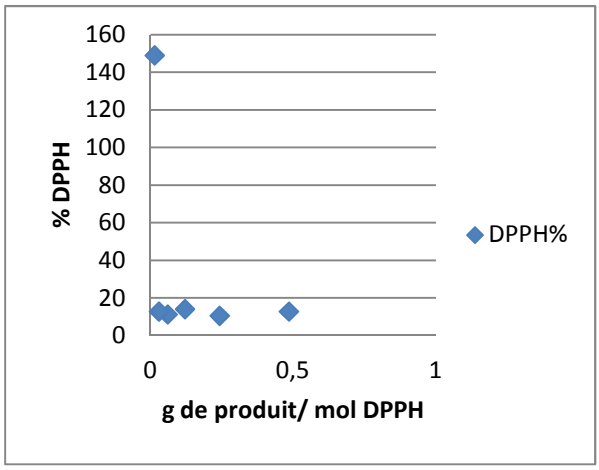


Fig. 19 : activité A.O d e l'extrait **H** vis-à-vis DPPH

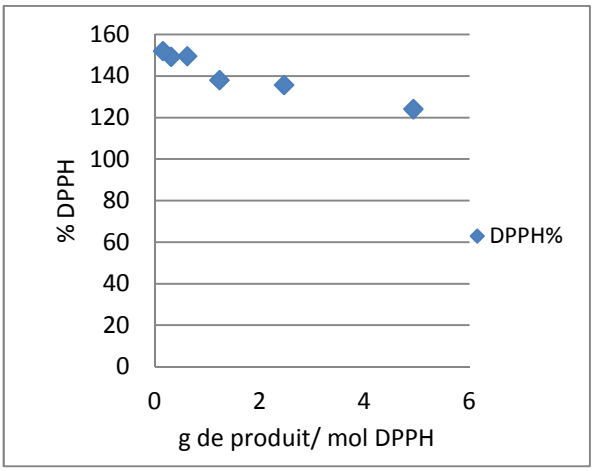


Fig. 20 : activité A.O de l'extrait G vis-à-vis DPPH

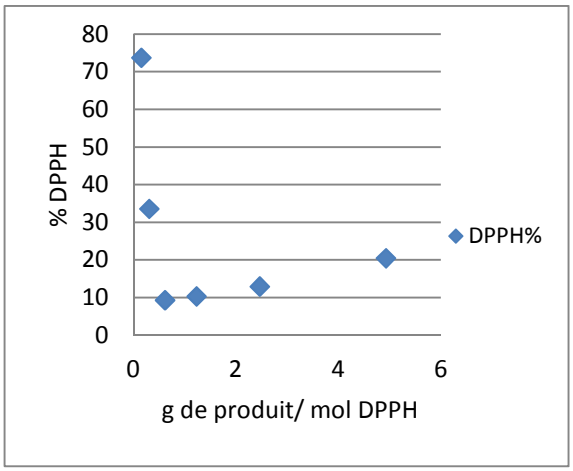


Fig. 21 : activité A.O de l'extrait (MeOH+H2O)

A.VI.3 Activité antioxydante des extraits et des composés isolés de *Marrubium deserti* et du Trolox vis-à-vis du CUPRAC

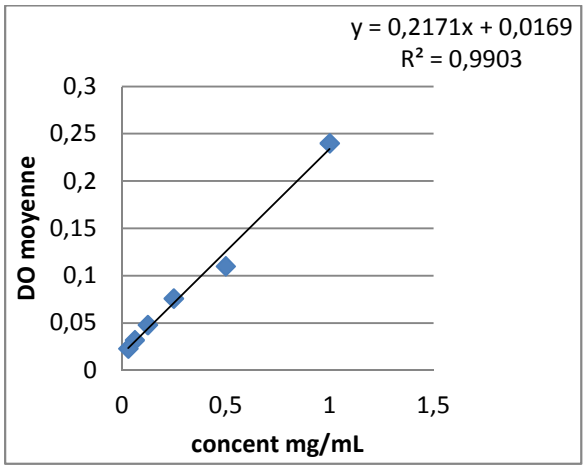


Fig. 22 : activité A.O du **Trolox** vis-à-vis du CUPRAC

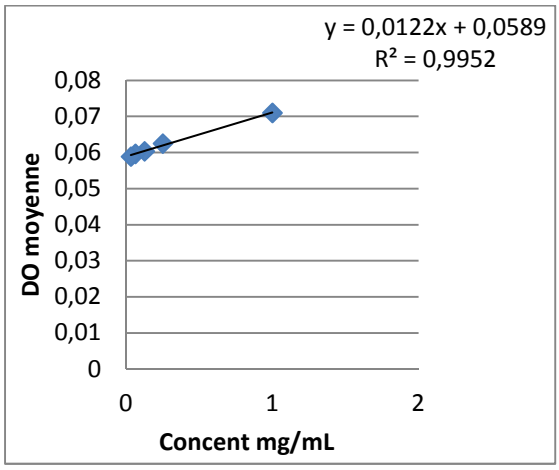


Fig. 23 : activité AO du composé **MD13** vis-à-vis du CUPRAC

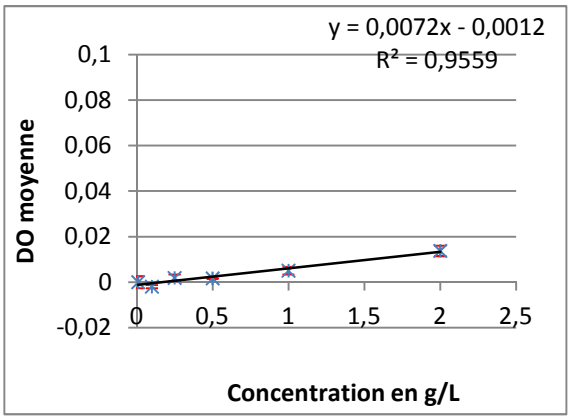


Fig. 23: activité A.O du composé **MD9** vis-à-vis du CUPRAC

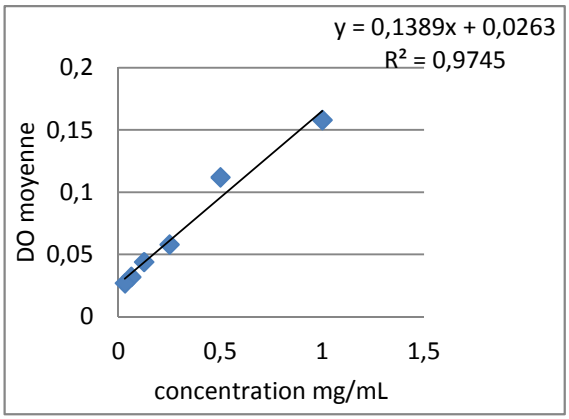


Fig. 24: activité A.O du composé MD12 vis-à-vis CUPRAC

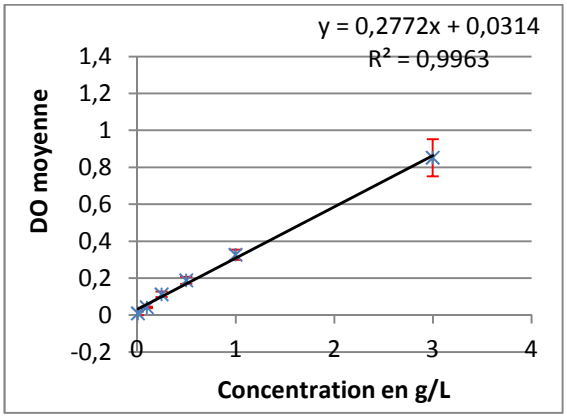


Fig. 25: activité A.O du composé **MD10** vis-à-vis du CUPRAC

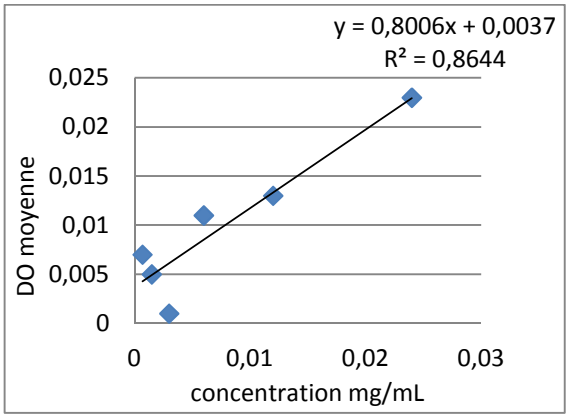


Fig. 26: activité A.O du composé **MD14** vis-àvis du

CUPRAc

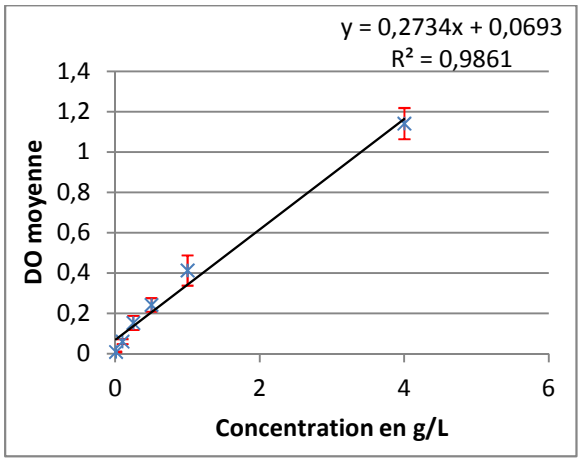


Fig. 27: activité A.O du composé **MD11** vis-à-vis du CUPRAc

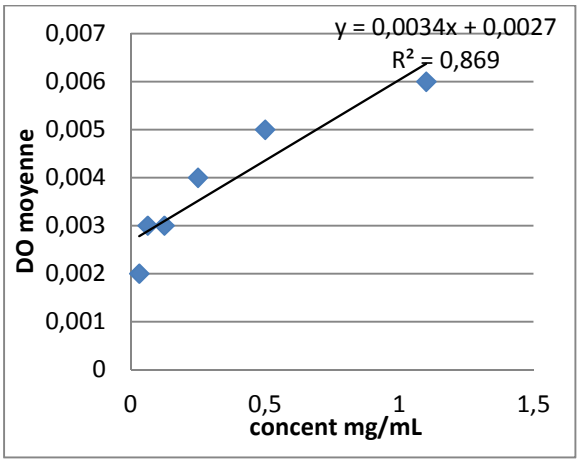


Fig. 28: activité A.O du composé **MD1** vis-à-vis du CUPRAc

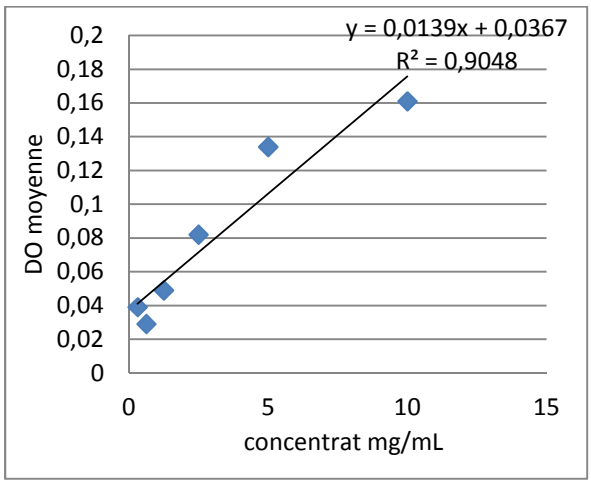


Fig. 29: activité A.O de l'extrait **A** vis-à-vis du CUPRAc

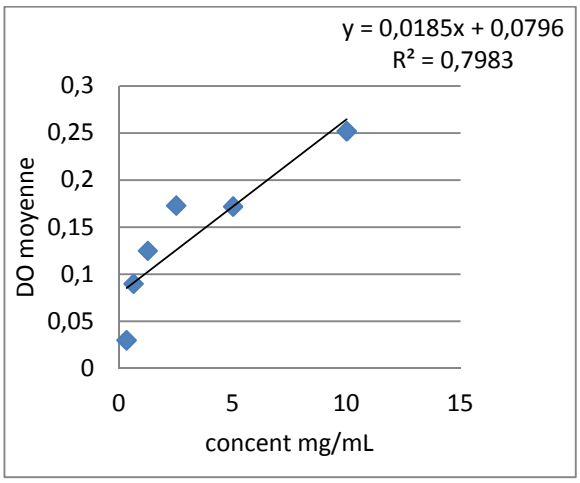


Fig. 30: activité A.O de la phase **B** vis-à-vis du CUPRAc

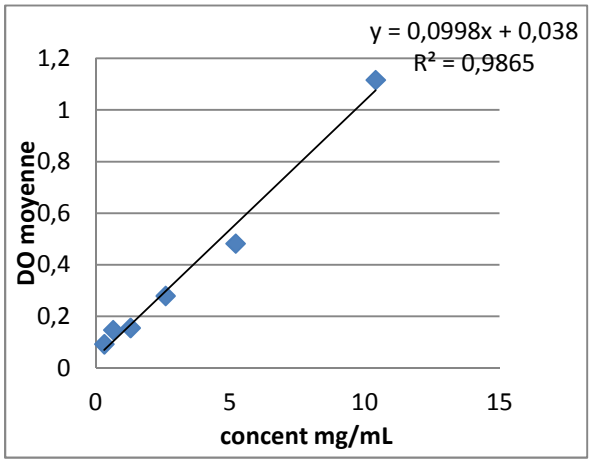


Fig. 31: activité A.O de la phase **C** vis-à-vis du CUPRAc

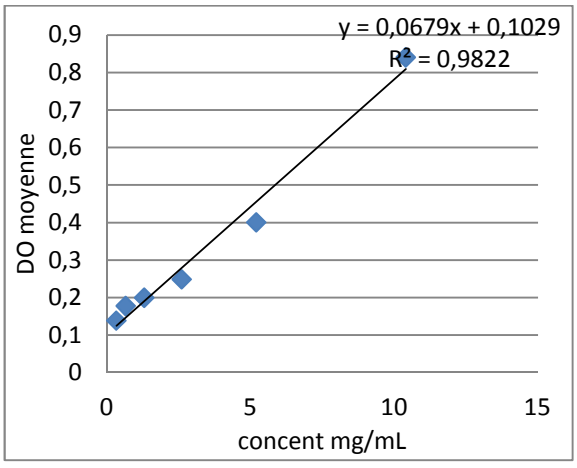
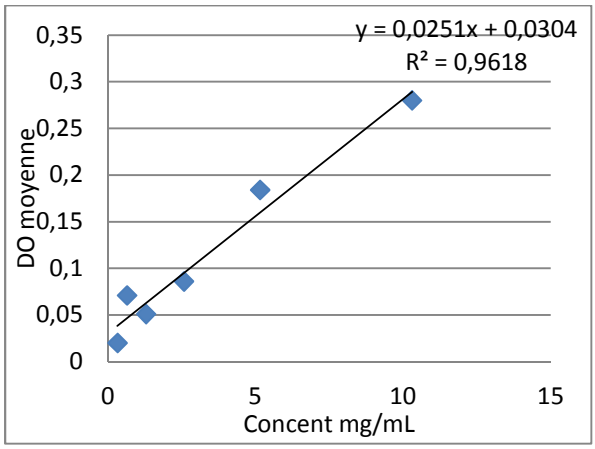


Fig. 32: activité A.O de la phase **D** vis-à-vis du CUPRAc



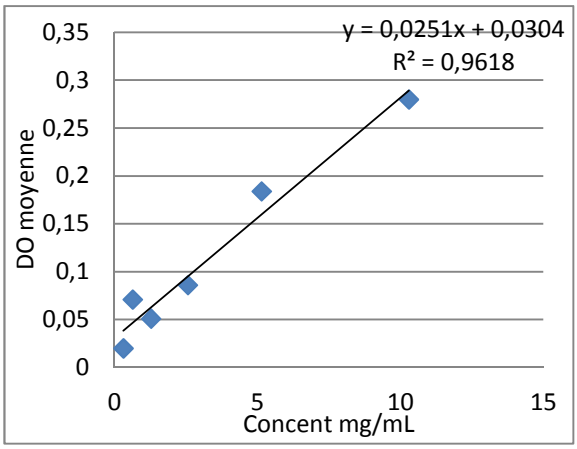


Fig. 33: activité A.O de l'extrait MeOH vis-à-vis du CUPRAC **Fig. 34**: activité A.O de la phase E vis-à-vis du CUPRAC

A.VI.4 Activité antioxydante des extraits et des composés isolés de *Phlomis Bovei* et du Trolox vis-à-vis du CUPRAC

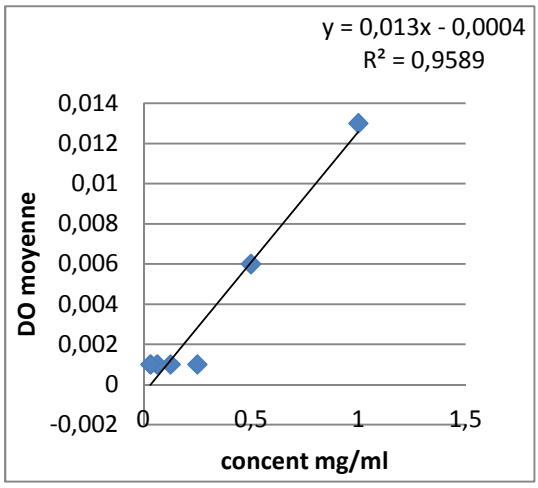


Fig. 35: activité A.O du composé **PB5** vis-à-vis du CUPRAC

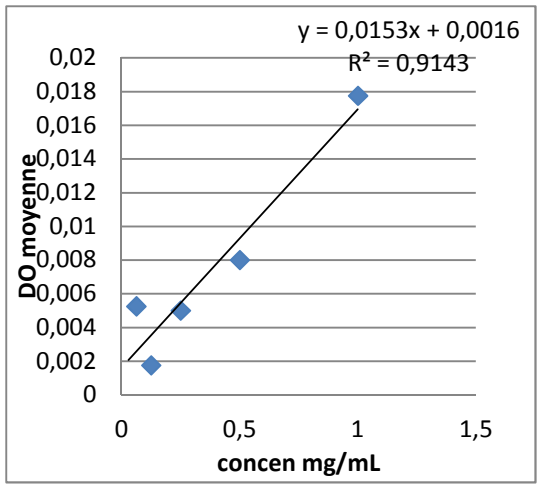


Fig. 36: activité A.O du composé **PB1** vis-à-vis du CUPRAC

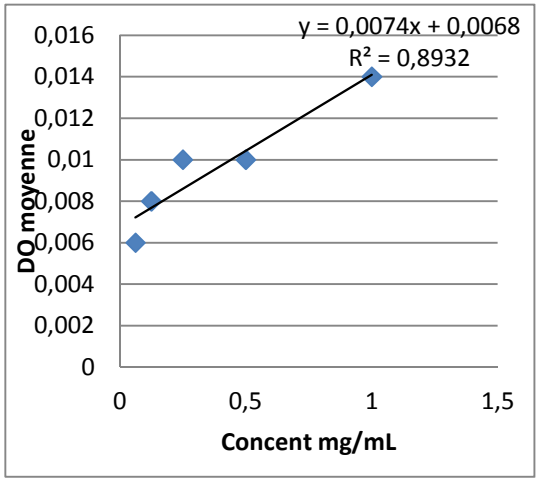


Fig. 37: activité A.O du composé **PB3** vis-à-vis du CUPRAC

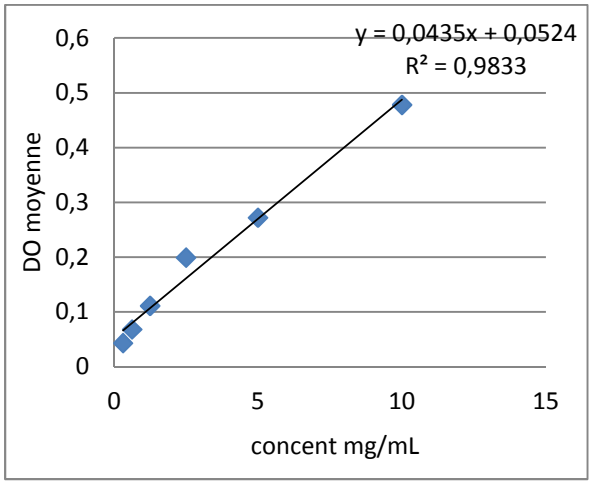


Fig. 38: activité A.O de l'extrait H2O vis-à-vis du CUPRAC

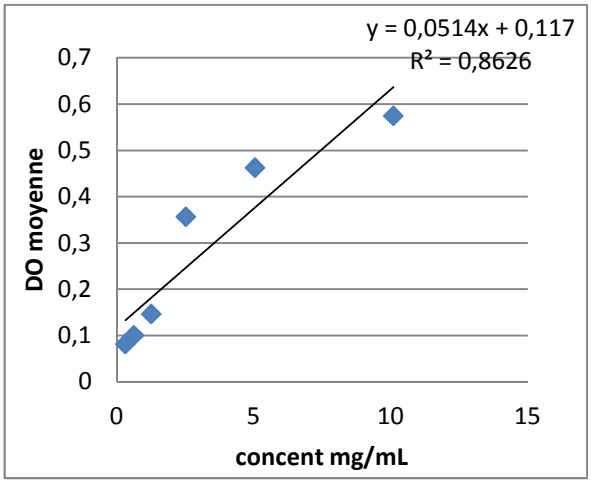


Fig. 39: activité A.O de l'extrait (MeOH+H2O) vis-à-vis du CUPRAC

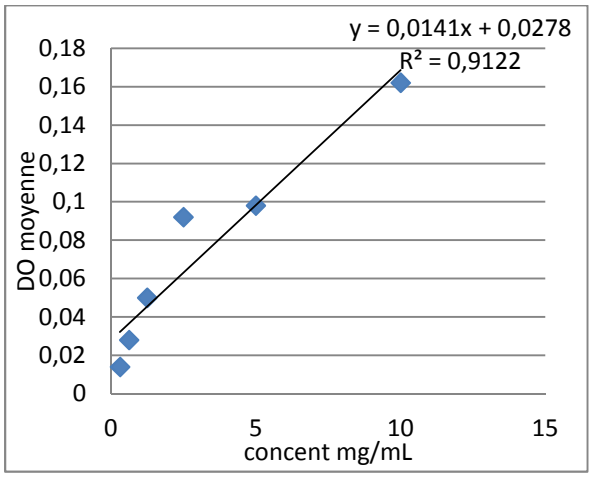


Fig. 40: activité A.O de l'extrait **G** vis-à-vis du CUPRAC

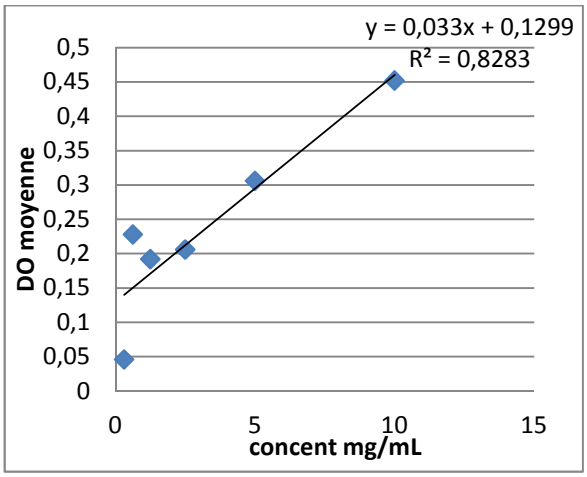


Fig. 41: activité A.O de l'extrait **H** vis-à-vis du CUPRAC

A-VI.5 Activités antioxydantes enregistrées dans le test ABTS pour les composés et les extraits de *Marrubium deserti*

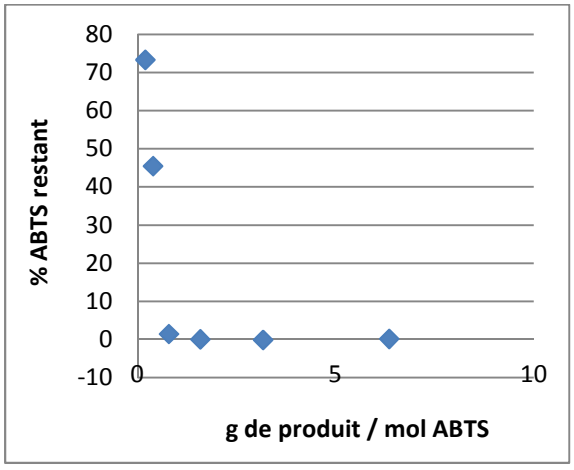


Fig. 42 : Test ABTS pour le Trolox

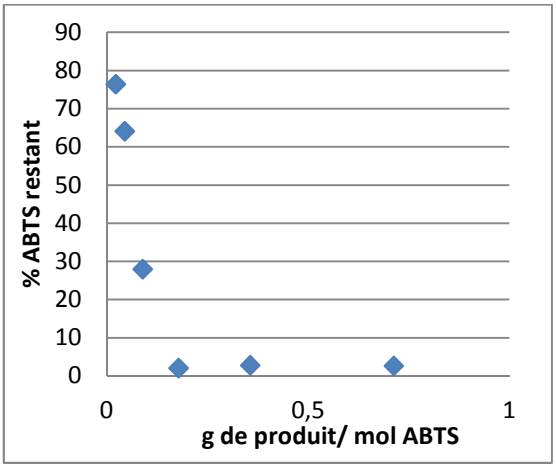


Fig. 43 : Test ABTS pour le composé **MD10**

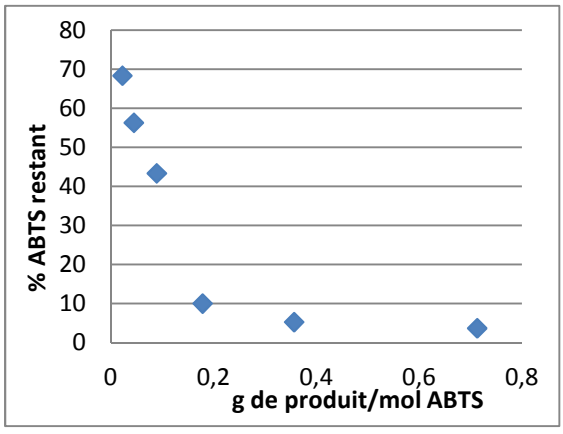


Fig. 44 : test ABTS pour le composé MD11

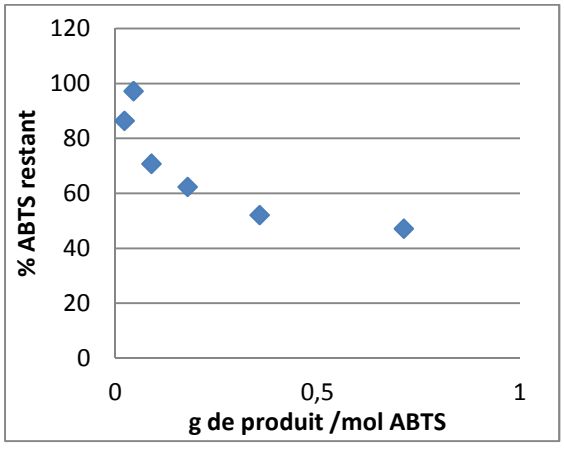


Fig. 45 : test ABTS pour le composé MD14

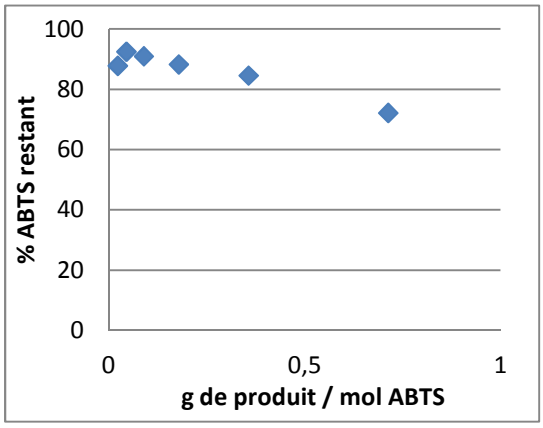


Fig. 46 : test ABTS pour le composé **MD9**

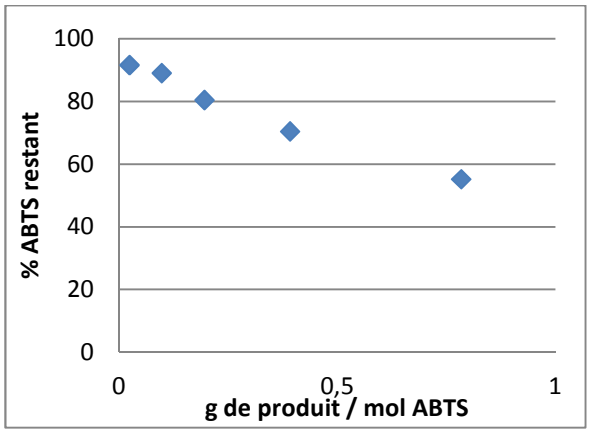


Fig. 47 : test ABTS pour le composé **MD13**

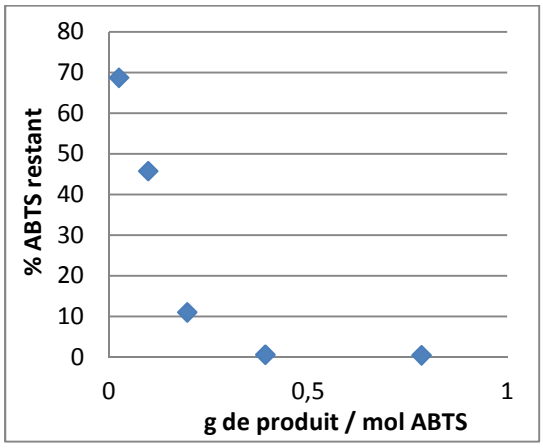


Fig. 48 : test ABTS pour le composé **MD12**

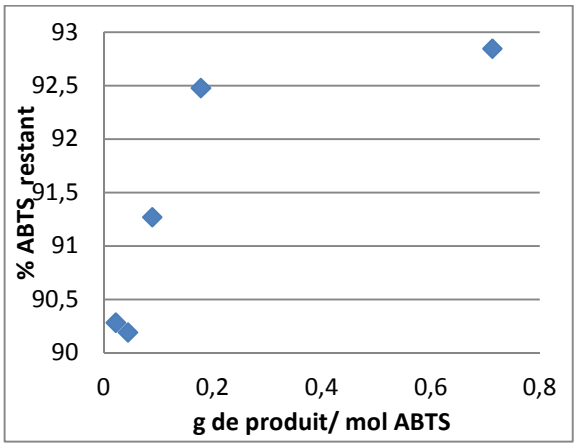


Fig. 49 : test ABTS pour le composé **MD1**

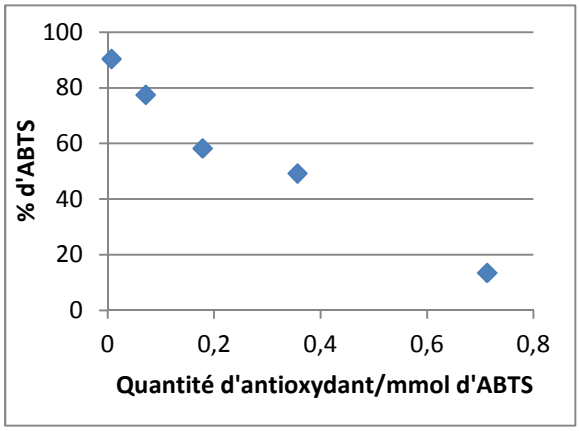


Fig. 50 : test ABTS pour la rutine

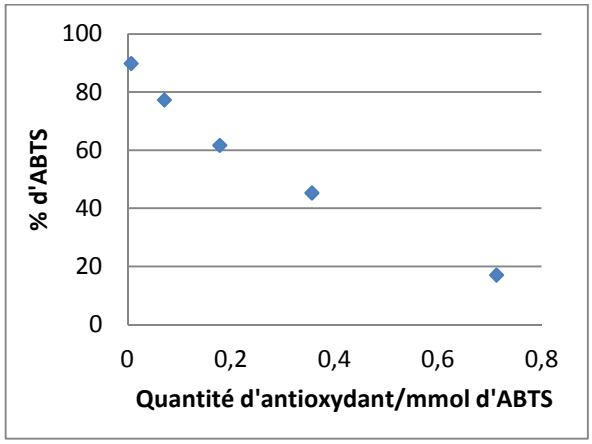


Fig. 51 : test ABTS pour la Phase C

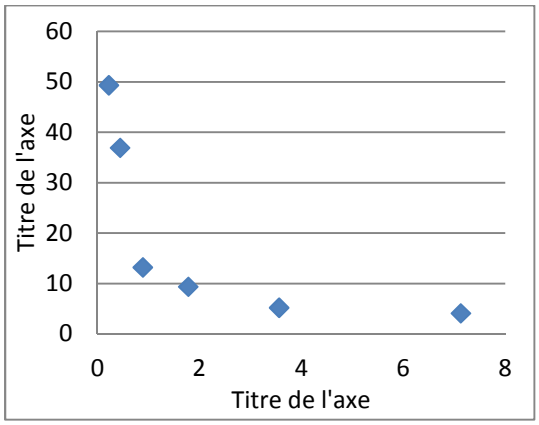


Fig. 52 : test ABTS pour la phase **B**

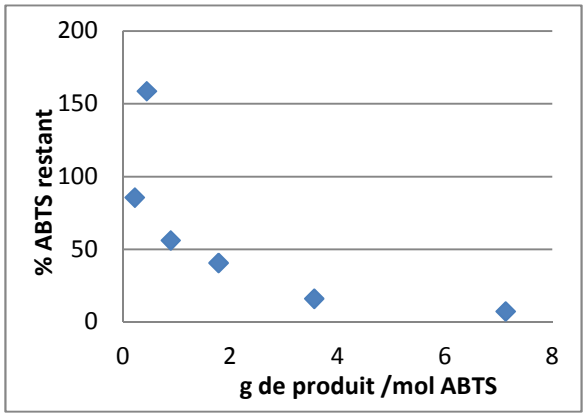


Fig. 53 : test ABTS pour l'extrait A

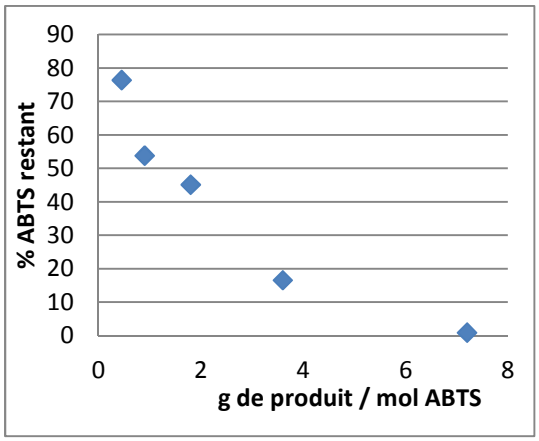


Fig. 54 : Test ABTS pour la phase E

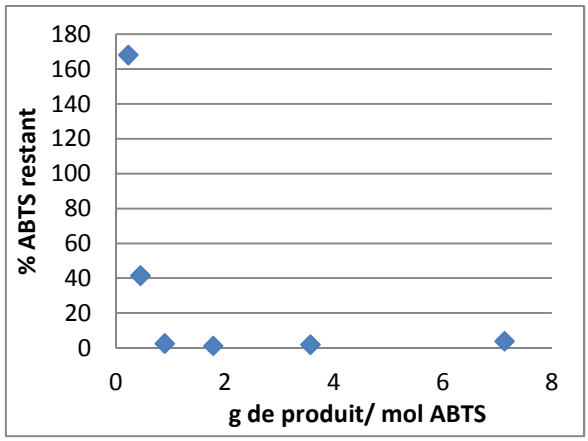


Fig. 55 : Test ABTS pour l'extrait MeOH

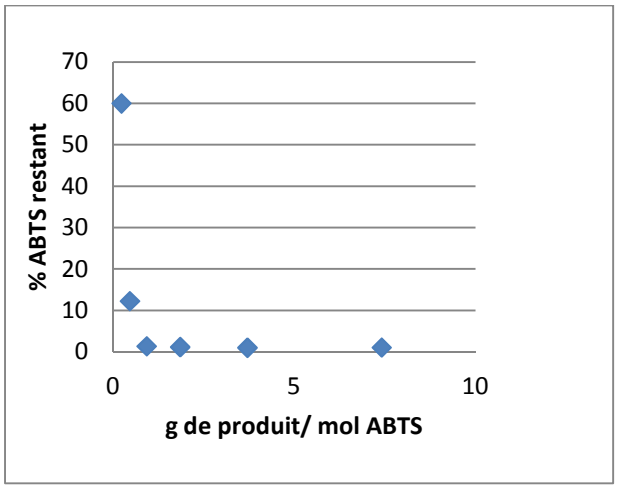


Fig.56 : Test ABTS pour la phaseD

A.VI.6 Activités antioxydantes enregistrées dans le test 'ABTS pour les composés et les extraits de *Phlomis Bovei*

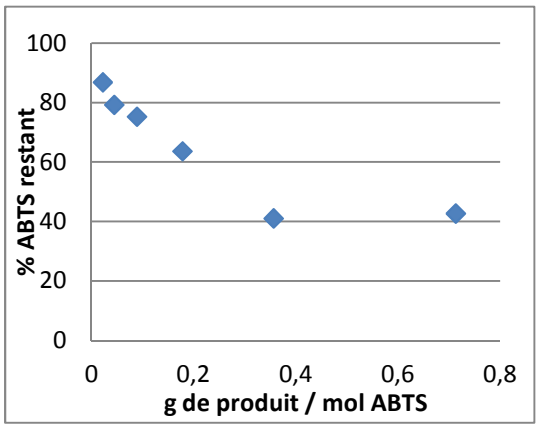


Fig.66 : test ABTS pour le composé **PB5**

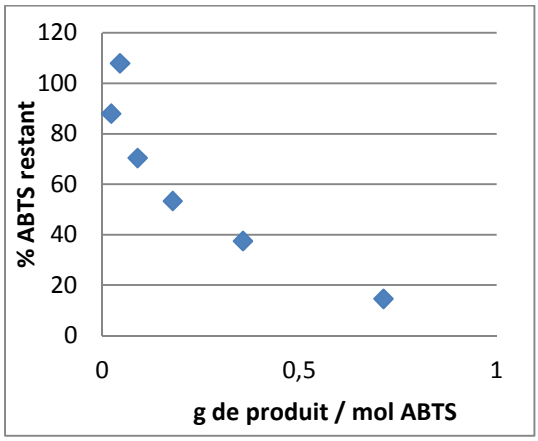


Fig.67 : Test ABTS pour le composé **PB6**

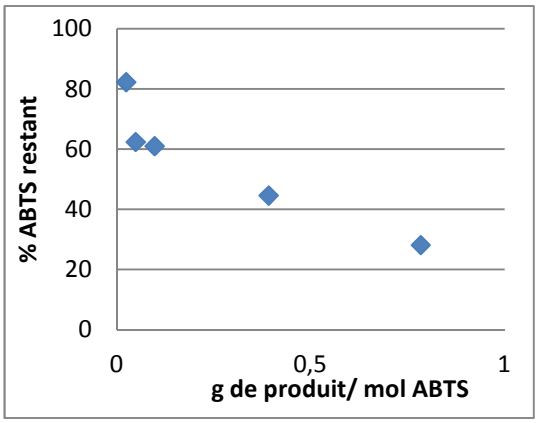


Fig.68 : test ABTS pour le composé **PB1**

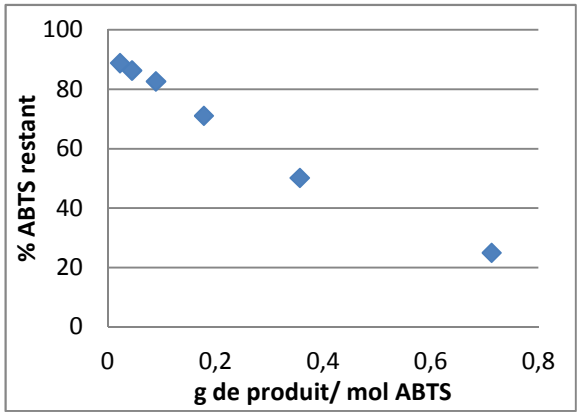


Fig. 69 : test ABTS pour le composé **PB3**

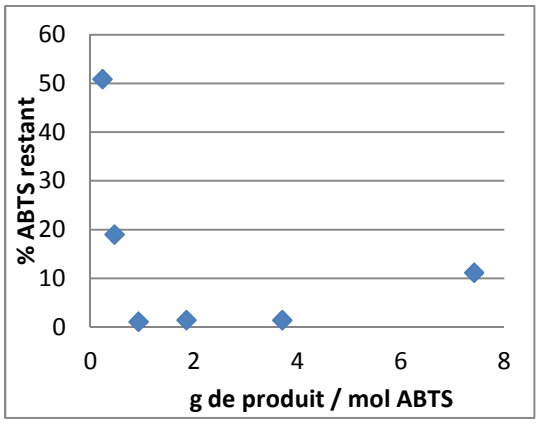


Fig. 70 : Test ABTS pour l'extrait H

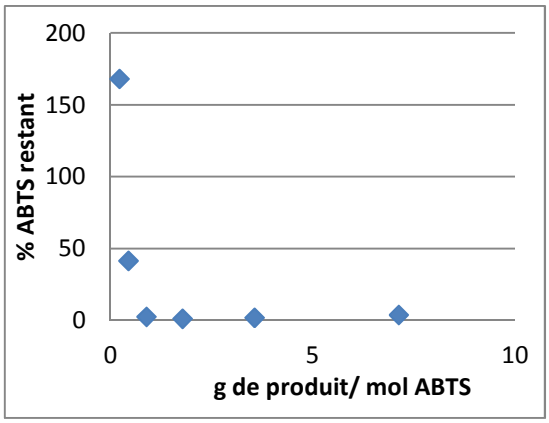


Fig. 71 : Test ABTS pour l'extrait H2O

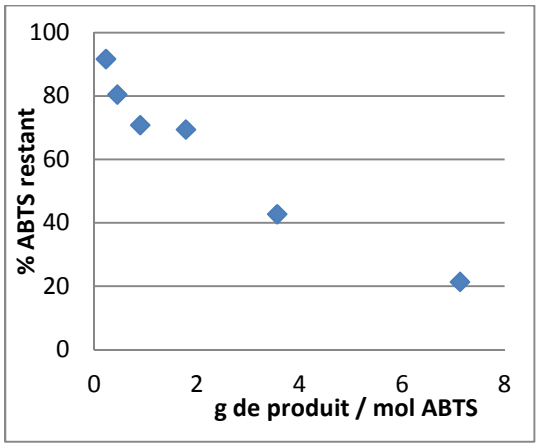


Fig. 72 : test ABTS pour l'extrait G

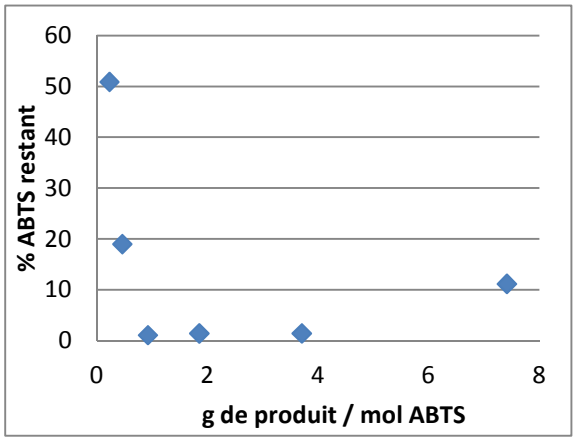


Fig. 73 : Test ABTS pour l'extrait (MeOH+H_2O)

V. Références

A

Ahmad V. U., Ali Z., Zahid M., Alam N., Saba N., Khan T., Qaisar M., Nisar M., 2000. Phytochemical study of *Salvia moorcroftiana*. *Fitoterapia*, 71, 84-85.

Ahmad V. U., Farooq U., Hussain J., Ullaf F., Ahmad N. S., Choudhary M. I., 2004. Two New Diterpenoids from *Ballota limbata*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 52(4), 441-443.

Amado N. G., Cerqueira D. M., Menezes F. S., da Silva J. F., Neto V. M., Abreu J. G., 2009. Isoquercitrin isolated from *Hyptis 270asciculate* reduces glioblastoma cell proliferation and changes beta-catenin cellular localization. *Anticancer Drugs*, 20(7), 543-52.

Al-Ansari M. A., Nawwar M. A., Saleh N. A. M., 1995. Stachysetine, a diapigenin-7-glucoside-p, p'-dihydroxy-truxinate from Stachys Aegyptiaca. Phytochemistry, 40(5), 1543-1548.

Amer M. E., Abou-Shoer M. I., Abdel-Kader M. S., El-Shaibani A. M. S., Abdel-Salem N. A., 2004. Alkaloids and 270ascicul acyl glycosides from *Acanthus arboreus*. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 15 (2), 262-266.

Aoyagi Y., Takahashi Y., Satake Y., Takeya K., Aiyama R., Matsuzaki T., Hashimoto S., Kurihara T., 2006. Cytotoxicity of abietane diterpenoids from *Perovskia abrotanoides* and of their semisynthetic analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14(15), 5285-5291.

Aoyagi Y., Yamazaki A., Nakatsugawa C., Fukaya H., Takeya K., Kawauchi S., Izumi H., 2008. Salvileucalin B, A Novel Diterpenoid with an Unprecedented Rearranged Neoclerodane Skeleton from *Salvia leucantha* Cav. *Organic letters*, 10(20), 4429-4432.

B

Badmaev V., Majeed M., Conte A. A., Parker J. E., 2002. Sabinsa Corporation, Piscataway, USA. *Nutracos,* 1(2), 6-7

Bakir M., Biggs D. A. C., Lough A., Mulder W. H., Reynolds W., Porter R. B., 2006. 7-Acetyl-12-methoxyhorminone from Jamaican *Hyptis verticillata* (*Labiatae*). *Acta Crystallographica*, Section E: Structure Reports Online, E 62(1), 306-308.

Bedir E., Manyama R., Khana I. A., 2003. Neo-clerodane diterpenoids and phenylethanoid glycosides from *Teucrium chamaedrys* L. *Phytochemistry*, 63, 977–983.

Bruno M., Rosselli S., Maggio A., Piozzi F., Scaglioni L., Servettaz O., 2004. Scuteparvin, a new neoclerodane diterpenoid from *Scutellaria parvula*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32, 755–759.

Bruno M., Piozzi F., Apostolides A., N., Baser K., Huesnue C., Tabanca N., Kirimer N., 2005. Kaurane diterpenoids from three *Sideritis species*. *Turkish Journal of Chemistry*, 29(1), 61-64.

C

Çalis I., Hosny M., Khalifa T., Raedis P., 1992. Phenylpropanoid glycosides from Marrubium alysson, Phytochemistry, 31(10), 3624 -3626.

Carbonell P., Coll J., 2001. Ajugatansins, neo-clerodane Diterpenes from *Ajuga reptans*, *Phytochemical Analysis* , 12, 73–78.

Chang J., Xu J., Li M., Zhao M., Ding J., Zhang J-S., 2005. Novel cytotoxic seco-abietane rearranged diterpenoids from *Salvia prionitis*. *Planta Medica*, 71(9), 861-866.

Coll J., Tandro´ n Y., 2004. Neo-clerodane diterpenes from *Teucrium fruticans*. *Phytochemistry*, 65, 387–392.

Coll J., Tandrón Y., 2005. Isolation and Identification of neo-Clerodane Diterpenes from *Ajuga remota* by Highperformance Liquid Chromatography, *Phytochemical Analysis*, 16, 61–67.

Chen X., Ding J., Ye Y.-M., Zhang J.-S., 2002. Bioactive Abietane and seco-Abietane Diterpenoids from *Salvia prionitis*, *Journal of Natural Product*, 65, 1016-1020.

D

Delazar A., Modarresi M., Shoeb M., Nahar L., Reid R. G., Kumarasamy Y., Majinda R. R. T., Sarker S. D., 2006. Eremostachiin: a new furanolabdane diterpene glycoside from *Eremostachys glabra*, *Natural Product Research*, 20(2), 167-172.

Delazar A., Modarresi M., Nazemiyeh H., Fathi-Azad F., Nahar L., Sarker S. D., 2008. Furanolabdane diterpene glycosides from *Eremostachys laciniata*, *Natural Product Communications*, 3(6), 873-876.

Delazar A., Celik S., Gokturk R. S., Unal O., Nahar L., Sarker S. D., 2005. Two acylated flavonoid glycosides from *Stachys bombycina*, and their free radical scavenging activity. *Pharmazie,* 60(11), 878-880.

De Albuquerque R. L., Kentopff M. R., Machado M. I. L., Silva M. G. V., Matos F. J., Morais S. M., Braz-Filho R. 2007. Abietane diterpenoids isolated from *Plectranthus barbatus* Andrews. *Quimica Nova*, 30(8),1882-1886

da Cruz Arau´ jo E. C., Lima M. A. S., Montenegro R. C., Nogueira M., Costa-Lotufo L. V., Pessoa C., de Moraes M. O., Silveira E. R., 2006. Cytotoxic Abietane Diterpenes from *Hyptis martiusii* Benth*, journal of biosciences*, 61(3/4), 177-183.

Dou H., Liaoa X., Peng S. L., Panb Y.-J., Ding L.-S., 2003. Chemical Constituents from the Roots of *Schnabelia tetradonta*. *Helvetica Chimica Acta*, 86 (8), 2797-2804.

Dou H., Peng S. L., Li B.-J., Luo S.-Z., Ding L.-S., 2004. Two new diterpenoids from the roots of *Schnabelia tetradonta*. *Chinese Journal of Organic Chemistry*, 24(11), 1469-1471.

E

Ertas A. I., Oztürk M., Bog˘a M., and Gu¨lac¸tı Topc¸u.,2009. Antioxidant and Anticholinesterase Activity Evaluation of ent-Kaurane Diterpenoids from *Sideritis arguta. Journal of Natural Products*, 72, 500–502.

Esquivel B., Flores E. A. 2001. A new neo-clerodane diterpenoid from *Salvia gesnerae* flora (*Labiatae*). *Heterocycles*, 55(3), 505-509.

F

Fecka I.,Turek S., 2007. Determination of Water-Soluble Polyphenolic Compounds in Commercial Herbal Teas from *Lamiaceae* : Peppermint, Melissa, and Sage. *Journal of agricultural and food chemistry,* 55 (26), 10908-10917.

Fiorentino A., D'Abrosca B., Ricci A., Pacifico S., Piccolella S., Monaco P., 2009. Structure determination of chamaedryosides A – C, three novel nor-neo-clerodane glucosides from *Teucrium chamaedrys*, by NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 47, 1007–1012.

G

Giang P .M., Son P. T., Matsunami K., Otsuka H., 2005. New labdane-type diterpenoids from Leonurus heterophyllus Sw. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 53(8), 938-941.

Gomez C. V., Martinez-Vazquez M., Esquivel B., 2009. Antifeedant activity of anticopalic acid isolated from *Vitex hemsleyi*. *Journal of Biosciences*, 64(7/8), 502-508.

Gohari A. R., Saeidnia S., Gohari M. R., Moradi-Afrapoli F., Malmir M., Hadjiakhoondi A., 2009. Bioactive flavonoids from *Satureja atropatana* Bonge. *Natural Product Research*, 23(17), 1609-1614.

Grace M. H., Cheng D. M., Raskin I., Lila M. A., 2008. Neo-clerodane diterpenes from *Ajuga turkestanica. Phytochemistry Letters*, 1(2), 81-84.

Guvenalp Z., Ozbek H., Unsalar T., Kazaz C., Demirezer L. O., 2006. Iridoid, flavonoid, and phenylethanoid glycosides from *Wiedemannia orientalis. Turkish Journal of Chemistry*, 30(3), 391-400.

H

Han T., Li H., Zhang Q., Zheng H., Qin L., 2006. NEW THIAZINEDIONES AND OTHER COMPONENTS from Xanthium strumarium. *Chemistry of Natural Compounds***, 42 (5), 567-570.**

Han Q.-B., Cheung S., Tai J., Qiao C.-F., Song J.-Z., Tso T.-F., Sun H.-D., Xu H.-X., 2006. Maoecrystal Z, a Cytotoxic Diterpene from Isodon eriocalyx with a Unique Skeleton. Organic Letters, 8 (21), 4727-4730.

Harding W. W., Tidgewell K., Schmidt M., Shah K., Dersch C. M., Snyder J., Parrish D., Deschamps J. R., Rothman R. B., Prisinzano T. E., 2005. Salvinicins A and B, New Neoclerodane Diterpens from *Salvia divinorum*. *Organics Letters*, 7(14), 3017-3020.

Hase T., Ohtani K., Kasai R., Yamasaki K., Picheansoonthon C., 1995. Revised structure for Hortensin, A flavonoid from *Millingtonia hortensis*. *Phytochemistry*, 40(1), 287-290.

Hennebelle T., Sahpaz S., Skaltsounis A. L., Bailleul F, Phenolic compounds and diterpenoids from *Marrubium peregrinum* , *Biochemical Systematics and Ecology*, 35(9), 2007, 624-626.

Hooper S. N., Jurgens T., Chandler R. F., Sevens M. F. G., 1984. Methyl p-coumarate : A cytotoxic constituent from *Comptonia peregrine*. *Phytochemirstry*, 23(9), 2096-2097.

Hu Y., Shen Y., Gan F., Hao X., 2002. Four diterpenes from Callicarpa pedunculata. *Biochemical Systematics and Ecology,* 30(10), 999-1001.

Hussein A. A., Meyer M. J. J., Rodriguez B., 2003. Spectral Assignments and reference data. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 41, 147-151.

Hussain J., Ullaha F., Hussain H. Hussain S. T., Shahc M. R., 2008. Nepetolide: A New Diterpene from *Nepeta suavis*, *Z. Naturforsch*. 63b, 591 – 594.

I

Ibrahim S. A., Ali M. S., 2007. Constituents of *Nepeta crassifolia* (*Lamiaceae*). *Turkish Journal of Chemistry*, 31(4), 463-470.

Isobe T., Doe M., Morimotor Y., Nagata K., Ohsaki A., 2006. The Anti-Helicobacter pylori Flavones in a Brazilian Plant, *Hyptis 273asciculate*, and the Activity of Methoxyflavones. *Biochemical and Pharmaceutical Bulletin*, 29(5), 1039-1041.

Itokawa H., Sudo K., Takeya K., 1981. Studies on a novel p-Coumaroyl glucoside of apigenin and other flavonoids isolated from Patchouli (*labiatae*). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 29 (1), 254-256.

J

Jamal A. K., Yaacob W. A., Din L. B., 2009. A chemical study on *Phyllanthus columnaris. European Journal of Scientific Research, 28(1),* 76-81.

K

Kabouche A., Kabouche Z., O¨ ztu¨rk M., Kolak U., Topcu G., 2007. Antioxidant abietane diterpenoids from *Salvia barrelieri*. *Food Chemistry*, 102, 1281–1287.

Kawahara N., Inoue M., Kawai K.-I, Sekita S., Satake M., Goda Y., 2003. Diterpenoid from *Salvia greggii*. *Phytochemistry*, 63, 859–862.

Kotsos M. P., Aligiannis N., Mitakou S., 2007. A new flavonoid diglycoside and triterpenoids from *Stachys spinosa* L. (*Lamiaceae*). *Biochemical Systematics and Ecology*, 35, 381-385.

Kubo I., Xu Y., Shimizu K., 2004. Antibacterial Activity of ent-Kaurene diterpenoids from *Rabdosia rosthornii. Phytotherapy Research*, 18, 180–183.

Ko W. G., Kang T. H., Lee S. J., Kim Y. C., Lee B. H., 2001. Rotundifuran , a labdane type diterpene from *Vitex rotundifolia*, induces apoptosis in human myeloid leukaemia cells. *Phytotherapy Research,* 15(6), 535-537.

Kwon J. H., Chang M. J., Seo H. W., Lee J. H., Min B. S., Na M., Kim J. C., Woo M. H., Choi J. H., Lee H. K., Bae K. H., 2008. Triterpenoids and a sterol from the Stem-back of Styrax jabonica and their protein Tyrosine Phosphatase 1B inhibitory activities. Phytotherapy Research, 22, 1303-1306.

L

Li B-L., Pan Y-J., Yu K-B., 2002. Taibaihenryiin C, a diterpenoid with a novel skeleton from *Isodon henryi. Tetrahedron Letters*, 43, 3845–3847

Liu H.-Y., He H.-P., Gao S., Chen C.-X., Shen Y.-M., Hao X.-J., 2006. Two New Diterpenoids from *Callicarpa pedunculata*. *Helvetica Chimica Acta*, 89, 1017-1022.

Li L.-M., Weng Z.-Y., Huang S.-X., Pu J.-X., Li S.-H., Huang H., Yang B.-B., Han Y., Xiao W.-L., Li M.-L., Han Q-. B., Sun H.-D., 2007. Cytotoxic ent-Kauranoids from the Medicinal Plant *Isodon xerophilus*, *Journal of Natural Products*, 70, 1295-1301

Li X.-N., Pu J.-X., Du X., Lou L.-G., Li L.-M., Huang S.-X., Zhao B., i Zhang M., He F., Luo X., Xiao W.-L., Sun H.-D., 2010. Structure and Cytotoxicity of Diterpenoids from *Isodon eriocalyx*. *Journal of Natural Products*, 73 (11), 1803-1809.

Lu Y., Foo L. Y., 2000. Flavonoid and phenolic glycosides from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry*, 55, 263–267.

M

Marquina S., Garcia Y., Alvarez L., Tortoriello J., 2008. 3-Acetoxy-7-methoxyflavone, a novel flavonoid from the anxiolytic extract of *Salvia elegans* (*Lamiaceae*). *Natural Product Communications*, 3(2), 185-188.

Marin P. D., Veitch N. C., Grayer J. R., Kite G. C., Sokovic M., Janackovic P., 2007. Flavonoids from *Phlomis fruticosa* (*Lamiaceae*) growing in Montenegro. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35, 462-466.

Marsan M. P., Warnock W., Muller I., Nakatani Y., Ourisson G., Milon A., 1996. Synthesis of deuterium-Labeled plant sterols and analysis of their Side-Chain mobility by solid state deuterium NMR. *Journal of Organic Chemistry*, 61, 4252-4257.

Medana C., Massolino C., Pazzi M., Baiocchi C., 2006. Determination of salvinorins and divinatorins in Salvia divinorum leaves by liquid chromatography/multistage mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry,* 20 (2), 131–136.

Modnicki D., Tokar M., Klimek B., 2007. Flavonoids and phenolic acids of *Nepeta cataria* L. var. citriodora (Becker) Balb. (*Lamiaceae*). *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 64(3), 247-252.

N

Na Z., Mei S. X., Li C. M., Lin Z. W, Sun H. D., 2001. A New Flavone Glycoside from *Isodon enanderianus*. *Chinese Chemical Letters*, 12 (3), 231-232.

Narukawa Y., Fukui M., Hatano K., Takeda T., 2006. Four new diterpenoids from *Salvia fulgens* Cav. *Journal of Natural Medicines*, 60(1), 58-63.

Nazemiyeh H., Mukhlesur Rhman M., Gibbons S., Nahar L., Delazar A., Ghahramani M, A., Talebpour A. H., Sarker S. D., 2008. Assessment of the antibacterial activity of phenylethanoid glycosides from Phlomis lanceolata against multiple-drug-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Natural Medicines*, 62, 91–95.

Nguyen V. H., Pham V. C., Nguyen T. T. H., Tran V. H., Doan T. M. H., 2009. Novel Antioxidant neo-Clerodane Diterpenoids from Scutellaria barbata. *European Journal of Organic Chemistry*, (33), 5810-5815.

Nguyen T. D., Xuejun J., Jeong-Hyung L., Dongho L., Young-Soo H., Kyeong L., Young H. K., Jung J. L., 2007. Abietane Diterpenes from *Salvia miltiorrhiza* Inhibit the Activation of Hypoxia-Inducible Factor-1, *Journal of Natural Products*, 70, 1093-1097.

Niu X. M., Li S. H., , Na Z., Lin Z. W., Sun H. D., 2004. Two Novel ent-Abietane Diterpenoids from *Isodon xerophilus*, *Helvetica Chimica Acta*, 87, 1951-1957.

Nugroho A., Choi J.-K., Park J.-H., Lee K.-T., Bae C. C., Park H.-J., 2009. Two New Flavonol Glycosides from *Lamium amplexicaule* L. and Their in vitro Free Radical Scavenging and Tyrosinase Inhibitory Activities. *Planta medica,* 75(4), 364-366.

O

Ono M., Yanaka T., Yamamoto M., Ito Y. Nohara T., 2002. New diterpenes and norditerpenes from the fruits of *Vitex rotundifolia*, *Journal of Natural Products*, 65(4), 537-541.

Ono M., Nagasawa Y., Ikeda T., Tsuchihashi R., Okawa M., Kinjo J., Yoshimitsu H., Nohara T., 2009. Three new diterpenoids from the fruit of *Vitex agnus-castus*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 57(10), 1132-1135.

P

Patora J., Klimek B., 2002. Flavonoids from lemon balm (Melissa officinalis., *Lamiaceae*). *Acta Poloniae Pharmaceutica,* 59(2), 139-143.

Phan M. G., Phan T. S., Katsuyoshi M., Hideaki O., 2005. New Bis-spirolabdane-Type Diterpenoids from *Leonurus heterophyllus* SW. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 53 (11), 1475.

Porter R. B. R., Biggs D. A. C., Reynolds W. F., 2009. Abietane diterpenoids from *Hyptis verticillata*. *Natural Product Communications*, 4(1), 15-18.

Pınar Sahin F., Ezer N., Calıs I., 2004. Three acylated flavone glycosides from *Sideritis ozturkii* Aytac & Aksoy. *Phytochemistry*, 65, 2095–2099.

R

Rao G. V., Rao P. S., 1982. A phytochemical study of *Heylandia latebrosa*. *Fitoterpia*, 53, 21.

Rasamison V. E., Ranaivo-Harimanana L., Cao S., Pan E., Ratovoson F., Randriantafika F., Rakotondrajaona R., Rakotonandrasana S., Andriantsiferana R., Kingston D. G.I., 2010. A new labdane diterpene from *Vitex cauliflora* Moldenke from the Madagascar rainforest. *Fitoterapia*, 81, 55–58.

Ravn H., Nishibe S., Sasahara M., Xuebot L., 1990. Phenolic Compounds from *Plantago Asitica. Phytochemistry*, 29(11), 3627-3631.

Redaelli C., Formentini L., Santaniello E., 1980. Apigenin 7-glucoside and its 2'' and 6''-acetate from ligulate flowers of *Matricaria Chamomilla*. *Phytochemistry*, 19, 985-986.

Rigano D., Aviello G., Bruno M., Formisano C., Rosselli S., Capasso R., Senatore F., Izzo A. A., Borrelli F., 2009. Antispasmodic Effects and Structure-Activity Relationships of Labdane Diterpenoids from *Marrubium globosum* ssp libanoticum, *Journal of Natural Products*, 72, 1477-1481.

Rigano D., Grassia A., Bruno M., Rosselli S., Formisano C., Apotoside Arnold N., Senator F., 2006. Labdane Diterpenoids from *Marrubium globosum* ssp.libanoticum, *Journal of Natural products*. 69, 836-838.

Rodriguez B., 2003. A methoxyabietane diterpenoid from the root of Salvia phlomoides and structural correction of another diterpene from *Cryptomeria japonica*, *Chemical Sciences*, 58(4), 324-327.

Rodriguez B., Robledo A., Pascual-Villalobos M. J., 2009. Rearranged abietane diterpenoids from the root of *Teucrium lanigerum*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 37(2), 76-79.

S

Seifert K., Lien N. T., Schmidt J., Johne S., Popu S., Porzel A., 1989. Iridoide from *Verbascum pulverulentum*. *Planta Medica*, 55,470-473.

Shan Y., Xu L., Lu Y., Wang X., Zheng Q., Kong L., Niwa M., 2008. Diterpenes from *Coleus forskohlii* (WILLD.) BRIQ. (*Labiatae*). *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 56(1), 52-56.

Shang Q., Liu W., Xu W. R., Liu P., Han Y.-M., Chen C.-l, Tang L.-D., 2010. Virtual Evaluation on Activities of Flavonoids from *Scutellaria Baicalensi*. *Chinese Herbal Medicines*, 2010, 2(2), 136-140.

Shen Y.-H., Wen Z.-Y., Xu G., Xiao W.-L., Peng L-Y., Lin Z.-W., Sun H.-D., 2005. Cytotoxic ent-Kaurane Diterpenoids from *Isodon eriocalyx*. *Chemistry & Biodiversity*, 2, 1665-1672.

Shirota O., Nagamatsu K., Sekita S., 2006. Neo-clerodane Diterpenes from the Hallucinogenic **Sage *Sal*W*ia divinorum.*** *Journal of Natural Products, 69,* 1782-1786.

Silva A. M. S., Alkorta I., Elguero J., Silva V. L. M., 2001. A ^{13}C RMN study of the structure of four cinnamic acids and their methyl ester. *Journal of Molecular Structure*, 595, 1-6.

Skalta H., Bermejo P., Lazari D., Silvan A. M., Skaltsounis A. L., Sanz A., Abad M. J., 2000. Inhibition of Prostaglondin E2 and Leukotrien C4 in mouse peritoneal Macrophage and thromboxane B2 production in human platelets by flavonoids from *Stachys chrysantha* and *Stachys candida*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin,* 23 (1), 47-53.

Sun H-D., Qiu S-X., Lobkovsky E. B., Lin L. Z., Farnsworth N. R., Clardy J., Fong H. H. S., 2001. Crystal and molecular structures of a natural equimolecular mixture of two epimeric diterpenes, *Tetrahedron*, 57(1), 65-70.

T

Tana N., Kalogaa M., Radtkea O. A., Kiderlenc A. F., O¨ ksu¨zb S., Ulubelenb A., Kolodzieja H., 2002. Abietane diterpenoids and triterpenoic acids from *Salvia cilicica* and their antileishmanial activities. *Phytochemistry*, 61, 881–884.

Topcu G., Kokdil G., Turkmen Z., Voelter W., Adou E., Kingston D. G. I. 2004. A new clerodane diterpene and other constituents from *Ajuga chamaepitys* ssp. Laevigata. *Chemical Sciences*, 59(5), 584-588.

U

Ulubelen A., Mericli A. H., Mericli F., 2004. Diterpenes and norditerpenes from the roots of Dorystoechas hastate. *Pharmazie*, 59(4),301-303.

Uriarte-Pueyo I., Calvo M. I., 2010. Structure–activity relationships of acetylated flavone glycosides from *Galeopsis ladanum* L. (*Lamiaceae*). *Food Chemistry*, 120, 679–683.

V

Valant-Vetschera K. M., Roitman J. N., Wollenweber E., 2003. Chemodiversity of exudate flavonoids in some members of the *Lamiaceae*. *Biochemical Systematics and Ecology* ,31 (11), 1279–1289.

Van Loo P., De Bruyn A., Budesinsky M., 1986. Reinvestigation of the structural assignment of signals in the ^{1}H and ^{13}C NMR spectra of the flavones apigenin. *Magnetic Resonance Chemistry*, 24, 879-882.

Vassallo A., Bader A., Braca, Alessandra B., Rastrelli L., De Simone F., De Tommasi N., 2008. Secondary metabolites from the roots of *Salvia palaestina* Bentham, *Natural Product Communications*, 3(12), 1967-1970.

W

Wang C. Z., Mehendale S. R., Yuan C. S., 2007. Commonly used antioxidant botanicals: active constituents and their potential role in cardiovascular illness. *American Journal of Chinese Medicinal,* 35, 543–558.

Weng Z.-Y ., Huang S.- X., Han Q. -B., Xiao W. L., Sun H. D.,2007. Xerophinoid C , a new diterpene glucoside derivative from Isodon xerophilus (Labiatae). Acta Botanica Yunnanica, 29(2), 256-258.

Woz´niak D., Lamer-Zarawska E., Matkowski A., 2004. Antimutagenic and antiradical properties of flavones from the roots of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Food Chemistry,* 48(1), 9 – 12.

Wu J., Zhang S., Xiao Q., Li Q., Huang J., Long L., Huang L., 2003. Phenylethanoid and aliphatic alcohol glycosides from *Acanthus ilicifolius*. *Phytochemistry*, 63, 491–495.

X

Xia H. J., Qiu F., Zhu S., Zhang T. Y., Qu G., Yao X. S., 2007. Isolation and Identification of ten metabolites of Breviscapine in Rat Urine. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30(7), 1308-1316.

Xuemei N., Shenghong L., Qinshi Z., Zhongwen L., Handong S., Yang L.,Lili Z., Qitai Z., 2002. A novel diterpene hydroperoxide, glutinosin C, from *Isodon glutinosa*, *Tetrahedron Letters*, 43, 5277–5280

Xu J., Chang J., Zhao M., Zhang J.-S., 2006. Abietane diterpenoid dimers from the roots of *Salvia prionitis*. *Phytochemistry* (Elsevier), 67(8), 795-799.

Y

Yalçin F. N., Ersoez T., Bedir E., Doenmez A. A.; Stavri M., Zloh M., Gibbons S., Calis I., 2006. Amanicadol, a pimarane-type diterpene from *Phlomis amanica* Vierch. *Chemical Sciences*, 61(11), 1433-1436.

Ye F., Wang H., Jiang S., Wu J., Shao J., Cheng X., Tu Y., Zhang D. Y., 2004. Quality evaluation of commercial extracts of *Scutellaria baicalensis*. *Nutritional Cancer*, 49, 217–222.

Yuming D., Leu Y.-L., Chien K.-Y., Yu J.-S., 2009. Separation and Determination of Low Abundant Flavonoids in *Scutellaria Baicalensis* Georgi by Micellar Electrokinetic Capillary Electrophoresis. *Analytical Letters*, 42 (10-12), 1444-1457.

Z

Zahid M., Ishrud O., Pan Y., Asim M., Riaz M., Ahmad V. U., 2002. Flavonoid glycosides from *Salvia moorcroftiana* Wall. *Carbohydrate Research* , 337, 403–407.

Zahid M., Saeed M., Asim M., Ishrud O., Wu S., Ahmad V. U., Pan Y., 2003. New Glycosides from *Salvia moorcroftiana* (*Lamiaceae*). *Helvetica Chimica Acta*, 86, 2021-2027

Zhang H., Fan Z., Tan G. T., Chai H-B., Pezzuto J. M., Sun Ha., Fong H. H. S. 2002. Pseudoirroratin A, a new cytotoxic ent-kaurene diterpene from *Isodon pseudo-irrorata*. *Journal of Natural Products*, 65(2), 215-217.

Zheng C. J., Huang B. K., Wang Y., Ye Q., Han T., Zhang Q. Y., Zhang H., Qin L. P., 2010. Anti-inflammatory diterpenes from the seeds of *Vitex negundo*. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 18(1), 175-81.

Zhi N., Wei X., Xue-Mei N., Shuang-Xi M., Zhong-Wen L., Chao-Ming L., Han-Dong S., 2002. Diterpenoids from *Isodon enanderianus*. *Phytochemistry*, 60, 55-60.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Conclusions et perspectives

Cette thèse s'inscrit dans le cadre de la recherche de nouveaux composés pouvant trouver une application thérapeutique à partir d'espèces végétales. Deux aspects principaux sont visés par ce travail.

Le premier consiste en l'étude phytochimique de deux *Lamiaceae* endémiques algériennes : *Phlomis bovei* de Noé *et Marrubium deserti* de Noé. Ces deux espèces font localement l'objet d'un usage thérapeutique traditionnel. D'après une recherche bibliographique exhaustive, l'investigation concernant *Phlomis bovei* est considérée comme étant la première.

Ces études réalisées sur l'extrait dichlorométhane , les phases acétate d'éthyle et butanolique des parties aériennes de *Marrubium deserti* de Noé ainsi que sur l' extrait méthanolique de *Phlomis bovei* de Noé a permis d'isoler 24 composés dont 5 composés originaux et 19 composés connus. Ces produits appartiennent à 3 classes de métabolites secondaires :

Les diterpènes :

Le marrulibacétal A, la désertine, la 13*S*-9α,13α-époxy-7-hydroxy-labda-6β(19),16(15)-diol dilactone, et la 13*S*-9α,13α-époxy-7,14-dihydroxy-labda-6β(19),16(15)-diol dilactone sont 4 nouveaux composés naturels de type labdane diterpénique. 4 autres composés connus isolés pour la première fois de cette espèce sont la marrubiine, la marrulactone, la marrulibacétal , et le mélange de deux isomères : la cyllenine A et 15-epi-cyllenine A.

Les flavonoïdes :

5 flavonoïdes sont isolés des phases AcOEt et butanolique de *Marrubium deserti* de Noé : l'apigénine-7-*O*-glucoside, l'apigénine-7-*O*-[6''-E-p-*O*-coumaryl] D-glucopyranoside, l'apigénine-7-*O*-néohesperidoside, l'apigénine-7-*O*-glucuronide, et l'apigénine. Les trois derniers composés cités sont isolés pour la première fois de cette espèce. De plus, l'apigénine-7-*O*-néohesperidoside n'a jamais été identifiée auparavant dans le genre *Marrubium*.

Les phénylpropanoïdes :

Deux phénylpropanoïdes, l'actéoside et le forsythoside, isolés de la phase AcOEt de *Marrubium deserti* sont identifiés pour la première fois dans cette espèce.

L'étude phytochimique de l'extrait méthanolique de *Phlomis bovei* de Noé a permis d'isoler l'acide chlorogénique, le 4-hydroxy-cinnamate de méthyle isolé pour la première fois dans ce genre, et 6 flavonoïdes dont 5 sont connus : le chrysoériol 7-*O*-(3''-(*E* et *Z*)-*p*-coumaroyl)-β-glucopyranoside, l'apigénine-7-*O*-glucoside, l'apigénine-7-*O*-[6''-E-p-*O*-coumaryl]_D-glucopyranoside, apigénine-7-*O*-(3''-*p*-coumaryl) glucopyranoside, hispiduline-7-*O*-glucuronide et un nouveau flavonoïde : l'apigénine-7-*O*-(6''-(5'''-méthoxy-coumaryl)-glucoside**.**

L'utilisation conjointe des différentes techniques chromatographiques d'analyse et de purification telles que CCM, CC, MPLC, SPE et HPLC, et les techniques d'analyses spectroscopiques (UV, RMN, masse), nous ont permis d'isoler et d'identifier ce nombre important de métabolites secondaires.

Le deuxième aspect a permis de mettre en évidence des activités antibactérienne, antioxydante, génotoxique et antigénotoxique des certains extraits et des molécules majoritaires isolées.

L'effet bactéricide et la potentialisation de la norfloxacine des diterpènes et des phénylpropanoïdes ont été mis en évidence sur cinq espèces bactériennes pathogènes : *Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis , SARM, Pseudomonas aeruginosa , et klebsiella oxytoca.* L'agent antibactérien le plus actif vis-à-vis des bactéries Gram+ (*Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, SARM*) parmi ces composés est le forsythoside. Alors que l'actéoside, un diglycoside, ainsi que la marrubiine, le marrulibacétal A et la marrulactone ne présentent aucun pouvoir antibactérien. Les résultats obtenus ont été interprétés afin de définir certaines relations structure-activité. Il en ressort que pour les diterpènes, la présence particulière du noyau *spiro*-éther apporte l'absence d'activité antibactérienne alors que le nombre de sucres présentés dans la structure des phénylpropanoïdes est capital pour cette activité. La marrubiine, le marrulibacétal A, la 13*S*-9α,13α-époxy-7-hydroxy-labda-6β(19),16(15)-diol dilactone, la 13*S*-9α,13α-époxy-7,14-dihydroxy-labda-6β(19),16(15)-diol dilactone, la marrulactone et l'actéoside présentent une activité de potentialisation de la norfloxacine sur les souches de *P. aeruginosa* multirésistantes aux concentrations testées. Par ailleurs, le mélange de la 13*S*-9α,13α-époxy-7-hydroxy-labda-6β(19),16(15)-diol dilactone et de la 13*S*-9α,13α-époxy-7,14-dihydroxy-labda-6β(19),16(15)-diol dilactone possède un effet de potentialisation peu significatif vis-à-vis de la souche *S. aureus* 1199B. L'effet bactéricide synergique a été évalué pour le forsythoside, et le mélange 13*S*-9α,13α-époxy-7-hydroxy-labda-6β(19),16(15)-diol dilactone / 13*S*-9α,13α-époxy-7,14-dihydroxy-labda-6β(19),16(15)-diol dilactone vis-à-vis des souches bactériennes. L'association forsythoside - oxacilline sur une souche de taphylocoque doré (SA29213) a montré un effet synergique peu significatif. Alors que le mélange ne présente aucun effet additif ou synergique avec la ciprofloxacine sur *Pseudomonas aeruginosa* ou sur *Staphyloccocus aureus*.

L'activité antiradicalaire des molécules isolées et des extraits a été évaluée par le test antiradicalaire qui consiste à estimer la capacité de piégeage des radicaux libre DPPH (diphényl-1-picrylhydrazyl) et ABTS (acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique). L'activité antioxydante a été déterminée à l'aide de la méthode CUPRAC. Les résultats obtenus ont montré que les extraits apolaires (extrait CH_2Cl_2) *de M. deserti* et *P. bovei* ne présentent aucun effet antioxydant ou antiradicalaire.

Par contre, les extraits polaires (méthanolique et hydrométanolique) de *Phlomis Bovei* sont doués d'un pouvoir antiradicalaire très important. L'activité antiradicalaire des extraits polaires (MeOH et H_2O) ainsi que les phases AcOEt, BuOH de *Marrubium deserti* de Noé dépend du type du radical à piéger. En revanche, la phase BuOH provenant de l'extrait MeOH de *M. deserti* présente des

activités antioxydantes les plus intéressantes car elles sont significatives et homogènes dans les 3 types de tests. Les deux phénylpropanoïdes (actéoside et forsythoside) présentent une activité antioxydante intéressante vis-à-vis du DPPH, ABTS et CUPRAC. L'apigénine-7-*O*- glucuronide montre un effet important avec un TEAC proche de celui du trolox vis-à-vis du radical ABTS, tandis que la terniflorine est presque 4 fois plus actif que le Trolox vis-à-vis du CUPRAC. L'apigénine 7-*O*-néohesperidoside, l'apigénine-7-*O*-glucoside, la marrubiine, le chrysoériol 7-*O*-(3''-(E et *Z*)-*p*-coumaryl)-β-glucopyranoside, l'apigénine-7-*O*-(3''-*p*-coumaryl)-β-glucopyranoside et *l'apigénine-7-O-(6''-(5''' methoxy-coumaryl*) glucoside, l'hydroxy-4-cinnamate de méthyle ne présentent pas d'activité antioxydante significative dans les trois méthodes utilisées.

Les activités génotoxique et antigénotoxique ont été évaluées au moyen de test SOS chromotest développé par Quillardet en 1985. L'actéoside, l'apigénine 7-*O*-néohesperidoside**,** l'apigénine**,** le chrysoériol-7-*O*-(3''-(*E* et *Z*)-*p*-coumaroyl)-β-glucopyranoside**,** l'apigénine-7-*O*-glucosideet l'apigénine-*7-O-(*6''-(5''' methoxy-coumaroyl) glucoside sont marginalement génotoxique à une concentration connue, tandis que le forsythoside et la terniflorine n'ont pas montré d'effet génotoxique. La phase BuOH présente une activité génotoxique importante à une concentration de 250 µg/essai. Tous les extraits et les composés de *Marrubium deserti* de Noé et *Phlomis bovei* de Noé possèdent un effet antigénotoxique.
Les effets antigénotoxiques pourraient être la conséquence du pouvoir antioxydant et antiradicalaire des molécules et des extraits testés dans la mesure où les radicaux libres font partie des principaux acteurs qui contribuent aux dégradation des macromolécules biologiques liées aux stress oxydants . Ces espèces instables sont mises en cause dans un grand nombrede pathologies majeurescomme le cancer, les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives.

Ainsi, les activités antibactérienne, antioxydante, et antigénotoxique positives démontrées dans cette étude viennent conforter leur utilisation traditionnelle sous différentes formes.
Cependant, beaucoup de travaux restent à réaliser tant sur le plan chimique que sur le plan biologique. Par exemple, les études phytochimiques suivantes peuvent être envisagées :

- Etudier l'extrait apolaire de *Phlomis bovei* ainsi que l'extrait aqueux de *Marrubium deserti* de Noé.
- Réaliser l'étude des autres organes de *Marrubium deserti* de Noé séparément

Sur le plan biologique :

- Préciser le mécanisme de l'activité antigénotoxique
- Tester les composés et les extraits polaires pour leurs propriétés antibactériennes
- Tester les composés apolaires pour rechercher les activités antiradicalaires, génotoxiques et/ou antigénotoxiques.

الملخص

نهدف من خلال هذا البحث كمرحلة اولية إلى دراسة فيتوكيميائية تخص فصل وتحديد منتجات الأيض الثانوي للنبتتين من العائلة الشفوية *Lamiaceae* و هما *Marrubium deserti* de Noé و *Phlomis bovei* .

وقد سمحت لنا الطرق المختلفة من فصل وتنقية للمستخلصات ثنائي كلورو ميثان وخلات الإيثيل و البيوتانول لنبات *M.deserti* من تحديد بنية خمسة مركبات من نوع diterpènes labdane منها مركبين جديدين فصلا لاول مرة بالاضافة الى مركبين من نوع تربين ثلاثي triterpènes و سبع مركبات فلافونويدية.كما سمحت لنا دراسة المستخلص الميثانولي لنبات *P. bovei* من عزل و تحديد بنية خمسة فلافونيدات جليكوزيدية و كومارويل منها مركب جديد فصل لاول مرة.

وقد تم تحديد البنية الجزيئية للمركبات المفصولة باستعمال الطرق الفيزيوكيميائية : مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV)، ومطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون (RMN-^{1}H) وللكربون (RMN-^{13}C)، ومطيافية الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد (Cosy, HMQC, HMBC, Noesy), ومطيافية الكتلة (HR-EI-MS) وقد تمت مقارنة البيانات المختلفة مع المراجع البيبليوغرافية.

في المرحلة الثانية من هذا البحث و بغية الوقوف على العلاقة بين البنية والفعالية تم إجراء بعض التحاليل البيولوجية المضادة للأكسدة (DPPH، ABTS،CUPRAC) و المضادة للبكتيريا والتشكيل المقاوم للأدوية المتعددة، كما تم أيضا اختبار السمية من النوع antigénotoxicité للمركبات و المستخلصات باستخدام اختبار chromotest.

قد قمنا بدراسة خاصية الفعالية ضد البكتيريا للتربينات ' phenylpropanoides والمفصولة من *M.deserti* على 5 أنواع من البيكتيريا(Gram-,Gram+) لكن بالنسبة للتربينات من نوع Labdane خماسية الحلقة مع احتوائها على نواة أو نواتين من نوع Spiro éther فتعتبر الدراسة الأولى من نوعها في هذا المجال'و نستطيع فرض انعدام هذه الخاصية بالنسبة للجزيئات(marrubiine,marrulibacétal A, la marrulactone) و قد يعود ذلك إلى احتوائها على نواة من نوع Spiro éther.أما بالنسبة للخليط MD5a/MD5b (13s-9α,13α-époxy-7-hydroxy-labda 6β(19),16(15)-dioldilactone,et13s-9α,13α-époxy-7,14dhydroxy-labda-6β(19),16(15)-diol dilactone. فتبين أن فعاليته محدودة بالنسبة إلى P.aeruginosa و S.aureus.

إن هذه الدراسة استكملت بالبحث عن لفعل additif أو synergique لبعض المركبات مع مضاد حيوي مرجعي.

لمستخلصات الأطوار العضوية و المركبات النقية للنبتتين antigénotoxique،génotoxique إن دراسة الفعالية المستخرج من BuoH سمحت لنا بملاحظة أن الطور Escherichia coli باستخدام SOS chromotest باستعمال 250 µg/essai génotoxique. ضعيف الفعالية M.deserti

في الجزء الثاني من هذه الدراسة قمنا بإظهار خاصية المستخلصات و بعض المركبات في إلغاء الخاصية الجينوطوكسيكية لنيتروفورانتوان(كل المستخلصات الأطوار العضوية و الجزيئات تمتلك خاصية ضد جينوطوكسيكية).

من أجل شرح طريقة عمل الخاصية ضد جينوطوكسيكية تم مقارنة هذه الخصائص مع الخاصية المضادة للأكسدة لكل المستخلصات الأطوار و المركبات التي تم اختبارها.

الكلمات المفتاحية: Phénylpropanoides ’فلافونويدات, Phlomis bovei ’Marrubium deserti ’diterpénes الفعالية ضد البكتيريا’MDR البكتيرية’ SOS chromotest ’ جينوطوكسيكية’ ضد جينوطوكسيكية’ الفعالية المضادة للأكسدة.

Résumé

Ce travail a dans un premier temps consisté à étudier dans un cadre phytochimique deux plantes médicinales endémiques de la flore algérienne : *Marrubium deserti* de Noé et *Phlomis bovei* de Noé (Lamiaceae). A notre connaissance, cette dernière n'avait fait l'objet d'aucune étude phytochimique ou pharmacologique. Diverses méthodes de séparation et de purification de l'extrait dichlorométhane, et des phases butanolique et acétate d'éthyle issues des parties aériennes de *M. deserti* de Noé nous ont permis d'isoler et d'identifier huit diterpènes de type labdane dont quatre sont originaux, un triterpène, sept flavonoïdes et deux phénylpropanoïdes glycosylés. L'étude de l'extrait méthanolique des parties aériennes de *P. bovei* a mis en évidence cinq flavonoïdes glycosylés et coumaroylés dont un est original, aux côtés de l'acide chlorogénique et du 4-hydroxy cinnamate de méthyle.

Les structures moléculaires des composés isolés ont été déterminées par RMN 1D et 2D (^{1}H, ^{13}C, COSY H-H, HSQC, HMBC et NOESY), par spectrométrie de masse basse et haute résolution, par mesure des pouvoirs rotatoires et par comparaison des données avec celles de la littérature.

Dans un second temps, nous avons entrepris des investigations concernant les propriétés antibactériennes et modulatrices de la MDR (Multi-Drug resistance) et antioxydantes (DPPH, ABTS et CUPRAC). Nous avons également évalué la génotoxicité et l'antigénotoxicité des produits et des extraits en utilisant le test SOS chromotest.

L'étude de l'activité antibactérienne a été réalisée sur cinq souches bactériennes pathogènes (Gram + et Gram-) pour les diterpènes et les phénylpropanoïdes isolés de *M.deserti.* Concernant les diterpènes de type labdane pentacyclique, avec la présence d'un ou deux noyaux de type *spiro* éther, c'est la première étude dans ce domaine : on peut suggérer que l'absence d'activité antibactérienne de ces molécules (la marrubiine, le marrulibacétal A, la marrulactone) est en partie due à la présence particulière de ce noyau *spiro* éther. Alors que le mélange **MD5a / MD5b** (13*S*-9α, 13α-époxy-**7**-hydroxy-labda-6β(19), 16(15)-diol dilactone, et 13*S*-9α, 13α-époxy-**7, 14-dihydroxy**-labda- 6β(19), 16(15)-diol dilactone) montre une activité peu significative de potentialisation de la norfloxacine vis-à-vis de *S. aureus et P. aeruginosa* **.**
Cette étude a été complétée par la recherche d'effet additif ou synergique de certain des composés avec des antibiotiques de référence.

Les mesures d'activité génotoxique et antigénotoxique des extraits, des phases organiques et des composés purs des deux plantes, à l'aide du SOS chromotest utilisant la souche bactérienne *Escherichia coli,* nous ont permis d'observer que seule la phase BuOH issue de *M. deserti* s'avère faiblement génotoxique à 250 µg/essai. Dans un second temps, il s'est agit de mettre en évidence le pouvoir des extraits et de certains composés à inhiber la genotoxicité de la nitrofurantoïne : tous les extraits, les phases organiques et les molécules possèdent une activité antigénotoxique dose dépendante vis-à-vis de la nitrofurantoïne.
Afin de proposer un mécanisme d'action potentiel de l'effet antigénotoxique, ces effets ont été comparés aux effets anti-oxydants de tous les extraits, phases et composés testés.

Mots clés : *Marrubium deserti*, *Phlomis bovei*, Flavonoïdes, Diterpènes, Phénylpropanoïdes, Activité bactéricide, MDR bactérienne, SOS chromotest, Génotoxicité, Antigénotoxicité, Activité antioxydante.

Summary

This thesis consists firstly in the phytochemical study of endemic medicinal plants of two *Lamiaceae* from the Algerian Flora, *Marrubium deserti* de Noé and *Phlomis bovei .in* our knowledge, this last plant was not made the object of phytochemical or pharmacologic studies.

Various separation and purification methods of the dichloromethane, butanolic and ethyl acetate phases of aerial parts of *Marrubium deserti* de Noé has allowed us to isolate and identify eight labdane type diterpene in which four are new natural compounds, one triterpene, seven flavonoids and two glycosidic phenylpropanoids. Also, the study of the methanol extraction of the aerial parts of *Phlomis bovei* has clearly showed five glycosidic phenylpropanoids and coumaroyls including one new natural compound, methyl-4-hydroxycinnamate and chlorogenic-acid.

The structures of the compounds have been confirmed mainly by the use of the techniques of NMR 1D and 2D (^{1}H, ^{13}C, COSY H-H, HSQC, HMBC and NOESY), by the High Resolution Mass Spectrometry (HR-EI-MS), by the measurement of rotatory powers and by the comparison with the literature.

Secondly, we undertook investigations concerning the biological properties of the antibacterial and the bacterial MDR modulation domains and the antioxidant (DPPH, ABTS and CUPRAC). We also evaluated the genotoxicity and the anti-genotoxicity of these products and extracts using the SOS chromotest.

The study of antibacterial activity of the diterpens and the phenylpropanoids isolated of *M. deserti de Noe* has been accomplished on five pathogenic bacterial stocks (Gram+ and Gram-). Concerning the labdane pentacyclic type of diterpenes with one or two spiro ether rings.

It is the first study in this domain: they can suggest that the absence of antibacterial activity of these molecules (marrubiine, marrulibacetal A, marrulactone) is partly owed to particular presence of this spiro ether ring . While the mixture **MD5a / MD5b** (13*S*-9α, 13α-époxy-**7**-hydroxy-labda-6β(19), 16(15)-diol dilactone, et 13*S*-9α, 13α-époxy-**7, 14-dihydroxy**-labda- 6β(19), 16(15)-diol dilactone) show a low activity of potentialisation of the norfloxacine.

The genotoxic and antigenotoxic activity of extracts, phases and pure compounds of two plants, were evaluated by the SOS chromotest on the bacterial stocks Escherichia coli. The results of genotoxicity studies showed that alone BuOH phase proves a lower genotoxic activity at 250 µg/essay.

In the second time, the study of the power of extracts and certain compounds to inhibit the genotoxicity for nitrofurantoin revealed the significant anti-genotoxic effect with all extracts, organics phases and molecule in a dose dependent manner against nitrofurantoin.

For propose a potential mechanism of action of antigenotoxic effect, these effects were compared with anti-oxidant effects of extracts, phases and compounds tested.

Keywords: *Marrubium deserti de Noe*, *Phlomis bovei*, flavonoids, diterpens, phenylpropanoids, antibacterial, bacterial MDR modulation, SOS chromotest, genotoxicity, antigenotoxicity, antioxydative activities.

Publications

N. Zaabat, S. Akkal, N. Darboure, H. Laouer, M. G. Dijoux Franca Helmut and Duddeck., 2010. Secondary metabolites of an Algerian *Phlomis Bovei* and their antioxidant activities. *Chemistryof Natural Compounds*, 46 (3).

N. Zaabat., Darbour N., Bayet C., Michalet S., Doléans-Jordheim A., Chekir-Ghedira L., Akkal S., M.-G. Dijoux-Franca., 2010. Étude préliminaire de *Marrubium deserti* de Noé, une *Lamiaceae* endémique algérienne. *Pharmacognosie***.**

Poster

N. Zaabat , N. *Darbour, C. Bayet, S. Michalet , A. Doléans-Jordheim, L. Chekir-Ghedira, S. Akkal, M G. Dijoux-Franca. 2010. Grasse.*

Chemistry of Natural Compounds, Vol. 46, No. 3, 2010

SECONDARY METABOLITES OF AN ALGERIAN *Phlomis bovei* AND THEIR ANTIOXIDANT ACTIVITIES

N. Zaabat,[1,3] S. Akkal,[1] N. Darboure,[3] H. Laouer,[2] M. G. Dijoux Franca,[3] and Helmut Duddeck[4]

UDC 547.972

The plants of the genus *Phlomis* are native to Turkey, North Africa, Europe, and Asia. *Phlomis bovei* De Noe, sy*n. Phlomis samia* Desfontaines (Lamiaceae), is a rare Algerian endemic plant, commonly known as Kayat El Adjarah [1] in the Algerian dialect or variously named Farseouan, Tarseouan, Iniji, R′ilef, and Azaref throughout the North of Africa [2]. It is one among the nine endemic plants recorded in the Rapport National sur la Diversite Biologique [1]. *P. bovei* is a herbaceous perennial plant, which grows up to 0.8 m and often develops a stout woody base.

Phlomis bovei was collected from the east of Algeria in june 2006 and was taxonomically identified by Dr. Hocine Laouer from the Department of Biology, University of Setif.

About 465 g of the air powdered leaves were extracted with *n*-hexane, CH_2Cl_2, and MeOH in succession at room temperature. The MeOH extract was fractionated over silica gel–VLC eluting with CH_2Cl_2 followed by increasing concentrations of MeOH. Fractions 3 and 4 (41 g), eluted with CH_2Cl_2–MeOH 50:50–25:75), were combined and further applied to column chromatography over silica gel using CH_2Cl_2–EtOAc and EtOAc–MeOH. Fraction L (1.73 g), eluted with 95:5 EtOAc–MeOH, was subjected to RP18 MPLC with H_2O–MeOH. Purification of fraction L6 (18 mg) by Sephadex LH20 (MeOH) allowed the isolation of compound **1.** Purification of fraction L17 (112 mg) by SPE RP18 MeOH–H_2O and TLC on silica gel (9–1) CH_2Cl_2–MeOH afforded compound **2**. Fraction L22 (62 mg) was subjected to SiO_2 TLC using (EtOAc–MeOH–H_2O 100:10:5), yielding **3** (9 mg).

The structures of these compounds were elucidated by UV, ^{1}H NMR, and ^{13}C NMR, and all these data were in good agreement with the respective literature data [3–8].

Compound 1, $C_{15}H_{10}O_5$, mp 347°C, UV (MeOH, λ_{max}, nm): 266, 330; +NaOH: 275, 324, 390; +$AlCl_3$: 277, 301, 341, 387; +$AlCl_3$/HCl: 277, 301, 341, 387; +NaOAc: 278, 300, 380; +NaOAc/H_3BO_3: 273, 279, 350. ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD, δ, ppm, J/Hz): 7.78 (2H, d, J = 8.9, H-2′, H-6′), 6.90 (2H, d, J = 8.9, H-3′, H-5′), 6.51 (1H, s, H-3), 6.42 (1H, d, J = 2.1, H-8), 6.22 (1H, d, J = 2.1, H-6). This compound was characterized as 5,7,4′-trihydroxyflavone (apigenin) [6].

Compound 2, $C_{21}H_{20}O_{10}$, mp 226–228°C, MS–ES positive 433**,** UV (MeOH, λ_{max}, nm): 269, 334; + NaOH: 267, 381; + $AlCl_3$: 277, 349 sh, 383; + $AlCl_3$/HCl: 279, 346 sh, 382. ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD, δ, ppm, J/Hz): 7.91 (2H, d, J = 8.8, H-2′, H-6′); 6.95 (2H, d, J = 8.8, H-3′, H-5′); 6.83 (1H, d, J = 2.5, H-8); 6.51 (1H, s, H-3), 6.54 (1H, d, J = 2.55, H-6); 5.20 (1H, d, J = 7.5, H-1″ Glu); 3.05–3.90 (sugar protons). Identified as apigenin 7-*O*-glucoside or apigetrin [7].

Acid hydrolysis of **2** produced apigenin and D-glucose.

Compound 3, $C_{10}H_{10}O_2$, mp 110°C, ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD, δ, ppm, J/Hz): 7.66 (2H, d, J = 8.85, H-2′, H-6′); 6.73 (2H, d, J = 7.56, H-3′, H-5′); 6.85 (1H, d, J = 12.6, H-4); 5.72 (1H, d, J = 12.6, H-3), ^{13}C NMR (CD_3OD, 75 MHz): 112.6 (C-3), 116.7 (C-3′,5′), 126.6 (C-1′), 133.9 (C-2′,6′), 145.6 (C-4), 170 (C-2). Identified as 4-(4′-hydroxyphenyl)-*trans*-but-3-en-2-one [8].

1) Laboratoire de Phytochimie et Analyses physicochimiques et Biologiques, Departement de Chimie, Faculte de Sciences exactes, Universite Mentouri Constantine, Route d′Ain el Bey, 25000 Constantine, Algerie, fax: 213 31 62 49 12, e-mail: salah4dz@yahoo.fr; 2) Department of Biology, University Ferhat Abbas, 19000 Setif, Algeria; 3) Universite de Lyon, UMR 5557 CNRS-UCBL, CESN, Dept de Botanique et Pharmacognosie, Faculte de Pharmacie, 8 avenue Rockefeller, 69373 Lyon Cedex 08, France; 4) Universitat Hannover, Institut fur Organische Chemie, Schneiderberg 1B, D-30167, Hannover, Germany. Published in Khimiya Prirodnykh Soedinenii, No. 3, p. 384, May–June, 2010. Original article submitted November 14, 2008.

 0009-3130/10/4603-0454 ©2010 Springer Science+Business Media, Inc.

Compounds **1** and **2** are isolated for the first time from *P. bovei*. Compound **3** was isolated for the first time from a *Phlomis* species.

Free Radical Scavenging Activity. The CH_2Cl_2 and MeOH–H_2O extracts of the flowers of *P. bovei* were examined for *in vitro* antioxidant properties using the DPPH test.

The radical-scavenging activity was measured by the molar ratio of antioxidant to DPPH radical required for 50% reduction in DPPH radical concentration in 45 min. The results of our experiments demonstrated that the two compound-extracts tested possess radical-scavenging activity. It was also found that the free-radical-scavenging activity of MeOH–H_2O extract (EC_{50} 0.30) was stronger than that of CH_2Cl_2 extract (EC_{50} 0.50).

REFERENCES

1. P. Quezel and S. Santa, *Nouvelle Flore de l′Algerie et des Regions Desertiques Meridionales*, C.N.R.S, Paris, 1962, p. 805.
2. L. Trabut, in *Repertoire des Noms Indigenes des plantes spontanees, cultivees et utilisees dans le Nord de l′Afrique*. Collection du centenaire de l′Algerie, Imprimeries "La Typo-Litho" et Jules Carbonnel Reunies: Alger, 1935, p. 190.
3. T. J. Mabry, K. R. Markham, and M. B. Thomas, *The Systematic Identification of Flavonoids*, Springer, New York, 1970.
4. K. R. Markham, *Techniques of Flavonoid Identification*, Academic Press, London, 1982.
5. K. R. Markham and H. Geiger, *Advance in Research Since 1986*, J. B. Harborne ed., Chapman and Hall, London, 1993.
6. T. H. Simpson and L. Garden, *J. Chem. Soc*., **46**, 38 (1952).
7. T. Wada and T. Hahori, *Nat. Resour.*, **32**, 67 (1953).
8. Das, Biswanath, G. Anjani, A. Kashinatham, B. Venkataiah, Rao, and S. Padma, *Nat. Prod. Sci.,* **4** (2), 78 (1998).

Phytothérapie
© Springer-Verlag France 2010
DOI 10.1007/s10298-010-0589-y

Article original

Pharmacognosie

Étude préliminaire de *Marrubium deserti* de Noé, une Lamiaceae endémique algérienne

N. Zaabat[1,2], N. Darbour[1], C. Bayet[1], S. Michalet[1], A. Doléans-Jordheim[1], L. Chekir-Ghedira[3], S. Akkal[2], M.-G. Dijoux-Franca[1,4]

[1]UMR 5557 CNRS-UCBL écologie microbienne, CESN, ISPB, université de Lyon, F-69373 Lyon, France
[2]Laboratoire de phytochimie, faculté des sciences, université de Constantine, 25000 Constantine, Algérie
[3]Laboratoire de biologie moléculaire, faculté de médecine dentaire, université de Monastir, 5000 Monastir, Tunisie
[4]8, avenue Rockefeller, bâtiment Nétien, F-69373 Lyon cedex 08, Lyon, France

Correspondance : dijoux@univ-lyon1.fr

Résumé : Connue pour ses propriétés médicinales, aromatiques ou culinaires, la famille des Lamiacées présente un intérêt économique majeur, notamment comme source d'huiles essentielles. Dans le cadre de l'étude de la biodiversité de la flore algérienne, l'analyse phytochimique et la recherche des activités biologiques des parties aériennes de *Marrubium deserti* de Noé ont été entreprises. L'extraction par des solvants de polarité croissante tels que le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et le butanol, puis la purification des extraits obtenus ont permis d'isoler et d'identifier à ce jour un diterpène original de type labdane, un flavonoïde et des phénylpropanoïdes glycosylés. Les extraits et les composés isolés ont fait l'objet d'une étude biologique comme antioxydants, antibactériens et antigénotoxiques.

Mots clés : *Marrubium deserti* – Antioxydants – Antibactériens – Antigénotoxiques

Preliminary study of *Marrubium deserti* de Noé, an endemic Algerian Lamiaceae

Abstract: Known for its medicinal, aromatic or culinary properties, the Lamiaceae family represents a major economic interest, in particular as a source of essential oils. The purpose of this research concerns the phytochemical and the biological study of one of the Algerian flora's medicinal plants known as *Marrubium deserti* de Noé. The extraction by solvents of increasing polarity: dichloromethane, ethyl acetate and butanol led to the isolation and identification of a novel labdane-type diterpene, a flavonoid and phenylpropanoid glycosides. Extracts and pure compounds were tested as antioxidant, antibacterial as well as antigenotoxic.

Keywords: *Marrubium deserti* – Antibacterial – Antioxydant – Antigenotoxic

Introduction

Le genre Marrubium appartient à la famille des Lamiacées et comprend environ 75 espèces répandues dans une grande partie du globe et notamment en Europe et en Asie. On compte 50 espèces sur le pourtour méditerranéen [9]. En Algérie, sept espèces sont répertoriées [19].

Dans la littérature, plusieurs espèces du genre Marrubium sont référencées pour leur large utilisation en médecine traditionnelle [13,30]. Notons par exemple *Marrubium vulgare*, utilisée dans plusieurs pays dans le traitement des inflammations, de la gastroentérite et des troubles respiratoires (asthme) [3,16,23]. Cette espèce possède également des propriétés hypotensives [6], antioxydantes [28] et insecticides [18]. Par ailleurs, *Marrubium deserti* de Noé, une espèce endémique algérienne, présente plusieurs applications en médecine traditionnelle (Fig. 5). Les feuilles et les rameaux utilisés sous forme d'infusion, de macération et de poudre permettent de traiter la toux, les dysménorrhées, les troubles digestifs, les parasitoses intestinales, la fièvre et les maladies respiratoires [14]. En usage externe, la plante est utilisée dans le traitement des réactions allergiques ainsi que pour soigner les piqûres de scorpion. Sur le plan chimique, de nombreuses espèces ont été étudiées et s'avèrent être riches en terpènes et plus particulièrement en diterpènes. On y trouve également un nombre important de flavonoïdes et de phénylpropanes [5,11,26].

En vue de mieux cerner la chimiobiodiversité et de valoriser la flore endémique algérienne, des études chimique et biologique de *Marrubium deserti* de Noé ont été entreprises dans ce travail. Ainsi, à ce jour, quatre composés ont été isolés et identifiés selon leurs données spectroscopiques (RMN, SM, UV). Un diterpène original, le 9,16–15,16-diépoxy-13,14-dihydroxy, 15-méthoxylabdan-6,19-olide (Fig. 1), a été isolé de l'extrait au dichlorométhane ; un flavonoïde glycosylé, l'apigénine-7-*O*-β-néohespéridoside (Fig. 2) [12] et deux

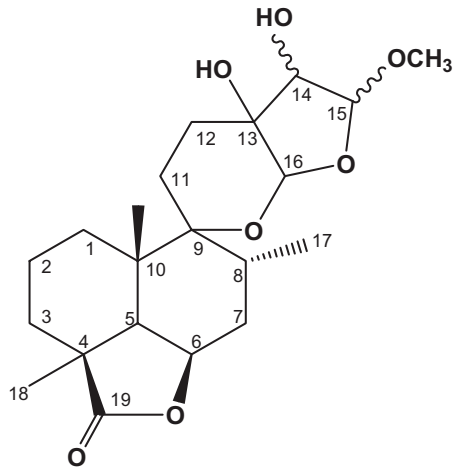


Fig. 1. Marrulibacétal A

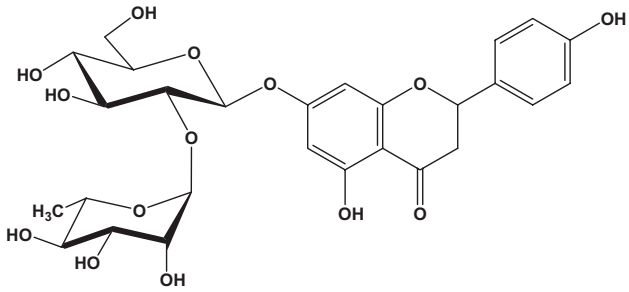


Fig. 2. Apigénine-7-O-β-néohesperidoside

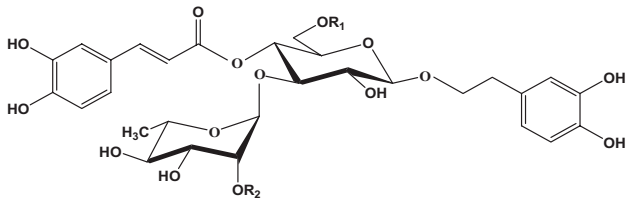


Fig. 3. Actéoside R_1=R_2=H
Fig. 4. Forsythoside B R_1=β-D-apiose, R_2=H



Fig. 5.

phénylpropanoïdes, l'actéoside (Fig. 3) [4], le fosythoside B (Fig. 4) [24], ont été isolés de l'extrait AcOEt. Dans la mesure où les dérivés polyphénoliques sont décrits comme des composés majeurs dans la lutte contre les effets nocifs des radicaux libres, impliqués dans de nombreuses pathologies [2,17], le pouvoir antioxydant a été mesuré pour les composés **2, 3** et **4** (Figs. 2,3,4) via les tests de l'ABTS et du CUPRAC. Pour compléter cette étude préliminaire, l'activité antibactérienne des différents composés a été également évaluée. Enfin, pour commencer à appréhender l'innocuité des composés de cette plante, la recherche d'un effet antigénotoxique a été réalisée pour ces mêmes composés.

Matériel et méthodes

Matériel végétal

Les parties aériennes de *Marrubium deserti* de Noé ont été récoltées au mois de mai 2007 dans la région de Mssila (Algérie). L'espèce a été identifiée par le professeur Hocine Laouer (département de biologie, faculté des sciences, université Ferhat-Abbas, Sétif, Algérie). Un échantillon a été déposé dans l'herbier du musée de l'Histoire naturelle de la ville de Nice (échantillon numéro B 8991).

Souches bactériennes utilisées pour l'étude de l'activité antibactérienne

Les micro-organismes utilisés sont : *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Klebsiella oxytoca* (ATCC 700324). Les souches bactériennes sont cultivées sur gélose Mueller-Hinton.

Souches bactériennes utilisées pour l'étude de l'activité antigénotoxique

Escherichia coli PQ37 est une souche bactérienne génétiquement modifiée qui dérive d'une souche K12. Elle est utilisée pour réaliser le SOS chromotest.

Matériel chromatographique et appareillage

Les spectres RMN ont été enregistrés sur un spectromètre BRÜKER DR x 500 (500 MHz pour ^{1}H dans le $CDCl_3$ ou le MeOH-d_4). Les spectres de masse basse résolution ont été enregistrés avec un Thermo® LCQ Advantage, en mode ESI (positif et négatif). Les spectres de masse haute résolution ont été enregistrés sur un appareil Thermo Finnigan Mat 95XL. L'HPLC analytique est réalisée sur système avec un détecteur UV 6000LP à photodiode Agilent®, une colonne Lichrospher® 100 RP-18 (125 × 4 mm ; 5 µm ; 100 A), avec du MeOH (solvant A) et de l'H_2O (solvant B) dans un gradient de 20 à 100 % de B en 55 minutes. Les chromatographies sur couche mince ont été réalisées sur gel de silice Merck® Si 60 F_{254} (20 × 20 cm) ou RP18 F_{254} (20 × 20 cm),

[révélation : vanilline-H_2SO_4] ou sur polyamide 11 F_{254} Merck® (20 × 20 cm) [révélation : solution méthanolique à 1 % de diphénylborate d'aminoéthanol et à 5 % de PEG 400]. La chromatographie sur colonne : gel de silice 60 (40–63 µm) ; la filtration sur gel d'exclusion-diffusion : Sephadex® LH-20 ; la chromatographie liquide moyenne pression : RP-18 (40–63 µm) ; la chromatographie liquide sous vide (VLC) gel de silice Merck® Si 60 F_{254} (0,063–0,200 mm) ; la SPE (extraction sur phase solide) : RP-18 (40–63 µm). Les tests antioxydants ont été réalisés sur microplaques 96 puits avec un spectrophotomètre Thermo® (Multiskan Ex).

Extraction et purification

Après broyage, les parties aériennes séchées (1,5 kg) sont extraites par du CH_2Cl_2 (6 l) sous agitation mécanique à température ambiante pendant 24 heures. Après filtration, cette opération est renouvelée trois fois. Les filtrats ensuite réunis et concentrés à sec sous vide à une température inférieure à 35 °C donnent l'extrait CH_2Cl_2 (A) [30 g].

La plante ainsi partiellement épuisée est ensuite extraite par du MeOH (4 × 6 l) dans les mêmes conditions que précédemment. On obtient un extrait méthanolique (150 g).

L'extrait méthanolique est soumis à un partage liquide–liquide avec des solvants de polarité croissante : CH_2Cl_2 (B) [7,4 g], AcOEt (C) [6,5 g], BuOH (D) [12,0 g].

Un premier fractionnement de l'extrait A (15 g) a été réalisé par VLC sur phase normale avec les gradients d'élution suivants : hexane/CH_2Cl_2 (50:50, 0:100), CH_2Cl_2/AcOEt (90:10, 0:100) et AcOEt/MeOH (50:50, 0:100), pour donner neuf fractions (A1 à A9). La fraction A4 (10 g) reprise par du CH_2Cl_2 (250 ml) est soumise à un partage liquide–liquide avec 100 % H_2O (250 ml), MeOH/H_2O (50:50) [250 ml] pour obtenir trois fractions : la première contenant les produits apolaires (phase CH_2Cl_2 A4.1) et les deux autres contenant les produits polaires (phase MeOH A4.2 et MeOH/H_2O A4.3). La fraction A4.2 (9 g) a été ensuite passée sur une colonne de Sephadex® LH20 et éluée par des gradients (Hex/CH_2Cl_2) [50:50, 0:100] et (CH_2Cl_2/AcOEt) [100:0, 0:100] pour donner 13 fractions (A4.2.1 à A4.2.13).

La fraction A4.2.11 (88 mg) est soumise à une chromatographie sur colonne de gel de silice. L'élution est effectuée par un gradient CH_2Cl_2/MeOH (100:0, 50:50). Après regroupement on obtient neuf fractions (A4.2.11.1 à 4.2.11.9).

La fraction A4.2.11.4 (23 mg) montre en CCM sur RP18 (MeOH/H_2O, 6:4) deux taches de couleur violet noir après révélation avec la vanilline sulfurique. La séparation de ces deux produits a donc pu être effectuée par chromatographie sur couche mince préparative RP18 pour obtenir le composé **1** (9-16,15-16-dipoxy-13,14-dihydroxy-15-methoxy-labdan-6-19-olide, 6 mg). Le deuxième produit est toujours en cours de purification et d'identification.

Un premier fractionnement de l'extrait (C) a été réalisé par filtration sur gel LH20 avec un mélange isochratique MeOH/H_2O (9/1) pour donner 18 fractions (C1 à C18). La fraction C7 (1 g), solubilisée dans (MeOH/H_2O) a permis l'obtention d'un précipité (C7.1, 143,3 mg) et d'un filtrat (C7.2, 873,0 mg). La purification de la fraction C7.1 par SPE sur phase inverse (RP18) en utilisant comme éluant un mélange de polarité croissante (MeOH/H_2O) (10:90, 100:0) a donné le composé **2** (apigénine-7-*O*-β-néohespéridoside, 22 mg).

La fraction C7.2 (873 mg) a été fractionnée par chromatographie liquide moyenne pression (CLMP) sur phase inverse (RP18) avec un mélange MeOH/H_2O de polarité croissante. Quatorze fractions ont été obtenues (C7.2.1 à C7.2.14). Ensuite, C7.2.6 a été purifiée par chromatographie sur couche mince préparative en phase polyamide DC6. Trois sous-fractions ont été obtenues (C7.2.6.1a à C7.2.6.2.1c). Le composé **3** (24 mg) a été isolé et purifié de la fraction C7.2.6.1a par filtration sur gel Sephadex® LH20 (MeOH/H_2O, 90:10) suivie d'une SPE sur phase inverse.

La CCM sur polyamide de la sous-fraction C7.2.6.2 en utilisant le mélange H_2O/MeOH/méthyle éthyle cétone/acétylacétone (13:3:3:1) montre deux taches bleue-blanc à 365 nm : l'une correspondant au composé **3** (actéoside), le composé **4** (forsythoside B) a été isolé par CCM préparative sur polyamide suivie d'une purification sur colonne de Sephadex® LH20 (MeOH/H_2O, 90:10) et d'une SPE sur phase inverse (21,1 mg).

Méthode d'étude de l'activité antibactérienne

Activité antibiotique

Ce test est utilisé pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI). La méthode utilisée est décrite par le Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie (CASFM) [25]. Elle est réalisée en milieu liquide, sur microplaque de 96 puits. Le composé à tester est tout d'abord dissout dans du DMSO (300 µg/ml), puis dilué dans du milieu de culture MH2 (milieu Mueller-Hinton) ajusté en ions Ca^{2+} et Mg^{2+} (solution « mère »). Une dilution en série de cette solution « mère », également dans du milieu MH2, permet d'obtenir diverses solutions « filles » (réalisation d'une gamme de concentrations, 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128). Les concentrations finales en DMSO en contact avec les bactéries doivent être inférieures à 3 % afin d'éviter l'effet toxique du solvant. À partir d'une préculture de bactéries (24 heures à 37 °C) sur milieu gélosé MH2, une suspension bactérienne contenant 10^6 CFU/ml est réalisée. Chaque puits mélangé contient alors : 100 µl de la suspension bactérienne, 50 µl d'une solution de la gamme de dilution du composé testé et 50 µl de MH2 (les concentrations finales en produit à tester vont de 256 à 0,5 µg/ml). Après 18–24 heures d'incubation à 37 °C, les concentrations bactériennes pour lesquelles il n'y a aucun développement bactérien (absence de trouble du milieu de culture) sont déterminées. On détermine la CMI comme étant la concentration la plus faible inhibant la croissance des bactéries [8].

Mesure de l'activité antioxydante

ABTS

En réagissant avec le persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$), l'ABTS (acide 2,2'-azino-bis-[3-éthylbenz-thiazoline-6-sulfonique]) forme le radical $ABTS^{+\cdot}$, de couleur bleue à verte. L'ajout d'antioxydant va réduire ce radical et provoquer la décoloration du mélange. La décoloration du radical mesurée par spectrophotométrie à 734 nm est proportionnelle à la concentration en antioxydant. La méthode utilisée est celle décrite en 2002 par Arts et al. [1].

Cinq dilutions ont été préparées pour chaque extrait et chaque composé pur à partir d'une solution mère (10 et 1 mg/ml respectivement) : 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 et 1/32. Sur une plaque de 96 puits, 20 µl des dilutions sont répartis, auxquels sont additionnés 200 µl d'ABTS (19,2 mg d'ABTS dans 5 ml H_2O auxquels sont ajoutés 3,3 mg de $K_2S_2O_8$; après 12 heures, 4,5 ml de ce mélange sont dilués dans 220 ml d'EtOH). L'absorbance du mélange est mesurée à 734 nm par un lecteur de microplaque. La lecture se fait au bout de 45 minutes. Le blanc est constitué par 220 µl de MeOH. La décroissance de l'absorbance causée par l'antioxydant reflète la capacité de capture du radical libre. Le pouvoir antiradicalaire (ARP) est exprimé comme étant inversement proportionnel à la quantité d'antioxydant/mol d'ABTS nécessaire pour dégrader 50 % de l'$ABTS^{+\cdot}$ (IC_{50}) : $ARP = 1/IC_{50}$

Une comparaison est faite avec la capacité du Trolox® (analogue structural hydrosoluble de la vitamine E) à capturer l'$ABTS^{+\cdot}$… La capacité antioxydante, exprimée en équivalent Trolox® (TEAC), correspond donc à la concentration de Trolox® ayant la même activité que la substance à tester à une concentration donnée. Le résultat est donné en µM ou en mM ou équivalent Trolox® par gramme de produit ou par millilitre s'il s'agit d'un liquide. TEAC = ARP produit/ARP Trolox®.

CUPRAC

Le test CUPRAC a été décrit par Resüat et al. en 2004 [22]. Cinq dilutions de chaque extrait (10 mg/ml) et de chaque produit (1 mg/ml) ont été préparées à partir de la solution mère : 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 et 1/32. Sur une plaque de 96 puits, 50 µl des dilutions sont répartis, auxquels sont additionnés 50 µl H_2O, 50 µl $CuCl_2$ (0,85 g dans 50 ml H_2O), 50 µl de tampon acétate (3,85 g de NH_4Ac dans 50 ml H_2O, pH = 7) et 50 µl de néocuproïne (0,039 g dissout dans 25 ml H_2O). Les solutions sont ensuite incubées à 25 °C pendant 60 minutes.

L'absorbance est mesurée à 450 nm par un lecteur de microplaques.

Les résultats sont exprimés sous la forme : DO = *f* [produit]

La pente de la droite obtenue correspond à : *E* % = coefficient d'extinction massique, la concentration est exprimée en gramme/litre.

La capacité antioxydante est calculée en équivalents Trolox® : $TEAC_{massique} = E\,\%_{produit}/E\,\%_{Trolox^{®}}$

Mesure de l'activité antigénotoxique

Le protocole suivi est décrit par Quillardet et Hofnung, les concentrations testées pour des extraits sont de 250, de 50 et de 10 µg/essai et pour les composés de 50, de 10 et de 2 µg/essai.

La souche *Escherichia coli PQ37* est incubée pendant une nuit à 37° C dans le milieu de culture Luria (LB) supplémenté d'ampicilline, puis diluée huit fois dans le même milieu et incubée de nouveau pendant deux heures à 37 °C [27]. Trois cent microlitres de cette deuxième culture sont dilués neuf fois en présence du LB. Aux 300 µl de cette deuxième dilution, on ajoute 10 µl de l'extrait ou 10 µl du composé que l'on souhaite tester à la concentration choisie plus 10 µl de la solution mutagéne (nitrofurantoïne). Le mélange est incubé pendant deux heures, sous agitation continue à 37 °C.

Dosage de la β-galactosidase

Soixante microlitres du mélange (culture bactérienne + extrait ou composé + nitrofurantoïne) sont dilués dix fois dans le tampon B et incubés pendant cinq à dix minutes à 37 °C. Cent vingt microlitres du substrat o-nitrophényl-β-D-galactopyranoside (ONPG) sont alors additionnés au mélange à une concentration de 4 mg/ml permettant ainsi le développement d'une coloration jaune en présence de *β*-galactosidase, qui peut apparaître au bout de 10 à 90 minutes d'incubation. La réaction est stoppée par 400 µl d'une solution de Na_2CO_3 (1 M) et l'intensité de la coloration est suivie par lecture de l'absorbance à 405 nm.

Dosage de la phosphatase alcaline

Soixante microlitres du mélange (culture bactérienne + extrait ou composé + nitrofurantoïne) sont dilués dix fois dans le tampon phosphate (trishydroxyméthylaminométhane [1 M] et du sodium dodecyl sulfate [SDS] [3,46 mM]. Le pH est ajusté à 8,8) et incubés pendant cinq à dix minutes à 37 °C. Cent vingt microlitres du substrat *p*-nitrophénylphosphate (PNPP) sont alors additionnés au mélange à une concentration de 4 mg/ml, permettant ainsi le développement d'une coloration jaune, en présence de la phosphatase alcaline, qui peut apparaître au bout de 10 à 90 minutes d'incubation. La réaction est stoppée par 200 µl d'une solution de HCl (2,5 M). Cinq minutes après, une solution de tris (2 M) [20] est ajoutée. L'intensité de la coloration est suivie par lecture de l'absorbance à 405 nm. Quatre témoins sont réalisés : deux blancs (blanc positif et blanc 0), le premier ne renferme que les bactéries et le second que le LB. Deux témoins positifs sont utilisés en contrôle : le premier renferme le milieu LB avec la nitrofurantoïne, un agent mutagène ; le second, les bactéries avec la nitrofurantoïne.

Le pourcentage de l'effet antigénotoxique est calculé par la formule $\mathbf{\%AG = 100 - (IF_1 - IF_0/IF_2 - IF_0) \times 100}$, où IF_1 = facteur d'induction en présence des composés testés ; IF_2 = facteur d'induction en absence des composés testés ; IF_0 = facteur d'induction du témoin négatif.

Résultats et discussion

Dans cette étude préliminaire, les composés isolés des extraits de parties aériennes de *Marrubium deserti* de Noé sont : un diterpène original, le 9,16-15,16-diépoxy-13-,14-dihydroxy,15-méthoxy labdan-6,19-olide (**1**) et de nom trivial marrulibacétal A (Tableau 1), l'apigénine-7-*O*-β-néohespéridoside (**2**), l'actéoside (**3**) et le forsythoside (**4**), qui ont été identifiés par RMN 1D et 2D, spectrométrie de masse et UV et par comparaison avec les données de la littérature [10,29].

Tableau 1. RMN du ^{1}H et du ^{13}C du composé **1** (300/75 MHz, δ, *J* en Hz) dans le $CDCl_3$

Position	δ_H (ppm), M (J_{Hz})	δ_C (ppm)
1	1,96, m/1,16, m	27,8
2	1,72, m/1,47, m	17,9
3	2,12, m/142, m	28,2
4	–	43,9
5	2,38, d (5,0)	44,6
6	4,78, t (5,0)	76,6
7	2,20, m/2,18, m	32,3
8	2,07, m	33,5
9	–	80,3
10	–	40,9
11	1,77 (2H), m	20,7
12	2,08, m/1,86, m	30,0
13	–	75,8
14	3,88, s	78,6
15	4,93, d (1,5)	109,8
16	5,47, s	105,7
17	1,11, d (6,8)	19,4
18	1,28, s	23,2
19	–	184,1
20	1,03, s	22,0

Le marrulibacétal A (**1**) appartient à la classe des labdanes. La structure est nouvelle. La stéréochimie relative est en cours de détermination [31].

Les composés isolés ont été évalués pour leur activité antibactérienne (Tableau 2), antioxydante (ABTS et CUPRAC) (Tableau 3) et antigénotoxique (Tableau 4). Le composé **1** (marrulibacétal A) présente une activité bactériostatique vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et de *Pseudomonas aeruginosa* à une concentration de 46 µM. Le composé **4** (forsythoside) présente des activités antibactériennes significatives vis-à-vis de la bactérie *Enterococcus faecalis*.

Il est intéressant de noter que le composé **1** présente une activité à la fois sur des bactéries à Gram+ et à Gram–. Dans la littérature, le forsythoside A (**4**) (l'isomère de l'actéoside) était connu pour présenter une activité antibactérienne sur *Staphylococcus aureus* [7]. À notre connaissance, c'est la première fois que le type particulier de labdane pentacyclique (composé **1**) est testé pour son activité antibactérienne. Les labdanes bicycliques sont décrits comme très actifs sur *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*, alors que les dérivés glycosylés sont plutôt actifs sur les Gram+ (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*) [15]. Enfin, une recherche d'activité de modulation de la résistance aux antibiotiques sur des souches MDR (*multidrug-resistant*) (*Staphylococcus aureus* 1199B) a également été évaluée pour ces composés, mais aucune activité significative n'a été observée (données non présentées).

Tableau 2. Concentration minimale inhibitrice (CMI, en µM) des composés **1, 3** et **4** sur différentes souches de bactéries pathogènes

Composés	Bactéries			
	Gram+		Gram–	
	Staphylococcus aureus **ATCC 29213**	*Enterococcus faecalis* **ATCC 29212**	*Pseudomonas aeruginosa* **ATCC 15442**	*Klebsiella oxytoca* **ATCC 700324**
1	46	> 200	46	> 200
3	162,5	> 200	162,5	> 200
4	130	65	130	> 200

Tableau 3. Activité antiradicalaire des composés **2, 3** et **4** avec les méthodes ABTS, CUPRAC

	ABTS		CUPRAC
Composés	**IC_{50} (g de produit/mmol d'ABTS)**	**TEAC**	**TEAC massique**
Trolox®	0,09	1	1
Acide gallique	0,03	3	5,7
Rutine	0,34	0,26	3,3
2	3,50	0,025	0,07
3	0,20	0,45	2,6
4	0,14	0,64	2,6

Tableau 4. Activité antigénotoxique des composés **2, 3, 4** sur *Escherichia coli* PQ37

Dose (µg/essai)		Pourcentage d'inhibition
2	50	91
	10	87
	2	55
3	50	97
	10	81
	2	59
4	50	96
	10	62
	2	59

Concernant les activités antioxydantes, les composés **3** et **4** ont montré un ARP important avec une activité supérieure à celle de la rutine par la méthode ABTS. La méthode CUPRAC confirme un pouvoir antioxydant significatif pour ces deux composés avec toutefois des activités légèrement inférieures à celle de la rutine et moins importantes que celle de l'acide gallique.

Les deux phénylpropanoïdes ont également montré des activités antigénotoxiques intéressantes avec une inhibition presque totale de la génotoxicité à 50 µg, effet qui reste important même à 2 µg (Tableau 4).

Conclusion

Cette étude préliminaire de fractionnement des extraits au dichlorométhane et à l'acétate d'éthyle des parties aériennes de *Marrubium deserti* de Noé a été réalisée par différentes méthodes chromatographiques et a conduit à l'isolement d'un nouveau diterpène, de deux phénylpropanoïdes et d'un flavonoïde glycosylé. Au cours de ce travail, une nouvelle molécule, le marrulibacétal A (**1**) présentant une bonne activité antibactérienne vis-à-vis des deux souches *Staphylococcus aureus et Pseudomonas aeruginosa* a été mis en évidence. Ce type de molécule n'a jamais fait l'objet d'étude dans le domaine antibactérien d'où l'intérêt d'une étude relation structure–activité en perspective. Les activités antioxydantes des composés **2, 3** et **4** ont été évaluées en utilisant deux méthodes : la décoloration du radical cation $ABTS^{+\cdot}$ et la réduction de l'ion métallique par la méthode CUPRAC ont montré que les phénylpropanoïdes sont les plus actifs. Il serait intéressant de poursuivre des études sur la présence d'autres substances actives et de vérifier les différentes activités (antibactérienne, antioxydante [ABTS, CUPRAC], antigénotoxique et/ou génotoxique) des différents extraits de *Marrubium deserti* de Noé.

Bibliographie

1. Arts MJTJ, Dallinga JS, Voss HP, et al. (2002) A critical appraisal of the use of the trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay in defining optimal antioxidant structures. Food Chem 80: 409–14
2. Aruoma OJ, Halliwell B (1995) DNA damage by free radicals: carcinogenic implications, Immunology of free radicals species. Academic Press, London
3. Balmé F (1982) Plantas Medicinais. Ed. Hemus Ltda, Sâo Paulo, Brazil, p. 241
4. Birkofer L, Kaiser C, Thomas U (1968) Acteosid und Neoacteosid : Zuckerester aus *Syringa vulgaris* L. Z Naturforsh B 23: 1051–8
5. Çalis I, Hosny M, Khalifa T, Ruedi P (1992) Phenylpropanoid glycosides from *Marrubium alysson*. Phytochem 31(10): 3624–6
6. El-Bardai S, Lyoussi B, Wibo M, Morel N (2001) Pharmacological evidence of hypotensive activity of *Marrubium vulgare* and *Foeniculum vulgare* in spontane hypertensive rat. Clin Exp Immunol 23: 329–43
7. Endo K, Takahashi K, Abe T, Hikino H (1981) Structure of forsythoside A, an antibacterial principle of *Forsythia* leaves. Heterocycles 16: 1311–4
8. Ericsson MH, Sherris JC (1971) Antibiotic sensitivity testing: report of an international collaborative study. Acta Path Micr 217: 1–90
9. Greuter W, Burdet HM, Long G (1986) Eds. Med-Chechlist. Conservatoire et Jardins Botaniques, Genève 3: 292–5
10. Hennebelle T, Sahpaz S, Skaltsounis AL, Bailleul F (2007) Phenolic compounds and diterpenoids from *Marrubium peregrinum*. Biochem Syst Ecol 35(9): 624–6
11. Iida A, Tanaka M, Mihara T, et al. (1995) Marrubinones A and B, labdane diterpenoids from *Marrubium astracanicum* (Labiatae). Chem Pharm Bull 43(9): 1454–7
12. Katagiri Y, Hashidoko Y Tahara S (2002) Localization of flavonoids in the yellow lupin seedlings and their UV-B-absorbing potential. Z Naturforsch 57c: 811–6
13. Lewis HW (1977) Medical Botany. Plants Affecting Man's Health. John Wiley, New York
14. Maiza K, Brac de Laperrière RA, Hammiche V (1993) Médicaments et aliments : l'approche ethnopharmacologique, p. 169
15. Meenakshi S, Mahesh P, Sharma RP (1998) Biological acivity of the labdane diterpenes. Planta Med 65: 2–8
16. Newall CA, Anderson LA, Phillipson JD (1996) Herbal Medicines. The Pharmaceutical Press, London, p. 165
17. Olinski R, Gackowski D, Foksinski M (2002) Oxidative DNA damage: assessment of the role in carcinogenesis and acquired immunodeficiency syndrome. Free Rad Bio Med 33: 192–200
18. Pavela R (2004) Insecticidal activity of certain medicinal plants. Fitoterapia 75: 745–9
19. Quezel F, Santana S (1962–1963) Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Ed CNRS, Paris France 1(2): 801–2
20. Quillardet P, Hofnung M (1985) The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins procedures. Mutation Res 147: 65–78
21. Quillardet P, Huisman O, D'Ari R, Hofnung M (1982) SOS chromotest a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity. Proc Natl Acad Sci USA 79: 5971–5
22. Resüat A, Kubilay GCL, Mustafa O, et al. (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: 7970–81
23. Salinas GM, Guerra MCR, Villareal JV, et al. (2005) Bacterial activity of organic extracts from *Flourensia cernua* against strains of *Mycobacterium tuberculosis*. Arch Med Res 37: 45–9
24. Seidel V, Bailleul F, Tillequin F (1999) Terpenoids and phenolics in the genus *Ballota* (Lamiaceae) Recent Res Devel Phytochem 3: 27–39
25. Soussy CJ (2007) Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie. Édition de janvier
26. Takeda Y, Yanagihara K, Masudo T, et al. (2000) Labdane diterpenoids from *Marrubium globossum* ssp. Globossum. Chem Pharm Bull 48(8): 1234–5
27. Tomas B, Michal S, Pavel C, et al. (2005) Genotoxic activity of a technical toxaphene mixture and its photodegradation products in SOS genotoxicity tests. Mutation Res 565: 113–20
28. Vander Jagt TJ, Ghattas R, Vander Jagt DJ, et al. (2002) Comparison of the total antioxidant content of widely used medicinal plants of New Mexico. Life Sci 70: 1035–40
29. Venkateshwar G, Rao PS (1982) A phytochemical study of *Heylandia latebrosa*. Fitoterapia 3(1): 21–4
30. Walt JM, Breyer-Brandwizk M (1962) The medicinal and poisonous plants of Southern and Eastern Africa 2nd Ed. E and S Livingstone, Edinburgh
31. Zaabat N, Darbour N, Bayet C, et al. (2010) (publication en cours)

2010 12e SYMPOSIUM INTERNATIONAL D'

AROMATHÉRAPIE & PLANTES MÉDICINALES

CONCOURS POSTERS UNIVERSITAIRES

Prix Spécial de Phytothérapie des Editions Springer

Sont nommés LAUREATS :

Nabila ZAABAT
N. DARBOUR
C. BAYET
S. MICHALET
A. DOLEANS-JORDHEIM
L. CHEKIR-GHEDIRA
S. AKKAL
MG. DIJOUX-FRANCA

Université de Lyon / Université de Constantine / Université de Monastir

Pour leur poster intitulé :

« Etude phytochimique de Marrubium deserti de Noé et activités antibactériennes, antioxydantes et antigénotoxiques »

Pour servir et valoir ce que de droit,

Délivré à Grasse, le 28 mars 2010

L'Organisateur

VILLE DE GRASSE

Grasse. *Vivre la Côte d'Azur de l'intérieur.*

Etude phytochimique de *Marrubium deserti de Noé* et activités antibactériennes, antioxydantes et antigénotoxiques

Zaabat N[1,2], Darbour N[1], Bayet C[1], Michalet S[1], Doléans-Jordheim A[1], Chekir-Ghedira L[3], Akkal S[2], Dijoux-Franca MG[1]

[1] *Université de Lyon, F-69622, Lyon, France; Université Lyon 1, Villeurbanne; CNRS, UMR 5557, Ecologie Microbienne, ISPB, 69373 Lyon, France.*
[2] *Université de Constantine , Laboratoire de Phytochimie, Faculté des Sciences, 25 000 Constantine , Algérie.*
[3] *Université de Monastir , Pharmacognosie /Biologie Moléculaire , Faculté de Pharmacie, 5000 Monastir,Tunisie.*

Introduction



L'étude phytochimique des parties aériennes de *Marrubium deserti de Noé*, une plante endémique algérienne utilisée en médecine traditionnelle pour la toux entre autres utilisations, a permis d'identifier :

- le ß-stigmastérol et un diterpène original de la famille de la marubiine (**1**) ainsi que d'autres dérivés qui sont en cours d'identification structurale.
- deux dérivés de phénylpropanoïdes (l'actéoside **2** et le forsytoside **3**)
- la terniflorine, l'apigénine-7-*O*-glucuronide, son dérivé-7-*O*-glucosidé et son dérivé 7-*O*-ß-néohesperidoside (**4**).

Le diterpène (**1**), l'actéoside (**2**) et le forsytoside (**3**) ont été testés pour leurs activités antibacteriennes sur des bactéries Gram + et Gram – (tableau **1**). Les activités antioxydantes (ABTS, CUPRAC) et antigénotoxiques des composés **2**, **3** et **4** ont également été évaluées (tableaux **2**, **3** et **4**).

Résultats

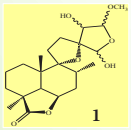
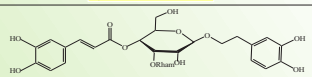
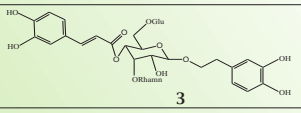
Composés \ Bactéries	Gram +		Gram –	
	S. aureus ATCC29213	*E. faecalis* ATCC29212	*P. aeruginosa* ATCC15442	*K. oxytoca* ATCC700324
 1	46	> 200	46	> 200
 2	162,5	> 200	162,5	> 200
 3	130	65	130	> 200

Tableau **1:** Concentration Minimale Inhibitrice (en µM) des composés **1**, **2** et **3** sur différentes bactéries pathogènes

Composés	IC50 (g de produit/ mmol d'ABTS)	TEAC
Trolox	0,09	82
Acide Gallique	0,03	237
Rutine	0,34	22
2	**0,20**	**36**
3	**0,14**	**52**
4	3,50	2

Tableau **2**: Activité antiradicalaire des composés **2**, **3** et **4** avec la méthode ABTS (TEAC:=ARP produit/ARP Trolox)

Composés	TEAC massique
Trolox	1
Acide Gallique	5,7
Rutine	3,3
2	**2,6**
3	**2,6**
4	0,07

Tableau **3**: Activité antioxydante des composés **2**, **3** et **4** avec la méthode CUPRAC (TEAC : Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)

	Dose (µg/essai)	% d'inhibition
2	50	**97**
	10	81
	2	59
3	50	**96**
	10	62
	2	59
4	50	**91**
	10	87
	2	55

Tableau **4**: Activité antigénotoxique des composés **2**, **3** et **4** sur *E. coli PQ37*

Discussion

Les composés **1** et **3** présentent des activités antibactériennes significatives: sur *S. aureus* et *P. aeruginosa* pour **1**, et sur *E. faecalis* pour **3**. Il est intéressant de noter que le composé **1** présente une activité à la fois sur des bactéries à Gram + et à Gram –. Une recherche d'activité de modulation de la résistance aux antibiotiques sur des souches MDR (MultiDrug-Resistant) (*S. aureus* 1199B) a également été évaluée pour ces composés, mais aucune activité significative n'a été observée.

Concernant les activités antioxydantes, les composés **2** et **3** ont montré un pouvoir antiradicalaire important avec une activité supérieure à celle de la rutine pour la méthode ABTS; la méthode CUPRAC confirme un pouvoir antioxydant significatif pour ces deux composés avec toutefois des activés légèrement inférieures à celle de la rutine et moins importantes que celle de l'acide gallique. Ces deux phénylpropanoïdes ont également montré des activités antigénotoxiques intéressantes avec une inhibition presque totale de la génotoxicité à 50 µg, effet qui reste important même à 2 µg.

Impression Sce ICAP - Université Claude Bernard Lyon1