



UNIVERSITE PASQUALE PAOLI – CORSE

École Doctorale « Environnement et Société » UMR CNRS 6134 (SPE)

Thèse en Convention de Cotutelle Internationale présentée

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN CHIMIE

Mention: Chimie Théorique, Physique, Analytique

Soutenue publiquement par

Mohammed SEMAOUI

le 14 décembre 2021

**Extraction et caractérisation des constituants contenus dans les
extraits de *Scolymus grandiflorus*, *Carduncellus pinnatus* et *Salvia
argentea* : Evaluation de leurs activités biologiques**

Directeur(s) :

Mr. Alain MUSELLI, Professeur Univ. de Corse (France)

Mr. Mohammed El Amine DIB, Professeur Univ. Tlemcen (Algérie)

Rapporteurs :

Mr. Nicolas BALDOVINI, Dr-HDR Univ. de Nice (France)

Mr. Abdelkrim CHERITI, Professeur Univ. de Béchar (Algérie)

Jury :

Mr. Zoheir ARRAR, Professeur Univ. de Tlemcen (Algérie)

Mr. Alain MUSELLI, Professeur Univ. de Corse (France)

Mr. Mohammed El Amine DIB, Professeur Univ. Tlemcen

Mr. Nicolas BALDOVINI, Dr-HDR Univ. de Nice (France)

Mr. Abdelkrim CHERITI, Professeur Univ. de Béchar (Algérie)

Mme. Pascale BRADESI, Docteur Univ. de Corse (France)

Membre invité:

Mme. Fouzia MESLI, Professeur Univ. de Tlemcen Invité



Mt. hood oregon flowers lavender mountains
par Debbie Cox

The important thing is not to stop questioning. Curiosity has its own reason for existence. One cannot help but be in awe when he contemplates the mysteries of eternity, of life, of the marvelous structure of reality. It is enough if one tries merely to comprehend a little of this mystery each day.

“Albert Einstein”

Ce ne sera pas facile, mais c'est possible.

- Jason Lapointe-

Je dédie cette thèse

Aux êtres les plus chers de ma vie : Mes parents,

A MON PERE,

Merci papa, je sais que tu es fier de moi
mon plus haut exemple et mon modèle de persévérance
pour aller toujours de l'avant et ne jamais abandonner. Pour
son enseignement continu à m'indiquer les vraies valeurs de
la vie.

A MA MERE,

Pour son éducation, sa patience, sa compréhension,
son soutien et ses prières.

J'espère que cette thèse sera à la hauteur de vos attentes et
qu'elle soit l'accomplissement
de vos efforts et vos sacrifices

A MES CHERS FRERES ET SŒURS : pour vous
exprimer toute mon affection et ma tendresse pour votre
aide si précieuse qui a rendu cette réussite possible

A ma grande famille, mes amis et collègues

AVANT PROPOS

Tout d'abord je remercie le bon Dieu, tout puissant et miséricordieux, qui m'a donné la force, l'intelligence et la patience d'accomplir ce travail qui représente la fin d'un énorme parcours, riche en expériences humaines et académiques.

Ce travail de thèse en cotutelle résulte d'une parfaite collaboration entre les laboratoires, UMR CNRS 6134 SPE-Lab. Chimie des Produits Naturels de l'Université de Corse (France) et le Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives, LASNABIO de l'Université de Tlemcen (Algérie). Durant ce projet j'ai bénéficié de l'expertise avisée des deux laboratoires.

A un grand monsieur, un père et un Ange du Dieu sur terre, le **Professeur Boufeldja TABTI**, cinq mois se sont écoulés depuis votre départ. De savoir que là-haut tu as trouvé la paix, la sérénité et le bonheur que vous méritez. J'ai d'abord refusé d'y croire et j'ai dû me résigner à me dire que seuls me restent les moments passés ensemble, gravés à jamais dans mon cœur et ma mémoire.

J'exprime toute ma gratitude à Monsieur le **Professeur Jean COSTA**, Professeur Emérite de l'Université de Corse (France), pour ses nombreux conseils et encouragements lors de nos petites rencontres.

Je tiens à remercier énormément mon directeur de thèse en Algérie, le **Professeur Mohammed El Amine DIB**, pour m'avoir aidé et supporté – dans tous les sens du terme !! – pendant ces 5 ans de travail ensemble. Je vous suis reconnaissant pour votre engagement de tous les jours et votre accompagnement tout au long de ce travail de thèse doctoral. Merci donc infiniment pour ce parcours.

Je tiens également à remercier sincèrement mon directeur de thèse en France, le **Professeur Alain MUSELLI** de m'avoir accueilli chaleureusement au sein du Laboratoire de Chimie des Produits Naturels, je vous remercie de m'avoir fait confiance totale, en me faisant profiter de votre grande expérience. Votre suivi, encouragements et précieux conseils ont permis le bon déroulement et l'aboutissement de ce travail de thèse.

Je tiens également à remercier **Monsieur Zoheir ARRAR** professeur de l'université de Tlemcen, de m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury.

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à **Monsieur Nicolas BALDOVINI Docteur Habilité à Diriger des Recherches** de l'Université de Nice, et **Monsieur Abdelkrim CHERITI Professeur** de l'Université de Béchar, pour leur participation à la commission d'examen et pour avoir accepté la charge de rapporteur.

Je remercie aussi **Madame Pascale BRADESI**, Docteur de l'Université de Corse, d'avoir bien voulu juger ce travail.

Je remercie aussi **Madame Fouzia MESLI**, Professeur de l'université de Tlemcen, d'avoir accepté notre invitation.

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à **Madame Nabila Ainseba**, Docteur Habilité à Diriger des Recherches de l'Université de Tlemcen, parmi les premiers qui m'ont accueillie à mon arrivée à Tlemcen, et qui m'a toujours encouragée, bien conseillée et soutenue pour ce travail de thèse, toute ma gratitude et mon amitié.

J'aimerais également exprimer toutes ma gratitude à Madame **Houria MEDJDOUB**, Docteur de l'Université de Tlemcen, et son mari Monsieur Brahim, pour leur aide à la récolte et l'échantillonnage de la plante.

Mes remerciements vont également aux **Professeur Said GHALEM**, pour son accueil au sein du laboratoire LASNABIO.

Je remercie Monsieur le **Professeur Noury BENABADJI**, pour l'identification des plantes.

Je remercie aussi Monsieur le **Docteur Salim Kezzal** Pharmacien, Chef du Laboratoire de Contrôle Qualité à l'Institut Pasteur d'Algérie, pour son accueil dans son laboratoire.

Je remercie le **Dr Mathieu Paoli** (UCPP) pour l'acquisition des spectres de RMN et le **Dr Aura Tintaru** (AMU) pour son aide précieuse dans l'interprétation des spectres de RMN mono et bidimensionnelle.

Rien ne serait possible sans l'aide administrative et logistique de **Mr Amine ATTAR** en Algérie, et **Mr le Docteur David MOUNGAR** en France, merci pour votre gentillesse, votre patience et votre aide dans les démarches administratives, pas toujours simple.

Ce travail n'aurait pas pu être mené à bien sans une équipe de collègues :

Je remercie tout d'abord Ali MEDBOUHI pour ces orientations si précieuses, et tous les collègues du laboratoire de Chimie des Produits Naturels de Corse ; je remercie Jean-Marie D (Jimmy), Franck R, Anais P, Stéphane A et Yin Y, qui ont eu la patience de m'initier aux arcanes des analyses GC et GC/MS. Merci pour votre aide et vos conseils. Mes remerciements vont également à mes collègues et doctorants du laboratoire LASNABIO en Algérie, Rania B, les ingénieurs du labo Boumediene, Khira et Soumia, et les doctorantes Lyna B., Radja A. et Hanane S.

Je remercie toutes les personnes que j'ai rencontré durant cette expérience de vie, je tiens à remercier Mohamed BDrissou, Omar KH, Omar et Mohamed TB, Omar HM et Brahim BA et tous les gens dont j'ai eu la chance de faire connaissance à l'étranger, et tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ce projet.

A MA FIANCEE, je souhaite que Dieu te garde, et t'aider à réaliser à ton tour tes vœux les plus chers.

Mes parents et Mes frères ;

Pour votre soutien, tant moral que financier, tout au long de mes années d'études.

SOMMAIRE

Liste des figures

Liste des tableaux

Abréviations

INTRODUCTION GENERALE.....	01
CHAPITRE I: METHODOLOGIE D'ETUDE DES HUILES ESSENTIELLES ET LEURS CONSTITUANTS.....	05
I.1. Echantillonnage de la matière végétale.....	07
I.2. Préparation des huiles essentielles.....	07
I.3. L'analyse des huiles essentielles.....	08
I. 3. 1. Chromatographie en phase gazeuse CPG.....	08
I. 3. 2. Chromatographie en phase gazeuse/Spectrométrie de masse CPG/SM.....	09
I. 3. 3. Résonance magnétique nucléaire RMN.....	10
I. 3. 4. Méthodologie d'analyse.....	11
I.4. Outils statistiques.....	15
CHAPITRE II : ETUDE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE SCOLYMUS GRANDIFLORUS	16
II.1. Description botanique et travaux antérieurs.....	17
II.2. Lieux de récolte et rendements en huile essentielle.....	19
II.3. Etude de la composition chimique de l'huile essentielle de <i>S. grandiflorus</i>.....	19
II.4. Variabilité chimique des huiles essentielles de <i>S. grandiflorus</i>.....	26
CHAPITRE III: ETUDE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE CARDUNCELLUS PINNATUS.....	31
III.1. Description botanique et travaux antérieurs.....	32
III.2. Lieux de récolte et rendements en huile essentielle.....	34
III.3. Analyse des huiles essentielles de <i>C. pinnatus</i>.....	34
III.4. Composition chimique des huiles essentielles au cours du cycle végétatif de la plante	36

CHAPITRE IV : ETUDE DE L’HUILE ESSENTIELLE DE SALVIA ARGENTEA	40
IV.1. Description botanique et travaux antérieurs	41
IV.2. Lieux de récolte de <i>S. argentea</i> et rendements en huile essentielle.....	44
IV.3. Etude de la composition chimique de l’huile essentielle de <i>S. argentea</i> L.....	44
CHAPITRE V : EVALUATION DES ACTIVITES BIOLOGIQUES DES HUILES ESSENTIELLES.	53
V.1. Propriété antioxydante des huiles essentielles.....	54
V.2. Evaluation de l’activité antioxydante des huiles essentielles de <i>S. grandiflorus</i> , <i>C. pinnatus</i> et <i>S. argentea</i>	55
V. 2. 1. Test de piégeage du radical libre : DPPH	55
V. 2. 2. Test de piégeage radicalaire et le pouvoir réducteur : FRAP.....	56
V.3. Activités antimicrobiennes des huiles essentielles.....	57
V. 3. 1. Evaluation des activités antimicrobiennes et antifongiques de l’huile essentielle de <i>Scolymus grandiflorus</i>	58
V. 3. 2. Evaluation des activités antimicrobiennes de l’huile essentielle de <i>Carduncellus pinnatus</i>	59
V. 3. 3. Evaluation des activités antimicrobiennes de l’huile essentielle de <i>Salvia argentea</i>	61
V.4. Discussion.....	62
V.5. A la recherche de nouveaux actifs anticancéreux – nouveaux agents anti-angiogénique, cas des Davanoides contenus dans l’huile essentielle de <i>S. grandiflorus</i>	65
V. 5. 1. Approche théorique.....	65
V. 5. 2. Analyse de Docking (amarrage) moléculaire	67
V. 5. 3. Évaluation in silico des propriétés (ADME).....	75
V. 5. 4. Propriétés pharmacocinétique et médicinal	79
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	82
PARTIE EXPERIMENTALE.....	87
ANNEXES.....	92
BIBLIOGRAPHIE.....	105

Liste des figures

Figure 1 : Identification des constituants d'une huile essentielle par combinaison des techniques de CPG et de CPG/SM.

Figure 2 : Méthodes d'analyses complémentaires des constituants d'une huile essentielle.

Figure 3 : Partie racinaire de *S. grandiflorus*.

Figure 4 : Partie aérienne de *S. grandiflorus*.

Figure 5 : Répartition géographique de *S. grandiflorus* de l'ouest de l'Algérie.

Figure 6 : Chromatogramme de l'huile essentielle de *S. grandiflorus* obtenu sur colonne apolaire.

Figure 7 : Fractionnement de l'huile essentielle Coll. de racines de *S. grandiflorus*.

Figure 8 : Données RMN et structure de la *cis*-Davanone.

Figure 9 : Données RMN et structure de la *cis*-Hydroxydavanone

Figure 10 : Données RMN et structure de la *cis*-davanol.

Figure 11 : Données RMN et structure de la Davana furane.

Figure 12 : Classification hiérarchique ascendante (CHA) des différents échantillons d'huiles essentielles de *S. grandiflorus*.

Figure 13 : L'analyse en composantes principales (ACP) des différents échantillons d'huiles essentielles de *S. grandiflorus*.

Figure 14 : Partie racinaire de *C. pinnatus*.

Figure 15 : Partie aérienne de *C. pinnatus*.

Figure 16 : Chromatogramme de l'huile essentielle de *C. pinnatus* obtenu sur colonne apolaire

Figure 17 : *Salvia argentea* (à droite, la partie aérienne, à gauche, la plante entière).

Figure 18 : Chromatogramme de l'huile essentielle de *S. argentea* obtenu sur colonne apolaire.

Figure 19 : Fractionnement de l'huile Coll. à partir des racines de *S. argentea* L.

Figure 20 : structure de ferruginol **23** et de dérivé Phenaleno[1,9-bc]furane **22**.

Figure 21 : Structures et les valeurs des déplacements chimiques de l'Aethiopinone **22** (gris foncé) et de Saprorthoquinone **27** (gris clair).

Figure 22 : Structures et les valeurs des déplacements chimiques de la salvipisone **26** (gris clair) et de la 12-hydroxysapriparaquinone **25** (gris foncé).

Figure 23 : Cavité enzymatique avec les résidus du site actif pour les cibles : 5t89,3HNG et 2XIR , (ces codes des enzymes ont été téléchargés de la base de données PDB (<https://www.rcsb.org/>)).

Figure 24 : c) Le composé le plus performant, d) Un nouvel inhibiteur L-20 identifié par l'amarrage moléculaire 2-Hydroxy davanone est montré dans le site actif.

Figure 25 : L'illustration graphique de l'interaction entre (A) Davanone ; (B) iso davanone; (C) 2-Hydroxy davanone et acide hexadécanoïque avec protéine VEGF. Comme le montre cette figure, les composés ancrés étaient situés dans les résidus de liaison au VEGF les plus proches. Ce type d'interaction altère son affinité à se lier aux VEGFR-1 et 2.

Figure 26 : e) Le composé ayant le meilleur score f) Un nouvel inhibiteur L-25 identifié par l'amarrage moléculaire. L'acide hexadécanoïque est montré dans le site actif.

Figure 27 : i) Le composé ayant le meilleur score, j) Un nouvel inhibiteur L-25 identifié par l'amarrage moléculaire. L'acide hexadécanoïque est montré dans le site actif.

Figure 27(a): L'illustration graphique de l'interaction entre (A) iso davanone; (B) acide tétradécénoïque; (C) Davanol D1 et (D) Acide hexadécanoïque avec VEGFR-2.

Figure 28 : L'illustration graphique de l'interaction entre les quatre composés supérieurs ancrés (A) Davanone L13; (B) Davanol D1 L18; (C) Acide tétradécanoïque L24 et (D) Acide hexadécanoïque L25 avec ADNc.

Figure 29 : Diagramme BOILED-Egg. Les points situés dans le jaune de BOILED-Egg (jaune) représentent les molécules prédites à pénétrer passivement à travers la barrière hémato-encéphalique (BBB). Ceux du blanc de l'Egg sont relatifs aux molécules dont l'absorption est prévue passivement par le tractus gastro-intestinal; les points bleus indiquent les molécules pour lesquelles il était censé être efflué du système nerveux central (SNC) par la glycoprotéine P, tandis que les rouges indiquent les molécules prédites de ne pas être effluées du SNC par la P-glycoprotéine.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition chimique des huiles essentielles de *S. grandiflorus* provenant de diverses localités de la région de Tlemcen.

Tableau 2 : Distribution géographique des stations de *C. pinnatus* Desf.

Tableau 3 : Structure et données spectrales de RMN du Carbone-13 de l'Aplotaxene.

Tableau 4 : Composition chimique des huiles essentielles de *C. pinnatus*.

Tableau 5 : Valeurs de déplacements chimiques de RMN du carbone-13 du (3-rac)-4,12-Epoxy-3,11-cyclo-4,5-seco-20(10→5)-abeo-abieta-5(10),6,8,11,13-pentaène 22 et du Ferruginol 23 ; Comparaison entre les données expérimentales δ (ppm) et celles de la littérature δ [ref].

Tableau 6 : Composition chimique des huiles essentielles des racines de *Salvia argentea* L.

Tableau 7 : Activités anti-radicalaires des huiles essentielles étudiées par la méthode DPPH.

Tableau 8 : Tests des activités antioxydantes des huiles essentielles par la méthode FRAP.

Tableau 9 : Activités antimicrobiennes des huiles essentielles de *S. grandiflorus* comparées à la Davanone de la littérature.

Tableau 10 : Activité antifongique de l'huile essentielle de *S. grandiflorus* contre *Alternaria alternata* et *Fusarium solani*.

Tableau 11 : Activités antimicrobiennes des huiles essentielles de *C. pinnatus*.

Tableau 12 : Activité antifongique de l'huile essentielle de *C. pinnatus*.

Tableau 13 : Activité antibactérienne in vitro de l'huile essentielle de *S. argentea* contre les souches bactériennes.

Tableau 14 : Activité antifongique de l'huile essentielle de *S. argentea* contre les champignons phytopathogènes.

Tableau 15 : Quelques propriétés anti-angiogénique médicamenteuses des constituants de *S. grandiflorus*.

Tableau 16 : Résultats des liaisons entre les atomes des meilleurs composés et les résidus de sites actifs de trois cibles.

Tableau 17 : Résultats du bilan énergétique des meilleurs complexes formés avec des molécules de propriété médicamenteuse.

Tableau 18 : Les énergies d'amarrage des inhibiteurs de l'ADNt c.

Tableau 19 : Les énergies d'accostage des inhibiteurs du VEGF/VEGFR.

Tableau 20 : Règle de cinq de Lipinski pour l'analyse ADME des meilleurs inhibiteurs (ligands).

Tableau 21 : Paramètres d'évaluation pharmacocinétique et de toxicité des meilleurs composés.

Tableau 22 : Paramètres de ressemblance avec le médicament, de plomb et de PAINS des meilleurs composés.

Tableau 23 : Propriétés pharmacocinétiques et chimie médicinale pour la meilleure molécule.

Tableau 24 : Bilan énergétique des complexes formés avec l'ADNc sous d'autres cliniques et nos résultats pour les huiles essentielles de *S. grandiflorus*.

Abréviations

ACP	Analyse en Composantes Principales
CHA	Classification Hiérarchique Ascendante
BHA	Butylatedhydroxyanisole
CCM	Chromatographie sur Couche Mmince
CDCl₃	Chloroforme deutéré
COSY	Correlation SpectroscopY
CPG-SM	Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse
d	Doublet (RMN)
Da	Dalton (unité de masse moléculaire)
Dd	doublet de doublet
DPPH	1,1-DiPhényl-2-PicrylHydrazyle
EI	Ionisation par impact électronique (Electron Impact ionization)
FID	Détecteur à Ionisation de Flamme, Flame Ionization Detector
FRAP	Capacité de Réduction Ferrique du Plasma
FT	Transformation de Fourier (Fourier Transform)
FT-IR	Infrarouge à Transformée de Fourier, Fourier Transform Infrared Spectroscopy.
HEs	Huiles Essentielles
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
IC50	Concentration inhibitrice à 50%
IR	Infra-Rouge
Ir	Indice de rétention
J	Constante de couplage (RMN)
m/z	masse/charge électrique
RMN¹³C	Résonance Magnétique Nucléaire du carbone
RMN ¹H	Résonance Magnétique Nucléaire du proton
RMN 2D	Résonance Magnétique Nucléaire bidimensionnelle.
UV	Ultra-Violet
MOE	Molecular operating environment
VEGF	Facteur de croissance endothélial vasculaire
VEGF-R	Récepteur du facteur de croissance endothélial vasculaire

INTRODUCTION GENERALE

Ce projet de thèse a pour ambition de contribuer à connaissance et la préservation de la biodiversité végétale d'Algérie. Il constitue une continuation aux travaux déjà entamés sur la thématique Plantes à Parfums, Aromatiques et Médicinales (PPAM) initiée dans le cadre d'un Partenariat entre les laboratoires, CPN de l'Université de Corse (France) et LASNABIO de l'Université Tlemcen (Algérie). Le travail de doctorat vise la valorisation des espèces végétales de l'Ouest algérien sur lesquelles peut s'appuyer un développement durable.

La recherche sur les Plantes à Parfums, Aromatiques et Médicinales a générée des progrès significatifs grâce à la découverte de nouveaux composés à potentiel thérapeutique. En fait, la nature est une riche ressource de constituants moléculaires ayant le potentiel de traiter les maladies de l'homme, des plantes et des animaux, y compris le cancer, les maladies virales et bactériennes.

L'Algérie est le plus grand pays du bassin méditerranéen avec une superficie supérieure à 2,3 millions de km². Il présente une grande biodiversité végétale qui s'élève à plus de 16000 espèces dont une grande part d'espèces endémiques est menacée. Ainsi, il a été dénombré plus de 600 plantes utiles dont 200 espèces aromatiques et médicinales parmi lesquelles 25% sont des espèces endémiques.

En Algérie, l'agriculture est considérée comme un secteur d'activité distinct dans la croissance économique. Malheureusement ce secteur doit répondre à un problème majeur à savoir assurer une bonne conservation des fruits et légumes pendant le stockage. En effet, des pertes considérables sont observées en phase de post-récolte. Les causes de ces pertes sont généralement attribuées à une dégradation pathologique due à des infections fongiques et bactériennes.

Le développement de la résistance aux microorganismes pathogènes et les effets sur la santé et l'environnement ont conduit les chercheurs à développer des méthodes nouvelles et efficaces, considérées comme sûres et respectueuses de l'environnement, pour contrôler les maladies post-récolte, les dommages oxydatifs et lutter contre le cancer.

Afin de surpasser cet obstacle, les substances naturelles extraites des plantes aromatiques (Huiles essentielles, extraits et Hydrolat) apparaissent comme des alternatives pertinentes aux conservateurs alimentaires et produits phytosanitaires synthétiques. La caractérisation des constituants moléculaires des extraits issus des

plantes ainsi que la recherche de principes actifs constituent un challenge scientifique intéressant à mener.

L'intégration des progrès dans les technologies chromatographiques et spectroscopiques, et les améliorations apportées aux bases de données a fait de l'identification structurale un processus rapide et peu coûteux tout en réduisant considérablement les délais de l'analyse [1].

La méthodologie appliquée lors de ce travail de thèse vise la caractérisation et la valorisation des métabolites secondaires de deux plantes de la famille des astéracées : *Scolymus grandiflorus* et *Carduncellus pinnatus* ; et une plante de la famille des Lamiacées : *Salvia argentea* L. La procédure analytique intègre une étape de préparation de l'échantillon, une étape d'analyse proprement dite puis une étape d'interprétation des résultats afin de trouver des applications à l'étude. Pour cela, deux volets complémentaires seront développés:

Dans un premier temps, nous développerons une étude chimique qui vise à :

- Préparer des huiles essentielles par hydrodistillation et étudier les échantillons individuels et/ou leurs fractions obtenues par des chromatographies préparatives,
- Analyser la composition chimique des extraits végétaux par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) et Chromatographie en phase gazeuse couplée à la Spectroscopie de Masse (CPG/SM), la mise en œuvre de la RMN mono et bidimensionnelle,
- Caractériser de nouvelles molécules notamment absentes de nos propres bibliothèques de données (« Aromes ») et/ou jamais décrites dans la littérature.

Dans un deuxième temps, le volet biologique nous permettra :

- D'étudier les activités antioxydantes des différents extraits utilisables dans la prévention de nombreux cancers,
- D'étudier les activités antibactériennes et antifongiques *in-vitro* des différents extraits sur des souches pathogènes responsables de plusieurs maladies,
- D'initier une étude *in-silico* de molécules possédant le squelette Davanoïde dans le but de rechercher de nouveau agent anti-angiogénique.

Dans le premier chapitre, nous développerons les principales techniques chromatographiques d'analyse et de caractérisation des huiles essentielles, ensuite nous présenterons les méthodes d'analyse par RMN mono et bidimensionnelle comme outil avancé d'identification et de quantification des composés naturels purifiés.

Dans le chapitre (II), nous présenterons les études chimiques antérieures sur le genre *Scolymus*, ensuite nous analysons la composition chimique, la variabilité chimique et la phylogénie de l'espèce *Scolymus grandiflorus* ainsi que les développements analytiques ayant conduit à l'identification des molécules majoritaires absentes ou peu communes dans les bibliothèques de données à notre disposition.

Le chapitre (III) introduit une étude bibliographique du genre *Carduncellus*, ensuite décrit l'étude de la composition chimique et du suivi végétatif de l'huile essentielle de *Carduncellus pinnatus*.

Le Chapitre (IV) est consacré à l'espèce *Salvia argentea*. Après une présentation générale du genre *Salvia*, nous étudierons la composition chimique de l'huile essentielle par CPG, CPG-SM et RMN du carbone-13 après fractionnement par chromatographie liquide préparative. Nous développerons les moyens analytiques mis en œuvre incluant la RMN bidimensionnelle pour l'identification de constituants absents des bibliothèques.

Et enfin dans le Chapitre (V) nous présentons les résultats des activités antioxydantes, antibactériennes des trois huiles essentielles et un travail initiatique sur l'inhibition des récepteurs du VEGF par deux méthodes de chimie computationnelle : les analyses d'amarrage moléculaire (Eng. Docking) et les simulations de dynamique moléculaire (MD). Dans cette contribution, une combinaison de trois approches théoriques a été développée en utilisant la ressemblance médicamenteuse, la chimie médicinale et les propriétés ADME pour explorer les inhibiteurs potentiels parmi les composés des huiles essentielles des racines de *S. grandiflorus* contre trois enzymes : VEGF, VEGFR1 et VEGFR2.

CHAPITRE I : METHODOLOGIE
D'ETUDE DES HUILES ESSENTIELLES
ET LEURS CONSTITUANTS

Les huiles essentielles (HEs) sont des produits naturels issus de la matière végétale dotés d'un grand intérêt. Elles possèdent notamment diverses propriétés biologiques. Le terme «biologique» comprend toutes les activités que ce mélange complexe de composés volatils exerce non seulement sur les humains mais aussi sur les animaux et les plantes.

Les premières recherches sur les constituants des huiles essentielles ont été attribuées au chimiste français M. J. Dumas (1800–1884) [2] qui a publié ses résultats en 1833 sur l'analyse de certains constituants hydrocarbonés, oxygénés, soufrés et azotés. Un autre chercheur français M. Berthelot [3] a caractérisé plusieurs substances naturelles et leurs réarrangements. Cependant, des enquêtes plus approfondies effectuées par O. Wallach assisté par Kekule [4], ont montré que plusieurs terpènes décrits sous différents noms et référencés selon leurs sources botaniques étaient en fait chimiquement identiques. Ces auteurs ont donc essayé d'isoler les différents constituants de l'huile essentielle et d'étudier leurs propriétés de base. Pour cela, ils ont employé la distillation fractionnée et effectué des réactions avec des réactifs inorganiques pour caractériser les fractions individuelles obtenues. Les réactifs utilisés étaient l'acide chlorhydrique, les oxydes d'azote, de brome et le chlorure de nitrosyle. Les hydrocarbures présents dans les huiles essentielles de formule moléculaire $C_{10}H_{16}$ étaient connus et nommés 'terpènes' par Kekule [4] en raison de leur présence dans l'huile de térébenthine.

Plusieurs méthodes ont été développées depuis, pour l'extraction, la purification et la caractérisation des constituants des huiles essentielles. Il existe différents procédés, mais le choix de la méthode utilisée définit obligatoirement la nature de l'essence, son rendement, ainsi que son éventuelle utilisation.

I.1. Echantillonnage du matériel végétal

L'échantillonnage est une étape primordiale dans l'étude phytochimique, elle est plus particulièrement capitale pour l'étude des constituants de la fraction volatile du fait de leur sensibilité aux facteurs environnementaux. Ces derniers peuvent influencer considérablement la quantité mais aussi la qualité des métabolites secondaires des végétaux. Plusieurs études ont montré l'influence du climat, de l'exposition lumineuse, des conditions édaphiques (liés à la nature du sol) ou encore de l'état végétatif de la plante. A titre d'exemple, Figueiredo et al [5] ont démontré que la composition

chimique des huiles essentielles d'*Achillea millefolium* varie selon le stade de développement des fleurs. Cette variation s'observe au travers de la couleur des huiles essentielles produites durant le cycle de maturité des fleurs, couleur qui varie selon le taux de chamazulène. Il est donc indispensable d'être particulièrement vigilant quant à la détermination botanique, la phénologie, la période de récolte et au recueil d'informations relatives à l'environnement afin d'être en mesure d'expliquer les éventuelles variations de composition en métabolites volatils.

I.2. Préparation des huiles essentielles

La composition des huiles essentielles et leurs propriétés dépendent fortement de l'âge de la plante, du caractère génotypique et des paramètres environnementaux. Les huiles essentielles extraites le plus souvent à partir des feuilles, des fleurs et/ou des racines peuvent être utilisées comme additifs pour améliorer l'arôme des produits alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques [6]. Une fois la matière végétale identifiée, il convient d'utiliser une méthode d'extraction adaptée pour l'obtention des composés volatils. L'hydrodistillation conventionnelle (HD) utilisant un appareil de type 'Clevenger' comme méthode d'extraction est reconnue par la Commission Européenne de Pharmacopée [7]. C'est la technique la plus populaire et la plus efficace qui est actuellement utilisée pour extraire l'huile essentielle de différentes parties de plantes. Il s'agit d'un mécanisme au cours duquel l'eau et la matière végétale sont tous deux mélangés et chauffés dans un ballon, la vapeur produite traverse alors les cellules végétales et contribue à l'extraction des métabolites volatils. Les molécules volatiles vont se mêler à la vapeur d'eau, se vaporiser et co-distiller en formant un hétéro-azéotrope. Ces composés bien que possédant des températures d'ébullition différentes, vont se vaporiser simultanément dans les mêmes conditions de pression et de température que celles de l'hétéro-azéotrope, c'est à dire à environ 100° C à pression standard [8]. L'hydrodistillation permet d'obtenir deux produits de distillation : la partie insoluble dans l'eau de condensation est décantée et fournit l'huile essentielle tandis que la partie contenant les composés hydrosolubles constitue l'eau de distillation appelée hydrolat ou encore eau florale.

Cette technique est principalement utilisée pour faire de petites quantités de substances volatiles à partir de plante aromatique à l'échelle laboratoire. Cependant, en raison de l'utilisation de la chaleur il subsiste des risques d'altération des constituants moléculaires et de leurs principales caractéristiques thérapeutiques.

Pour la production des huiles essentielles, à l'hydrodistillation s'ajoute l'extraction à la vapeur qui est un procédé généralement plus usité dans l'industrie.

I.3. L'analyse des huiles essentielles

L'analyse d'un mélange complexe de composés volatils s'effectue classiquement par le couplage « en ligne » d'une technique chromatographique, généralement la CPG, avec une technique d'identification spectrale, généralement la Spectrométrie de Masse (SM) ou, quelques fois, la Spectrométrie Infrarouge par Transformée de Fourier (IRTF). Cette procédure est privilégiée lors de la réalisation d'analyse « de routine » d'un échantillon dont les constituants ne présentent pas de difficultés d'identification [9], [10]. Dès lors que l'étape d'identification se complexifie, la procédure nécessite un fractionnement de l'échantillon par chromatographie liquide « préparative » sur colonne qui peut se poursuivre jusqu'à la purification d'un constituant. L'objectif étant d'aboutir à son élucidation structurale par les techniques spectroscopiques usuelles : RMN du proton et du carbone-13, SM, IRTF, etc...

I. 3. 1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La CPG est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition [11]. C'est la technique de séparation la plus utilisée car elle permet d'effectuer l'individualisation des constituants à partir d'échantillons de l'ordre du milligramme voire du microgramme. La séparation a lieu dans des colonnes capillaires qui possèdent un fort pouvoir de résolution parfaitement adaptée aux mélanges complexes volatils.

Chaque constituant est caractérisé par des indices calculés à partir d'une gamme d'alcane ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires, à température constante (indices de Kováts, IK) ou en programmation de température (indices de rétention, Ir). Cependant, la comparaison des indices de rétention avec ceux de la littérature ne suffit pas à identifier formellement un composé. Le développement des phases stationnaires chirales (colonne à base de cyclodextrines) et de la CPG multidimensionnelle a permis de surmonter certaines difficultés de séparation et d'identification des composés volatils [11].

I. 3. 2. Chromatographie en phase gazeuse/Spectrométrie de masse CPG/SM

Les premiers appareils de routine CPG/SM à colonnes capillaires datent de 1975. Depuis, cette méthode de couplage n'a cessé d'évoluer et a trouvé de nombreuses applications dans les domaines de l'agroalimentaire (aliments, eau), des produits pétroliers (carburants, matières synthétiques), des produits naturels (parfumerie, cosmétique, médecine), etc. [12]. Dans le secteur particulier des huiles essentielles, le couplage CPG/SM est, aujourd'hui, la technique de référence [13], [14].

Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse (CPG/SM) permet d'effectuer simultanément la séparation et l'analyse des différents constituants d'un mélange complexe. Pour l'analyse des molécules vaporisables, deux modes d'ionisation sont utilisés : l'ionisation par impact électronique (IE) et l'ionisation chimique (IC). L'ionisation en impact électronique (IE) consiste en la formation d'ions positifs à partir d'un ion moléculaire $[M^+]$ obtenu par interaction entre la vapeur d'un échantillon de masse M et un courant d'électrons (émis par un filament chauffé) accéléré sous vide et sous une différence de potentiel de 70 à 100 eV. Les ions positifs ainsi formés constituent le spectre de masse du composé [11].

Les systèmes actuels de CPG/SM sont très performants pour la séparation, la détection et l'identification des molécules. Néanmoins, en mode IE, il existe des difficultés qui sont dues :

- à la similitude des spectres de masse. C'est le cas de molécules proches d'un point de vue structurale comme les quatre isomères du menthol ou du farnésol [15], [16] ou les acétates d'isobornyle et de bornyle qui ne diffèrent que par la configuration du carbone asymétrique portant le groupement fonctionnel [17]. Cette similitude des spectres de masse est également observée pour certaines molécules possédant des squelettes différents telles les (Z,Z) et (E,Z)- α -farnésène (sesquiterpènes linéaires avec 4 insaturations) et le cis- α -bergamotène (sesquiterpène bicyclique diénique) [18] ou encore le 1-endo-bourbonanol (sesquiterpène tricyclique) et le 1,6-germacradièn-5-ol (sesquiterpène monocyclique) [19],

- à la faible intensité voire l'absence du pic moléculaire sur le spectre de masse,
- à la co-élution des composés ou à la mauvaise résolution de certains pics chromatographiques.

Afin de pallier aux limites analytiques du couplage CPG/SM-IE, l'ionisation chimique a été utilisée pour l'identification des constituants des huiles essentielles [18]. Il s'agit d'un mode d'ionisation plus doux que l'impact électronique dans lequel il est recherché des réactions ions-molécules entre les molécules de l'échantillon en phase gazeuse et les ions d'un plasma obtenu à partir d'un gaz réactant. La réaction plasma/molécule produit des ions positifs (ionisation chimique positive, ICP) ou négatifs (ionisation chimique négative ICN) qui sont repérés sur des spectres de masse plus simples et surtout plus informatifs que ceux obtenus en IE [20]. Ce mode d'ionisation assure l'observation de l'ion pseudomoléculaire et il s'est avéré très efficace pour la différenciation de stéréoisomères présents dans les huiles essentielles [21].

I. 3. 3. Résonance magnétique nucléaire RMN

Une alternative aux méthodes d'analyse décrites précédemment est la RMN du carbone-13 des mélanges, sans séparation préalable des constituants. Cette technique, initiée par Formáček et Kubeczka [17], [22] puis développée par Casanova et al. [23]–[25] offre des potentialités fortement intéressantes pour l'analyse des huiles essentielles. Pour autant, la RMN est la technique de choix pour la caractérisation des molécules organiques ; elle permet l'accès à des informations concernant le squelette et la fonctionnalisation des molécules. Dans cette optique les données de la littérature constituent une base intéressante permettant la comparaison entre les déplacements chimiques de composés décrits et ceux mesurés dans les mélanges ; ainsi, des reconstitutions de spectres RMN sont possibles à partir de molécules « modèles ». Dans le cas échéant ou une molécule s'avère plus difficilement identifiable, une purification en vue de réaliser une analyse structurale en RMN 2D doit être envisagée.

I.4. Méthodologie d'analyse

Au laboratoire CPN, l'identification des constituants d'une huile essentielle est réalisée par des techniques d'analyses conventionnelles basées sur l'utilisation conjointe de techniques chromatographiques et spectroscopiques.

Le mélange complexe des volatils (fractionné ou non par chromatographie liquide sur colonne) est analysé simultanément par CPG/Ir et CPG/SM-IE (Figure 1). Le calcul des Ir polaires et apolaires et la quantification des composés s'effectuent par CPG/Ir. L'analyse par CPG/SM permet d'obtenir les spectres de masse des constituants

qui, à l'aide d'un logiciel, sont ensuite comparés à ceux répertoriés dans des bibliothèques, dont une élaborée au laboratoire et les autres, commerciales, en éditions traditionnelles ou informatisées [26] [27], [28] [29] [30] [31], [32]. Afin de rendre performante l'identification, il est préconisé de posséder une bibliothèque riche mais surtout adaptée au domaine d'investigation [10]. La bibliothèque « Arômes » construite au laboratoire, est élaborée à partir de chromatogrammes et de spectres de masse enregistrés dans les mêmes conditions opératoires que celles utilisées pour l'analyse des mélanges complexes, assurant ainsi une fiabilité accrue dans l'identification. Elle contient actuellement les indices de rétention sur deux colonnes de polarité différentes et les spectres de masse de plus de 1200 composés volatils dont plus de 900 molécules terpéniques. Cette bibliothèque a été constituée à partir de molécules disponibles dans le commerce et elle est enrichie continuellement par des molécules isolées par fractionnement à partir des huiles essentielles ou encore obtenues par hémi-synthèse et dans tous les cas, caractérisées par RMN.

L'identification est assistée par un logiciel d'aide à l'identification. Chaque proposition du logiciel de comparaison des spectres de masse est assortie d'une note de concordance qui reflète la validité de la structure proposée. Si la note de concordance est correcte, les indices de rétention du constituant proposé sont comparés à ceux présents dans la bibliothèque élaborée au laboratoire, ou dans les bibliothèques commerciales, ou encore répertoriés dans la littérature. Toutefois, se limiter à la note de concordance n'est pas suffisant; il faut systématiquement procéder à l'examen du spectre de masse du composé recherché afin d'en tirer les principales informations : masse de l'ion moléculaire, fragmentations caractéristiques ou encore mise en évidence de co-élutions. A ce stade, trois approches différentes (a, b, et c) sont envisagées (Figures 1 et 2) :

- (a) le spectre de masse du constituant et ses indices de rétention sont en accord avec ceux d'un composé présent dans la bibliothèque élaborée au laboratoire. L'identification du constituant est réalisée sans ambiguïté. Cette démarche est systématiquement mise en œuvre quelle que soit la nature du mélange complexe (huile essentielle, hydrolat ou fraction volatile extraite par SPME).
- (b) les données spectrales et les indices de rétention du constituant recherché ne correspondent à aucun composé de la bibliothèque du laboratoire mais à ceux d'un composé présent dans les bibliothèques commerciales (ou dans la littérature). Dans ce cas nous vérifions, par l'étude des fragmentations

principales en Impact Electronique si les spectres de masse du produit proposé sont bien en accord avec la structure de ce dernier. Cette approche mécanistique peut être complétée, lorsque cela s'avère possible, soit par une étape d'hémisynthèse suivie de l'exploitation de l'analyse du composé synthétisé, soit par le recours à la RMN du carbone 13.

- (c) aucune proposition de structure n'est faite par les différentes bibliothèques sur la base des données spectrales du constituant. Auquel cas, nous n'avons d'autre ressource que le schéma classique de purification du constituant dans l'optique d'une étude structurale.

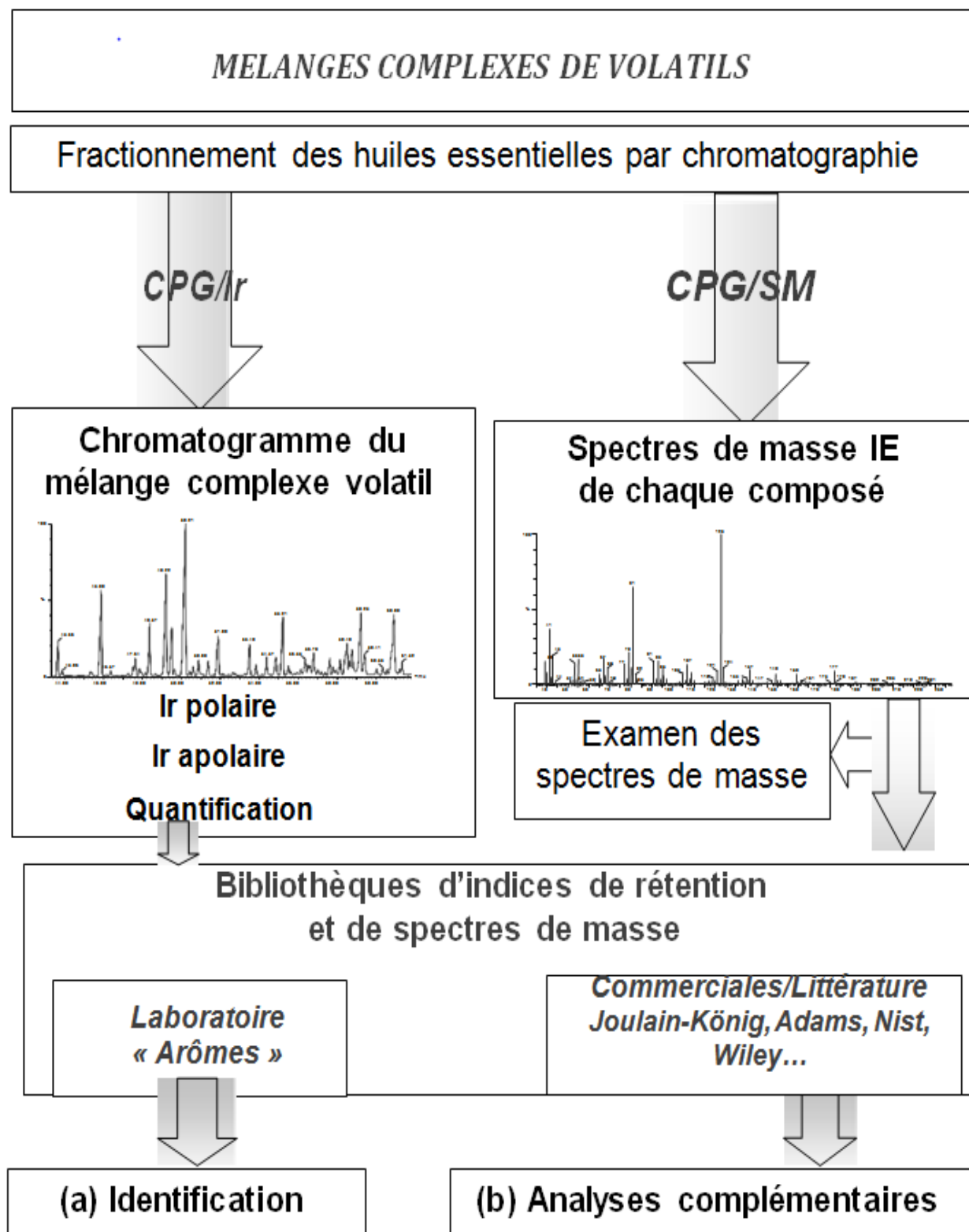


Figure 1 : Identification des constituants d'une huile essentielle par combinaison des techniques de CPG et de CPG/SM.

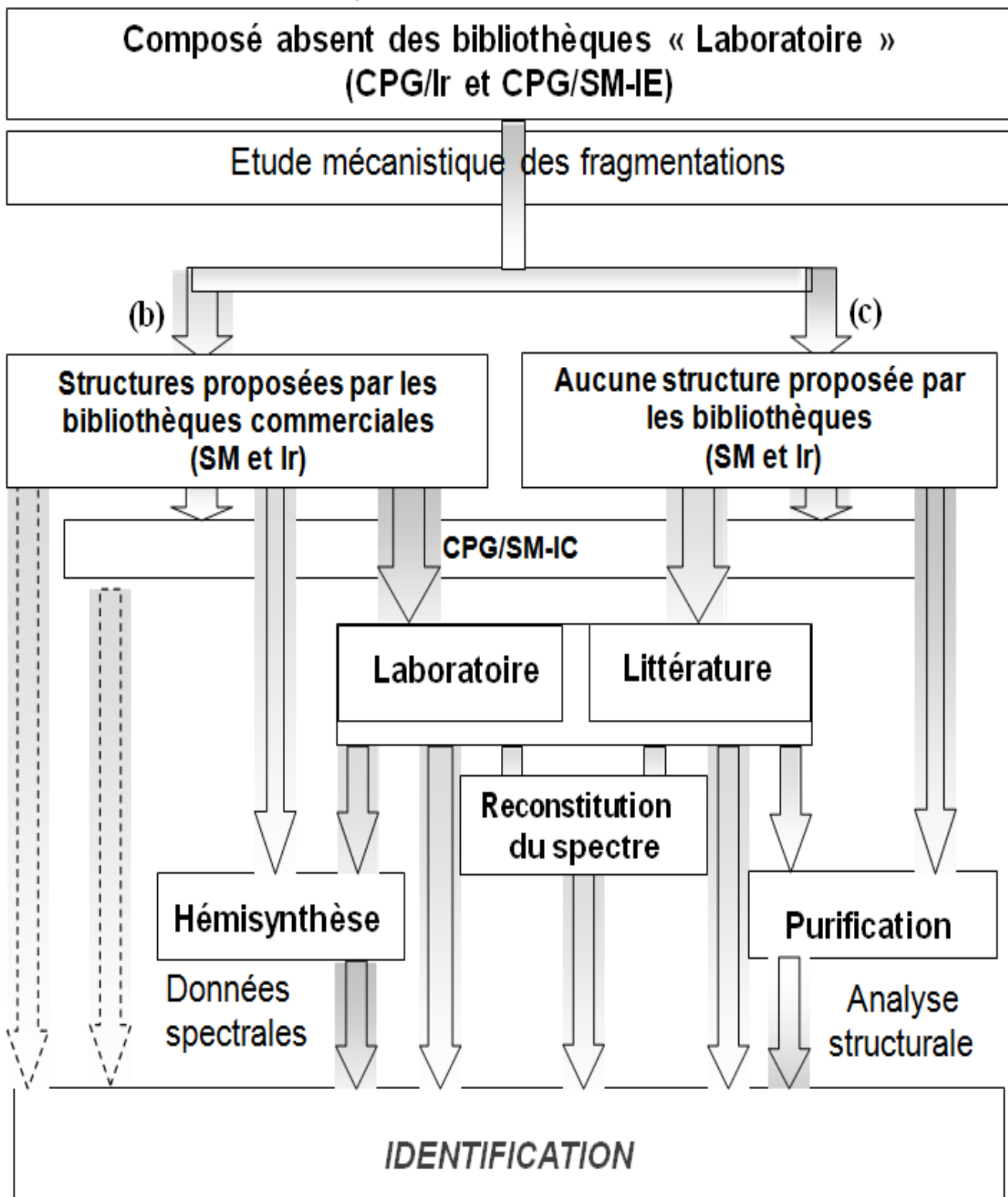


Figure 2 : Méthodes d'analyses complémentaires des constituants d'une huile essentielle.

I.5. Outils statistiques

Les travaux de recherche actuellement menés sur les compositions chimiques des huiles essentielles, intègrent de plus en plus l'étude de la variabilité chimique induite par les critères environnementaux (altitude, nature du sol, climat), physiologiques (morphologie du végétal, stade végétatif) ou encore génétiques. Pour étudier la diversité en métabolites secondaires d'une plante, il est indispensable d'effectuer un traitement statistique des données qualitatives et/ou quantitatives (présence/absence, teneurs) relatives aux constituants des matrices étudiées. Pour cela, les deux outils les plus fréquemment utilisés sont l'Analyse en Composante Principale (ACP) et la Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) [33].

L'ACP est un outil permettant de convertir un nuage de points d'un espace multivarié en un nuage de points dans un espace à deux dimensions. Les points et les variables de la matrice sont projetés selon deux axes perpendiculaires représentatifs de l'ensemble du nuage [34]. Il est important que les deux axes choisis aient un pourcentage de représentation (variabilité expliquée) suffisamment élevé pour que le traitement soit jugé pertinent. Concrètement, dans notre domaine d'étude, les points sont les stations de récolte des échantillons végétaux tandis que les variables sont les pourcentages (normalisés ou standardisés) des constituants individuels du mélange ou rangés par familles chimiques.

La CAH est une méthode d'agglomération de différents points dans un espace varié. Tout d'abord la dissimilarité entre chaque point *via* des calculs de distance est établie, ensuite, le système agglomère les points entre eux de façon itérative et aboutit à la formation de plusieurs groupes. Les agglomérations successives sont représentées sous forme d'arborescence sur un dendrogramme. Ceci permet ainsi de classer les échantillons selon plusieurs groupes, en fonction de l'importance de la dissimilarité entre chaque rameau de l'arbre [33]. Bien que permettant d'établir différents groupes, la CAH ne fournit strictement aucune information concernant les affinités de ces groupes avec les variables utilisées.

Dans notre cas, nous avons systématiquement établi les groupes les plus représentatifs en CAH et confirmé ces résultats en ACP. Puis, les affinités de chaque groupe avec les composés discriminants ont été déterminées par ACP. *In fine*, et selon la classification ainsi faite, chaque échantillon a été confronté aux données de la matrice afin de contrôler les propositions du traitement statistique.

CHAPITRE II : ETUDE DE L'HUILE
ESSENTIELLE DE *SCOLYMUS*
GRANDIFLORUS Desf.

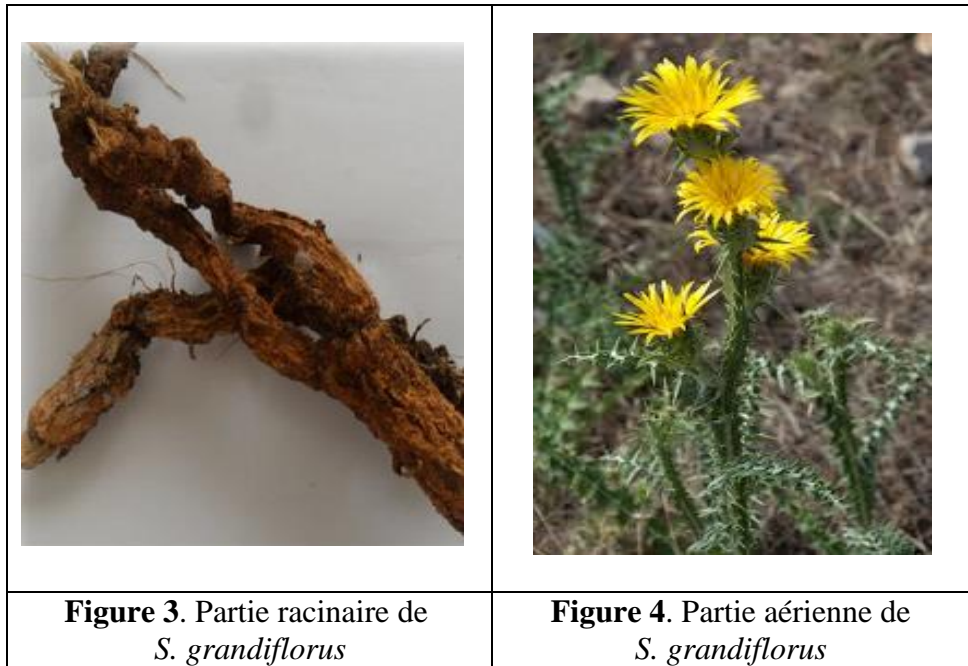
II. *Scolymus grandiflorus* Desf.

II.1. Description botanique et travaux antérieurs

Étymologie du nom : *Scolymus* vient du grec scolymos qui signifie « chardon à racine comestible ». Le genre *Scolymus* L. appartient à la famille des *Compositae* ou *Asteraceae* qui constitue une vaste famille de plantes dans le monde se distinguant par des fleurons regroupés en capitules [35]. Cette famille comporte 1900 genres et plus de 30 000 espèces. Le genre *Scolymus* comprend principalement trois espèces : *S. hispanicus* L., *S. maculatus* L. et *S. grandiflorus* Desf. La première description de ce genre apparaît dans les travaux de Charles de l'Ecluse (1576) avec dans un premier temps la description d'une seule espèce : *S. theophrasti* synonyme de *S. hispanicus* L. puis 25 années plus tard, la description des trois espèces : *S. theophrasti* Hispan. [= *S. hispanicus* L. subsp. *hispanicus*]; *S. theophrasti narbonensis* [= *S. maculatus* L.], et *S. dioscor castos theophrasti* [= *S. grandiflorus* Desf.] [36].

Se différenciant du reste des taxons des astéracées par la présence de fleurs ligulées et par des akènes compressés dorsalement qui sont entourés par des palées, *S. grandiflorus* et *S. hispanicus* ont un pappus avec deux à cinq soies raides et scabres [36].

S. grandiflorus (Figures 3-4) est une plante annuelle ou bisannuelle de 75 cm de haut, possédant des tiges aux ailes épineuses-dentées ininterrompues et des feuilles basales de 10 à 16 cm, ovales épineuses-dentées, avec un aspect allongé. Elle présente des ligules de 25 à 37 mm de diamètre, jaunes à orange et sa floraison s'étend de mai à juillet. *S. grandiflorus* est une espèce très répandue dans les zones côtières, elle affectionne les sols sableux dans des terrains abandonnés, et cohabite avec les chardons des genres *Carduus* et *Carthamus* [36]. Avec une large distribution dans le bassin méditerranéen, la plante pousse en abondance dans le nord-ouest de l'Algérie et en Sicile et forme de petites populations dans le reste de son aire de répartition, ie., Maroc, Libye, France (Pyrénées orientales), Turquie, Liban, Malte, etc...



Communément appelée, chardon d'Espagne et nommée localement « Ghernina », à l'instar des deux autres espèces du genre [33], *S. hispanicus* est l'un des légumes sauvages les plus appréciés et consommés dans les pays méditerranéens, reconnus pour ses propriétés médicinales telles que diurétique, dépurative, digestive et cholérétique [36,37]. Il y a un important intérêt concernant la consommation habituelle de cette plante sauvage comestible dans la société [36].

Le genre *Scolymus* est très peu documenté en termes d'études phytochimiques, à notre connaissance, seule l'espèce *S. hispanicus* a été étudiée. La composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes a été rapportée pour la première fois par Hüseyin Servi en 2019 [43]. Les principaux composés étaient l'heneicosane (19,4%), l'acétone hexahydrofarnésique (17,0%) et le phytol (17,0%). Les n-alcanes saturés (35,2%), les sesquiterpènes oxygénés (25,6%) et les diterpènes (17,0%) étaient les métabolites dominants. L'extrait méthanoïque de la partie aérienne a permis l'identification de six flavonoïdes et quatre acides phénoliques [41]. L'extrait éthanolique [44] obtenu de la partie aérienne de la plante montre la présence d'acide rosmarinique et de plusieurs flavonoïdes : luteolin-8-glucoside, quercetin-5-glucoside et isorhamnetin-3-galactoside. L'acétate de taraxastéryle et l'acide sinapique ont été signalés comme constituants majeurs dans les extraits alcooliques des racines de la plante [39], [40].

II.2. Lieux de récolte et rendements en huile essentielle

Les racines de *S. grandiflorus* ont été collectées en mai 2018 au cours de la période de floraison dans 21 sites localisés dans deux zones de la région de Tlemcen (ouest Algérien) : les stations Y1 à Y7 proviennent des monts du Tell (altitudes variant de 800 à 1163 m) et les stations Y8 à Y21 sont situées à proximité du littoral (altitudes variant de 185 à 610 m) (Figure 5).

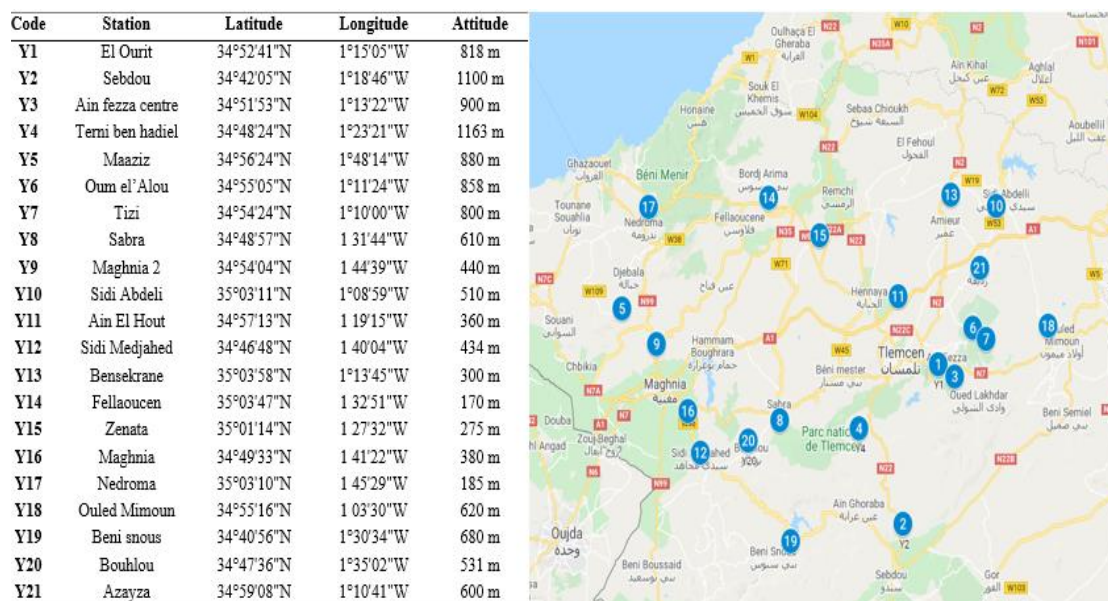


Figure 5. Répartition géographique de *S. grandiflorus* de l'ouest de l'Algérie

L'huile essentielle préparée à partir des racines de *S. grandiflorus* collectées dans la région de Tlemcen. Cette dernière est de couleur jaune pâle et le rendement moyen en huile essentielle varie de 0,07% à 0,08% (masse/masse) en fonction de la masse sèche de la plante. Il est à noter qu'aucune différence significative du rendement en huile essentielle n'a été observée entre les deux zones de récolte du végétal.

II.3. Etude de la composition chimique de l'huile essentielle de *S. grandiflorus*

L'objectif de ce travail consistait à déterminer la composition chimique de l'huile essentielle des racines de *S. grandiflorus*. En accord avec la séquence analytique décrite dans le chapitre 1, nous avons tout d'abord procédé à la préparation des huiles essentielles individuelles par hydrodistillation des racines récoltées dans 21 différentes localités de Tlemcen. Ces échantillons ont préalablement été soumis à une analyse « de routine » par CPG-DIF et CPG/SM puis ils ont été regroupés pour produire une « huile

essentielle collective » (HE Coll.) (Tableau 1), celle-ci a été fractionnée par chromatographie liquide sur colonne et les fractions ainsi obtenues ont été analysées afin d'améliorer le taux d'élucidation de la composition chimique. Une chromatographie flash sur colonne ouverte de l'huile essentielle Collective a produit dix fractions au total : une fraction hydrocarbonée et 9 fractions concentrant les composés oxygénés. Enfin, nous nous proposons d'étudier la variabilité chimique en recherchant des corrélations entre les facteurs environnementaux et la composition chimique des huiles essentielles.

II. 3. 1. Analyse des huiles essentielles de *Scolymus grandiflorus*

L'analyse de l'huile essentielle collective de *S. grandiflorus* a permis l'identification de 25 composés représentant 93,2% de la composition chimique du mélange (Tableau 1). Les composés majoritaires sont la cis-Davanone **17** (45,3%), la cis-2-hydroxyDavanone **23** (11,2%) et le cis-Davanol **18** (6,5%). L'huile essentielle est largement dominée par des composés oxygénés (92,7%), parmi eux les sesquiterpènes sont largement majoritaires (79,4%) et ils sont accompagnés par des composés non terpéniques qui représentent (12,9%) de la composition globale du mélange.

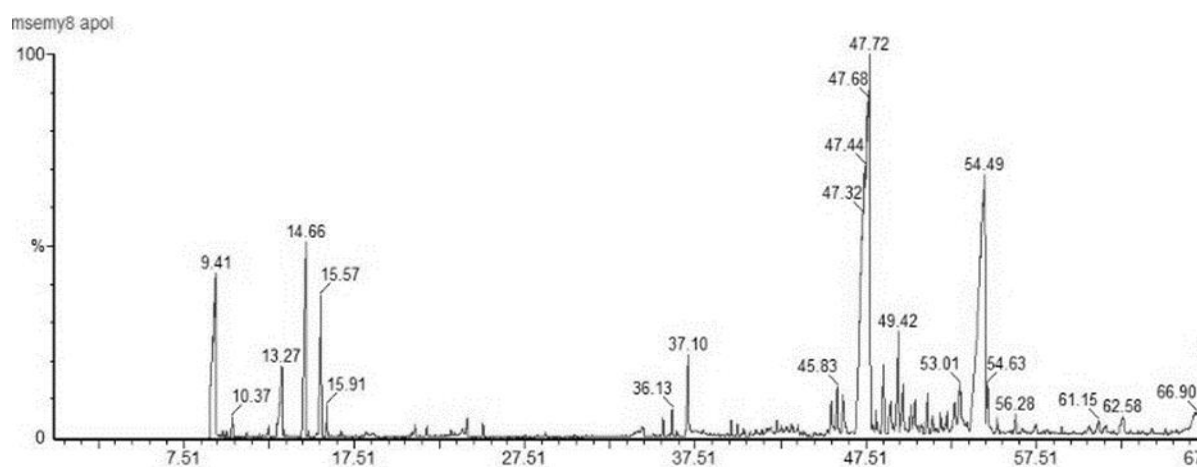


Figure 6. Chromatogramme de l'huile essentielle de *S. grandiflorus* obtenu sur colonne apolaire.

Ainsi, 20 composés ont été identifiés par comparaison de leurs indices de rétention et leurs spectres de masse avec ceux enregistrés dans la bibliothèque « Arômes ». Parmi eux, quatre composés ont été identifiés à partir de la comparaison de leurs indices de rétention et de leurs spectres de masse avec ceux contenus dans les bibliothèques commerciales et à l'aide de données de la RMN 1D et 2D (Tableau 1). L'identification de ces composés a nécessité la mise en œuvre d'une chromatographie

liquide sur colonne réalisée à partir de l'huile essentielle collective, selon un schéma de fractionnement biséquentiel décrit dans la figure 7.

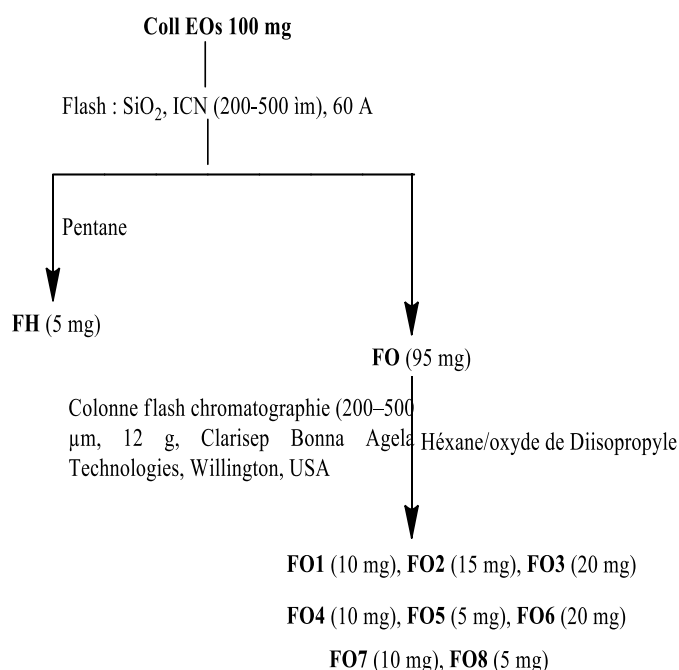


Figure 7 : Fractionnement de l'huile essentielle Coll de racines de *S. grandiflorus*.

L'analyse par CPG-SM des fractions oxygénées obtenues par chromatographie liquide sur colonne a montré l'existence de plusieurs séries de composés élués avec une résolution médiocre voire insuffisante et présentant des spectres de masse semblables, nous orientant vers la présence des stéréo-isomères. En particulier, les fractions FO1, FO3 et FO8 ont clairement montré la présence respective de 4 isomères en proportion variable du Davana furane **6-8**, de la cis-Davanone (**13,14, 16, 17**), du cis-Davanol **18** et de la cis-2-hydroxyDavanone **20-23**. Ces derniers sont notés (1-4) dans le Tableau 1. Afin d'aller plus en avant sur l'identification des constituants de l'huile essentielle concentrés dans les fractions obtenues par chromatographie sur colonne, les fractions enrichies ont été analysées par RMN à une et deux dimensions. L'objectif étant de réaliser l'identification des composés majoritaires au sein de mélanges, parfois encore complexes, malgré la séparation sur colonne. Par application du concept « Extraction NMR » [41], nous avons procédé à l'extraction des valeurs de déplacements chimiques des constituants prédominants du spectre RMN du carbone-13 et examiner les différentes corrélations atomiques afférentes à partir des spectres en deux dimensions.

S'agissant de la cis-Davanone **17** représentant 68,9% de la fraction FO3 et de la cis-2-hydroxyDavanone **23** (37,7%) dans la fraction FO8, la comparaison des données expérimentales de RMN du carbone 13 avec celles reportées dans la littérature [42], [43] n'a pas permis pas de certifier sans ambiguïté la nature de l'isomère majoritaire présent dans l'huile essentielle. En revanche, l'interprétation des spectres RMN enregistrés en deux dimensions a confirmé la présence des isomères cis et a permis d'attribuer les stéréochimies relatives des trois carbones asymétriques des deux molécules telles que présentées dans les figures 8 et 9.

Peak	RMN ¹³ C		RMN ¹ H		RMN 2D		
	δ [ppm]	DEPT	δ (ppm)	J(Hz)	COSY	HMBC (C-H)	HMBC (H-C)
1	212,07	C=O	NA	NA	NA	8, 9, 15	
2	144,71	HC=C	5,91	dxd (17.21/ 10.62)		5, 12	10, 12, 5a, 5b
3	135,37	C=C	NA	NA	NA	9, 13, 14	
4	116,08	HC=C	5,38	txq	9, 13	9, 13, 14	13, 9, 14
5	111,35	H ₂ C=C	a: 5.19 b: 4.97	17.21/1.6 10.62/1.6			12, 2
6	82,97	Cq-O	NA	NA	NA	2, 5a, 5b, 12	
7	81,00	CH-O	4,09		8, 11	8, 15, (10)	8, 11, 12, 15
8	51,26	CH	2,73	m	15, 7	15	7, 9, 11, 15
9	42,70	CH ₂	3,26	qxd	4, 13		4, 7, 8, 14
10	37,54	CH ₂	a: 1.88 b: 1.75	m m	10b, 11 10a, 11	11	2
11	29,87	CH ₂	a: 1.99 b: 1.62	m m	11b, 7, 10 11a, 7, 10	8, 10	10, 7, 11b, 15
12	26,61	CH ₃	1,26	s	ND		2, 5a, 7, 10, 11
13	25,73	CH ₃	1,76	s	ND	14	
14	18,09	CH ₃	1,62	s	ND	13, 4	
15	13,17	CH ₃	0,99	d (6)	8	8	4, 7, 8, 9, 11

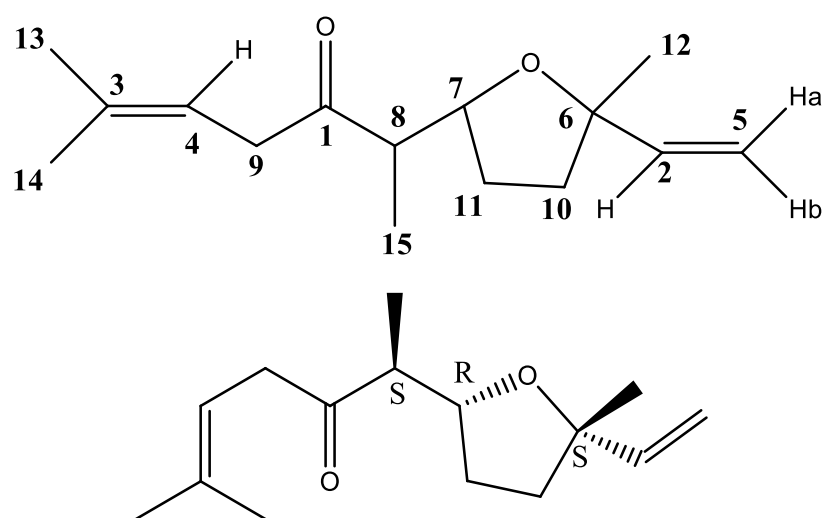


Figure 8 : Données RMN et structure de la cis-Davanone **17**

Peak	RMN ¹³ C		RMN ¹ H		RMN 2D	
	δ [ppm]	DEPT	δ (ppm)	J (Hz)	COSY	HMBC (C->H)
1	202,98	C=O	NA	NA	NA	3,5,8,10,18
3	152,54	CH=C	6,88	d (15.6Hz)	5	15
4	144,61	CH=C	5,91	dxd (17/10.6)	6a, b	11a, 11b, 16
5	125,23	CH=C	6,38	d (15.6Hz)	3	15
6	111,47	CH ₂ =C	5,19	dxd (17.3/1.56)	4	16
			4,99	dxd (10.6/1.56)	4	16
7	82,99	C _q	NA	NA	NA	4, 6a,6b, 11, 13,16
8	80,49	CH-O	4,22	txd? (8.3/6)	13a, b, 10	10, 11, 13, 18
9	70,99	C _q	NA	NA	NA	3, 5, 15
10	49,90	CH	2,95	q (7 Hz)	18, 8	18, 13, 5
11	37,58	CH ₂	1,92	m	11b, 13a	13a, 13b, 6
			1,75	m	11a, 13b	13a, 13b, 6
13	29,39	CH ₂	2,02	m	13b, 11	
			1,67	m	13a, 11a, 11b	
14	29,35	CH ₃	1,27	m		3,5,10,11,14,15
15	29,31	CH ₃	1,4	s	ND	3,5,10,11,14,15
16	26,52	CH ₃	1,28	s	ND	11,4
18	13,05	CH ₃	1,05	d (7.16Hz)	10	8,10

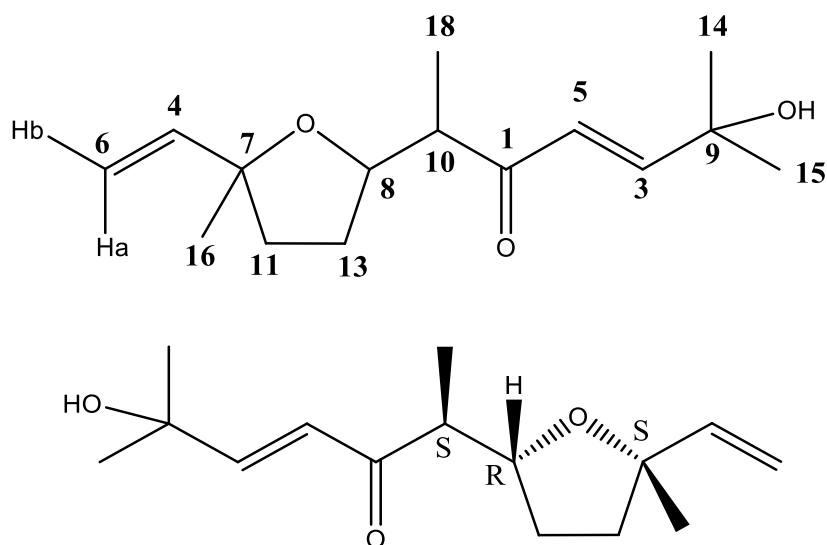


Figure 9 : Données RMN et structure de la cis-2-hydroxyDavanone **23**

La même approche basée sur le concept d'extraction des données RMN des constituants majoritaires a été appliquée pour l'identification du cis-Davanol **18** représentant 39,7% de la fraction FO3 et l'isomère noté (4) de la Davana furane **10** (66,5%) dans la fraction FO1. Signalons qu'à notre connaissance, les données de RMN du carbone-13 des deux molécules sont décrites dans ce manuscrit pour la première fois (Figures 10 et 11).

Peak	RMN ¹³ C		RMN ¹ H		RMN 2D	
	δ [ppm]	DEPT	δ (ppm)	J(Hz)	COSY	HMBC C->H
1	144,09	CH=	5,84	dxd		
2	133,20	Cq	NA	NA	NA	13/14
3	120,72	CH=	5,33	m		
4	111,88	CH ₂	5.21 (trans) 5.05 (cis)	dxd dxd		
5	85,06	CH-O	3,88		11; 8	
6	81,80	Cq-O	NA	NA	NA	1
7	76,20	CH-O	3,62	txd	8	2
8	43,96	CH	1,64	m	15	15
9	37,26	CH ₂	1.73/1.90	m		
10	32,81	CH ₂	2.28/2.15	m		
11	31,39	CH ₂	2.09/1.68			
12	26,83	CH ₃	1,35	s		
13	25,91	CH ₃	1,76	s		
14	17,99	CH ₃	1,64	s		
15	12,98	CH ₃	0,78	d	8	

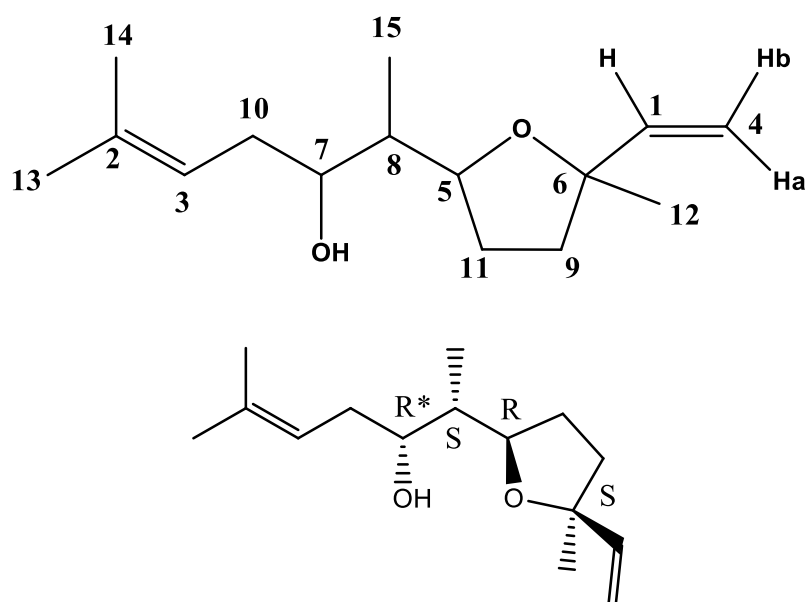


Figure 10 : Données RMN et structure du cis-Davanol **18**

Peak	RMN 13C		RMN 1H		RMN 2D		
	δ [ppm]	DEPT	δ (ppm)	J(Hz)	COSY	HMBC (C-H)	HMBC (H-C)
1	156,10	C=C	NA	NA	NA	14, 3,10,15,13	
2	150,16	C=C	NA	NA	NA	6,15,3,5	
3	144,54	CH=C	5,93	dxd (11/18)	4a, 4b	4a, 12, 13	7
4	111,41	CH ₂ =C	Ha: 5.22 (trans)	dxd (18/1.7)	3	ND	7, 3
			Hb: 4.98 (cis)	dxd (11/1.7)	3	ND	7
5	105,77	CH=C	5,87	m	15	15, 6	
6	105,58	CH=C	5,94	d(3?)		15, 10	5, 1, 2
7	82,66	Cq-O	NA	NA	NA	4a,b, 3/12, 13	
8	81,20	CH-O	4,27	dxd	12a,12b	12,10,14	14
9	37,88	CH ₂ -O	1,79	m		3,13,12	
10	37,77	CH-	3,04	quint	14, 8	14,12,6	14,8,1
12	28,12	CH ₂	Ha: 1.91	m	8, 12b	9,10	
			Hb: 1.80	m	8, 12a	9,10	
13	26,03	CH/CH ₃	1,3	s	ND	9, 3	7
14	14,14	CH/CH ₃	1,22	d (J=7.7)	10	8,10	3,1
15	13,56	CH/CH ₃	2,27	S	5	ND	10,8,1

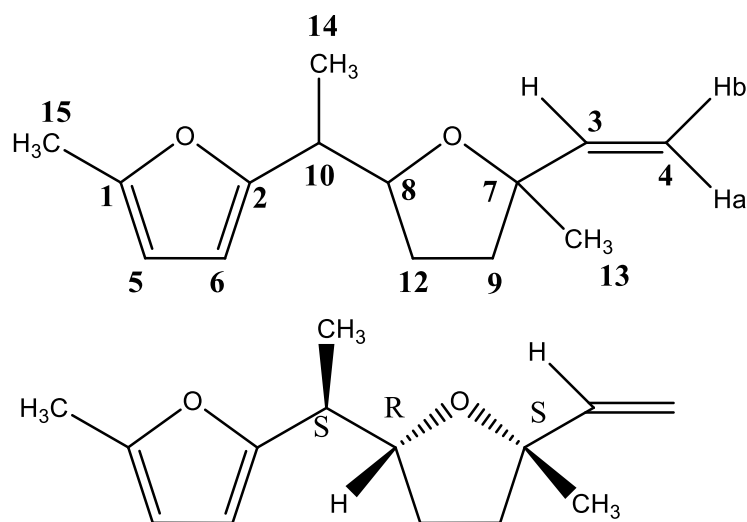


Figure 11 : Données RMN et structure de la Davana furane **10**.

L'huile essentielle de *Scolymus grandiflorus* se caractérise par une forte proportion en composés appartenant à la famille des davanoïdes (81,2%). Il s'agit de terpènes au squelette irrégulier qui se caractérisent par une partie cyclique commune (méthyl-vinyl-tetrahydrofurane). A notre connaissance, ce type de composé n'a jamais été décrit dans le genre de *Scolymus*.

Le davanoïde le plus abondant est la *cis*-Davanone, une cétone sesquiterpénoïde qui a été isolée pour la première fois à partir d'*Artemisia pallens* par Sipma et Van der Wal en 1968 [44]. La molécule pure est non odorante [45], cependant, il existe huit isomères de ce composé caractérisés par Lamparsky et Klimes [46]. La Davanone est également caractéristique de la famille des Astéracées, elle a été identifiée comme le principal constituant de plusieurs espèces d'*Artemisia*, telles que *A. ciniformis* [47], où elle représente 40,1 et 32,2% de l'huile essentielle des tiges et feuilles respectivement. Il en est de même pour les parties aériennes d'*A. kermanensis*, *A. kopetdaghensis* et *A. khorassanica* d'Iran qui contiennent des proportions en Davanone de 21,4%, 47,9% et 12,2%, respectivement [48], [49]. Enfin, cette molécule a aussi été identifiée dans la composition chimique de l'huile essentielle des feuilles et des fleurs de *Lantana camara* L. avec des pourcentages de 23,37 % et 28,59 % respectivement [50], [51]. A notre connaissance, notre étude signale pour la première fois la présence de la *cis*-Davanone dans un mélange naturel à un pourcentage supérieur à 50%. Enfin, la *cis*-Davanone a fait l'objet de plusieurs études décrivant les voies de synthèse organique [52], y compris la stéréochimie relative qui a été proposée indépendamment par Naegeli [43] et Birch [53] et prouvée par Ohloff et Giersch [54].

II.4. Variabilité chimique des huiles essentielles de *S. grandiflorus*

Vingt et un échantillons (Y1 à Y21) de *S. grandiflorus* ont été collectés à l'état sauvage dans différentes localités de la région de Tlemcen pendant la période de floraison. En particulier, sept échantillons (S1-S7) proviennent de localités situées en région montagneuse soumises à de fortes précipitations (altitudes comprises entre 600 et 1100 m) et quatorze échantillons (S8-S21) proviennent de stations situées sur le littoral plus faiblement exposées aux précipitations (altitudes entre 170 et 500 m) (Tableau 1, Figure 14). Les analyses chromatographiques des 21 échantillons ont montré que les compositions chimiques des huiles essentielles préparées à partir des racines de cette plante étaient qualitativement similaires mais présentaient des différences notables dans l'abondance des principaux constituants. Une analyse statistique réalisée à partir

des constituants les plus discriminants a alors été réalisée. La classification hiérarchique ascendante (Figure 12) et l'analyse en composantes principales (Figure 13) des échantillons suggèrent l'existence de deux groupes principaux d'huiles essentielles de *S. grandiflorus*.

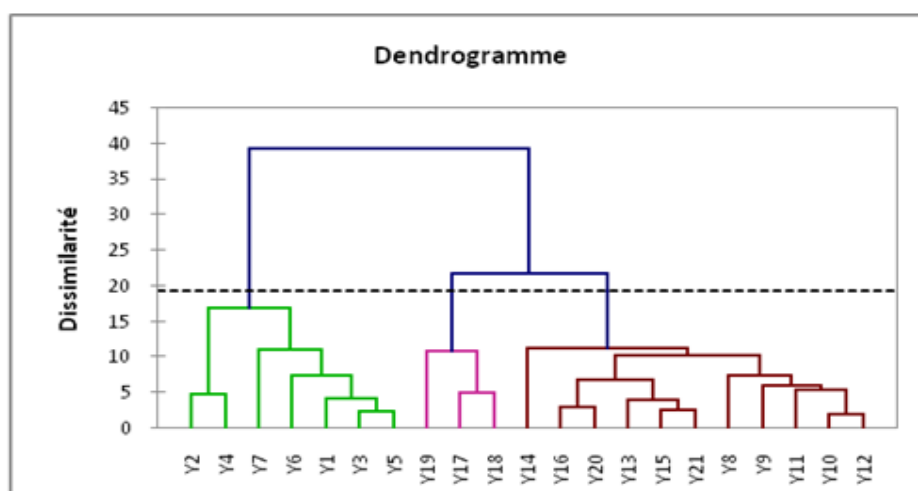


Figure 12 : Classification hiérarchique ascendante (CHA) des différents échantillons d'huiles essentielles de *S. grandiflorus*

Le **groupe I** (Y1–7) se compose principalement des échantillons d'huiles essentielles dominées la *cis*-2-hydroxyDavanone **23** (14,0–33,2%) et la 5,5-Diméthylfuranone **1** (5,5–9%). Tandis que, le **groupe II** (Y8–Y21) comprend les échantillons riches en *cis*-Davanone **17** (41,3–73,2%), l'éther de Davana **12** (0,7–5,3%) et l'acide Hexadécanoïque **25** (3,2–16,8%) (Figure 5, Tableau 1). L'étude met en évidence une corrélation entre la composition chimique de l'huile essentielle des racines de *S. grandiflorus* et l'origine de son lieu de récolte. Les huiles essentielles préparées à partir de racines prélevées dans des zones situées à proximité du littoral et soumises à un faible régime de précipitation présentent des proportions en *cis*-Davanone bien plus élevées (41,3-73,2%) que celles issues de racines prélevées en région montagneuse (19,9-45,3%).

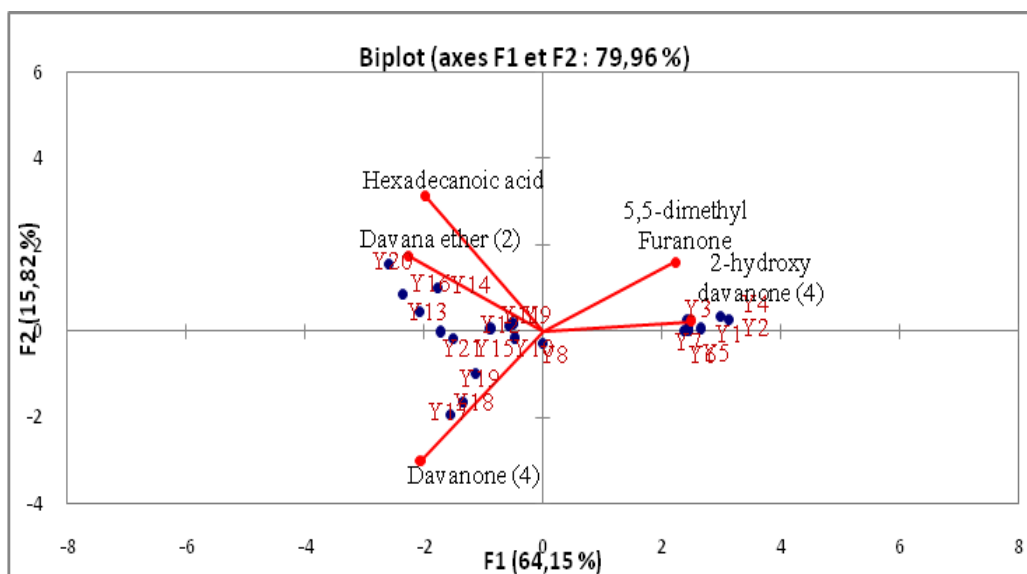


Figure 13 : L'analyse en composantes principales (ACP) des différents échantillons d'huiles essentielles de *S. grandiflorus*.

A notre connaissance, seule l'espèce *S. hispanicus* a fait l'objet d'étude phytochimique, en conséquence, nous décrivons pour la première fois la composition chimique de l'huile essentielle de racines de *S. grandiflorus*. Les composés majeurs sont des molécules terpéniques appartenant au squelette davanane. L'étude a permis de réexaminer les données de RMN du carbone-13 de la cis-Davanone et de la cis-2-hydroxyDavanone et nous décrivons pour la première fois les données de RMN du carbone-13 du cis-Davanol et de la Davana furane. Nos résultats ont montré des différences importantes entre les stations, indiquant l'existence d'un polymorphisme chimique. Les différences observées dans la composition chimique des huiles essentielles peuvent être dues à des facteurs écologiques ou à de nombreux autres facteurs liés au stress hydrique en lien avec la nature du sol et aux conditions climatiques [55].

Tableau 1: Compositions chimiques des huiles essentielles de *S. grandiflorus* provenant de diverses localités de la région de Tlemcen

^a No	Constituants	^b IRla	^c IRa	^d IRp	^e HE Coll	^f Stations																					^g Identification
						Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8	Y9	Y10	Y11	Y12	Y13	Y14	Y15	Y16	Y17	Y18	Y19	Y20	Y21	
1	5,5-dimethyl Furanone	914	919	1594	2,9	5,5	5,5	6,3	6,6	5,9	7,5	9,0	3,4	2,5	2,8	2,1	2,2	1,2	1,5	1,1	0,6	0,6	0,9	1,1	1,6	1,0	Ir, ¹³ C RMN
2	Lavender lactone	1002	996	1647	1,5	2,2	3,9	3,1	2,9	1,9	2,2	3,2	1,0	0,5	1,1	0,4	0,7	0,3	0,6	0,4	0,3	0,2	0,3	0,8	0,6	0,3	Ir, SM, ref
3	<i>cis</i> -Arbusculone	1052	1032	1442	2,1	1,9	0,5	1,6	0,7	2,7	4,9	5,6	2,1	1,7	1,7	1,2	1,9	0,6	1,1	0,8	0,8	0,3	0,6	1,1	1,1	0,8	Ir, SM, ref
4	<i>trans</i> -Arbusculone	1071	1048	1481	0,9	1,5	0,7	1,3	0,6	1,9	3,7	3,4	1,4	0,9	1,1	0,8	1,2	0,7	0,8	0,6	0,4	0,3	0,4	0,7	0,7	0,4	Ir, SM, ref
5	<i>cis</i> -oxyde de Linalol	1065	1055	1493	0,4	0,2	0,5	0,3	0,4	0,3	0,3	0,2	0,1	0,1	0,3	0,4	0,1	0,3	0,4	0,3	0,6	0,2	0,2	0,5	0,4	0,3	Ir, SM, ref
6	Davana furane (1)	/	1371	1702	0,2	0,3	0,2	0,4	0,3	0,4	0,2	0,4	0,3	0,2	0,1	0,2	0,5	0,5	0,4	0,3	0,3	0,2	0,2	0,4	0,4	0,3	Ir, SM
7	Davana furane (2)	/	1379	1722	0,7	1,1	0,2	0,7	0,5	1,1	0,7	0,5	0,3	0,4	0,5	0,4	0,3	0,2	0,9	0,1	0,3	0,6	0,4	0,5	0,7	0,2	Ir, SM
8	Davana furane (3)	/	1383	1729	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,5	0,4	0,2	0,7	0,2	0,2	0,3	0,6	0,6	0,4	0,4	0,2	tr	0,1	0,2	0,6	Ir, SM
9	(E)- β -Elemene	1387	1389	1593	0,5	0,9	0,4	0,1	0,6	1,3	0,2	0,4	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3	0,1	0,7	0,7	0,7	0,6	0,3	0,3	0,6	Ir, SM, ref
10	Davana furane (4)	1393	1394	1766	2,6	2,0	2,5	1,3	3,5	2,3	3,0	2,3	2,0	2,7	2,3	3,9	2,2	2,2	3,2	2,6	3,2	0,9	1,7	1,4	3,6	3,4	Ir, ¹³ C RMN
11	Davana ether (1)	/	1466	1890	0,8	0,2	0,7	tr	0,6	0,1	0,2	0,3	0,2	0,8	0,3	0,4	0,7	0,5	1,5	1,2	1,3	0,2	0,1	0,3	1,7	1,2	Ir, SM
12	Davana ether (2)	1487	1474	1908	2,1	0,5	0,5	0,5	0,7	0,7	0,6	0,5	0,7	2,3	1,0	0,7	2,2	3,7	4,5	3,1	4,1	2,3	2,2	1,1	5,3	3,2	Ir, SM, ref
13	Davanone (1)	/	1534	1955	1,1	1,0	0,2	0,3	0,3	1,4	0,7	0,3	0,4	0,9	0,6	0,4	1,1	1,4	2,4	1,6	1,9	1,3	1,2	0,3	2,8	1,4	Ir, SM
14	Davanone (2)	/	1540	1973	1,1	0,7	0,3	0,5	0,2	0,9	0,7	0,7	0,9	1,9	1,1	1,0	1,7	0,4	1,4	1,6	1,5	1,8	1,5	0,8	1,3	2,2	Ir, SM
15	Iso Davanone	1562	1537		1,6	0,7	0,9	0,5	1,2	0,5	0,9	1,1	1,1	2,5	1,3	1,3	2,0	1,7	1,9	2,1	1,5	2,2	2,4	1,1	1,9	1,7	Ir, SM, ref
16	Davanone (3)	/	1546	1994	1,8	1,4	0,4	1,1	0,7	1,1	1,5	1,3	1,4	2,7	1,6	1,7	2,2	2,9	2,7	2,0	1,1	1,8	2,2	1,9	1,7	2,0	Ir, SM
17	<i>Cis</i> -Davanone (4)	1569	1570	2035	45,3	24,4	19,9	26,4	23,0	27,8	30,6	35,0	51,9	45,0	51,0	45,8	49,6	53,7	41,3	52,7	50,4	73,2	68,4	61,5	48,4	54,5	Ir, ¹³ C RMN
18	<i>Cis</i> -Davanol	1591	1602	2090	6,5	2,4	4,9	4,0	6,2	3,6	3,5	2,0	2,9	5,8	3,5	3,2	6,7	2,1	3,1	4,9	2,7	2,8	3,3	2,5	2,3	5,3	Ir, ¹³ C RMN
19	Eudesma-11-en-4 α -ol	1642	1638	2233	2,1	1,8	4,0	3,7	2,9	1,9	1,1	0,8	2,3	1,4	1,9	2,7	1,8	1,8	2,2	1,7	1,1	1,7	2,1	1,8	1,0	1,4	Ir, SM
20	2-hydroxy Davanone (1)	/	1644	2496	0,1	0,5	0,1	0,2	0,2	0,3	0,4	0,4	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,4	0,9	0,8	0,1	0,2	0,2	Ir, SM
21	2-hydroxy Davanone (2)	/	1657	2513	0,4	1,4	0,9	0,9	1,3	1,7	1,3	0,8	0,4	0,5	0,3	0,2	0,6	0,4	0,5	0,2	0,2	0,3	0,3	0,1	0,3	0,1	Ir, SM
22	2-hydroxy Davanone (3)	/	1665	2531	5,3	4,3	3,2	5,2	4,2	3,9	2,1	1,7	1,3	1,3	1,2	0,9	1,2	0,8	0,9	0,6	0,6	0,7	1,0	0,2	0,5	0,7	Ir, SM
23	<i>Cis</i> -2-hydroxy Davanone (4)	1668	1682	2566	11,2	26,1	33,2	23,1	29,8	23,9	19,7	14,0	10,8	8,7	5,7	5,1	6,1	1,8	2,4	2,5	2,2	1,8	2,7	3,1	2,3	2,8	Ir, ¹³ C RMN
24	Acide Tetradecanoïque	1748	1745	2682	0,8	0,3	0,2	0,2	0,4	0,2	0,3	0,2	0,4	0,3	0,2	0,3	0,4	0,7	0,6	0,6	0,3	1,3	1,0	0,7	tr	0,5	Ir, SM
25	Acide Hexadecanoïque	1942	1942	2628	0,8	0,5	0,3	0,2	0,6	0,3	0,7	0,4	9,5	8,5	10,2	12,5	9,8	13,1	11,5	8,6	15,2	3,2	3,8	8,9	16,8	10,3	Ir, SM
Total d'identification (%)					93,2	82,2	84,4	82,2	88,7	86,4	87,5	84,9	95,6	92,8	90,5	86,3	96,0	92,0	86,7	91,0	92,1	99,7	98,3	91,3	96,1	95,4	

Composés oxygénés	92,7	81,3	84	79,7	88,1	85,1	87,3	84,5	95,3	92,4	90,1	85,9	95,6	91,7	86,6	90,3	91,4	99,0	97,7	91	95,8	94,8
Composés hydrocarbonés	0,5	0,9	0,4	0,1	0,6	1,3	0,2	0,4	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3	0,1	0,7	0,7	0,7	0,6	0,3	0,3	0,6
Sesquiterpènes hydrocarbonés	0,5	0,9	0,4	0,1	0,6	1,3	0,2	0,4	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3	0,1	0,7	0,7	0,7	0,6	0,3	0,3	0,6
Monoterpènes oxygénés	0,4	0,2	0,5	0,3	0,4	0,3	0,3	0,2	0,1	0,1	0,3	0,4	0,1	0,3	0,4	0,3	0,6	0,2	0,2	0,5	0,4	0,3
Sesquiterpènes oxygénés	79,4	65,4	69,2	64	71,3	67,8	63,3	58,9	74,6	73,9	69,6	63,5	76,0	71,3	65	74,5	69,0	91,0	88,2	74,8	69,7	76,7
Composés non terpéniques oxygénés	12,9	15,7	14,3	15,4	16,4	17	23,7	25,4	20,6	18,4	20,2	22,0	19,5	20,1	21,2	15,5	21,8	7,8	9,3	15,7	25,7	17,8

tr : traces (≤ 0.08 %);

a: Ordre d'éluion donné sur colonne apolaire (Rtx-1),

b: Indices de rétention donnés par la littérature sur colonne apolaire (IRIa),

c: Indices de Rétention sur colonne apolaire Rtx-1 ; (IRa),

d: Indices de rétention sur colonne polaire Rtx-wax (IRp).

e : Pourcentages relatifs des constituants donnés sur colonne apolaire de l'huile essentielle Collective (HE Coll).

f : Pourcentages relatifs des constituants donnés sur colonne apolaire des huiles essentielles individuelles préparées à partir des racines prélevées dans les différentes stations (Y1-21).

g : Ir : Indice de rétention; SM: Spectre de Masse en impact électronique ; ref: composés identifiés à l'aide des bibliothèques commerciales [30].

CHAPITRE III : ETUDE DE L'HUILE
ESSENTIELLE DE *CARDUNCELLUS*
PINNATUS Desf.

III. *Carduncellus pinnatus* DC.

III.1. Description botanique et travaux antérieurs

Le genre *Carduncellus* est un chardon du complexe *Carduncellus-Carthamus*, qui appartient à la tribu *Cynareae*, rang taxonomique associé aux marguerites que l'on retrouve dans la famille des Astéracées [56]. A ce jour la classification taxonomique du genre s'est avérée sujet à controverses ; de nombreuses tentatives pour clarifier les limites systématiques (taxonomie) relatives ont inclut la division de *Carduncellus* et *Carthamus* en plusieurs genres, mais aucune de ces classifications proposées n'a été acceptée [57].

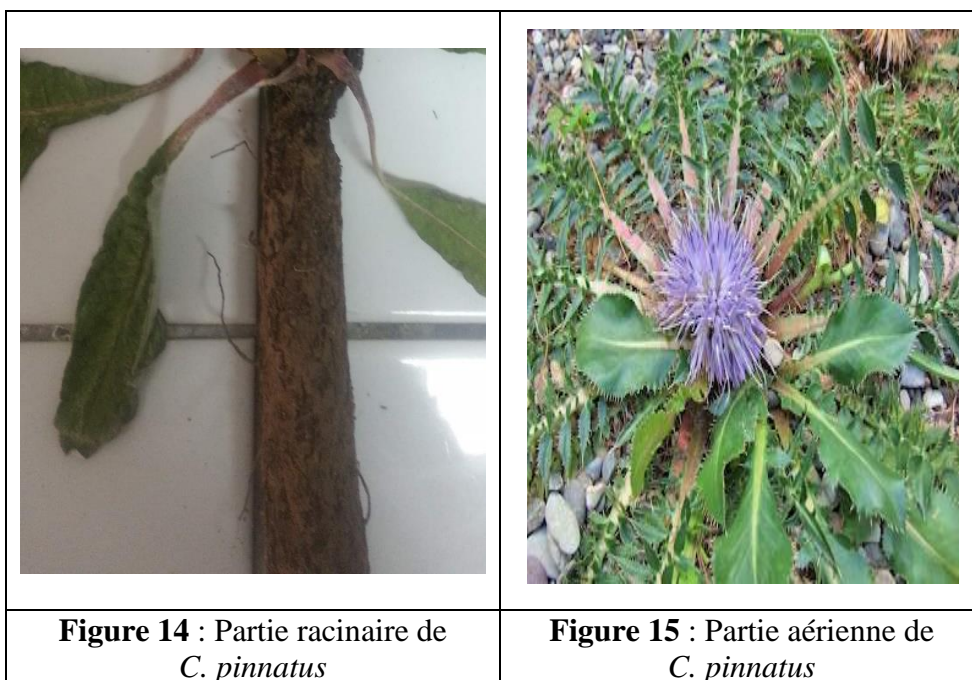
Le genre comprend 18 espèces dont *C. tinctorius* L. qui est la seule espèce cultivée [56]. Les espèces de *Carduncellus-Carthamus* partagent une distribution géographique allant de la région méditerranéenne (Europe du sud et Afrique du Nord, vers l'Est jusqu'en Grèce et en Égypte) à l'Asie occidentale. Probablement originaires de l'Asie du Sud et connues pour avoir été cultivées en Chine, en Inde, en Iran et en Égypte [35], [58], les espèces de ce genre ont fait l'objet d'études notamment pour les teneurs remarquables en métabolites d'intérêts tels que des flavonoïdes, des stérols, des sesquiterpènes et des polyacétylènes [59].

Carduncellus pinnatus (la partie racinaire et la partie aérienne sont présentées dans les figures 14 et 15 respectivement) est une espèce très répandue en Afrique du Nord et en Sicile [60]. La plante pousse en petites populations généralement disjointes [60], les feuilles font de 1 à 2 décimètres de long, ailées, à folioles alternes, petites, uniformes, ovales-lancéolées, aiguës, nerveuses, glabres, rigides, souvent lobées, à bord inégalement denté-piqueur. Elle dispose d'une tige dressée, simple de 1 à 2 décimètres, sa fleur de calice glabre est cylindrique, avec des écailles externes feuillues dessus et à bord épineux denté [61]. En Algérie cette plante fleurit au début du printemps pour une période courte d'un mois et demi.

Selon une enquête ethnobotanique menée par Cheriti [62], il s'avère que les fruits de *C. pinnatus* sont dépuratifs et toniques. Mais les racines sont utilisées traditionnellement par la population locale afin de prévenir et/ou de lutter contre les troubles digestifs.

Une première caractérisation des huiles essentielles préparées à partir des parties aériennes de *Carduncellus helenioides* récoltées dans la wilaya de M'sila (ouest Algérie) a été menée par Meratate [35]. Au total, quarante-quatre constituants ont été identifiés, la composition de l'huile essentielle est caractérisée par la présence de l'oxyde de diépicedrène

(10,6%), l'époxyde d'isoaromadendrène (7,1%), l'oxyde de caryophyllène (6,20%), le β -eudesmol (6,17%) et l'oxyde d'aromadendrène (1,3%). La composition chimique de l'huile essentielle obtenue à partir des fleurs séchées de *C. tinctorius* L. poussant en Iran a été étudiée [63], ces principaux constituants sont : le 1-hydroxy-3-propyl-5-(4-méthyl-pentène)-2-méthylbenzène (25,2%), 2,5,5-triméthyl-3-propyle, tétrahydro-1-naphtol (19,8%), benzaldéhyde (8,0%), l'oxyde de caryophyllène (6,5%) et l'acide laurique (5,1%). Les travaux réalisés sur les extraits alcooliques montrent une variété de structures moléculaires. Ainsi Shabana et al [59] ont isolé 16 flavonoïdes dans l'extrait n-butanol de *C. eriocephalus* Boiss. var. *albiflora*, Les mêmes auteurs ont publié une étude décrivant les flavonoïdes de l'extrait éthanolique de *C. mareoticus* (Del.) Hanelt, [64].



A notre connaissance, il n'y a aucune étude chimique sur *Carduncellus pinnatus*. Par conséquent, ce travail a pour objectif d'étudier pour la première fois la composition chimique des huiles essentielles des racines de cette plante.

III.2. Lieux de récolte et rendements en huile essentielle

Les parties racinaires de *C. pinnatus* ont été collectées dans 10 localités de la région de Tlemcen, où la plante pousse spontanément et en abondance au cours des mois de mars et avril 2019 (Tableau 2). Les rendements en huile essentielle varient légèrement de 0,18% à 0,20% pour toutes les populations végétales étudiées.

Tableau 2 : Distribution géographique des stations de *C. pinnatus* Desf.

Ech.	Régions	Coordonnées GPS		Altitudes (m)
S1	Ain Fezza	34°51'57.4"N	1°13'19.6"W	900
S2	Grottes de Ain fezza	34°51'58.1"N	1°13'14.0"W	900
S3	El Ourit	34°52'41.1"N	1°15'05.3"W	818
S4	Tizi	34°54'20.9"N	1°10'04.1"W	800
S5	Hbalat	34°42'07.5"N	1°18'49.4"W	1100
S6	Azayza	34°59'09.0"N	1°10'41.5"W	600
S7	Sidi Boudjnen	34°57'02.7"N	1°57'57.4"W	580
S8	Bab el-assa	34°57'36.3"N	2°00'57.8"W	380
S9	Beni snous	34°38'22.7"N	1°33'53.5"W	680
S10	Terni ben hadiel	34°48'21.5"N	1°23'07.8"W	1200

III.3. Analyse des huiles essentielles de *Carduncellus pinnatus*

L'analyse chromatographique préliminaire des 10 huiles essentielles individuelles a permis d'obtenir des profils chromatographiques qualitativement similaires, ne différant que par les proportions des composés majoritaires. Les composés chimiques des échantillons analysés sont présentés dans le Tableau 4. Afin d'effectuer une analyse détaillée, tous les échantillons des huiles essentielles ont été combinés pour produire une huile essentielle collective (Coll EO).

L'analyse de l'huile essentielle collective de *C. pinnatus* a permis l'identification de 25 composés représentant 89,7% de la composition chimique du mélange (Tableau 4). L'huile de *C. pinnatus* est dominée par les composés hydrocarbonés qui représentent 78,7%, alors que les constituants oxygénés sont présents avec un faible pourcentage (11,0%). Les principaux composés de l'huile essentielle de *C. pinnatus* sont l'aplotaxene **17** (48,7-84,4%), l'acide pentadécanoïque **23** (1,9-13,9%), l'acide hexadécanoïque **24** (0,1-11,1%) et le pentadécène **13** (0,1-4,8%) (Tableau 4).

Afin d'assurer l'identification du composé majoritaire, l'acquisition d'un spectre de RMN C-13 a été réalisé directement sur la fraction hydrocarbonée dans laquelle l'Aplotaxene **17** a été concentré à 80% à la suite de la chromatographie liquide sur colonne de l'HE Coll. Ainsi, directement en mélange et sans séparation préalable, à partir du spectre de RMN du carbone-13, par application du concept « Extraction NMR » [41], nous avons procédé à l'extraction des valeurs de déplacements chimiques de l'Aplotaxene.

Le spectre RMN fait apparaître 17 raies de résonance de forte intensité dont 8 correspondaient à des carbones éthyléniques, les valeurs de déplacements chimiques oléfiniques suggèrent l'absence de doubles liaisons conjuguées et de fonction organique oxygénée. La structure du (Z,Z,Z)-heptadéca-1,8,11,14-tétraène a été confirmée en comparant les valeurs de déplacements chimiques expérimentales et celles issues de la littérature, les variations des valeurs de déplacements chimiques n'excèdent jamais $\pm 0,61$ ppm (Tableau 3).

Dans cette étude, nous avons rapporté pour la première fois la composition chimique de l'huile essentielle préparée à partir des racines de *C. pinnatus*. Cette huile essentielle apparaît comme une source importante d'Aplotaxène, un hydrocarbure aliphatique tétra-insaturé qui a été reporté initialement dans les racines de *Saussurea lappa* [65]. Cette molécule a été identifiée dans les racines de plusieurs genres et semble être un marqueur taxonomique du genre *Cirsium* spp. [66] [67]. En effet, il est le constituant principal des huiles essentielles des racines de *Cirsium japonicum* DC. (75%) [68] et de *Cirsium dipsacolepis* (80%) [69]. Signalons la présence, certes dans une moindre mesure, de l'Aplotaxene dans les huiles essentielles de racines de *Rhaponticum carthamoides*, *Inula racemosa* et *Saussurea* (anciennement *Aplotaxus*) *lappa*, où il représente entre 20 et 21,2 % de la composition chimique [70], [71], [72]. Enfin, la présence de l'Aplotaxène a également été rapportée dans les genres *Centaurea*, *Leuzea*, *Arctium*, *Carthamus* et *Saussurea* [66]. En particulier l'Aplotaxene a été retrouvé dans l'extrait à l'éther de pétrole des racines de *Centaurea incana* [73] et dans l'extrait éthanolique des racines de *Centaurea diffusa* Lam.[74] [75]. Enfin, les extraits au dichlorométhane des racines de *Carduus acanthoides* et *Carduus nutans* et l'extrait à l'oxyde de diéthyle des racines de *Cirsium helenioides* produisent des quantités relativement élevées du composé.

Tableau 3 : Structure et données spectrales de RMN du Carbone-13 de l'Aplotaxène

C	¹³ C RMN δ(ppm)	¹³ C RMN δ (litt)	Δδ (ppm)
1	114,21	114,3	0,09
2	139,12	139,1	0,02
3	33,78	33,8	0,02
4	29,51	28,9	0,61
5	29,72	29,5	0,22
6	28,84	28,9	0,06
7	28,81	28,9	0,09
8	130,29	130,3	0,01
9	127,75	127,9	0,15
10	27,20	27,2	0
11	128,29	128,4	0,11
12	128,27	128,4	0,13
13	25,63	25,6	0,03
14	127,13	127,3	0,17
15	131,98	132,0	0,02
16	20,57	20,6	0,03
17	14,28	14,3	0,02

Aplotaxène

δ (litt) : Déplacements chimiques décrits dans la littérature selon Casey et Aclfnou [76];
 δ : Déplacements chimiques observés dans le spectre de la fraction FH.

III.4. Composition chimique des huiles essentielles au cours du cycle végétatif de la plante

Afin d'étudier les processus de production des métabolites secondaires dans la partie racinaire au cours du cycle végétatif de la plante (du début de croissance à la floraison), nous avons suivi l'évolution de la composition chimique des huiles essentielles de *C. pinnatus* produites du mois de mars à juin (Tableau 4). Pour cela, nous avons choisi une station suffisamment vaste et contenant de nombreux pieds individuels à partir de laquelle la matière végétale racinaire a été échantillonnée de manière raisonnée, sans perturber la pousse naturelle des pieds utilisés pour l'étude tout au long du cycle biologique.

Au début de la phase de croissance (mars), l'Aplotaxène (52,4%) est ultra dominant dans l'huile essentielle, puis sa proportion relative diminue au cours du cycle végétatif pour atteindre 38,4% en pleine floraison.

La diminution progressive de la proportion de l'Aplotaxène est corrélée à l'augmentation progressive de l'acide hexadécanoïque (0,2-11,3%) et à la diminution de l'acide pentadécanoïque (0,1-13,9%) au cours de cette même période (Tableau 4).

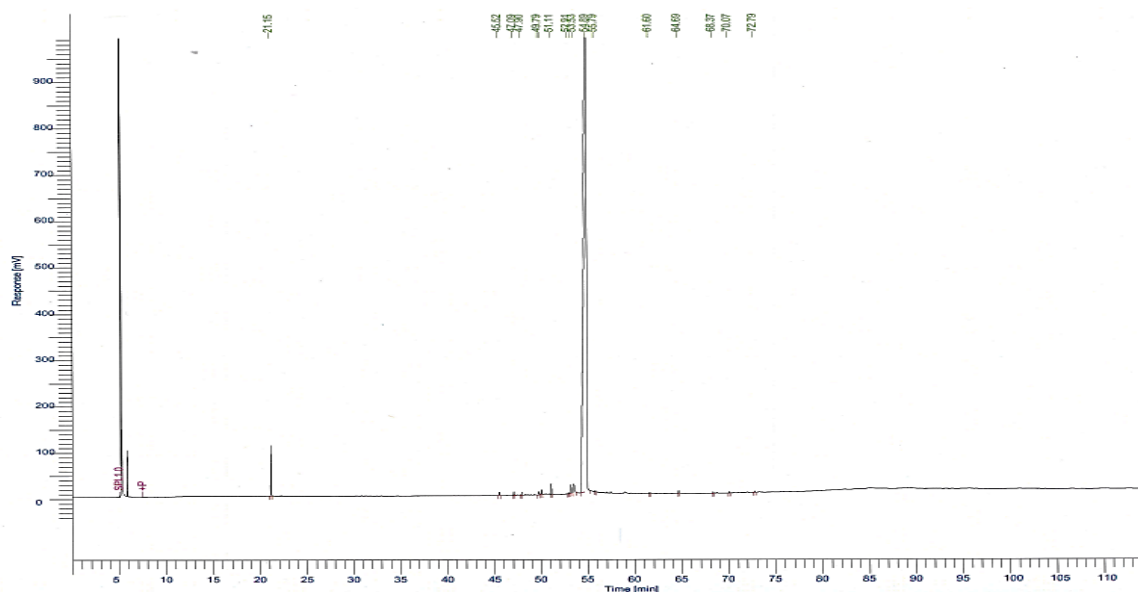


Figure 16 : Chromatogramme de l'huile essentielle de *C. pinnatus* obtenu sur colonne apolaire.

Les huiles essentielles des racines de *C. pinnatus* sont caractérisées par la présence d'hydrocarbures, notamment l'Aplotaxène [(Z,Z,Z)-heptadéca-1,8,11,14-tétraène]. L'étude de la composition chimique des huiles essentielles au cours du cycle végétatif a confirmé un métabolisme particulier, avec une production accrue d'Aplotaxène pendant la phase de floraison et sa diminution au moment de la fin du cycle végétatif. Par ailleurs, le signalement de cet hydrocarbure aliphatique peu commun, en proportion plus que remarquable au sein de l'huile essentielle, nous amène à penser que l'Aplotaxène pourrait être utile pour une étude taxonomique du genre dont la classification a fait l'objet de nombreuses controverses.

Tableau 4 : Composition chimique des huiles essentielles de *C. pinnatus*

aN°	Composés	bIrlita	cIra	dIrp	eHE Coll	Min	Max	Moy	Suivi végétatif				fIdentification
									Janvier	Février	Mars	Avril	
1	(Z)-3-Hexenal	778	767	1129	0,4	0,1	0,6	0,3	0,3	0,1	0,4	0,2	Ir, SM
2	Hexanal	810	822	1095	0,3	0,1	0,4	0,2	0,1	0,2	0,2	0,3	Ir, SM
3	(E,E)-2,4-Heptadienal	984	990	1499	0,2	tr	0,3	0,2	tr	0,1	0,3	0,1	Ir, SM
4	Limonène	1022	1027	1211	0,5	tr	1,7	0,6	0,6	tr	1,7	4,6	Ir, SM
5	Non-6-enal	1101	1071	1438	0,5	0,1	0,6	0,3	0,6	0,2	0,2	0,4	Ir, SM
6	Dodecanal	1185	1164	1499	0,8	tr	1,4	0,8	0,4	1,4	0,9	2,5	Ir, SM
7	(Z)-Dec-7-enal	1180	1168	-	0,2	0,1	0,4	0,3	0,4	0,1	0,3	0,5	Ir, SM , ref
8	Dodecyne	1213	1205	1235	0,3	tr	0,4	0,2	0,1	0,2	0,2	0,4	Ir, SM
9	Pulegone	1216	1226	1640	0,8	0,3	1,2	0,7	0,4	0,6	0,9	0,8	Ir, SM
10	Dec-2-yn-1-ol	1275	1262	1692	0,2	0,1	0,5	0,3	0,2	0,4	0,3	0,9	Ir, SM, ref
11	Eugénol	1330	1329	2163	0,3	0,1	0,4	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	Ir, SM
12	Longifolène	1413	1404	1557	0,5	0,1	0,9	0,5	0,5	0,7	0,4	1,2	Ir, SM
13	Pentadecène	1489	1486	1544	4,8	0,1	4,8	2,2	1,8	2,1	6,1	0,5	Ir, SM
14	Isoshyobunone	1518	1518	1882	0,3	0,1	0,4	0,2	0,2	0,4	0,2	0,6	Ir, SM
15	Epoxyde de α -Funebrène	1510	1526	2395	0,3	0,1	0,7	0,3	0,5	0,1	0,3	0,6	Ir, SM
16	Hexadecène	1592	1587	1644	1,5	0,2	0,8	0,4	0,2	0,6	0,2	0,8	Ir, SM
17	Aplotaxène	1667	1661	1869	66,0	48,7	84,4	56,7	52,4	54,5	48,5	38,4	Ir, ¹³ C NMR
18	(Z)-Tetradec-7-en-1-ol	1660	1663	2221	1,3	0,1	2,2	1,5	2,5	2,7	5,6	2,4	Ir, SM
19	Eudesma-4(15),7-dien- β -ol	1672	1678	2340	0,9	0,1	1,2	0,6	1,2	0,1	0,4	2,1	Ir, SM
20	1-Heptadecène	1690	1684	1765	0,2	0,2	1,4	0,5	0,2	0,7	tr	0,6	Ir, SM
21	(E)-Octadec-3-ène	1795	1792	1877	0,2	0,1	1,1	0,5	0,2	0,2	0,7	1,4	Ir, SM
22	Heptadeca-9,16-dien-7-one	1827	1832	2180	0,6	0,2	1,7	0,9	1,4	0,8	3,2	0,8	Ir, SM
23	Acide pentadecanoïque	1876	1870	2831	3,8	1,9	13,9	4,7	13,9	10,3	6,5	0,9	Ir, SM
24	Acide hexadecanoïque	1942	1961	2888	0,1	0,1	11,1	2,4	0,2	tr	tr	11,3	Ir, SM
Total identifié (%)					85,0				78,5	76,6	77,7	72,5	
Composés oxygénés					11,0				22,5	17,6	19,9	24,6	
Composés hydrocarbonés					74,0				56,0	59,0	57,8	47,9	

^a: Ordre d'élution donné une colonne apolaire (Rtx-1),

^b: Indices de rétention issus de la littérature sur colonne apolaire ($IR_{lit a}$),

^c: Indices de rétention donnés sur colonne apolaire Rtx-1 ; (I_{ra}),

^d: Indices de rétention donnés sur colonne polaire Rtx-wax (I_{rp}).

^e : Pourcentages relatifs donnés sur colonne apolaire.

^f : I_r : Indice de rétention; SM: Spectre de Masse en impact électronique ; ref: composés identifiés à l'aide de la bibliothèque commerciale [77].

CHAPITRE IV : ETUDE DE L'HUILE
ESSENTIELLE DE *SALVIA ARGENTEA* L.

IV. *Salvia argentea* L.

IV.1. *Description botanique et travaux antérieurs*

La famille des *Lamiaceae* (*Labiatae*) comprend 200 genres et 3000 espèces. Le genre *Salvia* L., communément associé aux sauges, est l'un des genres les plus vaste, il comporte plus de 900 espèces [78] distribuées dans différentes régions du monde, telles que la Méditerranéenne, l'Afrique du Sud, l'Amérique et l'Asie du Sud-Est. La flore algérienne compte 23 espèces parmi lesquelles cinq sont endémiques [79]. Les plantes du genre *Salvia* mesurent généralement entre 30 et 150 cm de haut, sont herbacées et vivaces, rarement bisannuelles ou annuelles, avec de jolies fleurs de différentes couleurs [80]. Le nom *Salvia* vient du mot latin «Salveo», qui signifie «guérir/sauver» [81]. Les espèces du genre *Salvia* sont utilisées depuis l'Antiquité pour traiter plus de soixante affections différentes allant des courbatures à l'épilepsie, et principalement pour traiter le rhume, la tuberculose, les hémorragies et les troubles du cycle menstruel [82]. A titre d'exemple, la sauge (*Salvia officinalis* L.) est largement utilisée en Europe comme remède domestique à plusieurs fins.

Salvia argentea L. connue sous le nom de «Ferrache enneda» (Figure 17) a une racine pivotante vivace et ses feuilles sont fortement recouvertes d'un duvet argenté qui est à l'origine de son nom [83] [84]. C'est une plante herbacée vivace que l'on retrouve dans les régions méditerranéennes, au nord-ouest de l'Afrique, au sud de l'Europe, et à l'extrême ouest de l'Asie (Turquie) [85]. En Algérie, elle est présente au nord du pays où ses feuilles sont notamment utilisées pour traiter les maladies respiratoires. La plante pousse principalement sur des sols volcaniques riches en basalte et elle affectionne les falaises rocheuses. Ainsi, on la retrouve peu fréquemment à proximité de la mer, ou à basse altitude, mais plus habituellement en altitude. *S. argentea* a une large zone basale de feuilles disposées le long d'une tige qui mesure de 30 à 60 cm de haut. Les feuilles individuelles mesurent de 20 à 30 cm de long et 15 cm de large [36]. Les deux surfaces des feuilles sont fortement couvertes de poils soyeux qui leur donnent un aspect laineux. Les feuilles sont douces au toucher, elles émergent initialement d'un blanc argenté, puis prennent une coloration verte après la floraison estivale. Le temps frais de l'automne rend les feuilles à nouveau argentées [86].

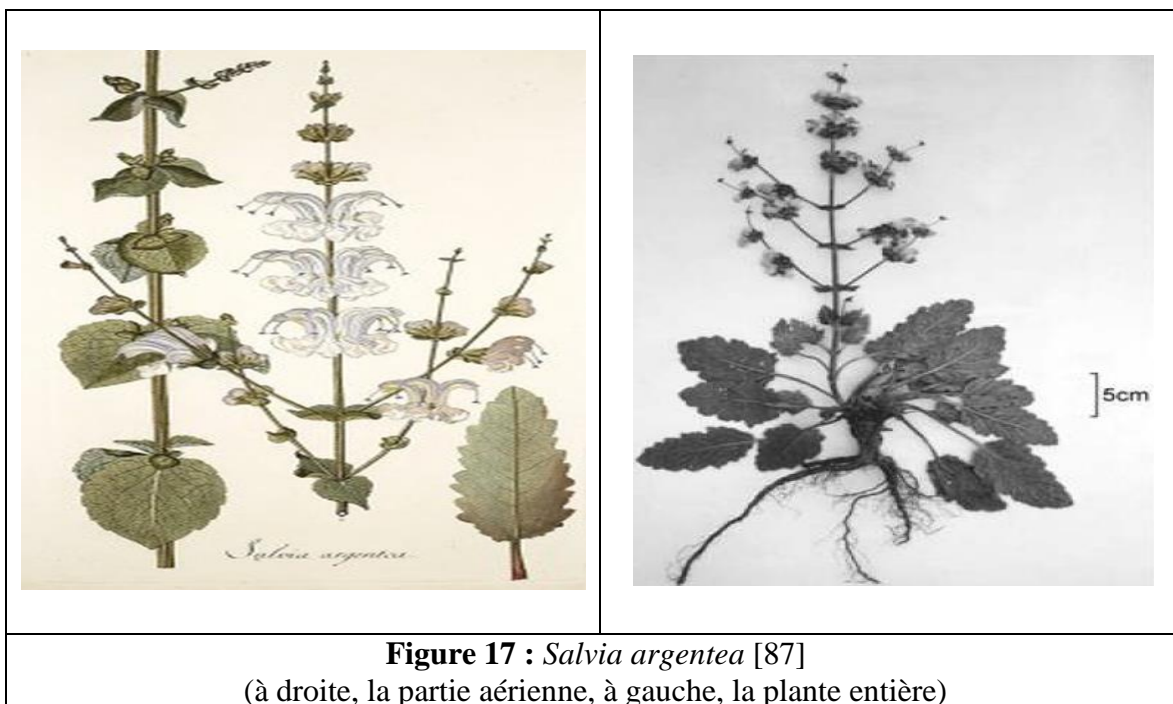


Figure 17 : *Salvia argentea* [87]
 (à droite, la partie aérienne, à gauche, la plante entière)

Les herboristes ont révélé que *S. argentea* est utilisée en médecine traditionnelle à des fins thérapeutiques. L'enquête a révélé que les feuilles de la plante sont consommées cuites dans certaines régions d'Espagne pour ses vertus dans le traitement des maladies respiratoires [88]. Le mucilage obtenu à la suite du mouillage des fruits est utilisé pour le traitement des maladies oculaires [89]. En complément, *S. argentea* connaît de multiples usages en qualité de condiments, additifs alimentaires, épices et comme base pour les tisanes [90]. Enfin, les feuilles de *S. argentea* ont historiquement été utilisées pour soigner les plaies, probablement en raison de leurs propriétés hémostatiques [91].

Plusieurs espèces du genre *Salvia* ont été étudiées pour leurs compositions chimiques et leurs constituants biologiquement actifs. Les flavonoïdes, les triterpénoïdes et les substances volatiles, en particulier les monoterpènes, sont les principaux constituants des parties aériennes, tandis que dans les racines, les diterpénoïdes sont généralement plus abondants [92]. Différentes méthodes ont été utilisées pour extraire les composés volatils des parties aériennes de *S. argentea* : la distillation à la vapeur d'eau, l'extraction à l'hexane, à l'éther de pétrole et au dichlorométhane. Les extraits ont été analysés par CPG/SM. L'analyse du distillat à la vapeur obtenu à partir de la plante originaire de l'ouest Algérien a révélé la présence de l'hydroxy- α -humulène comme composé principal (40,1%), suivi du 1,3,8-p-menthatriène (12,1%), du globulol (7,4%) et du β -sesquiphellandrène (5,8%) [93].

Les extraits obtenus à l'aide de solvants organiques sont riches en composés aliphatiques puisque le tritriacontane (9,9% et 14,1%), l'heptacosane (8,4% et 10,5%), l'hentriacontane (8,3% et 10,9%), le tétradécanal (8,4% et 10,2%) et le méthyl dotriacontane (7,9% et 7,6%) ont été identifiés comme les principaux constituants [93].

L'huile essentielle obtenue à partir des parties aériennes de *S. argentea* est connue pour sa richesse en composés sesquiterpéniques. Ainsi, l'huile essentielle originaire du sud-ouest de la Macédoine contient une fraction sesquiterpénique représentant environ 70% et dominée par l'oxyde de caryophyllène (37,6%), l' α -copaène (8,5%), l'époxyde d'humulène II (6,3%) et le (E)-caryophyllène (6,1%) [94]. L'huile essentielle originaire de la région sud-est de la Serbie, est également caractérisée par une teneur élevée en sesquiterpènes, dont les principaux constituants sont le viridiflorol (32,4%), le manool (14,6%) et l' α -humulène (10,7%) [95].

S. argentea récoltée au nord-ouest de la Tunisie produit une huile essentielle dont les constituants majoritaires sont le manool, l'oxyde de manoylène, l' α -pinène, l' α -fenchone, le camphre, le viridiflorol, l' α -cadinol et le τ -cadinol [89]. Enfin, Farhat et son équipe [96] ont identifié dans une huile essentielle provenant de Tunisie du viridiflorol (26,93%), du manool (13,59%), de l' α -thuyone (8,06%), du p-cymène (6,39%) et de l' α -humulène (5,28%) comme constituants dominants.

Les racines de *S. argentea* ont fait l'objet de simplement deux études. Les métabolites obtenus à l'aide de solvants organiques sont cette fois, des diterpénoïdes. L'étude menée par Michavila en 1986 [97] sur les métabolites des racines de la plante extraites à l'acétone à température ambiante durant une semaine, a conduit à l'identification de l'isopimara-8(9),15diène, la salvipisone, le ferruginol, l'aéthiopinone, l'arucadiol, la 1-céto-aéthiopinone et la 1-R-hydroxymiltirone. Le second travail mené par Yang en 1996 [98] a permis d'isoler suite au fractionnement d'un extrait acétonique des racines de *S. argentea* commercial (Green Farm Plantes, Bentley, Royaume-Uni) cinq diterpénoïdes : le ferruginol, l'aéthiopinone, la 1-céto-aéthiopinone, la salvipisone et la 2,3-déhydrosalvipisone.

IV.2. Lieux de récolte de *S. argentea* et rendements en huile essentielle

Le matériel végétal a été récolté entre mars et juillet 2018 à partir d'une population sauvage localisée au nord-ouest de la wilaya de Tlemcen (Algérie). L'échantillonnage est basé sur une collection aléatoire de plantes. L'identification botanique a été réalisée par le Professeur Benabadji de l'Université de Tlemcen. L'huile essentielle préparée à partir des racines de *S. argentea* a fourni une huile essentielle de couleur rougeâtre avec un rendement de 0,1% (m/m) sur la base de la masse sèche de la plante. Il est à remarquer que les rendements en huile essentielle de la plante augmentent de manière significative pour atteindre 0,17% au moment de la floraison et de la fructification.

IV.3. Etude de la composition chimique de l'huile essentielle de *Salvia argentea* L.

L'identification des constituants de l'huile essentielle de *Salvia argentea* L., a été réalisée suivant la séquence analytique décrite dans le premier chapitre du manuscrit. L'utilisation conjointe des techniques chromatographiques et spectroscopiques basée sur la comparaison des indices de rétention et des spectres de masse avec ceux contenus dans des bases de données de référence a été mise en œuvre. Toutefois, malgré la bibliothèque conçue au laboratoire « Arômes » riche de plus de 1000 composés et des bibliothèques commerciales possédant jusqu'à plusieurs milliers de molécules de référence, nous avons été confrontés à des incertitudes analytiques concernant l'identification de plusieurs constituants dont certains, sont majoritaires dans les huiles essentielles de *S. argentea*. En particulier, l'identification des composés majoritaires présents dans l'huile essentielle a nécessité la mise en œuvre d'analyses complémentaires intégrant des chromatographies liquides préparatives et la RMN mono et bidimensionnelle.

Les travaux présentés dans cette partie du mémoire ont été réalisés à partir d'une huile essentielle « collective » (HE Coll) obtenue par le cumul de 6 huiles essentielles individuelles préparées à partir d'échantillons provenant des différentes stations de récolte. Les profils chromatographiques obtenus en CPG-Ir et CPG/SM-IE sont qualitativement et quantitativement similaires. La figure 18 illustre le profil chromatographique de l'huile essentielle collective.

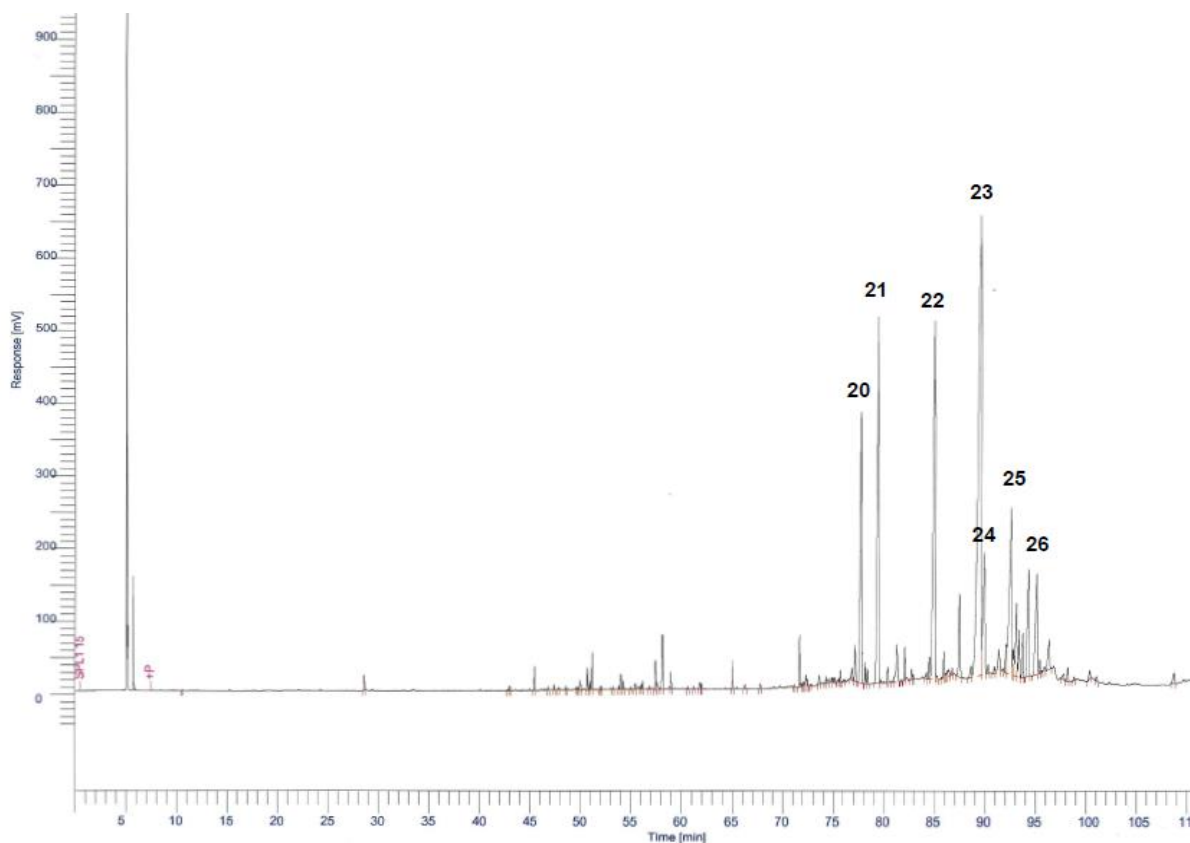


Figure 18 : Chromatogramme de l'huile essentielle de *S. argentea* obtenu sur colonne apolaire

Des chromatographies liquide successives sur colonne de l'huile essentielle collectives (HE coll) ont permis d'obtenir deux fractions, l'une hydrocarbonée, l'autre oxygénée éluées respectivement à l'hexane (FH) et à l'oxyde de diisopropyle (FO). La fraction oxygénée FO a été soumise à une nouvelle chromatographie sur colonne ouverte avec le même type de silice en utilisant un gradient d'élution Hexane/oxyde de diisopropyle. Vingt-quatre fractions ont alors été obtenues et les composés d'intérêt ont été concentrés comme suit : **22** (77%, FH), **23** (77,3%, Fr. 10), **24** (43,3%, Fr.20), **25** (29,0%, Fr. 4), **26** (45,7%, Fr. 4) et **27** (18,6%, Fr. 20). Toutes ces fractions ont été analysées par CPG-SM et RMN ¹³C.

Les identifications du Ferruginol **23** et du (3-rac)-4,12-Epoxy-3,11-cyclo-4,5-seco-20(10→5)-abeo-abieta-5(10),6,8,11,13-pentaene **22** ont été réalisées par comparaison de leurs données de RMN carbone-13 avec celles décrites dans la littérature. Les structures et les valeurs des déplacements chimiques de ces deux molécules sont présentées respectivement dans la Figure 20 et le Tableau 5.

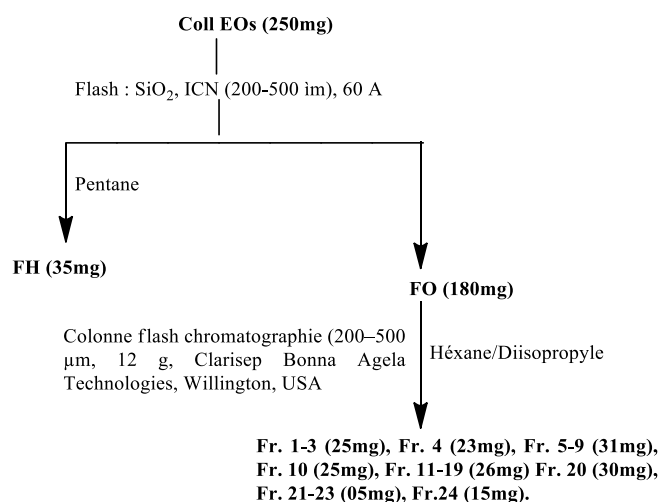


Figure 19 : Fractionnement de l'huile Coll. à partir des racines de *S. argentea* L.

Tableau 5 : Valeurs de déplacements chimiques de RMN du carbone-13 du (3-*rac*)-4,12-Epoxy-3,11-cyclo-4,5-seco-20(10→5)-abeo-abieta-5(10),6,8,11,13-pentaene **22** et du Ferruginol **23** ; Comparaison entre les données expérimentales δ (ppm) et celles de la littérature δ [ref].

	22		23	
	¹³ C RMN δ (ppm)	¹³ C RMN δ [99]	¹³ C RMN δ (ppm)	¹³ C RMN δ [97]
1	26,66	26,56	38,87	38,87
2	23,77	23,70	19,24	19,22
3	48,40	48,32	41,70	41,68
4	93,73	93,58	33,44	33,43
5	121,63	121,62	50,36	50,34
6	126,31	126,28	19,33	19,31
7	124,39	124,37	29,77	29,75
8	132,74	132,74	131,41	131,34
9	130,36	130,23	127,23	127,20
10	129,19	129,11	37,51	37,50
11	127,31	127,31	110,96	110,95
12	152,31	152,27	150,73	150,65
13	127,02	127,06	148,65	148,66
14	122,07	122,08	126,61	126,62
15	29,26	29,36	26,81	26,81
16	22,02	21,95	21,62	21,61
17	22,14	22,16	22,75	22,73
18	28,11	28,03	33,31	33,30
19	22,58	21,95	22,56	22,55
20	18,83	18,74	24,80	24,78

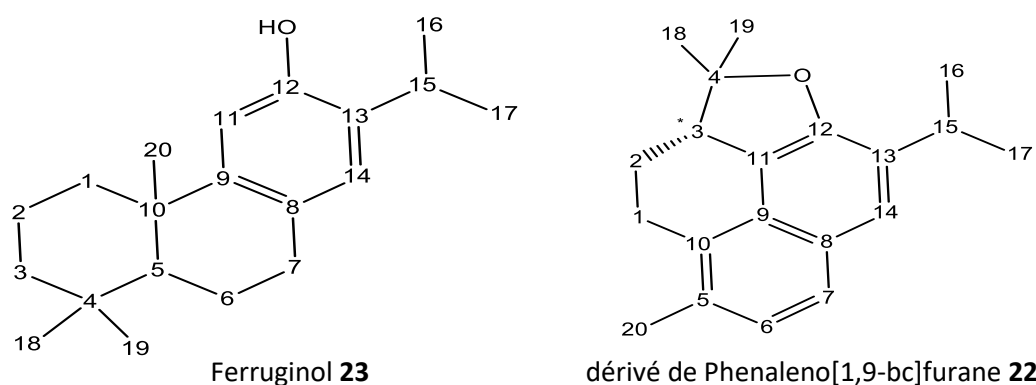
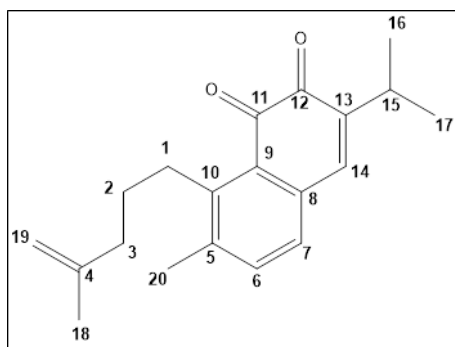


Figure 20 : structure de ferruginol **23** et de dérivé de Phenaleno[1,9-bc]furane **22**

S'agissant des identifications de l'Aethiopinone **24** et de la Salvipisone **26**, l'application du concept d'extraction des valeurs de déplacements chimiques des constituants prédominants du spectre RMN du carbone-13 et l'examen des différentes corrélations atomiques afférentes à partir des spectres en deux dimensions ont permis d'identifier sans ambiguïté les deux molécules. Par ailleurs, la comparaison des données de RMN du carbone-13 issues de la littérature avec les données expérimentales permet de confirmer les présences respectives des deux molécules dans les fractions Fr. 20 et Fr. 4. En revanche, il est à signaler que l'examen du spectre de RMN bidimensionnelle de l'Aethiopinone **24** nous conduit à proposer des attributions de valeurs de déplacements chimiques pour certains carbones qui sont en désaccord avec celles décrites dans la littérature [100]. En complément, l'examen des spectres de RMN du carbone-13 des fractions Fr. 20 et Fr. 4, montrent que l'Aethiopinone **24** et de la Salvipisone **26** sont respectivement accompagnés par deux composés diterpéniques (**27**, 18,6%, Fr. 20 et **25**, 29,0%, Fr. 4) dont il a été aisé d'extraire les 2 séries de raies de résonance. Ainsi, nous avons identifiés par comparaison des données expérimentales avec celles de la littérature, un dérivé de l'Aethiopinone connu sous le nom de Saprorthoquinone **27**, et un dérivé de la Salvipisone **26** connu sous le nom de 12-hydroxysapriparaquinone **25**.

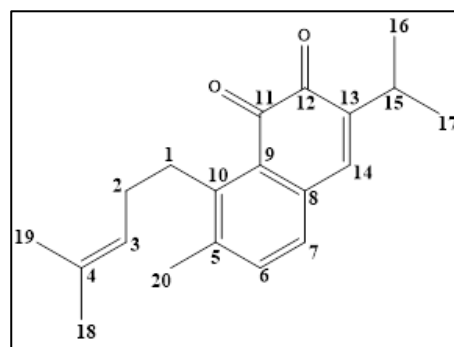
Les structures et les valeurs des déplacements chimiques de deux couples de molécules sont présentées respectivement dans les Figures 21 et 22.

δ [ppm]	Intensity [rel]	Annotation	C type	H (ppm)	mult, J (Hz)	δ [100], [101]	$\Delta\delta$ (ppm)
182,49	2,79	C12	Cq	NA	NA	182,37	0,12
182,32	8,62	C12	Cq	NA	NA	182,10	0,22
181,60	3,13	C11	Cq	NA	NA	181,49	0,11
181,45	8,83	C11	Cq	NA	NA	181,10	0,35
148,65	14,90	C10	Cq	NA	NA	148,40	0,25
148,11	5,00	C10	Cq	NA	NA	148,04	0,07
145,64	15,32	C4	Cq	NA	NA	145,30	0,34
144,65	14,64	C13	Cq	NA	NA	144,50	0,15
144,62	5,10	C13	Cq	NA	NA	144,52	0,10
140,34	35,87	C14	CH	7,08	s	140,00	0,34
140,33	17,27	C14	CH	7,08	s	140,22	0,11
140,22	5,47	C5	Cq	NA	NA	140,13	0,09
140,09	16,18	C5	Cq	NA	NA	139,80	0,29
136,71	36,03	C6	CH	7,35	d, 7,70	136,40	0,31
136,66	12,59	C6	CH	7,35	d, 7,71	136,57	0,09
134,94	14,77	C8	Cq	NA	NA	134,70	0,24
134,89	4,95	C8	Cq	NA	NA	134,78	0,11
132,32	4,56	C18	Cq	NA	NA	132,37	0,05
128,46	3,06	C9	Cq	NA	NA	128,35	0,11
128,27	9,17	C9	Cq	NA	NA	127,90	0,37
128,15	44,39	C7	CH	7,05	d, 7,91	128,05	0,10
128,15	44,39	C7	CH	7,05	d, 7,90	127,90	0,25
123,82	11,78	C4	CH	5,3	txs	123,73	0,09
110,13	37,61	C19	CH ₂ =	4,72	d, mult	110,00	0,13
38,43	38,25	C3	CH ₂	2,25	t	38,30	0,13
30,23	11,07	C2	CH ₂	3,01	mult	30,22	0,01
30,04	33,50	C2	CH ₂	3,01	mult	30,00	0,04
27,52	11,17	C3	CH ₂	2,18	t	27,46	0,06
26,90	40,74	C15	CH	3,02	hept	26,90	0,00
26,90	40,74	C15	CH	3,02	hept	26,84	0,06
26,73	32,84	C1	CH ₂	1,63	t	26,80	0,07
25,73	12,72	C19	CH ₃	1,71	mult	25,74	0,01
22,41	35,86	C18	CH ₃	1,77	s, large	22,30	0,11
21,49	100,00	C16+C17	CH ₃ x2	1,17	d, 7,03Hz	21,40	0,09
21,49	100,00	C16+C17	CH ₃ x2	1,17	d, 7,03Hz	21,73	0,24
19,92	11,09	C20	CH ₃	2,38	s	19,90	0,02
19,79	33,23	C20	CH ₃	2,36	s	19,70	0,09
17,61	9,11	C1	CH ₃	1,63	s	17,59	0,02



Aethiopinone **22**

(Valeurs de déplacements chimiques repérées en gris foncé dans le tableau)

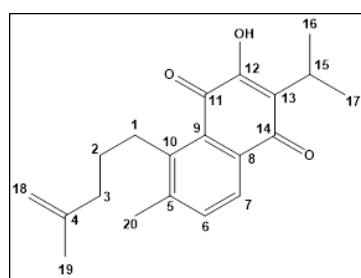


Saprorthoquinone **27**

(Valeurs de déplacements chimiques repérées en gris clair dans le tableau)

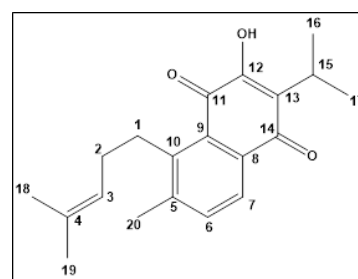
Figure 21 : Structures et les valeurs des déplacements chimiques de l'Aethiopinone **22** (gris foncé) et de Saprorthoquinone **27** (gris clair).

δ [ppm]	Intensity [rel]	C type (Annotation)	H (ppm)	mult, J (Hz)	δ [102], [103]	$\Delta\delta$ (ppm)
184,59	3,02	Cq (C14)	NA	NA	184,6	0,01
184,57	3,68	Cq (C14)	NA	NA	184,5	0,07
183,33	2,72	Cq (C11)	NA	NA	183,3	0,03
183,28	3,62	Cq (C11)	NA	NA	183,4	0,12
153,20	3,97	Cq (C12)	NA	NA	153,2	0,00
153,18	5,61	Cq (C12)	NA	NA	153,2	0,02
145,56	6,21	Cq (C4)	NA	NA	145,5	0,06
144,81	5,68	Cq (C10)	NA	NA	144,8	0,01
144,38	4,03	Cq (C10)	NA	NA	144,4	0,02
143,20	3,70	Cq (C5)	NA	NA	143,2	0,00
143,07	6,45	Cq (C5)	NA	NA	143	0,07
136,30	15,82	CH (C6)	7,49	d, 7.8Hz	136,30	0,00
136,28	10,90	CH (C6)	7,49	d, 7.8Hz	136,3	0,02
133,38	4,05	Cq (C8)	NA	NA	133,5	0,12
133,33	2,40	Cq (C8)	NA	NA	136,2	2,87
132,52	3,51	Cq (C4)	NA	NA	132,5	0,02
126,44	7,43	Cq (C13)	NA	NA	132,5	6,06
126,44	7,43	Cq (C9)	NA	NA	126,5	0,06
126,26	2,80	Cq (C9)	NA	NA	126,4	0,14
125,45	11,46	Cq (C13)	NA	NA	125,5	0,05
125,45	11,46	CH (C7)	7,95	d, 7.8Hz	126,3	0,85
125,43	14,79	CH (C7)	7,95	d, 7.8Hz	123,80	1,63
123,74	8,61	CH (C3)	5,27	txq	123,7	0,04
110,20	14,46	CH ₂ (C18)	4,75	m	110,30	0,10
38,49	14,49	CH ₂ (C3)	2,24	t, 7.8	38,50	0,01
29,94	13,90	CH ₂ (C2)	3,17	mult	30,2	0,26
29,71	34,37	CH ₂ (C2)	3,14	mult	30,00	0,29
27,82	10,95	CH ₂ (C1)	2,19	t, 7.6	27,8	0,02
27,03	12,48	CH ₂ (C1)	1,61	mult	27,10	0,07
25,75	10,13	CH ₃ (C19)	1,72	s	26,9	1,15
24,47	21,00	CH (C15)	3,37	hept	24,4	0,07
24,47	21,00	CH (C15)	3,37	hept	24,60	0,13
22,42	13,70	CH ₃ (C19)	1,79	s	22,40	0,02
20,34	8,55	CH ₃ (C20)	2,45	s	20,30	0,04
20,24	12,64	CH ₃ (C20)	2,42	s	20,20	0,04
19,84	41,74	2*CH ₃ (C16+C17)	1,29	d, 7.2	19,90	0,06
19,84	41,74	2*CH ₃ (C16+C17)	1,30	d, 7.2	19,80	0,04
17,57	7,24	CH ₃ (C18)	1,61	s	17,60	0,03
		OH	7,78	s		
		OH	7,76	s		



Salvipisone **26**

(Valeurs de déplacements chimiques repérées en gris clair dans le tableau)



12-hydroxysapriparaquinone **25**

(Valeurs de déplacements chimiques repérées en gris foncé dans le tableau)

Figure 22 : Structures et les valeurs des déplacements chimiques de la salvipisone **26** (gris clair) et de la 12-hydroxysapriparaquinone **25** (gris foncé).

Au final, l'analyse de l'huile essentielle « collective » obtenue à partir des racines de *S. argentea* a permis l'identification de 27 composés représentant 94,6 % du mélange. Parmi eux, 21 constituants ont été identifiés par comparaison de leurs indices de rétentions et leurs spectres de masse avec ceux de la bibliothèque « Arômes ». Le Ferruginol **23** a été proposé par les bibliothèques commerciales et confirmés par RMN [31], [32]. Enfin, cinq autres diterpènes absents des bibliothèques de références ont fait l'objet d'élucidations structurales à partir de leurs spectres RMN mono et bidimensionnelle et leurs présences ont été confirmées par la comparaison des valeurs de déplacements décrites dans la littérature. Il s'agit d'un dérivé phenaléno[1,9-bc]furane de l'Aethiopinone **22**, de l'Aethiopinone **24**, de la 12-hydroxySapriparaquinone **25**, de la Salvipisone **26** et de la Saprorthoquinone **27**. L'huile essentielle collective de *S. argentea*, tout comme les huiles essentielles individuelles constitutives, sont dominées par des composés diterpénique aux squelettes abietane et seco-abietane et labdane. Le ferruginol **23** est un diterpène phénolique au squelette abietane retrouvé dans le genre *Salvia*, il constitue le constituant principal avec le tiers de la composition chimique de l'huile essentielle (27,2 - 30,9 %). Il est présent en compagnie d'un autre diterpène hydrocarboné au squelette abietane, l'abietatriène **20** (5,2 – 7,7 %). Ensuite, on peut distinguer le labda-7,14-diène-13-ol **21** (8,5 - 11,3 %), deux seco-abietanes l'aethiopinone **24** (4,5 - 7,8 %) et la salvipisone (2) **26** (7,3 – 9,2 %). Ces deux quinones diterpéniques ont régulièrement été retrouvées dans le genre *Salvia* et elles ont suscité un intérêt particulier pour leur capacité à être des pigments mais pas que, elle sont connues pour leur activités cytotoxiques, antibiotiques, antioxydantes, antiinflammatoire et leur capacité d'agrégation des plaquettes sanguines [100]. Signalons la présence d'un dérivé époxyde de l'aethiopinone, le (3-rac)-4,12-Epoxy-3,11-cyclo-4,5-seco-20(10→5)-abeo-abieta-5(10),6,8,11,13-pentaene **22** (12,3 - 15,2 %) qui a été obtenu par cyclisation acidocatalysée de l'aethiopinone [99]. A notre connaissance, nous décrivons pour la première fois sa présence à l'état naturel.

Tableau 6 : Compositions chimiques des huiles essentielles des racines de *Salvia argentea* L.

a ^N °	Composés	c ^{Ir th}	d ^{Ir a}	b ^{Ir p}	e ^{HE coll}	Stations						Min.	Max.	Moy.	i ^{Identification}
						S1	S2	S3	S4	S5	S6				
1	Bornéol	1150	1152	1687	0,2	t	0,1	t	t	t	t	0,1	0,2	0,2	Ir, SM
2	(E)-β-Caryophyllène	1424	1418	1591	0,2	0,3	0,4	0,1	0,3	0,3	0,3	0,1	0,4	0,3	Ir, SM
3	α-Muuroolène	1496	1494	1719	0,3	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,3	0,2	Ir, SM
4	γ-Cadinène	1507	1508	1752	0,4	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,4	0,3	Ir, SM
5	cis/trans-Calaménène	1512	1511	1816	0,2	0,1	t	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	Ir, SM
6	δ-Cadinène	1516	1516	1752	0,6	0,5	0,4	0,2	0,4	0,4	0,5	0,2	0,6	0,4	Ir, SM
7	α-Calacorène	1531	1530	1895	0,3	0,1	0,2	t	0,1	0,2	0,1	0,1	0,3	0,2	Ir, SM
8	α-Cadinène	1535	1532	1743	0,2	0,1	0,1	t	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	Ir, SM
9	β-Calacorène	1548	1553	1939	0,1	0,1	t	t	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	Ir, SM
10	Palustrol	1567	1562	1920	0,2	0,1	0,1	0,2	t	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	Ir, SM
11	Cubébol	1509	1566	1924	0,1	0,2	0,3	0,2	0,3	0,3	0,2	0,1	0,3	0,2	Ir, SM
12	oxyde de Caryophyllène	1576	1571	1980	0,3	0,1	0,1	0,3	0,2	t	0,1	0,1	0,3	0,2	Ir, SM
13	β-Oplopénone	1593	1605	2023	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	t	0,1	0,1	0,2	0,1	Ir, SM
14	τ-Muurolol	1634	1628	2143	0,7	0,6	0,4	0,5	0,4	0,6	0,6	0,4	0,7	0,5	Ir, SM
15	τ-Cadinol	1632	1631	2169	0,3	0,1	0,2	t	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,2	Ir, SM
16	α-Cadinol	1645	1641	2231	0,6	0,7	0,5	0,6	0,6	0,7	0,5	0,5	0,7	0,6	Ir, SM
17	Cadalène	1654	1658	2203	0,3	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,3	0,2	Ir, SM
18	Isopimara-8,15-diène	-	1910	-	0,8	0,7	0,6	0,8	0,6	0,6	0,7	0,6	0,8	0,7	Ir, SM
19	Cleroda-3,13-(E)-dièn-16-ol	2027	2029	2608	0,7	0,6	0,6	0,5	0,6	0,6	0,5	0,5	0,7	0,6	Ir, SM
20	Abietatriène	2042	2043	2493	5,2	6,5	7,7	7,6	6,6	6,9	6,5	5,2	7,7	6,7	Ir, SM
21	Labda-7,14-dièn-13-ol	2086	2082	2705	11,3	10,6	8,5	9,5	9,9	11,1	10,1	8,5	11,3	10,1	Ir, SM, RMN C-13
22	Dérivé Phenaléno[1,9-bc]furane	-	2212	>3000	15,2	13,9	14,5	14,0	12,3	14,3	14,0	12,3	15,2	14,0	Ir, RMN C-13
23	Ferruginol	-	2310	>3000	30,9	27,2	29,3	28,1	29,2	28,2	27,5	27,2	30,9	28,6	Ir, SM, RMN C-13
24	Aethiopinone	-	2316	>3000	7,8	4,5	6,5	5,5	7,0	5,5	5,6	4,5	7,8	6,1	Ir, RMN C-13
25	12-hydroxysapriparaquinone	-	2364	>3000	7,4	7,3	9,2	8,9	8,8	8,0	8,9	7,3	9,2	8,4	Ir, RMN C-13
26	Salvipisone	-	2394	>3000	7,2	7,1	8,1	8,8	8,7	7,9	7,7	7,1	8,8	7,9	Ir, RMN C-13
27	Saprorthoquinone	-	2407	>3000	2,9	3,7	3,2	3,1	3,2	3,5	3,1	2,9	3,7	3,2	Ir, RMN C-13
% Total identification					94,6	85,9	91,6	89,6	90,2	90,1	88,1	85,9	94,6	90,0	
Diterpènes hydrocarbonés					6,0	7,2	8,3	8,4	7,2	7,5	7,2				
Diterpènes oxygénés					83,4	74,9	79,9	78,4	79,7	79,1	77,4				
Sesquiterpènes hydrocarbonés					2,6	1,9	1,6	0,9	1,6	1,7	1,8				
Sesquiterpènes oxygénés					2,6	1,9	1,8	1,9	1,7	1,8	1,7				

Composés hydrocarbonés	8,6	9,1	9,9	9,3	8,8	9,2	9,0
Composés oxygénés	86	76,8	81,7	80,3	81,4	80,9	79,1

^a: Ordre d'élution dans une colonne apolaire (Rtx-1),

^b: Indices de rétention dans une colonne polaire Rtx-wax (IRp).

^c: Indices de rétention donner par la littérature dans une colonne apolaire (Ir th),

^d: Indices de Rétention dans une colonne apolaire Rtx-1 ; (Ira),

^e : Pourcentages d'identification donnés sur colonne apolaire de l'huile essentielle.

^f : Ir : Indices de rétention; SM: Spectres de Masse en impact électronique ; ref: Composés identifiés à l'aide de bibliothèques commerciales [77].

CHAPITRE V : EVALUATION DES
ACTIVITES BIOLOGIQUE DES HUILES
ESSENTIELLES

Cette partie vise l'évaluation des potentialités antimicrobiennes et antioxydantes des huiles essentielles préparées à partir de *Scolymus grandiflorus*, *Carduncellus pinnatus* et *Salvia argentea*. Le travail visant la mise en évidence des activités antimicrobiennes a été réalisé dans le cadre d'une collaboration avec l'institut Pasteur d'Alger. L'évaluation des propriétés antioxydantes a été réalisée au sein de mes laboratoires de rattachement.

V.1. Propriétés antioxydantes des huiles essentielles

La réduction univalente de l'oxygène ou stress oxydant est un déséquilibre entre la production d'espèces radicalaires (ou réactives) de l'oxygène (ERO) et les capacités cellulaires antioxydantes. Elle conduit à la formation d'espèces réactives, telles que le radical anion superoxyde (O_2^-), le radical hydroxyle ($HO\cdot$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), ces espèces peuvent déclencher la peroxydation des lipides membranaires et causent des dommages cellulaires, qui sont liés à une grande variété d'événements pathologiques [104].

Les espèces radicales sont impliquées dans de nombreuses réactions oxydatives en chaîne. Un exemple courant d'un tel processus est la peroxydation des lipides dans les aliments, conduisant au rancissement. Ces dernières années, plusieurs études suggèrent que les produits alimentaires naturels avec des activités de piégeage des radicaux libres pourraient avoir une grande pertinence pour la prévention et la guérison des maladies dans lesquelles des radicaux libres ont été impliqués [105].

Plusieurs tests ont été introduits (DPPH, FRAP, β -carotène, ORAC....) pour mesurer la capacité antioxydante de composés uniques et/ou d'un mélange complexe. Toutes ces techniques sont basées sur des dosages colorimétriques et/ou fluorimétriques. L'évaluation des activités antioxydantes est basée sur la mesure des absorbances en présence et en absence de la substance antioxydante, l'activité est toujours évaluée en référence à un antioxydant témoin (BHT, acide ascorbique, etc.). Il est nécessaire de mettre en œuvre et de combiner les résultats des différentes méthodes afin de connaître la capacité antioxydante d'un actif dans divers environnements [106].

A notre connaissance, aucun de travail relatif aux activités antioxydantes des plantes étudiées n'est rapporté dans la littérature. Il s'agit donc dans cette étude d'étudier les propriétés antioxydantes des huiles essentielles de *S. grandiflorus*, *C.*

pinnatus et *S. argentea* à l'aide de deux méthodes différentes : l'activité de piégeage radicalaire DPPH et le pouvoir réducteur (FRAP).

V.2. Evaluation de l'activité antioxydante de *S. grandiflorus*, *C. pinnatus* et *S. argentea*

V. 2. 1. Test de piégeage du radical libre : DPPH

L'activité antioxydante a été évaluée à l'aide de deux méthodes DPPH et FRAP, en utilisant le BHT et l'acide ascorbique comme contrôle positif. Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) est largement utilisé en biochimie végétale ou alimentaire pour évaluer l'effet de piégeage des radicaux libres des substances naturelles, les huiles essentielles ou extraits. Ce radical libre fixe un électron ou un radical hydrogène pour devenir une molécule diamagnétique stable. Les capacités de piégeage des radicaux libres des trois huiles essentielles sont indiquées sur le tableau 7.

Tableau 7 : Activités anti-radicalaires des huiles essentielles étudiées par la méthode DPPH

Echantillon	<i>S. grandiflorus</i>	<i>C. pinnatus</i>	<i>S. argentea</i>	Acide ascorbique	BHT
CI ₅₀ (µg/mL)	11,6±0,6	50±1,8	10,4±0,8	88±2,8	17,1±0,6

Les résultats ont été rapportés comme la moyenne de trois répétitions. L'activité de l'huile essentielle est proportionnelle à la concentration, plus la valeur de la CI₅₀ est faible, plus le produit apporte une meilleure activité protectrice. Nos résultats montrent que l'huile essentielle de *S. grandiflorus* et de *S. argentea* possèdent une très bonne activité antiradicalaire supérieure à celle du BHT et de l'acide ascorbique, avec des CI₅₀s respectivement de 11,6 µg/mL et de 10,48 µg/mL.

Il est à noter que l'huile essentielle de *Salvia argentea* a été 8 fois plus active que l'acide ascorbique et 1,5 fois plus active que le BHT, alors que l'huile essentielle de *S. grandiflorus* est 7,5 fois plus active que l'acide ascorbique et environ 1,5 fois plus active que le BHT (Tableau 7).

Cependant, l'huile essentielle de *C. pinnatus* possède une activité de piégeage des radicaux DPPH intéressante avec une valeur de la CI₅₀ de 50 µg/mL, inférieure à l'acide ascorbique (CI₅₀ = 88 µg/mL) mais largement supérieure à celle du BHT (CI₅₀ = 17,1 µg/mL) (Tableau 7).

V. 2. 2. Test de piégeage radicalaire et le pouvoir réducteur : FRAP

Les tests FRAP sont basés sur des mécanismes de transfert d'électrons. Les résultats des tests FRAP sont présentés sur le tableau 8 et ont révélé que *C. pinnatus*, *S. argentea* et *S. grandiflorus* présentaient une capacité antioxydante modérée.

Tableau 8 : Tests des activités antioxydantes des huiles essentielles par la méthode FRAP

Echantillon	<i>S. grandiflorus</i>	<i>C. pinnatus</i>	<i>S. argentea</i>	BHT	Acide ascorbique
CI ₅₀ (µg/mL)	18,2±0,9	23,1±1,6	15,4±1,4	13,2±1,4	22,3±1,2

Les tests FRAP ont révélés que les huiles essentielles de *S. grandiflorus* et *S. argentea* présentent les activités antioxydantes les plus importantes avec des CI_{50s} respectives de 18,2 et 15,4 µL/mL, alors que le BHT reste l'antioxydant le plus fort avec une CI₅₀ de 13,2 µL/mL). D'autre part, les résultats ont montré que *C. pinnatus* présente aussi une capacité antioxydante important avec une CI₅₀ de 23,1 µL/mL similaire à celle de l'acide ascorbique de référence 22,3 µL/mL mais qui reste inférieure à celui du BHT (13,2 µL/mL).

Le pouvoir antioxydant de *Scolymus grandiflorus*, *Carduncellus pinnatus* et *Salvia argentea* a été évalué pour la première fois dans ce travail et semble être très proche des contrôles positifs. Ce potentiel d'activité est directement lié à la composition chimique des huiles essentielles qui sont riches en composantes actifs. L'huile essentielle de *S. argentea* possède une activité antioxydant très intéressante probablement liée à la présence des diterpènes phénoliques au squelette abiétane et seco-abiétane. Les abiétanes et les seco-abiétane sont des diterpénoïdes naturels qui ont été isolés à partir de diverses sources végétales. Ces composés présentent une grande variété d'activités biologiques intéressantes, qui ont suscité un intérêt significatif de la part des communautés médicinales et pharmacologiques [107], [108].

Plusieurs diterpènes phénoliques type-abiétane (PDA) ont été isolés du genre *Salvia*, les deux espèces les plus étudiées pour leurs activités sont *Salvia Rosmarinus* (romarin), et *Salvia officinalis* L. (sauge). Les extraits de ces deux plantes et d'autres espèces de la famille de *Salvia* sont des alternatives naturelles puissantes aux antioxydants synthétiques. Leurs activités sont principalement dues aux antioxydants diterpènes-phénoliques (PDA). Les premiers PDA isolés étaient l'acide carnosique et le carnosol qui sont les plus connus, mais les structures d'autres composés hautement

actifs comme le rosmanol, épimosmanol, l'isorosmanol méthyl carnosate et le rosmanol-9-éthyl éther sont génériquement indiqués comme PDA avec plusieurs autres acides phénoliques tels que les acides rosmarinique et caféique qui ont des potentiels antioxydants aussi élevés. Les quinones sont connues pour être des transporteurs d'électrons (l'ubiquinone, la vitamine K, etc...) et sont essentielles pour de nombreux processus enzymatiques. Ils peuvent agir comme anti- ou pro-oxydants selon les conditions du milieu, et cette polyvalence chimique leur confère un rôle important dans différents processus biochimiques essentiels aux organismes vivants [109]. L'état d'oxydation des quinones, leur permet d'agir par différents mécanismes, tels que : des piègeurs de radicaux libres, des chélateurs d'ions métalliques comme le fer et le cuivre, mais aussi des inhibiteurs des enzymes responsables de la production de radicaux libres [110], [111].

Cependant, les effets antioxydants de l'Aplotaxène de *C. pinnatus* et celle de l'Aethiopinone et de Salvipisone de *S. argentea* n'ont pas été étudiés. Des études plus approfondies sont nécessaires pour évaluer le pouvoir antioxydant de ces molécules.

V.3. Activités antimicrobiennes des huiles essentielles.

L'activité antimicrobienne *in vitro* des huiles essentielles a fait l'objet de recherches approfondies contre un très grand nombre de micro-organismes [112]. Néanmoins, l'émergence de bactéries multirésistantes pose un défi pour le traitement des infections, de sorte que la nécessité de trouver de nouvelles substances aux propriétés antimicrobiennes utilisées dans la lutte contre ces micro-organismes est évidente [113], [114]. Historiquement, la plupart des antibiotiques proviennent d'un petit ensemble de structures moléculaires fonctionnelles dont la durée de vie a été prolongée par des générations de réorganisations et d'arrangements synthétiques [115].

De plus, les industries alimentaire, pharmaceutique et cosmétique ont montré un grand intérêt pour les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles, car les additifs naturels se sont imposés comme alternatives aux conservateurs synthétiques [116]. L'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits de plantes est à l'origine de nombreuses applications, y compris la conservation des aliments crus et

transformés, les produits pharmaceutiques, la médecine alternative et les thérapies naturelles [117].

L'objectif de notre étude était d'étudier les activités antimicrobiennes et antifongiques *in vitro* des huiles essentielles utilisées dans les thérapies naturelles contre différentes bactéries.

V. 3. 1. Evaluation des activités antimicrobiennes et antifongiques de l'huile essentielle de *Scolymus grandiflorus* Desf.

Activité antimicrobienne évaluée par la méthode des disques

La capacité antibactérienne de l'huile essentielle a été déterminée contre deux espèces représentatives appartenant aux bactéries à Gram-positif (*Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis*), trois espèces à Gram-négatif (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Salmonella typhi*), et un champignon représentatif, *Candida albicans*. Les résultats des tests sont résumés dans le tableau 9.

Tableau 9 : Activités antimicrobiennes des huiles essentielles de *S. grandiflorus* comparées à la Davanone de la littérature.

Microorganismes	Diamètres d'inhibition (mm)		
	<i>S. grandiflorus</i>	AmB	GENT
Bactéries Gram-négatif			
<i>E. coli</i> ATCC 25922	17	ND	16
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	15	ND	11
<i>S. typhi</i> ATCC 14028	25	ND	22
Bactéries Gram-positif			
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	18	ND	20
<i>E. faecalis</i> ATCC 7314	13	ND	11
Levures			
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	22	20	ND

AmB : Amphotéricine B ; GENT : Gentamicine

Les résultats obtenus par la méthode des disques montrent que l'huile essentielle de *S. grandiflorus* a montré une activité antimicrobienne intéressante contre toutes les souches testées. L'huile essentielle a inhibé la croissance de *S. typhi* (25 mm), *C. albicans* (22 mm), *S. aureus*, (18 mm), *E. coli* (17 mm), *P. aeruginosa* (15 mm) et *E. faecalis* (13 mm) avec des diamètres d'inhibition comparables à ceux de l'antibiotique Gentamicine et de l'Amphotéricine B (Tableau 9).

Activité antifongique

L'activité antifongique de l'huile essentielle de *S. grandiflorus* a été étudiée sur deux souches fongiques *Alternaria alternata* et *Fusarium solani* responsables de la pourriture des fruits en post récolte.

Les résultats obtenus dans le test de l'activité antifongique de l'huile essentielle par la technique de croissance radiale sont rapportés dans le Tableau 10. L'analyse des données a montré que l'activité antifongique de l'huile essentielle contre les deux champignons testés présentait une différence significative. Les résultats indiquent que l'inhibition de la croissance mycélienne de chaque souche a été significativement influencée par l'huile essentielle (Tableau 10).

Tableau 10 : Activité antifongique de l'huile essentielle de *S. grandiflorus* contre *Alternaria alternata* et *Fusarium solani*.

Souches	Zone d'inhibition (mm)
	(2 μ L/mL)
<i>Alternaria alternata</i>	42
<i>Fusarium solani</i>	55

A la concentration minimale de 2 μ L/mL des inhibitions de la croissance mycélienne de 42 mm et de 55 mm sont observées contre les phytopathogènes *Alternaria alternata* et *Fusarium solani*, respectivement.

V. 3. 2. Evaluation des activités antimicrobiennes de l'huile essentielle de *Carduncellus pinnatus* Desf.

Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle a été déterminée contre deux bactéries Gram-positives (*S. aureus* et *E. faecalis*), trois espèces Gram-négatives (*P. aeruginosa*, *E. coli* et *S. typhi*) et un champignon (*C. albicans*). Les résultats des tests sont résumés dans le tableau 16. L'activité antibactérienne *in vitro* de l'huile de *C. pinnatus* contre les bactéries testées a été évaluée qualitativement et quantitativement par la présence ou l'absence de zones d'inhibition.

Comme le montre le tableau 11, l'huile essentielle a présenté des effets inhibiteurs contre pratiquement toutes les souches. *S. typhi*, *E. coli* et *S. aureus* se sont avérées être les agents pathogènes les plus inhibés avec des diamètres de zone d'inhibition de 15,

12 et 12 mm, respectivement. Le reste des souches bactériennes n'a montré aucune inhibition, avec des diamètres de zone d'inhibition de 10 mm (Tableau 11).

Tableau 11 : Activités antimicrobiennes des huiles essentielles de *C. pinnatus*

Microorganismes	Diamètres d'inhibition (mm)		
	<i>C. Pinnatus L</i>	AmB	GENT
Bactéries Gram-négatif			
<i>E. coli</i> ATCC 25922	12	ND	16
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	10	ND	11
<i>S. typhi</i> ATCC 14028	15	ND	22
Bactéries Gram-positif			
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	12	ND	20
<i>E. faecalis</i> ATCC 7314	10	ND	11
Levures			
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	11	20	ND

Activité antifongique

L'effet inhibiteur de l'huile essentielle de *C. pinnatus* été évalué contre deux champignons phytopathogènes, *A. alternata* et *F. solani* (Tableau 12). Nos résultats indiquent que l'huile essentielle de *C. pinnatus* présentent une activité antifongique très faible contre la souche fongique *A. alternata* avec une zone d'inhibition de 8 mm, alors qu'elle a été plus active contre *Fusarium solani* avec un diamètre d'inhibition de 42 mm, un champignon responsable de nombreuses maladies des fruits et légumes et connu pour produire des mycotoxines responsables de nombreuses intoxications chez les consommateurs.

Tableau 12 : Activité antifongique de l'huile essentielle de *C. pinnatus*

Souches	Zone d'inhibition (mm)
	2 μ L/mL <i>C. pinnatus</i>
<i>Alternaria alternata</i>	08
<i>Fusarium solani</i>	42

V. 3. 3. Evaluation des activités antimicrobiennes de l'huile essentielle de *Salvia argentea*

Activité Antibactérienne

Les propriétés antimicrobiennes de l'huile essentielle de *Salvia argentea* ont été étudiées contre 11 souches : cinq (05) souches à Gram-positif : *Staphylococcus aureus*, *Clostridium sporogenes*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* et *Lactobacillus rhamnosus* ; trois (03) souches à Gram-négatif : *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* ainsi que deux *Candida albicans* (levure). Les résultats des tests de l'activité antimicrobienne sont regroupés dans le Tableau 13 :

Tableau 13 : Activité antibactérienne *in vitro* de l'huile essentielle de *S. argentea* contre les souches bactériennes.

Microorganismes	Diamètres d'inhibition (mm)		
	<i>S. argentea</i>	GENT	Amb
Gram-négatifs			
<i>E. coli</i> ATCC 25922	15	16	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	13	11	-
<i>S. typhi</i> ATCC 14028	11	22	-
Gram-positifs			
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	10	20	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25929	28	22	-
<i>C. sporogenes</i> ATCC 19404	14	14	-
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	41	22	-
<i>E. faecalis</i> ATCC 7314	09	11	-
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 53103	14	16	-
Levures			
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	14	-	20
<i>C. albicans</i> ATCC 4226	14	-	22

L'huile essentielle de *S. argentea* a montré une activité inhibitrice très importante contre la bactérie Gram-positif, *B. subtilis* avec un diamètre d'inhibition de 41 mm. Elle est également active avec un diamètre d'inhibition de 28 mm contre *S. aureus*. Cependant, les diamètres d'inhibition (en mm) montrent une activité modérée vis-à-vis des autres souches : *E. coli* (15 mm), *C. sporogenes* (14 mm) *L. rhamnosus* (14 mm) et les deux levures (14 mm) comparativement aux références.

Activité antifongique

L'huile essentielle de *S. argentea* a été testé contre 4 espèces fongiques responsables des maladies post récolte, une forte activité a été mesurée contre la souche *F. solani* avec une inhibition 90 mm soit tout le disque, et une faible activité contre les 3 autres souches fongiques avec des diamètres allant de 14 à 25 mm (Tableau 14).

Tableau 14 : Activité antifongique de l'huile essentielle de *S. argentea* contre les champignons phytopathogènes

Souches	Zone d'inhibition (mm)
<i>Alternaria alternata</i>	25
<i>Fusarium solani</i>	90
<i>Penicillium notatum</i>	14
<i>Rhizopus stolonifer</i>	19

V.4. Discussion

Les résultats ont montré que l'huile essentielle de *S. grandiflorus* présentait une activité antioxydante, antimicrobienne et antifongique significative. Cette activité est probablement liée à son profil chimique, notamment au pourcentage élevé en composés davanoides. De la littérature, il a été mentionné que la cis-Davanone décrite par Vajs et Schmidts [118], [119] présentait une activité antimicrobienne remarquable. Cependant, il serait intéressant d'étudier le potentiel biologique des constituants davanoides individuels et/ou en combinaison. De plus, le niveau d'activité peut être liée à l'effet causé par l'interaction et les phénomènes de synergie des constituants de l'huile essentielle [120].

Les Davanoïdes auraient des propriétés antifongiques, antispasmodiques et antibactériennes. En effet, le composé le plus actif parmi les davanoides est la cis-hydroxyDavanone, dont la propriété cytotoxique a été avérée [121], et son activité antifongique était comparable à celle de l'antibiotique bifonazole [118] qui été quatre fois supérieure à celle de la Davanone contre une gamme de champignons.

D'autre part, les résultats ont montré que l'huile essentielle de *C. pinnatus* présentait une activité antioxydante, antimicrobienne et antifongique remarquable. Cette activité est probablement liée à son profil chimique, notamment au pourcentage

élevé en Aplotaxène qui est reporté dans la littérature comme une phytotoxine ayant une activité totale suffisante pour potentiellement agir comme un allélochimique [25].

L'étude de l'action de l'Aplotaxène sur les cellules T, a joué un rôle crucial dans la pathogenèse des maladies auto-immunes à médiation cellulaire et des troubles inflammatoires chroniques [122]. L'huile essentielle des racines de *Cirsium japonicum* riche en Aplotaxène (78,8%) a été répertoriée dans la pharmacopée japonaise et chinoise qui encourage son utilisation pour traiter la polyarthrite rhumatoïde, l'hématémèse et l'hématurie pour ses propriétés antihémorragiques et anti-inflammatoires au Japon et en Chine [68]. Cependant, aucune information n'a été trouvée dans la littérature disponible sur les activités antimicrobiennes et antioxydantes de l'Aplotaxène.

Les propriétés antioxydantes et antimicrobiennes de *S. argentea* sont probablement liées à son profil chimique riche en composés diterpéniques, en particulier au pourcentage relativement élevé en Ferruginol, un diterpène phénolique au squelette abiétane présent dans les plantes appartenant aux familles des Podocarpacees [123], des Cupressacées, des Lamiacées [124], et des Verbénacées [125]. Entre autres, la majorité des squelettes de diterpènes ont montré des effets gastro protecteurs significatifs à des doses orales de 50 à 100 mg/kg, y compris pour les squelettes carbonés clérodane, labdane [126] et abiétane [127]. A une dose orale unique de 25 mg/kg le Ferruginol a montré une activité gastro-protectrice similaire à celle du médicament de référence Lansoprazole à 20 mg/kg dans le modèle de lésions gastriques induites par HCl/EtOH chez la souris, réduisant l'apparence des lésions de 60 % [128]. Ainsi une inhibition significative de la lipoperoxydation sur les membranes érythrocytaires a été observée avec une valeur CI_{50} aussi basse que 1,4 μM . Dans le même essai, le composé de référence, la catéchine, a montré une valeur CI_{50} de 260 μM [128].

L'activité gastro-protectrice des diterpènes et leurs dérivés, observée dans différents modèles de lésions gastriques induites chez l'animal a été expliquée par des mécanismes incluant la stimulation de la synthèse des prostaglandines, l'augmentation de la production de mucus et la suppression de la sécrétion d'acide gastrique [128].

Le Ferruginol purifié de l'extrait brut méthanoïque des fruits de *Vitex rotundifolia* du Japon, a présenté une activité antioxydante plus forte que l'antioxydant standard, le 3-tert-butyl-4 hydroxy-anisole (BHA), en utilisant une méthode au

thiocyanate ferrique. La présence d'un groupement phénolique peut être responsable de sa capacité à capter des radicaux libres [125]. Les recherches de Becerra et Evans [129], [130] suggèrent que la résistance du bois des Podocarpacees aux champignons et aux bactéries est due à la forte concentration de diterpènes phénoliques, le Totarol et le Ferruginol. L'étude de Ulubelen et al. [131] a prouvé que le Ferruginol montre une activité en réduisant la pression artérielle presque autant que les composés témoins positifs, le propranolol et la phentolamine [131]. Le Ferruginol isolé par Chen et al [107] des écorces de *Amentotaxus formosana* a révélé une activité cytotoxique puissante contre les cellules d'adénocarcinome du sein humain, les cellules MCF-7 avec une valeur IC₅₀ de 0,08 µg/mL [107]. Enfin, le Ferruginol extrait de la parties aériennes de *Fuerstia africana* collectées du Kenya a montré une forte activité antipaludique comparable à celle de la chloroquine avec une IC₅₀ de 1,95 µg/mL [132].

L'Aethiopinine est un composé naturel isolé pour la première fois en 1980 des extraits à l'acétone des racines de *Salvia aethiopsis* L. par Boya et Valverde [100]. Hernández-Pérez et al [133] ont montré que cet o-naphtoquinone diterpène exerce des effets analgésiques et anti-inflammatoires après administration orale à des souris. Des études de structure/activité ont suggéré que le groupe o-naphtoquinone était impliqué dans l'inhibition de l'inflammation expérimentale [134]. La molécule a montré une activité antimicrobienne très élevée avec des valeurs de CMI de 2,44 µg/mL et 1,22 µg/mL contre *S. epidermidis* et *B. subtilis*, respectivement, cette molécule a également montré une activité cytotoxique envers les cellules de carcinome humain KB cultivées avec une valeur ED₅₀ de 0,62 µg/mL [133]. Cette étude a prouvé que l'activité de l'extrait est due principalement à l'Aethiopinine présent comme produit majoritaire (24%).

A ce jour, aucun des antibiotiques utilisés n'est en capacité de déstabiliser le film bactérien des *Staphylocoques*, en revanche la Salvipisine et l'Aethiopinine ont une activité inhibitrice de 45,7 à 77,1% respectivement, et ont légèrement réduit la concentration inhibitrice du biofilm en oxacilline. Les diterpénoïdes ont également modifié les paramètres de la morphologie du biofilm. Il a été conclu que la Salvipisine et l'Aethiopinine augmentent l'action de l'antibiotique β-lactamine contre *S. aureus* et *S. epidermidis*, probablement par altération de l'hydrophobicité de la surface cellulaire et de la perméabilité de la paroi cellulaire/membranaire, mais pas en modifiant la liaison pénicilline-protéine [135].

V.5. | A la recherche de nouveaux actifs anticancéreux – nouveau agent anti-angiogénique, cas des Davanoïdes extraits de l’huile essentielles de *S. grandiflorus*.

V. 5. 1. Approche théorique :

Le cancer est une maladie connue depuis l’Antiquité. Biologiquement, le cancer résulte de la survenue d’un dysfonctionnement de certaines cellules du corps. Celles-ci commencent à se multiplier de manière anarchique et à proliférer, d’abord localement, puis dans les tissus environnants, puis à distance où elles forment des métastases. Les évolutions de la science permettent aujourd’hui de guérir quelques formes de cancer, néanmoins la médecine ne dispose pas à ce jour des moyens (ou médicaments) permettant traiter l’ensemble des cancers et des complications connexes [136], [137]. Par conséquent, essayer de trouver ou de rechercher de nouveaux agents anticancéreux efficaces est une stratégie essentielle dans tout programme de traitement du cancer.

Les plantes médicinales possèdent des aptitudes qui contribuent à la sécurité alimentaire et au traitement des maladies en améliorant les conditions de santé des gens. Ces plantes sont donc une excellente source de nouveau composé à usage thérapeutique. Par ailleurs, la modélisation et la simulation sont devenues des pratiques largement usitées dans de nombreux domaines scientifiques et techniques et en particulier en chimie. Ils sont souvent nécessaires lorsque l’expérience réelle est trop difficile, trop dangereuse et trop coûteuse. La chimie numérique subventionne une meilleure compréhension de l’action des plantes médicinales contre les maladies et propose des formations de haut niveau, centrées sur l’étude du vivant au niveau moléculaire. En outre, elle représente un pont entre la théorie et l’expérience et permet de représenter, d’interpréter et de prédire des structures et des fonctions biomoléculaires [138].

Par conséquent, ce travail visait à étudier pour la première fois les molécules de l’huile essentielle de *Scolymus grandiflorus* comme nouveaux agents antiangiogéniques capables de moduler ou bloquer l’interaction du Facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) sur son récepteur (VEGFR), sachant que parmi les facteurs pro-angiogéniques, le VEGF semble être l’un des acteurs principaux de l’angiogenèse tumorale. Il exerce son activité pro-angiogénique en se fixant à la surface des récepteurs (VEGFR1/2). Ces récepteurs ont des affinités différentes pour le VEGF et induisent différents effets cellulaires et biologiques.

Tableau 15 : Quelques propriétés anti-angiogénique médicamenteuses des constituants de *S. grandiflorus*

Ligands	Composés	Toxicité	LogP	Energies (Kcal/mol)	LogS	Hdon+Hacc	Flexibilité
L01	5,5-dimethyl Furanone	No	1,70	1.82361e+001	-1,18	don:0; acc:2	3 out 3
L02	Lavender lactone	No	1,27	8,81161e+000	-1,05	don:0; acc:1	1 out 1
L03	Cis-Arbusculone	No	1,70	2,65666e+001	-1,45	don:0; acc:2	2 out 2
L04	Trans-Arbusculone	No	1,70	2,73648e+001	-1,45	don:0; acc:2	2 out 2
L05	cis-Oxyde de Linalool	No	1,88	3,73575e+001	-1,56	don1; acc:2	2 out 2
L06	Davana furane	No	3,51	2,49849e+001	-2,89	don:0; acc:0	2 out 2
L09	(E)-β-Elemene	No	4,75	4,43553e+001	-6,04	don:0; acc:0	3 out 3
L11	Davana éther	No	3,75	2,97817e+001	-3,03	don:0; acc:2	2 out 2
L13	Cis-Davanone	No	3,67	3,22538e+001	-2,88	don:0; acc:2	5 out 5
L15	Iso-Davanone	No	3,67	3,10733e+001	-2,88	don:0; acc:2	5 out 5
L18	Davanol D1	No	3,46	3,72150e+001	-2,66	don:1; acc:2	5 out 5
L19	Eudesma-11-en-4α-ol	No	3,92	4,83154e+001	-4,36	don:1; acc:1	1 out 1
L20	Cis-2-hydroxyDavanone	No	2,64	3,23785e+001	-2,48	don:1; acc:3	5 out 5
L24	Acide Tétradécénoïque	No	4,77	-1,4216e+001	-5,46	don:1 acc:2	12 out 12
L25	Acide Hexadécanoïque	No	5,55	-1,4606e+001	-6,49	don:1; acc:2	14 out 14

LogP : Coefficient de partage octanol/eau ; **Log S** : Coefficient de solubilité ;

Hdon et Hacc : nombre de donneurs et d'accepteurs possibles de liaisons hydrogène, (la capacité de liaison hydrogène d'un soluté médicamenteux est reconnue comme un déterminant crucial de la perméabilité. Un potentiel élevé de liaison hydrogène est souvent lié à une faible perméabilité et absorption) ; **flexibilité** : nombre de liaisons rotatives.

L'inhibition des récepteurs du VEGF a été étudiée théoriquement par deux méthodes de chimie computationnelle : les analyses d'amarrage moléculaire et les simulations de dynamique moléculaire (MD). Dans cette étude, une combinaison de trois approches théoriques a été utilisée pour explorer les inhibiteurs potentiels parmi les composés des huiles essentielles des racines de *S. grandiflorus* contre trois enzymes: VEGF, VEGFR1 et VEGFR2. La structure complète des récepteurs du facteur de croissance endothélial vasculaire avec leurs cavités enzymatiques et les résidus du site actif du VEGFR-1 (3HNG), VEGFR- 2 (2XIR) et le VEGF (5T89) a été obtenu par la méthode de diffraction des rayons X (Figure 22). Les ligands d'huile essentielle des racines de *S. grandiflorus*, la toxicité minimisée et l'énergie obtenue par le logiciel MOE, sont présentés dans le Tableau 15.

Selon le tableau 15, nous relevons que les 15 inhibiteurs (L1 à L6, L9, L11, L13, L15, L18, L19, L20, L24 et L25) répondent à la règle de Lipinski. (poids moléculaire < 500, pas plus de cinq donneurs de liaisons hydrogène, pas plus de dix accepteurs de liaisons hydrogène et une valeur de coefficient de partage (log P) <5), cette règle a été conçue à l'origine pour aider au développement de médicaments biodisponibles par voie orale [139].

D'après les résultats obtenus on peut constater que la cis-Davanone **L13** et les deux acides tétradécanoïque **L24** et hexadécanoïque **L25** ont les plus grandes valeurs de logP et les plus petites valeurs logS, donc une bonne solubilité dans l'eau, une élimination efficace par les reins et une bonne perméabilité à travers la membrane cellulaire.

De plus, les ligands **L13**, **L24** et **L25** ont une valeur élevée d'angle de torsion 5 out 5, 12 out 12 et 14 out 14 par rapport aux autres composés, cela montre que ces composés sont plus flexibles.

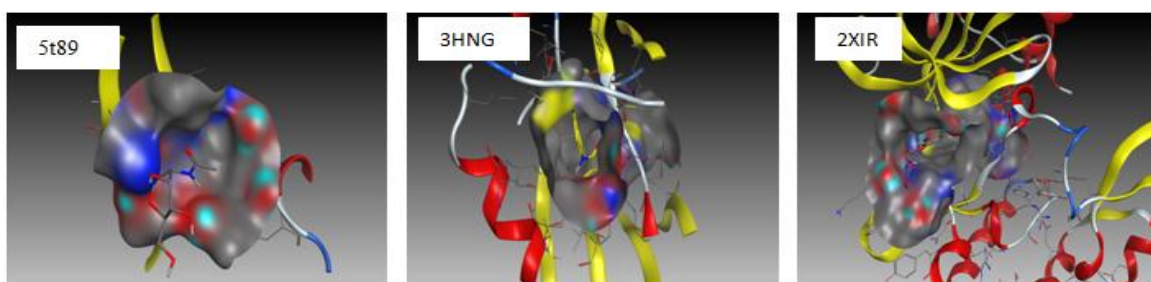


Figure 23 : Cavité enzymatique avec les résidus du site actif pour les cibles: 5t89,3HNG et 2XIR, (ces codes des enzymes ont été téléchargés de la base de données PDB (<https://www.rcsb.org/>)).

V. 5. 2. Analyse de Docking Moléculaire

Les résultats des calculs d'amarrage et des liaisons entre les atomes des meilleurs composés et les résidus du site actif sont donnés dans le Tableau 16.

Interaction avec VEGF

Selon les résultats du tableau 17, parmi les meilleurs composés étudiés, la cis-2-hydroxyDavanone (**L20**; Figure 23) a été prédite comme le plus fort liant des récepteurs du VEGF qui forme un complexe avec plus de stabilité et une plus faible énergie (-4,066 Kcal/mol) (Table 17). De plus, on constate que les interactions entre les résidus du site actif du 5t89 et la cis-2-hydroxyDavanone **L20** forment un complexe stable. Le deuxième meilleur ligand était l'acide hexadécanoïque **L25** avec une énergie de -4,0039 Kcal/mol, qui interagit avec l'acide aminé LEU 97 H-accepteur à une

distance de 2,90 Å, forte interaction et une liaison énergétique de 2,8 Kcal/mol. Cela suggère que l'acide hexadécanoïque **L25** peut inhiber les récepteurs du VEGF. Le meilleur ligand avec VEGF est illustré sur la Figure 23.

Tableau 16: Résultats des liaisons entre les atomes des meilleurs composés et les résidus de sites actifs de trois cibles.

Composés	S-score (kcal/mol)	Liaisons entre atomes des composés et résidus du site actif					
		Atome de composé	Atomes récepteurs impliqués	Résidus récepteurs impliqués	Type d'interaction	Distance (Å)	Energies (kcal/mol)
VEGF							
L3	-3.370	O2 2	N	LEU 97	H-accepteur	2.95	-1.2
L6	-3.407	O2 2	OE1	GLU 38	H-donneur	3.08	-2.0
L24	-3.809	O1 1	N	LEU 97	H-accepteur	2.82	-3.4
		O1 1	NH2	ARG 56	ionique	3.99	-0.5
L25	-4.003	O1 1	N	LEU 97	H-accepteur	2.90	-2.8
VEGFR1							
L13	-6.529	O1 1	N	ASP 1040	H-accepteur	2.93	-3.4
L18	-7.345	C6 6	6-ring	PHE 1041	H-pi	4.27	-0.8
L24	-7.470	O1 1	NE	ARG 1021	H-accepteur	2.87	-5.8
		O1 1	NH2	ARG 1021	H-accepteur	2.99	-4.0
		O2 2	NH2	ARG 1021	H-accepteur	3.26	-3.7
		O2 2	O	HOH 3024	H-accepteur	3.24	-1.3
		O1 1	NE	ARG 1021	ionique	2.87	-5.4
		O1 1	NH2	ARG 1021	ionique	2.99	-4.6
		O2 2	NH2	ARG 1021	ionique	3.26	-3.0
L25	-8.504	O1 1	NE	ARG 1021	H-accepteur	3.03	-5.3
		O1 1	NH2	ARG 1021	H-accepteur	2.83	-8.1
		O2 2	NE	ARG 1021	ionique	3.03	-4.3
		O2 2	NH2	ARG 1021	ionique	3.45	-2.1
		O1 1	NE	ARG 1021	ionique	3.93	-0.6
		O1 1	NH2	ARG 1021	ionique	2.83	-5.7
		O2 2					
VEGFR2							
L24	-6.753	O2 2	N	ASP 1046	H-accepteur	3.41	-2.5
		O1 1	NZ	LYS 868	ionique	4.00	-0.5

S-score : Énergie de liaison ; **VEGF** : Structure du facteur de croissance endothélial vasculaire ;

VEGFR1 - VEGFR2 : Récepteurs de VEGF

Acides aminés : (**LEU** : Leucine ; **ARG** : Argénine ; **ASP** : Asparagine, **PHE** : Phénylalanine.).

O : Oxygène, N : Azote, H : Hydrogène.

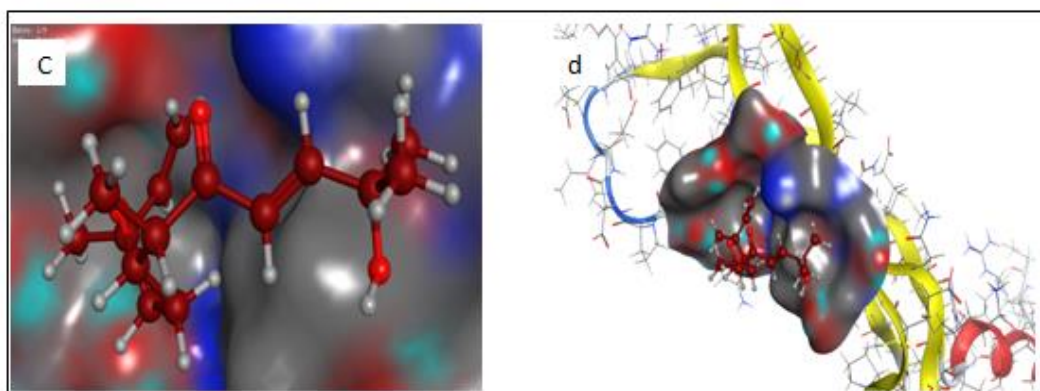


Figure 24 : c) Le composé ayant obtenu le meilleur score, d) Un nouvel inhibiteur L-20 identifié par l'amarrage moléculaire 2- Hydroxy davanone est montré dans le site actif

Tableau 17 : Résultats du bilan énergétique des meilleurs complexes formés avec des molécules de propriété médicamenteuse.

Cibles	Structures chimiques	Énergie de liaison (Kcal/mole)	RMSD - refine	Energy-Conf	Energy-Place	Energy-Refine	RMSD
VEGF		-3.992	1.454	37.594	-29.409	-10.361	1.417
VEGFR-1	 cis-Davanone L13	-6.529	1.338	51.148	-61.149	3.690	1.237
VEGFR-2		-4.778	1.1872	53.321	-54.385	-8.944	1.053
VEGF		-3.811	2.0319	42.106	-28.2838	-9.492	1.397
VEGFR-1	 Davanol D1L18	-6.657	1.275	56.214	-65.602	-2.615	1.278
VEGFR-2		-6.657	1.275	56.214	-65.602	-2.615	1.278
VEGF		-4.066	1.343	17.758	-24.060	-9.659	1.395
VEGFR-1	 Cis-2-hydroxyDavanone L20	-6.161	1.716	21.885	-52.651	-16.814	1.116
VEGFR-2		-3.391	1.533	35.967	-39.906	26.020	1.070
VEGF		-3.809	0.958	-81.019	-38.265	-7.389	1.517
VEGFR-1	 Acide tétradécanoïque L24	-7.470	1.327	-76.820	-58.290	-18.760	1.316
VEGFR-2		-6.753	1.187	-72.972	-66.076	-13.576	1.140
VEGF		-4.0031	2.502	-79.796	-14.401	-9.407	1.560
VEGFR-1	 Acide hexadécanoïque L25	-8.504	1.124	-72.783	-58.660	-25.356	1.219
VEGFR-2		-7.318	1.078	-69.892	-60.781	-8.456	1.011

Binding Energy : Énergie de liaison ; **Rmsd –refine** : Rmsd – affiner ; **Energy –Conf** : Énergie de configuration ;
Energy – Place: Énergie de place; **Energy – Refine** : Énergie d'affinement ; **RMSD** : Déplacement quadratique moyen

Interaction avec le VEGFR-1

Nous notons que l'acide hexadécanoïque (**L25**; Figure 24) a été prédit pour être le plus fort liant des récepteurs VEGF-R1, qui a formé un complexe plus stable avec la plus faible énergie (- 8,504 Kcal/mol), **L25** interagit avec six acides aminés (ARG 1021), deux liaisons H-accepteurs et quatre liaisons ioniques à une distance de 3,00, 2,83 et 3,03, 3,45, 3,93 et 2,83 Å, et l'existence de six forces électriques (GLU 910, GLU 878, CYS 912, LEU 882, ASP 1040 et LYS 861). On peut conclure que les interactions entre les résidus du site actif de 3HNG et l'acide hexadécanoïque **L25** forme un complexe stable avec des fortes interaction. Le meilleur ligand qui interagit avec VEGFR-1 est donné sur la figure 25.

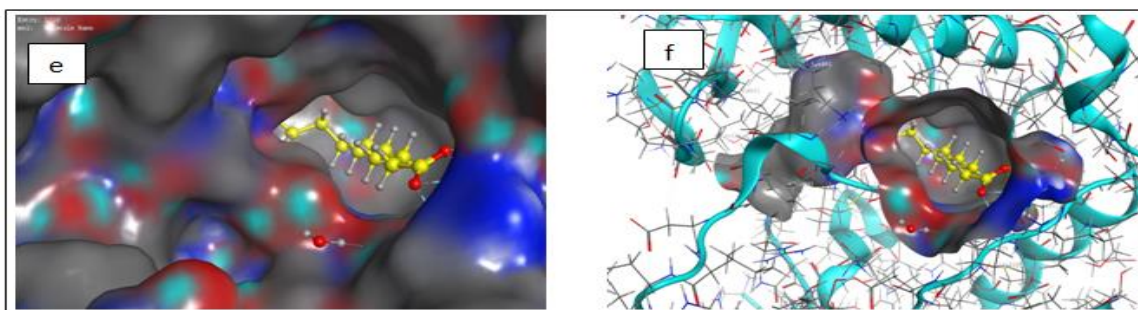


Figure 25 : Un nouvel inhibiteur L-25 identifié par amarrage moléculaire (L'acide hexadécanoïque dans le site actif)

Interaction avec VEGFR-2

Nous notons que l'acide hexadécanoïque (**L25**; figures 26 et 26a) a été prédit pour être le plus fort liant des récepteurs VEGF-R2 qui a formé le complexe le plus stable avec la plus faible énergie -7,318 Kcal/mol. Il est à noter que les interactions entre le résidu du site actif de 2XIR et le ligand acide hexadécanoïque ont formé un complexe stable avec une forte interaction. Le deuxième meilleur ligand était l'acide tétradécanoïque (**L24**) avec une énergie de - 6,753 Kcal/mol (Tableau 16) avec l'existence de deux acides aminés ASP 1046 et LYS 868 avec accepteur H ionique à une distance de 3,41 et 4,00, respectivement et une liaison énergétique de 2,5 et 0,5 Kcal/mol, respectivement. Les résultats du bilan énergétique des meilleurs complexes formés avec les trois cibles sont donnés dans le Tableau 17.

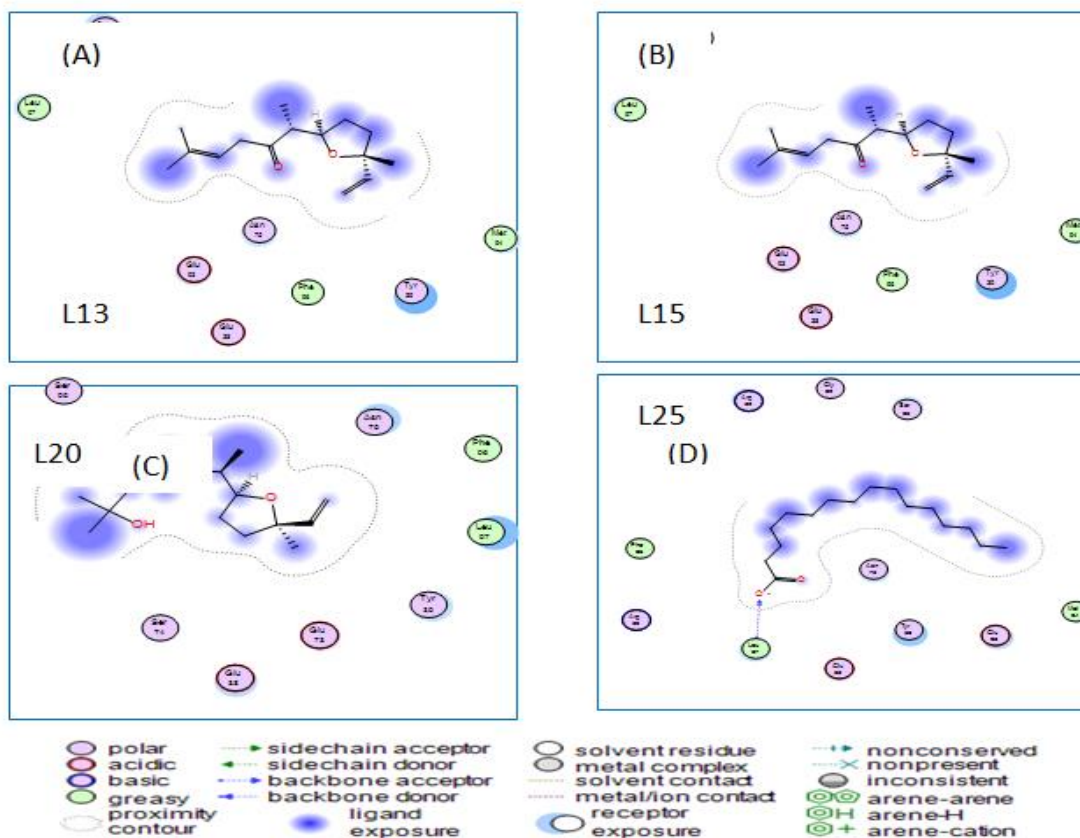


Figure 26 : Illustration graphique de l'interaction entre (A) cis-Davanone ; (B) iso davanone; (C) cis-2-hydroxyDavanone et (D) acide hexadécanoïque avec le VEGF. Comme le montre cette figure, les composés ancrés interagissent avec les liaisons des résidus du VEGF les plus proches. Ce type d'interaction altère son affinité à se lier aux VEGFR-1 et 2.

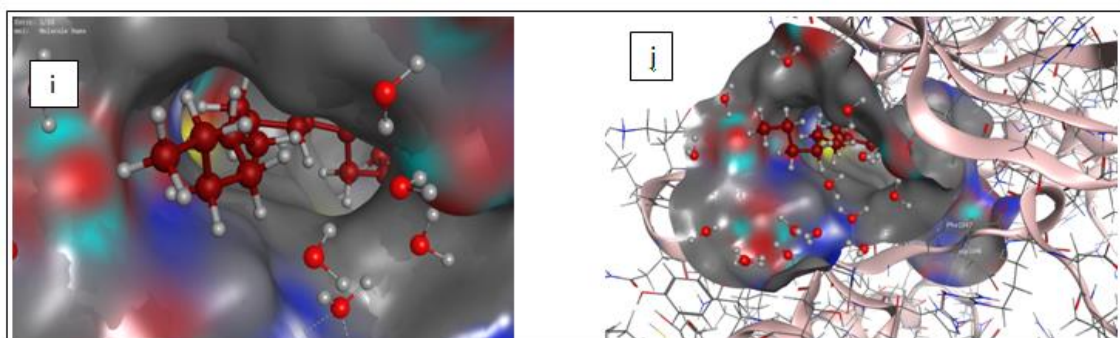


Figure 27 : i) Le composé le mieux noté, j) Un nouvel inhibiteur L-25 identifié par amarrage moléculaire était l'acide hexadécanoïque a été montré dans le site actif.

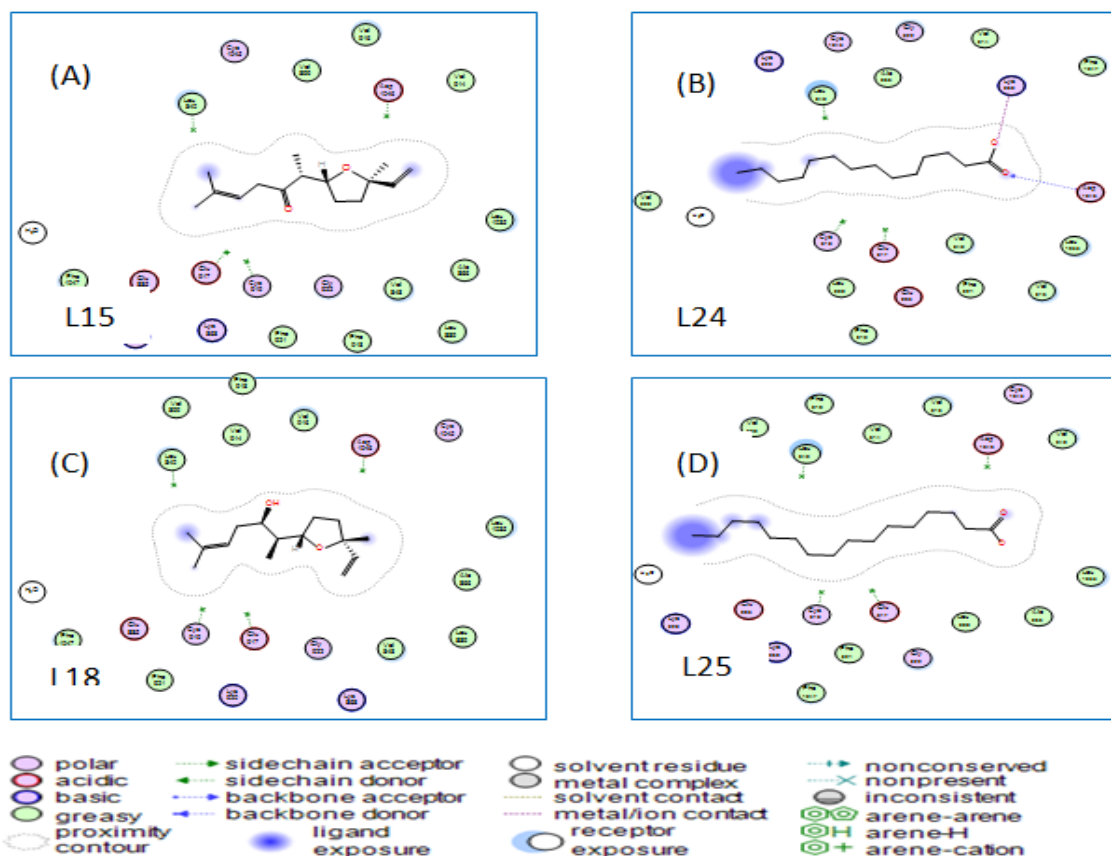


Figure 27a: Illustration graphique de l'interaction entre (A) iso davanone; (B) acide tétradécanoïque; (C) Davanol D1 et (D) acide hexadécanoïque avec VEGFR-2.

Interaction avec l'ADNc

L'ADN tumoral circulant (ADNc) est un petit fragment d'ADN qui se trouve dans la circulation sanguine des patients cancéreux. Des études ont proposé que ce fragment d'ADN basé sur une tumeur puisse agir en tant que leader pour la migration des cellules tumorales vers d'autres. Récemment, ce petit fragment d'ADN a été considéré comme un biomarqueur détectable dans les tumeurs malignes humaines de stade précoce et avancé [140]. Une étude d'amarrage moléculaire bio-informatique a été réalisée sur l'ADNc et est présentée dans le Tableau 18.

Nos résultats ont démontré que l'acide hexadécanoïque (**L25**), l'acide tétradécanoïque (**L24**), la cis-Davanone (**L13**) et le Davanol D1 (**L18**) étaient les composés interagissant de manière la plus satisfaisante (Figure 27). Les énergies d'accostage calculées pour ces composés étaient respectivement de -7,210, -6,984, -6,223 et -6,171 Kcal/mol (Tableau 18).

D'après ces résultats, il convient de noter que plusieurs facteurs, notamment la variabilité des structures des ligands et la capacité à construire des liaisons covalentes et/ou non covalentes, pourraient affecter leur affinité de liaison à l'ADNc. Il existe même d'autres facteurs tels que la distribution des charges électrostatiques avec l'ADN et les paires de bases A: T [141].

Tableau 18 : Les énergies d'amarrage des inhibiteurs de l'ADNc

Composés	DE*(kcal/mol)	ETOR (kT)	VDW (kT)	EIE (kT)
5.5-dimethyl Furanone	-5.053	278.718	336.166	-1550.53
Lavender lactone	-4.191	276.077	337.637	-1574.26
Cis-Arbusculone	-4.746	278.032	348.588	-1575.77
Trans-Arbusculone	-4.576	278.901	344.688	-1555.81
cis-oxyde de Linaool	-4.611	286.323	357.123	-1576.79
Davanafurane	-5.247	288.118	358.120	-1573.26
(E)-β-Elemène	-5.022	281.461	363.974	-1578.91
Davana ether	-5.009	281.490	363.947	-1578.89
Cis-Davanone	-6.223	280.120	356.716	-1571.56
Iso davanone	-5.843	278.929	361.956	-1562.72
Davanol D1	-6.171	283.362	360.574	-1568.81
Eudesma-11-en-4α-ol	-4.393	282.663	377.026	-1567.59
Cis-2-HydroxyDavanone	-5.884	280.596	335.328	-1550.61
Acide Tétradécanoïque	-6.984	257.680	349.569	-1562.28
Acide Hexadécanoïque	-7.210	255.039	349.577	-1564.55

* DE : énergie Docking (Liaison); ETOR : Énergie de torsion ; VDW : Van der Waals ;
EIE : Énergie d'interaction électrostatique.

Interaction avec VEGF-VEGFR

Les résultats des énergies d'accostage des meilleurs inhibiteurs du VEGF/VEGFR sont présentés dans le Tableau 19. De nombreuses études ont montré que le VEGF est un médiateur clé de l'angiogenèse dans le cancer [142]. Les résultats d'amarrage moléculaire ont révélé que l'acide hexadécanoïque **L25**, la cis-2-hydroxyDavanone **L20** et la cis-Davanone **L13** étaient les meilleurs composés interagissant avec les résidus du site actif du VEGF (Figure 26). Les énergies d'accostage calculées pour ces molécules étaient respectivement de -4,003, -4,066 et -3,992 Kcal/mol.

De plus, parmi les composés ancrés, l'acide hexadécanoïque **L25**, l'acide tétradécanoïque **L24** et le Davanol D1 **L18** étaient des excellents composés interagissant avec le VEGFR-1 (Figure 27). Les énergies d'accostage calculées pour ces composés étaient respectivement de -8,504, -7,470 et -7,345 Kcal/mol. Conformément à nos résultats d'amarrage moléculaire, l'acide hexadécanoïque **L25**,

l'acide tétradécanoïque **L24** et le davanol D1 **L18** étaient les meilleurs composés interagissant avec le VEGFR-2 (Figure 24), les énergies d'accostage calculées pour ces composés étaient respectivement de -7,318, -6,753 et -6,340 Kcal/mol.

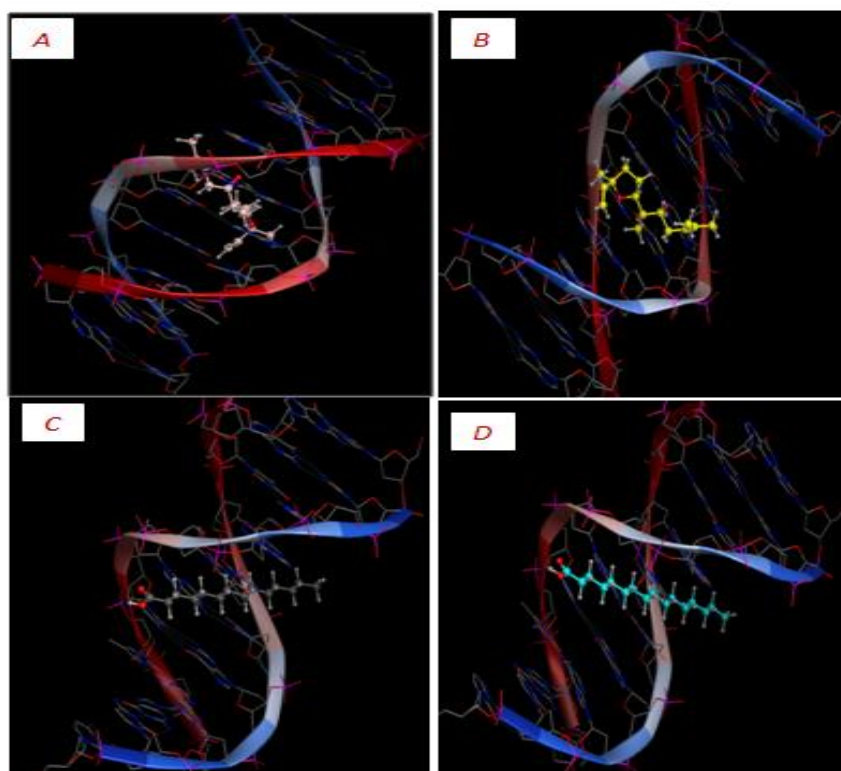


Figure 28 : Illustration graphique de l'interaction entre les quatre composés supérieurs ancrés (A) cis-Davanone L13; (B) Davanol D1 L 18; (C) acide tétradécanoïque L24 et (D) acide hexadécanoïque L25 avec ADNc.

D'après tous les résultats nous avons observé que l'acide hexadécanoïque **L25** a montré une affinité de liaison pour interagir avec les récepteurs de l'ADNc, VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGF. L'acide tétradécanoïque **L24** a interagi avec l'ADNc, le VEGFR-1 et le VEGFR-2. De plus, le davanol-D1 **L18** a l'affinité d'interagir avec l'ADNc, le VEGFR-1 et VEGFR-2. La cis-Davanone **L13** a l'affinité d'interagir avec l'ADNc et le VEGF et la cis-2-hydroxyDavanone **L20** a l'affinité d'interagir uniquement avec le VEGF.

L'inhibition de l'interaction entre le VEGF et le VEGFR est un moyen important de prévenir l'angiogenèse et le développement d'une tumeur maligne dans d'autres tissus. D'après les résultats donnés, nous pouvons conclure que la meilleure inhibition est celle produite par deux molécules d'acide hexadécanoïque (**L25**) et la cis-Davanone (**L13**).

Tableau 19 : Les énergies d'accostage des inhibiteurs du VEGF/VEGFR

Composés	Récepteur	DE (kcal/mol)	ETOR (kT)	EVDW(kT)	EIE (kT)
Cis-Davanone L13	VEGF	-3,992	435,552	1130,180	-2146,00
	VEGFR -1	-6,529	1348,713	4060,459	-7791,00
	VEGFR-2	-4,778	1408,056	6684,242	-16584,6
Davanol D1 L18	VEGF	-3,811	431,094	1113,038	-2086,24
	VEGFR -1	-7,345	1387,813	4085,864	-7713,85
	VEGFR-2	-6,340	1433,824	7013,454	-16721,3
Cis-2-hydroxyDavanone L20	VEGF	-4,066	432,167	1173,493	-2215,62
	VEGFR-1	-6,161	1384,406	3576,242	-7906,98
	VEGFR-2	-3,391	1410,636	7085,165	-16877,8
Acide Tétradécanoïque L24	VEGF	-3,809	415,596	1189,618	-2260,86
	VEGFR -1	-7,470	1353,340	4062,425	-7922,66
	VEGFR-2	-6,753	1367,229	6873,763	-16871,6
Acide Hexadécanoïque L25	VEGF	-4,003	388,611	1137,990	-2116,06
	VEGFR -1	-8,504	1378,607	4115,919	-7973,84
	VEGFR-2	-7,318	1411,548	7260,273	-16765,5

DE: Energie de docking; **ETOR**: Energie de Torsion; **VDW**: Energie de Van der Waals;

EIE: Energie d'Interaction Electrostatique.

V. 5. 2. Évaluation *in silico* des propriétés ADME

Une étude informatique des meilleurs composés a été réalisée pour l'évaluation des propriétés ADME (Absorption, Distribution, Métabolisme, et Élimination) (Tableau 20). Les résultats exposés dans le tableau 20 ont révélé que les composés **L13**, **L24** et **L25** ont des valeurs de logP de 1,66, 3,69 et 4,19, respectivement, (tous inférieur à 5), les masses moléculaires sont égale à 236,35, 228,37 et 256,42, respectivement, (tous inférieur à 500). D'après ces résultats on peut noter que ces trois composés respectent bien les règles de Lipinski, la règle de Veber et la règle d'Egan, de cela, ces composés ne devraient pas causer de problèmes de biodisponibilité orale.

L'étude des paramètres d'absorption montre que les composés **L13**, **L18**, **L20**, **L24**, et **L25** ont une perméabilité cellulaire optimale Caco-2 (supérieur à 0,9 ; tableau 26) et les ligands **L24** et **L25** ont une bonne perméabilité cutanée (log Kp inférieur à 2,5 (Tableau 21), donc ces composés présentent une biodisponibilité orale prometteuse.

Les volumes de distribution des deux ligands **L13** et **L18** dans le plasma (VDss) étaient respectivement de -0,199 et -0,23, suggèrent que le médicament sera bien distribué dans le plasma puisque les valeurs du VDss sont inférieures à -0,15 [tous les composés ne sont pas des substrats transporteurs de cation organique rénal 2 (OCT2), et ne sont pas toxique (test d'Ames)]. Par conséquent les composés **L13** et **L18** peuvent être des agents potentiels intéressants dans le cadre d'une thérapie anticancéreuse pour soulager la douleur liée au cancer.

La molécule **L20** était totalement incapable de pénétrer dans le système nerveux central (SNC). Les molécules **L24** et **L25** étaient incapables de pénétrer le plasma et/ou les tissus et présentaient une toxicité aquatique (Toxicité pour le vairon).

Tableau 20 : Règle de cinq de Lipinski pour l'analyse ADME des meilleurs inhibiteurs (ligands).

La règle de cinq de Lipinski							Ressemblance à la drogue
N°	Name	MM (g/mol)	Lipophilicité (MLogP)	liaisons hydrogène Donneurs	liaison hydrogène Accepteurs	Nombre de violations	La règle de Lipinski
		Lessthan 500 Da	Lessthan 5	Lessthan 5	Lessthan 10	Lessthan 2 Violations	
13	Davanone	236,35	2,54	0	2	0 violation	Yes
18	Davanol D1	238,37	2,63	1	2	0 violation	Yes
20	2- Hydroxy Davanone	252,35	1,66	1	3	0 violation	Yes
24	acid Tretradecanoïque	228,37	3,69	1	2	0 violation	Yes
25	acid Hexadecanoïque	256,42	4,19	1	2	1 violation: MLOGP>4.15	Yes

MM: Masse Moléculaire; **MLogP**: Coefficient de partage du composé entre l'eau et le n-octanol; **donneurs de n-OHNH**: nombre de liaisons hydrogène donateurs; **accepteurs n-ON**: nombre d'accepteurs de liaison hydrogène; **n-ROTB**: nombre de liaisons rotatives. **Da** :Dalton.

Les paramètres d'absorption et de distribution, respectivement, ont été représentés graphiquement par la version étendue et renouvelée du modèle Edan – Egg nommé modèle prédictif de perméation Brain Or IntestinaL EstimatedD (BOILED) (BOILED-Egg). La figure 28 montre que tous les ligands pénètrent dans le cerveau en traversant la barrière hémato-encéphalique (BHE), à l'exception de **L9**. (La BHE est une barrière biologique qui protège le cerveau des molécules toxiques). La perméabilité du BHE est utilisée pour l'administration de médicaments au cerveau [143].

Tableau 21 : Paramètres d'évaluation pharmacocinétique et de toxicité des meilleurs composés

		L13	L20	L18	L24	L25
Absorption	Intestinale humain	96,829	95,234	93,407	92,691	92,004
	Perméabilité cutanée	-2,269	-3,169	-2,286	-2,705	-2,717
	Perméabilité Caco-2	1,366	1,337	1,638	1,56	1,558
Distribution	VDss (humain)	-0,199	-0,033	-0,23	0,578	0,543
	Fraction non liée (humain)	0,385	0,476	0,401	0,171	0,101
	Perméabilité BHE	0,553	-0,189	0,544	-0,027	-0,111
	Perméabilité SNC	-2,684	-3,091	-2,841	-1,925	-1,816
Excrétion	Clairance totale	1,512	1,432	1,494	1,693	1,763
	Transporteur rénal de cations organiques	No	No	No	No	No
Toxicité	Toxicité aiguë orale chez le rat (DL50)	1,997	1,995	1,853		1,44
	toxicité Ames	No	No	No	No	No
	Toxicité de Tetrahymena Pyriformis	1,265	0,995	1,499	0,978	0,84
	Toxicité pour le vairon	0,979	1,794	1,241	-0,601	-1,083

vert = bonne, jaune = assez bon, rouge = mauvais.

Les composants actifs **L13**-Cis-Davanone, **L20**-cis-2-hydroxyDavanone, **L18**-Davanol D1, **L24**-acide tétradécanoïque et **L25**-acide hexadécanoïque.

BHE : Barrière hémato-encéphalique (si > 0,3 BHE bien distribué, si <1 mal distribué au BHE)

SNC : système nerveux central (si > - 2 pénètrent dans le SNC, si < -3 incapables de pénétrer dans le SNC)

Ames : test biologique permettant d'estimer le potentiel cancérigène d'une substance chimique.

Toxicité pour le vairon : test de toxicologie aquatique (si <0,3; toxicité aiguë élevée)

VDss : volume de distribution dans le plasma ; perméabilité cutanée : (faible si > -2,5)

perméabilité Caco-2 : mesure la perméabilité intestinale (bonne si > 0,9),

absorption intestinale humaine : (bonne si > 90).

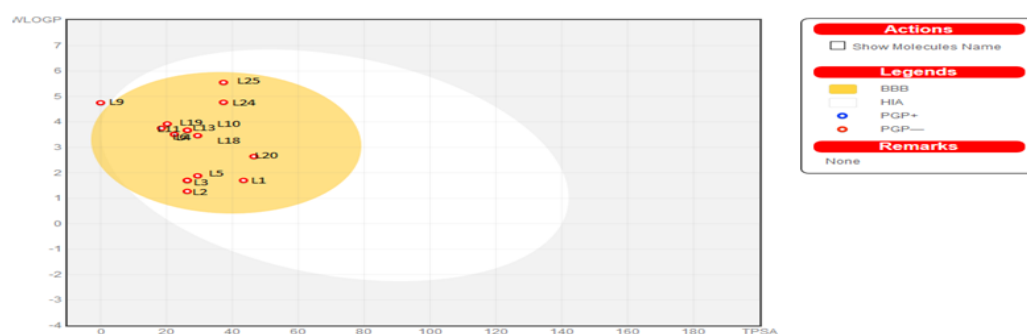


Figure 29 : Diagramme BOILED-Egg. Les points situés dans le jaune de BOILED-Egg (jaune) représentent les molécules prédites à pénétrer passivement à travers la barrière hémato-encéphalique (BBB). Ceux du blanc du Egg sont relatifs aux molécules dont l'absorption est prévue passivement par le tractus gastro-intestinal; les points bleus indiquent les molécules pour lesquelles il était censé être efflué du système nerveux central (SNC) par la glycoprotéine P. tandis que les rouges indiquent les molécules prédites de ne pas être effluées du SNC par la P-glycoprotéine.

Les propriétés ADMET et le graphique BOILED-Egg (Figure 28) valident le fait que les composés **L13** et **L18** passent la barrière cérébrale et ont une forte absorption dans les intestins avec une bonne biodisponibilité. La cis-Davanone **L13** a l’affinité de liaison la plus élevée parmi tous les inhibiteurs, elle est proposée comme médicament naturel oralement actif.

En analysant les énergies d’accostage des inhibiteurs de l’ADNc des composés (valeur DE), la Cis-Davanone **L13** a montré l’énergie la plus basse (-6,223 Kcal/mol) avec l’ADNc, ce qui en fait le meilleur ligand parmi nos ligands sélectionnés, il peut bloquer la croissance tumorale sans induire trop d’effets secondaires, de plus ce composé (**L13**) a été proposé comme un inhibiteur thérapeutique potentiel de l’interaction VEGF/VEGFR. Dans cette étude, le Davanol D1 **L18** révèle le deuxième score le plus bas (-6,171 Kcal/mol) avec l’ADNc, a été prédit comme étant le deuxième meilleur inhibiteur de cible (avec une affinité de liaison maximale pour l’interaction VEGF/VEGFR après **L13**).

En plus de la règle de Lipinski, quatre autres règles de ressemblance aux médicament nommées Ghose, Egan, Veber et Muegee, ont été simultanément satisfaites par le composé **L13** (Tableau 22). Enfin, le résultat du modèle des structures d’interférence pan assay (PAINS), conçu pour exclure les petites molécules susceptibles de présenter des faux positifs dans les dosages biologiques, n’affiche aucune alerte pour le composé **L13**.

Tableau 22 : Paramètres de ressemblance avec le médicament, de plomb et de PAINS des meilleurs composés

MNP ID		L13	L20	L18	L24	L25
Drug-likeness	Lipinski violations	0	0	0	0	1
	Ghose violations	0	0	0	0	1
	Veber violations	0	0	0	1	1
	Egan violations	0	0	0	0	1
	Muegge violations	0	0	0	1	2
Lead-likeness violations	1	0	2	3	2	
PAINS alerts	0	0	0	0	0	

V. 5. 3. Propriétés pharmacocinétique et médicinale

Les résultats de la chimie médicinale et de la pharmacocinétique ont révélé que tous les composés ont des absorptions gastro-intestinales élevées. Nous remarquons qu'il y avait un complément entre nos résultats d'évaluation des propriétés de l'ADME (Tableau 21) et les résultats prédits en chimie médicinale et pharmacocinétique (Tableau 23).

La Cis-davanone **L13** est caractérisée par une lipophilie élevée et un coefficient de perméabilité cutanée log Kp élevé, on peut expliquer que plus le log Kp est négatif (avec Kp en cm/s), moins l'absorption de la molécule par la peau est bonne. D'après les résultats de tableau 23 on constate une nette différence des valeurs de coefficient de perméabilité entre l'acide hexadécanoïque (**L25**) et la cis-2-hydroxyDavanone (**L20**) (-2,77 cm/s et -6,50 cm/s respectivement) ; ce qui explique qu'ils auront des affinités différentes.

Tableau 23 : Propriétés pharmacocinétiques et chimie médicinale des composés majoritaires dans l'huile essentielle de *S. grandiflorus*

Molécules	Prop.pharmacocinétiques		Chimie Médicinale	
	Absorption GI	Log Kp	Lead-likeness	Accessibilité synthétique
Cis-Davanone L13	Élevé	-5,38 cm/s	No; 1 violation: MM<250	3,96
Davanol D1 L18	Élevé	-5,17 cm/s	No; 2 violations: MM<250, XLOGP3>3,5	4,27
Cis-2-hydroxyDavanone L20	Élevé	-6,50 cm/s	Yes Pains; o alert Brenk :2 alerts: isolated_alkene. michael_acceptor_1	4,04
Acide Tétradécanoïque L24	Élevé	-3,35 cm/s	No; 3 violations: MM<250. Rotors>7. XLOGP3>3,5	2,09
Acide Hexadécanoïque L25	Élevé	-2,77 cm/s	No; 2 violations: Rotors>7. XLOGP3>3,5	2,31

MM : Masse Moléculaire ; **Absorption GI** : Absorption gastro-intestinale des médicaments ;
Log Kp : Perméation de la peau.
Lead-likeness : Guide tactique pour sélectionner les points de départ pour l'optimisation chimique qui offre la meilleure chance de fournir des candidats « de type médicament ».

L'évaluation de l'accessibilité synthétique (SA) est un processus permettant d'évaluer la facilité de synthèse des composés. Une méthode rapide pour l'évaluation de l'accessibilité synthétique pour un grand nombre de composés chimiques devrait entraîner une percée dans la découverte de médicaments.

L'accessibilité synthétique (SA) a été un facteur majeur dans la sélection d'une valeur acceptable, cette dernière est d'ordre comprise entre 3,96, 4,27 et 2,31 respectivement pour les ligands (**L13**, **L18** et **L25**). Ce sont des composés plus

intéressants qui peuvent être synthétisés ou soumis à des essais biologiques ou à d'autres expériences.

Les quatre molécules Afatinib, Erlotinib, Gefitinib et Osimertinib (Tableau 24) sont des molécules utilisées dans le traitement du cancer, elles empêchent la croissance tumorale en inhibant l'action de l'EGFR (EGFR est une protéine qui permet la prolifération cellulaire). Le Sunitinib bloque les activités du récepteur VEGFR2. Le Régorafénib est une petite molécule biodisponible par voie orale avec des activités anti-angiogéniques et antinéoplasiques potentielles. Malheureusement, ils ont des effets secondaires. Le but de ce travail est de trouver une molécule inhibitrice naturelle sans effets secondaires.

Afin de compléter cette recherche, nous avons jugé utile d'effectuer des calculs entre des médicaments d'Immunothérapie Clinique (cancer du poumon, Cancer du rein et Cancer du foie), nos deux ligands sélectionné **L13**, **L25** et la séquence ctDNA afin de savoir l'affinité du complexe (ligand-ADN) et par la suite comparer les énergies de stabilité. Les résultats sont en parfait accord.

Tableau 24 : Bilan énergétique des complexes formés avec l'ADNc des inhibiteurs de tyrosine kinase comparées avec les résultats des deux ligands L13 et L25 de l'huiles essentielles de *S. grandiflorus*.

Drogues	ctDNA	Voie
Immunothérapie (Clinique)		
Cancer du poumon		
Afatinib	-8,630	Injectable
Gefitinib	-8,365	par voie orale à une dose quotidienne prédéterminée
Erlotinib	-7,481	Injectable
Osimertinib	-7,811	par voie orale à une dose quotidienne prédéterminée
Cancer du rein		
Sunitinib	-8,019	Orale
Cancer du foie		
Regorafenib	-8,578	Orale
Nos résultats		
cis-Davanone L13	-6,223	Orale
Acide Hexadécanoïque L25	-7,210	Orale

Nos résultats d'amarrage moléculaire avec l'ADNc coïncidaient avec les résultats cliniques. En comparant nos résultats avec les inhibiteurs de tyrosine kinase l'Afatinib, Gefitinib, Erlotinib et Osimertinib utilisés en Immunothérapie, notre ligand naturel, l'acide hexadécanoïque **L25** (13,2%) a mieux stabilisé le système avec une énergie de -7,210 Kcal/mol (Tableau 24). De plus, la davanone **L13** pourrait être un excellent candidat comme médicament, avec une liaison énergétique de -6,223 Kcal/mol, il a une meilleure absorption 96,829 (Tableau 19), et selon son volume de distribution (VDss), le composé sera bien distribué dans le plasma.

Par conséquent, nous proposons la cis-Davanone **L13** issue des huiles essentielles de la racine de *S. grandiflorus* comme nouveau et meilleur inhibiteur d'ADNc, du VEGF et ses récepteurs (VEGFR1/2), il possède une absorption élevée dans les intestins avec une bonne biodisponibilité oral.

Les présentes simulations de DM et d'analyse bio-informatique ont été utilisées pour examiner de nouvel inhibiteur des récepteurs VEGFR extrait des racines de *S. grandiflorus*. L'étude de Hosseinzadeh [121], a montré que les sesquiterpénoïdes (hydroperoxyde de davanone (1) et hydroxy davanone (2)) ont été identifiés comme des constituants actifs responsables de la propriété cytotoxique dans l'extrait éther de pétrole de *A. aucheri*. [121]. L'acide que nous avons validé (acide hexadécanoïque **L25**) s'est avéré être d'un intérêt majeur dans les recherches de Mansoor et al, qui ont prouvé que cette acide a des effets anticancéreux [144]. De plus Ravi et al. ont proposé sur la base des résultats d'une étude d'amarrage que l'activité cytotoxique observée de l'acide N-hexadécanoïque extrait des feuilles de *Kigelia pinnata*, est liée à son interaction avec l'ADN topoisomérase-I [145].

CONCLUSION
ET PERSPECTIVES

Avec une superficie supérieure à 2,3 millions de km², l'Algérie est le plus grand pays du bassin méditerranéen. Il présente une grande biodiversité végétale qui s'élève à plus de 1600 espèces dont une bonne proportion d'espèces endémiques sont menacées. Ainsi, il a été dénombré plus de 600 plantes utiles dont 200 espèces aromatiques et médicinales parmi lesquelles 25% sont des espèces endémiques.

Le développement de la résistance aux microorganismes pathogènes et les effets sur la santé et l'environnement ont conduit les chercheurs à développer des méthodes nouvelles et efficaces, considérées comme sûres et respectueuses de l'environnement, pour contrôler les maladies post-récolte et les dommages oxydatifs. L'action antioxydante, qui est l'une des fonctions physiologiques importantes, est censée protéger les organismes vivants contre ces dommages oxydatifs, ce qui entraîne la prévention de diverses maladies.

Les substances naturelles extraites des plantes aromatiques apparaissent comme des alternatives pertinentes aux conservateurs alimentaires et produits phytosanitaires synthétiques. La caractérisation des constituants moléculaires des plantes ainsi que la recherche de principes actifs constituent un défi scientifique intéressant à mener.

Ce travail doctoral a porté sur l'analyse chimique et biologique des racines de trois plantes médicinales Algérienne *Scolymus grandiflorus*, *Carduncellus pinnatus* et *Salvia argentea*. Ces dernières ont été sélectionnées sur des critères ethnobotaniques, l'utilisation fréquente par la population locale et par rapport au fait que leurs huiles essentielles ou extraits n'ont fait jusqu'alors l'objet d'aucune étude scientifique.

Ce projet de thèse avait deux objectifs complémentaires : d'une part, la connaissance, la préservation et la valorisation des espèces végétales de l'Ouest algérien à la suite d'une enquête ethno-pharmacologique, et d'autre part, obtenir des extraits végétaux et des molécules actives destinées à des applications économiquement durables liées à l'industrie agroalimentaire et éventuellement pharmaceutique.

Le premier chapitre a été consacré à un aperçu bibliographique des méthodes d'extraction, de fractionnement ainsi que les principales techniques utilisées pour l'analyse et l'identification des constituants des huiles essentielles.

Dans le deuxième chapitre, nous avons caractérisé les huiles essentielles des trois espèces à l'aide d'une procédure basée sur la complémentarité des techniques analytiques incluant l'analyse par CPG-Ir et CPG-SM (IE), la chromatographie liquide sur colonne des huiles essentielles afin d'en isoler les composés absents de notre bibliothèque et tenter de les identifier et/ou les confirmer, à l'aide de la RMN mono et bidimensionnelle.

La composition chimique des huiles essentielles étant influencée par des facteurs biotiques, abiotiques et génétiques, nous avons effectué des études de variabilité chimique et le suivi de la composition chimique des huiles essentielles des trois espèces étudiées au cours du cycle végétatif de la plante.

Les investigations chimiques menées sur les huiles essentielles des racines de *Scolymus grandiflorus* constituent un travail inédit qui a permis de détecter la présence de plusieurs constituants appartenant à la famille des davanoïdes, molécules naturelles qui, à notre connaissance, n'ont jamais été reportées dans le genre *Scolymus*. Les différentes étapes de fractionnement et de purification réalisées sur l'huile essentielle ont mené à l'isolement de 4 constituants au squelette davanoïde dont les données spectrales étaient absentes de nos bibliothèques. L'étude par RMN du C-13 a abouti à l'identification de la 5,5-diméthylfuranone, la Davanafurane, de la cis-Davanone et de la cis-2-hydroxyDavanone. L'étude a permis de réexaminer les données de RMN du carbone-13 de la cis-Davanone et de la cis-2-hydroxyDavanone et nous décrivons pour la première fois les données de RMN du carbone-13 du cis-Davanol et de la Davanafurane. Par ailleurs, l'analyse a également permis de mettre en évidence la très probable présence de trois séries d'isomères pour les trois molécules au squelette davana, par l'observation de spectres de masse très voisins. Au total, 25 composés représentant 93,2% de l'huile essentielle totale ont été repérés et les composés majoritaires sont : la Cis-Davanone (45,3%), le Davanol D1 (6,5%), la 2-hydroxyDavanone (3) (5,3%) et la cis-2-hydroxyDavanone (4) (11,2%). Les sesquiterpènes oxygénés et les composés non terpéniques oxygénés représentent 79,4% et 12,9% respectivement, ce qui fait de l'huile essentielle des racines de *S. grandiflorus*, une huile essentielle très riche en composés oxygénés. En complément, l'étude statistique de la variabilité intraspécifique de des huiles essentielles de *S. grandiflorus* a distingué deux groupes d'échantillons se discriminant selon les lieux de récolte. Les huiles essentielles préparées à partir de racines prélevées dans des zones situées à proximité du littoral et soumises à un faible

régime de précipitation présentent des proportions en cis-Davanone bien plus élevées (41,3-73,2%) que celles issues de racines prélevées en région montagnaise (19,9-45,3%).

Le troisième chapitre présente la première description de la composition chimique de l'huile essentielle des racines de *Carduncellus pinnatus*. L'analyse CPG-Ir et CPG-SM a montré que l'huile essentielle est dominée par les composés hydrocarbonés qui représentent 74% de la composition totale. Au total, vingt-quatre constituants ont été identifiés, ils représentent 85% de la composition chimique totale. L'huile essentielle est dominée par un hydrocarbure aliphatique, le (Z,Z,Z)-heptadéca-1,8,11,14-tétraène, trivialement dénommé Aplotaxene. Les terpènes sont présents en faible proportion. Enfin, la présence en proportion plus que remarquable de cet hydrocarbure aliphatique peu commun, nous amène à penser que l'Aplotaxène pourrait être utile pour une étude taxonomique du genre dont la classification a fait l'objet de nombreuses controverses.

Le quatrième chapitre a été consacré à l'étude de la composition chimique des huiles essentielles des racines de *Salvia argentea*. L'analyse par CPG-Ir et CPG-SM a clairement signifié la présence de constituants abondants dont les données spectrales étaient absentes de nos bibliothèques de données. Ainsi, en compagnie de l'Abietatriène, les analyses complémentaires intégrant des chromatographies liquides préparatives sur colonne et l'utilisation de la RMN mono et bidimensionnelle ont conduit à l'identification du Labda-7,14-diène-13-ol, du Ferruginol, le dérivé de Phenaleno[1,9-bc]furane, l'Aethiopinone, la saprothoquinone, la Salvipisone, et de la 12-hydroxysapriparaquinone. Le composé dérivé de Phenaleno[1,9-bc]furane obtenu de la fraction hydrocarbonée n'a jamais été décrit dans la littérature. Au total, vingt-sept constituants représentant 94,6% de l'huile essentielle ont été identifiés.

Le chapitre cinq a permis d'étudier les activités antioxydante, antibactérienne et antifongique *in vitro* des trois huiles essentielles. La forte activité antioxydante montrée par les huiles essentielles de *S. grandiflorus* et *S. argentea* est attribuable à la présence de composés oxygénés majoritaires. L'évaluation qualitative de l'activité antimicrobienne a montré que toutes les huiles essentielles testées présentaient des effets positifs, en particulier, l'huile essentielle de *Salvia argentea* a démontré un

excellent potentiel. Les huiles de *S. grandiflorus* et *C. pinnatus* ont montré une activité modérée vis-à-vis des souches de *A. alternata* et *F. solani*. Afin de confirmer la relation composition chimique - activité biologique, il serait intéressant de réaliser des tests biologiques sur chacun des constituants purs.

Les résultats de la simulation d'amarrage ont révélé que la cis-Davanone (Ligand 13) a une affinité pour interagir avec l'ADNc, le VEGF et ses récepteurs. Les propriétés ADMET et le graphique BOILED-Egg valident que le composé L13 passe la barrière cérébrale et présente une forte absorption dans les intestins avec une bonne biodisponibilité. Les résultats de cette étude contribuent aux connaissances pharmacologiques et à l'efficacité thérapeutique de la cis-Davanone et peuvent à l'origine du développement de nouveaux médicaments anti-angiogéniques. Les résultats ont montré que l'huile essentielle de *S. grandiflorus* présentait un pourcentage élevé en Cis-Davanone, Davanol D1 et de cis-2-hydroxyDavanone. Ces molécules peuvent constituer de nouvelles sources d'agents anticancéreux non toxiques. Cependant, une étude expérimentale complémentaire *in vitro* et / ou *in vivo* devrait permettre de vérifier les résultats théoriques obtenus *in silico*.

PARTIE
EXPERIMENTALE

1. Extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles des trois plantes a été réalisée par hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger. Environ 1 kg de matière végétale fraîche est introduit dans un volume d'environ 4 L d'eau, l'ensemble est porté à ébullition pendant 4 heures. Les vapeurs chargées d'essences, traversent le réfrigérant, se condensent et tombent dans un tube gradué pour décanter. L'eau et l'extrait volatil se séparent par différence de densité. L'huile essentielle est séchée par Na₂SO₄, puis conservée à 4°C. Les rendements en huiles essentielles sont données dans la partie résultats du manuscrit.

2. Fractionnements des huiles essentielles

Les huiles essentielles ont été soumis à un fractionnement sur chromatographie flash avec une colonne de silice (200–500 µm, 12g, Clarisep Bonna Agela Technologies, Willington, USA) en utilisant un appareil Automated Combi Flash (Teledyne ISCO, Lincoln, USA), équipé d'un collecteur de fractions automatique contrôlé par un détecteur UV, éluant les produits avec un gradient d'hexane (A) et d'oxyde de diisopropyle (B) tel que [A: 100%; B: 0%] à [A: 0%; B: 100%]. Les fractions obtenues sont toutes soumises à des analyses GC-FID, GC/MS et éventuellement RMN.

3. Analyses par Chromatographie en Phase Gazeuse

Les analyses par chromatographie en phase gazeuse ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe Perkin Elmer Clarus 600 (Walton, MA, Etats Unis), équipé d'un injecteur split/splitless, de deux colonnes capillaires Rtx-1 (polydiméthyl-siloxane, 60 m x 0,22 mm d.i., épaisseur du film de phase stationnaire : 0,25 µm) et Rtx-WAX (polyéthylène glycol, 60 m x 0,22 mm d.i., épaisseur du film de phase stationnaire : 0,25 µm) et de deux détecteurs à ionisation de flamme (DIF). Le gaz vecteur utilisé est le dihydrogène, la pression en tête de colonne est de 25 psi avec un débit de 0,7 ml/mn, la température de l'injecteur et des détecteurs est de 250°C. La programmation de la température consiste en une élévation de 60 à 230°C à 2°C/mn puis en un palier de 30 mn à 230°C. L'injection se fait en mode split 1/80. La quantité d'huile essentielle injectée est de 0,1 µl et 0,2 µl pour les fractions. Pour chacun des composés, les indices de rétention polaires et apolaires sont calculés par extrapolation linéaire à partir des temps de rétention d'une gamme d'étalon d'alcanes. Les proportions relatives des constituants des huiles essentielles ont été exprimées en pourcentages obtenus par

normalisation de l'aire de pic, sans utiliser de facteurs de correction, comme décrit précédemment [146].

4. Analyses par CPG/SM

Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe Perkin Elmer Autosystem XL (Walton, MA, Etats Unis), doté d'un injecteur automatique et de deux colonnes (60 m x 0,22 mm d.i. ; épaisseur du film de phase stationnaire : 0,25 μm) polaire (Rtx-Wax) et apolaire (Rtx-1), couplées à un détecteur de masse Perkin Elmer TurboMass. Le chromatographe fonctionnant dans les mêmes conditions que décrites précédemment. La quantité d'huile essentielle injectée est de 0,2 μl . Les molécules sont bombardées par un faisceau électronique de 70 eV, la détection se fait par un analyseur quadripolaire constitué d'un assemblage de quatre électrodes parallèles de section cylindrique. La température de la source est de 150 °C. L'acquisition des données chromatographiques est réalisée en mode Scan, sur une gamme de masse s'étendant de 35 à 350 uma, le temps de Scan est 1s. L'identification de chaque composé des mélanges a été réalisée par comparaison des spectres de masse (impact électronique) avec ceux de composés standards (bibliothèque laboratoire) ou ceux présents dans les banques informatisées suivant une méthodologie décrite dans le chapitre 1.

5. Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Des expériences de spectroscopie RMN sur les composés ont été réalisées sur un spectromètre Bruker AVANCE 400 à transformée de Fourier fonctionnant à 100,13 MHz, équipé d'une sonde de 5 mm, dans du chloroforme deutéré (CDCl_3), tous les déplacements étant référés au tétraméthyl silane (TMS) interne. Les spectres ont été enregistrés avec les paramètres suivants: largeur d'impulsion (PW), 4 μs (angle de basculement 45 °); temps d'acquisition, 2,7 s pour une table de données de 128 K avec une largeur spectrale (SW) de 24 000 Hz (240 ppm); Découplage du mode CPD; résolution numérique 0,183 Hz / pt. Le nombre de scans accumulés était de 3000 pour chaque échantillon (50-60 mg dans 0,5 mL de CDCl_3)[147].

6. Mesure des activités antioxydantes

6.1. Test DPPH

L'activité de piégeage des radicaux libres du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) a été mesurée selon les procédures décrites dans la littérature [148]. En bref, 0,06 mM de DPPH (Sigma, St. Louis, MO) dans une solution d'éthanol a été préparé et un aliquote de 1 mL a été ajoutée à 1 mL de solution d'huile essentielle dans EtOH à diverses concentrations (5 à 30 μ l / mL). Après 30 minutes d'incubation dans l'obscurité à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 517 nm, et le pourcentage d'activité de piégeage des radicaux a été calculé selon l'équation $[(A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{contrôle}}] \times 100$, où $A_{\text{échantillon}}$ est l'absorbance des composés d'essai, $A_{\text{contrôle}}$ est l'absorbance de la réaction témoin (contenant tous les réactifs à l'exception des composés d'essai). Du 2,6-di-tert-butyl-4-méthylphénol (BHT) ont été utilisés comme témoins positifs à une concentration de 1 mg / mL. EtOH (2 ml) a été utilisé comme blanc. Une solution de DPPH (1 mL) / EtOH (1 mL) a été utilisé comme contrôle négatif. Chaque essai a été réalisé en triple.

6.2. Test FRAP

Le pouvoir antioxydant réducteur ferrique a été déterminé en utilisant 2,5 mL de tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6), 2,5 mL d'une solution de ferricyanure de potassium à 1%, 2,5 mL d'acide trichloroacétique à 10%, ont été ajoutés à 2,5 mL d'extraits à différentes concentrations. Les mélanges ont été bien vortexés et ensuite incubés à 50 °C pendant 20 minutes, et centrifugés à 3000 tr / min pendant 10 minutes. 2,5 mL du surnageant ont été mélangés avec 2,5 mL d'éthanol et 0,5 mL de chlorure ferrique à 0,1% ont été ajoutés avant que les valeurs d'absorbance ne soient prises à 700 nm.

7. Inoculum fongiques

Les champignons, *Fusarium solani* et *Alternaria alternata* (Université LEGEN Tlemcen) responsables de différentes pourritures des fruits, ont été isolés à partir d'olives, de fraises et de tomates puis cultivés sur 10 mL de milieu de dextrose – gélose de pomme de terre fondue (PDA, SigmaAldrich, USA), dans des boîtes de Pétri de 9 cm à température ambiante et dans l'obscurité. Les champignons ont été cultivés pendant 10 jours. Une purification précise avec les méthodes d'isolement de spores uniques, puis une identification correcte par des méthodes phénotypiques [120,121] ont

été réalisés, la récolte a été effectuée en mettant en suspension des conidies dans 5 mL d'eau distillée stérile contenant 0,1% (v/v) de Tween 80. Une boucle stérilisée a été utilisée pour séparer les spores des hyphes. La suspension de spores a été filtrée, le nombre de spores a été calculé avec un compteur de cellules automatisé (TC20 de Bio-Rad), Cellometer Vision, et la concentration de spores a été ajustée à 1×10^6 spores/mL à l'aide d'un hémocytomètre avant utilisation, comme indiqué précédemment.

8. Activités antifongiques *in vitro*

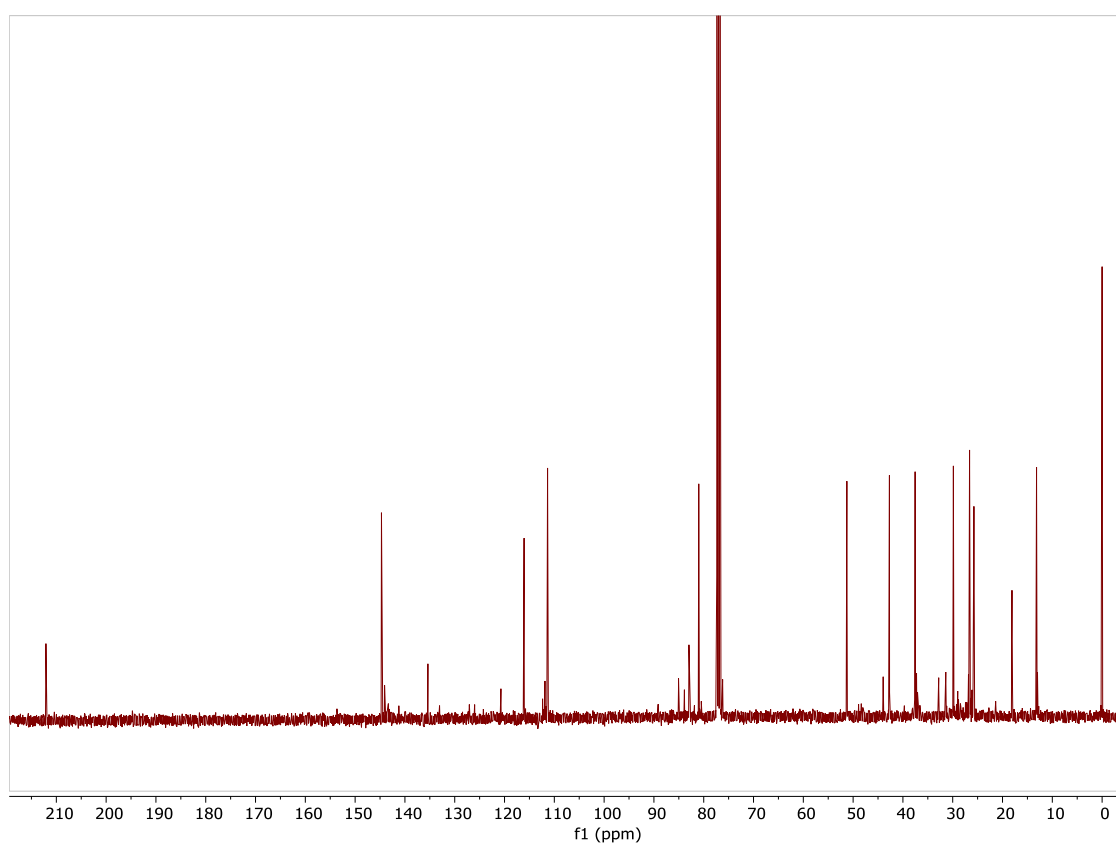
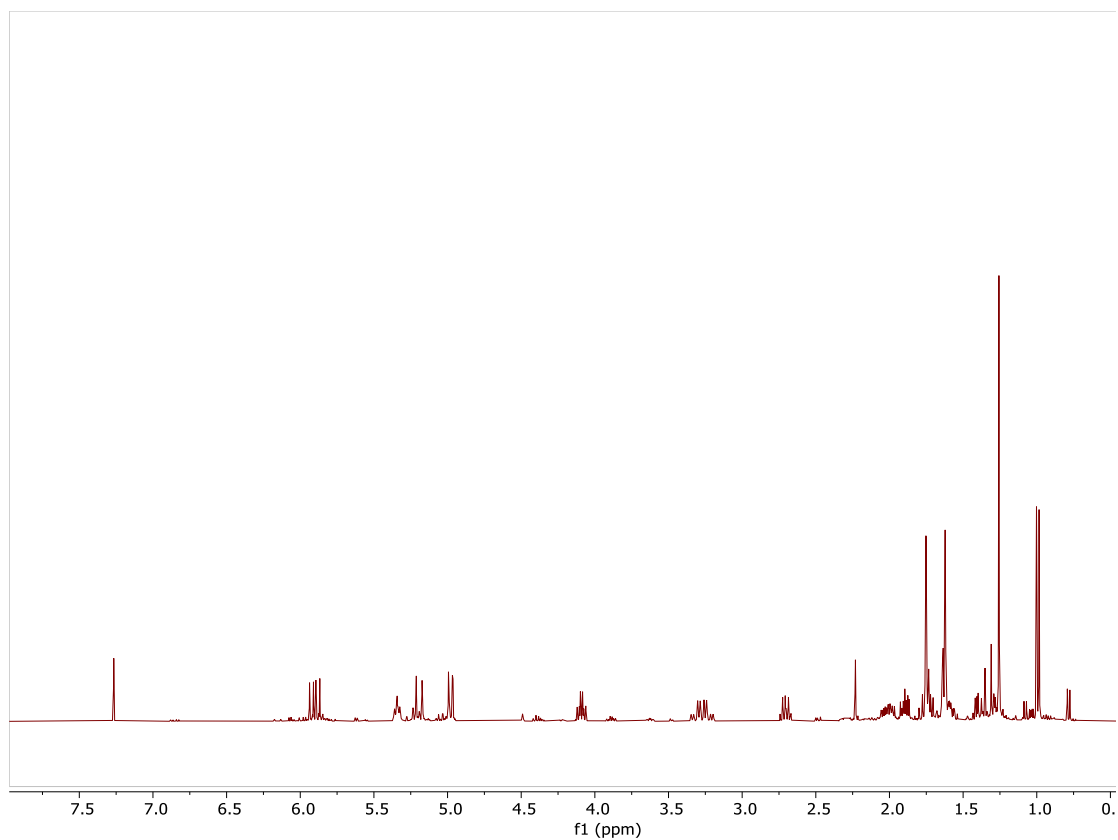
La méthode utilisée a été précédemment décrite par Snouci et al. [151], elle est basée sur une méthode publiée par Tian et al. [152], Singh et al.[153]. Des aliquotes d'huiles essentielles dissoutes séparément dans 0,5 mL de DMSO à 10% (v / v) ont été pipetées de manière aseptique sur des boîtes de Pétri en verre de 9 cm contenant du PDA à une température de 45 et 50 °C pour obtenir des concentrations de (2, 4, 8 μ L/mL). Après homogénéisation à l'aide d'un vortex, le contenu des tubes a été versé dans des boîtes de Pétri. Les boîtes ont été laissées sécher pendant 15 à 20 minutes. Une boîte de Pétri contenant 10 mL de milieu PDA sans extrait a été utilisée comme contrôle négatif. Un disque mycélien de 9 mm de diamètre, découpé à la périphérie de la pré-culture de 5 jours, a été inoculé de manière aseptique au centre de chaque boîte de Pétri. Toutes les boîtes de Pétri ont été scellées avec du parafilm stérile et incubées à 28 ° C pendant 9 jours. L'efficacité du traitement a été évaluée quotidiennement en mesurant la moyenne des deux diamètres perpendiculaires de chaque colonie. Le pourcentage d'inhibition de croissance des deux champignons testés, par rapport au témoin, a été calculé jusqu'au 9^{ème} jour, en utilisant la formule suivante : $I\% = (DC - DT / DC) \times 100$ où DC est le diamètre de la croissance mycélienne du contrôle négatif, DT est le diamètre moyen de la colonie fongique de traitement. Les tests ont été réalisés en triple.

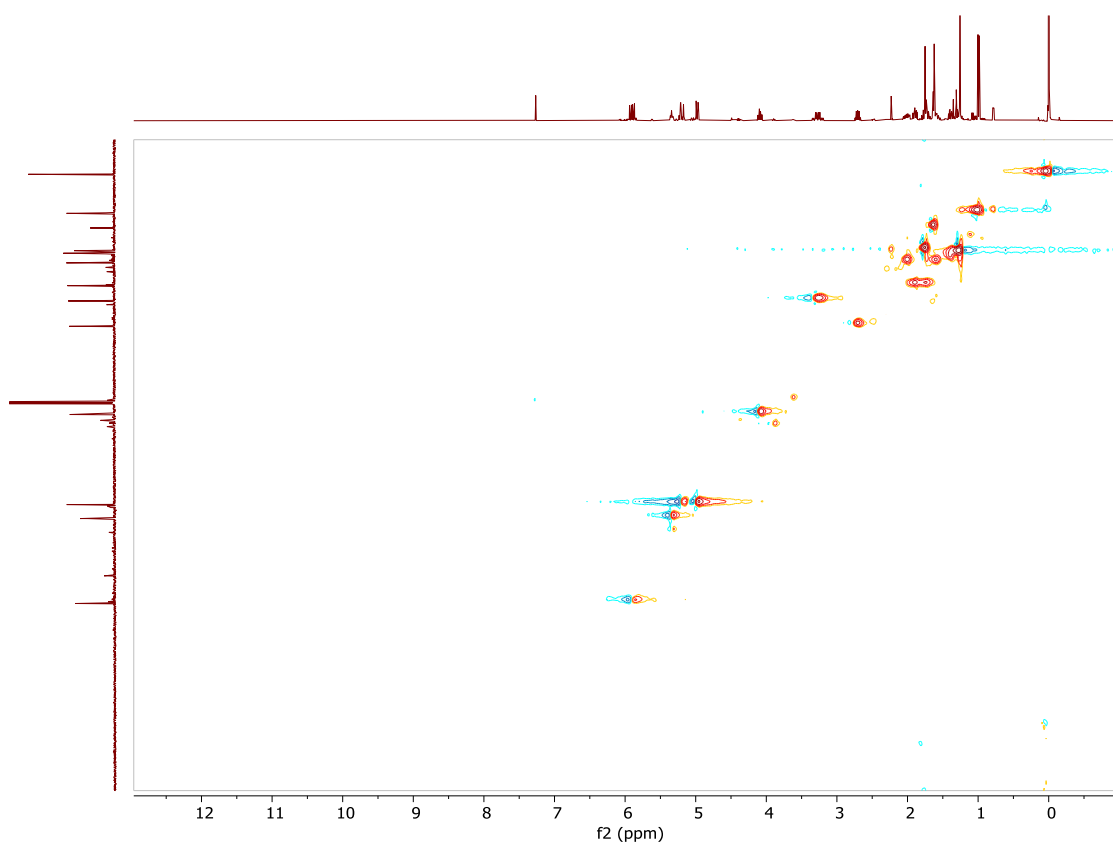
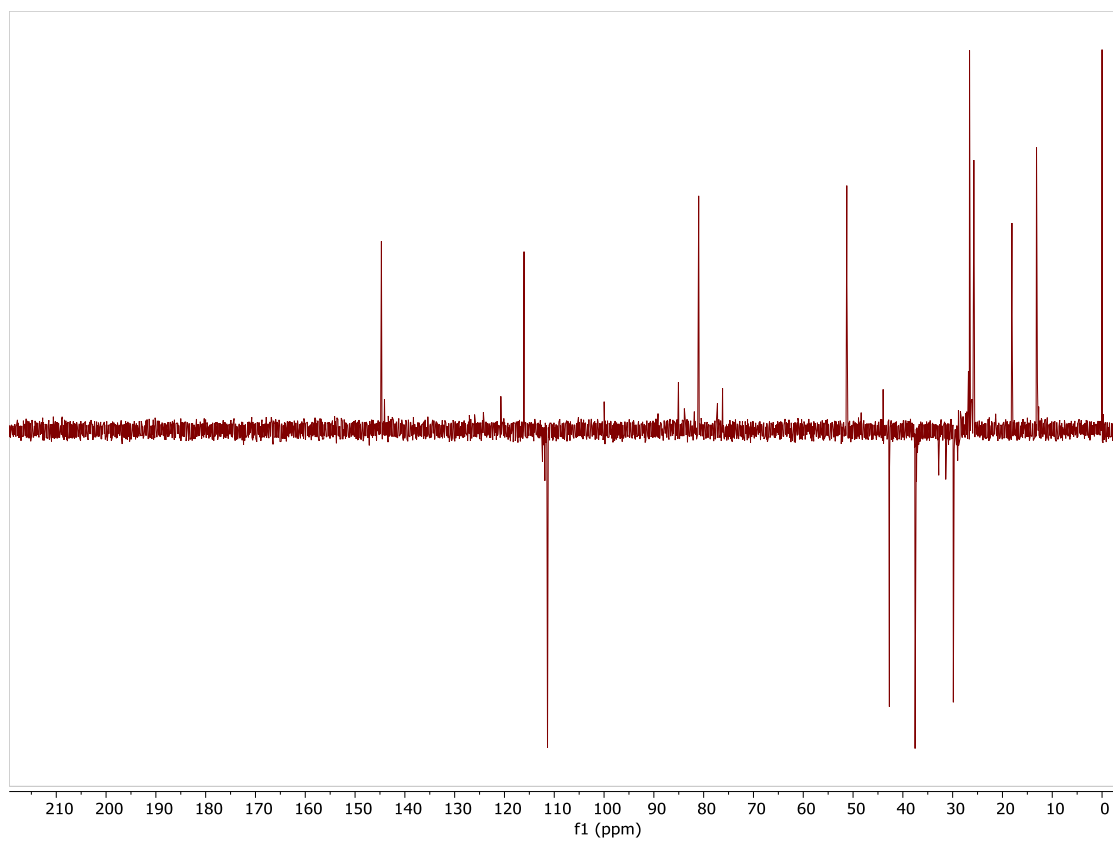
9. Activité antibactérienne

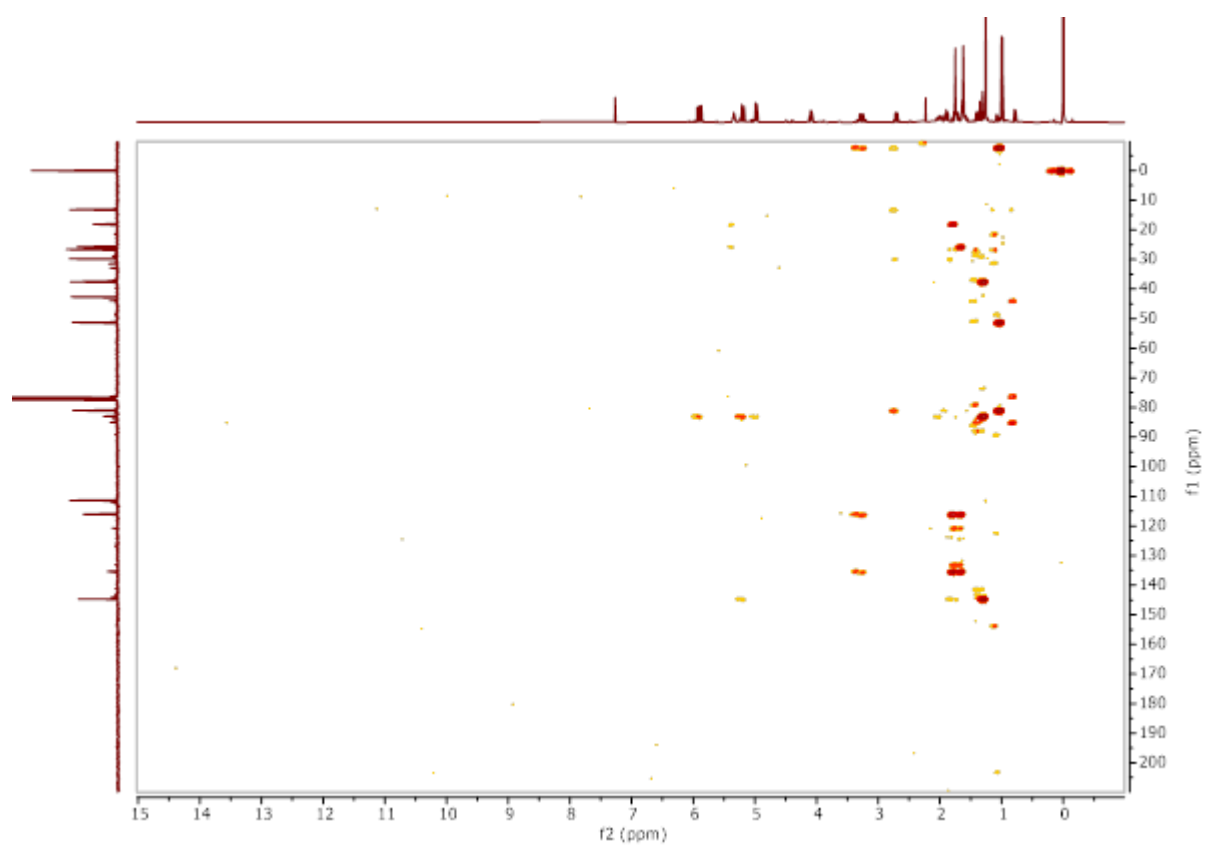
Méthode de diffusion disque-agar en papier: Les composés d'essai (100 μ L) ont été dissous dans 1 mL de DMSO et dilués deux fois de 60 à 2 μ L / mL; Des aliquotes de 3 μ L ont été appliquées à des disques de papier de 3 mm de diamètre. Après évaporation du solvant organique, des disques ont été placés au centre de plaques d'agar de 9 cm de diamètre préalablement inoculées avec 0,5 mL de suspension de spores (10^4 CFU/mL). Après 3 jours, la concentration de chaque composé d'essai provoquant des zones exemptes de mycélium et le diamètre ont été déterminés [154].

| ANNEXES

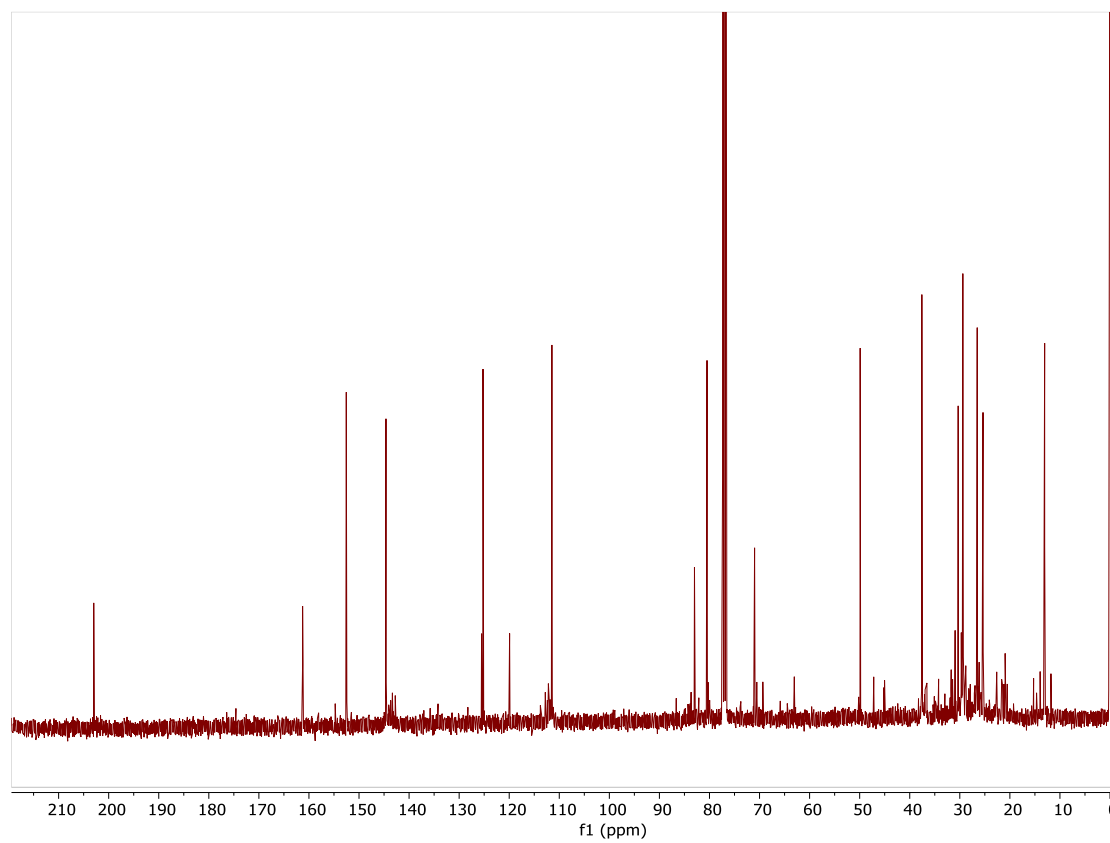
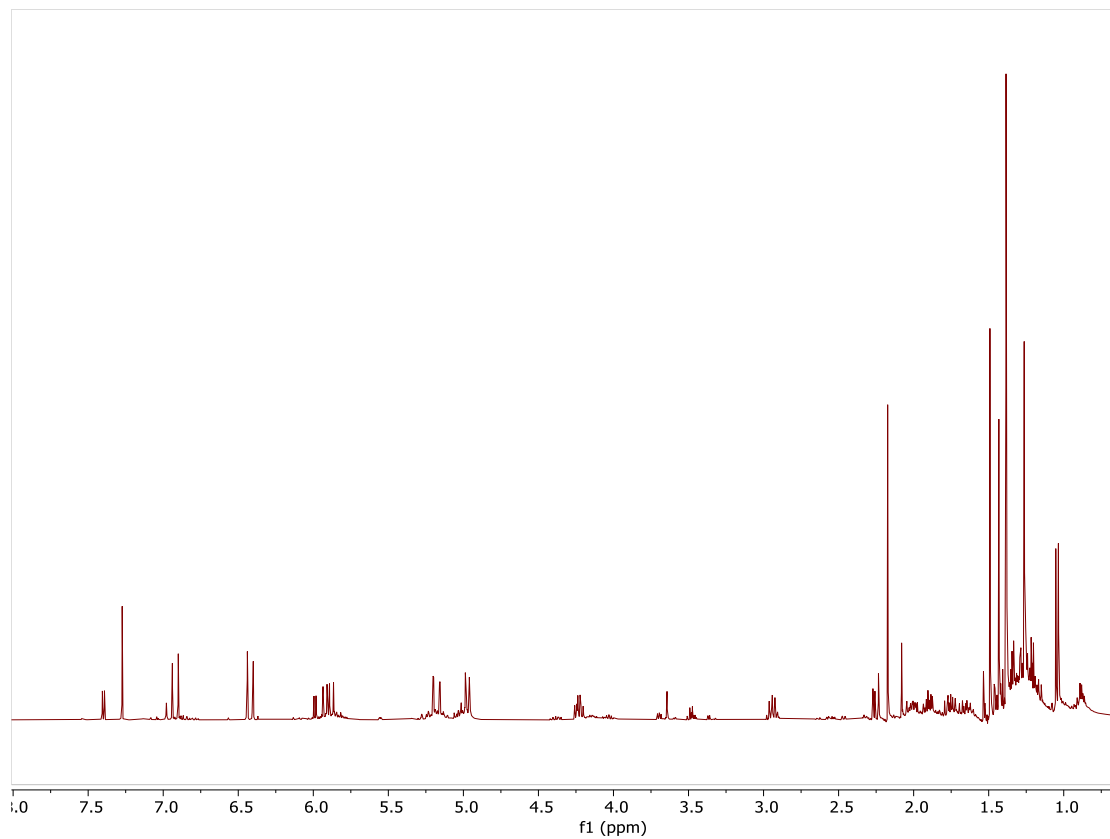
Annexe 01 : Spectres RMN (1H, 13C, DEPT, HSQC, HMBC) de la *Cis-davanone*.

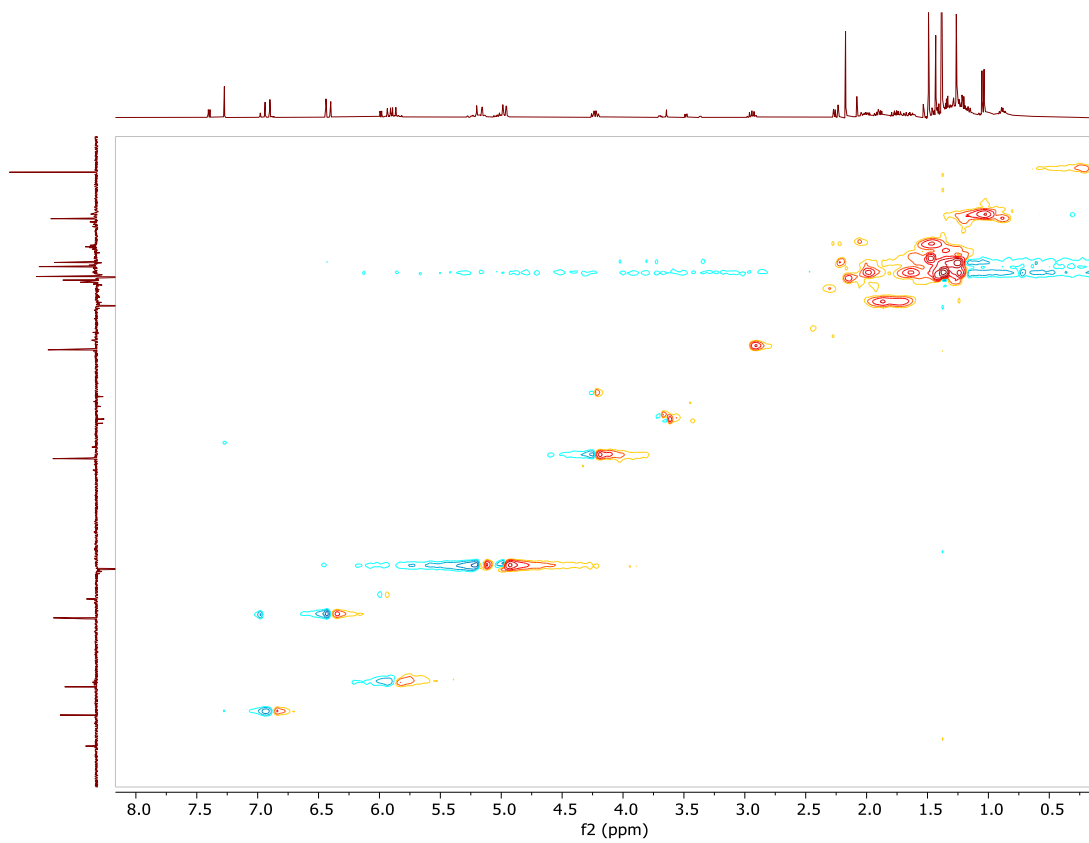
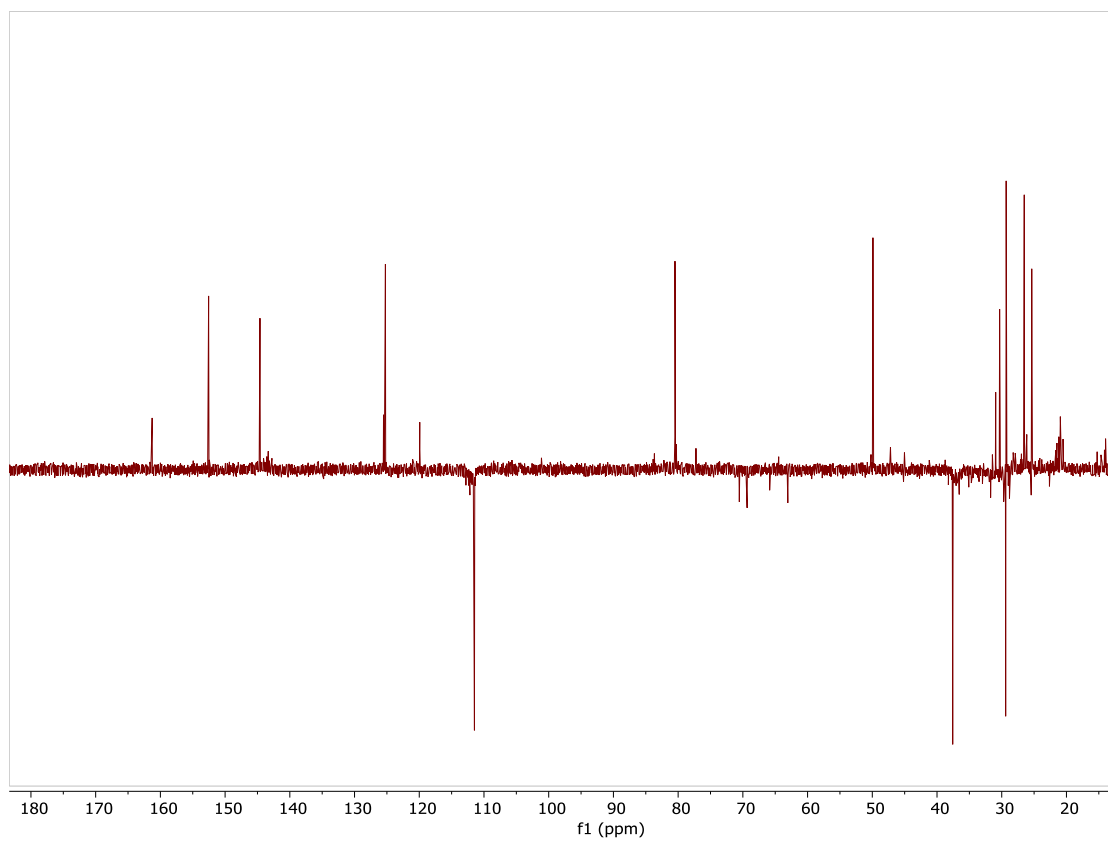


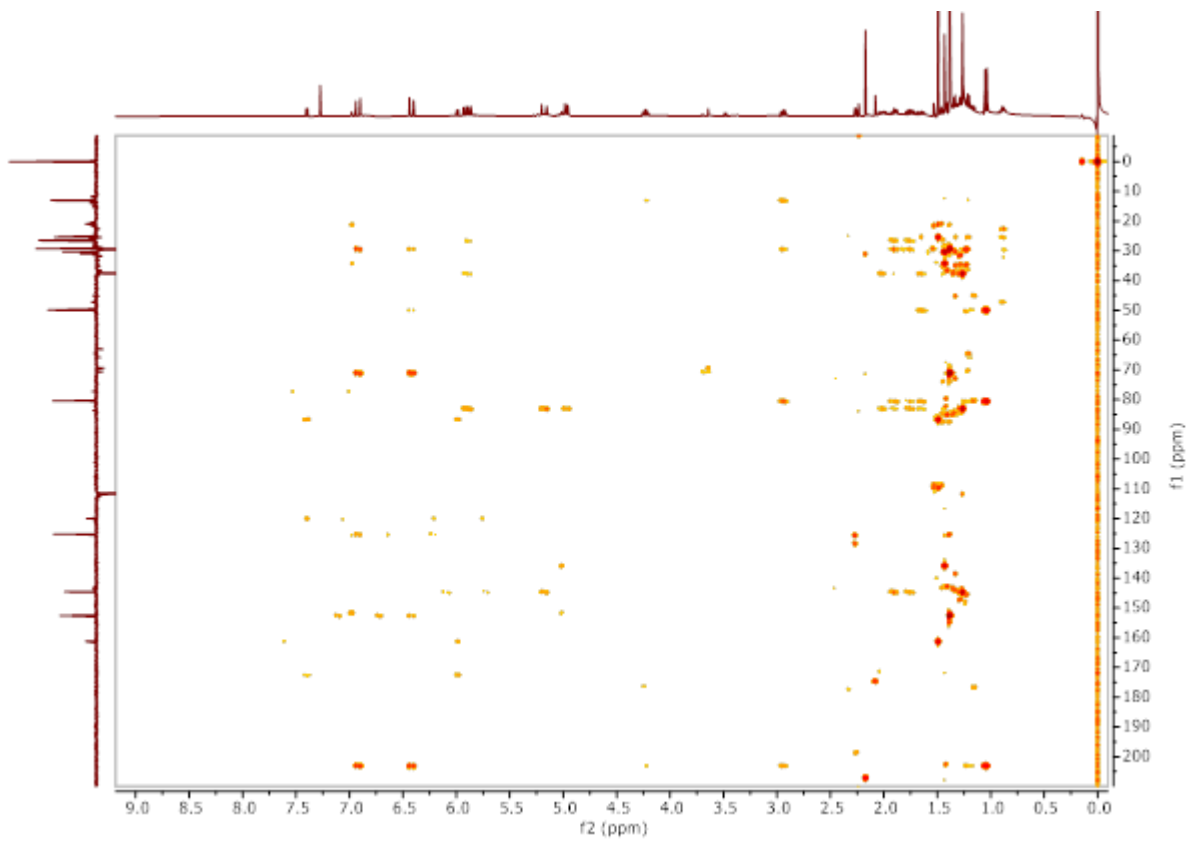




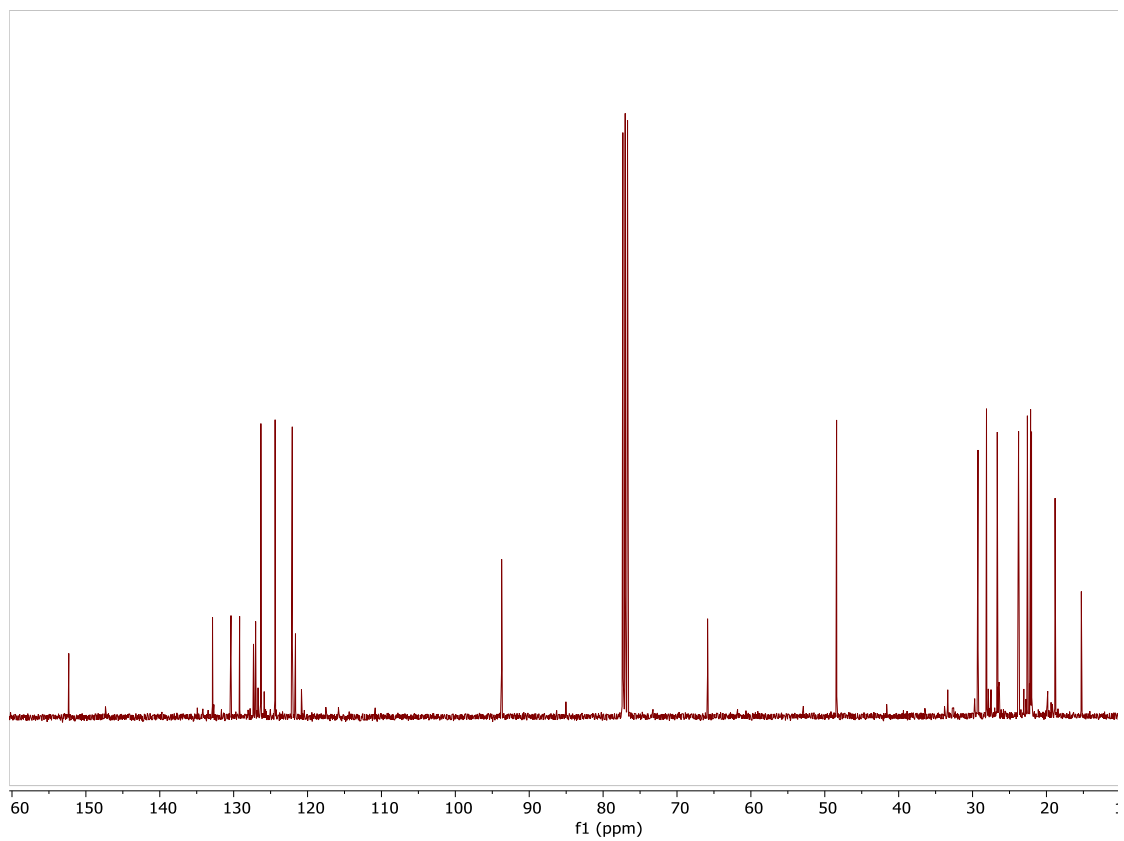
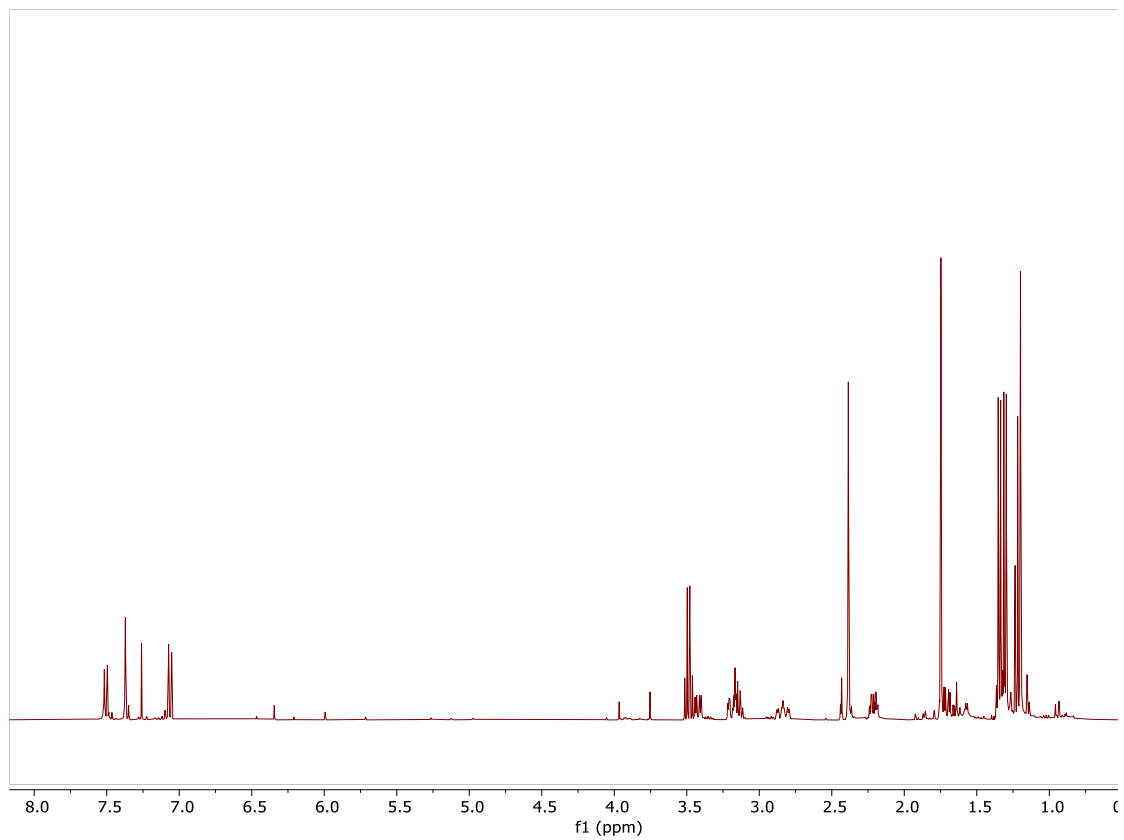
Annexe 02: Spectres RMN (^1H , ^{13}C , DEPT, HSQC, HMBC) de la *cis*-2-hydroxyDavanone.

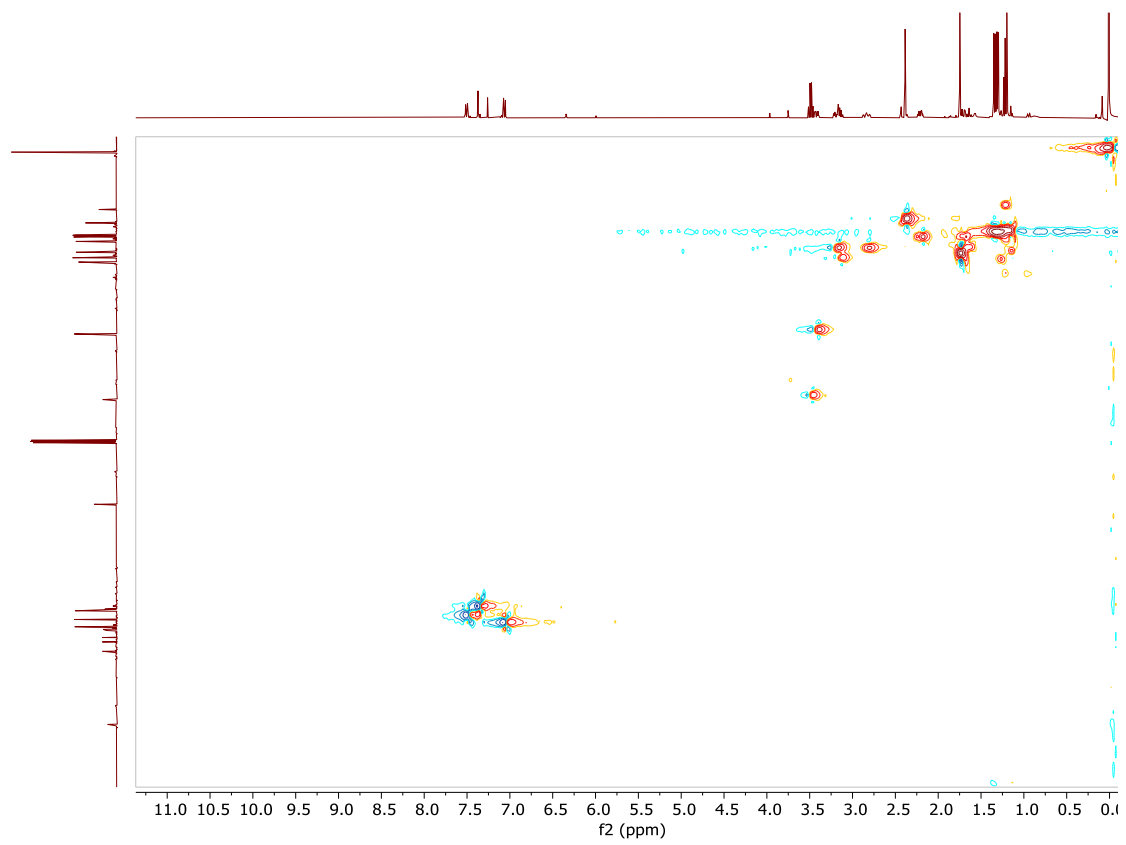
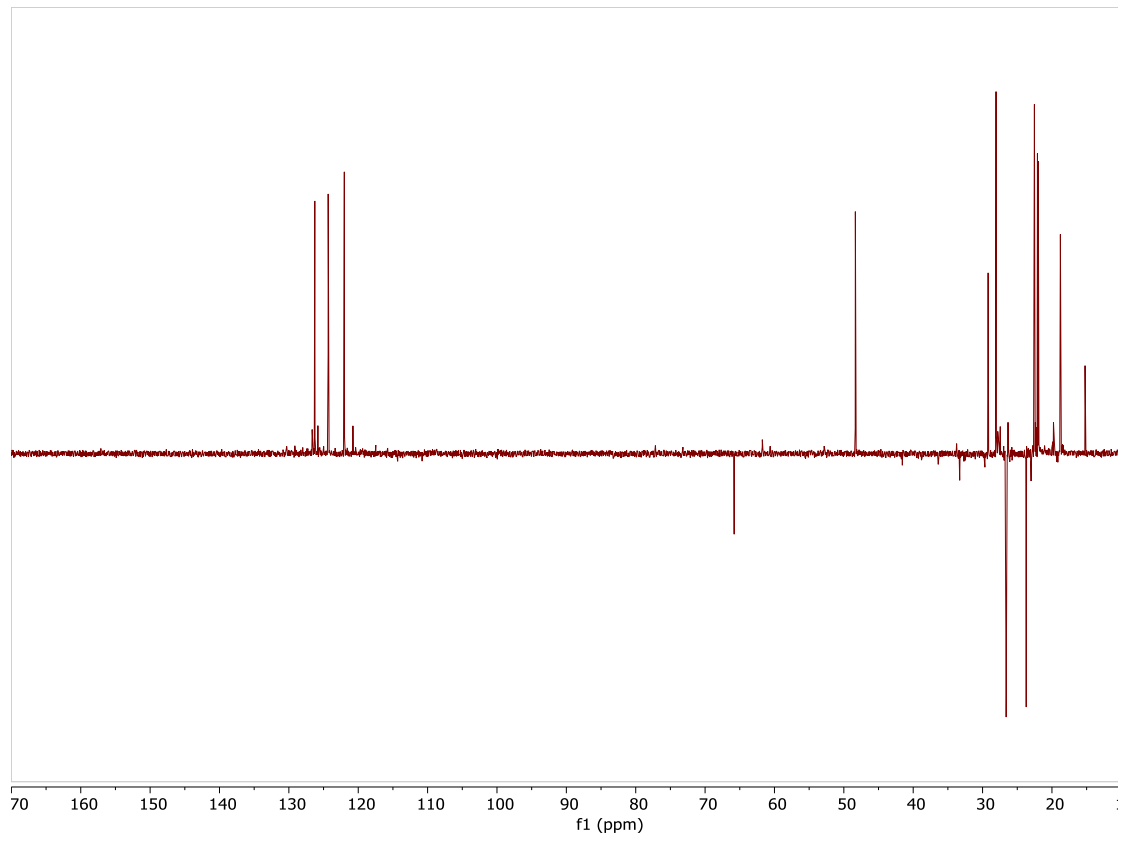


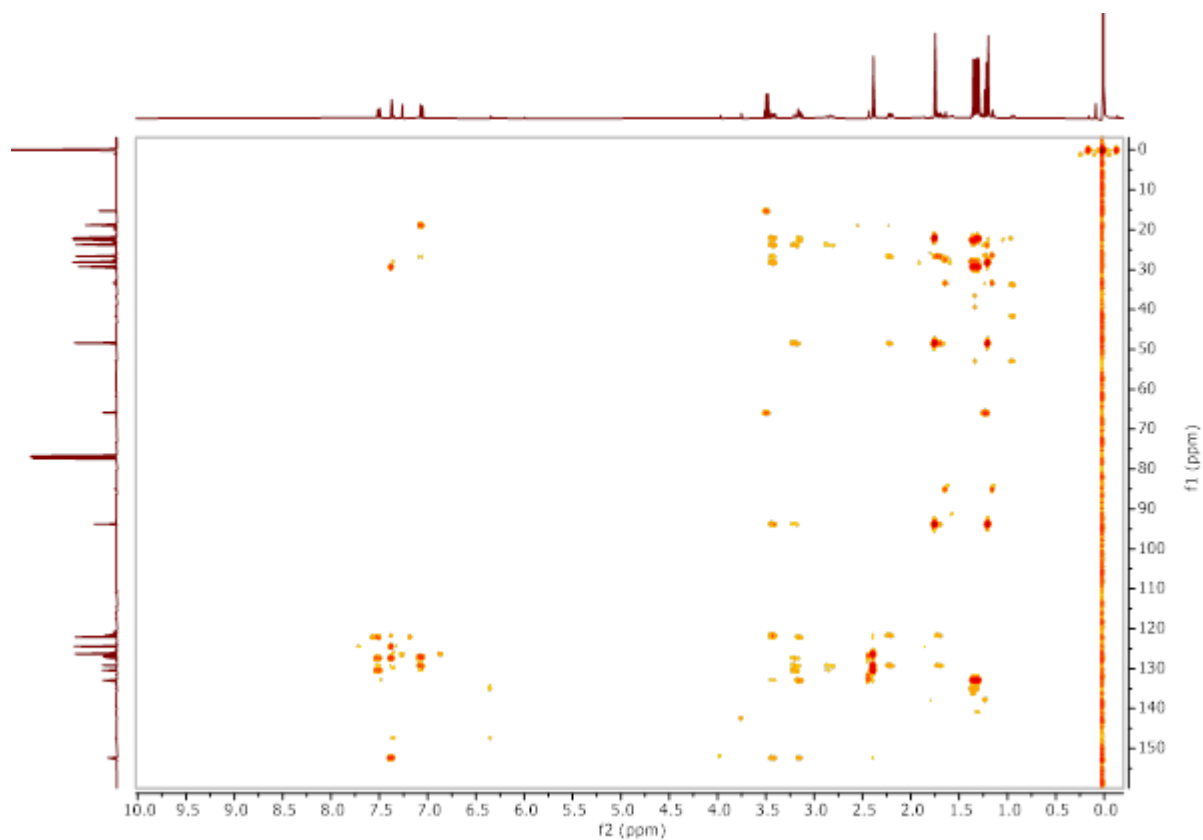




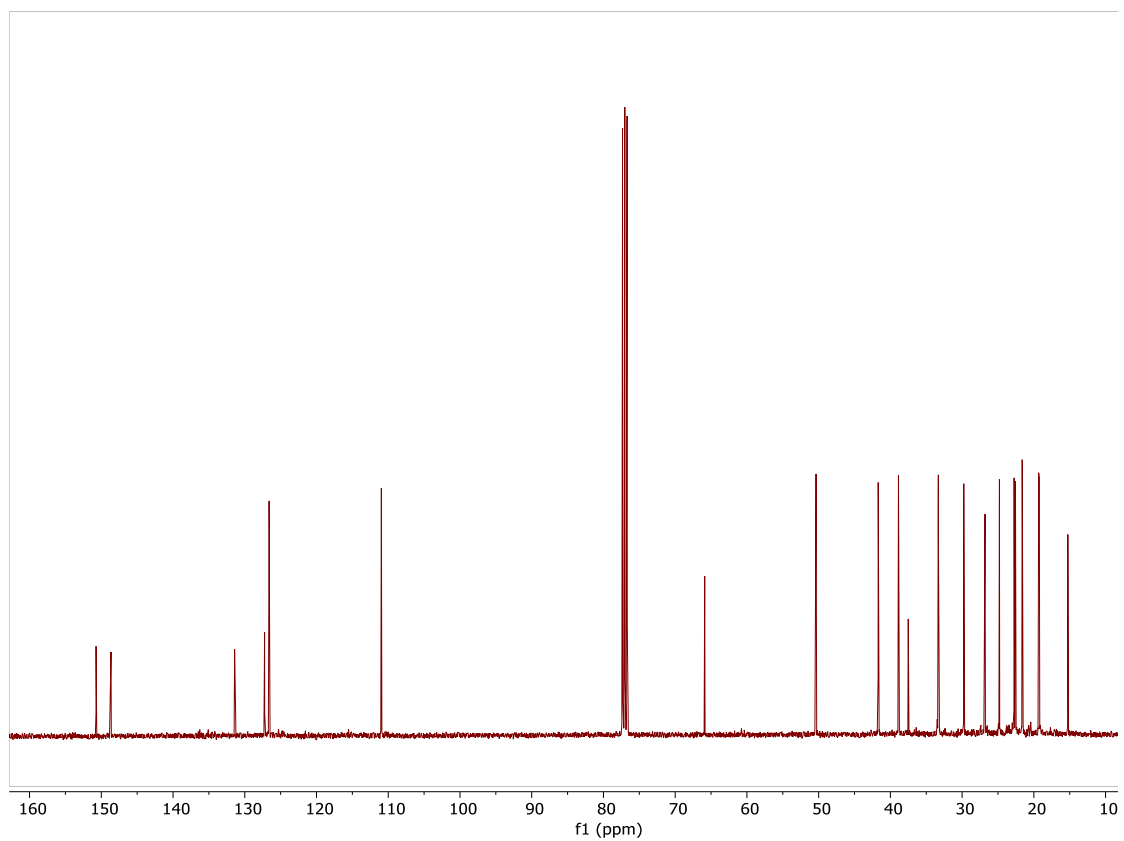
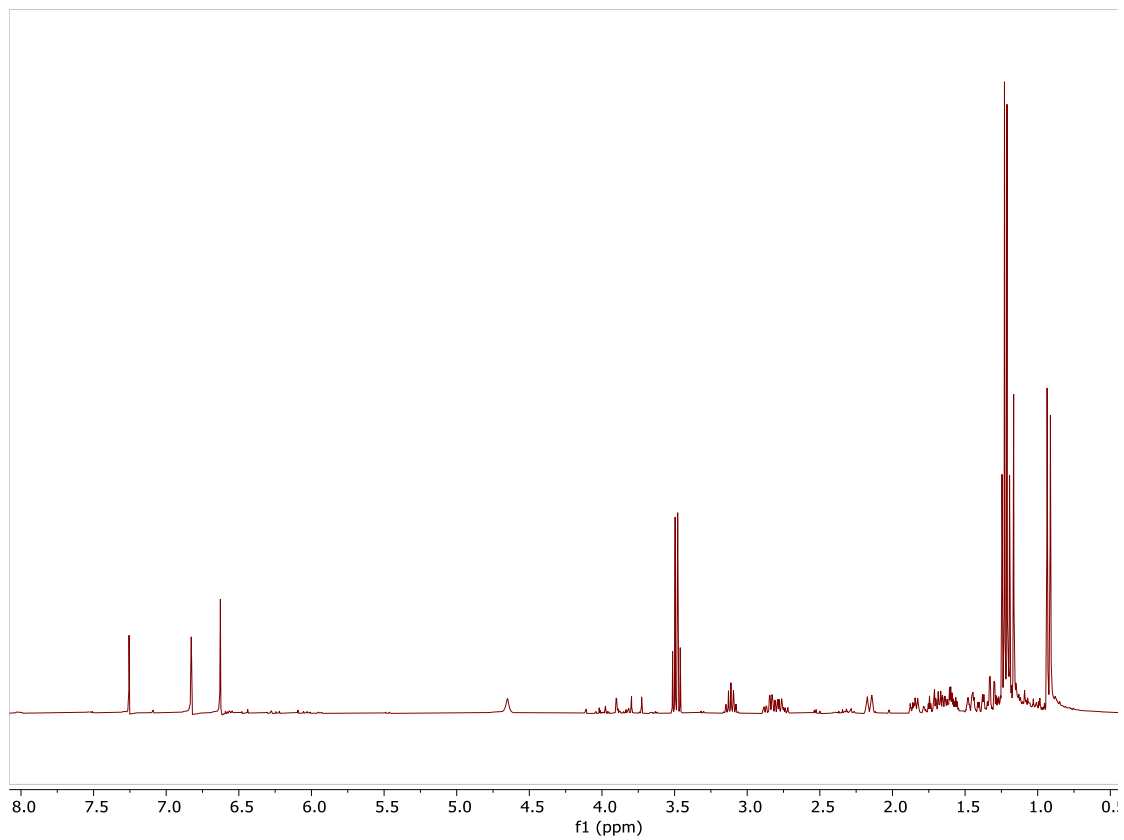
Annexe 03: Spectres RMN (^1H , ^{13}C , DEPT, HSQC, HMBC) du composé ID.

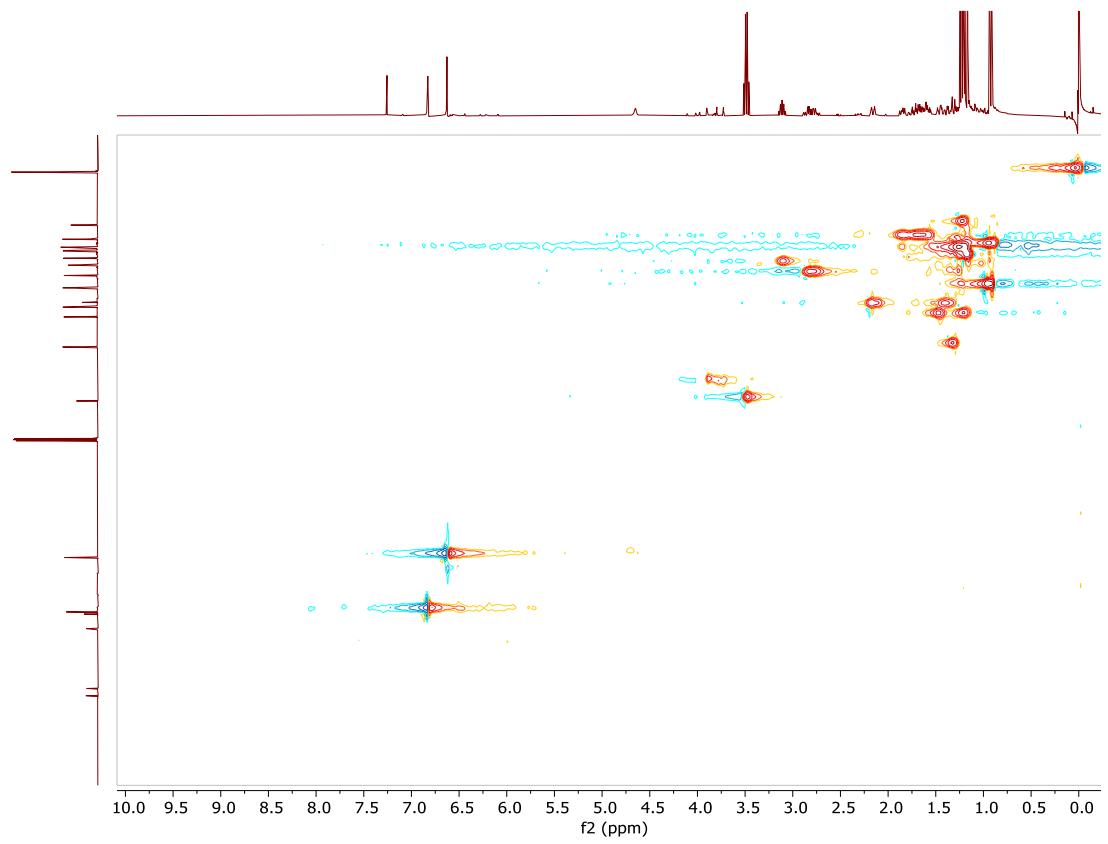
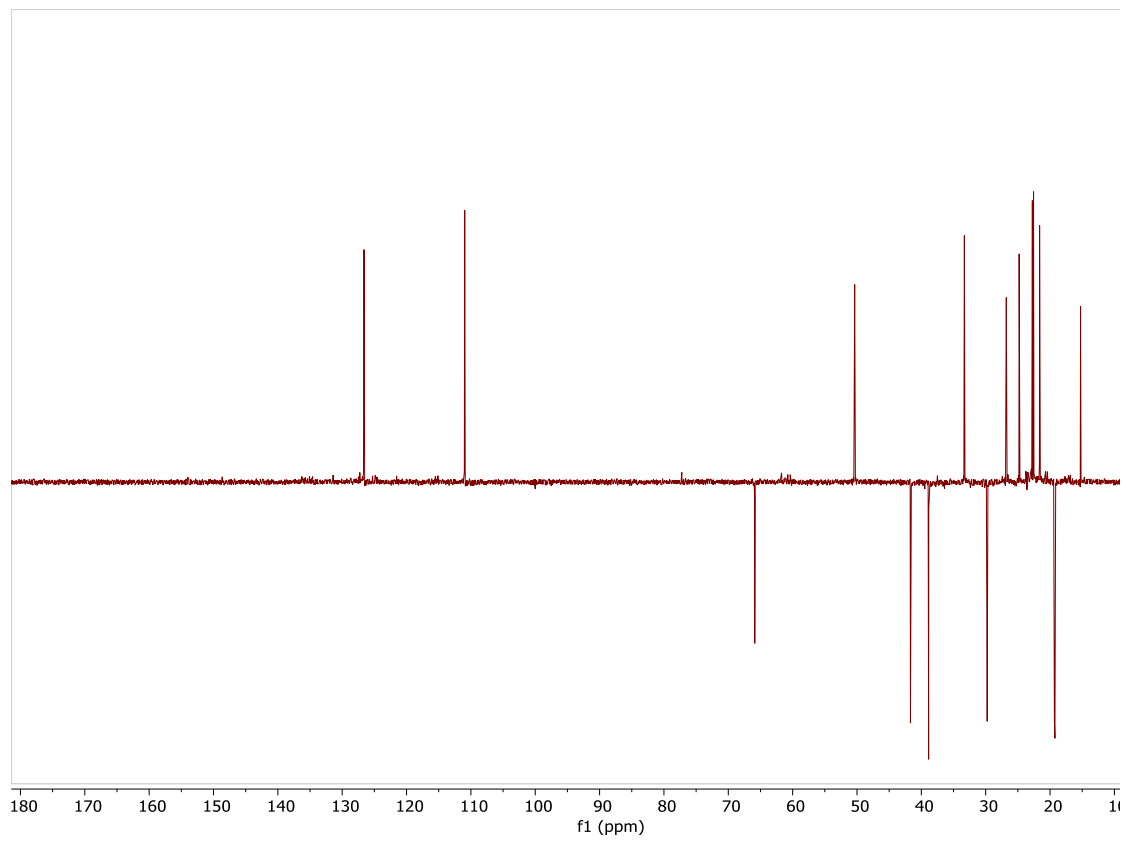


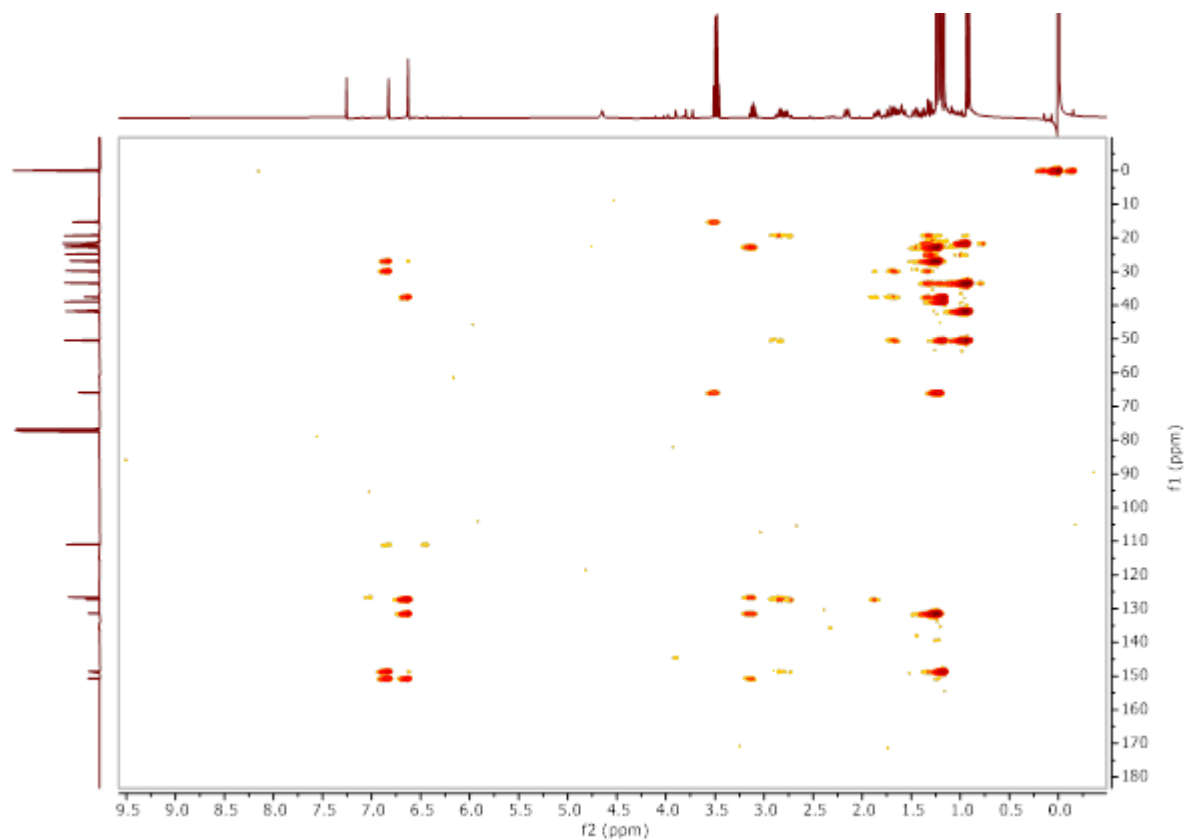




Annexe 04: Spectres RMN (¹H, ¹³C, DEPT, HSQC, HMBC) du Ferruginol.







BIBLIOGRAPHIE

- [1] K. D. Bartle et P. Myers, « History of gas chromatography », *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 21, n° 9-10, p. 547-557, 2002.
- [2] M. J. Dumas, « Ueber die vegetabilischen Substanzen welche sich dem Kampfer nähern, und über einige ätherische Oele », *Annalen der Pharmacie*, vol. 6, n° 3, p. 245-258, 1833.
- [3] M. P. Berthelot, « Repertoire de Chimie Appliquée », p. 254, 1859.
- [4] K.-H. Kubeczka, « History and Sources of Essential Oil Research », *ESSENTIAL*, p. 34, 2020.
- [5] A. C. Figueiredo, J. G. Barroso, M. S. S. Pais, et J. J. C. Scheffer, « Composition of the Essential Oils from Leaves and Flowers of *Achillea millefolium* L. ssp. *millefolium* », *Flavour and Fragrance Journal*, vol. 7, n° 4, p. 219-222, 1992.
- [6] S. Shabnum et M. G. Wagay, « Essential oil composition of *Thymus vulgaris* L. and their uses », *Journal of Research & Development*, vol. 11, p. 83-94, 2011.
- [7] Conseil de l'Europe, *Pharmacopée européenne*. Maisonneuve S.A. Sainte Ruffine., 1996.
- [8] E. Bocchio, « Hydrodistillation des huiles essentielles: Théorie et applications », *Parfums, cosmétiques, arômes*, n° 63, p. 61-62, 1985.
- [9] D. Joulain, « Modern methodologies applied to the analysis of essential oil and other complex natural mixture: use and abuse », *Perfumer & Flavorist*, vol. 19, p. 5-17, 1994.
- [10] P. J. Marriott, R. Shellie, et C. Cornwell, « Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils », *Journal of Chromatography A*, vol. 936, n° 1-2, p. 1-22, 2001.
- [11] J. Tranchant, « Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse » (4ème édition). Ed. Masson, p. 699, 1995.
- [12] F. McLafferty et J. A. Michnowicz, « State-of-the-art GC/MS », *Chemtech, American Chemical Society*, vol. 22, n° 3, p. 182-189, 1992.
- [13] P. Longevialle et F. W. McLafferty, « Principes de la spectrométrie de masse des substances organiques ». Ed. Masson, 1981.
- [14] E. Constantin et A. Schnell, « Spectrométrie de masse: principes et applications ». Technique et documentation-Lavoisier., 1996.
- [15] Y. Masada, « Analysis of essential oils by gas chromatography and mass spectrometry », p. 24, 1976.
- [16] W. M. Coleman, B. M. Gordon, et B. M. Lawrence, « Examinations of the matrix isolation fourier transform infrared spectra of organic compounds: part XII », *Applied spectroscopy*, vol. 43, n° 2, p. 298-304, 1989.
- [17] K. H. Kubeczka, W. Schultze, V. Formáček, et W. Herres, « New developments in essential oils analysis by Fourier-Transform spectroscopy », *Developments in food science*, vol. 18, p. 931-950, 1988.
- [18] W. Schultze, G. Lange, et G. Schmaus, « Isobutane and ammonia chemical ionization mass spectrometry of sesquiterpene hydrocarbons », *Flavour and fragrance journal*, vol. 7, n° 2, p. 55-64, 1992.
- [19] D. Joulain et R. Laurent, « Two Closely Related Sesquiterpenols: 1-endo-bourbonanol and 1, 6-germacradien-5-o1 », *Journal of Essential Oil Research*, vol. 1, n° 6, p. 299-301, 1989.
- [20] E. De Hoffmann, J. Charette, et V. Stroobant, « Spectrométrie de Masse, (2 ème Ed). », *Dunod, Paris*, p. 339, 1999.

- [21] F. Darriet, J.-M. Desjobert, J. Costa, et A. Muselli, « Identification of chrysanthenyl esters from the essential oil of *Anthemis maritima* L. investigated by GC/RI, GC-MS (EI and CI) and ¹³C-NMR spectroscopy: chemical composition and variability », *Phytochemical analysis*, vol. 20, n° 4, p. 279-292, 2009.
- [22] V. Formacek et K.-H. Kubeczka, « Essential Oils Analysis by Capillary Gas Chromatography and Carbon-13 NMR Spectroscopy », *Journal of Natural Products*, vol. 47, n° 5, p. 912-912, 1982.
- [23] F. Tomi, P. Bradesi, A. Bighelli, et J. Casanova, « Computer-aided identification of individual components of essential oils using carbon-13 NMR spectroscopy », *Journal of Magnetic Resonance Analysis*, vol. 1, p. 25-34, 1995.
- [24] P. Bradesi, A. Bighelli, F. Tomi, et J. Casanova, « L'analyse des mélanges complexes par RMN du carbone-13. Part 1 », *Canadian Journal of Applied Spectroscopy*, vol. 41, p. 15-24, 1996.
- [25] P. Bradesi, A. Bighelli, F. Tomi, et J. Casanova, « L'analyse des mélanges complexes par RMN du Carbone-13-Partie 2 », *Canadian Journal of Applied Spectroscopy*, vol. 41, n° 2, p. 41, 1996.
- [26] J. Walter et S. Takayuki, « Qualitative Analysis of Flavour and Fragrance Volatiles by Glass Capillary Gas Chromatography ». Academic Press: New York, 1980.
- [27] F. W. McLafferty et D. B. Stauffer, « Wiley Registry of Mass Spectral Data, Mass Spectrometry Library Search System Bench-Top/PBM, Version 3.10 d », *Palisade, Newfield*, 1994.
- [28] F. W. McLafferty et D. B. Stauffer, « The Wiley/NBS registry of mass spectral data », vol. 1. Wiley New York, 1989.
- [29] K. W. A. Joulain D., « The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons », *Journal of Natural Products.*, vol. 62, n° 8, p. 1212-1213, août 1999.
- [30] « National Institute of Standards and Technology, PC Version 1.7 of The NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, The Perkin Elmer Corporation, 1999. »
- [31] R. P. Adams, « Identification of essential oil components by gas chromatography, quadrupole mass spectroscopy », 2001.
- [32] W. A. König, D. H. Hochmuth, et D. Joulain, « Terpenoids and related constituents of essential oils, library of massfinder 2.1 », *University of Hamburg, Institute of Organic Chemistry: Hamburg*, 2001.
- [33] R. G. Brereton, « *Chemometrics: data analysis for the laboratory and chemical plant* ». John Wiley & Sons, 2003.
- [34] E. Cicchetti, P. Merle, et A. Chaintreau, « Quantitation in gas chromatography: usual practices and performances of a response factor database », *Flavour and Fragrance Journal*, vol. 23, n° 6, p. 450-459, 2008.
- [35] F. Meratate *et al.*, « Chemical Composition of The Essential Oil of *Carduncellus Helenioides* (Desf.) Hanelt from Algeria », *Oriental Journal of Chemistry*, vol. 32, n° 3, p. 1305-1312, juin 2016.
- [36] F. M. Vázquez, « The genus *Scolymus* Tourn. ex L. (*Asteraceae*): taxonomy and distribution », *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, vol. 58, n° 1, p. 83-100, juin 2000.
- [37] M.-J. Sanz, M.-C. Terencio, S. Mañez, J.-L. Rios, et C. Soriano, « A New Quercetin-Acylglucuronide from *Scolymus hispanicus* », *Journal of Natural Products.*, vol. 56, n° 11, p. 1995-1998, nov. 1993.

- [38] S. Polo, J. Tardío, A. Vélez-del-Burgo, M. Molina, et M. Pardo-de-Santayana, « Knowledge, use and ecology of golden thistle (*Scolymus hispanicus* L.) in Central Spain », *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, vol. 5, n° 1, p. 42, 2009.
- [39] I. Marmouzi *et al.*, « Phytochemical and pharmacological variability in Golden Thistle functional parts: comparative study of roots, stems, leaves and flowers », *Natural product research*, vol. 31, n° 22, p. 2669-2674, 2017.
- [40] N. Kirimer, Z. Tunalier, K. H. Can Başer, et I. Cingi, « Antispasmodic and spasmogenic effects of *Scolymus hispanicus* and taraxasteryl acetate on isolated ileum preparation », *Planta Medica*, vol. 63, n° 6, p. 556-558, déc. 1997.
- [41] U. Gerhard, S. Thomas, et R. Mortishire-Smith, « Accelerated metabolite identification by “Extraction-NMR” », *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, vol. 32, n° 3, p. 531-538, 2003.
- [42] L. H. Alwahibi, W. M. Abdel-Mageed, M. S. A. Abdelkader, O. A. Basudan, A. A. El-Gamal, et K. Bolla, « Sesquiterpene Lactones and Flavonoids from *Artemisia sieberi* », *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Research*, vol. 8, n° 4, p. 6, 2016.
- [43] P. Naegeli et G. Weber, « The total synthesis of racemic davanone », *Tetrahedron Letters*, vol. 11, n° 12, p. 959-962, janv. 1970.
- [44] G. Sipma et B. van der Wal, « The structure of davanone a new sesquiterpene from davana: (*Artemisia pallens*, Wall.) », *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, vol. 87, n° 6, p. 715-720, 1968.
- [45] A. F. Thomas, W. Thommen, B. Willhalm, E. W. Hagaman, et E. Wenkert, « Terpenoids Derived from Linalyl Oxide. Part 1. The stereochemistry of the davanones », *Helvetica Chimica Acta*, vol. 57, n° 7, p. 2055-2061, 1974.
- [46] D. Lamparsky et I. Klimes, « Natural flavouring materials-Davana oil. Some analytical results with respect to biogenetically plausible structural features », *Topics in Flavour Research*, p. 281-304, 1985.
- [47] A. Rustaiyan, S. Masoudi, et M. Kazemi, « Volatile Oils Constituents from Different Parts of *Artemisia ciniformis* Krasch. et M. Pop. ex Poljak and *Artemisia incana* (L.) Druce. from Iran », *Journal of Essential Oil Research*, vol. 19, n° 6, p. 548-551, nov. 2007.
- [48] A. Rustaiyan, M. Tabatabaei-Anaraki, M. Kazemi, S. Masoudi, et P. Makipour, « Chemical Composition of Essential Oil of Three *Artemisia* Species Growing Wild in Iran: *Artemisia kermanensis* Podl., *A. kopetdaghensis* Krasch., M. Pop et Lincz. ex Poljak., and *A. haussknechtii* Boiss. », *Journal of Essential Oil Research*, vol. 21, n° 5, p. 410-413, sept. 2009.
- [49] M. Ramezani, J. Behravan, et A. Yazdinezhad, « Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Volatile Oil of *Artemisia khorassanica*. from Iran », *Pharmaceutical Biology*, vol. 42, n° 8, p. 599-602, janv. 2005.
- [50] G. S. E. Baroty, H. M. Goda, et E. A. Khalifa, « Antimicrobial and antioxidant activities of leaves and flowers essential oils of Egyptian *Lantana camara* L. », *Der Pharma Chemica*, p. 10, 2014.
- [51] A. K. Saikia et R. K. Sahoo, « Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Lantana camara* L. », *Middle-East Journal of Scientific Research*, vol. 8, n° 3, p. 599-602, 2011.
- [52] K. K. Wan, C. D. Evans-Klock, B. C. Fielder, et D. A. Vosburg, « Synthesis of cis- and trans-Davanoids: Artemone, Hydroxydavanone, Isodavanone, and Nordavanone », *Synthesis*, vol. 45, p. 1541-1545, 2013.

- [53] A. J. Birch, J. E. T. Corrie, et R. G. Subba, « A non-stereospecific synthesis of (±)-davanone », *Australian Journal of Chemistry.*, vol. 23, n° 9, p. 1811-1817, 1970.
- [54] G. Ohloff et W. Giersch, « Zur Stereochemie des (+)-Davanons », *Helvetica Chimica Acta*, vol. 53, n° 4, p. 841-843, 1970.
- [55] R. Belabbes *et al.*, « Chemical Variability, Antioxidant and Antifungal Activities of Essential Oils and Hydrosol Extract of *Calendula arvensis* L. from Western Algeria », *Chemistry & Biodiversity*, vol. 14, n° 5, p. e1600482, 2017.
- [56] T. Garnatje, S. Garcia, R. Vilatersana, et J. Valles, « Genome Size Variation in the Genus *Carthamus* (*Asteraceae*, *Cardueae*): systematic implications and additive changes during allopolyploidization », *Annals of Botany*, vol. 97, n° 3, p. 461-467, mars 2006.
- [57] R. Vilatersana, A. Susanna, N. Garcia-Jacas, et T. Garnatje, « Generic delimitation and phylogeny of the *Carduncellus*-*Carthamus* complex (*Asteraceae*) based on ITS sequences », *Plant Systematics and Evolution*, vol. 221, n° 1-2, p. 89-105, 2000.
- [58] A. A. Turgumbayeva *et al.*, « Volatile oil composition of *Carthamus Tinctorius* L. flowers grown in Kazakhstan », *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, vol. 25, p. 87-89, 2018.
- [59] M. M. Shabana, M. M. El-Sherei, M. Y. Moussa, A. A. Sleem, et H. M. Abdallah, « Investigation of Phenolic Constituents of *Carduncellus eriocephalus* Boiss. var. *albiflora* Gauba and their Biological Activities », *Natural Product Communications*, vol. 2, n° 8, p. 1934578X0700200, août 2007.
- [60] R. Vilatersana, A. Susanna, N. Garcia-Jacas, et T. Garnatje, « Karyology, generic delineation and dysploidy in the genera *Carduncellus*, *Carthamus* and *Phonus* (*Asteraceae*) », *Botanical Journal of the Linnean Society*, vol. 134, n° 3, p. 425-438, nov. 2000.
- [61] R. L. Desfontaines, H. J. Redouté, et P. J. Redouté, « Flora atlantica :sive historia plantarum quae in Atlante, agro tunetano et algeriensi crescunt ». *Panckouckes*, vol. 2, 1798.
- [62] A. Cheriti, A. Rouissat, K. Sekkoum, et G. Balansard, « Plantes de la pharmacopée traditionnelle dans la région d'El-Bayadh (Algérie) », *Fitoterapia (Milano)*, vol. 66, n° 6, p. 525-538, 1995.
- [63] P. Ziarati, J. Asgarpanah, et M. Kianifard, « The essential oil composition of *Carthamus tinctorius* L. flowers growing in Iran », *African Journal of Biotechnology*, vol. 11, n° 65, p. 12921, 2012.
- [64] M. M. Shabana, M. M. El-Sherei, M. Y. Moussa, A. A. Sleem, et H. M. Abdallah, « Flavonoid Constituents of *Carduncellus Mareoticus* (Del.) Hanelt and their Biological Activities », *Natural Product Communications*, vol. 3, n° 5, p. 1934578X0800300, mai 2008.
- [65] Binder, R. G., Benson, M., Haddon, W. F., & French, R. C. « Aplotaxene derivatives from *Cirsium arvense* », *Phytochemistry*, vol. 31, n° 3, p. 1033-1034, mars 1992.
- [66] L. P. Christensen, « Aplotaxene derivatives from *Cirsium helenioides* », *Phytochemistry*, vol. 31, n° 6, p. 2039-2041, juin 1992.
- [67] J. Nazaruk, E. Karna, et D. Kalemba, « The chemical composition of the essential oils of *Cirsium palustre* and *C. rivulare* and their antiproliferative effect », *Natural product communications*, vol. 7, n° 2, p. 1934578X1200700242, 2012.

- [68] M. Miyazawa, C. Yamafuji, et Y. Ishikawa, « Volatile Components of *Cirsium japonicum* DC. », *Journal of Essential Oil Research*, vol. 17, n° 1, p. 12-16, janv. 2005.
- [69] S. Takano et S. Kawaminami, « Cyperenyl acetate and cyperenal from *Cirsium dipsacolepis* », *Phytochemistry*, vol. 27, n° 4, p. 1197-1199, 1988.
- [70] J. Havlik *et al.*, « Norsesquiterpene hydrocarbon, chemical composition and antimicrobial activity of *Rhaponticum carthamoides* root essential oil », *Phytochemistry*, vol. 70, n° 3, p. 414-418, févr. 2009.
- [71] Y. R. Naves, « Studies on volatile vegetable matter; presence of a mixture of ionones and dihydro-ionones (iso-irone from Haarmann and Reimer) in the essential oil of costus root », *Helvetica Chimica Acta*, vol. 32, n° 3, p. 1064-1069, 1949.
- [72] M. M. Bokadia, A. J. Macleod, S. C. Mehta, B. K. Mehta, et H. Patel, « The essential oil of *inula racemosa* », *Phytochemistry*, vol. 25, n° 12, p. 2887-2888, janv. 1986.
- [73] J. Cossy et P. Aclinou, « Isolation and Total synthesis of the major constituent of the roots of *centaurea incana*: aplotaxene », *Tetrahedron letters*, vol. 31, n° 52, p. 7615-7618, 1990.
- [74] N. Quintana, E. G. El Kassis, F. R. Stermitz, et J. M. Vivanco, « Phytotoxic compounds from roots of *Centaurea diffusa* Lam. », *Plant signaling & behavior*, vol. 4, n° 1, p. 9-14, 2009.
- [75] V. Tesevic, D. Djokovic, V. Vajs, et P. Marin, « Constituents of the roots of plant species *Centaurea scabiosa* », *Journal-Serbian Chemical Society*, vol. 59, p. 979-979, 1994.
- [76] J. Casey et P. Aclfnou, « Isolation and total synthesis of the major constituent of the roots of *centauria incana*: Aplotaxene », *Tetrahedron letters*, vol. 31, p. 7615-7618, 1990.
- [77] R. G. Kelsey, « The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons », *Journal of natural products*, vol. 62, n° 8, p. 1212-1213, août 1999.
- [78] P. C. Standley et L. O. Williams, « *Flora of Guatemala* ». *Chicago Field Museum of Natural History*, p. 1-304, 1975.
- [79] P. (Pierre) Quézel et S. Santa, « Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales », 1962.
- [80] J. R. Edmondson, R. R. Mill, et K. Tan, « *Flora of Turkey and the East Aegean Islands* ». Edinburgh University Press, vol. 7, 1982.
- [81] P. Hamlyn, « The Marshall Cavendish, Encyclopedia of Gardening », *Garrod and Lofthouse International, London*, vol. 19, p. 2034, 1969.
- [82] G. Topçu, « Bioactive Triterpenoids from *Salvia* Species ¹ », *Journal of natural products*, vol. 69, n° 3, p. 482-487, mars 2006.
- [83] Y. Benabdesslem, K. Hachem, K. Kahloula, et M. Slimani, « Ethnobotanical Survey, Preliminary Physico-Chemical and Phytochemical Screening of *Salvia argentea* (L.) Used by Herbalists of the Saïda Province in Algeria », *Plants*, vol. 6, n° 4, p. 59, déc. 2017.
- [84] P. Baran, C. Özdemir, et K. Aktaş, « The Morphological and Anatomical Properties of *Salvia argentea* L. (*Lamiaceae*) in Turkey », *Research journal of agriculture and biological sciences*, vol. 4, no 6, p. 725-733, 2008.
- [85] J. B. Walker, K. J. Sytsma, J. Treutlein, et M. Wink, « *Salvia* (*Lamiaceae*) is not monophyletic: implications for the systematics, radiation, and ecological specializations of *Salvia* and tribe *Mentheae* », *American Journal of Botany*, vol. 91, n° 7, p. 1115-1125, 2004.

- [86] B. Clebsch et B. Clebsch, « *new book of salvias* ». Timber Press, 2003.
- [87] N. J. Jacquin et F. Von, « *Plantarum rariorum horti caesarei Schoenbrunnensis descriptiones et icones* », 1797.
- [88] J. Tardío, H. Pascual, et R. Morales, « *Wild Food Plants Traditionally Used in the Province of Madrid, Central Spain* », *Economic Botany*, vol. 59, n° 2, p. 122-136, 2005.
- [89] M. B. T. Rayouf, K. Msaada, K. Hosni, et B. Marzouk, « *Essential Oil Constituents of *Salvia argentea* L. from Tunisia: Phenological Variations* », *medicinal and aromatic plant science and biotechnology*, vol. 7, no 1, p. 40-44, 2013.
- [90] B. Demirci, F. Demirci, A. A. Dönmez, G. Franz, D. H. Paper, et K. Hüsnü Can Başer, « *Effects of *Salvia*. Essential Oils on the Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay* », *Pharmaceutical Biology*, vol. 43, n° 8, p. 666-671, janv. 2005.
- [91] A. Pieroni, C. L. Quave, et R. F. Santoro, « *Folk pharmaceutical knowledge in the territory of the Dolomiti Lucane, inland southern Italy* », *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 95, n° 2, p. 373-384, déc. 2004.
- [92] Ł. Kuźma, M. Rózalski, E. Walencka, B. Rózalska, et H. Wysokińska, « *Antimicrobial activity of diterpenoids from hairy roots of *Salvia sclarea* L.: salvipisone as a potential anti-biofilm agent active against antibiotic resistant Staphylococci* », *Phytomedicine*, vol. 14, n° 1, p. 31-35, janv. 2007.
- [93] K. Hachem, Y. Benabdesslem, D. E. H. Adli, A. Chikhi, et K. Kahloula, « *A review on the phytochemical composition and the traditional medicinal uses of *Salvia argentea* (Lamiaceae)* », *Systematic Reviews in Pharmacy*, vol. 11, n° 7, p. 113-118, 2020.
- [94] D. T. Velickovic, M. S. Ristic, N. P. Milosavljevic, D. N. Davidovic, et S. Z. Bogdanovic, « *Chemical composition of the essential oil of *Salvia argentea* L.* », *Agro Food Industry Hi Tech*, vol. 25, p. 6, 2014.
- [95] M. Couladis, O. Tzakou, D. Stojanovic, N. Mimica-Dukic, et R. Jancic, « *The essential oil composition of *Salvia argentea* L.* », *Flavour and fragrance journal*, vol. 16, n° 3, p. 227-229, mai 2001.
- [96] M. B. Farhat, A. Landoulsi, R. Chaouch-Hamada, J. A. Sotomayor, et M. J. Jordán, « *Profiling of essential oils and polyphenolics of *Salvia argentea* and evaluation of its by-products antioxidant activity* », *Industrial Crops and Products*, vol. 47, p. 106-112, mai 2013.
- [97] A. Michavila, M. C. De La Torre, et B. Rodríguez, « *20-Nor-abietane and rearranged abietane diterpenoids from the root of *Salvia argentea** », *Phytochemistry*, vol. 25, n° 8, p. 1935-1937, juill. 1986.
- [98] M.-H. Yang, G. Blunden, Y.-X. Xu, G. Nagy, et I. Máthé, « *Diterpenoids from *Salvia* Species* », *Pharmacy and Pharmacology Communications*, vol. 2, n° 1, p. 69-71, 1996.
- [99] M. J. Sexmero Cuadrado, M. C. De la Torre, L. Z. Lin, G. A. Cordell, B. Rodriguez, et A. Perales, « *Cyclization reactions of the o-naphthoquinone diterpene aethiopinone. A revision of the structure of prionitin.* », *The Journal of Organic Chemistry*, vol. 57, n° 17, p. 4722-4728, août 1992.
- [100] M. T. Boya et S. Valverde, « *An orthoquinone isolated from *Salvia aethiopsis** », *Phytochemistry*, vol. 20, n° 6, p. 1367-1368, janv. 1981.
- [101] L.-Z. Lin, G. Blaskó, et G. A. Cordell, « *Diterpenes of *Salvia prionitis** », *Phytochemistry*, vol. 28, n° 1, p. 177-181, 1989.

- [102] B. Rodríguez, F. Fernández-Gadea, et G. Savona, « A rearranged abietane diterpenoid from the root of *Salvia aethiopis* », *Phytochemistry*, vol. 23, n° 8, p. 1805-1806, janv. 1984.
- [103] G. Topcu, C. Eriş, et A. Ulubelen, « Rearranged abietane diterpenes from *Salvia limbata* », *Phytochemistry*, vol. 41, n° 4, p. 1143-1147, 1996.
- [104] J. R. Soare, T. C. P. Dinis, A. P. Cunha, et L. Almeida, « Antioxidant Activities of Some Extracts of *Thymus zygis* », *Free Radical Research*, vol. 26, n° 5, p. 469-478, janv. 1997.
- [105] S. R. Maxwell, « Prospects for the use of antioxidant therapies », *Drugs*, vol. 49, n° 3, p. 345-361, 1995.
- [106] Rania B., « Recherche de nouveaux principes actifs présents dans cinq plantes de la famille des asteraceae », 2018.
- [107] H. L. Chen, L. Kw, G. Kh, W. Jp, W. Sj, et L. Cn, « New diterpenoids and cytotoxic and anti-inflammatory diterpenoids from *Amentotaxus formosana*. », *Fitoterapia*, vol. 82, n° 2, p. 219-224, nov. 2010.
- [108] R. Benrezzouk, M. C. Terencio, M. L. Ferrandiz, M. Hernandez-Perez, R. Rabanal, et M. J. Alcaraz, « Inhibition of 5-lipoxygenase activity by the natural anti-inflammatory compound aethiopinone », *Inflammation Research*, vol. 50, n° 2, p. 96-101, mars 2001.
- [109] G. Lenaz, R. Fato, A. Baracca, et M. L. Genova, « Mitochondrial Quinone Reductases: Complex I », *Methods in Enzymology*, vol. 382, p. 3-20, 2004.
- [110] J. M. C. Gutteridge et B. Halliwell, « Free Radicals and Antioxidants in the Year 2000: A Historical Look to the Future », *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 899, n° 1, p. 136-147, janv. 2006.
- [111] A. S. de Oliveira *et al.*, « Antioxidant and Antifungal Activity of Naphthoquinones Dimeric Derived from Lawsone », *Journal of Biosciences and Medicines*, vol. 05, n° 02, p. 39-48, 2017.
- [112] P. López, C. Sánchez, R. Batlle, et C. Nerín, « Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains », *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 53, n° 17, p. 6939-6946, août 2005.
- [113] R. S. Pereira, T. C. Sumita, M. R. Furlan, A. O. C. Jorge, et M. Ueno, « Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária », *Revista de Saúde Pública*, vol. 38, n° 2, p. 326-328, avr. 2004.
- [114] S. Hemaiswarya, A. K. Kruthiventi, et M. Doble, « Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases », *Phytomedicine*, vol. 15, n° 8, p. 639-652, août 2008.
- [115] M. A. Fischbach et C. T. Walsh, « Antibiotics for emerging pathogens », *Science*, vol. 325, n° 5944, p. 1089-1093, août 2009.
- [116] O. O. Okoh, A. P. Sadimenko, et A. J. Afolayan, « Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods », *Food Chemistry*, vol. 120, n° 1, p. 308-312, mai 2010.
- [117] M. Lis-Balchin et S. G. Deans, « Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes* », *Journal of applied microbiology*, vol. 82, n° 6, p. 759-762, 1997.
- [118] V. Vajs, A. Trifunovi, P. Jana, S. Milosavljevi, et V. Te, « Antifungal activity of davanone-type sesquiterpenes from *Artemisia lobelii* var. *conescens* », *Journal of the Serbian Chemical Society*, p. 969-972, 2004.

- [119] E. Schmidt *et al.*, « Antimicrobial Activities of single aroma compounds », *Natural Product Communications*, vol. 5, n° 9, p. 1934578X1000500, sept. 2010.
- [120] S. Chouhan, K. Sharma, et S. Guleria, « Antimicrobial activity of some essential oils—present status and future perspectives », *Medicines (Basel)*, vol. 4, n° 3, p. 58, août 2017.
- [121] L. Hosseinzadeh, Y. Shokoohinia, M. Arab, E. Allahyari, et M. Mojarrab, « Cytotoxic and apoptogenic sesquiterpenoids from the petroleum ether extract of *Artemisia aucheri* aerial parts », *Iranian journal of pharmaceutical research*, p. 9, 2019.
- [122] B.-R. Na *et al.*, « Aplotaxene blocks T cell activation by modulation of protein kinase C- θ -dependent pathway », *Food and Chemical Toxicology*, vol. 62, p. 23-31, déc. 2013.
- [123] R. C. Cambie, R. E. Cox, et D. Sidwell, « Phenolic diterpenoids of podocarpus ferrugineus and other podocarps », *Phytochemistry*, vol. 23, n° 2, p. 333-336, janv. 1984.
- [124] A. Ulubelen et G. Topcu, « Abietane diterpenoids from *Salvia microstegia* », *Phytochemistry*, vol. 30, n° 6, p. 2085-2086, janv. 1991.
- [125] M. Ono, M. Yamamoto, C. Masuoka, Y. Ito, M. Yamashita, et T. Nohara, « Diterpenes from the Fruits of *Vitex rotundifolia* », *Journal of natural products*, vol. 62, n° 11, p. 1532-1537, nov. 1999.
- [126] G. Schmeda-Hirschmann, J. Rodriguez, et L. Astudillo, « Gastroprotective activity of the diterpene solidagenone and its derivatives on experimentally induced gastric lesions in mice », *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 81, n° 1, p. 111-115, 2002.
- [127] B. Sepúlveda, L. Astudillo, J. A. Rodríguez, T. Yáñez, C. Theoduloz, et G. Schmeda-Hirschmann, « Gastroprotective and cytotoxic effect of dehydroabietic acid derivatives », *Pharmacological research*, vol. 52, n° 5, p. 429-437, 2005.
- [128] J. A. Rodríguez, C. Theoduloz, T. Yáñez, J. Becerra, et G. Schmeda-Hirschmann, « Gastroprotective and ulcer healing effect of ferruginol in mice and rats: Assessment of its mechanism of action using in vitro models », *Life Sciences*, vol. 78, n° 21, p. 2503-2509, avr. 2006.
- [129] J. Becerra *et al.*, « Antifungal and antibacterial activity of diterpenes isolated from wood extractables of chilean *podocarpaceae* », *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*, vol. 47, n° 2, p. 151-157, juin 2002.
- [130] J. K. S.-K. J. Evans, « La lutte biologique contre la végétation concurrente en forêt: cas particulier de *Rubus fruticosus* en Australie », *Revue forestiere francaise*, vol. 6, p. 585-592, 2002.
- [131] A. Ulubelen *et al.*, « Cardioactive Diterpenes from the roots of *Salvia eriophora* », *Planta Medica*, vol. 68, n° 9, p. 818-821, sept. 2002.
- [132] A. Koch, J. Orjala, P. C. Mutiso, et D. D. Soejarto, « An antimalarial abietane diterpene from *Fuerstia africana* T.C.E. Fries », *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 34, n° 3, p. 270-272, mars 2006.
- [133] M. Hernández-Pérez, R. M. Rabanal, A. Arias, M. C. de La Torre, et B. Rodríguez, « Aethiopinone, an antibacterial and cytotoxic agent from *Salvia aethiopsis* roots », *Pharmaceutical Biology*, vol. 37, n° 1, p. 17-21, janv. 1999.
- [134] M. Hernández-Pérez, R. Rabanal, M. C. de la Torre, et B. Rodríguez, « Analgesic, Anti-Inflammatory, Antipyretic and Haematological Effects of Aethiopinone, an *o*-Naphthoquinone Diterpenoid from *Salvia aethiopsis* Roots and two Hemisynthetic Derivatives », *Planta medica*, vol. 61, n° 06, p. 505-509, déc. 1995.

- [135] E. Walencka, S. Rozalska, H. Wysokinska, M. Rozalski, L. Kuzma, et B. Rozalska, « Salvipisone and aethiopinone from *Salvia sclarea* hairy roots modulate staphylococcal antibiotic resistance and express anti-biofilm activity », *Planta medica*, vol. 73, n° 6, p. 545-551, juin 2007.
- [136] S. Chakraborty et T. Rahman, « The difficulties in cancer treatment », *ecancermedicalsience*, vol. 6, p. 16, 2012.
- [137] M. Mehrabi, R. Khodarahmi, et M. Shahlaei, « Critical effects on binding of epidermal growth factor produced by amino acid substitutions », *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, vol. 35, n° 5, p. 1085-1101, 2017.
- [138] M. Fouzia et B. Salim, « Virtual screening of natural and synthetic inhibitors of cyclooxygenase COX-2 enzyme using docking-scoring functions », *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, vol. 9, n° 01, p. 020-027, 2019.
- [139] G. A. Petersson, A. Bennett, T. G. Tensfeldt, M. A. Al-Laham, W. A. Shirley, et J. Mantzaris, « A complete basis set model chemistry. I. The total energies of closed-shell atoms and hydrides of the first-row elements », *The Journal of chemical physics*, vol. 89, n° 4, p. 2193-2218, août 1988.
- [140] J. Drach *et al.*, « Involvement of P-glycoprotein in the transmembrane transport of interleukin-2 (IL-2), IL-4, and interferon-gamma in normal human T lymphocytes », *Blood*, vol. 88, n° 5, p. 1747-1754, sept. 1996.
- [141] S. Neidle, « DNA minor-groove recognition by small molecules », *Natural product reports*, vol. 18, n° 3, p. 291-309, janv. 2001.
- [142] P. Carmeliet, « VEGF as a Key Mediator of Angiogenesis in Cancer », *Oncology*, vol. 69, n° Suppl. 3, p. 4-10, 2005.
- [143] K. K. Jain, « Blood–brain barrier », *MedLink Neurology*, 2012.
- [144] M. Saljooghianpour et T. A. Javaran, « Identification of phytochemical components of aloe plantlets by gas chromatography-mass spectrometry », *African Journal of Biotechnology*, vol. 12, n° 49, p. 6876-6880, 2013.
- [145] L. Ravi et K. Krishnan, « Research Article Cytotoxic Potential of N-hexadecanoic Acid Extracted from *Kigelia pinnata* Leaves », *Asian Journal of Cell Biologie.*, vol. 12, p. 20-27, 2017.
- [146] A. Medbouhi *et al.*, « Chemical Composition and Biological Investigations of *Eryngium triquetrum* Essential Oil from Algeria », *Chemistry & biodiversity*, vol. 15, n° 1, p. e1700343, janv. 2018.
- [147] A. Bouzabata, F. Boussaha, J. Casanova, et F. Tomi, « Composition and chemical variability of leaf oil of *Myrtus Communis* from North-Eastern Algeria », *Natural Product Communications*, vol. 5, n° 10, p. 1659-1662, oct. 2010.
- [148] R. B. Ammar *et al.*, « Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae): A structure-activity relationship study », *Food Chemistry*, vol. 116, n° 1, p. 258-264, sept. 2009.
- [149] Y.-W. Choi, K. D. Hyde, et W. H. Ho, « Single spore isolation of fungi », *Fungal diversity*, p. 29-38, 1999.
- [150] E. Noman, A. Al-Gheethi, N. K. Rahman, B. Talip, R. Mohamed, et O. A. Kadir, « Single spore isolation as a simple and efficient technique to obtain fungal pure culture », *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, vol. 140, p. 012055, avr. 2018.
- [151] H. Senouci, N. G. Benyelles, M. E. A. Dib, J. Costa, et A. Muselli, « Essential Oil of *Ammoides verticillata* as Biocides for the Control of Fungal Infections and

- Devastating Pest (*Bactrocera oleae*) of olive tree », *Recent patents on food, nutrition & agriculture*, vol. 10, p. 182-188, juin 2019.
- [152] J. Tian, X. Ban, H. Zeng, J. He, B. Huang, et Y. Wang, « Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cicuta virosa* L. var. *latisecta* Celak », *International Journal of Food Microbiology*, vol. 145, n° 2-3, p. 464-470, févr. 2011.
- [153] P. Singh, B. Srivastava, A. Kumar, R. Kumar, N. K. Dubey, et R. Gupta, « Assessment of *Pelargonium graveolens* oil as plant-based antimicrobial and aflatoxin suppressor in food preservation », *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 88, n° 14, p. 2421-2425, nov. 2008.
- [154] F. Hadacek et H. Greger, « Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice », *Phytochemical analysis*, p. 11, 2000.