

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITÉ SAAD DAHLAB DE BLIDA



Faculté des Sciences

Département de Chimie

Mémoire Présenté par

Asmaa BOUFRIDI

En vue d'obtenir le diplôme de Master

Domaine	Science de la matière
Filière	Chimie
Option	Chimie des substances naturelles

Titre

**Étude chimique de l'huile essentielle d'*Ajuga iva*
Détermination de l'activité antioxydante et tests d'activités
biologiques**

Soutenue le 08 juin 2011, devant le jury composé de :

Y. DAGHBOUCHE	Pr	Président	Université de Blida
A. BADIS	MCA	Examineur	Université de Blida
M. BRADA	MCA	Examineur	C/U Khemis-Miliana
M. EL HATTAB	MCA	Promoteur	Université de Blida

MA-540-19-1

Remerciement et dédicace

« Hamdoulah ya Rabi, wa laka alf hamd wa chokr » Puisse Allah le tout puissant m'éclairer de sa lumière divine pour la suite.

Avant tous, j'exprime toute ma reconnaissance à Monsieur EL-HATTAB Mohamed, mon promoteur, pour son encadrement et pour m'avoir fait confiance. Votre souci du travail bien fait m'a beaucoup éclairé dans la réalisation de ce mémoire. J'ai beaucoup apprécié de travailler à vos côtés, pour votre dynamisme, votre franchise, votre rigueur, votre soutien et disponibilité au quotidien et toutes les conversations échangées. Merci de m'avoir tant appris sur le monde des produits naturels.

Je voudrais remercier Madame DAGHBOUCHE d'avoir présidé ce jury et d'avoir participé à la discussion en apportant des remarques et des points de vue très intéressants.

Monsieur BRADA, docteur au centre universitaire de Khemis-meliana, a accepté d'examiner ce travail. Je suis très touché de sa participation et lui prie de recevoir le témoignage de ma respectueuse considération.

Je tiens à remercier Monsieur BADIS d'avoir accepté de juger ce travail en tant qu'examineur. Je le remercie également pour la discussion scientifique qui a eu lieu lors de la soutenance.

J'ai eu la chance et le bonheur d'effectuer les tests d'activité microbiologique au « Laboratoire de recherche sur les Produits Bioactifs et la Valorisation de la Biomasse (LPBVB) » de l'école nationale supérieure dirigé par le professeur Nasreddine SABAOU. Je remercie Omrane d'avoir accepté de travailler avec moi et de m'avoir fait bénéficier de ses compétences, de sa passion, et de ses qualités humaines.

J'exprime mes vifs remerciements à tous mes enseignants (en particulier Mr. Ait Yahiya).

Papa et Mama, votre soutien sur tous les plans ne m'a jamais fait défaut. Vous avez su m'inculquer les règles de bonnes conduites. Je ne saurai jamais vous remercier assez. Je prie le tout puissant de vous donner une longue vie et m'aider à être toujours votre fierté. Trouvez à ce modeste travail un début de récompense de vos sacrifices.

Je remercie ma sœur Aicha et mon frère Zakaria pour leur soutien (surtout les prières de Zakaria). Je vous dédie ce travail et j'espère que vous allez suivre les pas de votre grande sœur! Honorez-moi.

Je remercie également toute ma famille sans exception (mes tantes, mes oncles, mes cousins et mes cousines), Grand-mère, ça y est j'ai fini avec les études ! Enfin presque...

Très cher **Mokrane**, tu m'as accompagné durant mes cinq années universitaires, je ne saurai te remercier pour avoir été (et tu l'es toujours) une précieuse source de réconfort et d'encouragement, j'ai pu compter, je compte et compterai toujours sur toi. Merci pour ton écoute, ton soutien et d'avoir toujours eu les mots justes pour me rassurer. Merci pour ton humour et ta gaieté, tu as toujours su dessiner le sourire sur mon visage. Je te dédie ce modeste travail.

Moumouh (un frère et un excellent ami, tu as toujours trouvé un créneau disponible pour moi, merci beaucoup pour tes conseils)

Mohamed Amine BOUKRID (l'boukri, mon petit fréro, merci pour tous, tu m'as considéré comme ta sœur, je suis honorée)

Tahar (tu es chic et tu le resteras, je te remercie pour les moments passés ensemble)

Un Grand MERCI à tous mes collègues de laboratoire, pour tous les bons moments passés à vos côtés : djaouida (joujou, bon courage pour la suite, et plein de bonheur avec Mohamed), Zahida (toujours de bonne humeur, bonne continuation), Amira (Princesse, merci pour tes conseils, bon courage), Hanane (toujours pétillante, bonne chance pour la suite!!!!) merci beaucoup les filles pour tous les fous rires partagés, votre bonne humeur, ainsi que les sorties entre copines, je vous souhaite tout le bonheur du monde!

Les seuls Boys du laboratoire, je vous remercie énormément : Boubkeur (la zen attitude, ta gentillesse et ta bonne humeur vont nous manquer, bon courage et bonne continuation), Réda (Binôme, tant de bons moments passés ensemble, bonne chance et bon courage pour la Chine !! 谢谢)

Sans oublier les filles de l'infrarouge : Sara L (manger trop fait grossir !!!), Sara K (la gentillesse en elle-même), Nassima, Ibtisem, Leila, je vous remercie pour vos encouragements et pour les bons moments passés avec vous.

Je remercie pour cela tous mes anciens et actuels collègues du Département de Chimie, ainsi que Nacer pour la Chendgoura.

Mes sentiments de reconnaissances et mes remerciements vont également à l'encontre de toute personne qui m'a encouragé et qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

Résumé :

Ce travail porte sur l'étude de la composition chimique de l'huile essentielle de *Ajuga iva* ainsi que la détermination de son activité antioxydante et antimicrobienne. L'analyse de l'huile essentielle d'*Ajuga iva* a été effectuée par CG/SM. La composition chimique est dominée par des composés oxygénés (88,46%) avec le « 2-méthoxy-4-vinylphénol » et le composé « 4-méthyle-3-penten-2-one » comme produits majoritaires.

L'activité antioxydante de l'huile essentielle d'*Ajuga iva* a été déterminée par la méthode au DPPH. Les résultats ont montré que l'huile essentielle d'*Ajuga iva* présente un fort pouvoir antioxydant dû notamment à la présence de composés phénoliques.

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle a été évaluée sur quatre souches bactériennes (deux souches Gram – et deux souches Gram +), deux levures et deux champignons à l'aide de la méthode de diffusion des disques. Les tests d'activité ont montré que l'huile essentielle est dotée de propriétés antibactériennes et antifongiques.

Mots clés : Huile essentielle, *Ajuga iva*, 2-méthoxy-4-vinylphénol, activité antioxydante, activité antimicrobienne.

Summary:

This work concerns the study of the chemical composition of the essential oil of *Ajuga iva* and the determination of its antimicrobial and antioxidant activities. Analysis of the essential oil of *Ajuga iva* was carried out by GC / MS. The chemical composition is dominated by oxygenated compounds (88.46%) with the "2-methoxy-4-vinylphenol" and compound "4-methyl-3-penten-2-one" as the major product. The antioxidant activity of the essential oil of *Ajuga iva* was determined by the DPPH method. The results showed that the essential oil of *Ajuga iva* has strong antioxidant properties due mainly to the presence of phenolic compounds.

The antimicrobial activity of oil essentially communication was evaluated on four bacterial strains (two strains Gram - and Gram + two strains), two yeasts and two fungi using the disk diffusion method. The activity tests have shown the essential oil has antibacterial and antifungal properties.

Keywords: Essential oil, *Ajuga iva*, 2-methoxy-4-vinylphenol, antioxidant activity, antimicrobial activity.

ملخص

هذا العمل يركز على دراسة التركيبية الكيميائية للزيت الأساسي لأجوجا ايفا كما تم تقييم نشاط مضادات الأكسدة و مضادات الميكروبات. أجري تحليل التركيب الكيميائي للزيت الأساسي لأجوجا ايفا بواسطة اللوني للغاز إلى جانب قياس الطيف الكتلي. وقد هيمنت على هذا الزيت الأساسي المركبات الاوكسيجينية بنسبة (88.5 %) مع مركب الفينول " 2-ميثوكسي-4-فينيلفينول", ومركب " 4 - ميثيل- 3 - بنتان- 2 -أون" كغالبية المنتجات. تم تحديد نشاط مضادات الأكسدة لهذا الزيت الأساسي لأجوجا ايفا بواسطة أسلوب DPPH. وأظهرت النتائج أن الزيت الأساسي لأجوجا ايفا لديه خصائص مضادات الأكسدة قوية ويرجع ذلك أساسا إلى وجود مركبات الفينول. بخصوص نشاط مضادات الميكروبات لهذا الزيت الأساسي، والمقررة على أربع سلالات بكتيرية (سلالتين غرام - و سلالتين غرام +) ، اثنتين من الخمائر و اثنتين من الفطريات باستخدام طريقة نشر القرص. تبين أن الزيت الأساسي له خصائص مضادة للجراثيم والفطريات.

2.2 Propriétés organoleptiques	26
2.3 Propriétés physico-chimiques	26
3. Analyse de l'huile essentielle	26
3.1 Analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier	26
3.1.1 Principe	26
3.1.2 Condition opératoires et résultats	26
3.2 Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM)	28
3.2.1 Principe	28
3.2.2 Condition opératoires	29
3.2.3 Résultats et discussions	29
CHAPITRE III. ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE ET BIOLOGIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE <i>AJUGA IVA</i>	33
PARTIE 1 : ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE <i>AJUGA IVA</i>	33
III.1.1 Introduction	33
III.1.2 Estimation du pouvoir antioxydant par la méthode au DPPH	33
III.1.3 Préparation des solutions	34
III.1.4 Résultats et discussion	34
PARTIE 2 : ACTIVITÉS BIOLOGIQUES DE L'HUILE ESSENTIELLE DE <i>AJUGA IVA</i>	39
III.2.1 Introduction	39
III.2.2 Milieu de culture	40
III.2.3 Préparation des pré-cultures	40
III.2.4 mode opératoire	40
III.2.5 Résultats et discussions	42
Conclusion	47
Bibliographie	49
Annexes	58

Table des figures

Figure 1 : Planche représentant la plante entière de <i>Ajuga iva</i>	7
Figure 2 : Structure chimique d'un ecdysteroïde.....	10
Figure 3 : Voie de biosynthèse des ecdysteroïdes	11
Figure 4 : Quelques ecdysteroïdes isolés des espèces du genre <i>Ajuga</i>	11
Figure 5 : Structure chimique du withanolide	12
Figure 6 : Structure chimique du Bracteosin A et Bracteosin B	12
Figure 7 : Structure chimique d'un clerodane	13
Figure 8 : Voie de biosynthèse du noyau clerodane	14
Figure 9 : Structure chimique de Ajugarin I.....	15
Figure 10 : Structure chimique d'un Iridane	15
Figure 11 : Structure chimique de Ajugaside A	16
Figure 12 : Structure chimique d'un Anthocyane.....	17
Figure 13 : Structure chimique de la para-quinone.....	18
Figure 14 : Photo de <i>Ajuga iva</i>	22
Figure 15 : Montage de l'entraînement à la vapeur d'eau	24
Figure 16 : Séparation de l'huile essentielle	24
Figure 17 : Traitement du mélange hétéro-azéotropique eau-huile essentielle.....	25
Figure 18 : Spectres Infrarouge.....	27
Figure 19 : Illustration en secteurs de la composition chimique de l'huile essentielle	32
Figure 20 : Structure chimique des composés majoritaire	32
Figure 21 : Evolution de l'activité antioxydante en fonction de la concentration.....	36
Figure 22 : Variation du taux de piégeage du radical libre DPPH par l'huile essentielle	36
Figure 23 : Variation du taux de piégeage du radical libre DPPH par la vitamine C.....	37
Figure 24 : Comparaison du IC ₅₀ de quelques huiles essentielles	38
Figure 25 : Dépôt de l'huile essentielle sur les disques	42
Figure 26 : Chambre UV.....	42
Figure 27 : Stérilisation des disques imprégnés d'huile essentielle	42
Figure 28 : Milieu de travail stérile	42

Figure 29 : Aromatogramme de <i>Bacillus subtilis</i> avec l'huile essentielle d' <i>Ajuga iva</i>	43
Figure 30 : Aromatogramme de <i>Micrococcus luteus</i> avec l'huile essentielle d' <i>Ajuga iva</i>	43
Figure 31 : Aromatogramme de <i>Salmonella enterica</i> avec l'huile essentielle d' <i>Ajuga iva</i>	44
Figure 32 : Aromatogramme d' <i>Escherichia coli</i> avec l'huile essentielle d' <i>Ajuga iva</i>	44
Figure 33 : Aromatogramme de <i>Candida albicans</i> avec l'huile essentielle d' <i>Ajuga iva</i>	45
Figure 34 : Aromatogramme de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> avec l'huile essentielle d' <i>Ajuga iva</i>	45
Figure 35 : Aromatogramme de <i>Fusarium culmarum</i> avec l'huile essentielle d' <i>Ajuga iva</i>	46
Figure 36 : Aromatogramme de <i>Mucor ramaniannus</i> avec l'huile essentielle d' <i>Ajuga iva</i>	46

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Composition chimique de l'huile essentielle d' <i>Ajuga iva</i>	29
Tableau 2 : Variation du taux de piégeage en fonction de l'absorbance pour les différentes concentrations de l'huile essentielle	35
Tableau 3 : Variation du taux de piégeage en fonction de l'absorbance pour les différentes concentrations de la vitamine C	37
Tableau 4 : Valeurs des IC ₅₀ de certaines huiles essentielles	38
Tableau 5 : Références et pathologie des bactéries Gram (+) et Gram (-) utilisés	41
Tableau 6 : Références et pathologie des champignons et levures utilisés	41
Tableau 7 : Zone d'inhibition des bactéries obtenues avec l'huile essentielle d' <i>Ajuga iva</i>	43
Tableau 8 : Zone d'inhibition des champignons et levures obtenues avec l'huile essentielle d' <i>Ajuga iva</i>	45

Liste des Annexes

Annexe 1 : Ecdysteroides isolés des espèces du genre <i>Ajuga</i>	A-1
Annexe 2 : Withanolides isolés des espèces du genre <i>Ajuga</i>	A-5
Annexe 3 : Diterpènes neo-clerodane isolés des espèces du genre <i>Ajuga</i>	A-7
Annexe 4 : Iridoïdes isolés des espèces du genre <i>Ajuga</i>	A-12
Annexe 5 : Anthocyanines isolés des espèces du genre <i>Ajuga</i>	A-13
Annexe 6 : Dérivés de la quinone isolés des espèces du genre <i>Ajuga</i>	A-14
Annexe 7 : Phénéthyle alcool glucoside isolé des espèces du genre <i>Ajuga</i>	A-15
Annexe 8 : Carte du lieu de récolte de l'espèce <i>Ajuga iva</i>	A-16
Annexe 9 : Chromatogramme de l'huile essentielle d' <i>Ajuga iva</i>	A-17



Introduction

« Les plantes semblent avoir été semées avec profusion sur la terre, comme les étoiles dans le ciel, pour inviter l'homme par l'attrait du plaisir et de la curiosité à l'étude de la nature. »

Jean Jacques ROUSSEAU

La biodiversité naturelle de notre planète représente une source inépuisable pour l'industrie pharmaceutique, agroalimentaire et chimique, on compte actuellement, plus de 300 000 espèces végétales sur notre planète, et ce nombre ne cesse d'augmenter au fil du temps [1]. Depuis son apparition sur terre, l'homme a entretenu d'étroits rapports avec le monde végétal. Les plantes ont toujours fait partie de son alimentation puisqu'il ne lui est pas physiologiquement possible de se nourrir exclusivement de produits animaux. Mais en complément cette approche nutritionnelle fondamentale, l'être humain a certainement su très tôt utiliser sous divers formes des plantes spécifiques pour soigner la maladie [2] (qu'il s'agisse de maladies bénignes, rhume ou toux, ou plus sérieuses, telles que la tuberculose ou la malaria) [3]. La médecine par les plantes se développa au fil des siècles et des cultures. Hippocrate préconisait voici 2500 ans : « que ton aliment soit ton remède ». Les plus anciennes traces écrites remontent à la Chine, à l'Inde, à la Mésopotamie et à l'Égypte ancienne. Le papyrus Ebers, daté de quelques 1600 ans avant J.-C., outre les méthodes de diagnostic, présente environ 800 préparations à base de plantes et de minéraux [2].

En fait, Une plante médicinale est un végétal doué d'un effet thérapeutique sur l'organisme sans être toxique à dose normale. Nombre de plantes d'usage traditionnel n'ont pas encore fait l'objet de recherches scientifiques approfondies. Notre connaissance des véritables vertus des plantes reste donc très fragmentaire. Souvent la limite entre plante médicinale et toxique s'avère floue, car pour soigner, le végétal doit avoir un effet manifeste sur l'organisme - bénéfique à dose modéré mais potentiellement dangereux en cas d'abus. En outre, la médecine sait mettre à profit des plantes franchement dangereuses : ainsi, la digitale, à l'origine du plus célèbre médicament pour le cœur, peut s'avérer mortelle, même à faible dose. De ce fait, le terme général de plante médicinale recouvre donc un large éventail de végétaux allant de plantes parfaitement comestibles à de véritable tueuses dont il faut se méfier à tous prix. [2]. Environ 35 000 espèces de plantes médicinales sont connues ; dont les deux tiers proviennent de cueillette dans la nature. Plusieurs milliers sont actuellement menacées d'extinction, ce qui est le cas du *Harpagophytum*, car l'extraction de sa racine aux

vertus anti-inflammatoires, largement appréciée contre les rhumatismes, détruit la plante. En Namibie, des projets d'exploitation durable sont en cours, mais bien d'autres végétaux n'auront pas cette chance [2].

Un nombre croissant de remèdes végétaux est disponible sur le marché et ces derniers doivent être évalués. Par ailleurs, le développement sans précédent de l'automédication a entraîné quelques accidents avec des plantes apparemment aussi bénignes que le séneçon ou la germandrée, et d'autres, plus exotiques tels l'éphédre ou le kava-kava. En même temps que grandit l'intérêt populaire pour la médecine par les plantes, se développe dans les milieux scientifiques un curieux phénomène de suspicion envers les végétaux [2].

Il faut noter que l'action de la phytothérapie qui est une médecine symptomatique sur l'organisme dépend de la composition des plantes. Au fil des siècles, l'extraction et l'usage des principes odorants des plantes se sont développés, notamment par les civilisations arabe, qui leurs attribuent avant tout un usage religieux.

La notion de principe actif et le développement de la chimie organique qui permet de synthétiser dans de nombreux cas les substances considérées comme responsables de l'activité des végétaux bouleversera rapidement la médecine par les plantes. En effet, de nombreux composés volatils sont aujourd'hui des ingrédients courants des préparations pharmaceutiques, dans ce cadre les sesquiterpènes ont montré des activités pharmacologiques remarquables contre les maladies comme le cancer [3]. Les principes isolés présentaient l'avantage d'être facilement dosables, d'agir de façon énergétique et de pouvoir être produits en grande quantité. Ainsi se développa la puissante industrie pharmaceutique, tandis que les plantes médicinales jugées peu actives et peu fiables, étaient écartées de la thérapeutique en place. Il fallut cependant constater que les principes actifs isolés et les molécules de synthèse provoquaient des effets secondaires que n'avait habituellement pas le végétal utilisé dans son intégrité [2].

Ces dernières années, l'essor remarquable de la phytothérapie a provoqué une augmentation importante de la demande, près de 80 % des habitants de notre planète n'ont pas accès à la pharmacie « moderne ». Dans de nombreux pays, la majorité de la population, toujours croissante, a donc recours aux végétaux pour se soigner [2]. De plus, l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques (considérés comme la solution quasi universelle aux infections graves) décroît, les bactéries et les virus se sont peu à peu adaptés aux médicaments et leurs résistent de plus en plus [4].

Ces plantes médicinales constituent donc une source intéressante de nouveaux composés dans la recherche de molécules bioactives, qui sont d'une importance capitale pour le développement et la mise au point de médicaments essentiels.

Beaucoup d'espèces importantes du genre *Ajuga* sont utilisées en médecine populaire africaine et asiatique, elles ont fait l'objet de plusieurs études scientifiques. A notre connaissance, aucune étude ou peu d'études ont été réalisées sur les huiles essentielles de ce genre, c'est pourquoi nous nous sommes intéressés à l'étude chimique et l'activité biologique de l'huile essentielle de l'espèce *Ajuga iva*. Ce choix est basé sur divers critères, parmi eux, l'emploi de l'espèce végétale en médecine populaire (traditionnelle), et la diversité des composés chimiques qu'elle renferme.

Notre mémoire est réparti en trois chapitres :

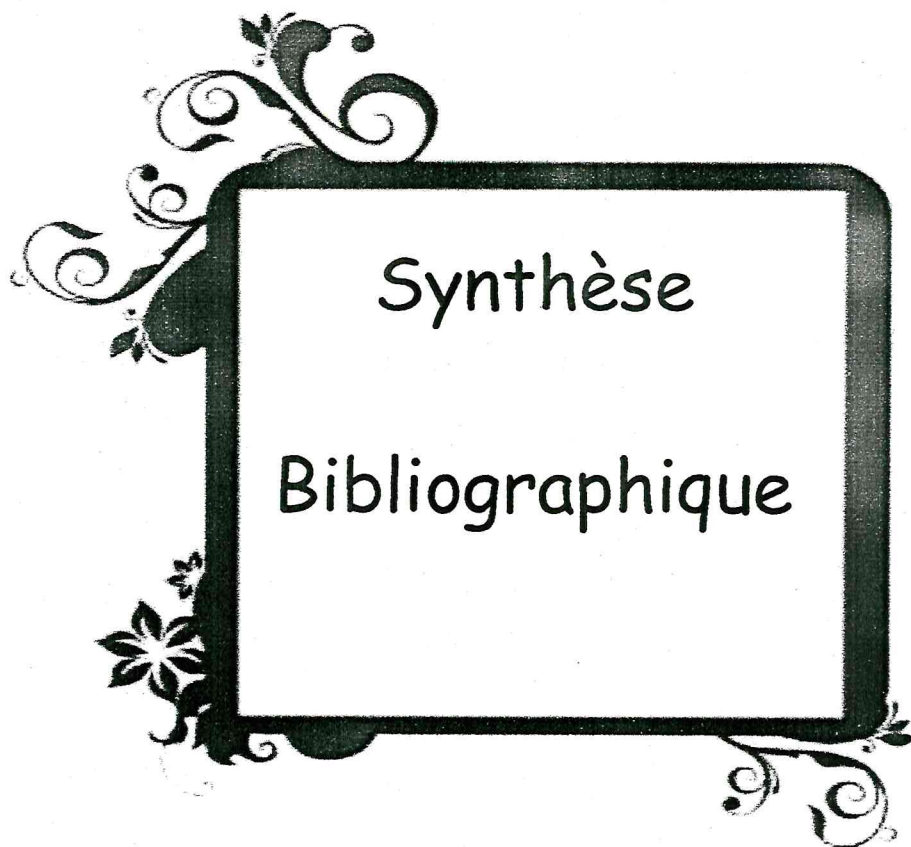
- Synthèse bibliographique.
- Étude chimique de l'huile essentielle d'*Ajuga iva* : extraction et analyse.
- Activités anti-oxydante et antimicrobiennes de l'huile essentielle d'*Ajuga iva*.

Ces plantes médicinales constituent donc une source intéressante de nouveaux composés dans la recherche de molécules bioactives, qui sont d'une importance capitale pour le développement et la mise au point de médicaments essentiels.

Beaucoup d'espèces importantes du genre *Ajuga* sont utilisées en médecine populaire africaine et asiatique, elles ont fait l'objet de plusieurs études scientifiques. A notre connaissance, aucune étude ou peu d'études ont été réalisées sur les huiles essentielles de ce genre, c'est pourquoi nous nous sommes intéressés à l'étude chimique et l'activité biologique de l'huile essentielle de l'espèce *Ajuga iva*. Ce choix est basé sur divers critères, parmi eux, l'emploi de l'espèce végétale en médecine populaire (traditionnelle), et la diversité des composés chimiques qu'elle renferme.

Notre mémoire est réparti en trois chapitres :

- Synthèse bibliographique.
- Étude chimique de l'huile essentielle d'*Ajuga iva* : extraction et analyse.
- Activités anti-oxydante et biologiques de l'huile essentielle d'*Ajuga iva*.



Synthèse

Bibliographique

1. Introduction

L'espèce *Ajuga iva* appartient à l'une des plus importantes familles du règne végétal : les Lamiacées, ces dernières appartiennent à l'ordre des Lamiales connus pour leur matière de réserve constituée d'oligosaccharides (au lieu d'amidon) [1]. Ce sont des plantes herbacées, des sous arbrisseaux [5], très rarement des arbres (*Hyptis*) [6], cosmopolites [1], mais avec une prépondérance des régions méditerranéennes et rares dans les régions arctiques et en haute montagne [7].

Cette famille compte plus de 7200 espèces à travers environ 240 genres qui sont classées en sept sous-familles: *Ajugoideae* Kostel, *Lamioideae* Harley, *Nepetoideae* (Dumort.) Luer., *Prostantheroideae* Luer., *Scutellarioideae* (Dumort.) Caruel., *Symphorematoideae* Briq. et *Viticoideae* Briq. [8]

Le clade des *Ajugoideae* regroupe les genres *Clerodendrum*, *Teucrium*, *Trichostema*, *Ajuga* et les genres apparentés [5].

En fait le mot *Ajuga* dérive du mot latin : *a* (privatif) et *jugum*, joug = corolle sans lèvre supérieure développée. En allemand : Günsel, en anglais : bugle, en italien : bugula.

Ce sont des plantes plus ou moins poilues, à fleurs bleues, bleuâtres, purpurines, rosées, jaunes, rarement blanches [9]. On a décrit environ 50 espèces de ce genre distribuées dans les deux régions tempérées des deux hémisphères [10].

2. Systématique et taxonomie de l'espèce *Ajuga iva*

2.1 Dénomination de l'espèce *Ajuga iva*

- Nom scientifique : *Ajuga iva*
- Synonyme : *Teucrium iva* L.
- Nom vernaculaire : en français : Bugle, Ivette-musquée, Ivette-de-Narbonne, Arthétique. En anglais : Musky-Bugle, Herb-Ivy, Herb-Ive. En italien : Iva, Iva moscata [9]
- Nom local arabe : Chendgoura [11].
- Nom local berbère : touf et-toulba [11]

2.2 Classification botanique de l'espèce *Ajuga iva*

Phylum : Plantae

Embranchement : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe: Euasterids

Ordre: Lamiales

Famille: Lamiaceae

Sous-famille : Ajugoideae

Genre : *Ajuga*

Espèce : *Ajuga iva*

3. Description de l'espèce *Ajuga iva* Schreb

C'est une petite plante, ordinairement velue-blanchâtre, souvent à odeur musquée, de 5 à 20 cm, elle croit dans les endroits arides, sur les vieux murs, les coteaux pierreux, au bord des champs dans la région méditerranéenne. Ses fleurs purpurines s'épanouissent depuis le mois de mai jusqu'au mois d'octobre. Les feuilles, qui sont de 5 à 10 fois plus longues que larges, n'ont pas de pétiole, et sont entières ou avec quelques dents vers le haut (très rarement profondément divisées), plus au moins velues. C'est une plante vivace, à tiges étalées, rameuses, ligneuses vers leur base, à rameaux couchés et redressés. La plante se perpétue par des bourgeons qui naissent à la base des tiges ligneuses. Quelquefois, la corolle et les étamines ne se développent pas et cependant ces fleurs produisent des fruits à graines bien conformées, donc leurs stigmates ont été pollinisés par le pollen d'autres fleurs [9] (Figure 1).

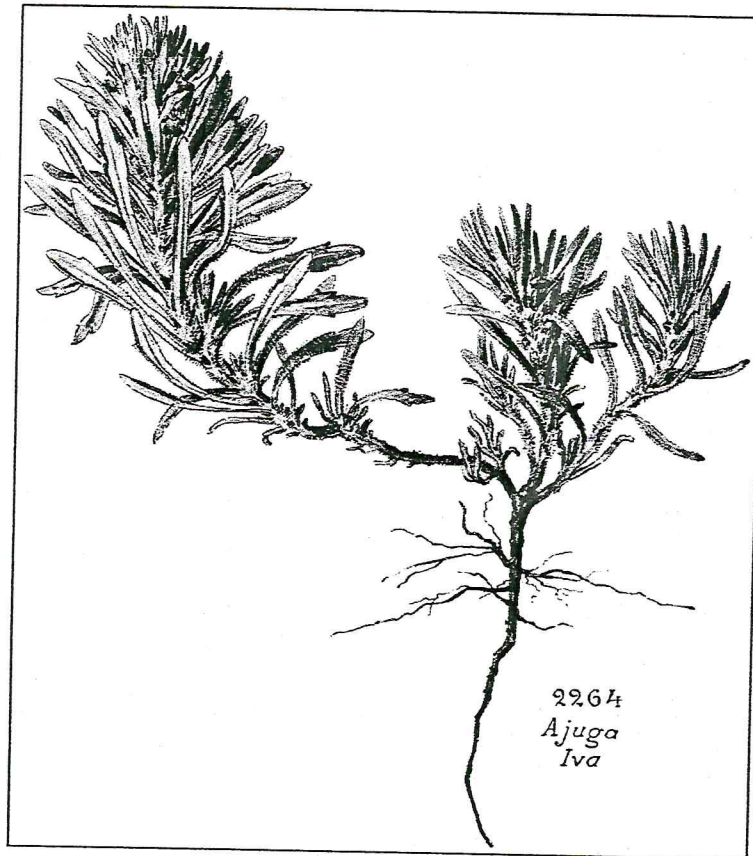


Figure 1 : Planche représentant de la plante entière de *Ajuga iva*

4. Distribution de l'espèce *Ajuga iva*

D'après un itinéraire d'un voyage botanique en Algérie, exécuté en 1856 dans le sud des provinces d'Oran et d'Alger, Ernest Cosson a cité *Ajuga iva* parmi la liste de plantes observées aux environs de Djelfa et dans les montagnes voisines [12].

Quelques années plus tard, Bénédicte Pierre Georges Hochreutener a cité *Ajuga iva* comme circumméditerranéen dans son livre [13].

En fait cette plante ne s'élève pas à une grande altitude sur les montagnes, elle est trouvée en région méditerranéenne [9], au Sud de l'Europe [11], en Afrique du nord, et aux Iles Canaries [9].

5. Propriétés pharmacologiques et biologiques des espèces du genre *Ajuga*

Le genre *Ajuga* a montré un large spectre des activités biologique et pharmacologique, il présente des activités antifongique [14,15], antibactérienne [14, 16], antimicrobienne [14,15], antihypertenseur [14], anti-plasmodial [14], hypoglycémique [14, 15] et anti-appétissant pour les larves et les insectes [14, 16].

Il est utilisé en médecine populaire comme agents diurétique [14,17], anti-tumorale [15,16], comme remède contre la fièvre [14, 17-19], contre les maux de dents et contre la dysenterie et l'hypertension [14, 17, 19], contre la diarrhée [16, 18, 20], la fièvre rhumatismale [16, 20], les piqures d'insectes [18, 20], ainsi que les maladies de la vessie [18, 20], on note aussi son emploi dans le traitement de l'asthme, et la malaria [16], ainsi que d'autres utilisations.

Beaucoup d'études sur les espèces du genre *Ajuga* ont montré la présence de composés actifs tels que les stéroïdes glucosidiques qui sont anti-leucémiques, des ecdystéroïdes qui présentent un effet hypoglycémique, et les diterpènes néo-clerodanes qui sont antibactériens [14].

En ce qui concerne la *Ajuga iva*, elle est utilisée en médecine traditionnelle algérienne pour le traitement du diabète, et est connue à avoir des activités anti-inflammatoire, antifongique, antimicrobienne et anthelminthique [21], elle est utilisée au Sahara dans du miel ou de l'eau contre la fièvre [22]. Son domaine d'utilisation s'élargit jusqu'au Maroc où elle est utilisée comme anthelminthique contre les désordres intestinaux, et présente un effet hypoglycémique et des effets vasodilatateurs [17].

6. Étude chimique des espèces du genre *Ajuga*

Le genre *Ajuga* a fait l'objet de nombreuses études chimiques, nous reprenons à la suite les principaux travaux réalisés sur les extraits, les décoctés ainsi que les huiles essentielles obtenues à partir des espèces du genre *Ajuga*.

6.1 Techniques utilisées dans la préparation d'extraits et huile essentielle du genre *Ajuga*

Les extraits lipidiques ont été préparé par solvant, environ 80% de ces extractions ont été effectuées avec le méthanol [10, 15, 20, 23-37] ou l'éthanol [18, 38-40] à température ambiante, nous avons constaté toutefois que certaines extractions ont été réalisées avec des solvants organiques peu polaires comme l'acétone [41- 44], le dichlorométhane [45], ou par un mélange de solvant tel que l'éther de pétrole- diéthyl éther- méthanol [46].

Des techniques d'extraction plus élaborées ont été également utilisées dans la préparation d'extraits à partir du genre *Ajuga*, dans ce cadre nous citons l'extraction assistée aux ultrasons avec comme solvant le dichlorométhane [47].

Contrairement aux extraits lipidiques qui ont fait l'objet de beaucoup de travaux, nous avons noté la rareté de travaux expérimentaux sur les huiles essentielles des espèces

appartenant à ce genre. L'huile essentielle de *Ajuga orientalis* obtenue par hydro-distillation utilisant un appareil de type Clevenger a fait l'objet d'une étude chimique et elle a montré comme produit majoritaire : germacrene-D (24.2%), β -cubebene (18.3%), β -caryophyllene (16.9%) and α -cubebene (5.3%). [48].

Certains travaux ont utilisé la décoction comme méthode d'extraction [14, 17, 21, 49-52], cette méthode consiste à placer la plante dans de l'eau froide et de porter l'ensemble à ébullition.

6.2 Métabolites secondaires isolés des espèces du genre *Ajuga*

Les études effectuées sur les espèces du genre *Ajuga* ont permis d'isoler plusieurs composés, on distingue en particulier des diterpènes neo-clerodane [25, 49], des ecdystéroïdes [25], des iridoïdes glucosilés [25, 49] et des withanolides [49]. Les trois premières classes sont potentiellement bioactives, elles ont montré une activité chemo-préventive contre le cancer [10].

6.2.1 Les stéroïdes

Les stéroïdes contiennent ou sont dérivées du système cyclique perhydro-1,2-cyclopentenophenanthrene et se retrouvent dans une variété de différentes sources marines, terrestres et synthétiques [53]. En première approximation, on peut estimer qu'il n'y a pas de différence fondamentale entre les triterpènes et les stéroïdes, ces derniers pouvant être regardé comme des triterpènes tétracycliques qui ont perdu, au minimum, trois méthyles et par ce fait ne constituent pas un assemblage d'unités isopréniques. En fait, on doit prendre en compte la biosynthèse pour séparer les deux groupes [53].

Le passage d'un squelette en C30 à un squelette en C27 ou moins, c'est-à-dire, aux stéroïdes, implique au minimum une déméthylation progressive en C4 et en C14. On note également une rupture du cyclopropane et un déplacement de la double liaison engendré par cette rupture [53].

Peu de stéroïdes végétaux, en dehors des sapogénines et des hétérosides cardiotoniques, ont un réel intérêt thérapeutique. Sur un plan strictement phytochimique, on peut mentionner l'existence des ecdystéroïdes [53].

6.2.1.1 Ecdystéroïdes

Les ecdystéroïdes sont une classe des stéroïdes biologiquement actifs [33]. Ces composés apparentés à l'ecdysone (=2 β ,3 β , 14 α , 22R,25-pentahydroxy-5 β -cholest-7-èn-6-one) sont

caractérisés par un enchainement 6-céto-7,8-déhydro et une polyhydroxylation [53] (Figure 2).

Du point de vue biosynthétique, les ecdystéroïdes dérivent du lanostérol via le cholestérol et l'ecdysone (Figure 3).

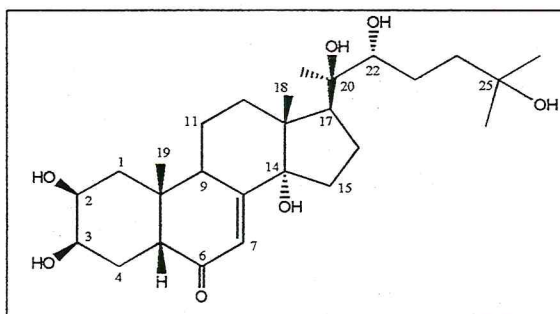


Figure 2 : Structure chimique d'un ecdystéroïde

Ils sont isolés de nombreuses espèces du règne animal qui appartiennent à l'embranchement Protomia, par exemple, les insectes, les vers et les arthropodes, ainsi qu'une variété différente d'espèces végétales [54].

Un ecdystéroïde exerce divers effets pharmacologiques parmi eux des effets bénéfiques pour les humains comme l'abaissement du taux de cholestérol et la glycémie pour les diabétiques [33].

Le squelette carboné des ecdystéroïdes ressemble à celui du cholestérol : quatre cycles caractéristiques A, B, C et D et une chaîne latérale en position C-17. La différence est que le noyau de la molécule ecdystéroïde comporte un chromophore 7-ène-6-one et un OH en position α sur le C-14 [53]. Notons que les ecdystéroïdes isolés à partir d'animaux sont considérés comme zooecdystéroïdes et ceux isolés de plantes sont appelés phytoecdystéroïdes [54].

De nombreuses et différentes variations peuvent être remarquées en ce qui concerne les phytoecdystéroïdes isolés du genre *Ajuga*, on distingue:

- La présence d'un hydroxyle en position β sur le C-2
- Rare présence d'un groupement hydroxyle sur le noyau stéroïde en C-5 et C-11, et d'un groupement OXO en C-1.
- Une conjugaison avec des sucres est fortement observée.
- Le nombre d'atome de carbone varie entre 29 et 41.
- Une variation dans la chaîne latérale (chaîne latérale linéaire ramifiée, présence d'un cycle tétrahydrofurane, chaîne latérale osidique, chaîne complexe ...)

Des exemples d'ecdystéroïdes isolés du genre *Ajuga* sont représentés sur la figure 4.

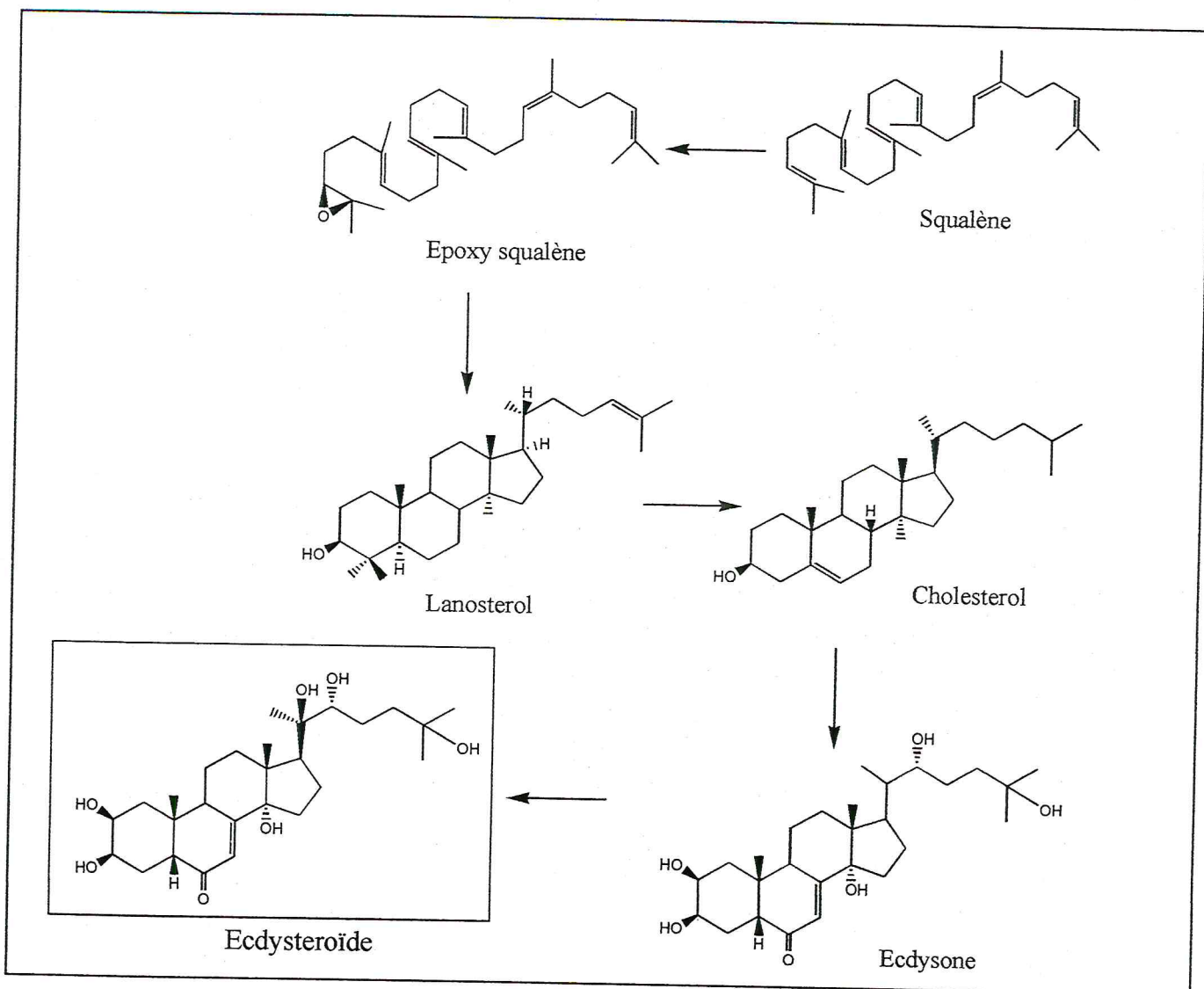


Figure 3 : Voie de biosynthèse des ecdystéroïdes

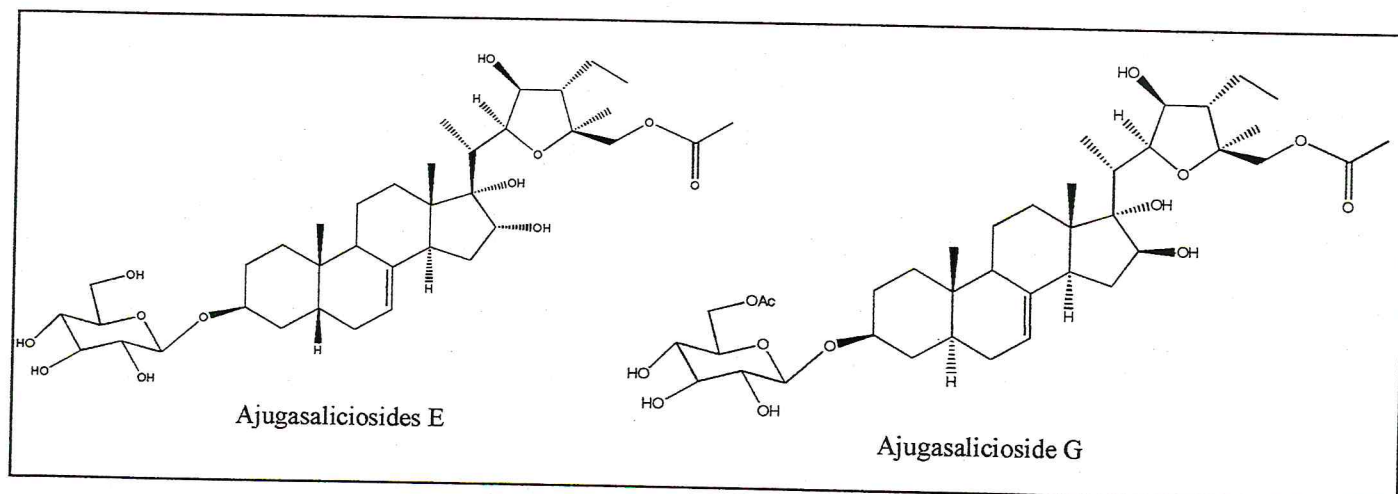


Figure 4 : Quelques ecdustéroïdes isolés des espèces du genre *Ajuga*

6.2.1.2 Les withanolides

Les withanolides sont des lactones stéroïdiens C-28 [54], ils sont considérés comme un monopole des plantes de la famille des *Solanaceae* [23]. Ils sont caractérisés par un squelette type ergostane, la chaîne du côté C17 se transforme en un cycle lactonique à six membres (Figure 5). Les withanolides et les ergostanes connexes sont les seuls stéroïdes naturels obtenus à partir d'une même famille et qui ont des représentants à la fois avec des orientations α - et β - de la chaîne C17 [54]. Il n'y a que quelques rapports sur leur isolement des organismes marins et des membres des *Taccaceae* et des *Leguminosae* [23].

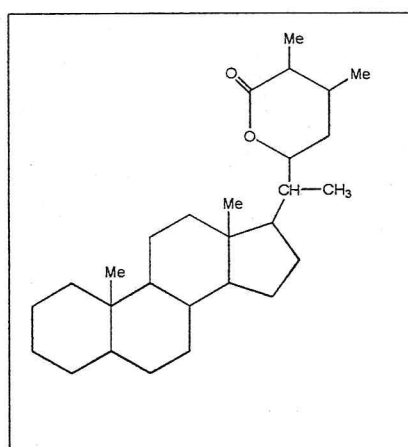


Figure 5 : Structure chimique du Withanolide

Deux composés withanolides « Bracteosin A, C » (figure 6) isolés à partir des espèces du genre *Ajuga* ont montré un bon « docking » vis-à-vis de l'inhibiteur cholinestérase [55].

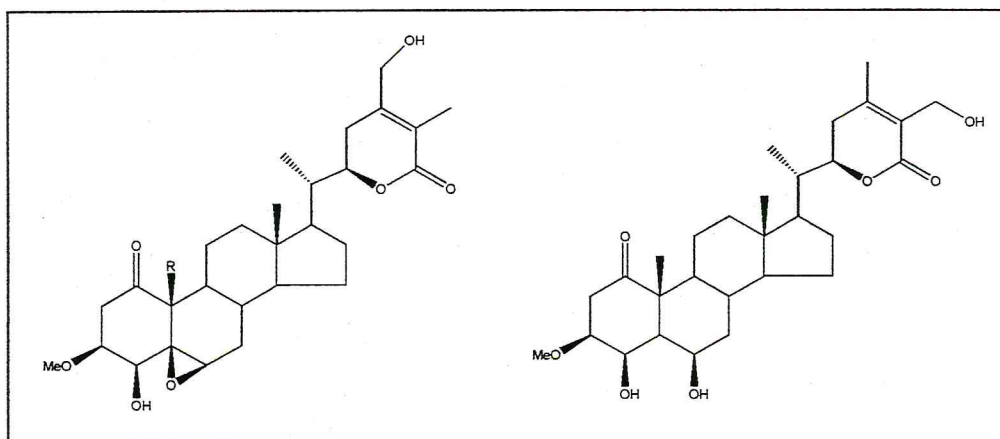


Figure 6 : Structure chimique du **Bracteosin A** (à gauche) et **Bracteosin B** (à droite)

6.2.2 Les terpènes

La chimie des terpènes a vu le jour grâce à Wallach, son travail sur l'essence de térébenthine marque le début de la chimie moderne des substances naturelles.

En 1887, il proposa pour la première fois, la notion de squelette isoprénique qui présente l'unité de base de toute structure terpénique : unité isoprénique (C₅) (2-méthyle-1,3-butadiène) par conséquent les terpénoïdes sont classés comme : mono – sesqui – di- ses- tri et tétra- terpénoïdes ayant respectivement : 2, 3, 4, 5, 6 et 8 résidu d'unité d'isoprène [56].

Les terpénoïdes sont la classe la plus répandue et la plus importante des métabolites secondaires isolés des organismes végétaux [56].

Dans la famille des *Lamiaceae* les terpénoïdes et spécialement les diterpénoïdes sont les plus dominants des métabolites secondaires, ces derniers sont isolés spécialement à partir des extraits de dichlorométhane ou d'acétone [44].

Les diterpènes dérivent de leur précurseur aliphatique qui est le géranyl-géraniol.

6.2.2.1 Diterpènes neo-clerodanes

Les diterpènes rencontrés dans ce genre sont principalement des diterpènes lactoniques de la série du neo-clerodane (Figure 7), leur identification s'est faite sur la base des méthodes d'analyses, principalement la RMN mono- et bidimensionnelle, ainsi que la spectrométrie de masse et l'infrarouge.

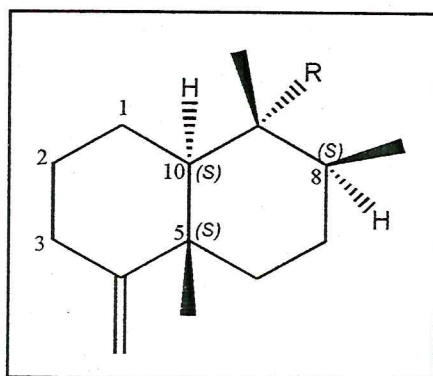


Figure 7 : Structure chimique d'un Clerodane

Les clérodanes appartiennent aux squelettes des diterpènes labdaniques (Figure 8)

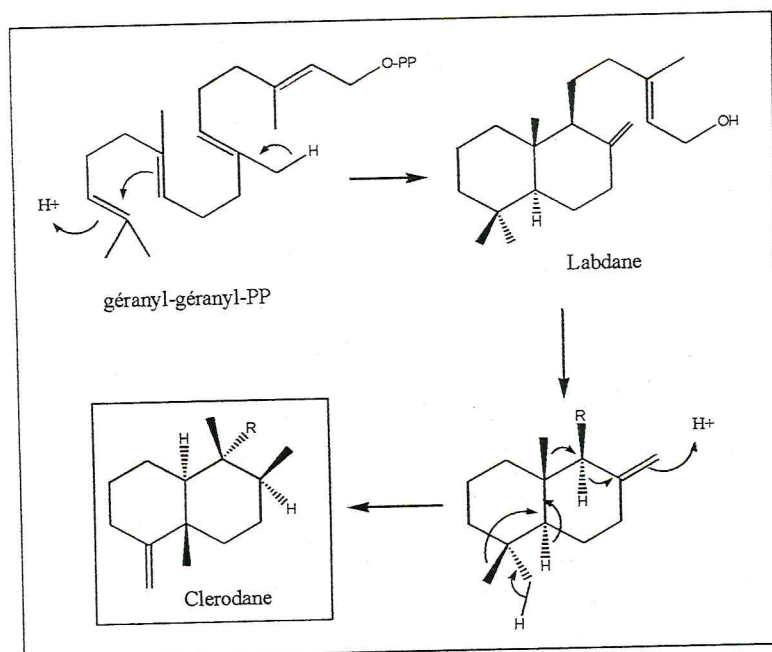


Figure 8 : Voie de biosynthèse du noyau clérodane

Beaucoup de ces composés possèdent un ester 2-méthylbutyrique sur le C-3, un hydroxyle sur le C-2 et un groupement $\text{CH}_2\text{-OAc}$ sur le C-5, la stéréochimie au niveau du H2, H3 et H5 a été déterminée par comparaison avec quelques diterpènes neo-clerodanes déjà isolés à partir des espèces d'*Ajuga* comme le Ajugapitin [57] et le 15-éthoxy-14-hydroajugapitin [58], et en tenant compte de la grande constante de couplage ($J=9.8\text{Hz}$) entre le H2 et le H3, de ce fait les groupements en C2 et C3 seront orientés respectivement en α et β [49].

La présence d'un cycle oxirane en (C-4)-(C-17) au lieu d'une double liaison en C-4 est très remarquée, elle a été élucidée par méthodes spectroscopiques [49].

Une étude par cristallographie des RX a confirmé que les deux cycles à six chaînons sont dans des conformations chaise. Ceci a été confirmé en prenant compte de leurs valeurs des angles de valences qui sont proche de ceux de la forme chaise du cyclohexane [86].

On note également une variation dans le radical R, la plus observée est la présence d'un cycle hexahydrofurofurane sur le carbone 9, sa présence était confirmée par RMN- H^1 [49], ce groupement cyclique présente des conformations enveloppe et plane [86].

Plus de 50 diterpènes neo-clerodane étaient identifiés dont **Ajugarin I** isolé des espèces *Ajuga reptans* et *Ajuga remota* (Figure 9)

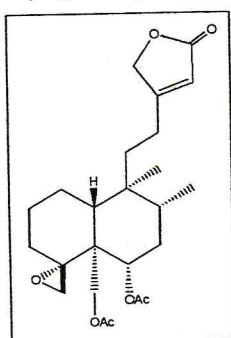


Figure 9 : Structure chimique de **Ajugarin I**

6.2.2.2 Les iridoïdes

Les iridoïdes sont une classe de métabolites secondaires trouvée dans une grande variété de plantes et chez certains animaux [59]. Ce sont des monoterpènes caractérisés par un squelette cyclopenta[c]pyranique, parfois désigné par le terme d'iridane (cis-2-oxabicyclo-[4,3,0]-nonane) (Figure 10). Certains auteurs limitent même leur définition à la seule notion de « méthylcyclopentane » [53]. Ils sont bio-synthétisés de l'isoprène et sont souvent intermédiaires dans la biosynthèse des alcaloïdes [59].

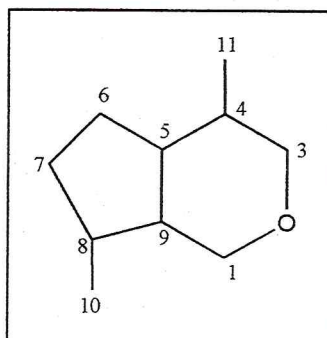


Figure 10 : Structure chimique d'un Iridane

Ils existent d'habitude dans la nature sous la forme glucosidique, cependant on peut les trouver mais rarement comme un aglycone [60].

Le groupe (plus de 500 structures connues) comprend majoritairement des hétérosides d'iridoïdes (>300), des hétérosides de séco-iridoïdes (>100) et des composés non hétérosidiques (>100) [53].

Les iridoïdes tirent leur nom de celui des fourmis du genre *Iridomirmex* à partir desquelles furent isolés des composés impliqués dans les mécanismes de défense propres à ces insectes [53], ils sont trouvés dans plusieurs plantes médicinales et peuvent être responsables pour certains de leurs activités pharmaceutiques (activité cardiovasculaire, hypoglycémique, anti-inflammatoire, anti-oxydante et hypo-lipidique.) [60].

On remarque que les iridoïdes sont préférentiellement élaborés par des gamopétales : Dipsacales, Gentianales, Lamiales, Scrophulariales, ce qui en fait d'eux des marqueurs chimiotaxonomiques intéressants [53]. Ils sont produits et utilisés par les plantes comme un moyen de défense contre les herbivores ou contre l'infection par des microorganismes. Pour les humains et autres mammifères [53, 60], les iridoïdes sont souvent caractérisés par un goût amer, ils sont toxiques pour les herbivores.

La stéréochimie au niveau du carbone chiral C-8 a été déterminée du point de vue biosynthétique [61]. Les iridoïdes ont généralement dix atomes de carbone. Dans la majorité

des cas, le carbone C-11 est absent, cependant on trouve une exception où il est inclus dans un groupement carboxylique.

Les variations structurales observées sont nombreuses. On note que le méthyle normalement porté par le carbone C-8 peut être plus ou moins oxydé : hydroxy-méthyle, époxyde.

Certains d'entre eux présentent un hydroxyle porté par le carbone C-1, ce dernier peut être engagé dans une liaison hétérosidique avec l'hydroxyle porté par le carbone anomérique du D-glucose de la majorité des iridoïdes glucosides.

Ces derniers isolés jusqu'à présent ont un groupe 8 α -méthyle et un 9 β -hydrogène en commun [61].

6.2.2.3 Diterpène glucosidique

Un diterpène glucosidique (ajugaside A) a été isolé à partir d'*Ajuga decumbens*, sa structure établie par RMN a été confirmée par hydrolyse acide [25] (Figure 11).

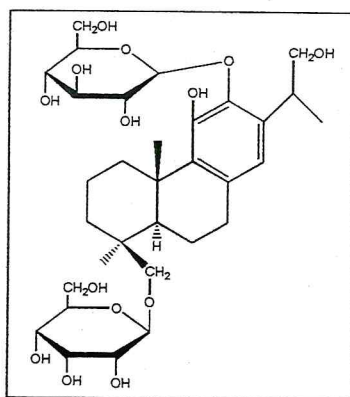


Figure 11 : Structure chimique de **Ajugaside A**

6.2.3 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments quasiment universels des végétaux. Presque toujours hydrosolubles, ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles, tel est le cas des flavonoïdes jaunes, des anthocyanosides rouges, bleus ou violets. Quand ils ne sont pas directement visibles, ils contribuent à la coloration par leur rôle de copigment.

Dans certains cas, la zone d'absorption de la molécule est située dans le proche ultraviolet : la « coloration » n'est alors perçue que par les insectes qui sont ainsi efficacement attirés et guidés vers le nectar et donc contraints à assurer le transport du pollen. Ils sont également présents dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques des feuilles, assurant ainsi la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement ultraviolet [53].

6.2.3.1 Anthocyanines

Le terme anthocyane, initialement forgé pour désigner la substance responsable de la coloration des fleurs du bleuet (grec : anthos : fleur, kuanos : bleu) s'applique à un groupe de pigments hydrosolubles responsables de la coloration rouge, rose, mauve, pourpre, bleue ou violette de la plupart des fleurs et des fruits [62]. Ces pigments existant sous la forme d'hétérosides (les anthocyanosides) et leurs génines (les anthocyanidols) sont des dérivés du cation flavylum (Figure 12), ce qui souligne l'appartenance de ces molécules au vaste groupe des flavonoïdes au sens large [53, 54, 62].

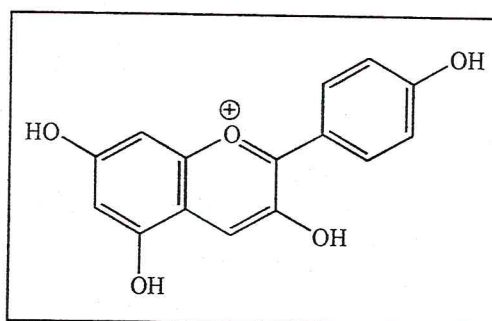


Figure 12 : Structure chimique d'un Anthocyane

Ils jouent un rôle écologique majeur dans la pollinisation et la dispersion des graines grâce à leur couleur vive qui attire les insectes et les oiseaux. [53, 54]. Leur fort pouvoir colorant et l'absence de toxicité en font d'eux des colorants naturels susceptibles de remplacer, dans l'industrie alimentaire, les colorants synthétiques [53, 54]. Ce sont de puissants antioxydants car ils peuvent augmenter la durée de conservation des aliments dans lesquels ils sont ajoutés [62]. Leur intérêt thérapeutique est pratiquement limité au domaine vasculaire [53]. Une molécule d'anthocyanine constitue un organe ou aglycone anthocyanidine qui, dans son état naturel est glucosylée par un ou plusieurs sucres différents [62].

6.2.4 Dérivés de la quinone

Les quinones sont des composés oxygénés qui correspondent à l'oxydation de dérivés aromatiques et qui sont caractérisées par un motif 1,4-dicétocyclohexa-2,5-diénique (para-quinone) (Figure 13) ou, éventuellement par un motif 1,2-dicétocyclohexa-3,5-diénique (ortho-quinone) [53].

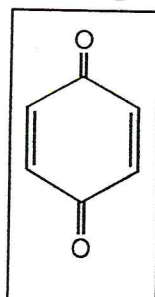


Figure 13 : structure chimique de la para-quinone

Ils ont deux propriétés physiques remarquables: l'odeur et la couleur. En général, les 1,2-quinones sont éclatantes de couleur, allant de l'orange au rouge, tandis que les 1,4-quinones sont généralement plus légers, c'est-à-dire du jaune à l'orange [54]. Les quinones sont issues de l'oxydation de phénols, on peut aussi s'attendre à trouver le motif quinonique dans différentes classes de métabolites secondaires. C'est ainsi que l'on connaît quelques flavonoïdes-quinones et d'assez nombreuses quinones à squelette terpénique. Dans ce dernier groupe, les mieux connues sont les quinones diterpéniques à squelette abiétane caractéristique des *Lamiacées* [53]. Ils jouent des rôles variés et importants dans les systèmes biologiques. Chez les insectes, ils sont utilisés à des fins de défense, et les membres de la famille de la vitamine K, qui sont fondés sur le 2-méthyl-1,4-naphtoquinone, sont des agents de la coagulation sanguine [54]. Bien qu'ils soient présents dans tous les tissus vivants et sont au cœur de la vie elle-même, une grande quantité reste à apprendre sur leurs rôles biologiques. Il faut mentionner que des quinones de divers degrés de complexité ont des activités antibiotiques, antimicrobiennes et anticancéreuses [54].

La biosynthèse des quinones chez les plantes supérieures est caractérisée par la diversité des voies métaboliques qui permettent aux différents organismes vivants de les élaborer à partir d'un nombre assez limité de précurseurs : acétate/malonate, mévalonate, phénylalanine [53].

6.2.5 Autres composés

Parmi toutes les molécules d'alcool organique aromatique le β -phénéthyle alcool (PEA) est probablement le plus prestigieux arôme chimique dans le monde de la parfumerie, à cause de son odeur exquise de pétales de rose naturelle. En lutte contre les insectes, le PEA a été considéré comme un répulsif de moustiques. Notons qu'il a aussi une action bactériostatique et des propriétés antifongiques, et il a été affirmé comme un agent tensio-actif.

En raison de son faible coût, sa stabilité et la qualité de son odeur, le PEA est idéalement adapté pour une utilisation dans les parfums, les barres de savon, où son utilisation peut aller jusqu'à 30 à 50% de la fragrance. La consommation de l'alcool β -phénéthyle ne présente généralement pas de problèmes de santé comme approuvé par l'US Food and Drug Administration et le Conseil de l'Europe pour utilisation dans les arômes [54].

6.3 Travaux antérieurs sur de l'espèce *Ajuga iva*

Études chimiques

D'après les travaux bibliographiques de M.L. Bondi [39], il semble que les premières études chimiques sur la *Ajuga iva* débutent en 1982, par l'isolement et l'identification de quatre diterpènes clérodanes : **Ivain I-IV** à partir des parties aériennes de *Ajuga iva*, il note aussi que dix ans plus tard, Wessner a trouvé sept phytoecdystéroïdes dans la plante entière (y compris les racines) d'*Ajuga iva* récoltée en Algérie [39], pour la première fois, M.L. Bondi a isolé deux épimères : **Ivain IV** et **14,15-dihydroajugapitin** en même temps à partir de *Ajuga iva*, ces deux composés ont montré une bonne activité anti-appétant contre deux espèces de larves (*Spodoptera frugiperda* et *Spodoptera littoralis*) [39].

D'autres études menées ont permis d'identifier divers composés à partir d'*Ajuga iva*, il s'agit, par exemple, des ecdystéroïdes : **Makisterone A**, le **20 hydroxyecdysone**, le **cyasterone** et leurs dérivés. Des iridoïdes tel que l'**Harpagide** et le **8-O-acetylharpagide**, ainsi que deux flavonoïdes comme le **naringin** et le **apigenin-7-O-neohesperidoside**. [21].

L'étude de l'extrait aqueux de *Ajuga iva* a permis d'isoler et d'identifier des terpénoïdes et des flavonoïdes responsables de l'activité anti-oxydante de cette plante [50].

D'autres auteurs ont évoqué l'existence d'ecdysones et d'ecdysterones dans *Ajuga iva* [49].

Des études phytochimiques ont révélé la présence de flavonoïdes et de tanins comme composés majoritaires, alors que les saponines sont vraiment faibles [17].

Études biologiques

La plupart des décoctés d'*Ajuga iva* ont fait l'objet de beaucoup d'études biologiques.

Notons que l'extrait éthanolique brut de *Ajuga iva* a une activité insecticide contre quelques *Lepidoptera* [36].

L'administration par voie orale de l'extrait aqueux de *Ajuga iva* à des rats diabétiques a montré une diminution des niveaux de glucose dans leur plasma, ce qui se traduit par une activité hypoglycémique [49, 50, 52].

Le traitement par *Ajuga iva* a montré aussi une diminution du taux de cholestérol [50, 21], des triacylglycérols, ainsi qu'un abaissement des concentrations de l'oxyde nitrique, des carbonyles, et des caroténoïdes chez les rats [50].

Des études de toxicité de l'espèce *Ajuga iva* réalisaient sur des souris et des rats administrée par voie orale à ces animaux ont montré qu'elle est sans danger [14].



Partie
Expérimentale

Chapitre II : Extraction et Analyse de l'huile essentielle de *Ajuga iva*

1. Matériel végétal

1.1 Récolte de la plante et séchage

La plante a été récoltée durant le mois de mars et avril 2011 au environ de Soumaâ et à Chréa (wilaya de Blida) ; sachant que cette région renferme un tapis végétal couvrant près de 22 673 ha de son territoire soit un taux de boisement de 85% [63].

Après un tri grossier sur place, les plantes ont été étalées pour séchage pendant plusieurs jours à l'extérieur (Figure 14), mais à l'abri de la lumière directe du soleil.

L'espèce *Ajuga iva* a été identifiée par le Docteur phytothérapeute Mr. Yahia MAHMOUDI. Également, pour des besoins d'expérimentations, une quantité d'environ 4 Kg a été commandée chez l'herboriste.

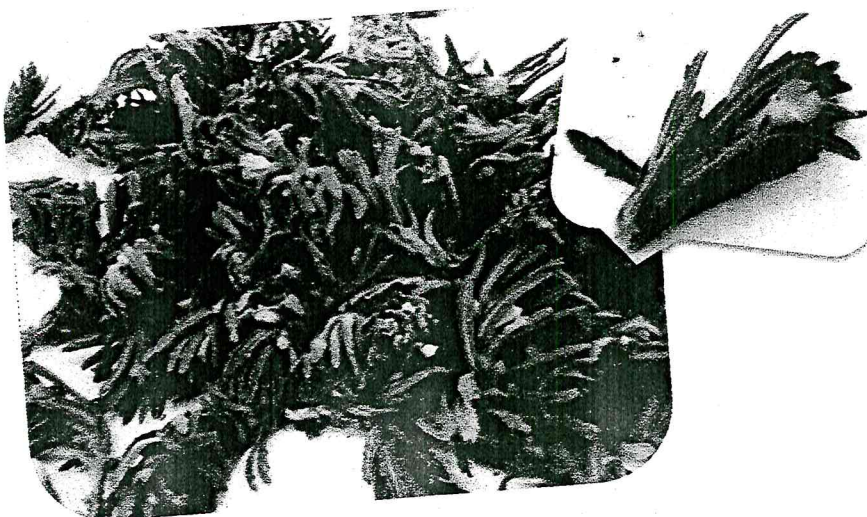


Figure 14 : Photo de *Ajuga iva*

1.2 Détermination du taux d'humidité

Le contenu en humidité ou la teneur en eau de la plante a été déterminé par le procédé de séchage à l'étuve. Un fragment de matière fraîche est prélevé et pesé, puis soumis à l'étuve (de 60°C à 100°C) pendant quelques jours, récupérer la matière végétale sèche et la pesée encore une fois. Le taux en humidité est calculé comme suit :

Soit :

m_f : masse de la plante fraîche.

m_s : masse de la plante sèche.

H% : taux d'humidité exprimé en pourcentage.

$$H\% = \frac{m_f - m_s}{m_f} \times 100$$

Sachant que $m_f = 4.3149$ g, et $m_s = 1.2769$ g

On peut déterminer le taux d'humidité de l'espèce *Ajuga iva* comme étant égal à :

$$H\% = \frac{4.3149 - 1.2769}{4.3149} \times 100 = 70.4 \%$$

$$H \% = 70.4 \%$$

2. Procédé d'extraction de l'huile essentielle

L'huile essentielle de *Ajuga iva* a été extraite par entraînement à la vapeur d'eau.

Description du montage expérimental : La plante sèche est placée dans une ampoule à décanter au dessus d'un ballon rempli d'eau, sans être en contact avec cette dernière. On admet que la vapeur produite par l'eau bouillante pénètre les tissus de la plante, éclate les cellules (cause la rupture des glandes sébacées), libère leurs huiles volatiles et les entraînent avec elle. Ces dernières sont ensuite refroidies dans un réfrigérant et recueillies dans un récipient (Figure 15). Étant donné que ces huiles n'ont qu'une solubilité partielle dans l'eau, elles vont pouvoir être séparées par décantation et une extraction liquide-liquide avec l'éther diéthylique (Figure 16). Le mélange hétéro-azéotropique (eau-huile) se sépare en une phase organique contenant l'huile essentielle dans l'éther et une phase aqueuse, cette dernière est soumise au relargage en ajoutant du chlorure de sodium, après filtration, la phase aqueuse est soumise de nouveau à une extraction liquide-liquide avec de l'éther diéthylique afin d'épuiser au maximum l'huile essentielle soluble dans l'eau. Cette opération d'extraction liquide-liquide est effectuée trois fois, les phases organiques obtenues sont mélangées en une seule. La phase organique totale est filtrée sur du sulfate de sodium (Na_2SO_4) afin d'éliminer toute trace d'eau. La phase organique filtrée est ensuite distillée à la pression atmosphérique pour éliminer l'éther diéthylique. L'huile essentielle récupérée est stockée dans des flacons hermétiques à l'abri de la lumière à 4°C.

Les conditions opératoires de l'extraction de l'huile essentielle de *Ajuga iva* par entraînement à la vapeur d'eau sont présentées ci-dessous :

- Quantité de matière végétale sèche : 60 g
- Volume d'eau : 800 ml
- Temps de l'entraînement à la vapeur d'eau : 3h

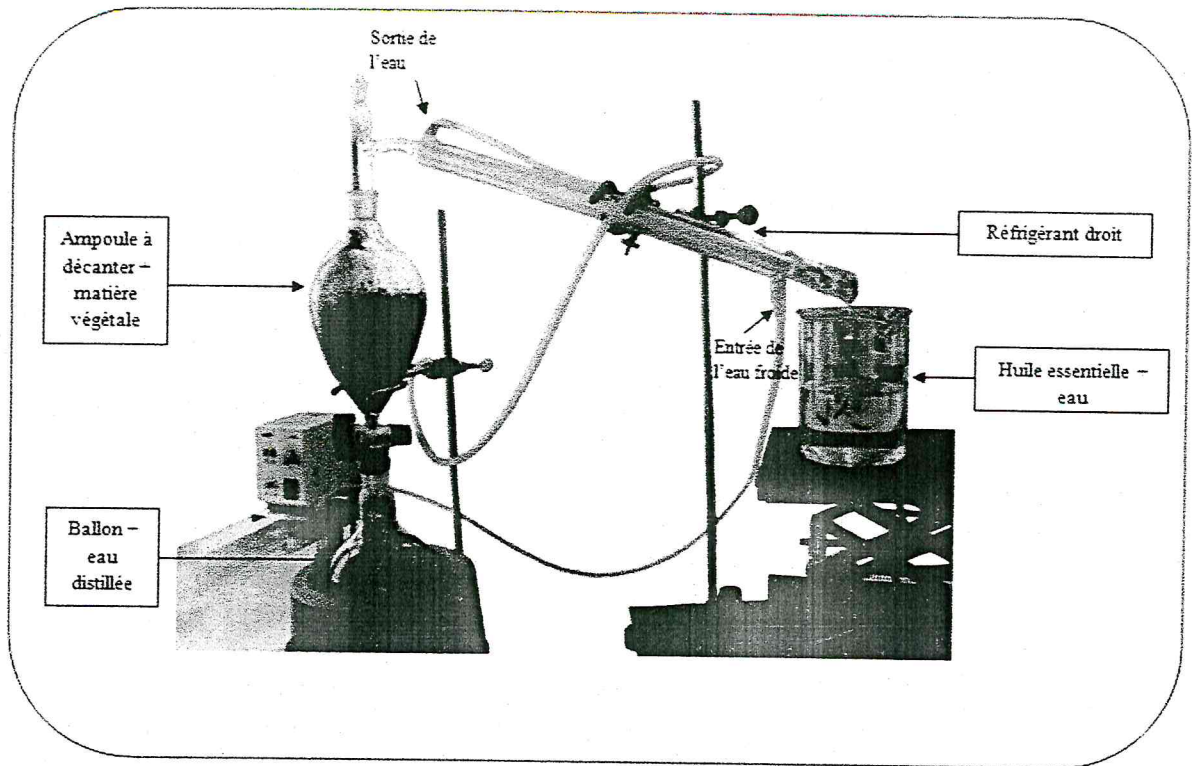


Figure 15 : Montage de l'entraînement à la vapeur d'eau

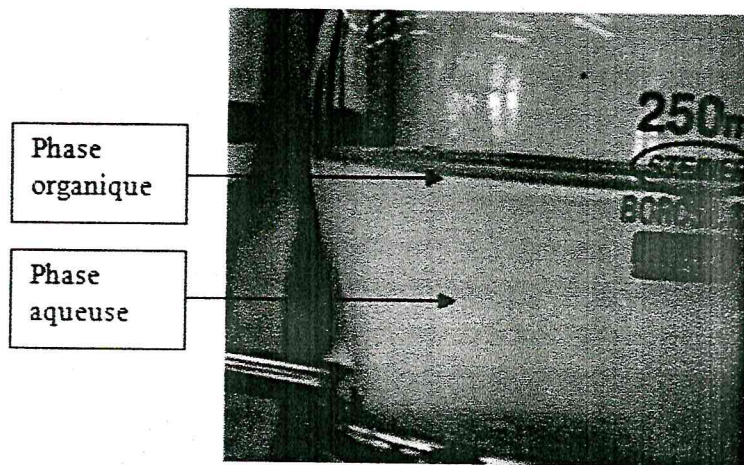
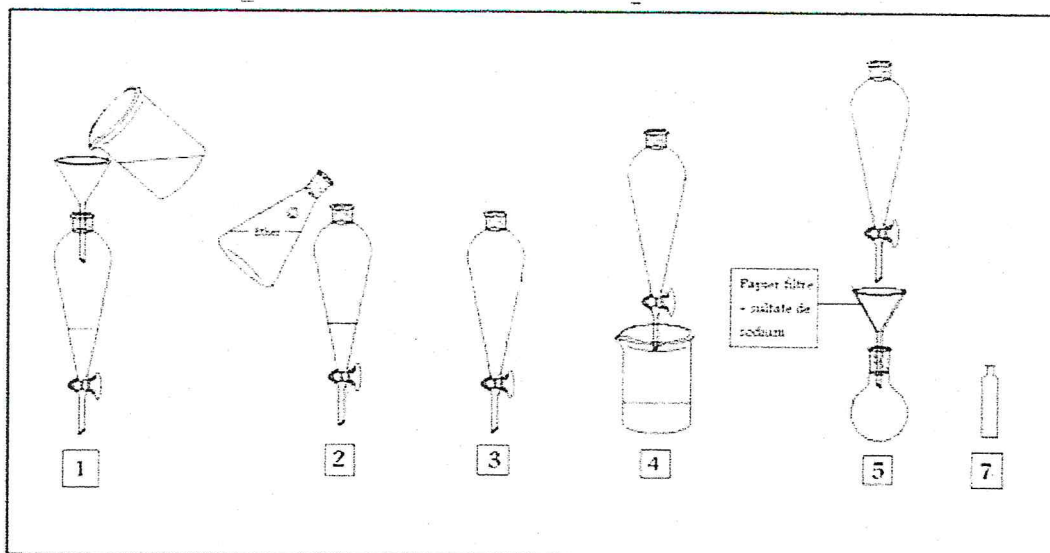


Figure 16 : Séparation de l'huile essentielle



- 1 : Transfert de l'hydrolat dans l'ampoule à décanter.
- 2 : Ajout de l'éther diéthylique.
- 3 : Une bonne agitation puis laisser décanter.
- 4 : Séparation des deux phases.
- 5 : Élimination des traces d'eau par le sulfate de sodium Na_2SO_4 .
- 6 : Evaporation de l'éther diéthylique
- 7 : Récupération de l'huile essentielle.

Figure 17 : Traitement du mélange hétéro-azéotropique eau-huile essentielle

2.1 Calcul du rendement

Le rendement de l'huile essentielle est défini comme étant le rapport de la masse de l'huile essentielle obtenue sur la masse de la matière végétale sèche.

Il est donné par la relation :

$$R \% = \frac{m_{HE}}{m_{MVS}} \times 100$$

Avec : $R\%$: rendement en pourcentage

m_{HE} : la masse de l'huile essentielle

m_{MVS} : la masse de la matière végétale sèche.

Le rendement en huile essentielle est compris entre 0.01 % et 0.02 %, il a fallu plusieurs entraînements à la vapeur d'eau pour obtenir une quantité d'huile à analyser. Cette faible teneur serait probablement due à l'âge de la plante, à la période de récolte, sans négliger sa nature. Cependant on a remarqué que l'huile essentielle obtenue à partir des parties aériennes

fleuries a un rendement moyen de 0.2 %, ceci s'explique par la période de récolte, car les feuilles doivent être récoltés au moment de leur plein développement, mais avant la formation des boutons floraux.

2.2 Propriétés organoleptiques

L'huile essentielle obtenue est un liquide visqueux, de couleur jaune pâle, et doté d'une odeur caractéristique.

2.3 Propriétés physico-chimiques

L'examen physique réalisé sur l'huile essentielle de *Ajuga iva* est l'indice de réfraction.

Ce dernier a été mesuré à l'aide d'un réfractomètre de type ABBE, à une température de 24.8 °C.

Le produit étalon pour la réfractométrie servant à ajuster le réfractomètre est l'eau distillée, cette dernière présente un indice de réfraction égal à 1.3342 nD à 24.2°C.

En ce qui concerne notre huile essentielle, elle a présenté un indice de réfraction égal à 1.4936 nd à 24.8 °C.

3. Analyse de l'huile essentielle

L'identification des constituants d'une huile essentielle est une opération délicate nécessitant l'utilisation, l'adaptation et le perfectionnement des techniques d'analyse, ainsi que la mise en œuvre d'une méthodologie d'analyse rigoureuse.

3.1 Analyse par spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

3.1.1 Principe

Les scientifiques ont longtemps utilisés l'absorption infrarouge comme un moyen d'établir et de chercher la structure des molécules.

Les spectromètres à transformée de Fourier pour l'infrarouge ont comme avantages une sensibilité, une résolution et une vitesse d'acquisition des données particulièrement élevées (un spectre complet peut être relevé en moins d'une seconde). Ces avantages sont compensés par la complexité des appareils et leur cout élevé [64].

3.1.2 conditions opératoires et résultats

Un spectromètre de type JASCO FTIR-4100 a été utilisé pour l'obtention des spectres IR de l'huile essentielle de *Ajuga iva*. Une cellule discontinue avec une fenêtre en KBr a été utilisée. Les bandes d'absorption sont données en longueur d'onde entre 4000 et 700 cm^{-1} .

Dans ces conditions, le spectre infrarouge obtenu pour l'huile essentielle d'*Ajuga iva* est donné par la figure 18a.

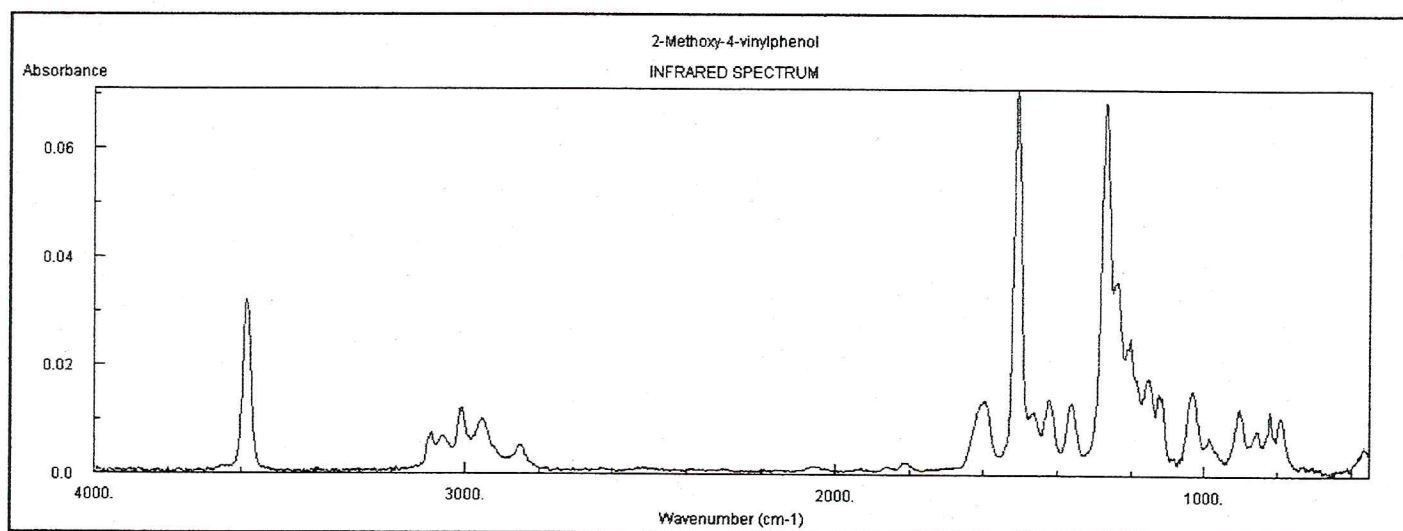
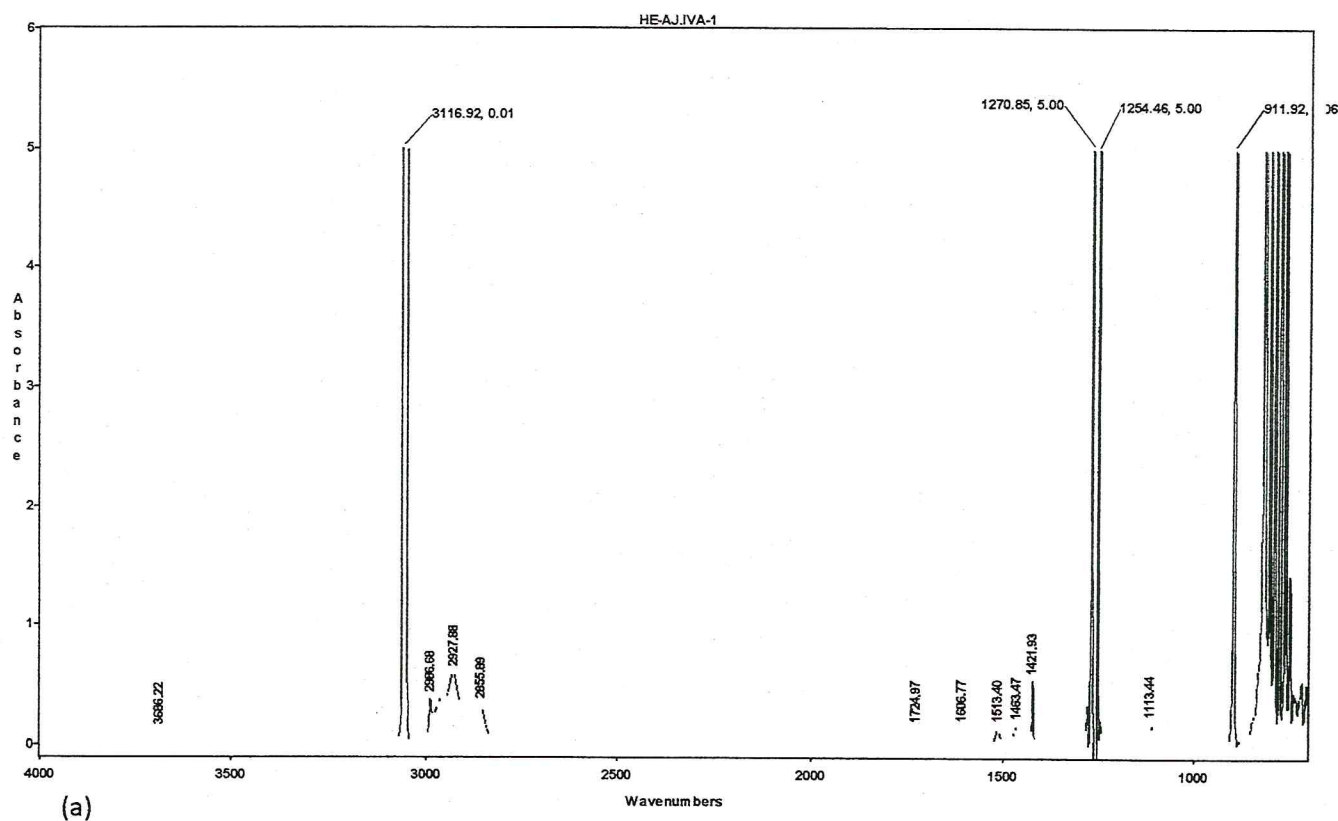


Figure 18 : (a) Spectre infrarouge de l'huile essentielle d'*Ajuga iva*, (b) Spectre infrarouge obtenu à partir de la base de données NIST du **2-methoxy-4-vinylphenol**

La bande à 3116 cm^{-1} est caractéristique d'un vinyl et/ou d'un $\text{R}_2\text{-C}=\text{CH}_2$ en plus c'est une bande spécifique des elongations C-H aromatique, en remarque aussi la présence d'un alcool aromatique confirmé par la bande à 1250 cm^{-1} . Les bandes à 3116 , 2928 , 1423 et 1250 cm^{-1} nous informent sur la présence d'un acide carboxylique. La bande 2928 cm^{-1} met en évidence la présence des liaisons C-H alcane.

Ce spectre IR nous a permis de confirmer l'abondance (produit majoritaire) du composé *2-méthoxy-4-vinylphenol* dans l'huile essentielle rapporté par l'analyse de chromatographie en phase gazeuse, car, en examinant les deux spectres IR (spectre IR de l'huile essentielle d'*Ajuga iva* (figure -16-) et le spectre IR du produit majoritaire le *2-méthoxy-4-vinylphenol* obtenu à partir de la base de donnée NIST (figure -17-)) nous constatons une grande similitude.

3.2 Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM)

3.2.1 Principe

Pour l'analyse de l'huile essentielle de *Ajuga iva*, nous avons mis en œuvre la méthode chromatographique (CG/SM).

La CPG est la technique de séparation la plus utilisée dans le domaine des huiles essentielles, car elle permet d'effectuer l'individualisation des constituants à partir d'échantillons de l'ordre du milligramme voire du microgramme. Les progrès technologiques réalisés dans le domaine des colonnes capillaires, des phases stationnaires et des détecteurs (FID) ont contribué à rendre la CPG incontournable pour l'analyse des huiles essentielles [65].

En ce qui concerne la spectrométrie de masse, elle est utilisée depuis de nombreuses années pour l'élucidation de la structure de composés organiques simultanément avec d'autres techniques spectroscopiques comme l'infrarouge ou la résonance magnétique nucléaire.

Le développement important de la spectrométrie de masse dans l'identification des constituants des aromes et les huiles essentielles a été rendu possible grâce au couplage de la chromatographie en phase gazeuse directement avec la spectrométrie de masse.

Simultanément il devenait possible d'obtenir un spectre de masse interprétable pour des quantités de substance qui allaient du microgramme au nano gramme. Ainsi, grâce à cette innovation importante, la spectrométrie de masse est devenue la technique la plus sensible pour obtenir des données importantes sur la structure de composés organiques inconnus.

3.2.2 Conditions opératoires :

L'analyse est effectuée sur un chromatographe HP-6890 couplé à un spectromètre de masse HP 5972, dans les conditions suivantes :

- Une colonne capillaire de type HP1 (polydiméthylesiloxane 100%), de longueur 30 m d'un diamètre de 0.25 mm et une épaisseur du film de 0.25 µm.
- Un potentiel d'ionisation du spectromètre de masse égale à 70 eV.
- Le programme de température du four est : 90 (3') à 240 (10') à raison de 3°C/min puis jusqu'à 280°C à raison de 10°C/min
- Gaz vecteur He.
- Injection en mode Split : 1/90.
- Les échantillons de l'huile essentielle sont dilués dans l'AcOEt à 1%.

3.2.3 Résultats et discussions

L'identification est effectuée en se basant sur les banques de données spectrales de l'appareil (NBS75k.l, Wiley7n.l). L'identification par une base spectrale consiste à comparer le spectre de masse du produit avec celui du même produit de cette base, cette comparaison est donnée à un certain taux de similitude. Dans notre cas tous les produits ont été identifiés à un taux de similitude de plus de 90%.

Nous tenons à rappeler que NBS75k est une banque comprenant les spectres de masse de plus de 75000 molécules, et celle de Wiley7n comprend plus de 250000 molécules.

Le tableau -1- présente les composés chimiques identifiés et non-identifiés à partir de l'huile essentielle de *Ajuga iva*.

Tableau 1 : Composition chimique de l'huile essentielle d'*Ajuga iva*

Ordre d'élution	Temps de rétention (mn)	Nom du produit	Formule	% de l'air du pic
1	2,1	4-méthyl-3-penten-2-one	C₆H₁₀O	23,1
2	2,4	4-hydroxy-4-methyl-2-pentanone	C₆H₁₂O₂	5,6
3	2,5	3-hexen-1-ol	C ₆ H ₁₂ O	0,08
4	2,6	NI		0,1
5	3,9	1-Octen-3-ol	C₈H₁₆O	2,7
6	4,2	3-octanol	C ₈ H ₁₈ O	0,1
7	4,9	NI		0,08

8	6,1	NI		0,2
9	6,3	3,5-dimethyl-2-cyclohexen-1-one	C ₈ H ₁₂ O	0,9
10	6,5	Linalool	C₁₀H₁₈O	2,8
11	6,7	NI		0,1
12	6,8	4,5-dihydro-5,5-dimethyl-4-isopropylidene-1H-Pyrazole	C₈H₁₄N₂	3,3
13	7,1	NI		0,1
14	7,5	NI		0,08
15	7,7	NI		0,1
16	8,7	Acide heptanoique	C ₇ H ₁₄ O ₂	0,2
17	9,2	1-methyl-4(2-propanol-2-yl)-cyclohexene	C ₁₀ H ₁₈ O	0,3
18	9,5	2-hydroxy-3-propyl-2-cyclopenten-1-one	C ₈ H ₁₂ O ₂	0,07
19	10,0	2,3-dihydro-benzofurane	C₈H₈O	5,9
20	10,4	4-vinylphenol	C ₈ H ₈ O	0,5
21	11,3	Geraniol	C ₁₀ H ₁₈ O	0,3
22	12,2	Acide nonanoique	C ₉ H ₁₈ O ₂	0,5
23	13,4	2-methoxy-4-vinylphenol	C₉H₁₀O₂	41,6
24	13,8	4-vinyl-2-methoxy-phenol	C ₉ H ₁₀ O ₂	0,08
25	13,9	NI		0,2
26	14,8	Eugenol	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	0,2
27	15,0	NI		0,1
28	15,6	NI		0,1
29	15,9	NI		0,3
30	16,2	NI		0,5
31	17,9	NI		0,1
32	18,5	(E)-6,10-dimethyl-5,9-undecadien-2-one	C ₁₃ H ₂₂ O	0,2
33	18,6	NI		0,06
34	19,7	NI		0,3
35	19,8	trans-beta-Ionone	C ₁₃ H ₂₀ O	0,3

36	20,4	NI		0,08
37	20,5	NI		0,5
38	20,7	Dihydroactinidiolide (5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-2(4H)-benzofuranone	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	0,4
39	20,9	NI		0,4
40	21,0	NI		0,2
41	21,6	NI		0,06
42	22,5	Megastigmatrienone	C ₁₃ H ₁₈ O	0,2
43	22,7	NI		0,4
44	22,8	NI		0,4
45	23,1	Megastigmatrienone	C₁₃H₁₈O	1,4
46	23,5	NI		0,2
47	23,7	NI		0,3
48	24,3	NI		0,2
49	24,7	Megastigmatrienone	C ₁₃ H ₁₈ O	0,9
50	25,3	Jasmonate de méthyle	C ₁₃ H ₂₀ O ₃	0,9
51	25,6	dihydro methyl jasmonate	C ₁₃ H ₂₂ O ₃	0,2
52	26,4	Z-beta-ocimene	C ₁₀ H ₁₆	0,1
53	27,0	NI		0,3
54	28,5	2-methyl-octadecane	C ₁₉ H ₄₀	0,09
55	29,6	NI		0,03

L'huile essentielle de *Ajuga iva* n'est pas complexe comme la majorité des huiles essentielles. L'analyse de cette huile par CG/SM nous a permis d'identifier 26 constituants représentant 93.41% de la composition chimique de cette huile : deux composés hydrocarbonés et 23 composés oxygénés ainsi qu'un composé azoté. Cette première analyse met en évidence une composition plus riche en composés oxygénés (88.46%) qu'en composés hydrocarbonés (7.69%).

La majorité des constituants repérés sur le chromatogramme, sont présents en faible proportion ou à l'état de trace et nombre d'entre eux sortent en même temps (même pic).

Les produits majoritaires sont : 2-methoxy-4-vinylphenol (1) (41,64%), 4-méthyl-3-penten-2-one (2) (23.12%), 2,3-dihydro-benzofurane (3) (5.97%), 4-hydroxy-4-methyl-2-pentanone (4) (5.6%), 4,5-dihydro-5,5-dimethyl-4-isopropylidene-1H-Pyrazole (5) (3.3%), Linalool (6) (2.86%), 1-Octen-3-ol (7) (2.69%) , Megastigmatrienone (8) (1.42%).

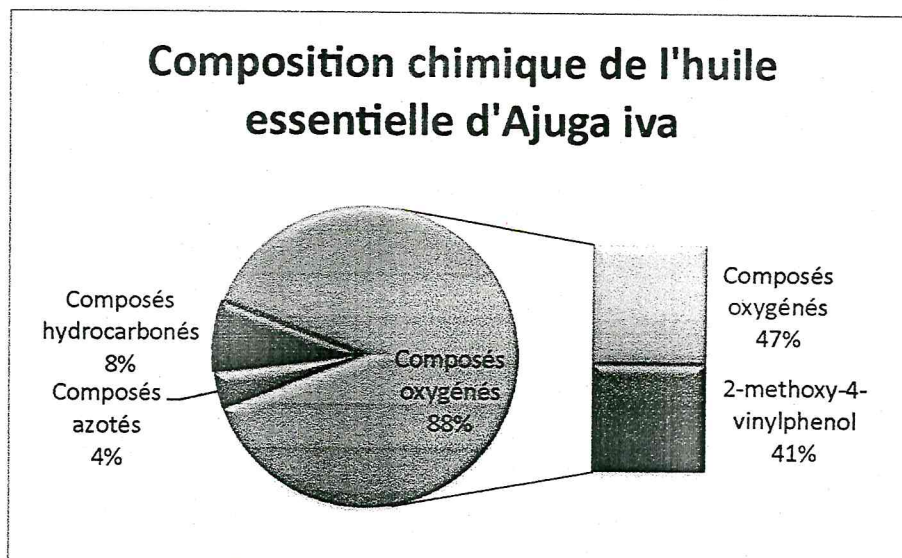


Figure 19 : Illustration en secteurs de la composition chimique de l'huile essentielle

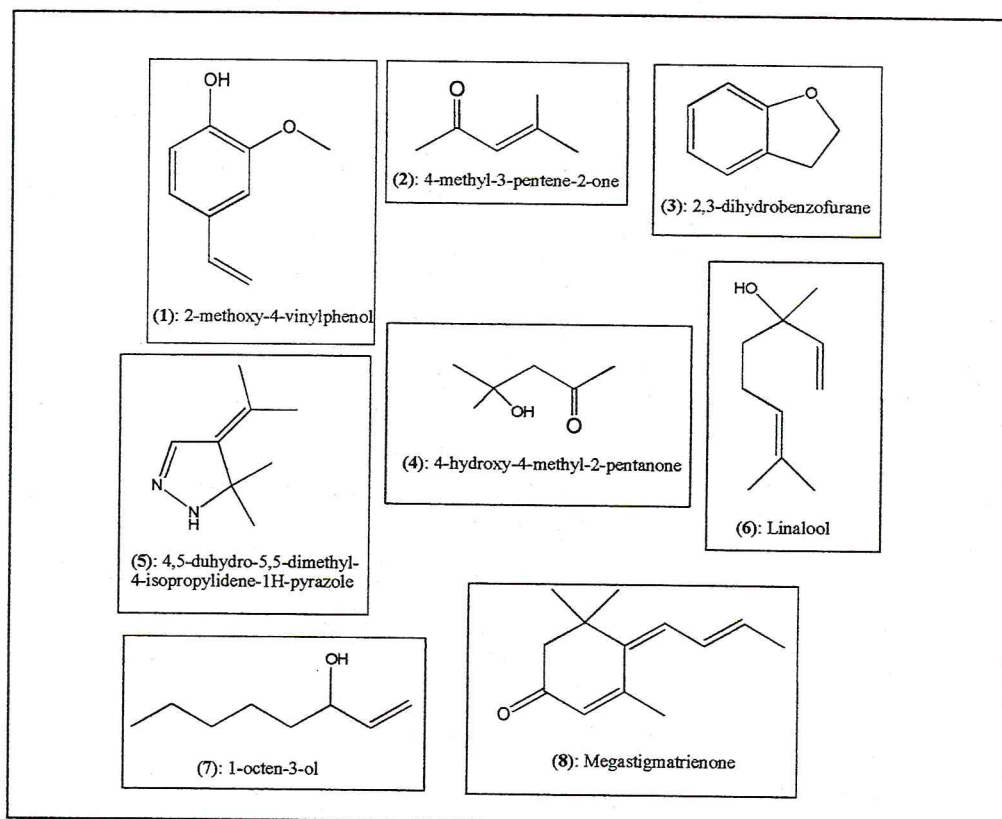


Figure 20 : Structure chimique des composés majoritaires

Chapitre III : Activités antioxydante et antimicrobiennes de l'huile essentielle de *Ajuga iva*

Partie 1 : Activité antioxydante de l'huile essentielle de *Ajuga iva*

III. 1.1 Introduction

Les propriétés anti-oxydantes des huiles essentielles sont depuis peu massivement étudiées. Le stress oxydatif, qui survient lors de déséquilibres entre la production de radicaux libres et d'enzymes anti-oxydantes, est en relation avec l'apparition de maladies telles que l'Alzheimer, l'artériosclérose et le cancer. Une façon de prévenir ce stress oxydatif qui endommage et détruit les cellules est de rechercher, dans l'alimentation, un apport supplémentaire de composés antioxydants (vitamine C, α -tocophérol, etc....).

Les huiles essentielles de cannelle, muscade, clou de girofle, basilic, persil, origan et thym possèdent de puissants composés antioxydants. Le thymol et le carvacrol sont les composés les plus actifs. Leur activité est en relation avec leur structure phénolique car les composés de ce type ont des propriétés oxydo-réductrices et jouent ainsi un rôle important en neutralisant les radicaux libres et en décomposant les peroxydes. L'activité anti-oxydante des huiles essentielles est également attribuable à certains alcools, éthers, cétones, et aldéhydes monoterpéniques: le tinalool, le 1,8-cinéole, le géraniol, le citronellal, la menthone et quelques monoterpènes: α -terpinène, γ -terpinène... [3]

III.1.2 Estimation du pouvoir antioxydant par la méthode au DPPH

Le test de piégeage des radicaux libres par la méthode du DPPH a été réalisé pour l'évaluation de l'activité antioxydante de notre huile essentielle.

Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est une molécule contenant un radical libre stable. La présence d'un antioxydant [qui peut donner un électron au DPPH et donc le piéger] provoque une diminution de l'absorbance du DPPH à 517 nm. [66, 67].

Cette variation de l'absorbance est suivie par spectrophotométrie ultraviolette (Spectromètre UV-Visible, UV-1605, Shimadzu, Japon).

Comparé à d'autres méthodes, l'analyse de DPPH a beaucoup d'avantages, tels que la bonne stabilité, une sensibilité crédible, la simplicité et la faisabilité.

Les résultats de l'analyse par DPPH ont été présentés de plusieurs manières. La majorité d'études expriment les résultats par la valeur du IC50, définie comme étant la quantité

d'antioxydant nécessaire pour diminuer la concentration initiale de DPPH de 50%. Cette valeur est déduite graphiquement [68]

III.1.3 Préparation des solutions

- 4 mg de DPPH ont été pesé exactement et déposé dans une fiole jaugée de 100 ml. Le méthanol a été ajouté jusqu'au trait de Jauge. Après une bonne agitation, la solution de DPPH est stockée dans l'obscurité et dans un environnement sec. La solution de DPPH doit être préparée le jour des analyses car ce radical se dégrade à la lumière.
- L'huile essentielle a été pesé avec précision (5 mg), et dissoute dans du méthanol (2 ml) pour produire une solution mère de concentration connue 2.5 mg/ml.
- Dans 10 tubes à essai, on met 1 ml de méthanol dans chaque tube, on rajoute des volumes allant de 5 à 100 µl de notre solution mère et en fin 1 ml de la solution du DPPH préparée ultérieurement, bien agité à l'aide du vortex, et mettre à l'abri de la lumière. On laisse réagir pendant 30 min à température ambiante, puis on note leurs absorbances à 517 nm.
- Un blanc a été préparé avec 1 ml de méthanol et 1 ml de DPPH.
- La vitamine C a été utilisée comme standard antioxydant à des concentrations de 0.5, 1, 3, 4, 5, 6 µg/ml.
- Cette opération est répétée trois fois, les résultats sont la moyenne de 3 expériences menées en parallèle.

L'équation du taux de piégeage des radicaux libres est donnée comme suit :

$$I \% = \frac{Abs_B - Abs_E}{Abs_B} \times 100$$

Avec : $I\%$: Taux de piégeage des radicaux libres

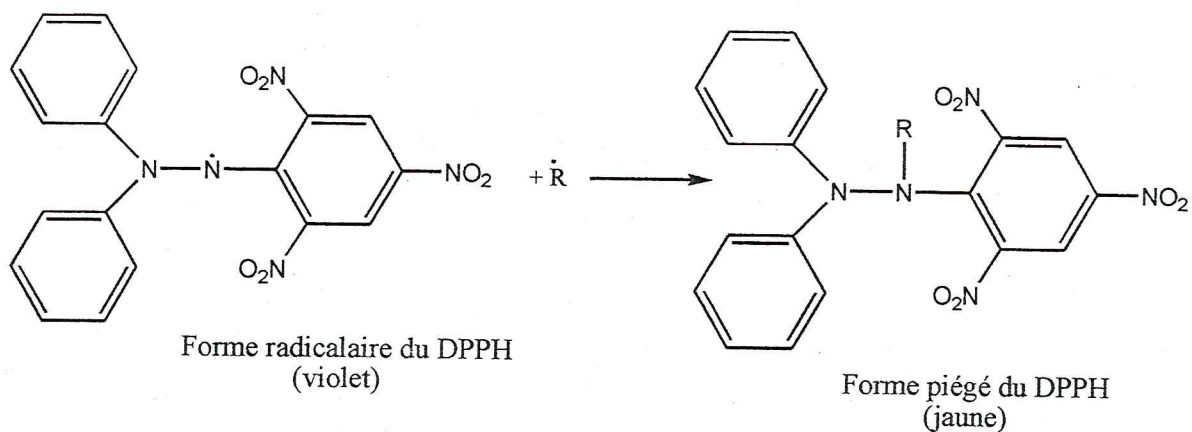
Abs_B : Absorbance du blanc

Abs_E : Absorbance de l'échantillon

III.1.4 Résultats et discussions

L'activité antioxydante exprime la capacité de réduction des radicaux libres. Pour notre huile essentielle nous avons employé la méthode au DPPH, ce radical libre présente une coloration violet foncé, mais lorsqu'il est piégé par des substances antioxydantes, la forme réduite confère à la solution une coloration jaune pale. Le virage vers cette coloration et

l'intensité de la décoloration dépend de la nature, la concentration et la puissance de la substance antioxydante.



a- Huile essentielle Ajuga iva

Le tableau -2- regroupe les résultats de l'expérience effectuée dans le but de déterminer le taux de piégeage du radical libre DPPH.

Tableau 2 : Variation du taux de piégeage en fonction de l'absorbance pour les différentes concentrations de l'huile essentielle

Tube	Concentration (mg/ml)	V _{méthanol} (ml)	V _{HE} (μl)	V _{DPPH} (ml)	Abs _{moy}	I _{moy} %
1	0,00625	1	5	1	0,458	19,22
2	0,0125	1	10	1	0,3765	33,59
3	0,025	1	20	1	0,18	68,25
4	0,0375	1	30	1	0,0535	90,56
5	0,05	1	40	1	0,026	95,41
6	0,0625	1	50	1	0,023	95,94
7	0,075	1	60	1	0,0205	96,38
8	0,0875	1	70	1	0,021	96,30
9	0,1	1	80	1	0,0185	96,74
10	0,125	1	100	1	0,018	96,82

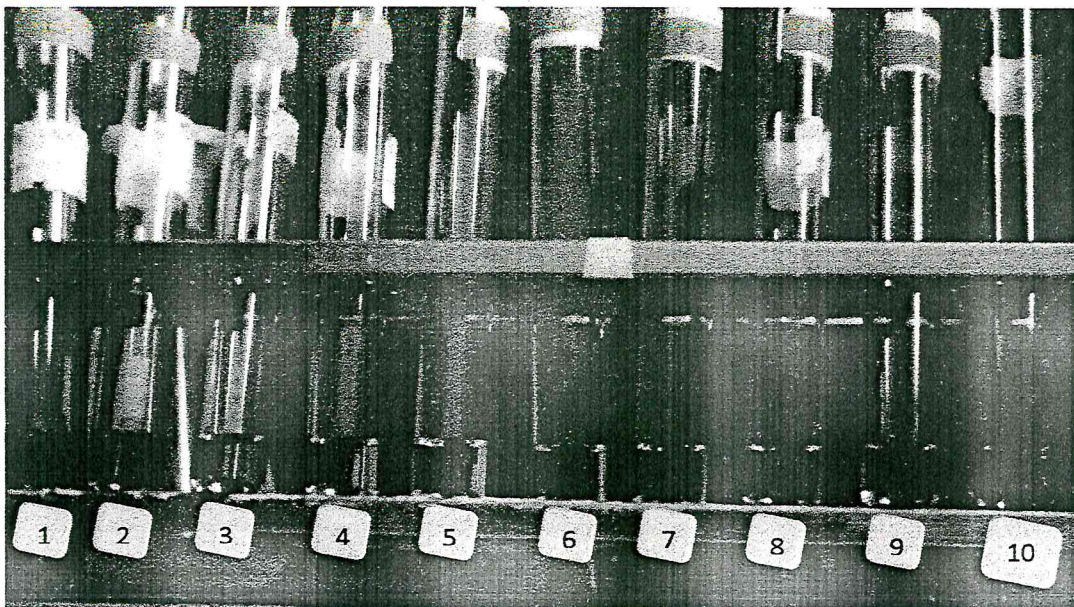


Figure 21 : Évolution de l'activité antioxydante en fonction de la concentration : couleur violet (Synonyme de non activité), jaune (synonyme d'activité)

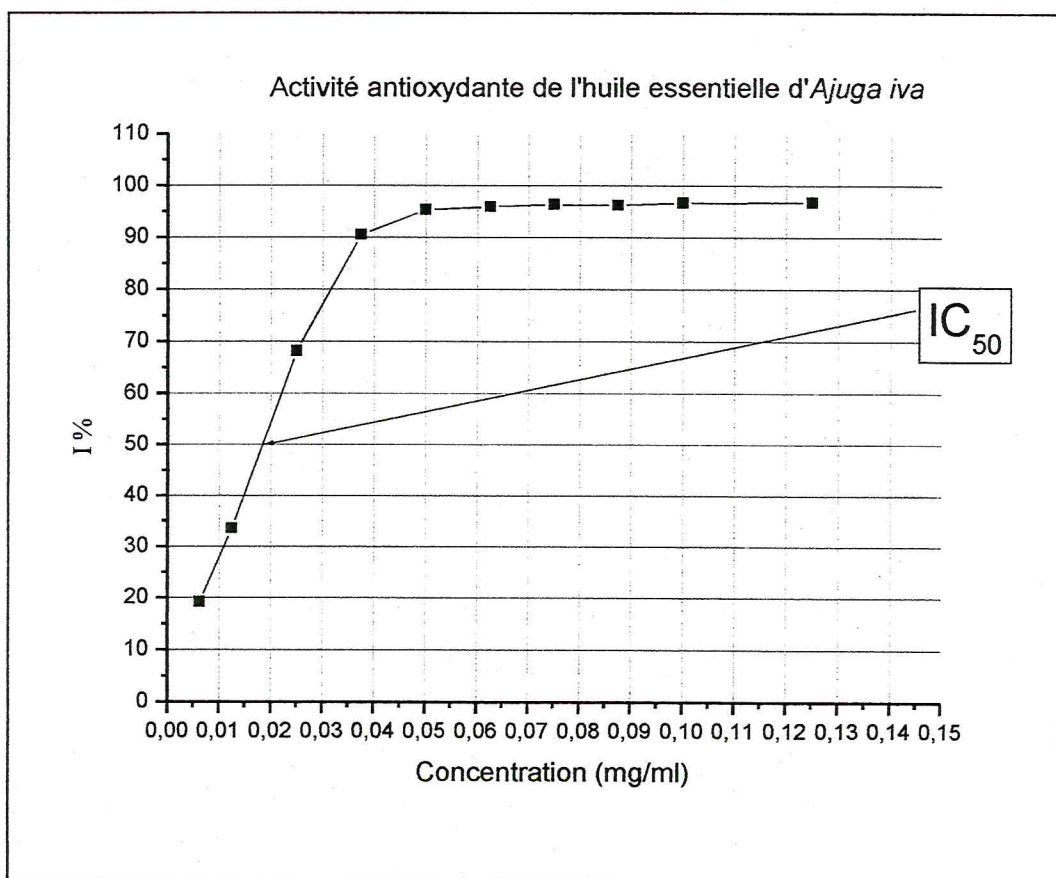


Figure 22 : Variation du taux de piégeage du radical DPPH par l'huile essentielle

La figure -19- représente le taux de piégeage des radicaux libre en fonction de la concentration en mg/ml. L'extrapolation a permis de déduire la IC_{50} de l'huile essentielle et qui correspond à 0.018 mg/ml.

b- Vitamine C :

Le tableau -3- regroupe les résultats obtenus :

Tableau 3 : Variation du taux de piégeage en fonction de l'absorbance pour les différentes concentrations de la vitamine C

Tube	Concentration (mg/ml)	V _{méthanol} (ml)	V _{vitC} (μl)	V _{DPPH} (ml)	Abs _{moy}	I _{moy} %
1	0,0005	1	5	1	0,459	21,49
2	0,001	1	10	1	0,348	40,56
3	0,003	1	30	1	0,076	86,90
4	0,004	1	40	1	0,035	94,02
5	0,005	1	50	1	0,031	94,70
6	0,006	1	60	1	0,029	95,05

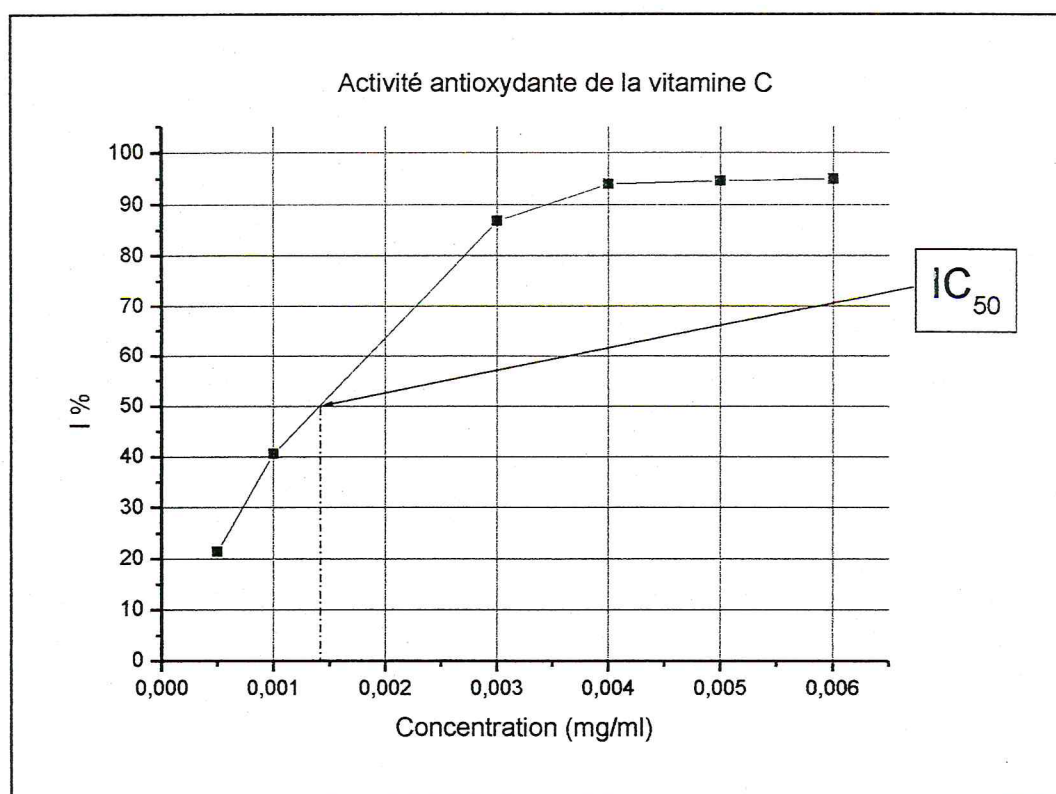


Figure 23 : Variation du taux de piégeage du radical DPPH par la vitamine C

Le IC₅₀ de la vitamine C est égale à 0.0014 mg/ml, cette valeur est déduite graphiquement. En comparant les résultats obtenus, on remarque que la valeur du IC₅₀ de la vitamine C représente le 1/12 de celle de notre huile essentielle, ce résultat paraît très intéressant, surtout en le comparant avec d'autres études (dans les mêmes conditions), sur l'activité antioxydante de certaines huiles essentielles obtenue à partir d'espèces végétales de la famille des Lamiaceae (Tableau 4).

Tableau 4 : valeurs des IC₅₀ de certaines huiles essentielles

Espèce	IC ₅₀ (mg/ml)	Référence
HE <i>Salvia tomentosa</i>	0.15	[69]
HE <i>Pistacia atlantica</i>	13.91	[70]
HE <i>Marrubium globosum</i>	1.203	[71]
HE <i>Satureja cuneifolia</i>	0.0651	[72]
HE <i>Thymus caramanicus</i>	0.263	[73]
HE <i>coriandrum sativum</i>	0.24	[74]
Notre HE (<i>Ajuga iva</i>)	0.018	-

Comparaison entre les IC₅₀ :

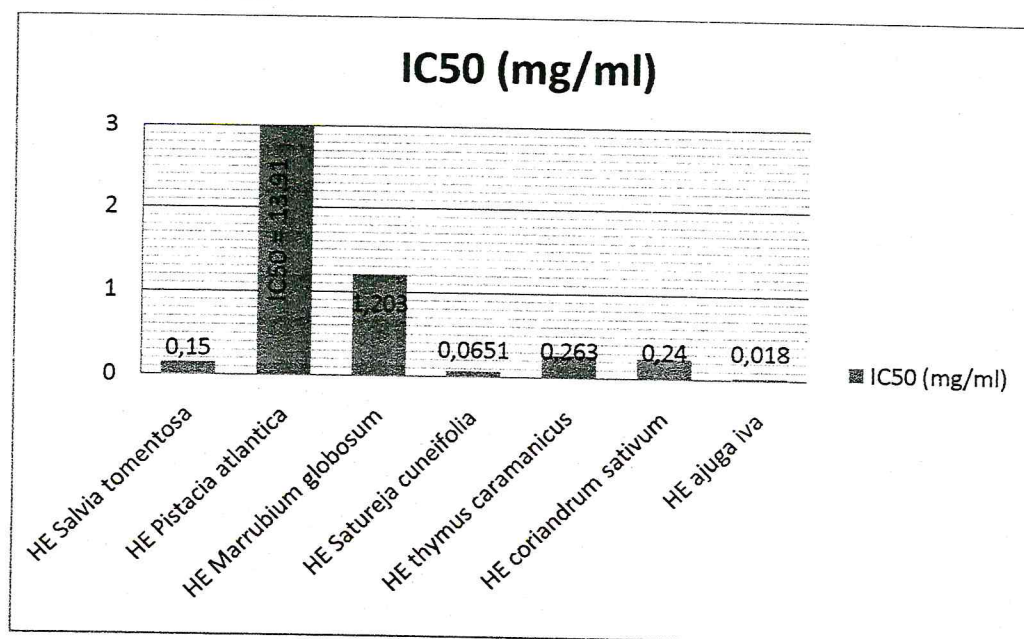


Figure 24 : Comparaison du IC₅₀ de quelques huiles essentielles

Il faut noter que l'activité antioxydante de l'huile essentielle d'*Ajuga iva* est due à la présence de composés phénoliques, surtout le **2-methoxy-4-vinylphenol**, qui présente un pouvoir antioxydant très élevé. [75].

Partie 2 : Activités antimicrobiennes de l'huile essentielle *Ajuga iva*

III. 2.1 Introduction

Les anciennes civilisations utilisèrent les plantes aromatiques et les épices dans les préparations alimentaires non seulement pour la saveur qu'elles apportent mais également pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques, ils utilisent les effets bénéfiques des composés volatils des huiles essentielles pour soigner les pathologies courantes.

Prenant l'exemple de l'origan, le thym, le romarin ou alors le clou de girofle qui sont fréquemment utilisés comme ingrédients alimentaires, leurs huiles essentielles ont toutes une particularité commune : elles sont riches en composé phénolique, comme l'eugénol, le thymol, et le carvacrol. Ces derniers présentent une forte activité antibactérienne, ils ont un effet antimicrobien contre un large spectre de bactéries : *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*...

Avec l'émergence des microorganismes pathogènes résistants aux antibiotiques, les huiles essentielles antibactériennes présentent une sérieuse alternative à la médecine des antibiotiques contre les pathologies infectieuses d'origine bactérienne (bactéries endocanalisales, microflore vaginale) ou/et d'origine fongique (les dermatophytes).

D'autres familles de composés présentent aussi des propriétés antibactériennes intéressantes : certains alcools, aldéhydes et cétones monoterpéniques (géraniol, linalol, menthol, camphre, carvone...), des phénylpropanes (cinnamaldéhydes) ainsi que des monoterpènes (γ -terpinènes, cymènes...)

Aujourd'hui après avoir été délaissé un temps soit peu par la médecine, le potentiel thérapeutique des huiles essentielles et de leurs constituants volatils est reconsidéré et les études qui leur sont consacrées abondent dans la littérature scientifique. Les industries pharmaceutiques sont très intéressées par les propriétés de ces huiles d'autant plus qu'il s'agit d'aromatants naturels. De ce fait, beaucoup de chercheurs à travers le monde étudient leur potentiel en tant qu'agent de conservation. Dans les domaines phytosanitaires et agroalimentaires, les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agent de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant la denrée alimentaire.

Étant donnée la grande complexité de la composition chémotypique des huiles essentielles, malgré de possibles synergies, certains auteurs préfèrent étudier l'effet d'un composé isolé pour pouvoir ensuite le comparer à l'activité globale de l'huile. Ainsi l'activité fongistatique des composés aromatiques semble être liée à la présence de certaines fonctions chimiques, pour cela 12 composés aromatiques ont été testés vis-à-vis

de huit souches pathogènes pour l'homme *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Microsporium canis* et 5 *Trichophyton spp*. Les résultats ont montré que les phénols sont plus antifongiques et que les aldéhydes testés. Les groupements méthoxy, à l'inverse, ne semblent pas apporter à ce type de molécules une fongitoxicité significative.

Pour finir, il faut noter que de très nombreuses drogues à huiles essentielles sont réputées efficaces pour diminuer ou supprimer les spasmes gastro-intestinaux, il est fréquent qu'elles stimulent la sécrétion gastrique, et empêchent la formation de gaz digestif car elles sont carminatives. Ces effets bénéfiques divers expliquent sans doute que la médecine populaire et les thérapeutiques «douces» et de «terrain» fassent un très large usage de ces drogues [76].

III.2.2 Milieu de culture

- Le milieu de culture utilisé pour la culture est celui préconisé par Shirling et Gottlieb [77] (Milieu ISP2 (International *Sterptomyces* Project)). Sa composition est la suivante :

Dans un ballon de deux litres on pèse 4 g de l'extrait de levure, 10 g de l'extrait de malt, 4 g de glucose ainsi que 20 g d'agar, sans oublier 0.2% de Tween 80. Le tout est solubilisé dans un litre d'eau distillée. Le pH du milieu avant la stérilisation est égal à 7,2. La stérilisation du milieu est réalisée à l'autoclave pendant 20 min à 120°C.

III.2.3 Préparation des pré-cultures

Des flacons contenant de l'eau physiologique stérile sontensemencés par des germes cibles puis incubés pendant 24 h pour les bactéries et 48 h pour les champignons. Chaque pré-culture (bien agité à l'aide d'un vortex) est ajoutée à un flacon contenant le milieu de culture ISP2 en surfusion. Ce milieu est coulé dans des boîtes de Pétri stériles.

III.2.4 Mode opératoire

Lors des tests antibactériens et antifongiques par la méthode des disques imprégnés, ceux-ci doivent être stérilisés aux rayons UV avant d'être déposés aseptiquement à la surface du milieu de culture.

Pour cela, nous avons imbibé des disques de 9 mm de diamètre par 2 µg, 1 µg et 0.5 µg d'huile essentielle, puis nous les avons stérilisés sous UV (à 254 nm) pendant 45 min.

Les disques sont déposés aseptiquement à l'aide d'une pince stérilisée au bec Bunsen dans des boîtes de Pétri contenant le milieu ISP2 (à 10 g/l d'agar) préalablementensemencé par le microorganisme cible. Pour permettre une bonne diffusion de l'huile essentielle d'*Ajuga iva* dans le milieu et inhiber momentanément la croissance du germe test, les boîtes sont placées à 4°C pendant deux heures, puis incubées à 30°C durant 24h pour les bactéries et 48h pour les champignons. Dans le cas d'une éventuelle activité antibactérienne ou antifongique positive, le

résultat se traduira par une auréole claire et distincte autour du disque appelée : halo ou zone d'inhibition.

La lecture des résultats se fait en mesurant le diamètre de l'auréole de l'inhibition.

Les germes testés qui ont été retenus pour ce travail proviennent du Laboratoire de Recherche sur les Produits Bioactifs et la Valorisation de la Biomasse. Il s'agit de deux Gram négatifs et deux Gram positifs, deux champignons et deux levures.

Les souches utilisées sont regroupées dans les tableaux -5- et -6- :

Tableau 5 : Références et pathologie des bactéries Gram (+) et Gram (-) utilisés

Germes tests		Référence des souches	Pathologie
Gram (+)	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	Non pathogène
	<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 9314	Non pathogène Contaminant naturel
Gram (-)	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 10536	Infection urinaire et de plaie, septicémie, méningite néonatale
	<i>Salmonella enterica</i>	CIP 81.3	gastroentérites

Tableau 6 : Références et pathologie des champignons et levures utilisés

Germes tests		Référence des souches	Pathologie
Champignons	<i>Fusarium culmorum</i>	F3288	Pathogène : maladies des céréales, des herbes (fusariose), infections chez l'homme
	<i>Mucor ramannianus</i>	NRRL 1829	Mucoromycoses opportunistes
Levures	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC 4226	Non pathogène
	<i>Candida albicans</i>	IPA 200	Pathogène : responsable d'infections superficielles aussi bien que systémiques

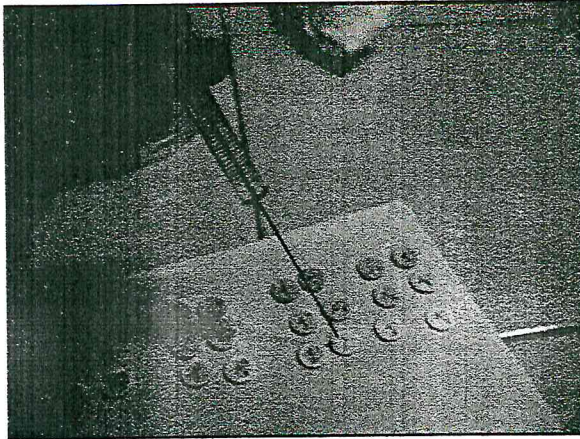


Figure 25 : Dépôt de l'huile essentielle sur les disques.

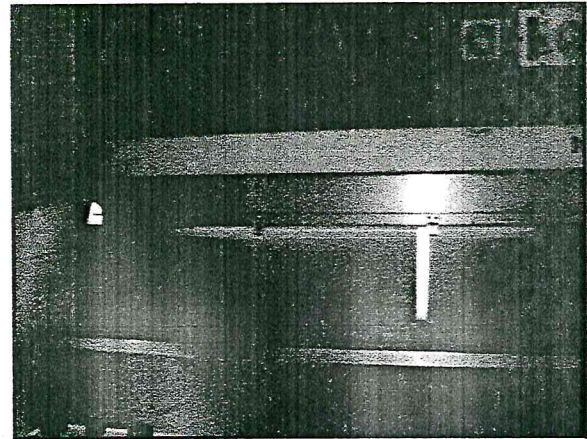


Figure 26 : Chambre UV.

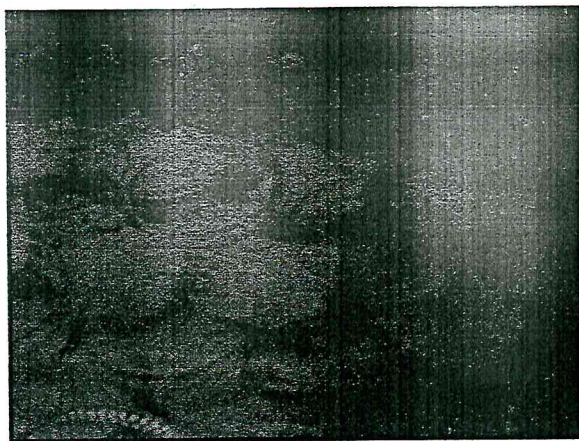


Figure 27 : Stérilisation des disques imprégnés d'huile essentielle.

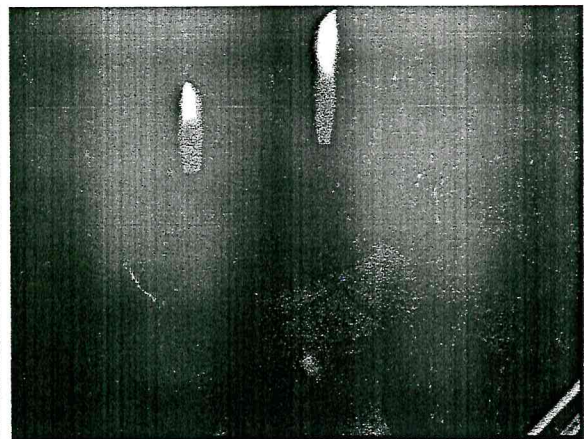


Figure 28 : Milieu de travail stérile.

III.2.5 Résultats et discussions

L'étude du pouvoir antibactérien et antifongique d'huile essentielle d'*Ajuga iva* a été effectuée par un test appelé « Aromatogramme » qui est une méthode de diffusion sur gélose ou méthode des disques absorbants.

Le diamètre des zones d'inhibition nous permet d'estimer la résistance ou la sensibilité des différents germes testés de l'huile essentielle. Selon Chifundra et al. [78] nous avons :

- Souche sensible : diamètre d'inhibition compris entre 0 et 9 mm.
- Souche peu sensible : diamètre d'inhibition compris entre 10 et 15 mm.
- Souche sensible ou intermédiaire : diamètre d'inhibition compris entre 16 et 20 mm.
- Souche très sensible : diamètre d'inhibition supérieur à 20 mm.

Il faut noter que la méthode des disques ne fournit que des informations qualitatives (ou semi-quantitatives, grâce aux courbes de concordance, *NdT*) sur la sensibilité ou la résistance d'une souche. Il existe des méthodes quantitatives permettant de mesurer les concentrations

minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) d'un composé vis-à-vis d'une souche spécifique. [79]

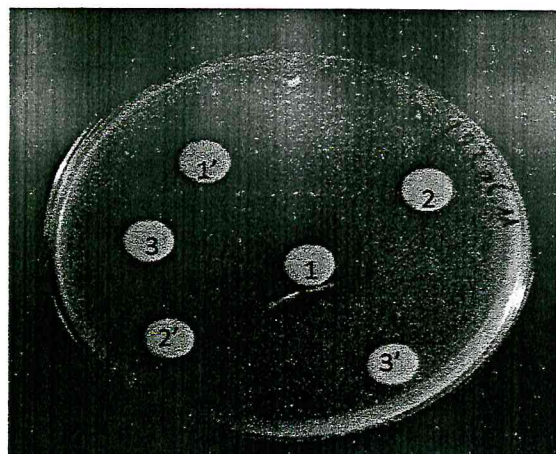
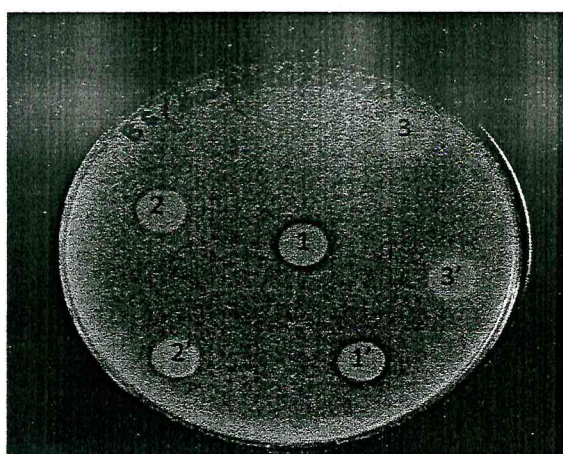
Les résultats qualitatifs du pouvoir antibactérien et antifongique de l'huile essentielle *Ajuga iva* sur les souches étudiées sont représentés dans les Tableaux -7- et -8- respectivement.

- Résultat du test antibactérien de l'huile essentielle d'*Ajuga iva* :

Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau -7-

Tableau 7 : Zones d'inhibition des bactéries obtenues avec l'huile essentielle de *Ajuga iva*

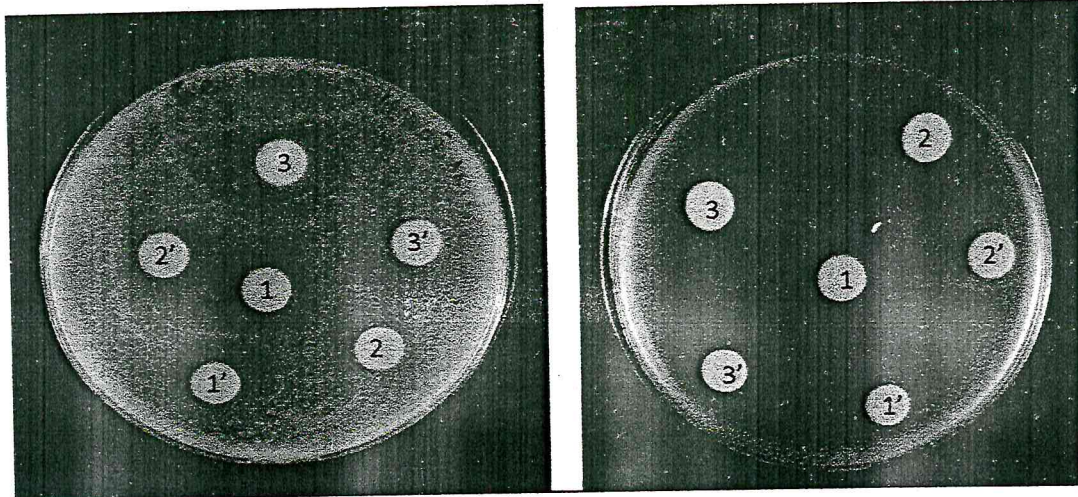
Numéro du disque	Quantité d'huile déposée par disque (µg)	Diamètre de la zone d'inhibition en (mm) y compris le diamètre des disques (9mm)			
		Bactéries Gram (+)		Bactéries Gram (-)	
		<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella enterica</i>
1 et 1'	2	11	12.7	-	19
2 et 2'	1	-	11.3	-	14.5
3 et 3'	0.5	-	16	-	12.2



Bactérie Gram (+)

Figure 29 : Aromatogramme de *Bacillus subtilis* avec l'huile essentielle d'*Ajuga iva*.

Figure 30 : Aromatogramme de *Micrococcus luteus* avec l'huile essentielle d'*Ajuga iva*.



Bactérie Gram (-)

Figure 31 : Aromatogramme de *Salmonella enterica* avec l'huile essentielle d'*Ajuga iva*.

Figure 32 : Aromatogramme d'*Escherichia coli* avec l'huile essentielle d'*Ajuga iva*.

Discussion des résultats :

Un effet inhibiteur de l'huile essentielle sur le développement du Gram négatif *Salmonella enterica* et le Gram positif *Micrococcus luteus* a été constaté, alors que la croissance a eu lieu normalement dans la boîte contenant la bactérie *Escherichia Coli*.

Nous avons noté l'apparition d'une zone d'inhibition autour des trois disques absorbants dans le cas de la bactérie *Salmonella enterica* et *Micrococcus luteus*.

On peut attribuer le caractère peu sensible de la bactérie *Micrococcus luteus* vis-à-vis de l'huile essentielle étudiée, du moment où le diamètre d'inhibition est compris entre 10 et 15 mm.

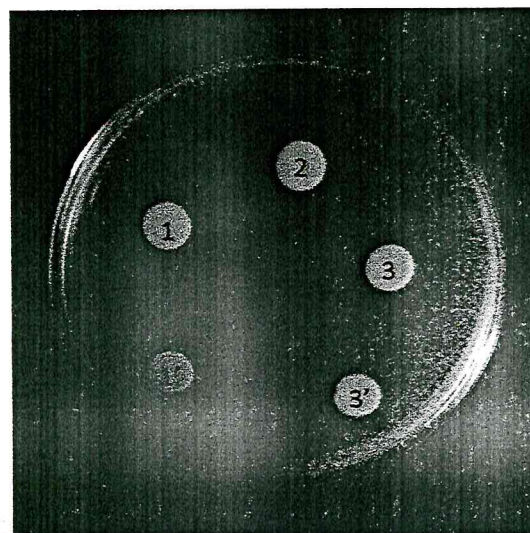
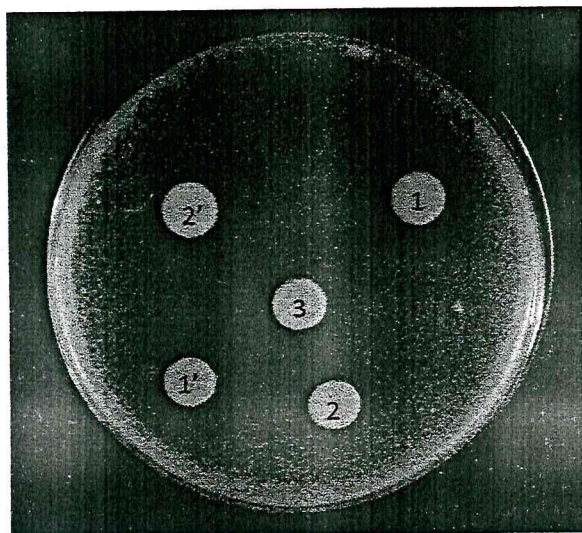
En ce qui concerne la bactérie *Salmonella enterica*, on peut dire qu'elle est peu sensible à sensible vis-à-vis de notre huile essentielle.

En ce qui concerne la *Bacillus subtilis*, on remarque que notre huile exerce une activité antibactérienne vis-à-vis de cette souche, étant donné qu'elle présente un halo égal à 11mm, on peut donc dire que la *Bacillus subtilis* est peu sensible.

Résultat du test antifongique de l'huile essentielle d'*Ajuga iva* :

Tableau 8 : Zones d'inhibition des champignons et levures obtenues avec l'huile essentielle de *Ajuga iva*

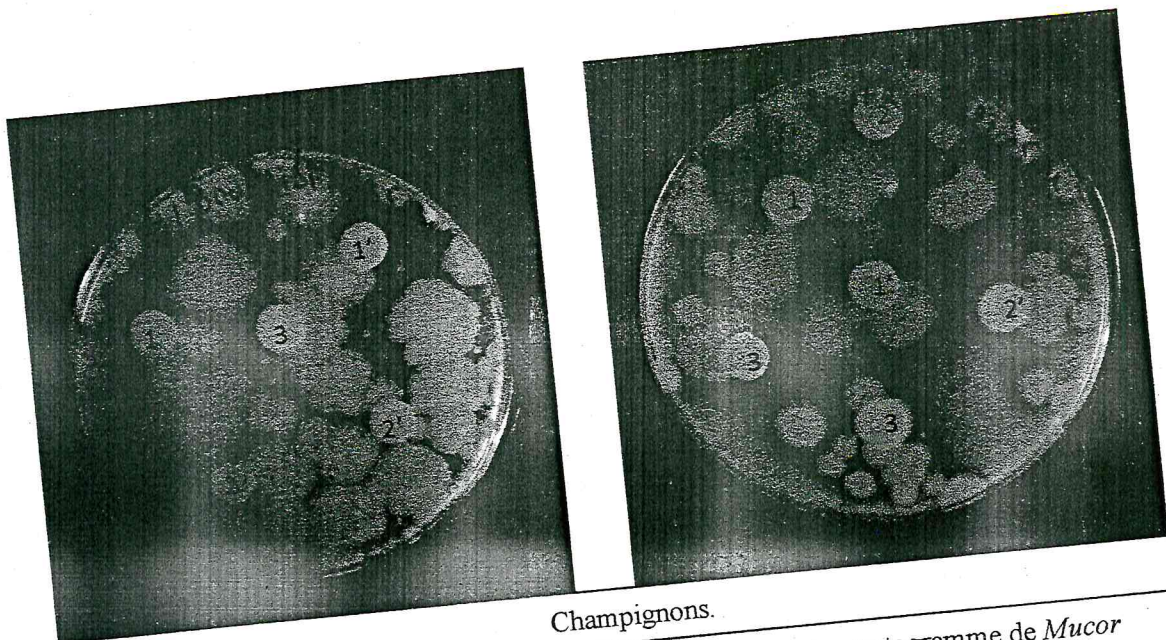
Numéro du disque	Quantité d'huile déposée par disque (µg)	Diamètre de la zone d'inhibition en (mm) y compris le diamètre des disques (9mm)			
		Champignons		Levures	
		<i>Fusarium culmorum</i>	<i>Mucor ramannianus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Candida albicans</i>
1 et 1'	2	contamination	contamination	13	13.2
2 et 2'	1	contamination	contamination	-	-
3 et 3'	0.5	contamination	contamination	-	-



Levures.

Figure 33 : Aromatogramme de *Candida albicans* avec l'huile essentielle d'*Ajuga iva*.

Figure 34 : Aromatogramme de *Saccharomyces cerevisiae* avec l'huile essentielle d'*Ajuga iva*.



Champignons.

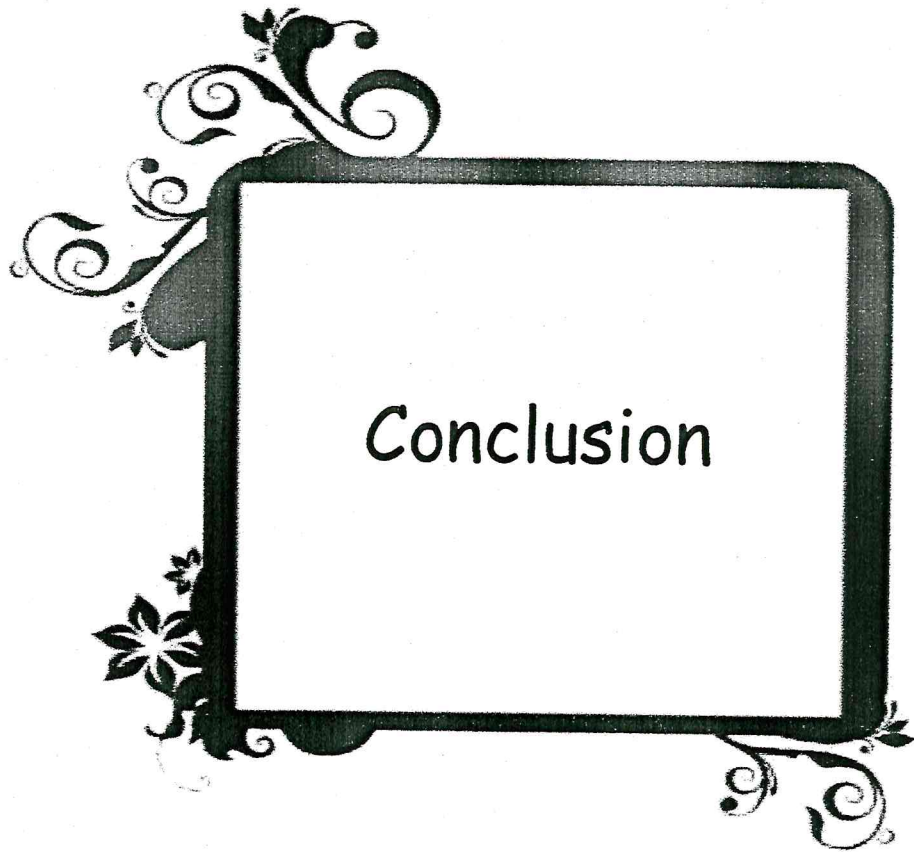
Figure 35 : Aromatogramme de *Fusarium culmarum* avec l'huile essentielle d'*Ajuga iva*.

Figure 36 : Aromatogramme de *Mucor ramaniannus* avec l'huile essentielle d'*Ajuga iva*.

Pour la *Candida albicans* qui est une levure pathogène pour l'homme. Elle présente une sensibilité peu élevée pour l'huile essentielle d'*Ajuga iva*, avec un diamètre égal à 13.2 mm. De même pour *saccharoryces cerevisiae*, elle est peu résistante vis-à-vis de notre huile essentielle.

En ce qui concerne les champignons, une contamination par la bactérie *Bacillus subtilis* a eu lieu, donc un autre test serait important afin de déterminer la sensibilité des champignons étudiés.

En admettant que le diamètre d'aire d'inhibition est un bon indicateur de l'activité bactéricide, un travail plus approfondi sur la détermination de la CMI sera intéressant.



Conclusion

Les travaux de recherche entrepris au cours de ce mémoire nous ont permis, dans un premier temps, de mettre en valeur le potentiel pharmacologique et la composition chimique des espèces du genre *Ajuga*, en particulier l'espèce *Ajuga iva*.

L'extraction de l'huile essentielle de *Ajuga iva* nous a permis de constater la pauvreté de cette espèce en huile essentielle comparativement à d'autres espèces.

Cette huile essentielle n'avait auparavant fait l'objet d'aucune étude biologique et sa composition chimique n'avait jamais été clairement établie.

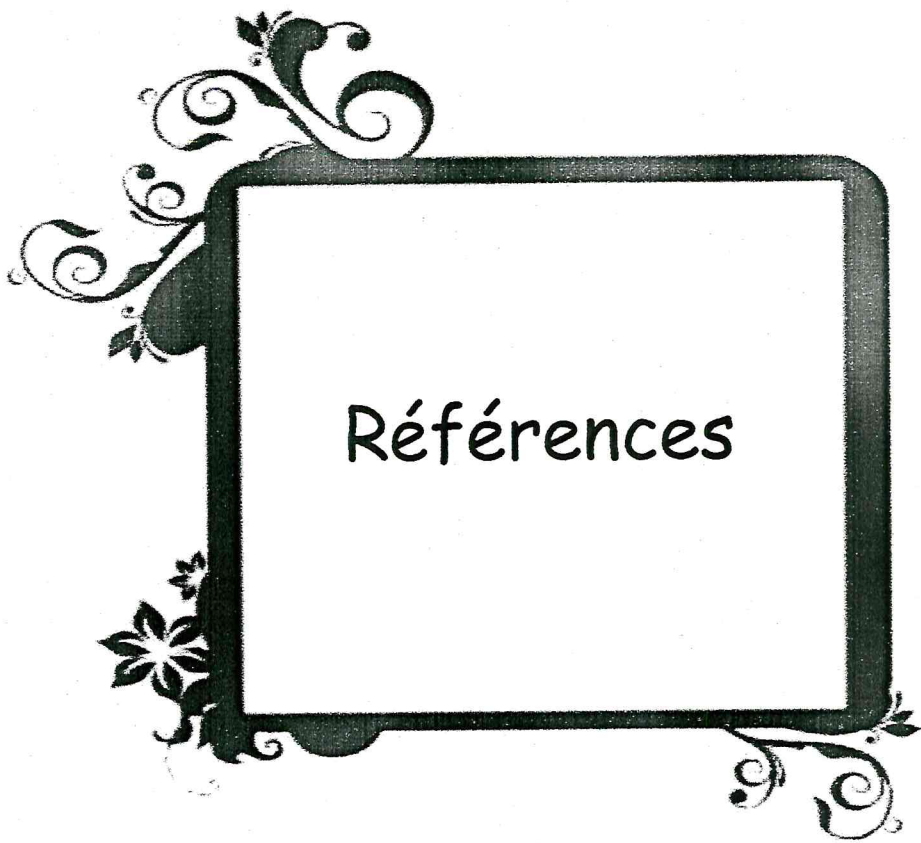
Grâce à l'analyse chromatographique CG/SM, nous avons pu mettre en évidence la richesse de cette huile en composés oxygénés, ces derniers sont dominés par le composé 2-methoxy-4-vinylphenol, qui présente 41 % de la composition de l'huile essentielle.

Ce composé majoritaire, s'est révélé être en partie responsable de l'activité antioxydante de l'huile essentielle, car cette dernière a présenté un fort pouvoir antioxydant.

En ce qui concerne l'activité antibactérienne, il découle que l'huile essentielle de *Ajuga iva* a un effet plus au moins important sur la bactérie *Salmonella enterica*, en revanche elle ne présente aucun effet sur la bactérie *Escherichia coli*. Pour les tests antifongiques, uniquement les levures étaient inhibées, elles ont présenté une activité peu sensible vis-à-vis de notre huile essentielle.

D'après les résultats obtenus, nous pouvons dire que l'objectif premier de ce mémoire a été atteint.

La composition chimique et l'activité biologique des huiles essentielles des espèces du genre *Ajuga* n'ont encore jamais été étudiées ce qui ouvre d'intéressantes perspectives de recherche pour les années à venir.



Références

Références bibliographiques :

- [1] H. Herrmann et V. Wunsch., le règne végétal, Edition SGED, 1998, 400.
- [2] Gérard Debuigne & François Couplan, Larousse des plantes médicinales, Edition Larousse, 2009, 383.
- [3] M. Piochon, Étude des huiles essentielles d'espèce végétale de la flore laurentienne : composition chimique, activité pharmacologique et héli synthèse, doctorat d'état, Université du Québec, (2008).
- [4] N. Djabou., L. *Sombucus nigra.*, une plante de la pharmacopée traditionnelle Nord Africaine, Mémoire de Magister en chimie, Université Abou bakr belkaid, Tlemcen, (2006).
- [5] W.S. Judd., C.S. Campbell., E.A. Kellg., P.F. Stevens., Botanique systématique, 1^{er} édition américaine, 2002, 447.
- [6] URL : www.botanique.org
- [7] J.L. Guignard., Botanique systématique moléculaire, 12^{ème} édition, 2001, 285.
- [8] C. Brauchler., H. Meimberg., G. Heub., Molecular phylogeny of Menthinae (Lamiaceae, Nepetoideae, Mentheae) – Taxonomy, biogeography and conflicts, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55, 501–523, (2010).
- [9] G. Bonnier., R. Dowin., La grande flore en couleurs, 4^{ème} édition Belin, 2004, 669.
- [10] M.H. Grace., D.M. Cheng., Ilya Raskin., Mary Ann Lila., Neo-clerodane diterpenes from *Ajuga turkestanica*, *Phytochemistry Letters*, 1, 81–84, (2008).
- [11] Centre for Mediterranean Cooperation, International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, A guide to medicinal plants in north Africa, 2005, 256.
- [12] Ernest Cosson, Itinéraire d'un voyage botanique en Algérie, Société botanique de France, 1857, 107.
- [13] Benedict Pierre George Hochrentiner, Le Sud-oranais: études floristiques et phytogéographiques faites au cours d'une exploration dans le Sud-Ouest de l'Algérie, 1904.

- [14] J. El Hilaly., Z.H. Israili., B. Lyoussi., Acute and chronic toxicological studies of *Ajuga iva* in experimental animals, *Journal of Ethnopharmacology*, 91, 43–50, (2004).
- [15] H.R. Nawaz., A. Malik., P.M. Khan., S. Ahmed., Ajugin E and F: Two withanolides from *Ajuga parviflora*, *Phytochemistry*, 52, 1357-1360, (1999).
- [16] S. Turkoglu., I. Turkoglu., M. Kahyaoglu and S. Celik., Determination of antimicrobial and antioxidant activities of Turkish endemic *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreber subsp. *euphratica* P.H. Davis (Lamiaceae), *Journal of Medicinal Plants Research*, 4, 13, 1260-1268, (2010).
- [17] J. El-Hilaly ., B. Lyoussi., M. Wibo., N. Morel., Vasorelaxant effect of the aqueous extract of *Ajuga iva* in rat aorta, *Journal of Ethnopharmacology*, 93, 69–74, (2004).
- [18] N. Riaz., A. Malik., A.U. Rehman., S.A. Nawaz., P.M., M.I. Choudhary., Cholinesterase-Inhibiting Withanolides from *Ajuga bracteosa*, *Chemistry & biodiversity*, 1, (2004).
- [19] B. Darvas., C. Defu., L.A. Polgar., C. Kormendy., E. Vidal., L. Pap & J. Coll., Effects of some Materials Extracted from *Ajuga reptans* var. *reptans* on *Aedes aegypti* and *Dysdercus cingulatus* Larvae. *Pestic, Sci* , 49, 392-395. (1997).
- [20] M. Pir., S. Ahmad., H.R. Nawaz., N. Ullah., A. Malik., New acetylated quinols from *Ajuga parviflora*, *Fitoterapia*, 70, 229-232, (1999).
- [21] A. Chennai., D. Ait Yahia., F.O. Boukourt ., J. Prost., M.A. Lacaille-Dubois., M. Bouchenak., Effect of aqueous extract of *Ajuga iva* supplementation on plasma lipid profile and tissue antioxidant status in rats fed a high-cholesterol diet, *Journal of Ethnopharmacology*, 109, 207–213, (2007).
- [22] Reveu de l'orient et de l'Algérie, bulletin de la société oriental. Société orientale de France, 1850, 395.
- [23] P.M. Khan., A. Saeed., H. Rubnawaz., A. Malik., The first report of a withanolide from the family Labiatae, *Phytochemistry*, 51, 669-671, (1999).
- [24] P. Akbaya., J'rg .Gertscha., I. fialisb., J'rg. Heilmanna., O. Zerbea., O. Stichera., Novel Antileukemic Sterol Glycosides from *Ajuga salicifolia* ,*HELVETICA CHEMICA ACTA* , 85 (2002).

- [25] M. Takasaki., I. Yamauchi., M. Haruna., T. Konoshima., New Glycosides from *Ajuga decumbens*, J. Nat. Prod, 61, 1105-1109, (1998).
- [26] L.A. Manguro., S.O. Wagai., P. Lemmen., Flavonol and iridoid glycosides of *Ajuga remota* aerial parts, Phytochemistry, 67, 830–837 ,(2006).
- [27] T. Konoshima., M. Takasaki., H. Tokuda., H. Nishino, Cancer chemopreventive activity of an iridoid glycoside, 8-acetylharpagide from *Ajuga decumbens*, Cancer Letters, 157, 87-92, (2000).
- [28] M. Takasaki., H. Tokuda., H. Nishino and T. Konoshima., Cancer Chemopreventive Agents (Antitumor-promoters) from *Ajuga decumbens*, J. Nat. Prod, 62, 972-975, (1999).
- [29] A.Castro., J. Coll., Y.A. Tandron., A. K. Pant and C.S. Mathela., Phytoecdysteroids from *Ajuga macrosperma* var. *breWiflora* Roots, J. Nat. Prod, 71,1294–1296, (2008).
- [30] P.M. Khan., A. Malik., S. Ahmad., H.R. Nawaz., Withanolides from *Ajuga parviflora*, J. Nat. Prod, 62, 1290-1292, (1999).
- [31] P. M. Khan., H.R. Nawaz., S. Ahmad and A. Malik., Ajugins C and D, New Withanolides from *Ajuga parviflora*, Helvetica Chimica Acta , 82, (1999).
- [32] A. Chaari., H. Ben Jannet, Z. Mighri., M.C. Lallemand and N. Kunesch., 7-O-6'-O-Malonylcachinesidic Acid, a New Macrocyclic Iridoid Ester of Malonic Acid from the Tunisian Plant, *Ajuga pseudoiva* , J. Nat. Prod , 65, 618-620, (2002).
- [33] A. Vanyolos and all., C-29 Ecdysteroids from *Ajuga reptans* var. *reptans*, J. Nat. Prod, 72, 929–932, (2009).
- [34] J. Coll., Y.A. Tandron., X. Zeng., New phytoecdysteroids from cultured plants of *Ajuga nipponensis* Makino, Steroids, 72, 270–277, (2007).
- [35] L. Dinan., P. Whiting., P. Bourne., J. Coll., 8-O-Acetylharpagide is not an ecdysteroid agonist, Insect Biochemistry and Molecular Biology, 31, 1077–1082, (2001).
- [36] R. Jbilou., H. Amri., N. Bouayad., N. Ghailani ., A. Ennabili ., F. Sayah .,Insecticidal effects of extracts of seven plant species on larval development, α -amylase activity and offspring production of

Tribolium castaneum (Herbst) (Insecta: Coleoptera: Tenebrionidae), *Bioresource Technology*, 99,959–964, (2008).

[37] P. Akbay., I. Calis., J. Heilmann., O. Sticher., New Stigmastane Sterols from *Ajuga salicifolia*, 66, 4, (2003).

[38] R. Gautam., S.M. Jachak., A. Saklani., Anti-inflammatory effect of *Ajuga bracteosa* Wall Ex Benth Mediated through cyclooxygenase (COX) inhibition, *Journal of Ethnopharmacology*, (2010).

[39] M.L. Bondi., M.R.Y. Al-Hillo., K. Lamara., S. Ladjel., M. Bruno., F. Piozzi., M.S.J. Simmonds., Occurrence of the antifeedant 14,15-dihydroajugapitin in the aerial parts of *Ajuga iva* from Algeria *Biochemical Systematic and Ecology*, 28, 1023-1025, (2000).

[40] X.C. Huang., S. Qin., Y.W. Guo., K. Krohn., Four New Neoclerodane Diterpenoids from *Ajuga decumbens*, *Helvetica Chimica Acta*, 91, (2008).

[41] H. Ben Jannet., A. Chaari., Z. Mighri., M.T. Martin., A. Loukaci., Neo-clerodane diterpenoids from *Ajuga pseudoiva* leaves, *Phytochemistry*, 52, 1541-1545, (1999).

[42] H. Ben Jannet., F. H. Skhiri., Z. Mighri., M.S.J. Simmonds., W.M. Blaney., Antifeedant activity of plant extracts and of new natural diglyceride compounds isolated from *Ajuga pseudoiva* leaves against *Spodoptera littoralis* larvae, *Industrial Crops and Products*, 14, 213–222, (2001).

[43] G. Kökdil., G. Topcu., A. C. Gören., W. Voelter., Steroids and terpenoids from *Ajuga relictia*, *Z. Naturforsch*, 57, 957- 960, (2002).

[44] G. Topcu., A. Ulubelen., Structure elucidation of organic compounds from natural sources using 1D and 2D NMR techniques, *Journal of Molecular Structure*, 834–836 57–73, (2007).

[45] P. Carbonell., J. Coll., Ajugatansins., neo-clerodane diterpenes from *Ajuga reptans*, *Phytochem Anal*, 12, 73–78 (2001).

[46] H. Chen., R.X. Tan., Z.L. Liu., Y. Zhang., Antibacterial neoclerodane diterpenoids from *Ajuga lupulina*. *J. Nat. Prod.*, 59, 668-670, (1996).

[47] J. Coll., Y. Tandrón., Isolation and identification of neoClerodane Diterpenes from *Ajuga remota* by High performance Liquid Chromatography, *Phytochem. Anal*, 16, 61–67, (2005).

- [48] Seyed Ebrahim Sajjadi and Alireza Ghannadi, Volatile Oil Composition of the Aerial Parts of *Ajuga orientalis* L. from Iran, Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, 166-168, (2004)
- [49] J. El Hilaly., B. Lyoussi., Hypoglycaemic effect of the lyophilised aqueous extract of *Ajuga* in normal and streptozotocin diabetic rats, Journal of Ethnopharmacology, 80 , 109–113, (2002).
- [50] D.T .Senouci., H. Ghomari., D. Krouf., S. Bouderbala., J. Prost., M.A. Lacaille-Dubois., M. Bouchenak., Antioxidant effect of *Ajuga iva* aqueous extract instreptozotocin-induced diabetic rats. Phytomedicine, 16, 623–631, (2009).
- [51] S. Bouderbala., M.L. Senhadji., J. Prost., M.A.L. Duboisc., M. Bouchenak., Changes in antioxidant defense status in hypercholesterolemic rats treated with *Ajuga iva*, Phytomedicine, 15, 453–461. (2008).
- [52] J. El-Hilaly., A. Tahraoui., Z.H. Israili., B. Lyoussi., Hypolipidemic effects of acute and sub-chronic administration of an aqueous extract of *Ajuga iva* L, whole plant in normal and diabetic rats, Journal of Ethnopharmacology, 105, 441–448 , (2006).
- [53] J. Bruneton., Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales, 3^{ème} édition, 1999, 618.
- [54] Glenn D. Considine, Van Nostrand's Encyclopedia of Chemistry, Edition Wiley, 2005, 1831.
- [55] M.I. Choudhary and all., Withanolides, a new class of natural cholinesterase inhibitors with calcium antagonistic properties, Biochemical and Biophysical, Research Communications, 334, 276–287, (2005).
- [56] M. El-Hattab, Contribution à l'étude chimique des extraits lipidiques et huiles essentielles d'algues méditerranéennes et de l'océan atlantique isolement, détermination, détermination structurale de nouveaux métabolites et modélisation mathématique des procédés d'extraction, doctorat d'état, Université Saad DAHLAB de Blida, (2005) .
- [57] A. Hernandez., C. Pascual., J. Sanz., B. Rodriguez., Phytochemistry, 21, 2909-2911, (1982).
- [58] F.C. Coll., J. O. Dargauo., Phytochemistry, 23, 2577-2579, (1984).

- [59] Z. H. Israili, B. Lyoussi., Ethnopharmacology of the plants of genus *Ajuga*, Pak. J. Pharm. Sci, 22, 4, 425-462, (2009).
- [60]: S. Bouderbala, J. Prost, M.A. Lacaille-Dubois, M. Bouchenak. Iridoid extracts from *Ajuga iva* increase the antioxidant enzyme activities in red blood cells of rats fed a cholesterol-rich diet, Nutrition Research, 30, 358–365, (2010)
- [61] N. Shoji., A. Umeyama., N. Sunahara., S. Arihara., Ajureptoside a novel C₉ iridoid glucoside from *ajuga reptans.*, Journal of Natural Products, 55, 7,1004-1006,(1992).
- [62] N.A. Nyman., J.T. Kumpulainen., Determination of anthocyanidins in berries and red wine by High-Performance Liquid Chromatography, J. Agric. Food Chem, 49, 9, 4183-4187, (2001).
- [63] Plan de Gestion II, période quinquennale, Parc national de Chréa, 2005-2009
- [64] Skoog & West & Holler, Chimie Analytique, Edition De Boeck Université, 870, (2002).
- [65] J. PAOLINI, caractérisation des huiles essentielles par CPG/Ir, CPG/SM-(IE et IC) et RMN du carbone-13 de *Cistus albidus* et de deux asteraceae endémiques de Corse : *Eupatorium cannabinum Subsp corsicum*, et *Doronicum corsicum*, thèse de doctorat, Université de Corse Pascal Paoli, 2005
- [66] J. Kubola, S. Siriamompun, Phytochemicals and antioxidant activity of different fruit fractions (peel, pulp, aril and seed) of Thai gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng), Food chemistry, 127, 1138–1145 (2011)
- [67] R. A. A. Mothana, S. S. Hasson, W. Schultze, A. Mowitz, U. Lindequist, Phytochemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of essential oils of three endemic Soqotraen *Boswellia* species, Food chemistry 126, 1149–1154, (2011).
- [68] J. Deng, W. Cheng, G. Yang, A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay, Food Chemistry, 125, 1430–1435, (2011)
- [69] B. Tepe, D. Daferera, A. Sokmen, M. Sokmen, M. Polissiou, Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae), Food Chemistry ,90 333–340, (2005)

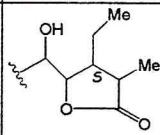
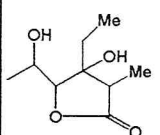
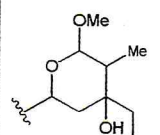
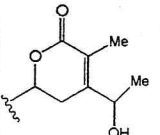
- [70] N. Gourine, M. Yousfi, I. Bombarda, B. Nadjemi, P. Stocker, E.M. Gaydou, Antioxidant activities and chemical composition of essential oil of *Pistacia atlantica* from Algeria, *Industrial Crops and Products* 31, 203–208, (2010)
- [71] C. Sarikurkcü, B. Tepe, D. Daferera, M. Polissiou, M. Harmandar, Studies on the antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of *Marrubium globosum* subsp. *Globosum* (Lamiaceae) by three different chemical assays, *Bioresource Technology* 99, 4239–4246, (2008)
- [72] F. Oke, B. Aslim, Sahlan Ozturk, Senol Altundag, Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten, *Food Chemistry* 112 874–879, (2008)
- [73] J. Safaei-Ghomi, A. H. Ebrahimabadi, Z. Djafari-Bidgoli, H. Batooli, GC/MS analysis and in vitro antioxidant activity of essential oil and methanol extracts of *Thymus caramanicus* Jalas and its main constituent carvacrol, *Food Chemistry* 115, 1524–1528 (2009).
- [74] M. Neffati, J. Sriti, G. Hamdaoui, M. E. Kchouk, B. Marzouk, Salinity impact on fruit yield, essential oil composition and antioxidant activities of *Coriandrum sativum* fruit extracts, *Food Chemistry* 124, 221–225, (2010)
- [75] S. Fukai, S. Tanimoto, A. Maeda, H. Fukuda, Y. Okada, M. Nomura, Pharmacological activity of compounds extracted from Persimmon Peel (*Diospyros kaki* THUNB.), *Journal of Oleo Science*, 58, (4) 213-219 (2009)
- [76] M. CHAKOU & K. BASSOU, Efficacités antibactériennes et antifongiques des huiles essentielles obtenues par extraction de la menthe verte *Mentha spicata* L- issue de la région de Ouargla sur quelques germes pathogènes : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Candida albicans*. Mémoire de DES, Université Kasdi Merbah OUARGLA, 2006/2007
- [77] E.B. Shirling, D. Gottlieb, Methods for characterization of *Streptomyces* species, *International journal of systematic bacteriology*, 16, 313-340, (1966)
- [78] K. Chifundra, W. M. Bury, Kizungub, Screening photochimique et antibactérien des extraits de *Ficus sycomorus* L. Short, *Fitoterapia*, 61 535-539, (1990)
- [79] T. Hart & P. Shears, Atlas de poche de microbiologie, Flammarion Médecine-Sciences, 1997, 314.

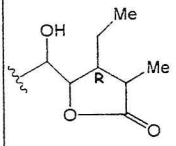
- [80] A. Kimani, M. Kuria and all, The Antiplasmodial Activity of Isolates from *Ajuga remota*, J. Nat. Prod, 65, 789-793, (2002).
- [81] A. Castro., J. Coll., Y.A. Tandron., A. K. Pant and C.S. Mathela., Phytoecdysteroids from *Ajuga macrosperma* var. *breWiflora* Roots, J. Nat. Prod, 71,1294–1296, (2008).
- [82] P. Malakov., G.Y. Papanov, Areptins A and B: Two new Neo-Clerodane diterpenoids from *Ajuga*, Phytochemistry, 49, 8, 2443-2447, (1998).
- [83] A. Kimani, M. Kuria and all, The Antiplasmodial Activity of Isolates from *Ajuga remota*, J. Nat. Prod, 65, 789-793, (2002).
- [84] N. Terahara., A. Callebaut., R. Ohba., T. Nagata., M.O. Kameyama., M. Suzuki, Acylated anthocyanidin 3-sophoroside-5-glucosides from *Ajuga reptans* flowers and the corresponding cell cultures, Phytochemistry, 58, 493–500, (2001).
- [85] D.L. Madhavi., S. Juthangkoon., K. Lewen., M.D. Berber-Jimenez., M.A.L. Smith., Characterization of anthocyanins from *Ajuga pyramidalis* Metallica Crispa cell cultures, J. Agric. Food Chem., 44, 1170-1176, (1996).
- [86] H. Chen., R.X. Tan., Z.L. liu., C.Y. Zhao., J. Sun., A Clerodane diterpene with Antibacterial, Acta Cryst, 53, 814-816, (1997).

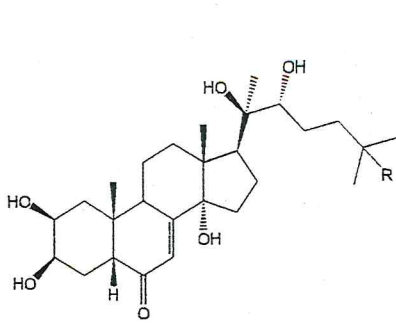


Annexes

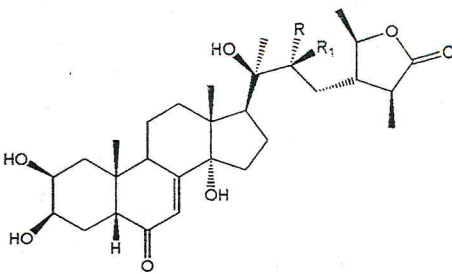
Annexe 1 : Ecdystéroïdes isolés des espèces du genre *Ajuga*

Numéro de référence	Composés					Espèces
	Numéro de la Structure	R	R1	Nom Des produits isolés	Propriétés physiques	
[34]	1	OH	-	<i>20-hydrox ecdysone, 20E</i>	-	A. <i>nipponis</i> Makino
		H	-	<i>Ajugasterone C</i>	-	
	2	OH	H	<i>cyasterone</i>	-	
		Oac	H	<i>cyasterone 22-acétate</i>	-	
		O	O	<i>22-dehydrocyasterone</i>	-	
	3	-	-	<i>Ajugacetalsterone A</i>	-	
	4	-	-	<i>22-Dehydrocyasterone 2-glucoside</i>	-	
5	-	-	<i>Ajugacetalsterone B</i>	-		
[33]	6		-	<i>Reptanslactone A</i>	$[\alpha]_D^{25} +17$	A. <i>reptans</i>
			-	<i>Reptanslactone B</i>	$[\alpha]_D^{25} +3$	
			-	<i>sendreisterone</i>	$[\alpha]_D^{28} +22$	
			-	<i>24- dehydroprecyasterone</i>	MP 275-277 $[\alpha]_D^{25} +7$	

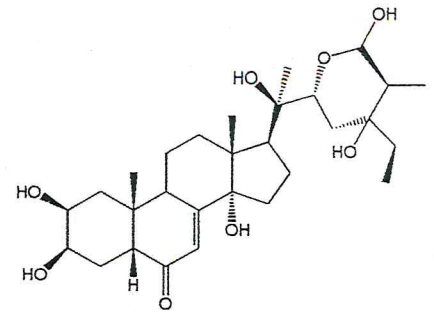
			-	Breviflorasterone	MP 268-270 $[\alpha]^{25}_D +15$	
[51]	7	H		Ajugasaliciosides A	$[\alpha]^{20}_D +8.4$	A. salicifolia
		beta-D glycosyl		Ajugasaliciosides B	$[\alpha]^{20}_D +16.5$	
	8	H		Ajugasaliciosides C	$[\alpha]^{20}_D -13.6$	
		beta-D glycosyl		Ajugasaliciosides D	$[\alpha]^{20}_D -16.6$	
	9	-	-	Ajugasaliciosides E	$[\alpha]^{20}_D -13.5$	
[80]	10	H		ajugasalicigenin I	MP 192 $[\alpha]^{20}_D +5.7$	A. salicifolia
		Beta glucose		ajugasalicioside F	MP 243 $[\alpha]^{20}_D -3$	
	11	-	-	ajugasalicioside G	MP 187 $[\alpha]^{20}_D -8$	
	12	-	-	ajugasalicioside H	MP 154 $[\alpha]^{20}_D -13.2$	
[47]	13	-	-	(24S)-24-ethylcholesta-5,25-diene-11 α -hydroxy-1-one	-	A. <i>relicta</i>
	14	-	-	(24S)-24-ethylcholesta-5,25-diene-7 α -hydroxy-3-one	-	
[81]	15			Ajugacetalsterone C		A. <i>macrosp</i> <i>er</i> <i>ma</i> <i>var.</i> <i>breviflora</i>
	16			Breviflorasterone		
	17			Ajugacetalsterone D		



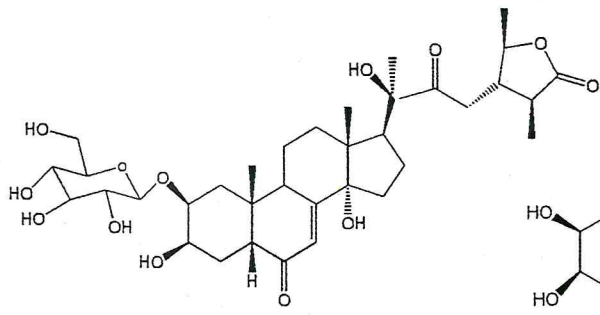
Composé -1-



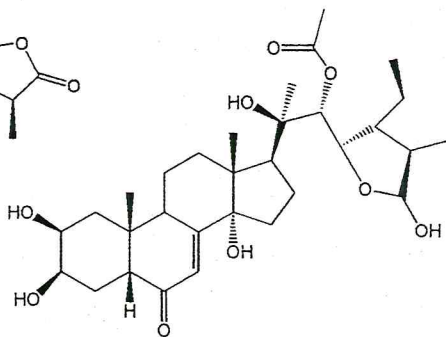
Composé -2-



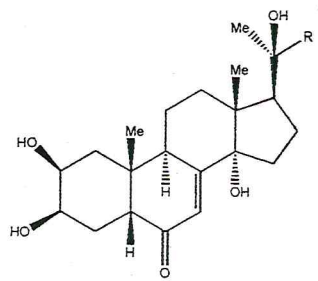
Composé -3-



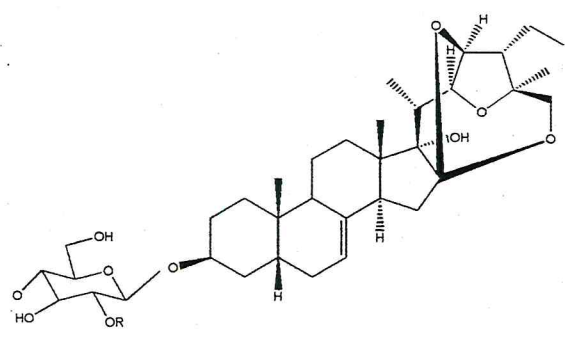
Composé -4-



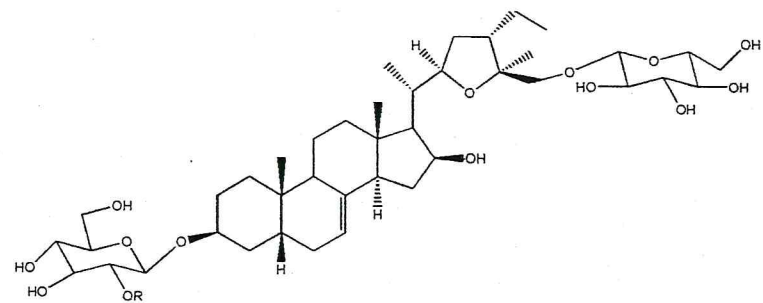
Composé -5-



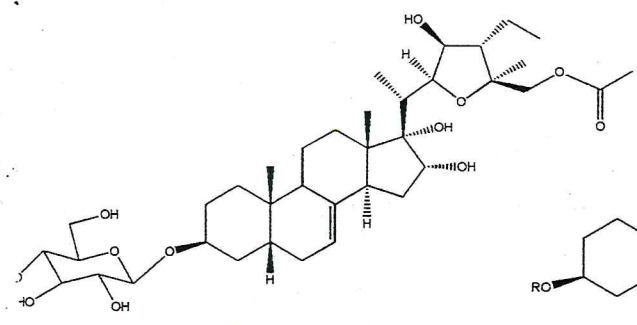
Composé -6-



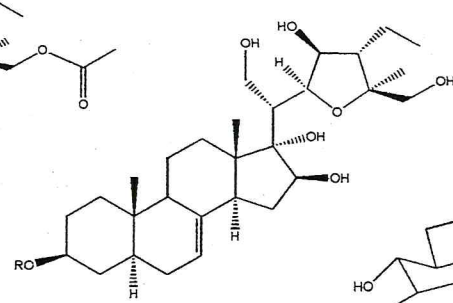
Composé -7-



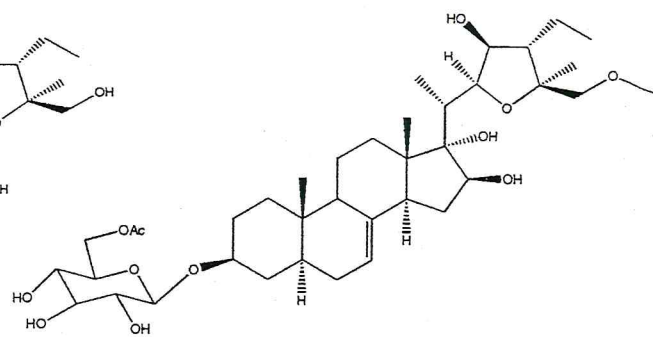
Composé -8-



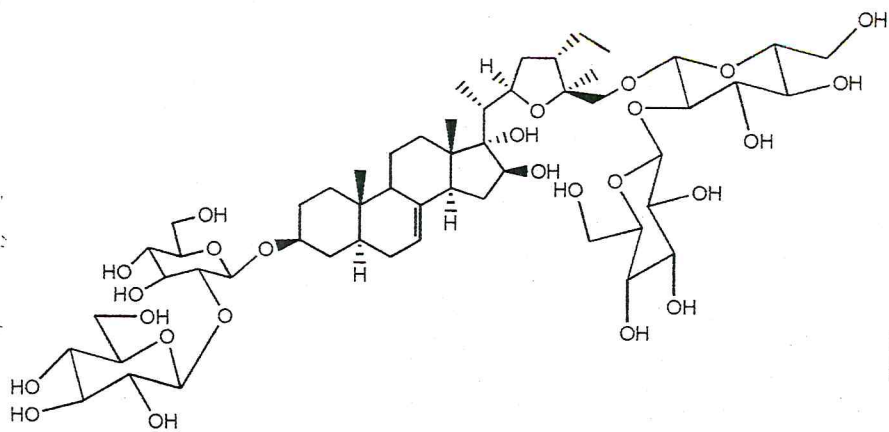
Composé -9-



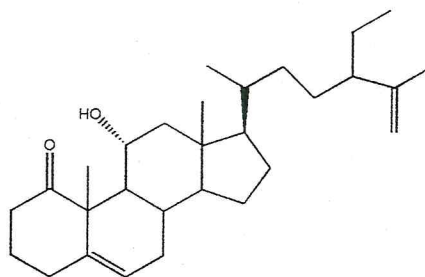
Composé -10-



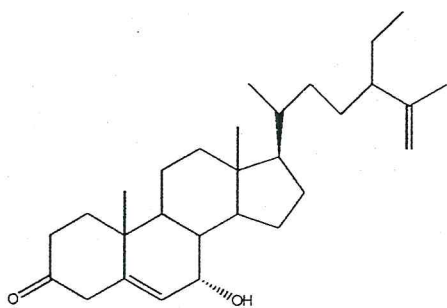
Composé -11-



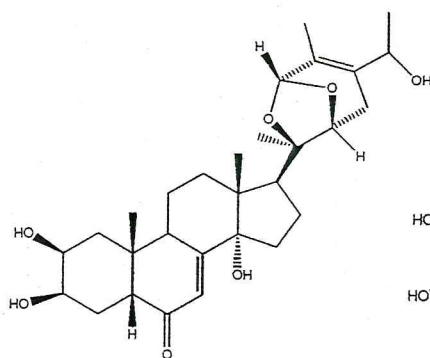
Composé -12-



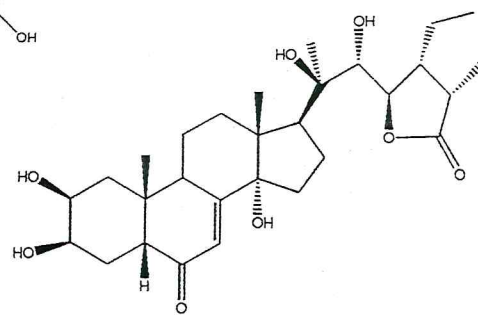
Composé -13-



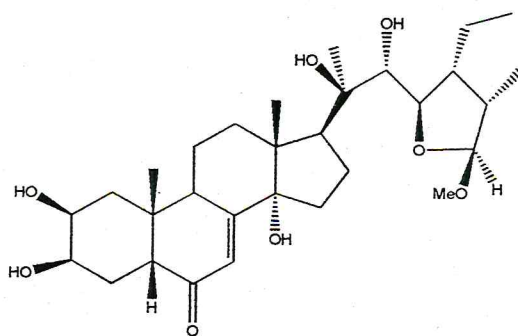
Composé -14-



Composé -15-



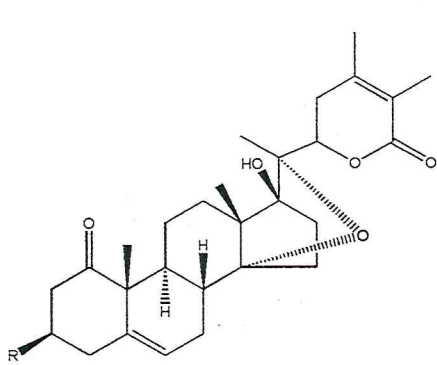
Composé -16-



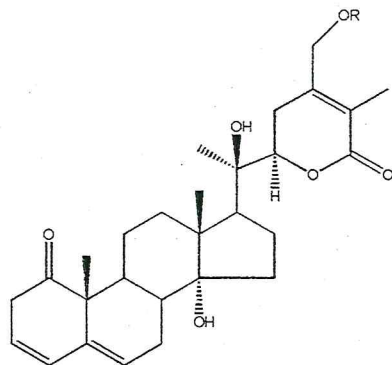
Composé -17-

Annexe 2 : Withanolides isolés des espèces du genre *Ajuga*

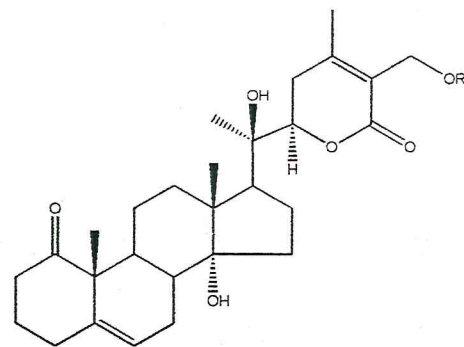
Numéro de référence	Composés				Espèce
	Numéro de la structure	Radicaux	Nom du composé	Propriétés physique	
		R			
[18]	19	OH	ajugin	$[\alpha]_D +70.5^\circ$ $C_{28}H_{38}O_6$	<i>A. parviflora</i>
[26]	20	H	ajugin A	$[\alpha]_D^{25} +120^\circ$ $C_{28}H_{38}O_6$	<i>A. parviflora</i>
	21	H	ajugin B	$[\alpha]_D^{25} +64^\circ$ $C_{28}H_{40}O_6$	
[27]	22	H	ajugin C	$[\alpha]_D^{25} +123^\circ$ $C_{28}H_{38}O_7$ $R_f = 0.45$	<i>A. parviflora</i>
	23	H	ajugin D	$[\alpha]_D^{25} +74^\circ$ $C_{28}H_{40}O_8$ $R_f=0.33$	
[24]	24	OH	Ajugin E	$[\alpha]_D^{21} +125^\circ$ $C_{28}H_{39}O_7$	<i>A. parviflora</i>
	25	OH	Ajugin F	$[\alpha]_D^{21} +57^\circ$ $C_{28}H_{41}O_6$	
[20]	26	Me	Bracteosin A	$[\alpha]_D^{31} +37^\circ$ $C_{29}H_{42}O_7$	<i>A. bracteosa</i>
		COOH	Bracteosin B	$[\alpha]_D^{31} +14.5^\circ$ $C_{29}H_{40}O_9$	
	27	-	Bracteosin C	$[\alpha]_D^{31} +29$ $C_{29}H_{44}O_7$	



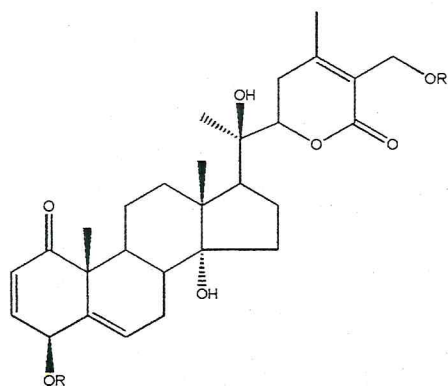
Composé -19-



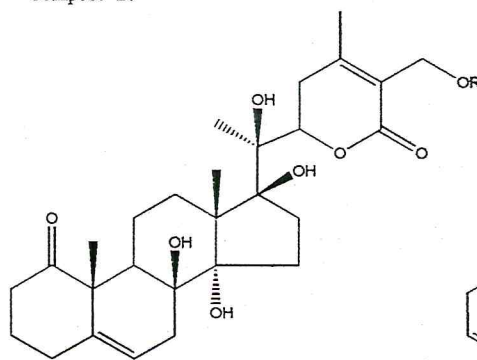
Composé -20-



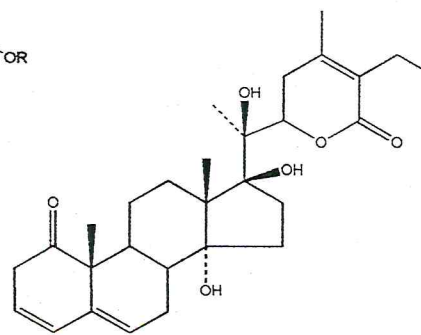
Composé -21-



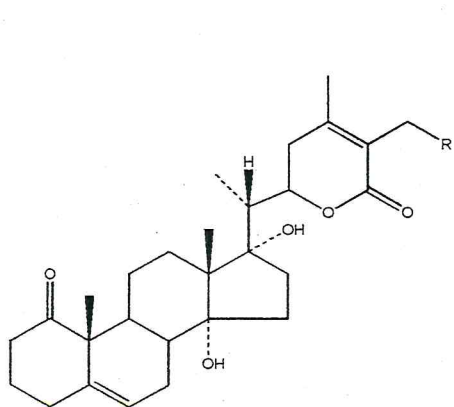
Composé -22-



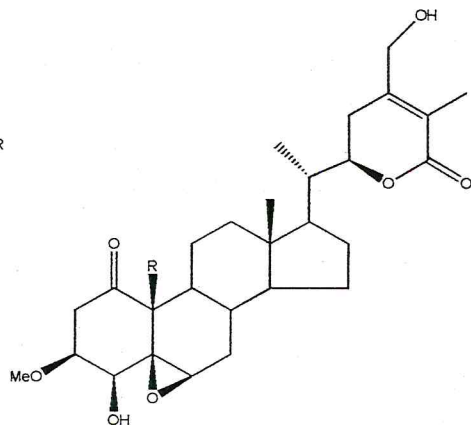
Composé -23-



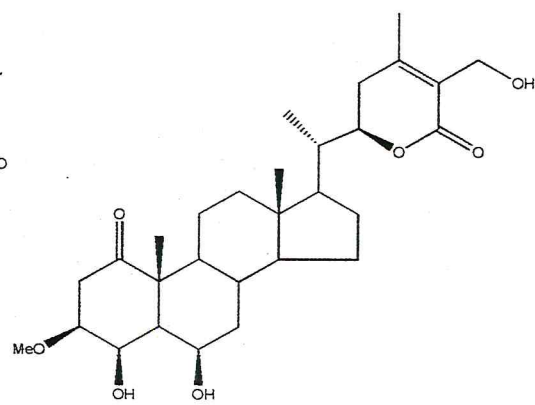
Composé -24-



Composé -25-



Composé -26-



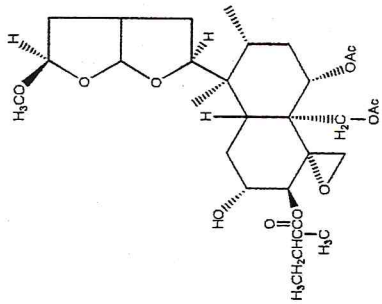
Composé -27-

Annexe 3 : Diterpènes néo-clerodanes isolés des espèces du genre *Ajuga*

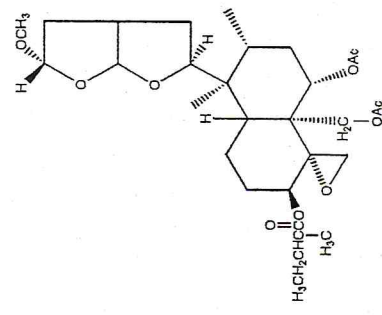
Numéro de référence	Numéro de structure	Composé						Espèce
		Radicaux				Nom du composé	Propriétés physique	
		R	R1	R2	R3			
[46]	28	-	-	-	-	Lupulins A	C ₃₀ H ₄₆ O ₁₁	<i>A. lupulina</i>
	29	-	-	-	-	Lupulins B	C ₃₀ H ₄₆ O ₁₀	
	30	-	-	-	-	Lupulins C	C ₂₄ H ₃₆ O ₆	
[82]	35	-	-	-	-	Areptins A	-	<i>A. reptans</i>
	36	-	-	-	-	Areptins B	-	
[41]	37	H	OH	OMe	H	Havitene A	[α] _D ²⁰ -12,1° C ₂₉ H ₄₄ O ₁₁	<i>A. pseudoiva</i>
		H	OH	H	OMe	Havitene B	[α] _D ²⁰ -2,8° C ₂₉ H ₄₄ O ₁₁	
		OH	H	H	OMe	Havitene C	C ₂₉ H ₄₄ O ₁₁	
		-	OH	H	-	Ivain IV	C ₂₉ H ₄₄ O ₁₁	
[39]	38	-	H	OH	-	14,15-dihydroajugapitin	[α] _D -39°	<i>A. iva</i>
		H2	H	OMeBu	-	Ajugamarin F4	-	
[45]	33	Alpha-H, Beta-OH	Beta-OMeBu	H	-	Ajugatanin A1	-	<i>A. reptans</i>
		H2	Beta-OH	OMeBu	-	Ajugatanin B1	-	
		H2	Alpha-OH	OMeBu	-	3α-hydroxyajugamarin F4	-	
		O	Beta-OMeBu	H	-	Ajugareptansone A	-	

[45]	34	H	H	H	H	H	Clerodin	-	A. reptans				
			H	H	H	Dihydroclerodin	-						
			OTig	Beta-OH	OMeBu	-	Ajugatanin D1	-					
			OMeBu	H	H	-	Ajugatanin A	-					
			OTig	H	H	-	Ajugatanin B	-					
			OMeBu	H	OH	-	Ajugareptansin	-					
			OH	Alpha-OAC	OMeBu	-	Areptin A	-					
			[83,45]	33	H2	H	H	-		Ajugarin I	C ₂₄ H ₃₄ O ₇	A. reptans A. remota	
						OAc	OAc	-		Ajugarin I			-
						OH	OAc	-		Ajugarin II			-
OAc	OAc	-				Ajugarin III	-						
OAc	H	-				Ajugarin IV	-						
OH	H	-				Deacetylajugarin IV	-						
-	-	H				H	Clerodin	-					
-	-	H				H	Dihydroclerodin	-					
-	-	OH				OMeBu	Ajugapitin	-					
-	-	OH				OMeBu	dihydroajugapitin	-					
[47]	41	-	-	H	H	14-hydro-15-hydroxyclerodin	-	A. remota					
		-	-	OH	OMeBu	14-hydro-15-hydroxyajugapitin	-						
		-	-	OH	OMeBu	14-hydro-15-hydroxyajugapitin	-						
		-	-	OH	OMeBu	14-hydro-15-hydroxyajugapitin	-						

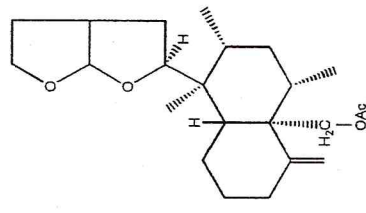
[44]	31	-	-	-	-	-	acide Ajugalaevigatique	-	<i>A. chamaepitys</i>
	32	-	-	-	-	-	acide 13(S)-15-hydroxylabd-8(17)-en-19-oïque	-	
[40]	42	-	MeBu	β -MeO	-	-	15-epilupulin A	$[\alpha]_D^{20} -85^\circ$ $C_{30}H_{46}O^+$ ₁₁	<i>A. decumbens</i>
		-	MeBu	β -MeO	-	-	lupulin A	-	
		-	IsoBu	β -MeO	-	-	hativene A	-	
[40]	43	-	H	-	-	-	6-O-deacetylajugamarin	$[\alpha]_D^{20} +10^\circ$ $C_{27}H_{38}O^+$ ₉	<i>A. decumbens</i>
		-	Ac	-	-	-	ajugamarin	-	
[40]	44	-	-	-	-	-	ajugadecumbenin A	$[\alpha]_D^{20} 0^\circ$ $C_{24}H_{34}O^+$ ₈	<i>A. decumbens</i>
		Tig	-	-	-	-	Ajugadecumbenin B	$[\alpha]_D^{20} +6^\circ$ $C_{27}H_{38}O^+$ ₈	
		MeBu	-	-	-	-	Ajugamarin F ₃	-	
[9]	46	H, H	OAc	-	-	-	14,15- dihydroajugachin B	$[\alpha]_D^{20} -28^\circ$ $C_{31}H_{46}O$ ₁₂	<i>A. turkestanica</i>
		H, OCH ₃	OAc	-	-	-	14-hydro-15-methoxyajugachin B	$C_{32}H_{48}O$ ₁₃	
		H, OH	OAc	-	-	-	chamaepitin	$C_{31}H_{46}O$ ₁₃	
		OCH ₃	H	-	-	-	lupulin A	-	
		-	OAc	-	-	-	ajugachin B	-	
47	-	H	-	-	-	ajugapitin	-		



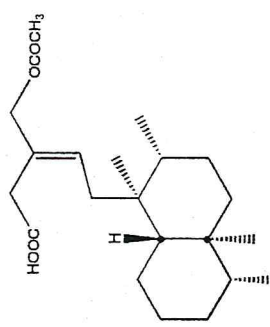
Composé -28-



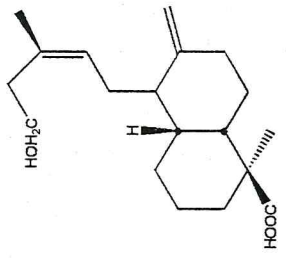
Composé -29-



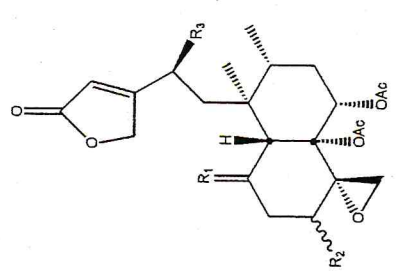
Composé -30-



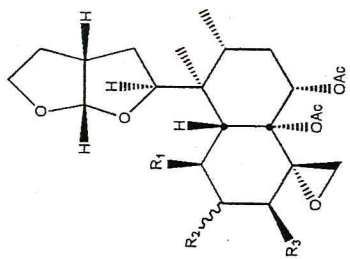
Composé -31-



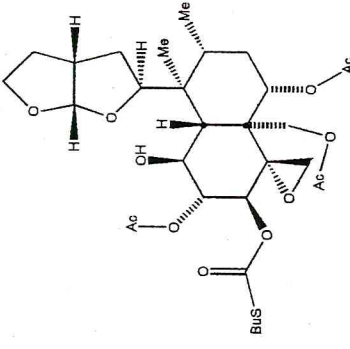
Composé -32-



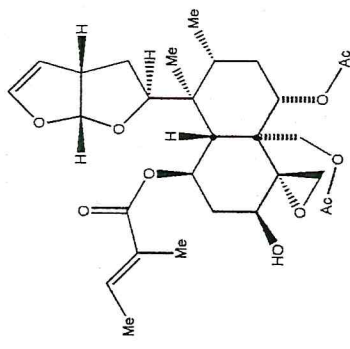
Composé -33-



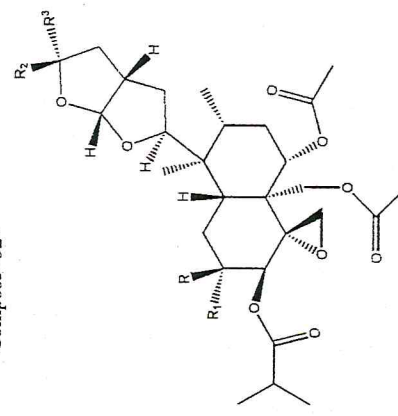
Composé -34-



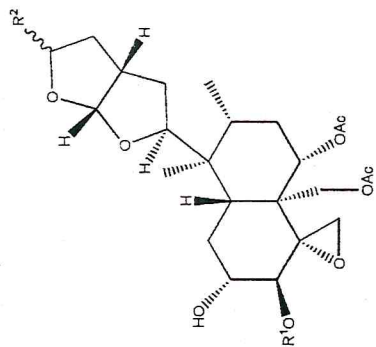
Composé -35-



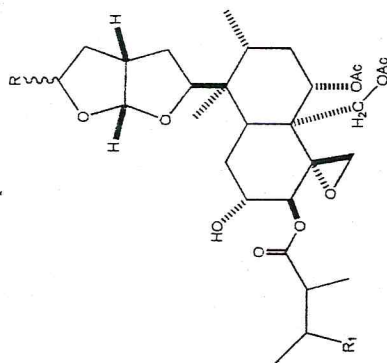
Composé -36-



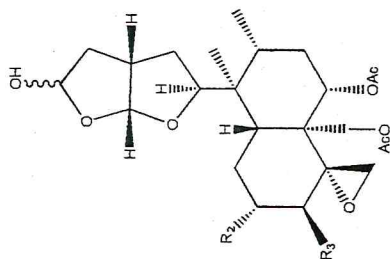
Composé -37-



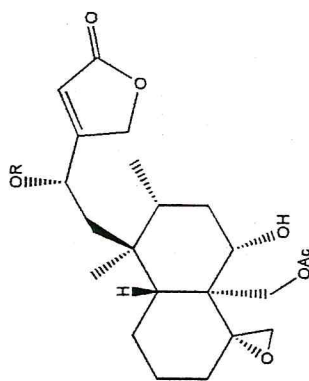
Composé -42-



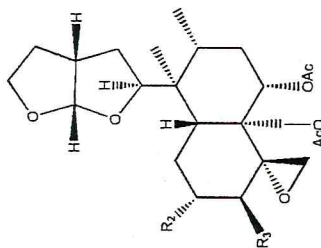
Composé -46-



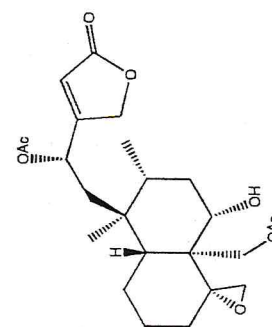
Composé -41-



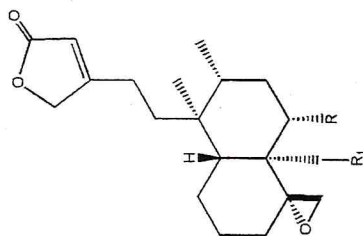
Composé -45-



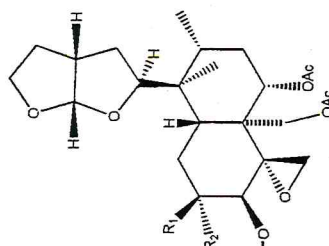
Composé -40-



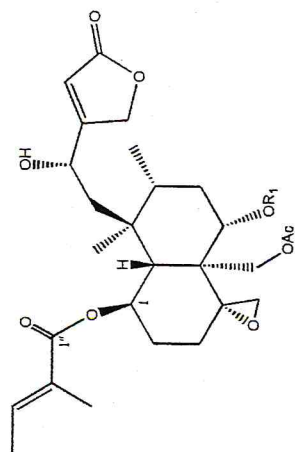
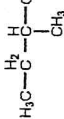
Composé -44-



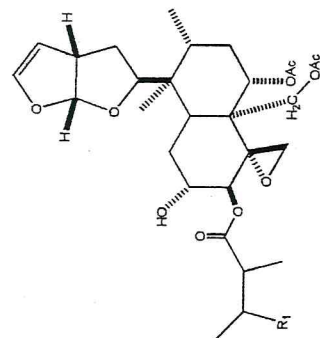
Composé -39-



Composé -38-



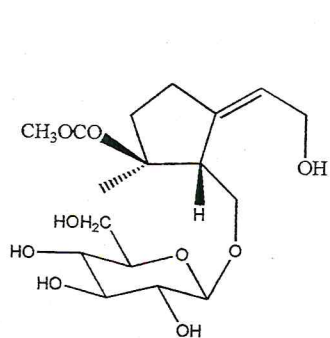
Composé -43-



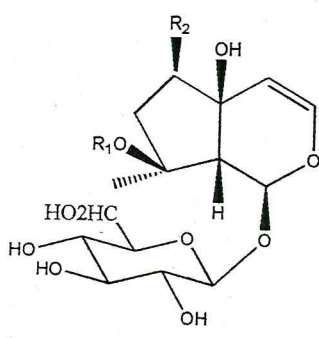
Composé -47-

Annexe 4 : Iridoides isolés des espèces du genre *Ajuga*

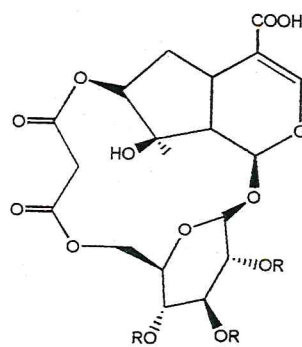
Numéro de référence	Composé					Espèce
	Numéro de structure	Radicaux		Nom du composé	Propriétés physique	
		R	R1			
[61]	48	-	-	Ajureptoside	-	<i>A. reptans</i>
[27, 61]	49	AC	H	Reptoside	-	<i>A. reptans</i> <i>A. decumbens</i>
		H	OH	Harpagide	-	
[27, 28, 83,61]	49	AC	OH	8-acetylharpagide	-	<i>A. reptans</i> <i>A. remota</i> <i>A. decumbens</i>
[32]	50	H	-	7-O-6L-O-malonylcachinesidic acid	-	<i>A. pseudoiva</i>
[26]	51	-	-	6,8-diacetylharpagide	-	<i>A. remota</i>
	52	-	-	6,8-diacetylharpagide 1-O-(2β,3β-diacetyl-β-glucoside)	-	



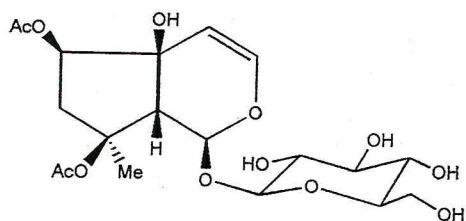
Composé -48-



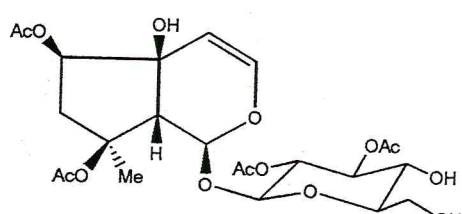
Composé -49-



Composé -50-



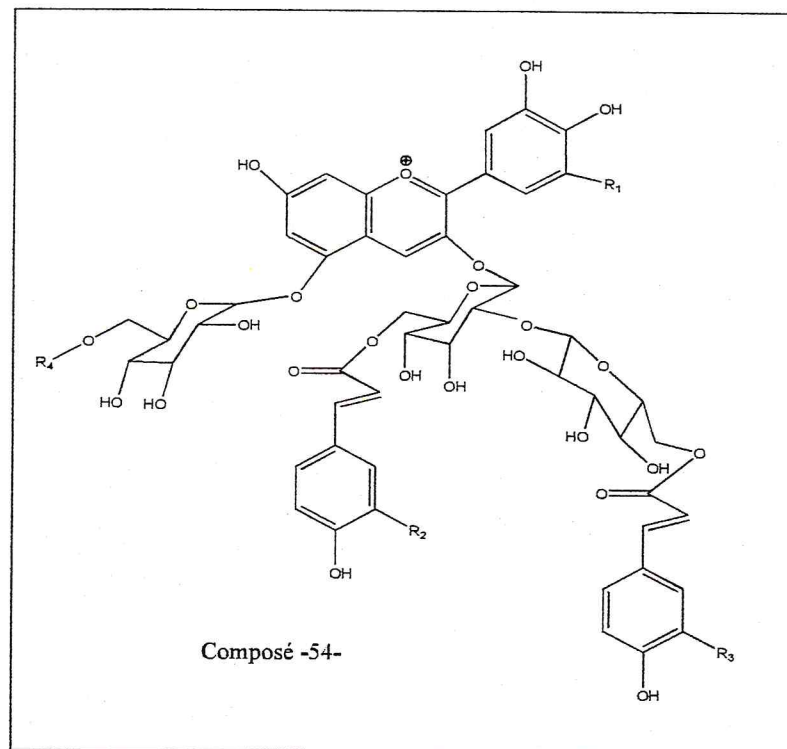
Composé -51-



Composé -52-

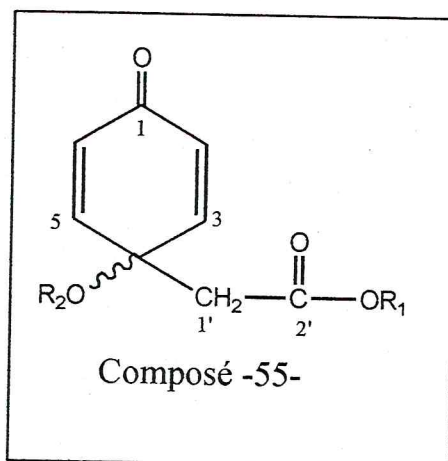
Annexe 5 : Anthocyanines isolés des espèces du genre *Ajuga*

Numéro de référence	Composé					Espèce	
	Numéro de structure	Radicaux					Nom du composé
		R1	R2	R3	R4		
[84]	54	OH	H	OCH3	malonyl	delphinidin 3-(p coumaroylferuloyl) sophoroside-5-malonylglucoside	<i>A. reptans</i>
		OH	OCH3	OCH3	malonyl	delphinidin 3-(diferuloyl)sophoroside-5-malonylglucoside	
		OH	OCH3	OCH3	H	delphinidin 3-(diferuloyl)sophoroside-5-glucoside	
		H	H	H	H	cyanidin 3-(di-p-coumaroyl) sophoroside-5-glucoside	
[84, 85]	54	H	H	OCH3	malonyl	cyanidin 3-(feruloyl-p-coumaroyl) sophoroside-5-malonylglucoside	<i>A. reptans</i> <i>A. pyramidalis</i>

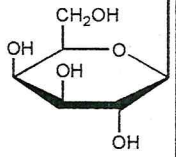
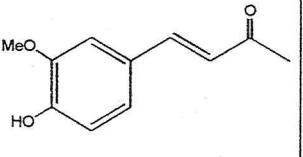
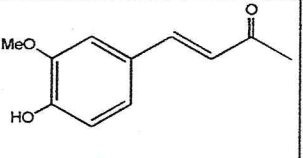


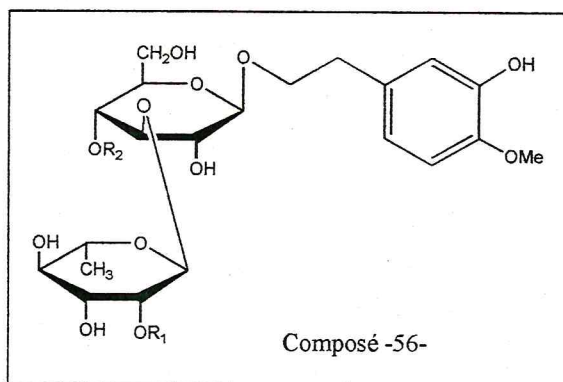
Annexe 6 : Dérivés de la quinone isolés des espèces du genre *Ajuga*

Numéro de référence	Composé						Espèce
	Numéro de structure	Radicaux		Double liaison	Nom du composé	Propriétés physique	
		R1	R2				
[20]	55	CH ₂ CH ₃	COCH ₃		4-Acetyloxy-4-(methylenecarboethoxy)-cyclohexa-2,5-dienone	[α] _D ²⁵ 0° C ₁₂ H ₁₄ O ₅	A. <i>parviflora</i>
		CH ₃	COCH ₃		4-Acetyloxy-4-(methylenecarbomethoxy)-cyclohexa-2,5-dienone	[α] _D ²⁵ 0° C ₁₁ H ₁₂ O ₅	
		CH ₂ CH ₃	H		4-Hydroxy-4-(methylenecarbomethoxy)-cyclohexa-2,5-dienone	[α] _D ²⁵ 0° C ₁₀ H ₁₂ O ₄	
		CH ₃	H		4-hydroxy-4-methylenecarbomethoxy-cyclohexa-2,5-dienone	-	

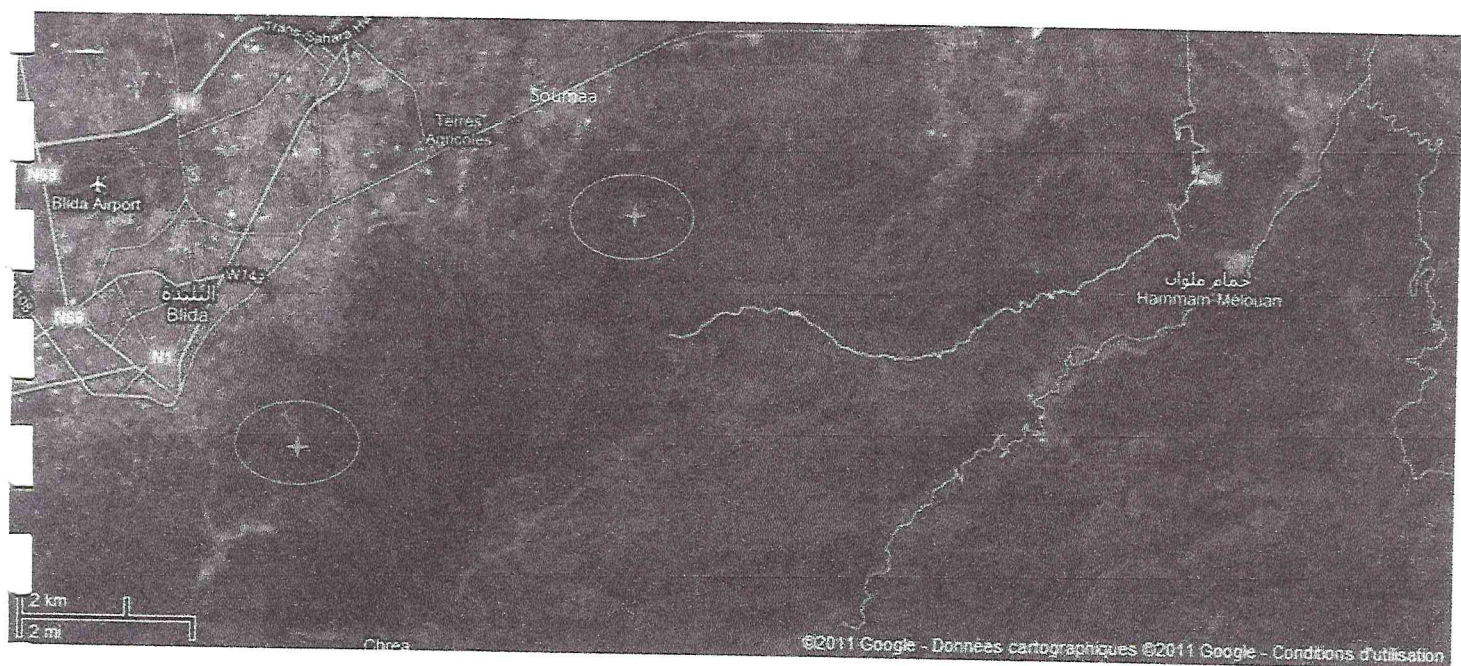


Annexe 7 : Phénéthyle alcool glucoside isolés des espèces du genre *Ajuga*

Numéro de référence	Composé				Espèce	
	Numéro de structure	Radicaux		Nom du composé		Propriétés physique
		R1	R2			
[86]	56			Galactosyl-martynoside	$[\alpha]_D^{25} -37.4^\circ$ $C_{37}H_{51}O_{20}$	
		H		martynoside	-	
		H	H	Darendoside B	-	



Annexe 8 : Carte du lieu de récolte de l'espèce *Ajuga iva*



Zone de récolte de l'espèce végétale

Annexe 9 : Chromatogramme de l'huile essentielle d'*Aiuga iya*

