

REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE

*Union - Discipline – Travail*

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Institut National Polytechnique

Félix HOUPHOUËT-BOIGNY



N° d'ordre : 133/2022

**THESE UNIQUE DE DOCTORAT**

Pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL  
POLYTECHNIQUE FELIX HOUPHOUËT-BOIGNY EN  
SCIENCES DES PROCÉDES CHIMIQUES, ALIMENTAIRES ET  
ENVIRONNEMENTAUX**

Spécialité : **Chimie Organique et Substances Naturelles**

Présentée par :

**SOUMAHORO Brahima**

Thème :

---

**Etude comparative de la composition chimique des  
feuilles de *Hyptis suaveolens* L. Poit. (Lamiaceae) avant  
et après extraction de l'huile essentielle**

---

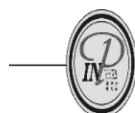
Soutenue publiquement le 11/11/2022 devant le **JURY** composé de :

M. YAO Kouassi Benjamin	Professeur Titulaire, INP-HB	<b>Président</b>
M. BEDI Sahouo Gustave	Professeur Titulaire, ENS	<b>Rapporteur</b>
M. ATTIOUA K. Barthélémy	Professeur Titulaire, UFHB	<b>Rapporteur</b>
Mme. YAO Kouassi A. Philomène	Maître de Conférences, USP	<b>Examinatrice</b>
M. SORO Yaya	Professeur Titulaire, INP-HB	<b>Directeur</b>

REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE

*Union - Discipline – Travail*

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Institut National Polytechnique  
FÉLIX HOUPHOUËT-BOIGNY

EDP  
Ecole Doctorale Polytechnique

N° d'ordre : 133/2022

**THESE UNIQUE DE DOCTORAT**

Pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL  
POLYTECHNIQUE FELIX HOUPHOUËT-BOIGNY EN  
SCIENCES DES PROCEDES CHIMIQUES, ALIMENTAIRES ET  
ENVIRONNEMENTAUX**

Spécialité : **Chimie Organique et Substances Naturelles**

Présentée par :

**SOUMAHORO Brahima**

Thème :

---

**Etude comparative de la composition chimique des  
feuilles de *Hyptis suaveolens* L. Poit. (Lamiaceae) avant  
et après extraction de l'huile essentielle**

---

Soutenue publiquement le 11/11/2022 devant le **JURY** composé de :

<b>M. YAO Kouassi Benjamin</b>	Professeur Titulaire, INP-HB	<b>Président</b>
<b>M. BEDI Sahouo Gustave</b>	Professeur Titulaire, ENS	<b>Rapporteur</b>
<b>M. ATTIOUA K. Barthélémy</b>	Professeur Titulaire, UFHB	<b>Rapporteur</b>
<b>Mme. YAO Kouassi A. Philomène</b>	Maître de Conférences, USP	<b>Examinatrice</b>
<b>M. SORO Yaya</b>	Professeur Titulaire, INP-HB	<b>Directeur</b>

**DEDICACE**

*A la mémoire de mon défunt père, feu **TANOH Ya SOUMAHORO Alaman** et à celle de ma défunte grande mère, feue **SOUMAHORO Kadidja**, qui ont su nous inculquer l'amour des études et du travail bien fait. Repos et paix à leurs âmes !*

*A ma très chère et adorable mère, **KONE Awa**, ma source d'inspiration, pour son amour et son soutien sans faille. Qu'elle soit comblée de grâces !*

*A ma très chère tante, **KOFFI Brou Christiane**, mon soutien de tous les temps, pour la maman qu'elle a su être pour nous. Qu'elle trouve en ce travail l'accomplissement et le réconfort de toutes ces années de sacrifices et de bienveillances à notre égard !*

*A mes frères **Lawanga, Amery, Moussa, Siaka** et mes sœurs **Mantogoman et Biba**, pour leurs prières et soutiens !*

*A ma bien aimée **COULIBALY Fatou**, pour son soutien inconditionnel !*

*A mon fils **Abdoul Aziz** et à ma fille **Kadidja Noura**, pour le courage qu'ils m'ont insufflé !*

*A mes **parents, amis et proches**, pour leur soutien moral et matériel. Qu'ils trouvent satisfactions en ce travail !*

**Gloire à ALLAH !!**

## REMERCIEMENTS

Nos remerciements vont à l'endroit de tous ceux et celles qui de près ou de loin ont favorisé l'aboutissement de ce travail. En particulier, nous adressons nos sincères remerciements à :

- l'INP-HB avec à sa tête le Directeur Général Dr **Moussa Abdoul Kader DIABY** pour le cadre de formation, l'Ecole Doctorale Polytechnique qu'il nous a offert ;
- l'EDP et le LAPISEN avec à leur tête le Directeur, Professeur **YAO Kouassi Benjamin** pour avoir permis notre inscription en thèse et aussi pour le cadre technologique mis à notre disposition ;
- le Département de Formation et de Recherche en Génie Chimique et Agro-Alimentaire avec comme directeur, le Professeur **ADIMA Amissa Augustin**, pour l'aide scientifique et morale ;
- Professeur **YAO Kouassi Benjamin**, Professeur Titulaire pour avoir accepté de présider le jury de thèse ;
- Professeur **BEDI Sahouo Gustave**, Professeur Titulaire et Professeur **ATTIOUA Koffi Barthélémy**, Professeur Titulaire pour avoir instruit cette thèse ;
- Docteur **YAO Kouassi A. Philomène**, Maître de Conférences à l'Université de San Pedro pour avoir examiné cette thèse.

Notre profonde gratitude à l'endroit du Professeur **SORO Yaya**, Professeur Titulaire, notre directeur de thèse ainsi qu'au Docteur **Siaka SORHO**, Maître de Conférences et au Docteur **SORO Doudjo**, Maître de Conférences qui n'ont cessé de nous soutenir et de nous orienter tout au long de ce travail de recherche.

Nos remerciements particuliers sont adressés à l'endroit des docteurs **KASSI Amian Brice Benjamin** et **GOLY Kouassi Roselin Cyrille** sans oublier les docteurs **ABRO Koutouan Désiré Martial**, **KONE Kouwelton Patrick Franck Olivier**, **KOUASSI Esaïe Kouadio Appiah**, **YAO Kouassi Jean Claude**, **KONAN Dibi Jacques**, **YAO N'guessan Jean Claude**, **SEKA Clovis**, **BOHOUI Gouegoui Serge Pacôme**, **KONE Horo**, **DOUHORE Gnaoré Yoh Toussaint**, **KONE Kagbagnan**, **KOUAKOU Adou Eric**, **YAPO Sylvestre()**, **ANO Judicaël**, **COULIBALY Aïssata** et **GOURE Bi Irié Apollinaire**, pour leurs appuis et leurs précieux conseils.

Nos sincères remerciements à tous les enseignants chercheurs de l'EDP et en particulier à ceux du LAPISEN pour leurs soutiens et leurs encouragements.

Nous remercions spécialement tous nos **amis doctorants** de l'EDP (**Mme YABA Virginie Epse Koménan, KANATE Losseyini, KOUAME Konan Thomas, SANOU Ali, N'ZI Kouadio Amino Jacqueline, ATCHE Philatryho, TRAORE Zoumana, OUATTARA Leygnima Yaya, SANOU Sibiri Ferdinand, ADJEME N'cho Michel, TRA Bi Dieudonné, TRAORE Sékou et OUATTARA Yaya Anianhou**) pour tous les moments passés ensemble et tous les obstacles franchis au coude à coude.

Nos remerciements vont également à l'endroit de tout le personnel d'encadrement et techniciens de laboratoire de l'EDP ; en particulier à M. **KOUAME Yao Constant De Modeste, M. N'Da Phillipe** et M. **OBLE Oblé Jean** pour leurs soutiens de tous les temps.

Nous remercions particulièrement M. **André Pénantien KRINA** notre principal et tous les collègues du collège moderne de Massala de même que Mme **COULIBALY Judith épouse Koffi** et les collègues du collège moderne II de Yamoussoukro pour leurs encouragements et leurs conseils avisés.

**TABLE DES MATIERES**

<b>DEDICACE</b> .....	<b>i</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>ii</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>iv</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>xi</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>xiii</b>
<b>LISTE DES SCHEMAS</b> .....	<b>xix</b>
<b>SIGLES – ABREVIATIONS – FORMULES CHIMIQUES</b> .....	<b>xxi</b>
RESUME _____	XXIII
ABSTRACT _____	XXIII
<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	<b>1</b>
<b>PRESENTATION DU PROJET DE THESE</b> .....	<b>4</b>
CONTEXTE GENERAL DU SUJET DE THESE _____	4
BUT ET ENJEU DE L’ETUDE _____	4
QUESTIONS DE RECHERCHE _____	4
HYPOTHESES _____	5
ORIGINALITE _____	5
<b>CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>6</b>
<b>I. GENERALITES SUR LES METHODES D’EXTRACTION DES METABOLITES SECONDAIRES</b> .....	<b>6</b>
I.1. EXTRACTION SOLIDE-LIQUIDE _____	6
I.1.1. Macération .....	6
I.1.2. Extraction au Soxhlet.....	7
I.1.3. Infusion .....	8
I.1.4. Décoction .....	8
I.1.5. Digestion.....	8
I.2. EXTRACTION LIQUIDE-LIQUIDE _____	9

<b>II. GENERALITES SUR LES PHYTOMOLECULES .....</b>	<b>10</b>
II.1. ALCALOIDES .....	10
II.1.1. Propriétés physiques et chimiques.....	10
II.1.2. Propriétés biologiques et pharmacologiques .....	11
II.1.3. Classification biogénétique.....	11
II.1.4. Caractérisation .....	12
II.2. COMPOSES PHENOLIQUES .....	12
II.2.1. Propriétés physiques et chimiques.....	13
II.2.2. Propriétés biologiques et pharmacologiques .....	13
II.2.3. Classification .....	14
II.2.4. Caractérisation.....	19
II.3. TERPENOIDES .....	20
II.3.1. Propriétés physiques et chimiques.....	20
II.3.2. Propriétés biologiques et pharmacologiques .....	21
II.3.3. Classification .....	21
II.3.4. Caractérisation.....	24
II.4. SAPONOSIDES .....	24
II.4.1. Propriétés physiques et chimiques.....	24
II.4.2. Propriétés biologiques et pharmacologiques .....	25
II.4.3. Caractérisation.....	25
<b>III. HUILES ESSENTIELLES.....</b>	<b>25</b>
III.1. METHODES D'EXTRACTION DES HUILES ESSENTIELLES .....	26
III.1.1. Hydrodistillation.....	26
III.1.2. Entraînement à la vapeur d'eau.....	26
III.2. COMPOSITION CHIMIQUE DES HUILES ESSENTIELLES .....	27
III.3. PROPRIETES BIOLOGIQUES ET THERAPEUTIQUES DES HUILES ESSENTIELLES .....	27
<b>IV. GENERALITES SUR LES RESIDUS D'HYDRODISTILLATION .....</b>	<b>28</b>
IV.1. TRAVAUX ANTERIEURS SUR LES RESIDUS D'HYDRODISTILLATION .....	28

IV.2. EFFETS DE LA CHALEUR SUR LES CONSTITUANTS CHIMIQUES DES HUILES ESSENTIELLES	29
IV.3. UTILISATIONS POTENTIELLES DES RESIDUS D'HYDRODISTILLATION	29
<b>V. QUELQUES GENERALITES SUR <i>HYPTIS SUAVEOLENS</i></b>	<b>30</b>
V.1. DONNEES BOTANIQUES	30
V.2. CLASSIFICATION SYSTEMATIQUE	31
V.3. NOMS USUELS	31
V.4. VERTUS THERAPEUTIQUES	32
V.5. TRAVAUX ANTERIEURS SUR <i>HYPTIS SUAVEOLENS</i>	32
V.5.1. Extraits non volatils	33
V.5.2. Huile essentielle des feuilles de <i>Hyptis suaveolens</i>	37
<b>VI. GENERALITES SUR LES TECHNIQUES D'ANALYSES DES METABOLITES SECONDAIRES</b>	<b>39</b>
VI.1. CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE	39
VI.2. GENERALITES SUR LES TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES	39
VI.2.1. Chromatographie sur couche mince	40
VI.2.2. Chromatographie sur colonne ouverte	42
VI.2.3. Chromatographie liquide haute pression	43
VI.2.4. Chromatographie en phase gazeuse	44
VI.3. GENERALITES SUR LES TECHNIQUES SPECTROMETRIQUES	45
VI.3.1. Spectrométrie de masse	45
VI.3.2. Couplage chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse	46
VI.4. ANALYSES SPECTROSCOPIQUES	46
VI.4.1. Spectroscopie Ultraviolet-Visible	46
VI.4.2. Spectroscopie Infra-Rouge	47
VI.5. RECHERCHE DE METABOLITES SECONDAIRES CONNUS DANS LES ORGANES DES PLANTES MEDICINALES PAR LA METHODE DE DEREPLICATION	47
<b>VII. ACTIVITE ANTIOXYDANT DES METABOLITES SECONDAIRES</b>	<b>48</b>
VII.1. DEFINITION ET PRINCIPE	48
VII.1.1. Transfert de l'atome d'hydrogène	49



VII.1.2. Transfert d'électrons .....	49
VII.2. PIEGEAGE DU RADICAL LIBRE DPPH .....	50
VII.3. REDUCTION DU RADICAL-CATIONIQUE ABTS .....	50
<b>CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>53</b>
<b>I. MATERIEL .....</b>	<b>54</b>
I.1. MATERIEL VEGETAL .....	54
I.2. MATERIEL DE LABORATOIRE .....	54
I.2.1. Appareillage et instruments .....	54
I.2.2. Solvants et réactifs .....	55
<b>II. METHODES .....</b>	<b>56</b>
II.1. EXTRACTION DES METABOLITES SECONDAIRES .....	56
II.1.1. Extraction de l'huile essentielle .....	56
II.1.2. Extraction solide-liquide .....	56
II.1.3. Extraction liquide-liquide .....	57
II.2. CRIBLAGE DES FAMILLES DE METABOLITES SECONDAIRES .....	57
II.2.1. Détection des alcaloïdes .....	57
II.2.2. Détection des polyphénols .....	58
II.2.3. Détection des flavonoïdes .....	58
II.2.4. Détection des terpénoïdes .....	59
II.2.5. Détection des quinones et anthraquinones .....	60
II.2.6. Détection des tanins .....	60
II.2.7. Détection des anthocyanes et leucoanthocyanes .....	61
II.2.8. Détection des saponosides .....	61
II.3. ANALYSES QUANTITATIVES .....	61
II.3.1. Dosage des polyphénols totaux .....	61
II.3.2. Dosage des flavonoïdes totaux .....	62
II.3.3. Dosage des tanins .....	62
II.3.4. Evaluation de l'activité antioxydante .....	63

---

II.4. ANALYSES STATISTIQUES .....	64
II.5. SEPARATION ET IDENTIFICATION DES MOLECULES .....	65
II.5.1. Chromatographie sur couche mince .....	65
II.5.2. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.....	65
II.5.3. Spectrophotomètre UV-visible .....	66
II.6. IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS DES FEUILLES DE <i>HYPTIS SUAVEOLENS</i> PAR LA METHODE DE DEREPLICATION .....	66
II.6.1. Analyse par CLHP-ESI-Q-TOF-MS des extraits et des fractions .....	66
II.6.2. Déréplication .....	67
<b>CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIO .....</b>	<b>69</b>
<b>I. BIBLIOMETRIE .....</b>	<b>69</b>
I.1. BIBLIOMETRIE DES RESIDUS D'HYDRODISTILLATION .....	69
I.2. BIBLIOMETRIE DE <i>HYPTIS SUAVEOLENS</i> .....	70
<b>II. RENDEMENTS DES EXTRACTIONS ET DES FRACTIONNEMENTS .....</b>	<b>72</b>
II.1. RENDEMENTS DES EXTRACTIONS SOLIDE-LIQUIDE .....	72
II.2. RESULTATS DU FRACTIONNEMENT DES EXTRAITS BRUTS .....	73
<b>III. PROFIL PHYTOCHIMIQUE DES EXTRAITS DE FEUILLES DE <i>HYPTIS SUAVEOLENS</i> .....</b>	<b>74</b>
III.1. PROFIL PHYTOCHIMIQUE DES BROYATS, DES EXTRAITS DE FEUILLES ET DE L'HYDROLAT DE <i>HYPTIS SUAVEOLENS</i> .....	74
III.2. PROFIL PHYTOCHIMIQUE DES FRACTIONS ISSUES DES EXTRAITS HYDROALCOOLIQUES .....	75
<b>IV. TENEUR EN COMPOSES PHENOLIQUES DES EXTRAITS ET FRACTIONS .....</b>	<b>77</b>
IV.1. TENEURS EN COMPOSES PHENOLIQUES DES EXTRAITS HYDROALCOOLIQUES .....	77
IV.2. TENEURS EN COMPOSES PHENOLIQUES DES FRACTIONS ISSUES DES EXTRAITS HYDROALCOOLIQUES .....	79
IV.2.1. Teneur en polyphénols totaux des fractions issues des extraits hydroalcooliques .....	80
IV.2.2. Teneur en flavonoïdes totaux des fractions issues des extraits hydroalcooliques .....	81
IV.2.3. Teneur en tanins totaux des différentes fractions issues des extraits hydroalcooliques .....	82

---

---

<b>V. ACTIVITES ANTIOXYDANTES DES EXTRAITS ET FRACTIONS DE FEUILLES DE <i>HYPTIS SUAVEOLENS</i></b> .....	<b>83</b>
V.1. BIOAUTOGRAPHIE .....	83
V.2. CAPACITE DE PIEGEAGE DU RADICAL DPPH .....	85
V.2.1. Capacité de piégeage du radical DPPH des extraits hydroalcooliques avant et après extraction de l'HE de feuilles de <i>Hyptis suaveolens</i> . .....	85
V.2.2. Capacité de piégeage du DPPH des différentes fractions issues des extraits hydroalcooliques .....	86
V.2.3. Corrélation entre teneurs en composés phénoliques et IC <sub>50</sub> .....	88
V.3. POTENTIEL DE REDUCTION DU RADICAL CATIONIQUE ABTS <sup>+</sup> .....	90
V.3.1. Potentiel de réduction du radical cationique ABTS <sup>+</sup> des extraits hydroalcooliques.....	90
V.3.2. Potentiel de réduction du radical cationique ABTS <sup>+</sup> des différentes fractions issues des extraits hydroalcooliques.....	90
V.3.3. Corrélation entre le pouvoir antiradicalaire ABTS <sup>+</sup> et la teneur en composés phénoliques des extraits hydroalcooliques.....	92
<b>VI. IDENTIFICATION DES COMPOSES DES FEUILLES DE <i>HYPTIS SUAVEOLENS</i> AVANT ET APRES EXTRACTION DE L'HE</b> .....	<b>94</b>
VI.1. ANALYSES DEREPPLICATIVES DE FRACTIONS ISSUES DES EXTRAITS HYDROALCOOLIQUES __	94
VI.1.1. Analyse comparative HPLC-MS/Q-TOF des fractions à l'acétate d'éthyle .....	96
VI.1.2. Analyse comparative HPLC-MS/Q-TOF des fractions au dichlorométhane.....	98
VI.2. ELUCIDATION DES STRUCTURES DES COMPOSES DES DIFFERENTES FRACTIONS ISSUES DES EXTRAITS HYDROALCOOLIQUES .....	100
<b>VII. STRUCTURES DES COMPOSES DES FRACTIONS AU DICHLOROMETHANE ET A L'ACETATE D'ETHYLE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE</b> .....	<b>146</b>
VII.1. ANALYSES GC-MS DES FRACTIONS A L'ACETATE D'ETHYLE ISSUES DES EXTRAITS HYDROALCOOLIQUES AVANT ET APRES L'EXTRACTION DE L'HUILE ESSENTIELLE DES FEUILLES DE <i>HYPTIS SUAVEOLENS</i> .....	146
VII.1.1. Analyses GC-MS comparative des fractions à l'acétate d'éthyle avant et après l'extraction de l'huile essentielle .....	147

---

VII.1.2. Structures des composés détectés des fractions à l'acétate d'éthyle avant et après l'extraction de l'huile essentielle.....	149
VII.2. ANALYSES CG-MS DES FRACTIONS AU DICHLOROMETHANE ISSUES DES EXTRAITS HYDROALCOOLIQUES AVANT ET APRES EXTRACTION DE L'HUILE ESSENTIELLE DES FEUILLES DE <i>HYPTIS SUAVEOLENS</i> .....	185
VII.2.1. Analyses GC-MS comparative des fractions au dichlorométhane avant et après l'extraction de l'huile essentielle.....	185
VII.2.2. Structures des composés détectés des fractions au dichlorométhane avant et après l'extraction de l'huile essentielle.....	187
<b>VIII. TRANSFORMATIONS STRUCTURALES OBSERVEES AU NIVEAU DES MOLECULES AVANT ET APRES EXTRACTION DE L'HE .....</b>	<b>204</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVE.....</b>	<b>208</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>210</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>227</b>

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1 :</b> Solubilité des alcaloïdes.....	11
<b>Tableau 2:</b> Classes de composés phénoliques et leurs structures de base .....	14
<b>Tableau 3:</b> Noms usuels de <i>Hyptis suaveolens</i> .....	32
<b>Tableau 4:</b> Quelques composés isolés des extraits du genre <i>Hyptis</i> .....	34
<b>Tableau 5:</b> Quelques composés identifiés dans l'huile essentielle des feuilles de <i>Hyptis suaveolens</i>	38
<b>Tableau 6 :</b> Révélateurs et colorations de quelques familles métabolites secondaires sur plaques CCM .....	41
<b>Tableau 7 :</b> Programme d'éluion des échantillons sur le système HPLC-QTOF .....	67
<b>Tableau 8:</b> Rendements, aspects et couleurs des extraits hydroalcooliques.....	72
<b>Tableau 9:</b> Rendements, aspects et couleurs des différentes fractions.....	73
<b>Tableau 10:</b> Familles de métabolites secondaires des broyats, de l'hydrolat et des extraits hydroalcooliques .....	74
<b>Tableau 11 :</b> Criblages phytochimiques des fractions issues des extraits hydroalcooliques .....	76
<b>Tableau 12 :</b> Capacité antioxydante ABTS des extraits hydroalcooliques avant et après extraction de l'HE de feuilles de <i>Hyptis suaveolens</i> .....	90
<b>Tableau 13:</b> Composés détectés dans les fractions à l'acétate d'éthyles (FAE1) et (FAE2).....	97
<b>Tableau 14:</b> Composés détectés dans les fractions au dichlorométhane (F <sub>DCM1</sub> ) et (F <sub>DCM2</sub> ).....	99
<b>Tableau 15 :</b> Composés détectés dans les fractions à l'acétate d'éthyle avant et après extraction de l'HE .....	147
<b>Tableau 16 :</b> Composés détectés dans les fractions au dichlorométhane avant et après extraction de l'HE .....	186
<b>Tableau 17:</b> Composés thermostables.....	204
<b>Tableau 18:</b> Distinction entre nouveaux composés détectés après et composés détectés avant extraction de l'HE .....	205
<b>Tableau 19:</b> récapitulatif des principaux composés des fractions acétate d'éthyle affectés et des composés formés au cours de l'extraction de l'huile essentielle détectés par analyse dérèplivative LC-MS/Q-TOF .....	233
<b>Tableau 20:</b> Composés déjà isolés et détectés par analyse dérèplivative LC-MS/Q-TOF dans les fractions acétate d'éthyle de feuilles de <i>Hyptis suaveolens</i> . .....	234
<b>Tableau 21:</b> récapitulatif des principaux composés des fractions au dichlorométhane affectés et formés au cours de l'extraction de l'huile essentielle détectés par analyse dérèplivative LC-MS/Q-TOF ....	235

**Tableau 22:** Composés déjà isolés et détectés par analyse déréplicative LC-MS/Q-TOF dans les fractions au dichlorométhane issues des extraits hydroalcooliques de feuilles de *Hyptis suaveolens* avant et après extraction de l'HE.....236

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1 :</b> Macération sur agitateur magnétique.....	7
<b>Figure 2 :</b> Montage d'extraction au Soxhlet .....	8
<b>Figure 3 :</b> Extraction liquide-liquide à l'aide d'une ampoule à décanter .....	9
<b>Figure 4 :</b> Structures de quelques précurseurs des alcaloïdes.....	11
<b>Figure 5:</b> Structures de quelques alcaloïdes .....	12
<b>Figure 6:</b> Structures de quelques acides hydroxybenzoïques.....	15
<b>Figure 7:</b> Structures de quelques acides hydroxycinnamiques .....	15
<b>Figure 8:</b> Structures de quelques flavonoïdes .....	17
<b>Figure 9:</b> Structure de l'acide ellagique.....	18
<b>Figure 10:</b> Structures de base du Flavan-3-ol et de l'Epi-catéchine.....	18
<b>Figure 11:</b> Structure d'un trimère de type 4-8 .....	19
<b>Figure 12:</b> Structures de la quinone et de l'antraquinone .....	20
<b>Figure 13:</b> Structures de quelques monoterpènes.....	21
<b>Figure 14 :</b> Structures de quelques sesquiterpènes .....	22
<b>Figure 15 :</b> Structures de quelques diterpènes .....	22
<b>Figure 16:</b> Structures de quelques triterpènes .....	23
<b>Figure 17:</b> Structures de deux tétraterpènes .....	23
<b>Figure 18:</b> Structure de la digitogénine.....	25
<b>Figure 19 :</b> Dispositif de l'hydrodistillation .....	27
<b>Figure 20:</b> Photographies de plants de <i>Hyptis suaveolens</i> (photo soumahoro, prise le 17/07/2017 à Yamoussoukro).....	31
<b>Figure 21 :</b> Plaques CCM après élution observées sous lampe UV.....	40
<b>Figure 22 :</b> Photographie d'un appareillage GC/MS .....	46
<b>Figure 23:</b> Nombre de publication par année sur les résidus d'hydrodistillation de 2008 à 2019 .....	70
<b>Figure 24:</b> Nombre de publication par domaine d'application sur les résidus d'hydrodistillation de 2008 à 2019 .....	70
<b>Figure 25:</b> Nombre de publications par année sur l'espèce <i>Hyptis suaveolens</i> de 1983 à 2019.....	71
<b>Figure 26:</b> Nombre de publications par domaine d'utilisation de <i>Hyptis suaveolens</i> de 1952 à 2019 .....	71
<b>Figure 27:</b> Teneurs en composés phénoliques des extraits hydroalcooliques.....	78
<b>Figure 28:</b> Teneurs en polyphénols totaux des différentes fractions issues des extraits hydroalcooliques .....	80

<b>Figure 29:</b> Teneurs en flavonoïdes totaux des différentes fractions issues des extraits hydroalcooliques .....	81
<b>Figure 30:</b> Teneur en tanins totaux des différentes fractions issues des extraits hydroalcooliques.....	82
<b>Figure 31 :</b> Activité antioxydante des extraits hydroalcooliques des feuilles de <i>Hyptis suaveolens</i> et leurs fractions par bioautographie .....	84
<b>Figure 32 :</b> Pourcentages d'inhibition du DPPH par les extraits hydroéthanoliques .....	85
<b>Figure 33:</b> Concentration minimale d'inhibition du DPPH de 50% des extraits hydroéthanoliques..	85
<b>Figure 34:</b> Pourcentages d'inhibition du DPPH par les fractions issues des extraits hydroalcooliques .....	87
<b>Figure 35:</b> Concentrations d'inhibition du DPPH de 50% des fractions issues des extraits hydroalcooliques .....	87
<b>Figure 36:</b> Corrélation entre pouvoir de réduction du DPPH des extraits de feuilles de <i>Hyptis suaveolens</i> avant extraction de l'HE et leurs teneurs en composés phénoliques .....	88
<b>Figure 37:</b> Corrélation entre pouvoir de réduction du DPPH des extraits de feuilles de <i>Hyptis suaveolens</i> après extraction de l'HE et leurs teneurs en composés phénoliques .....	89
<b>Figure 38:</b> Capacité antioxydante ABTS <sup>+</sup> des différentes fractions issues des extraits hydroéthanoliques.....	91
<b>Figure 39 :</b> Corrélation entre pouvoir antiradicalaire ABTS <sup>+</sup> et les teneurs en composés phénoliques des extraits de feuilles de <i>Hyptis suaveolens</i> avant extraction de l'HE.....	92
<b>Figure 40:</b> Corrélation entre pouvoir antiradicalaire ABTS <sup>+</sup> et les teneurs en composés phénoliques des extraits de feuilles de <i>Hyptis suaveolens</i> après extraction de l'HE.....	93
<b>Figure 41:</b> Profil chromatographique ESI/MS total.....	95
<b>Figure 42:</b> Profil chromatographique ESI/MS des composés majoritaires.....	95
<b>Figure 43:</b> Formules brutes suggérées par le logiciel MassHunter .....	95
<b>Figure 44:</b> Profils chromatographiques ESI/MS des composés majoritaires de la fraction acétate d'éthyle avant (A) et après (B) l'extraction de l'HE .....	96
<b>Figure 45:</b> Profils chromatographiques ESI/MS des composés majoritaires des fractions au dichlorométhane avant (A) et après (B) l'extraction de l'HE .....	98
<b>Figure 46:</b> Spectre de masse LC-ESI/MS du composé 1 .....	101
<b>Figure 47:</b> Spectre UV (LC-UV/DAD) du composé 1 .....	101
<b>Figure 48:</b> Spectre de fragmentation ESI/MS du composé 1 .....	102
<b>Figure 49:</b> Structure du composé 1 .....	103
<b>Figure 50:</b> Spectre de masse LC-ESI/MS du composé 2.....	104
<b>Figure 51:</b> Spectre UV (LC-UV/DAD) du composé 2.....	104
<b>Figure 52:</b> Spectre de fragmentation ESI/MS du composé 2 .....	105



---

<b>Figure 53:</b> Structure du composé 2 .....	106
<b>Figure 54:</b> Spectre de masse LC-ESI/MS du composé 3.....	106
<b>Figure 55:</b> Spectre UV (LC-UV/DAD) du composé 3 .....	106
<b>Figure 56:</b> Spectre de fragmentation ESI/MS du composé 3 .....	107
<b>Figure 57:</b> Structure du composé 3 .....	108
<b>Figure 58:</b> Spectre de masse LC-ESI/MS du composé 4.....	108
<b>Figure 59:</b> Spectre de fragmentation ESI/MS du composé 4 .....	109
<b>Figure 60:</b> Structure du composé 4.....	110
<b>Figure 61:</b> Spectre de masse LC-ESI/MS du composé 5.....	110
<b>Figure 62:</b> Spectre UV (LC-UV/DAD) du composé 5 .....	110
<b>Figure 63:</b> Spectre de fragmentation ESI/MS du composé 5 .....	111
<b>Figure 64:</b> Structure du composé 5 (quercétine) .....	112
<b>Figure 65:</b> Spectre de masse LC-ESI/MS du composé 6.....	112
<b>Figure 66:</b> Spectre UV (LC-UV/DAD) du composé 6.....	113
<b>Figure 67:</b> Spectre de fragmentation ESI/MS du composé 6 .....	113
<b>Figure 68:</b> Structure du composé 6.....	115
<b>Figure 69:</b> Spectre de masse LC-ESI/MS du composé 7 .....	115
<b>Figure 70:</b> Spectre UV (LC-UV/DAD) du composé 7 .....	116
<b>Figure 71:</b> Spectre de fragmentation ESI/MS du composé 7 .....	116
<b>Figure 72:</b> Structure du composé 7 .....	117
<b>Figure 73:</b> Spectre de masse LC-ESI/MS du composé 8.....	118
<b>Figure 74:</b> Spectre de fragmentation ESI/MS du composé 8 .....	118
<b>Figure 75:</b> Structure du composé 8.....	120
<b>Figure 76:</b> Spectre de masse LC-ESI/MS du composé 9.....	120
<b>Figure 77:</b> Spectre de fragmentation ESI/MS du composé 9 .....	120
<b>Figure 78:</b> Structure du composé 9 .....	122
<b>Figure 79:</b> Spectre de masse LC-ESI/MS du composé 10.....	122
<b>Figure 80:</b> Spectre UV (LC-UV/DAD) du composé 10.....	123
<b>Figure 81:</b> Spectre de fragmentation ESI/MS du composé 10 .....	123
<b>Figure 82:</b> Structure du composé 10.....	125
<b>Figure 83:</b> Spectre de masse LC-ESI/MS du composé 11 .....	125
<b>Figure 84:</b> Spectre de fragmentation ESI/MS du composé 11 .....	125
<b>Figure 85:</b> Structure du composé 11 .....	127
<b>Figure 86:</b> Spectre de masse LC-ESI/MS du composé 12.....	127
<b>Figure 87:</b> Spectre UV (LC-UV/DAD) du composé 12.....	127

---

---

<b>Figure 88:</b> Spectre de fragmentation ESI/MS du composé 12 .....	128
<b>Figure 89:</b> Structure du composé 12.....	129
<b>Figure 90:</b> Spectre de masse LC-ESI/MS du composé 13.....	129
<b>Figure 91:</b> Spectre de fragmentation ESI/MS du composé 13 .....	130
<b>Figure 92:</b> Structure du composé 13.....	131
<b>Figure 93:</b> Spectre de masse LC-ESI/MS du composé 14.....	131
<b>Figure 94:</b> Spectre de fragmentation ESI/MS du composé 14 .....	132
<b>Figure 95:</b> Structure du composé 14.....	133
<b>Figure 96:</b> Spectre de masse LC-ESI/MS du composé 15.....	133
<b>Figure 97:</b> Spectre de fragmentation ESI/MS du composé 15 .....	134
<b>Figure 98:</b> Structure du composé 15.....	136
<b>Figure 99:</b> Spectre de masse LC-ESI/MS du composé 16.....	136
<b>Figure 100:</b> Spectre UV (LC-UV/DAD) du composé 16.....	137
<b>Figure 101:</b> Spectre de fragmentation ESI/MS du composé 16.....	137
<b>Figure 102:</b> Structure du composé 16.....	139
<b>Figure 103:</b> Spectre de masse LC-ESI/MS du composé 17 .....	139
<b>Figure 104:</b> Spectre de fragmentation ESI/MS du composé 17 .....	139
<b>Figure 105:</b> Structure du composé 17.....	141
<b>Figure 106:</b> Spectre de masse LC-ESI/MS du composé 18 .....	141
<b>Figure 107:</b> Spectre UV (LC-UV/DAD) du composé 18.....	141
<b>Figure 108:</b> Spectre de fragmentation ESI/MS du composé 18.....	142
<b>Figure 109:</b> Structure du composé 18.....	143
<b>Figure 110:</b> Spectre de masse LC-ESI/MS du composé 19 .....	143
<b>Figure 111:</b> Spectre UV (LC-UV/DAD) du composé 19.....	144
<b>Figure 112:</b> Spectre de fragmentation ESI/MS du composé 19.....	144
<b>Figure 113:</b> Structure du composé 19.....	146
<b>Figure 114:</b> Chromatogrammes des fractions à l'acétate d'éthyle avant et après extraction de l'HE .....	147
<b>Figure 115:</b> Spectre de masse du composé 20.....	149
<b>Figure 116:</b> Structure du composé 20.....	150
<b>Figure 117:</b> Spectre de masse du composé 25.....	151
<b>Figure 118:</b> Structure du composé 25.....	152
<b>Figure 119:</b> Spectre de masse du composé 26.....	152
<b>Figure 120:</b> Structure du composé 26 (Acide salicylique).....	154
<b>Figure 121:</b> Spectre de masse du composé 29.....	154

---

---

<b>Figure 122:</b> Structure du composé 29.....	155
<b>Figure 123:</b> Spectre de masse du composé 30.....	156
<b>Figure 124:</b> Structure du composé 30.....	158
<b>Figure 125:</b> Spectre de masse du composé 31.....	158
<b>Figure 126:</b> Structure du composé 31.....	159
<b>Figure 127:</b> Spectre de masse du composé 32.....	160
<b>Figure 128:</b> Structure du composé 32.....	161
<b>Figure 129:</b> Spectre de masse du composé 35.....	161
<b>Figure 130:</b> Structure du composé 35.....	163
<b>Figure 131:</b> Spectre de masse du composé 36.....	163
<b>Figure 132:</b> Structure du composé 36.....	165
<b>Figure 133:</b> Spectre de masse du composé 38.....	165
<b>Figure 134:</b> Structure du composé 38.....	167
<b>Figure 135:</b> Spectre de masse composé 39.....	167
<b>Figure 136:</b> Structure du composé 39.....	169
<b>Figure 137:</b> Spectre de masse du composé 40.....	169
<b>Figure 138:</b> Structure du composé 40 (Acide homoprotocatéchnique).....	171
<b>Figure 139:</b> Spectre de masse du composé 41.....	171
<b>Figure 140:</b> Structure du composé 41.....	173
<b>Figure 141:</b> Spectre de masse du composé 43.....	173
<b>Figure 142:</b> Structure du composé 43.....	175
<b>Figure 143:</b> Spectre de masse du composé 45.....	175
<b>Figure 144:</b> Structure du composé 45 (Acide p-coumarique). ....	176
<b>Figure 145:</b> Spectre de masse du composé 48.....	177
<b>Figure 146:</b> Structure du composé 48 (Acide catécholactique).....	179
<b>Figure 147:</b> Spectre de masse du composé 49.....	179
<b>Figure 148:</b> Structure du composé 49 (Acide caféique).....	181
<b>Figure 149:</b> Spectre de masse du composé 54.....	181
<b>Figure 150:</b> Structure du composé 54 (Maltose isomère 1).....	183
<b>Figure 151:</b> Spectre de masse du composé 55.....	183
<b>Figure 152:</b> Structure du composé 55.....	185
<b>Figure 153:</b> Chromatogramme des fractions au dichlorométhane issues des E <sub>HA</sub> avant et après l'extraction de l'huile essentielle .....	186
<b>Figure 154:</b> Spectre de masse du composé 57.....	188
<b>Figure 155:</b> Structure du composé 57.....	189

---

---

<b>Figure 156:</b> Spectre de masse du composé 62.....	189
<b>Figure 157:</b> Structure du composé 62 (Acide p-anisique).....	190
<b>Figure 158:</b> Spectre de masse du composé 63.....	191
<b>Figure 159:</b> Structure du composé 63 (Dihydroactinidiolide).....	192
<b>Figure 160:</b> Spectre de masse du composé 68.....	193
<b>Figure 161:</b> Structure du composé 68.....	194
<b>Figure 162:</b> Spectre de masse du composé 74.....	194
<b>Figure 163:</b> Structure du composé 74 (D-(-)-Fructofuranose).....	196
<b>Figure 164:</b> Spectre de masse du composé 75.....	196
<b>Figure 165:</b> Structure du composé 75 ( $\beta$ -D-glucose).....	198
<b>Figure 166:</b> Spectre de masse du composé 86.....	199
<b>Figure 167:</b> Structure du composé 86.....	201
<b>Figure 168:</b> Spectre de masse du composé 88.....	201
<b>Figure 169:</b> Structure du composé 88 (Prégnénolone).....	203
<b>Figure 172:</b> Photographie du Séchage des feuilles de <i>Hyptis suaveolens</i> (photo soumahoro, prise le 02/08/2017 à Yamoussoukro.....	227
<b>Figure 173 :</b> Poudres de feuilles sèches de <i>Hyptis suaveolens</i> avant et après extraction de l'huile essentielle.....	227
<b>Figure 174:</b> Droite d'étalonnage de l'acide gallique.....	228
<b>Figure 175:</b> Droite d'étalonnage de la quercétine.....	228
<b>Figure 176:</b> Droite d'étalonnage de l'acide tannique.....	229
<b>Figure 177:</b> Courbe d'étalonnage du Trolox ( ABTS).....	229
<b>Figure 178 :</b> Appareillages.....	230

## LISTE DES SCHEMAS

<b>Schéma 1:</b> Equation de précipitation des alcaloïdes.....	12
<b>Schéma 2:</b> Biosynthèse des flavonoïdes.....	16
<b>Schéma 3:</b> Réactions mises en jeu lors de la caractérisation des flavonoïdes .....	19
<b>Schéma 4:</b> Test de criblage des anthraquinones par la réaction de Bornträger .....	20
<b>Schéma 5:</b> Etapes de la réaction de Liebermann et Burchard.....	24
<b>Schéma 6:</b> Mode d'action des antioxydants par transfert d'un atome d'hydrogène.....	49
<b>Schéma 7:</b> Mode d'action des antioxydants par transfert d'électron.....	49
<b>Schéma 8 :</b> Réduction du DPPH.....	50
<b>Schéma 9:</b> Réduction du radical ABTS en présence d'un antioxydant .....	51
<b>Schéma 10:</b> Proposition de fragmentation du composé 1 .....	103
<b>Schéma 11:</b> Proposition de fragmentation du composé 2 .....	105
<b>Schéma 12:</b> Proposition de fragmentation du composé 3 .....	107
<b>Schéma 13:</b> Proposition de fragmentation du composé 4 .....	109
<b>Schéma 14:</b> Fragmentation du composé 5 .....	111
<b>Schéma 15:</b> Fragmentation du composé 6.....	114
<b>Schéma 16:</b> Proposition de fragmentation du composé 7 .....	117
<b>Schéma 17:</b> Fragmentation du composé 8.....	119
<b>Schéma 18:</b> Proposition de fragmentation du composé 9 .....	121
<b>Schéma 19:</b> Fragmentation du composé 10.....	124
<b>Schéma 20:</b> Fragmentation du composé 11.....	126
<b>Schéma 21:</b> Proposition de fragmentation du composé 12.....	128
<b>Schéma 22:</b> Fragmentation du composé 13.....	130
<b>Schéma 23:</b> Proposition de fragmentation du composé 14.....	132
<b>Schéma 24:</b> Proposition de fragmentation du composé 15.....	135
<b>Schéma 25:</b> Fragmentation du composé 16.....	138
<b>Schéma 26:</b> Proposition de fragmentation du composé 17.....	140
<b>Schéma 27:</b> Proposition de fragmentation du composé 18.....	142
<b>Schéma 28:</b> Proposition de fragmentation du composé 19.....	145
<b>Schéma 29:</b> Proposition de fragmentation du composé 20.....	150
<b>Schéma 30:</b> Proposition de fragmentation du composé 25.....	151
<b>Schéma 31:</b> Proposition de fragmentation du composé 26.....	153
<b>Schéma 32:</b> Proposition de fragmentation du composé 29.....	155

---

<b>Schéma 33:</b> Proposition de fragmentation du composé 30 .....	157
<b>Schéma 34:</b> Proposition de fragmentation du composé 31 .....	159
<b>Schéma 35:</b> Proposition de fragmentation du composé 32 .....	160
<b>Schéma 36:</b> Proposition de fragmentation du composé 35 .....	162
<b>Schéma 37:</b> Proposition de fragmentation du composé 36 .....	164
<b>Schéma 38:</b> Proposition de fragmentation du composé 38 .....	166
<b>Schéma 39:</b> Proposition de fragmentation du composé 39 .....	168
<b>Schéma 40:</b> Proposition de fragmentation du composé 40 .....	170
<b>Schéma 41:</b> Proposition de fragmentation du composé 41 .....	172
<b>Schéma 42:</b> Proposition de fragmentation du composé 43 .....	174
<b>Schéma 43:</b> Proposition de fragmentation du composé 45 .....	176
<b>Schéma 44:</b> Proposition de fragmentation du composé 48 .....	178
<b>Schéma 45:</b> Proposition de fragmentation du composé 49 .....	180
<b>Schéma 46:</b> Proposition de fragmentation du composé 54 .....	182
<b>Schéma 47:</b> Proposition de fragmentation du composé 55 .....	184
<b>Schéma 48:</b> Proposition de fragmentation du composé 57 .....	188
<b>Schéma 49:</b> Proposition de fragmentation du composé 62 .....	190
<b>Schéma 50:</b> Proposition de fragmentation du composé 63 .....	191
<b>Schéma 51:</b> Proposition de fragmentation du composé 68 .....	193
<b>Schéma 52:</b> Proposition de fragmentation du composé 74 .....	195
<b>Schéma 53:</b> Proposition de fragmentation du composé 75 .....	197
<b>Schéma 54:</b> Proposition de fragmentation du composé 86 .....	200
<b>Schéma 55:</b> Proposition de fragmentation du composé 88 .....	202

## SIGLES – ABREVIATIONS – FORMULES CHIMIQUES

<b>ABTS</b>	Acide 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)
<b>ACN</b>	Acide nitrique
<b>F<sub>AE</sub></b>	Fraction à l'acétate d'éthyle
<b>F<sub>Aq</sub></b>	Fraction aqueuse
<b>°C</b>	Degré Celsius
<b>CCM</b>	Chromatographie sur couche mince
<b>DCM</b>	Dichlorométhane
<b>CPG</b>	Chromatographie en phase gazeuse
<b>E<sub>HA</sub></b>	Extrait hydroalcoolique
<b>F<sub>DCM</sub></b>	Fraction au dichlorométhane
<b>DPPH</b>	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
<b>EDP</b>	Ecole Doctorale Polytechnique
<b>EAG/g</b>	Equivalent Acide Gallique par gramme
<b>EQ/g</b>	Equivalent Quercétine par gramme
<b>F<sub>Eth</sub></b>	Fraction éthanolique
<b>eV</b>	Electron Volt
<b>FeCl<sub>3</sub></b>	Trichlorure de fer
<b>GC-MS</b>	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
<b>HCl</b>	Acide chlorhydrique
<b>HE</b>	Huile essentielle
<b>F<sub>Hex</sub></b>	Fraction hexanique
<b>HPLC</b>	Chromatographie en phase liquide à haute pression
<b>HPLC /MS</b>	Chromatographie en phase liquide à haute pression couplée à la spectrométrie de masse
<b>HS</b>	<i>Hyptis suaveolens</i>
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentration d'inhibition à 50%
<b>IR</b>	Infra-Rouge
<b>LAPISEN</b>	Laboratoire des Procédés Industriels de Synthèses, de l'Environnement et des Energies Nouvelles
<b>LC/MS</b>	Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse
<b>m/z</b>	Masse par charge électrique
<b>mL</b>	Millilitre
<b>mm</b>	Millimètre
<b>MSTFA</b>	N-méthyl-N-triméthylsilyltrifluoroacétanide
<b>nm</b>	Nanomètre
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>PI</b>	Pourcentage d'Inhibition
<b>RF</b>	Rapport Frontale
<b>RP</b>	Phase inverse
<b>Rpm</b>	Rotation par minute
<b>Scans/s</b>	Scans par seconde
<b>TLC</b>	Thin Layer Chromatography (Chromatographie sur couche mince)
<b>TMS</b>	Triméthylsilyle
<b>uma/s</b>	Unité de masse atomique par seconde
<b>UMRI</b>	Unité Mixte de Recherche et d'Innovation
<b>UV</b>	Ultra-violet

<b>v/v</b>	Volume par volume
<b>μ</b>	Micron
<b>μL</b>	Microlitre
<b>μmol</b>	Micromole
<b>μm</b>	Micromètre



## RESUME

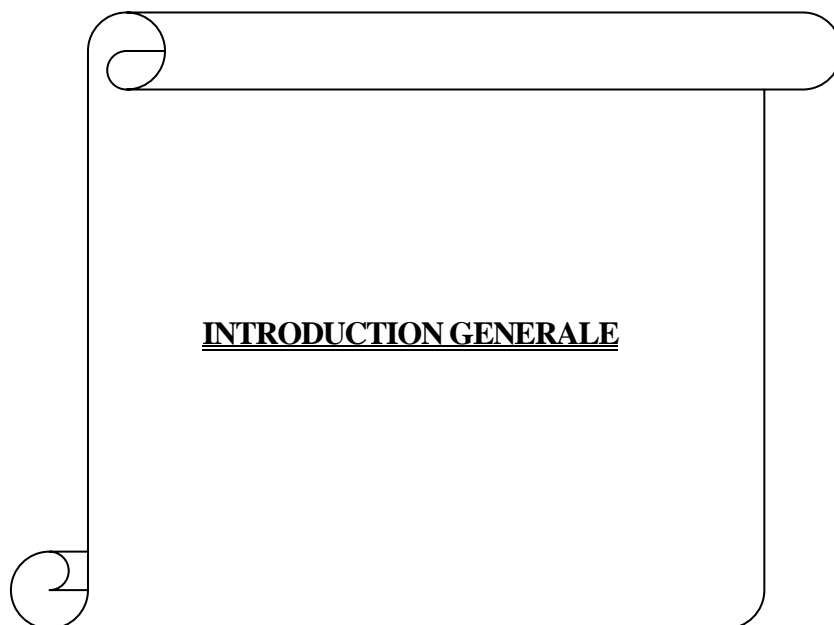
*Hyptis suaveolens* (L.) est une plante aromatique dont les feuilles contiennent aussi bien des huiles essentielles (moins de 1%) que des biomolécules actives non volatiles (plus de 8%). Cependant, les résidus de feuilles, après extraction de l'huile essentielle, sont généralement mal exploités. Une étude comparative de la composition chimique des feuilles de la plante avant et après extraction de l'huile essentielle, a donc été entreprise. L'extraction des métabolites secondaires des feuilles de *Hyptis suaveolens* avant et après extraction de son huile essentielle a été réalisée par macération avec un mélange éthanol-eau (70/30 : v/v) avec des rendements respectifs de 21,25% et 27,60 %. Le fractionnement successif des extraits hydroalcooliques par polarité croissante de solvant avec l'hexane, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle, l'éthanol et l'eau a donné des rendements plus élevés pour les fractions après extraction (variant de 12,32% pour l'hexane à 29,53 % pour l'eau) qu'avant extraction (variant de 9,61% pour l'éthanol à 34,04 % pour l'eau) de l'huile essentielle à l'exception des fractions hexanique et aqueuse. Le screening phytochimique de ces deux matrices végétales a révélé la présence de toutes les familles de métabolites secondaires recherchées autant avant qu'après extraction de l'huile essentielle exceptés les alcaloïdes qui sont absents après extraction de l'huile essentielle. Les teneurs en polyphénols et tanins totaux baissent respectivement de 39,167±2,222 à 20,833±1,111 mg EAG/g d'extrait et de 8,733±0,156 à 6,500±0,267 mg EAT/g d'extrait au cours de l'extraction de l'huile essentielles. En revanche, les teneurs en flavonoïdes totaux sont plus importantes (20,583±0,389 mg EQ/g d'extrait) après hydrodistillation contre (15,417±0,222 mg EQ/g d'extrait) avant extraction de l'HE. En outre, l'activité antioxydante s'accroît après extraction de l'huile essentielle avec respectivement des valeurs de IC<sub>50</sub> allant de 0,28 mg/mL à 0,27 mg/mL pour le DPPH et de TEAC allant de 256,47 μmol/L TE à 290,91 μmol/L TE pour l'ABTS. Comparativement à l'acide ascorbique de IC<sub>50</sub> 0,05 mg/mL, les feuilles de *Hyptis suaveolens* ont une activité antioxydante modérée. L'identification des composés par la méthode dérèplicative (LC-MS/Q-TOF) a permis de déterminer les structures de dix-neuf (19) molécules déjà isolées du genre *Hyptis*. Dix-huit (18) de ces molécules ont été confirmées par une analyse en GC-MS. Cette analyse en GC-MS a permis d'identifier au total cinquante-huit (58) composés des fractions à l'acétate d'éthyle et au dichlorométhane. Trente-deux (32) de ces composés identifiés lors de l'analyse GC-MS sont des composés thermostables. Les feuilles de *Hyptis suaveolens* après l'extraction de l'HE sont donc une source potentielle de composés bioactifs dont l'exploitation contribuerait à une utilisation optimale et à une gestion durable de la plante.

**Mots clés :** *Hyptis suaveolens* ; composition chimique ; feuilles avant et après ; extraction de l'huile essentielle ; molécules

## ABSTRACT

*Hyptis suaveolens* (L.) is an aromatic plant whose leaves contain both essential oils (less than 1%) and non-volatile active biomolecules (more than 8%). However, the leaf residues after extraction of the essential oil are generally poorly exploited. A comparative study of the chemical composition of the leaves of the plant before and after extraction of the essential oil was therefore undertaken. The extraction of secondary metabolites from the leaves of *Hyptis suaveolens* before and after extraction of its essential oil was carried out by maceration with an ethanol-water mixture (70/30: v/v) with respective yields of 21.25 and 27, 60%. The successive fractionation of the hydroalcoholic extract obtained by hexane, dichloromethane, ethyl acetate, ethanol and water gave higher yields of the fractions after extraction (from 12.32 % for hexane to 29.53% for water) than before extraction (from 9.61 % for ethanol to 34.04% for water) of the essential oil except hexane and aqueous fractions. Phytochemical screening of these two plant matrices revealed the presence of all the families of secondary metabolites sought both before and after extraction of the essential oil except the alkaloids which are absent afterwards. The contents of polyphenols and total tannins drop respectively from 39.167±2.222 to 20.833±1.111 mg GAE/g of extract and from 8.733±0.156 to 6.500±0.267 mg TAE/g of extract during the extraction of the essential oil. On the other hand, the concentrations of total flavonoids are higher (20.583±0.389 mg QE/g of extract) after hydrodistillation against (15.417±0.222 mg QE/g of extract) before hydrodistillation. The antioxidant activity increases after extraction of the essential oil with respectively IC<sub>50</sub> values ranging from 0.28 mg/mL to 0.27 mg/mL for DPPH and TEAC values ranging from 256.47 μmol/L TE to 290, 91 μmol/L TE for ABTS. Compared to ascorbic acid of IC<sub>50</sub> 0.05 mg/mL, the leaves of *Hyptis suaveolens* would have a moderate antioxidant activity. The identification of the compounds by the dereplicative method (LC-MS/Q-TOF) made it possible to determine the structures of nineteen (19) molecules already isolated from the genus *Hyptis*. Eighteen (18) of these molecules were confirmed by GC-MS analysis which identified fifty-eight (58) compounds from the ethyl acetate and dichloromethane fractions. Thirty-two (32) of these identified compounds are heat-stable compounds. The leaves of *Hyptis suaveolens* after EO extraction are therefore a potential source of bioactive compounds whose exploitation would contribute to optimal use and sustainable management of the plant.

**Key words:** *Hyptis suaveolens*; chemical composition; before and after sheets; essential oil extraction; compounds



**INTRODUCTION GENERALE**

Les plantes constituent une source prioritaire et inépuisable de molécules pour le traitement de diverses maladies des populations et en particulier celles des pays en développement (Soro *et al.*, 2012). Parmi ces plantes médicinales se trouvent les plantes aromatiques qui produisent des huiles essentielles. Ce sont de véritables sources naturelles de composés bioactifs utilisés dans l'alimentation, l'industrie cosmétique et chimique, l'aromathérapie et surtout dans les produits pharmaceutiques (Lagouri *et al.*, 1995) (Mimica-Dukić, 2003) (Botsoglou *et al.*, 2003) (Ruberto *et al.*, 2000). Autrefois utilisées uniquement pour leurs parfums agréables et leurs propriétés curatives, les plantes aromatiques sont de plus en plus employées dans la cosmétique pour l'élaboration de produits de beauté, de relaxants et de stimulants. En outre, elles sont employées en thérapie comme antioxydants, antimicrobiens et antiviraux (Goly *et al.*, 2015) (Goly *et al.*, 2017).

Le développement des pratiques médicinales de ces dernières décennies et surtout celle de l'aromathérapie, a engendré une demande de plus en plus forte en huiles essentielles. Aussi, l'on assiste à une recrudescence des problèmes de gestion adéquate des résidus d'hydrodistillation qui sont dans la plupart des cas simplement brûlés et rejetés dans la nature. En effet, l'huile essentielle ne représente qu'environ 5% de la matière première végétale. C'est donc un véritable gaspillage que de rejeter systématiquement le Marc qui représente plus de 95% de la matière végétale. Une étude sur l'exploitabilité de ces résidus est d'actualité car très peu de travaux ont été effectués sur ces résidus appelés « déchets » d'hydrodistillation.

De ce fait, depuis quelques années, notre laboratoire développe un programme de valorisation de ces résidus. Ainsi, dans une étude récente, avons-nous montré que les extraits hydroéthanoliques des feuilles de *Hyptis suaveolens* après extraction de l'huile essentielle ont une activité antimicrobienne plus accentuée que ces feuilles avant extraction de l'huile essentielle (Goly *et al.*, 2015). Ce résultat pourrait suggérer la transformation de certains composés en d'autres à forte activité antimicrobienne sous l'effet de la chaleur ou encore l'augmentation des quantités des polyphénols et des flavonoïdes totaux connus pour leurs activités antimicrobiennes. C'est dans ce contexte que le thème : « Etude comparative de la composition chimique des feuilles de *Hyptis suaveolens* avant et après extraction de l'huile essentielle », nous a été initié.

*Hyptis suaveolens* (Lamiaceae), espèce végétale très répandue dans les zones tropicales d'Amérique, d'Asie et d'Afrique, est le plus souvent utilisée dans la pharmacopée pour le traitement de l'asthme, des panaris, de l'ictère et de l'hyperthermie (Sharma *et al.*, 2013). En outre, *Hyptis suaveolens* contient des molécules à propriétés stimulante,

carminative, sudorifique, lactogène, anticatarrhale et antiparasitaire cutanée (Daziell, 1937). Ses feuilles et ses brindilles ont montré des activités antiplasmodiques, antioxydantes, antibactériennes, antifongiques, antidiabétiques, antirhumatiques, anti-soporifiques, anti-inflammatoires et antiseptiques dans les cas de brûlures et de multiples complications de la peau (Grassi *et al.*, 2006). La décoction des racines est un apéritif et est renommée pour sa teneur en acide ursolique, un inhibiteur naturel de l'intégration du VIH (Moreira *et al.*, 2010).

Les analyses phytochimiques préliminaires réalisées, ont montré que les feuilles de *Hyptis suaveolens* contiennent de l'huile essentielle (moins de 5% de la masse des feuilles sèches) qui referme du menthol, de la limonène et des sesquiterpènes (Tia *et al.*, 2011) qui possèdent de nombreuses propriétés pharmacologiques et biologiques (Kumar *et al.*, 2015). Les extraits de feuilles ont révélé la présence d'alcaloïdes, de sucres simples, de stéroïdes, de terpénoïdes, de tanins, de flavonoïdes, d'antraquinones et de phénols qui représentent plus de 13% de la masse des feuilles sèches (Kumar *et al.*, 2015) (Goly *et al.*, 2015). En outre, après l'extraction de l'huile essentielle, les extraits hydroéthanoliques ont montré des propriétés antibactériennes (Goly *et al.*, 2015). Cependant, après l'extraction de l'huile essentielle, les résidus de feuilles contenant des composés non volatils sont le plus souvent inexploités malgré leurs propriétés antibactériennes, ce qui ne contribuerait pas certainement à une gestion rationnelle et efficiente de ces ressources. De ce fait, en dehors de l'étude menée par notre laboratoire, aucune autres données phytochimiques sur les feuilles de cette plante après extraction de son huile essentielle permettant de justifier ces activités biologiques n'ont été trouvées dans la littérature. Il serait donc important de s'intéresser davantage à la valorisation de ces résidus d'hydrodistillation afin de contribuer efficacement à leur gestion adéquate et à l'optimisation de l'emploi des ressources végétales (Chang *et al.*, 2000) (Someya *et al.*, 2002) (Li *et al.*, 2006) (Wolfe *et al.*, 2003).

La présente étude a pour objectif général de comparer la composition chimique des feuilles de *Hyptis suaveolens* avant et après extraction de l'huile essentielle. De façon spécifique, il s'agit :

- d'extraire et de quantifier les métabolites secondaires contenus dans les feuilles de *Hyptis suaveolens* avant et après extraction de l'huile essentielle ;
- d'évaluer et de comparer les activités antioxydantes des feuilles de *Hyptis suaveolens* avant et après extraction de l'huile essentielle ;
- de déterminer les structures des métabolites secondaires ;

- d'établir les similitudes et les différences entre les composés détectés avant et après extraction de l'huile essentielle.

Le présent document s'articule autour de trois (3) chapitres. Le premier chapitre traite des données botaniques et des techniques et méthodes d'analyses des extraits de plantes. Le deuxième chapitre décrit le matériel et les méthodes utilisés au cours des différentes tâches de recherche. Le troisième chapitre donne les résultats obtenus et leur discussion. Une conclusion et quelques perspectives mettent fin au mémoire.

**PRESENTATION DU PROJET DE THESE**

#### CONTEXTE GENERAL DU SUJET DE THESE

Le sujet de thèse intitulé « Etude comparative de la composition chimique des feuilles de *Hyptis suaveolens* avant et après extraction de l'huile essentielle » se situe dans le cadre général des objectifs du développement durable (ODD). Il vise la valorisation des résidus des extractions d'huiles essentielles. Il englobe plusieurs domaines de recherche que sont la chimie organique précisément la chimie des substances naturelles et les sciences des procédés et de l'environnement.

#### BUT ET ENJEU DE L'ETUDE

Cette étude a pour but de valoriser les résidus d'hydrodistillation par leur exploitation comme sources de biomolécules d'intérêt. L'enjeu général de ce travail est la gestion durable des ressources végétales et l'amélioration de la santé humaine et animale.

#### QUESTIONS DE RECHERCHE

Les plantes aromatiques en général et en particulier les feuilles de *Hyptis suaveolens* sont utilisées non seulement pour leurs extraits volatils (huiles essentielles), mais également pour leurs extraits non volatils. Ces deux types d'extraits de plantes aromatiques sont riches en molécules bioactives. Cependant, après l'extraction de l'huile essentielle, les résidus qui représentent plus de 95% de l'organe de la plante sont très souvent négligés. Pourtant, des extraits de ces résidus ont montré de très bonnes activités biologiques. Dès lors, trouver des voies rationnelles de valorisation de ces résidus constitue un enjeu majeur dans l'optique de la gestion efficiente et durable de la plante. Ainsi, l'étude phytochimique de la composition chimique de ces résidus en comparaison avec celle des feuilles sans extraction de l'huile essentielle devient nécessaire. De ce fait, cette étude se base sur les questions suivantes :

- Comment valoriser les résidus d'extraction d'huile essentielle des feuilles de *Hyptis suaveolens* ?
- Quelle est la composition chimique des feuilles de *Hyptis suaveolens* avant et après extraction de l'huile essentielle ?
- Quel est le potentiel antioxydant des résidus d'extraction de l'huile de feuilles de *Hyptis suaveolens* ?
- Quelle est la structure des biomolécules susceptibles de justifier les activités biologiques de ces résidus ?
- Quels sont les mécanismes des éventuelles réactions chimiques qui auraient lieu au cours de l'hydrodistillation ?

- Comment pourrait-on valoriser les résidus d'extraction d'huile essentielle de cette plante par l'utilisation des biocomposés qu'ils pourraient contenir ?

#### **HYPOTHESES**

Ce projet vise à valoriser les résidus issus de l'extraction de l'huile essentielle des feuilles de *Hyptis suaveolens*. Il s'articule autour des hypothèses suivantes :

- les résidus issus de l'extraction de l'huile essentielle des feuilles de *Hyptis suaveolens* sont une source potentielle de molécules bioactives ;
- les résidus de l'hydrodistillation des feuilles de *Hyptis suaveolens* ont des propriétés biologiques ;
- les structures des biomolécules des résidus issus de l'hydrodistillation des feuilles de *Hyptis suaveolens* peuvent être élucidées et servir de base de données pour la valorisation de cette matrice végétale.

#### **ORIGINALITE**

L'extraction et l'emploi des huiles essentielles dans de nombreux domaines d'activités est une pratique en plein essor ces dernières années. Toutefois, cette pratique génère de grandes quantités de résidus qui sont dans la majorité des cas simplement brûlés avant d'être rejetés dans la nature ; Ce qui ne contribue certainement pas à une utilisation rationnelle et efficace de ces ressources. C'est pourquoi, une étude sur l'exploitabilité de ces résidus est d'actualité car peu d'informations sont disponibles. C'est ainsi que des extraits de résidus d'hydrodistillation de feuilles de *Hyptis suaveolens* ont fait l'objet d'une étude biologique préliminaire qui a montré qu'ils avaient une activité antimicrobienne plus accentuée que ceux de feuilles avant extraction de l'huile essentielle. Cependant, cette étude reste quasiment la seule sur cette matrice végétale à notre connaissance. De ce fait, la détermination des caractéristiques chimiques de ces résidus d'hydrodistillation constitue une originalité. En outre, aucune mention n'est faite dans la littérature sur l'identification de molécules dans des résidus d'hydrodistillation de feuilles de *Hyptis suaveolens*. L'identification de ces composés est une autre originalité de ce travail.





**CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

## Introduction

*Hyptis suaveolens* (L). Poit., est une plante aromatique utilisée pour ses nombreuses propriétés biologiques. La plante contient des huiles essentielles utilisées dans divers domaines. Elle a été l'objet de nombreuses études qui ont permis de déterminer la composition chimique aussi bien de son huile essentielle que de ses extraits non volatils. Cependant, aucune étude à notre connaissance n'a été menée sur ses résidus après extraction de l'huile essentielle. Ainsi dans ce chapitre nous ferons l'état de l'art dans un premier temps sur des métabolites secondaires, les huiles essentielles et les résidus d'hydrodistillation. Ensuite, nous donnerons quelques généralités sur l'espèce *Hyptis suaveolens* et sur les techniques d'analyse des extraits de plantes.

## I. GENERALITES SUR LES METHODES D'EXTRACTION DES METABOLITES SECONDAIRES

Les plantes aromatiques et médicinales sont de véritables sources de composés bioactifs utilisés dans l'alimentation, l'industrie cosmétique et chimique, l'aromathérapie et surtout dans les produits pharmaceutiques. Ces plantes doivent leurs nombreuses propriétés biologiques et thérapeutiques à des composés organiques biosynthétisés à partir de glucides, de lipides, de protéines et d'acides nucléiques et aminés : Ce sont les métabolites secondaires. L'étude de ces composés issus des plantes est du domaine de la phytochimie.

Le principe de l'extraction des molécules contenues dans la plante est basé sur leurs solubilités différentielles vis-à-vis des solvants en fonction de leurs affinités. Il consiste à traiter par un solvant, un mélange de solides (extraction solide-liquide) ou de liquides (extraction liquide-liquide) dans le but d'en extraire un constituant. Les extractions peuvent se faire en mode continue ou en discontinue ou encore par combinaison des deux méthodes.

### I.1. EXTRACTION SOLIDE-LIQUIDE

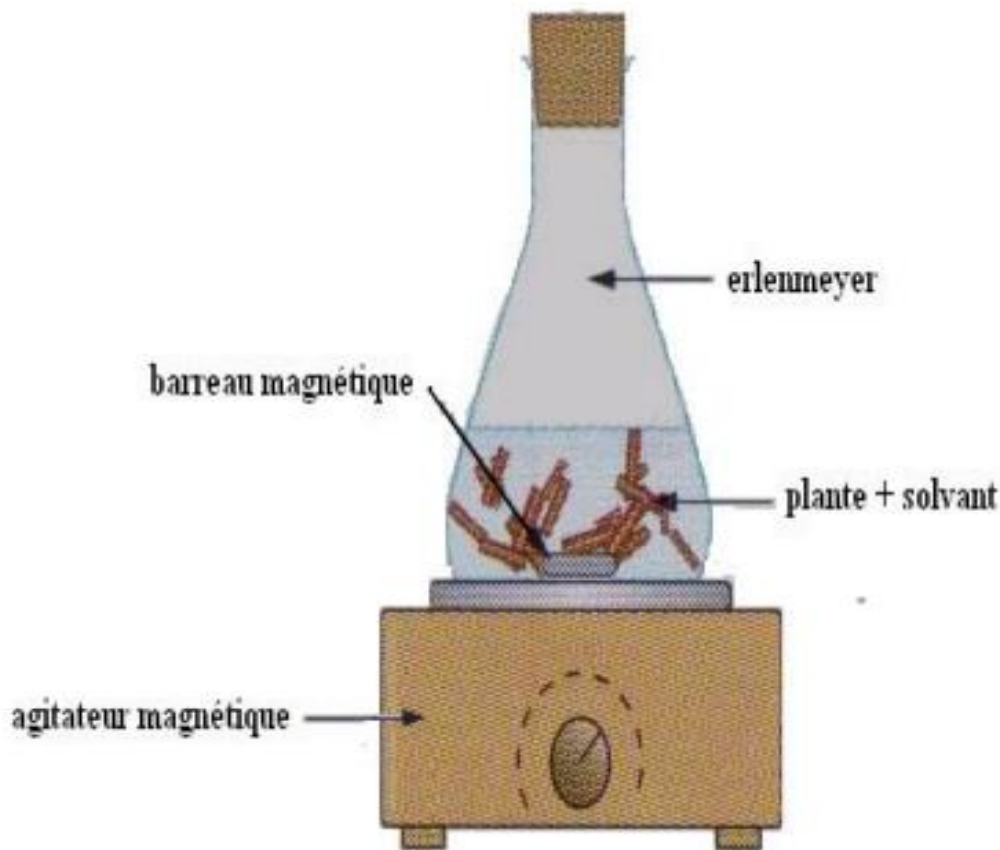
Il existe plusieurs techniques d'extraction parmi lesquelles on peut citer : la décoction, l'infusion, la macération, la digestion, l'extraction au soxhlet, l'hydrodistillation et l'entraînement à la vapeur.

#### I.1.1. Macération

Elle consiste à laisser séjourner le broyat de feuilles à froid dans un solvant durant une période adéquate afin d'en extraire les constituants solubles dans le solvant.

A une masse  $m$  (g) de broyat de feuilles est ajoutée un volume  $v$  (ml) de solvant égal à 10 fois la masse du broyat et on laisse le tout séjourner pendant 24h sur un agitateur

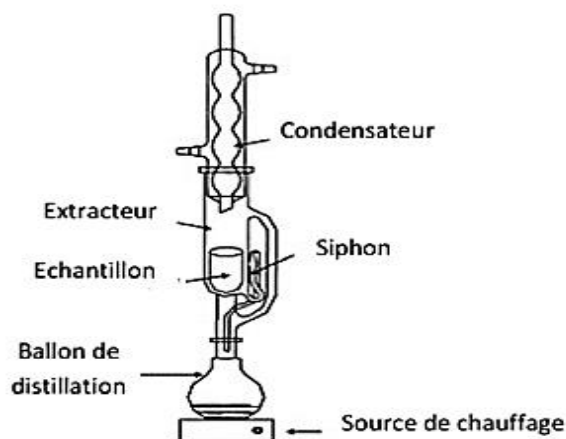
magnétique (Figure 1). Ensuite, le surnageant obtenu après décantation est filtré à l'aide de coton puis de papier filtre. Cette opération est répétée sur le marc jusqu'à épuisement. Tous les filtrats obtenus sont additionnés et concentrés à l'évaporateur rotatif puis à l'étuve pour donner les différents extraits.



**Figure 1 :** Macération sur agitateur magnétique

### **I.1.2. Extraction au Soxhlet**

L'échantillon à traiter est introduit dans une cartouche poreuse en cellulose qui est ensuite placée dans l'extracteur Soxhlet, comme le montre la figure 2. Le solvant d'extraction est porté à l'ébullition et l'extracteur Soxhlet se remplit lentement avec le solvant condensé. Lorsque le solvant atteint le siphon top, l'extracteur Soxhlet rempli se vide dans le réservoir de solvant placé juste en dessous. Au cours de ce processus, le solvant extrait et transporte l'extrait de matériaux. Ce cycle est répété en continu jusqu'à ce que le chauffage soit arrêté.



**Figure 2 :** Montage d'extraction au Soxhlet

### **I.1.3. Infusion**

Il s'agit de tremper le broyat de feuille dans de l'eau bouillante pour en extraire les principes actifs.

Après avoir pesé le broyat de feuilles, on fait bouillir une quantité d'eau distillée correspondant à 10 fois la masse du broyat. Ensuite on renverse l'eau bouillante sur le broyat. Le temps de refroidissement écoulé, on filtre et le filtrat est concentré, congelé puis lyophilisé.

### **I.1.4. Décoction**

Le principe est de faire bouillir dans l'eau distillée pendant 10 min le broyat de la plante afin d'en récupérer les substances extractibles par l'eau à chaud.

Le broyat de la plante est préalablement pesé et mis dans un ballon de 5 L de volume auquel est ajoutée la quantité d'eau distillée correspondant à 10 fois la masse du broyat. Ensuite, le ballon contenant l'ensemble est porté à ébullition sur un chauffe-ballon pendant 10 mn. Le temps écoulé, le ballon est descendu pour refroidissement et filtration. Enfin, le filtrat obtenu est concentré à l'évaporateur rotatif, congelé et lyophilisé. Puis les lyophilisats sont conservés dans des flacons stériles hermétiquement fermés.

### **I.1.5. Digestion**

On utilise cette méthode pour les principes actifs dont la dissolution à froid est très lente, mais qui sont détruits à haute température. Exemple : Le sirop de baume de tolu.

C'est une solution intermédiaire au cours de laquelle la substance dont on veut extraire le principe actif est maintenue en contact avec le solvant à une température élevée, mais inférieure à celle de l'ébullition.

## I.2. EXTRACTION LIQUIDE-LIQUIDE

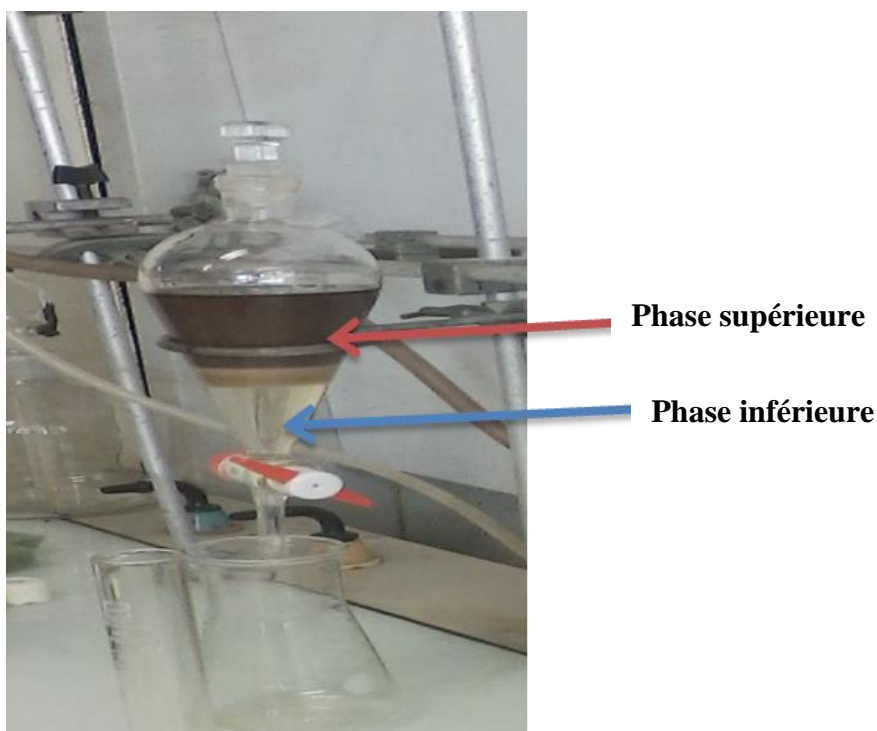
Cette technique permet d'extraire une substance dissoute dans un solvant, à l'aide d'un autre solvant, appelé solvant d'extraction, dans lequel elle est plus soluble. Le solvant initial et le solvant d'extraction ne doivent pas être miscibles (Figure 3). On parle aussi d'extraction par partition. Pour accélérer la partition de la substance entre les deux solvants non miscibles, on agite le mélange. Cette partition se fait en fonction du coefficient de partage des deux solvants en mélange.

Pour effectuer une extraction liquide-liquide en laboratoire, on peut utiliser une ampoule à décanter ou un extracteur en continue ; le calcul des pourcentages des extractions réalisées suivant la relation :

$$\% \text{ Extraction} = \frac{T_2 - T_1}{\text{Masse de la substance}} \times 100$$

$T_2$  : Masse d'extrait évaporé.

$T_1$  : Masse de cristalliseur à vide.



**Figure 3 :** Extraction liquide-liquide à l'aide d'une ampoule à décanter

## II. GENERALITES SUR LES PHYTOMOLECULES

La phytochimie est la branche de la chimie qui étudie la structure, le métabolisme et la fonction ainsi que les méthodes d'analyse, de purification et d'extraction des substances naturelles issues des plantes. Ainsi, pourrait-elle se définir comme étant l'ensemble des méthodes et techniques de préparation et d'analyse des métabolites secondaires des plantes (Boutelis, 2015) (Dehak, 2013). Ces métabolites secondaires jouent un rôle majeur dans les interactions de la plante avec son environnement contribuant ainsi à sa survie dans son écosystème (Raven *et al.*, 2000). L'ensemble des interactions biochimiques d'une plante sur une autre plante et aussi sur les micro-organismes au moyen de métabolites secondaires (Wardle *et al.*, 1998) est connu sous le nom de « allélopathie » dont le premier mécanisme a été proposé par Molish en 1937 (Rice *et al.*, 1984).

Les métabolites secondaires sont présents dans toutes les parties de la plante, mais ils diffèrent selon la plante et le rôle qu'ils jouent d'une plante à une autre (Muanda, 2010). Ils sont produits en très faible quantité et sont d'une grande variété structurale (plus de 200000 structures définies). On distingue trois principales familles de métabolites secondaires chez les végétaux, et une famille secondaire de composés mixtes (Crozier *et al.*, 2008). Ce sont les alcaloïdes et composés azotés, les composés phénoliques, les composés terpéniques et les composés mixtes.

### II.1. ALCALOÏDES

Les alcaloïdes sont des composés organiques azotés généralement présents dans toutes les classes d'organismes vivants et surtout de plantes supérieures. Ce groupe de métabolites secondaires contient plus de 10000 composés connus. La majorité des alcaloïdes dériveraient des acides aminés tels que le Tryptophane, la Tyrosine, la Lysine, l'Histidine et l'Ornithine (Louis, 2004). Ils ont pour formule générale (C<sub>x</sub>H<sub>y</sub>O<sub>z</sub>N<sub>t</sub>) et sont doués de propriétés physiques, chimiques, biologiques et pharmacologiques.

#### II.1.1. Propriétés physiques et chimiques

Les alcaloïdes et leurs sels sont en général des produits solides cristallisés et caractérisés par un point de fusion propre. Leurs masses molaires varient entre 100 et 900 g/mol. Les alcaloïdes non oxygénés sont des liquides volatils alors que les alcaloïdes oxygénés sont des solides cristallisés, très souvent doués de pouvoir rotatoire. Ils s'extraient par l'eau acide ou par des solvants comme le chloroforme après alcalinisation du milieu (Bruneton, 1993).

Les alcaloïdes précipitent généralement avec des réactifs iodométalliques (réactifs de Mayer, de Dragendorff, de Wasicky, de Bouchardât). La saveur amère est une caractéristique générale chez les alcaloïdes. Ils sont plus solubles dans l'alcool que dans l'eau (tableau 1) (Bruneton, 1993).

**Tableau 1** : Solubilité des différentes formes d'alcaloïdes

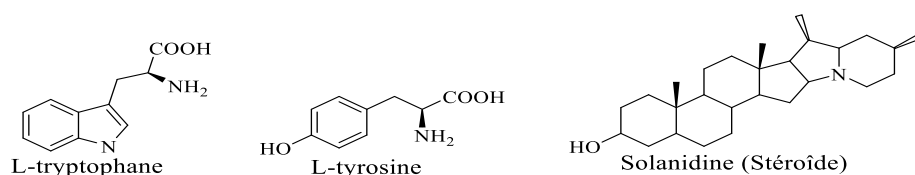
Solvants Formes	Eau	Solvants organiques polaires (éthanol, méthanol...)	Solvants organiques apolaires (hexane, chloroforme...)
Base	Insoluble	Soluble	Soluble
Sel	Soluble	Soluble	Insoluble

### II.1.2. Propriétés biologiques et pharmacologiques

En plus de leur rôle dans la protection des végétaux et probablement dans le métabolisme de l'azote et de son stockage, les alcaloïdes présentent diverses autres activités biologiques. Ainsi, certains présentent des activités antimicrobiennes (Calystégines, Canthin-6-one, Berbérine) (Louis, 2004). Malgré leur toxicité (Strychnine ou Aconitine), d'autres sont employés dans la médecine pour leurs propriétés analgésiques (la Morphine, la Codéine) et dans le cadre de protocoles de sédation (Anesthésie, Atropine) où ils sont souvent accompagnés des hypnotiques. Ils sont utilisés comme agents antipaludéens (Quinine, Chloroquinine) ou anticancéreux (Taxol, Vinblastine, Vincristine) ou stupéfiants (Cocaïne). Ils sont également utilisés comme anticholinergiques, anti-malariales, antihypertensives, antitumorales, sympathomimétiques, cardio-dépressives, anesthésiantes, narcotiques et diurétiques (Hesse, 2002).

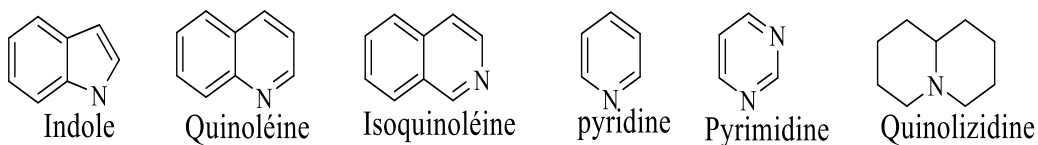
### II.1.3. Classification biogénétique

Selon la classification biogénétique, les alcaloïdes sont issus principalement du métabolisme des acides aminés (Tyrosine, Tryptophane). Certains présentent des éléments de structures dérivées des terpènes (solanidine) (figure 4).



**Figure 4** : Structures de quelques précurseurs des alcaloïdes

Les alcaloïdes peuvent être aliphatiques ou hétérocycliques (ce sont les composés les plus nombreux). Les principaux cycles sont l'indole, la quinoléine, l'isoquinoléine, la pyridine, pyrimidine et la quinolizidine (figure 5).



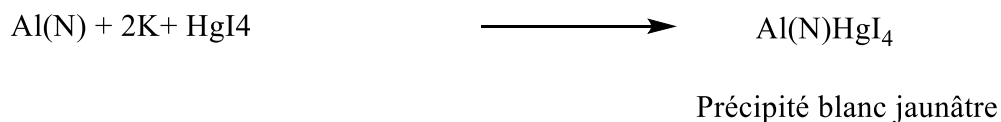
**Figure 5:** Structures de quelques alcaloïdes

Certains alcaloïdes ont servi de modèle pour la synthèse d'analogues ayant des propriétés plus intéressantes. Plus de 10 000 alcaloïdes ont été isolés ou détectés dans les plantes, dans les champignons et même chez les animaux (Mann *et al.*, 1994b).

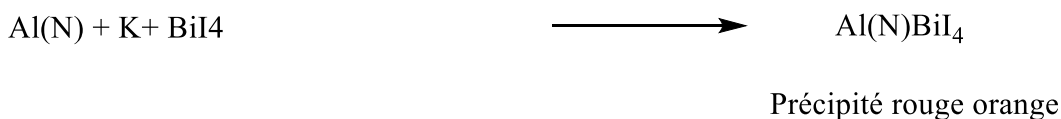
#### II.1.4. Caractérisation

Tous les alcaloïdes présentent des propriétés alcalines plus ou moins marquées et forment des sels avec les acides (sulfates, chlorhydrates...). Ils peuvent aussi précipiter les hydrates de métaux lourds tels que le bismuth, le mercure, le tungstène et l'iode. Cela leur permet ainsi d'adopter une structure d'ammonium quaternaire (Rizt *et al.*, 1982) (schéma 1).

Mayer: précipité blanc jaunâtre.



Dragendorff: précipité rouge orange.



**Schéma 1:** Equation de précipitation des alcaloïdes

#### II.2. COMPOSÉS PHÉNOLIQUES

Les composés phénoliques constituent le groupe le plus nombreux et largement distribué des substances dans le règne végétal avec plus de 8000 flavonoïdes. Ils sont



présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois), mais leurs nature et teneur varient largement d'une espèce à une autre (Grolier *et al.*, 2001). Ils constituent un ensemble de composés, dérivant de la phénylalanine et de la tyrosine (Phillips *et al.*, 2005). Leur structure de base est un noyau benzénique auquel sont directement liés un ou plusieurs groupes hydroxyles, libres ou engagés dans une autre fonction chimique (osidique, éther, méthylique, ester) (Bruneton, 1993).

### **II.2.1. Propriétés physiques et chimiques**

Les polyphénols sont des solides cristallins. L'introduction d'un hydroxyle sur un cycle aromatique augmente la possibilité de formation de liaisons intermoléculaires avec d'autres composés.

Certains composés phénoliques ont des propriétés d'arôme. C'est le cas par exemple de la vanilline qui participe à l'arôme du café grillé (Mayer *et al.*, 2001). Les dihydrochalcones sont responsables du goût sucré (Cheynier *et al.*, 2006a).

Les composés phénoliques sont souvent responsables de deux propriétés gustatives: l'astringence et l'amertume dont l'intensité varie avec leur degré de polymérisation (cas des tannins condensés). Plus le degré de polymérisation (ou de galloylation) est élevé, plus l'astringence augmente alors que l'amertume diminue (Laetitia, 2009). Les composés phénoliques sont capables de former des complexes avec les protéines qui peuvent bloquer les sites actifs des enzymes, inhibant ainsi leur activité. Un exemple simple de cette complexation est l'astringence qui est due à des interactions entre ces composés phénoliques et les protéines salivaires. Les proanthocyanidines peuvent former des complexes avec des protéines et les polysaccharides réduisant ainsi la digestion des fibres (Laetitia, 2009).

### **II.2.2. Propriétés biologiques et pharmacologiques**

Les pigments phénoliques de certains flavonoïdes assurent la reproduction de la plante par des zoo-vecteurs comme les insectes et les oiseaux. Tous les composés phénoliques absorbent les UV et participent de ce fait à la protection des végétaux contre le rayonnement solaire grâce à leur localisation superficielle dans les tissus. C'est le cas des esters hydroxycinnamiques et de certains flavonols dans la protection contre le rayonnement UV (Macheix *et al.*, 2006).

Certains composés phénoliques jouent un rôle protecteur contre les attaques des parasites, de champignons ou de bactéries. Ils jouent un rôle très important dans la prévention

des maladies cardio- vasculaires et d'autres pathologies chroniques comme le cancers, la maladie de Parkinson, l'arthrite, l'artériosclérose (Laetitia, 2009).

### II.2.3. Classification

Plusieurs classes de composés phénoliques ont été définies selon leur squelette de base (tableau 2).

**Tableau 2:** Classes de composés phénoliques et leurs structures de base

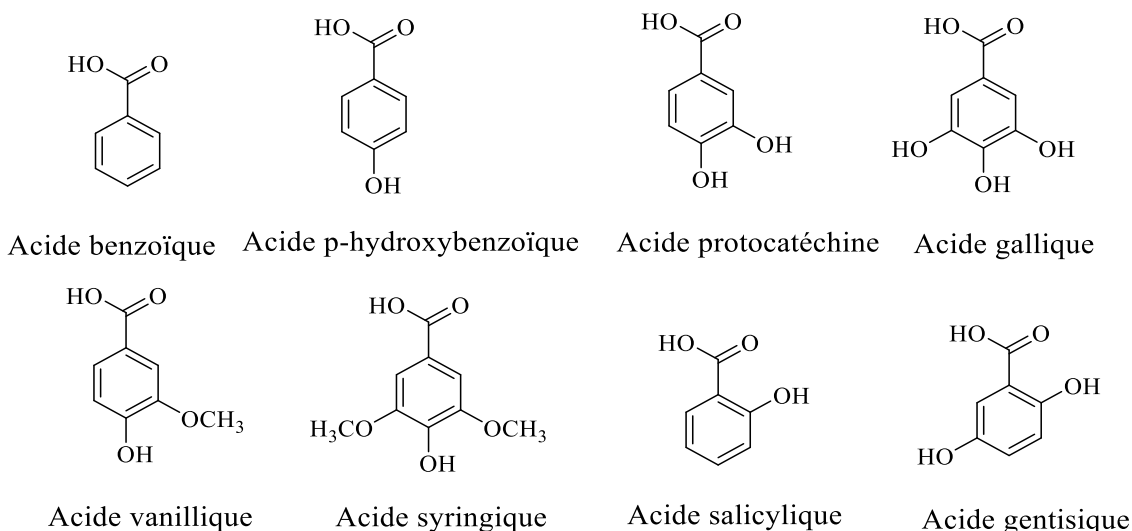
Classe	Structure de base
Phénols simples, benzoquinones	$C_6$
Acides phénoliques	$C_6-C_1$
Acides phényle acétique, Acétophénones	$C_6-C_2$
Acides hydroxycinnamiques, coumarine, phénylpropènes, chromones	$C_6-C_3$
Naphtoquinones	$C_6-C_4$
Xanthones	$C_6-C_1-C_6$
Stilbènes, anthraquinones	$C_6-C_2-C_6$
Flavonoïdes, isoflavonoïdes	$C_6-C_3-C_6$
Tanins hydrolysables	$(C_6-C_1)_2$
Lignanes, néolignanes	$(C_6-C_3)_2$
Biflavonoïdes	$(C_6-C_3-C_6)_2$
Lignines	$(C_6-C_3)_n$
Catéchol mélanines	$(C_6)_n$
Tanins condensés	$(C_6-C_3-C_6)_n$

#### II.2.3.1. Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des composés non flavoniques. Ils sont présents dans les plantes sous forme combinée. Ils dérivent de l'acide benzoïque et existent sous forme d'ester ou de glucoside. Ils regroupent les acides hydroxybenzoïques, hydroxycinnamiques et leurs dérivés.

#### II.2.3.2. Acides hydroxybenzoïques

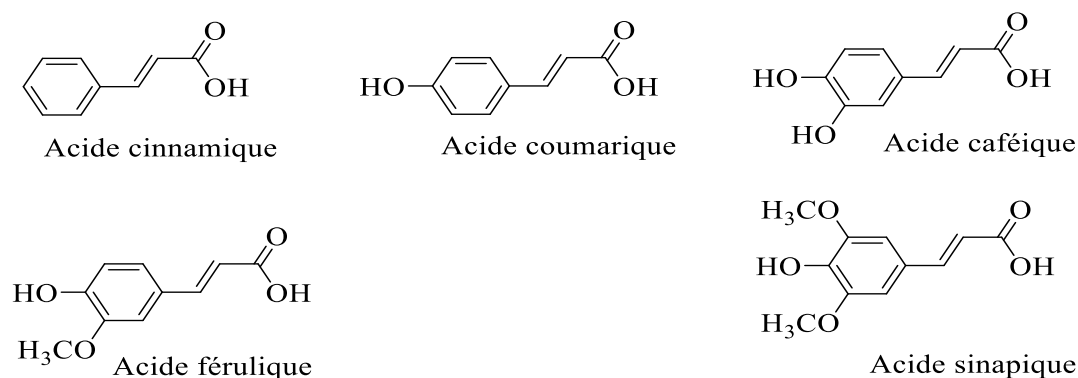
Les acides hydroxybenzoïques (Figure 6) dérivent de l'acide benzoïque et sont formés d'un squelette à sept atomes de carbones ( $C_6-C_1$ ).



**Figure 6:** Structures de quelques acides hydroxybenzoïques

### II.2.3.3. Acides hydroxycinnamiques et leurs dérivés

Ils sont aussi appelés phénylpropanoïdes et possèdent une structure du type C6-C3 dérivée de celle de l'acide cinnamique. Les composés les plus fréquents sont les acides p-coumarique et caféique (qui présentent une répartition quasi-universelle chez les végétaux), ainsi que les acides férulique et sinapique (Figure 7). Les esters d'acides hydroxycinnamiques contribuent aux caractéristiques organoleptiques des produits transformés telles que l'amertume, l'astringence et le brunissement enzymatique (Macheix *et al.*, 2006).

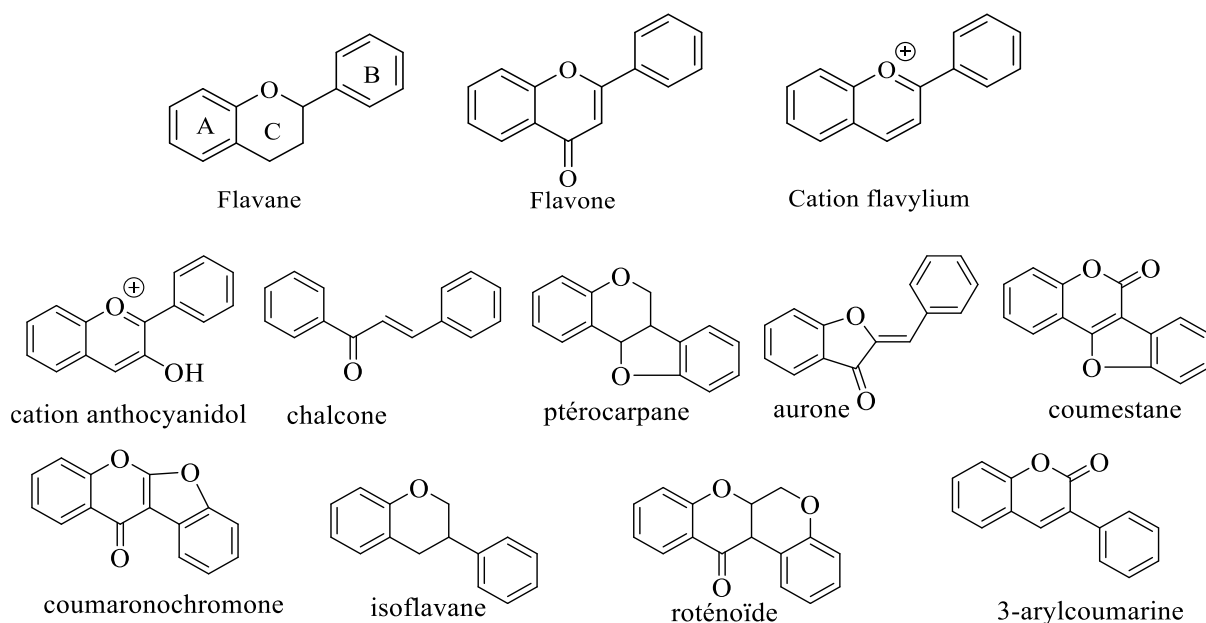


**Figure 7:** Structures de quelques acides hydroxycinnamiques

### II.2.3.4. Flavonoïdes

Les flavonoïdes ont tous une origine biosynthétique commune. Ils sont produits de la même voie biosynthétique par l'intermédiaire de la 2',4',6',4 tétrahydroxychalcone, formée





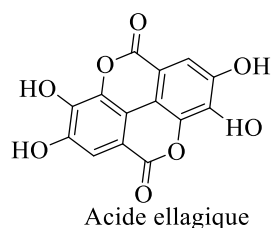
**Figure 8:** Structures de quelques flavonoïdes

Les flavonoïdes hydroxylés en position 3, 5, 7, 3', 4' et 5' sont souvent glycosylés. Ils ont des propriétés antioxydante, antiallergique, antispasmodique, antibactérienne, hépatoprotectrice et oestrogénique (Marinova *et al.*, 2005) (Jan *et al.*, 2007).

Les flavonoïdes sont des solides cristallisés dont la teinte varie du blanc ivoire au jaune vif. Ils sont solubles dans l'eau (surtout à chaud), l'alcool et les autres solvants organiques polaires, mais sont insolubles dans les solvants organiques apolaires. Les génines sont solubles dans l'éther et peu solubles dans l'eau. Les flavonoïdes sont solubles dans les solutions alcalines (ammoniaque ou potasse) en donnant une coloration jaune qui disparaît par addition d'un acide.

### II.2.3.5. Tanins

Les tanins sont utilisés depuis très longtemps pour convertir la peau des animaux en cuir grâce à l'interaction des flavonoïdes avec les fibres de collagène, protéine riche en résidus proline et hydroxyproline (Codornui-Hernandez *et al.*, 2003). Ils sont classés selon leur structure, en deux groupes majeurs : les tanins condensés (proanthocyanidines) et les tanins hydrolysables (gallotanins et ellagitanins). Les tanins hydrolysables sont des esters d'acide gallique ou d'acide ellagique et de glucose. La figure 9 donne la structure de l'acide ellagique.



**Figure 9:** Structure de l'acide ellagique

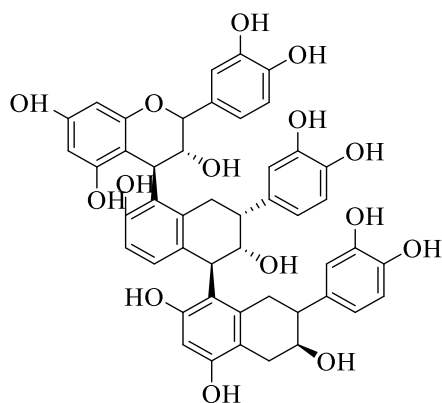
Les tanins condensés sont des oligomères ou polymères de flavan-3-ols. Ils ont la propriété de libérer des anthocyanes en milieu acide, à chaud, par rupture de liaison intermonomérique (Cheynier *et al.*, 2006a). Leur structure est formée d'une répétition d'unités monomériques qui varient par leurs centres asymétriques, leur degré d'oxydation et leur nombre de substituant galloylés (Souquet *et al.*, 1996).

Selon la nature de l'anthocyane libérée, on distingue deux types de proanthocyanidines : d'une part les procyanidines (polymères de catéchine, de l'épicatéchine et de leur 3-O-gallate) libèrent de la cyanidine et d'autre part, les prodelphinidines (polymères de gallocatéchine, d'épigallocatéchine et de leur 3-O-gallate) libèrent de la delphinidine (Konaté *et al.*, 2012). La structure de base du flavan-3-ol et de l'épicatéchine sont données dans la figure 10.



**Figure 10:** Structures de base du Flavan-3-ol et de l'Epi-catéchine

Les unités de flavan-3-ol sont liées entre elles, par des liaisons carbone-carbone de type 4-8 (figure 11) ou de type 4-6. Les tanins ont des propriétés antioxydantes, antimicrobiennes et anti-inflammatoires. Leur aptitude à piéger les radicaux libres pourraient réduire le risque de maladies cardio-vasculaires et de cancer (Bruneton, 1999).

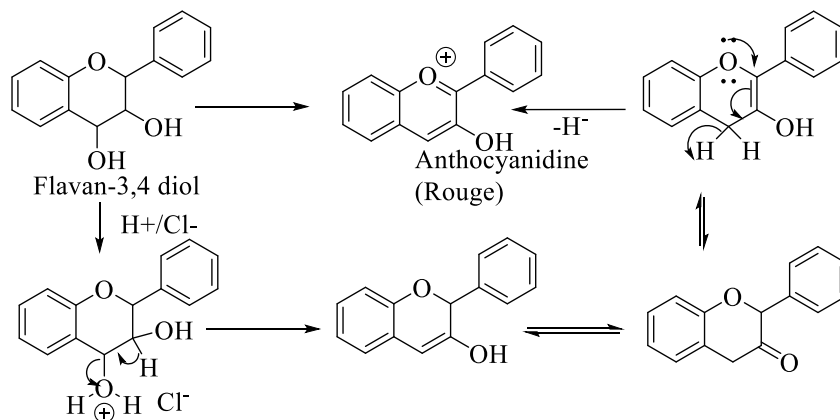


**Figure 11:** Structure d'un trimère de type 4-8

## II.2.4. Caractérisation

Les composés flavoniques sont réduits en présence d'un acide concentré et de magnésium. Après l'élimination d'une molécule d'eau, le produit de réduction conduit à des anthocyanidines de couleur rouge.

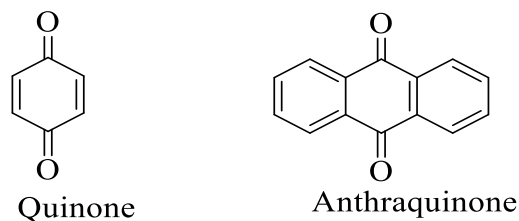
Les anthocyanes et les leucoanthocyanes sont mis en évidence par la réduction du noyau du flavonoïde, mais cette fois-ci en absence de métaux. Le schéma 3 donne les réactions mises en jeu lors de la caractérisation des flavonoïdes.



**Schéma 3:** Réactions mises en jeu lors de la caractérisation des flavonoïdes

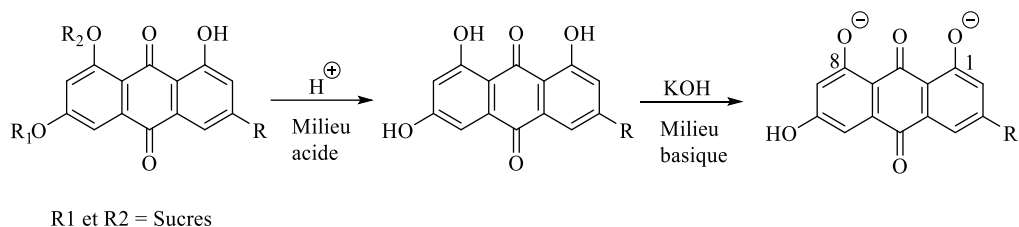
Les hydroxyles des tanins peuvent être libres ou engagés dans des substitutions de type O-méthyle, O-glycosyle, O-prényle. Le chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ ) en solution diluée forme avec les phénols des colorations variant du bleu au violet, qui sont dues à la formation de complexes d'oxydation.

Les quinones et anthraquinones (figure 12) font partie du groupe des quinones naturelles qui sont des substances oxygénées engendrées par l'oxydation des composés aromatiques et caractérisées par un motif 1,4-dicétocyclohexa 2,5-diène.



**Figure 12:** Structures de la quinone et de l'anthraquinone

La caractérisation des composés anthraquinoniques est effectuée par la réaction de Bornträger. Elle est basée sur la coloration rouge que fournissent les 1,8-dihydroxyanthraquinones lorsqu'elles sont placées en milieu fortement alcalins. L'extrait aqueux est traité en milieux acide dans le but de transformer l'ensemble des principes actifs en anthraquinones libres, car ils peuvent être liés à des hétérosides (Durand *et al.*, 2011) (schéma 4).



**Schéma 4:** Test de criblage des anthraquinones par la réaction de Bornträger

### II.3. TERPÉNOÏDES

Les terpénoïdes forment une classe de composés produits par de nombreuses plantes, en particulier les conifères. Ce sont des composants majeurs de la résine et de l'essence de térébenthine produite à partir de résine.

#### II.3.1. Propriétés physiques et chimiques

Les terpénoïdes sont des molécules à nombre de carbones multiples de 5, et dont le précurseur est l'isopentényldiphosphate (IPP). Ils sont formés de l'assemblage d'un nombre entier d'unités pentacarbonées ramifiées dérivées du 2-méthyl butadiène (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>)<sub>n</sub>. Ces squelettes peuvent être arrangés de façon linéaire ou former des anneaux. On peut considérer l'isoprène comme l'un des éléments de construction préférés de la nature. Certains sont des lipides synthétisés à partir de l'acétyl-CoA. Il existe environ 20000 composés terpéniques connus. Ils sont stockés dans les vacuoles au niveau des écorces, des épines, des racines ou encore des feuilles. On en retrouve également dans le latex. Ils sont plus solubles dans les solvants moins polaires.



### II.3.2. Propriétés biologiques et pharmacologiques

Les terpénoïdes possèdent des propriétés antihypertensive, antirétrovirale, anti-inflammatoire, analgésique, antimicrobienne et antiparasitaire bien que certains tels que les cholestérols (LDL) soient dangereux pour la santé (Yuetal *et al.*, 2013).

### II.3.3. Classification

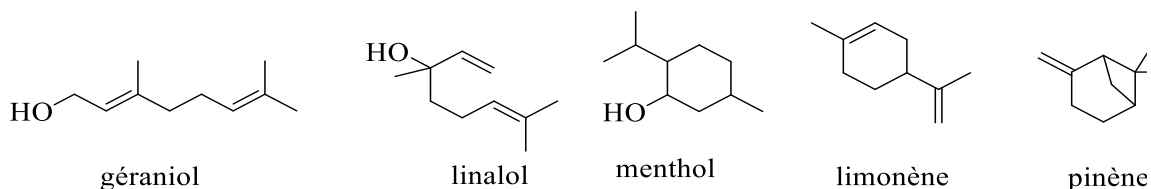
Les terpénoïdes se classent en fonction du nombre  $n$  (entier) d'unités d'isoprène qui les compose. Ainsi, on a pour :

- $n = 1$ , l'isoprène en (C5)
- $n = 2$ , les monoterpènes en (C10)
- $n = 3$ , les sesquiterpènes en (C15)
- $n = 4$ , les diterpènes en (C20)
- $n = 5$ , les sesterpènes en (C25)
- $n = 6$ , les triterpènes en (C30)
- $n = 8$ , les tétraterpènes en (C40) et les polyterpènes pour  $n \geq 9$ .

Parmi les terpènes, les plus importants dans les cellules de plantes sont l' $\alpha$ -pinène, le  $\beta$ -pinène, le  $\delta$ -3-carène, le Limonène et le  $\beta$ -carotène.

#### II.3.3.1. Monoterpènes

Les monoterpènes sont des composés à 10 carbones, souvent volatils, aromatiques et biologiquement actifs. Ils sont largement présents dans les huiles essentielles (Noudjou *et al.*, 2007). On distingue les monoterpènes linéaires (Géraniol, Linalol), les monoterpènes monocycliques (Menthol, Limonène) et les monoterpènes bicycliques ( $\beta$  et  $\alpha$ -pinène). (Figure 13)

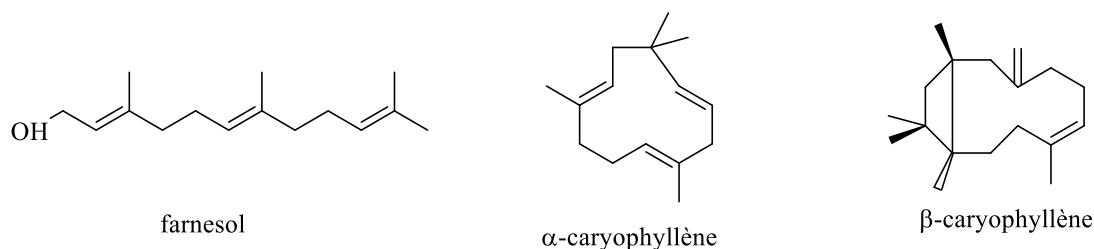


**Figure 13:** Structures de quelques monoterpènes

### II.3.3.2. Sesquiterpènes

Ce sont des composés à 15 atomes de carbones et abondamment représentés chez les végétaux. On distingue :

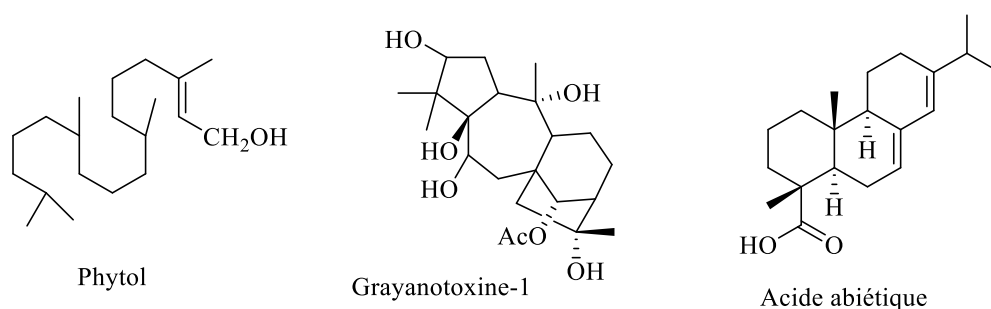
- les sesquiterpènes linéaires (le farnésol), beaucoup utilisés en parfumerie ;
- les sesquiterpènes polycycliques (le caryophyllène), responsables du caractère piquant du poivre ;
- les sesquiterpènes monocycliques (l'acide S- (+) -abscissique), une phytohormone présente dans les bourgeons, les feuilles et les fruits de nombreuses plantes. Les structures de quelques sesquiterpènes sont données dans la figure 14.



**Figure 14 :** Structures de quelques sesquiterpènes

### II.3.3.3. Diterpènes

Ce sont des composés terpéniques à 20 carbones. On retrouve parmi les dérivés de diterpènes, les composés acycliques comme le phytol (présent sous forme estérifiée dans la chlorophylle), les diterpènes toxiques comme la grayanotoxine et les diterpènes de résine (Acide abiétique) (Harbone, 1998). Les structures de quelques diterpènes sont données dans la figure 15.



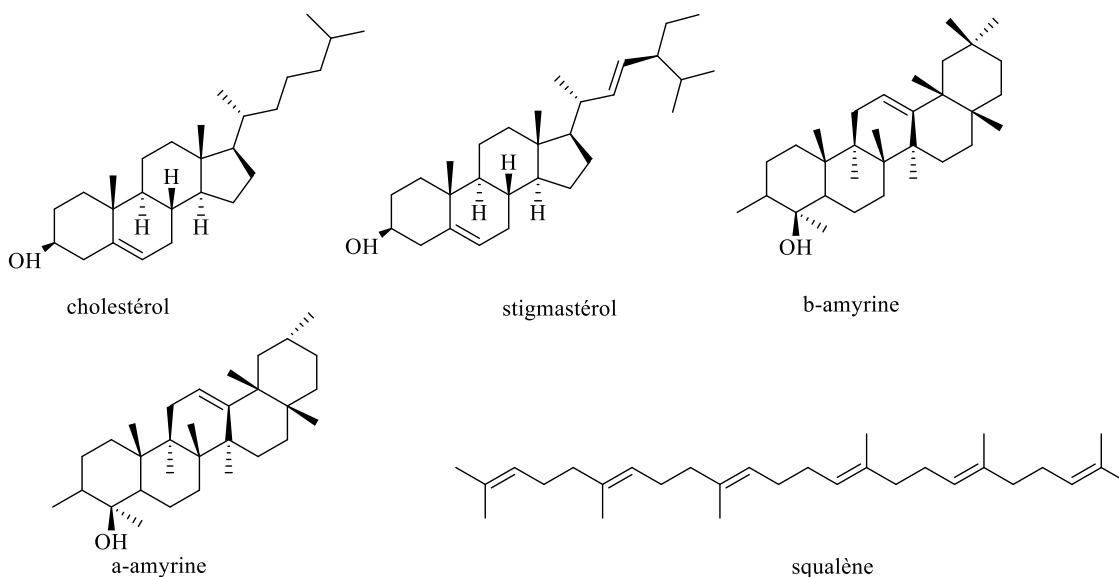
**Figure 15 :** Structures de quelques diterpènes

### II.3.3.4. Triterpènes

Cette famille regroupe des composés dérivés d'une unité à 30 carbones. Ils sont très répandus, notamment dans le règne animal et végétal, à l'état libre, estérifié, ou sous forme hétérosidique. Ils peuvent être des composés :

- aliphatiques tels que le squalène qui est un intermédiaire dans la biogénèse des triterpènes cycliques et des stéroïdes ;
- tétracycliques tels que les stéroïdes et les phytostérols ;
- pentacycliques tels que l' $\alpha$ -amyrine et la  $\beta$ -amyrine connues pour leurs propriétés anti-diarrhéique et analgésique (Villasenor *et al.*, 2004).

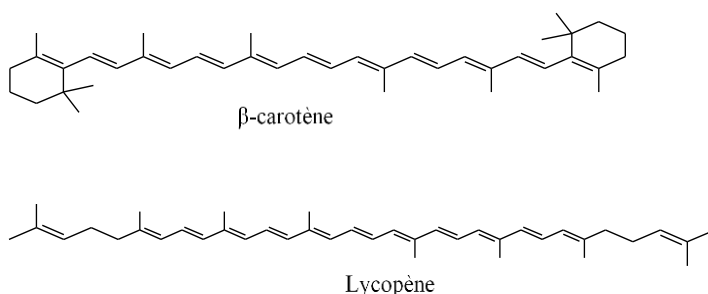
Les structures de quelques triterpènes sont données à la figure 16.



**Figure 16:** Structures de quelques triterpènes

### II.3.3.5. Tétraterpènes

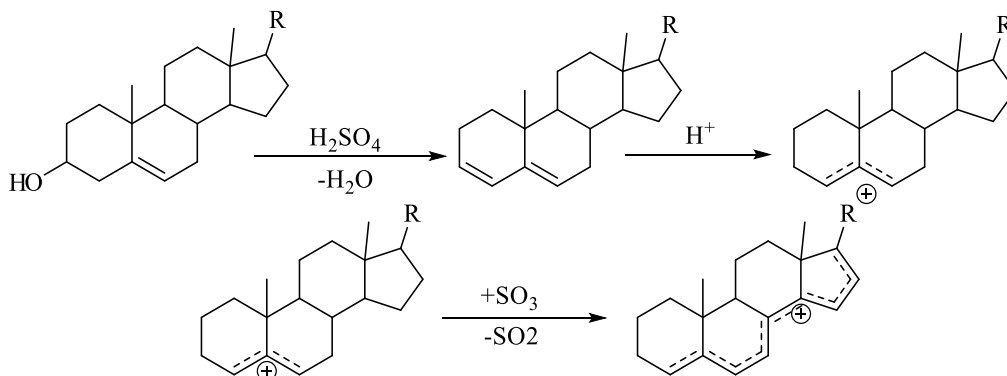
Cette famille de terpènes à 40 carbones, compte en particulier les caroténoïdes dont un pigment photosynthétique majeur est le  $\beta$ -carotène mais également des pigments aux propriétés antioxydantes comme le Lycopène (figure 17). Ces derniers sont présents dans des légumes comme les carottes, le brocoli, la tomate et la citrouille (Yvon, 2004).



**Figure 17:** Structures de deux tétraterpènes

### II.3.4. Caractérisation

Les stérols et les terpènes sont mis en évidence par la réaction de Liebermann et Burchard dont les étapes sont données dans le schéma 5.



**Schéma 5:** Etapes de la réaction de Liebermann et Burchard

Les colorations bleu-vert et rouge-violet à rose indiquent respectivement la présence des stéroïdes et des triterpènes. Ces colorations sont dues à une déshydratation en position 3, par addition d'acide sulfurique concentré. Cette réaction est suivie soit d'une isomérisation ou soit d'une transposition moléculaire, ce qui provoque le changement de coloration (Lucchesi, 2005).

### II.4. SAPONOSIDES

Ce sont des hétérosides généralement d'origine végétale. Ils ont la propriété d'engendrer une mousse persistante par agitation en milieu aqueux. Cette propriété est due à leur caractère tensioactive et amphiphile (à la fois hydrophile et lipophile). En outre, les saponosides provoquent aussi la lyse de cellules, de tissus et de globules rouges (pouvoir hémolytique). En général, ces produits sont amers et sternutatoires (font éternuer) (Santos-Buelga *et al.*, 2000).

#### II.4.1. Propriétés physiques et chimiques

L'hétéroside est soluble dans l'eau et les solvants hydroalcooliques à faible teneur d'alcool (alcools à faible degré) mais insoluble dans les solvants organiques apolaires. Tous les hétérosides peuvent être hydrolysés et l'hydrolyse acide est totale et sépare complètement la génine du sucre.

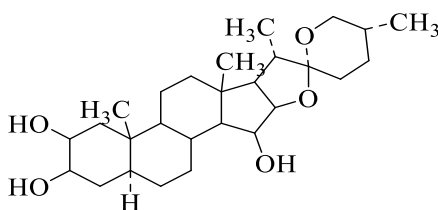
Les saponosides sont des hétérosides dont la génine stéroïdique ou triterpénique (composé lipophile) est reliée à des résidus de sucres (composés polaires). Cette structure

particulière leur confère des propriétés amphiphiles et tensioactives, d'où leur pouvoir moussant.

#### II.4.2. Propriétés biologiques et pharmacologiques

Par leur pouvoir hémolytique, les saponosides sont toxiques et irritants au niveau des bronches. L'action irritante se manifeste par une action expectorante et antitussive. Si les reins sont irrités, il y'a une action diurétique. Si les vaisseaux sont irrités, il y'a une action vasoconstrictrice. Les saponosides ont des propriétés anti-inflammatoire, cicatrisante et anthelminthique (antiparasitaire).

Un exemple de saponine, la digitogénine existant sous forme de glycoside (glucose, galactose, et xylose) dans les plantes apparentées à la digitale est donné par la figure 18.



**Figure 18:** Structure de la digitogénine

#### II.4.3. Caractérisation

Les saponosides sont caractérisés par une mousse persistante obtenue après agitation et dont la détermination de la hauteur permet de calculer l'indice de mousse (Pouvoir aphrogène).

### III. HUILES ESSENTIELLES

Les huiles essentielles sont des liquides volatils à fortes odeurs sécrétés par les plantes et doués de propriétés biologiques. Ce sont des mélanges complexes constitués majoritairement de composés terpéniques volatils à la température ambiante (Mann *et al.*, 1994a) (Mazen *et al.*, 2002). Elles sont extraites de différentes parties (feuilles, écorces, racines, tiges, fleurs, bois, fruits, graine) de la matière première végétale principalement par entraînement à la vapeur d'eau ou par hydrodistillation (Guenther *et al.*, 1950) (Bauer *et al.*, 1985). Elles peuvent être également obtenues par extraction *via* des solvants volatils, au CO<sub>2</sub> supercritique, par effleurage, et par expression à froid (Celiktas *et al.*, 2007) (Anwar *et al.*, 2009). Elles ne représentent qu'environ 0 à 5% de la masse végétale et les 95% restant sont considérés comme des déchets qui sont insuffisamment exploités (Sójka *et al.*, 2009).

### III.1. METHODES D'EXTRACTION DES HUILES ESSENTIELLES

La méthode d'extraction de l'huile essentielle dépend de sa diffusion dans les cellules de la plante. Les méthodes d'extraction les plus courantes sont l'hydrodistillation et l'entraînement à la vapeur d'eau. L'extraction par les solvants volatils, l'effleurage et l'expression à froid et l'extraction à sec sont rarement utilisés (Mohammedi, 2006) (Kanko, 2010)

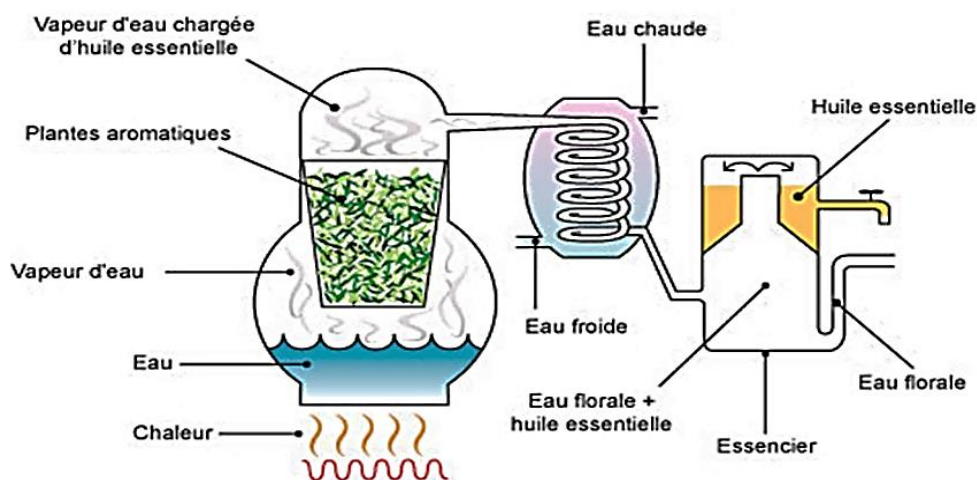
#### III.1.1. Hydrodistillation

L'hydrodistillation est l'une des méthodes les plus anciennes et les plus utilisées pour l'extraction des huiles essentielles. Le matériel végétal sec ou frais est porté à ébullition dans l'eau à environ 100°C. Les vapeurs d'eau chargées d'huiles essentielles se condensent dans un réfrigérant puis sont recueillies dans un essencier où le mélange eau-huile se sépare par différence de densité (Mohammedi, 2006). Cette méthode est relativement moins coûteuse et a de bons rendements. Cependant, elle peut engendrer la dégradation thermique et l'hydrolyse de certains constituants de l'huile (Guenther *et al.*, 1950).

Afin d'atténuer ces phénomènes de dégradation et d'hydrolyse qui peuvent influencer sur la qualité des huiles essentielles, il a été mis en place la technique d'entraînement à la vapeur d'eau.

#### III.1.2. Entraînement à la vapeur d'eau

Dans le cas de la distillation à la vapeur d'eau, le matériel végétal est suspendu au-dessus de l'eau et la vapeur d'eau passant à travers, distille les cellules en entraînant l'huile essentielle. Ensuite, cette vapeur est condensée et recueillie comme dans le cas de l'hydrodistillation pour donner l'huile essentielle par décantation (Mohammedi, 2006). Malgré tout, les huiles essentielles restent toujours affectés par les conditions de la distillation à la vapeur d'eau (Bauer *et al.*, 1985). La figure 19 donne le dispositif de distillation par entraînement à la vapeur.



**Figure 19 :** Dispositif de la distillation par entraînement à la vapeur

### III.2. COMPOSITION CHIMIQUE DES HUILES ESSENTIELLES

Les huiles essentielles sont produites par plus de 2000 espèces parmi lesquelles environ 100 ont des valeurs économiques (Moerman *et al.*, 1996) (Burt *et al.*, 2004). Ce sont des mélanges formés de différents métabolites secondaires (Guenther *et al.*, 1950) dont les plus abondants sont les monoterpènes, les diterpènes et les sesquiterpènes (Mohammedi, 2006).

### III.3. PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES ET THÉRAPEUTIQUES DES HUILES ESSENTIELLES

Utilisées en alimentation, les huiles essentielles sont également présentes dans la parfumerie et dans les industries pharmaceutiques et chimiques (Moerman *et al.*, 1996). Leurs applications pharmaceutiques et alimentaires deviennent de plus en plus croissantes en lieu et place des produits synthétiques grâce à leurs nombreuses propriétés bactéricides et fongicides. (Burt *et al.*, 2004). Certaines essences ou leurs bioconstituants tels que le Limonène du zeste de citron ou de l'orange, l'Acétate de géranyle des feuilles de citronnier et le Caryone des grains de cumin, sont de très bons ingrédients dans la pâte dentifrice et autres produits hygiéniques. Dans le cas d'autres espèces comme la sauge, le thym, l'origan et autres, elles ont montré leur potentiel antioxydant (Dang *et al.*, 2001). Elles peuvent donc être utilisées comme antioxydants naturels pour la conservation de la graisse, des huiles et de leurs produits dérivés. Elles agissent également comme agents antimicrobiennes dans l'alimentation (Goly *et al.*, 2017)

Tous ces domaines d'application des huiles essentielles imposent une extraction de plus en plus croissante d'huiles essentielles. De ce fait, on assiste à une recrudescence des

déchets appelés résidus d'hydrodistillation qui sont le plus souvent rejetés dans la nature sans aucune autre forme de valorisation.

#### **IV. GENERALITES SUR LES RESIDUS D'HYDRODISTILLATION**

Le développement des pratiques médicinales ces dernières décennies et surtout celle de l'aromathérapie a engendré une demande de plus en plus forte des huiles essentielles. Toutefois, on assiste à une recrudescence des problèmes de gestion adéquate de ces résidus. Si les déchets solides sont souvent utilisés comme compost, les résidus liquides sont simplement rejetés dans la nature. C'est pourquoi, une étude sur l'exploitabilité de ces résidus est d'actualité. S'il existe quelques données sur les résidus d'hydrodistillation de certains fruits et végétaux, force est de constater qu'il n'existe à notre connaissance que très peu d'études sur la valorisation des feuilles. Ainsi, certains auteurs ont proposé diverses voies de valorisation de ces sous-produits comme sources de composés phénoliques, de fibres et de protéines (Moure *et al.*, 2001). D'autres estiment que ces sous-produits sont des sources potentielles d'éléments minéraux et de composés actifs possédant des propriétés antioxydantes que l'on pourrait extraire afin d'accroître le recyclage complet de la matière première (Takeoka *et al.*, 2003) (Bryngelsson *et al.*, 2002). Malgré tout cela, ces sous-produits sont très souvent brûlés avant d'être rejetés dans la nature. De ce fait, trouver des voies de leur valorisation reste un véritable défi pour toute la communauté scientifique.

##### **IV.1. TRAVAUX ANTÉRIEURS SUR LES RÉSIDUS D'HYDRODISTILLATION**

Ces dernières années, il y a un intérêt grandissant envers les résidus de distillation du fait du développement des procédures de recyclage appliquées pour l'isolation des composés actifs que pourraient renfermer cette matrice végétale. Ainsi, les résidus de la grenade et de la canneberge ont longuement été évalués pour leurs propriétés anti-inflammatoires, anti-mutagéniques, antioxydantes et anticancéreuses (Gil *et al.*, 2000) (Zheng *et al.*, 2000) (Naveena *et al.*, 2008). Il a été établi que la peau de la grenade contenait une grande quantité de composés phénoliques tels que les tanins hydrolysables, les anthocyanes et les lignanes (Cuccioloni *et al.*, 2009) (Gil *et al.*, 2000). Plusieurs autres auteurs ont rapporté que les antioxydants isolés des résidus d'hydrodistillation pourraient avoir des activités plus accentuées que celles des composés de synthèse. Ainsi, les polyphénols de peau de grenade auraient une meilleure capacité d'inhibition de l'oxydation lipidique de la viande pendant la cuisson que le BHT. Également, il a été rapporté que les résidus de plantes après hydrodistillation seraient riches en coumarines, en acides cinnamiques et dérivés, en



chalcones, en diterpènes phénoliques et en acides phénoliques avec une possibilité d'applications nutritionnels et thérapeutiques (Li *et al.*, 2008) (Trouillas *et al.*, 2003). Par conséquent, il serait important de s'intéresser davantage à la valorisation de ces résidus d'hydrodistillation afin de contribuer efficacement à leur réduction et à l'optimisation de l'emploi des ressources végétales (Gil *et al.*, 2002) (Chang *et al.*, 2000) (Someya *et al.*, 2002) (Li *et al.*, 2006) (Wolfe *et al.*, 2003).

#### IV.2. EFFETS DE LA CHALEUR SUR LES CONSTITUANTS CHIMIQUES DES HUILES ESSENTIELLES

Des études sur la valorisation de résidus de végétaux ont montré que la quantité de composés phénoliques extraits dépendait du procédé utilisé. Il a été rapporté que l'exposition des peaux de citrons à une température de 150°C durant 40 minutes augmente la quantité de phénols totaux extraits qui était passée de 71,8 à 171,0 µM (Jeong *et al.*, 2004). Cependant, leur activité pourrait diminuer conformément à l'hypothèse selon laquelle l'élévation de température change la structure des composés phénoliques responsables de leur activité (Garrote *et al.*, 2003). D'autres études ont mis en évidence la corrélation entre les structures et les activités biologiques des différents composés phénoliques (Jeong *et al.*, 2004) (Garrote *et al.*, 2003). En effet, l'activité antioxydante des composés phénoliques dépend du nombre et de l'arrangement des groupements hydroxyles et de la conjugaison des liaisons. Par conséquent, la valorisation des résidus d'hydrodistillation doit tenir compte de la méthode ou des solvants d'extraction.

#### IV.3. UTILISATIONS POTENTIELLES DES RÉSIDUS D'HYDRODISTILLATION

Les résidus d'hydrodistillation pourraient constituer une source potentielle de composés bioactifs et d'éléments minéraux pour l'obtention d'ingrédients naturels et actifs pour les industries alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques (Sójka *et al.*, 2009) (Aaby *et al.*, 2005). L'extraction de leurs composés organiques pourrait être plus facile et simple par rapport à la matière première. En effet, les résidus sont débarrassés de certains constituants tels que l'huile et les résines qui entravent parfois l'extraction des composés actifs comme les polyphénols généralement doués de propriétés antioxydantes.

L'intérêt pour les antioxydants naturels est de plus en plus grandissant et croit chaque année de 6 à 7% (Meyer-Aurich *et al.*, 2006). Ces produits constituent une perspective économique prometteuse dans la formulation d'aliments fonctionnels car les antioxydants peuvent être d'un très grand profit pour la santé humaine (Pokorný *et al.*, 2001). Les déchets solides peuvent être ensuite utilisés pour le compostage ou la production de récipients biodégradables pour la culture des plantes. Cette exploitation offre donc une réelle

opportunité dans l'optique de la gestion durable des matières premières (Garcia-Serna *et al.*, 2007).

Parmi les plantes pourvoyeuses d'huiles essentielles, nous avons la famille des *Lamiacées* à laquelle appartient l'espèce *Hyptis suaveolens* qui fait l'objet de notre étude.

## V. QUELQUES GENERALITES SUR *HYPTIS SUAVEOLENS*

*Hyptis suaveolens* est une herbe pérenne et aromatique originaire d'Amérique tropicale. Cependant, dans certains pays comme le Bangladesh, elle est classée parmi les espèces en voie de disparition (Kashem *et al.*, 2013). La plante appartient à la famille des *Lamiacées* ou *Labiacées*, constituée de plantes aromatiques dicotylédones qui sont le plus souvent des herbacées, des arbustes et rarement des arbres ou des lianes (Ramamoorthy *et al.*, 1993).

De nombreuses espèces de cette famille sont des plantes mellifères, fréquentées par les abeilles. C'est une source importante d'huiles essentielles, d'antibiotiques naturels pour l'aromathérapie et la parfumerie. L'industrie des cosmétiques utilise également les *Lamiacées* pour leurs propriétés hydratantes et souvent antiseptiques. Elle comprend environ 210 genres et près de 6 000 espèces dont *chromolaena odorata*, *Lamium purpureum* (Lamier), *Salvia pratense* (Sauge), *Thymus serpyllum* (Thym), *Ocimum basilicum*, *Hyptis mutabilis*, *Hyptis emoryi*, *Hyptis spécigéra*, ... et *Hyptis suaveolens* (Ramamoorthy *et al.*, 1993).

### V.1. DONNÉES BOTANIQUES

*Hyptis suaveolens* est une herbacée très aromatique d'environ 2 m de haut (Parsons Cuthbertson, 1992). Elle pousse généralement dans les milieux ouverts et les sols bien drainés. Dans la région soudanienne, elle se retrouve parfois sur les bas-côtés des routes, le pourtour des villages et des cultures pendant les premières années des jachères (Kerharo, 1974).

*Hyptis suaveolens* est une plante à fort parfum poivro-menthé, buissonnante, à nombreuses ramifications annuelles ou parfois vivace à partir de la base qui est lignifiée. La racine est pivotante et blanche ou brune. La tige est quadrangulaire et creuse avec des poils glanduleux. Les feuilles d'environ 6 sur 4 cm, avec des pétioles de 2 cm en moyenne sont simples, entières, opposées, dentées, ovales, pubescentes sur les deux faces. Les cymes courtes terminales ou axillaires, avec des feuilles à la base. Les fleurs hermaphrodites

bleuâtres à calice de 8 mm avec 10 côtés et 5 lobes pointus sont groupés en glomérules axillaires, sessiles à 5 pétales blancs. Le fruit est une noix (Akoègninou *et al.*, 2006). La figure 20 donne des photographies de la plante.



**Figure 20:** Photographies de plants de *Hyptis suaveolens* (photo soumahoro, prise le 17/07/2017 à Yamoussoukro)

#### V.2. CLASSIFICATION SYSTÉMATIQUE

La classification de Cronquist (Cronquist, 1981) est la suivante :

**Règne**.....Plantea  
**Sous-règne**.....Tracheobionta  
**Division**..... Magnoliophyta  
**Classe**.....Magnoliopsida  
**Sous-classe**.....Asteridae  
**Ordre**.....Lamiales  
**Famille**.....Lamiaceae  
**Genre**.....*Hyptis*  
**Nom binomial**.....*Hyptis suaveolens*

#### V.3. NOMS USUELS

*Hyptis suaveolens* (L.) a plusieurs synonymes tels que *Ballota suaveolens* L., *Bystropogon graveolens* Blume, *Bystropogon suaveolens* (L.) L'Hér., *Gnoteris cordata* Raf., *Gnoteris villosa* Raf., *Hyptis congesta* Leonard, *Hyptis ebracteata* R.Br., *Hyptis graveolens* Schrank, *Hyptis plumieri* Poit., *Marrubium indicum* Blanco, *Mesosphaerum suaveolens* (L.) Kuntze, *Schaueria graveolens* (Blume) Hassk ou *Schaueria suaveolens* (L.) Hassk (Tang *et al.*, 2018). En Afrique, elle est utilisée dans de nombreuses régions pour le traitement traditionnel de multiples pathologies ; ce qui lui vaut diverses appellations usuelles (tableau 3).

**Tableau 3:** Noms usuels de *Hyptis suaveolens*

<b>Ethnies</b>	<b>Noms usuels</b>
<b>Tagouana</b>	Pouroukio
<b>Ashanti</b>	Filingoro
<b>Dioula</b>	Sosso-gbè-fé
<b>Agni</b>	Sésémoro
<b>Baoulé</b>	Tchouamangninin

#### V.4. VERTUS THÉRAPEUTIQUES

*Hyptis suaveolens* est une plante médicinale utilisée dans plus de vingt-deux pays. Cependant, les feuilles sont les plus utilisées, suivies des grains et la plante entière en troisième position (Tang *et al.*, 2018).

Toutes les parties de la plante sont utilisées en médecine traditionnelle. Ainsi, la plante entière est utilisée pour traiter la dysenterie et les mamittes. Les feuilles sont utilisées en dans le traitement des infections respiratoires et gastro-intestinales, des indigestions, des rhumes, des douleurs abdominales, de la fièvre, des brûlures, des plaies, des crampes et des maladies de la peau (Mahesh *et al.*, 2001) (Oliveira *et al.*, 2005). Les tiges feuillées sont disposées à l'intérieur des habitations pour leurs propriétés insectifuges (Adjanooun *et al.*, 1986). Les jeunes pousses de la plante sont consommées en Inde et en Thaïlande comme aromatisant (Burkill, 1994). En Côte d'Ivoire et au Sénégal, la tisane est consommée pour lutter contre la toux et les troubles bronchiques (Kerharo, 1974). Les Tagouana utilisent cette plante dans la nourriture des chiens pour les préparer à la lutte (Koné, 2009).

#### V.5. TRAVAUX ANTÉRIEURS SUR *HYPTIS SUAVEOLENS*

En raison de sa présence partout à travers le monde et de la diversité de son usage, *Hyptis suaveolens* a été l'objet de plusieurs études tant au niveau de ses extraits non volatils qu'au niveau de l'huile essentielle. Cependant, il n'existe à notre connaissance aucune étude phytochimique sur les résidus après extraction de l'huile essentielle.

### **V.5.1. Extraits non volatils**

Les extraits non volatils des plantes s'obtiennent généralement en traitant ses différents organes (feuilles, tiges, graines, fleurs, racines, écorces) par un solvant pur ou un mélange de solvants dans le but d'en extraire un constituant.

#### **V.5.1.1. Etudes phytochimiques**

Les analyses phytochimiques préliminaires des extraits de *Hyptis suaveolens* ont révélé la présence d'alcaloïdes, de sucres simples, de stéroïdes, de terpénoïdes, de tanins, de flavonoïdes, d'antraquinones et de phénols (Kumar *et al.*, 2015). Les analyses spectrales des extraits de ses feuilles ont permis d'identifier des amines, des éthers, des alcanes, des alcènes, des cétones, des esters, des acides des carboxyliques, des alcools et des composés de cétones aliphatiques et aromatiques (Kumar *et al.*, 2015). L'acide hydrocyanique est contenu dans les racines, les écorces et les feuilles. L'espèce Nigériane a montré des traces d'alcaloïdes (Edeoga *et al.*, 2006).

Des études antérieures ont permis d'identifier et d'élucider les structures de nombreuses molécules des feuilles, des tiges et des racines de *Hyptis suaveolens*. Ces études se sont plus focalisées sur les diterpènes, triterpènes, stéroïdes et sesquiterpènes. Peu sont les composés élucidés de la famille des flavonoïdes et des polyphénols. Le tableau 4 donne quelques composés isolés des extraits de plantes du genre *Hyptis*.

**Tableau 4:** Quelques composés isolés des extraits du genre *Hyptis*

Formules brutes	Noms des composés	Références
C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>6</sub>	(6'-cinnamoyloxy-2',5'-époxy-1'-hydroxyheptyl) -5,6-dihydro-2 <i>H</i> -pyran-2-one	(Suárez-Ortiz <i>et al.</i> , 2017)
C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> O <sub>7</sub>	( <i>E</i> )-3-(4-méthoxyphényl)acrylate de 1-(5-(hydroxy(2-oxo-5,6-dihydro-2 <i>H</i> -pyran-3-yl) méthyl) tétrahydrofuran-2-yl)éthyle	
C <sub>21</sub> H <sub>27</sub> O <sub>7</sub>	( <i>E</i> )-3-(4-hydroxyphényl)acrylate de 1-(5-(hydroxy(2-oxo-5,6-dihydro-2 <i>H</i> -pyran-3-yl) méthyl) tétrahydrofuran-2-yl)éthyle	
C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>8</sub>	( <i>E</i> )-3-(3,4-dihydroxyphényl)acrylate de 1-(5-(hydroxy(2-oxo-5,6-dihydro-2 <i>H</i> -pyran-3-yl) méthyl) tétrahydrofuran-2-yl)éthyle	
C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>7</sub>	3-(4-hydroxyphényl)propanoate de 1-(5-(hydroxy(2-oxo-tétrahydro-2 <i>H</i> -pyran-3-yl) méthyl) tétrahydrofuran-2-yl)éthyle	
C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> O <sub>7</sub>	3-(4-méthoxyphényl)propanoate de 1-(5-(hydroxy(2-oxo-tétrahydro-2 <i>H</i> -pyran-3-yl) méthyl) tétrahydrofuran-2-yl)éthyle	
C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	6-heptyl-5,6-dihydro-2 <i>H</i> -pyran-2-one	(Davies-Coleman <i>et al.</i> , 1989)
C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	Acide suaveolique	(Manchand <i>et al.</i> , 1974)
C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	Suaveolol	
C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub>	Suaveolate de méthyle	
C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	carboxylate de 1-méthyl( <i>1R,7S,8S</i> )-8-hydroxy-7-isopropyl-1-méthyl-1,2,3,4,4a,5,6,7,8,9,10,10a-dodécahydrophénanthrène	(Paolo Grassi <i>et al.</i> , 2006)
C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	( <i>1S,2S,8R</i> )-8-(hydroxyméthyl)-2-isopropyl-8-méthyl-1,2,3,4,4b,5,6,7,8,8a,9,10-dodécahydrophénanthrène-1-ol	

Tableau 4 (suite 1)

Formules brutes	Noms des composés	Références
C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O	Déshydroabiétinol	(Misra <i>et al.</i> , 1983)
C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	13 $\alpha$ -épi-dioxyabiét-8(14)-én-18-ol	
C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O	$\beta$ -sitostérol	
C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	Acide oléanoïque	
C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O <sub>3</sub>	Acide 3 $\beta$ -hydroxyl lup-12-én-28-oïque	
C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	Podophyllotoxine	(Prawatsri <i>et al.</i> , 2013), (Lautie <i>et al.</i> , 2008)
C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	Acide rosamarinique	
C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	Picropodophyllotoxine	(Tang <i>et al.</i> , 2018)
C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	Quercétine	
C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	Rosamarinate de méthyle	
C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	(2E)-1-(2-hydroxyphényl)-pent-2-én-1-one	(Mukherjee <i>et al.</i> , 1984)
C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>	1-[(3-hydroxy-5,5-diméthylcyclohex-3-én-1-yle)oxy]hexan-3-one	
C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	Acide uros-12-én-3 $\beta$ -ol-27-oïque	
C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	Acide 3 $\beta$ -hydroxyl lup-20(29)-én-27-oïque	
C <sub>35</sub> H <sub>60</sub> O <sub>6</sub>	Glycoside de $\beta$ -sitostérol	(Raja <i>et al.</i> , 1990), (Ziegler <i>et al.</i> , 2002)
C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	Acide uros-12-én-3 $\beta$ -29-oïque	(Raja <i>et al.</i> , 1990), (Aspinall <i>et al.</i> , 1991)
C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>4</sub>	Acide 1,19 $\alpha$ -dihydroxyl-uros-2(3),12-dién-28-oïque	
C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O	(2R,4aS,4bS,10aR)-2,4b,8,8,10a-pentaméthyl-décahydro-2H-2,4a-méthanophénanthrèn-1(4bH)-one	(Chukwujekwu <i>et al.</i> , 2005)
C <sub>28</sub> H <sub>46</sub> O <sub>23</sub>	L-fuco-4-O-méthyl-D-glucurano-D-xylan	(Ziegler <i>et al.</i> , 2002), (Chukwujekwu <i>et al.</i> , 2005)
C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside quercétine	(Ekow <i>et al.</i> , 2018)
C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	Apigénine	
C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	Méthyle Wogonine	
C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	Kaempférol	
C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	Genkwanine	
C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub>	19-oxo-inuroyléanol	(Edigènia <i>et al.</i> , 2005)
C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> O <sub>6</sub>	11,14-dihydroxy-12-méthoxy-7-oxo-8,11,13-abiétatrièn-19,20-diolide	
C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>6</sub>	19,20-époxy-12-méthoxy-11,14,19-trihydroxy-7-oxo-8,11,13-abiétatriène	
C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	Inuroyléanol	
C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	Coultérone	

Tableau 4 (suite 2)

Formules brutes	Noms des composés	Références	
C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	(E)-4-méthoxy-2,2-diméthyl-5-phénylhex-4-én-3-ol	(Joseph <i>et al.</i> , 2016)	
C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub>	(+)- <i>cis</i> -3,4,6,9-tétrahydro-10-hydroxy-7-méthoxy-1,3-diméthyl-1 <i>H</i> -naphtho[2,3- <i>c</i> ] pyran-6,9-dione		
C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	2-éthylhexyl ester de l'acide 2-Propenoïque		
C <sub>14</sub> H <sub>30</sub> O	1-tétradécanol		
C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> NO	3-Isopropylisoxazole		
C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub>	5,5-diméthylimidazolidin-2,4-diimine		
C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	1,4-bis(p-tolylsulphinyl) piperazine		
C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	<i>Cis</i> -3-hexényl tiglate		
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> F <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	3-trifluoroacétyl-4,5-dihydrofurane		
C <sub>16</sub> H <sub>32</sub>	1-hexadécène		
C <sub>19</sub> H <sub>40</sub> O	1-Nonadécanol		
C <sub>22</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>	Acétate de phytol		
C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	(3-méthyl-3-(4-méthylpent-3-én-1-yl) oxiran-2-yl) méthanol		
C <sub>18</sub> H <sub>38</sub> O	1-Octadécanol		
C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> BO	Isopropyl( <i>trans</i> -2-méthylcyclopentyl) isopropoxyborane		
C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	N-cyano-N-pentylcarbamate d'éthyle		
C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> BrN <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	5-bromo-1,2-diméthyl-4-nitroimidazole		
C <sub>25</sub> H <sub>29</sub> O <sub>2</sub> P	( <i>IRS,2RS</i> )-2-(di- <i>o</i> -tolylphosphinoyl)-1-phényl-1-pentanol		
C <sub>27</sub> H <sub>56</sub> O	1-Heptacosanol		
C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	bis(3-formyl-4-hydroxyphényl) disulfide		
C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> F <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	2-hydroperfluoroheptanoate d'heptyle		
C <sub>18</sub> H <sub>15</sub> NOS	1-(Benzothiazol-2-yl)-3-phénylpenta3,4-dién-2-ol		
C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> IO	2-Iodo-2-phényléthanol		
C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub>	2,5-diisopropylperhydroxyréno[2,3- <i>d</i> ] [1,2] dioxine		
C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	2-méthyl-3-méthylène-2-(4-méthylpent-3-én-1-yl) oxirane		
C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	Acide gallique		(Bezerra <i>et al.</i> , 2017)
C <sub>14</sub> H <sub>6</sub> O <sub>8</sub>	Acide ellagique		
C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	Catéchine		
C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	Acide caféique		
C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	Acide palmitique	(Rai <i>et al.</i> , 2013)	
C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	Acide stéarique		
C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	Acide oléique		
C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	Acide linoléique		
C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	Acide linoléique		
C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	Acide palmitoléique		
C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	Acide myristique		

### V.5.1.2. Données biologiques et pharmacologiques



La plante possède les activités tumorigène, mycotoxique, phototoxique et insecticide. Elle est également stimulante, carminative, sudorifique, lactogène, anticatarrhale et antiparasitaire cutanée (Burkill, 1995) (Priya, 2015). La fumée dégagée par la combustion de la plante entière est insectifuge (Kerharo et Adam, 1974). Les feuilles sont utilisées comme un anticancéreux et un agent contraceptif chez les femmes (Santos *et al.*, 2007). Les feuilles et les brindilles sont antiplasmodiques, antirhumatiques, antispasmodiques, anti-inflammatoires (Kirtikar et Basu, 1991) et antiseptiques dans les cas de brûlure et de multiple complication de la peau. La décoction des racines est un apéritif et est renommée pour sa teneur en acide urosolique, un inhibiteur naturel de l'intégration du VIH (Chatterjee et Pakrashi, 1997). Une étude récente a montré que l'extrait éthanolique 70% des feuilles de *Hyptis suaveolens* après extraction de l'huile essentielle à une activité antibactérienne et antioxydante plus accentuée que ce même extrait avant extraction de l'huile essentielle (Goly *et al.*, 2015).

## V.5.2. Huile essentielle des feuilles de *Hyptis suaveolens*

### V.5.2.1. Etudes phytochimiques

La plante contient des huiles essentielles qui renferment des composés des familles des monoterpènes et des sesquiterpènes. L'Eucalyptol, le  $\gamma$ -élémane, le  $\beta$ -pinène, le (+)-3-carene, le *trans*- $\beta$ -caryophyllène et le Germacrène D sont les composés majoritaires de l'huile essentielle des feuilles de l'espèce provenant du Brésil (Moreira *et al.*, 2010). En Côte d'Ivoire, le Sabinène, le  $\beta$ -pinène, le Limonène, le Terpinolène, le  $\beta$ -Caryophyllène et l'Oxyde de caryophyllène sont les composés majoritaires mis en évidence dans l'huile essentielle de feuilles de *H. suaveolens* récoltées dans la région de Yamoussoukro (Tia *et al.*, 2011). La plante contient également une huile éthérique de couleur vert-jaune avec une relative présence de menthol dont la concentration est de 0,06% au Sénégal. En Inde les proportions en huile essentielle des feuilles de *Hyptis suaveolens* varient de 0,01% à 0,03% de la masse des feuilles. Ces huiles sont constituées d'acide linoléique (77%), d'acide oléique (6%) et d'acides saturés (12%) (Burkill, 1995) (GOLY, 2016).

Le tableau 5 présente quelques molécules identifiées dans l'huile essentielle des feuilles de *Hyptis suaveolens* selon la littérature.

**Tableau 5:** Quelques composés identifiés dans l'huile essentielle des feuilles de *Hyptis suaveolens*

Composés	Références
$\alpha$ -phellandrène	(Iwu <i>et al.</i> , 1990)
$\alpha$ -pinène	//
4,11,11-triméthyl-8-méthylène-Bicyclo-[7.2.0]-Undec-4-ène	(Peerzada N., 1997)
$\alpha$ -caryophyllène	//
3-cyclohexèn-1-carboxaldéhyde	(Azevedo <i>et al.</i> , 2001)
5 $\alpha$ -androst-2,11-dione	(Rivas <i>et al.</i> , 2002)
5 $\alpha$ -androst-9(11)-èn-12-one	(Edeoga <i>et al.</i> , 2006)
4-méthyl-1-(1-méthyléthyl)-3-cyclohexèn-1-ol	//
Thujane	(Malele <i>et al.</i> , 2003)
1-8-cineole	//
3,7-diméthyl-1,6-octadièn-3-ol	//
2,5-diméthyl-3-méthylène-1,5-heptadiène	//
1, 3,3-triméthylbicyclo [2.2.1] heptan-2-ol	//
$\alpha$ -cymène	//
Elémène	//
Limonène	//
Octahydro-1, 4-diméthylazulène	//
$\beta$ -caryophyllène	//
$\beta$ -pinène	//
Sabinène	//
Fenchol	//
4-terpinenol	//
Eugénol	//
$\alpha$ -copaène	//
$\beta$ -élémente	//
$\alpha$ -humulène	//
$\alpha$ -bergamotène	//
Aromadenedrène	//
$\gamma$ -cadinène	//
$\delta$ -cadinène	//
$\alpha$ -phellandrène	//
Myrcène	//
Linalol	//
$\alpha$ -terpinolène	//
$\gamma$ -terpinène	//
Bicyclogermacrène	//
Fenchone	//
$\beta$ -élémente	//
<i>Trans</i> - $\alpha$ -bergamotène	//
Spathuléol	//
Camphène	//
Terpinolène	//
$\alpha$ -terpinéol	//

### V.5.2.2. Données pharmacologiques

L'huile essentielle de *Hyptis suaveolens* originaire d'El Salvador inhibe la croissance de *Aspergillus* sp (Grassi *et al.*, 2008). L'huile essentielle des feuilles de la plante a des propriétés antifongique et antibactérienne (Goly *et al.*, 2017) (Goly *et al.*, 2015) (Nantitanon *et al.*, 2007). Elle est active contre *S. cerevisiae*, *Mucor* sp. et *F. moniliforme* (Malele *et al.*,

2003) et *F. oxysporum* (Tripathi *et al.*, 2009). Ainsi que contre *A. fumigates*, *A. parasiticus* et *A. Flavius* (Moreira *et al.*, 2010). En combinaison avec l'huile essentielle de *Trichoderma harzianum*, elle permet de contrôler l'amaigrissement et le putréfaction par *S. sclerotiorum* (Singh, 1999). De plus, l'huile essentielle de *H. suaveolens* est utilisée contre les piqûres de moustique (Abagli et Alavo, 2011).

## **VI. GENERALITES SUR LES TECHNIQUES D'ANALYSES DES METABOLITES SECONDAIRES**

### **VI.1. CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE**

Le criblage phytochimique permet d'avoir une idée générale sur les différentes familles de métabolites secondaires présentes dans les plantes sans toutefois renseigner sur la structure d'une molécule bien déterminée. De ce fait, le criblage constitue seulement un guide pour les travaux d'extraction, de séparation et d'isolement. Il est basé sur deux types de réactions : les réactions de précipitation (formation de complexes insolubles) et les réactions de coloration (formation de complexes colorés). En effet, en présence de réactifs appropriés, chaque famille de métabolites secondaires, donne des précipités et/ou des colorations soit par des réactions de complexations entre les groupements fonctionnels et les réactifs ou soit par la formation de liaisons  $\pi$  conjuguées ou simplement la formation d'insaturation (Harbone, 1998).

Des exemples de caractérisation de quelques métabolites secondaires sont donnés dans les schémas 1, 3,4 et 5.

### **VI.2. GÉNÉRALITÉS SUR LES TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES**

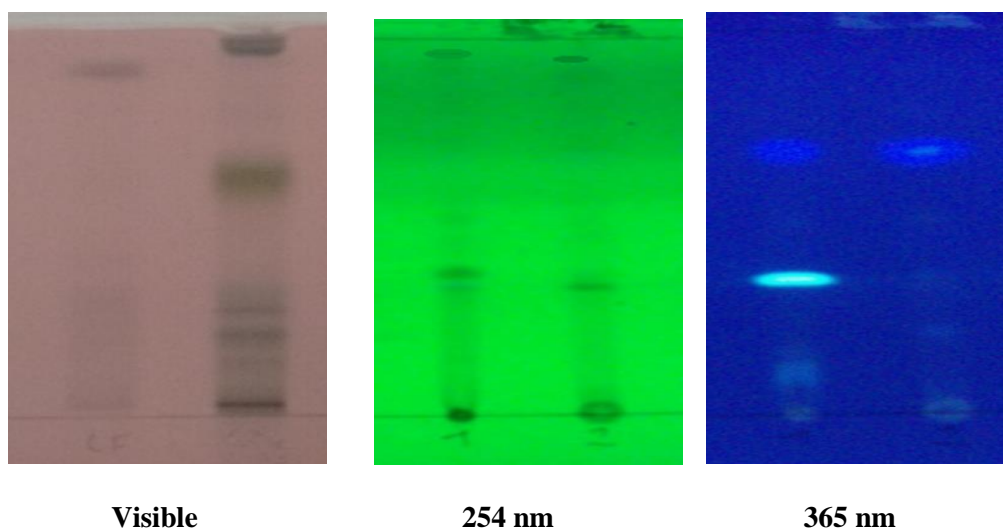
La séparation par chromatographie est une méthode physique basée sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe et l'autre mobile. Selon la technique chromatographique mise en jeu, la séparation des composants entraînés par la phase mobile, résulte soit de leur adsorption et de leur désorption successive sur la phase stationnaire, soit de leur solubilité différente dans chaque phase. Elle peut être influencée par la tendance des molécules à passer à l'état de vapeur (Sewell et Clarke, 1998).

Il existe différentes sortes de chromatographies parmi lesquelles la Chromatographie sur Couche Mince (CCM), la Chromatographie sur Colonne (CC), la Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP) et la Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG).

### VI.2.1. Chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur Couche Mince (CCM) est employée dans le suivi des purifications et permet de vérifier la présence et le degré de pureté des produits étudiés. Une plaque de CCM se compose d'un support en aluminium, en plastique ou en verre, sur lequel est fixée une fine couche (0,1 à 0,2 mm) d'adsorbant (silice, cellulose, alumine, polyamide) qui est la phase stationnaire. La CCM est généralement considérée comme une technique de chromatographie d'adsorption, mais le partage peut intervenir dans le cas de l'utilisation d'une phase stationnaire liquide sous forme de film.

L'échantillon à étudier est déposé à l'état liquide au moyen d'un tube capillaire et séché par ventilation. La plaque ainsi préparée est introduite dans la cuve préalablement saturée par l'éluant. Le mélange est entraîné par capillarité par la phase mobile vers le haut de la plaque (figure 21). La plaque est retirée de la cuve lorsque l'éluant parcourt une distance suffisante (environ 1 cm du bord supérieur) puis séchée avant la lecture sous la lampe UV. La révélation se fait par des réactifs spécifiques ensuite, il faut chauffer et les substances apparaissent sous diverses colorations. Les plaques pulvérisées avec le réactif  $\text{FeCl}_3$  ne sont pas chauffées.



**Figure 21** : Plaques CCM après élution observées sous lampe UV

Les réactifs de Godin,  $\text{AlCl}_3$  et  $\text{FeCl}_3$ , sont respectivement utilisés pour mettre en évidence la présence de tous les composés, des flavonoïdes et des tanins. Le tableau 6 donne les colorations de quelques composés après élution et révélation.

**Tableau 6** : Révélateurs et colorations de quelques familles métabolites secondaires sur plaques CCM

Familles de métabolites secondaires	Révélateurs	Colorations
Alcaloïdes	Dragendorff	Orange ou brun en lumière visible
Stérols	Godin	Verte
Terpénoïdes	Godin	Violette
Coumarines	NH <sub>3</sub> , Fluorescence à 365nm	Jaune, violette, Bleue
Polyphénols	NEU à 254nm et 365nm	Bleu, bleu violet, bleu- verdâtre
Flavonoïdes	AlCl <sub>3</sub> /NEU à 365nm	Orange/jaune, vert ou orange
Tanins	FeCl <sub>3</sub>	Noirâtre

Le comportement d'une molécule particulière dans un système donné est exprimé par son Rapport frontal ou Référence frontale (Rf) qui est le rapport de la distance parcourue par cette molécule sur celle parcourue par la phase mobile (front de l'éluant). Il est toujours compris entre 0 et 1.

$$Rf = \frac{\text{Distance parcourue par la substance}}{\text{Distance parcourue par le front de l'éluant}}$$

$$Rf = \frac{\text{Distance parcourue par la substance}}{\text{Distance parcourue par le front de l'éluant}}$$

Le rapport frontal est caractéristique d'une substance donnée et est fonction de l'éluant et de la « phase stationnaire » (Lagnika, 2005)

La chromatographie sur couche mince peut être analytique ou préparatoire. Lorsqu'elle est préparatoire, les zones du support correspondant aux substances d'intérêts sont récupérées, dispersées dans une petite quantité de solvant, filtrée pour la récupération des composés purs (LAFONT, 2005). Quant à l'isolement des constituants du mélange, il est réalisé par la chromatographie sur colonne (Sewell et Clarke, 1998).

### **VI.2.2. Chromatographie sur colonne ouverte**

Dans cette forme de chromatographie, la phase stationnaire est contenue dans une colonne. Plusieurs types de phases ont été mis en œuvre pour les colonnes en verre. La taille et le diamètre de la colonne sont choisis en fonction de la quantité d'échantillon à purifier et de la résolution souhaitée. La quantité de phase stationnaire utilisée est généralement 30 à 50 fois supérieure à la quantité d'échantillon déposée. L'extrait à fractionner peut-être déposé en phase liquide concentrée ou en phase solide. Pour la chromatographie d'adsorption, la phase stationnaire utilisée est le gel de silice 60 Å (15-40 µm) préalablement activée pendant 1 heure à l'étuve à 100°C. La chromatographie d'exclusion est réalisée sur gel de Sephadex LH 20.

L'éluant qui peut être sous la pression d'une pompe ou non, entre par une extrémité et sort par l'autre. En pratique, la phase mobile est composée des mêmes solvants que ceux utilisés pour la chromatographie sur couche mince analytique. Toutefois, l'élution peut être accélérée grâce à l'addition progressive de solvant de plus en plus polaire par rapport à la phase initiale.

Les différentes fractions sont collectées selon le profil chromatographique dans des erlenmeyers ou dans des tubes à essais (LAFONT, 2005)

Lorsque la séparation sur colonne se fait à pression atmosphérique, on parle de chromatographie liquide à pression atmosphérique. Dans le cas contraire, on parle de flash chromatographie. Dans ce dernier cas, la colonne est sous pression et permet d'accélérer le débit et la séparation par rapport au système équivalent à pression atmosphérique. Cette technique améliore la résolution de séparation et permet le traitement de quantités plus élevées d'échantillons.

Le système est composé d'une bouteille d'air comprimé qui alimente une pompe pneumatique, d'une vanne d'injection, de deux modules de compression utilisable selon les quantités d'échantillons et d'un régulateur de pression (manomètre) (LAFONT, 2005).

### VI.2.3. Chromatographie liquide haute pression

La Chromatographie en phase Liquide à Haute Pression (CLHP) est une technique basée sur les mêmes principes que ceux de la Chromatographie classique sur Colonne (CC). Cependant, la CLHP permet de pallier les inconvénients que présente la CC : la lenteur des séparations, l'absence de détecteurs et la quantité considérable d'échantillon nécessaire.

Après la dissolution des solutés dans la phase mobile, le mélange est injecté sous haute pression dans la colonne qui renferme la phase stationnaire. Cette dernière, constituée de microparticules de silice, est très sensible aux impuretés. Il faut donc purifier et filtrer l'échantillon par des pré-colonnes avant son injection en tête de colonne. La phase stationnaire interagit avec les molécules de solutés en fonction de leur nature, ce qui permet leur séparation. Les mécanismes d'échange sont basés sur les coefficients de partage. Les diverses molécules sont éluées à des temps différents en fonction de la polarité de la phase mobile. Ces temps dits de « rétention » dépendent de la nature de la phase stationnaire, de la composition de la phase mobile (éluant) et des conditions analytiques.

Les composés sont identifiés grâce à un détecteur (absorptiométrique, réfractométrique, fluorimétrique) qui enregistre un signal et le transmet sous forme de pic. Si la séparation est bonne, chaque pic représente un constituant pur du mélange à séparer. Le chromatogramme représente l'ensemble des pics enregistrés (Rosset *et al.*, 1991)

Il existe plusieurs types de phases stationnaires mettant en jeu des mécanismes de rétention différents, tels que la chromatographie d'adsorption, de partage, d'échange d'ions et d'exclusion. Ils dépendent de la nature des forces ou des phénomènes régissant la distribution du soluté entre les deux phases.

La chromatographie de partage est la technique la plus utilisée. Dans ce cas, la phase stationnaire est composée d'un support (gel de silice) imprégné avec un liquide convenable ou greffé de motifs organiques variés. La séparation est fondée sur le partage des solutés entre la phase greffée et la phase mobile : elle dépend des différences de solubilité des solutés dans les deux phases liquides. De nos jours, les phases greffées sont de plus en plus employées.

Il existe également la chromatographie de partage classique (normal phase chromatography) dans laquelle les molécules greffées ont un groupement polaire ( $\text{NH}_2$  -CN). La phase mobile y est peu polaire (hexane pur ou en mélange avec un peu de méthanol ou d'acétonitrile), et la chromatographie de partage à polarité de phase inversée ("reversed

phase chromatography”) où les molécules greffées sont apolaires (principalement des chaînes hydrocarbonées), la phase mobile est polaire, elle est composée de mélanges hydroalcooliques (eau-méthanol ou eau-acétonitrile) (Rosset *et al.*, 1991). Une photographie d'un appareillage CLHP est donnée en annexe 5.

#### VI.2.4. Chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique de séparation utilisée dans l'analyse de composés relativement volatils et thermiquement stables. Elle est basée sur les différences d'affinité des molécules à séparer, entre la phase stationnaire et le gaz vecteur (N<sub>2</sub> ou He). Pour les substances peu volatiles, elles doivent subir une modification chimique (silylation) afin de les rendre plus volatiles. Le chromatographe se compose d'un injecteur, d'une colonne et d'un détecteur.

L'injecteur est une zone de haute température où l'échantillon est introduit en solution à l'aide d'une seringue puis vaporisé et mélangé au gaz vecteur. Le gaz vecteur, généralement l'hélium, ou l'azote constitue la phase mobile. C'est le véhicule des analytes depuis l'injecteur jusqu'au détecteur *via* la colonne analytique. La viscosité d'un gaz étant fonction de la température, la plupart des injecteurs sont munis d'un régulateur électronique de débit, ce qui permet d'ajuster la pression du gaz en fonction de la température, de manière à maintenir le débit gazeux constant dans la colonne afin de rendre le chromatographe plus performant (Bouchonnet et Libong, 2004). Il existe deux types d'injecteurs. Le premier type concerne les injecteurs à fuite qui sont les plus répandus et dans ce cas, il s'agit d'une injection en "split" ou injection avec "division de flux". Ce type d'injection est utilisé pour l'analyse de solutions concentrées. Ce type d'injection permet d'évacuer une fraction importante du flux gazeux diminuant ainsi la quantité d'échantillon qui pénètre dans la colonne pour éviter de saturer la phase stationnaire. Le second type est les injecteurs "sans fuite" pour lesquels l'injection se fait par mode "splitless", ou "sans division de flux". Ce type d'injection est utilisé pour introduire des analytes en solution diluée. Dans ce cas, l'électrovanne est fermée pendant les quelques dizaines de secondes qui suivent l'injection, de manière qu'une quantité maximale d'analyte pénètre dans la colonne (Bouchonnet et Libong, 2004).

Les colonnes analytiques les plus récentes en CPG sont des colonnes de type capillaire. Elles sont constituées d'un tube de silice fondue, dont la paroi interne est couverte d'un film chimique (phase stationnaire). La réussite d'une bonne séparation chromatographique dépend fortement du choix de la phase stationnaire. En général, les phases polaires



(polyéthylène glycols, ...) retiennent plus les composés polaires et les colonnes apolaires (polysiloxanes, ...) retiennent plus les composés apolaires.

Le détecteur permet de mettre en évidence le passage des différents gaz séparés par la colonne. La détection peut être basée sur des techniques de mesures différentes. Il y a des détecteurs à conductibilité thermique et des détecteurs à ionisation de flamme.

Le détecteur à conductibilité thermique ou catharomètre est basé sur la mesure des variations de la conductibilité thermique des mélanges gazeux en fonction de leur composition. Il est à réponse universelle, mais relativement peu sensible.

Le détecteur à ionisation de flamme est un détecteur beaucoup plus sensible que le catharomètre, mais il n'est utilisé que pour les composés organiques. L'échantillon apporté par le gaz vecteur après séparation sur la colonne est brûlé dans une flamme d'hydrogène-air. Cette combustion forme des ions et particules chargées, responsable du passage d'un courant d'ionisation, entre deux électrodes, que l'on amplifie grâce à un électromètre. Une photographie d'un appareillage de CPG est donnée en annexe 5.

### VI.3. GÉNÉRALITÉS SUR LES TECHNIQUES SPECTROMÉTRIQUES

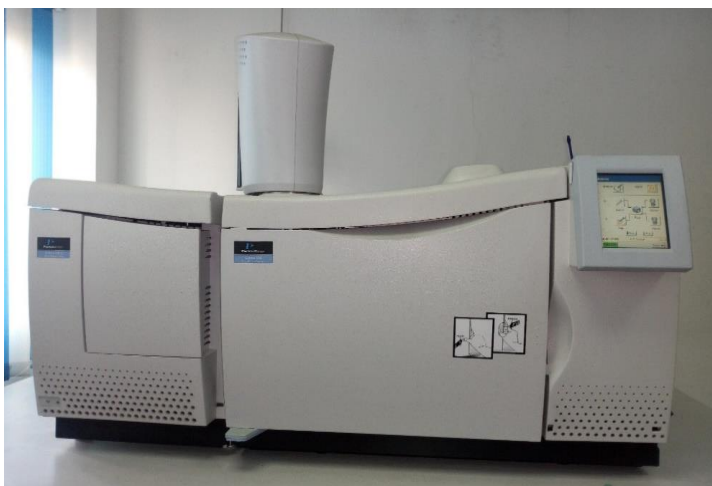
#### VI.3.1. Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une méthode d'analyse appliquée à la détermination structurale des composés organiques. Elle permet de déterminer la masse moléculaire d'une substance et de fournir des informations structurales à partir de l'étude des fragments moléculaires engendrés (De-Hoffmann *et al.*, 1999). C'est l'une des méthodes analytiques de choix car elle est hautement sensible (détection de composés à l'état de traces en quantité inférieure au milligramme), applicable à des mélanges complexes, combinable à de nombreuses techniques chromatographiques et elle a des applications diverses (analyses chimiques qualitatives et quantitatives, interaction entre molécules, biomédecine et autres) (Prasain *et al.*, 2004). Un spectromètre de masse est un appareil qui permet l'identification et la quantification des analytes, par la mesure de leurs rapports masse sur charge ( $m/e$  ou  $m/z$ ).

Les composés à analyser sont propulsés à l'état gazeux dans une chambre d'ionisation où ils sont bombardés par un faisceau d'électron à haute énergie (70 eV) pour les transformer en ions par perte d'un ou de plusieurs électrons. Ces ions sont dirigés vers l'analyseur où ils sont séparés en fonction de leur rapport  $m/z$ , puis vers le détecteur. Les spectres sont enregistrés à l'aide d'un logiciel qui permet également d'assurer le pilotage du spectromètre.

### VI.3.2. Couplage chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) est une méthode d'analyse qui permet d'identifier et/ou de quantifier avec plus de précision les composés présents dans de nombreuses substances. Cependant, l'usage de celle-ci présente des limites, car elle n'est applicable qu'à l'analyse de substances volatiles ou qui peuvent devenir volatiles après dérivatisation chimique (Shulaev *et al.*, 2008). Après la séparation en phase gazeuse dans la colonne, les différents composés sont guidés dans la chambre d'ionisation du spectromètre. Ils sont alors ionisés soit par impact électronique (EI ou ESI) ou par ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI). Ensuite, les différents fragments formés sont analysés par un détecteur puis enregistrés sous forme de spectres de masses. Une photographie d'un appareillage en GC/MS est donnée dans la figure 22.



**Figure 22** : Photographie d'un appareillage GC/MS

### VI.4. ANALYSES SPECTROSCOPIQUES

L'analyse spectroscopique est basée sur la capacité d'absorption de la lumière par les composés à des fréquences bien déterminées. Elle utilise généralement la combinaison de plusieurs techniques spectroscopiques telles que la spectroscopie UV, la spectroscopie IR, la spectroscopie RMN du proton  $H^1$  et celle du carbone  $^{13}C$ .

#### VI.4.1. Spectroscopie Ultraviolet-Visible

La spectroscopie Ultraviolet-Visible (UV) est une technique qui permet d'obtenir des informations sur les caractéristiques optiques, la nature chimique et les propriétés physiques et structurales des composés. L'absorption spécifique de rayonnement UV par les différentes liaisons dans une molécule permet d'obtenir différentes bandes d'absorptions formées de

plusieurs raies. En effet, l'intensité de l'absorption est liée à la nature de liaisons chimiques (liaison  $\sigma$  ou  $\pi$ ) dans les molécules. Chacune des raies du spectre caractérise le passage d'un électron de son état d'énergie initial (fondamental) à un autre état d'énergie dit excité. Chaque transition est propre à un type d'électron bien déterminé et permet donc de différencier les types de liaisons présents dans la molécule. Ainsi, la mesure de l'absorption UV permet de déterminer la composition chimique d'un mélange en rapport avec des témoins (Stoog *et al.*, 1997).

#### VI.4.2. Spectroscopie Infra-Rouge

L'analyse en Spectroscopie Infra-Rouge (IR) d'une substance permet de déterminer ses différents groupes fonctionnels. La région infrarouge ordinaire ( $4000-667\text{ cm}^{-1}$ ) est la plus pratique pour l'analyse des composés organiques. La région ( $12500 - 4000\text{ cm}^{-1}$ ) s'appelle proche infrarouge et la région ( $667-50\text{ cm}^{-1}$ ) représente l'infrarouge lointain. L'absorption différentielle du rayonnement IR par les fonctions chimiques permet de les distinguer à travers les vibrations caractéristiques des liaisons chimiques (Peter *et al.*, 2004). En effet, les différents groupes fonctionnels absorbent dans des régions de fréquence qui leur sont caractéristiques. Ainsi, la présence ou l'absence d'une bande dans une région de fréquence définie montre la présence ou l'absence d'un groupe fonctionnel spécifique dans la molécule.

La confirmation de l'identité d'un composé se fait généralement par comparaison de son spectre IR à celui d'un échantillon témoin. Si les spectres IR du composé analysé et celui du témoin enregistrés dans les mêmes conditions sont superposables alors ils représentent le même composé. Le nombre de bandes enregistrés dans la région de l'empreinte digitale (au-dessus de  $1500\text{ cm}^{-1}$ ), est très utile pour l'identification car dans cette région, deux composés différents ne peuvent pas avoir le même spectre. C'est dans cette région que sont enregistrées la majorité des bandes d'absorption causées par des vibrations de flexion telles que les bandes d'absorption des liaisons carbone-carbone, carbone-oxygène (C-C, C-O) se trouvant dans les éthers, les alcools, les esters, et la liaison carbone-azote (C-N) des amines, des amides et des acides aminés (Yadav, 2013).

#### VI.5. RECHERCHE DE MÉTABOLITES SECONDAIRES CONNUS DANS LES ORGANES DES PLANTES MÉDICINALES PAR LA MÉTHODE DE DÉRÉPLICATION

La déréduplication est une technique d'identification des composés dans les mélanges complexes tels que les extraits bruts ou les fractions obtenues lors des premières étapes de

purification. Elle a pour but une estimation rapide de la composition d'un extrait et d'évaluer son potentiel en termes de molécules nouvelles d'intérêts biologiques et chimiques. En effet, cette technique permet d'une part, d'évaluer la composition des extraits et de détecter la présence de métabolites secondaires déjà décrits dans la littérature. D'autre part, elle facilite la détection de probables composés non encore isolés dans les extraits étudiés afin de les étudier. Également, la démarche déréplicative permet de rechercher parmi les métabolites secondaires identifiés, la présence des composés typiques au genre ou à l'espèce végétale étudiée.

Pour effectuer une déréplication efficace, une étude bibliographique approfondie doit être réalisée afin d'établir la liste des molécules décrites dans la littérature pour chaque espèce étudiée ou le genre de l'espèce à étudier.

Cette méthode est basée sur le traitement de données (data) obtenues à partir de spectres de masse (SM) et de fragmentation (SM/SM). Le traitement se fait à l'aide du logiciel MassHunter® (Agilent) pour aboutir à des formules dont la recherche de structures se fait dans les bases de données ChemSpider et PubChem. Si la formule proposée existe, plusieurs structures sont proposées ce qui permet de choisir celle qui correspond aux données de la littérature.

## VII. ACTIVITE ANTIOXYDANT DES METABOLITES SECONDAIRES

### VII.1. DÉFINITION ET PRINCIPE

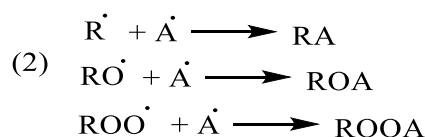
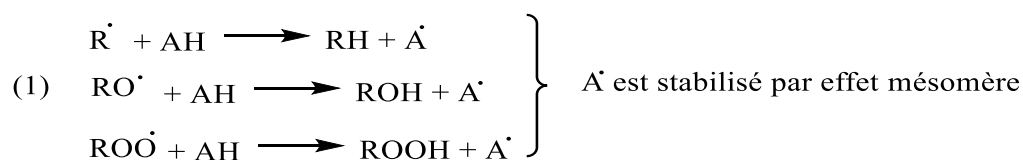
Un antioxydant est une substance capable d'inhiber de façon significative l'oxydation d'un substrat oxydable lorsqu'il est présent à de faibles concentrations par rapport à celle du substrat. Les plantes sont une source potentielle d'antioxydants naturels qui leur permet de neutraliser les espèces réactives oxygénée (ERO). Les antioxydants sont de ce fait des substances indispensables pour lutter contre différentes maladies humaines surtout les maladies cardio-vasculaires. En plus, ils sont considérés comme de puissants agents anticancéreux et anti-âge (Szymanska *et al.*, 2016). Les ERO comprennent les radicaux libres et aussi des espèces non radicalaires. Leur production excessive peut être la cause d'un stress oxydatif, un processus délétère impliqué dans le développement de certaines pathologies dégénératives (maladies cardiovasculaires, cancers) (Datta *et al.*, 2000).

De nombreuses propriétés biologiques et pharmacologiques, en particulier les propriétés antioxydant associées à une plante, sont généralement liées à la présence de

composés phénoliques tels que les acides phénoliques et les flavonoïdes. En effet, selon leur structure, les polyphénols ont un fort caractère réducteur et donneur de protons qui se manifeste par des réactions rapides avec les ERO. L'efficacité des antioxydants phénoliques est liée d'une part à la stabilisation des radicaux phénoliques par délocalisation des électrons autour du cycle aromatique et d'autre part, elle dépend du nombre de groupement OH à hydrogène labile (Bouhadjra, 2011). Ainsi, deux modes d'action des antioxydants sont généralement rencontrés : le transfert de l'atome d'hydrogène et le transfert d'électrons.

### VII.1.1. Transfert de l'atome d'hydrogène

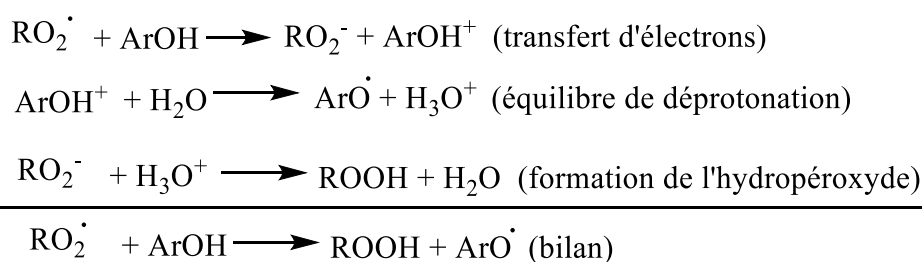
L'hydrogène libéré par l'antioxydant réagit avec les radicaux peroxydes  $\text{ROO}\cdot$  qui sont alors stabilisés sous forme d'hydroperoxydes (ROOH) (Schéma 6). Les antioxydants sous la forme  $\text{A}\cdot$  sont stabilisés par l'effet mésomère. Ainsi, la phase de propagation est freinée avec d'autres radicaux qui se complexent pour former des produits chimiquement stables.



**Schéma 6:** Mode d'action des antioxydants par transfert d'un atome d'hydrogène

### VII.1.2. Transfert d'électrons

Dans le cas d'un transfert d'électrons un radical cation est d'abord formé (Schéma 7). Il s'en suit une déprotonation rapide et réversible en solution.

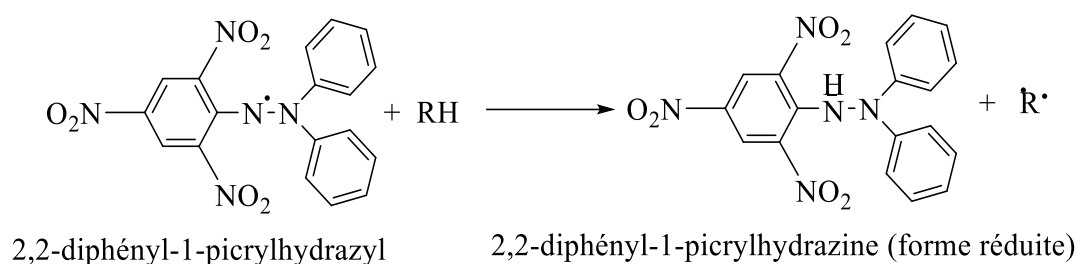


**Schéma 7:** Mode d'action des antioxydants par transfert d'électron

Il existe plusieurs méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante. Cependant, les plus simples et les plus utilisées sont les tests de réduction des radicaux DPPH et ABTS.

### VII.2. PIÉGEAGE DU RADICAL LIBRE DPPH

La méthode de piégeage du radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) est considérée comme étant la première approche pour évaluer le potentiel antioxydant d'un composé ou d'un extrait. C'est une méthode simple, dans laquelle le composé ou l'extrait est mélangé avec la solution de DPPH et l'absorbance est évaluée après une période d'incubation bien définie. Le DPPH se caractérise par un radical libre stable (un électron non apparié sur un atome du pont d'azote). Du fait de cette délocalisation, la molécule DPPH• reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire. Ce qui donne lieu à une couleur violette foncée, mesurable par spectrophotométrie à environ 520 nm. La présence d'une substance antioxydant capable de céder un atome d'hydrogène dans la solution de DPPH induit une réduction du DPPH se traduisant par une perte de la couleur violette (Schéma 8). La couleur de la solution devient alors de plus en plus jaunâtre. La mesure de l'efficacité de l'antioxydant se fait par mesure de la diminution de cette coloration violette de la solution (Singh *et al.*, 2011).



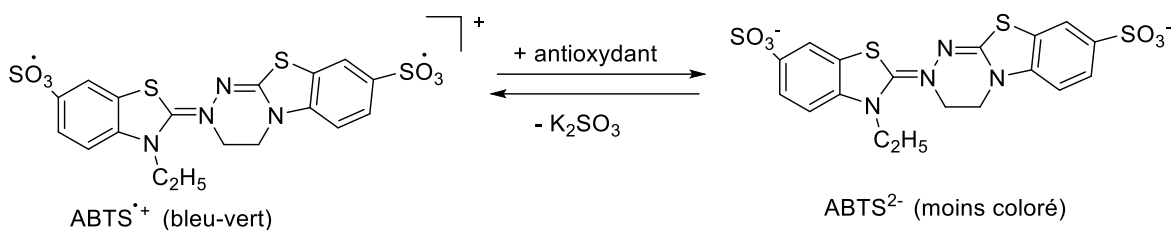
**Schéma 8 :** Réduction du DPPH

### VII.3. REDUCTION DU RADICAL-CATIONIQUE ABTS

L'ABTS est un sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique).

La méthode ABTS consiste à mesurer par spectrophotométrie l'activité antioxydant d'un extrait par sa capacité à stabiliser le radical cationique ABTS<sup>•+</sup> de coloration bleu-vert en le transformant en ABTS<sup>+</sup> incolore par piégeage d'un proton. Elle est évaluée par la mesure de l'inhibition de l'oxydation d'un substrat déterminé (Číž *et al.*, 2010) (Dudonné *et al.*, 2009). Pour ce faire un radical cation est formé *in vitro* dans les conditions standards à partir de l'ABTS par oxydation en présence du dioxyde de manganèse MnO<sub>2</sub>. L'inhibition de ce radical cation ABTS<sup>•+</sup> (de couleur bleu-vert en solution aqueuse) par le donneur de

protons (antioxydant) conduit à la décoloration de la solution mesurable à 734 nm (Schéma 9) (Zulueta *et al.*, 2009). Cette décoloration traduit la capacité antioxydante de l'échantillon, exprimée en TEAC, par rapport au Trolox pris comme antioxydant de référence.



**Schéma 9:** Réduction du radical ABTS en présence d'un antioxydant

La méthode TEAC est une méthode simple et peu coûteuse où l'ABTS<sup>•+</sup> réagit rapidement avec les antioxydants (Thaipong *et al.*, 2006).

### Conclusion partielle

L'intérêt de plus en plus croissant accordé aux plantes aromatiques et médicinales est certainement lié à l'impact positif qu'elles pourraient avoir sur le bien-être et la santé. Les plantes aromatiques sont utilisées dans l'alimentation, l'industrie cosmétique, chimique, l'aromathérapie et surtout dans les produits pharmaceutiques non seulement pour leurs huiles essentielles mais également pour les biomolécules non volatiles qu'elles **contiennent**. En outre, les huiles essentielles représentent environ 5% de la matière première végétale et les résidus d'hydrodistillation environ 95%. Ainsi, les résidus insuffisamment valorisés, peuvent constituer des sources de molécules d'intérêt. C'est dans ce cadre qu'il a été montré que les résidus d'hydrodistillation de *Hyptis suaveolens* ont une activité antimicrobienne plus accentuée que les feuilles avant extraction de l'huile essentielle. La détermination de la composition phytochimique de ces résidus d'hydrodistillation contribuerait donc à une exploitation optimale et efficiente de la plante. Pour ce faire, des généralités sur les techniques d'analyses des métabolites secondaires que sont le criblage phytochimique, les techniques chromatographiques, spectrométriques, spectrophotométriques et de dérégulation ont été abordées. Par ailleurs, L'état de l'art sur l'évaluation des activités antioxydantes des métabolites secondaires par les méthodes DPPH et ABTS a également été réalisé.







**CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES**

## Introduction

L'étude phytochimique des extraits de plantes requiert l'utilisation d'un matériel adéquat et de méthodes diverses (extractions, screening, dosage spectrophotométrique, CCM, LC-MS, GC-MS...). Ce chapitre décrit le matériel utilisé au cours des travaux ainsi que les méthodes d'extraction et d'analyse des extraits de plante.

## I. MATERIEL

### I.1. MATÉRIEL VÉGÉTAL

Les feuilles de *Hyptis suaveolens* ont été récoltées au mois de juillet 2017 dans le district de Yamoussoukro (6047'18.762" Nord et 5015'25.9992" Ouest) au centre de la Côte d'Ivoire. La plante a été authentifiée par Monsieur Amani N'guessan, technicien botaniste à l'Institut National Polytechnique Félix Houphouët-Boigny (INP-HB) de Yamoussoukro. Les brindilles portant les feuilles ont été séparées de la source à l'aide de machette puis introduites dans un sac en plastique de couleur noire et transportées au laboratoire. Le matériel végétal est étalé sur la paille à l'abri des rayons du soleil, à l'air ambiant, à une température de 26 à 30°C pour un séchage de 14 jours (photographie annexe 1 : figure 172). Les feuilles sèches ont été réparties en deux (2) lots qui ont servi à la préparation des deux (2) échantillons.

Les feuilles séchées de *Hyptis suaveolens* (avant et après extraction de l'HE) sont broyées à l'aide d'un broyeur électrique de marque IKA M20 (France). Les poudres obtenues ont été tamisées à l'aide d'un tamis de 0,5 mm de maille pour obtenir de fines poudres de couleur verte et vert-marron (Annexe 1 : figure 173) nommées respectivement échantillon 1 (avant extraction de l'HE) et Echantillon 2 (après extraction de l'HE). Les poudres obtenues sont conservées dans des bocaux colorés à 4 °C jusqu'à utilisation ultérieure.

### I.2. MATÉRIEL DE LABORATOIRE

Le matériel de laboratoire utilisé est constitué de la verrerie courante, des appareils d'analyse et instruments de mesure ainsi que des solvants et réactifs.

#### I.2.1. Appareillage et instruments

Les instruments et appareils de laboratoires sont constitués :

- d'une cocotte et un appareil de type Clevenger pour l'extraction de l'huile essentielle ;
- d'un broyeur électrique de marque IKA M20 (France) et de tamis (maille : 0,5 mm) pour la pulvérisation des feuilles et le tamisage de la poudre ;

- d'une balance analytique (précision 0,0001g) de marque Sartorius (Germany) pour les pesées ;
- d'agitateurs magnétiques et de barreaux aimantés pour les macérations ;
- de calottes chauffantes pour la décoction et l'infusion ;
- de cotons et de papiers filtre Whatmann pour la filtration des milieux ;
- d'ampoules à décanter pour l'extraction liquide-liquide ;
- de bain-marie pour le chauffage des extraits ;
- d'une étuve pour le séchage des extraits ;
- d'évaporateur rotatif de type BUCHI 461 Water Bath pour la concentration des extraits et fractions ;
- de plaques chromatographiques pour la séparation des composés du mélange ;
- de colonnes CC pour la séparation et la purification des composés ;
- de la verrerie courante du laboratoire (erlenmeyer-bécher-tubes à essais-ballons-éprouvette graduées, fioles, pipettes, ...) ;
- d'un spectrophotomètre UV/Visible de marque JASCO V-530 pour la détermination des absorbances des composés présents dans les échantillons étudiés ;
- d'un chromatographe HPLC de type RP-18 (5 $\mu$ m) Lichro CART® 150-4,6mm pour l'isolement et identification des molécules ;
- d'un chromatographe GC de marque TURBOMASS/2020, modèle Clarus 600 C muni d'un détecteur à barrettes de diodes ;
- d'un appareil Quadrupôle Time Of Flight (Q-TOF) de marque Agilent, Q-TOF 6200, série TOF/6500 séries Q-TOF B.08.00 (B8058.0) pour la détermination de la masse molaire des composés et l'identification des molécules

Le matériel technique est composé d'un logiciel MassHunter d'analyse de données spectrométriques (CLHP-ESI-MS).

## **I.2.2. Solvants et réactifs**

### **I.2.2.1. Solvants**

Le choix des solvants et des réactifs utilisés pour les extractions et la purification des composés contenus dans les plantes dépend des résultats attendus.

Pour nos travaux les solvants ont servi à faire des extractions et des chromatographies. Nous avons utilisé l'acétate d'éthyle, l'acétone, le n-butanol, l'éthanol, le chloroforme, le dichlorométhane, l'eau, l'hexane, le méthanol. Tous les solvants proviennent de Lancaster, VWR, Sigma ou Merck et ont été acheté chez POLYCHIMIE en Côte d'Ivoire. Les solvants

techniques ont été distillés avant leurs utilisations

### **I.2.2.2. Réactifs**

Ce sont des solutions ioniques qui donnent des réactions de précipitation ou de coloration en présence de certains types de composés. Les plus couramment utilisées principalement dans les réactions de screening phytochimique sont :

- l'Iodobismuthite de potassium pour la détection des alcaloïdes ;
- le Trichlorure de fer pour la détection des polyphénols ;
- l'Acide chlorhydrique plus le Magnésium pour la détection des flavonoïdes ;
- l'Anhydride acétique plus l'Acide sulfurique concentré pour la détection des terpénoïdes ;
- l'Ammoniaque 2 fois dilué pour la détection des quinones et anthraquinones ;
- l'Alcool chlorhydrique pour la détection des tanins catéchiques ;
- le Formaldéhyde à 40% plus l'Acide chlorhydrique concentré pour la détection des tanins galliques ;
- l'Acide chlorhydrique/ chauffage pour la détection des leucoanthocyanes ;
- l'Eau distillée pour la détection des saponosides.

Ces réactifs utilisés u cours de nos travaux proviennent de Lancaster.

## **II. METHODES**

### **II.1. EXTRACTION DES METABOLITES SECONDAIRES**

#### **II.1.1. Extraction de l'huile essentielle**

L'huile essentielle est extraite par entrainement à la vapeur à l'aide d'un dispositif de type Clevenger durant 3 heures selon la méthode décrite par Goly *et al.* (2015). Une masse de 1,5 Kg de feuilles séchées est introduite dans un autocuiseur contenant 2 L d'eau distillée et surmonté d'un appareil de type Clevenger. L'ensemble est porté à ébullition durant 3 heures après l'apparition de la première goutte. L'huile essentielle est récupérée après décantation et séchage sur du sulfate de magnésium. Les résidus hydrodistillation sont séchés à nouveau à l'ombre à l'abri de la lumière du soleil pendant 14 jours puis pulvérisés et tamisés pour donner l'échantillon 2 (après extraction de l'huile essentielle).

#### **II.1.2. Extraction solide-liquide**

Les extraits hydroalcooliques totaux ont été préparés selon la méthode décrite par Soro *et al.* (2012). Une masse de 100 g de broyat de chaque échantillon est macérée dans 1 L d'un mélange éthanol/eau (70/30 : v/v) sous agitateur magnétique durant 24 heures. Après

décantation, le mélange est filtré successivement sur du coton hydrophile et du papier Watman n° 2. L'opération est répétée trois (3) fois jusqu'à épuisement du broyat. Le filtrat obtenu est concentré à pression réduite à la température de 40 °C à l'aide d'un évaporateur rotatif de type BUCHI 461 puis lyophilisé pour donner les extraits hydroalcooliques totaux avant ( $E_{HA1}$ ) et après ( $E_{HA2}$ ) extraction de l'huile essentielle.

### II.1.3. Extraction liquide-liquide

Les extraits hydroalcooliques totaux obtenus ont été fractionnés successivement à partir de solvants de polarités croissantes (hexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle, éthanol et eau) suivant la méthode rapportée par *Bouamama et al.* (2006). Une masse de 10 g des extraits hydroalcooliques  $E_{HA1}$  ou  $E_{HA2}$  est dissoute dans 100 mL d'eau et partitionnés jusqu'à épuisement, successivement avec l'hexane, le dichlorométhane et l'acétate d'éthyle. La phase aqueuse résultante est séchée puis extraite par macération avec l'éthanol. Le résidu solide résultant constitue l'extrait aqueux. Les différentes phases organiques obtenues sont séparément séchées sur sulfate de sodium anhydre. Après filtration et élimination des solvants sous pression réduite, les fractions à l'hexane ( $F_{HEX1}$  et  $F_{HEX2}$ ), au dichlorométhane ( $F_{DCM1}$  et  $F_{DCM2}$ ), à l'acétate d'éthyle ( $F_{AE1}$  et  $F_{AE2}$ ), à l'éthanol ( $F_{Eth1}$  et  $F_{Eth2}$ ) et à l'eau ( $F_{Aq1}$  et  $F_{Aq2}$ ) respectivement avant et après extraction de l'huile essentielle ont été conservées au réfrigérateur à 4 °C dans des bocaux colorés sous azote jusqu'à leur utilisation ultérieure.

## II.2. CRIBLAGE DES FAMILLES DE METABOLITES SECONDAIRES

La méthode de criblage utilisée est celle décrite par Harbone (1998). Elle est basée sur des réactions de précipitation et/ou de coloration.

### II.2.1. Détection des alcaloïdes

#### II.2.1.1. Détection des alcaloïdes sur le broyat

Une masse de 10 g de poudre végétale est ajoutée à 50 mL d'une solution d'acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ) diluée au 1/10. Le mélange est agité et macéré pendant 24 heures à la température ambiante du laboratoire ensuite filtré sur du coton puis sur du papier whatmann n° 2. Dans 2 tubes à essais contenant chacun 1 mL de filtrat, sont respectivement ajoutées 5 gouttes de réactif de Mayer et de Dragendorff. La présence d'alcaloïdes est révélée par l'apparition de précipité orange (Harbone, 1998).

#### II.2.1.2. Détection des alcaloïdes sur les extraits ou fractions

Le résidu obtenu à partir de 6 mL d'extrait évaporé, est repris dans 6 mL d'alcool à 60° (degré alcoolique) et la solution alcoolique ainsi obtenue est répartie dans 2 tubes à essai. Dans le premier tube, sont ajoutées 2 gouttes de réactifs de Dragendorff. L'apparition d'un précipité ou d'une coloration orange indique la présence d'alcaloïdes ou composés azotés. Dans le deuxième tube, sont ajoutées 2 gouttes de réactif de Bouchardât. L'apparition de coloration brune-rougeâtre indique une présence d'alcaloïdes (Harbone, 1998) (Wagner, 1983).

## **II.2.2. Détection des polyphénols**

### **II.2.2.1. Détection des polyphénols sur le broyat**

Dans un tube à essais, à 5 mL d'infusé à 10% (10g de broyat dans 100 mL d'eau bouillante), est ajouté 1 mL d'une solution aqueuse diluée de trichlorure de fer ( $\text{FeCl}_3$ ) à 1%. En présence de composés phénoliques, il se développe une coloration verdâtre ou bleu noirâtre (Harbone, 1998).

### **II.2.2.2. Détection des polyphénols sur les extraits ou fractions**

Une goutte de solution alcoolique de chlorure ferrique à 2% est ajoutée à 2 mL d'extrait. L'apparition d'une coloration bleu noirâtre ou verte plus ou moins foncée traduit la présence de composés phénoliques (Wagner, 1983).

Les composés phénoliques peuvent en outre être mis en évidence après révélation à l'aide de réactifs appropriés. La solution de vaporisation est celle du chlorure de fer ( $\text{FeCl}_3$ ) dont le pourcentage doit être situé entre 1 et 5 % dans la solution d'acide chlorhydrique 0,5 mol/L.

Pour préparer une solution à 3 % dans la solution d'acide chlorhydrique à 0,5 mol/L, la solution d'acide chlorhydrique à 0,5 mol/L est préalablement préparée en dissolvant 4,2 mL de HCl (12 N) dans 50 mL d'eau distillée. Le volume est ensuite complété à 100 mL. Puis, sont introduit dans une fiole jaugée, 3 g de chlorure de fer (III) et la solution d'acide chlorhydrique à 0,5 mol/L jusqu'à obtenir 100 mL de solution.

Les zones qui correspondent aux acides hydroxamiques se colorent en rouge, celles correspondant aux phénols en bleu ou virent sur le vert (Copius-Peereboom, 1964).

## **II.2.3. Détection des flavonoïdes**

### **II.2.3.1. Détection des flavonoïdes sur le broyat**

Dans un tube à essais, à 5 mL d'infusé à 10% sont ajoutés 5 mL d'alcool chlorhydrique (mélange de même volume de l'alcool à 95°, d'eau distillée et d'acide chlorhydrique concentré), 1 mL d'alcool isoamylique puis quelques copeaux de magnésium. L'apparition d'une coloration rose-orangée (flavones) ou rose-violacée (flavanones) ou rouge (flavanones, flavanonols) rassemblée dans la couche surnageant d'alcool isoamylique indique la présence d'un flavonoïde libre (génine). Les colorations sont moins intenses avec les hétérosides flavoniques. Détection des flavonoïdes sur les extraits ou fractions.

Un volume de 2 mL d'extrait est évaporé à sec. Après refroidissement, le résidu est repris par 5 mL d'alcool chlorhydrique dilué 2 fois dans un tube à essais. Ensuite, 2 à 3 copeaux de magnésium y sont ajoutés. Enfin, l'addition de 3 gouttes d'alcool isoamylique intensifiant une coloration orange ou violacée, indique la présence de flavonoïdes (Harbone, 1988).

#### **II.2.4. Détection des terpénoïdes**

##### **II.2.4.1. Détection des terpénoïdes sur le broyat**

Après une macération de 24h avec 1g de broyat dans 20 mL d'hexane, l'extrait obtenu est filtré sur du coton puis sur du papier filtre et complété à 20 mL. Dans une capsule, 10 mL d'extrait hexanique sont évaporés à sec et repris avec 1 mL d'anhydride acétique puis 1 mL de chloroforme. Un volume de 1 à 2 mL d'acide sulfurique est déposé au fond du tube, contenant l'extrait. En cas de réaction positive, il se forme un anneau rouge-brunâtre ou violet à la zone de contact des deux liquides, la couche surnageant étant verte ou violette (Harbone, 1998).

##### **II.2.4.2. Détection des terpénoïdes sur les extraits ou fractions**

Un volume de 5 mL de l'extrait est évaporé à sec dans une capsule sur un bain de sable. Le résidu obtenu est dissout à chaud dans 1 mL d'anhydride acétique puis transvasé dans un tube à essais auquel est ajouté un volume de 0,5 mL d'acide sulfurique concentré. La réaction est positive s'il y a l'apparition d'un anneau pourpre ou violet virant au bleu puis au vert (Wagner, 1983).

La révélation des stérols et terpènes se fait à l'aide du chlorure de bismuth (III) à 33 % dans l'éthanol. Cette solution est pulvérisée sur le chromatogramme, qui est chauffé à 110 °C jusqu'à obtenir la fluorescence optimale. Des tâches violées en UV à 366 nm marquent la présence de stérols (Munier, 1953).

## II.2.5. Détection des quinones et anthraquinones

### II.2.5.1. Détection des quinones et anthraquinones sur les broyats

Un mélange d'1g de broyat et de 15 à 30 mL d'éther de pétrole est placé dans un tube à essai. Après agitation et un repos de 24 h, les extraits sont filtrés sur du coton puis sur du papier filtre et concentrés à l'évaporateur rotatif. La présence de quinones libres est confirmée quand la coloration vire au jaune, rouge ou violet, lorsque l'on ajoute quelques gouttes de solution de soude (NaOH) à 1/10 sur les extraits.

A l'extrait au chloroforme des broyats, est ajoutée une solution aqueuse d'hydroxyde de potassium à 10 % (v/v). Après agitation, la présence des anthraquinones est confirmée par un virage de la phase aqueuse au rouge (Rizt *et al.*, 1982).

### II.2.5.2. Détection des quinones et anthraquinones sur les extraits ou fraction

Deux (2) mL d'extrait sont évaporés à sec. Le résidu est repris avec 5 mL de solution d'acide chlorhydrique (1/5) puis l'ensemble est chauffé pendant 30 minutes à ébullition au Bain-marie dans un tube à essais. Après refroidissement sous courant d'eau froide, l'hydrolysate est extrait avec 20 mL de chloroforme dans un tube à essais. A la phase organique recueillie, un volume de 0,5 mL de réactif de Bornträger (ammoniaque dilué 2 fois), est ajouté. Le virage de la coloration au rouge ou violet indique la présence de composés quinoniques (Rizt *et al.*, 1982).

## II.2.6. Détection des tanins

### II.2.6.1. Détection des tanins catéchiques

Un (1) mL de solution d'alcool chlorhydrique est ajouté à 5 mL d'infusé. La solution obtenue est ensuite portée à ébullition pendant 15 minutes. La formation de précipité rouge soluble dans l'alcool amylique indique la présence de tanins catéchiques (Ethel *et al.*, 1922).

### II.2.6.2. Détection des tanins galliques

Quinze (15) mL de réactif de Stiasny (mélange de 10 mL de formaldéhyde à 40% et 15 mL d'acide chlorhydrique concentré) sont ajoutés à 30 mL d'infusé. La solution obtenue est portée à ébullition pendant 15 minutes au bain-marie. La formation d'un précipité révèle la présence de tanins galliques. La solution est filtrée et le filtrât est saturé par l'acétate de sodium, puis quelques gouttes d'une solution de chlorure ferrique à 1% y sont ajoutées. L'apparition d'une coloration bleu-noire indique la présence de tanins galliques non précipités par le réactif de Stiasny (Ethel *et al.*, 1922).



### II.2.7. Détection des anthocyanes et leucoanthocyanes

Les anthocyanes et les leucoanthocyanes sont mis en évidence par la réduction du noyau du flavonoïde, mais cette fois-ci en absence de métaux.

#### II.2.7.1. Détection des leucoanthocyanes

Les leucoanthocyanes sont caractérisées par la réaction à la cyanidine sans ajout de copeaux de magnésium avec un chauffage pendant 15 min au bain-marie. En présence de leucoanthocyanes, il se développe une coloration rouge-cerise ou violacée. Quant aux catéchols, elles donnent une teinte brun-rouge.

#### II.2.7.2. Détection des anthocyanes

A 5 mL d'infusé à 10% présentant une coloration plus ou moins foncée, sont ajoutés 5 mL d'acide sulfurique puis 5 mL d'hydroxyde d'ammonium. La coloration s'accroît par acidification puis vire au bleu-violacé en milieu basique indique la présence d'anthocyane (Harbone, 1998).

### II.2.8. Détection des saponosides

A 1 g de poudre végétale dans un erlenmeyer de 250 mL sont ajoutés 100 mL d'eau distillée. Le mélange est légèrement chauffé, filtré puis refroidi. Le filtrât est complété à 100 mL avec de l'eau distillée. Dans un tube à essais, 20 mL du filtrat sont introduits et agités vigoureusement pendant 15 secondes. Puis le tube est placé verticalement pendant 30 minutes. Au bout de cette période, la mousse persistante indique la présence des saponines (Harbone, 1998).

## II.3. ANALYSES QUANTITATIVES

Les analyses quantitatives de composés phénoliques ainsi que celles de l'activité antioxydante des différents extraits ont été réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible de type Jasco V-533.

### II.3.1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été réalisé selon la méthode décrite par *Wood et al. (2002)*. A un volume de 30  $\mu$ L d'extrait sont ajoutés 2,5 mL de réactif de Folin-Ciocalteu dilué au 1/10<sup>e</sup>. Le mélange obtenu est maintenu pendant 2 min à l'obscurité et à la température ambiante ( $27\pm 03^{\circ}\text{C}$ ), puis 2 mL de solution de carbonate de sodium ( $75\text{ g.L}^{-1}$ )

y sont ajoutés. La solution obtenue est ensuite incubée à 50 °C pendant 15 min. La lecture de l'absorbance est réalisée au spectrophotomètre UV-visible à une longueur d'onde de 760 nm contre un blanc constitué de 5 mL de réactif de Folin-Ciocalteu dilué au 1/10<sup>e</sup> et de 4 mL de solution de carbonate de sodium (75 g.L<sup>-1</sup>). L'expérience est reprise trois fois. L'acide gallique a été utilisé comme standard de référence pour la quantification des teneurs en polyphénols totaux exprimées en mg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait).

### II.3.2. Dosage des flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes totaux est déterminée selon la méthode décrite par Marinova et Antanassova (2005). Des volumes de 0,75 mL de solution de nitrite de sodium à 5% (m/v) et de 0,75 mL de solution de chlorure d'Aluminium à 10% (m/v) sont ajoutés à 2,5 mL d'extrait de ratio 1/500 (m/V). Après 5 min d'incubation, le mélange est mis en contact avec 5 mL d'une solution de soude à 1 M. Le volume obtenu est ajusté à 25 mL puis agité vigoureusement. L'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 510 nm. L'expérience est reprise trois fois. La Quercétine est utilisée comme standard de référence pour la quantification des teneurs en flavonoïdes totaux exprimées en milligramme d'équivalent de Quercétine par gramme d'extrait (mg EQ. g<sup>-1</sup> d'extrait).

### II.3.3. Dosage des tanins

La teneur en tanins est déterminée par la méthode de la vanilline décrite par Julkunen-Titto (1985). Un volume de 100 µL de chaque extrait est ajouté à 3000 µL de la solution vanilline dans le méthanol à 4 %, puis l'ensemble est vigoureusement agité. Ensuite, un volume de 1500 µL de l'acide chlorhydrique concentré (HCl) est additionné. Le mélange obtenu est laissé en réaction à température ambiante pendant 20 min. L'absorbance est mesurée à 550 nm contre un blanc constitué de solution de vanilline dans le méthanol. Différentes concentrations comprises entre 0 et 0,45 µg/mL préparées à partir d'une solution mère de l'acide tannique utilisé comme standard, ont permis de tracer la courbe d'étalonnage. Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide tannique par gramme d'extrait sec (mg EAT/g d'extrait sec). L'expérience est reprise trois fois. Les teneurs sont calculées à partir de la relation 1.

$$C = C_i * D * 10 / m \quad (1)$$

Avec C = mg équivalent acide tannique dans 1000 mg d'extrait sec

C<sub>i</sub> = concentration de l'échantillon lue (µg/mL),

D = dilution, m = masse de l'échantillon (mg).

### II.3.4. Evaluation de l'activité antioxydante

Il existe plusieurs méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante parmi lesquelles on a la réduction du radical cationique ABTS<sup>+</sup> et le piégeage du radical DPPH. Elles fournissent des informations préliminaires fiables sur la présence des composés antioxydants actifs dans les extraits.

#### II.3.4.1. Réduction du radical DPPH par bioautographie

La réduction du radical DPPH par bioautographie a été réalisée selon la méthode décrite par Dominguez *et al.* (2005). Les différents extraits de concentrations équivalentes (0,02 g/mL) ont été déposés sur des plaques CCM puis élués à l'aide du système de solvants suivant : Butanol/acide acétique/eau distillée (6 / 1,5 / 2,5). Après le développement, les plaques sont séchées puis pulvérisées avec une solution de DPPH à 0,2% dans du méthanol. Ensuite, les plaques sont examinées après 30 min à l'œil nu. La présence de bandes jaune à fonds violets indique la réduction du radical DPPH (violet) en 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine (jaune).

#### II.3.4.2. Piégeage du radical 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyle

La capacité antioxydante réalisée sur des extraits de plantes est effectuée selon la méthode décrite par Sanchez-Moreno, (2002). La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration violette, due à une recombinaison des radicaux DPPH•, mesurable par spectrophotométrie UV. Une solution de DPPH à  $6,34 \times 10^{-5}$  M (préparée à partir de 2,5 mg de DPPH dissouts dans 100 mL de méthanol absolu) est protégée de la lumière et stockée à basse température. La Vitamine C est utilisée comme témoin positif. Une gamme de concentrations (500 ; 300 ; 100 ; 50 et 25  $\mu\text{g/mL}$ ) des extraits de plantes ou de la vitamine C (antioxydant de référence) est préparée dans le méthanol. Ensuite, 50  $\mu\text{L}$  de chaque solution sont ajoutés à 1,95 mL de solution de DPPH. Après homogénéisation, le mélange est incubé à la température du laboratoire à l'obscurité. Après 30 min d'incubation, les absorbances sont mesurées à 517 nm contre un blanc qui ne contient que du méthanol. L'expérience est reprise trois fois. Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH est calculé selon l'équation de la relation 2.

$$\%I = (A_0 - A_e) * 100 / A_0 \quad (2)$$

Avec :

$A_0$  = Absorbance du DPPH sans extrait à  $t = 0$

$A_e$  = Absorbance du DPPH résiduel (extrait + DPPH)

La concentration d'extrait de plante responsable de 50% d'inhibition du radical DPPH ( $IC_{50}$ ) est déterminée à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique.

### II.3.4.3. Réduction du radical-cation de l'acide 2,2-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)

Selon Miller *et al.* (1993), l'activité antioxydante d'un extrait réside dans sa capacité à stabiliser le radical cationique ABTS<sup>•+</sup> de coloration bleu-vert en le transformant en ABTS<sup>+</sup> incolore par piégeage d'un proton (Miller *et al.*, 1993). Le radical-cationique ABTS<sup>•+</sup> est obtenu en mélangeant 8 mM d'ABTS (87,7 mg dans 20 mL d'eau distillée) et 3 mM de persulfate de potassium (0,0162 g dans 20 mL eau distillée) dans un ratio 1/1 (v/v). Ensuite, le mélange réactionnel est incubé à l'obscurité à température ambiante (27 à 30 °C) pendant 16 heures. Puis, la solution d'ABTS<sup>•+</sup> obtenue est diluée avec du méthanol absolu pour avoir une solution d'absorbance  $0,7 \pm 0,02$  à 734 nm. En outre, une prise d'essai de 3,9 mL de cette solution diluée d'ABTS<sup>•+</sup> est ajoutée à 100 µL de l'extrait à tester. Après Agitation, le mélange est incubé pendant 6 minutes à l'obscurité. L'absorbance résiduelle du radical ABTS<sup>•+</sup> est mesurée à 734 nm au spectrophotomètre UV-visible et devrait représenter entre 20% et 80% de l'absorbance du blanc. Les essais sont réalisés en triple et les résultats sont exprimés en µmol de Trolox équivalent par litre d'extrait (µmol/L TE).

L'activité des extraits est exprimée par la Capacité Antioxydante Equivalente Trolox (TEAC) qui correspond à la concentration de Trolox (antioxydant de référence) induisant la même capacité antioxydante qu'une concentration de 1 mM de l'extrait testé. L'étalonnage du spectrophotomètre est effectué par lecture de l'absorbance de différentes concentrations de Trolox (3,75 ; 5 ; 6,25 ; 10 ; 11,25, 13,75 et  $15 \cdot 10^{-4}$  mM). Le taux d'inhibition (%I) de l'ABTS<sup>•+</sup> est déterminé par la formule de la relation 3.

$$\% I = [(Abs_{\text{contrôle}} - Abs_{\text{extrait}}) / Abs_{\text{contrôle}}] \times 100 \quad (3)$$

Avec :

$Abs_{\text{contrôle}}$  = absorbance ABTS dilué,

$Abs_{\text{extrait}}$  = absorbance ABTS dilué + échantillon

## II.4. ANALYSES STATISTIQUES

Pour l'ensemble des expérimentations, les résultats sont présentés comme une moyenne  $\pm$  écart-type. Une analyse statistique (ANOVA, Test de Tukey, comparaison deux à deux,  $p < 0,05$ ) a été utilisée pour indiquer les différences significatives entre les échantillons. Les coefficients de corrélation linéaire ( $R^2$ ) sont calculés à l'aide du logiciel Microsoft Excel 2010.

## II.5. SÉPARATION ET IDENTIFICATION DES MOLÉCULES

Les techniques Chromatographiques (CCM, CLHP), la spectrométrie de masse (SM) et la spectroscopie UV ont permis la séparation et l'identification des molécules.

### II.5.1. Chromatographie sur couche mince

Pour la chromatographie sur couche mince (CCM), des plaques de gel de silice (Silicagel 60 Å, 70-200µm) à support en aluminium prêtes à l'emploi ont été utilisées. Elles sont imprégnées d'un réactif permettant une meilleure visibilité des molécules absorbant à 254 nm. Pour cette étude, les systèmes de solvants les plus couramment employés sont : le mélange hexane/acétate d'éthyle (4 :1) pour les fractions apolaires ( $F_{Hex}$ ,  $F_{DCM}$ ) et pour les fractions polaires, sont utilisés les mélanges dichlorométhane/éthanol (4/1,5) pour  $F_{AE}$ , butanol/acétate d'éthyle/eau (4/4/4) pour  $F_{Eth}$  et le mélange butanol/acétate d'éthyle/eau (4/3/5) pour  $F_{Aq}$ . Les plaques CCM sont analysées en lumière visible, sous fluorescence UV (254 et 366 nm) et révélées par des réactifs appropriés.

### II.5.2. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) est l'une des méthodes d'analyse les plus couramment employées pour l'identification des composés. Pour les extraits de plante, elle est précédée d'une hydrolyse acide suivie de la silylation des différents échantillons.

#### II.5.2.1. Hydrolyse acide

A 10 g de poudre préalablement extraite par l'hexane jusqu'à épuisement des lipides, sont ajoutés 50 mL d'une solution d'acide chlorhydrique (2N). Ensuite, le tout est porté à reflux pendant 2 heures. Après refroidissement, l'hydrolysate est traité par l'acétate d'éthyle (3 × 50 mL) pour en extraire les aglycones. Cela étant, les fractions organiques sont regroupées et séchées sur sulfate de magnésium anhydre ( $MgSO_4$ ). Enfin, ces fractions sont filtrées et le filtrat est concentré sous vide à l'évaporateur rotatif et conservé sous azote.

#### II.5.2.2. Silylation des différents échantillons

La silylation est une technique utilisée en GC-MS pour rendre les composés contenus dans les extraits plus volatils et plus thermos tolérants en les convertissant en dérivés du triméthylsilyle (TMS). L'agent de silylation utilisé dans notre travail est le *N*-méthyl-*N*-triméthylsilyl trifluoroacétamide (MSTFA). La silylation du groupement hydroxyle en présence de MSTFA s'est faite comme suit : A 3 mg de chaque échantillon

sont additionnés 0,5 mL de dichlorométhane distillé et 0,2 mL de MSTFA. Ensuite, l'ensemble est chauffé au bain Marie à 37°C durant 30 minutes.

### II.5.2.3. Mode opératoire de la GC-MS

Un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectrophotomètre de masse de marque TURBOMASS/2020, modèle Clarus 600 C de type PE AutoSystem GC avec un échantillonneur automatique intégré avec une colonne Rtx-5 de 30m de long, d'un diamètre intérieur de 0,25 mm ont été utilisés. Le gaz porteur utilisé est l'hélium, avec une vitesse linéaire de 1mL/mn. La température (65 à 300°C) du four a été programmée à 5°C/min et maintenue à 300°C pendant 14 minutes. Les températures de l'injecteur et du détecteur ont été fixées respectivement à 280°C et 350°C. L'injection est réalisée en mode *splitless*. La quantité d'échantillon injectée est de 0,5 µL. Les paramètres du spectromètre de masse pour le mode d'impacts électroniques sont : la température de la source d'ionisation 300°C, une tension de 5 mV et la vitesse de scan 65 scans/s. L'identification des composés silylés a été possible, en comparant les temps de rétention variant de 11 à 60 min avec ceux des standards et les données spectrales obtenues à partir des bibliothèques Wiley et NIST. Les spectres de masse par impact électronique sont acquis sur la plage de masse 50-600 Da.

### II.5.3. Spectrophotomètre UV-visible

Les spectres UV des composés ont été enregistrés lors des analyses HPLC/UV grâce au détecteur à barrettes de diodes du système HP 1100. Un spectrophotomètre UV-visible JASCO V- 530, équipé d'un enregistreur de spectres a été utilisé pour la quantification des molécules.

## II.6. IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS DES FEUILLES DE *HYPTIS SUAVEOLENS* PAR LA MÉTHODE DE DÉRÉPLICATION

### II.6.1. Analyse par CLHP-ESI-Q-TOF-MS des extraits et des fractions

Pour cette analyse, un système CLHP Agilent 1260 Infinity couplé à un Q-TOF-MS Agilent 6530, équipé d'une source ESI, a été utilisé. Les analyses ont été réalisées en mode positif. Une colonne analytique Sunfire® C<sub>18</sub> (150×2,1 mm ; 3,5 µm, Waters) est utilisée avec un débit de 250 µL/min et un gradient linéaire à deux voies : Voie A (95-0 % de H<sub>2</sub>O plus 0,1 % d'acide formique), Voie B (5-100 % de ACN) pendant 30 minutes. Les conditions ESI ont été définies avec une température à 320 °C, une tension de source à 3,5 kV, et un débit de gaz de 10 µL/min.

Dans le mode ion positif, la purine  $C_5H_4N_4$  (ion à  $m/z$  121,050873 g/mol) et la phosphagène  $C_{18}H_{18}F_{24}N_3O_6P_3$  (ion à  $m/z$  922,009798) ont été utilisées comme masses de verrouillage internes. Les scans complets ont été acquis à une résolution de 11000 (à  $m/z$  922). Le volume d'injection des échantillons a été fixé à 5  $\mu$ L. Le gradient utilisé pour l'éluion est donné dans le tableau 7.

**Tableau 7** : Programme d'éluion des échantillons sur le système HPLC-QTOF

Temps (Minutes)	Solvant A (%)	Solvant B (%)
0	100	0
5	100	0
15	95	5
25	5	95
30	0	100
32	0	100
42	0	100
52	100	0
Solvant A : Eau + acide formique à 0,1% et Solvant B : Acétonitrile		

## II.6.2. Déréplication

Une analyse de déréplication sur différents extraits et fractions a été menée afin d'identifier les pics correspondant aux molécules connues ou pas. Elle est fondée sur l'emploi du couplage de la Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) et de la Spectrométrie de Masse tandem (MS/MS ou MS2) Q/TOF. Un traitement automatisé des données brutes de HPLC-ESI-MS a été réalisé avec le logiciel MassHunter. Celui-ci fait ressortir une liste de données qui se traduit graphiquement en pics correspondant chacun à un composé présent dans l'extrait. En cliquant sur un pic donné, le logiciel génère un ensemble de formules correspondant au seul ion moléculaire  $[M+H]^+$ . La formule donnant le meilleur score ou celle qui correspond à la formule brute des molécules de l'espèce ou du genre étudié, est recherchée dans les bases de données ChemSpider et PubChem. Si la formule proposée existe, plusieurs structures sont proposées et nous choisissons celle qui correspond aux données de la littérature, c'est à dire les molécules connues de l'espèce ou du genre. Les fragmentations de la molécule choisie permettent de confirmer ou non la structure du composé.

## Conclusion partielle

Ce chapitre a permis de décrire le matériel et les méthodes utilisés dans notre travail. En plus de la verrerie courante de laboratoire, le matériel végétal est constitué de feuilles de *Hyptis suaveolens*. Les appareillages, les instruments de mesure, les réactifs et les solvants utilisés ont été donnés. Les méthodes d'extractions, de criblages phytochimiques, de dosages de quelques familles de métabolites secondaires ainsi que celles des analyses chromatographiques, spectrométriques et spectroscopiques ont également été présentées.





**CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION**

## Introduction

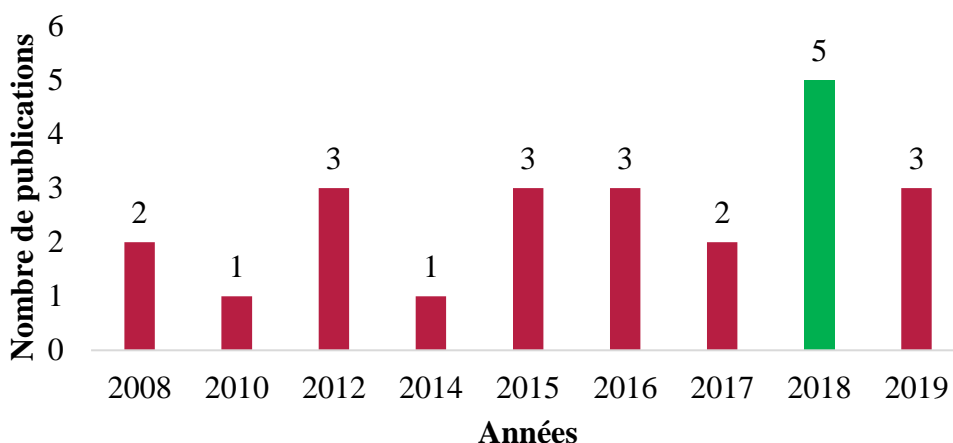
L'objectif principal de ce sujet de thèse est de montrer que les résidus de feuilles de *Hyptis suaveolens* après extraction de l'huile essentielle sont une source potentielle de molécules bioactives autant que les feuilles avant extraction de l'huile essentielle. Pour cela il a fallu tout d'abord extraire les métabolites secondaires en les regroupant en fonction de leur polarité avant et après extraction de l'HE. Puis, après leur détection, les différentes familles identifiées ont été quantifiées pour faciliter le choix des fractions pour l'isolation et la purification des molécules. En fin, l'identification et l'élucidation des structures de quelques composés ont été réalisées pour servir de base de données phytochimiques. Ainsi, ce chapitre donne les résultats obtenus suivis de la discussion.

## I. BIBLIOMETRIE

La bibliométrie est l'application d'un ensemble de techniques mathématiques et méthodes statistiques s'appuyant sur l'analyse des publications scientifiques pour évaluer l'évolution et l'intérêt accordé à une thématique donnée. Ici nous nous intéresserons d'une part au nombre et à la fréquence des études menées sur les huiles essentielles et d'autre part à leurs domaines d'application afin d'établir l'intérêt grandissant accordé à cette thématique des huiles essentielles qui est un pan essentiel de notre sujet de thèse.

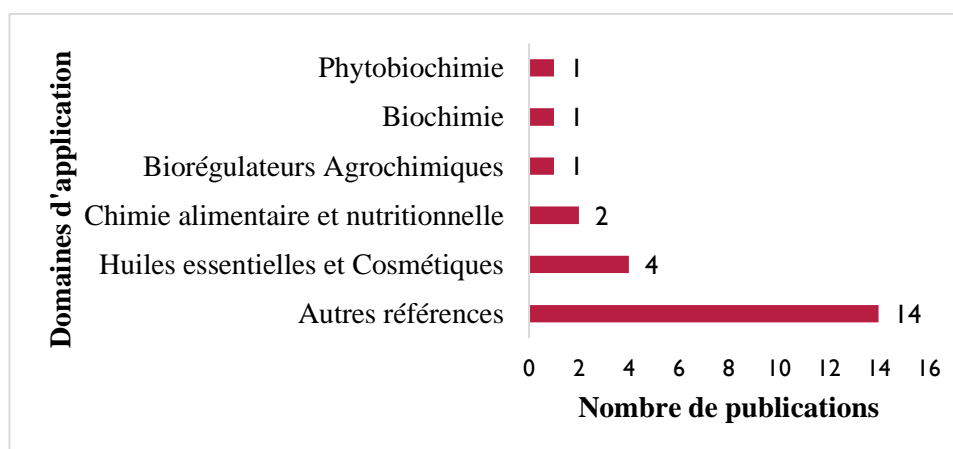
### I.1. BIBLIOMÉTRIE DES RÉSIDUS D'HYDRODISTILLATION

Sur la thématique des résidus d'hydrodistillation, la figure 23 montre que les premiers travaux scientifiques remontent seulement à 2008 avec 2 publications. Cependant, l'on note un pic de 5 publications en 2018 et 3 publications à février 2019. Ce qui montre que la thématique de la valorisation des résidus d'extraction des huiles essentielles est un sujet récent et d'actualité.



**Figure 23:** Nombre de publication par année sur les résidus d’hydrodistillation de 2008 à 2019

Au niveau des publications par domaine d’application des huiles essentielles, l’on note également un faible taux de publication sur les résidus d’hydrodistillation (figure 24). De plus, il n’existe à notre connaissance qu’une seule étude phytochimique sur les résidus des feuilles de *Hyptis suaveolens* (Goly *et al.*, 2015). Ce qui donne un caractère original à nos travaux dont l’un des objectifs assignés est de réaliser une étude chimique sur les résidus d’hydrodistillation de feuilles de *Hyptis suaveolens*.

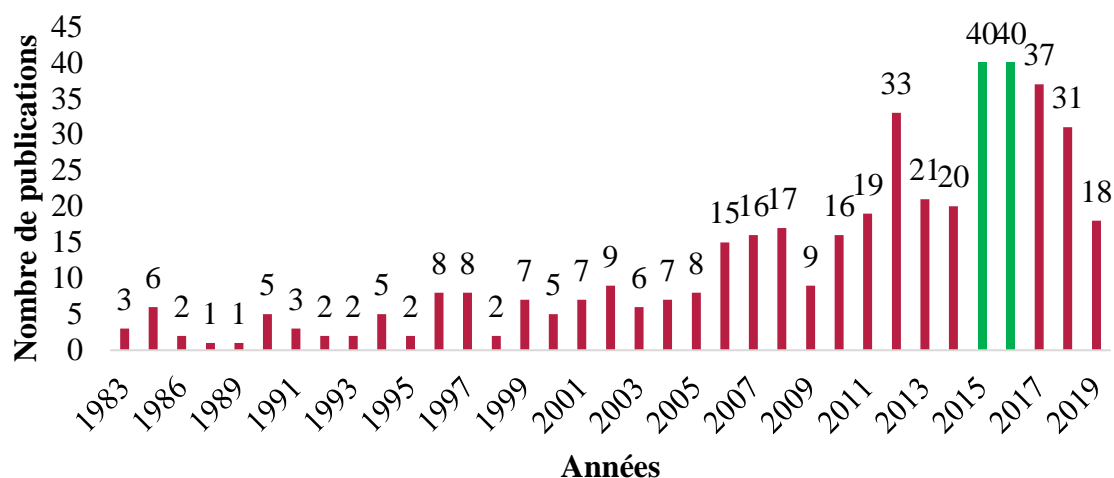


**Figure 24:** Nombre de publication par domaine d’application sur les résidus d’hydrodistillation de 2008 à 2019

## I.2. BIBLIOMÉTRIE DE *HYPTIS SUAVEOLENS*

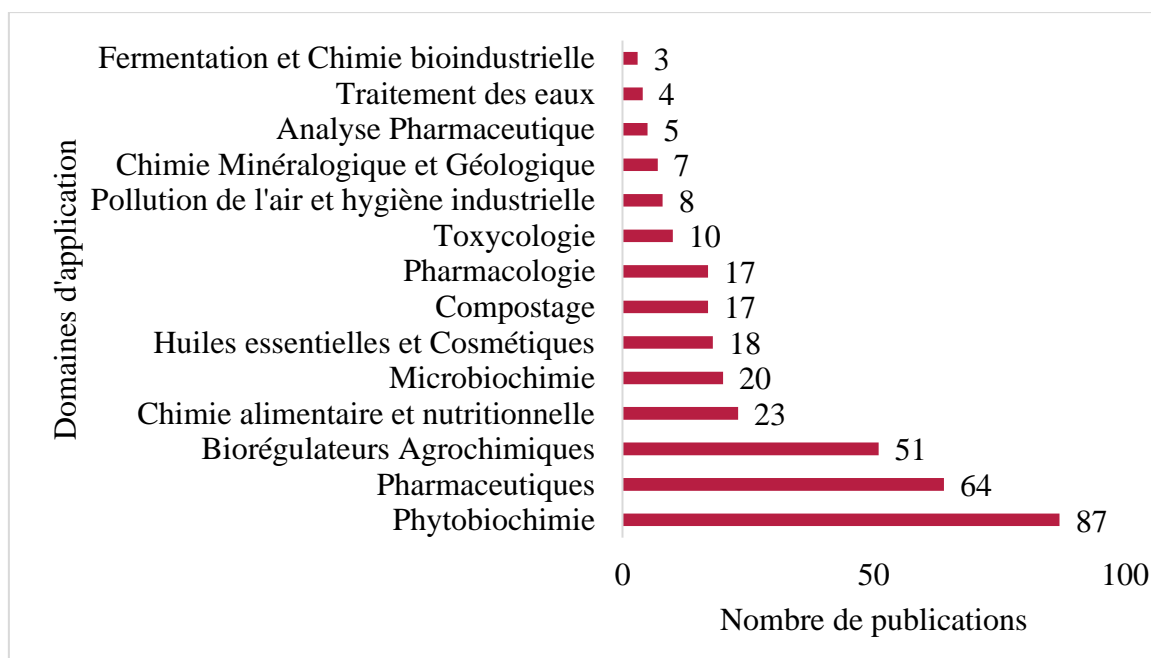
Les premières études scientifiques sur *HYPTIS SUAVEOLENS* datent de 1952 avec une seule publication (Nayak et Guha, 1952). Mais on compte aujourd’hui plus de 458 publications avec plus de 166 publications sur les cinq dernières années avec deux pics à 40 publications en 2015 et 2016 (figure 25), soit plus de 36,24% de l’ensemble des publications

de 1952 jusqu'en février 2019. Ce qui dénote un intérêt croissant pour cette espèce aromatique aux multiples vertus thérapeutiques et biologiques.



**Figure 25:** Nombre de publications par année sur l'espèce *Hyptis suaveolens* de 1983 à 2019

*Hyptis suaveolens* est une plante aromatique utilisée dans de nombreux domaines en l'occurrence la cosmétique, le traitement des eaux, l'agrochimie, la chimie alimentaire, la pharmaceutique, la biochimie où on note les plus forts taux de publication avec plus de 87 publications pour la biochimie de la plante (figure 26). Ce qui justifie son importance et son choix pour nos travaux.



**Figure 26:** Nombre de publications par domaine d'utilisation de *Hyptis suaveolens* de 1952 à 2019

## II. RENDEMENTS DES EXTRACTIONS ET DES FRACTIONNEMENTS

Dans le but d'extraire la quasi-totalité des molécules et ensuite les regrouper en fonction de leurs polarités, des extractions ont été réalisées pour donner les extraits hydroalcooliques avant extraction de l'huile essentielle ( $E_{HA1}$ ) et après extraction de l'huile essentielle ( $E_{HA2}$ ). Les extraits  $E_{HA1}$  et  $E_{HA2}$  ont ensuite été fractionnés successivement avec l'hexane, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle, l'éthanol, et l'eau pour donner les fractions ( $F_{HEX}$ ), ( $F_{DCM}$ ), ( $F_{AE}$ ), ( $F_{Eth}$ ) et ( $F_{Aq}$ ) respectivement.

### II.1. RENDEMENTS DES EXTRACTIONS SOLIDE-LIQUIDE

Les extractions solide-liquide réalisées avant et après l'extraction des huiles essentielles ont permis d'obtenir les extraits brut  $E_{HA1}$  et  $E_{HA2}$  respectivement (tableau 8).

**Tableau 8:** Rendements, aspects et couleurs des extraits hydroalcooliques

Types d'extraits	Paramètres physiques		
	Rendements (%)	Aspects	Couleurs
$E_{HA1}$	21,25 ± 0,17	Cireux	Rouge-verdâtre
$E_{HA2}$	27,60 ± 0,28	Cireux	Marron

$E_{HA1}$  = Extrait hydroalcoolique avant extraction de l'huile essentielle

$E_{HA2}$  = Extrait hydroalcoolique après extraction de l'huile essentielle

Les résultats du tableau 8 montrent que les deux extraits ont un aspect pâteux. L'extrait  $E_{HA1}$  est de coloration rouge-verdâtre alors que l'extrait  $E_{HA2}$  est de coloration marronne. Après l'extraction de l'HE, le taux de composés solubles dans le mélange éthanol-eau (70/30 : v/v) augmente de 21,27 à 27,60 %. La coloration verdâtre de l'extrait  $E_{HA1}$  s'expliquerait par la présence de la chlorophylle. Après l'extraction de l'HE, il y a absence de la chlorophylle qui a certainement été extraite par l'huile à cause de son caractère liposoluble (Novidzro *et al.*, 2019). L'aspect cireux des extraits serait dû à la présence des terpénoïdes dans ces extraits. L'augmentation des rendements d'extraction après l'extraction de l'HE pourrait être dû à l'hydrolyse des sucres ou à la libération de certains composés polaires initialement liés aux composés terpéniques qui sont les constituants majoritaires des huiles essentielles (Van Bergen *et al.*, 1997). En effet, à l'état naturel, certains composés terpéniques sont liés à des sucres ou à des composés phénoliques sous forme d'hétérosides ou de complexes moins solubles dans le mélange éthanol-eau (Dossa *et al.*, 2012). Les

rendements obtenus avant et après extraction de l'HE sont plus élevés que ceux obtenus par Goly *et al.* (2015) qui sont respectivement de 13,01 % et 14,40 %. Cette différence pourrait être liée à la durée de l'extraction ou à la granulométrie des broyats, deux facteurs qui influencent le rendement d'extraction (Koné *et al.*, 2017).

## II.2. RÉSULTATS DU FRACTIONNEMENT DES EXTRAITS BRUTS

Le fractionnement liquide-liquide des extraits bruts ( $E_{HA1}$  et  $E_{HA2}$ ) a conduit à neuf (9) fractions (tableau 9).

**Tableau 9:** Rendements, aspects et couleurs des différentes fractions

Types de fractions	Paramètres physiques		
	Rendement en (%)	Aspect	Couleur
$F_{HEX1}$	$16,32 \pm 0,00$	Huileux	Verdâtre
$F_{HEX2}$	$12,32 \pm 0,00$	Huileux	Verdâtre
$F_{DCM1}$	$18,23 \pm 0,01$	Cireux	Verdâtre
$F_{DCM2}$	$19,97 \pm 0,10$	Cireux	Verdâtre
$F_{AE1}$	$20,79 \pm 0,01$	Cireux	Marron
$F_{AE2}$	$25,73 \pm 0,25$	Cireux	Marron
$F_{Eth1}$	$09,61 \pm 0,01$	Cireux	Marron-orangée
$F_{Eth2}$	$12,36 \pm 0,06$	Cireux	Rouge-verdâtre
$F_{Aq1}$	$34,04 \pm 0,02$	Cristaux-pailleux	Rougeâtre
$F_{Aq2}$	$29,53 \pm 0,13$	Cristaux-pailleux	Marron

$F_{HEX1}$  et  $F_{HEX2}$  = Fractions hexaniques avant et après extraction de l'HE,  $F_{DCM1}$  et  $F_{DCM2}$  = Fractions au dichlorométhane avant et après extraction de l'HE ;  $F_{AE1}$  et  $F_{AE2}$  = Fractions à l'acétate d'éthyle avant et après extraction de l'HE ;  $F_{Eth1}$  et  $F_{Eth2}$  = Fractions éthanoliques avant et après extraction de l'HE ;

$F_{Aq1}$  et  $F_{Aq2}$  = Fractions aqueuses avant et après extraction de l'HE

Les résultats du tableau 9 révèlent que les deux fractions hexaniques ( $F_{HEX1}$  et  $F_{HEX2}$ ) ont un aspect huileux alors que les fractions aqueuses ( $F_{Aq1}$  et  $F_{Aq2}$ ) sont sous forme de cristaux. Les autres fractions ont un aspect cireux. Toutes les fractions au dichlorométhane et à l'hexane sont de coloration verdâtre. Les fractions à l'acétate d'éthyle et celle aqueuse après extraction de l'HE sont de couleur marron.

Les rendements les plus élevés sont de 34,04 % et de 29,53 % respectivement pour les fractions aqueuses 1 et 2. Les plus faibles rendements ont été obtenus avec la partition à l'éthanol et sont de 09,61 % et de 12,36 % pour  $F_{Eth1}$  et  $F_{Eth2}$  respectivement. Après

l'extraction de l'HE, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et l'éthanol extraient plus de molécules dans le partitionnement. L'eau et l'hexane extraient plus de molécules de l'extrait E<sub>HA1</sub> au cours de l'extraction liquide-liquide.

La baisse des rendements dans les fractions à l'hexane et à l'eau après l'extraction de l'huile essentielle pourrait être dû à la récupération préalable de certains composés solubles dans l'hexane par l'huile essentielle d'une part et d'autre part, elle serait due à la perte lors de l'hydrodistillation de composés hydrosolubles dans l'eau florale.

Le rendement plus important des fractions au dichlorométhane, à l'acétate d'éthyle et à l'éthanol après l'extraction de l'HE pourrait s'expliquer par l'élévation de la température lors de l'hydrodistillation. En effet, lors des réactions thermiques, des aglycones sont libérés suite à des clivages glycosidiques ou des composés organiques sont transformés en d'autres composés plus solubles dans les solvants utilisés (Silverstein *et al.*, 2005). Nous n'avons pas trouvé d'études similaires dans la littérature afin de les comparer à nos résultats.

L'importance du rendement des fractions aqueuses s'expliquerait par le fait que les feuilles de *Hyptis suaveolens* contiendraient un taux élevé de composés polaires hydrophiles. Le fort pouvoir d'extraction de l'eau justifierait le rendement observé et le choix de l'eau comme solvant de préparation des remèdes traditionnels (N'guessan *et al.*, 2009). En outre, la présence d'eau dans les cellules végétales favoriserait la perméabilité de leurs tissus à l'eau et augmenterait le phénomène de diffusion de masse dans le processus d'extraction (Durant *et al.*, 2011) (Moure *et al.*, 2000).

### **III. PROFIL PHYTOCHIMIQUE DES EXTRAITS DE FEUILLES DE *HYPTIS SUAVEOLENS***

Les criblages phytochimiques ont été réalisés sur les broyats avant (B<sub>1</sub>) et après (B<sub>2</sub>), sur l'hydrolat (eau florale) et sur les extraits hydroalcooliques avant (E<sub>HA1</sub>) et après (E<sub>HA2</sub>) l'extraction de l'huile essentielle ainsi que sur toutes les fractions issues des extraits hydroalcooliques.

#### **III.1. PROFIL PHYTOCHIMIQUE DES BROYATS, DES EXTRAITS DE FEUILLES ET DE L'HYDROLAT DE *HYPTIS SUAVEOLENS***

Les résultats du criblage des familles de métabolites secondaires réalisés sur les broyats, le florale et les extraits hydroalcooliques de feuilles de *Hyptis suaveolens* avant et après l'extraction de l'huile essentielle sont donnés dans le tableau 10.

**Tableau 10:** Familles de métabolites secondaires des broyats, de l'hydrolat et des extraits

hydroalcooliques

Familles de Métabolites secondaires	Broyat 1	E <sub>HA1</sub>	Broyat 2	E <sub>HA2</sub>	Hydrolat
Stérols et terpènes	+	+	+	+	-
Polyphénols	+	+	+	+	+
Flavonoïdes	+	+	+	+	+
Leucoanthocyanes	+	+	+	+	+
Tanins catéchiques	+	+	+	+	+
Tanins galliques	+	+	+	+	+
Alcaloïdes	+	+	-	-	+
Saponines	+	+	+	+	+
Quinones et anthraquinones	+	+	+	+	+

+ : présence ; - : absence ; Broyat 1 et 2 : Broyat de feuilles de *Hyptis suaveolens* avant et après extraction de l'HE

Les résultats du tableau 10 montrent que les broyats et les extraits hydroalcooliques de feuilles de *Hyptis suaveolens* contiennent toutes les familles de métabolites secondaires recherchées excepté les alcaloïdes qui sont absents après l'extraction de l'HE. La présence de ces familles de composés dans les feuilles de *Hyptis suaveolens* a déjà été rapportée dans la littérature (Praveen *et al.*, 2010)(Gavani Paarakh, 2008).

L'absence des alcaloïdes après l'extraction de l'huile essentielle pourrait se justifier par leur extraction au cours de l'hydrodistillation car l'eau utilisée pour l'hydrodistillation (hydrolat) contient les alcaloïdes. L'on pourrait dire que ces alcaloïdes sont sous forme de sels (Harbone, 1998).

L'absence des stérols et terpènes dans l'hydrolat indique qu'ils seraient extraits par l'huile essentielle ou seraient hydrosolubles (Van Bergen *et al.*, 1997).

Les résultats obtenus sur les broyats avant extraction de l'huile essentielle sont en accord avec ceux obtenus par Das Prabhat *et al.*, (2009). Ils sont également conformes aux résultats de Goly *et al.*, (2015) à l'exception des alcaloïdes qui n'ont pas été détectés par ces auteurs. Par ailleurs, les résultats sur les broyats après sont sensiblement similaires aux résultats obtenus au cours des travaux de Goly *et al.*, (2015) qui sont les seuls travaux réalisés à notre connaissance sur les résidus de feuilles de *Hyptis suaveolens* après extraction de l'huile essentielle.

### III.2. PROFIL PHYTOCHIMIQUE DES FRACTIONS ISSUES DES EXTRAITS HYDROALCOOLIQUES



Les résultats des criblages phytochimiques effectués sur les fractions issues des extraits hydroalcooliques ( $E_{HA1}$  et  $E_{HA2}$ ) des feuilles de *Hyptis suaveolens* avant et après extraction de l'huile essentielle sont donnés dans le tableau 11.

**Tableau 11** : Criblages phytochimiques des fractions issues des extraits hydroalcooliques

Types de fractions										
Familles de Métabolites secondaires	Avant extraction HE						Après extraction HE			
	F <sub>HEX1</sub>	F <sub>DCM1</sub>	F <sub>AE1</sub>	F <sub>Eth1</sub>	F <sub>Aq1</sub>	F <sub>HEX2</sub>	F <sub>DCM2</sub>	F <sub>AE2</sub>	F <sub>Eth2</sub>	F <sub>Aq2</sub>
Stérols et terpènes	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
Polyphénols	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Flavonoïdes	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Leucoanthocyanes	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
Tanins catéchiques	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
Tanins galliques	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+
Alcaloïdes	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
Saponines	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Quinones et anthraquinones	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+

+ : présence - : absence

Les résultats du tableau 11 montrent que la grande majorité des familles de métabolites secondaires recherchées sont présentes dans les deux fractions F<sub>Aq1</sub> et F<sub>Aq2</sub> excepté les stérols et terpènes. Les saponines et les leucoanthocyanes sont absents dans les fractions à l'hexane (F<sub>HEX1</sub> et F<sub>HEX2</sub>) et au dichlorométhane (F<sub>DCM1</sub> et F<sub>DCM2</sub>) alors que les stérols et terpènes et les flavonoïdes sont présents dans ces fractions. Les leucoanthocyanes, absents dans les fractions F<sub>AE1</sub> et F<sub>Eth1</sub>, sont présents dans les fractions F<sub>AE2</sub> et F<sub>Eth2</sub>. Ce qui s'expliquerait par la libération des leucoanthocyanes de leurs complexes terpéniques qui les rendaient insolubles dans ces solvants polaires.

Les tanins galliques absents dans la fraction F<sub>Eth1</sub> sont présents dans la fraction F<sub>Eth2</sub>. Cette absence des tanins dans la fraction F<sub>Eth1</sub> serait due à la même raison que dans le cas des leucoanthocyanes.

Les alcaloïdes présents dans les fractions F<sub>DCM1</sub> et F<sub>Eth1</sub> sont absents dans les fractions F<sub>DCM2</sub> et F<sub>Eth2</sub> obtenues après extraction de l'HE. En effet, l'extrait hydroalcoolique dont ces deux dernières fractions sont issues ne contient pas d'alcaloïdes.

Cette répartition des composés selon leur polarité montre que l'eau extrait la quasi-totalité des familles de composés présentes dans les extraits hydroalcooliques excepté les stéroïdes et terpènes qui y sont absents. Ce qui justifierait l'utilisation de la décoction dans la préparation de nombreux traitements traditionnels. Les résultats obtenus avant l'extraction de l'huile essentielle sont en accord avec ceux de Kumar *et al.*, (2015). En revanche, les résultats obtenus après extraction de l'HE sont à notre connaissance, les premiers sur les fractions issues des extraits hydroalcooliques de feuilles de *Hyptis suaveolens* et même de feuilles d'autres plantes aromatiques après l'extraction de l'huile essentielle. Ils n'ont donc pas pu être comparés aux données de la littérature.

#### **IV. TENEUR EN COMPOSES PHENOLIQUES DES EXTRAITS ET FRACTIONS**

Les feuilles de *Hyptis suaveolens* sont réputées pour leur activité antioxydante. De même, il est rapporté dans la littérature que les plantes doivent principalement cette activité grâce à leur teneur en composés phénoliques. De ce fait, les teneurs de certains composés phénoliques tels que les polyphénols, les flavonoïdes et les tanins ont été déterminés dans les différents extraits et fractions à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible de type Jasco V-533.

##### **IV.1. TENEURS EN COMPOSES PHÉNOLIQUES DES EXTRAITS HYDROALCOOLIQUES**

Les concentrations en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins totaux des extraits hydroalcooliques des feuilles de *Hyptis suaveolens* avant et après extraction de l'HE sont données par les histogrammes de la figure 27.

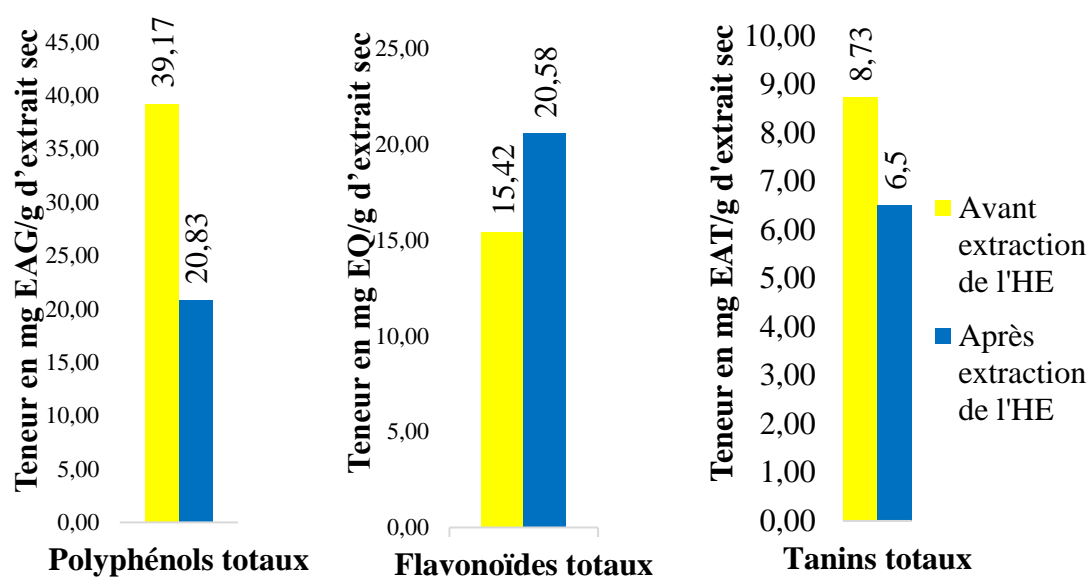


Figure 27: Teneurs en composés phénoliques des extraits hydroalcooliques

Le diagramme de la figure 27 montre que les teneurs en polyphénols totaux et tanins totaux diminuent après l'extraction de l'HE avec des concentrations variant de 39,17 mg EAG/g d'extrait sec à 20,83 mg EAG/g d'extrait sec et de 8,73 mg EAT/g d'extrait sec à 6,50 mg EAT/g d'extrait sec respectivement. En revanche, celles des flavonoïdes totaux augmentent de 15,42 mg EQ/g d'extrait sec à 20,58 mg EQ/g d'extrait sec.

La baisse des teneurs en polyphénols et tanins totaux au cours de l'extraction de l'HE serait due au caractère hydrosoluble de ces composés ou que les formes libres et glycosylées de ces composés seraient importantes (Oboh, 2008) (Bruneton, 1999). De ce fait, ces composés seraient extraits en partie par l'eau florale lors de l'hydrodistillation (A. Sharma *et al.*, 2017). Nos teneurs en polyphénols sont supérieures à ceux (10,00 et 2,5 mg EAG/g d'extrait) obtenus par Sharma *et al.* (2017) sur l'extrait aqueux de *Hyptis suaveolens* acclimaté en Inde. Notre teneur en polyphénols totaux de E<sub>HA1</sub> est également supérieure à celle obtenue par Dossa *et al.*, (2015) (34,32 mg EAG/g) sur des feuilles de *Hyptis suaveolens* récoltées au Bénin. Les teneurs en tanins totaux (8,73 et 6,50 mg EAT/g d'extrait sec) sont supérieures à celle rapportée dans la littérature qui est de (5,50 ± 0,074 mg EAT/g) (Edeog, 1995).

Les différences constatées pourraient être liées non seulement aux méthodes d'extraction, mais aussi et surtout aux conditions environnementales et aux pratiques agricoles (Lee *et al.*, 2003)(Sr. Prema *et al.*, 2015). Quant aux teneurs en polyphénols (20,83 mg EAG/g) et tanins (6,5 mg/g d'extrait sec) après extraction de l'huile essentielle, elles

n'ont pu être comparées à la littérature car ce sont les premiers travaux sur cette matrice végétale à notre connaissance. Cependant, la bonne teneur en polyphénols totaux des feuilles de *Hyptis suaveolens* après extraction de l'huile essentielle pourrait justifier l'utilisation des feuilles de la plante en Asie comme thé médicinal (Zoe., 1891) et comme complément alimentaire en Amérique du sud (Gentry *et al.*, 1990). La forte concentration en tanins des feuilles de la plante justifierait son rejet par la plupart des herbivores du fait de l'astringence provoquée par précipitation des enzymes salivaires en présence des tanins (Harbone, 1998).

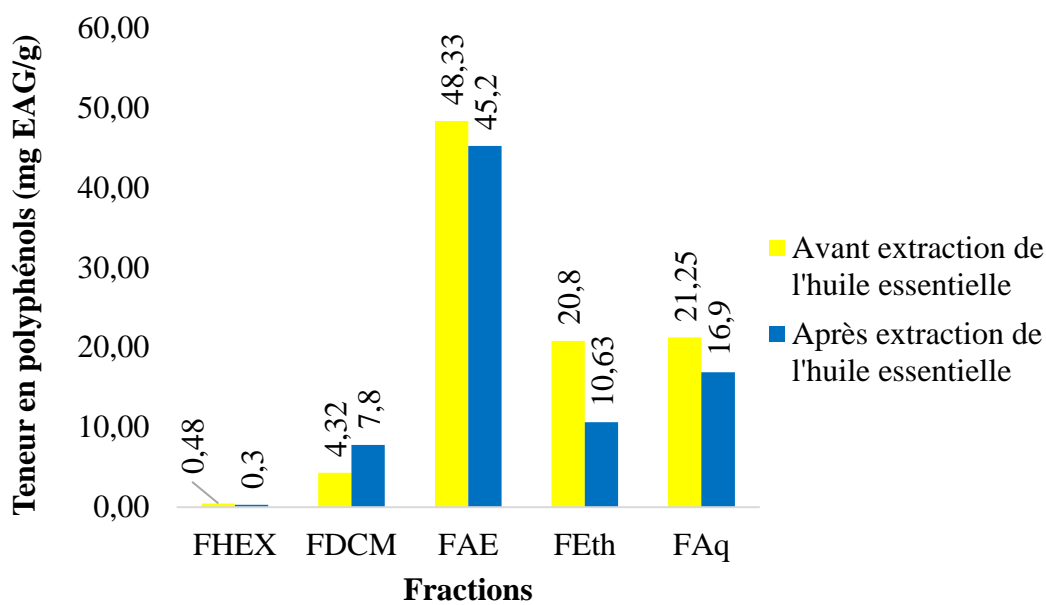
L'augmentation de la teneur en flavonoïdes dans l'extrait hydroalcoolique après extraction de l'HE pourrait s'expliquer par l'absence des huiles essentielles dont la présence inhiberait l'extraction des flavonoïdes. En effet, les composés terpéniques qui composent majoritairement les huiles essentielles sont généralement liés à certains composés phénoliques tels que les flavonoïdes en formant des complexes qui pourraient être insolubles dans le solvant d'extraction. L'élévation de la température lors de l'hydrodistillation provoquerait la destruction de ces complexes, favorisant ainsi l'extraction des flavonoïdes (Bruneton, 1999) (Muyonga *et al.*, 2014). Cette augmentation de la teneur en flavonoïdes serait en accord avec l'accentuation des activités antimicrobiennes de l'extrait hydroalcoolique des feuilles de *Hyptis suaveolens* après extraction de l'huile essentielle telle que rapportée par des travaux antérieurs menés dans notre laboratoire (Goly *et al.*, 2015). En effet, les flavonoïdes sont reconnus pour leurs propriétés antioxydantes et antimicrobiennes (Konaté *et al.*, 2012).

Les teneurs en flavonoïdes déterminées (15,42 et 20,58 mg EQ/g d'extrait sec) sont supérieures à celle obtenue par Sharma *et al.*, (2017) sur l'extrait aqueux de *Hyptis suaveolens* acclimaté en Inde (2,5-1,3 mg EQ/g d'extrait) et de même que celle obtenue par Dossa *et al.*, (2015) sur l'extrait hydroalcoolique de feuilles de *Hyptis suaveolens* acclimaté au Bénin avant extraction de l'huile essentielle (12,12 mg EQ/g). Ces différences pourraient être liées aussi aux méthodes d'extraction utilisées ou encore aux conditions environnementales et aux pratiques agricoles (Sr. Prema *et al.*, 2015).

#### IV.2. TENEURS EN COMPOSES PHÉNOLIQUES DES FRACTIONS ISSUES DES EXTRAITS HYDROALCOOLIQUES

#### IV.2.1. Teneur en polyphénols totaux des fractions issues des extraits hydroalcooliques

La figure 28 résume les teneurs en polyphénols totaux des différentes fractions issues des extraits hydroalcooliques des feuilles de *Hyptis suaveolens* avant et après extraction de l'huile essentielle.



**Figure 28:** Teneurs en polyphénols totaux des différentes fractions issues des extraits hydroalcooliques

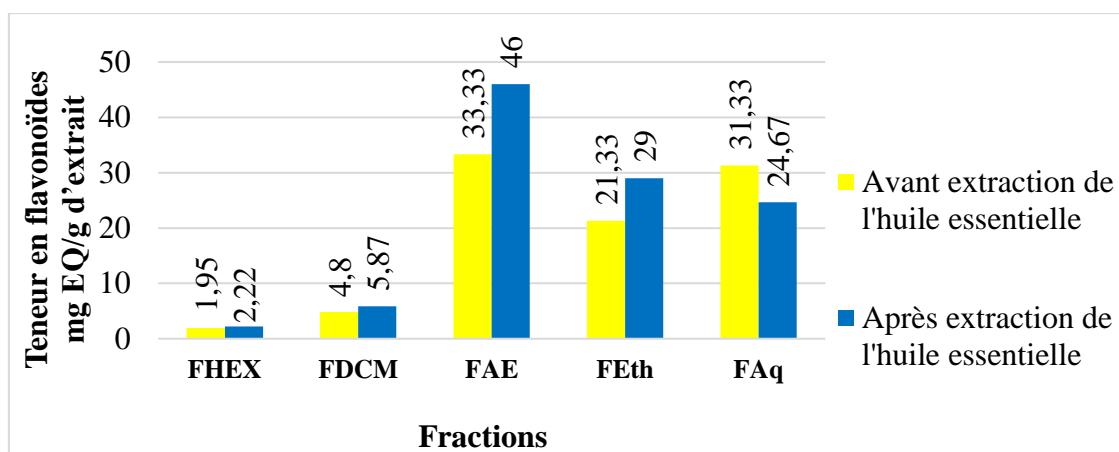
Les teneurs en polyphénols totaux des différentes fractions issues des extraits hydroalcooliques avant et après extraction de l'huile essentielle varient respectivement de 0,40 à 48,33 et 0,30 à 45,20 mg EAG/g de fraction (figure 28). De façon générale, les teneurs des fractions avant extraction de l'huile essentielle sont plus élevées, à l'exception de la fraction au dichlorométhane ( $F_{DCM1}$ ) dont la teneur en polyphénols ( $4,32 \pm 0,02$  mg EAG/g de fraction) est faible par rapport à celle de la fraction  $F_{DCM2}$  ( $7,89$  mg EAG/g de fraction). Cette augmentation de la teneur en polyphénols totaux extraits au dichlorométhane serait probablement liée à la transformation de certains glycosides hydrosolubles en génines, par perte de leurs sucres, sous l'effet de la chaleur (Muyonga *et al.*, 2014) les rendant ainsi plus solubles dans le dichlorométhane (Edwards-Lévy, 2011). Les fractions à l'acétate d'éthyle ( $F_{AE1}$  et  $F_{AE2}$ ) dont les teneurs sont respectivement de  $48,33 \pm 0,08$  et  $45,20 \pm 0,04$  mg EAG/g, sont les plus riches en composés phénoliques. Les fractions à l'eau ( $F_{Aq1}$  et  $F_{Aq2}$ ) et à l'éthanol ( $F_{Eth1}$  et  $F_{Eth2}$ ) avec respectivement ( $21,25 \pm 0,01$  et  $16,90 \pm 0,03$  mg EAG/g) et

( $20,80 \pm 0,04$  et  $10,63 \pm 0,08$  mg EAG/g) contiennent aussi une forte teneur en polyphénols. Les teneurs en polyphénols totaux les plus basses ont été déterminées dans les fractions à l'hexane avant ( $0,48$  mg EAG/g) et après ( $0,3$  mg EAG/g) l'extraction de l'HE.

Les polyphénols présents dans les fractions moyennement polaires ou polaires pourraient être majoritairement sous une forme de génines libres comme l'ont montré des travaux antérieurs sur les feuilles fraîches de *Hyptis suaveolens* acclimaté au Nigeria (Oboh, 2008). Nous n'avons pas trouvé d'études de détermination de la teneur en polyphénols des fractions après extraction de l'huile essentielle de *Hyptis suaveolens* ni d'autres plantes dans la littérature afin de les comparer à nos résultats.

#### IV.2.2. Teneur en flavonoïdes totaux des fractions issues des extraits hydroalcooliques

Les teneurs en flavonoïdes totaux des fractions issues des extraits hydroalcooliques avant et après extraction de l'huile essentielle sont présentées dans la figure 29.



**Figure 29:** Teneurs en flavonoïdes totaux des différentes fractions issues des extraits hydroalcooliques

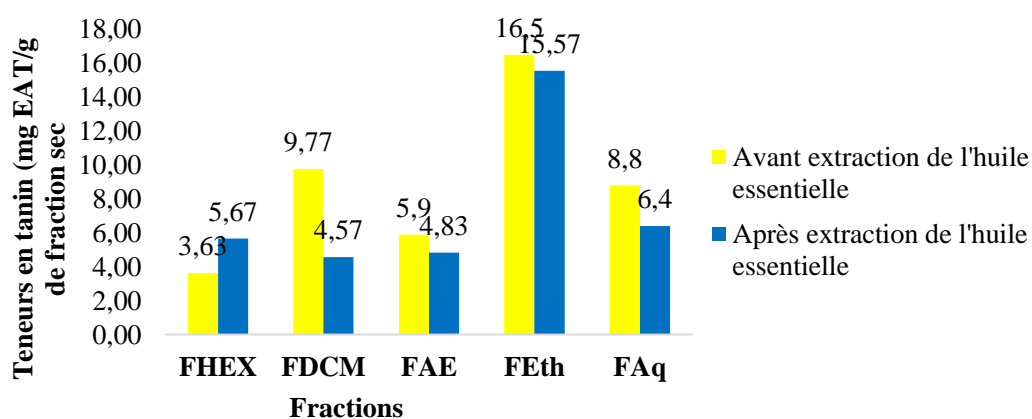
Les teneurs en flavonoïdes totaux des différentes fractions issues des extraits hydroalcooliques avant et après extraction de l'huile essentielle (figure 29), varient respectivement de 1,95 à 33,33 mg EQ/g de la fraction et de 2,22 à 46,00 mg EQ/g de la fraction. De façon générale, les teneurs en flavonoïdes des fractions avant extraction de l'huile essentielle sont plus faibles que celles des fractions des extraits après extraction de l'HE, à l'exception de celle de la fraction aqueuse où l'on note une baisse de la teneur en flavonoïdes (24,67 mg EQ/g de fraction) dans la fraction FAq2. Cette diminution de la teneur en flavonoïdes serait due à l'extraction d'une certaine quantité de flavonoïdes glycosylés hydrosolubles par l'eau florale au cours de l'hydrodistillation (Sharma *et al.*, 2017).

Les fractions à l'acétate d'éthyle  $F_{AE1}$  et  $F_{AE2}$  avec des teneurs respectives de  $33,33 \pm 1,77$  et  $46,00 \pm 2,00$  mg EQ/g sont les plus riches en flavonoïdes suivies des fractions aqueuses ( $31,33 \pm 0,44$  et  $24,67 \pm 0,44$  mg EQ/g) et éthanoliques ( $21,33 \pm 0,89$  et  $29 \pm 0,67$  mg EQ/g). Les fractions au dichlorométhane et à l'hexane sont les plus pauvres en flavonoïdes.

Ces résultats montrent d'une part que la teneur en flavonoïdes dans les fractions dépend de la polarité des solvants utilisés comme rapportés par Marco, (1968). D'autre part, ils corroborent le fait que les feuilles de *Hyptis suaveolens* seraient plus riches en flavonoïdes aglycones (Bruneton, 1999) ou que certaines formes glycosylées ou méthoxylées se seraient transformées en aglycones sous l'effet de la chaleur (Muyonga *et al.*, 2014). Nous n'avons pas trouvé d'études de détermination de la teneur en flavonoïdes des fractions après extraction de l'huile essentielle de *Hyptis suaveolens* ni d'autres plantes dans la littérature afin de les comparer aux présents résultats.

#### IV.2.3. Teneur en tanins totaux des différentes fractions issues des extraits hydroalcooliques

La figure 30 donne les résultats de la teneur en tanins totaux des différentes fractions issues des extraits hydroalcooliques avant et après extraction de l'HE.



**Figure 30:** Teneur en tanins totaux des différentes fractions issues des extraits hydroalcooliques

A l'exception de la fraction à l'hexane issue de l'extrait hydroalcoolique après extraction de l'HE, la teneur des tanins totaux est plus élevée dans les fractions issues de l'extrait hydroalcoolique avant extraction de l'HE (figure 30). Il y a donc une diminution de façon générale de la teneur en tanins totaux dans les fractions issues de l'extrait hydroalcoolique après extraction de l'HE. Cette diminution du taux de tanins totaux est plus

marquée dans la fraction au dichlorométhane. De tous les solvants de fractionnement utilisés, l'éthanol est celui qui donne les meilleures teneurs en tanins totaux avec des concentrations de 16,5 et 15,57 mg/g de fraction respectivement pour les fractions  $F_{\text{Eth1}}$  et  $F_{\text{Eth2}}$ .

L'augmentation du taux de tanins totaux dans la fraction à l'hexane ( $F_{\text{Hex2}}$ ) après extraction de l'HE pourrait s'expliquer par l'extraction des composés terpéniques couplés aux tanins par l'HE au cours de l'hydrodistillation.

La forte présence des tanins dans les fractions à l'éthanol s'expliquerait par la forte solubilité des tanins dans l'éthanol et dans l'eau (surtout à chaud) par rapport aux solvants organiques apolaires (Boutelis, 2015) (Dehak, 2013).

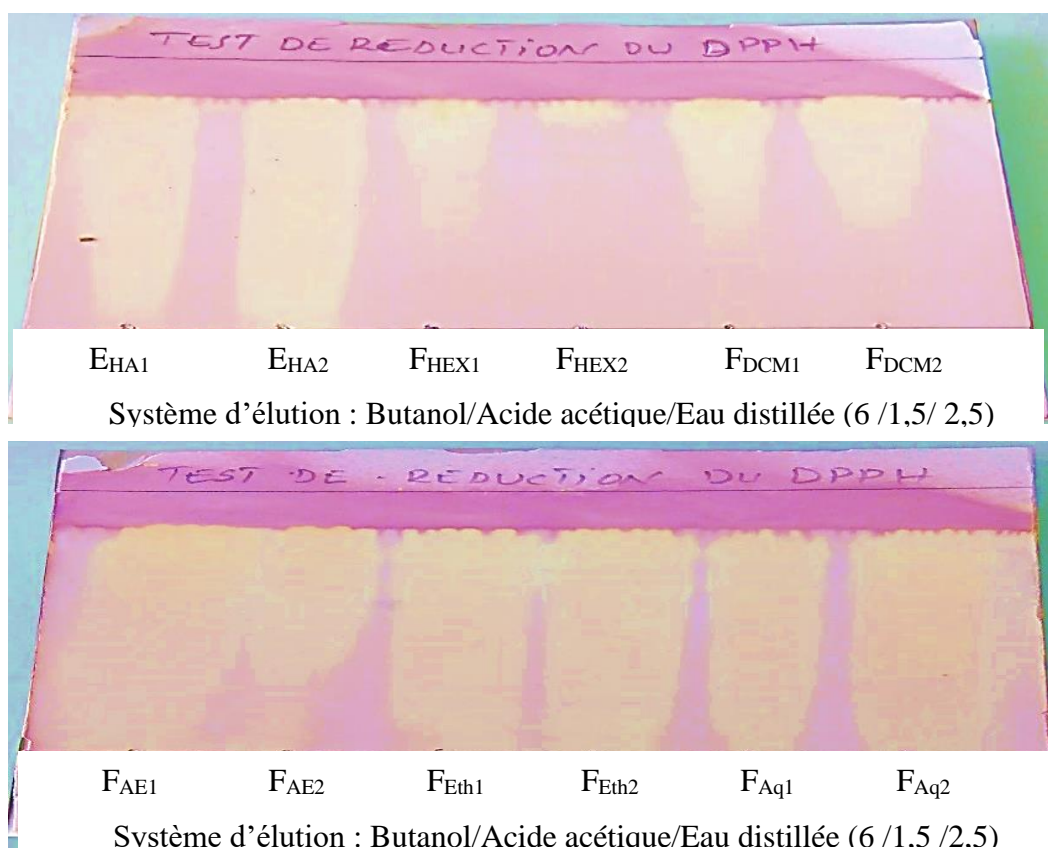
## **V. ACTIVITES ANTIOXYDANTES DES EXTRAITS ET FRACTIONS DE FEUILLES DE *HYPTIS SUAVEOLENS***

La présence de composés phénoliques dans les feuilles de *Hyptis suaveolens* serait une raison suffisante pour évaluer leur potentielle activité antioxydante. Ces composés contribuent fortement à la réduction de l'action oxydative des espèces oxygénées réactives (EOR) qui sont les causes de nombreuses maladies. Les méthodes utilisées sont celles du piégeage des radicaux DPPH et ABTS qui sont des méthodes fréquemment utilisées pour l'évaluation du potentiel antioxydant des substances naturelles.

### **V.1. BIOAUTOGRAPHIE**

La figure 31 traduit la capacité des extraits hydroalcooliques et de leurs fractions avant et après extraction de l'HE à réduire le radical DPPH. Les largeurs des bandes jaunes à fonds violets sont proportionnelles au pouvoir de réduction du radical DPPH des différents extraits et fractions.





**Figure 31** : Activité antioxydante des extraits hydroalcooliques des feuilles de *Hyptis suaveolens* et leurs fractions par bioautographie

E<sub>HA</sub> (extrait hydroalcoolique) ; F<sub>HEX</sub> (fraction à l'hexane) ; F<sub>DCM</sub> (fraction au dichlorométhane) ; F<sub>AE</sub> (fraction à l'acétate d'éthyle) ; F<sub>Eth</sub> (fraction à l'éthanol) et F<sub>Aq</sub> (fraction aqueuse) ; 1 : avant extraction de l'huile essentielle et 2 : après extraction de l'huile essentielle.

La figure 31 montre que les extraits de feuilles de *Hyptis suaveolens* et leurs fractions ont une bonne capacité de réduction du radical DPPH tant avant qu'après l'extraction de l'HE. L'extraction de l'huile essentielle impacte donc peu leur pouvoir antioxydant. Cependant, cette activité antioxydante varie en fonction de la polarité des extraits ou fractions. Ainsi, les extraits et fractions polaires (à l'eau, à l'éthanol et à l'acétate d'éthyle) présentent des bandes jaunes plus larges, montrant leur plus forte capacité de réduction du DPPH par rapport aux fractions à l'hexane et au dichlorométhane. Ce résultat concorde avec celui de Povilaitytė et Venskutonis (2000). De plus l'activité antioxydante de chacun des extraits est soutenue par leurs teneurs en composés phénoliques qui en seraient responsables (Dvaranauskaite, 2008).

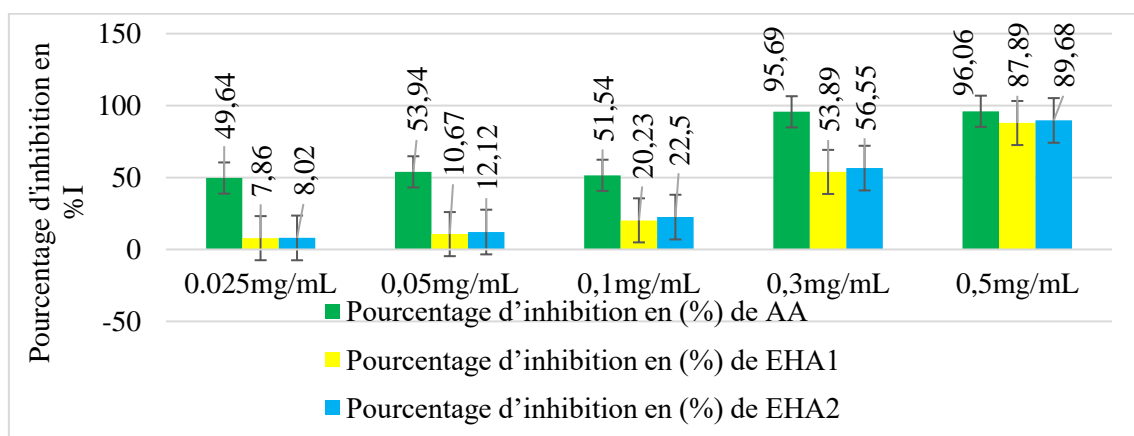
Toutefois, ces résultats devraient être validés par la méthode de quantification spectrophotométrique du pourcentage d'inhibition du radical DPPH.

## V.2. CAPACITE DE PIÉGEAGE DU RADICAL DPPH

Le pouvoir antioxydant des extraits hydroalcooliques des feuilles de *H. suaveolens* avant et après l'extraction de l'HE et de leurs fractions est représenté par le pourcentage d'inhibition (PI en %) du radical libre DPPH à différentes concentrations et par la concentration inhibitrice de 50% (IC<sub>50</sub>) du radical DPPH.

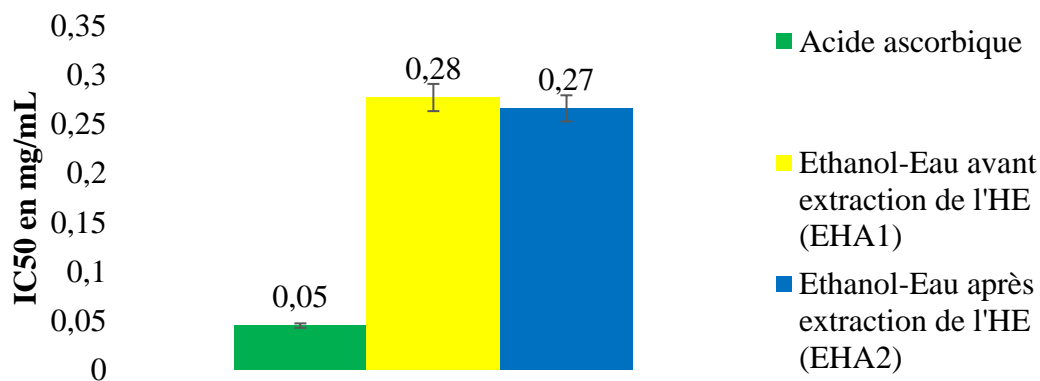
### V.2.1. Capacité de piégeage du radical DPPH des extraits hydroalcooliques avant et après extraction de l'HE de feuilles de *Hyptis suaveolens*.

Les figures 32 et 33 traduisent respectivement, le pourcentage d'inhibition (PI en %) du radical libre DPPH à différentes concentrations et la concentration inhibitrice de 50% (IC<sub>50</sub>) du radical DPPH. L'acide ascorbique (AA) est utilisé comme antioxydant de référence.



AA : Acide ascorbique ; EHA1 : Extrait hydroalcoolique avant extraction de l'HE ; EHA2 : Extrait hydroalcoolique après extraction de l'HE

**Figure 32 :** Pourcentages d'inhibition du DPPH par les extraits hydroéthanoliques



**Figure 33:** Concentration minimale d'inhibition du DPPH de 50% des extraits hydroéthanoliques

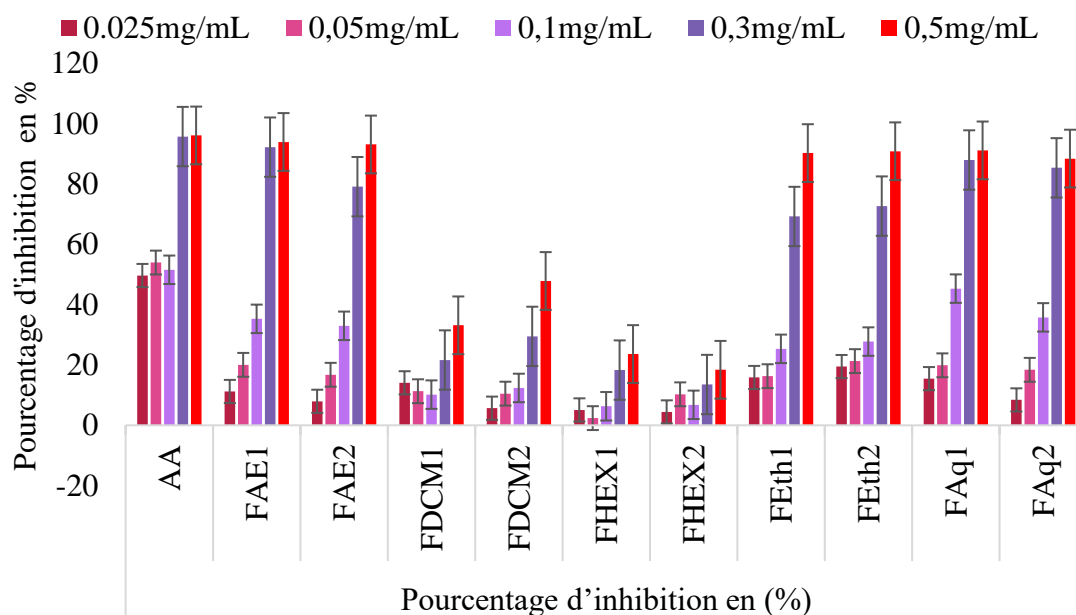
Les figures 32 et 33 montrent que les extraits hydroalcooliques de feuilles de *Hyptis suaveolens* avant et après extraction de l'HE ont des capacités de piégeage du radical DPPH quasi similaires avec des  $IC_{50}$  de 0,28 mg/mL et 0,27 mg/mL respectivement. Ce qui signifierait que la majorité des composés antioxydants des feuilles de *Hyptis suaveolens* restent dans les résidus après l'hydrodistillation. Insignifiant par rapport à celui de l'acide ascorbique ( $IC_{50} = 0,05$  mg/mL) à de faibles doses, le pouvoir antioxydant des feuilles de *Hyptis suaveolens* s'en rapproche à une concentration de 0,5 mg/mL avec des pourcentages d'inhibition du DPPH de l'ordre de 96,06 ; 87,89 et 89,68 respectivement pour l'acide ascorbique (AA), l'extrait hydroalcoolique avant ( $E_{HA1}$ ) et après ( $E_{HA2}$ ) l'extraction de l'huile essentielle. Ainsi, les extraits de feuilles de *Hyptis suaveolens*, surtout ceux des feuilles après extraction de l'HE pourraient être utilisés en additif à d'autres aliments comme antioxydant de substitution (Chizzola *et al.*, 2008).

Les résultats de l'activité antioxydante de l'extrait hydroalcoolique avant extraction de l'HE obtenus pour les pourcentages d'inhibition, sont du même ordre que ceux rapportés par Dossa *et al.*, (2015). Cependant, on note une légère différence entre les valeurs des  $IC_{50}$  (0,28 mg/mL contre 0,58 mg/mL pour Dossa *et al.*, 2015). Cette différence serait probablement liée à l'écart des teneurs en composés phénoliques constaté dans ces deux études.

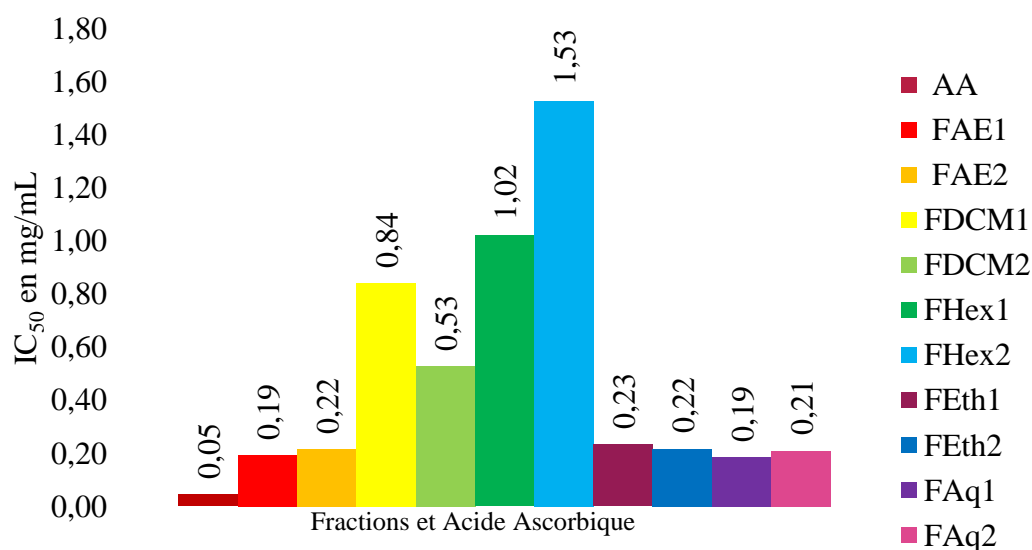
La relation entre la capacité de réduction du radical DPPH et les teneurs en composés phénoliques des extraits hydroalcooliques permet de dire qu'elle serait particulièrement liée la présence des flavonoïdes. Comme l'ont montré certaines études (Gavani et Paarakh, 2008).

### **V.2.2. Capacité de piégeage du DPPH des différentes fractions issues des extraits hydroalcooliques**

Le pouvoir antioxydant des fractions issues des extraits hydroalcooliques avant et après extraction de l'HE de feuilles de *Hyptis suaveolens* est traduit par le pourcentage d'inhibition du DPPH à différentes concentrations (figure 34) et par la concentration d'inhibition du DPPH de 50 % (figure 35).



**Figure 34:** Pourcentages d'inhibition du DPPH par les fractions issues des extraits hydroalcooliques



AA : Acide ascorbique

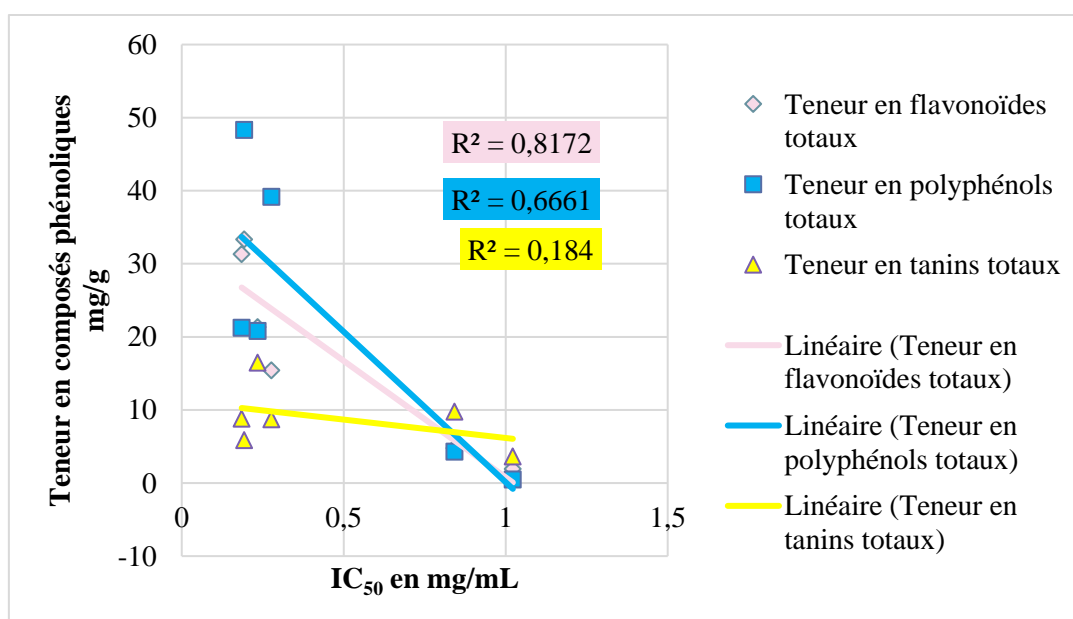
**Figure 35:** Concentrations d'inhibition du DPPH de 50% des fractions issues des extraits hydroalcooliques

Les fractions issues des solvants polaires (acétate d'éthyle, eau et éthanol) ont des activités antioxydantes similaires entre elles mais supérieures à celles des fractions issues des solvants apolaires (dichlorométhane, hexane) comme prédit par la méthode bioautographie (figure 31). Ces résultats sont en accord avec les résultats de plusieurs auteurs

qui ont montré que les solvants polaires extraient plus de composés antioxydants que les solvants de faible polarité (Dapkevicius, 2002) (Bandonienė, 2002). En outre, les fractions polaires ont une bonne capacité de piégeage du radical DPPH qui est comparable à celle de l'acide ascorbique (96,06%) à des doses de 0,5 mg/mL avec des pourcentages d'inhibition proches pour les fractions à l'acétate d'éthyle (93,9% à 93,07%). Cependant, ces fractions polaires avec des valeurs de  $IC_{50}$  variant entre 0,19 mg/mL et 0,23 mg/mL, restent des antioxydants modérés en comparaison avec l'acide ascorbique dont la valeur de la concentration d'inhibition du radical DPPH de 50% est de 0,05mg/mL (Wei *et al.*, 2012).

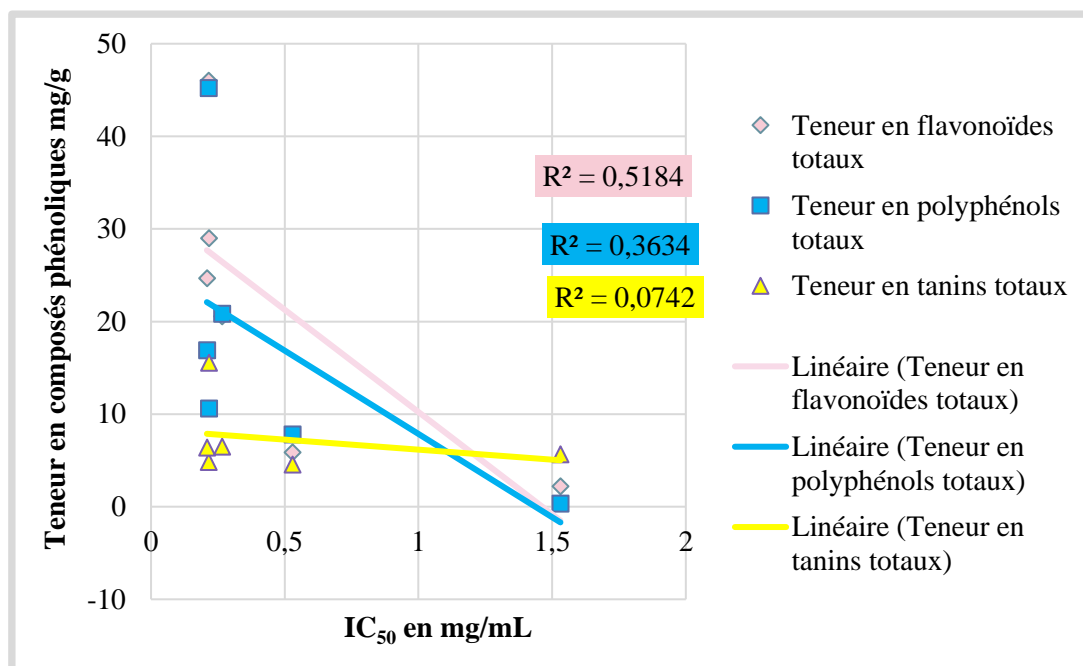
### V.2.3. Corrélation entre teneurs en composés phénoliques et $IC_{50}$

Les figures 36 et 37 traduisent la corrélation entre le pouvoir de réduction du DPPH des extraits hydroalcooliques avant et après extraction de l'HE de feuilles de *H. suaveolens* et leurs teneurs en composés phénoliques.



**Figure 36:** Corrélation entre pouvoir de réduction du DPPH des extraits de feuilles de *Hyptis suaveolens* avant extraction de l'HE et leurs teneurs en composés phénoliques

La figure 36 montre qu'il existe une bonne corrélation entre le potentiel de réduction du DPPH des extraits de feuilles de *Hyptis suaveolens* avant extraction de l'huile essentielle et leurs teneurs en flavonoïdes totaux et en polyphénols totaux avec respectivement des coefficients de corrélation de  $R = 0,904$  et  $R = 0,816$ . En revanche cette corrélation est faible avec leurs teneurs en tanins totaux ( $R = 0,429$ ).



**Figure 37:** Corrélation entre pouvoir de réduction du DPPH des extraits de feuilles de *Hyptis suaveolens* après extraction de l'HE et leurs teneurs en composés phénoliques

Le même constat est fait également pour les extraits et fractions après extraction de l'huile essentielle (figure 37), avec la plus forte corrélation pour les teneurs en flavonoïdes totaux ( $R = 0,720$ ) suivies des teneurs en polyphénols totaux ( $R = 0,603$ ) et enfin les teneurs en tanins totaux ( $R = 0,272$ ).

Il existe une bonne corrélation entre les pouvoirs de réduction du radical DPPH et les teneurs en composés phénoliques des différents extraits hydroalcooliques et leurs fractions avant et après extraction de l'HE des feuilles de *Hyptis suaveolens* selon les figures 36 et 37. En effet, les extraits de feuilles de *Hyptis suaveolens* ont également donné de très bonnes teneurs en flavonoïdes totaux et polyphénols totaux à l'inverse des teneurs en tanins totaux qui sont relativement faibles. Ce qui montre que les flavonoïdes sont les principaux contributeurs du potentiel antioxydant des feuilles de *Hyptis suaveolens* comme l'ont rapporté certains auteurs sur d'autres espèces de plantes (Li *et al.*, 2008)(Yen *et al.*, 2008) (Wahiba, 2009).

Certes, nous avons de bonnes corrélations avec la méthode au DPPH, mais il est bien connu que les antioxydants agissent très différemment avec les différents radicaux libres. Afin d'obtenir plus d'informations sur la capacité à inhiber les radicaux libres, cette capacité a également été testée par une deuxième méthode (méthode du radical cationique ABTS<sup>•+</sup>).

### V.3. POTENTIEL DE RÉDUCTION DU RADICAL CATIONIQUE ABTS<sup>•+</sup>

Les analyses ont été effectuées en utilisant le Trolox comme référence. Les résultats en triplex ont été exprimés par la Capacité Antioxydante Equivalente Trolox (TEAC) en  $\mu\text{mol/L TE}$ .

#### V.3.1. Potentiel de réduction du radical cationique ABTS<sup>•+</sup> des extraits hydroalcooliques

La capacité de piégeage du radical cationique ABTS<sup>•+</sup> des extraits hydroalcooliques avant ( $E_{\text{HA1}}$ ) et après ( $E_{\text{HA2}}$ ) l'extraction de l'HE est traduite par le tableau 12.

**Tableau 12 :** Capacité antioxydante ABTS des extraits hydroalcooliques avant et après extraction de l'HE de feuilles de *Hyptis suaveolens*

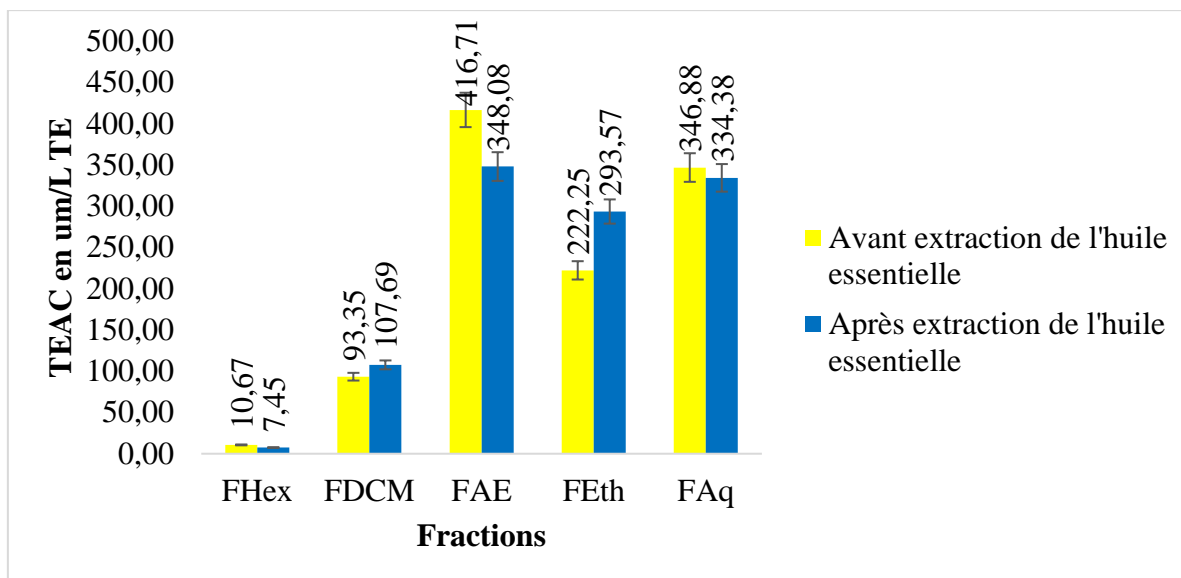
Extraits	$E_{\text{HA1}}$	$E_{\text{HA2}}$
TEAC en $\mu\text{mol/L TE}$	$256,47 \pm 8,33$	$290,91 \pm 29,15$

$E_{\text{HA1}}$  et  $E_{\text{HA2}}$  : Extraits hydroalcooliques avant et après extraction de l'HE

Contrairement au test DPPH, il y a une légère augmentation du pouvoir antioxydant après l'extraction de l'huile essentielle avec des TEAC passant de  $256,47 \mu\text{mol/L TE}$  à  $290,91 \mu\text{mol/L TE}$ . Ce qui est en conformité avec les teneurs en flavonoïdes totaux qui elles aussi croient au cours de l'hydrodistillation. Ainsi, les flavonoïdes contribueraient beaucoup plus au potentiel antioxydant de la plante (Gavani et Paarakh, 2008).

#### V.3.2. Potentiel de réduction du radical cationique ABTS<sup>•+</sup> des différentes fractions issues des extraits hydroalcooliques

La figure 38 traduit les pouvoirs de réduction du radical cationique ABTS<sup>•+</sup> des fractions issues des extraits hydroéthanoliques avant et après extraction de l'HE de feuilles de *Hyptis suaveolens*.



F<sub>HEX</sub> : Fractions hexaniques ; F<sub>DCM</sub> : Fractions au dichlorométhane ; F<sub>AE</sub> : Fractions à l'acétate d'éthyle ; F<sub>Eth</sub> : Fractions à l'éthanol ; F<sub>Aq</sub> : Fractions aqueuses

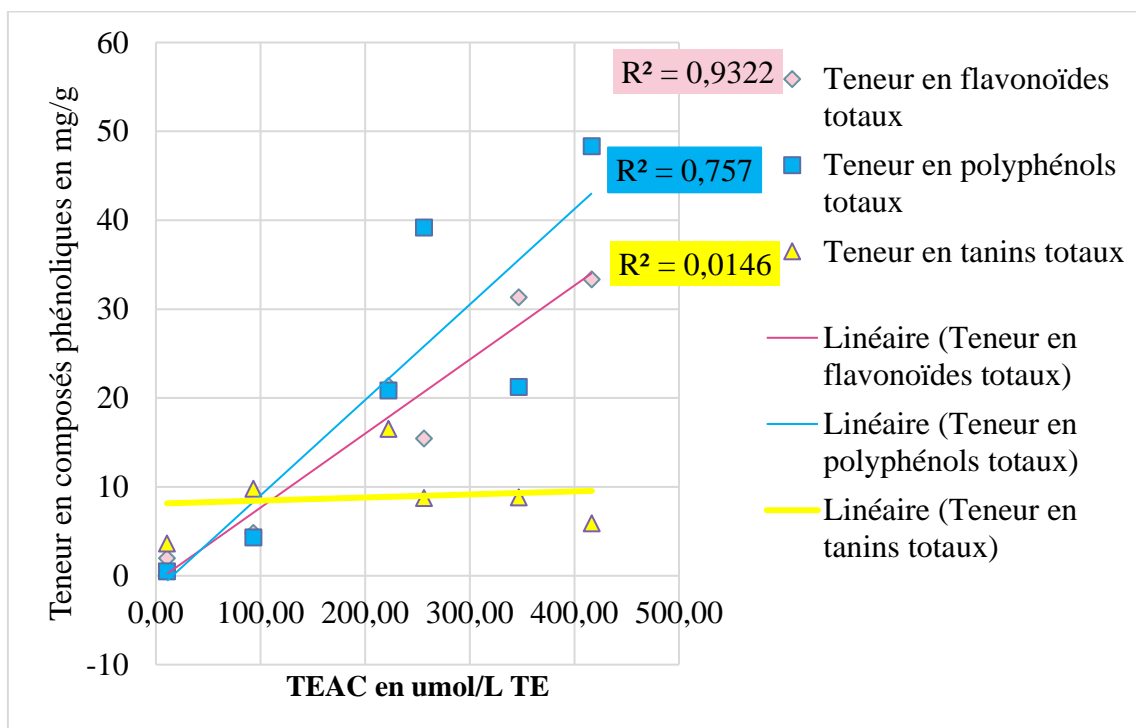
**Figure 38** : Capacité antioxydante ABTS<sup>+</sup> des différentes fractions issues des extraits hydroéthanoliques

La figure 38 montre que les fractions obtenues à partir des solvants polaires (acétate d'éthyle, eau et éthanol) ont des activités antioxydantes supérieures à celles des fractions obtenues à partir des solvants apolaires (dichlorométhane, hexane) (Dapkevicius, 2002) (Bandonienė, 2002). Ainsi, les plus forts potentiels antioxydants sont observés pour les fractions à l'acétate d'éthyle (416,71 à 346,08 µmol/L TE), suivies des fractions aqueuses (346,88 à 334,38 µmol/L TE) et des fractions à l'éthanol (222,25 à 293,57 µmol/L TE) respectivement avant et après extraction de l'huile essentielle. Cependant, une baisse de cette activité est enregistrée pour les fractions à l'acétate d'éthyle contre une légère augmentation pour les fractions aqueuses, après extraction de l'HE, contrairement à leurs teneurs en flavonoïdes totaux qui augmentent pour les fractions à l'AE et baissent pour les fractions aqueuses. Cette tendance pourrait s'expliquer par la nature des flavonoïdes extraits par ces deux types de solvants. En effet, le pouvoir antioxydant des composés phénoliques dépend non seulement de la quantité et de la nature des composés mais également de leurs structures et du nombre de groupement hydroxyle sur leurs chaînes carbonées (Fiol *et al.*, 2012) (Cheynier *et al.*, 2006b).



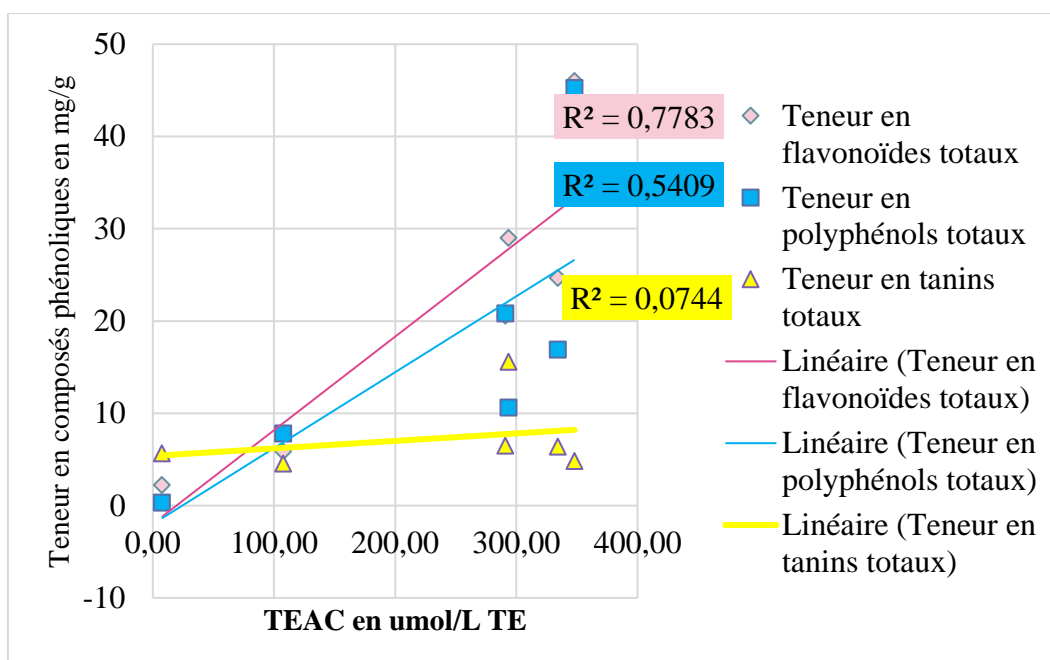
### V.3.3. Corrélation entre le pouvoir antiradicalaire ABTS<sup>•+</sup> et la teneur en composés phénoliques des extraits hydroalcooliques

Les figures 39 et 40 traduisent la corrélation entre le pouvoir antiradicalaire ABTS<sup>•+</sup> et la teneur en composés phénoliques des extraits hydroalcooliques avant et après extraction de l'HE de feuilles de *Hyptis suaveolens*.



**Figure 39** : Corrélation entre pouvoir antiradicalaire ABTS<sup>•+</sup> et les teneurs en composés phénoliques des extraits de feuilles de *Hyptis suaveolens* avant extraction de l'HE

La figure 39 montre une forte corrélation entre la capacité de réduction de l'ABTS<sup>•+</sup> des extraits de feuilles de *Hyptis suaveolens* avant l'extraction de l'huile essentielle et leurs teneurs en flavonoïdes totaux et en polyphénols totaux avec respectivement des coefficients de corrélation de  $R = 0,9655$  et  $R = 0,8701$ . Cependant, cette corrélation est faible avec leurs teneurs en tanins totaux ( $R = 0,1208$ ).



**Figure 40:** Corrélation entre pouvoir antiradicalaire ABTS\*+ et les teneurs en composés phénoliques des extraits de feuilles de *Hyptis suaveolens* après extraction de l'HE

De même qu'avant l'extraction de l'HE, la figure 40 montre de bonnes corrélations pour les extraits et fractions après l'extraction de l'huile essentielle. On relève la plus forte corrélation pour les teneurs en flavonoïdes totaux ( $R= 0,8822$ ) suivies des teneurs en polyphénols totaux ( $R= 0,7355$ ) et enfin les teneurs en tanins totaux ( $R= 0,2728$ ).

Comme dans le cas du DPPH, ces résultats corroborent les résultats obtenus sur la quantification des composés phénoliques des feuilles de la plante. En effet, les extraits de feuilles de *Hyptis suaveolens* ont donné de très bonnes teneurs en flavonoïdes totaux et en polyphénols totaux, contrairement aux teneurs en tanins totaux qui sont relativement faibles. Ce qui montre que les flavonoïdes sont les contributeurs principaux de l'activité antiradicalaire des feuilles de la plante (L. Zhang *et al.*, 2011) (Sun et Ho, 2005).

En outre, il ressort de ces deux méthodes d'évaluation du pouvoir antioxydant que la méthode ABTS\*+ donne de plus fortes corrélations par rapport à la méthode DPPH ; Ce qui justifierait le fait que l'utilisation d'une seule méthode n'est pas suffisante pour évaluer le pouvoir antioxydant (Silva *et al.*, 2006).

### Conclusion partielle

Les feuilles de *Hyptis suaveolens* possèdent un pouvoir antioxydant plus important après l'extraction de l'HE. Les flavonoïdes sont les principaux métabolites secondaires

responsables de cette activité. Les extraits de feuilles de *H. suaveolens* peuvent donc être utilisés comme additifs alimentaires.

## **VI. IDENTIFICATION DES COMPOSES DES FEUILLES DE *HYPTIS SUAVEOLENS* AVANT ET APRES EXTRACTION DE L'HE**

Les extraits hydroalcooliques des feuilles de *Hyptis suaveolens* avant et après l'extraction de l'huile essentielle et leurs fractions possèdent de très bonnes activités antioxydantes. Pour répondre au deuxième objectif spécifique de ce travail, les principaux composés présents dans les feuilles de la plante ont été identifiés. Pour cela, la conjugaison de deux méthodes d'analyse chromatographique a été employée. Il s'agit de la méthode déréplivative basée sur le couplage Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP) et Spectrométrie de Masse tandem (SM/SM) - Temps de Vol Quadripolaire (Q/TOF) et la méthode de Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (GC-MS).

### **VI.1. ANALYSES DÉRÉPLICATIVES DE FRACTIONS ISSUES DES EXTRAITS HYDROALCOOLIQUES**

Une étude comparative de fractions issues des extraits hydroalcooliques des feuilles de *Hyptis suaveolens* avant et après l'extraction de l'huile essentielle a été réalisée par la méthode HPLC-ESI-Q-TOF-MS. Elle vise d'une part, à déterminer les composés thermostables et thermosensibles lors de l'extraction de l'huile essentielle. D'autre part, elle a pour but de détecter les molécules formées à la suite de probables réactions thermiques qui auraient lieu lors de l'extraction de l'huile essentielle. Ainsi, pour une appréciation plus rigoureuse des similitudes et des différences entre les profils chromatographiques (figure 41) des différentes fractions avant et après l'extraction de l'huile essentielle, il a été procédé à une intégration automatisée des chromatogrammes (dans les mêmes conditions) à l'aide du logiciel MassHunter® (Agilent) Qualitative Analysis B.07.00. Ceci a permis d'obtenir les pics des différents composés principaux issus de ces fractions (figure 42).

En cliquant sur un pic donné, le logiciel génère un ensemble de formules correspondant au seul ion moléculaire  $[M+H]^+$  (figure 43).

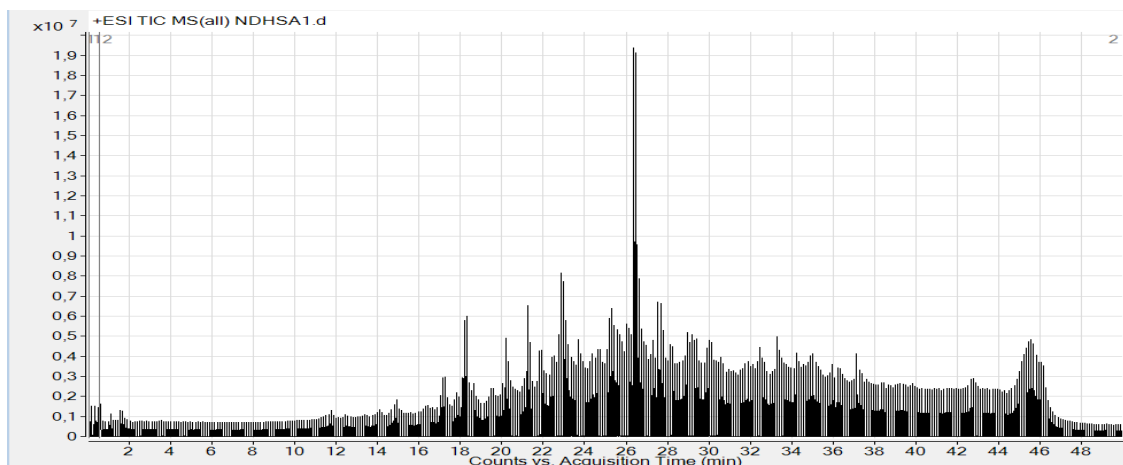


Figure 41: Profil chromatographique ESI/MS total

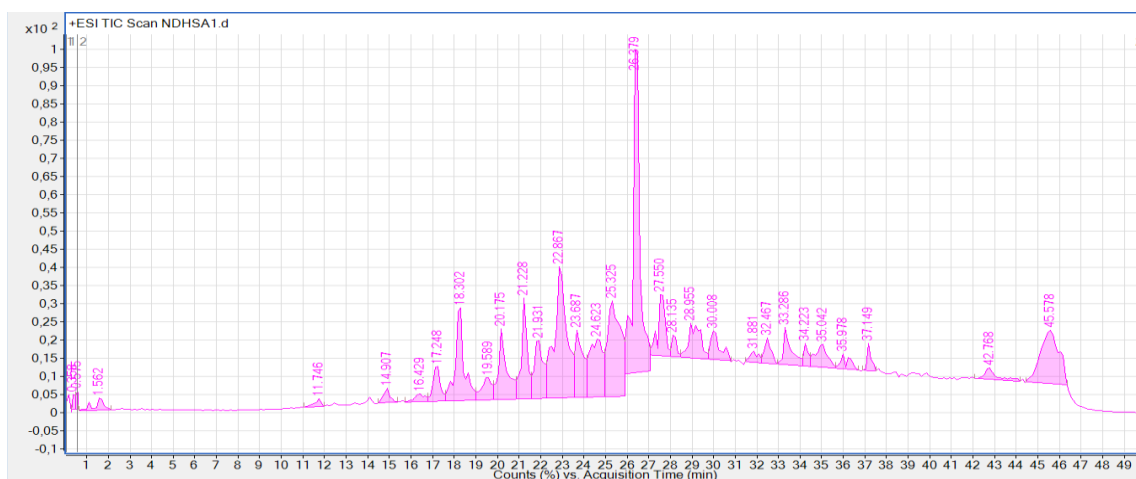


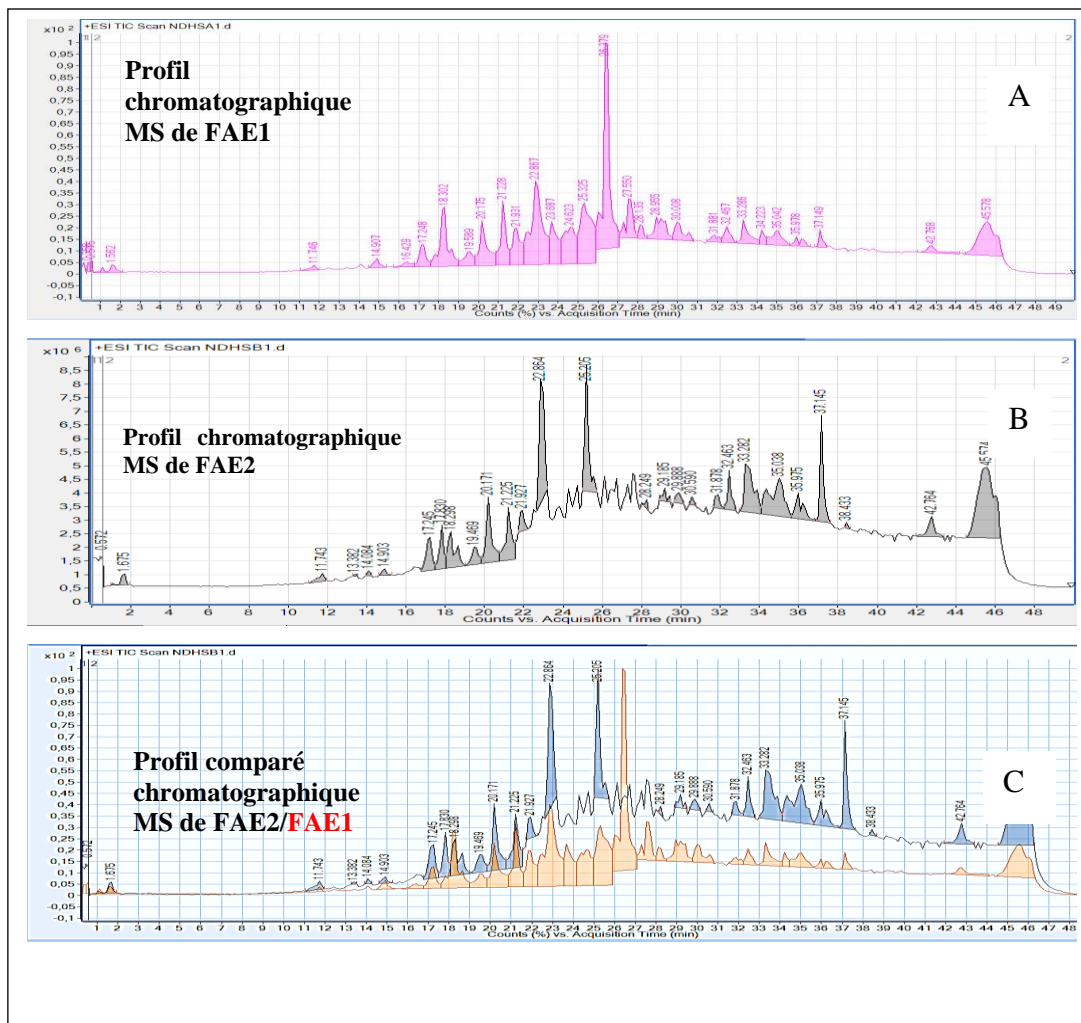
Figure 42: Profil chromatographique ESI/MS des composés majoritaires

Best	ID Source	Formula	Species	m/z	Score	Diff (ppm)	Score (MFG)	Mass (MFG)	DBE
▶	MFG	C20 H30 O2	(M+H) <sup>+</sup>	303.2318	98,33	-0,24	98,33	302,2246	6
○	MFG	C18 H28 N3 O	(M+H) <sup>+</sup>	303.2318	89,9	-4,92	89,9	302,2232	6,5
○	MFG	C13 H30 N6 S	(M+H) <sup>+</sup>	303.2318	83,53	0,58	83,53	302,2253	2
○	MFG	C15 H32 N3 O S	(M+H) <sup>+</sup>	303.2318	78,37	5,35	78,37	302,2266	1,5
○	MFG	C16 H26 N6	(M+H) <sup>+</sup>	303.2318	72,65	-9,64	72,65	302,2219	7
○	MFG	C17 H34 O2 S	(M+H) <sup>+</sup>	303.2318	65,35	10,08	65,35	302,228	1
○	MFG	C19 C13 O9 S4	(M+2H) <sup>+</sup> 2	303.3823	46,84	-1,57	46,84	604,7491	18,5
○	MFG	C14 H2 C13 N3 O8 S5	(M+2H) <sup>+</sup> 2	303.3823	46,61	1,79	46,61	604,7511	14
○	MFG	C15 C13 O14 S3	(M+2H) <sup>+</sup> 2	303.3823	45,56	2,57	45,56	604,7516	14,5
○	MFG	C14 H C12 N O12 S5	(M+2H) <sup>+</sup> 2	303.3823	43,98	-3,45	43,98	604,7479	14
○	MFG	C16 H4 C13 O9 S5	(M+2H) <sup>+</sup> 2	303.3823	42,77	4,01	42,77	604,7524	13,5
○	MFG	C23 C13 O4 S5	(M+2H) <sup>+</sup> 2	303.3823	38,31	-5,7	38,31	604,7466	22,5
○	MFG	C17 C13 N4 O5 S5	(M+2H) <sup>+</sup> 2	303.3823	36,77	6,22	36,77	604,7538	18,5

Figure 43: Formules brutes suggérées par le logiciel MassHunter

### VI.1.1. Analyse comparative HPLC-MS/Q-TOF des fractions à l'acétate d'éthyle

Les profils chromatographiques HPLC-MS/Q-TOF des fractions à l'acétate d'éthyle issues des extraits hydroalcooliques des feuilles de *Hyptis suaveolens* avant et après l'extraction de l'huile essentielle et leur superposition sont représentés sur la figure 44.



**Figure 44:** Profils chromatographiques ESI/MS des composés majoritaires de la fraction acétate d'éthyle avant (A) et après (B) l'extraction de l'H.E

Les figures 44A et 44B montrent que les métabolites secondaires présents dans ces deux fractions sortent de la colonne presque dans le même intervalle de temps 1,56-45,58 min. La superposition des deux chromatogrammes (Figure 44C) montre des similitudes et des différences dans leurs profils.

Les analyses réalisées en mode positif ont permis de déterminer les masses moléculaires et les formules brutes des composés révélés par la chromatographie.

Le tableau 13 donne les formules brutes et les masses moléculaires correspondantes avec les différents scores pour chacun des principaux composés détectés.

**Tableau 13:** Composés détectés dans les fractions à l'acétate d'éthyles (FAE1) et (FAE2)

N° du PIC	Avant extraction de l'huile essentielle				Après extraction de l'huile essentielle			
	Temps de rétention (min)	Formule brute	Masse moléculaire (g/mol)	Score (%)	Temps de rétention (min)	Formule brute	Masse moléculaire (g/mol)	Score (%)
1	1,562	**C <sub>25</sub> H <sub>34</sub> N <sub>4</sub>	390	98,51	1,675	*C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	390	92,91
2	11,746	*C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	390	97,15	11,743	*C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	178	87,31
3	14,907	*C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	194	86,17	13,382	*C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	390	97,61
4	16,429	*C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	178	86,31	14,084	***C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	138	95,79
5	17,248	*C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	162	98,03	14,903	*C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	194	84,60
6	17,951	*C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	176	47,48	17,245	*C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	162	99,08
7	18,302	*C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub>	208	87,19	17,83	***C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	152	99,65
8	19,589	*C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	390	96,28	18,298	*C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	208	94,48
9	20,175	*C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	122	89,6	18,064	*C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	176	47,2
10	20,994	*C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>7</sub>	392	50,54	19,469	***C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	196	99,58
11	21,228	*C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	194	98,83	20,171	*C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	122	92,71
12	21,814	*C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	302	98,7	20,991	*C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>7</sub>	392	64,29
13	21,931	*C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	464	99,49	21,225	*C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	194	99,72
14	22,165	*C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	164	82,67	21,810	*C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	302	93,82
15	22,867	*C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	162	97,28	21,927	*C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	464	98,59
16	23,101	*C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	286	98,49	22,044	*C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	164	76,53
17	23,687	**C <sub>30</sub> H <sub>37</sub> N <sub>11</sub> O <sub>10</sub>	711	97,76	22,864	*C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	162	98,79
18	24,623	**C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub> S	162	83,64	22,981	*C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	360	93,43
19	25,325	*C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	300	99,12	23,098	*C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	286	93,36
20	26,379	**C <sub>8</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	148	99,69	25,177	*C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	300	89,73
21	27,316	**C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	270	80,07	25,205	*C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	162	98,17
22	27,55	**C <sub>13</sub> H <sub>23</sub> N <sub>11</sub>	333	92,08	28,249	***C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	314	99,04
23	28,135	**C <sub>20</sub> H <sub>37</sub> N <sub>11</sub> O <sub>3</sub>	479	95,52	29,185	***C <sub>21</sub> H <sub>36</sub> O <sub>4</sub>	352	97,67
24	28,955	**C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	280	97,34	29,320	***C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	152	82,29
25	29,884	*C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O	272	61,63	29,888	***C <sub>34</sub> H <sub>45</sub> NO <sub>13</sub>	675	97,18
26	30,008	**C <sub>28</sub> H <sub>24</sub> O <sub>11</sub>	536	99,09	29,888	***C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	288	83,52
27	30,360	*C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	284	98,53	30,473	*C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	284	97,55
28	31,881	**C <sub>23</sub> H <sub>44</sub> N <sub>6</sub> OS	452	88,24	30,59	***C <sub>21</sub> H <sub>39</sub> NOS	353	85,4
29	32,467	*C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> S	148	67,03	31,114	*C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O	272	67,73
30	33,286	*C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	198	99,59	31,878	***C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	316	88,85
31	33,520	*C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>4</sub>	470	91,22	32,348	*C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>4</sub>	470	57
32	34,223	**C <sub>27</sub> H <sub>49</sub> NO <sub>9</sub>	531	97,25	32,463	*C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> N <sub>2</sub> PS	148	88,65
33	34,691	*C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	306	88,25	33,282	*C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	198	97,83
34	35,042	**C <sub>24</sub> H <sub>45</sub> NS	379	86,93	35,038	***C <sub>19</sub> H <sub>41</sub> N <sub>11</sub>	423	96,35
35	35,978	*C <sub>18</sub> H <sub>35</sub> NO	281	98,31	35,975	*C <sub>18</sub> H <sub>35</sub> NO	281	99,51
36	36,330	*C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O	288	82,67	36,092	*C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O	286	84,52
37	36,40	*C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O	286	87,94	36,245	*C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O	288	71,30
38	37,149	*C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	390	99,25	37,145	*C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	390	99,02
39	37,383	*C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	360	96,53	37,380	*C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	306	76,90
40	42,768	*C <sub>44</sub> H <sub>58</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	662	96,66	38,433	***C <sub>22</sub> H <sub>43</sub> NO	337	98,72
41	45,578	*NON	109		42,764	*C <sub>44</sub> H <sub>58</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	662	99,32
42		IDENTIFIE			45,574	*NON	109	
						IDENTIFIE		

Composés déjà identifiés dans la plante

\*\*Composés thermosensibles transformés

\*\*\*nouveaux composés formés après extraction de l'HE \* composés thermostables

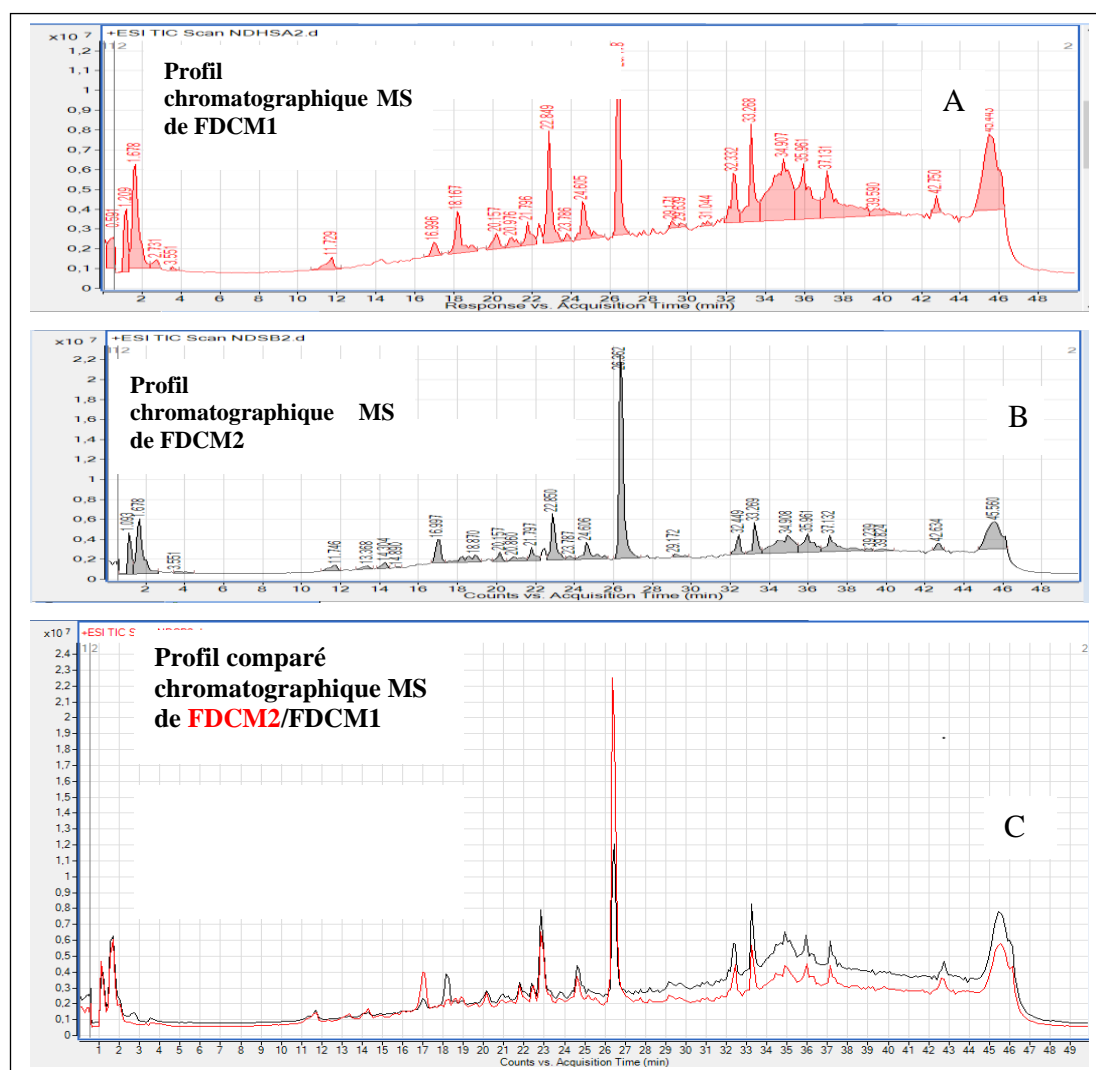
Il ressort de l'analyse du tableau 13 que la majorité (29/42 soit 69,05%) des molécules contenues dans les fractions à l'acétate d'éthyle issues des extraits hydroalcooliques de

feuilles de *Hyptis suaveolens* est thermostable. En effet, ces molécules sont présentes avant et après l'hydrodistillation. Cependant, un bon nombre (13/42 soit 31%) de ses composés sont soit extraits ou soit transformés au cours de l'extraction de l'huile essentielle (annexe 5).

Parmi les composés détectés dans les fractions à l'acétate d'éthyle, dix-sept (17) ont déjà été isolés des feuilles de *Hyptis suaveolens* (Tang *et al.*, 2018) (Suárez-Ortiz *et al.*, 2017) (Mukherjee *et al.*, 1984). Quatorze sur dix-sept (14/17) de ces composés connus sont des molécules thermostables (annexe 6).

### VI.1.2. Analyse comparative HPLC-MS/Q-TOF des fractions au dichlorométhane

Les figures 45A, 45B et 45C présentent respectivement, les profils HPLC-MS/Q-TOF des fractions au dichlorométhane issues des extraits hydroalcooliques des feuilles de *Hyptis suaveolens* avant et après extraction de l'huile essentielle et leur superposition.



**Figure 45:** Profils chromatographiques ESI/MS des composés majoritaires des fractions au

dichlorométhane avant (A) et après (B) l'extraction de l'HE

La figure 45 montre la présence de nombreux composés de polarités différentes avec des temps de rétention variant entre 1,093 min et 45,56 min. Les analyses réalisées dans les mêmes conditions que dans le cas des fractions à l'acétate d'éthyle ont permis de déterminer également les masses moléculaires et les formules brutes des composés révélés par la chromatographie (tableau 14).

**Tableau 14:** Composés détectés dans les fractions au dichlorométhane (F<sub>DCM1</sub>) et (F<sub>DCM2</sub>)

N° du PIC	Avant extraction de l'huile essentielle				Après extraction de l'huile essentielle			
	Temps de rétention (min)	Formule brute	Masse moléculaire (g/mol)	Score (%)	Temps de rétention (min)	Formule brute	Masse moléculaire (g/mol)	Score (%)
1	1,209	**C <sub>5</sub> H <sub>13</sub> NO	103	97,97	1,678	***C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>12</sub> S	380	84,77
2	1,678	**C <sub>9</sub> H <sub>19</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub> S	277	75,56	3,551	***C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>	129	95,6
3	2,731	**C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	230	94,21	11,746	*C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	178	85,96
4	3,551	**C <sub>12</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>7</sub>	293	99,64	13,368	*C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	122	82,14
5	11,729	*C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	178	87,16	14,304	***C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub>	346	96,58
6	16,996	**C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O	206	84,35	14,89	***C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> N <sub>12</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	504	86,08
7	18,167	**C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> N <sub>6</sub> O	208	94,18	16,997	***C <sub>15</sub> H <sub>23</sub> N <sub>11</sub> O <sub>3</sub>	405	93,53
8	20,157	*C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O	122	96,37	18,402	*C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	152	86,09
9	20,859	*C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>7</sub>	392	65,20	18,87	***C <sub>23</sub> H <sub>34</sub> O <sub>11</sub>	456	77,25
10	20,976	**C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> N <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	392	95,61	20,157	*C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	122	87,5
11	21,652	*C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	302	92,89	20,86	***C <sub>25</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	354	74,45
12	21,796	*C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	210	87,03	20,860	*C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>7</sub>	392	56,54
13	21,842	*C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	464	85,84	21,454	***C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	170	77,85
14	22,03	*C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	164	84,98	21,680	*C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	302	99,67
15	22,849	*C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	162	99,82	21,797	*C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	210	99,25
16	22,872	*C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	360	95,01	21,876	*C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	464	97,55
17	23,786	*C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> S	186	99,74	22,031	*C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	164	63,19
18	24,605	*C <sub>30</sub> H <sub>40</sub> O <sub>11</sub>	576	80,12	22,85	*C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	162	99,39
19	26,478	*C <sub>8</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	148	99,76	22,886	*C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> S	360	96,53
20	29,171	*C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>	308	95,18	24,606	*C <sub>30</sub> H <sub>40</sub> O <sub>11</sub>	576	98,39
21	29,45	*C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	152	75,46	26,362	*C <sub>8</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	148	83,98
22	29,639	*NON DEFINIE	109	ND	29,172	*C <sub>22</sub> H <sub>44</sub>	308	86,03
23	31,044	**C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	326	89,20	32,449	*C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>5</sub>	148	72,76
24	32,332	*C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> S	148	66,25	33,035	*C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O	272	71,41
25	33,034	*C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O	272	56,21	33,269	*C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	198	69,16
26	33,268	*C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	198	94,84	34,556	*C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	306	98,26
27	34,556	*C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	306	73,87	34,908	***C <sub>30</sub> H <sub>57</sub> NO <sub>3</sub> S	511	67,55
28	34,907	**C <sub>21</sub> H <sub>45</sub> N <sub>11</sub> O	467	96,9	35,961	*C <sub>18</sub> H <sub>35</sub> NO	281	90,54
29	35,961	*C <sub>18</sub> H <sub>35</sub> NO	281	98,68	37,132	*C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	390	98,82
30	37,131	*C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	390	99,47	39,239	***C <sub>26</sub> H <sub>41</sub> Cl	388	97,82
31	39,59	**C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> N <sub>7</sub> O	171	93,0	39,824	***C <sub>28</sub> H <sub>43</sub> N	393	81,05
32	40,643	**C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O	288	84,45	42,634	*C <sub>44</sub> H <sub>58</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	662	94,04
33	42,75	*C <sub>44</sub> H <sub>58</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	662	98,75	45,56	*(ND)	109	97,14

Composés déjà identifiés dans la plante

\*\*Composés thermosensibles transformés

\*\*\*nouveaux composés formés après extraction de l'HE \* composés thermostables



Il ressort également de l'analyse comparative des fractions au dichlorométhane issues des extraits hydroalcooliques des feuilles de *Hyptis suaveolens* avant et après extraction de l'HE que la majorité des molécules (23/34 soit 67,6 %) est thermostable. En outre, de nouveaux composés se forment après l'hydrodistillation (annexe 7).

Parmi les composés détectés dans les fractions au dichlorométhane, onze (11) ont déjà été isolés des feuilles de *Hyptis suaveolens* (Mukherjee *et al.*, 1984) (Tang *et al.*, 2018) (Ekow *et al.*, 2018). En outre, 10/11 soit 90,9 % de ces composés connus sont des molécules thermostables (annexe 8).

### Conclusion partielle

Il ressort de ces analyses comparatives que la majorité des molécules présentes dans les feuilles de *Hyptis suaveolens* est thermostable donc non affectée lors de l'extraction de l'huile essentielle. Cependant, il est à noter que certaines molécules thermosensibles subissent des transformations au cours de l'extraction de l'huile essentielle. Parmi les formules moléculaires proposées, nombreuses sont celles qui ne correspondent pas à des molécules déjà identifiées dans la plante. En revanche, dix-neuf (19) correspondent à des structures déjà isolées de la plante avec 8 composés propres aux fractions à l'acétate d'éthyle, 2 composés propres aux fractions au dichlorométhane et 9 composés communs aux deux types de fractions. Sur les 19 composés déjà connus dans les feuilles de la plante, 16 sont thermostables, 1 thermosensibles et 2 sont des molécules formées au cours de l'hydrodistillation.

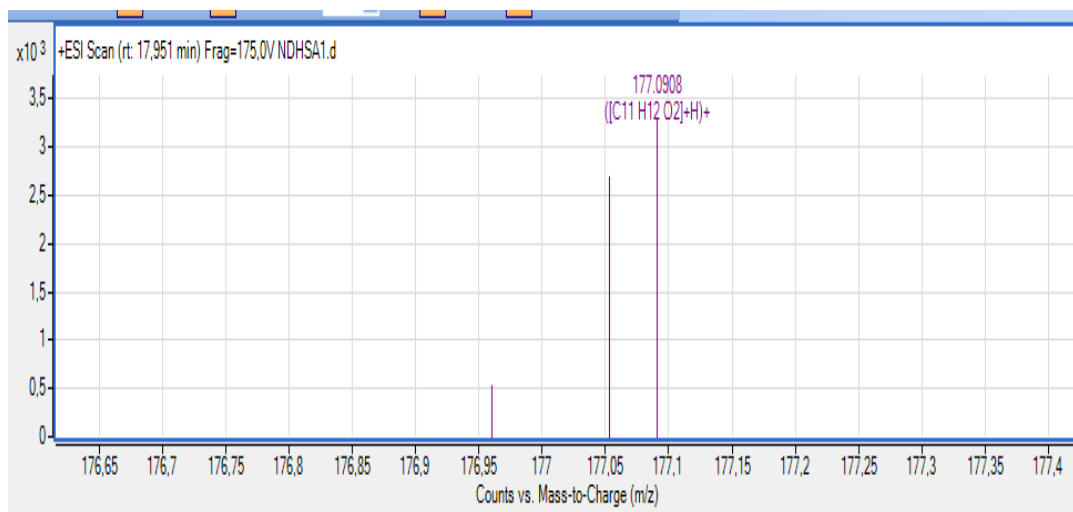
### VI.2. ELUCIDATION DES STRUCTURES DES COMPOSÉS DES DIFFÉRENTES FRACTIONS ISSUES DES EXTRAITS HYDROALCOOLIQUES

Il s'agit de retrouver les structures des composés à partir de l'interprétation des données fournies par les analyses HPLC-ESI-MS/Q-TOF des différents extraits et fractions des feuilles de la plante.

L'analyse HPLC-ESI-MS/Q-TOF des fractions à l'acétate d'éthyle et au dichlorométhane des feuilles de *Hyptis suaveolens* avant et après l'extraction de l'HE a permis d'obtenir les spectres de masse et de fragmentation ainsi que les spectres UV-visible et les formules brutes de plusieurs composés majeurs. Parmi les formules brutes obtenues, les bases de données NIST ou ChemSpider ou PubChem ont fourni des structures. Nous nous sommes intéressés aux structures correspondant à celles de certains composés déjà isolés de l'espèce *Hyptis suaveolens*.

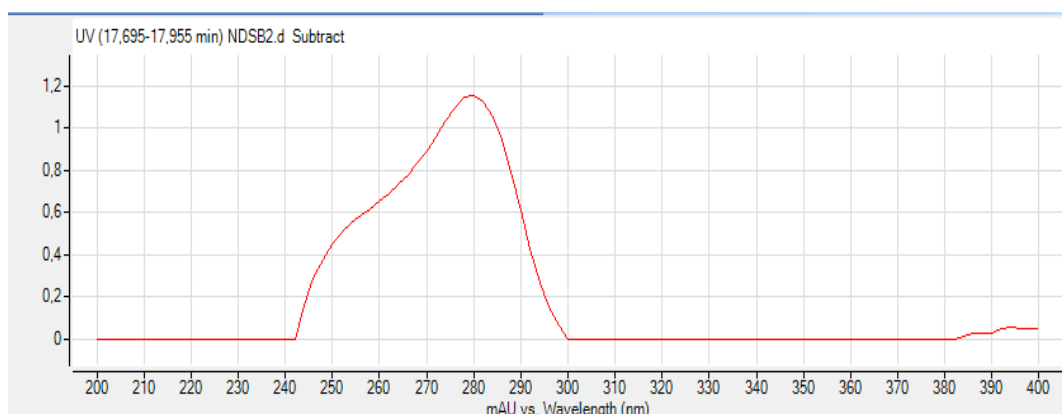
### Structure du composé 1

Le composé **1**, avec un temps de rétention égal à 17,95 min, correspond à l'ion moléculaire  $[M+H]^+$  à  $m/z$  : 177,091 (figure 46). Sa masse molaire moléculaire est donc de 176,084 g/mol et la formule brute la plus probable (ayant le meilleur score) est  $C_{11}H_{12}O_2$  (cal. 176,215)



**Figure 46:** Spectre de masse LC-ESI/MS du composé **1**

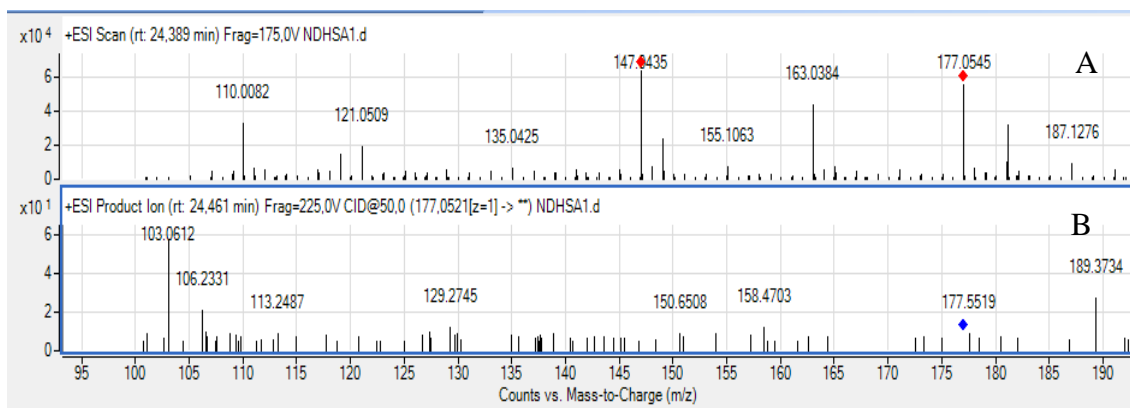
Le spectre UV de cette molécule présente une absorption maximale à 280 nm (figure 47) impliquant ainsi la présence de double liaisons conjuguées  $C=C-C=C$  et  $C=C-C=O$  dans sa structure (SCOTT, 1964b).



**Figure 47:** Spectre UV (LC-UV/DAD) du composé **1**

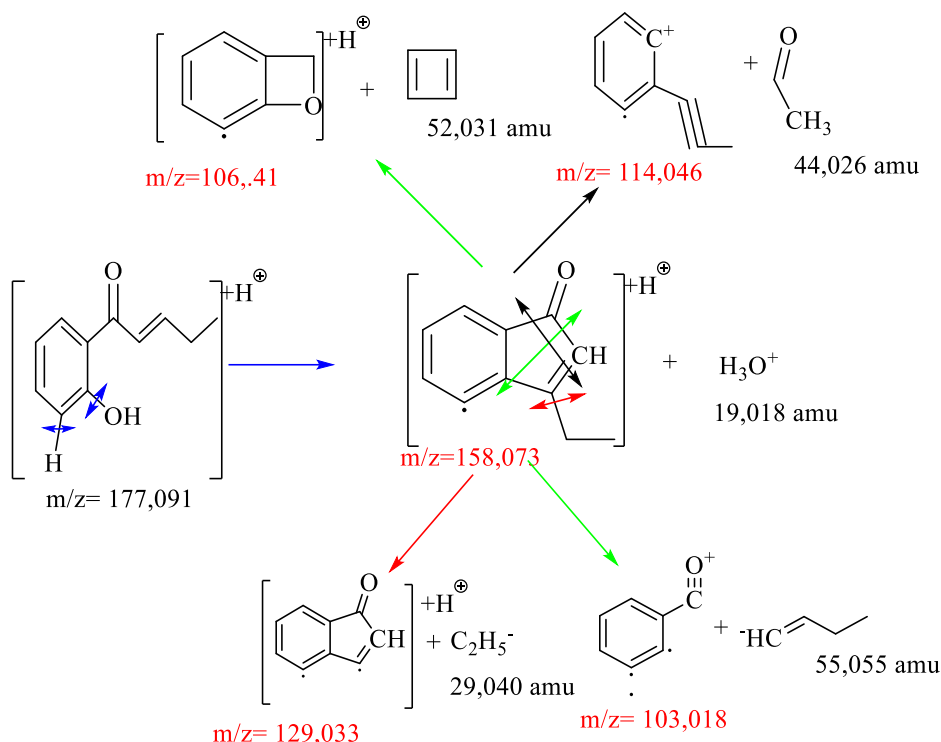
Le spectre de fragmentation du composé **1** (figure 48), donne le profil chromatographique SM (figure 48A) avec un ion moléculaire à  $m/z$  : 177 et les fragments

de dissociation induite par collision de l'ion moléculaire (figure 48B). L'analyse de ce spectre montre des ions fragments majeurs à  $m/z$  : 158 [M+H-19],  $m/z$  : 151[M+H-26],  $m/z$  : 129 [M+H-19-29],  $m/z$  : 113 [M+H-19-45],  $m/z$  : 106 [M+H-19-52],  $m/z$  : 103 [M+H-19-55] (pic de base).



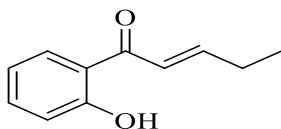
**Figure 48:** Spectre de fragmentation ESI/MS du composé 1

Parmi les structures proposées par les bases de données ChemSpider et PubChem, seul le (2E)-1-(2-hydroxyphényl)-pent-2-èn-1-one donne un mode de fragmentation similaire à celui du composé recherché (schéma 10).



**Schéma 10:** Proposition de fragmentation du composé **1**

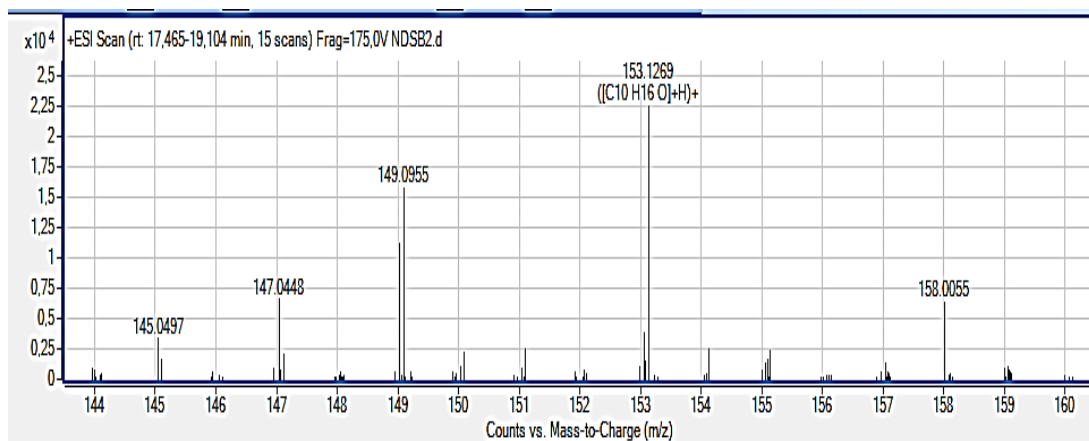
Le fragment de masse paire à  $m/z$  : 158 résulterait de la perte d'un ion hydronium ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ) sur le cycle benzénique suivie d'un réarrangement (cyclisation) en accord avec la règle de l'azote (la masse molaire de l'ion moléculaire étant impaire, la masse molaire du fragment issu de la collision devrait l'être également). Les fragments à  $m/z$  : 106 et  $m/z$  : 103 proviendraient du fragment précédent respectivement par élimination d'une molécule de cyclobutadiène et d'un groupe butényle à la suite des clivages en position  $\alpha$  et  $\gamma$  du groupement oxo sur le cycle en ( $\text{C}_5$ ). Quant au fragment à  $m/z$  : 129, il serait dû au départ du groupement éthyle en  $\alpha$  de la double liaison éthylénique sur le cycle en ( $\text{C}_5$ ). Le composé **1** serait donc le (2E)-1-(2-hydroxyphényl)-pent-2-èn-1-one et il appartient à la famille des composés phénoliques. Ce composé a déjà été identifié dans les feuilles de *Hyptis suaveolens* (Mukherjee *et al.*, 1984).



**Figure 49:** Structure du composé **1**

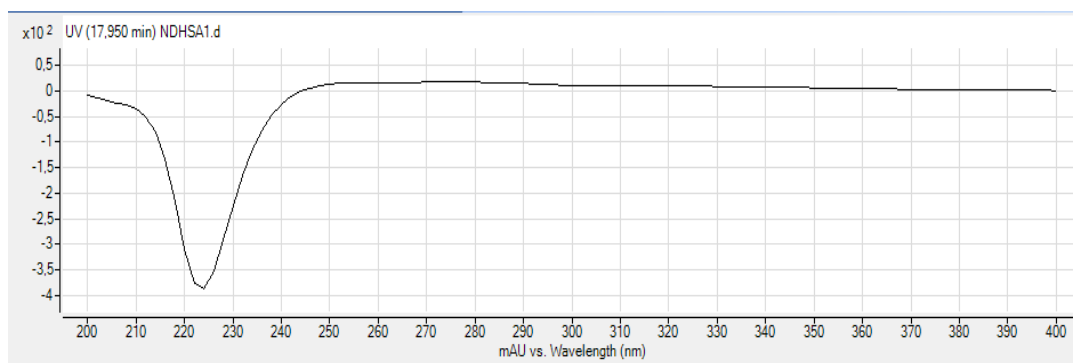
### Structure du composé 2

Le composé **2** qui apparait au temps de rétention égal à 18,40 min (figure 50) donne le pic de l'ion moléculaire  $[M+H]^+$  à  $m/z$  : **153,127** correspondant à la masse molaire moléculaire 152,120 g/mol. La formule brute la plus probable est  $C_{10}H_{16}O$  (cal. 152,24)



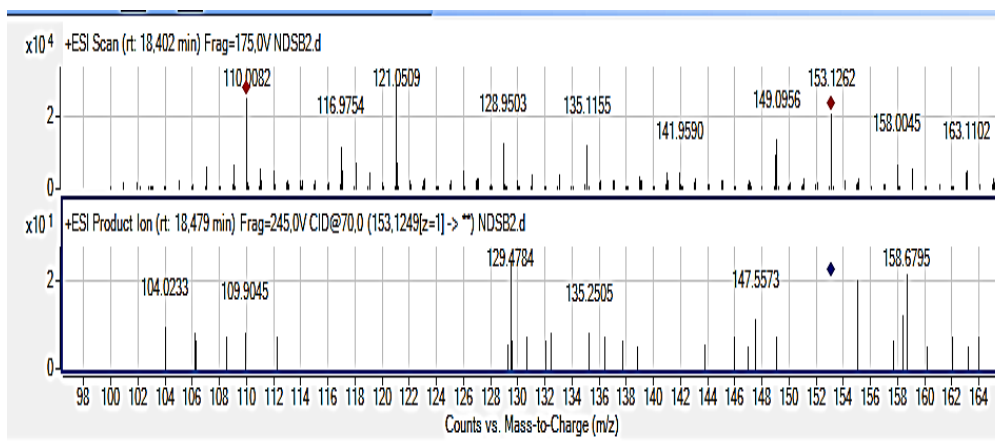
**Figure 50:** Spectre de masse LC-ESI/MS du composé **2**

Le spectre UV ne donne pas de bande d'absorption maximale au tour de 230 nm (figure 51) qui aurait indiqué la présence de liaisons conjuguées ( $C=C-C=C$ ) (Scott, 1964b).



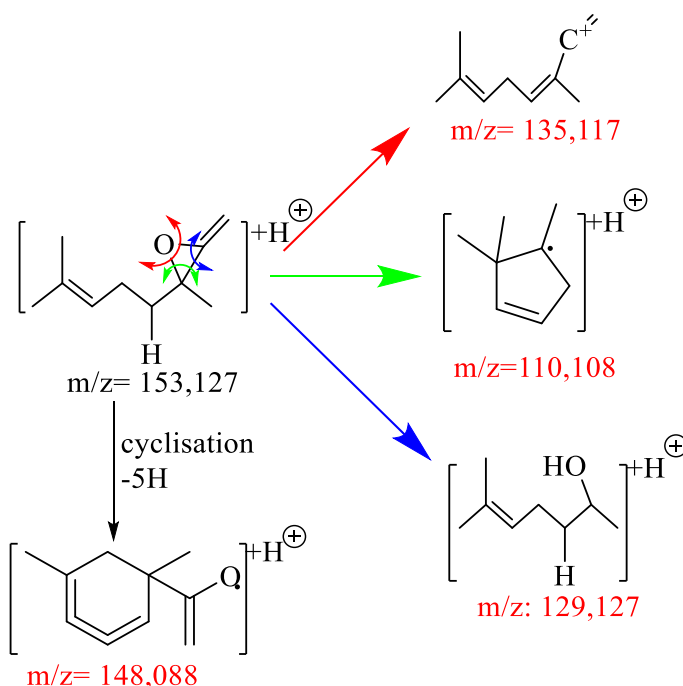
**Figure 51:** Spectre UV (LC-UV/DAD) du composé **2**

L'analyse du spectre de fragmentation du composé **2** (figure 52) montre la présence de fragments majeurs à  $m/z$  : 148  $[M+H-5H]$ ,  $m/z$  : 135  $[M+H-18]$ ,  $m/z$  : 129  $[M+H-24]$  (pic de base),  $m/z$  : 110  $[M+H-43]$ ,  $m/z$  : 104  $[M+H-49]$ .



**Figure 52:** Spectre de fragmentation ESI/MS du composé **2**

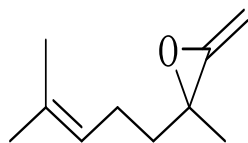
Parmi les structures proposées par les bases de données ChemSpider et PubChem, seul le 2-méthyl-3-méthylène-2-(4-méthylpent-3-èn-1-yl) oxirane donne un mode de fragmentation similaire à celui du composé recherché (schéma 11).



**Schéma 11:** Proposition de fragmentation du composé **2**

Le fragment à  $m/z$  : 148 (paire) serait dû à un réarrangement (cyclisation) avec perte d'atomes d'hydrogène. Le fragment à  $m/z$  : 110 avec une masse paire, proviendrait d'une cyclisation suivie de l'élimination d'un groupe éthoxy ( $\text{CH}_3\text{CO}^-$ ). Les fragments à  $m/z$  135 et 129 résulteraient respectivement de la perte d'une molécule d'eau et d'un groupement en C2. Le composé **2** est donc le 2-méthyl-3-méthylène-2-(4-méthylpent-3-èn-1-yl) oxirane.

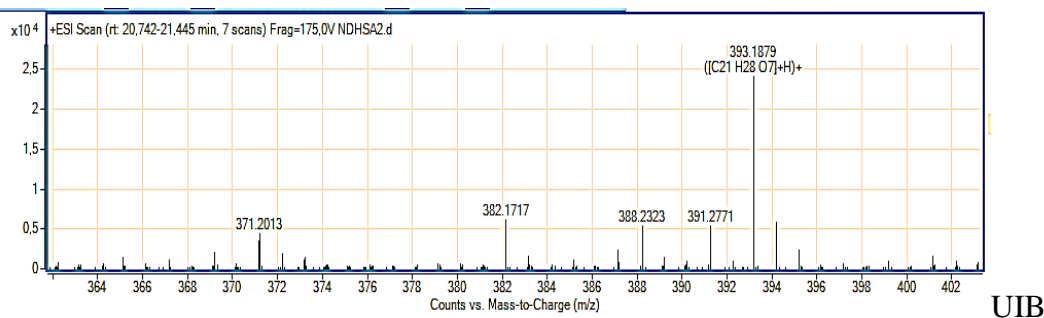
Cette molécule pourrait être classée dans la famille des terpènes. La structure de ce composé est en accord avec celle de la littérature (Joseph *et al.*, 2016)



**Figure 53:** Structure du composé 2

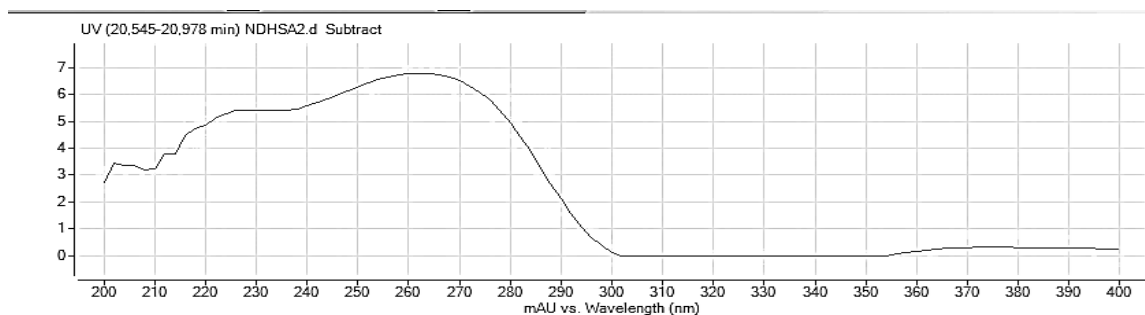
### Structure du composé 3

Le composé 3 qui apparaît au temps de rétention égal à 20,859 min correspond à l'ion moléculaire  $[M+H]^+$   $m/z$  : **393,1879** de masse molaire moléculaire 392,1835 g/mol. La formule brute la plus probable est  $C_{21}H_{28}O_7$  (cal. 392,45) (figure 54).



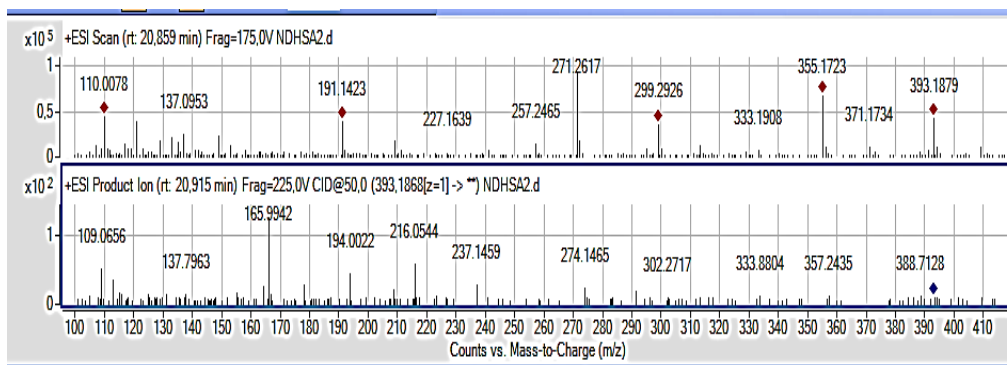
**Figure 54:** Spectre de masse LC-ESI/MS du composé 3

Le spectre UV de la molécule montre deux absorptions maximales à 228 nm et 265 nm (figure 55) impliquant ainsi la présence de double liaisons conjuguées ( $C=C-C=C$ ) dans sa structure (SCOTT, 1964b).



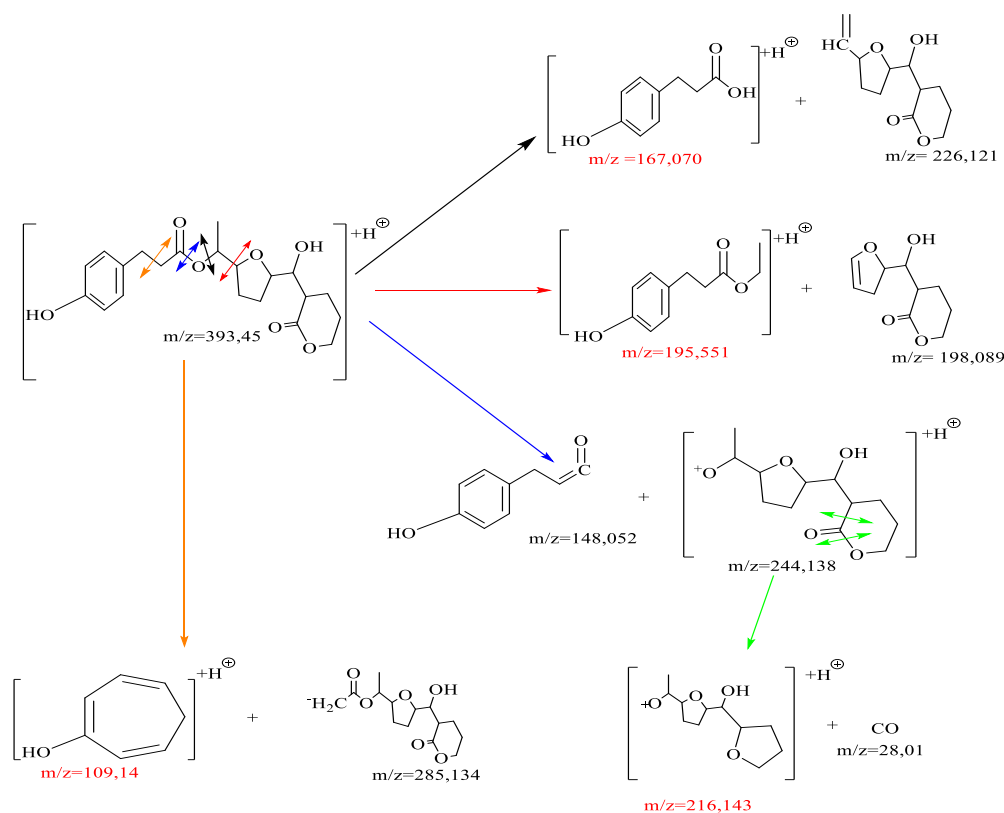
**Figure 55:** Spectre UV (LC-UV/DAD) du composé 3

L'analyse du spectre de fragmentation du composé **3** (figure 56) montre la présence de fragments caractéristiques à  $m/z$  : 216[M+H-177],  $m/z$  : 194[M+H-177-22],  $m/z$  : 166[M+H-177-22-28] (pic de base),  $m/z$  : 109[M+H-177-22-29-57].



**Figure 56:** Spectre de fragmentation ESI/MS du composé **3**

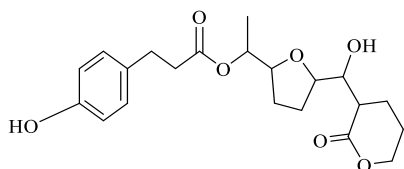
Parmi les structures proposées par les bases de données ChemSpider et PubChem, seul le propanoate de 1-(5-(hydroxy(2-oxotétrahydro-2*H*-pyran-3-yl) méthyl) tétrahydrofuran-2-yl)éthyl 3-(4-hydroxyphényl) donne un mode de fragmentation similaire à celui du composé recherché (schéma 12).



**Schéma 12:** Proposition de fragmentation du composé **3**



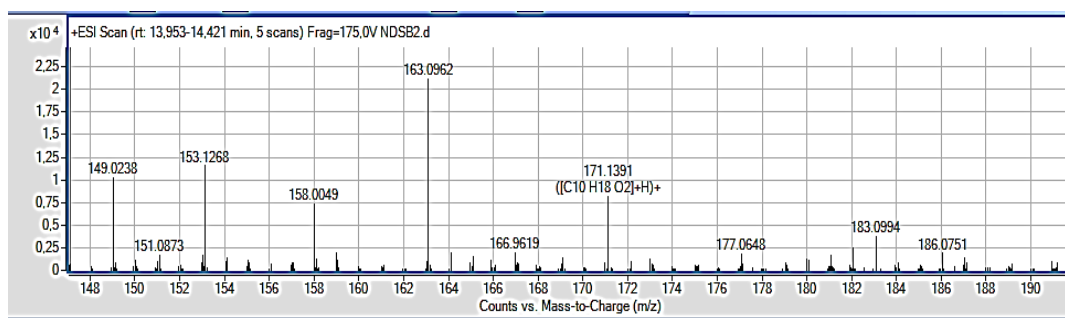
Le pic de base de masse moléculaire  $m/z$  :167 (166 sur le spectre à la suite d'un réarrangement selon la règle de l'azote), serait dû à un réarrangement type Mc Lafferty avec coupure de la liaison carbone-oxygène en  $\alpha$  (Fragmentation  $\alpha$ ). Le fragment  $m/z$  :195 (194 sur le spectre après un réarrangement, règle de l'azote), proviendrait de la scission de la liaison carbone-carbone en  $\alpha$  du groupement méthyle. Le fragment  $m/z$  :109 résulterait du clivage de la liaison carbone-carbone en  $\beta$  du cycle aromatique suivie de la formation de l'ion tropylium. Le composé **3** est donc le propanoate de 1-(5-(hydroxy(2-oxotétrahydro-2H-pyran-3-yl) méthyl) tétrahydrofuran-2-yl) éthyl-3-(4-hydroxyphényl) et il appartient à la famille des composés phénoliques. Il a également été identifié des feuilles de *Hyptis brevipes* de la même famille que la plante de l'étude (Suárez-Ortiz *et al.*, 2017)



**Figure 57:** Structure du composé **3**

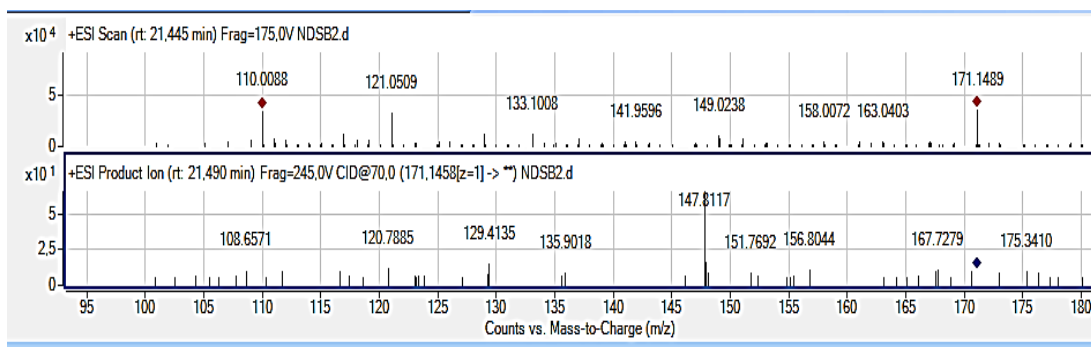
#### Structure du composé **4**

Le composé **4** avec un temps de rétention égal à 21,814 min correspond à l'ion moléculaire  $[M+H]^+$  à  $m/z$  : **171,139** de masse molaire moléculaire égale à 170,131g/mol. La formule brute la plus probable est  $C_{15}H_{10}O_7$  (cal. 170,120) (figure 58).



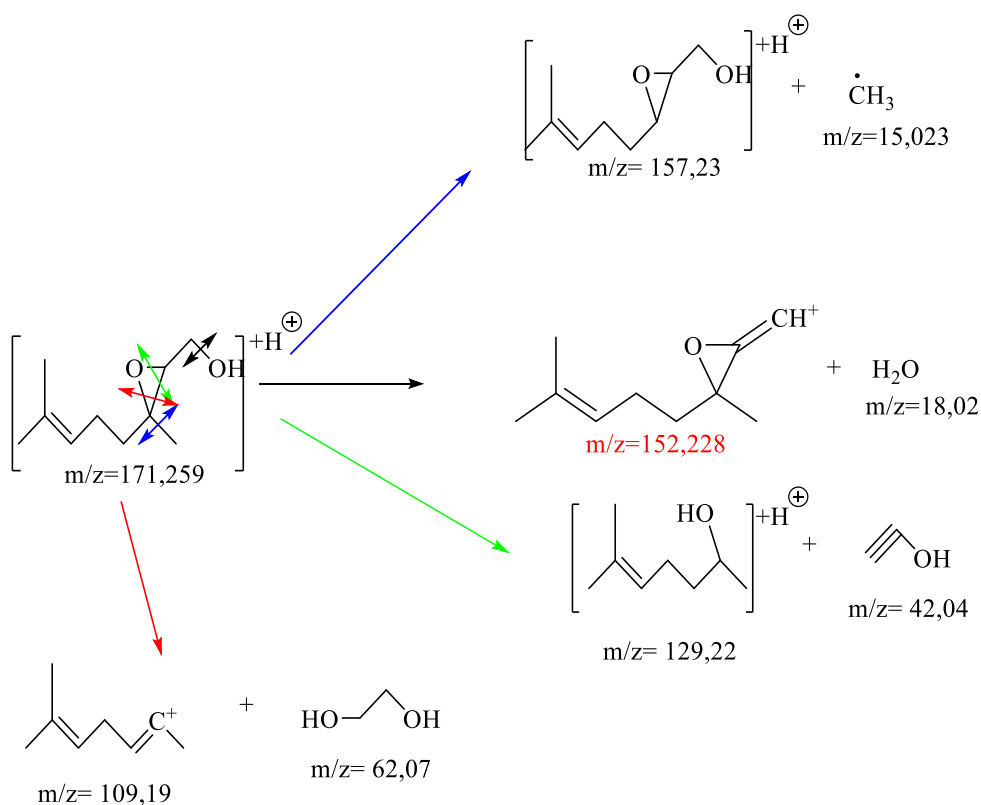
**Figure 58:** Spectre de masse LC-ESI/MS du composé **4**

L'analyse du spectre de fragmentation du composé **4** (figure 59) montre la présence de fragments majeurs à  $m/z$  :157 $[M+H-14]$ ,  $m/z$  : 152 $[M+H-19]$ ,  $m/z$  : 148 $[M+H-23]$  (pic de base),  $m/z$  : 129 $[M+H-42]$ ,  $m/z$  : 121 $[M+H-50]$ ,  $m/z$  : 109 $[M+H-62]$ .



**Figure 59:** Spectre de fragmentation ESI/MS du composé **4**

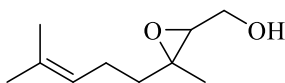
Parmi les structures proposées par les bases de données ChemSpider et PubChem, seul le (3-méthyl-3-(4-méthylpent-3-èn-1-yl)oxiran-2-yl)méthanol donne un mode de fragmentation similaire à celui du composé recherché (schéma 13).



**Schéma 13:** Proposition de fragmentation du composé **4**

Le fragment à  $m/z$  : 157 serait dû à la perte d'un groupement méthyle de l'époxyde par fragmentation  $\alpha$ . Le fragment à  $m/z$  : 152 proviendrait de la perte d'une molécule d'eau. Quant au fragment à  $m/z$  : 129, il résulterait d'une double coupure sur l'époxyde en position  $\gamma$  du groupement hydroxyle. De même, le fragment à  $m/z$  : 109 serait issu d'un double clivage de l'époxyde en  $\beta$  du groupement méthyle. Le composé **4** est donc le (3-méthyl-3-

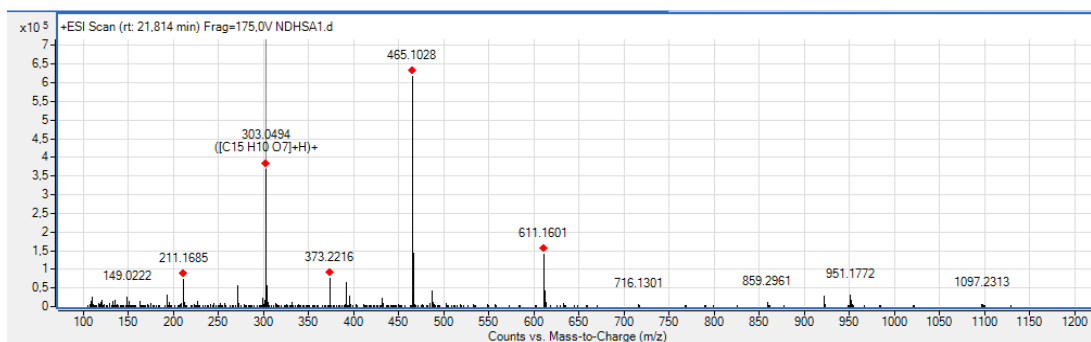
(4-méthylpent-3-èn-1-yl) oxiran-2-yl) méthanol et il est de la famille des stérols et terpènes. Il a déjà été isolé des feuilles de *Hyptis suaveolens* (Joseph *et al.*, 2016).



**Figure 60:** Structure du composé 4

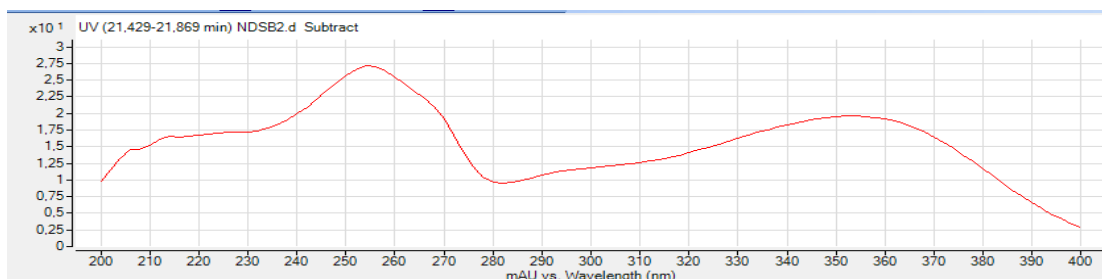
### Structure du composé 5

Le composé 5 avec un temps de rétention égal à 21,814 min correspond à l'ion moléculaire  $[M+H]^+$  à  $m/z$  : **303,0494**. Sa masse molaire moléculaire est de 302,0427g/mol. La formule brute la plus probable est  $C_{15}H_{10}O_7$  (cal. 302,238) (figure 61).



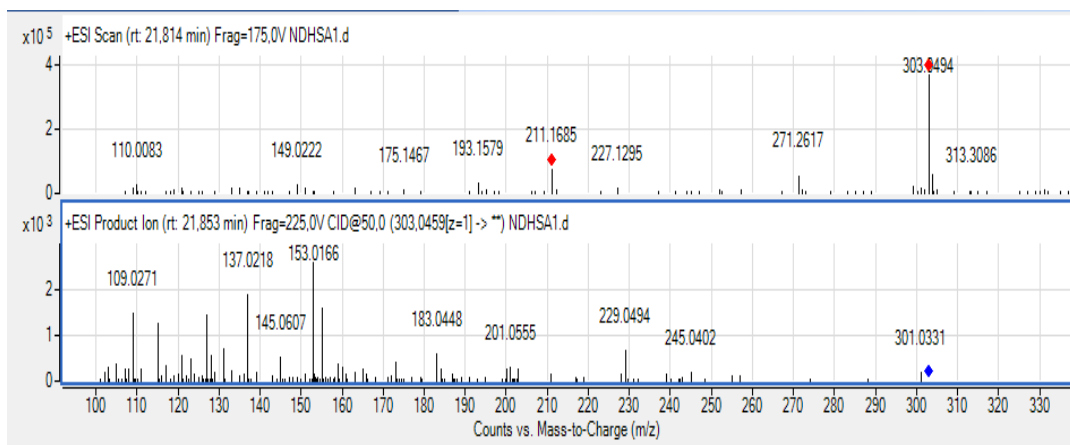
**Figure 61:** Spectre de masse LC-ESI/MS du composé 5

Le spectre UV de la molécule montre deux absorptions maximales à 255 nm et 355 nm (figure 62) qui indiquent la présence de double liaisons conjuguées ( $C=C-C=C$  et/ou  $C=C=O$ ) dans sa structure (Scott, 1964b) (Scott, 1964a).



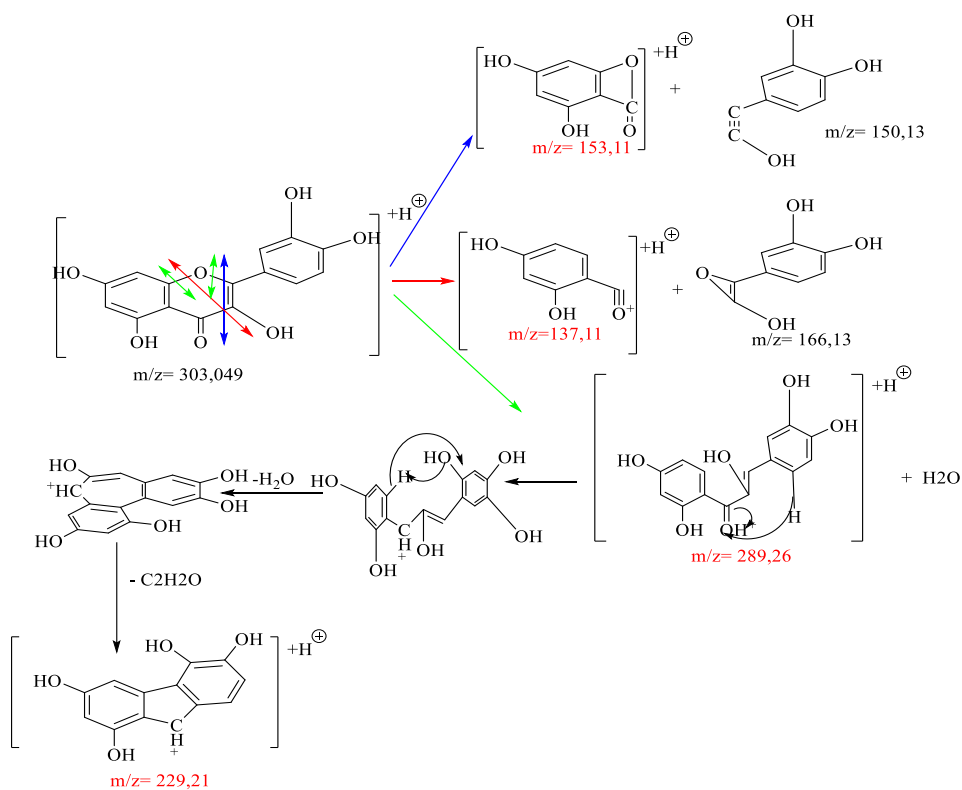
**Figure 62:** Spectre UV (LC-UV/DAD) du composé 5

L'analyse du spectre de fragmentation du composé 5 (figure 63) montre des fragments majeurs à  $m/z$  : 229  $[M+H-74]$ ,  $m/z$  : 153  $[M+H-150]$  (pic de base),  $m/z$  : 137  $[M+H-166]$ .



**Figure 63:** Spectre de fragmentation ESI/MS du composé **5**

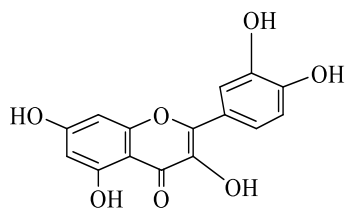
Parmi les structures proposées par les bases de données ChemSpider et PubChem, seul la quercétine donne un mode de fragmentation similaire à celui du composé recherché (schéma 14).



**Schéma 14:** Fragmentation du composé **5**

Le pic de base à  $m/z$  : 153 provient d'une double coupure sur le cycle C intermédiaire des liaisons carbone-oxygène et carbone-carbone respectivement en position  $\gamma$  et  $\beta$  de son groupement hydroxyle. Egalement, le fragment à  $m/z$  : 137 dérive d'une double scission sur le cycle C intermédiaire des liaisons carbone-oxygène et carbone-carbone respectivement en

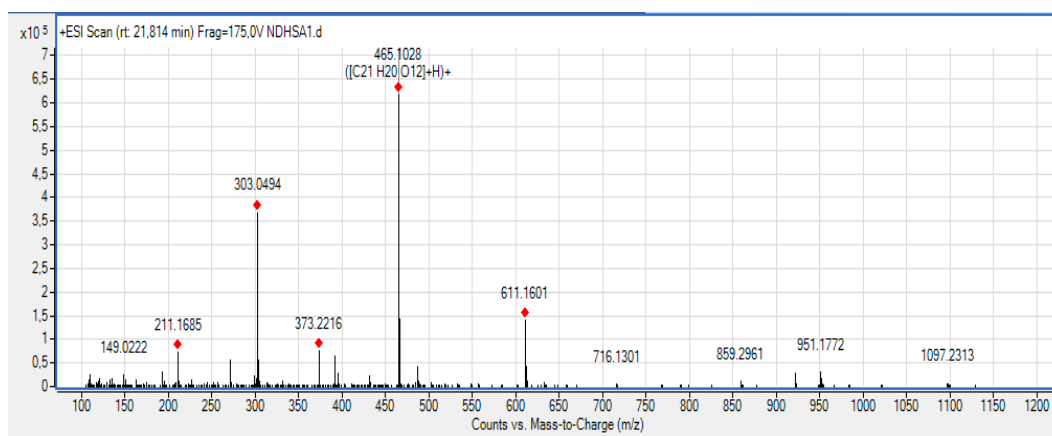
position  $\alpha$  du cycle aromatique et  $\beta$  de son groupement hydroxyle. Quant au fragment à  $m/z$  : 229, il est issu de l'élimination du groupement oxo, suivie d'une cyclisation après la perte d'une molécule d'eau et d'un groupement éthanone sur le cycle C intermédiaire (schéma 14). Le composé **5** est donc la quercétine et il est de la famille des flavonoïdes. Ce composé est effectivement présente dans les feuilles de *H. suaveolens* (Tang *et al.*, 2018).



**Figure 64:** Structure du composé **5** (quercétine)

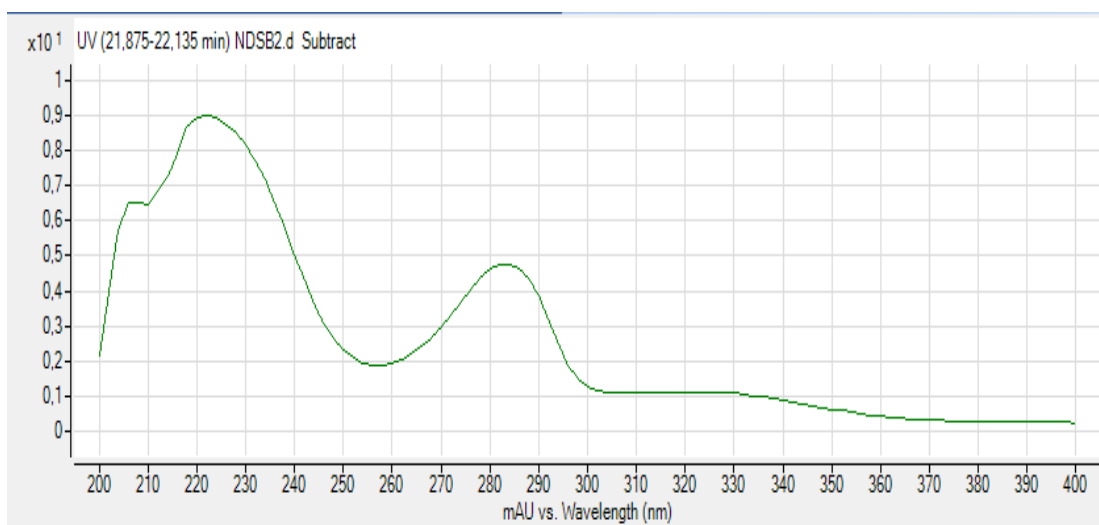
### Structure du composé **6**

Le composé **6** avec un temps de rétention égal à 21,814 min correspond à l'ion moléculaire  $[M+H]^+$  à  $m/z$  : **465,1028** de masse molaire moléculaire 464,0955g/mol. Ainsi, la formule brute la plus probable est  $C_{21}H_{20}O_{12}$  (cal. 464,3790) (figure 65).



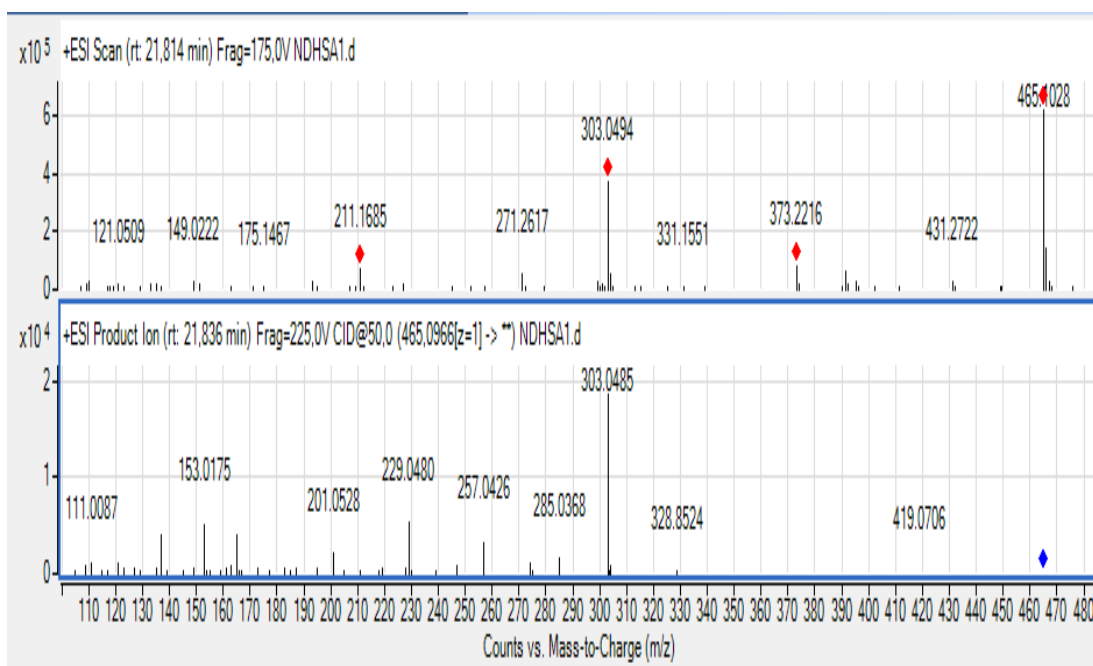
**Figure 65:** Spectre de masse LC-ESI/MS du composé **6**

Le spectre UV de la molécule montre deux absorptions maximales à 224 nm et 285 nm (figure 66) qui indiquent la présence de double liaisons conjuguées ( $C=C-C=C$  et/ou  $C=C=O$ ) dans sa structure (Scott, 1964b).



**Figure 66:** Spectre UV (LC-UV/DAD) du composé **6**

L'analyse du spectre de fragmentation du composé **6** (figure 67) indique la présence de fragments majeurs à  $m/z$  : 303[M+H-162] (pic de base),  $m/z$  : 285[M+H-162-18],  $m/z$  : 257[M+H-162-46],  $m/z$  : 229[M+H-162-74],  $m/z$  : 153[M+H-162-150].



**Figure 67:** Spectre de fragmentation ESI/MS du composé **6**

Parmi les structures proposées par les bases de données ChemSpider et PubChem, seul la quercétine 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside donne un mode de fragmentation similaire à celui du composé recherché (schéma 15).

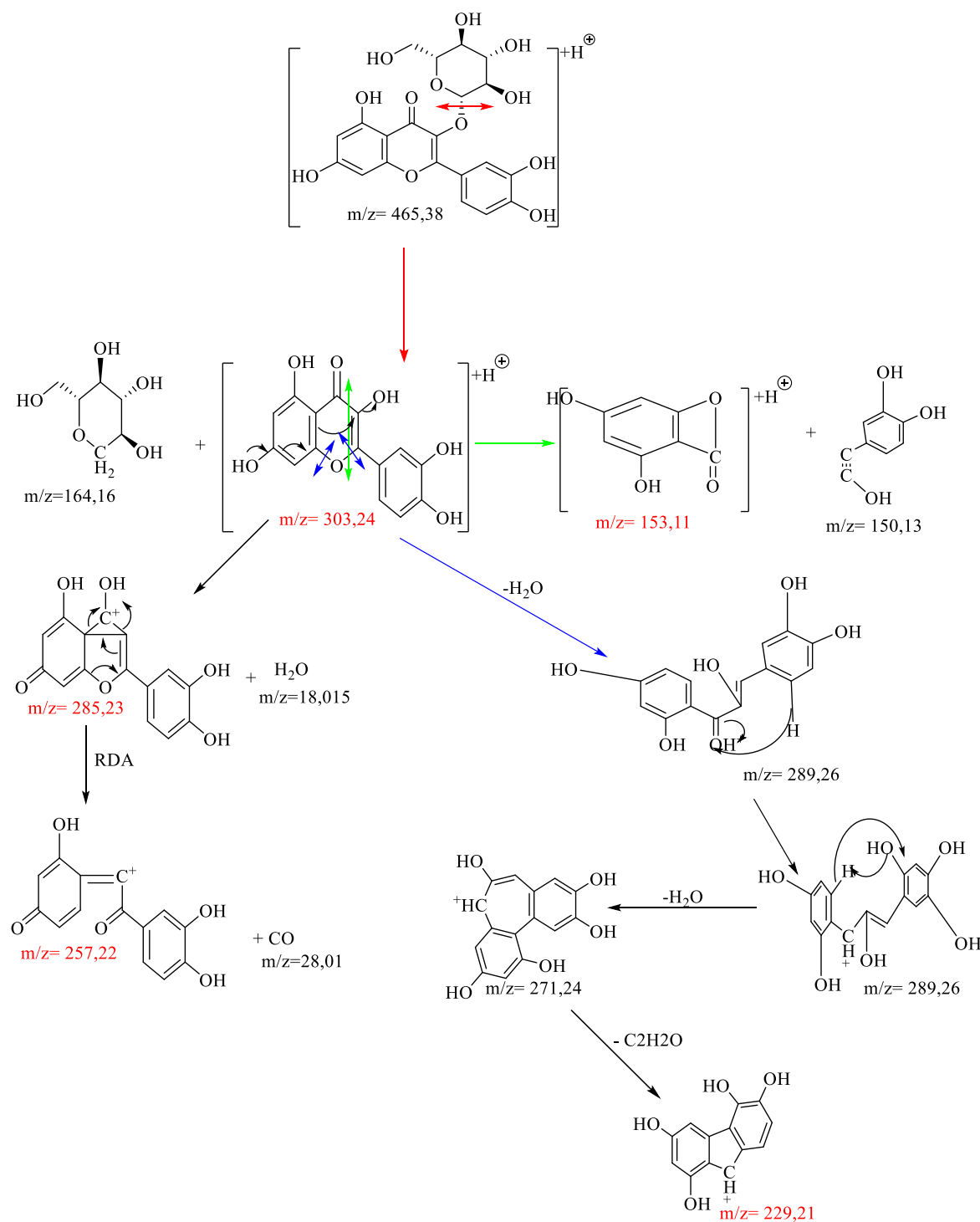
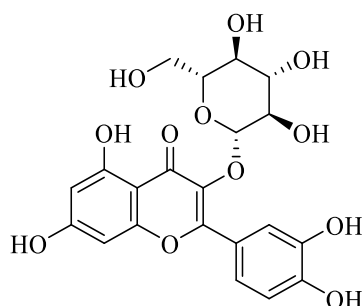


Schéma 15: Fragmentation du composé 6

Le pic de base à  $m/z : 303$  provient de la perte du groupement glucosyle. Le fragment à  $m/z : 153$  résulte du pic de base après une double coupure sur le cycle C intermédiaire des liaisons carbone-oxygène et carbone-carbone respectivement en  $\beta$  et en  $\alpha$  du groupement hydroxyle de ce cycle. De même, le fragment à  $m/z : 285$  est issu du pic de base par perte d'une molécule d'eau sur le cycle C intermédiaire. Quant au fragment à  $m/z : 257$ , il découle

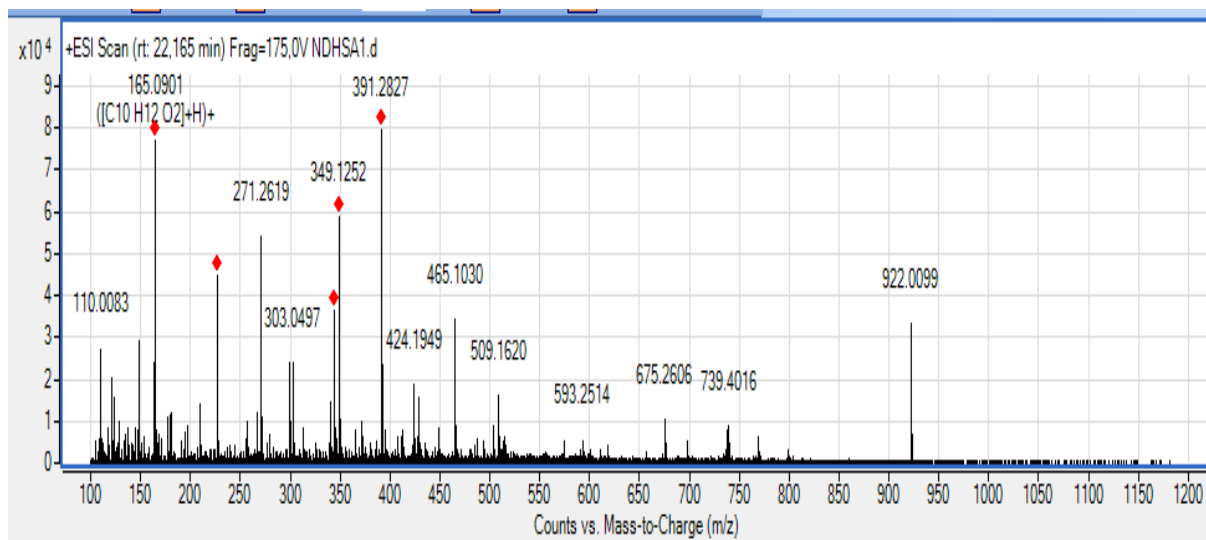
d'un mécanisme de Retro Diels-Alder (RDA) sur le cycle C intermédiaire avec perte du groupement carbonyle (schéma 15). Le composé **6** est donc la quercétine 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside de la famille des flavonoïdes. Il est présent dans la plante de l'étude (Ekow *et al.*, 2018)



**Figure 68:** Structure du composé **6**

#### Structure du composé **7**

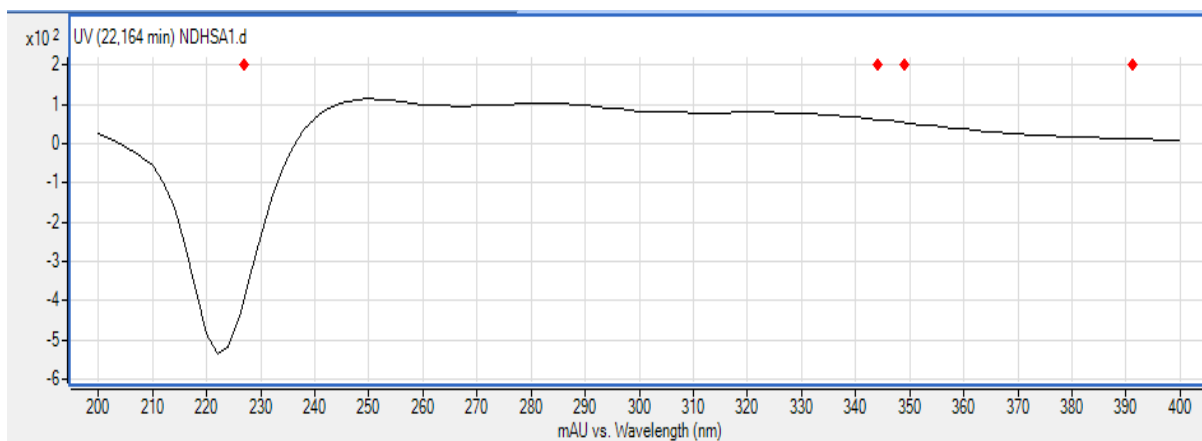
Le composé **7** avec un temps de rétention égal à 22,165 min correspond à l'ion moléculaire  $[M+H]^+$  à  $m/z$  : **165,0901** de masse molaire moléculaire 164,0837g/mol. La formule brute la plus probable est  $C_{10}H_{12}O_2$ (cal. 164,20) (figure 69).



**Figure 69:** Spectre de masse LC-ESI/MS du composé **7**

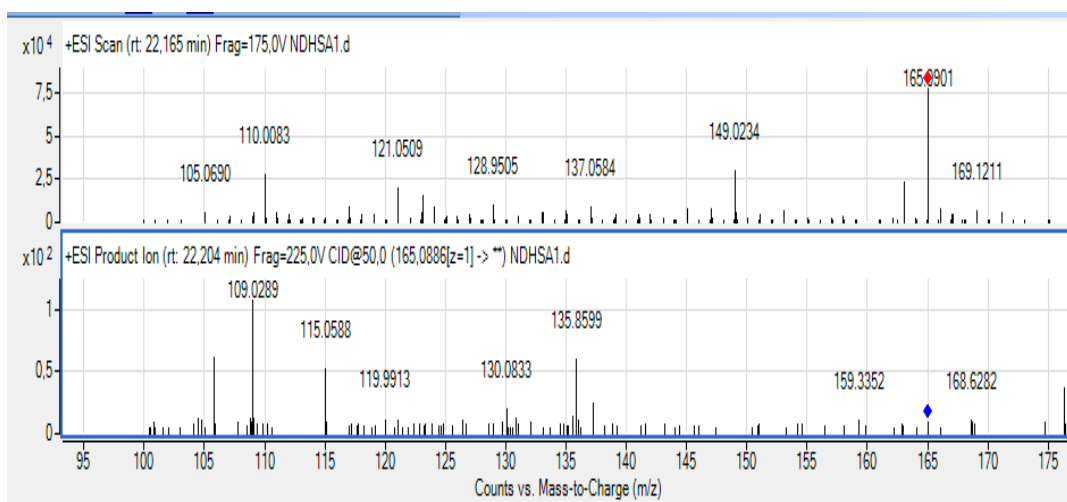
Le spectre UV de la molécule montre une absorption maximale à 250 nm (figure 70) impliquant la présence uniquement de double liaisons conjuguées ( $C=C-C=C$  et/ou  $C=C-C=O$ ) dans sa structure (Scott, 1964b) (Scott, 1964a).





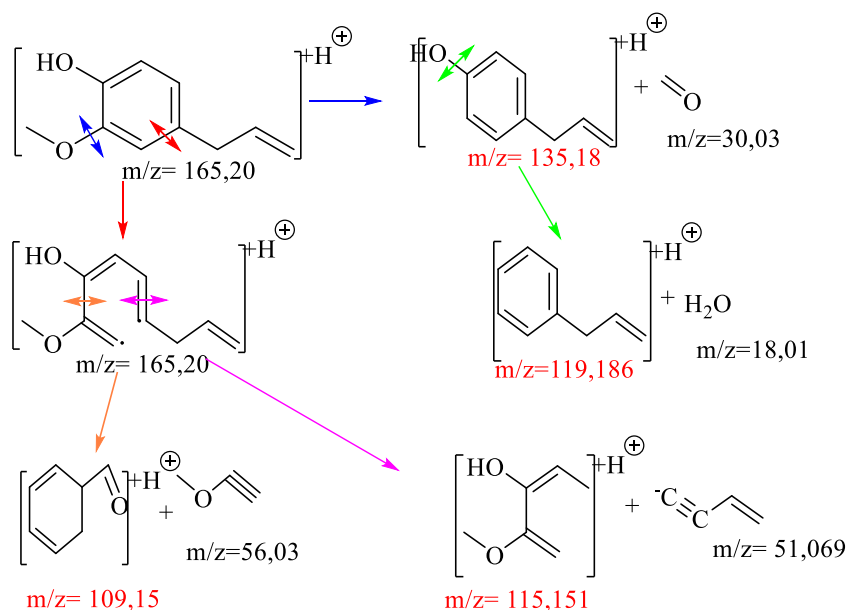
**Figure 70:** Spectre UV (LC-UV/DAD) du composé 7

L'analyse du spectre de fragmentation du composé 7 (figure 71) indique la présence de fragments majeurs à  $m/z$  : 136 [M+H-29],  $m/z$  : 120 [M+H-45],  $m/z$  : 115 [M+H-50],  $m/z$  : 109 [M+H-56] (pic de base).



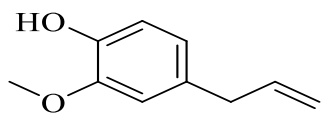
**Figure 71:** Spectre de fragmentation ESI/MS du composé 7

Parmi les structures proposées par les bases de données ChemSpider et PubChem, seul le 4-allyl-2-méthoxyphénol donne un mode de fragmentation similaire à celui du composé recherché (schéma 16).



**Schéma 16:** Proposition de fragmentation du composé **7**

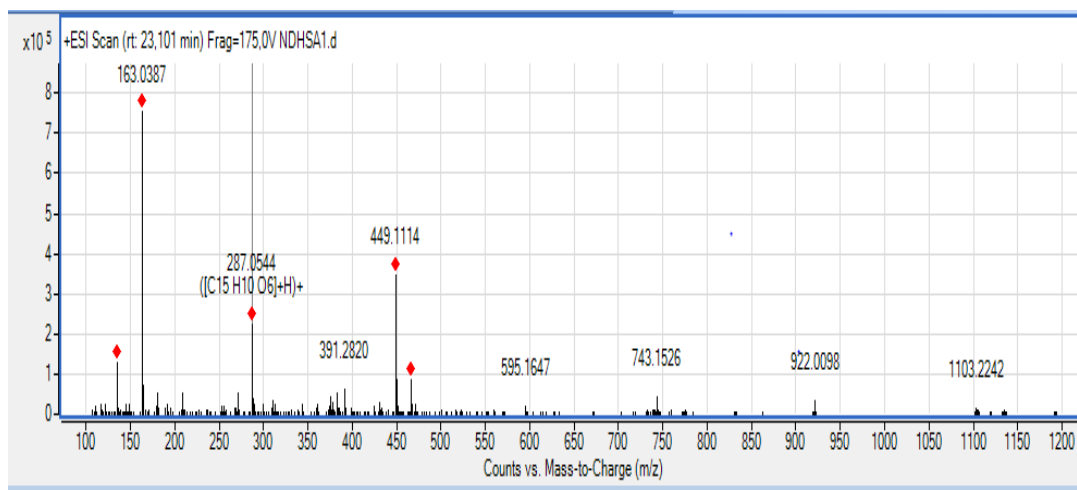
Le fragment à  $m/z$  : 135 proviendrait de la perte du groupement méthoxyle sous forme formaldéhyde. Le fragment à  $m/z$  : 119 serait issu du précédent après une déshydratation. Le pic majoritaire à  $m/z$  : 109 résulterait d'un double clivage sur le cycle aromatique des liaisons simples carbone-carbone en position  $\beta$  et  $\gamma$  du groupement méthoxyle. Similairement, le fragment à  $m/z$  : 115 serait dû à une double scission sur le cycle des liaisons simple et double en  $\alpha$  du groupement propényle (schéma 16). Le composé **7** est donc le 4-allyl-2-méthoxyphénol de la famille des composés phénoliques. Il a été identifié dans l'huile essentielle des feuilles de *H. suaveolens* récoltées en Tanzanie (Malele *et al.*, 2003).



**Figure 72:** Structure du composé **7**

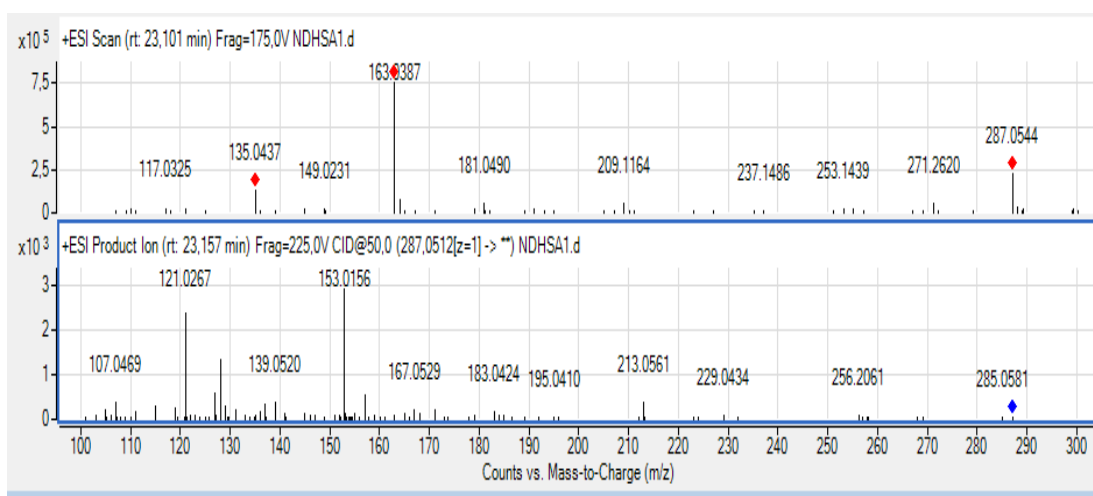
### Structure du composé **8**

Le composé **8** avec un temps de rétention égal à 23,101 min correspond à l'ion moléculaire  $[M+H]^+$  à  $m/z$  : **287,0544** de masse molaire moléculaire 286,0477g/mol. La formule brute la plus probable est  $C_{15}H_{10}O_6$  (cal. 286,46) (figure 73).



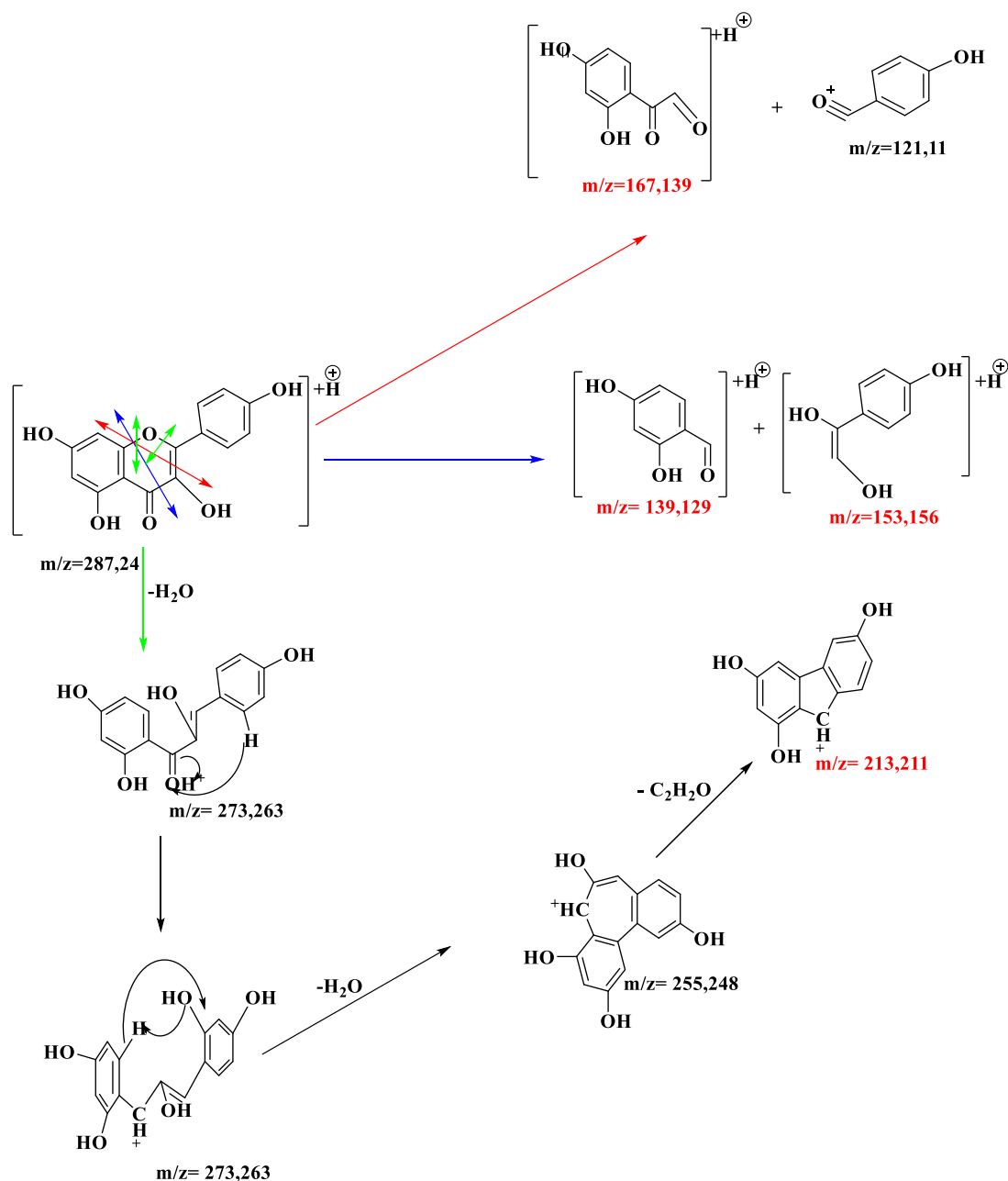
**Figure 73:** Spectre de masse LC-ESI/MS du composé **8**

L'analyse du spectre de fragmentation du composé **8** (figure 74) indique la présence des fragments majeurs à  $m/z$  : 213[M+H-74],  $m/z$  : 167[M+H-120],  $m/z$  : 153[M+H-134] (pic de base),  $m/z$  : 139[M+H-148],  $m/z$  : 121[M+H-166].

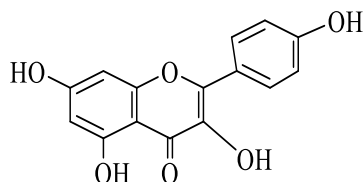


**Figure 74:** Spectre de fragmentation ESI/MS du composé **8**

Parmi les structures proposées par les bases de données ChemSpider et PubChem, seul le Kaempférol donne un mode de fragmentation similaire à celui du composé recherché (schéma 17).

Schéma 17: Fragmentation du composé **8**

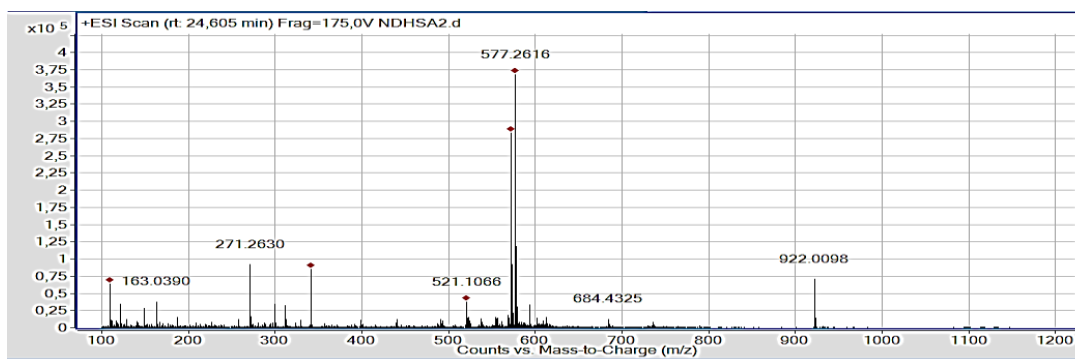
Le pic de base à m/z : 153 et le fragment à m/z : 139, proviendraient de la double coupure sur le cycle intermédiaire des liaisons carbone-carbone et carbone-oxygène respectivement en  $\beta$  et en  $\alpha$  du cycle adjacent au cycle intermédiaire (schéma 17). Le composé **8** est donc le Kaempférol qui est un flavonoïde. Il a été identifié dans les feuilles de la plante étudiée (Ekow *et al.*, 2018).



**Figure 75:** Structure du composé **8**

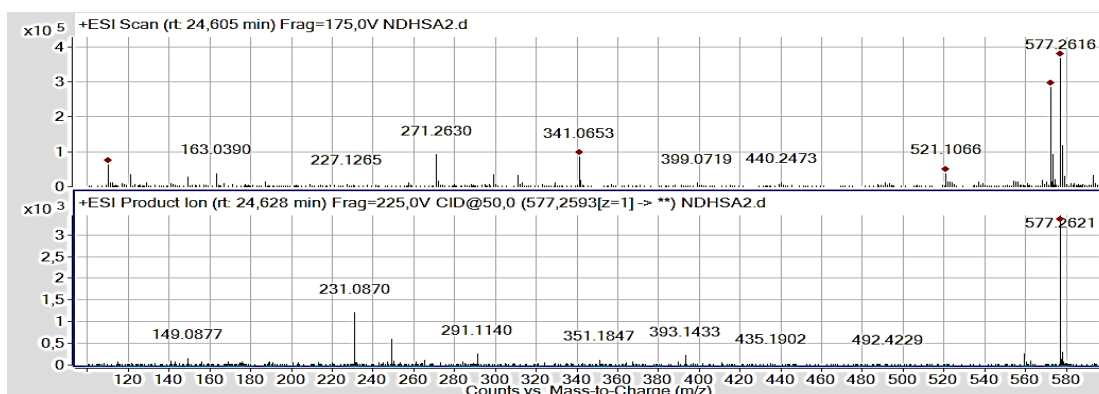
### Structure du composé **9**

Le composé **9** avec un temps de rétention égal à 24,605 min correspond à l'ion moléculaire  $[M+H]^+$  à  $m/z$  : **577,262** de masse molaire moléculaire 576,259 g/mol. La formule brute la plus probable est  $C_{16}H_{12}O_6$  (cal. 576,859) (figure 76).



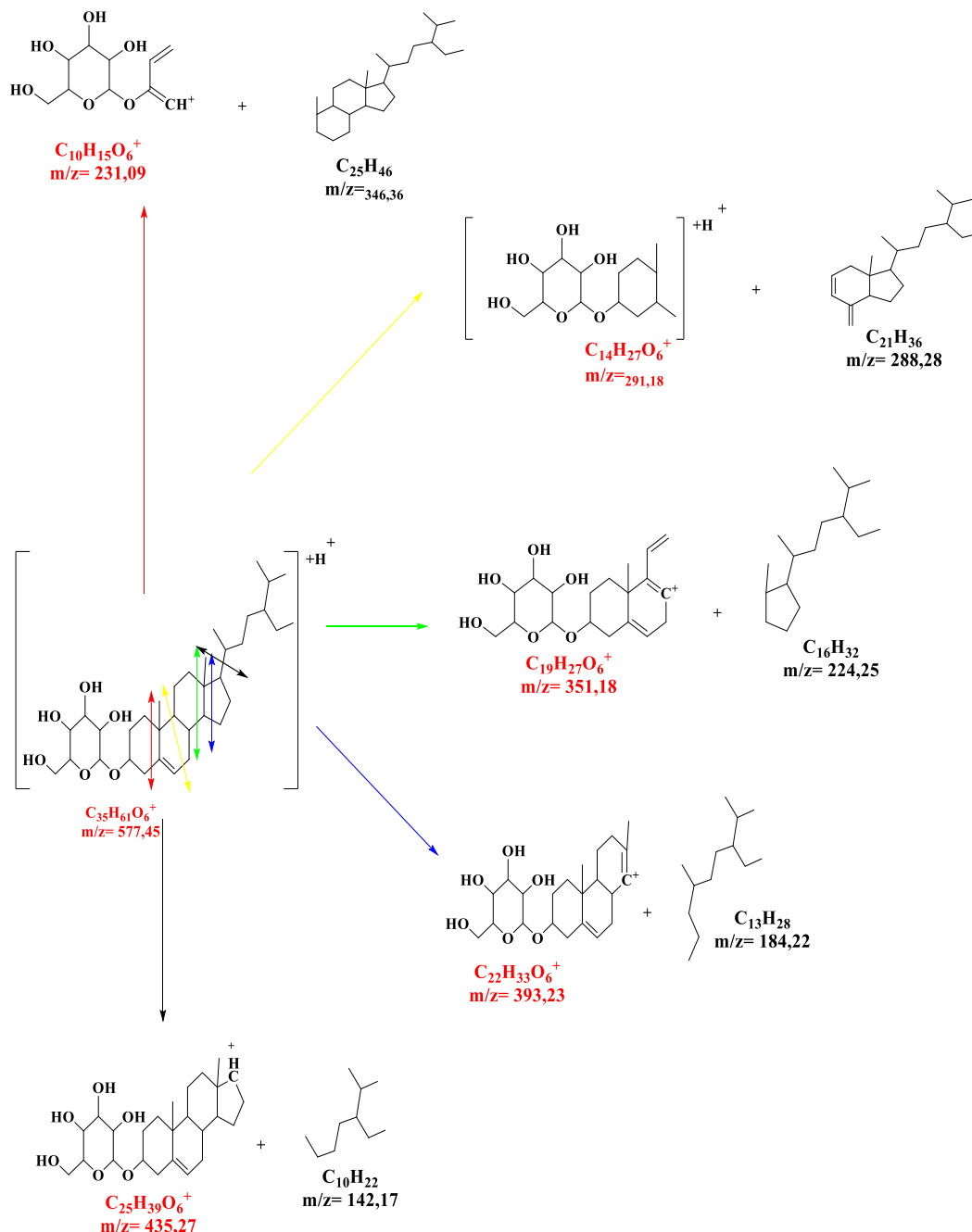
**Figure 76:** Spectre de masse LC-ESI/MS du composé **9**

L'analyse du spectre de fragmentation du composé **9** (figure 77) indique la présence de fragments majeurs à  $m/z$  : 577 $[M+H]$  (pic de base),  $m/z$  : 492 $[M+H-85]$ ,  $m/z$  : 393 $[M+H-184]$ ,  $m/z$  : 351 $[M+H-226]$ ,  $m/z$  : 291 $[M+H-286]$ ,  $m/z$  : 231 $[M+H-346]$ ,  $m/z$  : 149 $[M+H-428]$ .



**Figure 77:** Spectre de fragmentation ESI/MS du composé **9**

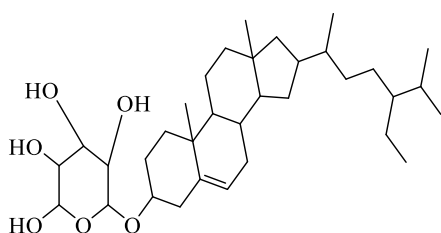
Parmi les structures proposées par les bases de données ChemSpider et PubChem, seul le  $\beta$ -sitostérol glucose donne un mode de fragmentation similaire à celui du composé recherché (schéma 18).



**Schéma 18:** Proposition de fragmentation du composé **9**

Le pic moléculaire est le pic de base, ce qui dénote de la stabilité de la molécule. Le fragment à  $m/z$  : 231 proviendrait de la double coupure sur le cycle contigu au groupement glucosyle des deux liaisons carbone-carbone en  $\alpha$  du cycle suivant. Le fragment à  $m/z$  : 291

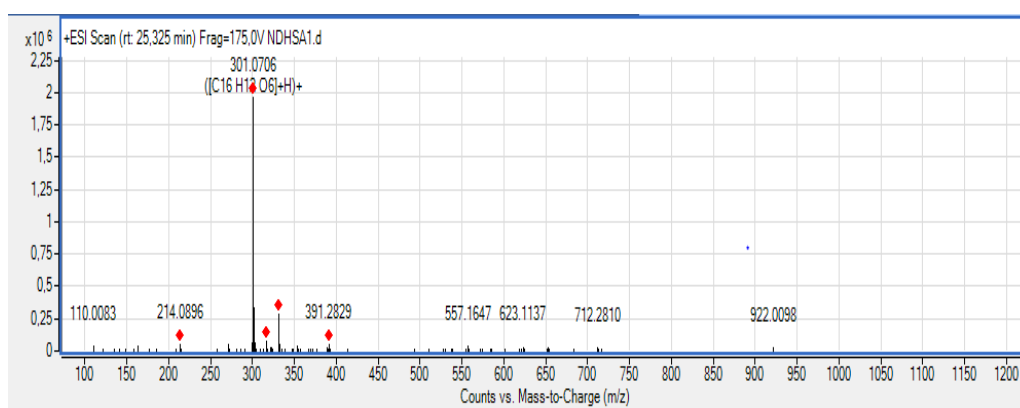
résulterait aussi d'une double scission sur le cycle insaturé des liaisons carbone-carbone entre le cycle précédent et le cycle suivant et celle entre l'insaturation et le groupe (CH<sub>2</sub>). Le fragment à m/z : 351 serait dû à un autre double clivage sur le troisième cycle en C<sub>6</sub> des liaisons carbone-carbone contigües au cycle en (C<sub>5</sub>). Le fragment à m/z : 393 serait issu de la coupure des liaisons carbone-carbone sur le cycle en (C<sub>5</sub>) en α du cycle adjacent. Quant au fragment à m/z : 435, il découlerait de la perte du substituant 1-méthyl,4-isopropylhexane (C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>) (schéma 18). Le composé **9** est donc le β-sitostérol glucose qui appartient à la classe des stérols et terpènes. Il est effectivement présent dans la plante de l'étude (Ziegler *et al.*, 2002).



**Figure 78:** Structure du composé **9**

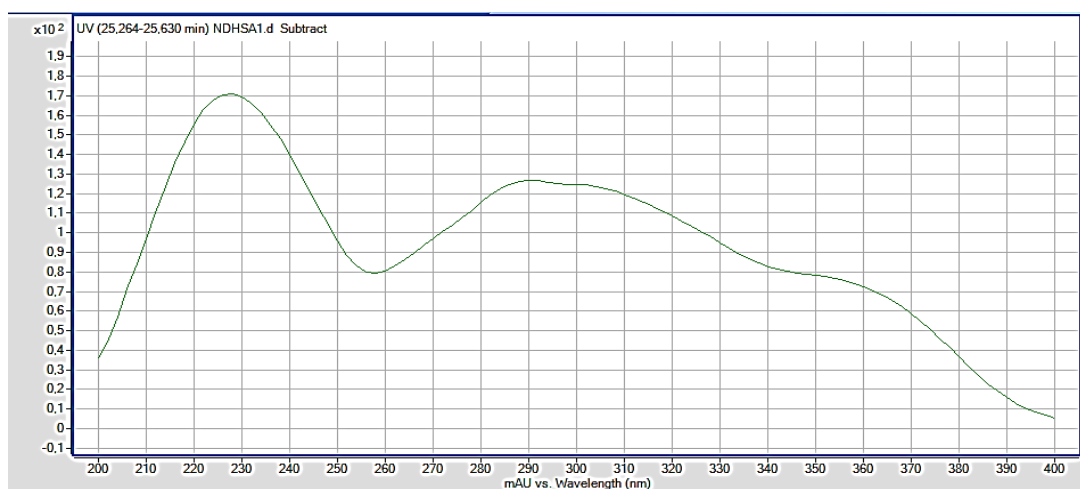
#### Structure du composé **10**

Le composé **10** avec un temps de rétention égal à 25,325 min correspond à l'ion moléculaire [M+H]<sup>+</sup> à m/z : **301,0706** de masse molaire moléculaire égale à 300,0634 g/mol. La formule brute la plus probable est C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> (cal. 300,2660) (figure 79).



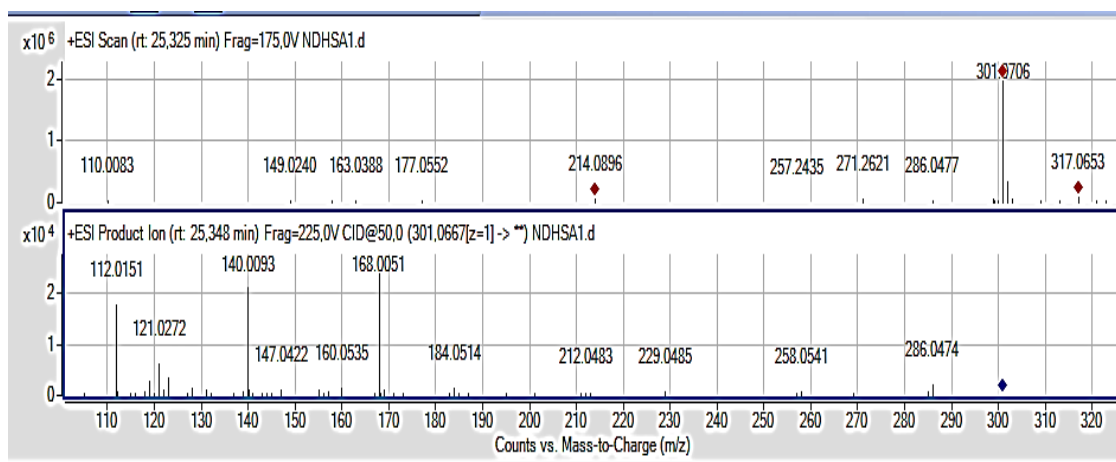
**Figure 79:** Spectre de masse LC-ESI/MS du composé **10**

Le spectre UV de la molécule indique trois absorptions maximales à 228 nm, 290 nm et 350 nm (figure 80) qui indiquent la présence de double liaisons conjuguées (C=C-C=C et/ou C=C=O) dans sa structure (Scott, 1964b) (Scott, 1964a).



**Figure 80:** Spectre UV (LC-UV/DAD) du composé **10**

L'analyse du spectre de fragmentation du composé **10** (figure 81) montre la présence de fragments majeurs à  $m/z$  : 286[M+H-15],  $m/z$  : 168[M+H-15-118] (pic de base),  $m/z$  : 140[M+H-15-118-28],  $m/z$  : 121[M+H-180],  $m/z$  : 112[M+H-189].



**Figure 81:** Spectre de fragmentation ESI/MS du composé **10**

Parmi les structures proposées par les bases de données ChemSpider et PubChem, seul le méthyle Wogonine donne un mode de fragmentation similaire à celui du composé recherché (schéma 19).



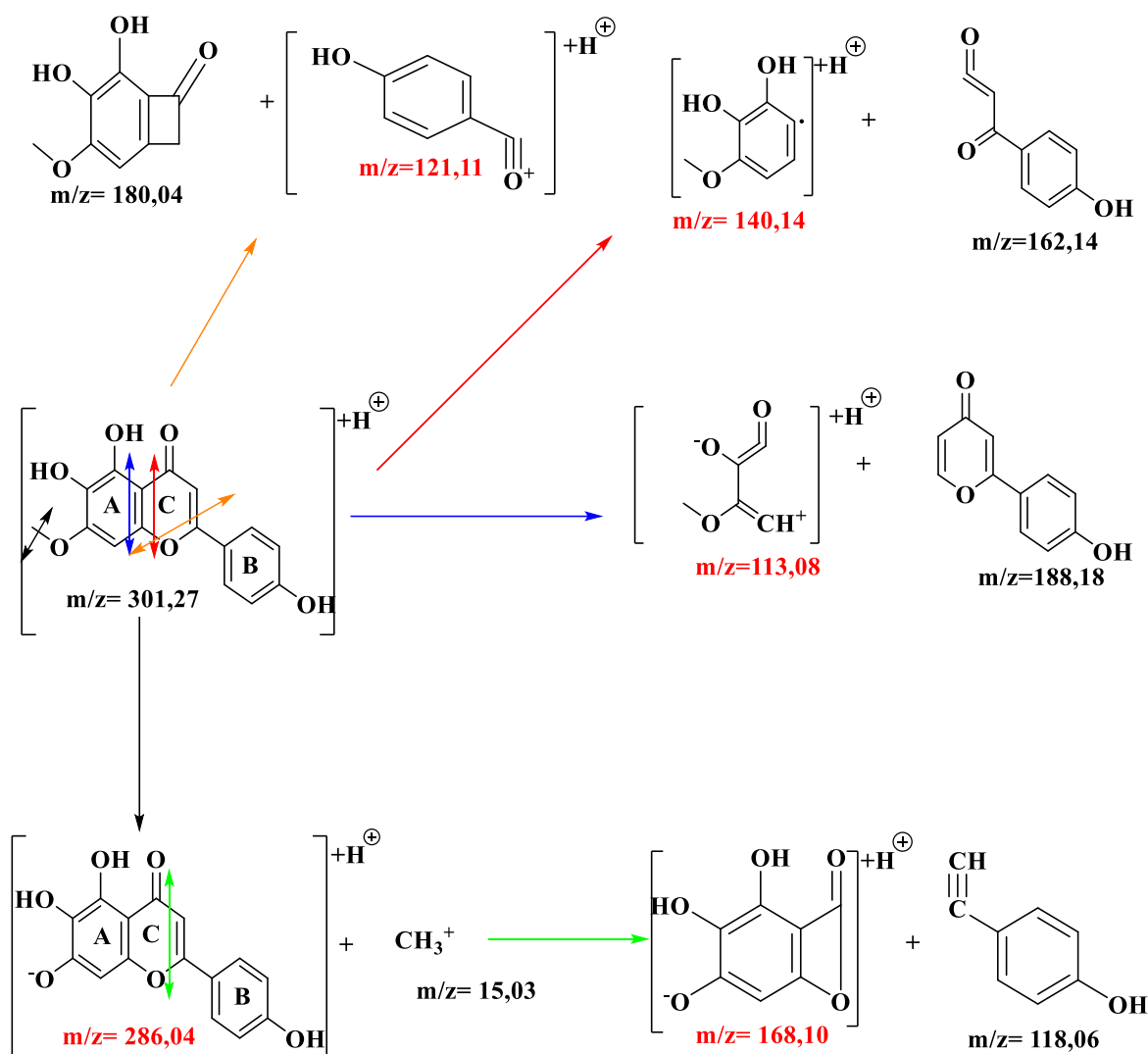
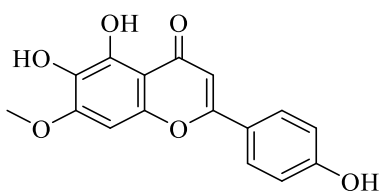


Schéma 19: Fragmentation du composé 10

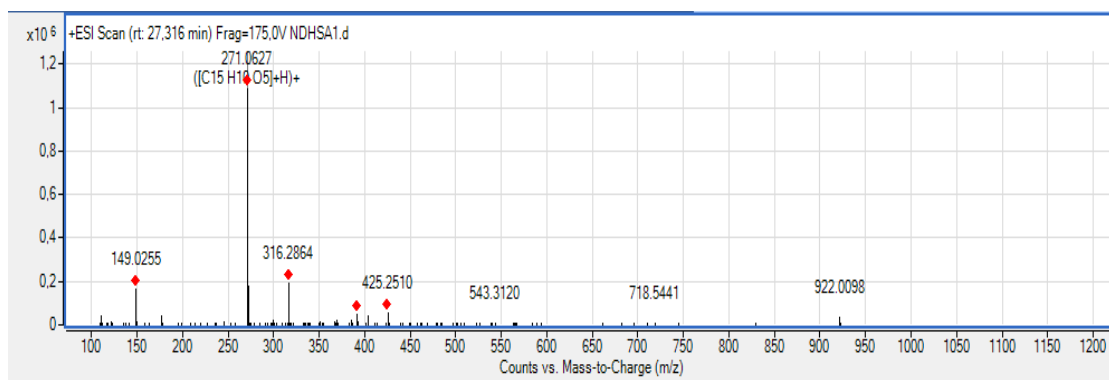
Le fragment à  $m/z$  : 286 provient de la perte du groupement méthyle. Le pic de base à  $m/z$  : 168 est issu du fragment précédant à la suite de la coupure des liaisons carbone-carbone et carbone-oxygène sur le cycle C intermédiaire en position  $\beta$  du cycle contigu (A). Le fragment à  $m/z$  : 112 résulte de la double scission sur le cycle (A) des liaisons carbone-carbone en  $\alpha$  du cycle C intermédiaire. Le fragment à  $m/z$  : 140 découle du clivage du type (RDA) des liaisons carbone-carbone et carbone-oxygène sur le cycle C intermédiaire en position  $\alpha$  du cycle contigu (A). Quant au fragment à  $m/z$  : 121, il est dû au clivage des liaisons carbone-carbone et carbone-oxygène respectivement en  $\gamma$  et en  $\beta$  du cycle adjacent (schéma 19). Le composé **10** est donc le méthyle Wogonine de la famille des flavonoïdes et a déjà été décrit de la plante (Tang *et al.*, 2018).



**Figure 82:** Structure du composé **10**

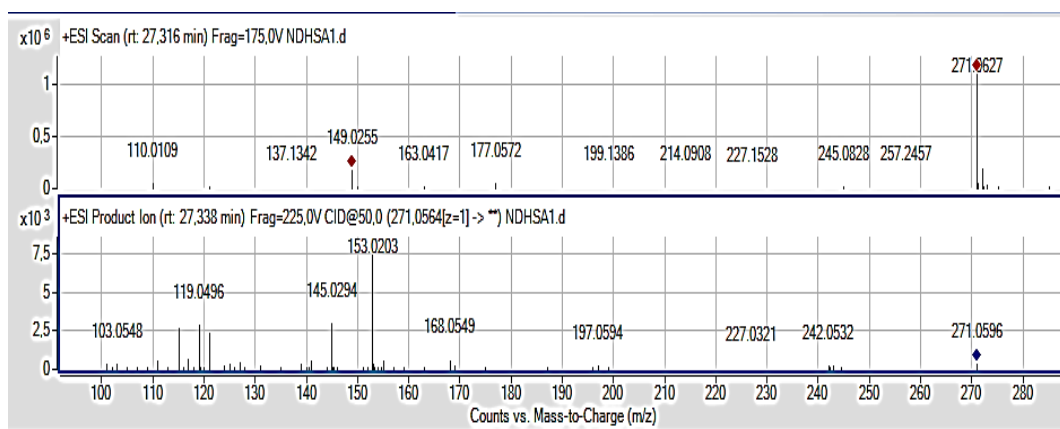
### Structure du composé **11**

Le composé **11** avec un temps de rétention égal à 27,316 min correspond à l'ion moléculaire  $[M+H]^+$  à  $m/z$  : **271,0627** de masse molaire moléculaire 270,0528 g/mol. La formule brute la plus probable est C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub> (cal. 270,24) (figure 83).



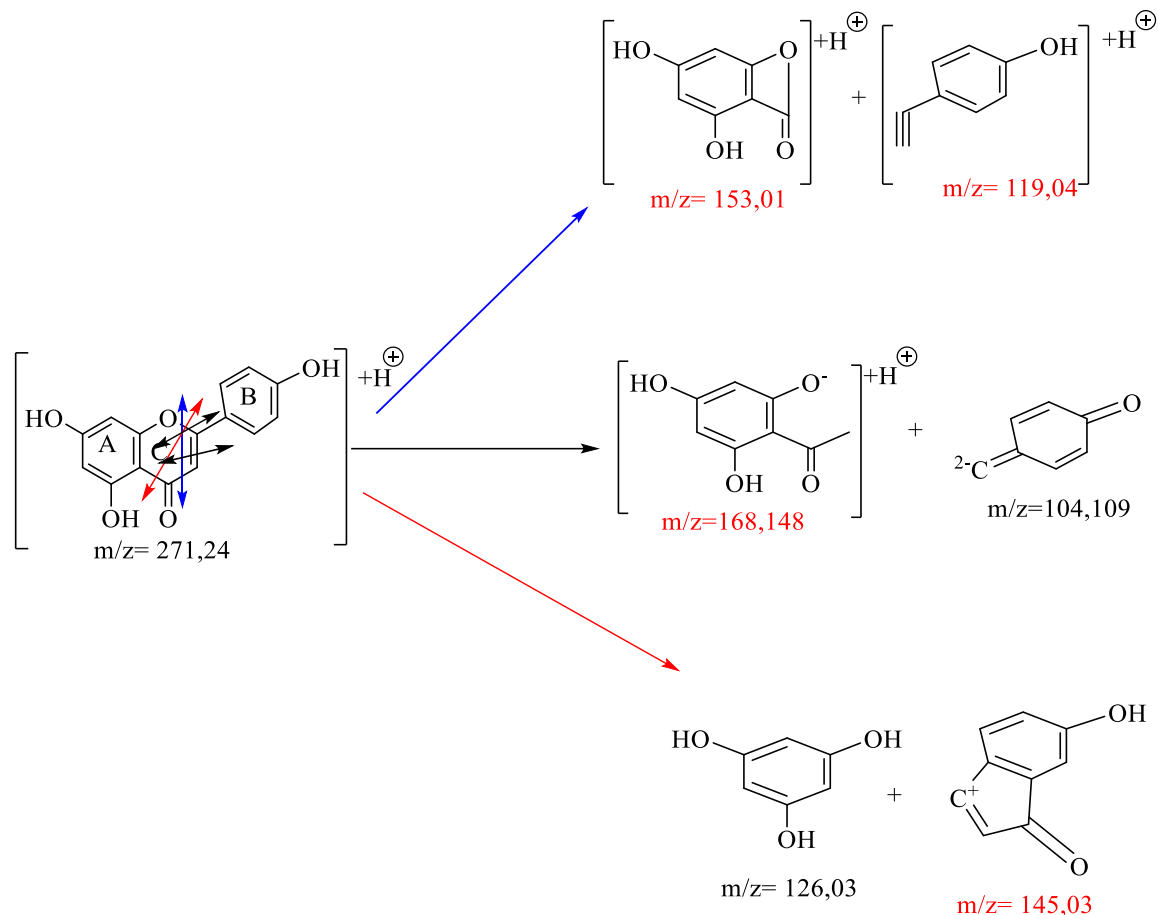
**Figure 83:** Spectre de masse LC-ESI/MS du composé **11**

L'analyse du spectre de fragmentation du composé **11** (figure 84) indique la présence de fragments majeurs à  $m/z$  : 153 $[M+H-118]$  (pic de base),  $m/z$  : 145 $[M+H-126]$ ,  $m/z$  : 119 $[M+H-152]$ .



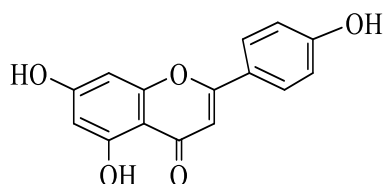
**Figure 84:** Spectre de fragmentation ESI/MS du composé **11**

Parmi les structures proposées par les bases de données ChemSpider et PubChem, seul l'Apigénine donne un mode de fragmentation similaire à celui du composé recherché (schéma 20).



**Schéma 20:** Fragmentation du composé **11**

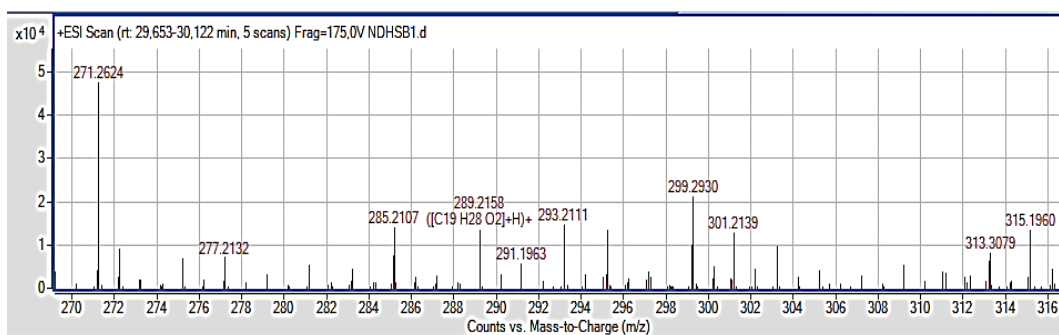
Le pic de base à m/z : 153 résulte de la scission sur le cycle C intermédiaire des liaisons carbone-carbone et carbone-oxygène en β du cycle contigu (A). Le fragment à m/z : 168 provient de la coupure sur le cycle C intermédiaire des liaisons carbone-carbone et carbone-oxygène respectivement en γ et en β du cycle contigu (A). Concernant le fragment à m/z : 145, il est dû au clivage des liaisons carbone-carbone et carbone-oxygène respectivement en α et en β du cycle contigu (A) (schéma 20). Le composé **11** est donc l'Apigénine qui appartiendrait à la famille des flavonoïdes. Il a été identifié dans les feuilles de la plante (Ekow *et al.*, 2018).



**Figure 85:** Structure du composé **11**

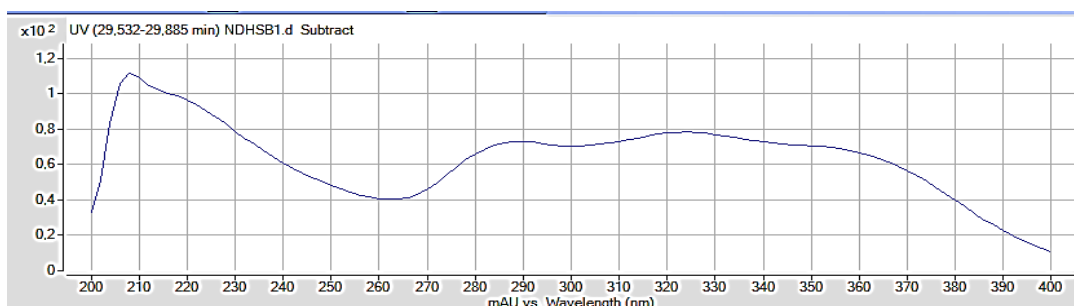
### Structure du composé **12**

Le composé **12** avec un temps de rétention égal à 29,888 min correspond à l'ion moléculaire  $[M+H]^+$  à  $m/z$  : **289,216** de masse molaire moléculaire 288,209 g/mol. La formule brute la plus probable est C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub> (cal. 288,209) (figure 86).



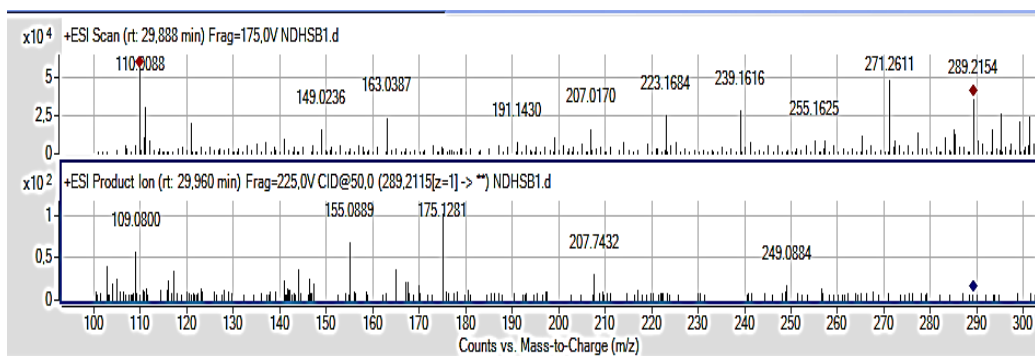
**Figure 86:** Spectre de masse LC-ESI/MS du composé **12**

Le spectre UV de la molécule indique deux absorptions maximales à 208 nm et 290 nm (figure 87) qui montrent la présence de cycle avec double liaisons (C-C=O) dans sa structure (Scott, 1964b).



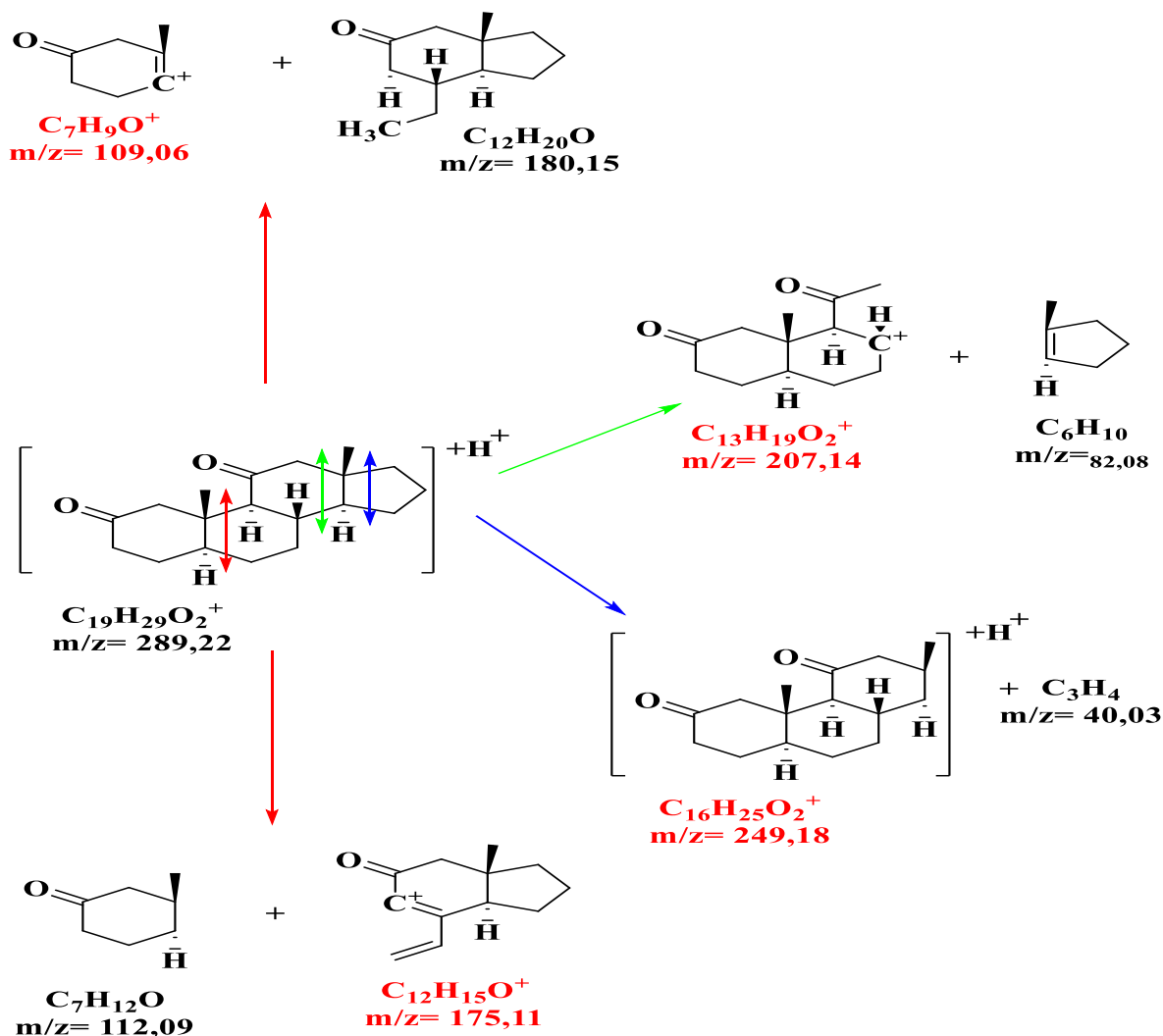
**Figure 87:** Spectre UV (LC-UV/DAD) du composé **12**

L'analyse du spectre de fragmentation du composé **12** (figure 88) montre la présence de fragments majeurs à  $m/z$  : 249 $[M+H-39]$ ,  $m/z$  : 208 $[M+H-81]$ ,  $m/z$  : 175 $[M+H-113]$  (pic de base),  $m/z$  : 155 $[M+H-133]$ ,  $m/z$  : 109 $[M+H-179]$ .



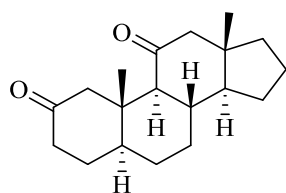
**Figure 88:** Spectre de fragmentation ESI/MS du composé **12**

Parmi les structures proposées par les bases de données ChemSpider et PubChem, seul la 5 $\alpha$ -androstane-2,11-dione donne un mode de fragmentation similaire à celui du composé recherché (schéma 21).



**Schéma 21:** Proposition de fragmentation du composé **12**

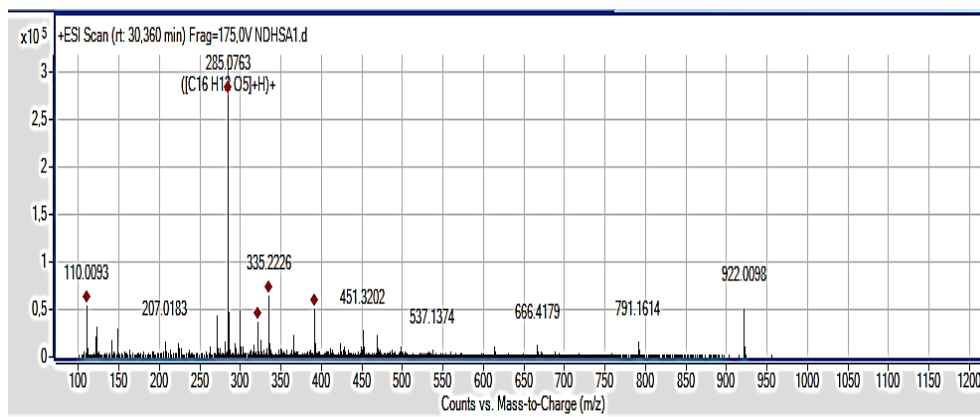
Le fragment majoritaire à  $m/z$  : 175 et le fragment à  $m/z$  : 109 seraient dus à la coupure sur le cycle intermédiaire des trois cycles en (C6) des liaisons carbone-carbone contigües au cycle extrême en (C6). Le fragment à  $m/z$  : 207 proviendrait du clivage sur le cycle en (C6) adjacent au cycle en (C5) des liaisons carbone-carbone contigües au cycle en (C5). Quant au fragment à  $m/z$  : 249, il découlerait de la rupture de liaisons carbone-carbone sur le cycle en (C5) en  $\alpha$  du cycle adjacent (schéma 21). Le composé **12** serait donc le 5 $\alpha$ -androstan-2,11-dione qui ferait parti de la famille des stérols et terpènes. Il a été identifié dans l'HE des feuilles de *Hyptis suaveolens* (Rivas *et al.*, 2002)



**Figure 89:** Structure du composé **12**

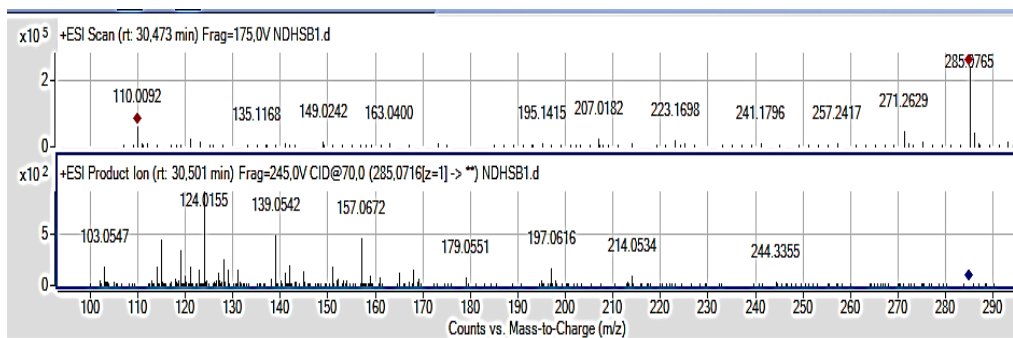
### Structure du composé **13**

Le composé **13** avec un temps de rétention égal à 30,360 min correspond à l'ion moléculaire  $[M+H]^+$  à  $m/z$  : **285,0763** de masse molaire moléculaire 284,0685 g/mol. La formule brute la plus probable est  $C_{16}H_{14}O_5$  (cal. 284,2700) (figure 90).



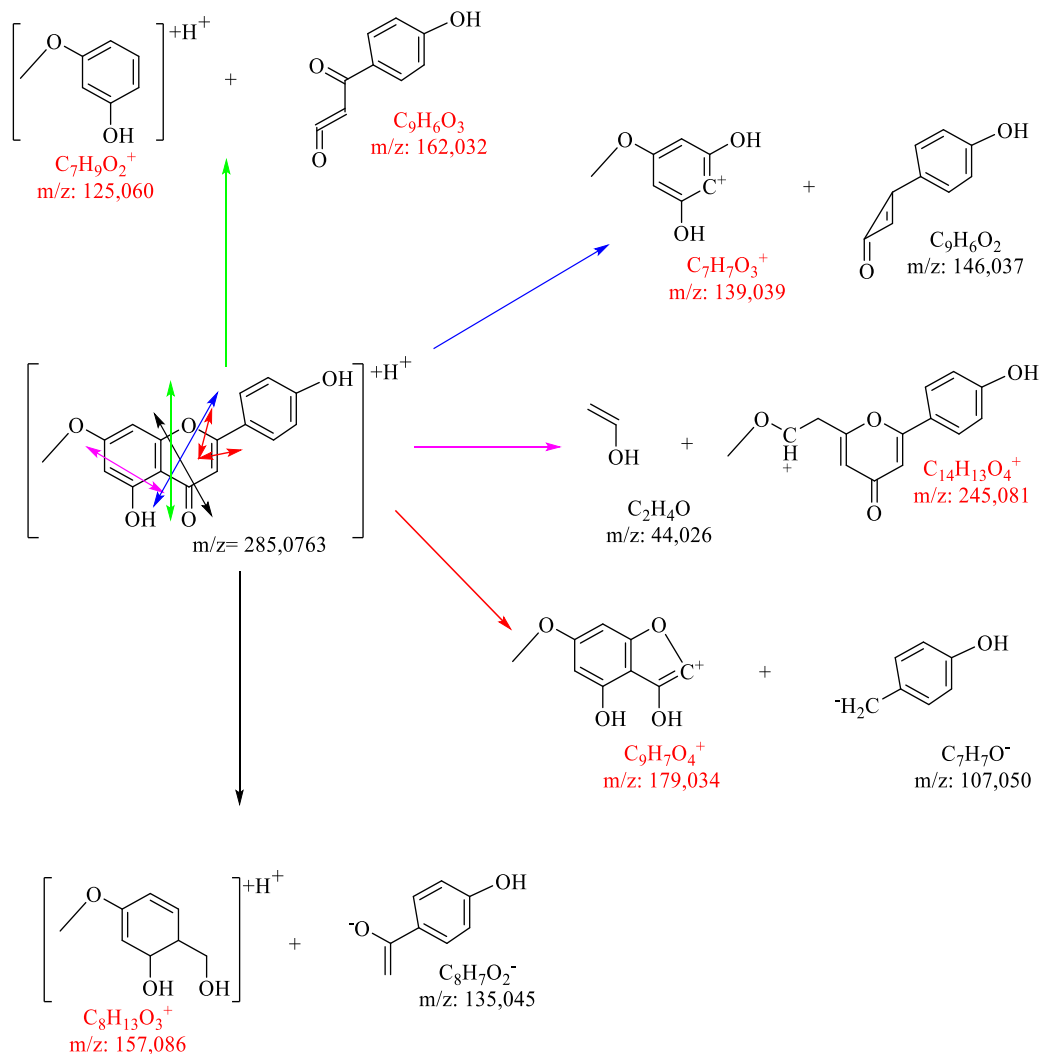
**Figure 90:** Spectre de masse LC-ESI/MS du composé **13**

L'analyse du spectre de fragmentation du composé **13** (figure 91) montre la présence de fragments majeurs à  $m/z$  : 197 $[M+H-88]$ , à  $m/z$  : 157 $[M+H-128]$ , à  $m/z$  : 139 $[M+H-146]$ , à  $m/z$  : 124 $[M+H-161]$  (pic de base).



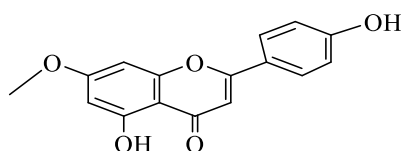
**Figure 91:** Spectre de fragmentation ESI/MS du composé **13**

Parmi les structures proposées par les bases de données ChemSpider et PubChem, seul le Genkwanine donne un mode de fragmentation similaire à celui du composé recherché (schéma 22).



**Schéma 22:** Fragmentation du composé **13**

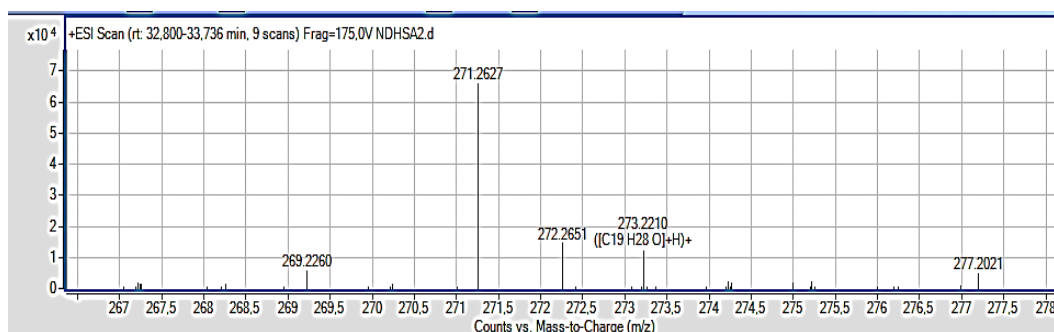
Le pic majoritaire à  $m/z$  : 125 (124 sur le spectre, différence due à un réarrangement selon la règle de l'azote), provient de la scission des liaisons carbone-carbone et carbone-oxygène sur le cycle C intermédiaire en  $\alpha$  du cycle contigu (A). Le fragment à  $m/z$  : 139 est dû à la rupture des liaisons carbone-carbone et carbone-oxygène sur le cycle C intermédiaire respectivement en  $\alpha$  et en  $\beta$  du cycle contigu (A). Le fragment à  $m/z$  : 245 découle de la coupure sur le cycle aromatique (portant le groupement méthoxyle) des liaisons carbone-carbone simples en  $\alpha$  du groupement hydroxyle et en  $\beta$  du groupement méthoxyle. Le fragment à  $m/z$  : 179 résulte du clivage des liaisons carbone-carbone et carbone-oxygène sur le cycle C intermédiaire en  $\beta$  du cycle monosubstitué. De même le fragment à  $m/z$  : est issu du clivage sur le cycle C intermédiaire des liaisons carbone-carbone et carbone-oxygène respectivement en  $\beta$  et en  $\alpha$  du cycle méthoxylé (schéma 22). Le composé **13** est donc le Genkwanine qui est un flavonoïde. Il a été identifié dans les feuilles de *H. suaveolens* (Ekow *et al.*, 2018).



**Figure 92:** Structure du composé **13**

#### Structure du composé **14**

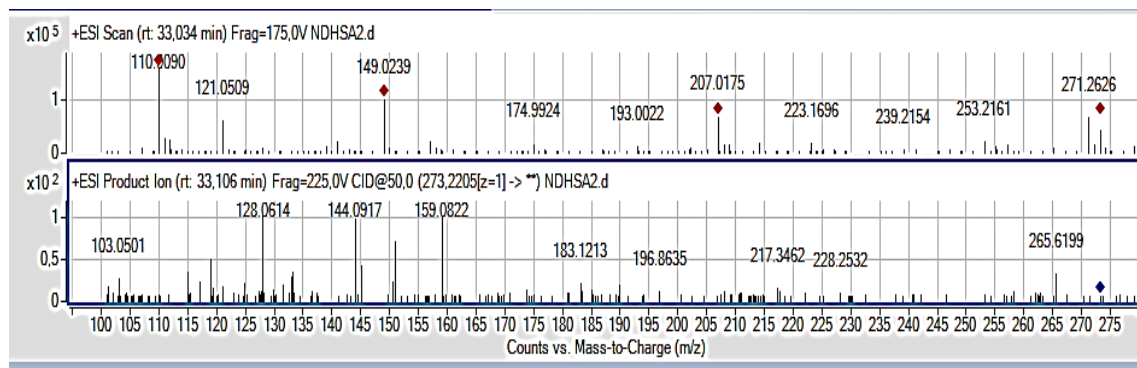
Le composé **14** avec un temps de rétention égal à 33,106 min correspond à l'ion moléculaire  $[M+H]^+$  à  $m/z$  : **273,2210** de masse molaire moléculaire 272,2140 g/mol. La formule brute la plus probable est  $C_{19}H_{28}O$  (cal. 272,43) (figure 93).



**Figure 93:** Spectre de masse LC-ESI/MS du composé **14**

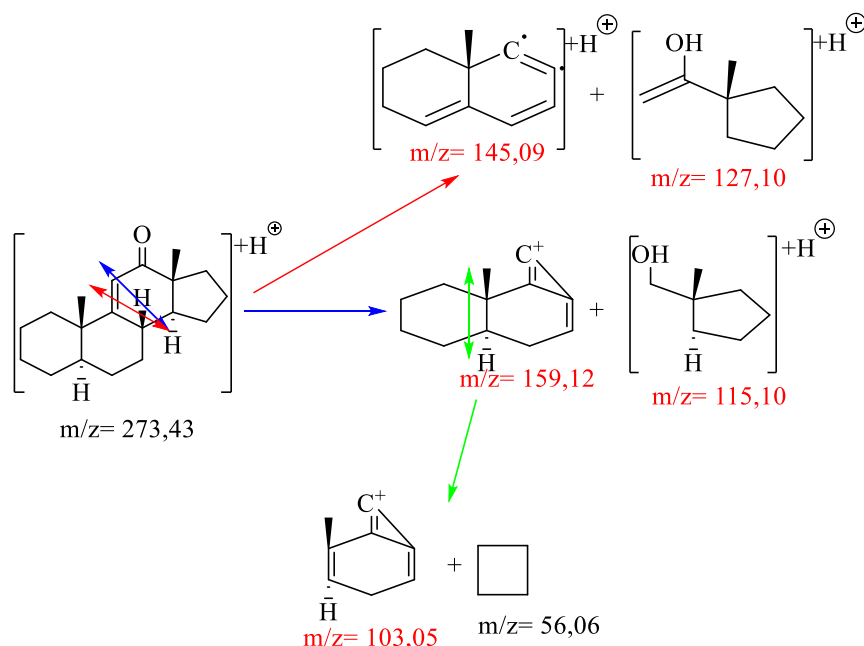


L'analyse du spectre de fragmentation du composé **14** (figure 94) montre la présence de fragments majeurs à  $m/z$  : 159[M+H-114] (pic de base),  $m/z$  : 144[M+H-129],  $m/z$  : 128[M+H-145],  $m/z$  : 115[M+H-158],  $m/z$  : 103[M+H-114-56].



**Figure 94:** Spectre de fragmentation ESI/MS du composé **14**

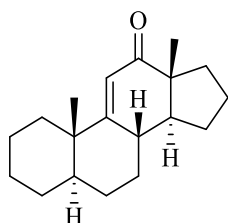
Parmi les structures proposées par les bases de données ChemSpider et PubChem, seul la 5 $\alpha$ -androst-9(11)-èn-12-one donne un mode de fragmentation similaire à celui du composé recherché (schéma 23).



**Schéma 23:** Proposition de fragmentation du composé **14**

Le pic de base à  $m/z$  : 159 dériverait du double clivage sur le cycle insaturé de la liaison carbone-carbone entre l'insaturation et le groupement carbonyle et celle entre le cycle en (C5) et le cycle saturé en (C6). Le fragment à  $m/z$  : 103 serait issu du pic de base par perte d'un cyclobutane à la suite de la coupure sur le cycle saturé des liaisons carbone-carbone

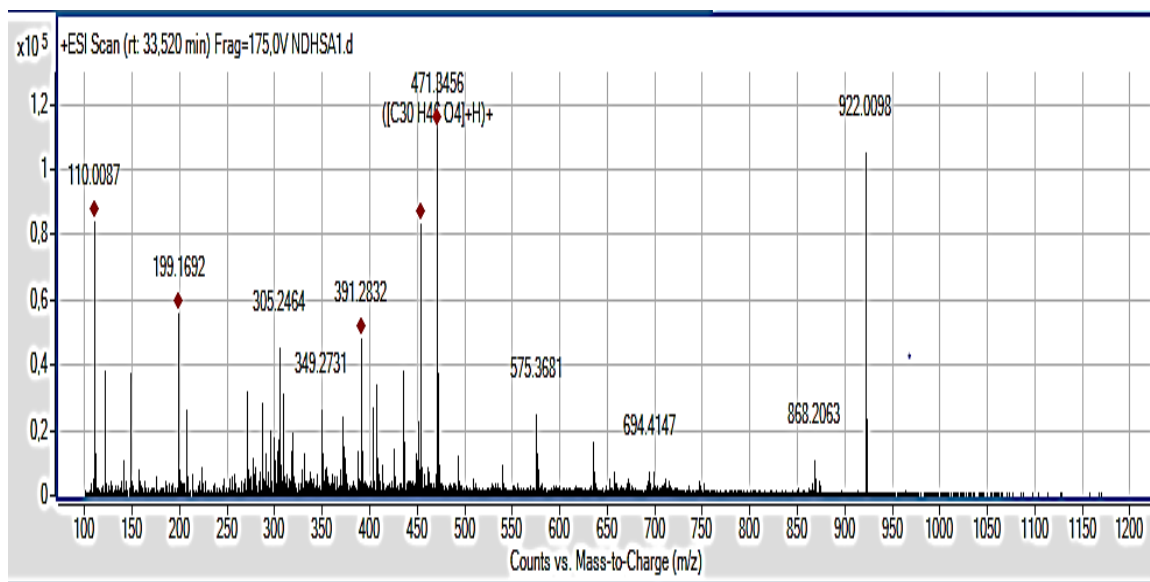
contigües au second cycle en (C6). Les fragments à  $m/z$  : 145 (144 sur le spectre) et  $m/z$  : (128 sur le spectre) proviendraient de la rupture sur le cycle insaturé des liaisons carbone-carbone contigües au cycle intermédiaire en (C6) (schéma 23). Le composé **14** serait donc la 5 $\alpha$ -androst-9(11)-èn-12-one de la famille des terpènes et stérols. Il a été identifié dans les feuilles de la plante (Edeoga *et al.*, 2006).



**Figure 95:** Structure du composé **14**

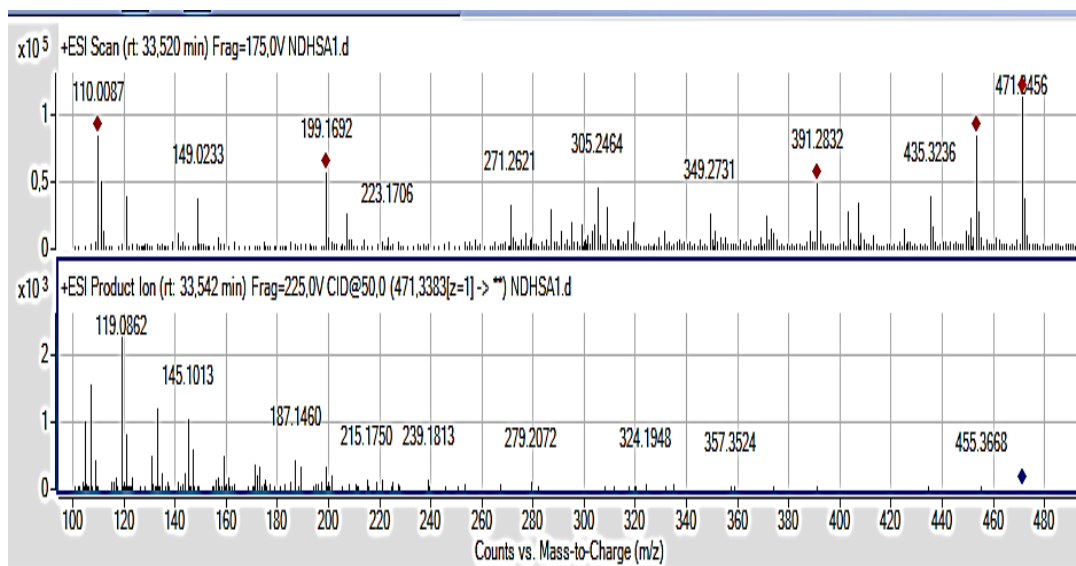
#### Structure du composé 15

Le composé **15** avec un temps de rétention égal à 33,520 min correspond à l'ion moléculaire  $[M+H]^+$  à  $m/z$  : **471,346** de masse molaire moléculaire 470,340 g/mol. La formule brute la plus probable est  $C_{30}H_{46}O_4$  (cal. 470,69) (figure 96).



**Figure 96:** Spectre de masse LC-ESI/MS du composé **15**

L'analyse du spectre de fragmentation du composé **15** (figure 97) montre la présence de fragments majeurs à  $m/z$  : 455 $[M+H-16]$ ,  $m/z$  : 357 $[M+H-16-98]$ ,  $m/z$  : 187 $[M+H-16-268]$ ,  $m/z$  : 157 $[M+H-16-298]$ ,  $m/z$  : 145 $[M+H-16-310]$ ,  $m/z$  : 119 $[M+H-16-336]$ .



**Figure 97:** Spectre de fragmentation ESI/MS du composé **15**

Parmi les structures proposées par les bases de données ChemSpider et PubChem, seul l'Acide 1,19 $\alpha$ -dihydroxyl-uros-2(3),12-di $\acute{e}$ n-28-oïque donne un mode de fragmentation similaire à celui du composé recherché (schéma 24).

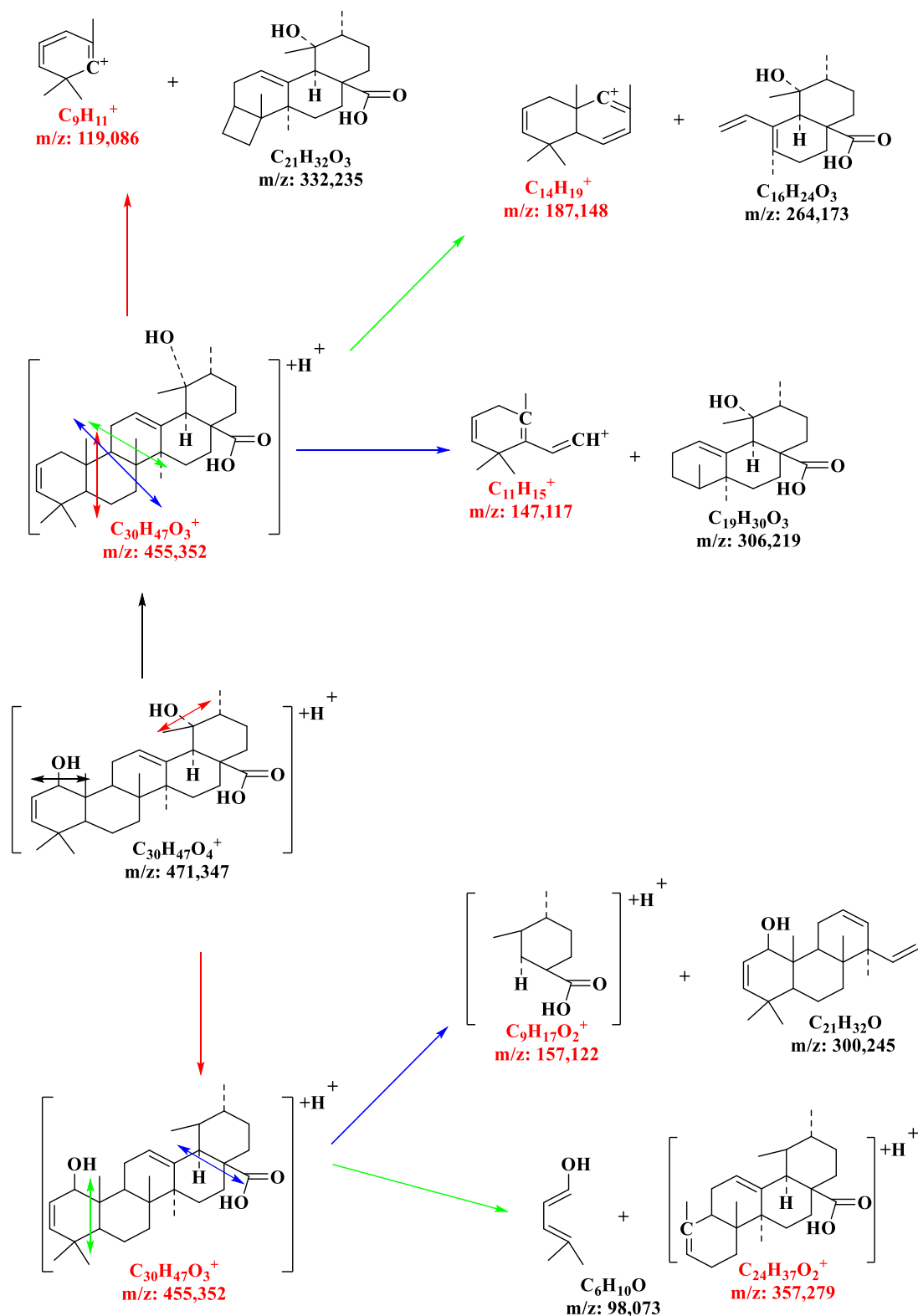
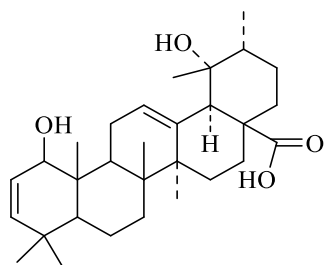


Schéma 24: Proposition de fragmentation du composé 15

Le fragment à  $m/z : 455$  est obtenu après une déshydroxylation sur l'un des cycles périphériques. Tous les autres fragments sont issus du fragment précédent. Le pic majoritaire à  $m/z : 119$  et les fragments à  $m/z : 187$  et à  $m/z : 147$ , seraient issus de la déshydroxylation

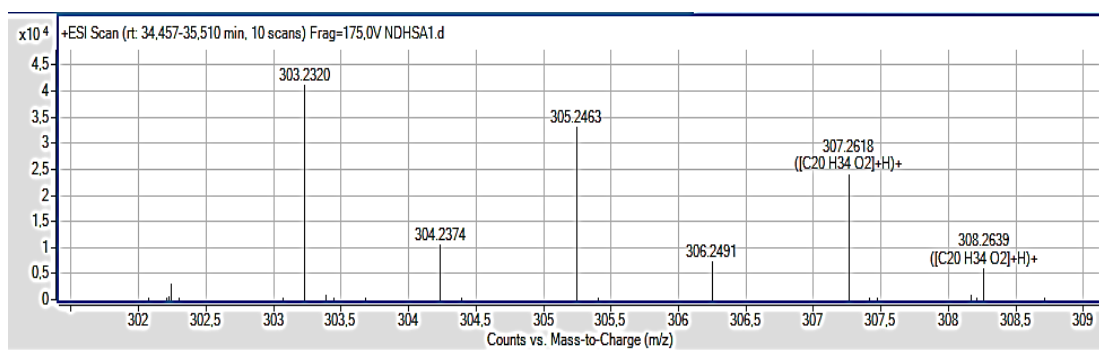
sur le cycle périphérique insaturé suivie d'une double scission des liaisons carbone-carbone respectivement contigües au cycle insaturé, entre les deux cycles insaturés et en  $\gamma$  du cycle insaturé extrême et enfin les liaisons contigües au cycle saturé intermédiaire aux cycles insaturés. Quant aux fragments à  $m/z$  : 357 et à  $m/z$  : 157, ils sont issus de la déshydratation sur le cycle périphérique saturé suivie d'une double scission de liaisons carbone-carbone respectivement sur le cycle insaturé périphérique en  $\alpha$  du cycle adjacent et sur le cycle saturé en  $\alpha$  du cycle saturé extrême (schéma 24). Le composé **15** serait donc l'Acide 1,19 $\alpha$ -dihydroxyl-uros-2(3),12-dièn-28-oïque qui est de la famille des terpènes et stérols. Ce composé a été identifié dans les feuilles de *H. suaveolens* (Raja *et al.*, 1990) (Aspinall *et al.*, 1991).



**Figure 98:** Structure du composé **15**

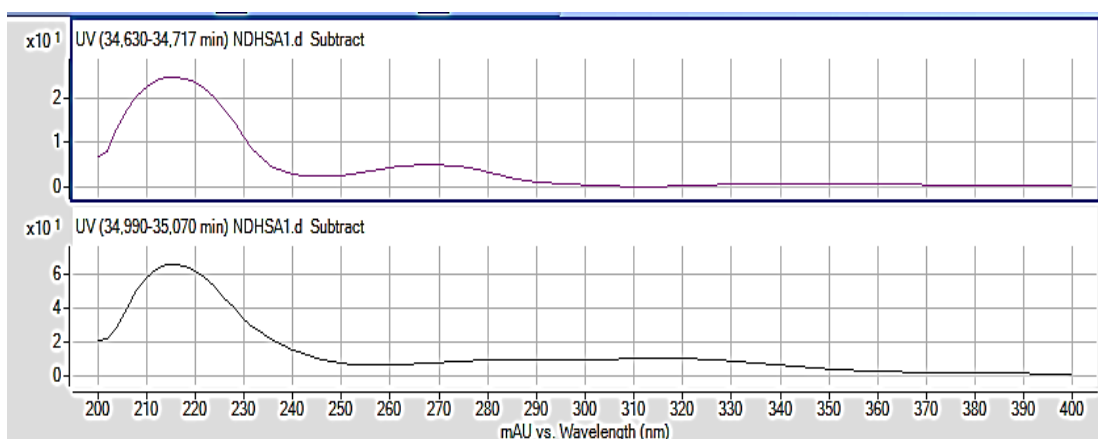
#### Structure du composé **16**

Le composé **16** avec un temps de rétention égal à 34,691 min correspond à l'ion moléculaire  $[M+H]^+$  à  $m/z$  : **307,262** de masse molaire moléculaire 306,256 g/mol. La formule brute la plus probable est  $C_{20}H_{34}O_2$  (cal. 306,49) (figure 99).



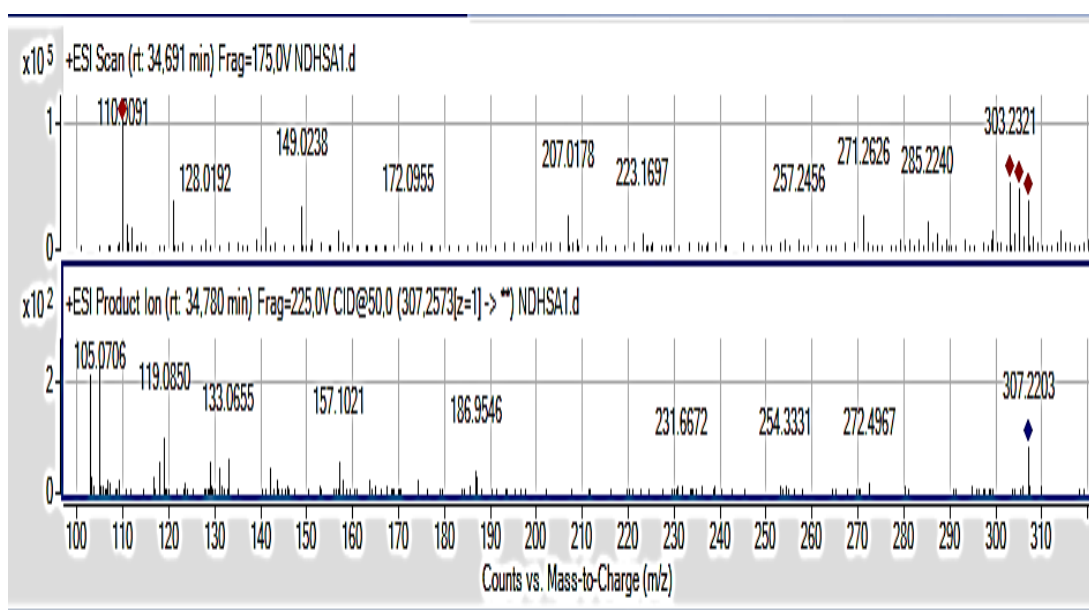
**Figure 99:** Spectre de masse LC-ESI/MS du composé **16**

Le spectre UV de la molécule présente une absorption maximale à 215 nm (figure 100) indiquant la présence de double liaisons conjuguées (C=C) dans sa structure (Scott, 1964b).



**Figure 100:** Spectre UV (LC-UV/DAD) du composé **16**

L'analyse du spectre de fragmentation du composé **16** (figure 101) indique la présence de fragments majeurs à  $m/z$  : 187[M+H-18-102],  $m/z$  : 157[M+H-18-132],  $m/z$  : 133[M+H-18-156],  $m/z$  : 119[M+H-18-170],  $m/z$  : 105[M+H-18-184] (pic de base).



**Figure 101:** Spectre de fragmentation ESI/MS du composé **16**

Parmi les structures proposées par les bases de données ChemSpider et PubChem, seul le Suaveolol donne un mode de fragmentation similaire à celui du composé recherché (schéma 25).

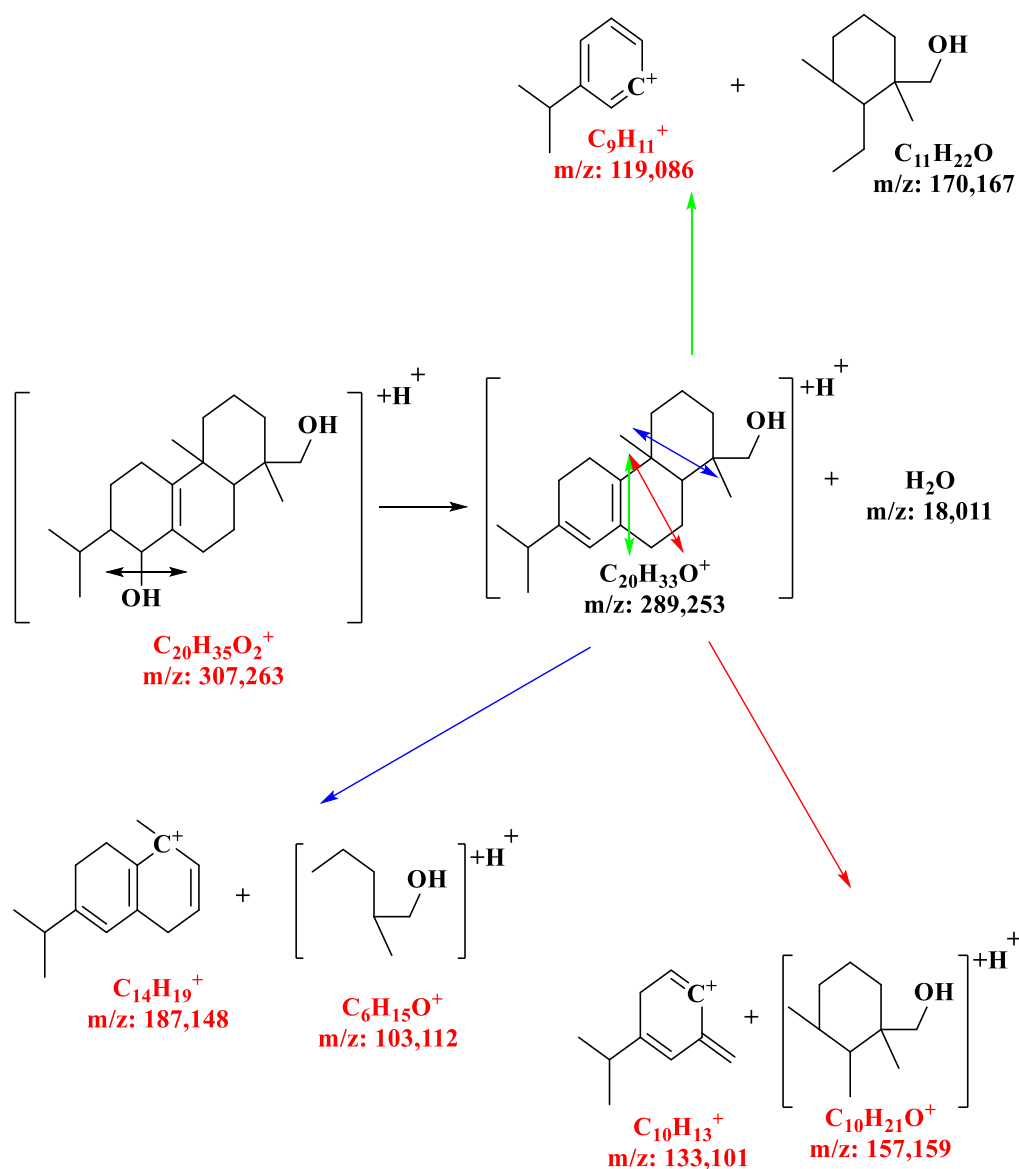
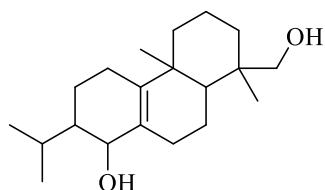


Schéma 25: Fragmentation du composé 16

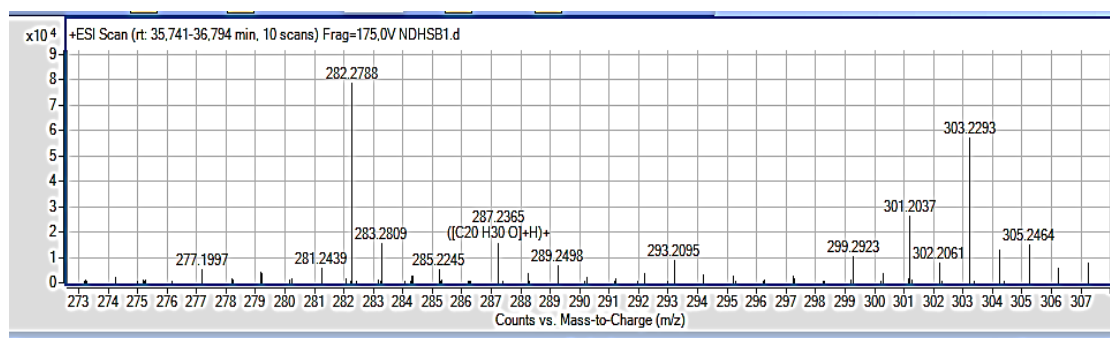
L'observation du pic moléculaire à  $m/z$  : 307 sur le spectre dénote de la stabilité de la molécule qui serait due à la présence d'insaturation dans la structure. La quasi-totalité des fragments s'obtiennent après déshydratation au niveau du cycle insaturé. Le fragment majoritaire à  $m/z$  : 103 (105 sur le spectre) et celui de masse à  $m/z$  : 187, proviennent du clivage sur le cycle saturé des liaisons carbone-carbone en  $\alpha$  du cycle adjacent. Le fragment à  $m/z$  : 119 est dû au clivage sur le cycle intermédiaire des liaisons carbone-carbone en  $\alpha$  de l'insaturation. Concernant les fragments à  $m/z$  : 157 et à  $m/z$  : 133, ils résultent de la double scission sur le cycle intermédiaire des liaisons carbone-carbone en position  $\alpha$  et  $\beta$  des deux autres cycles (schéma 25). Le composé **16** est donc le Suaveolol qui est de la famille des terpènes et stérols. Il a déjà été rapporté dans la littérature (Manchand *et al.*, 1974)



**Figure 102:** Structure du composé **16**

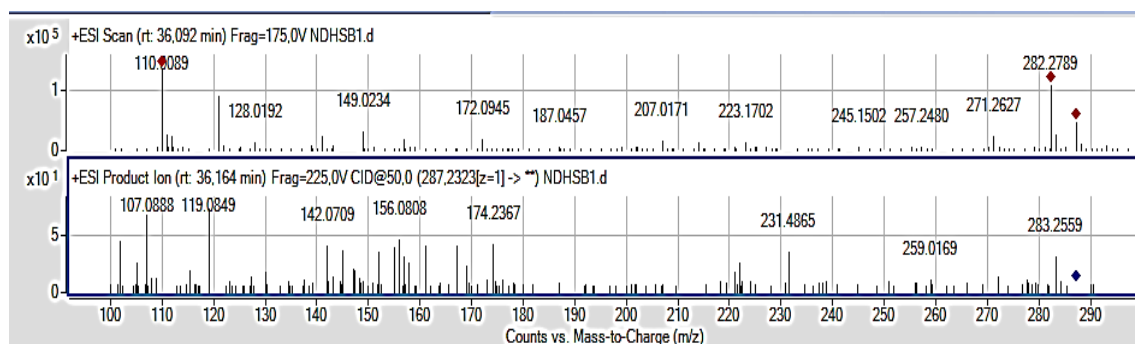
### Structure du composé **17**

Le composé **17** avec un temps de rétention égal à 36,092 min correspond à l'ion moléculaire  $[M+H]^+$  à  $m/z$  : **287,237** de masse molaire moléculaire 286,230 g/mol. La formule brute la plus probable est  $C_{20}H_{30}O$  (cal. 286,46) (figure 103).



**Figure 103:** Spectre de masse LC-ESI/MS du composé **17**

L'analyse du spectre de fragmentation du composé **17** (figure 104) indique la présence de fragments majeurs à  $m/z$  : 231 $[M+H-56]$ ,  $m/z$  : 174 $[M+H-113]$ ,  $m/z$  : 156 $[M+H-131]$ ,  $m/z$  : 142 $[M+H-145]$ ,  $m/z$  : 119 $[M+H-168]$  (pic de base),  $m/z$  : 107 $[M+H-180]$ .



**Figure 104:** Spectre de fragmentation ESI/MS du composé **17**



Parmi les structures proposées par les bases de données ChemSpider et PubChem, seul le déshydroabiétinol donne un mode de fragmentation similaire à celui du composé recherché (schéma 26).

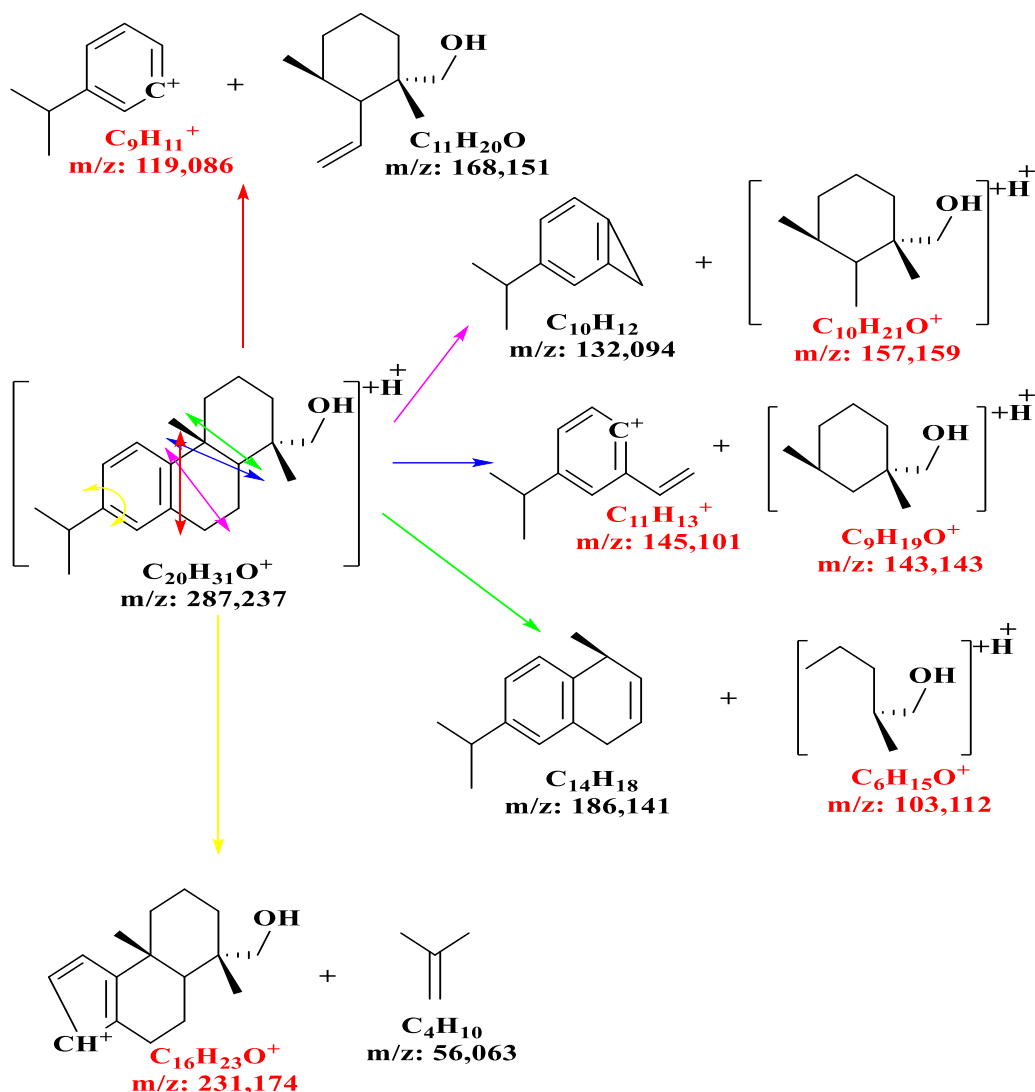
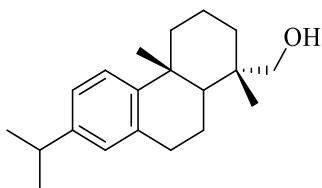


Schéma 26: Proposition de fragmentation du composé 17

Le fragment majoritaire à m/z : 119 serait dû au clivage sur le cycle intermédiaire des liaisons carbone-carbone contiguës au cycle aromatique. Le fragment à m/z : 103 proviendrait de la coupure sur le cycle saturé des liaisons carbone-carbone en  $\alpha$  du cycle adjacent. Concernant le fragment à m/z : 157, il résulterait de la double scission sur le cycle intermédiaire des liaisons carbone-carbone en position  $\alpha$  et  $\beta$  des deux autres cycles. Le fragment à m/z : 143 (142 sur le spectre, différence due à un réarrangement), dériverait de la coupure sur le cycle intermédiaire des liaisons carbone-carbone en  $\alpha$  du cycle saturé adjacent. Le fragment à m/z : 231 proviendrait de la rupture sur le cycle aromatique des liaisons carbone-carbone en  $\beta$  du groupement isopropyle (schéma 26). Le composé 17 serait

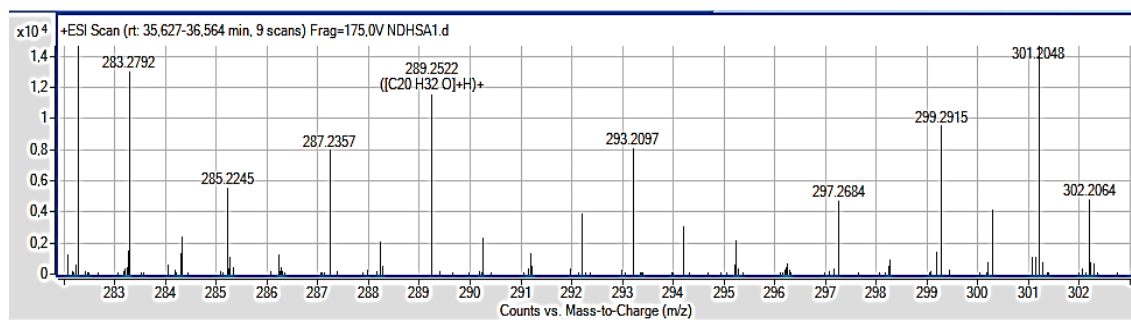
donc déshydroabiétinol de la famille des terpènes et stérols. Ce composé a été rapporté dans la littérature (Misra *et al.*, 1983).



**Figure 105:** Structure du composé **17**

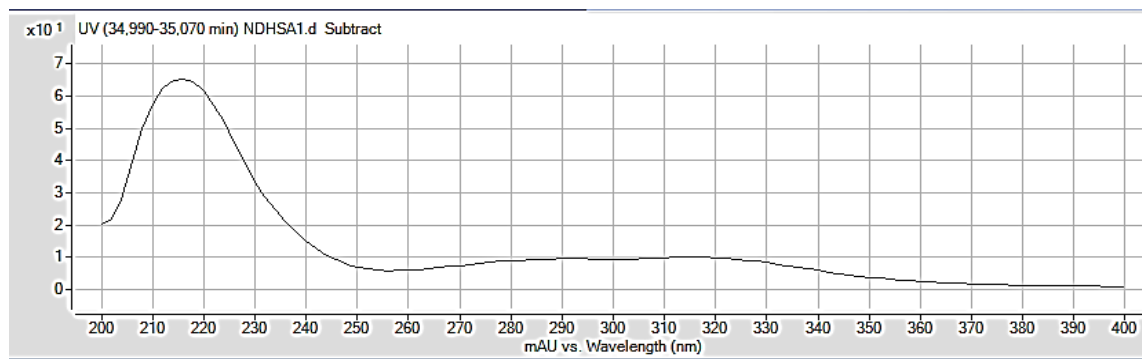
### Structure du composé **18**

Le composé **18** avec un temps de rétention égal à 36,330 min correspond à l'ion moléculaire  $[M+H]^+$  à  $m/z$  : **289,252** de masse molaire moléculaire 288,245 g/mol. La formule brute la plus probable est  $C_{20}H_{32}O$  (cal. 288,48) (figure 106).



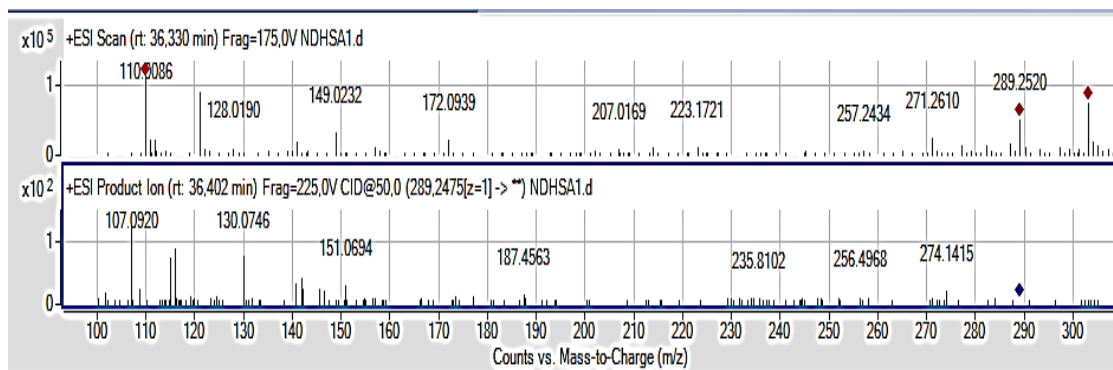
**Figure 106:** Spectre de masse LC-ESI/MS du composé **18**

Le spectre UV de la molécule montre une absorption maximale à 218 nm (figure 107) qui indique la présence de double liaison (C=C) dans sa structure (Scott, 1964b).



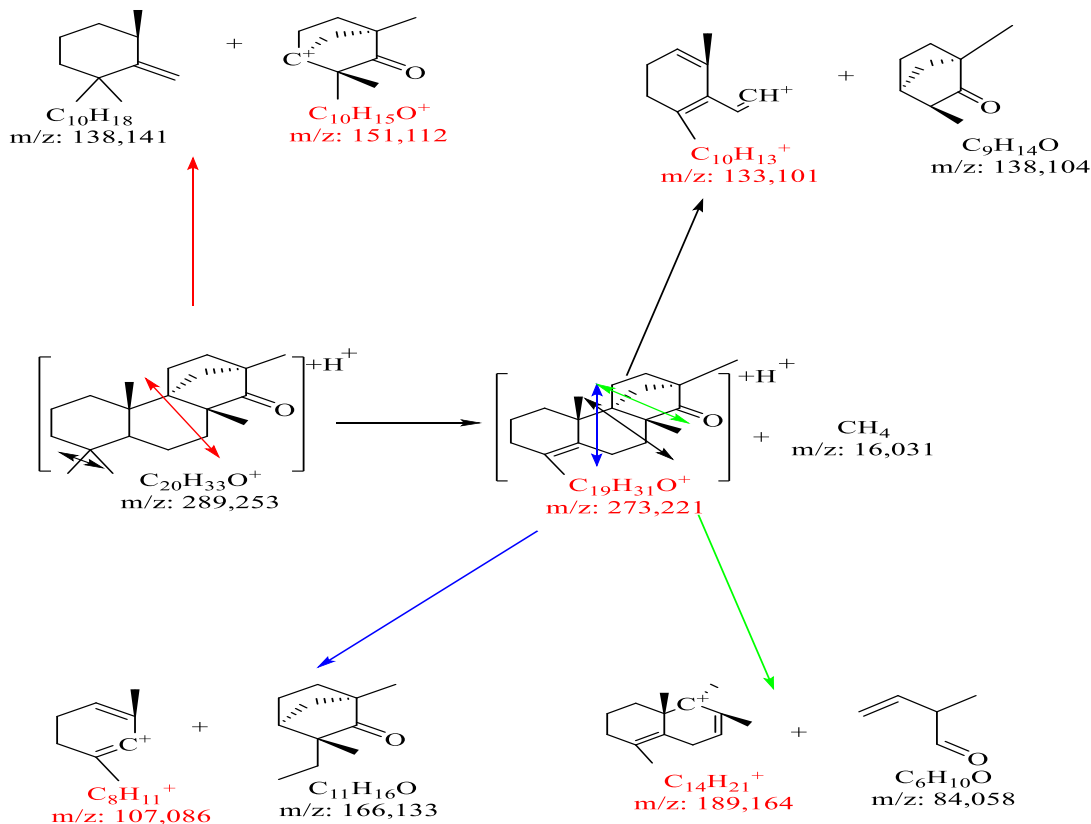
**Figure 107:** Spectre UV (LC-UV/DAD) du composé **18**

L'analyse du spectre de fragmentation du composé **18** (figure 108) montre la présence de fragments majeurs à  $m/z$  : 274[M+H-15],  $m/z$  : 151[M+H-138],  $m/z$  : 130[M+H-159],  $m/z$  : 107[M+H-172] (pic de base).



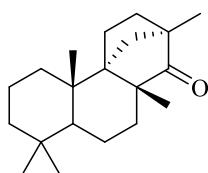
**Figure 108:** Spectre de fragmentation ESI/MS du composé **18**

Parmi les structures proposées par les bases de données ChemSpider et PubChem, seule la (2*R*,4*aS*,4*bS*,10*aR*)-2,4*b*,8,8,10*a*-pentaméthyl-décahydro-2*H*-2,4*a*-méthanophénanthrène-1(4*bH*)-one donne un mode de fragmentation similaire à celui du composé recherché (schéma 27).



**Schéma 27:** Proposition de fragmentation du composé **18**

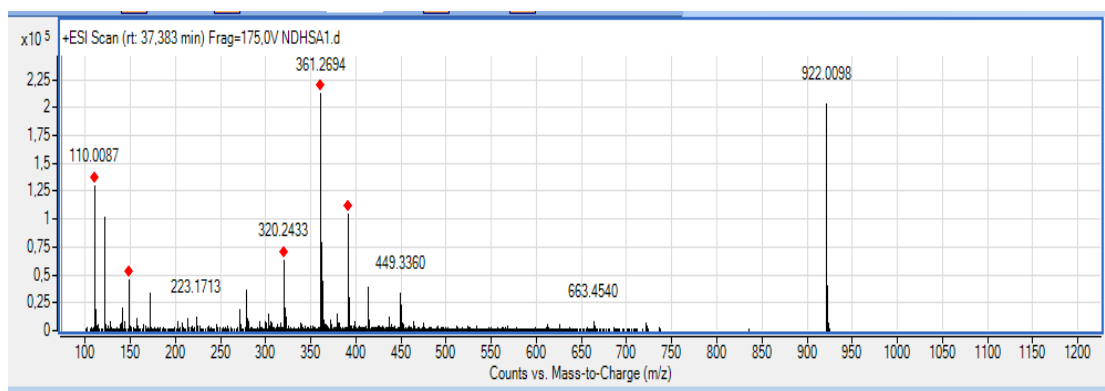
Le fragment à  $m/z$  : 151 serait dû à la scission sur le cycle intermédiaire des liaisons carbone-carbone en  $\alpha$  et  $\beta$  de deux cycles extrêmes. Le fragment à  $m/z$  : 273 (274 sur le spectre), proviendrait de la perte de l'un des deux groupements méthyles propres au cyclohexane périphérique. Les autres fragments majoritaires seraient issus du fragment à  $m/z$  : 273. Le fragment le plus abondant à  $m/z$  : 107 résulterait de la coupure sur le cycle intermédiaire des liaisons contigües au cycle insaturé. Le fragment à  $m/z$  : 133 dériverait du clivage sur le cycle intermédiaire des liaisons carbone-carbone en  $\alpha$  du cycle carbonylé. Quant au fragment à  $m/z$  : 189, il découlerait de la rupture sur le cycle carbonylé des liaisons carbone-carbone en  $\alpha$  du cycle intermédiaire (schéma 27). Le composé **18** est donc la (2*R*,4*aS*,4*bS*,10*aR*)-2,4*b*,8,8,10*a*-pentaméthyl-décahydro-2*H*-2,4*a*-méthanophénanthrène-1(4*bH*)-one de la famille des stérols et terpènes. Ce composé a été rapporté dans la littérature (Chukwujekwu *et al.*, 2005).



**Figure 109:** Structure du composé **18**

#### Structure du composé **19**

Le composé **19** avec un temps de rétention égal à 37,322 min correspond à l'ion moléculaire  $[M+H]^+$  à  $m/z$  : **361,091** de masse molaire moléculaire 360,085 g/mol. La formule brute la plus probable est  $C_{18}H_{16}O_8$  (cal. 360,32) (figure 110).



**Figure 110:** Spectre de masse LC-ESI/MS du composé **19**

Le spectre UV de la molécule indique deux absorptions maximales à 230 nm et 330 nm (figure 111) montrant la présence de double liaisons conjuguées (C=C-C=C et/ou C=C=O) dans sa structure (Scott, 1964b).

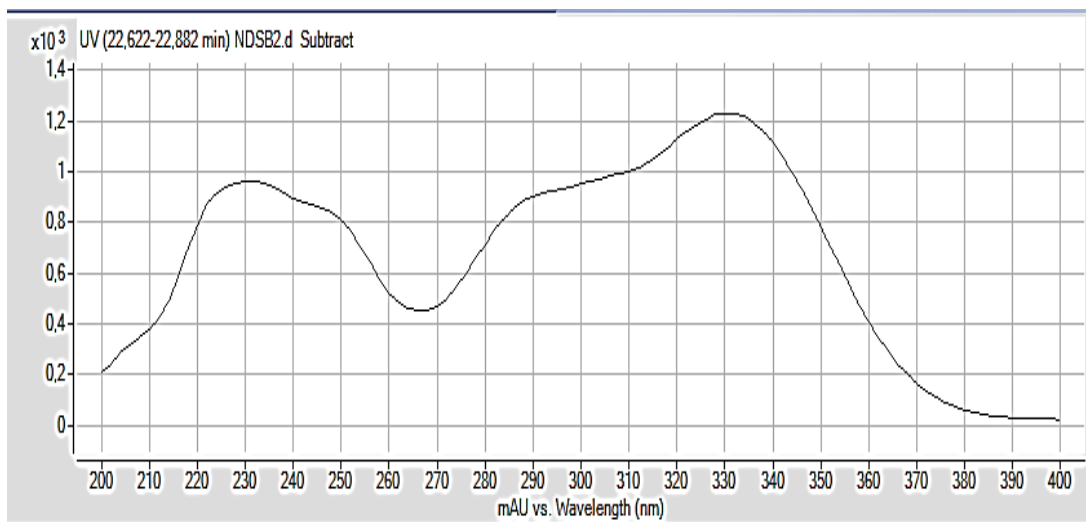


Figure 111: Spectre UV (LC-UV/DAD) du composé 19

L'analyse du spectre de fragmentation du composé 19 (figure 112) révèle la présence de fragments majeurs à  $m/z$  : 277[M+H-84],  $m/z$  : 179[M+H-182],  $m/z$  : 151[M+H-210],  $m/z$  : 123[M+H-238] (pic de base).

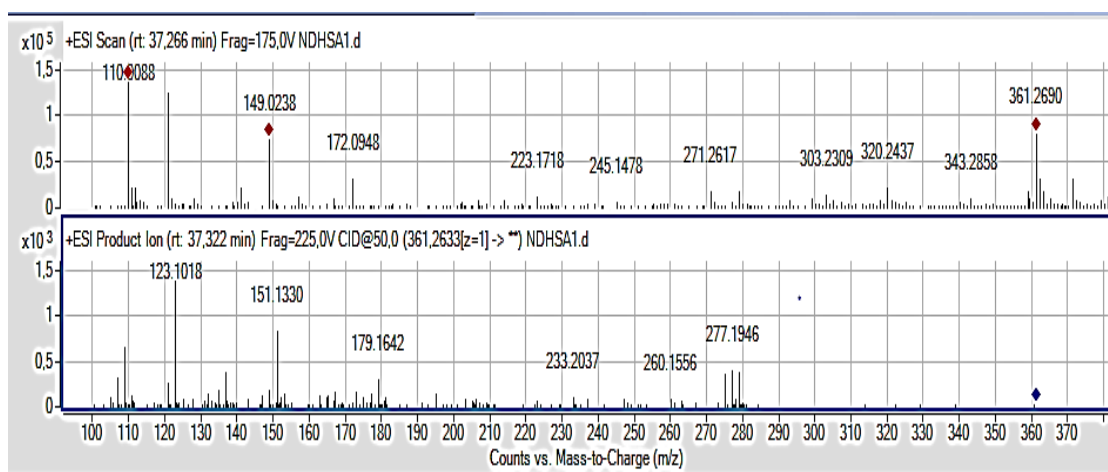


Figure 112: Spectre de fragmentation ESI/MS du composé 19

Parmi les structures proposées par les bases de données ChemSpider et PubChem, seul l'acide rosamarinique donne un mode de fragmentation similaire à celui du composé recherché (schéma 28).

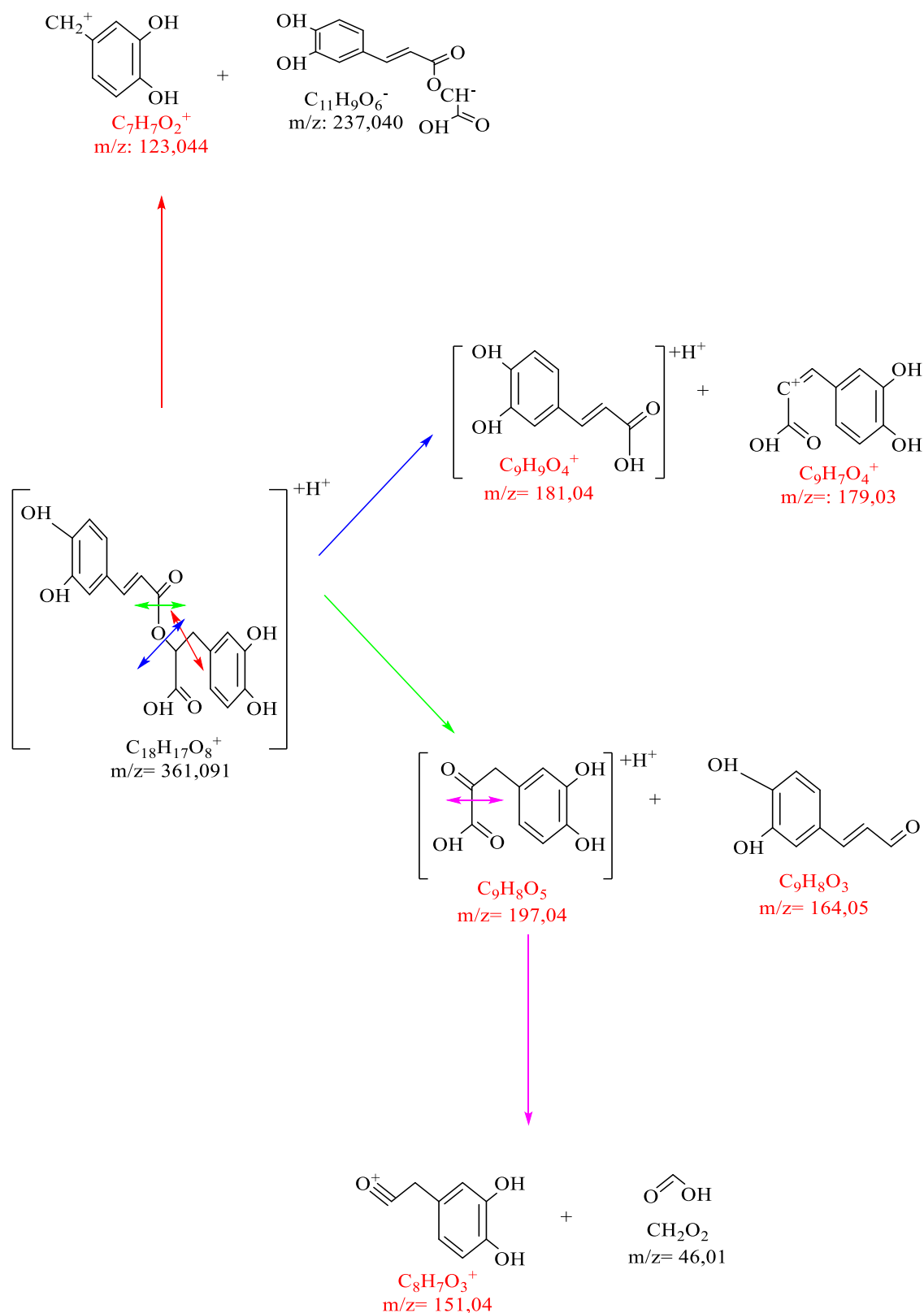
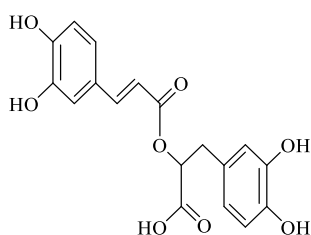


Schéma 28: Proposition de fragmentation du composé 19

Le pic majoritaire à  $m/z$  : 123 proviendrait du clivage de la liaison carbone-carbone en position  $\beta$  du groupe carboxylique. Le fragment à  $m/z$  : 179 résulterait de la rupture de la liaison carbone-oxygène en  $\beta$  du groupement carboxylique. Le fragment à  $m/z$  : 163 serait lié à la scission de la liaison carbone-oxygène en  $\gamma$  du groupement carboxylique (Fragmentation  $\alpha$ ). Quant au fragment à  $m/z$  : 151, il découlerait d'une double coupure au niveau des liaisons carbone-carbone et carbone-oxygène respectivement en  $\alpha$  et en  $\gamma$  du groupement carboxylique (schéma 28). Le composé **19** est donc l'Acide rosamarinique qui appartient à la famille des polyphénols. Ce composé a été rapporté dans la littérature (Prawatsri *et al.*, 2013) (Lautie *et al.*, 2008).



**Figure 113:** Structure du composé **19**

### Conclusion partielle

L'interprétation des spectres de masse tirés des analyses SM/MS ont permis d'identifier les structures de dix-neuf (19) composés. Elles peuvent être réparties comme suit : polyphénols (10) et terpénoïdes (9).

## VII. STRUCTURES DES COMPOSES DES FRACTIONS AU DICHLOROMETHANE ET A L'ACETATE D'ETHYLE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse a permis l'identification de plusieurs molécules dans les fractions à l'acétate d'éthyle et au dichlorométhane issues des extraits hydroalcooliques des feuilles de *Hyptis suaveolens* avant et après l'extraction de l'huile essentielle. Il s'agit ici d'établir la conformité de ces structures proposées avec leur spectre de masse par la détermination de schémas de fragmentations cohérents.

### VII.1. ANALYSES GC-MS DES FRACTIONS A L'ACÉTATE D'ÉTHYLE ISSUES DES EXTRAITS HYDROALCOOLIQUES AVANT ET APRÈS L'EXTRACTION DE L'HUILE ESSENTIELLE DES FEUILLES DE *HYPTIS SUAVEOLENS*

Les chromatogrammes des fractions à l'acétate d'éthyle indiquent la présence de plusieurs composés autant avant qu'après extraction de l'huile essentielle (figures 114 A et figures 114 B).

### VII.1.1. Analyses GC-MS comparative des fractions à l'acétate d'éthyle avant et après l'extraction de l'huile essentielle

Les chromatogrammes GC-MS des fractions à l'acétate d'éthyle issues des extraits hydroalcooliques avant et après extraction de l'huile essentielle (figure 114 ou annexe 15 et 16) présentent au total 33 et 30 composés respectivement dont les temps de rétention varient entre 16,496 et 41,290 minutes.

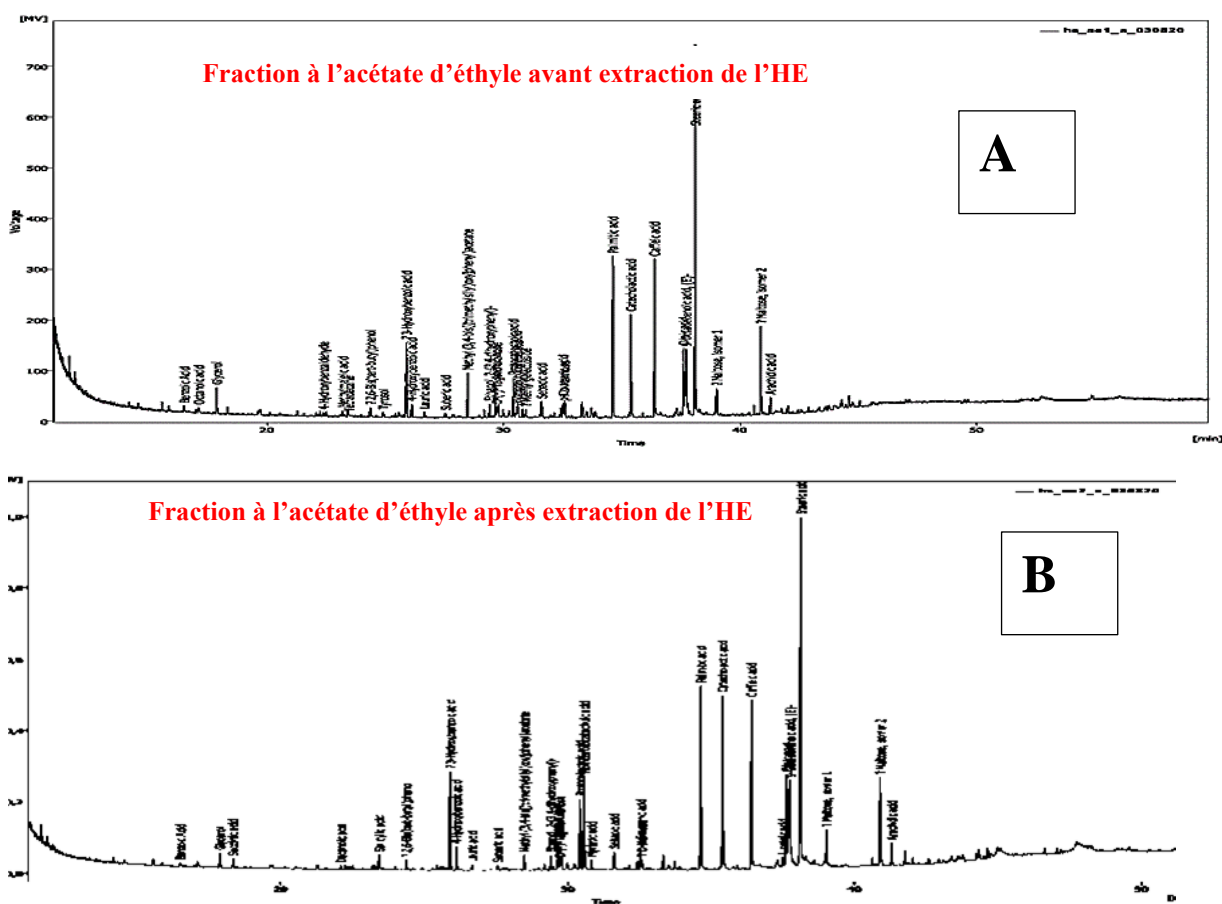


Figure 114: Chromatogrammes des fractions à l'acétate d'éthyle avant et après extraction de l'HE

Les noms des différents composés détectés sont consignés dans le tableau 15.

Tableau 15 : Composés détectés dans les fractions à l'acétate d'éthyle avant et après extraction de l'HE

N°	Temps de rétention (min)	Nom du composé	Avant	Après
----	--------------------------	----------------	-------	-------



20	16,496	Acide benzoïque	+	+
21	17,107	Acide octanoïque	+	-
22	17,877	Glycérol	+	+
23	18,337	Acide succinique	-	+
24	22,103	Acide décanoïque	-	+
25	22,384	2,4-dihydroxybenzaldéhyde	+	-
26	23,199	Acide méthylmaléique	+	-
27	23,434	Acide salicylique	-	+
28	23,464	Tétradécane	+	-
29	24,364	2,6-Bis(tertio-butyl)-phénol	+	+
30	24,905	4-(2-hydroxyéthyl)phénol	+	-
31	25,890	Acide 3-hydroxybenzoïque	+	+
32	26,115	Acide 4-hydroxybenzoïque	+	+
33	26,655	Acide laurique	+	+
34	27,546	Acide subérique	+	+
35	28,481	2-(3,4-dihydroxyphényl) acétate de méthyle	+	+
36	29,401	2-(3,4-dihydroxyphényl)éthanol	+	+
37	29,646	Acide azélaïque	+	+
38	29,719	D-(-)-Tagatofuranose	+	+
39	30,407	Acide 3,4-dihydroxybenzoïque	+	+
40	30,557	Acide 2-(3,4-dihydroxyphényl) acétique	+	+
41	30,602	Diisobutyl phtalate	+	-
42	30,812	Acide myristique	+	+
43	30,947	Méthylgalactoside	+	-
44	31,607	Acide sébacique	+	+
45	32,522	Acide <i>p</i> -coumarique	+	+
46	32,578	D-mannose	+	+
47	34,618	Acide palmitique	+	+
48	35,384	Acide 3-(3,4-dihydroxyphényl)-2-hydroxypropanoïque	+	+
49	36,384	Acide caféique	+	+
50	37,494	Acide linoléique	-	+
51	37,614	Acide oléique	+	+
52	37,719	Acide ( <i>E</i> )-9-octadécénoïque	+	+
53	38,100	Acide stéarique	+	+
54	39,005	Maltose isomère 1	+	+
55	40,876	Maltose isomère 2	+	+
56	41,271	Acide arachidique	+	+

+ : Présence ; - : Absence

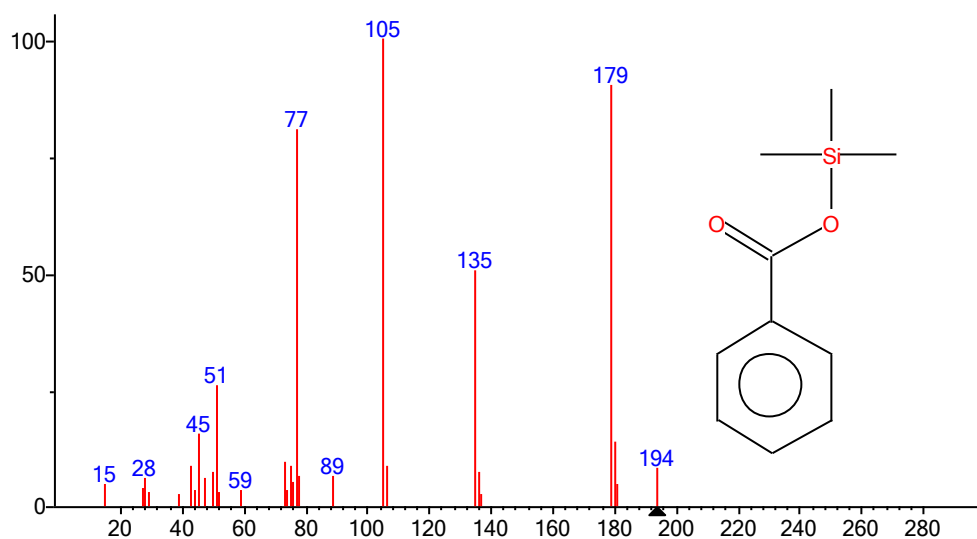
Les résultats enregistrés dans le tableau 15 indiquent la présence de 26 composés thermostables sur les 37 détectés dans les fractions à l'acétate d'éthyle (soit 70,3 %). La majorité de ces composés thermostables sont des composés aromatiques ou des hétérocycles qui sont reconnus pour leur stabilité thermique (Lin *et al.*, 1998)

### VII.1.2. Structures des composés détectés des fractions à l'acétate d'éthyle avant et après l'extraction de l'huile essentielle

Dans cette partie, seules les fragmentations des composés aromatiques et phénoliques sont réalisées. Les fragmentations des autres composés (21; 22; 23; 24; 27; 28; 33; 34; 37; 42; 44; 46; 47; 50; 51; 52; 53) notamment celles des composés aliphatiques qui se font généralement par ruptures successives de liaisons carbone-carbone ne sont pas étudiés dans ce travail. Egalement pour les composés hydrocarbonés saturés acycliques dont le spectre de fragmentation est marqué par une décroissance de l'intensité des pics lorsque la masse des ions fragments croît. Quant aux alcanes ramifiés leurs spectres de fragmentation sont caractérisés par des clivages au niveau des branches de ramification et la présence du pic moléculaire (McCarthy *et al.*, 1968) (M.Silverstein *et al.*, 2005).

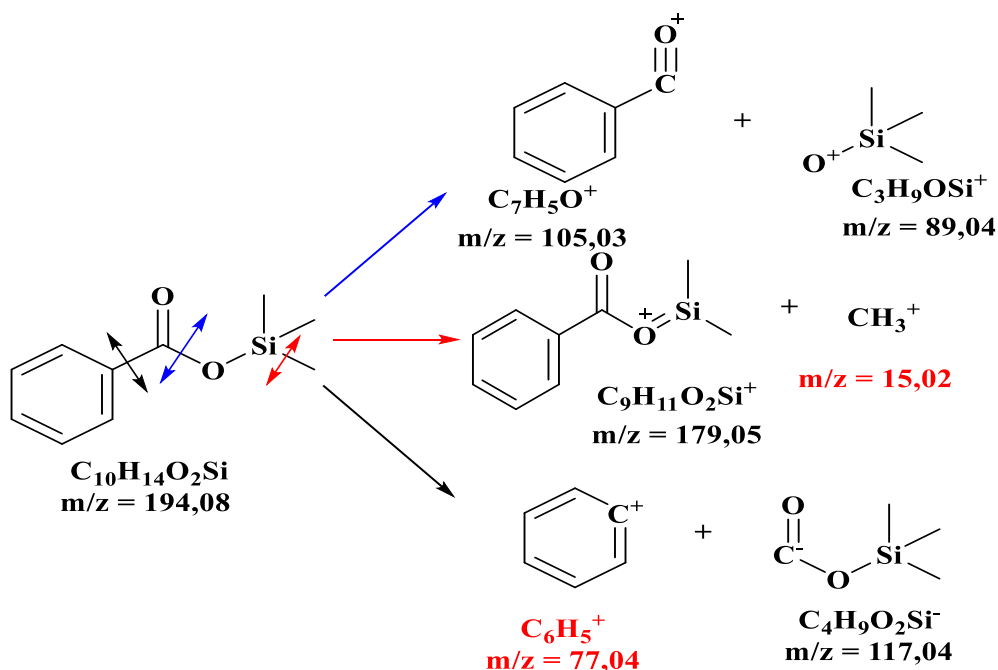
#### Composé 20

La base de données de l'appareil indique que le composé **20** du pic 1 de temps de rétention 16,496 min correspond à l'acide benzoïque silylé de masse moléculaire 194 qui représente l'ion moléculaire (figure 115).



**Figure 115:** Spectre de masse du composé **20**

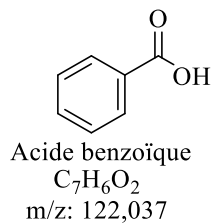
L'analyse du spectre de fragmentation du composé **20** (figure 115) montre la présence de fragments majeurs à m/z : 194, m/z : 179 (pic de base), m/z : 135, m/z : 105, m/z : 89, m/z : 77.



**Schéma 29:** Proposition de fragmentation du composé 20

Le pic majoritaire à  $m/z$  : 105 et le fragment à  $m/z$  : 89 ( $C_3H_9OSi$ ) seraient dus à la rupture de la liaison simple entre l'oxygène et le carbone. Le pic de base à  $m/z$  : 179 et le fragment à  $m/z$  : 15 ( $CH_3$ ) proviendraient de la coupure de la liaison entre le silicium et un groupement méthyle. Le fragment à  $m/z$  : 77 résulterait de la rupture de la liaison en  $\alpha$  du cycle aromatique (schéma 29).

La structure recherchée serait donc celle de l'acide benzoïque (figure 116) dont l'indice de Kovats expérimental du dérivé silylé est égale à  $1229 \pm 3$  contre 1240 pour l'indice de Kovats théorique (Annexe 15). Ce composé appartient à la famille des composés phénoliques. Il n'aurait pas encore été identifié dans les feuilles de la plante.



**Figure 116:** Structure du composé 20

## Composé 25

Le composé **25** de temps de rétention 22,384 min correspond au 2,4-dihydroxybenzaldehyde silylé de masse moléculaire à  $m/z$  : 282 qui représente l'ion moléculaire (figure 117).

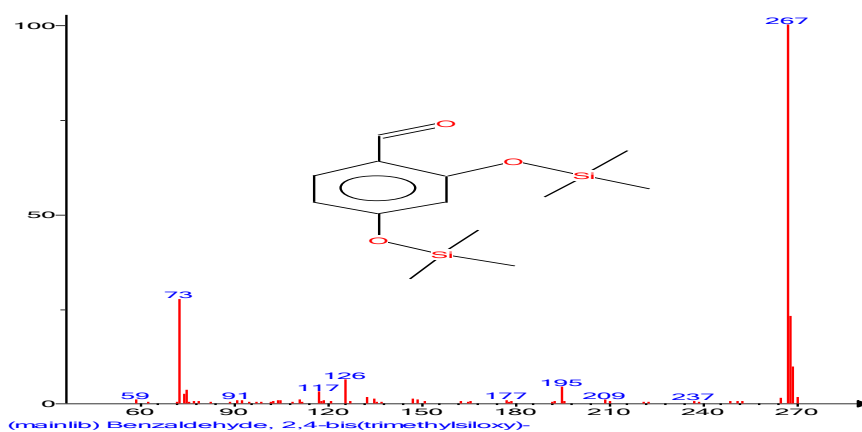


Figure 117: Spectre de masse du composé **25**

L'analyse du spectre de fragmentation du composé **25** (figure 117) montre la présence de fragments majeurs à  $m/z$  : 267 (pic de base),  $m/z$  : 209,  $m/z$  : 193,  $m/z$  : 157,  $m/z$  : 127,  $m/z$  : 73.

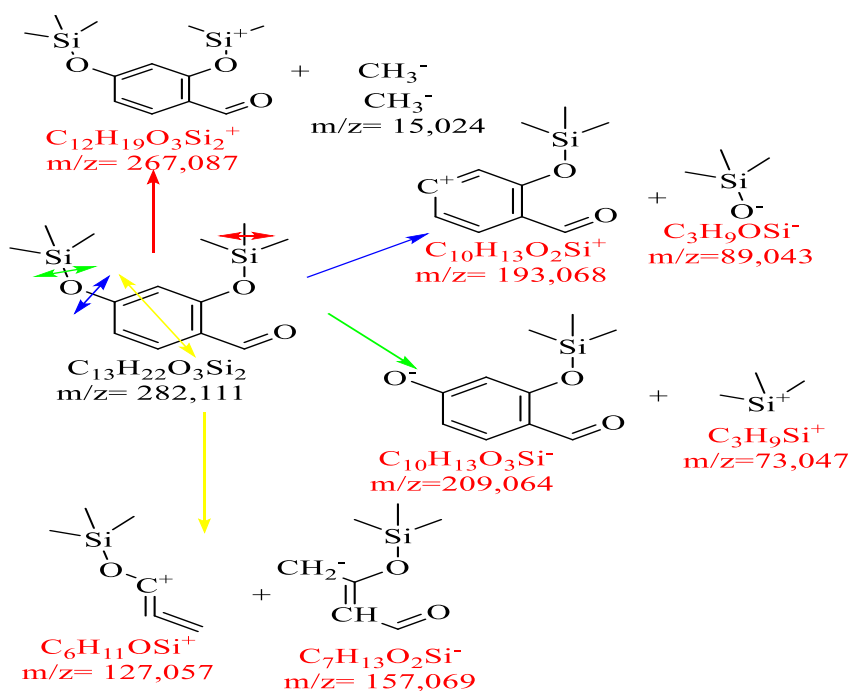
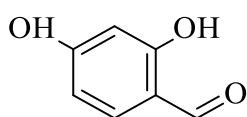


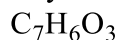
Schéma 30: Proposition de fragmentation du composé **25**

Le fragment le plus abondant à  $m/z$  : 267 serait dû à la perte d'un groupement méthyle sur le silicium. Les fragments à  $m/z$  : 73 (groupement triméthylsilyle) et à  $m/z$  : 209 résulteraient de la rupture d'une liaison oxygène-silicium. Les fragments à  $m/z$  : 193 (195 sur le spectre) et à  $m/z$  : 89 (91  $m/z$  sur le spectre), proviendraient de la rupture de la liaison entre un carbone et un oxygène lié au silicium (schéma 30).

La structure recherchée serait donc celle du 2,4-dihydroxybenzaldehyde, TMS (figure 118) dont l'indice de Kovats expérimental du dérivé silylé est égale à  $1308 \pm 5$  contre 1306 pour l'indice de Kovats théorique (Annexe 15). Ce composé appartient à la famille des composés phénoliques. Il n'aurait pas encore été identifié dans les feuilles de la plante.



2,4-dihydroxybenzaldehyde

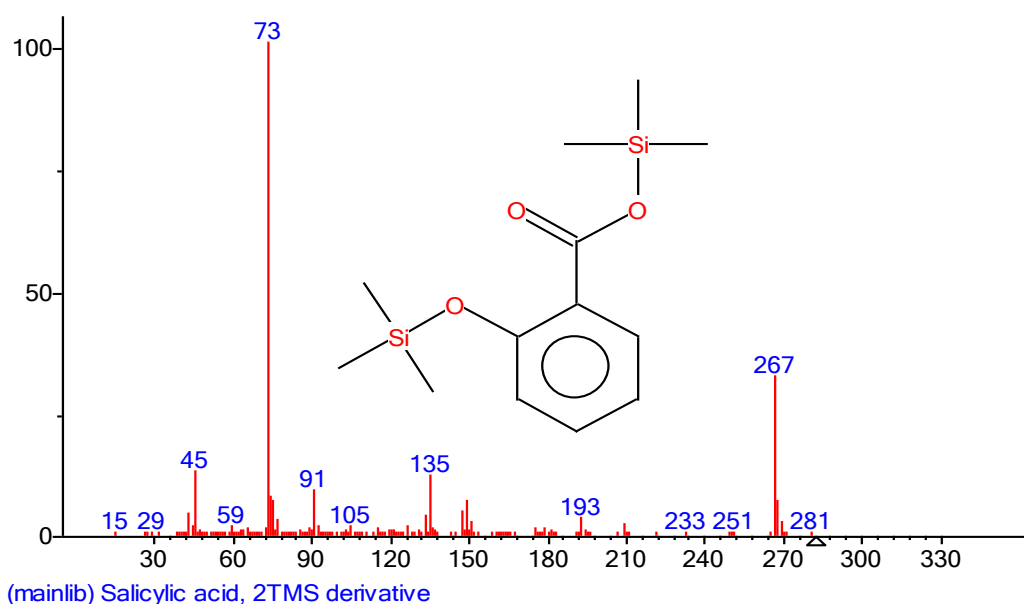


$$m/z = 138,032$$

**Figure 118:** Structure du composé **25** (Acide succinique)

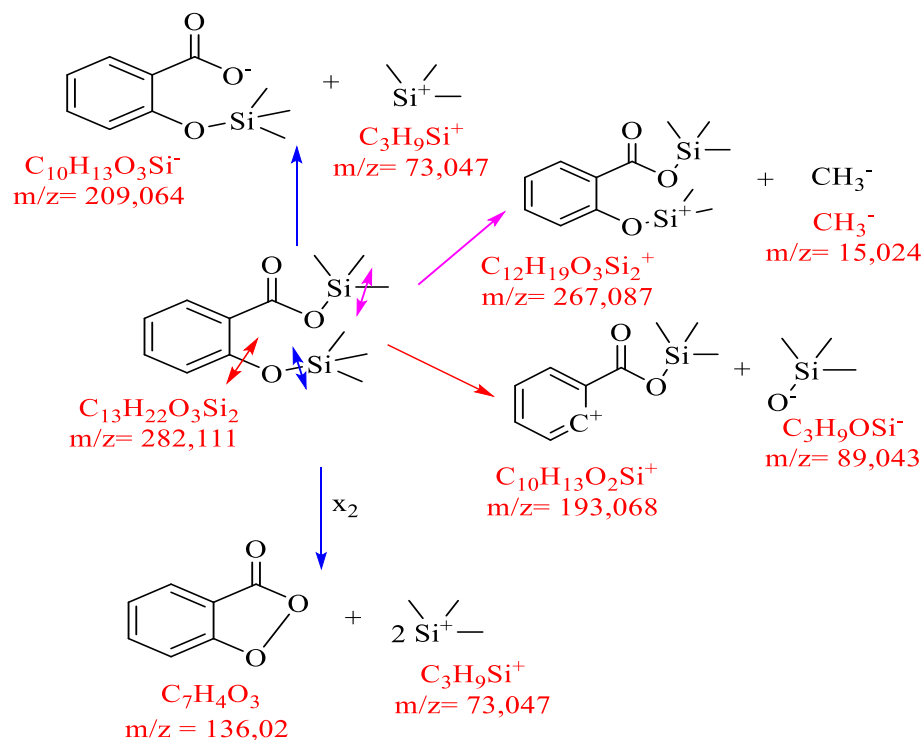
### Composé 26

Le composé **26** de temps de rétention 23,434 min correspond à l'acide salicylique silylé de masse moléculaire  $m/z = 282$  (281 sur le spectre) qui représente l'ion moléculaire (figure 119).



**Figure 119:** Spectre de masse du composé **26**

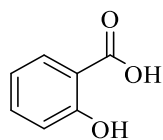
L'analyse du spectre de fragmentation du composé **26** (figure 119) montre la présence de fragments majeurs à  $m/z$  : 267,  $m/z$  : 209 (pic de base),  $m/z$  : 193,  $m/z$  : 135,  $m/z$  : 89,  $m/z$  : 73.



**Schéma 31:** Proposition de fragmentation du composé **26**

Le fragment le plus abondant à  $m/z$  : 73 (groupe triméthylsilyl) et le fragment à  $m/z$  : 209 résulteraient de la rupture d'une liaison oxygène-silicium. Le fragment à  $m/z$  : 267 serait dû à la perte d'un groupe méthyle sur le silicium. Les fragments à  $m/z$  : 193 et à  $m/z$  : 89 (91  $m/z$  sur le spectre) proviendraient de la rupture de la liaison entre un carbone et un oxygène lié au silicium. Le fragment à  $m/z$  : 136 (135 sur le spectre) serait issu du départ des deux groupes triméthylsilyles (schéma 31).

La structure recherchée serait donc celle de l'acide 2-hydroxybenzoïque (figure 120) dont l'indice de Kovats expérimental du dérivé silylé est égale à  $1522 \pm 3$  contre 1497 pour l'indice de Kovats théorique (Annexe 16). Ce composé appartient à la famille des composés phénoliques. Il n'aurait pas encore été identifié dans les feuilles de la plante.

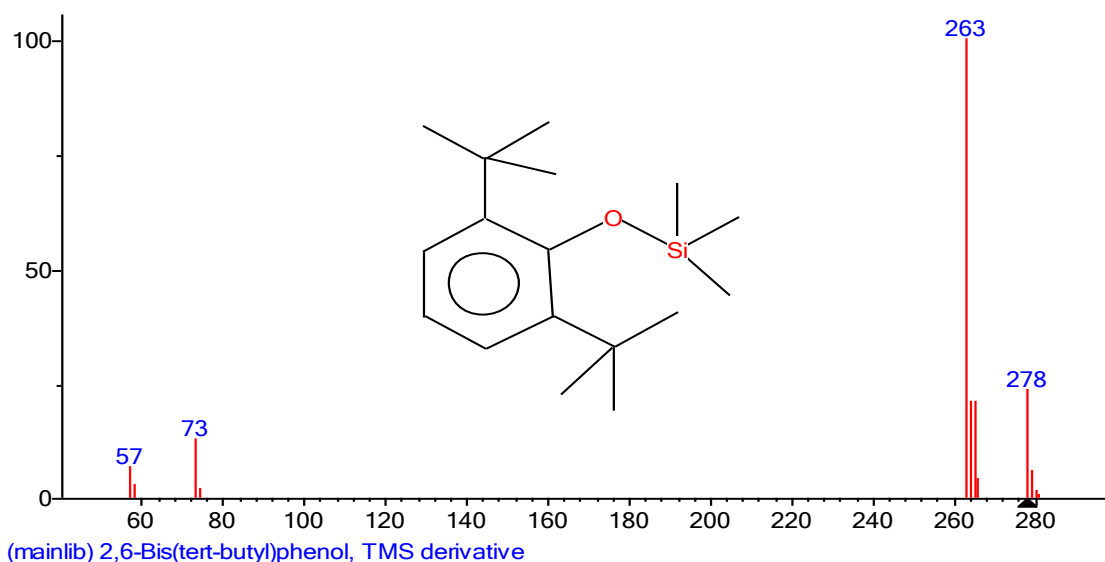


Acide 2-hydroxybenzoïque

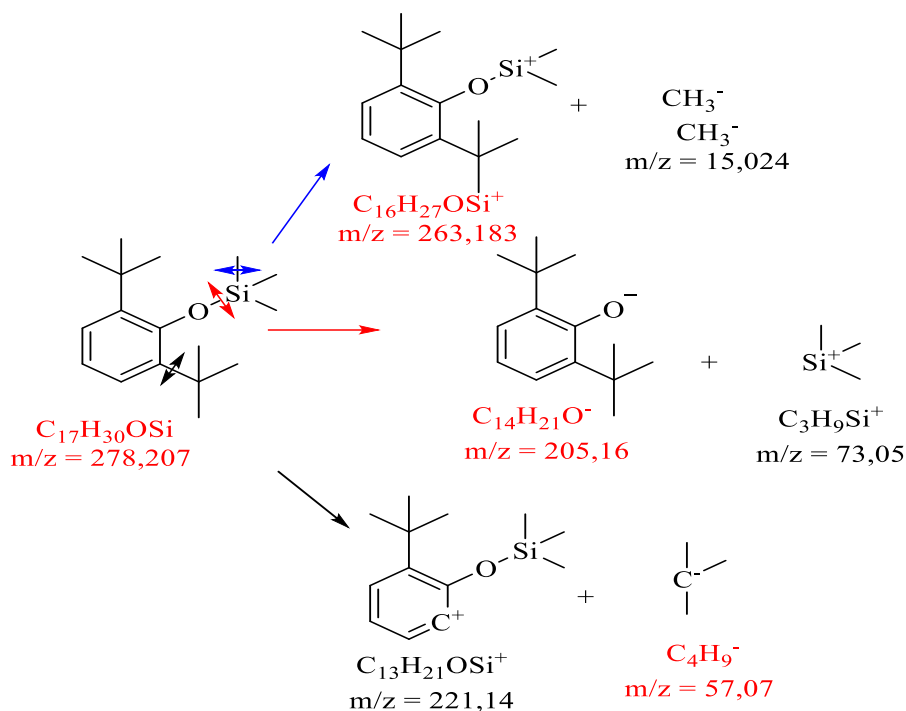
$C_7H_6O_3$   
 $m/z = 138,032$

**Figure 120:** Structure du composé **26** (Acide salicylique)**Composé 29**

Le composé **29** de temps de rétention 24,364 min correspond au 2,6-Bis(tert-butyl)phénol silylé de masse moléculaire à  $m/z$  : 278 qui représente l'ion moléculaire (figure 121)

**Figure 121:** Spectre de masse du composé **29**

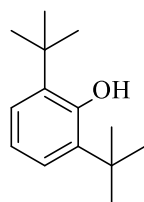
L'analyse du spectre de fragmentation du composé **29** (figure 121) montre la présence de fragments majeurs à  $m/z$  : 278,  $m/z$  : 263 (pic de base),  $m/z$  : 73,  $m/z$  : 57.



**Schéma 32:** Proposition de fragmentation du composé **29**

Le fragment le plus abondant à  $m/z$  : 263 résulterait de la perte d'un groupement méthyle sur le silicium. Le fragment à  $m/z$  : 73 pourrait être un groupement triméthylsilyl qui résulterait de la rupture de la liaison oxygène-silicium. Le fragment à  $m/z$  : 57 ( $C_4H_9$ ) proviendrait de la cassure d'une liaison carbone-carbone entre un groupement tertibutyle et le cycle aromatique (schéma 32).

La structure recherchée serait donc celle du 2,6-Bis(tert-butyl)phénol (figure 122) dont l'indice de Kovats expérimental du dérivé silylé est égale à 1632 contre 1535 pour l'indice de Kovats théorique (Annexe 15). Ce composé appartient à la famille des composés phénoliques. Il a déjà été isolé de l'huile essentielle des feuilles de la plante (Malele *et al.*, 2003).



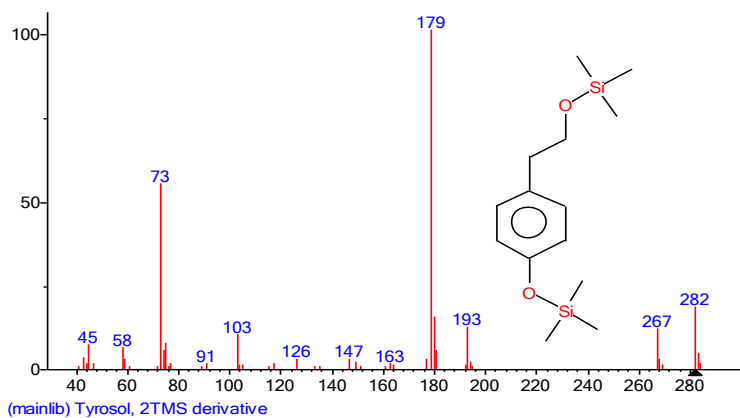
2,6-bis(tert-butyle)-phénol  
 $C_{14}H_{22}O$   
 $m/z = 206,167$

**Figure 122:** Structure du composé **29**



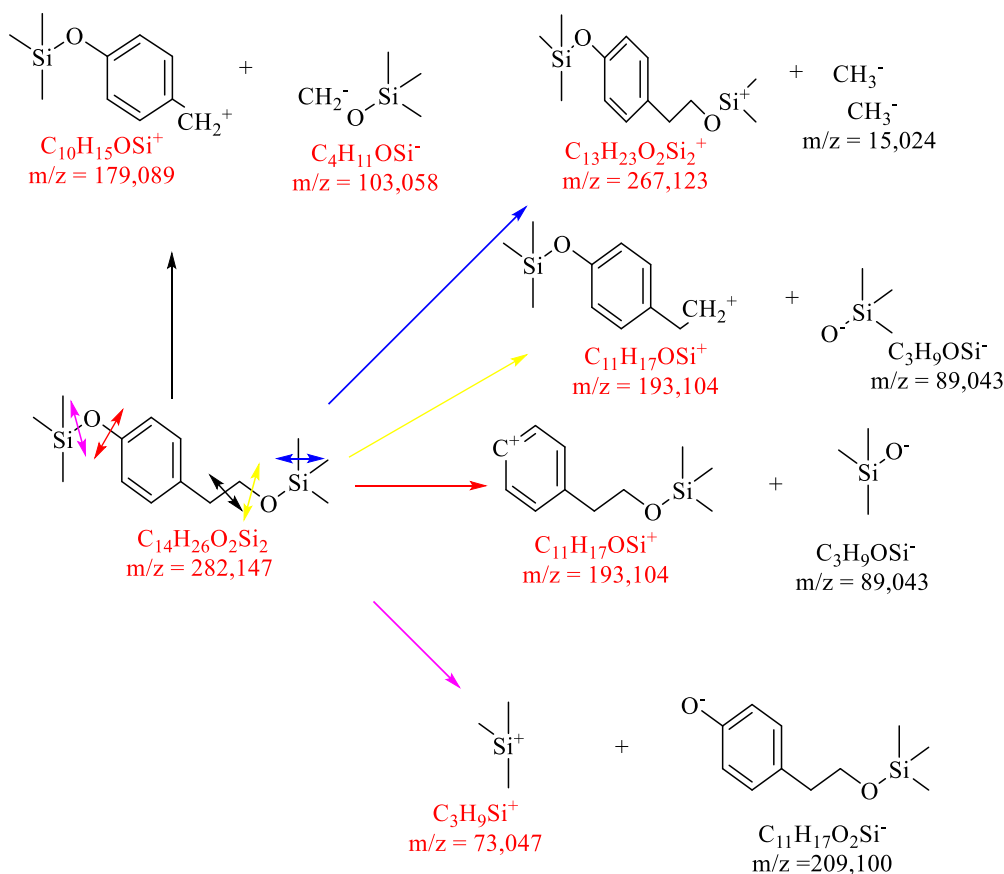
**Composé 30**

Le composé **30** de temps de rétention 24,905 min correspond au 4-(2-hydroxyethyl) phénol silylé de masse moléculaire à  $m/z$  : 282 qui représente l'ion moléculaire (figure 123).



**Figure 123:** Spectre de masse du composé **30**

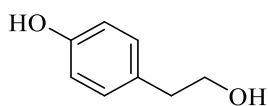
L'analyse du spectre de fragmentation du composé **30** (figure 123) montre la présence de fragments majeurs à  $m/z$  : 282,  $m/z$  : 267,  $m/z$  : 193,  $m/z$  : 179 (pic de base),  $m/z$  : 103,  $m/z$  : 73.



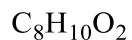
**Schéma 33:** Proposition de fragmentation du composé **30**

Le fragment le plus abondant à  $m/z$  : 179 et le fragment à  $m/z$  : 103 résulteraient de la rupture de la liaison carbone-carbone en position  $\beta$  du cycle. Le fragment à  $m/z$  : 267 serait dû à la perte d'un groupement méthyle sur le silicium. Le fragment à  $m/z$  : 193 proviendrait du départ d'un dérivé silylé  $[(CH_3)_3SiO^-]$  par coupure de liaison carbone-oxygène entre le cycle et l'oxygène en  $\alpha$  ou en  $\gamma$  du cycle. Le fragment à  $m/z$  : 73 pourrait être un groupement triméthylsilyl qui résulterait de la rupture d'une liaison oxygène-silicium (schéma 33).

La structure recherchée serait donc celle du Tyrosol (figure 124) dont l'indice de Kovats expérimental du dérivé silylé est égale à  $1566 \pm 1$  contre 1557 pour l'indice de Kovats théorique (Annexe 15). Ce composé est de la famille des composés phénoliques. Il n'aurait pas encore été identifié dans les feuilles de la plante.



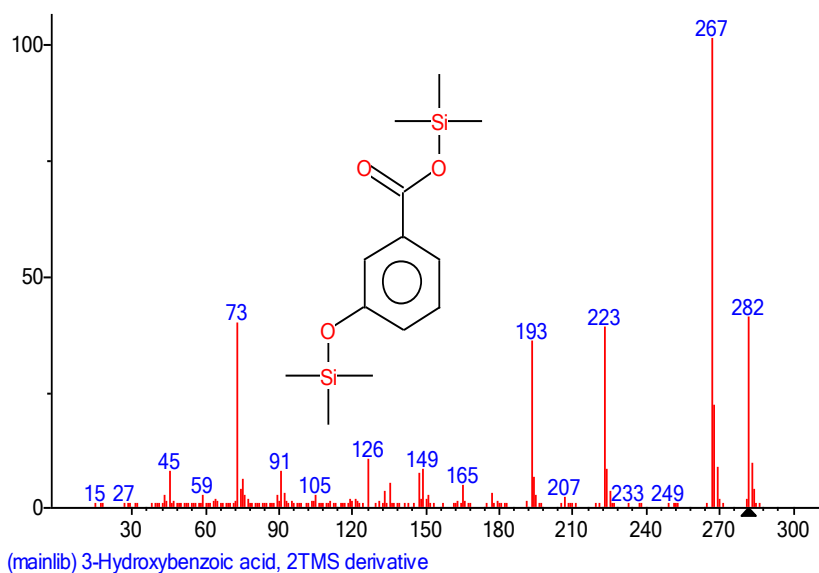
4-(2-hydroxyéthyl)phénol



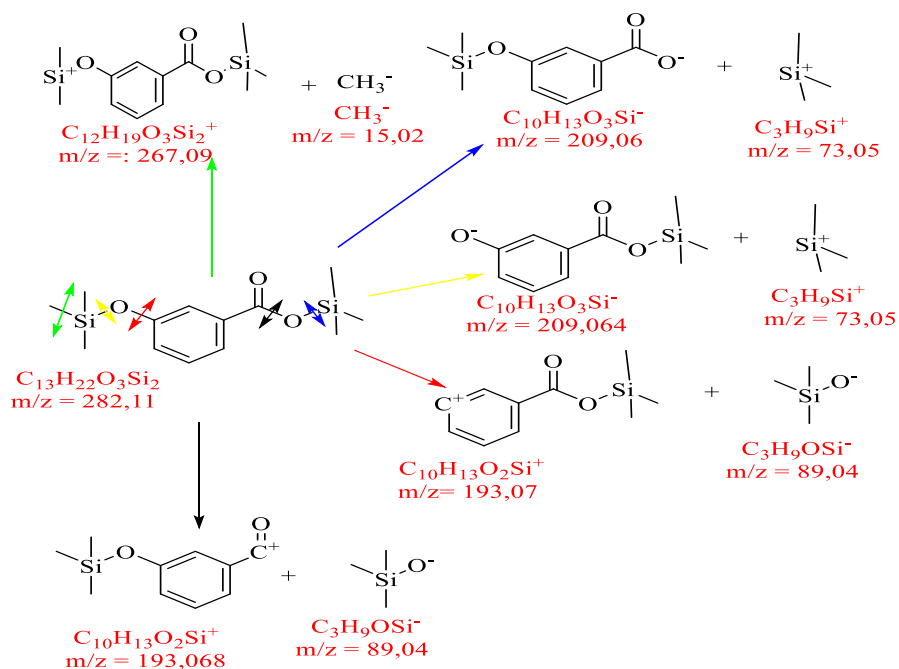
$$m/z = 138,068$$

**Figure 124:** Structure du composé **30** (Tyrosol)**Composé 31**

Le composé **31** de temps de rétention 25,890 min correspond à l'acide 3-hydroxybenzoïque silylé de masse moléculaire à  $m/z$  : 282 qui représente l'ion moléculaire (figure 125).

**Figure 125:** Spectre de masse du composé **31**

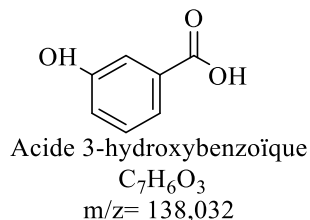
L'analyse du spectre de fragmentation du composé **31** (figure 125) montre la présence de fragments majeurs à  $m/z$  : 282,  $m/z$  : 267 (pic de base),  $m/z$  : 223,  $m/z$  : 193,  $m/z$  : 126,  $m/z$  : 73.



**Schéma 34:** Proposition de fragmentation du composé 31

Le fragment le plus abondant à  $m/z$  : 267 serait dû à la perte d'un groupement méthyle sur le silicium. Les fragments à  $m/z$  : 73 (groupement triméthylsilyl) et à  $m/z$  : 209 (207 sur le spectre de masse, différence probablement due à la présence d'isotopes) résulteraient de la rupture d'une liaison oxygène-silicium. Les fragments à  $m/z$  : 193 et à  $m/z$  : 89 (91  $m/z$  sur le spectre) proviendraient de la rupture de la liaison entre un carbone et un oxygène lié au silicium (schéma 34).

La structure recherchée serait donc celle de l'acide 3-hydroxybenzoïque (figure 126) dont l'indice de Kovats expérimental du dérivé silylé est égale à  $1560 \pm 1$  contre 1596 pour l'indice de Kovats théorique (Annexe 15). Ce composé appartient à la famille des composés phénoliques. Il n'aurait pas encore été identifié dans les feuilles de la plante.



**Figure 126:** Structure du composé 31

## Composé 32

Le composé **32** de temps de rétention 26,115 min correspond à l'acide 4-hydroxybenzoïque silylé de masse moléculaire à  $m/z$  : 282 qui représente l'ion moléculaire (figure 127).

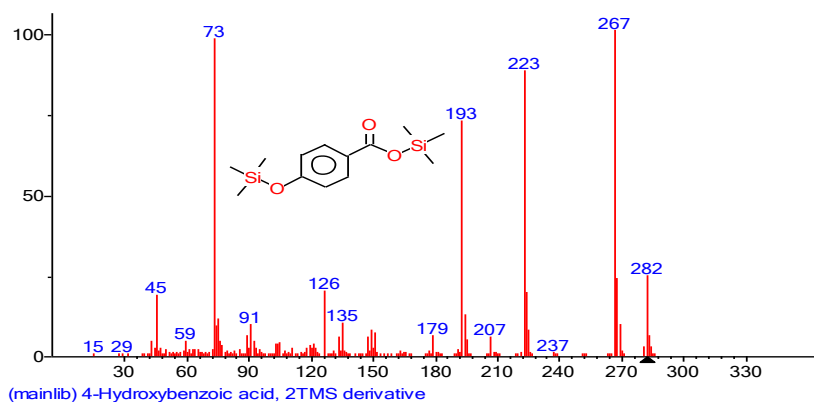


Figure 127: Spectre de masse du composé **32**

L'analyse du spectre de fragmentation du composé **32** (figure 127) montre la présence de fragments majeurs à  $m/z$  : 282,  $m/z$  : 267 (pic de base),  $m/z$  : 223,  $m/z$  : 193,  $m/z$  : 89,  $m/z$  : 73.

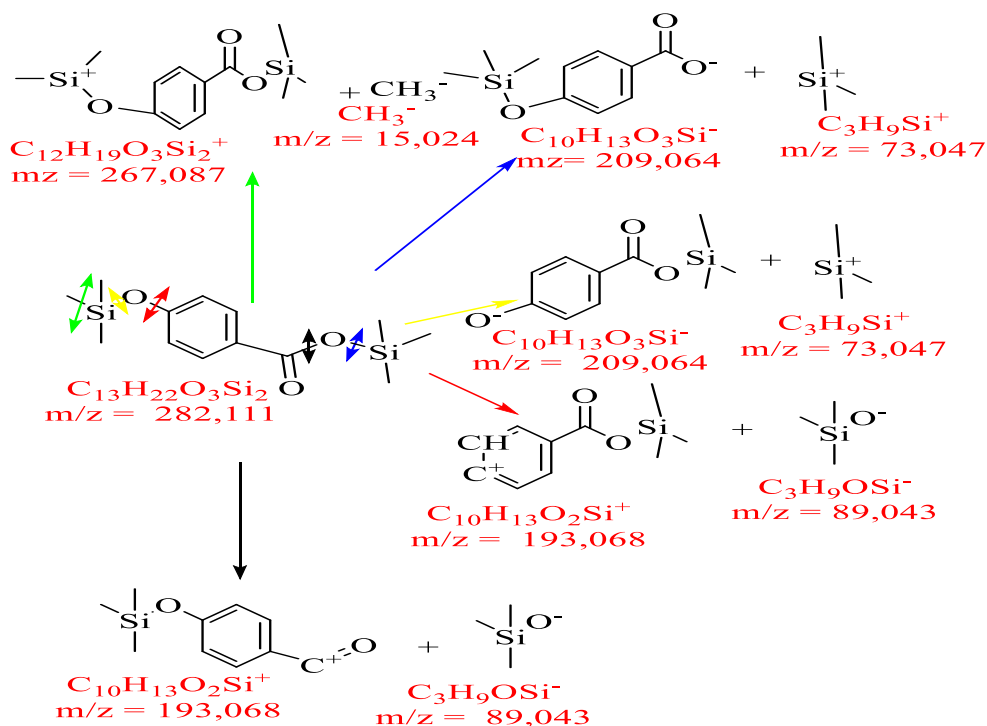
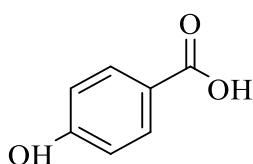


Schéma 35: Proposition de fragmentation du composé **32**

Le fragment le plus abondant à  $m/z$  : 267 serait dû à la perte d'un groupement méthyle sur le silicium. Les fragments à  $m/z$  : 73 (groupement triméthylsilyl) et à  $m/z$  : 209 (207 sur le spectre de masse, différence probablement due à la présence d'isotopes), résulteraient de la rupture d'une liaison oxygène-silicium. Les fragments à  $m/z$  : 193 et à  $m/z$  : 89 (91  $m/z$  sur le spectre), proviendraient de la rupture de la liaison entre un carbone et un oxygène lié au silicium (schéma 35).

La structure recherchée serait donc celle de l'acide 4-hydroxybenzoïque (figure 128) dont l'indice de Kovats expérimental du dérivé silylé est égale à  $1622 \pm 1$  contre 1607 pour l'indice de Kovats théorique (Annexe 15). Ce composé est de la famille des composés phénoliques. Il n'aurait pas encore été identifié dans les feuilles de la plante.

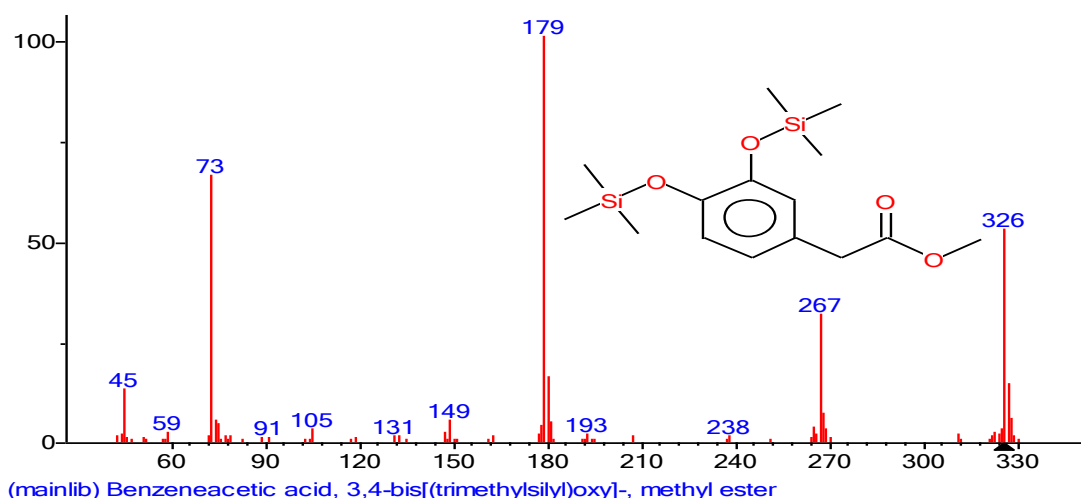


Acide 4-hydroxybenzoïque  
 $C_7H_6O_3$   
 $m/z = 138,032$

**Figure 128:** Structure du composé **32**

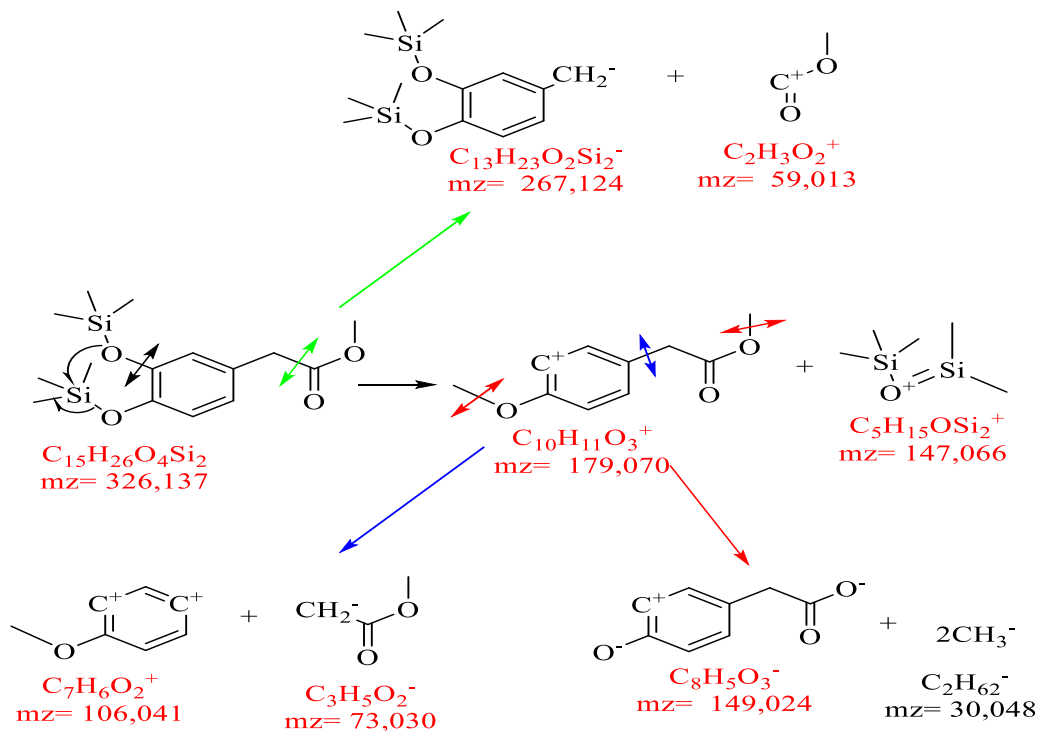
### Composé 35

Le composé **35** de temps de rétention 28,481 min correspond au 2-(3,4-dihydroxyphenyl) acétate de méthyle silylé de masse moléculaire à  $m/z$  : 326 qui représente l'ion moléculaire (figure 129).



**Figure 129:** Spectre de masse du composé **35**

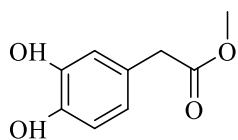
L'analyse du spectre de fragmentation du composé **35** (figure 129) montre la présence de fragments majeurs à  $m/z$  : 326,  $m/z$  : 267,  $m/z$  : 179 (pic de base),  $m/z$  : 149,  $m/z$  : 105,  $m/z$  : 73,  $m/z$  : 45.



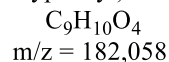
**Schéma 36:** Proposition de fragmentation du composé **35**

Le pic de base à  $m/z$  : 179 serait dû à la perte de deux dérivés silylés  $[(CH_3)_2Si=OSi(CH_3)_3]$  par cassure de liaisons oxygène-silicium et oxygène-carbone après transposition. Les fragments à  $m/z$  : 267 et à  $m/z$  : 59 découleraient de la rupture de la liaison (C-C) en  $\alpha$  du groupement carbonyle. Les fragments à  $m/z$  : 73 (groupement triméthylsilyl) et 106 (105 sur le spectre), résulteraient de la coupure d'une liaison (C-C) en  $\alpha$  du cycle aromatique à partir du pic de base. Egalement, le fragment à  $m/z$  : 149 serait issu du pic de base par perte des deux groupements méthyles (schéma 36).

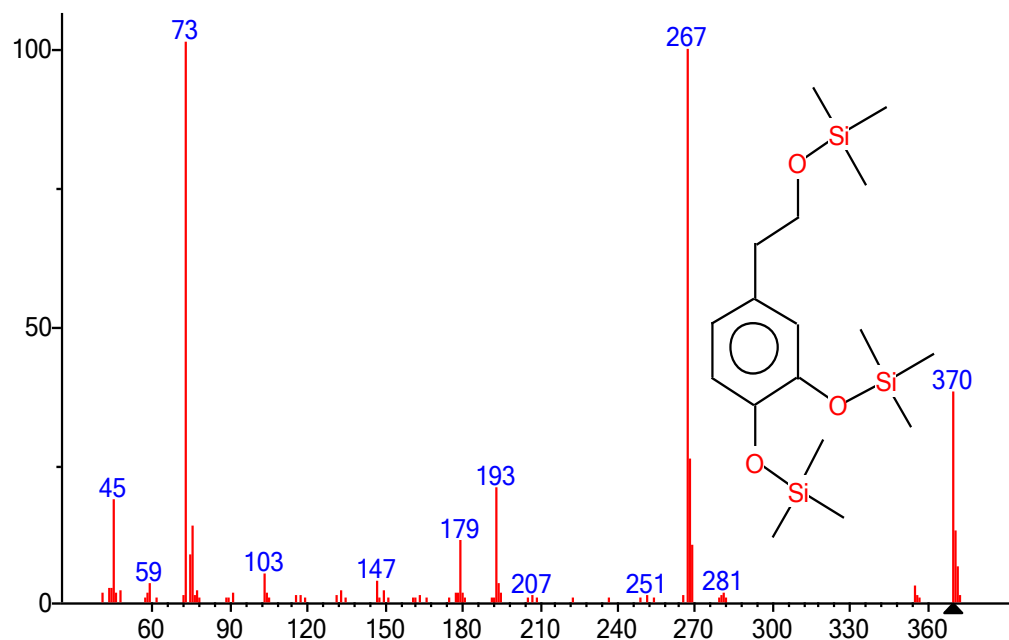
La structure recherchée serait donc celle de l'acide 2-(3,4-dihydroxyphényl) acétate de méthyle (figure 130) dont l'indice de Kovats expérimental du dérivé silylé est égale à 1756 contre 1708 pour l'indice de Kovats théorique (Annexe 15). Ce composé est de la famille des composés phénoliques. Il n'aurait pas encore été identifié dans les feuilles de la plante.



2-(3,4-dihydroxyphenyl)acetate de méthyle

**Figure 130:** Structure du composé **35****Composé 36**

Le composé **36** de temps de rétention 29,401 min correspond au 2-(3,4-dihydroxyphenyl)éthanol silylé de masse moléculaire à  $m/z$  : 370 qui représente l'ion moléculaire (figure 131).

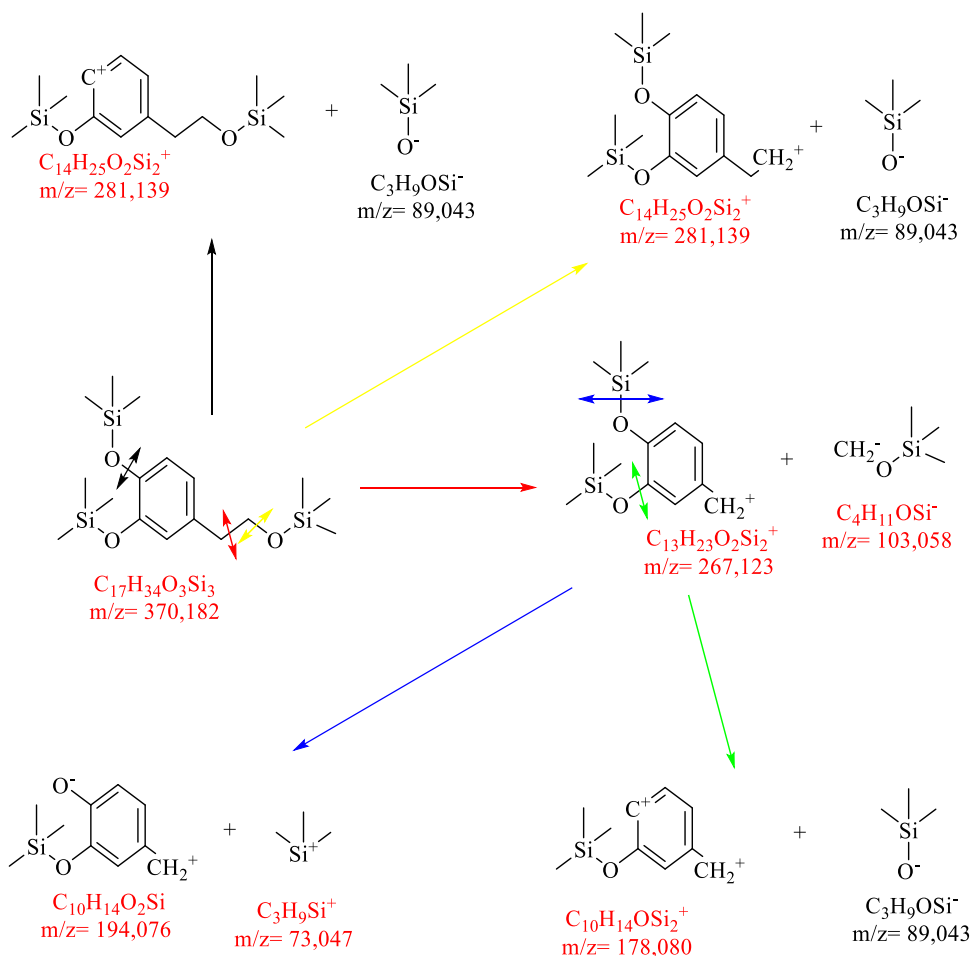


(mainlib) Ethanol, (2-(3,4-dihydroxyphenyl)-, tris(trimethylsilyl)-

**Figure 131:** Spectre de masse du composé **36**

L'analyse du spectre de fragmentation du composé **36** (figure 131) montre la présence de fragments majeurs à  $m/z$  : 370,  $m/z$  : 267 (pic de base),  $m/z$  : 193,  $m/z$  : 179,  $m/z$  : 147,  $m/z$  : 73.

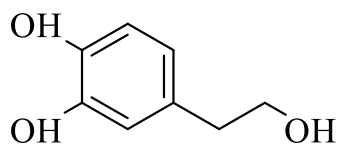




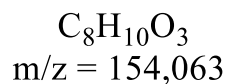
**Schéma 37:** Proposition de fragmentation du composé **36**

Le pic de base à  $m/z$  : 267 et le fragment à  $m/z$  : 103 seraient dus à la scission de la liaison (C-C) en  $\beta$  du cycle aromatique. Le fragment à  $m/z$  : 281 dériverait de la perte d'un groupement  $[(CH_3)_3Si-O]$  par cassure de liaisons oxygène-carbone. Les fragments à  $m/z$  : 73 (groupement triméthylsilyl) et 194 (193 sur le spectre), résulteraient de la cassure d'une liaison (Si-O) à partir du pic de base. Egalement, le fragment à  $m/z$  : 178 (179 sur le spectre) serait issu du pic de base par perte des deux groupements  $[(CH_3)_3Si-O]$  (schéma 37).

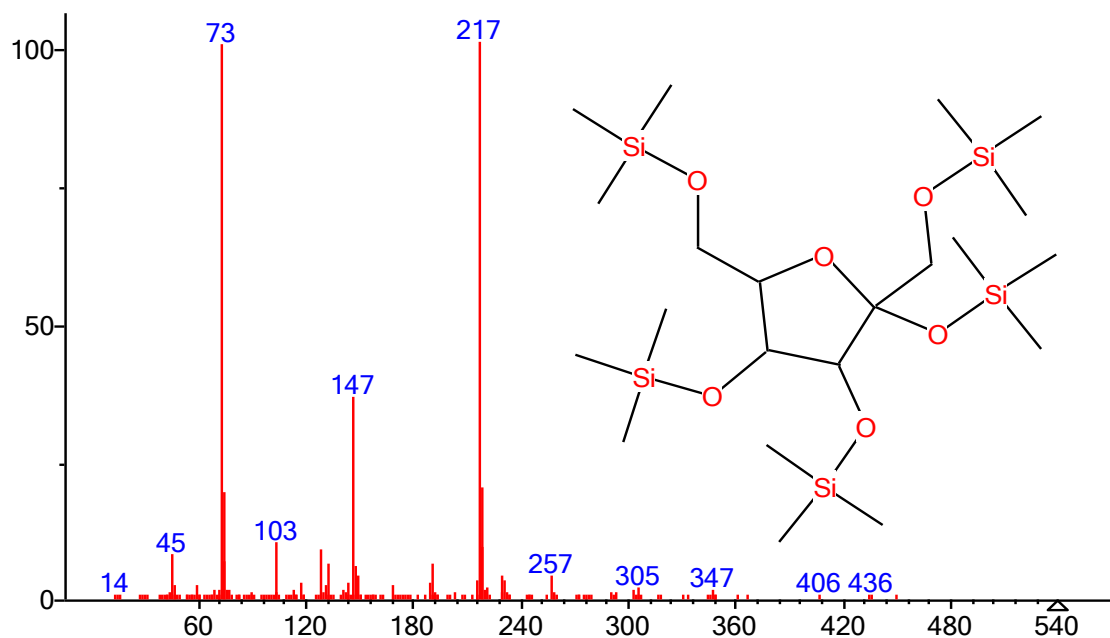
La structure recherchée serait donc celle du 2-(3,4-dihydroxyphényl)éthanol (figure 132) dont l'indice de Kovats expérimental du dérivé silylé est égale à  $1756 \pm 1$  contre 1750 pour l'indice de Kovats théorique (Annexe 16). Ce composé appartient à la famille des composés phénoliques. Il n'aurait pas encore été identifié dans les feuilles de la plante.



2-(3,4-dihydroxyphényl)-éthanol

**Figure 132:** Structure du composé **36****Composé 38**

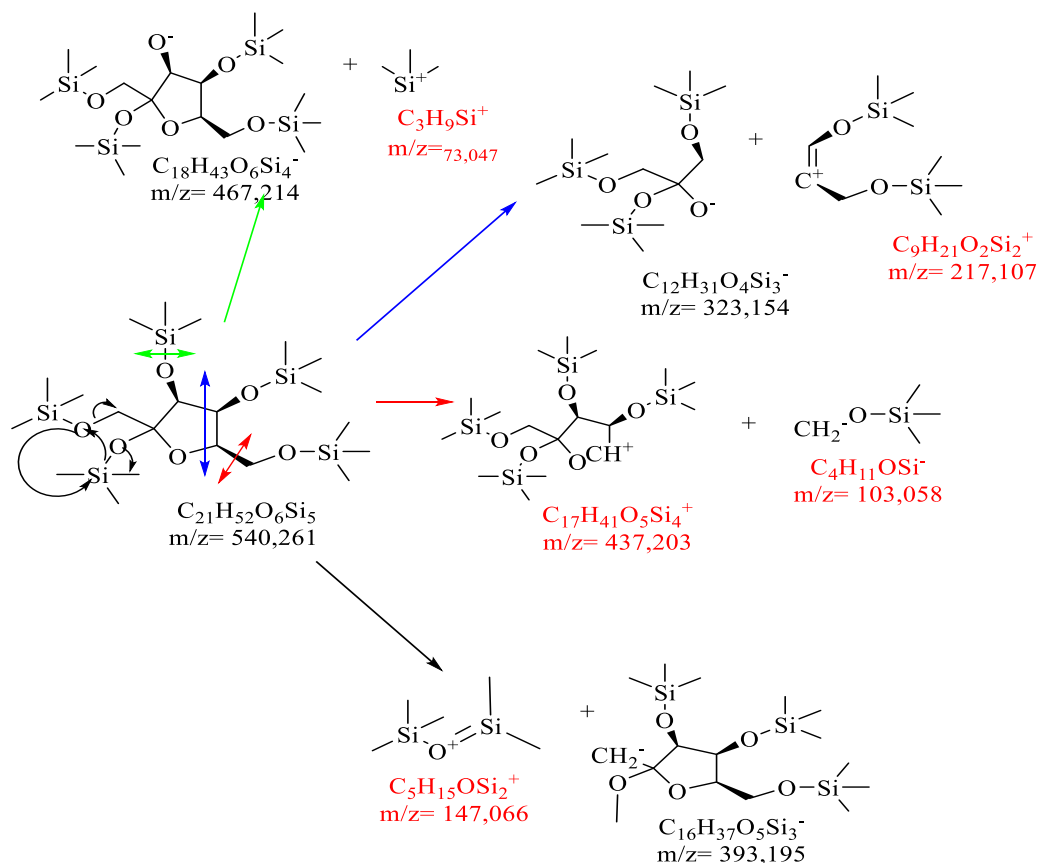
Le composé **38** de temps de rétention 29,716 min correspond au D-(-)-Tagatofuranose silylé de masse moléculaire à  $m/z$  : 540 (figure 133).



(mainlib) D-(-)-Tagatofuranose, pentakis(triméthylsilyl) ether (isomer 2)

**Figure 133:** Spectre de masse du composé **38**

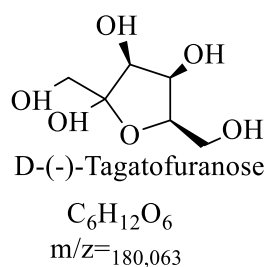
L'analyse du spectre de fragmentation du composé **38** (figure 133) montre la présence de fragments majeurs à  $m/z$  : 436,  $m/z$  : 217 (pic de base),  $m/z$  : 147,  $m/z$  : 103,  $m/z$  : 89,  $m/z$  : 73.



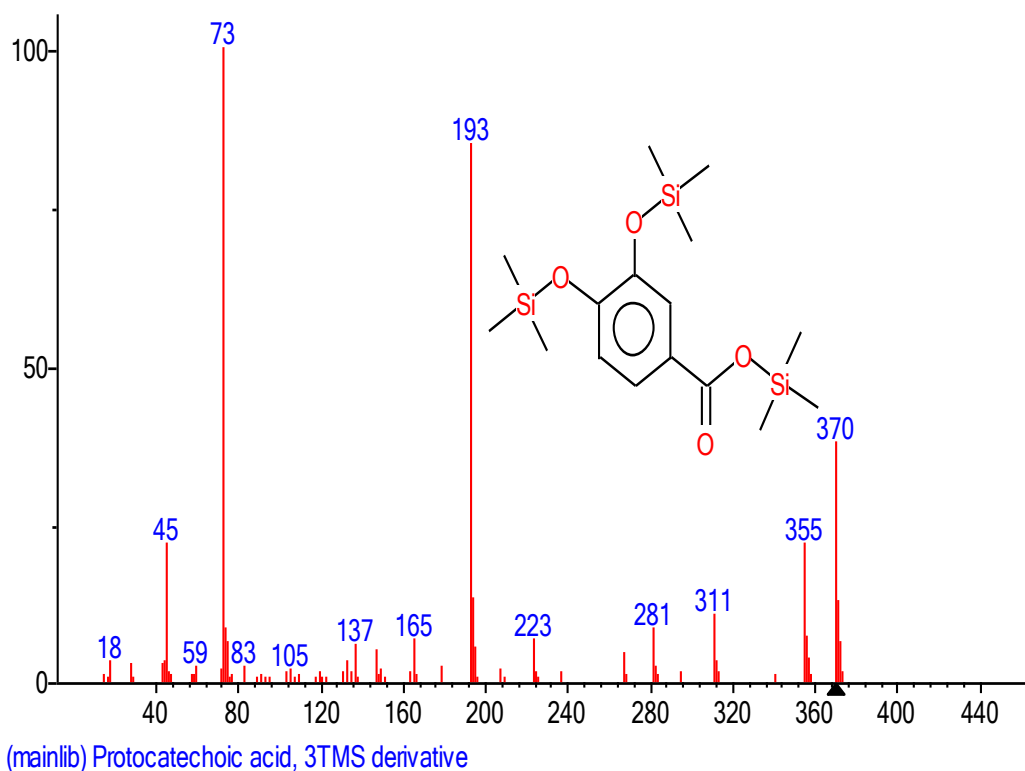
**Schéma 38:** Proposition de fragmentation du composé **38**

Les fragments les plus abondants à m/z : 73 et à m/z : 217 seraient dus respectivement à la rupture de la liaison oxygène-silicium et à l'ouverture du cycle entre l'oxygène et le carbone ternaire adjacent suivie de la scission de la liaison (C-C) en position  $\gamma$  du groupement oxy du cycle. Les fragments de masse à m/z : 103 et à m/z : 437 (436 sur le spectre) seraient dus à la coupure de liaison (C-C) en  $\alpha$  du cycle. Le fragment à m/z : 147 serait un dérivé silylé [(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si=O-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>] par cassure de liaisons oxygène-silicium et oxygène-carbone après transposition (schéma 38).

La structure recherchée serait donc celle du D-(-)-Tagatofuranose (figure 134) dont l'indice de Kovats expérimental du dérivé silylé est égale à  $1813 \pm 1$  contre 1763 pour l'indice de Kovats théorique (Annexe 15). Ce composé peut être classé dans la famille des terpènes et stérols. Il n'aurait pas encore été identifié dans les feuilles de la plante.

**Figure 134:** Structure du composé **38****Composé 39**

Le composé **39** de temps de rétention 30,407 min correspond à l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque silylé de masse moléculaire à  $m/z$  : 370 qui représente l'ion moléculaire (figure 135).

**Figure 135:** Spectre de masse composé **39**

L'analyse du spectre de fragmentation du composé **39** (figure 154) montre la présence de fragments majeurs à  $m/z$  : 370,  $m/z$  : 355,  $m/z$  : 311,  $m/z$  : 281,  $m/z$  : 223,  $m/z$  : 193 (pic de base),  $m/z$  : 165,  $m/z$  : 137,  $m/z$  : 89,  $m/z$  : 73.

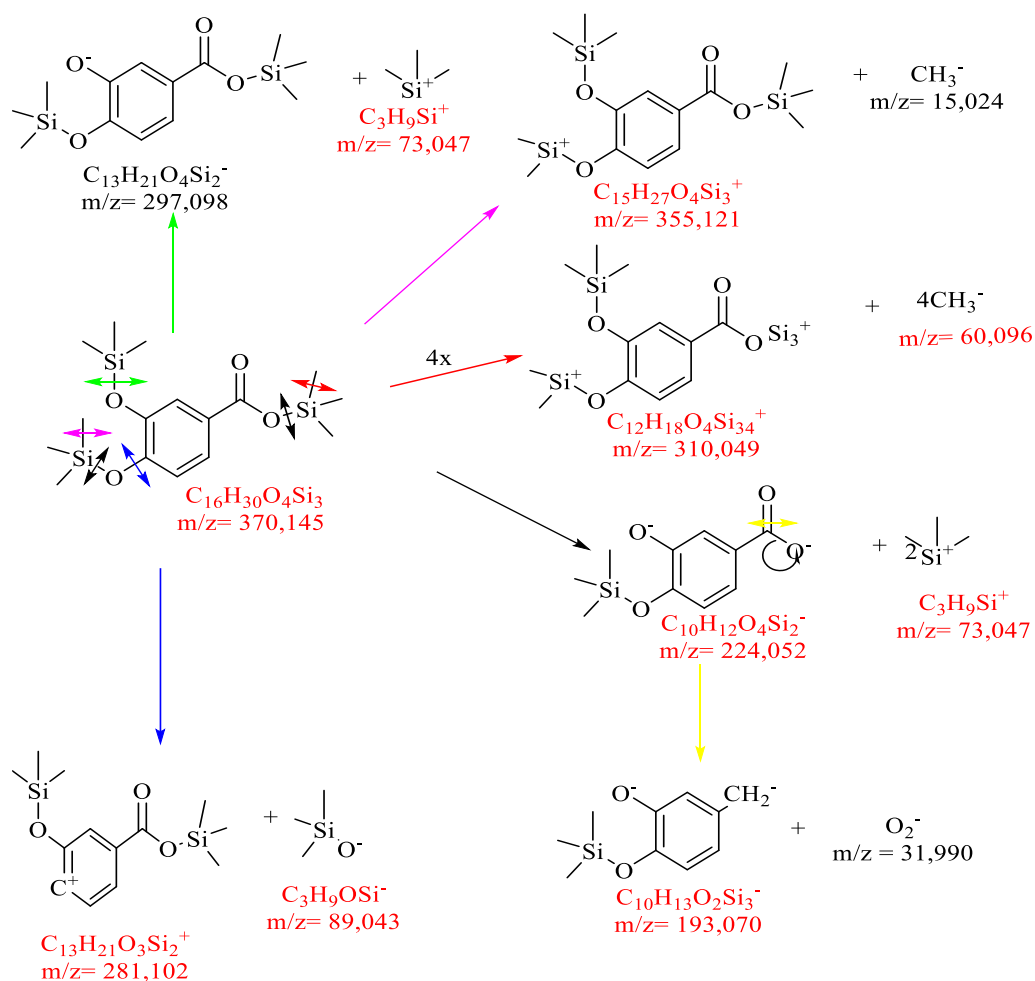
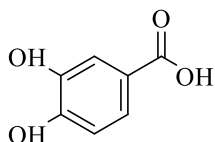


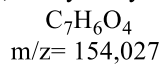
Schéma 39: Proposition de fragmentation du composé 39

Le fragment le plus abondant à  $m/z$  : 73 (groupe triméthylsilyl), serait dû à la rupture d'une liaison oxygène-silicium. La perte d'un groupe méthyle puis de trois autres sur le silicium conduirait respectivement au fragment à  $m/z$  : 355 et celui à  $m/z$  : 310 (311 sur le spectre). Les fragments à  $m/z$  : 281 et à  $m/z$  : 89 (83 sur le spectre de masse, différence probablement due à la présence d'isotopes), résulteraient de la rupture d'une liaison simple oxygène-carbone. Le fragment à  $m/z$  : 224 (223 sur le spectre), ferait suite à la perte de deux groupements triméthylsilyles. Le fragment à  $m/z$  : 193 serait issu du fragment précédant par la fragmentation du groupement carbonyle avec départ des oxygènes sur le carbone du carbonyle (schéma 39).

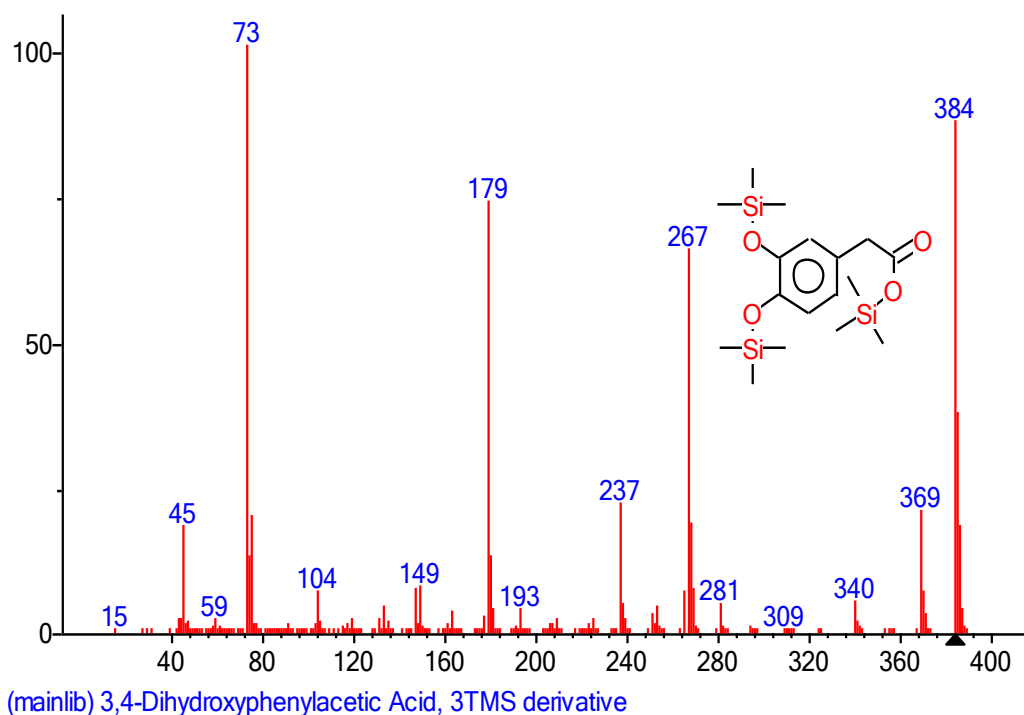
La structure recherchée serait donc celle de l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque (figure 136) dont l'indice de Kovats expérimental du dérivé silylé est égale à  $1835 \pm 1$  contre 1795 pour l'indice de Kovats théorique (Annexe 15). Ce composé est de la famille des composés phénoliques. Il n'aurait pas encore été identifié dans les feuilles de la plante.



Acide 3,4-dihydroxybenzoïque

**Figure 136:** Structure du composé **39** (Acide protocatéchique)**Composé 40**

Le composé **40** de temps de rétention 30,557 min correspond à l'acide 2-(3,4-dihydroxyphényl) acétique de silylé de masse moléculaire à  $m/z$  : 384 qui représente l'ion moléculaire (figure 137).

**Figure 137:** Spectre de masse du composé **40**

L'analyse du spectre de fragmentation du composé **40** (figure 137) montre la présence de fragments majeurs à  $m/z$  : 384,  $m/z$  : 369,  $m/z$  : 340,  $m/z$  : 267,  $m/z$  : 237,  $m/z$  : 179 (pic de base),  $m/z$  : 149,  $m/z$  : 104,  $m/z$  : 89,  $m/z$  : 73.

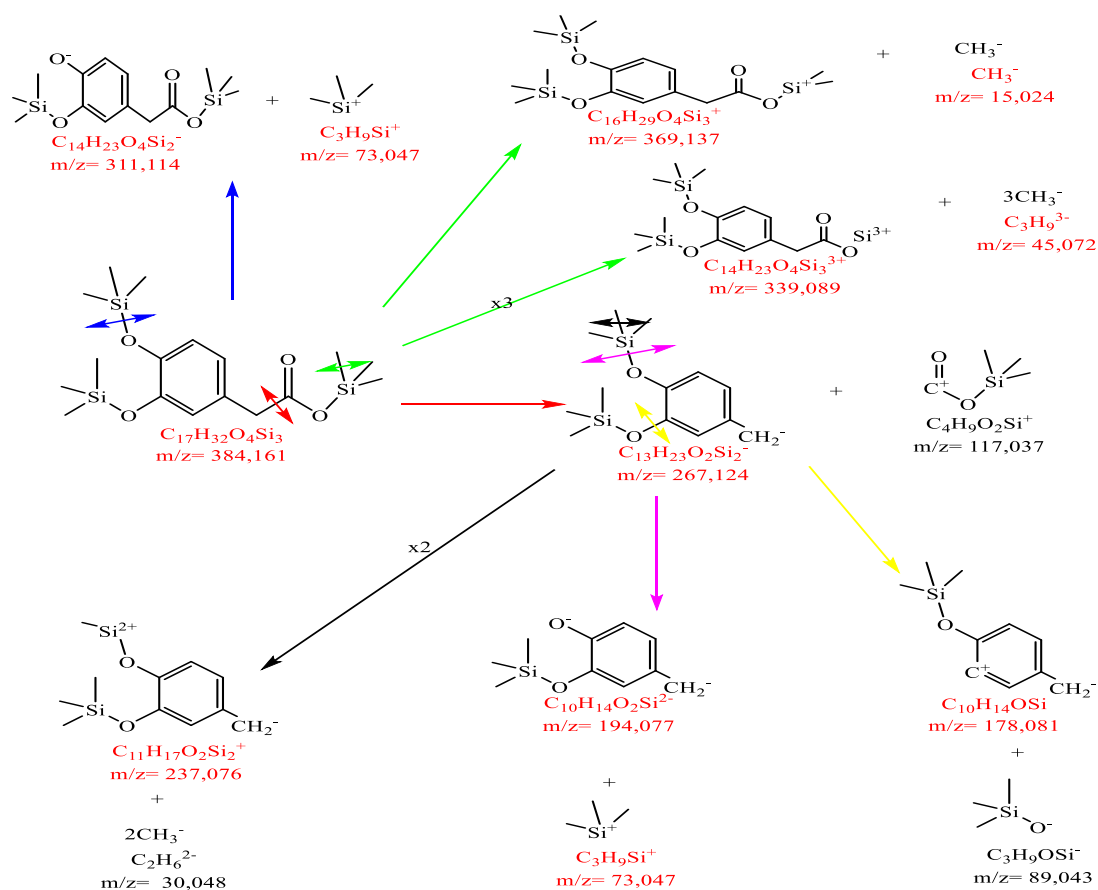
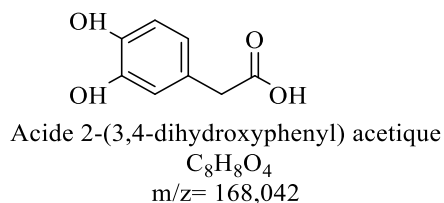


Schéma 40: Proposition de fragmentation du composé 40

Le fragment le plus abondant à  $m/z$  : 73 (groupe triméthylsilyl), serait dû à la rupture d'une liaison oxygène-silicium. La perte d'un groupe méthyle puis de deux autres sur le silicium conduirait respectivement au fragment de masse à  $m/z$  : 369 et celui à  $m/z$  : 339 (340 sur le spectre). Le fragment à  $m/z$  : 267 dériverait de la scission en  $\alpha$  du groupe carbonyle de la liaison carbone-carbone. Les fragments à  $m/z$  : 237, à  $m/z$  : 194 (193 sur le spectre) et à  $m/z$  : 178 (179 sur le spectre de masse, différence probablement due à la présence d'isotopes), proviendraient du fragment précédent ( $m/z$  : 267) respectivement par la perte de deux groupes méthyle, d'un groupe triméthylsilyle et d'un dérivé sililé  $[(CH_3)_3SiO]$  (schéma 40).

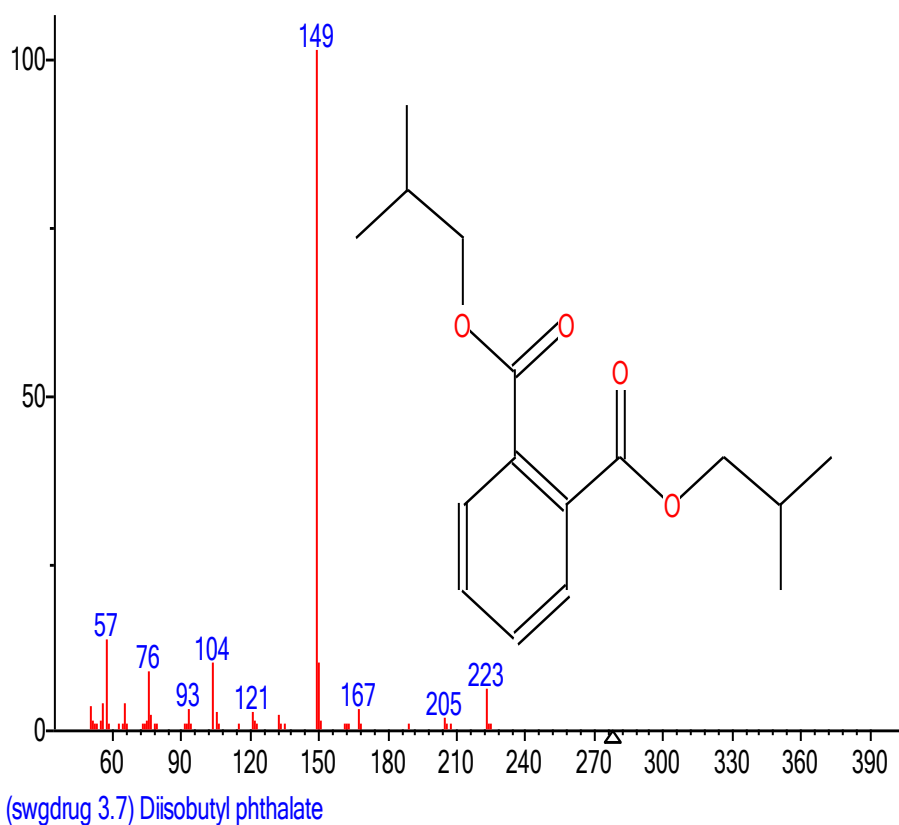
La structure recherchée serait donc celle de l'acide 2-(3,4-dihydroxyphényl) acétique (figure 138) dont l'indice de Kovats expérimental du dérivé sililé est égale à  $1836 \pm 9$  contre 1801 pour l'indice de Kovats théorique (Annexe 15). Ce composé est de la famille des composés phénoliques. Il n'aurait pas encore été identifié dans les feuilles de la plante.



**Figure 138:** Structure du composé **40** (Acide homoprotocatéchique)

### Composé 41

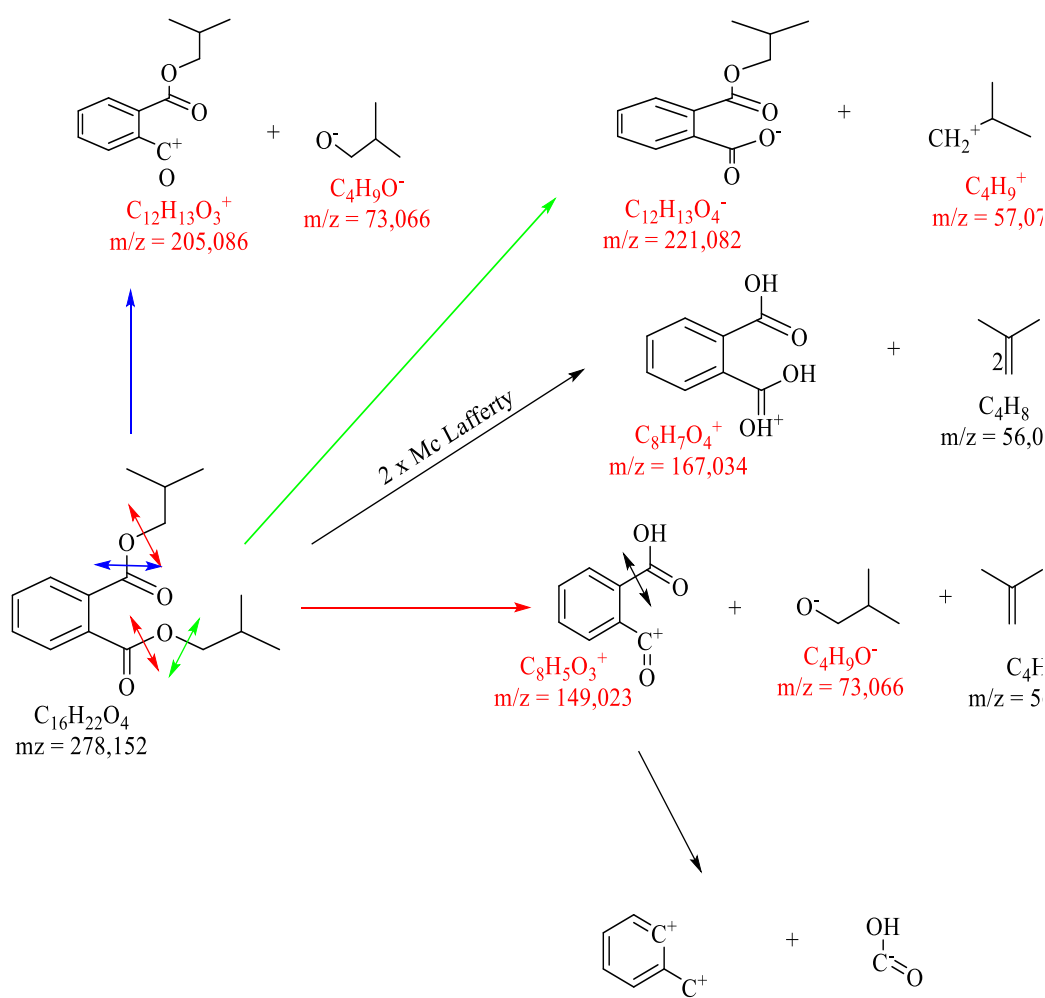
Le composé **41** de temps de rétention 30,602 correspond au Diisobutyl phtalate de masse moléculaire à  $m/z$  : 278,152. Son spectre de masse (figure 139) présente plusieurs fragments caractéristiques.



**Figure 139:** Spectre de masse du composé **41**

L'analyse du spectre de fragmentation du composé **41** (figure 158) montre la présence de fragments majeurs à  $m/z$  : 223,  $m/z$  : 149 (pic de base),  $m/z$  : 104,  $m/z$  : 93,  $m/z$  : 76,  $m/z$  : 57.

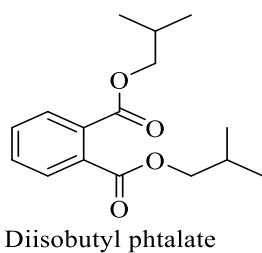




**Schéma 41:** Proposition de fragmentation du composé **41**

Le pic le plus abondant de masse à m/z : 149 proviendrait d'un réarrangement de type Mc Lafferty sur l'une des fonctions ester suivi de la rupture de la liaison carbone-oxygène en  $\alpha$  du groupement carbonyle de l'autre fonction ester. Les fragments à m/z : 221 (223 sur le spectre) et à m/z : 57 résulteraient de la coupure d'une liaison carbone-oxygène en  $\beta$  du groupement carbonyle. Les fragments à m/z : 205 et à m/z : 73 (76 sur le spectre), dériveraient de la rupture d'une liaison carbone-oxygène en  $\alpha$  du groupement carbonyle. Le fragment à m/z : 104 découlerait du pic de base par élimination du groupement carboxylique (COOH). Le fragment à m/z : 167 serait dû à deux réarrangements Mc Lafferty (schéma 41).

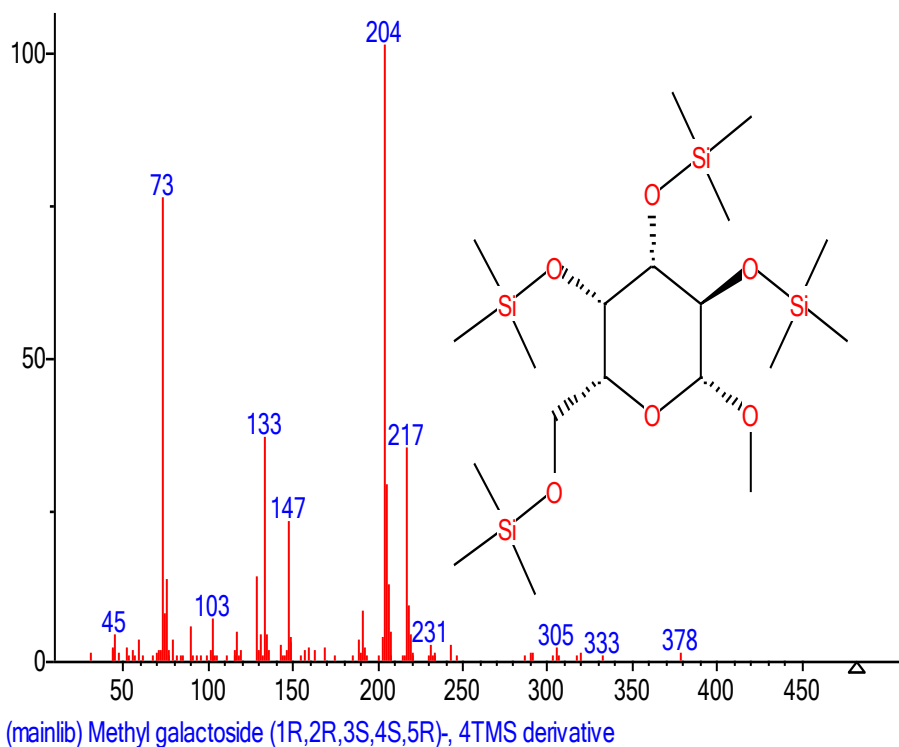
La structure recherchée serait donc celle du Diisobutyl phtalate (figure 140) dont l'indice de Kovats expérimental est égale à 1819 contre 1804 pour l'indice de Kovats théorique (Annexe 15). Ce composé est un composé aromatique. Il n'aurait pas encore été identifié dans les feuilles de la plante.



**Figure 140:** Structure du composé **41**

### Composé **43**

Le composé **43** de temps de rétention 30,947 min correspond au méthyl galactoside silylé de masse moléculaire à  $m/z$  : 482 (figure 141).



**Figure 141:** Spectre de masse du composé **43**

L'analyse du spectre de fragmentation du composé **43** (figure 141) montre la présence de fragments majeurs à  $m/z$  : 378,  $m/z$  : 217,  $m/z$  : 204 (pic de base),  $m/z$  : 147,  $m/z$  : 133,  $m/z$  : 103,  $m/z$  : 73.

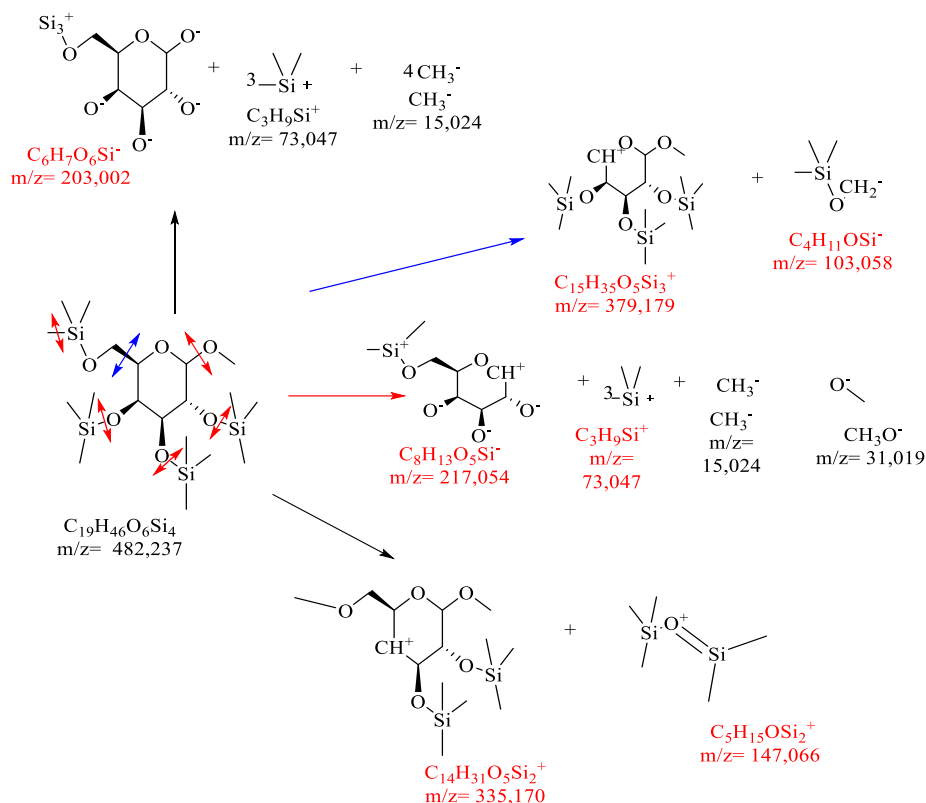
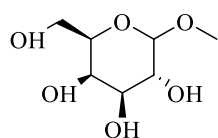


Schéma 42: Proposition de fragmentation du composé 43

Le fragment majoritaire à  $m/z$  : 203 (204 sur le spectre) proviendrait de la perte de trois groupements triméthylsilyle à  $m/z$  : 73 et de quatre groupements méthyle. Les fragments à  $m/z$  : 379 (378 sur le spectre) et à  $m/z$  : 103, seraient dus à la rupture de la liaison carbone-carbone en position  $\alpha$  du cycle. Celui de masse à  $m/z$  : 217 résulterait de la perte de trois groupements triméthylsilyles, d'un groupement méthoxyle et d'un groupement méthyle. Le fragment à  $m/z$  : 147 serait un dérivé silylé  $[(\text{CH}_3)_2\text{Si}=\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3]$  par cassure de liaisons oxygène-silicium et oxygène-carbone après transposition (schéma 42).

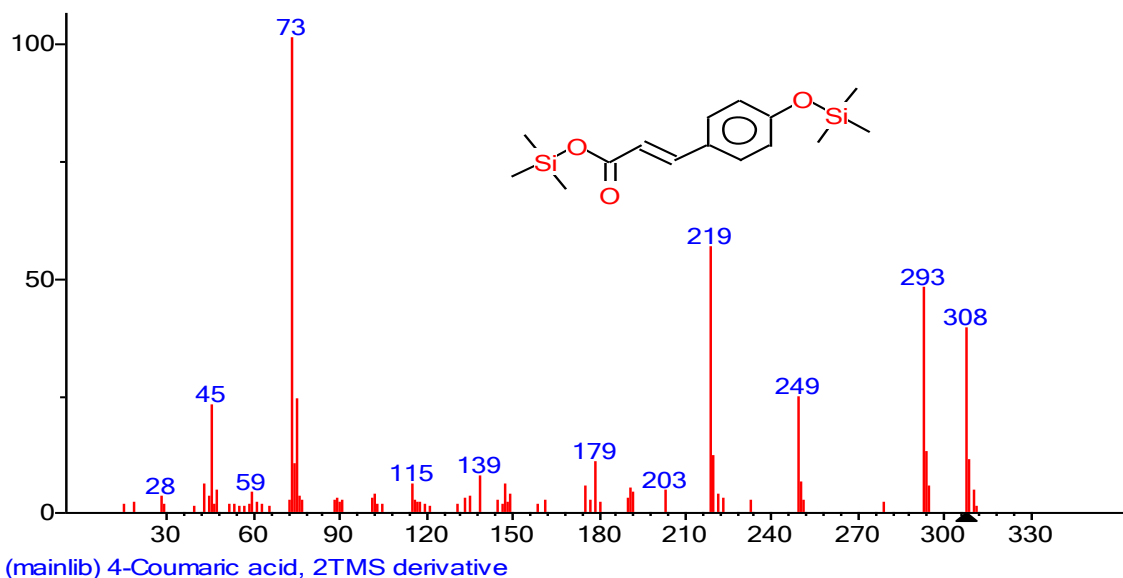
La structure recherchée serait donc celle du méthyl galactoside (figure 142) dont l'indice de Kovats expérimental du dérivé silylé est égale à  $1720 \pm 5$  contre 1820 pour l'indice de Kovats théorique (Annexe 15). Ce composé peut être classé dans la famille des composés phénoliques. Il n'aurait pas encore été identifié dans les feuilles de la plante.



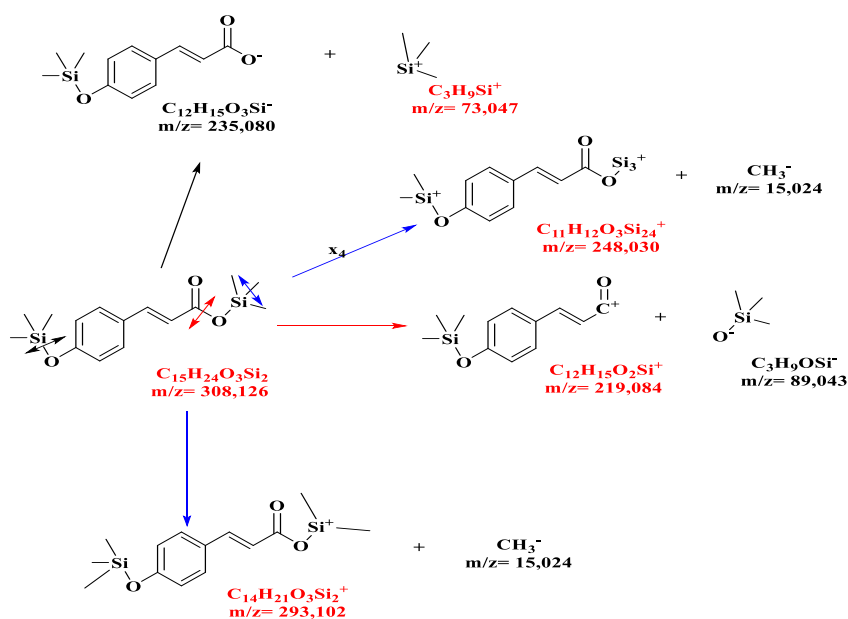
méthyl galactoside


 $m/z = 194,079$ 
**Figure 142:** Structure du composé **43****Composé 45**

Le composé **45** de temps de rétention 32,522 min correspond à l'acide p-coumarique silylé de masse moléculaire  $m/z$  : 308 qui représente l'ion moléculaire (figure 143).

**Figure 143:** Spectre de masse du composé **45**

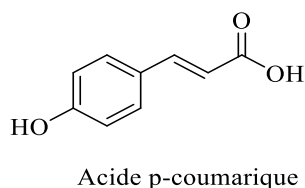
L'analyse du spectre de fragmentation du composé **45** (figure 143) montre la présence de fragments majeurs à  $m/z$  : 308,  $m/z$  : 293,  $m/z$  : 249,  $m/z$  : 219 (pic de base),  $m/z$  : 179,  $m/z$  : 139,  $m/z$  : 115,  $m/z$  : 73.



**Schéma 43:** Proposition de fragmentation du composé **45**

Le fragment le plus abondant à  $m/z$  : 73 (groupe triméthylsilyl), serait dû à la rupture d'une liaison oxygène-silicium. Le fragment à  $m/z$  : 293 serait dû à la perte d'un groupe méthyle sur le silicium. Le fragment à  $m/z$  : 248 (249 sur le spectre), dériverait de la perte de quatre groupes méthyle. Le fragment à  $m/z$  : 219 et à  $m/z$  : 89 proviendraient de la rupture de la liaison entre un carbone et un oxygène lié au silicium (schéma 43).

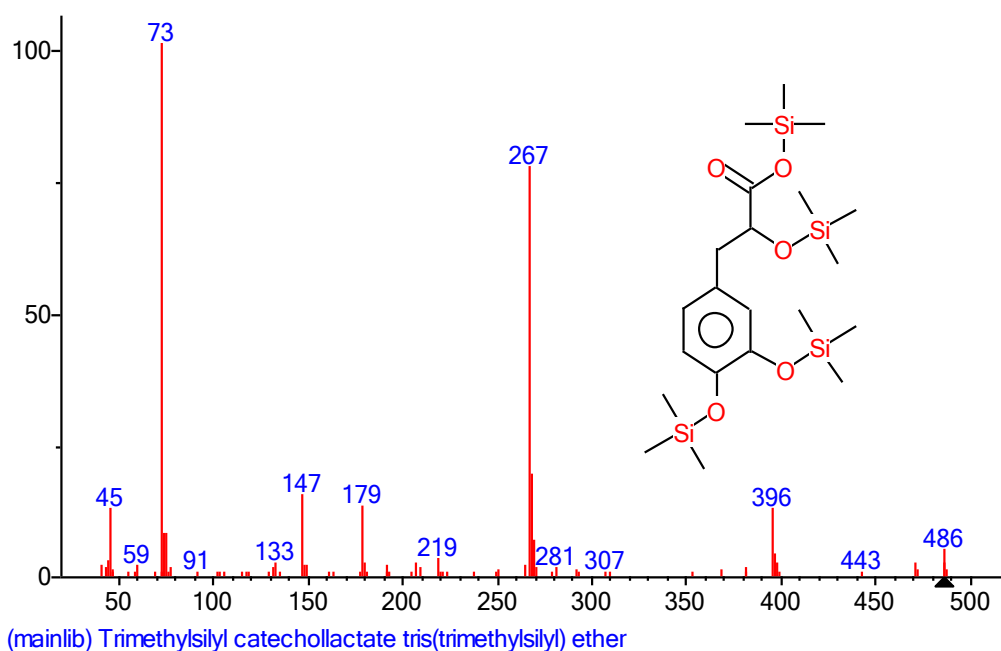
La structure recherchée serait donc celle de l'acide p-coumarique (figure 144) dont l'indice de Kovats expérimental du dérivé silylé est égale à  $1949 \pm 5$  contre 1895 pour l'indice de Kovats théorique (Annexe 15). Ce composé appartient à la famille des composés phénoliques. Il n'aurait pas encore été identifié dans les feuilles de la plante.



**Figure 144:** Structure du composé **45**

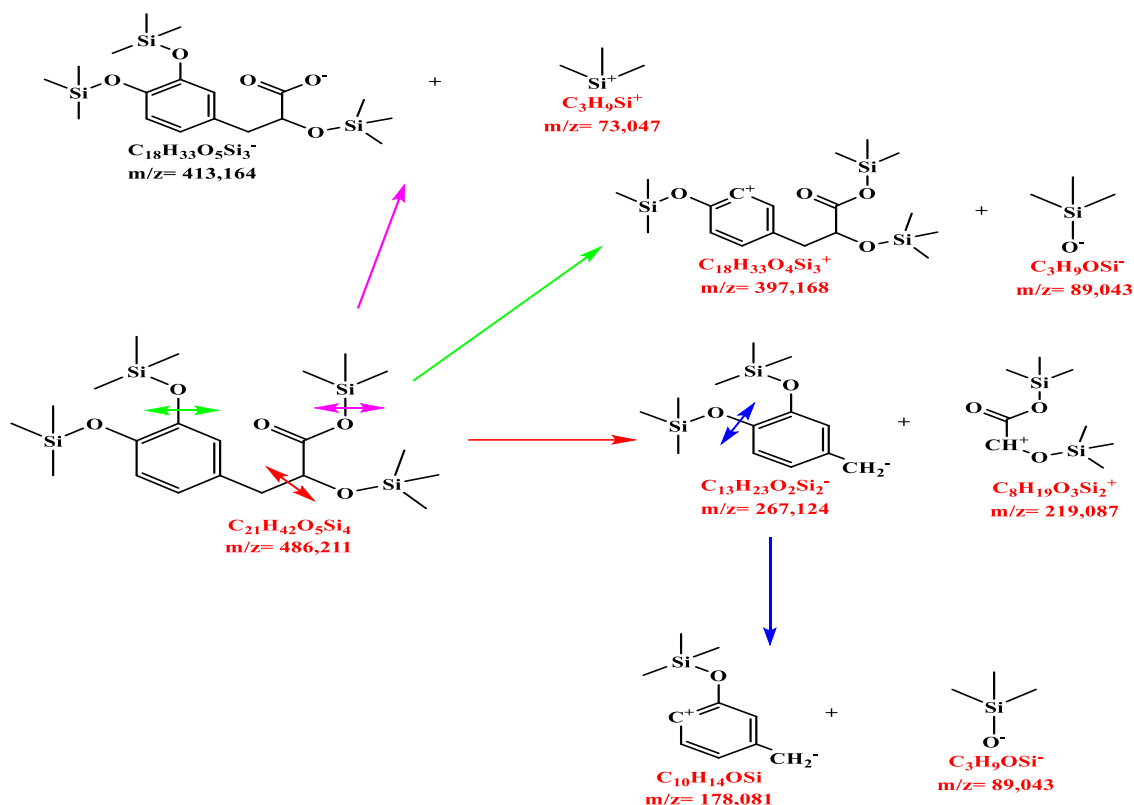
### Composé **48**

Le composé **48** de temps de rétention 35,384 min correspond à l'acide 3-(3,4-dihydroxyphényl)-2-hydroxypropanoïque silylé de masse moléculaire  $m/z$  : 486 qui représente l'ion moléculaire (figure 145).



**Figure 145:** Spectre de masse du composé **48**

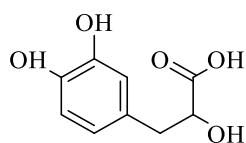
L'analyse du spectre de fragmentation du composé **48** (figure 145) montre la présence de fragments majeurs à  $m/z$  : 486,  $m/z$  : 396,  $m/z$  : 267 (pic de base),  $m/z$  : 179,  $m/z$  : 147,  $m/z$  : 73,  $m/z$  : 45.



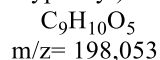
**Schéma 44:** Proposition de fragmentation du composé **48**

Le fragment le plus abondant à  $m/z$  : 73 (groupe triméthylsilyl), serait dû à la rupture d'une liaison oxygène-silicium. Le fragment à  $m/z$  : 397 (396 sur le spectre) et celui à  $m/z$  : 89 (91 sur le spectre), seraient issus de la cassure d'une liaison simple carbone-oxygène. Les fragments à  $m/z$  : 267 et à  $m/z$  : 219 dériveraient de la scission en  $\beta$  du groupement carbonyle de la liaison carbone-carbone. Le fragment à  $m/z$  : 178 (179 sur le spectre de masse, différence probablement due à la présence d'isotopes), proviendrait du fragment précédent ( $m/z$  : 267) par la perte d'un dérivé silylé  $[(CH_3)_3SiO]$  (schéma 44).

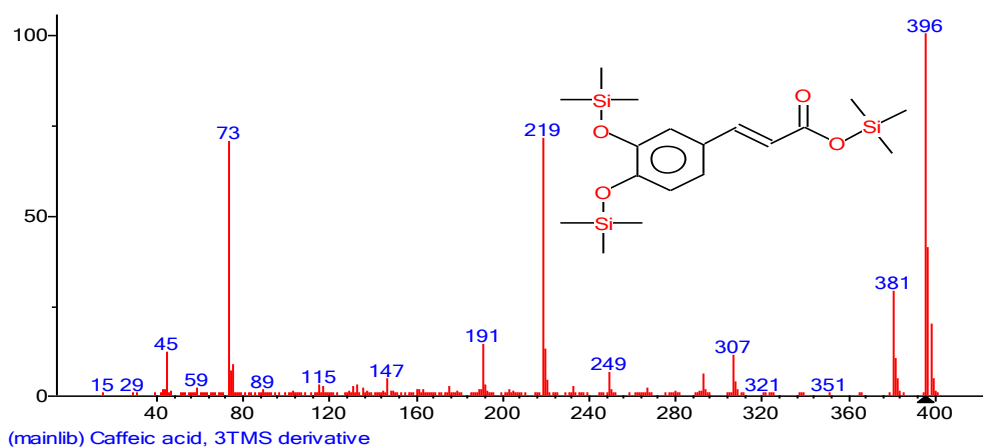
La structure recherchée serait donc celle de l'acide 3-(3,4-dihydroxyphényl)-2-hydroxypropanoïque (figure 146) dont l'indice de Kovats expérimental du dérivé silylé est égale à  $1940 \pm 5$  contre 2040 pour l'indice de Kovats théorique (Annexe 15). Ce composé appartient à la famille des composés phénoliques. Il n'aurait pas encore été identifié dans les feuilles de la plante.



Acide 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-hydroxypropanoïque

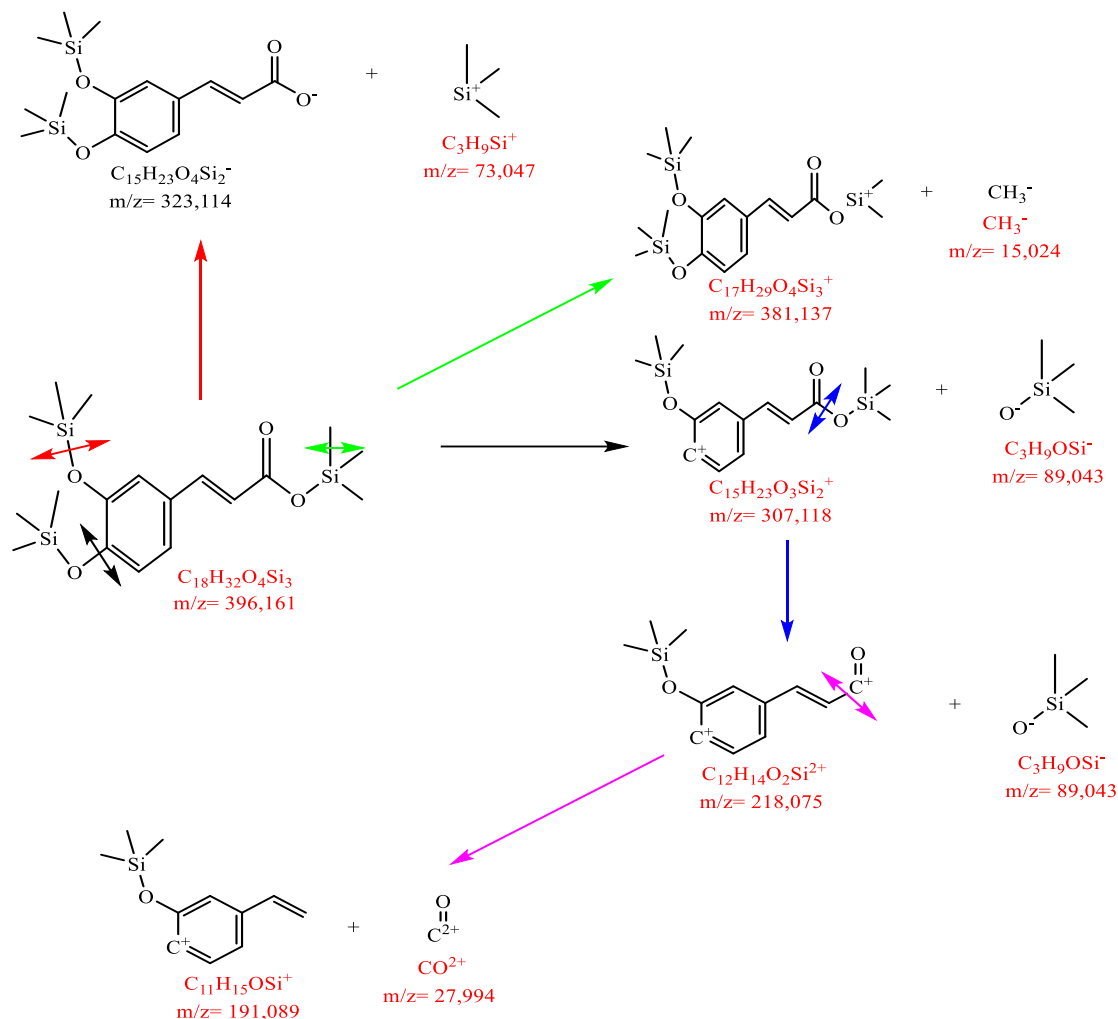
**Figure 146:** Structure du composé **48** (Acide catécholactique)**Composé 49**

Le composé **49** de temps de rétention 36,384 min correspond à l'acide caféique silylé de masse moléculaire  $m/z$  : 396 qui représente l'ion moléculaire (figure 147). Le pic de base est égal au pic moléculaire, ce qui dénote de la grande stabilité de cette molécule.

**Figure 147:** Spectre de masse du composé **49**

L'analyse du spectre de fragmentation du composé **49** (figure 147) montre la présence de fragments majeurs à  $m/z$  : 396 (pic de base),  $m/z$  : 381,  $m/z$  : 307,  $m/z$  : 219,  $m/z$  : 191,  $m/z$  : 73.

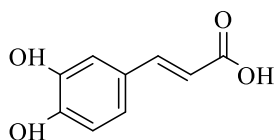




**Schéma 45:** Proposition de fragmentation du composé **49**

Le fragment à  $m/z$  : 73 (groupement triméthylsilyl), serait dû à la rupture d'une liaison oxygène-silicium. Le fragment à  $m/z$  : 381 résulterait de la perte d'un groupement méthyle sur le silicium. Le fragment de masse à  $m/z$  : 307 et celui de à  $m/z$  : 89 seraient issus de la cassure d'une liaison simple carbone-oxygène. Le fragment à  $m/z$  : 218 (219 sur le spectre), dériverait de la perte de deux dérivés silylés  $[(CH_3)_3SiO]$  de masse à  $m/z$  : 89. Le fragment à  $m/z$  : 191 proviendrait du fragment précédent (à  $m/z$  : 219) par la perte du groupement carbonyle (CO) de masse à  $m/z$  : 28 (29 sur le spectre) (schéma 45).

La structure recherchée serait donc celle de l'acide caféique (figure 148) dont l'indice de Kovats expérimental du dérivé silylé est égale à  $2155 \pm 4$  contre 2092 pour l'indice de Kovats théorique (Annexe 15). Ce composé appartient à la famille des composés phénoliques. Il a déjà été identifié dans les feuilles de la plante (Bezerra *et al.*, 2017).

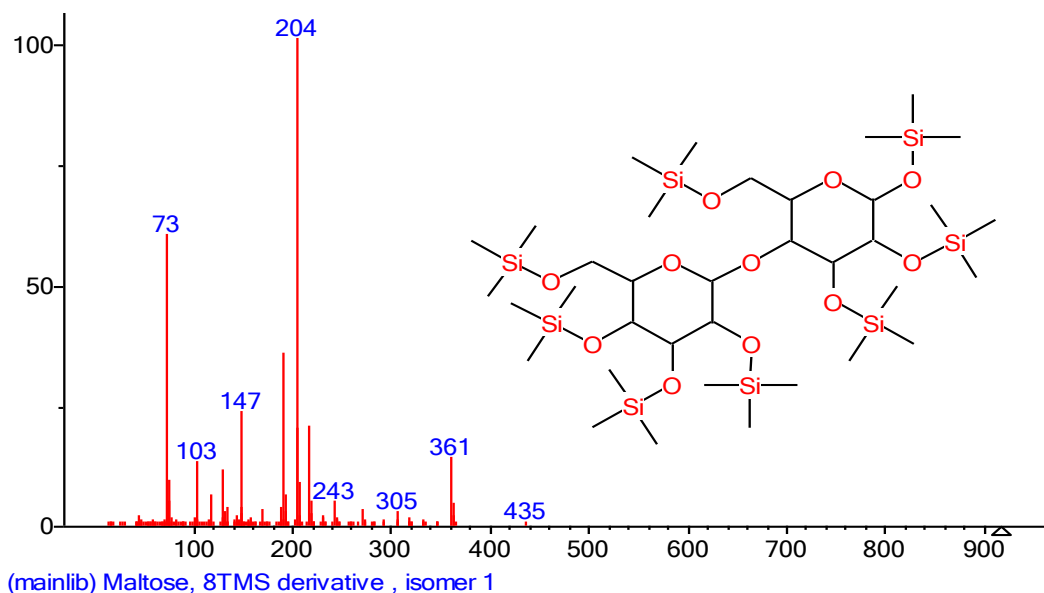


Acide (E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylique  
 $C_9H_8O_4$   
 $m/z = 180,042$

**Figure 148:** Structure du composé **49** (Acide caféique).

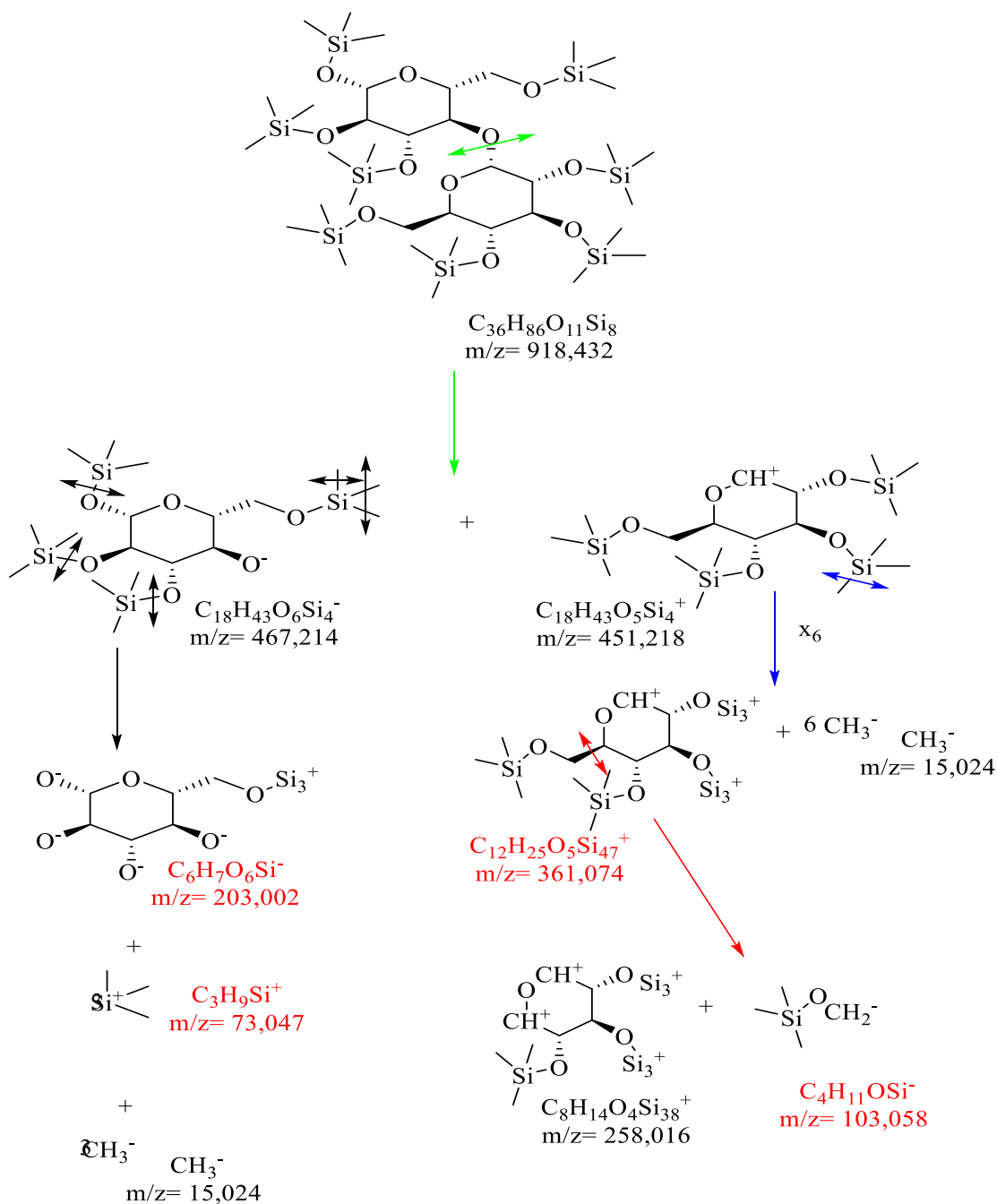
### Composé 54

Le composé **54** de temps de rétention 39,005 min correspond au maltose isomère 1 silylé de masse moléculaire  $m/z$  : 918 (figure 149).



**Figure 149:** Spectre de masse du composé **54**

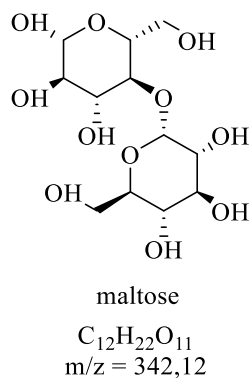
L'analyse du spectre de fragmentation du composé **54** (figure 149) montre la présence de fragments majeurs à  $m/z$  : 361,  $m/z$  : 204 (pic de base),  $m/z$  : 147,  $m/z$  : 103,  $m/z$  : 73.



**Schéma 46:** Proposition de fragmentation du composé **54**

Le fragment majoritaire à  $m/z$  : 203 (204 sur le spectre) proviendrait de la cassure de la liaison carbone-oxygène entre les deux cycles suivis de la perte de trois groupements triméthylsilyle à  $m/z$  : 73 et de trois groupements méthyle sur le fragment de masse  $m/z$  : 467. Le fragment à  $m/z$  : 361 serait dû à la perte de six groupements méthyles sur le fragment de masse à  $m/z$  : 451. Le fragment à  $m/z$  : 103 serait dus à la rupture d'une des liaisons carbone-carbone en position  $\alpha$  du cycle (schéma 46).

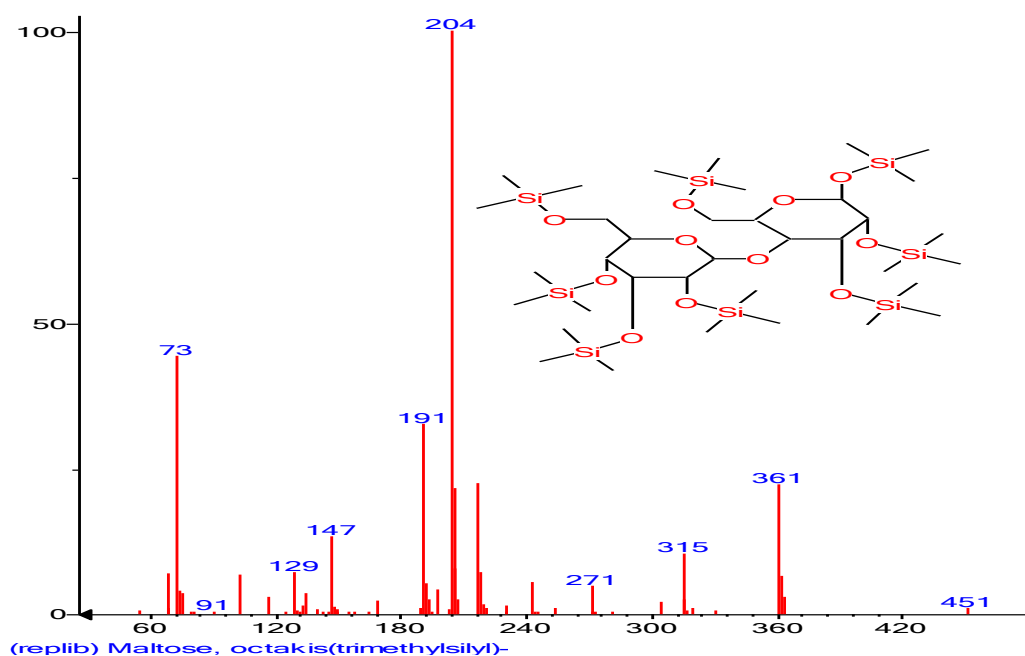
La structure recherchée serait donc celle du maltose isomère 1 (figure 150) dont l'indice de Kovats expérimental du dérivé silylé est égale à 2138 contre 2238 pour l'indice de Kovats théorique (Annexe 15). Ce composé peut être classé dans la famille des composés phénoliques. Il n'aurait pas encore été identifié dans les feuilles de la plante.



**Figure 150:** Structure du composé **54** (Maltose isomère 1)

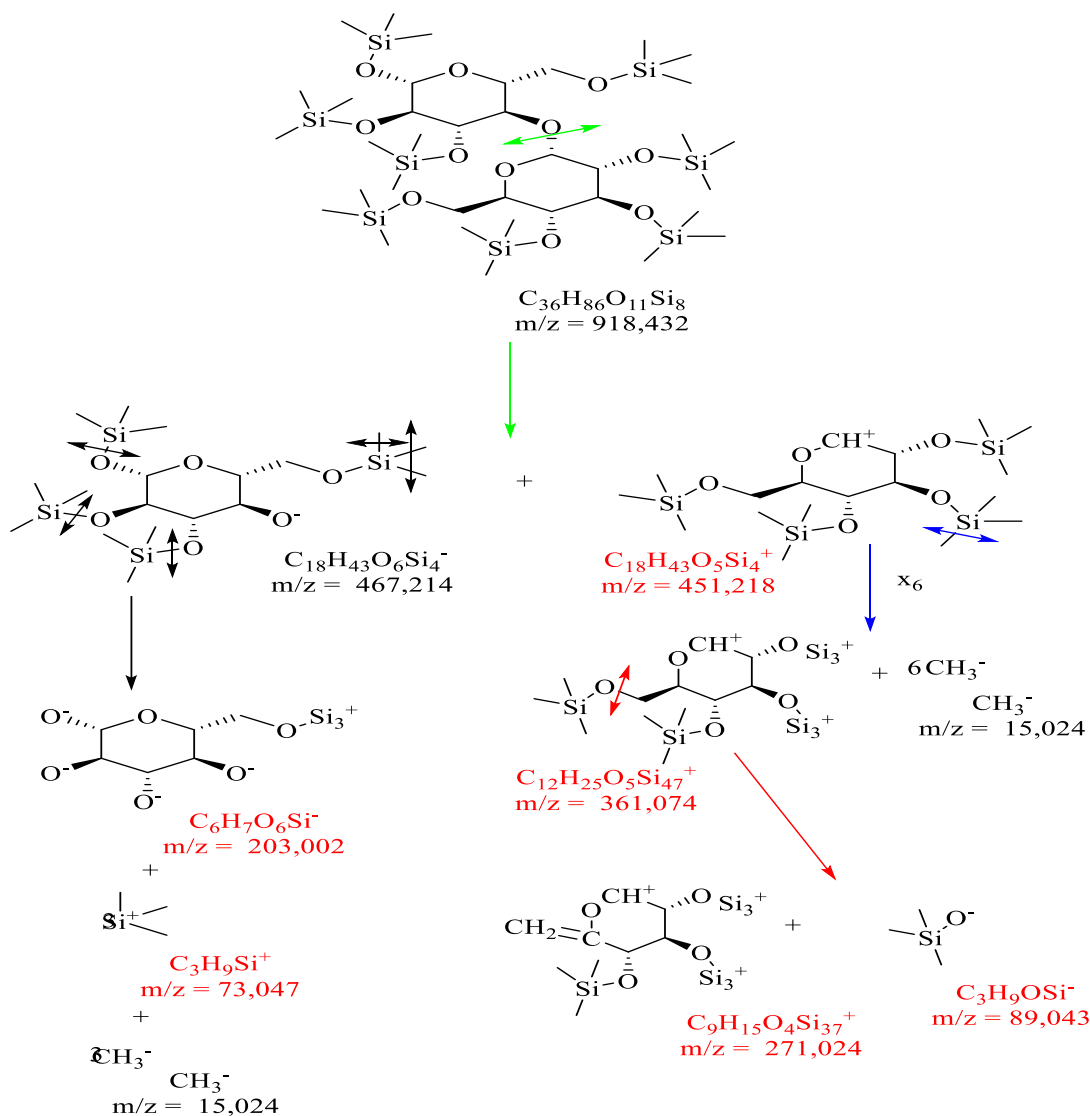
### Composé 55

Le composé **55** de temps de rétention 40,876 min correspond au maltose isomère 2 silylé de masse moléculaire  $m/z$  : 918 (figure 151).



**Figure 151:** Spectre de masse du composé **55**

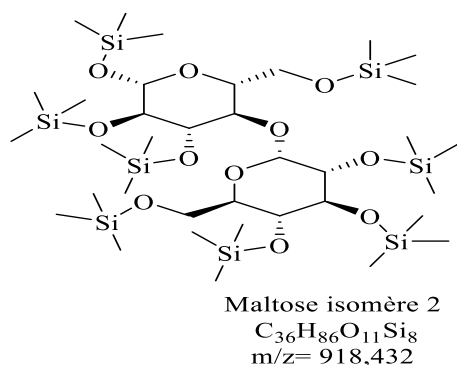
L'analyse du spectre de fragmentation du composé **55** (figure 151) montre la présence de fragments majeurs à  $m/z$  : 451,  $m/z$  : 361,  $m/z$  : 315,  $m/z$  : 271  $m/z$  : 204 (pic de base),  $m/z$  : 191,  $m/z$  : 147,  $m/z$  : 89,  $m/z$  : 73.



**Schéma 47:** Proposition de fragmentation du composé **55**

Le fragment de masse  $m/z$  : 451 résulterait de la coupure de la liaison carbone-oxygène entre les deux cycles. Le fragment majoritaire à  $m/z$  : 203 (204 sur le spectre), dériverait de la perte de trois groupements triméthylsilyl à  $m/z$  : 73 et de trois groupements méthyle sur le fragment de masse  $m/z$  : 467. Le fragment à  $m/z$  : 361 serait dû à la perte de six groupements méthyles sur le fragment de masse à  $m/z$  : 451. Les fragments à  $m/z$  : 89 (91 sur le spectre) et à  $m/z$  : 271 seraient dus à la rupture d'une des liaisons carbone-oxygène en position  $\beta$  du cycle à partir du fragment à  $m/z$  : 361 (schéma 47).

La structure recherchée serait donc celle du maltose isomère 2 (figure 152) dont l'indice de Kovats expérimental du dérivé silylé est égale à 2248 contre 2348 pour l'indice de Kovats théorique (Annexe 15). Ce composé peut être classé dans la famille des composés phénoliques. Il n'aurait pas encore été identifié dans les feuilles de la plante.



**Figure 152:** Structure du composé **55**

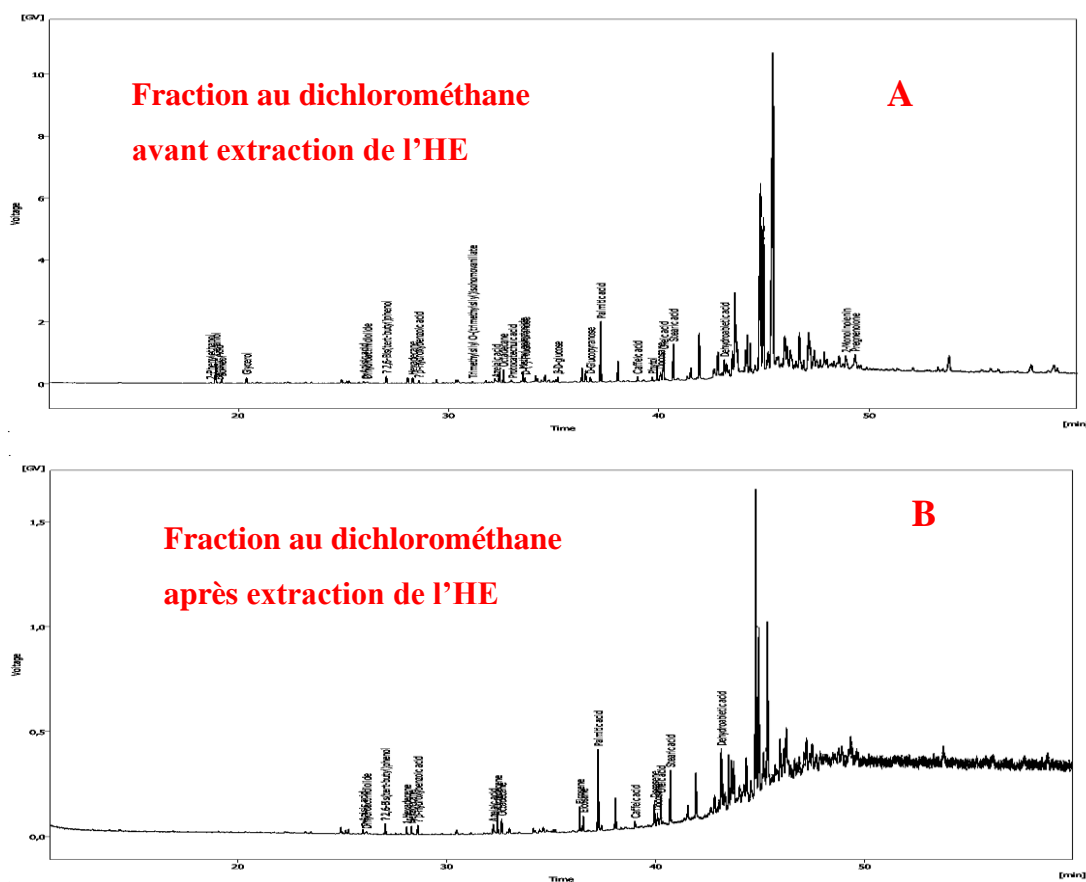
Toutes ces trente-sept (37) molécules sont connues dans la littérature avec quinze (15) déjà isolées du genre *Hyptis* (tableau 4) et vingt et deux (22) molécules non encore identifiées dans les feuilles de la plante étudiée dont les structures devront être confirmées par analyses RMN. Parmi les quinze molécules déjà détectées dans la plante, onze (11) composés ont également été détectés au cours de l'analyse LC-MS menée dans la présente étude (tableau 13 et 14).

#### VII.2. ANALYSES CG-MS DES FRACTIONS AU DICHLOROMÉTHANE ISSUES DES EXTRAITS HYDROALCOOLIQUES AVANT ET APRÈS EXTRACTION DE L'HUILE ESSENTIELLE DES FEUILLES DE *HYPTIS SUAVEOLENS*

Les chromatogrammes des fractions au dichlorométhane indiquent la présence de plusieurs composés autant avant qu'après extraction de l'huile essentielle (figures 153A et 153B).

##### VII.2.1. Analyses GC-MS comparative des fractions au dichlorométhane avant et après l'extraction de l'huile essentielle

Les chromatogrammes GC-MS des fractions au dichlorométhane issues des extraits hydroalcoliques avant et après extraction de l'huile essentielle présentent au total 27 et 18 composés respectivement dont les temps de rétention varient entre 16,496 et 43,116 minutes (figure 153 ou annexe 17 et 18).



**Figure 153:** Chromatogramme des fractions au dichlorométhane issues des  $E_{HA}$  avant et après l'extraction de l'huile essentielle

Les différents composés détectés sont consignés dans le tableau 16.

**Tableau 16 :** Composés détectés dans les fractions au dichlorométhane avant et après extraction de l'HE

No	Temps de rétention (min)	Nom du composé	Avant	Après
57	18,677	2-phényléthanol	+	-
58	18,922	Géranol	+	-
59	19,057	Acide benzoïque	+	-
60	19,202	Bornéol	+	-
61	20,387	Glycérol	+	-
62	25,965	Acide p-Anisique	+	+
63	26,135	Dihydroactinidiolide	+	+
64	27,035	2,6-Bis(tertiobutyle)phénol	+	+
65	28,065	Hexadécène	-	+
66	28,285	Hexadécane	+	+
67	28,585	Acide p-hydroxybenzoïque	+	+
68	31,136	Isohomovanillate de triméthylsilyl-O-(triméthylsilyl)	+	-
69	32,257	Acide azélaïque	+	+

**Tableau 16** (suite)

70	32,417	Octadécène	-	+
71	32,602	Octadécane	+	+
72	33,032	Acide protocatéchoïque	+	-
73	33,537	Galactoside de méthyle	+	-
74	33,642	D-(-)-Fructofuranose	+	-
75	35,178	$\beta$ -D-Glucose	+	-
76	36,343	Eicosène	-	+
77	36,508	Eicosane	-	+
78	36,733	D-Glucopyranose	+	-
79	37,234	Acide palmitique	+	+
80	38,979	Acide caféique	+	+
81	39,685	Phytol	+	-
82	39,925	Docosène	-	+
83	40,060	Docosane	+	+
84	40,225	Acide oléique	+	+
85	40,685	Acide stéarique	+	+
86	43,111	Acide déhydroabiétique	+	+
87	48,883	2-Monolinolenine	+	-
88	49,318	Prégnénolone	+	-

+ : Présence ; - : Absence

Parmi les trente et deux (32) composés détectés dans les fractions au dichlorométhane issues des extraits hydroalcooliques avant et après l'extraction de l'HE, onze (11) l'ont déjà été dans les fractions à l'acétate d'éthyle. Ainsi, nous avons ici déterminé uniquement les structures des vingt et un (21) composés qui n'ont encore pas été identifiés dans les fractions précédentes.

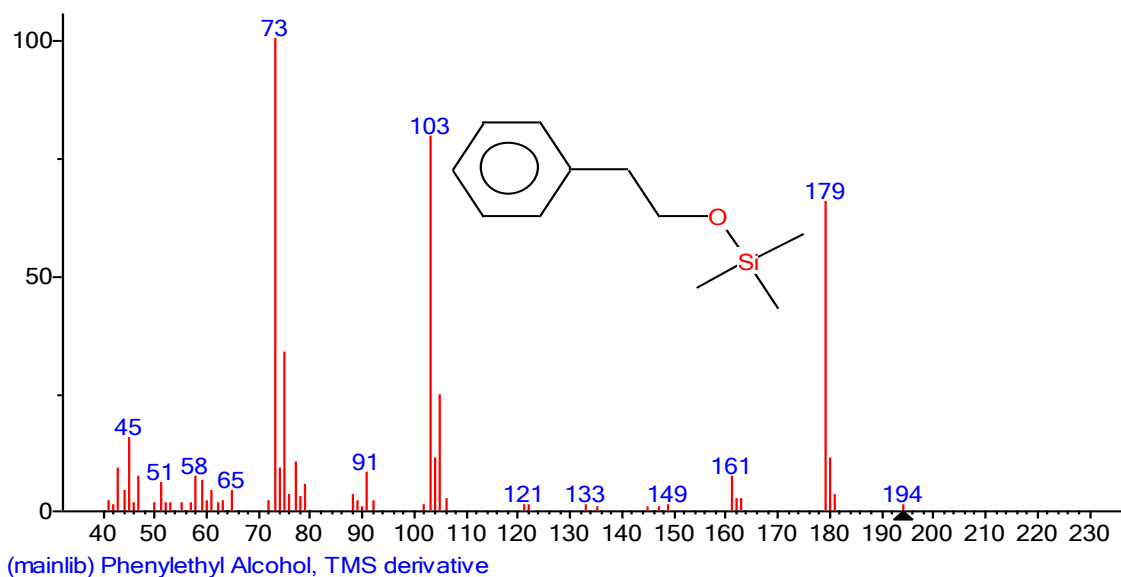
### VII.2.2. Structures des composés détectés des fractions au dichlorométhane avant et après l'extraction de l'huile essentielle

Dans cette partie également, seules les fragmentations des composés aromatiques et phénoliques seront réalisées. Celles des autres composés déjà détectés dans les fractions à l'acétate d'éthyle et des composés aliphatiques (58 ; 59 ; 60 ; 61 ; 64 ; 65 ; 66 ; 67 ; 69 ; 70 ; 71 ; 72 ; 73 ; 76 ; 77 ; 78 ; 79 ; 80 ; 81 ; 83 ; 84 ; 85 ; 87), ne sont pas réalisées pour les mêmes raisons que celles évoquées dans le cas des fractions à l'acétate d'éthyle.

#### Composé 57

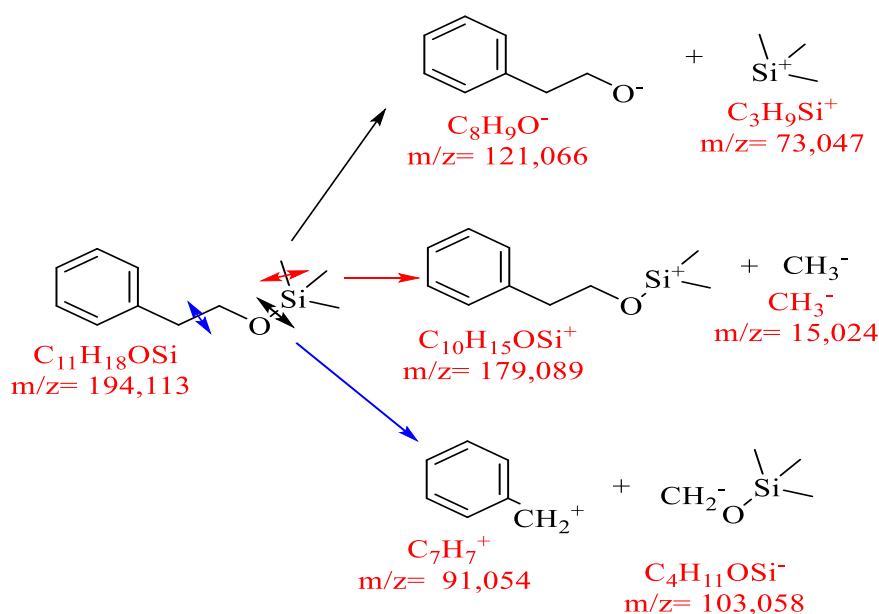
Le composé **57** de temps de rétention 18,677 min correspond au 2-phényléthanol silylé de masse moléculaire  $m/z$  : 194 qui représente l'ion moléculaire (figure 154).





**Figure 154:** Spectre de masse du composé **57**

L'analyse du spectre de fragmentation du composé **57** (figure 154) montre la présence de fragments majeurs à  $m/z$  : 194,  $m/z$  : 179 (pic de base),  $m/z$  : 161,  $m/z$  : 103,  $m/z$  : 89,  $m/z$  : 73.

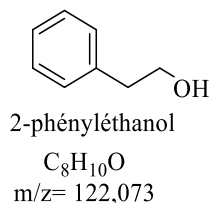


**Schéma 48:** Proposition de fragmentation du composé **57**

Le pic majoritaire de masse  $m/z$  : 73 (groupe triméthylsilyl) et le fragment à  $m/z$  : 121 résulteraient de la coupure de la liaison entre le silicium et l'oxygène (Si-O). Le fragment à  $m/z$  : 179 serait dû à la perte d'un groupement méthyle sur le silicium. Les fragments à

$m/z$  : 103 et à  $m/z$  : 91 découleraient de la rupture de la liaison (C-C) en  $\beta$  du cycle aromatique (schéma 48).

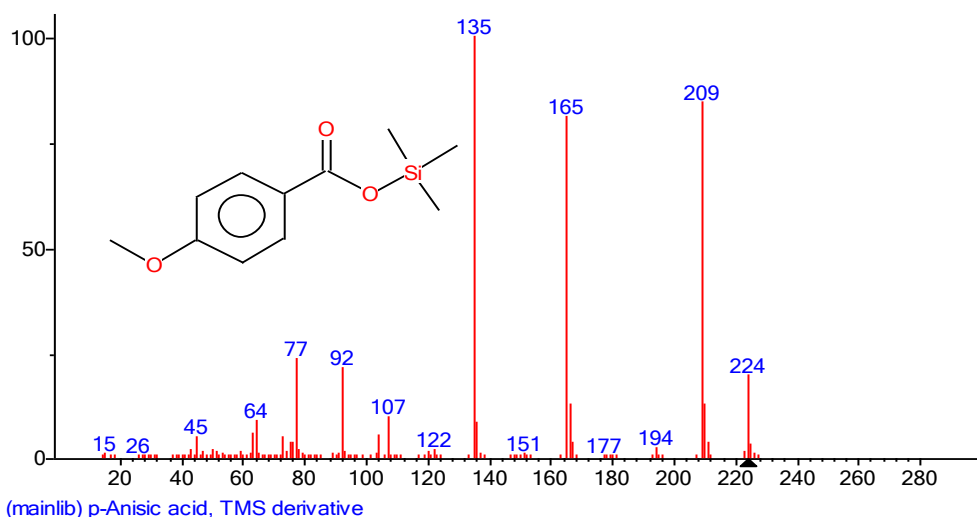
La structure recherchée serait donc celle du 2-phényléthanol (figure 155) dont l'indice de Kovats expérimental du dérivé silylé est égale à  $1200 \pm 15$  contre 1219 pour l'indice de Kovats théorique (Annexe 17). Ce composé appartient à la famille des composés phénoliques. Il n'aurait pas encore été identifié dans la plante étudiée.



**Figure 155:** Structure du composé **57**

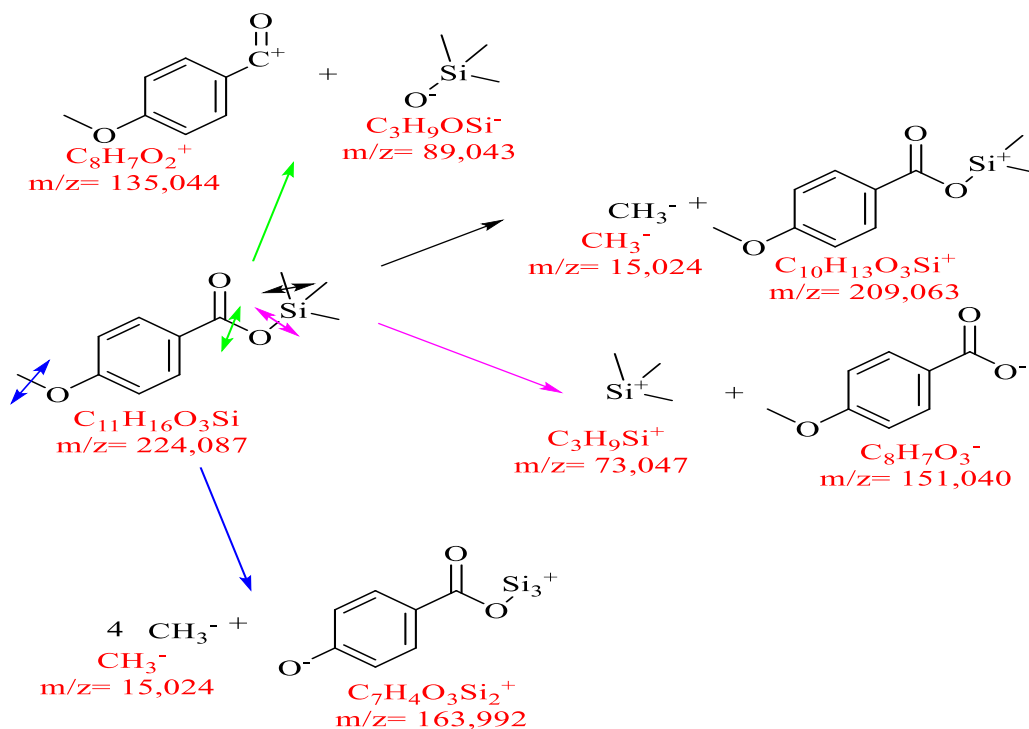
### Composé 62

Le composé **62** de temps de rétention 25,965 min correspond à l'acide p-anisique silylé de masse moléculaire  $m/z$  : 224 qui représente l'ion moléculaire (figure 156).



**Figure 156:** Spectre de masse du composé **62**

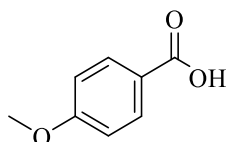
L'analyse du spectre de fragmentation du composé **62** (figure 156) montre la présence de fragments majeurs à  $m/z$  : 224,  $m/z$  : 209 (pic de base),  $m/z$  : 165,  $m/z$  : 135,  $m/z$  : 89,  $m/z$  : 77.



**Schéma 49:** Proposition de fragmentation du composé **62**

Le pic majoritaire à  $m/z$  : 135 et le fragment à  $m/z$  : 89 (92 sur le spectre) résulteraient de la rupture d'une liaison oxygène-carbone en position  $\alpha$  du groupement carbonyle. Le fragment à  $m/z$  : 209 serait dû à la perte d'un groupement méthyle sur le silicium. Les fragments à  $m/z$  : 151 et à  $m/z$  : 73 (77 sur le spectre), proviendraient de la rupture de la liaison entre l'oxygène et le silicium. Le fragment à  $m/z$  : 164 (165 sur le spectre) serait issu du départ des quatre groupements méthyles (schéma 49).

La structure recherchée serait donc celle de l'acide p-méthoxybenzoïque (figure 157) dont l'indice de Kovats expérimental du dérivé silylé est égale à  $1500 \pm 5$  contre 1500 pour l'indice de Kovats théorique (Annexe 18). Ce composé est de la famille des composés phénoliques. Il n'aurait pas encore été identifié dans la plante étudiée.

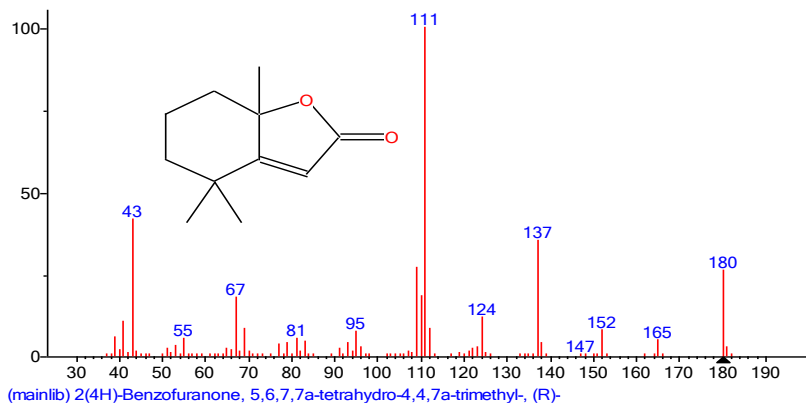


Acide 4-méthoxybenzoïque  
 $C_8H_8O_3$   
 $m/z = 152,047$

**Figure 157:** Structure du composé **62** (Acide p-anisique)

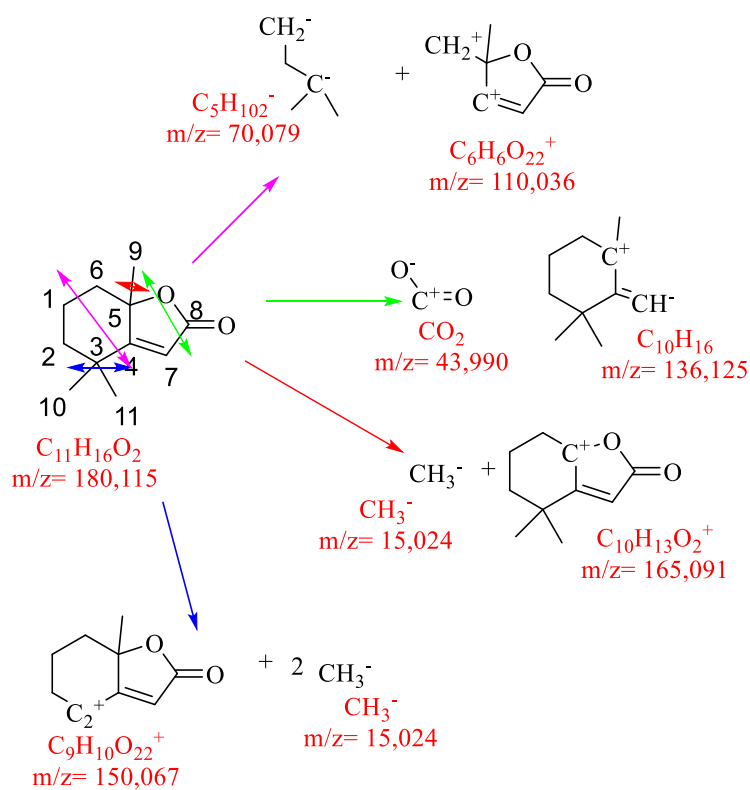
## Composé 63

Le composé **63** de temps de rétention 26,135 min correspond au dihydroactinidiolide de masse moléculaire  $m/z$  : 180 qui représente l'ion moléculaire (figure 158).



**Figure 158:** Spectre de masse du composé **63**

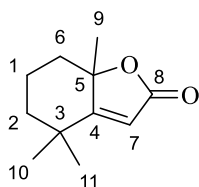
L'analyse du spectre de fragmentation du composé **63** (figure 158) montre la présence de fragments majeurs à  $m/z$  : 180,  $m/z$  : 165,  $m/z$  : 152,  $m/z$  : 137,  $m/z$  : 124,  $m/z$  : 111 (pic de base),  $m/z$  : 95,  $m/z$  : 81,  $m/z$  : 67,  $m/z$  : 43.



**Schéma 50:** Proposition de fragmentation du composé **63**

Le pic majoritaire à  $m/z$  : 110 (111 sur le spectre) et le fragment à  $m/z$  : 70 (67 sur le spectre) résulteraient de la rupture des liaisons carbone-carbone ( $C_1-C_6$  et  $C_3-C_4$ ). Les fragments à  $m/z$  : 44 (43 sur le spectre) et à  $m/z$  : 136 (137 sur le spectre) seraient dus aux clivages de la liaison carbone-oxygène en  $\beta$  du groupement carbonyle et de la liaison carbone-carbone en  $\alpha$  du groupement carbonyle. Les fragments à  $m/z$  : 165 et  $m/z$  : 150 (152 sur le spectre) proviendraient respectivement de la perte d'un et de deux groupements méthyle. Le fragment à  $m/z$  : 164 (165 sur le spectre) serait issu du départ des quatre groupements méthyles (schéma 50).

La structure recherchée serait donc celle du dihydroactinidiolide (figure 159) dont l'indice de Kovats expérimental est égale à  $1483 \pm 10$  contre 1508 pour l'indice de Kovats théorique (Annexe 18). Ce composé peut être classé dans la famille des stérols et terpènes. Il n'aurait pas encore été identifié dans la plante étudiée.

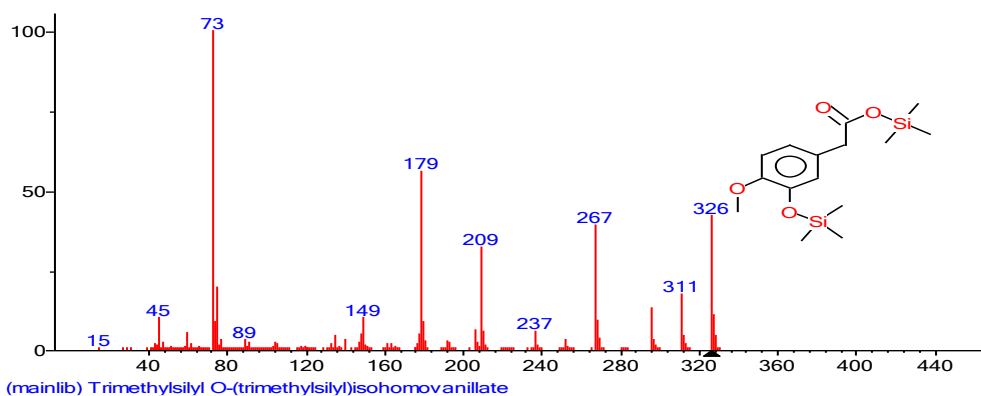


4,4,7a-triméthyl-5,6,7,7a-tétrahydrobenzofuran-2(4H)-one  
 $C_{11}H_{16}O_2$   
 $m/z = 180, 115$

**Figure 159:** Structure du composé **63** (Dihydroactinidiolide)

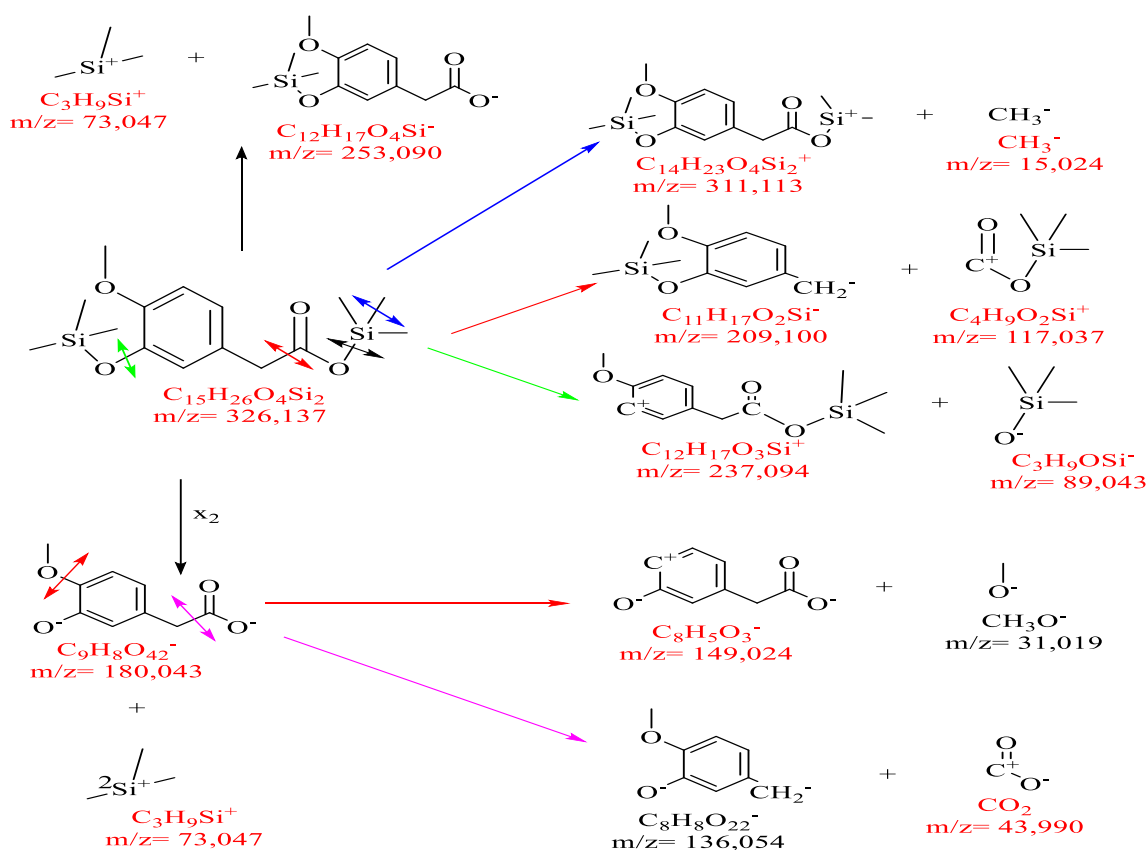
### Composé 68

Le composé **68** de temps de rétention 31,136 min correspond à l'acide 2-(3-hydroxy-4-méthoxyphényl) acétique silylé de masse moléculaire  $m/z$  : 326 qui représente l'ion moléculaire (figure 160).



**Figure 160:** Spectre de masse du composé **68**

L'analyse du spectre de fragmentation du composé **68** (figure 160) montre la présence de fragments majeurs à  $m/z$  : 326,  $m/z$  : 311,  $m/z$  : 267,  $m/z$  : 237,  $m/z$  : 209,  $m/z$  : 179 (pic de base),  $m/z$  : 149,  $m/z$  : 89,  $m/z$  : 73.

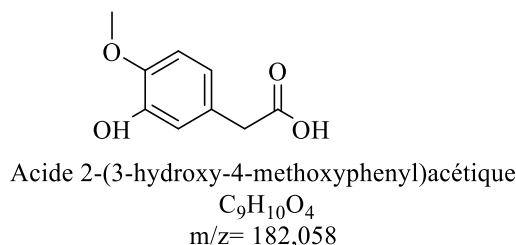


**Schéma 51:** Proposition de fragmentation du composé **68**

Le fragment majoritaire à  $m/z$  : 73 serait un groupement triméthylsilyle issu de la rupture d'une liaison oxygène-silicium. Le pic de base à  $m/z$  : 180 (179 sur le spectre) serait dû à la perte de deux groupements triméthylsilyle par cassure de liaisons oxygène-silicium.

Le fragment à  $m/z$  : 311 ferait suite à la perte d'un groupement méthyle. Les fragments à  $m/z$  : 209 et à  $m/z$  : 117 découleraient de la rupture de la liaison (C-C) en  $\alpha$  du groupement carbonyle. Le fragment à  $m/z$  : 267 serait dû au départ de quatre groupements méthyle. Les fragments à  $m/z$  : 237 et 89 résulteraient de la coupure en  $\alpha$  du cycle aromatique de la liaison entre le carbone et l'oxygène lié au silicium. Les fragments à  $m/z$  : 149 et à  $m/z$  : 44 (45 sur le spectre) seraient issus du pic de base respectivement par perte du groupements méthoxy et par la scission de la liaison carbone- carbone en  $\alpha$  du groupement carbonyle (schéma 51).

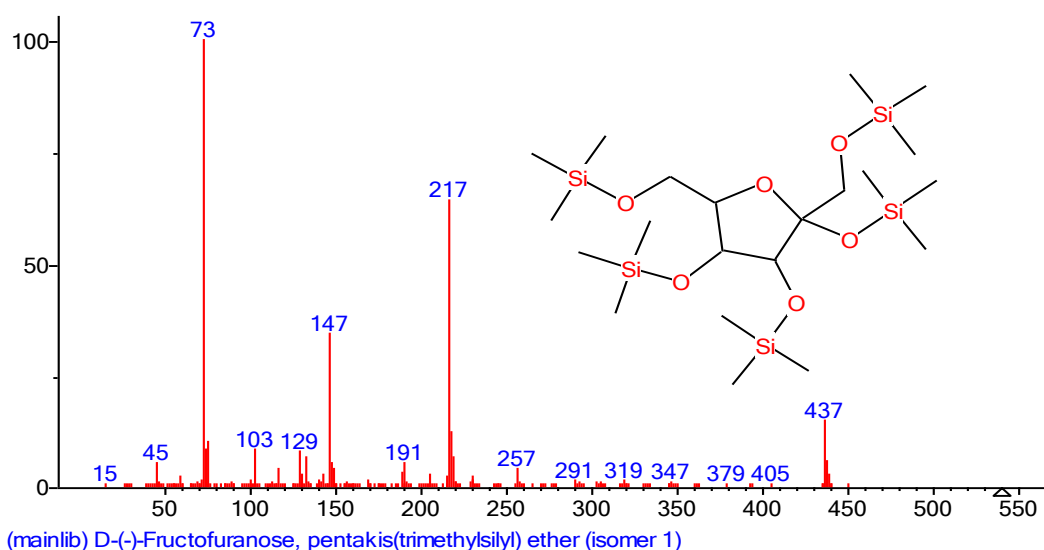
La structure recherchée serait donc celle de l'acide 2-(3-hydroxy-4-méthoxyphényl)acétique (figure 161) dont l'indice de Kovats expérimental du dérivé silylé est égale à  $1757 \pm 1$  contre 1730 pour l'indice de Kovats théorique (Annexe 18). Ce composé est de la famille des composés phénoliques. Il n'aurait pas encore été identifié dans la plante étudiée.



**Figure 161:** Structure du composé **68**

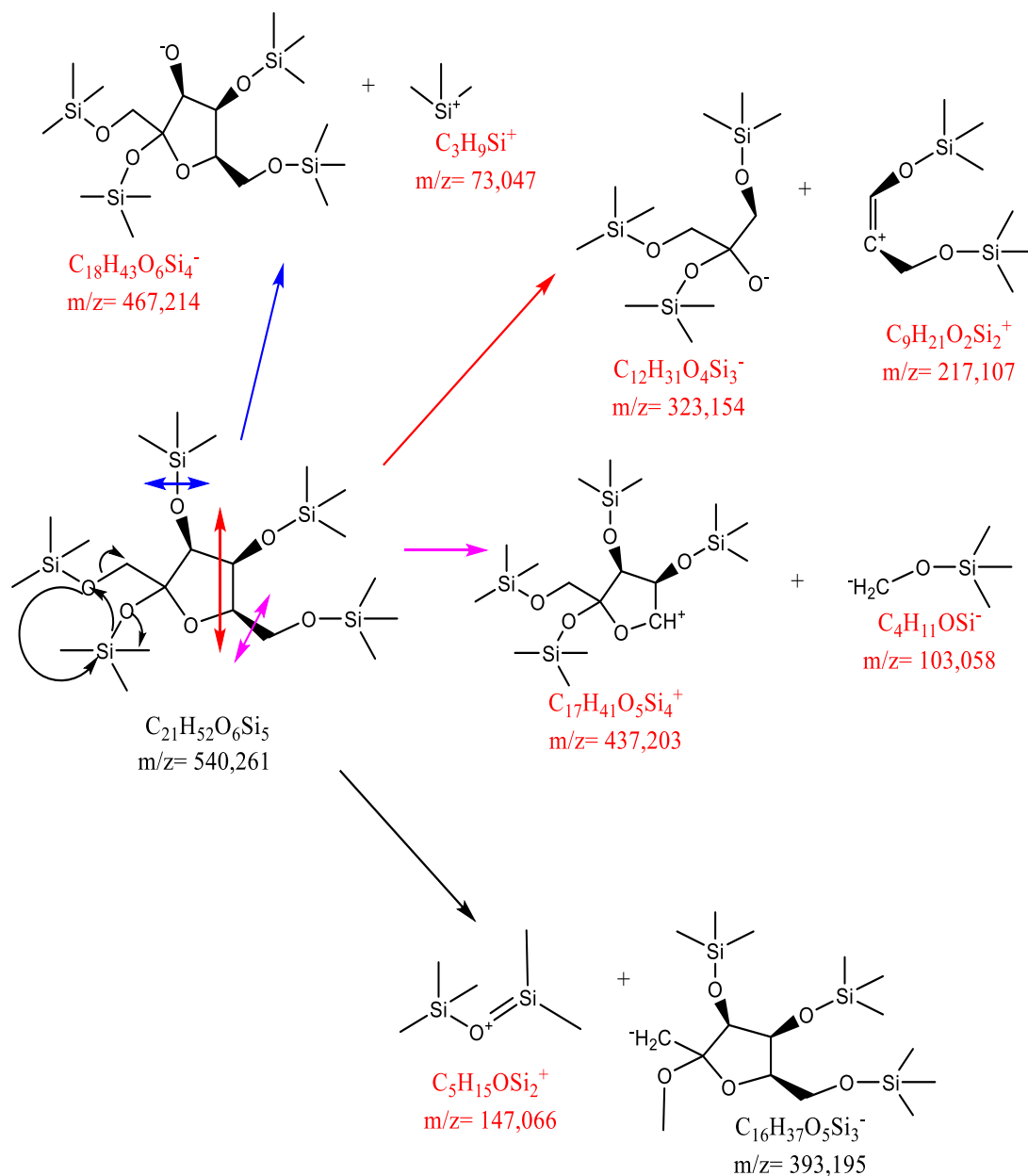
### Composé 74

Le composé **74** de temps de rétention 33,642 min correspond au D-(-)-Fructofuranose silylé de masse moléculaire  $m/z$  : 540 qui représente l'ion moléculaire (figure 162).



**Figure 162:** Spectre de masse du composé **74**

L'analyse du spectre de fragmentation du composé **74** (figure 162) montre la présence de fragments majeurs à  $m/z$  : 437,  $m/z$  : 323,  $m/z$  : 217 (pic de base),  $m/z$  : 147,  $m/z$  : 129,  $m/z$  : 103,  $m/z$  : 73.



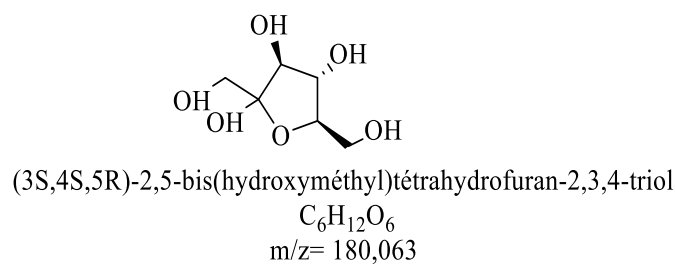
**Schéma 52:** Proposition de fragmentation du composé **74**

Le fragment à  $m/z$  : 73 serait dû à la cassure de liaison oxygène-silicium. Celui de masse  $m/z$  : 217 résulterait de l'ouverture du cycle entre l'oxygène et le carbone tertiaire adjacent suivie de la scission de la liaison (C-C) en position  $\gamma$  du groupement oxy du cycle. Les fragments de masse à  $m/z$  : 103 et à  $m/z$  : 437 seraient dus à la coupure de liaison (C-C) en  $\alpha$  du cycle. Le fragment à  $m/z$  : 147 serait un dérivé silylé  $[(CH_3)_2Si=O-Si(CH_3)_3]$  obtenu



par cassure de liaisons oxygène-silicium et oxygène-carbone après transposition (schéma 52).

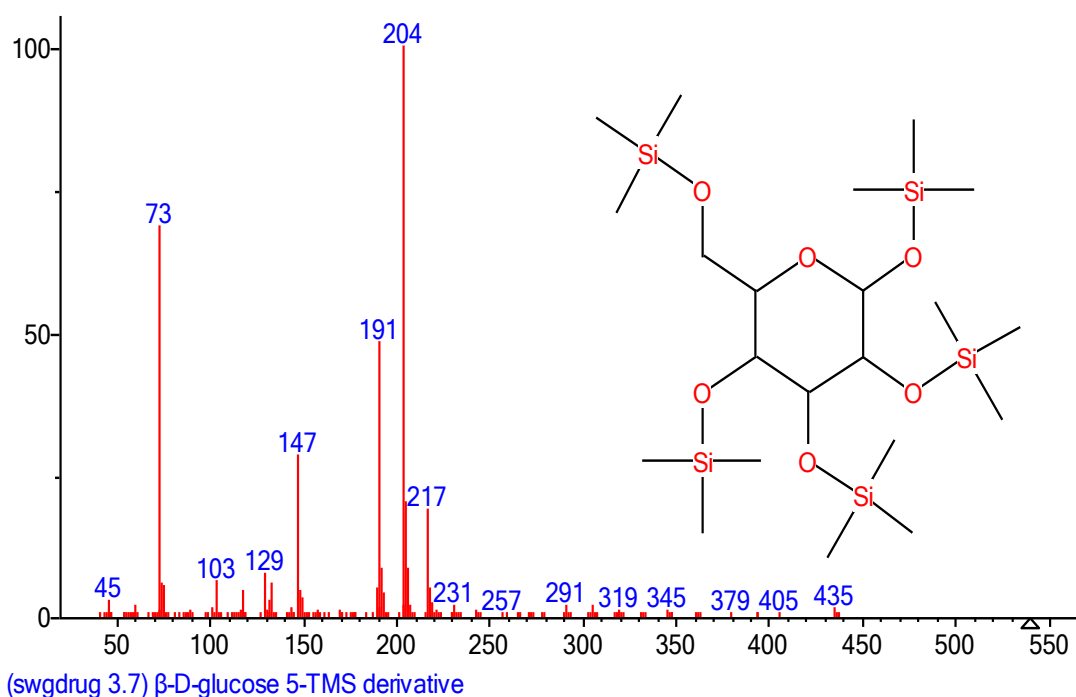
La structure recherchée serait donc celle du D-(-)-Fructofuranose (figure 163) dont l'indice de Kovats expérimental du dérivé silylé est égale à  $1792 \pm 1$  contre 1851 pour l'indice de Kovats théorique (Annexe 17). Ce composé peut être classé dans la famille des oses. Il n'aurait pas encore été identifié dans la plante étudiée.



**Figure 163:** Structure du composé **74** (D-(-)-Fructofuranose)

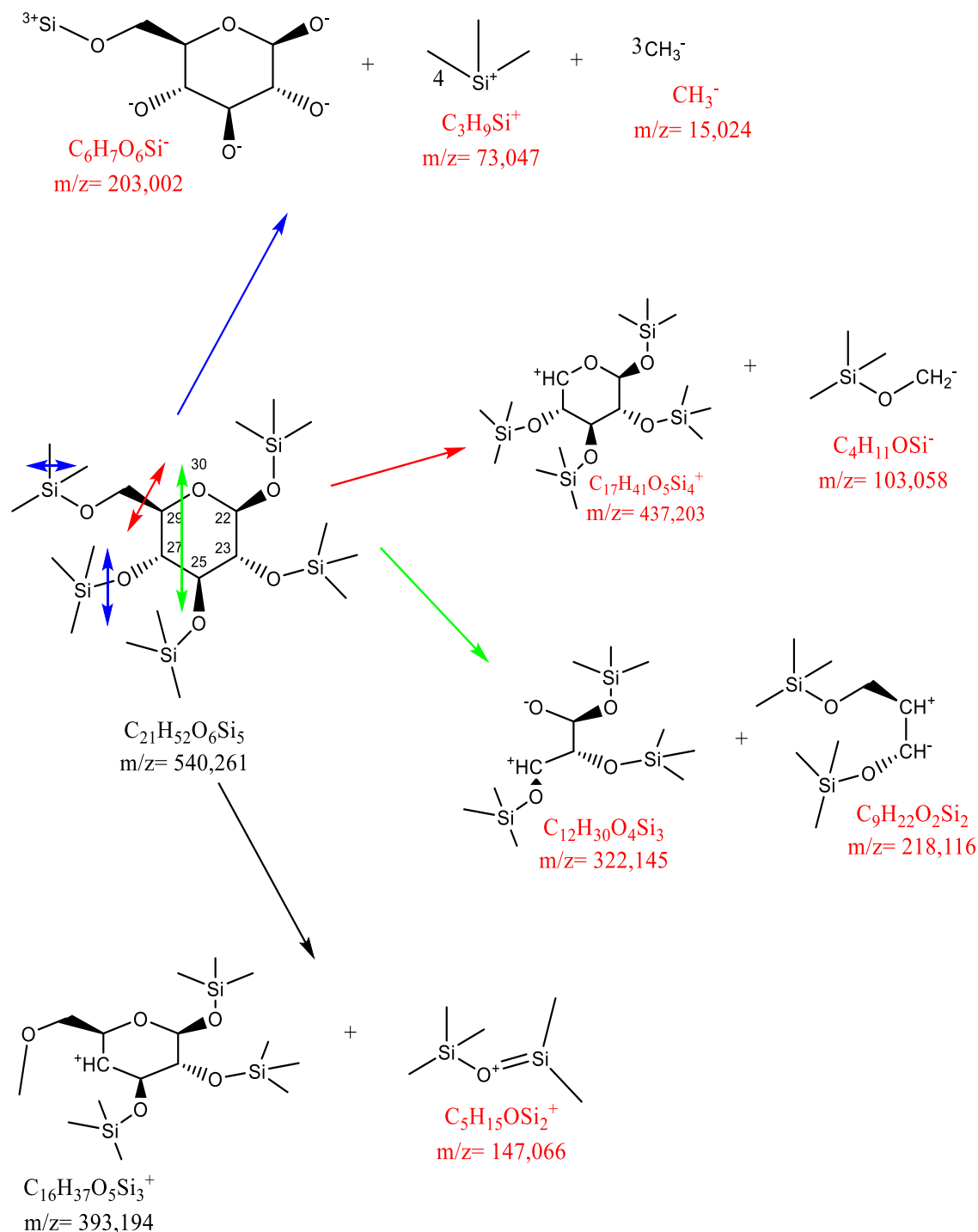
### Composé 75

Le composé **75** de temps de rétention 35,178 min correspond au  $\beta$ -D-glucose silylé de masse moléculaire  $m/z$  : 540 qui représente l'ion moléculaire (figure 164).



**Figure 164:** Spectre de masse du composé **75**

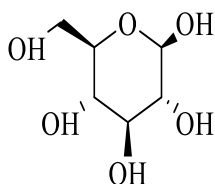
L'analyse du spectre de fragmentation du composé **75** (figure 164) montre la présence de fragments majeurs à  $m/z$  : 435,  $m/z$  : 217  $m/z$  : 204 (pic de base),  $m/z$  : 191,  $m/z$  : 147,  $m/z$  : 129,  $m/z$  : 103,  $m/z$  : 73.



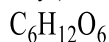
**Schéma 53:** Proposition de fragmentation du composé **75**

Le fragment majoritaire à  $m/z$  : 203 (204 sur le spectre) proviendrait de la perte de quatre groupements triméthylsilyle à  $m/z$  : 73 et de trois groupements méthyle. Les fragments à  $m/z$  : 437 (435 sur le spectre) et à  $m/z$  : 103 seraient dus à la rupture de la liaison carbone-carbone en position  $\alpha$  du cycle. Celui de masse  $m/z$  : 217 résulterait de l'ouverture du cycle entre l'oxygène et le carbone ( $C_{29}$ ) suivie de la scission de la liaison ( $C_{25}-C_{27}$ ). Le fragment à  $m/z$  : 147 serait un dérivé silylé  $[(CH_3)_2Si=O-Si(CH_3)_3]$  par cassure de liaisons oxygène-silicium et oxygène-carbone après transposition (schéma 53).

La structure recherchée serait donc celle du  $\beta$ -D-glucose (figure 165) dont l'indice de Kovats expérimental du dérivé silylé est égale à 1930 contre 1930 pour l'indice de Kovats théorique (Annexe 17). Ce composé peut être classé dans la famille des oses. Il n'aurait pas encore été identifié dans la plante étudiée.



(2R,3R,4S,5S,6R)-6-(hydroxyméthyl)tétrahydro-2H-pyran-2,3,4,5-tétraol

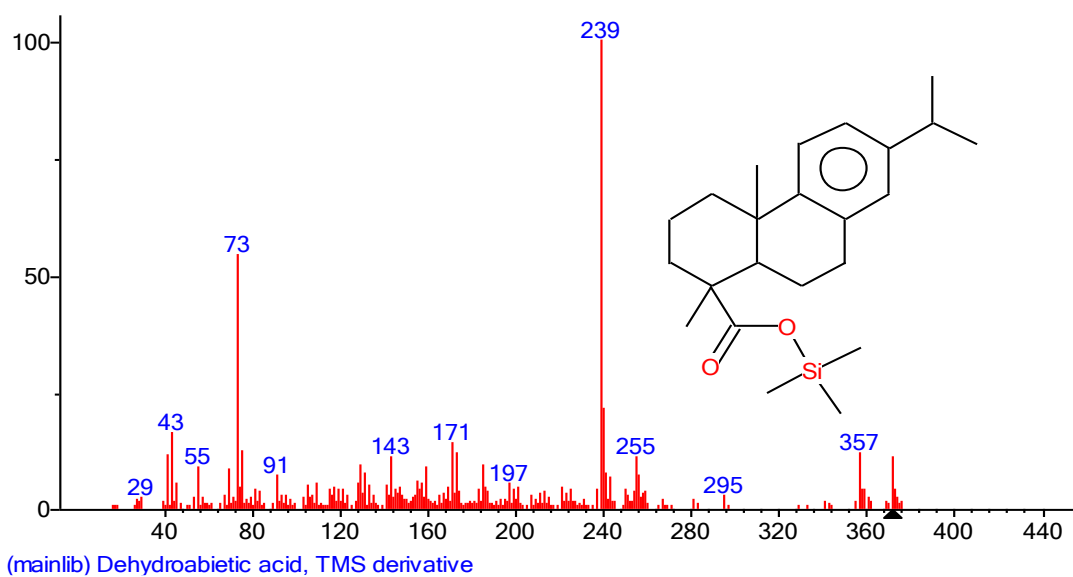


$$m/z = 180,063$$

**Figure 165:** Structure du composé **75** ( $\beta$ -D-glucose)

### Composé 86

Le composé **86** de temps de rétention 43,111 min correspond à l'acide déhydroabiétique silylé de masse moléculaire  $m/z$  : 372 qui représente l'ion moléculaire (figure 166).



**Figure 166:** Spectre de masse du composé **86**

L'analyse du spectre de fragmentation du composé **86** (figure 166) montre la présence de fragments majeurs à  $m/z$  : 357,  $m/z$  : 255,  $m/z$  : 239 (pic de base),  $m/z$  : 171,  $m/z$  : 143,  $m/z$  : 91,  $m/z$  : 73.

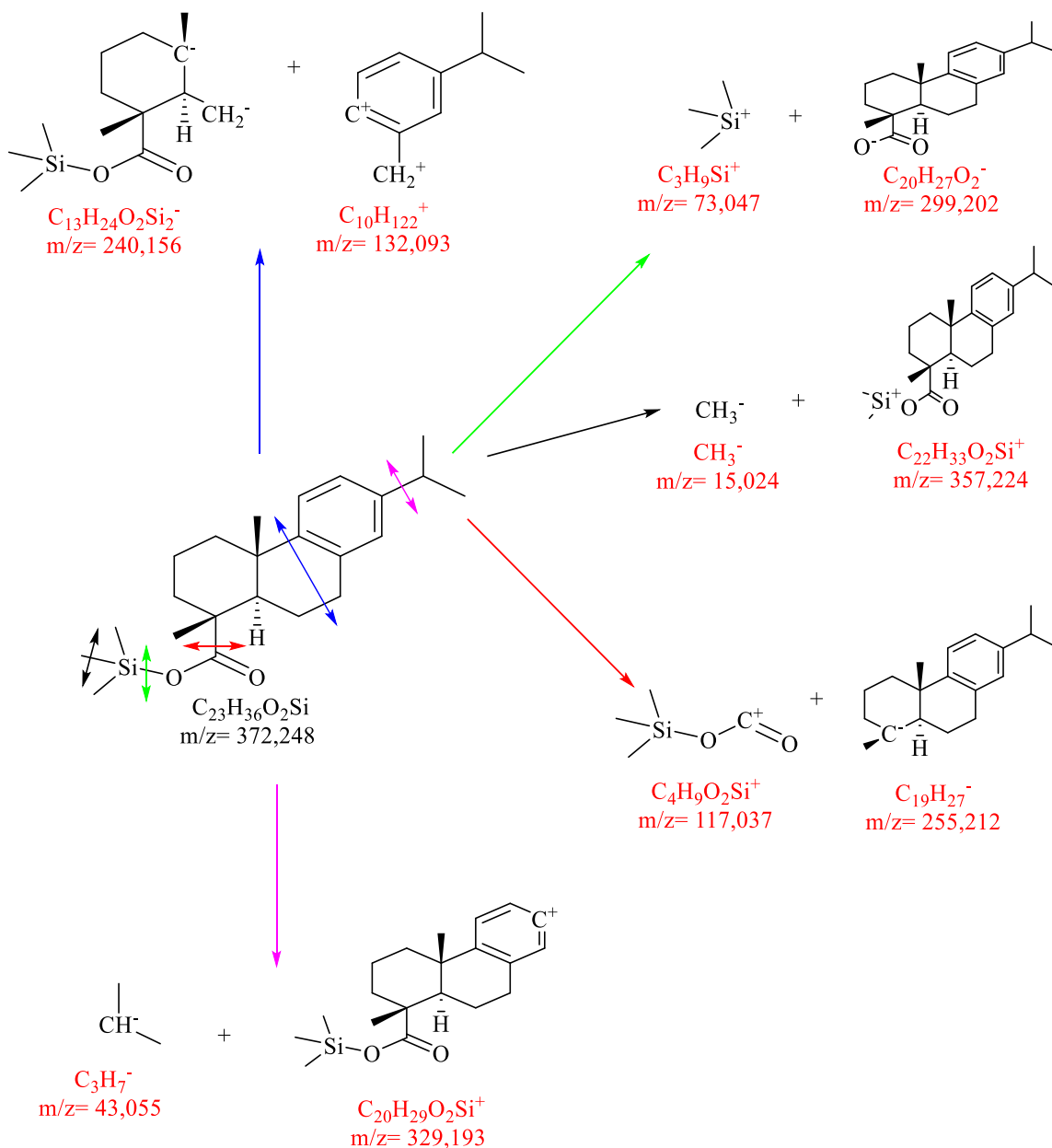
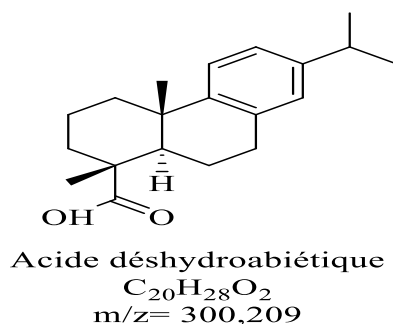


Schéma 54: Proposition de fragmentation du composé 86

Le pic de base à  $m/z$  : 239 serait dû à la double coupure sur le cycle intermédiaire au niveau de la liaison carbone-carbone reliant les deux cycles extrêmes et celle se trouvant en  $\beta$  de ces deux cycles. Le fragment à  $m/z$  : 73 proviendrait de la cassure de la liaison oxygène-silicium. Le fragment à  $m/z$  : 357 qui résulterait de la perte d'un groupement méthyle sur le silicium. Le fragment de masse à  $m/z$  : 255 serait issu du clivage de la liaison carbone-carbone en  $\alpha$  du groupement carbonyle. Le fragment à  $m/z$  : 43 serait dû à la scission de la liaison carbone-carbone entre le cycle aromatique et le groupement isopropyle (schéma 54).

La structure recherchée serait donc celle de l'acide déhydroabiétique (figure 167) dont l'indice de Kovats expérimental du dérivé silylé est égale à  $2371 \pm 3$  contre 2386 pour

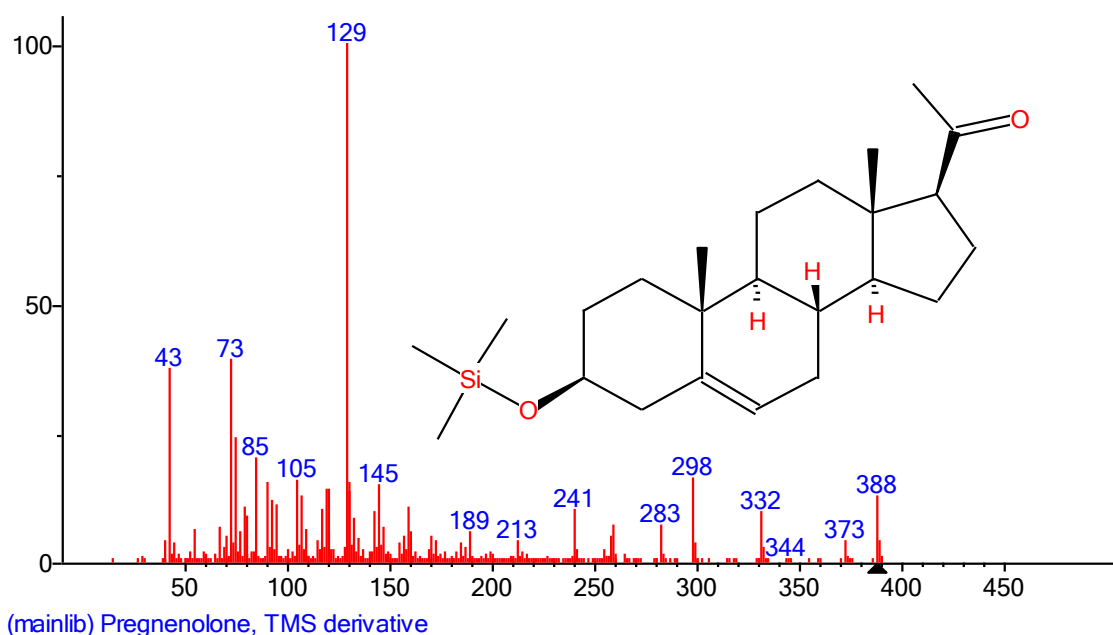
l'indice de Kovats théorique (Annexe 17). Ce composé peut être classé dans la famille des terpènes et stérols. Il n'aurait pas encore été identifié dans la plante étudiée.



**Figure 167:** Structure du composé **86**

### Composé **88**

Le composé **88** de temps de rétention 49,318 min correspond à la prégnénolone silylée de masse moléculaire  $m/z$  : 388 qui représente l'ion moléculaire (figure 168).



**Figure 168:** Spectre de masse du composé **88**

L'analyse du spectre de fragmentation du composé **88** (figure 168) montre la présence de fragments majeurs à  $m/z$  : 388,  $m/z$  : 373,  $m/z$  : 344,  $m/z$  : 332,  $m/z$  : 298,  $m/z$  : 283,  $m/z$  : 241,  $m/z$  : 145,  $m/z$  : 129 (pic de base),  $m/z$  : 105,  $m/z$  : 85,  $m/z$  : 73,  $m/z$  : 43.

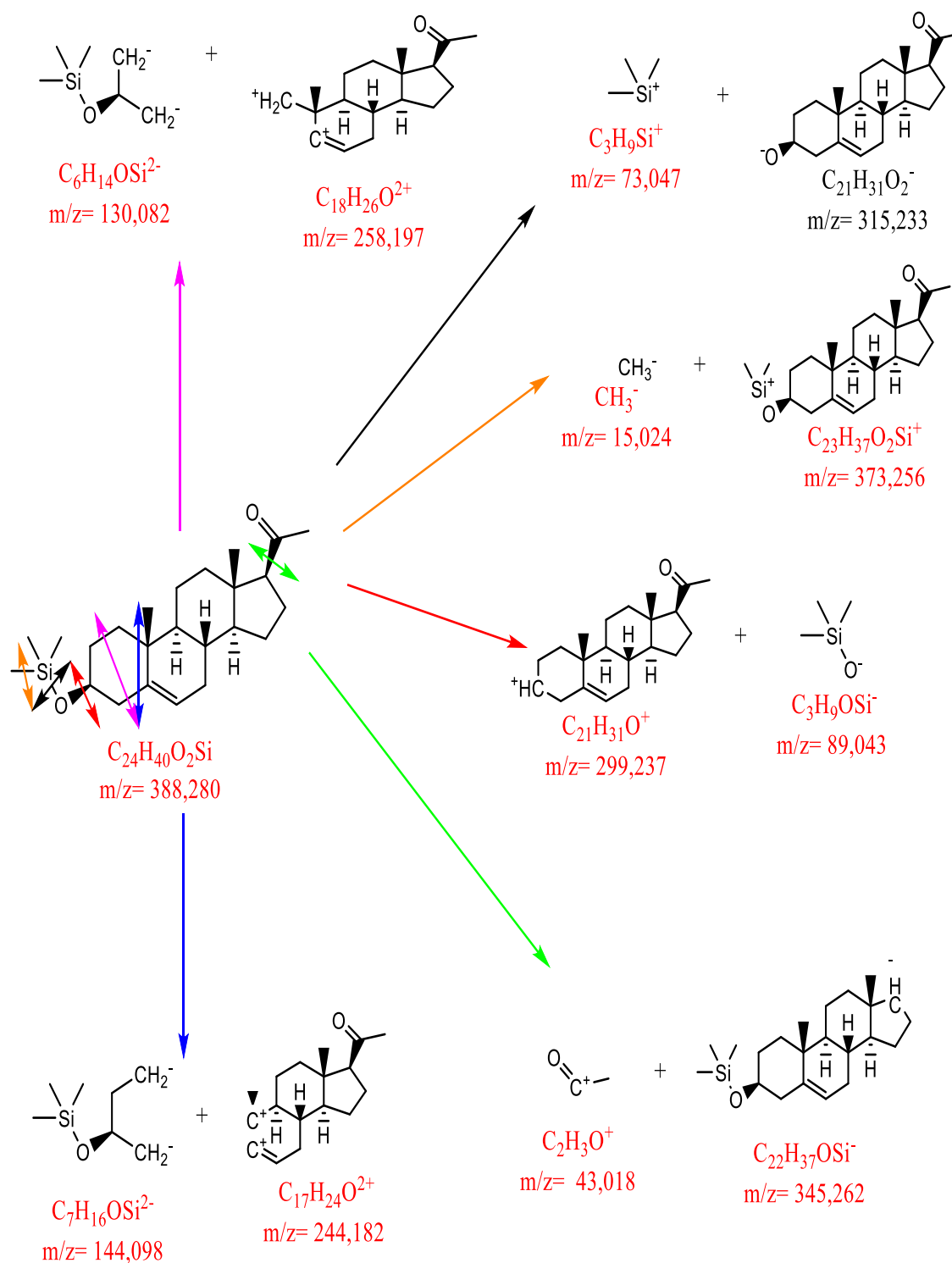
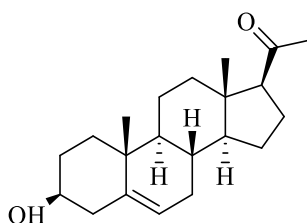


Schéma 55: Proposition de fragmentation du composé 88

Le pic majoritaire à  $m/z$  : 129 serait dû à la double coupure sur le cycle lié au groupement oxy au niveau des liaisons carbone-carbone opposées se trouvant en  $\alpha$  et en  $\beta$  du cycle suivant. Le fragment à  $m/z$  : 73 proviendrait de la cassure de la liaison oxygène-silicium. Le fragment à  $m/z$  : 373 résulterait de la perte d'un groupement méthyle sur le

silicium. Les fragments de masse à  $m/z$  : 299 (298 sur le spectre) et à  $m/z$  : 89 (91 sur le spectre) seraient issus du clivage de la liaison carbone-oxygène en  $\alpha$  du cycle. Les fragments de masse à  $m/z$  : 244 (241 sur le spectre) et à  $m/z$  : 144 (145 sur le spectre) découleraient de la scission sur le cycle lié au groupement oxy des liaisons carbone-carbone en  $\alpha$  du cycle suivant. Les fragments à  $m/z$  : 43 et à  $m/z$  : 345 (344 sur le spectre) seraient dus à la scission de la liaison carbone-carbone entre le cycle et le groupement carbonyle (schéma 55).

La structure recherchée serait donc celle de la Prégnénolone (figure 169) dont l'indice de Kovats expérimental du dérivé silylé est égale à  $2784 \pm 1$  contre 2787 pour l'indice de Kovats théorique (Annexe 17). Ce composé appartient à la famille des terpènes et stérols. Il n'aurait pas encore été identifié dans la plante étudiée.



1-((3S,8S,9S,10R,13S,14S,17S)-3-hydroxy-10,13-diméthyl-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tétradécahydro-1H-cyclopenta[a]phénanthrène-17-yl)éthan-1-one  
 $C_{21}H_{32}O_2$   
 $m/z = 316, 240$

**Figure 169:** Structure du composé **88** (Prégnénolone)

Toutes ces vingt et une (21) molécules sont connues dans la littérature mais seulement l'hexadécène a déjà été isolé des feuilles de *Hyptis suaveolens* (Joseph *et al.*, 2016). Parmi ces molécules, on a sept (7) composés qui ont été détectés lors de l'analyse LC-MS menée dans la présente étude (tableau 14).

### Conclusion partielle

L'analyse chromatographique en phase gazeuse des fractions à l'acétate d'éthyle et au dichlorométhane des extraits hydroalcooliques ( $E_{HA}$ ) des feuilles de *Hyptis suaveolens* avant et après l'extraction de l'huile essentielle a permis d'identifier au total cinquante-huit (58) composés dont les spectres de masse ont permis d'établir des schémas de fragmentation cohérents. Parmi ces composés, dix-sept (17) seraient des composés thermosensibles qui se seraient transformés en partie, au cours de l'extraction de l'huile essentielle et trente-deux (32) seraient des molécules thermostables qui resteraient inchangées dans les feuilles de la plante après l'extraction de l'HE (tableau 17). En outre, il y a neuf (9) nouveaux composés



formés au cours de l'extraction de l'HE. La présence de tous ces métabolites secondaires dans les feuilles de *Hyptis suaveolens* justifierait ses activités antimicrobiennes et antioxydantes.

**Tableau 17:** Composés thermostables

F <sub>AE</sub>	F <sub>DCM</sub>
Acide benzoïque	Acide p-anisique
Glycérol	Dihydroactinidiolide
2,6-Bis(tert-butyl) phénol	2,6-Bis(tert-butyl) phénol
Acide 3-hydroxybenzoïque	Hexadécane
Acide 4-hydroxybenzoïque	Acide p-hydroxybenzoïque
Acide laurique (acide décanoïque)	Acide azélaïque
Acide subérique	Octadécane
Méthyl (3,4-bis[(triméthylsilyl)oxy] phényl) acétate	Acide palmitique
(2-(3,4-dihydroxyphényl) -, tris(triméthylsilyl)- éthanol	Acide caféique
Acide azélaïque	Docosane
D- (-) -Tagatofuranose	Acide oléique
Acide protocatéchoïque	Acide stéarique
Acide homoprotocatéchique	Acide déhydroabiétique
Acide myristique	
Acide sébacique	
Acide p-coumarique	
D-Mannose	
Acide palmitique	
Acide catécholactique	
Acide caféique	
Acide oléique	
Acide (E)-9-octadécénoïque	
Acide stéarique	
Maltose isomère 1	
Maltose isomère 2	
Acide arachidique	

**FAE : Fraction à l'acétate ; FDCM : Fraction au dichlorométhane**

## VIII. TRANSFORMATIONS STRUCTURALES OBSERVEES AU NIVEAU DES MOLECULES AVANT ET APRES EXTRACTION DE L'HE

Les méthodes les plus couramment utilisées pour l'extraction des huiles essentielles sont l'hydrodistillation et l'entraînement à la vapeur d'eau. Ces deux méthodes reposent sur la distillation des cellules végétales sous l'effet de la chaleur de l'eau bouillante afin d'en extraire l'huile essentielle. L'exposition de la matière végétale à la chaleur et à l'humidité peut occasionner des réactions chimiques telles que l'hydratation ou la déshydratation, la décarboxylation, la déshydroxylation, l'hydrogénation ou la déshydrogénation.... Ainsi, dans

cette partie nous énumérerons quelques probables réactions chimiques qui auraient provoqué la formation des nouvelles molécules détectées dans les feuilles de *Hyptis suaveolens* après l'extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation.

Le tableau 18 fait l'état des différences constatées entre les nouvelles molécules détectées après extraction de l'HE et les molécules détectées avant l'extraction de l'HE qui seraient susceptibles de les engendrer par suite de réactions chimiques.

**Tableau 18:** Distinction entre nouveaux composés détectés après et composés détectés avant extraction de l'HE

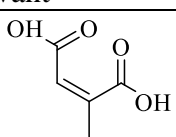
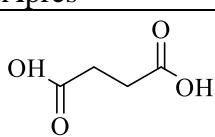
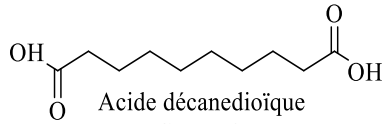
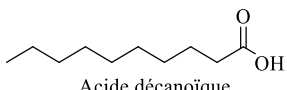
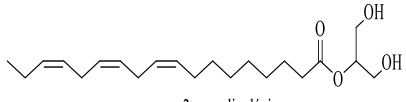
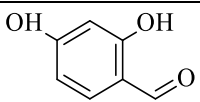
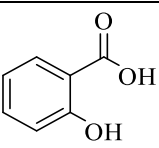
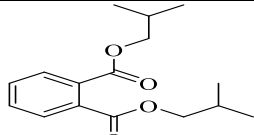

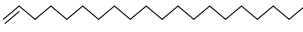
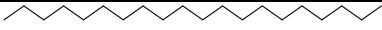
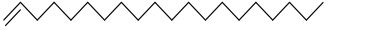

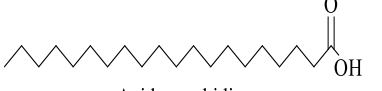
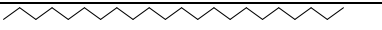

Avant	Après	Différences	Probables réactions
 <p>Acide méthyl maléïque C<sub>5</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub> m/z= 130,027</p>	 <p>Acide succinique C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub> m/z= 118,027</p>	(CH <sub>3</sub> et =) /(3H)	Déméthylation + hydrogénation  (Gilman <i>et al.</i> , 1994)
 <p>Acide décanedioïque C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub> m/z= 202,121</p>	 <p>Acide décanoïque C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub> m/z= 172,146</p>	2H <sub>2</sub> O	Déshydratation (Alexy <i>et al.</i> , 2001)
 <p>2-monolinoléine C<sub>21</sub>H<sub>36</sub>O<sub>4</sub> m/z= 352,261</p>		(C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> )/ C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	Hydratation + rupture en α de la double liaison (Diels- Alder) (Garrigues <i>et al.</i> , 1994)
 <p>2,4-dihydroxybenzaldéhyde C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub> m/z= 138,032</p>	 <p>Acide 2-hydroxybenzoïque C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub> m/z= 138,032</p>	Position du OH	Transposition
 <p>Diisobutyl phthalate C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub> m/z= 278,152</p>		Isobutyle et groupement ester	Hydratation + Substitution (Laib Barkat, 2016)

Tableau 18 (suite 1)

Avant	Après	Différences	Probables réactions
<p>Acide oléique C<sub>18</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub> m/z= 282,256</p>	<p>Acide (9Z,12Z)-octadéca-9,12-diénoïque C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub> m/z= 280,240</p>	Une insaturation	Déshydrogénation (Peng Kong, 2007)
<p>Acide (E)-octadec-9-énoïque C<sub>18</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub> m/z= 282,256</p>		Une insaturation	Déshydrogénation (Peng Kong, 2007)
<p>Acide stéarique C<sub>18</sub>H<sub>36</sub>O<sub>2</sub> m/z= 284,272</p>		Deux insaturation	Déshydrogénation (Peng Kong, 2007)
<p>2-monolinolénine C<sub>21</sub>H<sub>36</sub>O<sub>4</sub> m/z= 352,261</p>		(C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> ) + une insaturation	Hydratation + hydrogénation (Zheng <i>et al.</i> , 2000)
<p>Acide palmitique C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub> m/z= 256,240</p>	<p>hexadéc-1-ène C<sub>16</sub>H<sub>32</sub> m/z= 224,250</p>	(H <sub>2</sub> O)	Déshydratation (Alexy <i>et al.</i> , 2001)
<p>hexadécane C<sub>16</sub>H<sub>34</sub> m/z= 226,266</p>		(2H)	Déshydrogénation (Peng Kong, 2007)
<p>octadécane C<sub>18</sub>H<sub>38</sub> m/z= 254,297</p>	<p>octadéc-1-ène C<sub>18</sub>H<sub>36</sub> m/z= 252,282</p>	(2H)	Déshydrogénation (Peng Kong, 2007)
<p>Acide oléique C<sub>18</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub> m/z= 282,256</p>		(H <sub>2</sub> O) et une liaison double	Hydrogénation + Déshydratation (Peng Kong, 2007)
<p>Acide (E)-octadec-9-énoïque C<sub>18</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub> m/z= 282,256</p>		(H <sub>2</sub> O) et une liaison double	Hydrogénation + Déshydratation (Peng Kong, 2007)
<p>Acide stéarique C<sub>18</sub>H<sub>36</sub>O<sub>2</sub> m/z= 284,272</p>		(H <sub>2</sub> O)	Déshydratation (Alexy <i>et al.</i> , 2001)
<p>2-monolinolénine C<sub>21</sub>H<sub>36</sub>O<sub>4</sub> m/z= 352,261</p>		(C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub> ) et insaturation	Hydrogénation + Déshydratation (Peng Kong, 2007)

Tableau 18 (suite 2)

Avant	Après	Différences	Probables réactions
 Acide arachidique $C_{20}H_{40}O_2$ $m/z = 312,303$	 Eicosène $C_{20}H_{40}$ $m/z = 280,313$	$2H_2O$	Déshydratation (Alexy <i>et al.</i> , 2001)
 Eicosane $C_{20}H_{42}$ $m/z = 282,33$		$(H_2)$	Déshydrogénation (Peng Kong, 2007)
 Eicosène $C_{20}H_{40}$ $m/z = 280,313$	 Eicosane $C_{20}H_{42}$ $m/z = 282,33$	$(H_2)$	Hydrogénation (Zheng <i>et al.</i> , 2000)
 Acide arachidique $C_{20}H_{40}O_2$ $m/z = 312,303$		$(2OH)$	Déshydroxylation hydrogénation (Peng Kong, 2007)
 docosane $C_{22}H_{46}$ $m/z = 310,360$	 docos-1-ène $C_{22}H_{44}$ $m/z = 308,344$	$(H_2)$	Déshydrogénation (Peng Kong, 2007)

D'une manière générale, les différences constatées entre les nouvelles molécules détectées avant et après extraction de l'HE seraient dues à des réactions de déshydratations, de déshydrogénation ou de déméthylation, sous l'effet de la chaleur (Van Bergen *et al.*, 2000) (Jyotshna *et al.*, 2018) (Peng *et al.*, 2005). Dans certains cas, ce sont les réactions inverses qui sont observées, c'est-à-dire hydratation et hydrogénation par le contact prolongé avec l'eau bouillante (Barkat, 2016).

Certains auteurs ont montré que ces réactions de dégradations des molécules étaient dépendantes de la nature des molécules, de la température, des catalyseurs (Zhang *et al.*, 2003) (Lin *et al.*, 1998). En outre, il a été également relevé que les mécanismes de certaines de ces réactions de dégradation se déroulaient en plusieurs phases parmi lesquelles on a des réactions d'élimination, des réactions de scission de chaîne et des réactions d'addition.

**CONCLUSION ET PERSPECTIVE**

Les plantes aromatiques sont importantes sur le plan économique, sanitaire, alimentaire et environnemental. Elles sont donc constamment exploitées non seulement pour leurs composés bioactifs non volatils mais également pour leurs huiles essentielles. De ce fait, la valorisation des résidus issus des extractions d'huiles essentielles serait un enjeu majeur dans le cadre des Objectifs du Développement Durable (ODD). Ainsi, l'objectif général de ce travail est de contribuer à la valorisation des résidus d'extraction d'huile essentielle de feuilles de *Hyptis suaveolens* par l'exploitation des biomolécules qui restent dans ces résidus. Une étude comparative des familles de métabolites secondaires de *Hyptis suaveolens* avant et après l'extraction de l'huile essentielle a donc été réalisée.

Les rendements des extraits obtenus à partir des différents broyats ont montré globalement que les feuilles après extraction de l'huile essentielle donnent des rendements plus élevés avec des écarts variant de 0,74% à 6,35%. Le criblage phytochimique a révélé la présence de polyphénols tels que les flavonoïdes, les tanins, les leucoanthocyanes, les quinones et anthraquinones, des saponines, des stérols et terpènes autant avant qu'après extraction de l'huile essentielle. En outre, Le dosage spectrophotométrique de composés phénoliques a permis de montrer que les teneurs en flavonoïdes totaux augmentent avec l'extraction de l'huile essentielle tandis qu'il y a une diminution de celles des polyphénols et des tanins totaux dans les extraits hydroéthanoliques.

Au niveau activité, on note que les extraits de feuilles de *Hyptis suaveolens* ont une bonne activité antioxydante qui s'accroît après extraction de l'huile essentielle avec une très étroite corrélation avec leur teneur en flavonoïdes totaux qui croît au cours du processus.

La conjugaison des méthodes d'analyse structurale LC-MS et GC-MS a permis la détection de plus d'une centaine de composés autant avant qu'après extraction de l'huile essentielle. L'identification des composés par la méthode déréplicative (LC-MS/Q-TOF) a conduit à la détermination des structures de dix-neuf (19) molécules déjà isolées du genre *Hyptis*. Parmi ces molécules déjà connues, dix-huit (18) ont été confirmées par l'analyse en GC-MS. Cette analyse GC-MS a permis d'identifier au total cinquante-huit (58) composés des fractions à l'acétate d'éthyle et au dichlorométhane. La majorité de ces composés identifiés dans les feuilles de *Hyptis suaveolens* sont des composés thermostables qui restent inchangés dans les feuilles après l'extraction de l'huile essentielle. De plus certains composés thermosensibles se transforment partiellement ou totalement en de nouvelles molécules bioactives lors de l'hydrodistillation à la suite de réaction dont les mécanismes réactionnels restent à déterminer. De ce fait, les feuilles de *Hyptis suaveolens* après extraction de l'huile essentielle sont une importante source de molécules bioactives qui par

valorisation sur le plan alimentaire, nutritionnel et médicinal pourraient contribuer à l'amélioration de la santé humaine et animale.

En perspective, nous envisageons approfondir cette étude par l'élucidation des structures moléculaires par analyse de la résonance magnétique nucléaire (RMN). En outre, il serait intéressant de déterminer les mécanismes des différentes réactions chimiques qui auraient lieu au cours de l'extraction de l'huile essentielle dans l'optique d'une maîtrise globale du processus. Nous prévoyons également déterminer les caractéristiques nutritionnelles des feuilles de la plante après extraction de l'huile essentielle en vue de la formulation de compléments alimentaires. Par ailleurs, nous projetons d'étendre ce travail à d'autres espèces pourvoyeuses d'huiles essentielles en vue d'une généralisation de nos résultats.



**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



- Aaby, K., Skrede, G., Wrolstad, R. E. (2005). Phenolic composition and antioxidant activities in flesh and achenes of strawberries (*Fragaria ananassa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4032–4040.
- Abagli, A. Z., Alavo, T. B. C. (2011). Essential oil from bush mint, *Hyptis suaveolens*, is as effective as DEET for personal protection against Mosquito bites. *The Open Entomol J*; 5:45-8., 5, 45–48.
- Adjanohoun, E. ., Aké, A. ., Akpagana, K., Chibon, P., El-Hadji, A., Eyme, J., Garba, M., Gassita, J.-N., Gbeassor, M., Goudoté, E., Guinko, S., Hodouto, K.-K., Houngnon, P., Kéita, A., Keoula, Y., Kluga-Ocloo, W. ., Lo, I., Siamevi, K. M., Taffame, K. K. (1986). Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Togo. *Medecine traditionnelle et pharmacopée. Agence de Coopération Culturelle et Technique, Paris, France*, 671.
- Akoègninou, A., vander Burg, W. J., Van der Manesen, L. J. G., Adjakidjè, V., Essou, J. P., Yédomonhan, B. S. H. (2006). Flore Analytique du Bénin. *Backhuys Publishers Wageningen*, 1019.
- Alexy, P., Bakos, D., Crkonova, G., Kolomaznik, K., Krsiak, M. (2001). Blends of polyvinylalcohol with collagen hydrolysate thermal degradation and processing properties. *Macromolecular Symposia*, 170, 41.
- Anwar, F. (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds from Pakistan. *Flavour and Fragrance Journal*, 24(4), 170–176.
- Aspinall, G., Capek, P., Carpenter, R., Gowda, D.C., Szafranek, J. (1991). A Novel L Fuco-4-O-Methyl- D-Glucurono-D-Xylan from *Hyptis-Suaveolens*. *Carbohydr Res*, 214(1), 107–113.
- Azevedo, N., Campos, I., Ferreira, H., Portes, T., Santos, S., Seraphin, J. (2001). Chemical variability in the essential oil of *Hyptis suaveolens*. *Phytochemistry*, 57(5), 733–736.
- Bandonienè, D. (2002). Antioxidative activity of sage (*Salvia officinalis* L.), savory (*Satureja hortensis* L.) and borage (*Borago officinalis* L.) extracts in rapeseed oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(5), 286–292.
- Bauer, K., Garbe, D., Surburg, H. (1985). *Common fragrance and flavor materials*. Wiley Online Library.
- Bezerra, J. W. A., Costa, A. R., da Silva, M. A. P., Rocha, M. I., Boligon, A. A., da Rocha, J. B. T., Barros, L. M., Kamdem, J. P. (2017). Chemical composition and toxicological

- evaluation of *Hyptis suaveolens* (L.) Poiteau (Lamiaceae) in *Drosophila melanogaster* and *Artemia salina*. *South African Journal of Botany*, 113, 437–442. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.10.003>
- Bors, W., Heller, W., Michel, C. (1998). The Chemistry of Flavonoids. In *In Rice-Evans Ca. Packer L., Eds. Flanonoids in Health and Disease Vol. 1. New York: Marcel Dekker* (pp. 111–136).
- Botsoglou, A., N. (2003). The effects of dietary oregano essential oil and  $\alpha$ -tocopheryl acetate on lipid oxidation in raw and cooked turkey during refrigerated storage. *Meat Science*, 65(3), 1193–1200.
- Bouchonnet, S. D., Libong. (2004). Le couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse. *Actualité Chimique* 275, 7–14.
- Bouhadjra, K. (2011). *Etude de l'effet des antioxydants naturels et de synthèse sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge. Mémoire de Magister, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou (Algérie).*
- Boutelis, D. A. (2015). *cours phytochimique, Université de oued, Algérie.*
- Bruneton, J. (1993). *Pharmacognosie: Phytochimie Et Plantes Médicinales, 2eme Edition, .*
- Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e ed.) - Bruneton Jean - Google Livres. In *Ed. Lavoisier, Techniques et documentation* (p. 405). [https://books.google.ci/books?hl=fr&lr=&id=2UXvAQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR2&dq=Bruneton,+J.+\(1999\).+Pharmacognosie,+plantes+médicinales.+Ed.+Lavoisier,+Techniques+et+documentation,+Paris,+405.&ots=Itvq8jo\\_L4&sig=P\\_Zg6Xm0724TWCpC-d4\\_B2k5aY&redir\\_esc=y#v=on](https://books.google.ci/books?hl=fr&lr=&id=2UXvAQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR2&dq=Bruneton,+J.+(1999).+Pharmacognosie,+plantes+médicinales.+Ed.+Lavoisier,+Techniques+et+documentation,+Paris,+405.&ots=Itvq8jo_L4&sig=P_Zg6Xm0724TWCpC-d4_B2k5aY&redir_esc=y#v=on)
- Bryngelsson, S. (2002). Lipids and antioxidants in groats and hulls of Swedish oats (*Avena sativa* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(6), 606–614.
- Burkill, H. M. (1994). *The useful plants of west tropical Africa.*
- Burkill, H.M. (1995). The Useful Plants of West Tropical Africa. *Royal Botanic. Garden Kew, Vol 3, 2ème Edition, vol3, 2eme Eds.*
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253.
- Celiktas, O.Y. (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*, 100(2), 553– 559.
- Chang, S. (2000). Low-density lipoprotein antioxidant activity of phenolic compounds and polyphenol oxidase activity in selected clingstone peach cultivars. *Journal of*

- Agricultural and Food Chemistry*, 48(2), 147–151.
- Chatterjee, A., Pakrashi, S. C. (1997). "The Treatise On Indian Medicinal Plants." *PID, New Delhi*, 5, 15.
- Cheynier, V., Sarni-Marchando, P. (2006). *Structures phénoliques et goût. In Les polyphénols en agroalimentaire; Tec Doc Ed., Lavoisier, Paris, 2006, 89-134.*
- Chizzola, R., Michitsch, H., Franz, C. (2008). Antioxidative properties of *Thymus vulgaris* leaves: comparison of different extracts and essential oil chemotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 6897–6904.
- Chukwujekwu, J., Smith, P., Coombes, P., Mulholland, D.A., Staden, J. V. (2005). Antiplasmodial diterpenoid from the leaves of *Hyptis suaveolens*. *Journal of Ethnopharmacology*, 102(2), 295–297.
- Číž, M., Luca, A., Hasirci, V., Sahin, S., Sumnu, G. (2010). Different methods for control and comparison of the antioxidant properties of vegetables. *Food Control*, 21, 518–523.
- Codornui-Hernandez. (2003). Theoretical study of flavonoïds and proline interaction. Aqueous and gas phases. *Journal of Molecular Structure (Theochem)*, 623, 64.
- Copius-Peereboom, J. W. (1964). Thin Layer Chromatography. *Elsevier Publ., Ed., Amsterdam*, 199.
- Cronquist, A. (1981). *An Integrated System of Classification of Flowering Plants.*
- Crozier, A., Clifford, M. ., Ashihara, H. (2008). *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet. John Wiley Sons.*
- Cuccioloni, M. (2009). Pomegranate fruit components modulate human thrombin. *Fitoterapia*, 80(5), 301–305.
- Dang, N, M. (2001). Antioxidant activity of essential oils from various spices. *Food/Nahrung*, 45(1), 64–66.
- Dapkevicius, A. (2002). Isolation and Structure Elucidation of Radical Scavengers from *Thymus vulgaris* leaves. *Journal of Natural Products*, 65(6), 892–896.
- Das Prabhat, K. (2009). The Wealth of Indian (Raw materials). *Journal of Global Pharma Technology*, 1, 84.
- Datta, K., Sinha, S., Chattopadhyay, P. (2000). "Reactive oxygen species in health and disease," *Natl. Med. J. India, Vol. 13, No. 6*, 304–310.
- Davies-Coleman, M. T., Rivett, D. (1989). In Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. *Herz, W.; Grisebach, H.; Kirby, G. W.; Tamm, C., Eds.; Springer: New York*, 55, 1–35.
- Daziel, J. M. (1937). *The Useful Plants of Tropical West Africa, London: Crown Agents for*

*the Colonies.*

- De-Hoffmann, E., Charette, J., Stroobant, V. (1999). *Spectrométrie de masse. Dunod. Paris.*
- Dehak, K. (2013). Méthode d'extraction et de séparation des substances naturelles. In *Doctorat, Université de Ouargla, Algérie.*
- Dossa, A., Tachon, C., Dangou, J., Chrostowska, A., Fouquet, E., Sohounhloué, D. (2012). Optimization of the extraction of sorghum's polyphenols for industrial production by membrane processes. *Res. J. Recent Sci.*, 1(4), 1–8.
- Medoatinsa, S. E., Dossa, C. P., Agbangnan, Viwami, F., Agbidinoukoun, G. S., Bogninou, R., Noudogbessi, J. P., Lagnika, L., Ahissou, H., Sohounhloué, D. C. K. (2015). In vitro antiplasmodial and antioxidant activities of ethanolic and hydroethanolic extracts of *Hyptis suaveolens*. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(08), 101–112. [www.wjpps.com](http://www.wjpps.com)
- Dudonné, S., Vitrac, X., Coutiere, P., Merillon, J. M. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAc assays. *J Agric Food Chem*, 57, 1768–1774.
- Durant, M., Molinier, V., Kunz, W., Aubry, J.-M. (2011). Classification of organic solvents revisited by using the COSMO-RS approach. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 17(18), 64–5155.
- Dvaranauskaite, A. (2008). Characterization of steam volatiles in the essential oil of black currant buds and the antioxidant properties of different bud extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(9), 3279–3286.
- Edeoga, H. O., Okoli, B. E. (1995). Histochemical studies in the leaves of some *Dioscorea* L. (Dioscoreaceae) and the taxonomic importance. *Feddes Repertonum*, 106(17), 113–120.
- Edeoga, H., Omosun, G., Uche, L. (2006). Chemical composition of *Hyptis suaveolens* and *Ocimum gratissimum* hybrids from Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, 5(10), 892–895.
- Edigênia, C., Araújo, C., Lima, M. A. S., Edson, P., Nunes, E. R. S. (2005). Abietane diterpenes from *Hyptis platanifolia*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16 no.6B, Vol. 16, No. 6B, 1336-1341. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532005000800005>
- Ekow, N. T., Dzobo, K., Adu, F., Chirikure, S., Wonkam, A., Dandara., C. (2018). J. Ethnopharm. 211 (2018) 58. *Journal of Ethnopharmacology*, 211, 58.

- Ethel, A., Edith, O., Hazleton. (1922). A Quantitative Tannin Test. *Biochem J.*, 16(4), 516–517.
- Fiol, M., Adermann, S., Neugart, S., Rohn, S., Mügge, C., Schreiner, M., Krumbein, A., Kroh, L. (2012). Highly glycosylated and acylated flavonols isolated from kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*) – Structure -antioxidant activity relationship. *Food Research International*, 47, 80–89.
- Garcia-Serna, J., Pérez-Barrigón, L., Cocero, M. J. (2007). New trends for design towards sustainability in chemical engineering: Green engineering. *Chemical Engineering Journal*, 133(1), 7–30.
- Garrigues, C., Guyot, A., Tran, V. (1994). Thermal dehydrochlorination and stabilization of polyvinylchloride in solution. 9. Dialkyltin maleates - Diels-Alder reaction. *Polymer Degradation and Stability*, 43, 307.
- Garrote, G. (2003). Valorisation of waste fractions from autohydrolysis of selected lignocellulosic materials. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 78(4), 392–398.
- Gavani, U., Paarakh, P. (2008). Antioxidant activity of *Hyptis suaveolens* Poit. *International Journal of Pharmacology*, 4(3), 227–229.
- Gentry, H. S., Mittleman, M., McCrohan, P. R. (1990). Introduction of chia and gum tragacanth in the U.S. *Advances in New Crops. Proceedings of the First National Symposium “New Crops: Research, Development, Economics”, Indianapolis, Indiana, USA, 23-26 October 1988.*, 252–256.  
<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19920311487>
- Gil, I., M. (2002). Antioxidant capacities, phenolic compounds, carotenoids, and vitamin C contents of nectarine, peach, and plum cultivars from California. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(17), 4976–4982.
- Gil, M, I. (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 4581–4589.
- Gilman, J., VanderHart, D., Kashiwagi, T., Nelson, G. L. E. (1994). In: Fire and Polymers II: Materials and tests for hazard prevention. *Washington, DC: American Chemical Society*, 161.
- Goly, K. R. C. (2016). *Activités antimicrobiennes d’extraits de feuilles de Hyptis suaveolens (Poit) et de Lippia multiflora (Moldenke) et application à la conservation du poisson maquereau (Scomber scombrus Linnaeus, 1758) fumé.*

- Goly, K. R. C., Dadie, A., Soro, Y., Kouame, N. D., Kassi, A. B. B., Marcellin, D. (2017). *Antimicrobial and Preservative Activities of Lippia Multiflora Essential Oil on Smoked Mackerel ( Scomber Scombrus ) Fish*. <https://doi.org/10.4172/1989-8436.100063>
- Goly, K. R. C., Soro, Y., Dadie, A., Kassi, A. B. B., Marcellin, D. (2015). Antibacterial activity of essential oils and extracts from the leaves of *Hyptis suaveolens* and *Lippia multiflora* on multi-resistant bacteria. *Rasayan j. Chem.*, 8(4), 396–403. <http://www.rasayanjournal.com><http://www.rasayanjournal.co.in>
- Grassi, P., Nunez, M. J., Reyes, T. S. U., Franz, C. (2008). Chemical variation in the essential oil composition of *Hyptis suaveolens* (L) Poit (Lamiaceae). *Natural Product Communications*, 3(7), 1137–1140.
- Grassi, Paolo, Reyes, T. S. U., Sosa, S., Tubaro, A., Hofer, O., Zitterl-Eglseer, K. (2006). Anti-Inflammatory Activity of Two Diterpenes of *Hyptis suaveolens* from El Salvador. In *Z. Naturforsch* (Vol. 61). <http://www.znaturforsch.com>
- Grolier, P., Borel, P., Scalbert, A., Remesy, C. (2001). Les Phytomicronutriments. In: *Traite De Nutrition Clinique De L'adulte, Médecine-Sciences. Médecine-Sciences, Flammarion*, 165–177.
- Guenther, E. (1950). The Essential Oils. *Florida, USA, REK, Publishing Company, IV*.
- Harbone, J. B. (1988). The Flavonoids. Chapman And Hall, London, Part I, 17-56. In *Chapman And Hall, London, Part I* (pp. 17–56).
- Harbone, J. B. (1998). *Phytochemical Methods, A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis; New York*.
- Heller, W., Forkmann, G. (1993). Biosynthesis of flavonoids. In *The Flavonoids. Advances in Research since 1986* (ed. J. B. HARBORNE), pp. 499-535.
- Hesse. (2002). Alkaloids – Nature's Curse or Blessing? *Vhca, Zürich. Vhca, Zurich*.
- Iwu, M. M., Ezeugwu, C., Okunji, C., Sanson, D. R., Tempesta, M. S. (1990). Antimicrobial Activity and Terpenoids of the Essential Oil of *Hyptis suaveolens*. *Pharmaceutical Biology*, 28(1), 73–76.
- Jan, M., María, G.-A., María, P. M.-L., Milan, Ž., Julián, C. R.-G. (2007). Measurement Of Antioxidant Activity Of Wine Catechins, Procyanidins, Anthocyanins And Pyranoanthocyanins. *Int. j. Mol. Sci*, 8, 797–809.
- Jeong, M., S. (2004). Effect of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(11), 3389–3393.
- Joseph, Joselin, Jeeva, Solomon. (2016). GC-MS and FT-IR analysis of a coastal medicinal plant- *Hyptis suaveolens* ( L .) Poit. *Journal of Coastal Life Medicine*, 4(5), 380–385.

- <https://doi.org/10.12980/jclm.4.2016J5-147>
- Jyotshna, Nupur, S., Akhilesh, K. Y., Karuna, S., Madan, M. G., Raj, K. L. (2018). Impact of postharvest processes on major phenolic constituents and antioxidant potentials of different *Ocimum* species. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 10, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2018.04.002>
- Kanko, C. (2010). *Contribution à l'étude phytochimiques de plantes médicinales et aromatiques de Côte d'Ivoire. Activités analgésique et anti-inflammatoire de stéroïdes isolés de l'écorce de Parkia biglosa (Mimosaceae). Thèse de Doctorat d'Etat, Université de Cocody-Abidjan,*
- Kashem, M., Rahman, M. M. (2013). Establishment of efficient protocols for In vitro regeneration of *Hyptis suaveolens* (L) Poit. using Apical shoots and nodal segments. *The Chittagong Univ.J.B.Sci*, 8(1 2), 99–105.
- Kerharo, J., Adams, J. G. (1974). La Pharmacopée Sénégalaise Traditionnelle: Plantes Médicinales et Toxiques. In *Edition. Vigot Frères, paris* (pp. 211–214, 224-225,490).
- Kirtikar, K. R., Basu, B. D. (1991). "Indian Medicinal Plants." *Singh B Singh, M.P.Publishers, India, 2032.*
- Konaté, K., Hilou, A., Mavoungou, J., Lepengué, A., Souza, A., Barro, N., Datté, J. Y., M'Batchi, B., Nacoulma, O. (2012). Antimicrobial activity of polyphenol-rich fractions from *Sida alba* L. (Malvaceae) against co-trimoxazol-resistant bacteria strains. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 11(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-11-5>
- Koné, K. patrick F. O., Soro, Y., Siaka, S. (2017). Détermination des paramètres influençant le rendement d'extraction hydro-alcoolique des métabolites secondaires de *Alchornea cordifolia* (Euphorbiaceae) et *Tridax procumbens* linn (Asteraceae). *J. Soc. Ouest-Afr. Chim*, 16. <http://www.soachim.org>
- KONE, M. D. (2009). *Thèse de doctorat « Etude de la phytochimie et des activités larvicide, anticholinestérasique et antioxydante des extraits de quatre plantes du Mali : Acacia nilotica Guill. et Perr. (Mimosaceae), Calotropis procera (Ait.) Ait.f. (Asclepiadaceae), Euphorb.*
- Kumar, S., Nandha, Thampi, N. (2015). Phytochemical screening and characterization of the bioactive compounds from the leaves of *Hyptis suaveolens* and *Spathodea campanulata*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(7), 840–850. [www.jocpr.com](http://www.jocpr.com)
- Laetitia, M. (2009). *Etude des composés phénoliques de la pomme cajou (anacardium occidentale l.). thèse de doctorat biochimie, chimie et technologie des aliments*

université montpellier ii sciences et techniques du languedoc.

- LAFONT, R. (2005). *Méthodes physiques de séparation et d'analyse et méthodes de dosage des biomolécules. Biologie et Multimédia, Université Pierre et Marie Curie, UFR de Biologie, France.*
- Lagnika, L. (2005). *Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises. Thèse de Doctorat en pharmacie, Université Louis Pasteur de Strasbourg/Université d'Abomey-calavi, Bénin.*
- Lagouri, V., Boskou, D. (1995). Screening for antioxidant activity of essential oils obtained from spices. *Developments in Food Science*, 37, 869–879.
- Laib, I., Barkat, M. (2016). *Impact of cooking and conservation for twelve days on total polyphenols content, antioxidant and anticholinesterase activities of red onion. 10(13), 270–277. <https://doi.org/10.5897/AJPP2015.4519>*
- Lautie, E., Quintero, R., Fliniaux, M-A and With, V. M.-L. (2008). Selection methodology with scoring system: Application to Mexican plants producing podophyllotoxin related lignans. *Journal of Ethnopharmacology*, 120(3), 402–412.
- Ledand, J. C., Ara, K., Peter, B. K., Sara, L. W., James, A., Duke, H. L. (2006). *Natural Products From Plants, Star Educational Books, New Delhi, Phytochemicals the Phytochemical Components of Plants.*
- Lee, K. W., Kim, Y. J., Lee, H. J., Lee, C. Y. (2003). Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Food Chemistry*, 51(25), 7292–7295. <https://doi.org/10.1021/jf0344385>
- Li, B, H. (2008). Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT-Food Science and Technology*, 41(3), 385–390.
- Li, Y. (2006). Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry*, 96(2), 254–260.
- Lin, S., Li, F., Cheng, S., Harris, F. (1998). Organo-soluble polyimides: Synthesis and polymerization of 2,20 -bis(trifluoromethyl)-4,40 ,5,50-biphenyltetracarboxylic dianhydride. 1998;31:2080. *Macromolecules*, 31, 2080.
- Louis S. (2004). *Diversité Structurale Et D'activité Biologique Des Albumines Entomotoxiques De Type 1b Des Graines De Légumineuses. Thèse. Ecole Doctorale : Evolution, Ecologie Microbienne Et Modélisation. Formation Doctorale : Analyse Et Modélisation Des Systèmes Biolog.*
- Lucchesi, M. E. (2005). *Extraction Sans Solvant Assistée Par Micro-Ondes: Conception Et Application A L'Extraction Des Huiles Essentielles ; Thèse De Doctorat En Science ;*



Université De La Réunion.

- M.Silverstein, R., Webster, F. X., Kiemle, D. J. (2005). *Spectrometric identification of organic compounds* (I. John Wiley and Son (ed.); 7th editio).
- Macheix, J.-J., Fleuret, A., Sarni-Manchado, P. (2006). Composés phénoliques dans la plante- Structure, biosynthèse, répartition et rôles. In Les polyphénols en agroalimentaire. In *Ed. Lavoisier, Techniques et documentation* (pp. 1–28).
- Mahesh, S., Chatterjee, A., Pakrashi, S. C. (2001). The Treatise on Indian Medicinal Plants. In *PID, New Delhi* (p. 1).
- Malele, R., Mutayabarwa, C., Mwangi, J.W., Thoithi, G. (2003). Essential Oil of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. from Tanzania: Composition and Antifungal Activity. *Journal of Essential Oil Research*, 15(6), 438–440.
- Manchand, P. S., White, J. D., Fayos, J., Clardy, J. . (1974). Chemical constituents of tropical plants. Structures of suaveolic acid and suaveolol. *The Journal of Organic Chemistry*, 39(15), 2306–2308.
- Mann, J., Davidson, R. S., Hobbs, J. B., Banthorpe, D. V, Harborne, J. B. (1994a). Natural Products, Their chemistry and biological significance. *Ed Mann, J Scientific and Technical. Chapitre 5: Terpenoids*, 289–359.
- Mann, J., Davidson, R. S., Hobbs, J. B., Banthorpe, D. V, Harborne, J. B. (1994b). *Natural Products. Longman., Ch. 7, 389p.*
- Marco, J. G. (1968). A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, (45), 594.
- Marinova, D., Ribarova, F., Atanassova, M. (2005). Total Phenolics In Bulgarian Fruits And Vegetables. *Journal Of The University Of Chemical Technology And Metallurgy*, 40, N3, 255–260.
- Mazen, E. K. (2002). Molecular régulation of plant monoterpenes biosynthesis in relation to fragrance. In *Thesis of Doctorat, Proefschrift Wageningen University, Netherland.*
- McCarthy, E. D., Han, J., Calvin, M. (1968). Hydrogen atom transfer in mass spectrometric fragmentation patterns of saturated aliphatic hydrocarbons. *Analytical Chemistry*, 40(10), 1475–1480.
- Meyer-Aurich, A. (2006). Impact of tillage and rotation on yield and economic performance in corn-based cropping systems. *Agronomy Journal*, 98(5), 2006, vol. 98, no. 5, pages 1204–1212.
- Miller, N. ., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the

- antioxydant status in premature neonates. *Clinical Sciences*, 84(4) : 407-412.
- Mimica-Dukić, N. (2003). Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils. *Planta Medica*, 69(5), 413–419.
- Misra, T., Singh, R., Upadhyay. (1983). Tri-Terpenoids from *Hyptis-Suaveolens* Roots. *Phytochemistry*, 22(2), 603–605.
- Moerman, E., D. (1996). An analysis of the food plants and drug plants of native North America. *Journal of Ethnopharmacology*, 52(1), 1–22.
- Mohammedi, Z. (2006). *Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen*. Thèse Magistère, Université Abou Bakr Belkaïd Tlemcen, Algérie.
- Moreira, A. C. P., de Oliveira, E. L., Wanderley, P. A., Egberto, S. C., de Souza, E. L. (2010). Composition chimique et activité antifongique de l'huile essentielle de feuilles de l'espèce *Hyptis suaveolens* (L.) Poit contre *Aspergillus*. *Journal Brésilien de Microbiologie*, 41, 28–33. <https://kopernio.com/viewer?doi=10.1590/S1517-83822010000100006> route=6
- Moure, A., Franco, D., Sineiro, J., Dominguez, H., Nunez, M.J., Lema, J. M.. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72(2), 145– 171.
- Moure, A., Franco, D., Sineiro, J., Dominguez, H., Nunez, M. J., Lema, J. M. (2000). Evaluation of extracts from *Gevuina avellana* hulls as antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (9), 3897–3890.
- Muanda, N. (2010). *Identification De Polyphénols, Evaluation De Leur Activité Antioxydante et Etude De Leurs Propriétés Biologiques*. Thèse De Doctorat Université Paul Verlaine-Metz ; UFR Des Sciences Fondamentales Et Appliquées ; Spécialité : Chimie Organique 294 P.
- Mukherjee, K., Mukherjee, R., Ghosh, P. (1984). Chemistry of *Hyptis suaveolens*: a pentacyclic triterpene. *J. Nat. Prod*, 47(2), 377–378.
- Munier, R. M. (1953). Caractérisation chimique des alcaloïdes. *Bull, Société Chimique et Biologique*, 35, 1225.
- Munin, A., Edwards-Lévy, F. (2011). Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds; a Review. *Pharmaceutics*, 3(1999–4923), 793–829. <https://doi.org/doi:10.3390>
- Muyonga, J. H., Andabati, B., Ssepuuya, G. (2014). Effect of heat processing on selected grain amaranth physicochemical properties. *Food Science Nutrition*, 2(1), 9–16. <https://doi.org/10.1002/fsn3.75>
- N'guessan, K., Kadja, B., Guédé, N. Z., Dossahoua, T., Laurent, A. (2009). Screening

- phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Article Original Sci. Nat*, 6, 1–15.  
<http://www.ethnopharmacologia.org/prelude/pdf/biblio-hg-53-guessan.pdf>
- Nantitanon, W., Chowwanapoonpohn, S., Okonogi, S. (2007). Antioxidant and antimicrobial activities of *Hyptis suaveolens* essential oil. *Sci Pharm*, 75, 35–46.
- Naveena, B., M. (2008). Comparative efficacy of pomegranate juice, pomegranate rind powder extract and BHT as antioxidants in cooked chicken patties. *Meat Science*, 80(4), 1304–1308.
- Nayak, U. G., Guha, P. C. (1952). Essential oil from *Hyptis suaveolens*. *Journal of the Indian Chemical Society*, 29, 183-6.
- Noudjou, F., Kouninki, H., Hance, T., Haubruge, E., ST. Ngamo, L., Pierre, M. M., Martin, N., Malaisse, F., Marlier, M. G. L. (2007). Composition of *Xylopi aethiopia* (Dunal) A. Rich essential oils from Cameroon and identification of a minor diterpene: ent-13-epi manoyl oxide. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 2007, Vol.11, N°3, 11*, 193–199.
- Novidzro, K. M., Wokpor, K., Amoussou, F. B., Koudouvo, K., Dotsé, K., Osseyi, E., Koumanglo, K. H. (2019). Etude de quelques paramètres physicochimiques et analyse des éléments minéraux, des pigments chlorophylliens et caroténoïdes de l'huile des graines de *Griffonia simplicifolia*. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 13(4), 2360–2373.
- Oboh, G. (2008). Polyphenol Extracts from *Hyptis suaveolens* Leaves Inhibit Fe 2+-induced Lipid Peroxidation in Brain. In *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences* (Vol. 2).  
[http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/0806/IJBPS\\_2\(1\)/IJBPS\\_2\(1\)41-46o.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/0806/IJBPS_2(1)/IJBPS_2(1)41-46o.pdf)
- Oliveira, M. J., Campos, I. F. P., Oliveira, C. B. A., Santos, M. R., Souza, P. S., Santos, S. C., Seraphin, J. C., Ferri, P. H. (2005). Influence of growth phase on the essential oil composition of *Hyptis suaveolens*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 33(3), 275–285.
- Parsons, W. T., Cuthbertson, E. G. (1992). Noxious Weeds of Australia. In *Data Press, Melbourne/Sydney*, 490–492.
- Peerzada N. (1997). The Chemical Composition of the Essential Oil of *Hyptis suaveolens*. *Molecules*, 2, 165–168.
- Peng, Z., Kong, L. X. (2007). A thermal degradation mechanism of polyvinyl alcohol/silica

- nanocomposites. *Polymer Degradation and Stability*, 92(6), 1061–1071.  
<https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2007.02.012>
- Peng, Z., Kong, L. X., Pisano, J. J., Bronzert, T. J., Blažek, J., Van Bergen, P. F., Poole, I., Ogilvie, T. M. A., Caple, C., Evershed, R. P., d'Acampora Zellner, B., Dugo, P., Dugo, G., Mondello, L., Anderson, J. L., Armstrong, D. W., Ruth, S. M. Van, Al-Rubaye, A. F., Hameed, I. H., Kadhim, M. J. (2005). Analysis of amino acid phenylthiohydantoin by gas chromatography. *Analytical Chemistry*, 14(19), 5597–5607.  
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0231\(20000130\)14:2<71::AID-RCM837>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(20000130)14:2<71::AID-RCM837>3.0.CO;2-9)
- Peter, K., Vollhardt, C., Schore, N. (2004). *Traité de chimie organique''*. In 4ème Ed. De Boeck, Bruxelles.
- Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel R. D., Kale L., S. K. (2005). Scalable Molecular Dynamics With Namd. *J Comput Chem*, 26: 1781-1802. *J Comput Chem*, 26, 1781–1802.
- Pokorný, J., Korczak, J. (2001). Preparation of natural antioxidants. In *Antioxidants in food: practical application*. Cambridge England: Woodhead Publishing Limited (pp. 311–341).
- Povilaitytė, V., Venskutonis, P. R. (2000). Antioxidative activity of purple perill (Perilla frutescens L.), moldavian dragonhead (Dracocephalum moldavica L.), and roman chamomile (Anthemis nobilis L.) extracts in rapeseed oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77(9), 951–956.
- Prasain, J., Wang, C., Barnes, S. (2004). Mass spectrometric methods for the determination of flavonoids in biological samples. In *Free Radical Biology and Medicine* 37(9) (pp. 1324–1350).
- Praveen, S. N., Shweta, N., Kar, D. M., Das, P. (2010). In vitro antihelmintic activity of whole plant extracts of *Hyptis suaveolens* poit International. *Journal of Current Pharmaceutical Research*, 2(2), 50–51.
- Prawatsri, S., Suksamrarn, A., Chindaduang, A., Rukachaisirikul, T. (2013). 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 2005, 18 – 20 October. *Chem. Biodiversity*, 10, 1494.
- Priya, D. (2015). A review on the pharmacology and phytochemistry of folklore medicinal plant *Hyptis suaveolens* (L.) POIT. In *International Journal of Basic, Applied and Innovative Research IJBAIR* (Vol. 4, Issue 4).  
[www.arpjournals.com](http://www.arpjournals.com); [www.antrescentpub.com](http://www.antrescentpub.com)

- Rai, I., Bachheti, R., Joshi, A., Pandey, D. (2013). Physicochemical properties and elemental analysis of some non cultivated seed oils collected from Garhwal region, Uttarkhand (India). *International Journal of Chem Tech Research*, 5(1), 232–236.
- Raja, R., Rao, L., Prakash, R. A. (1990). An Astring contracted triterpenoid from *Hyptis suaveolens*. *Phytochemistry*, 29, 1326–1328.
- Ramamoorthy, T. P., Eliot, M., Bye, R., Fa, A. L. J. (1993). *Mexican Lamiaceae: Evolution, distribution, endemism. Biological Diversity of Mexico: Origins and Distribution.. Oxford University Press, New York, 1993.*
- Raven, H. P., Evert, R. F., Eichhorn, S. E. (2000). *Biologie Végétale. De Boeck Université S.A.*
- Rice, E. L. (1984). Allelopathy. *Second Edition. Academic Press.*, 2, 422.
- Rivas, R., Valera, D., Avila, J., Aubert, L., Alonso-, Amelot, M., Rojas, L.B., Usabillaga, A. (2002). The essential oil of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit and its insect deterrent properties. *J. Essent. Oil- Bear. Plants*, 5, 126–131.
- Rizt, A.M. (1982). Constituents of Plants Growing In Qatar. *Fitoterapia*, 2(52), 35–42.
- Rosset, R., Cande, M., Jardy, A. (1991). Chromatographie en phase liquide et supercritique. In *Masson, Paris.*
- Ruberto, G., Baratta, T. M. (2000). Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry*, 69(2), 167–174.
- Santos-Buelga, C., Scalbert, A. (2000). Proanthocyanidins and Tannin-Like Compounds- Nature, Occurrence, Dietary Intake and Effects on Nutrition and Health. *J. Sci. Food Agric.*, 80, 1094–1117.
- Santos, T. C., Marques, M. S., Menezes, I. A. C., Dias, K. S., Silva, A. B. L., Mello, I. C. M., Carvalho, A. C. S., Cavalcanti, S. C. H., Antonioli, Â. R., Marçal, R. M. (2007). Antinociceptive effect and acute toxicity of the *Hyptis suaveolens* leaves aqueous extract on mice. *Fitoterapia*, 78(5), 333–336. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2007.01.006>
- Scott, A. I. (1964a). C-Aromatic compounds. In *Interpretation of the Ultraviolet Spectra of Natural Products* (pp. 89–134). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-013615-8.50008-x>
- Scott, A. I. (1964b). Conjugated chromophores. In *Interpretation of the Ultraviolet Spectra of Natural Products* (pp. 45–88). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-013615-8.50007-8>
- Sewell, P., Clarke, B. (1998). *Chromatographic Separation, Wiley, Ed., New York.*

- Sharma, A., Sharma, A., Batish, D. R. (2017). Comparative antioxidant activity of *Hyptis suaveolens* before and after hydrodistillation. *International Journal of Advance Research in Science and Engineering*, 06(09), 1312–1322.
- Sharma, P., Roy, R. K., Anurag, Gupta, D., Sharma, V. K. (2013). *Hyptis suaveolens* (L.) poit: A phyto-pharmacological review. *International Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*, 4(1), 1–11. www.ijcps.com
- Shulaev, V., Cortes, D., Miller, G., Mittler, R. (2008). Metabolomics for plant stress response. *Physiologia Plantarum*, 132, 199–208.
- Silva, S., Gomes, L., Leitão, F., Coelho, A. V., Boas, L. V. (2006). Phenolic Compounds and antioxidant activity of *Olea europaea* L. fruits and leaves. *Food Science and Technology International*, 12, 385–396.
- Silverstein, R., Webster, F., Kiemle, D. . (2005). Spectrometric identification of organic compounds,. In *seventh Edition, John Wiley Sons, Ing.*
- Singh, H. B., Handique, A. K. (1999). Antifungal activity of the essential oil of *Hyptis suaveolens* and its efficacy in biocontrol measures in combination with *Trichoderma harzianum*. *J Essen Oil Res*, 9, 683–687.
- Singh, S. ., Kedare, P.R. (2011). “Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay.,” *J. Food Sci. Technol.*, Vol. 48, No. 4, 412–22.
- Sójka, M., Król, B. (2009). Composition of industrial seedless black currant pomace. *European Food Research and Technology*, 228(4), 597–605.
- Someya, S., Yoshiki, Y., Okubo, K. (2002). Antioxidant compounds from bananas (*Musa Cavendish*). *Food Chemistry*, 79(3), 351–354.
- Soro, Y., Amian, K. B. B., Fanté, B., Sorho, S., Amadou, T. S., Jean-marie, C. (2012). *Flavonoids and gallic acid from leaves of Santaloides afzelii ( connaraceae )*. 5(3), 332–337.
- Souquet, J.-M., Cheynier, V., Brossaud, F., Moutounet, M. (1996). Polymeric Proanthocyanidins Fromgrape Skins. *Phytochemistry*, 43, 509–512.
- Sr. Prema, K. J., Louis, J., Varaprasad, B. (2015). Phytopharmaceutical Studies of Selected Medicinal Plants Subjected to Abiotic Elicitation (Stress) in Industrial Area. In the world’s leading publisher Of, for scientists We are IntechOpen, Built by scientists, O. A. Books, 200 4 (Eds.), *INTECH* (pp. 153–200). We are IntechOpen, Built by scientists, for scientists. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/61891> 199
- Stoog, D. A., West, D. W., Holler, F. J., Buess-Herman, C. (1997). « Chimie analytique ». In *Ed. De Boeck, Bruxelles.*

- Suárez-Ortiz, G. A., Cerda-García-Rojas, C. M., Fragoso-Serrano, M., Pereda-Miranda, R. (2017). Complementarity of DFT Calculations, NMR Anisotropy, and ECD for the Configurational Analysis of Brevipolides K-O from *Hyptis brevipes*. *Journal of Natural Products*, 80(1), 181–189. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00953>
- Sun, T., Ho, C. T. (2005). Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food Chemistry*, 90, 743–749.
- Szymanska, R., Pospisil, P., Kruk, J. (2016). “Plant-derived antioxidants in disease prevention.” *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2016, 1–2.
- Takeoka, G., R., Dao, L. T. (2003). Antioxidant constituents of almond *Prunus dulcis* (Mill.) DA Webb hulls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(2), 496–501.
- Tang, G., Xile, L., Xue, G., Xiaojing, L., Xiudi, L., Ji, D. W. A. S. (2018). Studies On The Chemical Compositions Of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. *Journal Of Serbian Chemical Society*, 83(0), 1–15.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., Hawkins Byrne, D., Thaipong K., Boonprakob U., Crosby K., Cisneros-Zevallos L., B. D. H., Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., Hawkins Byrne, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis, Biodiversity and Nutrition: A Common Path Biodiversity and Nutrition: A Common Path* 19, 19(6–7), 669–675. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.01.003>
- Tia, E. V, Adima, A. A., Niamké, S. L., Jean, G. A., Martin, T., Lozano, P., Menut, C. (2011). Chemical composition and insecticidal activity of essential oils of two aromatic plants from Ivory Coast against *Bemisia tabaci* G. (Hemiptera: Aleyrodidae). *Natural Product Communications*, 6(8), 1183–1188. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21922931>
- Tripathi, A., Sharma, N., Sharma, V. (2009). In vitro efficacy of *Hyptis suaveolens* L. (Poit) essential oil on growth and morphogenesis of *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* (Massey). *Snyder Hansen. WJMB*, 25, 503–512.
- Trouillas, P. (2003). Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas. *Food Chemistry*, 80(3), 399–407.
- Van Bergen, P. F., Bull, I. D., Poulton, P. R., Evershed, R. P. (1997). Organic geochemical studies of soils from the Rothamsted classical experiments - I. Total lipid extracts, solvent insoluble residues and humic acids from broadbalk wilderness. *Organic Geochemistry*, 26(1–2), 117–135. [https://doi.org/10.1016/S0146-6380\(96\)00134-9](https://doi.org/10.1016/S0146-6380(96)00134-9)

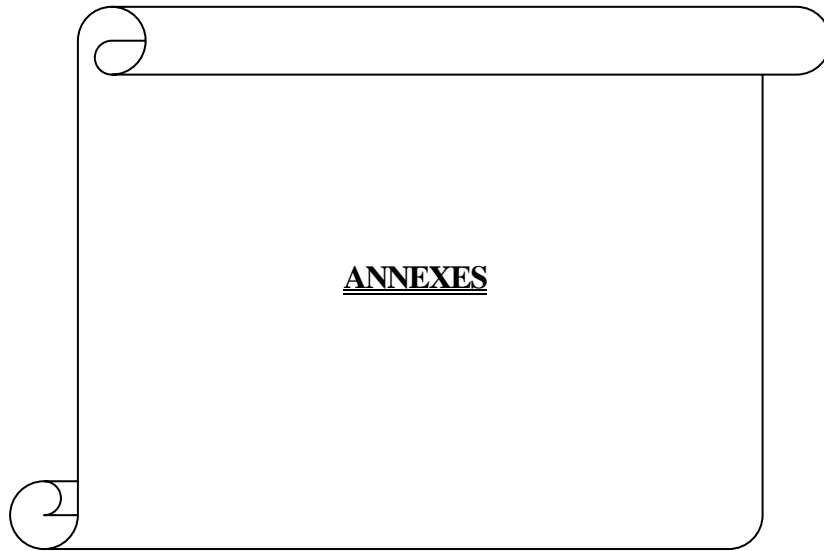
- Van Bergen, P. F., Poole, I., Ogilvie, T. M. A., Caple, C., Evershed, R. P. (2000). Evidence for demethylation of syringyl moieties in archaeological wood using pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 14(2), 71–79. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0231\(20000130\)14:2<71::AID-RCM837>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(20000130)14:2<71::AID-RCM837>3.0.CO;2-9)
- Villasenor, I. ., Canlas, A. ., Faustino, K. . (2004). Evaluation of the bioactivity of triterpene mixture isolated from *Carmona retusa* (Vahl) Masam leaves. *Ethnopharmacology*, 92, 53–56.
- Wagner, H. (1983). Drogen Analyse, Dünnschicht Chromatographische Analyse Von Arzneidrogen. *Springer Verlag Berlin Heidelberg New York*, 522.
- Wahiba, R. (2009). *Évaluation du potentiel antioxydant de plantes médicinales et analyse phytochimique*. Sup, Enseignement Universit, Recherche Scientifique Es-s, Oran.
- Wardle, A. D., Nilcon, M. C., Gallet, C., Zackrisson, O. (1998). An Ecosystem Level Perspective of Allelopathy. *Biological Review*, 79, 305–319.
- Wei, C. L., Mahmud, R., Pillai, S., Perumal, S., Ismail, S. (2012). Antioxidant Activities of Essential Oil of *Psidium Guajava* L. Leaves. *APCBEE Procedia*, 2, 86–91. <https://doi.org/10.1016/J.APCBEE.2012.06.016>
- Wolfe, K., Wu, X., Liu, R. H. (2003). Antioxidant activity of apple peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), 609–614.
- Yadav, L. D. S. (2013). *Organic spectroscopy*. *Springer Science Business Media*.
- Yen, F. L., Wua, T. H., Lin, L. T., Cham, T. M., Lin, C. C. (2008). Concordance between antioxidant activities and flavonol contents in different extracts and fractions of *Cuscuta chinensis*. *Food Chemistry*, 108, 455–462.
- Yu et al, J. (2013). Current Therapeutic Research 75 (2013). *Current Therapeutic Research*, 75, 8–14.
- Yvon Gervaise. (2004). Analyse des antioxydants naturels dans les matières premières et les produits ; polyphenols. *Euroforum, Paris-12 Octobre 2004*, 12.
- Zhang, H., Farris, R., Westmoreland, P. (2003). Low flammability and thermal decomposition behavior of poly(3,30 -dihydroxybiphenylisophthalamide) and its derivatives. *Macromolecules*, 36, 3944.
- Zhang, L., Yang, X., Zhang, Y., Wang, L., Zhang, R. (2011). In vitro antioxidant properties of different parts of pomegranate flowers. *Food and Bioproducts Processing*, 89, 234–240.
- Zheng, Z., Shetty, K. (2000). Solid-state bioconversion of phenolics from cranberry pomace



and role of *Lentinus edodes*  $\beta$ -glucosidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3), 2000, vol. 48, no. 3, pages 895–900.

Ziegler, H., Jensen, T., Christensen, J., Staerk, D., Hagerstr, H. (2002). Possible Artefacts in the in vitro Determination of Antimalarial Activity of Natural Products that Incorporate into Lipid Bilayer: Apparent Antiplasmodial Activity of Dehydroabietinol, a Constituent of *Hyptis suaveolens*. *Planta Med*, 68(6), 547–549.

Zulueta, A., Esteve, M. J., Frigola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 114, 310–316.



**ANNEXES**

**Annexe 1:** Photographie du Séchage des feuilles de *Hyptis suaveolens* et échantillons avant et après extraction de l'HE



**Figure 170:** Photographie du Séchage des feuilles de *Hyptis suaveolens* (photo soumahoro, prise le 02/08/2017 à Yamoussoukro)



(1) Avant extraction de l'huile essentielle



(2) Après extraction de l'huile

essentielle

**Figure 171 :** Poudres de feuilles sèches de *Hyptis suaveolens* avant et après extraction de l'huile essentielle

## **Annexe 2:** Dosage des polyphénols totaux

Les analyses quantitatives des polyphénols totaux, ont été effectuées à partir de la droite d'étalonnage, tracée en utilisant l'acide gallique comme standard (Figure 192).

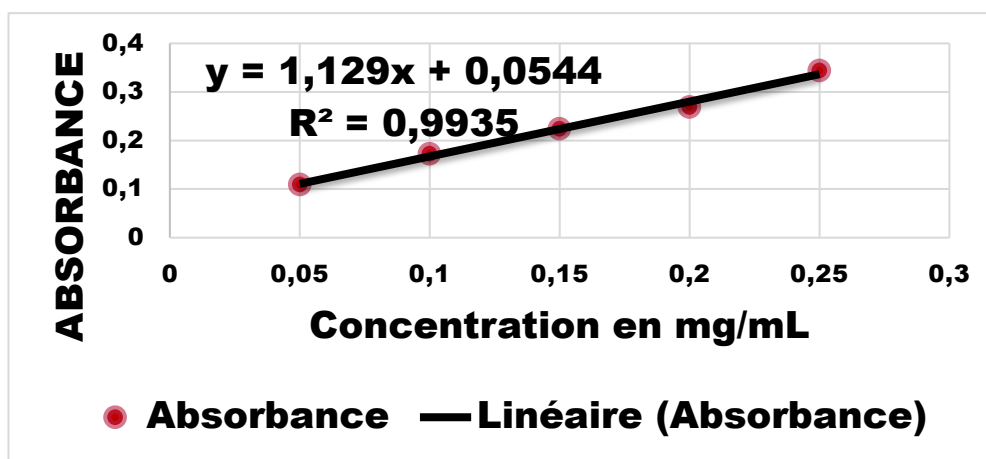


Figure 172: Droite d'étalonnage de l'acide gallique

### Annexe 3: Dosage des flavonoïdes totaux

Les analyses quantitatives des flavonoïdes totaux ont été effectuées à partir de la droite d'étalonnage, tracée en utilisant la quercétine comme standard avec un coefficient de régression de  $R^2 = 0,9983$  (Figure 193).

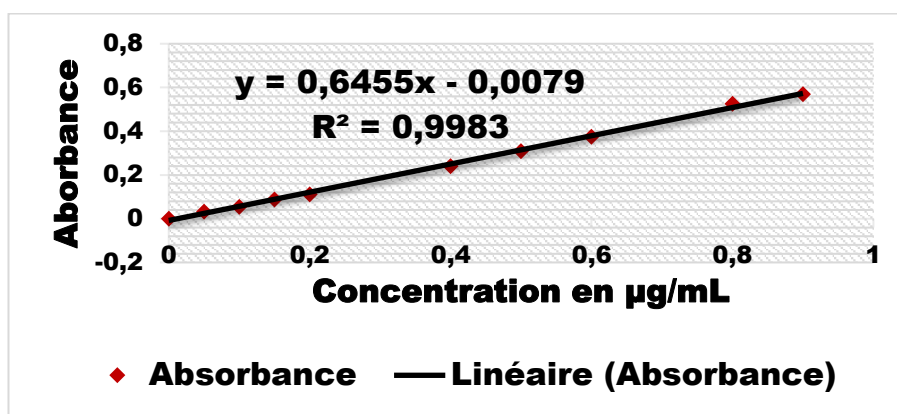


Figure 173: Droite d'étalonnage de la quercétine

### Annexe 3 : Dosage des tanins totaux

Les analyses quantitatives des tanins totaux, ont été effectuées à partir de la droite d'étalonnage, tracée en utilisant l'acide tannique comme standard (Figure 194).

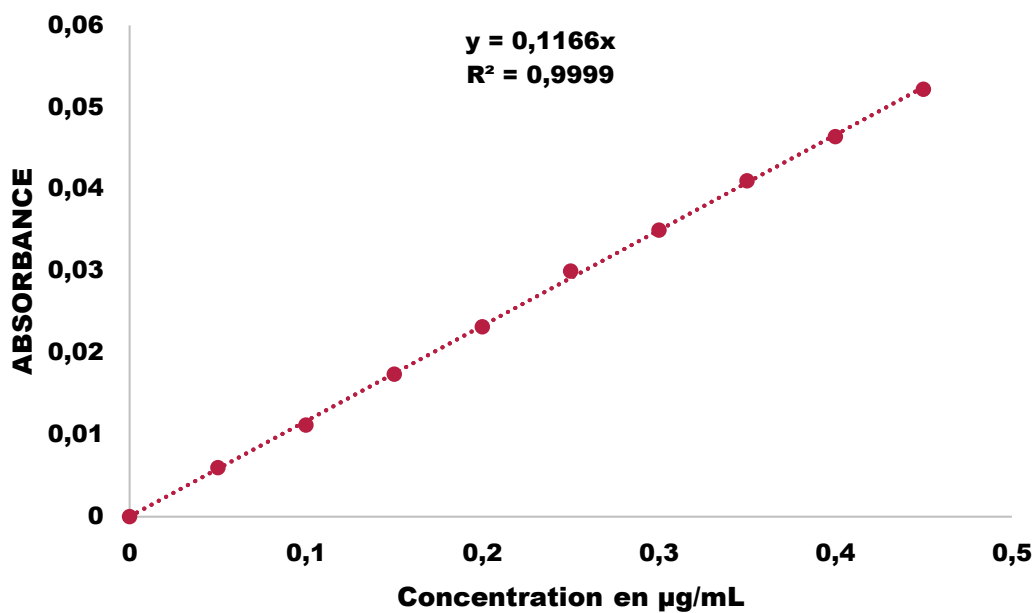


Figure 174: Droite d'étalonnage de l'acide tannique

#### Annexe 4 : Potentiel de réduction du radical cationique ABTS•+

Les analyses ont été effectuées en utilisant le trolox comme référence (figure 195).

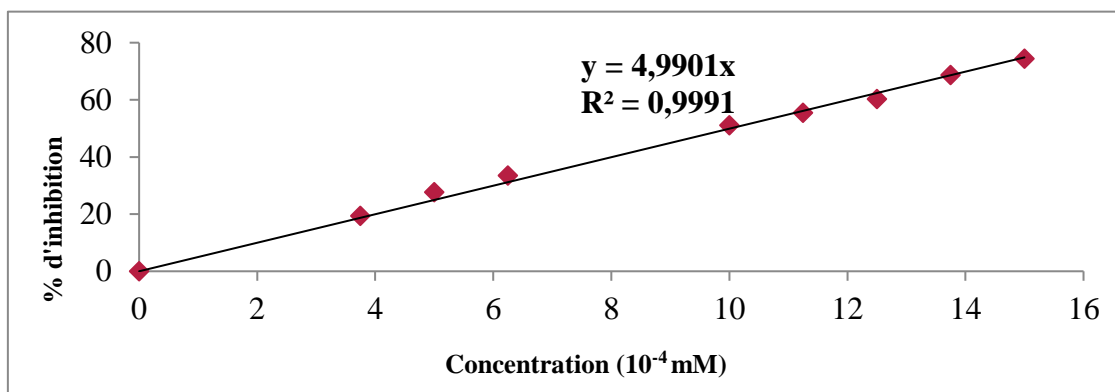
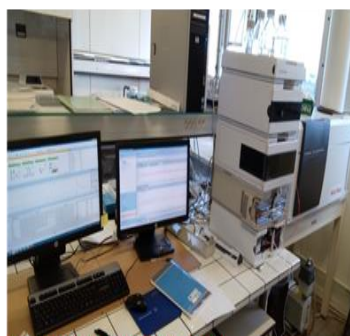


Figure 175: Courbe d'étalonnage du Trolox (ABTS)

## Annexe 5 : Appareillages

Spectrophotomètre UV-Visible  
V-Jasco 530

Spectromètre de masse CLHP- Q-TOF



Chromatographe (CLHP)



Spectromètre de masse GC-MS

Figure 176 : Appareillages

## Annexe 6: Dosage spectrophotométrique des polyphénols

Extrait	Concentration lue au spectro en mg EAG/mL d'extrait				
	1	2	3	Moy	Ecart type
Eth/Aq avant extraction de l'HE	0,15	0,15	0,17	0,15666667	0,00888889
Eth/Aq après extraction de l'HE	0,09	0,08	0,08	0,08333333	0,00444444

mg/mL	Concentration lue au spectro en mg EAG/mL d'extrait				
	1	2	3	Moy	Ecart type
HEX1	0,02	0,06	0,04	0,04	0,01333333
HEX2	0,02	0,01	0,04	0,02333333	0,01111111
DCM1	0,04	0,04	0,05	0,04333333	0,00444444
DCM2	0,08	0,08	0,08	0,08	0
AE1	0,21	0,18	0,2	0,19666667	0,01111111
AE2	0,17	0,2	0,18	0,18333333	0,01111111
Eth1	0,1	0,11	0,11	0,10666667	0,00444444
Eth2	0,05	0,07	0,05	0,05666667	0,00888889
Aq1	0,12	0,1	0,1	0,10666667	0,00888889
Aq2	0,09	0,08	0,09	0,08666667	0,00444444
				$T=c*v*d/m$	

**Annexe 7: Dosage spectrophotométrique des flavonoïdes**

Extrait	Concentration lue au spectro (c) en µg EQ/mL d'extrait				
	1	2	3	Moy	Ecart type
Eth/Aq avant extraction de l'HE	0,61	0,63	0,61	0,61666667	0,00888889
Eth/Aq après extraction de l'HE	0,84	0,83	0,8	0,82333333	0,01555556

ug/mL	Concentration lue au spectro en µg EQ/mL d'extrait				Ecart type
	1	2	3	Moy	
HEX1	0,4	0,38	0,39	0,39	0,00666667
HEX2	0,44	0,46	0,43	0,44333333	0,01111111
DCM1	0,97	0,91	1	0,96	0,03333333
DCM2	1,17	1,23	1,12	1,17333333	0,03777778
AE1	0,36	0,32	0,32	0,33333333	0,01777778
AE2	0,44	0,49	0,45	0,46	0,02
Eth1	0,22	0,2	0,22	0,21333333	0,00888889
Eth2	0,28	0,3	0,29	0,29	0,00666667
Aq1	0,31	0,32	0,31	0,31333333	0,00444444
Aq2	0,24	0,25	0,25	0,24666667	0,00444444
$T=c*v*d/m/1000$ (v=50; d=1ou20; m=0,05)					

**Annexe 8: Dosage spectrophotométrique des tanins**

Extrait	Concentration lue au spectro en µg EAT/g d'extrait				Ecart type
	1	2	3	Moy	
Eth/Aq avant extraction de l'HE	0,89	0,85	0,88	0,87333333	0,01555556
Eth/Aq après extraction de l'HE	0,61	0,68	0,66	0,65	0,02666667

C(ug/mL)	Concentration lue au spectro en µg EAT/g d'extrait				Ecart type
	1	2	3	Moy	
HEX1	0,38	0,34	0,37	0,36333333	0,01555556
HEX2	0,57	0,55	0,58	0,56666667	0,01111111
DCM1	0,9	1,08	0,95	0,97666667	0,06888889
DCM2	0,49	0,41	0,47	0,45666667	0,03111111
AE1	0,61	0,59	0,57	0,59	0,01333333
AE2	0,46	0,5	0,49	0,48333333	0,01555556
Eth1	1,67	1,68	1,6	1,65	0,03333333
Eth2	1,59	1,55	1,53	1,55666667	0,02222222
Aq1	0,87	0,89	0,88	0,88	0,00666667
Aq2	0,61	0,64	0,67	0,64	0,02
$T=C*25*40/0,1/1000$					

**Annexe 9: Activité antioxydante (DPPH)**

		Lecture au spectrophotomètre à 517nm				
Concentration extraits		0,025mg/mL	0,05mg/mL	0,1mg/mL	0,3mg/mL	0,5mg/mL
Absorbances	Acide ascorbique	0,3461	0,313	0,3368	0,0296	0,0271
	Eth/Aq1	0,6332	0,6139	0,5482	0,3169	0,0832
	Eth/Aq2	0,6321	0,6039	0,5326	0,2986	0,0709

		Lecture au spectrophotomètre à 517nm				
Concentration des fractions		0,025mg/mL	0,05mg/mL	0,1mg/mL	0,3mg/mL	0,5mg/mL
Absorbances	Acide ascorbique	0,3461	0,313	0,3368	0,0296	0,0271
	AE1	0,6153	0,5541	0,4485	0,0542	0,0423
	AE2	0,622	0,5626	0,453	0,1414	0,0468
	DCM1	0,5519	0,5699	0,5771	0,5034	0,4295
	DCM2	0,6011	0,5704	0,5584	0,4495	0,3325
	Hex1	0,607	0,5699	0,5921	0,5493	0,4983
	Hex2	0,6252	0,6431	0,6172	0,5382	0,5032
	Eth1	0,4957	0,4932	0,4398	0,1814	0,0577
	Eth2	0,4744	0,4638	0,4256	0,1611	0,0541
	Aq1	0,484	0,4587	0,3132	0,0691	0,0509
	Aq2	0,52	0,4634	0,3647	0,0833	0,0659
	Détermination du %I= (Ao-A)*100/Ao		Ao= 0,6872			

**Annexe 10: Activité antioxydante (ABTS)**

	Absorbance lue au spectro			Moy	Ecart type	A <sub>control</sub>
	1	2	3			
Eth/Aq avant extraction de l'HE	0,5115	0,5275	0,5175	0,51883333	0,00577778	0,6973
Eth/Aq après extraction de l'HE	0,5253	0,4893	0,47	0,49486667	0,02028889	0,6973
			%I=(A <sub>control</sub> -A <sub>extrait</sub> )x100/A <sub>control</sub>			



Fractions	Absorbance lue au spectro			Moy	Ecart type	Acontrol
	1	2	3			
HEX1	0,3334	0,34	0,3043	0,3259	0,0144	0,6973
HEX2	0,4113	0,4507	0,4527	0,43823333	0,01795556	0,6973
DCM1	0,4188	0,3104	0,3882	0,37246667	0,04137778	0,6973
DCM2	0,3228	0,3354	0,3095	0,32256667	0,00871111	0,6973
AE1	0,4093	0,3911	0,4215	0,4073	0,0108	0,6973
AE2	0,4528	0,4601	0,4523	0,45506667	0,00335556	0,6973
Eth1	0,5444	0,5414	0,5421	0,54263333	0,00117778	0,6973
Eth2	0,5165	0,4637	0,4988	0,493	0,01953333	0,6973
Aq1	0,4558	0,4588	0,4531	0,4559	0,00193333	0,6973
Aq2	0,4736	0,4852	0,435	0,4646	0,01973333	0,6973
%I=(Acontrol-Aextrait)x100/Acontrol						
Capacité antioxydante en µmol /TE = %I*D/4,9901 D(facteur de dilution)						

**Annexe 11:** des principaux composés des fractions acétate d'éthyle affectés et des composés formés au cours de l'extraction de l'huile essentielle détectés par analyse dérèpliative LC-MS/Q-TOF

**Tableau 19:** récapitulatif des principaux composés des fractions acétate d'éthyle affectés et des composés formés au cours de l'extraction de l'huile essentielle détectés par analyse dérèpliative LC-MS/Q-TOF

Avant extraction de l'huile essentielle				Après extraction de l'huile essentielle			
Temps de rétention (ms)	Formules brutes des composés transformés	Masse moléculaire (g/mol)	Score (%)	Temps de rétention (ms)	Formules brutes des composés formés	Masse moléculaire (g/mol)	Score (%)
1,562	C <sub>25</sub> H <sub>34</sub> N <sub>4</sub>	390	98,51	14,084	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	138	95,79
23,687	C <sub>30</sub> H <sub>37</sub> N <sub>11</sub> O <sub>10</sub>	711	97,76	17,83	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	152	99,65
24,623	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub> S	162	83,64	19,469	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	196	99,58
27,55	C <sub>13</sub> H <sub>23</sub> N <sub>11</sub>	333	92,08	28,249	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	314	99,04
26,37	C <sub>8</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	148	99,69	29,185	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	352	97,67
27,316	**C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	270	80,07	29,32	*C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	152	82,29
28,135	C <sub>20</sub> H <sub>37</sub> N <sub>11</sub> O <sub>3</sub>	479	95,52	29,88	*C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	288	83,52
28,955	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	280	97,34	29,888	C <sub>34</sub> H <sub>45</sub> NO <sub>13</sub>	675	97,18
30,008	C <sub>28</sub> H <sub>24</sub> O <sub>11</sub>	536	99,09	30,59	C <sub>21</sub> H <sub>39</sub> NOS	353	85,4
31,881	C <sub>23</sub> H <sub>44</sub> N <sub>6</sub> OS	452	88,24	31,878	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub>	316	88,85
34,223	C <sub>27</sub> H <sub>49</sub> NO <sub>9</sub>	531	97,25	35,038	C <sub>19</sub> H <sub>41</sub> N <sub>11</sub>	423	96,35
35,042	C <sub>24</sub> H <sub>45</sub> NS	379	86,93	38,433	C <sub>22</sub> H <sub>43</sub> NO	337	98,72

\*\*Composés thermosensibles transformés (déjà identifiés) ; \*nouveaux composés (déjà identifiés)

formés après extraction de l'HE

**Annexe 12 :** Composés déjà isolés et détectés par analyse dérèplivative LC-MS/Q-TOF dans les fractions acétate d'éthyle de feuilles de *Hyptis suaveolens*

**Tableau 20:** Composés déjà isolés et détectés par analyse dérèplivative LC-MS/Q-TOF dans les fractions acétate d'éthyle de feuilles de *Hyptis suaveolens*.

Composés connus détectés dans les fractions acétate d'éthyle			Avant extraction de l'huile essentielle		Après extraction de l'huile essentielle	
Nom	Formule brute	Masse moléculaire (g/mol)	Temps de rétention (ms)	Score (%)	Temps de rétention (ms)	Score (%)
(2E)-1-(2-hydroxyphényl)-pent-2-en-1-one	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	176,22	17,951	48,47	18,064	47,2
Propanoate de 1-(5-(hydroxy(2-oxotétrahydro-2H-pyran-3-yl)méthyl)tétrahydrofuran-2-yl)éthyl 3-(4-hydroxyphényl)	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>7</sub>	392,45	20,994	50,54	20,991	64,29
Quercétine	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	302,24	21,814	98,7	21,81	93,82
3-O-β-D-glucopyranoside quercétine	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	464,38	21,931	99,49	21,927	98,59
Acide p-coumarique	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	164,20	22,165	82,67	22,044	76,53
Kaempférol	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	286,46	23,101	98,49	23,098	93,36
Méthyle Wogonine	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	300,27	25,325	99,12	25,177	89,73
Apigénine	**C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	270,24	27,316	80,07	ND	ND
2-méthyl-3-méthylène-2-(4-méthylpent-3-èn-1-yl)oxirane	*C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	152,24	ND	ND	29,32	82,29
5α-androst-9-èn-12-one	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O	272,43	29,884	61,63	31,114	67,73
5α-androstan-2,11-dione	*C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	288,21	ND	ND	29,888	83,52
Genkwanine	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	284,27	30,360	98,53	30,473	97,55
Acide 1,19α-dihydroxyluros-2(3),12-dièn-28-oïque	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>4</sub>	470,69	33,520	91,22	32,348	57,00
Suaveolol	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	306,49	34,691	88,25	37,380	76,90
(2R,4aS,4bS,10aR)-2,4b,8,8,10a-pentaméthyldecahydro-2H-2,4a-méthanophénanthren-1(4bH)-one	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O	288,48	36,330	82,67	36,245	71,30
Déshydroabiétinol	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O	286,46	36,40	87,94	36,092	84,52
Acide rosamarinique	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	360,32	37,383	96,53	22,981	93,43

\*\*Composés thermosensibles (1) ; Composés thermostables (14) ; \* Nouvelles molécules formées (2) ; ND = Non Détecté

**Annexe 13:** principaux composés des fractions au dichlorométhane affectés et formés au cours de l'extraction de l'huile essentielle détectés par analyse dérèplivative LC-MS/Q-TOF

**Tableau 21:** récapitulatif des principaux composés des fractions au dichlorométhane affectés et formés au cours de l'extraction de l'huile essentielle détectés par analyse dérèplivative LC-MS/Q-TOF

Avant extraction de l'huile essentielle				Après extraction de l'huile essentielle			
Temps de rétention (ms)	Formule brute	Masse moléculaire (g/mol)	Score (%)	Temps de rétention (ms)	Formule brute	Masse moléculaire (g/mol)	Score (%)
1,209	C <sub>5</sub> H <sub>13</sub> NO	103	97,97	1,678	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>12</sub> S	380	84,77
1,678	C <sub>9</sub> H <sub>19</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub> S	277	75,56	3,551	C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>	129	95,6
2,731	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	230	94,21	14,304	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub>	346	96,58
3,551	C <sub>12</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>7</sub>	293	99,64	14,89	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> N <sub>12</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	504	86,08
16,996	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O	206	84,35	16,997	C <sub>15</sub> H <sub>23</sub> N <sub>11</sub> O <sub>3</sub>	405	93,53
18,167	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> N <sub>6</sub> O	208	94,18	18,87	C <sub>23</sub> H <sub>34</sub> O <sub>11</sub>	456	77,25
20,976	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> N <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	392	95,61	20,86	C <sub>25</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	354	74,45
31,044	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	326	89,20	21,454	*C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	170	77,85
34,907	C <sub>21</sub> H <sub>45</sub> N <sub>11</sub> O	467	96,9	34,908	C <sub>30</sub> H <sub>57</sub> NO <sub>3</sub> S	511	90,54
39,59	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> N <sub>7</sub> O	171	93,0	39,239	C <sub>26</sub> H <sub>41</sub> Cl	388	81,05
40.643	**C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O	288	84,45	39,824	C <sub>28</sub> H <sub>43</sub> N	393	94,04

\*\*Composés thermosensibles déjà identifiés    \*nouveaux composés déjà identifiés formés après extraction de l'HE

**Annexe 14:** Composés déjà isolés et détectés par analyse dérèplivative LC-MS/Q-TOF dans les fractions au dichlorométhane des extraits hydroalcooliques de feuilles de *Hyptis suaveolens* avant et après extraction de l'HE.

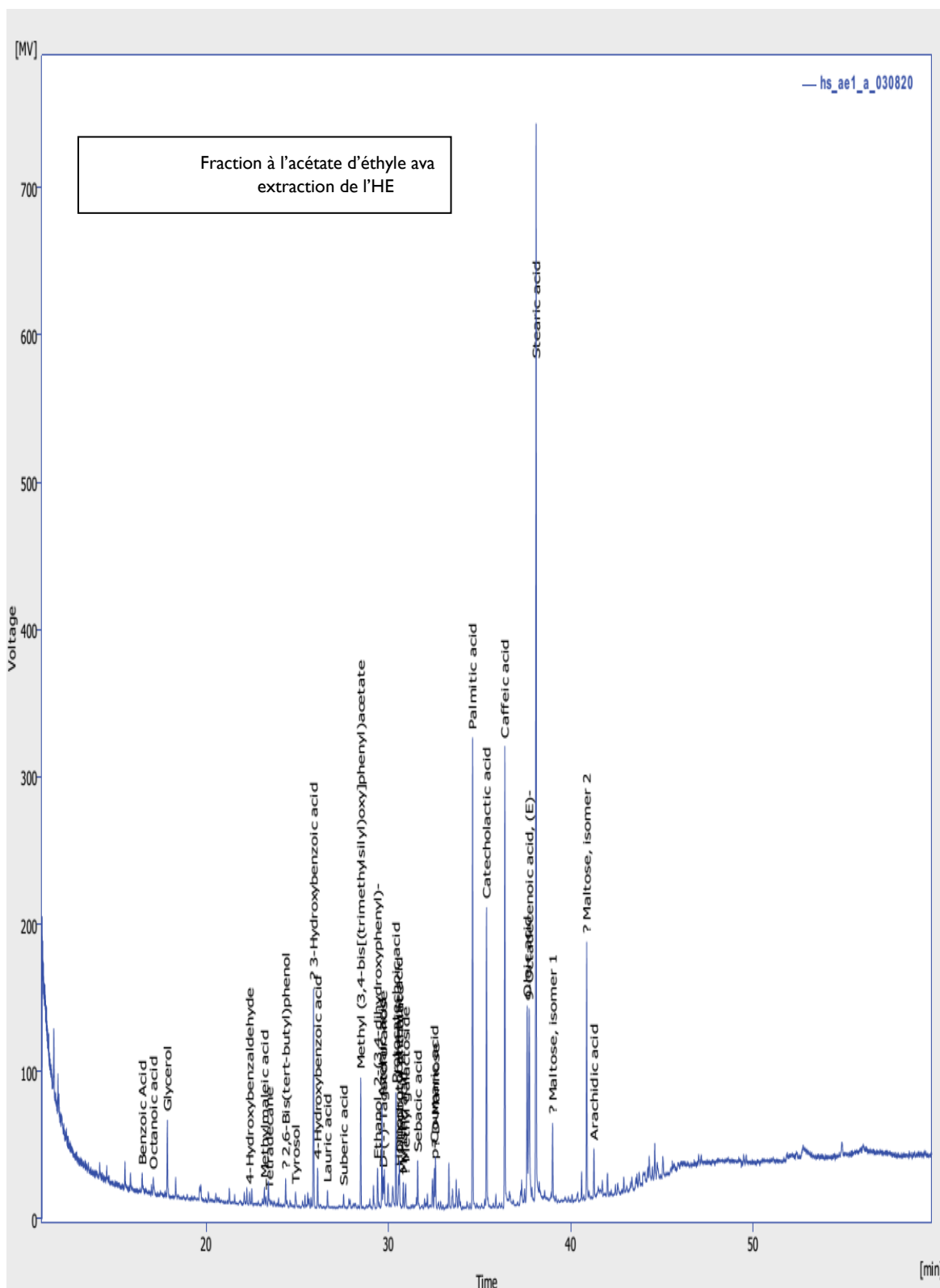
**Tableau 22:** Composés déjà isolés et détectés par analyse déréplicative LC-MS/Q-TOF dans les fractions au dichlorométhane issues des extraits hydroalcooliques de feuilles de *Hyptis suaveolens* avant et après extraction de l'HE

Composés connus détectés dans les fractions dichlorométhane			Avant extraction de l'huile essentielle		Après extraction de l'huile essentielle	
Nom	Formule brute	Masse moléculaire (g/mol)	Temps de rétention (ms)	Score (%)	Temps de rétention (ms)	Score (%)
(3-méthyl-3-(4-méthylpent-3-èn-1-yl)oxiran-2-yl) méthanol	*C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	170,12	ND	ND	21,454	77,85
Propanoate de 1-(5-(hydroxy(2-oxotétrahydro-2H-pyran-3-yl) méthyl) tétrahydrofuran-2-yl)éthyl-3-(4-hydroxyphényl)	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>7</sub>	392,45	20,859	65,20	20,86	56,54
Quercétine	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	302,24	21,652	92,89	21,68	99,67
3-O-β-D-glucopyranoside quercétine	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	464,38	21,842	85,84	21,876	97,55
4-allyl-2-méthoxyphénol	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	164,20	22,872	84,98	22,031	63,19
Acide rosamarinique	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	360,32	22,872	95,01	22,886	96,53
β-sitostérol glycoside	C <sub>30</sub> H <sub>40</sub> O <sub>11</sub>	576,86	24,65	80,12	24,606	83,98
Acide p-anisique	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	152,24	29,45	75,46	18,402	86,09
5α-androst-9(11)-èn-12-one	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O	272,43	33,034	56,21	33,035	69,16
Suaveolol	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	306,49	34,907	73,87	34,556	67,55
(2R,4aS,4bS,10aR)-2,4b,8,8,10a-pentaméthyldécacydro-2H-2,4a-méthanophénanthrèn-1(4bH)-one	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O	288,48	40,643	84,45	ND	ND

Composés détectés uniquement dans la fraction DCM (2) ; Composés thermostables (10) ;

\*Nouvelles molécules formées (1) ; ND= Non Détecté

**Annexe 15:** Molécules détectées dans la fraction à l'acétate d'éthyle avant l'extraction de l'HE par analyse GC-MS



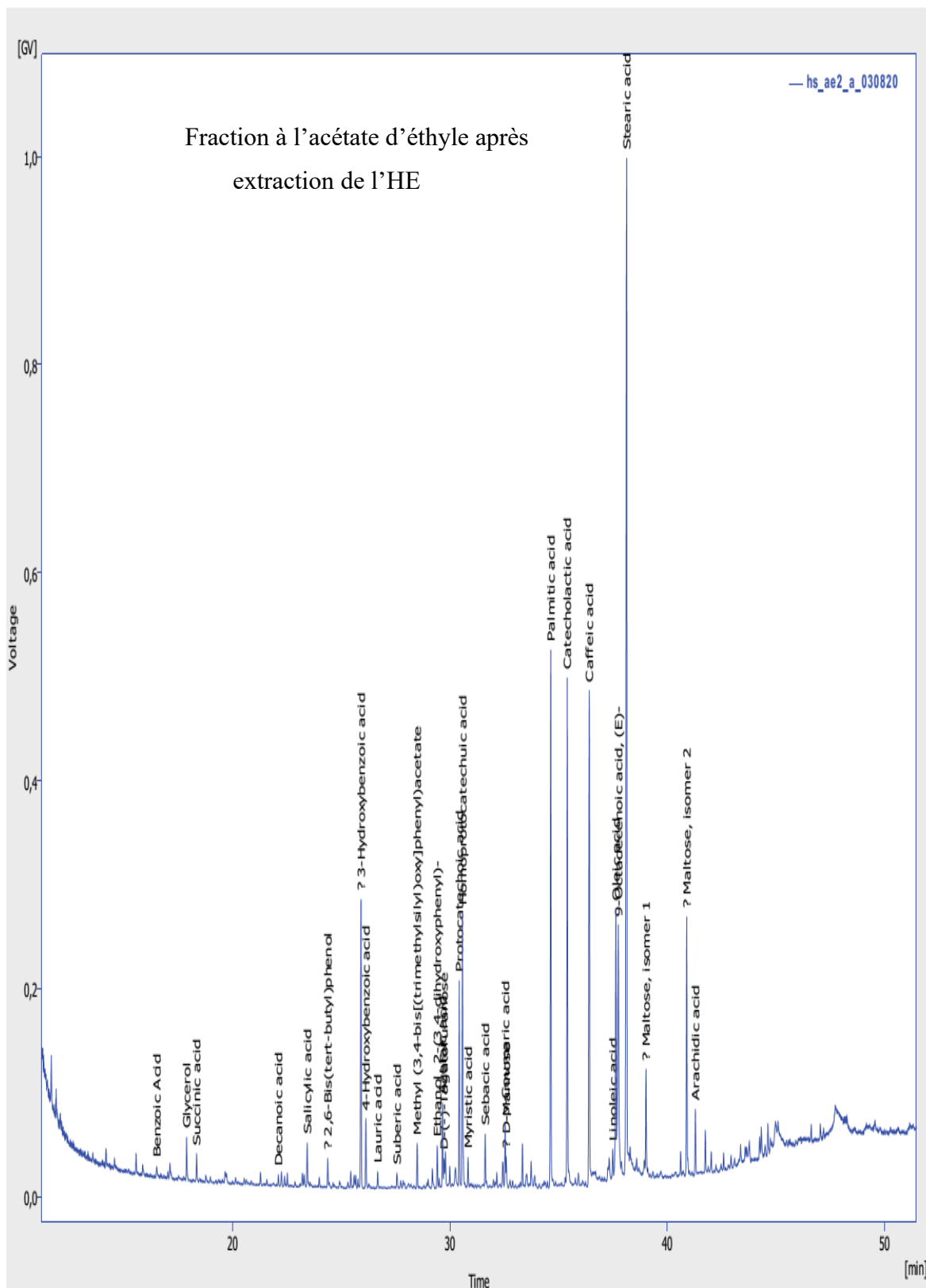
## Column Rtx-5MS 30m

n-Alkane	RT	KI	RTx	Kix	KI_exp	Compound
n-C10	12,67	1000	16,48	1239	1229±3 (11)	Benzoic Acid, TMS
n-C11	15,39	1100	17,1	1262	1258±0 (5)	Octanoic acid, TMS
n-C12	18,17	1200	17,86	1289	1292±4 (6)	Glycerol, 3TMS
n-C13	20,89	1300	18,33	1306	1308±5 (13)	Succinic acid, 2TMS
n-C14	23,5	1400	19,64	1354	1355±0 (3)	Nonanoic acid, TMS
n-C15	25,97	1500	22,08	1446	1453±1 (6)	Decanoic acid, TMS
n-C16	28,32	1600	23,2	1489	1521±N/A (1)	Ethyl p-ethoxybenzoate
n-C17	30,52	1700	24,36	1535	1632	? 2,6-Bis(tert-butyl)phenol, TMS
n-C18	32,62	1800	24,9	1557	1566±N/A (1)	Tyrosol, 2TMS
n-C19	34,61	1900	25,87	1596	1560±1 (8)	? 3-Hydroxybenzoic acid, 2TMS
n-C20	36,53	2000	26,13	1607	1622±1 (10)	4-Hydroxybenzoic acid, 2TMS
n-C21	38,34	2100	26,65	1629	1655±2 (11)	Lauric acid, TMS
n-C22	40,07	2200	27,54	1667	1691±2 (10)	Suberic acid, 2TMS
n-C23	41,74	2300	28,47	1707	1756	Methyl (3,4-bis[(trimethylsilyl)oxy]phenyl)acetate
n-C24	43,33	2400	29,39	1749	1756±N/A (1)	Ethanol, (2-(3,4-dihydroxyphenyl)-, tris(trimethylsilyl)-
n-C25	44,87	2500	29,64	1760	1806±3 (11)	Azelaic acid, 2TMS
n-C26	46,34	2600	29,71	1763	1813±N/A (1)	D-(-)-Tagatofuranose, 5TMS
n-C27	47,88	2700	30,4	1795	1835±1 (11)	Protocatechoic acid, 3TMS
n-C28	49,53	2800	30,55	1801	1836±9 (2)	Homoprotocatechuic acid, 3TMS
n-C29	51,33	2900	30,6	1804	1819	Diisobutyl phthalate
n-C30	53,44	3000	30,81	1814	1850±0 (11)	Myristic acid, TMS
n-C31	55,87	3100	30,93	1820		? Methyl galactoside, 4TMS
n-C32	58,7	3200	31,6	1851	1904±0 (7)	Sebacic acid, 2TMS
			32,51	1895	1949±5 (24)	p-Coumaric acid, 2TMS
			32,56	1897	1844±N/A (1)	? D-Mannose, 5TMS
			34,61	2000	2050±2 (23)	Palmitic acid, TMS
			35,38	2040		Catecholactic acid, 4TMS
			36,38	2092	2155±4 (19)	Caffeic acid, 3TMS
			37,6	2159	2218±2 (10)	Oleic Acid, TMS
			37,71	2165	2222±5 (2)	9-Octadecenoic acid, (E)-, TMS
			38,08	2186	2246±4 (16)	Stearic acid, TMS
			38,998	2238		? Maltose, 8TMS, Isomer 1
			40,87	2348		? Maltose, 8TMS, Isomer 2
			41,26	2371	2449±6 (8)	Arachidic acid, TMS

Result Table (Uncal - hs\_ae1\_a\_030820)  
 !!! Calibration curve could not be constructed for multiple compounds !!!

	Reten. Time [min]	Area [MV.s]	Height [MV]	Area [%]	Compound Name
24	16,496	43,738	14,525	0,3	Benzoic Acid
28	17,107	34,706	12,843	0,2	Octanoic acid
35	17,877	125,718	53,052	0,7	Glycerol
61	22,384	26,810	9,481	0,2	4-Hydroxybenzaldehyde
67	23,199	35,840	13,252	0,2	Methylmaleic acid
70	23,464	16,029	5,451	0,1	Tetradecane
77	24,364	46,927	19,766	0,3	? 2,6-Bis(tert-butyl)phenol
80	24,905	36,767	11,106	0,2	Tyrosol
87	25,890	339,160	148,943	2,0	? 3-Hydroxybenzoic acid
89	26,115	69,149	27,540	0,4	4-Hydroxybenzoic acid
94	26,655	32,801	12,476	0,2	Lauric acid
99	27,546	29,465	10,223	0,2	Suberic acid
106	28,481	196,435	89,241	1,2	Methyl (3,4-bis[(trimethylsilyloxy)phenyl]acetate
114	29,401	82,372	28,134	0,5	Ethanol, 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-
117	29,646	154,748	71,192	0,9	Azelaic acid
118	29,716	56,280	22,563	0,3	D-(-)-Tagatofuranose
124	30,407	184,927	79,417	1,1	Protocatechoic acid
125	30,557	71,094	23,873	0,4	Homoprotocatechuic acid
126	30,602	77,514	33,221	0,5	Diisobutyl phthalate
129	30,812	49,061	18,588	0,3	Myristic acid
130	30,947	70,159	17,689	0,4	? Methyl galactoside
135	31,607	80,417	33,467	0,5	Sebacic acid
141	32,522	60,894	28,394	0,4	p-Coumaric acid
142	32,578	90,855	36,200	0,5	? D-Mannose
154	34,618	730,235	320,228	4,3	Palmitic acid
160	35,384	517,849	204,697	3,0	Catecholactic acid
166	36,384	746,621	313,707	4,4	Caffeic acid
174	37,614	361,532	136,274	2,1	Oleic acid
175	37,719	547,622	134,321	3,2	9-Octadecenoic acid, (E)-
177	38,100	1938,253	734,562	11,4	Stearic acid
181	39,005	138,318	55,261	0,8	? Maltose, isomer 1
194	40,876	393,322	175,500	2,3	? Maltose, isomer 2
197	41,271	93,576	34,506	0,6	Arachidic acid
	Total	16992,831	4739,225	100,0	

**Annexe 16:** Molécules détectées dans la fraction à l'acétate d'éthyle après l'extraction de l'HE par analyse GC-MS





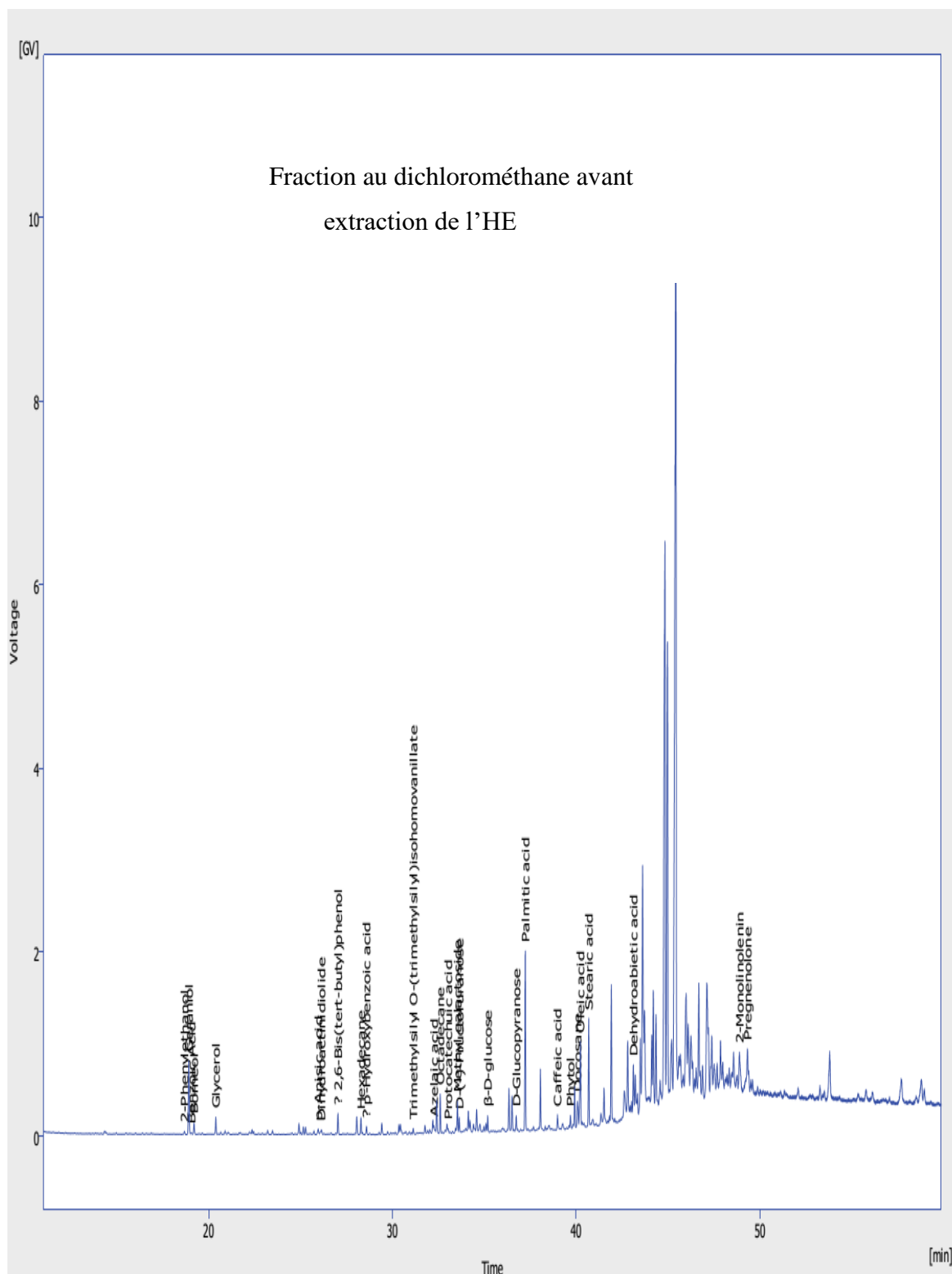
## Column Rtx-5MS 30m

n- Alkane	RT	KI	RTx	Kix	KI_exp	Compound
n-C10	12,67	1000	16,5	1240	1229±3 (11)	Benzoic Acid, TMS
n-C11	15,39	1100	17,88	1289	1292±4 (6)	Glycerol, 3TMS
n-C12	18,17	1200	18,34	1306	1308±5 (13)	Succinic acid, 2TMS
n-C13	20,89	1300	22,1	1446	1453±1 (6)	Decanoic acid, TMS
n-C14	23,5	1400	23,43	1497	1522±3 (21)	Salicylic acid, 2TMS
n-C15	25,97	1500	24,36	1535	1632	? 2,6-Bis(tert-butyl)phenol, TMS
n-C16	28,32	1600	25,9	1597	1560±1 (8)	? 3-Hydroxybenzoic acid, 2TMS
n-C17	30,52	1700	26,13	1607	1622±1 (10)	4-Hydroxybenzoic acid, 2TMS
n-C18	32,62	1800	26,67	1630	1655±2 (11)	Lauric acid, TMS
n-C19	34,61	1900	27,56	1668	1691±2 (10)	Suberic acid, 2TMS
n-C20	36,53	2000	28,49	1708	1756	Methyl (3,4-bis[(trimethylsilyl)oxy]phenyl)acetate
n-C21	38,34	2100	29,42	1750	1756±N/A (1)	Ethanol, (2-(3,4-dihydroxyphenyl)-, tris(trimethylsilyl)-
n-C22	40,07	2200	29,65	1760	1806±3 (11)	Azelaic acid, 2TMS
41,74		2300	29,72	1764	1813±N/A (1)	D-(-)-Tagatofuranose, 5TMS
n-C24	43,33	2400	30,42	1795	1835±1 (11)	Protocatechoic acid, 3TMS
n-C25	44,87	2500	30,57	1802	1836±9 (2)	Homoprotocatechuic acid, 3TMS
n-C26	46,34	2600	30,83	1815	1850±0 (11)	Myristic acid, TMS
n-C27	47,88	2700	31,62	1852	1904±0 (7)	Sebacic acid, 2TMS
n-C28	49,53	2800	32,54	1896	1949±5 (24)	p-Coumaric acid, 2TMS
n-C29	51,33	2900	32,58	1898	1844±N/A (1)	? D-Mannose, 5TMS
n-C30	53,44	3000	34,64	2002	2050±2 (23)	Palmitic acid, TMS
n-C31	55,87	3100	35,39	2041		Catecholactic acid, 4TMS
n-C32	58,7	3200	36,41	2094	2155±4 (19)	Caffeic acid, 3TMS
			37,49	2153	2212±2 (9)	Linoleic acid, TMS
			37,63	2161	2218±2 (10)	Oleic Acid, TMS
			37,74	2167	2222±5 (2)	9-Octadecenoic acid, (E)-, TMS
			38,12	2188	2246±4 (16)	Stearic acid, TMS
			39,02	2239		? Maltose, 8TMS, Isomer 1
			40,89	2349		? Maltose, 8TMS, Isomer 2
			41,29	2373	2449±6 (8)	Arachidic acid, TMS

Result Table (Uncal - hs\_ae2\_a\_030820)  
 !!! Calibration curve could not be constructed for multiple compounds !!!

	Reten. Time [min]	Area [MV.s]	Height [MV]	Area [%]	Compound Name
26	16,511	33,170	11,773	0,1	Benzoic Acid
35	17,882	104,889	42,870	0,4	Glycerol
38	18,337	72,622	28,029	0,3	Succinic acid
58	22,103	30,587	11,813	0,1	Decanoic acid
67	23,434	99,967	42,939	0,4	Salicylic acid
74	24,374	64,326	28,944	0,2	? 2,6-Bis(tert-butyl)phenol
83	25,910	677,924	278,130	2,5	? 3-Hydroxybenzoic acid
86	26,130	153,888	67,706	0,6	4-Hydroxybenzoic acid
91	26,670	40,918	16,771	0,1	Lauric acid
95	27,555	46,475	15,500	0,2	Suberic acid
101	28,490	105,301	43,832	0,4	Methyl (3,4-bis[(trimethylsilyl)oxy]phenyl)acetate
108	29,416	103,598	41,504	0,4	Ethanol, 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-
110	29,656	184,784	82,771	0,7	Azelaic acid
111	29,721	72,474	29,019	0,3	D-(-)-Tagatofuranose
117	30,426	434,035	200,051	1,6	Protocatechoic acid
118	30,576	598,569	264,858	2,2	Homoprotocatechuic acid
121	30,831	74,641	30,153	0,3	Myristic acid
125	31,622	122,443	52,441	0,4	Sebacic acid
132	32,542	143,189	61,881	0,5	p-Coumaric acid
133	32,587	68,005	30,723	0,2	? D-Mannose
146	34,638	1237,950	517,338	4,5	Palmitic acid
152	35,393	1150,734	490,092	4,2	Catecholactic acid
158	36,408	1324,385	477,372	4,8	Caffeic acid
164	37,494	118,186	33,864	0,4	Linoleic acid
165	37,634	707,751	264,574	2,6	Oleic acid
166	37,744	1021,866	248,897	3,7	9-Octadecenoic acid, (E)-
168	38,129	2893,599	985,063	10,5	Stearic acid
174	39,019	274,574	107,174	1,0	? Maltose, isomer 1
185	40,895	597,077	249,880	2,2	? Maltose, isomer 2
188	41,290	150,757	64,176	0,5	Arachidic acid
	Total	27544,553	7427,618	100,0	

**Annexe 17:** Molécules détectées dans la fraction au dichlorométhane avant l'extraction de l'HE par analyse GC-MS

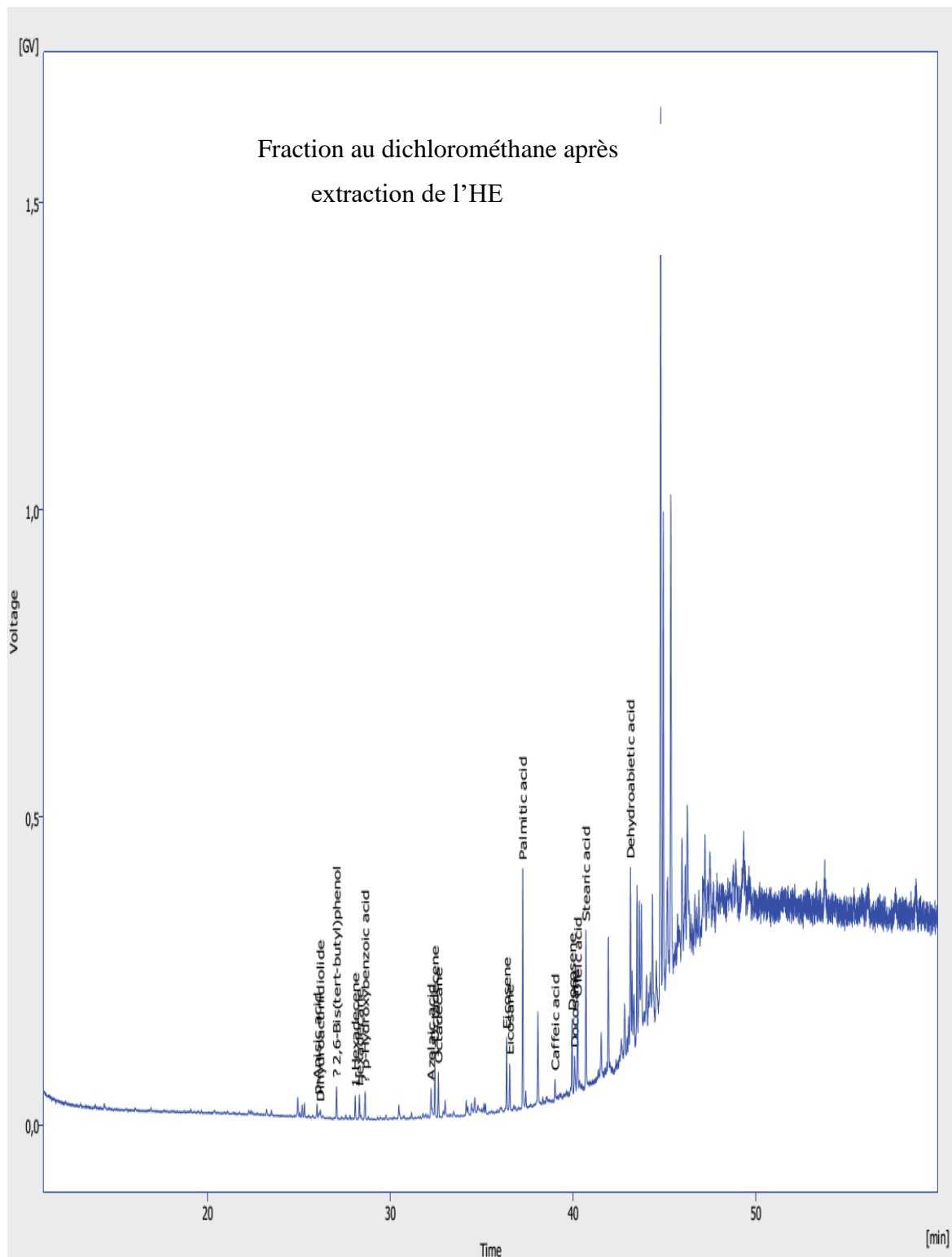


Column	Rtx-1MS 60m					
	n- Alkane	RT	KI	RTx	Kix	KI_exp
n-C10	12,67	1000	18,677	1219	1200±15 (2)	2-Phenylethanol, TMS
n-C11	15,39	1100	18,921	1228	1270	Geraniol, TMS
n-C12	18,17	1200	19,055	1233	1229±3 (11)	Benzoic Acid, TMS
n-C13	20,89	1300	19,193	1238	1195	Borneol, TMS
n-C14	23,5	1400	20,385	1281	1292±4 (6)	Glycerol, 3TMS
n-C15	25,97	1500	28,59	1612	1622±1 (10)	? p-Hydroxybenzoic acid, 2TMS
n-C16	28,32	1600	31,125	1729	1757±N/A (1)	Trimethylsilyl O-(trimethylsilyl)isohomovanillate
n-C17	30,52	1700	32,25	1782	1789±2 (7)	Azelaic acid, 2TMS
n-C18	32,62	1800	32,6	1799	1800	Octadecane
n-C19	34,61	1900	33,024	1817	1826±0 (4)	Protocatechuic acid, 3TMS
n-C20	36,53	2000	33,537	1846	1928	Methyl galactoside, 4TMS
n-C21	38,34	2100	33,627	1851	1792±N/A (1)	D-(-)-Fructofuranose, 5TMS
n-C22	40,07	2200	35,178	1930	1930	β-D-glucose, 5-TMS
n-C23	41,74	2300	36,727	2011	2037	D-Glucopyranose, 5TMS
n-C24	43,33	2400	37,228	2039	2042±1 (12)	Palmitic acid, TMS
n-C25	44,87	2500	38,977	2137	2141±1 (4)	Caffeic acid, 3TMS
n-C26	46,34	2600	39,683	2178	2180±2 (4)	Phytol, TMS
n-C27	47,88	2700	40,07	2200	2200	Docosane
n-C28	49,53	2800	40,219	2209	2208±0 (7)	Oleic acid, TMS
n-C29	51,33	2900	40,675	2236	2239±1 (11)	Stearic acid, TMS
n-C30	53,44	3000	43,106	2386	2371±3 (6)	Dehydroabietic acid, TMS
n-C31	55,87	3100	48,877	2760	2786±N/A (1)	2-Monolinolenin, 2TMS
n-C32	58,7	3200	49,314	2787	2784±N/A (1)	Pregnenolone, TMS

Result Table (Uncal - hs\_dcm1\_a\_220720)  
 !!! Calibration curve could not be constructed for multiple compounds !!!

	Compound Name	Reten. Time [min]	Area [MV.s]	Height [MV]	Area [%]
44	2-Phenylethanol	18,677	174,770	43,915	0,1
46	Geraniol	18,922	2548,323	809,473	0,8
47	Benzoic Acid	19,057	135,964	29,206	0,0
48	Borneol	19,202	510,972	134,122	0,2
55	Glycerol	20,387	574,659	196,539	0,2
86	p-Anisic acid	25,965	268,183	62,316	0,1
88	Dihydroactinidiolide	26,135	232,341	56,197	0,1
93	? 2,6-Bis(tert-butyl)phenol	27,035	669,190	233,763	0,2
102	Hexadecane	28,285	539,414	187,102	0,2
105	? p-Hydroxybenzoic acid	28,585	301,957	91,759	0,1
122	Trimethylsilyl O-(trimethylsilyl)isohomovanillate	31,136	210,664	64,806	0,1
129	Azelaic acid	32,257	276,978	90,431	0,1
132	Octadecane	32,602	1194,030	434,126	0,4
136	Protocatechuic acid	33,032	135,577	54,622	0,0
140	Methyl galactoside	33,537	1026,233	350,530	0,3
141	D-(-)-Fructofuranose	33,642	505,061	173,252	0,2
152	β-D-glucose	35,178	510,434	183,458	0,2
160	D-Glucopyranose	36,733	510,175	173,071	0,2
164	Palmitic acid	37,234	5412,867	1962,272	1,8
174	Caffeic acid	38,979	490,619	168,768	0,2
178	Phytol	39,685	415,783	149,135	0,1
180	Docosane	40,060	1237,745	292,599	0,4
181	Oleic acid	40,225	3239,724	943,627	1,1
185	Stearic acid	40,685	3198,494	1183,532	1,0
197	Dehydroabietic acid	43,111	1960,921	563,181	0,6
230	2-Monolinolenin	48,883	2786,076	446,145	0,9
232	Pregnenolone	49,318	2179,874	497,458	0,7
	Total		305085,428	64647,609	100,0

**Annexe 18:** Molécules détectées dans la fraction au dichlorométhane après l'extraction de l'HE par analyse GC-MS



Column	Rtx-1MS 60m					
	n- Alkane	RT	KI	RTx	Kix	KI_exp
n-C10	12,67	1000	25,97	1500	1500±5 (2)	p-Anisic acid, TMS
n-C11	15,39	1100	26,15	1508	1483±10 (15)	Dihydroactinidiolide
n-C12	18,17	1200	27,04	1546	1632	? 2,6-Bis(tert-butyl)phenol, TMS
n-C13	20,89	1300	28,07	1589	1590±2 (19)	1-Hexadecene
n-C14	23,5	1400	28,29	1599	1600	Hexadecane
n-C15	25,97	1500	28,6	1613	1622±1 (10)	? p-Hydroxybenzoic acid, 2TMS
n-C16	28,32	1600	31,14	1730	1757±N/A (1)	Trimethylsilyl O-(trimethylsilyl)isohomovanillate
n-C17	30,52	1700	32,2	1780	1789±2 (7)	Azelaic acid, 2TMS
n-C18	32,62	1800	32,42	1790	1791±3 (10)	1-Octadecene
n-C19	34,61	1900	32,62	1800	1800	Octadecane
n-C20	36,53	2000	36,35	1991	1993±2 (12)	Eicosene
n-C21	38,34	2100	36,52	1999	2000	Eicosane
n-C22	40,07	2200	37,23	2039	2042±1 (12)	Palmitic acid, TMS
n-C23	41,74	2300	38,98	2137	2141±1 (4)	Caffeic acid, 3TMS
n-C24	43,33	2400	39,92	2191	2192±3 (6)	Docosene
n-C25	44,87	2500	40,06	2199	2200	Docosane
n-C26	46,34	2600	40,23	2210	2208±0 (7)	Oleic acid, TMS
n-C27	47,88	2700	40,69	2237	2239±1 (11)	Stearic acid, TMS
n-C28	49,53	2800	43,12	2387	2380	Dehydroabiatic acid, TMS
n-C29	51,33	2900				
n-C30	53,44	3000				
n-C31	55,87	3100				
n-C32	58,7	3200				

Result Table (Uncal - hs\_dcm2\_a\_210720)  
 !!! Calibration curve could not be constructed for multiple compounds !!!

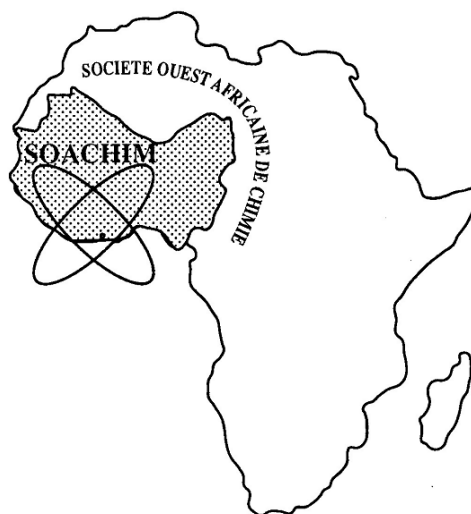
	Compound Name	Reten. Time [min]	Area [MV.s]	Height [MV]	Area [%]
78	p-Anisic acid	25,970	79,341	24,442	0,1
80	Dihydroactinidiolide	26,145	64,418	15,196	0,1
85	? 2,6-Bis(tert-butyl)phenol	27,035	160,922	53,401	0,3
93	1-Hexadecene	28,065	114,701	39,151	0,2
96	Hexadecane	28,290	114,289	40,988	0,2
99	? p-Hydroxybenzoic acid	28,601	142,623	46,002	0,2
119	Azelaic acid	32,207	146,433	48,659	0,2
121	1-Octadecene	32,417	249,488	83,746	0,4
123	Octadecane	32,612	200,799	74,383	0,3
147	Eicosene	36,343	330,023	121,698	0,5
148	Eicosane	36,508	231,599	77,920	0,4
154	Palmitic acid	37,224	1066,730	391,799	1,7
163	Caffeic acid	38,994	129,223	37,324	0,2
170	Docosene	39,925	349,693	125,052	0,6
171	Docosane	40,060	236,722	62,694	0,4
172	Oleic acid	40,235	478,339	143,734	0,8
177	Stearic acid	40,680	750,224	259,457	1,2
190	Dehydroabiatic acid	43,116	925,449	302,648	1,5
	Total		61091,978	13533,502	100,0

*Etude comparative des caractéristiques  
phytochimiques des feuilles de Hyptis  
suaveolens avant et après extraction de l'huile  
essentielle*

**Brahima Soumahoro, Yaya Soro, Amian Brise Benjamin Kassi,  
Sorho Siaka**

*Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie*

*J. Soc. Ouest-Afr. Chim. (2020), 049 : 1 - 8*  
25<sup>ème</sup> Année, Juin 2020



ISSN 0796-6687

Code Chemical Abstracts : JSOCF2

Cote INIST (CNRS France) : <27680>

Site Web: <http://www.soachim.org>

## Etude comparative des caractéristiques phytochimiques des feuilles de *Hyptis suaveolens* avant et après extraction de l'huile essentielle

Brahima Soumahoro<sup>1</sup>, Yaya Soro<sup>1\*</sup>, Amian Brise Benjamin Kassi<sup>2</sup>, Sorho Siaka<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire des Procédés Industriels de Synthèse, de l'Environnement et des Energies Nouvelles (LAPISEN), Institut National Polytechnique Félix HOUPHOUËT-BOIGNY, BP 1093 Yamoussoukro, Côte d'Ivoire

<sup>2</sup>Laboratoire de Chimie Organique et Substances Naturelles (LCOSN), UFR-SSMT, Université Félix Houphouët-Boigny, 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire.

(Reçu le 15/04/2020 – Accepté après corrections le 01/11/2020)

**Résumé :** L'extraction des métabolites secondaires des feuilles de *Hyptis suaveolens* avant et après extraction de son huile essentielle a été réalisée par macération avec un mélange éthanol-eau (70/30 : v/v) avec des rendements respectifs de 21,25 et 27,60 %. Le fractionnement successif de l'extrait hydroalcoolique obtenu par l'hexane, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle, l'éthanol et l'eau a donné des rendements plus élevés des fractions après extraction (12,32-29,53 %) comparés à ceux avant extraction (9,61-34,04 %) de l'huile essentielle à l'exception des fractions hexanique et aqueuse. Le screening phytochimique de ces deux matrices végétales a révélé la présence de toutes les familles de métabolites secondaires recherchées autant avant qu'après extraction de l'huile essentielle exceptés les alcaloïdes qui sont absents après. Le dosage des flavonoïdes totaux a donné des teneurs plus importantes (2,22-46,00 mg EQ/g d'extrait) après extraction de l'huile essentielle sauf dans les fractions aqueuses où la teneur en flavonoïdes est plus élevée avant extraction de l'huile essentielle (1,95-33,33 mg EQ/g d'extrait). En revanche, la teneur en polyphénols totaux diminue de 0,40-48,33 à 0,30-45,20 mg EAG/g d'extrait avec l'extraction de l'huile essentielle hormis le cas de la fraction au dichlorométhane.

**Mots clés :** Etude phytochimique, *Hyptis suaveolens*, Teneur, Polyphénols totaux, Flavonoïdes totaux

## Comparative study of the phytochemical characteristics of the leaves of *Hyptis suaveolens* before and after extraction of the essential oil

**Abstract:** The extraction of secondary metabolites from the leaves of *Hyptis suaveolens* before and after extraction of its essential oil was carried out by maceration with an ethanol-water mixture (70/30: v / v) with yields of 21.25 and 27.60% respectively. The successive fractionation of the hydroalcoholic extract obtained with hexane, dichloromethane, ethyl acetate, ethanol and water gave higher yields of the fractions after extraction (12.32-29.53%) compared to those before extraction (9.61-34.04%) of the essential oil with the exception of the hexane and aqueous fractions. Phytochemical screening of these two plant matrices revealed the presence of all the families of secondary metabolites sought both before and after extraction of the essential oil except the alkaloids which are absent after. The determination of total flavonoids gave higher contents (2.22-46.00 mg EQ/g d'extrait) after extraction of the essential oil except in the aqueous fractions where the content of flavonoids is higher before extraction of the essential oil (1.95-33.33 mg EQ/g d'extrait). On the other hand, the content of total polyphenols decreases from 0.40-48.33 to 0.30-45.20 mg EAG/g d'extrait with the extraction of the essential oil except in the case of the dichloromethane fraction.

**Keywords:** Phytochemical study, *Hyptis suaveolens*, Content, Total polyphenols, Total flavonoids

\* \* Auteur correspondant : Soro Yaya ; [soro\\_y@yahoo.fr](mailto:soro_y@yahoo.fr)



## 1. Introduction

Les plantes constituent une source prioritaire et inépuisable de molécules pour le traitement de diverses maladies dans les populations des pays en développement. Ainsi, *Hyptis suaveolens* (Lamiaceae), répandue dans les zones tropicales d'Amérique, d'Asie et d'Afrique, est le plus souvent utilisée dans la pharmacopée pour le traitement de l'Asthme, des panaris, de l'Ictère et de l'hyperthermie<sup>[1]</sup>. Elle est stimulante, carminative, sudorifique, lactogène, anticatarrhale et antiparasitaire cutanée<sup>[2]</sup>. Les feuilles et les brindilles sont antiplasmodiques, antioxydantes, antibactériennes, antifongiques, antidiabétiques, antirhumatiques, antispurifiques, anti-inflammatoires et antiseptiques dans les cas de brûlures et de multiples complications de la peau<sup>[3]</sup>. La décoction des racines est un apéritif et est renommée pour sa teneur en acide urosolique, un inhibiteur naturel de l'intégration du VIH<sup>[4]</sup>.

Les analyses phytochimiques préliminaires des extraits de feuilles ont révélé la présence d'alcaloïdes, de sucres simples, de stéroïdes, de terpénoïdes, de tanins, de flavonoïdes, d'antraquinones et de phénols qui représentent plus de 13% de la masse des feuilles sèches<sup>[5][6]</sup>. Les feuilles de la plante contiennent également des huiles essentielles (moins de 1% de la masse des feuilles sèches) qui renferment du menthol, des limonènes et des sesquiterpènes<sup>[7]</sup> et qui possèdent de nombreuses propriétés pharmacologiques et biologiques<sup>[8][9]</sup>. Cependant, après l'extraction de l'huile essentielle, les résidus de feuilles contenant des composés non volatils sont le plus souvent inexploités malgré leurs potentielles propriétés<sup>[10]</sup>.

Depuis quelques années, notre laboratoire développe un programme de valorisation de ces résidus. Ainsi, dans une étude récente, nous avons montré que les extraits hydroéthanoliques des feuilles de *Hyptis Suaveolens* après extraction de l'huile essentielle ont une activité antimicrobienne plus accentuée que ces feuilles avant extraction de l'huile essentielle<sup>[6]</sup>. Ce résultat pourrait suggérer la transformation de certains composés en d'autres composés à forte activité antimicrobienne sous l'effet de la chaleur ou encore l'augmentation des quantités des polyphénols et des flavonoïdes totaux connus pour leurs activités antimicrobiennes. Malheureusement, nous n'avons trouvé dans la littérature aucune base de données phytochimiques sur les feuilles de cette plante après extraction de son huile essentielle permettant de justifier ces activités biologiques.

La présente étude vise à déterminer la composition en métabolites secondaires ainsi qu'à quantifier les

polyphénols et flavonoïdes totaux d'extraits et de fractions de feuilles de *Hyptis suaveolens* avant et après extraction de l'huile essentielle pour vérifier cette hypothèse.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Matériel végétal

Les feuilles de *Hyptis suaveolens* ont été récoltées en juillet 2017 à Yamoussoukro (6°47'18.762" Nord et 5°15'25.9992" Ouest) au centre de la Côte d'Ivoire et identifiées par monsieur Amani N'Guessan, botaniste à l'Institut National Polytechnique Félix HOUPOUËT-BOIGNY (INP-HB) de Yamoussoukro. Un spécimen de *Hyptis suaveolens* est répertorié dans l'herbier du CSRS sous le numéro : n° Coll : 18027 / bdcsrcs : 65599. Les feuilles ont été séchées à l'ombre à la température ambiante du laboratoire (26 à 30 °C) pendant 7 jours et réparties en 2 lots qui ont servi à la préparation des 2 échantillons.

### 2.2. Méthodes

#### 2.2.1. Préparation des échantillons

Les feuilles sèches avant et après extraction de l'huile essentielle, par hydrodistillation à l'aide d'un dispositif de type Clevenger durant 3h<sup>[6]</sup>, ont été broyées à l'aide d'un broyeur électrique de marque IKA M20 (France) et les poudres obtenues ont été tamisées à l'aide d'un tamis de 0,5 mm de maille. Les poudres obtenues (**figure 1**) ont été conservées dans des bocaux colorés à 4 °C jusqu'à leur utilisation ultérieure.



(1) Avant extraction de l'huile essentielle (2) Après extraction de l'huile essentielle

**Figure 1** : Poudres de feuilles sèches de *Hyptis Suaveolens* avant et après extraction de l'huile essentielle

### 2.2.2. Préparation des extraits hydroalcooliques totaux

Les extraits hydroalcooliques totaux ont été préparés selon la méthode décrite par Yapi Yayé et al.<sup>[11]</sup>. Une masse de 100g de broyat de chaque échantillon a été macérée dans 1 L d'un mélange éthanol/eau (70/30 : v/v) sous agitateur magnétique durant 24 heures. Après décantation, le mélange a été successivement filtré sur du coton hydrophile et du papier Watman n° 2. L'opération a été répétée trois (3) fois jusqu'à épuisement du broyat. Le filtrat obtenu a été concentré à pression réduite à la température de 40 °C à l'aide d'un évaporateur rotatif de type BUCHI 461 puis lyophilisé pour donner les extraits hydroalcooliques totaux avant ( $E_{HA1}$ ) et après ( $E_{HA2}$ ) extraction de l'huile essentielle.

### 2.2.3. Fractionnement des différents extraits hydroalcooliques totaux

Les extraits hydroalcooliques totaux obtenus ont été fractionnés successivement à partir de solvants de polarités croissantes (hexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle, éthanol et eau) suivant la méthode rapportée par Bouamama et al.<sup>[12]</sup>. Les extraits hydroalcooliques 1 et 2 (10 g) ont été dissous dans 100 mL d'eau et partitionnés successivement avec l'hexane (3x 100mL), le dichlorométhane (3x 100 mL) et l'acétate d'éthyle (3x 100 mL). La phase aqueuse résultante a été séchée puis extraite avec l'éthanol (3x 100 mL). Le résidu solide résultant constitue l'extrait aqueux. Les différentes phases organiques obtenues ont été séparément séchées sur sulfate de sodium anhydre. Après filtration et élimination des solvants sous pression réduite, les fractions à l'hexane ( $F_{HEX}$ : 1,632 g et 1,232 g), au dichlorométhane ( $F_{DCM}$ : 1,823 g et 1,997 g), à l'acétate d'éthyle ( $F_{AE}$ : 2,079 g et 2,573 g), à l'éthanol ( $F_{Eth}$ : 0,961 g et 1,236 g) et l'eau ( $F_{Aq}$ : 3,404 g et 2,953 g) respectivement avant et après extraction de l'huile essentielle ont été obtenues.

### 2.2.4. Criblage des familles de métabolites secondaires

La méthode de criblage utilisée est celle décrite par Harbone et basée sur des réactions de précipitation et/ou de coloration<sup>[13]</sup>.

### 2.2.5. Dosages des polyphénols et flavonoïdes totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été réalisé selon la méthode décrite par Wood et al.<sup>[14]</sup>. A un

volume de 30  $\mu$ L d'extrait ont été ajoutés 2,5 mL de réactif de Folin-Ciocalteu dilué au 1/10<sup>e</sup>. Le mélange obtenu a été maintenu pendant 2 min à l'obscurité à la température ambiante (27 $\pm$ 03°C) puis 2 mL de carbonate de sodium (75 g.L<sup>-1</sup>) y ont été ajoutés. La solution obtenue a été ensuite incubée à 50 °C pendant 15 min. La lecture de l'absorbance a été réalisée au spectrophotomètre UV-visible à une longueur d'onde de 760 nm contre un blanc constitué de 5 mL de réactif de Folin-Ciocalteu dilué au 1/10<sup>e</sup> et de 4 mL de carbonate de sodium (75 g.L<sup>-1</sup>). L'acide gallique a été utilisé comme standard de référence pour la quantification des teneurs en polyphénols totaux exprimées en mg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait).

La teneur en flavonoïdes totaux a elle été déterminée selon la méthode décrite par Marinova et al.<sup>[15]</sup>. Des volumes de 0,75 mL de nitrite de sodium à 5% (m/v) et de 0,75 mL de chlorure d'Aluminium à 10% (m/v) ont été ajoutés à 2,5 mL d'extrait de ratio 1/500 (m/V). Après 5 min d'incubation, le mélange a été mis en contact avec 5 mL d'une solution de soude à 1 M. Le volume obtenu a été ajusté à 25 mL puis agité vigoureusement. L'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 510 nm. La quercétine a été utilisée comme standard de référence pour la quantification des teneurs en flavonoïdes totaux exprimées en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ.g<sup>-1</sup> d'extrait).

## 3. Résultats et discussion

### 3.1. Rendements d'extraction et de fractionnement des extraits

Les rendements des extraits hydroalcooliques (EHA) de broyats de feuilles de *Hyptis suaveolens* avant et après extraction de l'huile essentielle (HE) ainsi que ceux des fractions à l'hexane (FHEX), au dichlorométhane (FDCM), à l'acétate d'éthyle (FAE), à l'éthanol (FEth) et à l'eau (FAq) issues de ces extraits sont donnés dans la **figure 2**.

La **figure 2** montre qu'après extraction de l'huile essentielle, le taux de composés solubles dans le mélange éthanol-eau (70/30 : v/v) augmente de 21,27 à 27,60 %. Ce résultat pourrait être dû à la libération de certains sucres ou de certains composés polaires initialement liés aux composés terpéniques qui sont les constituants majoritaires des huiles essentielles<sup>[16]</sup>. En effet, à l'état naturel, certains monoterpènes et sesquiterpènes sont liés à des sucres ou à d'autres composés tels que certains composés

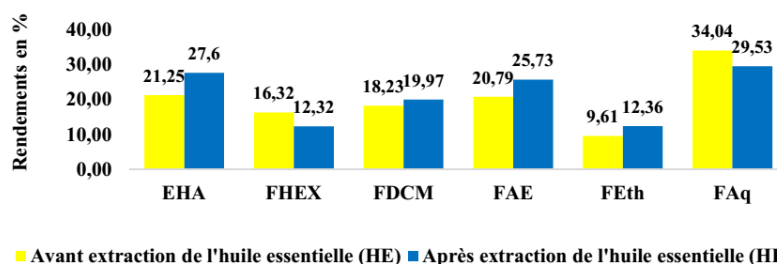
phénoliques sous forme d'hétérosides, en formant des complexes moins solubles dans le mélange éthanol-eau<sup>[17]</sup>. Ces résultats sont plus élevés que ceux obtenus par Goly et *al.*<sup>[6]</sup> qui ont obtenus des rendements respectifs de 13,01 et 14,40 %. Cette différence pourrait être liée à la durée de l'extraction ou à la granulométrie des broyats, deux facteurs qui ont influencé le rendement d'extraction selon nos résultats antérieurs lors de la détermination des paramètres influençant le rendement d'extraction hydroalcoolique des métabolites secondaires de deux plantes<sup>[18]</sup>.

La **figure 2** montre également que seuls les rendements des fractions à l'hexane et à l'eau avant extraction de l'huile essentielle (16,32 et 34,04 %) sont plus élevés que ceux des mêmes fractions après extraction de l'huile essentielle (12,32 et 29,53 %). Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que d'une part, l'huile essentielle a préalablement récupéré des composés solubles dans l'hexane et d'autre part, certains composés hydrophiles ont été extraits dans l'eau florale au cours de l'hydrodistillation.

Les rendements plus élevés dans les autres fractions après extraction de l'huile essentielle (12,36 à 25,73 %) pourraient s'expliquer par l'élévation de la température lors de l'hydrodistillation. En effet, lors de réactions thermiques des aglycones sont libérés suite à des clivages glycosidiques ou des composés organiques sont transformés en d'autres composés plus solubles dans les solvants utilisés<sup>[19]</sup>. Nous n'avons pas trouvé d'études similaires dans la littérature afin de les comparer à nos résultats.

### 3.2. Criblage phytochimique des extraits hydroalcooliques et des fractions

Les résultats des criblages phytochimiques réalisés sur les extraits hydroalcooliques avant (EHA1) et après (EHA2) extraction de l'huile essentielle ainsi que sur les fractions à l'hexane (FHEX), au dichlorométhane (FDCM), à l'acétate d'éthyle (FAE), à l'éthanol (FEth) et à l'eau (FAq) issues de ces extraits sont donnés dans le **tableau I**.



**Figure 2** : Rendements des extraits et fractions de broyats de feuilles de *Hyptis suaveolens* avant et après extraction de l'huile essentielle (HE)

**Tableau I** : Résultats des criblages phytochimiques des extraits hydroalcooliques et des fractions issues de ces extraits.

Familles de métabolites secondaires	Avant extraction de l'huile essentielle						Après extraction de l'huile essentielle					
	EHA1	FHex	FDCM	FEA	FEth	FAq	EHA2	FHex	FDCM	FEA	FEth	FAq
Stérols et terpènes	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
Polyphénols	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Flavonoïdes	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Leucoanthocyanes	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
Tanins catéchiques	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Tanins galliques	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+
Alcaloïdes	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Saponines	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
Quinones et anthraquinones	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+

+ : Présence ; - : Absence

Les résultats du **tableau I** montrent la présence de toutes les familles de métabolites secondaires recherchées dans les extraits hydroalcooliques avant et après extraction de l'huile essentielle à l'exception des alcaloïdes qui sont absents après extraction de l'huile essentielle. Cette absence des alcaloïdes dans l'extrait hydroalcoolique EHA2 pourrait se justifier par l'extraction de ces alcaloïdes, qui ont été détectés dans l'eau florale, au cours de l'hydrodistillation. Ces résultats montrent également que l'huile essentielle n'a pas récupéré tous les terpènes des feuilles avant son extraction et que le mélange éthanol-eau extrait la quasi-totalité des composés présents dans les feuilles de la plante comme rapporté dans la littérature<sup>[20]</sup>.

Lors du fractionnement, l'eau, l'acétate d'éthyle et l'éthanol extraient la quasi-totalité des familles de composés exceptés les quinones et anthraquinones qui sont absents dans l'éthanol. La fraction aqueuse est la plus riche en familles de métabolites secondaires, ce qui pourrait justifier l'utilisation de la décoction dans de nombreux traitements traditionnels. Ces résultats avant extraction de l'huile essentielle sont en accord avec ceux de la littérature<sup>[5]</sup>. Nous n'avons pas trouvé dans la littérature d'études de criblages phytochimiques après extraction de l'huile essentielle de *Hyptis Suaveolens* ni d'autres plantes afin de les comparer à nos résultats.

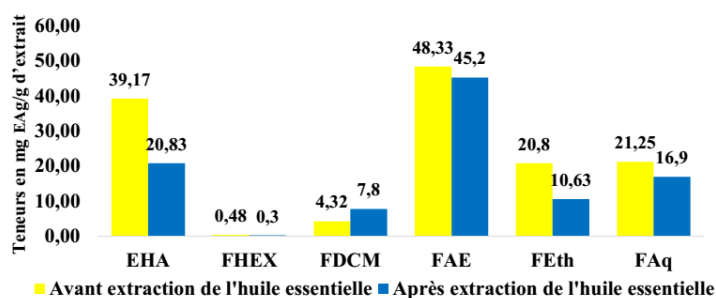
### 3.3. Dosage des polyphénols totaux

Les analyses quantitatives des polyphénols totaux, ont été effectuées à partir de la droite d'étalonnage, tracée en utilisant l'acide gallique comme standard avec un coefficient de régression de  $R^2 = 0,9935$ . Les résultats obtenus sont présentés dans la **figure 3**.

Les teneurs en polyphénols totaux des extraits hydroalcooliques (EHA) de feuilles de *Hyptis*

*suaveolens* avant et après extraction de l'HE sont respectivement de 39,17 et 20,83 mg EAG/g d'extrait selon la figure 3. Cette baisse serait liée au caractère hydrosoluble des composés phénoliques<sup>[21]</sup> qui auraient été extraits en partie par l'eau florale pendant l'hydrodistillation<sup>[10]</sup>. Ces teneurs sont supérieures à celles obtenues par Sharma *et al.* sur l'extrait aqueux de *Hyptis suaveolens* acclimaté en Inde (10,00 et 2,5 mg EAG/g d'extrait)<sup>[10]</sup> et à celle obtenue par Dossa *et al.* (34,32 mg EAG/g) sur l'extrait hydroalcoolique de feuilles de *Hyptis suaveolens* acclimaté au Bénin avant extraction de l'huile essentielle<sup>[20]</sup>. Cette différence pourrait être liée à la méthode d'extraction ou encore aux conditions environnementales et aux pratiques agricoles car ce sont des facteurs susceptibles d'impacter les valeurs des teneurs en polyphénols totaux<sup>[22][23]</sup>.

Les teneurs en polyphénols totaux des différentes fractions avant et après extraction de l'huile essentielle varient respectivement de 0,40-48,33 et 0,30-45,20 mg EAG/g de la fraction. De façon générale, les teneurs des fractions avant extraction de l'huile essentielle sont plus élevées à l'exception de la fraction au dichlorométhane (FDCM) où l'on note une augmentation de la teneur en polyphénols de 4,32±0,02 à 7,80±0,00 mg EAG/g de la fraction. Cette augmentation de la teneur en polyphénols totaux extraits par le dichlorométhane serait probablement liée à la transformation de certains glycosides hydrosolubles en génines, par perte de leurs sucres, sous l'effet de la chaleur<sup>[24]</sup>, ce qui les rendrait plus solubles dans le dichlorométhane<sup>[25]</sup>. L'acétate d'éthyle (FAE), dont les teneurs avant et après sont respectivement de 48,33±0,08 et 45,20±0,04 mg EAG/g, reste le solvant qui extrait le maximum de composés phénoliques suivi de l'eau (FAq) (21,25±0,01 et 16,90±0,03 mg EAG/g) et de l'éthanol (FEth) (20,80±0,04 et 10,63±0,08 mg EAG/g).



**Figure 3** : Teneurs en polyphénols totaux des extraits hydroéthanoliques et des fractions avant et après extraction de l'HE

Ces résultats montrent que les polyphénols présents dans les fractions moyennement polaires ou polaires sont majoritairement sous une forme de génines libres comme l'ont montré des travaux antérieurs sur les feuilles fraîches de *Hyptis suaveolens* acclimaté au Nigeria<sup>[26]</sup>. Nous n'avons pas trouvé dans la littérature d'études de détermination de la teneur en polyphénols des fractions après extraction de l'huile essentielle de *Hyptis Suaveolens* ni d'autres plantes afin de les comparer à nos résultats.

#### 3.4. Dosage des flavonoïdes totaux

Les analyses quantitatives des flavonoïdes totaux ont été effectuées à partir de la droite d'étalonnage, tracée en utilisant la quercétine comme standard avec un coefficient de régression de  $R^2 = 0,9983$ . Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 4.

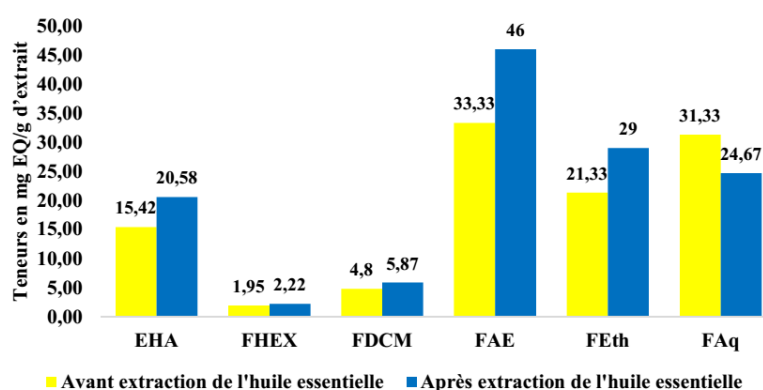
Les teneurs en flavonoïdes totaux des extraits hydroalcooliques (EHA) de feuilles de *Hyptis suaveolens* avant et après extraction de l'HE sont respectivement de  $15,42 \pm 0,39$  et  $20,58 \pm 0,22$  mg EQ/g d'extrait (figure 4). L'augmentation de la teneur en flavonoïdes dans l'extrait hydroalcoolique après extraction de l'huile essentielle pourrait s'expliquer par l'absence des huiles essentielles dont la présence inhiberait l'extraction des flavonoïdes.

En effet, les composés terpéniques qui composent majoritairement les huiles essentielles sont généralement liés à certains composés phénoliques tels que les flavonoïdes en formant des complexes qui pourraient être insolubles dans le solvant d'extraction. L'élévation de la température lors de l'hydrodistillation provoquerait la destruction de ces complexes, favorisant ainsi l'extraction des flavonoïdes<sup>[21][24]</sup>. Cette augmentation de la teneur en

flavonoïdes est en accord avec l'accroissement des activités antimicrobiennes de l'extrait hydroalcoolique des feuilles de *Hyptis suaveolens* après extraction de l'huile essentielle telle que rapportée par nos travaux antérieurs<sup>[6]</sup>. En effet, les flavonoïdes sont reconnus pour leurs propriétés antioxydant et antimicrobiennes<sup>[27]</sup>.

Nos teneurs en flavonoïdes sont supérieures à celles obtenues par Sharma *et al.* sur l'extrait aqueux de *Hyptis suaveolens* acclimaté en Inde ( $2,5-1,3$  mg EQ/g d'extrait)<sup>[10]</sup> et à celle obtenue par Dossa *et al.* ( $12,12$  mg EQ/g) sur l'extrait hydroalcoolique de feuilles de *Hyptis suaveolens* acclimaté au Bénin avant extraction de l'huile essentielle<sup>[20]</sup>. Cette différence pourrait être liée à la méthode d'extraction utilisée ou encore aux conditions environnementales et aux pratiques agricoles car ce sont des facteurs susceptibles d'impacter les valeurs des teneurs en polyphénols totaux<sup>[22][23]</sup>.

Les teneurs en flavonoïdes totaux des différentes fractions avant et après extraction de l'huile essentielle sont respectivement de  $1,95-33,33$  et  $2,22-46,00$  mg EQ/g de la fraction. De façon générale, les teneurs en flavonoïdes des fractions avant extraction de l'huile essentielle sont plus faibles que celle à après extraction de l'HE à l'exception de celle de la fraction aqueuse (FAq) où l'on note une diminution de la teneur en flavonoïdes de  $31,33$  à  $24,67$  mg EQ/g de la fraction. Cette diminution de la teneur en flavonoïdes dans la fraction aqueuse après extraction de l'huile essentielle serait due à l'extraction d'une certaine quantité de flavonoïdes glycosylés hydrosolubles par l'eau florale au cours de l'hydrodistillation<sup>[10]</sup>.



**Figure 4 :** Teneurs en flavonoïdes totaux des extraits hydroalcooliques et des fractions avant et après extraction de l'HE

Les fractions à l'acétate d'éthyle (FAE) avant et après extraction de l'HE ( $33,33 \pm 1,77$  à  $46,00 \pm 2,00$  mg EQ/g) sont les plus riches en flavonoïdes suivies des fractions aqueuses ( $31,33 \pm 0,44$  à  $24,67 \pm 0,44$  mg EQ/g) et éthanolique (FEth) ( $21,33 \pm 0,89$  à  $29 \pm 0,67$  mg EQ/g). Les fractions au dichlorométhane (FDCM) ( $4,8 \pm 0,17$  à  $5,87 \pm 0,19$  mg EQ/g) et à l'hexane (FHEX) ( $1,95 \pm 0,03$  à  $2,22 \pm 0,06$  mg EQ/g) sont les plus pauvres en flavonoïdes. Ces résultats montrent que la teneur en flavonoïdes dans les fractions dépend de la polarité des solvants utilisés comme rapportés par Marc<sup>[28]</sup>. Nous n'avons pas trouvé dans la littérature d'études de détermination de la teneur en flavonoïdes des fractions après extraction de l'huile essentielle de *Hyptis Suaveolens* ni d'autres plantes afin de les comparer à nos résultats.

#### 4. Conclusion

Les rendements d'extraction hydroalcoolique des feuilles de *Hyptis Suaveolens* sont plus élevés après extraction de l'huile essentielle. Les feuilles de *Hyptis suaveolens* contiennent la totalité des familles de métabolites secondaires recherchées avant et après extraction de l'huile essentielle à l'exception des alcaloïdes qui sont absents dans les feuilles après l'extraction de l'huile essentielle. De façon générale, les teneurs en polyphénols sont plus élevés avant extraction de l'huile essentielle contrairement aux teneurs en flavonoïdes. Les structures des polyphénols et flavonoïdes des feuilles de *Hyptis Suaveolens* avant et après extraction de l'huile essentielle sont en cours de détermination.

#### 5. Références Bibliographiques

- [1] Sharma PP, Roy RK, Anurag C, Gupta D and Vipin KS. *Hyptis suaveolens* (L.) poit.: A Phyto Pharmacological Review. International Journal of chemical and pharmaceutical sciences (2013) 4(1), 1–11.
- [2] Daziel JM, The Useful Plants of Tropical West Africa: Crown Agents for the Colonies 1937, London.
- [3] Grassi P, Reyesb TSU, Sosac S, Tubaroc A, Hoferd O, and Zitterl-Eglseera K. Anti-Inflammatory Activity of Two Diterpenes of *Hyptis suaveolens* from El Salvador. Z. Naturforsch (2006) 61, 165-170.
- [4] Moreira ACP, Lima EO, Wanderley PA, Carmo ES, De Souza EL. Chemical composition and antifungal activity of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit leaves essential oil against *Aspergillus* species. Braz J Microbiol. (2010) 41, 28–33.
- [5] Kumar SN and Nivetha T. Phytochemical screening and characterization of the bioactive compounds from the leaves of *Hyptis suaveolens* and *Spathodea campanulata*. J. Chem. Pharm. Res. (2015) 7(7), 840–850
- [6] Goly KRC, Soro Y, Dadié A, Kassi ABB and Djé M. Antibacterial activity of essential oils and extracts from the leaves of *Hyptis suaveolens* and *Lippia multiflora* on multi-resistant bacteria. Rasayan J. Chem. (2015) 8(4), 396–403.
- [7] Tia EV, Adima AA, Niamké SL, Jean GA., Martin T, Lozano P, Menut C. Chemical composition and insecticidal activity of essential oils of two aromatic plants from Ivory Coast against *Bemisia tabaci* G. (Hemiptera: Aleyrodidae). Nat. Prod. Commun. (2011) 6(8), 1183–1188.
- [8] Mandal SM, Mondal KC, Dey S and Pati BR. Antimicrobial activity of the leaf extracts of *Hyptis suaveolens* (L.) poit. Indian J. Pharm. Sci. (2007) 69(4), 568-569.
- [9] Tachakittirungrod S and Chowwanapoonpohn S. Comparison of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oils from *Hyptis suaveolens* and *Alpinia galanga* Growing in Northern Thailand. CMU. J. Nat. Sci. (2007) 6(1), 31-42.
- [10] Sharma A, Sharma A, Batish DR. Comparative antioxidant activity of *Hyptis suaveolens* before and after hydrodistillation. International Journal of Advance Research in Science and Engineering (2017) 6(9), 1312-1322.
- [11] Yaye YG, KRA AKM, Ackah JAAB and Djaman AJ. Evaluation de l'activité antifongique et essai de purification des principes actifs des extraits de *Terminalia mantaly* (h.perrier), une combretacée, sur la croissance in vitro de *Candida albicans*. Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège (2011) 80, 953-964.
- [12] Bouamama H, Noël T, Villard J, Benharref A and Jana M. Antimicrobial activities of the leaf extracts of two Moroccan *Cistus* L. species. J. Ethnopharmacol. (2006) 104(1-2), 104–107.
- [13] Harbone JB, Phytochemical Methods, A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis 1998, New York.
- [14] Wood JE, Senthilmohana ST, Peskinb AV. Antioxidant activity of procyanidin-containing plant extracts at different pHs. Food Chemistry (2002) 77(2), 155–161.
- [15] Marinova D, Ribarova F, Atanassova M. Total phenolics and total flavonoids in bulgarian fruits and vegetables. Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy (2005) 40(3), 255-260.
- [16] Van Bergen PF, Bull ID, Poulton PR, Evershed RP. Organic geochemical studies of soils from the Rothamsted Classical Experiments—I. Total lipid extracts, solvent insoluble residues and humic acids from Broadbalk Wilderness. Org. Geochem (1997) 26(1/2), 117–135.
- [17] Dossa ACP, Tachon C, Dangou J, Chrostowska A, Fouquet E, Sohounhloué DCK. Optimization of the extraction of sorghum's polyphenols for industrial production by membrane processes. Res. J. Recent Sci. (2012) 1(4), 1–8.
- [18] Koné KPFO, Soro Y et Siaka S. Détermination des paramètres influençant le rendement d'extraction hydroalcoolique des métabolites secondaires de *Alchornea*

- cordifolia* (Euphorbiaceae) et *Tridax procumbens* linn (Asteraceae). *J. Soc. Ouest-Afr. Chim* (2017) 44, 15-22.
- [19] Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ. Spectrometric identification of organic compounds, seventh Edition 2005, John Wiley & Sons, Ing.
- [20] Medoatinsa SE, Dossa CPA, Viwami F, Bogninou-Agbidinokoun GSR, Noudogbessi JP, Lagnika L, Ahissou H, Sohounhlou DCK. In vitro antiplasmodial and antioxidant activities of ethanolic and hydroethanolic extracts of *Hyptis suaveolens*. *World J. Pharm. Pharm. Sci.*(2015) 4(8), 101–112.
- [21] Bruneton J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales 4e ed. 1999, Paris.
- [22] Lee KW, Kim YJ, Lee HJ and Lee CY. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Food chemistry* (2003) 51, 7292–7295.
- [23] Jonnada SPK, Jesudas L and Bobbarala V. Phytopharmaceutical Studies of Selected Medicinal Plants Subjected to Abiotic Elicitation (Stress) in Industrial Area. Chapter 7, INTECH, Eds.2015, India: 153–200.
- [24] Muyonga JH, Andabati B & Ssepuuya G. Effect of heat processing on selected grain amaranth physicochemical properties. *Food Science & Nutrition* (2014) 2(1), 9-16.
- [25] Munin A and Edwards-Lévy F. Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds; a Review. *Pharmaceutics* (2011) 3(4), 793–829.
- [26] Oboh G. Polyphenol Extracts from *Hyptis suaveolens* Leaves Inhibit Fe<sup>2+</sup>-induced Lipid Peroxidation in Brain. *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences* (2008) 2(1), 41–46.
- [27] Konaté K, Hilou A, Mavoungou JF, Lepengué AN, Souza A, Barro N, Datté JY, M'Batchi B and Nacoulma OG. Antimicrobial activity of polyphenol-rich fractions from *Sida alba* L. (Malvaceae) against co-trimoxazol-resistant bacteria strains. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*(2012) 11(5), 1-6.
- [28] Marco GJ. A rapid method for evaluation of antioxidants. *J. Am. Oil Chem.*(1968) 45,

## RESUME

*Hyptis suaveolens* (L.) est une plante aromatique dont les feuilles contiennent aussi bien des huiles essentielles (moins de 1%) que des biomolécules actives non volatiles (plus de 8%). Cependant, les résidus de feuilles, après extraction de l'huile essentielle, sont généralement mal exploités. Une étude comparative de la composition chimique des feuilles de la plante avant et après extraction de l'huile essentielle, a donc été entreprise. L'extraction des métabolites secondaires des feuilles de *Hyptis suaveolens* avant et après extraction de son huile essentielle a été réalisée par macération avec un mélange éthanol-eau (70/30 : v/v) avec des rendements respectifs de 21,25% et 27,60 %. Le fractionnement successif des extraits hydroalcooliques par polarité croissante de solvant avec l'hexane, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle, l'éthanol et l'eau a donné des rendements plus élevés pour les fractions après extraction (variant de 12,32% pour l'hexane à 29,53 % pour l'eau) qu'avant extraction (variant de 9,61% pour l'éthanol à 34,04 % pour l'eau) de l'huile essentielle à l'exception des fractions hexanique et aqueuse. Le screening phytochimique de ces deux matrices végétales a révélé la présence de toutes les familles de métabolites secondaires recherchées autant avant qu'après extraction de l'huile essentielle exceptés les alcaloïdes qui sont absents après extraction de l'huile essentielle. Les teneurs en polyphénols et tanins totaux baissent respectivement de 39,167±2,222 à 20,833±1,111 mg EAG/g d'extrait et de 8,733±0,156 à 6,500±0,267 mg EAT/g d'extrait au cours de l'extraction de l'huile essentielles. En revanche, les teneurs en flavonoïdes totaux sont plus importantes (20,583±0,389 mg EQ/g d'extrait) après hydrodistillation contre (15,417±0,222 mg EQ/g d'extrait) avant extraction de l'HE. En outre, l'activité antioxydante s'accroît après extraction de l'huile essentielle avec respectivement des valeurs de IC<sub>50</sub> allant de 0,28 mg/mL à 0,27 mg/mL pour le DPPH et de TEAC allant de 256,47µmol/L TE à 290,91µmol/L TE pour l'ABTS. Comparativement à l'acide ascorbique de IC<sub>50</sub> 0,05mg/mL, les feuilles de *Hyptis suaveolens* ont une activité antioxydante modérée. L'identification des composés par la méthode dérèplicative (LC-MS/Q-TOF) a permis de déterminer les structures de dix-neuf (19) molécules déjà isolées du genre *Hyptis*. Dix-huit (18) de ces molécules ont été confirmées par une analyse en GC-MS. Cette analyse en GC-MS a permis d'identifier au total cinquante-huit (58) composés des fractions à l'acétate d'éthyle et au dichlorométhane. Trente-deux (32) de ces composés identifiés lors de l'analyse GC-MS sont des composés thermostables. Les feuilles de *Hyptis suaveolens* après l'extraction de l'HE sont donc une source potentielle de composés bioactifs dont l'exploitation contribuerait à une utilisation optimale et à une gestion durable de la plante.

**Mots clés :** *Hyptis suaveolens* ; composition chimique ; feuilles avant et après ; extraction de l'huile essentielle ; molécules

## ABSTRACT

*Hyptis suaveolens* (L.) is an aromatic plant whose leaves contain both essential oils (less than 1%) and non-volatile active biomolecules (more than 8%). However, the leaf residues after extraction of the essential oil are generally poorly exploited. A comparative study of the chemical composition of the leaves of the plant before and after extraction of the essential oil was therefore undertaken. The extraction of secondary metabolites from the leaves of *Hyptis suaveolens* before and after extraction of its essential oil was carried out by maceration with an ethanol-water mixture (70/30: v/v) with respective yields of 21.25 and 27, 60%. The successive fractionation of the hydroalcoholic extract obtained by hexane, dichloromethane, ethyl acetate, ethanol and water gave higher yields of the fractions after extraction (from 12.32 % for hexane to 29.53% for water) than before extraction (from 9.61 % for ethanol to 34.04% for water) of the essential oil except hexane and aqueous fractions. Phytochemical screening of these two plant matrices revealed the presence of all the families of secondary metabolites sought both before and after extraction of the essential oil except the alkaloids which are absent afterwards. The contents of polyphenols and total tannins drop respectively from 39.167±2.222 to 20.833±1.111 mg GAE/g of extract and from 8.733±0.156 to 6.500±0.267 mg TAE/g of extract during the extraction of the essential oil. On the other hand, the concentrations of total flavonoids are higher (20.583±0.389 mg QE/g of extract) after hydrodistillation against (15.417±0.222 mg QE/g of extract) before hydrodistillation. The antioxidant activity increases after extraction of the essential oil with respectively IC<sub>50</sub> values ranging from 0.28 mg/mL to 0.27 mg/mL for DPPH and TEAC values ranging from 256.47 µmol/L TE to 290, 91 µmol/L TE for ABTS. Compared to ascorbic acid of IC<sub>50</sub> 0.05 mg/mL, the leaves of *Hyptis suaveolens* would have a moderate antioxidant activity. The identification of the compounds by the dereplicative method (LC-MS/Q-TOF) made it possible to determine the structures of nineteen (19) molecules already isolated from the genus *Hyptis*. Eighteen (18) of these molecules were confirmed by GC-MS analysis which identified fifty-eight (58) compounds from the ethyl acetate and dichloromethane fractions. Thirty-two (32) of these identified compounds are heat-stable compounds. The leaves of *Hyptis suaveolens* after EO extraction are therefore a potential source of bioactive compounds whose exploitation would contribute to optimal use and sustainable management of the plant.

**Key words:** *Hyptis suaveolens*; chemical composition; before and after sheets; essential oil extraction; compounds