

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE FRERES MENTOURI CONSTANTINE1
FACULTE DES SCIENCES EXACTES
DEPARTEMENT DE CHIMIE

N° d'ordre :72/D3C/2018

Série :11/Ch/2018

THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat de troisième cycle (LMD)

Spécialité: Chimie Organique

Option: Analyses physicochimiques, contrôle de la qualité et synthèse de substances bioactives

Par : Hamza FADEL

Thème

**Etudes phytochimique et pharmacologique d'une
plante saharienne et d'espèces de la région des
Aurès**

Devant le jury:

Djamila ZAMA	Professeur, Université Frères Mentouri, Constantine 1	Présidente
Samir BENAYACHE	Professeur, Université Frères Mentouri, Constantine 1	Directeur de thèse
Fadila BENAYACHE	Professeur, Université Frères Mentouri, Constantine 1	Rapporteuse pour la soutenance
Santiago GÓMEZ- RUIZ	Professeur, Université Rey Juan Carlos, Móstoles, Madrid, Espagne	Examineur
Hamada HABA	Professeur, Université El Hadj Lakhdar, Batna 1	Examineur
Ouahiba BOUMAZA	Professeur, Université Frères Mentouri, Constantine 1	Examinatrice

Thèse soutenue le : 25 Juin 2018

Remerciement

Je tiens tout d'abord à remercier mon dieu Allah qui ma donné la volonté et le courage pour la réalisation de ce travail. Je souhaite remercier en premier lieu mon directeur de thèse le professeur : Samir BENAYACHE pour m'avoir accueilli au sein de son unité de recherche VARENBIOMOL (Unité de Recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimique et Biologiques, université Constantine-1, Route d'Ain El Bey, 25 000, Constantine, Algérie) et je lui suis également reconnaissant pour le temps conséquent qu'il ma accordé, ses qualité pédagogique et scientifique, sa franchise et sa sympathie et sa confiance durant ma recherche scientifique notamment au cours des trois premières années qui ont été pour moi les plus décisives. J'ai beaucoup appris a ses cotés et je lui adresse ma gratitude pour tout cela.

Mes remerciements vont aussi aux membres de jury de ma thèse les professeurs : Djamila ZAMA, Fadila BENAYACHE, Santiago GÓMEZ-RUIZ, Hamada HABA et Ouahiba BOUMAZA.

Ce travail a été réalisé aussi grâce à des nombreuses collaborations et se situe à l'interface entre la phytochimie, la biologie et la chimie analytique :

Mes remerciements vont aussi à madame le docteur : Anne BOOS, maître de conférences à l'université de Strasbourg de l'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC), France, pour sa supervision durant les deux premiers mois de mon stage a l'étranger pour la réalisation du dosage des éléments inorganiques .

Je tiens à relever aussi ici l'excellente collaboration avec le laboratoire de monsieur le professeur Santiago GÓMEZ-RUIZ de l'université de Rey Juan Carlos, Móstoles (Madrid) en Espagne, pour sa disponibilité, ses compétences scientifiques et sa sympathie.

Mes remerciements vont aussi à Mme la professeure : Isabel LOPEZ-BAZZOCCHI et le docteur : Antonio IGNACIO-JIMENEZ de l'université de la Laguna de l'Instituto Universitario de Bio-Orgánica Antonio González, Departamento de Química Orgánica et le docteur : Jacob LORENZO-MORALEZ, maître de conférences à l'université de la Laguna, pour ses supervisions durant mon stage dans son laboratoire.

Je veux remercier aussi mes collègues Nabil GHEDADBA, Ayoub BENKHALFA AKIL et Younes ELHIOUI et tous mes collègues de l'unité de recherche VRAENBIOMOL pour les bons moments passés ensemble.

Des mentions spéciales pour les ingénieurs de laboratoire: Hichem HAZMOUN, Hichem SERRAA et Naouel KOUALDI pour leur aide et motivation durant ma période de recherche.

Je remercie ainsi les étudiantes de master que j'ai suivies lors des travaux pratiques phytochimique et biologique et cela pendant les trois premières années de ma recherche et ma préparation de cette thèse.

J'ai eu aussi beaucoup de plaisir à me consacrer aux diverses tâches d'enseignement qui m'ont été confiées.

Dédicace

Cette thèse est dédiée à :

A mes chers parents mon père et ma mère qui m'ont encouragé à être ce que je suis, avec tant d'amour.

A ma sœur et mon frère pour ses tendresses et ses encouragements durant la tout ma carrière et durant la réalisation de ce travail.

A tout ma famille, surtout mes oncles : El-Hadj El-Arabi, Ramadhan, Djamel et Tarek sans oublier mes tantes Ghanoudja et Sassia, pour leurs encouragements.

A tous mes amis et collègues.

Communications scientifiques

Cette thèse a été réalisée du Novembre 2013 au 25 Juin 2018 au niveau de l'unité de recherche VARENBIOMOL (Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physico-chimique et Biologiques) à l'université Frères Mentouri, Constantine-1, Algérie, sous la direction du professeur : Samir BENAYACHE.

Les résultats obtenus ont été partiellement publiés/ou présentés lors des congrès nationaux et internationaux, sous forme de communications orales et de posters affichés:

Publications

Hamza Fadel, Fadila Benayache, Samir Benayache. 2016. Antioxidant properties of four Algerian medicinal and aromatic plants *Juniperus oxycedrus* L., *Juniperus phoenicea* L., *Marrubium vulgare* L. and *Cedrus atlantica* (Manetti ex Endl). *Der Pharmacia Lettre* **8**(3):72-79.

Hamza Fadel, Ines Sifaoui, Atteneri López-Arencibia, María Reyes-Batlle, Soumaya Hajaji, Olfá Chiboub, Ignacio A. Jiménez, Isabel L. Bazzocchi, Jacob Lorenzo-Morales, Samir Benayache, José E. Piñero. 2018. Assessment of the antiprotozoal activity of *Pulicaria inuloides* extracts an Algerian medicinal plant: Leishmanicidal bioguided fractionation. *Parasit Res* **117**(2): 531-537.

Communications orales

Fadel Hamza, Benayache Samir, Benayache Fadila, Ghedadba Nabil, Bencharchar Ilhem, Hazmoune Hichem, Khoualdi Naouel, Hanfer Mourad. Valorisation de la composition biochimique, screening et estimation biologique et quantitative des l'huiles et de différents extraits d'origine végétale des plantes médicinales et aromatiques de L'Algérie. 6^{es} Journées Scientifiques Internationales sur la Valorisation des Bioressources 1-3 Mai 2015, Hôtel Regency****, Monastir, Tunisie.

Hamza Fadel, Ines Sifaoui, Atteneri López-Arencibia, María Reyes-Batlle, Soumaya Hajaji, Olfá Chiboub, Ignacio A. Jiménez, Isabel L. Bazzocchi, Jacob Lorenzo-Morales, Samir Benayache, José E. Piñero. Antiprotozoal activity of an Algerian medicinal plant *Pulicaria inuloides*, leishmanicidal bioguided fractionation. Congreso de Jóvenes Químicos y Bioquímicos Terapéuticos QuimBioQuim-2017. Los días 4-5 de Octubre de 2017, Campus de Móstoles de la Universidad Rey Juan Carlos, España.

Hamza Fadel, Ines Sifaoui, Atteneri López-Arencibia, María Reyes-Batlle, Soumaya Hajaji, Olfa Chiboub, Ignacio A. Jiménez, Isabel L. Bazzocchi, Jacob Lorenzo-Morales, Samir Benayache, José E. Piñero. Leishmanicidal bioguided fractionation of an Algerian medicinal plant *Pulicaria inuloides*, 1^{er} Séminaire National sur: L'Eau, l'Environnement et Santé, Université Chadli Bendjedid -El-Tarf 6-7 Mars 2018.

Communications posters

Hamza Fadel, Samir Benayache, Fadila Benayache, Nabil Ghedadba, Mourad Hanfer, Hichem Hazmoune. Extraction, isolation, et évaluation des activités antioxydante, dosage des Polyphénols, dosage des flavonoïdes, dosage des flavonols d'une plante médicinale algérienne appartenant à la famille des asteraceae. 12^{ème} Journées Nationales du Département de Pharmacie 4-5 Juin 2014, Batna.

Hamza Fadel, Samir. Benayache, Fadila Benayache, Ilhem Bencharchar, Nabil Ghedadba, Mourad Hanfer, Hicham Hazmoune. Etude phytochimique et activités biologiques de extraits naturelles isolées d'une plante médicinale saharienne algérienne. The Second International Conference on "Natural Health" Mostaganem University, October 26th- 28th 2014 ALGERIA Laboratory of Pharmacognosy & Api Phytotherapy (LPAP).

Hamza Fadel, Samir. Benayache, Fadila Benayache, Ilhem Bencharchar, Nabil Ghedadba, Mourad Hanfer, Hicham Hazmoune. Isolation and structural elucidation of bioactive compounds and biological activities of the extracts of an endemic Saharan species of the genus *Pulicaria*. Quatrième Colloque International de Chimie CIC-4, Batna, le 25-27 Novembre 2014.

Hamza Fadel, Samir. Benayache, Fadila Benayache, Ilhem Bencharchar, Nabil Ghedadba, Mourad Hanfer, Hicham Hazmoune. Isolation and structural elucidation of three compounds and biological activities of vegetable extracts from an Algerian medicinal plant. Premier colloque international de biotechnologie végétale et microbienne le 2-3 décembre 2014, université USTO, Oran.

Hamza Fadel, Samir Benayache, Fadila Benayache, Hichem Hazmoune, Naouel Khoualdi, Nabil Ghedadba. Valorisation des plantes médicinales et aromatiques de Sahara et de l'est de l'Algérie (les Aurès), étude phytochimique et biologique. Le Séminaire International Des Biotechnologies Appliquées à : l'Agriculture, la Santé et l'Environnement SIBAASE du 17-19 Avril 2016, Université Abbass Laghrour – Khenchela.

Hamza Fadel, Samir Benayache, Fadila Benayache, Hichem Hazmoune, Naouel Khoualdi, Nabil Ghedadba. Valorisation des extraits végétaux et des huiles essentielles issus des plantes médicinales et aromatiques de Sahara et de l'est de l'Algérie (les Aurès). 14^{ème} Journées Nationales du Département de Pharmacie 27-28 Avril 2016, Batna.

Hamza Fadel, Ines Sifaoui, Atteneri López-Arencibia, María Reyes-Batlle, Soumaya Hajaji, Olfa Chiboub, Ignacio A. Jiménez, Isabel L. Bazzocchi, Jacob Lorenzo-Morales, Samir Benayache, José E. Piñero. Antiprotozoal activity of an Algerian medicinal plant: *Pulicaria inuloides*, leishmanicidal bioguided fractionation. XX Congreso de la Sociedad Española de Parasitología (SOCEPA) 19-21 Juillet 2017, Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias, Université de La Laguna, Tenerife, Espagne.

Ines Sifaoui, Hamza Fadel, Atteneri López-Arencibia, María Reyes-Batlle, Soumaya Hajaji, Olfa Chiboub, Ignacio A. Jiménez, Isabel Lopez-Bazzocchi, Jacob Lorenzo-Morales, Samir Benayache, José E. Piñero. Actividad antiparasitaria de *Pulicaria inuloides*, planta medicinal de Argelia, mediante fraccionamiento bioguiado frente *Leishmania*. XXI Semana Científica “Antonio Gonzalez”, celebrada del 24-27 de octubre de 2017, Instituto Universitario de Bio-Organica Antonio González, Departamento de Química Orgánica, Universidad de La Laguna, Avenida Astrofísico Francisco Sánchez 2, La Laguna 38206, Tenerife, Canary Islands, Spain.

Hamza Fadel, Ines Sifaoui, Atteneri López-Arencibia, María Reyes-Batlle, Soumaya Hajaji, Olfa Chiboub, Ignacio A. Jiménez, Isabel Lopez-Bazzocchi, Jacob Lorenzo-Morales, Samir Benayache, José E. Piñero. Evaluation of the leishmanicidal activity of the aerial parts of an Algerian medicinal and aromatic plant. Les Rencontres de l’Agriculture et de la biologie, du 5-7 Mai 2018, Université Constantine-1, Algérie.

Table des matières

Remerciements	
Dédicace	
Communications scientifiques	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction générale	1
Chapitre I : Rappels bibliographiques	
I.1. Généralités sur la région de récoltes des plantes	4
I.1.1. Les Aurès	4
I.1.2. Sahara d'Algérie	5
I.1.2.a. Description de la région de Béchar	5
I.2. Espèces sélectionnées dans les Aurès	6
I.2.1. <i>Juniperus phoenicea</i> L.	6
I.2.2. <i>Juniperus oxycedrus</i> L.	7
I.2.3. <i>Marrubium vulgare</i> L.	7
I.2.4. <i>Marrubium deserti</i> de Noé.	8
I.2.5. <i>Cedrus atlantica</i> (Endl.) Manetti	9
I.2.6. <i>Echinops ritro</i> L.	10
I.2.7. <i>Peganum harmala</i> L.	10
I.2.8. <i>Euphorbia helioscopia</i> L.	11
I.2.9. <i>Daphne gnidium</i> L.	12
I.2.10. <i>Bunium incrassatum</i> L.	13
I.2.11. <i>Calendula algeriensis</i> L.	13
I.3. Conclusion	14

Chapitre II : Activités biologiques *in vitro*

II.1. Matériel végétal	15
II.1.1. Sites et périodes de récolte	15
II.2. Protocole d'extraction	16
II.3. Screening phytochimique	18
II.3.1. Mise en évidence des saponines	18
II.3.2. Mise en évidence des flavonoïdes	18
II.3.3. Mise en évidence des tanins	18
II.3.4. Mise en évidence des alcaloïdes	19
II.4. Evaluation de l'activité antioxydant	19
II.4.1. DPPH radical scavenging	19
II.4.2. Test du blanchissement du β-carotène	20
II.4.3. Dosage des polyphénols	20
II.4.4. Dosage des flavonoïdes	20
II.4.5. Dosage des flavonols	21
II.5. Évaluation de l'activité antibactérienne	21
II.5.1. Matériels bactériologiques utilisés	21
II.5.2. Revivification des souches	22
II.5.3. Identification biochimique	22
II.5.4. La méthode de l'antibiogramme par diffusion sur milieu gélosé (Méthode des disques)	22
II.5.5. Préparation des dilutions	23
II.5.6. Milieu	23
II.5.7. Préparation des disques	23
II.5.8. Préparation de l'inoculum	24
II.5.9. Ensemencement	24
II.5.10. Pré-incubation	24
II.5.11. Incubation	24
II.5.12. La lecture	24
II.6. Résultats et discussion	25
II.6.1. Screening phytochimique	25
II.6.2. Evaluation de l'activité antioxydante	26
II.6.2.1. DPPH radical scavenging	26

II.6.2.2. Test du blanchissement du β -carotène	32
II.6.2.3. Dosage des polyphénols	34
II.6.2.4. Dosage des flavonoïdes	37
II.6.2.5. Dosage des flavonols	39
II.6.3. Activité antibactérienne de <i>P. inuloides</i> et <i>C. albidus</i>	42
II.7. Conclusion.....	44

Chapitre III : Phytochimie

III.1. La famille des Astéracées	45
III.2. Le genre <i>Pulicaria</i>	45
III.2.1. Le genre <i>Pulicaria</i> en Algérie	45
III.3. <i>Pulicaria inuloides</i> : Aspects botaniques.....	45
III.3.1. Utilisation en médecine traditionnelle	46
III.3.2. Travaux antérieurs sur le genre <i>Pulicaria inuloides</i>	46
III.4. Etude phytochimique de l'espèce <i>P. inuloides</i> : Travaux personnels	47
III.4.1. Récolte de matériel végétal.....	47
III.4.2. Matériels et produits utilisé	48
III.4.3. Extraction des parties aériennes	48
III.4.4. Séparation et purification.....	50
III.4.4.1. Tests chromatographiques	50
III.4.5. Séparation par colonne sur gel de silice et purification des composés de précipité de l'extrait acétate d'éthyle	51
III.4.6. Séparation par colonne sur gel de silice et purification des composés du filtrat résiduel de l'extrait acétate d'éthyle	54
III.4.6.1. Etude de la fraction F-32	56
III.4.6.2. Etude de la fraction F-34	57
III.4.7. Séparation par colonne sur gel de silice et purification de l'extrait chloroformique ..	57
III.4.7.1. Etude de la fraction F3.....	59
III.4.8. Conclusion	59
III.5. La famille des Cistacées	60
III.6. Le genre <i>Cistus</i>	60
III.7. <i>C. albidus</i> : aspects botaniques	62
III.7.1. Utilisation en médecine traditionnelle.....	62

III.7.2. Travaux antérieurs sur l'espèce <i>C. albidus</i>	63
III.8. Etude phytochimique de l'espèce <i>C. albidus</i> : Travaux personnels	63
III.8.1. Récolte du matériel végétal	63
III.8.2. Extraction des parties aériennes	63
III.8.3. Séparation et purification	65
III.8.3.1. Tests chromatographiques.....	65
III.8.4. Séparation chromatographique sur colonne de gel de silice de l'extrait AcOEt	66
III.8.4.1. Etude de la fraction F5.....	68
III.8.4.2. Etude de la fraction F14	69
III.8.4.3. Etude de la fraction F15	69
III.8.5. Conclusion	70
III.9. Résultats et discussions	70
III.9.1. Identification du composé 4	70
III.9.1. a. Données spectroscopiques UV-Visible	70
III.9.1.b. Données spectroscopiques IR.....	72
III.9.1.c. Donnée spectroscopiques RMN	73
III.9.2. Identification du composé 5	81
III.9.2.a. Données spectroscopiques UV-Visible	81
III.9.2.b. Donnée spectroscopiques RMN	83
III.9.3. Identification du composé 6	89
III.9.3.a. Données spectroscopiques UV-Visible	89
III.9.3.b. Données spectroscopiques RMN.....	90
III.9.4. Identification du composé 7	96
III.9.4.a. Données spectroscopiques UV-Visible	96
III.9.4.b. Données spectroscopiques RMN	98
III.9.5. Identification du composé 8	103
III.9.5.a. Profil CCM du composé 8	103
III.9.5.b. Données spectroscopiques IR.....	103
III.9.5.c. Données spectroscopiques UV-Visible	104
III.9.5.d. Donnée spectroscopiques RMN	106
III.9.6. Identification du composé 9	112
III.9.6.a. Profil CCM du composé 9	112
III.9.6.b. Données spectroscopiques UV-Visible	113
III.9.6.c. Donnée spectroscopiques RMN.....	115

III.9.7. Identification du composé 10	117
III.9.7.a. Profil CCM du composé 10	117
III.9.8. Identification de composé 11	118
III.9.8.a. Profil CCM du composé 11	118
III.9.8.b. Données spectroscopiques UV-Visible	119
IV.9.8.c. Donnée spectroscopiques RMN	121
IV.9.9. Identification du composé 12	124
IV.9.9.a. Profil CCM du composé 12	124
IV.9.9.b. Données spectroscopiques UV-Visible	124
IV.9.9.c. Données spectroscopiques RMN	126
III.9.10. Identification du composé 13	130
III.9.10.a. Profil CCM du composé 13	130
III.9.10.b. Donnée spectroscopiques UV-Visible.....	131
III.9.10.c. Donnée spectroscopiques RMN.....	133
III.10. Conclusion	136

Chapitre IV : Fractionnement bioguidé

IV.1. Introduction	138
IV.2. Présentation des parasitoses	138
IV.2.1. La leishmaniose	138
IV.2.2. La trypanosomiase	139
IV.2.3. L'amibiase	139
IV.3. Evaluation de l'activité antiparasitaire <i>in vitro</i>	140
IV.3.1. La culture <i>in vitro</i>	140
IV.3.2. Activité anti-leishmanienne	140
IV.3.3. Evaluation <i>in vitro</i> de l'activité anti-trypanosoma	141
IV.3.4. Evaluation <i>in vitro</i> de l'activité anti-trophozoite d' <i>Acanthameoba</i>	141
IV.3.5. Détermination des CI ₅₀	142
IV.4. Test de cytotoxicité des molécules sur des macrophages J774	142
IV.5. Screening antiparasitaire <i>in vitro</i> des extraits de <i>P. inuloides</i>	142
IV.6. Fractionnement bioguidé de l'extrait CHCl₃ de la partie aérienne de <i>P. inuloides</i>	143

IV.6.1. Fractionnement de la fraction F5	144
IV.6.2. Acétylation du composé 1.....	145
IV.7. Screening antiparasitaire <i>in vitro</i> des extraits de <i>C. albidus</i>	146
IV.7.1. Fractionnement bioguidé de l'extrait CHCl ₃ de la partie aérienne de <i>C. albidus</i> vis-à-vis de <i>T. cruzi</i>	146
IV.7.2. Fractionnement bioguidé de l'extrait acétate d'éthyle de la partie aérienne de <i>C. albidus</i> vis-à-vis d' <i>A. castellanii</i>	148
IV.8. Résultats et discussion	150
IV.8.1. Screening antiparasitaire <i>in vitro</i> des extraits de <i>P. inuloides</i>	150
IV.8.2. Fractionnement bioguidé de l'extrait CHCl ₃ de la partie aérienne <i>P. inuloides</i>	151
IV.8.3. Identification du composé 1	153
IV.8.3.a. Profil CCM du composé 1	153
IV.8.3.b. Acétylation du composé 1	154
IV.8.4. Identification du composé 2	155
IV.8.4.a. Profil CCM du composé 2	155
IV.8.4.b. Données spectroscopiques RMN.....	155
IV.8.5. Identification du composé 3	161
IV.8.5.a. Profil CCM du composé 3	161
IV.8.5.b. Données spectroscopiques RMN	162
IV.8.6. Identification du composé 14	169
IV.8.6.a. Profil CCM du composé 14	169
IV.8.6.b. Données spectroscopiques RMN.....	170
IV.8.7. Screening antiparasitaire <i>in vitro</i> des extraits de la partie aérienne de <i>C. albidus</i>	173
IV.8.8. Fractionnement bioguidé de l'extrait CHCl ₃ de la partie aérienne de <i>C. albidus</i>	173
IV.8.9. Identification du composé 15	175
IV.8.9.a. Profil CCM du composé 15	175
IV.8.9.b. Données spectroscopiques IR.....	175
IV.8.9.c. Données spectroscopiques UV-Visible	176
IV.8.9.d. Données spectroscopiques RMN.....	178
IV.8.10. Fractionnement bioguidé de l'extrait AcOEt de la partie aérienne de <i>C. albidus</i> ..	182
IV.8.11. Identification du composé 16	183
IV.8.11.a. Profil CCM du composé 16	183
IV.8.11.b. Données spectroscopiques IR.....	184
IV.8.11.c. Données spectroscopiques UV-Visible.....	185

IV.8.11.d. Données spectroscopiques RMN	187
---	-----

IV.9. Conclusion	192
------------------------	-----

Chapitre V : Les huiles essentielles

V.1. Définition et généralités	194
--------------------------------------	-----

V.2. Procédés d'extraction des huiles essentielles	195
--	-----

V.2.1. Hydrodistillation	195
--------------------------------	-----

V.2.2. Entraînement à la vapeur d'eau	195
---	-----

V.2.3. Extraction par micro-onde	196
--	-----

V.2.4. L'expression à froid	197
-----------------------------------	-----

V.3. Protocole d'extraction de <i>P. inuloides</i> et <i>C. albidus</i>	197
---	-----

V.4. Résultats et discussion	198
------------------------------------	-----

V.4.1. L'analyse de la composition de l'HE de <i>C. albidus</i>	198
---	-----

V.4.2. L'analyse de la composition de l'HE de <i>P. inuloides</i>	204
---	-----

V.4.3. Etude comparative concernant la composition de l'huile essentielle de la plante <i>P. inuloides</i>	206
--	-----

V.5. Conclusion	209
-----------------------	-----

Chapitre VI : Etude analytique

VI.1. Introduction	210
--------------------------	-----

VI.2. Présentation de laboratoire	211
---	-----

VI.3. Analyse par ICP/AES	212
---------------------------------	-----

VI.4. Analyse par ICP/MS	212
--------------------------------	-----

VI.5. Produits chimiques, appareils et matériels utilisés	213
---	-----

VI.6. Collection et préparation des extraits	213
--	-----

VI.6. Protocoles utilisés	215
---------------------------------	-----

VI.6.1. Teneur en eaux	215
------------------------------	-----

VI.6.2. Minéralisation	215
------------------------------	-----

VI.6.3. Analyse par ICP-AES	216
-----------------------------------	-----

VI.6.4. Analyse par ICP-MS	216
----------------------------------	-----

VI.7. Résultats et discussion	217
-------------------------------------	-----

VI.7.1. Teneur en eaux	217
------------------------------	-----

VI.7.2. Analyse minérale ICP-AES et ICP-MS	217
VI.8. Conclusion	220
Conclusion générale et perspectives	221
Références bibliographiques	
Annexes	
Résumé	
Abstract	
ملخص	

Liste des figures

Chapitre I : Rappel bibliographiques

Figure 1. Localisation de la zone des Aurès en vert dans le nord-est Algérien	4
Figure 2. Localisation de Sahara en jaune sur la carte de l'Algérie	5
Figure 3. Localisation de la zone Bechar en jaune sur la carte de l'Algérie	5
Figure 4. La plante <i>Juniperus phoenicea</i> L.	6
Figure 5. La plante <i>Juniperus oxycedrus</i> L.	7
Figure 6. La plante <i>Marrubium vulgare</i> L.	8
Figure 7. La plante <i>Marrubium deserti</i> de Noè.	9
Figure 8. La plante <i>Cedrus atlantica</i> (Endl.) Manetti	9
Figure 9. La plante <i>Echinops ritro</i> L.	10
Figure 10. La plante <i>Peganum harmala</i> L.	11
Figure 11. La plante <i>Euphorbia helioscopia</i> L.	12
Figure 12. La plante <i>Daphne gnidium</i> L.	12
Figure 13. La plante <i>Bunium incrassatum</i> L.	13
Figure 14. La plante <i>Calendula algeriensis</i> L.	14

Chapitre II : Activités biologiques *in vitro*

Figure 1. Site de prélèvement de <i>Pulicaria inuloides</i> (Poir.) DC.	15
Figure 2. Site de prélèvement de <i>Cistus albidus</i> L.	15
Figure 3. Site de prélèvement des différentes espèces de la région des Aurès	16
Figure 4. Organigramme récapitulatif des étapes d'extraction de différentes espèces	17
Figure 5. Activité antioxydant par DPPH des différents extraits organiques des parties aériennes de <i>P. inuloides</i>	28
Figure 6. Activité antioxydant par DPPH des différents extraits organiques des parties racines de <i>P. inuloides</i>	29
Figure 7. Activité antioxydant par DPPH des différents extraits organiques des parties aériennes de <i>C. albidus</i>	29
Figure 8. Activité antioxydant par DPPH des extraits bruts des différentes espèces de la région des Aurès	30
Figure 9. Activité antioxydant par DPPH des extraits bruts de différentes espèces de la région des Aurès	30
Figure 10. Comparaison entre les valeurs de CI ₅₀ (µg/ml) des extraits de <i>P. inuloides</i> et les espèces des Aurès	31
Figure 11. Comparaison entre les valeurs de CI ₅₀ (mg/ml) des extraits de <i>C. albidus</i> et les espèces des Aurès	31
Figure 12. Activité antioxydant par β-carotène des extraits bruts des différentes espèces des Aurès	33
Figure 13. Activité antioxydant par β-carotène des différents extraits de <i>P. inuloides</i>	33
Figure 14. Comparaison entre les valeurs de l'activité antioxydant par β-carotène de différentes espèces (%)	34

Figure 15. Taux des polyphénols de standard acide gallique (en $\mu\text{gAGE}/\text{mg}$)	35
Figure 16. Comparaison entre les valeurs des teneurs en polyphénols dans les différentes espèces ($\mu\text{gAGE}/\text{mg}$)	36
Figure 17. Taux des flavonoïdes (en $\mu\text{gQE}/\text{mg}$ et $\mu\text{gRuE}/\text{mg}$)	37
Figure 18. Comparaison entre les valeurs des teneurs en flavonoïdes dans les différentes espèces ($\mu\text{gQE}/\text{mg}$ et $\mu\text{gRuE}/\text{mg}$)	39
Figure 19. Taux des flavonols (en $\mu\text{gQE}/\text{mg}$ et $\mu\text{gRuE}/\text{mg}$)	39
Figure 20. Comparaison entre les valeurs des teneurs en flavonols dans les différentes espèces ($\mu\text{gQE}/\text{mg}$ et $\mu\text{gRuE}/\text{mg}$)	41

Chapitre III : Phytochimie

Figure 1. Photos de <i>Pulicaria inuloides</i> (Poir.) DC.	46
Figure 2. Quelques composés isolés de <i>Pulicaria inuloides</i>	47
Figure 3. Organigramme récapitulatif des étapes d'extraction des parties aériennes de l'espèce <i>P. inuloides</i>	49
Figure 4. Organigramme récapitulatif des étapes d'extraction des racines de <i>P. inuloides</i>	50
Figure 5. Profil chromatographique des trois extraits dans les deux systèmes et sous lampe UV $\lambda = 365 \text{ nm}$	51
Figure 6. Profil chromatographique chimique du précipité obtenu à partir de l'extrait acétate d'éthyle	51
Figure 7. Plaque préparative de la fraction FII sous lampe UV 254 et 365 nm	53
Figure 8. Plaque préparative de la fraction FIV sous lampe UV 254 et 365 nm	53
Figure 9. Schéma de purification des flavonoïdes de précipité de l'extrait acétate d'éthyle des parties aériennes de l'espèce <i>P. inuloides</i>	54
Figure 10. La fraction F-32 (CH_2Cl_2 : AcOEt) (2: 1)	56
Figure 11. La fraction F-32 (CH_2Cl_2 : AcOEt) (2: 2)	57
Figure 12. Carte phénolique de la fraction F3	59
Figure 13. Plaque préparative du composé 10	59
Figure 14. La plante <i>Cistus albidus</i> L.	62
Figure 15. Organigramme récapitulatif des étapes d'extraction des parties aériennes de l'espèce <i>C. albidus</i>	64
Figure 16. Profil chromatographique des trois extraits sous lampe UV $\lambda = 365 \text{ nm}$ et $\lambda = 254 \text{ nm}$	65
Figure 17. Profil chromatographique CCM de la fraction F5	69
Figure 18. Profil chromatographique CCM de la fraction F14= Composé 12	69
Figure 19. Profil chromatographique CCM et préparative du produit 13	70
Figure 20. Série spectrale UV du composé 4	72
Figure 21. Spectre IR du composé 4	73
Figure 22. RMN ^1H (CD_3OD ; 400 MHz) du composé 4	74
Figure 23. Étalement de la zone [6,4 ppm – 8,2 ppm] du spectre RMN ^1H (CD_3OD ; 400 MHz) du composé 4	75
Figure 24. Étalement de la zone [3,3 ppm - 4,7 ppm] du spectre RMN ^1H (CD_3OD ; 400 MHz) du composé 4	76

Figure 25. Spectre HSQC (CD ₃ OD ; 400 MHz) du composé 4	77
Figure 26. Structure du composé 4	77
Figure 27. Spectre HMBC (CD ₃ OD ; 400 MHz) du composé 4	78
Figure 28. Spectre NOESY (CD ₃ OD ; 400 MHz) du composé 4	79
Figure 29. Spectre RMN ¹³ C (CD ₃ OD ; 400 MHz) du composé 4	80
Figure 30. Structure du composé 4	80
Figure 31. Série spectrale UV du composé 5	82
Figure 32. RMN ¹ H (CD ₃ OD; 400 MHz) du composé 5	83
Figure 33. Étalement de la zone [6,6 ppm – 7,6 ppm] du spectre RMN ¹ H (CD ₃ OD ; 400 MHz) du composé 5	84
Figure 34. Étalement de la zone [3,1 ppm – 4,7 ppm] du spectre RMN ¹ H (CD ₃ OD ; 400 MHz) du composé 5	84
Figure 35. Spectre HSQC ¹ H- ¹³ C (CD ₃ OD ; 400 MHz) du composé 5	85
Figure 36. Spectre HMBC ¹ H- ¹³ C (CD ₃ OD ; 400 MHz) du composé 5	86
Figure 37. Spectre RMN ¹³ C (Dept-90) (CD ₃ OD ; 400 MHz) du composé 5	86
Figure 38. Étalement de spectre NOESY ¹ H- ¹ H (CD ₃ OD ; 400 MHz) du composé 5	87
Figure 39. Structure du composé 5	87
Figure 40. Série spectrale UV du composé 6	90
Figure 41. Spectre RMN ¹ H (CD ₃ OD ; 400 MHz) du composé 6	91
Figure 42. Étalement de la zone [6,8 ppm – 8,1 ppm] du spectre RMN ¹ H (CD ₃ OD ; 400 MHz) du composé 6	92
Figure 43. Étalement de la zone [3,2 ppm – 4,7 ppm] du spectre RMN ¹ H (CD ₃ OD ; 400 MHz) du composé 6	92
Figure 44. Spectre HSQC ¹ H- ¹³ C (CD ₃ OD ; 400 MHz) du composé 6	93
Figure 45. Spectre HMBC ¹ H- ¹³ C (CD ₃ OD ; 400 MHz) du composé 6	94
Figure 46. Spectre RMN COSY ¹ H- ¹ H (CD ₃ OD ; 400 MHz) du composé 6	94
Figure 47. Spectre RMN NOESY ¹ H- ¹ H (CD ₃ OD ; 400 MHz) du composé 6	95
Figure 48. Spectre LC / MS du composé 6	95
Figure 49. Structure du composé 6	96
Figure 50. Série spectrale UV du composé 7	97
Figure 51. Spectre RMN ¹ H (CD ₃ OD ; 400 MHz) du composé 7	98
Figure 52. Étalement de la zone [6,7 ppm – 7,6 ppm] du spectre RMN ¹ H (CD ₃ OD ; 400 MHz) du composé 7	99
Figure 53. Étalement de la zone [3,0 ppm – 5,0 ppm] du spectre RMN ¹ H (CD ₃ OD ; 400 MHz) du composé 7	100
Figure 54. Spectre HSQC ¹ H- ¹³ C (CD ₃ OD ; 400 MHz) du composé 7	101
Figure 55. Spectre RMN COSY ¹ H- ¹ H (CD ₃ OD ; 400 MHz) du composé 7	101
Figure 56. Spectre RMN NOESY ¹ H- ¹ H (CD ₃ OD ; 400 MHz) du composé 7	102
Figure 57. Structure du composé 7	102
Figure 58. Profil chromatographique CCM du composé 8 dans deux systèmes	103
Figure 59. Spectre IR du composé 8	104
Figure 60. Série spectrale UV du composé 8	106
Figure 61. RMN ¹ H (CDCl ₃ ; 600 MHz) du composé 8	106

Figure 62. Étalement de la zone [6,9 ppm – 7,8 ppm] de spectre RMN ¹ H (CD ₃ OD ; 600 MHz) du composé 8	107
Figure 63. Étalement de la zone [3,2 ppm – 5,0 ppm] de spectre RMN ¹ H (CD ₃ OD ; 600 MHz) du composé 8	108
Figure 64. Étalement de spectre ROESY (CD ₃ OD ; 600 MHz) du composé 8	108
Figure 65. Étalement de spectre HMBC (CD ₃ OD ; 600 MHz) du composé 8	109
Figure 66. Étalement de spectre HMBC (CD ₃ OD ; 600 MHz) du composé 8	110
Figure 67. RMN ¹³ C (CD ₃ OD ; 600 MHz) du composé 8	110
Figure 68. Spectre LC / MS du composé 8	111
Figure 69. Structure du composé 8	112
Figure 70. Profil chromatographique CCM du composé 9 dans deux systèmes	113
Figure 71. Série spectrale UV du composé 9	115
Figure 72. Spectre RMN ¹ H (CD ₃ OD ; 400 MHz) du composé 9	115
Figure 73. Étalement de la zone [6,7 ppm–8,0 ppm] du spectre RMN ¹ H (CD ₃ OD ; 400 MHz) du composé 9	116
Figure 74. Étalement de la zone [2,4 ppm – 5,0 ppm] de spectre RMN ¹ H (CD ₃ OD ; 400 MHz) du composé 9	116
Figure 75. Structure du composé 9	117
Figure 76. Profil chromatographique CCM du produit 11 dans les deux systèmes	119
Figure 77. Série spectrale UV-visible du composé 11	121
Figure 78. Spectre RMN ¹ H (CD ₃ OD ; 400 MHz) du composé 11	121
Figure 79. Étalement de la zone [6,0 ppm – 7,62 ppm] de spectre RMN ¹ H (CD ₃ OD ; 400 MHz) du composé 11	122
Figure 80. Étalement de la zone [2,6 ppm – 5,0 ppm] de spectre RMN ¹ H (CD ₃ OD ; 400 MHz) du composé 11	123
Figure 81. Structure partielle du composé 11	123
Figure 82. Profil chromatographique CCM du composé 12	124
Figure 83. Série spectrale UV du composé 12	126
Figure 84. RMN ¹ H (Acétone; 600 MHz) du composé 12	126
Figure 85. Étalement de la zone [5,4 ppm – 8,0 ppm] de spectre RMN ¹ H (Acétone ; 600 MHz) du composé 12	127
Figure 86. Étalement de la zone [3,8 ppm – 5,4 ppm] de spectre RMN ¹ H (Acétone ; 600 MHz) du composé 12	128
Figure 87. Structure du composé 12	128
Figure 88. Profil chromatographique CCM du produit 13 dans deux systèmes	131
Figure 89. Série spectrale UV-visible du composé 13	132
Figure 90. Spectre RMN ¹ H (CD ₃ OD ; 400 MHz) du composé 13	133
Figure 91. Étalement de la zone [6,0 ppm – 8,0 ppm] de spectre RMN ¹ H (CD ₃ OD ; 400 MHz) du composé 13	134
Figure 92. Structure du composé 13	134

Chapitre IV : Fractionnement bioguidé

Figure 1. Les promastigotes de <i>Leishmania amazonensis</i>	144
---	-----

Figure 2. Purification de la fraction F5C par chromatron	145
Figure 3. Les epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	147
Figure 4. Les trophozoïtes d' <i>Acanthamoeba castellanii str. Neff</i>	149
Figure 5. Schéma d'extraction et de fractionnement bioguidé de l'extrait de chloroforme de la partie aérienne de <i>P. inuloides</i>	152
Figure 6. Profil chromatographique CCM du composé 1 , (hexane: AcOEt, 3: 7) Révélation sous UV et anisaldéhyde	153
Figure 7. Structure du composé 1	153
Figure 8. Préparation des dérivés 2 et 3 à partir du composé naturel 1	154
Figure 9. Profil chromatographique CCM du composé 2	155
Figure 10. RMN ¹ H (CD ₃ OD et CDCl ₃ ; 600 MHz) du composé 1 et 2	156
Figure 11. Étalement de la zone [6,9 ppm – 7,73 ppm] de spectre RMN ¹ H (CD ₃ OD ; 600 MHz) du composé 2	156
Figure 12. Étalement de la zone [2,3 ppm – 4,1 ppm] de spectre RMN ¹ H (CDCl ₃ ; 600 MHz) du composé 2	157
Figure 13. Etalement de Spectre HMBC (CDCl ₃ ; 600 MHz) du composé 2	158
Figure 14. Etalement de spectre HMBC (CDCl ₃ ; 600 MHz) du composé 2	158
Figure 15. Corrélations de spectre ROESY (CDCl ₃ ; 600 MHz) du composé 2	159
Figure 16. RMN ¹³ C (Dept-90, CD ₃ OD; 600 MHz) du composé 2	160
Figure 17. Structure du composé 2	160
Figure 18. Profil chromatographique CCM du composé 3	161
Figure 19. Profil chromatographique CCM des composés 2 et 3	161
Figure 20. RMN ¹ H (CDCl ₃ ; 600 MHz) des composé 2 et 3	162
Figure 21. Étalement de spectre RMN ¹ H (CDCl ₃ ; 600 MHz) des composé 2 et 3	162
Figure 22. Étalement de la zone [6,7 ppm – 7,8 ppm] de spectre RMN ¹ H (CDCl ₃ ; 600 MHz) du composé 3	163
Figure 23. Étalement de la zone [2,0 ppm – 4,4 ppm] de spectre RMN ¹ H (CDCl ₃ ; 600 MHz) du composé 3	164
Figure 24. Etalement de spectre HMBC (CDCl ₃ ; 600 MHz) du composé 3	165
Figure 25. Etalement de spectre HMBC (CDCl ₃ ; 600 MHz) du composé 3	165
Figure 26. Etalement de spectre HMBC (CDCl ₃ ; 600 MHz) du composé 3	166
Figure 27. Corrélations de spectre ROESY (CDCl ₃ ; 600 MHz) du composé 3	166
Figure 28. RMN ¹³ C (CD ₃ OD ; 600 MHz) du composé 3	167
Figure 29. Structure du composé 3	167
Figure 30. Profil chromatographique CCM du composé 14	170
Figure 31. RMN ¹ H (CDCl ₃ ; 600 MHz) du composé 14	170
Figure 32. Étalement de la zone [6,6 ppm – 8,2 ppm] de spectre RMN ¹ H (CDCl ₃ ; 600 MHz) du composé 14	171
Figure 33. Étalement de la zone [3,8 ppm – 7,8 ppm] de spectre RMN ¹ H (CDCl ₃ ; 600 MHz) du composé 14	172
Figure 34. Structure partielle du composé 14	172

Figure 35. Schéma d'extraction et purification de l'extrait de chloroforme de la partie aérienne de <i>C. albidus</i>	174
Figure 36. Profil chromatographique CCM du composé 15	175
Figure 37. Spectre IR du composé 15	176
Figure 38. Série spectrale UV du composé 15	178
Figure 39. RMN ¹ H (Acétone ; 600 MHz) du composé 15	178
Figure 40. Étalement de la zone [6,6 ppm – 7,8 ppm] de spectre RMN ¹ H (Acétone ; 600 MHz) du composé 15	179
Figure 41. Étalement de la zone [1,8 ppm – 4,4 ppm] de spectre RMN ¹ H (Acétone ; 600 MHz) du composé 15	180
Figure 42. Étalement de spectre ROESY (CD ₃ OD ; 600 MHz) du composé 15	181
Figure 43. Structure du composé 15	181
Figure 44. Schéma d'extraction et purification de produits de l'extrait d'acétate d'éthyle de la partie aérienne de <i>C. albidus</i>	183
Figure 45. Profil chromatographique CCM du composé 16	184
Figure 46. Spectre IR du composé 16	184
Figure 47. Série spectrale UV du composé 16	186
Figure 48. RMN ¹ H (CD ₃ OD; 600 MHz) du composé 16	187
Figure 49. Étalement de la zone [6,2 ppm – 7,8 ppm] de spectre RMN ¹ H (CD ₃ OD ; 600 MHz) du composé 16	188
Figure 50. RMN ¹³ C (CD ₃ OD ; 600 MHz) du composé 16	189
Figure 51. Structure du composé 16	189

Chapitre V : Les huiles essentielles

Figure 1. Montage d'hydrodistillation.....	195
Figure 2. Montage d'entraînement à la vapeur d'eau.....	196
Figure 3. Montage d'extraction par micro-onde.....	196
Figure 4. Montage d'expression à froid.....	197
Figure 5. Protocole d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau.....	198
Figure 6. Chromatogramme GC de l'huile essentielle de l'espèce du genre <i>C. albidus</i> analysé par GC/MS.....	199
Figure 7. Histogrammes représentent les teneurs en% de l'HE des trois échantillons.....	202

Chapitre VI : Etude analytique

Figure 1. Campus de Cronenbourg-Strasbourg/ France.....	211
Figure 2. Appareil ICP/AES.....	212
Figure 3. Appareil ICP/MS.....	213
Figure 4. Organigramme récapitulatif d'extraction des différentes espèces des Aurès.....	214
Figure 5. Préparation des échantillons à minéraliser.....	215
Figure 6. Préparation des échantillons à analyser par ICP/MS.....	217
Figure 7. Diagramme de concentrations en éléments majeurs dans les différents échantillons des espèces (mg/kg).....	219
Figure 8. Diagramme de concentrations en éléments mineurs (traces) dans les différents échantillons des espèces (mg/kg).....	219

Liste des tableaux

Chapitre II : Activités biologiques *in vitro*

Tableau 1. Résultats de l'extraction des différentes espèces	17
Tableau 2. Les différentes dilutions de la solution mère des différents extraits organiques de <i>P. inuloides</i>	23
Tableau 3. Les différentes dilutions de la solution mère des différents extraits organiques de <i>C. albidus</i>	23
Tableau 4. Résultats de la caractérisation de screening phytochimique des extraits de différentes espèces	26
Tableau 5. Comparaison entre les valeurs de CI ₅₀ (µg/ml et mg/ml) de différents espèces	27
Tableau 6. Comparaison entre les valeurs de CI ₅₀ (mg/ml et mg/ml) de différents espèces	27
Tableau 7. Activité antioxydant par β-carotène de différentes espèces	32
Tableau 8. Taux des polyphénols dans les différents extraits de différentes espèces (µgAGE/mg).....	36
Tableau 9. Taux des flavonoïdes dans les différents extraits de différentes espèces (en µgQE/mg).....	38
Tableau 10. Taux des flavonoïdes dans les différents extraits de différentes espèces (en µgRuE/mg)	38
Tableau 11. Taux des flavonols dans les différents extraits de différentes espèces (en µgQE/mg).....	40
Tableau 12. Taux des flavonols dans les différents extraits de différentes espèces (en µgRuE/mg)	41
Tableau 13. Zones d'inhibitions des différentes dilutions des extraits organiques de <i>P. inuloides</i>	42
Tableau 14. Zones d'inhibitions des différentes dilutions des extraits organiques de <i>C. albidus</i>	43

Chapitre III : Phytochimie

Tableau 1. Classification de l'espèce <i>Pulicaria inuloides</i> (Poir.) DC.	46
Tableau 2. Résultats de la séparation sur colonne de gel de silice du précipité obtenu a partir de l'extrait acétate d'éthyle	52
Tableau 3. Regroupement des fractions du précipité obtenu a partir de l'extrait acétate d'éthyle.....	52
Tableau 4. Résultats de la séparation par colonne de gel de silice du filtrat de l'extrait acétate d'éthyle de l'espèce <i>P. inuloides</i>	55
Tableau 5. Regroupement final des fractions du filtrat de l'extrait acétate d'éthyle	55
Tableau 6. Résultats de la séparation sur colonne de gel de silice de l'extrait chloroformique	58
Tableau 7. Regroupement final des fractions de l'extrait chloroforme de <i>P. inuloides</i>	58
Tableau 8. Classification de l'espèce <i>Cistus albidus</i> L.....	62

Tableau 9. Rendements d'extraction des extraits de l'espèce de <i>Cistus albidus</i> L.	65
Tableau 10. Résultats de la séparation sur colonne de gel de silice de l'extrait AcOEt de <i>C. albidus</i>	66
Tableau 11. Regroupement des fractions de l'extrait acétate d'éthyle de <i>C. albidus</i>	67
Tableau 12. Données spectroscopiques UV du composé 4	71
Tableau 13. Valeurs des déplacements chimiques δ et J (Hz) RMN ^1H et ^{13}C (CD_3OD) du composé 4	79
Tableau 14. Données de la série spectrale UV du composé 5	82
Tableau 15. Valeurs des déplacements chimiques δ et J (Hz) RMN ^1H et ^{13}C (CD_3OD) du composé 5	88
Tableau 16. Données spectroscopiques UV du composé 6	89
Tableau 17. Données spectroscopiques UV du composé 7	97
Tableau 18. Données spectroscopiques UV du composé 8	105
Tableau 19. Valeurs des déplacements chimiques δ et J (Hz) RMN ^1H et ^{13}C (CD_3OD) des composés 8	111
Tableau 20. Données spectroscopiques UV du composé 9	114
Tableau 21. Valeurs des déplacements chimiques δ et J (Hz) RMN ^1H et ^{13}C (CD_3OD) des composés 10	118
Tableau 22. Données de la série spectrale UV- visible du composé 11	120
Tableau 23. Données spectroscopiques UV du composé 12	125
Tableau 24. Liste des espèces et des familles contenant l'Isokaempferid	129
Tableau 25. Données de la série spectrale UV-visible du produit 13	132
Tableau 26. Liste des espèces par familles contenant le kaempferol	135

Chapitre IV : Fractionnement bioguidé

Tableau 1. Pourcentage de rendement et screening antiparasitaire des extraits de la partie aérienne de <i>P. inuloides</i> contre les différents parasites	143
Tableau 2. Résultats du fractionnement bioguidé de l'extrait chloroforme de la partie aérienne de <i>P. inuloides</i>	143
Tableau 3. Résultats du fractionnement bioguidé de la fraction F5	144
Tableau 4. Résultats du fractionnement de la fraction F5C	145
Tableau 5. Pourcentage de rendement et screening antiparasitaire des extraits de la partie aérienne de <i>C. albidus</i> contre les différents parasites	146
Tableau 6. Résultats du fractionnement bioguidé de l'extrait chloroforme de la partie aérienne de <i>C. albidus</i>	147
Tableau 7. Résultats du fractionnement bioguidé de la fraction F6	148
Tableau 8. Résultats du fractionnement bioguidé de la fraction F6,6	148
Tableau 9. Regroupement final des fractions de l'extrait acétate d'éthyle de la partie aérienne de <i>C. albidus</i>	149
Tableau 10. Résultats du screening antiparasitaire des fractions de l'extrait acétate d'éthyle de la partie aérienne de <i>C. albidus</i>	149
Tableau 11. Résultats du fractionnement bioguidé de la fraction F14	150
Tableau 12. Pourcentage de rendement et screening antiparasitaire des extraits de la partie aérienne de <i>P. inuloides</i> contre les différents parasites	151
Tableau 13. Valeurs des déplacements chimiques δ et J (Hz) RMN ^1H et ^{13}C (CD_3OD) des composés 1	154
Tableau 14. Activité leishmanienne et cytotoxicité <i>in vitro</i> des composés 1-3 , (IC_{50} et CC_{50} en mM)	168

Tableau 15. Valeurs des déplacements chimiques δ et J (Hz) RMN ^1H et ^{13}C (CD_3OD et CDCl_3) des composés 1-3	169
Tableau 16. Pourcentage de rendement et screening antiparasitaire des extraits de la partie aérienne de <i>C. albidus</i> contre les différents parasites	173
Tableau 17. Données spectroscopiques UV du composé 15	177
Tableau 18. Données spectroscopiques UV du composé 16	186
Tableau 19. Liste des espèces par familles contenant la Quercétine.....	190

Chapitre V : Les Huiles essentielles

Tableau 1. Résultats de l'extraction par entraînement à la vapeur d'eau des huiles essentielles de <i>P. inuloides</i> et <i>C. albidus</i>	198
Tableau 2. Composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes de <i>C. albidus</i>	199
Tableau 3. Composition chimique de l'HE de l'espèce <i>C. albidus</i> provenant de différents pays	201
Tableau 4. Les composés communs dans l'HE de l'espèce du genre <i>C. albidus</i> étudié en Algérie et en France	203
Tableau 5. Produits communs entre notre échantillon et deux espèces de <i>Cistus</i>	203
Tableau 6. Composition de l'huile essentielle des parties aériennes de <i>P. inuloides</i>	205
Tableau 7. Structure des composés identifiés dans l'huile essentielle de <i>P. inuloides</i>	206
Tableau 8. Composition chimique de l'HE des parties aériennes de la plante <i>P. inuloides</i> (Yemen).....	207
Tableau 9. Composition chimique des HE de quelques espèces de <i>Pulicaria</i>	209

Chapitre VI : Etude analytique

Tableau 1. Les différents extraits alcooliques des espèces des Aurès	214
Tableau 2. Teneur en eau de quatre espèces des Aurès	217
Tableau 3. Limites de détection (LOD) de quelques éléments analysés par ICP-MS (mg/Kg)	218

Abréviations et symboles

% : Pourcentage
°C : Température en degré Celsius
Abs : Absorption
AcOEt : Acétate d'éthyle
AG : Acide Gallique
AlCl₃ : Trichlorure d'Aluminium
BHA : Butyl hydroxyanizole
CC : Chromatographie sur colonne
CCM : Chromatographie sur couche mince
CDCl₃ : chloroforme deutérié
CHCl₃ : Chloroforme
CI₅₀ : Concentration inhibitrice à 50%
CMI : Concentration minimal inhibitrice
CCM : Chromatographie sur couche mince
d : Doublet
D : nombre de dilution
DMSO : Dimethyl sulfoxyde
DPPH : 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
Eq : Equivalent.
EtOH : Ethanol
FeCl₃ : Chlorure de fer
g : Gramme
GC/MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.
GN : Gélose nutritive
h : Heure
H₂O : Eau
H₂SO₄ : Acide sulférique
H₃BO₃ : Acide borique
HCl : Acide chlorhydrique
HE : huile essentielle
HMBC : Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC : Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz : Hertz
ICP-AES: Spectroscopie d'émission atomique à plasma à couplage inductif.
ICP-MS: Spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif.
IR : Indice de rétention.
J : Constante de couplage
l : Litre
m : masse
MeOH : Méthanol
mg : Milligramme
min : Minute.
ml : Millilitre
NaOAc : Acétate de sodium
NaOH : Hydroxyde de sodium
***n*-BuOH** : *n*-Butanol.
nm : Nanomètre
NOESY: Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
PI : Pourcentage d'inhibition

ppm : Partie par million
Rdt : Rendement.
R_f : Rapport frontal
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire.
ROESY: Rotating-frame Overhauser Spectroscopy.
Ru : Rutine.
s : Singulet
SI : Système d'élution I
SII : Système d'élution II
SM : Solution mère
t: Temps
TFC : Contenu des flavonoïdes totaux
TLC : Thin-layer chromatography
TPC : Contenu des polyphénols totaux
UV-Vis : Ultraviolet-Visible
V: Volume
δ_C : Déplacement chimique du carbone
δ_H : Déplacement chimique du proton
λ_{max} : Longueur d'onde
μg : Microgramme
μgQE/mg d'extrait : Microgramme d'équivalent quercétine par milligramme d'extrait.
μl : Microlitre

Introduction générale

Introduction générale

Depuis longtemps, l'homme a utilisé des remèdes traditionnels à base de plantes (tisanes, poudres et décoctions), pour se soigner. Les plantes médicinales représentent une des principales sources pour la découverte des médicaments. L'intérêt de l'étude et de l'utilisation des plantes médicinales a mené à la caractérisation et à l'identification de molécules majeures et à l'isolation de composés chimiques actifs d'une importance thérapeutique incontestable (Leduc et al., 2006).

Selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), près de 65 à 80% de la population mondiale, essentiellement dans les pays en développement, utilisent principalement des plantes médicinales traditionnelles pour leurs soins de santé primaires, en raison de la pauvreté et du manque d'accès à la médecine moderne. Malgré les progrès remarquables dans le domaine de la chimie organique au XXe siècle, plus de 25% des médicaments prescrits dans les pays développés tirent leurs actifs directement ou indirectement des plantes médicinales traditionnelles (Newman et al., 2000).

Avec le développement de la chimie et plus particulièrement les procédés de synthèse organique, la chimie des plantes a dans un premier temps marqué le pas, mais au cours de ces dernières années, les produits naturels ont connu un regain d'intérêt. On peut constater que l'industrie pharmaceutique, les médecins et les équipes de chercheurs se tournent à nouveau vers les ressources naturelles et les plantes médicinales (Meftah, 2003).

En Algérie et dans tous les pays du Maghreb, les plantes médicinales et aromatiques sont principalement utilisées par les personnes âgées qui utilisent encore des recettes de tisanes. Parmi les plantes médicinales utilisées en Algérie, on distingue les espèces naturelles très peu exigeantes et poussant dans des sols et des climats très divers, allant de la zone subhumide non loin de la côte méditerranéenne aux zones arides et semi-arides de l'extrême sud, au climat chaud (Reguieg, 2011).

En Algérie et dans le Maghreb Ishâ-Ben-Amran (Kairouan, Tunisie) a laissé divers traités sur la médecine et les drogues simples au 9^{ème} siècle. Abdallah-Ben-Lounès (Oran) a décrit l'utilisation de plusieurs plantes médicinales (Benhouhou, 2005). Pendant le colonialisme Français de 1830 à 1962, les botanistes ont réussi à cataloguer un grand nombre d'espèces comme médicinales et un livre sur les plantes médicinales et aromatiques d'Algérie a été

publié en 1942 par Fourment et Roques, ils ont mentionné 200 espèces décrites et étudiées dans le Nord d'Algérie et 6 espèces du Sahara (Hamdi-Pacha et al., 1993), parmi les plantes médicinales d'importance, les plantes de la famille des composées constituent la plus vaste subdivision du règne végétal (Hamdi-Pacha et al., 1993).

Dans ce contexte notre étude s'est intéressée au screening phytochimique et biologique de *Pulicaria inuloides* une plante saharienne appartenant à la famille des composées (Astéracées) et plusieurs espèces de la région des Aurès : *Cistus albidus* (Cistacées), *Juniperus oxycedrus*, *Juniperus phoenicea* (Cupressacées), *Marrubium vulgare*, *Marrubium deserti* de Noé (Lamiacées), *Cedrus atlantica* (Pinacées), *Echinops ritro* (Astéracées), *Peganum harmala* (Zygophyllacées), *Euphorbia helioscopia* (Euphorbiacées), *Daphne gnidium* (Thymeleacées), *Bunium incrassatum* (Apiacées) et *Calendula algeriensis* (Astéracées).

A la suite de ces screening, deux espèces ont été choisies pour une étude phytochimique approfondie, *Pulicaria inuloides* et *Cistus albidus*.

Notre travail sera organisé en six (06) chapitres :

- Le premier chapitre consistera en un rappel bibliographique sur les différentes espèces médicinales et aromatiques sélectionnées.
- Le deuxième chapitre présentera le screening phytochimique et biologiques des espèces sélectionnées dans le cadre de ce travail (activité antioxydante, antibactérienne, dosage de polyphénols, flavonoïdes et flavonols).
- le troisième chapitre sera consacré à l'étude phytochimique approfondie des deux espèces sélectionnées à l'issue du screening précédant : *Pulicaria inuloides* et *Cistus albidus*.
- Le quatrième chapitre concernera le fractionnement bioguidé de l'extraits chloroforme des parties aériennes de la plante saharienne *Pulicaria inuloides* vis-à-vis de *Leishmania amazonensis* et les extraits chloroforme et acétate d'éthyle des parties aériennes de *Cistus albidus* contre *Trypanosoma cruzi* et *Acanthamoeba castellanii*, respectivement.
- Le cinquième chapitre concernera l'étude de la composition chimique des huiles essentielles des parties aériennes de *Pulicaria inuloides* et *Cistus albidus*.

- Le sixième chapitre présentera la détermination des éléments inorganiques dans les différents extraits des espèces sélectionnées pour le screening phytochimique et biologique.

On terminera ce travail par une conclusion générale.

Chapitre I :

Rappels bibliographiques

I.1. Généralités sur la région de récoltes des plantes

I.1.1. Les Aurès

L'Aurès est une région montagneuse située à l'est Algérien (Figure 1). Cette région était connue dès l'antiquité sous le nom "Auriasus mons" signifiant «La montagne fauve» (Chaker, 1990).

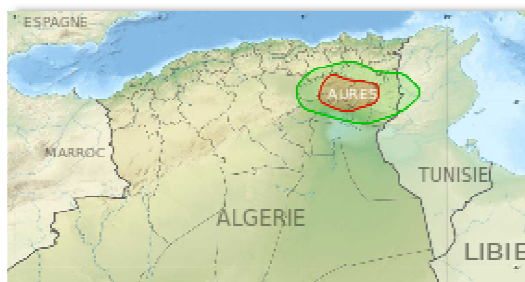


Figure 1. Localisation de la zone des Aurès en vert dans le nord-est Algérien (Berkane et Yehiaoui, 2007)

Les Aurès sont caractérisés par un climat varié, allant du semi- aride au nord à l'aride au sud, et du subhumide aux sommets au semi- aride dans les vallées (Berkane et Yehiaoui, 2007).

Les Aurès sont caractérisé par la présence d'une flore remarquable, composée de 447 espèces végétales dont 9 espèces sont endémiques, 18 espèces protégées, 14 espèces assez rares, 21 espèces rarissimes, 19 espèces rares, 62 plantes médicinales et 29 espèces fongiques (parc national de Belezma) (Beloula, 2008).

La région de Batna située au nord-est de l'Algérie, s'étend sur une superficie totale de 1201947 ha (Laamari, 2004), elle est limitée au nord par les Wilayas de Sétif et d'Oum-El-Bouaghi, à l'ouest par la Wilaya de Msila, à l'est par la Wilaya de Khenchela et au sud par la Wilaya de Biskra (Dekhinet et al., 2007).

La région de Khenchela, située également au nord-est de l'Algérie, occupe une superficie de 981100 ha, limitée à l'ouest par la forêt de Kimel et la forêt domaniale des Aurès, au nord par les plaines d'Oum- El- Bouaghi, à l'est par Tébessa et au sud par le Sahara (Laamari, 2004).

I.1.2. Le Sahara d'Algérie

Le Sahara septentrional (Figure 2), avec sa grande superficie, compte environ 500 espèces de plantes spontanées (Ozenda, 1991), dont une partie reste utiliser par la population comme plantes d'intérêt médicinale (Maiza et al., 1993).



Figure 2. Localisation de Sahara en jaune sur la carte de l'Algérie

I.1.2.a. Description de la région de Béchar

La zone de Béchar (Figure 3) est située dans le sud-ouest du territoire algérien; elle est délimitée à l'est par El Bayadh, à l'ouest par le Maroc, au nord par Naama et au sud par Tindouf et Adrar. La wilaya de Béchar est située à environ 1000 km au sud-ouest de la capitale Alger à la frontière entre l'Algérie et le Maroc. Cette région s'étend sur une superficie de 161 400 km², soit environ 6,77% du territoire national, la wilaya de Béchar occupe la 6^{ème} place des wilayas d'Algérie. Son climat est chaud et sec en été et très froid en hiver, les précipitations ne dépasse pas 100 mm par an. La population est estimée à plus de 251 657 habitants (statistiques de 2005).



Figure 3. Localisation de la zone Bechar en jaune sur la carte de l'Algérie

En général, le couvert végétal des zones Sahariennes et Aurésiennes est totalement dépendant de leurs biotopes caractérisés par la rudesse du climat pour les Aurès et un stress hydrique et oxydatif pour la région saharienne. Cette composante floristique est très caractéristique puisqu'elle arrive à survivre et à proliférer dans des conditions climatiques extrêmes. Cela se traduit quantitativement par le faible nombre d'espèces inventoriées et étudiées dans ce grand espace et qualitativement par leur richesse en métabolites secondaires.

Pour cela, un rappel bibliographique a été réalisé sur quelques espèces utilisées en phytothérapie traditionnelle par les populations locales et appartenant à différentes familles botaniques.

I.2. Espèces sélectionnées dans les Aurès

I.2. 1. *Juniperus phoenicea* L.

Le genre *Juniperus* appartient à la famille des Cupressacées et comprend 67 espèces et 37 variétés. C'est un petit arbre sauvage qui pousse autour de la Méditerranée et sur les îles Canaries (Adams, 2011). *Juniperus phoenicea* L. (*J. phoenicea*) (Figure 4) appelé également Zimba (en chaoui) est une espèce aromatique communément appelé «Arar Lahmar» en Algérie (Quezel et Medail, 2003). Cette plante a été utilisée dans la médecine populaire algérienne comme diurétique, stimulant et tonique stomachique (Ait Youssef, 2006). Une décoction de feuilles et/ou des fruits a été utilisée pour traiter la diarrhée, les rhumatismes et le diabète (Allali et al., 2008). Quelques travaux phytochimiques de *J. phoenicea* ont montré la présence des flavonoïdes (Nasri et al., 2011), phénylpropanoïdes (Comte et al., 1997) et les acides diterpéniques (Barrero et al., 2004).



Figure 4. La plante *Juniperus phoenicea* L.

I.2.2. *Juniperus oxycedrus* L.

Juniperus oxycedrus L. (*J. oxycedrus*) appelée également Tagga (en chaoui) (Figure 5) est un arbuste aromatique poussant à l'état sauvage dans les endroits pierreux de la Méditerranée et des pays du Proche-Orient (Montagne, 1999). Cette plante est utilisée en dermatologie humaine et vétérinaire pour traiter l'eczéma chronique et d'autres maladies de la peau (Bouhlal et al., 1988). Une autre utilisation de *J. oxycedrus* est la préparation de l'huile dite de cade, connue aussi sous le nom de «goudron de genévrier». Cette huile était utilisée en dermatologie pour traiter l'eczéma chronique et d'autres maladies de la peau tandis que l'huile rectifiée était utilisée comme composant de parfum dans les détergents, les savons, les crèmes et les lotions (Leung et Foster, 1996). *J. oxycedrus* a été utilisé aussi en médecine traditionnelle pour le traitement de diverses maladies, telles que l'hyperglycémie, la tuberculose, la bronchite et la pneumonie (Sanchez de Medina et al., 1994). Les feuilles et les tiges de *J. oxycedrus* réduisent la pression sanguine des rats normotendus, inhibe la réponse à l'histamine, à la sérotonine et à l'acétylcholine et présente une activité anti-inflammatoire significative (Moreno et al., 1998). Plusieurs extraits de feuilles, de résines, d'écorces et de fruits de *J. oxycedrus* inhibent la croissance de plusieurs micro-organismes (Karaman, 2003).

Quelques travaux phytochimiques antérieurs réalisés sur *J. oxycedrus* ont montré la présence des acides tel que: (l'acide shikimique, 4-O- β -d-glucopyranosylfêrulique et l'acide oleuropénique-8-O- β -d-glucopyranoside).



Figure 5. La plante *Juniperus oxycedrus* L.

I.2.3. *Marrubium vulgare* L.

Marrubium vulgare L. (*M. vulgare*) (Figure 6) est une espèce aromatique appartenant à la famille des Lamiacées. Communément appelé «White Horehound» et Tamarriout (en

chaoui), c'est une plante herbacée, vivace robuste, à tiges densément cotonneuses à fleur blanche. Plusieurs études ont rapporté que le traitement avec de faibles doses de *M. vulgare* a de nombreux effets bénéfiques tels que: l'effet antibactérien (Mubashir et al., 2008) et l'action antioxydante (Kadri et al., 2011 ; Pukalskas et al., 2012 ; Orhan et al., 2010). Il a également été prouvé que cette plante abaisse la tension artérielle chez le rat. Elle est utilisée dans la médecine traditionnelle marocaine pour son activité hypotensive (El-Bardai et al., 2004).

Quelques travaux phytochimiques antérieurs réalisés sur *M. vulgare* ont montré la présence des flavonoïdes (Nawal et Mohamed, 2013 ; Neamah et al., 2017), triterpénoïdes, acides phénoliques (Neamah et al., 2017), diterpènes (Marrubiin) et des phényéthanoïdes glycosides (samioside, marruboside et verbascoside) (Amri et al., 2017).



Figure 6. *Marrubium vulgare* L.

I.2.4. *Marrubium deserti* de Noé.

Marrubium deserti de Noé., (Figure 7) est une espèce aromatique algérienne. Elle a plusieurs applications en médecine traditionnelle. Les feuilles et les rameaux utilisés sous forme d'infusion permettent de traiter la toux, les dysménorrhées, les troubles digestifs, les parasitoses intestinales, la fièvre et les maladies respiratoires (Çalis et al., 1992). En usage externe, la plante est utilisée dans le traitement des réactions allergiques ainsi que pour soigner les piqûres de scorpion. Sur le plan chimique, de nombreuses espèces ont été étudiées et s'avèrent être riches en terpènes et plus particulièrement en diterpènes. On y trouve également un nombre important de flavonoïdes et de phenylpropanes (Takeda et al., 1992).

Quelques travaux phytochimiques antérieurs réalisés sur *M. deserti* ont montré la présence des terpénoïdes, diterpènes labdanique et des composés phénoliques (Zaabat et al., 2011).



Figure 7. *Marrubium deserti* de Noè.

I.2.5. *Cedrus atlantica* (Endl.) Manetti

Cedrus atlantica (Endl.) Manetti., (*C. atlantica*) (Figure 8) appelée également Idhguel (en chaoui) est une espèce aromatique appartenant à la famille des Pinacées. Cette espèce est uniquement distribuée au Maroc et en Algérie, elle possède un bois de grande qualité, utilisé dans la construction et l'artisanat. Cette espèce pousse principalement en Algérie dans les forêts domaniales de Tissemsilt, Beni-Oudjana, Belezma, Ouled Yacoub, Bainem et Tala Guilef (Boudarene, 1991 ; Boudarene et al., 2001 ; Canard et al., 1997).

Il a été montré aussi que l'huile essentielle de cette plante possède des propriétés anti-inflammatoires (Sugita et al., 2004), antifongiques (Bouchra et al., 2003) et antimicrobiennes (Hammer et al., 1999). Elle est également utile dans le traitement de la perte de cheveux dans une combinaison d'huiles en aromathérapie (Ormerod et al., 2000).

Quelques travaux phytochimiques antérieurs réalisés sur *C. atlantica* ont montré la présence des diterpenoides (Dakir et al., 2004), diterpènes abiétanes (Barrero et al., 2005), flavonoïdes (Flavonol O-acylé glycoside) (Belhadj et al., 2017).



Figure 8. La plante *Cedrus atlantica* (Endl.) Manetti.

I.2.6. *Echinops ritro* L.

Le genre *Echinops* appartient à la famille des Astéracées et comprend plus de 120 espèces distribuées dans l'Est et le Sud de l'Europe, en Afrique tropicale et en Afrique du Nord et en Asie (Tadesse et Abegaz, 1990 ; Shukla, 2003). *Echinops ritro* L. (*E. ritro*) (Figure 9) est une plante vivace de 2-4 dm, rameuse, quelquefois simple et monocéphale, blanche tomenteuse, non glanduleuse-feuilles fermes, embrassantes, vertes et glabres ou aranéeuses en dessus, très blanches-tomenteuses en dessous, pennatifides ou pennatipartites à lobes fortement épineux, poils basilaires de l'involucre égalant environ le quart de la longueur des folioles intérieures de ce dernier, celles-ci ciliées sur les bords, glabres du reste-akène à soies dépassant la cupule formée de poils soudés seulement à la base. Certaines espèces sont connues pour avoir une utilisation en médecine, elles sont utiles dans le traitement de la migraine, de la diarrhée, des douleurs cardiaques et le traitement des hémorroïdes (Dawit et Ahadu, 1993). Quelques travaux phytochimiques antérieurs réalisés sur *E. ritro* ont montré la présence des flavonoïdes (Chevrier, 1976 ; Sytar et al., 2015), thiophènes (Fokialakis et al., 2006), alcaloïdes (Shukla, 2003), sesquiterpènes (Ulubelen, 1991), acides gras (Chevrier et al., 1975) et des alcanes (Chevrier et Abdel Gawad, 1974).

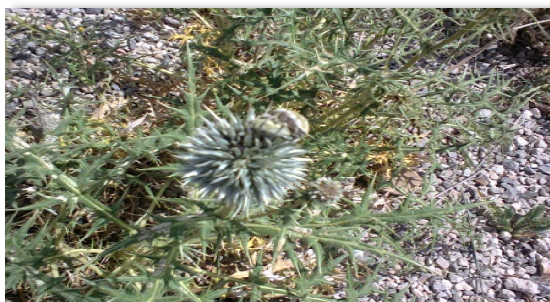


Figure 9. La plante *Echinops ritro* L.

I.2.7. *Peganum harmala* L.

Peganum harmala L. (*P. harmala*) (Figure 10) est une espèce aromatique de la famille des Zygophyllacées (Hilal et Young ken, 1983). Communément appelé «Harmal», elle pousse spontanément dans les régions semi-arides et pré-désertique, distribué en Afrique du Nord et au Moyen orient (El-Bahri et Chemli, 1991). En médecine traditionnelle marocaine par exemple, les graines de *P. harmalas* ont utilisées sous forme de poudre, décoction, macération ou infusion pour la fièvre, la diarrhée et les tumeurs sous-cutanées. Elle est largement utilisée comme remède contre les douleurs (douleurs rhumatismales, articulation douloureuse et

douleur intestinale) (Bellakhdar, 1997a). Elle est également utilisée pour le traitement de l'asthme, la jaunisse, les lumbagos et de nombreuses autres maladies (Dymock et al., 1976 ; Nadikarni, 1976). Quelques travaux phytochimiques antérieurs réalisés sur *P. harmala* ont montré la présence des alcaloïdes, composés stéroïdiens, acides gras, acides aminés et hydrates de carbone (Marwat et Rehman Fu, 2011), triterpénoïdes, glycoside phénolique (Wang et al., 2016) et des alcaloïdes indoliques (Wang et al., 2018).



Figure 10. La plante *Peganum harmala* L.

I.2.8. *Euphorbia helioscopia* L.

Le genre *Euphorbia* est le plus grand genre de la famille des Euphorbiacées avec plus de 2000 espèces et est subdivisé en plusieurs sous-genres et sections (Davis et al., 1988). Plusieurs espèces du genre *Euphorbia* ont été étudiées pour leurs effets antiviraux et anti tumoraux, selon les informations transmises par la tradition (Betancur-Galvis et al., 2002). Les feuilles de ce genre sont utilisées dans la médecine pour la bronchite et les rhumatismes (Chen et al., 1979). Les espèces d'*Euphorbia* ont été utilisées dans la médecine traditionnelle turque contre les rhumatismes, l'enflure et surtout comme dissolvant des verrues (Baytop, 1984). *Euphorbia helioscopia* L. (*E. helioscopia*) (Figure 11) appelée également Tafuri (en Tamazight) a été utilisée traditionnellement dans le traitement de plusieurs maladies et plusieurs chercheurs ont confirmé ses différentes activités pharmacologiques (Panda, 2004). *E. helioscopia* possède une activité antioxydante qui a été principalement démontrée par des études *in vitro* (Uzair et al., 2009 ; Ben Mohamed Maoulainine et al., 2012 ; Saleem et al., 2014). Quelques travaux phytochimiques antérieurs réalisés sur *E. helioscopia* ont montré la présence des terpénoïdes et des lactames (He et al., 2010 ; Mu et al., 2013), diterpènes ester (Barla et al., 2006), flavonoïdes, coumarines (scopoletine et isoscopectine), chalcones, diterpénoïdes (Geng et al., 2011).



Figure 11. La plante *Euphorbia helioscopia* L.

1.2.9. *Daphne gnidium* L.

Daphne gnidium L. (*D. gnidium*) appelé également Lezzaz (en Tamazight) appartient à la famille botanique des Thyméléacées. Elle est très fréquente autour du bassin méditerranéen. Au Maroc par exemple, les racines et les feuilles de cette plante sont traditionnellement utilisées pour éviter la chute des cheveux, comme purgatif, odontalgique, comme tonique capillaire et pour traiter la jaunisse et plusieurs tumeurs solides (Hmamouchi, 1999 ; Merzouki et al., 2000). Cependant, *D. gnidium* est considérée aussi comme dangereuse en raison de sa toxicité élevée. Elle provoque des maux de tête, frissons, pâleur, dilatation pupillaire, gonflement de la bouche et des lèvres, difficulté de déglutition, diarrhée et spasmes digestifs, convulsions, troubles pulmonaires et décès (Bellakhdar, 1997b ; Charnot, 1945). Quelques travaux phytochimiques antérieurs réalisés sur *D. gnidium* ont montré la présence des flavonoïdes, coumarine et des vitamines (Deiana et al., 2003 ; Cottiglia et al., 2001), composés phénoliques (Dif et al., 2014) et des triterpènes (Chaabane et al., 2013).



Figure 12. La plante *Daphne gnidium* L.

I.2.10. *Bunium incrassatum* L.

Bunium incrassatum L. (*B. incrassatum*) (Figure 13) est une espèce aromatique appartenant à la famille des Apiacées. Largement distribuée dans les parties de l'est de l'Algérie, elle est appelée « Talghouda ». Il s'agit d'une plante médicinale économiquement importante. Les racines de cette plante sont très nutritives et généralement consommée comme la pomme de terre (Quezel et Santa, 1963). Dans la pharmacopée traditionnelle, les tubercules séchés et en poudre sont considérées comme astringentes et antidiarrhéiques et se révèlent utiles contre les inflammations hémorroïdaires. En outre, cette plante est utilisée pour la bronchite et le traitement de la toux. De plus, il est bien documenté que les huiles essentielles et les extraits de certaines espèces de *Bunium spp* possèdent des effets antihistaminiques, antibactériens, antifongiques (Boskabady et Moghaddas, 2004) ainsi que des activités antioxydantes (Shahsavari et al., 2008). Quelques travaux phytochimiques réalisés sur *B. incrassatum* ont montré la présence des coumarines, stérols (β -sitostérol), acides oléiques et des sucres (Bousetla et al., 2011), quelques travaux ainsi ont montré la présence des coumarines (Appendino et al., 1994) et des sesquiterpènes (Appendino et al., 1991) dans l'espèce de *B. paucifolium*, d'autres travaux ont montré aussi la présence des monoterpénoïdes dans l'espèce de *B. persicum* (Salehi et al., 2008).



Figure 13. La plante *Bunium incrassatum* L.

I.2.11. *Calendula algeriensis* L.

Le genre *Calendula* appartient à la famille des Astéracées. Il est distribué dans la région méditerranéenne, au Maroc et en Espagne et en Iran, vers le sud jusqu'aux du Hoggar (Algérie) et au Yémen (Norlindh, 1946). Il est utilisé pour leurs effets anti-inflammatoires, antipyrétiques, antitumoraux et curatifs (Ukiya et al., 2006). *Calendula algeriensis* (*C. algeriensis*) (figure 14) est une plante herbacée annuelle, à fleurs jaunes ou jaune orangé, dont

la floraison débute aux premiers jours du printemps et peut durer presque toute l'année (Midhat et al., 2017).

Quelques travaux phytochimiques antérieurs réalisés sur le genre *Calendula* ont montré la présence des caroténoïdes, la lutéine, le lycopène, la rutine, l'ubiquinone et surtout la quercétine (Saini et al., 2012), protéines, acides aminés, sucres réducteurs, flavonoïdes, saponines, phénoliques, terpénoïdes, stéroïdes et glycosides (Lovecka et al., 2017), flavonoïdes (l'isorhamnétine et les dérivés de quercétine) (Olennikov et al., 2017), composés phénoliques et flavonoïdes (Butnariu et Coradini, 2012), acides phydroxybenzoïque, salicylique, vanillique, caféique, gallique (Gora et al., 1979 ; Gong et al., 2012), flavonoïdes (-O-glycosides) , acides amines, flavonoïdes acylsméthoxylés (Abasova et al., 1995), alcaloïdes, caroténoïdes, saponines et tanins (Duke, 1992), polysaccharides (Wagner et al., 1984), triterpénoïdes monoesters (Neukirch et al., 2004).



Figure 14. *Calendula algeriensis* L.

I.3. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté une recherche bibliographique concernant les différentes espèces étudiées dans le cadre de ce travail. Cette étude bibliographique a concerné essentiellement les espèces sélectionnées pour le screening phytochimique et biologique qui sera abordé dans le prochain chapitre. Il sera question d'évaluer la teneur en composés phénoliques et flavonoïdes totaux et de comparer leurs activités antioxydante et antibactérienne.

Les deux espèces *Pulicaria inuloides* et *Cistus albidus* ont été sélectionnées pour une étude phytochimique plus approfondies qui sera développée dans le chapitre III.

Chapitre II :
Activités biologiques *in*
vitro

II.1. Matériel végétal

II.1.1. Sites et périodes de récolte

La plante *Pulicaria inuloides* (Poir.) DC., a été récoltée au moment de la floraison en 2013 au barrage du Bechar « Djorf Ettorba » (80 km au sud-ouest de Béchar) (Figure 1) et a été identifié par Ben Abd El-Hakem Mohamed, directeur de l'agence nationale pour la conservation de la nature à Bechar en Algérie. Après le séchage dans un endroit sec à l'abri des rayons solaires, les parties aériennes (feuilles, tiges et fleurs, 1500 g) et les parties racines (200 g) ont été pulvérisées et pesées.



Figure 1. Site de prélèvement de *Pulicaria inuloides* (Poir.) DC.

La plante *Cistus albidus* L., a été récoltée dans la région des Aurès (les montagnes de Fountoub de Batna, nord-est de l'Algérie) (Figure 2) au mois de juin 2015. Les parties aériennes (feuilles et tiges) ont été séchées dans un endroit sec à l'abri des rayons solaires et de l'humidité puis bien pulvérisées et pesées (3500 g).



Figure 2. Site de prélèvement de *Cistus albidus* L.

Les espèces *Euphorbia helioscopia* L., *Peganum harmala* L., *Daphne gnidium* L., *Calendula algeriensis* L., *Bunium incrassatum* L., *Echinops ritro* L. et *Marrubium deserti* de Noè., ont été récoltées au printemps 2015 dans la région des Aurès (Ouled Fadhel-Touffana de Batna, nord-est de l'Algérie) (Figure 3). Après séchage dans un endroit sec à l'abri des rayons solaires et de l'humidité, les parties aériennes de ces plantes (feuilles, tiges et fleurs) ont été pulvérisées et pesées (30 et 70 g).



Figure 3. Site de prélèvement des différentes espèces de la région des Aurès

Les espèces *Juniperus oxycedrus* L., *Juniperus phoenicea* L., et *Marrubium vulgare* L., ont été récoltées en février 2015 dans la région des Aurès (Arris de Batna, nord-est de l'Algérie).

L'espèce *Cedrus atlantica* (Endl.) Manetti., a été récoltée au mois de juin 2015 dans la région des Aurès (Yabous de Khenchla, nord-est de l'Algérie).



II.2. Protocole d'extraction

Les parties aériennes des plantes ; *J. oxycedrus*, *J. phoenicea*, *M. vulgare*, *C. atlantica*, *C. algeriensis*, *E. helioscopia*, *P. harmala*, *D. gnidium*, *B. incrassatum*, *M. deserti* et *E. ritro* sont mises à macérer dans un mélange hydro alcoolique (éthanol : eau, 8 : 2, v : v) à température ambiante. Les extraits récupérés ont été concentrés sous pression réduite à une température modérée (37°C). La macération est répétée deux fois avec renouvellement du solvant. Les schémas suivants représentent le protocole d'extraction des différentes espèces.

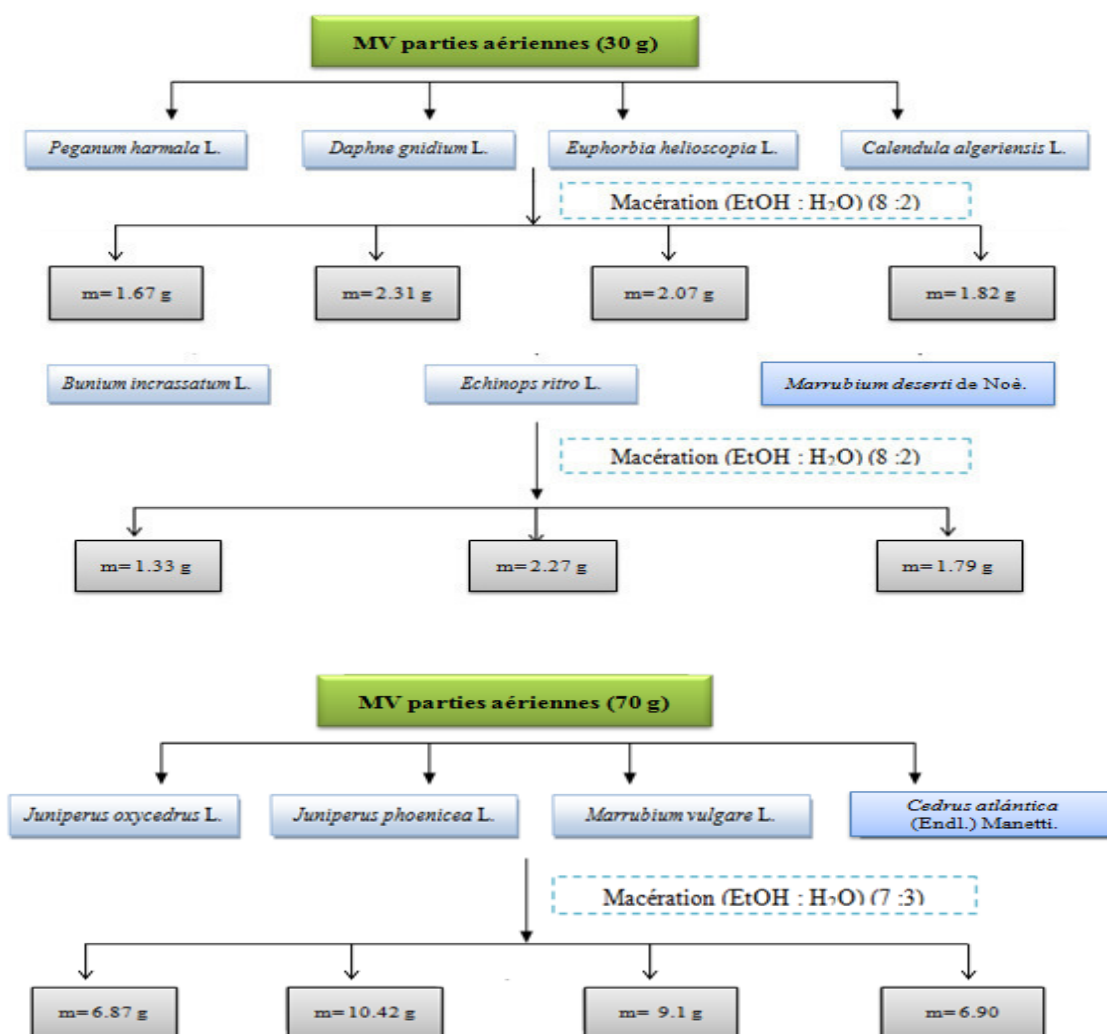


Figure 4. Organigramme récapitulatif des étapes d'extraction de différentes espèces

(Voire chapitre III pour les protocoles d'extraction des espèces *P. inuloides* et *C. albidus*)

Le tableau suivant montre les différents rendements d'extraction des différentes espèces

N°	Espèce	Rdt %	N°	Espèce	Rdt %
1	<i>Pulicaria inuloides</i> (Poir.) DC.	22,66	8	<i>Euphorbia helioscopia</i> L.	6,90
2	<i>Cistus albidus</i> L.	19,14	9	<i>Peganum harmala</i> L.	5,56
3	<i>Juniperus oxycedrus</i> L.	9,81	10	<i>Daphne gnidium</i> L.	7,70
4	<i>Juniperus phoenicea</i> L.	14,88	11	<i>Bunium incrassatum</i> L.	4,43
5	<i>Marrubium vulgare</i> L.	13,0	12	<i>Marrubium deserti</i> de Noè.	7,56
6	<i>Cedrus atlantica</i> (Endl.) Manetti.	9,85	13	<i>Echinops ritro</i> L.	5,96
7	<i>Calendula algeriensis</i> L.	6,06			

Tableau 1. Résultats de l'extraction des différentes espèces

Le rendement en pourcentage des différents extraits a été calculé sur la base du poids sec comme suit: Rendement (%) = $(W_1 \times 100) / W_2$ Où; W_1 = poids de l'extrait après évaporation du solvant; W_2 = Poids de la poudre broyée (plante sèche).

II.3. Screening phytochimique

Un screening phytochimique a été effectué sur les différents extraits organiques (chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol) des espèces *P. inuloides* et *C. albidus* ainsi que sur les différents extraits alcooliques bruts des parties aériennes des onze (11) plantes des régions des Aurès : *J. oxycedrus*, *J. phoenicea*, *M. vulgare*, *C. atlantica*, *C. algeriensis*, *E. helioscopia*, *P. harmala*, *D. gnidium*, *B. incrassatum*, *M. deserti* et *E. ritro*.

II.3.1. Mise en évidence des saponines

Quelques milligrammes d'extraits des différentes espèces ont été solubilisés dans de l'eau distillée dans des tubes à essai. Après agitation pendant quelques minutes. L'apparition de mousse persistante indique la présence de saponines (Adegoke et al., 2010).

II.3.2. Mise en évidence des flavonoïdes

Quelques milligrammes d'extraits des différentes espèces ont été solubilisés dans de l'eau distillée dans des tubes à essai. Après addition de HCl puis de quelques morceaux de magnésium, l'apparition d'une couleur rouge indique la présence de flavonoïdes (Shahid-Ud-Duaula et Anwarul, 2009).

II.3.3. Mise en évidence des tanins

Quelques milligrammes des extraits des différentes espèces ont été solubilisés dans des tubes contenant de l'eau distillée. Pour détecter la présence ou l'absence des tannins, le trichlorure de fer ($FeCl_3$, 1%) a été ajouté. L'apparition d'une couleur vert-bleu foncé indique la présence des tanins galliques et la couleur bleu-verdâtre indique la présence des tanins catéchiques (Boxi et al., 2010).

II.3.4. Mise en évidence des alcaloïdes

Quelques milligrammes des extraits des différentes espèces ont été mis en solution dans quelques millilitres d'acide sulfurique (10%) et laissés à macérer pendant 24 heures, après filtration, le réactif de Dragendorff a été ajouté. L'apparition d'un précipité orangé à rouge vermillon indique la présence d'alcaloïdes (Adegoke et al., 2010).

II.4. Evaluation de l'activité antioxydant

L'activité antioxydante a été effectuée en utilisant deux méthodes : celle du DPPH et celle du β -carotène, le dosage des polyphénols, flavonoïdes et flavonols a été effectué sur les différents extraits organiques (extraits bruts, chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol) des espèces *P. inuloides* et *C. albidus* ainsi que les différents extraits bruts des parties aériennes des onze (11) espèces de la région des Aurès : *J. oxycedrus*, *J. phoenicea*, *M. vulgare*, *C. atlantica*, *C. algeriensis*, *E. helioscopia*, *P. harmala*, *D. gnidium*, *B. incrassatum*, *M. deserti* et *E. ritro*.

II.4.1. DPPH radical scavenging

L'activité antioxydante des extraits des différentes espèces a été évaluée en utilisant la méthode du DPPH (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl). Tous les extraits ont été préparés dans le méthanol avec une concentration de 8 mg/ml. Ensuite, 30 μ l de chacun de ces solutions ont été ajoutés à 3 ml de la solution de DPPH (0,04 mg/ml). Après 30 min d'incubation dans une chambre noire à température ambiante, les absorbances des échantillons ont été mesurées avec un spectrophotomètre à 517 nm. Le pourcentage de piégeage du radical DPPH a été calculé en utilisant l'équation suivante :

$$\text{PI (\%)} = [(\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon}) / \text{Abs contrôle}] \times 100$$

L'expérience a été répétée deux fois et les résultats ont été exprimés en valeurs des IC₅₀ (concentration inhibitrice de 50% des radicaux DPPH). Elle a été calculée à partir du graphe de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'échantillon en utilisant Microsoft Excel (Ozturk et al., 2011 ; Koleva et al., 2002).

II.4.2. Test du blanchissement du β -carotène

Une solution de β -carotène/acide linoléique a été préparée par la solubilisation de 0,5 mg de β -carotène dans 2 ml de chloroforme et 25 μ l d'acide linoléique auxquelles 200 mg de Tween40 ont été additionnés. Le chloroforme est ensuite évaporé et 100 ml d'eau oxygénée ont été ajoutés avec une agitation vigoureuse jusqu'à la formation d'une émulsion. L'antioxydant standard (BHA) est utilisé comme contrôle positif. La décoloration du β -carotène est suivie à 490 nm à des intervalles de temps réguliers pendant 48 heures (Mahdavi et al., 2016 ; Wanasundara et al., 2005).

L'activité inhibitrice de la dégradation du β -carotène de tous les extraits a été calculée selon l'équation suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = [\text{Abs échantillon } t=48\text{h} / \text{Abs échantillon } t=0] \times 100$$

Ou :

Abs échantillon $t=48\text{h}$ est l'absorbance de l'émulsion contenant l'extrait après 48 heures.

Abs échantillon $t=0\text{h}$ est l'absorbance initiale de l'émulsion contenant l'extrait.

II.4.3. Dosage des polyphénols

La teneur totale en polyphénols a été déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu. 0,5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu (1N) ont été mélangés avec 0,25 ml de chaque extrait préparé dans l'eau distillé avec une concentration de (1 mg/ml), après 4 min à température ambiante et à l'obscurité, 2,5 ml de carbonate de sodium (20%) ont été ajoutés. Après 2 heures d'incubation à température ambiante, l'absorbance des échantillons et de la solution étalon ont été mesurés à 760 nm avec un spectrophotomètre. Des concentrations croissantes d'acide gallique (7,81-250 μ g/ml) ont été utilisées pour obtenir une courbe standard. Les résultats sont exprimés en microgrammes d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait (μ gAGE/mg) (Singleton et al., 1999 ; Oyaizu et al., 1986).

II.4.4. Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes a été déterminée par la méthode du trichlorure d'aluminium en utilisant la rutine et la quercétine comme composés de référence (Ordonez et al., 2006), cette méthode est basée sur la formation d'un complexe flavonoïde-aluminium qui a un maximum

d'absorption à 420 nm. Tous les extraits organiques des différentes espèces ont été préparés dans des solutions méthanoliques avec une concentration de 1 mg/ml. Ensuite, 1 ml de chaque solution a été mélangé avec 1 ml d'une solution aqueuse de trichlorure d'aluminium (2%). L'absorption a été mesurée à 420 nm après 1 heure de temps. Toutes les déterminations ont été réalisées en double. L'absorption de la solution méthanolique des standards (rutine et quercétine) (7,81-250 µg/ml) a été mesurée dans les mêmes conditions et les résultats ont été exprimés en microgrammes d'équivalents de rutine/ou quercétine d'extrait (µgRuE/mg et µgQE/mg).

II.4.5. Dosage des flavonols

La teneur en flavonols a été déterminée par la méthode du trichlorure d'aluminium en utilisant la rutine et la quercétine comme composés de référence. Cette méthode repose également sur la formation de complexe avec une absorption maximale à 415 nm (Kumaran et al., 2006 ; Moossavi et al., 2016). 0,5 ml de chacune des solutions méthanoliques des extraits organiques des différentes espèces (1 mg/ml) ont été mélangés avec 0,5 ml de trichlorure d'aluminium (2%) et 1,5 ml d'acétate de sodium (50 mg/ml). L'absorbance a été lue après 2,5h à 415 nm. Toutes les déterminations ont été réalisées en double. L'absorption de la solution de standard rutine/ou quercétine (7,81-500 µg/ml) dans le méthanol a été mesurée dans les mêmes conditions. Les résultats ont été exprimés en µgRuE/mg et µgQE/mg d'extrait.

II.5. Évaluation de l'activité antibactérienne

L'étude de l'activité antibactérienne des trois (03) extraits : chloroformique, acétate d'éthyle et *n*-butanolique des espèces *P. inuloides* et *C. albidus* a été effectuée au laboratoire de bactériologie au niveau du Centre Hospitalier Universitaire, CHU Ben Badis de Constantine.

II.5.1. Matériels bactériologiques utilisés

Les souches bactériennes utilisées sont les suivantes :

- *Pseudomonas aeruginosa*.
- *Staphylococcus aureus*.

- *Escherichia coli*.

Les milieux de culture utilisés sont les suivants :

- Gélose de Chapman: pour la souche de *Staphylococcus aureus*.
- Gélose Hektoen: pour la souche d'*Escherichia coli*.
- Gélose nutritive : pour la souche de *Pseudomonas aeruginosa*.
- Gélose Mueller-Hinton (MH) : pour tester l'effet des extraits testés sur les souches étudiées.
- L'eau distillée stérile: pour faire le test de l'antibiogramme.

II.5.2. Revivification des souches

On a réalisé des repiquages dans des milieux solides sélectifs dont le but est l'obtention des souches jeunes.

II.5.3. Identification biochimique

Les souches testées sont des souches identifiées au niveau du Centre Hospitalier Universitaire de Constantine (CHU).

II.5.4. La méthode de l'antibiogramme par diffusion sur milieu gélosé (Méthode des disques)

Cette étude a été réalisée en suivant la méthode de l'antibiogramme par diffusion sur milieu gélosé (Méthode des disques). L'antibiogramme est un examen de laboratoire permettant d'apprécier la sensibilité d'une bactérie prélevée chez un malade vis-à-vis de divers antibiotiques (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2012 ; Dabena, 1997).

Cette méthode diffère selon que la bactérie soit exigeante ou non. Dans notre étude les souches bactériennes utilisées sont des bactéries non exigeantes c'est à dire qu'elles se cultivent facilement dans les milieux de base.

II.5.5. Préparation des dilutions

La solution mère a été préparée par la solubilisation de 60 mg de chaque extrait dans 9 ml d'eau ultra pure et 1 ml de diméthylsulfoxyde (DMSO) (Rukayadi et al., 2008 ; Carbonelle et al., 1987). A partir de cette solution on a préparé plusieurs dilutions :

Concentration initiale (µg/ml)	Volume de la SM (ml)	Volume de l'eau ultra pure (ml)	Concentration finale (µg/ml)
6000	6,4	3,6	3840 (D1)
3840	2	2	1920 (D2)
	1	3	960 (D3)

Tableau 2. Les différentes dilutions de la solution mère des différents extraits organiques de *P. inuloides*

Concentration initiale (µg/ml)	Volume de la SM (ml)	Volume de l'eau ultra pure (ml)	Concentration finale (µg/ml)
6000	6,4	3,6	3840 (D1)
3840	2	2	1920 (D2)
	1	3	960 (D3)
	0,5	3,5	750 (D4)

Tableau 3. Les différentes dilutions de la solution mère des différents extraits organiques de *C. albidus*

II.5.6. Milieu

Le milieu standard utilisé est le Mueller-Hinton. L'épaisseur de la gélose doit être strictement de 4 mm répartie uniformément.

Les boîtes sont pré-séchées avant l'emploi (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2012 ; Minor et Veron 1989).

II.5.7. Préparation des disques

On utilise dans cette méthode, le papier Whatman N°3 découpé sous forme de disques circulaires d'environ 6 mm, afin d'obtenir une zone d'inhibition facile à mesurer. On place les

disques dans un tube à essai stérile (20 min à 120°C) dans une autoclave) (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2012 ; Minor, 1989).

II.5.8. Préparation de l'inoculum

On a raclé trois colonies bien isolées et parfaitement identiques dans l'eau physiologique. L'ensemencement a été fait après les 24 heures qui suivent la préparation de l'inoculum (Ericsson et al., 1971).

II.5.9. Ensemencement

- On trempe un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- On l'essore en le pressant sur la paroi interne du tube, afin de décharger au maximum.
- On frotte l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée sèche, de haut en bas, en stries serrées.
- Dans le cas où on ensemence plusieurs boîtes de pétri, on recharge l'écouvillon à chaque fois.
- Application immédiate des disques (contiennent 20 µl de chaque dilution de l'extrait à étudier (Ericsson et al., 1971).
- On place aussi à chaque fois un disque d'un antibiotique selon le type des bactéries (les bactéries utilisées sont de gram (+) pour faire la comparaison. On a utilisé les antibiotiques suivants : céphazoline pour *Escherichia coli*, ceftazidime pour *Pseudomonas aeruginosa* et vancomycine pour *Staphylococcus aureus*.

II.5.10. Pré-incubation

Les boîtes ont été laissées pendant 15 min à température ambiante (Ericsson et al., 1971).

II.5.11. Incubation

L'incubation a été effectuée à l'étuve pendant 24 heures à 37°C (Ericsson et al., 1971).

II.5.12. La lecture

Pour chaque disque, on mesure le diamètre de la zone d'inhibition à l'aide d'une règle. Les diamètres mesurés ont été comparés aux diagrammes de référence.

II.6. Résultats et discussion

Les résultats obtenus (Tableau 1) nous ont permis de classer toutes les espèces en fonction de leurs rendements comme suit : *P. inuloides* > *C. albidus* > *J. phoenicea* > *M. vulgare* > *C. atlantica* > *J. oxycedrus* > *D. gnidium* > *M. deserti* > *E. helioscopia* > *C. algeriensis* > *E. ritro* > *P. harmala* > *B. incrassatum*.

Les résultats ont montré que les rendements d'extraction les plus élevés ont été obtenu avec *P. inuloides* et *C. albidus* suivis par *J. phoenicea* et *M. vulgare* (22,66 > 19,14 > 14,88 > 13,0 %, respectivement).

II.6.1. Screening phytochimique

Les résultats obtenus (Tableau 4) ont montré que les saponines étaient présentes en quantité importante dans les extraits *n*-butanolique de *C. albidus*, AcOEt de *P. inuloides* et les extraits bruts de : *J. phoenicea*, *M. vulgare* et *C. atlantica*, alors que dans les extraits bruts d'*E. helioscopia*, *D. gnidium*, *B. incrassatum*, *E. ritro* et *M. deserti* et les extraits CHCl₃ et AcOEt de *C. albidus* les saponines ont été totalement absentes.

Les flavonoïdes sont abondants dans les extraits organiques AcOEt et *n*-BuOH de *P. inuloides* et *C. albidus* et dans l'extrait brut d'*E. helioscopia*.

Les extraits bruts de : *D. gnidium*, *C. algeriensis*, *M. deserti*, *E. ritro* et les extraits AcOEt et *n*-BuOH) de *P. inuloides* sont riches en tanins catéchiques, alors que les extraits AcOEt et *n*-BuOH de *C. albidus* et les extraits bruts d'*E. helioscopia* et *B. incrassatum* se caractérisent par leurs richesse en tanins galliques.

L'extrait *n*-BuOH de *C. albidus* et les extraits bruts de ; *J. oxycedrus*, *J. phoenicea*, *M. vulgare*, *C. atlantica*, *D. gnidium* et *P. harmala* sont fortement riches en alcaloïdes.

Les résultats de screening phytochimique des extraits de différentes espèces sont montré dans le tableau suivant ;

Plante	Extrait	Saponines	Flavonoïdes	Tanins galliques	Tanins catéchiques	Alcaloïdes
<i>P. inuloides</i> P. aériennes	CHCl ₃	/	/	/	/	/
	AcOEt	+++	+++	-	+++	+
	<i>n</i> -BuOH	-	+++	-	+++	-
<i>C. albidus</i> P. aériennes	CHCl ₃	-	-	-	+	+
	AcOEt	-	++	+++	-	+
	<i>n</i> -BuOH	+++	++	+++	-	+++
<i>J. oxycedrus</i>	EtOH-H ₂ O	++	++	+	+	+++
<i>J. phoenicea</i>	EtOH-H ₂ O	+++	++	+	+	+++
<i>M. vulgare</i>	EtOH-H ₂ O	+++	+	+	++	+++
<i>C. atlantica</i>	EtOH-H ₂ O	++	+	+	+	+++
<i>E. helioscopia</i>	EtOH-H ₂ O	-	+++	+++	-	+
<i>D. gnidium</i>	EtOH-H ₂ O	-	-	-	+++	+++
<i>C. algeriensis</i>	EtOH-H ₂ O	+	-	-	+++	++
<i>P. harmala</i>	EtOH-H ₂ O	+	-	-	++	+++
<i>B. incrassatum</i>	EtOH-H ₂ O	-	-	+++	-	+
<i>E. ritro</i>	EtOH-H ₂ O	-	-	-	+++	++
<i>M. deserti</i>	EtOH-H ₂ O	-	-	-	++	+
<i>P. inuloides</i> P. racines	CHCl ₃	/	/	/	/	/
	AcOEt	+	+	-	+++	+
	<i>n</i> -BuOH	-	+++	+++	-	-

Tableau 4. Résultats de la caractérisation de screening phytochimique des extraits de différentes espèces

+++ : Très abondants ++ : Moyennement abondants + : Abondants - : Négatifs

II.6.2. Evaluation de l'activité antioxydante

II.6.2.1. DPPH radical scavenging

L'activité antioxydante de tous les extraits étudiés a été exprimée en valeurs CI₅₀ (une valeur faible de CI₅₀ indique une forte capacité de l'extrait, tandis qu'une valeur élevée indique une faible activité de l'extrait). Pour chaque extrait la CI₅₀ a été déduite de la courbe d'étalonnage correspondante.

Plante	Extrait	IC ₅₀ (µg/ml)	Standards	IC ₅₀ (µg/ml)
<i>P. inuloides</i> <i>P. aériennes</i>	CHCl ₃	71,64±11,65	BHA	8,25±0,55
	AcOEt	14,41±4,16	Acide ascorbique	3,09±0,73
	<i>n</i> -BuOH	20,67±3,22	Rutine	8,52±1,84
	Extrait brut	30,58±10,38	Quercétine	3,45±0,26
<i>P. inuloides</i> <i>P. racines</i>	CHCl ₃	12,85±0,31	Acide ascorbique	1,30±0,13
	AcOEt	4,08±0,41		
	<i>n</i> -BuOH	8,76±0,002		
	Extrait brut	40,72±9,72		
<i>J. oxycedrus</i>	EtOH-H ₂ O	481,39±132,07	BHA Rutine	1,87 1,38
<i>J. phoenicea</i>	EtOH-H ₂ O	403,89± 30,87		
<i>M. vulgare</i>	EtOH-H ₂ O	20,37±2,18		
<i>C. atlantica</i>	EtOH-H ₂ O	8,92± 0,35		

Tableau 5. Comparaison entre les valeurs de CI₅₀ (µg/ml) des différentes espèces

Plante	Extrait	IC ₅₀ (mg/ml)	Standards	IC ₅₀ (mg/ml)
<i>C. albidus</i> <i>P. aériennes</i>	CHCl ₃	1,369±0,378	Acide ascorbique	0,142±0,019
	AcOEt	0,445±0,112		
	<i>n</i> -BuOH	0,461±0,055		
<i>E. helioscopia</i>	EtOH-H ₂ O	0,109±0,083	Rutine	0,542±0,248
<i>D. gnidium</i>	EtOH-H ₂ O	1,969± 0,463		
<i>C. algeriensis</i>	EtOH-H ₂ O	8,807±0,386		
<i>P. harmala</i>	EtOH-H ₂ O	39,211±12,956		
<i>B. incrassatum</i>	EtOH-H ₂ O	0,193±0,120		
<i>E. ritro</i>	EtOH-H ₂ O	0,130±0,100		
<i>M. deserti</i>	EtOH-H ₂ O	0,153±0,070		

Tableau 6. Comparaison entre les valeurs de CI₅₀ (mg/ml) des différentes espèces

En comparant les valeurs de CI₅₀ des différentes espèces qui sont représentées dans le tableau 5, on constate que l'extrait brut de l'espèce *C. atlantica*, a montré pouvoir antioxydant puissant (CI₅₀= 8,92± 0,35 µg/ml), suivi respectivement par les extraits bruts des espèces ; *M. vulgare*, *P. inuloides*, *J. phoenicea* et *J. oxycedrus* (20,37±2,18 ; 30,58±10,38 ; 40,72±9,72 ; 403,89± 30,87 et 481,39±132,07 µg/ml). Ces résultats nous ont permis de classer ces espèces en fonction de leurs activité antioxydante comme suit : *C. atlantica* > *P. inuloides* > *J. phoenicea* > *J. oxycedrus*.

En comparant les valeurs de CI_{50} des différentes espèces de tableau 6, on constate que l'extrait brut de l'espèce *E. helioscopia* est doté d'un pouvoir antioxydant puissant ($CI_{50}=0,10\pm0,08$ mg/ml), suivi respectivement par les extraits bruts des espèces ; *E. ritro*, *M. deserti*, *B. incrassatum*, *D. gnidium*, *C. algeriensis* et *P. harmala* ($0,13\pm0,1$; $0,15\pm0,07$; $0,19\pm0,12$; $1,969\pm0,46$; $8,807\pm0,38$ et $39,211\pm12,95$ mg/ml). Ces résultats nous ont permis de classer ces espèces comme suit : *E. helioscopia* > *E. ritro* > *M. deserti* > *B. incrassatum* > *D. gnidium* > *C. algeriensis* > *P. harmala*.

Par comparaison des extraits des parties aériennes de *P. inuloides* avec les standards antioxydants utilisés (Tableau 5), l'extrait AcOEt représente l'extrait le plus actif avec une $IC_{50}=14,41\pm4,16$ μ g/ml suivi respectivement par les extraits butanolique et chloroformique ($IC_{50}=20,67\pm3,22$ et $71,64\pm11,65$ μ g/ml). L'extrait AcOEt des parties racines de *P. inuloides* (Tableau 5) représente l'extrait le plus actif avec une $IC_{50}=4,08\pm0,41$ μ g/ml suivi respectivement par les extraits butanolique et chloroformique ($IC_{50}=8,76\pm0,002$ et $12,85\pm0,31$ μ g/ml). Par comparaison des extraits des parties aériennes de *C. albidus* avec le standard utilisé (Tableau 6), l'extrait AcOEt a montré une activité puissante (CI_{50} de $0,44\pm0,11$ mg/ml) suivi respectivement par l'extrait butanolique et chloroformique ($CI_{50}=0,46\pm0,05$ et $1,369\pm0,378$ mg/ml).

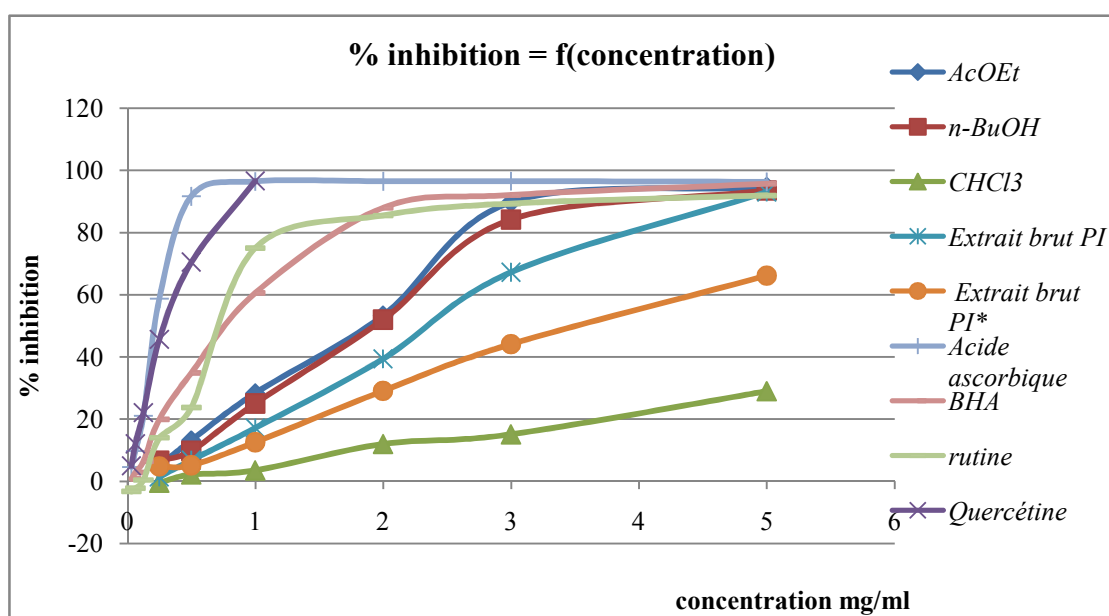


Figure 5. Activité antioxydant par DPPH des différents extraits organiques des parties aériennes de *P. inuloides* (PI ; *P. inuloides*, parties aériennes, PI* ; parties racines)

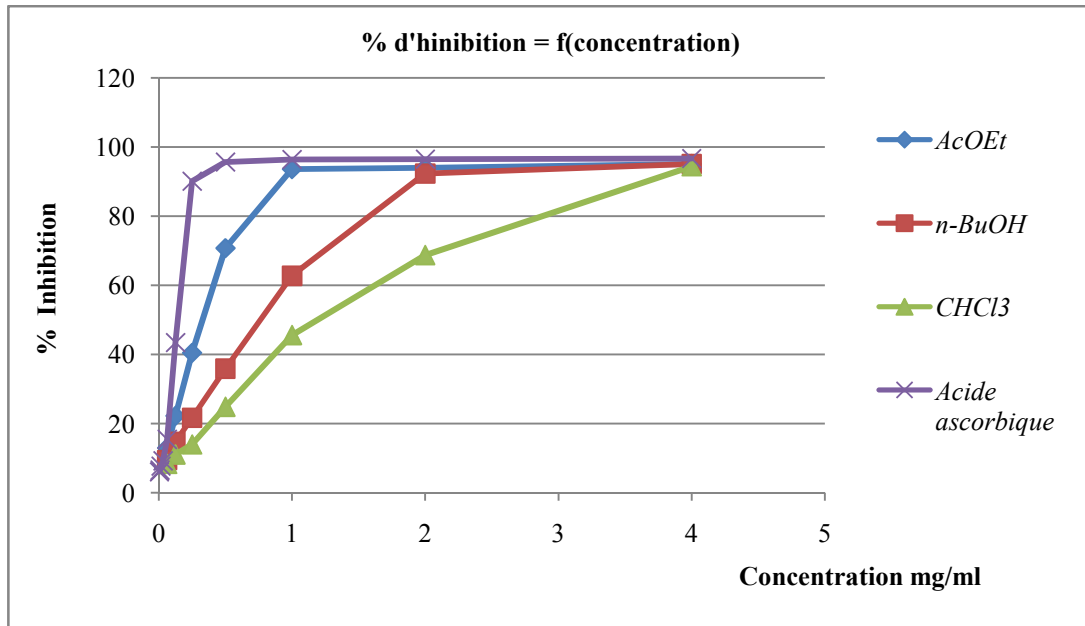


Figure 6. Activité antioxydant par DPPH des différents extraits organiques des parties racines de *P. inuloides*

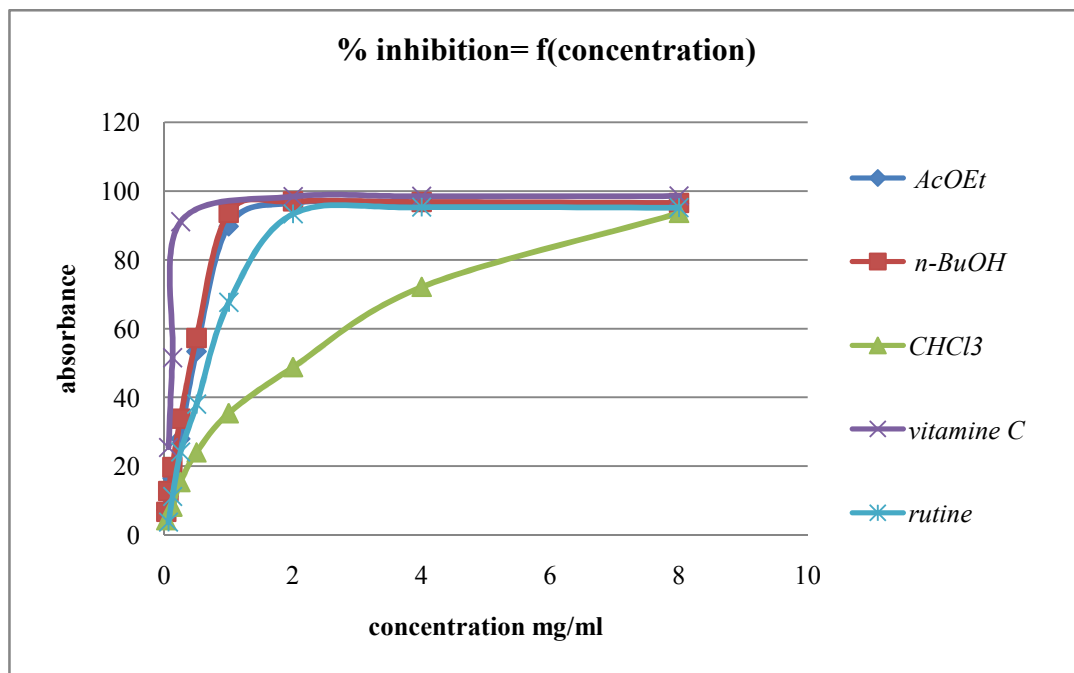


Figure 7. Activité antioxydant par DPPH des différents extraits organiques des parties aériennes de *C. albidus*

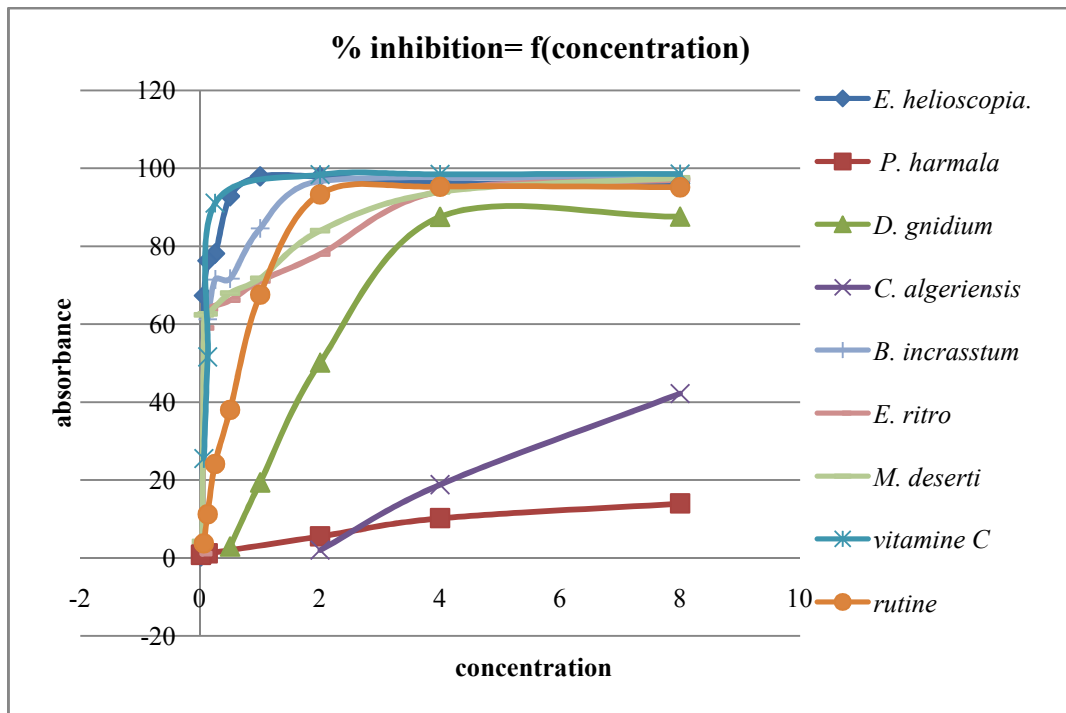


Figure 8. Activité antioxydant par DPPH des extraits bruts des différentes espèces de la région des Aurès

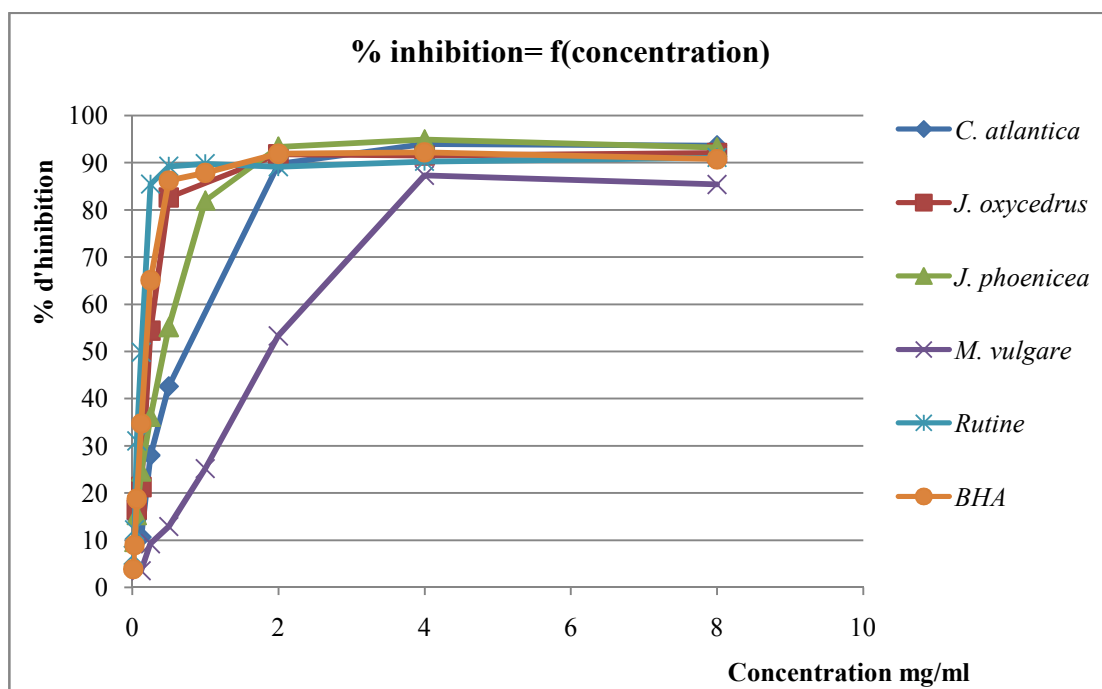


Figure 9. Activité antioxydant par DPPH des extraits bruts de différentes espèces de la région des Aurès

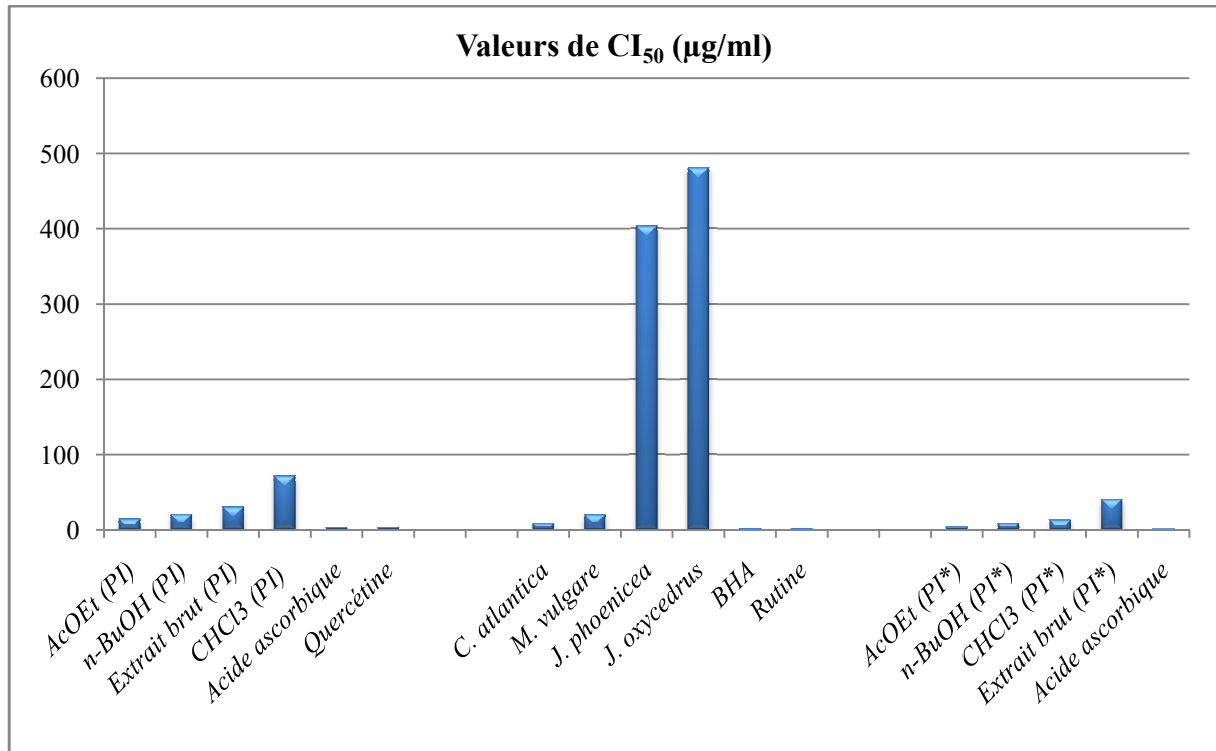


Figure 10. Comparaison entre les valeurs de CI₅₀ (µg/ml) des extraits de *P. inuloides* et les espèces des Aurès (PI ; *P. inuloides*, parties aériennes, PI* ; parties racines)

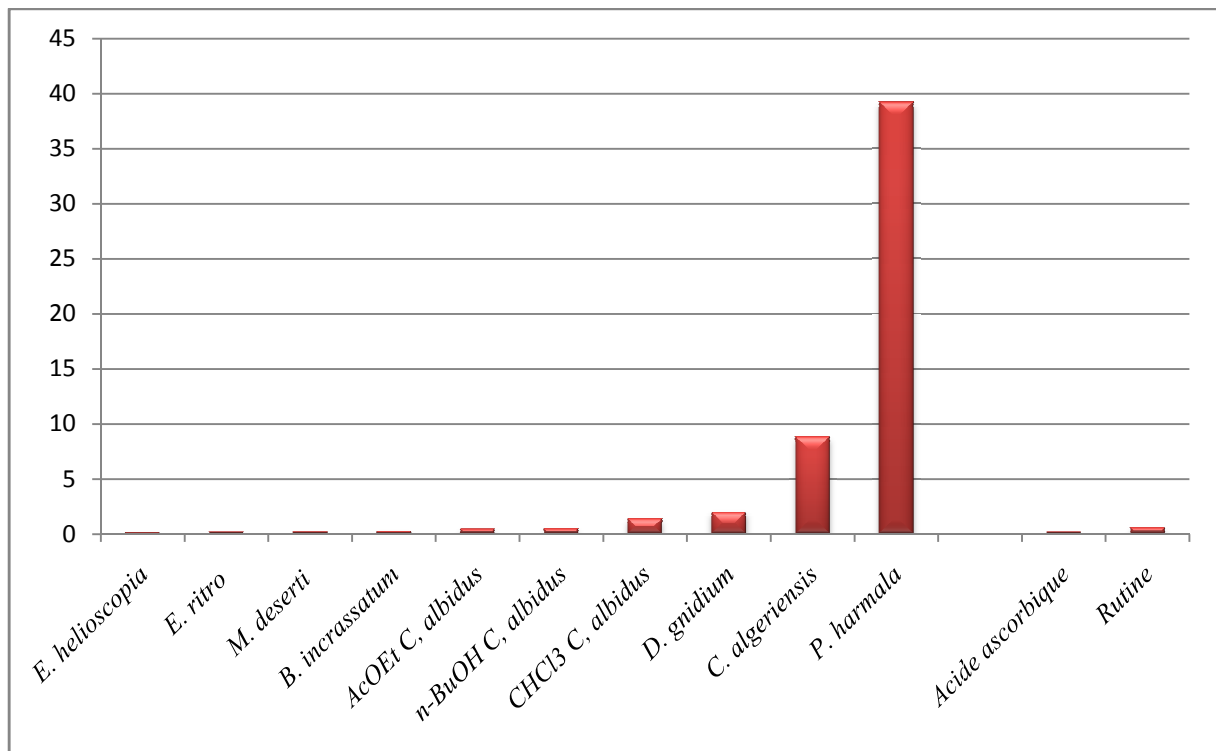


Figure 11. Comparaison entre les valeurs de CI₅₀ (mg/ml) des extraits de *C. albidus* et les espèces des Aurès

II.6.2.2. Test du blanchissement du β -carotène

Dans ce test, la capacité antioxydant des différents extraits végétaux est déterminée par la mesure de l'inhibition des composés organiques, cette méthode est employée couramment parce que le β -carotène montre une activité biologique forte et est un composé physiologique important.

La cinétique de blanchiment du β -carotène en présence et en absence des différents extraits des différentes espèces sont représentés dans les tableaux et les figures suivantes ;

Plante	Extrait	Activité antioxydant (%)	Standard	Activité antioxydant (%)
<i>P. inuloides</i>	CHCl ₃	80,18 ± 16,09	BHA	92,28±2,46
	AcOEt	84,13±13,2		
	<i>n</i> -BuOH	83,01±11,85		
	Extrait brut	82,4±14,31		
	Extrait brut des racines	82,01±8,96		
<i>C. albidus</i> <i>P. aériennes</i>	CHCl ₃	43,57±32,83		
	AcOEt	71,57±14,08		
	<i>n</i> -BuOH	46,28±4,21		
<i>E. helioscopia</i>	EtOH-H ₂ O	94,77±10,43		
<i>D. gnidium</i>	EtOH-H ₂ O	82,80±0,64		
<i>C. algeriensis</i>	EtOH-H ₂ O	86,62±4,68		
<i>P. harmala</i>	EtOH-H ₂ O	91,14±0,98		
<i>B. incrassatum</i>	EtOH-H ₂ O	79,52±1,78		
<i>E. ritro</i>	EtOH-H ₂ O	74,71±7,49		
<i>M. deserti</i>	EtOH-H ₂ O	60,31±18,26		

Tableau 7. Activité antioxydant par β -carotène de différentes espèces

Les résultats de tableau 7 ont montré que l'activité antioxydante la plus élevée a été donnée par l'extrait brut d'*E. helioscopia* avec 94,77±10,43% par rapport aux contrôle positif (BHA, 92,28±2,46%), suivi respectivement par les extraits bruts de *P. harmala* et *C. algeriensis*, *D. gnidium*, *P. inuloides*, *B. incrassatum*, *E. ritro* et *M. deserti* (91,14±0,98 ; 86,62±4,68 ; 82,80±0,64 ; 82,4±14,31 ; 79,52±1,78 ; 74,71±7,49 et 60,31±18,26%, respectivement). Ces résultats nous ont permis de classer ces espèces comme suit : *E. helioscopia* > *P. harmala* > *C. algeriensis* > *D. gnidium* > *P. inuloides* > *B. incrassatum* > *E. ritro* > *C. albidus* > *M. deserti*.

Les résultats concernant les différents extraits de *P. inuloides* on montrés également que l'extrait acétate d'éthyle a montré une bonne activité inhibitrice estimé à 84,10%, suivie respectivement par les extraits butanolique et chloroformique (83,01 et 80,18%). Les résultats concernant les différents extraits de *C. albidus* on montrés aussi que l'extrait acétate d'éthyle a montré une activité inhibitrice relativement bonne estimé à 71,57%. Ces résultats restent relativement en corrélation avec ceux obtenus précédemment par le test du DPPH.

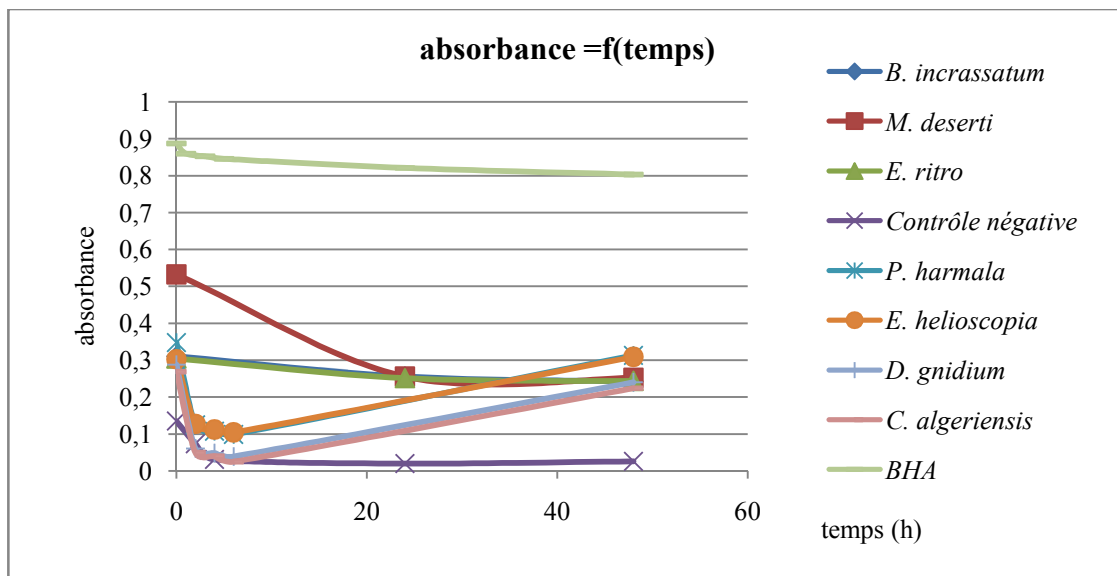


Figure 12. Activité antioxydant par β -carotène des extraits bruts des différentes espèces des Aurès

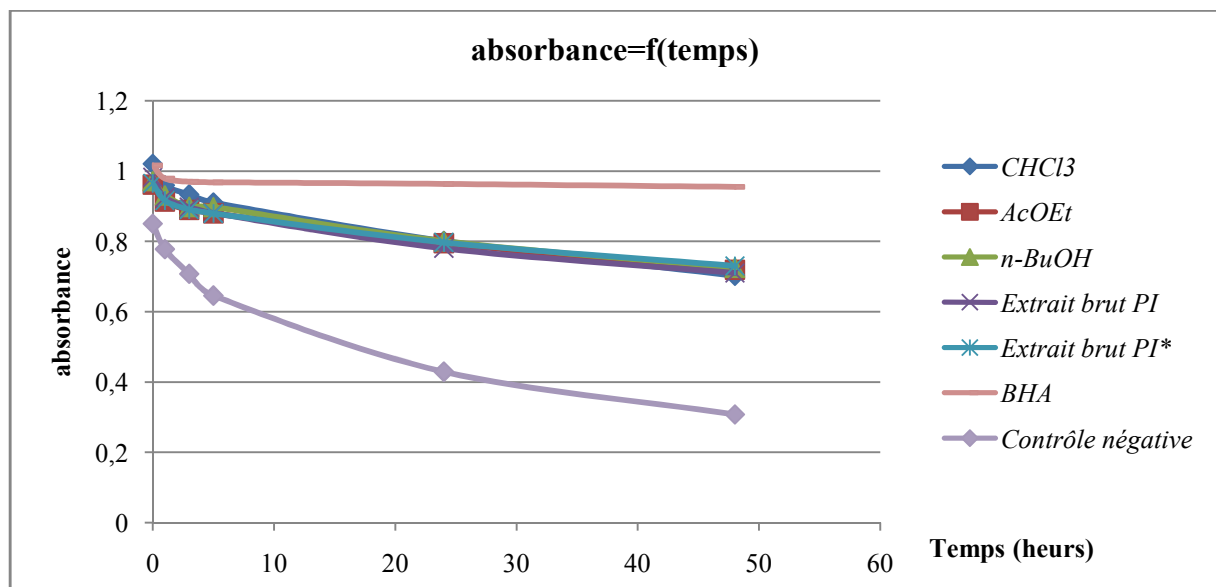


Figure 13. Activité antioxydant par β -carotène des différents extraits de *P. inuloides* (PI ; *P. inuloides*, parties aériennes, PI* ; parties racines)

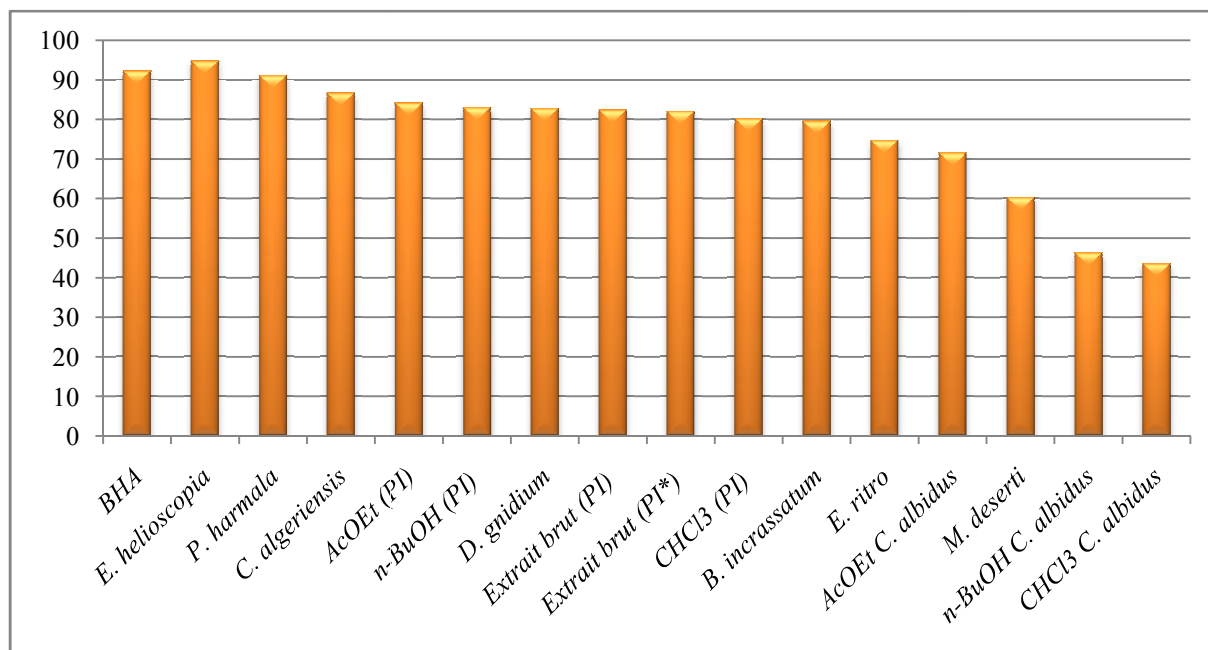


Figure 14. Comparaison entre les valeurs de l'activité antioxydant par β -carotène des différentes espèces (%) (PI ; *P. inuloides*, parties aériennes, PI* ; parties racines)

II.6.2.3. Dosage des polyphénols

La détermination de la teneur en polyphénols dans les différents extraits des différentes espèces est estimée par la méthode de Folin-Ciocalteu qui est basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique (WO₄²⁻) phosphomolybdique (MoO₄²⁻) du réactif de Folin par les groupements oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation des produits de réduction de couleur bleue (Majhenic et al., 2007). Les teneurs en polyphénols ont été exprimées par une courbe linéaire d'étalonnage qui a été rapportée en microgramme d'équivalents de l'étalon utilisé (acide gallique) par milligramme d'extrait ($\mu\text{gEGA}/\text{mg}$) et ont été déterminées par les équations suivantes : $y = 0,009x + 0,309$ avec $R^2 = 0,998$ et $y = 0,015x + 0,289$ avec $R^2 = 0,999$.

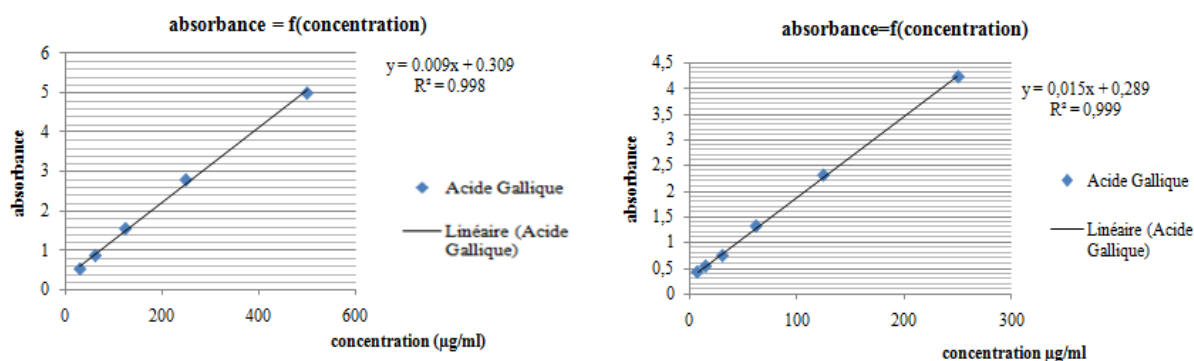


Figure 15. Taux des polyphénols de standard acide gallique (en µgAGE/mg)

Les teneurs en polyphénols des différents extraits des différentes espèces varient de $(20,00 \pm 8,18$ et $316,56 \pm 188,51$ µgAGE/mg) (Tableau 8).

Les résultats ont montré aussi que les extraits bruts des parties aériennes et des racines de *P. inuloides*, *E. helioscopia* et *D. gnidium* ont des teneurs élevées en polyphénols ($129,79 \pm 77,75$; $111,63 \pm 11,24$; $144,04 \pm 3,29$ et $115,16 \pm 7,22$ µgAGE/mg, respectivement) par comparaison aux autres extraits bruts. Ces résultats de tableau 8 nous a permis de classer toutes les espèces en fonction de leur richesse en composés polyphénoliques suivant cet ordre : *P. inuloides* > *C. albidus* > *E. helioscopia* > *D. gnidium* > *J. phoenicea* > *J. oxycedrus* > *C. atlantica* > *B. incrassatum* > *C. algeriensis* > *E. ritro* > *P. harmala* > *M. vulgare* > *M. deserti* (Figure 16).

Les extraits AcOEt et *n*-BuOH de *P. inuloides* et *C. albidus* représentent les teneurs les plus élevées en polyphénols ($316,56 \pm 188,51$; $248,19 \pm 41,40$; $307,12 \pm 63,35$; $229,76 \pm 19,63$; $298,80 \pm 115,86$ et $253,70 \pm 24,69$ µgAGE/mg, respectivement), ce qui indique la richesse de ces espèces en substances polyphénoliques. Ces résultats obtenus restent relativement en corrélation avec ceux obtenus précédemment par le test de l'activité antioxydante.

Les résultats de la teneur en polyphénols totaux sont montrés dans le tableau suivant :

Plante	Extrait	TFC µgAGE/mg	Plante	Extrait	TFC µgAGE/mg
<i>P. inuloides</i> (P. aériennes)	CHCl ₃	91,54 ±5,61	<i>J. oxycedrus</i>	EtOH-H ₂ O	60,05±1,72
	AcOEt	316,56± 188,51	<i>J. phoenicea</i>	EtOH-H ₂ O	62,01±2,88
	<i>n</i> -BuOH	248,19 ±41,40	<i>M. vulgare</i>	EtOH-H ₂ O	20,02±3,21
	Extrait brut	129,79±77,75	<i>C. atlantica</i>	EtOH-H ₂ O	39,13±2,25
<i>P. inuloides</i> (P. racines)	CHCl ₃	32,28±12,71	<i>E. helioscopia</i>	EtOH-H ₂ O	144,04±3,29
	AcOEt	307,12±63,35	<i>D. gnidium</i>	EtOH-H ₂ O	115,16±7,22
	<i>n</i> -BuOH	229,76±19,63	<i>C. algeriensis</i>	EtOH-H ₂ O	34,67±6,63
	Extrait brut	111,63±11,24	<i>P. harmala</i>	EtOH-H ₂ O	22,679±2,93
<i>C. albidus</i> (P. aériennes)	CHCl ₃	47,89±9,78	<i>B. incrassatum</i>	EtOH-H ₂ O	35,95±9,11
	AcOEt	298,80±115,86	<i>E. ritro</i>	EtOH-H ₂ O	28,81±0,71
	<i>n</i> -BuOH	253,70±24,69	<i>M. deserti</i>	EtOH-H ₂ O	20,00±8,18

Tableau 8. Taux des polyphénols dans les différents extraits de différentes espèces (µgAGE/mg)

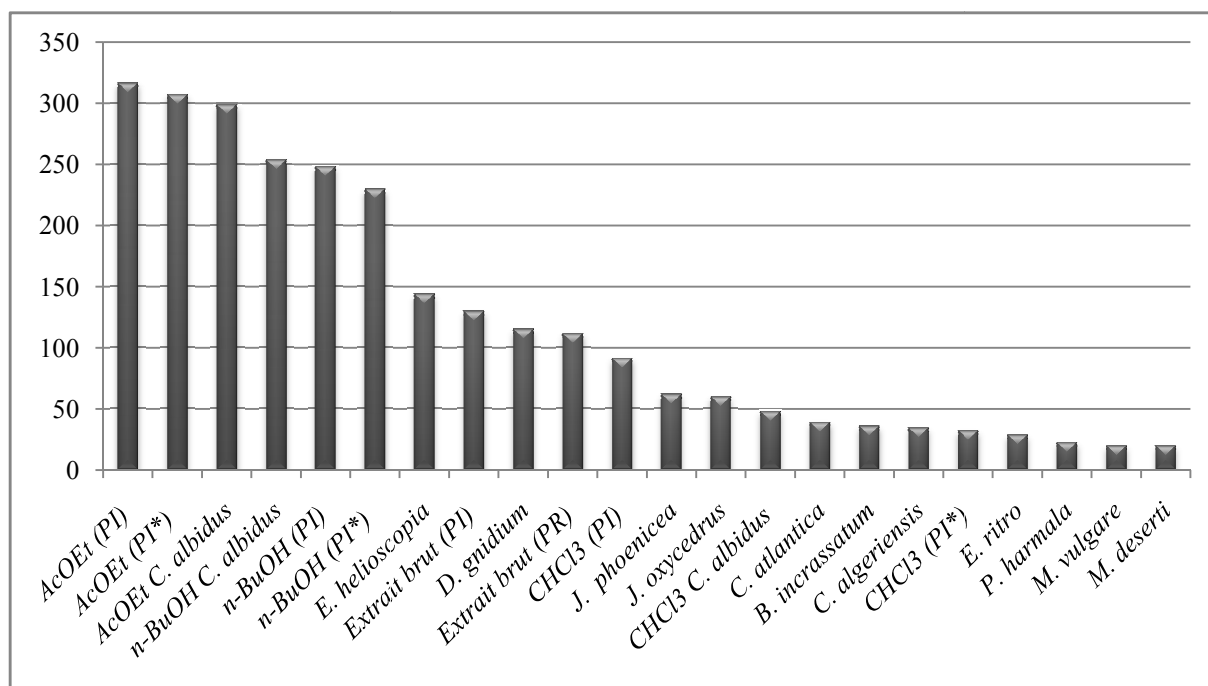


Figure 16. Comparaison entre les valeurs des teneurs en polyphénols dans les différentes espèces (µgAGE/mg) (PI ; *P. inuloides*, parties aériennes, PI* ; parties racines)

II.6.2.4. Dosage des flavonoïdes

La teneur totale en flavonoïdes a été mesurée en utilisant les deux équations suivantes; $y = 0,0152x + 0,1208$ avec $R^2 = 0,9995$ et $y = 0,010x + 0,070$ avec $R^2 = 0,997$, tel que : $y =$ l'absorbance à 420 nm et $x =$ la concentration des flavonoïdes en $\mu\text{gQE}/\text{mg}$ et $\mu\text{gRuE}/\text{mg}$.

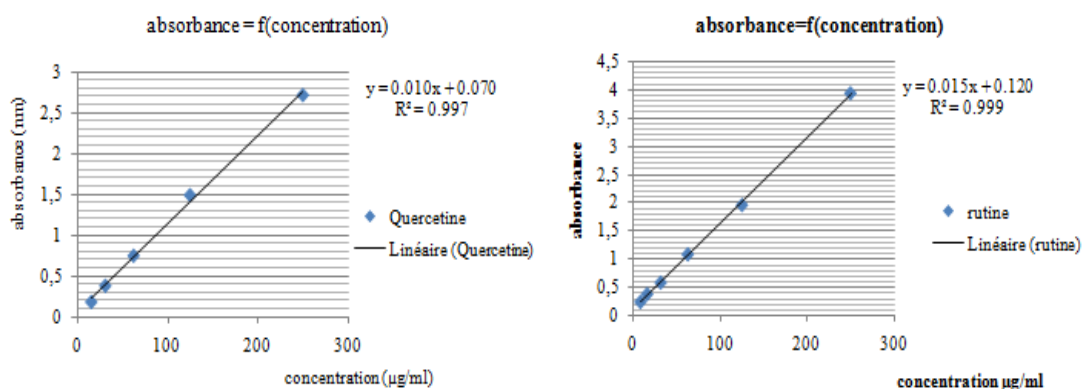


Figure 17. Taux des flavonoïdes (en $\mu\text{gQE}/\text{mg}$ et $\mu\text{gRuE}/\text{mg}$)

La teneur en flavonoïdes des différents extraits des différentes espèces varie de $(3,85 \pm 1,38 \mu\text{gRuE}/\text{mg})$ et $(396,85 \pm 0,33 \mu\text{gQE}/\text{mg})$ (Tableaux 9 et 10). Les résultats obtenus ont révélé que les extraits bruts d'*E. helioscopia* et *D. gnidium*, *P. inuloides* ont montré des teneurs élevées en composés flavonoïdiques ($188,25 \pm 13,11$; $164,60 \pm 3,27 \mu\text{gRuE}/\text{mg}$ et $159,93 \pm 18,49 \mu\text{gQE}/\text{mg}$, respectivement). L'abondance en flavonoïdes dans les différentes espèces étudiées se présente selon l'ordre suivant ; *P. inuloides* > *C. albidus* > *E. helioscopia* > *D. gnidium* > *B. incrassatum* > *P. harmala* > *C. algeriensis* > *J. oxycedrus* > *C. atlantica* > *J. phoenicea* > *M. deserti* > *M. vulgare* > *E. ritro* (Figure 18).

Les résultats ont révélé ainsi que les extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol de *P. inuloides* et *C. albidus* contiennent des teneurs plus élevées en composés flavonoïdiques ($396,85 \pm 0,33$; $125,32 \pm 22,88 \mu\text{gQE}/\text{mg}$; $262,87 \pm 1,65$ et $254,72 \pm 7,68 \mu\text{gRuE}/\text{mg}$, respectivement).

Ces résultats montrent une assez bonne corrélation entre l'activité antioxydante et le taux des phénols totaux pour les espèces *P. inuloides*, *C. albidus*, *E. helioscopia* et *D. gnidium*.

Les résultats de dosage des flavonoïdes totaux sont représentés dans le tableau suivant :

Plante	Extrait	TFC µgQE/mg	Plante	Extrait	TFC µgQE/mg
<i>P. inuloides</i> (P. aériennes)	CHCl ₃	140,89±27,95	<i>J. oxycedrus</i>	EtOH-H ₂ O	23,12±3,22
	AcOEt	396,85±0,33	<i>J. phoenicea</i>	EtOH-H ₂ O	13,95±2,18
	<i>n</i> -BuOH	125,32±22,88	<i>M. vulgare</i>	EtOH-H ₂ O	5,01±0,05
	Extrait brut	159,93±18,49	<i>C. atlantica</i>	EtOH-H ₂ O	16,86±5,31
CHCl ₃	/				
AcOEt	5,08±3,11				
<i>n</i> -BuOH	6,31±0,59				
<i>P. inuloides</i> (P. racines)	CHCl ₃	/			
	AcOEt	5,08±3,11			
	<i>n</i> -BuOH	6,31±0,59			
	Extrait brut	22,64±7,52			

Tableau 9. Taux des flavonoïdes dans les différents extraits de différentes espèces (en µgQE/mg)

Plante	Extrait	TFC µgRuE/mg	Plante	Extrait	TFC µgRuE/mg
<i>C. albidus</i> (P. aériennes)	CHCl ₃	96,54 ±2,90	<i>M. deserti</i>	EtOH-H ₂ O	10,70±0,37
	AcOEt	262,87 ± 1,65	<i>E. helioscopia</i>	EtOH-H ₂ O	188,26±13,11
	<i>n</i> -BuOH	254,72 ±7,68	<i>D. gnidium</i>	EtOH-H ₂ O	164,61±3,27
<i>B. incrassatum</i>	EtOH-H ₂ O	96,41±11,20	<i>C. algeriensis</i>	EtOH-H ₂ O	56,74±8,59
<i>E. ritro</i>	EtOH-H ₂ O	3,85±1,38	<i>P. harmala</i>	EtOH-H ₂ O	72,83±10,45

Tableau 10. Taux des flavonoïdes dans les différents extraits de différentes espèces (en µgRuE/mg)

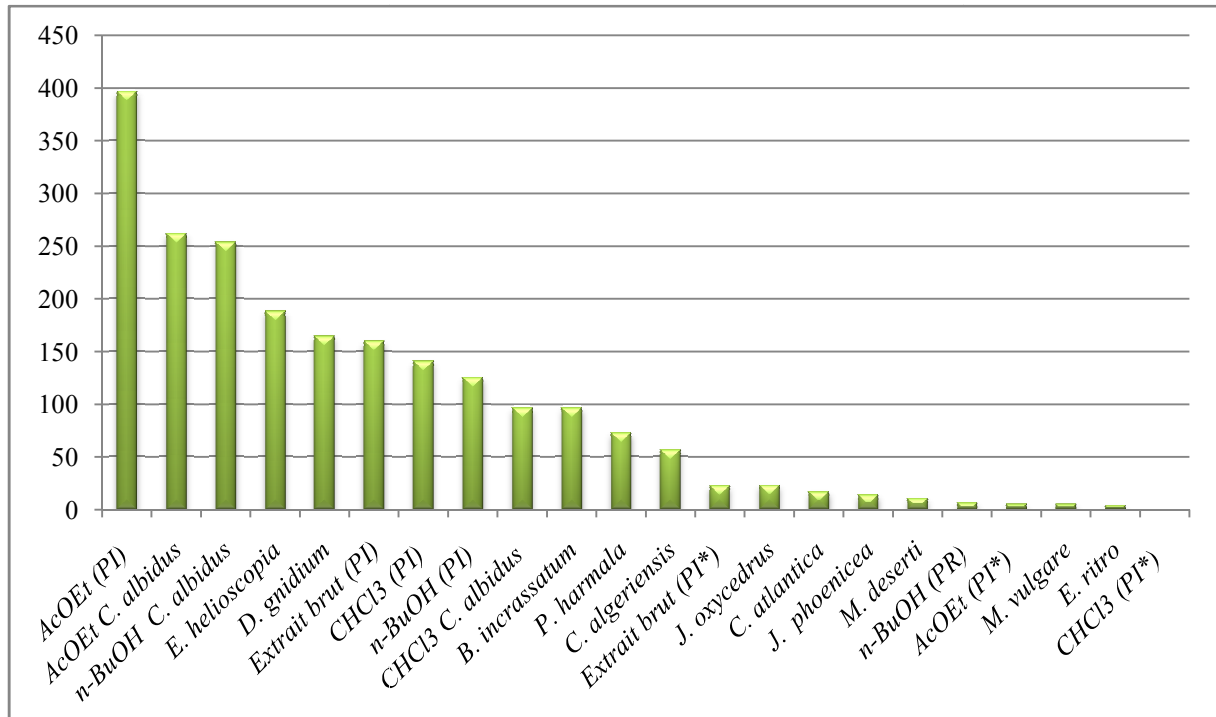


Figure 18. Comparaison entre les valeurs des teneurs en flavonoïdes dans les différentes espèces (µgQE/mg et µgRuE/mg) (PI ; *P. inuloides*, parties aériennes, PI* ; parties racines)

II.6.2.5. Dosage des flavonols

La teneur en flavonols a été mesurée en utilisant les équations suivantes : $y = 0,0051x + 0,8403$ avec $R^2 = 0,998$ et $y = 0,008x + 0,318$ avec $R^2 = 0,999$ tel que : $y =$ l'absorbance à 415 nm, $x :$ la concentration des flavonols en µgQE/mg et µgRuE/mg.

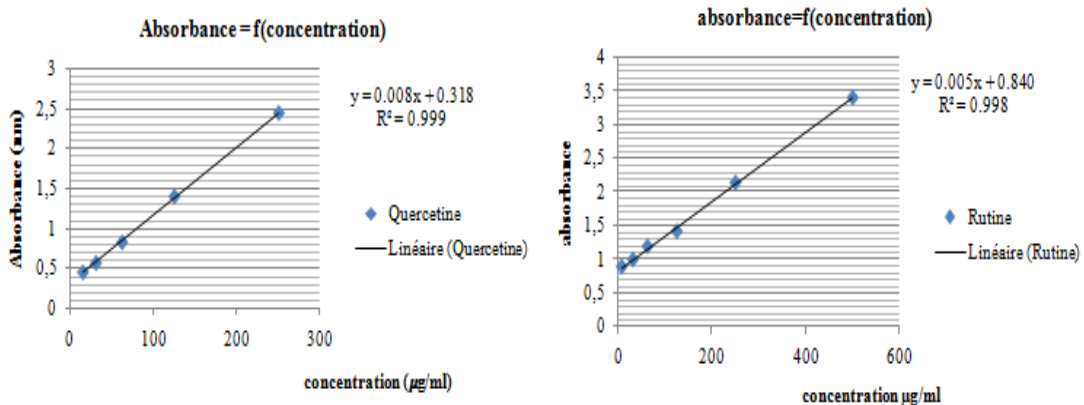


Figure 19. Taux des flavonols (en µgQE/mg et µgRuE/mg)

Les teneurs en flavonols des différents extraits des différentes espèces varient de (14,11±3,29 µgQE/mg et 521,93±54,43 µgRuE/mg) (Tableaux 11 et 12).

Les résultats obtenus (Figure 20) nous ont permis de classer toutes les espèces en fonction de leurs richesses en flavonols selon l'ordre suivant: *C. albidus* > *P. inuloides* > *E. helioscopia* > *D. gnidium* > *P. harmala* > *B. incrassatum* > *C. algeriensis* > *M. deserti* > *J. oxycedrus* > *M. vulgare* > *J. phoenicea* > *C. atlantica* > *E. ritro*.

Les résultats obtenus ont révélé que les extraits bruts d'*E. helioscopia*, *D. gnidium*, *P. harmala* et *B. incrassatum* ont des teneurs élevées en flavonols (202,46±10,55 ; 199,73±6,71 114,53±5,69 et 106,08±27,43 µgRuE/mg, respectivement).

Les résultats ont révélé ainsi que les extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol de *P. inuloides* et *C. albidus* contiennent des teneurs plus élevées en flavonols (375,45±31,1 et 78,48±16,28 µgQE/mg ; 521,93±54,43 et 301,01±4,54 µgRuE/mg, respectivement).

Ces résultats montrent également une bonne corrélation entre l'activité antioxydante et le taux en flavonols des espèces *P. inuloides*, *C. albidus*, *E. helioscopia* et *D. gnidium*.

Les résultats de dosage des flavonols totaux sont montrés dans le tableau suivant :

Plante	Extrait	TFC µgQE/mg	Plante	Extrait	TFC µgQE/mg
<i>P. inuloides</i> (P. aériennes)	CHCl ₃	31,18±18,19	<i>J. oxycedrus</i>	EtOH-H ₂ O	32,11±4,78
	AcOEt	375,45±31,1	<i>J. phoenicea</i>	EtOH-H ₂ O	18,19±0,16
	<i>n</i> -BuOH	78,48±16,28	<i>M. vulgare</i>	EtOH-H ₂ O	23,63±1,036
	Extrait brut	72,48±32,5	<i>C. atlantica</i>	EtOH	14,11±3,29
<i>P. inuloides</i> (P. racines)	CHCl ₃	-			
	AcOEt	173,92±67,62			
	<i>n</i> -BuOH	227,20±98,17			
	Extrait brut	34,26±5,56			

Tableau 11. Taux des flavonols dans les différents extraits de différentes espèces (en µgQE/mg)

lante	Extrait	TFC µgRuE/mg	Plante	Extrait	TFC µgRuE/mg
<i>C. albidus</i> (<i>P. aériennes</i>)	CHCl ₃	109,2±7,75	<i>M. deserti</i>	EtOH-H ₂ O	37,70
	AcOEt	521,93±54,43	<i>E. helioscopia</i>	EtOH-H ₂ O	202,46±10,55
	<i>n</i> -BuOH	301,01±4,54	<i>D. gnidium</i>	EtOH-H ₂ O	199,73±6,71
<i>B. incrassatum</i>	EtOH-H ₂ O	106,08±27,43	<i>C. algeriensis</i>	EtOH-H ₂ O	83,40±6,27
<i>E. ritro</i>	EtOH-H ₂ O	/	<i>P. harmala</i>	EtOH-H ₂ O	114,53±5,69

Tableau 12. Taux des flavonols dans les différents extraits de différentes espèces (en µgRuE/mg)

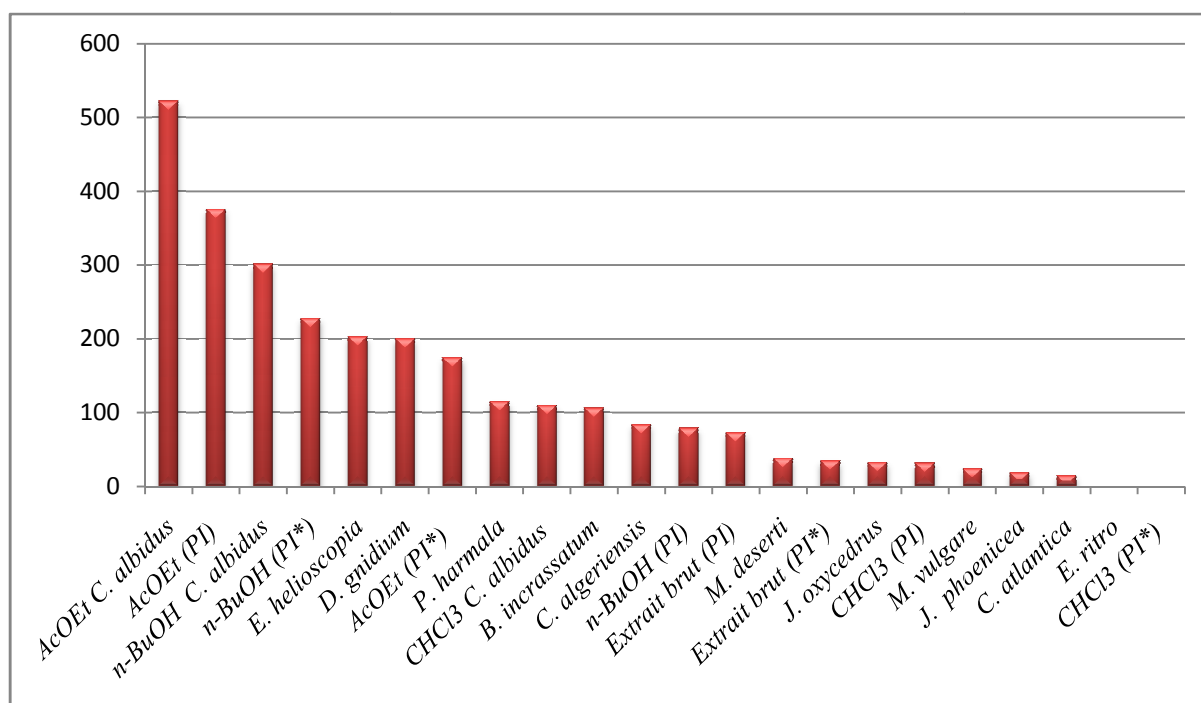


Figure 20. Comparaison entre les valeurs des teneurs en flavonols dans les différentes espèces (µgQE/mg et µgRuE/mg) (PI ; *P. inuloides*, parties aériennes, PI* ; parties racines)

Les teneurs en polyphénols, flavonoïdes et flavonols diffèrent d’une espèce à une autre, d’un genre à un autre et d’une famille à une autre, cette différence est liée à l’existence de plusieurs facteurs tels que les facteurs géographiques, climatiques et génétiques, mais également le degré de maturation de la plante et la durée de stockage ont une forte influence sur le contenu en flavonoïdes.

II.6.3. Activité antibactérienne de *P. inuloides* et *C. albidus*

Les résultats de l'activité antibactérienne qui a été réalisée sur les différents extraits (chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol) de *P. inuloides* ont montré que les trois extraits avaient une activité plus ou moins importante selon la nature de la souche et le milieu de culture utilisé.

La comparaison des trois extraits organiques a montré que l'extrait chloroformique était le plus actif car il a donné les plus grandes inhibitions des bactéries à gram positif (*Escherichia coli*, *Pseudomana saeruginosa* et *Staphylococcus aureus*).

Les diamètres des zones d'inhibition sont compris entre 9 et 11 mm pour *E. Coli*, 7 et 9 mm pour *P. aeruginosa*, 7 et 12 mm pour *S. aureus* sur le milieu Mueller-Hinton, mais elles sont relativement faibles en comparaison avec les zones d'inhibitions des antibiotiques utilisés (entre 18 et 22 mm).

Les extraits du chloroforme et d'acétate d'éthyle ont montré une concentration minimale inhibitrice contre *E. Coli* (CMI= 1920 µg/ml), par contre l'extrait butanolique a montré une concentration minimale inhibitrice (CMI= 3840 µg/ml).

		Inhibition zones (mm)		
		<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
Inhibition zones of positive control (mm)		Céphazoline	Ceftazidine	Vancomycine
		22	18	21
Extrait CHCl₃	SM µg/ml	11	9	12
	D1 (3840 µg/ml)	10	7	9
	D2 (1920 µg/ml)	9	-	-
	D3 (960 µg/ml)	-	-	-
Extrait AcOEt	SM	10	10	-
	D1 (3840 µg/ml)	9	8	-
	D2 (1920 µg/ml)	8	-	-
	D3 (960 µg/ml)	-	-	-
Extrait <i>n</i>-BuOH	SM	8	-	-
	D1 (3840 µg/ml)	7	-	-
	D2 (1920 µg/ml)	-	-	-
	D3 (960 µg/ml)	-	-	-

Tableau 13. Zones d'inhibitions des différentes dilutions des extraits organiques des parties aériennes de *P. inuloides*

Les résultats de l'activité antibactérienne qui a été réalisée sur les différents extraits organiques (chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol) de *C. albidus* ont montrés que la souche du *P. aeruginosa* semble très résistante à la solution mère et les quatre dilutions des deux extraits CHCl₃ et AcOEt (absence des zone d'inhibition autour les disques), mais elle semble sensible à la solution mère de l'extrait *n*-BuOH avec une zone d'inhibition de 9 mm. Cette dernière est relativement faible en comparaison avec la zone d'inhibition de l'antibiotique utilisé (26-28 mm). La souche de *S. aureus* a été inhibée par la solution mère de trois extraits organique de *C. albidus* (CHCl₃, AcOEt et *n*-BuOH) avec des zones d'inhibition compris entre 8 et 11 mm et aussi par la première dilution de la phase *n*-butanolique avec une zone d'inhibition de 7 mm. Comparativement aux trois extraits organiques du l'espèce *C. albidus*, l'extrait *n*-BuOH a montré une activité antibactérienne vis-à-vis des deux souches testées avec une concentration minimal inhibitrice (CMI) 6000 µg/ml contre *P. aeruginosa* et CMI= 3840 µg/ml contre *S. aureus*.

Souches bactériennes	Zones d'inhibition (mm)							
	Extraits	Antibiogramme (mm)	SM	D1	D2	D3	D4	
<i>P. aeruginosa</i>	CHCl ₃	Ticarcilline	26	-	-	-	-	-
	AcOEt		26	-	-	-	-	-
	<i>n</i> -BuOH		28	9	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	CHCl ₃	Oxacilline	11	8	-	-	-	-
	AcOEt		11	9	-	-	-	-
	<i>n</i> -BuOH		15	11	7	-	-	-

Tableau 14. Zones d'inhibitions des différentes dilutions des extraits organiques des parties aériennes de *C. albidus*

II.7. Conclusion

Les résultats obtenus ont montré que les extraits organiques acétate d'éthyle et *n*-butanolique des espèces *P. inuloides* et *C. albidus* et les extraits bruts d'*E. helioscopia* et *D. gnidium* ont une activité antioxydante plus importante que celle des autres extraits. Cette activité est bien corrélée avec le dosage des polyphénols, flavonoïdes et flavonols, ce qui a montré une richesse de ces espèces en composés phénoliques. Les résultats obtenus ont montré aussi que les extraits organiques des parties aériennes de *P. inuloides* et *C. albidus* possèdent une activité antibactérienne modérée en comparaison avec les standards (antibiotiques) utilisés. Les résultats de cette étude ont montré que ces espèces peuvent être considérées comme des sources potentielles d'agents antioxydants et antibactériens.

Sur la base de ces résultats nous avons entrepris l'étude phytochimique approfondie de ces espèces dans le but de déterminer la nature des polyphénols responsables de ces activités. Ces travaux seront abordés dans les chapitres suivants.

Chapitre III :

Phytochimie

III.1. La famille des Astéracées

La famille des Astéracées est l'une des plus grandes familles de plantes à fleurs, composée d'environ 1600 genres et de plus de 23 000 espèces (Bohm et Stuessy, 2001). La distribution mondiale des plantes d'Astéracées et leur potentiel en tant que sources d'agents antimicrobiens et antioxydants, font que celle-ci ont toujours suscité et suscitent encore l'intérêt des laboratoires de recherche.

III.2. Le genre *Pulicaria*

Le genre *Pulicaria* (Astéracées) comprend plus de 80 espèces présentes dans le monde entier, de l'Europe à l'Afrique du Nord et à l'Asie (Williams et al., 2003). Plusieurs activités biologiques ont été rapportées pour certaines espèces de *Pulicaria*, comme ; l'activité anti-inflammatoire, antilukémique (Al-Yahya et al., 1984), l'activité chimio-préventive et anticancéreuse (Al-Yahya et al., 1988), cytotoxique (Fawzy et al., 2013), antibactérienne (Hanbali et al., 2005, Al-Naqeb, 2015), antioxydant (Algabr et al., 2010), antihistaminique (Mahfouz et al., 1973), activité antispasmodique (Tanira et al., 1996) et l'activité antifongique (Znini et al., 2013). Au Maroc, *Pulicaria odora* L. est couramment utilisée comme remède traditionnel pour traiter les maux de dos, les troubles intestinaux et les crampes menstruelles. Il est également prescrit aux femmes après l'accouchement et en tant que composante du remède traditionnel appelé «Mssakhen» (Ezoubeiri et al., 2005).

III.2.1. Le genre *Pulicaria* en Algérie

En Algérie, le genre *Pulicaria* est représenté par seize (16) espèces. Cinq (05) sont situés dans le Sahara (Quezel et Santa, 1963 ; Ozenda, 2004), on distingue : *P. inuloides*, *P. incisa* (LAM.) DC., *P. undulata*, *P. desertorum* et *P. prostrata*.

III.3. *Pulicaria inuloides* : Aspects botaniques

Pulicaria inuloides (Poir.) DC., est une plante annuelle ou occasionnellement vivace garnie de nombreuses feuilles à bord ondulé, habituellement entre 40 à 60 cm. les fleurs sont groupées en capitules de couleur jaune. Les feuilles sont alternes, blanchâtres, pubescentes, ondulées,

embarrassantes avec deux oreillettes à la base. Involucre à bractées linéaires. L'odeur qui se dégage de la plante est très agréable (Quezel et Santa, 1963a ; Al-Hajj et al., 2014a).



Figure 1. Photos de *Pulicaria inuloides* (Poir.) DC.

Les systématiciens de la botanique s'accordent à classer cette espèce comme suit :

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Asteridae
Ordre	Asterales
Famille	Asteraceae
Genre	<i>Pulicaria</i>
Espèce	<i>Pulicaria inuloides</i> (Poir.) DC.

Tableau 1. Classification de l'espèce *Pulicaria inuloides* (Poir.) DC.

III.3.1. Utilisation en médecine traditionnelle

Les fleurs et les feuilles de *Pulicaria inuloides* (Poir.) DC. sont utilisées comme épices pour aromatiser les aliments et comme des tisanes (Alhaj et al., 2014).

III.3.2. Travaux antérieurs sur l'espèce *Pulicaria inuloides*

Un nouveau dimère diterpénoïde *ent*-kaurane naturel ; 15 β , 15' β -oxybis (acide *ent*-kaur-16-en-19-oïque) (1) (Figure 2) et des composés connus : l'acide 15 β -hydroxy-*ent*-kaur-16-en-19-oïque (2), 15 β -hydroxy-*ent*-kaur-16-ène-19-oate- β -d-glucopyranoside (3), 6-hydroxykaempférol-3, 7-diméthyléther (4), quercétagétine 3,7,3'-triméthyléther (5), β -

sitostérol et daucostérol ont été isolés dans les parties aériennes de *Pulicaria inuloides* (Poir.) DC., qui a été cueillie dans les montagnes de Taiz, au Yémen. Les composés (2-5) ont été isolés pour la première fois dans le genre *Pulicaria*. L'activité antimicrobienne de l'isolat a été évaluée contre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Candida albicans*. Les tests d'activité cytotoxique de la sulphorhodamine B contre HepG2 (cancer du foie) et le test antioxydant ABTS ont été réalisés (Galala et al., 2016). Les principaux composants identifiés dans l'huile essentielle de *P. inuloides* cultivée au Yémen : le 2-cyclohexèn-1-one, 2-méthyl-5-(1-méthyle) (47,34%), l'acide hexadécanoïque (CAS) (12,82%) et le 1,2-diéthoxy-ethane (9,613%) (Al-Hajj et al., 2014a). Les résultats des tests d'activité antioxydante par piégeage des radicaux DPPH, blanchiment au β -carotène et la chélation des métaux, ont montré que l'extrait MeOH de *P. inuloides* était plus actif que l'extrait Et₂O (Al-Hajj et al., 2014b).

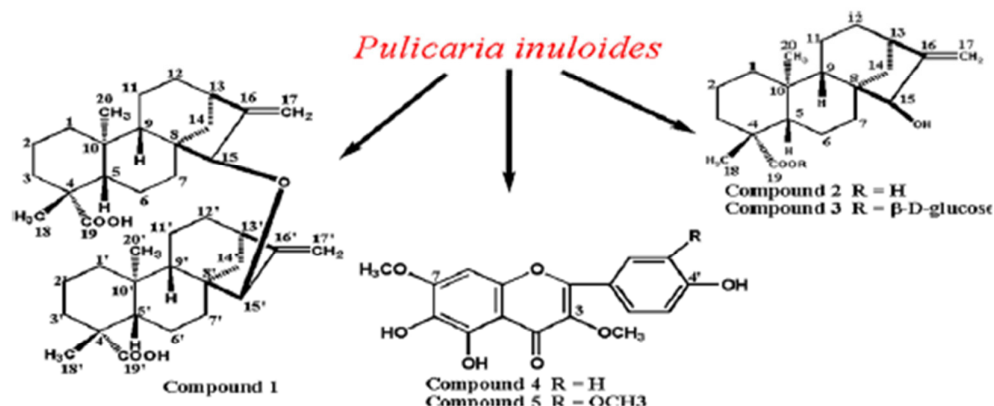


Figure 2. Quelques composés isolés de *Pulicaria inuloides*

III.4. Etude phytochimique de l'espèce *P. inuloides* : Travaux personnels

III.4.1. Récolte du matériel végétal

La plante *Pulicaria inuloides* (Poir.) DC. a été cueillie au moment de la floraison en 2013 au barrage de Béchar, Djorf Ettorba (80 km au sud-ouest de Béchar) et identifiée par Benabdelhakem Mohamed, directeur de l'agence nationale pour la conservation de la nature à Bechar. Un spécimen (PU/105/VAR/05-13) a été déposé à l'herbier de l'unité de recherche de VARENBIOMOL, université Frères Mentouri, Constantine, Algérie. Après le séchage dans un endroit sec à l'abri des rayons solaires, les parties aériennes ont été broyées et pesées (1500 g) ainsi que les racines (200 g).

III.4.2. Matériels et produits utilisés

Matériel de laboratoire	Produits chimiques
<ul style="list-style-type: none"> ❖ Evaporateur rotatif. ❖ Balance. ❖ Etuve. ❖ Ampoule a décanté. ❖ Cuve. ❖ Lampe UV. ❖ Plaque CCM en aluminium. ❖ Pipettes. ❖ Béchers, éprouvettes et tubes à essais. ❖ Colonne. ❖ Flacons de 500 ml. ❖ Spectrophotomètre UV. 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ L'éthanol. ❖ Acide acétique. ❖ Chloroforme. ❖ Acétate d'éthyle. ❖ Gel de silice. ❖ Eau distillée. ❖ Méthanol. ❖ Anisaldéhyde. ❖ L'acide sulfurique. ❖ Acide chlorhydrique. ❖ Hydroxyde de sodium. ❖ <i>n</i>-Butanol. ❖ Acide gallique. ❖ H₃PO₄. ❖ Hexane. ❖ Dichlorométhane.

III.4.3. Extraction des parties aériennes

Les parties aériennes (feuilles, tiges et fleurs) de *P. inuloides* (1500 g) ont été coupées en petits morceaux et mises à macérer dans un mélange méthanol-eau (7: 3) pendant sept (07) jours, cette opération est répétée trois fois avec renouvellement de solvant.

Après concentration à une température n'excédant pas 40°C, nous avons obtenu un résidu sirupeux, dont la quantité est égale 340 g avec un rendement de Rdt= 22%. Ce dernier est dilué avec 1500 ml d'eau distillée. La solution obtenue est laissée au repos à froid pendant une nuit pour décantation. Cette décantation permet le dépôt de la chlorophylle, des cires, du sable...etc. Après filtration, la phase aqueuse obtenue est épuisée successivement par une extraction liquide-liquide dans une ampoule à décanter en utilisant des solvants non miscibles à l'eau et de polarité croissante en commençant par l'éther de pétrole, le chloroforme, l'acétate d'éthyle, et le *n*-butanol. Les quatre phases organiques récupérées ont été séchées, concentrées sous pression réduite à sec et pesées. 6 g d'extraits pour la phase éther de pétrole, 5 g pour la phase chloroformique, 6 g pour la phase acétate d'éthyle et 50 g pour la phase *n*-Butanol ont été obtenus.

Le schéma suivant montre les différentes étapes d'extraction de l'espèce *Pulicaria inuloides* (Poir.) DC. :

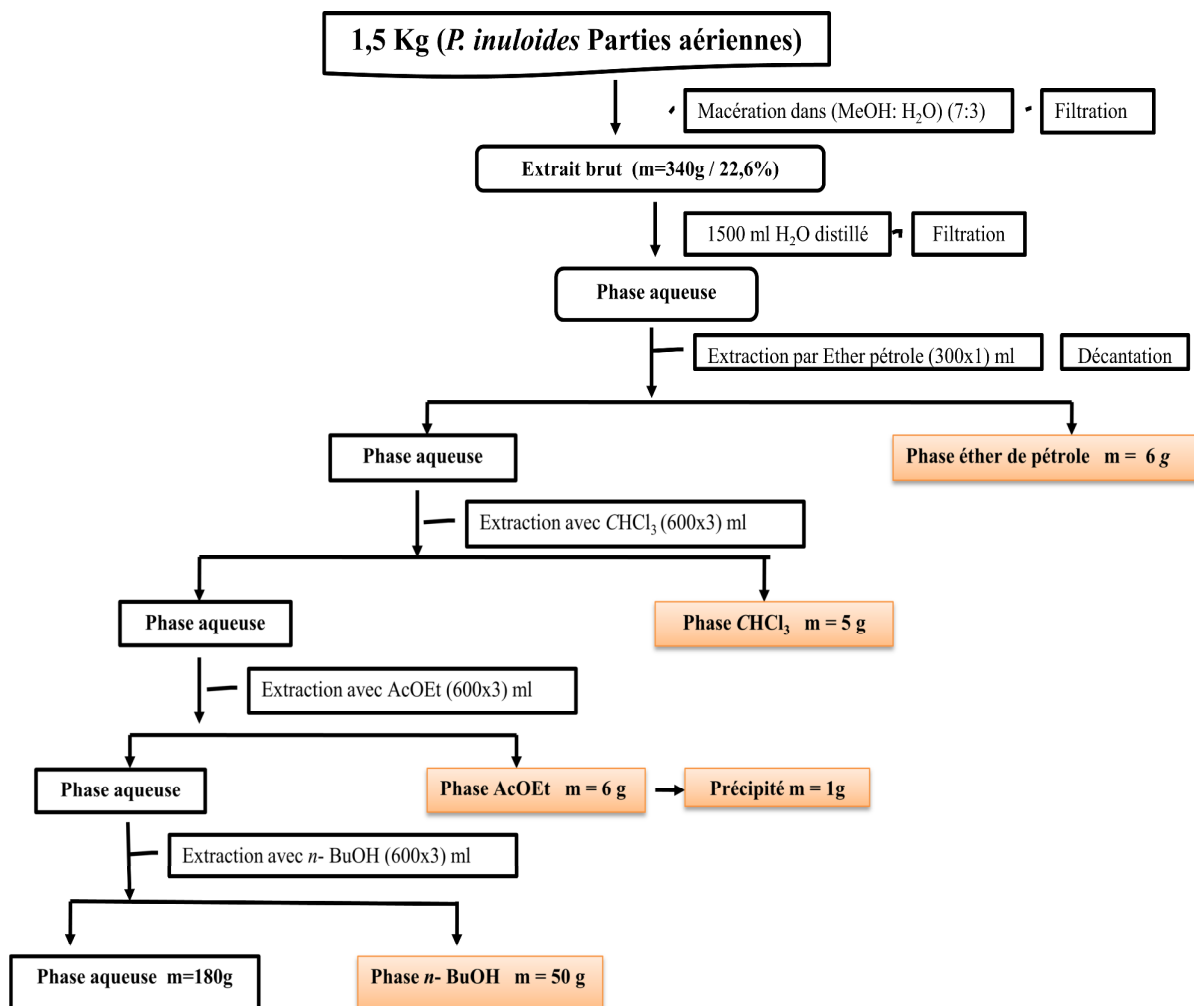


Figure 3. Organigramme récapitulatif des étapes d'extraction des parties aériennes de l'espèce *P. inuloides*

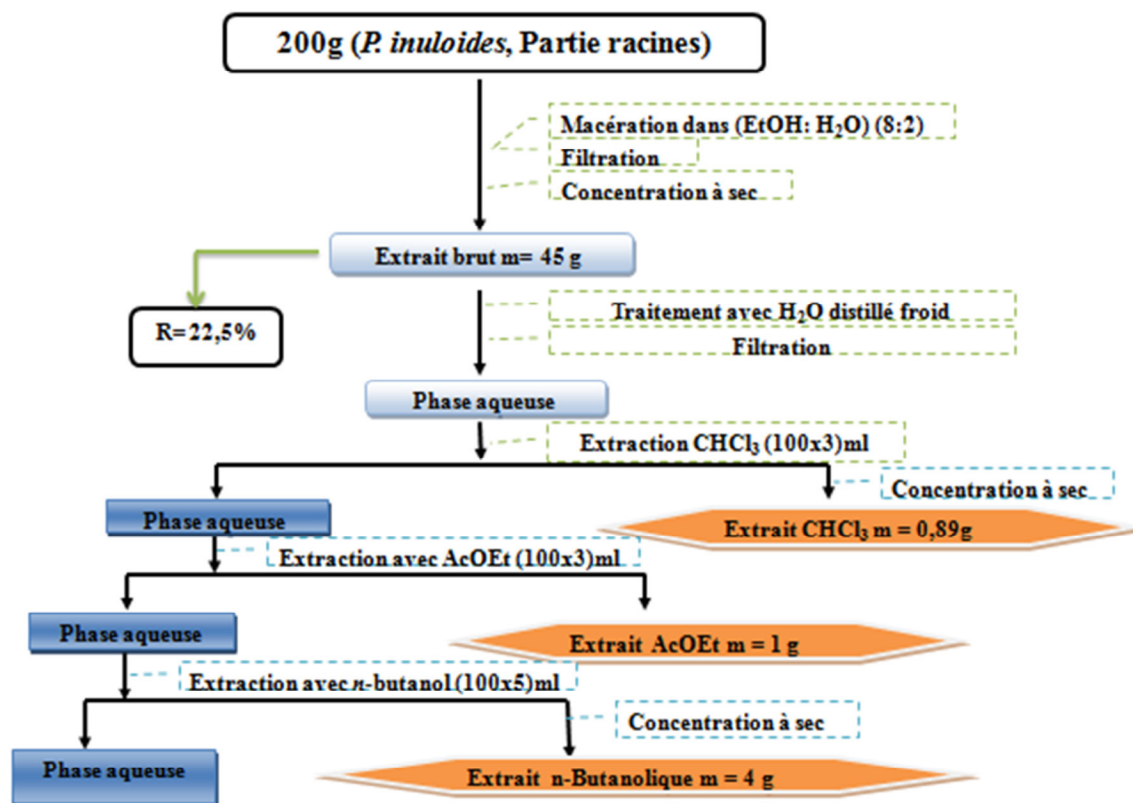


Figure 4. Organigramme récapitulatif des étapes d'extraction des racines de *P. inuloides*

III.4.4. Séparation et purification

III.4.4.1. Tests chromatographiques

Pour l'ensemble des extraits, nous avons débuté le traitement par une chromatographie analytique sur couche mince de gel de silice. La comparaison des profils CCM en phase normale des extraits organiques obtenus précédemment dans différents systèmes d'élution, dichlorométhane-acétate d'éthyle (5: 5), chloroforme-méthanol (9: 1) ont montré la richesse de l'extrait acétate d'éthyle en métabolites secondaires de type flavonoïdes.

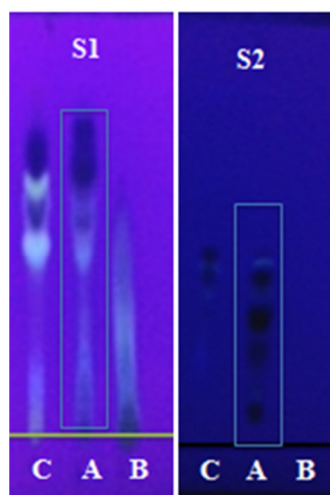


Figure 5. Profil chromatographique des trois extraits dans les deux systèmes et sous lampe $UV\lambda=365\text{ nm}$ A : la phase AcOEt, B : la phase *n*-BuOH, C : la phase $CHCl_3$
 S1: CH_2Cl_2 : AcOEt (5: 5), S2: $CHCl_3$: MeOH (9: 1)

Un précipité jaune a été obtenu après le traitement de l'extrait acétate d'éthyle par le méthanol :

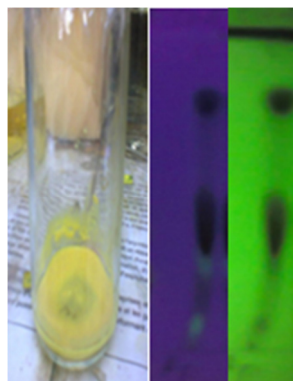


Figure 6. Profil chromatographique chimique du précipité obtenu à partir de l'extrait acétate d'éthyle

III.4.5. Séparation par colonne sur gel de silice et purification des composés de précipité de l'extrait acétate d'éthyle

Le précipité obtenu de l'extrait acétate d'éthyle (1 g) dissout dans le dichlorométhane (CH_2Cl_2) est mélangé à une petite quantité de gel de silice, l'ensemble est séché sous vide, jusqu'à obtention d'une poudre homogène. Après, ce dernier a subi une chromatographie sur

une colonne de gel de silice en phase normale, éluée avec un gradient: dichlorométhane-acétate d'éthyle (100: 0 à 0: 100). 190 lots de 50 ml ont été collectés. Le suivi de ces fractions est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support d'aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm) puis révélées à l'anisaldéhyde. Le tableau suivant représente les résultats de cette séparation :

Lots	CH ₂ Cl ₂ %	AcOEt %	Lots	CH ₂ Cl ₂ %	AcOEt %
1-4	100	0	111-137	75	25
5-6	99	1	138-150	70	30
7-8	97	3	151-154	60	40
9	95	5	155-169	50	50
10	92	8	170-174	40	60
11	87	13	175-176	30	70
12-103	85	15	177-178	20	80
104-107	83	17	179-180	10	90
108-110	80	20	181-190	0	100

Tableau 2. Résultats de la séparation sur colonne de gel de silice du précipité obtenu à partir de l'extrait acétate d'éthyle

Les lots ont été rassemblés sur la base de l'analyse chromatographique analytique par CCM qui a permis l'obtention de six (06) fractions notées FI à FVI. Les lots qui ont le même Rf ont été regroupés comme suit :

Nom de la fraction	Lots	Observation
FI	1-28	Séparable
FII	29-42	Séparable
FIII	43-116	Séparable
FIV	117-155	Séparable
FV	156-184	Complexe
FVI	185-190	Difficile à séparer

Tableau 3. Regroupement des fractions du précipité obtenu à partir de l'extrait acétate d'éthyle

L'examen de ces fractions sous UV nous a permis de sélectionner les fractions FII (270,3 mg) et FIV (200 mg) pour une purification ultérieure sur plaques préparatives de gel de silice de format 20 cm x 20 cm éluées avec un système (CH₂Cl₂: AcOEt, 4: 2).

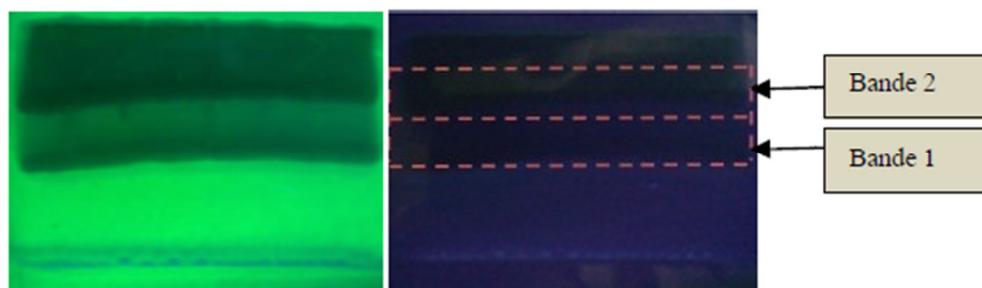


Figure 7. Plaque préparative de la fraction FII sous lampe UV 254 et 365 nm

La bande 1 a donné le composé **5**, et la bande 2 a donné le composé **4**.

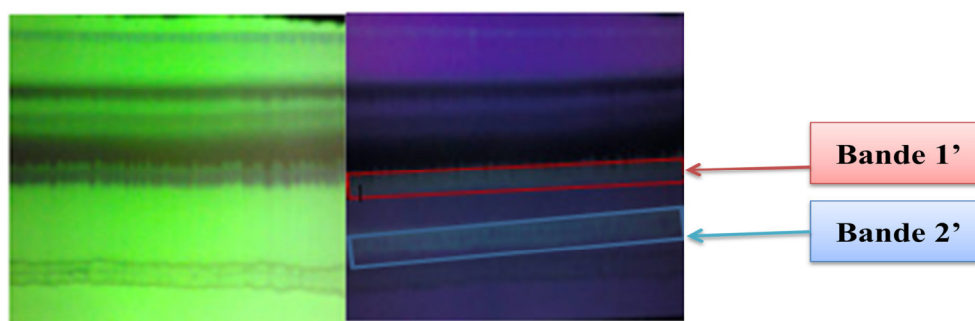


Figure 8. Plaque préparative de la fraction FIV sous lampe UV 254 et 365 nm

La fraction IV a également donné une bonne séparation et a permis d'isoler le composé **6** à partir de la bande 1' et le composé **7** à partir de la bande 2'.

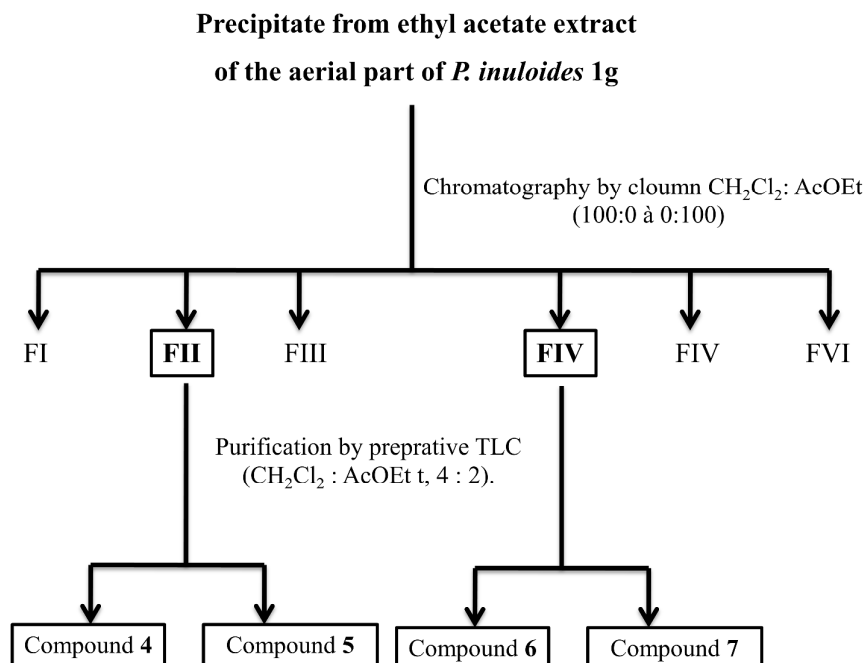


Figure 9. Schéma de purification des flavonoïdes de précipité de l'extrait acétate d'éthyle des parties aériennes de l'espèce *P. inuloides*

III.4.6. Séparation par colonne sur gel de silice et purification des composés du filtrat résiduel de l'extrait acétate d'éthyle

Une colonne a été utilisée pour la séparation du filtrat de la phase acétate d'éthyle (4,2 g) en utilisant comme phase stationnaire le gel de silice (High purity grade, pore size 60°A, 230-400 mesh particle size 43-63 μm , Particle size for flash chromatography). Le filtrat est dissout dans du dichlorométhane (CH_2Cl_2) et mélangé à une petite quantité de gel de silice, l'ensemble est séché sous vide, puis pulvérisé jusqu'à obtention d'une poudre homogène. Ce dernier est déposé sur une colonne gel de silice préparée dans le dichlorométhane. L'élution est réalisée par un gradient de polarité du système (CH_2Cl_2 -AcOEt) en commençant par le dichlorométhane pur et en terminant par l'acétate d'éthyle. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm) puis révélées avec de l'anisaldéhyde. La progression de cette colonne est rassemblée dans le tableau suivant :

Lots	CH ₂ Cl ₂ %	AcOEt %	Lots	CH ₂ Cl ₂ %	AcOEt %
1-102	100	0	300-328	70	30
103-119	99	1	329-333	60	40
120-146	98	2	334-338	50	50
147-157	95	5	339-347	40	60
158-265	90	10	348-355	30	70
266-268	85	15	356-363	20	80
289-294	80	20	364-371	10	90
295-299	75	25	372-379	0	100

Tableau 4. Résultats de la séparation par colonne de gel de silice du filtrat de l'extrait acétate d'éthyle de l'espèce *P. inuloides*

Le regroupement des fractions a été effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support d'aluminium et les différents lots ont été rassemblés en fractions, selon leur profil chromatographique. Ceci a conduit aux résultats suivants :

Nom de fraction	Lots	Observation
F1	1-9	Mélange de produits
F2	10-15	Mélange de produits
F3	16-17	Mélange de produits
F4	18-22	Mélange de produits
F5	23-27	Mélange de produits
F6	28-31	Mélange de produits
F7	32-43	Mélange de produits
F8	44-47	Mélange de produits
F9	48-57	Mélange de produits
F10	58-61	Mélange de produits
F11	62-70	Mélange de produits
F12	71-75	Mélange de produits
F13	76-102	Mélange de produits
F14	103-112	Mélange de produits
F15	113-117	Mélange de produits
F16	118-119	Mélange de produits
F17	120-121	Mélange de produits
F18	122-130	Mélange de produits
F19	131-134	Mélange de produits
F20	135-139	Mélange de produits
F21	140-146	Mélange de produits
F22	147-152	Mélange de produits
F23	153-157	Mélange de produits
F24	158-165	Mélange de produits

Tableau 5. Regroupement final des fractions du filtrat de l'extrait acétate d'éthyle

F25	166-171	Mélange de produits
F26	172-175	Mélange de produits
F27	176-184	Mélange de produits
F28	185-190	Mélange de produits
F29	191-193	Mélange de produits
F30	194-205	Mélange de produits
F31	206-219	Mélange de produits
F32	220-234	Séparable
F33	235-236	Mélange de produits
F34	237-265	Séparable
F35	266-295	Mélange de produits
F36	296-302	Mélange de produits
F37	303-323	Mélange de produits
F38	324-338	Mélange de produits
F39	339-346	Mélange de produits
F40	347-351	Mélange de produits
F41	352-355	Mélange de produits
F42	356-363	Mélange de produits
F43	364-379	Mélange de produits

Tableau 5. Regroupement final des fractions du filtrat de l'extrait acétate d'éthyle (suite du tableau 5)

Suite à ces résultats, nous avons sélectionné les fractions F-32 et F-34 de cet extrait pour une séparation sur plaques préparatives éluées avec un mélange CH_2Cl_2 : AcOEt.

III.4.6.1. Etude de la fraction F-32

La fraction F-32 (79,5 mg) a subi une séparation chromatographique sur des plaques préparatives de gel de silice (silica gel HF254 For TLC) de format 20 cm x 20 cm, éluée avec un mélange (CH_2Cl_2 : AcOEt) (2: 1). Cette fraction a donné le composé nommé composé **8**.

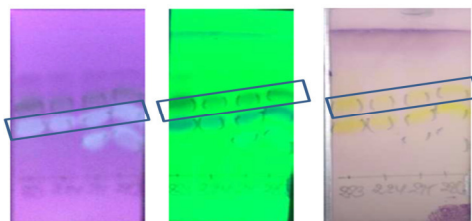


Figure 10. La fraction F-32 (CH_2Cl_2 : AcOEt) (2: 1)

III.4.6.2. Etude de la fraction F-34

La fraction F-34 (192,8 mg) a subi une séparation chromatographique sur plaques préparatives de gel de silice (Silica gel HF254 For TLC) de format 20 cm x 20 cm éluée avec un mélange (CH_2Cl_2 : AcOEt) (2: 2). Cette fraction a conduit au composé **9**.

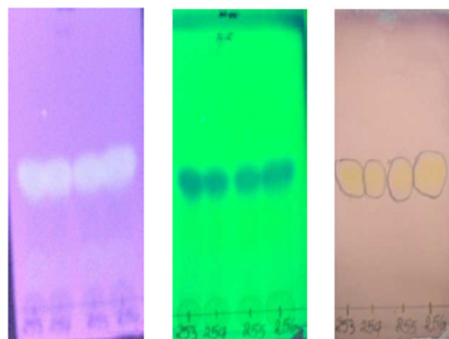


Figure 11. La fraction F-32 (CH_2Cl_2 : AcOEt) (2: 2)

III.4.7. Séparation par colonne sur gel de silice et purification de l'extrait chloroformique

Une colonne a été utilisée pour la séparation de l'extrait chloroformique (5 g) en utilisant comme phase stationnaire le gel de silice. L'extrait chloroformique dissout dans le chloroforme est mélangé à une petite quantité de gel de silice, l'ensemble est séché sous vide jusqu'à obtention d'une poudre homogène. Ce dernier est déposé sur une colonne gel de silice préparée dans le chloroforme, L'élution est réalisée par un gradient de polarité du système CHCl_3 -MeOH (100: 0 à 0: 100). Le suivi de ces fractions est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support d'aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm) puis révélées à l'anisaldéhyde. Ceci a conduit aux résultats rassemblés dans le tableau 6.

Lots	CHCl ₃ %	MeOH %	Lots	CHCl ₃ %	MeOH %
1-23	100	0	146-151	84	16
24-31	99	1	152-157	82	18
32-68	98	2	158-168	80	20
69-71	97	3	169-176	75	25
72-86	96	4	177-181	70	30
87-92	95	5	182-184	65	35
93-102	94	6	185-188	60	40
103-111	93	7	189-197	50	50
112-120	92	8	198-202	40	60
121-127	91	9	203-207	30	70
128-133	90	10	208-212	20	80
134-140	88	12	213-215	10	90
141-145	86	14	216-217	0	100

Tableau 6. Résultats de la séparation sur colonne de gel de silice de l'extrait chloroformique

Le suivi des fractions est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support d'aluminium et les différents lots ont été rassemblés en fractions, selon leur profil chromatographique. Ceci a conduit aux résultats rassemblés dans le tableau 7.

Nom de la fraction	Regroupement	Observation
F1	1-43	Séparable
F2	44-48	Séparable
F3	49-75	Séparable
F4	76-94	Séparable
F5	95-100	Séparable
F6	101-116	Difficile à séparer
F7	117-126	Difficile à séparer
F8	127-153	Difficile à séparer
F9	154-166	Séparable
F10	167-171	Difficile à séparer
F11	172-190	Difficile à séparer
F12	191-214	Difficile à séparer
F13	215-217	Séparable

Tableau 7. Regroupement final des fractions de l'extrait chloroforme de *P. inuloides*

Sur la base des résultats de profile chromatographique CCM, nous avons sélectionné la fraction F3 :

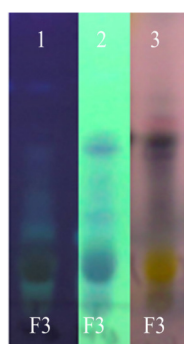


Figure 12. Carte phénolique de la fraction F3 : 1- sous lampe UV $\lambda= 365$ nm, 2- sous lampe UV 254 nm et 3- après révélation à l'anisaldéhyde

La plaque CCM nous montre que cette fraction est assez séparable dans le système CH_2Cl_2 : AcOEt, 2 : 2.

III.4.7.1. Etude de la fraction F3

La fraction F3 (350 mg) a subi une séparation chromatographique sur des plaques préparatives de gel de silice de format 20 cm x 20 cm. éluée avec un mélange (CH_2Cl_2 : AcOEt, 2 : 2). Une fois éluées, les plaques sont visualisées sous UV avec des lampes de 365 et 254 nm. Cette fraction a donné le composé **10**.



Figure 13. Plaque préparative du composé **10**

III.4.8. Conclusion

Des séparations chromatographiques ont été effectuées sur le précipité de l'extrait acétate d'éthyle, le filtrat de ce dernier et l'extrait chloroforme des parties aériennes de *P. inuloides*. Le précipité a donné les composés **4**, **5**, **6** et **7**, le filtrat a donné les composés **8** et **9** et l'extrait chloroforme a donné le composé **10**.

III.5. La famille des Cistacées

La famille des cistacées (composée de huit genres et de 175 espèces) comprend le genre *Cistus*, qui comprend environ 20 espèces d'arbustes largement répandues dans toute la région méditerranéenne (Comandini et al., 2006 ; Tomas-Menor et al., 2013). En médecine populaire méditerranéenne, les espèces *Cistus* ont été utilisées comme remèdes (Barrajón-catalán et al., 2010) et pour leurs actions anti-inflammatoire (Demetzos et al., 2001), anti-ulcérogène, cicatrisation, antimicrobienne (Demetzos et al., 1999), antifongique (Bayoub et al., 2010), antivirales, anti-tumorales (Dimas et al., 2000), cytotoxique (Ben Jemia et al., 2013) et leurs propriétés anti-nociceptives (Barrajón-Catalán et al., 2010). A titre d'exemple, un thé préparé à partir de *C. salvifolius* (Al-khalil, 1995) a été traditionnellement utilisé pour le traitement de la goutte (Alkhalil, 1995) et les ulcères (Yesilada et al., 1999). Au Maroc, *C. salvifolius* a également montré une activité antibactérienne contre *Mycobacterium aurum* et *Mycobacterium smegmatis* (Haouat et al., 2013). *Cistus incanus* spp. *tauricus* contient un extrait spécifique riche en polyphénols (appelé CYSTUS052) qui a démontré une activité antivirale contre les infections par le virus grippal A (Ehrhardt et al., 2007). L'activité antimicrobienne de nombreuses espèces végétales est liée à leurs composés phénoliques (Rauha et al., 2000). Ces antioxydants sont largement distribués dans le règne végétal et sont considérés comme des agents thérapeutiques potentiels contre un large éventail de maladies (Middleton et al., 2000).

La littérature disponible rapporte des études chimiques sur la composition d'extraits d'espèces *Cistus*, obtenus par différents solvants. Des composés apparentés à la catéchine ont été identifiés dans les extraits aqueux de *C. monspeliensis* (Pomponio et al., 2003). Chez *C. ladanifer* le groupe le plus abondant est celui des dérivés de l'acide ellagique et le gallate de punicalagine étant le composé phénolique le plus abondant. Ces composés (c'est-à-dire les ellagitannins) pourraient être liés à la forte inhibition de la croissance de *Candida albicans*, *C. glabrata* et *C. parapsilosis* (Barros et al., 2012).

III.6. Le genre *Cistus*

Cistus (Cistacées) est l'un des genres les plus caractéristiques de la Méditerranée. Les espèces arbustives se rencontrent principalement dans les sous-bois et d'autres (*C. ladanifer*, *C. laurifolius* et *C. monspeliensis*) dominent dans les broussailles sempervirentes. L'adaptation

du genre aux environnements méditerranéens est évidente à partir des caractéristiques écologiques telles que la germination des graines dépendant du feu (Roy et Sonié, 1992), la pollinisation dépendante des insectes (Talavera et al., 1993), la reproduction dépendante de fleurs (Herrera, 1987) et la phénologie dépendante du printemps (Herrera, 1986). Une longue histoire des activités humaines a favorisé la distribution et l'abondance des espèces de *Cistus* dans la méditerranée (Thompson, 2005). Les espèces co-occurrentes de *Cistus* sont fréquentes, en particulier dans les montagnes composées à la fois par acide et les sols basiques. La spécificité environnementale liée au substrat confère une valeur supplémentaire aux espèces acidiphiles et basiphiles en tant qu'indicateurs prévisibles des perturbations des régions boisées. Contrairement à la connaissance détaillée des caractéristiques écologiques de *Cistus*, la compréhension de l'évolution des caractères morphologiques et des relations phylogénétiques au sein du genre est extrêmement limitée.

La taxonomie de *Cistus* a été traditionnellement basée sur le nombre végétatif (nombre de nerfs, forme et pilosité des feuilles) et les caractères de reproduction (nombre de sépale, couleur de pétale, longueur de style et nombre de valves de fruit). Les monographies mondiales de *Cistus* ont reconnu entre 16 espèces (Grosser, 1903) et 28 espèces (Dunal, 1824). Suite au traitement de Grosser (1903) avec d'autres espèces décrites plus récemment, on pense actuellement que le genre comprend environ 20 espèces, dont 16 se trouvent en Europe (Warburg, 1968), 11 en Espagne (Martin et Guinée, 1949), 12 en Ibérie (Demoly et Montserrat, 1993) et 12 en Maroc (Soriano, 2002). La plus grande diversité d'espèces se rencontre donc en Méditerranée occidentale, où 14 espèces sont réparties dans la péninsule Ibérique et le nord-ouest de l'Afrique.

III.7. *C. albidus* : aspects botaniques

La plante *Cistus albidus* L., est un membre de l'un des genres communément appelés «Rockrose ou Ciste», est distribuée entourant de la mer Méditerranéenne, principalement aux Sud-ouest d'Europe et Afrique du Nord. Cette espèce est un arbuste jusqu'à un mètre de haut, ligneux à feuilles vertes persistantes et ses fleurs roses sont abondantes et attrayantes (Quezel et Santa, 1963b ; Cabezudo et al., 1992 ; Rameau et al., 2008).



Figure 14. La plante *Cistus albidus* L.

Les systématiciens de la botanique s'accordent à classer cette espèce comme suit :

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Dilleniidae
Ordre	Violales
Famille	Cistaceae
Genre	<i>Cistus</i>
Espèce	<i>Cistus albidus</i> L.

Tableau 8. Classification de l'espèce *Cistus albidus* L.

III.7.1. Utilisation en médecine traditionnelle

Cistus albidus L., est utilisée pour le traitement de diverses maladies. Les décoctions de feuilles sont utilisées pour le traitement de l'hypoglycémie et des douleurs gastriques. En tant que cataplasme, les feuilles sont utilisées pour traiter les abcès, infusés dans le thé, elles sont utilisées comme digestifs. Elle est connue aussi pour ses effets anti-tumoraux antifongiques,

antiviraux, anti-inflammatoires, gastro-protecteurs et pour sa prévention contre les maladies cardiovasculaires (Mohamedi, 2006).

III.7.2. Travaux antérieurs sur l'espèce *C. albidus*

Des études ont montré les effets bénéfiques des extraits de *Cistus* et leurs activités ; contre les ulcères (Yesilada et al., 1997), antiprolifératives et cytotoxiques (Skoric et al., 2012), antibactériennes et antioxydantes (Tomás-Menor et al., 2015).

Seules quelques études ont porté sur la phytochimie de *C. albidus*. Ainsi, il a été montré que l'extrait hexanique contenait principalement des triterpènes oxygénés, des acides gras et des acides labdanoliques (15%) ainsi que des flavonoïdes (0,6%) (De Pascual Teresa et al., 1986), il a été observé que *C. albidus* émettait un pourcentage important de composés organiques volatils, les principaux étant le (E)- β -caryophyllène, le limonène et le β -pinène (Peñuelas et Llusà, 2001).

Les huiles essentielles de *C. albidus* poussant sur des substrats calcaires et siliceux (Sud de la France) sont apparues sous forme d'huiles riches en sesquiterpènes, dominées par l' α -zingibérène, l' δ -cadinène, l' α -curcumène, le (E)- β -caryophyllène et l'allo-aromadendrène (Robles et al., 1999).

III.8. Etude phytochimique de l'espèce *C. albidus* : Travaux personnels

III.8.1. Récolte du matériel végétal

Cistus albidus L. a été collectée en juin 2015 dans la région des Aurès à Foug-toub de Batna (55 km à l'est de Batna). La plante a été identifiée par le professeur Mohamed Kaabeche (Université de Sétif 1, Algérie) et déposée à l'herbier de l'unité de recherche VARENBIOMOI, Université Frères Mentouri, Constantine-1, Algérie : (CA/55/VAR/05-15).

III.8.2. Extraction des parties aériennes

Les parties aériennes (3500 g) ont été mises à macérer dans un mélange éthanol: eau (7: 3) pendant trois jours, cette opération est répétée trois fois avec renouvellement du solvant.

Après concentration à une température n'excédant pas 38°C, nous avons obtenu un résidu sirupeux, dont la masse est égale à 670 g (Rdt= 19,14%). L'extrait brut est dilué avec 1500 ml d'eau distillée. La solution ainsi obtenue est laissée au repos à froid pendant une nuit pour décantation. Après filtration, la phase aqueuse obtenue est épuisée successivement par une extraction liquide-liquide dans une ampoule à décanter en utilisant des solvants non miscibles à l'eau et de polarité croissante en commençant par l'éther de pétrole, chloroforme, puis l'acétate d'éthyle et en dernier le *n*-butanol. Les quatre extraits organiques récupérés ont été séchés, concentrés sous pression réduite à sec et pesés. Le processus d'extraction est résumé dans le schéma suivant :

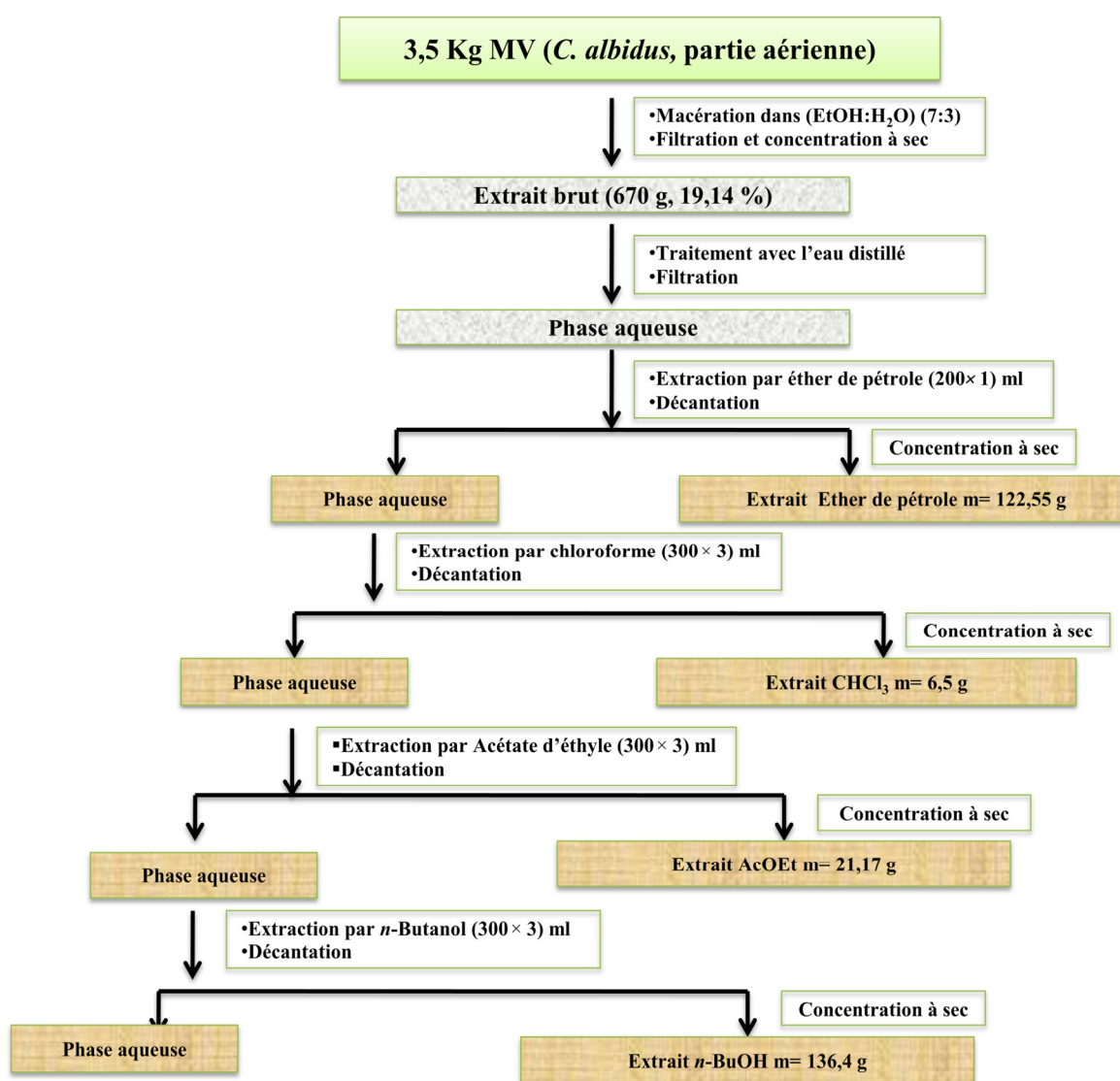


Figure 15. Organigramme récapitulatif des étapes d'extraction des parties aériennes de l'espèce *C. albidus*

Le tableau suivant présente les rendements de différents extraits obtenus de *C. albidus*:

Matériel végétal	Extrait	Aspect	Couleur	Masse (g)	Rendement (%)
3500 g	Ether de pétrole	Pâteux	Verte	122,55	3,50
	Chloroforme	Pâteux	Verte	6,50	0,18
	Acétate d'éthyle	Pâteux	Jaune	21,17	0,63
	<i>n</i> -Butanol	Pâteux	Marron	136,40	3,90

Tableau 9. Rendements d'extraction des extraits de l'espèce de *Cistus albidus* L.

III.8.3. Séparation et purification

III.8.3.1. Tests chromatographiques

Les extraits obtenus (chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol) sont soumis à une chromatographie analytique sur couche mince de gel de silice, pour mettre au point l'éluant ou le système d'éluant qui donnerait les meilleurs résultats de séparation pour lancer une colonne chromatographique. Le meilleur système obtenu était le mélange (CHCl₃: MeOH, 3: 1).

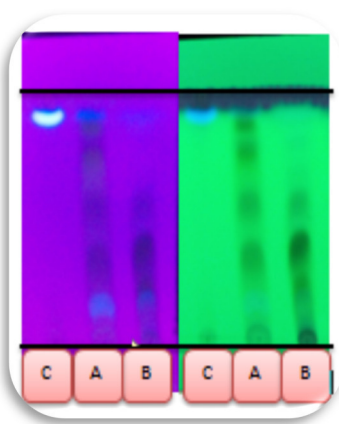


Figure 16. Profil chromatographique des trois extraits sous lampe UV $\lambda = 365$ nm et $\lambda = 254$ nm. A : la phase AcOEt, B : la phase *n*-BuOH, C : la phase CHCl₃

Ce résultat analytique nous a montré que l'extrait acétate d'éthyle (21,17 g) était t riche en produits par rapport aux autres extraits. C'est pour cette raison que celui-ci a été choisi pour une purification ultérieure par chromatographie sur colonne.

III.8.4. Séparation chromatographique sur colonne de gel de silice de l'extrait AcOEt

Après avoir trouvé le bon système, la séparation de la phase acétate d'éthyle (21,17 g) a été effectuée sur une colonne en utilisant comme phase stationnaire le gel de silice (High purity grade, pore size 60°A, 230-400 mesh particle size 43-63 µm, particle size for flash chromatography). L'extrait acétate éthyle dissout dans le chloroforme est mélangé à une petite quantité de gel de silice. L'ensemble est séché sous vide jusqu'à obtention d'une poudre homogène. Cette dernière est déposée sur une colonne de gel de silice préparée dans le chloroforme. L'élution est réalisée par un gradient de polarité du système chloroforme-méthanol en commençant par le chloroforme pur et en terminant par le méthanol pur. Des fractions de 500 ml sont recueillies en bas de la colonne dans des flacons. Elles sont ensuite évaporées, puis analysées par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support d'aluminium dans différents systèmes d'élutions. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm) puis révélées à l'anisaldéhyde. La progression de cette colonne est rassemblée dans le tableau suivant :

Lots	CHCl ₃ %	MeOH %	Lots	CHCl ₃ %	MeOH %
1-209	100	0	314-320	50	50
210-266	95	5	321-324	40	60
267-281	90	10	325-328	30	70
282-289	85	15	329-333	20	80
290-296	80	20	334-339	10	90
297-307	70	30	340-345	100	0
308-313	60	40	-	-	-

Tableau 10. Résultats de la séparation sur colonne de gel de silice de l'extrait AcOEt de *C. albidus*

Selon les résultats donnés par les plaques chromatographiques sur gel de silice, éluées par différents systèmes, les fractions similaires (qui ont les mêmes compositions) ont été regroupées. Le tableau suivant résume le regroupement des fractions ;

Nom de la fraction	Lots	Observation
F1	1-6	Faible quantité
F2	7-11	Faible quantité
F3	12-17	Mélange de produits
F4	18-22	Mélange de produits
F5	23-31	Formation d'un précipité
F6	32-39	Mélange de produits
F7	40-45	Mélange de produits
F8	46-56	Mélange de produits
F9	57-71	Mélange de produits
F10	72-74	Mélange de produits
F11	75-81	Mélange de produits
F12	82-101	Mélange de produits
F13	102-105	Mélange de produits
F14	106	Produit pure
F15	107-118	Formation d'un précipité
F16	119-127	Mélange de produits
F17	128-133	Mélange de produits
F18	134-145	Mélange de produits
F19	146-148	Mélange de produits
F20	149-154	Mélange de produits
F21	155-161	Mélange de produits
F22	162-170	Mélange de produits
F23	171-202	Mélange de produits
F24	203-205	Mélange de produits
F25	206-209	Mélange de produits
F26	210-211	Mélange de produits
F27	212-214	Mélange de produits
F28	215	Précipité
F29	216-221	Mélange de produits
F30	222-230	Mélange de produits

Tableau 11. Regroupement des fractions de l'extrait acétate d'éthyle de *C. albidus*

F31	231-236	Mélange de produits
F32	237-244	Mélange de produits
F33	245-255	Mélange de produits
F34	256-266	Mélange de produits
F35	267-281	Mélange de produits
F36	282-289	Mélange de produits
F37	290-296	Mélange de produits
F38	297-307	Mélange de produits
F39	308-313	Mélange de produits
F40	314-320	Mélange de produits
F41	321-324	Mélange de produits
F42	325-328	Mélange de produits
F43	329-333	Mélange de produits
F44	334-345	Mélange de produits

Tableau 11. Regroupement des fractions de l'extrait acétate d'éthyle de *C. albidus* (suite du tableau 11)

Parmi les fractions obtenues, nous avons étudié celles qui sont séparables et celles qui ont une quantité importante. Après l'examen des plaques CCM de gel de silice sous lumière UV à 254 nm et 365 nm, on a choisi l'étude de trois (03) fractions : F5, F14 et F15.

III.8.4.1. Etude de la fraction F5

Cette fraction contient un produit majoritaire sous forme de précipité. Après plusieurs lavages au méthanol, le précipité blanc ainsi obtenu (qui est soluble dans le chloroforme) a été testé sur plaque analytique de gel de silice éluée avec le système (CHCl_3 : AcOEt, 2: 1), ce précipité a donné un spot unique de fluorescence noir-violette sous lumière UV à $\lambda = 365$ nm et sous la lampe UV à $\lambda = 254$ nm. Après révélation à l'anisaldéhyde, la plaque présente un spot unique de coloration jaune signifiant la pureté de produit que nous avons codé composé **11**. Ce produit est séché puis pesé (44 mg).

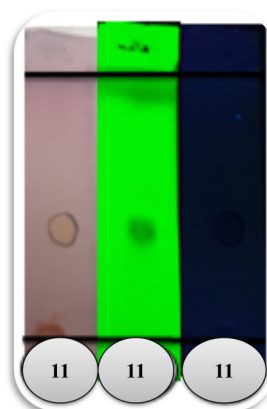


Figure 17. Profil chromatographique CCM de la fraction F5

III.8.4.2. Etude de la fraction F14

La fraction F14 a donnée le composé **12** ($R_f = 0,40$; hexane: EtOAc, 5: 5) sous la forme d'un solide amorphe jaune (12 mg) (Figure 18).

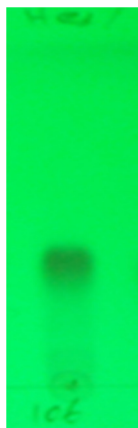


Figure 18. Profil chromatographique CCM de la fraction F14= Composé **12**, (hexane: AcOEt, 5: 5)

III.8.4.3. Etude de la fraction F15

Nous avons observé la formation d'un précipité dans la fraction F15. Après filtration de cette fraction, le précipité obtenu est dissous dans un mélange (MeOH: CHCl_3), puis testé sur une plaque analytique de gel de silice, éluee par le système : chloroforme : acétate d'éthyle (2: 1).

Le test donne une seule tache noire sous lumière UV à 254 nm et jaune sous lumière UV à 365 nm. Le filtrat de cette fraction a été chromatographié sur des plaques préparatives de gel de silice éluées avec le mélange chloroforme : acétate d'éthyle (2 : 1) pour donner le composé **13** (2,7 mg).

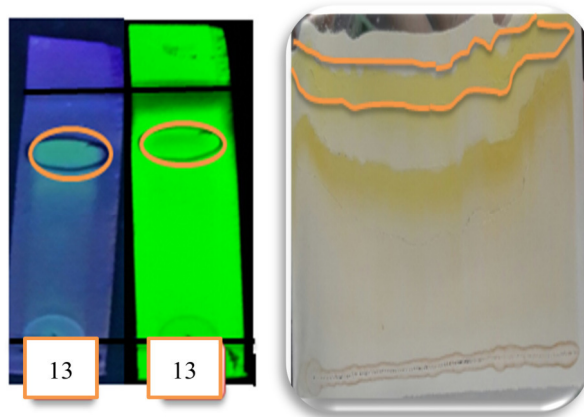


Figure 19. Profil chromatographique CCM et préparative du produit **13**

III.8.5. Conclusion

La séparation chromatographiques qui été effectuées sur l'extrait acétate d'éthyle de *C. albidus* a permet l'isolement des composés **11**, **12** et **13**.

III.9. Résultats et discussions

III.9.1. Identification du composé 4

III.9.1. a. Données spectroscopiques UV-Visible

L'étude des séries spectrale UV (Figure 20) du composé **4** montre les résultats suivants : la fluorescence violette sous UV à 365 nm de ce composé et les bandes d'absorption dans la région UV-Vis (bande I : λ_{\max} = 341 nm et bande II : λ_{\max} = 281 nm) nous orientent vers une flavone ou flavonol substitué en C-3.

- **Série I:** l'effet bathochromique ($\Delta\lambda$ = +39 nm) de la bande I en présence de NaOH avec l'augmentation de l'intensité lumineuse, et la stabilité du spectre sont en faveur

de la présence d'un OH libre en C-4', l'absence d'une nouvelle bande entre 320-335 nm dans le spectre de NaOH par rapport au spectre méthanol indique l'absence d'un hydroxyle libre en C-7.

- **Série II:** l'effet bathochromique de la bande I ($\Delta\lambda = +33$ nm) du spectre AlCl_3 comparativement au spectre méthanol et le déplacement ($\Delta\lambda = +24$ nm) de cette bande enregistrée dans le milieu MeOH: $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ confirme que cette molécule dispose un OH libre en C-5 et indique une O-substitution en C-6.
- **Série III:** l'absence du déplacement bathochrome de la bande II en présence de NaOAc confirme la présence d'une substitution O-R en C-7. La comparaison du spectre NaOAc + H_3BO_3 par rapport au spectre MeOH indique l'absence de groupements ortho di-OH sur le cycle B (pas de déplacement bathochrome de la bande I).

Les résultats sont rassemblés dans le tableau suivant :

Série	Réactifs	Bande II (nm)	Bande I (nm)	Déplacement (nm)	Interprétation
I	MeOH	281	341	-	Flavone ou flavonol substitué en C-3
	MeOH + NaOH	307	380	Bande I: $\Delta\lambda = +39$	OH en 4' O-R en 7
	MeOH + NaOH + 5 min	307	374	Stable après 5 min	OH en 4' O-R en 7
II	MeOH + AlCl_3	300	374	Bande I : $\Delta\lambda = +33$	OH en 5
	MeOH/ $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$	294	365	Bande I: $\Delta\lambda = +24$	OH en 5 Oxygénation en C-6
	AlCl_3 / $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$	294	365	Bande I : Faible déplacement	Absence du groupement ortho di OH sur B
III	MeOH + NaOAc	281	347	Bande II : pas de déplacement	O-R en 7
	MeOH/ NaOAc + H_3BO_3	287	337	Bande I: $\Delta\lambda = -4$	Absence de groupements ortho di-OH sur B

Tableau 12. Données spectroscopiques UV du composé 4

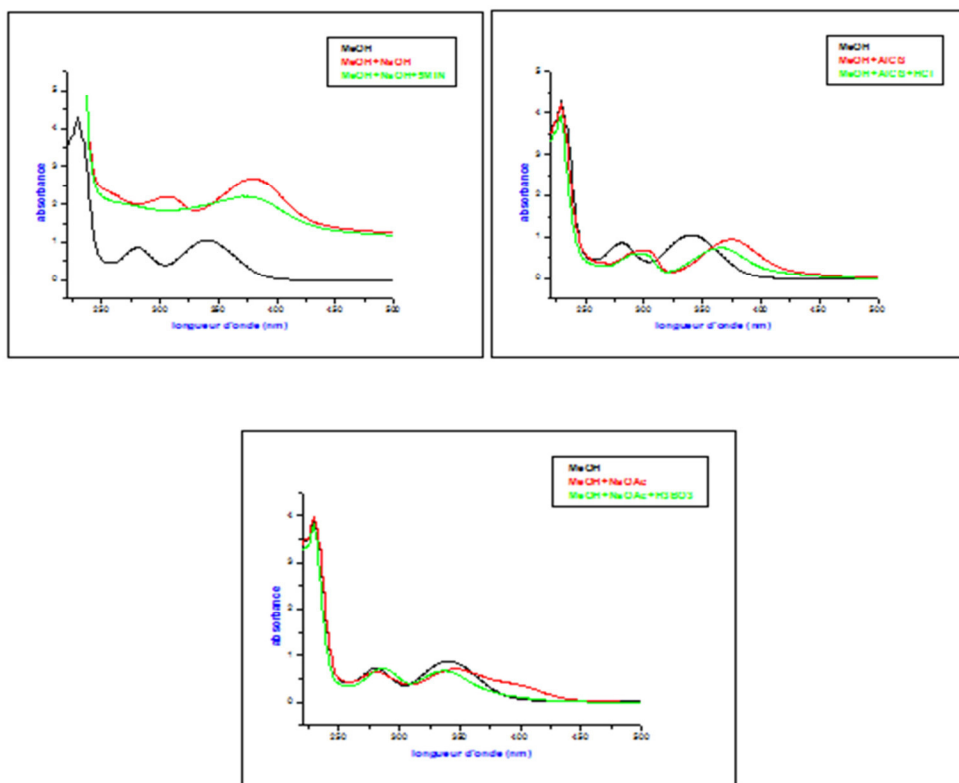


Figure 20. Série spectrale UV du composé 4

III.9.1.b. Données spectroscopiques IR

L'examen du spectre infrarouge de composé 4 (Figure 21) montre la présence des fonctions hydroxyles à $3413,7\text{ cm}^{-1}$, la fonction C=C à $1562,5\text{ cm}^{-1}$ et la fonction cétone à $1660,37\text{ cm}^{-1}$.

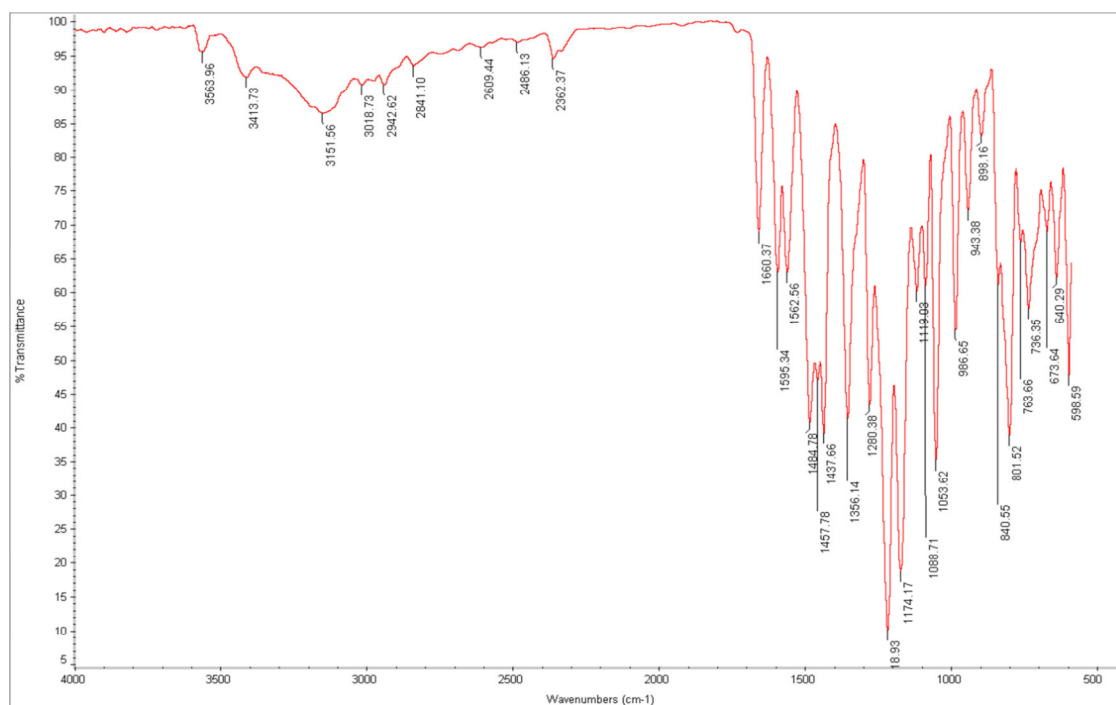


Figure 21. Spectre IR du composé 4

III.9.1.c. Donnée spectroscopiques RMN

L'examen du spectre RMN ¹H (400 MHz) enregistré dans CD₃OD du composé 4 montre la présence de deux groupements méthoxyles et des protons aromatiques.

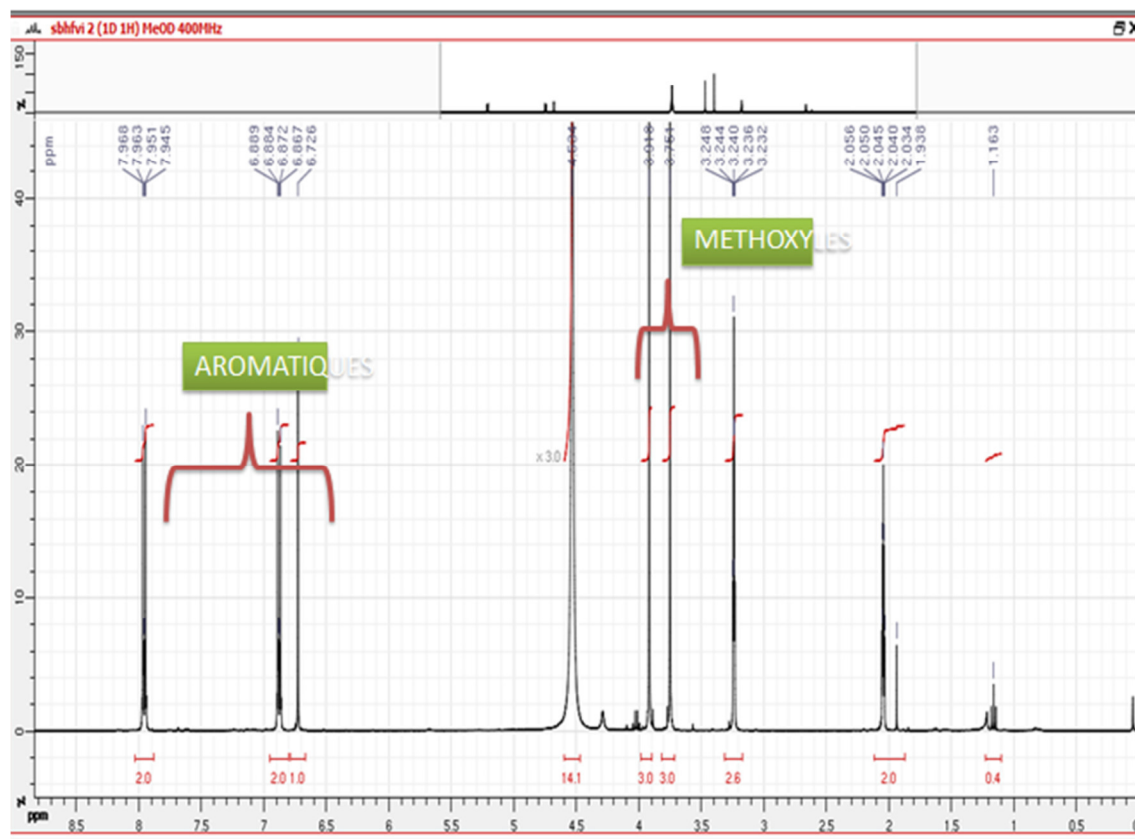


Figure 22. RMN ^1H (CD_3OD ; 400 MHz) du composé 4

Dans la région aromatique, on observe un système AA'BB' caractéristique d'une para substitution sur le cycle B avec un doublet d'intégration 2H à $\delta_{\text{H}} = 6,87$ ppm avec une constante de couplage $J = 8,4$ Hz (couplage ortho) et un autre doublet d'intégration 2H à $\delta_{\text{H}} = 7,95$ ppm ($J = 8,4$ Hz ; couplage ortho). Ces signaux sont attribués aux protons H-3', H-5' et H-6', H-2' respectivement. Les premiers étant plus blindés que les seconds par le groupement hydroxyle voisin en C-4' (Figure 23).

Un singulet observé à $\delta_{\text{H}} = 6,72$ ppm d'intégration 1H qui est attribué au proton H-3 ou H-8 en raison de la valeur de son déplacement chimique d'une part et des données spectroscopiques UV d'autre part qui indique une O-substitution en C-6.

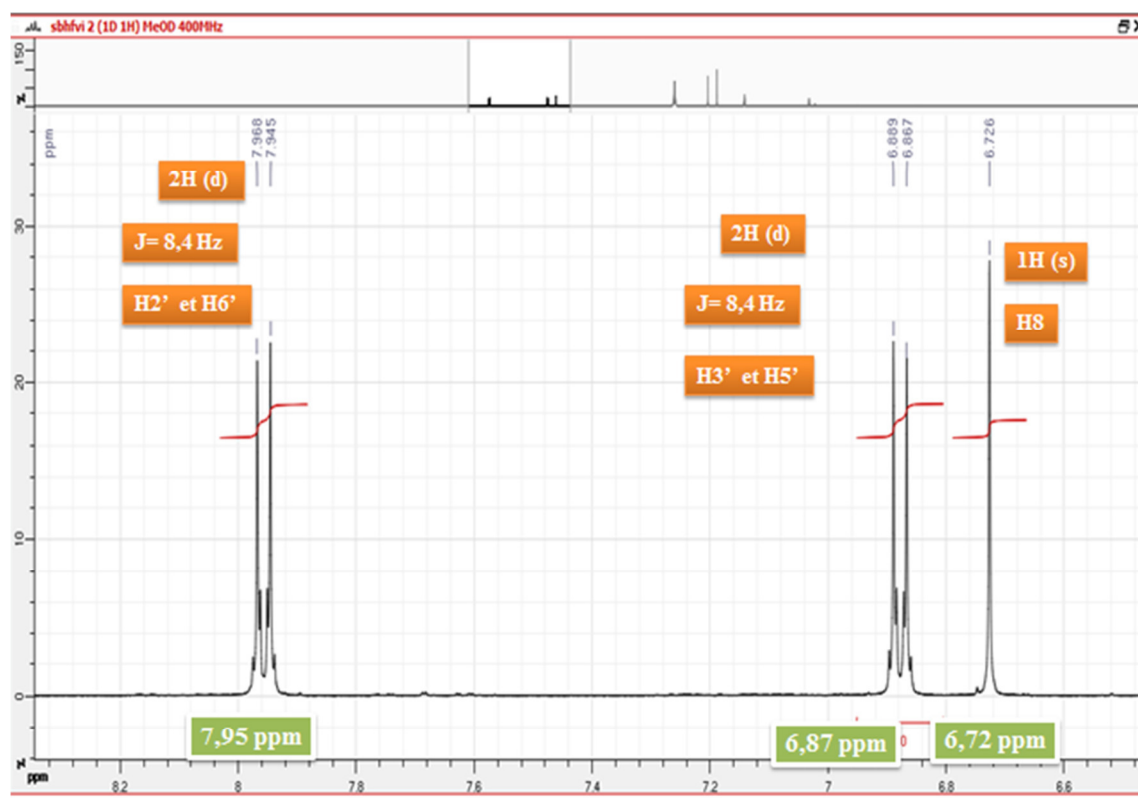


Figure 23. Étalement de la zone [6,6 ppm – 8,2 ppm] du spectre RMN ^1H (CD_3OD ; 400 MHz) du composé **4**

L'apparition de deux signaux sous forme de singulets à $\delta_{\text{H}} = 3,75$ ppm et $\delta_{\text{H}} = 3,91$ ppm d'intégration 3H chacun, indiquent la présence de deux groupements méthoxyles dont l'un est positionné en C-7 et le second en C-3, C-6 ou C-8 du fait des données spectroscopiques UV (Figure 24).

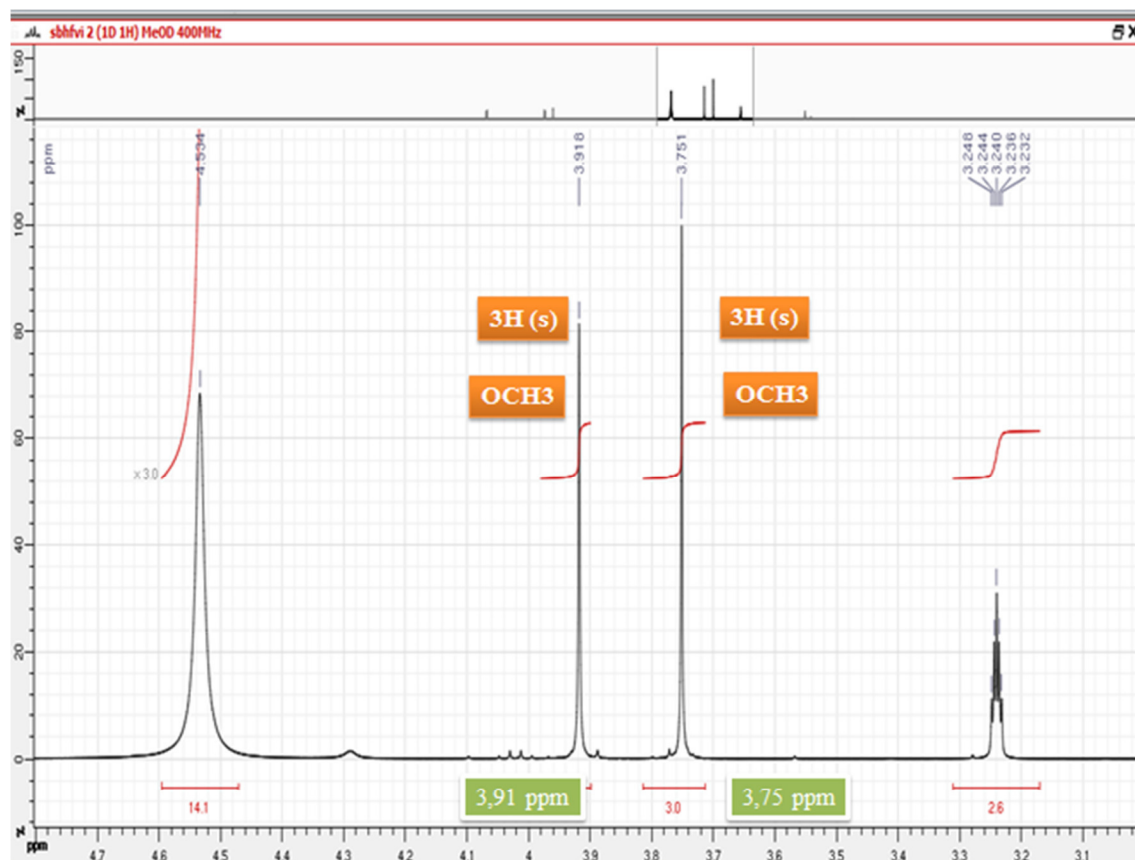


Figure 24. Étalement de la zone [3,1 ppm - 4,7 ppm] du spectre RMN ^1H (CD_3OD ; 400 MHz) du composé **4**

Les corrélations HSQC (Figure 25) permettent de lever ces ambiguïtés. En effet le proton à $\delta_{\text{H}} = 6,72$ ppm corrèle avec le carbone à $\delta_{\text{C}} = 91,5$ ppm qui ne peut être que le carbone C-8. De ce fait compte tenu des informations précédentes données par la série spectrale UV. Les deux groupements méthoxy sont localisés dans les positions C-7 et C-3.

Les autres corrélations sont les suivantes :

- Le signal d'intégration 3H du groupement méthoxyle qui apparait à $\delta_{\text{H}} = 3,71$ ppm avec le carbone C_{OMe} à $\delta_{\text{C}} = 60,4$ ppm.
- Le signal d'intégration 3H du groupement méthoxyle à $\delta_{\text{H}} = 3,91$ ppm avec le carbone C_{OMe} à $\delta_{\text{C}} = 56,9$ ppm.
- Le signal d'intégration 2H (H-3', H-5') à $\delta_{\text{H}} = 6,87$ ppm avec les carbones C-3', C-5' à $\delta_{\text{C}} = 116,4$ ppm.
- Le signal d'intégration 2H (H-2', H-6') à $\delta_{\text{H}} = 7,95$ ppm avec le carbone C-2', C-6' à $\delta_{\text{C}} = 131,3$ ppm.

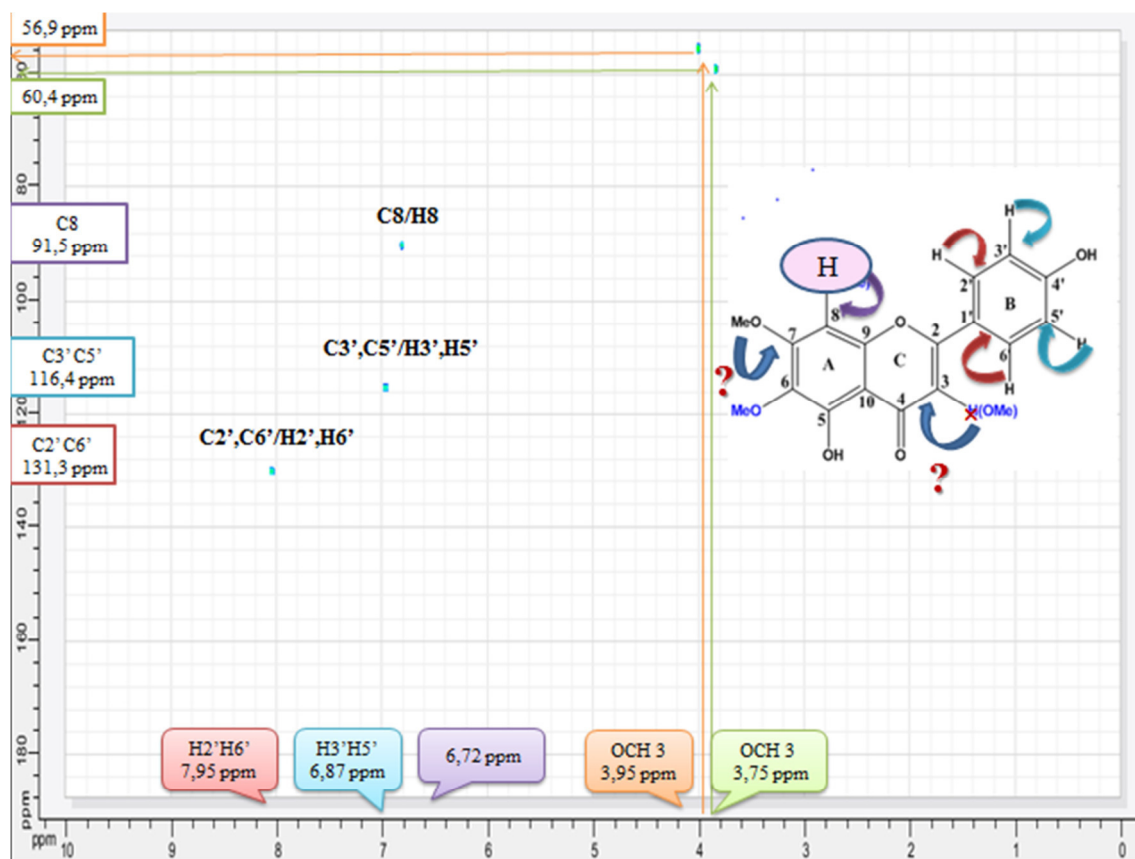


Figure 25. Spectre HSQC (CD_3OD ; 400 MHz) du composé 4

L'analyse du spectre HMBC (Figure 27) montre que les deux groupements méthoxy à $\delta_{\text{H}} = 3,75 \text{ ppm}$ et à $\delta_{\text{H}} = 7,95 \text{ ppm}$ corrélient avec les carbones à $\delta_{\text{C}} = 139,1 \text{ ppm}$ et $\delta_{\text{C}} = 155,6 \text{ ppm}$, ce qui permet de les localiser sur les carbones C-3 et C-7 respectivement. Toutes les autres corrélations confirment de manière non ambiguë la structure du composé 4 comme étant le 6-hydroxy kaempferol 3,7-diméthyl éther (Galala et al., 2016 ; Oton et al., 1981).

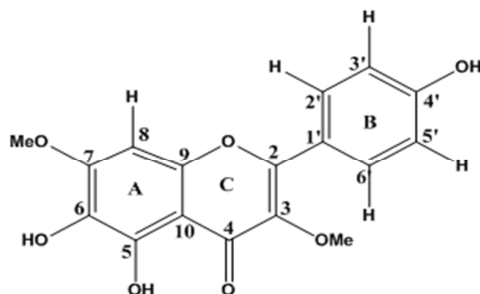


Figure 26. Structure du composé 4: 6-hydroxy kaempferol 3,7-diméthyl éther

Le proton H-8 à $\delta_H = 6,72$ ppm donne une tache d'autocorrélation avec le carbone C-8 à $\delta_C = 91,5$ ppm et une corrélation avec les carbones C-10 à $\delta_C = 107$ ppm, C-9 à $\delta_C = 146,6$ ppm, C-5 à $\delta_C = 150,8$ ppm, C-4 à $\delta_C = 180$ ppm et le carbone à $\delta_C = 131$ ppm qui ne peut être que le carbone C-6, cette attribution confirme que ce carbone est oxygéné et blindé par effet mésomère par les atomes d'oxygène porté par les carbones C-5 et C-7. Les protons H-2', H-6' à $\delta_H = 7,95$ ppm et H-3', H-5' corrélient avec les carbones C-3', C-5' à $\delta_C = 116,8$ ppm et les carbones C-2', C-6' à $\delta_C = 131,3$ ppm respectivement et avec les carbones à $\delta_C = 157,9$ ppm, $\delta_C = 122,6$ ppm et $\delta_C = 161,5$ attribuables à C-2, C-1' et C-4' respectivement. Ceci complète les attributions de tous les carbones et confirme l'ensemble de la structure proposée pour le composé 4.

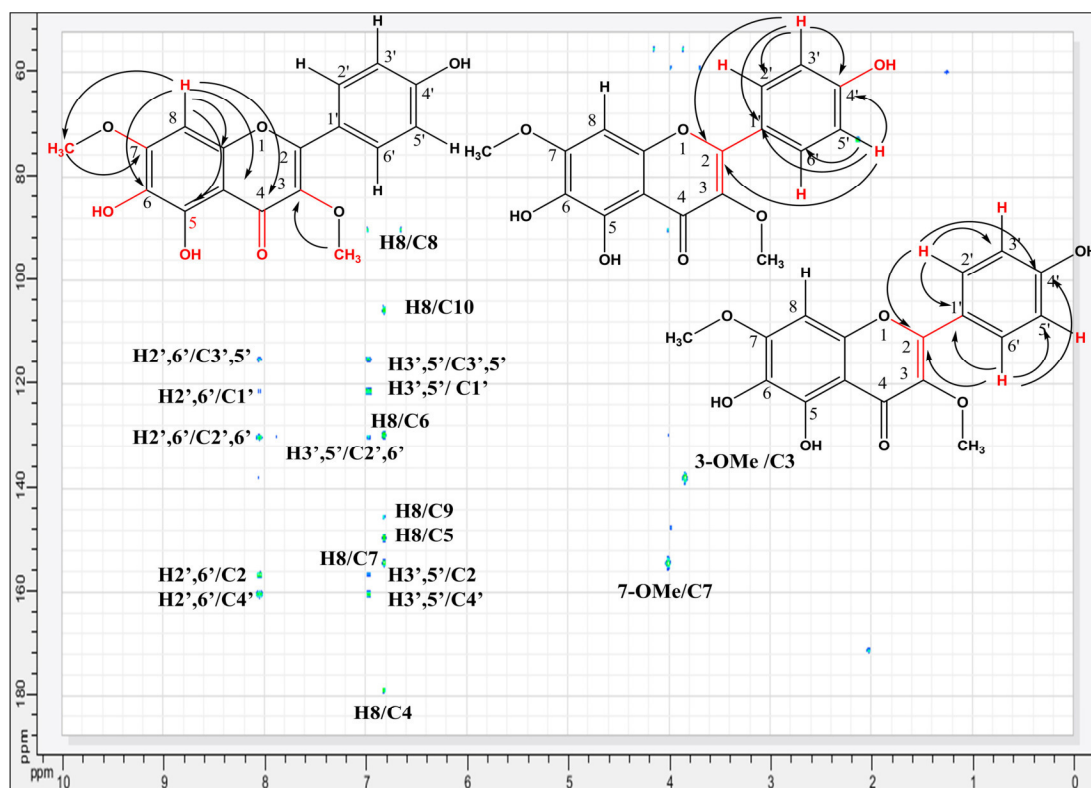


Figure 27. Spectre HMBC (CD₃OD ; 400 MHz) du composé 4

L'analyse du spectre RMN NOESY (Figure 28) montre une corrélation entre le proton H-8 et le OCH₃ à $\delta_H = 3,95$ ppm ce qui permet de confirmer la localisation de ce méthoxy en C-7. Ce spectre montre également la corrélation entre H-3', H-5' à $\delta_H = 6,87$ ppm et H-2', H-6' à $\delta_H = 7,95$ ppm.

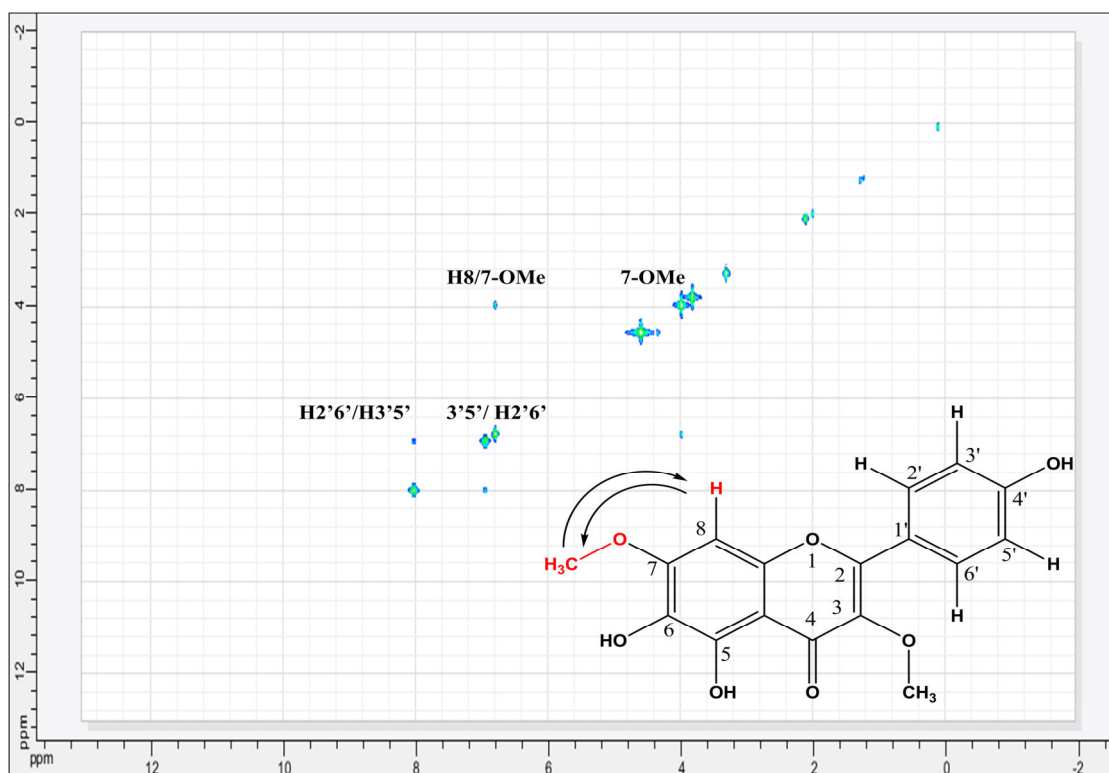


Figure 28. Spectre NOESY (CD₃OD ; 400 MHz) du composé **4**

L'ensemble des attributions des carbones est rassemblé dans la figure 29 et le tableau 13 et suivant :

Position	Composé 4		Position	Composé 4	
	δ_H	δ_C		δ_H	δ_C
2	-	157,9 s	1'	-	122,6 s
3	-	139,2 s	2'	7,95 d (8,4)	131,3 d
4	-	180,0 s	3'	6,87 d (8,4)	116,8 d
5	-	150,8 s	4'	-	161,5 s
6	-	131,0 s	5'	6,87 d (8,4)	116,8 d
7	-	155,6 s	6'	7,95 d (8,4)	131,3 d
8	6,72 s	91,5 d	3-OMe	3,75 s	60,4 q
9	-	146,6 s	7-OMe	3,95 s	56,9 q
10	-	107,0 s	-	-	-

Tableau 13. Valeurs des déplacements chimiques δ et J (Hz) RMN ¹H et ¹³C (CD₃OD) du composé **4**

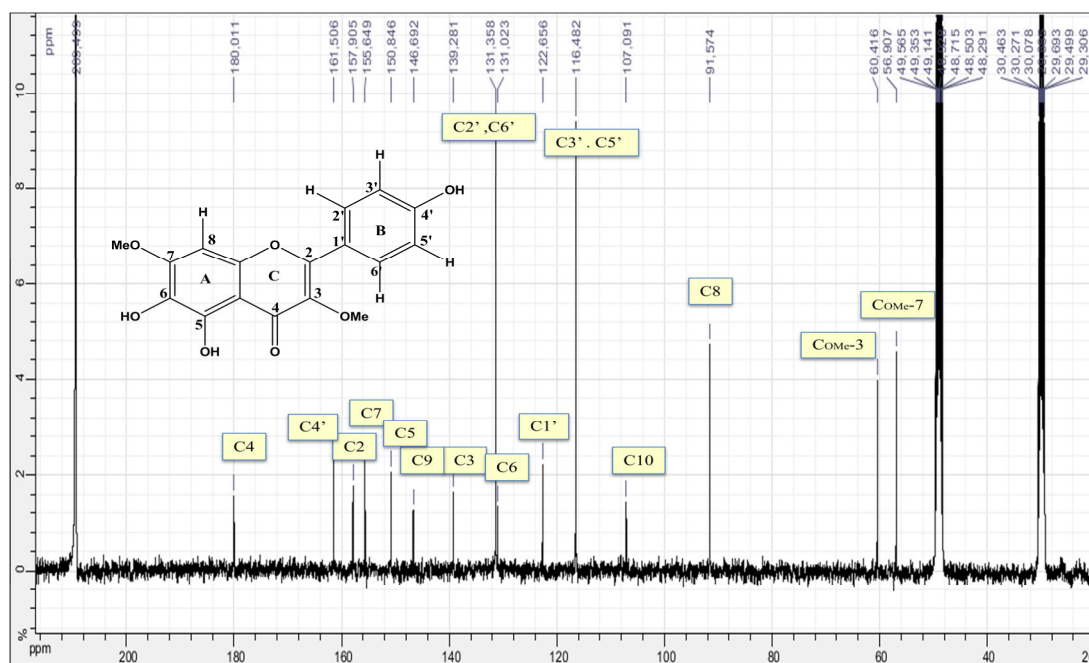


Figure 29. Spectre RMN ^{13}C (CD_3OD ; 400 MHz) du composé 4

L'ensemble de résultat des analyses spectroscopiques nous oriente vers la structure finale du composé 4

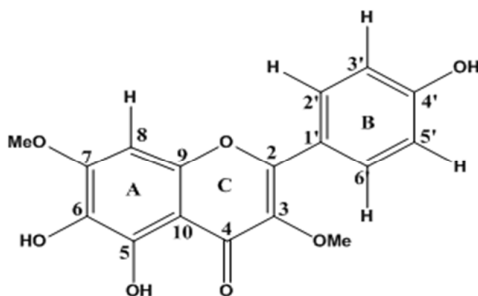


Figure 30. Structure du composé 4: 3; 4',3,6-Trihydroxy-3,7-dimethoxy-flavon (**6-hydroxy kaempferol 3,7-dimethyl ether**)

Le composé 4 (6-hydroxy kaempferol 3,7-dimethyl ether) a été isolé et identifié précédemment dans les parties aériennes du *Pulicaria inuloides* de Yemen (Astéracées) (Galala et al., 2016), *Pulicaria parthenium* (Astéracées)(Wagner et al., 1976), *Pulicaria dysenterica* (Astéracées) (Oton et al., 1981 ; Williams et al., 2000), *Ageratina deltoidea* (Astéracées), *Heterotheca inuloides* (Astéracées), (Wagner et al., 1976), *Inula spp.* (Astéracées) (Harborne, 1999), *Parthenium incanum* et *Parthenium tomentosum*

(Astéracées) (Wagner et al., 1976), *Tanacetum parthenium* (Astéracées) (Williams et al., 1995) et *Eriodictyon trichocalyx* (Hydrophyllacées) (Wagner et al., 1976).

On constate que ce composé (6-hydroxy kaempferol 3,7-dimethyl ether), peut être considéré comme un marqueur chimiotaxonomique de la famille des Astéracées.

III.9.2. Identification du composé 5

III.9.2.a. Données spectroscopiques UV-Visible

Ce composé montre une fluorescence violette sous UV à 365 nm. L'étude des séries spectrales UV du composé **5** (Figure 31) montre la présence de deux bandes caractéristiques des flavonoïdes : bande I : $\lambda_{\max} = 350$ nm et bande II : $\lambda_{\max} = 280$ nm indiquant la présence d'un flavonol substitué en 3.

- **Série I :** le spectre enregistré après l'addition de NaOH provoque un déplacement bathochrome ($\Delta \lambda = +32$ nm) avec augmentation d'intensité par rapport au spectre enregistré dans le méthanol, ce qui suppose la présence d'un hydroxyle libre en position 4'.
- **Série II :** l'addition de AlCl_3 à la solution du composé **5** dans le méthanol mène à la formation de complexes entre les hydroxyles ortho du cycle B et l'hydroxyle en position 5 et la fonction carbonyle ce qui explique l'effet bathochrome de la bande I, mais l'addition de HCl provoque un déplacement hypsochrome ($\Delta \lambda = -58$) de la bande I par rapport au spectre AlCl_3 qui est expliqué par la disparition du complexes instable donc ce composé est substitué par un ortho di-OH sur le cycle B. Un effet bathochrome par rapport au spectre MeOH ($\Delta \lambda = +24$) est expliqué par le maintien d'un complexe stable entre la fonction carbonyle et un OH en position C-5. La valeur du $\Delta \lambda = +24$ indique une oxygénation en C-6.
- **Série III :** l'absence d'un effet bathochrome de la bande II du spectre NaOAc par rapport au spectre MeOH nous oriente vers une substitution du C-7 par un groupement O-R. Un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta \lambda = +16$) du spectre NaOAc+ $\text{H}_3\text{B}\text{O}_3$ par rapport au spectre MeOH indique la présence d'un groupement ortho di-OH sur le cycle B.

Les résultats de la spectroscopie UV-Visible sont rassemblés dans le tableau suivant :

Réactifs	Bande II (nm)	Bande I (nm)	Déplacement (nm)	Interprétation
MeOH	280	350	-	Flavonol substitué en C-3
MeOH+NaOH	264	382	Bande I : $\Delta\lambda = +32$	OH en 4'
MeOH+NaOH +5 min	264	375	Stable après 5 min	OH en 4'
MeOH+AlCl ₃	281	432	Bande I : $\Delta\lambda = +82$	Ortho di OH sur B avec 5-OH
MeOH/AlCl ₃ +HCl	293	374	Bande I : $\Delta\lambda = -58$	OH en 5 Oxygénation en C-6
MeOH+NaOAc	280	356	Bande II : pas de déplacement	O-R en 7
MeOH/NaOAc+H ₃ BO ₃	267	366	Bande I : $\Delta\lambda = +16$	Ortho di-OH sur B

Tableau 14. Données de la série spectrale UV du composé 5

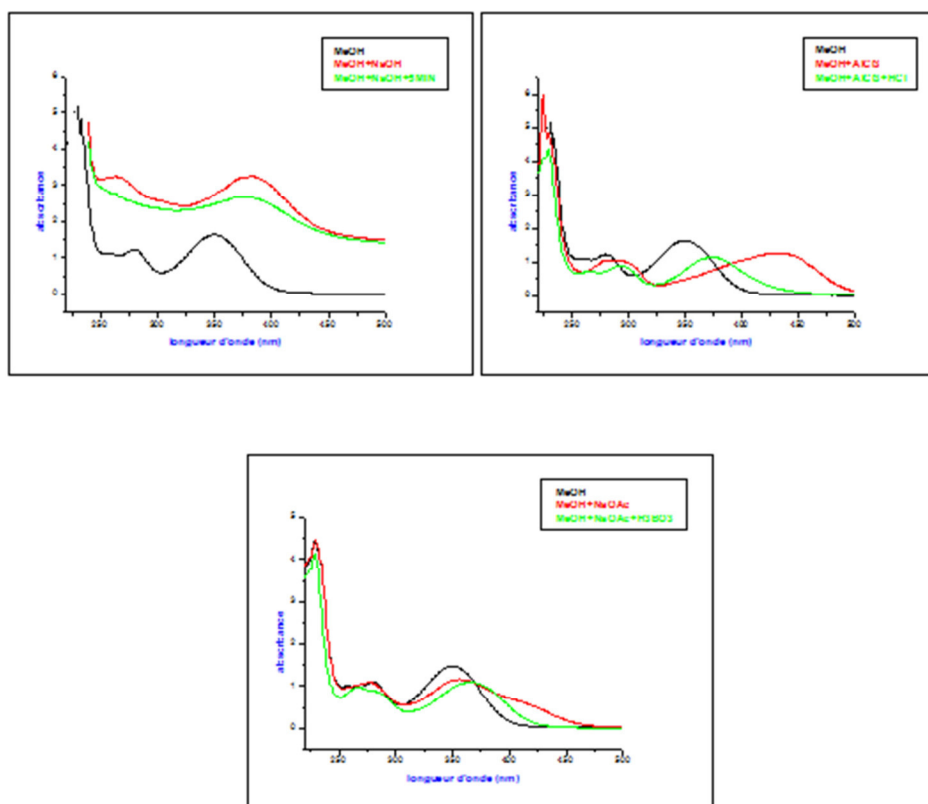


Figure 31. Série spectrale UV du composé 5

III.9.2.b. Donnée spectroscopiques RMN

L'examen du spectre RMN ^1H (400 MHz) enregistré dans CD_3OD montre les signaux caractéristiques d'un flavonoïde dans la région la zone aromatique et la présence de deux groupements méthoxyles avec :

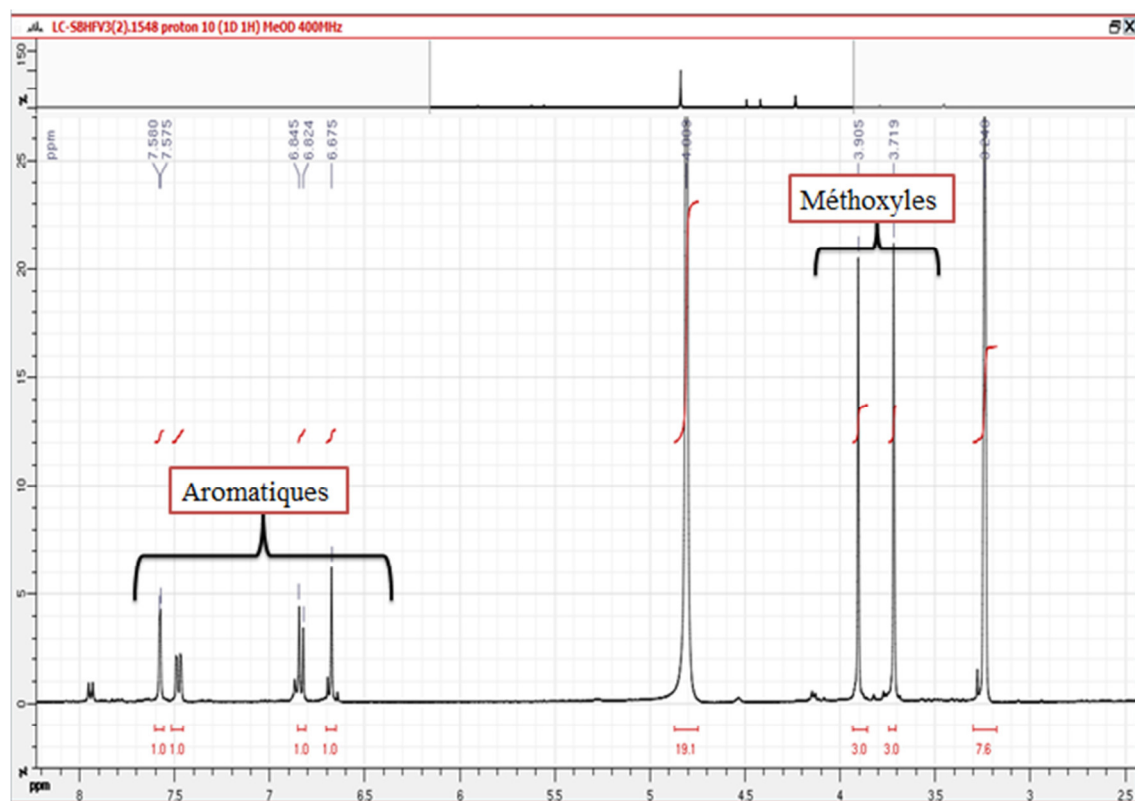


Figure 32. RMN ^1H (CD_3OD ; 400 MHz) du composé 5

- Un doublet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 7,58$ ppm ($J = 1,9$ Hz, couplage méta) attribuable à H-2'.
- Un doublet de doublet d'intégration 1H ($J = 8,6$ et $1,9$ Hz, couplage ortho et méta) à $\delta_{\text{H}} = 7,47$ ppm attribué au proton H-6'.
- Un doublet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 6,83$ ppm ($J = 8,6$ Hz, couplage ortho) attribuable à H-5'.
- Un singulet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 6,67$ ppm attribuable à H-8 en raison de la valeur de son déplacement chimique (Figure 33).

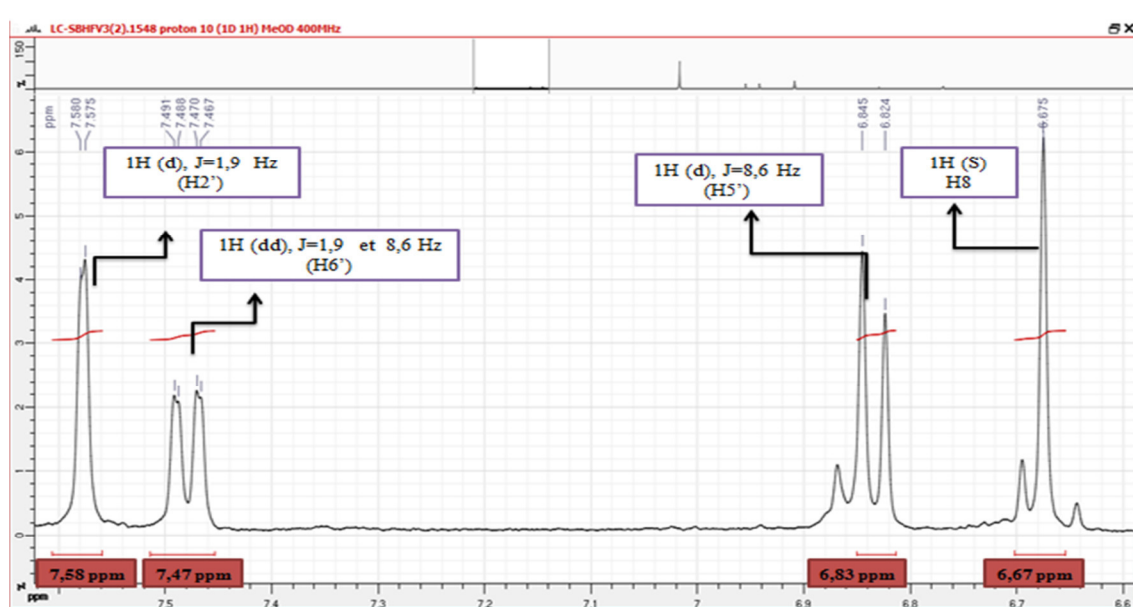


Figure 33. Étalement de la zone [6,6 ppm – 7,6 ppm] du spectre RMN ^1H (CD_3OD ; 400 MHz) du composé **5**

Deux singlets d'intégration 3H chacun à $\delta_{\text{H}} = 3,71$ ppm et $\delta_{\text{H}} = 3,90$ ppm attribuables aux protons groupements méthoxyles. D'après les données UV ces groupements sont liés aux carbones C-3 et C-7 (Figure 34).

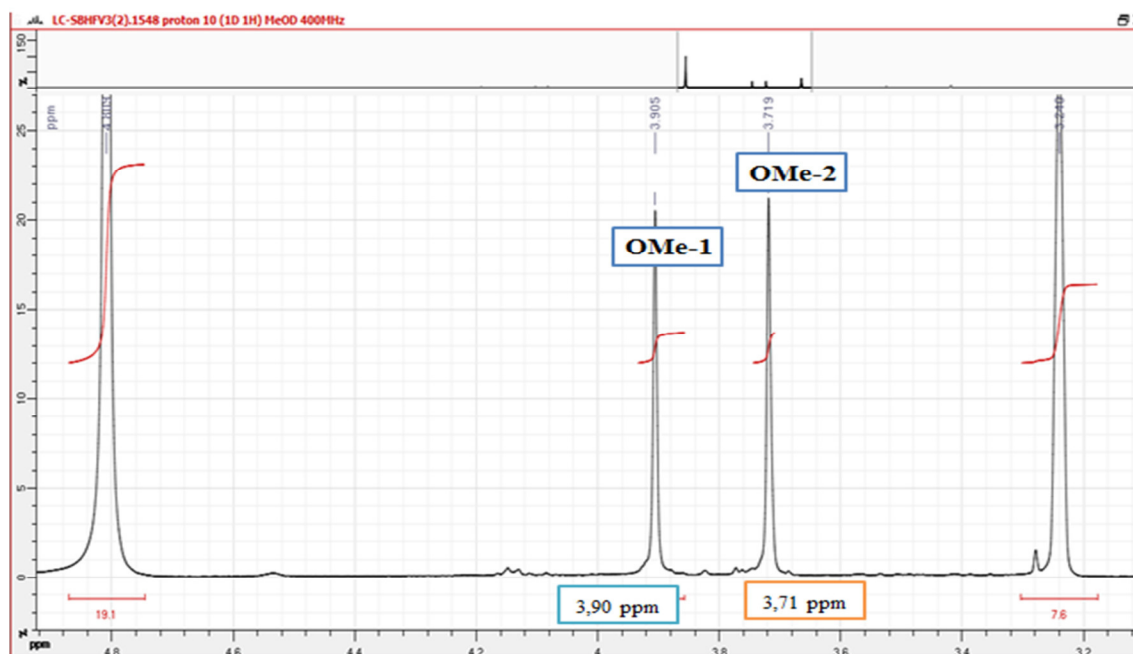


Figure 34. Étalement de la zone [3,2 ppm – 4,8 ppm] du spectre RMN ^1H (CD_3OD ; 400 MHz) du composé **5**

Les corrélations HSQC (Figure 35) permettent de confirmer l'attribution du signal à $\delta_H = 6,67$ ppm au proton H-8 en raison de sa corrélation avec le carbone à $\delta_C = 90$ ppm qui ne peut être que le carbone C-8. Les signaux d'intégration 1H (H-5', H-6' et H-2') à $\delta_H = 6,83$; 7,47 et 7,58 ppm corrélient respectivement avec les carbones C-5', C-6' et C-2' à $\delta_C = 114$; 115 et 120 ppm. Les groupements méthoxy à $\delta_H = 3,71$ ppm et à $\delta_H = 3,90$ ppm corrélient avec les carbones $\delta_C = 59$ ppm à $\delta_C = 55$ ppm. La localisation précise de ces deux groupements sur le squelette flavonique est donnée par les corrélations HMBC (Figure 36).

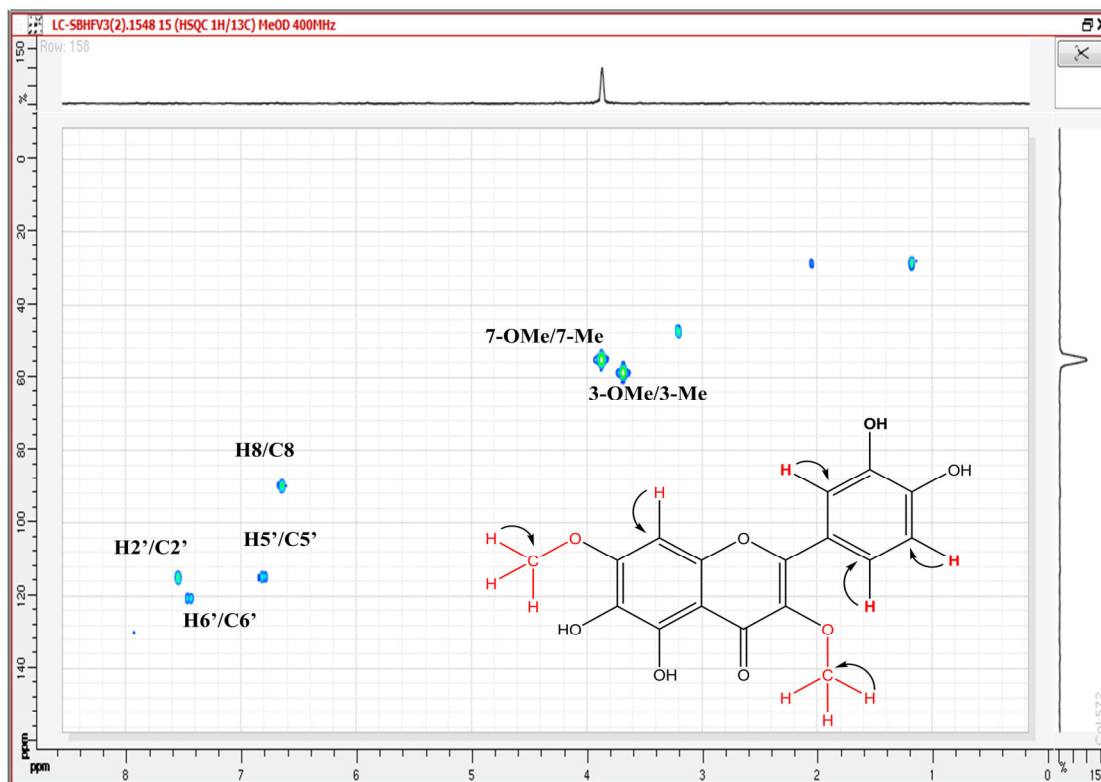


Figure 35. Spectre HSQC ^1H - ^{13}C (CD_3OD ; 400 MHz) du composé 5

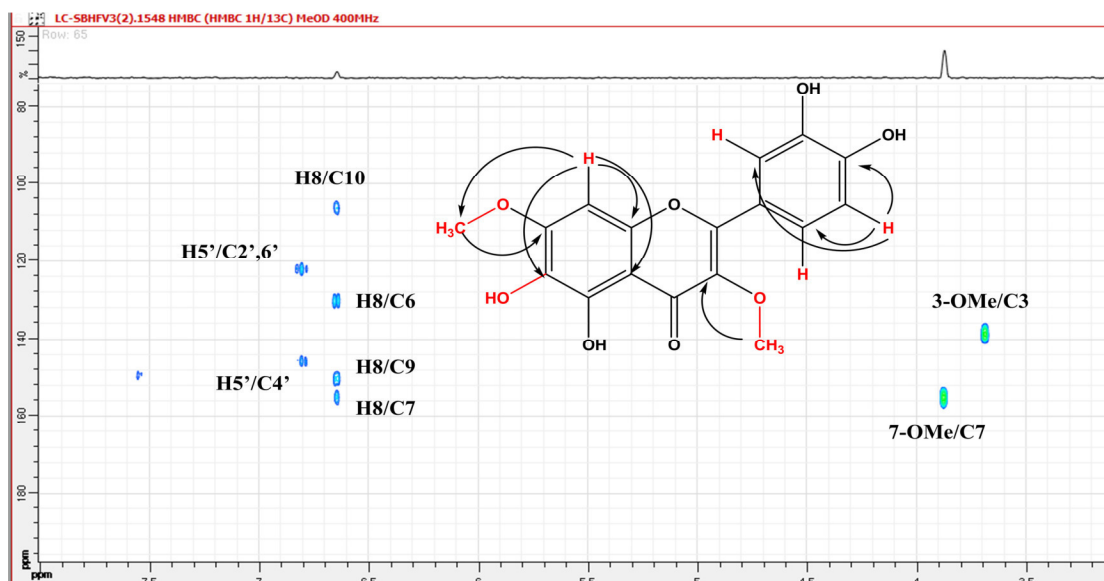


Figure 36. Spectre HMBC ^1H - ^{13}C (CD_3OD ; 400 MHz) du composé **5**

L'ensemble des attributions des carbones du composé **5** est montrée sur la figure 37 :

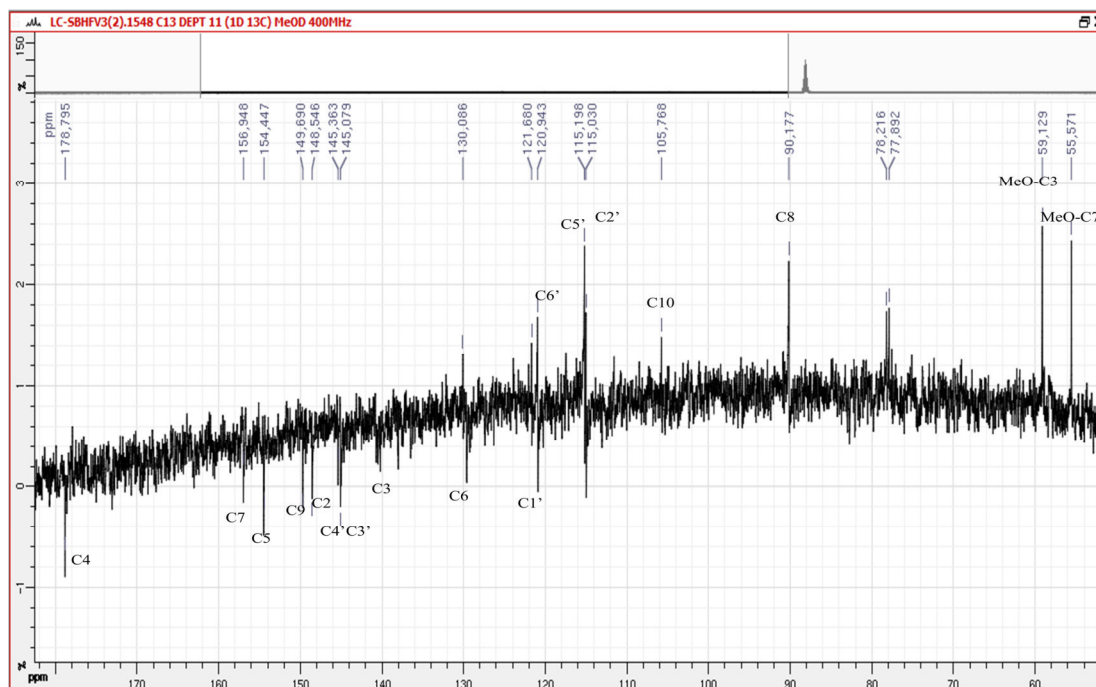


Figure 37. Spectre RMN ^{13}C (Dept 90) (CD_3OD ; 400 MHz) du composé **5**

L'étalement de spectre NOESY (Figure 38) a montré aussi la corrélation entre le proton de méthoxyle à $\delta_{\text{H}} = 3,90$ ppm et $\delta_{\text{H}} = 6,67$ ppm, cela confirme la position de méthoxyle en position C-7 et le proton en position H-8.

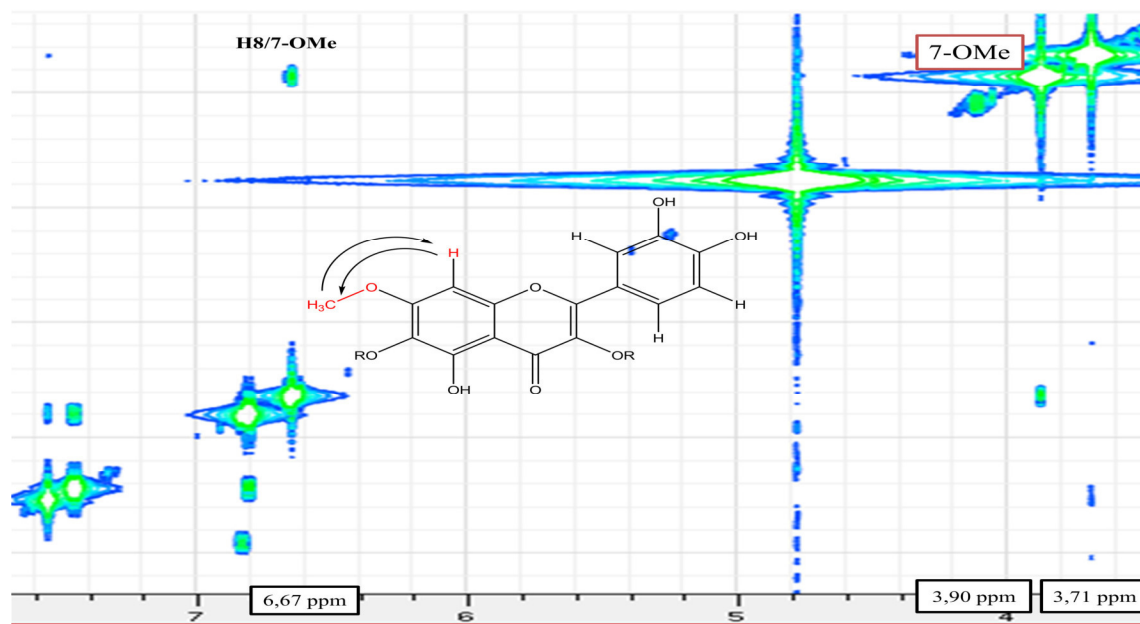


Figure 38. Etalement de spectre NOESY ^1H - ^1H (CD_3OD ; 400 MHz) du composé **5**

Toutes ces données mènent à la structure du composé **5** (Goodwin et Rosler, 1984 ; Mercader et al., 2008)

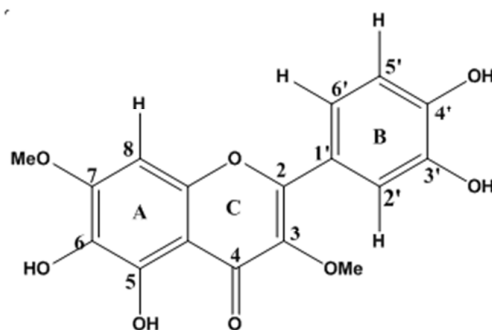


Figure 39. Structure du composé **5**: 5,6,3',4' tetrahydroxy-7,3 diméthoxy flavone (**3,7-Dimethylquercetagenin**)

Les résultats de la RMN ^1H (CD_3OD ; 400 MHz) sont rassemblés dans le tableau suivant :

Position	Composé 5		Position	Composé 5	
	δ_H	δ_C		δ_H	δ_C
2	-	148,5 s	1'	-	121,6 s
3	-	141,0 s	2'	7,58 d (1,9)	115,0 d
4	-	178,8 s	3'	-	145,0s
5	-	154,4 s	4'	-	145,0 s
6	-	130,0 s	5'	6,83 d (8,6)	115,2 d
7	-	156,9 s	6'	7,47 dd (8,6 et 1,9)	120,9 d
8	6,67 s	90,1 d	3-OMe	3,71 s	59,1 q
9	-	149,7 s	7-OMe	3,90 s	55,5 q
10	-	105,7 s	-	-	-

Tableau 15. Valeurs des déplacements chimiques δ et J (Hz) RMN ^1H et ^{13}C (CD_3OD) du composé **5**

Le composé **5** (**3,7-Dimethylquercetagenin**) a été isolé et identifié précédemment dans l'espèce de *Pulicaria spp* (Astéracées), *Brickellia glutinosa* (Astéracées) (Goodwin et Rosler, 1984 ; Wagner et al. 1976 ; Jay et Voirin, 1976), *Pulicaria arabica* (El-Neghoumi et al., 1982), *Pulicaria dysenterica* (Astéracées) (Oton et al., 1981), *Inula germanica* (Astéracées) (Wollenweber et al., 1995) *Pterocaulon purpurascens* (Astéracées), *Parthenium tomentosum* (Astéracées), (Wagner et al., 1976), *Chrysosplenium tetrandrum* (Saxifragacées) (Jay et Voirin, 1976), *Ambrosia artemisiifolia* (Astéracées), *Madia sativa* (Astéracées) (Wollenweber et al., 1989 ; Wollenweber et al., 1997), *Tanacetum parthenium* (Astéracées) (Williams et al., 1995), *Artemisia abrotanum* (Astéracées) (Bergendorff et Sterner, 1995), *Marsdenia tomentosa* Decne. (Apocynacées) (Seto et al., 1977), *Artemisia annua* (Astéracées) (Chen et al., 2001), *Haplopappus rengifoanus* (Astéracées), *Holocarpha obconica* (Astéracées), *Melampodium americanum* (Astéracées), *Neurolaena spp* (Astéracées) et *Eriodictyon trichocalyx* (Hydrophyllacées) (Wagner et al., 1976 ; Jay et Voirin, 1976).

On constate que le composé (3,7-Dimethylquercetagenin) peut être considéré comme un marqueur chimiotaxonomique de la famille des Astéracées.

III.9.3. Identification du composé 6

III.9.3.a. Données spectroscopiques UV-Visible

Ce composé montre une fluorescence noire violette sous UV à 365 nm. L'étude des séries spectrales UV du composé 6 (Figure 40) montre la présence de deux bandes caractéristiques des flavonoïdes : bande I : $\lambda_{\text{max}} = 333$ nm et bande II : $\lambda_{\text{max}} = 270$ nm indiquant la présence d'une flavone ou d'un flavonol substitué en position 3.

- **Série I** : le déplacement bathochromique ($\Delta\lambda = +37$ nm) de la bande I en présence de NaOH avec l'augmentation de l'intensité lumineuse indique la présence d'un OH libre en position 4'.
- **Série II** : l'absence de l'effet bathochrome de la bande I en comparant le spectre $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ et le spectre MeOH indique l'absence d'un OH libre à la position 5 donc le C5 est occupé par un O-R.
- **Série III** : l'absence du déplacement bathochrome de la bande II en présence de NaOAc confirme la présence d'une substitution O-R en C-7. La comparaison du spectre $\text{NaOAc} + \text{H}_3\text{BO}_3$ par rapport au spectre MeOH indique l'absence de groupements ortho di-OH sur le cycle B.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau suivant :

Réactifs	Bande II (nm)	Bande I (nm)	Déplacement (nm)	Interprétation
MeOH	270	333	-	Flavone ou d'un flavonol substitué en position 3
MeOH + NaOH	250	370	Bande I : $\Delta\lambda = +37$ avec augmentation d'intensité	OH en 4'
MeOH + NaOH + 5 min	251	369	Stable après 5 min	OH en 4'
MeOH + AlCl_3	270	333	Bande I : pas de déplacement	O-R en 5
MeOH/ $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$	270	333	Bande I : pas de déplacement	O-R en 5
AlCl_3 / $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$	270	334	Bande I : pas de déplacement	Absence d'ortho di-OH sur B
MeOH + NaOAc	270	338	Bande II : pas de déplacement	O-R en 7
MeOH / NaOAc + H_3BO_3	269	335	Bande I : $\Delta\lambda = +2$	Absence d'ortho di-OH sur B

Tableau 16. Données spectroscopiques UV du composé 6

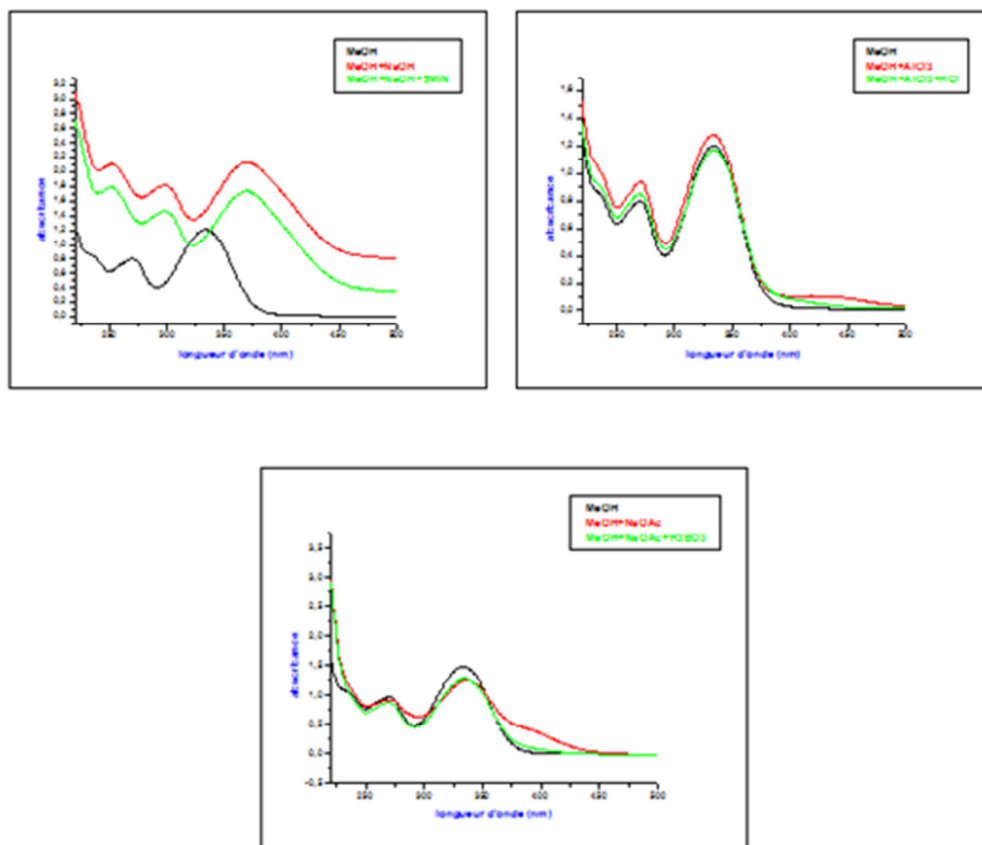


Figure 40. Série spectrale UV du composé 6

III.9.3.b. Données spectroscopiques RMN

L'examen du spectre RMN ^1H (400 MHz) enregistré dans CD_3OD montre les signaux caractéristiques d'un flavonoïde dans la zone aromatique et la présence de trois groupements méthoxyles avec :

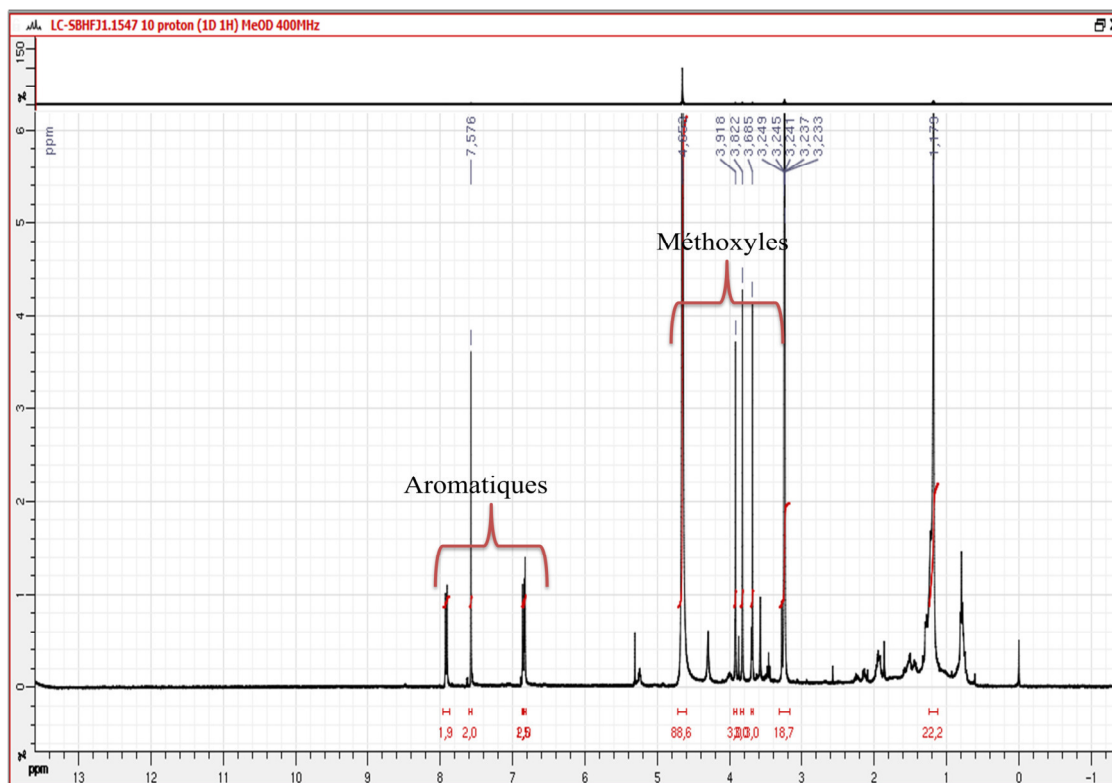


Figure 41. Spectre RMN ^1H (CD_3OD ; 400 MHz) du composé **6**

- Un doublet à $\delta_{\text{H}} = 8,0$ ppm ($J = 8,6$ Hz couplage ortho) d'intégration 2H attribués à H-2' et H-6'.
- Un doublet à $\delta_{\text{H}} = 6,85$ ppm ($J = 8,6$ Hz, couplage ortho) d'intégration 2H attribués à H-3' et H-5'.
- Un singulet à $\delta_{\text{H}} = 6,82$ ppm d'intégration 1H, attribué à H-8 en raison de la valeur de son déplacement chimique (Figure 42).

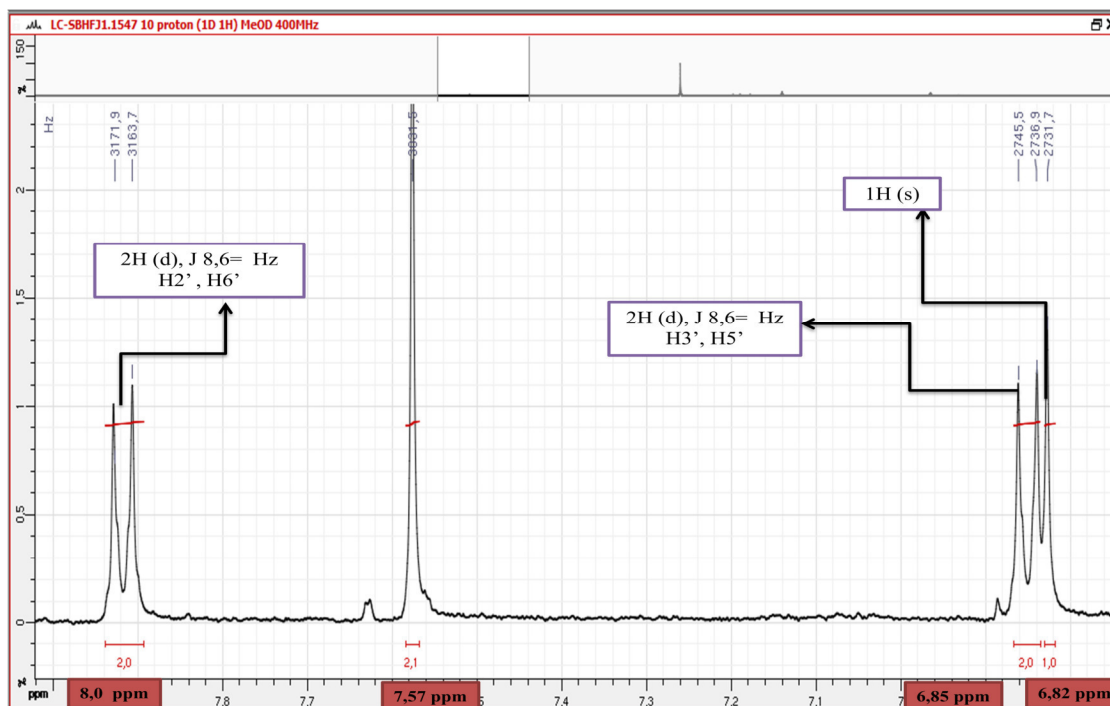


Figure 42. Étalement de la zone [6,8 ppm – 8,1 ppm] du spectre RMN ^1H (CD_3OD ; 400 MHz) du composé **6**

L'apparition de trois signaux sous forme de singlet d'intégration 3H à 3,68 ; 3,82 et 3,91 ppm indique la présence de trois groupements méthoxyles (Figure 43).

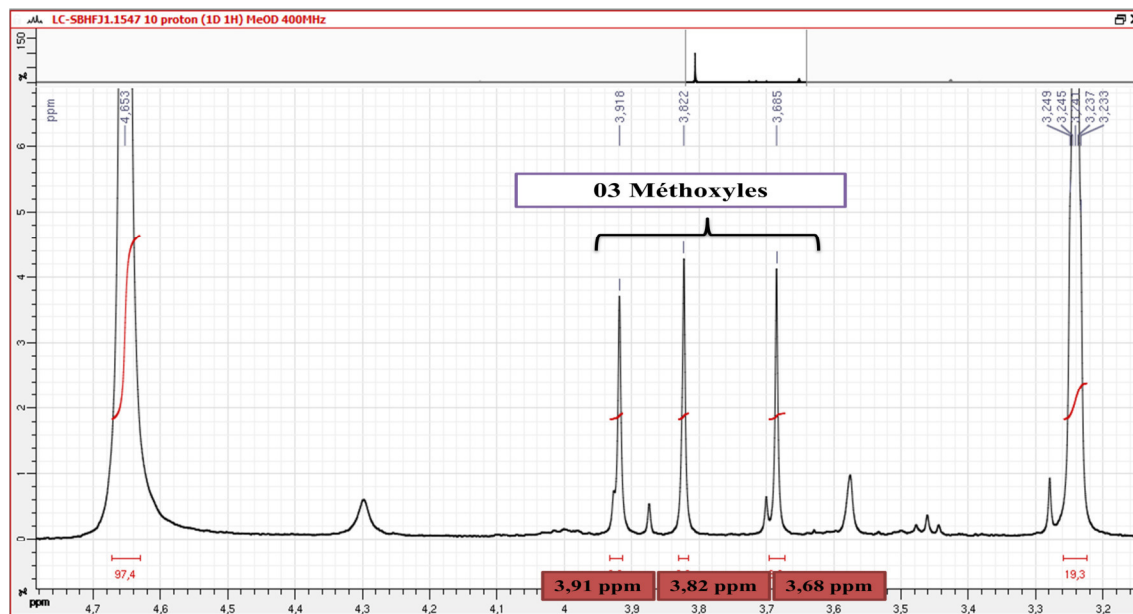


Figure 43. Étalement de la zone [3,2 ppm – 4,7 ppm] du spectre RMN ^1H (CD_3OD ; 400 MHz) du composé **6**

Le spectre HSQC (Figure 44) confirme l'attribution du signal à $\delta_H = 6,82$ ppm à H-8 en raison de sa corrélation avec le carbone à $\delta_C = 96$ ppm qui ne peut être que le carbone C-8. Les signaux d'intégration 1H (H-5', H-3' et H-2', H-6') à $\delta_H = 6,85$ et 8,0 ppm corrélient respectivement avec les carbones C-5', C-3' et H-6', C-2' à $\delta_C = 115$ et 130 ppm.

Les groupements méthoxy à $\delta_H = 3,68$ ppm, $\delta_H = 3,82$ ppm et à $\delta_H = 3,91$ ppm corrélient avec les carbones $\delta_C = 59$ ppm, $\delta_C = 62$ ppm et à $\delta_C = 55$ ppm. La localisation précise de ces trois groupements sur le squelette flavonique est donnée par les corrélations HMBC (Figure 45).

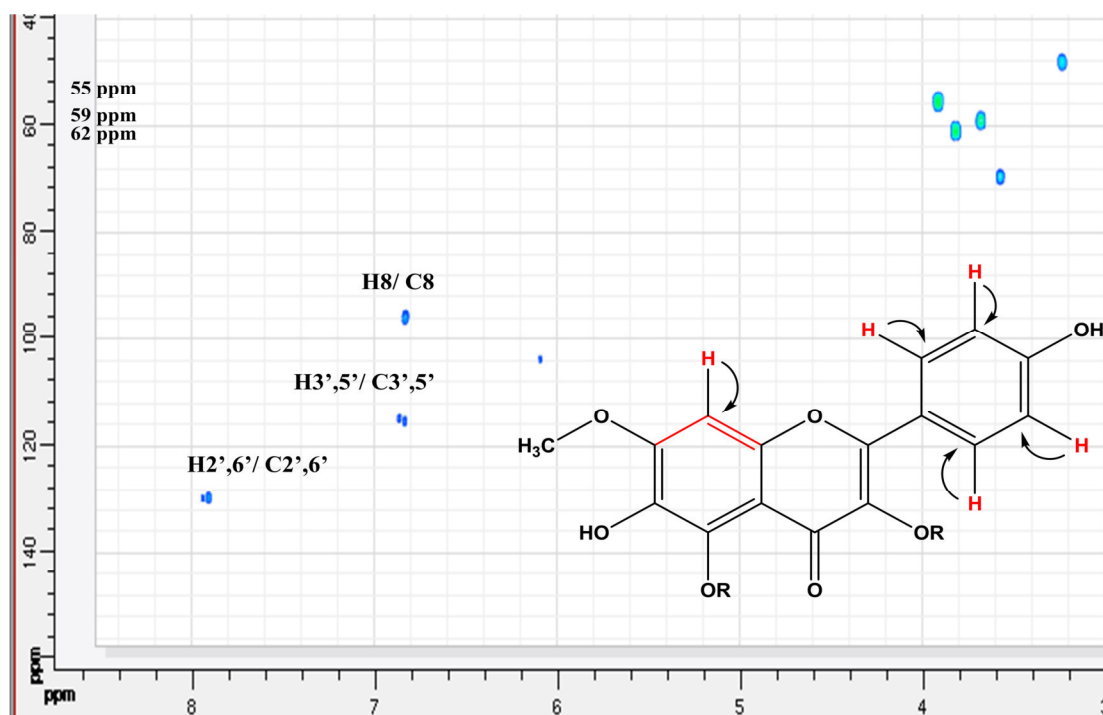


Figure 44. Spectre HSQC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ (CD_3OD ; 400 MHz) du composé 6

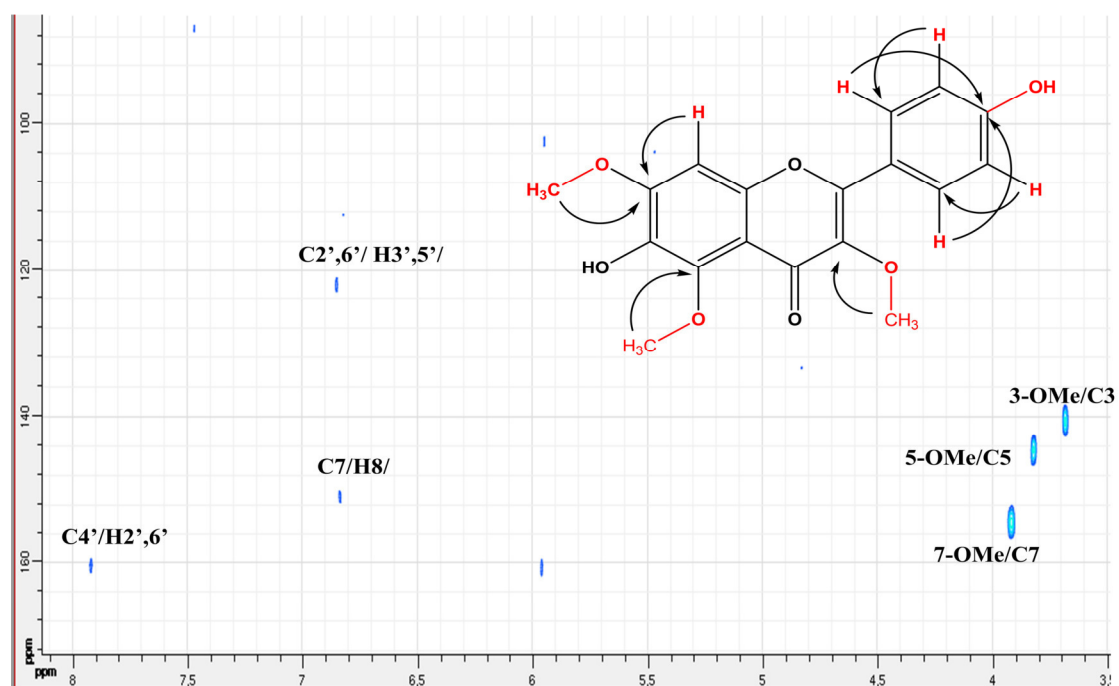


Figure 45. Spectre HMBC ^1H - ^{13}C (CD_3OD ; 400 MHz) du composé 6

Le spectre COSY (Figure 46) a confirmé également la corrélation entre les protons H-3' et H-5' à $\delta_{\text{H}} = 6,85$ ppm avec H-2' et H-6' à $\delta_{\text{H}} = 8,0$ ppm.

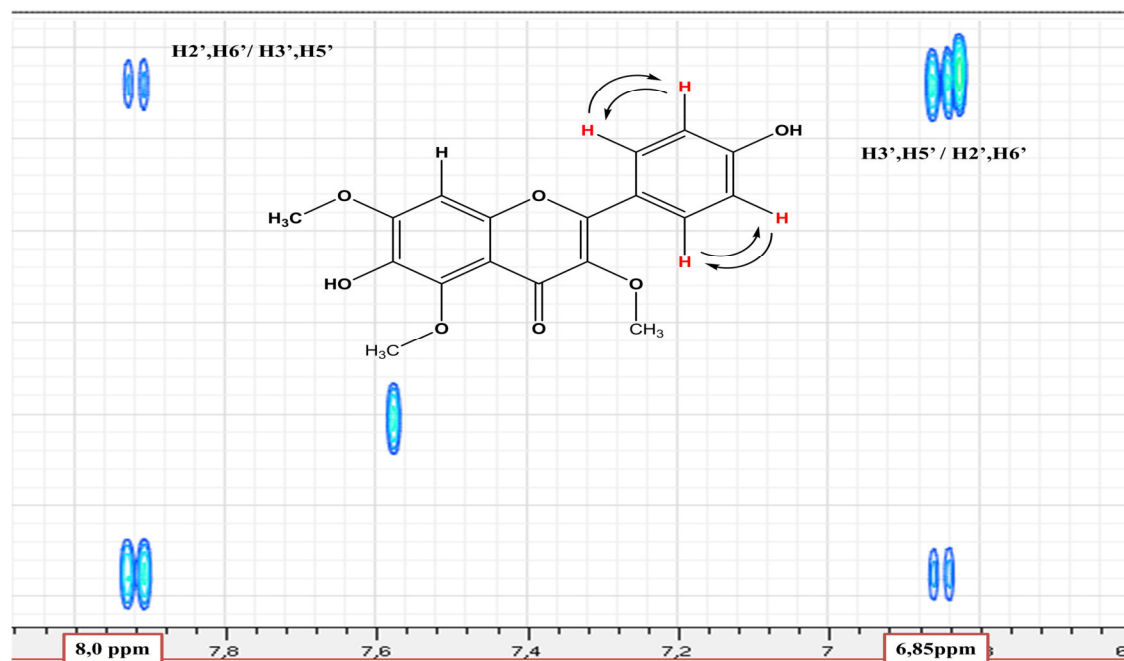


Figure 46. Spectre RMN COSY ^1H - ^1H (CD_3OD ; 400 MHz) du composé 6

Le spectre NOESY (Figure 47) a confirmé aussi la corrélation entre le méthoxyle à 4,0 ppm avec le proton à $\delta_{\text{H}} = 6,82$, cela confirme la localisation de méthoxyle en position C-7 et le proton de H-8.

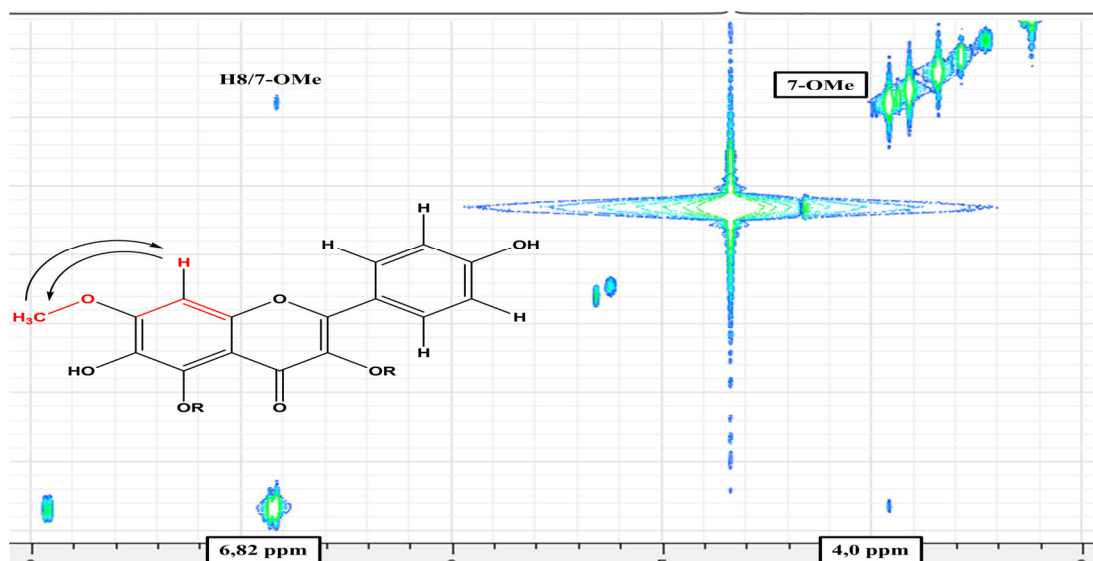


Figure 47. Spectre RMN NOESY ^1H - ^1H (CD_3OD ; 400 MHz) du composé **6**

Le spectre de masse (LC-MS) (Figure 48) du composé **6** a montré un pic moléculaire à $m/z = 344$ confirmant ainsi les données de la formule brute ($\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_7$) et indiquant la présence de trois groupements méthoxyles et deux groupements hydroxyles sur le squelette flavonique.

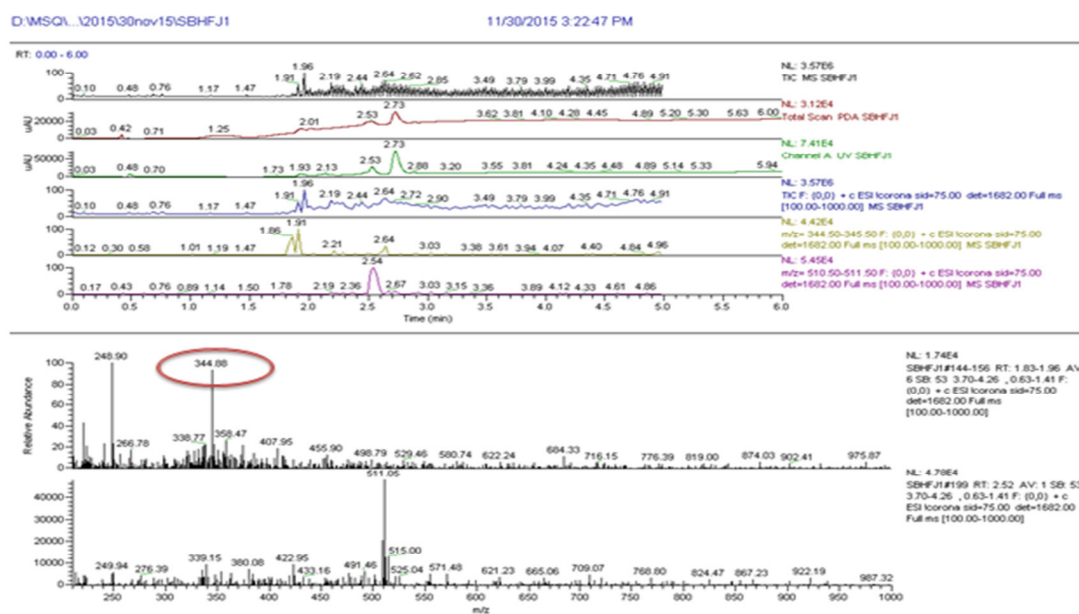


Figure 48. Spectre LC / MS du composé **6** (m/z 344,8)

L'ensemble de résultat des analyses spectroscopiques nous oriente vers la structure finale du composé **6**

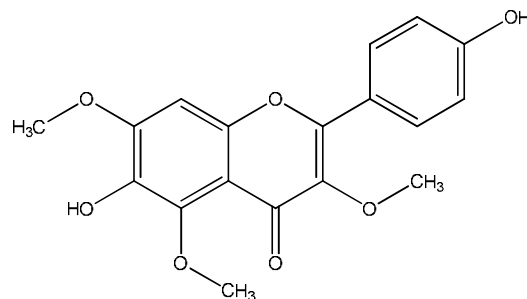


Figure 49. Structure du composé **6**: 4',6-Dihydroxy-3,5,7-triméthoxy-flavone (**6-hydroxykaempferol 3,5,7-triméthyl ether**)

Seulement quelques travaux ont été publiés sur le composé **6** (6-hydroxykaempferol 3,5,7-triméthyl ether) qui a été isolé pour la première fois dans l'espèce du *Jasonia candicans* (Astéracées) (Ahmed et al., 1994), il peut être considéré comme un marqueur chimiotaxonomique de la famille des Astéracées.

III.9.4. Identification du composé 7

III.9.4.a. Données spectroscopiques UV-Visible

Ce composé montre une fluorescence noire violette sous UV à 365 nm. L'étude des séries spectrales UV du composé **7** (Figure 50) montre la présence de deux bandes caractéristiques des flavonoides : bande I : $\lambda_{\text{max}} = 340$ nm et bande II : $\lambda_{\text{max}} = 256$ nm indiquant la présence d'une flavone ou un flavonol substitué en 3.

- **Série I** : le déplacement bathochromique ($\Delta\lambda = +31$ nm) avec augmentation d'intensité de la bande I en présence de NaOH indique la présence d'un OH libre en position 4'.
- **Série II** : la présence de l'effet bathochrome ($\Delta\lambda = +29$ nm) de la bande I en comparant le spectre $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ et le spectre MeOH indique la présence de groupement ortho di-OH libre sur le cycle B et un groupement OH en C-5.

Série III : le déplacement bathochrome faible de la bande II ($\Delta\lambda = +1$ nm) en présence de NaOAc confirme la présence d'une substitution O-R en C-7. La comparaison du spectre $\text{NaOAc} + \text{H}_3\text{BO}_3$ par rapport au spectre MeOH ($\Delta\lambda = +29$ nm) indique la présence de groupements ortho di-OH sur le cycle B.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau suivant :

Réactifs	Bande II (nm)	Bande I (nm)	Déplacement (nm)	Interprétation
MeOH	256	340	-	Flavone ou un flavonol substitué en 3
MeOH + NaOH	256	371	Bande I : $\Delta\lambda = +31$	OH libre en 4' O-R en 7
MeOH + NaOH + 5 minutes	256	375	Le spectre de NaOH est stable après 5 min	OH libre en 4' O-R en 7
MeOH + AlCl ₃	263	369	Bande I : $\Delta\lambda = +29$	Ortho di-OH sur B
MeOH + AlCl ₃ + HCl	293	341	Bande I : $\Delta\lambda = -28$	Ortho di-OH sur B et OR en 5
MeOH + NaOAc	257	343	Bande II : $\Delta\lambda = +1$	OR en 7
MeOH + NaOAc + H ₃ B ₃ O ₃	260	360	Bande I : $\Delta\lambda = +28$	Ortho di-OH sur B

Tableau 17. Données spectroscopiques UV du composé 7

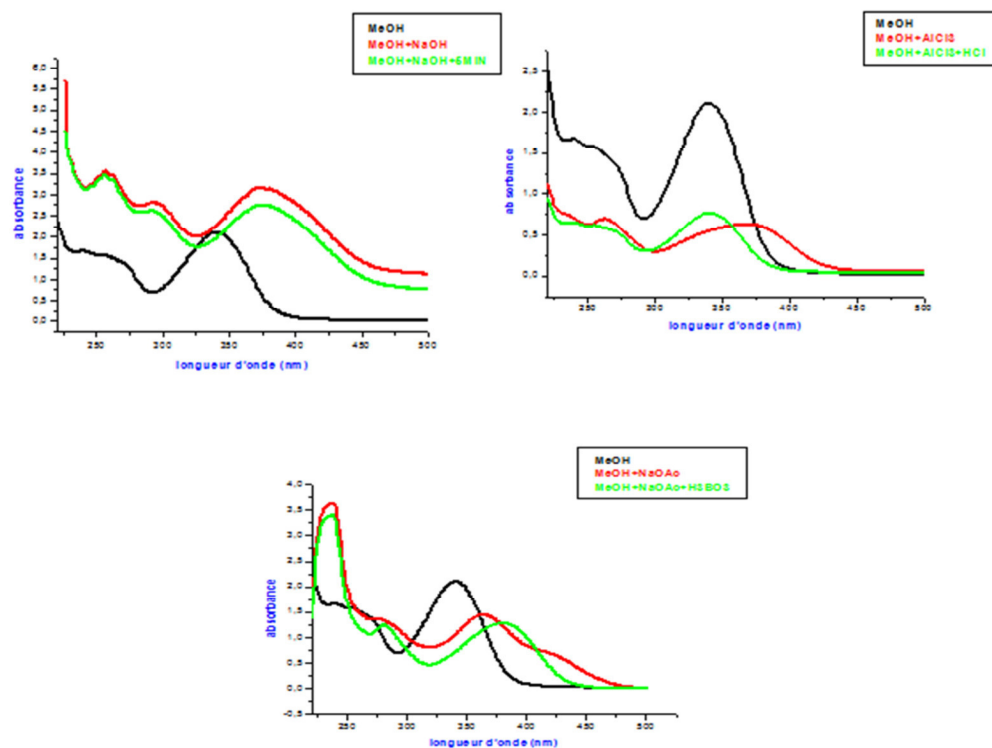


Figure 50. Série spectrale UV du composé 7

III.9.4.b. Données spectroscopiques RMN

L'examen du spectre RMN ^1H (400 MHz) enregistré dans CD_3OD montre les signaux caractéristiques d'un flavonoïde dans la zone aromatique et la présence de trois groupements méthoxyles avec :

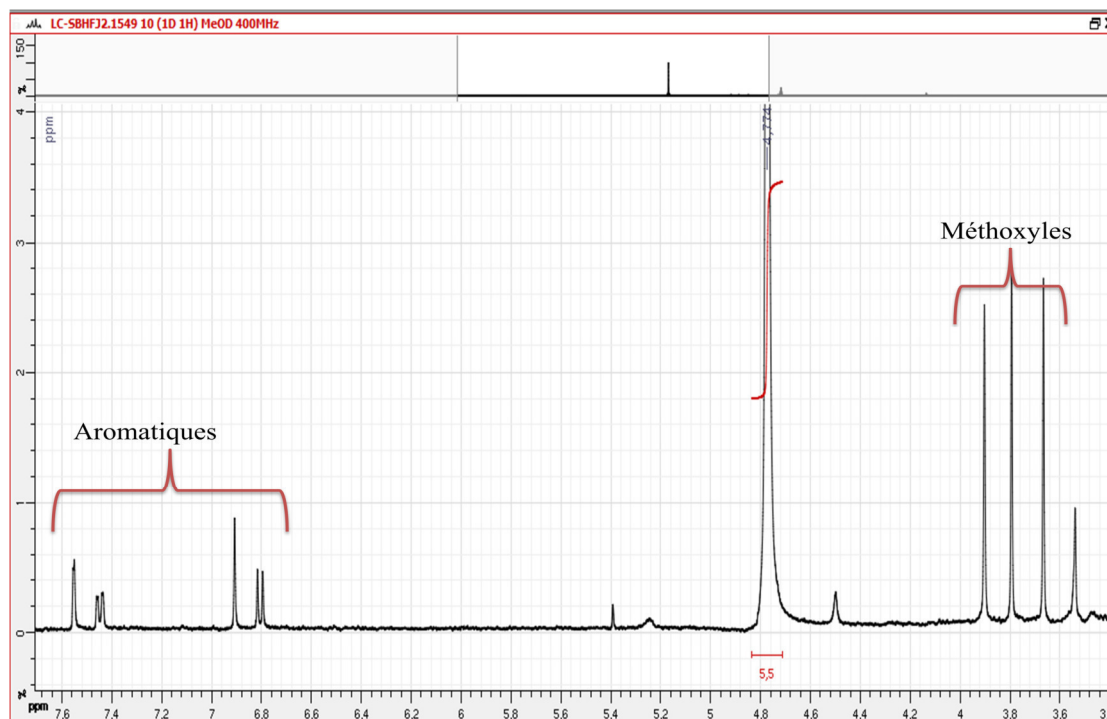


Figure 51. Spectre RMN ^1H (CD_3OD ; 400 MHz) du composé 7

- Un doublet à $\delta_{\text{H}} = 7,55$ ppm ($J = 1,9$ Hz couplage méta) d'intégration 1H attribués à H-2'.
- Un doublet de doublet à $\delta_{\text{H}} = 7,44$ ppm ($J = 8,6$ et $1,9$ Hz, couplage ortho et méta) d'intégration 1H attribués à H-6'.
- Un singulet à $\delta_{\text{H}} = 6,90$ ppm d'intégration 1H, attribué à H-8 en raison de la valeur de son déplacement chimique et doublet à $\delta_{\text{H}} = 6,80$ ppm ($J = 8,6$ Hz, couplage ortho) d'intégration 1H attribués à H-5' (Figure 52).

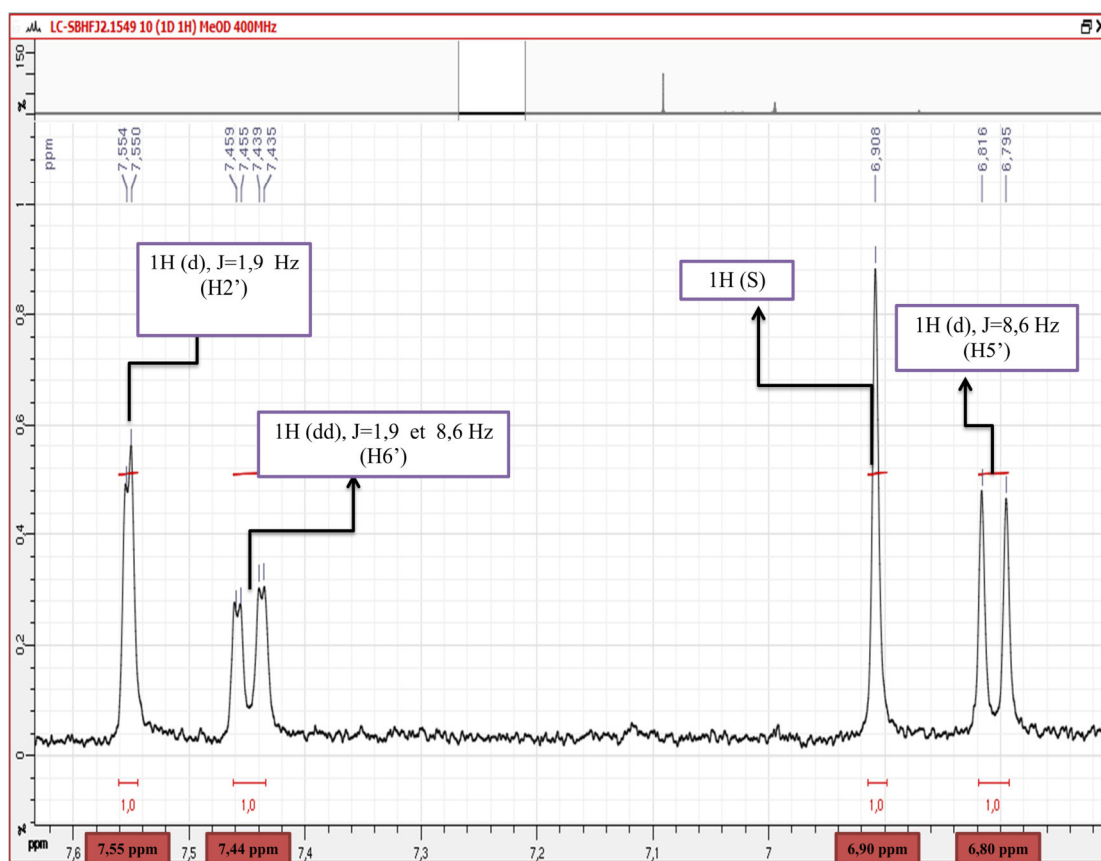


Figure 52. Étalement de la zone [6,7 ppm – 7,6 ppm] du spectre RMN ^1H (CD_3OD ; 400 MHz) du composé **7**

L'apparition de trois signaux sous forme de singulet d'intégration 3H à 3,66 ; 3,79 et 3,90 ppm indique la présence de trois groupements méthoxyles (Figure 53).

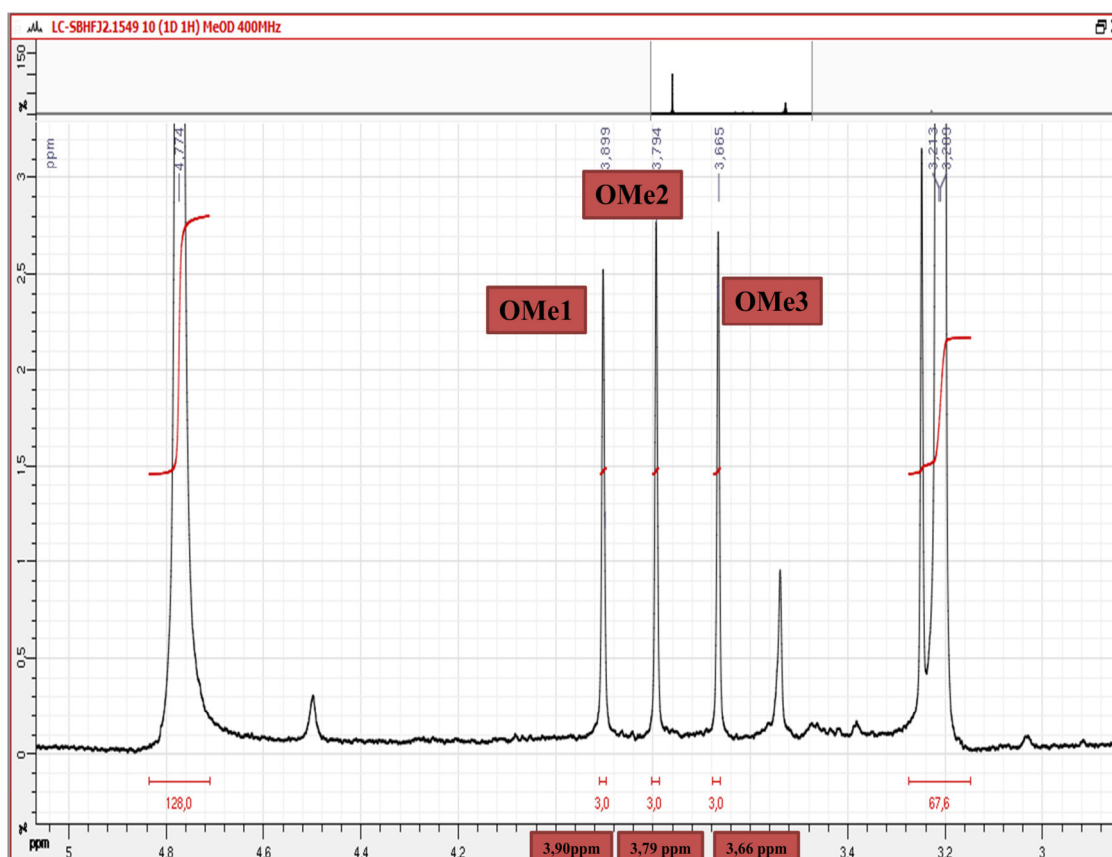


Figure 53. Étalement de la zone [3,0 ppm – 5,0 ppm] du spectre RMN ^1H (CD_3OD ; 400 MHz) du composé **7**

Le spectre HSQC (Figure 54) confirme l'attribution du signal à $\delta_{\text{H}} = 6,90$ ppm à H-8 en raison de sa corrélation avec le carbone à $\delta_{\text{C}} = 96$ ppm qui ne peut être que le carbone C-8.

Les signaux d'intégration 1H (H-6' et H-2') à $\delta_{\text{H}} = 7,44$ et $7,55$ ppm corrélient respectivement avec les carbones C-6' et H-2' à $\delta_{\text{C}} = 121$ et 140 ppm.

Les groupements methoxy à $\delta_{\text{H}} = 3,66$ ppm, $\delta_{\text{H}} = 3,79$ ppm et à $\delta_{\text{H}} = 3,90$ ppm corrélient avec les carbones $\delta_{\text{C}} = 59$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 62$ ppm et à $\delta_{\text{C}} = 55$ ppm. La localisation précise de ces trois groupements sur le squelette flavonique est déduite par comparaison avec celles du composé **6**.

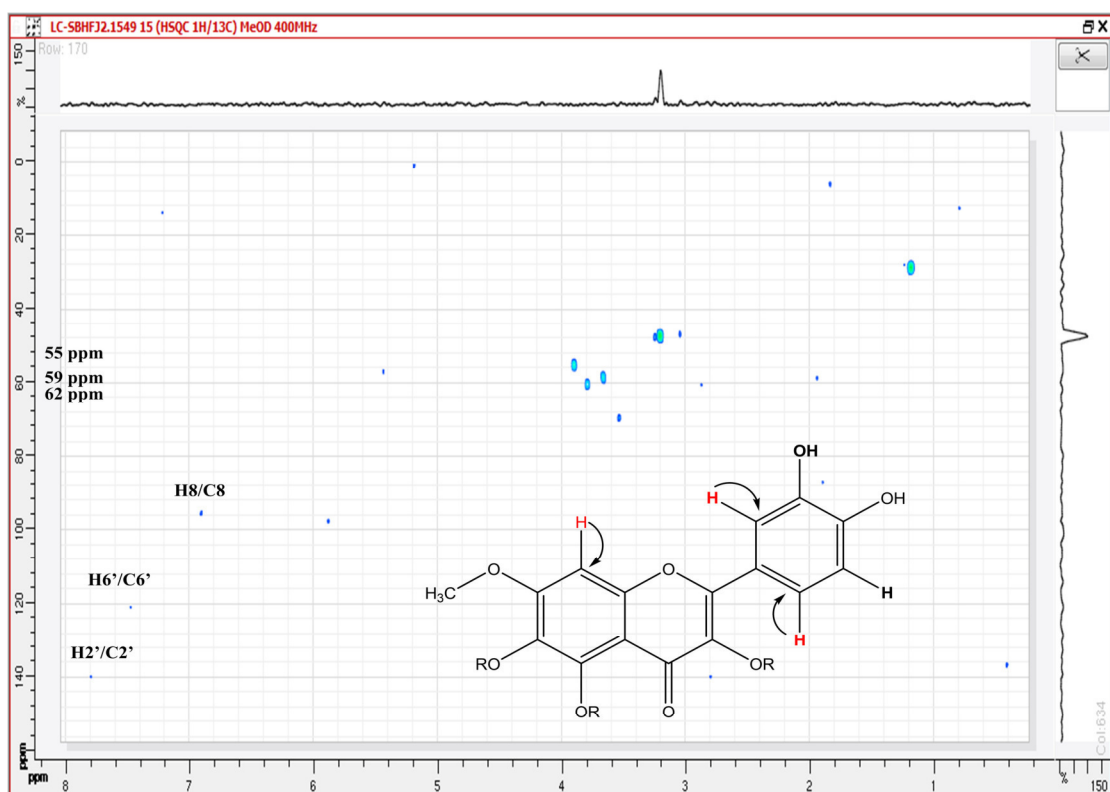


Figure 54. Spectre HSQC ^1H - ^{13}C (CD_3OD ; 400 MHz) du composé 7

Le spectre COSY (Figure 55) a confirmé également la corrélation entre les protons H-2' à $\delta_{\text{H}}=7,55$ ppm avec H-6' à $\delta_{\text{H}}=7,44$ ppm et H-6' à $\delta_{\text{H}}=7,44$ ppm avec H-5' à $\delta_{\text{H}}=6,80$ ppm.

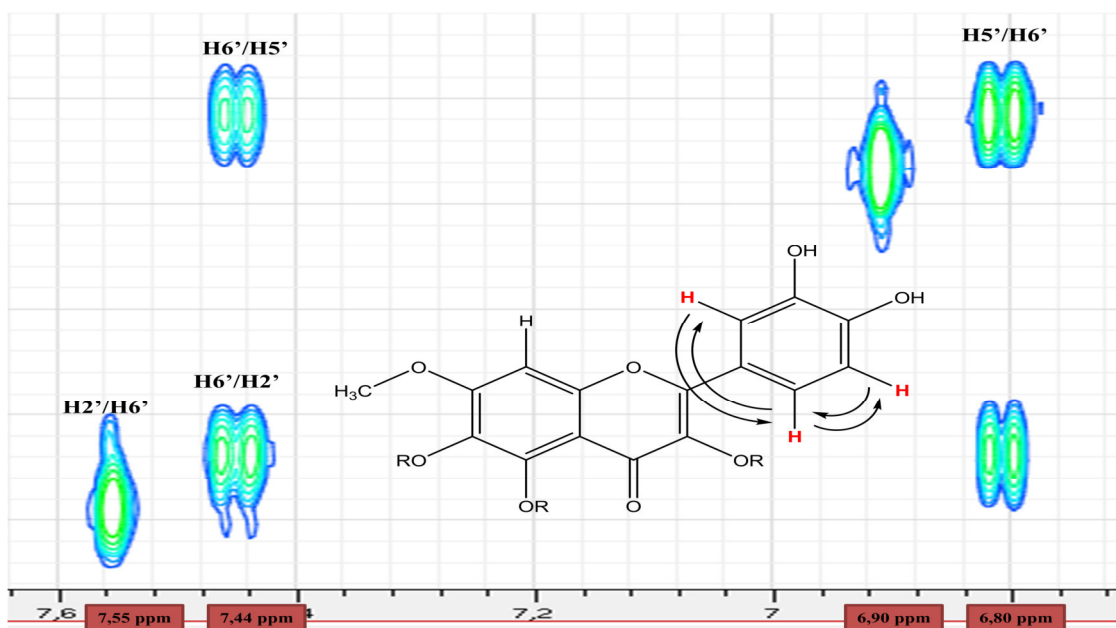


Figure 55. Spectre RMN COSY ^1H - ^1H (CD_3OD ; 400 MHz) du composé 7

Le spectre NOESY (Figure 56) a confirmé aussi la corrélation entre le méthoxyle à 3,90 ppm avec le proton à $\delta_{\text{H}} = 6,90$, cela confirme la localisation de méthoxyle en position C-7 et le proton de H-8.

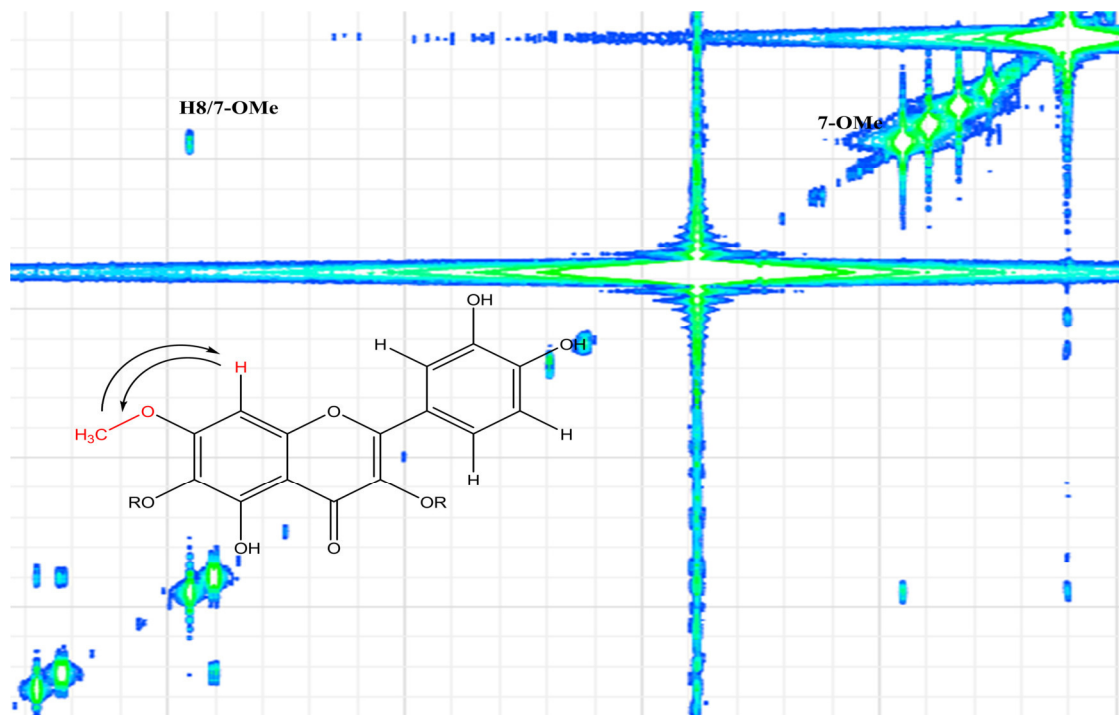


Figure 56. Spectre RMN NOESY ^1H - ^1H (CD_3OD ; 400 MHz) du composé 7

L'ensemble de résultat des analyses spectroscopiques nous oriente vers la structure finale du composé 7 (Mercader et al., 2008)

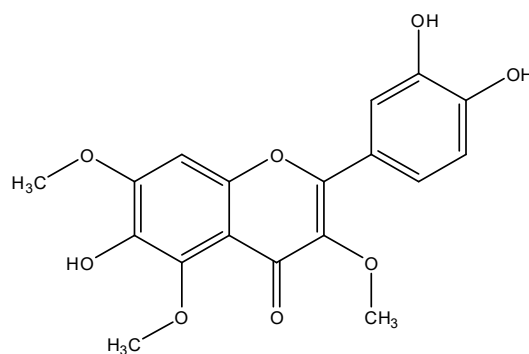


Figure 57. Structure du composé 7: 6,3',4'-Trihydroxy-3,5,7-triméthoxyflavone
(Quercetagein 3,5,7-triméthyl ether)

Seulement quelques travaux ont été publiés sur le composé **7** (Quercetagein 3,5,7-triméthyl ether). Ce composé a été isolé précédemment et pour la première fois dans l'espèce *Pulicaria arabica* (Astéracées) (El-Negoumy et al., 1982). Il peut être considéré comme un marqueur chimiotaxonomique de la famille des Astéracées.

III.9.5. Identification du composé **8**

III.9.5.a. Profil CCM du composé **8**

Le composé **8** se présente sous une couleur jaune (6,7 mg), de fluorescence bleue sous lumière de wood 365 nm et noir violette sous la lumière 254 nm, caractéristique d'une flavone ou d'un flavonol avec 3-OR.

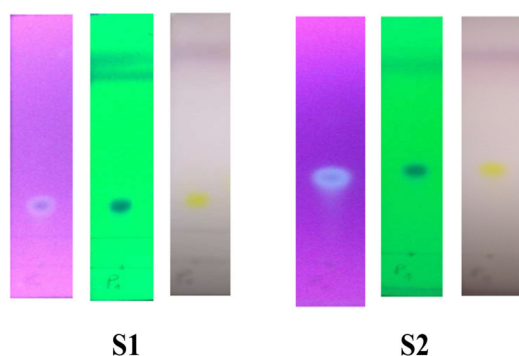


Figure 58. Profil chromatographique CCM du composé **8** dans deux systèmes **S1** (CHCl₃: AcOEt, 2: 2), **S2** (CH₂Cl₂: AcOEt, 0,5: 1,5)

Système	S1	S2
R _f	0,28	0,45
La fluorescence sous la lampe UV	Noir violette	Noir violette

IV.9.5.b. Données spectroscopiques IR

L'examen du spectre infrarouge de composé **8** (Figure 59) montre la présence de fonctions hydroxyles à 3485,9 cm⁻¹, de fonction C=C à 1493,5 cm⁻¹ et une fonction cétone à 1615,9 cm⁻¹.

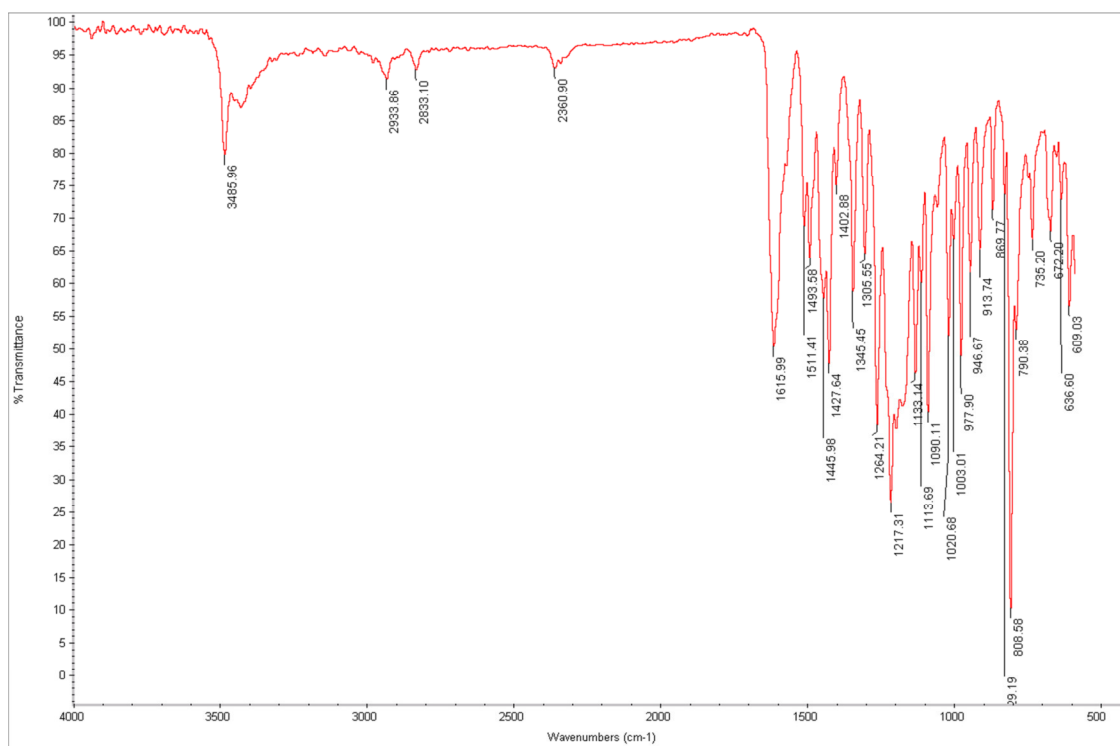


Figure 59. Spectre IR du composé 8

IV.9.5.c. Données spectroscopiques UV-Visible

Le composé 1 montre la fluorescence violette sous UV à 365 nm. L'étude des séries spectrales UV (Figure 60) du composé 8 montre deux bandes d'absorption caractéristiques des flavonoïdes : bande I : $\lambda_{\text{max}} = 339$ nm et bande II : $\lambda_{\text{max}} = 260$ nm. Ces résultats orientent vers une flavone ou un flavonol substitué en C-3.

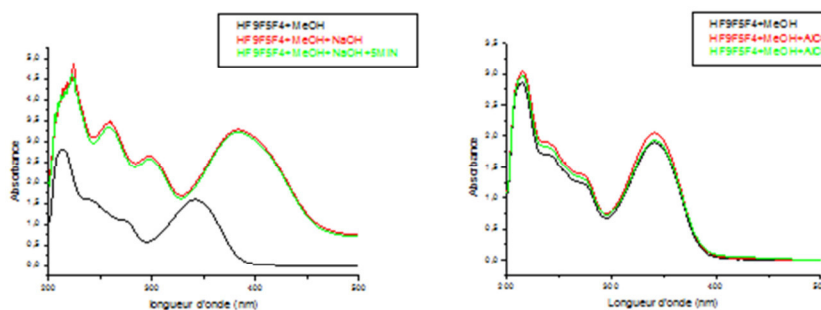
- **Série I:** l'effet bathochromique ($\Delta\lambda = +44$ nm) de la bande I en présence de NaOH, avec augmentation d'intensité et la stabilité du spectre sont en faveur de la présence d'un OH libre en C-4', l'absence d'une nouvelle bande entre 320-335 nm dans le spectre de NaOH par rapport au spectre méthanol indique l'absence d'un hydroxyle libre en C-7.
- **Série II:** l'absence de l'effet bathochrome de la bande I du spectre AlCl_3 et l'effet hypsochrome après l'addition de HCl comparativement au spectre méthanol indique l'absence d'un groupement ortho di-OH sur le cycle B et la présence d'un groupement OR en 5.

- Série III:** l'absence de déplacement bathochrome de la bande II en présence de NaOAc confirme la présence d'une substitution O-R en C-7. La comparaison du spectre NaOAc + H₃BO₃ par rapport au spectre MeOH confirme l'absence de groupements ortho di-OH sur le cycle B.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau suivant :

Réactifs	Bande II (nm)	Bande I (nm)	Déplacement ($\Delta\lambda$) (nm)	Interprétation
MeOH	260	339	-	Flavonol substitué en 3
MeOH + NaOH	260	383	Bande I : $\Delta\lambda = +44$	OH libre en 4'
MeOH + NaOH + 5 minutes	259	382	Absence de nouvelles bande et stabilité après 5 min	OH libre en 4' OR en 7 OR en trois
MeOH + AlCl ₃	260	341	Bande I: $\Delta\lambda = +2$	Absence d'ortho di-OH sur B et OR en C-5
MeOH + AlCl ₃ + HCl	260	341	Bande I : $\Delta\lambda = +2$	OR en 5
MeOH + NaOAc	260	344	bande II : pas de déplacement	OR en 7
MeOH + NaOAc + H ₃ B ₃ O ₃	260	342	Bande I : $\Delta\lambda = +3$	Absence d'ortho di-OH sur B

Tableau 18. Données spectroscopiques UV du composé **8**



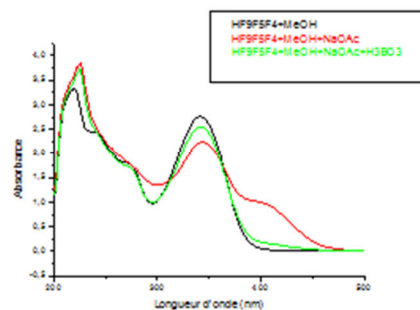


Figure 60. Série spectrale UV du composé 8

IV.9.5.d. Donnée spectroscopiques RMN

L'examen du spectre RMN ^1H (600 MHz) enregistré dans CD_3OD du composé 8 confirme la présence de signaux caractéristiques d'un flavonoïde avec :

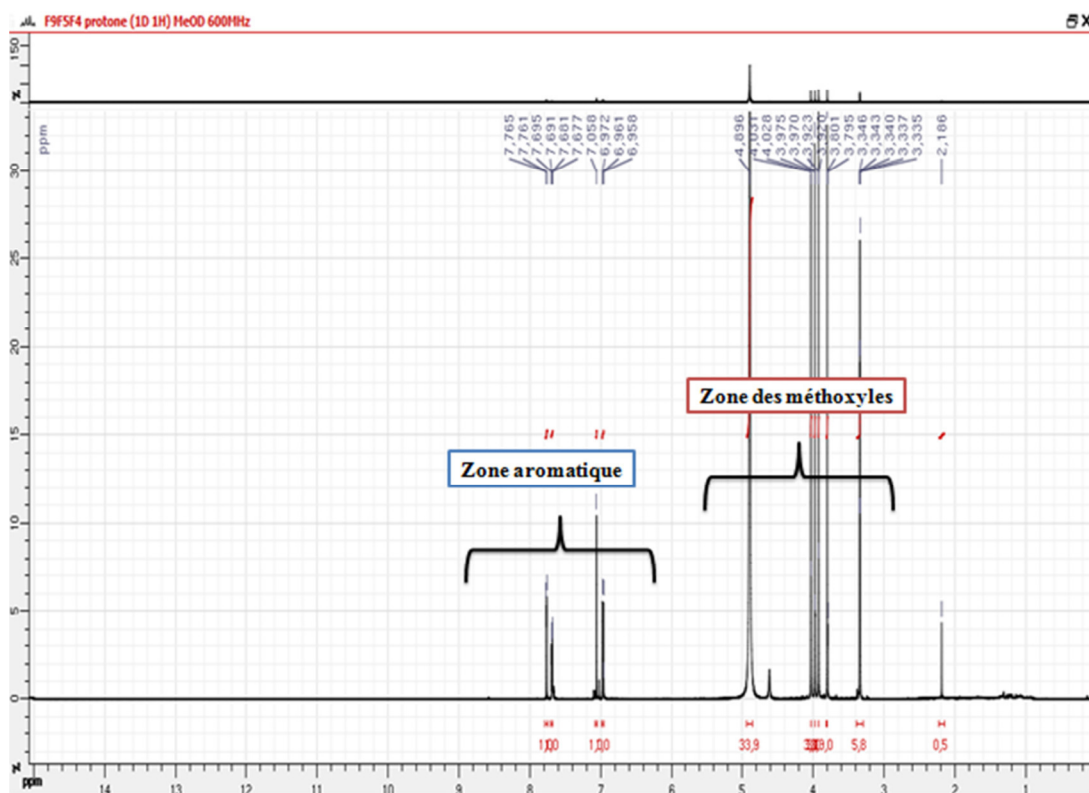


Figure 61. RMN ^1H (CDCl_3 ; 600 MHz) du composé 8

- Un signal sous forme de doublets (couplage méta, $J=1,8$ Hz) d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}}=7,76$ ppm attribuable au proton H-2'.
- Un doublet de doublet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}}=7,69$ ppm ($J= 1,8$ Hz et 8,5 Hz) attribuable à H-6'.
- Un doublet d'intégration 1H (couplage ortho, $J=8,5$ Hz) à $\delta_{\text{H}}=6,96$ ppm attribuable à H-5'.
- Un singulet à $\delta_{\text{H}}= 7,06$ ppm attribuable à H-8 ou H-3 (Figure 62).

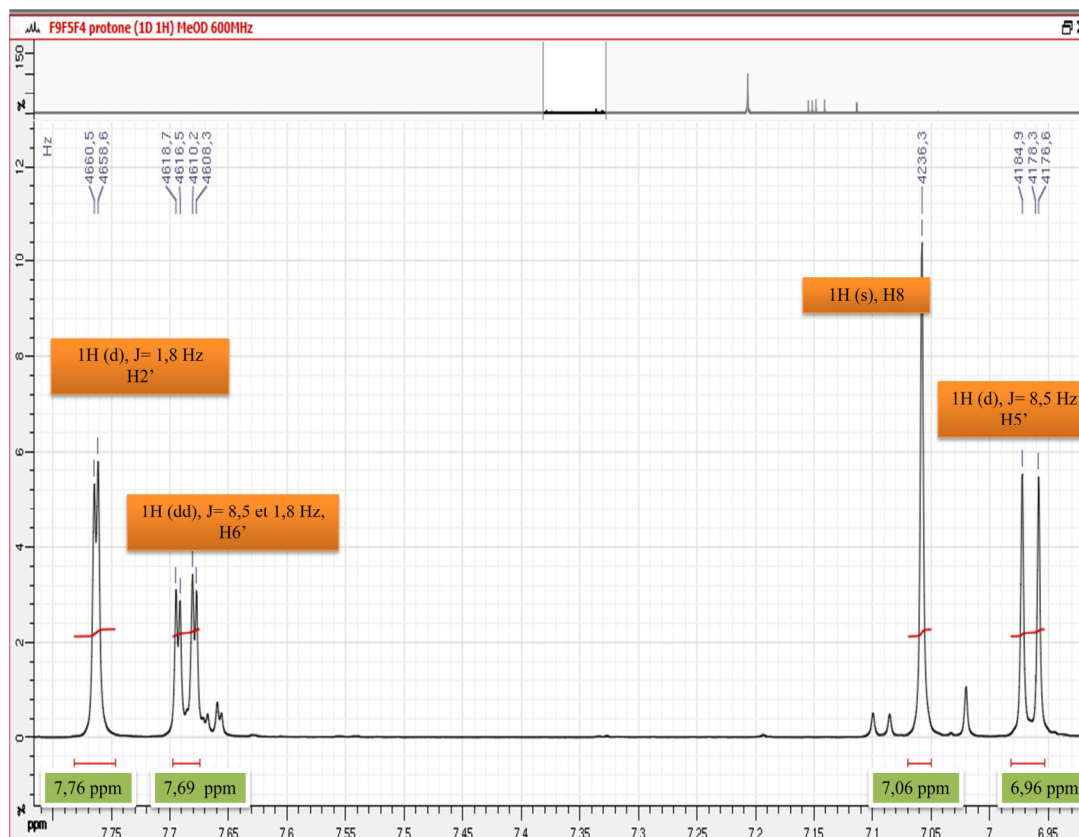


Figure 62. Étalement de la zone [6,9 ppm – 7,8 ppm] de spectre RMN ^1H (CD_3OD ; 600 MHz) du composé **8**

L'étalement du spectre RMN ^1H du composé **8** (Figure 63) montre quatre autres singulets d'intégration 3H à $\delta_{\text{H}}= 3,80$; 3,92 ; 3,97 et 4,03 ppm qui sont attribuables à des groupements méthoxyles.

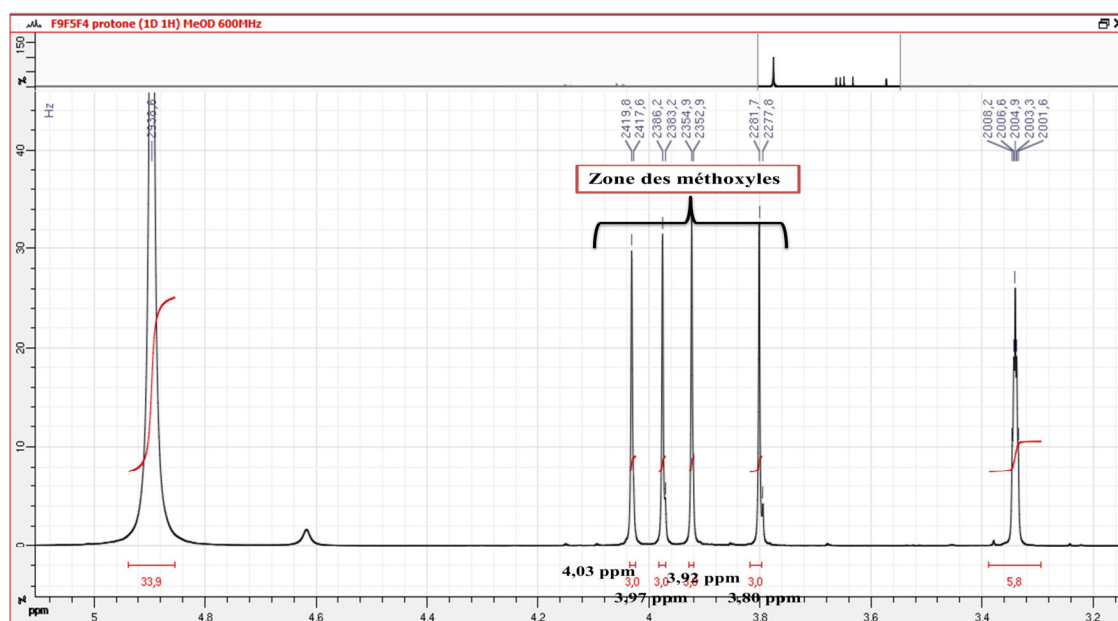


Figure 63. Étalement de la zone [3,2 ppm – 5,0 ppm] de spectre RMN ^1H (CD_3OD ; 600 MHz) du composé **8**

L'étalement du spectre RMN ROESY (Figure 64) montre une corrélation entre les deux groupements méthoxyles à $\delta_{\text{H}} = 3,97$ ppm, $\delta_{\text{H}} = 4,03$ ppm et les protons H-2' à $\delta_{\text{H}} = 7,76$ ppm et le proton à $\delta_{\text{H}} = 7,06$ ppm. Ces informations ajoutés au fait de l'absence de groupement ortho di-OH sur le cycle B permettent de localiser ces groupements methoxy sur les carbones C-3' et C-7, respectivement et d'attribuer le proton à $\delta_{\text{H}} = 7,06$ ppm au proton H-8.

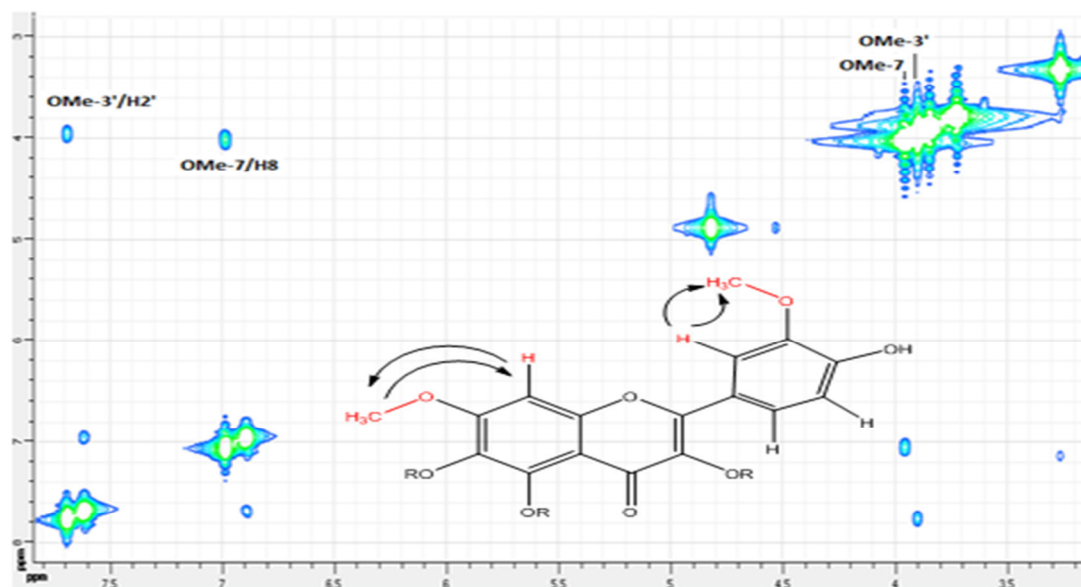


Figure 64. Etagement de spectre ROESY (CD_3OD ; 600 MHz) du composé **8**

Les corrélations HMBC (Figure 65) permettent de confirmer ces attributions en montrant les corrélations du proton H-8 avec les carbones à $\delta_c = 156,30$; $153,2$ et $139,9$ ppm attribués à C-7, C-9 et C-6, respectivement. On constate également sur cette figure des corrélations entre le proton H-2' et les carbones à $\delta_c = 156,9$; $149,6$ et $151,6$ ppm attribués à C-2, C-3' et C-4' à $\delta_c = 156,9$; $149,6$ et $151,6$ ppm respectivement conformément aux données de la littérature (Ahmed et al., 1994).

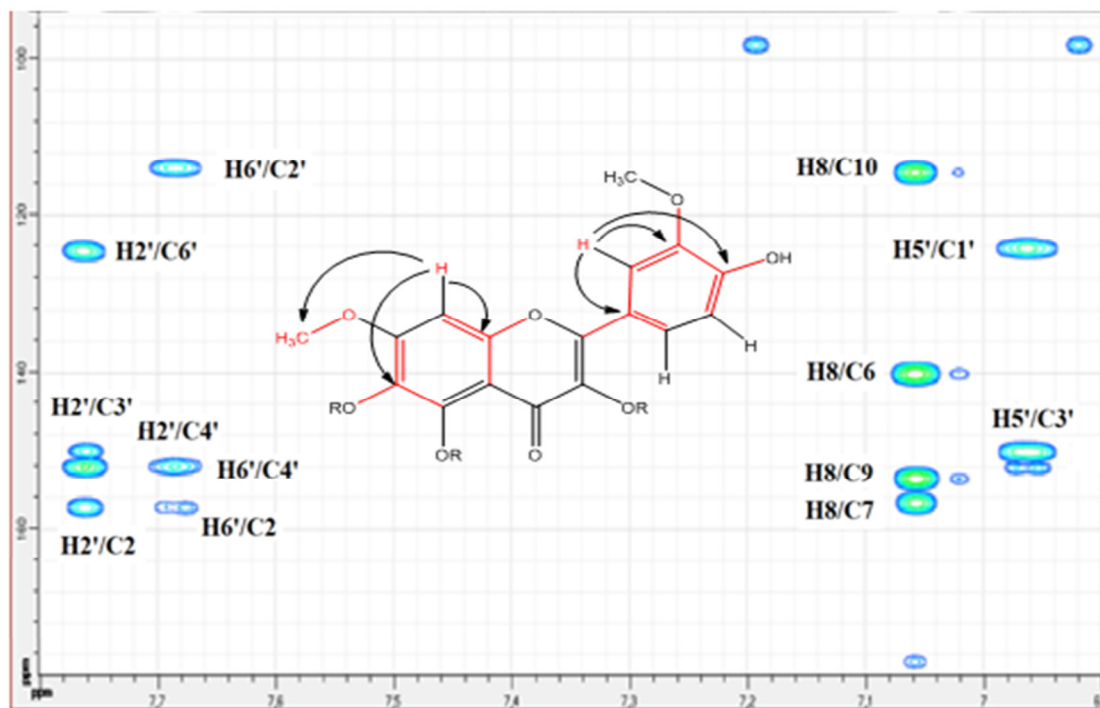


Figure 65. Etagement de spectre HMBC (CD₃OD ; 600 MHz) du composé **8**

Ce spectre HMBC permet de confirmer la localisation des groupements méthoxyles à $\delta_H = 3,97$ ppm, $\delta_H = 4,03$ ppm en positions C-3' et C-7, respectivement. Ce même spectre permet de localiser les deux autres groupements méthoxyles à $\delta_H = 3,80$ ppm et $\delta_H = 3,92$ ppm en positions C-3 et C-5, respectivement.

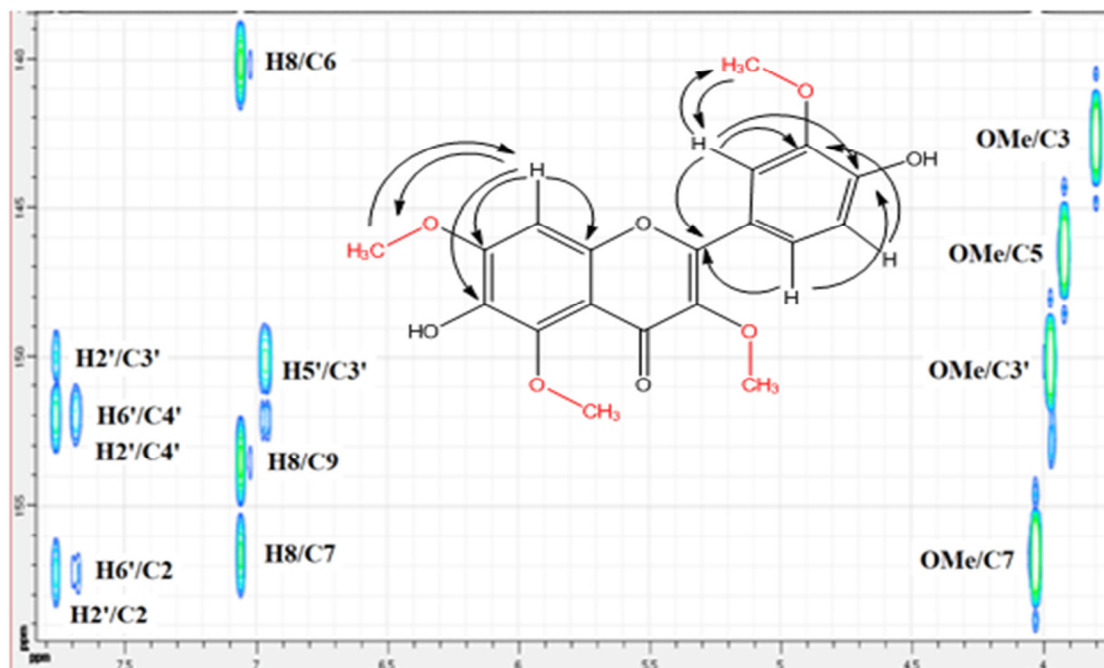


Figure 66. Etalement de spectre HMBC (CD₃OD ; 600 MHz) du composé **8**

L'ensemble des attributions des protons et carbones du composé **8** est rassemblé dans la figure 67 et le tableau 19

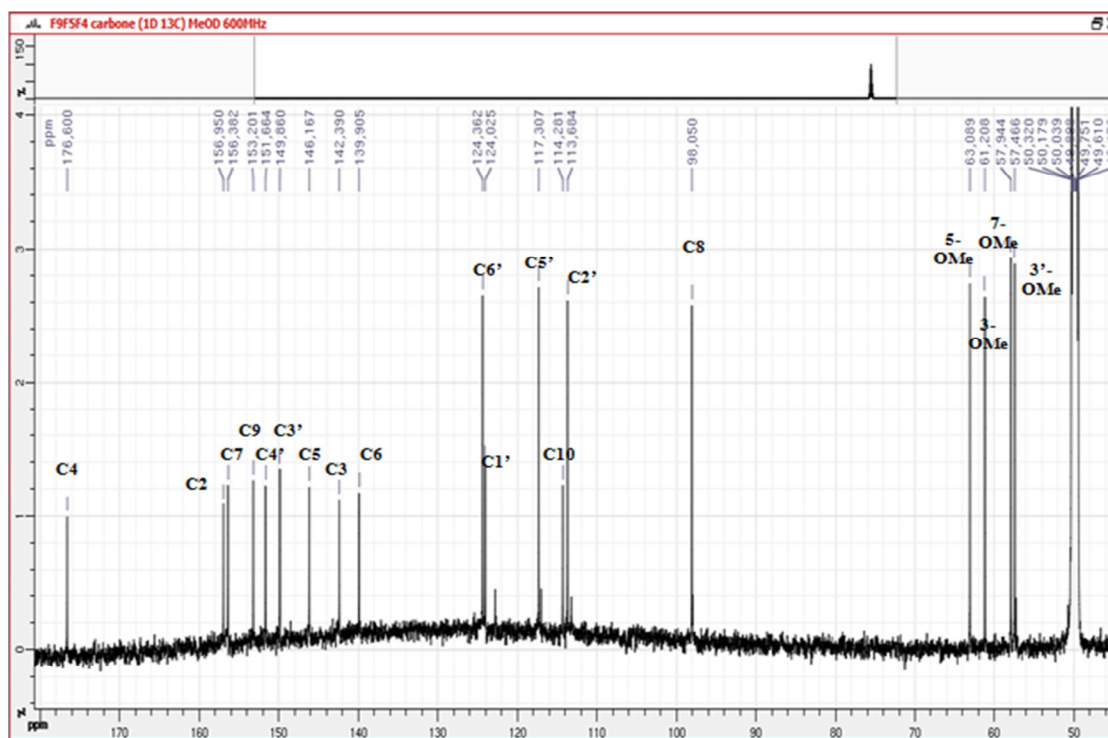


Figure 67. RMN ¹³C (CD₃OD ; 600 MHz) du composé **8**

Position	Composé 8		Position	Composé 8	
	$\delta_H^{[a]}$	$\delta_C^{[a,b]}$		$\delta_H^{[a]}$	$\delta_C^{[a,b]}$
2	-	156,9 s	2'	7,76 d (1,8)	113,6 d
3	-	142,4 s	3'	-	149,8 s
4	-	176,6 s	4'	-	151,6 s
5	-	146,1 s	5'	6,96 d (8,5)	117,3 d
6	-	139,9 s	6'	7,69 dd (8,5; 1,8)	124,3 d
7	-	156,3 s	3-OMe	3,80 s	61,1 q
8	7,06 s	98,0 d	5-OMe	3,92 s	63,1 q
9	-	153,2 s	7-OMe	4,03 s	57,9 q
10	-	114,2 s	3'-OMe	3,97 s	57,4 q
1'	-	124,0 s			

Tableau 19. Valeurs des déplacements chimiques δ et J (Hz) RMN ^1H et ^{13}C (CD_3OD) des composés **8**

^[a] Spectre enregistré dans CD_3OD , ^[b] Données basées sur HMBC, ^[c] Signaux superposés.

Le spectre de masse (LC-MS) du composé **8** (Figure 68) montre un pic moléculaire à $m/z=374$ confirmant ces données de la formule brute ($\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_8$) indique la présence de quatre groupements méthoxyles et deux groupements hydroxyles sur le squelette flavonique.

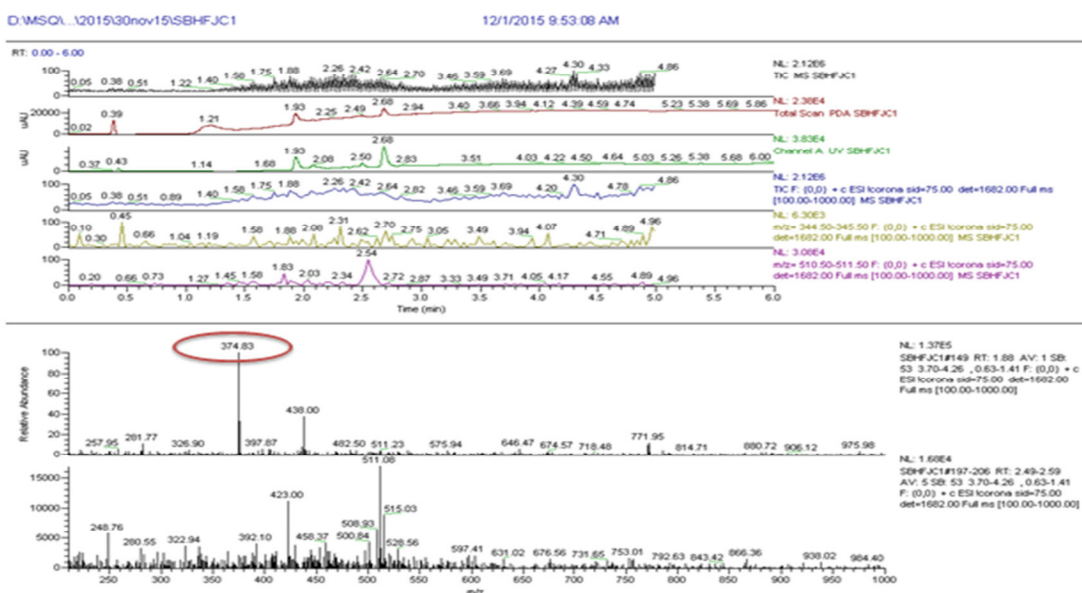


Figure 68. Spectre LC / MS du composé **8** (m/z 374,8)

Toutes les autres corrélations sur le spectre HMBC permettent de confirmer de manière non ambiguë la structure du composé **8** comme étant celle de la quercétagine 3,5,7,3'-tétraméthyléther.

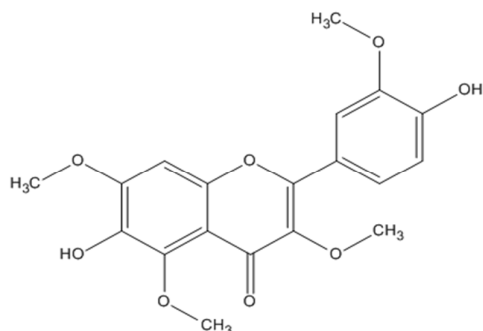


Figure 69. Structure du composé **8** : 6,4'-dihydroxy-3,5,7,3'-tetraméthoxyflavone
(quercétagine 3,5,7,3'-tétraméthyléther)

Seulement quelques travaux ont été publiés sur le composé le composé **8** qui a été isolé pour la première fois dans l'espèce *Pulicaria arabica* (Astéracées) (El-Negoumy et al., 1982) et dans l'espèce *Jasonia candicans* (Astéracées) (Ahmed et al., 1994), ce composé a été isolé et identifié aussi dans les deux espèces *Pulicaria arabica* (Astéracées) et *Eupatorium odoratum* (Astéracées) (El-Negoumy et al. 1982). Donc, ce composé peut être considéré comme un marqueur chimiotaxonomique de la famille des Astéracées.

III.9.6. Identification du composé 9

III.9.6.a. Profil CCM du composé 9

Le composé **9** se présente sous une couleur jaune (8,5 mg), de fluorescence bleue sous lumière de wood 365 nm et noir violette sous la lumière 254 nm, caractéristique d'une flavone ou d'un flavonol avec 3-OR.

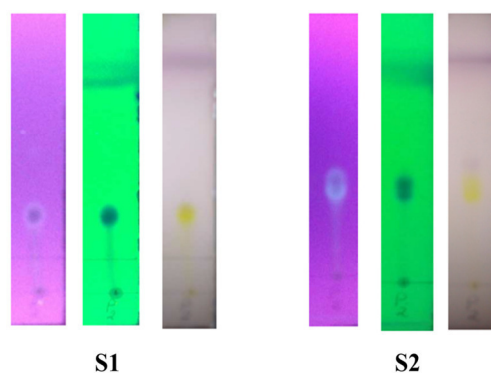


Figure 70. Profil chromatographique CCM du composé **9** dans deux systèmes **S1** (CHCl_3 : AcOEt, 2: 2), **S2** (CH_2Cl_2 : AcOEt, 0,5: 1,5)

Système	S1	S2
R_f	0,34	0,42
La fluorescence sous la lampe UV	Noir violette	Noir violette

III.9.6.b. Données spectroscopiques UV-Visible

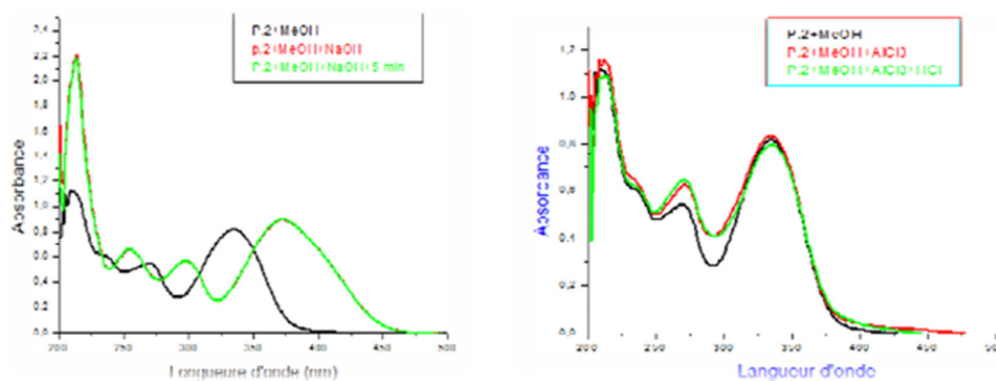
Ce composé montre une fluorescence violette sous UV à 365 nm. L'étude des séries spectrales UV du composé **9** (Figure 71) montre la présence de deux bandes caractéristiques des flavonoïdes : bande I : $\lambda_{\text{max}} = 335$ nm et bande II : $\lambda_{\text{max}} = 270$ nm indiquant la présence d'une flavone ou un flavonol substitué en 3.

- L'addition de NaOH provoque un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = +38$ nm) avec l'augmentation de l'intensité lumineuse, indiquant la présence d'un OH libre en position 4'.
- L'absence d'une nouvelle bande entre 320-335 nm dans le spectre de NaOH par rapport au spectre méthanol, indique l'absence d'un hydroxyle libre en C-7.
- La stabilité de la bande II enregistrée dans le milieu MeOH: AlCl_3 et dans le milieu MeOH : $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ confirme que la molécule dispose un O-R en C-5.
- L'absence du déplacement bathochrome de la bande II en présence de NaOAc confirme la présence d'une substitution O-R en C-7. La comparaison du spectre NaOAc + H_3BO_3 par rapport au spectre MeOH indique l'absence de groupements ortho di-OH sur le cycle B (pas de déplacement bathochrome de la bande I).

L'ensemble des données de la série spectrale UV est reporté dans le tableau suivant:

Réactifs	Bande II (nm)	Bande I (nm)	Déplacement ($\Delta\lambda$) (nm)	Interprétation
MeOH	270	335	-	Flavone ou flavonol substitué en 3
MeOH + NaOH	253	373	Bande I : $\Delta\lambda = +38$	OH en C-4' O-R en C-7
MeOH + NaOH + 5 minutes	270	335	Le spectre de NaOH est stable après 5 min	OH en C-4' O-R en C-7
MeOH + AlCl ₃	270	334	Bande I : pas de déplacement	OR en C-5
MeOH/ + AlCl ₃ + HCl	270	334	Bande I : pas de déplacement	OR en C-5
MeOH + NaOAc	270	335	Bande II : pas de déplacement	OR en C-7
MeOH / + NaOAc + H ₃ BO ₃	270	335	Bande I : pas de déplacement	L'absence de groupement ortho di-OH sur B

Tableau 20. Données spectroscopiques UV du composé 9



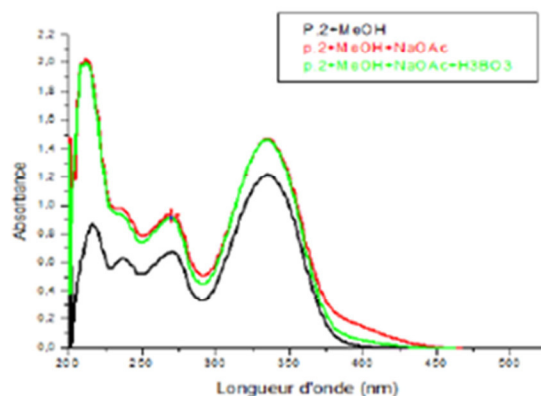


Figure 71. Série spectrale UV du composé **9**

III.9.6.c. Donnée spectroscopiques RMN

L'examen du spectre RMN ^1H (400 MHz) enregistré dans le CD_3OD du composé **9** montre la présence de quatre groupements méthoxyles et des protons aromatiques.

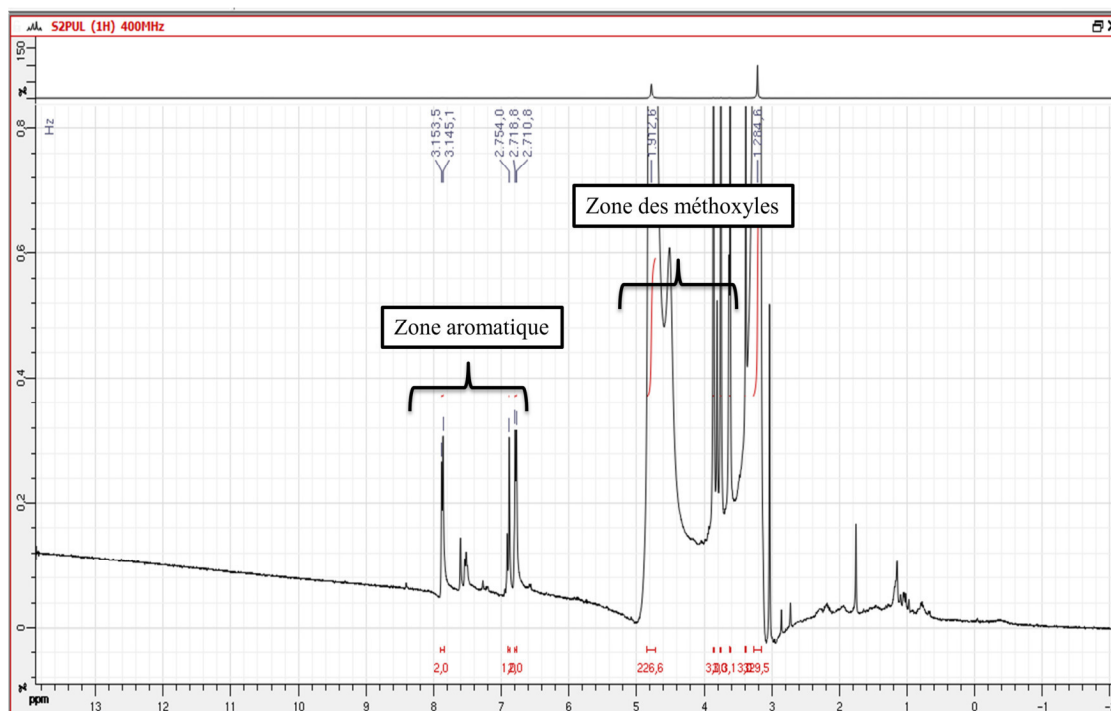


Figure 72. Spectre RMN ^1H (CD_3OD ; 400 MHz) du composé **9**

Deux signaux d'intégration 2H sous forme doublets à $\delta_H = 6,8$ ppm et $\delta_H = 7,9$ ppm ($J = 8,5$ Hz, couplage ortho) qui sont attribuables aux protons H-5' et H-3', H-2' et H-6', respectivement. Un autre signal sous forme de singulet d'intégration 1H à $\delta_H = 6,9$ ppm attribué au proton H-8 (Figure 73).

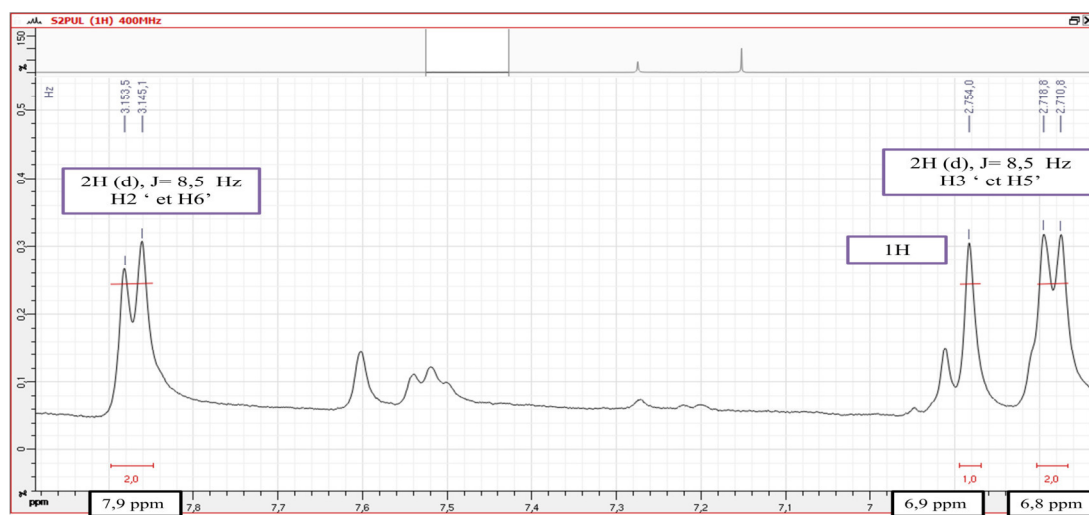


Figure 73. Étalement de la zone [6,7 ppm–8,0 ppm] du spectre RMN ^1H (CD_3OD ; 400 MHz) du composé **9**

Quatre singulets d'intégration 3H chacun à $\delta_H = 3,4$; $3,6$; $3,75$ et $3,82$ ppm attribuables aux groupements méthoxyles. D'après les données UV ces groupements sont liés aux carbones C-3, C-6, C-7 et C-8 (Figure 74).

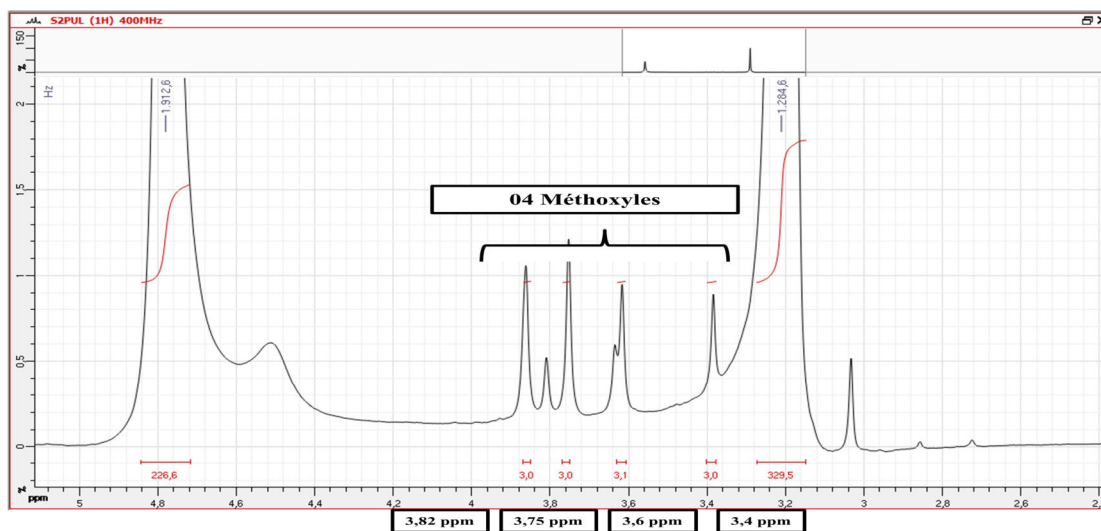


Figure 74. Étalement de la zone [2,4 ppm – 5,0 ppm] de spectre RMN ^1H (CD_3OD ; 400 MHz) du composé **9**

Toutes ces données permettent la détermination de la structure partielle suivante :

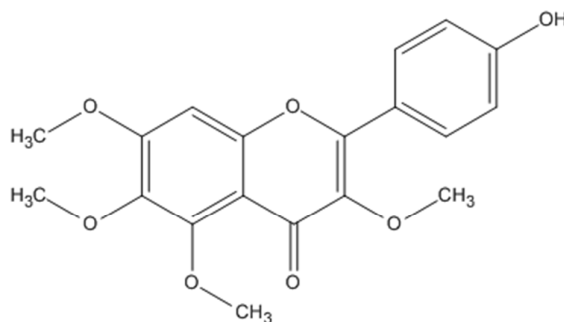


Figure 75. Structure du composé **9** ; 4'-hydroxy-3,5,6,7-tetraméthoxyflavone

Seulement quelques travaux ont été publiés sur le composé le composé **9** qui a été décrit une seule fois dans les parties aériennes de l'espèce *Varthemia iphionoides* (Astéracées) (Al-Dabbas et al., 2011). Donc, ce composé peut être considéré comme un marqueur chimiotaxonomique de la famille des Astéracées.

III.9.7. Identification du composé **10**

III.9.7.a. Profil CCM du composé **10**

Le composé **10** se présente sous une couleur jaune (8,5 mg), de fluorescence bleue sous la lampe UV 365 nm et noir violette sous la lampe UV 254 nm, caractéristique d'une flavone ou un flavonol avec 3-OR. Ce produit est identique aux deux composés **8** (Et composé **1**, voir Chapitre 4).

L'ensemble des attributions des protons et carbones du composé **10** est rassemblé dans le tableau 21 ;

Position	Composé 10		Position	Composé 10	
	$\delta_H^{[a]}$	$\delta_C^{[a,b]}$		$\delta_H^{[a]}$	$\delta_C^{[a,b]}$
2	-	156,9 s	2'	7,76 d (1,8)	113,6 d
3	-	142,4 s	3'	-	149,8 s
4	-	176,6 s	4'	-	151,6 s
5	-	146,1 s	5'	6,96 d (8,5)	117,3 d
6	-	139,9 s	6'	7,69 dd (8,5; 1,8)	124,3 d
7	-	156,3 s	3-OMe	3,80 s	61,1 q
8	7,06 s	98,0 d	5-OMe	3,92 s	63,1 q
9	-	153,2 s	7-OMe	4,03 s	57,9 q
10	-	114,2 s	3'-OMe	3,97 s	57,4 q
1'	-	124,0 s	-	-	-

Tableau 21. Valeurs des déplacements chimiques δ et J (Hz) RMN ^1H et ^{13}C (CD_3OD) des composés 10

^[a] Spectre enregistré dans CD_3OD , ^[b] Données basées sur HMBC, ^[c] Signaux superposés.

III.9.8. Identification de composé 11

III.9.8.a. Profil CCM du composé 11

- Le composé 11 se présente sous forme de poudre (44 mg).
- La fluorescence noir violette sous lumière de Wood (365 et 254 nm) est caractéristique d'un flavonol substitué en 3.
- $R_f = 0,45$ dans le système ($\text{CHCl}_3 : \text{AcOEt}$) (2 : 1) (v/v), et $R_f = 0,72$ dans le système ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{AcOEt}$) (2 : 1) (v/v)

Systeme	S ₁	S ₂
R_f	0,457	0,727
Fluorescence sous lumière de Wood	Noir violette	Noir violette

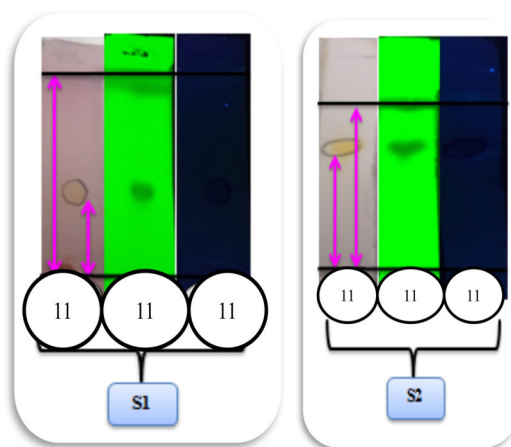


Figure 76. Profil chromatographique CCM du produit **11** dans deux systèmes

III.9.8.b. Données spectroscopiques UV-Visible

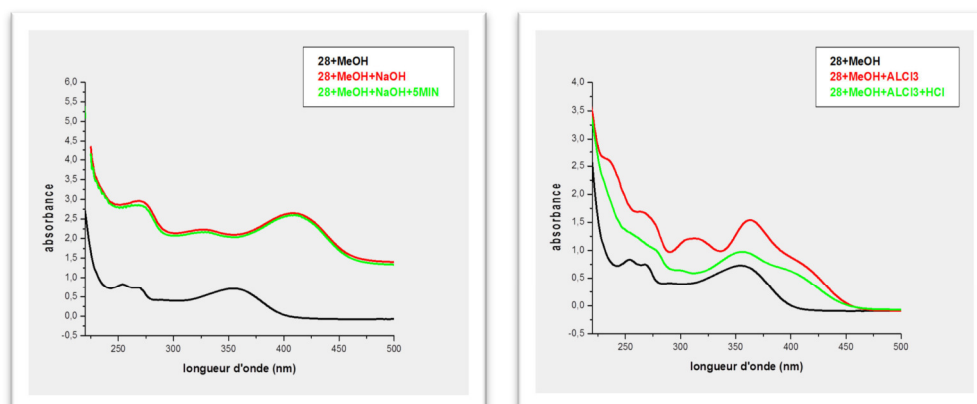
Ce composé montre une fluorescence violette sous UV à 365 nm. L'étude des séries spectrales UV du composé **11** (Figure 77) montre la présence de deux bandes caractéristiques des flavonoïdes : bande I : $\lambda_{\text{max}} = 354 \text{ nm}$ et bande II : $\lambda_{\text{max}} = 267 \text{ nm}$ indiquant la présence d'un flavonol substitué en 3.

- L'addition du réactif NaOH, conduit à un déplacement bathochrome (+54 nm) de la bande I avec augmentation de l'intensité lumineuse, indiquant que la position 4' est occupée par un OH libre. L'apparition d'une nouvelle bande à 327 nm indique la présence d'un OH libre en position 7. La stabilité du spectre NaOH confirme la substitution du C-3.
- L'ajout de AlCl_3 provoque un déplacement bathochrome ($\Delta\lambda = +9 \text{ nm}$) de la bande I, L'effet hypsochrome de la bande I ($\Delta\lambda = -10 \text{ nm}$) du spectre enregistré dans le milieu ($\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$) comparativement à celui enregistré après addition de AlCl_3 , indique la présence d'un système ortho-di OH sur le cycle B et un OR en 5.
- L'addition de NaOAc provoquant un déplacement bathochrome de la bande II ($\Delta\lambda = +8 \text{ nm}$) par rapport au spectre MeOH indique la présence d'un OH libre en 7.
- L'ajout du réactif NaOAc + H_3BO_3 provoque un effet bathochrome (+5 nm) de la bande I par rapport au spectre MeOH indique la présence d'un groupement ortho di-OH sur le cycle B.

Les données spectrales UV obtenues après enregistrement dans le méthanol et en présence des réactifs spécifiques sont présentés dans le tableau suivant :

Réactifs	Bande II (nm)	Autre Bande (nm)	Bande I (nm)	Déplacement (nm)	Interprétation
MeOH	267	-	354	-	Flavonol substitué en 3
MeOH + NaOH	269	327	408	Bande I : $\Delta\lambda = +54$	OH en 4'
MeOH + NaOH + 5 min	296	327	408	Le spectre est stable après 5 min	OH en 4' et OH en 7
MeOH + AlCl ₃	262	312	363	Bande I : $\Delta\lambda = +9$	Ortho di-OH sur B et OR en 5
AlCl ₃ / AlCl ₃ + HCl	-	-	353	Bande I : $\Delta\lambda = -10$	Ortho di-OH sur B et un OR en 5
MeOH + NaOAc	275	321	379	Bande II: $\Delta\lambda = +8$	OH libre en 7
MeOH/ NaOAc + H ₃ BO ₃	270	-	359	Bande I: $\Delta\lambda = +5$	Ortho di-OH sur B.

Tableau 22. Données de la série spectrale UV- visible du composé **11**



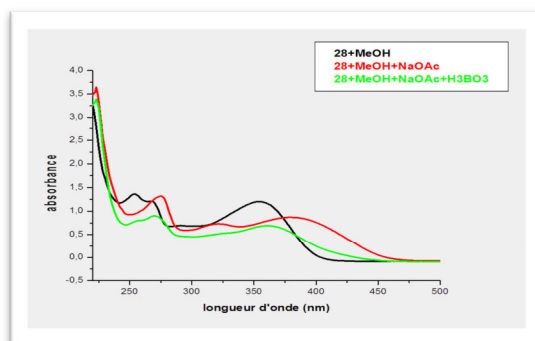


Figure 77. Série spectrale UV-visible du composé **11**

IV.9.8.c. Donnée spectroscopiques RMN

L'examen du spectre RMN ^1H (400 MHz) enregistré dans CD_3OD du composé **11** montre les signaux caractéristiques d'un flavonoïde dans la zone aromatique et la présence de deux groupements méthoxyles avec :

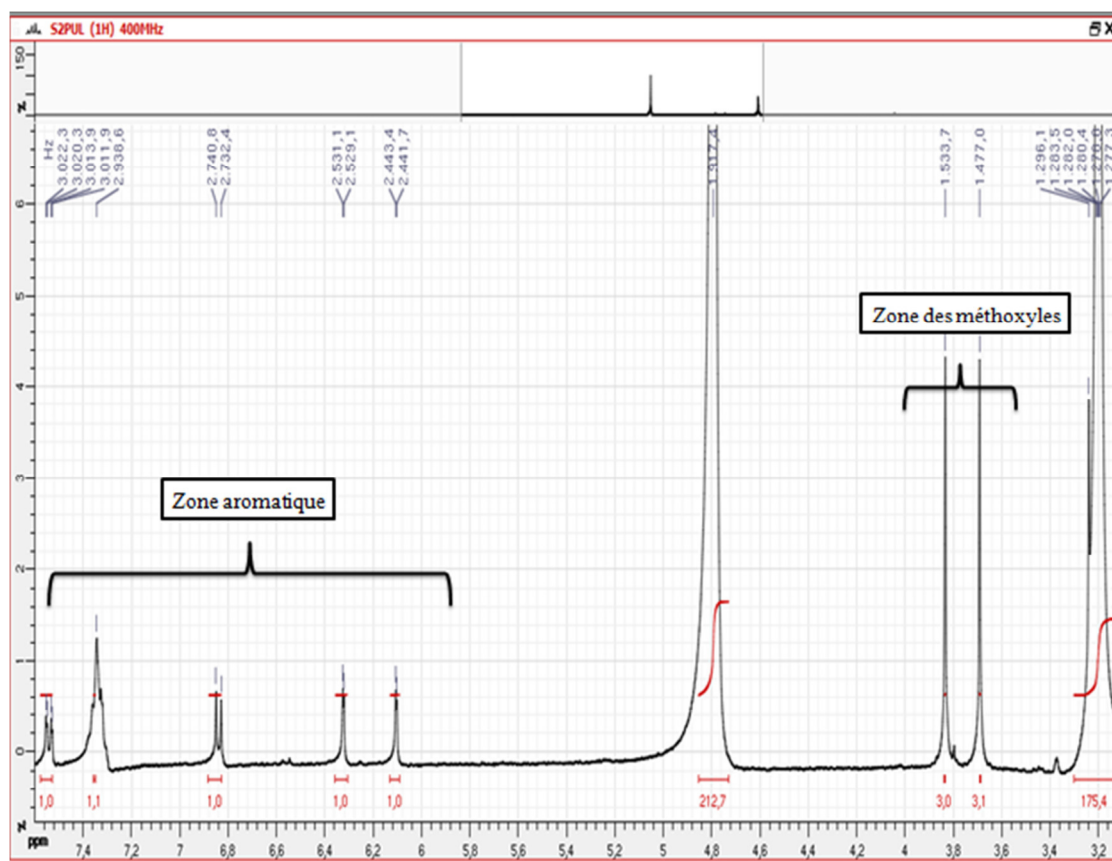


Figure 78. Spectre RMN ^1H (CD_3OD ; 400 MHz) du composé **11**

- Deux signaux sous forme de doublets à $\delta_H = 6,11$ ppm et $\delta_H = 6,31$ ppm ($J = 1,7$ Hz, couplage méta) attribuable aux protons H-6 et H-8 respectivement.
- Un signal sous forme de doublet de doublet ($J = 8,4$ et $1,7$ Hz, couplage méta) d'intégration 1H à $\delta_H = 7,52$ ppm attribué au proton H-6'.
- Un signal sous forme de doublet d'intégration 1H à $\delta_H = 7,61$ ppm ($J = 1,7$ Hz, couplage méta) attribué au proton H-2'.

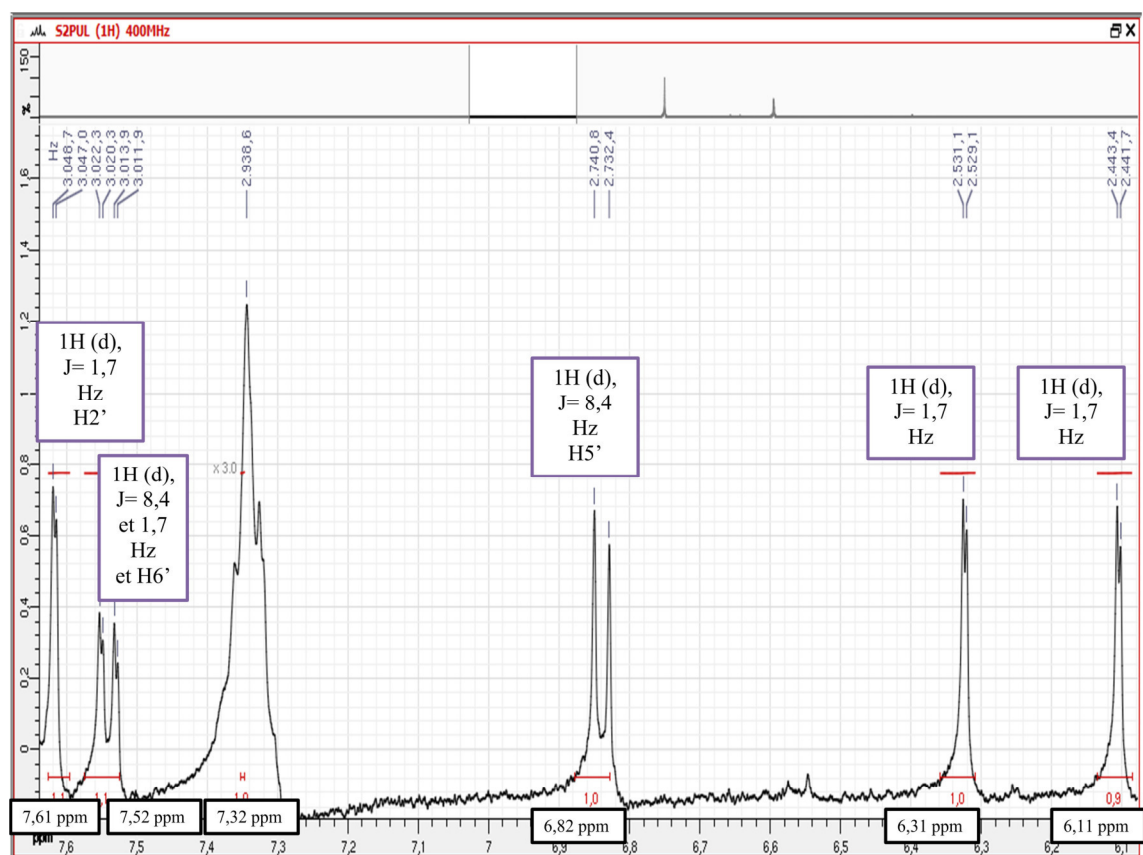


Figure 79. Étalement de la zone [6,0 ppm – 7,62 ppm] de spectre RMN ^1H (CD_3OD ; 400 MHz) du composé **11**

Deux singulets d'intégration 3H à $\delta_H = 3,69$ ppm et $3,83$ ppm attribuables aux protons groupements méthoxyles (Figure 80).

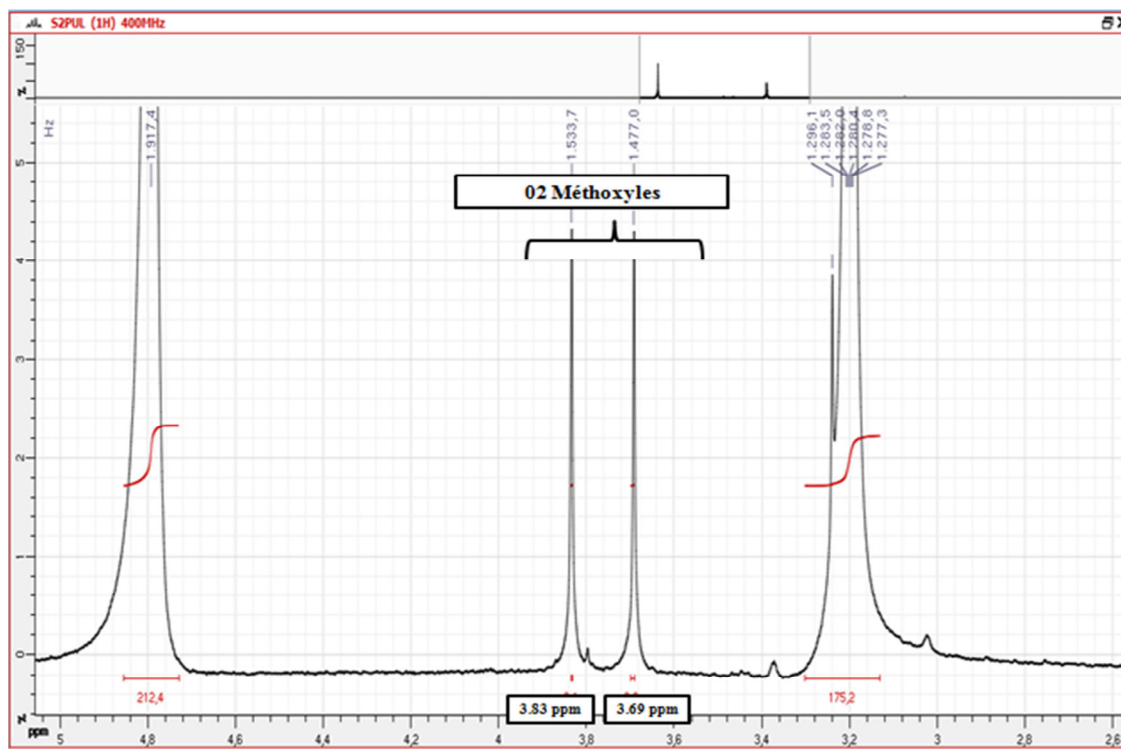


Figure 80. Étalement de la zone [2,6 ppm – 5,0 ppm] de spectre RMN ^1H (CD_3OD ; 400 MHz) du composé **11**

Toutes les données mènent à la structure du composé **11**

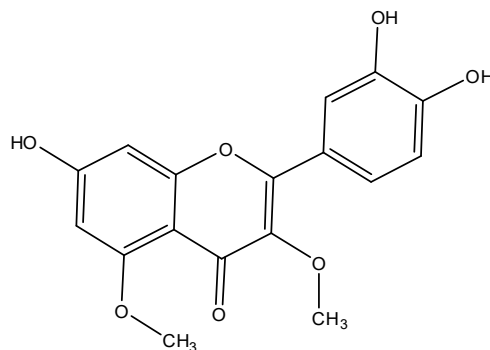


Figure 81. Structure partielle du composé **11** ; 3',4'-Dihydroxy-3,5-diméthoxyflavone (Quercetin-3,5-diméthylether) (Caryatine)

Seulement quelques travaux ont été publiés sur le composé le composé **11** qui est connu ainsi sous le nom ; 3,5-Di-O-Methylquercetin et Caryatine, ce composé a été isolé de l'espèce *Carya pecan* (Juglandacées), *Eucryphia cordifolia* (Cunoniacées), *Eucryphia glutinosa* (Cunoniacées) et *Rhododendron spp.* (Ericacées) (Sasaki, 1964).

IV.9.9. Identification du composé 12

IV.9.9.a. Profil CCM du composé 12

Le composé **12** se présente sous une couleur jaune (12 mg), de fluorescence noir violette sous la lampe UV 365 nm et 254 nm, caractéristique flavonol substitué en 3.

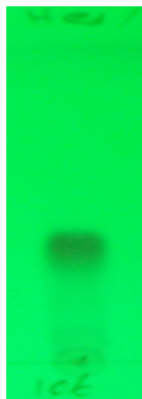


Figure 82. Profil chromatographique CCM du composé **12**, (hexane: AcOEt, 5: 5)

IV.9.9.b. Données spectroscopiques UV-Visible

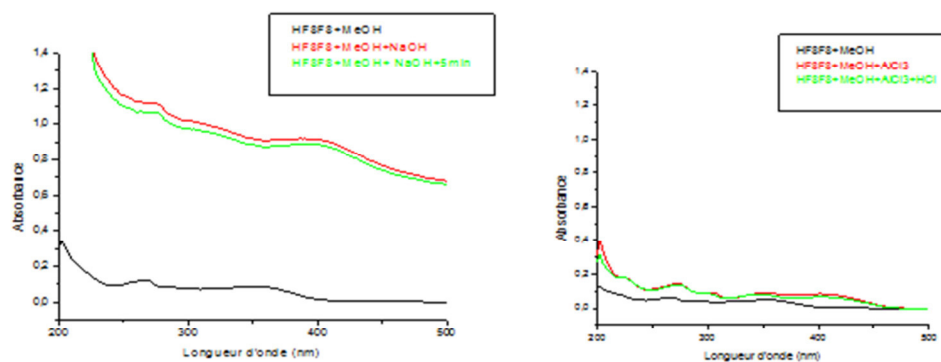
Ce composé montre une fluorescence violette sous UV à 365 nm. L'étude des séries spectrales UV du composé **12** (Figure 83) montre la présence de deux bandes caractéristiques des flavonoïdes : bande I : $\lambda_{\text{max}} = 354$ nm et bande II : $\lambda_{\text{max}} = 267$ nm indiquant la présence d'un flavonol substitué en 3.

- **Série I:** l'effet bathochromique ($\Delta\lambda = +42$ nm) de la bande I en présence de NaOH, et la stabilité du spectre sont en faveur de la présence d'un OH libre en C-4'.
- **Série II:** l'effet bathochrome de la bande I du spectre AlCl_3 ($\Delta\lambda = +51$ nm) comparativement au spectre méthanol indique la présence d'un groupement OH libre en 5.
- **Série III:** la présence du déplacement bathochrome ($\Delta\lambda = +8$ nm) de la bande II après l'addition du NaOAc confirme la présence d'une substitution O-H en C-7. La comparaison du spectre NaOAc + H_3BO_3 par rapport au spectre MeOH confirme l'absence de groupements ortho di-OH sur le cycle B.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau suivant :

Réactifs	Bande II (nm)	Bande I (nm)	Déplacement ($\Delta\lambda$) (nm)	Interprétation
MeOH	267	354	-	Flavonol substitué en 3
MeOH + NaOH	275	396	Bande I : $\Delta\lambda = +42$	OH libre en 4'
MeOH + NaOH + 5 minutes	275	396	Le spectre de NaOH est stable après 5 min	OH libre en 4' et OR en 3
MeOH + $AlCl_3$	272	405	Bande I : $\Delta\lambda = +51$	OH libre en 5
MeOH + $AlCl_3$ + HCl	272	405	Bande I : $\Delta\lambda = +51$	OH libre en 5
MeOH + NaOAc	275	380	Bande II : $\Delta\lambda = +8$	OH en 7
MeOH + NaOAc + $H_3B O_3$	269	355	Bande I : $\Delta\lambda = +1$	Absence d'ortho di-OH sur B

Tableau 23. Données spectroscopiques UV du composé 12



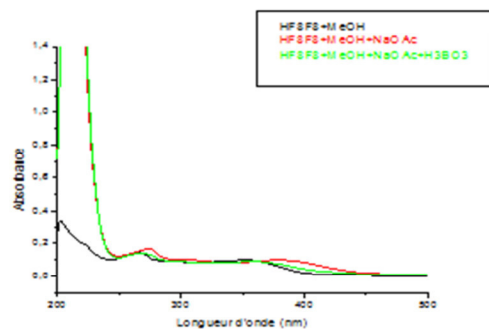


Figure 83. Série spectrale UV du composé 12

IV.9.9.c. Données spectroscopiques RMN

L'examen du spectre RMN ^1H (400 MHz) du composé 12 enregistré dans l'acétone montre les signaux caractéristiques d'un flavonoïde dans la zone aromatique et la présence d'un groupement méthoxyles avec :

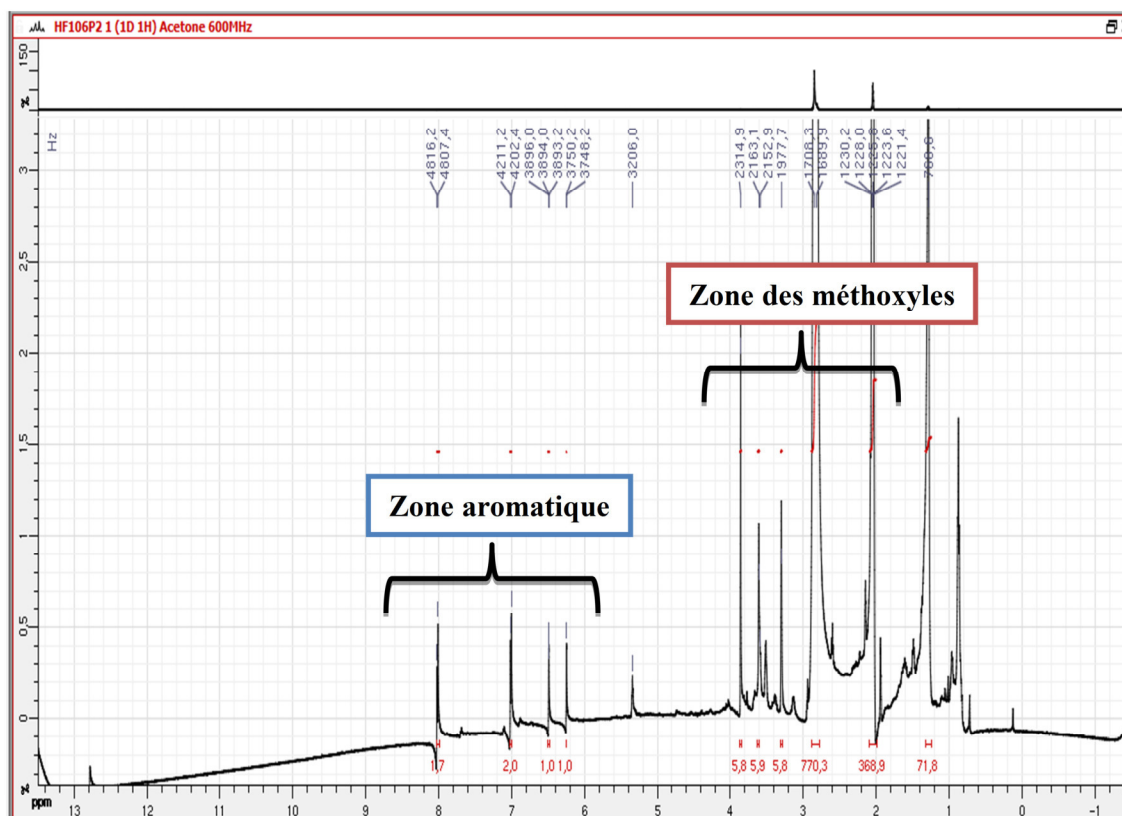


Figure 84. RMN ^1H (Acétone ; 600 MHz) du composé 12

- Deux signaux sous forme de doublets ($J= 2,0$ Hz, couplage méta) à $\delta_{\text{H}}= 6,22$ ppm et $\delta_{\text{H}}= 6,65$ ppm attribuables aux protons H-6 et H-8, respectivement.
- Deux signaux sous forme de doublets ($J= 8,8$ Hz, couplage ortho) à $\delta_{\text{H}}= 7,0$ ppm et $\delta_{\text{H}}= 8,0$ ppm attribuables aux protons H-3', H5' et H2', H6', respectivement (Figure 85).

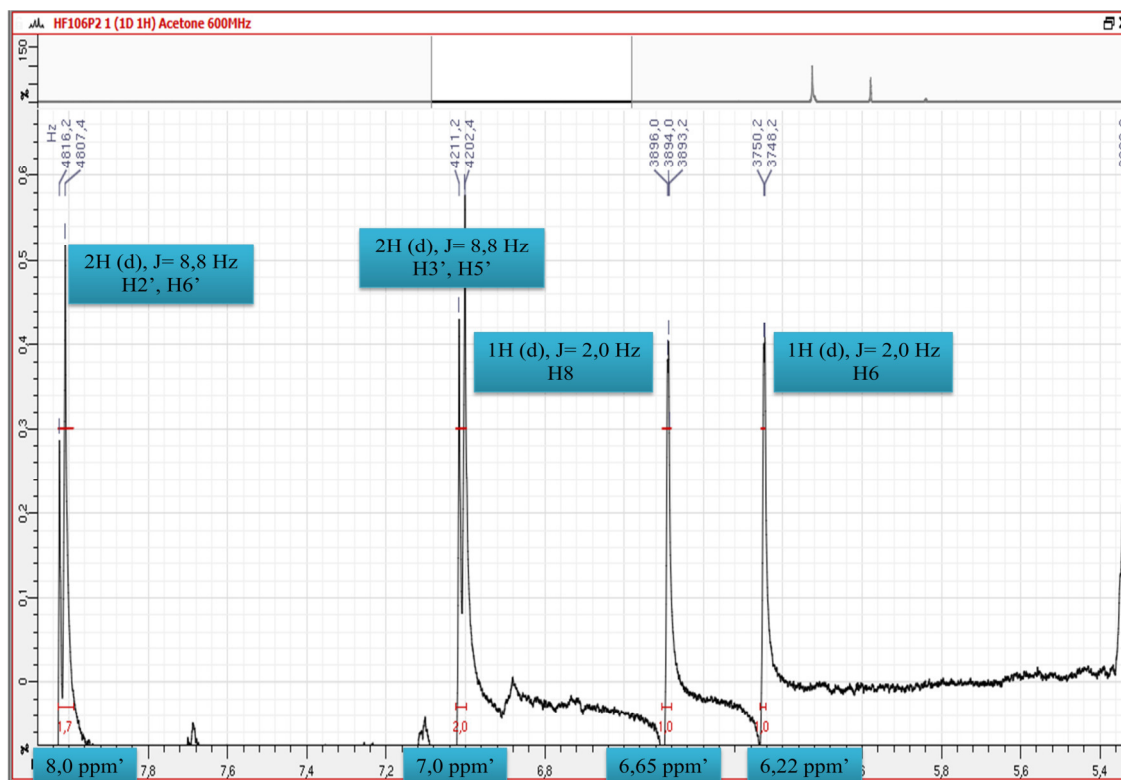


Figure 85. Étalement de la zone [5,4 ppm – 8,0 ppm] de spectre RMN ^1H (Acétone ; 600 MHz) du composé **12**

L'étalement du spectre RMN ^1H du composé **12** (Figure 86) montre un autre singulet d'intégration 3H à $\delta_{\text{H}}= 3,82$ ppm qui est attribuable à un groupement méthoxyle.

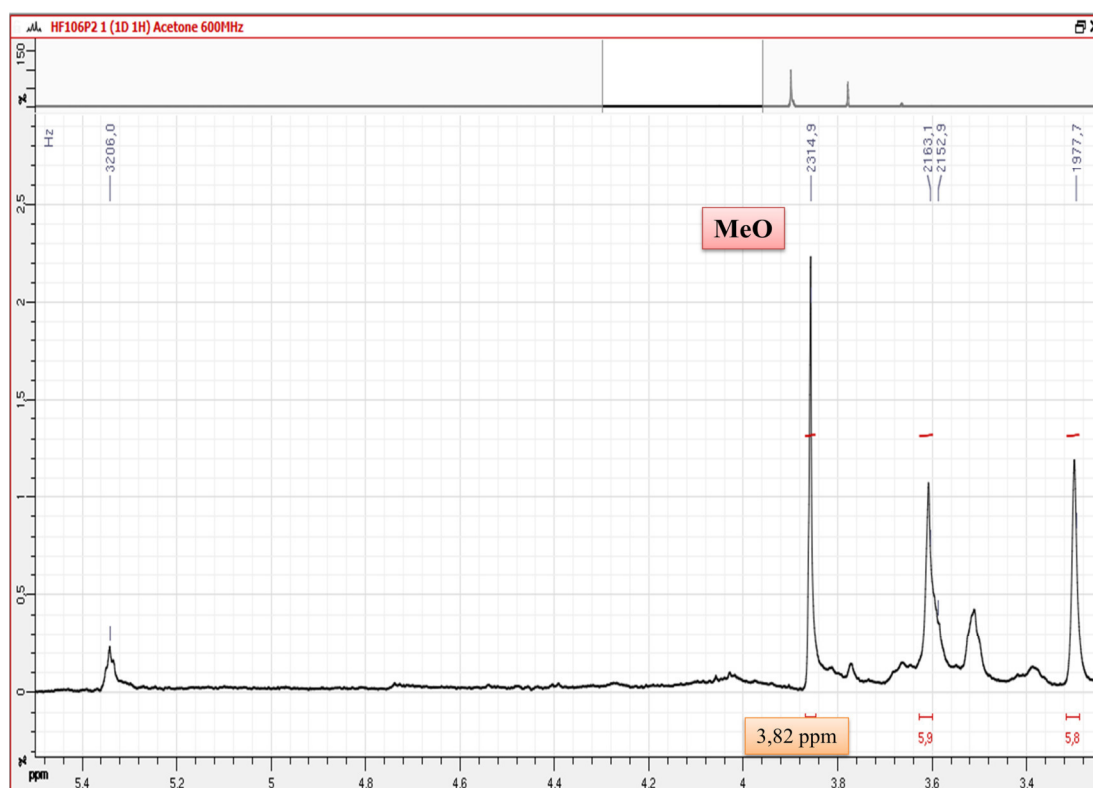


Figure 86. Étalement de la zone [3,8 ppm –5,4 ppm] de spectre RMN ^1H (Acétone ; 600 MHz) du composé **12**

L'ensemble de résultat des analyses spectroscopiques nous oriente vers la structure finale du composé **12** (Nakatani et al., 1991)

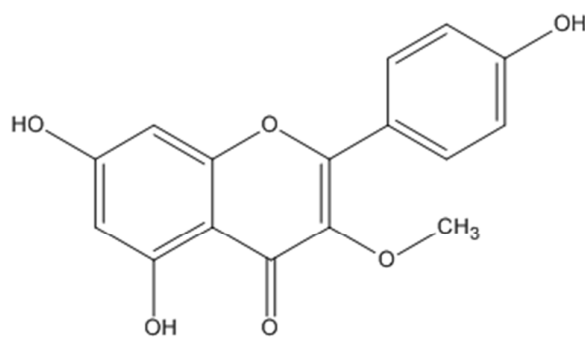


Figure 87. Structure du composé **12**; 4',5,7-trihydroxy-3-methoxyflavone (**Isokaempferid**)

Le composé **12** (**Isokaempferid**) est connue aussi sous le nom **Kaempferol 3-methyl ether**, ce composé a été isolé précédemment dans différentes espèces (Tableau 24);

Espèces	Familles	Références
<i>Cistus albidus</i>	Cistacées	(Pascual Teresa et al., 1978 ; Wollenweber et Mann, 1984)
<i>Cistus ladanifer</i>	Cistacées	(Chaves et al., 2001 ; Naturforsch., 1983)
<i>Cistus laurifolius</i>	Cistacées	(Vogt et al., 1987 ; Wollenweber and Mann, 1983)
<i>Cistus albidus</i>	Cistacées	(Vogt et al., 1987 ; Wollenweber and Mann, 1983)
<i>Cistus creticus</i>	Cistacées	(Wollenweber et Mann, 1983)
<i>Cistus psilosepaus</i>	Cistacées	(Wollenweber et Mann, 1983)
<i>Cistus salvifolius</i>	Cistacées	(Gürbüz et al., 2015 ; Wollenweber et Mann, 1983)
<i>Cistus symphytifolius</i>	Cistacées	(Vogt et al., 1987)
<i>Cistus osbeckiifolius</i>	Cistacées	(Vogt et al., 1987)
<i>Cistus incanus ssp. tauricus,</i>	Cistacées	(Vogt et al., 1987)
<i>Cistus incanus ssp. villosus,</i>	Cistacées	(Vogt et al., 1987)
<i>Cistus incanus ssp. corsicus</i>	Cistacées	(Vogt et al., 1987)
<i>Cistus incanus ssp. creticus,</i>	Cistacées	(Vogt et al., 1987)
<i>Cistus crispus</i>	Cistacées	(Vogt et al., 1987)
<i>Cistus parviflorus</i>	Cistacées	(Vogt et al., 1987)
<i>Cistus monspeliensis,</i>	Cistacées	(Vogt et al., 1987)
<i>Cistus psilosepalus</i>	Cistacées	(Vogt et al., 1987)
<i>Cistus albanicus</i>	Cistacées	(Vogt et al., 1987)
<i>Cistus populifolius</i>	Cistacées	(Vogt et al., 1987)
<i>Cistus laurifolius,</i>	Cistacées	(Vogt et al., 1987)
<i>Cistus ladanifer</i>	Cistacées	(Vogt et al., 1987)
<i>Cistus libanotis</i>	Cistacées	(Vogt et al., 1987)
<i>Centaurea arenaria</i>	Astéracées	Csapi et l., 2010)
<i>Psiadia dentata</i>	Astéracées	(Robin et al., 2001)
<i>Centaurea bracteata Scop.</i>	Astéracées	(Flamini et al., 2001)
<i>Jasonia candicans</i>	Astéracées	(Ahmed et al., 1994)
<i>Centaurea clementei</i>	Astéracées	(Gonzalez et al., 1985)
<i>Chrysothamnus humilis</i>	Astéracées	(Stevens et al., 1999)
<i>Chrysothamnus nauseosus</i>	Astéracées	(Stevens et al., 1999)
<i>Flourensia hirsuta</i>	Astéracées	(Dillon et Mabry, 1977)
<i>Flourensia ilicifolia</i>	Astéracées	(Dillon et Mabry, 1977)
<i>Haplopappus deserticola</i>	Astéracées	(Tojo et al., 1999)
<i>Serratula wolffi</i>	Astéracées	(Bohlmann et Czerson, 1976)
<i>Viguiera gardneri</i>	Astéracées	(Schorr et al., 2002)
<i>Acacia neovernicosa</i>	Fabacées	(Wollenweber et Seigler, 1982)
<i>Cassia javanica</i>	Fabacées	(El-Sayyad et Ross, 1983)
<i>Crotalaria madurensis</i>	Fabacées	(Bhakuni DS, Chaturvedi, 1984)
<i>Genista ephedroides</i>	Fabacées	(Pistelli et al., 1998)
<i>Prosopis glandulosa</i>	Fabacées	(Bragg et al., 1978)
<i>Prosopis laevigata</i>	Fabacées	(Bragg et al., 1978)

Tableau 24. Liste des espèces et des familles contenant l'Isokaempferid

<i>Prosopis juliflora</i>	Fabacées	(Bragg et al., 1978)
<i>Rhynchosia rufescens</i>	Fabacées	(Adinarayana et Ramachandraiah, 1984)
<i>Dracocephalum kotschy</i>	Lamiacées	(Fattahi et al., 2013)
<i>Salvia glutinosa</i>	Lamiacées	(Lu et Foo, 2002)
<i>Salvia yosgadensis</i>	Lamiacées	(Lu et Foo, 2002)
<i>Solanum sarrachoides</i>	Solanacées	(Abou-Gazar et al., 2004)
<i>Larrea tridentata</i>	Zygophyllacées	(Abou-Gazar et al., 2004)
<i>Rosa rugosa</i>	Rosacées	(Xiao et al., 2006)
<i>Zingiber aromaticum</i>	Zingibéracées	(Usia et al., 2005)
<i>Betula nigra</i>	Bétulacées	(Wollenweber, 1977)
<i>Combretum quadrangulare</i>	Combrétacées	(Ganzera et al., 1998)
<i>Geranium macrorrhizum</i>	Géraniacées	(Tsankova et Ognyanov, 1976)

Tableau 24. Liste des espèces par familles contenant l'Isokaempferid (suite du tableau 24)

Sur la base de ce tableau, il apparaît que les familles les plus riches en Isokaempferid sont les suivantes ; Cistacées, Astéracées, Fabacées et Lamiacées.

III.9.10. Identification du composé 13

III.9.10.a. Profil CCM du composé 13

- Le composé **13** se présente sous forme de poudre blanche.
- La fluorescence jaune sous lumière Wood UV= 365 nm est caractéristique d'un flavonol avec 3-OH, et avec ou sans 5-OH.
- $R_f = 0,53$ dans le système (CHCl₃: AcOEt) (2: 1) (v/v) et $R_f = 0,77$ dans le système (CH₂Cl₂: AcOEt) (2 : 1) (v/v).

Système	S ₁	S ₂
R_f	0,536	0,774
Fluorescence sous lumière de Wood	Jaune	Jaune

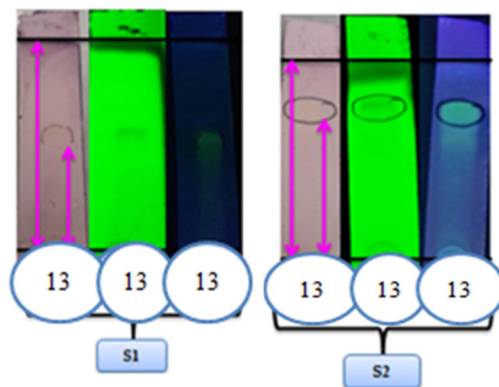


Figure 88. Profil chromatographique CCM du produit **13** dans deux systèmes

III.9.10.b. Donnée spectroscopiques UV-Visible

Ce composé montre une fluorescence jaune sous UV à 365 nm. L'étude des séries spectrales UV du composé **13** (Figure 89) montre la présence de deux bandes caractéristiques des flavonoïdes : bande I : $\lambda_{\max} = 360$ nm et bande II : $\lambda_{\max} = 268$ nm indiquant la présence d'un flavonol.

- L'ajout de NaOH provoque un déplacement bathochrome ($\Delta\lambda = +51$ nm) de la bande I avec un effet hyperchrome par rapport au spectre méthanolique, ce qui oriente vers 4'OH libre. L'apparition d'une nouvelle bande à 322 nm indique la présence d'un OH libre en 7.
- L'ajout de NaOAc provoque un déplacement bathochrome ($\Delta\lambda = +2$ nm) de la bande II, ce qui indique que la position 7 comporte un substituant OH libre. Le fait qu'il n'y a pas de changement notable de la bande I en comparant le spectre AlCl_3 : HCl et AlCl_3 laisse prévoir l'absence d'un système ortho di-OH sur le cycle B. Ceci est aussi confirmé par l'absence de l'effet bathochrome de la bande I du spectre obtenu après addition de H_3BO_3 .

Les résultats sont rassemblés dans le tableau suivant :

Réactifs	Bande II (nm)	Autre Bande (nm)	Bande I (nm)	Déplacement (nm)	Interprétation
MeOH	268	-	360	-	Flavonol avec ou sans 5-OH
MeOH + NaOH	279	322	411	Bande I: $\Delta\lambda = +51$	OH en 4'
MeOH + NaOH + 5 min	278	322	410	Stable après 5 min	OH en 4' OH en 7
MeOH + AlCl ₃	237	313	361	Bande I: $\Delta\lambda = +1$	-
AlCl ₃ / AlCl ₃ + HCl	270	322	358	Bande I: $\Delta\lambda = -3$	Absence de groupements ortho di-OH sur B
MeOH + NaOAc	270	-	342	Bande II: $\Delta\lambda = +2$	OH en 7
MeOH + NaOAc + H ₃ BO ₃	268	-	351	Bande I: $\Delta\lambda = -9$	Absence de groupements ortho di-OH sur B

Tableau 25. Données de la série spectrale UV-visible du produit **13**

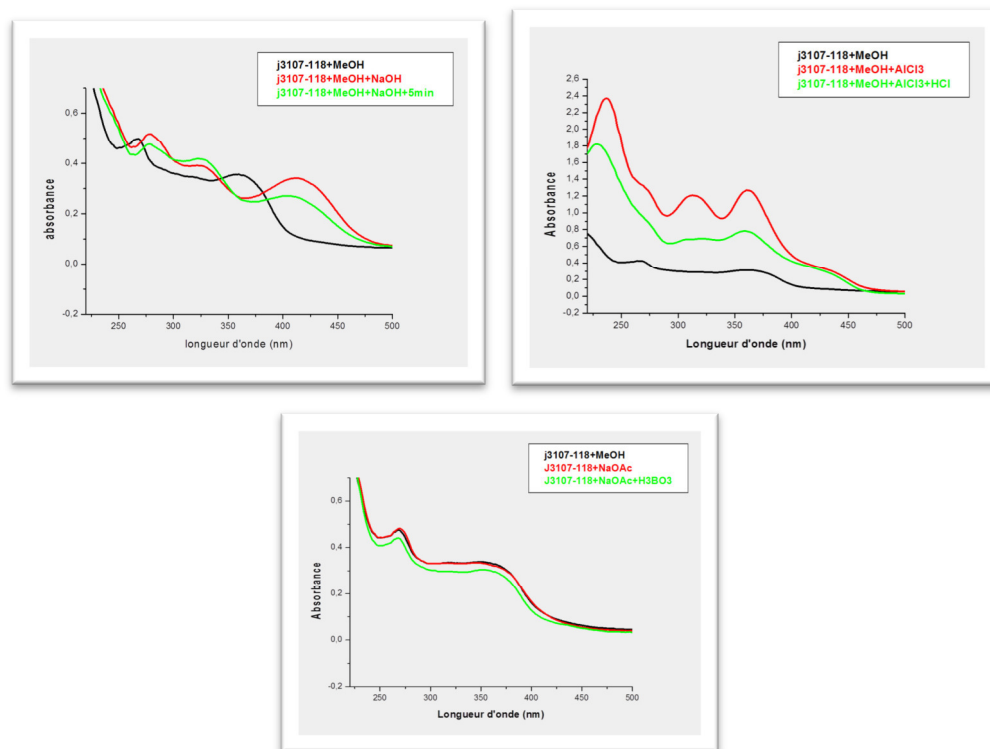


Figure 89. Série spectrale UV-visible du composé **13**

III.9.10.c. Donnée spectroscopiques RMN

L'examen du spectre RMN ^1H (400 MHz) du composé **13** enregistré dans CD_3OD montre les signaux caractéristiques d'un flavonoïde uniquement dans la zone aromatique avec :

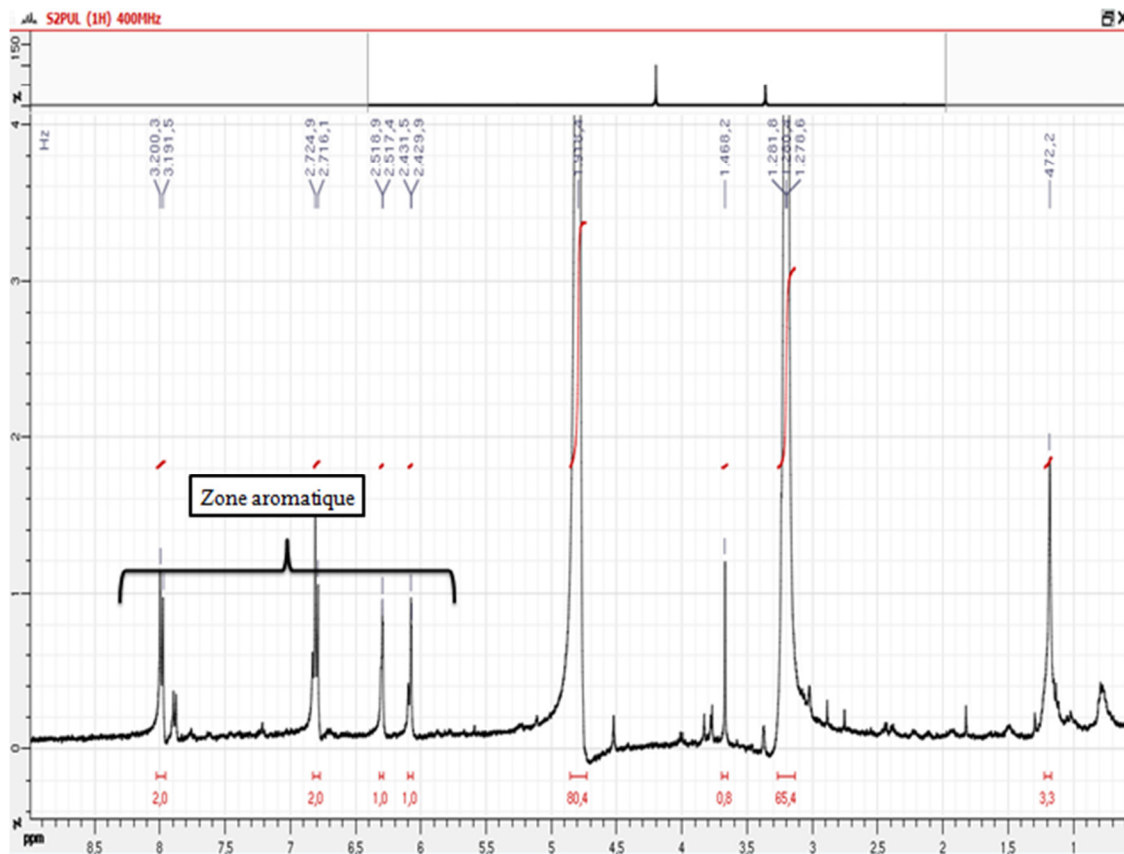


Figure 90. Spectre RMN ^1H (CD_3OD ; 400 MHz) du composé **13**

- Deux signaux sous forme de doublets d'intégration 2H à $\delta_{\text{H}} = 6,8$ ppm et $\delta_{\text{H}} = 8,0$ ppm ($J = 8,8$ Hz, couplage ortho) attribuable aux protons H-3', H-5' et H-2', H-6' respectivement.
- Deux signaux sous forme de doublet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 6,1$ ppm et $\delta_{\text{H}} = 6,31$ ppm ($J = 1,6$ Hz, couplage méta) attribué au proton H-6 et H-8, respectivement (Figure 91).

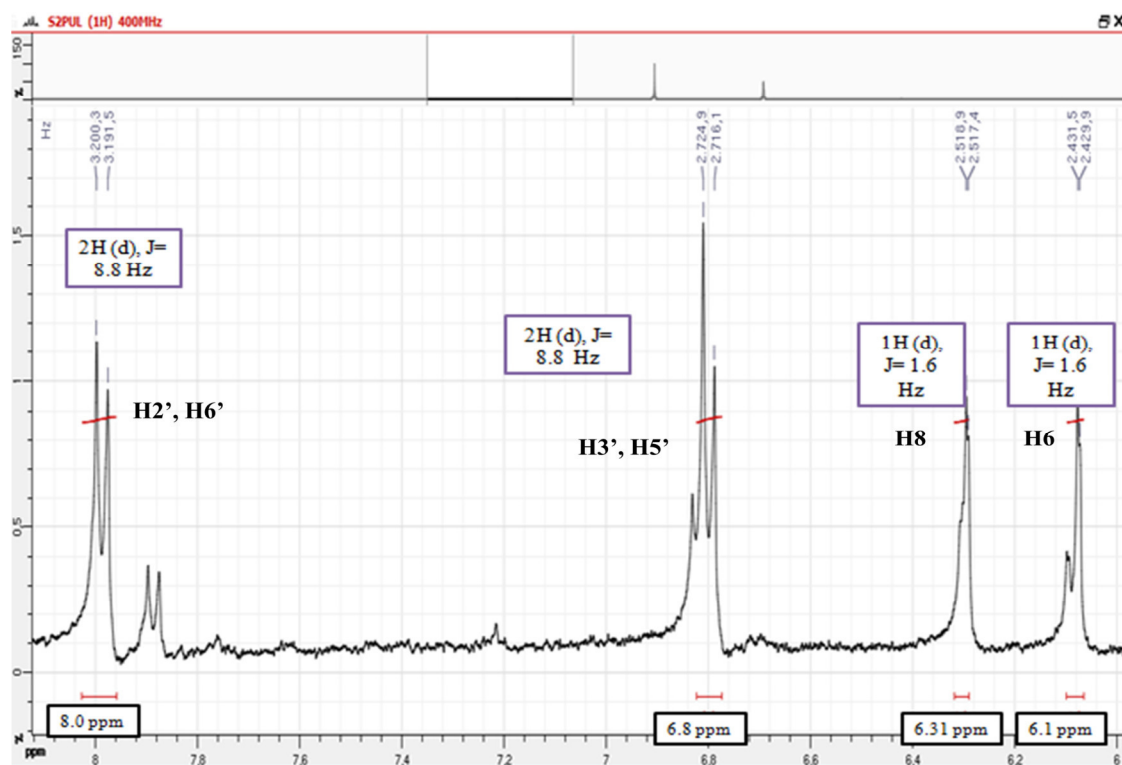


Figure 91. Étalement de la zone [6,0 ppm – 8,0 ppm] de spectre RMN ^1H (CD_3OD ; 400 MHz) du composé **13**

L'ensemble de résultat des analyses spectroscopiques nous oriente vers la structure finale du composé **13**

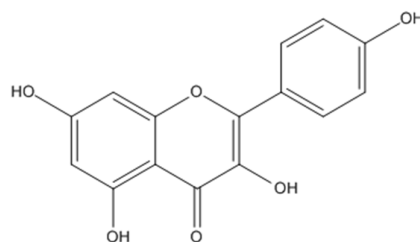


Figure 92. Structure du composé **13**; 5,7,4'-trihydroxyflavonol (**kaempferol**)

Le composé **13** est connue sous plusieurs noms tels que ; kaempferol, nimbecetin, pelargidenolon, rhamnolutein, populnetine, robigenine et swartziol, ce composé a été identifié précédemment dans différentes espèces (Tableau 26) ;

Espèces	Familles	Références
<i>Cistus albidus</i>	Cistacées	(Pascual Teresa et al., 1978 ; Wollenweber et Mann, 1984)
<i>Cistus libanotis</i>	Cistacées	(Pascual Teresa et al., 1982)
<i>Cistus symphytifolius</i>	Cistacées	(Vogt et al., 1987)
<i>Cistus osbeckiifolius</i>	Cistacées	(Vogt et al., 1987)
<i>Cistus incanus ssp. tauricus</i>	Cistacées	(Vogt et al., 1987)
<i>Apocynum venetum</i>	Apocynacées	(Grundmann et al., 2009)
<i>Nerium oleander</i>	Apocynacées	(Mors et al., 2000)
<i>Rhaponticum carthamoides</i>	Astéracées	(Kokoska et al., 2009)
<i>Silphium perfoliatum</i>	Astéracées	(El-Sayed et al., 2002)
<i>Epimedium brevicornum</i>	Berbéridacées	(Shen et al., 2007)
<i>Epimedium dolichostemen</i>	Berbéridacées	(Shen et al., 2007)
<i>Epimedium franchetii</i>	Berbéridacées	(Shen et al., 2007)
<i>Epimedium fargesii</i>	Berbéridacées	(Shen et al., 2007)
<i>Epimedium koreanum</i>	Berbéridacées	(Shen et al., 2007)
<i>Epimedium leishanense</i>	Berbéridacées	(Shen et al., 2007)
<i>Epimedium leptorrhizum</i>	Berbéridacées	(Shen et al., 2007)
<i>Epimedium membranaceum</i>	Berbéridacées	(Shen et al., 2007)
<i>Epimedium wushanense</i>	Berbéridacées	(Shen et al., 2007)
<i>Epimedium myrianthum</i>	Berbéridacées	(Shen et al., 2007)
<i>Euphorbia virgata</i>	Euphorbiacées	(Jassbi, 2006)
<i>Euphorbia prostrata</i>	Euphorbiacées	(Ismail et al., 1977)
<i>Solanum elaeagnifolium</i>	Solanacées	(Chiale et al., 1991)
<i>Solanum elaeagnifolium</i>	Solanacées	(Chiale et al., 1991)
<i>Rodgersia podophylla</i>	Saxifragacées	(Chin and Kim, 2006)
<i>Casearia ilicifolia</i>	Samydacées	(Weniger Haag-Berrurier, 1978)
<i>Phellodendron amurense var. wilsoni</i>	Rutacées	(Wu et al., 2003)
<i>Morinda citrifolia</i>	Rubiacees	(Deng et al., 2007)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicacées	(Abrahams et al., 2003 ; Baxter et al., 2005)
<i>Fragaria × ananassa</i>	Rosacées	(Aaby et al., 2007)
<i>Angelica furcijuga</i> KITAGAWA	Apiacées	(Matsuda et al., 2005)
<i>Eugenia jambolana</i>	Myrtacées	(Mahmoud et al., 2001)
<i>Meconopsis betonicifolia</i>	Papavéracées	(Takeda et al., 1996)
<i>Camellia sinensis</i>	Théacées	(Yoshikawa et al., 2008)
<i>Taxus brevifolia</i>	Taxacées	(Parmar et al., 1999)
<i>Tetrapanax papyriferus</i>	Araliacées	(Ho et al., 2005)

Tableau 26. Liste des espèces par familles contenant le kaempferol

Sur la base de ce tableau, il apparaît que le kaempferol est un composé assez commun reparté dans plusieurs familles.

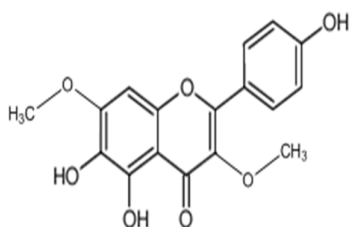
III.10. Conclusion

Le but de notre travail dans ce chapitre était d'isoler et identifier les métabolites secondaires de type flavonoïdes des espèces *Pulicaria inuloides* (Astéracées) (saharienne) *Cistus albidus* (Cistacées) (région des Aurès).

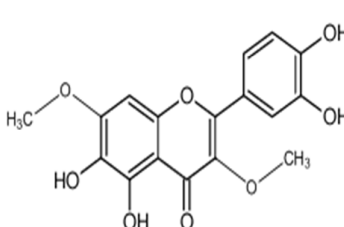
Nos travaux phytochimiques de séparation et de purification des extraits ; CHCl₃ et AcOEt des parties aériennes de l'espèce *P. inuloides* nous ont permis l'isolement et la purification de six (07) produits de type flavonoïde. L'étude phytochimique de séparation et de purification de l'extrait AcOEt de la partie aérienne de l'espèce *C. albidus* nous a permis l'isolement et la purification de trois (03) produits du type flavonoïdes, dont les structures ont été déterminées par la combinaison des différentes méthodes spectrales à savoir la spectrophotométrie UV-Visible, la RMN et ses séquences, bidimensionnelle: COSY, ROESY, NOESY, HSQC, HMBC, ainsi que la spectrométrie de masse LC-MS.

Les composés identifiés sont indiqués ci-dessous :

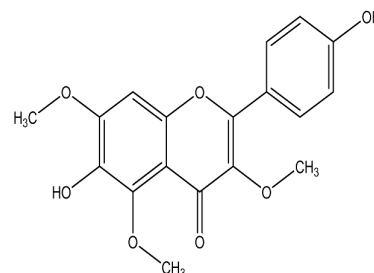
- ✓ **Composé 4** : 6-hydroxy kaempferol 3, 7-diméthyl éther
- ✓ **Composé 5** : 3,7-Dimethylquercetagetin
- ✓ **Composé 6** : 4',6-Dihydroxy-3,5,7-trimethoxy-flavone
- ✓ **Composé 7** : Quercetagetin 3,5,7-trimethyl ether
- ✓ **Composé 8** : Quercétagétine 3,5,7,3'-tétraméthyléther
- ✓ **Composé 9** : 4'-hydroxy-3,5,6,7-tetramethoxyflavone
- ✓ **Composé 11** : Quercetin-3,5-dimethylether (Caryatine)
- ✓ **Composé 12** : Isokaempferid
- ✓ **Composé 13** : kaempferol



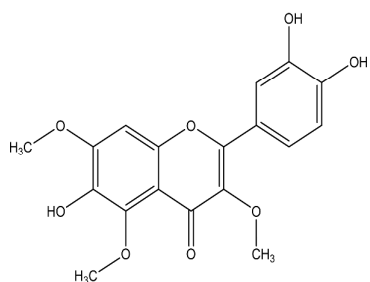
4 : 6-hydroxy kaempferol 3, 7-diméthyl éther)



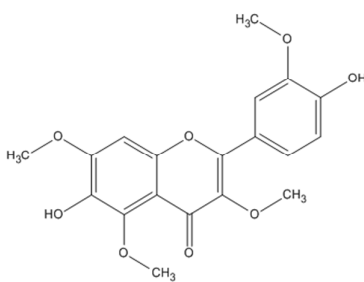
5 : 3,7-Dimethylquercetagetin



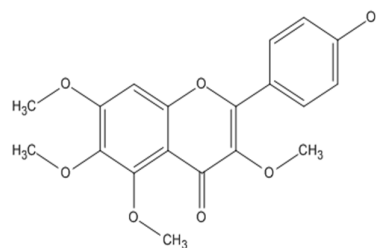
6 : 4',6-Dihydroxy-3,5,7-trimethoxy-flavone



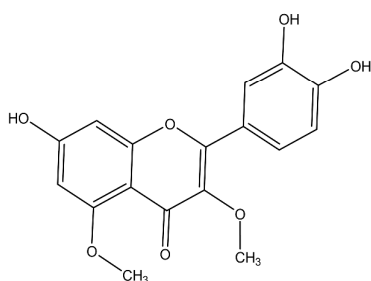
7 : Quercetagenin 3,5,7-trimethyl ether



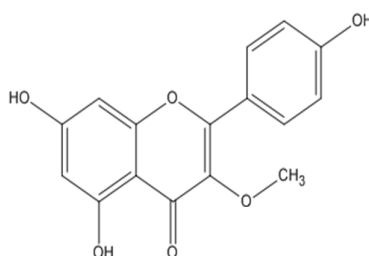
8 : Quercétagine 3,5,7,3'-tétraméthyléther



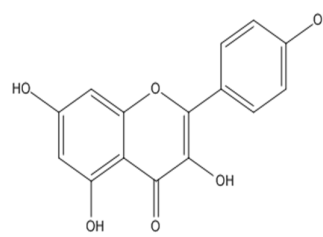
9 : 4'-hydroxy-3,5,6,7-tetraméthoxyflavone



11 : Quercetin-3,5-diméthylether



12 : Isokaempferid



13 : Kaempferol

Après un screening antiparasitaire effectués sur tous nos extraits, il est apparu que l'extrait chloroformique de la partie aérienne du *P. inuloides* et les extraits chloroforme et acétate d'éthyle des parties aériennes de *C. albidus* avaient une assez bonne activité. Ils ont donc été sélectionnés pour un fractionnement bioguidé contre les trois (03) parasites suivants ; *Leishmania amazonensis* (forme promastigote) *Acanthamoeba castellanii str. Neff* (forme trophozoite) et *Trypanosoma cruzi* (forme epimastigote). Ces résultats seront exposés dans le chapitre suivant.

Chapitre IV :

Fractionnement bioguidé

IV.1. Introduction

Les maladies parasitaires posent encore de nombreux problèmes de santé, parmi lesquelles nous pouvons citer l'amibiase, la trypanosomiase et la leishmaniose (WHO, 2015). La richesse de la biodiversité végétale et la connaissance des thérapeutiques traditionnelles sont susceptibles d'ouvrir de nouvelles voies dans le domaine thérapeutique parasitaire. A cet effet nous avons effectué un screening antiparasitaire sur tous les extraits obtenus à partir des deux espèces *P. inuloides* et *C. albidus*. Ce screening nous a permis de sélectionner l'extrait chloroformique de la partie aérienne de *P. inuloides* et les extraits chloroforme et acétate d'éthyle de la partie aérienne du *C. albidus* pour un fractionnement bioguidé contre les trois (03) parasites suivants ; *Leishmania amazonensis* (forme promastigotes) *Acanthamoeba castellanii str. Neff* (forme trophozoïtes) et *Trypanosoma cruzi* (forme epimastigotes). Les résultats de ces travaux seront abordés dans ce chapitre.

IV.2. Présentation des parasitoses

IV.2.1. La leishmaniose

Les leishmanioses constituent un groupe de parasitoses tropicales qui demeure encore aujourd'hui un grave problème de santé publique à travers le monde malgré les avancées de la recherche. Cette maladie est considérée par l'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S) comme faisant partie des six maladies parasitaires majeures présentes dans le monde. Ces maladies émergentes sont négligées et peuvent être opportunistes au cours du SIDA. Ces parasitoses qui sont provoquées par un protiste euglenobionte appartenant au genre *Leishmania*, constitue un spectre de maladies, pour l'homme, allant de formes cutanées présentant des cicatrices à des formes défigurantes dénommées mucocutanées. Elles peuvent aussi être fatales lorsque non traitées, elles évoluent sous une forme viscérale. Ces parasites sont transmis par des insectes hématophages (Myler et Fasel, 2008).

IV.2.2. La trypanosomiase

La maladie de Chagas, causée par *Trypanosoma cruzi*, touche environ 18 millions de personnes dans les Amériques (Reyes-Chilpa et al., 2008). Ce parasite peut être transmis à l'homme par des insectes triatomes, des aliments, du sang et des organes provenant de donneurs infectés, ou par contamination transplacentaire (OMS, 2010). Actuellement, la chimiothérapie de cette maladie est principalement constituée de nifurtimox et de benzonidazole (OMS, 2010), qui montrent un taux de guérison de 50-70% en phase aiguë et de moins de 20% en phase chronique (Dias et Desso, 2009). Plusieurs études impliquant l'analyse de produits végétaux naturels les ont recommandées comme sources alternatives de médicaments contre *T. cruzi*, y compris *Arrabidaea triplinervia* (Leite et al., 2006), *Dracocephalum kotschy* (Saeidnia et al., 2004) et *Azorella compacta* (Araya et al., 2003).

IV.2.3. L'amibiase

Les amibes libres (AL) sont des protozoaires largement répandus dans la nature. Elles peuvent être trouvées dans des environnements naturels et artificiels tels que le sol, la poussière, les rivières ou les piscines, les tours de refroidissement des centrales nucléaires ou les réseaux de distribution d'eau potable (Rodríguez-Saragossa, 1994, Martinez et Visvesvara, 2004). Ces amibes présentent deux formes principales dans leur cycle de vie: la forme végétative et motile, appelée trophozoïte, et la forme latente et non motrice, appelée kyste, cette dernière étant responsable de la dissémination de l'AL dans la nature en raison de sa capacité à résister aux conditions environnementales. Remarquablement, les kystes d'*Acanthamoeba* sp. ont été décrits pour résister aux traitements de désinfection tels que le chlore, les radiations ou le peroxyde d'hydrogène (Storey et al., 2004). Outre leur capacité à héberger divers micro-organismes pathogènes tels que virus, bactéries ou champignons et à les protéger des conditions environnementales (Guimaraes et al., 2016), certains AL, tels que *Acanthamoeba* sp., *Naegleria fowleri* ou *Balamuthia mandrillaris*, sont des agents pathogènes opportunistes qui peuvent causer de graves pathologies oculaires ou cérébrales (Visvesvara et al., 2007).

IV.3. Evaluation de l'activité antiparasitaire *in vitro*

IV.3.1. La culture *in vitro*

Quatre souches ont fait l'objet de notre étude à savoir *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016), *Leishmania donovani* (MHOM/IN/90/GE1F8R), la souche d'*Acanthamoeba castellanii str. Neff* (ATCC 30010) et les cellules macrophagiques J774A.1 (ATCC#TIB-67). Les *Leishmania* sous forme promastigotes sont cultivés à 26°C dans le milieu RPMI (Rose well Park Memorial Institute) contenant 0,5% de phénol et 10% de sérum de veau foetal décomplémenté (RPMI 1640 modified medium) (Gibco, Grand Island, US). La souche d'*Acanthamoeba castellanii str. Neff* (ATCC 30010, a été cultivée pendant 3 jours à 25°C dans du milieu PYG (protéase peptone à 0,75% (m/v), extraite de levure à 0,75% (m/v) et glucose à 1,5% (m/v) et la lignée cellulaire des macrophages murins J774A.1 (ATCC # TIB-67) a été cultivée dans le RPMI 1640 supplémenté avec 10% de sérum bovin foetal à 37 °C et 5% d'atmosphère CO₂.

IV.3.2. Activité anti-leishmanienne

La méthode utilisée pour l'évaluation de l'activité anti-leishmanienne est celle de Cabrera-Serra et al. (2007). Elle est basée sur la réduction d'une molécule à potentiel fluorimétrique l'Alamar Blue. À l'état oxydé cette molécule possède une coloration bleue, une fois réduite par des cellules vivantes elle devient de couleur rose fortement fluorescente. Les extraits à tester sont dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) avec une concentration finale entre 100-400 µg/ml. Toutefois, des dilutions supplémentaires ont été effectuées dans du milieu RPMI 1640 (sans phénol et contenant du sérum de veau foetal décomplémenté) pour avoir une concentration de DMSO au maximum de 0,1%. Les promastigotes de *Leishmania amazonensis* et *Leishmania donovani* sont dénombrées à l'aide d'un compteur de cellules automatisé (Beckman coulter Z2, USA) puis ensemencées sur une plaque de 96 puits à une concentration de 1.10⁶ parasites/ml dans le milieu RMPI (sans phénol et contenant du sérum de veau foetal décomplémenté). Le volume final est de 200 µl dans chaque puit. La miltefosine (Æterna Zentaris Inc, Québec) et a été utilisée comme témoin positif. Finalement, un volume de 20 µl d'Alamar Blue (Invitrogen, USA) est ajouté à chaque puit et les plaques sont mises dans les incubateurs à 26°C sous agitation. Après 72 heures d'incubation,

l'absorbance de chaque plaque est mesurée à 570 nm et 630 nm avec un lecteur de microplaques (BioRad, USA).

IV.3.3. Evaluation *in vitro* de l'activité anti-trypanosoma

L'activité anti-trypanosoma *in vitro* des extraits contre le stade épimastigote de *Trypanosoma cruzi* a été effectuée dans des microplaques à 96 puits, comme décrit par (Vega et al., 2005). Brièvement, les extraits ont été dilués en série dans 100 µl de milieu LIT (Liver Infusion Tryptose) et supplémentés avec 10% de sérum fœtal bovin inactivé par la chaleur dans des plaques à 96 puits. Après cela, les parasites dont la croissance est en phase logarithmique ont été comptés, dilués (10^5 /puits) et ajoutés à ces puits. Enfin, les plaques ont été observées sous un microscope inversé après 72 h d'incubation à 27°C.

IV.3.4. Evaluation *in vitro* de l'activité anti-trophozoïte d'*Acanthameoba*

La méthode utilisée est celle décrite par Martin-Navarro et al. (2008), en utilisant l'Alamar Blue comme révélateur. Les amibes sont dénombrées à l'aide d'un compteur de cellules automatisé (BECKMAN Coulter Z2), après ensemencement dans une plaque de 96 puits à une concentration de 1.10^4 parasites/ml dans le milieu PYG (protéase peptone à 0,75% (m/v), à raison de 50 µl/puit. Les plaques sont incubées à la température ambiante pendant 15 minutes pour permettre au parasite d'adhérer au fond des puits. En effet, cette fixation est vérifiée à l'aide d'un microscope inversé Leika DMIL (Leika, Wetzlar, Allemagne). Entretemps, les extraits (ou molécules) à tester sont dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) avec une concentration finale entre 0,1 et 100 µg/ml. Toutefois, des dilutions supplémentaires sont effectuées dans le même milieu pour avoir une concentration de DMSO au maximum de 0,1%. Un volume de 50 µl des différentes dilutions est ajouté à chaque puit. Finalement, un volume de 10 µl d'Alamar Blue est ajouté à chaque puit et les plaques sont incubées à 26°C et sous agitation. Après 96 heures d'incubation, l'absorbance de chaque plaque est mesurée à 570 nm et 630 nm avec un lecteur de microplaques (BioRad, USA).

IV.3.5. Détermination des CI₅₀

Les valeurs de CI₅₀ (concentration de l'échantillon qui inhibe 50% de la croissance du parasite) sont calculées en utilisant le logiciel Sigma Plot 12.0 à partir d'un graphe exprimant le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'échantillon.

IV.4. Test de cytotoxicité des molécules sur des macrophages J774

La cytotoxicité des molécules actives sur les cellules macrophagiques J774A.1 (ATCC TIB-67) a été déterminée selon la méthode décrite par Lorenzo-Morales et al. (2005). Pour ce faire, les macrophages cultivés dans du milieu RPMI 1640 (Gibco / Life Technologies, Madrid, Espagne) ont été comptés etensemencés dans des plaques à 96 puits (10⁵ cellules/ml) puis l'extrait/ou molécule à tester a été dilué dans le même milieu et ajouté dans un volume total de 100 µl. En tant que témoin négatif, les cellules ont été incubées avec le milieu seul. Enfin, 10 µl d'Alamar Blue ont été ajoutés dans chaque puit et le mélange a été incubé pendant 24h à 37°C et sous atmosphère de 5% de CO₂. Après cela, les plaques ont été analysées en utilisant un lecteur de plaque multimode EnSpire (Perkin Elmer, Madrid, Espagne) avec une longueur d'onde d'excitation de 570 nm et une longueur d'onde d'émission de 585 nm. Les valeurs de toxicité (Cytotoxicité calculées à 50% (CC₅₀)) ont été calculées en utilisant le logiciel d'analyse statistique Sigma Plot 12.0. Les résultats obtenus ont été exprimés en moyenne ± écart-type. Les différences à p <0,05 étaient considérées comme statistiquement significatives.

IV.5. Screening antiparasitaire *in vitro* des extraits de *P. inuloides*

Les extraits de CHCl₃, EtOAc et *n*-BuOH des parties aériennes de *P. inuloides* ont été testés pour leur activité antiparasitaire contre *L. amazonensis*, *L. donovani*, *T. cruzi* et *A. castellanii* (Tableau 1).

Extraits	Rendement (%)	<i>T. cruzi</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>A. castellanii</i>
CHCl ₃	0,33	-	+	+
EtOAc	0,40	-	+	-
<i>n</i> -BuOH	3,33	-	+	-

Tableau 1. Pourcentage de rendement et screening antiparasitaire des extraits de la partie aérienne de *P. inuloides* contre les différents parasites

Clé: (-) inactive, (+) activité modérée, tous les extraits ont été testés à 400 µg/ml.

IV.6. Fractionnement bioguidé de l'extrait CHCl₃ de la partie aérienne de *P. inuloides*

Un screening de l'activité antiparasitaire contre les promastigotes de *Leishmania amazonensis* a été réalisé sur les différentes fractions de l'extrait chloroformique de la partie aérienne de *P. inuloides*. Les treize fractions de l'extrait chloroformique qui ont été obtenues précédemment (Voir chapitre III) ont été réduites à neuf en fonction de leurs profils chromatographiques sur couche mince (CCM). Les résultats du screening montrent que la fraction **F5** a été la plus active contre *L. amazonensis* :

N°	Fraction	<i>L. amazonensis</i>	Masse (mg)
1	F1	+	846,2
2	F2	++	473,5
3	F3	+	188,6
4	F4	-	400
5	F5	+++	278
6	F6	+	116,4
7	F7	++	5
8	F8	++	61,8
9	F9	-	398,9

Tableau 2. Résultats du fractionnement bioguidé de l'extrait chloroforme de la partie aérienne de *P. inuloides*

Clé: (-) inactive, (+, ++) activité modérée, (+++) activité forte, tous les extraits ont été testés à 400 µg/ml.

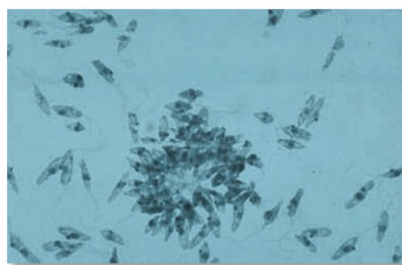


Figure 1. Les promastigotes de *Leishmania amazonensis*

IV.6.1. Fractionnement de la fraction F5

Une petite colonne a été utilisée pour la séparation de la fraction **F5** (278 mg) en utilisant comme phase stationnaire le gel de silice. L'élution est réalisée avec un gradient de polarité du système hexane/acétate d'éthyle. Le suivi de ces fractions est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support d'aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm) et des plaques de gel de silice chauffées ont été pulvérisées avec H₂O-H₂SO₄-AcOH (1: 4: 20). Un screening de l'activité antiparasitaire a été réalisé sur les différentes fractions, et les résultats sont montrés dans le tableau suivant.

Les résultats du screening montrent que la fraction **F5D** était la plus active contre *L. amazonensis* :

N°	Fraction	<i>L. amazonensis</i>			Masse (mg)
		400 µg/ml	200 µg/ml	100 µg/ml	
1	F5A	++	++	++	15,2
2	F5B	++ (c)	++ (c)	++ (c)	8,3
3	F5C	++ (c)	++ (c)	++ (c)	53,9
4	F5D	++	++	-	31
5	F5E	-	-	-	149

Tableau 3. Résultats du fractionnement bioguidé de la fraction F5

Clé: (-) inactive, (++) activité modérée, (c) contamination

La fraction F5D donne le composé **1** ($R_f = 0,22$, hexanes: EtOAc, 3: 7) sous la forme d'un solide amorphe jaune (77 mg).

Les résultats de screening antiparasitaire réalisé sur les différentes fractions ont montré que la fraction active F5C (53,9 mg) est contaminée aussi bien du point de vue chimique que biologique. Une purification sur un « chromatron » (Figure 2) (Harrison, 1977 ; Pinto et al., 2000), en utilisant un gradient hexane-acétate d'éthyle de polarité croissante (0-100%) a permis d'obtenir le composé **14**. Malheureusement nous n'avons pas eu le temps matériel pour évaluer l'activité antiparasitaire de ce composé.

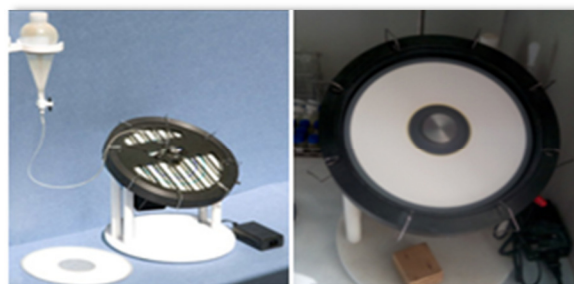


Figure 2. Purification de la fraction F5C par chromatron

N°	Fraction	Masse
1	F5C1= 14	190 µg
2	F5C2 mélange complexe	47,79 mg

Tableau 4. Résultats du fractionnement de la fraction F5C

IV.6.2. Acétylation du composé **1**

À une solution du composé **1** (7,0 mg) et une quantité catalytique de 4-diméthylaminopyridine (DMAP) dans 1 ml de CH_2Cl_2 , on a ajouté de la triéthylamine (2 gouttes) et de l'anhydride acétique (1 goutte). Le mélange réactionnel a été agité pendant 24 heures à température ambiante jusqu'à ce que la CCM ait montré une conversion complète. Le mélange est ensuite désactivé avec du MeOH (4 gouttes) et agité pendant 30 minutes. Le mélange a été évaporé et le résidu purifié par CCM préparative sur gel de silice, en utilisant le mélange CH_2Cl_2 -EtOAc (9: 1) comme éluant pour donner les dérivés **2** (1,7 mg) et **3** (3,3 mg).

IV.7. Screening antiparasitaire *in vitro* des extraits de *C. albidus*

Les extraits de CHCl₃, EtOAc et *n*-BuOH des parties aériennes de *C. albidus* ont été testés pour leur activité antiparasitaire contre *L. amazonensis*, *L. donovani*, *T. cruzi* et *A. castellanii* (Tableau 5).

Extracts	Yield (%)	<i>T. cruzi</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. donovani</i>	<i>A. castellanii</i>
CHCl ₃	0,18	+	+	-	-
EtOAc	0,63	-	+	-	+
<i>n</i> -BuOH	3,90	-	+	-	+

Tableau 5. Pourcentage de rendement et screening antiparasitaire des extraits de la partie aérienne de *C. albidus* contre les différents parasites

Clés: (-) inactive, (+) activité modérée, tous les extraits ont été testés à 400 µg/ml.

IV.7.1. Fractionnement bioguidé de l'extrait CHCl₃ de la partie aérienne de *C. albidus* vis-à-vis de *T. cruzi*

L'extrait de CHCl₃ (6,5 g) a été soumis à une chromatographie sur colonne de gel de silice éluée avec un mélange hexane-acétate d'éthyle de polarité croissante (hexane: AcOEt, 100: 0 à 0: 100). Douze (12) fractions ont été obtenues après combinaison basée sur les profils chromatographiques sur couche mince (CCM).

Fraction	<i>T. cruzi</i> µg/ml		Masse (mg)	Fraction	<i>T. cruzi</i> µg/ml		Masse (mg)
F1	400	-	7	F7	400	++	230
	200	-			200	++	
	100	-			100	+	
F2	400	-	430	F8	400	++ (c)	140
	200	-			200	++ (c)	
	100	-			100	+	
F3	400	++ (p)	805	F9	400	++ (c)	227
	200	++			200	++ (c)	
	100	+			100	-	
F4	400	++ (p)	603	F10	400	+ (c)	222
	200	-			200	+	
	100	-			100	-	
F5	400	++ (c)	650	F11	400	+	83
	200	++			200	+	
	100	+			100	-	
F6	400	++ (p)	200	F12	400	-	3 g
	200	++ (p)			200	-	
	100	++ (p)			100	-	

Tableau 6. Résultats du fractionnement bioguidé de l'extrait chloroforme de la partie aérienne de *C. albidus*

Clés: (-) inactive, (+) activité faible, (++) Modéré, (p) précipitation, (c) contamination, tous les extraits ont été testés à 400, 200 et 100 µg/ml.

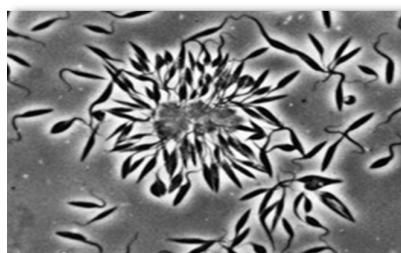


Figure 3. Les epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

Sur la base des résultats du test de screening contre *T. cruzi*, la fraction active (F6, 200 mg) a été soumise à une séparation et une purification supplémentaires sur une colonne de gel de silice et éluee avec de l'hexane-acétate d'éthyle de polarité croissante (100: 0 à 0: 100). Six (06) sous-fractions ont été obtenues après combinaison sur la base de leur profils de CCM et testées contre *T. cruzi* (Tableau 7 et figure 35).

Fraction	<i>T. cruzi</i> µg/ml		Masse (mg)	Fraction	<i>T. cruzi</i> µg/ml		Masse (mg)
F6,1	Quantité faible		3,6	F6,4	400	++ (p)	29
	Quantité faible				200	++	
	Quantité faible				100	++	
F6,2	Quantité faible		3,5	F6,5	400	++ (c)	61,6
	Quantité faible				200	++ (c)	
	Quantité faible				100	++ (c)	
F6,3	400	(c)	11,1	F6,6	400	++ (p)	31
	200	(c)			200	++ (p)	
	100	++			100	++ (p)	

Tableau 7. Résultats du fractionnement bioguidé de la fraction F6

Clé: (-) inactive, (+) activité faible, (++) Modéré, (p) précipitation, (c) contamination, tous les extraits ont été testés à 400, 200 et 100 µg/ml.

La fraction active F6,6 (31 mg) a été soumise à une séparation et une purification supplémentaires sur une colonne de gel de sephadex et éluée avec de CHCl₃ : MeOH (50 : 50). Quatre (04) sous-fractions ont été obtenues après combinaison sur la base de leur profils de CCM et testées contre *T. cruzi* (Tableau 8 et figure 35). La fraction inactive F6,6,3 (5,5 mg) donne le produit majoritaire nommé composé **15**.

Fraction	<i>T. cruzi</i> µg/ml			Mass
	400	200	100	
F6,6,1	++ (p)	++ (p)	++ (p)	13,1 mg
F6,6,2	++	++	-	4,3 mg
F6,6,3	-	-	-	5,5 mg
F6,6,4	/	/	/	1,0 mg

Tableau 8. Résultats du fractionnement bioguidé de la fraction F6,6

Clé: (-) inactive, (+) activité faible, (++) Modéré, (p) précipitation, (c) contamination, tous les extraits ont été testés à 400, 200 et 100 µg/ml.

IV.7.2. Fractionnement bioguidé de l'extrait acétate d'éthyle de la partie aérienne de *C. albidus* vis-à-vis d'*A. castellanii*

Les quarante quatre fractions de l'extrait obtenues précédemment (Voir chapitre III) ont été réduites à seize en fonction des profils chromatographiques sur couche mince (CCM) en opérant un regroupement large. Ceci a conduit aux résultats suivants :

Fraction	Regroupement	Fraction	Regroupement
F1	F1-F3	F9	F15
F2	F4-F6	F10	F16-F20
F3	F7	F11	F21
F4	F8-F9	F12	F22
F5	F10-F11	F13	F23
F6	F12	F14	F24-F28
F7	F13	F15	F29-F31
F8	F14	F16	F32-F44

Tableau 9. Regroupement final des fractions de l'extrait acétate d'éthyle de la partie aérienne de *C. albidus*

Un screening de l'activité antiparasitaire contre les trophozoïtes d'*A. castellanii* a été réalisé sur les seize fractions de l'extrait acétate d'éthyle de la partie aérienne de *C. albidus* et les résultats sont montrés dans le tableau suivant :

Fraction	<i>A. castellanii</i>	Masse (mg)	Fraction	<i>A. castellanii</i>	Masse (mg)
F1	Quantité faible	33,5	F9	+	6,6
F2	Quantité faible	46,8	F10	+ (p)	297,8
F3	Quantité faible	28,8	F11	+	60
F4	+	89,9	F12	+	27,9
F5	++	68,0	F13	+	82,8
F6	+	28,4	F14	+++	10,5 g
F7	++	38,7	F15	+++	850
F8	-	12,0	F16	++ (c)	296

Tableau 10. Résultats du screening antiparasitaire des fractions de l'extrait acétate d'éthyle de la partie aérienne de *C. albidus*

Clé: (-) inactive, (+) activité faible, (++) Modéré, (+++) forte, (p) précipitation, (c) contamination, tous les extraits ont été tétés à 400 µg/ml.

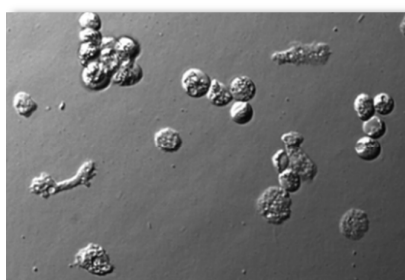


Figure 4. Les trophozoïtes d'*Acanthamoeba castellanii* str. Neff

La fraction inactive F8 a été identifiée précédemment comme étant le composé **12** (Isokaempferid) (Voir chapitre III).

Sur la base des résultats du test de screening contre *A. castellanii*, la fraction active (F14 ; 10,5 g) a été soumise à une séparation et une purification supplémentaires sur une colonne de gel de silice et éluee avec de l'hexane-acétate d'éthyle de polarité croissante (100: 0 à 0: 100). Sept sous-fractions ont été obtenues après la combinaison sur la base de leur profils CCM et testées contre *A. castellanii* (Tableau 11 et figure 44).

Fraction	<i>A. castellanii</i> µg/ml			Masse (mg)
	400	200	100	
F14A	+++	+	+	46,7
F14B	++ (c)	++ (c)	-	27,2
F14C	+ (c)	-	-	Quantité faible
F14D	+ (p)	-	-	368,0
F14E	++ (c)	-	-	923,7
F14F	++ (p)	-	-	1,63 g
F14G	+ (c)	+	-	7,90 g

Tableau 11. Résultats du fractionnement bioguidé de la fraction F14

Clé: (-) inactive, (+) activité faible, (++) Modéré, (+++) forte, (p) précipitation, (c) contamination, tous les extraits ont été testés à 400, 200 et 100 µg/ml.

La fraction F14D qui a montré une activité négative contre les trophozoïte d'*A. castellanii* a donnée le composé **16**.

La fraction active F14A n'a malheureusement pas été étudiée sur le plan phytochimique.

IV.8. Résultats et discussion

IV.8.1. Screening antiparasitaire *in vitro* des extraits de *P. inuloides*

La préparation d'extraits est l'un des procédés possibles pour extraire des molécules bioactives. Cependant, aucun solvant unique ne peut extraire de manière spécifique tous les métabolites secondaires en raison de leur solubilité et de leur polarité variables (Mohamed et Khan, 2013). Dans la présente étude, les parties aériennes de *P. inuloides* ont été macérées en utilisant trois solvants organiques avec un large éventail de polarité: CHCl₃, EtOAc et *n*-BuOH. Comme observé dans le tableau 12, les résultats ont montré que le rendement

d'extraction le plus élevé a été obtenu avec le *n*-BuOH avec un rendement de 3,33%. Les extraits CHCl₃, EtOAc et *n*-BuOH des parties aériennes de *P. inuloides* ont été testés pour leur activité antiparasitaire contre *L. amazonensis*, *T. cruzi* et *A. castellanii* (Tableau 12). Tous les extraits testés ont montré une activité leishmanienne modérée à une concentration de 400 µg/ml. De plus, les épimastigotes de *T. cruzi* apparaissent moins sensibles aux extraits que les promastigotes de *L. amazonensis* à la même concentration. En ce qui concerne l'activité antiamibienne, l'extrait de CHCl₃ a montré une activité modérée, tandis que les autres extraits se sont révélés inactifs.

Extraits	Rendement (%)	<i>T. cruzi</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>A. castellanii</i>
CHCl ₃	0,33	-	+	+
EtOAc	0,40	-	+	-
<i>n</i> -BuOH	3,33	-	+	-

Tableau 12. Pourcentage de rendement et screening antiparasitaire des extraits de la partie aérienne de *P. inuloides* contre les différents parasites

IV.8.2. Fractionnement bioguidé de l'extrait CHCl₃ de la partie aérienne *P. inuloides*

La figure 5 résume les différentes étapes de fractionnement bioguidé de l'extrait CHCl₃ de l'espèce *P. inuloides* ;

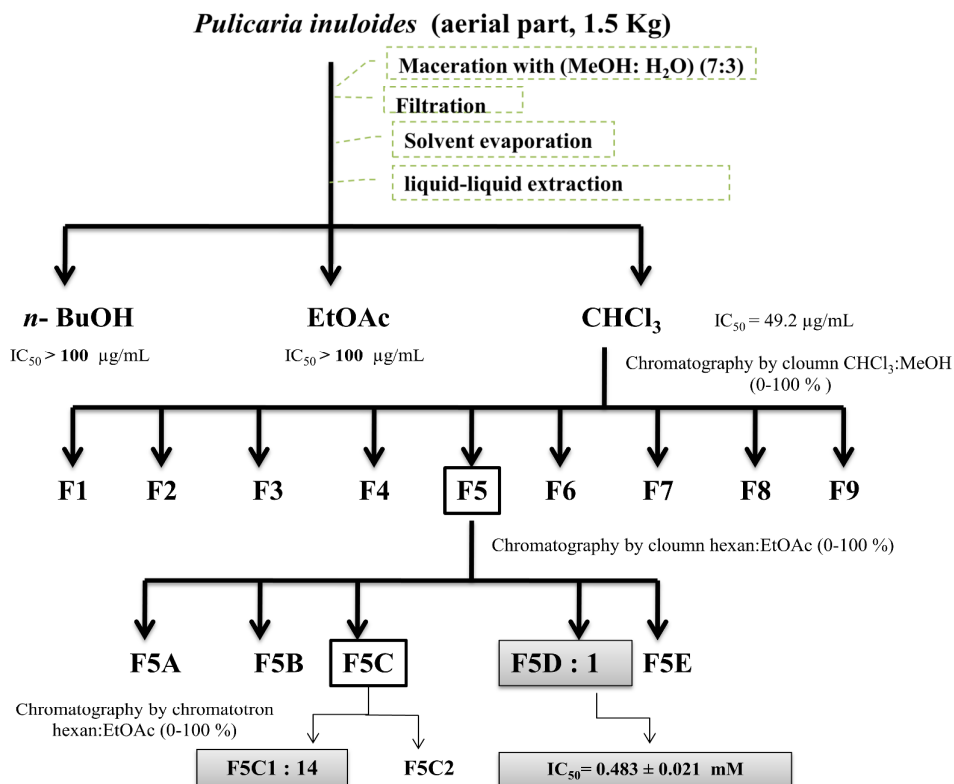


Figure 5. Schéma d'extraction et de fractionnement bioguidé de l'extrait de chloroforme de la partie aérienne de *P. inuloides*

La fraction la plus active F5 a été soumise à une flash chromatographie sur gel de silice et les sous-fractions collectées (F5A-F5E) ont été évaluées à une concentration de 400 µg/ml. La sous-fraction F5D présentait l'activité leishmanienne la plus élevée avec une valeur IC_{50} de 0,484 Mm (Tableau 14). La sous-fraction F5D s'est révélée être un composé pur par CCM (Figures 5 et 6) nommée composé **1**. Sa structure a été élucidée au moyen d'études spectroscopiques (RMN 1H , ^{13}C , ROESY et HMBC).

La fraction F5C (53,9 mg) a été fractionnée par un chromatotron en utilisant des mélanges d'hexane-acétate d'éthyle de polarité croissante (0-100%) pour obtenir deux (02) sous-fractions (F5C1 et F5C2) (Figures 5). La fraction F5C1 donne le composé **14** ($R_f = 0,48$; hexane: EtOAc, 8: 2) sous forme d'un solide amorphe jaune (190 µg).

IV.8.3. Identification du composé 1

IV.8.3.a. Profil CCM du composé 1

Le composé **1** se présente sous une couleur jaune (77 mg), de fluorescence noire violette sous la lampe UV, caractéristique d'une flavone ou flavonol avec 3-OR.

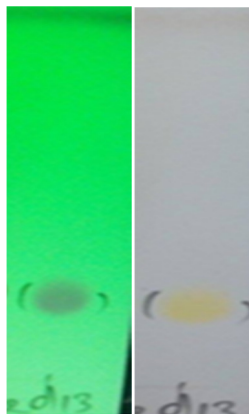


Figure 6. Profil chromatographique CCM du composé **1**, (hexane: AcOEt, 3: 7)

Révélation sous UV et anisaldéhyde

Ce composé **1** a été déjà isolé dans le chapitre précédent et identique aux deux composés **8** et **10** (Voir Chapitre III).

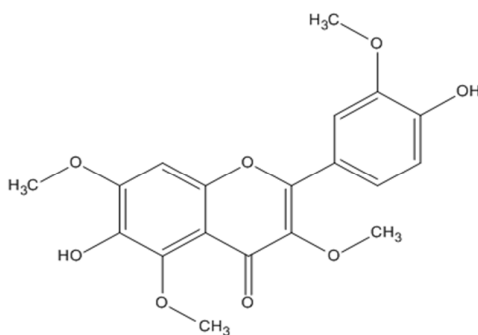


Figure 7. Structure du composé **1** : 6,4'-dihydroxy-3,5,7,3'-tetraméthoxyflavone

(quercétagine 3,5,7,3'-tétraméthyléther)

L'ensemble des attributions des protons et carbones du composé **1** est rassemblé dans le tableau 13 ;

Position	Composé 1		Position	Composé 1	
	$\delta_H^{[a]}$	$\delta_C^{[a,b]}$		$\delta_H^{[a]}$	$\delta_C^{[a,b]}$
2	-	156,9 s	2'	7,76 d (1,8)	113,6 d
3	-	142,4 s	3'	-	149,8 s
4	-	176,6 s	4'	-	151,6 s
5	-	146,1 s	5'	6,96 d (8,5)	117,3 d
6	-	139,9 s	6'	7,69 dd (8,5; 1,8)	124,3 d
7	-	156,3 s	3-OMe	3,80 s	61,1 q
8	7,06 s	98,0 d	5-OMe	3,92 s	63,1 q
9	-	153,2 s	7-OMe	4,03 s	57,9 q
10	-	114,2 s	3'-OMe	3,97 s	57,4 q
1'	-	124,0 s	-	-	-

Tableau 13. Valeurs des déplacements chimiques δ et J (Hz) RMN ^1H et ^{13}C (CD_3OD) des composés 1

^[a] Spectre enregistré dans CD_3OD , ^[b] Données basées sur HMBC, ^[c] Signaux superposés.

IV.8.3.b. Acétylation du composé 1

Les dérivés 2 et 3 ont été préparés par acétylation du composé 1 selon les méthodes classiques pour confirmer sa structure d'une part (Tasdemir et al., 2006) et pour étudier les relations structure-activité de ces composés vis-à-vis de l'activité antiparasitaire impliquant *Leishmania amazonensis*. La réaction d'acétylation a été effectuée en utilisant le réactif 4-diméthylaminopyridine (DMAP) en présence d'anhydride acétique selon la réaction suivante :

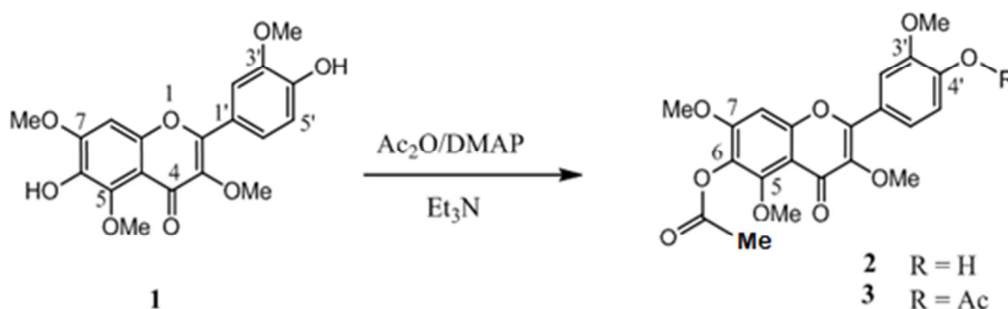


Figure 8. Préparation des dérivés 2 et 3 à partir du composé naturel 1

IV.8.4. Identification du composé 2

IV.8.4.a. Profil CCM du composé 2

Le composé **2** se présente sous une couleur jaune (1,7 mg), de fluorescence noire violette sous la lampe UV, caractéristique d'une flavone ou un flavonol 3-OR.

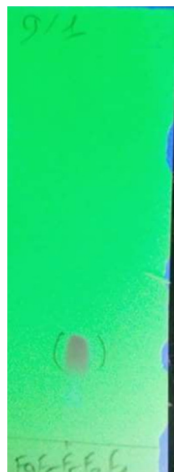


Figure 9. Profil chromatographique CCM du composé **2**, (CH_2Cl_2 : AcOEt, 9: 1)

IV.8.4.b. Données spectroscopiques RMN

L'examen du spectre RMN ^1H (600 MHz) enregistré dans le CDCl_3 du composé **2** montre comme attendu la présence de signaux caractéristiques des protons H-2' sous forme d'un doublet (couplage méta, $J=1,8$ Hz) à $\delta_{\text{H}}= 7,72$ ppm, H-6' sous forme d'un doublet de doublet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}}= 7,63$ ppm ($J= 1,8$ Hz et 8,5 Hz), H-5' sous forme d'un doublet ($J=8,5$ Hz, couplage ortho) à $\delta_{\text{H}}= 7,04$ ppm, et H-8 sous forme de singulet à $\delta_{\text{H}}= 6,78$ ppm. Ces signaux sont les mêmes que ceux observés dans le composé **1**, la seule différence est l'apparition d'un signal correspondant au méthyle du groupement acétyle.

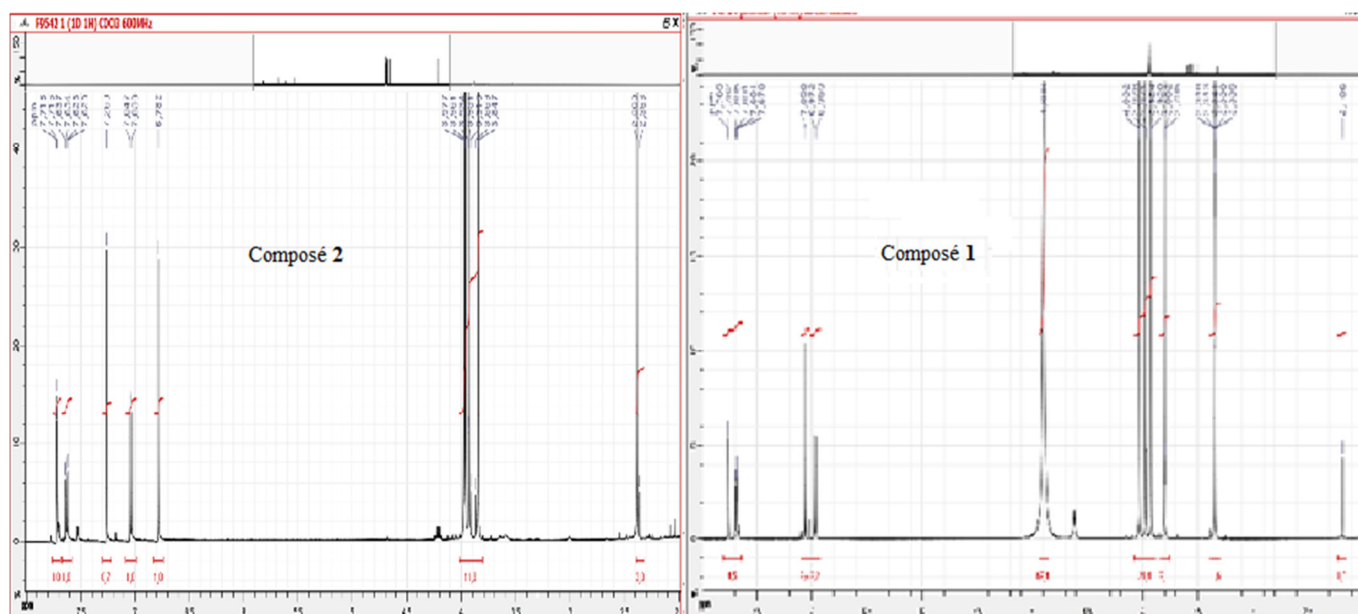


Figure 10. RMN ^1H (CD_3OD et CDCl_3 ; 600 MHz) du composé 1 et 2

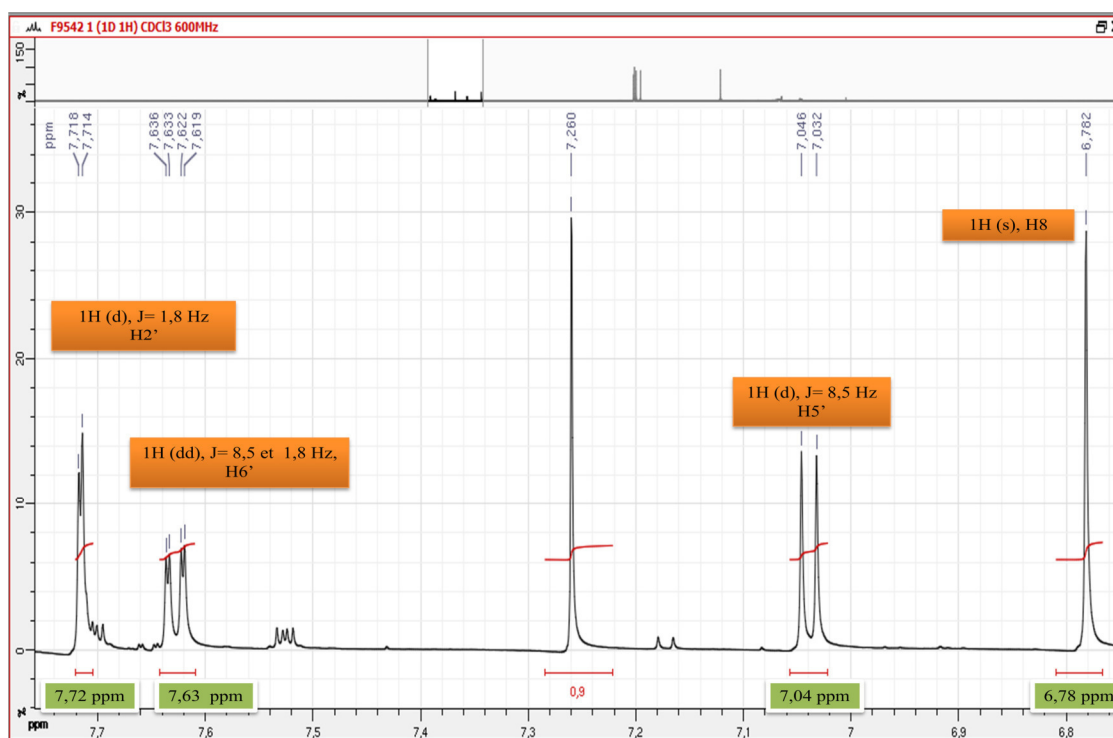


Figure 11. Étalement de la zone [6,9 ppm – 7,73 ppm] de spectre RMN ^1H (CD_3OD ; 600 MHz) du composé 2

L'étalement du spectre RMN ^1H du composé 2 (Figure 12) montre quatre singulets d'intégration 3H à $\delta_{\text{H}} = 3,85$; $3,93$; $3,96$ et $3,98$ ppm des groupements méthoxyles.

L'acétylation a fait apparaître un autre signal singulet d'intégration 3H à $\delta_{\text{H}} = 2,38$ ppm, attribuable à un méthyle du groupement acétyle.

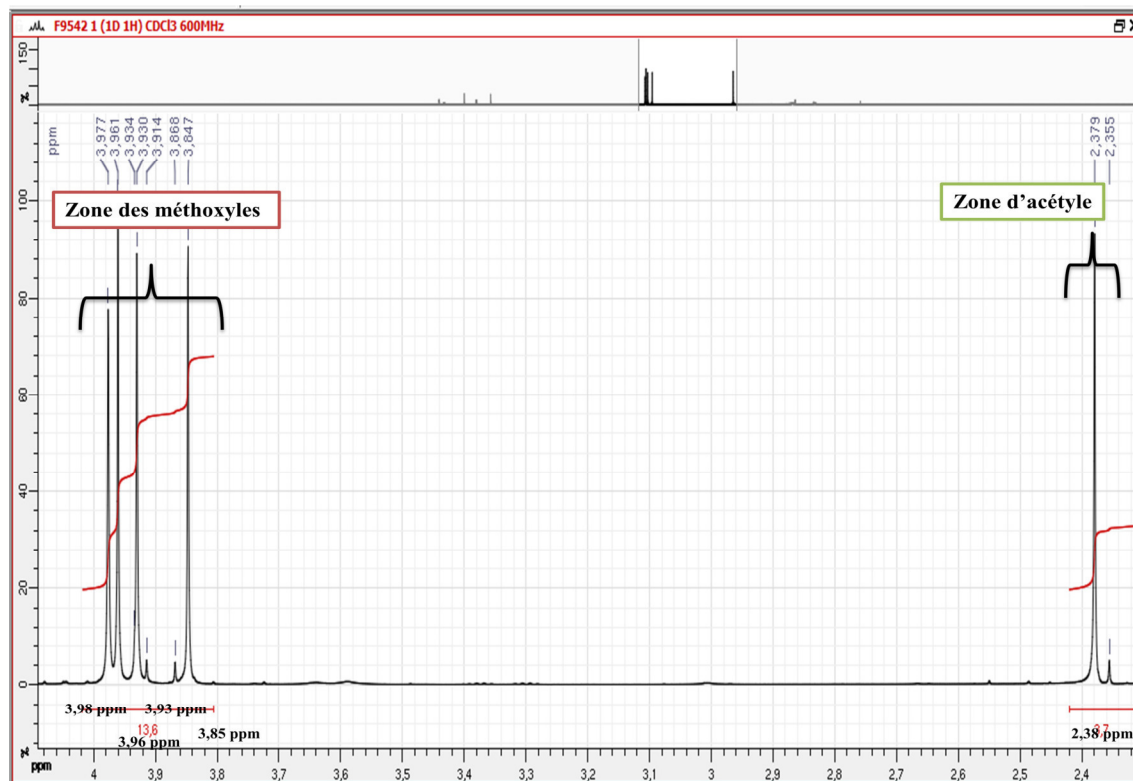


Figure 12. Étalement de la zone [2,3 ppm – 4,1 ppm] de spectre RMN ^1H (CDCl_3 ; 600 MHz) du composé **2**

Le méthyle du groupement acétyle donne une corrélation avec le carbone à $\delta_{\text{C}} = 131$ ppm (Figure 13), correspondant au carbone C-6 caractérisé par sa corrélation dans le spectre HMBC avec le proton H-8 (Figure 14).

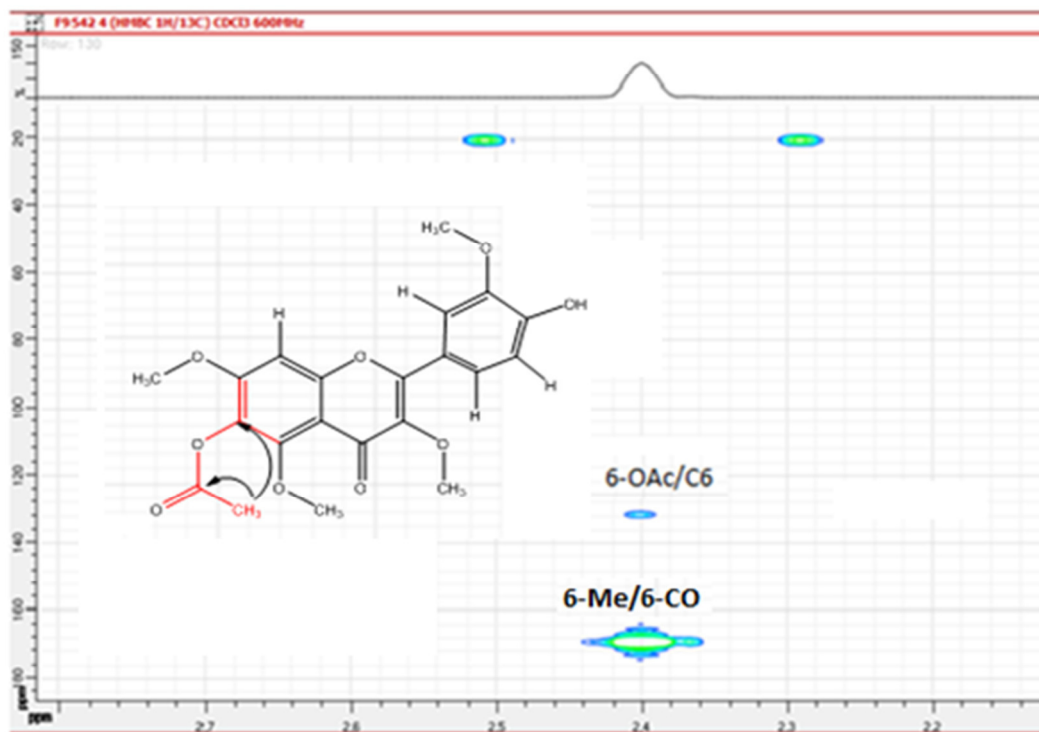


Figure 13. Etalment de Spectre HMBC (CDCl₃ ; 600 MHz) du composé 2

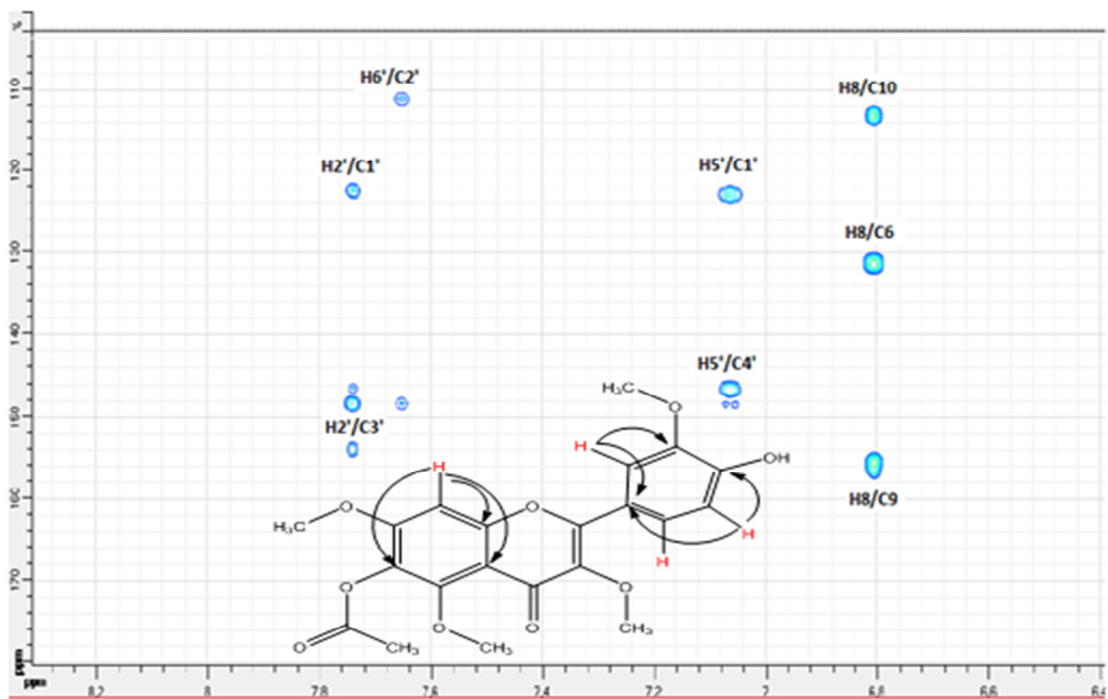


Figure 14. Etalment de spectre HMBC (CDCl₃ ; 600 MHz) du composé 2

Les autres données spectrales confirment également de manière non ambiguë la structure du composé **2** comme étant :

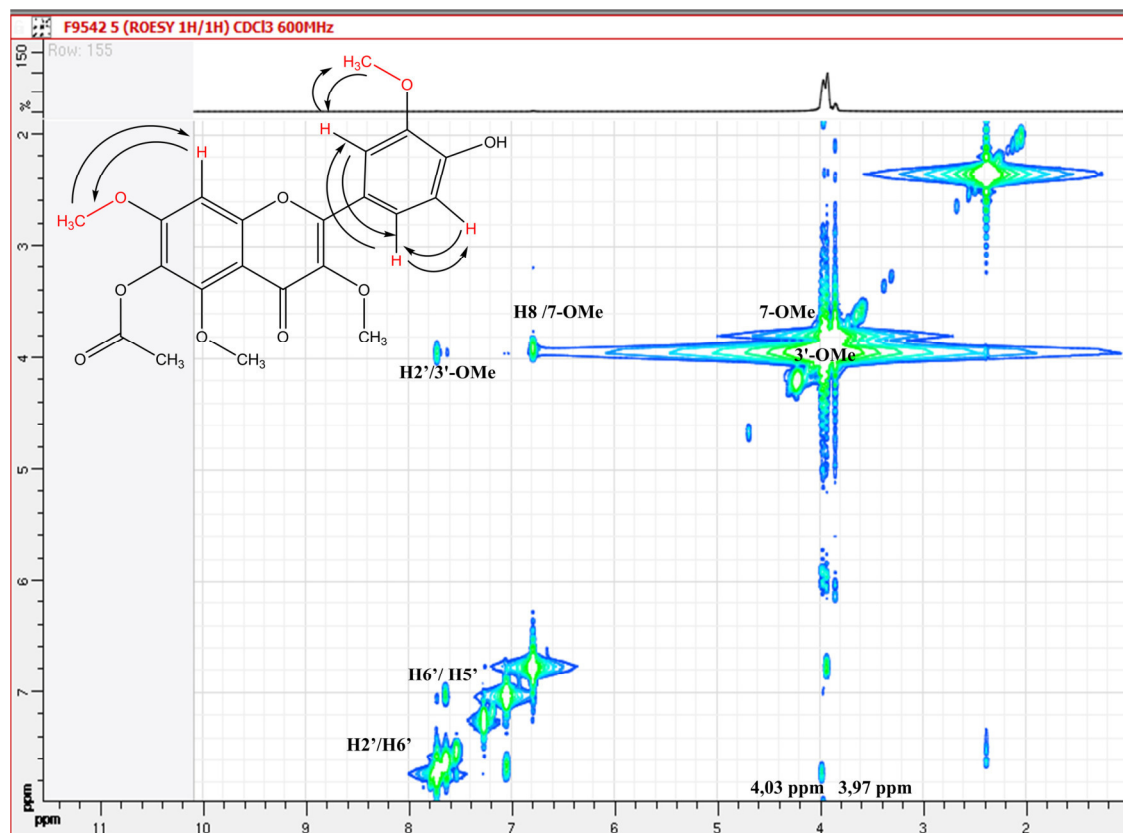


Figure 15. Corrélations de spectre ROESY (CDCl₃ ; 600 MHz) du composé **2**

L'ensemble des attributions des carbones du composé **2** est rassemblées dans le la figure 16 et le tableau 15 (page 178).

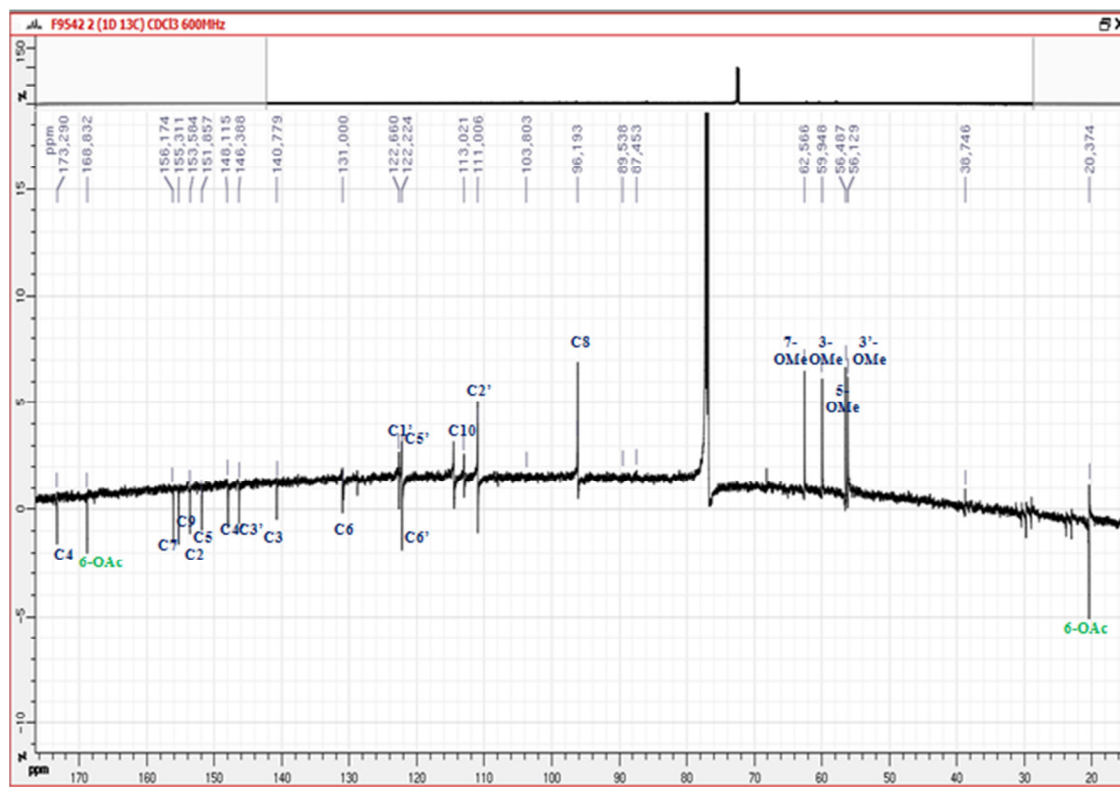


Figure 16. RMN ^{13}C (Dept 90, CD_3OD ; 600 MHz) du composé 2

Ces données nous orientent vers la structure du composé 2

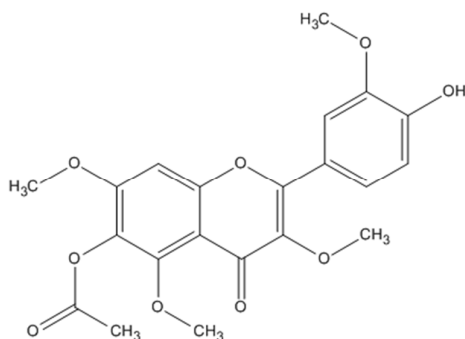


Figure 17. Structure du composé 2; 6-Acetoxy-4'-hydroxyl-3,5,7,3'-tetramethoxyflavone

IV.8.5. Identification du composé 3

IV.8.5.a. Profil CCM du composé 3

Le composé **3** se présente sous une couleur jaune (3,3 mg), de fluorescence noire violette sous la lampe UV, caractéristique d'une flavone ou un flavonol 3-OR.

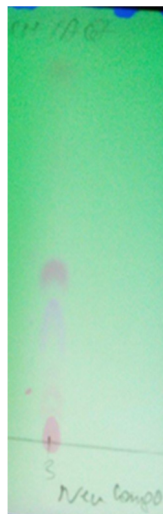


Figure 18. Profil chromatographique CCM du composé **3**, (CH_2Cl_2 : AcOEt, 9: 1)

La comparaison des profils CCM des composés **2** et **3** montrent que ce dernier est moins retenu que le premier. Ce qui laisse supposer que le composé **3** a moins d'hydroxyles libres.

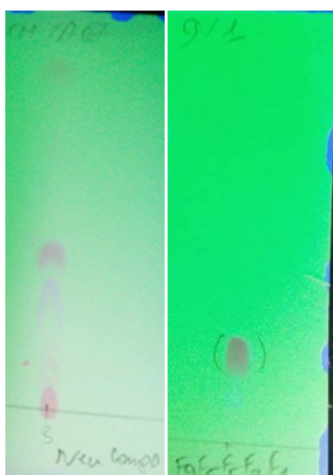


Figure 19. Profil chromatographique CCM des composés **2** et **3**, (CH_2Cl_2 : AcOEt, 9: 1)

IV.8.5.b. Données spectroscopiques RMN

L'examen du spectre RMN ^1H (600 MHz) enregistré dans le CDCl_3 du composé **3** montre la présence des mêmes signaux que le composé **2** mis à part un méthyle supplémentaire dans la zone des acétyles ce qui laisse penser que le composé **3** est diacétylé (Figure 20 et 21).

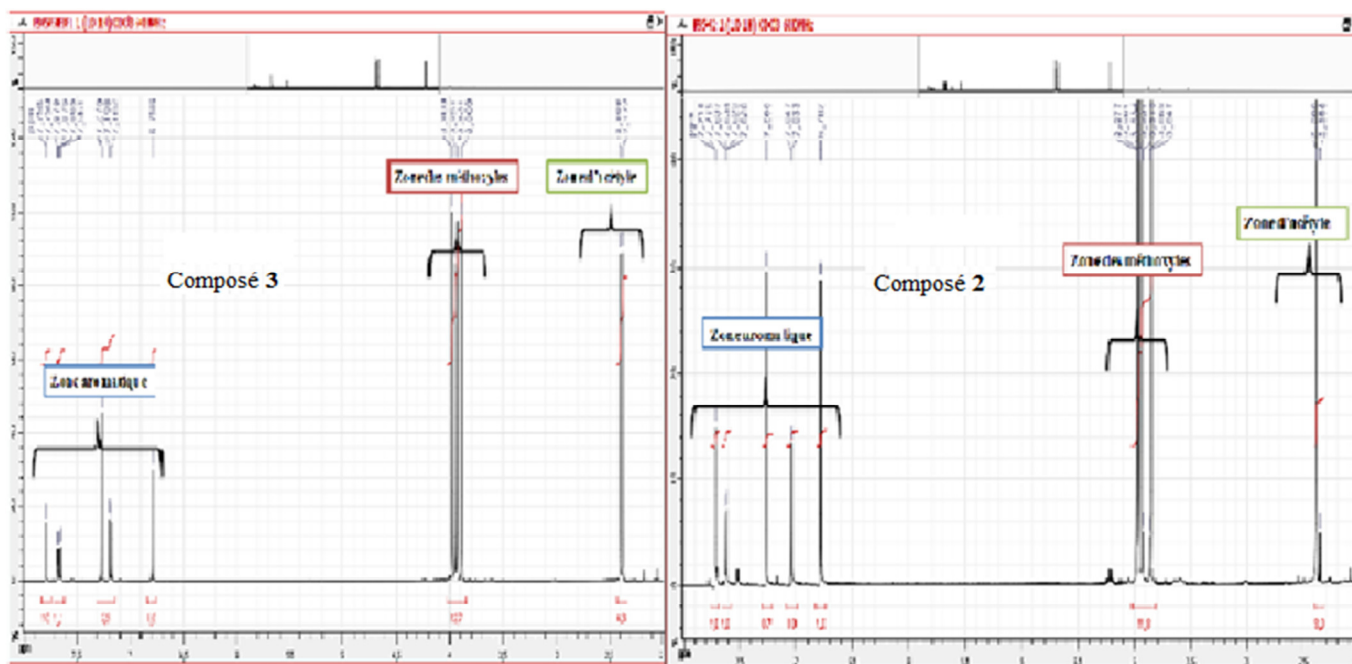


Figure 20. RMN ^1H (CDCl_3 ; 600 MHz) des composé **2** et **3**

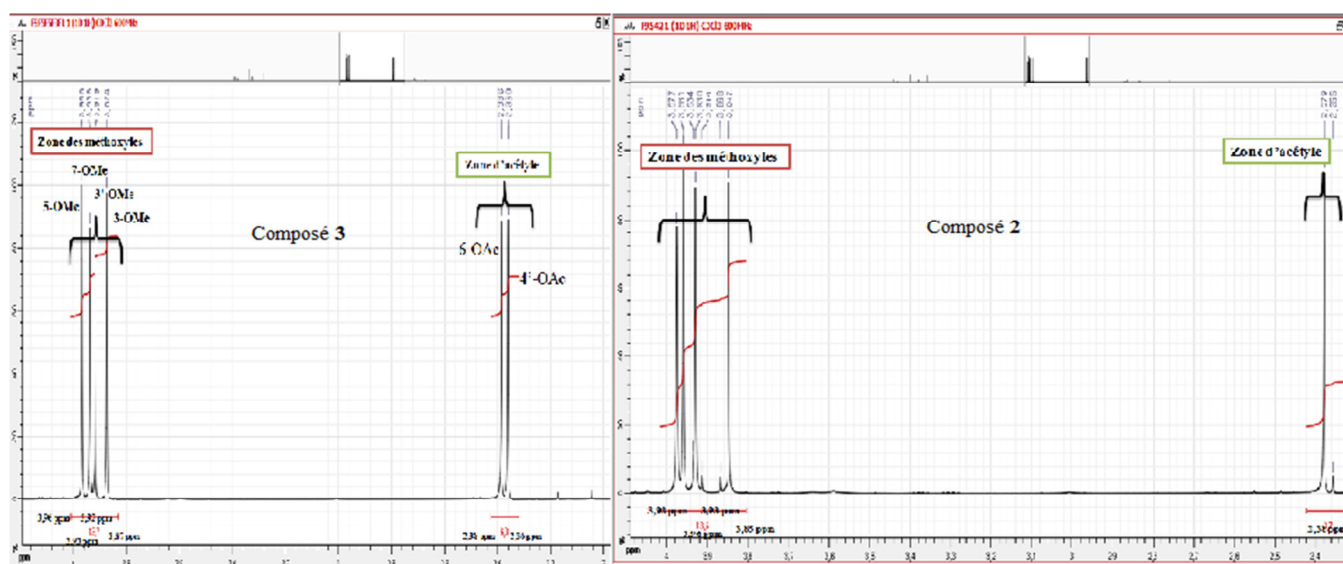


Figure 21. Étalement de spectre RMN ^1H (CDCl_3 ; 600 MHz) des composé **2** et **3**

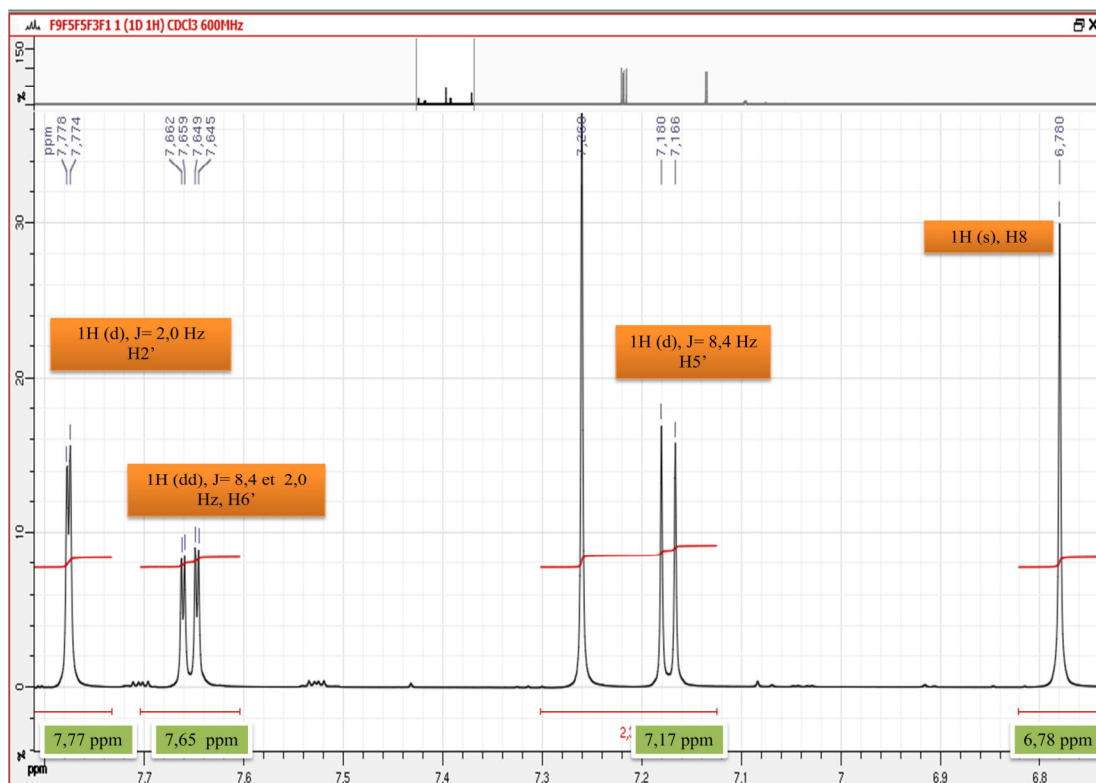


Figure 22. Étalement de la zone [6,7 ppm – 7,8 ppm] de spectre RMN ^1H (CDCl_3 ; 600 MHz) du composé **3**

L'étalement du spectre RMN ^1H du composé **3** (Figure 23) montre les quatre singulets d'intégration 3H à $\delta_{\text{H}} = 3,87$; 3,92; 3,93 et 3,96 ppm attribués aux quatre groupements méthoxyles, et deux autres signaux singulets d'intégration 3H à $\delta_{\text{H}} = 2,36$ ppm et $\delta_{\text{H}} = 2,38$ ppm attribuables aux méthyles de deux groupements acétyles.

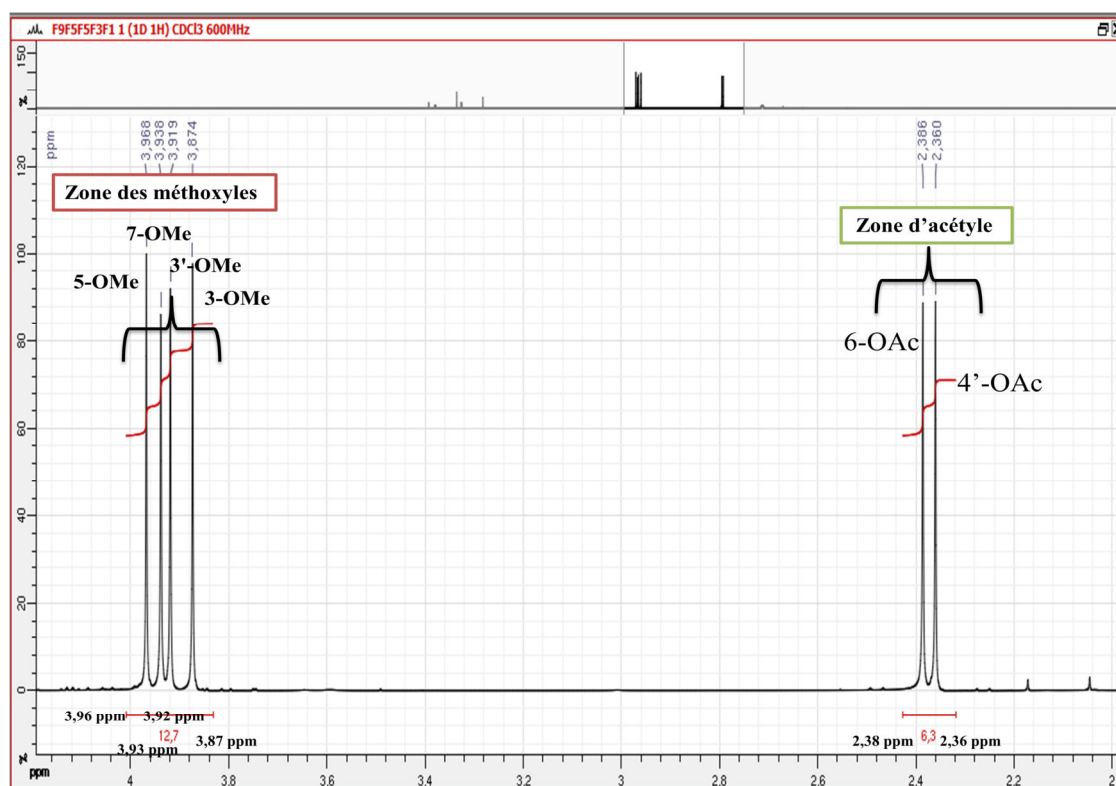


Figure 23. Étalement de la zone [2,0 ppm – 4,4 ppm] de spectre RMN ^1H (CDCl_3 ; 600 MHz) du composé **3**

Les deux méthyles des groupements acétyles donnent des corrélations avec les carbones à $\delta_c = 131$ ppm et $\delta_c = 141,53$ ppm (Figure 24) correspondant respectivement au carbone C-6 caractérisé précédemment par sa corrélation dans le spectre HMBC avec le proton H-8 et au carbone C-4' caractérisé par ses corrélations dans le spectre HMBC avec les protons H-2', H-6' et H-5' (Figure 25).

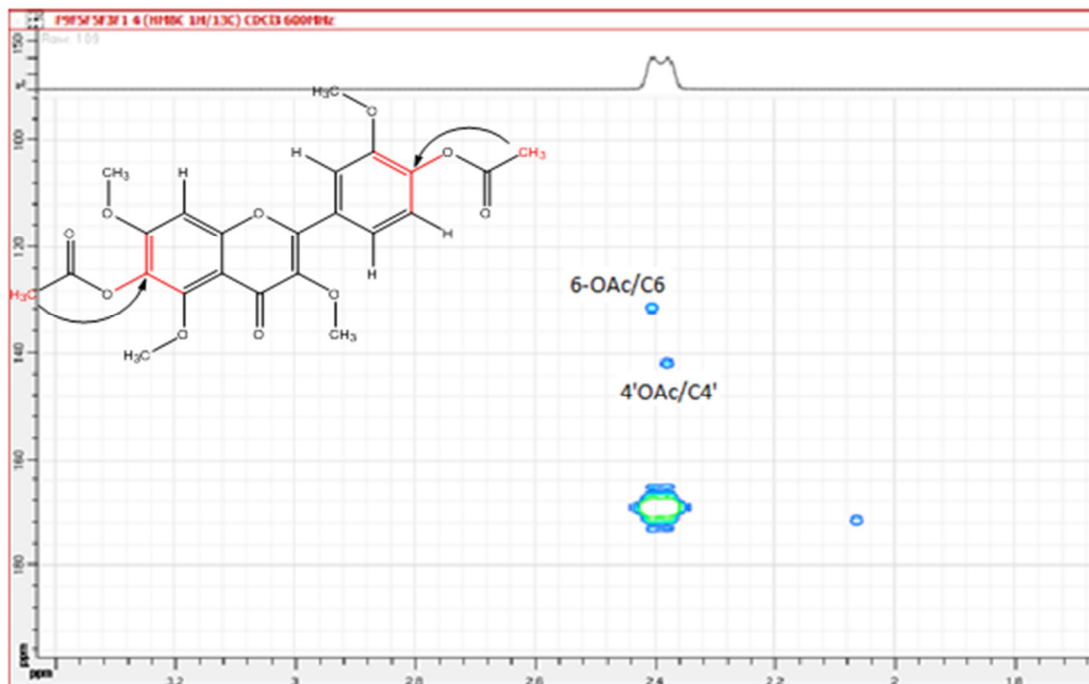


Figure 24. Etagement de spectre HMBC (CDCl₃ ; 600 MHz) du composé 3

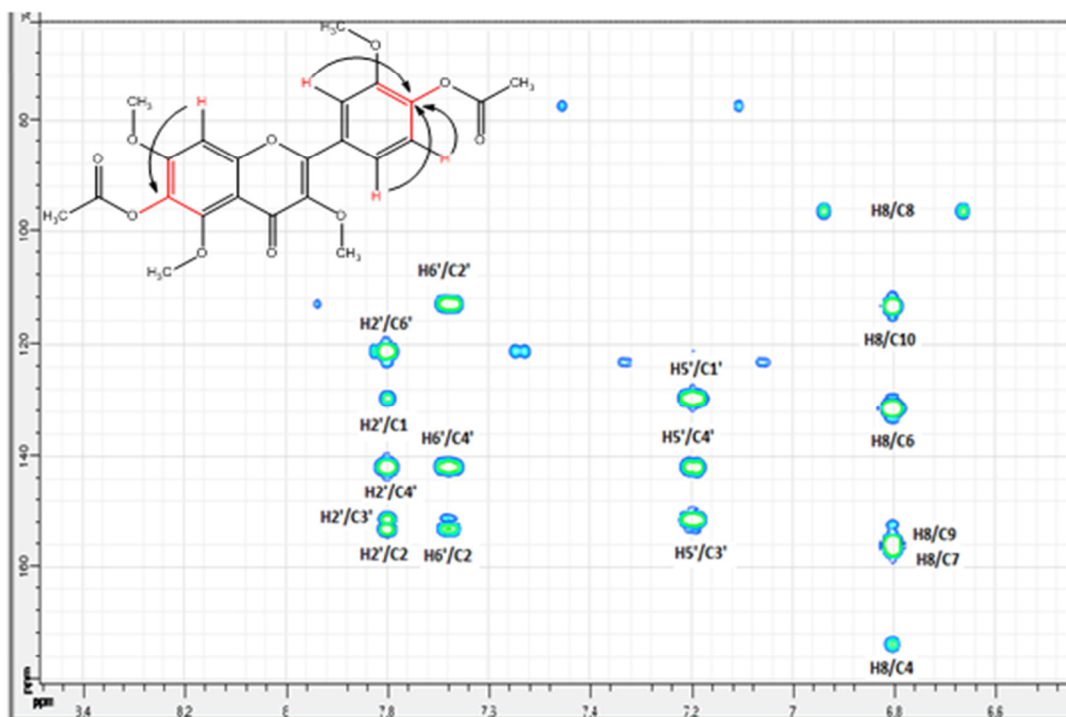


Figure 25. Etagement de spectre HMBC (CDCl₃ ; 600 MHz) du composé 3

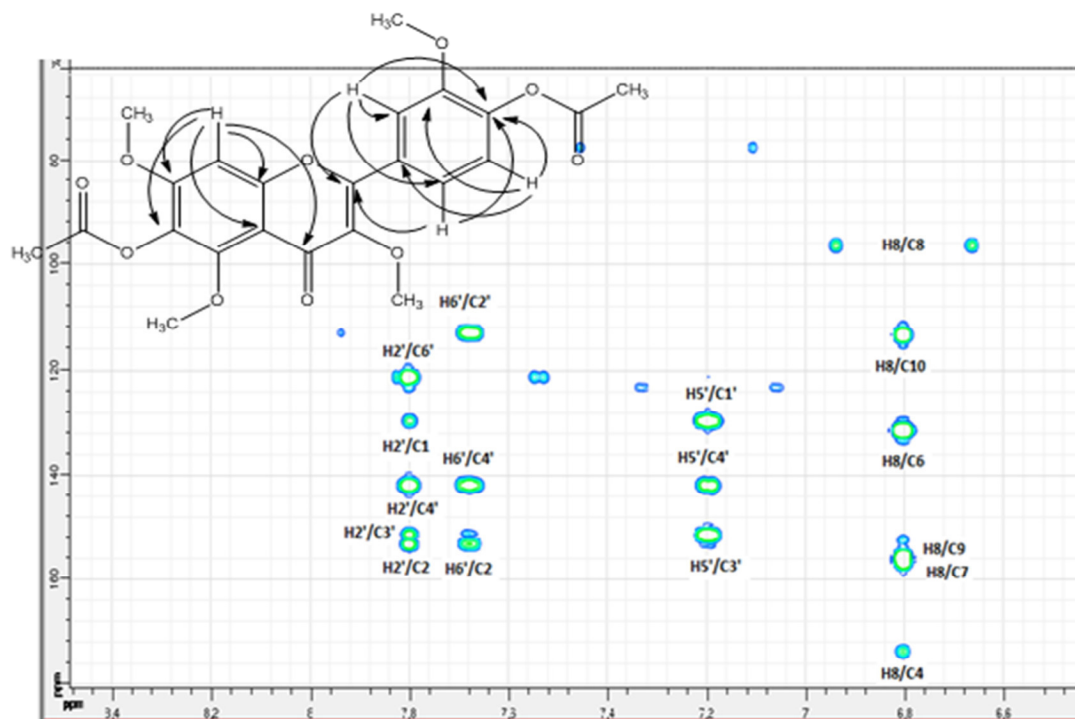


Figure 26. Etallement de spectre HMBC (CDCl_3 ; 600 MHz) du composé 3

Les autres données spectrales confirment de manière non ambiguë la structure du composé 3 comme étant ;

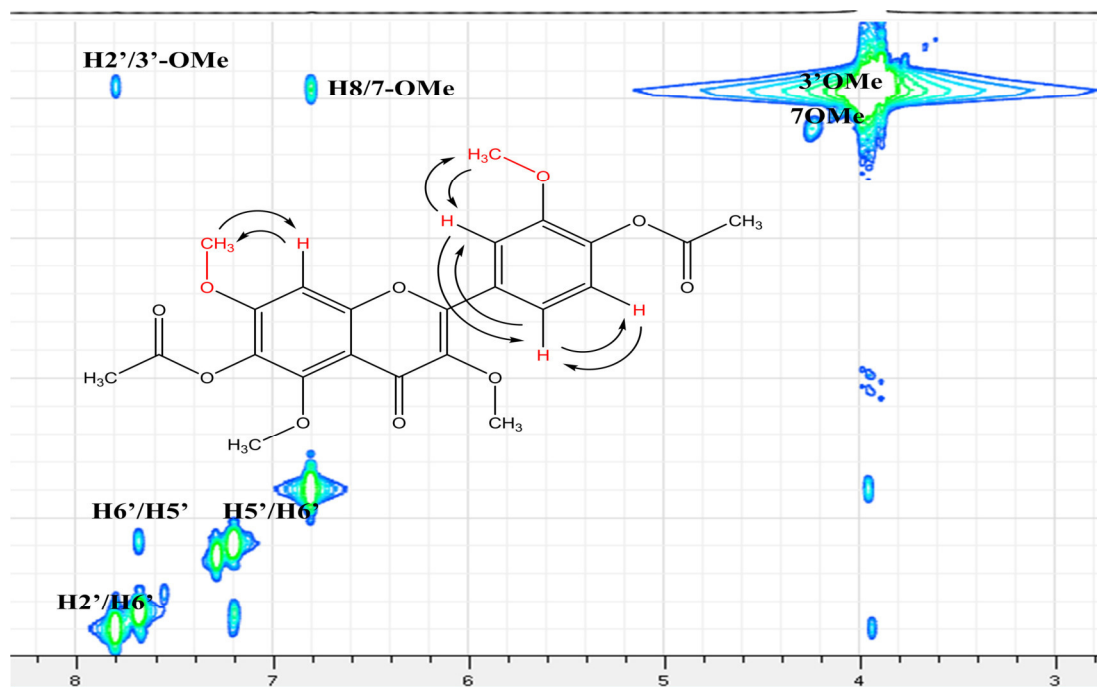


Figure 27. Corrélations de spectre ROESY (CDCl_3 ; 600 MHz) du composé 3

L'ensemble des attributions des carbones du composé **3** est rassemblées dans la (Figure 28) ci-après et le tableau 15 (page 178)

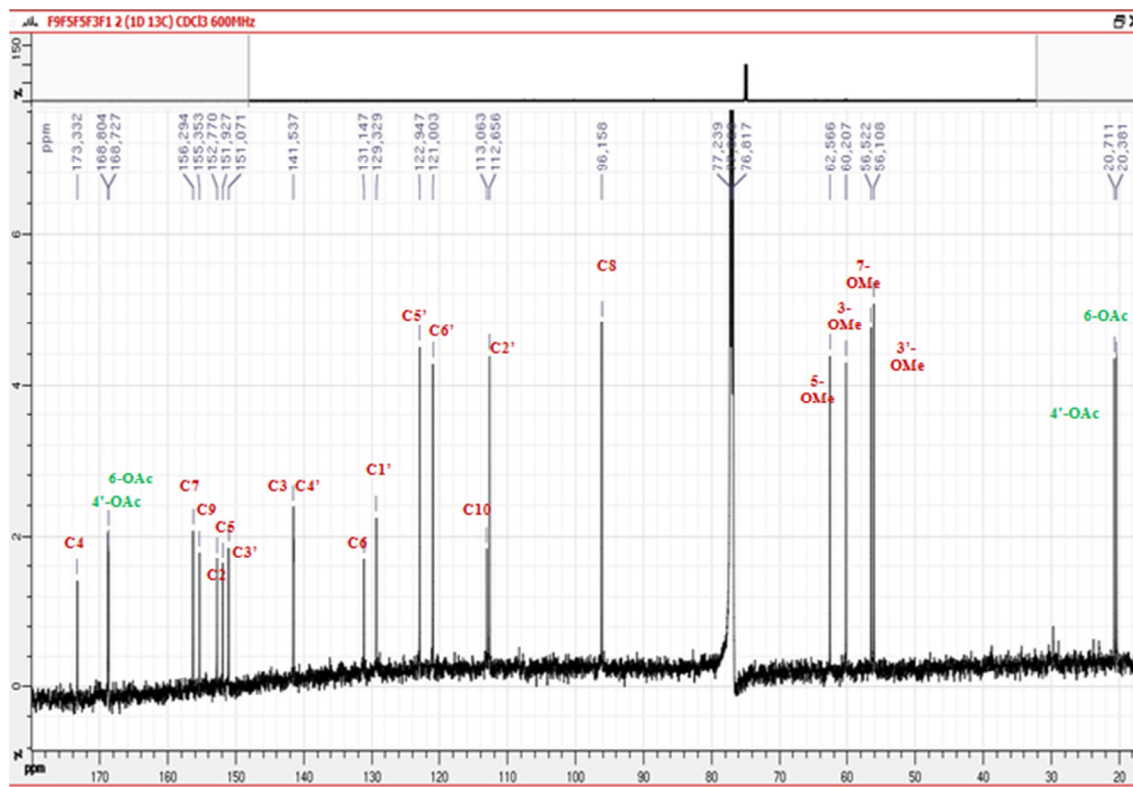


Figure 28. RMN ^{13}C (CD_3OD ; 600 MHz) du composé **3**

Toutes ces données nous orientent vers la structure du composé **3**

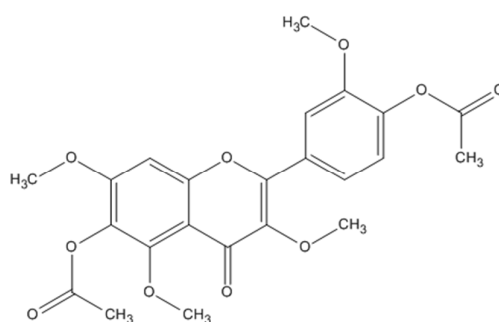


Figure 29. Structure du composé **3**; 6,4'-Diacetoxy-3,5,7,3'-tetraméthoxyflavone

La structure des dérivés 6-acétylé et 6,4'-diacétylés (**2** et **3**) ont été établies au moyen des données spectroscopiques RMN (Tableau 15), ils sont nouveaux et n'ont pas été précédemment décrits dans la littérature. Les dérivés **2** et **3** ont été évalués pour leur activité

leishmanienne (Tableau 14). Le composé **2** était le plus actif parmi les composés testés avec une valeur de IC_{50} de 0,240 mM et aussi le moins toxique contre les cellules macrophagiques (CC_{50} = 0,664 mM, cytotoxicité calculées à 50%), ce qui suggère qu'un groupement acétate en C-6 améliore légèrement le profil cytotoxique du composé parent **1**. De plus, le composé **1** et ses dérivés présentaient une faible toxicité vis-à-vis des cellules hôtes. En général, le composé naturel **1** et les analogues **2** et **3** ont montré une activité leishmanienne relativement modérée contre *L. amazonensis*.

Composé	<i>L. amazonensis</i> $IC_{50} \pm SD$ mM	Toxicité CC_{50} mM
1	0,483 \pm 0,021 (<5%)	0,524 \pm 0,055 (<11%)
2	0,239 \pm 0,003 (<2%)	0,664 \pm 0,193 (<29%)
3	0,479 \pm 0,010 (<3%)	0,365 \pm 0,080 (<22%)
Miltefosine	6,4 10^{-3}	

Tableau 14. Activité leishmanienne et cytotoxicité *in vitro* des composés **1-3**, (IC_{50} et CC_{50} en mM)

Ces résultats sont en accord avec les travaux antérieurs rapportant l'activité leishmanienne de *Pulicaria crispa* (El-On et al., 2009), qui soutiennent que le genre *Pulicaria* pourrait être une source de nouveaux agents anti leishmanioses.

L'ensemble des attributions des carbones des composés **1-3** est rassemblé dans le tableau suivant :

Position	Composé 1		Composé 2		Composé 3	
	$\delta_{\text{H}}^{[a]}$	$\delta_{\text{C}}^{[a,b]}$	δ_{H}	$\delta_{\text{C}}^{[b]}$	δ_{H}	$\delta_{\text{C}}^{[b]}$
2	-	156,9 s	-	153,6 s	-	152,8 s
3	-	142,4 s	-	140,8 s	-	141,5 s ^c
4	-	176,6 s	-	173,3 s	-	173,3 s
5	-	146,1 s	-	151,9 s	-	151,9 s
6	-	139,9 s	-	131,0 s	-	131,1 s
7	-	156,3 s	-	156,1 s	-	156,3 s
8	7,06 s	98,0 d	6,78 s	96,1 d	6,78 s	96,1 d
9	-	153,2 s	-	155,3 s	-	155,3 s
10	-	114,2 s	-	113,0 s	-	113,1 s
1'	-	124,0 s	-	122,6 s	-	129,3 s
2'	7,76 d (1,8)	113,6 d	7,72 d (1,8)	111,0 d	7,77 d (2,0)	112,6 d
3'	-	149,8 s	-	146,3 s	-	151,1 s
4'	-	151,6 s	-	148,0 s	-	141,5 s ^c
5'	6,96 d (8,5)	117,3 d	7,04 d (8,5)	122,2 d ^c	7,17 d (8,4)	122,9 d
6'	7,69 dd (8,5; 1,8)	124,3 d	7,63 dd (8,5; 1,8)	122,2 d ^c	7,65 dd (8,4; 2,0)	121,0 d
3-OMe	3,80 s	61,1 q	3,85 s	59,9 q	3,87 s	60,1 q
5-OMe	3,92 s	63,1 q	3,96 s	56,5 q	3,96 s	62,5 q
7-OMe	4,03 s	57,9 q	3,93 s	62,6 q	3,93 s	56,5 q
3'-OMe	3,97 s	57,4 q	3,98 s	56,1 q	3,92 s	56,0 q
4'-OAc	-	-	-	-	2,36 s	20,7 q
6-OAc	-	-	2,38 s	20,4 q	2,38 s	20,3 q
4'-OAc	-	-	-	-	-	168,7 s ^c
6-OAc	-	-	-	168,9 s	-	168,7 s ^c

Tableau 15. Valeurs des déplacements chimiques δ et J (Hz) RMN ^1H et ^{13}C (CD_3OD et CDCl_3) des composés **1-3**

^[a] Spectre enregistré dans CD_3OD , ^[b] Données basées sur HMBC, ^[c] Signaux superposés.

IV.8.6. Identification du composé 14

IV.8.6.a. Profil CCM du composé 14

Le composé **14** se présente sous une couleur jaune (190 μg), de fluorescence bleue pale sous la lampe UV 254 nm.

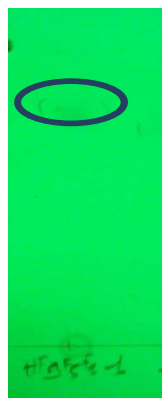


Figure 30. Profil chromatographique CCM du composé **14**, (hexane: AcOEt, 8: 2)

IV.8.6.b. Données spectroscopiques RMN

L'examen du spectre RMN ^1H (600 MHz) enregistré dans le CDCl_3 du composé **14** montre la présence d'un groupement méthoxyle et de protons aromatiques.

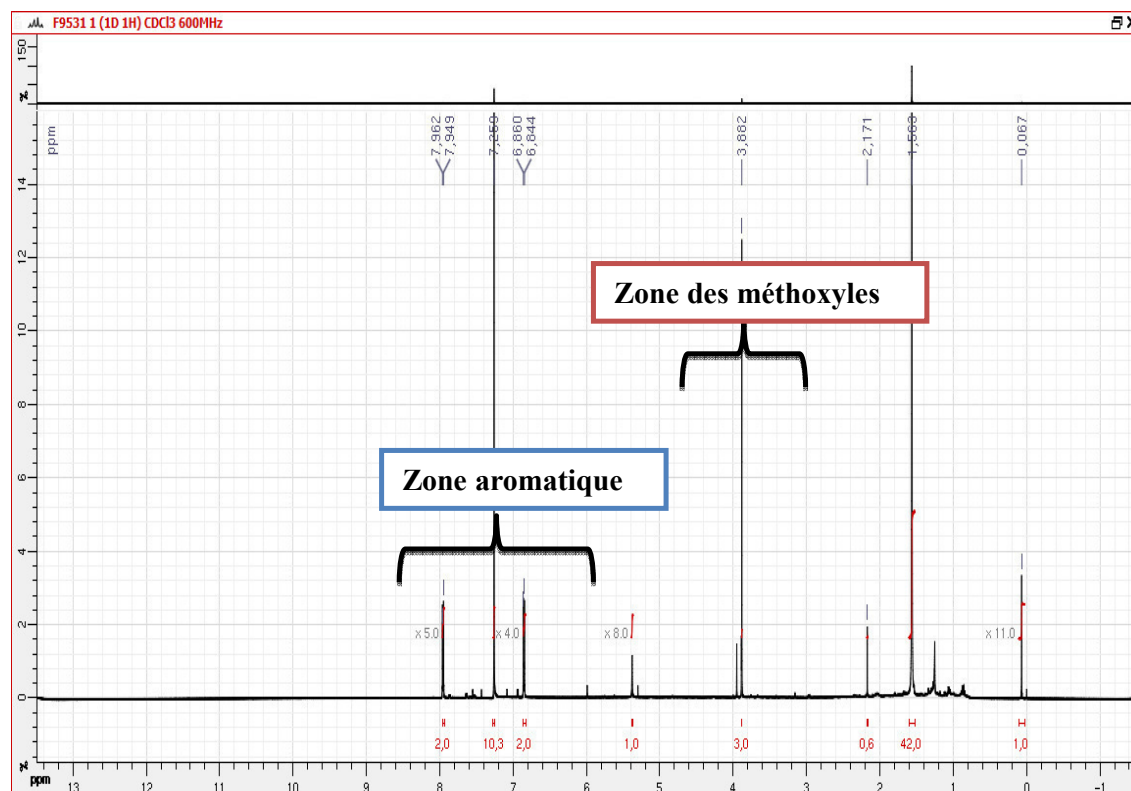


Figure 31. RMN ^1H (CDCl_3 ; 600 MHz) du composé **14**

L'étalement de la zone [6,6 ppm – 8,2 ppm] du spectre proton du composé **14** a montré deux signaux sous forme de doublets à $\delta_{\text{H}}= 6,86$ et $7,96$ ppm ($J= 8,8$ Hz, couplage ortho) (Figure 32).

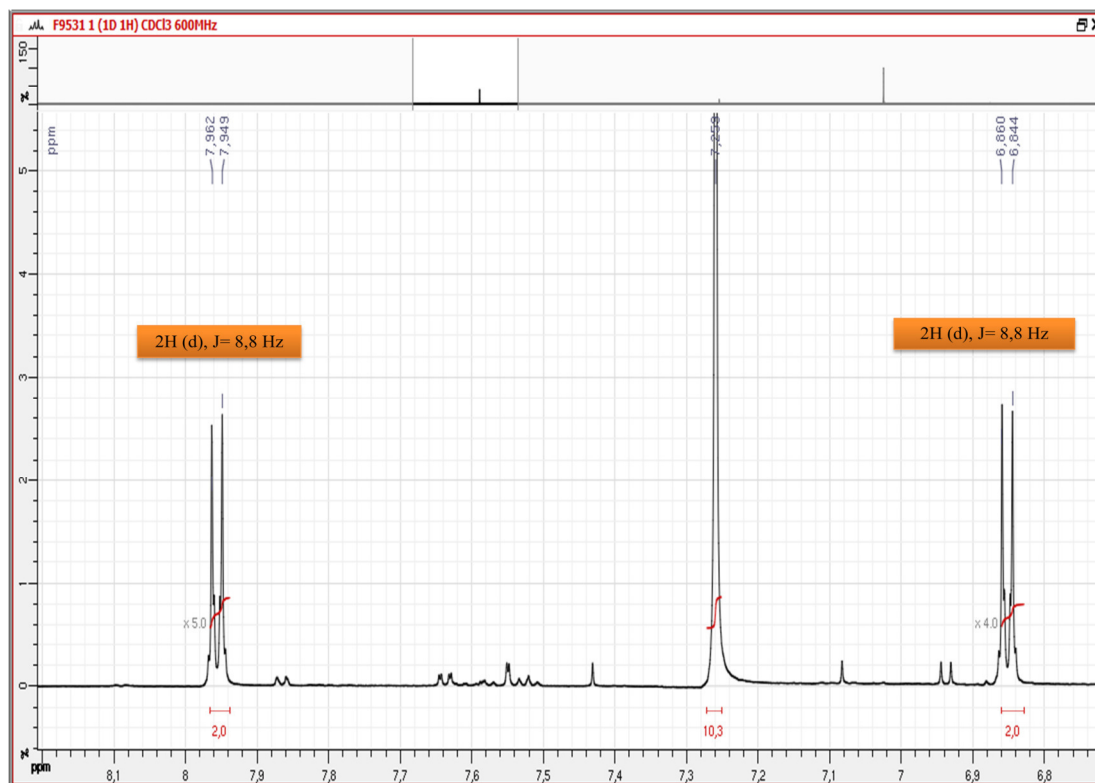


Figure 32. Étalement de la zone [6,6 ppm – 8,2 ppm] de spectre RMN ^1H (CDCl_3 ; 600 MHz) du composé **14**

Un autre signal sous forme de singulet d'intégration 3H à $\delta_{\text{H}}= 3,84$ ppm attribué à un groupement méthoxyle (Figure 33).

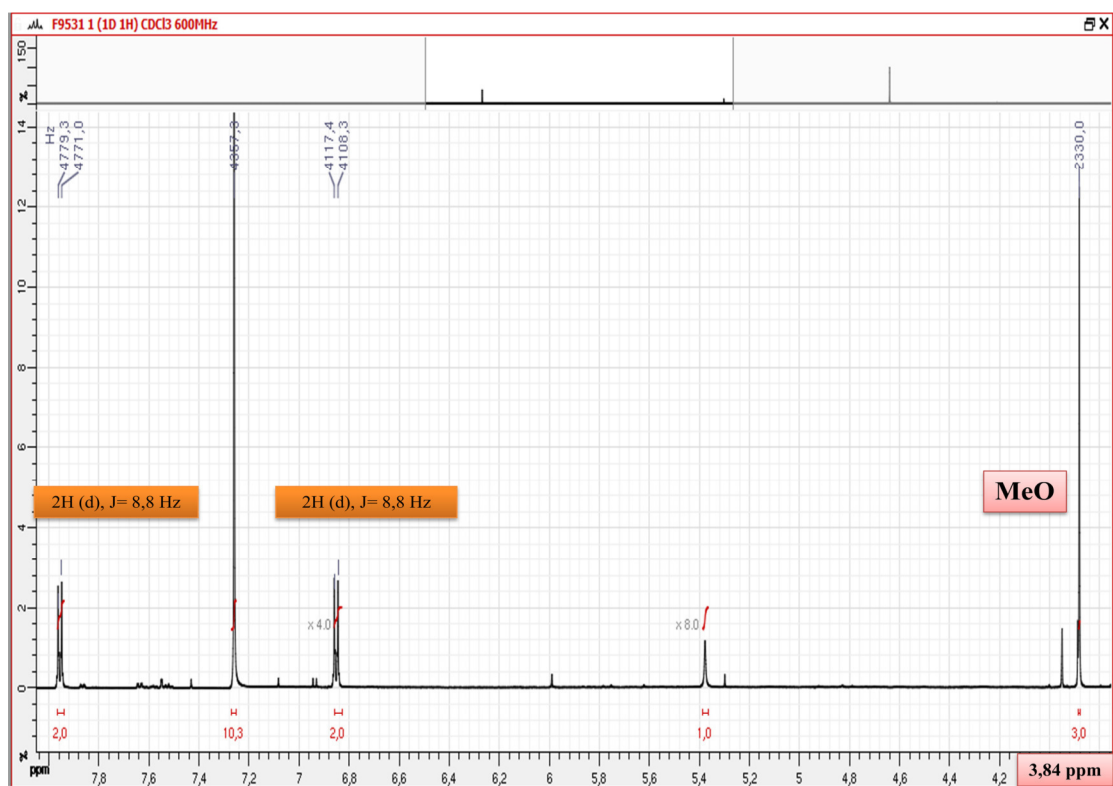


Figure 33. Étalement de la zone [3,8 ppm – 7,8 ppm] de spectre RMN ^1H (CDCl_3 ; 600 MHz) du composé **14**

Ces données nous orientent vers la structure du composé **14** qui pourrait être la suivante :

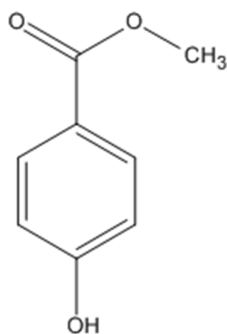


Figure 34. Structure partielle du composé **14**; 4-hydroxy-methyl benzoyle (**Methyl paraben**)

IV.8.7. Screening antiparasitaire *in vitro* des extraits de la partie aérienne de *C. albidus*

La partie aérienne de *C. albidus* (3500 g) a été déjà extraite avec de l'éthanol à 70% (Voir chapitre III) et le résidu sec (670 g) est extrait successivement avec CHCl₃, EtOAc et *n*-BuOH, les résultats ont montré que l'extrait *n*-BuOH avait le rendement d'extraction le plus élevé (3,9%) (Tableau 16). Les résultats du screening antiparasitaire *in vitro* des trois extraits contre *Leishmania amazonensis*, *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* et *Acanthamoeba castellanii str. Neff* (Tableau 16) présentaient un certain degré d'effet antiparasitaire contre les différents parasites. Les extraits de CHCl₃ et AcOEt ont montré également une activité contre *Trypanosoma cruzi* et *Acanthamoeba castellanii str. Neff*, respectivement.

Extracts	Yield (%)	<i>T. cruzi</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. donovani</i>	<i>A. castellanii</i>
CHCl ₃	0,18	+	+	-	-
EtOAc	0,63	-	+	-	+
<i>n</i> -BuOH	3,90	-	+	-	+

Tableau 16. Pourcentage de rendement et screening antiparasitaire des extraits de la partie aérienne de *C. albidus* contre les différents parasites

IV.8.8. Fractionnement bioguidé de l'extrait CHCl₃ de la partie aérienne de *C. albidus*

L'extrait CHCl₃ de la partie aérienne de *C. albidus* (6,5 g) qui est actif contre les épimastigotes de *T. cruzi* a été soumis à une chromatographie sur colonne de gel de silice, éluée avec un mélange hexane-acétate d'éthyle de polarité croissante (hexane: AcOEt, 100: 0 à 0: 100) pour donner douze (12) fractions (Tableau 6). La fraction active F6 (200 g) a été séparée par chromatographie sur colonne de gel de silice, et éluée avec de l'hexane-acétate d'éthyle de polarité croissante (hexane: AcOEt ; 100: 0 à 0: 100) pour obtenir six (06) fractions (Figure 35). Les fractions F6,4 (29 mg) et F6,5 (61,6 mg) semblent être les plus actives jusqu'à la concentration de 100 µg/ml (Tableau 7).

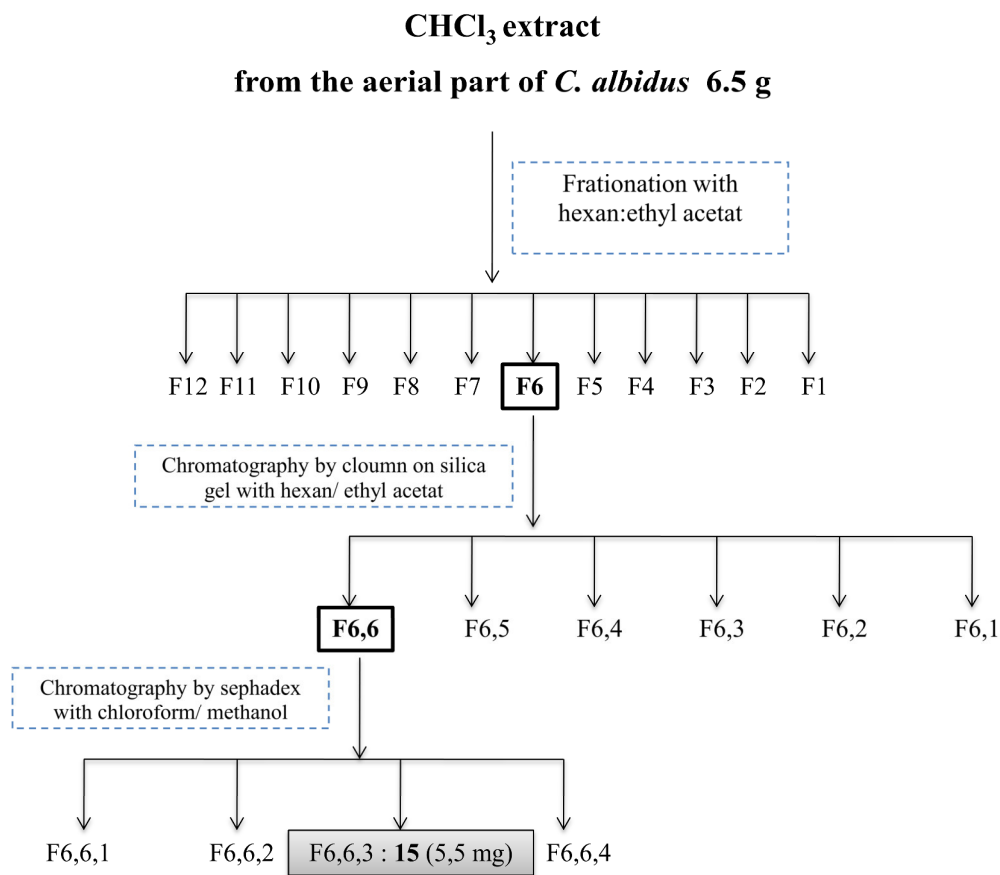


Figure 35. Schéma d'extraction et purification de l'extrait de chloroforme de la partie aérienne de *C. albidus*

La fraction F6,6 (31 mg) a été fractionnée sur une colonne sephadex LH20 en utilisant des mélanges chloroforme-méthanol de polarité croissante (0-100%, en recueillant des volumes de 50 ml pour chaque lot. Une fois les lots rassemblées selon leurs profils chromatographiques, on obtient 4 sous-fractions (F6,6,1-F6,6,4) (Figure 35). La fraction F6,6,2 (4,3 mg) semble être la plus active jusqu'à la concentration de 200 µg/ml (Tableau 7), elle est constituée d'un mélange de produits avec une masse faible, qui n'ont pas été séparés. La fraction inactive F6,6,3 donne le composé **15** ($R_f = 0,48$, hexanes: EtOAc, 5: 5) sous la forme d'un solide amorphe, jaune (5,5 mg). Le composé **15** a été identifié grâce aux données spectroscopiques sous le nom de 4'-Dihydroxy-7-méthoxyflavone également appelée **Genkwanin** (Yuan et al., 2017).

IV.8.9. Identification du composé 15

IV.8.9.a. Profil CCM du composé 15

Le composé se présente sous forme d'une poudre jaune (5,5 mg), de fluorescence noire violette sous lampe UV 365 nm et 254 nm, caractéristique d'une flavone ou d'un flavonol substitué en 3 (3-OR).



Figure 36. Profil chromatographique CCM du composé **15**, (hexane: AcOEt, 5: 5)

IV.8.9.b. Données spectroscopiques IR

L'examen du spectre infrarouge de composé **15** (Figure 37) montre la présence des fonctions hydroxyles à $3263,1\text{ cm}^{-1}$, la fonction C=C à $1499,7\text{ cm}^{-1}$ et deux fonctions cétone à $1662,7$ et $1603,89\text{ cm}^{-1}$.

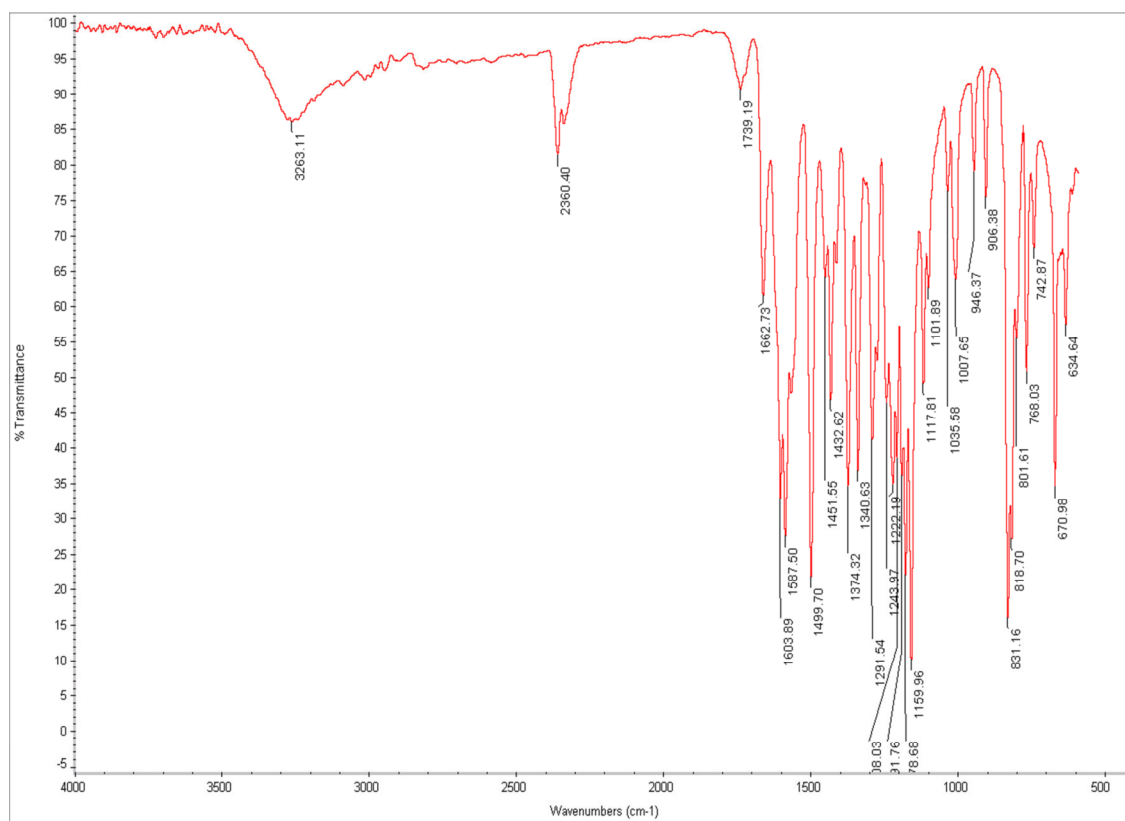


Figure 37. Spectre IR du composé 15

IV.8.9.c. Données spectroscopiques UV-Visible

Ce composé montre une fluorescence violette sous UV à 365 nm. L'étude des séries spectrales UV du composé 15 (Figure 38) montre la présence de deux bandes caractéristiques des flavonoides : bande I : $\lambda_{\text{max}} = 336$ nm et bande II : $\lambda_{\text{max}} = 268$ nm indiquant la présence d'une flavone ou d'un flavonol substitué en 3.

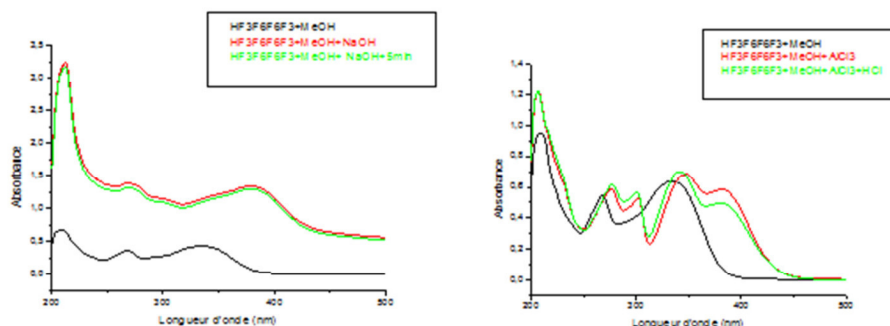
- **Série I:** l'effet bathochromique ($\Delta\lambda = +44$ nm) de la bande I en présence de NaOH et la stabilité du spectre sont en faveur de la présence d'un OH libre en C-4', l'absence d'une nouvelle bande entre 320-335 nm dans le spectre de NaOH par rapport au spectre méthanol indique l'absence d'un hydroxyle libre en C-7.
- **Série II:** l'effet bathochromique ($\Delta\lambda = +45$ nm) de la bande I du spectre AlCl_3 comparativement au spectre méthanol confirme que cette molécule dispose un OH libre en C-5.

- Série III:** l'absence du déplacement bathochrome de la bande II en présence de NaOAc confirme la présence d'une substitution O-R en C-7. La comparaison du spectre NaOAc+H₃BO₃ par rapport au spectre MeOH indique l'absence de groupements ortho di-OH sur le cycle B.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau suivant :

Réactifs	Bande II (nm)	Bande I (nm)	Déplacement ($\Delta\lambda$) (nm)	Interprétation
MeOH	268	336	-	Flavone ou Flavonol
MeOH + NaOH	269	380	Bande I : $\Delta\lambda = +44$	OH libre en 4'
MeOH + NaOH + 5 minutes	269	380	Le spectre de NaOH est stable après 5 min	OH libre en 4' OR en 7
MeOH + AlCl ₃	276	381	Bande I : $\Delta\lambda = +45$	OH libre en 5
MeOH + AlCl ₃ + HCl	277	381	Bande I : $\Delta\lambda = +45$	OH libre en 5 Absence d'ortho di-OH
MeOH + NaOAc	268	381	Bande II : pas de déplacement	OR en 7
MeOH + NaOAc + H ₃ BO ₃	268	339	Bande I : $\Delta\lambda = +3$	Absence d'ortho di-OH sur B

Tableau 17. Données spectroscopiques UV du composé 15



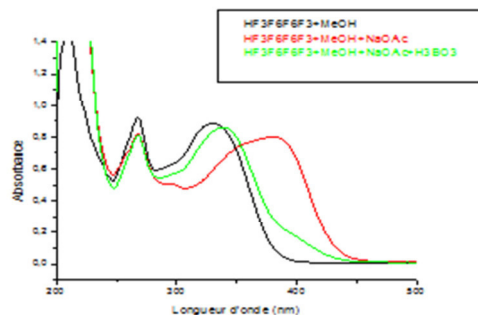


Figure 38. Série spectrale UV du composé **15**

IV.8.9.d. Données spectroscopiques RMN

L'examen du spectre RMN ^1H (600 MHz) enregistré dans l'acétone du composé **15** montrent des signaux caractéristiques d'un flavonoïde avec la présence d'un groupement méthoxyle et des protons aromatiques suivants :

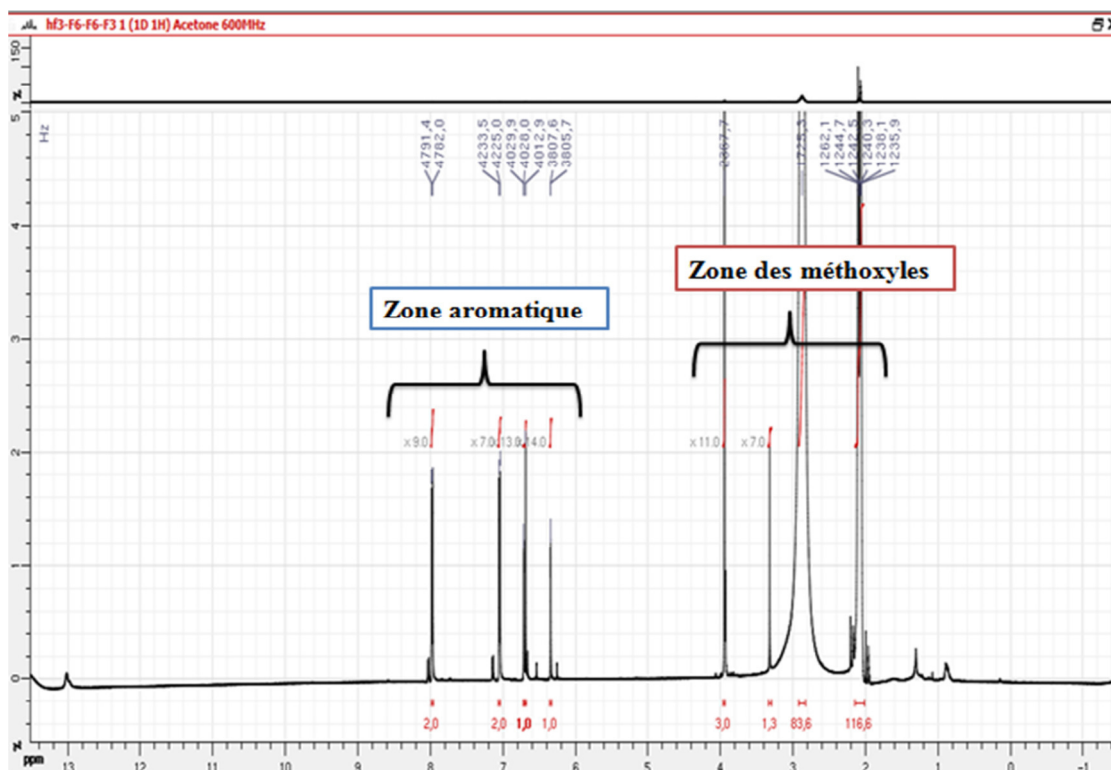


Figure 39. RMN ^1H (Acétone ; 600 MHz) du composé **15**

- Un signal sous forme de doublets (couplage méta $J=1,9$) à $\delta_H= 6,3$ ppm Hz attribuable au proton H-6.
- Un signal sous forme de doublets (couplage méta $J=1,9$) à $\delta_H= 6,71$ ppm Hz attribuable au proton H-8.
- Un singulet d'intégration 1H à $\delta_H= 6,69$ ppm attribuable à H-3.
- Deux autres signaux sous forme de doublet ($J= 8,48$ Hz, couplage ortho) à $\delta_H= 7,05$ ppm et $\delta_H= 8,03$ ppm attribuables aux protons H-3'-H-5' et H2'-H-6', respectivement (Figure 40).

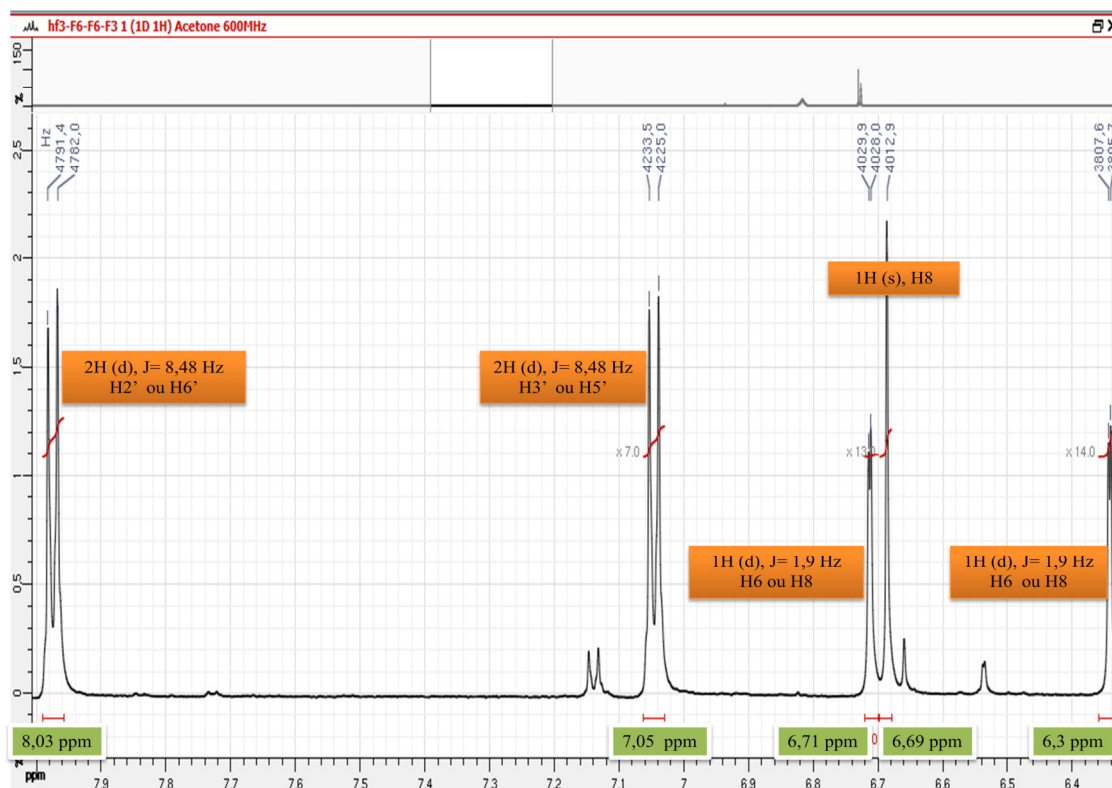


Figure 40. Étalement de la zone [6,6 ppm – 7,8 ppm] de spectre RMN ^1H (Acétone ; 600 MHz) du composé **15**

L'étalement du spectre RMN ^1H du composé **15** (Figure 41) montre un autre singulet d'intégration 3H à $\delta_H= 3,95$ ppm attribuable à un groupement méthoxy.

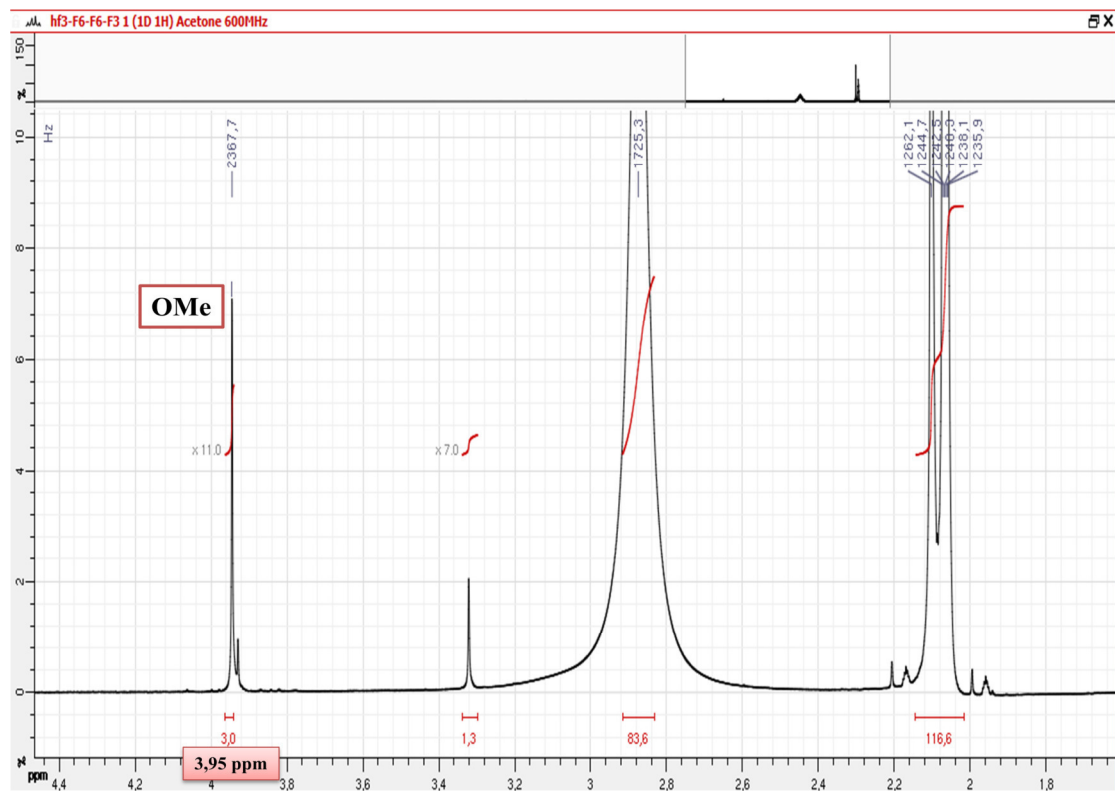


Figure 41. Étalement de la zone [1,8 ppm – 4,4 ppm] de spectre RMN ^1H (Acétone ; 600 MHz) du composé **15**

L'étalement du spectre RMN ROESY (Figure 42) montre une corrélation entre le groupement méthoxyle et les protons H-6 et H-8, à $\delta_{\text{H}} = 6,3$ ppm (1H, $J = 1,9$ Hz) et à $\delta_{\text{H}} = 6,71$ ppm (1H, $J = 1,9$ Hz), respectivement, ce qui permet de le localiser en position C-7.

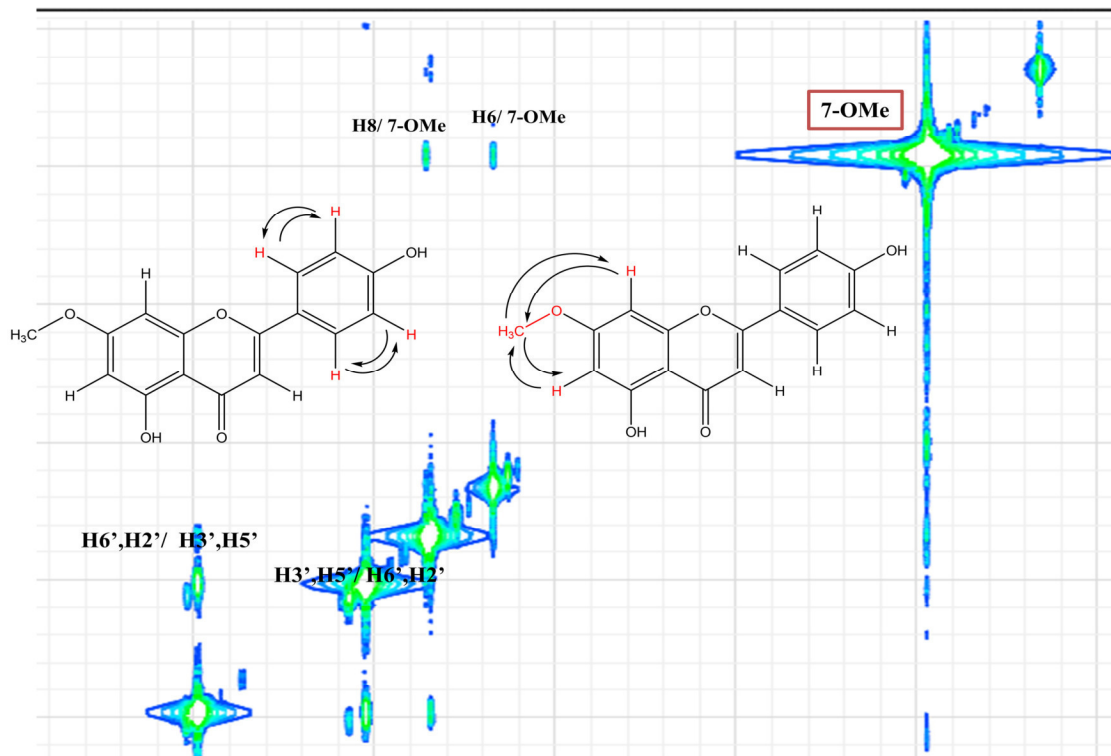


Figure 42. Etallement de spectre ROESY (CD_3OD ; 600 MHz) du composé **15**

L'ensemble de ces données nous oriente vers la structure finale du composé **15**

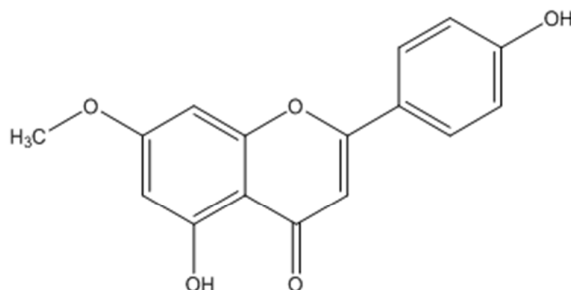


Figure 43. Structure du composé **15**; 4',5-dihydroxy-7-methoxyflavone (**Genkwanine**)

Le composé **15** (Genkwanine) a été isolé et identifié précédemment dans l'espèce *Cistus palinxae* (Cistacées) (Teresa et al., 1983), *Cistus laurifolius* (Cistacées) (Sadhu et al., 2006), *Andrographis paniculata* (Acanthacées), *Mimosa hostilis* (Fabacées) (Ohsaki et al., 2006), *Ocimum americanum* L.var.*pilosum* (Willd.) Paton, *Ocimum basilicum* L. (Lamiacées), *Ocimum selloi* Benth, *Ocimum kilimandscharicum* L. (Grayer et aal., 2001) et

Ocimum x citriodorum Vis (Lamiacées) (Gaspar-Marques et al., 2004), *Salvia dorrii* et *Salvia lavandulaefolia*, *Salvia lavandulifolia*, *Salvia microsiphon*, *Salvia nicolsoniana*, *Salvia officinalis*, *Salvia palaestina*, *Salvia stenophylla* et *Salvia yosgadensis* (Lamiacées) (Lu et Foo, 2002), *Teucrium ramosissimum* (Lamiacées) (Henchiri et al., 2009), *Daphne genkwa* (Thymelaeacées) (Harborne, 1999), *Larrea divaricata* et *Larrea tridentata* (Zygophyllacées), c'est un aussi constituant majeur de *Genkwa Flos* (Thyméléacées) (Yuan et al., 2017) pour le traitement de l'œdème, de l'ascite, de la toux, de l'asthme et du cancer et est synthétisé aussi à partir de la tyrosine (Lee et al., 2015).

IV.8.10. Fractionnement bioguidé de l'extrait AcOEt de la partie aérienne de *C. albidus*

Les fractions de l'extrait d'AcOEt de la partie aérienne de *C. albidus* (21,17 g) (Tableau 9 et 10) ont été regroupées en fonction de leurs profils chromatographiques sur couche mince (CCM) pour donner seize (16) fractions et testées contre les trophozoïtes d'*Acanthamoeba castellanii str. Neff*. Les résultats ont montré que la fraction F14 (10,5 g) était la plus active. Elle a été fractionnée sur une colonne de gel de silice en utilisant des mélanges de (CH₂Cl₂: AcOEt; 100: 0 à 0: 100) pour obtenir sept (07) fractions après leur combinaison en fonction de leur profil CCM (F14A-F14G) (Figure 44) (Tableau 11). La fraction F14A (46,7 mg) semble être la plus active jusqu'à la concentration de 100 µg/ml, elle est constituée d'un mélange de produits qui n'ont pas été séparés. La fraction F14D donne le composé **16** (R_f= 0,73 ; EtOAc: DCM, 6: 4) sous forme d'un solide, amorphe jaune (368 mg). Le composé **16** (368 mg) a été identifié grâce aux données spectroscopiques sous le nom de 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-chromen-4-one, également appelé **Quercétine** (Sambandam et al., 2016 ; Nandani et al., 2013).

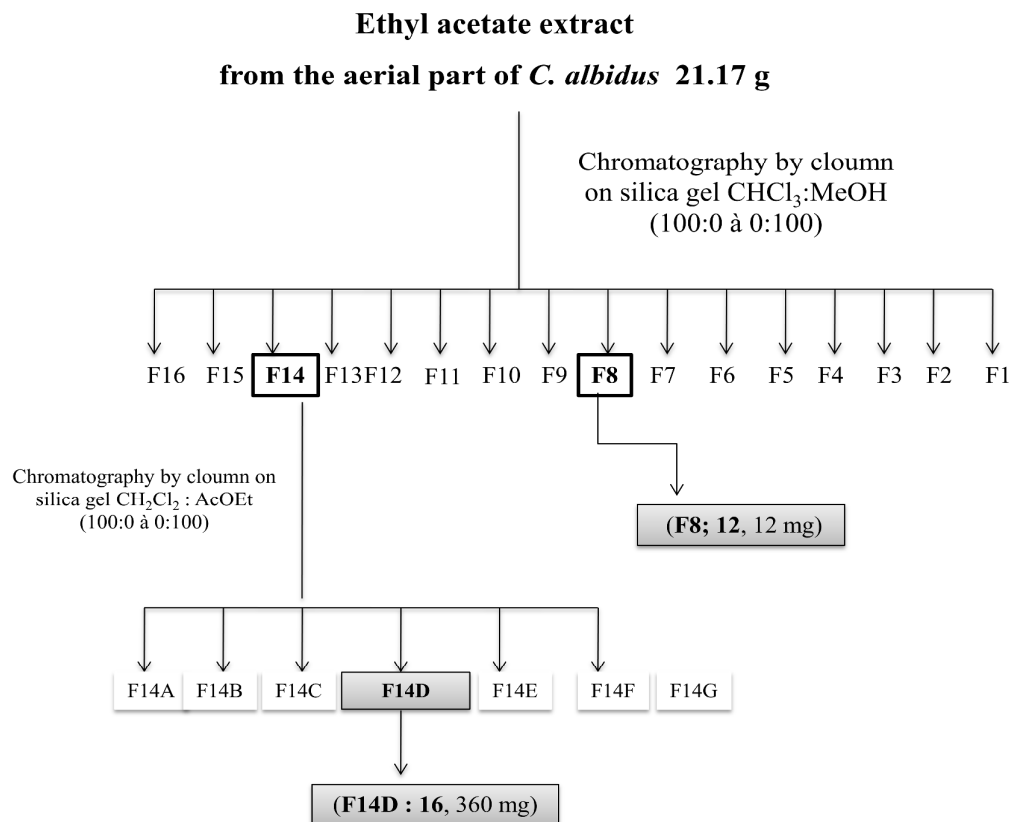


Figure 44. Schéma d'extraction et purification de produits de l'extrait acétate d'éthyle de la partie aérienne de *C. albidus*

IV.8.11. Identification du composé 16

IV.8.11.a. Profil CCM du composé 16

Le composé **16** se présente sous une couleur jaune (368 mg), de fluorescence jaune sous lumière UV à 365 nm caractéristique de la présence d'un flavonol.

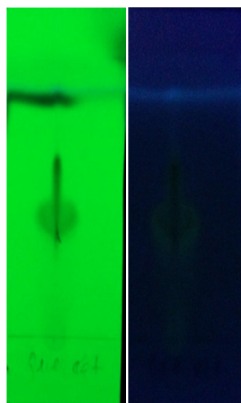


Figure 45. Profil chromatographique CCM du composé **16**, (hexane: acétone, 5: 5)

IV.8.11.b. Données spectroscopiques IR

L'examen du spectre d'infrarouge du composé **16** montre la présence de fonctions hydroxyles à $3307,6 \text{ cm}^{-1}$, la présence de fonctions C=C à $1449,8 \text{ cm}^{-1}$ et la présence de fonctions cétone à $1660,4$ et $1609,4 \text{ cm}^{-1}$.

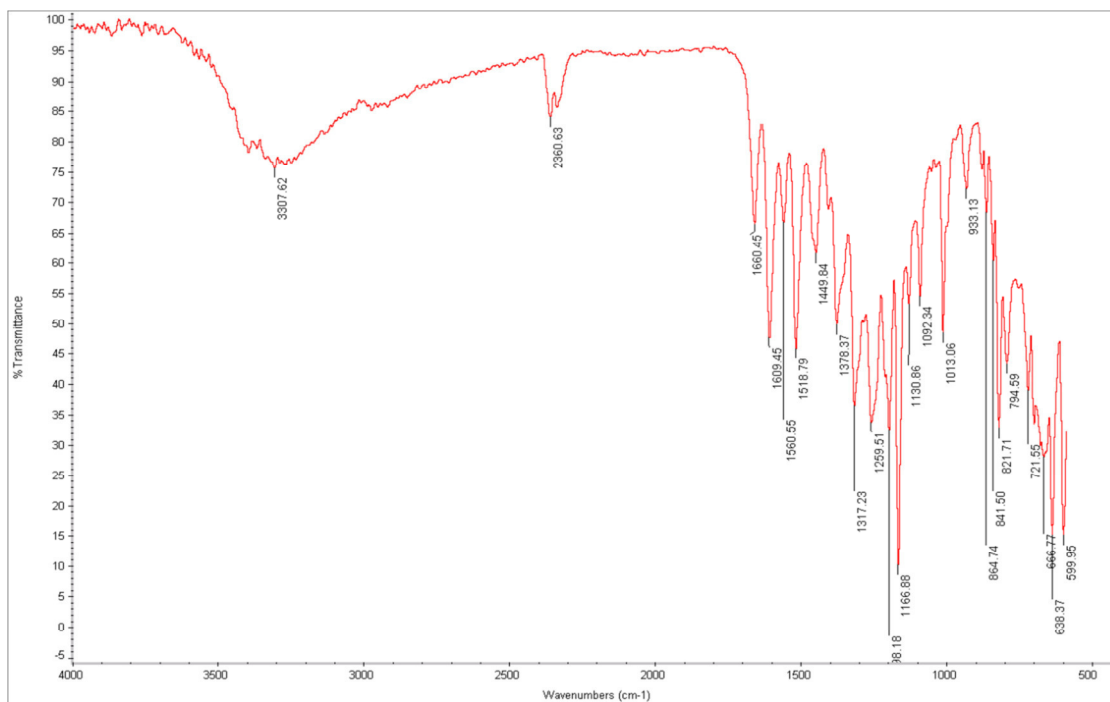


Figure 46. Spectre IR du composé **16**

IV.8.11.c. Données spectroscopiques UV-Visible

Ce composé montre une fluorescence violette sous UV à 365 nm. L'étude des séries spectrales UV du composé **16** (Figure 47) montre la présence de deux bandes caractéristiques des flavonoïdes : bande I : $\lambda_{\text{max}} = 371$ nm et bande II : $\lambda_{\text{max}} = 256$ nm indiquant la présence d'un flavonol.

- **Série I:** l'effet bathochromique ($\Delta\lambda = +38$ nm) de la bande I en présence de NaOH, est en faveur de la présence d'un OH libre en C-4', l'apparition d'une nouvelle bande à 326 nm dans le spectre de NaOH par rapport au spectre méthanol indique la présence d'un hydroxyle libre en C-7.
- L'instabilité du spectre après 5 minutes indique la présence d'hydroxyles libres en position 3 et 4'.
- **Série II:** l'effet bathochromique ($\Delta\lambda = +81$ nm) de la bande I dans le spectre AlCl_3 comparativement au spectre méthanol indique la présence de groupements ortho di-OH sur le cycle B et un OH libre en C-5. l'addition de HCl provoque un déplacement hypsochrome ($\Delta\lambda = -22$) de la bande I par rapport au spectre AlCl_3 ce qui confirme que ce composé est substitué par un ortho di-OH sur le cycle B.
- **Série III:** la présence du déplacement bathochrome de la bande II ($\Delta\lambda = +19$ nm) en présence de NaOAc confirme la présence d'une substitution O-H en C-7. La comparaison du spectre NaOAc + H_3BO_3 par rapport au spectre MeOH indique ($\Delta\lambda = +16$ nm) indique la présence de groupements ortho di-OH sur le cycle B.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau suivant :

Réactifs	Bande II (nm)	Autres bandes (nm)	Bande I (nm)	Déplacement ($\Delta\lambda$) (nm)	Interprétation
MeOH	256	-	371	-	Flavone ou Flavonol substitué en 3
MeOH + NaOH	280	326	409	Bande I : $\Delta\lambda = +38$	OH libre en 4'
MeOH + NaOH + 5 minutes	Absence de bande	326	Absence de bande	-	OH libre en 4' OH en 7
MeOH + AlCl_3	273	-	452	Bande I : $\Delta\lambda = +81$	Ortho di-OH en B et OH en 5
MeOH + AlCl_3 + HCl	269	-	430	Bande I : $\Delta\lambda = -22$	Ortho di-OH en B et OH en 5
MeOH + NaOAc	275	323	383	Bande II : $\Delta\lambda = +19$	OH en 7
MeOH + NaOAc + H_3BO_3	263	-	387	Bande I : $\Delta\lambda = +16$	Ortho di-OH sur B

Tableau 18. Données spectroscopiques UV du composé 16

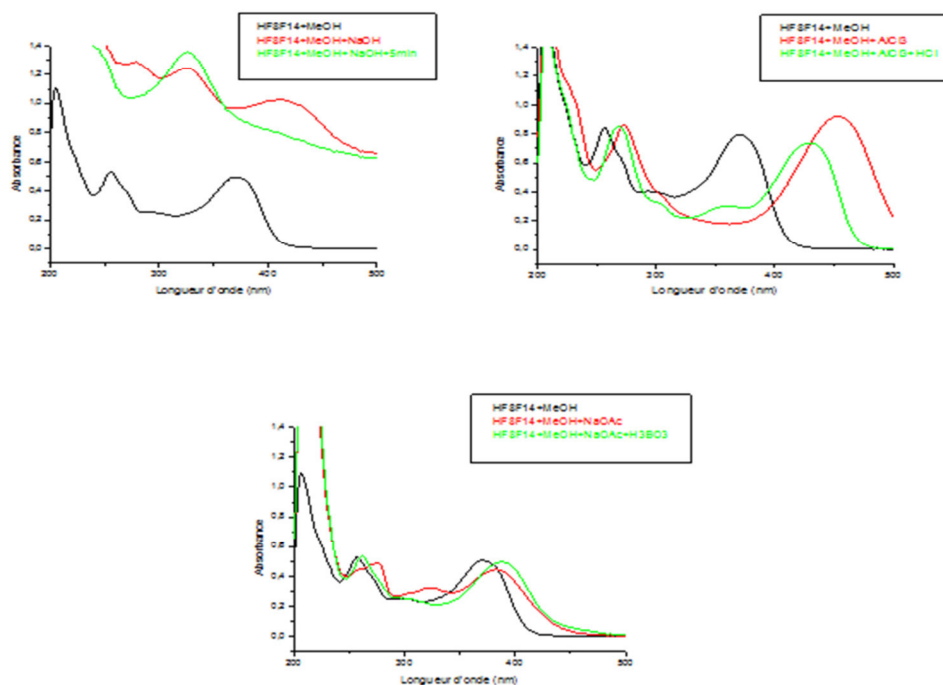


Figure 47. Série spectrale UV du composé 16

IV.8.11.d. Données spectroscopiques RMN

L'examen du spectre RMN ^1H (600 MHz) enregistré dans CD_3OD du composé **16** la présence des protons aromatiques caractéristiques d'un composé de type flavonoïde.

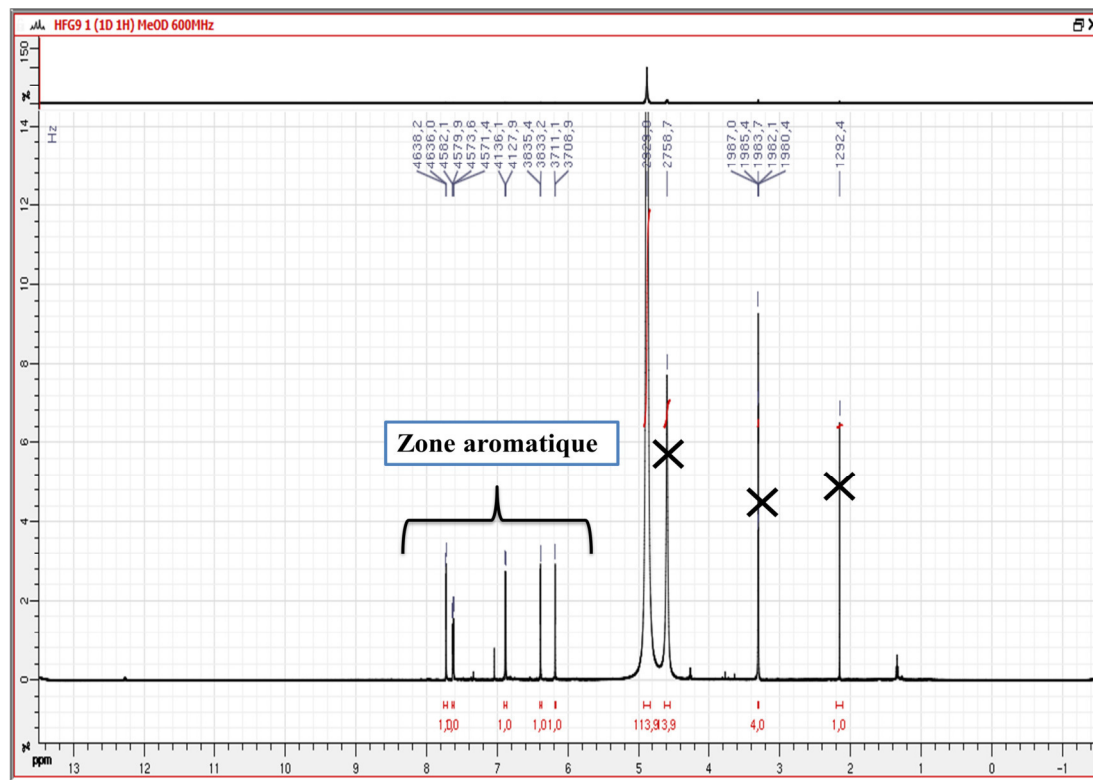


Figure 48. RMN ^1H (CD_3OD ; 600 MHz) du composé **16**

Deux signaux sous forme de doublets (couplage méta, $J = 2,2$ Hz) d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 6,19$ ppm et $\delta_{\text{H}} = 6,4$ ppm attribuables aux protons H-6 et H-8 respectivement. Un doublet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 6,9$ ppm attribuable à H-5, un doublet de doublet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 7,6$ ppm ($J = 2,2$ et 8,5 Hz) attribuable à H-6' et un doublet à $\delta_{\text{H}} = 7,7$ ppm, $J = 2,2$ Hz attribuable à H-2' (Figure 49).

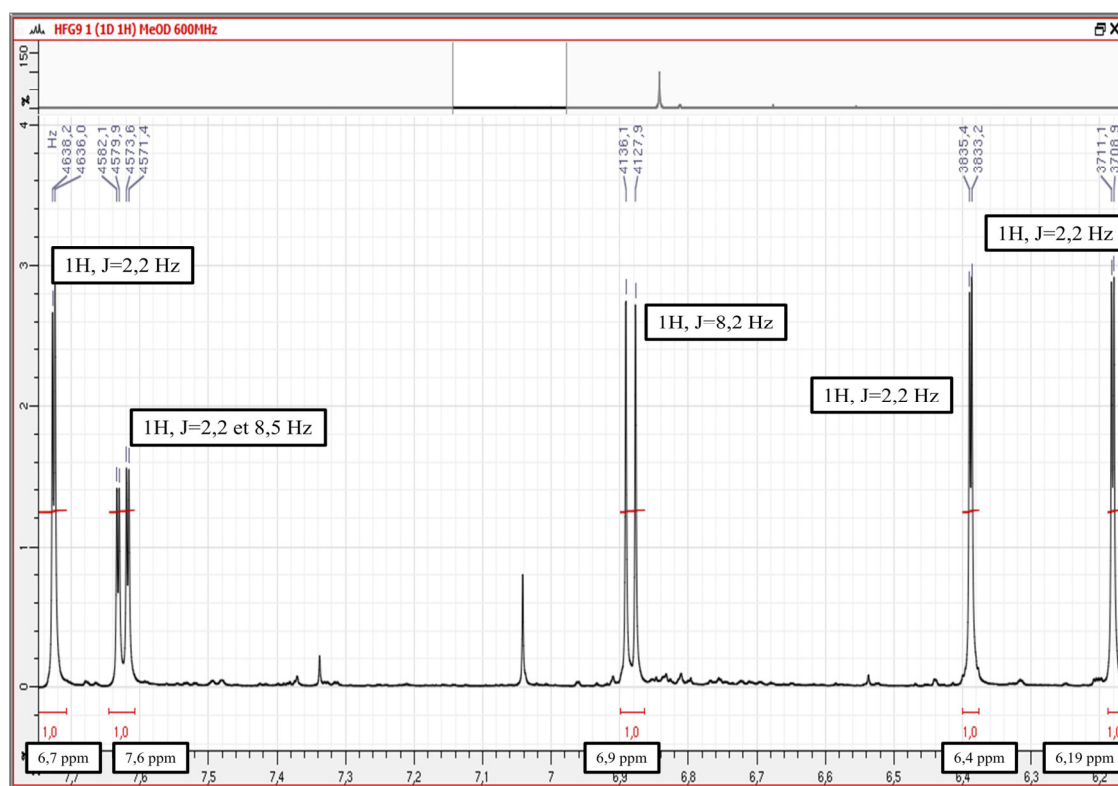


Figure 49. Étalement de la zone [6,2 ppm – 7,8 ppm] de spectre RMN ^1H (CD_3OD ; 600 MHz) du composé **16**

L'examen du spectre RMN ^{13}C (600 MHz) enregistré dans le CD_3OD du composé **16** montre la présence de quinze (15 carbones) aromatiques (Figure 50) qui confirment la structure de la quercétine en comparaison avec les données de la littérature (Sambandam et al., 2016 ; Nandani et al., 2013).

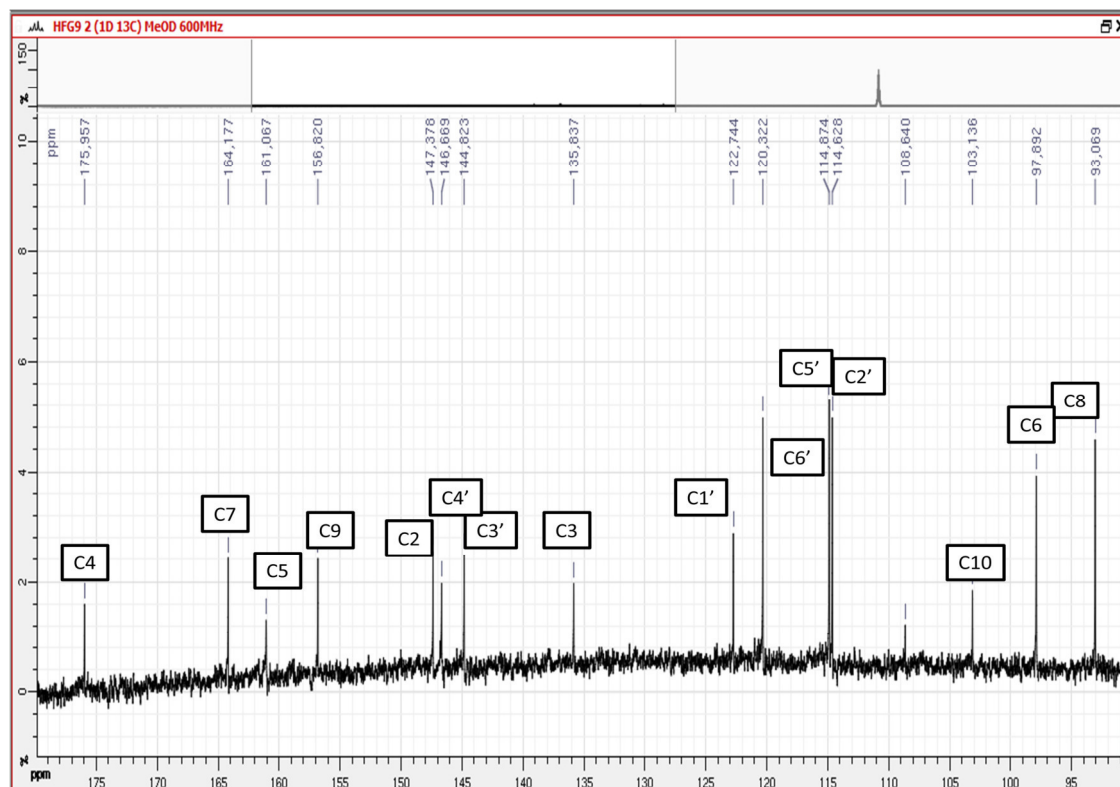


Figure 50. RMN ^{13}C (CD_3OD ; 600 MHz) du composé **16**

L'ensemble de résultat des analyses spectroscopiques nous oriente vers la structure finale du composé **16**

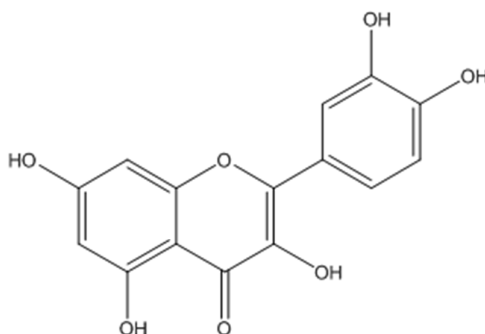


Figure 51. Structure du composé **16**; 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone (**Quercétine**)

Le composé **16** est connu ainsi sous les noms ; quercétine, sophorétine et xanthaurine, c'est une molécule très connue et qui a été isolée et identifiée à partir de différentes espèces (tableau 19);

Espèces	Familles	Références
<i>Cistus albidus</i>	Cistacées	(Teresa et al., 1978 ; Wollenweber et Mann, 1984)
<i>Cistus populifolius</i>	Cistacées	(Teresa et al., 1977)
<i>Cistus salvifolius</i>	Cistacées	(Gürbüz et al., 2015)
<i>Brickellia glutinosa</i>	Astéracées	(Goodwin et Rosler, 1984)
<i>Artemisia vestita</i>	Astéracées	(Yin et al., 2008)
<i>Blumea balsamifera</i>	Astéracées	(Saewan et al., 2011)
<i>Saussurea medusa</i>	Astéracées	(Xie et al., 2005)
<i>Silphium perfoliatum</i>	Astéracées	(El-Sayed et al., 2002)
<i>Epimedium acuminatum</i>	Berbéridacées	(Shen et al., 2007)
<i>Epimedium brevicornum</i> ,	Berbéridacées	(Shen et al., 2007)
<i>Epimedium davidii</i>	Berbéridacées	(Shen et al., 2007)
<i>Epimedium pubescens</i>	Berbéridacées	(Shen et al., 2007)
<i>Epimedium sagittatum</i>	Berbéridacées	(Shen et al., 2007)
<i>Epimedium myrianthum</i>	Berbéridacées	(Shen et al., 2007)
<i>Epimedium pauciflorum</i>	Berbéridacées	(Shen et al., 2007)
<i>Epimedium stellatum</i>	Berbéridacées	(Shen et al., 2007)
<i>Epimedium zhenbaense</i>	Berbéridacées	(Shen et al., 2007)
<i>Epimedium zhushanense</i>	Berbéridacées	(Shen et al., 2007)
<i>Epimedium membranaceum</i>	Berbéridacées	(Shen et al., 2007)
<i>Epimedium leptorrhizum</i>	Berbéridacées	(Shen et al., 2007)
<i>Epimedium leishanense</i>	Berbéridacées	(Shen et al., 2007)
<i>Epimedium koreanum</i>	Berbéridacées	(Shen et al., 2007)
<i>Epimedium franchetii</i>	Berbéridacées	(Shen et al., 2007)
<i>Epimedium fargesii</i>	Berbéridacées	(Shen et al., 2007)
<i>Epimedium dolichostemen</i>	Berbéridacées	(Shen et al., 2007)
<i>Sedum takesimense</i> Nakai	Crassulacées	(Thuong et al., 2007)
<i>Sinocrassula indica</i>	Crassulacées	(Yoshikawa et al., 2007)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicacées	(Abrahams et al., 2003 ; Baxter et al., 2005)
<i>Brassica carinata</i> Y line	Brassicacées	(Marles et al., 2003)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicacées	(Baxter et al., 2005)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicacées	(Abrahams et al., 2003 ; Baxter et al., 2005)
<i>Albizia lebbeck</i>	Fabacées	(Mors et al., 2000)

Tableau 19. Liste des espèces par familles contenant la Quercétine

<i>Euchresta formosana</i>	Fabacées	(Lo et al., 2002)
<i>Styphnolobium japonicum</i>	Fabacées	(Kite et al., 2007)
<i>Trifolium pratense</i>	Fabacées	(Lin et al., 2000)
<i>Cassia tora</i>	Fabacées	(Nandani et al., 2013)
<i>Aspalathus linearis</i>	Fabacées	(Bramati et al., 2002)
<i>Aspalathus linearis</i>	Fabacées	(Bramati et al., 2002)
<i>Hypericum perforatum</i>	Hypericacées	(Tatsis et al., 2007)
<i>Hypericum perforatum var. angustifolium</i>	Hypericacées	(Hashida et al., 2008)
<i>Hypericum sampsonii</i>	Hypericacées	(Don et al., 2004)
<i>Psorospermum androsaemifolium</i> BAKER	Hypericacées	(Poumale et al., 2008)
<i>Salvia dorrii</i>	Lamiacées	(Lu et Foo, 2002)
<i>Psidium guajava</i>	Myrtacées	(Arima et Danno, 2002)
<i>Syzygium cumini</i>	Myrtacées	(Ayyanar et Subash-Babu, 2012)
<i>Phyllanthus emblica</i>	Phyllanthacées	(Zhang et al., 2002)
<i>Phyllanthus niruri</i>	Phyllanthacées	(Mors et al., 2000)
<i>Phyllanthus urinaria</i>	Phyllanthacées	(Mors et al., 2000)
<i>Eriobotrya japonica</i>	Rosacées	(Ito et al., 2000)
<i>Malus doumeri var. formosana</i>	Rosacées	(Lin et al., 2007)
<i>Spiraea formosana</i>	Rosacées	(Wu et al., 2004)
<i>Rosa rugosa</i>	Rosacées	(Xiao et al., 2006)
<i>Fragaria × ananassa</i>	Rosacées	(Aaby et al., 2007)
<i>Phellodendron amurense</i>	Rutacées	(Leu et al., 2006)
<i>Phellodendron japonicum</i> MAXIM	Rutacées	(Chiu et al., 2005)
<i>Rodgersia podophylla</i>	Saxifragacées	(Chin et Kim, 2006)
<i>Kadsura heteroclita</i>	Schisandracées	(Pu et al., 2008)
<i>Smilax bracteata</i>	Smilacacées	(Zhang et al., 2008)
<i>Smilax riparia</i>	Smilacacées	(Li et al., 2006)
<i>Xyris pteygoblephara</i>	Xyridacées	(Guimarães et al., 2007)
<i>Ribes nigrum</i>	Grossulariacées	(Sambandam et al., 2016)
<i>Anaxagorea luzonensis</i> A. GRAY	Annonacées	(Gonda et al., 2000)
<i>Allium cepa</i>	Alliacées	(Mors et al., 2000)
<i>Punica granatum</i>	Lythracées	(Lansky et Newman, 2007)
<i>Hibiscus sabdariffa</i>	Malvacées	(Ali et al., 2005)
<i>Ardisia colorata</i>	Myrsinacées	(Sumino et al., 2002)
<i>Cruciata taurica</i>	Rubiacées	(De Rosa et al., 2002)
<i>Piper umbellatum</i>	Piperacées	(Tabopda et al., 2008)
<i>Oryza sativa cv. Heugjinjubyeo</i>	Poacées	(Han et al., 2004)
<i>Podocarpus fasciculatus</i>	Podocarpacees	(Kuo et al., 2008)
<i>Euphorbia tinctoria</i>	Euphorbiacées	(Jassbi, 2006)
<i>Warburgia stuhlmannii</i>	Canellacées	(Manguro et al., 2003)
<i>Costus spicatus</i>	Costacées	(Da Silva et al., 2000)

Tableau 19. Liste des espèces par familles contenant la Quercétine (suite du tableau 19)

Sur la base de ce tableau, il apparaît que les familles les plus riches en quercétine sont les suivantes ; Cistacées, Astéracées, Berbéridacées, Brassicacées, Fabacées, Hypericacées, Rosacées et Phyllanthacées.

IV.9. Conclusion

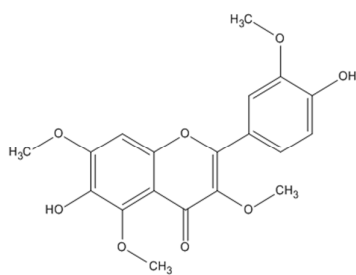
L'évaluation antiparasitaire *in vitro* des extraits de *P. inuloides* contre *Leishmania amazonensis*, *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* et *Acanthamoeba castellanii* str. Neff a révélé que l'extrait CHCl₃ possède une activité leishmanienne modérée. En outre, le fractionnement bioguidé de cet extrait actif conduit à l'isolement et à la caractérisation de la quercétagétine-3,5,7,3'-tétraméthyléther **1** comme composant actif principal. Le composé **1** et ses dérivés 6-acétyl **2** et 6,4'-diacétyl **3** ont montré une activité modérée contre les formes promastigotes de *L. amazonensis* avec des valeurs de CI₅₀ allant de 0,240 à 0,484 mM et une faible toxicité sur les cellules macrophages (CC₅₀ 0,37-0,66 mM).

L'évaluation antiparasitaire *in vitro* des extraits organiques de *C. albidus* contre *Leishmania amazonensis*, *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* et *Acanthamoeba castellanii* str. Neff a révélé que les extraits CHCl₃ et AcOEt possèdent des activités anti-trypanosoma et anti-acanthamoeba modérées, respectivement. Le fractionnement bioguidé de l'extrait actif CHCl₃ contre *T. cruzi* a conduit à isoler deux fractions F6,4 et F6,5 qui ont montré une activité puissante jusqu'à 100 µg/ml. Le fractionnement bioguidé de l'extrait actif d'AcOEt contre *A. castellanii* a conduit à isoler une fraction F14A qui a montré une activité importante jusqu'à 100 µg/ml. Les fractions F6,4 ; F6,5 et F14A sont constituées des mélanges de produits, qui n'ont pas été séparées.

Cette étude rapporte aussi pour la première fois l'évaluation de l'activité anti-leishmanienne de la plante saharienne *P. inuloides* et l'évaluation des activités anti-trypanosoma et anti-amoeba des extraits organiques de la partie aérienne de l'espèce *C. albidus*. D'autres études *in vivo* devraient être entreprises pour confirmer les potentiels biologiques des extraits chloroforme de la partie aérienne de *P. inuloides* et chloroforme et acétate d'éthyle des parties aériennes de *C. albidus*. Le fractionnement bioguidé contre les parasites *L. amazonensis*, *T. cruzi* et *A. castellanii* nous a permis d'isoler trois (03) composés naturels, dont les structures ont été établis par la combinaison des différentes méthodes spectrales ; UV-Visible, IR, NMR ¹H, ¹³C et ses séquences, bidimensionnelle: ROESY et HMBC.

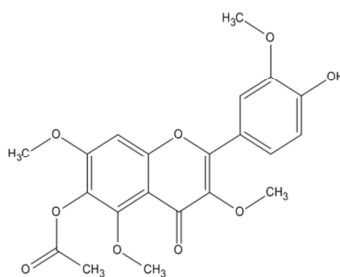
Les composés identifiés sont indiqués ci-dessous :

- ✓ **Composé 1** : Quercétagétine 3,5,7,3'-tétraméthyléther
- ✓ **Composé 2** : 6-Acetoxy-4'-hydroxyl-3,5,7,3'-tetramethoxyflavone
- ✓ **Composé 3** : 6,4'-Diacetoxy-3,5,7,3'-tetramethoxyflavone
- ✓ **Composé 15** : Genkwanine
- ✓ **Composé 16** : Quercétine



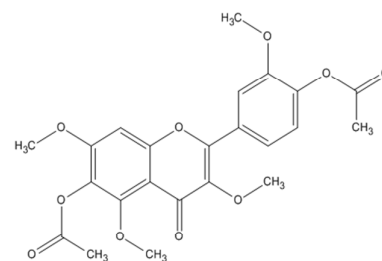
1

Quercétagétine 3,5,7,3'-
tétraméthyléther



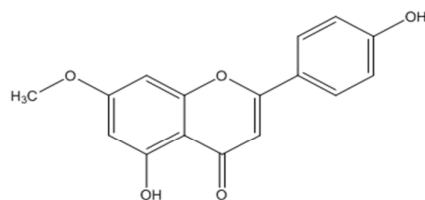
2

6-Acetoxy-4'-hydroxyl-3,5,7,3'-
tetramethoxyflavone



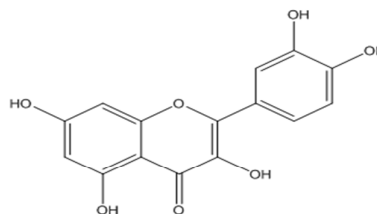
3

6,4'-Diacetoxy-3,5,7,3'-
tetramethoxyflavone



15

Genkwanine



16

Quercétine

Chapitre V :
Les huiles essentielles

V.1. Définition et généralités

Une huile essentielle est un liquide hydrophobe concentré contenant des composés aromatiques volatils de la plante. Ils sont également connus en tant qu'huiles aromatiques, huiles parfumées, huiles volatiles de vapeur, huiles étherées, ou simplement comme "l'huile de" la matière végétale à partir de laquelle elles ont été extraites, telles que l'huile de clou de girofle (Somesh et al., 2015). Les huiles essentielles sont généralement incolores, surtout lorsqu'elles sont fraîches. Néanmoins, avec le temps, l'huile essentielle peut s'oxyder, ce qui fait que la couleur devient plus foncée. Par conséquent, l'huile essentielle doit être stockée dans un endroit frais et sec étroitement fermé et de préférence dans des récipients en verre ambrés.

L'huile essentielle est utilisée dans la parfumerie, l'aromathérapie, les cosmétiques, l'encens, la médecine, les produits d'entretien ménagers et pour aromatiser les aliments et les boissons. Ce sont des produits de valeur dans les industries de la parfumerie et de l'alimentation. Un certain nombre de pays produisent différents types d'huiles essentielles (Rao et al., 2005). Une huile essentielle est généralement séparée de la phase aqueuse par une méthode physique qui n'entraîne pas de changement significatif dans sa composition chimique.

De nombreuses huiles aromatiques ont été citées pour de nombreuses applications dans les domaines liés à la santé, dans les aliments et les utilisations commerciales (Burt, 2004) en raison de leurs effets bactéricides, de leurs propriétés virucides, antifongiques et antioxydantes (Chaudhari et al., 2012). En général, les terpénoïdes sont les principaux constituants des huiles essentielles qui sont responsables de leurs activités biologiques (Silvério et al., 2013).

Le but de cette étude c'est d'analyser les compositions chimiques des huiles essentielles des espèces *Pulicaria inuloides* (saharienne) et *Cistus albidus* de la région des Aurès. Leurs huiles essentielles ont été obtenues par la méthode d'entraînement à la vapeur d'eau.

V.2. Procédés d'extraction des huiles essentielles

Il existe plusieurs méthodes d'extraction des huiles essentielles, mais les plus utilisées sont l'entraînement à la vapeur d'eau et l'hydrodistillation de la plante fraîche ou sèche.

V.2.1. Hydrodistillation

C'est la méthode la plus simple et plus anciennement utilisée (Meyer-Warnod et al., 1984). Le procédé consiste à immerger la matière végétale dans un ballon rempli d'eau placé sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à l'ébullition. La chaleur permet l'éclatement des cellules végétales et la libération des molécules odorantes qui y sont contenues. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et les huiles essentielles se séparent de l'eau par différence de densité. Au laboratoire, le Clevenger est le système équipé d'une cohobe généralement utilisé pour l'extraction des huiles essentielles, et la durée d'une hydrodistillation peut considérablement varier selon le matériel utilisé et la matière végétale à traiter (Figure 1).

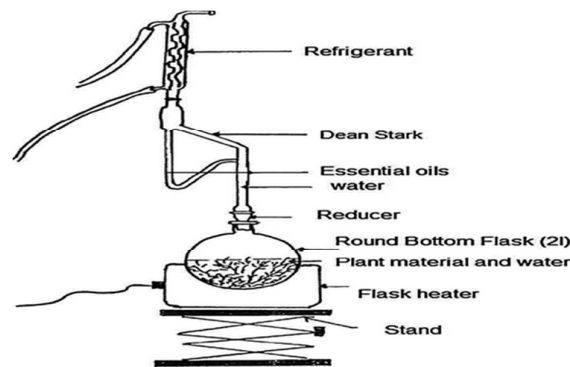


Figure 1. Montage d'hydrodistillation

V.2.2. Entraînement à la vapeur d'eau

C'est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles. Cette technique ne met pas en contact direct de l'eau et la matière végétale. La vapeur d'eau traverse la matière végétale située au-dessus d'une grille et les cellules éclatent et libèrent l'huile

essentielle pour former un mélange d'eau et huile essentielle qui est ensuite véhiculée vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparées en une phase aqueuse et une phase organique : l'huile essentielle (Figure 2).

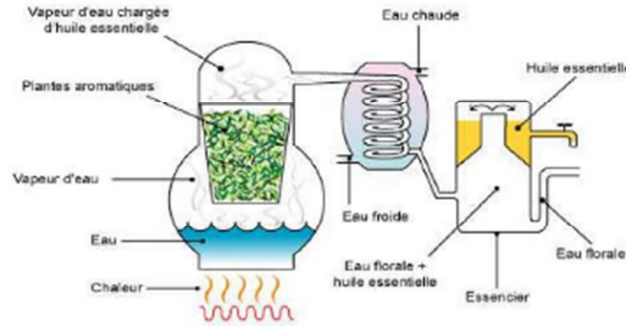


Figure 2. Montage d'entraînement à la vapeur d'eau

V.2.3. Extraction par micro-onde

Le procédé de cette technique consiste à irradier la matière végétale broyée par micro-ondes en présence d'un solvant absorbant fortement les micro-ondes (le méthanol, pour l'extraction de composés polaires ou l'hexane pour l'extraction de composés apolaires) (Golmakani et al., 2008). L'ensemble est chauffé sans atteindre l'ébullition durant de courtes périodes entrecoupées par des étapes de refroidissement (Figure 3).

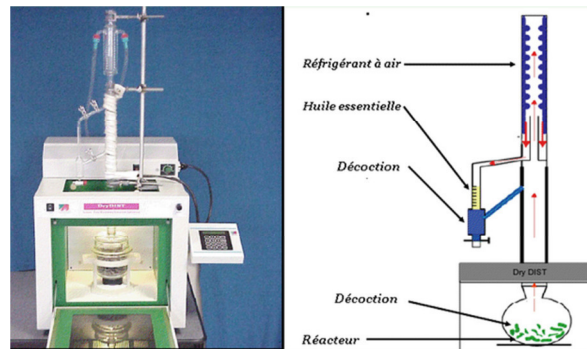


Figure 3. Montage d'extraction par micro-onde

V.2.4. L'expression à froid

Ce procédé d'extraction est le plus simple mais aussi le plus limité. Il est réservé à l'extraction des composés volatils dans les péricarpes des hespéridés ou encore d'agrumes qui ont une très grande importance pour l'industrie des parfums et des cosmétiques. Le principe consiste à déchirer les péricarpes riches en cellules sécrétrices. L'essence libérée est recueillie par un courant d'eau et reçoit tout le produit habituel de l'entraînement à la vapeur d'eau, d'où la dénomination d'huile essentielle (Arnould et al., 1981).



Figure 4. Montage d'expression à froid

V.3. Protocole d'extraction de HE de *P. inuloides* et *C. albidus*

Les parties aériennes des espèces médicinales et aromatiques *P. inuloides* (tiges, feuille et fleurs, 150 g) et *C. albidus* (tiges et feuille, 250 g) ont été soumises à une distillation par entraînement à la vapeur. Le principe consiste à faire passer les vapeurs d'eau bouillantes à travers les plantes à une température adéquate pour détruire les cellules végétales, afin de libérer ainsi les molécules aromatiques et les entraîner dans un serpentin de refroidissement. Là, les vapeurs refroidies retournent à l'état liquide formant un mélange azéotropique «eau + huiles essentielles». Les huiles essentielles et l'eau florale se séparent par simple différence de densité. Cette opération a été effectuée en trois heures de temps.

Afin d'obtenir l'huile essentielle restante mélangée avec la phase aqueuse, la décantation a été réalisée dans une ampoule à décanter dans laquelle le mélange précédent se sépare en deux phases non miscibles en utilisant l'hexane comme une phase organique. La phase aqueuse se situe dans la partie inférieure et la phase organique (huile essentielle soluble dans l'hexane) se situe au-dessus.



Figure 5. Protocole d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau

V.4. Résultats et discussion

Après l'obtention de l'huile essentielle, l'hexane a été évaporé, et l'huile essentielle obtenue a été pesée et analysée par un appareil GC-MS agilent modèle 6890 et les résultats de la composition chimique sont représentés dans le tableau suivant :

Plante	Poids de la plante sec (W_2)	Poids de l'huile (W_1)	Rendement (%)
<i>P. inuloides</i>	150 g	600 mg	0,4
<i>C. albidus.</i>	250 g	27,7 mg	0,011

Tableau 1. Résultats de l'extraction par entraînement à la vapeur d'eau des huiles essentielles de *P. inuloides* et *C. albidus*

Le rendement en pourcentage des huiles essentielles obtenues à partir de deux espèces médicinales et aromatiques a été calculé sur la base du poids sec comme suit:

$$\text{Rendement (\%)} = (W_1 \times 100) / W_2$$

Où; W_1 = Poids de l'huile obtenue ; W_2 = poids de l'espèce sec.

Ce rendement peut varier d'une région à un autre, selon les conditions de températures, d'humidité, de la composition du sol et ainsi la technique d'extraction utilisée.

V.4.1. L'analyse de la composition de l'HE de *C. albidus*

Les constituants chimiques de l'espèce médicinale *C. albidus*, ont été identifiés en utilisant la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse GC/MS et en

comparant la masse modèle de fragmentation des spectres avec celles de la bibliographie (Adams, 2007 ; Stein et al., 2008).

Cette technique nous a permis d'obtenir un chromatogramme, qui est constitué du temps en abscisse et ou chaque pic représente un constituant;

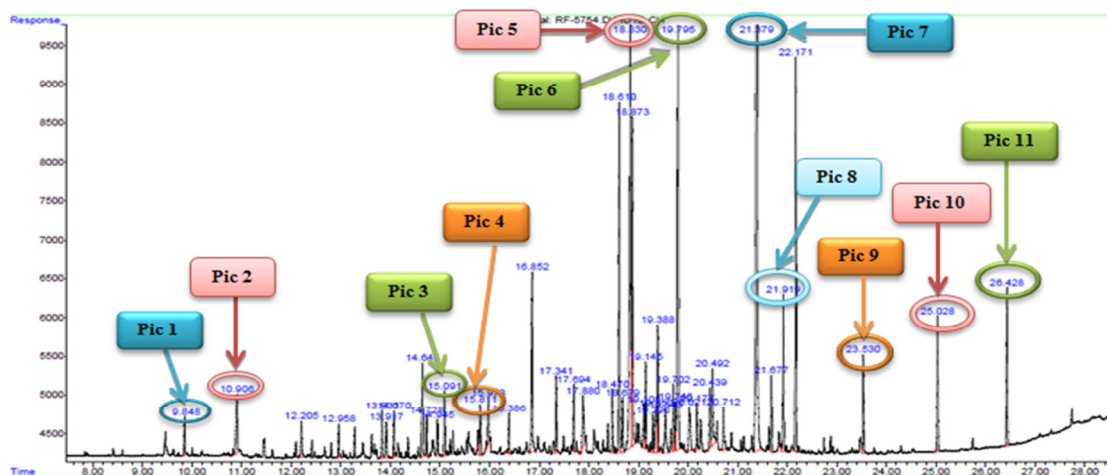


Figure 6. Chromatogramme GC de l'huile essentielle de l'espèce du genre *C. albidus* analysée par GC/MS

Le tableau suivant montre les résultats chromatographiques, exprimés en pourcentages de surface de pic GC calculés sans correction du facteur de réponse :

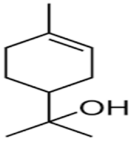
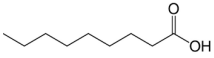
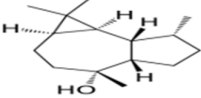
N° de pic	Temps de rétention (min)	Teneur (%)	Nom du composé identifié	Formule brute	Structure
1	9,848	0,4	Alpha-terpinéol	$C_{10}H_{18}O$	
2	10,906	1,1	Acide nonanoïque	$C_9H_{18}O_2$	
3	15,091	0,826	Lédol	$C_{15}H_{26}O$	

Tableau 2. Composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes de *C. albidus*

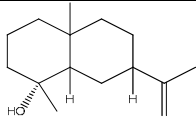
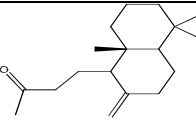
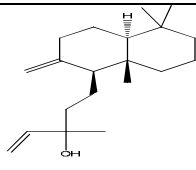
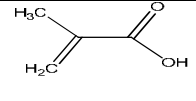
4	15,811	0,6	Selin-11-en-4-alpha-ol	$C_{15}H_{26}O$	
5	18,83	22,3	15,16-dinorlabd-8(20)-en-13-one	$C_{18}H_{30}O$	
6	19,795	12,4	Manool	$C_{20}H_{34}O$	
7	21,379	17,3	Acide méthacrylique M-292	$C_4H_6O_2$	
8	21,919	1,9	Tricosane	$C_{23}H_{48}$	$CH_3.(CH)_{21}.CH_3$
9	23,53	1,2	Pentacosane	$C_{25}H_{52}$	$CH_3.(CH)_{23}.CH_3$
10	25,028	1,6	Heptacosane	$C_{27}H_{56}$	$CH_3.(CH)_{25}.CH_3$
11	26,428	1,9	Nonacosane	$C_{29}H_{60}$	$CH_3.(CH)_{27}.CH_3$

Tableau 2. Composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes de *C. albidus* (suite du tableau 2)

L'analyse de l'HE des parties aériennes de l'espèce du genre *C. albidus* par GC/MS nous a permis d'identifier onze (11) constituants répartissant en sept (07) composés oxygénés (42,3%) et quatre (04) composés hydrocarbonés (6,6%), tout le représentant 61,5% de la composition chimique de l'huile essentielle. Les composés majoritaires ont été le 15,16-dinorlabd-8(20)-en-13-one (22,3%) suivi par l'acideméthacrylique (M-292) avec une teneur (17,3%) et le diterpene oxygéné manool (12,4%). Viennent ensuite les composés : nonacosane (1,9%), tricosane (1,9%), heptacosane (1,6%), pentacosane (1,2%) et l'acide nonanoïque (1,14%). Les composés présents en faibles proportions ont été le ledol, le selin-11-en-4-alpha-ol et le monoterpène alpha-terpinéol avec des teneurs respectives de 0,8 ; 0,6 et 0,4%, respectivement.

Nous avons comparé les compositions chimiques de la même espèce provenant de la région de Provence (Sud-est de la France) (Paolini et al., 2008) et de la Province d'Alicante (Communauté de Valence, Sud-est de l'Espagne) (Morales-Soto et al., 2015). Le tableau suivant représente les différents composés identifiés :

N°	Nom du composé	IR	Teneurs (%)		
			En Algérie 2015	En France 2003	En Espagne 2013
1	3-Hexen-1-ol, (3Z)	855	-	-	6,64
2	Benzene, ethenyl(Styrene)	867	-	-	2,34
3	2-Heptanol	894	-	-	2,24
4	Benzenemethanol	1035	-	-	5,14
5	a-Guaiacol	1088	-	-	20,72
6	2-Phenylethanol	1116	-	-	4,49
7	Camphor	1158	-	-	1,29
8	alpha terpinéol	1196- 1172	0,43	0,2	-
9	acide nonanoïque	1267	1,1	-	-
10	Bornylacetate	1291	-	-	15,34
11	b-bourbonène	1388	-	1,9	-
12	(E)-b-caryophyllène	1419	-	5,9	-
13	allo-aromadendrène	1451	-	3,4	-
14	a-curcumène	1467	-	7,7	-
15	germacrène-D	1477	-	3,1	-
16	a-zingibérène	1488	-	12,8	-
17	shyobunone	1503	-	1,4	-
18	d-cadinène	1516	-	3,4	-
19	oxyde de caryophyllène	1575	-	3,8	-
20	Lédol	1602- 1588	0,83	0,2	-
21	a-cadinol	1643	-	5,4	-
22	selin -11-èn-4-alpha-ol	1658	0,61	-	-
23	a-bisabolol	1665	-	4,1	-
24	15,16-dinorlabd-8(20)-èn-13-one	1957	22,31	-	-
25	Manool	2056	12,44	-	-
26	Acide methacrylique M-292	2236	17,29	-	-
27	Tricosane	2299- 2300	1,9	0,6	-
28	Pentacosane	2499	1,17	-	-
29	Heptacosane	2700	1,62	-	-
30	Nonacosane	2900	1,91	-	-

Tableau 3. Composition chimique de l'HE de l'espèce *C. albidus* provenant de différents pays

L'histogramme suivant montre la composition chimique de l'HE de *C. albidus* provenant de différents pays est représentée ci-dessous :

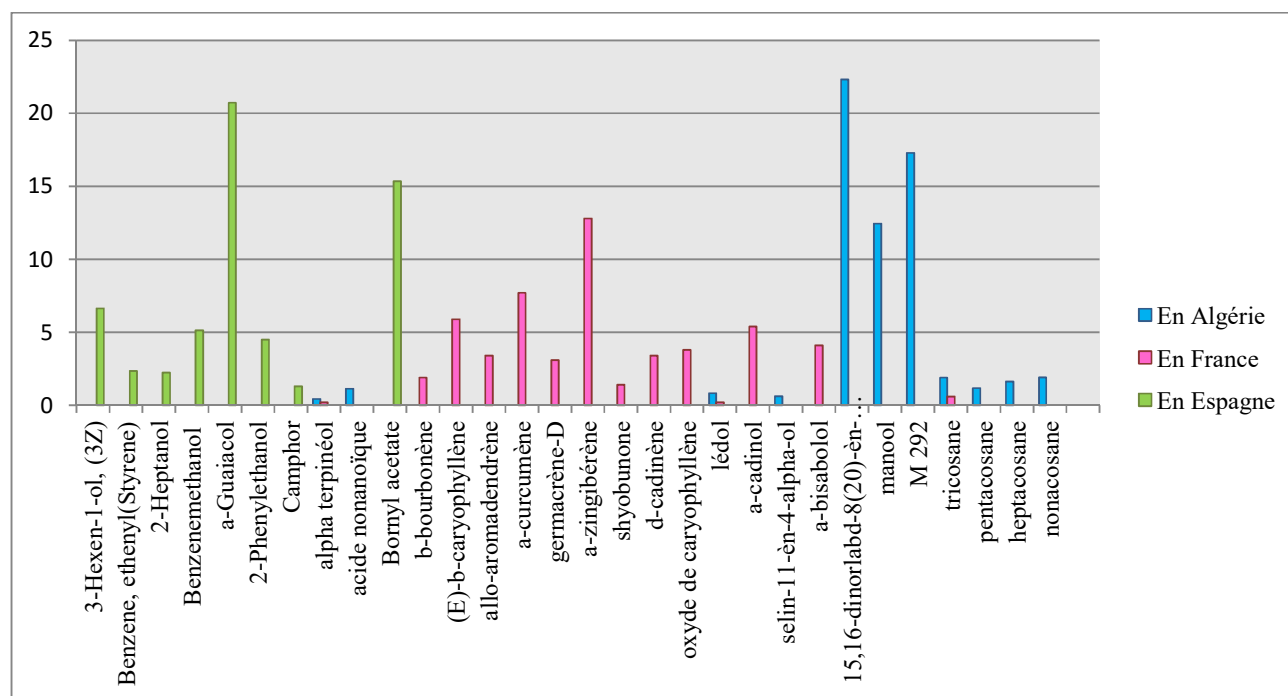


Figure 7. Histogrammes représentent les teneurs en % de l'HE des trois échantillons

D'après cette recherche bibliographique, la composition chimique de notre échantillon était très différente de celle des échantillons de la même espèce étudiée en France et en Espagne, car les constituants principaux de notre huile essentielle 15,16-dinorlabd-8(20)-en-13-one (22,3%), l'acide méthacrylique (17,3%) et le diterpène oxygéné manool (12,4%) n'étaient pas présent dans les autres échantillons. Les deux composés majoritaires de notre huile, le manool et le 15,16-dinorlabd-8(20)-en-13-one ont un squelette du type labdane et ont des structures apparentées aux molécules constituant l'ambre gris naturel qui est sécrété par les poissons et qui est d'une grande importance économique, ces deux produits prépondérants dans notre huile participent donc à l'odeur caractéristique de l'ambre gris. Alors que l'échantillon de Provence est dépourvu de ce type de molécules et se caractérise par la présence en proportion importante de sesquiterpènes à squelette bisabolane : α -zingibérène (12,8%) et α -curcumène (7,7%) (Paolini et al., 2008) et l'échantillon espagnol en est également dépourvu et contient l' α -guaïacol (20,7%) et le bornyl acétate (15,3%) comme produits majoritaires (Morales-Soto et al., 2015).

Seuls trois produits sont communs à notre échantillon et à celui de Provence en France où ils se trouvent avec des teneurs plus faibles (traces). Ces composés communs sont représentés dans le tableau suivant :

Composés	Teneur (%)	
	HE de <i>C. albidus</i>	HE de <i>C. albidus</i>
	Algérie	France
Tricosane	1,9	0,6
Ledol	0,826	0,2
Alpha-terpinéol	0,428	0,2

Tableau 4. Les composés communs dans l'HE de l'espèce du genre *C. albidus* étudié en Algérie et en France

Les autres composés minoritaires de ces trois échantillons sont largement différents à l'exception des trois composés cités précédemment et qui sont communs entre l'espèce étudiée et celle de France. Il est à signaler également que la plupart des composés majoritaires de notre échantillon ne sont pas présents dans les autres espèces de *Cistus*. Par ailleurs si le squelette labdanique (Paolini et al., 2008) rencontrés dans deux des composés majoritaires de notre espèce est présent également dans d'autres espèces de *Cistus* telles que *C. monspeliensis*, *C. ladaniferus*, *C. parviflorus* et *C. creticus* dont les chemotypes sont également de type labdanique, ces produits majoritaires sont spécifiques à notre espèce *Cistus* et sont nouveaux pour le genre *Cistus*.

Certains composés minoritaires de notre échantillon sont présents dans la composition chimique d'huiles essentielles du *C. ladaniferus* (Mariotti, 1994 ; Mariotti et al., 1997) et *C. monspeliensis* (Gülz et al., 1984) avec des teneurs différentes, ces composés sont présentés dans le tableau suivant :

Composés	Teneur en%		
	HE de <i>C. albidus</i> Algérie	HE de <i>C. ladaniferus</i>	HE de <i>C. monspeliensis</i>
Ledol	0,83	3,3	3,8
Tricosane	1,9	-	3,6
heptacosane	1,6	-	28,7
Nonacosane	1,9	-	8,6

Tableau 5. Produits communs entre notre échantillon et deux espèces de *Cistus*

Cette recherche a montré aussi que l'HE de *Cistus monspeliensis* renferme des composés à squelettes cistane (Tabacik et al., 1971) et clérodane (Angelopoulou et al., 2001), ceux-ci ne sont pas présents dans l'huile essentielle de notre espèce.

Ce travail apporte une nouveauté à ce genre qui réside dans le fait que c'est la première fois que des diterpènes à squelette du type labdane sont décrits pour notre espèce et avec des teneurs élevées. Ces molécules sont nouvelles également pour le genre *Cistus*. Ces molécules du type labdaniques ont des structures similaires à celles rencontrés dans l'ambre gris. Ce qui souligne, outre l'originalité de nos résultats, l'intérêt économique de l'espèce algérienne comparativement aux échantillons provenant d'autres pays méditerranéens.

VI.4.2. L'analyse de la composition de l'HE de *P. inuloides*

Après l'obtention de l'huile essentielle, l'hexane a été évaporé et l'huile essentielle obtenue est pesée et analysée par un appareil GC/MS agilent modèle 6890 et les résultats de la composition chimique sont représentés dans le tableau suivant :

N°	TR	IR	Composants	%
1	12,203	1289	Thymol	0,1
2	12,303	1298	Carvacrol	0,1
3	13,111	1345	α -cubebene	0,4
4	13,538	1374	α -copaene	1,1
5	13,778	1431	β -gurjunene	0,3
6	13,778	1387	β -cubebene	0,2
7	14,084	1479	amorpha-4,7(11)-diene	0,3
8	14,084	1409	α -gurjunene	0,2
9	14,244	1417	β -caryophyllene	0,1
10	14,39	1430	β -copaene	0,2
11	14,656	1448	cis- muuro-la-3,5-diene	0,1
12	14,718	1451	trans- muuro-la-3,5-diene	0,2
13	14,822	1471	cis-cadina-1(6),4-diene	0,1
14	14,915	1465	cis-muuro-la-4(14),5-diene	0,8
15	15,077	1475	trans-cadina-1(6),4-diene	1,0
16	15,123	1478	γ -muurolene ,	2,9
17	15,198	1484	germacrene D	0,4
18	15,247	-	selina-3,5-diene	3,1
19	15,36	1493	trans-muuro-la-4(14),5-diene	1,4
20	15,486	1500	α -muurolene	7,8
21	15,693	1513	γ -cadinene	6,6
22	15,836	1522	δ -cadinene	24,0
23	15,924	1528	cis-calamenene	2,8
24	16,032	1537	α -cadinene	1,9
25	16,119	1544	α -calacorene	0,4
26	16,369	1557	trans-cadinene ether	0,2
27	16,539	1445	4- α -H,10- α -H-guaia-1(5),6-diene	0,2
28	16,655	1660	1,6-germacradien-5-ol	4,1
29	16,75	1496	Valencene	0,3
30	16,875	1518	Zonarene	0,3
31	17,071	1585	β -oplopenone	0,3
32	17,206	1612	1,10-di-epi-cubenol	0,6
33	17,4	1616	1-epi-cubenol	1,0
34	17,57	1652	α -epi-cadinol	15,0
35	17,602	1644	α -muurolol	2,1
36	17,71	1555	1, 2,3,4-tetrahydro-1,5,7-trimethylnaphthalene	1,1
37	17,788	1652	alpha- cadinol	12,7
38	18,271	1700	amorphan-4,9-dien-2-ol	2,4
39	18,428	1767	14-hydroxy- α -muurolene	0,6
40	18,544	1588	epi-globulol	0,7
41	18,943	1551	elema-1,11-dien-15-al	0,7
42	18,966	1861	3-Oxyanthranilic acid	0,3
43	19,272	1759	Cyclocolorenone	0,2
44	20,186	1814	Isopropyl tetradecanoate	0,5
Total				99,8%

Tableau 6. Composition de l'huile essentielle des parties aériennes de la plante *P. inuloides*

Le chromatogramme GC/MS révèle la présence de quarante quatre (44) composés représentant 99,8% de la composition globale de l'huile essentielle de la plante médicinale *P. inuloides*. La composition en sesquiterpènes hydrocarbonés était prépondérante, le δ -cadinène est le composé majoritaire (24%), suivi par l' α -muurolène (7,8%), le γ -cadinène (6,6%). L' α -epi-cadinol (15%) et l' α -cadinol (12,7%) qui sont les principaux sesquiterpènes oxygénés identifiés. Les noms et les formules des principaux composés identifiés dans notre plante médicinale sont résumés dans le tableau suivant :

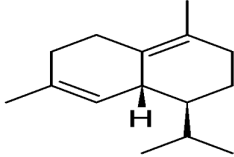
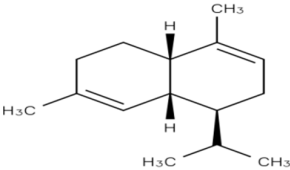
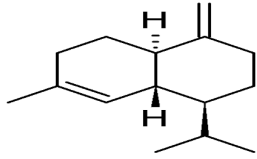
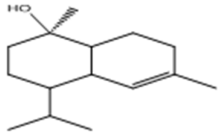
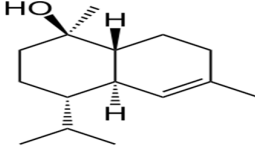
N°	Nom du composé	Formule brute	Structure
1	δ -cadinène	$C_{15}H_{24}$	
2	α -muurolène	$C_{15}H_{24}$	
3	γ -cadinène	$C_{15}H_{24}$	
4	α -epi-cadinol	$C_{15}H_{26}O$	
5	α -cadinol	$C_{15}H_{26}O$	

Tableau 7. Structure des composés identifiés dans l'huile essentielle de *P. inuloides*

V.4.3. Etude comparative concernant la composition de l'huile essentielle de la plante *P. inuloides*

L'étude comparative réalisée sur l'HE de la même espèce *P. inuloides* dans d'autres régions du monde a révélé une grande diversité dont les produits majoritaires de notre espèce

d'Algérie ont été complètement différents de ceux obtenus dans le cas de deux HE provenant du Yémen. En effet les produits majoritaires de notre espèce *P. inuloides* étaient; le δ -cadinene (24%), l' α -muurolene (7,8%), le γ -cadinene (6,6%), l' α -epi-cadinol (15%) et l' α -cadinol (12,7%), qui n'étaient pas présents dans les deux échantillons du Yémen.

Les produits majoritaires des deux espèces Yéménites sont: 1,2-diethoxy-ethane (9,6%), 2-methyl-5-(1-methyl)-Cyclohexen-1-one (47,3%) pour la première (Al-Hajj et al., 2014a) et 2-methyl-5-(1-methyl)-Cyclohexen-1-one (55,1%), toluene (20,6%) et Z-Citral (2,9%) pour la deuxième (Al-Hajj et al., 2014b) qui ne sont pas du tout présents dans notre espèce.

Le tableau suivant représente les composés majoritaires dans les trois espèces:

N°	Nom du composé	TR (Min)	Teneurs en %		
			En Algérie	En Yemen	
				Bany Mater	Sana
1	1,2-diethoxy Ethane	1,5	-	9,6	-
é	Toluène (CAS)	5,7	-	-	20,6
3	α -copaene	13,5	1,1	-	-
4	trans-cadina-1(6),4-diene	15,0	1,0	-	-
5	γ -muurolene ,	15,1	2,9	-	-
6	selina-3,5-diene	15,2	3,1	-	-
7	trans-muurola-4(14),5-diene	15,3	1,4	-	-
8	α -muurolene	15,4	7,8	-	-
9	γ -cadinene	15,6	6,6	-	-
10	δ -cadinene	15,8	24,0	-	-
11	cis-calamenene	15,9	2,8	-	-
12	α -cadinene	16,0	1,9	-	-
13	1,6-germacradien-5-ol	16,6	4,1	-	-
14	1-epi-cubenol	17,4	1,0	-	-
15	α -epi-cadinol	17,5	15,0	-	-
16	α -muurolol	17,6	2,1	-	-
17	1, 2,3,4-tetrahydro-1,5,7-trimethylnaphthalene	17,7	1,1	-	-
18	alpha- cadinol	17,7	12,7	-	-
19	amorphan-4,9-dien-2-ol	18,2	2,4	-	-

Tableau 8. Composition chimique de l'HE des parties aériennes de la plante *P. inuloides* (Yemen)

20	2-méthyle-5-(1-méthyle)-2-Cyclohexen-1-one	18,6-18,9	-	47,3	55,1
21	2-méthyle-5-(1-méthyle éthyle) Cyclohexanol	19,0	-	2,7	-
22	Zingiberene	19,0	-	-	1,0
23	Z-Citral	19,1	-	-	2,9
24	2-méthyle-5-(1-méthyle)-2-Cyclohexen-1-ol	19,2	-	1,0	-
25	alpha-Farnesene	19,3	-	-	1,1
26	1-(1,5-diméthyl-4-hexenyl)-4-méthyl Benzène	19,5	Mount Imran	1,1	-
27	Cyclohexene, 3-(1,5-diméthyl-4-hexenyl)-	19,6	-	-	1,7
28	cis-Carvotanacetol	19,9	-	1,1	-
29	7-Oxabicyclo[4.1.0]heptane, 1-méthyl- (C	19,9	-	-	1,5
30	Isopropyl tetradecanoate	20,1	0,5	-	-
31	Thymohydroquinone diméthyl ether	20,5	-	1,1	-
32	Geranyl propionate	20,6	-	-	1,5
33	(-)-Caryophyllene oxide	21,9-22,0	-	1,1	0,9
34	2-E-Tetradecen-1-ol	22,2	-	1,0	-
35	2-méthyle-5-(1-méthyle)-2-Cyclohexen-1-one	24,0	-	1,4	-
36	Tetracosane	26,5	-	1,5	-
37	Pentacosane	26,6	-	-	0,8
38	3,7,11,15-tetraméthyle-2-Hexadecen-1-ol	27,7	-	1,8	-
39	Hexadecanoic acid (CAS)	32,8	-	12,8	-

Tableau 8. Composition chimique de l'HE des parties aériennes de la plante *P. inuloides* (Yemen) (suite du tableau 8)

En basant sur ces résultats, on constate que la composition chimique de notre HE et celle des autres espèces du même genre *Pulicaria* étudiées antérieurement présentent une différence significative entre les différents produits majoritaires (tableau 9) ;

Nous avons sélectionné pour accomplir cette étude comparative deux espèces différentes : *Pulicaria undulata* (Iran) et *Pulicaria jaubertii* (Yemen), l'analyse qualitative et quantitative de leurs huiles essentielles a montré toujours un grand intervalle de différence en termes de composés majoritaires dont les résultats sont représentés dans le tableau suivant :

Plante	Composés majoritaires			Référence
<i>P. inuloides</i>	δ -cadinene (24%)	α -epi-cadinol (15%)	α -cadinol (27%)	-
<i>P. jaubertii</i>	Carvotanacetone (93,5%)	-	-	(Al-Fatimi et al., 2015)
<i>P. undulata</i>	4-terpéneol (20,12%)	1S-cis-Calamenene (13,37%)	Junipéne (8,66%).	(Mehdi et al., 2011)

Tableau 9. Composition chimique des HE de quelques espèces de *Pulicaria*

Ces huiles essentielles étudiées présentent une très grande variabilité au niveau de leurs compositions. Cette variabilité peut s'expliquer par différents facteurs d'origine génétique ou liée à la localisation géographique et aux conditions écologiques de croissance et de développement de la plante.

V.5. Conclusion

L'analyse par GC et GC-MS de l'huile essentielle de *C. albidus* récoltée dans la région des Aurès et isolée par la méthode d'entraînement à la vapeur d'eau a permis l'identification d'onze (11) composés dont les plus importants étaient ; le 15,16-dinorlabd-8(20)-en-13-one (22,31%), l'acide méthacrylique (17,3%) et le diterpène oxygéné manool (12,4%). Ces trois composés sont décrits pour la première fois dans la composition chimique d'une huile essentielle de *C. albidus*, ce qui en fait un chémotype particulier spécifique à l'Algérie.

L'analyse par GC/MS de l'huile essentielle de *P. inuloides* révèle la présence de quarante quatre (44) composés dont la composition en sesquiterpènes hydrocarbonés était prépondérante, le δ -cadinene est le composé majoritaire (24%), suivi par l' α -muurolene (7,8%), le γ -cadinene (6,6%). La composition chimique de l'huile essentielle du *P. inuloides* récoltée dans la région de Sahara algérien s'est révélée très différente de celles d'huiles d'autres d'échantillons de la même espèce, ainsi que celle d'autres espèces du même genre.

Etant donné que ces espèces aromatique n'ont pas fait l'objet de beaucoup d'études et comme chaque huile essentielle est dotée de vertues thérapeutiques et pharmacologique, il serait intéressant pour la suite de ce travail, de mener des étude plus approfondie sur les composés existant au sein de ces huiles essentielles et de faire des évaluations biologiques sur diverses activités telles qu'insecticides, antifongiques, bactéricides ou antimicrobiennes.

Chapitre VI :
Etude analytique
ICP-AES et ICP -MS

VI.1. Introduction

Les métaux sont généralement toxiques s'ils sont présents en excès (Lutz et al., 1996 ; Drasch et al., 1994 ; Oskarsson et al., 1996). Les éléments minéraux forment une vaste famille d'éléments inorganiques que l'on peut trouver dans notre alimentation végétale ou animale, ce sont des substances indispensables pour la croissance des plantes et des animaux parmi lesquels on trouve les éléments suivants : Na, K, Cl, Ca, P et Mg qui sont des macroéléments ou éléments minéraux majeurs et également Fe, Zn, Cu, Se et I qui sont des oligoéléments ou éléments en traces.

Aujourd'hui, l'utilisation des herbes médicinales pour le traitement de nombreuses maladies humaines est en augmentation, en raison des traitements doux qu'ils représentent et de leurs faibles effets secondaires. Elles sont bénéfiques, non seulement pour leurs propriétés curatives, mais aussi pour leur valeur nutritive. La détermination de leur teneur en composés minéraux est très importante, car plusieurs compositions élémentaires inorganiques sont publiées pour beaucoup de plantes médicinales, la concentration et la nature de l'élément absorbé sont spécifiques à la plante, l'élément peut devenir toxique pour l'espèce et pour le milieu dans lequel elle évolue lorsque sa concentration est supérieure à la capacité d'absorption de l'espèce présente dans le milieu.

Différentes plantes médicinales et aromatiques (*Pulicaria inuloides* (Poir.) DC., *Cedrus atlantica* (Endl.) Manetti., *Juniperus oxycedrus* L., *Juniperus phoenicea* L., *Juniperus phoenicea* L., *Marrubium vulgare* L., *Euphorbia helioscopia* L., *Peganum harmala* L., *Daphne gnidium* L., *Calendula algeriensis* L., *Bunium incrassatum* L., *Echinops ritro* L.,...etc) ont été cueillies dans la région des Aurès et ainsi dans le Sahara d'Algérie, la teneur en macroéléments et en éléments-traces a été déterminée après la digestion par microonde par spectroscopie d'émission atomique par plasma à couplage inductif (ICP-AES) et spectroscopie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS).

L'objectif de cette étude se concentre d'une part sur la détermination de la teneur en éléments essentiels et d'autre part sur les éléments non essentiels qui sont considérés comme toxiques pour l'homme, couvrant au total les éléments suivants ; Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ti, Pb, et Zn.

VI.2. Présentation de laboratoire

L'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC) a été créé le 1^{er} janvier 2006, il se situe sur le campus de Cronenbourg-Strasbourg. C'est une unité mixte de recherche du centre national de la recherche scientifique CNRS de l'université de Strasbourg (Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, a).

Trois laboratoires originaux constituent aujourd'hui trois départements de l'IPHC

- ❖ Département d'écologie, physiologie et éthologie (DEPE).
- ❖ Département de recherche subatomique (DRS).
- ❖ Département des sciences analytiques (DSA).

Le DSA a pour principaux objectifs l'élaboration de nouvelles architectures complexes qui permettent la reconnaissance, le transport et le transfert des ions. L'application de ces substances concerne le traitement des solutions et la séparation des mélanges complexes des macromolécules biologiques (Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, b).



Figure 1. Campus de Cronenbourg-Strasbourg / France (CNRS délégation Alsace)

La plateforme analytique inorganique du laboratoire de reconnaissance et procède de séparation moléculaire (RePSeM) (où notre stage s'est déroulé) est dirigé par Mme. Anne Boos depuis 2003. L'objet de ce laboratoire est de suivre et d'analyser les éléments inorganiques (analyse quantitative et qualitative des éléments-traces) dans des échantillons de nature variée (végétal, animal,...) à l'aide des deux techniques d'analyse qui sont ; l'ICP/AES et l'ICP/MS.

VI.3. Analyse par ICP/AES

Le principe de l'analyse spectrométrique ICP-AES est de mesurer les radiations émises par les atomes passés dans un état excité, sous forme atomique ou ionisée, grâce à un plasma à très haute température. L'atome excité est instable, donc il tend à revenir à un état fondamental plus stable en libérant son excédent d'énergie par émission de photons.

L'appareil utilisé est un appareil Varian 720ES et se décompose en quatre parties :

- a) Système d'introduction des échantillons.
- b) Système d'atomisation et d'excitation.
- c) Système optique de séparation des différentes raies d'émissions optique.
- d) Système de détection des photons séparés (Francis Rouessac et Annick Rouessac, 2009).



Figure 2. Appareil ICP/AES

VI.4. Analyse par ICP/MS

Le principe de cette technique est de mesurer le rapport masse/charge des atomes présents dans l'échantillon en utilisant un plasma pour l'ionisation des éléments grâce à l'action d'un champ électrique (ou magnétique) dans un vide poussé qui permet aux ions de suivre des trajectoires différentes en fonction du rapport masse/charge.

L'appareil utilisé est un appareil Agilent 7500 Cx et se décompose en quatre parties ;

- a) Système d'ionisation ; l'échantillon est introduit dans la torche à plasma sous forme d'aérosol, pour détruire toutes les formes moléculaires et laisser seulement les éléments sous forme ionisée ou atomique.

- b) Système d'accélération ; pour accélérer les ions formés grâce à des lentilles électroniques et augmenter leur énergie cinétique.
- c) Système de séparation ; pour la filtration des ions selon le rapport masse/charge.
- d) Système de détection ; les ions frappent un détecteur qui va fournir un signal électrique proportionnel au nombre d'ions reçus et les résultats sont exportés sous forme de spectres de masse (Francis Rouessac et Annick Rouessac, 2009).



Figure 3. Appareil ICP/MS

VI.5. Produits chimiques, appareils et matériels utilisés

Produits chimiques	Aappareils et matériels
<ul style="list-style-type: none"> ○ Acide nitrique HNO₃ (Trace Select, 69%, marque Fluka) ○ Acide chlorhydrique HCl (37%) ○ Eau ultra pure ○ Méthanol pour HPLC ○ Acétonitrile ○ Acide formique ○ Indium 1 ppm 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Microonde, réacteurs en Téflon ○ ICP-AES ○ ICP-MS ○ LC-MS ○ Etuve ○ HPLC

VI.6. Collection et préparation des extraits

Les espèces suivantes ont été récoltées dans les régions des Aurès (Nord-est de l'Algérie, Voir chapitre II).

N°	Espèces	N°	Espèces
1	<i>Juniperus phoenicea</i> L.	7	<i>Daphne gnidium</i> L.
2	<i>Juniperus oxycedrus</i> L.	8	<i>Euphorbia helioscopia</i> L.
3	<i>Cedrus atlantica</i> (Endl.) Manetti.	9	<i>Marrubium deserti</i> de Noè.
4	<i>Marrubium vulgare</i> L.	10	<i>Calendula algeriensis</i> L.
5	<i>Bunium incrassatum</i> L.	11	<i>Peganum harmala</i> L.
6	<i>Echinops ritro</i> L.		

Tableau 1. Les différents extraits alcooliques des espèces des Aurès

L'organigramme suivant montre les différentes étapes d'extraction des différentes espèces des Aurès;

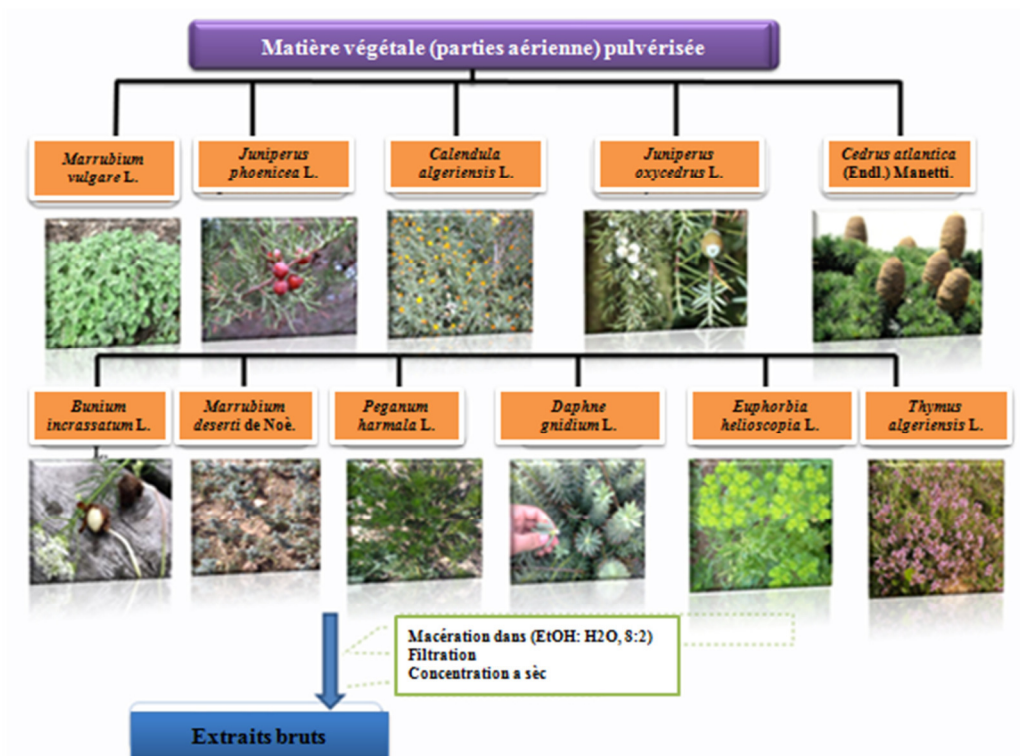


Figure 4. Organigramme récapitulatif d'extraction des différentes espèces des Aurès

VI.7. Protocoles utilisés

VI.7.1. Teneurs en eau

Les différentes espèces sèches ; *Cedrus atlantica* (Endl.) Manetti., *Juniperus oxycedrus* L., *Juniperus phoenicea* L. et *Thymus algeriensis* L., ont été bien broyées à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à obtention d'une poudre homogène. Ensuite 2,0 g de chaque espèce a été placée à l'étuve à 105°C pendant 48 heures. La teneur en eau a été calculée en utilisant la relation suivante ;

$$\text{Teneur en eau (\%)} = (M_1 - M_2) * 100 / M_0$$

M_1 : masse (en g) de la capsule avec l'échantillon avant la déshydratation.

M_2 : masse (en g) de la capsule avec l'échantillon après la déshydratation.

M_0 : masse (en g) de l'extrait avant la déshydratation (Audigie et al., 1978).

VI.7.2. Minéralisation

Tous les échantillons (21 extraits) ont été pesés (0,25 g) et minéralisés avec 2,5 ml d'acide nitrique (69%) et 1,5 ml d'eau ultra pure. Les réacteurs ont été placés dans un système micro-onde à 220°C et sous une de pression de 20 bars. Les réacteurs ont été ensuite refroidis à 50-60°C. La durée de cette opération était d'environ 1h.



Figure 5. Préparation des échantillons à minéraliser

Après refroidissement, les extraits minéralisés (minéralisâtes) ont été transférés dans des tubes à essai déjà pesés. Les résultats ont été exprimés en effectuant une correction au moyen d'un échantillon blanc préparé avec uniquement 2,5 ml d'acide nitrique et 1,5 ml de l'eau ultra pure pour les extraits et 4 ml d'acide nitrique pour les espèces sèches.

VI.7.3. Analyse par ICP-AES

Le dosage a été ensuite effectué avec un spectromètre à émission atomique à plasma induit ou ICP-AES. Le plasma est produit par un phénomène d'induction dans une torche localisée à l'intérieur d'une bobine. Il est amorcé grâce à une décharge électrique qui produit des électrons libres et des ions d'argon. Ces espèces sont soumises au champ magnétique créé dans la bobine d'induction. Les électrons sont accélérés dans le champ magnétique et produisent un courant induit. Avec les ions, ils produisent des collisions qui créent et entretiennent le plasma et qui produisent aussi l'atomisation, l'excitation et l'ionisation.

L'échantillon est entraîné dans ce plasma. Les métaux sont atomisés à des températures pouvant atteindre 10000 K et émettent de l'énergie lumineuse à des longueurs d'onde qui sont spécifiques. La lumière émise est séparée par un réseau dispersif et son intensité est mesurée à l'aide d'un détecteur solide à canaux multiples. Les concentrations des éléments en solution sont déterminées en comparant les intensités lumineuses respectives de l'échantillon et des solutions étalons.

Les résultats ont été par la suite reportés à l'échantillon en mg/kg.

VI.7.4. Analyse par ICP-MS

Toutes les solutions obtenues (21 solutions) après minéralisation (minéralisâtes) ont été diluées 10 fois. On a prélevé 400 µl de chaque solution (minéralisâtes) et on y ajoutait 40 µL d'indium à 1ppm qui est utilisé comme standard interne. On a complété avec de l'eau ultra pure jusqu'à 4,0 ml. Finalement, tous les échantillons ont été analysés par ICP/MS qui permette de déterminer et quantifier les éléments inorganiques les moins concentrés dans les échantillons.

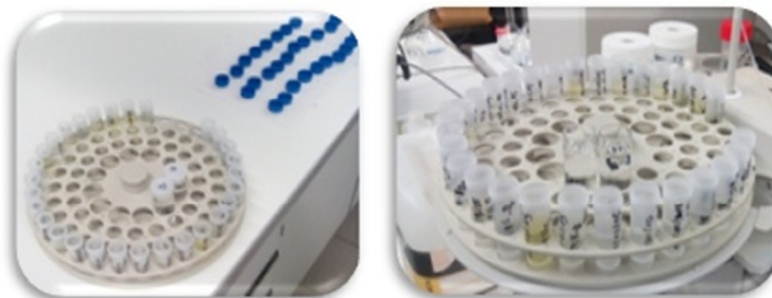


Figure 6. Préparation des échantillons à analyser par ICP/MS

VI.8. Résultats et discussion

VI.8.1. Teneurs en eau

Les résultats obtenus ont montré que l'espèce *T. algeriensis* a présenté la plus grande teneur en eau (13,7%) suivi par *C. atlantica* (11,5%). Les deux autres espèces *J. oxycedrus* et *J. phoenicea* ont présenté presque la même teneur en eau (9,2 et 9,8%), ceci étant probablement dû à leurs appartenances au même genre (*Juniperus*).

Plante	Teneur en eau (%)
<i>Cedrus atlantica</i> (Endl.) Manetti.	11,58
<i>Juniperus oxycedrus</i> L.	9,23
<i>Juniperus phoenicea</i> L.	9,82
<i>Thymus algeriensis</i> L.	13,74

Tableau 2. Teneurs en eau de quatre espèces des Aurès

VI.8.2. Analyse minérale ICP-AES et ICP-MS

Les diagrammes suivants montrent les masses prélevées des plantes sèches et des différents extraits végétaux et des minéralisates après minéralisation; la spectroscopie d'émission atomique par plasma à couplage inductif ICP-AES et ICP-MS a été utilisée pour la détermination des principaux éléments majeurs et mineurs présents dans les différentes plantes et extraits végétaux issus de plantes algériennes médicinales et aromatiques sahariennes et des régions des Aurès.

Pour les différents échantillons, les limites de détection (LOD) les plus basses ont été enregistrés pour les éléments : V, Ti, B, Ba, Cr, Cu, Fe, Si et Zn (2 à 10 mg/kg), moyennes pour : Al, K, Mg, Mn, Na, P, S, (10 à 100 mg/kg) et les plus hautes pour le calcium Ca (>100 mg/kg).

Les résultats obtenus ont montré que les éléments : K, S, Ca, Mg et Na ont été les principaux éléments présents dans nos échantillons, cela peut nous confirmer leurs importances dans le domaine de la santé et dans l'alimentation. Les résultats ont montré que les quatre espèces *C. atlantica*, *J. oxycedrus*, *J. phoenicea* et *T. algeriensis* sont riches en Calcium (Ca). Les espèces *P. harmala*, *C. algeriensis*, *M. vulgare*, *M. deserti*, *E. ritro* et *B. incrassatum* sont plus riches en élément potassium (K). Les extraits bruts de *D. gnidium* et *C. atlantica* sont riches en éléments de magnésium (Mg). *C. algeriensis* et les extraits organiques de *P. inuloides* sont riches en sodium (Na).

Les résultats des limites de détection (LOD) de quelques éléments-traces analysés par ICP-MS sont présentés dans le tableau 3 :

Espèces /Extraits		LOD (mg/Kg)									
		B	Cr	Ba	Fe	Al	Mg	Na	P	S	Ca
<i>P. inuloides</i> P. aériennes	CHCl ₃	-	-	-	-	-	-	44,69	-	45,08	251,69
	AcOEt	-	-	-	-	-	28,81	13,20	9,63	12,03	67,17
	<i>n</i> -BuOH	-	-	-	-	8,54	23,69	10,85	7,92	13,31	74,34
<i>P. inuloides</i> P. racines	CHCl ₃	-	-	-	4,46	9,38	26,03	11,93	8,71	21,18	118,24
	AcOEt	-	-	-	-	-	45,83	20,99	15,32	10,95	61,13
	<i>n</i> -BuOH	-	-	-	-	-	50,37	23,07	16,84	23,28	-
<i>C. atlantica</i>	Sèche	5,55	-	-	6,41	13,50	37,45	17,15	12,52	17,31	96,62
<i>J. oxycedrus</i>	Sèche	-	-	8,67	6,67	14,03	38,92	17,83	13,01	17,99	100,42
<i>J. phoenicea</i>	Sèche	-	-	-	7,72	16,24	45,06	20,64	15,07	20,83	116,27
<i>T. algeriensis</i>	Sèche	5,89	4,50	8,86	6,81	14,32	39,74	18,21	13,29	18,37	102,55
<i>P. harmala</i>	EtOH	-	-	-	-	-	48,76	22,34	16,31	22,54	125,82
<i>C. algeriensis</i>	EtOH	-	-	-	-	-	41,31	18,92	13,81	19,09	106,58
<i>M. vulgare</i>	EtOH	-	-	-	-	-	41,08	18,82	13,74	18,99	106,00
<i>E. ritro</i>	EtOH	-	-	-	-	-	51,53	23,60	17,23	23,81	132,95
<i>M. deserti</i>	EtOH	-	-	-	-	-	57,07	26,14	19,08	26,37	147,25
<i>E. helioscopia</i>	EtOH	-	-	-	-	-	51,29	23,49	17,15	23,70	132,33
<i>D. gnidium</i>	EtOH	7,92	-	-	-	-	53,37	24,45	17,85	24,66	137,70
<i>J. oxycedrus</i>	EtOH	-	-	-	-	-	30,00	13,74	10,03	13,86	77,40
<i>J. phoenicea</i>	EtOH	-	-	-	-	-	46,74	21,41	15,63	21,60	120,60
<i>C. atlantica</i>	EtOH	6,79	-	-	-	-	45,77	20,96	15,30	21,15	118,08
<i>B. incrassatum</i>	EtOH	-	-	-	-	-	47,02	21,54	15,72	21,73	121,33

Tableau 3. Limites de détection (LOD) de quelques éléments analysés par ICP-MS (mg/Kg)

Les résultats de l'analyse des éléments inorganiques (majeurs et traces) sont présentés dans les figures 7 et 8 ci-dessous ;

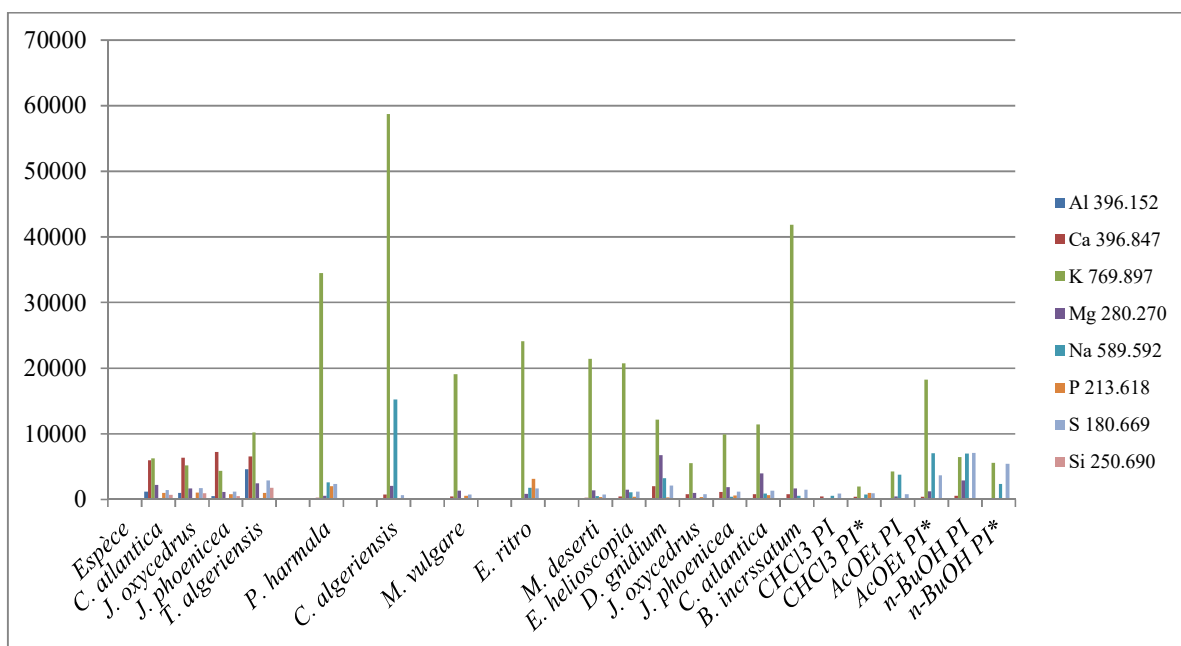


Figure 7. Diagramme de concentrations en éléments majeurs dans les différents échantillons des espèces (mg/kg) (PI ; *P. inuloides*, parties aériennes, PI* ; parties racines)

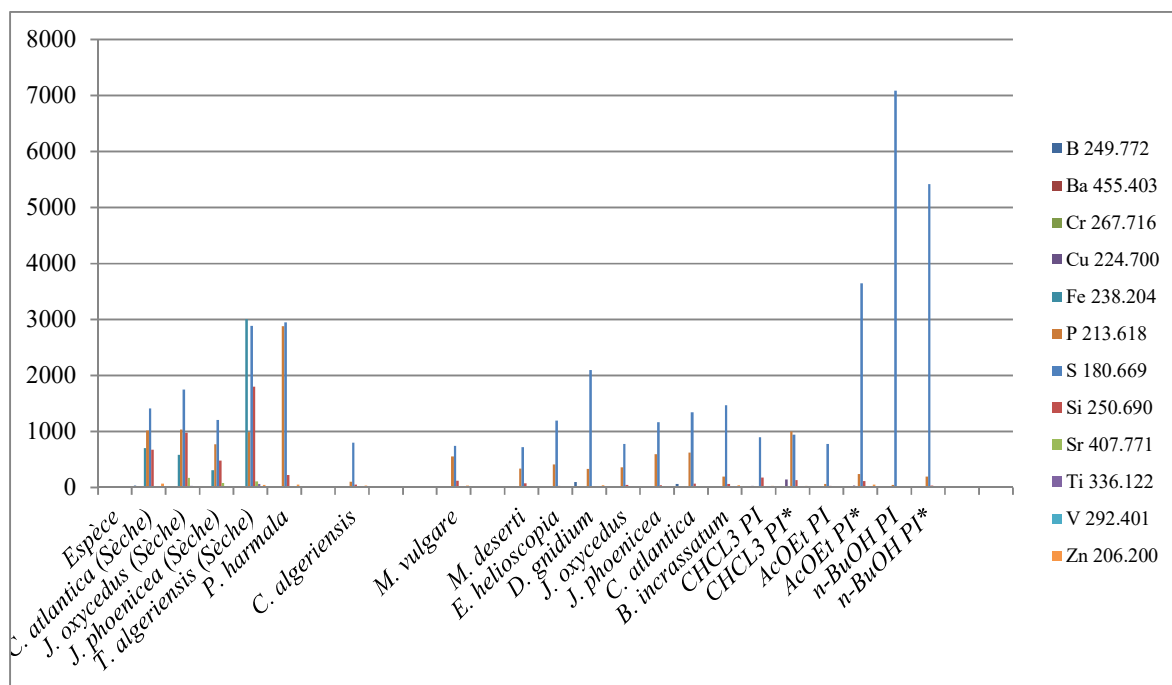


Figure 8. Diagramme de concentrations en éléments mineurs (traces) dans les différents échantillons des espèces (mg/kg) (PI ; *P. inuloides*, parties aériennes, PI* ; parties racines)

VI.9. Conclusion

L'ICP-AES et l'ICP-MS sont deux méthodes rapides et sensibles pour la détection de divers éléments inorganiques contenus dans les différentes espèces étudiées et provenant de la région des Aurès.

Dans notre étude, l'ICP-MS a été réalisée pour déterminer les différents éléments inorganiques se trouvant en faibles concentration, tandis que l'ICP-AES a été réalisée pour déterminer les éléments présents à des teneurs plus élevées.

Les résultats obtenus de notre étude ont montré que les tous les échantillons (espèces) contenaient plusieurs éléments à la fois (Na, Mg, Al, Si, P, S, k, Ca, Mn, Zn, B, Ba, ...etc).

Les éléments K, S, Ca, Mg et Na sont les principaux éléments présents dans les échantillons qui sont essentiels pour la santé et la quantification de ces éléments est importante pour des fins nutritionnels.

Nos résultats ont montré que les concentrations de métaux lourds (Cu, Cr, Zn, ...etc) dans nos échantillons étaient relativement faibles.

En comparant le contenu total des éléments dans les 21 extraits issus des espèces médicinales et aromatiques algériennes que nous avons étudiées, nous avons constaté que la distribution des éléments dans les échantillons était différente, ce qui indique que le genre, la famille et la région de récoltes influent sur la teneur des éléments inorganiques dans les plantes.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

L'objet de notre travail a porté sur l'étude phytochimique, biologique et analytique de deux espèces médicinales et aromatiques de la région des Aurès et du Sahara Algérienne, *Cistus albidus* (Cistacées) et *Pulicaria inuloides* (Astéracées) qui sont utilisées en médecine traditionnelle pour traiter plusieurs pathologies.

Dans le premier chapitre, nous avons présenté une étude bibliographique sur toutes les espèces qui ont été récoltés dans les régions des Aurès (*Cistus albidus*, *Euphorbia helioscopia*, *Echinops ritro*, *Juniperus oxycedrus*, *Marrubium vulgare*, *Juniperus phoenicea*, *Marrubium deserti* de Noè., *Peganum harmala*, *Calendula algeriensis*, *Cedrus atlantica*, *Daphne gnidium* et *Bunium incrassatum*) et au Sahara algérien (*Pulicaria inuloides*).

Dans le deuxième chapitre, nous avons effectué une étude biologique *in vitro* (activité antioxydant, antibactérienne, dosage des polyphénols, flavonoïdes et flavonols) sur tous les extraits hydro alcooliques et organiques issus de ces espèces. Les résultats obtenus ont montré des activités antioxydantes importantes des extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol des espèces *P. inuloides* et *C. albidus* ainsi que les extraits hydroalcooliques d'*Euphorbia helioscopia* et *Peganum harmala*, Les extraits de *P. inuloides* et *C. albidus* ont montré une activité antibactérienne modérés par comparaison avec les standards utilisés.

Dans le troisième chapitre, l'étude phytochimique des parties aériennes de *P. inuloides* et *C. albidus* a permis d'isoler ; douze (12) composés naturelles, parmi lesquels onze flavonoïdes et un composé phénolique. Nous avons obtenu deux nouveaux dérivés par acétylation d'un flavonoïde isolé de l'espèce *P. inuloides*. La détermination structurale de tous ces composés a été réalisée en utilisant les méthodes spectrales telles que les spectroscopies UV-Visible, IR et RMN mono et bidimensionnelle (1H, 13C, COSY, ROESY, NOESY, HSQC et HMBC), ainsi que le couplage LC-MS, pour certains composés.

Les composés identifiés sont indiqués ci-dessous :

- ✓ Composé **1** : Quercétagétine 3,5,7,3'-tétraméthyléther
- ✓ Composé **2** : 6-Acetoxy-4'-hydroxyl-3,5,7,3'-tetramethoxyflavone
- ✓ Composé **3** : 6,4'-Diacetoxy-3,5,7,3'-tetramethoxyflavone
- ✓ Composé **4** : 6-hydroxy kaempferol 3, 7-diméthyl éther
- ✓ Composé **5** : 3,7-Dimethylquercetagetin
- ✓ Composé **6** : 4',6-Dihydroxy-3,5,7-trimethoxy-flavone
- ✓ Composé **7** : Quercetagetin 3,5,7-trimethyl ether
- ✓ Composé **9** : 4'-hydroxy-3,5,6,7-tetramethoxyflavone
- ✓ Composé **11** : Quercetin-3,5-dimethylether (Caryatine)
- ✓ Composé **12** : Isokaempferid
- ✓ Composé **13** : kaempferol
- ✓ Composé **14** : Methyl paraben
- ✓ Composé **15** : Genkwanine
- ✓ Composé **16** : Quercétine

Nous avons également décrit dans ce travail l'évaluation anti protozoaire *in vitro* des parties aériennes de *P. inuloides* et *C. albidus* contre *Leishmania amazonensis*, *Trypanosoma cruzi* et *Acanthamoeba castellanii str. Neff*. Le fractionnement bioguidé de l'extrait CHCl₃ de l'espèce *P. inuloides* a conduit à l'isolement et à la caractérisation de la quercétagétine-3,5,7,3'-tétraméthyléther (**1**) en tant que composant principal. Deux dérivés acétylés ont été préparé à partir de ce composé. Ces composés ont présenté une activité leishmanienne modérée avec des valeurs IC₅₀ allant de 0,234 à 0,484 mM pour la forme promastigote, ainsi que de faibles niveaux de toxicité sur les macrophages (CC₅₀ allant de 0,365 à 0,664 mM). Les fractionnements bioguidés des extraits CHCl₃ et AcOEt de l'espèce *C. albidus* ont conduit à l'isolement de deux fractions actives F6,4, F6,5 pour le premier et une fraction active F14A pour le second. Ces fractions sont actives jusqu'à 100 µg/ml.

Nous avons également décrit dans ce travail l'étude de la composition chimique des huiles essentielles des parties aériennes des deux espèces *P. inuloides* et *C. albidus*. L'extraction de ces huiles essentielles a été effectuée par la méthode de l'entraînement à la vapeur d'eau et l'analyse de leurs compositions chimiques a été effectuée par GC-MS. Les résultats ont montré l'identification de 11 composés à partir de l'huile essentielle de *C. albidus*, dont les plus importants sont ; 15,16-dinorlabd-8(20)-en-13-one (22,31%), l'acide méthacrylique (17,3%) et le diterpène oxygéné manool (12,4%). Les résultats ont également révélé la présence de 44 composés dans l'huile essentielle de *P. inuloides* dont les composés majoritaires sont des sesquiterpènes hydrocarbonés ; le δ-cadinene (24%), l'α-muurolene (7,8%), γ-cadinene (6,6%), α-epi-cadinol (15%) et l'α-cadinol (12,7%).

La détermination des éléments inorganiques dans les extraits de toutes les espèces décrites dans ce travail (21 extraits) a été effectuée par spectroscopie d'émission atomique (ICP-AES) et spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS). Les résultats obtenus ont montré que tous les extraits contenaient à la fois beaucoup d'éléments (Na, Mg, Al, Si, P, S, K, Ca, Mn, Zn, B, Ba, Ag, Pb,...etc) avec des pourcentages variables et ont montré aussi des concentrations faibles en métaux lourds.

Nos perspectives de recherche pour le futur sont les suivantes :

- Poursuivre l'étude phytochimique des espèces *P. inuloides* et *C. albidus* afin d'isoler d'autres métabolites secondaires contenus dans les extraits et l'étude des compositions chimiques des huiles essentielles isolées des autres espèces décrites dans ce travail.
- Poursuivre les évaluations biologiques *in vitro* et *in vivo* de tous les extraits décrits dans ce travail ainsi que les molécules pures obtenues afin de mettre en évidence des relations structure-activité.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Aaby K, Ekeberg D, Skrede G. 2007. Characterization of phenolic compounds in strawberry (*Fragaria×ananassa*) fruits by different HPLC detectors and contribution of individual compounds to total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**: 4395-4406.

Abasova RL, Aslanov SM, Mamedova ME. 1995. Amino acids of *Calendula officinalis*. *Chemistry of Natural Compounds* **30**: 641-661.

Abou-Gazar H, Bedir E, Takamatsu S, Ferreira D, Khan IA. 2004. Antioxidant lignans from *Larrea tridentata*. *Phytochemistry* **65**(17): 2499-2505.

Abrahams S, Lee E, Walker AR, Tanner GJ, Larkin PJ, Ashton AR. 2003. The arabidopsis TDS4 gene encodes leucoanthocyanidin dioxygenase (LDOX) and is essential for proanthocyanidin synthesis and vacuole development. *Plant Journal* **35**(5): 624-636.

Adams RP. 1998. The leaf essential oils and chemotaxonomy of *Juniperus* sect *Juniperus*. *Biochemical Systematics and Ecology* **26**: 637-645.

Adams RP. 2014. *Junipers of the World: The Genus Juniperus*, 4th edn, Trafford Publishing Co, Bloomington.

Adegoke AA, Iberi PA, Akinpelu DA, Aiyegoro OA, Mbotto CI. 2010. Studies on phytochemical screening and antimicrobial potentials of *Phyllanthus amarus* against multiple antibiotic resistant bacteria. *International Journal of Applied Research in Natural Products* **3**(3): 6-12.

Adinarayana D, Ramachandraiah P. 1984. Methylated flavonols of *Rhynchosia rufescens*. *Pharmazie* **39**: 714-715.

Ahmed AA, Ahmed AM, Toshiyuki T, Munekazu I. 1994. Two methylated flavonols from *Jasonza candicans*. *Phytochemistry* **35**(1): 241-243.

Ait Youssef M. 2006. *Plantes Médicinales de Kabylie*. *Ibis Press* 177-179.

Al-Dabbas MM, Al-Ismail K, Abu-Taleb R, Hashimoto F, Rabah IO, Kitahara K, Fujita K, Sukanuma T. 2011. Chemistry and antiproliferative activities of 3-methoxyflavones isolated from *Varthemia iphionoides*. *Chemistry of Natural Compounds* **47**(17): 17-21.

Al-Fatimi M, Awadh Ali NA, Wurster M, Al-Sokari SS, Lindequist U, Setzer WS. 2015. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil of *Pulicaria Jaubertii* from south Yemen. *World Journal of Pharmaceutical Research* **4**(12): 1-9.

Algabr MN, Mekkiou R, Ameddah S, Menad A, Boumaza O, Seghiri R, Benayache S, Benayache F. 2010. Antioxydant activities from the aerial parts of *Pulicaria jaubertii*. *Advances in Natural Applied Science* **4**(1): 63-70.

Al-Hajj NQM, Ma C, Thabit R, Al-alfarga A, Gasmalla MAA, Musa A, Aboshora W, Wang H. 2014. Chemical composition of essential oil and mineral contents of *Pulicaria inuloides*. *Journal of Academia and Industrial Research* **2**(12): 675-678.

Alhajj NQM, Wang HX, Gasmalla MAA, Ma C, Thabit R, Rahman MTR, Tang Y. 2014b. Chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Pulicaria inuloides*. *Journal of Food and Nutrition Research* **2**(5): 221-227.

Al-Hajj NQM, Wang HX, Ma C, Lou Z, Bashari M, Thabit R. 2014b. Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Essential Oils of Some Aromatic Medicinal Plants (*Pulicaria inuloides*-Asteraceae and *Ocimum forskolei*-Lamiaceae). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* **13**(8): 1287-1293.

Ali BH, Al-Wabel N, Blunden G. 2005. Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of *Hibiscus sabdariffa* L.: a review. *Phytotherapy Research* **19**(5): 369-375.

Al-Khalil S. 1995. A survey of plants used in Jordanian traditional medicine. *International Journal of Pharmacognosy* **33**(4): 317-323.

Allali H, Benmehdi H, Dib MA, Tabti B, Ghalem S, Benabadji N. 2008. Phytotherapy of diabetes in west Algeria. *Asian Journal of Chemistry* **20**(4): 2701.

Al-Naqeb G. 2015. Antioxidant and antibacterial activities of some Yemeni medicinal plants. *International Journal of Herbal Medicine* **3**(3): 06-11.

Al-Yahya MA, El-Sayed AM, Mossa JS, Kozlowski JF, Antoun MD, Ferin M, Baird WM, Cassady JM. 1988. Potential cancer chemopreventive and cytotoxic agents from *Pulicaria crispa*. *Journal of Natural Products* **51**(3): 621-624.

Al-Yahya MA, Khafagy S, Shihata A, Kozlowski JF, Antoun MD, Cassady JM. 1984. Phytochemical and biological screening of Saudi medicinal plants. Part 6. Isolation of 2-alpha-hydroxyalantolactone the antileukemic principle of *Francoeuria crispa*. *Journal of Natural Products* **47**(6): 1013-1017.

Amri B, Martino E, Vitulo F, Corana F, Ben-Kaâb LB, Rui M, Rossi D, Mori M, Silvia R, Collina S. 2017. *Marrubium vulgare* L. Leave extract: Phytochemical composition, antioxidant and wound healing properties. *Molecules* **22**(11): 1851.

Anderberg AA. 1991. Taxonomy and phylogeny of the tribe Inuleae (Asteraceae). *Plant Systematics and Evolution* **176**(1): 75-123.

Angelopoulou D, Demetzos C, Dimas C, Perdetzoglou D, Loukis A. 2001. Essential oils and hexane extracts from leaves and fruits of *Cistus monspeliensis*. Cytotoxic activity of ent-13-epi-manoyl oxide and its isomers. *Planta Medica* **67**(2): 168-171.

Appendino G, Ozent Hc, Jakupovic J. 1994. Prenylated isocoumarins from *Bunium paucifolium*. *Phytochemistry* **36**: 531-532.

Appendino G, Ozent Hc, Lusso P, Cisero M. 1991. Sesquiterpene ketal from *Bunium paucifolium*. *Phytochemistry* **30**: 3467-3468.

Araya JE, Neira I, Silva S, Mortara RA, Manque P. 2003. Diterpenoids from *Azorella compacta* (Umbelliferae) active on *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **98**: 413-418.

Arima H, Danno G. 2002. Isolation of antimicrobial compounds from guava (*Psidium guajava* L.) and their structural elucidation. *Biosci Biotechnol Biochem* **66**(8):1727-1730.

Arnould-Taylor WE. 1981. *Aromatherapy for the Whole Person*. UK: Stanley Thornes 22-26.

Audigie C, Figarella J, Zonszaain F. 1978. Manipulation d'analyse biochimique. Do in (Ed). Paris, 274.

Ayyanar M, Subash-Babu P. 2012. *Syzygium cumini* (L.) Skeels: A review of its phytochemical constituents and traditional uses. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **2**(3): 240-246.

Barla A, Irman HB, Kultur S, Oksuz S. 2006. Secondary metabolites from *Euphorbia helioscopia* and their vasodepressor activity. *Turkish Journal of Chemistry* **30**: 325-332.

Barrajón-Catalán E, Fernández-Arroyo S, Saura D, Guillén E, Fernández-Gutiérrez A, Segura-Carretero A, Micol V. 2010. Cistaceae aqueous extracts contain in ellagitannins show antioxidant and antimicrobial capacity, and cytotoxic activity against human cancer cells. *Food and Chemical Toxicology* **48**: 2273-2282.

Barrero AF, Quilez del Moral JF, Herrador MM, Akssira M, Bennamara A, Akkad S, Aitigri M. 2004. Oxygenated diterpenes and other constituents from Moroccan *Juniperus phoenicea* and *Juniperus thurifera* var. *africana*. *Phytochemistry* **65**(17): 2507-2515.

Barrero AF, Quilez del Moral JF, Herrador MM, Arteaga JF, Akssira M, Benharref A, Dakir M. 2005. Abietane diterpenes from the cones of *Cedrus atlántica*. *Phytochemistry* **66**(1): 105-111.

Barros L, Duenas M, Alves CT, Silva S, Henriques M, Santos-Buelga C, Ferreira ICFR. 2013. Antifungal activity and detailed chemical characterization of *Cistus ladanifer* phenolic extracts. *Industrial Crops and Products* **41**:41-45.

Baxter IR, Young JC, Armstrong G, Foster N, Bogenschutz N, Cordova T, Peer WA, Hazen SP, Murphy AS, Harper JF. 2005. A plasma membrane H⁺-ATPase is required for the formation of proanthocyanidins in the seed coat endothelium of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America (PNAS)* **102**(7): 2649-2654.

Bayoub K, Baibai T, Mountassif D, Retmane A, Soukri A. 2010. Antibacterial activities of the crude ethanol extracts of medicinal plants against *Listeria monocytogenes* and some other pathogenic strains. *African Journal of Biotechnology* **9**: 4251-4258.

Baytop T. 1984. *Therapy with medicinal plants in Turkey*. University Press, Istanbul 385-386.

Belhadj MM, Abedini A, Gangloff SC, Kabouche A, Kabouche Z, Voutquenne-Nazabadioko L. 2017. A new δ -tocotrienolic acid derivative and other constituents from the cones of *Cedrus atlantica* and their *in vitro* antimicrobial activity. *Phytochemistry Letters* **20**: 252-258.

- Bellakhdar J. 1997a. La Pharmacopée marocaine traditionnelle. Médecine arabe ancienne et savoirs populaires. Ibis Press, Paris 529-530.
- Bellakhdar J. 1997b. La pharmacopée marocaine traditionnelle: Médecine arabe ancienne et savoirs populaires. France, Ibis Press.
- Beloula, A. 2008. Inventaire floristique et Faunistique au niveau des Falaises (Escarpement Rocheux), Parc National de Belezma.
- Ben Jemia M, Kchouk ME, Senatore F, Autore G, Marzocco S, De Feo V, Bruno M. 2013. Antiproliferative activity of hexane extract from Tunisian *Cistus libanotis*, *Cistus Monspeliensis* and *Cistus villosus*. *Chemistry Central Journal* 7(1): 47.
- Ben Mohamed Maoulainine L, Jelassi A, Hassen I, Ould Mohammed Salem Ould Boukhari A. 2012. Antioxidant proprieties of methanolic and ethanolic extracts of *Euphorbia helioscopia* (L.) aerial parts. *Int Food Res J* 19(3): 1125-1130.
- Benhouhou S. 2005. A Guide to Medicinal Plants in North Africa *Pulicaria incisa* (Lam.) DC IUCN, Malaga 195-196.
- Bergendorff O, Sterner O. 1995. Spasmolytic flavonols from *Artemisia abrotanum*. *Planta Medica* 61(4): 370-371.
- Berkane, A. et Yehiaoui, A. 2007. L'érosion dans les Aurès. Article scientifique: Sécheresse 18(3): 213- 216.
- Betancur-Galvis L, Morales GE, Forero JE, Roldan J. 2002. Cytotoxic and antiviral activities of Colombian medicinal plant extracts of the *Euphorbia* genus. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio De Janeiro* 97(4): 541-546.
- Bhakuni DS, Chaturvedi R. 1984. Chemical constituents of *Crotalaria madurensis*. *Journal of Natural Products* 47(4): 585-591.
- Bohlmann F, Czerson H. 1976. Polyacetylenverbindungen, 240. Über die inhaltsstoffe von *serratula wolfii andrae*. *Chemische Berischte* 109(6): 2291-2295.
- Bohm BA, Stuessy TF. 2001. Flavonoids of the sunflower family. Austria: Springer-Verlag/Wien.
- Boskabady MH and Moghaddas A. 2004. Antihistaminic effect of *Bunium persicum* on Guinea Pig Tracheal Chains. *Iranian Biomedical Journal* 8(3): 149-155.
- Bouchra C, Mohamed A, Mina IH, Hmamouchi M. 2003. Antifungal activity of essential oils from several medicinal plants against four postharvest *citrus* pathogens. *Phytopathologia Mediterranea* 42(3): 251-256.
- Boudarene L, A. Baaliouamer A, Meklati BY. 2001. Application of GC and GC/MS in the analysis of Algerian *Cedrus* essential oils. 6th International Conference on Chemistry and its Role in Development (ICCRD), Mansourah, Egypt 17-20.
- Boudarene L. 1991. Analyse d'huiles essentielles d'aiguilles de Cedre de l'Atlas'poussant en Algerie, Master Thesis, Algeria (U.S.T.H.B.).

- Bouhlal K, Meynadier JM., Peyron JL, Peyron L, Marion JP, Bonetti G, Meynadier J. 1988. Le cade en dermatology. *Parfums Cosmetiques Aromes* **83**: 73-82.
- Bousetla A, Zellagui A, Derouiche K, Rhouati S. 2015. Chemical constituents of the roots of Algerian *Bunium incrassatum* and evaluation of its antimicrobial activity. *Arabian Journal of Chemistry* **8**(3): 313-316.
- Boxi M, Rajesh Y, Raja Kumar V, Praveen B, Mangamma K. 2010. Extraction, phytochemical screening and *invitro* evaluation of antioxidant properties of *Commicarpus chinensis* (aqueous leaf extract). *International Journal of pharma and bio sciences* **1**: 537-547.
- Bragg LH, Bacon JD, McMillan C, Mabry TJ. 1978. Flavonoid patterns in the. *Prosopis Juliflora* complex. *Biochemical Systematics and Ecology* **6**(2): 113-116.
- Bramati L, Minoggio M, Gardana C, Simonetti P, Mauri P, Pietta P. 2002. Quantitative characterization of flavonoid compounds in rooibos tea (*Aspalathus linearis*) by LC-UV/DAD. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**(20): 5513-5519.
- Bravo L, Ph.D. 1998. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Lead Review Article* **56**(11): 317-333.
- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Internationa Journal of Food Microbiology* **94**(3): 223-253.
- Butnariu M, Coradini CZ. 2012. Evaluation of biologically active compounds from *Calendula officinalis* flowers using spectrophotometry. *Chemistry Central Journal* **35**(6): 1-7.
- Williams CA, Harborne JB, Greenham J. 2000. Geographical variation in the surface flavonoids of *Pulicaria dysenteria*. *Biochememical Systemtics and Ecology* **28**(7): 679-687.
- Cabezudo B, Navarro T, Pérez Latorre AV, Nieto Caldera JM, Orshan G. 1992. Estudios Fenomorfológicos En La Vegetación Del Sur De España. I. *Cistus* L. *Acta Botanica Malacitana* **17**: 229-237.
- Cabrera-Serra MG, Lorenzo-Morales J, Romero M, Valladares B, Piñero JE. 2007. *In vitro* activity of perifosine: a novel alkylphospholipid against the promastigote stage of *Leishmanias pecies*. *Parasitology Research* **100**(5): 1155-1157.
- Çalis I, Hosny M, Khalifa T, Ruedi P. 1992. Phenylpropanoid glyco-sides from *Marrubium alysson*. *Phytochemistry* **31**(10): 3624-6.
- Canard D, Perru O, Devillar C. 1997. Terpene composition variations in diverse provenances of *Cedrus libani* (A) Rich, and *Cedrus atlantica* Manetti. *Trees* **11**(8): 504-510.
- Carbonelle B, Denis F, Marmonier A, Pinon G, Varguas R. 1987. Bactériologies médicales: techniques usuelles. Edition SIMEP (2^{ème} tirage), Paris, France 121-136.
- Chaabane F, Pinon A, Simon A, Ghedira K, Chekir-Ghedira L. 2013. Phytochemical potential of *Daphne gnidium* in inhibiting growth of melanoma cells and enhancing melanogenesis of B16-F0 melanoma. *Cell Biochemistry and Function* **31**(6): 460-467.

Chaker S. 1990. Aurès (linguistique), Encyclopédie berbère, viii, Aix-en-Provence, Edisud 1162-1169.

Charnot A. 1945. La toxicologie au Maroc. Mémoire de la Soc. Sci Nat du Maroc, Rabat. Edition Siège de l'I S 717.

Chaudhari LKD, Jawale BA, Sharma S, Sharma H, Kumar CDM, Kulkarni PA. 2012. Antimicrobial activity of commercially available essential oils against *Streptococcus mutans*. *Journal of Contemporary Dental Practice* **13**(1): 71-74.

Chaves N, Sosa T, Escudero JC. 2001. Plant growth inhibiting flavonoids in exudate of *Cistus ladanifer* and in associated soils. *Journal of Chemistry and Ecology* **27**(3): 623-631.

Chen Y, Tang ZJ, Jiang FX, Zhang XX, Lao AINA. 1979. Studies on the active principles of Ze—Qi (*Euphorbia helioscopia* L.), a drug used for chronic bronchitis. *Yao Hsueh Hsueh Pao* **14**(2): 91-95.

Chen, et al., 2001. Lexicon of active components in plants, 1: medicinal science and technology press of China, Beijing.

Chevrier M, Abdel Gawad M, Raynaud, J. 1975. Unsaponifiable, fatty acids of *Echinops ritro*. *Pharmazie* **30**: 389-390.

Chevrier M, Abdel Gawad M. 1974. Alkanes from *Echinops ritro* L. (Compositae). *Bulletin de la Société de Pharmacie de Lyon* **18**: 58-65.

Chevrier M. 1976. The flavonoids of *Echinops ritro*. *Fitoterapia* **47**: 115-117.

Chiale CA, Cabrera JL, Juliani HR. 1991. Kaempferol. 3-(6''-Czs-cinnamoylglucoside) from *Solanum elaeagnifolium*. *Phytochemistry* **30**(3): 1042-1043.

Chin YW and Kim J. 2006. Three new flavonol glycosides from the aerial parts of *Rodgersia podophylla*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **54**(2): 234-236.

Chiu CY, Li CY, Chiu CC, Niwa M, Kitanaka S, Damu AG, Lee EJ, Wu TS. 2005. Constituents of leaves of *Phellodendron japonicum* MAXIM and their antioxidant activity. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* (Tokyo) **53**(9): 1118-1121.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2012. Reference method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A6, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Penn, USA.

CNRS délégation Alsace <http://www.alsace.cnrs.fr/video.zspx>

Comandini O, Contu M, Rinaldi AC. 2006. An overview of *Cistus* ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* **16**(6):381-395.

Comte G, Vercauteren J, Chulia AJ, Allais DP, Delagea C. 1997. Phenylpropanoids from leaves of *Juniperus phoenicea*. *Phytochemistry* **45**(8): 1679-1682.

Cottiglia F, Loy G, Garau D, Floris C, Casu M, Pompei R, Bonsignore L. 2001. Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of *Daphne gnidium* L. *Phytomedicine* **8**(4): 302-305.

Csapi B, Hajdú Z, Zupkó I, Berényi A, Forgo P, Szabó P, Hohmann J. 2010. Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea arenaria*. *Phytotherapy Research* **24**(11): 1664-1669.

Da Silva BP, Bernardo RR, Parente JP. 2000. Flavonol glycosides from *Costus spicatus*. *Phytochemistry* **53**(1): 87-92.

Dabena H .1997. Infectiologie de A à Z. Ed. Arnette, France 500-502.

Dakir M, El-Hanbali F, Mellouki F, Akssira M, Benharref A, Quilez Del Moral JF, Barrero AF. Antibacterial diterpenoids from *Cedrus atlántica*. 2004. *Natural Product Research* **19**(7): 719-722.

Davis PH, Mill RR, Tan Kit (eds.). 1988. Flora of Turkey and the east Aegean islands. University Press, Edinburgh **10**: 513-539.

Dawit A and Ahadu A. 1993. Medicinal plants and enigmatic health practices of northern Ethiopia. Birhanena Selam, Addis Ababa 37-44, 83-89.

De Pascual Teresa J, Urones JGMarcos IS, Barcala PB, Garrido NM. 1986. Diterpenoid and other components of *Cistus laurifolius*, *Phytochemistry* **25**(5): 1185-1187.

De Rosa S, Mitova M, Handjieva N, Caliş I. 2002. Coumarin glucosides from *Cruciata taurica*. *Phytochemistry* **59**(4): 447-450.

Deiana M, Rosa A, Casu V, Cottiglia F, Bonsignore L, Dessì MA. 2003. Chemical composition and antioxidant activity of extracts from *Daphne gnidium* L. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **80**(1): 65-70.

Dekhinet S, Berkane A, Yahiaoui A, Hasseine B, Chaabane K. 2007. Carte des substances utiles de la Wilaya de Batna. Rapport annuel. Université de Batna- Laboratoire LAPAPEZA. Code du projet f-0501- 10-05: 1- 6.

Demetzos C, Dimas K, Hatziantoniou S, Anastasaki T, and Angelopoulou D. 2001. Cytotoxic and anti-inflammatory activity of labdane and cis clerodane typediterpenes. *Planta Medica* **67**(7): 614-618.

Demetzos C, Stahl B, Anastassaki T, Gazouli M, Tzouvelekis LS, Rallis M. 1999. Chemical analysis and antimicrobial activity of the resins Ladano, of itsessential oil and of the isolated compounds. *Planta Medica* **65**(1): 76-78.

Demoly JP, Montserrat P. 1993. *Cistus*. In: Castroviejo S. et al. (Eds.). Consejo de Investigaciones Cientificas, Madrid. *Flora Ibérica* **3**: 319-337.

Deng S, Palu 'K, West BJ, Su CX, Zhou BN, Jensen JC. 2007. Lipxygenase inhibitory constituents of the fruits of noni (*Morinda citrifolia*) collected in Tahiti. *Journal of Natural Products* **70**(5): 859-862.

- Dias LC and Dessoy MA. 2009. Chemotherapy of Chagas' disease: state of the art and perspectives for the development of new drugs. *Quimica Nova* **32**(9): 2444-2457.
- Dif MM, Toumi FB, Benyahia M, Bouzid K, Rahmani M, Sellam F. 2014. First determination of polyphenol variation in *Daphne gnidium* L. leaves depending on altitude and slope at Tessala Mounts (North-West Algeria). *Review of Ecology* **69**: 338-344.
- Dillon MO, Mabry TJ. 1977. Flavonoid aglycones from *Flourensia*. *Phytochem* **16**: 1318-1319.
- Dimas K, Demetzos C, Angelopoulou D, Kolokouris A, Mavromoustakos T. 2000. Biological activity of myricetin and its derivatives against human leukemic cell lines *in vitro*. *Pharmacological Research* **42**(5): 475-478.
- Don MJ, Huang YJ, Huang RL, Lin YL. 2004. New phenolic principles from *Hypericum sampsonii*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **52**(7): 866-869.
- Drasch G, Schupp I, Hofl H, Reinke R, Roeder G. 1994. Mercury burden of human fetal and infant tissues. *European Journal of Pediatrics* **153**(8): 607-610.
- Dubaie AS, El-Khulaidi AA. 1993. Studies on the flora of Yemen on the flora of Tihama plain. *Feddes Repertorium* **104**(3-4): 259-265.
- Duke JA. 1992. Handbook of phytochemical constituents of GRAS herbs and other economic plants. CRC Press: Tokyo, 117-118.
- Dunal MF. 1824. Cistineae. In: De Candolle AP (Ed.) *Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis* I. Treuttel et Würtz, Paris 263-286.
- Dymock W, Warden CJH, Hooper D. 1976. Pharmacopia Indica. *Harmard National Foundation of Pakistan* **1**: 252-253.
- Ehrhardt C, Hrinčius ER, Korte V, Mazur I, Droebner K, Poetter A, Dreschers S, Schmolke M, Planz O, Ludwig S. 2007. A polyphenol rich plant extract, CYSTUS052, exerts anti influenza virus activity in cell culture without toxic side effects or the tendency to induce viral resistance. *Antiviral Research* **76**(1): 38-47.
- El-Bahri L, Chemli R. 1991. *Peganum harmalan* L.: a poisonous plant of North Africa. *Veterinary and Human Toxicology* **33**(3): 276-277.
- El-Bardai S, Lyoussi B, Wibo M, Morel N. 2004. Comparative study of the antihypertensive activity of *Marrubium vulgare* and of the dihydropyridine calcium antagonist amlodipine in spontaneously hypertensive rat. *Clin Exp Hypertens* **26**(6): 465-474.
- El-Negoumi SI, Mansour RMA, Saleh NAM. 1982. Flavonols of *Pulicaria arabica*. *Phytochemistry* **21**(4): 953-954.
- El-On J, Ozer L, Gopas J, Sneir R, Enav H, Luft N, Davidov G, Golan-. Goldhirsh A. 2009. Antileishmanial activity in Israeli plants. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **103**(4): 297-306.

- El-Sayed NH, Wojcińska M, Drost-Karbowska K, Matławska I, Williams J, Mabry TJ. 2002. Kaempferol triosides from *Silphium perfoliatum*. *Phytochemistry* **60**(8): 835-838.
- El-Sayyad SM, Ross SA. 1983. A phytochemical study of some *Cassia* species cultivated in Egypt. *J Nat Prod* **46**(3): 431-432.
- Ericsson HM, Sherris JC. 1971. Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study. *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol* **217**: 1-90.
- Ezoubeiri A, Gadhi Chems eddoha A, Fdil N, Benharref A, Jana M, Vanhaelen M. 2005. Isolation and antimicrobial activity of two phenolic compounds from *Pulicaria odora* L. *Journal of Ethnopharmacology* **99**(2): 287-292.
- Fattahi M, Nazeri V, Torras-Claveria L, Sefidkon F, Cusido RM, Zamani Z, Palazon J. 2013. A new biotechnological source of rosmarinic acid and surface flavonoids: Hairy root cultures of *Dracocephalum kotschyi* Bioss. *Indus Crops and Products* **50**: 256-263.
- Fawzy GA, Al Ati Hanan Y, El-Gamal AA. 2013. Chemical composition and biological evaluation of essential oils of *Pulicaria jaubertii*. *Pharmacogn Mag* **9**(33): 28-32.
- Flamini G, Antognoli E, Morelli I. 2001. Two flavonoids and other compounds from the aerial parts of *Centaurea bracteata* from Italy. *Phytochemistry* **57**(4): 559-564.
- Fokialakis N, Cantrell CL, Duke SO, Skaltsounis AL, Wedge DE. 2006. Antifungal activity of thiophenes from *Echinops ritro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**(5): 1651-1655.
- Francis Rouessac and Annick Rouessac. 2009. Analyse chimique, méthode et techniques instrumentales 7^{ème} édition 361-363 et 303-314.
- Galala AA, Sallam A, Abdel-Halim OB, Sahar R. Gedara SR. 2016. New ent-kaurane diterpenoid dimer from *Pulicaria Inuloides*. *Natural Product research* **30**(21): 2468-2475.
- Ganzera M, Ellmerer-Müller, EP, Stuppner H. 1998. Cycloartane triterpenes from *Combretum quadrangulare*. *Phytochem* **49**(3): 835-838.
- Gaspar-Marques C, Simões MF, Rodríguez B. 2004. Further labdane and kaurane diterpenoids and other constituents from *Plectranthus fruticosus*. *Journal of Natural Products* **67**(4): 614-621.
- Geng D, Weng LJ, Han YY, Yang X. 2011. Chemical constituents from *Euphorbia helioscopia*. *Advanced Materials Research* **396-398**: 1337-1340.
- Golmakani MT, Rezaei K. 2008. Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. *Food Chemistry* **109**(4): 925-930.
- Gonda R, Takeda T, Akiyama T. 2000. Studies on the constituents of *Anaxagorea luzonensis* A. GRAY. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)* **48**(8): 1219-1222.

Gong Y, Liu X, He WH, Xu HG, Yuan, F, Gao YX. 2012. Investigation into the antioxidant activity and chemical composition of alcoholic extracts from defatted marigold (*Tagetes erecta* L.) residue. *Fitoterapia* **83**(3): 481-489.

Gonzalez CI, Macias FA, Massanet GM, Rodriguez LF. 1985. Flavonoids from *Centaurea clementei*. *Journal of Natural Products* **48**(5): 819-822.

Goodwin RS, Rosler KHA. 1984. Flavonoids from *Brickellia glutinosa*. *Journal of Natural Products* **47**(4): 711-714.

Gora J, Swiatek L, Kalembe D, Kurowska A. 1979. Chemical substances from inflorescences of *Arnica montana* L. and *Calendula officinalis* L. soluble in isopropyl myristate and propylenic glycol. *Planta Medica* **36**: 286-287.

Grayer RJ, Veitch NC, Kite GC, Price AM, Kokubun T. 2001. Distribution of 8-oxygenated leaf-surface flavones in the genus *Ocimum*. *Phytochemistry* **56**(6): 559-67.

Grosser W. 1903. Cistaceae. In: Engler A. (Ed.), *Dans PXanzenreich*, Berlin **14**: 161.

Grundmann O, Nakajima JI, Kamata K, Seo S, Butterweck V. 2009. Kaempferol from the leaves of *Apocynum venetum* possesses anxiolytic activities in the elevated plus maze test in mice. *Phytomedicine* **16**(4): 295-302.

Guimaraes AJ, Gomes KX, Cortines JR, Peralta JM, Peralta RH. 2016. *Acanthamoeba* spp. as a universal host for pathogenic microorganisms: one bridge from environment to host virulence. *Microbiololy Research* **193**: 30-38.

Guimarães KG, de Souza Filho JD, Dos Mares-Guia TR, Braga FC. 2007. Dihydroisocoumarin from *Xyris pterygoblephara* active against dermatophyte fungi. *Phytochemistry* **69**(2): 439-444.

Gülz PG, Kobold U, Michaelis K, Vostrowsky O. 1984. The composition of terpene hydrocarbons in the essential oil from leaves of four *Cistus* species. *Z Naturforsch* **39c**: 699-704.

Gürbüz P, Demirezer LO, Güvenalp Z, Kuruüzüm-Uz A, Kazaz C. 2015. Isolation and structure elucidation of uncommon secondary metabolites from *Cistus salviifolius* L. *Records of Natural Products* **9**(2): 175-183.

Hamdi-Pacha Y, Benyache F, Benayache S, Benazzouz M, Smati F, Benchouala C. 1993. Le moléculaire et l'effet de caractérisation anti-bactérien des algériennes de quelques plantes d'*Inula Viscosa* L. et de *Centaurea pullata* L. *Journal Algérien de Médecine* **3**(3): 183-186.

Hammer KA, Carson CF, Riley TV. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol* **86**(6): 985-990.

Han SJ, Ryu SN, Kang SS. 2004. A New 2-arylbenzofuran with antioxidant activity from the black colored rice (*Oryza sativa* L.) Bran. . *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **52**(11): 1365-1366.

Hanbali FEL, Akssira M, Ezoubeiri A, Gadhi Chems eddoha A, Mellouki F, Benherraef A, Blazquez AM, Boira H. 2005. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Pulicaria odora* L. *Journal of Ethnopharmacology* **99**(3): 399-401.

Haouat AC, Sqalli H, Farah A, Haggoud A, Iraqui M. 2013. Activité antimycobactérienne des extraits de deux espèces marocaines du genre *Cistus*. *Phytotherapie* **11**(6): 365-372.

Harborne JB, Cody V, Middleton EJr. 1985. Nature, distribution, and function of plant flavonoids, plant flavonoids in biology and medicine: biochemical, pharmacological, and structure-activity relationships. Proceedings of a symposium held in Buffalo, Alan R Liss Inc, New York 22-26.

Harborne JB. 1989. Methods in plant biochemistry, I: plant phenolics. London, Academic Press.

Harborne. 1999. Phytochemical dictionary second edition, Taylor and Francis, Chapter 37.

Harborne. 1999. The Handbook of Natural Flavonoids, Flavonols 1: 181.

Harborne. 1999. The handbook of natural flavonoids. 1, 2. flavones, John Wiley & Son.

Harrison S. 1977. Preparative centrifugal chromatography device. US Pat. US 4: 139-458.

Hashida C, Tanaka N, Kashiwada Y, Ogawa M, Takaishi Y. 2008. Prenylated phloroglucinol derivatives from *Hypericum perforatum* var. *angustifolium*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* (Tokyo) **56**(8): 1164-1167.

He J, Zhu HJ, Luo GF, Guang-Ming Liu GM, Chen H, Li Y, Chen S, Lu X, Zhou G, Cheng YX. 2010. New Compounds from *Euphorbia helioscopia* and Absolute Configuration Determination by Computational Methods. *Bull Korean Chemical Society* **31**(8): 2211.

Henchiri H, Bodo B, Deville A, Dubost L, Zourgui L, Raies A, et al. 2009. Sesquiterpenoids from *Teucrium ramosissimum*. *Phytochemistry* **70**(11-12): 1435-1441.

Herrera J. 1986. Flowering and fruiting phenology in the coastal shrublands of Donana, south Spain. *Vegetatio* **68**(2): 91-98.

Herrera J. 1987. Flower and fruit biology in southern spanish mediterranean shrublands. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **74**(1): 69-78.

Hilal HS, Young ken HW. 1983. Certain poisonous plants of Egypt. Pharmaceutical society of Egypt, Ed. Dokki, Cairo, Egypt: The national information and documentation centre, NIDOC 88-90.

Hmamouchi M. 1999. Les plantes médicinales et aromatiques Marocaines. Edition Fédala, Maroc 87-88. ISBN.9954-. 8007-0-0.

Ho JC, Chen CM, Row LC. 2005. Flavonoids and benzene derivatives from the flowers and fruit of *Tetrapanax papyriferus*. *Journal of Natural Products* **68**(12): 1773-1775.

Institue Pluridisciplinaire Hubert Curien (a) <http://www.iphc.cnrs.fr/>

Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (b), informations générales sur les départements
<http://www.alsace.cnrs.fr/-informations-generales-html>

Ismail SI, El-Missiry MM, Hammouda FM, Rizk AM. 1977. Flavonoids of *Euphorbia geniculata* and *Euphorbia prostata*. *Pharmazie* **32**(8-9): 538.

Ito H, Kobayashi E, Takamatsu Y, Li SH, Hatano T, Sakagami H, Kusama K, Kazue Satoh K, Sugita D, Shimura S, Itoh Y, Yoshida T. 2000. Polyphenols from *Eriobotrya japonica* and their cytotoxicity against human oral tumor cell lines. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **48**(5): 687-693.

Jassbi AR. 2006. Chemistry and biological activity of secondary metabolites in *Euphorbia* from Iran. *Phytochemistry* **67**(18): 1977-1984.

Jay M, Voirin B. 1976. Les flavonoides de deux especes du genre *Chrysosplenium*. *Phytochem* **15**(4): 517-519.

Kadri A, Zarai Z, B'ekir A, Gharsallah N, Damak M, Gdoura R. 2011. Chemical composition and antioxidant activity of *Marrubium vulgare* L. essential oil from Tunisia. *African Journal of Biotechnology* **10**(19): 3908-3914.

Karaman I, Sahin F, Gulluce M, Ogutcu H, Sengul Adıguzel A. 2003. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *Journal of Ethnopharmacology* **85**(2-3): 231-235.

Kite GC, Stoneham CA, Veitch NC. 2007. Flavonol tetraglycosides and other constituents from leaves of *Styphnolobium japonicum* (Leguminosae) and related taxa. *Phytochemistry* **68**(10): 1407-1416.

Kokoska L and Janovska D. 2009. Chemistry and pharmacology of *Rhaponticum carthamoides*: a review. *Phytochemistry* **70**(7): 842-855.

Koleva II, van Beek TA, Linssen JP, de Groot A, Evstatieva LN. 2002. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis* **13**(1): 8-17.

Kumaran A, Karunakaran RJ. 2007. *In vitro* antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT- Food Science and Technology* **40**(2): 344-352.

Kuo YJ, Hwang SY, Wu MD, Liao CC, Liang YH, Kuo YH, Ho HO. 2008. Cytotoxic Constituents from *Podocarpus fasciculatus*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **56**(4): 585-588.

Laamari M. 2004. Etude éco-biologique des pucerons dans quelques localités de l'est-Algérien. Thèse de doctorat d'état en sciences agronomiques. I. N. A. EL-Harrach-Alger, 204.

Lansky EP, Newman RA. 2007. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology* **109**(2): 177-206.

- Leduc C, Coonishish J, Haddad P, Currier A. 2006. Plants used by Cree Nation of Eeyou Istchee (Quebec, Canada) for treatment of diabetes: A novel approach in quantitative ethnobotany. *Journal of Ethnopharmacology* **105**(1-2): 55-63.
- Lee H, Kim BG, Kim M, Ahn JH. 2015. Biosynthesis of two flavones, apigenin and genkwanin, in *Escherichia coli*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **25**(9): 1442-1448.
- Leite JP, Oliveira AB, Lombardi JA, Filho JD, Chiari E. 2006. Trypanocidal activity of Triterpenes from *Arrabidaea triplinervia* and derivatives. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **29**(11): 2307-2309.
- Leu CH, Li CY, Yao X, Wu TS. 2006. Constituents from the leaves of *Phellodendron amurense* and their antioxidant activity. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* (Tokyo) **54**(9): 1308-1311.
- Leung AY and Foster S. 1996. Encyclopedia of common natural ingredients. New York, Wiley.
- Li J, Bi X, Zheng G, Hitoshi Y, Ikeda T, Nohara T. 2006. Steroidal glycosides and aromatic compounds from *Smilax riparia*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **54**(10): 1451-1454.
- Lin LZ, He XG, Lindenmaier M, Yang J, Cleary M, Qiu SX, Cordell GA. 2000. LC-ESI-MS Study of the Flavonoid Glycoside Malonates of Red Clover (*Trifolium pratense*). *J Agric Food Chem* **48**(2): 354-365.
- Lin YP, Hsu FL, Chen CS, Chern JW, Lee MH. 2007. Constituents from the Formosan apple reduce tyrosinase activity in human epidermal melanocytes. *Phytochemistry* **68**(8): 1189-1199.
- Liu LL, Yang JL, Shi YP. 2010. Phytochemicals and biological activities of *Pulicaria* species. *Chemistry and Biodiversity* **7**(2): 327-349.
- Lo WL, Chang FR, Liaw CC, Wu YC. 2002. Cytotoxic coumaronochromones from the roots of *Euchresta formosana*. *Planta Medica* **68**(2): 146-151.
- Lorenzo-Morales J, Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, Santana-Morales MA, Afonso Lehmann RN, Maciver SK, Valladares B, Martínez-Carretero E. 2010. Therapeutic potential of a combination of twogene-specific small interfering RNAs against clinical strains of *Acanthamoeba*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **54**(12): 5151-5155.
- Lovecka P, Lipov J, Thumova K, Macurkova A. 2017. Characterization of biologically active substances from *Calendula officinalis*. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **18**(14): 1167-1174.
- Lu Y, Foo LY. 2002. Polyphenolics of *Salvia*-a review. *Phytochem* **59**(2): 117-140.
- Lutz E, Lind B, Herin P, Krakau I, Bui TH, Vahter M. 1996. Concentrations of mercury, cadmium, and lead in brain and kidney of second trimester fetuses and Infants. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **10**(2): 61-67.

- Mahdavi B, Yaacob W, Din LB, Lee YH, Nazlina I. 2016. Chemical composition, antioxidant, and antibacterial activities of essential oils from *Etilingera brevilabrum* Valetton. *Records of Natural Products* **10**(1): 22-31.
- Mahfouz M, Ghazal A, El-Dakhakhny M, Ghoneim MT. 1973. Pharmacological studies on the active principle isolated from *Pulicaria dysenterica*. *Journal of Drug Research* **5**(2): 151-172.
- Mahmoud II, Marzouk MS, Moharram FA, El-Gindi MR, Hassan AM. 2001. Acylated flavonol glycosides from *Eugenia jambolana* leaves. *Phytochemistry* **58**: 1239-1244.
- Maiza K, Brac De La Perriere RA, Hammiche V. 1993. Pharmacopée traditionnelle saharienne: Sahara septentrional 169-171. In: Actes du 2^{ème} colloque européen d'ethnopharmacologie et de la 11^{ème} conférence internationale d'ethnomédecine, Heidelberg.
- Majhenic L, Kerget MS, Knez Z. 2007. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chemistry* **104**(3): 1258-1268.
- Manguero LO, Ugi I, Hermann R, Lemmen P. 2003. Flavonol and drimane-type sesquiterpene glycosides of *Warburgia stuhlmannii* leaves. *Phytochemistry* **63**(4): 497-502.
- Mariotti JP, Tomi F, Casanova J, Costa J, Bernardini AF. 1997. Composition of the essential oils of *Cistus ladaniferus* L. cultivated in Corsica (France). *Flavour Fragrance Journal* **12**(3): 147-151.
- Mariotti JP. 1994. Analyse d'huiles essentielles par chromatographie et RMN du carbone-13: *Cistus ladaniferus*, *Cistus monspeliensis* et *Stachysglutinosa*. Thèse de Doctorat, Université de Corse, Faculté des sciences et techniques.
- Marles MA, Gruber MY, Scoles GJ, Muir AD. 2003. Pigmentation in the developing seed coat and seedling leaves of *Brassica carinata* is controlled at the dihydroflavonol reductase locus. *Phytochemistry* **62**(5): 663-672.
- Martin Bolaños M, Guinea E. 1949. Jarales y jaras (*Cistografia Hispanica*). Bol Inst Forest. Invest Exp, Madrid **44**: 3-228.
- Martín-Navarro CM, Lorenzo-Morales J, Cabrera-Serra MG, Rancel F, Coronado-Alvarez NM, Piñero JE, Valladares B. 2008. The potential pathogenicity of 336 chlorhexidine-sensitive *Acanthamoeba* strains isolated from contact lens cases 337 from asymptomatic individuals in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Journal of Medical Microbiology* **57**(11): 1399-1404.
- Marwat SK, Rehman Fu. 2011. Medicinal and Pharmacological Potential of Harmala (*Peganum harmala* L.) Seeds. *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention* **70**: 585-599.
- Matsuda H, Morikawa T, Ohgushi T, Ishiwada T, Nishida N, Yoshikawa M. 2005. Inhibitors of Nitric Oxide Production from the Flowers of *Angelica furcijuga*: Structures of Hyuganosides IV and V. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **53**(4): 387-392.
- Meftah T, A.N.N. 2003. Programme UICN-Cosmétologie au naturel, cosmétologie au naturel, Alger.

Mehdi R, Jafar V, Meissam N, Mozghan KM. Screening of chemical composition of essential oil, mineral elements and antioxidant activity in *Pulicaria Undulata* (L.) C. A. Mey from Iran. *Journal of medicinal plants research* **5**(10): 2035-2040.

Mercader AG, Duchowicz PR, Fernández FM, Castro EA, Bennardi DO, Autino JC, Romanelli GP. 2008. QSAR prediction of inhibition of aldose reductase for flavonoids. *Bioorganic Medicinal Chemistry* **16**(15): 7470-7476.

Meyer-Warnod B. 1984. Natural essential oils: extraction processes and application to some major oils. *Perfume Flavorist* **9**: 93-104.

Midhat L, Ouazzani N, Esshaimi M, Ouhammou A, Mandi L. 2017. Assessment of heavy metals accumulation by spontaneous vegetation: Screening for new accumulator plant species grown in Kettara mine-Marrakech, Southern Morocco. *International Journal of Phytoremediation* **19**(2): 191-198.

Minor LE-L, Veron M. 1989. Bactériologie médicale. 2^{ème} édition. Ed. Flammarion, Paris.

Mohamed SA, Khan JA. 2013. Antioxidant capacity of chewing stick miswak *Salvadora persica*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **13**(40): 1-6.

Mohamedi Z. 2006. Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Thèse de Master, Univ Abou Bakr Belkaid, Tlemcen.

Montagne P. 1999. The Concise Larousse Gastronomique. London, UK: Hamlyn 691.

Moossavi M, Hoshyar R, Hemmati M, Ali Farahi A, Javdani H. 2016. An invivo study on the hepato-protective effects of *Crocus sativus*, *Ziziphus jujuba* and *Berberis vulgaris* against acute acetaminophen and rifampicin-induced hepatotoxicity. *Clinical Phytoscience* **2**(16): 2-7.

Morales-Soto A, Oruna-Concha M, Elmore JS, Barrajon-Catalan E, Micol V, Roldan, C, Segura-Carretero A. 2015. Volatile profile of Spanish *Cistus* plants as sources of antimicrobials for industrial applications. *Industrial Crops and Products* **74**(15): 425-433.

Moreno L, Bello R, Beltran B, Calatayud S, Primo-Yufero E, Esplugues J. 1998. Pharmacological screening of different *Juniperus oxycedrus* L. extracts. *Pharmacology Toxicology* **82**(2): 108-112.

Mors WB, Nascimento MC, Pereira BM, Pereira NA. 2000. Plant natural products active against snake bite-the molecular approach. *Phytochemistry* **55**(6): 627-642.

Mu SZ, Shang S, Yan C, Yang FM, Hao XJ. 2013. Study on chemical constituents of *Euphorbia helioscopia* and their antitumor activities. *Zhong Yao Cai* **36**(7): 1092-1096.

Mubashir MH, Bahar A, Iqbal ZM, Saroor KA, Shamshir K, Singh P. 2008. Antibacterial activity of whole plant extract of *Marrubium vulgare*. *African Journal of Biotechnology* **7**(2): 86-87.

Myler PJ and Fasel N. 2008. Leishmania: after the genome. british ed.: Caiser Academic Press.

Nadikarni KM. 1976. Indian Materia Medica. *Popular Pakistan Limited, Bombay* **1**: 927-929.

Nakatani N, Jitoe A, Masuda T, Yonemori S. 1991. Flavonoid constituents of *Zingiber zerumbet* Smith. *Agricultural and Biological Chemistry* **55**(2): 455-460.

Nandani D, Verma RN, Batra A. 2013. Isolation and identification of quercetin and emodin from *Cassia tora* L. *Annals of Phytomedicine* **2**(2): 96-104.

Nasri N, Tlili N, El-Falleh W, Cherif E, Ferchichi A, Khaldi A, Triki S. 2011. Chemical compounds from Phoenician juniper berries (*Juniperus phoenicea*). *Natural Product Research* **25**(18): 1733-1742.

Nawal H, Mohamed, Atta EM. 2013. Cytotoxic and antioxidant activity of *Marrubium vulgare* and its flavonoid constituents. 2nd International conference on chemical, environmental and biological sciences (ICCEBS'2013) March 17-18, 2013 Dubai (UAE).

Neamah SI, Sarhan IA, Al-Shaye'a ON. 2017. Bioactive compounds from *Marrubium Vulgare* L. based on *in vitro* antioxidant Activity. *Journal of Global Pharma Technology* **11**(9): 183-188.

Neukirch H, D' Ambrosio M, Dalla Via J, Guerriero A. 2004. Simultaneous quantitative determination of eight triterpenoid monoesters from flowers of 10 varieties of *Calendula officinalis* L. and characterisation of a new triterpenoid monoester. *Phytochemical Analysis* **15**(1): 30-35.

Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. 2000. The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Product Report* **17**(3): 215-234.

Norlindh T. 1946. Studies in the Calenduleae II. Phytogeography and interrelation. *Botaniska Notiser* **4**: 471-506.

Ohsaki A, Yokoyama R, Miyatake H, Fukuyama Y. *Chem Pharm Bull* (Tokyo). 2006 Two diterpene rhamnosides, mimosasides B and C, from *Mimosa hostiles*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **54**(12): 1728-1729.

Olennikov DN, Kashchenko NI, Chirikova NK, Akobirshoeva A, Zilfikarov IN, Vennos C. 2017. Isorhamnetin and quercetin derivatives as anti-cetylcholinesterase principles of marigold (*Calendula officinalis*) flowers and preparations. *International Journal of Molecular Sciences* **18**(8): 1685.

Ordonez AAL, Gomez JD, Vattuone MA, Isla MI. 2006. Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swart extracts. *Food Chemistry* **97**(3): 452-458.

Orhan IE, Belhattab R, Şenol FS, Gulpinar AR, Hoşbaş S, Kartal M. 2010. Profiling of cholinesterase inhibitory and antioxidant activities of *Artemisia absinthium*, *A. herba-alba*, *A. fragrans*, *Marrubium vulgare*, *M. astranicum*, *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* and essential oil analysis of two *Artemisia* species. *Industrial Crops Products* **32**(3): 566-571.

- Orhan N, Aslan M, Pekcan M, Orhan DD, Bedir E, Ergun F. 2012. Identification of hypoglycaemic compounds from berries of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* through bioactivity guided isolation technique. *J Ethnopharmacol* **139**(1): 110-118.
- Ormerod A, Hay I, Jamieson M. 2000. Treatment of hair loss. PCT Int Appl. PIXXD2 WO 2000007553 A1 20000217.
- Oskarsson A, Schultz A, Skerfving S, Hallen IP, Ohlin B, Lagerkvist BJ. 1996. Total and inorganic mercury in breast milk in relation to fish consumption and amalgam in lactating women. *Arch environ Health* **51**(3): 234-41.
- Oton PJ, Oksuz S, Ulubelen A, Mabry TJ. 1981. 6-Hydroxyflavonoids from *Pulicaria dysenterica* (Compositae). *Phytochemistry*, **20**(8): 2057.
- Oyaizu M. 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine, Japan. *Journal of Nutrition* **44**(6): 307-315.
- Ozenda P. 1991. Flore et végétation du Sahara. 2^{ème} édition. Ed. C.N.R.S, Paris, 662.
- Ozenda P. 2004. Flore et végétation du Sahara. 3^{ème} édition. CNRS, Paris, 662.
- Ozturk H, Kolak U, Meric C. 2011. Antioxidant, anticholinesterase and antibacterial activities of *Jurinea consanguinea* DC. *Records of Natural Products* **5**(1): 43-51.
- Paolini J, Tomi P, Bernardini AF, Bradesi P, Casanova J, Kaloustian J. 2008. Detailed analysis of the essential oil from *Cistus albidus* L. by combination of GC/RI, GC/MS and ¹³C NMR spectroscopy. *Natural Products Research* **22**(14): 1270-1278.
- Parmar VS, Jha A, Bisht KS, Talneja P, Singh SK, Kumar A, Rajni Jain. P, Olsen CE. 1999. Constituents of yew trees. *Phytochemistry* **50**(8): 1267-1304.
- Peñuelas J, Llusà J. 2001. Seasonal patterns of non-terpenoid C6-C10 VOC emission from seven Mediterranean woody species. *Chemosphere* **45**(3): 237-244.
- Pinto E, Catalani LH, Lopes NP, Di Mascio P, Colepicolo P. 2000. Peridinin as the major biological carotenoid quencher of singlet oxygen in marine algae *Gonyaulax polyedra*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **268**(2): 496-500.
- Pistelli L, Bertoli A, Giachi II, Manunta A. 1998. Flavonoids from *genista ephedroides*. *Journal of Natural Products* **61**(11): 1404-1406.
- Pomponio R, Gotti R, Santagati NA, Cavrini V. 2003. Analysis of catechins I extracts of *Cistus* species by microemulsion electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A* **990**: 215 - 223.
- Poumale HM, Randrianasolo R, Rakotoarimanga JV, Raharisololalao A, Krebs HC, Tchouankeu JC, Ngadjui BT. 2008. Flavonoid glycosides and other constituents of *Psorospermum androsaemifolium* BAKER (Clusiaceae). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)* **56**(10): 1428-1430.

- Pu JX, Yang LM, Xiao WL, Li RT, Lei C, Gao XM, Huang SX, Li SH, Zheng YT, Huang H, Sun HD. 2008. Compounds from *Kadsura heteroclita* and related anti-HIV activity. *Phytochemistry* **69**(5): 1266-1272.
- Pukalskas A, Venskutonis PR, Salido S, De Waard P, Van Beek T. 2012. Isolation, identification and activity of natural antioxidants from horehound (*Marrubium vulgare* L.) cultivated in Lithuania. *Food Chemistry* **130**(3): 695-701.
- Quezel P et Santa S. 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques et méridionales. Tome II, Edition du centre national de la recherche scientifique (CNRS), Paris.
- Quezel P, Medail F. 2003. Ecologie et biogéographie des forêts du bassin méditerranéen. Lavoisier, Paris 137.
- Quezel P, Santa S. 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS Paris edn 2: 949.
- Quezel P, Santa S. 1963a. Nouvelle flore de l'algérie et des régions désertiques méridionales. Éditions du Centre national de la Recherche scientifique. Tom II, 15 quai Antole-France, Paris: 947.
- Quezel P, Santa S. 1963b. Nouvelle flore de l'algérie et des régions désertiques méridionales. Éditions du Centre national de la Recherche scientifique. Tom II, 15 quai Antole-France, Paris: 698.
- Rameau JC, Mansion D, Dumé G, Gauberville C. 2008. La flore forestière française (guide écologique illustré), Tome 3: Région méditerranéenne. Institut pour le développement forestier 2426.
- Rao BRR, Kaul PN, Syamasundar KV, Ramesh S. 2005. Chemical profiles of primary and secondary essential oils of *palmarosa* (*Cymbopogon martini* (Roxb.) Wats var. *motia* Burk.). *Industrial Crops and Products* **21**(1): 121-127.
- Rauha JP, Remes S, Heinonen M, Hopia A, Kähkönen M, Kujala T, Pihlaja K, Vuorela H, Vuorela P. 2000. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology* **56**(1): 3-12.
- Reguieg L. 2011. Using medicinal plants in Algeria. 2011. E.N.S.A, Phytotechnie, El-Harrach, Algiers, Algeria. *American Journal of Food and Nutrition* **1**(3): 126-127.
- Reyes-Chilpa R, Estrada-Muñiz E, Veja-Avila E, Abe F, Kinjo J, Hernández- Ortega S. 2008. Trypanocidal constituents in plants *Mammea*-type coumarins. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **103**(5): 431-436.
- Rigane G, Ben Younes S, Ghazghazi H, Ben Salem R. 2013. Investigation into the biological activities and chemical composition of *Calendula officinalis* L. growing in Tunisia. *International Food Research Journal* **20**(6): 3001-3007.
- Robin V, Irurzun A, Amoros M, Boustie J, Carrasco L. 2001. Antipoliiovirus flavonoids from *Psiadia dentata*. *Antiviral Chemistry Chemotherapy* **12**: 283-291.

- Robles C, Bonin G, Garzino S. 1999. Potentialités autotoxiques et allélopathiques de *Cistus albidus* L. C.R. *Académie des sciences* **322**: 677-685.
- Rodriguez-Zaragoza S. 1994. Ecology of free-living amoebae. *Critical Reviews in Microbiology* **20**(3): 225-241.
- Roy J, Sonié L. 1992. Germination and population dynamics of *Cistus* species in relation to Wre. *Journal of Applied Ecology* **29**: 647-655.
- Rukayadi Y, Shim JS, Hwang JK. 2008. Screening of Thai medicinal plants for anticandidal activity. *Mycoses* **51**(4) 308-312.
- Sadhu SK, Okuyama E, Fujimoto H, Ishibashi M, Yesilada E. 2006. Prostaglandin inhibitory and antioxidant components of *Cistus laurifolius*, a Turkish medicinal plant. *Journal of Ethnopharmacology* **108**(3): 371-378.
- Saeidnia S, Gohari AR, Uchiyama N, Ito M, Honda G, Kiuchi F. 2004. Two new monoterpene glycosides and trypanocidal terpenoids from *Dracocephalum kotschyi*. *Bioll Pharm Bull* **52**(10): 1249-1250.
- Saewan N, Koysomboon S, Chantrapromma K. 2011. Anti-tyrosinase and anti-cancer activities of flavonoids from *Blumea balsamifera* DC. *Journal of Medicinal Plants Research* **5**(6): 1018-1025.
- Saini P, Al-Shibani N, Sun J et al. 2012. Effects of *Calendula officinalis* on human gingival fibroblasts. *Homeopathy* **101**(2): 92-98.
- Saleem U, Ahmad B, Hussain K, Ahmad M, Nadeem IB, Bukhari NI, et al. 2014. Estimation of antioxidant power in various extracts of *Euphorbia helioscopia* L. with five different in vitro antioxidant models. *Asian Journal of Chemistry* **26**(4): 1241-1245.
- Salehi P, Mohammadi F, Asghari B. 2008. Seed essential oil analysis of *Bunium persicum* by hydrodistillation-headspace solvent microextraction. *Chemistry of Natural Compounds* **44**(1): 111-113.
- Sambandam B, Thiyagarajan D, Ayyaswamy A, Raman P. 2016. Extraction and isolation of flavonoid quercetin from the leaves of *Trigonella foenum-graecum* and their antioxidant activity. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **8**(6): 120-124.
- Sanchez de Medina F, Gamez MJ, Jimenez I, Jimenez J, Osuna JI, Zarzuelo A. 1994. Hypoglycemic activity of juniper berries. *Planta Medica* **60**(3): 197-200.
- Sasaki T. 1964. Synthesis of quercetin 3, 5-dimethyl ether "Caryatin" and galangin 3, 5-dimethyl ether. *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan; Yakugaku zasshi* **84**(2): 195-198.
- Schorr K, Garcia-Pineros AJ, Siedle B, Merfort I, Da Costa FB. 2002. Guaianolides from *Viguiera gardneri* inhibit the transcription factor NF-kB. *Phytochemistry* **60**(7): 733-740.
- Seto H, Hayashi K, Mitsuhashi H. 1977. Studies on the constituents of asclepiadaceae plants. XLIII. Component of *Marsdenia tomentosa* DECNE. Structure of Tomentomin. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **25**(5): 876-878.

Shahid-Ud-Duaula AFM, Anwarul-Basher M. 2009. Phytochemical screening, plant growth inhibition, and antimicrobial activity studies of *Xylocarpus granatum* Malaysian. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **7**(1): 9-21.

Shahsavari N, Barzegar M, Sahari MA. 2008. Antioxidant activity and chemical characterization of essential oil of *Bunium persicum*. *Plant Foods for Human Nutrition* **63**(4): 183-188.

Shen P, Guo BL, Gong Y, Hong DY, Hong Y, Yong EL. 2007. Taxonomic, genetic, chemical and estrogenic characteristics of *Epimedium* species. *Phytochemistry* **68**(10): 1448-1458.

Shukla YN. 2003. Chemical, botanical and pharmacological studies on the genus *Echinops*: a review. *Journal of Medicinal and Aromatic Plants Sciences* **25**: 720-732.

Silvério MS, Del-Vechio-Vieira G, Pinto MAO, Alves MS, Sousa OV. 2013. Chemical composition and biological activities of essential oils of *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeisch (Asteraceae). *Molecules* **18**(8): 9785-9796.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* **299**: 152-178.

Site officielle de Wilaya de Bechar. <http://www.wilaya-bechar.gov.dz> .

Skoric M, Todorovic S, Gligorijevic N, Jankovic R, Zivkovic S, Ristic M, Radulovic S. 2012. Cytotoxic activity of ethanol extracts of *in vitro* grown *Cistus creticus* subsp. *creticus* L. on human cancer cell lines. *Industrial Crops Products* **38**: 153-159.

Somesh M, Rupali S, Swati S, Jose M, Manish M. 2015. *In vitro* comparative study on antimicrobial activity of five extract of few citrus fruit: Peel & Pulp vs Gentamicin. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* **9**(1): 165-173.

Soriano I. 2002. Cistaceae. In: Valdés B, Rejdali M, Achhal A, Jury JL, Montserrat JM (Eds.), Checklist of vascular plants of N Morocco with identification Keys, consejo superior de investigaciones científicas, Madrid **2**: 196-200.

Stevens JF, Wollenweber E, Ivancic M, Hsu VL, Sundberg S, Deinzer ML. 1999. Leaf surface flavonoids of *Chrysothamnus*. *Phytochemistry* **51**(6): 771-780.

Storey MV, Winiecka-Krusnell J, Ashbolt NJ, Stenstrom TA. 2004. The efficacy of heat and chlorine treatment against thermotolerant Acanthamoebae and Legionellae. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* **36**(9): 656-662.

Sugita K, Ouchi J, Okajima T, Watanabe H. 2004. Topical nonsteroidal anti-inflammatory agents containing essential oils and body-warming substances. Jpn. Kokai Tokyo. JP 2004175723 A2 20040624.

Sumino M, Sekine T, Ruangrunsi N, Igarashi K. 2002. Ardisiphenols and other antioxidant principles from the fruits of *Ardisia colorata*. *Chem Pharm Bull* **50**(11): 1484-1487.

Sytar O, Bruckova K, Hunkova E, Zivcak M, Konate K, Brestic M. 2015. The application of multiplex fluorimetric sensor for the analysis of flavonoids content in the medicinal herbs family Asteraceae, Lamiaceae, Rosaceae. *Biology Research* **48**(5): 2-9.

Tabacik C, Bard M. 1971. Etude chimio-taxonomique dans le genre *Cistus*. *Phytochem* **10**(12): 3093-3106.

Tabopda TK, Ngoupayo J, Liu J, Mitaine-Offer AC, Tanoli SA, Khan SN, Ali MS, Ngadjui BT, Tsamo E, Lacaille-Dubois MA, Luu B. 2008. Bioactive aristolactams from *Piper umbellatum*. *Phytochemistry* **69**(8): 1726-1731.

Tadesse M and Abegaz B. 1990. A revision of the genus *Echinops* (Ccmposite, craude) in Ethiopia, with notes on phylogeography and chemistry. *Proceedings of the 12th Plenary Meeting of AETFAT* 605-629.

Takeda K, Yamaguchi S, Iwata K, Tsujino Y, Fujimori T, Husain, SZ. 1996. A malonylated anthocyanin and flavonols in the blue flowers of *Meconopsis*. *Phytochemistry* **42**: 863-865.

Takeda Y, Yanagihara K, Masudo T, et al. 2000. Labdane diterpenoids from *Marrubium globosum* ssp. *Globosum*. *Chem Pharm Bull* **48**(8): 1234-1235.

Talavera S, Gibbs PE, Herrera J. 1993. Reproductive biology of *Cistus ladanifer* (Cistaceae). *Plant Systematics and Evolution* **186**(3-4): 123-134.

Tanira MOM, Ali BH, Bashir AK, Wasfi IA, Chandranath I. 1996. Evaluation of the relaxant activity of some United Arab Emirates plants on intestinal smooth muscle. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **48**(5): 545-550.

Tasdemir D, Kaiser M, Brun R, Yardley V, Schmidt TJ, Tosun F, Rüedi P. 2006. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: *in vitro*, *in vivo*, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. *Antimicrob Agents Chemother* **5**(4): 1352-1364.

Tatsis EC, Boeren S, Exarchou V, Troganis AN, Vervoort J, Gerothanassis IP. 2007. Identification of the major constituents of *Hypericum perforatum* by LC/SPE/NMR and/or LC/MS. *Phytochemistry* **68**(3): 383-393.

Teresa JDP, Urones JG, Basabe P, Pinto del rey A. 1978. Componentes de *Cistus albidus* L. *Anales de Química* **74**: 345-350.

Teresa JDP, Urones JG, Marcos IS, Núñez L, Basab P. 1983. Diterpenoids and flavonoids from *Cistus palinhae*. *Phytochemistry* **22**(12): 2805-2808.

Thompson JD. 2005. *Plant Evolution in the Mediterranean*. Oxford University Press, Oxford 288.

Thuong PT, Kang HJ, Na M, Jin W, Youn UJ, Seong YH, Song KS, Min BS, Bae K. antioxidant constituents from *Sedum takesimensense*. *Phytochemistry* **68**(19): 2432-2438.

Tojo E, Rial ME, Urzua A, Mendoza L. 1999. Clerodane diterpenes from *Halopappus deserticola*. *Phytochem* **52**: 1531-1533.

- Tomás-Menor L, Barrajon-Catalán E, Segura-Carretero A, Martí N, Saura D, Menéndez JA, Joven J, Micol V. 2015. The promiscuous and synergic molecular interaction of polyphenols in bactericidal activity: an opportunity to improve the performance of antibiotics? *Phytotherapy Research* **29**(3): 466-473.
- Tomás-Menor L, Morales-Soto A, Barrajon-Catalán E, Roldán-Segura C, Segura-Carretero A, Micol V. 2013. Correlation between the antibacterial activity and the composition of extracts derived from various Spanish *Cistus* species. *Food and Chemical Toxicology* **55**: 313-322.
- Tsankova E, Ognyanov I. 1976. Germazone, a novel tricyclic sesquiterpene ketone in the essential oil from *Geranium macrorrhizum* L. *Tetrahedron Letters* **17**(42): 3833-3836.
- Tuesa PDJ, Urones JG, Basabe P, M. Pacho MJN. 1977. Cistaceas Flavonoides II. *Cistus populifolius* L. and *Cistus Birsutus*. Lam. *Anales de Química* **73**(7-8): 1047-1048.
- Ukiya M, Akihisa T, Yasukawa K, Tokuda H, Suzuki T, Kimura Y. 2006. Anti-inflammatory, anti-tumorpromoting, and cytotoxic activities of constituents of marigold (*Calendula officinalis*) flowers. *Journal of Natural Products* **69**(12): 1692-1696.
- Ulubelen A. 1991. Kurucu, S. Sesquiterpene acids from *Echinops ritro*. *Fitoterapia* **62**, 280.
- Usia T, Kadota S, Tezuka Y. 2005. Constituents of *Zingiber aromaticum* and their CYP3A4 and CYP2D6 inhibitory activity. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* (Tokyo) **53**(3): 333-335.
- Uzair M, Loothar BA, Choudhary BA. 2009. Biological screening of *Euphorbia helioscopia* L. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* **22**(2): 184-186.
- Vega C, Rolón M, Martínez-Fernández AR, Escario JÁ, Gómez-Barrio A. 2005. A new pharmacological screening assay with *Trypanosoma cruzi* epimastigotas expressing beta-galactosidase. *Parasitology Research* **95**(4): 296-298.
- Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL. 2007. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol. Journal of Medical Microbiology* **50**(1): 1-26.
- Vogt T, Proksch P, Gulz PG. 1987. Epicuticular flavonoid aglycones in the genus *Cistus*, Cistaceae). *Journal of Plant Physiology* **131**(1-2): 25-36.
- Wagner H, Ingrid ML, Farkas JS. 1976. Synthese neuer flavonol-dimethyläther der quercetagenin, gossypetin, herbacetin und 6-hydroxy-kämpferol-reihe. Strukturbeweis für flavonole aus parthenium, larrea, spinacia und betula-arten. *Tetrahedron Letters* **17**(1): 67-70.
- Wagner H, Proksch A, Riess-Maurer I et al. 1984. Immunostimulating polysaccharides (heteroglycanes) of higher plants. Preliminary communication. *Arzneimittel Forsch* **34**(6): 659-661.
- Wagner H, Maurer I, Farkas L, Strelisky J. 1976. Synthese neuer flavonol-dimethyläther der quercetagenin, gossypetin, herbacetin und 6-hydroxy-kämpferol-reihe. Strukturbeweis für flavonole aus parthenium, larrea, spinacia und betula-arten. *Tetrahedron Letters* **17**(1): 67-70.

- Wanasundara PKJPD, Shahidi F. 2005. Antioxidants: Science, Technology, and applications, *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, 6th edition, edited by Fereidoon Shahidi, Copyright John Wiley & Sons Inc 7: 431-489.
- Wang C, Zhang Z, Wang Y, He X. 2016. Cytotoxic constituents and mechanism from *Peganum harmala*. *Chemistry and Biodiversity* **13**(7): 961-968.
- Wang KB, Hu X, Li SG, Li XY, Li DH, Bai J, Pei YH, Li ZL, Hua HM. 2018. Racemic indole alkaloids from the seeds of *Peganum harmala*. *Fitoterapia* **125**: 155-160.
- Warburg EF. 1968. *Cistus* L. In: Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA. (Eds.). Cambridge University Press, Cambridge. *Flora Europaea* **2**: 282-285.
- Weniger B, Haag-Berrurier MR. 1978. Antons constituents of *Casearia ilicifolia* Vent. *Planta Medica* **33**(2): 170-172.
- Williams CA, Harborne JB, Greenham JR, Grayer RJ, Kite GC, Eagles J. 2003. Variations in lipophilic and vacuolar flavonoids among European *Pulicaria* species. *Phytochemistry* **64**(1): 275-283.
- Williams CA, Houtt JR, Harborne JB, Greenham J, Eagles J. 1995. A biologically active lipophilic flavonol from *Tanacetum parthenium*. *Phytochemistry* **38**(1): 267-270.
- Wollenweber E and Mann K. 1984. Flavonoid aglycones in the leaf resin of some *Cistus* species. *Z Naturforsch* **39**(3-4): 303-306.
- Wollenweber E, Dorr M, Fritz H, Papendieck S, Yatskievych G, Roitman JN. 1997. Exudate flavonoids in Asteraceae from Arizona, California and Mexico. *Z Naturforsch* **52c**: 301-307.
- Wollenweber E, Mann K, Hochwart S, Yatskievych G. 1989. Exudate flavonoids in miscellaneous Asteraceae. *Phytochemical Bulletin* **21**: 19-23.
- Wollenweber E, Seigler DS. 1982. Flavonoids from the exudate of *Acacia neovernicosa*. *Phytochemistry* **21**(33): 1063-1066.
- Wollenweber E. 1977. New flavonoids from *Betula nigra*. *Phytochemistry* **16**(2): 295.
- Wu TS, Hsu MY, Kuo PC, Sreenivasulu B, Damu AG, Su CR, Li CY, Chang HC. 2003. Constituents from the leaves of *Phellodendron amurense* var. *wilsonii* and their bioactivity. *Journal of Natural Products* **66**(9): 1207-1211.
- Wu TS, Hwang CC, Kuo PC, Kuo TH, Damu AG, Su CR. 2004. New neolignans from *Spiraea formosana*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **52**(10): 1227-1230.
- Xiao Z, Wu H, Wu T, Shi H, Hang B, Aisa H. 2006. Kaempferol and quercetin flavonoids from *Rosa rugosa*. *Chemistry of Natural Compounds* **42**(6): 736-737.
- Xie H, Wang T, Matsuda H, Morikawa T, Yoshikawa M, Tani T. 2005. Bioactive constituents from chinese natural medicines. XV. Inhibitory effect on aldose reductase and structures of saussureosides A and B from *Saussurea medusa*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **53**(11): 1416-1422.

- Yesilada E, Gurbuz I, Ergun E. 1997. Effect of *Cistus laurifolius* L. on gastric and duodenal lesions. *Journal of Ethnopharmacology* **55**(3): 201-211.
- Yeşilada E, Gürbüz I, Shibata H. 1999. Screening of Turkish anti-ulcerogenic folk remedies for anti- *helicobacter pylori* activity. *Journal of Ethnopharmacology* **66**(3): 289-293.
- Yin Y, Gong FY, Wu XX, Sun Y, Li YH, Chen T, Xu Q. 2008. Anti-inflammatory and immunosuppressive effect of flavones isolated from *Artemisia vestita*. *Journal of Ethnopharmacology* **120**(1): 1-6.
- Yoshikawa M, Sugimoto S, Nakamura S, Matsuda H. 2008. Medicinal flowers. XXII. Structures of chakasaponins V and VI, chakanoside I, and chakaflavonoside A from flower buds of Chinese tea plant (*Camellia sinensis*). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* (Tokyo). **56**(9): 1297-1303.
- Yoshikawa M, Wang T, Morikawa T, Xie H, Matsuda H. 2007. Bioactive constituents from chinese natural medicines. XXIV. Hypoglycemic effects of *Sinocrassula indica* in sugar-loaded rats and genetically diabetic KK-A(y) mice and structures of new acylated flavonol glycosides, sinocrassosides A(1), A(2), B(1), and B(2). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* (Tokyo) **55**(9): 1308-1315.
- Yuan L, Liang C, Diao X, Cheng X, Liao M, Zhang L. 2017. Metabolism studies on hydroxygenkwanin and genkwanin in human liver microsomes by UHPLCQ-TOF-MS. *Xenobiotica* **48**(4): 332-341.
- Zaabat N, Hay AE, Michalet S, Darbour N, Bayet C, Skandrani I, Chekir-Ghedira L, Akkal S, Dijoux-Franca MG. 2011. Antioxidant and antigenotoxic properties of compounds isolated from *Marrubium deserti* de Noé. *Food and Chemical Toxicology* **49**(12): 3328-3335.
- Zhang L, Liao CC, Huang HC, Shen YC, Yang LM, Kuo YH. 2008. Antioxidant phenylpropanoid glycosides from *Smilax bracteata*. *Phytochemistry* **69**(6): 1398-1404.
- Zhang P, Jin WR, Shi Q, He H, Ma JZ, Qu HB. 2008. Two novel thiophenes from *Echinops grijissi* Hance. *Journal of Asian Natural Products Research* **10**(10): 977-981.
- Zhang YJ, Abe T, Tanaka T, Yang CR, Kouno I. 2002. Two new acylated flavanone glycosides from the leaves and branches of *Phyllanthus emblica*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* (Tokyo) **50**(6): 841-843.
- Znini M, Cristofari G, Majidi L, Paolini J, Desjobert JM, Costa J. 2013. Essential oil composition and antifungal activity of *Pulicaria mauritanica* Coss against postharvest phytopathogenic fungi in apples. *LWT - Food Science and Technology* **54**(2): 564-569.

Annexes



Photo 1. Colonne de gel de silice **Photo 2.** Un rota-vapeur **Photo 3.** La cuve

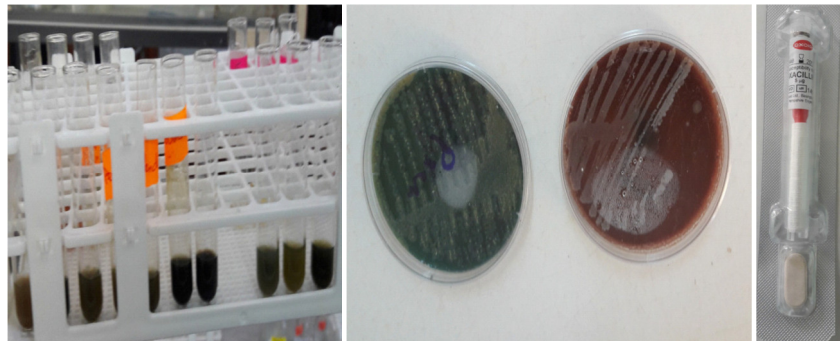


Photo 4. Screening phytochimique **Photo 5.** Souche bactérienne **Photo 6.** Oxacilline



Photo 7. Balance **Photo 8.** Étuve de 300C° **Photo 9.** La lampe UV



Photo 10. Préparation de CCM préparatives **Photo 11.** Ampoule à décanter



Photo 11. Minéralisation des extraits

Photo 12. Appareil ICP-AES



Photo 13. Appareil ICP/MS

Photo 14. Schlenk tube

Photo 15. Microscope



Photo 16. Appareil UV



Photo 17. Centrifugateur



Photo 19. HPLC analytique



Photo 20. Bain a ultrason



Photo 21. Spectroscopie infrarouge (IR / FTIR)

Résumé

Notre but dans ce travail était de chercher les métabolites secondaires de type flavonoïdes de deux familles (Astéracées et Cistacée) et de découvrir de nouveaux composés naturels à intérêt biologique. Les extraits issus de treize (13) espèces dont douze (12) provenant de la région des Aurès ont été soumis à un screening phytochimique. Sur la base des résultats de ce criblage préliminaires, l'investigation phytochimique des espèces *Pulicaria inuloides* et *Cistus albidus* a été effectuée. Cette démarche a permis l'isolement de douze (12) composés naturels, dont les caractérisations complètes a été effectuée grâce aux méthodes spectroscopiques, UV-Visible, IR et RMN. Onze (11) flavonoïdes, un (01) composé phénolique ont été décrits ainsi que deux dérivés acétylés d'un des composés isolé.

Les activités biologiques *in vitro* (activité antioxydante et antibactérienne) et les dosages des polyphénols, flavonoïdes et flavonols des différents extraits obtenus ont été discutés.

Nous avons également rapporté l'évaluation de l'activité antiparasitaire *in vitro* des deux espèces aromatiques *Pulicaria inuloides* et *Cistus albidus* contre *Leishmania amazonensis*, *Trypanosoma cruzi* et *Acanthamoeba castellanii* str. Neff. Le fractionnement bioguidé de l'extrait CHCl_3 de la partie aérienne de *P. inuloides* conduit à l'isolement et la caractérisation du flavonol ; quercétagétine-3,5,7,3'-tétraméthyléther comme composant actif. Deux dérivés acétylés ont été préparé à partir de ce composé naturel et ces trois composés ont été évalués pour leur activité contre la forme promastigote de *L. amazonensis*. Les trois composés ont présenté une activité leishmanienne modérée avec des valeurs de CI_{50} allant de 0,234 à 0,484 mM et une faible toxicité sur les cellules macrophagiques (CC_{50} allant de 0,365 à 0,664 mM). Cette étude rapporte pour la première fois l'évaluation antiparasitaire de *Pulicaria inuloides* et les résultats montrent que cette espèce peut être considérée comme une source d'agents anti leishmaniens. Le fractionnement bioguidé de l'extrait actif de CHCl_3 de *C. albidus* contre *T. cruzi* a conduit à isoler deux fractions F6,4 et F6,5 qui ont montré une activité puissante jusqu'à 100 $\mu\text{g/ml}$. Le fractionnement bioguidé de l'extrait actif d'AcOEt de la partie aérienne de *C. albidus* contre *A. castellanii* a conduit à isoler une fraction F14A qui a montré une activité importante jusqu'à 100 $\mu\text{g/ml}$. Les fractions F6,4 ; F6,5 et F14A sont constituées des mélanges de produits, qui n'ont pas été séparées.

Nous avons également décrits les compositions chimiques des huiles essentielles de *Pulicaria inuloides* et *Cistus albidus*. Les composés majoritaires de l'espèce *C. albidus* sont le manool et le 15,16-dinorlabd-8(20)-en-13-one dont le squelette est de type labdane est un marqueur spécifique dans ce genre, ces composés ne sont pas décrits dans les échantillons provenant d'autres régions et en particulier des régions méditerranéennes (Espagne et France) qui sont parus dans la littérature. Les composés majoritaires de l'espèce *Pulicaria inuloides* sont : le δ -cadinène, l' α -muurolène, le γ -cadinène, l' α -épi-cadinol et l' α -cadinol ne sont pas présents dans les autres échantillons de *Pulicaria inuloides* qui ont été récoltées dans d'autres régions.

Dans cette étude, les teneurs en minéraux (éléments inorganiques) de 21 extraits isolés de différentes espèces aromatiques du Sahara (*P. inuloides*) et de la région des Aurès (*Euphorbia helioscopia* L., *Peganum harmala* L., *Daphne gnidium* L., *Calendula algeriensis* L., *Bunium incrassatum* L., *Echinops ritro* L. *Marrubium deserti* de Noè., *Juniperus oxycedrus* L., *Juniperus phoenicea* L., *Marrubium vulgare* L., *Cedrus atlantica* (Endl.) Manetti et *Thymus algeriensis* L.) ont été également déterminées par spectroscopie d'émission atomique par plasma à couplage inductif (ICP-AES) et spectroscopie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS) et les résultats obtenus ont montré des concentrations plus élevées en Ca, K, Mg, Na et S (mg/kg) dans les différents extraits végétaux.

Mots clés : *Pulicaria inuloides*, *Cistus albidus*, les Aurès, fractionnement bioguidé, activité biologique, flavonoïdes, huiles essentielles, ICP-AES et ICP-MS.

Abstract

Our goal in this work was to search the secondary metabolites of flavonoids type from two species from Asteraceae and Cistaceae families in order to search new natural compounds of biological interest. Thirteen (13) extracts from different species including twelve (12) from the Aures regions were subjected to a phytochemical screening. On the basis of these preliminary results, the phytochemical investigation of the aerial parts two species, *Pulicaria inuloides* and *Cistus albidus* from the Bechar and the Aures regions respectively was carried out. This approach allowed the isolation of twelve natural compounds, among which eleven flavonoids, one phenolic compound as well as two acetyl derivatives of one of the isolated compounds were characterized using spectroscopic methods such as UV-Visible, IR and NMR.

The biological activities *in vitro* (antioxidant and antibacterial activity) as well as the total phenolic and flavonoids compounds of the various extracts were discussed.

We also reported the evaluation of the *in vitro* antiprotozoal activity of the two species *Pulicaria inuloides* and *Cistus albidus* against *Leishmania amazonensis*, *Trypanosoma cruzi* and *Acanthamoeba castellanii* str. *Neff*. The bioguided fractionation of the CHCl_3 extract from the aerial part of *P. inuloides* leads to the isolation and characterization of quercetagenin-3,5,7,3'-tetramethylether as the active ingredient. Two acetylated derivatives were prepared from this natural compound and these three compounds were evaluated for their activities against the promastigote form of *L. amazonensis*. All these compounds exhibited moderate leishmanicidal activity with IC_{50} values ranging from 0.234 to 0.484 mM and low toxicity to macrophage cells (CC_{50} ranging from 0.365 to 0.664 mM). This study reported the antiprotozoal evaluation of *Pulicaria inuloides* for the first time and the results show that this species can be considered as a source of anti-leishmanicidal agents. The bioguided fractionation of the active extract of CHCl_3 from *C. albidus* against *T. cruzi* led to the isolation of two fractions F6,4 and F6,5 which showed also a potent activity up to 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The bioguided fractionation of the active extract of AcOEt from the aerial part of *C. albidus* against *A. castellanii* led to the isolation of a fraction F14A which showed a significant activity up to 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Fractions F6,4 ; F6,5 and F14A consists of product mixtures, which have not been separated.

We have also described the chemical compositions of the essential oils of *Pulicaria inuloides* and *Cistus albidus*. The major compounds of the species *C. albidus* are manool and 15,16-dinorlabd-8(20)-en-13-one whose skeleton of type labdane is a specific marker in this genus, these compounds are not described in samples from other regions and in particular in the Mediterranean regions (Spain and France) that appeared in the literature. The major compounds of the species *Pulicaria inuloides* are: δ -cadinene, α -muurolene, γ -cadinene, α -epi-cadinol and α -cadinol are not present in the other samples of *Pulicaria inuloides* from other areas published in the literature.

In this study, the mineral content (inorganic elements) of 21 isolated extracts of various aromatic species of the Sahara (*P. inuloides*) and the Aures region (*Euphorbia helioscopia* L., *Peganum harmala* L., *Daphne gnidium* L., *Calendula algeriensis* L., *Bunium incrassatum* L., *Echinops ritro* L., *Marrubium deserti* de Noè., *Juniperus oxycedrus* L., *Juniperus phoenicea* L., *Marrubium vulgare* L., *Cedrus atlantica* (Endl.) Manetti and *Thymus algeriensis* L.) were also determined by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES) and inductively coupled plasma mass spectroscopy (ICP-MS) . The results obtained showed higher concentrations of Ca, K, Mg, Na and S (mg/kg) in the different plant extracts.

Key words: *Pulicaria inuloides*, *Cistus albidus*, Aures, bioguided fractionation, biological activity, flavonoids, essential oils, ICP-AES and ICP-MS.

ملخص

هدفنا في هذا العمل هو البحث عن منتجات الأيض الثانوي من نوع الفلافونويدات من عائلتين (الأستراسيا و السيستاسيا) لإكتشاف مركبات طبيعية جديدة ذات الفائدة البيولوجية. لإثبات ذلك قمنا في ذلك (12) نوعا تم قطفها من منطقة الأوراس، وضعت لتحاليل أولية، وناءا على نتائج هذه التحاليل الأولية لهذا الفحص، قمنا بالتحقيق الفيتوكيميائي لمستخلصات نباتتي *Pulicaria inuloides* و *Cistus albidus*. هذه العملية سمحت لنا بعزل (12) مركبا طبيعيا، من بينها إحدى عشرة (11) مركبا فلافونويديا، ومركب فينولي وكذلك مشتقين جديدين تم تحضيرهما من إحدى المركبات الفلافونويدية المتحصل عليها. تم تحديد نيتها الجزيئية باستخدام الطرق الطيفية مثل: الأشعة فوق البنفسجية IR, UV, و NMR.

تم كذلك مناقشة بعض الفعاليات البيولوجية مثل الفعالية المضادة للأكسدة والمضادة للجراثيم وكذا المحتوى الكلي للبوليفينولات، للفلافونويدات والفلافونولات.

قمنا أيضا بتقييم الفعالية المضادة للطفيليات مخبريا للنبتين *Pulicaria inuloides* و *Cistus albidus* ضد الليشمانيا من نوع *Leishmania amazonensis* و الأميبا من نوع *Acanthamoeba castellanii str. Neff* وكذا التريبانوسوما من نوع *Trypanosoma cruzi*. الفصل الموجه بيولوجيا لمستخلص الكلوروفورم الخاص بالأجزاء الهوائية لنبته *Pulicaria inuloides* سمح لنا بعزل وتحديد مركب من نوع فلافونول كمركب فعال تحت اسم: quercetagenin-3,5,7,3'-tetramethyl ether. تم تحضير أيضا اثنين من المشتقات الأستيلية انطلاقا من هذا المركب الطبيعي المتحصل عليه وقد تم تقييم فعالية كل من المركبات الثلاثة ضد الليشمانيا وروماستيقوت الشكل. المركبات الثلاثة أظهرت فعالية معتدلة ضد الليشمانيا بتركيز IC_{50} يتراوح من 0,234 إلى 0,484 ميليمولار وكذا أظهرت النتائج سمية منخفضة للمركبات الثلاثة بتركيز CC_{50} يتراوح بين 0,365 إلى 0,664 ميليمولار. هذه الدراسة تمثل أول تقرير لتقييم الفعالية المضادة للطفيليات لنبته *Pulicaria inuloides*، والنتائج المتحصل عليها تشير إلى أن هذا النوع يمكن اعتباره مصدرا واعدا للأدوية الخاصة بالليشمانيا. الفصل الموجه بيولوجيا لمستخلص الكلوروفورم الخاص بالأجزاء الهوائية لنبته *Cistus albidus* ضد التريبانوسوما كروزي سمح لنا بعزل المستخلصين الفعالين F6,4 و F6,5 اللذان أظهرتا فعالية بيولوجية تقدر ب: 100 µg/ml. الفصل الموجه بيولوجيا لمستخلص الأستيات الخاص بالأجزاء الهوائية لنبته *Cistus albidus* ضد الأكانتاميبيا كاستياني سمح لنا بعزل المستخلص الفعال F14A والذي أظهر فعالية بيولوجية تقدر ب: 100 µg/ml. المستخلصات F6,4 ; F6,5 و F14A تشكل مزيج من المركبات والتي لم يتم فصلها بعد.

قمنا في هذا العمل أيضا وفتحنا التراكيب الكيميائية للزيوت العطرية لكل من نباتتي (*Cistus* و *Pulicaria inuloides*) المركبات الرئيسية لنبته *Cistus albidus* هي: 15,16-dinorlabd-8(20)-en-13-one و manool لديها هيكل لإداني الذي يمثل هيكل مميز لهذا النوع من النباتات والتي لم تذكر في عينات من هذه النبتة من مناطق أخرى لا سيما مناطق البحر الأبيض المتوسط (إسبانيا وفرنسا) من الأبحاث المنشورة. أما المركبات الرئيسية لنبته *P. inuloides* فهي: α -epi-cadinol, γ -cadinene, muurolene, δ -cadinene, و α -cadinol والتي لم تذكر هي الأخرى في الأبحاث المنشورة لهذه النبتة.

تم تحديد أيضا في هذه الدراسة المحتويات المعدنية (أو العنصر غير العضوية) لواحد وعشرون (21) مستخلصا معزولا من نباتات عطرية مختلفة والتي تم قطفها سواء في الصحراء (*P. inuloides*) أو من منطقة الأوراس: (*Euphorbia helioscopia* L., *Peganum harmala* L., *Daphne gnidium* L., *Calendula algeriensis* L., *Bunium incrassatum* L., *Echinops ritro* L., *Marrubium deserti* de Noè., *Juniperus oxycedrus* L., *Thymus algeriensis* L., *Cedrus atlantica* (Endl.) Manetti, *Juniperus phoenicea* L., *Marrubium vulgare* (ICP-AES) تم تحديدها واسطة التحليل الطيفي للانبعاث الذري البلازمي (ICP-AES) والتحليل الطيفي الكتلي البلازمي (ICP-MS) والنتائج التي تم الحصول عليها أظهرت مستويات عليا من عناصر Ca, K, Mg, Na و S (ملغ/كغ) في مختلف مستخلصات النباتات.

كلمات مفتاحية: *Cistus albidus*, *Pulicaria inuloides*, الأوراس، الفعالية البيولوجية، الفصل الموجه بيولوجيا، الزيوت العطرية، التحليل الطيفي للانبعاث الذري (ICP-AES)، التحليل الطيفي الكتلي (ICP-MS).