

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

**UNIVERSITE CONSTANTINE 1
FACULTE DES SCIENCES EXACTES
DEPARTEMENT DE CHIMIE**

N° d'ordre :
Série :

THESE

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

Spécialité

Chimie Pharmaceutique

Par

**MME BERHAIL BOUDOUDA HOURIA
EPOUSE BOUROUISSA**

Thème

**Etude phytochimique et biologique des espèces *Biscutella raphanifolia*,
Zilla macroptera, *Inula graveolens* et *Inula viscosa***

Devant le jury :

Pr. Ahmed KABOUCHE
Pr. Zahia KABOUCHE
Pr. Amar ZELLAGUI
Pr. Nour-eddine GHERRAF
Pr. Rachid Benkiniouar

U. Constantine 1
U. Constantine 1
U. Larbi Ben M'hidi - Oum El-Bouaghi
U. Larbi Ben M'hidi - Oum El-Bouaghi
U. Constantine 1

Président
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur

Cette thèse est dédiée...

*À mes chers parents, source constante d'amour, d'encouragement,
de soutien et d'affection*

À mes frères et leurs épouses,

À mes sœurs et leurs époux,

À mes neveux et nièces,

À ma belle-famille,

À Seddik.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier très sincèrement ma directrice de thèse Madame la Professeure **Zahia Kabouche** pour m'avoir accueillie dans le laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques. Merci de m'avoir fait confiance et encouragée tout au long de ces années.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Monsieur le professeur **Ahmed Kabouche** de l'Université de Constantine I, d'avoir aimablement accepté de présider le jury de cette thèse. Je vous remercie aussi pour vos conseils, votre aide et votre disponibilité.

Je remercie vivement Monsieur le Professeur **Amar Zellagui** de l'Université d'Oum El Bouaghi, Monsieur le professeur **Nour-eddine Gherraf** de l'Université d'Oum El Bouaghi et Monsieur le professeur **Rachid Benkiniouar** de l'Université de Constantine I, d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail.

Je remercie Monsieur le Professeur **Olivier Thomas** de l'Université de Nice Sophia Antipolis (France) de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire pour effectuer une partie de ce travail.

Je tiens à remercier également Monsieur le Professeur **Mehmet Öztürk** de l'Université de Sitki Koçman-Müçla (Turquie) de m'avoir accueillie dans son laboratoire pour effectuer des activités biologiques.

Je remercie en particulier mon collègue du laboratoire Monsieur **Abbes Benmerache** qui m'a beaucoup encouragée et soutenue. Soyez assuré de toute ma gratitude.

J'ai cœur à adresser mes plus sincères remerciements à **Assia Khalfallah** et à **Nedjwa Berrehal**. Soyez assurées de toute ma gratitude, de mon profond respect et de ma sympathie.

Je remercie mes très chères amies **Sara Nemouchi**, **Imene Mennana**, **Sara Simoud**, **Rym Bousbaa**, **Ilhem Diaf** et **Amira**. Soyez assurées de ma gratitude et de mon amitié.

J'exprime également ma reconnaissance aux autres membres de l'équipe du laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques (LOST).

Un grand merci à mon mari *Seddik*, pour l'aide apportée pendant la rédaction de ce manuscrit et pour son soutien moral.

Toute ma gratitude va à ma mère et mes sœurs pour leur soutien tout au long de mes études et durant cette thèse.

Liste des abréviations

Techniques de chromatographie :

CCM : Chromatographie sur Couche Mince
CPP : Chromatographie sur Plaque Préparative
CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance
GC : Gaz Chromatography
GC/MS : Gaz Chromatography / Masse Spectrométrie
ml : millilitre
min : minute
l : litre
 R_f : Rapport frontal
tr : temps de rétention
u : unité

Détermination structurale :

COSY : COrelated SpectroscopY
d : doublet
dd : doublet de doublet
DEPT : Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
dt : doublet de triplet
HMBC : Heteronuclear Multiple Bonding Connectivity
HSQC : Heteronuclear Single Quantum Connectivity
Hz : Hertz
 J (Hz) : constante de couplage exprimée en Hertz
m : multiplet
MHz : mégahertz
NOESY : Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY
ppm : partie par million
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
RMN ^{13}C : Résonance Magnétique Nucléaire du carbone
RMN ^1H : Résonance Magnétique Nucléaire du proton
ROESY : ROtating Overhauser Effect SpectroscopY
s : singulet
SM : Spectrométrie de Masse
t : triplet
td : triplet de doublet
UV : Ultra-Violet
 λ_{max} : longueur d'onde maximale
 μg : Micro-gramme
 δ_{C} : Déplacement chimique du carbone en ppm
 δ_{H} : Déplacement chimique du proton en ppm

Solvants et réactifs :

AcAc : Acétylacétone
AcOEt : Acétate d'éthyle

AcONa : Acétate de sodium

MEC : Méthyléthylecétone

Dénomination des sucres :

Gal : Galactopyranose

Glc : Glucopyranose

Rha : Rhamnopyranose

Activité biologique :

ABTS : 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)

ATCC : American Type Culture Collection

BHA : ButylHydroxyAnisole

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CUPRAC : CUPric Reducing Antioxidant Capacity

DZI : Diamètre de Zone d'Inhibition

DPPH : 1,1-Diphényl-2-PicrylHydrazyl

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

CI₅₀ : Concentration Inhibitrice à 50%

NCCLS : National Committee for Clinical Laboratory Standard

nm : Nanomètre

I% : Pourcentage d'Inhibition

Liste des figures

Partie I : Revue bibliographique

Chapitre I : Aperçu bibliographique sur les Brassicaceae et sur les genres *Biscutella* et *Zilla*

Figure 1. Squelette des glucosinolates.....	6
Figure 2. Structures de quelques glucosinolates isolés de la famille des Brassicaceae	8
Figure 3. Structure de base des flavonoides.....	9
Figure 4. Différentes structures de flavonoides.....	10
Figure 5. Structures de quelques flavonoides isolés de la famille des Brassicaceae.....	20
Figure 6. Structures de quelques Coumarines isolées de la famille des Brassicaceae.....	24
Figure 7. Structure de phénylpropanoïde.....	31
Figure 8. Couplages oxydatifs de l'alcool coniférylique.....	31
Figure 9. Les groupes structuraux de lignanes.....	32
Figure 10. La biosynthèse des lignanes.....	33
Figure 11. Lignanes de la famille des Brassicaceae.....	34
Figure 12. Photos de <i>Biscutella raphanifolia</i> Poiret.....	35
Figure 13. Structures de composés isolés de l'espèce <i>Z. spinosa</i>	38
Figure 14. <i>Zilla macroptera</i> (Coss.) Maire.....	38

Chapitre II : Aperçu bibliographique sur les huiles essentielles du genre *Inula*

Figure 1. Photographie d' <i>Inula graveolens</i> (L.) Desf.....	47
Figure 2. Photographie d' <i>Inula viscosa</i> (L.) Ait.....	48

Chapitre III : Généralités sur les activités antioxydante, anticholinestérase et antibactérienne

Figure 1. Les antioxydants synthétiques les plus putatifs et populaires.....	52
Figure 2. Les mécanismes possibles de la réaction entre la quercétine comme un flavonoïde et les radicaux DPPH [•]	55
Figure 3. L'effet d'un antioxydant (AH) sur le radical DPPH [•]	59
Figure 4. Mécanisme de piégeage des radicaux par le resvératrol.....	60
Figure 5. Réaction proposée entre les radicaux DPPH et la curcumine.....	61
Figure 6. Génération d'ABTS ^{•+} par l'oxydation d'ABTS avec K ₂ S ₂ O ₈	62

Figure 7. Réaction de CUPRAC par une molécule antioxydante (HA: une molécule antioxydante, A ⁺ : une molécule antioxydante oxydée). Les protons libérés dans la réaction sont neutralisés par un tampon d'acétate d'ammonium.....	63
Figure 8. Structure chimique de la ferrozine.....	65
Figure 9. Chélation des ions ferreux (Fe ²⁺) par la curcumine.....	66
Figure 10. Chélation d'un ion ferreux par deux molécules de resvératrol.....	66
Figure 11. Réaction d'hydrolyse de l'acétylcholine.....	68
Figure 12. Structure chimique de deux substrats de l'acétylcholinestérase.....	69
Figure 13. Réduction de DTNB par la thiocholine.....	70

Partie II : Matériel et méthodes

Chapitre I : Matériel végétal et méthodes d'extraction, de séparation et de purification

Figure 1. Récapitulatif de l'extraction de <i>Biscutella raphanifolia</i> Poiret.....	73
Figure 2. Fractionnement et purification de la fraction F13.....	76
Figure 3. Fractionnement et isolement de la fraction F16.....	77
Figure 4. Récapitulatif de l'extraction de <i>Zilla macroptera</i>	79
Figure 5. Chromatogramme de l'extrait n-butanol.....	80
Figure 6. Chromatogramme de l'extrait n-butanol.....	82
Figure 7. Chromatogramme de l'extrait n-butanol.....	83
Figure 8. Chromatogramme de repurification de la fraction F6-F6bis-F7-P ₃ -P ₄	84
Figure 9. Chromatogramme de la fraction F6-F6bis-F7-P ₁	85
Figure 10. Chromatogramme de la fraction F6-F6bis-F7-P ₁ -P ₁	86
Figure 11. Chromatogramme de la fraction F6-F6bis-F7-P ₁ -P ₆	87
Figure 12. Récapitulatif sur le traitement de l'extrait butanolique de <i>Zilla macroptera</i> ..	88

Chapitre II : Activités biologiques

Figure 1 : Inhibition du DPPH par un phénol.....	91
---	----

Partie III : Résultats et discussion

Chapitre I : Etude phytochimique *Biscutella raphanifolia* Poiret.

Figure 1. Spectre RMN ¹ H du produit A4 (DMSO-d ₆ , 400 MHz).....	99
Figure 2. Spectre RMN ¹ H étalé du produit A4 (DMSO-d ₆ , 400 MHz).....	99
Figure 3. Plaque CCM de l'hydrolyse acide du composé A4	100
Figure 4. Spectre RMN ¹ H du produit A23 (CD ₃ OD, 400 MHz).....	103
Figure 5. Spectre RMN ¹ H étalé du produit A23 (CD ₃ OD, 400 MHz).....	104

Figure 6. Plaque CCM de l'hydrolyse acide du composé A23.....	104
Figure 7. Spectre RMN ¹³ C (400 MHz, CD ₃ OD) du produit A23.....	106
Figure 8. Spectre RMN ¹³ C étalé du produit A23 (400 MHz, CD ₃ OD).....	106
Figure 9. Spectre Dept 135 (400 MHz, CD ₃ OD) du produit A23.....	106
Figure 10. Spectre COSY (400 MHz, CD ₃ OD) du produit A23.....	107
Figure 11. Spectre COSY (400 MHz, CD ₃ OD) du produit A23.....	107
Figure 12. Spectre COSY (400 MHz, CD ₃ OD) du produit A23.....	108
Figure 13. Spectre HSQC (400 MHz, CD ₃ OD) du produit A23.....	108
Figure 14. Spectre HSQC (400 MHz, CD ₃ OD) du produit A23.....	109
Figure 15. Spectre HSQC (400 MHz, CD ₃ OD) du produit A23.....	109
Figure 16. Spectre HMBC (400 MHz, CD ₃ OD) du produit A23.....	110
Figure 17. Plaque CCM de l'hydrolyse acide du composé A23.....	112
Figure 18. Spectre HPLC-UV-DAD du composé A16.....	113

Chapitre II. Etude phytochimique *Zilla macroptera* (Coss.) Maire.

Figure 1. Spectre RMN ¹ H du composé P3-P3.....	115
Figure 2. Spectre RMN ¹³ C du composé P3-P3.....	115
Figure 3. Spectre RMN 1H étalé du composé P3-P3.....	117
Figure 4. Spectre RMN 1H étalé du composé P3-P3.....	117
Figure 5. Spectre COSY étalé du composé P3-P3.....	118
Figure 6. Spectre COSY étalé du composé P3-P3.....	118
Figure 7. Spectre COSY étalé du composé P3-P3.....	119
Figure 8. Corrélations observées sur le spectre COSY du composé P3-P3.....	119
Figure 9. Spectre HSQC du composé P3-P3.....	121
Figure 10. Spectre HSQC étalé du composé P3-P3.....	121
Figure 11. Spectre 13C du composé P3-P3.....	122
Figure 12. Spectre HMBC étalé du composé P3-P3.....	123
Figure 13. Spectre HMBC du composé P3-P3.....	123
Figure 14. Corrélations H-C observées sur le spectre HMBC.....	124
Figure 15. Spectre RMN ¹ H (CD ₃ OD/ 400 MHz) du composé P3-P6.....	126
Figure 16. Spectre COSY (CD ₃ OD/ 400 MHz) du composé P3-P6.....	126
Figure 17. Spectre HSQC (CD ₃ OD/ 400 MHz) du composé P3-P6.....	127
Figure 18. Spectre HMBC (CD ₃ OD/ 400 MHz) du composé P3-P6.....	128
Figure 19. Spectre RMN 1H (CD ₃ OD/400 MHz) du composé P3-P5.....	132
Figure 20. Spectre RMN ¹ H (MeOD, 400 MHz) du composé F3.....	132

Figure 21. Spectre RMN ¹ H étalé (MeOD, 400 MHz) du composé F3.....	133
Figure 22. Spectre COSY (MeOD, 400 MHz) du composé F3.....	133
Figure 23. Spectre COSY étalé (MeOD, 400 MHz) du composé F3.....	134
Figure 24. Spectre HSQC (MeOD, 400 MHz) du composé F3.....	134
Figure 25. Spectre HMBC (MeOD, 400 MHz) du composé F3.....	135
Figure 26. Spectre RMN ¹³ C (MeOD, 400 MHz) du composé F3.....	135
Figure 27. Spectre RMN ¹³ C (DMSO, 400 MHz) du composé F1.....	136
Figure 28. Spectre HSQC (DMSO, 400 MHz) du composé F1.....	137
Figure 29. Spectre RMN ¹ H (DMSO, 400 MHz) du composé F1.....	138
Figure 31. Corrélacion COSY H-H du composé F1.....	137
Figure 30. Spectre COSY (DMSO, 400 MHz) du composé F1.....	138
Figure 32. Spectre HMBC (DMSO, 400 MHz) du composé F1.....	139

Chapitre III : Analyse comparatives de la composition d'huiles essentielles des espèces *Inula graveolens* et *Inula viscosa*

Figure 1. Structures des composés majoritaires de l'huile essentielle d' <i>Inula graveolens</i> (L.) Desf.....	140
Figure 2. Structures des composés majoritaires de l'huile essentielle d' <i>Inula viscosa</i> ...	143

Chapitre IV : activités antioxydante, anticholinestérase et antibactérienne

Figure 1. Courbe représentant l'activité antiradicalaire DPPH des extraits de <i>Biscutella raphanifolia</i>	147
Figure 2. Courbe représentant l'activité antiradicalaire DPPH des extraits de <i>Zilla macroptera</i>	148
Figure 3. Courbe représentant l'activité antiradicalaire ABTS des extraits de <i>Biscutella raphanifolia</i>	150
Figure 4. Courbe représentant l'activité antiradicalaire ABTS des extraits de <i>Zilla macroptera</i>	151
Figure 5. Les résultats de l'activité de réduction cuprique des extraits de <i>Biscutella raphanifolia</i> mesurées à 100 µg/ml comparés avec les standards.....	152
Figure 6. Les résultats de l'activité de réduction cuprique des extraits de <i>Zilla macroptera</i> mesurées à 100 µg/ml comparés avec les standards.....	153
Figure 7. Les résultats de l'activité de chélation des ions ferreux des extraits de <i>Biscutella raphanifolia</i> mesurées à 100 µg/ml et d'EDTA.....	154
Figure 8. Les résultats de l'activité de chélation des ions ferreux des extraits de <i>Zilla</i>	155

macroptera mesurées à 100 µg/ml comparé avec l'EDTA.....

Figure 9. Classement des extraits par ordre croissant de l'activité antioxydante (DPPH, ABTS⁺ et CUPRAC)..... 157

Figure 10. Classement des extraits par ordre croissant de l'activité antioxydante (Chélation des ions ferreux)..... 157

Liste des tableaux

Partie I : Revue bibliographique

Chapitre I : Aperçu bibliographique sur les Brassicaceae et sur les genres *Biscutella* et *Zilla*

Tableau 1. Quelques glucosinolates isolés d'espèce de famille des Brassicaceae.....	7
Tableau 2. Quelques flavonoides isolés de différentes espèces de la famille des Brassicaceae.....	10
Tableau 3. Coumarines isolées de la famille des Brassicaceae.....	24
Tableau 4. Quelques alcaloïdes isolés des Brassicaceae (Soledade <i>et al.</i> , 2010)	26
Tableau 5. Quelques terpénoïdes isolés des Brassicaceae.....	28
Tableau 6. Quelques composés isolés de l'espèce <i>Z. spinosa</i>	37

Chapitre II : Aperçu bibliographique sur les huiles essentielles du genre *Inula*

Tableau 1. Composants majoritaires ($\geq 5\%$) d'huiles essentielles du genre <i>Inula</i>	45
Tableau 2. Composants majoritaires ($\geq 5\%$) d'huiles essentielles de l'espèce <i>Inula viscosa</i>	46
Tableau 3. Composants majoritaires ($\geq 5\%$) d'huiles essentielles de l'espèce <i>Inula graveolens</i>	46

Chapitre III : Généralités sur les activités antioxydante, anticholinestérase et antibactérienne

Tableau 1. Quelques avantages et inconvénients des antioxydants synthétiques et naturels couramment utilisés pour la protection des produits alimentaires (Valenzuela et Nieto, 1996; Gulçin, 2002).....	56
---	----

Partie II : Matériel et méthodes

Chapitre I : Matériel végétal et méthodes d'extraction, de séparation et de purification

Tableau 1. Rendements des extraits de <i>Biscutella raphanifolia</i>	72
Tableau 2. Résultats de séparation par chromatographie sur colonne de polyamide CS ₆ de l'extrait <i>n</i> -butanol.....	74
Tableau 3. Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de la fraction F13.....	75

Tableau 4. Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de gel de silice de la fraction F16.....	76
Tableau 5. Rendements des extraits de <i>Zilla macroptera</i>	78
Tableau 6. Conditions chromatographiques d'élution.....	80
Tableau 7. Résultats de la chromatographie sur colonne de l'extrait n-butanol.....	81
Tableau 8. Condition chromatographique d'élution.....	82
Tableau 9. Résultats de la séparation de la fraction F6-F6bis-F7.....	82
Tableau 10. Résultats de séparation de la fraction F6-F6bis-F7-P ₃	83
Tableau 11. Résultats de la séparation de la fraction F6-F6bis-F7-P ₁	85
Tableau 12. Résultats de la séparation de la fraction F6-F6bis-F7-P ₁ -P ₁	86
Tableau 13. Résultats de la repurification de la fraction F6-F6bis-F7-P ₁ -P ₆	87

Partie III : Résultats et discussion

Chapitre I : Etude phytochimique *Biscutella raphanifolia* Poiret.

Tableau 1. Données spectrales UV du composé A4.....	97
Tableau 2. Données RMN ¹ H du produit A4 (DMSO-d ₆ , 400 MHz).....	98
Tableau 3. Données spectrales UV du composé A23.....	101
Tableau 4. Données RMN ¹ H du produit A23 (CD ₃ OD, 400 MHz).....	103
Tableau 5. Données RMN ¹³ C (400 MHz, CD ₃ OD) du produit A23.....	105
Tableau 6. Données spectrales UV du composé C9.....	111

Chapitre II. Etude phytochimique *Zilla macroptera* (Coss.) Maire.

Tableau 1. Déplacements chimiques en RMN ¹ H (500 MHz) du composé P3-P3 dans CD ₃ OD.....	120
Tableau 2. Déplacements chimiques en RMN ¹³ C (500 MHz) du composé P3-P3 dans CD ₃ OD.....	124
Tableau 3. Déplacement chimique en RMN ¹ H et ¹³ C du composé P3-P6.....	129
Tableau 4. Déplacements chimiques en RMN ¹ H (CD ₃ OD/400 MHz) du composé P3-P5.....	130
Tableau 5. Déplacements chimiques en RMN ¹ H et ¹³ C du composé F3.....	135
Tableau 6. Déplacements chimiques en RMN ¹³ C (DMSO, 400 MHz) du composé F1..	136
Tableau 7. Déplacements chimiques en RMN ¹ H (DMSO, 400 MHz) du composé F1..	138

Chapitre III : Analyse comparatives de la composition d'huiles essentielles des espèces *Inula graveolens* et *Inula viscosa*

Tableau 1. Composition l'huile essentielle des parties aériennes fraîches d' <i>Inula graveolens</i> (L.) Desf.....	141
--	-----

Tableau 2. Composition des l'huiles essentielles des parties aérienne fraiche d' <i>I. viscosa</i> (L.) Ait.....	144
---	-----

**Chapitre IV : activités antioxydante, anticholinestérase
et antibactérienne**

Tableau 1. Pouvoir d'inhibition CI_{50} des extraits de <i>Biscutella raphanifolia</i> et des standards.....	147
Tableau 2. Pouvoir d'inhibition CI_{50} des extraits de <i>Zilla macroptera</i>	149
Tableau 3. Pouvoir d'inhibition CI_{50} des extraits de <i>Biscutella raphanifolia</i> et des standards.....	150
Tableau 4. Pouvoir d'inhibition CI_{50} des extraits de <i>Zilla macroptera</i>	151
Tableau 13. Pourcentages d'inhibition de l'activité Acétylcholinestérase des extraits de <i>Biscutella raphanifolia</i> Poiret.....	158
Tableau 14. Pourcentages d'inhibition de l'activité Butyrylcholinestérase des extraits de <i>Biscutella raphanifolia</i> Poiret.....	158
Tableau 15. Pourcentages d'inhibition de l'AChE des extraits de <i>Zilla macroptera</i>	159
Tableau 16. Résultats de l'activité antibactérienne des extraits d'éther de pétrole, de dichlorométhane et de <i>n</i> -butanol de l'espèce <i>Biscutella raphanifolia</i>	161
Tableau 17. Activité antibactérienne des huiles essentielles d' <i>Inula viscosa</i> (L.) Ait.....	162

Sommaire

Introduction générale1

Partie I : Revue bibliographique

Chapitre I : Aperçu bibliographique sur les Brassicaceae et sur les genres *Biscutella* et *Zilla*

I. Présentation des Brassicaceae (Crucifères).....	3
I.1. Caractéristiques des Brassicaceae.....	3
I.2. Utilisation des Brassicaceae.....	3
I.3. Activités biologiques des Brassicaceae.....	4
I.4. Principaux métabolites secondaires de plantes de la famille des Brassicaceae.....	5
I.4.1. Les glucosinolates.....	5
I.4.2. Les flavonoides.....	9
I.4.3. Les coumarines.....	21
I.4.4. Les alcaloïdes.....	24
I.4.5. Les terpénoïdes.....	26
I.4.6. Les lignanes.....	30
II. Aperçu bibliographique sur le genre <i>Biscutella</i>	34
II.1. Généralités.....	34
II.2. Description du genre <i>Biscutella</i>	35
II.3. Description botanique de l'espèce <i>Biscutella raphanifolia</i> Poiret.....	35
III. Aperçu bibliographique sur le genre <i>Zilla</i>	36
III.1. Généralités.....	36
III.2. Description du genre <i>Zilla</i>	36
III.3. Travaux antérieurs sur le genre <i>Zilla</i>	36
III.4. Description botanique de l'espèce	38

Chapitre II : Aperçu bibliographique sur les huiles essentielles du genre *Inula*

I. Introduction.....	40
II. Généralités sur les huiles essentielles	41
II.1. Définition et localisation.....	41
II.2. Activités biologiques des huiles essentielles.....	41
II.3. Méthodes d'extraction des huiles essentielles	
III. Les huiles essentielles du genre <i>Inula</i>	42
III.1. Présentation botanique et géographique de la famille des Asteraceae.....	42

III.2. Aperçu bibliographique sur le genre <i>Inula</i>	42
III.2.1. Présentation du genre <i>Inula</i>	42
III.2.2. Utilisation en médecine traditionnelle.....	42
III.2.3. Métabolites secondaires du genre <i>Inula</i>	43
III.2.4. <i>Inula graveolens</i>	47
III.2.4.1 Description botanique de la plante	47
III.2.4.2. Classification dans la systématique botanique.....	47
III.2.5. <i>Inula viscosa</i>	48
III.2.5.1. Description botanique de la plante.....	48
III.2.5.2. Classification dans la systématique botanique.....	49

Chapitre III : Généralités sur les activités antioxydante, anticholinestérase et antibactérienne

I. Activité antioxydante.....	50
Introduction.....	50
1. Antioxydants synthétiques.....	52
2. Les antioxydants naturels.....	53
3. Les flavonoides.....	53
4. Les acides phénoliques.....	55
5. Effets antioxydants.....	56
6. Tests d'activité antioxydante.....	57
Essai de piégeage des radicaux.....	57
6.1. Test du DPPH [•]	58
6.2. Test de balayage ABTS ^{•+}	61
6.3. Réduction cuprique (CUPRAC).....	63
6.4. Chélation des ions ferreux.....	64
Conclusion.....	67
II. Activité anticholinestérase.....	67
1. La maladie d'Alzheimer.....	67
2. Mesure de l'activité anticholinestérase.....	69
III. Activité antibactérienne.....	70
III.1. Technique de diffusion en milieu gélosé « antibiogramme »	70
III.2. Définition de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	71
III.3. Les souches bactériennes.....	71
3.1. Cocci gram positif.....	71
3.2. Bacilles gram négatif.....	71

Partie II : Matériel et méthodes

Chapitre I : Matériel végétal et méthodes d'extraction, de séparation et de purification

I. <i>Biscutella raphanifolia</i> Poiret.....	72
I.1. Récolte et séchage de la plante.....	72
I.2. Extraction.....	72
I.3. Traitement des extraits.....	74
I.4. Séparation et purification des composés de l'extrait <i>n</i>-butanol.....	74
I.4.1. Fractionnement de la fraction F13.....	75
I.4.2. Fractionnement de la fraction F16.....	76
Conclusion.....	77
II. <i>Zilla macroptera</i>.....	78
II.1. Récolte et séchage.....	78
II.2. Extraction.....	78
II.3. Traitement des extraits.....	80
II.4. Séparation et purification des composés de l'extrait <i>n</i>-butanol.....	80
II.4.1. Séparation chromatographique sur colonne.....	81
II.4.2. Analyse des fractions de l'extrait <i>n</i>-butanol.....	81
II.4.3. Etude de la fraction F6-F6bis-F7.....	81
II.4.3.a. Fractionnement de la fraction F6-F6bis-F7-P₃.....	83
II.4.3.b. Fractionnement de la fraction F6-F6bis-F7-P₁.....	84
Conclusion.....	88
III. Les huiles essentielles.....	89
III.1. Hydrodistillation des l'huiles essentielles.....	89
III.2. Analyse GC et GC/MS.....	89
III.2.1. Analyse GC.....	89
III.2.2. Analyse GC/MS.....	89
III.2.3. Identification des composants	90

Chapitre II : Activités biologiques

I. Activité antioxydante.....	91
I.1. Activité antiradicalaire DPPH.....	91
I.2. Essai de décoloration de radical cation ABTS⁺	92

I.3. La réduction cuprique (CUPRAC).....	92
I.4. Chélation des ions ferreux.....	93
II. Activité anticholinestérase.....	93
III. Activité antibactérienne.....	94
III.1. Microorganismes testés.....	94
III.2. Les tests de sensibilité.....	95

Partie III : Résultats et discussion

Chapitre I : Etude phytochimique *Biscutella raphanifolia* Poiret.

I. Elucidation structurale des composés isolés.....	96
I.1. Le produit A4.....	96
I.2. Le produit A23.....	100
I.3. Le produit C9.....	110
I.4. Le produit A16	116

Chapitre II. Etude phytochimique *Zilla macroptera* (Coss.) Maire.

II. Elucidation structurale des produits isolés.....	115
II.1. Elucidation structurale de produit P3-P3.....	115
II.2. Elucidation structurale de produit P3-P6.....	125
II.3. Elucidation structurale de produit P3-P5.....	129
II.4. Elucidation structurale de produit F3.....	131
II.5. Elucidation structurale de produit F1.....	136

Chapitre III : Analyse comparative de la composition d'huiles essentielles des espèces

Inula graveolens et *Inula viscosa*

I. <i>Inula graveolens</i>	140
I.1. Résultats et discussion de l'analyse GC/MS.....	140
II. <i>Inula viscosa</i>	142
II.1. Résultats et discussion de l'analyse GC/MS.....	142

Chapitre IV : activités antioxydante, anticholinestérase et antibactérienne

I. Activité antioxydante.....	147
I.1. Activité antiradicalaire DPPH.....	147
I.2. Essai de décoloration de radical cation ABTS ⁺	149

I.3. La réduction cuprique (CUPRAC).....	152
I.4. Chélation des ions ferreux.....	154
II. Activité anticholinestérase.....	158
II.1. Résultats de l'activité anticholinestérase du <i>Biscutella raphanifolia</i>.....	158
II.2. Résultats de l'activité anticholinestérase du <i>Zilla macroptera</i>.....	159
III. Activité antibactérienne.....	160
III.1. Activité antibactérienne de <i>Biscutella raphanifolia</i> Poiret.....	160
III.2. Evaluation de l'activité antibactérienne des l'huiles essentielles d'<i>Inula viscosa</i>.....	162
Conclusion générale.....	164
Références bibliographiques.....	166

Introduction générale

Introduction générale

L'histoire de la médecine traditionnelle rapporte qu'au fil des âges, l'homme n'a cessé de chercher de subvenir à ses besoins médicaux en puisant dans la nature qu'il découvre en général dans l'utilisation de plusieurs plantes qui s'avèrent très bénéfiques pour sa santé.

Les plantes aromatiques et médicinales sont depuis toujours une source essentielles de découverte de nouvelles molécules bioactives.

L'organisation mondiale de la santé (OMS) estime que près de 80% de la population de la plupart des pays en développement s'appuient sur les médicaments à base de plantes pour leurs besoins en matière de soins de santé (de Silva, 1997 ; Mukherjee et Wahil, 2006).

L'industrie pharmaceutique préfère d'exploiter les plante utilisées en médecine traditionnelle ou populaire pour extraire leurs principes actifs aux propriétés biologiques inédite.

Du point de vue de la composition chimique, Les plantes sont extrêmement complexes. On estime qu'elles sont formées de plusieurs milliers de constituants différents dont quelques un seulement sont responsables de l'effet thérapeutique ou toxique (Hostettmann *et al.*, 1998).

La flore Algérienne avec 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques dont 15% sont endémiques (Qeuzel et Santa, 1962).

Cette source semblent inépuisable puisque seule une petite partie des espèces végétales ont été investiguées dans les plans phytochimique et pharmacologique.

Ce travail s'inscrit dans le cadre de recherche des substances naturelles d'origines végétales à activités biologiques lancé par notre laboratoire pour but de l'étude des plantes algériennes, notre choix s'est porté de trois genres : *Biscutella* et *Zilla* de la famille des Brassicaceae et *Inula* de la famille des Asteraceae. La sélection du genre *Inula* s'est basée essentiellement sur sa richesse remarquable en métabolites secondaires d'un grand intérêt biologique. Alors que, la recherche bibliographique effectuée sur la famille des Brassicaceae a montré que les métabolites secondaires de cette famille sont peu étudiés ce qui nous a donné une motivation pour la concrétisation de ce travail.

En fixant comme principale objectif, l'extraction, la séparation et l'identification des métabolites secondaires ainsi que des activités biologiques des espèces *Biscutella raphanifolia* et *Zilla macroptera*. L'analyse des huiles essentielles des espèces *Inula graveolens* et *Inula viscosa* ainsi que l'activité antibactérienne de cette dernière huile.

Ce manuscrit est divisé en trois parties :

- ❖ La première partie, comportant trois chapitres, est une revue bibliographique traitant des généralités sur la famille des Brassicaceae et sur les genres *Biscutella* et *Zilla*. Cette partie comprend également des généralités sur les huiles essentielles et une bibliographie sur les huiles essentielles du genre *Inula*. Elle se termine par des généralités sur les activités antioxydante, anticholinestérase et antibactérienne
- ❖ Dans la deuxième partie, le matériel végétal et les méthodes utilisées sont décrits en détail.
- ❖ La troisième partie comporte quatre chapitres décrivant les résultats phytochimiques et d'activité antioxydante, anticholinestérase et antibactérienne.

Partie I

Revue bibliographique

Chapitre I

Aperçu bibliographique sur la famille des Brassicaceae et sur les genre Biscutella et Zilla

I. Présentation des Brassicaceae (Crucifères)

La famille des Brassicaceae anciennement appelée Crucifères est une famille très importante de plantes dicotylédones comportant 338 genres avec près de 3709 espèces (Warwick *et al.*, 2006), divisées en plus de 34 tribus (Koch *et al.*, 2009). Les différentes espèces sont distribuées dans le monde entier, mais surtout dans les zones tempérées (Franzke *et al.*, 2009), en particulier le bassin méditerranéen, les régions Sud-Sst et Centrale de l'Asie (Koch *et al.*, 2006), ainsi que dans la zone climatique « Irano-Touranienne » (Hedge, 1976).

Cette famille se propage dans la presque totalité des habitats et des milieux de vie possibles: bords de ruisseaux, bords de chemins, sables et rochers maritimes, pelouses humides ou sèches, prairies de montagne, talus calcaires, cultures et jardins.

I.1. Caractéristiques des Brassicaceae

- Plantes généralement herbacées, très rarement sous-arbrisseaux ou arbustes.
- Feuilles généralement alternes et dépourvues de stipules.
- Fleurs caractéristiques à quatre pétales disposés en croix, d'où la désignation ancienne de Crucifères. La composition de la fleur est constante à quelques exceptions près: 4 sépales, 4 pétales, 6 étamines dont 2 externes courtes et 4 internes longues, et 1 pistil diloculaire.
- Les fruits caractéristiques par : silique ou silicules, généralement déhiscents, avec toutefois de grandes variations de formes.

I.2. Utilisation des Brassicaceae

Les plantes Brassicacées comportent un groupe des légumes les plus consommés partout dans le monde, elles sont considérées comme une bonne source de composés phytochimiques bioactifs (Podsdek, 2007).

Plusieurs Brassicaceae possèdent un intérêt économique majeur et sont cultivées pour :

- La production de légumes :

Le raifort (*Armoracia rusticana*), le cresson de terre (*Barbarea verna*), le navet (*Brassica rapa*), le rutabaga (*Brassica napus*), le chou chinois (*Brassica pekinensis*), la roquette (*Eruca sativa*), la giroflée (*Erysimum cheiri*), le cresson de fontaine (*Nasturtium officinale*), le radis (*Raphanus sativus*), les choux, les moutardes...

- Plantes oléagineuses :

La cameline (*Camelina sativa*), Le colza (*Brassica napus oleracea*), le navet (*Brassica rapa*)...

- Plantes ornementales telles que :

Le genre *Malcomia* ex. La malcomie maritime (*Malcomia maritima*).

Le genre *Matthiola* ex. Tort giroflée (*Matthiola incana*).

Le genre *Cheiranthus* ex. La giroflée violier (*Cheiranthus cheiri*).

Le genre *Lunaria* ex. La monnaie du pape (*Lunaria annua*).

Le genre *Alissum* ex. Alysson à calices persistants (*Alissum calycinum*).

Le genre *Aubrieta* qui regroupe 12 espèces de plantes à fleurs originaires d'Europe et d'Asie centrale.

- Fourrages comme les choux et le colza.

I.3. Activités biologiques des Brassicaceae

Les plantes de cette famille ont des propriétés antifongiques, antirhumatismales, et antidiabétiques (Kirtikar et Basu, 1975).

Les légumes de la famille des Brassicaceae comportent des composés qui ont des activités anti-cancérigène et immunomodulatrice (Preobrazhenskaya *et al.*, 1993 ; Moreno *et al.*, 2006), qui ont révélé la présence de l'ascorbigen (Un dérivé d'indole contenant de l'acide L-ascorbique) et des glucosinolates.

Le sulforaphane est un produit d'hydrolyse de glucosinolates qui sont abondants dans les légumes du genre *Brassica*, et un des plus puissants aliments anti-carcinogènes (Tanongkankit *et al.*, 2011).

L'espèce *Brassica oleracea* est une source importante de fibres alimentaires et divers composés possédant des activités anti-ulcère (Lemous *et al.*, 2011), antifongique (Sisti *et al.*, 2003), antitrypanosomienne (Lgweh *et al.*, 2002), antioxydante (Sousa *et al.*, 2009; Samec *et al.*, 2011), antimicrobienne (Survay *et al.*, 2012), et immunomodulatrice (Thejass *et al.* 2007). Le pollen de *Brassica napus* L. a été utilisé depuis des décennies en Chine pour traiter l'hyperplasie bénigne de la prostate (HBP) (Han *et al.*, 2007).

I.4. Principaux métabolites secondaires de plantes de la famille des Brassicaceae

La recherche bibliographique réalisée sur les plantes de la famille des Brassicaceae montre la richesse de cette dernière en métabolites secondaires tels que :

- Les glucosinolates (Fahey *et al.*, 2011).
- Les flavonoides (Marzouk, online 2011).
- Les coumarines (Hashem, 2007).
- Les terpènes (Al-Gendya *et al.*, 2010).
- Les stéroïdes (Jahangir *et al.*, 2009).
- Les alcaloïdes (Brock *et al.*, 2006).
- Les lignanes (Milder *et al.*, 2005).

I.4.1. Les glucosinolates

Les glucosinolates appelés autrefois les hétérosides soufrés ou thioglucosides (β -thioglucoside-N-hydroxysulfates), précurseurs des isothiocyanates, sont présents dans seize familles d'angiospermes dicotylédones, y compris un grand nombre d'espèces comestibles où ils sont responsables de la saveur amère ou piquante de nombreux aliments communs comme la moutarde, les radis, le cresson, le chou-fleur etc...

Les glucosinolates et / ou leurs produits de dégradation sont connus depuis longtemps pour leurs propriétés fongicides, bactéricides, nématocides et allélopathique (Fahey *et al.*, 2001), et ont récemment suscité l'intérêt de la recherche intense en raison de leurs attributs chimioprotecteurs de cancer (Verhoeven *et al.*, 1997).

De nombreux commentaires ont porté sur la présence de glucosinolates dans les légumes, principalement la famille des Brassicacées (y compris le genre *Brassica*). Les objectifs principaux de la plupart des recherches antérieures ont été mis sur les aspects négatifs de ces composés en raison de la prévalence de certains glucosinolates « antinutritionnels » ou goitrigène. Il y a, cependant, un côté positif de cette image représenté par les propriétés thérapeutiques et prophylactiques d'autres glucosinolates « nutritionnels » ou « fonctionnels ». En plus des légumes comestibles du genre *Brassica* pourrait fournir d'importantes quantités de glucosinolates chimiquement et biologiquement actifs (Fahey *et al.*, 2011).

Le squelette d'un glucosinolate (Figure 1) comporte un glucose, un groupe sulfate et un aglycone variable qui peut être: une chaîne soufrée, une chaîne aliphatique linéaire, chaîne aliphatique branchée, alcène, chaîne alcoolique, chaîne linéaire avec carbonyle, hydrocarbure aromatique, benzoate, indole, ou multiglycosylé et autres.

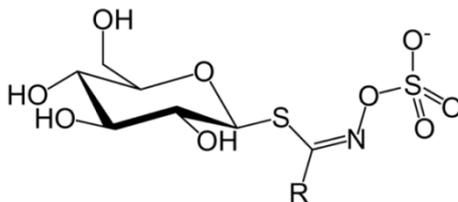


Figure 1. Squelette des glucosinolates

Actuellement, plus de 140 glucosinolates ont été identifiés au cours des trois dernières décennies dans les plantes (Auria et Gershenzon, 2005), dont pas moins d'une trentaine dans le colza (*Brassica napus*). Cette grande diversité est liée à celle des acides aminés précurseurs de ces composés. Sept acides aminés sont concernés (alanine, leucine, isoleucine, valine, phénylalanine, tyrosine et tryptophane) et divers homologues.

Le tableau 1 comporte quelques glucosinolates isolés d'espèce de cette famille et la figure 2 montre les structures de chaque composé.

Tableau 1. Quelques glucosinolates isolés d'espèce de famille des Brassicaceae

Nom de l'espèce	Nom du glucosinolate	Structure	Référence
<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>italica</i>	2-mercaptomethyl Sulfinyl Glucosinolate	G1	Survay <i>et al.</i> , 2012
	(Z)-1-((2S,5S)-5-hydroxytetra-hydro-2H-pyran-2-ylthio)-2-(1H-indol-3-yl) ethylidene amino Sulfate	G2	
	6'-O-trans-(4"- hydroxy Cinnamoyl)-4-(methylsulphinyl) butyl Glucosinolate	G3	Survay <i>et al.</i> , 2010
<i>Brassica alboglabra</i> Bailey	3-(Methylsulphinyl)propyl Glucosinolate	G4	Sun <i>et al.</i> , 2011
	neo-glucobrassicine	G5	
	4-Methoxyglucobrassicine	G6	
	3-Butenylglucosinolate	G7	
	Glucorucine	G8	
<i>Erysimum corinthium</i> Boiss	Sinigrine	G9	Al-Gendya <i>et al.</i> , 2010
	2(R)-Hydroxy-3-butenyl Glucosinolate	G10	
	3-(methylcarbonyl)propyl Glucosinolate	G11	
	Glucocheiroline	G12	
	4-Methylsulfonylbutyl Glucosinolate	G13	
<i>Hornungia petraea</i>	Glucotropaeoline	G14	Radulović <i>et al.</i> , 2012
	Glucolimnanthine	G15	
	Glucolepigramine	G16	
	Glucoaubrietine	G17	

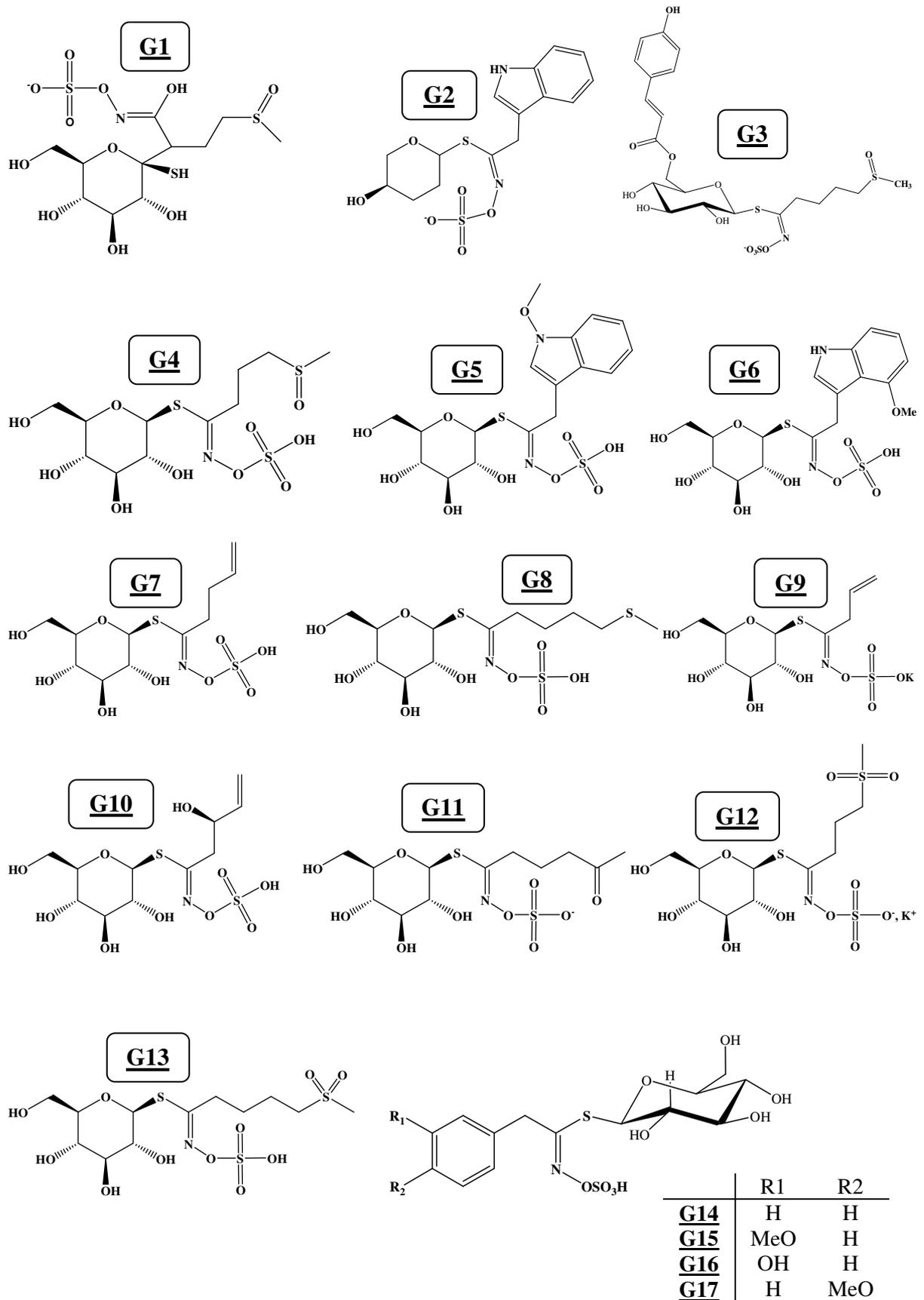


Figure 2. Structures de quelques glucosinolates isolés de la famille des Brassicaceae

I.4.2. Les flavonoides

Les flavonoides sont des métabolites secondaires des plantes partageant tous une même structure de base (Figure 3) à 15 atomes de carbones constitué de deux unités aromatiques A et B reliés par une chaîne de trois carbones souvent fermée en un hétérocycle oxygéné hexagonal ou pentagonal (Bruneton, 1999).

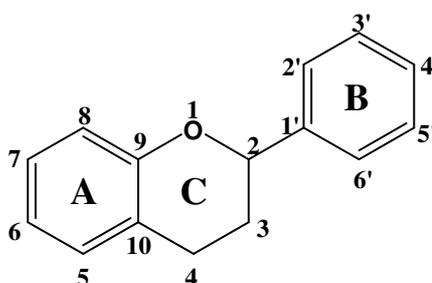


Figure 3. Structure de base des flavonoides

Ils ont été découverts par Albert Szent-Györgyi en 1936 qui a reçu le prix Nobel en 1937 (Grzybowski *et al.*, 2013), et dans les années 50, une étude des composés flavaniques de l'écorce de pin et des pépins de raisin et dépose des brevets sur la purification des procyanidines oligomères et leurs utilisations thérapeutiques.

Les flavonoïdes forment une sous-classe des polyphénols; ils représentent une source importante d'antioxydants dans notre alimentation. Il y en a plus de 9000 à avoir été décrits chez le règne végétal où ils sont présents le plus souvent sous la forme soluble d'hétérosides (Martens *et al.*, 2005), dont les plus importants sont les flavones, les isoflavones, les flavanones, les isoflavanones, les flavonols, les dihydroflavonols, les chalcones, les anthocyanes, les aures et les cathéchines (Figure 4). Ces divers composés sont reconnus par leurs nombreuses activités biologiques: antivirale, anti-inflammatoire, anticancéreuse etc...

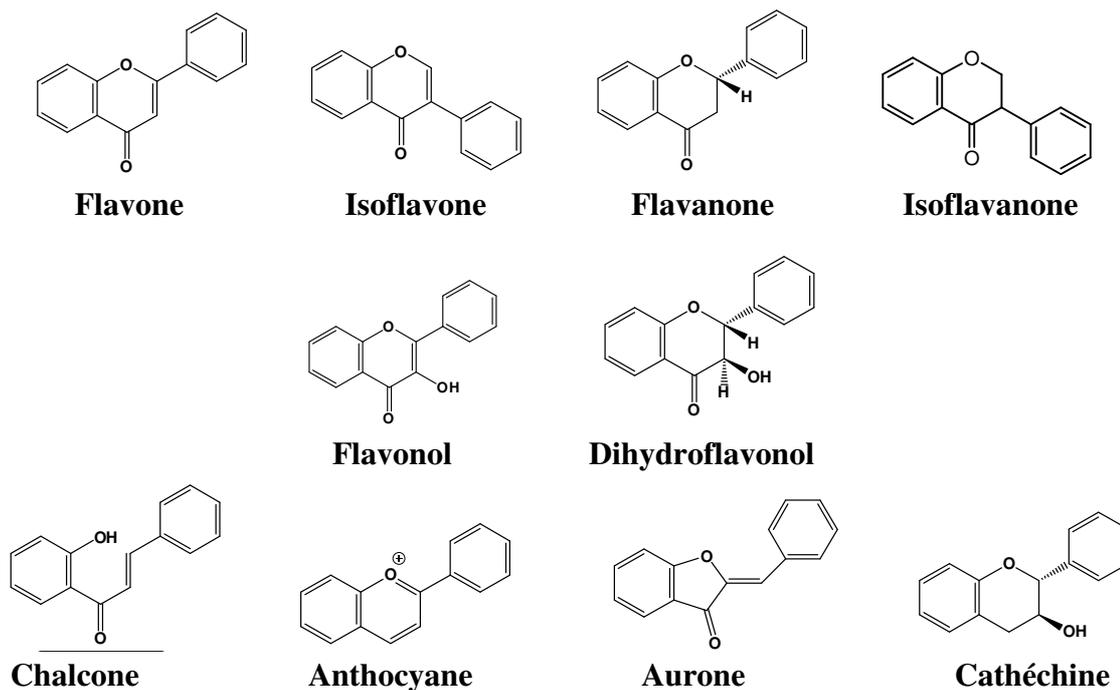


Figure 4. Différentes structures de flavonoides

Les flavonoides sont des pigments responsables des couleurs jaune, rouge, bleu, et brune des fleurs et des fruits, ils s'en servent pour attirer les insectes pollinisateurs (Harborne *et al.*, 1978a; Harborne *et al.*, 1978b), ils jouent aussi un rôle dans la protection de la plante contre les UV et de défense contre les pathogènes et les insectes ravageurs (Brehm *et al.*, 1975).

Le tableau 2 rassemble quelques espèces de la famille des Brassicaceae et leurs contenus flavonique, les structures respectives sont données dans la figure 5.

Tableau 2. Quelques flavonoides isolés de différentes espèces de la famille des Brassicaceae

Nom du flavonoides et N° de structure	Espèce	Référence
Kaempferol 3- <i>O</i> -sophorotrioside-7- <i>O</i> -glucopyranoside [S1]	<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>costata</i>	Vrchovská <i>et al.</i> , 2006
Kaempferol 3- <i>O</i> -sophoroside-7- <i>O</i> -glucopyranoside [S3]		
	<i>Brassica napus</i>	Olsson <i>et al.</i> , 1998
	<i>Erucaria hispanica</i>	Marzouk, In Press
Kaempferol 3- <i>O</i> -sophorotrioside-7- <i>O</i> -sophoroside [S4]	<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>costata</i>	Vrchovská <i>et al.</i> , 2006
Kaempferol 3- <i>O</i> -sophoroside-7- <i>O</i> -sophoroside [S5]		
Kaempferol 3- <i>O</i> -(feruloyl/caffeoyl)-sophoroside-7- <i>O</i> -glucopyranoside [S7]		
Kaempferol 3- <i>O</i> -sophorotrioside [S8]		

Kaempferol 3- <i>O</i> -(sinapoyl)-sophoroside [S9]		
Kaempferol 3- <i>O</i> -(feruloyl)-sophorotrioside [S10]		
Kaempferol 3- <i>O</i> -(feruloyl)-sophoroside [S11]		
Kaempferol 3- <i>O</i> -sophoroside [S12]		
Kaempferol 3- <i>O</i> -glucopyranoside [S13]		
Isorhamnetin 3,7- <i>O</i> -di- β -D-glucopyranoside [S14]	<i>Brassica rapa</i>	Sasaki <i>et al.</i> , 2002
Kaempferol 3-(2'''- <i>E</i> -sinapoylsophoroside)-7-glucopyranoside [S16]	<i>Brassica napus</i>	Olsson <i>et al.</i> , 1998
Quercetin 3-sophoroside-7-glucopyranoside [S17]		
Quercetin 3-(2'''- <i>E</i> -sinapoylsophoroside)-7-glucopyranoside [S18]		
Luteolin [S20]	<i>Spirodela polyrhiza</i>	Kim <i>et al.</i> , 2010
Naringenin [S19]	<i>Brassica napus</i>	Han <i>et al.</i> , 2007
Kaempferol [S21]		
Kaempferol 3-(3- <i>E-p</i> -coumaroyl- α -L-rhamnopyranoside) [S22]		
Kaempferol 3-(2,3- <i>di-E-p</i> -coumaroyl- α -L-rhamnopyranoside) [S23]		
3,5,6,7,8-pentahydroxy-4'-methoxy flavones [S24]	<i>Brassica alba</i>	Ponce <i>et al.</i> , 2004
3,5,6,7,8-pentahydroxy flavones [S25]		
2',3',4',5',6'-pentahydroxy chalcone [S26]		
Apigenin [S27]	<i>Erucaria hispanica</i>	Marzouk, In Press
	<i>Spirodela polyrhiza</i>	Kim <i>et al.</i> , 2010
Cyanidin 3- <i>O</i> -[2- <i>O</i> -(2- <i>O</i> -(4- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -(4- <i>O</i> -(β -glucopyranosyl)- <i>trans</i> -caffeoyl)- β -glucopyranosyl)- <i>trans</i> -caffeoyl)- β -glucopyranosyl)-6- <i>O</i> -(<i>trans</i> -caffeoyl)- β -glucopyranoside]-5- <i>O</i> -[6- <i>O</i> -(malonyl)- β -glucopyranoside] [S28]	<i>Moricandia arvensis</i>	Tatsuzawa <i>et al.</i> , 2013
Saxatilis C [S31]		
Saxatilis D [S32]		
Quercetin 3- <i>O</i> -[2- <i>O</i> -(α -rhamnopyranosyl)- β -galactopyranoside]-7- <i>O</i> -(α -rhamnopyranoside) [S33]	<i>Hesperis matronalis</i>	Tatsuzawa, 2013
Kaempferol 3- <i>O</i> -[2- <i>O</i> -(α -rhamnopyranosyl)- β -galactopyranoside]-7- <i>O</i> -(α -rhamnopyranoside) [S34]		
Cyanidin 3- <i>O</i> -[2- <i>O</i> -(2- <i>O</i> -(<i>E</i> -sinapoyl)- β -D-xylopyranosyl)-6- <i>O</i> -(4- <i>O</i> -(β -D-glucopyranosyl)- <i>E-p</i> -coumaroyl)- β -D-glucopyranoside]-5- <i>O</i> -[β -D-glucopyranoside] [S35]	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Nakabayashi <i>et al.</i> , 2009
Cyanidin 3- <i>O</i> -[2- <i>O</i> -(β -D-xylopyranosyl)- β -D-glucopyranoside]-5- <i>O</i> -[β -D-glucopyranoside] [S37]		

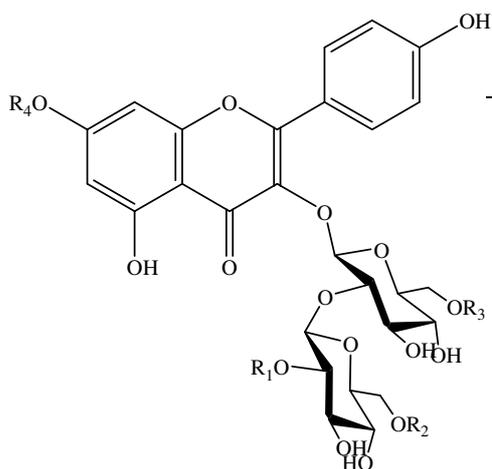
Cyanidin 3- <i>O</i> -[2- <i>O</i> -(β-D-xylopyranosyl)-6- <i>O</i> -(<i>E-p</i> -coumaroyl)-β-D-glucopyranoside]-5- <i>O</i> -[β-D-glucopyranoside] [S38]	<i>Cheiranthus cheiri</i>	Tatsuzawa <i>et al.</i> , 2006
Cyanidin 3- <i>O</i> -[2- <i>O</i> -(β-D-xylopyranosyl)-6- <i>O</i> -(<i>E-p</i> -coumaroyl)-β-D-glucopyranoside]-5- <i>O</i> -[6- <i>O</i> -(malonyl)-β-D-glucopyranoside] [S39]	<i>Iberis umbellata</i> L.	Saito <i>et al.</i> , 2008
	<i>Lunaria annua</i>	Tatsuzawa <i>et al.</i> , 2006
Cyanidin 3- <i>O</i> -[2- <i>O</i> -(2- <i>O</i> -(<i>E</i> -sinapoyl)-β-D-xylopyranosyl)-6- <i>O</i> -(4- <i>O</i> - <i>E-p</i> -coumaroyl)-β-D-glucopyranoside]-5- <i>O</i> -[6- <i>O</i> -(malonyl)-β-D-glucopyranoside] [S41]	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Nakabayashi <i>et al.</i> , 2009
Cyanidin 3- <i>O</i> -[2- <i>O</i> -(2- <i>O</i> -(<i>E</i> -sinapoyl)-β-D-xylopyranosyl)-6- <i>O</i> -(4- <i>O</i> -(β-D-glucopyranosyl)-(<i>E-p</i> -coumaroyl)-β-D-glucopyranoside)-5- <i>O</i> -[6- <i>O</i> -(malonyl)-β-D-glucopyranoside] [S42]		
Quercetin 3- <i>O</i> -α-L-rhamnopyranoside [S43]		
Quercetin 7- <i>O</i> -α-L-rhamnopyranoside [S44]		
Kaempferol 3,7- <i>O</i> -α-L-dirhamnopyranoside [S45]	<i>Erucaria hispanica</i>	Marzouk, In Press
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Nakabayashi <i>et al.</i> , 2009
Quercetin 3,7- <i>O</i> -α-L-dirhamnopyranoside [S46]		
Kaempferol 3- <i>O</i> -β-D-glucopyranosyl-7- <i>O</i> -α-L-rhamnopyranoside [S47]	<i>Erucaria hispanica</i>	Marzouk, In Press
Quercetin 3- <i>O</i> -β-D-glucopyranosyl-7- <i>O</i> -α-L-rhamnopyranoside [S48]	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Nakabayashi <i>et al.</i> , 2009
Kaempferol 3- <i>O</i> -α-L-rhamnopyranosyl (1 → 2)-β-D-glucopyranoside-7- <i>O</i> -α-L-rhamnopyranoside [S49]		
Quercetin 3- <i>O</i> -α-L-rhamnopyranosyl (1 → 2)-β-D-glucopyranoside-7- <i>O</i> -α-L-rhamnopyranoside [S50]		
Delphinidin 3- <i>O</i> -[2- <i>O</i> -(β-xylopyranosyl)-6- <i>O</i> -(<i>cis-p</i> -coumaroyl)-β-glucopyranoside]-5- <i>O</i> -[6- <i>O</i> -(malonyl)-β-glucopyranoside] [S51]	<i>Heliophila coronopifolia</i> L.	Saito <i>et al.</i> , 2011
Delphinidin 3- <i>O</i> -[2- <i>O</i> -(β-xylopyranosyl)-6- <i>O</i> -(<i>trans</i> -caffeyl)-β-glucopyranoside]-5- <i>O</i> -[6- <i>O</i> -(malonyl)-β-glucopyranoside] [S52]		
Delphinidin 3- <i>O</i> -[2- <i>O</i> -(β-xylopyranosyl)-6- <i>O</i> -(<i>trans-p</i> -coumaroyl)-β-glucopyranoside]-5- <i>O</i> -β-glucopyranoside [S53]		
Delphinidin 3- <i>O</i> -[2- <i>O</i> -(β-xylopyranosyl)-6- <i>O</i> -(<i>trans</i> -feruloyl)-β-glucopyranoside]-5- <i>O</i> -β-glucopyranoside		

[S54]		
Delphinidin 3- <i>O</i> -[2- <i>O</i> -(β -xylopyranosyl)-6- <i>O</i> -(<i>trans-p</i> -coumaroyl)- β -glucopyranoside]-5- <i>O</i> -[6- <i>O</i> -(malonyl)- β -glucopyranoside] [S55]		
Delphinidin 3- <i>O</i> -[2- <i>O</i> -(β -xylopyranosyl)-6- <i>O</i> -(<i>trans-feruloyl</i>)- β -glucopyranoside]-5- <i>O</i> -[6- <i>O</i> -(malonyl)- β -glucopyranoside] [S56]		
Cyanidin 3-[2-(xylosyl)-6-(<i>trans-p</i> -coumaroyl)-glucopyranoside]-5-[6-(malonyl)-glucopyranoside] [S57]		
Cyanidin 3-[2-(xylopyranosyl)-6-(<i>trans-feruloyl</i>)-glucopyranoside]-5-[6-(malonyl)-glucopyranoside] [S58]		
Cyanidin 3- <i>O</i> -[2- <i>O</i> -(2- <i>O</i> -(4- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -(4- <i>O</i> -(β -D-glucopyranosyl)- <i>trans</i> -caffeoil)- β -D-glucopyranosyl)- <i>trans</i> -caffeoil)- β -D-xylopyranosyl)-6- <i>O</i> -(4- <i>O</i> -(β -D-glucopyranosyl)- <i>trans</i> -sinapoyl)- β -D-glucopyranoside]-5- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -malonyl- β -D-glucopyranoside) [S60]	<i>Orychophragonus violaceus</i>	Honda <i>et al.</i> , 2005
Cyanidin 3- <i>O</i> -[2- <i>O</i> -(2- <i>O</i> -(4- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -(4- <i>O</i> -(β -D-glucopyranosyl)- <i>trans</i> -caffeoil)- β -D-glucopyranosyl)- <i>trans</i> -caffeoil)- β -D-xylopyranosyl)-6- <i>O</i> -(4- <i>O</i> -(β -D-glucopyranosyl)- <i>trans</i> -feruloyl)- β -D-glucopyranoside]-5- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside [S61]		
Cyanidin 3- <i>O</i> -[2- <i>O</i> -(2- <i>O</i> -(4- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -(4- <i>O</i> -(β -D-glucopyranosyl)- <i>trans</i> -caffeoil)- β -D-glucopyranosyl)- <i>trans</i> -caffeoil)- β -D-xylopyranosyl)-6- <i>O</i> -(4- <i>O</i> -(β -D-glucopyranosyl)- <i>trans-p</i> -coumaroyl)- β -D-glucopyranoside]-5- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -malonyl- β -D-glucopyranoside) [S62]		
Kaempferol 3- <i>O</i> - β -D-[β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 2)glucopyranoside]-7- <i>O</i> - β -D-[β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 4)glucopyranoside] [S63]	<i>Brassica oleracea</i>	Nielsen <i>et al.</i> , 1998
Kaempferol 3- <i>O</i> - β -D-[2- <i>E</i> -sinapoyl- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 2)glucopyranoside]-7- <i>O</i> - β -D-[β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 4)glucopyranoside] [S64]		
Kaempferol 3- <i>O</i> - β -D-[2- <i>E</i> -feruloyl- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 2)glucopyranoside]-7- <i>O</i> - β -D-[β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 4)glucopyranoside] [S65]		
Kaempferol 3- <i>O</i> - β -D-[2- <i>E</i> -caffeoil- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 2)glucopyranoside]-7- <i>O</i> - β -D-[β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 4)glucopyranoside] [S66]		
Cyanidin 3- <i>O</i> -[2- <i>O</i> -(2- <i>O</i> -(<i>trans-feruloyl</i>)- β -glucopyranosyl)-6- <i>O</i> -(4- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -(4- <i>O</i> -(β -glucopyranosyl)- <i>trans-feruloyl</i>)- β -glucopyranosyl)- <i>trans-p</i> -coumaroyl)- β -glucopyranoside]-5- <i>O</i> -[6- <i>O</i> -(malonyl)- β -glucopyranoside] [S67]	<i>Iberis umbellata</i> L.	Saito <i>et al.</i> , 2008
Cyanidin 3- <i>O</i> -[2- <i>O</i> -(β -glucopyranosyl)-6- <i>O</i> -(4- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -(4- <i>O</i> -(β -glucopyranosyl)- <i>trans-feruloyl</i>)- β -glucopyranosyl)- <i>trans-p</i> -coumaroyl)- β -		

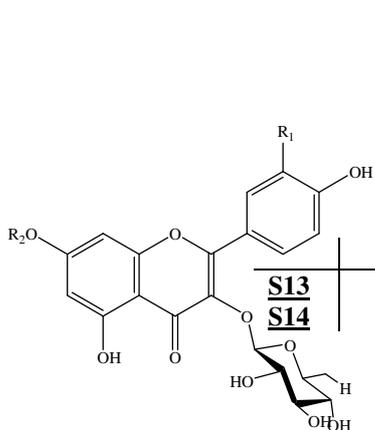
glucopyranoside]-5- <i>O</i> -[6- <i>O</i> -(malonyl)- β -glucopyranoside] [S68]		
Cyanidin 3- <i>O</i> -[2- <i>O</i> -(2- <i>O</i> -(<i>trans</i> -sinapoyl)- β -glucopyranosyl)-6- <i>O</i> -(4- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -(<i>trans</i> -feruloyl)- β -glucopyranosyl)- <i>trans-p</i> -coumaroyl)- β -glucopyranoside]-5- <i>O</i> -[6- <i>O</i> -(malonyl)- β -glucopyranoside] [S69]		
Cyanidin 3- <i>O</i> -[2- <i>O</i> -(2- <i>O</i> -(<i>trans</i> -feruloyl)- β -glucopyranosyl)-6- <i>O</i> -(4- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -(<i>trans</i> -feruloyl)- β -glucopyranosyl)- <i>trans-p</i> -coumaroyl)- β -glucopyranoside]-5- <i>O</i> -[6- <i>O</i> -(malonyl)- β -glucopyranoside] [S70]		
Cyanidin 3- <i>O</i> -[2- <i>O</i> -(β -glucopyranosyl)-6- <i>O</i> -(4- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -(<i>trans</i> -feruloyl)- β -glucopyranosyl)- <i>trans-p</i> -coumaroyl)- β -glucopyranoside]-5- <i>O</i> -[6- <i>O</i> -(malonyl)- β -glucopyranoside] [S71]		
Cyanidin 3- <i>O</i> -[2- <i>O</i> -(2- <i>O</i> -(<i>trans</i> -sinapoyl)- β -glucopyranosyl)-6- <i>O</i> -(4- <i>O</i> -(β -glucopyranosyl)- <i>trans-p</i> -coumaroyl)- β -glucopyranoside]-5- <i>O</i> -[6- <i>O</i> -(malonyl)- β -glucopyranoside] [S72]		
Cyanidin 3- <i>O</i> -[2- <i>O</i> -(2- <i>O</i> -(<i>trans</i> -feruloyl)- β -glucopyranosyl)-6- <i>O</i> -(4- <i>O</i> -(β -glucopyranosyl)- <i>trans-p</i> -coumaroyl)- β -glucopyranoside]-5- <i>O</i> -[6- <i>O</i> -(malonyl)- β -glucopyranoside] [S73]		
Cyanidin 3- <i>O</i> -[2- <i>O</i> -(β -glucopyranosyl)-6- <i>O</i> -(4- <i>O</i> -(β -glucopyranosyl)- <i>trans-p</i> -coumaroyl)- β -glucopyranoside]-5- <i>O</i> -[6- <i>O</i> -(malonyl)- β -glucopyranoside] [S74]		
Cyanidin 3- <i>O</i> -[2- <i>O</i> -(2- <i>O</i> -(<i>trans</i> -sinapoyl)- β -glucopyranosyl)-6- <i>O</i> -(<i>trans-p</i> -coumaroyl)- β -glucopyranoside]-5- <i>O</i> -[6- <i>O</i> -(malonyl)- β -glucopyranoside] [S75]		
Cyanidin 3- <i>O</i> -[2- <i>O</i> -(2- <i>O</i> -(<i>trans</i> -feruloyl)- β -glucopyranosyl)-6- <i>O</i> -(<i>trans-p</i> -coumaroyl)- β -glucopyranoside]-5- <i>O</i> -[6- <i>O</i> -(malonyl)- β -glucopyranoside] [S76]		
Cyanidin 3- <i>O</i> -[2- <i>O</i> -(β -D-xylopyranosyl)-6- <i>O</i> -(<i>cis-p</i> -coumaroyl)- β -D-glucopyranoside]-5- <i>O</i> -[β -D-glucopyranoside] [S79]	<i>Cheiranthus cheiri</i>	
Cyanidin 3- <i>O</i> -[2- <i>O</i> -(β -D-xylopyranosyl)-6- <i>O</i> -(<i>cis-p</i> -coumaroyl)- β -D-glucopyranoside]-5- <i>O</i> -[6- <i>O</i> -(malonyl)- β -D-glucopyranoside] [S81]	<i>Lunaria annua</i>	Tatsuzawa <i>et al.</i> , 2006
Cyanidin 3- <i>O</i> -[2- <i>O</i> -(β -D-xylopyranosyl)-6- <i>O</i> -(<i>trans</i> -feruloyl)- β -D-glucopyranoside]-5- <i>O</i> -[6- <i>O</i> -(malonyl)- β -D-glucopyranoside] [S82]		
Cyanidin 3- <i>O</i> -[2- <i>O</i> -(β -D-xylopyranosyl)-6- <i>O</i> -(4- <i>O</i> -(β -D-glucopyranosyl)- <i>trans-p</i> -coumaroyl)- β -D-	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Nakabayashi <i>et al.</i> , 2009

glucopyranoside]-5-O-(β-D-glucopyranoside) [S83]		
Cyanidin 3-O-[2-O-(2-O-(<i>trans</i> -caffeoyl)-β-D-xylopyranosyl)-6-O-(4-O-(β-D-glucopyranosyl)- <i>trans</i> - <i>p</i> -coumaroyl)-β-D-glucopyranoside]-5-O-(β-D-glucopyranoside) [S84]		Tatsuzawa <i>et al.</i> , 2006
Cyanidin 3-O-[2-O-(2-O-(<i>trans</i> -caffeoyl)-β-D-xylopyranosyl)-6-O-(<i>trans</i> - <i>p</i> -coumaroyl)-β-D-glucopyranoside]-5-O-(β-D-glucopyranoside) [S85]		
Cyanidin 3-O-[2-O-(2-O-(<i>trans</i> -feruloyl)-β-D-xylopyranosyl)-6-O-(<i>trans</i> - <i>p</i> -coumaroyl)-β-D-glucopyranoside]-5-O-(β-D-glucopyranoside) [S86]		
Cyanidin 3-O-[2-O-(2-O-(<i>trans</i> -feruloyl)-β-D-xylopyranosyl)-6-O-(4-O-(β-D-glucopyranosyl)- <i>trans</i> - <i>p</i> -coumaroyl)-β-D-glucopyranoside]-5-O-β-D-glucopyranoside [S87]	<i>Lobularia maritima</i>	
Cyanidin 3-O-[2-O-(β-D-xylopyranosyl)-6-O-(<i>trans</i> -feruloyl)-β-D-glucopyranoside]-5-O-β-D-glucopyranoside [S88]		Tatsuzawa <i>et al.</i> , 2007
Cyanidin 3-O-[2-O-(2-O-(<i>trans</i> -caffeoyl)-β-D-xylopyranosyl)-6-O-(<i>trans</i> -feruloyl)-β-D-glucopyranoside]-5-O-β-D-glucopyranoside [S89]		
Cyanidin 3-O-[2-O-(2-O-(<i>trans</i> -feruloyl)-β-D-xylopyranosyl)-6-O-(<i>trans</i> -feruloyl)-β-D-glucopyranoside]-5-O-β-D-glucopyranoside [S90]		
Cyanidin 3-O-[2-O-(2-O-(<i>trans</i> -sinapoyl)-3-O-(β-D-glucopyranosyl)-β-D-xylopyranosyl)-6-O-(<i>trans</i> - <i>p</i> -coumaroyl)-β-D-glucopyranoside]-5-O-[6-O-(malonyl)-(β-D-glucopyranoside) [S91]		
Cyanidin 3-O-[2-O-(2-O-(<i>trans</i> -sinapoyl)-3-O-(β-D-glucopyranosyl)-β-D-xylopyranosyl)-6-O-(<i>cis</i> - <i>p</i> -coumaroyl)-β-D-glucopyranoside]-5-O-[6-O-(malonyl)-(β-D-glucopyranoside) [S92]	<i>Malcolmia maritima</i> (L.)	Tatsuzawa <i>et al.</i> , 2008
Cyanidin 3-O-[2-O-(2-O-(<i>trans</i> -sinapoyl)-3-O-(β-D-glucopyranosyl)-β-D-xylopyranosyl)-6-O-(<i>trans</i> - <i>p</i> -coumaroyl)-β-D-glucopyranoside]-5-O-(β-D-glucopyranoside) [S93]		
Kaempferol-3-O-β-sophoroside-7-O-β-2 ^{'''} feruloyl glucopyranoside [S96]		
Luteolin 6,8-di- <i>C</i> -β-glucopyranoside [Lucenin 1] [S98]		
Isorhamnetin-3-O-β-glucopyranoside-7-O-α-rhamnopyranoside [S100]		
Luteolin 8- <i>C</i> -β-glucopyranoside [Orientin] [S101]	<i>Erucaria hispanica</i>	Marzouk, In Press
Apigenin 8- <i>C</i> -β-glucopyranoside [Vitexin] [S102]		
Quercetin 7-O-β-glucopyranoside [S103]		
Isorhamnetin [S105]		
3,7,4'-Trihydroxyflavone [S106]		

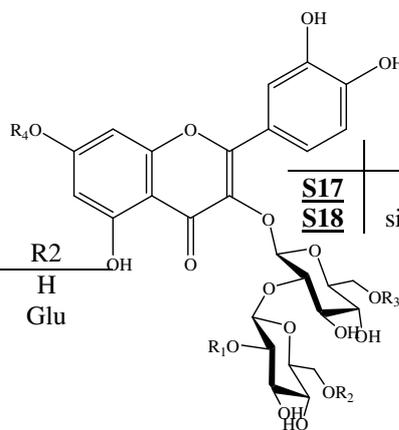
Quercetin 3-O-galactopyranoside [S108]	<i>Erucaria microcarpa</i> Bioss	Hashem, 2007
Robinetin [S110]		
Isorhamnetin-3-O-galactopyranoside [S111]		
Chrysoeriol [S112]	<i>Spirodela polyrhiza</i>	Kim <i>et al.</i> , 2010
Vitexin [S115]		
Orientin [S117]		
Luteolin 7-O-β-D-glucopyranoside [S118]		



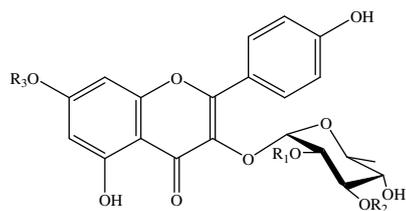
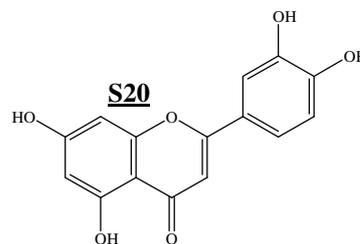
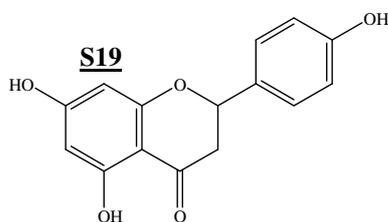
	R1	R2	R3	R4
S1	Glu	H	H	Glu
S3	H	H	H	Glu
S4	Glu	H	H	Glu
S5	H	H	H	sophorose
S7	H	feruloyl	caffeoyl	Glu
S8	Glu	H	H	H
S9	H	H	sinapoyl	H
S10	Glu	H	feruloyl	H
S11	H	H	feruloyl	H
S12	H	H	H	H
S16	sinapoyl	H	H	Glu



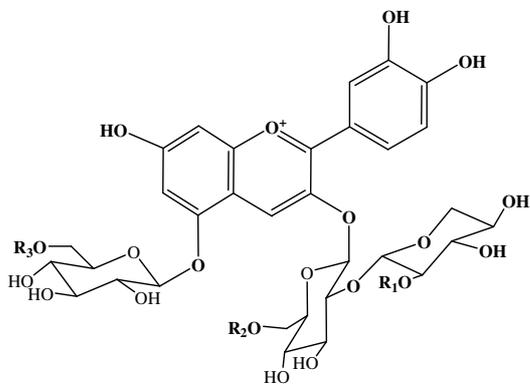
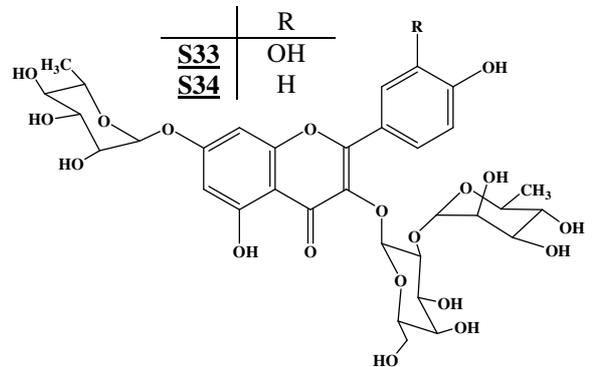
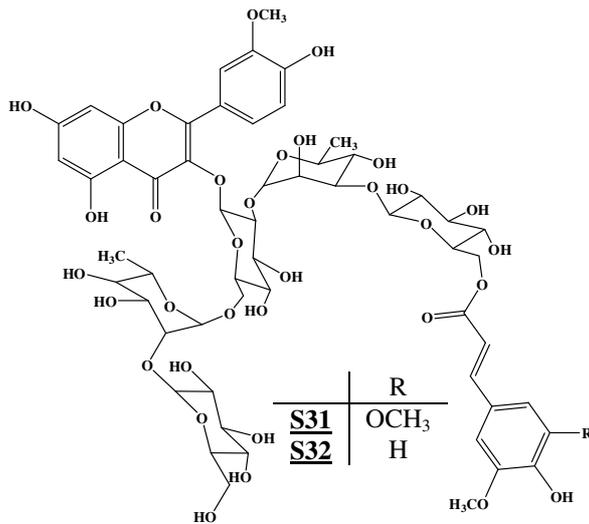
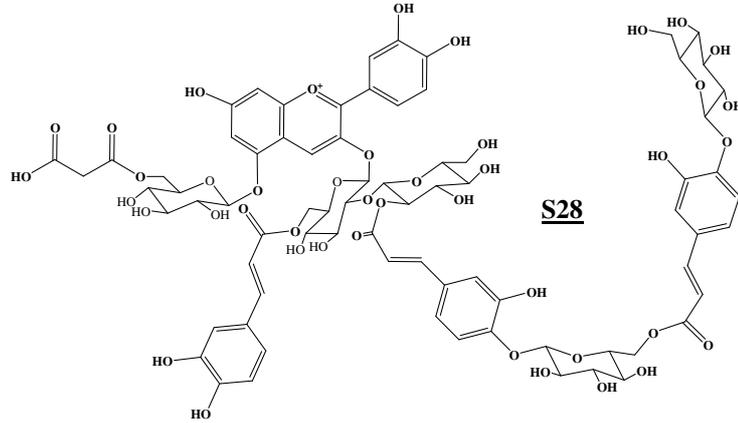
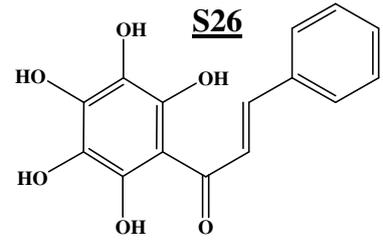
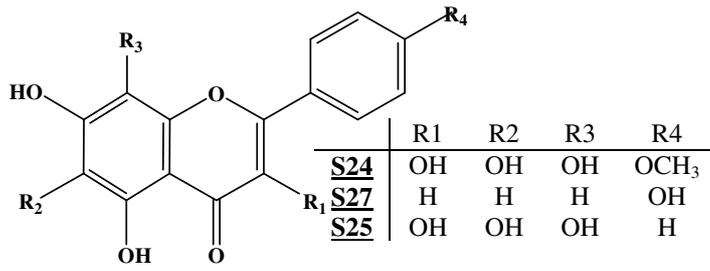
	R1	R2
S13	OH	H
S14	OCH ₃	Glu



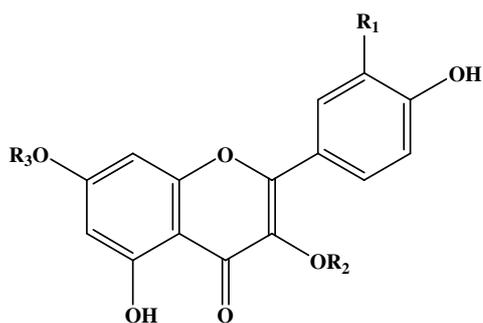
	R1	R2	R3	R4
S17	H	H	H	Glu
S18	sinapoyl	H	H	Glu



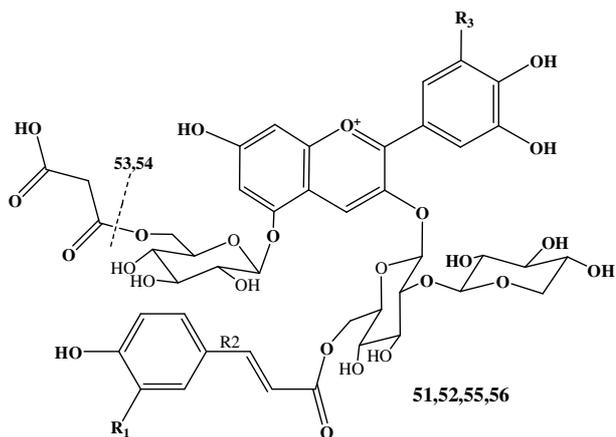
	R1	R2	R3
S22	H	<i>trans-p</i> - coumaroyl	H
S23	<i>trans-p</i> - coumaroyl	<i>trans-p</i> - coumaroyl	H
S119	Ara	H	Rha



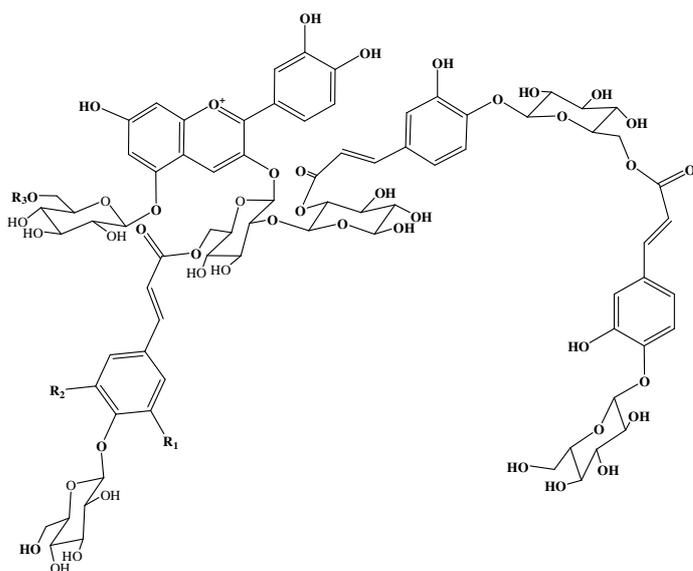
	R1	R2	R3
S37	H	H	H
S38	H	<i>p</i> -coumaroyl	H
S39	H	<i>p</i> -coumaroyl	malonyl
S40	H	<i>p</i> -coumaroyl-Glu	H
S41	sinapoyl	<i>p</i> -coumaroyl	malonyl
S42	sinapoyl	<i>p</i> -coumaroyl-Glu	malonyl



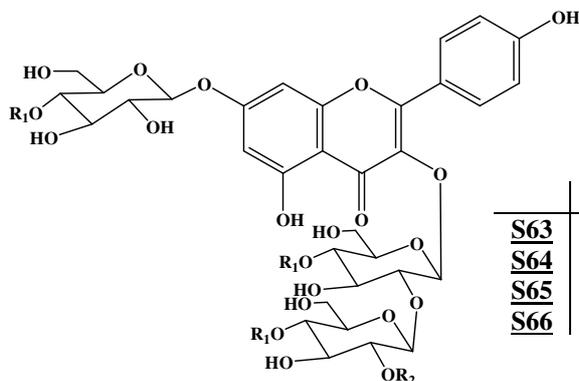
	R1	R2	R3
S21	H	H	H
S43	OH	Rha	H
S44	OH	H	Rha
S45	H	Rha	Rha
S46	OH	Rha	Rha
S47	H	Glu	Rha
S48	OH	Glu	Rha
S49	H	Rha (1-> 2) Glu	Rha
S50	OH	Rha (1-> 2) Glu	Rha
S108	OH	Gala	H



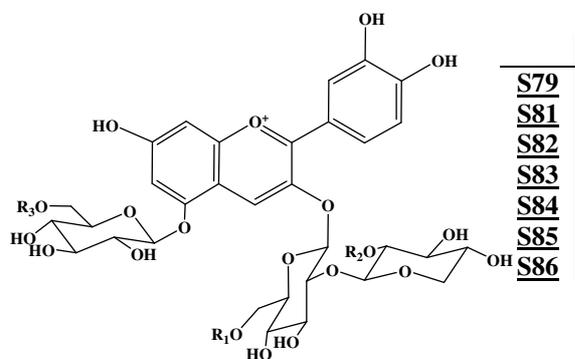
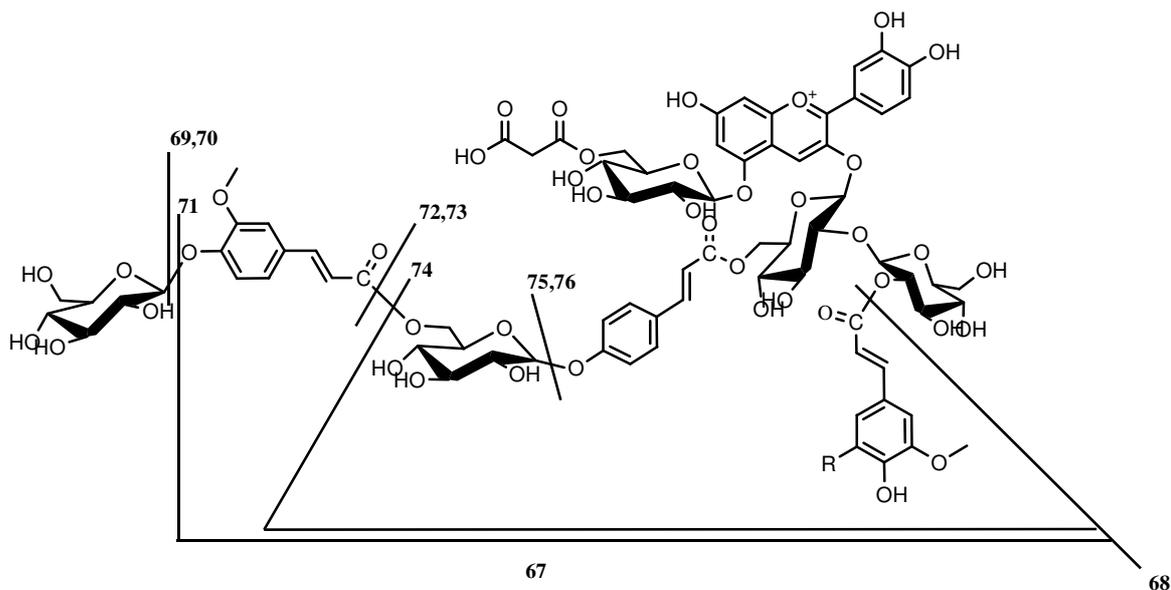
	R1	R2	R3
S51	H	<i>cis</i>	OH
S52	OH	<i>trans</i>	OH
S53	H	<i>trans</i>	OH
S54	OCH ₃	<i>trans</i>	OH
S55	H	<i>trans</i>	OH
S56	OCH ₃	<i>trans</i>	OH
S57	H	<i>trans</i>	H
S58	OCH ₃	<i>trans</i>	H



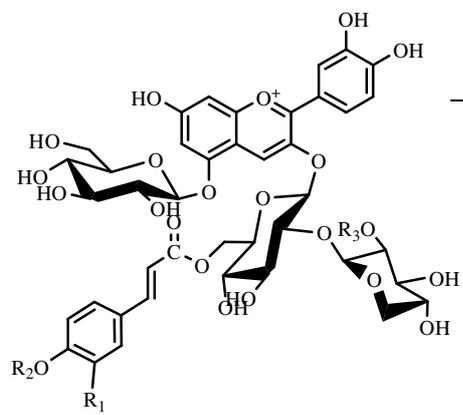
	R1	R2	R3
S60	H	H	malonyl
S61	H	OCH ₃	H
S62	OCH ₃	OCH ₃	malonyl



	R1	R2
S63	β-D-Glu	H
S64	β-D-Glu	sinapoyl
S65	β-D-Glu	feruloyl
S66	β-D-Glu	caffeoyl



	R1	R2	R3
S79	<i>cis-p-coumaroyl</i>	H	H
S81	<i>cis-p-coumaroyl</i>	H	malonyl
S82	<i>trans-p-feruloyl</i>	H	malonyl
S83	glucosyl- <i>trans-p-coumaroyl</i>	H	H
S84	glucosyl- <i>trans-p-coumaroyl</i>	<i>trans-caffeoyl</i>	H
S85	<i>trans-p-coumaroyl</i>	<i>trans-caffeoyl</i>	H
S86	<i>trans-p-coumaroyl</i>	<i>trans-feruloyl</i>	H



	R1	R2	R3
S35	H	Glu	<i>trans-sinapoyl</i>
S87	H	Glu	<i>trans-feruloyl</i>
S88	OCH ₃	H	H
S89	OCH ₃	H	<i>trans-caffeoyl</i>
S90	OCH ₃	H	<i>trans-feruloyl</i>

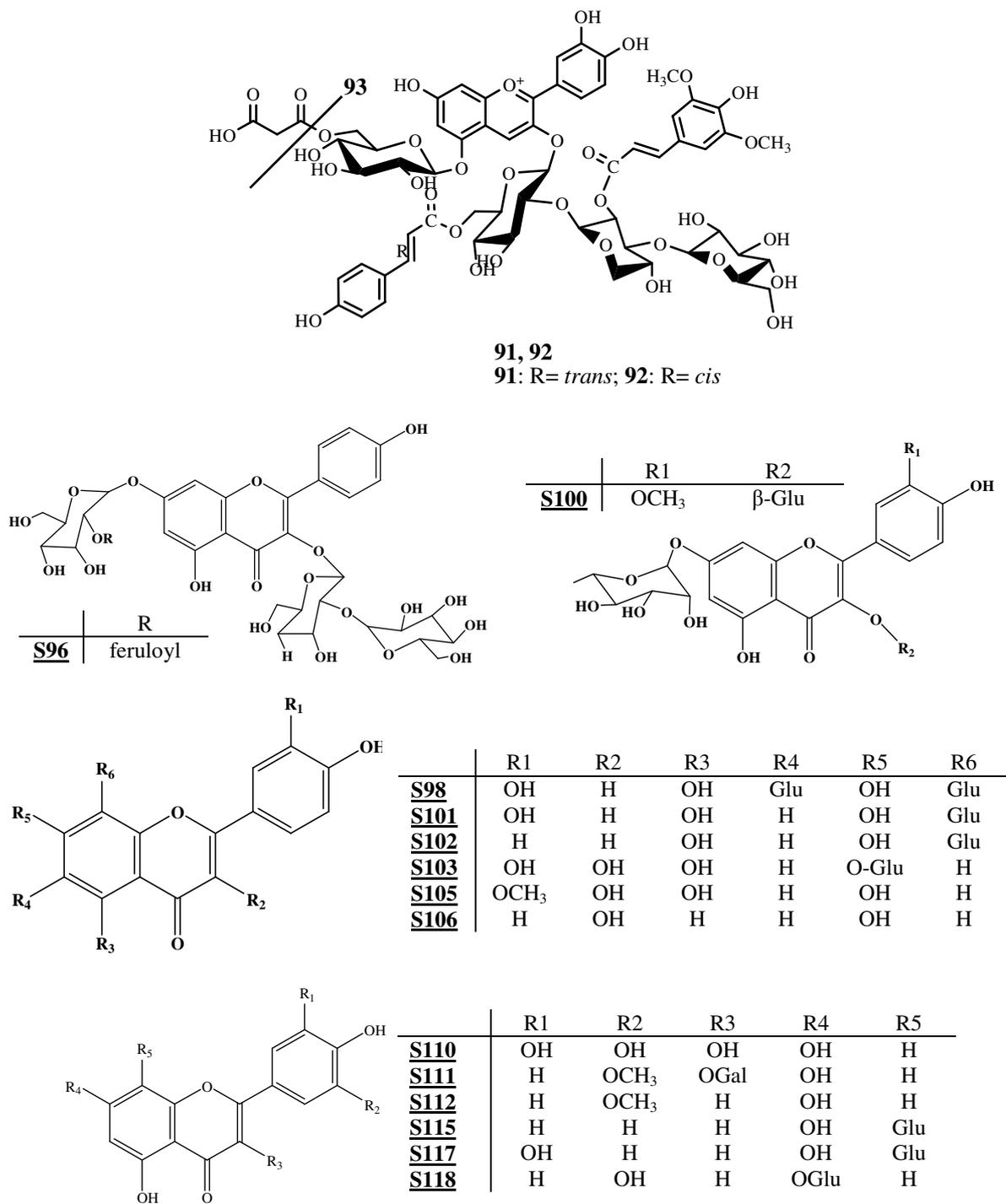
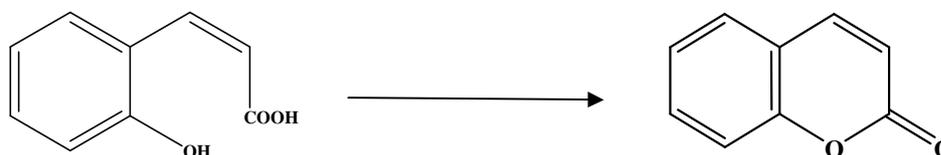


Figure 5. Structures de quelques flavonoides isolés de la famille des Brassicaceae

I.4.3. Les coumarines

Les coumarines sont des substances aromatiques naturelles très largement distribuées dans le règne végétal, dont la structure est composée d'un noyau benzo-2 pyrone (coumarine) résultant de la lactonisation de l'acide ortho-hydroxy- cis cinnamique.

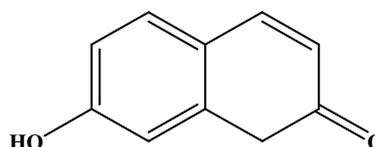


Acide ortho-hydroxy- cis cinnamique

Coumarine

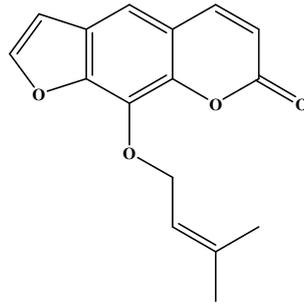
Les coumarines sont naturellement présentes dans les plantes et les micro-organismes, elles existent sous forme libre ou encore liée à des sucres. Environ 1000 dérivés de la coumarine ont été isolés à partir de plus de 800 espèces de plantes et de micro-organismes (Smyth *et al.*, 2009). La coumarine elle-même a été isolée de la fève tonka (*Coumarouna odorata*) par Vogel en 1820 (Erzengin *et al.*, 2012). D'après Smyth (Smyth *et al.*, 2009) les coumarines peuvent être grossièrement classées en cinq grands groupes :

- Coumarines simples: ont des substituants sur le noyau benzénique, ils peuvent être des dérivés hydroxylés, alkylés ou alcoxylés. ex. 7-hydroxy-coumarine.



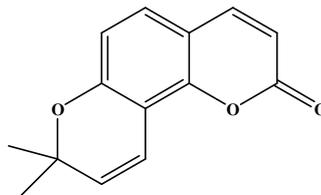
7-hydroxycoumarine

- Le deuxième groupe est celui des furocoumarines, qui contiennent un noyau furanne pentagonal attaché à la structure de la coumarine avec l'oxygène de furanne en position 7. ex. Impératorine.

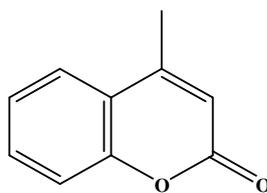
**Impératorine**

Les furocoumarines peuvent être linéaire ou angulaire, basée sur la position de fixation de l'anneau furane à la structure de la coumarine (Keating *et al.*, 1997).

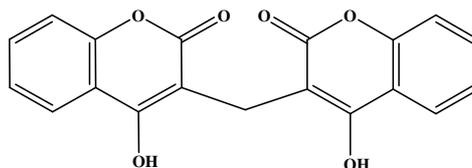
- Le grand groupe de coumarines sont les pyranocoumarines. Elles ont un noyau hétérocyclique à six chaînons contenant un atome d'oxygène, et peuvent exister sous formes linéaires ou angulaires. ex. Seseline.

**Seseline**

- Un autre groupe majeur des coumarines qui sont substitués dans le noyau pyrone soit en positions 3 ou 4, tels que 4-méthylcoumarine.

**4-méthylcoumarine**

- Le dernier groupe comporte les dimères de la coumarine, qui comportent généralement deux unités de la coumarine reliées entre elles. ex. Bishydroxycoumarine.

**Bishydroxycoumarine**

Les dérivés de la coumarine ont été trouvés à avoir de nombreuses applications thérapeutiques, notamment la photochimiothérapie, l'antitumorale et la thérapie anti-VIH (Kostova *et al.*, 2006), ils sont également actifs comme des antibactériens (Al-Haiza *et al.*, 2003 ; Musiciki *et al.*, 2000), des agents anti-inflammatoires (Fylaktakidou *et al.*, 2004), des anti-coagulants (Jung *et al.*, 2001), et des antifongiques (Stein *et al.*, 2006). En outre, les coumarines sont connues comme des agents hypolipidémiants avec une activité d'abaissement des triglycérides modéré (Madhavan *et al.*, 2003). La découverte récente de coumarines ayant une faible activité œstrogénique a entraîné l'utilisation de ces dérivés comme agents thérapeutiques dans la prévention de l'apparition de maladies liées à la ménopause, telles que l'ostéoporose, les risques accrus de maladies cardiovasculaires et les déficiences cognitives (Usui, 2006).

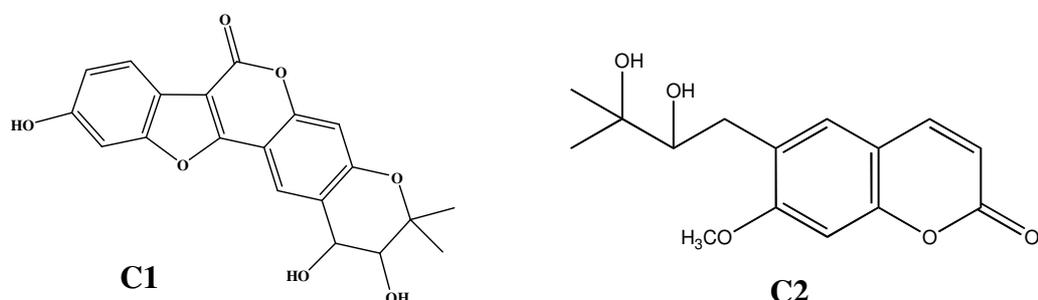
L'utilisation pharmaceutique des coumarines a donc un excellent potentiel. Un large éventail d'applications médicales des coumarines ont été résumées dans des études récentes, en particulier :

- Leurs propriétés antioxydantes (Rietjens *et al.*, 2005; Galvano *et al.*, 2001).
- L'activité biologique de prenyloxy coumarines (Curini *et al.*, 2006), et isopentenyl oxy coumarine (Epifano *et al.*, 2009).
- Application en pharmacothérapie du cancer du sein (Musa *et al.*, 2008).
- Les progrès des coumarines du genre *Calophyllum* comme agents anti-VIH (Wang *et al.*, 2006; Tsutomu, 2000; Kostova *et al.*, 2007).
- Utilisation des coumarines comme agents polyvalents biodynamiques (Kulkarni *et al.*, 2006).

Le tableau 3 rassemble deux exemples de coumarines isolées d'espèces de la famille des Brassicaceae.

Tableau 3. Coumarines isolées de la famille des Brassicaceae

Nom du Coumarines	N° de structure	Espèce	Référence
Corylidine	C1	<i>Erucaria</i>	Hashem, 2007
2,3-dihydroxy-dihydrosobrosin	C2	<i>microcarpa</i> Boiss	

**Figure 6.** Structures de quelques Coumarines isolées de la famille des Brassicaceae

I.4.4. Les alcaloïdes

➤ Généralités sur les alcaloïdes

Les alcaloïdes représentent un ensemble de molécules renfermant du carbone, de l'hydrogène et plus spécialement de l'azote. Leur dénomination – de l'arabe *al kali* (qui a donné « alcali » base) – fait référence à leur caractère « alcalin » ou « basique ». L'origine biosynthétique de la plupart des alcaloïdes sont les acides aminés.

Les noms usuels attribués aux alcaloïdes évoquent le plus souvent l'organisme d'origine comme l'atropine (de l'*Atropa belladonna*), parfois leur activité (émétine vomitive). Ils se terminent par le suffixe *-ine* comme presque tous les produits naturels.

Le premier « alcali végétal » isolé à l'état défini fut la morphine de l'opium, décrite en 1817 par F. W. Sertürner sous le nom primitif de « morhium » après avoir été entrevue en 1804 par A. Seguin. La même année apparurent la narcotine ou noscapine (opium), l'émétine (ipéca) et la strychnine (noix vomique), ce qui conduisit W. Meissner, en 1819, à forger le mot « alcaloïde » pour désigner ce nouveau type de produits.

Les alcaloïdes ont la propriété de former des sels et d'avoir un goût amer, ils se trouvent en tant que métabolites secondaires principalement chez les végétaux, les champignons et quelques groupes animaux peu nombreux.

➤ **Classification des alcaloïdes**

On peut classer les alcaloïdes en trois classes (Foley, 2003):

- Les proto-alcaloïdes: sont des amines simples, dont l'azote n'est pas inclu dans un hétérocycle. Ils dérivent aussi d'acides aminés;
- Les pseudo-alcaloïdes: ne sont pas dérivés d'acides aminés. Ils peuvent cependant être indirectement liés à la voie des acides aminés par l'intermédiaire d'un de leurs précurseurs, ou d'un de leurs dérivés. Ils peuvent aussi résulter d'amination, ou de réaction de transamination dans une voie connectée avec les précurseurs ou les postcurseurs d'acides aminés;
- Les alcaloïdes vrais: dérivent d'acides aminés et comportent un atome d'azote dans un système hétérocyclique. Ce sont des substances douées d'une grande activité biologique, même à faibles doses. Ils apparaissent dans les plantes, soit sous forme libre, soit sous forme d'un sel, soit comme N-oxide.

➤ **Utilisation des alcaloïdes**

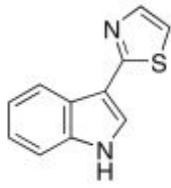
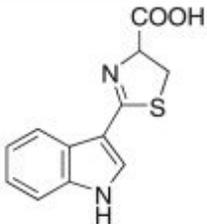
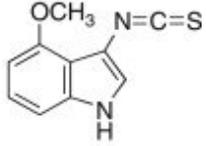
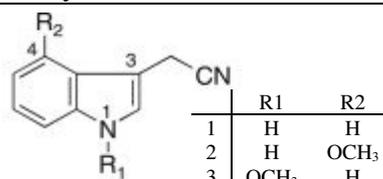
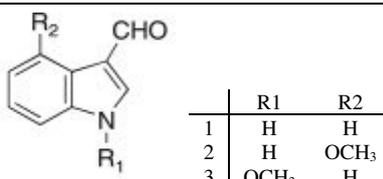
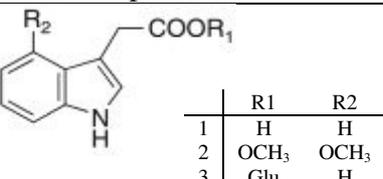
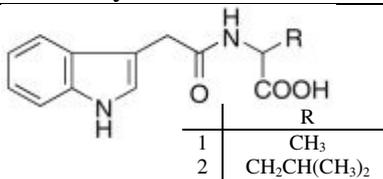
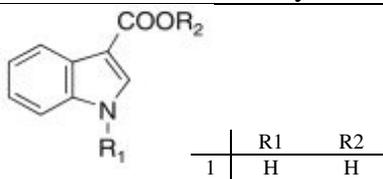
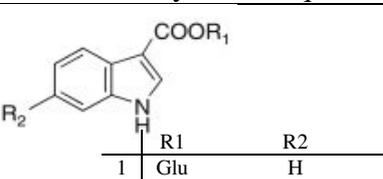
Les alcaloïdes sont utilisés en médecine moderne comme :

Antidote à l'empoisonnement de gaz neurotoxique (Atropine); Analgésique (antidouleur) (Codéine, la morphine) ; Stimulant du système nerveux central (La caféine), antipaludique (Quinine) ; anti-plaque de projection antibactérienne utilisée dans les dentifrices et les rince-bouche (Sanguinarine).

Ils sont utilisés aussi comme des anticancéreux (Vinblastine), des cholinergiques (Pilocarpine), des substances paralysantes (Curare), des stupéfiants (Cocaïne) et des poisons (Nicotine).

Le tableau 4 regroupe les différents alcaloïdes isolés de la famille des Brassicaceae.

Tableau 4. Quelques alcaloïdes isolés des Brassicaceae (Soledade *et al.*, 2010)

		
Phytoalexins camalexine	Camalexine	Rapalexine A
		
Indolyl-3-acétonitriles	Indole-3-carboxaldéhydes	Acide indolyl-3-acétique
		
Acide indolyl-3-acétique	Acide indole-3-carboxylique	

I.4.5. Les terpénoïdes

Le groupe des terpénoïdes comporte des polymères comme le caoutchouc, les huiles essentielles et les stéroïdes, ils ont attiré plus d'attention au cours des dernières années (Wagner et Elmadfa, 2003). Les terpénoïdes sont des hydrocarbures linéaires ou cycliques avec l'isoprène (C₅H₈) comme molécule de base. Leur classification est basée sur le nombre d'unités condensées « tête-à-queue » de cette molécule: hémiterpènes (C₅), monoterpènes (C₁₀), sesquiterpènes (C₁₅), diterpènes (C₂₀), sesterpènes (C₂₅), triterpènes (C₃₀), tetraterpènes (C₄₀) et polyterpènes. Plus de 40.000 composés terpéniques ont été trouvés, existant largement dans les fruits et légumes (Thoppil et Bishayee, 2011).

Les terpènes ont été isolés chez les champignons, les insectes, les éponges, les algues maritimes, et une grande majorité spécifique du règne végétal. Chez les bactéries et les levures, les composés terpéniques sont des métabolites de base (Thoppil et Bishayee, 2011). La biosynthèse de ces composés se fait par deux voies métaboliques, la première découverte dans les années 1950 qui conduit également au cholestérol *via* la voie des mévalonates dans le cytoplasme, la deuxième voie est la voie du méthylérythritol phosphate (ou voie non

mévalonate) dans les chloroplastes des végétaux, cette voie a été découverte à la fin des années 1980.

Les principales structures cellulaires produisant les terpènes sont soit des cellules à essence (Lauracées, Zingibéracées...), des poils sécréteurs stipités (*Pelargonium*) ou sessiles (Lamiaceae), des poches sécrétrices schizogènes (Myrtacées) ou schizolysigènes (Rutacées, Burséracées), canaux sécréteurs (Térébinthacées, Apiaceae, Asteraceae).

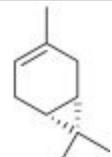
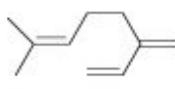
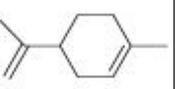
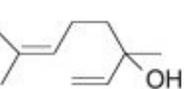
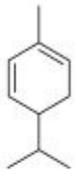
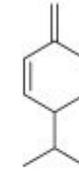
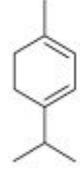
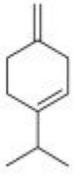
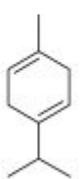
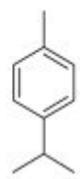
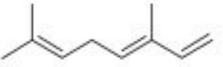
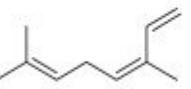
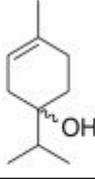
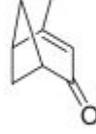
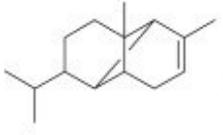
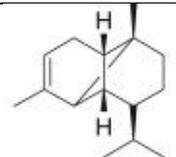
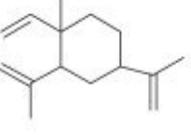
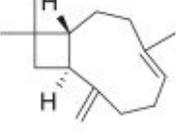
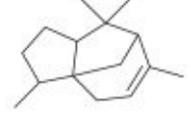
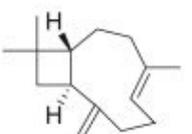
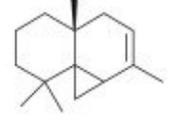
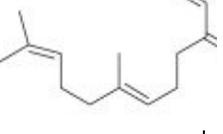
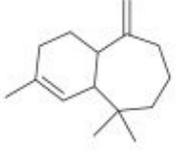
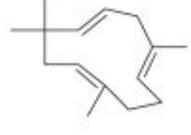
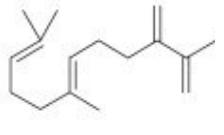
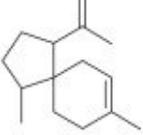
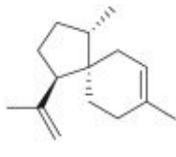
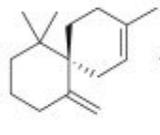
Certains terpènes des plantes qui ont C10, C15 et C20 peuvent exercer des réactions communicatives et défensives, servant attractifs pour les pollinisateurs, des toxines végétales ou des antibiotiques de plantes pour inhiber la propagation des agents pathogènes des plantes (McGarvey et Croteau, 1995; Wagner et Elmadfa, 2003). Le large éventail de structures et de fonctions terpénoïdes a suscité un intérêt accru dans leur utilisation commerciale.

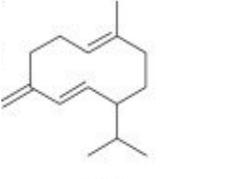
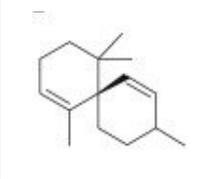
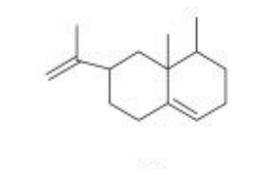
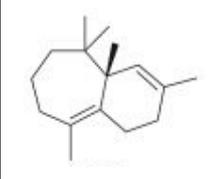
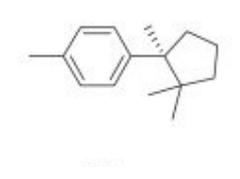
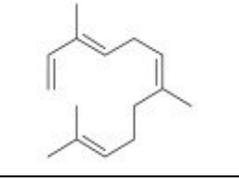
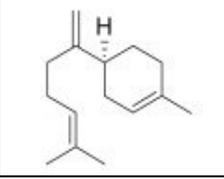
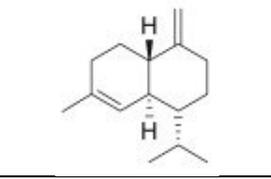
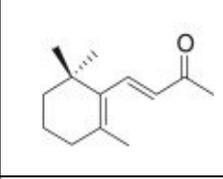
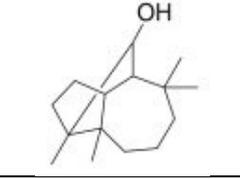
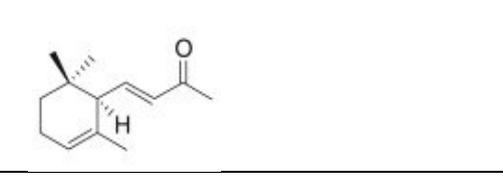
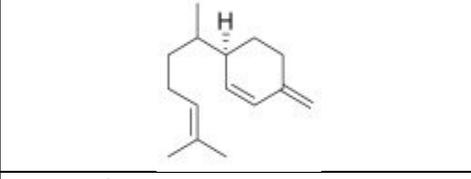
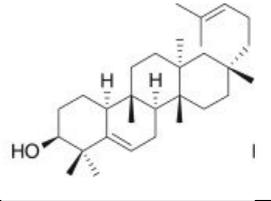
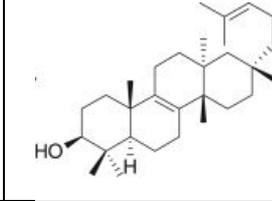
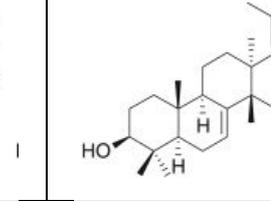
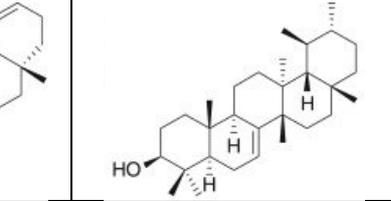
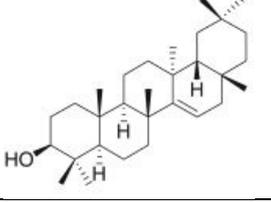
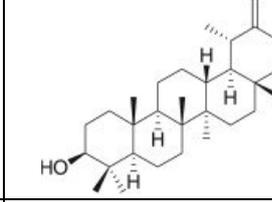
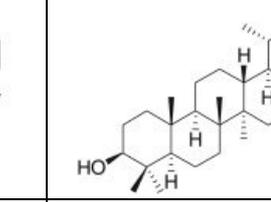
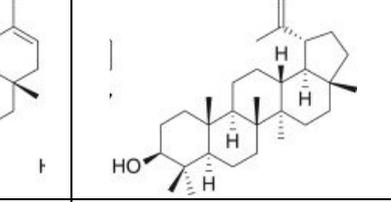
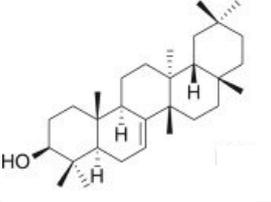
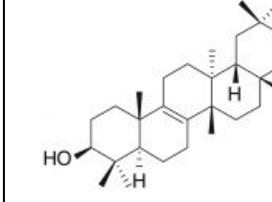
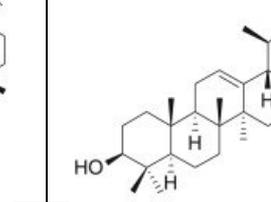
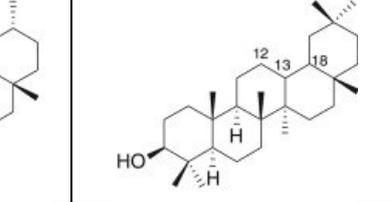
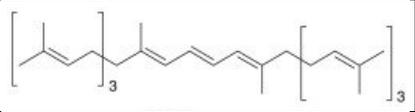
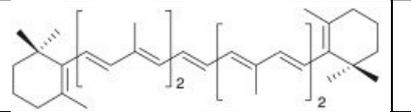
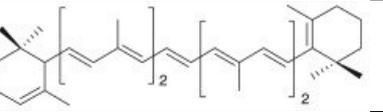
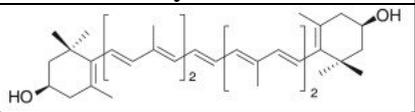
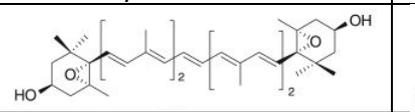
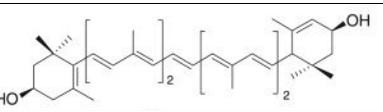
Les terpénoïdes ont été trouvés pour être utile dans la prévention et le traitement de plusieurs maladies comme le cancer, ils ont des propriétés antimicrobiennes, antifongiques, antiparasitaires, antiviraux, anti-allergénique, antispasmodique, anti-hyperglycémique, anti-inflammatoires et immunomodulatrices (Rabi et Bishayee, 2009; Wagner et Elmadfa, 2003; Sultana et Ata, 2008; Shah *et al.*, 2009). En outre, les terpènes peuvent être utilisés comme substances insecticides et protectrices dans le stockage des produits agricoles (Theis et Lerda, 2003).

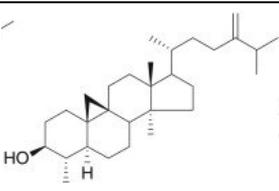
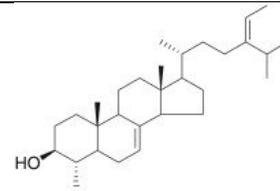
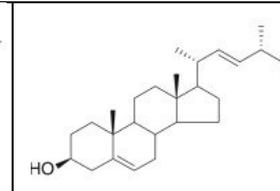
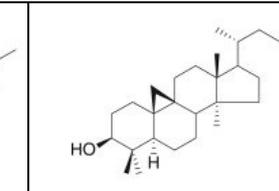
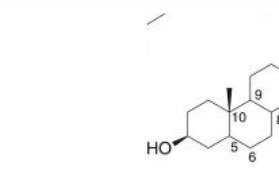
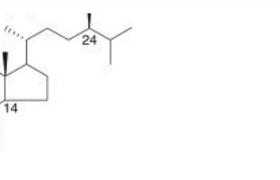
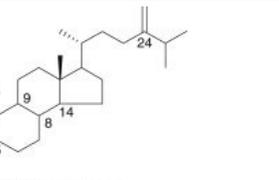
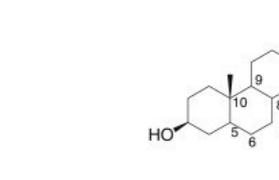
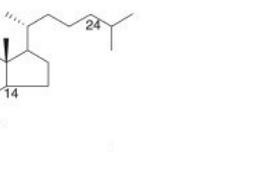
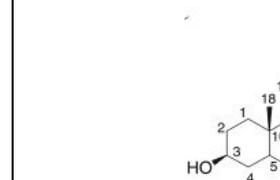
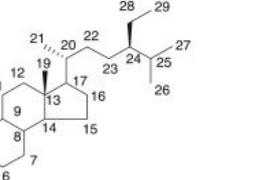
Des études épidémiologiques et expérimentales suggèrent que les monoterpènes peuvent être utiles dans la prévention et le traitement de plusieurs cancers, comme ceux du sein, du peau, du poumon, d'estomac, du côlon, du pancréas et du prostate (Kris-Etherton *et al.*, 2002; Gould, 1997; Reddy *et al.*, 1997; Vigushin *et al.*, 1998; Crowell, 1999; Burke *et al.*, 2002; Carvalho et Fonseca, 2006). Les triterpènes constituent le plus grand groupe de composés phytochimiques avec plus de 20 000 composés connus disponibles dans la nature (Liby *et al.*, 2007). Un grand nombre de triterpénoïdes ont été montré pour inhiber la croissance d'une variété de cellules cancéreuses sans exercer aucune toxicité dans les cellules normales (Setzer et Setzer, 2003; Laszczyk, 2009; Petronelli *et al.*, 2009).

Le tableau 5 comporte des différents terpénoïdes isolés de la famille des Brassicaceae.

Tableau 5. Quelques terpénoïdes isolés des Brassicaceae

Monoterpènes (Chen <i>et al.</i> , 2003; Chen <i>et al.</i> , 2004 ; D'Auriat et Gershenzon, 2005)					
					
α -thujene	β -thujene	Sabinene	α -pinene	β -pinene	3-carene
					
β -myrcene	Limonene	Linalool	α -phellandrene	β -phellandrene	α -terpinene
					
β -terpinene	γ -terpinene	Camphene	1,8-cineole	<i>p</i> -cymene	
					
(Z)- β -ocimene		(E)- β -ocimene		α -terpineol	Verbenone
Sesquiterpènes (Chen <i>et al.</i> , 2003; Chen <i>et al.</i> , 2004 ; D'Auriat et Gershenzon, 2005)					
					
α -ylangene	α -copaene	β -elemene	(Z)- β -caryophyllene	α -barbatene	
					
α -cedrene	(E)- β -caryophyllene	(Z)-thujopsene (E)-thujopsene		(Z)- β -farnesene	α -himachalene
					
α -humulene	β -farnesene	α -acoradiene	β -acoradiene	β -chamigrene	

				
germacrene D	α -chamigrene	Valencene	β -himachalene	Cuparene
				
(<i>E,E</i>)- α -farnesene	β -bisabolene	δ -cadinene	β -ionone	Longiborneol
				
α -ionone			β -sesquiphellandrene	
Triterpenes et Tetraterpenes (Lodeiro <i>et al.</i> , 2007; Lange et Ghassemian, 2003; Husselstein-Muller <i>et al.</i> , 2001; Suzuki <i>et al.</i> , 2006)				
				
Baruol	columbiol	Lemmaphylladienol	Baurenol	
				
taraxerol	taraxasterol	ψ -taraxasterol	Lupeol	
				
multiflorenol	isomultiflorenol	α -amyrine	12(13)-ene: α -amyrine 13(18)-ene: amyrine	
				
Phytoene		β -carotene	α -carotene	
				
Zeaxanthine	Violaxanthine	Luteine		

Steroides (Schaller, 2003; Fujioka et Yokota, 2003; Schaeffer <i>et al.</i> , 2001)			
			
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Cycloeucalenol 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 24-ethylidene lophenol 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Brassicasterol 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 24-ene: cycloartanol ▪ 24-methylene: 24-methylene cycloartanol
			
<ul style="list-style-type: none"> ▪ 5-ene: campesterol ▪ 5,7-diene: $\Delta^{5,7}$-campesterol ▪ 8,14-diene: $\Delta^{8,14}$-campsterol 		<ul style="list-style-type: none"> ▪ 24(28)-ene: 24-methylene pollinastanol ▪ 7,24(28)-diene: 24-methylene lophenol ▪ 8(9),24(28)-diene: obtusifoliol ▪ 8,14,24(28)-triene: 4α-methyl-ergosta-8, 14, 24(28)-trien-3β-ol ▪ 8,24(28)-diene: 4α-methyl-ergosta-8, 24(28)-dien-3β-ol 	
			
<ul style="list-style-type: none"> ▪ 5-ene, 24-methylene: 24-methylene cholesterol ▪ 5-ene: cholesterol ▪ 7-ene: Δ^7-cholesterol ▪ 8,14-diene: $\Delta^{8,14}$-cholesterol 		<ul style="list-style-type: none"> ▪ 5-ene: sitosterol ▪ 7-ene: Δ^7-sitosterol ▪ 8-ene: Δ^8-sitosterol ▪ 5,7-diene: $\Delta^{5,7}$-sitosterol ▪ 8,14-diene: $\Delta^{8,14}$-sitosterol ▪ 5,22-diene: stigmasterol ▪ 5,24(28)-diene: isofucosterol ▪ 5,7,22-triene: $\Delta^{5,7}$-stigmasterol ▪ 7,24(28)-diene: Δ^7-avensterol 	

I.4.6. Les lignanes

Les lignanes sont des composés phénoliques largement distribués dans les plantes supérieures, ils représentent un groupe vaste et plutôt varié de produits dérivés de phénylpropanes.

Les dimères de phénylpropanoïdes C6-C3 (figure 7), sont appelés lignanes lorsque les unités phénylpropanes sont liées par C8-C8' du groupement propane (Haworth, 1936) et

néolignanes lorsque les deux phénylpropanes sont liés autrement que par une liaison C8-C8' (Gottlieb, 1972) (figure 8). Les lignanes composés de trois ou quatre unités phénylpropanes sont couramment appelés sesquilignanes ou dilignanes respectivement (Umezawa, 2003).

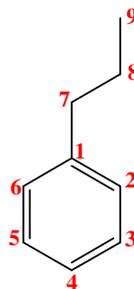


Figure 7. Structure de phénylpropanoïde

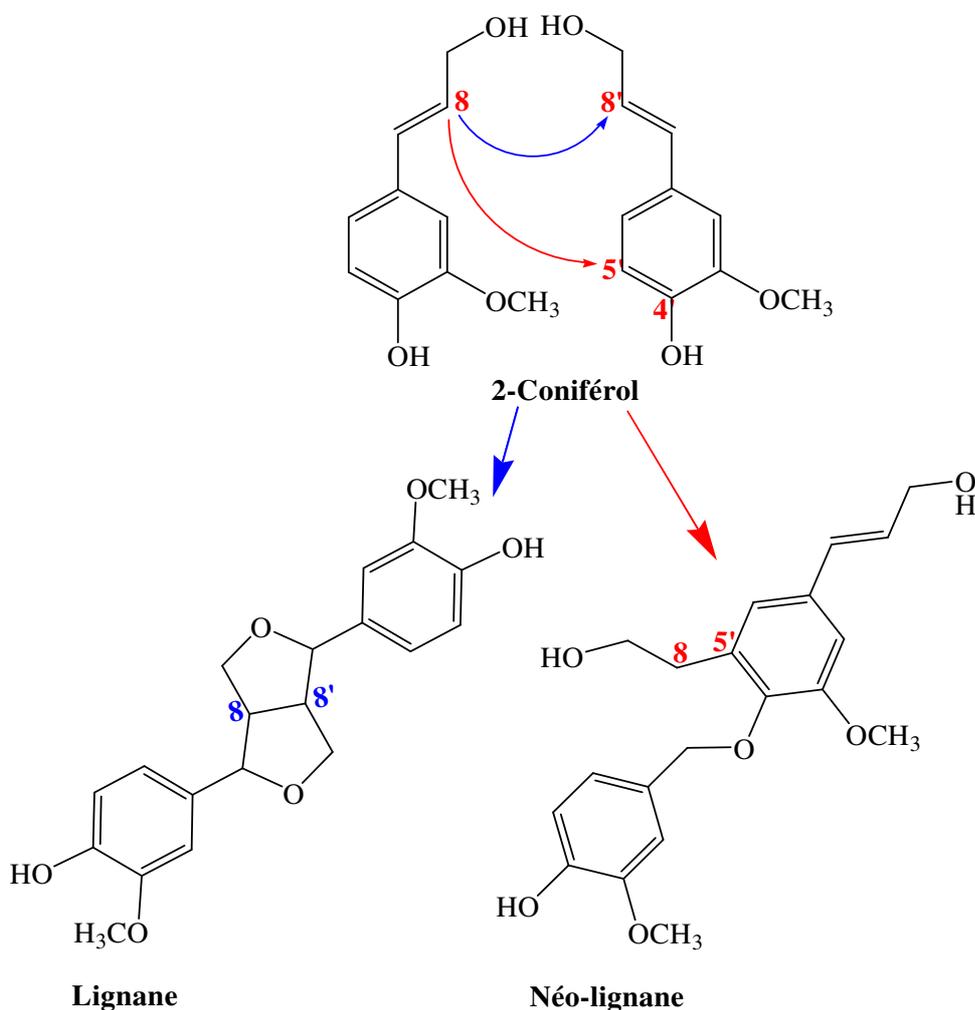


Figure 8. Coupages oxydatifs de l'alcool coniférylique

Selon le mode d'incorporation de l'atome d'oxygène et le type de cyclisation, les lignanes sont classés en huit groupes structuraux (figure 9) (Umezawa, 2003).

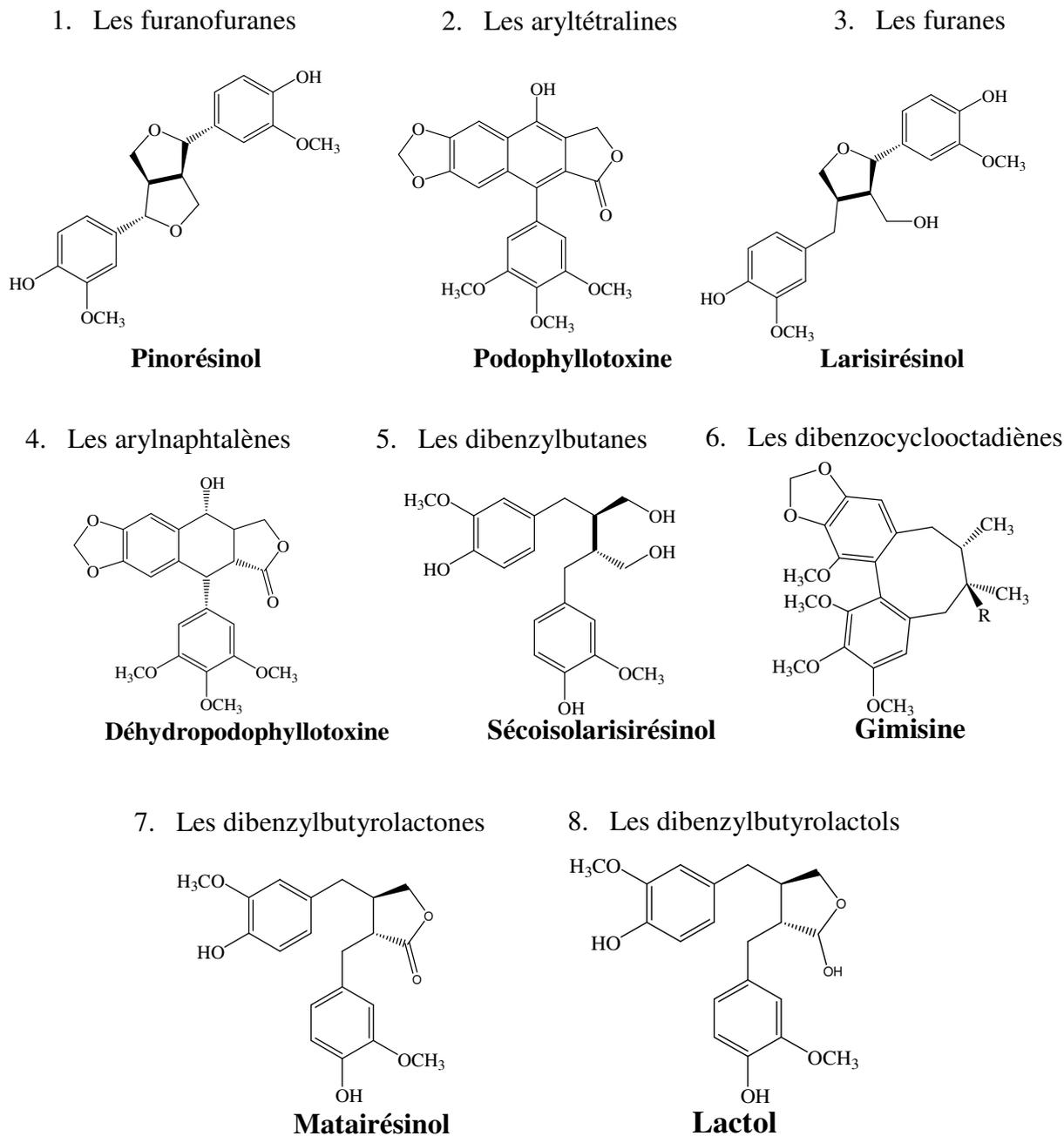


Figure 9. Les groupes structuraux de lignanes

Les lignanes sont des métabolites secondaires, produits dans presque toute les parties de la plante, y compris les racines, feuilles, fleurs, fruits, tiges et graines. Ils occupent une zone assez grande dans le monde végétal. Ils ont été identifiés dans près de 70 familles, dont beaucoup ont été utilisées dans la médecine traditionnelle (Zhang et al., 2014).

La biosynthèse des lignanes (figure 10) utilise la voie générale des phénylpropanoïdes, la phénylalanine est convertie en acide *trans*-cinamique, ce dernier donne par plusieurs étapes d'hydroxylation et de méthylation, les acides : *p*-coumarique, caféïque, férulique, 5-

hydroxyfêrulique et sinapique. La rêduction par NADPH est responsable de la formation des monolignols (l'alcool *p*-coumaryle, l'alcool connifêryle et l'alcool sinapyle).

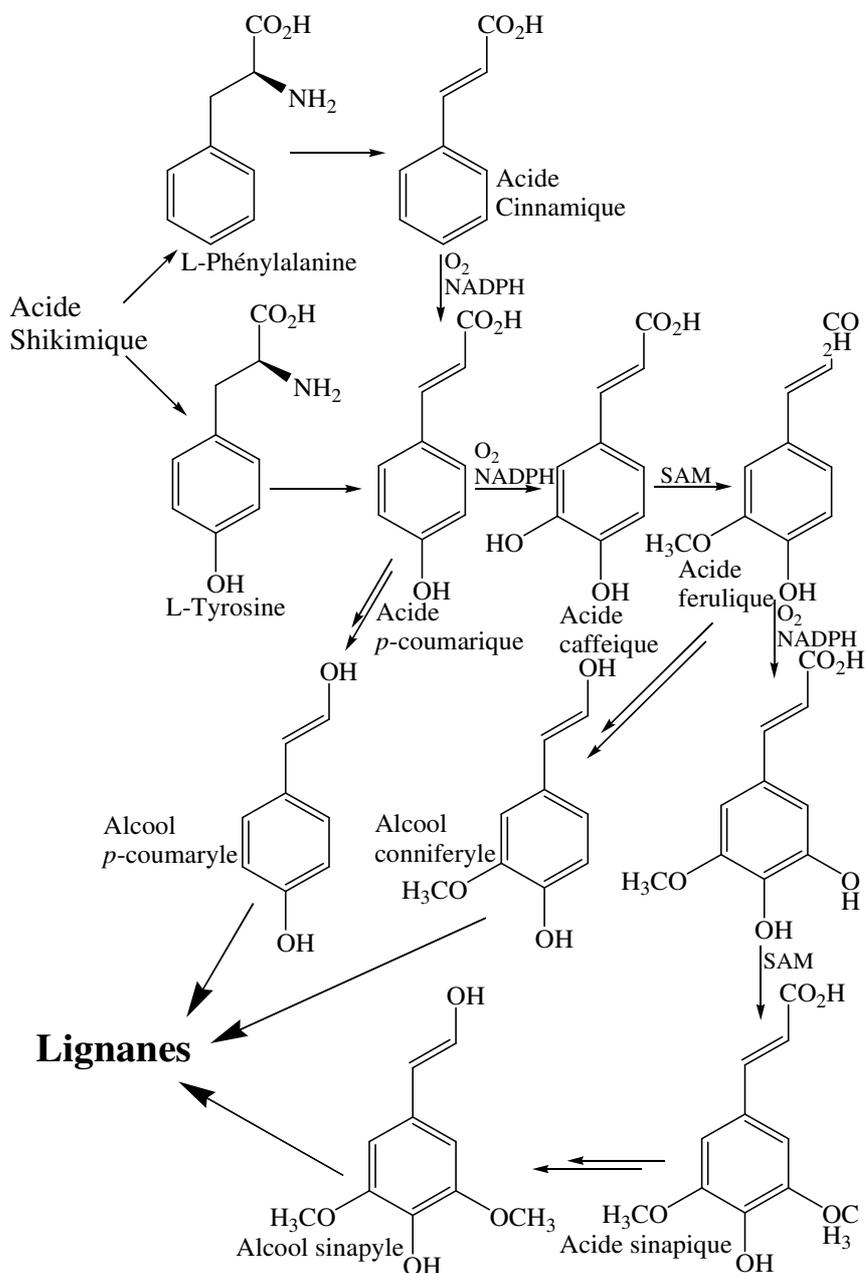


Figure 10. La biosynthèse des lignanes

Diffêrents types de lignanes ont attiré une attention considêrable en raison de leurs nombreuses activités biologiques telles que anticancêreuse, anti-VHB, anti-VIH, antibactêrienne, antioxydantes, antifongiques, anti-inflammatoire, anti-leishmanique, sêdative et insecticide (Zhang et al., 2014) et leurs propriêtés physico-chimiques uniques (optiques, stêrochimiques) (Lewis et Davin, 1999).

Les travaux de recherche phytochimique et pharmacologique de nouveaux lignanes ont fait des progrès remarquables, un total de 354 nouveaux lignanes naturels ont été isolés à partir de 61 familles de plantes et identifiés entre 2005 et 2011 (Zhang et al., 2014).

D'après Milder et al. (2005), les légumes de la famille des Brassicaceae comme le chou frisé, le brocoli, le chou pommé, le chou de Bruxelles, le chou rouge et le chou-fleur sont riches en :

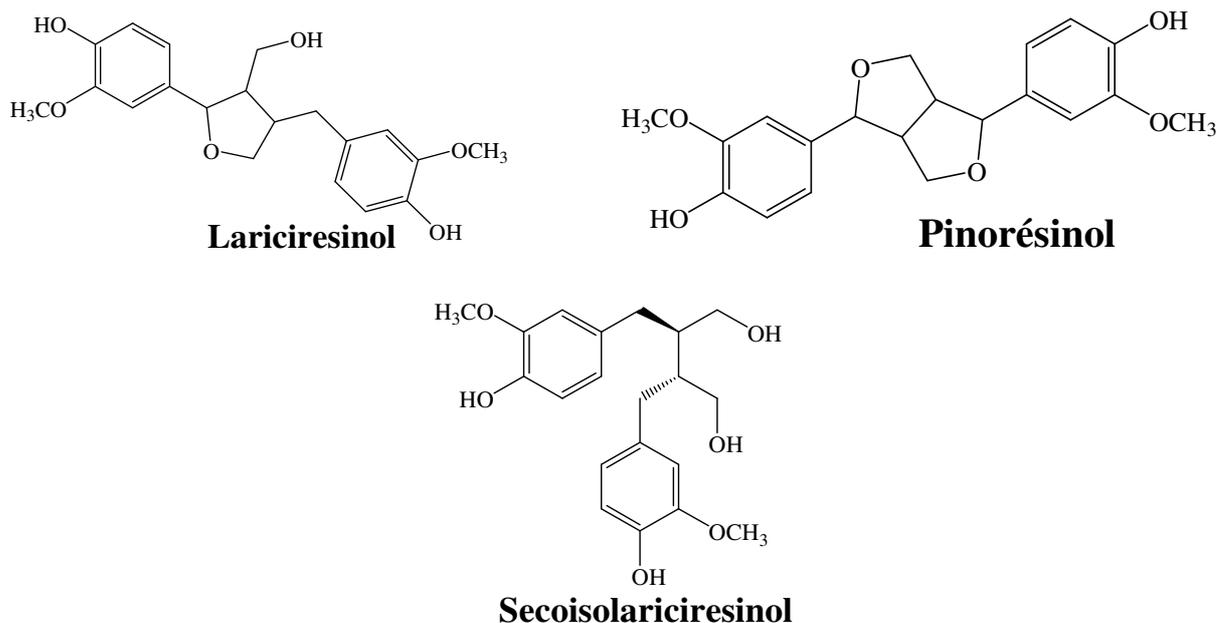


Figure 11. Lignanes de la famille des Brassicaceae

II. Aperçu bibliographique sur le genre *Biscutella*

II.1. Généralités

Biscutella L. (Lunetière « Goulgralane ») est un genre bien défini de la famille des Brassicaceae comprend environ 53 espèces qui se trouvent dans la région méditerranéenne, à l'exception de l'espèce *B. laevigata* L. qui s'étend en Europe centrale (Warwick et al., 2006).

Quezel et Santa (1963) comptent 7 espèces de ce genre en Algérie. D'après l'étude bibliographique qui nous avons menée, le genre *Biscutella* n'a fait l'objet d'aucune étude phytochimique auparavant.

II.2. Description du genre *Biscutella* (Quezel et Santa, 1962)

Le genre *Biscutella* est composé de plantes vivaces ou sous-frutescentes ou de plantes annuelles dépourvues de rejets stériles.

Les plantes de ce genre ont : six étamines, glandes présentes allongées ou cornues. Silicule angustiseptée, didyme, comprimée, à valves orbiculaires comprimées-carénées. Une graine par loge, horizontale, insérée au milieu de la loge et non ailée. Les fleurs jaunes. Les feuilles lyrées, en général hispides.

II.3. Description botanique de l'espèce *Biscutella raphanifolia* Poiret

Biscutella raphanifolia Poiret est une espèce endémique du Tell, littoral algéro-constantinois, Aurès. Il s'agit d'une plante vivace ou sous-frutescente. Silicules plus grandes (9-13 mm), glabres, marginées par une aile membraneuse très étroite (Quezel et Santa, 1962).



Figure 12. Photos de *Biscutella raphanifolia* Poiret

– **Place dans la systématique botanique**

Royaume	—————▶	Plantae
Sous- Royaume	—————▶	Tracheobiontae
Embranchement	—————▶	Spermatophytae
Sous- Embranchement	—————▶	Magnoliophytae
Classe	—————▶	Magnoliopsidae
Sous- Classe	—————▶	Dillennidae
Ordre	—————▶	Capparales
Famille	—————▶	Brassicaceae
Genre	—————▶	<i>Biscutella</i>
Espèce	—————▶	<i>B. raphanifolia</i> Poiret

III. Aperçu bibliographique sur le genre *Zilla*

III.1. Généralités

Le genre *Zilla* Forsk. Appartient de la famille des Brassicaceae, selon Warwick *et al* (2006) ce genre comportent seulement deux espèces indigènes aux régions désertiques s'étendant du Maroc à l'Arabie Saoudite.

Traditionnellement, ce genre utile dans le traitement des maladies comme les calculs rénaux (El-Menshawi *et al.*, 1980) et biliaires (Heneidy et Bidak, 2001).

III.2. Description du genre *Zilla* (Quezel et Santa, 1962)

Il s'agit de sous-arbrisseaux très épineux à rameaux divariqués-imbriqués; glauque et glabre, aux feuilles aternes, simples et entières, rapidement caduques. Les fleurs rose-lilas assez grandes (10-14 mm), actinomorphes et bisexuées, sont groupées en racèmes terminaux courts et pauciflores. Elles se composent de 4 sépales libres, de 4 pétales libres, de 6 étamines libres, formant un androcée tetradynome, et d'un ovaire supère et uniloculaire. Les fruits sont des silicules globuleuses, aux marges ailées.

III.3. Travaux antérieurs sur le genre *Zilla*

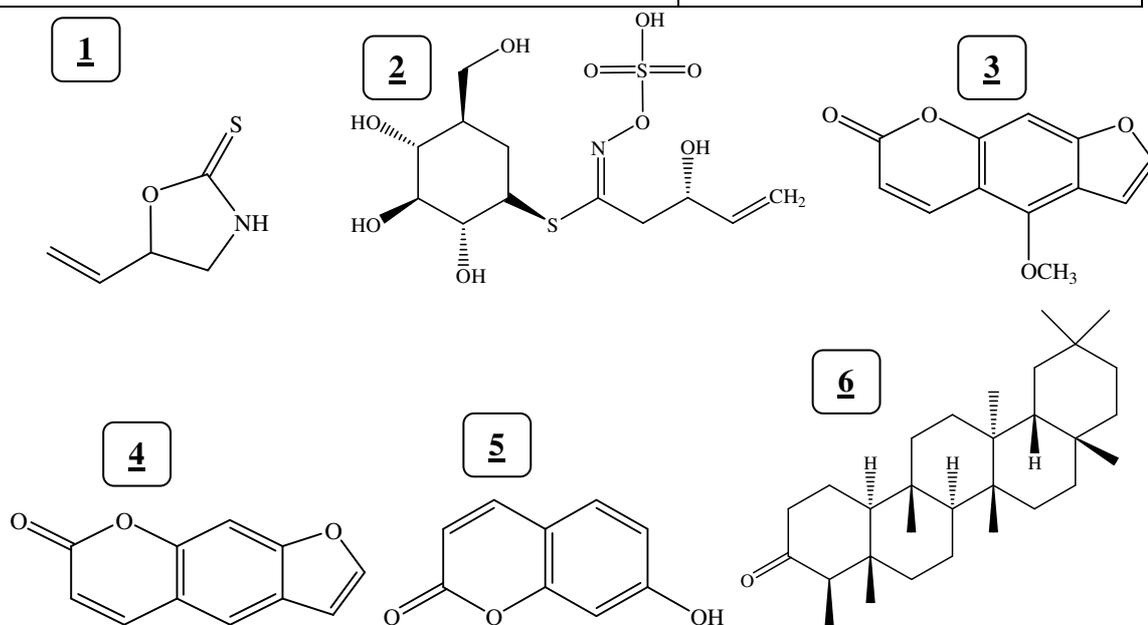
Les travaux phytochimiques effectués sur le genre *Zilla* ont été réalisés uniquement sur l'espèce *Z. spinosa*.

Les métabolites secondaires de cette espèce constitués de glucosinolates, de flavonoïdes, de coumarine, de triterpènes et de stérols (Karawya *et al.*, 1974; El-Menshaw *et al.*, 1980; Rizk *et al.*, 1985; El-Toumy *et al.*, 2011; El-Sharabasy et Zayed Mohamed, 2013).

Le tableau 6 rassemble des composés isolés à partir de l'espèce *Z. spinosa*, les structures respectives sont données dans la figure 13.

Tableau 6. Quelques composés isolés de l'espèce *Z. spinosa*

Nom du composé	Référence
Goitrine [1]	El-Menshawi <i>et al.</i> , 1980
Progoitrine [2]	Karawya <i>et al.</i> , 1974
Bergaptène [3]	El-Sharabasy et Zayed Mohamed, 2013
Psoralène [4]	
Umbelliferone [5]	
Fridelin [6]	
β -Amyrine [7]	
6-sterol glucoside [8]	
Quercetin 3-O-L-rhamnopyranosyl (1 \rightarrow 6)- β -glucopyranoside [9]	
Kaempferol 3-O-L-rhamnopyranosyl (1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside [10]	
Quercetin-3-O- α -L-rhamnopyranoside [11]	
Quercetin-3-O- β -glucopyranoside [12]	
Kaempferol 3-O- β -glucopyranoside [13]	
Quercetin [14]	
Kaempferol [15]	



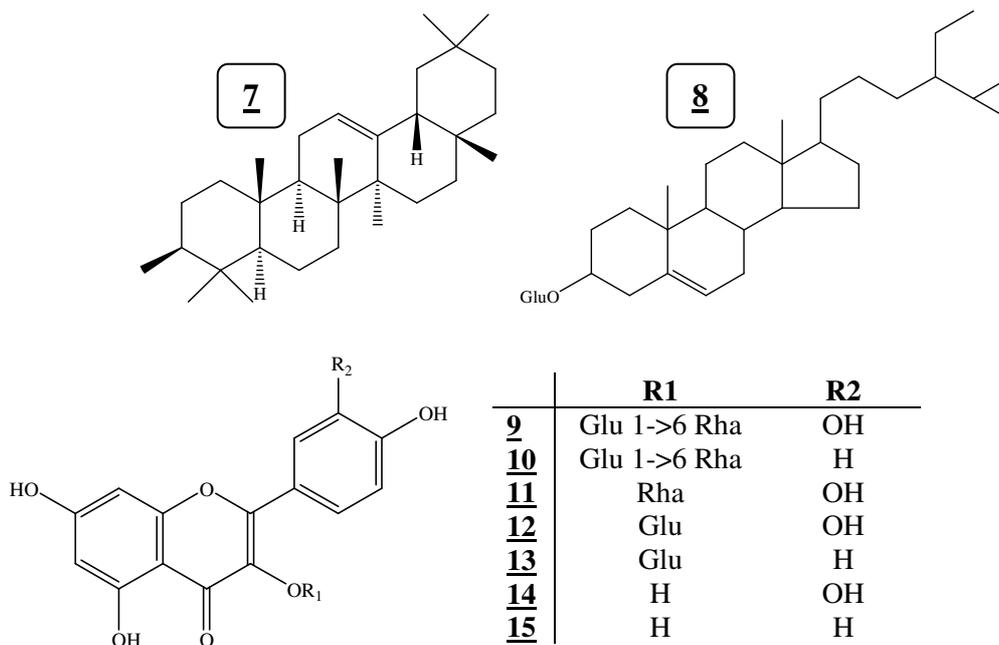


Figure 13. Structures de composés isolés de l'espèce *Z. spinosa*

III.4. Description botanique de l'espèce (Quezel et Santa, 1962)

Zilla macroptera (Coss.) Maire (figure 14) est une espèce du Sahara nord-occidental telles que Mzab, Tademaït, sud oranais et sud-est marocain. Cette espèce a une taille de 20 à 60 cm formant une boule très dense, glabre, épineuse, de couleur vert bleuté; ses feuilles sont sessiles, charnues, en spatule, présentent sur les jeunes rameaux; ses fleurs violettes sont pratiquement sans pétiole et le fruit est une silicule à quatre ailes.



Figure 14. *Zilla macroptera* (Coss.) Maire

– Place dans la systématique botanique

Royaume	—————▶	Plantae
Sous- Royaume	—————▶	Tracheobiontae
Embranchement	—————▶	Spermatophytae
Sous- Embranchement	—————▶	Magnoliophyta
Classe	—————▶	Magnoliopsida
Sous- Classe	—————▶	Dillennidae
Ordre	—————▶	Capparales
Famille	—————▶	Brassicaceae
Genre	—————▶	<i>Zilla</i>
Espèce	—————▶	<i>Z. macroptera</i> (Coss.) Maire

Chapitre II

Aperçu bibliographique sur les huiles essentielles du genre Inula

I. Introduction

Depuis l'Antiquité, les extraits de plantes aromatiques ont été utilisés à différentes fins, telles que la nourriture, le traitement des maladies et la parfumerie (Heath, 1981). Les plantes aromatiques médicinales offrent un mélange complexe de molécules volatiles connues comme les huiles essentielles grâce à leur métabolisme secondaire.

Les huiles essentielles sont un mélange complexe de composés, principalement des monoterpènes, des sesquiterpènes et des composés oxygénés (alcools, aldéhydes, esters, éthers, cétones et phénols). D'autres composés volatiles spécifiques comprennent le phénylpropène, le soufre ou l'azote. Généralement, la composition de l'huile est un équilibre de divers composés, bien que de nombreuses espèces peuvent composer le même constituant (Cowan, 1999).

Ces molécules volatiles exercent une activité antibactérienne qui a été utilisée dans la médecine populaire depuis des siècles. Les huiles essentielles sont considérées comme des agents antimicrobiens (Lis-Balchin & Deans 1997) et peuvent aussi avoir des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires.

Au cours des dernières décennies, l'émergence de la résistance aux antibactériens nous a forcés à chercher de nouveaux agents antimicrobiens efficaces. Le nombre important d'études sur l'utilisation en aromathérapie des huiles essentielles et leurs composés contre les bactéries multirésistantes, montrent un potentiel exceptionnel de ces produits naturels de freiner le développement de résistance antibactérienne.

Aromathérapie vient du grec aroma, « odeur » et therapia, « soins ». Il s'agit donc de soigner à l'aide de principes odoriférants. L'aromathérapie fait partie intégrante de la phytothérapie (phytos, « plante »).

L'aromathérapie est l'une des branches les plus dynamiques de la médecine complémentaire et alternative. Elle peut fournir un service médical complémentaire dans le traitement du cancer, la démence et la dépression. Il y a aussi de nombreuses indications pour l'application utile et réussie des huiles essentielles, comme le stress, les troubles du sommeil, maux de dos et les infections des voies urinaires.

Ainsi, l'utilisation des huiles essentielles dans le domaine de cosmétologie entre dans la fabrication des savons de toilette, des aérosols et des lotions désodorisantes (Young, 1941), ou

dans les crèmes et les gels pour permettre de préserver ces cosmétiques grâce à leur activité antiseptique et antioxydante, tout en leur assurant leur odeur agréable.

Des études approfondies sur les composants chimiques des espèces Asteraceae ont conduit à l'identification de plusieurs substances, y compris les huiles essentielles, avec une activité antibactérienne intéressante. Ce chapitre résume certains des principaux rapports sur la chimie et l'activité biologique des huiles essentielles du genre *Inula*, dans la littérature.

II. Généralités sur les huiles essentielles

II.1. Définition et localisation

Les huiles essentielles (HE) sont des huiles aromatiques obtenues principalement à partir de la matière végétale. Elles peuvent être stockées dans les fleurs, feuilles, fruits, racines, écorces, bois ou graines. Elles sont recherchées pour leurs propriétés thérapeutiques, odorantes ou cosmétiques.

II.2. Activités biologiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles présentent des propriétés antivirale, antibactérienne, antifongique, antiparasitaire, antitoxigénique et insecticide. Leur utilisation est autorisée dans les denrées alimentaires (Burt, 2004; Vukovic *et al.*, 2007). L'activité antimicrobienne des HE et leurs composants a été exploitée dans le contrôle des bactéries d'altération pathogènes des aliments (Azzouz et Bullerman, 1982; Deans et Ritchie, 1987; Akgul et Kivanc, 1989; Hao *et al.*, 1998; Hsieh *et al.*, 2001; Grande *et al.*, 2007; Sinigaglia *et al.*, 2008).

L'huile essentielle peut comprendre plus de 60 composants uniques, la principale composante constitue jusqu'à 85% de l'HE, tandis que les composants mineurs ne sont présents que comme traces pourraient avoir un rôle essentiel dans l'activité antibactérienne, éventuellement en produisant un effet combiné (Burt, 2004). Les terpénoïdes et les composants phénoliques (thymol, carvacrol, eugénol) sont principalement responsables des propriétés antibactériennes de plusieurs HE (Dorman et Deans, 2000; Ultee *et al.*, 2000).

Les huiles essentielles et leurs composants sont connus pour être actifs contre un large éventail de micro-organismes, notamment les bactéries (Ouattara *et al.*, 1997; Smith-Palmer *et al.*, 2001; Marino *et al.*, 2001 ; Lambert *et al.*, 2001; Delaquis *et al.*, 2002; Pintore *et al.*, 2002; Harpaz *et al.*, 2003).

II.3. Méthodes d'extraction des huiles essentielles

La distillation à la vapeur d'eau et l'hydro-distillation de la plante sèche ou fraîche sont les méthodes les plus couramment utilisées pour la production d'HE, mais d'autres méthodes peuvent être employées (expression, fermentation, enfleurage ou extraction) et leur choix peut influencer sur la composition chimique, les propriétés organoleptiques et donc l'activité biologique (Corbo *et al.*, 2009).

III. Les huiles essentielles du genre *Inula*

III.1. Présentation botanique et géographique de la famille des Asteraceae

Le genre *Inula* appartient à la famille des Astéracées qui comprend environ 25000 espèces cosmopolites, avec 408 espèces réparties en 109 genres en Algérie (Quezel et Santa, 1963), dont beaucoup sont riches en producteurs d'huiles essentielles avec des potentiels biologiques (Okunade, 2002).

Les Asteraceae sont principalement des herbes, des arbustes ou sous-arbrisseaux, parfois des épiphytes ou de herbes des plantes aquatiques. Les feuilles sont le plus souvent alternes, mais aussi opposées ou radiales, simples exstipulées (Paulian, 1967).

On trouve généralement les différentes espèces de cette famille dans les régions tempérées et froides du globe (Paris et Moyse, 1971).

III.2. Aperçu bibliographique sur le genre *Inula*

III.2.1. Présentation du genre *Inula*

Le genre *Inula* appartient à la tribu Inuleae, il comporte environ 100 espèces, réparties principalement en Europe, en Afrique et en Asie (Abid et Qaiser, 2002). Ce sont des plantes herbacées vivaces, à feuilles alternes. Capitules jaunes, contenant à la fois des fleurs tubuleuses et des fleurs ligulées. Bractées en plusieurs séries. Fleurs périphériques pistillées, à ligules tridentées. Anthères sagittées à la base. Akènes munis de côtes. Aigrette simple.

III.2.2. Utilisation en médecine traditionnelle

Dans le monde entier, plusieurs espèces de ce genre sont utilisées dans la médecine traditionnelle. Elles ont été utilisées pour traiter de nombreuses maladies, y compris les troubles digestifs, la bronchite, la tuberculose, le diabète et les ulcères intestinaux.

Chez certaines espèces d'*Inula*, comme *I. Britannica*, *I. salicina*, *I. bifrons*, *I. Conyza* et *I. spiraeifolia*, les dérivés de thymol sont les principaux constituants des racines (Bohlmann *et al.*, 1978). Beaucoup d'attention a été accordée à des espèces du genre *Inula*, en raison de leurs diverses activités biologiques telle que: anti-inflammatoire, antibactérienne, anti-hépatique, anti-tumorale, antispasmodique et antiseptique, aussi des propriétés toniques et aromatiques sont caractéristiques de ce genre (Bai *et al.*, 2006; Qi *et al.*, 2008; JNMC, 1986; Okuda, 1986; Zhao *et al.*, 2006).

III.2.3. Métabolites secondaires du genre *Inula*

Le genre *Inula* est très riche en métabolites secondaire; ce qui explique les diverses utilisations de ce genre dans la médecine traditionnelle et les diverses activités biologiques. La composition chimique de ce genre de plantes est représentée par:

- ✓ Les flavonoides : comme la quercetine, isorhamnetine, lutéoline, spinacetine (Zhang *et al.*, 2009)...
- ✓ Les terpénoïdes : sesquiterpène lactones, diterpènes et triterpènes (Mamoci *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2013).
- ✓ Les dérivés d'acide anthranilique (Qin *et al.*, 2008).
- ✓ Les huiles essentielles: avec les différents composants chimiques (Haoui *et al.*, in press).

Les huiles essentielles du genre *Inula*

- Activités biologiques:

Les huiles essentielles du genre *Inula* ont des propriétés antifongique, antiseptique, anti-inflammatoire, anti-infectieuse, microbicide, anticatarrhale, mucolytique puissante, calmante, régulatrice cardiaque, spasmolytique, antitussive et tonicardiaque (Hawi *et al.*, in press; Zhao *et al.*, 2010 ; Cafarchia *et al.*, 2002).

Ces huiles essentielles sont utilisées dans l'aromathérapie pour le traitement de :

- ❖ Hypertension, tachycardie supraventriculaire, arythmie, aortite, coronarite (infarctus), fatigue cardiaque.
- ❖ Laryngite, trachéite, toux spasmodique, bronchite chronique, rhinopharyngo-amygdalite, otite séreuse, emphysème.
- ❖ Dyskinésies biliaires, entérocolite virale.
- ❖ Petite insuffisance rénale, cystites, vaginites.
- ❖ Mycoses cutanées et gynécologiques.

- Composition chimique:

Plusieurs études sur la composition chimique des huiles essentielles de différentes espèces du genre *Inula* (*I. crithmoïdes*, *I. helenium*, *I. viscosa*, *I. graveolens*, *I. oculus-christi* et *I. thapsoides*) ont été signalées précédemment en France (Blanc *et al.*, 2006 ; Hernandez-Ochoa *et al.*, 2012), Turquie (Perez-Alonso *et al.*, 1996 ; Karamenderes et Zeybek, 2000 ; Ucuncu *et al.*, 2008), Espagne (Camacho *et al.*, 2000), Italie (De Laurentis *et al.*, 2002 ; Adams, 2004 ; Blanc *et al.*, 2004 ; Derius *et al.*, 2008), Algérie (Haoui *et al.*, 2001), Tunisie (Jallali *et al.*, 2014), Maroc (Lamiri *et al.*, 2001), Liban (Ghosn *et al.*, 2006) et en Iran (Mirza et Ahmadi, 2000 ; Javidnia *et al.*, 2006).

La composition chimique de certaines huiles essentielles d'*Inula* est présentée dans les tableaux 1, 2 et 3, seuls les composés majoritaires (ayant un pourcentage supérieur à 5%) sont mentionnés dans ces tableaux.

D'après le tableau 1, on remarque que la composition chimique des huiles essentielles de cinq espèces récoltées des zones très éloignées géographiquement est très différente. L'huile essentielle des parties aériennes d'*I. crithmoïdes* (Tunisie) est plus riche en *p*-cymène (Jallali *et al.*, 2014), alors que l'EH de l'espèce *I. helenium* est caractérisée par l'alantolactone avec un pourcentage de 51.3% pour l'espèce récoltée en Italie (Derius *et al.*, 2008) et de 56.6% poussant en France (Hernandez-Ochoa *et al.*, 2012).

L'huile essentielle des parties aériennes fraîches de l'espèce *I. oculus-christi* (Iran) est riche en pentacosane (13.7%) et en acide palmitique (13.6%) (Javidnia *et al.*, 2006).

L'huile essentielle des parties aériennes fraîches de l'espèce *I. thapsoides* (Turque) contient le dihydro edulan (12.4%) comme produit majoritaire (Ucuncu *et al.*, 2008).

Tableau 1. Composants majoritaires ($\geq 5\%$) d'huiles essentielles du genre *Inula*

Composé	Localité et pourcentage (%)					
	<i>I. crithmoides</i>		<i>I. helenium</i>		<i>I. oculus-christi</i>	<i>I. thapsoides</i>
	Tunisie (Jallali <i>et al.</i> , 2014)		Italie (Derius <i>et al.</i> , 2008)	France (Hernandez- Ochoa <i>et al.</i> , 2012)	Iran (Javidnia <i>et al.</i> , 2006)	Turquie (Ucuncu <i>et al.</i> , 2008)
	Soliman	Kairouan				
p-cymène	23.1	27.3	-	-	-	-
α -limonène	3.2	24.0	-	-	-	-
Thymol méthyl ether	8.3	2.7	-	-	-	-
Carvacrol méthyl ether	18.1	3.8	-	-	-	-
Alantolactone	-	-	51.3	56.6	-	-
Isoalantolactone	-	-	36.9	37.3	-	-
Acétate de bornyle	-	-	-	-	-	-
Bornéole	-	-	-	-	-	-
τ -cadinol	-	-	-	-	-	-
Pentacosane	-	-	-	-	13.7	8.3
Acide palmitique	-	-	-	-	13.6	-
Dill apiole	-	-	-	-	11.4	-
Méthyl eugénol	-	-	-	-	9.6	-
Viridiforol	-	-	-	-	5.7	-
Dihydro édulan	-	-	-	-	-	12.4
β -selinene	-	-	-	-	-	9.9
Oxide de caryophyllene	-	-	-	-	-	9.0
Epi- α -cadinol	-	-	-	-	-	5.2

Le tableau 2 représente les composants majoritaires d'huiles essentielles de l'espèce *Inula viscosa* récoltées de plusieurs pays du monde. Les principaux composants de ces huiles essentielles sont :

Le 12-carboxyeudesma-3,11(13)-diene, s'est trouvé en plus grand pourcentage dans les plantes Italienne des parties aériennes fraîches (62.4%) (De Laurentis *et al.*, 2002) et Algérienne des parties aériennes fraîches (28.9%) (Haoui *et al.*, 2001). Cependant les huiles essentielles des parties aériennes fraîches de cette espèce récoltée en France (Blanc *et al.*, 2006) et en Espagne (Camacho *et al.*, 2000) sont riches en fokienol avec des pourcentages qui varient respectivement entre 21.1% et 38.8%. Le borneol se trouve en pourcentage le plus élevé dans les parties aériennes fraîches de l'huile essentielle de turque avec un pourcentage de 25.2% (Perez-Alonso *et al.*, 1996).

Ces huiles essentielles de la même espèce prélevée de plusieurs pays du monde, présentent des variations plus ou moins importantes.

Tableau 2. Composants majoritaires ($\geq 5\%$) d'huiles essentielles de l'espèce *Inula viscosa*

Composé	Localité et pourcentage				
	Algerie (Haoui <i>et al.</i> , 2001)	France (Blanc <i>et al.</i> , 2006)	Turquie (Perez-Alonso <i>et al.</i> , 1996)	Espagne (Camacho <i>et al.</i> , 2000)	Italie (De Laurentis <i>et al.</i> , 2002)
12-carboxyeudesma-3,11(13)-diene	28.9	-	-	-	62.4
Acide linolénique	7.8	-	-	-	-
Acide palmitique	5.4	-	-	-	-
Fokienol	3.4	21.1	-	38.8	-
Nerolidol	-	8.6	-	7.7	-
Eudesm-6-en-4 α -ol	-	6.2	-	-	-
Bornéol	-	-	25.2	-	-
Acétate de bornyle	-	-	19.5	-	-
Acétate d'isobornyle	-	-	22.5	-	-

La composition chimique d'huiles essentielles de l'espèce *Inula graveolens* récoltées de plusieurs pays du monde est présentée dans le tableau 3.

Le pourcentage le plus élevé en acétate de bornyle a été obtenu dans les HE des parties aériennes fraîches des plantes Libanaise (70.6%,72.3%) (Ghosn *et al.*, 2006), Marocaine (63.9%) (Lamiri *et al.*, 2001) et Italienne (56.8%) (Blanc *et al.*, 2004), en plus bornéol qui se trouve en pourcentage élevé dans les plantes Turque (64.0%) (Karamenderes et Zeybek, 2000) et Iranienne (60.7%) (Mirza et Ahmadi, 2000). Cependant la plante de Sardaigne contient le Selin-11-en-4- α -ol (14.1%) comme produit majoritaire (Blanc *et al.*, 2004).

Tableau 3. Composants majoritaires ($\geq 5\%$) d'huiles essentielles de l'espèce *Inula graveolens*

Composé	Localité et pourcentage						
	Maroc (Lamiri <i>et al.</i> , 2001)	Iran (Mirza et Ahmadi, 2000)	Turquie (Karamenderes et Zeybek, 2000)	Corse, Italie (Blanc <i>et al.</i> , 2004)	Sardaigne, Italie (Adams, 2004)	Sannine, Liban (Ghosn <i>et al.</i> , 2006)	Bekaa, Liban (Ghosn <i>et al.</i> , 2006)
Camphène	5.0	-	-	6.1	-	-	-
β -caryophyllène	-	8.3	-	-	-	-	-
τ -cadinène	-	5.2	-	7.8	-	-	13.4
Oxyde de caryophyllène	-	-	-	-	6.2	-	-
Selin-11-en-4- α -ol	-	-	-	-	14.1	-	-
Bornéol	25.6	60.7	64.0	7.6	-	12.4	-
Acétate de bornyle	63.9	6.8	23.0	56.8	-	70.6	72.3
1,10-di-epi-cubenol	-	-	-	-	10.3	-	-
Cedr-8(15)-en-9- α -ol	-	-	-	-	10.3	-	-

III.2.4. *Inula graveolens***III.2.4.1. Description botanique de la plante**

Inula graveolens (L.) Desf. (Figure 1) est une plante annuelle entièrement pubescente-glanduleuse, visqueuse, à odeur fétide ; tige de 20 à 70 cm. dressée, très rameuse, à rameaux étalés-dressés, très feuillée ; feuilles sessiles, étroites, linéaires, aiguës, entières ou obscurément denticulées, les inférieures oblongues-linéaires; involucre à folioles linéaires-lancéolées, les extérieures herbacées, les intérieures scarieuses sur les bords ; achaines velus, rétrécis en col au sommet ; capitules petits, très nombreux, subsessiles, en longue panicule pyramidale, lâche ; fleurs jaunes ne dépassant pas l'involucre, celles de la circonférence souvent violacées (Quezel et Santa, 1963).



Figure 1. Photographie d'*Inula graveolens* (L.) Desf.

III.2.2. Classification dans la systématique botanique

Synonymes : Inule poisseeuse, Inule odorante, Inule fétide, *Dittrichia graveolens*.

Règne	—————▶	Plantae
Division	—————▶	Magnoliophyta
Classe	—————▶	Magnoliopsida
Ordre	—————▶	Asterales
Famille	—————▶	Asteraceae
Genre	—————▶	<i>Inula</i>
Espèce	—————▶	<i>Inula graveolens</i> (L.) Desf.

III.2.5. *Inula viscosa*

III.2.5.1. Description botanique de la plante (Quezel et Santa, 1963).

Inula viscosa (L.) Ait. (figure 2) est une plante vivace fréquente en région méditerranéenne, elle fleurit à la fin de l'été et au début de l'automne. Elle affectionne les anciennes cultures (friches), les décombres, les bords des routes et des chemins, formant d'abondantes touffes vertes à capitules jaunes.

La plante est visqueuse et très odoriférante, à odeur de camphre. Toute la plante est couverte de poils glanduleux qui libèrent une résine odoriférante et collante.

La racine est pivotante, ligneuse à sa base (pouvant atteindre 30 cm de long). Les tiges sont frutescentes à la base de 40-100 cm, à rameaux rougeâtres. Les feuilles sont entières ou dentées, aiguës, sinuées, insérées directement sur la tige pour les caulinaires. Elles sont glanduleuses sur les deux faces. Les caulinaires amplexicaules, plus largement lancéolées. Les fleurs sont rayonnantes, regroupées en inflorescences (capitules) formant de longues grappes de capitules, pyramidales. Les fruits sont des akènes de un à 2 mm de long. Ils sont rassemblés sur le réceptacle du capitule.



Figure 2. Photographie d'*Inula viscosa* (L.) Ait.

III.2.5.2. Classification dans la systématique botanique

Synonymes : *Dittrichia graveolens*, Magramen.

Règne	—————>	Plantae
Division	—————>	Magnoliophyta
Classe	—————>	Magnoliopsida
Ordre	—————>	Asterales
Famille	—————>	Asteraceae
Genre	—————>	<i>Inula</i>
Espèce	—————>	<i>Inula viscosa</i> (L.) Ait.

Chapitre III

*Généralités sur les activités
antioxydante,
anticholinestérase et
antibactérienne*

I. Activité antioxydante

L'oxydation est le transfert d'électrons d'un atome à l'autre, elle représente un élément essentiel de la vie aérobie et de métabolisme, car l'oxygène est l'accepteur d'électrons final dans le système de flux d'électrons qui produit de l'énergie sous forme d'ATP (Davies, 1995). Toutefois, des problèmes peuvent survenir lorsque le flux d'électrons est dissocié (transfert d'électrons non appariés simples), générant des radicaux libres. Des exemples de radicaux libres centrés sur l'oxygène, appelées espèces réactives de l'oxygène (ROS), comprennent le superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), l'hydroxyle (HO^{\cdot}), le peroxyde (ROO^{\cdot}), l'alcoxyde (RO^{\cdot}) et l'oxyde nitrique (NO^{\cdot}).

Les radicaux libres sont très réactifs et attaquent rapidement les molécules dans les cellules voisines, le dommage causé est inévitable et probablement traité par des processus de réparation. Les ROS sont produits par l'utilisation normale du corps de l'oxygène tels que la respiration et certaines fonctions immunitaires à médiation cellulaire (Gülçin, 2006a). Un radical libre est défini comme une espèce chimique indépendante très instable, possédant un ou plusieurs électrons non appariés.

Les ROS sont soit des radicaux qui contiennent au moins un électron non apparié ou des composés non radicaux réactifs, capables d'oxyder les biomolécules. Par conséquent, ces intermédiaires sont également appelés oxydants ou pro-oxydants (Halliwell et Gutteridge, 1989; Sies, 1991). ROS sont produits au cours des événements physiologiques normaux et peut facilement ouvrir la peroxydation des lipides membranaires, ce qui conduit à l'accumulation de peroxydes lipidiques (Elmastaş *et al.*, 2006; Gülçin, 2010). Les ROS sont également capables d'endommager les biomolécules essentielles telles que les acides nucléiques, les lipides, les protéines, les acides gras polyinsaturés et les hydrates de carbone. En outre, elles peuvent provoquer des dommages à l'ADN qui peut conduire à des mutations. Si les ROS ne sont pas efficacement balayées par les constituants cellulaires, elles peuvent stimuler des réactions radicalaires en chaîne et endommager par la suite les biomolécules telles que les protéines cellulaires, les lipides et les acides nucléiques, conduisant à des états pathologiques (Halliwell et Gutteridge, 1990).

Les ROS provoquent également le vieillissement, le cancer et d'autres maladies (Aruoma, 1994). En conséquence, ROS ont été impliqués dans plus de 100 maladies, notamment le paludisme, les syndromes d'immunodéficience acquise, les maladies

cardiaques, les accidents vasculaires cérébraux, l'artériosclérose, le diabète et le cancer (Tanizawa *et al.*, 1992; Hertog *et al.*, 1993; Duh, 1998; Alho et Leinonen, 1999).

Les cellules sont protégées contre le stress oxydatif par l'interaction d'un réseau d'enzymes antioxydants (Davies, 1995). En outre, les enzymes ont été évalués comme nouveaux types d'antioxydants naturels dans certaines applications alimentaires. Ils peuvent être utilisés pour éliminer l'oxygène et les espèces réactives de l'oxygène et de réduire les hydroperoxydes lipidiques (Frankel, 1998).

Un antioxydant a été défini comme étant toute substance présente à faible concentration par rapport à celle d'un substrat oxydable retarde ou inhibe l'oxydation de ce substrat de façon significative (Halliwell et Gutteridge, 1989; Sies, 1993; Halliwell, 1995).

Les antioxydants peuvent neutraliser les radicaux libres et augmenter la durée de vie en retardant le processus de peroxydation lipidique, qu'elle est l'une des principales raisons de la détérioration des produits alimentaires et pharmaceutiques au cours de traitement et de stockage (Halliwell, 1997).

Au cours des dernières années, un grand intérêt a été porté sur l'identification des sources alternatives naturelles et sûres d'antioxydants naturels, en particulier d'origine végétale.

La consommation de fruits et légumes a été associée à un risque réduit de maladies chroniques, notamment l'athérosclérose coronaire (Rimm *et al.*, 1996a, b). Des études épidémiologiques ont montré une association inverse entre la consommation de fruits et légumes et la mortalité liée aux maladies d'âge, comme les maladies coronariennes et le cancer, qui peut être attribuée à leur activité antioxydante (Eberhardt *et al.*, 2000; Ganesan *et al.*, 2011). Les principaux composants bioactifs de ces sources naturelles sont en particulier les composants phénoliques et les flavonoïdes, qui sont responsables de leurs avantages sur la santé (Bocco *et al.*, 1998).

Une grande variété de composés phénoliques biologiquement actifs contenant un ou plusieurs cycles aromatiques, se trouvent naturellement dans les aliments végétaux, où ils fournissent une grande partie de la saveur, la couleur et la texture. Les substances phénoliques simples comprennent des monophénols avec un noyau benzénique, tels que le 3-éthylphénol et le 3,4-diméthylphénol qui se trouvent dans les fruits et les graines, le groupe de l'acide

hydroxycinnamique, qui contient l'acide caféique, l'acide férulique, les flavonoïdes et leurs glycosides qui comprennent les catéchines, les proanthocyanidines, les anthocyanines et les flavonols.

La dose journalière des substances phénoliques peut être supérieure à 1 g par jour, mais la quantité de flavonoïdes définis dans l'alimentation revient probablement à pas plus de quelques dizaines de milligrammes par jour (Pokorny *et al.*, 2000).

1. Antioxydants synthétiques

Les antioxydants synthétiques les plus utilisés sont des composés phénoliques tels que le butylhydroxyanisole (BHA), le butylhydroxytoluène (BHT), la *tert*-butylhydroquinone (TBHQ) et le gallate de propyle (PG) (figure 1). Ces antioxydants synthétiques sont les plus couramment utilisés dans des applications alimentaires et pharmacologiques. Ils sont toujours substitués par des alkyles pour améliorer leur solubilité dans les graisses et les huiles (Hudson, 1990).

Toutefois, le BHA et le BHT ont été limités par des règles législatives en raison de doutes sur leurs effets toxiques et cancérogènes (Wichi, 1988 ; Sherwin 1990). Par conséquent, il y a un intérêt croissant des antioxydants naturels dans les applications alimentaires, et une tendance croissante de préférences des consommateurs vers des antioxydants naturels, qui ont tous donné un nouvel élan aux efforts pour explorer les sources naturelles des antioxydants (Gülçin, 2006b , 2007).

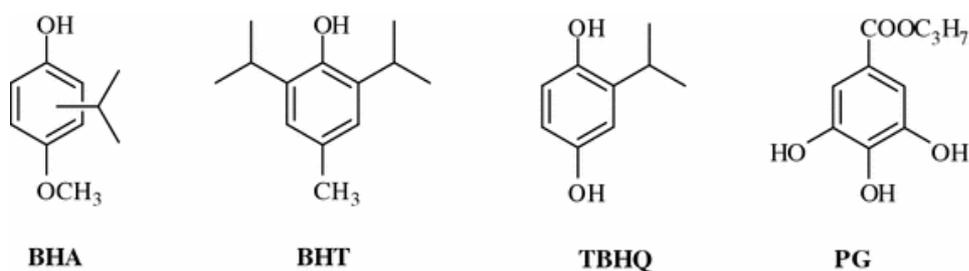


Figure 1. Les antioxydants synthétiques les plus putatifs et populaires

BHA et le BHT sont relativement stables à la chaleur, ils sont souvent utilisés pour la stabilisation de matières grasses dans des produits cuits au four. Les produits naturels apparaissent comme plus sains et plus sûrs que les antioxydants synthétiques (Valenzuela et Nieto, 1996).

2. Les antioxydants naturels

Le régime alimentaire humain contient une matrice de différents composés possédant des activités antioxydantes ou qui ont été suggérées pour piéger les ROS sur la base de leurs propriétés structurelles. Les représentants les plus éminents d'antioxydants alimentaires sont la vitamine C, les tocophérols, les caroténoïdes et les flavonoïdes. L'acide ascorbique (vitamine C) est considéré comme l'un des antioxydants les plus puissants, moins toxiques et naturels (Bendich *et al.*, 1986; Weber *et al.*, 1996). Il s'agit d'une vitamine soluble dans l'eau qui se trouve en concentrations élevées dans de nombreux aliments et plantes diététiques. L'acide ascorbique peut mettre fin à la chaîne de réactions radicalaires par transfert d'électrons.

Les principales sources de l'acide ascorbique dans l'alimentation sont les fruits, en particulier les agrumes, les kiwis, les cerises, les melons et les légumes comme la tomate, les légumes verts feuillus, le brocoli, les choux-fleurs et les choux de Bruxelles; son contenu pourrait dépasser 100 mg ascorbate/100 g de poids frais.

Les tocophérols sont une classe de composés chimiques dont beaucoup ont une activité de la vitamine E (Gülçin *et al.*, 2005a ; ArasHisar *et al.*, 2004). Ils sont les antioxydants les plus connus et les plus utilisés (Pokorny, 1987). Ils peuvent être classés comme des tocophérols et des tocotriénols, et dans chacune de ces deux classes il existe quatre isomères (α , β , γ et δ) fait un total de huit isomères de tocophérol. Le composé α -tocophérol est une forme courante de tocophérol ajouté à des produits alimentaires.

Les antioxydants naturels sont présents dans presque toutes les plantes, les micro-organismes, les champignons et même dans les tissus des animaux (Pokorny, 1999).

3. Les flavonoïdes

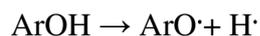
Les flavonoïdes sont des éléments communs des plantes, plus de 8000 polyphénols, y compris plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés dans différentes espèces végétales, et le nombre ne cesse de croître (Harborne *et al.*, 1999 ; Beecher, 1999), ils ont été isolés à partir de presque toutes les parties de la plante: feuilles, tiges , racines, fruits ou graines. La structure de base de ces composés est constituée de deux noyaux aromatiques reliés par une chaîne aliphatique de trois atomes de carbone formant un cycle pyranne ou moins fréquemment un cycle furane (Harborne, 1986).

Les flavonoïdes sont des antioxydants très efficaces proposés pour la protection contre les maladies cardio-vasculaires en réduisant l'oxydation de lipoprotéines de basse densité. Également, les flavonoïdes sont parmi les principaux constituants antioxydants de notre alimentation, leur dose journalière est supérieure à 100 mg (Dragsted *et al.*, 1997).

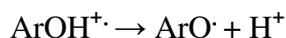
En général, la capacité effective antioxydante de flavonoïdes dépend de certains facteurs, le potentiel de chélation de métal est fortement dépendant de l'arrangement des groupements hydroxyles et un groupement carbonyle dans la molécule, la présence de l'hydrogène ou des substituant donateurs d'électrons capables de réduire les radicaux libres et délocaliser l'électron non apparié qui conduit à la formation d'un radical phénoxy stable.

Généralement, il existe deux mécanismes d'action d'un antioxydant phénolique (généralement ArOH) (Wright *et al.*, 2001):

- le transfert de l'atome d'hydrogène (HAT)

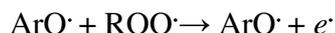
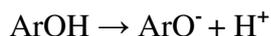


- transfert d'un électron unique suivi par un transfert de proton (SET-PT),



Récemment, un autre mécanisme a été découvert:

- transfert d'électron séquentiel de la perte de protons (SPLET)



Le groupe 7-OH joue un rôle important en tant que site d'ionisation et de transfert d'électrons. Par exemple, les mécanismes possibles pour la réaction de la quercétine avec le radical DPPH[·] a été donné en figure 2.

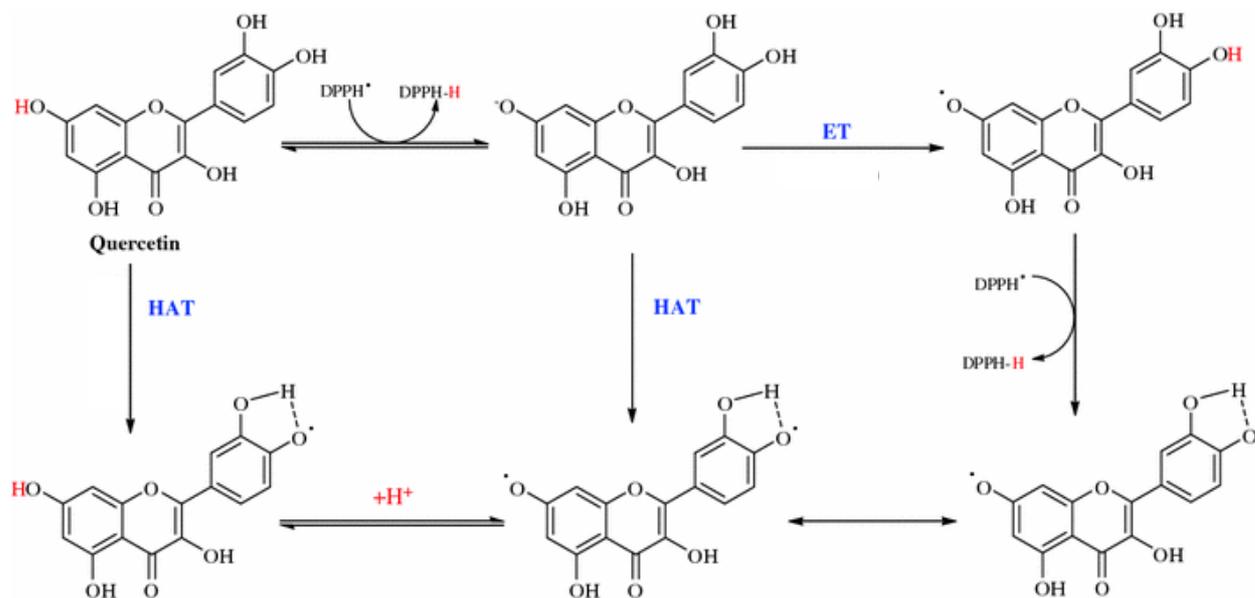


Figure 2. Les mécanismes possibles de la réaction entre la quercétine comme un flavonoïde et les radicaux DPPH•

Cette réaction est fortement accélérée par l'augmentation de la densité d'électrons dans les cycles A et C. De plus, l'itinéraire alternatif est un transfert d'électrons (ET) rapides à partir de l'anion phénolate vers les radicaux DPPH. Le cycle A est fortement électro-attracteur, et sous l'effet de la conjugaison, la partie catéchol du cycle B est le site le plus probable de déprotonation.

En raison de la présence de groupes -OH, de nombreux flavonoïdes sont principalement situés dans la phase aqueuse des systèmes biologiques. Les flavones, les flavonols, les isoflavones, les flavonones et les chalcones, se produisent dans tous types de tissus de parties aériennes de plantes (Herrmann, 1993 ; White et Xing, 1997). Les flavones et les flavonols sont trouvés dans presque toutes les parties de plantes, en particulier dans les feuilles et les pétales, ainsi que les flavonols survenant plus fréquemment que les flavones (Herrmann, 1976).

4. Les acides phénoliques

L'activité antioxydante des acides phénoliques et leurs dérivés dépend du nombre et de la position des groupements hydroxyle liés au cycle aromatique (Rice-Evans *et al.*, 1996; Sroka et Cisowski, 2003). La présence de différents substituants dans le squelette phénol peut modifier les propriétés antioxydantes, en particulier la capacité de donner l'hydrogène. En

général, le phénol non substitué est inactif en tant que donneur d'hydrogène, les monophénols sont des antioxydants moins efficaces que les polyphénols. L'introduction d'un groupement donneur d'électrons tel que le groupement hydroxyle dans la position *ortho* ou *para* augmente l'activité antioxydante du phénol ou de l'acide phénolique (Pokorny, 1988; Chimi *et al.*, 1991). En outre, la présence d'un groupement carbonyle, tel qu'un acide, un ester, ou une lactone, renforcée son activité antioxydante, cette dernière augmente lorsque le groupe carbonyle est séparé du noyau aromatique.

Dans la littérature, la position et le degré d'hydroxylation sont très importante pour la détermination de l'activité antioxydante (Dziedzic et Hudson, 1984; Chen et Ho, 1997).

Les avantages et les inconvénients des antioxydants synthétiques et naturels sont résumés dans le tableau 1.

Tableau 1. Quelques avantages et inconvénients des antioxydants synthétiques et naturels couramment utilisés pour la protection des produits alimentaires (Valenzuela et Nieto, 1996; Gulçin, 2002)

Antioxydants synthétiques	Antioxydants naturels
Peu coûteux	Chers
Largement appliqués	L'utilisation de certains produits soumis à restriction
Moyenne à forte activité antioxydante	Vaste activité antioxydante
Une préoccupation croissante de la sécurité	Perçue comme des substances inoffensives
L'utilisation de certains d'entre eux est interdite	Utilisation accrue, développement des applications
Faible solubilité dans l'eau	Large gamme de solubilité
Intérêt décroissant	Intérêt croissant
Certains d'entre eux sont stockés dans les tissus adipeux	Complètement métabolisés

5. Effets antioxydants

Dans les dernières années, l'importance des antioxydants dans la protection des organismes, des tissus, ou des systèmes non vivants contre le stress oxydatif, est devenue évidente. Cette déclaration est appuyée par des études réalisées dans différents domaines, y compris la physiologie, la pharmacologie, la nutrition et même la transformation des aliments (Magalhaes *et al.*, 2009). En ce qui concerne les aliments, les antioxydants peuvent être définis comme des substances qui sont capables de retarder ou d'empêcher l'oxydation.

Les activités des antioxydants dépendent non seulement de leurs caractéristiques structurales, mais aussi de nombreux autres facteurs, tels que la concentration, la température, le niveau de lumière, le type de substrat, et l'état physique du système.

Jusqu'à présent, les méthodes les plus couramment utilisées pour la détermination *in vitro* de l'activité antioxydante sont :

- ✓ Anti-radicalaire DPPH
- ✓ Piégeage de radical cation ABTS⁺
- ✓ Réduction cuprique (CUPRAC)
- ✓ Chélation des ions ferreux

6. Tests d'activité antioxydante

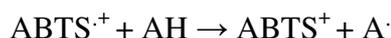
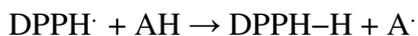
Essai de piégeage des radicaux

Les piègeurs des radicaux libres peuvent réagir directement pour mettre fin aux réactions en chaîne de peroxydation et améliorer la qualité et la stabilité des produits alimentaires (Soares *et al.*, 1997). L'élimination des radicaux libres, un des mécanismes connus en antioxydants. Ce mécanisme standard propose une technique rapide pour le dépistage de l'activité antioxydante de composés spécifiques. Les analyses basées sur l'utilisation des radicaux de DPPH[•] et d'ABTS^{•+} dans des méthodes spectrophotométriques plus populaires pour la détermination de la capacité antioxydante des aliments, des boissons et des extraits végétaux. Les deux radicaux chromogènes peuvent réagir directement avec des antioxydants. En outre, les méthodes de DPPH[•] et d'ABTS^{•+} ont été utilisées pour évaluer l'activité antioxydante des composés en raison des procédures simples, rapides, sensibles et reproductibles (Özcelik *et al.*, 2003; Gülçin *et al.*, 2005c).

Les antioxydants sont soupçonnés d'intercepter la chaîne d'oxydation des radicaux libres, de donner l'hydrogène des groupements hydroxyles phénoliques, et de former un produit final stable qui ne déclenche ou propage l'oxydation des lipides (Amarowicz *et al.*, 2004).

L'activité de piégeage des radicaux est très importante, en raison du rôle délétère des radicaux libres dans les aliments et dans les systèmes biologiques. Diverses méthodes sont actuellement utilisées pour évaluer l'activité antioxydante des végétaux. Les essais chimiques

sont basés sur la capacité de piéger les radicaux libres, en utilisant une variété de systèmes générant des radicaux et des méthodes pour la détection de la terminaison d'oxydation. Quand un antioxydant (AH) est ajouté aux radicaux, il existe un degré de décoloration qui inverse la formation du radical DPPH[·] et ABTS^{·+}:



Ces tests ont été appliqués pour déterminer l'activité antioxydante des constituants alimentaires (Köksal *et al.*, 2009). Ils sont rapides, ne nécessitent pas des réactifs onéreux ou des instrumentations sophistiquées. Ces chromogènes sont faciles à utiliser, ont une grande sensibilité et permettent une analyse rapide de l'activité antioxydante d'un grand nombre d'échantillons.

6.1. Test du DPPH[·]

Le test du DPPH[·] est la plus ancienne méthode de détermination de l'activité antioxydante. Il a d'abord été proposé en 1950 pour découvrir H donateurs en matériaux naturels. Plus tard, le test a été quantifié pour déterminer le potentiel antioxydant des composés alimentaires ainsi que des échantillons biologiquement pertinents (Roginsky et Lissi, 2005).

Le radical DPPH est l'un des rares radicaux organiques azotés stables qui porte une couleur violette foncée. Il est disponible, et ne doit pas être généré avant le dosage comme ABTS^{·+}. En test DPPH, les antioxydants sont capables de réduire le radical stable DPPH[·] à la couleur jaune de DPPH-H. Cette méthode est basée sur la réduction du DPPH[·] en solution alcoolique en présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène due à la formation de la forme non-radical DPPH-H dans la réaction.

La capacité de réduire le radical DPPH[·] par l'antioxydant peut être évaluée en mesurant la diminution de son absorbance. Le test de décoloration largement utilisé a été signalé par Blois (1958). Le DPPH est habituellement utilisé comme réactif pour évaluer l'activité antiradicalaire des antioxydants (Elmastas *et al.*, 2006b). Il s'agit d'un radical libre stable montrant une absorption maximale à 517 nm. Lorsque les radicaux DPPH rencontrent un substrat donneur de protons comme un antioxydant, les radicaux seraient trouvés et l'absorbance est réduite (Blois, 1958; Gülçin *et al.*, 2009).

Comme on le voit dans la figure 3, le radical chromogène violet (DPPH·) est réduit par des composants antiradicalaires (AH) à l'hydrazine jaune pâle correspondant (DPPH-H) (Blois, 1958; Elmastas *et al.*, 2006b). Le test est simple, rapide et ne nécessite qu'un spectrophotomètre UV-VIS à effectuer, ce qui explique probablement son utilisation généralisée dans le dépistage antioxydant.

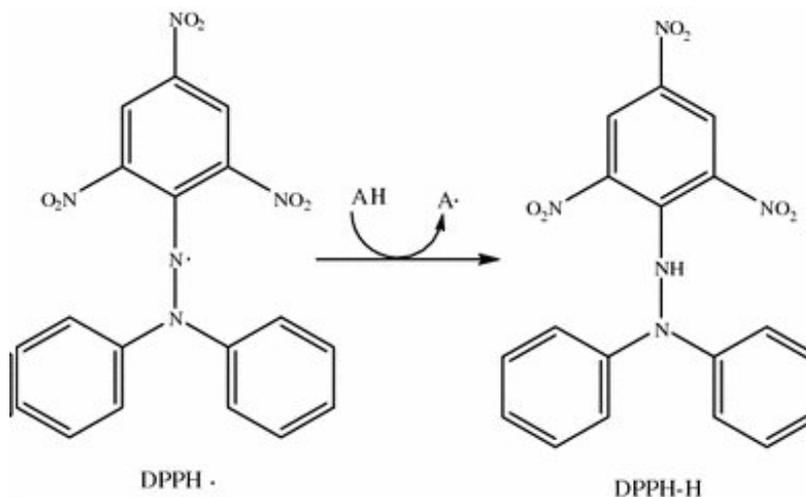
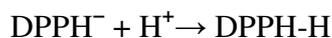
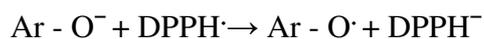


Figure 3. L'effet d'un antioxydant (AH) sur le radical DPPH·

Le test du DPPH· est considéré comme fondé principalement sur une réaction de transfert d'électrons et l'abstraction de l'hydrogène, basé sur la mesure de la capacité de réduire l'antioxydant vers DPPH· (Prior *et al.*, 2005).

Le radical libre stable DPPH· est un réactif utile pour étudier l'activité des phénols, catéchols et anilines à travers deux mécanismes différents: HAT et SPLET (Foti *et al.*, 2004a, b; Musialik et Litwinienko, 2005).



Une solution de DPPH· fraîchement préparée présente une couleur pourpre foncé avec un maximum d'absorption à 517 nm. Cette couleur pourpre disparaît généralement quand un

antioxydant est présent dans le milieu (Gülçin *et al.*, 2004d, 2006a). Ainsi, les molécules antioxydantes peuvent éteindre les radicaux libres DPPH[•] en fournissant des atomes d'hydrogène ou d'électrons (Gülçin *et al.*, 2007b; Samadi *et al.*, 2011).

En général, les résultats sont rapportés comme étant la concentration inhibitrice (IC₅₀). IC₅₀ est la quantité d'antioxydant nécessaire pour réduire 50% de la concentration initiale de DPPH[•] (Brand-Williams *et al.*, 1995).

Enfin, le test de DPPH[•] est considéré comme une méthode spectrophotométrique facile et utile en matière de dépistage pour mesurer la capacité de piégeage des radicaux libres des composés purs (Gülçin *et al.*, 2004d, 2007b, 2008b), des constituants alimentaires (Gülçin *et al.*, 2006c, 2011c; Ak et Gülçin, 2008), des extraits de plantes (Elmastas *et al.*, 2006b; Büyükkuroglu et Gülçin, 2009; Serbetçi Tohma et Gülçin, 2010) et d'autres échantillons tels que les composés synthétisés (talaz *et al.*, 2009; Balaydın *et al.*, 2010).

Le resvératrol est un principal constituant de raisin (figure 4), il a eu une activité marquée de piégeage des radicaux DPPH[•] (Gülçin 2010). Il est bien connu que la capacité des composés polyphénoliques d'agir comme des antioxydants dépend des propriétés redox de leurs groupements hydroxyles phénoliques et leur potentiel de délocalisation électronique à travers la structure chimique.

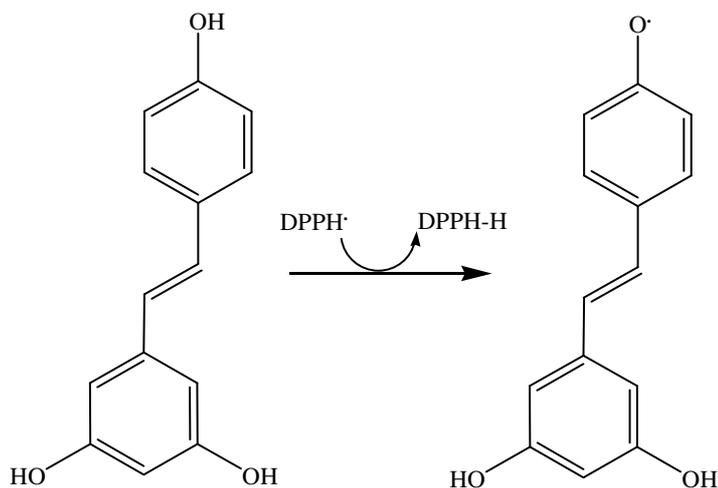


Figure 4. Mécanisme de piégeage des radicaux par le resvératrol

Comme on peut le voir dans la figure 5, un autre mécanisme a été observé dans la molécule de curcumine (Ak et Gülçin, 2008), dont l'intermédiaire B est le plus stable.

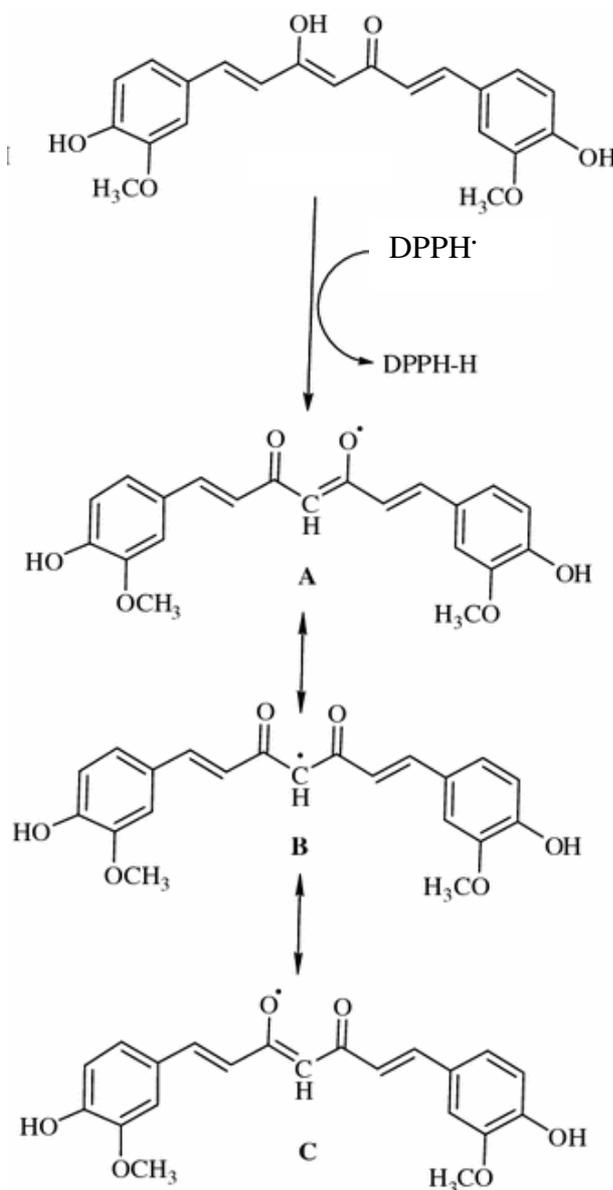


Figure 5. Réaction proposée entre les radicaux DPPH et la curcumine

6.2. Test de balayage ABTS^{•+}

Dans ce dosage, l'ABTS est oxydé à son radical cation ABTS^{•+}, qui est intensément coloré, la réaction entre les composés d'essai et le radical ABTS peut réduire la couleur d'ABTS^{•+}, ce qui permet la mesure de l'activité anti-oxydante.

ABTS^{•+} est applicable pour les composés lipophiles et hydrophiles. La production du radical cation ABTS^{•+} constitue la base de l'une des méthodes spectrophotométriques qui ont été appliquées pour mesurer l'activité antioxydante totale des substances pures, mélanges aqueux et boissons (Gulçin, 2009). Ce test est une technique de décoloration, dans lequel le radical est produit directement sous une forme stable avant la réaction avec les antioxydants.

ABTS^{•+} présente des maximum d'absorption dans des milieux aqueux de 414, 734 et 815 nm et dans un milieu éthanolique de 414, 730 et 873 nm. Le test d'ABTS^{•+} a été développé par Miller *et al.*, (1993).

Cependant, le radical cation ABTS^{•+} est généralement généré par K₂S₂O₈ (figure 6) (Gülçin *et al.*, 2006a, b, 2007a, b, 2010a, 2011a, b). En général, cette réaction chimique nécessite un long temps (jusqu'à 16 h), alors que la production enzymatique est plus rapide et les conditions de réaction sont plus douces. En ce qui concerne la longueur d'onde de détection, la détermination à 734 nm est préférable (Arnao 2000).

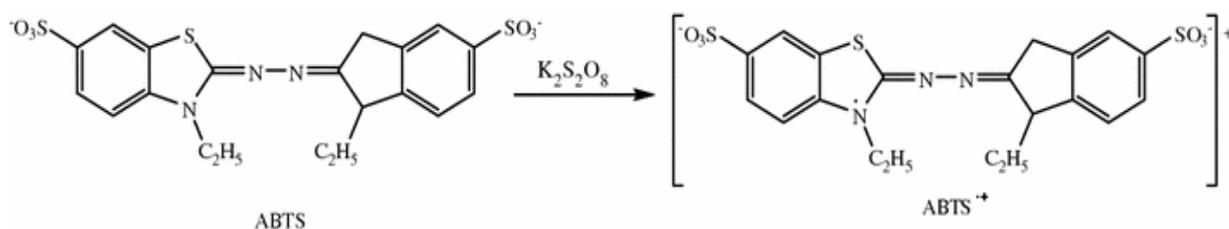


Figure 6. Génération d'ABTS^{•+} par l'oxydation d'ABTS avec K₂S₂O₈

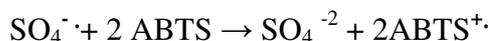
Il convient également de noter que la réaction avec ABTS^{•+} était très rapide et presque dans tous les cas a été achevée dans 0,25 à 0,5 min. Le blanchiment d'une solution préformée de radical cation bleu-vert ABTS^{•+} a été largement utilisé pour évaluer la capacité antioxydante des composés. La réaction du radical cation avec des capteurs de radicaux peut être facilement contrôlée en suivant la décroissance de l'absorbance de l'échantillon à 734 nm (Gülçin *et al.*, 2009).

Le radical cation ABTS^{•+} peut être préparé en employant différents oxydants. Les résultats obtenus à l'aide de l'oxydant K₂S₂O₈ montrent que la présence de peroxydisulfate augmente le taux d'ABTS^{•+}.

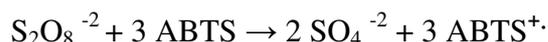
ABTS^{•+} ont été générés dans le système ABTS / K₂S₂O₈ :



Où la scission de la peroxydisulfate pourrait avoir lieu après le transfert d'électrons. En présence d'un excès d'ABTS, le radical sulfate réagira selon



Conduisant à la réaction générale



Généralement, $\text{ABTS}^{\cdot+}$ réagit avec les antioxydants dans 30 minutes. Il est soluble dans les solvants aqueux et organiques et n'est pas affecté par la force ionique. Ainsi, il peut être utilisé pour la détermination de l'activité antioxydante des extraits hydrophiles, ou lipophiles (Awika *et al.*, 2003).

6.3. Réduction cuprique (CUPRAC)

La méthode de CUPRAC a été développée par Apak *et al.*, (2006). Ce dosage est basé sur la réduction de Cu^{2+} en Cu^+ par l'action combinée de tous les antioxydants ou réducteurs dans un milieu aqueux-éthanolique (pH 7,0) en présence de Neocuproïne (2,9-diméthyl-1,10-phénanthroline), par les polyphénols, donnant un complexe Cu^+ avec un pic d'absorption maximale à 450 nm (figure 7) (Gülçin, 2008; Lee *et al.*, 2011). Cette méthode peut être utilisée pour la détermination de la capacité antioxydante du constituant alimentaire par le complexe Cu^{2+} -Neocuproïne (Cu^{2+} -Nc) en tant que réactif oxydant chromogène.

Le neocuproïne est un composé organique hétérocyclique et est un agent chélatant. Le dosage de CUPRAC est économique, rapide, stable, sélectif et approprié pour une variété d'antioxydants.

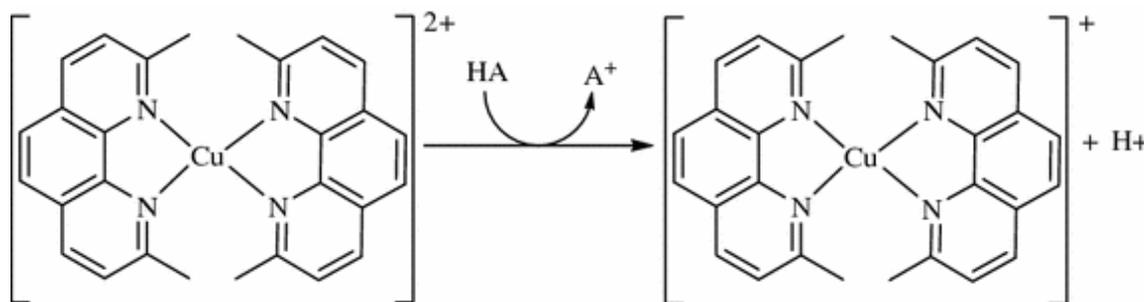


Figure 7. Réaction de CUPRAC par une molécule antioxydante (HA: une molécule antioxydante, $\text{A}^{\cdot+}$: une molécule antioxydante oxydée). Les protons libérés dans la réaction sont neutralisés par un tampon d'acétate d'ammonium

Le réactif de CUPRAC a un potentiel redox à proximité de celle du couple redox $\text{ABTS}^{\cdot+} / \text{ABTS}$. En outre, des sucres simples et de l'acide citrique, qui ne sont pas classés comme de véritables antioxydants, ne sont pas oxydés par le réactif de CUPRAC, alors que la plupart des antioxydants phénoliques sont facilement oxydés en raison de leurs potentiels redox favorables. Des antioxydants (tels que les thiols) restent inerte vis à vis des réactifs à

base de Fe^{3+} sont facilement oxydés par le réactif de CUPRAC (Apak *et al.*, 2005). Ce procédé est capable de mesurer à la fois des antioxydants hydrophiles et lipophiles (Apak *et al.*, 2008).

6.4. Chélation des ions ferreux

Les ions ferreux (Fe^{2+}) sont des pro-oxydants les plus efficaces dans les systèmes alimentaires, l'effet de chélation serait bénéfique, et la suppression de la liberté d'ions de fer de la circulation pourrait être une approche prometteuse pour prévenir les maladies induites par le stress oxydatif. Lorsque l'ion ferreux est chélaté, il peut perdre ses propriétés pro-oxydantes.

Le fer, dans la nature, peut être trouvé sous forme d'ions ferreux (Fe^{2+}) ou d'ion ferrique (Fe^{3+}) (forme prédominante dans les aliments). La chélation de fer peut rendre un effet antioxydant important en retardant l'oxydation catalysée par un métal. D'une compilation de données biochimique, humaines et animales, des liens ont été proposés entre l'accroissement des niveaux de fer dans le corps et un risque accru d'une variété de maladies telles que les maladies vasculaires, le cancer et certaines maladies neurologiques (Berg *et al.*, 2001 ; Siah *et al.*, 2005).

Le fer est un élément essentiel pour toutes les cellules vivantes, malgré son caractère essentiel, le fer peut être potentiellement toxique lorsqu'il est présent comme ion libre. Sa toxicité peut résulter de sa capacité à participer, en tant que catalyseur dans la formation du radical hydroxyle, une espèce capable d'induire l'oxydation des lipides, des protéines et de l'ADN (Halliwell et Gutteridge, 1984; Valko *et al.*, 2006).

Un chélateur d'ions ferreux efficace offre une protection contre les dommages oxydatifs en éliminant le fer. Les ions ferriques (Fe^{3+}) produisent également des radicaux de peroxydes bien que le taux est dix fois inférieur à celui de l'ion ferreux (Fe^{2+}). Pour assurer sa disponibilité et pour protéger les cellules de subir les effets toxiques d'ions de fer libres, le métal est lié à différents peptides et protéines, dont la ferritine est reconnue comme la seule et la plus importante protéine de fer-stockage (Ponka, 1999; Arosio *et al.*, 2009). En fait, la ferritine a été estimée pour pouvoir séquestrer jusqu'à 4500 atomes de fer par molécule, le stockage de ces atomes se produit sous la forme d'un noyau minéral ferrihydrite (Harrison et Arosio, 1996).

La ferrozine (figure 8) peut former des complexes avec Fe^{2+} , la formation de ces complexes est perturbée en présence des agents chélatants, ce qui entraîne une réduction de la couleur rouge du complexe. La mesure de la réduction de la couleur permet donc l'estimation de l'activité métal-chélateur. La basse absorbance indique un accroissement des activités métal-chélateur. La chélation des métaux est une importante propriété antioxydante (Kehrer, 2000 ; Gülçin *et al.*, 2003c).

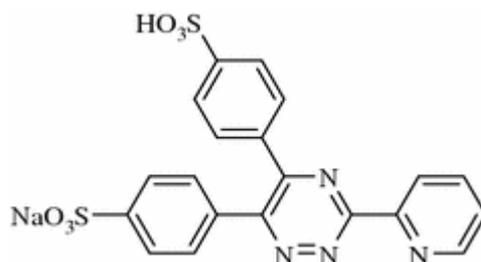


Figure 8. Structure chimique de la ferrozine

Le complexe ferrozine- Fe^{+2} produit un chromophore rouge avec une absorbance qui peut être mesurée à 562 nm.

La capacité métal-chélatant est significative car il réduit la concentration du métal de transition du catalyseur de la peroxydation lipidique. Il a été rapporté que les agents chélateurs sont efficaces comme antioxydants secondaires, car ils réduisent le potentiel d'oxydoréduction, ce qui stabilise la forme oxydée des ions métalliques.

Comme représenté sur la figure 9, la curcumine peut chélater les ions ferreux avec ses (-OH) et (-OCH₃). Il a été rapporté que les composés ayant des structures contenant des groupements fonctionnels (C-OH) et (C=O) peuvent chélater les ions métalliques. Kazazica *et al.*, (2006) ont montré que les flavonoïdes tels que le kaempférol peuvent chélater les Cu^{2+} et Fe^{2+} par les groupements carbonyles fonctionnels. Les composés avec des structures contenant deux ou plusieurs groupements fonctionnels tels que: -OH, -SH, -COOH, -PO₃H₂, C=O, -NR₂, -S- et -O-, peuvent présenter une activité de chélation des métaux (Yuan et Carrington, 2005 ; Gülçin, 2006a). La structure de la curcumine et ses sites de liaison de chélation de métal sont données dans la figure 9. Récemment, Fiorucci *et al.*, (2007) ont démontré que la quercétine peut chélater les ions métalliques de la même manière.

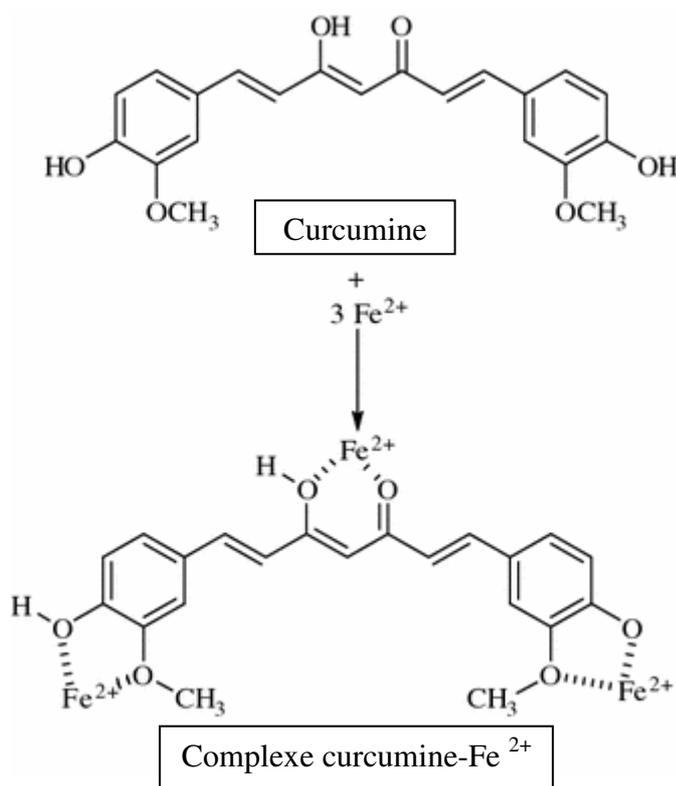


Figure 9. Chélation des ions ferreux (Fe²⁺) par la curcumine

Il a été indiqué que la curcumine délimitée les ions ferreux (Fe²⁺) par les groupes fonctionnels carbonyle et hydroxyle (Ak et Gulcin, 2008).

De la même manière, deux molécules de resvératrol peuvent se lier à des ions ferreux (Fe²⁺) par les groupements hydroxyle. Le resvératrol montre une capacité marquée de fixation de fer, ce qui suggère son action principale comme un inhibiteur de la peroxydation. Dans ce dosage, le resvératrol a interféré avec la formation du complexe de fer-ferrozine, ceci suggère que le resvératrol est capable de capturer des ions ferreux avant la ferrozine. La structure du resvératrol et ses sites de liaison pour la chélation de métal sont données dans la figure 10.

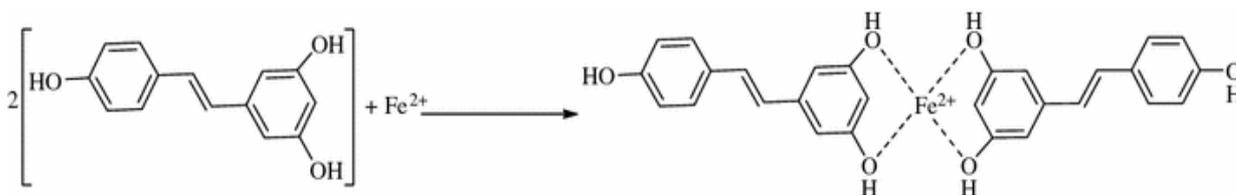


Figure 10. Chélation d'un ion ferreux par deux molécules de resvératrol

Récapitulation

Le principe de l'activité antioxydante est basé sur la disponibilité d'électrons pour neutraliser les radicaux libres. En outre, l'activité antioxydante est liée au nombre et à la nature du motif d'hydroxylation sur le noyau aromatique. Il est généralement reconnu que la capacité d'agir comme donneur d'hydrogène et inhibiteur de l'oxydation est améliorée par l'augmentation du nombre de groupements hydroxyle dans le cycle phénol. Les composés phénoliques sont un groupe beaucoup diversifié de composés phytochimiques qui sont largement distribués dans les plantes supérieures telles que les fruits, les légumes, le thé, l'huile d'olive, le tabac et ainsi de suite.

Aujourd'hui, il y a un intérêt croissant pour les substances présentant des propriétés antioxydantes, qui sont fournies aux organismes humains comme composants alimentaires ou pharmaceutiques préventifs spécifiques. Par conséquent, les antioxydants sont devenus une partie essentielle de la technologie de conservation des aliments et des soins de santé contemporaine. Il est bien connu que les plantes qui possèdent des propriétés pharmacologiques antioxydante sont liés à la présence de composés phénoliques, en particulier les acides phénoliques et les flavonoïdes.

D'autre part, une grande diversité des méthodes de bio-analyse pour la détermination de la capacité antioxydante du composant alimentaire est disponible. Ces tests bioanalytiques diffèrent les uns des autres en termes de mécanismes de réaction, des espèces oxydantes, des conditions de réaction et de la forme de l'expression des résultats.

II. Activité anticholinestérase

1. La maladie d'Alzheimer

— Histoire

En 1901, le psychiatre et neuropathologiste allemand Alois Alzheimer, identifie le premier cas de la maladie qui portera son nom, chez une patiente de 50 ans (Auguste Deter). Il suivit son cas jusqu'à sa mort en 1906 et décrivit les altérations anatomiques observées sur son cerveau. Durant les cinq années suivantes, onze cas similaires furent rapportés dans la littérature médicale (Berchtold et Cotman, 1998).

— Définition

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative (perte progressive de neurones) incurable du tissu cérébral qui entraîne la perte progressive et irréversible des fonctions mentales et notamment de la mémoire. C'est la forme la plus fréquente de démence chez l'être humain.

La maladie d'Alzheimer (MA) ou la démence sénile du type Alzheimer (DSTA) est un trouble neurodégénératif progressif mais irréversible provoquée par la perte de neurones et de synapses dans le cortex cérébral et certaines régions sous-corticales. La fréquence de la MA augmente avec l'âge, on estime qu'environ 10% des personnes de plus de 65 ans et 50% de ceux de plus de 85 ans souffrent de MA. Sauf s'il y a nouveaux traitements sont développés pour réduire le risque, le nombre de personnes atteintes de la MA aux Etats-Unis devrait être de 14 millions en 2050 (Ul-Haq et al., 2010).

— Traitement

La maladie d'Alzheimer, connue pour être associée à la perte progressive de la mémoire, est caractérisée par une faible concentration d'acétylcholine dans le cadre de l'hippocampe et le cortex du cerveau. L'inhibition de l'acétylcholinestérase a été utilisée avec succès comme une cible thérapeutique pour traiter la maladie d'Alzheimer, mais la résistance aux médicaments montre que la butyrylcholinestérase reste un sujet de préoccupation dans le traitement de la maladie d'Alzheimer (Ul-Haq et al., 2010)

— Les cholinestérases

Les cholinestérases (ChEs) sont une famille d'enzymes qui partagent une homologie étendue de séquence (65%). Les ChEs chez les vertébrés ont été classés en deux types, l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE), sur la base des spécificités de substrat et de l'inhibiteur des sensibilités distinctes. L'AChE est un élément clé des synapses cholinergiques du cerveau et des jonctions neuromusculaires. La fonction biologique majeure de l'acétylcholinestérase est la fin de nerf propagation de l'influx par hydrolyse rapide du neurotransmetteur acétylcholine cationique (ACh) (Figure 11).

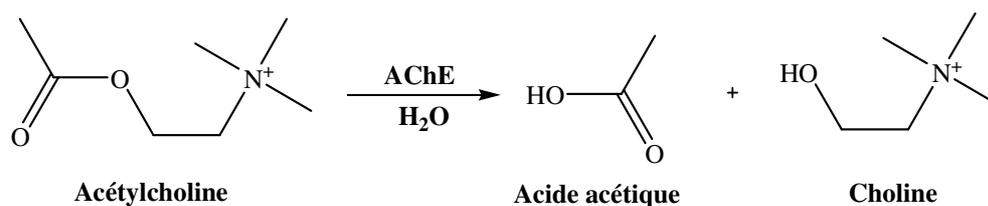


Figure 11. Réaction d'hydrolyse de l'acétylcholine

Selon l'hypothèse cholinergique, les troubles de la mémoire chez les patients atteints de DSTA résulte d'une déficience de la fonction cholinergique dans le cerveau (Perry, 1986). Plus précisément, de faibles quantités de l'ACh dans l'hippocampe et le cortex sont généralement considérés comme la cause de la MA (Terry et Buccafusco, 2003).

Bien que le rôle exact de la BChE n'est pas encore complètement compris, il est rapporté d'être impliqués dans la morphogénèse, la cytogénèse et la tumorigénèse, la régulation de la prolifération cellulaire et l'apparition de différenciation au cours du développement neuronal précoce, comme fixateur à la détoxification de certaines substances chimiques, et en le métabolisme des lipoprotéines (Ezio, 2003).

En outre, certaines populations de neurones présentent une activité exclusivement BChE dans le cerveau humain (Wright *et al.*, 1993), telle que l'hydrolyse de l'acétylcholine au niveau des synapses du système nerveux central, et le remplacement de la fonction AChE dans le cerveau d'Alzheimer rend la BChE comme une cible de médicament plus puissant que l'AChE (Carreiras et Marco, 2004). Les données biologiques appuient le rôle de la BChE dans la perturbation de la neurotransmission cholinergique observée dans la MA (Combarros *et al.*, 2005).

2. Mesure de l'activité anticholinestérase

La mesure de l'activité cholinestérasique, par la méthode colorimétrique indirecte d'Ellman (Ellman *et al.*, 1961), utilise un analogue de substrat naturel de l'AChE, l'acétylthiocholine (ATC), hydrolysée en acétate et thiocholine (figure 12).

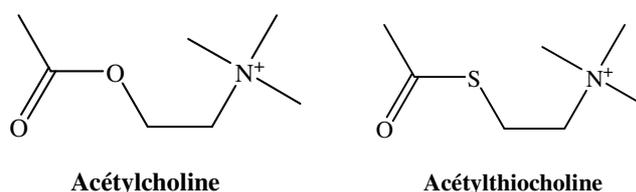


Figure 12. Structure chimique de deux substrats de l'acétylcholinestérase

L'acide 5,5'- dithiobis (2-nitrobenzoïque) (DTNB) présent dans le milieu réactionnel est réduit par la thiocholine issue de l'hydrolyse enzymatique (figure 13), et libère le thionitrobenzoate (TNB⁻) qui absorbe à une longueur d'onde maximale de 414 nm.

A partir de la variation de cette absorbance on peut déterminer l'activité de l'enzyme.

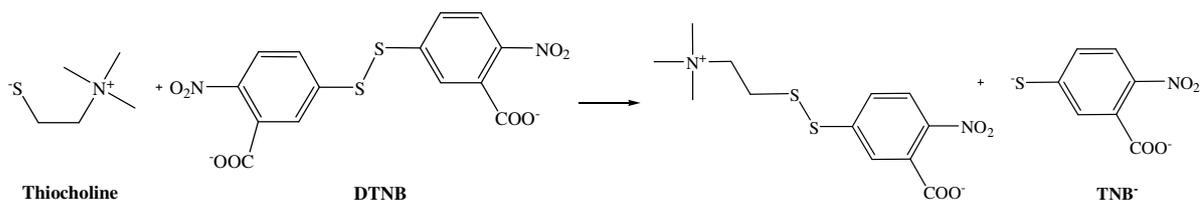


Figure 13. Réduction de DTNB par la thiocholine

III. Activité antibactérienne

La résistance aux antibiotiques est un problème qui continue à défier le secteur de la santé. La découverte de nouveaux antibiotiques et de nouvelles stratégies thérapeutiques est nécessaires pour relever ce défi. Les progrès dans l'identification de nouvelles sources d'antibiotiques naturels et l'expansion de la diversité chimique des antibiotiques fournissent des pistes chimiques pour les nouveaux médicaments (Wright et Sutherland, 2007).

Les antibiotiques à base de plantes représentent une grande source inexploitée de médicaments. Les antibactériens d'origine végétale ont un énorme potentiel thérapeutique. Les infections humaines en particulier celles impliquant des micro-organismes: bactéries, champignons ou virus, provoquent des infections graves dans les pays tropicaux et subtropicaux du monde. En général, les bactéries ont la capacité génétique à transmettre et à acquérir une résistance à des médicaments, qui sont utilisés comme agents thérapeutiques (Girish et Satish, 2008).

L'évaluation de l'activité antibactérienne d'une plante peut être réalisée par plusieurs méthodes, parmi ces méthodes la technique la plus utilisée est la diffusion en milieu gélosé « antibiogramme ».

III.1. Technique de diffusion en milieu gélosé « antibiogramme »

Le test de sensibilité antibiogramme est avant tout un outil de décision thérapeutique en classant les bactéries : sensibles, intermédiaires ou résistantes (Caron, 2012).

Dans cette méthode, des disques de 6mm de papier filtre sont imprégnés d'échantillon puis déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablementensemencé, en surface d'une suspension bactérienne. La lecture des résultats se fait après incubation à 37°C pendant 18h

par la mesure de diamètre de la zone d'inhibition (DZI) en millimètre de la croissance bactérienne.

D'après Ponce *et al.*, (2003) et Moreira *et al.*, (2005), le diamètre de la zone d'inhibition renseigne sur la sensibilité d'une bactérie donnée :

- Résistante : DZI < 8mm.
- Sensible : DZI = 9-14 mm.
- Très sensible : DZI = 15-19 mm.
- Extrêmement sensible : DZI > 20 mm.

III.2. Définition de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI est la concentration minimale d'un échantillon permettant d'inhiber la croissance bactérienne après un temps d'incubation de 18 à 24 h. Cette concentration est déterminée par la méthode standardisé de macro-dilution NCCLS (National Commitee for Clinical Laboratory Standards), elle consiste à disperser l'agent antimicrobien en concentration variable de façon homogène et stable dans le milieu de culture du germe étudié (Allegrini *et al.*,1973).

III.3. Les souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées sont l'origine des infections (respiratoire, urinaire, intestinales ...). Il existe deux types de germes : Cocci gram positif et Bacilles gram négatif.

3.1. Cocci gram positif

- *Staphylococcus aureus* : responsable d'intoxications alimentaires.
- *Enterococcus faecalis* : habitant le tube digestif, elle peut causer des infections mortelles.

3.2. Bacilles gram négatif

- *Pseudomonas aeruginosa* : responsable d'infections nosocomiales.
- *Enterobacter aerogenes* : responsable d'infections urinaire et nosocomiales.
- *Klebsiella pneumoniae* : responsable d'infections pulmonaires, urinaires ou nosocomiales.
- *Proteus mirabilis* : responsable d'infections urinaires ou infections de plaie.
- *Escherichia coli* : entraînant des gastro-entérites, des infections urinaires, méningites ou sepsis.

Partie II

Matériel

et

Méthodes

Chapitre I

Matériel végétal et méthodes d'extraction, de séparation et de purification

I. *Biscutella raphanifolia* Poiret

I.1. Récolte et séchage de la plante

La plante endémique *Biscutella raphanifolia* a été récoltée en Mai 2009 dans la région de Constantine. Le matériel végétal fraîchement récolté est séché à l'abri de la lumière et de la chaleur.

I.2. Extraction

Pour extraire des produits à partir d'une plante, il existe plusieurs techniques d'extraction. Nous avons procédé la méthode la plus couramment utilisée soit la macération dans un mélange alcool/eau.

1500g de la plante sèche, sous forme de poudre, sont mis à macérer trois fois dans un mélange méthanol/eau (80/20 : V/V) pendant 24heures. Les extraits obtenus sont concentrés puis repris avec 600 ml d'eau distillée. Après filtration, la solution obtenue est épuisée successivement par l'éther de pétrole, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et le n-butanol. Les phases organiques sont concentrées à sec sous pression réduite. On obtient 0.75 g de l'extrait éther de pétrole (PEBR), 2.1 g de l'extrait dichlorométhane (DEBR), 3.4 g de l'extrait acétate d'éthyle (EEBR), 30.5 g de l'extrait n-butanol (BEBR).

Les rendements d'extraction sont donnés dans le tableau 1.

Tableau 1. Rendements des extraits de *Biscutella raphanifolia*

Extrait	PEBR	DEBR	EEBR	BEBR
Rendement (%)	0.05	0.14	0.22	2.03

Le processus de l'extraction est résumé dans la figure 1.

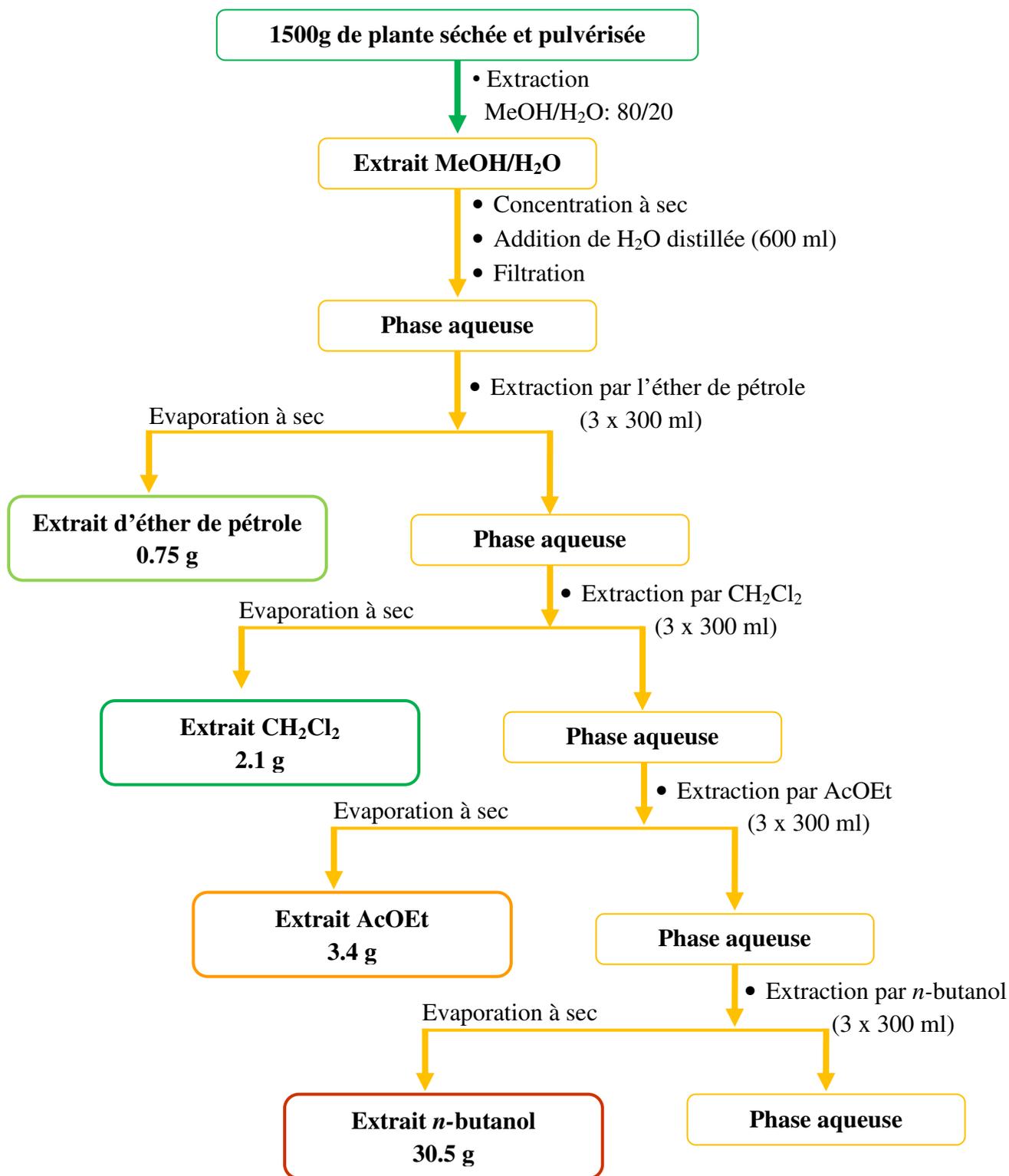


Figure 1. Récapitulatif de l'extraction de *Biscutella raphanifolia* Poiret

I.3. Traitement des extraits

La faible quantité de l'extrait d'éther de pétrole et de l'extrait dichlorométhane ainsi que la couleur rouge de ces deux extraits sous UV (254-365 nm) indiquent la présence abondante de chlorophylle. Ceci nous a incités à renoncer à l'étude de ces deux extraits.

Les différents tests chromatographiques sur l'extrait acétate d'éthyle et l'extrait *n*-butanol montrent que l'extrait *n*-butanol est le plus riche en composés.

I.4. Séparation et purification des composés de l'extrait *n*-butanol

15g de l'extrait *n*-butanol ont été fractionnés par chromatographie sur colonne de gel de polyamide SC₆ (le poids de la phase stationnaire est trente fois le poids de l'extrait). L'élution est réalisée par un gradient de polarité du système toluène / méthanol. Des fractions de 200 ml sont recueillies, leur suivi est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice. L'examen de plaques CCM est réalisé sous lumière UV à 254 nm et à 365 nm. Les fractions de compositions similaires sont rassemblées et évaporées. 20 fractions ont été ainsi obtenues (Tableau 2)

Tableau 2. Résultats de séparation par chromatographie sur colonne de polyamide SC₆ de l'extrait *n*-butanol

Fractions	Nom de la fraction	Système d'élution		Observations
		% Toluène	% MeOH	
1-77	F1	100-98-96	0-2-4	Mélange de produits en très faible quantité
78-107	F2	92	8	
108-130	F3	88	12	
131-168	F4	85	15	Trainée
169-192	F5	80	20	
193-213	F6	75	25	Mélange complexe
214-231	F7	70	30	
232-249	F8	65	35	Mélange inséparable
250-266	F9	60	40	
267-283	F10	55	45	
284-292	F11	50	50	
293-298	F12	40	60	Mélange complexe
299-300	F13	40	60	Mélange séparable
301-308	F14	40	60	Mélange complexe
309-312	F15	30	70	
313-318	F16	30	70	Mélange séparable
319-323	F17	30	70	Mélange complexe
324-338	F18	20	80	
339-353	F19	10	90	
354-368	F20	0	100	

- Etude des fractions obtenues

L'étude chromatographique analytique sur couche mince de fractions obtenues à partir de l'extrait *n*-butanol de *Biscutella raphanifolia* montre une présence d'un produit majoritaire qui masque l'observation d'autres produits.

Le poids important et la simplicité des fractions F13 et F16 nous a permis d'étudier ces deux fractions jusqu'à la détermination structurale de principaux composés isolés.

I .4.1. Fractionnement de la fraction F13

La fraction F13 (403 mg) a été mise à chromatographier sur colonne de gel de silice en phase et pression normale. On a utilisé le système isocratique AcOEt /MeOH/H₂O (8/1.5/0.5) pour une bonne séparation. Des fractions de 25 ml ont été collectées et analysées par chromatographie sur couche mince de gel de silice. Les résultats de cette séparation sont présentés dans le tableau 3.

Tableau 3. Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de la fraction F13

Fraction	Nom de la fraction	Observations
1-7	13-1	Mélange de produits en très faible quantité
8-13	13-2	
14-18	13-4	
19-22	13-5	Mélange séparable
23-29	13-6	Mélange complexe
30-35	13-7	
36-39	13-8	Mélange séparable, faible quantité
40-47	13-9	
48-53	13-10	Mélange complexe

La chromatographie sur couche mince de la sous fraction 13-5 montre un composé majoritaire sur des plaques préparatives de gel de silice éluées avec le système AcOEt/MeOH/H₂O (8/1/1) pour donner 25 mg du produit A23.

La fraction 13-8 a subi une séparation sur colonne de gel de silice, avec un système isocratique d'élution AcOEt/MeOH/H₂O (7/1.5/0.5). Deux fractions intéressantes ont été obtenues F13-8-5 et F13-8-6.

Par chromatographie sur colonne de gel de silice avec un système isocratique d'élution AcOEt/MeOH/H₂O (7/2/0.5), nous avons pu séparer un produit pur A4.

La figure 3 montre les différentes étapes de séparation et de purification de F13.

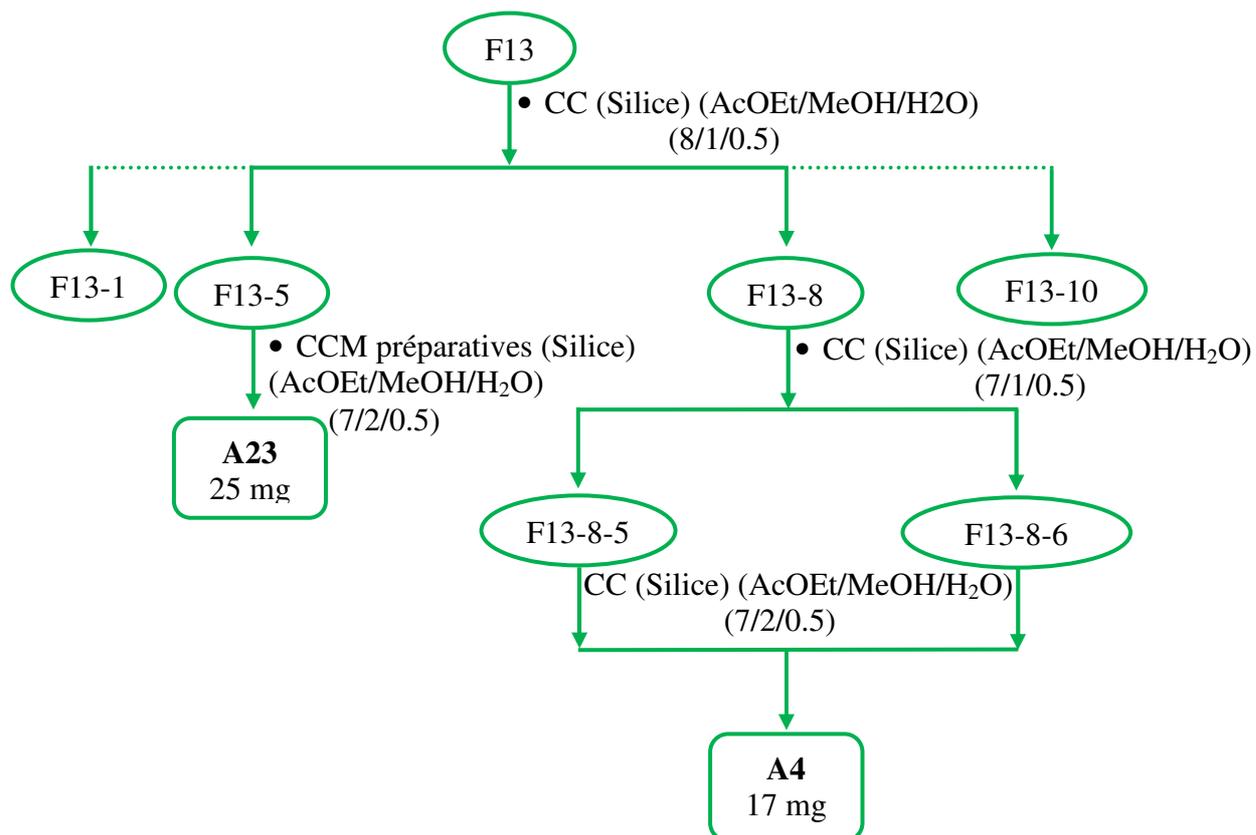


Figure 2. Fractionnement et purification de la fraction F13

1.4.2. Fractionnement de la fraction F16

Nous avons procédé à une séparation sur colonne de gel de silice avec le système isocratique d'éluion AcOEt/MeOH/H₂O (8/1/0.5). Des fractions de 25 ml ont été collectées. Le tableau 4 montre les résultats de cette colonne après regroupement des fractions selon les tests chromatographiques sur couche mince.

Tableau 4. Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de gel de silice de la fraction F16

Fraction	Nom de la fraction	Observations
1-5	F16-1	Mélange de produits en faible quantité
6-8	F16-2	
9-11	F16-3	Mélange séparable
12-15	F16-4	Mélange complexe
16-24	F16-5	Mélange séparable
25-30	F16-6	
31-33	F16-7	
34-38	F16-8	Trainée
39-42	F16-9	

La présence d'un même produit majoritaire dans ces fractions inhibe le processus de la séparation.

Nous avons procédé à des séparations sur colonnes de gel de silice avec différents systèmes isocratique d'élution (AcOEt/MeOH/H₂O) (Figure 3) pour obtenir deux produits purs A16, et C9.

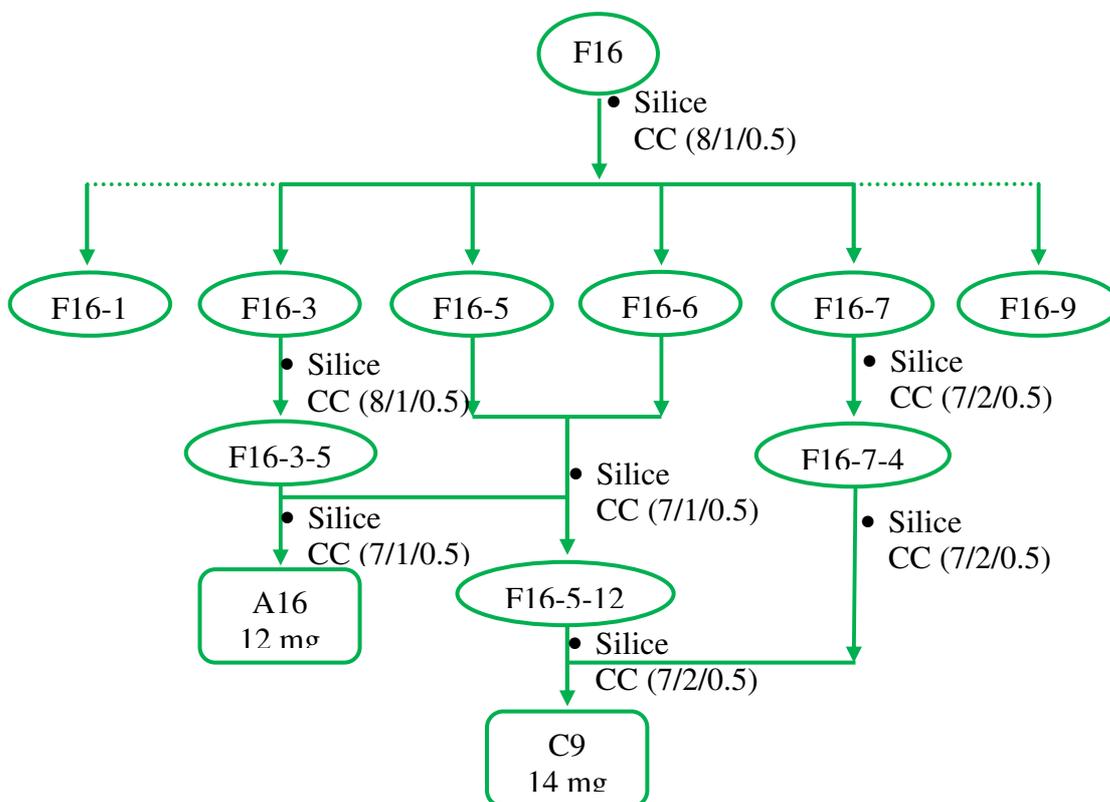


Figure 3. Fractionnement et isolement de la fraction F16

Conclusion

L'étude chromatographique de l'extrait n-butanol s'est avérée être compliquée suite à la présence d'un produit majoritaire.

Par conséquent, nous avons pu isoler quatre produits purs A23, A4, A16 et C9.

II. *Zilla macroptera***II.1. Récolte et séchage**

La plante endémique *Zilla macroptera* a été récoltée au mois de Mars de l'année 2011 dans la région de Ghardaia. Le matériel végétal fraîchement récolté est séché à l'abri de la lumière et de la chaleur, puis coupé en petits morceaux.

II.2. Extraction

Nous avons procédé à l'extraction de 2000g des parties aérienne de la plante sèche et coupée en petits morceaux par macération à froid trois fois dans le chloroforme pendant 24 heures, la solution obtenue à été filtrée puis concentrée à sec pour obtenir l'extrait chloroformique.

La plante traitée par le chloroforme a été reprise par un mélange éthanol/eau (80/20 : V/V) 3x24 heures. Les solutions résultantes sont filtrées puis concentrées. L'extrait obtenu est additionné d'eau distillée puis filtré pour obtenir la phase aqueuse. Cette dernière subit une extraction liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par l'éther de pétrole, le chloroforme, l'acétate d'éthyle, et le n-butanol. Les phases organiques sont concentrées à sec pour donner les différents extraits destinés à notre étude.

Le tableau 5 montre les rendements d'extraction.

Tableau 5. Rendements des extraits de *Zilla macroptera*

Extrait	Chloroforme	Ether de pétrole	Chloroforme	Acétate d'éthyle	n-butanol
Poids (g)	23.5	0.8	1.3	10.5	80
Rendement (%)	1.17	0.04	0.07	0.52	4.00

Le processus d'extraction est résumé dans la figure 4.

II.3. Traitement des extraits

Après la réalisation d'une étude chromatographique analytique par CLHP sur les différents extraits nous avons choisi l'extrait n-butanol pour faire la séparation et l'identification de produits.

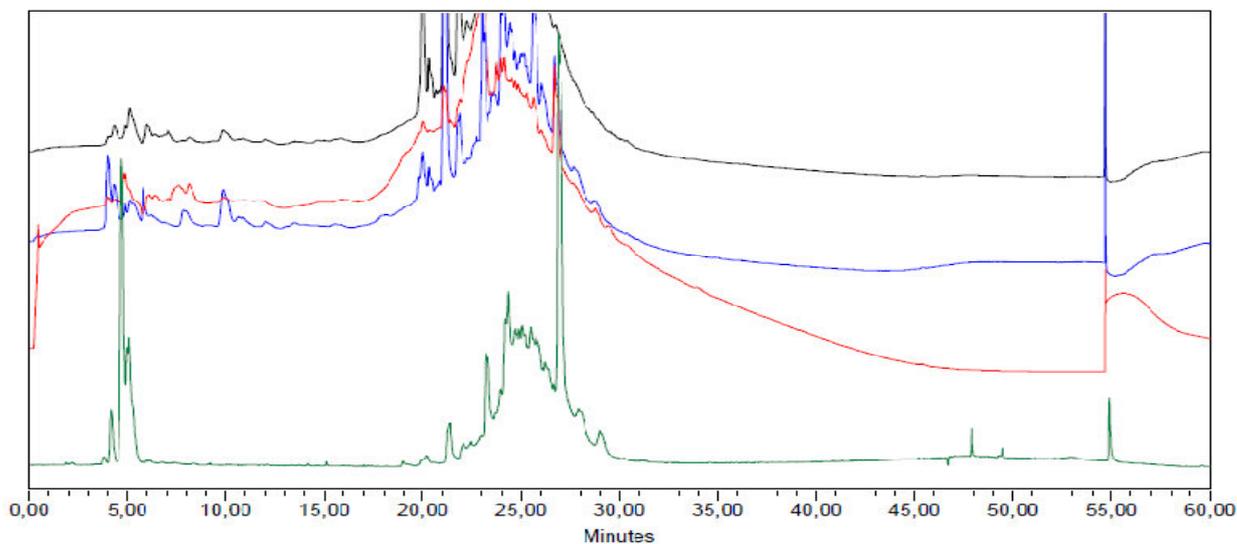
II.4. Séparation et purification des composés de l'extrait n-butanol

Une étude chromatographique analytique par CLHP a été réalisée sur cet extrait en utilisant différentes colonnes éluées par différents systèmes pour mettre au point les meilleures conditions de séparation.

Le chromatogramme représenté dans la figure 5 montre la richesse de cet extrait en composés, en utilisant une colonne de phenylhexyle éluée par un système binaire (H₂O+0.1% TFA/acétonitrile) (voir le tableau 6) et une détection UV avec des valeurs de λ_{\max} = 205, 254, et 280 nm.

Tableau 6. Conditions chromatographiques d'élution

	Temps (min)	Débit (ml/min)	% H ₂ O+TFA	% ACN	Système
1		0,80	90,0	10,0	Isocratique
2	5,00	0,80	90,0	10,0	Polarité croissante
3	35,00	0,80	0,0	100,0	Polarité croissante
4	45,00	0,80	90,0	10,0	Isocratique



- Chromatogramme enregistré à 213 nm
- Chromatogramme enregistré à 205 nm
- Chromatogramme enregistré à 254 nm
- Chromatogramme enregistré à 280 nm

Figure 5. Chromatogramme de l'extrait n-butanol

II.4.1. Séparation chromatographique sur colonne

2 g de l'extrait n-butanol sont dissous dans le méthanol puis additionnés à quelques grammes de gel silice diol puis évaporé à sec afin d'obtenir un solide sous forme de poudre. Ce dernier est déposé sur une colonne de gel de silice greffé diol préparée dans le cyclohexane. L'élution est réalisée par un gradient de polarité du type Cyclohexane/AcOEt/MeOH. Des fractions de 50 ml sont recueillies et analysées par CLHP. Les résultats de la progression de cette colonne sont rassemblés dans le tableau 7.

Tableau 7. Résultats de la chromatographie sur colonne de l'extrait n-butanol

Nom de la fraction	Système éluant			Poids (mg)
	% Cyclohexane	% AcOEt	% MeOH	
F1	100	0	0	25.59 (Précipité)
F1 bis	100	0	0	2.29
F2	50	50	0	2.17
F2 bis	50	50	0	2.55
F3	0	100	0	3.16 (pur)
F3 bis	0	100	0	43.99
F4	0	95	5	8.34
F4 bis	0	95	5	17.17
F5	0	90	10	33.36 (pur)
F5 bis	0	90	10	39.78
F6	0	80	20	81.06
F6 bis	0	80	20	205.07
F7	0	50	50	310.90
F7 bis	0	50	50	637.86
F8	0	0	100	119.37
F8 bis	0	0	100	35.18

II.4.2. Analyse des fractions de l'extrait n-butanol

Les fractions obtenues sont analysées par CLHP pour regrouper les fractions similaires, et déterminer les fractions jugées importantes en poids ayant une composition peu complexe. Nous avons procédé à la séparation de l'ensemble de fractions F6, F6 bis, et F7 (597 mg).

II.4.3. Etude de la fraction F6-F6bis-F7

La fraction F6-F6bis-F7 a été soumise à une chromatographie par CLHP en utilisant les conditions chromatographiques suivantes :

- ✓ Colonne semi-préparative de phenylhexyl.
- ✓ Eluant : H₂O+TFA/ACN (tableau 8).
- ✓ La concentration de la fraction : 100 mg/ml (dans le MeOH).

- ✓ Le volume injecté : 100µl.
- ✓ Longueur d'onde de séparation $\lambda = 213$ nm.

Les résultats de cette opération sont regroupés dans le tableau 9.

Tableau 8. Condition chromatographique d'élution

	Temps (min)	Débit (ml/min)	% H ₂ O+TFA	% ACN
1		3,00	77,0	23,0
2	5,00	3,00	77,0	23,0
3	20,00	3,00	10,0	90,0
4	25,00	3,00	77,0	23,0

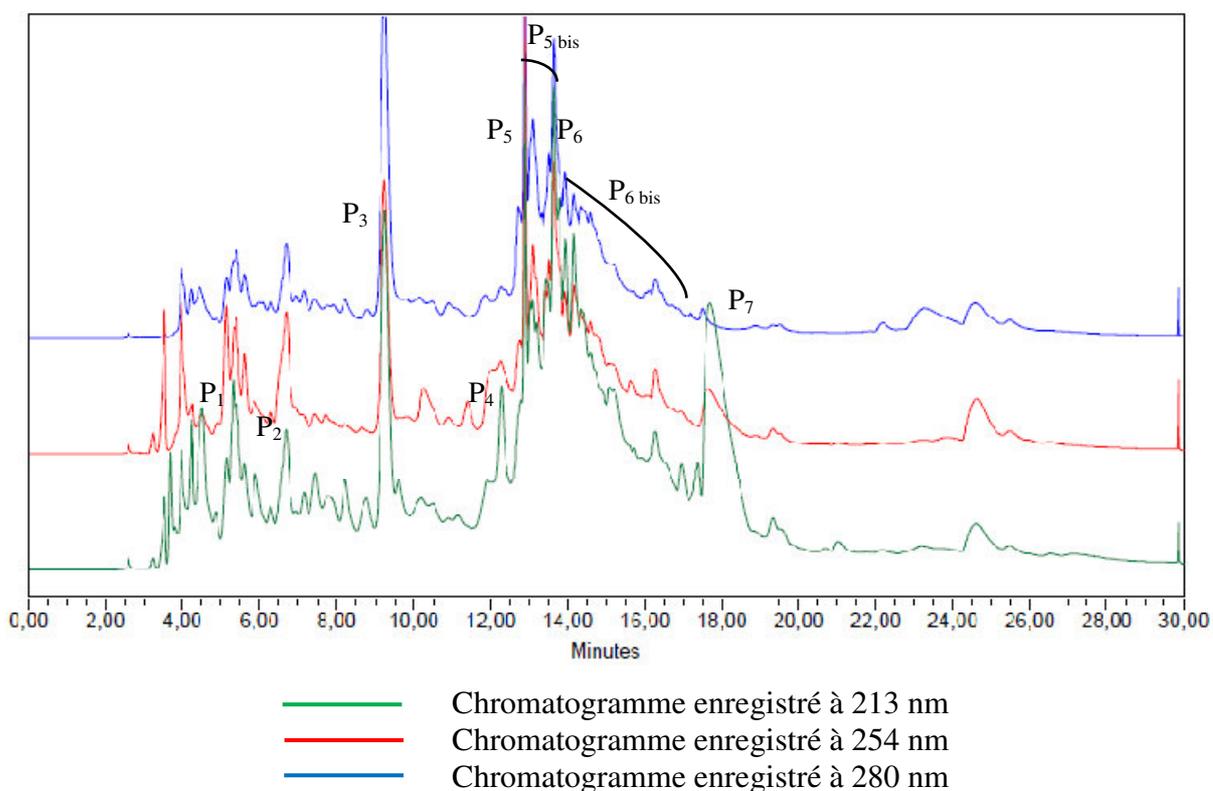


Figure 6. Chromatogramme de l'extrait n-butanol

Tableau 9. Résultats de la séparation de la fraction F6-F6bis-F7

Nom de Pic	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	P ₅	P _{5bis}	P ₆	P _{6bis}	P ₇
Poids (mg)	34.57	4.62	45.99	0.98	18.9 (pur)	20.44	19.48	102.86	2.98

Cette séparation nous a permis d'obtenir un produit pur F6-F6bis-F7-**P5**.

II.4.3.a. Fractionnement de la fraction F6-F6bis-F7-P₃

La fraction F6-F6bis-F7-P₃ a été chromatographiée par CLHP dans les conditions suivantes :

- ✓ Colonne semi-préparative de phenylhexyle.
- ✓ Système d'élution isocratique : 35% H₂O/65% MeOH.
- ✓ La concentration de la fraction : 10 mg/ml.
- ✓ Le volume injecté : 100µl.
- ✓ Débit : 3 ml/min
- ✓ Longueur d'onde de séparation $\lambda = 213$ nm.

Les résultats de cette opération sont regroupés dans le tableau 10.

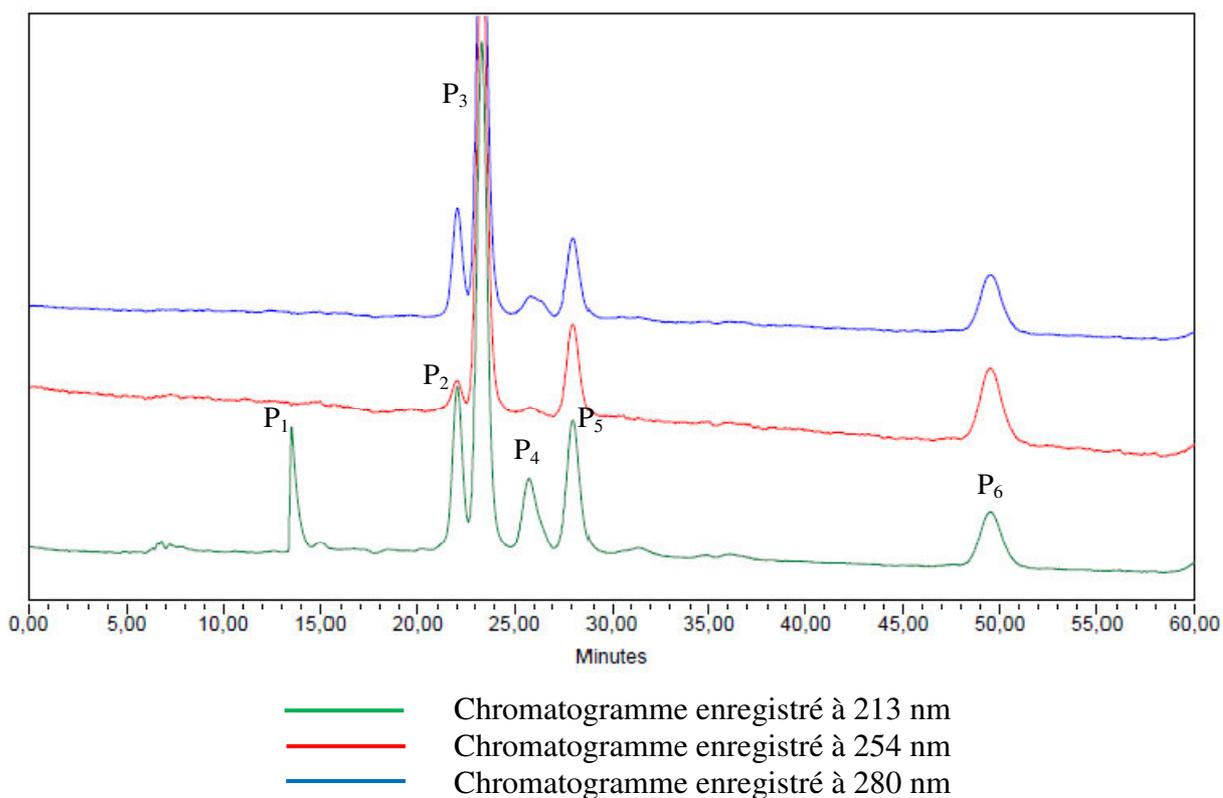


Figure 7. Chromatogramme de l'extrait n-butanol

Tableau 10. Résultats de séparation de la fraction F6-F6bis-F7-P₃

Nom de pic	P ₃ -P ₁	P ₃ -P ₂	P ₃ -P ₃	P ₃ -P ₄	P ₃ -P ₅	P ₃ -P ₆
Poids (mg)	8.18	7.69	5.23	7.95	7.25	7.20
Remarque	/	PUR	PUR	Repurification	PUR	PUR

➤ Repurification de F6-F6bis-F7-P₃-P₄

Nous avons procédé à la repurification de F6-F6bis-F7-P₃-P₄ par CLHP dans les conditions chromatographiques suivantes :

- ✓ Colonne semi-préparative C18.
- ✓ Système d'élution isocratique : 65% H₂O/35% MeOH.
- ✓ La concentration de la fraction : 10 mg/ml.
- ✓ Le volume injecté : 55µl.
- ✓ Débit : 3 ml/min
- ✓ Longueur d'onde de séparation $\lambda = 213$ nm.

Cette opération nous a permis d'obtenir deux produits purs F6-F6bis-F7-P₃-P₄-P₁ (1 mg) et F6-F6bis-F7-P₃-P₄-P₂ (1mg) (voir figure 8).

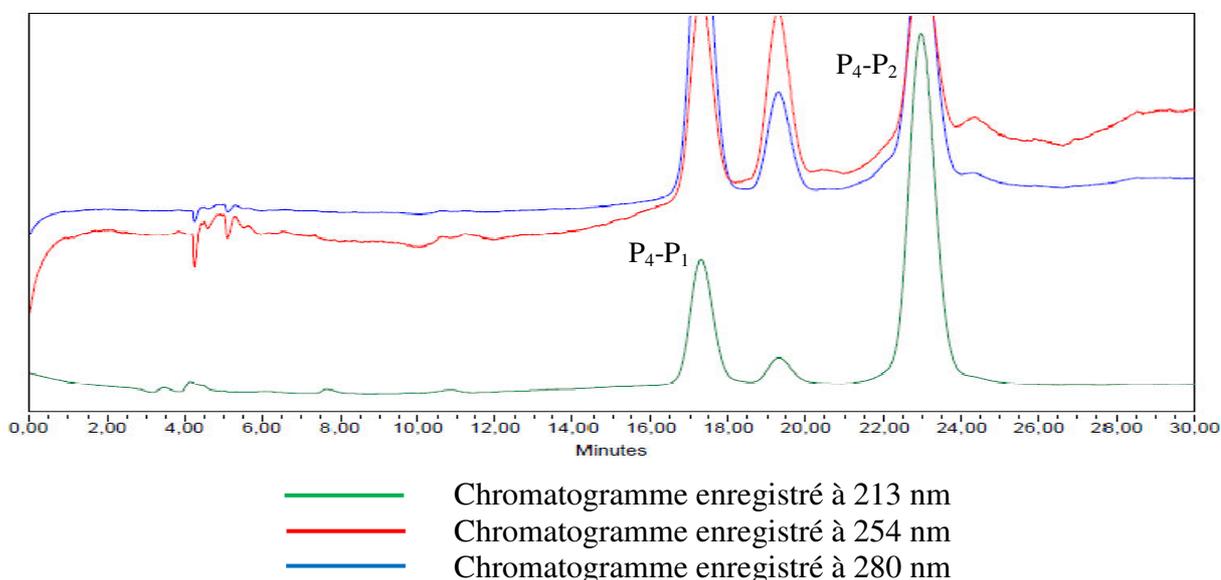


Figure 8. Chromatogramme de repurification de la fraction F6-F6bis-F7-P₃-P₄

II.4.3.b. Fractionnement de la fraction F6-F6bis-F7-P₁

Afin de séparer les différents pics de cette fraction nous avons utilisé les conditions chromatographiques suivantes :

- ✓ Colonne semi-préparative de phenylhexyle.
- ✓ Système d'élution isocratique : 75% H₂O/25% MeOH.
- ✓ La concentration de la fraction : 10 mg/ml.
- ✓ Le volume injecté : 100µl.
- ✓ Débit : 3 ml/min
- ✓ Longueur d'onde de séparation $\lambda = 213$ nm.

La figure 9 montre le chromatogramme de cette séparation et les fractions récoltées sont représentées dans le tableau 11.

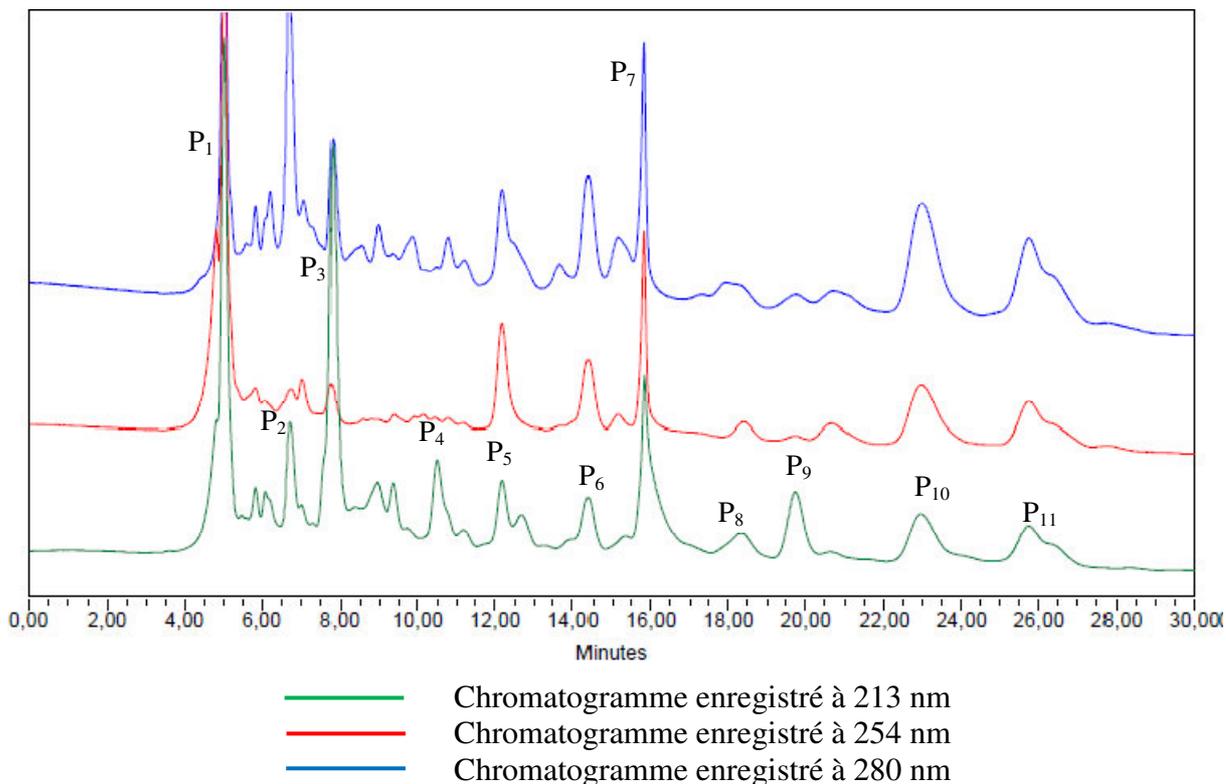


Figure 9. Chromatogramme de la fraction F6-F6bis-F7-P₁

Tableau 11. Résultats de la séparation de la fraction F6-F6bis-F7-P₁

Nom de la fraction	Poids (mg)	Observations
P ₁ -P ₁	3.48	Repurification
P ₁ -P ₂	2.57	Mélange
P ₁ -P ₃	2.21	PUR
P ₁ -P ₄	2.25	Mélange
P ₁ -P ₅	3.33	
P ₁ -P ₆	3.95	Repurification
P ₁ -P ₇	2.89	Mélange
P ₁ -P ₈	3.77	
P ₁ -P ₉	1.50	PUR
P ₁ -P ₁₀	1.52	Mélange
P ₁ -P ₁₁	0.91	

➤ **Repurification de F6-F6bis-F7-P₁-P₁**

La fraction F6-F6bis-F7-P₁-P₁ montre en chromatogramme (voir figure 10) trois pics, elle a été chromatografiée par CLHP dans les conditions suivantes :

- ✓ Colonne semi-préparative C18.
- ✓ Système d'élution isocratique : 90% H₂O/10% MeOH.
- ✓ La concentration de la fraction : 2 mg/ml.
- ✓ Le volume injecté : 50µl.
- ✓ Débit : 3 ml/min
- ✓ Longueur d'onde de séparation $\lambda = 213$ nm.

Deux produits purs F6-F6bis-F7-P₁-P₁₋₁ et F6-F6bis-F7-P₁-P₁₋₂ ont été isolés (voir tableau 12).

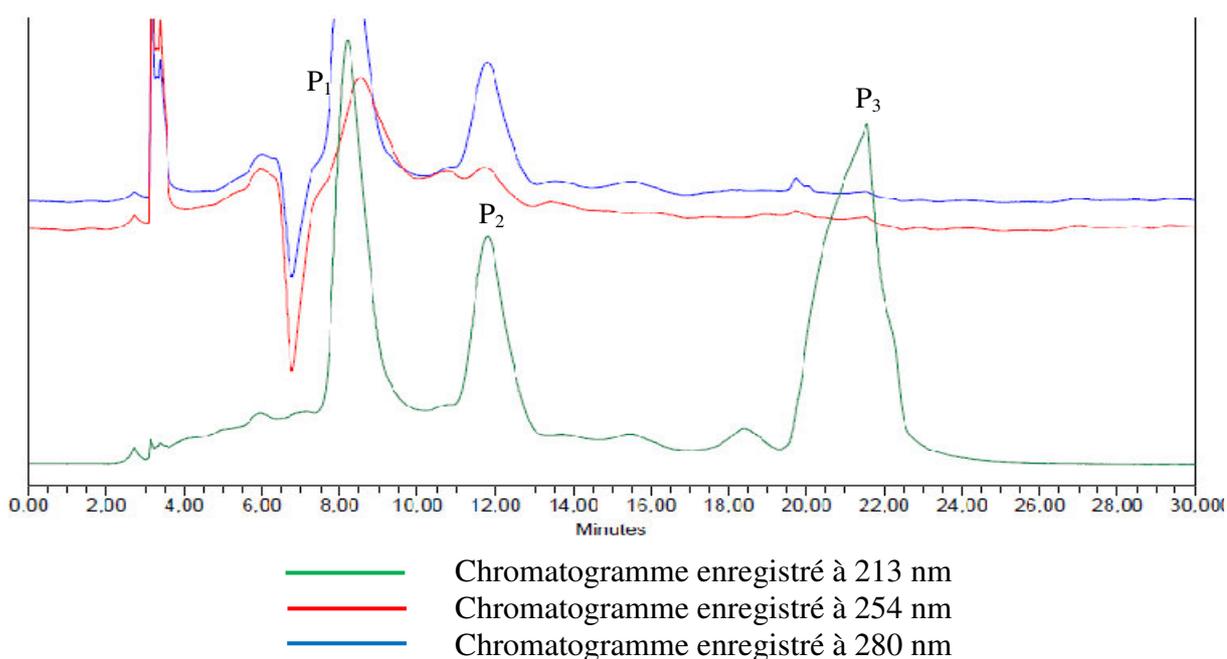


Figure 10. Chromatogramme de la fraction F6-F6bis-F7-P₁-P₁

Tableau 12. Résultats de la séparation de la fraction F6-F6bis-F7-P₁-P₁

Nom de la fraction	P ₁ -P _{1.1}	P ₁ -P _{1.2}	P ₁ -P _{1.3}
Poids (mg)	1.1	0.8	1.3
Observations	PUR	PUR	Non pur

➤ **Repurification de F6-F6bis-F7-P₁-P₆**

La fraction F6-F6bis-F7-P₁-P₆ est soumise à une chromatographie par CLHP dans les conditions suivantes :

- ✓ Colonne semi-préparative C18.
- ✓ Système d'élution isocratique : 83% H₂O/17% MeOH.
- ✓ La concentration de la fraction : 3 mg/ml.
- ✓ Le volume injecté : 100µl.
- ✓ Débit : 3 ml/min
- ✓ Longueur d'onde de séparation $\lambda = 213$ nm.

Ainsi trois pics ont été récoltés (voir figure 11) dont un produit pur (voir tableau 13).

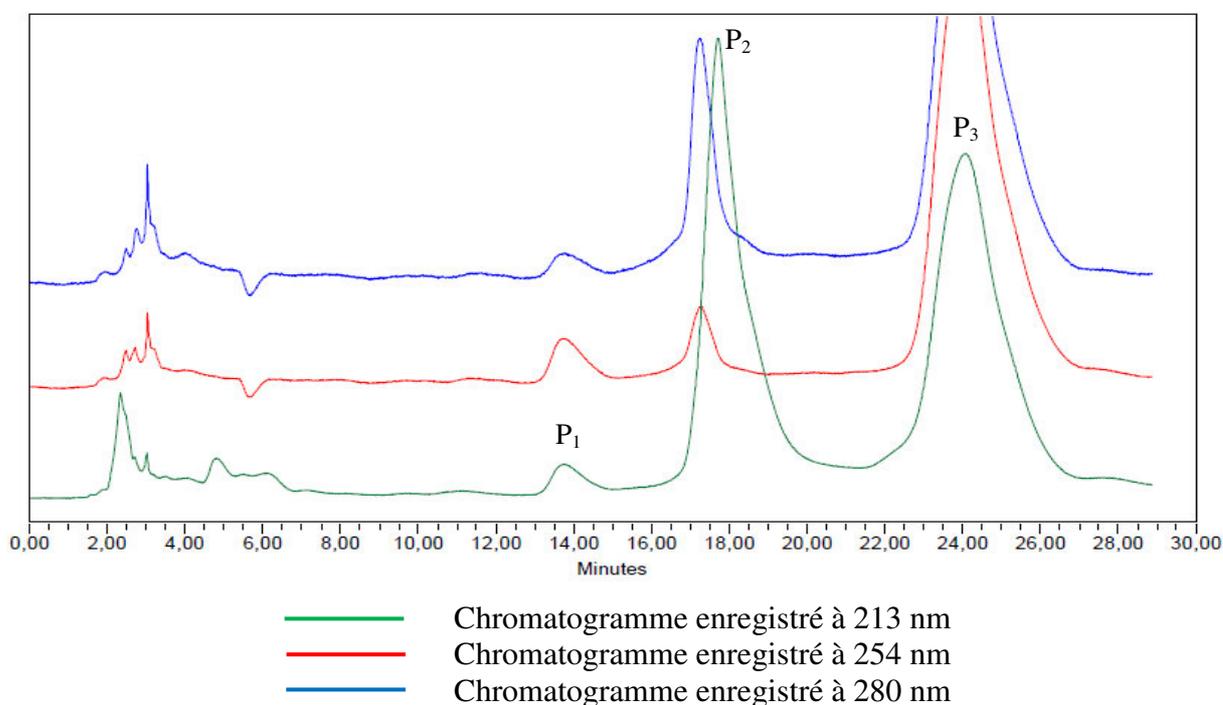


Figure 11. Chromatogramme de la fraction F6-F6bis-F7-P₁-P₆

Tableau 13. Résultats de la repurification de la fraction F6-F6bis-F7-P₁-P₆

Nom de la fraction	P ₁ -P _{6.1}	P ₁ -P _{6.2}	P ₁ -P _{6.3}
Poids (mg)	1.0	1.1	1.3
Observations	Non pur	PUR	Non pur

Conclusion

Le fractionnement et l'isolement des métabolites secondaires de l'extrait n-butanol de l'espèce *Zilla macroptera* (voir figure 12), nous a permis d'isoler 15 produits purs.

La faible quantité de quelques produits nous a empêché de faire l'identification structurales.

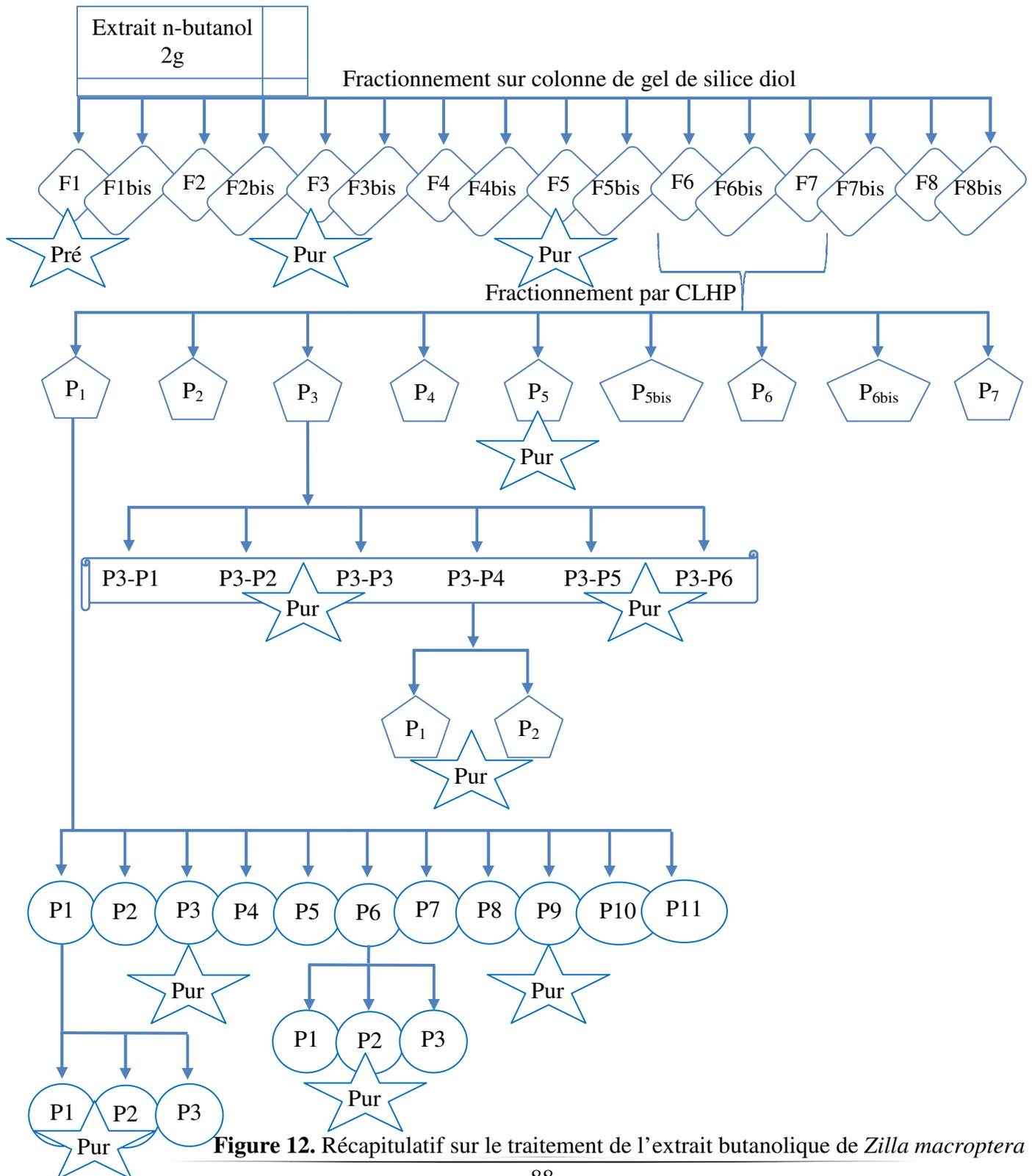


Figure 12. Récapitulatif sur le traitement de l'extrait butanolique de *Zilla macroptera*

III. Les huiles essentielles

III.1. Hydrodistillation des l'huiles essentielles

On a utilisé l'hydrodistillation dans un Clevenger, durant 3 heures pour extraire l'huile essentielle de la partie aérienne fraîche de la plante.

III.2. Analyse GC et GC/MS

III.2.1. Analyse GC

L'analyse GC a été réalisée sur un chromatographe en phase gazeuse Varian CP3800 équipé d'une colonne VF5-MS réticulé (30 m × 0,25 mm, épaisseur de film de 0,25 µm). La température du four a été programmée comme isotherme à 60°C pendant 5 min, puis à 275°C par une vitesse de 5°C / min et maintenue à cette température pendant 5 min. L'hélium est utilisé comme gaz vecteur à un débit de 1 ml / min.

III.2.2. Analyse GC/MS

L'analyse GC / MS a été réalisée à l'aide d'un GC couplé à un détecteur sélectif de masse Saturn 2200. Les conditions opératoires sont les mêmes que pour la GC analytique. Les paramètres d'exploitation MS étaient les suivants:

- 0,1 µL de l'huile essentielle a été mélangé avec de l'éther diéthylique (40%).
- Le potentiel d'ionisation : 70 ev.
- Courant d'ionisation : 2 A.
- Température de trappe d'ion : 200 ° C.
- Résolution : 1000.
- Temps de scan : 5 s.
- Bande de scan de 40 à 400 u.
- rapport de split : 01:50.
- vitesse linéaire : 30,0 cm / s.

Les pourcentages relatifs aux composés identifiés ont été calculés à partir de la GC par intégrateur informatisé.

III.2.3. Identification des composants

Les composants d'huiles essentielles ont été identifiés en fonction de leurs indices de rétention (RI) (déterminé par référence à une série homologue d'alcane normaux), et par comparaison de leurs modèles de fragmentation de spectrométrie de masse avec ceux rapportés dans la littérature (Adams, 2007 ; McLafferty et Stauffer, 1991 ; Swigar et Silverstein, 1981).

Chapitre II

Activités biologiques

I. Activité antioxydante

L'activité antioxydante des extraits a été testé par quatre méthodes : radical libre DPPH, ABTS⁺, Métal chélation et CUPRAC.

I.1. Activité antiradicalaire DPPH

Le principe de cette méthode est de mesurer la capacité d'inhibition du radical stable 1,1-Diphényl-2-Picrylhydrazyl ou DPPH (Figure 1) selon la méthode de Blois (1958).

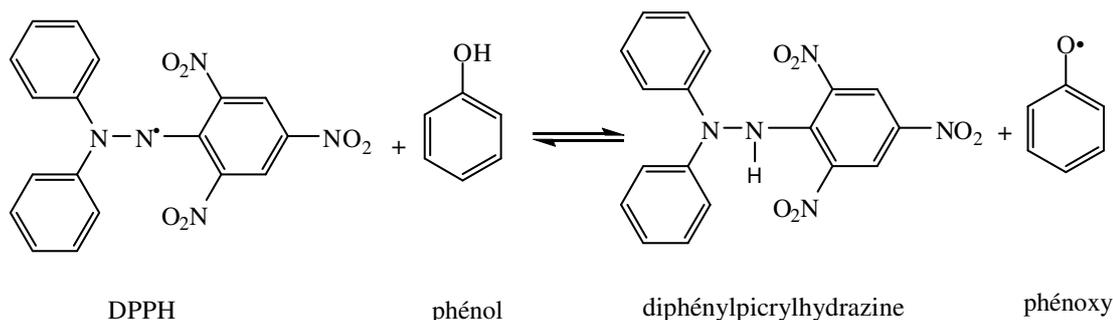


Figure 1 : Inhibition du DPPH par un phénol

Le dosage spectrophotométrique a été effectué dans des microplaques de 96 puits. On utilise le radical stable 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) comme réactif, 40 µl de différentes concentrations des extraits ont été ajoutés à 160 µl de solution de 0.4 mM de DPPH dans MeOH. Après une période d'incubation de 30 min à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance a été lue contre un blanc (MeOH) à 517 nm.

Les résultats ont été enregistrés en termes de pourcentage d'inhibition (I %) selon la réaction suivante :

$$I\% = (A_{\text{Blanc}} - A_{\text{Extrait}} / A_{\text{Blanc}}) \times 100$$

Où :

A_{Blanc} est l'absorbance de la réaction témoin contenant tous les réactifs à l'exception de l'extrait.

A_{Extrait} est l'absorbance de la réaction contenant de l'extrait.

Les résultats sont la moyenne des analyses en *triplicata*, ils ont été enregistrés en moyenne \pm écart type. La concentration d'extrait fournissant 50% d'activité de piégeage des radicaux (IC_{50}) a été calculée à partir du graphique de DPPH.

Le BHA et le α -tocophérol ont été utilisés comme des normes antioxydantes pour la comparaison de l'activité antioxydante de nos extraits.

I.2. Essai de décoloration de radical cation ABTS^{•+}

L'analyse spectrophotométrique ABTS^{•+} a été déterminée selon la méthode de Re *et al.*(1999). Le radical ABTS^{•+} a été produit par la réaction entre 7 mM d'ABTS dans H₂O et 2.45 mM de persulfate de potassium, le mélange a été stocké dans l'obscurité à température ambiante pendant 12h.

L'oxydation d'ABTS a commencé immédiatement mais l'absorbance n'était pas stable avant 6h de temps.

Avant l'utilisation du radical ABTS^{•+}, la solution a été diluée par l'éthanol jusqu'à l'obtention d'une absorbance de 0.708 ± 0.025 à 734 nm. Ensuite, 160 μ l de la solution d'ABTS^{•+} on été ajoutés à 40 μ l de la solution de l'extrait dans l'éthanol à différentes concentrations.

Après 10 min, l'absorbance a été mesurée à 734 nm, en utilisant un lecteur de microplaques de 96 puits. Les pourcentages d'inhibition ont été calculés pour chaque concentration par rapport à l'absorbance du blanc (EtOH). La capacité de piégeage de l'ABTS^{•+} a été calculée selon la réaction suivante :

$$\text{La capacité de piégeage de l'ABTS}^{\bullet+} = (A_{\text{Contrôle}} - A_{\text{Extrait}} / A_{\text{Contrôle}}) \times 100$$

- $A_{\text{Contrôle}}$ est l'absorbance de la concentration initiale d'ABTS^{•+}
- A_{Extrait} est l'absorbance de la concentration résiduelle de l'ABTS^{•+} en présence de l'extrait

Le BHA et le α -tocophérol ont été utilisés comme des normes antioxydantes pour la comparaison de l'activité de nos extraits.

I.3. La réduction cuprique (CUPRAC)

L'activité antioxydante par réduction cuprique des extraits a été déterminée par la méthode CUPRAC (Apak *et al.*, 2004). Pour chaque unité d'une plaque de 96 unités des solutions ont été ajoutées: 50 μ l de Cu(II) (10 mM), 50 μ l de neocuproïne (7.5 mM), 60 μ l de tampon NH₄Ac (1 M, pH = 7), et 40 μ l de l'extrait à différentes concentrations.

Après une heure du temps et à l'aide d'un lecteur de microplaques, l'absorbance a été enregistrée contre un blanc à 450 nm.

I.4. Chélation des ions ferreux

L'activité de chélation des ions Fe^{2+} a été mesurée en utilisant le Ferrin (Decker et Welch, 1990).

La solution des extraits à différentes concentrations (40 μl) a été ajoutée à: 40 μl EtOH, 40 μl FeCl_2 (0.2 mM) et 80 μl ferène (0.5 mM). L'absorbance a été mesurée après 10 min à 562 nm. L'activité de métal chélation a été calculée selon l'équation suivante:

$$\text{Activité de métal chélation (\%)} = (A_{\text{Contrôle}} - A_{\text{Extrait}} / A_{\text{Contrôle}}) \times 100$$

- $A_{\text{Contrôle}}$ est l'absorbance de l'échantillon dépourvu de l'extrait
- A_{Extrait} est l'absorbance de l'échantillon en présence de l'extrait

L'EDTA a été utilisé comme un standard antioxydant pour la comparaison de l'activité de nos extraits.

II. Activité anticholinestérase

Les activités inhibitrices de l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE) ont été mesurées en modifiant légèrement la méthode spectrophotométrique d'Ellman et al. (1961).

Les enzymes AChE de l'anguille électrique et BChE de sérum de cheval ont été utilisés, tandis que l'iodure d'acétylthiocholine et le chlorure butyrylthiocholine ont été utilisés comme substrats de la réaction (AChE et BChE respectivement) avec l'acide 5,5'-dithio-bis 2-nitrobenzoïque (DTNB), pour la mesure de l'activité anticholinestérase.

Brièvement, pour mesurer l'activité inhibitrice AChE, un mélange de: 130 μl du tampon de phosphate de sodium (100 mM, pH = 8), 10 μl de l'extrait à différentes concentrations, et 20 μl de l'enzyme AChE (5.32×10^{-3} U), ont été incubés pendant 15 min à 25°C, puis 20 μl de DTNB (0.5 mM) ont été ajoutés. La réaction est ensuite initiée par l'addition de 20 μl d'iodure d'acétylthiocholine (0.71 mM).

L'analyse de l'activité inhibitrice BChE a été déterminée suivant les mêmes étapes de celles de l'AChE, en utilisant l'enzyme BChE (6.85×10^{-3} U) et le substrat chlorure butyrylthiocholine (0.2 mM).

L'hydrolyse de ces substrats a été surveillée par spectrophotométrie de la coloration jaune de 5-thio-2-nitrobenzoate formé par la réaction de DTNB avec la thiocholine, libérée

par l'hydrolyse enzymatique de l'iodure d'acétylthiocholine ou de chlorure de butyrylthiocholine.

L'absorbance a été mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaque à une longueur d'onde de 412 nm.

Le pourcentage d'inhibition des enzymes AChE ou BChE a été déterminé par comparaison de la réaction de l'échantillon comportant l'extrait par rapport à l'échantillon à blanc (EtOH dans du tampon phosphate pH = 8) à l'aide de la formule suivante:

$$I (\%) = (E - S)/E \times 100$$

E : l'activité de l'enzyme sans extrait

S : l'activité de l'enzyme à la présence de l'extrait

Les expériences ont été réalisées en *triplicata*, et la galantamine a été utilisée comme composé de référence.

III. Activité antibactérienne

III.1. Microorganismes testés

a) L'étude de l'activité antibactérienne (Bauer *et al.*, 1966; NCCLS, 1993) des extraits a été effectuée selon la méthode de diffusion sur milieu gélosé « antibiogramme », vis-à-vis cinq pathovars d'*Escherichia coli*:

E. coli Entérotoxigénique (ECET) ATCC 1493.

E. coli Entérotoxigénique (ECEP) ATCC 2348.

E. coli Entérotoxigénique (ECEH) ATCC HB 101.

E. coli Entérotoxigénique (ECEI) ATCC LT 10407.

E. coli Entérotoxigénique (ECEA).

Et trois souches bactériennes à gram positif et à gram négatif.

Staphylococcus aureus ATCC 25923 (cocci Gram positif).

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 (bacille Gram négatif).

Enterococcus faecalis ATCC 29212 (cocci Gram positif).

Les résultats sont comparés à ceux des antibiotiques contrôles : Cefotaxime 30µg (CAZ), Cefamandole 30µg (MA), Amoxicilline + Acide clavulonique 20/10µg (AMC) et Gentamycine 500µg (10UI) (GM).

b) Les huiles essentielles ont été utilisées individuellement contre une variété de bactéries, notamment *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* et *Streptococcus a-hémolytique*. Les souches de référence ont été obtenues à partir de l'Institut Pasteur (Alger). Les autres souches de l'hôpital (SH) proviennent du laboratoire de bactériologie, Hôpital Benbadis, Constantine, en utilisant des méthodes classiques.

III.2. Les tests de sensibilité

La sensibilité des souches bactériennes a été étudiée en utilisant la méthode de diffusion sur disque et en comparant leurs zones d'inhibition de l'antibiogramme à ceux rapportés par le NCCLS.

Des disques contenant l'huile essentielle fraîchement préparés ont été utilisés pour des essais d'activité antibactérienne. Les diamètres des zones d'inhibition (ZDI) ont été mesurés et comparés avec celles suggérés par le NCCLS (P sensible ≥ 15 mm).

La sensibilité des souches à l'huile essentielle a été évaluée par la méthode de dilution en gélose; différentes concentrations de l'huile essentielle ont été inclus dans des boîtes de gélose Mueller-Hinton (MIC sensible ≤ 32 $\mu\text{g} / \text{ml}$). Les plaques d'agar ont été préparées et inoculés avec une suspension bactérienne. Après incubation à 37°C pendant 18-24 h, des zones d'inhibition ont été mesurées (les essais ont été effectués en triple). CMI des huiles essentielles ont également été déterminées par une méthode de dilution en gélose.

Partie III

Résultats

et

Discussion

Chapitre I

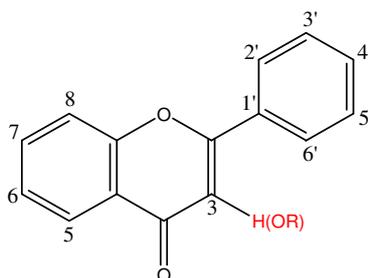
Etude phytochimique de Biscutella raphanifolia Poiret.

I. Elucidation structurale des composés isolés

Les structures des produits isolés ont été établies par la combinaison des données de RMN ^1H , RMN ^{13}C mono- et bidimensionnelle, des expériences de la spectrophotométrie d'absorption ultraviolette et de l'hydrolyse acide ont été nécessaires.

I.1. Le produit A4

- La fluorescence violette sous lumière de Wood suggère un squelette probable d'une flavone ou d'un flavonol substitué en position 3.



- Les valeurs du R_f sont calculées sur une plaque de gel de polyamide. La valeur du $R_f = 0.22$ dans le système organique (Toluène/ MEC/ MeOH : 4/ 3/ 3) et $R_f = 0.26$ dans le système aqueux (H₂O/ MeOH/ MEC/ Acétylacétone : 13/ 3/ 3/ 1), indiquent que le produit A4 est un glycoside.

L'élucidation structurale d'un composé flavonique peut nécessiter des analyses par spectrophotométrie UV à l'aide de réactifs (Tableau 1) (Markham, 1982 ; Mabry *et al.*, 1970).

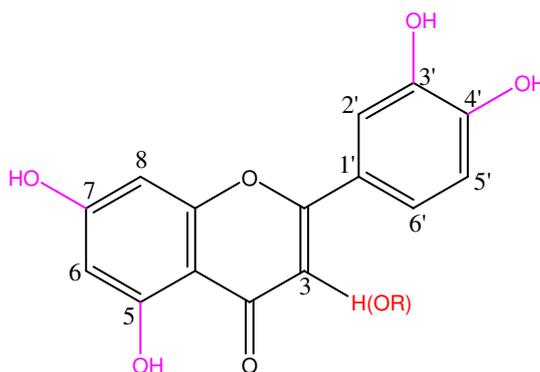
- Le maximum d'absorption (λ_{max}) de la bande I à 353 nm, dans le spectre enregistré dans MeOH, oriente vers un squelette probable d'une flavone ou d'un flavonol substitué en position 3.
- L'addition de NaOH, provoquant un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = +51$ nm), avec augmentation de l'intensité lumineuse par rapport au spectre enregistré dans MeOH, révèle la présence d'un OH libre en position 4'. Sur le même spectre, on observe une apparition d'une nouvelle bande à 331 nm, indiquant la présence d'un OH libre en position 7, ce qui est confirmé par le déplacement bathochrome de la bande II (+14 nm) après l'addition de NaOAc par rapport au spectre enregistré dans le MeOH.
- Le déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = +23$ nm) dans le spectre enregistré dans le milieu $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$, comparativement à celui enregistré dans MeOH, indique la présence d'un OH libre en position 5.

- L'addition de H_3BO_3 , à la solution de MeOH+NaOAc provoque un déplacement bathochrome de la bande I (+18 nm), indiquant la présence d'un système 3'-4' ortho di-OH sur le cycle B, cela est confirmé par le déplacement hypsochrome de la bande I ($\Delta\lambda = -38$ nm), en comparant les spectres enregistrés dans $AlCl_3$ et $AlCl_3+HCl$.

Tableau 1. Données spectrales UV du composé A4

Réactifs	λ_{max} (nm)			Interprétation
	Bande I	Autres bandes	Bande II	
MeOH	353	-	257	Flavone ou flavonol substitué en position 3
+ NaOH	404	331	272	OH libre en position 4' OH libre en position 7
$AlCl_3$	414	300	273	OH libre en position 5
$AlCl_3 + HCl$	376	359	269	Existence d'un système ortho 3',4'- di-OH sur le cycle B
NaOAc	363	-	271	OH libre en position 7
NaOAc+ H_3BO_3	371	-	262	Existence d'un système ortho 3',4'- di-OH sur le cycle B

Les observations ci-dessus permettent de proposer une première hypothèse structurale : flavone ou flavonol substitué en position 3, comportant des groupements OH dans les positions 5, 7, 3' et 4'.



Le spectre RMN 1H , enregistré dans $DMSO-d_6$ à 400 MHz (figures 1 et 2) montre la présence de :

- Un doublet d'intégration 1H à $\delta = 7.74$ ppm avec une constante de couplage $J = 2.0$ Hz, caractéristique d'un couplage méta attribuable à un proton en position 2'.
- Un doublet dédoublé d'intégration 1H à $\delta = 7.49$ ppm ($J = 8.4 ; 2.0$ Hz) attribuable à un proton en position 6'.
- Un doublet d'intégration 1H à $\delta = 6.77$ ppm et $J = 8.4$ Hz attribuable à un proton en position 5'.
- Un doublet d'intégration 1H à $\delta = 6.29$ ppm avec une constante de couplage $J = 2.0$ Hz caractéristique d'un couplage méta attribuable à un proton en position 8.
- Un doublet d'intégration 1H à $\delta = 6.10$ ppm avec une constante de couplage $J = 2.0$ Hz caractéristique d'un couplage méta attribuable à un proton en position 6.
- Un doublet d'intégration 1H à $\delta = 5.06$ ppm avec une constante de couplage $J = 7.6$ Hz caractéristique d'un proton anomérique du sucre H-1''.
- Dans l'intervalle de $\delta = 3.00 - 4.00$ ppm, on trouve les signaux des protons d'un sucre.

L'ensemble de ces données (tableau 2) nous a permis d'attribuer 5 protons dans les positions 2', 5', 6', 6, 8 et un proton anomérique H1''.

Tableau 2. Données RMN ^1H du produit A4 (DMSO-d₆, 400 MHz)

δ (ppm)	Intégration	Multiplicité	J (Hz)	Attribution
6.10	1H	d	2.0	H-6
6.29	1H	d	2.0	H-8
7.74	1H	d	2.0	H-2'
6.77	1H	d	8.4	H-5'
7.49	1H	dd	8.4 ; 2.0	H-6'
5.06	1H	d	7.6	H-1''
3-4	6H	m	-	Protons du sucre

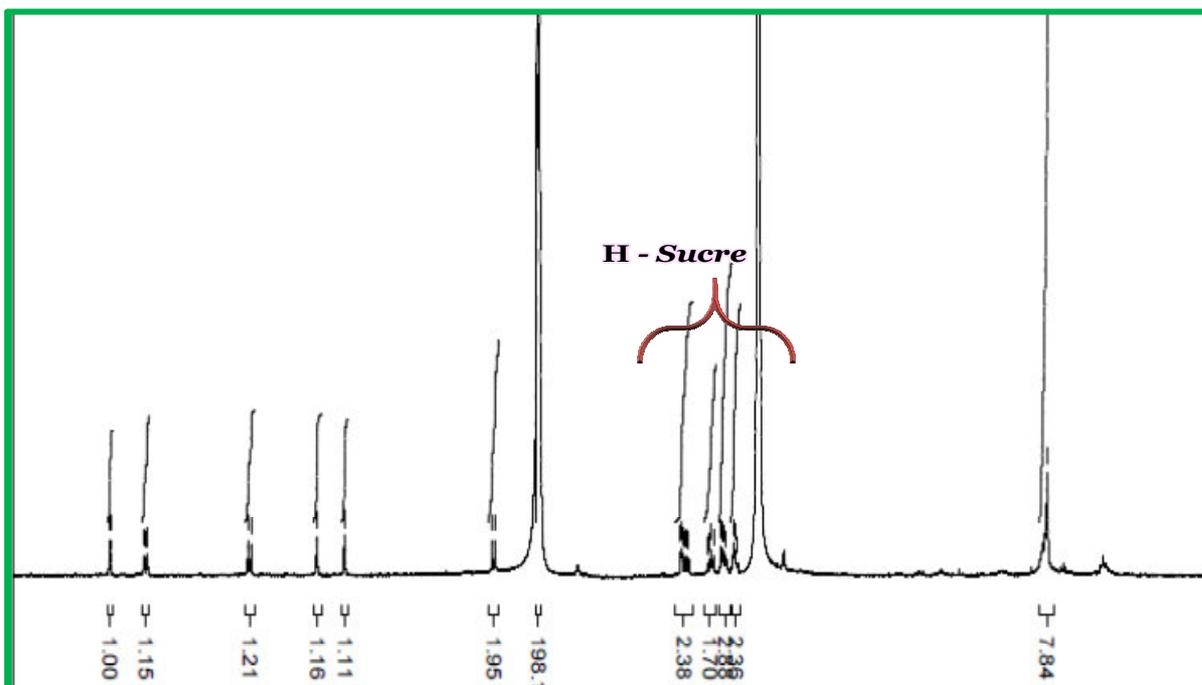


Figure 1. Spectre RMN ^1H du produit A4 (DMSO-d6, 400 MHz)

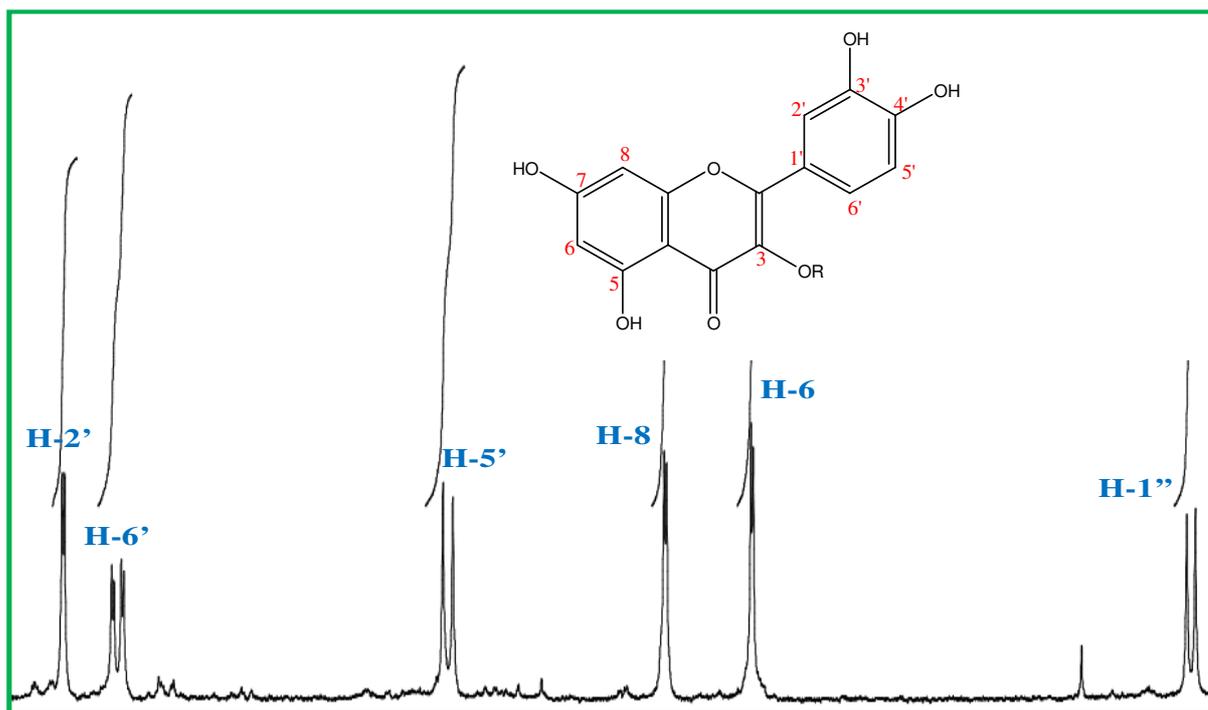


Figure 2. Spectre RMN ^1H étalé du produit A4 (DMSO-d6, 400 MHz)

L'hydrolyse acide de ce composé a libéré le glucose comme sucre identifié par cochromatographie en présence d'oses standards (figure 3). L'aglycone obtenue donne une fluorescence jaune sous lumière UV indiquant l'obtention d'un flavonol, ce qui confirme une jonction sucre aglycone en position 3.

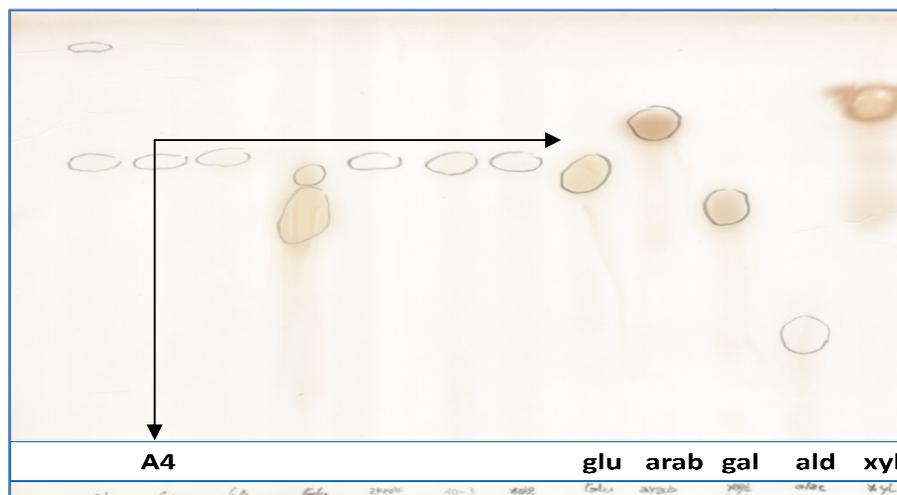
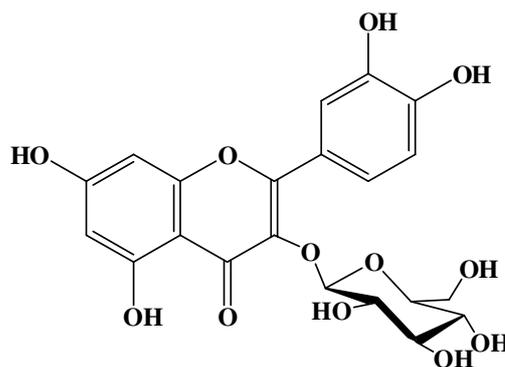


Figure 3. Plaque CCM de l'hydrolyse acide du composé A4

Les différentes données spectroscopiques permettent d'identifier la structure du composé A4 (Touafek *et al.*, 2011) :



Quercétine 3-O-β-D-glucoside

I.2. Le produit A23

Le produit A23 se présente sous forme d'un solide jaune soluble dans MeOH, il a une fluorescence violette sous lumière de Wood caractéristique d'un squelette probable d'une flavone ou d'un flavonol substitué en 3.

Le comportement chromatographique est indiqué par les valeurs du R_f calculées sur plaque de gel de polyamide dans les deux systèmes :

1. $R_f = 0.2$ (Toluène/ MEC/ MeOH: 4/ 3/ 3).
2. $R_f = 0.31$ (H₂O/ MeOH/ MEC/ AcAc: 13/ 3/ 3/ 1).

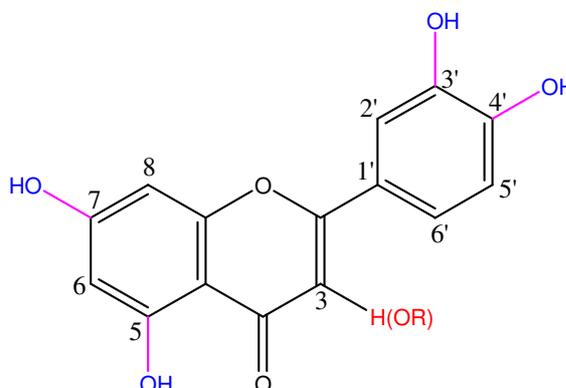
Les spectres UV enregistrés dans différents milieux (Tableau 3) ont conduit aux observations suivantes :

- Un squelette probable d'une flavone ou d'un flavonol, suggéré par l'observation de deux bandes d'absorption dans le spectre enregistré dans MeOH, l'une à $\lambda_{\text{max}} = 358$ nm et l'autre à $\lambda_{\text{max}} = 257$ nm.
- L'addition de NaOH induit un effet bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = +48$ nm) avec augmentation d'intensité par rapport au spectre enregistré dans MeOH, indiquant la présence d'un OH libre en position 4' sur le cycle B. Sur le même spectre, l'apparition d'une nouvelle bande à 331 nm est révélatrice de la présence d'un OH libre en 7; ce qui est confirmé par le déplacement bathochrome de la bande II, après addition de NaOAc ($\Delta\lambda = +13$ nm), par rapport au spectre enregistré dans MeOH.
- L'effet hypsochrome de la bande I ($\Delta\lambda = -35$ nm), observé en comparant les spectres AlCl_3 et $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ suggère la présence d'un système ortho 3',4'-dihydroxyle sur le cycle B, Cette hypothèse est confirmée par l'effet bathochrome ($\Delta\lambda = +22$ nm) de la même bande dans le spectre obtenu après addition de NaOAc + H_3BO_3 par rapport au spectre enregistré dans MeOH.
- L'effet bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = 66$ nm), observé après addition de $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ à la solution neutre indique la présence d'un OH libre en 5.

Tableau 3. Données spectrales UV du composé A23

Réactifs	λ_{max} (nm)			
	Bande I	Autres bandes	Bande II	Interprétation
MeOH	358	-	257	Flavone ou flavonol substitué en position 3
+ NaOH	406	331	272	OH libre en position 4' OH libre en position 7
AlCl_3	433	-	274	OH libre en position 5
$\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$	398	-	275	Existence d'un système ortho di-OH sur le cycle B
NaOAc	368	-	270	OH libre en position 7
NaOAc + H_3BO_3	380	-	264	Existence d'un système ortho di-OH sur le cycle B

Ces données permettent de proposer une structure partielle d'une: flavone ou d'un flavonol substitué(e) en position 3, comportant des groupements OH dans les positions 5, 7, 3' et 4'.



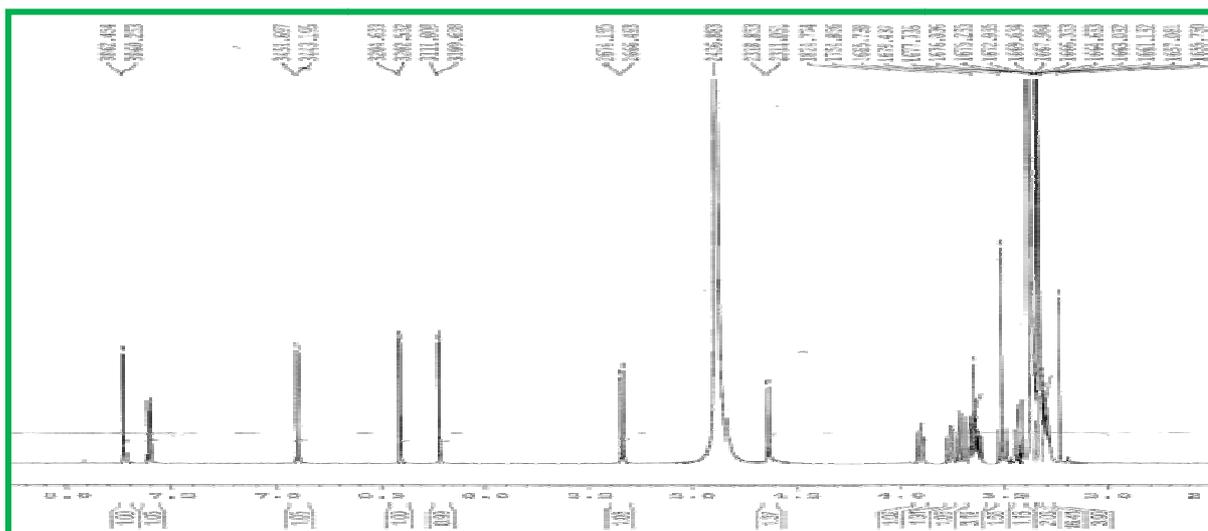
L'analyse du spectre RMN ^1H enregistré dans CD_3OD à 400 MHz (figures 4 et 5) montre:

- Un doublet d'intégration 1H à 7.72 ppm avec une constante de couplage 2.2 Hz caractéristique d'un couplage métra attribuable à un proton en position 2'.
- Un doublet dédoublé d'intégration 1H à 7.60 ppm ($J = 8.5 ; 2.2$ Hz), caractéristique d'un proton en couplage ortho et métra, en position 6'.
- Un doublet d'intégration 1H à 6.89 ppm et $J = 8.5$ Hz, caractéristique d'un couplage ortho, correspondant à un proton en position 5'.
- Deux doublets d'intégration 1H chacun, le premier à 6.41 ppm avec une constante de couplage 2.1 Hz, caractéristique d'un couplage métra attribuable à un proton en position 8, et le second à 6.22 ppm avec une constante de couplage 2.1 Hz, caractéristique d'un couplage métra, attribuable à un proton en position 6.
- Deux doublets d'intégration 1H chacun, le premier à 5.32 ppm et le second à 4.62 ppm avec $J = 7.7 ; 7.8$ Hz respectivement, caractéristiques de deux protons anomériques H-1'', H-1'''.
- Dans l'intervalle de $\delta = 3.20 - 4.00$ ppm, on trouve les signaux des protons de deux sucres.

L'ensemble des données du spectre RMN ^1H de produit A23 (le tableau 4) nous a permis d'attribuer 7 protons dont deux protons anomériques H1'', H1''' correspondant aux deux sucres.

Tableau 4. Données RMN ^1H du produit A23 (CD_3OD , 400 MHz)

δ (ppm)	Intégration	Multiplicité	J (Hz)	Attribution
6.22	1H	d	2.1	H-6
6.41	1H	d	2.1	H-8
7.72	1H	d	2.2	H-2'
6.89	1H	d	8.5	H-5'
7.60	1H	dd	8.5;2.2	H-6'
5.32	1H	d	7.7	H-1''
3.71	1H	dd	7.8; 9.0	H-2''
3.65	1H	t	9.1	H-3''
3.51	1H	t	9.1	H-4''
3.38	1H	/	/	H-5''
3.76	1H	dd	2.2; 11.7	Ha-6''
3.63	1H	dd	6.2; 11.9	Hb-6''
4.62	1H	d	7.8	H-1'''
3.30	1H	dd	5.1; 9.5	H-2'''
3.43	1H	t	9.1	H-3'''
3.35	1H	/	/	H-4'''
3.31	1H	dd	5.4; 9.4	H-5'''
3.91	1H	dd	6.3; 12.1	Ha-6'''
3.66	1H	dd	6.3; 12.1	Hb-6'''

**Figure 4.** Spectre RMN ^1H du produit A23 (CD_3OD , 400 MHz)

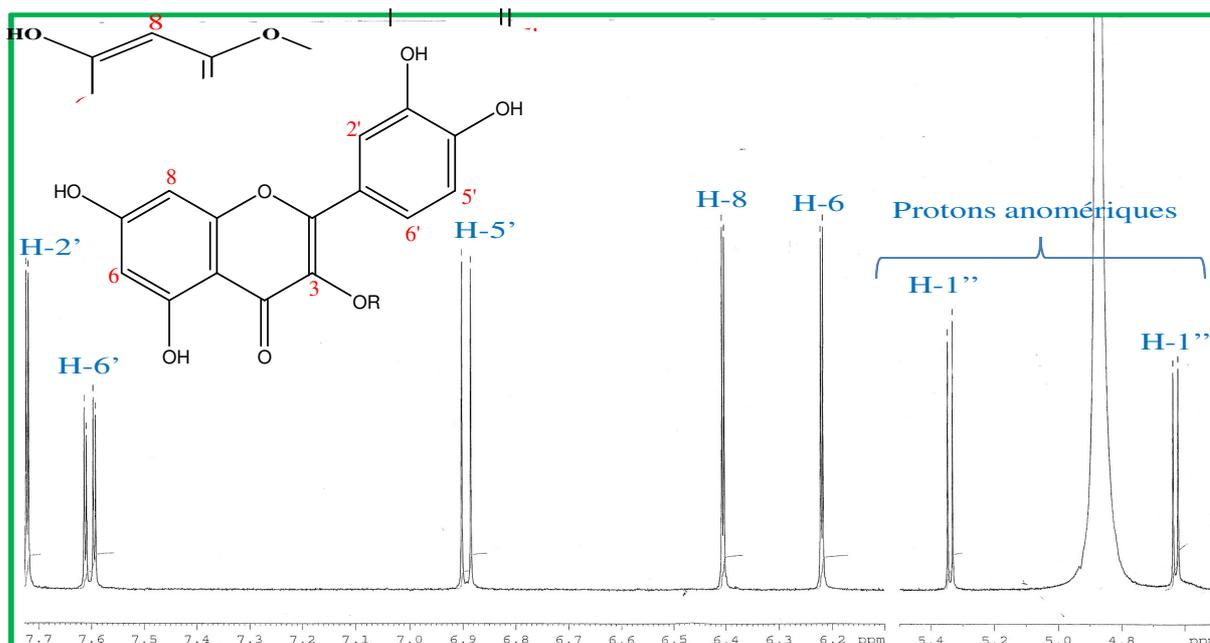


Figure 5. Spectre RMN ^1H étalé du produit A23 (CD_3OD , 400 MHz)

L'hydrolyse acide du composé A23 a libéré le glucose comme sucre identifié par cochromatographie en présence d'oses standards (figure 6), la partie aglycone obtenue donne une fluorescence jaune sous lumière UV caractéristique d'un flavonol avec OH en 3, ce qui confirme une jonction sucre aglycone en position 3.

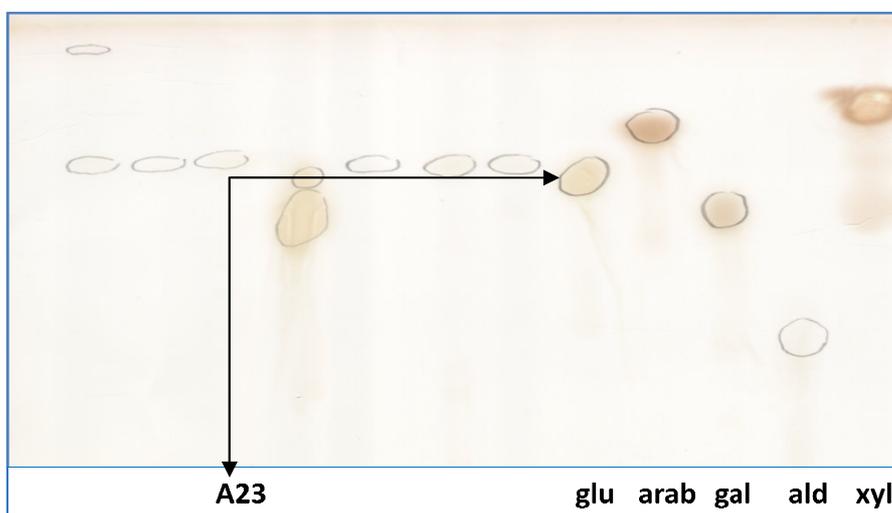
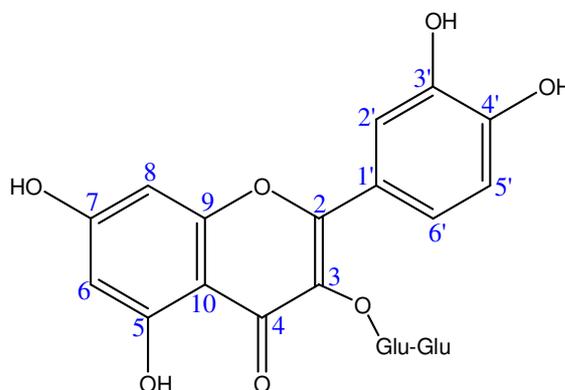


Figure 6. Plaque CCM de l'hydrolyse acide du composé A23

Le spectre RMN ^{13}C (figure 7) et de séquence DEPT 135 (figure 8) montrent la présence de deux carbones secondaires ($-\text{CH}_2-$), le premier à 61.25 ppm et le second à 61.05 ppm, ce qui confirme la présence de deux sucres de glucose. Les signaux apparaissent dans l'intervalle de 90 et 178 ppm, sont caractéristiques des carbones du squelette flavonique, et les

autres signaux apparaissant dans le champ plus blindé correspondant aux atomes de carbone de deux sucres de glucose.



Les résultats du spectre RMN ^{13}C , déplacements chimiques et attributions des signaux sont résumés dans le tableau 5.

Tableau 5. Données RMN ^{13}C (400 MHz, CD_3OD) du produit A23

δ (ppm)	Attribution	δ (ppm)	Attribution
177.9	C-4	103.8	C-1'''
165.2	C-7	102.3	C-1''
161.6	C-5	98.7	C-6
157.4	C-4'	93.4	C-8
157.1	C-9	86.3	C-3''
148.5	C-2	76.7	C-5'''/5''''
144.5	C-3'	76.4	C-3'''
134.1	C-3	74.1	C-2'''
121.8	C-6'	73.7	C-2''
121.6	C-1'	70.2	C-4'''
116.1	C2'	68.3	C-4''
114.6	C5'	61.2	C-6'''
104.1	C-10	61.0	C-6''

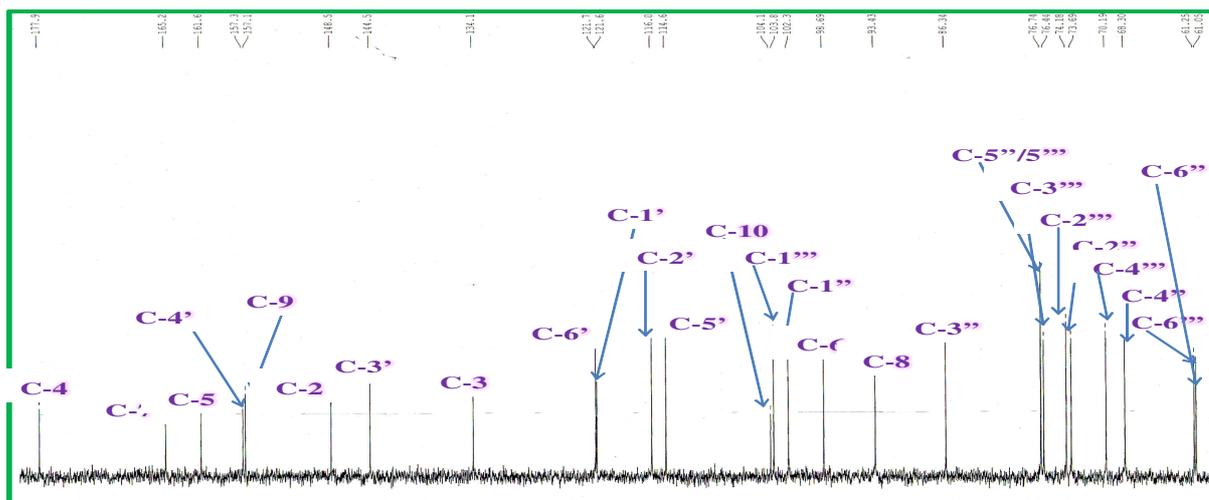


Figure 7. Spectre RMN ^{13}C étalé du produit A23 (400 MHz, CD_3OD)

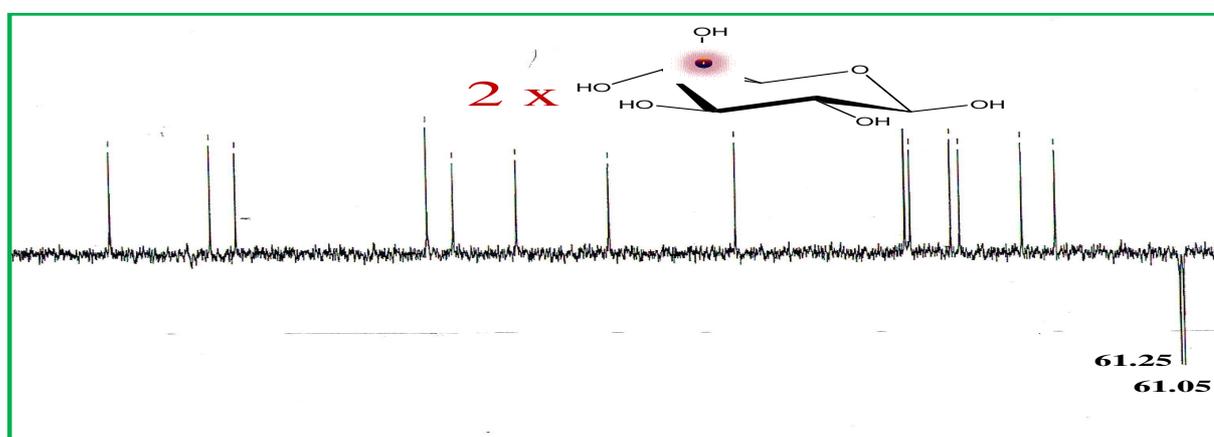


Figure 8. Spectre Dept 135 (400 MHz, CD_3OD) du produit A23

Les couplages entre les différents protons du composé A23, observés dans le spectre COSY homonucléaire ^1H - ^1H (figures 9-11) nous ont permis d'attribuer les différents protons des sucres. Ces données facilitent l'attribution des signaux carbonés et protons réalisée à l'aide des spectres HMBC et HSQC.

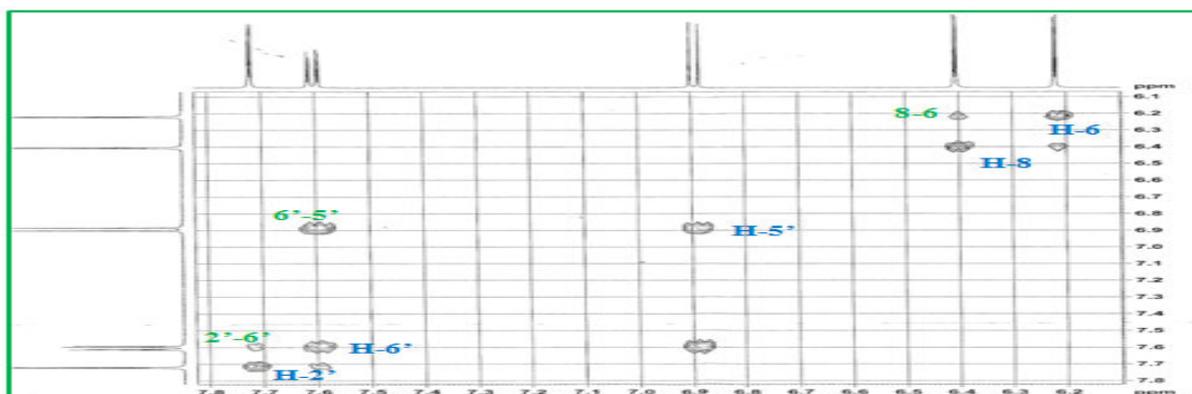


Figure 9. Spectre COSY (400 MHz, CD_3OD) du produit A23

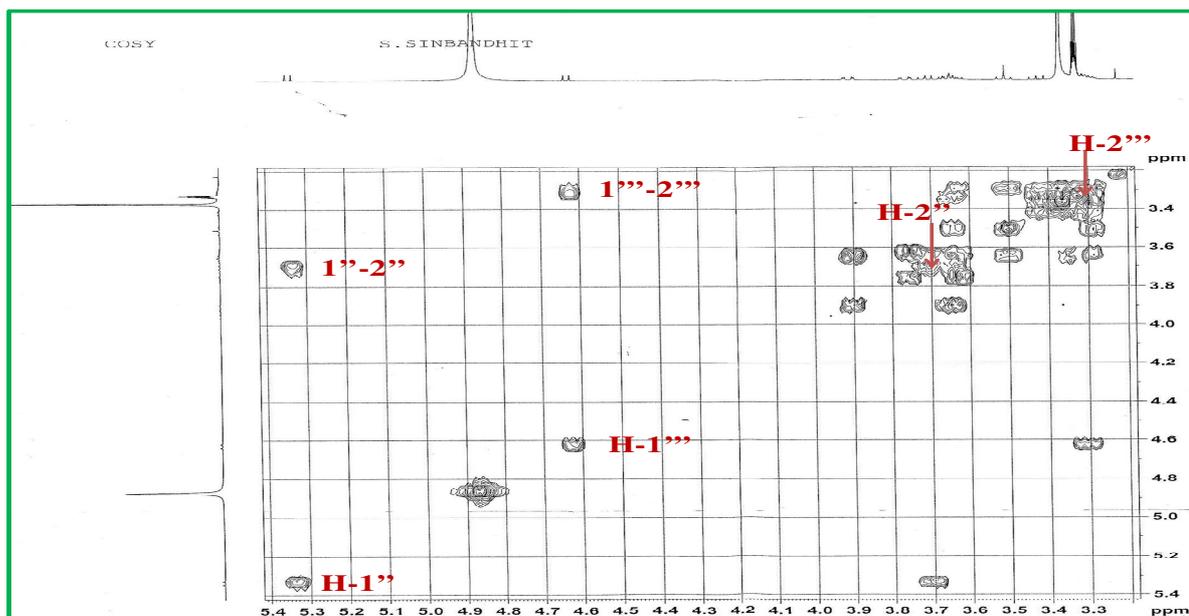


Figure 10. Spectre COSY (400 MHz, CD₃OD) du produit A23

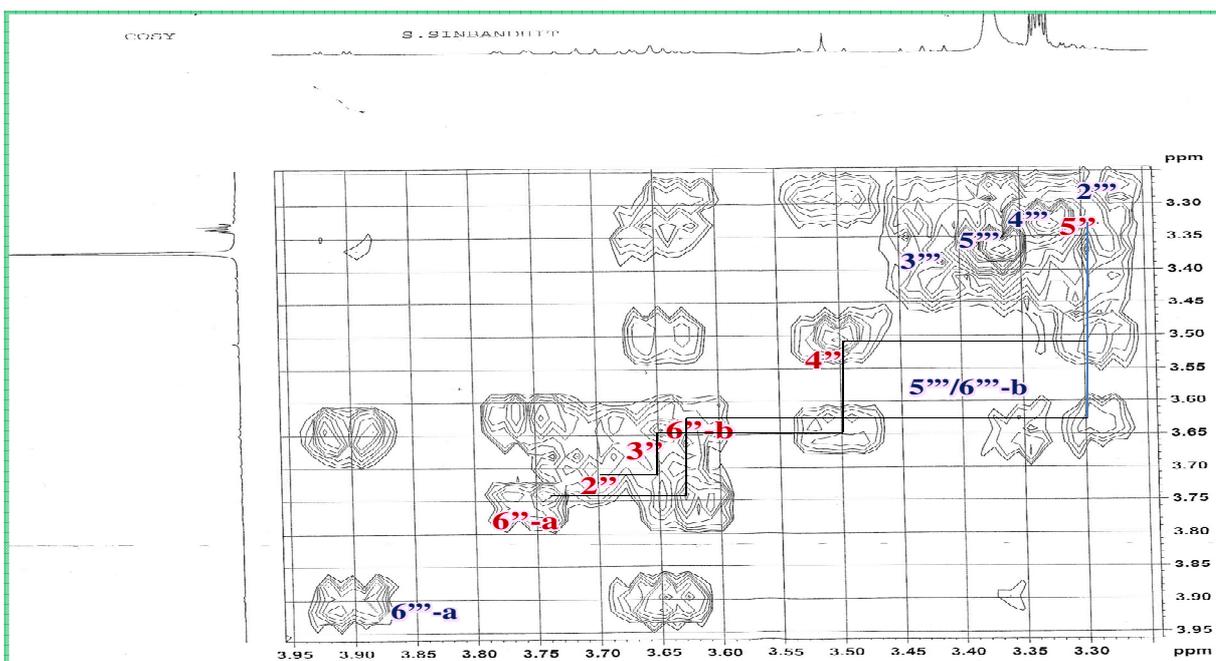


Figure 11. Spectre COSY (400 MHz, CD₃OD) du produit A23

Le spectre HSQC (figures 12-13) de ce composé montre les corrélations C-H entre :

- ❖ Les protons du cycle B résonant dans les champs faibles et les carbones correspondants :
 - H-2' à 7.72 ppm et le carbone résonant à 116.1 ppm.
 - H-6' à 7.60 ppm et le carbone résonant à 121.8 ppm.
 - H-5' à 6.89 ppm et le carbone résonant à 114.6 ppm.
- ❖ Les protons du cycle A et les carbones correspondants :

H-8 à 6.41 ppm et le carbone résonant à 93.4 ppm.

H-6 à 6.22 ppm et le carbone résonant à 98.7 ppm.

❖ Les protons anomériques et les carbones correspondants :

H-1'' à 5.32 ppm et le carbone résonant à 102.3 ppm.

H-1''' à 4.62 ppm et le carbone résonant à 103.8 ppm.

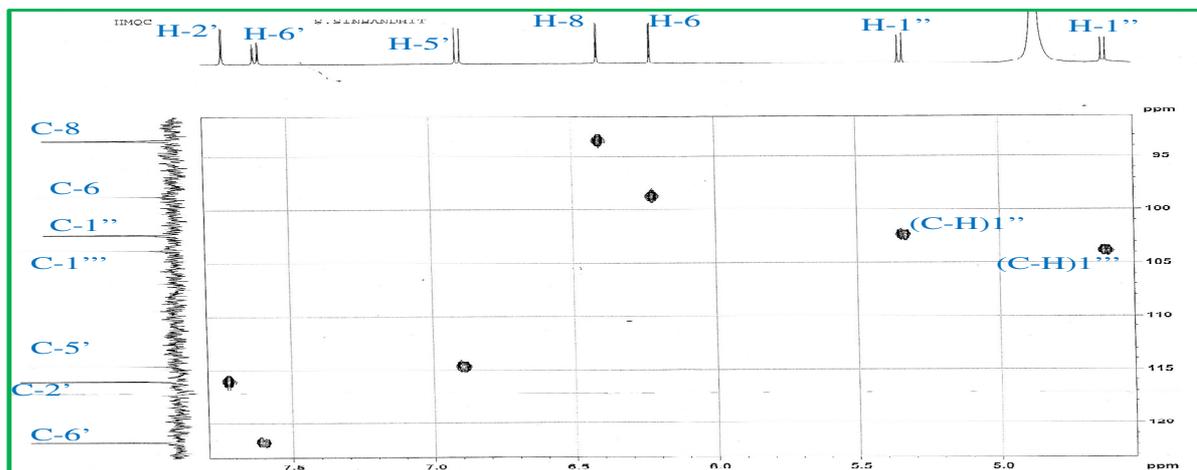


Figure 12. Spectre HSQC (400 MHz, CD₃OD) du produit A23

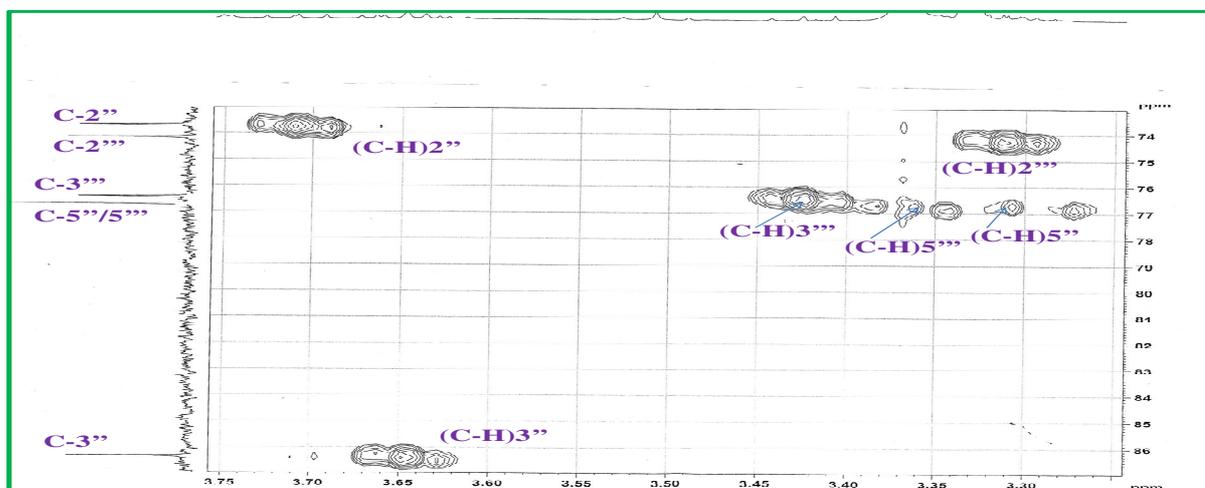
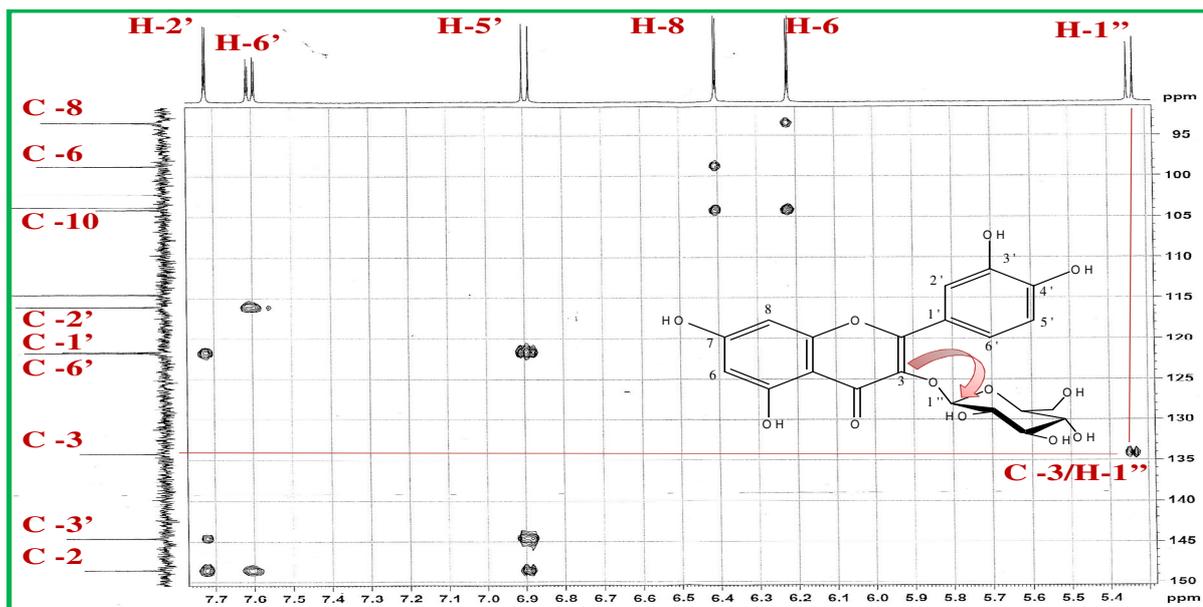
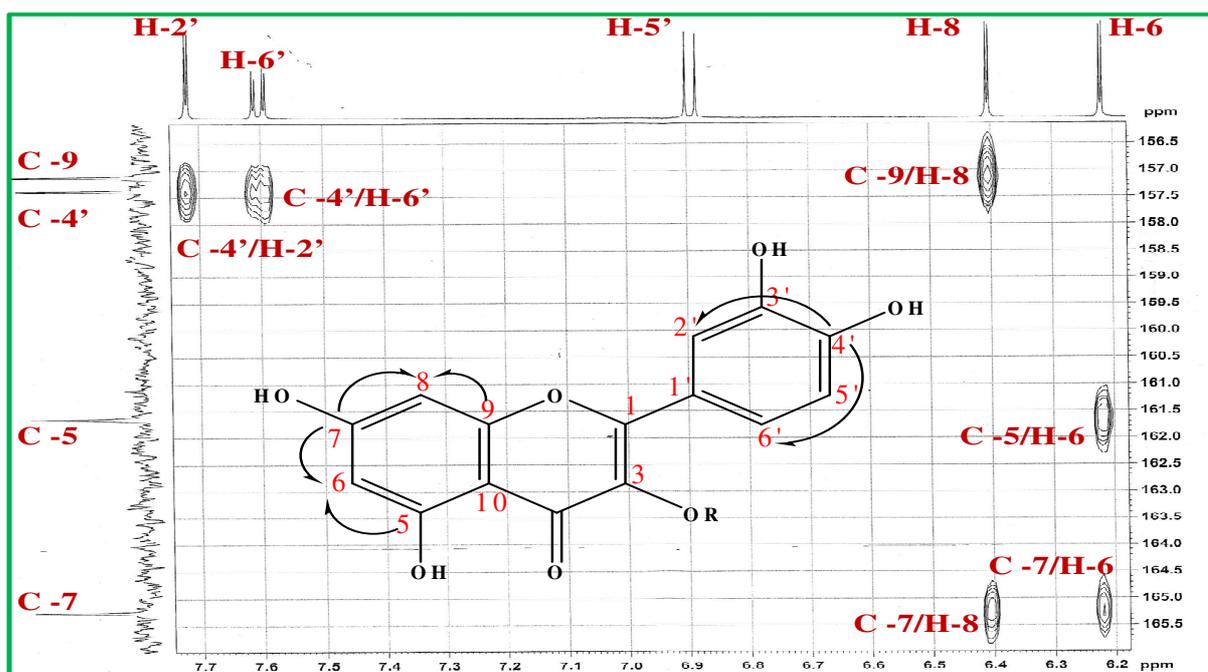


Figure 13. Spectre HSQC (400 MHz, CD₃OD) du produit A23

Le spectre HMBC (figures 14 et 15) de ce composé nous permet d'observer les couplages proton-carbone à longues distances entre le proton anomérique résonnant à 5.32 ppm du premier sucre et le carbone en position 3 résonant à 134.1 ppm.

Figure 14. Spectre HMBC (400 MHz, CD₃OD) du produit A23Figure 15. Spectre HMBC (400 MHz, CD₃OD) du produit A23

Le spectre COSY montre que le proton en position 3'' résonne à 3.65 ppm, la corrélation de ce proton dans le spectre HSQC montre que le carbone corrélié à ce proton résonne à 86.3 ppm et le spectre HMBC (figure 16) permet de déterminer la position de ce sucre par l'apparition d'une tache de corrélation entre le carbone C3'' et le proton anomérique H-1'' du deuxième sucre, apparaissant à 4.62 ppm.

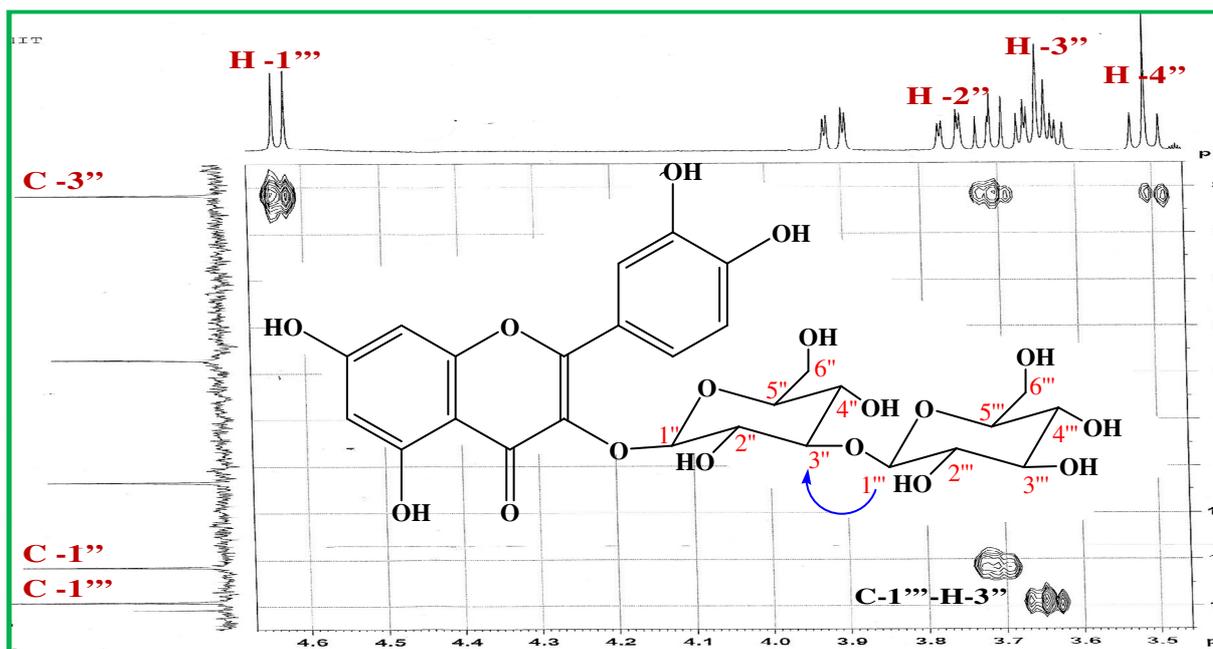
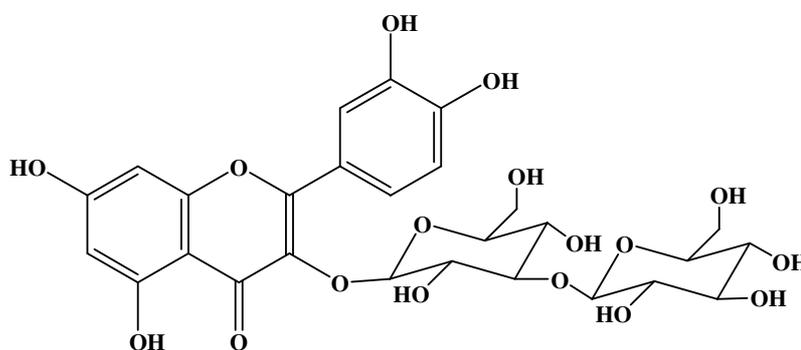


Figure 16. Spectre HMBC (400 MHz, CD₃OD) du produit A23

L'ensemble de ces analyses spectrales nous a permis d'identifier la structure du produit A23 (Imperatto, 1995) comme étant :



Quercétine 3-O-[β-D-glucosyl (1→3)-O-β-D-glucoside]

I.3. Le produit C9

Le produit C9 a une fluorescence violette sous lumière de Wood, caractéristique d'un squelette probable d'une flavone ou d'un flavonol substitué en 3.

Le comportement chromatographique est indiqué par les valeurs du R_f :

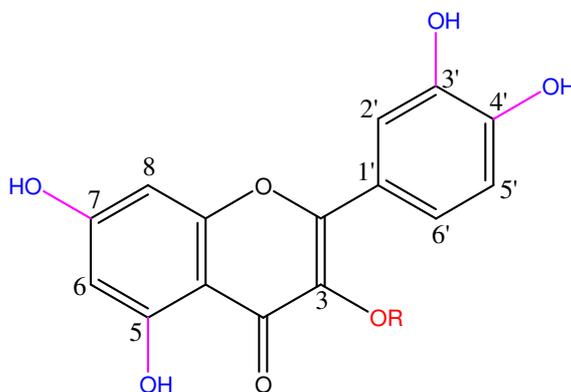
1. $R_f = 0.21$ (Toluène/ MEC/ MeOH : 4/ 3/ 3).
2. $R_f = 0.29$ (Toluène/ MeOH/ MEC/ Acétylacétone : 13/ 3/ 3/ 1).

Les données relatives à la série spectrales UV du composé C9 sont rassemblées dans le tableau 6.

Tableau 6. Données spectrales UV du composé C9

Réactifs	λ_{\max} (nm)			
	Bande I	Autres bandes	Bande II	Interprétation
MeOH	354	-	256	Flavonol ou flavonol substitué en position 3
+ NaOH	414	325	279	OH libre en position 4' OH libre en position 7
AlCl ₃	442	-	271	Existence d'un système ortho di-OH sur le cycle B
AlCl ₃ + HCl	408	-	266	OH libre en position 5
NaOAc	407	-	273	OH libre en position 7
NaOAc + H ₃ BO ₃	389	-	262	Existence d'un système ortho di-OH sur le cycle B

Ces données permettent de proposer une structure partielle d'un flavonol substitué en position 3, comportant des groupements OH dans les positions 5, 7, 3' et 4'.



L'hydrolyse acide de ce produit a libéré le glucose comme sucre identifié par cochromatographie en présence d'oses standards.

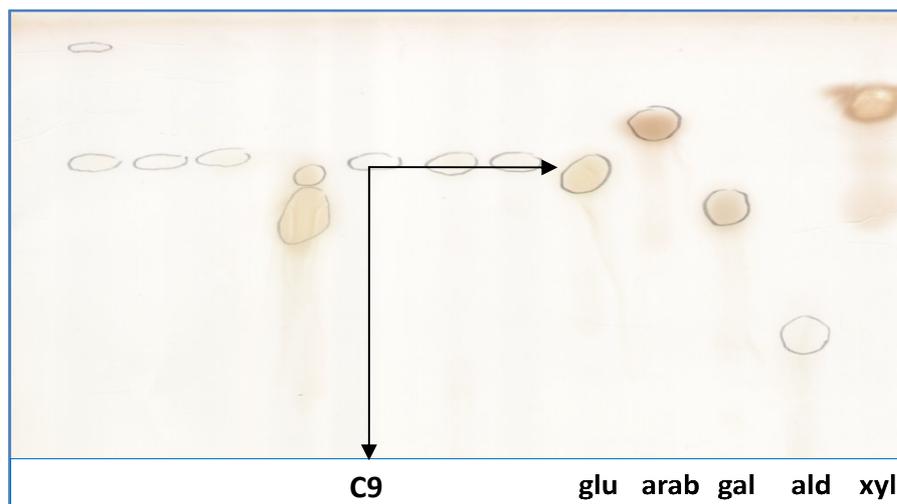
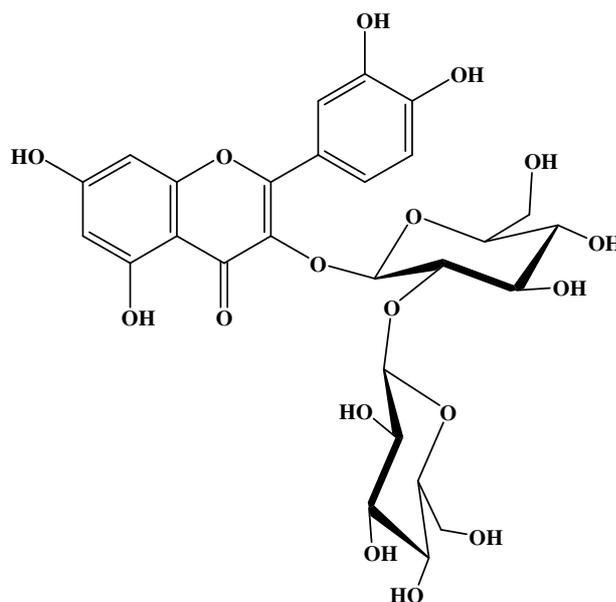


Figure 17. Plaque CCM de l'hydrolyse acide du composé A23

La combinaison des résultats de la série spectrales UV et l'hydrolyse acide ainsi l'authentification par HPLC-UV-DAD mènent à la structure suivante (Mohamed *et al.*, 2001) :



Quercétine 3-O-[β-D-glucosyl (1→2)-O-β-D-glucoside]

I.4. Le produit A16

- La masse moléculaire de ce composé est de 756.1899 g/mol correspondant à la formule brute $C_{36} H_{36} O_{18}$.
- Le spectre HPLC-UV-DAD (figure 18) a été enregistré dans les conditions suivantes :
 - Eluant : Acétonitrile – H₂O+Acide formique (0.03%)

- Débit : 0.5 ml/min
- Temps de rétention $t_R = 34.0$ nm

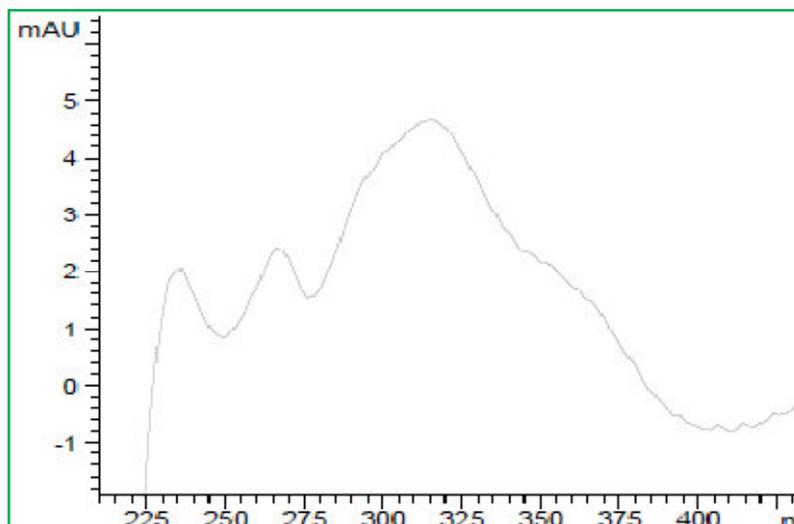
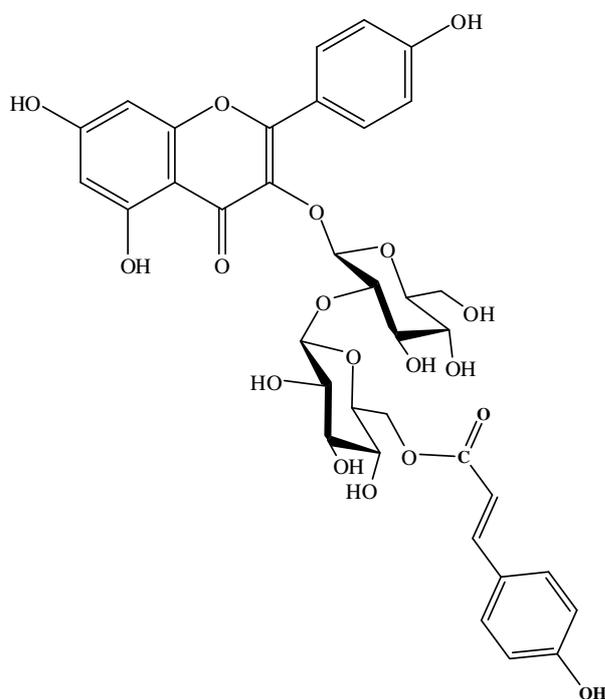


Figure 18. Spectre HPLC-UV-DAD du composé A16

La banque des données de l'appareil a permis d'identifier le produits A16 (par superposition des spectres de masse et UV) comme étant (Wang *et al.*, 2010) :



Kaempférol 3-O-[[β -D-glucosyl(1 \rightarrow 2)-(6' *p*-coumaroyl)- β -D-glucoside]
Brainoside

Conclusion

Dans ce travail, nous avons présenté une première étude phytochimique réalisée sur le genre *Biscutella*.

L'étude phytochimique de l'espèce *Biscutella raphanifolia* Poiret a permis l'isolement et l'identification de quatre flavonols glycosides :

- Quercétine 3-O- β -D-glucoside
- Quercétine 3-O-[β -D-glucosyl(1 \rightarrow 2)-O- β -D-glucoside]
- Quercétine 3-O-[β -D-glucosyl(1 \rightarrow 3)-O- β -D-glucoside]
- Kaempférol 3-O-[β -D-glucosyl(1 \rightarrow 2)-(6"*p*-coumaroyl)- β -D-glucoside]

Chapitre II

Etude phytochimique de Zilla macroptera (Coss.) Maire

II. Elucidation structurale des produits isolés

L'élucidation structurale de nos produits a été réalisée par des différentes analyses spectrales telles que la RMN monodimensionnelle : ^1H , ^{13}C , et la RMN bidimensionnelle homonucléaire ^1H - ^1H : COSY et hétéronucléaire ^1H - ^{13}C : HSQC, HMBC, et par comparaison des données spectrales avec celles de la littérature.

II.1. Elucidation structurale de produit P3-P3

L'allure des spectres RMN ^1H (figure 1) et ^{13}C (figure 2) du composé P3-P3 suggère la présence de deux cycles aromatiques, un système oléfinique, un sucre et deux groupements méthoxyyles.

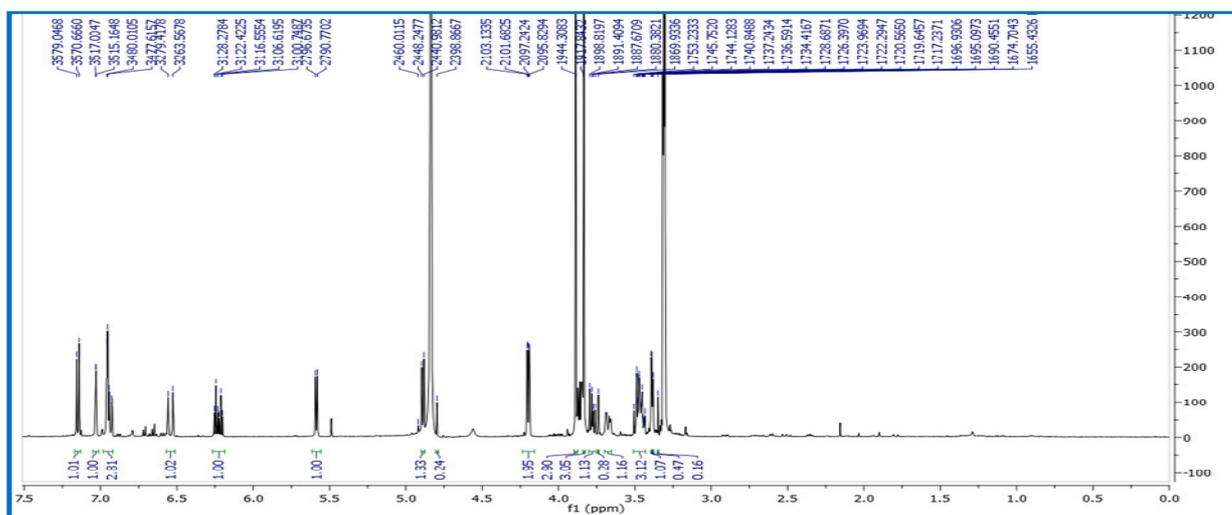


Figure 1. Spectre RMN ^1H du composé P3-P3

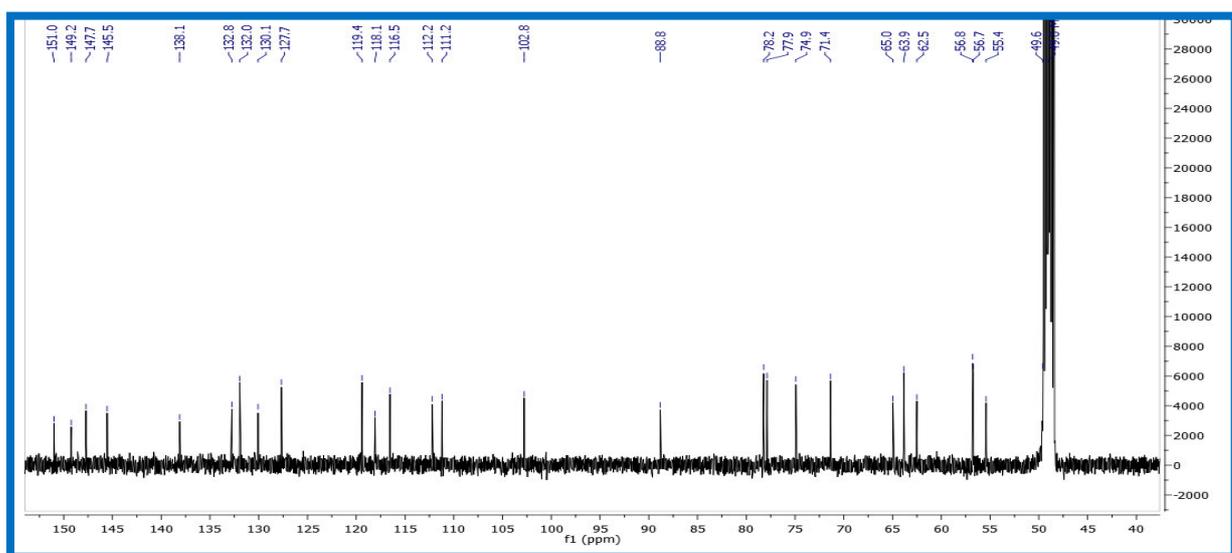


Figure 2. Spectre RMN ^{13}C du composé P3-P3

Le spectre RMN ^1H étalé (figures 3 et 4) montre :

- Les signaux de protons des cycles aromatiques apparaissent dans les champs faibles sous forme de :
 - Doublet d'intégration 1 H à 7.15 ppm ($J= 8.4$ Hz) caractéristique d'un couplage *ortho*.
 - Doublet d'intégration 1 H à 7.03 ppm ($J= 1.8$ Hz) caractéristique d'un couplage *meta*.
 - Doublet d'intégration 2 H à 6.96 ppm ($J= 2.4$ Hz) caractéristique d'un couplage *meta*.
 - Doublet dédoublé d'intégration 1 H à 6.93 ppm ($J= 8.4 ; 2.0$ Hz) caractéristique de deux couplages *ortho* et *meta*.
- Un système oléfinique :
 - Un signal sous forme d'un doublet d'intégration 1 H à 6.54 ppm ($J= 15.8$ Hz) caractéristique d'un couplage *trans*.
 - Un signal sous forme d'un doublet de triplet d'intégration 1 H à 6.22 ppm ($J= 15.8 ; 5.8$ Hz) caractéristique d'un couplage *trans* et 3J .
 - Un signal sous forme d'un doublet d'intégration 1 H à 5.58 ppm ($J= 5.9$ Hz) caractéristique d'un couplage 3J .
 - Un signal sous forme d'un doublet d'intégration 1 H à 4.89 ppm ($J= 7.3$ Hz) caractéristique d'un proton anomérique d'un sucre.
 - Un signal sous forme d'un doublet dédoublé d'intégration 2 H à 4.20 ppm ($J= 5.8 ; 1.5$ Hz) caractéristique d'un couplage 4J et vicinal.
 - Deux groupements méthoxy sous forme de deux singulets d'intégration 3 H chacun le premier à 3.87 ppm et le second à 3.83 ppm.
 - Un signal d'intégration 1H à 3.86 ppm.
 - Un doublet dédoublé d'intégration 1 H à 3.78 ppm ($J= 11.1 ; 7.4$ Hz) caractéristique à deux couplages 2J et 3J .
 - Un signal sous forme d'un multiplet d'intégration 1H à 3.49 ppm caractéristique de couplages avec trois protons.
 - Les autres signaux caractéristiques aux protons du sucre.

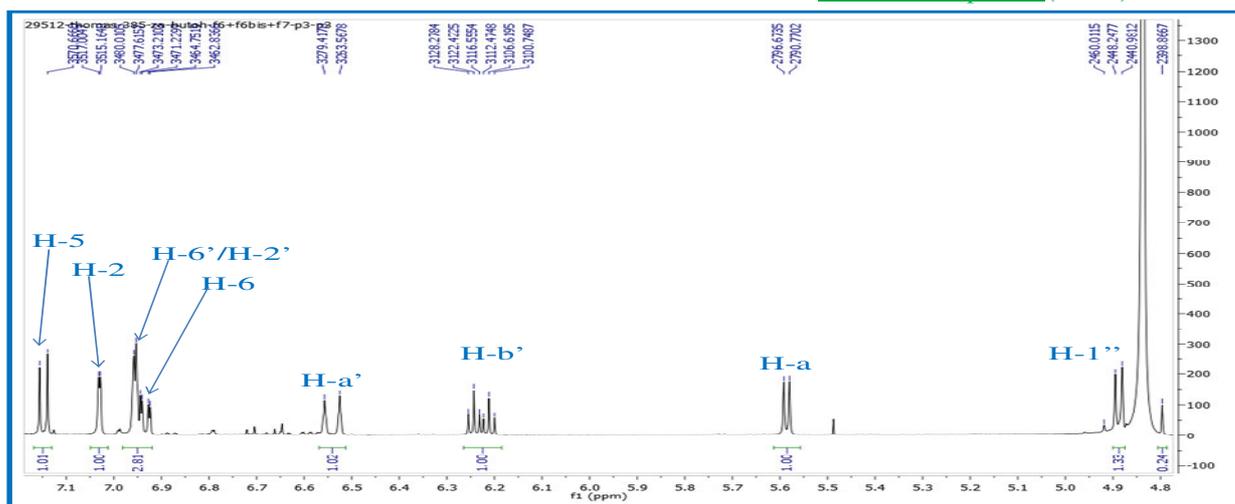


Figure 3. Spectre RMN ^1H étalé du composé P3-P3

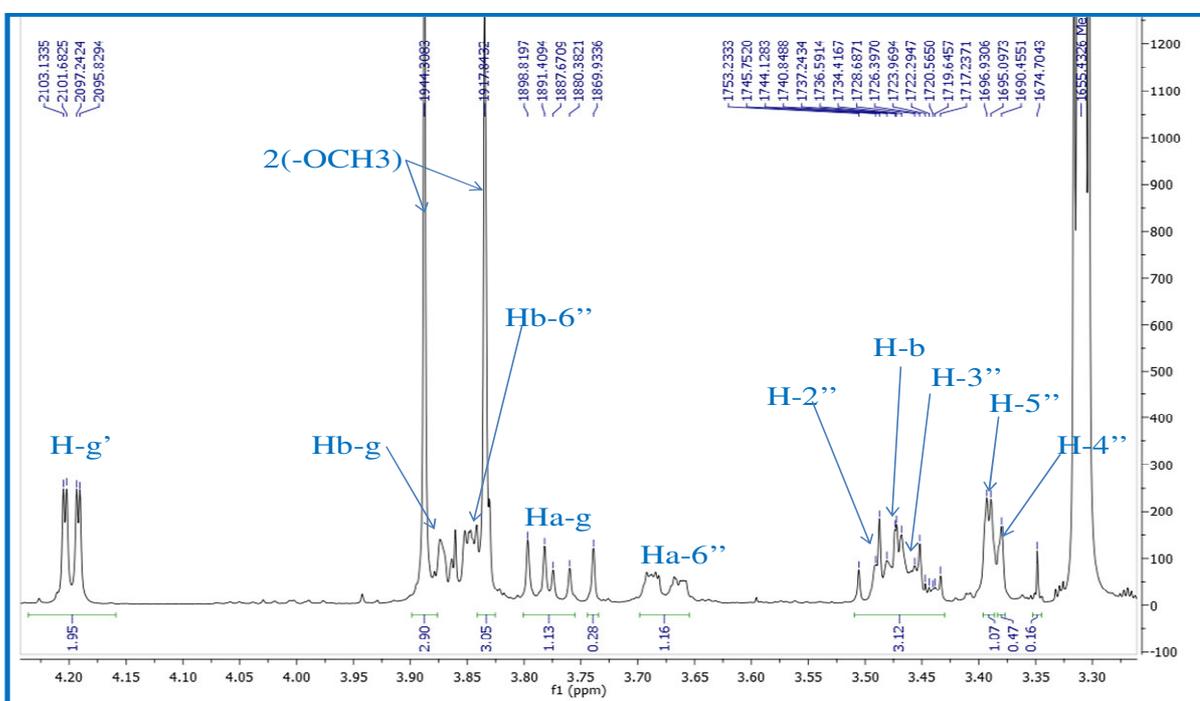


Figure 4. Spectre RMN ^1H étalé du composé P3-P3

L'expérience COSY nous a permis de faire les corrélations H-H entre les protons des cycles aromatiques (fragment a et b (figure 8)) et les substituants (figures 5 et 6), et donc identifier les protons qui ont des signaux non analysables sur le spectre proton (tableau 1) tels que le proton qui résonne à 3.87 ppm et les six protons du sucre (figure 7).

Les principaux couplages H-H observés via les taches de corrélations entre les signaux correspondants aux :

- H-a' : H-g', H-b'.
- H-b' : H-g', H-a'.

- H-g' : H-b', H-a'.

Conduisent au fragment c (figure 8)

Et ceux de :

- H-a : H-b.
- H-b : Ha-g, Hb-g, H-a.
- Ha-g : Hb, Hb-g.

Conduisent au fragment d (figure 8)

Et ceux de :

- H-1'' : H-2''; H-2'' : H-3''; H-3'' : H-4''; H-4'' : H-5'' et H-5'' : H-6'' a et b

Indiquent une structure d'un hexose.

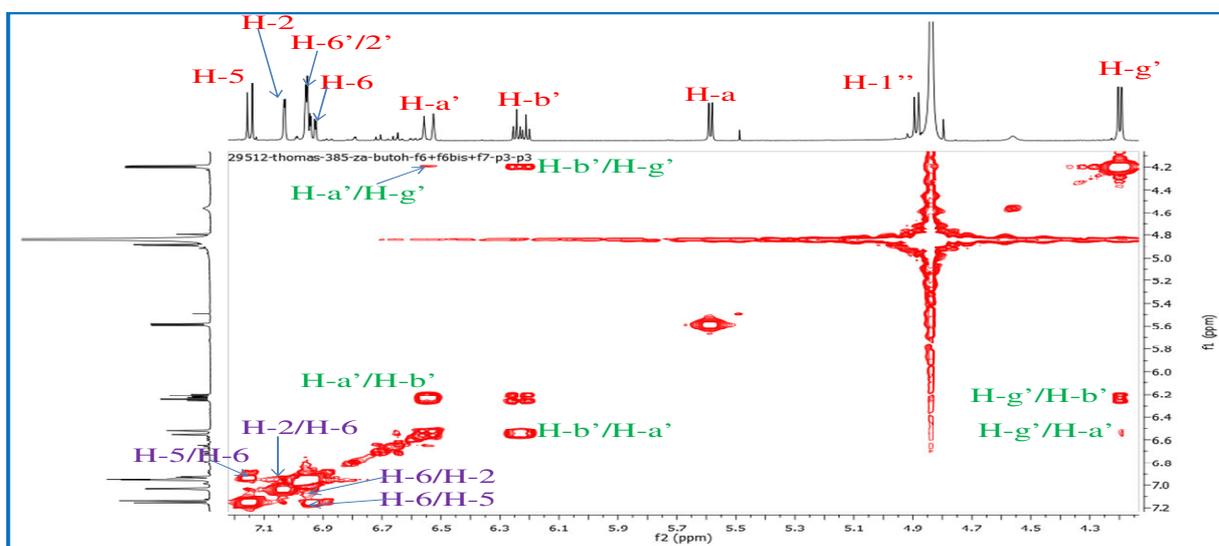


Figure 5. Spectre COSY étalé du composé P3-P3

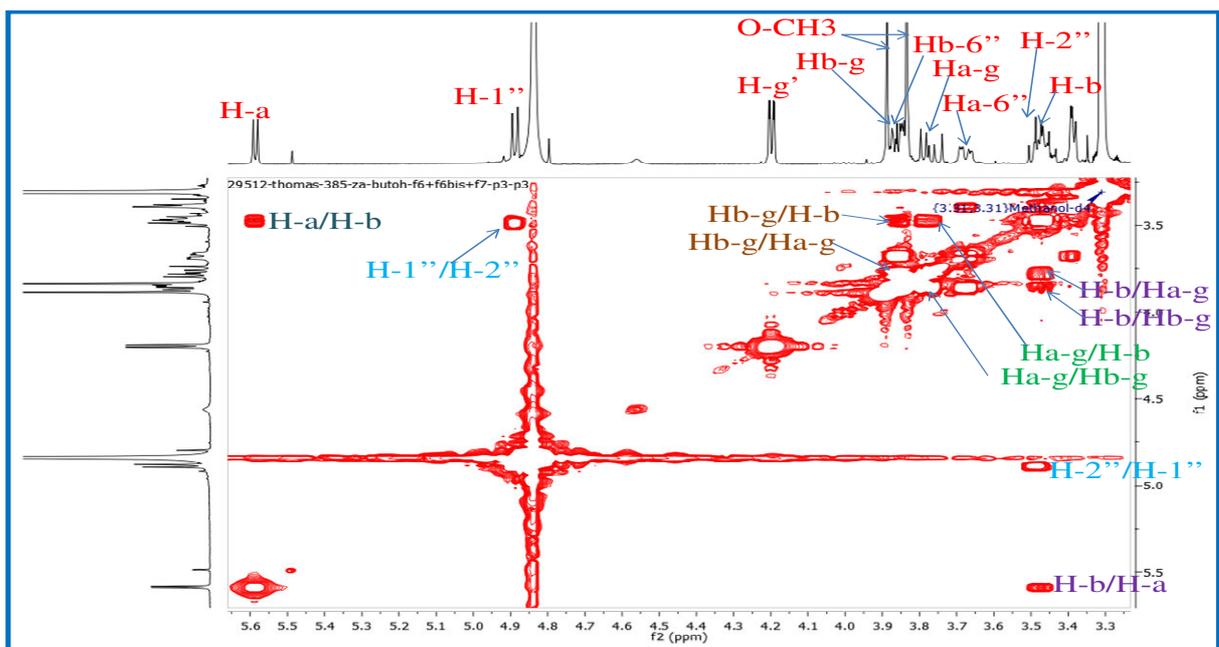


Figure 6. Spectre COSY étalé du composé P3-P3

Le spectre COSY étalé permet d'identifier les sept protons d'un hexose en partant du proton anomérique H-1'' à 4.89 ppm. Le proton H-2'' à 3.50 ppm (t, $J=9.1$ Hz) est couplé au proton H-3'' à 3.44 ppm (dl, $J=9.1$ Hz), lui-même couplé au proton H-4'' à 3.37 ppm (sl). Un signal correspondant à H-5'' à 3.40 ppm est couplé à deux protons Ha-6'' à 3.67 ppm et Hb-6'' à 3.84 ppm.

Toutes ces données identifient le sucre au glucose (fragment e (figure 8)).

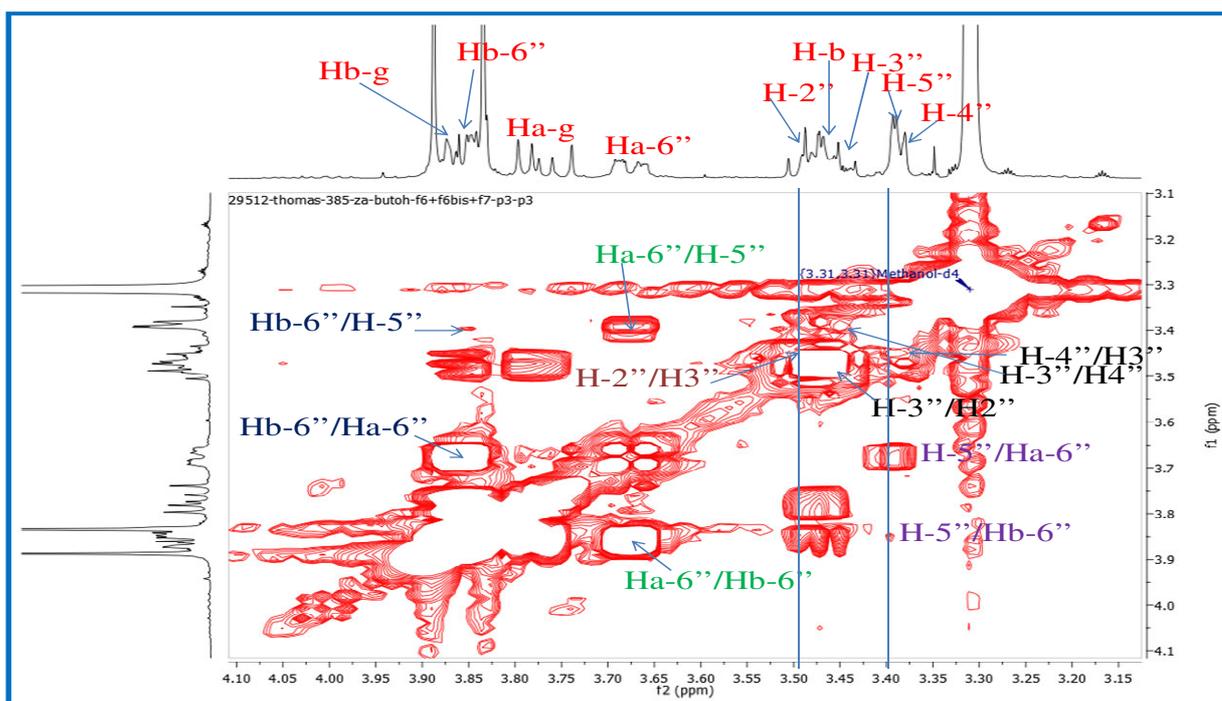


Figure 7. Spectre COSY étalé du composé P3-P3

Les données relatives aux spectres RMN ^1H et COSY indiquent :

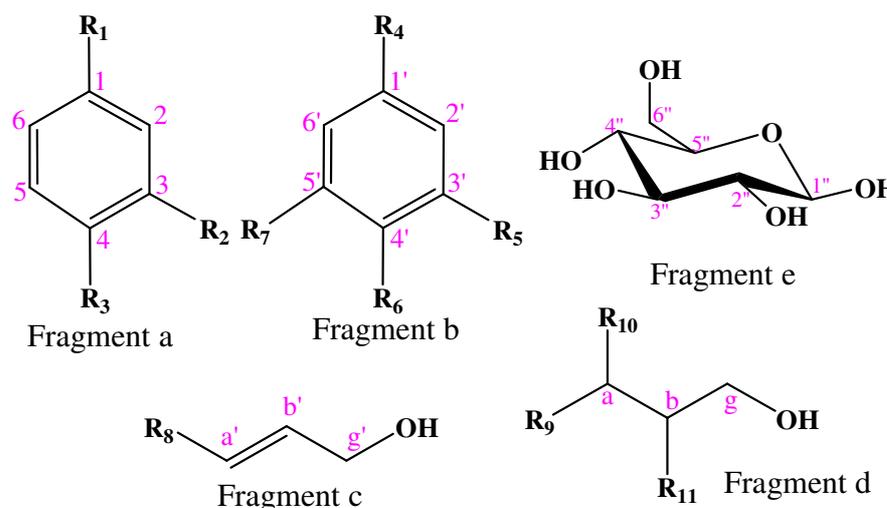


Figure 8. Corrélation observées sur le spectre COSY du composé P3-P3

Tableau 1. Déplacements chimiques en RMN ¹H (500 MHz) du composé P3-P3 dans CD₃OD

δ (ppm)	Intégration	Multiplicité	J (Hz)	Attribution
7.03	1H	d	1.8	H-2
7.15	1H	d	8.4	H-5
6.93	1H	dd	2.0 ; 8.4	H-6
5.58	1H	d	5.9	H-a
3.49	1H	m	/	H-b
3.78	1H	dd	7.4 ; 11.1	Ha-g
3.86	1H	/	/	Hb-g
6.96	2H	d	2.4	H-2' ; H-6'
6.54	1H	d	15.8	H-a'
6.22	1H	dt	5.8 ; 15.8	H-b'
4.20	2H	dd	1.5 ; 5.9	H-g'
3.87	3H	s	/	O-CH ₃
3.83	3H	s	/	O-CH ₃
4.89	1H	d	7.3	H-1''
3.50	1H	t	9.1	H-2''
3.44	1H	dl	9.1	H-3''
3.37	1H	sl	/	H-4''
3.40	1H	m	/	H-5''
3.67	1H	dd	2.2 ; 11.9	Ha-6''
3.84	1H	m	/	Hb-6''

L'analyse du spectre HSQC (figures 9, 10) permet de corréler chaque proton à son carbone ce qui facilite l'analyse du spectre HMBC.

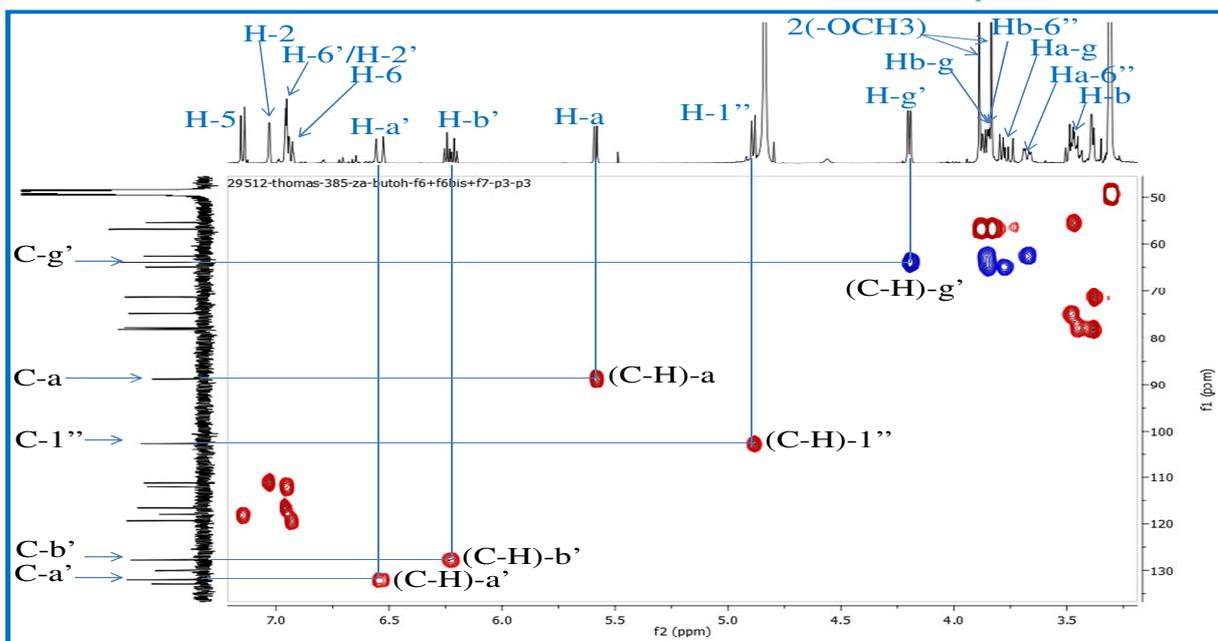


Figure 9. Spectre HSQC du composé P3-P3

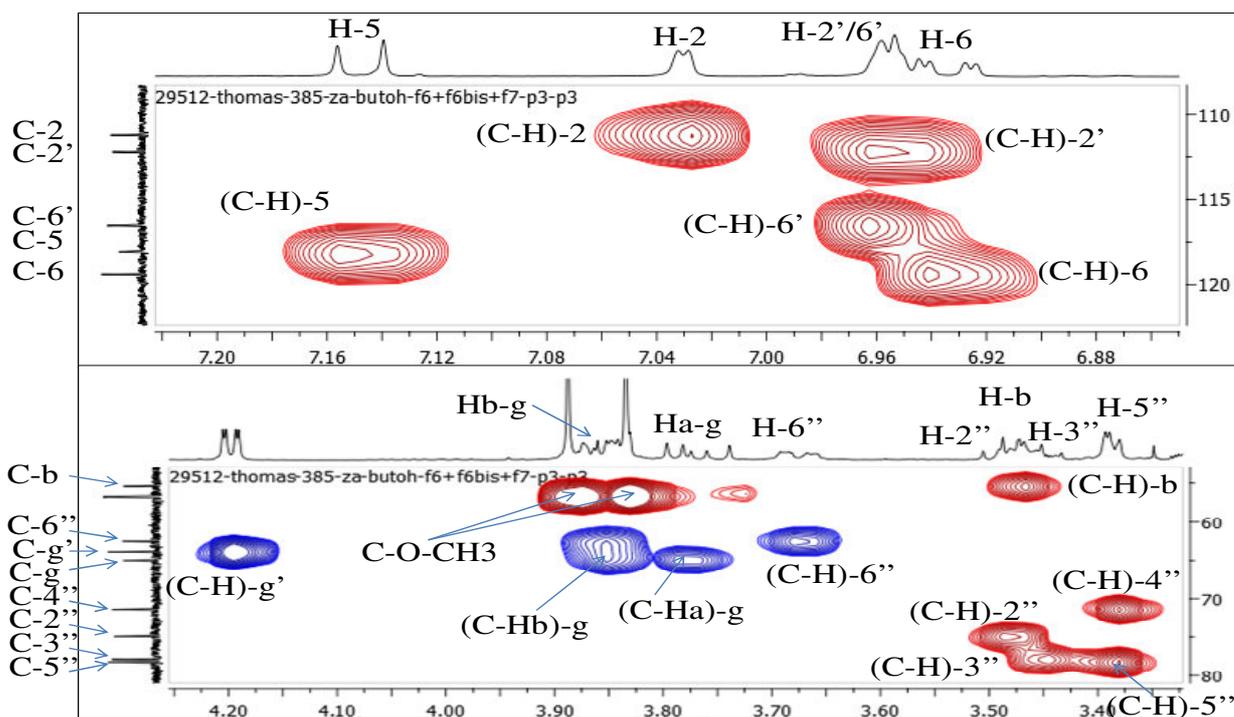


Figure 10. Spectre HSQC étalé du composé P3-P3

Les résultats de l'analyse du spectre HSQC permettent d'attribuer les déplacements chimiques des carbones sur le spectre ^{13}C (figure 11). L'attribution des carbones quaternaires nécessite une analyse du spectre HMBC (corrélations à longue distance).

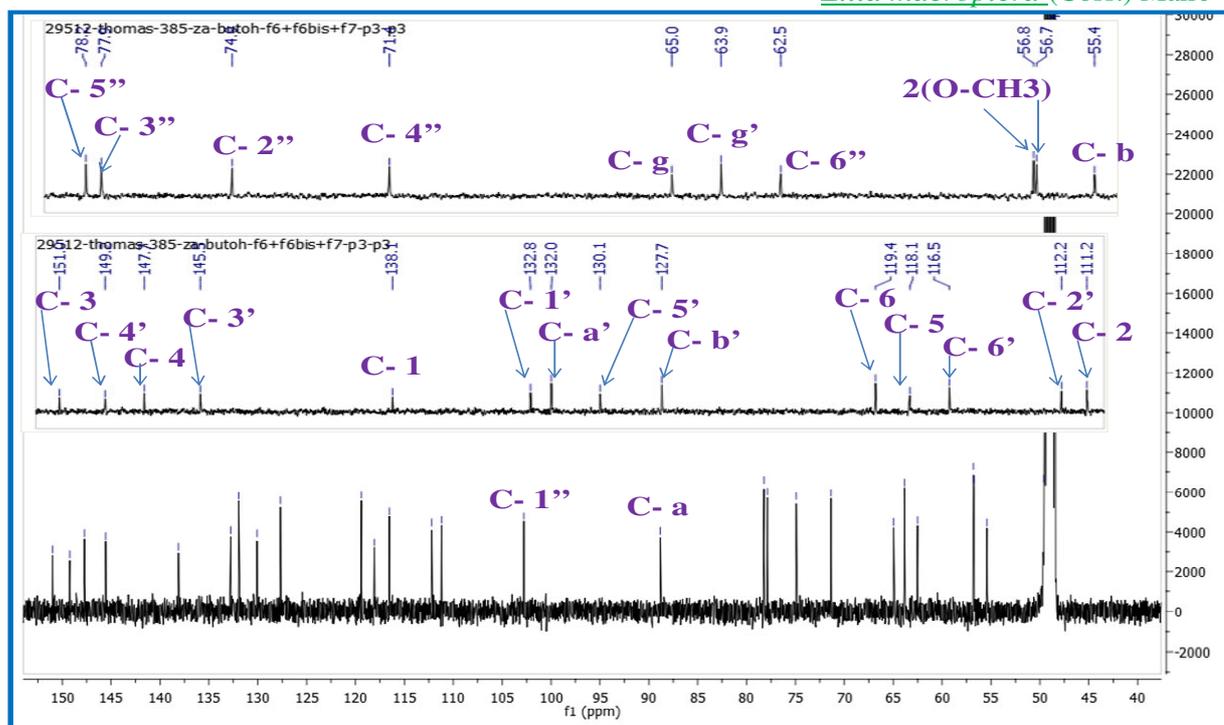


Figure 11. Spectre ^{13}C plus l'étalement du composé P3-P3

Dans l'expérience HMBC (figures 12 et 13) on observe les corrélations hétéronucléaire à longue distance entre :

- Le carbone résonne à 130.1 ppm et les protons H-a, H-g et H-b attribuable à C-5'.
- Le carbone résonne à 132.8 ppm et les protons H-b' et H-a' attribuable à C-1'.
- Le carbone résonne à 138.1 ppm et les protons H-2, H-5, H-a et H-b attribuable à C-1.
- Le carbone résonne à 145.5 ppm et les protons H-2' et $-\text{OCH}_3$ attribuable à C-3'.
- Le carbone résonne à 147.7 ppm et les protons H-5, H-2, H-6 et H-1'' attribuable à C-4.
- Le carbone résonne à 149.2 ppm et les protons H-6', H-2', H-a et H-b attribuable à C-4'.
- Le carbone résonne à 151.0 ppm et les protons H-5, H-2 et $-\text{OCH}_3$ attribuable à C-3.

La figure 14 montre les corrélations observées sur le spectre HMBC, et le tableau 2 regroupe les déplacements chimiques ^{13}C de ce composé.

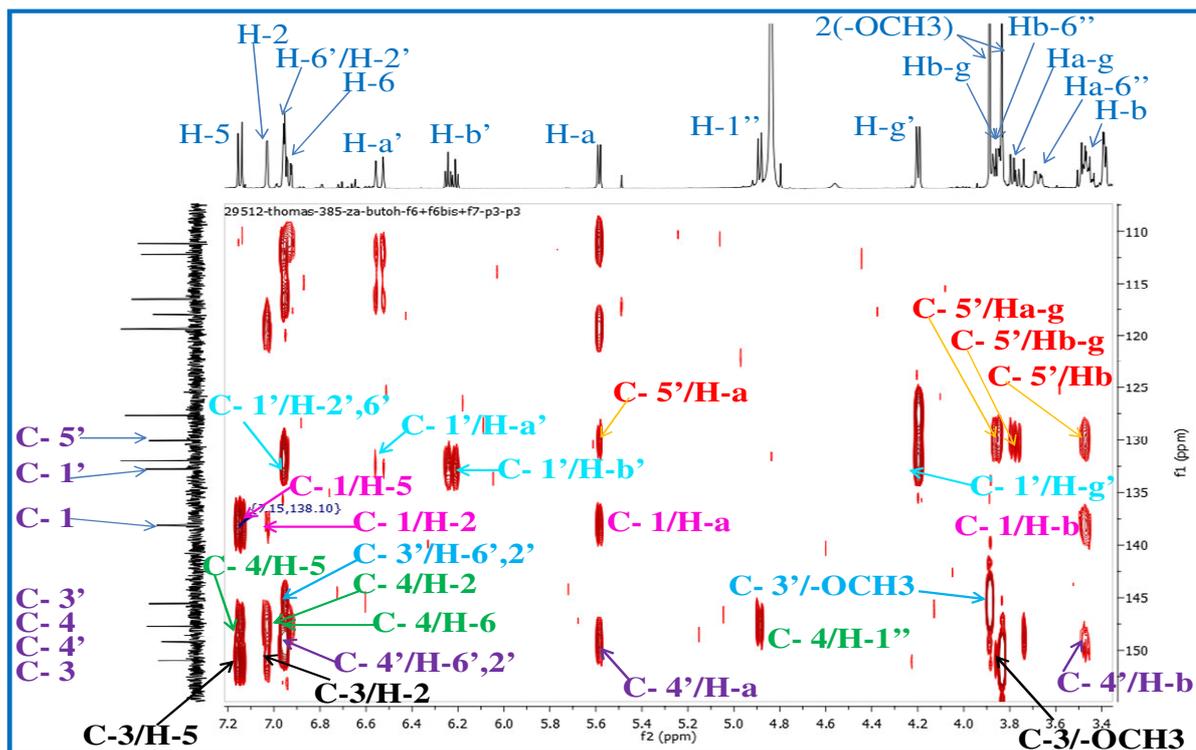


Figure 12. Spectre HMBC étalé du composé P3-P3

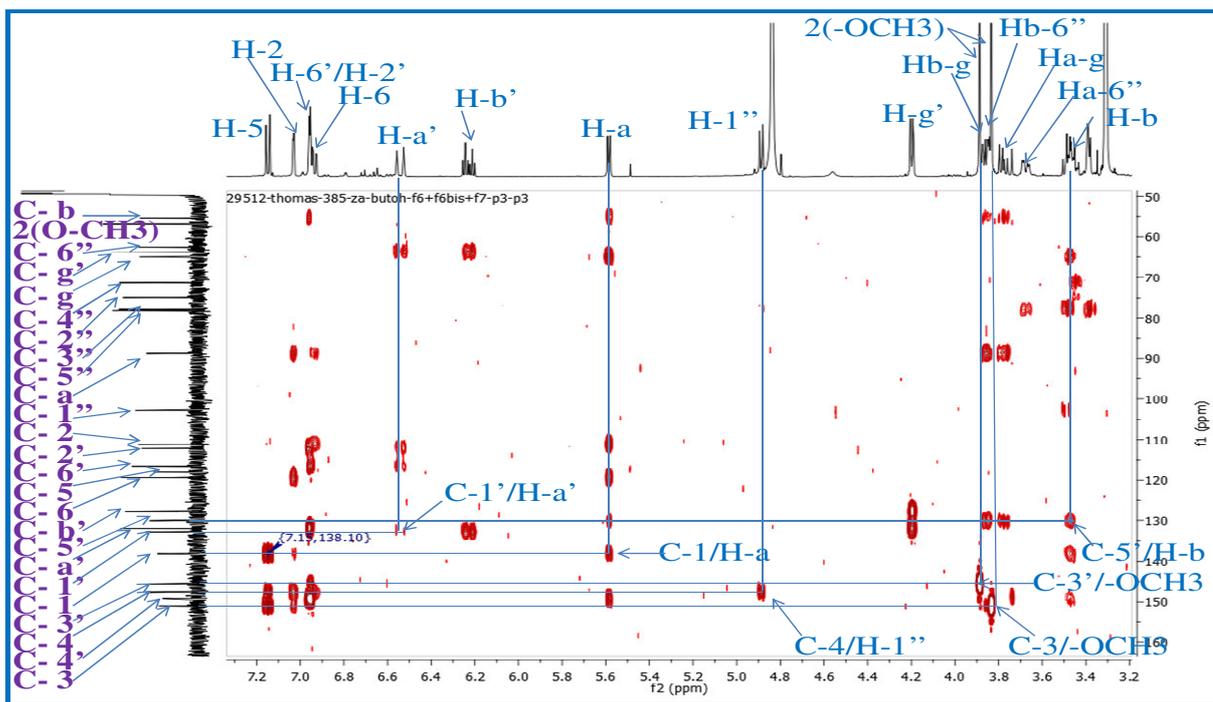


Figure 13. Spectre HMBC du composé P3-P3

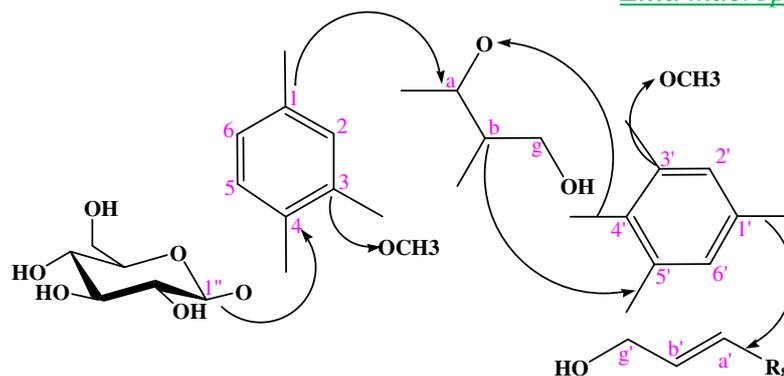
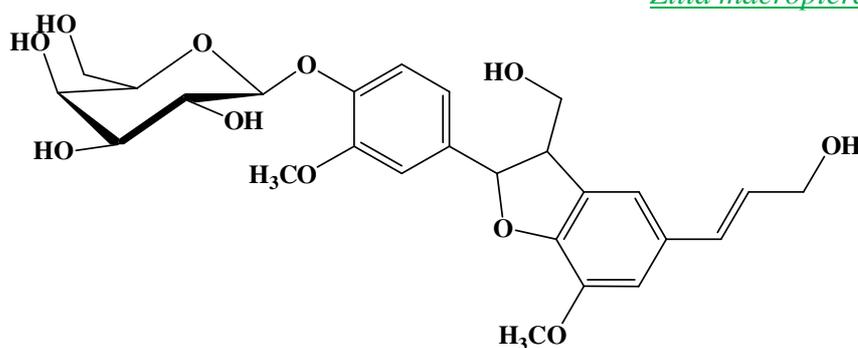


Figure 14. Corrélations H-C observées sur le spectre HMBC

Tableau 2. Déplacements chimiques en RMN ^{13}C (500 MHz) du composé P3-P3 dans CD_3OD

δ (ppm)	Attribution	δ (ppm)	Attribution
151.0	C-3	111.2	C-2
149.2	C-4'	102.8	C-1''
147.7	C-4	88.8	C-a
145.5	C-3'	78.2	C-5''
138.1	C-1	77.9	C-3''
132.8	C-1'	74.9	C-2''
132.0	C-a'	71.4	C-4''
130.1	C-5'	65.0	C-g
127.7	C-b'	63.9	C-g'
119.4	C-6	52.5	C-6''
118.1	C-5	56.8	CH ₃ -O
116.5	C-6'	56.7	CH ₃ -O
112.2	C-2'	55.4	C-b

Les données de RMN de composé P3-P3 sont en accord avec ceux de la littérature (Tolstikhina et Semenov, 1998) de la structure suivante :



Dehydrodicouferyl alcool-4-O- β -D-glucoside

II.2. Elucidation structurale de produit P3-P6

L'analyse du spectre RMN ^1H (figure 15) montre des signaux caractéristiques correspondant à des groupements :

- Feruloyl (trois protons aromatiques à 7.21, 7.08 et 6.82ppm de multiplicité doublet, doublet de doublet et doublet respectivement formant un système ABX, un groupement méthoxyle à 3.89 ppm et deux protons *trans* oléfiniques à 7.67 ppm et 6.37 ppm caractérisés par la même constante de couplage 15,8 Hz) ;
- 3-methoxy-4-hydroxyphényléthanol (trois protons aromatiques à 6.82, 6.76 et 6.70 ppm formant également un système ABX, un groupement méthoxyle à 3.82 ppm, un signal sous forme d'un triplet correspondant à un méthylène et deux protons non équivalents de la chaîne latérale du groupement aglycone) ;

Ce qui indique qu'il s'agit d'un phényléthanoïdes.

Sur le même spectre, on remarque la présence de trois protons anomériques, un doublet à 5.19 ppm ($J = 1.7$ Hz) correspond à un proton anomérique d'un rhamnose 1'' confirmé par la présence d'un doublet à 1.1 ppm d'intégration trois ($J = 6.3$ Hz) très caractéristique d'un méthyle en position C-6'' ; et deux doublets observés à 4.40 ppm ($J = 7.9$ Hz) 4.30 ppm ($J = 7.7$ Hz) correspondent aux deux protons anomériques du glucose 1'' et 1''''.

D'après la littérature le triplet à 5.01 ppm ($J = 9.7$ Hz) correspond au proton du glucose (H-4'') dont la fonction hydroxyle est estérifiée par l'acide ferulique.

Les autres signaux correspondent aux protons osidiques sont compris entre 3 et 4 ppm.

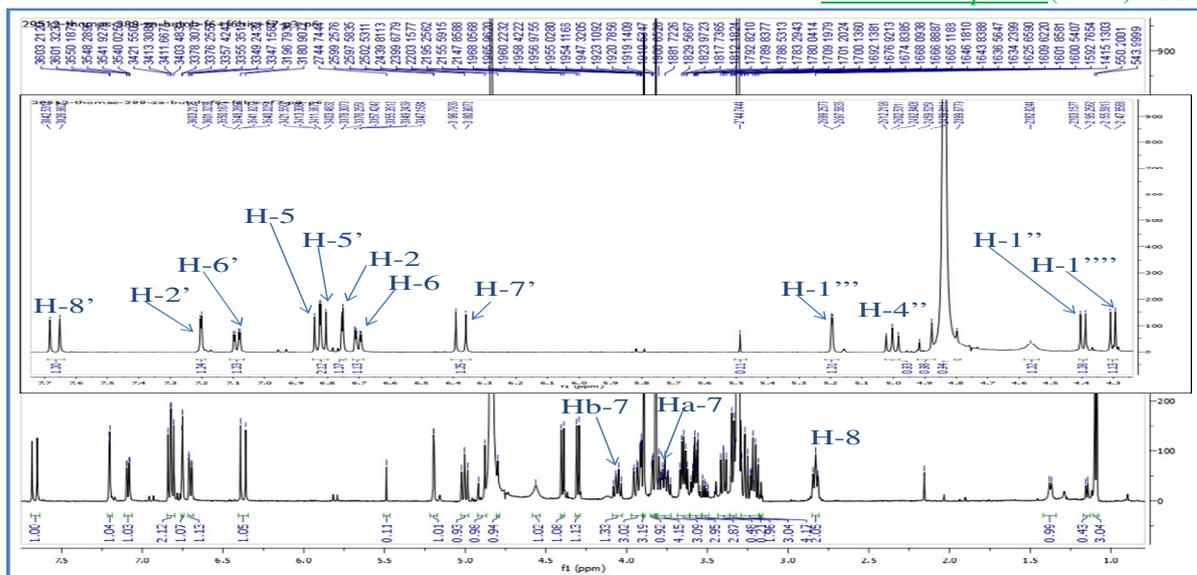


Figure 15. Spectre RMN ¹H (CD₃OD/ 400 MHz) du composé P3-P6

L'expérience COSY nous a permis d'attribuer les protons osidiques, les valeurs des constantes de couplage ($J > 7$ Hz) montrent qu'il s'agit un β -D-glucopyranoside. A partir de même spectre (figure 16) nous avons distribué 14 protons de deux glucoses et six signaux correspondant aux 8 protons du rhamnose.

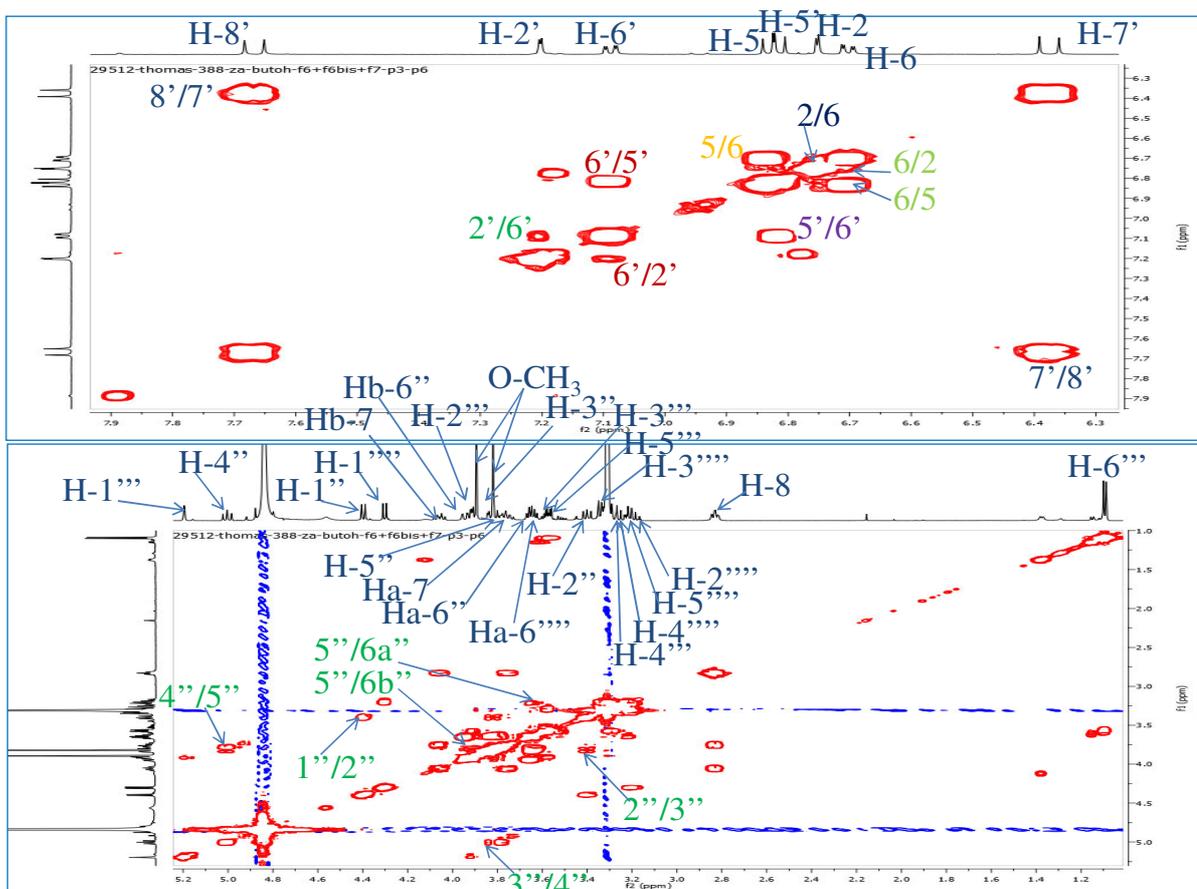


Figure 16. Spectre COSY (CD₃OD/ 400 MHz) du composé P3-P6

La présence des taches de corrélation H-C observées par l'expérience HSQC (figure 17) et H-C à longues distances observées par l'expérience HMBC (figure 18) entre :

- Le proton H-4'' du glucose et le carbone C-9 de la fonction ester ;
- Le proton anomérique du rhamnose H-1''' et le carbone C-3'' du glucose ;
- Le proton anomérique du glucose H-1'' et le carbone C-7 ;
- Le proton anomérique du glucose H-1''' et le carbone C-6'' du glucose ;

Permet de déterminer les différentes jonctions entre les unités de sucre et entre le glucose de la partie aglycone.

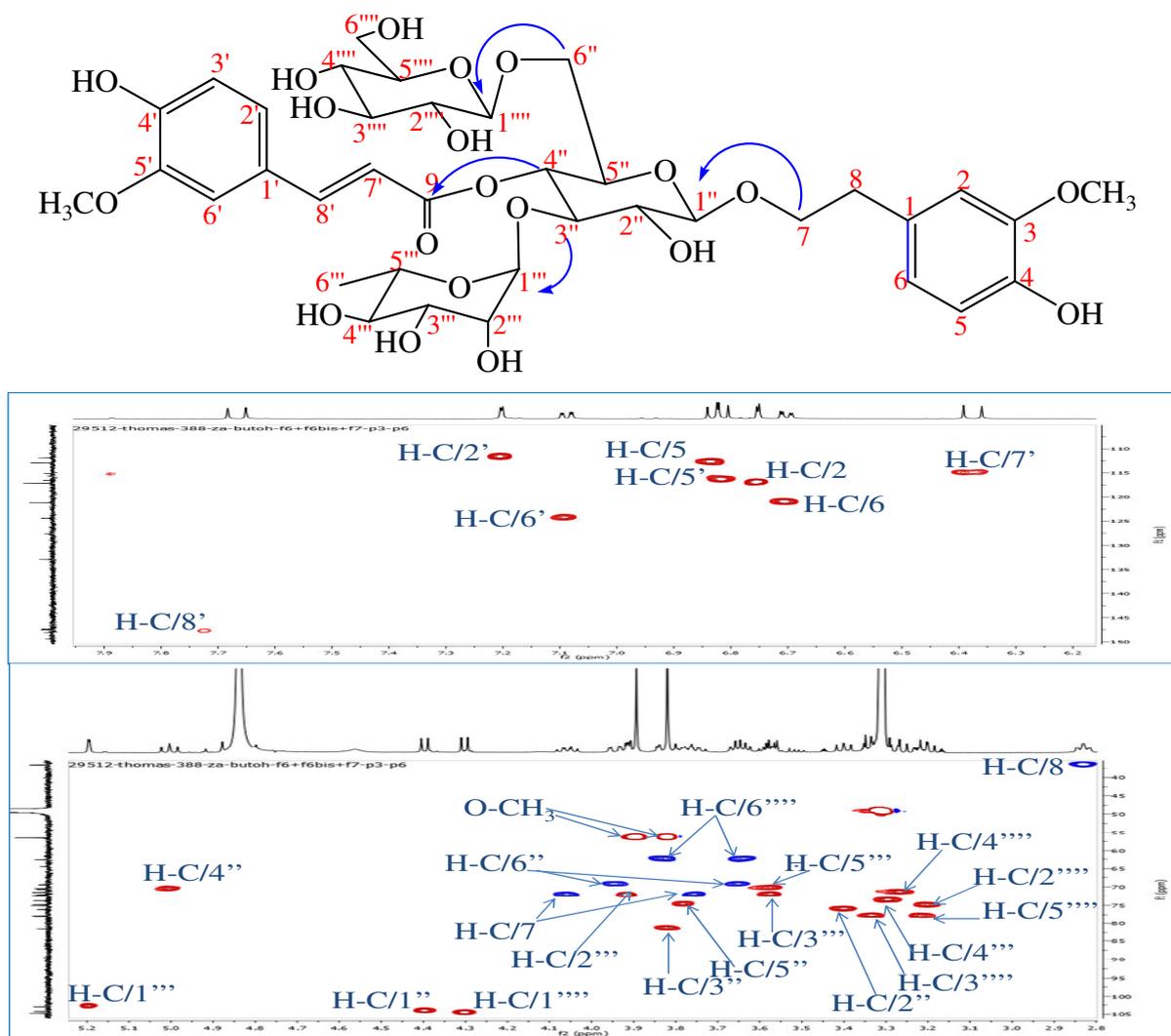


Figure 17. Spectre HSQC (CD₃OD/ 400 MHz) du composé P3-P6

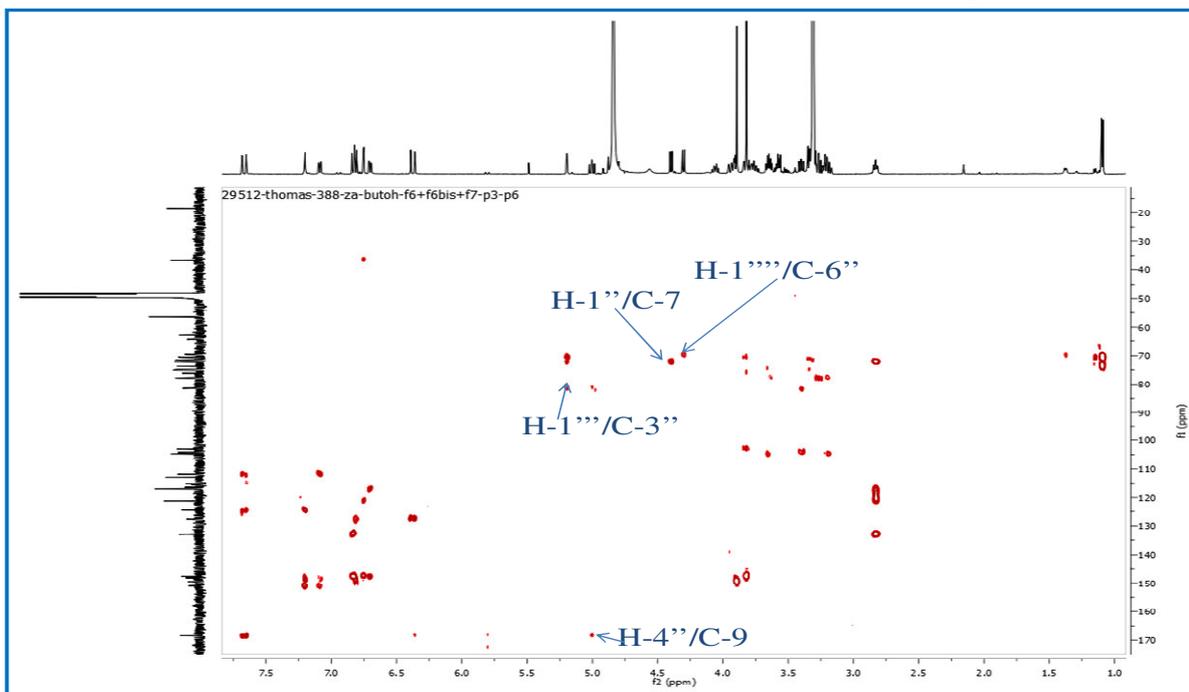
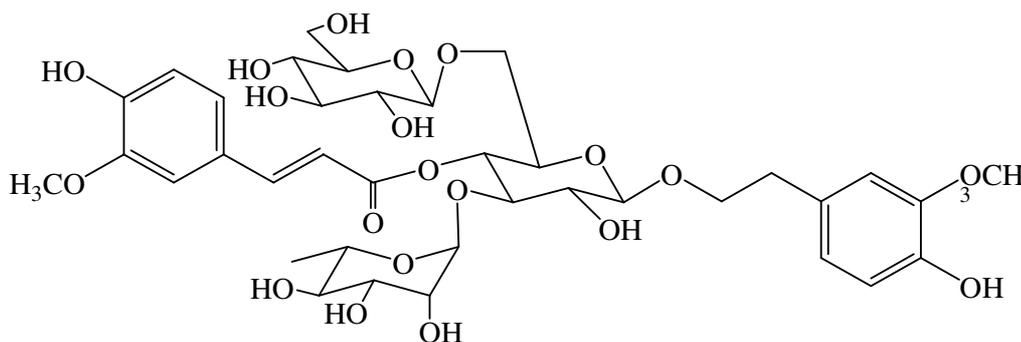


Figure 18. Spectre HMBC (CD₃OD/ 400 MHz) du composé P3-P6

La structure de composé P3-P6 est :

2-(4-hydroxy-3-méthoxyphényl) éthyl O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-O-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]-(4-O-feruloyl)- β -D-glucopyranoside ou cistanoside B.

Les déplacements chimiques de tous les signaux en RMN ¹H et ¹³C (mentionnés dans le tableau 3) sont identiques à ceux donnés dans la littérature (Jia *et al.*, 2009).



Cistanoside B

Tableau 3. Déplacement chimique en RMN ^1H et ^{13}C du composé P3-P6

N°	δC (ppm)	N°	δC (ppm)	N°	δH (m, J Hz)
1	132.95	5''	74.83	2	6.76 (d, 2.0)
2	117.12	6''	69.46	5	6.84 (d, 8.2)
3	147.38	1'''	103.03	6	6.70 (dd, 8.2-2.1)
4	149.44	2'''	72.37	7a	3.75
5	112.93	3'''	72.24	7b	4.05
6	121.21	4'''	73.78	8	2.83 (t, 8.5)
7	72.08	5'''	70.44	2'	7.21 (d, 1.9)
8	36.55	6'''	18.42	5'	6.82 (d, 8.2)
9	168.45	1''''	104.74	6'	7.08 (dd, 8.2-1.9)
1'	127.61	2''''	75.13	7'	6.37 (d, 15.8)
2'	111.85	3''''	77.86	8'	7.67 (d, 15.8)
3'	147.57	4''''	71.49	1''	4.40 (d, 7.9)
4'	150.99	5''''	77.95	2''	3.40
5'	116.54	6''''	62.66	3''	3.84
6'	124.41	O-CH ₃	56.51	4''	5.00
7'	115.11	O-CH ₃	56.46	5''	3.80
8'	148.12			6''a	3.85
1''	104.23			6''b	3.94
2''	76.17			1'''	5.19 (d, 1.7)
3''	81.52			6'''	1.10 (d, 6.3)
4''	70.68			1''''	4.30 (d, 7.7)

II.3. Elucidation structurale de produit P3-P5

L'analyse du spectre RMN ^1H (figure 19, tableau 4) de ce composé montre des déplacements chimiques et des signaux similaires de ceux de composé P3-P3 avec disparition des signaux correspondant au système ABX et on observe par contre deux signaux sous forme d'un singulet d'intégration 2H chacun à 6.96 et 6.75 ppm impliquent la présence de deux noyaux aromatique tétra substitués, deux signaux sous forme d'un singulet de trois groupements methoxyles à 3.9 ppm (d'intégration 3H) et à 3.82 ppm (d'intégration 6H), deux signaux correspondant aux deux protons oléfiniques *trans* à 6.55 ($J= 15.8$ Hz) et 6.23 ppm ($J= 5.7-5.8$ Hz) avec une configuration correspondant à un alcool allylique, et un proton anomérique du glucose a été observé à 4.87 ppm ($J= 7.7$ Hz).

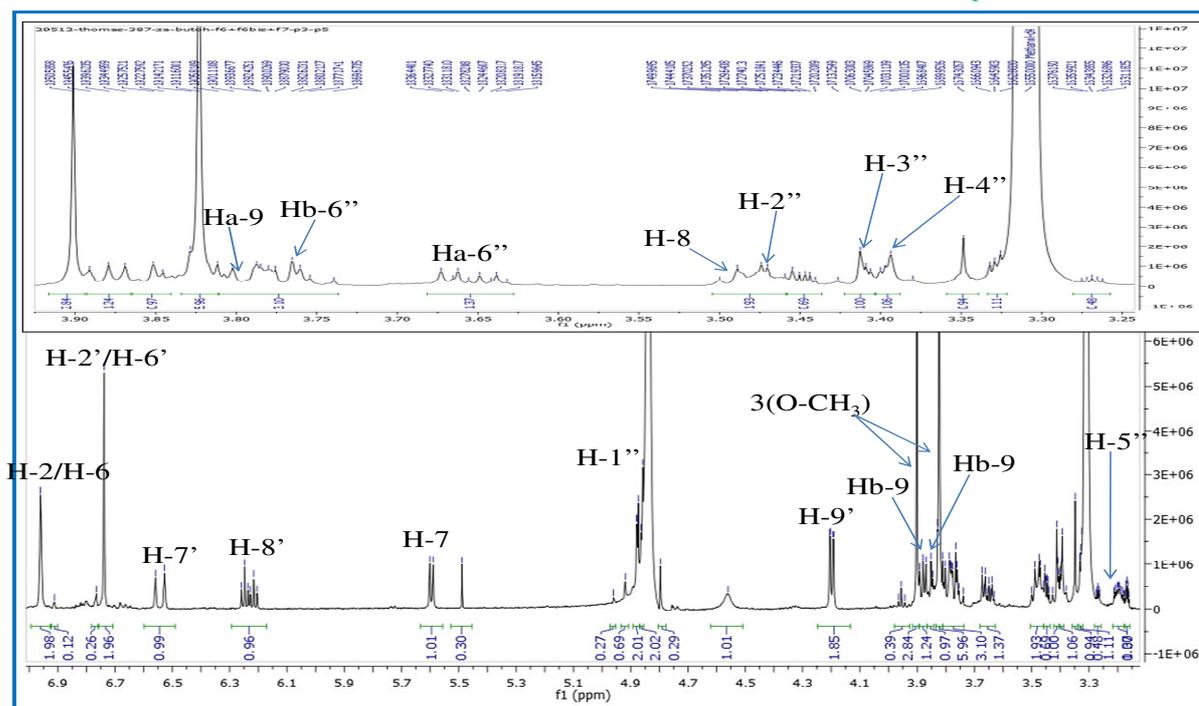
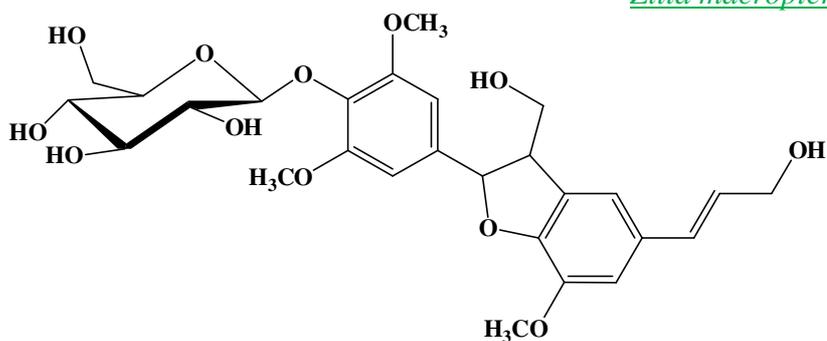


Figure 19. Spectre RMN ^1H ($\text{CD}_3\text{OD}/400\text{ MHz}$) du composé P3-P5

Tableau 4. Déplacements chimiques en RMN ^1H ($\text{CD}_3\text{OD}/400\text{ MHz}$) du composé P3-P5

N°	δ (ppm)	intégration	multiplicité	J (Hz)
2 et 6	6.95	2H	s	/
7	5.60	1H	d	5.8
8	3.48	1H	d	7.7
9	3.79-3.87	2H	/	/
2' et 6'	6.75	2H	s	/
7'	6.55	1H	d	15.8
8'	6.23	1H	dt	15.7-5.8
9'	4.2	1H	dd	15.8-1.3
1''	4.87	1H	d	7.7
O-CH_3	3.90	3H	s	/
O-CH_3	3.82	6H	s	/

Par comparaison avec les résultats du composé P3-P3 et celles proposés dans la littérature (Atsuko *et al.*, 2008), la structure du composé P3-P5 est : 5-methoxy dehydridiconiferyl alcool-4-O- β -D-glucoside.



5-methoxy dehydrodiconiferyl alcool-4-O- β -D-glucoside

II.4. Elucidation structurale de produit F3

Le spectre RMN ^1H (figure 20 et 21) montre les caractéristiques d'un iridoïde. En effet, on observe les signaux du : proton H-9 résonnant à 2.55 ppm (d, 8.3 Hz), H-1 résonnant à 5.40 ppm (d, 8.2 Hz), H-3 résonnant à 6.30 ppm (d, 6.1 Hz), H-4 résonnant à 4.94 ppm (d, 6.2 Hz), les deux protons Ha-10 et Hb-10 résonnant respectivement à 3.70 (d, 13.0 Hz) et 4.12 (d, 12.9 Hz) et enfin la présence du signal du proton anomérique H-1' du glucose à 4.70 ppm sous forme d'un doublet ($J = 7.8$ Hz).

Le proton H-7 résonne à 3.56 ppm (d, 1.0 Hz) couplé à H-6 résonnant à 4.04 ppm (d, 1.3 Hz) indiquent par leurs multiplicités selon le spectre COSY qu'ils ne sont pas couplés à d'autres protons vicinaux.

Tous les signaux enregistrés dans le produit F3 sont proches à ceux observés dans le catalpol (Suomi *et al.*, 2001) avec disparition du signal correspondant à H-5 et le déblindage du signal C-5 vers les bas champ (74.32 ppm), de plus l'absence de corrélation de ce carbone avec un proton dans le spectre HSQC indique la formation d'un alcool tertiaire à C-5.

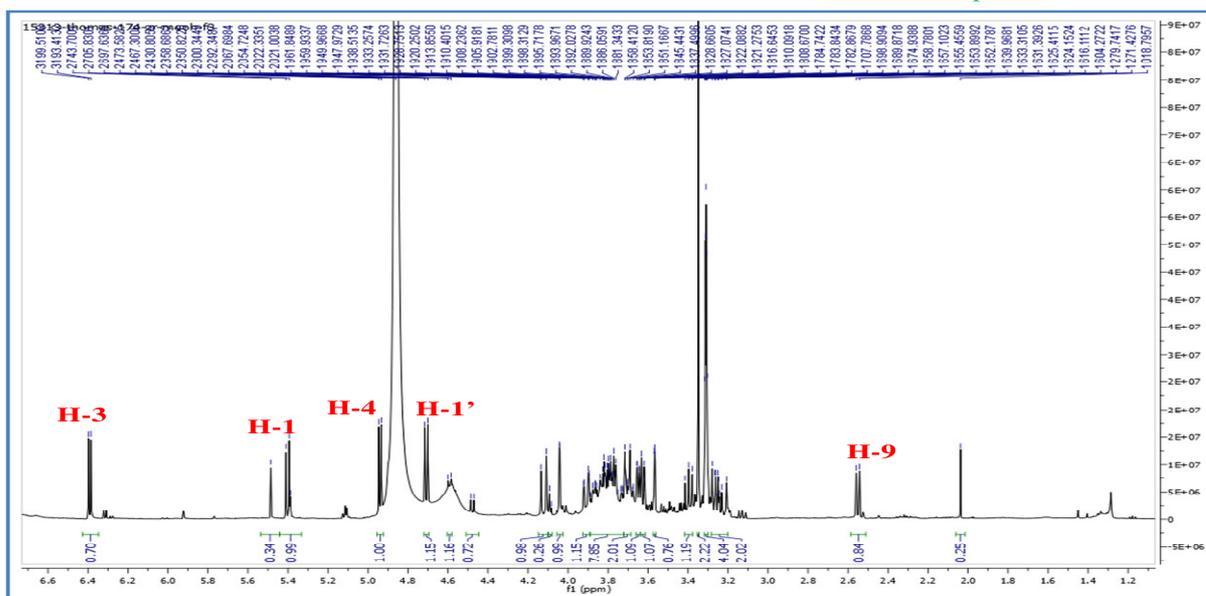


Figure 20. Spectre RMN ^1H (MeOD, 400 MHz) du composé F3

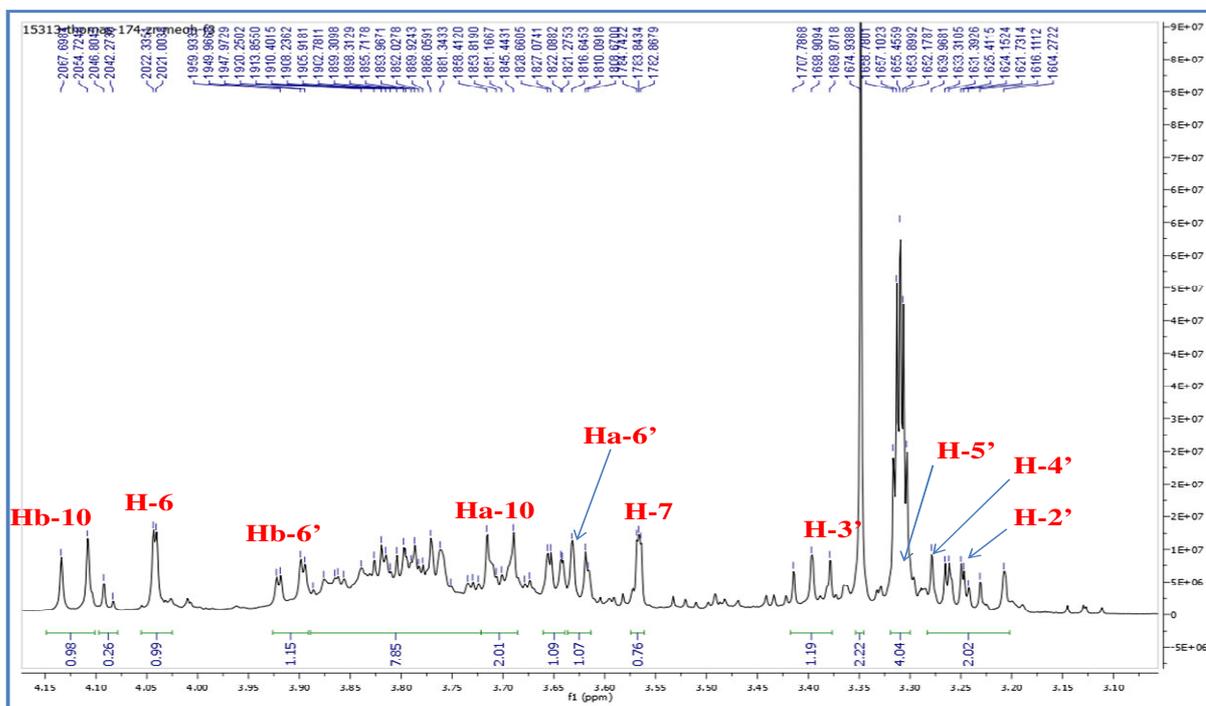


Figure 21. Spectre RMN ^1H étalé (MeOD, 400 MHz) du composé F3

L'expérience COSY H-H (Figure 22-23) permet de retrouver toutes les corrélations identifiant le noyau catalpol et les protons du glucose bien caractéristiques par leurs déplacement chimiques et constantes de couplage.

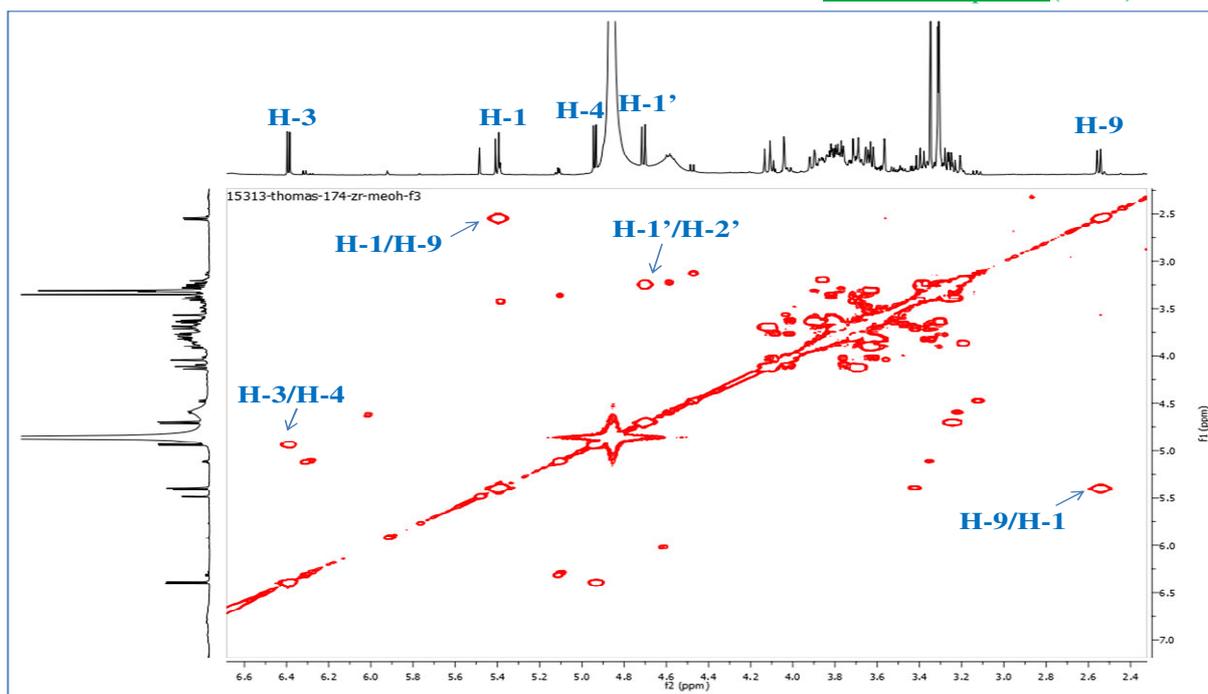


Figure 22. Spectre COSY (MeOD, 400 MHz) du composé F3

Le spectre étalé COSY permet d'identifier les protons osidiques : H-2' résonne à 3.24 ppm (t, 7.2 Hz), H-3' résonne à 3.40 ppm (t, 8.2 Hz), H-4' résonne à 3.26 ppm (t, 7.9), H-5' résonne à 3.27 ppm, Ha-6' résonne à 3.64 (dd, 5.8 ; 12.4 Hz) et Hb-6' résonne à 3.90 ppm (dd, 2.0 ; 13.0).

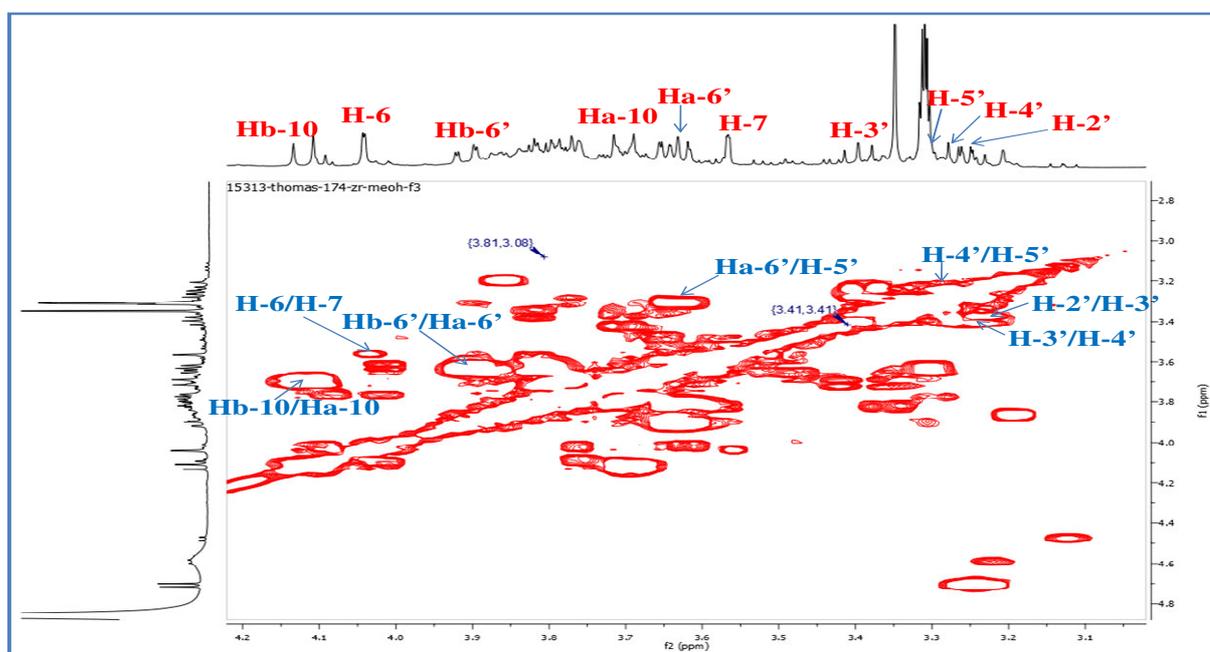


Figure 23. Spectre COSY étalé (MeOD, 400 MHz) du composé F3

Les corrélations C-H observées sur le spectre HSQC (figure 24) permettent d'attribuer les déplacements chimiques des carbones correspondants.

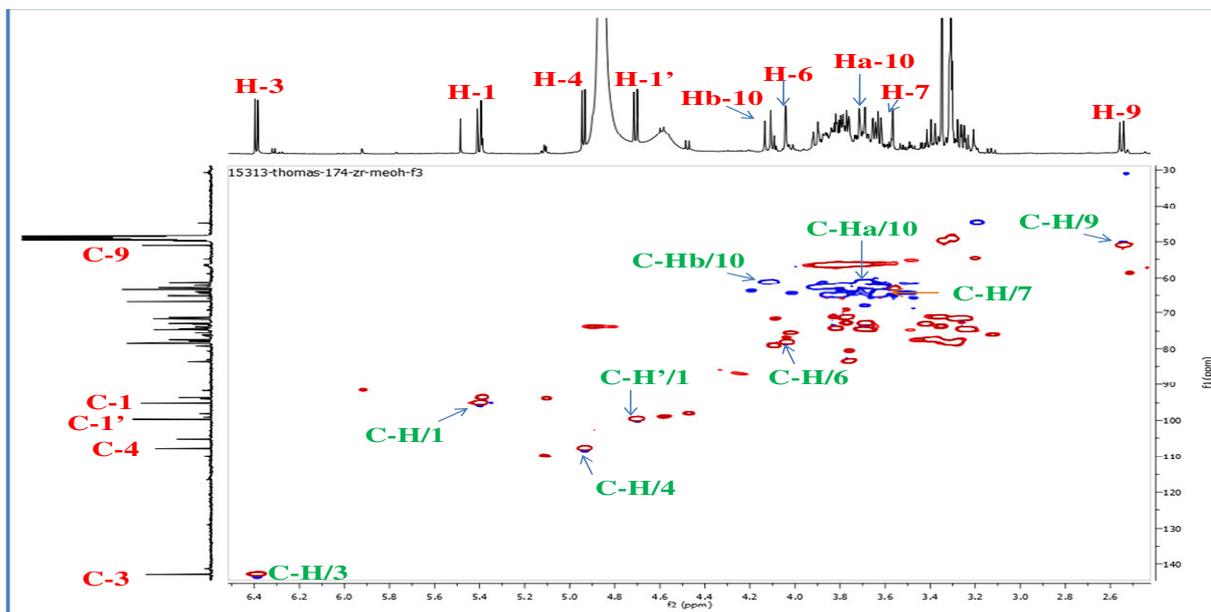


Figure 24. Spectre HSQC (MeOD, 400 MHz) du composé F3

L'analyse de l'expérience HMBC (figure 25) permet d'observer les couplages C-H à longue distance notamment le proton H-1' (4.70 ppm) et le carbone C-1 (95.11 ppm).

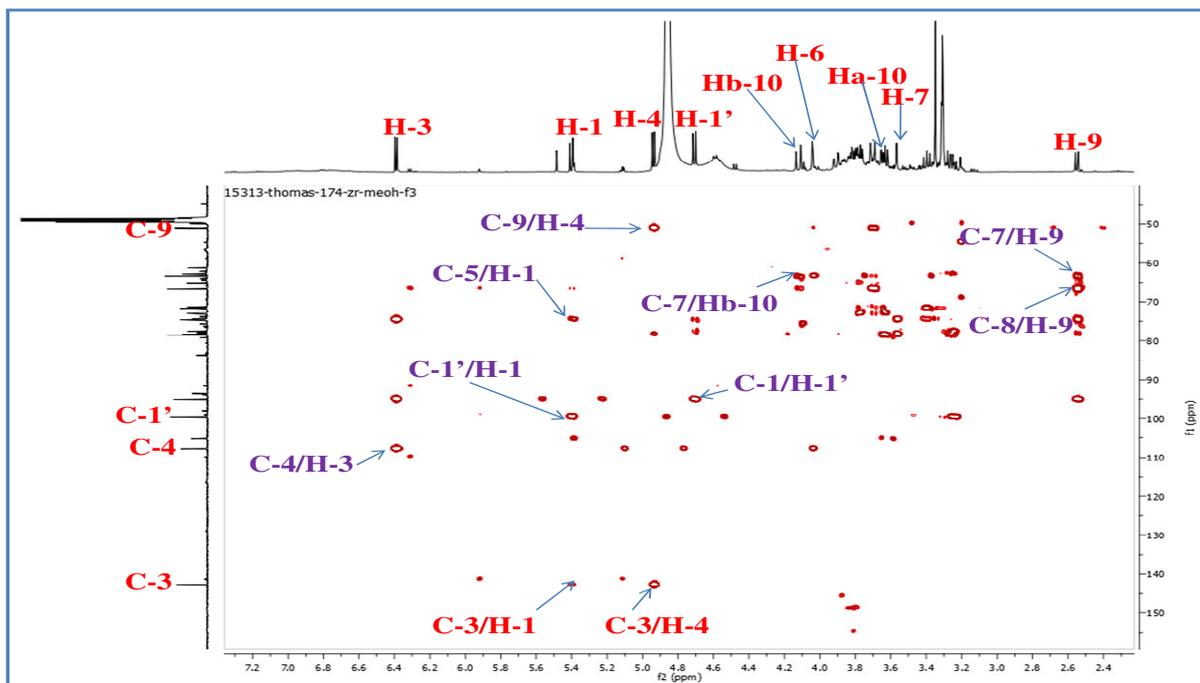


Figure 25. Spectre HMBC (MeOD, 400 MHz) du composé F3

Les données HMBC et HSQC permettent d'assigner les déplacements chimiques de tous les carbones (Figure 26 et tableau 5).

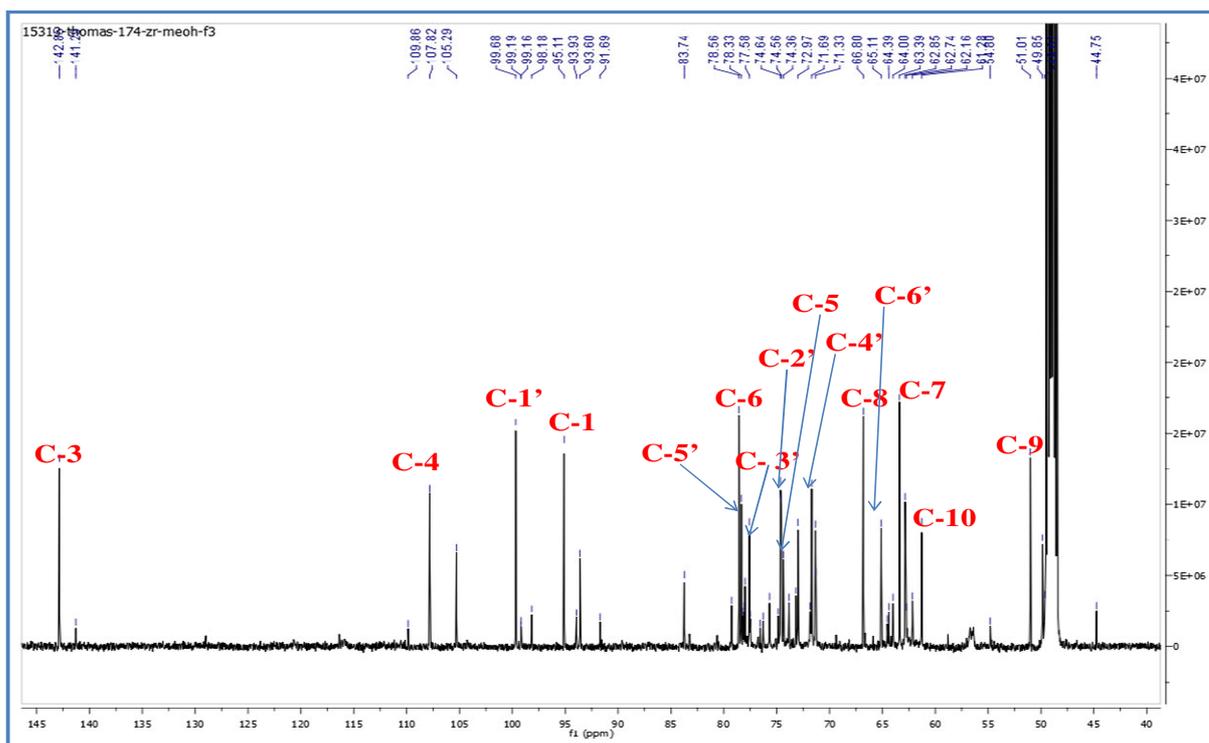
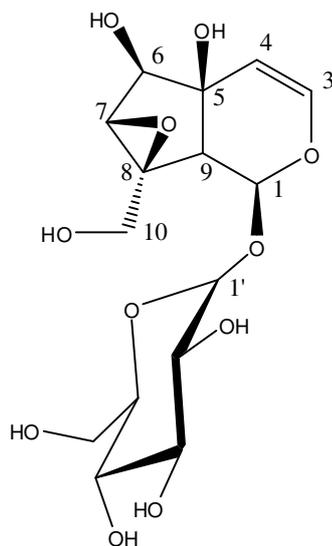


Figure 26. Spectre RMN ^{13}C (MeOD, 400 MHz) du composé F3

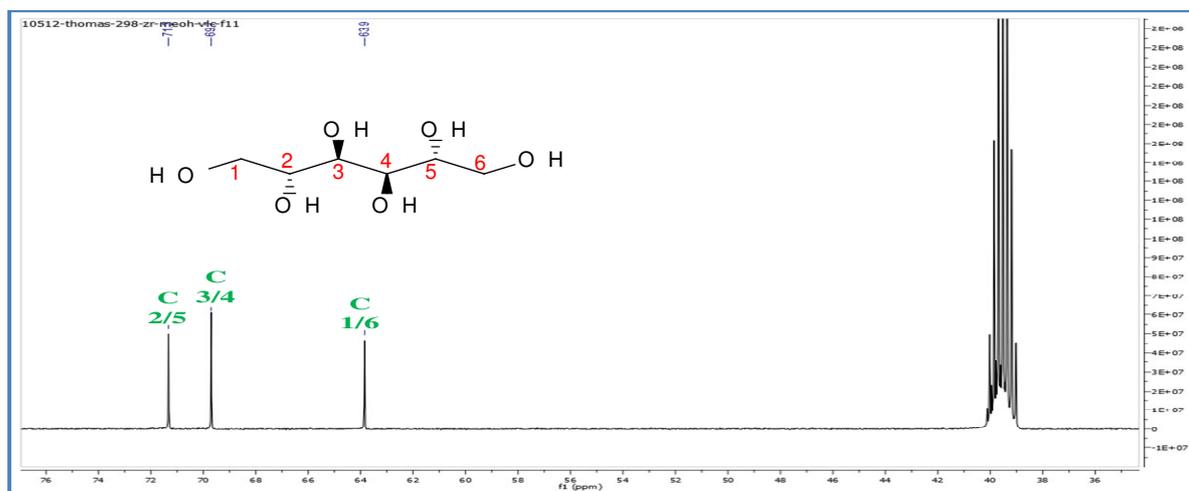
Tableau 5. Déplacements chimiques en RMN ^1H et ^{13}C du composé F3

N°	δC	δH (m, J Hz)	N°	δC	δH (m, J Hz)
1	95.11	5.40 (d, 8.2)	1'	99.68	4.70 (d, 7.8)
3	142.09	6.30 (d, 6.1)	2'	74.49	3.24 (t, 7.2)
4	107.82	4.94 (d, 6.2)	3'	77.43	3.40 (t, 8.2)
5	74.32	/	4'	71.59	3.26 (t, 7.9)
6	78.18	4.04 (d, 1.3)	5'	78.37	3.30
7	63.13	3.56 (d, 1.0)	6'	62.67	Ha- 3.64 (dd, 2.6 ; 12.4) Hb- 3.90 (dd, 2.0 ; 13.0)
8	66.65	/			
9	51.01	2.55 (d, 8.3)			
10	61.28	Ha- 3.70 (d, 13.0) Hb- 4.12 (d, 12.9)			

Toutes ces données permettent d'identifier sans ambiguïté le composé F3 comme étant :
5-hydroxycatalpol

**5-hydroxycatalpol****II.5. Elucidation structurale de produit F1**

Le spectre RMN ^{13}C (figure 27, tableau 6) montre trois signaux à 71.3, 69.7 et 63.9 ppm attribuables à des carbones oxygénés.

**Figure 27.** Spectre RMN ^{13}C (DMSO, 400 MHz) du composé F1**Tableau 6.** Déplacements chimiques en RMN ^{13}C (DMSO, 400 MHz) du composé F1

N° de carbone	δ_{C} (ppm)
2, 5	71.3
3, 4	69.7
1, 6	63.9

Le spectre HSQC (figure 28) permet d'observer les corrélations entre :

- Le carbone résonnant à 63.9 ppm et les protons résonnants à 3.61 ppm et 3.38 ppm ce qui indique un carbone oxyméthylène.
- Le carbone résonnant à 69.7 ppm et le proton à 3.55 ppm.
- Le carbone résonnant à 71.3 ppm et le proton à 3.45 ppm.

Les autres signaux des protons ne montrent pas des taches de corrélations, on en déduit que ce sont des signaux de protons de groupement OH couplés à des protons vicinaux.

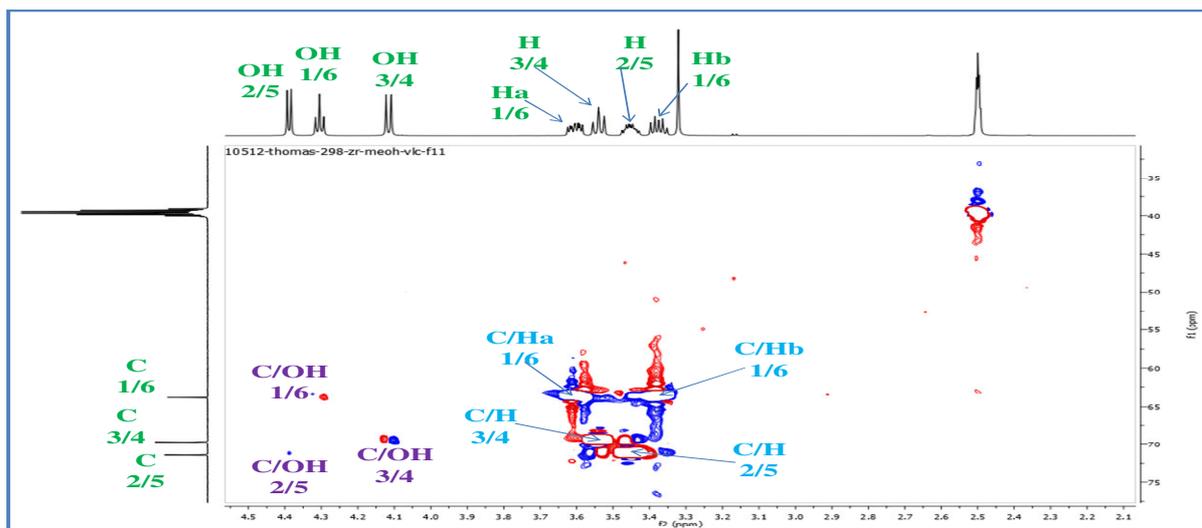


Figure 28. Spectre HSQC (DMSO, 400 MHz) du composé F1

Les spectres RMN ^1H (figure 29, tableau 9) et COSY (figure 30) confirment la corrélation H-H entre les deux protons géminés d'un oxyméthylène et le proton du groupement OH qui apparaît sous forme d'un triplet à 4.31 ppm (t, 5.7 Hz) et un autre proton résonnant à 3.45 ppm qui apparaît sous forme d'un multiplet. Ce dernier est lui-même corrélié à un proton d'un deuxième groupement OH résonnant à 4.39 ppm et un proton vicinal, résonnant à 3.54 ppm sous forme d'un triplet car il est à son tour couplé à un proton d'un troisième groupement OH. Les différentes corrélations COSY permettent de proposer le fragment ci-dessous (figure 31).

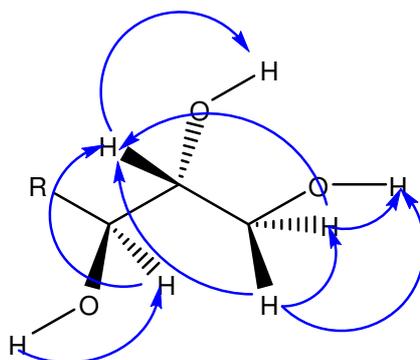


Figure 31. Corrélation COSY H-H du composé F1

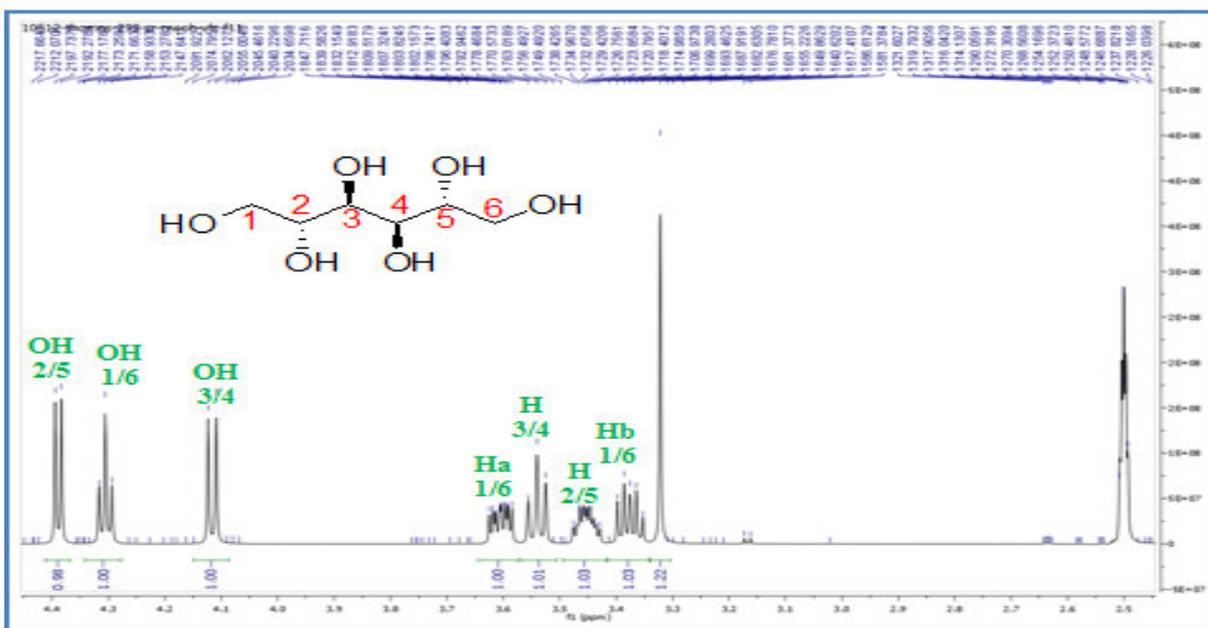


Figure 29. Spectre RMN ¹H (DMSO, 400 MHz) du composé F1

Tableau 7. Déplacements chimiques en RMN 1H (DMSO, 400 MHz) du composé F1

N°	δH (ppm)	Intégration	m, J (Hz)
OH/2,5	4.39	2H	d, 5.4
OH/1,6	4.31	2H	t, 5.7
OH/3,4	4.12	2H	d, 7.1
Ha/1,6	3.61	2H	m, /
H/3,4	3.54	2H	t, 7.9
H/2,5	3.45	2H	m, /
Hb/1,6	3.38	2H	dt, 5.9 ; 10.8

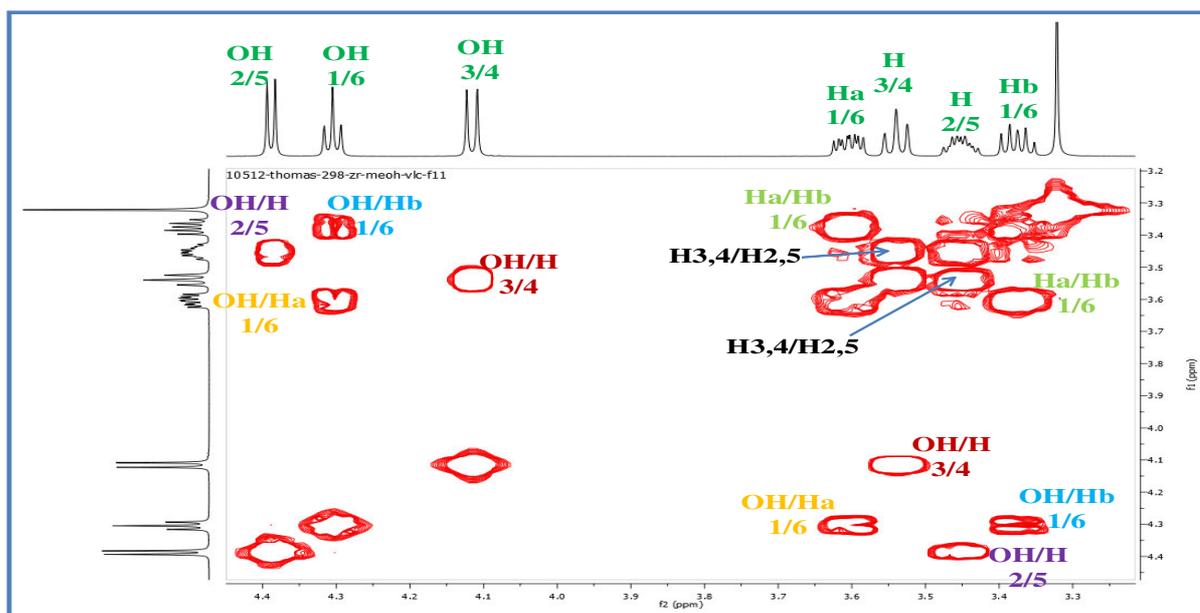


Figure 30. Spectre COSY (DMSO, 400 MHz) du composé F1

L'absence d'autres signaux dans les spectres RMN ^1H et RMN ^{13}C et la multiplicité du proton résonnant à 3.54 ppm révèlent la présence d'un fragment symétrique à celui élucidé (figure 31).

L'analyse du spectre HMBC (figure 32) montre les corrélations suivantes :

- Les protons de l'hydroxyle en positions 1 et 6 et les carbones en positions 2 et 5.
- Les protons de l'hydroxyle en positions 3 et 4 et les carbones en positions 2 et 5.
- Les protons en positions 1 et 6 et les carbones en positions 2 et 5.

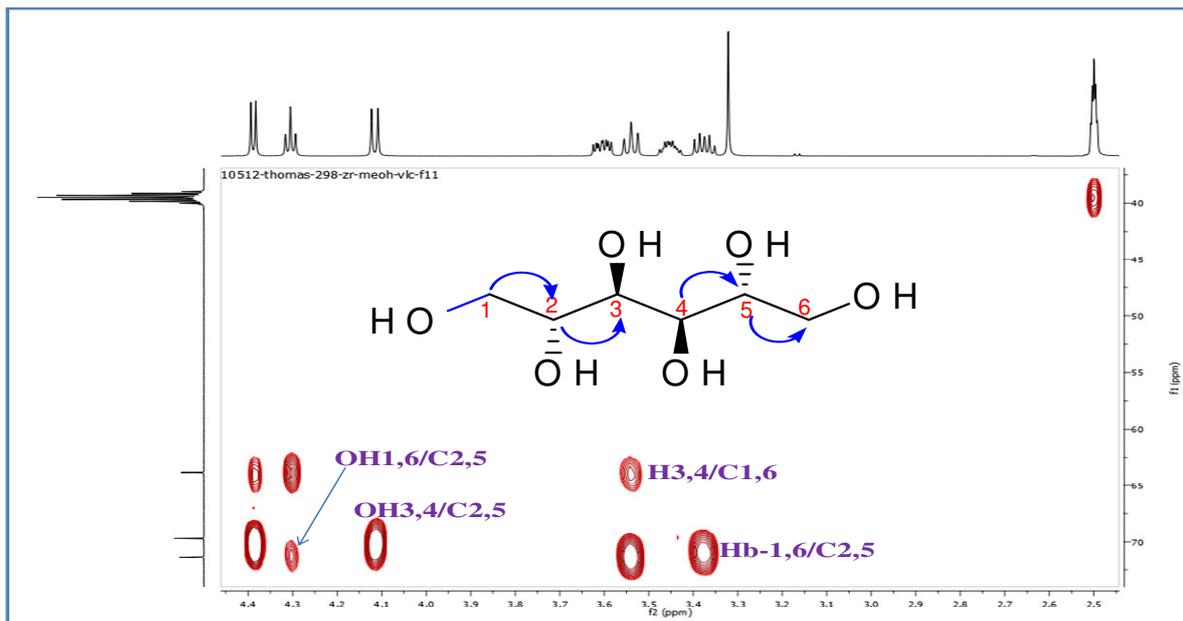
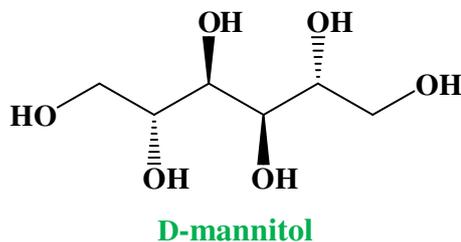


Figure 32. Spectre HMBC (DMSO, 400 MHz) du composé F1

Il se confirme, à l'issue de cette analyse spectrale que le composé F1 est un hexane 1, 2, 3, 4, 5, 6 hexaol. La similitude des données spectrales de F1 avec ceux du D-mannitol de la littérature (Branco *et al.*, 2010) nous a permis de suggérer la structure suivante :



Chapitre III

*Analyse comparative de la composition d'huiles essentielles des espèces *Inula graveolens* et *Inula viscosa**

I. *Inula graveolens*

L'hydrodistillation de 200g des parties aériennes fraîches d'*Inula graveolens* récoltée à Constantine en quatrième semaine d'Octobre 2011 donne une huile essentielle jaune avec un rendement de 1.2% (poids/poids).

I.1. Résultats et discussion de l'analyse GC/MS

30 composants, représentant 89.9% de l'huile essentielle d'*Inula graveolens* (L.) Desf. ont été identifiés et listés selon l'ordre de leur indice de rétention (Tableau 1).

Les principaux composants de cette huile sont (Figure 1) : l'acétate d'isobornyle (50,8%), le bornéol (18,3%) et le τ -cadinol (6.2%).

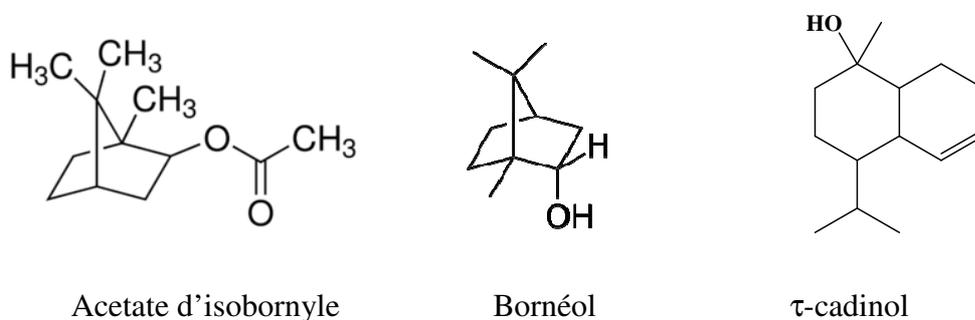


Figure 1. Structures des composés majoritaires de l'huile essentielle d'*Inula graveolens* (L.) Desf.

C'est la première fois que l'acétate d'isobornyle se trouve en tant que composant majoritaire d'une huile essentielle d'*Inula graveolens*.

Le bornéol (7,6%) ainsi que le τ -cadinol (7.8%) ont été signalés comme principaux composants de l'huile essentielle d'*I. graveolens* de la Corse (Blanc *et al.*, 2004), également représentée principalement par l'acétate de bornyle (56,8%).

L'acétate de bornyle se trouve aussi comme produit majoritaire dans la plante Libanaise (70.6%-72.3%) (Ghosn *et al.*, 2006) et Marocaine (63.9%) (Lamiri *et al.*, 2001).

Le selin-11-en-4- α -ol est un produit majoritaire (14.1%) caractérise la plante de Sardaigne (Adams, 2004). Alors que le bornéol est le produit majoritaire de la plante Iranienne (60.7%) (Mirza et Ahmadi, 2000) et Turque (64.0%) (Karamenderes et Zeybek, 2000).

Par conséquent, les compositions des huiles essentielles d'*I. graveolens* (L.) Desf. récoltées en Maroc, Iran, Turquie, Corse, Sardaigne et Liban étaient tout à fait différentes de la présente huile.

Tableau 1. Composition de l'huile essentielle des parties aériennes fraîches d'*Inula graveolens* (L.) Desf.

No	Composé ^a	IR ^b	Pourcentage ^c
1	Camphene	954	4.2
2	β -Pinene	979	0.1
3	1,8- Dehydrocineole	991	1.5
4	Limonène	1029	0.1
5	1,8-Cinéole	1031	0.9
6	3-Nonanone	1090	0.1
7	8-(1-Methylethylidene)bicyclo [5.1.0] octane	1099	0.1
8	<i>trans</i> -Thujone	1114	0.1
9	<i>Exo</i> - Fenchol	1122	0.1
10	Chrysanthenone	1128	1.0
11	<i>p</i> -Mentha-1,5-dien-8-ol	1138	0.9
12	<i>trans</i> -Pinocarveol	1139	0.1
13	<i>p</i> -Menth-2-en-1-ol	1141	0.2
14	Camphre	1146	1.5
15	Camphene hydrate	1150	0.1
16	Borneol	1169	18.3
17	Terpinen-4-ol	1177	0.1
18	<i>p</i> -Cymen-9-ol	1205	0.1
19	Thymol methyl ether	1235	0.1
20	Acétate d'isobornyle	1283	50.8
21	<i>trans</i> -caryophyllene	1419	0.6
22	Aromadendrene	1441	0.4
23	4,5-di-epi-Aristolochene	1471	0.1
24	Germacrene-D	1485	0.1
25	δ -Cadinene	1523	1.2

26	Oxyde de caryophyllène	1582	0.7
27	Caryophylla-4(12), 8(13)-dien-5 α -ol	1639	0.1
28	τ -Cadinol	1640	6.2
29	1,1,4,7-Tetraméthyl-1H- Cycloprop[e]azulene, 1a,2,3,4,4a,5,6, 7b -octahydro-	1651	0.1
30	<i>neo</i> -Intermedeol	1658	0.1
Total			89.9

^a Composés listés dans l'ordre de leur IR

^b IR (indice de rétention) calculé par rapport à n-alcanes (C6-C24) en utilisant une colonne VF-5MS

^c % Pourcentage relatif obtenu à partir de la surface du pic

Conclusion

L'huile essentielle obtenue par hydrodistillation des parties aériennes fraîches d'*Inula graveolens* (L.) Desf. récoltée à Constantine en Octobre 2011 (Rd = 1.2 %) est principalement composée d'acétate d'isobornyle (50.8 %), de bornéol (18,3%) et de τ -cadinol (6.2%). Cette composition est différente de celles rapportées pour les huiles essentielles de l'espèce récoltée au Maroc, Iran, Turquie, Corse, Sardaigne et Liban.

Nous notons que, la composition chimique peut être différente à cause du climat, période de récolte et nature du sol.

II. *Inula viscosa*

L'hydrodistillation de 200g des parties aériennes fraîches d'*I.viscosa* (L.) Ait., récoltée à Hamma Bouziane (Nord de Constantine) et à Ain El-Bey (Sud de Constantine) en première semaine de Novembre 2011 a abouti à 0.8 et à 0.1% (p / p) respectivement, d'huiles essentielles de couleur jaune.

II.1. Résultats et discussion de l'analyse GC/MS

L'huile essentielle des parties aériennes fraîches d'*I. viscosa* (L.) Ait. récoltée à Ain El-Bey (Sud de Constantine), a été obtenue avec un rendement de 10% elle se caractérise par 34 composés, ce qui représente 85,2% de l'huile essentielle (Tableau 2), avec le nérolidol (25,3%), l'acide isocostique (10,1%), l'acide costique (8,0%), le néo-intermedeol (6,4%) et l'oxyde de caryophyllène (5,5%) comme principaux composants (Figure 2).

L'hydrodistillation des parties aériennes fraîches d'*I. viscosa* (L.) Ait. récoltée à Hamma Bouziane (Nord de Constantine) a donné 8% d'une huile essentielle jaunâtre. 23 composants représentant 84,5% de l'huile essentielle ont été identifiés et listés dans le tableau 2 qui montre le pourcentage de composition de cette huile principalement caractérisée par l'acide isocostique (25,1%), l'acide costique (15,2%), le nérolidol (9,6%), l'acide linoléique (9,1%), le néo-intermedeol (7,5%) et le fokienol (7,2 %) (Figure 2).

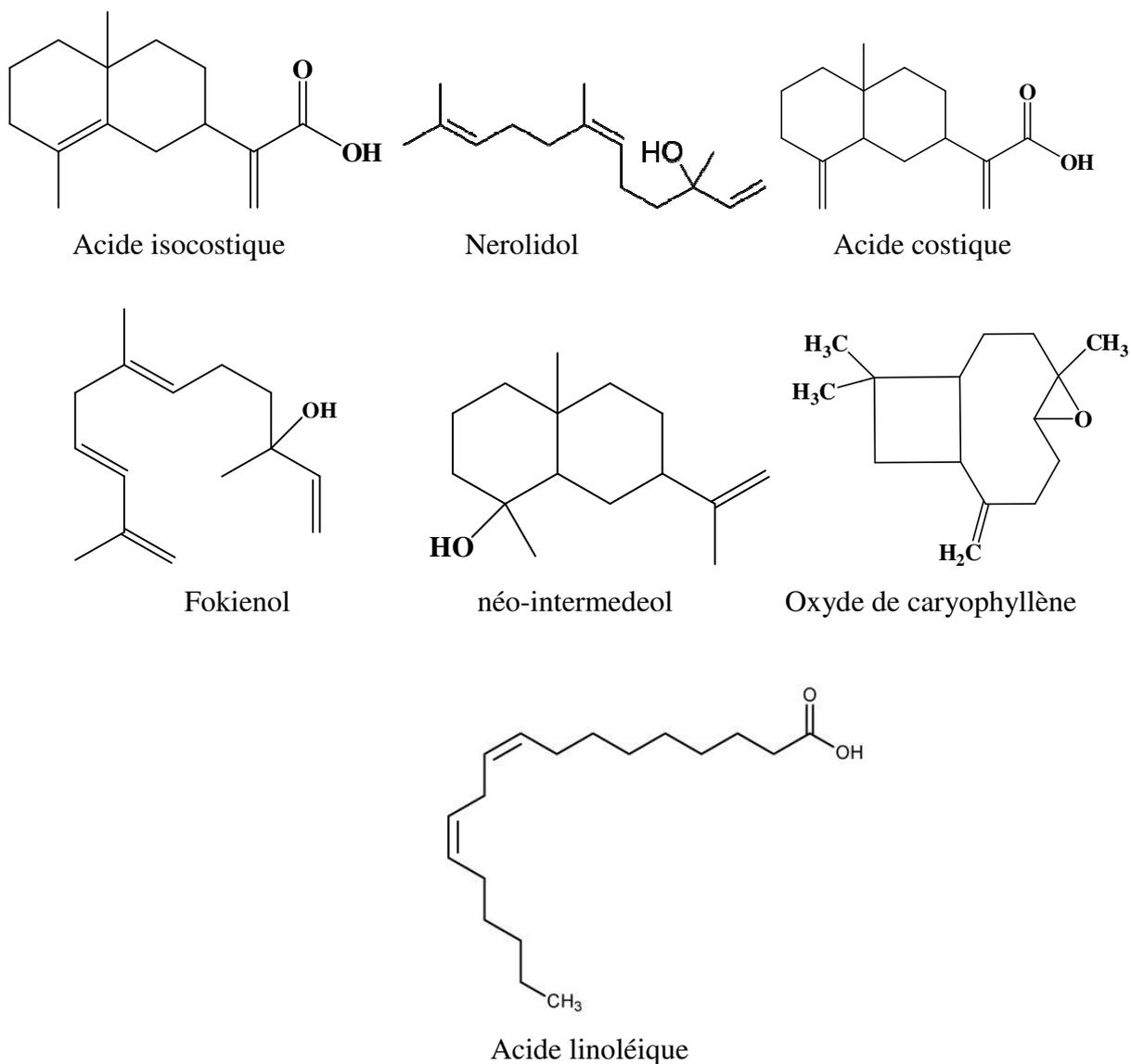


Figure 2. Structures des composés majoritaires de l'huile essentielle d'*Inula viscosa*

Tableau 2. Composition des l'huiles essentielles des parties aérienne fraiche d'*I. viscosa* (L.) Ait.

N ^o	composé ^a	IR ^b	Pourcentage (%) ^c	Pourcentage (%) ^d
1	2-Methylpentanene-2-thiol	862	1.5	-
2	α -Terpinene	913	0.1	-
3	Fenchol	1122	0.1	-
4	Isomenthone	1159	0.3	-
5	Borneol	1180	1.6	-
6	Dihydroedulane II	1284	0.1	-
7	Dihydroedulane I	1286	0.9	-
8	Acétate de bornyle	1289	0.9	-
9	Theaspirane B	1302	0.1	-
10	α -Ionone	1408	0.5	-
11	Isocaryophyllene	1421	-	0.1
12	Aromadendrene	1441	0.4	-
13	Cabreuva oxide B	1466	0.1	-
14	β -Selinene	1489	-	0.1
15	α -Selinene	1498	0.4	-
16	γ -Cadinene	1514	-	0.1
17	δ -Cadinene	1523	-	0.1
18	Nerolidol	1531	25.3	9.6
19	Selena-3,7(11)-diene	1540	-	0.1
20	<i>cis</i> -Dracunculifoliol	1541	-	0.9
21	Spathulenol	1578	0.2	-
22	β -Humulene	1579	-	2.2
23	Oxyde de caryophyllene	1583	5.5	0.1
24	α -Copaen-11-ol	1588	0.6	-
25	Viridiflorol	1590	0.2	-
26	Fokienol	1596	4.4	7.2
27	Humulene epoxide II	1604	0.3	0.4
28	<i>trans</i> -Longipinocarveol	1618	-	0.1
29	Epiglobulol	1629	0.1	-

30	τ -Cadinol	1640	-	0.1
31	Oxyde d'alloaromadendrene	1641	0.2	-
32	Cubenol	1647	1.0	-
33	α -Eudesmol	1654	-	0.9
34	<i>neo</i> -Intermedeol	1658	6.4	7.5
35	Davanol acetate	1689	2.0	-
36	<i>cis</i> -Lanceol	1760	-	0.4
37	6,10,14-Trimethyl pentadecan-2-one	1846	1.1	-
38	Acide isocostique	1925	10.1	25.1
39	Acide costique	1930	8.0	15.2
40	Acide linoléique	2105	3.1	9.1
41	Acide 9-hexadecenoïque	2144	1.8	-
42	Tricosane	2300	1.1	1.0
43	Tetracosane	2400	2.2	1.9
43	Pentacosane	2500	2.1	0.4
44	Hexacosane	2600	2.3	1.9
Composés identifiés		Total	85.2	84.5

^a Composés listés par ordre de leur IR

^b IR (indice de rétention) calculée par rapport à n-alcanes (C6-C24) en utilisant une colonne VF-5MS

^c Huile essentielle de parties aériennes fraîches d'*I. viscosa* récoltée à Ain El-Bey (Sud de Constantine)

^d Huile essentielle de parties aériennes fraîches d'*I. viscosa* récoltée à Hamma Bouziane (Nord de Constantine)

A partir de ces analyses, il est apparu que le nérolidol était plus abondant dans l'huile essentielle de la plante récoltée à Ain El-Bey (Sud de Constantine), tandis que l'acide costique, l'acide isocostique, l'acide linoléique, le néo-intermedeol et le fokienol ont été trouvés avec des pourcentages plus élevés dans l'huile essentielle de la plante récoltée à Hamma Bouziane (Nord de Constantine). L'oxyde de caryophyllène a été trouvé comme un composant principal dans l'huile essentielle de la plante de Ain El-Bey.

C'est la première fois que les acides isocostique et costique se trouvent être de principaux composants d'huile essentielle du genre *Inula*.

Ces acides sesquiterpéniques ont été isolés à partir de l'extrait hydroalcoolique des parties aériennes séchées d'*I. viscosa* (L.) Ait. récoltée en Turquie (Ulubelen *et al.*, 1986).

Le fokienol (38,3 ; 21.1%) et le nérolidol (7,7 ; 8.6%) ont également été détectés dans les huiles essentielles d'*I. viscosa* (L.) Ait. poussant en Espagne (Camacho *et al.*, 2000) et en France (Blanc *et al.*, 2006) respectivement.

Les présentes compositions sont différentes de celles signalées dans les huiles essentielles des feuilles de l'espèce algérienne *I. viscosa*, récoltée au village de Sidi Rezine (sud d'Alger), extraite par deux méthodes (hydrodistillation et distillation à la vapeur) qui étaient principalement représentées par le 12-carboxyeudesma-3,11(13)-diène (28,9 et 56,8%, respectivement) (Haoui *et al.*, 2012). L'huile hydrodistillée qui provienne de Sidi Rezine a également été caractérisée par la présence principale de l'acide linoléique (7,8%), composant principal de notre huile essentielle d'*I. viscosa* récoltée à Hamma Bouziane (9,1%).

Conclusion

L'huile essentielle des parties aériennes fraîches d'*I. viscosa* (L.) Ait., récoltée à Ain El-Bey (Sud de Constantine), est caractérisée par la présence du nérolidol (25,3%), de l'acide isocostique (10,1%), de l'acide costique (8,0%), du néo-intermedeol (6,4%) et de l'oxyde de caryophyllène (5,5%), en tant que composants principaux, alors que l'huile essentielle des parties aériennes fraîches d'*I. viscosa* (L.) Ait., récoltée à Hamma Bouziane (Nord de Constantine), est principalement représentée par l'acide isocostique (25,1%), l'acide costique (15,2%), le nérolidol (9,6 %), l'acide linoléique (9,1%), le néo-intermedeol (7,5%) et le fokienol (7,2%).

D'après cette étude, les acides isocostique et costique et le néo-intermedeol semblent être exclusifs aux présentes huiles essentielles de la plante qui pousse dans le nord et le sud de Constantine. L'oxyde de caryophyllène a été trouvé exclusivement comme un composant principal de la plante récoltée à Ain El-Bey (Sud de Constantine). Ces différences peuvent être expliquées par la différence du sol, du climat et de la période de récolte par rapport aux conditions de collecte de plante rapportées.

Chapitre IV

*Activités antioxydante,
anticholinestérase et
antibactérienne*

I. Activité antioxydante

L'activité antioxydante des extraits d'éther de pétrole (PEBR et PEZM), de dichlorométhane ou de chloroforme (DEBR et CEZM), d'acétate d'éthyle (EEBR et EEZM) et de *n*-butanol (BEBR et BEZM) des espèces *Biscutella raphanifolia* et *Zilla macroptera* a été testée par quatre méthodes : radical libre DPPH[•], ABTS^{•+}, Métal chélation et CUPRAC.

I.1. Activité antiradicalaire DPPH

I.1.1. Cas de *Biscutella raphanifolia*

Les résultats obtenus dans ce test, nous permettent de tracer une courbe de variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration (figure 1).

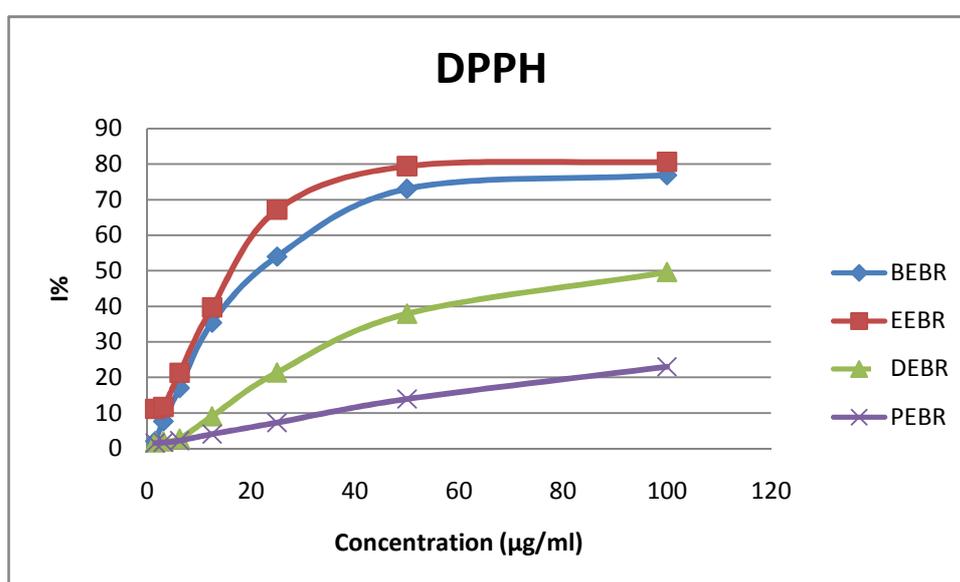


Figure 1. Courbe représentant l'activité antiradicalaire DPPH des extraits de *Biscutella raphanifolia* Poiret.

Les valeurs de CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$) calculé à partir des courbes de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration sont représentées dans le tableau 1.

Tableau 1. Pouvoir d'inhibition CI_{50} des extraits de *Biscutella raphanifolia* et des standards

		CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Extraits	BEBR	18.80±0.33
	EEBR	15.76±0.83
	DEBR	63.94±0.63
	PEBR	184.16±1.60
Standards	BHA	45.37±0.47
	α -tocophérol	7.31±0.17

L'extrait EEER a montré le pourcentage d'inhibition le plus élevé par rapport aux autres extraits, par contre l'extrait PEER a montré le pourcentage d'inhibition le plus bas, ceci peut être dû à la richesse de l'EEER en polyphénols et flavonoïdes.

À des fins comparatives deux antioxydants standards sont utilisés, le BHA et le α -tocophérol. Leur activité antiradicalaire est très puissante, les CI_{50} sont respectivement égales à $45.37 \pm 0.47 \mu\text{g/ml}$ et $7.31 \pm 0.17 \mu\text{g/ml}$.

L'activité antiradicalaire manifestée par l'extrait EEER, avec une CI_{50} de $15.76 \pm 0.83 \mu\text{g/ml}$, est trois fois plus grande que celle du BHA et deux fois moins grande que celle de l' α -tocophérol.

En comparaison avec les antioxydants standards, l'extrait BEER, avec une $CI_{50} = 18.80 \pm 0.33 \mu\text{g/ml}$, est deux à trois fois plus actif que le BHA et moins actif que l' α -tocophérol.

Selon les résultats obtenus de l'activité antioxydante, par cette méthode et par comparaison avec les produits de référence, les extraits sont classés par ordre d'efficacité :

α -tocophérol > EEER > BEER > BHA > DEER > PEER.

I.1.2. Cas de *Zilla macroptera*

Les résultats de l'activité antiradicalaire DPPH de différentes concentrations des extraits consignés en pourcentages d'inhibition nous permettent de déterminer les CI_{50} des extraits pour comparer leurs activités par rapport aux molécules de référence (figure 2).

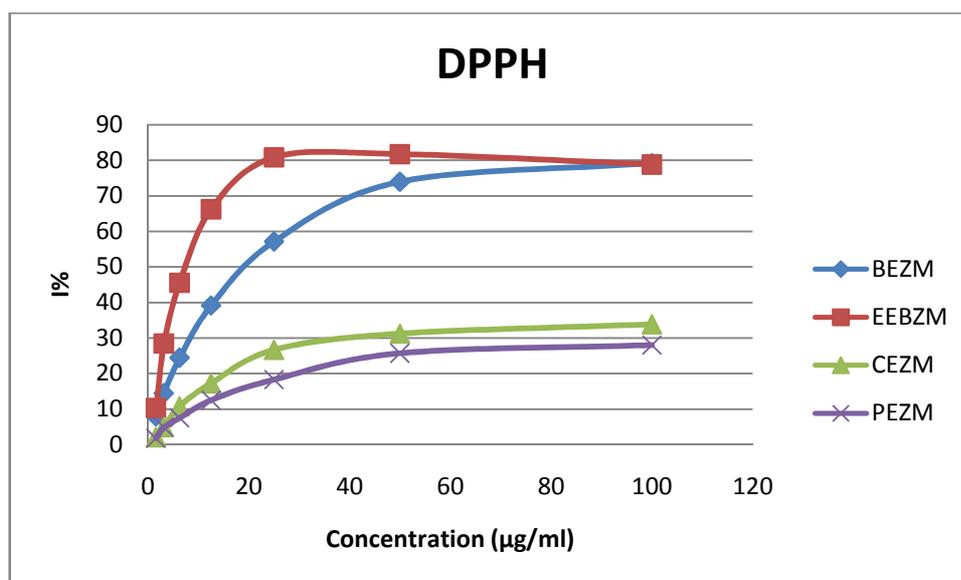


Figure 2. Courbe représentant l'activité antiradicalaire DPPH des extraits de *Zilla macroptera*

A partir de la précédente courbe nous avons calculé les CI_{50} pour faire une comparaison entre nos extraits et les standards (tableau 2).

Tableau 2. Pouvoir d'inhibition CI_{50} des extraits de *Zilla macroptera*

		CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Extraits	BEZM	47.80 \pm 0.42
	EEZM	15.69 \pm 0.72
	CEZM	176.12 \pm 0.71
	PEZM	205.09 \pm 2.15

D'après les résultats de cette activité, On remarque que l'extrait EEZM a montré le pourcentage d'inhibition le plus élevé, suivi par l'extrait BEZM, puis l'extrait CEZM et enfin l'extrait PEZM avec le pourcentage d'inhibition le plus bas.

L'activité antiradicalaire manifestée par EEZM avec une valeur de $CI_{50} = 15.69 \pm 0.72 \mu\text{g/ml}$ est trois fois plus grande que celle du BHA et deux fois moins grande que celle de l' α -tocophérol.

Ainsi, en comparaison avec les antioxydants standards, l'extrait BEZM a une valeur de $CI_{50} = 47.80 \pm 0.42 \mu\text{g/ml}$ très proche de la valeur du BHA.

L'activité antiradicalaire des extraits présente des valeurs de CI_{50} importantes, dont EEZM et BEZM ont des CI_{50} inférieures ou très proches de celle du BHA.

On peut classer nos extraits selon leurs activités :

$$\alpha\text{-tocophérol} > \text{EEZM} > \text{BHA} > \text{BEZM} > \text{CEZM} > \text{PEZM}$$

I.2. Essai de décoloration de radical cation ABTS⁺

I.2.1. Cas de *Biscutella raphanifolia*

La figure 3 montre les courbes des pourcentages d'inhibition tracées en fonction de la concentration des extraits étudiés.

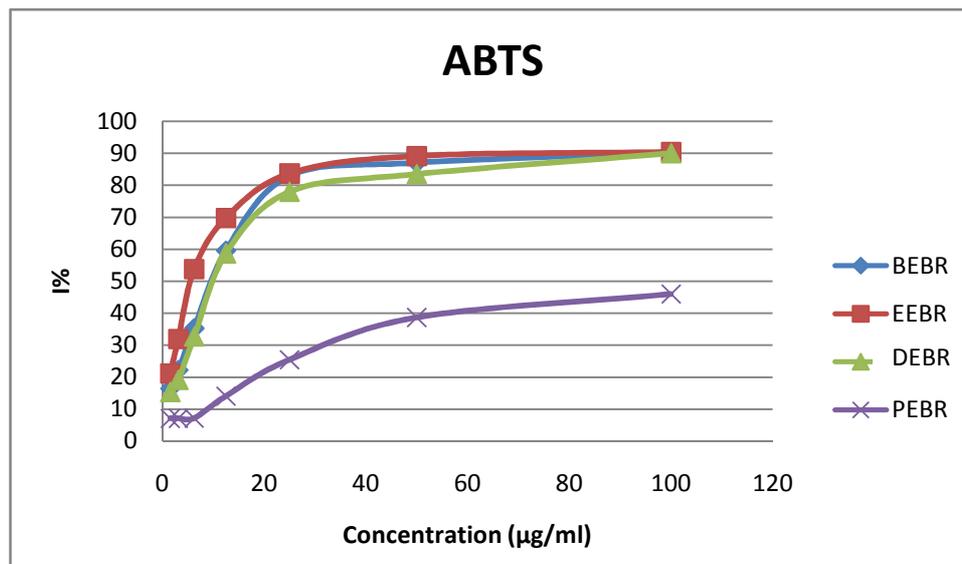


Figure 3. Courbe représentant l'activité antiradicalaire ABTS des extraits de *Biscutella raphanifolia*

Tous les extraits se sont avérés avoir une activité antioxydante par l'essai d'ABTS⁺ avec des pourcentages d'inhibition proches.

L'extrait EEBR est le plus actif, avec une $CI_{50} = 7.21 \pm 0.16 \mu\text{g/ml}$, suivi par l'extrait BEBR avec une $CI_{50} = 10.10 \pm 0.2 \mu\text{g/ml}$, et l'extrait DEBR ($CI_{50} = 10.24 \pm 0.32 \mu\text{g/ml}$) (tableau 3).

Tableau 3. Pouvoir d'inhibition CI_{50} des extraits de *Biscutella raphanifolia* et des standards

		CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Extraits	BEBR	10.10 ± 0.20
	EEBR	7.21 ± 0.16
	DEBR	10.24 ± 0.32
	PEBR	61.86 ± 1.55
Standards	BHA	4.10 ± 0.06
	α -tocophérol	4.31 ± 0.10

Les résultats de ce test montrent que les extraits testés ont une activité antioxydante, mais aucun d'entre eux n'a montré une meilleure activité que les standards BHA ($CI_{50} = 4.10 \pm 0.06 \mu\text{g/ml}$) et α -tocophérol ($CI_{50} = 4.31 \pm 0.10 \mu\text{g/ml}$).

L'extrait PEBR a la plus faible activité par rapport aux autres extraits. Ces résultats sont logiques car les polyphénols et les flavonoïdes sont plus abondants dans les extraits polaires.

Les résultats obtenus permettent de classer nos extraits selon leurs ordres d'efficacité :

$$\text{BHA} > \alpha\text{-tocophérol} > \text{EEBR} > \text{BEBR} > \text{DEBR} > \text{PEBR}.$$

I.2.1. Cas de *Zilla macroptera*

Les pourcentages d'inhibitions des extraits testés à différentes concentrations par la méthode d'ABTS⁺ nous ont permis de dessiner la courbe présentée dans la figure 4.

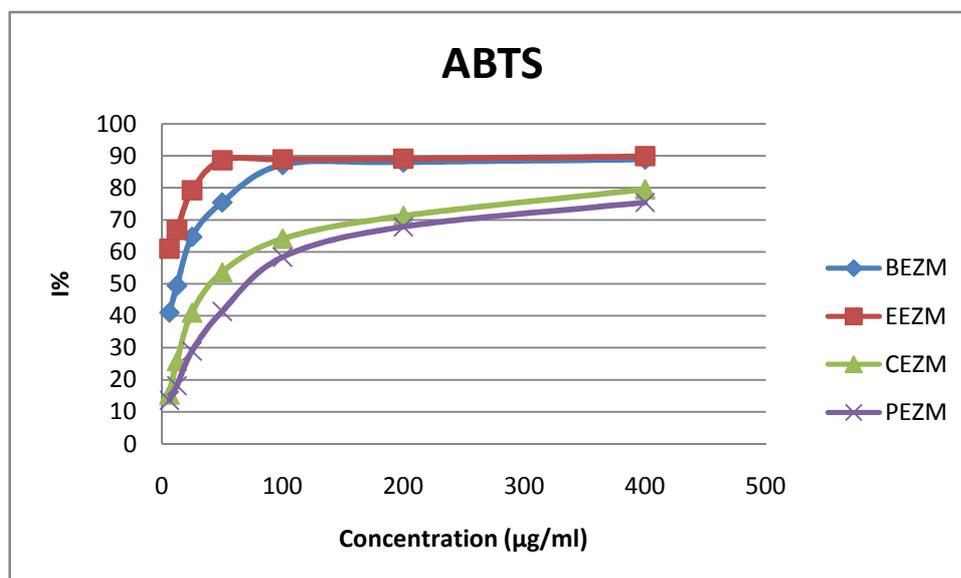


Figure 4. Courbe représentant l'activité antiradicalaire ABTS des extraits de *Zilla macroptera*

Tous les extraits de cette plante ont des pourcentages d'inhibition élevés, avérés avoir une activité antioxydante (Tableau 4).

Tableau 4. Pouvoir d'inhibition CI_{50} des extraits de *Zilla macroptera*

Extraits	CI_{50} (µg/ml)	
	Extrait	Valeur
Extraits	BEZM	11.15 ± 0.37
	EEZM	10.24 ± 0.25
	CEZM	59.09 ± 1.37
	PEZM	63.15 ± 1.62

Les deux extraits EEZM et BEZM ont montrés une meilleure activité antioxydante par rapport aux autres extraits, avec des CI_{50} de 10.24 ± 0.25 µg/ml et 11.15 ± 0.37 µg/ml respectivement, moins grande que celles des standards BHA ($CI_{50}=4.10 \pm 0.06$ µg/ml) et α -tocophérol ($CI_{50}=4.31 \pm 0.10$ µg/ml).

L'extrait PEZM possède une activité faible par rapport aux autres extraits.

Dans cette méthode le classement de nos extraits, selon leurs activités et par rapport aux molécules de référence est :

$$\text{BHA} > \alpha\text{-tocophérol} > \text{EEZM} > \text{BEZM} > \text{CEZM} > \text{PEZM}$$

I.3. La réduction cuprique (CUPRAC)

La capacité antioxydante (CUPRAC) est basée sur la mesure de l'absorbance à 450 nm par la formation d'un complexe stable entre la Neocuproïne et le cuivre (I), ce dernier est formé par la réduction du cuivre (II) en présence de Neocuproïne.

I.3.1. Cas de *Biscutella raphanifolia*

L'ensemble des valeurs d'absorbance obtenues est reporté dans la figure 5.

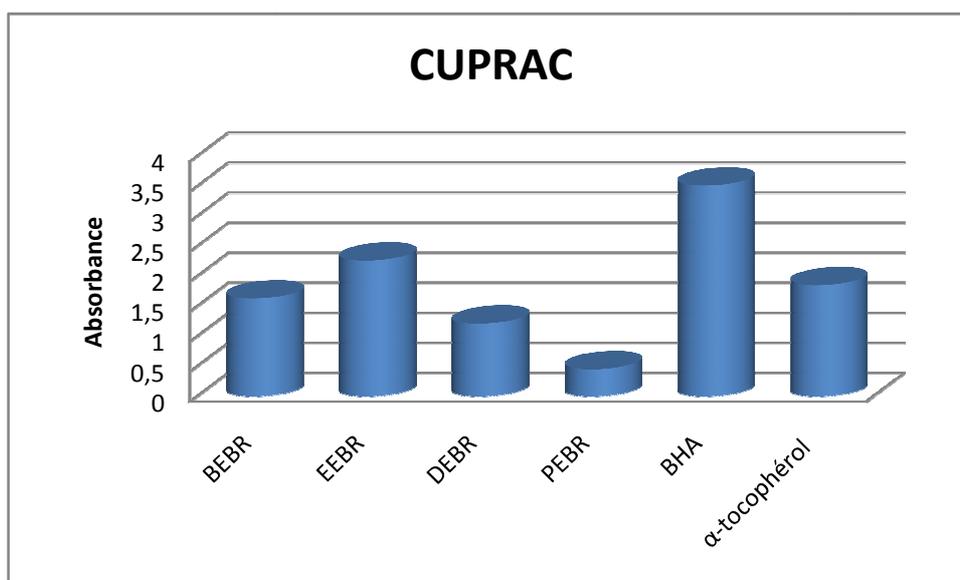


Figure 5. Activité de réduction cuprique des extraits de *Biscutella raphanifolia* mesurées (à 100 $\mu\text{g/ml}$) comparés avec les standards

Les résultats ont été comparés avec les standards BHA (3.51 ± 0.01) et α -tocophérol (1.85 ± 0.01) à 100 μg .

L'extrait EEBR a montré une activité plus grande que celle de l' α -tocophérol avec une absorbance de 2.26 ± 0.06 à 100 $\mu\text{g/ml}$ alors que les extraits DEBR et BEBR ont montré une activité antioxydante plus proche de celle de l' α -tocophérol et presque deux fois moins grande que le BHA.

L'extrait PEBR présente une valeur d'absorbance de 0.45 ± 0.02 c-à-d quatre fois moins actif que l' α -tocophérol.

En comparant les résultats de la réduction cuprique de nos extraits avec celles des standards, on constate qu'aucun extrait n'a montré une meilleure activité que le BHA.

Le classement des extraits par ordre d'efficacité est le suivant :

BHA > EEBR > α -tocopherol > BEBR > DEBR > PEBR.

I.3.2. Cas de *Zilla macroptera*

Les résultats de l'activité de réduction cuprique des extraits de *Zilla macroptera* ont été comparés aux standards BHA et l' α -tocophérol (figure 6). A $100 \mu\text{g/ml}$, le BHA donne une absorbance de 3.51 ± 0.01 , alors que l' α -tocophérol donne une absorbance de 1.85 ± 0.01 .

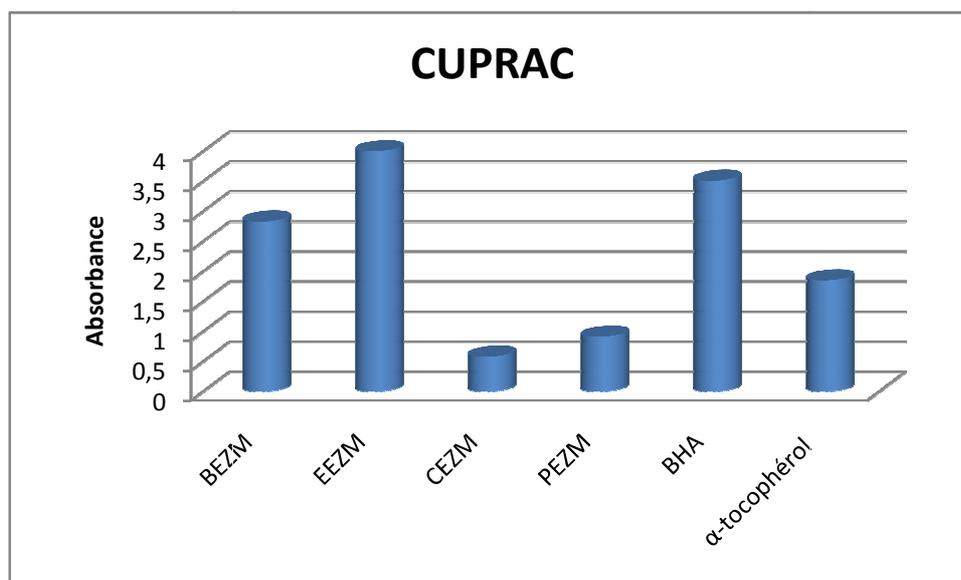


Figure 6. Activité de réduction cuprique des extraits de *Zilla macroptera* mesurées (à $100 \mu\text{g/ml}$) comparés avec les standards

L'extrait EEZM a montré une meilleure activité, il est plus actif que les deux molécules de référence avec une valeur d'absorbance de 4.00 ± 0.01 tandis que l'extrait BEZM a une valeur d'absorbance de 2.83 ± 0.05 , donc il est plus actif que l' α -tocophérol.

Les deux autres extraits (CEZM et PEZM) ont montré une activité antioxydante inférieure à celle des molécules de référence avec des valeurs d'absorbance de $0,91 \pm 0,07$ et $0,58 \pm 0,01$ respectivement.

Les activités peuvent être classées comme suit :

$$EEZM > BHA > BEZM > \alpha\text{-tocophérol} > CEZM > PEZM$$

I.4. Chélation des ions ferreux

I.4.1. Cas de *Biscutella raphanifolia*

Les résultats de l'activité de chélation des ions ferreux sont présentés dans la figure 7.

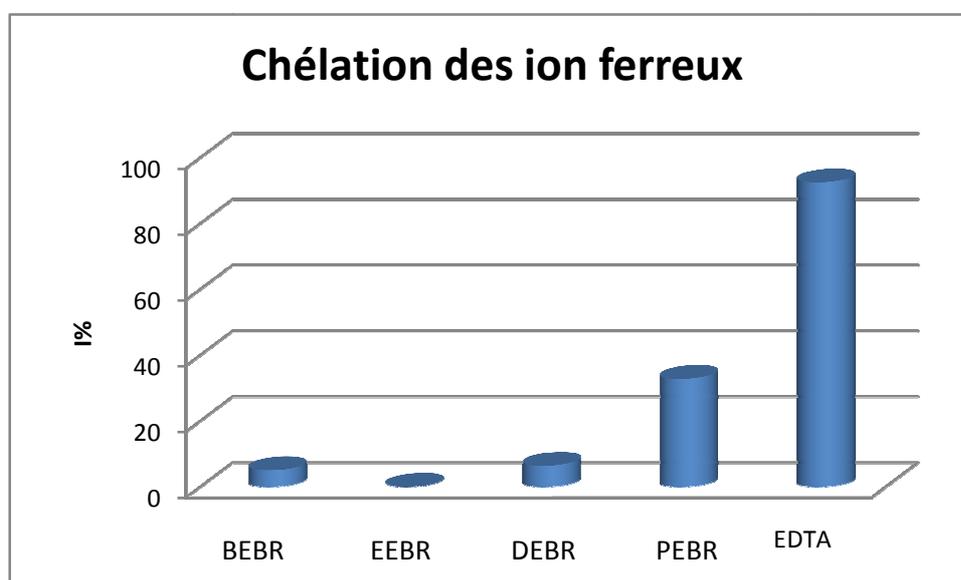


Figure 7. Activité de chélation des ions ferreux des extraits de *Biscutella raphanifolia* mesurées (à 100 µg/ml) et d'EDTA

On remarque que les extraits de BEBR et EEBR ne possèdent pas d'activité de chélation des métaux. Cependant, les deux autres extraits PEBR et DEBR semblent plus actifs.

Le standard utilisé dans ce test (EDTA) donne un pourcentage d'inhibition de $92.5 \pm 1.4\%$ à 100 µg/ml.

Ainsi, l'extrait BEBR est non actif jusqu'à 50 µg/ml, il a une faible activité à 100 µg/ml avec un pourcentage d'inhibition de $5.00 \pm 0.55\%$.

Comparativement aux autres méthodes d'activité antioxydante, on remarque que l'extrait PEBR est le plus actif dans cette méthode avec un pourcentage d'inhibition de $32.78 \pm 1.18 \%$ à $100 \mu\text{g/ml}$, mais trois fois moins actif que l'EDTA.

Par comparaison avec l'EDTA, on a classé les extraits par ordre d'efficacité :

$$\text{EDTA} > \text{PEBR} > \text{DEBR} > \text{BEBR} > \text{EEBR}.$$

I.4.2. Cas de *Zilla macroptera*

Les résultats de la méthode de chélation des ions ferreux des extraits testés sont représentés dans la figure 8.

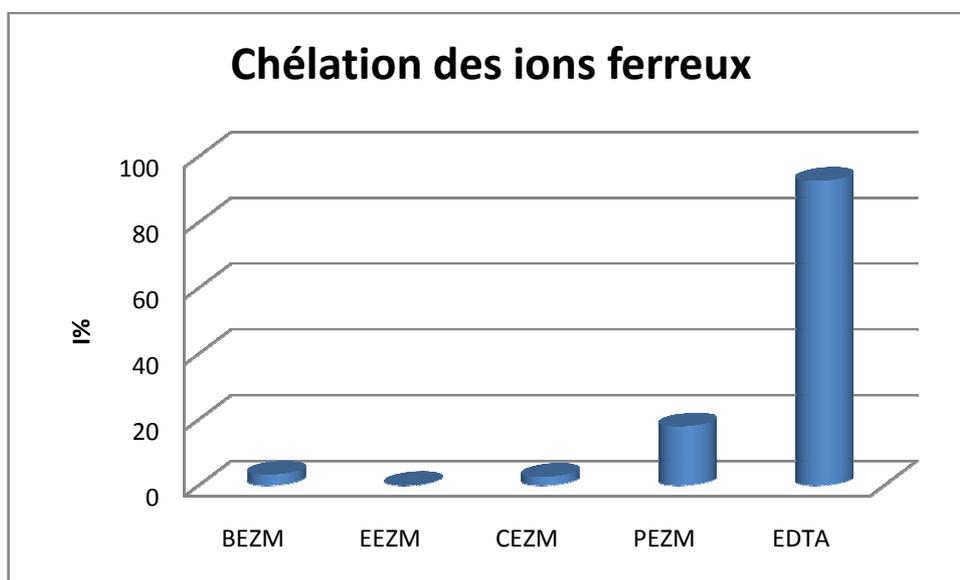


Figure 8. Activité de chélation des ions ferreux des extraits de *Zilla macroptera* (à $100 \mu\text{g/ml}$) comparés avec l'EDTA

Le standard EDTA donne un pourcentage d'inhibition de $92.5 \pm 1.4 \%$ à $100 \mu\text{g/ml}$.

On remarque que l'extrait EEZM ne possède pas d'activité de chélation des ions ferreux.

A une concentration inférieure à $50 \mu\text{g/ml}$, l'extrait BEZM n'a pas montré une activité de chélation des métaux, mais à des concentrations plus élevées cet extrait donne un pourcentage d'inhibition de $2,51 \pm 0,94 \%$, très moins actif que l'EDTA.

L'extrait le plus actif par rapport aux autres extraits est PEZM avec un pourcentage d'inhibition de $17,83 \pm 1,77 \%$, donc sept fois moins actif que la molécule de référence.

En comparant les résultats avec l'EDTA à 100 μ g, CEZM a une faible activité de chélation des ions ferreux avec un pourcentage d'inhibition de $3,19 \pm 0,96 \%$.

L'ordre d'efficacité des extraits étant comme suit :

PEZM > CEZM > BEZM > EEZM

Conclusion

L'étude de l'activité antioxydante de huit extraits de *Biscutella raphanifolia* Poiret et de *Zilla macroptera* (Cross.) Maire. montre que ces extraits sont plus ou moins actifs par rapport aux standards utilisés, selon les méthodes utilisés.

D'après les résultats obtenus, on a pu mettre en évidence une variabilité au niveau de la composition chimique de chaque extrait.

La variabilité de résultats est liée à la nature chimique des extraits et à la méthode utilisée.

Selon l'ordre de classement de l'activité des extraits étudiés par différentes méthodes, on peut affirmer que les extraits d'acétate d'éthyle sont les plus actifs, ce qui exprime son richesse en polyphénols.

L'EDTA est un bon chélateur des ions ferreux, cette activité due à sa richesse en centres ligands portant de paires d'électrons susceptible d'être mises en commun avec les atomes de fer pour former un complexe très stable EDTA-Fe.

L'ordre d'efficacité des extraits était le même dans trois méthodes (DPPH, ABTS⁺ et CUPRAC) (figure 9) d'où :

- Le classement des extraits de *Biscutella raphanifolia* et de *Zilla macroptera* est :

Acétate d'éthyle > *n*-butanol > chloroforme > éther de pétrole

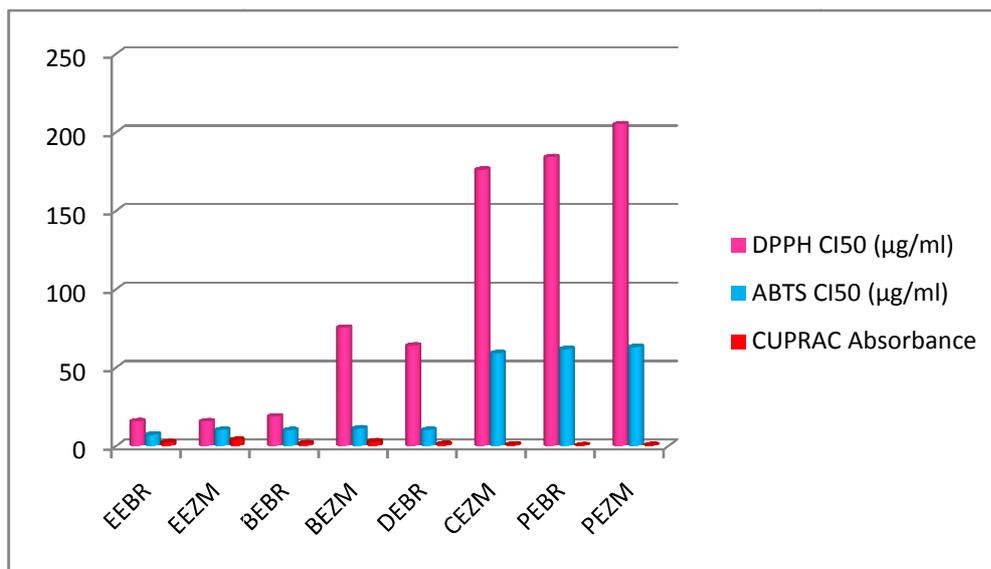


Figure 9. Classement des extraits par ordre croissant de l'activité antioxydante (DPPH, ABTS^{•+} et CUPRAC).

Cependant, ce classement s'est trouvé être différent par la méthode de chélation des ions ferreux (figure 10) car le mécanisme d'action est probablement différent.

Ether de pétrole > chloroforme > *n*-butanol > acétate d'éthyle

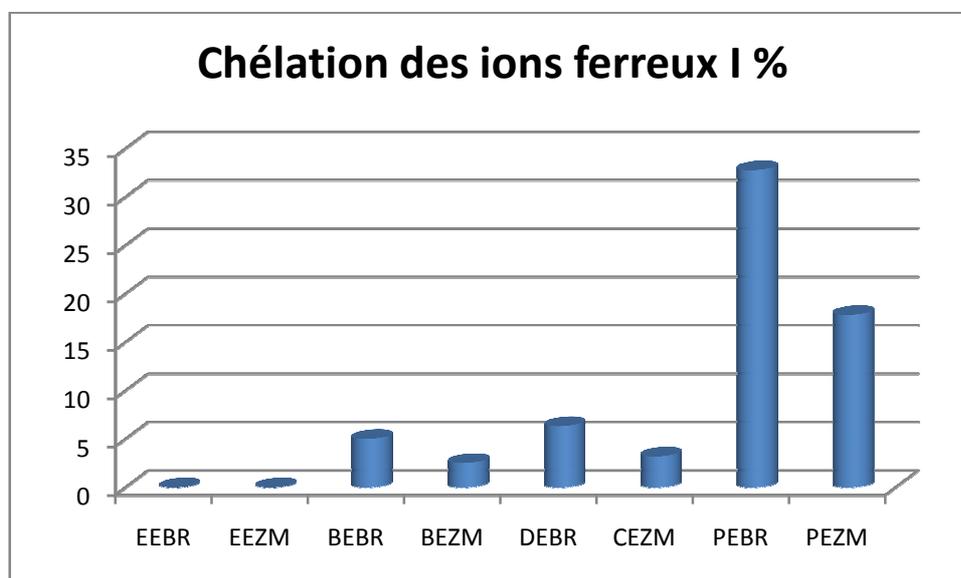


Figure 10. Classement des extraits par ordre croissant de l'activité antioxydante (Chélation des ions ferreux).

II. Activité anticholinestérase

L'activité anticholinestérase des huit extraits de *Biscutella raphanifolia* et de *Zilla macroptera* a été réalisée par l'utilisation de deux enzymes cholinestérase AChE et BChE.

II.1. Activité anticholinestérase de *Biscutella raphanifolia*

Les résultats de l'activité anticholinestérase des quatre extraits de *Biscutella raphanifolia* ont été regroupés dans les tableaux 13 et 14.

Tableau 13. Pourcentages d'inhibition de l'activité d'acétylcholinestérase des extraits de *Biscutella raphanifolia* Poiret

AChE				
Concentration (µg/ml)	25	50	100	200
BEBR	Na	na	Na	Na
EEBR	Na	na	Na	Na
DEBR	Na	na	6.04±1.30	8.10±1.26
PEBR	2.40±0.78	3.14±1.79	5.54±1.81	7.85±0.53
Galantamine^a	68.4±1.1	74.4±0.7	78.6±0.5	81.4±1.0

^a Composé de référence.
na Non actif.

Tableau 14. Pourcentages d'inhibition de l'activité de butyrylcholinestérase des extraits de *Biscutella raphanifolia* Poiret

BChE				
Concentration (µg/ml)	25	50	100	200
BEBR	Na	Na	Na	Na
EEBR	Na	Na	na	Na
DEBR	Na	Na	10.54±1.45	25.71±2.80
PEBR	Na	Na	1.19±0.42	7.91±1.50
Galantamine^a	40.6±2.9	48.7±0.9	65.0±0.4	75.5±1.1

^a Composé de référence.
na Non actif.

Les deux précédents tableaux montrent l'activité inhibitrice d'AChE et de BChE des extraits comparés à ceux de la galantamine utilisée comme un médicament pour le traitement de la maladie d'Alzheimer légère.

D'après les résultats d'activité réalisée contre les deux enzymes, il apparaît que les extraits de BEBR et EEBR ne possèdent pas d'activité anticholinestérase.

Par ailleurs, l'extrait PEBR a montré une faible activité anticholinestérase contre les deux enzymes utilisées avec des pourcentages d'inhibition dix fois inférieurs à ceux de la galantamine à une concentration de 200 µg/ml.

Néanmoins, l'extrait DEBR a été jugé le plus actif que les autres extraits avec un pourcentage d'inhibition dans BChE de 25.71 ± 2.80 % à 200 µg/ml et donc trois fois seulement moins actif que la galantamine avec $I=75.5 \pm 1.1$ %. Lorsqu'on utilise l'AChE, le même extrait donne un pourcentage d'inhibition de 8.10 ± 1.26 % donc il est dix fois moins actif que la galantamine (81.4 ± 1.0 %).

II.2. Activité anticholinestérase de *Zilla macroptera*

Les résultats de l'activité anticholinestérase réalisée par l'enzyme AChE de quatre extraits de *Zilla macroptera* ont été regroupés dans le tableau 15.

Tous les extraits n'ont pas une activité contre l'enzyme BChE.

Tableau 15. Pourcentages d'inhibition de l'AChE des extraits de *Zilla macroptera*

Concentration (µg/ml)	% Inhibition			
	AChE			
	25	50	100	200
BEZM	na	na	na	na
EEZM	na	$6,01 \pm 0,77$	$19,20 \pm 1,76$	$21,53 \pm 1,29$
CEZM	na	$7,51 \pm 0,31$	$14,65 \pm 0,42$	$17,74 \pm 1,18$
PEZM	na	na	na	na
Galantamine ^a	68.4 ± 1.1	74.4 ± 0.7	78.6 ± 0.5	81.4 ± 1.0

^a Composé de référence.
na Non actif.

Les résultats obtenus montrent que les extraits BEZM et PEZM n'ont pas une activité anticholinestérase.

L'extrait EEZM est le plus actif parmi nos extraits avec un pourcentage d'inhibition de $21,53 \pm 1,29$ % à 100 µg, suivi par CEZM avec I % = $17,74 \pm 1,18$ %. Néanmoins, ces deux extraits sont presque quatre fois moins actifs que la galantamine avec un I % = 81.4 ± 1.0 % dans la même concentration.

Conclusion

L'évaluation de l'activité anticholinestérase des extraits de *Biscutella raphanifolia* et de *Zilla macroptera* a été réalisée par l'utilisation de deux enzymes, acétylcholinestérase et butyrylcholinestérase. Les résultats présentés dans cette étude sont les premières informations sur ces activités.

D'après la littérature, les études des activités antioxydantes et anticholinestérasiques soulignent que les extraits polaires comprennent des composés antioxydants. Cependant, ces extraits sont incapables d'inhiber les enzymes d'acétyl- et de butyrylcholinestérase. En outre, les extraits non polaires peuvent être considérés comme des inhibiteurs des enzymes d'acétyl- et de butyrylcholinestérase.

Les résultats obtenus de l'activité anticholinestérase par les deux méthodes montrent que les extraits DEBR, PEBR, EEZM et CEZM possède la plus grande activité anticholinestérase par rapport au autre extraits, ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature.

Cependant, d'autres études sont nécessaires pour comprendre l'origine de cette activité. En particulier, les principaux constituants de chaque extrait doivent être testés pour leur activités anticholinestérasiques et antioxydantes.

III. Activité antibactérienne

III.1. Activité antibactérienne de *Biscutella raphanifolia* Poiret.

Les tests de sensibilité (tableau 16) sont réalisés sur les extraits d'éther de pétrole, de dichlorométhane et de *n*-butanol et sur les antibiotiques contrôles : Ceftazidime 30 µg (CAZ), Cefamandole 30 µg (MA), Amoxicilline+Acide clavulonique 20/10 µg (AMC) et Gentamycine 500 µg (10UI) (GM) contre :

- Les pathovars d'*E. coli*
 - ✓ *E. coli* Entérotoxigénique (ECET) ATCC 1493.
 - ✓ *E. coli* Entérotoxigénique (ECEP) ATCC 2348.
 - ✓ *E. coli* Entérohémorragique (ECEH) ATCC HB 101.
 - ✓ *E. coli* Entéroinvasive (ECEI) ATCC LT 10407.
 - ✓ *E. coli* Entéroaggrégative (ECEA).

- Les souches isolées à partir d'échantillons de germes pathologiques
 - ✓ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (cocci Gram positif).
 - ✓ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (bacille Gram négatif).
 - ✓ *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (cocci Gram positif).

Tableau 16. Résultats de l'activité antibactérienne des extraits d'éther de pétrole, de dichlorométhane et de *n*-butanol de l'espèce *Biscutella raphanifolia*.

Microorganisme	Zone d'inhibition (mm)						
	PEBR	DEBR	BEBR	CAZ	MA	AMC	GM
<i>E. coli</i> Entérohemorragique	13.5	14.5	15.0	22.0	22.0	30.0	26.5
<i>E. coli</i> Entérotoxigénique	17.5	13.5	13.5	23.5	22.5	28.0	22.5
<i>E. coli</i> Entéroinvasive	12.5	14.0	13.5	31.5	32.5	28.0	-
<i>E. coli</i> Entéropathogénique	15.5	14.5	-	21.5	24.0	38.5	24.5
<i>E. coli</i> Entéroaggrégative	12.0	-	11.5	32.5	35.5	32.0	26.0
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	27.0	18.5	24.0	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13.0	13.5	13.5	22.0	29.5	24.5	37.0
<i>Enterococcus faecalis</i>	15.5	14.5	14.0	18.0	19.5	30.0	20.5

D'après Ponce *et al.*, (2003) et Moreira *et al.*, (2005), les résultats de l'activité antibactérienne de nos extraits sont en majorité actifs (DZI =9-14 mm) ou très actifs (DZI = 15-19 mm).

L'extrait d'éther de pétrole a une meilleure activité antibactérienne contre ECET, EPEC et *Enterococcus faecalis* dont les diamètres d'inhibition sont de 17.5, 15.5 et 15.5 mm respectivement, alors que la souche ECEH était plus sensible à l'extrait de dichlorométhane avec un diamètre d'inhibition de 14.5 mm et à l'extrait de *n*-butanol avec 15 mm de diamètre d'inhibition.

Les activités antibactériennes trouvées pour les trois extraits sont meilleures que la GM (DZI = 0 mm) vis-à-vis des souches bactériennes *Staphylococcus aureus* et *E. coli* Entéroinvasive.

II.2. Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Inula viscosa*

L'activité antibactérienne de deux huiles essentielles de l'espèce *Inula viscosa* récoltée à Ain El-Bey et à Hamma Bouziane a été testée contre :

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Escherichia coli*
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Staphylococcus aureus*
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Enterobacter aerogenes*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Proteus mirabilis*
- *Streptococcus a-hémolytique*

Nous reprenons dans le tableau suivant les différents diamètres des zones d'inhibition et les concentrations minimales inhibitrices (CMI).

Tableau 17. Activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Inula viscosa* (L.) Ait.

Microorganisme	Zone d'inhibition (mm)		CMI ($\mu\text{g/ml}$)	
	HE ^c	HE ^d	HE ^c	HE ^d
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	18	16	40	40
<i>Escherichia coli</i>	20	13	40	80
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	21	10	40	80
<i>Staphylococcus aureus</i>	11	09	80	80
<i>Streptococcus a -hemolitic</i>	15	15	80	80
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	21	21	20	20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21	15	20	20
<i>Enterobacter aerogenes</i>	18	16.5	20	80
<i>Klebsiella pneumonia</i>	24	20	32	40
<i>Proteus mirabilis</i>	19	16	-	40

^c Huile essentielle (128 $\mu\text{g} / \text{ml}$) de parties aériennes fraîches d'*I. viscosa* récoltée à Ain El-Bey (Sud de Constantine)

^d Huile essentielle (128 µg / ml) de parties aériennes fraîches d'*I. viscosa* récoltée à Hamma Bouziane (Nord de Constantine)

L'huile essentielle de l'espèce *Inula viscosa* récoltée à Ain El-Bey a inhibé considérablement la croissance de *K. pneumoniae* (24mm), *P. aeruginosa* ATCC (21mm), *P. aeruginosa* SH (21mm), *E. coli* ATCC (20mm) et *E. coli* SH (20mm), tandis que l'huile essentielle de l'espèce récoltée à Hamma Bouziane a montré une bonne activité antibactérienne contre *P. aeruginosa* ATCC (21mm), *P. aeruginosa* SH (21mm) et *K. pneumoniae* (20mm).

Il semble que la première huile est plus active contre un plus grand nombre de micro-organismes. Cela peut s'expliquer par la différence entre les compositions des huiles testées.

On rappelle que, l'huile essentielle de la plante récoltée à Ain El-Bey se caractérise par la présence de nérolidol (25.3 %) et d'oxyde de caryophyllène (5.5 %) comme composant principales, présents dans l'huile essentielle de la plante récoltée à Hamma Bouziane avec des faibles pourcentages (9.6 % et 0.1 %, respectivement). Ce qui pourrait justifier la différence d'activité antibactérienne entre les deux huiles essentielles.

On en conclut que l'espèce *Inula viscosa* a montré une meilleure activité antibactérienne vis-à-vis d'un grand nombre de micro-organismes. Cela est probablement dû à la différence de la composition des huiles essentielles étudiées qui peut s'expliquer par l'influence de la nature du sol et de l'environnement.

Conclusion générale

Conclusion Générale

Dans le cadre de recherche de substances naturelles biologiquement actives, deux espèces de la famille des Brassicaceae : *Biscutella raphanifolia* Poiret. et *Zilla macroptera* (Cross.) Maire. ont fait l'objet de l'étude phytochimique et biologique (Activités antioxydante, anticholinestérase et antibactérienne) et deux espèces de la famille des Asteraceae : *Inula graveolens* et *Inula viscosa* ont fait l'objet des analyses GC et GC/MS et activité antibactérienne de leurs huiles essentielles.

✚ L'étude phytochimique de l'extrait *n*-butanol de l'espèce *Biscutella raphanifolia* a permis d'isoler et d'identifier quatre flavonols glycosides. En faisant appel aux différentes méthodes analyse spectroscopiques monodimensionnels RMN 1H et RMN 13C et bidimensionnels COSY, HSQC, HMBC et NOESY.

- Quercétine 3-O- β -D-glucoside
- Quercétine 3-O-[β -D-glucosyl(1 \rightarrow 2)-O- β -D-glucoside]
- Quercétine 3-O-[β -D-glucosyl(1 \rightarrow 3)-O- β -D-glucoside]
- Kaempférol 3-O-[β -D-glucosyl(1 \rightarrow 2)-(6''*p*-coumaroyl)- β -D-glucoside]

L'étude des activités biologiques des extraits de *n*-butanol, d'acétate d'éthyle, de chloroforme et d'éther de pétrole a été réalisée par quatre méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante (DPPH, ABTS, CUPRAC et Chélation des ions ferreux), deux méthodes de l'activité anticholinestérase (AChE et BChE) et l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion sur disque.

- L'extrait acétate d'éthyle à montré une très bonne activité antioxydante par rapport aux autres extraits.
- L'extrait d'éther de pétrole a manifesté une bonne activité antibactérienne, et exceptionnellement cet extrait a également montré une activité anticholinestérase.

✚ L'étude phytochimique de l'espèce *Zilla macroptera* nous a permis d'isoler quinze produits purs dont cinq ont été identifiés, les autres sont en cours d'identification.

- Dehydrodiconiferyl alcool-4-O- β -D-galactoside
- cistanoside B
- 5-methoxy dehydrodiconiferyl alcool-4-O- β -D-glucoside
- 5-hydroxycatalpol
- D-mannitol

Les résultats des activités biologiques effectuées sur les quatre extraits de la plante ont montré que l'extrait acétate d'éthyle possède une meilleure activité antioxydante, alors que l'extrait d'éther de pétrole a montré la plus grande activité anticholinestérase.

✚ L'analyse GC et GC/MS de huile essentielle des parties aériennes fraîches de l'espèce d'*Inula graveolens* a montré qu'elle est majoritairement composée d'acétate d'isobornyle (50,8%), de bornéol (18,3%) et de τ -cadinol (6,2%).

L'analyse GC et GC/MS des huiles essentielles des parties aériennes fraîches de l'espèce *Inula viscosa* récolté à Ain El-Bey (Sud de Constantine), est caractérisée par la présence principale du nérolidol (25,3%), de l'acide isocostique (10,1%), de l'acide costique (8,0%), du néo-intermedeol (6,4%) et de l'oxyde de caryophyllène (5,5%), alors que les composants majoritaires de l'huile essentielle des parties aériennes de la plante récoltée à Hamma Bouziane (Nord de Constantine) sont : l'acide isocostique (25,1%), l'acide costique (15,2%), le nérolidol (9,6 %), l'acide linoléique (9,1%), le néo-intermedeol (7,5%) et le fokienol (7,2%).

Les huiles essentielles d'*Inula viscosa* récoltée de deux régions différentes ont manifesté une bonne activité antibactérienne vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*.

Références bibliographiques

- Abid R, Qaiser M. (2002). Genus *Inula* L. (s. str.) (Compositae-Inuleae) in Pakistan and Kashmir. *Candollea*, **56**: 315-325.
- Adams RP. (2004). Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole Mass Spectroscopy. Series Edits., Editor, Allured Publ. Corp., Carol Stream, IL.
- Adams RP. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, 4th Ed., Allured, Publishing Co. Carol Stream, Illinois.
- Ak T, Gulçin I. (2008). Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chem Biol Interact.*, **174**: 27-37.
- Akgul A, Kivanc M. (1989). Sensitivity of four foodborne moulds to essential oils from Turkish spices, herbs and *Citrus* peel. *J Sci Food Agric.*, **47**: 129-132.
- Al-Gendya AA, El-gindib OD, Hafezb AS, Ateya AM. (2010). Glucosinolates, volatile constituents and biological activities of *Erysimum corinthium* Boiss. (Brassicaceae). *Food Chem.*, **118**(3): 519-524.
- Al-Haiza MA, Mostafa MS, El-Kady MY. (2003). Synthesis and biological evaluation of some new coumarin derivatives. *Molecules*, **8**: 275-286.
- Alho H, Leinonen J. (1999). Total antioxidant activity measured by chemiluminescence methods. *Method Enzymol*, **299**: 3-15.
- Allegrini J, Simmeon de Buochberg M, Billot A. (1973). Emulsions d'huiles essentielles, fabrication et application en microbiologie. *Travaux de la Société de Pharmacie de Montpellier*, **33** : 73-86.
- Amarowicz R, Pegg RB, Rahimi-Moghaddam P, Barl B, Weil JA. (2004). Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chem.*, **84**: 551-562.
- Apak R, Guçlu K, Ozyurek M, Celik SE. (2008). Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. *Microchim Acta.*, **160**: 413-419.

- Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Karademir SE. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E. using their cupricion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J Agric Food Chem.*, **52**: 7970-7981.
- Apak R, Guçlu K, Ozyurek M, Karademir SE, Altun M. (2005). Total antioxidant capacity assay of human serum using copper (II)- neocuproine as chromogenic oxidant: the CUPRAC method. *Free Radic Res.*, **39**: 949-961.
- Apak R, Guçlu K, Ozyurek M, Karademir SE, Erçag E. (2006). The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas. *Int J Food Sci Nut.*, **57**: 292-304.
- ArasHisar S, Hisar O, Beydemir S, Gulçin I, Yanık T. (2004). Effect of vitamin E on carbonic anhydrase enzyme activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) erythrocytes *in vitro* and *in vivo*. *Acta Vet Hung.*, **52**: 413-422.
- Arnao MB. (2000). Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends Food Sci Technol.*, **11**: 419-421.
- Arosio P, Ingrassia R, Cavadini P. (2009). Ferritins: a family of molecules for iron storage, antioxidation and more. *Biochim Biophys Acta.*, **1790**: 589-599.
- Aruoma OI. (1994). Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food Chem Toxicol.*, **62**: 671-683.
- Atsuko I, Yasuhiro T, Naotaka N, Toru A, Toyoyuki N, Takao T. (2008). Phenolic and iridoid glycosides from *Strychnos axillaris*. *Phytochemistry*, **69**(5), 1208-1214.
- Awika JM, Rooney LW, Wu X, Prior RL, Cisneros-Zevallos L. (2003). Screening methods to measure antioxidant activity of *Sorghum* (*Sorghum bicolor*) and *Sorghum* products. *J Agric Food Chem.*, **51**: 6657-6662.
- Azzouz MA, Bullerman LB. (1982). Comparative antimycotic effects of selected herbs, spices, plant components and commercial antifungal agents. *J Food Protect.*, **45**: 1298-1301.

- Bai N, Lai CS, He K, Zhou Z, Zhang L, Quan Z, Zhu N, Zheng QY, Pan MH, Ho CT. (2006). Sesquiterpene lactones from *Inula britannica* and their cytotoxic and apoptotic effects on human cancer cell lines. *J Nat Prod.*, **69**: 531-535.
- Balaydın HT, Gulçin I, Menzek A, Goksu S, Sahin E. (2010). Synthesis and antioxidant properties of diphenylmethane derivative bromophenols including a natural product. *J Enzyme Inhib Med Chem.*, **25**: 685-695.
- Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.*, **45**: 493-496.
- Beecher GR. (1999). In antioxidant food supplements in human health. In: Packer L, Hiramatsu M, Yoshikawa T (eds) Academic Press, New York.
- Bendich A, Machlin LJ, Scandurra O, Burton GW, Wayner DDM. (1986). The antioxidant role of vitamin C. *Free Radical Bio Med.*, **2**: 419-444.
- Berchtold NC, Cotman CW. (1998). *Evolution in the conceptualization of dementia and Alzheimer's disease: Greco-Roman period to the 1960s. Neurobiol Aging.*, **19**(3): 173-89.
- Berg D, Gerlach M, Youdim MBH, Double KL, Zecca L, Riederer P, Becker G. (2001). Brain iron pathways and their relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem.*, **79**: 225-236.
- Blois MS. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, **81**: 1199-1200.
- Blanc MC, Muselli A, Bradesi P, Casanova J. (2004). Chemical composition and variability of the essential oil of *Inula graveolens* from Corsica. *Flav Fragr J.*, **19**(4): 314-319.
- Blanc MC, Bradesi P, Gonçalves MJ, Salgueiro L, Casanova J. (2006). Essential oil of *Dittrichia viscosa* spp. *viscosa*: analysis by ¹³C-NMR and antimicrobial activity. *Flav Fragr J.*, **21**: 324-332.
- Bocco A, Cuvelier ME, Richard H, Berset C. (1998). Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *J Agric Food Chem.*, **46**: 2123-2129.
- Bohlmann F, Mahanta PK, Jakupovic J, Rastogi RC, Natu AA. (1978). New sesquiterpene lactones from *Inula* species. *Phytochemistry*, **17**: 1165-1172.

- Branco A, Santos JDG, Pimentel MAMM, Osuna JTA, Lima LS, David JM. (2010). D-Mannitol from Agave *sisalana* biomass wast. *Ind Crops and Prod.*, **32**: 507–510.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wissen Technol.*, **28**: 25-30.
- Brehm BG, Krell D. (1975). Flavonoid localization in epidermal Papillae of flower petals, a specialized adaptaion for ultra-violet absorbtion. *Science, New York*, **190**:1221-1223.
- Brock A, Herzfeld T, Paschke R, Koch M, Dräger B. (2006). Brassicaceae contain nortropane alkaloids. *Phytochemistry*, **67**(18): 2050-2057.
- Bruneton J. (1999). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, (3 éd.). Paris : Editions médicales internationales, éditions Tec & Doc Lavoisier, 1120.
- Burke YD, Ayoubi AS, Werner SR, McFarland BC, Heilman DK, Ruggeri BA, Crowell PL. (2002). Effects of the isoprenoids perillyl alcohol and farnesol on apoptosis biomarkers in pancreatic cancer chemoprevention. *Anticancer Res.*, **22**: 3127-3134.
- Burt S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int J Food Microbiol.*, **94**: 223-253.
- Büyükokuroglu ME, Gulçin I. (2009). In vitro antioxidant and antiradical properties of *Hippophae rhamnoides* L. *Phcog Mag.*, **4**: 189-195.
- Cafarchia C, De Laurentis N, Milillo M.A, Losacco V, Puccini V. (2002). Antifungal activity of essential oils from leaves and flowers of *Inula viscosa* (Asteraceae) by Apulian region. *Parassitologia*, **44**, 153-156.
- Camacho A, Fernandez A, Fernandez C, Altarejos J, Laurent R. (2000). Composition of the essential oil of *Dittrichia viscosa* (L.) W. greuter. *Riv. Ital.*, **29**: 3-8.
- Caron F. (2012). Antimicrobial susceptibility testing: A four facets tool for the clinician. *Journal des Anti-infectieux*, **14** (4) : 168-174.
- Carreiras MC, Marco JL. (2004). Recent approaches to novel anti-Alzheimer therapy. *Curr Pharm Design.*, **25**: 3167-3175.
- Carvalho CC, Fonseca MM. (2006). Carvone: Why and how should one bother to produce this terpene. *Food Chem.*, **95**: 413-422.

- Chemat F. (2009). Essential oils and aromas: Green extractions and Applications. HKB Publishers, Dehradun, 311 pages.
- Chen JH, Ho CT. (1997). Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *J Agric Food Chem.*, **45**: 2374-2378.
- Chen F, Ro DK, Petri J, Gershenzon J, Bohlmann J, Pichersky E, Tholl D. (2004). Characterization of a Root-Specific Arabidopsis Terpene synthase responsible for the formation of the volatile monoterpene 1,8-cineole. *Plant Physiol.*, **135**: 1956-1966.
- Chen F, Tholl D, D'Auria JC, Farooq A, Pichersky E, Gershenzon J. (2003). Biosynthesis and emission of terpenoid volatiles from *Arabidopsis* flowers. *Plant Cell*, **15**: 481-494.
- Chimi H, Cillard J, Cillard P, Rahmani M. (1991). Peroxyl and hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants. *J Am Oil Chem Soc.*, **68**: 307-312.
- Camacho A, Fernandez A, Fernandez C, Altarejos J, Laurent R. (2000). Composition of the essential oil of *Dittrichia viscosa* (L.) W. Greuter. *Rivi. Ital.*, **29**: 3-8.
- Combarros O, Riancho JA, Infante J, Sañudo C, Llorca J, Zarrabeitia MT, Berciano J. (2005). Interaction between CYP19 aromatase and butyrylcholinesterase genes increases Alzheimer's disease risk. *Dement Geriatr Cogn Disord.*, **20**: 153-157.
- Corbo MR, Bevilacqua A, Campaniello D, D'Amato D, Speranza B, Sinigaglia M. (2009). Prolonging microbial shelf life of foods through the use of natural compounds and nonthermal approaches – a review. *Int J Food Sci Technol.*, **44**: 223-241.
- Cowan MM. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.*, 564–582.
- Crouzet J. (1996). Arômes alimentaires. Techniques de l'ingénieur, F 4 100, Paris.
- Crowell PL. (1999). Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. *J Nutr.*, **129**: 775S-778S.
- Curini M, Cravotto G, Epifano F, Giannone G. (2006). Chemistry and biological activity of natural and synthetic prenyloxycoumarins. *Curr Med Chem.*, **13**: 199-222.
- D'Auria JC, Gershenzon J. (2005). The secondary metabolism of *Arabidopsis thaliana*: growing like a weed. *Curr Opin Plant Biol.*, **8**(3): 308-316.

- Davies KJ. (1995). Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp.*, **61**: 1-31.
- Deans SG, Ritchie G. (1987). Antibacterial properties of plant essential oils. *Int J Food Microbiol.*, **5**: 165-180.
- Delaquis JP, Stanich K, Girard B, Mazza G. (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill *Cilantro*, *Coriander* and *Eucalyptus* essential oils. *Int. J. Food Microbiol.*, **74**: 101-109.
- De laurentis N, Losacco V, Milillo MA. (2002). Chemical investigations of volatile constituents of *Inula viscosa* (L) Aiton (Asteraceae) from different areas of *Apulia*, Southern Italy. *Delpinoa n.s.*, **44**: 115-119.
- De silvaT. (1997). Industrial utilization of medicinal plants in developing countries. Bodeker G, Bhat KKS, Burley J, Vantomme P (Eds.), *Medicinal plants for forest conservation and healthcare*, vol. 11FAO, Rome, Italy (1997), pp. 38-48 (Nonwood Forest Products).
- Decker EA, Welch B. (1990). Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *J Agr Food Chem.*, **38**: 674-677.
- Deriu A, Zanetti S, Sechi LA. (2008). Antimicrobial activity of *Inula helenium* L. essential oil against Gram-positive and Gram-negative bacteria and *Candida* spp. *Int J Antimicrob Agents.*, **31** (6): 588-590.
- Dorman HJD, Deans SG. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol.*, **88**: 308-316.
- Dragsted LO, Strube M, Leth T. (1997). Dietary levels of plant phenols and other non-nutritive components: could they prevent cancer? *Eur J Cancer Prev.*, **6**: 522-528.
- Duh PD. (1998). Antioxidant activity of burdock (*Arctium lappa* Linne): its scavenging effect on free radical and active oxygen. *J Am Oil Chem Soc.*, **75**: 455-465.
- Dziedzic SZ, Hudson BJB. (1984). Phenolic acids and related compounds as antioxidants for edible oils. *Food Chem.*, **14**: 45-51.
- Eberhardt MV, Lee CY, Liu RH. (2000). Antioxidant activity of fresh apples. *Nature*, **405**: 903-904.

- Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Feather-Stone RM. (1961). A new and rapid determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem pharmacol.*, **7**: 88-95.
- Elmastas M, Gulçin I, Beydemir S, Kufrevioglu OI, Aboul-Enein HY. (2006). A study on the *in vitro* antioxidant activity of juniper (*Juniperus communis* L.) seeds extracts. *Anal Lett.*, **39**: 47-65.
- Elmastas M, Turkecul I, Ozturk L, Gulçin I, Isildak O, Aboul-Enein HY. (2006b). The antioxidant activity of two wild edible mushrooms (*Morchella vulgaris* and *Morchella esculanta*). *Comb Chem High T Scr.*, **9**: 443-448.
- El-Menshawi B, Karawya M, Wassel G, Reisch J, Kjaer A. (1980). Glucosinolates in the genus *Zilla* (Brassicaceae). *J Nat Prod.*, **43** (4): 534-536.
- El-Sharabasy F, Zayed Mohamed N. (2013). Chemical constituents and biological activity from chloroform extract of *Zilla spinosa*. *Int J Pharm Pharm Sci.*, **5**(1): 422-427.
- El-Toumy SA, El-Sharabasy FS, Ghanem HZ, El-Kady MU, Kassem Asmaa F. (2011). Phytochemical and Pharmacological Studies on *Zilla spinosa*. *J Appl Sci Res.*, **7**(8): 1362-1370.
- Epifano F, Pelucchini C, Curini M, Genovese S. (2009). Chemistry and biological activity of natural and synthetic prenyloxycoumarins. *Nat Prod Commun.*, **4**: 1755-1760.
- Erzengin M, Basaran I, Cakir U, Aybey A, Sinan S. (2012). In Vitro Inhibition Effect of Some Dihydroxy Coumarin Compounds on Purified Human Serum Paraoxonase 1 (PON1). *App Biochem and Biotechnol*, **168**(6): 1540-1548.
- Ezio G. (2003). Butyrlcholinesterase: Its structure and function. *Taylor and Francis Group plc.*
- Fahey JW, Zalcmann AT, Talalay P. (2001). The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, **56**(1): 5-51.
- Fiorucci SB, Golebiowski J, Cabrol-Bass D, Antonczak S. (2007). DFT study of quercetin activated forms involved in antiradical, antioxidant, and prooxidant biological processes. *J Agric Food Chem.*, **55**: 903-911.

- Foley PB. (2003). Beans, roots, and leaves: a history of the chemical therapy of Parkinsonism, Tectum Verlag. *Tectum Verlag*.
- Foti MC, Daquino C, Geraci C. (2004a). Abnormal solvent effects on hydrogen atom abstraction. 2. Resolution of the curcumin antioxidant controversy. The role of sequential proton loss electron transfer. *J Org Chem.*, **69**: 5888-5896.
- Foti MC, Daquino C, Geraci C. (2004b). Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH[•] radical in alcoholic solutions. *J Org Chem.*, **69**: 2309-2314.
- Frankel EN. (1998). Lipid oxidation, Dundee. The Oily Press.
- Franzke A, German D, Al-Shehbaz IA, Mummenhoff K. (2009). *Arabidopsis* family ties: Molecular phylogeny and age estimates in the Brassicaceae. *Taxon*, **58**: 425-437.
- Fujioka S, Yokota T. (2003). Biosynthesis and metabolism of Brassinosteroids. *Ann Rev Plant Biol.*, **54**: 137-164.
- Fylaktakidou KC, Hadipavlou-Litina DJ, Litinas KE, Nicolaides DN. (2004). Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/antioxidant activities. *Curr Pharm Des.*, **10**: 3813-3833.
- Galvano F, Piva A, Ritieni A, Galvano G. (2001). Dietary strategies to counteract mycotoxins' effects. *J Food Protect.*, **64**: 120-128.
- Ganesan K, Kumar KS, Rao PVS. (2011). Comparative assessment of antioxidant activity in three edible species of green seaweed, *Enteromorpha* from Okha, Northwest coast of India. *Innov Food Sci Emerg.*, **12**: 73-78.
- Ghosn MW, Chemali CB, Zaknoun FI, Saliba AN. (2006). Chemical profile of the *Dittrichia graveolens* (Desf.) Greuter essential oil of Lebanese origin. *J Essent Oil Res.*, **18**: 443-444.
- Girish HV, Satish S. (2008). Antibacterial Activity of Important Medicinal Plants on Human Pathogenic Bacteria-a Comparative Analysis. *World Appl Sci J*, **5** (3): 267-271.
- Gottlieb OR. (1972). Chemosystematics of the lauraceae. *Phytochemistry*, **11**(2): 1537-1570.

- Gould MN. (1997). Cancer chemoprevention and therapy by monoterpenes. *Environ Health Perspect*, **105**(4): 977-979.
- Grande MJ, López RL, Abriouel H, Valdivia E, Ben Omar N, Maqueda M, Martínez-Cañamero M, Gálvez A. (2007). Treatment of vegetable sauces with enterocin AS-48 alone or in combination with phenolic compounds to inhibit proliferation of *Staphylococcus aureus*. *J Food Protect.*, **70**: 405-411.
- Grzybowski A, Pietrzak K. (2013). Albert Szent-Györgyi (1893-1986): The scientist who discovered vitamin C. *Clin Dermatol.*, **31**(3): 327-331.
- Gulçin I. (2002). Determination of antioxidant activity, characterization of oxidative enzymes and investigation of some *in vivo* properties of nettle (*Urtica dioica*). Ph.D. Thesis, Ataturk University, p 12.
- Gulçin I. (2006a). Antioxidant and antiradical activities of L-Carnitine. *Life Sci.*, **78**: 803-811.
- Gulçin I. (2006b). Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, **217**: 213-220.
- Gulçin I. (2007). Comparison of *in vitro* antioxidant and antiradical activities of L-tyrosine and L-Dopa. *Amino Acids*, **32**: 431-438.
- Gulcin I. (2008). Measurement of antioxidant ability of melatonin and serotonin by the DMPD and CUPRAC methods as trolox equivalent. *J Enzyme Inhib Med Chem.*, **23**: 871-876.
- Gulçin I. (2009). Antioxidant activity of L-Adrenaline: an activity structure insight. *Chem Biol Interact.*, **179**: 71-80.
- Gulçin I. (2010). Antioxidant properties of resveratrol: a structure activity insight. *Innov Food Sci Emerg.*, **11**: 210-218.
- Gulçin I, Berashvili D, Gepdiremen A. (2005a). Antiradical and antioxidant activity of total anthocyanins from *Perilla pankinensis*. Decne. *J Ethnopharmacol.*, **101**: 287-293.
- Gulçin I, Beydemir S, Sat IG, Kufrevioglu OI. (2005c). Evaluation of antioxidant activity of cornelian cherry (*Cornus mas* L.). *Acta Aliment Hung.*, **34**: 193-202.

- Gulçin I, Bursal E, Sehitoglu HM, Bilsel M, Goren AC. (2010a). Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. *Food Chem Toxicol.*, **48**: 2227–2238.
- Gulçin I, Elias R, Gepdiremen A, Boyer L. (2006a). Antioxidant activity of lignans from fringe tree (*Chionanthus virginicus* L.). *Eur Food Res Technol.*, **223**: 759-767.
- Gulçin I, Elias R, Gepdiremen A, Boyer L, Koksall E. (2007a). A comparative study on the antioxidant activity of fringe tree (*Chionanthus virginicus* L.) extracts. *Afr J Biotechnol.*, **6**: 410-418.
- Gulçin I, Elias R, Gepdiremen A, Taoubi K, Koksall E. (2009). Antioxidant secoiridoids from fringe tree (*Chionanthus virginicus* L.). *Wood Sci Technol.*, **43**: 195-212.
- Gulçin I, Elmastas M, Aboul-Enein HY. (2007b). Determination of antioxidant and radical scavenging activity of basil (*Ocimum basilicum*) assayed by different methodologies. *Phytother Res.*, **21**: 354-361.
- Gulçin I, Gagua N, Beydemir S, Bayram R, Bakuridze A, Gepdiremen A. (2011c). Apoptotic, antioxidant, antiradical and antiglaucoma effects of majdine and isomajdine from *Vinca herbacea* Waldst. and Kit. *J Enzyme Inhib Med Chem.*, **27**(4): 587-94.
- Gulçin I, Mshvildadze V, Gepdiremen A, Elias R. (2006b). Antioxidant activity of a triterpenoid glycoside isolated from the berries of *Hedera colchica*: 3-O-(b-D-glucopyranosyl)-hederagenin. *Phytother Res.*, **20**: 130-134.
- Gulçin I, Mshvildadze V, Gepdiremen A, Elias R. (2006c). Screening of antioxidant and antiradical activity of monodesmosides and crude extract from *Leontice smirnowii* Tuber. *Phytomedicine*, **13**: 343-351.
- Gulçin I, Oktay M, Kireççi E, Kufrevioglu OI. (2003c). Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chem.*, **83**: 371-382.
- Gulçin I, Sat IG, Beydemir S, Elmastas M, Kufrevioglu OI. (2004d). Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.). *Food Chem.*, **87**: 393-400.

- Gulcin I, Tel AZ, Kirecci E. (2008b). Antioxidant, antimicrobial, antifungal and antiradical activities of *Cyclotrichium niveum* (Boiss.) Manden and Scheng. *Int J Food Propert.*, **11**: 450-471.
- Gulcin I, Topal F, Cakmakçı R, Goren AC, Bilsel M, Erdogan U. (2011a). Pomological features, nutritional quality, polyphenol content analysis and antioxidant properties of domesticated and three wild ecotype forms of raspberries (*Rubus idaeus* L.). *J Food Sci.*, **76**: C585-C593.
- Gulcin I, Topal F, Ozturk Sarıkaya SB, Bursal E, Goren AC, Bilsel M. (2011b). Polyphenol contents and antioxidant properties of medlar (*Mespilus germanica* L.). *Rec Nat Prod.*, **5**: 158-175.
- Halliwell B. (1995). Antioxidant characterization; methodology and mechanism. *Biochem Pharmacol.*, **49**: 1341-1348.
- Halliwell B. (1997). Antioxidants in human health and disease. *Ann Rev Nut.*, **16**: 33-50.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. (1984). Oxygen toxicology, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J.*, **219**: 1-4.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. (1989). Free radicals in biology and medicine, 2nd edn. Clarendon Press, Oxford.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Meth Enzymol.*, **186**: 1-85.
- Han HY, Shan S, Zhang X, Wang NL, Lu XP, Yao XS. (2007). Down-regulation of prostate specific antigen in LNCaP cells by flavonoids from the pollen of *Brassica napus* L. *Phytomedicine*, **14**(5): 338-343.
- Hao YY, Brackett RE, Doyle MP. (1998). Efficacy of plant extracts in inhibiting *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in refrigerated cooked poultry. *Food Microbiol.*, **15**: 367-378.
- Haoui IE, Derriche R, Madani L, Oukali Z. (2011). Analysis of the chemical composition of essential oil from Algerian *Inula viscosa* (L.) Aiton. *Arab. J. Chem.*, In Press.

- Harborne JB, Smith DM. (1978a). Anthochlor and other flavonoids as honey guides in the Compositae. *Biochem. Syst. & Ecol.*, **6**(4): 287-291.
- Harborne JB, Smith DM. (1978b) Correlations between anthocyanin chemistry and pollination ecology in the Polemoniaceae. *Biochem. Syst. & Ecol.*, **6**(2): 127-130.
- Harborne JB. (1986). In: Cody V, Middleton E, Harborne JB, Alan R (eds) Plant flavonoids in biology and medicine. Liss, New York, pp 15-24.
- Harborne JB, Baxter H, Moss GP. (1999). Phytochemical dictionary: handbook of bioactive compounds from plants, 2nd edn. Taylor and Francis, London.
- Harpaz S, Glatman L, Drabkin V, Gelman A. (2003). Effects of herbal essential oils used to extend the shelf life of freshwaterreared Asian sea bass fish (*Lates calcarifer*). *J. Food Protect.*, **66**: 410-417.
- Harrison PM, Arosio P. (1996). The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta*, **1275**: 161-203.
- Hashem FA. (2007). Phenolic compounds of *Erucaria microcarpa* Bioss and their effect as scavengers for singlet oxygen. *J Herb Spic Med Plants.*, **12** (3): 27-41.
- Haworth RD. (1936). Natural resins. *Ann Rep Prog Chem.*, **33**(4): 266-279.
- Hedge IC. (1976). A systematic and geographical survey of the Old World Cruciferae. 1-45. In: J. G. Vaughan, A. J. Macleod, and B. M. G. Jones [ed.]. The biology and chemistry of the Cruciferae. Academic Press, London.
- Heneidy SZ, Bidak LM. (2001). Multipurpose plant species in bisha, Asir region South western Saudi Arabia. *J King Saud Univ.*, **13**: 11-26.
- Hernandez-Ochoa L, Vilarem G, Mouloungui Z, Medina-Gonzalez Y. (2012). Comparing the effect of utilization of ethyl heptanoate as co-solvent during extraction of essential oil of *Inula helenium* in a hydrodistillation process. *Chem Nat Compd.*, **47**(6): 995-997.
- Herrmann K. (1976). Flavonoids and flavones in food plants: a review. *J Food Technol.*, **11**: 433-448.
- Herrmann K. (1993). In pflanzlichen lebensmitteln vorkommende flavonoide als antioxidantien. *Gordian*, **93**: 108-111.

- Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D. (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the zupthen elderly study. *Lancet*, **342**: 1007-1014.
- Honda T, Tatsuzawa F, Kobayashi N, Kasai H, Nagumo S, Shigihara A, Saito N. (2005). Acylated anthocyanins from the violet-blue flowers of *Orychophragorus violaceus*. *Phytochemistry*, **66**(15): 1844-1851.
- Haoui I E, Derriche R, Madani L, Oukali Z. (2012). Analysis of the chemical composition of essential oil from Algerian *Inula viscosa* (L.) Aiton. *Arab J Chem*, in press, online.
- Hostettmann K, Potteray O, Wolfender JL. (1998). The potential of higher plants as a source of new drugs. *Chimie*, **52**: 10-17.
- Hsieh PC, Mau JL, Huang SH. (2001). Antimicrobial effects of various combinations of plant extracts. *Food Microbiol.*, **18**: 35-43.
- Hudson JF. (1990). Food antioxidants. Elsevier Applied Science, London.
- Husselstein-Muller T, Schaller H, Benveniste P. (2001). Molecular cloning and expression in yeast of 2,3-oxidosqualene- triterpenoid cyclases from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.*, **45**: 75-92.
- Imperato F. (1995). Flavonol glycosides from *Pteridium aquilinum*. *Phytochemistry*, **40**(6): 1801-1802.
- Jahangir M, Abdel-Farid IB, Kim HK, Choi YH, Verpoorte R. (2009). Healthy and unhealthy plants: The effect of stress on the metabolism of Brassicaceae. *Environ Exp Bot.*, **67**(1): 23-33.
- Jallali I, Zaouali Y, Missaoui I, Smeoui A, Abdely C, Ksouri R. (2014). Variability of antioxidant and antibacterial effects of essential oils and acetic extracts of two edible halophytes: *Crithmum maritimum* L. and *Inula crithmoides* L. *Food Chem.*, **145**: 1031-1038.
- Javidnia K, Banani A, Miri R, Kamalinejad M, Javidnia A. (2006). Constituents of the volatile oil of *Inula oculus-christi* L. from Iran. *J Essent Oil Res.*, **18**(6): 676-678.
- Jia C, Shi H, Jin W, Zhang K, Jiang Y, Zhao M, Tu P. (2009). Metabolism of echinacoside, a good antioxidant, in Rats: Isolation and identification of its biliary metabolites. *Drug Metabolism and Disposition*, **37**(2): 431-438.

- (JNMC) Jiangsu New Medical College (Ed.). (1986). Dictionary of traditional chinese medicines, Shanghai Scientific and Technological Publishing House, Shanghai, p. 80.
- Jung J, Kin J, Park OS. (2001). A convenient one pot synthesis of 4-hydroxycoumarin, 4-hydroxythiocoumarin and 4-hydroxyquinolin-2(1H)-one. *Synth Commun.*, **31**: 1195-1200.
- Kagale S, Divi UK, Krochko JE, Keller WA, Krishna P. (2007). Brassinosteroid confers tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napusto* a range of abiotic stresses. *Planta*, **225**: 353-364.
- Karamenderes C, Zeybek U. (2000). Composition of the essential oils of *Inula viscosa*, *I. graveolens* and *I. helenium* subsp. *turco racemosa*. *J Fac Pharm Istanbul Univ.*, **33**: 1-5.
- Karawya MS, Wassel GM, El-Menshawi BS. (1974). Phytochemical study of *Zilla spinosa* (Turra) Prantl. General analysis. Carbohydrates and lipids. *Die Pharmazie*, **29**: 60-61.
- Kazazica SP, Butkovic V, Srazica D, Klasinc L. (2006). Gas-phase ligation of Fe²⁺ and Cu²⁺ ions with some flavonoids. *J Agric Food Chem.*, **54**: 8391-8396.
- Keating GJ, O’Kennedy R. (1997). The chemistry and occurrence of coumarins. R. O’Kennedy, R.D. Thornes (Eds.), *Coumarins: biology, applications and mode of action*, Wiley Press, Chichester, UK, 23-66.
- Kehrer JP. (2000). The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, **149**: 43-50.
- Khan AL, Hussain J, Hamayun M, Gilani SA, Ahmad S, Rehman G, Kim YH, Kang SM, Lee IG. (2010). Secondary metabolites from *Inula britannica* L. and their biological activities. *Molecules*, **15**: 1562-1577.
- Koch MA, Al-Shehbaz IA. (2009). Molecluar systematics and evolution of “wild” crucifers(*Brassicaceae* or *Cruciferae*), in *Biology and Breeding of Crucifers*, ed Gupta S., editor. (Boca Raton, FL: *Taylor and Francis Group*), 1-18.
- Koch MA, Kiefer C. (2006). Molecules and migration: Biogeographical studies in cruciferous plants. *Plant Syst Evol.*, **259**: 121-142.

- Köksal E, Gulçin I, Sarıkaya O, Beyza S, Bursal E. (2009). On the *in vitro* antioxidant activity of silymarin. *J Enzyme Inhib Med Chem.*, **24**: 395-405.
- Kostova I, Mojzis J. (2007). Biologically active coumarins as inhibitors of HIV-1. *Future HIV Ther.*, **1**: 315-329.
- Kostova I, Raleva S, Genova P, Argirova R. (2006). Structure–activity relationships of synthetic coumarins as HIV-1 inhibitors. *Bioinorg. Chem Appl.*, **2006**: 1-9.
- Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, Coval SM, Binkoski AE, Hilpert KF, Griel AE, Etherton TD. (2002). Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am J Med.*, **113**(9B): 71S-88S.
- Kulkarni MV, Kulkarni GM, Lin CH, Sun CM. (2006). Recent advances in coumarins and 1-azacoumarins as versatile biodynamic agents. *Curr Med Chem.*, **13**: 2795-2818.
- Lambert RJW, Skandamis PN, Coate, PJ, Nychas GJE. (2001). A study of minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.*, **91**: 453-462.
- Lamiri A, Lhaloui S, Benjilali B, Berrada M. (2001). Insecticidal effects of essential oils against Hessian fly, *Mayetiola destructor* (Say). *Field Crops Res.*, **71**: 9-15.
- Lange BM, Ghassemian M. (2003). Genome organization in *Arabidopsis thaliana*: a survey for genes involved in isoprenoid and chlorophyll metabolism. *Plant Mol Biol.*, **51**: 925-948.
- Laszczyk MN. (2009). Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy. *Planta Med.*, **75**: 1549-1560.
- Lee G, Rossi MR, Coichev N, Moya HD. (2011). The reduction of Cu(II)/neocuproine complexes by some polyphenols: total polyphenols determination in wine samples. *Food Chem.*, **126**: 679-686.
- Lemous M, Santin JR, Klein Junior LC, Niero R, Faloni de Andrade S. (2011). Gastroprotective activity of hydroalcoholic extract obtained from the leaves of *Brassica oleracea* var. *acephala* DC in different animal models. *J Ethnopharmacol.*, **138**(2): 503-507.

- Lewis NG, Davin LB. (1999). Lignans: biosynthesis and function. *Compreh Nat Prod Chem.*, 639-712.
- Lgweh AC, Aguiyi JC, Okwuassaba FK. (2002). Antitrypanosomal effect of the aqueous extract of *Brassica oleracea*. *Fitoterapia*, **73**(1): 17-21.
- Liby KT, Yore MM, Sporn MB. (2007). Triterpenoids and rexinoids as multifunctional agents for the prevention and treatment of cancer. *Nat Rev Cancer.*, **7**: 357-369.
- Lis-Balchin M, Deans SG. (1997). Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. *J Appl Microbiol.*, **82**: 759-762.
- Lodeiro S, Xiong Q, Wilson WK, Kolesnikova MD, Onak CS, Matsuda SPT. (2007). An oxidosqualene cyclase makes numerous products by diverse mechanisms: A challenge to Prevailing concepts of triterpene biosynthesis. *J Am Chem Soc.*, **129**: 11213-11222.
- Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB. (1970). The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag. New York, Heidelberg, 254.
- Madhavan GR, Balraju V, Malleshasm B, Chakrabarti R, Lohray VB. (2003). Novel coumarin derivatives of heterocyclic compounds as lipid-lowering agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**: 2547-2551.
- Magalhaes LM, Santos M, Segundo MA, Reis S, Lima JLFC. (2009). Flow injection based methods for fast screening of antioxidant capacity. *Talanta*, **77**: 1559-1566.
- Mamoci E, Cavoski I, Simeone V, Mondelli D, Al-Bitar L, Caboni P. (2011). Chemical Composition and *In vitro* activity of plant extracts from *Ferula communis* and *Dittrichia viscosa* against *Postharvest Fungi*. *Molecules*, **16**: 2609-2625.
- Marino M, Bersani C, Comi G. (2001). Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. *Int J Food Microbiol.*, **67**: 187-195.
- Markham KR. (1982). Techniques of flavonoids identification. Academic press, London.
- Martens S, Mithöfer A. (2005). Flavones and flavone synthases. *Phytochemistry*, **66**(19), 2399-407.

- Marzouk MM. (In press 2011). Flavonoid constituents and cytotoxic activity of *Erucaria hispanica* (L.) Druce growing wild in Egypt. *Arab J Chem.*, In press 2011.
- Marzouk MM, Kawashty SA, Saleh NAM, Al-Nowaihi ASM. (2009). A new kaempferol trioside from *Farsetia aegyptia*. *Chem Nat Compd.*, **45**: 483-485.
- McGarvey DJ, Croteau R. (1995). Terpenoid metabolism. *Plant Cell*, **7**:1015-1026.
- Mclafferty FW, Stauffer DB. (1991). The important peak index of the registry of mass spectral data. John Wiley and Son, New York.
- Milder IEJ, Arts ICW, Van de Putte B, Venema DP, Hollman PCH. (2005). Lignan contents of Dutch plant foods: A database including lariciresinol, pinoresinol, secoisolariciresinol and matairesinol. *British Journal of Nutrition*, **93**: 393-402.
- Miller NJ, Rice-Evans CA, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci.*, **84**: 407-412.
- Mirza M, Ahmadi L. (2000). Composition of the Essential Oil of *Dittrichia graveolens* (L.) Greuter. *J Essent Oil Res.*, **12**: 507-508.
- Mohamed K, Khaled M, Hashim H, Kazuhiro O, Ryoji K, Kazuo Y. (2001). *Phytochemistry*, **57**(8): 1259-1262.
- Moreira MR, Ponce AG, del Val CE, Roura SI. (2005). Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogène. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, **38**: 565-570. In Celikel N, KavasG. (2008). Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms. *Czech Journal of Food Sciences*, **26** (3): 174-181.
- Moreno DA, Carvajal M, Lopez-Berenguer C, Garcia-Viguera C. (2006). Chemical and biological characterisation of nutraceutical compounds of broccoli. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **41**: 1508-1522.
- Mukherjee PK, Wahil A. (2006). Integrated approaches towards drug development from Ayurveda and other Indian système of medicine. *J Ethnopharmacol.*, **103**: 25-35.

- Musa MA, Cooperwood JS, Khan MAF. (2008). A review of coumarin derivatives in pharmacotherapy of breast cancer. *Curr Med Chem.*, **15**: 2664-2679.
- Musialik M, Litwinienko G. (2005). Scavenging of dpph* radicals by vitamin E is accelerated by its partial ionization: the role of sequential proton loss electron transfer. *Org Lett.*, **7**: 4951-4954.
- Musiciki B, Periers AM, Laurin P, Ferroud D, Benedetti Y, Lachaud S, Chatreaux F, Haesslein JL, Ltis A, Pierre C, Khider J, Tessol N, Airault M, Demassey J, Dupuis-Hamelin C, Lassaing P, Bonnefoy A, Vicat P, Klich M. (2000). Improved antibacterial activities of coumarin antibiotics bearing 5',5'-dialkylnoviose: biological activity of RU79115. *Bioorg Med Chem Lett.*, **10**: 1695-1699.
- Nakabayashi R, Kusano M, Kobayashi M, Tohge T, Yonekura-Sakakibara K, Kogure N, Yamazaki M, Kitajima M, Saito K, Takayama H. (2009). Metabolomics-oriented isolation and structure elucidation of 37 compounds including two anthocyanins from *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, **70**(8): 1017-1029.
- NCCLS. (1993). Performance standards for antimicrobial disk susceptibilities tests; Villionova, PA, USA: Approach Standard NCCLS: Publication M2-A5.
- Nielsen JK, Nørbæk R, Olsen CE. (1998). Kaempferol tetraglucosides from cabbage leaves. *Phytochemistry*, **49**(7): 2171-2176.
- Okuda T. (Ed.). (1986). Encyclopedia of Natural Medicine, vol. 1, Hirokawa, Tokyo, p. 64.
- Okunade AL. (2002). *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae). *Fitoterapia*, **73**: 1-16.
- Olsson LC, Veit M, Weissenböck G, Bornman JF. (1998). Differential flavonoid response to enhanced UV-b radiation in *Brassica napus*. *Phytochemistry*, **49**(4): 1021-1028.
- Ouattara B, Simord ER, Holley AR, Piette PJG, Begin A. (1997). Antimicrobial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage microorganisms. *Int J Food Microbiol.*, **37**: 155-162.
- Özcelik B, Lee JH, Min DB. (2003). Effects of light, oxygen and pH on the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method to evaluate antioxidants. *J Food Sci.*, **68**: 487-490.

- Perez-Alonso MJ, Velasco-Negueruela A. Composition of the volatile oil from the aerial parts of *Inula viscosa* (L) Aiton. *Flav Fragr J.*, **11**: 349-351.
- Perry EK. (1986). The cholinergic hypothesis - Ten years on. *Br Med Bull.*, **42**: 63-69.
- Petronelli A, Pannitteri G, Testa U. (2009). Triterpenoids as new promising anticancer drugs. *Anticancer Drugs*, **20**: 880-892.
- Peyron L. (1992). Techniques classiques actuelles de fabrication des matières premières naturelles aromatiques, Chapitre 10 : 217-238. Cité dans : Les arômes alimentaires. Coordonayeurs H. Richard et J.L. Multon. Tec et Doc-Lavoisier et Apria, p: 438, Paris.
- Pintore G, Usai M, Bradesi P, Juliano C, Boatto G, Tomi F, Chessa M, Cerri R, Casanova J. (2002). Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *Flav Fragr J.*, **17**: 15-19.
- Podsdek A. (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of *Brassica* vegetables: a review. *LWT-Food Sci. Technol.*, **40**: 1-11.
- Pokorny J. (1987). Major factors affecting the autoxidation of lipids'. In: Chan HWS (ed) Autoxidation of unsaturated lipids. Academic Press, London, pp 141-206.
- Pokorny J. (1988). Autoxidation of unsaturated lipids. In: Chan H (ed) Academic Press, London, p 141.
- Pokorny J. (1999). Antioxidants in food preservation'. In: Shafiur Rahman M (ed) Handbook of food preservation. Marcel Dekker, New York, pp 309-337.
- Pokorny J, Yanishlieva N, Gordon M. (2000). Antioxidants in food. Practical applications. Published in North and South America by CRC Press LLC, Corporate Blvd, NW Boca Raton FL 33431, USA.
- Ponce AG, Fridz R, del Val CE, Roura SI. (2009). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, **36**: 679-684. In Celikel N, KavasG. (2008). Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms. *Czech J Food Sci.*, **26** (3): 174-181.

- Ponce MA, Scervino JM, Erra-Balsells R, Ocampo JA, Godeas AM. (2004). Flavonoids from shoots, roots and roots exudates of *Brassica alba*. *Phytochemistry*, **65**(23): 3131-3134.
- Ponka P. (1999). Cellular iron metabolism. *Kidney Int.*, **55**: S2-S11.
- Preobrazhenskaya MN, Bukhman VM, Korolev AM, Efimov SA. (1993). Ascorbigen and other indole-derived compounds from *Brassica* vegetables and their analogs as anticarcinogenic and immunomodulating agents. *Pharmacol. Therapeut.*, **60**(2): 301-313.
- Prescott TAK, Kite GC, Porter EA, Veitch NC. (2013). Highly glycosylated flavonols with an *O*-linked branched pentasaccharide from *Iberis saxatilis* (Brassicaceae). *Phytochemistry*, **88**: 85-91.
- Prior RL, Wu XL, Schaich K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem.*, **53**: 4290-4302.
- Qi JL, Fu Y, Shi XW, Wu YB, Wang YZ, Zhang DQ, Shi QW. (2008). Sesquiterpene lactones and their anti-tumor activity from the flowers of *Inula Britannica*. *Drug Des Discov.*, **5**: 433-436.
- Qin JJ, Jin HZ, Fu JJ, Hu XJ, Zhu Y, Shen YH. (2008). Anthranilic acid derivatives from *Inula japonica*. *Chin Chem Lett.*, **19**: 556-558.
- Quezel P, Santa S. (1962). Nouvelle flore de l'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales. Paris: Tome I, Editions CNRS.
- Quezel P, Santa S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales. Paris: Tome II, Editions CNRS.
- Rabi T, Bishayee A. (2009). Terpenoids and breast cancer chemoprevention. *Breast Cancer Res Treat.*, **115**: 223-239.
- Radulović NS, Dekić MS, Stojanović-Radić ZZ. (2012). Antimicrobial volatile glucosinolate autolysis products from *Hornungia petraea* (L.) Rchb. (Brassicaceae). *Phytochem. Lett.*, **5**(2):351-357.

- Reddy BS, Wang CX, Samaha H, Lubet R, Steele VE, Kelloff GJ, Rao CV. (1997). Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary perillyl alcohol. *Cancer Res.*, **57**: 420-425.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol Med.*, **26**: 1231-1237.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Bio Med.*, **20**: 933-956.
- Rietjens IM, Martena MJ, Boersma MG, Spiegelberg W, Alink GM. (2005). Molecular mechanisms of toxicity of important food-borne phytotoxins. *Mol Nutr Food Res.*, **49**: 131-158.
- Rimm EB, Ascherio A, Giovannucci E, Spiegelman D, Stampfer M, Willett W. (1996a). Vegetable, fruits, and cereal fiber intake and risk of coronary heart disease among men. *JAMAJ-Am Med Assoc.*, **275**: 447-451.
- Rimm EB, Katan MB, Ascherio A, Stampfer MJ, Willett W. (1996b). Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. *Ann Intern Med.*, **125**: 384-389.
- Rizk AM, Heiba HI, Mayergi HA, Batounouny KH, (1985). *Fitoterapia*, IV 56.
- Roginsky V, Lissi EA. (2005). Review of methods to determine chainbreaking antioxidant activity in food. *Food Chem.*, **92**: 235-254.
- Sachdev-Gupta K, Radke CD, Renwick JAA. (1993). Antifeedant activity of cucurbitacins from *Iberis amara* against larvae of *Pieris rapae*. *Phytochemistry*, **33**(6): 1385-1388.
- Saito N, Tatsuzawa F, Suenaga E, Toki K, Shinoda K, Shigihara A, Honda T. (2008). Tetraacylated cyanidin 3-sophoroside-5-glucosides from the flowers of *Iberis umbellata* L. (Cruciferae). *Phytochemistry*, **69**(18): 3139-3150.
- Saito N, Tatsuzawa F, Toki K, Shinoda K, Shigihara A, Honda T. (2011). The blue anthocyanin pigments from the blue flowers of *Heliophila coronopifolia* L. (Brassicaceae). *Phytochemistry*, **72**(17): 2219-2229.

- Samadi A, Soriano E, Revuelta J, Valderas C, Chioua M, Garrido I, Bartolome B, Tomassolli I, Ismaili L, Gonzalez-Lafuente L, Villarroya M, Garcia AG, Oset-Gasque MJ, Marco-Contelles J. (2011). Synthesis, structure, theoretical and experimental *in vitro* antioxidant/pharmacological properties of α -aryl, N-alkyl nitrones, as potential agents for the treatment of cerebral ischemia. *Bioorg Med Chem.*, **19**: 951-960.
- Samec D, Piljac-Zegarac J, Bogovic M, Habjanic K, Gruz J. (2011). Antioxidant potency of white (*Brassica oleracea L. var. capitata*) and Chinese (*Brassica rapa L. var. pekinensis (Lour)*) cabbage: The influence of development stage, cultivar choice and seed selection. *Sci. Hortic-Amsterdam.*, **128**(2): 78-83.
- Sasaki K, Takahashi T. (2002). A flavonoid from *Brassica rapa* flower as the UV-absorbing nectar guide. *Phytochemistry*, **61**(3): 339-343.
- Schaeffer A, Bronner R, Benveniste P, Schaller H. (2001). The ratio of campesterol to sitosterol that modulates growth in *Arabidopsis* is controlled by sterol methyl transferase 2;1. *Plant J.*, **25**: 605-615.
- Schaller H. (2003). The role of sterols in plant growth and development. *Prog. Lipid Res.*, **42**: 163-175.
- Serbetçi Tohma H, Gulcin I. (2010). Antioxidant and radical scavenging activity of aerial parts and roots of Turkish liquorice (*Glycyrrhiza glabra L.*). *Int J Food Propert.*, **13**: 657-671.
- Setzer WN, Setzer MC. (2003). Plant-derived triterpenoids as potential antineoplastic agents. *Mini Rev Med Chem.*, **3**: 540-556.
- Shah BA, Qazi GN, Taneja SC. (2009). Boswellic acids: a group of medicinally important compounds. *Nat Prod Rep.*, **26**: 72-89.
- Sherwin ER. (1990). In: Branen AL, Davidson PM, Salminen S (eds) Food additives, Marcel Dekker Inc., New York, pp 139-193.
- Siah CW, Trinder D, Olynyk JK. (2005). Iron overload. *Clin Chim Acta*, **358**: 24-36.
- Sies H. (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med.*, **91**: 31-39.

- Sies H. (1993). Strategies of antioxidant defence. *Eur J Biochem.*, **215**: 213-219.
- Sinigaglia M, Bevilacqua A, Corbo MR, Pati S, Nobile DMA. (2008). Use of active compounds for prolonging the shelf life of mozzarella cheese. *Int Dairy J.*, **18**: 624-630.
- Sisti M, Amagliani G, Brandi G. (2003). Antifungal activity of *Brassica oleracea* var. *botrytis* fresh aqueous juice. *Fitoterapia*, **74**(5): 453-458.
- Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L. (2001). The application of plant essential oils as natural food essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiol.*, **18**: 463-470.
- Smyth T, Ramachandran VN, Smyth WF. (2009). A study of the antimicrobial activity of selected naturally occurring and synthetic coumarins. *Int J Antimicrob Ag.*, **33**(5): 421-426.
- Soares JR, Dins TCP, Cunha AP, Ameida LM. (1997). Antioxidant activity of some extracts of *Thymus zygis*. *Free Radical Res.*, **26**: 469-478.
- Soledade M, Pedras C, Zheng Q. (2010). 3.28 – The Chemistry of *Arabidopsis thaliana*. Comprehensive Natural Products II. *Chem Biol.*, **3**:1297-1315.
- Sousa C, Pontes H, Carmo H, Dinis-Oliveira RJ, Valentão P, Andrade PB, Remião F, Bastos ML, Carvalho F. (2009). Water extracts of *Brassica oleracea* var. *costata* potentiate paraquat toxicity to rat hepatocytes *in vitro*. *Toxicol. In Vitro.*, **23**(6): 1131-1138.
- Sroka Z, Cisowski W. (2003). Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food Chem Toxicol.*, **41**: 753-758.
- Stein AC, Álvarez S, Avancini C, Zacchino S, Poser G. (2006). Antifungal activity of some coumarins obtained from species of *Pterocaulon* (Asteraceae). *J Ethnopharmacol.*, **107** (1): 95-98.
- Sultana N, Ata A. (2008). Oleanolic acid and related derivatives as medicinally important compounds. *J Enzyme Inhib Med Chem.*, **23**: 739-756.
- Sun B, Liu N, Zhao Y, Yan H, Wang Q. (2011). Variation of glucosinolates in three edible parts of Chinese kale (*Brassica alboglabra* Bailey) varieties. *Food Chem.*, **124**(3): 941-947.

- Suomi J, Sirén H, Wiedmer KS, Riekkola ML. (2001). Isolation of aucubin and catalpol from *Melitaea cinxia* larvae and quantification by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Analytica Chimica Acta*, **429** (1) : 91-99.
- Survay NS, Kumar B, Jang M, Yoon DY, Jung YS, Yang DC, Park SW. (2010). Characterization of a cinnamoyl derivative from broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) florets. *Fitoterapia*, **81**(8): 1062-1066.
- Survay NS, Kumar B, Jang M, Yoon DY, Jung YS, Yang DC, Park SW. (2012). Two novel bioactive glucosinolates from Broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) florets. *Fitoterapia*, **22**(17): 5555-5558.
- Suzuki M, Xiang T, Ohyama K, Seki H, Saito K, Muranaka T, Hayashi H, Katsube Y, Kushiro T, Shibuya M, Ebizuka Y. (2006). Lanosterol Synthase in Dicotyledonous Plants. *Plant Cell Physiol.*, **47**: 565-571.
- Swigar AA, Silverstein RM. (1981). Monoterpenes-infrared, mass, proton-NMR, carbon-NMR spectra and Kovats Indices. Aldrich Chemical Company Inc., Madison.
- Talaz O, Gulçin I, Goksu S, Saracoglu N. (2009). Antioxidant activity of 5, 10-dihydroindeno [1, 2-b] indoles containing substituents on dihydroindeno part. *Bioorg Med Chem.*, **17**: 6583-6589.
- Tanizawa H, Ohkawa Y, Takino Y, Ueno A, Kageyama T, Hara S. (1992). Studies on natural antioxidants in citrus species. I. Determination of antioxidant activities of *Citrus* fruits. *Chem Pharm Bull.*, **40**: 1940-1942.
- Tanongkankit Y, Chiewchan N, Devahastin S. (2011). Evolution of anticarcinogenic substance in dietary fibre powder from cabbage outer leaves during drying. *Food chem.*, **127**(1): 67-73.
- Tatsuzawa F. (2013). Flavonol glycosides in the purple flowers of *Hesperis matronalis* L. (Brassicaceae). *Biochem Syst Ecol.*, **50**: 19-22.
- Tatsuzawa F, Ito S, Sato M, Muraoka H, Kato K, Takahata Y, Ogawa S. (2013). A tetraacylated cyanidin 3-sophoroside-5-glucoside from the purple-violet flowers of *Moricandia arvensis* (L.) DC. (Brassicaceae). *Phytochem Lett.*, **6**(2): 170-173.

- Tatsuzawa F, Saito N, Shinoda K, Shigihara A, Honda T. (2006). Acylated cyanidin 3-sambubioside-5-glucosides in three garden plants of the Cruciferae. *Phytochemistry*, **67**(12): 1287-1295.
- Tatsuzawa F, Saito N, Toki K, Shinoda K, Shigihara A, Honda T. (2008). Triacylated cyanidin 3-(3*X*-glucosylsambubioside)-5-glucosides from the flowers of *Malcolmia maritime*. *Phytochemistry*, **69**:1033-1040.
- Tatsuzawa F, Toki K, Saito N, Shinoda K, Shigihara A, Honda T. (2007). Four acylated cyanidin 3-sambubioside-5-glucosides from the purple-violet flowers of *Lobularia maritime*, *Heterocycles*, **71**: 1117-1135.
- Terry AV, Buccafusco JJ. (2003). The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: Recent challenges and their implications for novel drug development. *J Pharmacol Exp Ther.*, **306**: 821-828.
- Theis N, Lerda M. (2003). The evolution of function in plant secondary metabolites. *Int J Plant Sci.*, **164**: S93-S103.
- Thejass P, Kuttan G. (2007). Immunomodulatory activity of Sulforaphane, a naturally occurring isothiocyanate from broccoli (*Brassica oleracea*). *Phytomedicine*, **14**: 538-545.
- Thoppil RJ, Bishayee A. (2011). Terpenoids as potential chemopreventive and therapeutic agents in liver cancer. *World J Hepatol.*, **3**: 228-249.
- Tolstikhina VV, Semenov AA. (1998). Minor metabolites of *Scorzonera hispanica* L. Cell culture. *Rastitel'nye Resursy*, **34**(2), 77-80.
- Touafek O, Kabouche Z, Brouard I, Bermejo JB. (2011). Flavonoids of *Campanula alata* DESF. and their antioxidant activity. *Chem. Nat. Comp.*, **45**(6): 968-969.
- Tsutomu I. (2000). Anti HIV-1 active *Calophyllum* coumarins: distribution, chemistry, and activity. *Heterocycles*, **53** : 453-474.
- Ucuncu O, Gaydan F, Gulec C, Ckskuncelebi K, Yayli N. (2008). Essential oil composition and antimicrobial activity of *Inula thapsoides* subsp. *thapsoides* from Turkey. *Asian J Chem.*, **20**(2): 1049-1054.

- Ul-Haq Z, Khan W, Kalsoom S, Ansari FL. (2010). In silico modeling of the specific inhibitory potential of thiophene-2,3-dihydro-1,5-benzothiazepine against BChE in the formation of β -amyloid plaques associated with Alzheimer's disease. *Theo Biol Med Model.*, 7-22.
- Ultee A, Kets EPW, Alberda M, Hoekstra FA, Smid EJ. (2000). Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Archives Microbiol.*, **174**: 233-238.
- Ulubelen A, Goren S. (1986). Sesquiterpene acids from *Inula viscosa*. *Phytochemistry*, **26**: 1223-1224.
- Umezawa T. (2003). Diversity in lignan biosynthesis. *Phytochem Rev.*, **2**(3): 371-390.
- Usui T. (2006). Pharmaceutical prospect of phytoestrogens. *Endocr J.*, **53**: 7-20.
- Valenzuela AB, Nieto SK. (1996). Synthetic and natural antioxidants: food quality protectors. *Grasas y Aceites*, **47**: 186-196.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncola J, Izakovic M, Mazura M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Int.*, **160**: 1-10.
- Verhoeven DTH, Verhagen H, Goldbohm RA, VandenBrandt PA, van Poppel G. (1997). A review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by *Brassica* vegetables. *Chem Biol Interact.*, **103**: 79-129.
- Vigushin DM, Poon GK, Boddy A, English J, Halbert GW, Pagonis C, Jarman M, Coombes RC. (1998). Phase I and pharmacokinetic study of D-limonene in patients with advanced cancer. Cancer Research Campaign Phase I/II Clinical Trials Committee. *Cancer Chemother Pharmacol*, **42**:111-117.
- Vukovic N, Milosevic T, Sukdolak S, Solujic S. (2007). Antimicrobial activities of essential oil and methanol extract of *Teucrium montanum*. *Complement Alternat. Med.*, **4**: 17-20.
- Wang K, Ming-Ming L, Xuan-Qin C, Li-Yan P, Xiao C, Yan L, Qin-Shi Z. (2010). Phenolic Constituents from *Brainea insignis*. *Chem Pharm Bull.*, **58**(6): 868-871.
- Weber P, Bendich A, Schalch W. (1996). Vitamin C and human health a review of recent data relevant to human requirements. *Int J Vit Nut Res.*, **66**: 19-30.

- White PJ, Xing Y. (1997). Antioxidants from cereals and legumes. In: Shahidi F (ed) Natural antioxidants, chemistry, health effects, applications. AOCS Press, Champaign, pp 25-63.
- Wichi HP. (1988). Enhanced tumour development by butylated hydroxyanisole (BHA) from the perspective of effect on forestomach and oesophageal squamous epithelium. *Food Chem Toxicol.*, **26**: 717-723.
- Wright CI, Geula C, Mesulam MM. (1993). Neurological cholinesterases in normal brain and in Alzheimer's disease: relationship to plaques, tangles and patterns of selective vulnerability. *Ann Neurol.*, **34**: 373-384.
- Wright GD, Sutherland AD. (2007). New strategies for combating multidrug-resistant bacteria. *Trends mol med.*, **13** (6) : 260-267.
- Wright JS, Johnson ER, DiLabio GA. (2001). Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical methods, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *J Am Chem Soc.*, **123**: 1173-1183.
- Yuan YV, Bone DE, Carrington MF. (2005). Antioxidant activity of dulse (*Palmaria palmata*) extract evaluated *in vitro*. *Food Chem.*, **91**: 485-494.
- Zhang HB, Wen JK, Wang YY, Zheng B, Han M. (2009). Flavonoids from *Inula britannica* L. inhibit injury-induced neointimal formation by suppressing oxidative-stress generation. *J Ethnopharmacol.*, 126(1): 176-183.
- Zhang J, Chen J, Liang Z, Zhao C. 2014. New Lignans and Their Biological Activities. *Chem Biodivers*, **11**(1): 1-54.
- Zhao J, Li Y, Liu Q, Gao K. (2010). Antimicrobial activities of some thymol derivatives from the roots of *Inula hupehensis*. *Food Chem.*, 120 (2): 512-516.
- Zhao YM, Zhang ML, Shi QW, Kiyota H. (2006). Chemical constituents of plants from the genus *Inula*. *Chem Biodivers.*, **3**: 371-384.

*Résumés en français, anglais
et arabe*

Résumé

L'étude phytochimique des espèces *Biscutella raphanifolia* Poiret, récoltée à Constantine et de *Zilla macroptera* (Coss.) Maire de la région de Ghardaia, a permis, après différentes méthodes d'extraction et de séparation, d'isoler vingt produits dont dix ont été identifiés, quatre isolés à partir de l'extrait *n*-butanol de *Biscutella raphanifolia* et six à partir de l'extrait *n*-butanol de *Zilla macroptera*.

L'analyse GC et GC/MS de l'huile essentielle des parties aériennes fraîches de l'espèce *Inula graveolens* récoltée à Constantine a montré qu'elle est majoritairement composée d'acétate d'isobornyle (50,8%), de bornéol (18,3%) et de τ -cadinol (6,2%).

L'analyse GC et GC/MS des huiles essentielles des parties aériennes fraîches de l'espèce *Inula viscosa* récoltée de deux régions différentes de Constantine a montré qu'elles sont majoritairement composées de nérolidol (25,3%), d'acide isocostique (10,1%), d'acide costique (8,0%), du néo-intermedeol (6,4%) et d'oxyde de caryophyllène (5,5%) pour celle récoltée à Ain El-Bey (Sud de Constantine) et d'acide isocostique (25,1%), d'acide costique (15,2%), de nérolidol (9,6 %), d'acide linoléique (9,1%), de néo-intermedeol (7,5%), et de fokienol (7,2%) pour celle récoltée à Hamma Bouzianne (Nord de Constantine).

L'investigation des activités biologiques de huit extraits de *Biscutella raphanifolia* et de *Zilla macroptera* montre que la meilleure activité antioxydante a été manifestée par les extraits d'acétate d'éthyle, cette activité est probablement due à la présence de composants phénoliques dans les extraits polaires.

Les extraits d'éther de pétrole ont manifesté la meilleure activité anticholinestérase.

L'extrait d'éther de pétrole de *Biscutella raphanifolia* possède une meilleure activité antibactérienne contre *ECET*, *EPEC* et *Enterococcus faecalis*, alors que la souche *ECEH* était plus sensible à l'extrait de dichlorométhane.

Les deux huiles d'*Inula viscosa* ont manifesté une meilleure activité antibactérienne vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*.

Mots clés : Brassicaceae, *Zilla macroptera*, *Biscutella raphanifolia*, Asteraceae, *Inula graveolens*, *Inula viscosa*, Antioxydante, Anticholinestérase, Antibactérienne.

Abstract

The chemical study of secondary metabolites of the species *Biscutella raphanifolia* collected from Constantine and *Zilla macroptera* from the region of Ghardaia, allowed, by the use of different methods of extraction and separation, the isolation of twenty products from which ten were identified including, four isolated from the *n*-butanol extract of *Biscutella raphanifolia* and seven from the *n*-butanol extract of *Zilla macroptera*.

GC and GC/MS analyses of the essential oil of fresh aerial parts of *Inula graveolens* species showed that it is mainly characterized by isobornyl acetate (50.8%), borneol (18.3%) and τ -cadinol (6.2%).

GC and GC/MS analyses of the essential oils of fresh aerial parts of *Inula viscosa* collected from two different regions are mainly represented by nerolidol (25.3%), isocostic acid (10.1%), costic acid (8.0%), neo-intermedeol (6.4%) and caryophyllene oxide (5.5%) for the plant collected at Ain El-Bey (South Constantine) and by isocostic acid (25.1%), costic acid (15.2%), nerolidol (9.6%), linoleic acid (9.1%), neo-intermedeol (7.5%) and fokienol (7.2%) for the plant collected at Hamma Bouzianne (Northern Constantine).

The investigation of the biological activities of eight extracts of these two species showed that the ethyl acetate extract exhibited the best antioxidant activity which may be due to the presence of phenolic compounds in polar extracts.

Petroleum ether extracts showed the best anti-cholinesterase activity.

The petroleum ether extract of *Biscutella raphanifolia* exhibited the best antibacterial activity against ETEC, EPEC and *Enterococcus faecalis*, while the EHEC strain was more sensitive to the dichloromethane extract.

The essential oils of *Inula viscosa* showed the best activity against *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*.

Key words: Brassicaceae, *Zilla macroptera*, *Biscutella raphanifolia*, Asteraceae, *Inula graveolens*, *Inula viscosa*, antioxidant, anti-cholinesterase, antibacterial.

المخلص

سمحت الدراسة الكيميائية لمركبات الايض الثانوي للنوعين *Biscutella raphanifolia* التي قطفت من قسنطينة و *Zilla macroptera* التي قطفت من منطقة غرداية، باستعمال مختلف طرق الاستخلاص و الفصل، سمحت بعزل عشرين مركبا و تحديد بنية عشرة مركبات منها، أربع مركبات عزلت من المستخلص البوتانولي لنبته *Biscutella raphanifolia* و ست مركبات من المستخلص البوتانولي للنبته *Zilla macroptera*.

اظهر تحليل GC / MS و GC للزيوت الأساسية للجزء الهوائي للنبته الغضة *Inula graveolens* التي قطفت من قسنطينة و جود مركبات أساسية هي: (50,8%) acétate d'isobornyle و (18,3%) bornéol و (6,2%) τ -cadinol

كما اظهر تحليل GC / MS و GC للزيوت الأساسية للجزء الهوائي للنبته الغضة *Inula viscosa* التي قطفت من منطقتين مختلفتين في ضواحي قسنطينة و جود مركبات أساسية هي: (25,3%) nérolidol و (8,0%) l'acide costique و (10,1%) l'acide isocostique و (6,4%) néo-intermedeol و l'oxyde de caryophyllène (5,5%) بالنسبة إلى النبته التي قطفت من منطقة عين الباي (جنوب قسنطينة)

(25,1%) l'acide isocostique او (15,2%) l'acide costique و (9,1%) l'acide linoléique و (9,6 %) nérolidol و (7,5%) néo-intermedeol و (7,2%) fokiéol بالنسبة إلى النبته التي قطفت من منطقة الحامة بوزيان (شمال قسنطينة).

بينت الفعاليات البيولوجية للمستخلصات الثمانية للنبتين *Biscutella raphanifolia* و *Zilla macroptera* أن أحسن فعالية مضادة للأكسدة ظهرت على مستخلصات خلاص الإيثيل و هذا يرجع الى الوجود المحتمل للمركبات الفينولية في المستخلصات القطبية.

أعطت مستخلصات الايثر البترولي أحسن فعالية مضادة للكلولين بالمقارنة مع المستخلصات الأخرى. أعطى مستخلص الايثر البترولي للنبته *Biscutella raphanifolia* أحسن فعالية مضادة للبكتيريا ضد السلالات ECET, EPEC و *Enterococcus faecalis* كما أظهرت هذه الفعالية أن السلالة ECEH أكثر حساسية للمستخلص ثنائي كلور الميثان.

بينت نتائج الفعالية المضادة للبكتيريا للزيتيين الأساسيين للنبته *Inula viscosa* أنها تملك فعالية جيدة ضد سلالات *Pseudomonas aeruginosa* و *Klebsiella pneumoniae*.

الكلمات المفتاحية : *Brassicaceae, Zilla macroptera, Biscutella raphanifolia, Asteraceae, Inula graveolens, Inula viscosa, Antioxydante, Anticholinestérase, Antibactérienne*

