

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des sciences de la nature et de la vie

N° d'ordre: 05 / Bio / 2021

N° de série: 94 / D3C / 2021



THESE

En vue de l'obtention du diplôme de

Doctorat 3^{ème} Cycle

Spécialité: Biochimie Appliquée

Présentée par

Bensari Souheir

Intitulé

**Etude et valorisation des plantes médicinales algériennes;
Contribution à une enquête ethnobotanique et investigations
phytochimiques et biologiques sur les deux plantes: *Iris
unguicularis* Poir. et *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter.**

Devant le jury composé de :

Président : A.BENSEGUENI	Prof. Université frères mentouri Constantine 1
Directeur de thèse : D. KHELIFI	Prof. Université frères mentouri Constantine 1
Co- directeur de thèse: T.N. MOUAS	MCA. Université frères mentouri Constantine 1
Examinateurs : A. ZELLAGUI	Prof. Université Larbi Ben M'hidi. Oum El Bouaghi
I. BELLIL	MCA. Université frères mentouri Constantine 1

Remerciements

Tout d'abord je tiens à remercier **Dieu** le tout puissant et miséricordieux, qui ma donnée la force, le courage et la patience d'accomplir ce Modeste travail.

En second lieu, je tiens à remercier mon encadreur Mr : **Douadi Khelifi** pour son précieux conseil, son aide et de m'avoir accepté au sein de son laboratoire pour réaliser ce travail. Je tiens à remercier sincèrement Mr: **Mustafa Abdullah Yilmaz** de m'avoir accueillie dans son laboratoire dans le centre de recherche DUPTAM de l'université DILCE, et de m'avoir permis d'effectuer mes travaux dans les meilleures conditions, merci pour votre gentillesse, vos conseils, votre modestie et générosité, votre rigueur scientifique ainsi que l'aide et le temps consacré pour ces travaux ainsi que sa collègue Mme: **Sergi Irtegun-Kandemir** pour la réalisation de l'activité cytotoxique au sein de son laboratoire.

J'adresse mes vifs remerciements aux **membres du jury** pour l'intérêt qu'ils ont porté à cette recherche en acceptant d'examiner ce travail et de l'enrichir par leurs propositions. Je remercie Le Pr. **Bensegueni A.** qui m'a fait l'honneur de présider ce jury. Merci au Pr. **Zellegui A.** et madame **Bellil I.**, examinateurs de cette thèse. Qu'ils soient assurés de ma sincère reconnaissance.

Je remercie également Mr: **Lahouel Mesbah**, Professeur à l'université Mohammed Seddik Benyahia, Jijel pour l'accueil au sein de son laboratoire ainsi que Mme: **Lariche Nessrine** pour la disponibilité et l'aide précieuse.

Je remercie aussi Mr: **Chawki Bensouici** pour ses conseils ainsi que son équipe du laboratoire de biochimie au Crbt de Constantine.

Mes vifs remerciements vont également à mon oncle Mr: **Bensari Charaf** qui a toujours été présents pour les bons conseils.

Je remercie en particulier mon amie, collègue et complice Mlle: **Ouelbani Rayene** avec qui j'ai partagé ce long parcours avec ces hauts et bas, merci pour ta main toujours tendue, tes conseils et ta patience.

Je remercie de même Mme: **Behckri Sara**, Mme: **Meddouri Asma** et Mme: **Medoukali Imane** pour leur attention et leur sens d'orientation pour mener à bien les choses ainsi que toute l'équipe du GBBV.

Mes remerciements s'adressent aussi à tous **les ingénieurs** de la faculté **SNV** pour leur aide, patience et leur compréhension.

j'exprime aussi ma profonde reconnaissance à tout **le personnel** de la **conservation des forêts** de Constantine ainsi que **les herboristes** et la **population locale** pour leur collaboration.

Un grand merci au **ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique Algérien** qui m'a octroyée une bourse dans le cadre du programme PNE pour la finalisation de ma thèse.

En fin je remercie tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail

A ma très chère mère ZAHIA

Ma chère maman qui m'est le père et la mère, une femme passionnée, battante qui a une main toujours tendue pour les autres. Tu représentes une source de tendresse et l'exemple du dévouement tu n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi, ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études

Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.

Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A la mémoire de mon très cher papa

Disparu trop tôt papa j'aurais tant aimé t'avoir à mes côtés et t'entendre me dire BRAVO ma fille. J'espère que, du monde qui est sien maintenant, il apprécie cet humble geste comme preuve de reconnaissance de la d'une fille qui a toujours prié pour le salut de son âme. Puisse Dieu, le tout puissant, l'avoir en sa sainte miséricorde !

A la mémoire de mes très chers grands-parents et mon oncle Bensari Mourad

Symboles de bonté et de tendresse, Que dieu vous accorde sa sainte miséricorde

A ma très chère sœur Besma et mon très cher frère Djamel

Merci pour votre présence, vos nombreux sacrifices et d'être toujours à l'écoute. Dans ce travail je revois les traces de votre contribution dans chaque tâche accomplie durant toutes ces années.

A Mr. Kihal Mohamed Tahar

Merci pour ton encouragement, ton soutien moral et les conseils pour aller de l'avant malgré les obstacles.

A toute ma famille grands et petits

Merci d'avoir cru en moi

Liste des tableaux

Tableau 1: Quelques phénols simples isolés de différentes espèces du genre <i>Iris</i> .	6
Tableau 2: Quelques flavonoïdes isolés de différentes espèces du genre <i>Iris</i> .	7
Tableau 3: Quelques terpenoides isolés de différentes espèces du genre <i>Iris</i>	7
Tableau 4: Quelques terpenoides isolés de différentes espèces du genre <i>Iris</i> .	8
Tableau 5: Quelques flavonoides isolés d'une espèce du genre <i>Dittrichia</i> .	13
Tableau 6: Quelques lactones sésquitérpeniques isolés des espèces du genre <i>Dittrichia</i> .	13
Tableau 7: Quelques terpenoides isolés des espèces du genre <i>Dittrichia</i>	14
Tableau 8: Les principales espèces réactives de l'oxygène	25
Tableau 9: Principaux mécanismes d'action des antibiotiques	28
Tableau 10: Description du matériel d'analyse (LC-MS-IT-TOF)	51
Tableau 11: Description du matériel d'analyse (LC-MS-MS)	53
Tableau 12: Teneur en ployphénols des extraits de l'espèce <i>Iris.unguicularis</i> Poir.	65
Tableau 13: Teneur en Flavonoïdes des extraits de l'espèce <i>Iris.unguicularis</i> Poir.	67
Tableau 14: Caractérisation des différents constituants des extraits de <i>Iris unguicualris</i> Poir par la LC-MS- IT-TOF	69
Tableau 15: Identification et quantification des composés phénoliques par la LC-MS/MS des extraits AI, CI et BI	72
Tableau 16: Paramètres analytique et composés identifiés par la méthode de LC-MS/MS	72
Tableau 17: Inhibition du radical DPPH par les extraits de l'espèce <i>Iris unguicularis</i> Poir.	75
Tableau 18: Inhibition de l'oxydation du couplé acide linoléique β-carotène par les différents extraits de l'espèce <i>Iris unguicularis</i> Poir.	76
Tableau 19: Inhibition du CUPRAC par les extraits de l'espèce <i>Iris unguicularis</i> Poir.	77
Tableau 20: Activité des extraits de l'espèce <i>Iris unguicularis</i> Poir. sur les ions	78
Tableau 21: Résultats de l'activité antibactérienne des extraits de l' <i>Iris</i>	79
Tableau 22: Résultats de l'activité antibactérienne des antibiotiques µg/ml	80

Liste des figures

Figure 1: Photos de la plante <i>Iris unguicularis</i> Poir.	5
Figure 2: Photos de la plante <i>Dittrichia viscosa</i> (L.) Greuter	11
Figure 3: Acides sesquiterpéniques de <i>Dittrichia viscosa</i> (L.) Greuter.	16
Figure 4: Schéma des différents radicaux libres et des espèces réactives de l'oxygène	16
Figure 5: Réaction de peroxydation lipidique	19
Figure 6: Modifications de quelques chaînes latérales des acides aminés après attaque radicalaire.	20
Figure 7: Lésions de l'ADN après attaque radicalaire.	20
Figure 8: Les principaux sites essentiels pour la chélation des ions (Me^{+n})	25
Figure 9: Principales cibles et modes d'actions des antibiotiques	28
Figure 10: Origine de la résistance aux antibiotiques	30
Figure 11: Mécanisme de la neurotransmission	31
Figure 12: La réaction d'hydrolyse de l'acétylcholine par les cholinestérases	32
Figure 13: Les sites d'interaction de l'hAchE	33
Figure 14: Mécanisme de la mort cellulaire	37
Figure 15: Schéma de la régulation de la mort cellulaire par voie intrinsèque	39
Figure 16: Schéma de détection d'un échantillon par LC/MS/MS	46
Figure 17: Différentes étapes d'extraction à partir des rhizomes	51
Figure 18: Différentes étapes d'extraction de l'acide isocostique	60
Figure 19: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	65
Figure 20: Courbe d'étalonnage de la quercétine	66
Figure 21: Les chromatogrammes des extraits AI, CI et BI	68
Figure 22: Les chromatogrammes des extraits AI, CI et BI	72
Figure 23: les valeurs d' IC_{50} déterminées par le piégeage du radicale DPPH. Chaque valeur représente une moyenne \pm SD ($n=3$), $p<0.05$	75
Figure 24: les valeurs d' IC_{50} déterminées par l'effet du blanchiment du β -carotène. Chaque valeur représente une moyenne \pm SD ($n=3$), $p<0.05$	76
Figure 25: les valeurs du $A_{0.50}$ déterminées par l'inhibition du CUPRAC. Chaque	77

valeur représente une moyenne \pm SD ($n=3$), $p<0.05$

Figure 26: les valeurs d' IC_{50} déterminées par l'activité métal chélate. Chaque valeur
représente une moyenne \pm SD ($n=3$), $p<0.05$ **78**

Figure 27: Spectre RMN 1H de l'acide isocostique (CDCl₃ à 400 MHz) **83**

Figure 28: Spectre RMN ^{13}C de l'acide isocostique (CDCl₃ à 400 MHz) **84**

Figure 29: Effet de l'acide isocostique sur le piégeage du DPPH à différentes concentrations ($n=3$) **85**

Figure 30: Effet de l'acide isocostique sur la génération de l'anion superoxyde **86**

Figure 31: Effet de l'acide isocostique sur le gonflement mitochondriale ($n=3$) **87**

Figure 32: Pourcentage de la viabilité cellulaire en présence de l'acide isocostique **88**

Figure 33: Comparaison du pourcentage de viabilité cellulaire des différentes lignées cellulaires testées à 200 mg / ml d'acide isocostique en utilisant le test ANOVA unidirectionnel (****: la différence est très significative $p <0,0001$; ns: la différence n'est pas significatif $p \geq 0,05$) **89**

Figure 34: Structure de l'acide isocostique **90**

Liste des abréviations

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

A β : Peptides amyloïdes

ACI : Acetylthiocholineiodide

Ach : Acétylcholine

AChE : Acétylcholinestérase

AIF : Apoptosis Inducing Factor

ALT : Alanine aminotransférase

ANT : Adénine nucléotide translocase

Apaf-1 : Apoptotic protease activating factor 1

ATCC: American type culture collection

Bak : Bcl-2 homologous antagonist/killer

Bax : Bcl-2 associated X protein

Bcl-xL : Longer alternatively spliced form of Bcl-x

Bcl-2 : B cell lymphoma leukemia

BHA : Hydroxyanisole butylé

BHT : Hydroxytoluène butylé

BH : Bcl-2 Homology

BuChE : Butyrylcholinesterase

BuCI : S-Butyrylthiocholineiodide

CCL₄ : Tétrachlorométhane

chAT : Choline acétyltransférase

CI 50: Concentration inhibitrice à 50%.

CMB : Concentration minimale inhibitrice bactéricide

CMI : Concentration minimale inhibitrice

COA : Coenzyme A

CUPRAC : Cupric-reducing antioxidant capacity

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

DTNB : 5,5'-Dithiobis (2-nitro-benzoic acid)

EDTA : Éthylènediaminetétraacétique

ERO: Espèce réactive de l'oxygène

ESI : Ionisation électrospray

Fe Cl₂ :Chlorure de fer (II)

GPx : Glutathion peroxydase

GSH : Glutathion

hAChE : Inhibiteur d'acétylcholine estérase

hBuChE : Inhibiteur de la butyrylcholine estérase

LC-MS/MS : Chromatographie liquide couplée à deux spectrophotométrie de masse

LDL : Lipoprotéines de basse densité

LOO- : Radical peroxyde

LOOH : Radical hydroperoxyde

MALDI : Désorption et Ionisation par Laser Assistées par Matrice

MDA : Malonaldialdéhyde

MTT : 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromidedes)

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NaHCO₃ : Bicarbonate de sodium

NaH₂PO₄ : Dihydrogénophosphate de sodium

NaOH : Hydroxyde de sodium

NBT: Nitrobleutétrazolium

Nc : Néocuproïne

OMS: Organisation mondiale de la santé

PTP : Pore de perméabilité transitoire

redox : Réaction d'oxydoréduction

RMN : Résonance magnétique nucléaire

RMN 2D : Résonance magnétique nucléaire deux dimension

RL : Radical libre

RO- : Radical alkoxyde

ROO- : Radical peroxyde

ROS : Reactive Oxygen Species

RONS : Reactive oxygen and nitrogen species

SOD : Superoxyde dismutases

TOF : Temps de vol

VDAC : Canaux anioniques voltage-dépendants

IUCN: Union internationale pour la conservation de la nature

Sommaire

Introduction générale	1
------------------------------	---

Partie I

Généralités et données bibliographiques

Chapitre 1: Aperçu bibliographique sur les espèces étudiées

I. Etude de l'espèce <i>Iris unguicularis</i> Poir.	
1. Généralités sur la famille des <i>Iridaceae</i>	3
2. Distribution géographique	3
3. Etude du genre <i>Iris</i>	3
3.1. Description botanique du genre	3
3.2. Répartition géographique	3
3.3. Description botanique de l'espèce <i>Iris unguicularis</i> Poir.	4
3.4. Position systématique de la plante <i>Iris unguicularis</i> Poir.	4
3.5. Etude chimique et propriétés biologiques	4
3.5.1. Utilisation en médecine traditionnelle	5
3.5.2. Investigations phytochimiques et activités biologiques	5
II. Etude de l'espèce <i>Dittrichia viscosa</i> (L.) Greuter.	9
1. Généralités sur la famille des Asteraceae	9
2. Distribution géographique	10
3. Etude du genre <i>Dittrichia</i>	10
3.1. Description botanique du genre	10
3.2. Répartition géographique	11
3.3. Description botanique de l'espèce <i>Dittrichia viscosa</i> (L.) Greuter	11
3.5. Etude chimique et propriétés biologiques	12
3.5.1. Utilisation en médecine traditionnelle	12
3.5.2. Investigations phytochimiques et activités biologiques	12
3.5.3. Travaux antérieurs sur l'espèce <i>Dittrichia viscosa</i> (L.) Greuter	14
3.5. Etude chimique et propriétés biologiques	12
3.5.1. Utilisation en médecine traditionnelle	12
3.5.2. Investigations phytochimiques et activités biologiques	12

Chapitre 2: Aperçu bibliographique sur les activités biologiques

I. Activité antioxydante	17
1. Le stress oxydant	17
1.1. Définition	17
1.2. Les espèces réactives de l'oxygène	17
1.3. Cibles biologiques du stress oxydant	19

1.4. Le stress oxydant et les pathologies	21
2. Les antioxydants	21
2.1. Définition	21
2.2. Les systèmes de défenses antioxydants (Enzymatique et non enzymatique	21
2.3. L'activité antioxydante des composés phénoliques	23
II. Activité antibactérienne	25
1. Généralités	25
2. Techniques d'évaluation de l'activité antibactérienne	26
2.1. Méthode de dilution en milieu solide	26
2.2. Méthode de dilution en milieu liquide	26
2.3. Détermination de la CMI et la CMB	27
3. Les antibiotiques	27
3.1. Définition	27
3.2. Mode d'action	27
3.3. Résistance des bactéries aux antibiotiques	29
4. L'activité antibactérienne des composés phénoliques	30
III. Activité anti-Alzheimer	30
1. Généralités sur la maladie d'Alzheimer	30
2. La neurotransmission, l'Ach et les cholinestérases	31
2.1. Neurotransmission cholinergique (l'Ach)	32
2.2. les cholinestérases	32
3. Relation entre la maladie d'Alzheimer et la neurotransmission	34
4. Activité anticholinestérase	34
5. Les composés phénoliques et la maladie d'Alzheimer	35
IV. Activité cytotoxique	36
1. Définition du cancer	36
2. Mort cellulaire programmée (Apoptose)	36
3. Régulation de la mort cellulaire par voie intrinsèque (voie mitochondriale)	37
4. Evaluation du potentiel anticancéreux des plantes (Thérapie basée sur la mort cellulaire)	39

**Chapitre 3: Aperçu bibliographique sur la spectrométrie de masse
et la résonance magnétique nucléaire**

I. La spectrométrie de masse	41
1. Définition	41
2. Composition	41
3. Spectrométrie de masse tandem (LC/MS/MM)	44
II. II. La résonance magnétique nucléaire (RMN)	46

1. Définition	46
2. Les différentes techniques utilisées en RMN	47

Partie II

Matériel et Méthodes

I. Investigations phytochimiques et activités biologiques de l'espèce <i>Iris unguicularis</i> Poir.	49
1. Matériel végétal et extraction	49
2. Teneur en composés phénolique totaux et en flavonoïdes	49
3. Elucidation des profiles phytochimiques par la LC-MS-IT-TOF	51
4. Instruments et conditions chromatographiques de la LC-MS/MS	53
5. Activités biologiques	54
5.1. Activité antioxydante	54
5.1.1. Test de DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl)	54
5.1.2. Test du blanchiment du β-carotène	55
5.1.3. Test de la capacité antioxydante par la réduction du cuivre (CUPRAC)	55
5.1.4. Chélation des ions métalliques (Métal-chélate)	56
5.2. Activité antibactérienne	56
5.2.1. Les milieux de cultures utilisés	57
5.2.2. Préparation des suspensions bactériennes	57
5.2.3. Préparation de la gamme de concentration des extraits	57
5.3. Activité anti-Alzheimer	58
II. Activité cytotoxique de l'acide isocostique isolé à partir de l'espèce <i>Dittrichia viscosa</i> (L.) Greuter.	59
1. Matériel végétal et extraction	61
2. Spectroscopie de RMN	61
3. Activité cytotoxique	61
3.1. Extraction des mitochondries du foie	61
3.2. Activité antioxydante par piégeage du radicale (DPPH)	62
3.3. Mesure de la production mitochondriale de l'anion superoxyde	62
3.4. Mesure de l'apoptose par mesure du gonflement mitochondrial	62
3.5. Mesure de la viabilité des cellules par le test MTT	62

Partie III

Résultats et Discussion

I. Etude phytochimique et activités biologiques de l'espèce <i>Iris unguicularis</i> Poir.	65
1. Teneur en polyphénols	65
2. Teneur en Flavonoïdes	66
3. Elucidation des profiles phytochimiques par la LC-MS-IT-TOF	68

4. Analyse quantitative des composés phénoliques par la LC-MS/MS	71
5. Activité antioxydante	75
5.1. Test du DPPH	75
5.2. Test de blanchiment du β -carotène	76
5.3. Test de la capacité antioxydante par la réduction du cuivre (CUPRAC)	77
5.4. Chélation des ions métalliques (Métal-chélate)	78
6. Activité antibactérienne	79
7. Activité anti-Alzheimer	81
II. Etude de l'effet cytotoxique de l'acide isocostique isolé de l'espèce <i>Dittrichia viscosa</i>	82
(L.)Greuter	
1. Identification structurale par RMN de l'acide isocostique	82
1.1. RMN ^1H	82
1.2. RMN ^{13}C	83
2. Effet de l'acide isocostique sur le piégeage du radical DPPH	84
3. Effet de l'acide isocostique sur la production de l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\circ\cdot}$) par les mitochondries du foie des rats <i>in vitro</i>	85
4. Effet de l'acide isocostique sur le gonflement mitochondrial <i>in vitro</i>	86
5. L'activité antiproliférative de l'acide isocostique	90
Discussion générale	91
Conclusion et perspectives	94
Résumés	96
Références	99
Contribution à l'enquête ethnobotanique	112

Introduction Générale

L'homme à depuis longtemps eu recours aux vertus des plantes qui lui procurent les éléments essentiels pour prévenir, soigner ou guérir ses maladies, c'est ainsi qu'au cours du temps les traditions humaines ont su développer les connaissances et les utilisations des plantes médicinales qui font partie du savoir de base de toutes les sociétés humaines et qui appartiennent essentiellement à des praticiens traditionnels qui les transmettent oralement.

Aujourd'hui encore et malgré les progrès réalisés en médecine, la majorité de la population et en particulier les pays en voie de développement se réfèrent encore aux pratiques traditionnelles pour se soigner, soit à cause des traitements médicamenteux qui sont coûteux ou indisponibles ou tout simplement grâce aux résultats prometteurs des différents bénéfices de ces remèdes naturels [44].

Ce qu'on appelle médecine traditionnelle est devenue à travers le temps une source immense de molécules complexes qui semble inépuisable car elle recèle encore de grandes quantités de molécules offrant un domaine de recherche qui peut être considéré comme infini, en effet, de l'aspirine au taxol, l'industrie pharmaceutique s'appuie et s'inspire elle même de la diversité des métabolites secondaires des végétaux pour trouver des produits originaux aux propriétés inédites.

Ayant une position géographique privilégiée, l'Algérie possède une flore extrêmement riche et variée et insuffisamment exploitée qui comprend environ 3000 espèces de différentes familles dont 15 % sont endémiques, à cette richesse spécifique est associée une originalité sur le plan phytochimique et sur le plan propriétés biologiques. Cependant, l'évaluation des propriétés phytothérapeutiques demeure une tâche très intéressante et utile du fait que les métabolites secondaires font et restent l'objet de nombreuses recherches *in vitro* comme *in vivo*, notamment la recherche de nouveaux constituants naturels tels que les composés phénoliques, les terpènes,...etc.

L'élaboration de ce travail s'inscrit dans le cadre du projet de recherche de notre laboratoire qui a pour but la valorisation des ressources végétales de la flore Algérienne en contribuant dans un premier temps à la réalisation d'une enquête ethnobotanique au niveau des deux villes de Constanitne et Mila suivie par des travaux phytochimiques et biologiques sur deux espèces issues de la flore Algérienne: *Iris unguicularis* Poir. ainsi que *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter.

Notre manuscrit est divisé en trois principales parties qui sont : l'étude bibliographique, Matériel et Méthodes et enfin Résultats et Discussion.

La première partie qui est consacrée à l'étude bibliographique est elle même subdivisée en trois chapitres:

- ✚ Chapitre 1: ce chapitre regroupe un bref aperçu sur les données bibliographiques botaniques et chimiques sur les espèces sélectionnées pour les investigations phytochimiques et biologiques et qui comportent des données sur les familles et genres auxquels elles appartiennent ainsi que leur description botanique mais aussi des données sur leurs utilisations traditionnelles et les travaux antérieurs réalisés.
- ✚ Chapitre 2: ce chapitre est consacré à des données générales sur les activités biologiques réalisées dans cette thèse on souligne l'activité antioxydante, l'activité antibactérienne, l'activité anti-Alzheimer et enfin l'activité cytotoxique.
- ✚ Chapitre 3: ce dernier chapitre aborde les techniques qui permettent d'analyser et d'identifier les molécules issues des plantes médicinales et plus précisément la spectrométrie de masse et la résonnance magnétique.

La partie Matériel et Méthodes quant à elle, regroupe la présentation du matériel végétal (localisation et identification) ainsi que sa collecte et les différentes étapes d'extraction, suivi des méthodes employées dans cette étude pour les investigations phytochimiques et biologiques sur les deux espèces sélectionnées (*Iris unguicularis* Poir. et *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter).

La troisième partie correspondant aux Résultats et Discussion regroupe les travaux personnels réalisés et qui sont structurés en 2 parties :

- ✚ Investigations phytochimiques et activités biologiques de l'espèce *Iris unguicularis* Poir.
- ✚ L'effet cytotoxique de l'acide isocostique isolé de l'espèce *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter.

Partie I

*Généralités et données
bibliographiques*

| *Chapitre 1*

*Aperçu bibliographique sur les espèces
étudiées*

I. Etude de l'espèce *Iris unguicularis* Poir.

1. Généralités sur la famille des *Iridaceae*

La famille des *iridaceae* est une famille qui appartient à la sous classe des Monocotylédones, ce sont des plantes herbacées vivaces à rhizome rampant ou bulbiforme, rarement des sous-arbrisseaux. Les feuilles des différentes espèces qui composent cette famille sont linéaires, distiques en spirale et souvent engainantes, les fleurs hermaphrodites quant à elles sont enfermées avant la floraison dans une spathe, la périanthe est à 6 tépales pétales libres ou soudés en tube à la base, androcée à trois étamines, gynécée à trois carpelles soudés et ovaire infère. La capsule est loculicide, trivalve et polysperme et les graines sont rondes ou anguleuses à téguments minces ou plus ou moins épais. L'inflorescence est parfois ponctuée ou réduite à une feuille solitaire.

La famille est actuellement divisée en quatre sous-familles : Isophysidoideae, Nivenioideae, Iridoideae, Ixioideae. La sous famille **Isophysidoideae** contient le seul genre *Isophysis*, de la Tasmanie. La sous famille **Nivenioideae** contient six genres d'Afrique du Sud, l'Australie et Madagascar : *Klattia*, *Nivenia* et *Witsenia* ainsi que la seule saprophyte (*Geosiris*). Les sous famille **Iridoideae et Ixi oideae** contiennent la majorité des genres *Iridaceae* entre autre les genres *Iris*, *Moraea*, *Bobartia*, *Dietes*, *Ferraria*, *Ixia*, *Gladiolus*, *Crocus*, *Freesia* et *Watsonia* qui se propagent autour du bassin méditerranéen [1, 2].

2. Distribution géographique

C'est une famille de plantes cosmopolites largement distribuée dans le bassin méditerranéen, le Madagascar, l'Amérique central, l'Afrique central, du sud et l'Afrique de l'est mais qui manque dans les régions froides et le nord de l'Eurasie.

En Algérie, la famille des *Iridaceae* est représentée par 4 principaux genres qui sont: *Gladiolus* (L), *Romulea Maratti*, *Crocus* L et enfin le genre *Iris* [3].

3. Etude du genre *Iris*

3.1. Description botanique du genre

L'*Iris* est une plante vivace à rhizome allongé, rampant ou très court, à bulbe ou tubercule bulbiforme vêtus de tuniques brunes membraneuses ou fibreuses avec des feuilles linéaires ou ensiformes. Les tiges sont solitaires ou fasciculées, simples ou rameuses, très feuillées à la base, peu feuillées au-dessus. Les fleurs sont rarement solitaires on retrouve

deux ou plus par spathe à symétrie tertiaire avec trois tépales externes plus ou moins dilatés et trois tépales internes généralement dressés et un périanthe à tube très court ou plus ou moins allongé à division onguiculées au dessus du milieu, à limbe des trois externes étalés ou réfléchis et limbe des trois internes plus étroites, dressés ou peu étalés au sommet. les étamines insérées sur la base des divisions externes, basifixes, recouvertes par les stigmates [2].

3.2. Répartition géographique

La majorité des espèces de ce genre sont issus des zones tempérées et tropicales de l'hémisphère nord, dans des régions sèches semi-désertiques, ou dans des zones montagneuses rocheuses les plus froides. On les retrouve, en Europe, en Asie, en Afrique du nord et en Amérique du nord. En Algérie, l'Iris est représentée par trois espèces: *Iris pseudoacorus* L, *Iris planifolia* (Mill.), *Iris unguicularis* Poir. [3]. Dans cette étude nous nous intéresserons à l'espèce *Iris unguicularis* Poir.

3.3. Description botanique de l'espèce *Iris unguicularis* Poir

D'après Quezel et Santa 1963, *Iris unguicularis* Poir. est une plante endémique à rhizome rampant avec 4 à 6 feuilles par poussée qui sont linéaires et assez fermes, dressées ou arquées longuement atténues au sommet aigu. La division du périanthe est de coloration très variable. Les fleurs quant à elles sont un peu odorantes, subsessiles sur le rhizome, à tube périanthique très long simulant un pédoncule. Les tépales externes obovales-cuneiformes, étalés ou un peu récurvés, pourvus d'une bande médiane longitudinale jaune, dépassant le milieu, blancs veinés de bleu vers la base, pales, gris-violacé extérieurement, les tépales internes subégaux, drésés et peu incurvés au sommet, oblongs, longuent onguiculés à onglets brun rouge intérieurement. Les capsules bosselées sont oblongues trigones, brusquement contractées en bec de 4 mm environ. Les graines sont de couleur brun noir [2].

La floraison est de décembre à avril. Cette espèce est commune dans le Tell Algéro-constantinois jusqu'à environ 1600 m d'altitude est pousse dans la broussaille et les forêts (**Figure 1**)

3.4. Position systématique de la plante *Iris unguicularis* Poir.

Règne → Plantae

Ordre → Asparagales

Famille → Iridaceae
Genre → *Iris*
Espèce → *Iris unguicularis* Poir.



Figure 1: Photos de la plante *Iris unguicularis* Poir. (A) : Fleur; (B): Rhizomes

3.5. Etude chimique et propriétés biologiques

3.5.1. Utilisation en médecine traditionnelle

Les espèces du genre *Iris* sont réputées par leurs rhizomes qui ont longtemps été utilisés en médecine traditionnelle comme astringent, anti-inflammatoire, diurétique, tonique ainsi que dans les infections bactériennes et virales [4, 5]. En Turquie également, les rhizomes des *Iris* appelés localement 'navruz' ou 'susen' , étaient aussi utilisées comme carminatif et laxatif [6]. On citera ainsi quelques exemples de ces espèces très appréciées en médecine populaires:

Dans la médecine populaire Anatolienne, les deux plantes *Iris germanica* L. et *Iris pseudoacarius* étaient utilisées comme diurétique, carminatif et contre les constipations et les douleurs d'estomac. L' *Iris germanica* L. était utilisée également par divers applications orales et topiques pour le traitement des plaies et pour les tâches de rousseurs ainsi que pour soulager les douleurs dentaires, la décoction des racines quant à elle était utilisée comme antispasmodique et emménagogue [6].

Iris dichotoma Pall. appelée en chine "Bai She Gan" ou "Bai Hua She Gan" était utilisée en médecine traditionnelle chinoise pour le traitement des inflammations et les maladies du système respiratoire ainsi que pour la détoxification de l'organisme [4, 5].

Dans la médecine populaire Chinoise toujours et dans la dernière édition de "Chinese Pharmacopia", *Iris tectorum*. était dénommée "Chuan She Gan", utilisée pour le traitement du mal de gorge et du flegme et comme détoxifiant [5].

Iris bungei. était utilisée en médecine traditionnelle Mongol pour le traitement du cancer, des inflammations et dans les infections virales et bactériennes ainsi que *Iris Kumaonensis*, dont les rhizomes étaient utilisés pour les infections rénales [7].

3.5.2. Investigations phytochimiques et activités biologiques

Les rhizomes des différentes espèces du genre *Iris* ont fait objet de nombreuses études dont l'objectif était de déterminer les activités biologiques des extraits ou bien des principes actifs purs isolés de ces dernières. En effet, plusieurs métabolites secondaires et plus spécialement les composés phénoliques ont été isolés à partir des espèces de ce genre et qui ont montré des activités biologiques intéressantes telles que l'activité antioxydante, anti-inflammatoire et antibactérienne,...etc

a. Principaux métabolites secondaires isolés

- Phénols simples**

Se sont des composés contenus dans un certain nombre de plantes, dont le squelette est basé sur le C6-C1 et au maximum C6-C2 (**Tableau 1**)

Tableau 1 : Quelques phénols simples isolés des différentes espèces du genre *Iris*

<i>Iris spp</i>	Composés isolés	Formule	Références
<i>Iris suaveloens</i> Rhizome	Coniferaldehyde 1 p-hydroxyacetophénone 3	C ₁₁ H ₁₂ O ₃ C ₉ H ₁₂ O ₃	[8]
<i>Iris dichotoma</i> Rhizome	Iridochototin D Tecturoside	C ₁₀ H ₁₄ O ₅ C ₂₁ H ₃₀ O ₁₄	[9]
<i>Iris germanica</i>	Acide caféïque Acide p-coumarique Acidide protocatéchique Acide syringique Acide vanillique	C ₉ H ₈ O ₄ C ₈ H ₈ O ₃ C ₇ H ₆ O ₄ C ₉ H ₁₀ O ₅ C ₈ H ₈ O ₄	[10]

- **Polyphenols (Les flavonoïdes)**

C'est les plus distribués dans la nature et présents dans tout le règne végétal, basés sur un squelette de C₆ C₃ C₆ (**Tableau 2**).

Tableau 2: Quelques flavonoïdes isolés de différentes espèces du genre *Iris*

<i>Iris spp</i>	Composés isolés	Formule	Références
<i>Iris soforana</i> Rhizome/Racine	5, 3', 4'-trimethoxy-6,7-methylenedioxyisoflavone 5, 3'-dihydroxy-4'-methoxy-6,7-méthylenedioxyisolavone	C ₁₈ H ₁₄ O ₆ C ₁₇ H ₂₀ O ₆	[11]
<i>Iris tectorum</i> Rhizome	5, 7, 4'-trihydroxyisoflavone (genistein) 3, 4', 5-trihydroxy-7-methoxyflavone (rhamnocitrin)	C ₁₅ H ₁₀ O ₅ C ₁₆ H ₁₂ O ₆	[12] [13]
<i>Iris germanica</i> Rhizome	4, 7, 3'-trihydroxy-6, 4'-dimethoxyisolavone 5, 2'-dihydroxy-3-methoxy-6, 7-methylenedioxyflavone	C ₁₈ H ₁₆ O ₈ C ₁₇ H ₁₂ O ₇	[11] [14]
<i>Iris lactea</i> Partie souterraine	5-hydroxy-7-methoxyflavone (tectochrysin) 5, 2'-dihydroxy-6, 7-methylenedioxyflavanone	C ₁₆ H ₁₂ O ₄ C ₁₆ H ₁₂ O ₆	[15]

- **Terpénoïdes**

C'est composés sont également classés parmi les substances secondaires très importantes formés d'un assemblage d'un nombre entier d'unités isopréniques (**Tableau 3**).

Tableau 3: Quelques terpénoïdes isolés de différentes espèces du genre *Iris*

<i>Iris spp</i>	Composés isolés	Formule	Références
<i>Iris tectorum</i> Rhizome	Iritectol A Iridobelamal Isoiridogermanal	C ₃₀ H ₅₀ O ₅ C ₂₈ H ₄₈ O ₄ C ₂₉ H ₄₈ O ₄	[16]

<i>Iris japonica</i> Racines	Isoiridogermanal	$C_{29}H_{48}O_4$	[17]
	28-deacetylbelamcandal	$C_{32}H_{47}O_3$	
	Iridial	$C_{32}H_{47}O_3$	
<i>Iris germanica</i> Rhizome	Acetylisoiridogermanal	$C_{31}H_{50}O_5$	[17]
	α -Irigermanal	$C_{30}H_{50}O_3$	
	α -Dehydroirigermanal	$C_{30}H_{48}O_3$	

- **Xanthones:**

Se sont des pigments jaunes retrouvés dans de nombreuses espèces dont la formule brute est $C_{13}H_8O_2$ (**Tableau 4**).

Tableau 4: Quelques xanthones isolés de différentes espèces du genre *Iris*

<i>Iris spp</i>	Composés isolés	Formule	Références
<i>Iris dichotoma</i> Racine et rhizome	Neomagniferin	$C_{25}H_{28}O_{17}$	[9]
	Nigricaniside	$C_{19}H_{18}O_{11}$	
<i>Iris ross</i>	Mangiferin X ^{II} -o-acetate	$C_{19}H_{18}O_{11}$	[18]

b. Activités biologiques

Les travaux antérieurs réalisés sur les espèces du genre *Iris* avaient montré différentes activités de ces dernières surtout en ce qui concerne l'activité antioxydante et antibactérienne.

L'extrait éthanolique du rhizome de la plante *Iris albicans*, avait monté une activité antioxydante avec une CI50 de 11.1mg/ml et un pourcentage d'inhibition de 97.7% (+/-0.1), ainsi qu'une activité antibactérienne contre *Bacillus subtilis* ATCC 6633 [19].

Des flavonoïdes connus isolés à partir du rhizome et des racines de *Iris songarica* ainsi qu'un nouveau flavanonol Songaricol possédaient également une activité antioxydante qui empêchait la régénération des ERO [20]. Une activité antioxydante a également été enregistrée pour les deux composés irilone et Kaempférone isolés à partir de l'extrait

méthanolique de *Iris pseudopumila*, l'extrait méthanolique de cette dernière s'est montré actif lors de l'évaluation de l'activité antibactérienne [21].

Des isoflavonoïdes isolés à partir du rhizome de *Iris germanica* ($5'$, 5 , 7-trihydroxy- $3'$, $4'$, 8-trimethoxy isoflavone; 5 , 7 , $3'$ - trihydroxy- 6 , $4'$, $5'$ - trimethoxy isoflavone; 5-hydroxy- $4'$ -methoxy- 6 , 7-methylenedioxy isoflavone; 5-methoxy- $4'$ -hydroxy- 6 , 7methylenedioxy isoflavone; 5 , 7 , $5'$ -trihydroxy- 6 , $4'$ -dimethoxyisoflavone) ont été testés pour l'activité anti-inflammatoire qui s'est montrée significante par comparaison avec des médicaments anti-inflammatoire synthétiques tel que l'Aspirine et indométacine [22]. À coté de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait méthanolique de *Iris pseudopumila*, cette dernière avait également montré que les deux composés Isoorientin et isovitexin isolés avaient une activité prometteuse dans l'inhibition de AChE et BuChE [23]. Dans le but de trouver de nouveaux composés cytotoxiques pouvant être utilisés en chimiothérapie pour le traitement du cancer, des chercheurs ont pu isoler à partir de l'extrait du rhizome de la plante *Iris tectorum* deux flavonoïdes et quatre terpénoïdes qui ont montré une bonne activité cytotoxique ce qui est cohérent avec son utilisation en médecine traditionnelle [16].

3.5.3. Travaux antérieurs sur l'espèce *Iris unguicularis* Poir.

D'après les recherches bibliographiques, l'espèce *Iris unguicularis* Poir. n'était pas utilisée en médecine traditionnelle, tandis que sur le plan phytochimique, une seule investigation a été réalisée et qui avait pour objectif l'isolement et l'identification des différents constituants de cette espèce et l'évaluation biologique de ses produits afin de découvrir de nouveaux inhibiteurs potentiels de l'enzyme α -glucosidase et de la protéine de la glycation, ce qui a conduit à l'isolement des composés suivants: 24-Methylpollinasterol; Eupatorin; 5,7-Dihydroxy-6-methoxychromone; 4',5,7-Trihydroxy-6-methoxyflavanone, Tectorigenin,Kaempferol; 4',5,7-Trihydroxy-3',8-dimethoxyflavanone; 8-Methoxyeriodictyol; Hispidulin; Mangiferin; 1,3-O-diferuloylsucrose. Les deux composés, Kaempféról et 8-Methoxyeriodictyol, possédaient une activité prometteuse vis-à-vis de l'inhibition de l'enzyme α -glucosidase ce qui est important dans le contrôle du diabète [24]. Une autre équipe de recherche a étudié l'activité antioxydante et antifongique de l'extrait méthanolique de la partie aérienne de l'espèce *Iris unguicularis* Poir. et les résultats étaient satisfaisants, en effet cette dernière avait une bonne activité concernant le piégeage du radical libre DPPH, mais une activité modérée concernant le pouvoir réducteur, alors qu'une activité antifongique très

importante a été enregistré surtout contre l'espèce *Aspergillus niger* avec une inhibition de 100% [25].

II. Etude de l'espèce *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter.

1. Généralités sur la famille des Asteraceae

La famille des Asteraceae est une familles de plantes dicotylédones qui représente la deuxième plus grande famille de plantes à fleurs, se sont généralement des herbacées mais il peut exister des arbres et arbustes. Ces plantes sont vivaces glanduleuses et visqueuses à odeur forte caractérisées par des fleurs réunies les unes à côtés des autres en capitules, les étamines sont assemblées par leurs anthères déhiscentes vers l'intérieur, les stigmates quant à eux se déplient et exposent leur face gluante au pollen après avoir traversé le tube formé par des anthères. L'inflorescence est ordinairement un compact de fleurs sessiles tubulées et/ou ligulées sous-tendus par un involucre de bractées disposées sur un ou plusieurs rangs [2].

2. Distribution géographique

Cette famille compte près de 20000 espèces réparties en 1300 genres représentant environ 8 à 10% de toutes les plantes à fleurs [26]. En Algérie il existe 109 genres et 408 espèces d'après Quezel et Santa [2]. La distribution de cette famille est mondiale mais on la trouve principalement dans les régions tropicales et subtropicales et moins fréquente dans les forêts tropicales.

3. Etude du genre *Dittrichia*

3.1. Etude botanique:

3.1.1. Description botanique du genre:

Le genre renferme une variété d'environ 90 espèces qui sont des plantes herbacées vivaces annuelles ou bisannuelles, des arbustes ou des sous-arbrisseaux ayant une taille très variable de quelques centimètres à trois mètres pour certains [27]. Leurs feuilles sont alternes ou opposées, simples, entières ou découpées et parfois composées dépourvues de stipules, les capitules sont jaunes contenant à la fois des fleurs tubuleuses et des fleurs ligulées hermaphrodites, unisexuées ou neutres. Les étamines sont insérées sur la corolle; filets libres anthères soudées (synanthie) autour du style, à déhiscence longitudinale parfois appendiculées. Disque nectarifère épigyne. Ovaire infère, pseudo monomère uniloculaire ;

style traversant le tube formé par les anthères ; deux stigmates, placentation basale, un seul ovule anatrophe, unitégumenté. L'inflorescence est en capitule plan, convexe ou concave, entouré d'un involucre de bractées (fleur solitaire chez Echinops). Présence ou non de bractées (paleae) sur le réceptacle capitulaire, entre les fleurs (**Figure 2**).

3.1.2. Répartition géographique:

Le genre *Dittrichia* est largement distribué dans les régions tempérées et froides de l'Asie (Chine, Turquie, Japon, Korea...), l'Europe (Espagne, France...), Australie et en Afrique (Egypte, Algérie, Maroc) [28, 29].

II.3.1.3. Description botanique de l'espèce *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter

Règne → Plantae

Ordre → Asterales

Famille → Asteraceae

Genre → Dittrichia

Espèce → Viscosa



A



B

Figure 2: Photo de la plante *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter.

D'après Quezel et Santa 1963, *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter est une plante vivace à tige frutescente à la base et de 40-100 cm, à rameaux rougeâtres. Les feuilles sont entières, dentées, aiguës ou sinuées. La base du limbe des feuilles de la tige semble l'entourer

partiellement (feuilles embrassantes), c'est une plante glanduleuse visqueuse, à odeur forte. Les fleurs peuvent être à pétales soudés en languettes jaunes (fleurs ligulées) à l'extérieur du capitule ou bien des fleurs en tubes (fleurs tubulées), jaune orangé au centre du capitule. Les ligules dépassant très nettement l'involucré. La floraison est de la fin août à novembre comme chez toutes les Asteraceae. Elle pousse dans les Garrigues, rocailles ainsi que dans les terrains argileux un peu humides. Son histoire thérapeutique est très diversifiée et connue depuis longtemps par les guérisseurs. Cette plante est très fréquente dans les régions méditerranéennes. On la trouve dans les côtes sud de l'Europe (France, Espagne, Grèce, Italie, Bulgarie et Turquie), le Moyen-Orient (Palestine, Jordanie et Syrie) ainsi que l'Afrique du Nord (Maroc, Algérie, Egypte et Libye) [30].

3.2. Etude chimique et propriétés biologiques

3.1. Utilisation en médecine traditionnelle

La médecine traditionnelle a attribué de nombreuses propriétés thérapeutiques aux espèces du genre *Dittrichia*. En effet *Dittrichia viscosa* (L) Greuter. a été utilisée depuis longtemps comme anti-inflammatoire, antiseptique, antipyrrétique dans les régions du bassin méditerranéen [31]. Dans l'usage traditionnel Espagnol, cette plante est utilisée dans le traitement de désordre Gastroduodénal. En Jordanie ainsi que dans le moyen orient, plusieurs indications sont référencées telle que : anthelminthique, expectorant, diurétique, traitement de bronchite, tuberculose, l'anémie et le cataplasme pour les douleurs de rhumatisme. Des villageois utilisaient les feuilles fraîches ou leur poudre sèche pour soigner les plaies pour stopper l'hémorragie. Pour le traitement des hémorroïdes, les feuilles broyées et mélangées avec de l'huile d'olive sont appliquées comme une pommade. La mastication des feuilles est utilisée comme analgésique dentaire. Pour le traitement du diabète et de l'hypertension, une décoction des parties aériennes est employée [32]. Cette plante est considérée comme un cicatrisant, désinfectant et un déodorant de premier ordre et elle est également employée dans le traitement des mots de tête [29].

3.2. Investigations phytochimiques et activités biologiques

Plusieurs recherches sur un grand nombre d'espèces du genre *Dittrichia* ont conduits à l'isolement et l'identification de plusieurs métabolites secondaires caractéristiques de ce genre: flavonoïdes, terpènes et lactones sésquiterpéniques, quelques exemples sont cités ci-dessous:

a. métabolites secondaires isolés:

- **Flavonoïdes**

Plusieurs flavonoïdes ont été isolé du genre *Dittrichia*, nous citrons quelques exemples ci-dessous (**Tableau 5**).

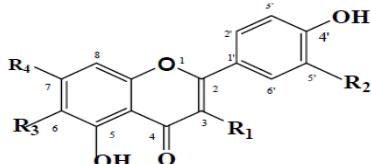


Tableau 5: Quelques flavonoïdes isolés d'une espèce du genre *Dittrichia*

<i>Dittrichia spp</i>	Composés isolés	R2	R2	R3	R4	Références
<i>Inula britanica</i>	Axillarine	OCH ₃	OH	OCH ₃	OH	[33]
	Kaempferol	OH	H	H	OH	
	Kaempferol-3-glucoside	OGlc	H	H	OH	
	Hipiduline-7-glucoside	H	H	OCH ₃	OGlc	
	Isorhamnetine 3-glucoside	OGlc	OCH ₃	H	OH	
	Patuletin 7-O-(6"-isovaleryl) glucoside	OH	OH	OCH ₃	(6"-isovaleryl) GlC	

- **Lactones sésquiterpéniques**

Se sont des composés sesquiterpéniques de formule brute C₁₅H₂₄ rattachés à des lactones qu'on trouve très souvent dans la familles des Asteraceae (**Tableau 6**).

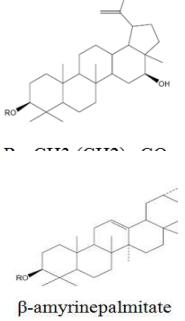
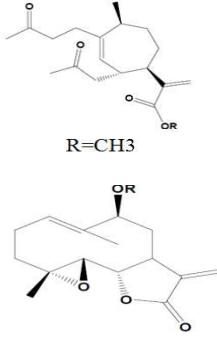
Tableau 6: Quelques lactones sésquiterpéniques isolés des espèces du genre *Dittrichia*

<i>Dittrichia spp</i>	Composés isolés	Structure	Références
<i>Inula helenium</i>	Isocostunolide		[34]
<i>Inula britanica</i>	1-O-acetylbritannicalactone		[35]
<i>Inula graveolens</i>	Tomentosine		[36]

- **Les terpènes**

Plusieurs terpenoïdes ont été isolé de plusieurs espèces de ce genre (**Tableau 7**).

Tableau 7: Quelques terpenoides isolés des espèces du genre *Dittrichia*

<i>Dittrichia spp</i>	Composés isolés	Structure	Références
<i>Inula britanica</i>	β -amyrinepalmitate, 16β -dihydroxylupeol 3-palmitate β -amyrine palmitate		[37]
<i>Inula verbascifolia</i>	6- α acétyl-4 oxobedfordidic acide 9 β -(3-methyl-pentoyl- 3-ene)- parthenolide		[38]

b. Activités biologiques

Les activités biologiques du genre *Dittrichia* peuvent être expliquées par la large gamme des propriétés biologiques des différents composés isolés. En effet, la plupart des flavonoïdes isolés de ce genre ont des propriétés anti-tumorales, antibactériennes et anti-inflammatoires [39, 40]. Les composés lactones sesquiterpéniques trouvés dans les racines de *Inula royleana* DC avaient des activités biologiques diverses telles que: antimicrobienne [41], anti-inflammatoire et antiproliférative contre différentes cellules cancéreuses [42]. Cependant, des composés alcaloïdes sont retrouvés dans les racines de *Inula royleana* et sont utilisé contre l'hypertension [43]. L'huile essentielle des parties aériennes de la plante est prescrite pour le traitement des maladies respiratoires et digestives. Une étude sur *Inula cappa* a attribué l'activité antioxydante à la teneur de cette dernière en acide chlorogénique [44].

3.3. Travaux antérieurs sur l'espèce *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter.

Plusieurs investigations phytochimiques et biologiques ont été réalisées sur cette espèce. En effet l'acide 1,3-dicaffeoylquinique isolé à partir des feuilles de l'extrait méthanolique a montré une très forte activité antioxydante dans le test d'ABTS avec une réduction de 80% de ce dernier ainsi qu'une forte activité contre le radical DPPH avec une CI50 de 50 µM [45]. Le tayunine germacranolide, isolé également de l'extrait méthanolique des feuilles de cette plante, a montré une bonne activité antifongique contre *Microsporum canis* et *Trichophyton rubrum* [46]. Une étude menée par l'équipe de Hernandez a conduit à l'isolement de 3 flavonoïdes: 7-méthoxyaromadendrine, 3-O-acétyl 7-Ométhylaromadendrine et 3,3'-dimethoxy quercétin qui ont montré leur efficacité dans le traitement de l'inflammation [47]. L'acide α -isocostique représente le premier produit naturel présentant des propriétés antifongiques et antibactériennes [48, 49]. Cependant, cette espèce comme la plupart des espèces du genre *Dittrichia*, est très riche en flavonoïdes, terpènes et lactones sésquiterpéniques qui lui offre un grand spectre d'activités biologiques mais nous allons nous étaler un peu plus sur les acides sésquiterpéniques isolés à partir de *Dittrichia viscosa* ainsi que sur son activité anticancéreuse.

a- Les acides sesquiterpéniques

Plusieurs études se sont intéressées aux acides sesquiterpéniques de *Dittrichia viscosa* et qui ont conduit à l'identification et l'isolement de plusieurs de ces composés. En effet l'acide α -costique représente le premier composé de cette famille isolé à partir de l'extrait d'éther de pétrole des feuilles de cette espèce [49]. Une autre étude rapportant la composition en sesquiterpènes de l'extrait acétonique de la partie aérienne avait abouti à l'isolement de deux nouveaux composés: l'acide 2,5-dihydroxyisocostique et l'acide 2,3-dihydroxycostique ainsi que l'acide isocostique [50]. Cependant d'autres acides sesquiterpéniques ont été isolés à partir de cette plante (**Figure 3**) [26, 41, 42].

b- Activité anticancéreuse

Des recherches antérieures menées sur des extraits de *Dittrichia Viscosa* avaient montré que cette dernière possédait une activité anticancéreuse importante, en effet des fractions méthanoliques des fleurs de cette dernière étaient actives contre les cellules MCF-7 avec une CI50 de 27.960µg/ml. Dans une autre étude qui avait pour but d'établir l'effet cytotoxique

de différentes plantes sur le cancer du col utérin, l'extrait méthanolique de cette dernière été doté d'un effet cytotoxique marquant sur deux lignées cellulaires SIH et HeLa avec des valeurs de CI50 de 54 ± 12 et $99 \pm 1 \mu\text{g/ml}$ et de 60 ± 8 et $112 \pm 4 \mu\text{g/ml}$ respectivement. Une activité antiproliférative de l'extrait chloroformique de cette plante a également été enregistrée contre la lignée cellulaire Vero avec une valeur de CI50 de $44.82 \mu\text{g/ml}$ [53].

Une étude faite sur des extraits de cette plante a également montré l'apoptose dans la lignée cellulaire du mélanome humain induite par les sesquiterpènes tomentosin ainsi que l'inuvisolide [54].

Une équipe a travailler sur la recherche de nouvelles substances naturelles capables d'inhiber la prolifération des cellules cancéreuses du col de l'utérus, l'effet cytotoxique de la tomentosine et de l'acide isocostique a été étudié sur les deux lignées SIH et HeLa, la tomentosine avait un effet inhibiteur significatif et important avec des valeurs de CI50 de $12.12 \pm 1.87 \mu\text{M}$ et $10.77 \pm 0.4 \mu\text{M}$, respectivement alors que l'acide isocostique avait un effet inhibiteur relativement modéré avec des valeur d'CI50 de $133.31 \pm 4.68 \mu\text{M}$ pour la cellule SiHa et $70.55 \pm 3.08 \mu\text{M}$ pour la lignée cellulaire Hela [54].

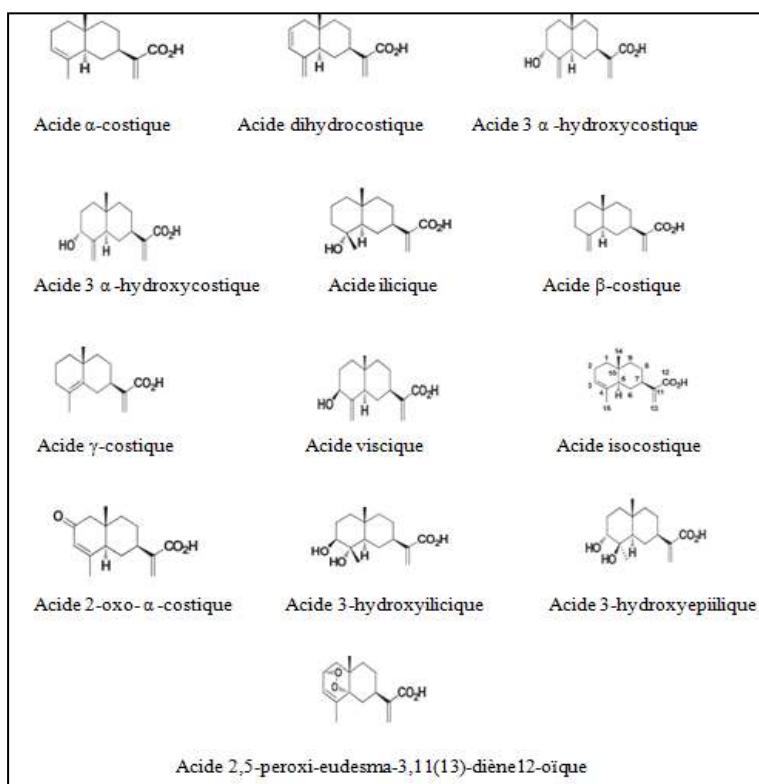


Figure 3: Acides sesquiterpéniques de *Dittrichia Viscosa* (L) Greuter.

Partie I

*Généralités et données
bibliographiques*

Chapitre 2

*Aperçu bibliographique sur les
activités biologiques ciblées*

I. Activité antioxydante

1. Le stress oxydant

1.1. Définition :

L'oxygène est un élément constitutif fondamental de la matière vivante. En effet, en plus de son rôle fondamental dans la respiration mitochondriale et la production de l'énergie, les cellules de l'organisme l'utilise pour oxyder les substances d'origine endogène ou exogène ce qui le réduira et aboutira par la suite à la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS: Rreactive Oxygen Species) considérées comme des sous produits toxiques du métabolisme normal de l'oxygène, ces dernières sont présentes en faible concentration, jouant un rôle physiologique comme second messagers et participent activement dans la signalisation cellulaire, ces espèces sont produites quotidiennement mais sont neutralisées immédiatement par les systèmes de défenses antioxydants ce qui conduit à un équilibre pro-oxydant/antioxydant [55,52], mais lorsque l'équilibre de cette balance est interrompu en faveur des premiers la situation devient alors physiopathologique appelée ainsi le stress oxydatif causant ainsi des phénomènes néfastes menant à des altérations des tissus ou des organes. Le stress oxydatif peut être dû à: une surproduction des pro-oxydants, un déficit en antioxydants, une carence nutritionnelle (vitamines, oligoéléments,...etc), une intoxication aux métaux lourds (plomb, mercure,..etc) ainsi que les irradiations (UV, rayons X,..etc).

1.2. Les espèces réactives de l'oxygène ROS et leur origine:

Le sigle ROS (Rreactive Oxygen Species) désigne toutes les espèces oxygénées réactionnelles qui peuvent être de nature radicalaire et non radicalaire (**Tableau 8**). Un radical libre est défini comme un atome possédant au moins un électron non apparié qui occupe l'orbitale externe, le radical va être alors muni d'une réactivité saisissante à l'égard de molécules plus stables et va réagir selon le cas comme oxydant ou réducteur afin d'apparier son électron célibataire conduisant ainsi à la formation de nouveaux radicaux par une cascade de réactions chimiques (**Figure 4**) [53, 54].

Tableau 8: Les principales espèces réactives de l'oxygène

Espèces radicalaires	Espèces non radicalaires
Anion superoxyde (O_2^-)	Oxygène singulet ($+O_2$)
Radical hydroxyle (OH^-)	Peroxyde d'oxygène (H_2O_2)
Monoxyde d'azote (NO^-)	Nitroperoxyde ($ONOOH$)

Les ROS sont principalement produites lorsque la chaîne respiratoire mitochondriale fonctionne et durant laquelle l'oxygène que nous respirons subit une réduction tétravalente conduisant à la production d'eau. Cependant, des électrons peuvent fuir au cours de ce processus et ne vont réduire qu'une partie de l'oxygène (environ 2% à 5 %) qui subiront une réduction mono-électronique (addition d'un seul électron) et qui seront convertis par la suite en radicaux superoxyde [55]. Il existe d'autres sources cellulaires telles que: l'enzyme NADPH oxydase qui est activée lors d'une inflammation et qui peut utiliser l'oxygène pour produire de grandes quantités de ROS dans la membrane cellulaire [56, 57], la détoxification des xénobiotiques par le cytochrome P450 présent au niveau du réticulum endoplasmique [58], nous citrons aussi la xanthine oxydase qui catalyse la réaction de transformation de xanthine en acide urique, cette dernière peut être considérée comme une source importante d'anions super oxyde [10].

Ainsi les radicaux libres formés tel que l'anion superoxyde (O_2^-) n'est pas très réactif mais constitue un des radicaux précurseurs pouvant être activés en d'autres espèces plus réactives. En effet sa faible réactivité permet son utilisation comme médiateurs régulant les fonctions biologiques c'est le chef de fil des espèces oxygénées réactives contrairement à d'autres radicaux tel que le peroxyde (ROO^-) et surtout le radical hydroxyle (OH^-) qui possède une très grande réactivité et peut se combiner avec presque toutes les molécules, il est considéré comme le plus toxique et nocif à l'égard des milieux biologiques. Il existe d'autres espèces qui ne sont pas des radicaux libres mais qui sont réactives et peuvent être toxiques par l'intermédiaires de réactions aboutissant à la formation des radicaux, tel que le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 qui peut se décomposer en présence de certains ions métalliques libres (Fe^{2+} spécialement) en OH^- et OH^\bullet , mais aussi l'oxygène singulet qui apparaît lors du processus de photosensibilisation [59, 60].

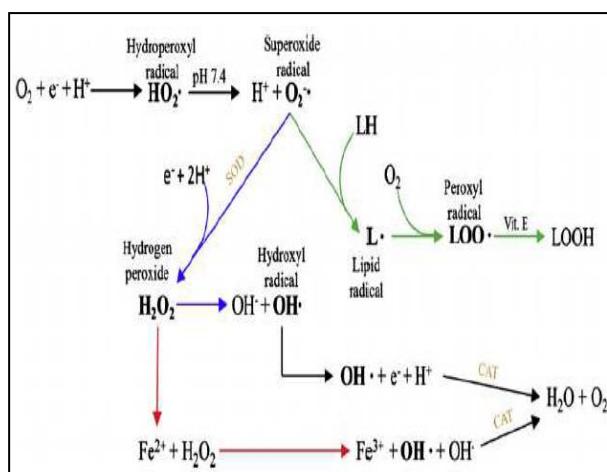


Figure 4: Schéma des différents radicaux libres et des espèces réactives de l'oxygène

1.3. Cibles biologiques du stress oxydant

a. Les lipides:

Les lipides et plus spécialement leurs acides gras insaturés sont une cible majeur des ROS ceci est dû à leur degré élevé d'instauration surtout le radical hydroxyle OH⁻ qui est capable d'arracher un atome d'hydrogène d'un acide gras qui subira par la suite un réarrangement des doubles liaisons "phase d'initiation", formant un radical diène conjugué qui après oxydation donne le radical peroxyde (LOO⁻) "phase de stabilisation", qui lui même peut arracher à nouveau un hydrogène d'une autre molécule lipidique donnant des hydroperoxydes (LOOH) "phase de propagation", qui pourra soit être neutralisé et réduit "phase de terminaison" [61], soit il va continuer à s'oxyder pour donner des aldéhydes toxiques dont le malonaldialdéhyde (MDA) ou l'hydroxynonal ce qui causera divers dommages moléculaires comme par exemple la formation des LDL oxydées qui participent grandement dans la formation de plaques d'athéromes ou à une mutation de l'ADN conduisant à l'arrêt de la division cellulaire ou de la synthèse de protéines (**Figure 5**) [62].

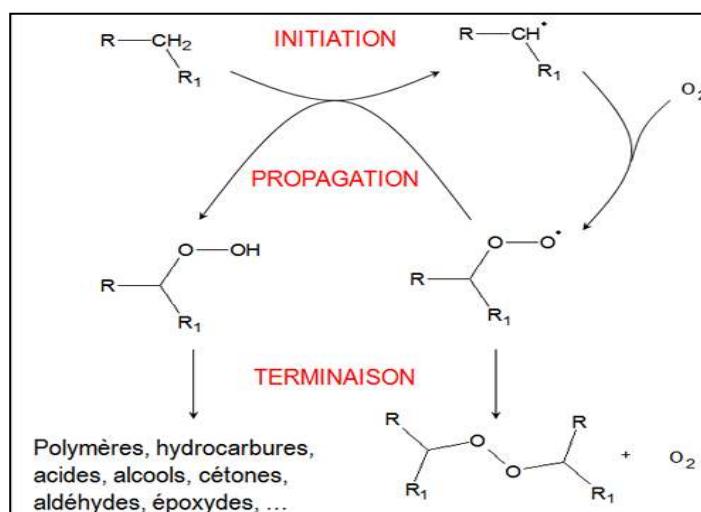


Figure 5: Réaction de peroxydation lipidique

b. Les protéines:

C'est surtout les AA aromatiques et les protéines qui comportent un groupement thiol (SH) qui sont sensibles aux attaques radicalaires. En effet, l'oxydation se produit soit par l'addition du radical OH⁻ au tryptophane, tyrosine ou histidine (AA aromatiques) ou par exemple l'addition des produits issus de la peroxydation lipidique (4HNE), l'oxydation peut se produire également par la coupure des liaisons peptidiques qui donneront des fragments

protéiques ce qui provoque une modification de la structure des protéines ainsi que la dégradation de l'activité protéique causant divers dysfonctionnements; transport protéique, signaux de transduction et l'activité enzymatique (**Figure 6**) [61].

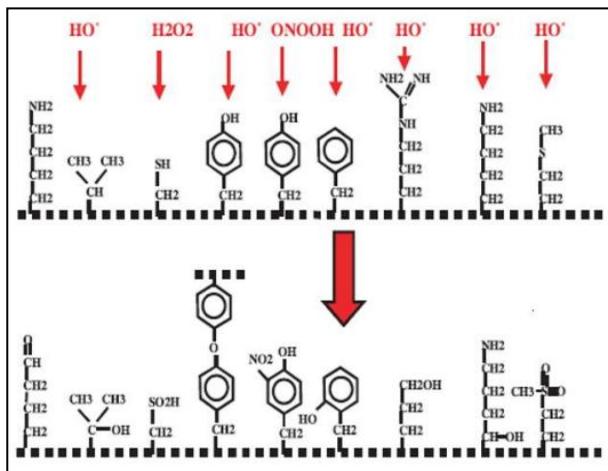


Figure 6: Modifications de quelques chaines latérales des acides aminés après attaque radicalaire.

c. Les acides nucléiques

Les lésions de l'ADN sont provoqués essentiellement par le radical hydroxyle OH⁻ mais le monoxyde de carbone O²⁻ peut provoquer aussi des altérations au niveau de l'ADN ce qui aboutira par exemple à la modification d'une base azoté, plus particulièrement la guanine qui se transformera en 8-hydroxy-2'-desoxyguanine mais aussi au mauvais appariement des bases, au blocage de la réPLICATION de l'ADN ou bien au pontage de l'ADN avec des protéines ou des dérivés de l'oxydation lipidique tel que le MDA. En bref, ça peut causer: la mutagenèse, perturbation de la transcription et de la traduction pouvant aller à l'arrêt des synthèses puis la mort cellulaire, de ce fait le stress oxydant amplifie toutes les lésions produites sur l'ADN (**Figure 7**) [60, 63].

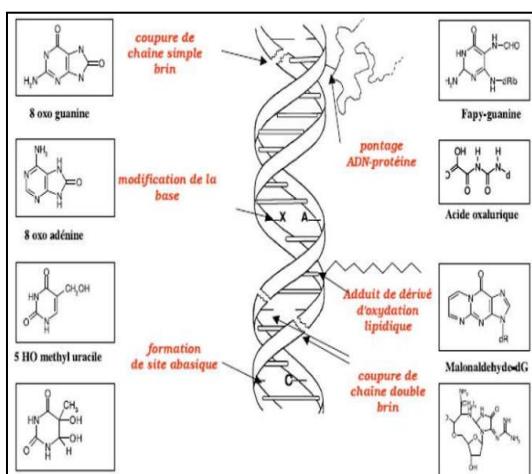


Figure 7: Lésions de l'ADN après attaque radicalaire.

1.4. Le stress oxydant et les pathologies:

Le stress oxydant est incriminé dans de nombreuses pathologies, qu'il soit un facteur déclenchant ou impliqué dans les complications lors de l'évolution d'une maladie donnée. En effet il peut s'agir de maladies où le stress oxydant est la cause initiale tel que le cancer, les intoxications (médicaments, CCL4, plomb,...etc), la cataracte, le vieillissement, irradiations mais il peut s'agir aussi de maladies où le stress est le facteur déclenchant; maladie d'Alzheimer, athérome, maladies virales [64, 65]. Un stress oxydant secondaire peut être provoquer par certaines maladies telles que; le diabète, l'insuffisance rénale, le sida, l'infarctus et le parkinson,...etc [61].

2. Les antioxydants

2.1. Définition:

Le terme antioxydant désigne toute substance qui à concentration relativement faible retarde, empêche ou élimine les dommages causés par les radicaux libres et les ROS [66] à une molécule cible, ils vont donc neutraliser l'excès des radicaux libres dans l'organisme afin de rétablir l'équilibre naturel.

2.2. Les systèmes de défenses antioxydants (Enzymatique et non enzymatique):

Pour faire face aux attaques des RL et des ROS l'organisme développe des systèmes de défenses afin d'assurer l'équilibre de la balance entre pro-oxydant/antioxydant.

⊕ **Antioxydants enzymatiques:** ces systèmes peuvent fonctionner en éliminant les espèces réactives de l'oxygène et les catalyseurs de leur formation en induisant la synthèse des antioxydants et enfin en augmentant l'activité des systèmes de réparation et d'élimination des molécules endommagées. Trois enzymes sont misent en œuvre [67]:

- *Les superoxyde dismutases SOD:*

Ce sont des métalloprotéines considérées comme un des systèmes antioxydants les plus efficaces et elles sont très répondues dans l'organisme dont le rôle est d'assurer l'élimination de l'anion superoxyde par une réaction de dismutation en le transformant en peroxyde d'hydrogène et en oxygène, en effet on distingue 3 type de SOD; la Cu/Zn-SOD cytosolique, la Mn-SOD mitochondriale et la

Cu/Zn-SOD extracellulaire, qui diffèrent par la localisation chromosomique du gène, leur contenu métallique, leur structure quaternaire et leur localisation cellulaire [68].

- *La catalase:* cette enzyme est située dans plusieurs tissus mais on la localise plus particulièrement dans les hématies et les peroxysomes hépatiques, elle agit en synergie avec les SOD et agit activement avec le peroxyde d'hydrogène par la catalyse de sa dismutation en eau [69].
- *La glutathion peroxydase GPx:* son bon fonctionnement est étroitement lié à la présence du sélénium [70]. Cette enzyme représente un des systèmes de protection les plus importants car elles sont capables de détoxifier le peroxyde d'hydrogène mais aussi les hydroxydes résultant de l'oxydation du cholestérol des acides gras. En effet, elle met en jeu le glutathion GSH sous sa forme réduite qui va agir comme capteur de radicaux libres [71], la glutathion réductase par contre à pour fonction de générer le GSH grâce aux molécules de NADPH utilisées comme donneurs d'électrons car étant donné que la concentration du glutathion est limitée, il est indispensable de le réduire en permanence afin que la GPX puisse maintenir sa fonction [72].

Antioxydants non enzymatiques:

- *Acide ascorbique:* Ce dernier n'est pas synthétisé par l'organisme humain et son apport est assuré par l'alimentation et représente un excellent antioxydant hydrosoluble qui à des concentrations très faibles est capable de piéger et neutraliser les ROS et capable d'inhiber également la peroxydation lipidique ainsi que la régénération des autres antioxydants tel que la vitamine E oxydée [73, 74].
- *Vitamine E:* Ce terme représente un ensemble d'isomères nommés les tocophérols représentés par (α , β , γ et δ) dont l'activité antioxydante est variable. D'un point de vu biologique, l' α -tocophérol est la plus abondante et intéressante dont le caractère hydrophobe permet l'insertion dans la membrane

qui est riche en acides gras polyinsaturés jouant ainsi un rôle protecteur en régissant (neutralisant) avec les radicaux ROO- empêchant ainsi la propagation de la peroxydation lipidique, elle joue également un rôle important dans l'atténuation du stress oxydatif dans les maladies neurodégénératives et en particulier la maladie d'Alzheimer [74, 75].

- *Les caroténoïdes:* Ce sont des pigments organiques responsables de la couleur orange, rouge et jaune des fruits et légumes. La plupart de ces composés sont connus par leur activité antioxydante qui leur confère un rôle protecteur vis à vis de ces derniers [76]. En effet cette propriété a également des effets bénéfiques sur notre santé et qui sont liés à leur structure caractérisée par un système de doubles liaisons conjuguées, ce qui fait de ces caroténoïdes d'excellents piégeurs de radicaux libres surtout vis-à-vis de la lipoperoxydation des phospholipides membranaires [75, 77]. Il existe plusieurs caroténoïdes mais le β -carotène est le plus étudié car il est capable de neutraliser l'oxygène singulet en empêchant ainsi l'initiation des réactions radicalaires [78].
- *Antioxydants de synthèse:* Afin de répondre aux besoins de l'homme, l'industrie a recours à la synthèse pour produire plus de molécules antioxydantes qui sont présentes dans la nature adaptées aux besoins de l'homme mais ces dernières ne doivent pas être toxiques et doivent avoir une bonne activité à faible concentration car elles restent des produits chimiques synthétiques qui présentent des dangers pour le système biologique, par exemple; BHA, BHT,...,etc [79].

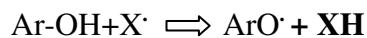
2.3. L'activité antioxydante des composé phénoliques

L'activité antioxydante est attribuée à leur structure qui leur confère une propriété redox. En effet, les groupements hydroxyles peuvent agir avec les ROS et RONS en donnant un électron ou un atome d'hydrogène, ce qui permettra la neutralisation de ces derniers [80, 81]. Les polyphénols agissent via plusieurs mécanismes:

- . Piégeage des radicaux libres.
- . Inhibition enzymatique génératrice des ROS.
- . La chélation des ions, des métaux responsables de la production ROS.

1. Piégeage des radicaux libres

Les composés phénoliques sont connus pour leurs capacités à piéger les radicaux libres et les ROS, ce qui permet par la suite d'avoir une bonne activité antioxydante, ils vont rapidement réduire les radicaux libres tel que: le superoxyde, les peroxyles (ROO⁻), les alkoxyles (RO⁻) par le transfert d'hydrogène [82]:



X[·]= ERO

ArO[·] = Radical aryloxyle

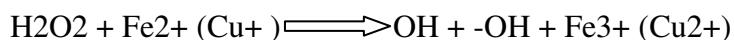
Le radical ArO[·] est capable de régir avec l'oxygène pour donner une quinone et un anion superoxyde ce qui est responsable d'un effet pro-oxydant indésirable des flavonoïdes. L'activité dépend donc du potentiel redox et de la réactivité du aryloxyle [83].

2. Inhibition enzymatique génératrice des ERO:

Grâce aux interactions de Van der Wall (groupements aromatiques) et en raison de la présence de multiples groupements fonctionnels dans les composés phénoliques (OH), ces derniers possèdent une affinité pour une grande variété de protéines notamment des enzymes [84], ce qui les rend capables d'inhiber une large gamme d'enzymes génératrices des ROS, telles que: la xanthine oxydase, la protéine kinase C, la cyclooxygénase, lipooxygénase, monooxygénase microsomiales et la glutathion S-transférase, en effet plusieurs travaux ont démontrés que ces composés sont impliqués dans ce mécanisme soit par formation de complexe inhibiteur-enzyme et/ou par piégeage direct des ROS [85].

3. La chélation des ions des métaux responsables de la production des ERO:

Les ions métalliques présentent un intérêt essentiel dans de nombreuses fonctions physiologiques comme par exemple les ions du cuivre ou de fer qui entrent dans la composition des hémoprotéines et de cofacteurs d'enzymes du système de défense antioxydant et qui interviennent dans de nombreuses activités enzymatiques ainsi que dans le fonctionnement du système nerveux et la stimulation des défenses naturelles mais ils sont également responsables de la production de superoxyde et de peroxyde d'hydrogène ainsi que le radical hydroxyle encore plus toxique et cela par la réduction du peroxyde d'hydrogène selon la réaction de Fenton [86]:



C'est ainsi que complexer les ions métalliques sous une forme qui bloque leur activité redox est considéré comme un mécanisme antioxydant. Cependant, grâce à leur structure chimique, les polyphénols sont considérés comme de bons chélateurs d'ions permettant de créer des composés complexes inactifs. Van Acker et ses collaborateurs , [87] ont mener des études sur la chélation des ions du fer par certains flavonoïdes, ce qui à permis à la fin de mettre en évidence trois principaux sites essentiels pour la chélation:

- les groupes 3'-hydroxy et 4'-hydroxy du cycle B.
- les groupes 3-hydroxy et 4-oxo du cycle C.
- les groupes 4-oxo de l'hétérocycle C et 5-hydroxy du cycle A.

La quercétine est considérée comme un complexant métallique particulièrement efficace étant donné qu'elle combine tous ces substituants (**Figure 8**).

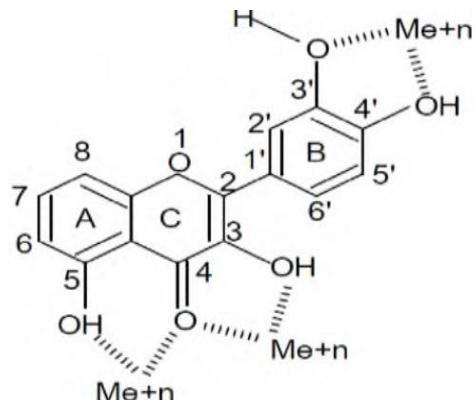


Figure 8: Les principaux sites essentiels pour la chélation des ions (Me^{+n})

II. Activité antibactérienne

1. Généralités

Les maladies infectieuses sont des maladies fréquentes causées par différents microorganismes (bactérie, virus, parasite ou encore mycose). À l'état normal l'organisme humain héberge un grand nombre de bactéries qui ne provoquent pas de maladies mais le pouvoir pathogène est dû à l'aptitude de la bactérie à envahir les tissus en résistant aux défenses de l'hôte en se multipliant, ainsi pour faire face à ces bactéries pathogènes les antibiotiques sont utilisés soit pour inhiber la multiplication des bactéries soit pour tuer les bactéries, mais l'utilisation inappropriée de ces agents antibactériens a conduit à l'apparition et au développement de bactéries pathogènes multi-résistantes d'où l'importance d'orienter les

recherches scientifiques vers l'évaluation de l'activité antibactérienne des plantes médicinales connues par leur richesse en molécules bioactives tel que les polyphénols, flavonoïdes et tanins dont l'activité antibactérienne a été étudiée dans plusieurs investigations [88,89] , en effet les plantes restent une source d'inspiration considérée comme infinie pour le développement de nouveaux médicaments pour faire face au phénomène de la résistance des germes aux antibiotiques.

2. Techniques d'évaluation de l'activité antibactérienne:

La détermination de l'activité antibactérienne d'un composé consiste à le mettre en contact avec une souche bactérienne et d'observer les conséquences de son effet sur cette dernière. On rapporte ci-dessous les deux techniques de l'évaluation de l'activité antibactérienne les plus utilisées :

2.1. Méthode de dilution en milieu solide:

La méthode de diffusion sur disque, est l'approche la plus ancienne et la plus utilisée dont le principe est relativement simple, en effet des disques de papier filtres stériles sont imprégnés de différentes concentrations du produit à tester en solution puis déposés sur une gélose de Mueller-Hinton coulée préalablement dans des boites de pétri etensemencée avec une suspension de la bactérie à tester, c'est ainsi que les différentes concentrations de chaque disque du produit à tester vont diffuser en inhibant ainsi la croissance bactérienne. Après 24h d'incubation, la lecture des résultats de l'activité se fait par la mesure de la zone d'inhibition en mm. En effet ces zones d'inhibition doivent être uniformément circulaires [90]. Selon Barros et Coll, l'activité antibactérienne est exprimée comme suit [91] :

- Diamètres inférieurs à 7 mm: aucune activité antimicrobienne (-).
- Diamètres de 7 à 9 mm: activité antibactérienne faible (+).
- diamètres de 10 à 11.9 mm: activité antibactérienne modeste (++) .
- Diamètres de 12 à 15 mm: activité antimicrobienne élevée (+++).
- Diamètres supérieurs à 15 mm: activité antimicrobienne forte (++++).

2.2. Méthode de dilution en milieu liquide :

Dans une série de tubes à hémolyse stériles, on met des concentrations décroissantes et à un même volume du produit à tester, puis on rajoute à un même volume une culture de bactérie en phase exponentielle de croissance. Après une incubation de 18h à 24h la CMI est

mesurée et toute croissance bactérienne est visualiser à l'œil nu caractérisée par un trouble ou un culot bactérien [92].

2.3. Détermination de la CMI et la CMB:

- **Concentration minimale inhibitrice CMI:**

Elle correspond à la concentration minimale d'un antibiotique inhibant toute culture d'une souche bactérienne visible à l'œil nu après un temps d'incubation de 18h à 24h. Sa détermination s'effectue par l'observation d'un trouble correspondant à la croissance des germes étudiés. La CMI caractérise alors l'effet bactériostatique d'un antibiotique [93].

- **Concentration minimale bactéricide CMB:**

Elle correspond à la concentration minimale d'un antibiotique ne laissant que 0.01% ou moins d'une population bactériennes survivantes après une durée d'incubation de 18h à 24h à 37°C. Elle caractérise l'effet bactéricide d'un antibiotique [94].

La CMB est déterminée à partir de la CMI:

- Si le rapport CMI / CMB = 1 ou 2 l'antibiotique est bactéricide
- Si le rapport CMI / CMB = 4 à 16 l'antibiotique est bactériostatique
- Si le rapport CMI / CMB ≥ 32 il y'a une tolérance des bactérie à l'antibiotique

3. Les antibiotiques

3.1. Définition

Le mot antibiotique, désigne toute substance élaborée par un micro-organisme capable de tuer ou d'inhiber la multiplication de d'autres microorganismes. Cette définition peut être étendue aux produits obtenus par synthèse ou hémisynthèse et dotés d'une de ces propriétés [95]. La classification des antibiotiques peut se faire selon: l'origine, la nature chimique, le mécanisme d'action et le spectre d'action mais la plus répondu se fait selon leurs mécanismes (**Tableau 9**) [96].

3.2. Mode d'action:

Les antibiotiques agissent à un niveau précis des structures bactériennes , dénommés site d'action (**Figure 8**). Les quatre cibles principales sont [95]:

. **La paroi:** inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne (**betalactamines**, **glycopeptides**, **fosfomycine**)

. **La membrane cytoplasmique:** inhibition de la synthèse de la membrane (**polymyxines**)

. **Le chromosome:** inhibition de la synthèse de l'ADN (**quinolones**)

. **Le ribosome:** inhibition de la synthèse protéique (**cyclines**, **aminosides**, **macrolides**)

Tableau 9: Principaux mécanismes d'action des antibiotiques [97]

Antibiotiques	Mécanisme d'action
Pénicilline	Inhibition de la synthèse de la paroi Activation des enzymes lytiques de la paroi.
Ampicilline	Inhibition des enzymes de transpeptidation qui sont impliquées dans le pontage des chaînes polysaccharidiques du peptidoglycane de la paroi bactérienne.
Ciprofloxacine et autres quinolones	Inhibition de la synthèse des acides nucléiques Inhibition de l'ADN gyrase bactérienne ce qui permet d'interférer avec la réPLICATION de l'ADN, la transcription et autres activités impliquant l'ADN.
Polymyxine B	Destruction de la membrane cellulaire Fixation sur la membrane cellulaire et perturbation de sa structure ainsi que ses propriétés de perméabilité.
Sulfamide	Antagonisme métabolique Inhibition de la synthèse de l'acide folique par compétition avec l'acide paminobenzoïque.

Dans le but d'obtenir une meilleure efficacité thérapeutique, dans certaines situations cliniques on procède à l'association de deux antibiotiques ayant des sites d'action distincts sur la même bactérie.

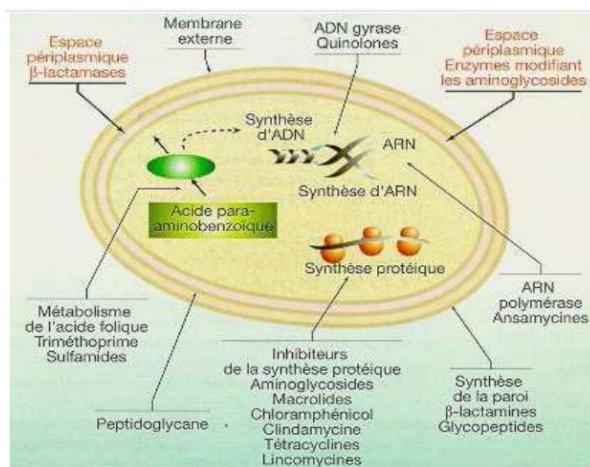


Figure 9: Principales cibles et modes d'actions des antibiotiques

3.3. Résistance des bactéries aux antibiotiques

Le spectre d'activité d'un antibiotique désigne l'ensemble des bactéries sensibles à l'antibiotique par effet bactéricide ou bactériostatique, les espèces non sensibles sont dites alors résistantes. La résistance aux antibiotiques peut être naturelle ou acquise (**Figure 10**) [98]:

- *La résistance naturelle:* par exemple la paroi des colibacilles est imperméable aux pénicillines G et M les rendant ainsi résistantes. Les bacilles à Gram négatif sont naturellement résistants aux antibiotiques hydrophobes car ces molécules ont des difficultés à passer la membrane externe de leur paroi. Les mycoplasmes, bactéries dépourvues de parois présentent une résistance naturelle aux β -lactames, puisque le mode d'action de cette famille d'antibiotiques consiste à inhiber la synthèse du peptidoglycane [99].
- *La résistance acquise:* En raison des modifications génétiques des bactéries, le spectre d'action d'un antibiotique est rétréci conduisant ainsi à l'apparition au sein d'une population bactérienne sensible des souches résistantes. Cette résistance résulte de deux types de mécanismes génétiques [100] :
 1. **Mutation chromosomique** qui affecte le chromosome induisant ainsi une modification structurale pouvant se traduire par un problème de perméabilité à un ou plusieurs antibiotiques, en rendant les cibles spécifiques des antibiotiques indifférentes mais cette dernière est rare, spontanée, stable et indépendante de l'antibiotique
 2. **La résistance plasmidique** elle est beaucoup plus fréquente et elle est le plus souvent liée à l'acquisition d'un élément génétique transférable, le plasmide, ADN extra-chromosomique qui gouverne la synthèse d'enzymes inactivant ainsi un ou plusieurs antibiotiques (ex: pénicillinases sécrétées par les staphylocoques), il faut noter que cette dernière est souvent multi-résistante car elle porte sur plusieurs antibiotiques et est transférable en bloc.

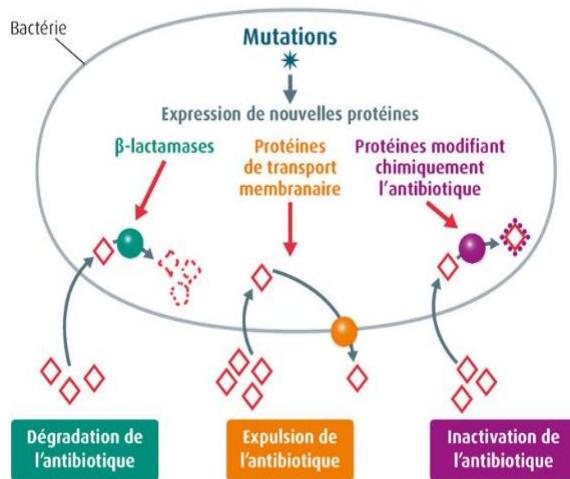


Figure 10: Origine de la résistance aux antibiotiques

4. L'activité antibactérienne des composés phénoliques.

Une des propriétés incontestable des composés phénoliques est leur activité antibactérienne qui est étroitement liée à leur structure, en effet la présence de groupes hydroxyles et d'autres fonctions fait de ces composés de très bon agents antibactériens [101].

Cependant, plusieurs études y accordent un grand intérêt et ont rapportés que par exemple, les isoflavones étaient considérés comme de bon agents bactéricides et bactériostatiques et plus particulièrement à l'égard des bactéries à Gram+, comme par exemple les 5-hydroxyisoflavanones avec un, deux ou trois groupements hydroxyles en position 7, 2' et 4' seraient responsables de l'inhibition de la croissance de *Streptococcus* sp. Il semblerait également que le cycle B des flavonoïdes joue un rôle important dans l'intercalation avec les acides nucléiques ce qui pourrait conduire à l'inhibition de l'ADN gyrase d'*Escherichia Coli*. Certaines catéchines, la naringénine et la quercétine agissent en présence de : 2', 4' ou 2', 6'-dihydroxylation sur le cycle B et une 5,7-dihydroxylation sur le cycle A sont importantes pour l'activité anti-SAMR (*staphylococcus aureus* méticilline résistants) [102, 103].

III. Activité anti-Alzheimer

1. Généralités sur la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) est une pathologie neurodégénérative du cerveau qui est très répandue dans le monde, d'après l'association française d'Alzheimer elle touche plus de 25 millions de la population mondiale dont la moitié touche les pays occidentaux ce qui est dû

au vieillissement de la population. Cette maladie conduit progressivement à la perte de la mémoire et provoque une altération des capacités cognitives (langage, raisonnement, attention,...etc) [104], elle est considérée aujourd'hui comme une réponse stéréotypée du système nerveux face à des agréassions multiples; mutations, trisomie 21, traumatismes répétés. L'évolution de la maladie peut être représentée par trois stades [105, 106]:

- **Stade précoce:** une perte de mémoire légère qui est souvent liée au stress quotidien ou bien au processus normal du vieillissement chez les personnes âgées.
- **Stade modéré:** l'évolution de la maladie provoque des changements dans le comportement du malade qui devient de plus en plus dépendant pour gérer son quotidien car ce dernier aura des difficultés à se souvenir de choses très simples telles que, reconnaître ou se rappeler des noms de personnes ce qui conduira progressivement le malade vers la dépression.
- **Stade sévère:** à ce stade le cerveau est gravement atteint et le malade trouve des difficultés à communiquer et perd sa mobilité progressivement et reste généralement alité.

2. La neurotransmission, l'acétylcholine et les cholinestérase

La neurotransmission est un mécanisme durant lequel l'influx nerveux est transmis d'un neurone à un autre via la fente synaptique, cette transmission est la base de la communication entre les cellules nerveuses afin de contrôler les fonctions vitales du système nerveux central et périphérique, cette communication est assurée par des molécules chimiques appelées les neurotransmetteurs, en effet il existe plusieurs catégories de neurotransmetteurs mais nous nous focaliserons sur les neurotransmetteurs cholinergiques qui sont très impliqués dans la MA [63, 64] (**Figure 10**).

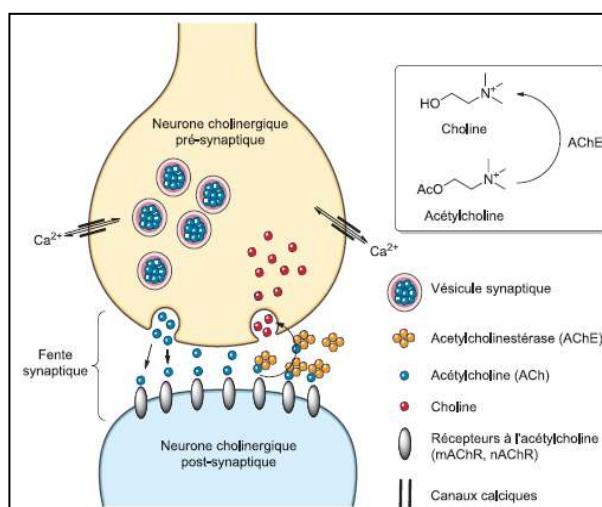


Figure 1: Mécanisme de la neurotransmission

2.1. Neurotransmission cholinergique (l'Ach):

La synthèse de l'Ach se fait par la choline acétyltransférase à partir de la choline et l'acétyl CoA au niveau des neurones cholinergiques pré-synaptiques, l'Ach est ensuite libérée dans la fente synaptique puis fixée au niveau des récepteurs des neurones cholinergiques postsynaptiques permettant ainsi la dépolarisation de la membrane et la transmission de l'influx nerveux ce qui engendrera diverses réactions biologiques et physiologiques. Après cette action de l'ACh, la membrane des neurones doit retrouver son niveau d'excitabilité électrique c.à.d. se polariser à nouveau pour permettre la transmission d'un nouveau influx nerveux, cette action se fait par les cholinestérases et plus spécialement par l'AChE (**Figure 12**).

L'acétylcholine est un neurotransmetteur jouant un rôle très important dans le système nerveux central et périphérique ainsi l'ACh est impliquée dans les commandes du cerveau au muscle mais aussi dans les mécanismes d'apprentissage et de la mémorisation.

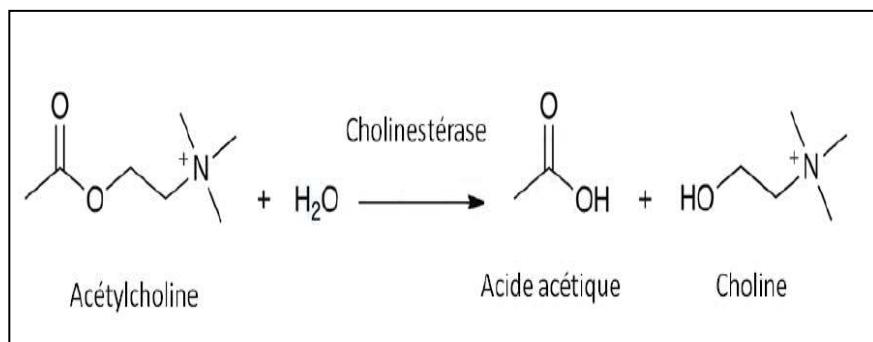


Figure 12: La réaction d'hydrolyse de l'acétylcholine par les cholinestérases

2.2. les cholinestérases

✚ L'acétylcholinestérase (AChE):

L'AChE est une enzyme (sérine hydrolase) qui se trouve principalement dans le sang ainsi qu'au niveau des synapses cholinergiques, cette dernière catalyse l'hydrolyse de l'ACh en choline et acétate, une réaction très importante dans la régulation de la neurotransmission cholinergique dans toutes les régions du cerveau. D'un point de vue purement structural, l'AChE humaine (hAChE) est composée de deux principaux sites d'interactions [10] (**Figure 13**):

- **Le site catalytique anionique (Catalytic Anionic Site, CAS)** comprenant la triade catalytique Ser203-His447-Glu334 qui hydrolyse l'acétylcholine et le résidu clé Trp86 qui forme une interaction cation avec l'ammonium quaternaire de l'ACh.
- **Le site périphérique anionique (Peripheric Anionic Site, PAS)** se situe, quant à lui, à l'entrée d'une gorge hydrophobe longue de 20 Å menant au CAS et comprend des acides aminés hydrophobes dont les résidus clés sont Trp286 et Tyr72. Le PAS permet « d'attirer» l'acétylcholine (par interaction cation-p avec Trp286) vers le CAS où elle est hydrolysée.

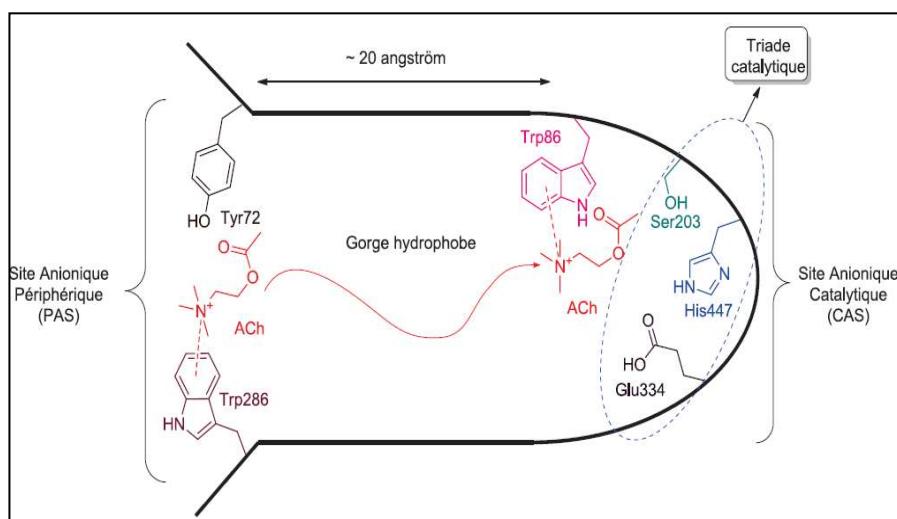


Figure 13: les sites d'interaction de l'hAChE

■ La butyrylcholiesterase BChE:

La BuChE humaine (hBuChE) à une structure très voisine de l'AChE humaine, elle est appelée la pseudocholinestérase qu'on retrouve principalement dans le foie. Cependant le site actif CAS de la BuChE est plus grand que celui de la l'AChE ce qui lui permet de fixer des molécules qui sont plus grandes que l'ACh comme la BCh. Des études ont montré que certains neurones cholinergiques utilisent la BuChE plutôt que l'AChE pour l'hydrolyse de l'ACh. Ainsi, 10 à 15 % des neurones cholinergiques dans l'hippocampe et l'amygdale, expriment la BuChE au lieu de l'AChE. Il faut savoir que chez un sujet sain, la BuChE est 4 fois moins présente dans le cerveau que l'AChE mais avec la progression de la maladie et la perte des neurones, on observera une baisse importante de l'activité de l'AChE alors que celle de la BChE augmentera deux fois plus [108].

3. Relation entre la maladie d'Alzheimer et la neurotransmission

Le système cholinergique est une des principales voies de neurotransmission dans le cerveau et impliqué dans les mécanismes de mémorisation et de cognition et c'est ce système qui est le plus atteint de manière précoce dans la maladie d'Alzheimer. En effet les cellules nerveuses qui sont principalement altérées sont celles qui utilisent l'acétylcholine comme neurotransmetteur et qui sont nombreuses au niveau de l'hippocampe et le cortex cérébral et c'est cette dégénérescence des neurones cholinergiques qui va entraîner une perte de l'activité de la choline acétyltransférase (chAT) dans le cerveau et par conséquent une diminution des contenus synaptiques en acétylcholine sachant que les sujets atteints de cette pathologie ont un déficit d'acétylcholine au niveau cérébral. C'est ainsi que l'atrophie cérébrale est une des principales caractéristiques de la maladie d'Alzheimer qui est due à une perte massive de neurones cholinergiques qui s'accompagne biochimiquement par une diminution de l'expression de l'acétylcholine transférase et par conséquent de l'ACh [109].

4. Activité anticholinestérase

Etant donné que la perte ou la dégradation de l'acétylcholine joue un rôle essentiel dans les troubles de la mémoire des patients souffrant de la maladie d'Alzheimer, la solution pour augmenter le taux d'acétylcholine au niveau synaptique consiste alors à diminuer sa dégradation, ceci en inhibant l'action de l'acétylcholinestérase en utilisant des inhibiteurs spécifiques ce qui empêchera l'hydrolyse de l'acétylcholine et engendrera par la suite une augmentation de sa concentration dans le cerveau [110].

C'est dans ce contexte qu'il est apparu sur le marché plusieurs inhibiteurs de l'AChE, en effet la physostigmine issue de la plante *Physostigma venenosum* fut le premier inhibiteur testé et qui possédait une affinité pour l'AChE plus importante que l'acétylcholine (10 000 fois supérieure) [111, 112], mais cette substance a été abandonnée par la suite à cause de sa toxicité et de sa courte durée de vie, en effet son utilisation pouvait conduire à une bradycardie, des vomissements et même une paralysie respiratoire [113].

En 1993, la tacrine fut le premier inhibiteur mis sur le marché pour le traitement de la MA mais retiré lui aussi par la suite à cause de sa courte demi-vie qui nécessite plusieurs prises par jours et surtout à cause de ses effets secondaires; les nausées, les vomissements, la diarrhée, les maux de tête, les étourdissements ainsi que l'augmentation des niveaux de lalanine aminotransférase (ALT) indiquant une toxicité hépatique [114].

Les inhibiteurs les plus connus et utilisés en thérapie sont la donepezil et la galantamine. La donepezil approuvée en 1997 [115], avait une spécificité meilleure que la tacrine pour le tissu cérébral, ainsi qu'une demi-vie plus longue avec une absence de toxicité hépatique mais certains effets secondaires ont été enregistrés tels que les nausées, les vomissements, les étourdissements, l'anorexie et la fatigue [116, 117].

La galantamine apparue en 2000, fut le premier alcaloïde naturel issu de l'espèce *Galanthus nivalis* L. mis sur le marché et aujourd'hui elle est autorisée dans plusieurs pays Européens comme un des traitements de la MA à des stades avancés [118]. La différence entre cette substance et les autres réside dans son double mécanisme d'action car en plus d'inhiber l'AChE, elle provoque une modulation allostérique des récepteurs présynaptiques nicotiniques, ce qui augmente la libération de neuromédiateurs [119]. Cette molécule est considérée comme meilleur inhibiteur du fait de sa longue demi-vie ainsi que son caractère sélectif, réversible et compétitif, de nos jours elle est largement utilisée dans les tests *in vitro* comme substance de références [120].

Il est vrai que la plupart des inhibiteurs connus sont des alcaloïdes mais plusieurs études ont été réalisées pour identifier de nouvelles molécules naturelles ayant une activité anti-AChE importante. C'est ainsi que selon Houghton et al, plusieurs composés, autres que les alcaloïdes, présentent une grande capacité d'inhiber l'enzyme AChE tels que les terpénoïdes, les composés phénoliques, les flavonoïdes et les isocouumarines [110].

5. Les composés phénoliques et la maladie d'Alzheimer:

Le stress oxydant est fortement lié au maladies neurodégénératives telle que la maladie d'Alzheimer, en effet le stress oxydant qui est le plus souvent caractérisé par une concentration excessive en ROS est impliqué dans la mort cellulaire et se manifeste par une peroxydation lipidique et une oxydation des protéines cela aura pour conséquence, une altération structurale et fonctionnelle des tissus neuronaux [121], tel qu'un dysfonctionnement des récepteurs de certains neurotransmetteurs, la perte de fonction de certaines protéines de transport et aussi une altération de la signalisation cellulaire pouvant conduire à l'activation de facteurs de transcription ou à des processus d'apoptose [122]. C'est ainsi que des composés dotés d'un effet antioxydant sont favorables notamment les antioxydants naturels comme les composés phénoliques qui grâce à leurs multiples actions biologiques ont des effets neuroprotecteurs et ce par leurs capacités à chélater certains métaux, l'inactivation des espèces radicalaires ou encore l'inhibition de différentes enzymes ainsi que des effets sur les voies de

signalisations intracellulaires [123]. Des études avaient montré que les composés phénoliques pouvaient préserver les mitochondries contre tout dysfonctionnement, cependant une équipe menant une recherche sur les flavonoïdes du thé noir avait démontré *in vitro* la capacité des flavonoïdes à protéger l'activité des mitochondries contre les dommages provoqués par la formation d'A β . Des flavonoïdes auraient des effets protecteurs sur la toxicité du glutamate impliqués dans la mort des neurones et ce par l'accumulation des ROS qui augmente l'influx calcique. Il faut noter que pour exercer cette action, il est important que les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle en position 3 et un cycle C insaturé [124]. Chez la femme ménopausée, le manque d'estrogènes augmenterait le risque de la MA c'est ainsi que la genistéine à faible dose montre une action neuroprotéctrice. Les composés phénoliques pourraient être des candidats prometteurs contre les différentes lésions en intervenant à plusieurs stades des neuropathologies majeures.

IV. Activité cytotoxique

1. Définition du cancer

Le cancer correspond à un événement génétique pathologique non héréditaire [125] caractérisé par la perte de contrôle et la multiplication anarchique de quelques cellules normales de l'organisme qui ont pu fuir aux mécanismes normaux de différenciation et de régulation de leur multiplication en résistant à la mort cellulaire programmée aboutissant à une prolifération non contrôlée et désordonnée [126], en effet ces cellules ne répondent plus aux mécanismes et signaux antiprolifératifs et ne sont plus sensibles au phénomène de l'apoptose avec une acquisition d'un pouvoir invasif conduisant à des tumeurs malignes qui ont la capacité d'envahir d'autres tissus voisins causant ce qu'on appelle des métastases autrement dit tumeurs secondaires létale [127].

2. Mort cellulaire programmée (Apoptose)

Ce phénomène correspond à un processus actif d'autodestruction en réponse à une réaction de l'organisme à des stimuli physiologiques ou pathologiques (**Figure 14**). En effet, ce phénomène est le résultat de l'achèvement de tout un programme hautement contrôlé correspondant à l'activation d'enzymes et l'expression de gènes dotés de caractère pro ou antiapoptotique qui vont aboutir à la destruction de la cellule. Ce processus reste nécessaire pour le maintien de l'homéostasie tissulaire ainsi qu'à la régulation des réponses immunitaires en permettant de sélectionner et d'éliminer les cellules dysfonctionnelles et dangereuses pour

l'organisme [128]. L'apoptose a donc un rôle physiologique essentiel pour le développement de l'organisme en participant dans la construction des deux organes de régulation qui sont très indispensables, cerveau et système immunitaire en assurant la différentiation d'un nombre de cellules bien déterminé [129], ainsi qu'un rôle pathologique où la dérégulation de ce processus va soit aboutir à une réduction de ce phénomène qui est associé généralement aux maladies auto-immunes et lymphoprolifératives ainsi que les phénomènes de carcinogénèse et les pathologies virales [130], soit à un excès d'apoptose souvent associé aux anomalies congénitales du développement ainsi que dans certaines pathologies neurodégénératives tel que la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson [131].

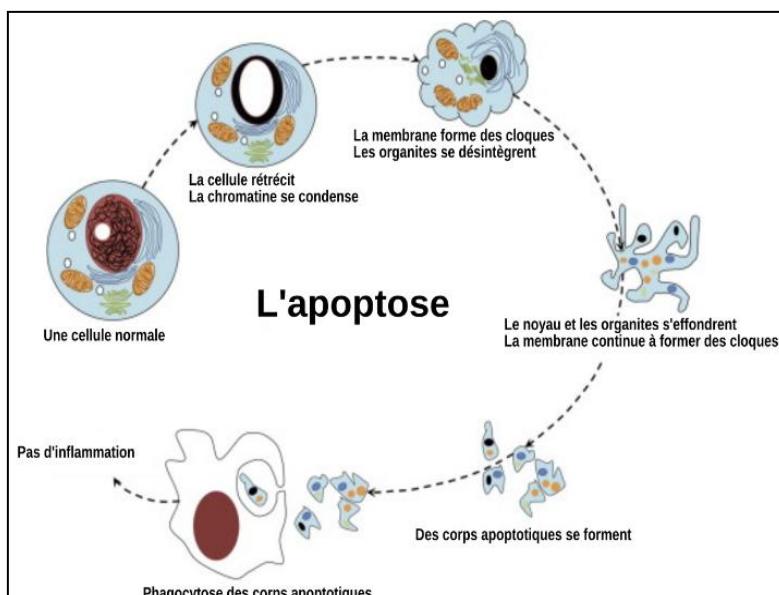


Figure 14: Mécanisme de la mort cellulaire

3. Régulation de la mort cellulaire par voie intrinsèque (voie mitochondriale)

La mitochondrie est un organite cellulaire majeur caractérisé par deux membranes: une membrane externe pauvre en protéines et une autre membrane interne qui est riche en protéines, l'espace situé entre ces deux dernières est appelé l'espace intermembranaire, le rôle fondamental de cet organite consiste à sa contribution dans la production de l'ATP à travers la phosphorylation oxydative au sein de la chaîne respiratoire. L'activité de la chaîne respiratoire au niveau de la membrane interne va engendrer un gradient de protons entre la matrice mitochondriale et l'espace intermembranaire conduisant ainsi à un ψ_m (potentiel transmembranaire mitochondrial). Le retour des protons dans la matrice ne peut se produire qu'au niveau de passages spécifiques constitués par l'ATP synthétase. L'ATP formée est

ensuite transportée par l'adénine nucléotide translocase (ANT) dans l'espace intermembranaire en échange d'une molécule d'ADP. Puis l'ATP passe dans le cytosol au travers de canaux anioniques voltage-dépendants (VDAC) [132].

Hormis son rôle physiologique, cet organite joue un rôle important dans l'apoptose, cette voie intrinsèque appelée également voie mitochondriale est liée à des changements dans la perméabilité des membranes internes et externes conduisant à l'activation des caspases qui représentent une famille de protéases retrouvées dans différentes organismes d'où l'importance de leurs fonctions notamment l'indication d'une organisation précoce d'une mort cellulaire [133]. Ces changements dans la perméabilité sont contrôlés par la famille des protéines Bcl-2 (B cell lymphoma leukemia) établie sur la structure d'un domaine conservé de type BH (Bcl-2 Homology) nécessaire pour leur fonction de régulation de l'apoptose et qui est représenté par quatre régions différentes (BH1 à BH4) [134, 135], le nombre de répétition de ce domaine diffère d'un membre à un autre de cette famille (**Figure 15**) [136]. Bien que ces protéines présentent une homologie structurale elles exercent des activités antagonistes, on peut les diviser en deux groupes: les protéines pro-apoptotiques comme par exemple Bax (Bcl-2 associated X protein) ou Bak (Bcl-2 homologous antagonist/killer) et les protéines anti-apoptotiques comme par exemple Bcl-2 ou Bcl-xL (longer alternatively spliced form of Bcl-x) [137].

En effet, sous l'influence de différents stimuli intracellulaires (dommages de l'ADN, carence en facteurs trophiques, hypoxie, irradiation, stress oxydant, choc thermique ou osmotique...etc.), les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak s'oligomérisent, s'insèrent à la membrane de la mitochondrie pour former le pore de perméabilité transitoire (PTP).

L'ouverture du PTP conduit à la libération dans le cytoplasme de protéines mitochondrielles comme le cytochrome c, SMAC/diablo (Second Mitochondria Derived Activator of Caspase/Direct Inhibitor of Apoptosis Binding protein with Low pI), AIF (Apoptosis Inducing Factor), et l'endonucléase G, qui vont activer des voies apoptotiques dépendantes ou indépendantes des caspases [138]. Le cytochrome c libéré va s'associer avec la protéine Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1) et la procaspase-9 pour former un grand complexe protéique appelé apoptosome au sein duquel la procaspase-9 va être activée par clivage protéolytique. La caspase-9 va ensuite à son tour activer par clivage les caspases effectrices 3 et 7 qui sont à l'origine des dommages cellulaires conduisant à la mort cellulaire [139, 140]. La protéine AIF et l'endonucléase G provoquent des dommages cellulaires dans

le noyau aboutissant à une condensation chromatinienne et une fragmentation de l'ADN, conduisant à l'apoptose des cellules indépendamment des caspases.

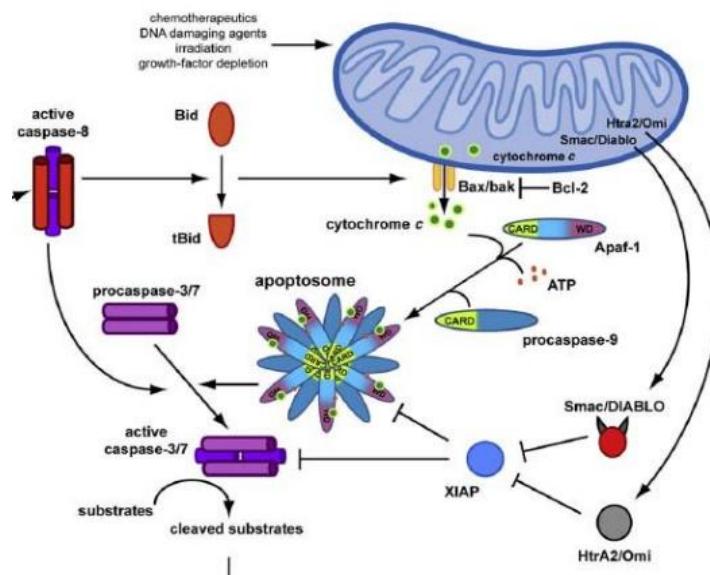


Figure 15: Schéma de la régulation de la mort cellulaire par voie intrinsèque (voie mitochondrial)

4. Evaluation du potentiel anticancéreux des plantes (Thérapie basée sur la mort cellulaire):

Les pathologies cancéreuses sont particulièrement marquées par une prolifération incontrôlée des cellules malignes qui échappent au phénomène de la mort cellulaire programmée (apoptose), c'est ainsi que les traitements visent à l'élimination complète des cellules cancéreuses en inhibant leur prolifération ou en induisant leur mort par stimulation de l'apoptose et en bloquant également les fonctions de la mitochondrie nécessaires pour le maintien de l'équilibre de la cellule, ce qui va freiner le fonctionnement normal de la cellule.

En effet les dégâts cellulaires causés par un agent anticancéreux peuvent être mesurés *in vitro* comme suit:

- **Gonflement mitochondrial :**

Cette méthode consiste à mesurer par spectrophotométrie la décroissance de l'absorption d'une suspension mitochondriale à 540 nm, car cette lumière est inversement proportionnelle à la taille des mitochondries. La méthode généralement utilisée est celle décrite par Elimadi, *et al*, dans laquelle les mitochondries sont incubées pendant 1 min avec un tampon respirant et du succinate puis une quantité de

Ca Cl₂ est rajoutée au mélange précédent suivie de la lecture de l'absorbance à 540 nm pendant 3 min [141, 142, 143].

- ***Mesure de la viabilité des cellules par le test MTT :***

Ce test permet d'évaluer l'effet cytotoxique d'un produit sur la viabilité des cellules cancéreuses. En effet ce test repose sur la réduction de MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromidedes) par le succinate déshydrogénase mitochondrial des cellules vivantes actives en formazan, conduisant à la formation d'un précipité dans la mitochondrie de couleur violette dont la quantité est proportionnelle à la quantité des cellules vivantes. Les cristaux de formazan ainsi formés sont solubilisés par le DMSO et détectés par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 560 nm pour connaître la quantité relative de cellules vivantes et actives métaboliquement [143].

Partie I

*Généralités et données
bibliographiques*

Chapitre 3

*Aperçu bibliographique sur la
spectrométrie de masse et la résonance
magnétique nucléaire*

I. La spectrométrie de masse

1. Définition

La spectrométrie de masse (MS) est une technique d'analyse physique très sensible qui donne des informations importantes sur les molécules d'un échantillon donné avec une très grande précision, en effet elle permet la mesure de la masse moléculaire de ce dernier et d'obtenir des données structurales représentées sous forme de spectres qui sont en corrélation avec la structure de l'échantillon étudié. Cette méthode fonctionne en mesurant les rapports masse/charge (m/z) des molécules ionisées permettant ainsi de fournir des informations qualitatives et quantitatives sur les molécules. Cette technique est résumée par Mc Lafferty: Méthode aux 3S (Sensitivity, Specificity, Speed) [144, 145].

2. Composition

Le spectromètre de masse est un outil qui est constitué de plusieurs parties et qui est réparti en série comprenant:

- ✚ Source d'ions ou chambre d'ionisation: qui à partir d'une phase liquide ou solide permet le passage des molécules à analyser de leur état naturel à l'état gazeux (production d'ions positifs ou négatifs).
- ✚ Analyseur qui sépare les ions en fonction de leur masse et de leur charge (rapport m/z)
- ✚ Détecteur qui détecte les ions sortant de l'analyseur qui vont être transformés en signal électrique.

a- *Source d'ionisation ou chambre d'ionisation :*

En utilisant un champ électrique, les molécules d'intérêt vont passer en phase gazeuse qui permettra leur ionisation pour pouvoir être détectées dans l'appareil. Il existe plusieurs types de source d'ionisation dont deux couronnées par deux prix Nobel de chimie en 2002.

1- *Ionisation electrospray (ESI):*

Electrospray ou électronebulisation est une source d'ionisation douce qui avec le développement de sources de type "nano" est devenue dotée d'une grande sensibilité permettant de détecter des quantités d'échantillon de l'ordre de l'attomole [146], cette technique fonctionne de la manière suivante:

- *La Nébulisation:* Un champ électrique est placé dans un gradient de pression décroissant dans une interface chauffée, les ions en solutions vont devenir alors sous une forme gazeuse conduisant à la formation d'un flux nébulisé ou spray de microgouttelettes chargées de solvant et d'analytes.
- *La désolvatation:* suite à l'évaporation du solvant, les microgouttelettes vont rétrécir et la densité de charge devient de plus en plus importante conduisant à une explosion coulombienne libérant ainsi les ions en phase gazeuse.
- *Le transport:* Il s'agit du transport des ions depuis la source jusqu'à l'analyseur.

2- La Désorption et Ionisation par Laser Assistées par Matrice (MALDI):

C'est une technique mise en œuvre par Karas et Hillenkamp en 1988 qui permettait l'analyse des molécules de haut poids moléculaire supérieure à 10kDa. Son principe se base sur l'irradiation d'un dépôt cristallin contenant l'analyte et une matrice organique co- conduira à la désorption du couple matrice / analyte cristallisés par des impulsions laser pulsées à une longueur d'onde UV ou IR qui vont se retrouver chargées [147]. On peut décomposer cette méthode d'ionisation en 2 grandes étapes:

- **Formation d'une matrice cristallisée contenant l'échantillon à analyser:**

Une matrice composée de petites molécules organiques généralement diluée dans une solution composée de solvant (généralement l'acétonitrile CN ou l'éthanol) et d'eau, est mélangée avec l'échantillon à analyser, cependant les constituants de la matrice utilisés généralement ont certaines caractéristiques telles que; une faible pression de vapeur, une faible masse moléculaire mais au même temps suffisamment importante pour ne pas se volatiliser lors de la préparation de l'échantillon, la capacité d'absorption à la longueur d'onde du laser capable de fonctionner avec les groupements chimiques polaires permettant ainsi leur utilisation en solution aqueuse [148].

- **Désorption et ionisation des molécules de l'échantillon sous vide à l'aide d'un laser:**

Cette étape se déroule sous vide à l'intérieur du spectromètre de masse. Les impulsions laser vont dégager une énergie qui va entraîner l'évaporation et l'ionisation des molécules de l'échantillon à analyser, l'irradiation du laser va conduire à une accumulation d'une grande

quantité d'énergie à l'intérieur de la phase condensée par l'excitation des molécules constituant la matrice, ce qui provoque par la sublimation de la matrice et la suppression d'une partie du dépôt. La désorption s'effectue lorsqu'un certain seuil d'énergie est atteint et à partir duquel les ions sont détectés, en effet il se produit une désorption des molécules ionisées et neutres dans le vide sous une forme de panache moléculaire, qui prend par la suite la forme d'une plume chaude [149, 150]

b- Analyseur:

Les analyseurs ont pour rôle la séparation des ions en fonction du rapport m/z, ces derniers sont caractérisés par; la résolution, la sensibilité, la gamme dynamique et la précision de mesure ce qui permet de classer les analyseurs en différents groupes.

1. Les analyseurs à temps de vol (TOF = Time of flight):

Ce type d'analyseur a été développé initialement en 1955 et il est souvent associé à l'ionisation MALDI. Le principe est comme suit [151]:

Dans un long tube appelé tube de vol dans lequel on applique un champ électrique, les ions vont se déplacer en fonction de leur rapport m/z, l'analyseur va mesurer donc le temps mis par les ions pour franchir une distance fixe après accélération par un champ électrique. La limite dans cet appareil réside dans le fait que la détermination du rapport m/z est en fonction de l'énergie cinétique des ions qui ont des masses identiques mais pas forcément la même vitesse et la même trajectoire dans le tube ce qui provoquera la diminution de la résolution. Afin d'éviter ce problème, l'analyseur TOF peut être équipé de:

• **Extracteur retardé (Delay extraction DE):**

Le principe repose sur le retard des ions de quelques nanosecondes juste avant l'entrée dans l'analyseur ce qui va homogénéiser les énergies cinétiques des ions et permet à l'ensemble des ions de pénétrer dans le tube avec une moindre dispersion temporelle et cela par l'ajout d'une lentille en amont de l'analyseur qui possède un potentiel légèrement supérieur à celui du MALDI.

• **Le réflecteur électrostatique (Réflexion):**

Une série de lentilles dotées de potentiels croissants, sont placées sur l'extrémité du tube de vol, ces dernières vont agir comme un miroir électrostatique qui

va permettre l'inversion de la direction des ions qui vont par la suite converger sur un plan sur lequel est placé le détecteur ce qui aboutira à la correction de la dispersion de l'énergie et d'augmenter par la suite la résolution [152].

2. Les analyseurs à trappe d'ions:

Dans ces analyseurs, les champs électriques vont assurer le confinement des ions ayant de différents rapport m/z dans l'analyseur, en effet ils sont constitués d'un tube de dérive ou d'un entonnoir à ions dans lequel un champ électrique faible non uniforme croissant est appliqué, le flux de gaz va entraîner les ions le long de l'appareil alors que le champ électrique va les ralentir, un courant alternatif de radiofréquence va maintenir les ions focalisés au centre du tube. Cependant, selon la mobilité les ions vont se séparer et ils migrent dans le tube jusqu'à la région où le champ électrique est suffisamment fort pour compenser les forces de dérive générées par le flux de gaz avant d'être élué à la fin en abaissant le champ électrique (les ions ayant la mobilité la plus faible sont détectés en premier)

c- Détecteur

Les ions qui sortent de l'analyseur vont être détecté par le détecteur qui est couplé à un système informatique assurant le traitement des données de l'élaboration des spectres.

3. Spectrométrie de masse tandem (LC/MS/MS):

a. Définition:

Le tandem MS/MS se différencie de la MS par la présence de deux analyseurs de masse séparés par une zone de réaction. En effet, les ions formés dans la source d'ionisation vont être séparés selon leurs rapports masse/charge (m/z), ensuite ces ions vont subir une fragmentation dans la zone de réaction puis ils sont séparés dans le deuxième analyseur de masse et enfin les ions sont détectés par le détecteur comme pour des spectromètres de masse conventionnels. L'identification obtenue est plus fine et plus exacte (**Figure 16**) [153].

b. Performances:

Trois avantages majeurs sont offerts par la LC-MS-MS; sa capacité à étudier de nombreuses molécules appartenant ou non à la même famille structurale, capacité à mettre en évidence des métabolites spécifiques d'une maladie et enfin une automatisation offrant la possibilité de grandes séries d'analyses [154, 155].

Les performances d'un spectromètre sont déterminées par:

- **Sa résolution :** son pouvoir à séparer des ions de masses voisines.
- **Son exactitude :** son pouvoir à mesurer la masse exacte d'un ion.
- **Sa sensibilité :** son pouvoir à mesurer les petites quantités.
- **Son domaine de masse :** son échelle de mesure de masse.

c. Domaines d'applications:

Les domaines d'application de la spectrométrie de masse au laboratoire médical en modes simple ou en mode tandem sont multiples. Les analyses peuvent être destinées aux:

- Application en mycologie et bactériologie:

L'identification rapide des microorganismes par MS-MALDI-TOF par l'analyse des protéines ribosomales et des protéines associées aux membranes, après transfert d'une colonie ou extraction des protéines. Elle passe par une comparaison des spectres obtenus avec des spectres de référence validés au niveau des performances [156].

- Application en biochimie:

- Utilisée pour le diagnostic et le suivi des maladies héréditaires du métabolisme; déficit du cycle de l'urée, déficit de la β -oxydation des acides gras...etc. [157]
- Acides biliaires, acides gras libres et les stéroïdes [158].
- Identification des stéroïdes non conjuguées par GC-MS/MS et les conjuguées par LC-MS-MS [159].

- Application dans le suivi thérapeutique-pharmacologie:

Exemples [21]:

- les immunosupresseurs (ciclosporine, tacrolimus, sirolimus).
- Les neuroleptiques (clozapine, haloperidol, penfluridol, thioridazine).
- Les antimycosiques (posaconazole).

- Les médicaments utilisés dans le traitement de la leucémie myéloïde aigüe: erufosine (acylphosphocholine), antihistaminiques, antirétroviraux.

- Application en toxicologie:

- Toxiques : métaux (jusqu'à 34 éléments).

- Cyanures. Dopage : détection et identification de stéroïdes anabolisants (nandrolone et métabolites : norandrostérone et noréthiocholanolone) [158]

- Stupéfiants: opiacés, cocaïniques, cannabis, dérivés de l'ecstasy [159]

Cette méthode s'applique également dans d'autres domaines comme: l'analyse écotoxicologique, l'agroalimentaire, les parfums ou l'alimentation.

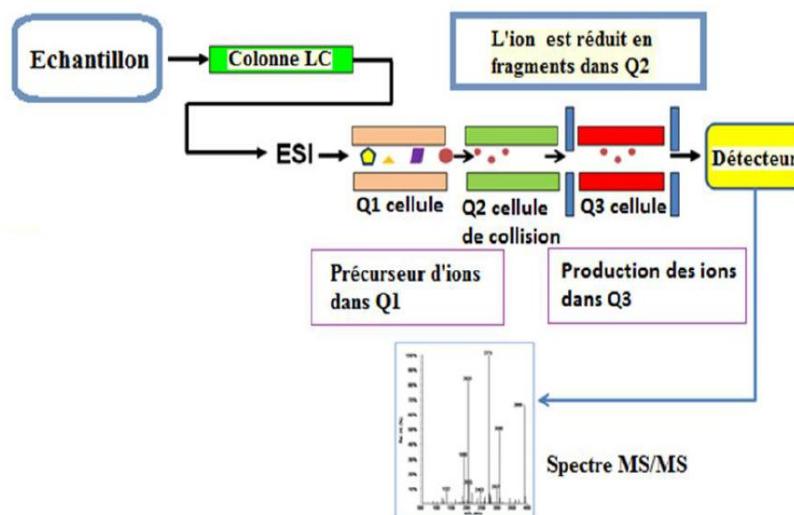


Figure 16: Schéma de détection d'un échantillon par LC/MS/MS

II- La résonance magnétique nucléaire (RMN):

1. Définition:

La RMN est une technique de la spectrométrie dont le principe est basé sur la mesure de l'absorption d'une radiofréquence par un noyau atomique dans un champ magnétique fort, ce dernier résonne alors à une fréquence spécifique qui lui est caractéristique. La RMN représente un outil précieux pour l'identification structurale de différentes molécules pures.

Les principaux noyaux étudiés sont : le proton 1H, le carbone 13C, le phosphore 31P, et l'azote 15N [160,161].

2. Les différentes techniques utilisées en RMN

1- La RMN monodimensionnelle (RMN-1D):

- RMN proton (1H):

Cette technique est très utilisée pour la détermination structurale de différentes molécules organiques inconnues en donnant accès à de nombreuses informations telles que, les différents types d'hydrogènes présents dans la molécule analysée, les différents types d'hydrogènes présents dans l'environnement électronique, le nombre d'hydrogènes voisins d'un hydrogène donné et le déplacement chimique caractéristique de chaque proton [160].

- RMN carbone (13C):

Cette technique est utilisée pour la mise en évidence des carbones du composé analysé en se basant sur les déplacements chimiques observés en fonction de l'environnement de chaque atome de carbone. Le DEPT (Distortionless Enhanced Polarization Transfer) permet la mise en évidence des carbones primaires (CH₃), secondaires (CH₂), tertiaire (CH) et dans une moindre mesure les carbones quaternaires [160,161].

2- La RMN bidimensionnelle (RMN-2D):

Dans la RMN-2D on a une succession de trois intervalles de temps: temps de préparation du système de spin à étudier pour l'expérience; le temps d'évolution du système de spin sous l'effet de plusieurs facteurs et en fonction du déplacement et des couplages scalaires du noyau correspondant, on parle de marquage et enfin le temps de détection où il y'a lieu l'acquisition du signal modulé. Il faut savoir que dans d'autres expériences il peut y'avoir une autre période qui est le temps de mixage qui se situe juste avant le temps de détection [161].

3- Corrélations homonucléaires:

- COSY (1H – 1H):** fournit des informations sur les couplages homonucléaires 2 J et 3 J (protons séparés par deux ou trois liaisons) entre les protons voisins et ceux qui sont adjacents.
- NOESY (1H – 1H) :** permet d'observer dans l'espace, les corrélations entre protons (effets Overhausser) d'une même molécule [160, 161].

4. Corrélations hétéronucléaires:

- **HSQC (1 JH-C)** : cette technique permet d'observer les couplages chimiques entre les carbones et les protons directement liés entre eux. Toutefois, elle ne permet pas d'observer les déplacements chimiques des atomes de carbones quaternaires.
- **HMBC (2 JH-C, 3 JH-C)** : cette technique permet de répondre aux problèmes précédemment posés, puisqu'elle permet la détection des couplages longue distance 2 JH-C, 3 JH-C et permet également de déduire les carbones quaternaires couplés aux protons [160, 161].

Partie II

Matériel et Méthodes

I. Investigations phytochimiques et activités biologiques de l'espèce *Iris unguicularis* Poir.

1. Matériel végétal et extraction

L'espèce *Iris unguicularis* Poir. a été récoltée en Mars (2015-2016) dans la forêt de Chettaba située à Constantine ($36^{\circ}20.428'N$, $006^{\circ}41.193'E$ à 721 m). L'identification de cette espèce a été réalisée par le professeur (Gérard de Bélair ph006_47. www.gdebelair.com.).

Après le séchage du matériel dans un endroit sec et à l'abri de la lumière, les rhizomes ont été ensuite broyés en une poudre fine en utilisant de l'azote liquide.

L'extraction a été réalisée par macération de la poudre des rhizomes en utilisant de l'éthanol comme solvant extracteur (**Figure 16**), l'extrait obtenu a été ensuite conservé à l'abri de la lumière à température ambiante jusqu'à son utilisation.

2. Teneur en composés phénolique totaux et en flavonoïdes

2.1 Dosage des polyphénols

- Principe

Cette méthode est basée sur l'interaction des composés phénoliques avec le réactif de folin-ciocalteu qui est un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). En effet, en oxydant les composés phénoliques, ce réactif est réduit en un mélange d'oxyde de tungstène (W_2PW_{23}) et d'oxyde de molybdène (MO_8O_{23}) de couleur bleu, dont l'absorbance est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon [162].

- Protocole

1mg de chaque extrait sont ajoutés et dissous dans 1 ml d'eau distillée, ensuite 100 μ l de la solution de FCR dilué (10%) ainsi que 75 μ l de carbonate de sodium (7,5%) sont ajoutés à 20 μ l de ces extraits. Le mélange est laissé à l'obscurité à température ambiante pendant 2h, la lecture est réalisée par la suite en mesurant l'absorbance à 765 nm contre un blanc sans extrait. Les résultats sont exprimés en μ g d'équivalent d'acide gallique (25 μ g/ml- 200 μ g/ml) par milligramme d'extrait (μ g EAG/mg d'extrait) en réalisant une courbe d'étalonnage avec différentes concentrations de ce standard [163].

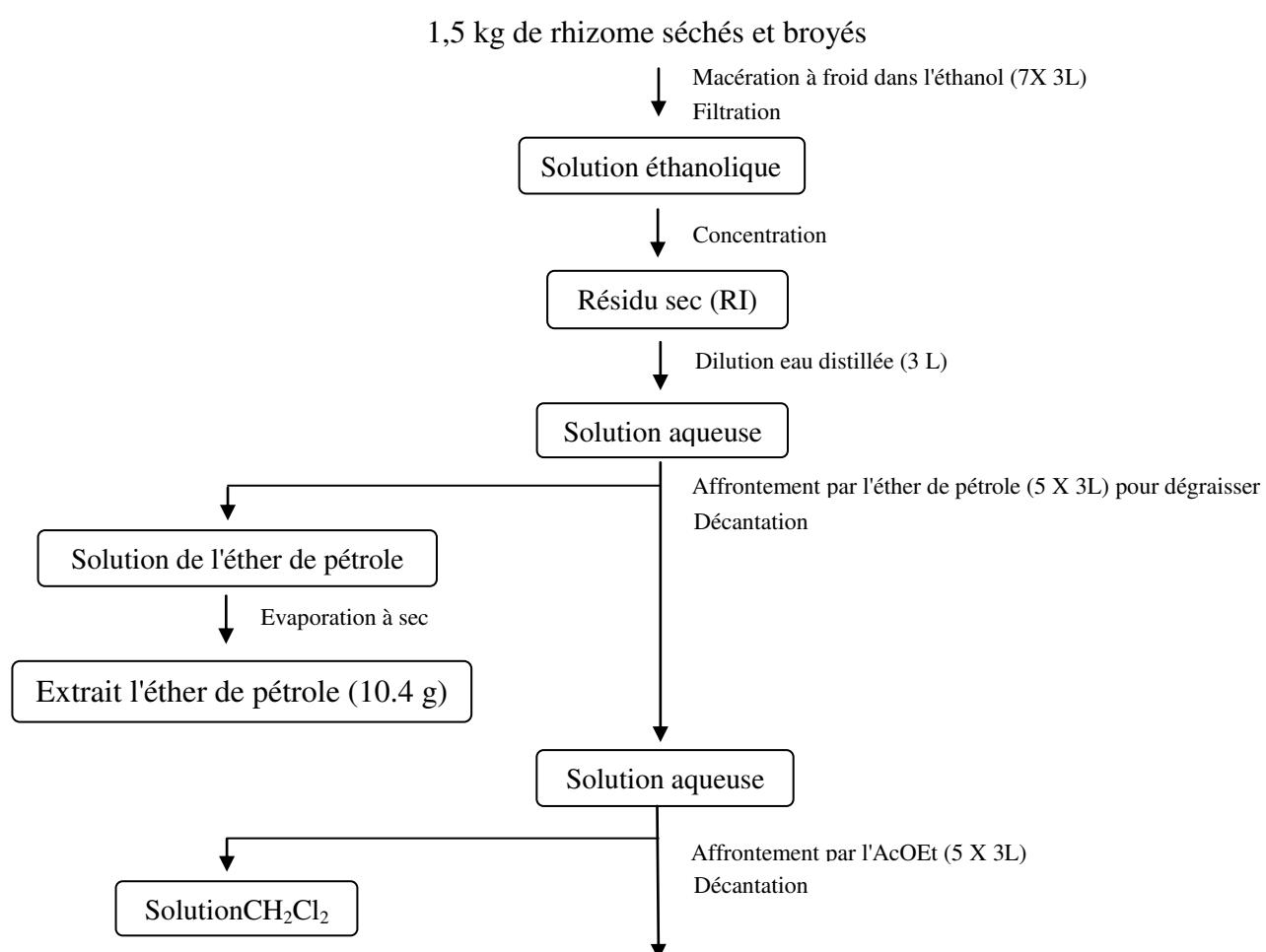
2.2. Dosage des flavonoïdes

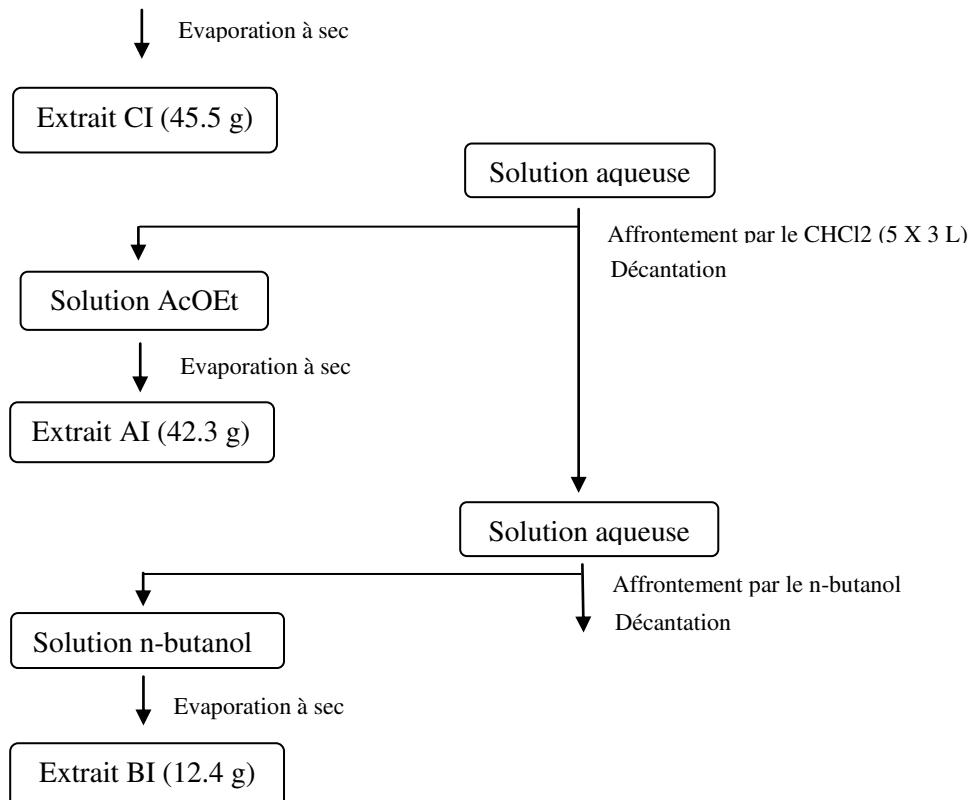
- *Principe*

La méthode est basée sur la formation de complexes jaunâtres après chélation des métaux par les flavonoïdes qui sont représentés par l'aluminium sous forme d'ions (Al^{+3}) résultants de la décomposition du chlorure d'aluminium (AlCl_3). La lumière absorbée dans le visible par ces complexes formés est proportionnelle à la concentration des flavonoïdes [162].

- *Protocole*

1mg de chaque extrait sont ajoutés et dissous dans 1 ml d'eau distillée. Par la suite, 130 µl de méthanol, 10 µl acétate de potassium (CH_3COOK) ainsi que 10 µl de nitrate d'aluminium ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 10%) sont ajoutés à 50 µl de chaque extrait, le mélange est incubé par la suite pendant 40 minutes et l'absorbance est mesurée à 415 nm. Les résultats sont exprimés en µg d'équivalents de la quercétine (25µg/ml - 200µg/ml) par milligramme d'extrait (µg QEs/mg d'extrait) en réalisant une courbe d'étalonnage avec différentes concentrations de ce standard. [164]



**Figure 17:** Différentes étapes d'extraction à partir des rhizomes

3. Elucidation des profils phytochimiques par la LC-MS-IT-TOF

Cette technique est utilisée pour établir les profils phytochimiques des différents extraits CI, AI et BI pour avoir une idée sur leurs constituants.

L'équipement et les modalités d'analyse pour la détermination du contenu en phytoconstituants sont décrits dans le (**Tableau 10**).

Tableau 10: Description du matériel d'analyse (LC-MS-IT-TOF)

Equipement/matériel	spécifications
Shimadzu LC-ESI-IT-TOF	<p>Equipement <i>Shimadzu</i>® UHPLC :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Passeur d'échantillons (SIL-20AC). - Une pompe à gradient (LC-20AD). - Un module de bus de communication (CBM-20A). - Un four à colonne (CTO-20AC). <p>Instrument MS :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Source d'ionisation ESI (mode d'ionisation négatif et positif).

	<ul style="list-style-type: none"> - Pression du gaz de séchage (N2) =100 kPa. - Débit du gaz de nébulisation (N2) = 1. 5 L/min. - Température du bloc chauffant = 200°C. - Température de la CDL = 200°C - Tension d'électrospray = 4,5 kV. - Tension du détecteur = 1,63 kV. - Plage de masse, m/z 100-1000 (MS1). - Pression IT = 1,8x104 Pa. - Pression TOF = 1,4x104 Pa. - Temps d'accumulation des ions = 30 msec. <p>L'analyse des données effectuée par Le logiciel LC-MS Solution Version 3.4.1 (Shimadzu, Japon) et le logiciel Formula Predictor.</p>
Colonne	Une colonne de chromatographie en phase inversée Agilent Eclipse XDB modèle : 150 mm (longueur), 4,6 mm (diamètre interne), 3,5 µm (taille des particules).
Système éluant [165]	<p>Gradient d'élution :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Solution A: formiate d'ammonium aqueux de 5 mM avec 0,1% d'acide formique) - Solution B: Acétonitrile avec 0,1% (Acide formique) <p>Profil d'élution :</p> <ul style="list-style-type: none"> - 7,5% B (0-5 min), 7,5-95% B (5-45 min), 95% B (7 min), 7,5% B (13 min).
Volume d'injection	4 µL
Débit et température	0,35 mL/min ; 35 °C
Préparation de l'échantillon	<ul style="list-style-type: none"> - Préparation d'une gamme de dilution à partir d'une solution mère (1000 ppm). - Filtration de l'échantillon en utilisant un microfiltre (0,2 µm).

4. Instruments et conditions chromatographiques de la LC-MS/MS

La quantification phytochimique des extraits AI, CI et BI a été réalisée par une méthode LC-MS/MS précédemment développée et validée [165].

L'équipement et les modalités d'analyse pour la détermination des composés phénoliques sont représentés dans le (**Tableau 11**).

Tableau 11: Description du matériel d'analyse (LC-MS-MS)

Equipement/matériel	spécifications
Shimadzu LC-ESI-MS-MS	<p>Equipement <i>Shimadzu</i>® UHPLC :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Echantillonneur automatique (modèle SIL-30AC). - Une pompe à gradient (LC-30 AD). - Dégazeur (DGU-20A3R). - Un four à colonne (CTO-10ASvp). <p>Instrument MS :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Modèle triple quadripôle équipé d'une source d'ionisation ESI. - Température d'interface = 350 °C. - Température DL = 250 °C. - Température du bloc thermique = 400 °C. - Pression du gaz de séchage (N2) = 15 L/min. - Débit du gaz de nébulisation (N2) = 3 L/min. <p>L'analyse des données effectuée par Le logiciel <i>LabSolutions</i>® (<i>Shimadzu</i>)</p>
Colonne	C18, phase inverse ODS-4 [100 mm (L) x 2,1 mm (ø), 2µm(ep.)]. Température = 35 °C.
Système éluant	<p>Gradient d'élution :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Solution A: Eau avec 10 mM de formiate d'ammonium ainsi que 0,1% acide formique. - Solution B: Acétonitrile avec 0,1% (Acide formique)

	Profil d'élution : - 5-20 % B (0-10 min), 20 % B (10-22 min), 20-50 % B (22-36 min), 95 % B (36-40 min), 5 % B (40-50 min).
Volume d'injection	4 µL
Débit	0,25 ml/min
Préparation de l'échantillon	- Préparation d'une gamme de dilution à partir d'une solution mère (1000 ppm). - Filtration de l'échantillon en utilisant un microfiltre (0,2 µm).

5. Activités biologiques

5.1. Activité antioxydante

5.1.1. Test de DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl)

Cette méthode est basée sur le dosage du radicale DPPH réduit par un agent antioxydant, ce dernier qui en début de réaction avait une couleur violette va devenir en fin de réaction de couleur jaunâtre, ce radical absorbe à une longueur d'onde de 517 nm mais en présence d'un antioxydant, l'absorbance de ce dernier va diminuer.

Cependant, 160 µl d'une solution DPPH préparée après dilution de 6 mg de la poudre de ce dernier dans un volume de 100 ml de méthanol est ajoutée à 40 µl de chaque extrait dilué dans du méthanol à différentes concentrations et incubés dans l'obscurité pendant 30 min, après incubation, la lecture est effectuée à 517 nm dans un lecteur de microplaques à 96 puits. Le BHA et le BHT sont utilisés comme standards et les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition qui sont calculés selon l'équation suivante [166]:

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

A_{Blanc} : Absorbance de la réaction avec la présence du réactif uniquement.

A_{Extrait} : Absorbance de la réaction avec la présence du réactif et de l'extrait.

Les valeurs de la CI_{50} sont calculés pour chaque extrait.

5.1.2. Test du blanchiment du β -carotène

L'activité est basée sur la mesure de la diminution de l'absorbance du β -carotène en fonction du temps. En effet l'acide linoléique en émulsion aqueuse est oxydé, le β -carotène va donc piéger les radicaux libres formés ce qui aboutira à sa décoloration (blanchiment) car au début il avait une couleur orange.

Une solution de β -carotène est préparée, en diluant 0,5 mg du β -carotène est diluée dans 1 ml de chloroforme auxquelles sont ajoutées 200 μ l de Tween 40 et 25 μ l acide linoléique donnant ainsi le mélange émulsifiant, après évaporation du chloroforme 50 ml d' H_2O sont ajoutés. L'absorbance du β -carotène doit être située entre 0.8 - 0.9 nm (si on la trouve supérieure on ajoute l'eau oxygéné H_2O_2).

Cependant, 160 μ l de la solution préparée est ajoutée à 40 μ l de chaque extrait préparé à différentes concentrations et l'absorbance est mesurée chaque 30 min avec incubation à 45°C pendant 120 min à 470 nm en utilisant un lecteur de microplaques à 96 puits. Le BHA et le BHT sont utilisés comme standards [167, 168].

L'activité antioxydante est exprimée en pourcentage et calculée par l'équation suivante :

$$\text{AA (\%)} = [1 - (A_{H0} - A_{Ht}) / (A_{C0} - A_{Ct})] \times 100$$

AA (%): Activité antioxydante;

A_{H0} : valeur de l'absorbance de la β -carotène en présence de l'extrait mesurée à t=0

A_{C0} : valeur de l'absorbance de la β -carotène en présence de contrôle négatif mesurée à t=0

A_{Ht} : valeur de l'absorbance de la β -carotène en présence de l'extrait mesurée à t=120 mn

A_{Ct} : valeur de l'absorbance de la β -carotène en présence de contrôle négatif mesurée à t=120 mn

Les valeurs de la CI_{50} sont calculés pour chaque échantillon.

5.1.3. Test de la capacité antioxydante par la réduction du cuivre (CUPRAC)

Cette méthode est basée sur le suivi de la diminution de l'absorbance accrue du complexe Néocuproïne (Nc), cuivre (Cu^{2+}) [$Nc^{2-} Cu^{2+}$] car en présence d'un agent antioxydant, ce complexe va être réduit.

Pour le protocole, un mélange de 3 solutions est préparé avec un volume de : 50 µl Cu (II) (10 mM), 50 µl neocuprine (7,5 mM), ainsi que 60 µl de solution tampon NH4Ac (1 M, pH = 7,0). Cependant, ce mélange est ajouté à 40 µl de chaque échantillon et incubé pendant 1h et la lecture est effectuée par spectrophotométrie à 450 nm dans un lecteur à microplaques de 96 puits. Le BHA et le BHT sont utilisés comme standards. Les résultats ont été calculés à titre de A0.5, ce qui correspond à la concentration qui indique le 0,50 d'absorbance [169].

5.1.4. Chélation des ions métalliques (Métal-chélate)

La méthode repose sur la capacité d'une molécules à fixer les ions Fe²⁺ qui jouent un rôle important lors de la production des radicaux libres.

Pour le mode opératoire, un mélange de : 40 µL d'éthanol, 40 µl Fe²⁺ (0,2 mM) additionnés à 80 µl Ferene (0,5 Mm) qui est utilisé pour amorcer la réaction est préparé. 40 µL de chaque échantillon sont ajoutés au mélange précédent et incubés pendant 10 min. Après incubation la lecture est mesurée à 593 nm dans un lecteur à microplaques de 96 puits et l'EDTA est utilisé comme standard tandis que le contrôle est le mélange de FeCl₂ et de Ferene [170].

L'effet de l'alkylation des ions de fer est évalué par l'équation suivante :

$$\text{Fe}^{2+} \text{ chelating effect (\%)} = [(A_S - A_C)/A_C] * 100$$

A_S: absorbance du control blanc , A_C: absorbance des solutions d'extrait.

Les valeurs de la CI₅₀ sont calculées pour chaque échantillon.

5.2. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne a été évaluée par la méthode de diffusion sur disque sur milieu gélosé Mueller-Hinton pour [171]:

Deux souches bactériennes à Gram + : *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300)

Bacillus subtilis (ATCC 6633)

Cinq souches bactériennes à Gram - : *Escherichia coli* (ATCC 25922)

Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853)

Proteus vulgaris (ATCC 29905)

Citrobacter freundii (ATCC 8090)

Morganella morganii (ATCC 25830)

Le DMSO est utilisé comme contrôle négatif tandis que des disques de :

Ox: oxacilline (1 µg/disque), Pi: pipemicide (20 µg/ disque),, E: erythromycine (15 µg/ disque),, PRL: piperacilline (100 µg/ disque), C: chloramphenicole (30 µg/ disque), CD: clindamycine (2 µg/disque), AK: amikacine (30 µg/disque) et enfin le CIP: ciprofloxacine (5 µg/disque) étaient utilisés comme contrôles positifs.

Les souches de référence ont été obtenues à partir du laboratoire de bactériologie, hôpital hospitalo-universitaire Benbadis, de Constantine.

5.2.1. Les milieux de cultures utilisés

La gélose nutritive a été utilisée pour conserver les différentes souches bactériennes.

La gélose Mueller Hinton a été employée pour l'étude de la sensibilité des différentes souches aux différents extraits testés.

5.2.2. Préparation des suspensions bactériennes

L'inoculum des différentes souches bactériennes a été préparé à partir des cultures bactériennes et cultivé dans des boites de pétri contenant la gélose nutritive après un temps d'incubation de 18 à 24 h à 37 °C, les suspensions sont ensuite préparées après le prélèvement des colonies de chaque souche (2 à 3 colonies) qui sont transférées dans des tubes stériles contenant de l'eau physiologique avec une densité de 0,5 McFarland caractérisée par l'observation d'un trouble.

5.2.3. Préparation de la gamme de concentration des extraits

Avant la préparation des différentes dilutions, chaque extrait a été stérilisé par filtration en utilisant des micro-filtres de 0.22 mm. Les solutions des extraits sont préparées dans du DMSO (Diméthyle sulfoxyde). La gamme de dilution été préparée dans des tubes à essais à partir d'une solution mère de manière à obtenir des concentrations au 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 (des concentrations allant de 100 µg/ml à 1.562 µg/ml).

Brièvement, les disques de papiers filtres stériles sont imprégnés de 10 µl des différentes concentrations des extraits et déposés délicatement sur les boites de pétri coulées préalablement avec une gélose de Mueller Hinton et ensemencées avec les souches bactériennes puis incubées à 37°C pendant 18h à 24h. Après incubation, l'effet positif des extraits est révélé par l'apparition d'une zone arrondie transparente autour du disque qui correspond à la zone d'inhibition, plus le diamètre de cette zone est grand plus la bactérie est sensible. Le DMSO est utilisé comme témoin négatif et les disques d'antibiotiques sont utilisées comme témoins positifs.

Les résultats obtenus après mesure des diamètres d'inhibition sont répétés trois fois et exprimés selon la moyenne des valeurs obtenues ± l'écart type (SD).

5.3. Activité anti-Alzheimer

Cette activité est déterminée par la mesure de l'activité de acétylcholinestérase (AChE) ainsi que celle de la butyrylcholinestérase (BChE) par spectrophotométrie selon la méthode Ellman avec des modifications [171]. Dans cette méthode, nous avons utilisé l'AChE de l'anguille électrique ainsi que la BChE du sérum de cheval. De plus, l'iodure d'acétylthiocholine (ACI) et le chlorure de butyrylthiocholine (BCI) ont été utilisés comme substrats et le DTNB [5,5-dithio-bis (2-nitrobenzoïque)] a été utilisé pour la mesure de l'activité cholinestérase, le méthanol quant à lui été utilisé pour dissoudre les extraits. Différentes solutions ont été préparées pour cette méthode: les solutions tampon, la solution du DTNB, les solution des substrats (ACI et BCI), ainsi que les solutions des deux enzymes AChE et BChE.

Cependant, 150 µL de 100 mM du tampon phosphate de sodium (pH 8.0) additionnés à 10 µL d'extrait dissout dans du méthanol à différentes concentrations sont mélangés à 20 µL de la solution de l'AChE (5.32 - 10⁻³ U) ou de la BChE (6.85 - 10⁻³ U) puis incubés à 25°C pendant 15 mn, ensuite 10 µL de la solution du DTNB (0.5 mM) sont ajoutés, la réaction est activée par l'ajout de 10 µL de l'acetylthiocholineiodide (0.71 mM) ou 10 µL de la butyrylthiocholinechloride (0.2 mM), la réaction est suivie par spectrophotométrie à 412 nm chaque 5min pendant 15 min en utilisant un lecteur de microplaques de 96 puits. Cette réaction est caractérisée par la formation d'une couleur jaune d'anion 5-thio-2-nitrobenzoate de méthyle (TNB) après la réaction du DTNB avec thiocholine libéré après hydrolyse enzymatique de l'iodure d'acétylthiocholine ou le chlorure de butyrylthiocholine.

Le pourcentage d'inhibition de l'AChE ou de la BChE, est déterminé par rapport au blanc (méthanol dans le tampon phosphate, PH= 8) par la formule suivante:

$$(E - S) / E *100.$$

E : l'activité de l'enzyme sans extrait / S : l'activité de l'enzyme avec l'extrait

Les expériences ont été répétées trois fois et la galantamine a été utilisé comme composé de référence.

II. Activité cytotoxique de l'acide isocostique isolé de l'espèce *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter.

1. Matériel végétal et extraction :

Les parties aériennes de l'espèce *Dittrichia viscosa* (12Kg) ont été récoltés durant le mois d'Octobre 2015 dans la Cité Boussouf située à Constantine (N36°20.368' et E 006°34.931' à 498 m). Le séchage s'est effectué dans un endroit aéré et à l'abri de la lumière.

Après séchage, cette espèce a été broyée en utilisant l'azote liquide et l'identification a été effectuée par le professeur Gérard de Belair ph001_23.www.gdebelair.com.

L'extraction a été réalisée par macération de la poudre de la partie aérienne en utilisant de l'acétone comme solvant extracteur (**Figure 18**) ainsi qu'une extraction acide utilisée pour affiner la recherche du produit en question de plus une extraction à froid en utilisant l'hexane a été également employée avant d'obtenir à la fin l'acide isocostique, qui a été ensuite conservé à l'abri de la lumière à température ambiante jusqu'à utilisation.

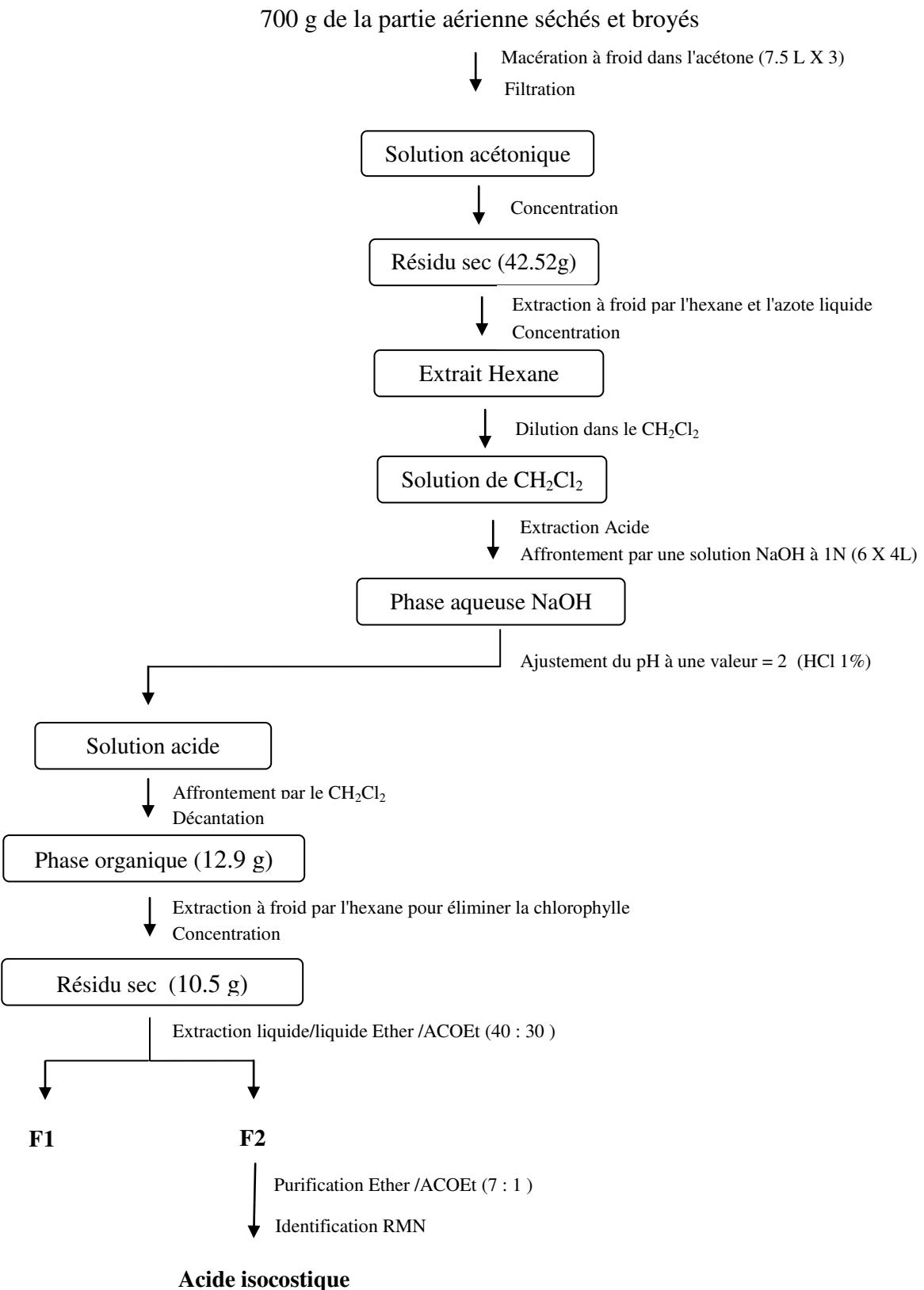


Figure 18: Différentes étapes d'extraction de l'acide isocostique

2. Spectroscopie de RMN

Les spectres RMN du proton et du carbone (RMN-¹H et ¹³C) ont été mesurés par un spectromètre Brucker à 400 MHz (Karlsruhe, Allemagne) et le tétraméthylsilane (TMS) a été utilisé comme standard. Le produit à analyser a été solubilisé dans le solvant deutéré ou le DMSO dans les tubes analytique de 5 mm. Les résultats sont exprimés en terme de déplacements chimiques en ppm par rapport au TMS.

3. Activité cytotoxique

3.1. Extraction des mitochondries du foie

Les mitochondries ont été isolées à partir des foies des rats Wistar ayant un poids de 300g après avoir été tués et disséqués et l'extraction s'est réalisée en se basant sur la centrifugation différentielle [172]. Les foies prélevés ont été finement coupés (1g) et placés dans un tampon d'isolement TSE (250 mM de saccharose + 50 mM de Tris + 5 mM d'EGTA, pH = 7,2 à 4°C) puis rincés deux fois dans le même tampon et potérisés dans un potter de DOUNCE pour provoquer la lyse cellulaire et permettre la libération des mitochondries, l'homogénat obtenu a été centrifugé à 1770 tr / min (g) pendant 10 min à 4°C pour éliminer les débris cellulaires et le surnageant a été centrifugé une deuxième fois à 9600 tr / min (g) pendant 10 min à 4°C, après cette centrifugation, le culot était remis en suspension dans 1,5 mL de TSE et centrifuger à 9600 tr / min (g) pendant 10 min à 4°C puis le culot a été remis en suspension dans 1,5 mL de TS (250 mM de sucrose + 50 mM de Tris, pH = 7,2 à 20 ° C) et centrifuger à 9600 rpm (g) pendant 10 min à 4°C et enfin, le culot mitochondrial a été remis en suspension dans 200 µL de TS.

3.2. Activité antioxydante par piégeage du radical (DPPH)

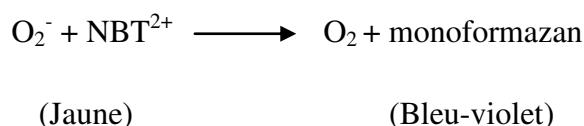
Le dosage a été réalisé en utilisant une solution de DPPH (100 uM) préparée et stockée dans l'obscurité. L'échantillon a été ajouté à cette solution et la diminution de l'absorbance a été mesurée à 530 nm. Cette étape était utilisée pour voir si ce produit a un effet antioxydant ou bien pro-oxydant.

3.3. Mesure de la production mitochondriale de l'anion superoxyde

La génération de l'anion superoxyde O_2^- est évaluée en mesurant la réduction du NBT (Nitrobleutétrazolium) par le superoxyde en monoformazan qui absorbe à une longueur d'onde de 560nm. En effet, dans un volume final de 1.2 ml de tampon respirant avec roténone, 0.2 mg/ml de suspension mitochondriale, 1.2 μ l de la cyclosporine (1 μ M), 12 ml du NBT $^{2+}$ (100 mM) + 120 μ l de l'échantillon préparé à différentes concentrations, ont été incorporées puis incubées pendant 1 minute, après incubation, 7.2 μ l du succinate (6mM) sont introduits et l'absorbance est suivie 560 nm pendant 360 secondes [142, 143].

Le pourcentage de production de l' O_2^- est calculé en prenant le 100% du contrôle.

La réaction est la suivante :



3.4. Mesure de l'apoptose par mesure du gonflement mitochondriaire

La mesure du gonflement mitochondrial se fait par spectrophotométrie. Dans un volume final de 1.8 ml du tampon respirant, 1g/ml de mitochondries, 10.8 µl du succinate ont été ajoutés puis incubés pendant 1 minute, ensuite, 2.25 µl du Ca Cl₂ à 100 mM + 180µl de l'échantillon préparé à différentes concentrations, ont été rajoutées et l'absorbance est suivie à 540 nm chaque minute pendant 3 min. La lumière absorbée par une suspension de mitochondries étant inversement proportionnelle à la taille des particules (mitochondrie), le gonflement mitochondrial est estimé en mesurant la décroissance de l'absorption de la suspension mitochondriale [143].

3.5. Mesure de la viabilité des cellules par le test MTT

- Sélection des lignées cellulaires:

L'activité antiproliférative a été réalisée *in vitro* contre quatre lignées cellulaires qui sont :

- La lignée cellulaire qui correspond au cancer du cerveau humain U-118
 - La lignée cellulaire qui correspond au cancer du colon CaCo-2
 - La lignée cellulaire qui correspond au cancer ovarien SKOV-3
 - La lignée cellulaire saine correspondant au Dermo-fibroblaste humain primaire (HDF)

Les lignées ont été obtenues de chez American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) et l'activité est mesurée en utilisant des kits commerciaux du test colorimétrique MTT.

- *Conditions de culture des cellules*

Les lignées cellulaires ont été cultivées dans un milieu de culture minimum essentiel du Dulbecco (DMEM) avec des sels d'Earle (MediatechCellgro®, Herndon, USA) supplémenté avec 10% de sérum bovin fœtal (FBS, v/v) inactivé par la chaleur (Hyclone®, Logan, USA) et 1% de la pénicilline (100 U / ml) et de la streptomycine (100 µg / ml) (Mediatech®, Cellgro, VA). Les cellules ont été par la suite cultivées à 37°C, dans un environnement humidifié contenant 5% de CO₂.

Après récolte des cellules cultivées, ces dernières ont été traitées avec une solution Trypsine/ EDTA à 80-90% de confluence et la viabilité cellulaire a été mesurée en utilisant un lecteur de microplaques à 96 puits (Corning®).

- *Protocole*

Le test MTT 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromidedes), permet d'évaluer l'effet de l'acide isocostique sur la viabilité de différentes lignées. Le principe de ce test est basé sur la réduction du MTT en formazan par le succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives ce qui forme un précipité de couleur violette dans la mitochondrie.

La viabilité cellulaire est mesurée par spectrophotométrie à 540 nm après solubilisation des cristaux de formazan formés par le DMSO. Le test est effectué sur des microplaques à 96 puits dans lesquels sont ajoutées les différentes cellules préparés (10000/puits) ainsi que 10 µl du composé à testée à différentes concentration 200 µg/ml, 100 µg, 50 µ g and 25 µg (dilué dans 0.4 % DMSO) pour un volume final de 100 µl/puits et incubé pendant 48 heures, 10 µl de la solution MTT ont été rajoutés pour un volume final de 0.5 mg/ml puis incubés pendant 3 heures à 37 °C. Après incubation, les cellules sont dissoutes dans la solution de DMSO dans chaque puits pour solubiliser les cristaux de formazan.

Les valeurs d'IC₅₀ sont déterminées après incubation de 48h des cellules en phase exponentielle de croissance. Cependant, ces valeurs sont déterminées en deux temps:

Le pourcentage de croissance pour chaque concentration est déterminé par l'équation suivante:

$$\% \text{ } C_x \text{ croissance} = A^{Cx} / A^T$$

% C_x croissance : indique le pourcentage de croissance des cellules en présence d'une concentration de l'extrait à testé.

C_x croissance : Concentration de l'extrait a testé.

A^{Cx} : Absorbance mesurée à 540 nm après 48h d'incubation des cellules.

A^T: Absorbance mesurée à 540 nm après 48h d'incubation des cellules en absence de l'extrait à testé (témoin).

Les résultats des tests sont exprimés en moyenne ± SD d'analyses en trois essais en utilisant le logiciel de statistiques GraphPadPrism 7 et le test ANOVA (P <0,05 ont été considérés comme significatifs.).

Partie III

Résultats et Discussion

I. Etude phytochimique et activités biologiques de l'espèce *Iris unguicularis* Poir.

1. Teneur en polyphénols

La teneur en composés phénoliques a été estimée par dosage colorimétrique en utilisant le Folin-Ciocalteu, en ayant recours à l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique, en effet les résultats sont exprimés en μg d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait ($\mu\text{g AcG} / \text{mg d'extrait}$) qui représente le standard le plus utilisé dans cette méthode (**Figure 19**).

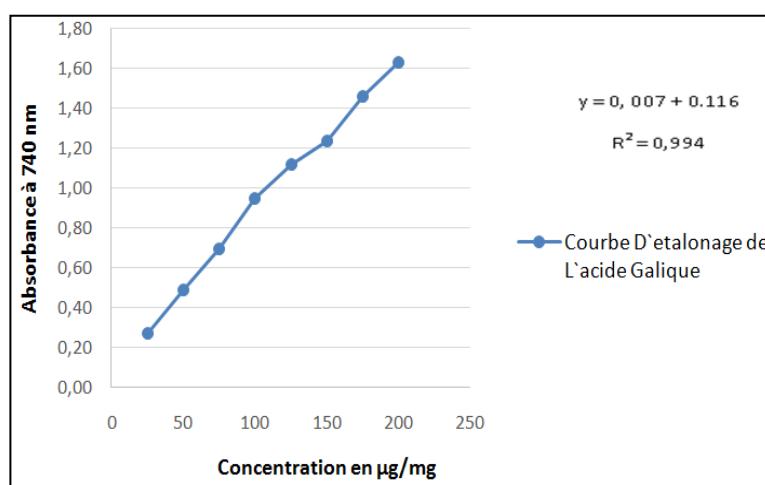


Figure 19: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Cependant les résultats obtenus à partir du dosage des différents extraits (PI, RI, AI, CI et BI) sont représentés dans le (**Tableau 12**).

Tableau 12: Teneur en polyphénols des extraits de l'espèce *Iris.unguicularis* Poir.

Extraits	Teneur en polyphénols ($\mu\text{gAcG}/\text{mg extrait}$) ^a
PI	16.28 \pm 0.46
RI	71.99 \pm 0.01
AI	213.77 \pm 0.22
CI	43.25 \pm 0.30
BI	16.06 \pm 0.88

^a $\mu\text{gAcG}/\text{mg extract}$: acide gallique équivalent par milligramme d'extrait; n=3

Les résultats montrent que la teneur en composés phénoliques varie considérablement d'un extrait à un autre. En effet, en comparant les deux extraits éthanoliques de la partie aérienne (PI) ainsi que celui des rhizomes (RI) de notre espèce, on constate que ce dernier décèle une meilleure richesse en composés phénoliques par rapport à l'extrait PI, ce qui vient soutenir les travaux qui ont souligné l'importance de cette partie des espèces du genre *Iris* plus que la partie aérienne [9].

Concernant maintenant les résultats des différents extraits (AI, CI et BI) issus de l'extrait RI, les résultats ont démontré que l'extrait AI était l'extrait le plus riche avec une teneur de $213.77 \pm 0.22 \mu\text{g AcG / mg d'extrait}$, suivis des deux extraits CI et BI où les teneurs sont de l'ordre de $43.25 \pm 0.30 \mu\text{g AcG / mg d'extrait}$ et $16.06 \pm 0.88 \mu\text{g AcG / mg d'extrait}$, respectivement, ce qui est justement en cohérence avec certaines études axées sur les espèces de ce genre et qui ont déjà révélés leur richesse en composés phénoliques [6].

2. Teneur en Flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes a été estimée par dosage colorimétrique en employant comme réactif, le chlorure d'aluminium (AlCl_3), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage de la quercétine et les résultats sont exprimés en μg d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait ($\mu\text{g QE} / \text{mg extract}$) qui représente le standard le plus utilisé pour le dosage de ces composés (**Figure 20**).

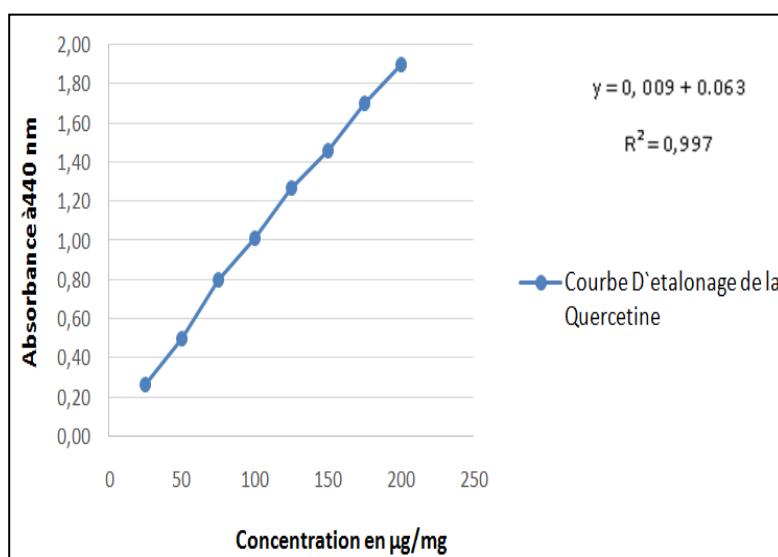


Figure 20: Courbe d'étalonnage de la quercétine

Les résultats du dosage des différents extraits (PI, RI, AI, CI et BI) sont représenté dans le (**Tableau 13**).

Tableau 13: Teneur en Flavonoïdes des extraits de l'espèce *Iris.unguicularis* Poir.

Extraits	Teneur en Flavonoides (μg QEs/mg extrait) ^b
PI	36.06 ± 1.60
RI	92.59 ± 2.92
AI	46.49 ± 2.52
CI	43.25 ± 0.30
BI	23.61 ± 1.51

^b μg AcG/mg extrait : acide gallique équivalent par milligramme d'extrait; n=3

Les résultats du dosage des deux extraits PI et RI, révèlent que la teneur en flavonoïdes varie de manière remarquable en faveur de l'extrait RI avec une teneur de $92.59 \pm 2.92 \mu\text{g}$ QEs / mg d'extrait, et qui est nettement plus élevée que celle de l'extrait PI avec une teneur de $36.06 \pm 1.60 \mu\text{g}$ QEs / mg d'extrait, ce qui met l'accent une fois de plus sur l'intérêt des rhizomes des espèces du genre *Iris* déjà évoqué dans d'autres investigations [9].

Pour les résultats du dosage des différents extraits issus de l'extrait RI, on ne constate pas une différence significative dans la teneur en flavonoïdes des deux extraits AI et CI ($46.49 \pm 2.52 \mu\text{g}$ QEs / mg d'extrait et $43.25 \pm 0.30 \mu\text{g}$ QEs / mg d'extrait) respectivement, suivis de l'extrait BI avec une teneur de $23.61 \pm 1.51 \mu\text{g}$ QEs / mg d'extrait.

Cependant, la présence de ces composés dans notre espèce est en cohérence avec des études qui ont révélé que les flavonoïdes représentaient des composés majoritaires des espèces du genre *Iris* [166, 175].

Il faut savoir que la cohérence de la teneur en composés phénoliques et flavonoïdes de notre étude avec celle des autres études concerne la présence de ces derniers avec une quantité remarquable qui varie justement d'une espèce à une autre et cela peut être expliqué par l'utilisation de standards différents [176] ainsi que d'autres facteurs et plus particulièrement les facteurs environnementaux qui via plusieurs interactions influencent significativement la synthèse de ces derniers.

I.3. Elucidation des profiles phytochimiques par la LC-MS-IT-TOF

Cette technique avait pour objectif la caractérisation des constituants des différents extraits AI, CI et BI. En effet, les profiles phytochimiques de ces extraits sont représentés sous forme de tracés chromatographiques qui sont illustrés dans la (**Figure 21**), et les résultats sont représentés dans le (**Tableau 14**), sous forme de formules chimiques avec leurs différents paramètres mesurés: temps de rétention, les formes d'ions détectés, les masses mesurées et prédictes (m/z) ainsi que l'efficacité (DBE). En effet chaque composé est représenté par des spectres de la formule exacte ainsi que les masses mesurées et prédictes, nous citerons à titre d'exemple les composés de 1 à 10 représentés dans les (**Figures 34 → 42**)

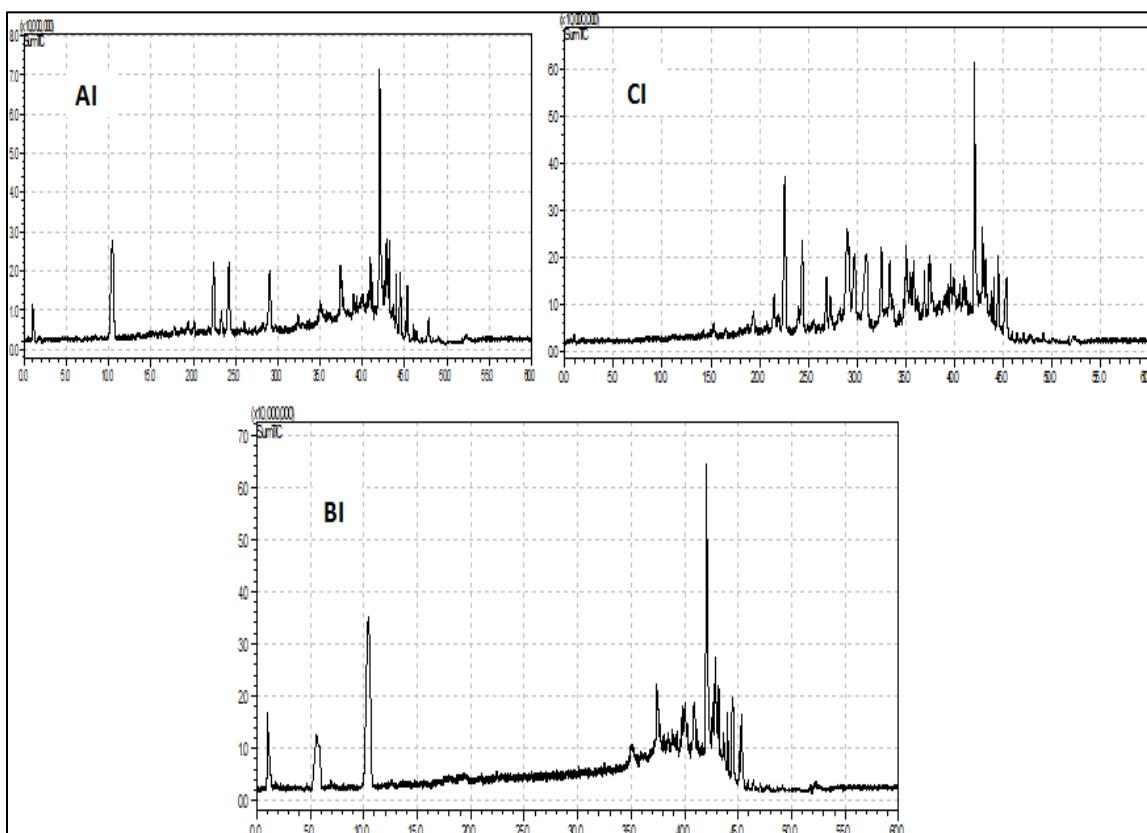


Figure 21: Les chromatogrammes des extraits AI, CI et BI

Tableau 14: Caractérisation des différents constituants des extraits de *Iris unguicualris* Poir par la LC-MS-IT-TOF

	Composition	RT. (min)	Mesurée m/z	Prédite m/z	Error (ppm)	DBE	AI	CI	BI
1	C ₁₇ H ₁₀ O ₅	1.00	293.0473 [M-H]-	293.0455 [M-H]-	6.14	13.0		*	*
2	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	1.06	367.1039 [M-H]-	367.1035 [M-H]-	1.09	8.0		*	
3	C ₂₅ H ₂₈ O ₁₆	5.560	583.1311 [M-H]-	583.1305 [M-H]-	1.03	12.0		*	
4	C ₁₉ H ₁₈ O ₁₁	10.42	423.0926 [M+H]+	423.0922 [M+H]+	0.95	11.0		*	
5	C ₁₇ H ₂₀ O ₁₁	10.46	423.0905 [M+Na]+	423.0898 [M+Na]+	1.65	8.0		*	
6	C ₁₇ H ₁₆ O ₇	20.39	333.0974 [M+H]+	333.0969 [M+H]+	1.50	10.0	*		
7	C ₃₂ H ₃₈ O ₁₇	22.36	717.2005 [M+Na]+	717.2001 [M+Na]+	0.56	14.0		*	
8	C ₁₆ H ₁₄ O ₇	22.57	341.0635 [M+Na]+	341.0632 [M+Na]+	-0.88	10.0	*		
9	C ₂₀ H ₁₆ O ₁₁	22.37	431.0595 [M-H]-	431.0620 [M-H]-	-5.34	13.0	*	*	
10	C ₁₉ H ₁₂ O ₁₀	23.31	399.0358 [M-H]-	399.0358 [M-H]-	0.00	14.0		*	
11	C ₂₇ H ₁₀ O ₆	24.07	429.0421 [M-H]-	429.0405 [M-H]-	3.73	23.0		*	
12	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	24.24	317.0650 [M+H]+	317.0656 [M+H]+	-1.89	11.0	*	*	
13	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	26.88	325.0670 [M+Na]+	325.0683 [M+Na]+	-4.00	10.0	*		
14	C ₂₂ H ₃₀ O ₈	27.30	445.1846 [M+Na]+	445.1833 [M+Na]+	2.92	8.0	*		
15	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	28.94	323.0522 [M+Na]+	323.0526 [M+Na]+	-1.24	11.0	*		
16	C ₂₇ H ₁₀ O ₆	29.03	429.0426 [M-H]-	429.0405 [M-H]-	4.89	23.0		*	
17	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	29.04	317.0652 [M+H]+	317.0656 [M+H]+	-1.26	11.0		*	
18	C ₂₀ H ₁₄ O ₁₁	29.12	429.0441 [M-H]-	429.0463 [M-H]-	-5.13	14.0	*		
19	C ₂₀ H ₁₄ O ₁₀	29.15	413.0498 [M-H]-	413.0514 [M-H]-	-3.87	14.0	*		
20	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	29.20	299.0554 [M-H]-	299.0561 [M-H]-	-2.34	11.0	*		
21	C ₉ H ₁₄ O ₁₂	29.75	332.0862 [M+NH4]+	332.0824 [M+NH4]+	11.44	3.0	*		
22	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	30.22	301.0705 [M+H]+	301.0707 [M+H]+	-0.66	11.0	*		
23	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	30.76	331.0803 [M+H]+	331.0812 [M+H]+	-2.72	11.0	*		
24	C ₁₀ H ₁₆ O ₁₃	31.02	362.0940 [M+NH4]+	362.0929 [M+Na]+	3.04	3.0	*		
25	C ₂₀ H ₁₄ O ₁₀	32.40	413.0487 [M-H]-	413.0514 [M-H]-	-6.54	14.0		*	
26	C ₁₃ H ₁₆ O ₄	32.42	259.0956 [M+Na]+	259.0941 [M+Na]+	5.79	6.0	*		
27	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	32.52	301.0707 [M+H]+	301.0707 [M+H]+	0.00	11.0	*	*	
28	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	33.38	329.0655 [M-H]-	329.0667 [M-H]-	-3.65	11.0	*		
29	C ₂₁ H ₁₆ O ₁₁	33.38	443.0594 [M-H]-	443.0620 [M-H]-	-5.87	14.0	*		
30	C ₁₅ H ₁₈ O ₅	33.49	301.1062 [M+Na]+	301.1046 [M+Na]+	5.31	7.0	*		
31	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	33.79	361.0920 [M+H]+	361.0918 [M+H]+	0.55	11.0	*		
32	C ₁₇ H ₂₀ O ₈	34.31	375.1054 [M+H]+	375.1050 [M+H]+	1.07	8.0	*		

Résultats et Discussions

33	C ₁₆ H ₁₀ O ₆	35.08	299.0554 [M+H] ⁺	299.0550 [M+H] ⁺	1.34	12.0	*		
34	C ₂₀ H ₁₂ O ₁₀	35.07	411.0345 [M-H] ⁻	411.0358 [M-H] ⁻	-3.16	15.0	*		
35	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	35.47	329.0654 [M+H] ⁺	329.0656 [M+H] ⁺	-0.61	12.0	*		
36	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	35.82	329.2326 [M-H] ⁻	329.2333 [M-H] ⁻	-2.13	2.0	*		
37	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	36.93	353.2292 [M+Na] ⁺	353.2298 [M+Na] ⁺	-1.70	2.0	*		
38	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	37.38	274.2750 [M+NH ₄] ⁺	274.2741 [M+NH ₄] ⁺	3.28	1.0			*
39	C ₂₀ H ₃₄	37.38	275.2769 [M+H] ⁺	275.2733 [M+H] ⁺	13.08	4.0			*
40	C ₁₈ H ₃₆ O ₃	37.49	318.3002 [M+NH ₄] ⁺	318.3003 [M+NH ₄] ⁺	20.04	4.0			*
41	C ₂₂ H ₃₈ O	37.51	319.3059 [M+H] ⁺	319.2995 [M+H] ⁺	20.04	4.0			*
42	C ₁₈ H ₃₆ O ₃	37.54	318.3006 [M+NH ₄] ⁺	318.3003 [M+NH ₄] ⁺	0.94	1.0	*	*	
43	C ₁₈ H ₂₈ O ₃	38.03	310.2395 [M+NH ₄] ⁺	310.2377 [M+NH ₄] ⁺	5.80	5.0			*
44	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	38.91	338.2675 [M+NH ₄] ⁺	338.2690 [M+NH ₄] ⁺	-4.43	5.0	*	*	
45	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	39.64	295.2264 [M+H] ⁺	295.2268 [M+H] ⁺	84.33	84.33	*		
46	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	39.78	296.2585 [M+NH ₄] ⁺	296.2584 [M+NH ₄] ⁺	0.34	4.0			*
47	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	40.02	296.2564 [M+NH ₄] ⁺	296.2584 [M+NH ₄] ⁺	-6.75	4.0	*	*	
48	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	40.78	298.2747 [M+NH ₄] ⁺	298.2741 [M+NH ₄] ⁺	2.01	3.0	*	*	
49	C ₁₉ H ₃₈	41.20	284.3293 [M+NH ₄] ⁺	284.3312 [M+NH ₄] ⁺	-6.68	1.0	*		
50	C ₂₁ H ₃₄ O ₃	41.82	352.2838 [M+NH ₄] ⁺	352.2846 [M+NH ₄] ⁺	-2.27	5.0		*	
51	C ₁₉ H ₂₈ O ₄	42.10	321.2112 [M+H] ⁺	321.2060 [M+H] ⁺	16.19	6.0			*
52	C ₃₃ H ₄₆ O ₄	42.70	505.3324 [M-H] ⁻	505.3323 [M-H] ⁻	0.20	11.0	*	*	
53	C ₃₅ H ₄₈ O ₃	43.01	515.3544 [M-H] ⁻	515.3531 [M-H] ⁻	-3.10	12.0	*	*	
54	C ₃₁ H ₄₀ O ₃	43.17	459.2903 [M-H] ⁻	459.2905 [M-H] ⁻	-0.44	12.0	*	*	
55	C ₁₈ H ₃₄ O	43.60	284.2949 [M+NH ₄] ⁺	284.2948 [M+NH ₄] ⁺	0.35	2.0	*	*	*
56	C ₂₀ H ₃₆ O	43.74	310.3111 [M+NH ₄] ⁺	310.3104 [M+NH ₄] ⁺	2.26	3.0		*	
57	C ₂₂ H ₃₈ O	43.98	336.3251 [M+NH ₄] ⁺	336.3261 [M+NH ₄] ⁺	-13.93	-2.0			*
58	C ₁₉ H ₄₄ O ₄	43.98	337.3265 [M+H] ⁺	337.3312 [M+H] ⁺	-2.0	-	13.93		*
59	C ₂₂ H ₃₈ O	44.02	336.3260 [M+NH ₄] ⁺	336.3261 [M+NH ₄] ⁺	-0.30	4.0	*	*	
60	C ₂₂ H ₄₀ O	44.40	338.3416 [M+NH ₄] ⁺	338.3417 [M+NH ₄] ⁺	-0.30	3.0		*	
61	C ₁₂ H ₂ O ₁₅	44.46	384.9342 [M-H] ⁻	384.9321 [M-H] ⁻	5.46	12.0	*	*	
62	C ₂₄ H ₃₈ O	44.48	360.3230 [M+NH ₄] ⁺	360.3261 [M+NH ₄] ⁺	-8.60	6.0	*		*
63	C ₅ H ₆ O ₂₀	44.50	384.9349 [M-H] ⁻	384.9380 [M-H] ⁻	-8.05	3.0	*		
64	C ₂₂ H ₄₀ O	44.54	338.3415 [M+NH ₄] ⁺	338.3417 [M+NH ₄] ⁺	-0.59	3.0	*		

65	C ₂₂ H ₄₂ O	45.11	340.3563 [M+NH4]+	340.3574 [M+NH4]+	-3.23	2.0	*	*	*
66	C ₂₄ H ₄₄ O	45.14	366.3727 [M+NH4]+	366.3730 [M+NH4]+	-0.82	3.0			*
67	C ₆ H ₂ O ₁₁	45.24	248.9588 [M-H]-	248.9524 [M-H]-	25.71	6.0	*		
68	C ₁₂ H ₂ O ₁₅	45.24	384.9338 [M-H]-	384.9321 [M-H]-	4.42	12.0	*	*	
69	C ₃₃ H ₅₄ O ₅	45.30	531.4045 [M+H]+	531.4044 [M+H]+	0.19	7.0	*	*	*
70	C ₃₅ H ₆₂ O ₃	47.86	548.5030 [M+NH4]+	548.5037 [M+NH4]+	-1.28	5.0		*	

* Présence

Cependant seuls les analytes ayant des pics d'une intensité supérieure à 2500000 ont été pris en considération. Cette analyse a permis en effet de détecter un total de 70 composés phytochimiques.

Bien que cette technique d'analyse reste très intéressante et importante en particulier pour les applications qualitative liées par ses caractéristiques de haute résolution ainsi que par ses mesures précises des différentes masses, cette dernière reste tout de même limitée étant donné qu'elle ne permet pas l'indentification des composés d'où la nécessité d'employer d'autres techniques d'identifications plus performantes.

I.4. Analyse quantitative des composés phénoliques par la LC-MS/MS

Dans cette partie, la détermination des composés phénoliques des différents extraits AI, CI et BI à été réalisée par la LC-MS/MS selon une méthodes standardisée et validée en utilisant 37 standards [165]. Les paramètres de validation sont rapportés dans le (**Tableau16**).

La détermination du contenu des différents extraits AI, BI et CI en phtyoconstituants et faite par comparaison des temps de rétention de ces derniers avec ceux des standards utilisés et leur quantité est exprimée en µg d'analyte/g d'extrait, les résultats de cette analyse sont représentés dans le (**Tableau 15**) et les différents profiles chromatographiques sont représentés dans la (**Figure 22**).

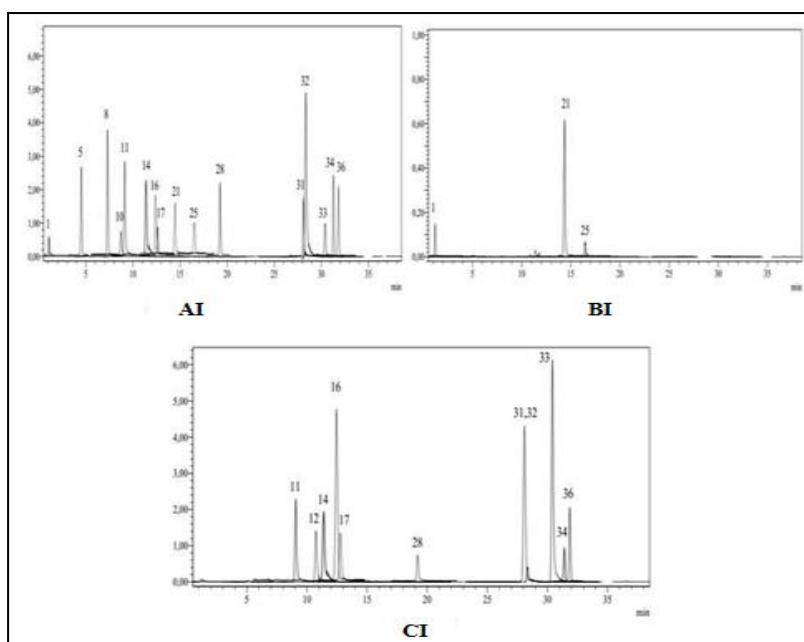


Figure 22: Les chromatogrammes des extraits AI, CI et BI

Tableau 15: Identification et quantification des composés phénoliques par la LC-MS/MS des extraits AI, CI et BI

	Analytes	Extraits ($\mu\text{g analyte/g extract}$)		
		AI	CI	BI
1	Acide quinique	43,2	N.D.	95,1
2	Acide protocatechuique	1080,4	N.D.	N.D.
3	Acide 4-OH-benzoïque	2218,2	N.D.	N.D.
4	Acide caféïque	272,0	N.D.	N.D.
5	Acide syringique	1218,6	518,3	N.D.
6	Vanilline	N.D.	491,5	N.D.
7	Acide <i>p</i> -Coumarique	1071,2	394,7	N.D.
8	Acide férulique	348,2	1088,4	N.D.
9	Acide sinapinique	99,1	202,3	N.D.
10	Nicotiflorine	76,7	N.D.	58,3
11	Apigetrine	37,3	N.D.	6,1
12	Fisétine	143,3	29,2	N.D.
13	Quercétine	112,1	352,6	N.D.
14	Lutéoline	326,7	10,1	N.D.
15	Naringénine	114,2	1453,4	N.D.
16	Apigénine	425,5	146,2	N.D.
17	Kaempférol	404,8	253,9	N.D.

Tableau 16: Paramètres analytique et composés identifiés par la méthode de LC-MS/MS

No	Analytes	RT ^a	Mother ion (m/z) ^b	Fragment ions	Ion. mode	Equation	R ^{2c}	RSD% ^d		Linearity Range (µg/L)	LOD/LOQ (µg/L) ^e	Recovery (%)		U ^f	AI	BI	CI
								Interday	Intraday			Interday	Intraday				
1	Quinic acid	1.13	190.95	85.3-93.3	Neg	y=41.06x+10671	0.996	0.00259	0.00274	250-10000	75.8/79.4	1.00288	0.98778	0.0082			
2	Malic acid	1.23	133.00	115.2-71.3	Neg	y=316.95x-42041	0.999	0.00477	0.00527	250-10000	55.3/67.5	1.01266	0.99836	0.0113			
3	Fumaricacid	1.48	115.00	71.4	Neg	y=64.99x-11592	0.997	0.00536	0.00460	100-5000	28.1/34.5	0.99748	0.99867	0.0124			
4	Gallicacid	3.00	168.85	125.2-79.2	Neg	y=226.76x+38152	0.998	0.01601	0.01443	250-10000	95.5/106.9	1.00004	1.00454	0.0282			
5	Protocatechucacid	4.93	152.95	108.3	Neg	y=297.75x+30590	0.995	0.01236	0.01296	100-5000	28.2/31.4	0.99404	1.01070	0.0411			
6	Pyrocatechol	6.48	109.00	108.35-91.3	Neg	y=30.61x+14735	0.996	0.01313	0.01339	1000-20000	261.1/278.4	0.99987	0.99936	0.0235			
7	Chlorogenicacid	7.13	353.15	191.2	Neg	y=781.36x-18697	0.998	0.00058	0.00076	25-1000	6.2/8.1	1.00806	0.99965	0.0069			
8	4-OH-benzoic acid	7.39	136.95	93.3-65.3	Neg	y=409.03x+112079	0.998	0.01284	0.01538	250-10000	33.2/38.1	0.99662	1.00058	0.0289			
9	Vanillicacid	8.57	166.90	152.3-108.3	Neg	y=35.84x-12097	0.999	0.00528	0.00619	1000-20000	122.2/139.7	1.00093	1.04095	0.0508			
10	Caffeicacid	8.80	178.95	135.2-134.3	Neg	y=3963.32x+178156	0.998	0.01454	0.01469	25-1000	18.4/22.4	1.00917	0.98826	0.0354			
11	Syringicacid	9.02	196.95	182.2-167.3	Neg	y=42.33x-52547	0.996	0.01049	0.01345	1000-20000	212.5/233.3	0.99922	0.99977	0.0238			
12	Vanillin	10.87	151.00	136.3-92.2	Neg	y=446.10x+70934	0.998	0.00696	0.00793	250-10000	44.3/53.1	0.99679	0.99611	0.0280			
13	Salicylicacid	11.16	136.95	93.3-65.3	Neg	y=5286.26x+309192	0.989	0.01016	0.01242	25-1000	5.0/6.5	1.00989	0.99013	0.0329			
14	p-Coumaricacid	11.53	162.95	119.3-93.3	Neg	y=3199.20x+13002	0.992	0.01820	0.01727	25-1000	7.3/9.1	1.00617	1.01224	0.0516			
15	Rutin	12.61	609.05	300.1-271.1	Neg	y=561.91x-16879	0.997	0.00473	0.00624	25-1000	5.5/6.5	1.00994	0.98017	0.0159			
16	Ferulicacid	12.62	192.95	178.3	Neg	y=80.45x-31782	0.997	0.00708	0.00619	250-10000	36.6/42.0	0.99987	1.00289	0.0494			
17	Sinapinicacid	12.66	222.95	208.3-149.2	Neg	y=141.96x-73294	0.992	0.01446	0.01517	250-10000	78.7/86.1	1.00164	0.99962	0.0281			
18	Hesperidin	12.67	610.90	303.1-465.1	Poz	y=1340.27x-43769	0.998	0.00945	0.01126	25-1000	3.4/4.2	1.01733	1.01263	0.0262			
19	Isoquercitrin	13.42	463.00	300.1-271.1	Neg	y=803.23x+4981	0.999	0.00682	0.00515	25-1000	5.4/6.3	1.00594	1.00722	0.0133			
20	Rosmarinicacid	14.54	359.00	161.2-197.2	Neg	y=909.67x-201692	0.994	0.02014	0.01751	100-5000	6.6/8.8	0.99206	1.03431	0.0713			
21	Nicotiflorin	14.68	593.05	285.1-255.2	Neg	y=498.38x+79274	0.991	0.00737	0.00875	100-5000	22.4/25.5	1.02558	1.00970	0.0276			
22	o-Coumaricacid	15.45	162.95	119.4-93.3	Neg	y=1219.34x-10915	0.999	0.02730	0.02566	25-1000	24.4/31.1	0.98344	0.99061	0.0513			
23	Rhoifolin	16.11	577.05	269.2-211.1	Neg	y=237.15x+11887	0.999	0.00747	0.01528	100-5000	23.1/27.9	1.01046	1.01739	0.0941			
24	Quercitrin	16.41	447.15	301.1-255.1	Neg	y=339.39x+38910	0.999	0.01528	0.02320	100-5000	22.0/25.2	0.99726	1.00620	2.0079			
25	Apigetin	16.59	431.00	268.2-239.2	Neg	y=1775.55x+91121	0.993	0.01797	0.01607	25-1000	5.4/6.1	1.01394	1.00419	0.0597			
26	Coumarin	17.40	147.05	91.0-103.2	Poz	y=33.64x-89700	0.994	0.01306	0.01239	1000-20000	208.4/228.4	0.99947	1.00081	0.0237			
27	Myricetin	18.72	317.00	179.2-151.3	Neg	y=583.55x+205727	0.999	0.00652	0.00711	250-10000	53.2/57.2	0.99982	1.00042	0.0126			
28	Fisetin	19.30	284.95	135.2-121.3	Neg	y=547.46x+274791	0.991	0.00557	0.00820	250-10000	54.4/61.4	0.99877	1.00031	0.0148			
29	Cinnamicacid	25.61	147.00	103.15-77.3	Neg	y=9.06x-12403	0.996	0.00648	0.00816	5000-20000	821.8/859.7	1.00051	0.99927	0.0143			
30	Liquiritigenin	25.62	254.95	119.3-135.1	Neg	y=2384.96x+59141	0.996	0.01849	0.01738	25-1000	5.5/6.6	1.00333	0.99957	0.0341			
31	Quercetin	28.17	300.90	151.2-179.2	Neg	y=1198.48x+480562	0.990	0.01589	0.01360	100-5000	23.3/28.9	0.98470	1.00103	0.0543			
32	Luteolin	28.27	284.75	133.2-151.2	Neg	y=3272.65x+150557	0.997	0.00575	0.00696	25-1000	5.4/6.5	1.00772	0.99524	0.0174			
33	Naringenin	30.68	270.95	151.2-119.3	Neg	y=4315.1x+178410	0.995	0.02054	0.02019	25-1000	5.4/6.4	0.99883	1.01002	0.0521			
34	Apigenin	31.43	268.95	117.3-151.2	Neg	y=4548.36x+295252	0.990	0.02304	0.02204	25-1000	5.4/6.3	1.01444	1.01331	0.0650			
35	Hesperetin	31.76	300.95	164.2-136.2	Neg	y=876.67x+48916	0.997	0.03209	0.02605	25-1000	5.6/6.9	0.98850	0.99435	0.0562			
36	Kaempferol	31.88	284.75	255.1-117.3	Neg	y=26.29x+87558	0.992	0.01436	0.01070	1000-20000	206.6/214.3	0.99971	0.99851	0.0209			
37	Chrysins	36.65	252.95	143.3-119.4	Neg	y=2032.13x+95593	0.993	0.00490	0.00630	25-1000	5.4/6.2	1.00338	1.00437	2.0083			

^aRT: Retention time, ^bMotherion(m/z): Molecular ions of the standard compounds (m/z ratio), ^cR²: Coefficient of determination, ^dRSD: Relative standard deviation, ^eLOD/LOQ (µg/L): Limit of detection/quantification, ^f U (%): percent relative uncertainty at 95% confidence level (k = 2))

Les résultats de cette analyse ont révélés la présence de 17 composés phénoliques répartis dans les différents extraits et qui sont analysés pour la première fois par cette méthode. En effet les deux extraits AI et CI étaient les plus riches en terme de flavonoïdes et d'acides phénoliques suivis de l'extrait BI.

L'analyse de l'extrait AI a révélé que ce dernier était surtout riche en acides phénoliques en particulier les acides: 4-OH- benzoïque, syringique, protocatéchique, *p*-coumarique avec une teneur de: 2218,2, 1218,6, 1080,4 et 1071,2 respectivement. En outre, cet extrait contenait de bonnes quantités d'acides caféïque et férulique (272,0 et 348,2 µg d'analyte / g d'extrait, respectivement) ainsi que de faibles quantités d'acides quinique et sinapinique (43,2 et 99,1 µg d'analyte / g d'extrait, respectivement). Concernant les flavonoïdes, l'extrait AI contenait des quantités élevées d'apigénine de kaempférol et de lutéoline (425,5, 404,8 et 326,7 µg d'analyte / g d'extrait, respectivement) ainsi que de faibles quantités de nicotiflorine, d'apigétrine, de fistétine, de quercétine et de naringénine (76,7; 37,3; 143,3; 112,1 et 114,2 µg analyte / g d'extrait, respectivement).

L'analyse de l'extrait CI quant à elle a démontré que les acides: férulique, syringique, vanilline, *p*-coumarique et sinapinique avec des teneurs de: 1088,4; 518,3; 491,5; 394,7 et 202,3 µg analyte / g d'extrait, respectivement), étaient les acides phénoliques les plus abondants. Pour les flavonoïdes, cet extrait avait une teneur assez élevée en naringénine (1453,4 µg d'analyte / g d'extrait) ainsi qu'une bonne quantité de quercétine et de kaempférol (352,6 et 253,9 µg d'analyte / g d'extrait, respectivement) alors qu'il avait une teneur moyenne en apigénine (146,2 µg d'analyte / g d'extrait) ainsi que de faibles quantités de fisétine et de lutéoline (29,2 et 10,1 µg d'analyte / g d'extrait, respectivement).

L'analyse de l'extrait BI a démontré que ce dernier contenait de faibles quantités d'acide quinique, de nicotiflorine et d'apigétrine avec des teneurs de: 95,1, 58,3 et 6,1 µg d'analyte / g d'extrait respectivement).

En se référant à la littérature, les composés: quercétine, lutéoline, naringénine, apigénine et kaempférol, identifiés dans cette étude sont parallèles à ceux identifiés dans d'autres espèces du genre *Iris* [17]. Cependant, l'acide quinique, l'acide 4-OH-benzoïque, l'acide sinapinique, la nicotiflorine et l'apigertine sont signalés pour la première fois dans ce genre.

I.5. Activité antioxydante

Plusieurs études ont rapporté l'activité antioxydante des composés phénoliques qui est fortement liée à leur structure chimique caractérisée par différents groupements fonctionnels qui conditionnent justement leur mécanisme d'action, c'est pour cela que dans la présente étude nous avons évalué le potentiel antioxydant des différents extraits PI, RI, AI, CI et BI de l'espèce *Iris unguicularis* en utilisant 4 méthodes différentes: le piégeage du radical DPPH, le test de blanchiment du β-carotène, la réduction du cuivre ainsi que le test de chélation des ions métalliques et ceci par le calcul de l' IC_{50} ainsi que le $A_{0.50}$ qui définissent la concentration efficace qui permet d'inhiber 50 % de l'activité radicalaire, en effet, plus la valeur est faible plus l'échantillon testé est considéré comme un puissant agent antioxydant.

I.5.1. Test du DPPH

Les résultats de l'activité antioxydante des différents extraits par piégeage du radical DPPH sont représentés par les valeurs de la concentration inhibitrice IC_{50} dans le (**Tableau 17**) ainsi que la (**Figure 23**).

Tableau 17: Inhibition du radical DPPH par les extraits de l'espèce *Iris unguicularis* Poir.

	Extraits testés						
	PI	RI	AI	CI	BI	BHT	BHA
IC_{50} µg/mL	133.08 ± 4.02	11.42 ± 0.03	6.12 ± 2.42	16.55 ± 2.30	-	22.32 ± 1.19	5.73 ± 0.41

(-) : Non actif

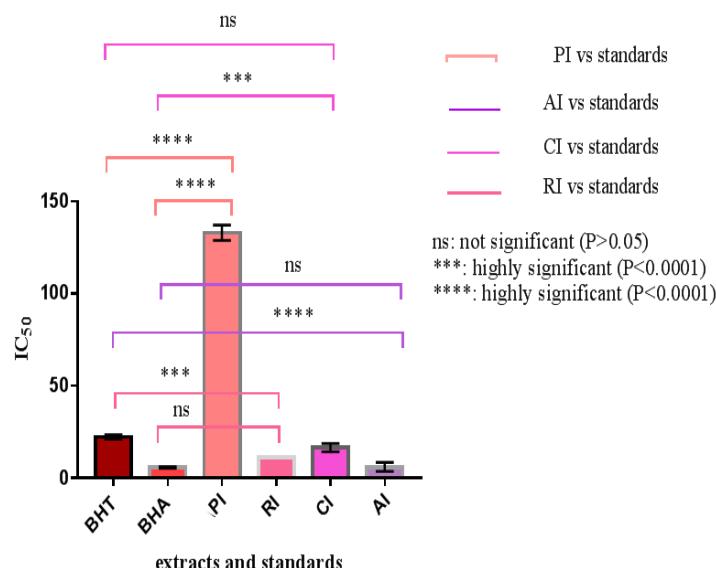


Figure 23: les valeurs d' IC_{50} déterminées par le piégeage du radical DPPH

Chaque valeur représente une moyenne ± SD ($n=3$), $p<0.05$

L'extrait AI a présenté l'activité la plus remarquable vis à vis du radical DPPH avec une valeur d' IC_{50} de $6.12 \pm 2.42 \mu\text{g/mL}$ par comparaison avec les standards BHT et BHA ($22.32 \pm 1.19 \mu\text{g/mL}$ et $5.73 \pm 0.41 \mu\text{g/mL}$ respectivement), suivi de l'extrait RI qui a également présenté une activité marquante avec une valeur d' $IC_{50} = 11.42 \pm 0.03 \mu\text{g/ml}$ par comparaison avec le BHT ($22.32 \pm 1.19 \mu\text{g/mL}$) alors que celle du BHA était plus élevée ($5.73 \pm 0.41 \mu\text{g/mL}$).

L'extrait CI avait également une activité intéressante avec une valeur d' $IC_{50} = 16.55 \pm 2.30 \mu\text{g/mL}$ par comparaison avec le BHT alors que celle du BHA était nettement plus faible.

L'extrait PI avait une activité très faible avec une $IC_{50}=133.08 \pm 4.02 \mu\text{g/mL}$, par comparaison avec les deux standards BHA et BHT alors que l'extrait BI n'avait aucune activité.

I.5.2. Test de blanchiment du β -carotène

Les résultats de ce test par calcul des valeurs d' IC_{50} des différents extraits, sont répertoriés dans le (**Tableau 18**) et la (**Figure 234**).

Tableau 18: Inhibition de l'oxydation du couplé acide linoléique β -carotène par les différents extraits de l'espèce *Iris unguicularis* Poir.

	Extraits testés						
	PI	RI	AI	CI	BI	BHT	BHA
$IC_{50} \mu\text{g/mL}$	-	1.03 ± 0.35	16.98 ± 1.75	4.64 ± 3.44	8.59 ± 4.69	1.05 ± 0.01	0.90 ± 0.02

(-) : non actif

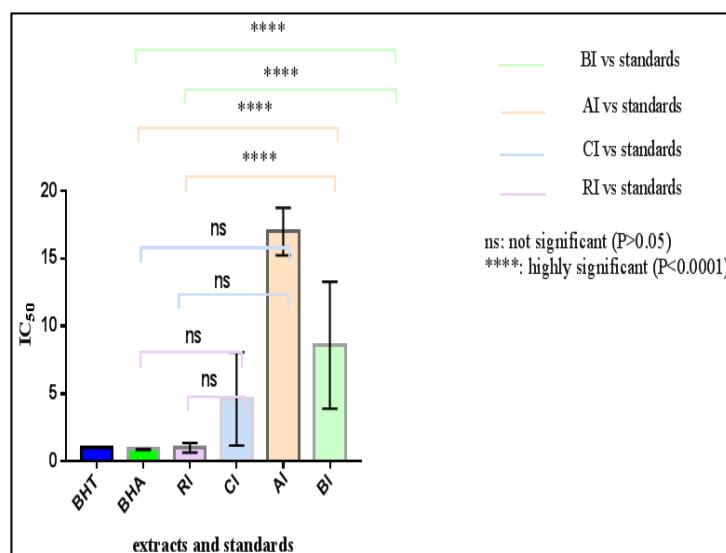


Figure 24: les valeurs d' IC_{50} déterminées par l'effet du blanchiment du β -carotène

Chaque valeur représente une moyenne \pm SD($n=3$), $p<0.05$

L'extrait RI a montré l'activité la plus élevée avec une valeur d' $IC_{50} = 1.03 \pm 0.35 \mu\text{g/mL}$ par comparaison aux valeurs enregistrées pour les standards BHT et BHA ($1.05 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$, $0.90 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$, respectivement) dont les valeurs sont très proches.

Les deux extraits CI et AI avaient également des valeurs d' IC_{50} intéressantes : $4.64 \pm 3.44 \mu\text{g/mL}$, $8.59 \pm 4.69 \mu\text{g/mL}$ respectivement mais qui restent nettement supérieurs aux valeurs des standards BHT et BHA.

L'extrait AI cette fois ci était considéré comme étant le moins actif avec une $IC_{50} = 16.98 \pm 1.75 \mu\text{g/mL}$ qui est largement supérieure aux IC_{50} des standards BHT et BHA.

I.5.3. Test de la capacité antioxydante par la réduction du cuivre (CUPRAC)

Les résultats de ce test par calcul des valeurs du $A_{0.50}$ des différents extraits, sont mentionnés dans le (Tableau 19) et la (Figure 25).

Tableau 19: Inhibition du CUPRAC par les extraits de l'espèce *Iris unguicularis* Poir.

	Extraits testés						
	PI	RI	AI	CI	BI	BHT	BHA
$A_{0.50} \mu\text{g/mL}$	-	12.70 ± 0.10	8.05 ± 0.10	11.13 ± 0.11	10 ± 0.20	9.62 ± 0.87	3.64 ± 0.19

(-) : non actif

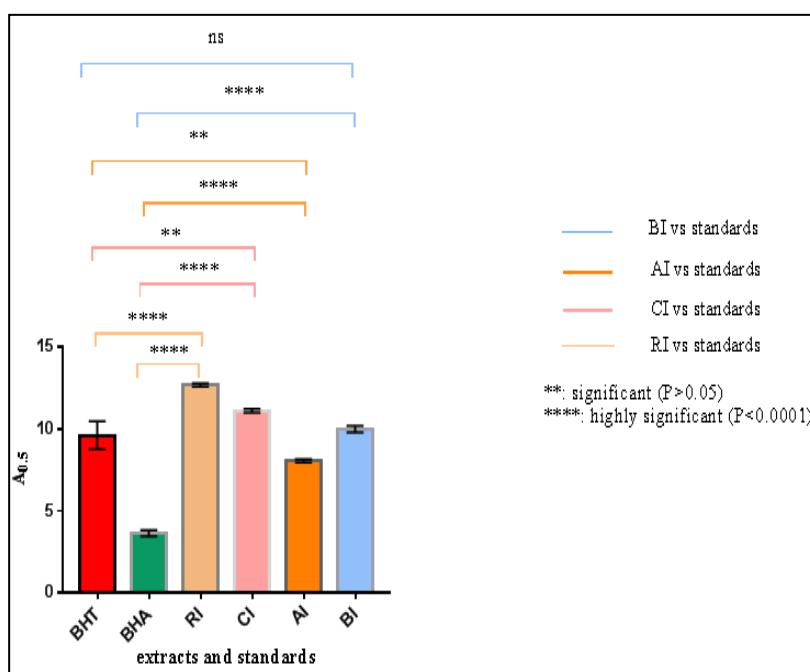


Figure 25: les valeurs du $A_{0.50}$ déterminées par l'inhibition du CUPRAC

Chaque valeur représente une moyenne \pm SD ($n=3$), $p<0.05$

Le BHA utilisé comme standard avait l'activité réductrice la plus élevée avec une valeur de $A_{0.50} = 3.64 \pm 0.19 \mu\text{g/mL}$.

Une bonne activité a été enregistrée pour l'extrait AI avec une valeur de $A_{0.50} = 8.05 \pm 0.10 \mu\text{g/mL}$ qui est inférieure à celle du contrôle positif BHT ($A_{0.50}=9.62 \pm 0.87 \mu\text{g/mL}$).

Des valeurs notables de $A_{0.50}$ étaient également rapportées pour l'extrait BI avec une concentration de: $10 \pm 0.20 \mu\text{g/mL}$ qui est presque égale à celle du BHT suivi de l'extrait CI avec une valeur de: $11.13 \pm 0.11 \mu\text{g/mL}$

L'extrait RI avait contre la valeur du $A_{0.50}$ la plus élevée par comparaison avec les standards mais qui reste tout de même intéressante: $A_{0.50}=12.70 \pm 0.10 \mu\text{g/mL}$.

I.5.4. Chélation des ions métalliques (Métal-chélate)

Les résultats du calcul de la capacité de chélation des ions métalliques des extraits sont représentés dans le (Tableau 20) et la (Figure 26).

Tableau 20: Activité des extraits de l'espèce *Iris unguicularis* Poir. sur les ions

	Extraits testés					
	PI	RI	AI	CI	BI	EDTA
IC₅₀ µg/mL	-	6.54 ± 0.70	4.52 ± 3.47	2.28 ± 0.36	-	3.47 ± 0.35

(-) : non actif

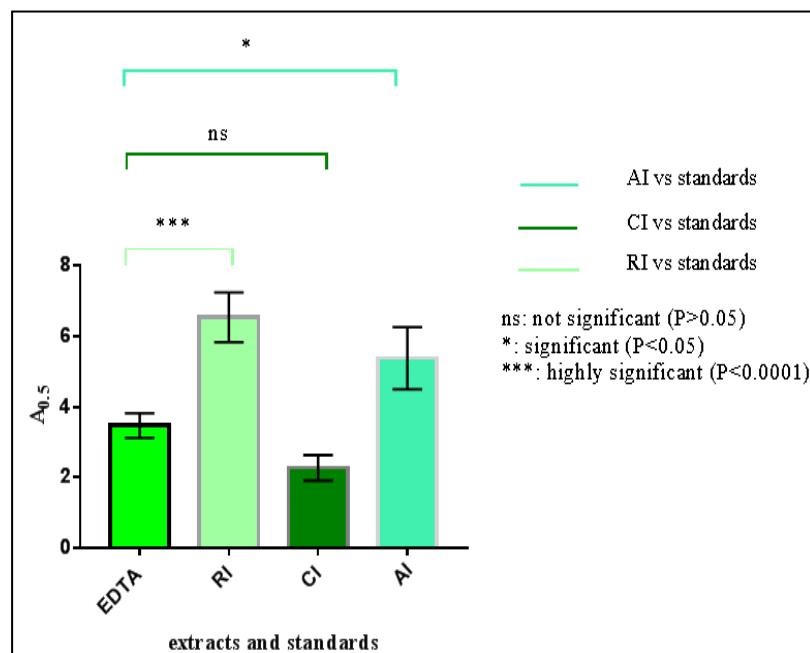


Figure 25: les valeurs d'IC₅₀ déterminées par l'activité métal chélate

Chaque valeur représente une moyenne \pm SD ($n=3$), $p<0.05$

L'extrait CI a montré l'activité de chélation des ions la plus forte avec une valeur d' $IC_{50}=2.28 \pm 0.36 \mu\text{g/mL}$ comparée à celle de l'EDTA utilisé comme standard et qui était plus élevée avec une valeur d' IC_{50} de $3.47 \pm 0.35 \mu\text{g/mL}$.

L'extrait AI avait lui aussi une activité très intéressante et remarquable avec une $IC_{50}=4.52 \pm 3.47 \mu\text{g/mL}$ qui est très proche de celle de l'EDTA.

L'extrait RI quant à lui avait la valeur d' IC_{50} la plus élevée (6.54 ± 0.70) mais qui reste intéressant.

Les résultats ont démontré que la teneur élevée en composés phénoliques dans les extraits était cohérente avec l'activité antioxydante très satisfaisante évaluée par les différentes méthodes [178], de plus la propriété antioxydante a déjà été attribuée à l'apigénine, la quercétine, la lutéoline ainsi qu'à la naringénine ce qui peut expliquer cette bonne activité [179, 180].

I.6. Activité antibactérienne

Les résultats de l'activité antibactérienne des extraits de l'espèce *Iris unguicularis* sont regroupés dans le (**Tableau 21**) tandis que ceux des antibiotiques utilisés comme contrôles positifs sont regroupés dans le (**Tableau 22**). Les valeurs rapportées sont les moyennes de trois mesures.

Comme on peut le constater, seules trois souches bactériennes parmi les sept testées se sont montrées sensibles aux différents extraits et qui sont: *S.aureus*, *B.subtilis* ainsi que *M.morgani*.

Tableau 21: Résultats de l'activité antibactérienne des extraits de l'*Iris*

Souches	Extraits $\mu\text{g/ml}$											BI
	RI	PI		AI			CI					
	10	50	25	100	50	25	100	50	25	12.5	6.25	100
<i>S.aureus</i> ATCC 43300	8 \pm 0,87	10 \pm 1,98	9 \pm 0,98	23 \pm 0,37	20 \pm 0,27	11 \pm 0,20	12 \pm 0,23	11 \pm 0,21	10 \pm 0,25	-	-	11 \pm 0,20
<i>B.subtilis</i> ATCC 6633	-	-	-	13 \pm 0,15	10 \pm 0,22	8 \pm 0,21	19 \pm 0,30	19 \pm 0,31	15 \pm 0,20	10 \pm 0,22	8 \pm 0,65	-
<i>M.morgani</i> ATCC 25830	-	-	-	10 \pm 0,86	-	-	-	-	-	-	-	-

(-): inactif

Tableau 22: Résultats de l'activité antibactérienne des antibiotiques µg/ml

Strains	Antibiotiques µg/ml							
	E	Pi	C	AK	CIP	Ox	PRL	CD
<i>S.aureus</i> ATCC 43300	15	20	30	30	5	1	100	2
<i>B.subtilis</i> ATCC 6633	22±1.25	Nt	28±0.80	Nt	Nt	-	Nt	Nt
<i>M. morganii</i> ATCC 25830	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	-	Nt

Ox: oxacilline, Pi: pipemicide, E: erythromycine, PRL: piperacilline, C: chloramphenicole, CD: clindamycine, AK: amikacine, CIP: ciprofloxaciné

(-) : inactif ; (NT) : non testé

Selon Barros *et al*, on peut dire que le potentiel antibactérien des extraits de cette espèce vari entre faible, modéré, élevé et très élevé, en effet [91]:

L'extrait AI a présenté une activité antibactérienne notable contre la souche *S.aureus* avec des diamètres d'inhibition de 11, 20, 23 mm pour des concentrations de 25, 50 et 100 µg / mL respectivement, suivie de la souche *B.subtilis* avec une activité qui varie entre faible et légèrement élevée avec des diamètres d'inhibition de 8 et 13 mm pour les concentrations 25 et 100 µg / mL, et enfin la souche *M.morganii* avec une activité modeste de l'extrait AI contre cette dernière avec un diamètre de 10 mm pour une concentration de 100 µg / mL.

L'extrait CI a montré une activité intéressante contre la souche *B.subtilis* avec une activité considérée comme assez forte avec des diamètres de 19 mm pour les deux concentrations 50 et 100 µg / mL. Une activité plus faible était notée pour les concentrations 12.5 et 25 µg / mL avec des diamètres de 10 et 15 mm, respectivement. Cet extrait avait également une activité contre la souche *S.aureus* avec des diamètres de 10, 11 et 12 mm pour les concentrations de 25, 50 et 100 µg / mL, respectivement.

Des activités faibles à modestes ont été enregistrées pour les extraits PI, RI et BI avec des diamètres de: 8 mm pour une concentration de 10 µg / mL rapporté pour l'extrait RI ainsi que des diamètres de 10 et 9 mm pour des concentrations de 1.562 et 50 µg / mL respectivement rapportés pour l'extrait PI et enfin un diamètre de 11 pour une concentration de 100 µg / ml rapporté pour l'extrait BI.

Pour les antibiotiques, quatre d'entre eux se sont montrés actifs contre les trois souches précédentes, en effet, les deux antibiotiques erythromycine et chloramphenicole avaient une forte activité contre la souche *S.aureus* avec des diamètres de 22 et 28 mm pour des

concentrations de 15 et 30 µg / ml, respectivement, suivi de l'antibiotique ciprofloxacine doté d'une activité notable contre la souche *B.subtilis* avec un diamètre de 28 mm pour la concentration de 5 µg / ml, et enfin, l'antibiotique amikacine avec un diamètre de 27 mm pour une concentration de 30 µg / ml contre la souche *M. morgani*.

En ce référant à la bibliographie, l'activité antibactérienne est une des propriétés reconnue des composés phénoliques ce qui est en cohérence avec nos résultats.

De plus, une étude a rapporté que *S.aureus* et *B.substilis* étaient sensibles à la quercétine [103] tandis qu'une autre a rapporté que *P.aeruginosa* et *P.vulgaris* étaient sensibles à la naringénine. L'apigénine quant à elle est considérée comme un composé bactériostatique et bactéricide très efficace [181].

I.7. Activité anti-Alzheimer

Les résultats de cette activité ont démontrés que tous les extraits de l'espèce *Iris unguicularis* étaient inactifs aux différentes concertations contre les deux enzymes acétyl et butyrylcholinestérase. En effet, l'extrait BI était assez pauvre en composés phénoliques, il contenait de faibles quantités d'acide quinique, de nicotiflorine et d'apigetrine, ce qui peut expliquer l'absence de l'activité.

Concernant les extraits AI et CI, l'absence de l'activité pourrait s'expliquer par l'effet d'antagonisme entre les composés actifs qui pourrait être à l'origine d'une inhibition partielle ou totale de l'action de l'un des composés actifs.

Cependant, une étude visant à comparer ces activités anti-cholinestérases des acides phénoliques sélectionnés seuls, par paires ou en association avec plus de deux acides phénoliques et en association avec des flavonoïdes, et afin d'étudier les interactions entre ces composés, avait démontré que les acides phénoliques seuls étaient des inhibiteurs efficaces de la cholinestérase mais combinés (avec des acides phénoliques ou des flavonoïdes) étaient des inhibiteurs moins efficaces ou inactifs [182].

C'est pourquoi pour des études ultérieures, il serait important et nécessaire de faire la purification de ces différents composés et tester par la suite chaque composé individuellement afin de confirmer cette hypothèse.

II. Etude de l'effet cytotoxique de l'acide isocostique isolé de l'espèce *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter

1. Identification structurale par RMN de l'acide isocostique (Figure 34)

1.1. RMN ^1H

L'analyse du spectre RMN ^1H enregistré dans le CDCl_3 à 250 MHz (**Figure 27**) montre :

- Un singulet à $\delta=0.81$ ppm attribuable à H-3 et H-14
- Quadruplet à $\delta=1.17-1.2$ ppm avec une constante de couplage de $J = 12.5$ Hz attribuable à n H-1 et , H-6 β
- Un doublet de triplet à $\delta = 1.27$ ppm avec une constante de couplage de $J = 4.1, 11.4$ Hz attribuable à H-1 et H-9 α
- Un multiplet à $\delta = 1.32-1.41$ ppm attribuable à H-2, H-8a et H-9
- Un triplet à $\delta = 1.45$ ppm avec une constante de $J = 3.4$ attribuable à H-1 et H-1 β .
- Un multiplet à $\delta = 1.50-1.68$ ppm attribuable à H-1, H-1 α et H-8 β .
- Singulet large à $\delta = 1.59$ ppm attribuable à H-3 et H-15.
- Doublet large à $\delta = 1.84-1.89$ ppm avec une constante de $J = 12.5$ Hz attribuable à H-1 et H 6 α .
- Multiplet à $\delta = 1.93-2.04$ ppm attribuable à H-2 et 2H-2.
- Multiplet à $\delta = 2.06- 2.18$ ppm attribuable à H-1 et H-5 α .
- Triplet de triplet à $\delta = 2.53$ ppm avec une constante de $J = 3.4, 11.8$ Hz attribuable à H-7 α .
- Large singulet à $\delta = 5.33$ ppm attribuable à H-1 et H-3.
- Large singulet à $\delta = 5.70$ ppm attribuable à H-1 et H-13 α .
- Large singulet à $\delta = 6.39$ ppm attribuabl à 1H et H-13 β .

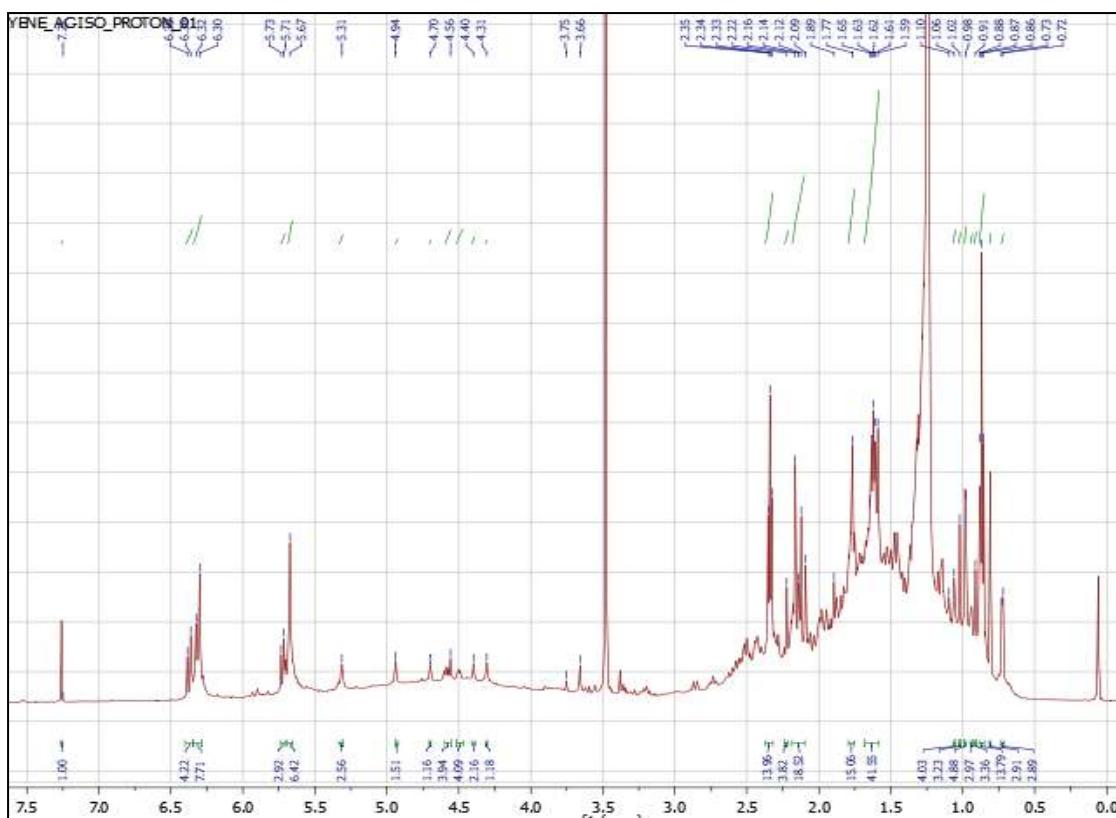


Figure 27: Spectre RMN ^1H de l'acide isocostique (CDCl_3 à 400 MHz)

1.2. RMN ^{13}C

L'analyse du spectre RMN ^{13}C enregistré dans CDCl_3 à 400 MHz (**Figure 27**) montre :

- C-14 qui résonne à ($\delta = 15.64$ ppm).
- C-15 qui résonne à ($\delta = 21.16$ ppm).
- C-2 qui résonne à ($\delta = 23.78$ ppm).
- C-8 qui résonne à ($\delta = 27.39$ ppm).
- C-6 qui résonne à ($\delta = 29.59$ ppm).
- C-10 qui résonne à ($\delta = 32.26$ ppm).
- C-1 qui résonne à ($\delta = 37.79$ ppm).
- C-9 qui résonne à ($\delta = 40.58$ ppm).

- C-7 qui résonne à ($\delta=40.98$ ppm).
- C-6 qui résonne à ($\delta=47.87$ ppm).
- C-3 qui résonne à ($\delta=121.5$ ppm).
- ¹³C-13 qui résonne à ($\delta=124.9$ ppm).
- ¹³C-4 qui résonne à ($\delta=134.75$ ppm).
- C-11 qui résonne à ($\delta=145.25$ ppm).
- C-12 qui résonne à ($\delta=172.00$ ppm).

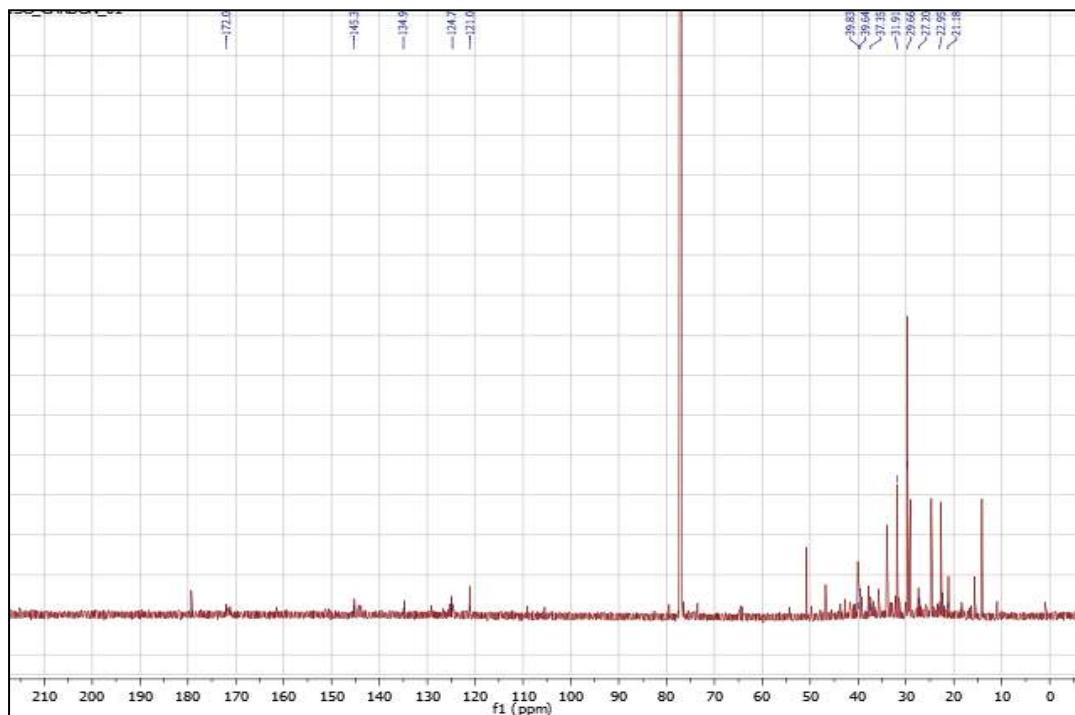


Figure 27: Spectre RMN ¹³C de l'acide isocostique (CDCl₃ à 400 MHz)

2. Effet de l'acide isocostique sur le piégeage du radical DPPH

La Figure 29 démontre les résultats du piégeage du radical DPPH par l'acide isocostique. En effet, ces résultats ont indiqué un faible pourcentage de piégeage du DPPH aux différentes concentrations (10^{-1} , 10^{-3} et 10^{-5} μM), caractérisé par une augmentation de l'absorbance de ce dernier.

Ceci nous amène à dire que ce produit pourrait être considéré comme un agent pro-oxydant capable d'augmenter la génération des espèces réactives de l'oxygène.

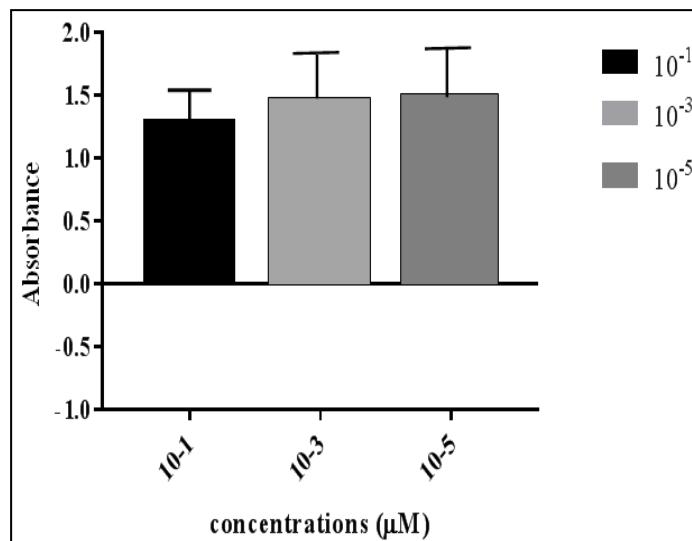


Figure 29: Effet de l'acide isocostique sur le piégeage du DPPH à différentes concentrations (n=3)

3. Effet de l'acide isocostique sur la production de l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot -}$) par les mitochondries du foie *in vitro*

Les résultats de la production de l'anion superoxyde par les mitochondries isolées des foies des rats et traitées par différentes concentrations de l'acide isocostique sont représentés dans la (**Figure 30**).

Nous avons remarqué une augmentation de la production de l'anion superoxyde aux différentes concentrations testées 10^{-1} , 10^{-3} et $10^{-5} \mu\text{M}$, et qui est meilleure que celle observée pour le contrôle allant jusqu'à un pourcentage de production de 800 % enregistré pour la concentration $10^{-1} \mu\text{M}$.

Cependant, d'après ces résultats on peut dire que l'acide isocostique est capable d'augmenter la génération de l'anion superoxyde induisant ainsi à un effet pro-oxydant à faibles et à fortes concentrations en ayant comme cible les mitochondries ce qui pourrait conduire à un effet apoptotique de ce composé.

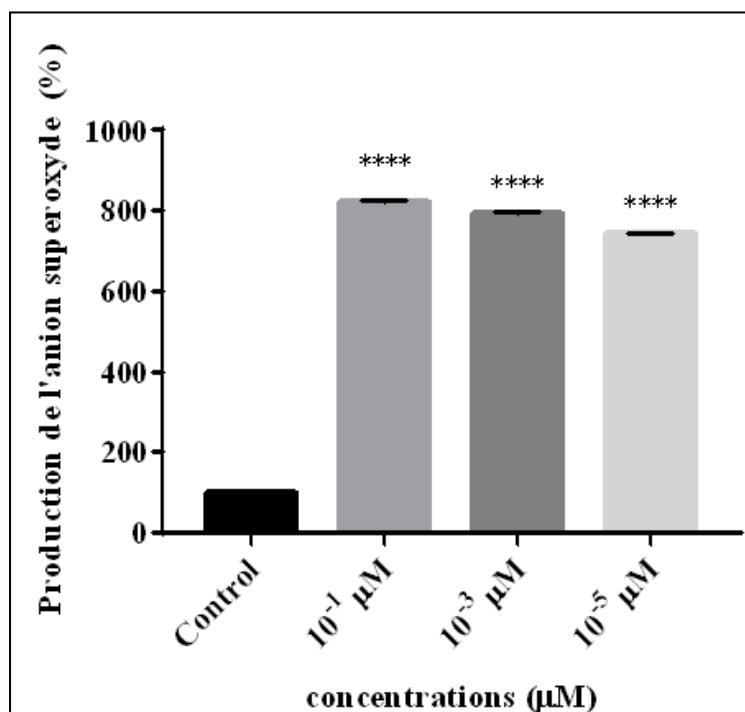


Figure 30 : Effet de l'acide isocostique sur la génération de l'anion superoxyde

4. Effet de l'acide isocostique sur le gonflement mitochondriaire *in vitro*

L'effet de l'acide isocostique sur les changements de la perméabilité membranaire des mitochondries évalué par la mesure du gonflement mitochondrial est rapporté dans la (**Figure 31**).

Les résultats ont démontré qu'après incubation du produit en question avec les mitochondries, le gonflement augmente significativement par comparaison avec le contrôle et qui est caractérisé par une décroissance de l'absorbance de la suspension mitochondriale.

Ceci affirme que l'acide isocostique a conduit à une altération de la perméabilité membranaire (augmentation) qui amène à une initiation de l'apoptose déterminant ainsi l'effet apoptotique de ce dernier.

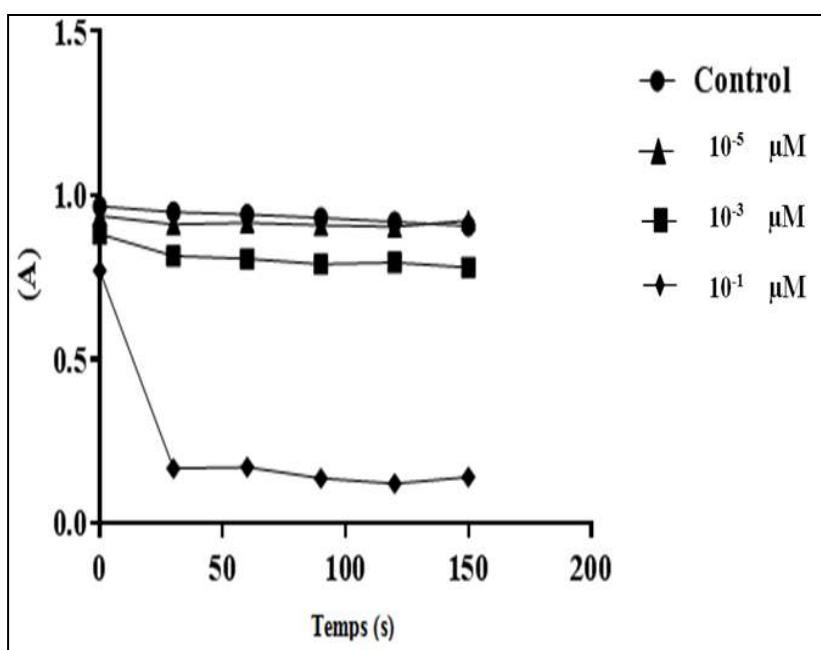


Figure 31: Effet de l'acide isocostique sur le gonflement mitochondriaire ($n=3$)

Le gonflement mitochondrial peut s'expliquer par l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (PTP) induit par un stress oxydatif caractérisé par une production des espèces réactives de l'oxygène, cette ouverture augmente la perméabilité de la membrane interne de la mitochondrie ce qui conduira à la dépolarisation de cette dernière et ce qui va permettre la pénétration des solutés (<1.5kDa) à l'intérieur de la mitochondrie [142] et plus précisément l'efflux du calcium matriciel vers l'espace inter-membranaire via l'uniport, ainsi qu'un découplage de la phosphorylation oxydative qui provoquera un arrêt de la synthèse de l'ATP. En effet, la déplétion d'ATP ajoutée à l'altération de l'homéostasie du calcium représentent des signaux de mort pour la cellule.

5. L'activité antiproliférative de l'acide isocostique

Les résultats de l'activité cytotoxique de l'acide isocostique vis-à-vis des différentes lignées cellulaires estimée par la mesure de la viabilité cellulaire via le test MTT, sont rapportés dans la (Figure 32).

Après incubation de 48h, nous avons remarqué que cet acide sésquiterpénique était capable d'inhiber la prolifération des différentes lignées cellulaires testées à différentes concentrations (25μg, 50μg, 100μg, et 200μg), utilisant comme contrôle négatif le DMSO (0,4%) en provoquant une cytotoxicité dose-dépendante.

Cependant, l'activité antiproliférative la plus élevée avait été enregistrée pour la lignée U118 considérée comme la plus sensible dont la viabilité est clairement diminuée entre les concentrations 100 μ g ($41.7321\pm 2.0903\%$) et 200 μ g ($3.8973\pm 0.63123\%$) avec une valeur d' IC_{50} de 72.32 μ g/ml suivie de la lignée PDF dont la viabilité est également diminuée entre les concentrations 100 μ g ($54.2629\pm 1.8133\%$) et 200 μ g ($11.6809\pm 0.1508\%$) avec une IC_{50} de 86.19 μ g/ml.

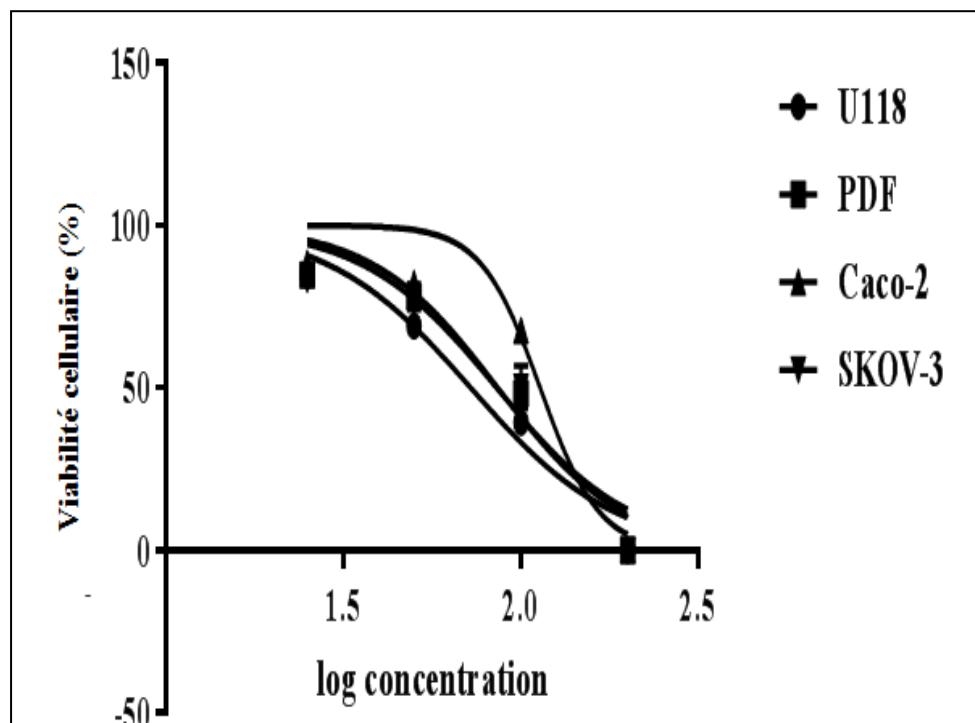


Figure 32: Pourcentage de la viabilité cellulaire en présence de l'acide isocostique

La viabilité des deux lignées Skov3 et CaCo-2 diminue de la même manière que les deux lignées précédentes (entre 100 et 200 μ g) avec des pourcentages différents; $58.8093\pm 5.4642\%$ et $17.3286\pm 0.2700\%$ respectivement pour la lignée Skov3 avec une IC_{50} de 85.5 μ g/ml ainsi que $73.5678\pm 0.9085\%$ et $73.5678\pm 0.9085\%$ respectivement pour la lignée Caco2 avec une valeur $IC_{50}=113.4 \mu$ g/ml. (**Figure 33**)

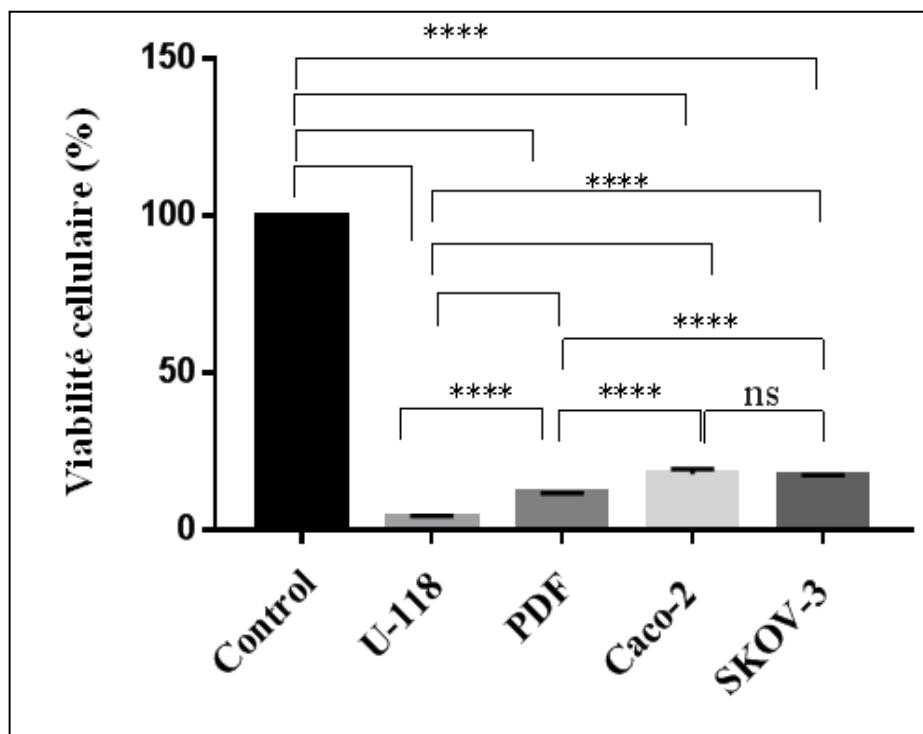


Figure 33: Comparaison du pourcentage de viabilité cellulaire des différentes lignées cellulaires testées à 200 mg / ml d'acide isocostique en utilisant le test ANOVA unidirectionnel (****: la différence est très significative $p < 0,0001$; ns: la différence n'est pas significatif $p > 0,05$

Ces résultats suggèrent que l'acide isocostique présente un potentiel cytotoxique très intéressant induisant une inhibition des cellules de la lignée U-118 dont l'IC₅₀ est inférieur à celle des cellules saines HDF ($IC_{50}=86.19 \mu\text{g/ml}$) ce qui représente un grand avantage car de cette manière le principe actif va exercer son action sans affecter les cellules saines diminuant ainsi les effets secondaires.

De plus, des chercheurs ont démontrés que les extraits végétaux ou composés purs présentent une activité cytotoxique intéressante si l'IC₅₀ $< 100 \mu\text{g}$ [183]. Cette propriété est très importante et précieuse pour l'élaboration des protocoles de traitements du cancer à faible dose de principe actif.

En analysant la structure de notre composé, la présence de certaines fonctions chimiques dans le squelette peut expliquer une activité élevée ou faible.

Cependant, on sait aussi que l'activité cytotoxique dépend de la nature, du nombre et de la position des groupes fonctionnels, c'est pour cette raison que la présence de fonctions oxygénées, de groupes méthyle et de groupes carbonyles dans ce sesquiterpène lui confère un caractère apoptotique.

De plus, la plupart des cellules cancéreuses contiennent des protéines anti-apoptotiques surexprimées telles que Bcl-2 et Bcl-XL, conduisant à une résistance à l'apoptose [17], ce qui nous amène à déduire que l'effet cytotoxique pourrait être dû à l'action de l'acide isocostique à agir comme antagoniste des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL exprimées par les lignées cellulaires testées.

Selon des travaux réalisés par une équipe de recherche, un composé synthétique, contenant une fonction acide et un groupement naphtalène dans sa structure similaires à ceux de l'acide isocostique, semblait être un puissant antagoniste de Bcl-XL [10].

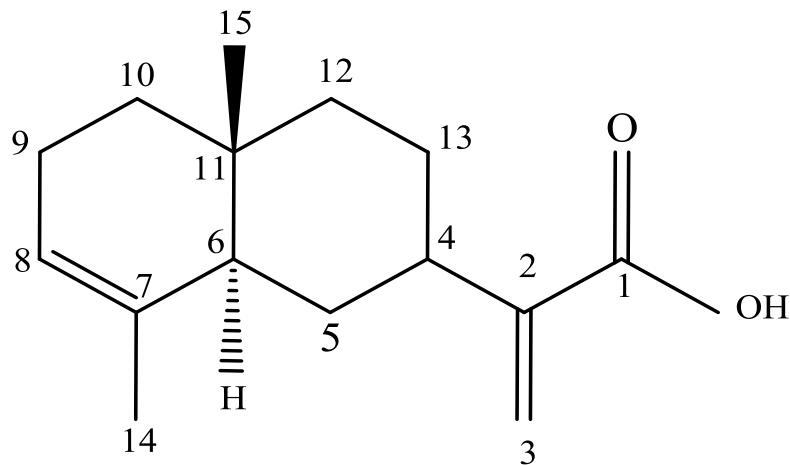


Figure 34 : Structure de l'acide isocostique

Discussion Générale

L'intérêt porté aux substances d'origine végétale au cours des dernières années est relié au fait que ces substances peuvent présenter une véritable réserve de molécules bioactives pour la recherche de produits thérapeutiques issus des plantes médicinales destiné à la santé humaine.

Cependant, la recherche de ces substances est souvent basée sur l'usage thérapeutique traditionnel des plantes ce qui constitue une base de données extrêmement importante pour les études phytochimiques et biologiques visant à valoriser les traitements thérapeutiques par des molécules d'origine naturelle c'est ainsi que l'investigation dans ce domaine devient une tâche primordiale.

En effet dans une optique de valorisation de la flore Algérienne, nous avons réalisé dans le présent travail un criblage phytochimique et biologique de deux espèces végétales qui sont : *Iris unguicularis* Poir. et *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter.

Dans la première partie nous avons commencé par le dosage des composés phénoliques et flavonoïdes des différents extraits de l'espèce *Iris unguicularis* (RI, PI, AI, CI et BI) pour avoir une idée sur leur teneur en métabolites secondaires et de confirmer une fois de plus l'importance des rhizomes du genre *Iris* rapportée dans plusieurs travaux, c'est ainsi que d'après les résultats, l'extrait RI (Rhizome) décèle une meilleure richesse en ces composés par rapport à l'extrait PI (Partie aérienne).

Suite à ces résultats notre étude s'est orientée vers le criblage phytochimique des différents extraits (AI, CI et BI) dérivés de l'extrait éthanolique (70%) des rhizomes en faisant appel aux méthodes spectrales qui sont: la LC-MS/MS IT-TOF caractérisée par sa haute résolution et qui a conduit à la détermination de 70 composés mais malgré l'importance des données obtenues, cette dernière reste limitée vu que l'identification des composés est inconnue, c'est pourquoi nous avons réalisé un screening par la LC-MS/MS basé sur une méthode validée en employant 37 standards qui a révélé la présence de 17 composés phénoliques.

En effet, l'extrait AI était le plus riche en terme d'acides phénoliques; l'acide 4-OH-benzoïque, l'acide protocatchuique ainsi que l'acide *p*-coumarique (2218.2, 1218.6, 1080.4, et 1071.2 analyte/g d'extrait respectivement) étaient les plus abondants suivis par les deux acides caféïque et férulique (272.0 et 348.2 µg d'analyte/g d'extrait, respectivement), en terme de flavonoïdes cet extract contenait une quantité intéressante d'apigénie, kaempférol et de lutéoline

(425.5, 404.8, et 326.7 µg d'analyte/g d'extrait, respectivement) alors que l'extrait CI contenait en majorité l'acide syringique, l'acide p-coumarique, l'acide férulique, l'acide sinapique et l'acide vanillique (518.3, 394.7, 1088.4, et 202.3 µg d'analyte/g d'extrait, respectivement) alors qu'en terme de flavonoïdes la naringénine était la plus abondante (1453.4 µg analyte/g) suivie par la quercétine et la kaempférol (352.6 et 253.9 µg d'analyte/g d'extrait respectivement), l'extrait BI quant à lui, était le plus pauvre en composés phénoliques. En reliant les résultats de l'identification des composés avec les résultats du criblage biologique réalisé sur cette espèce, on constate la présence d'une cohérence notée pour les deux activités antioxydante et antibactérienne où il a été enregistré une bonne activité antioxydante pour l'extrait RI et plus spécialement pour le test de β-carotène avec une IC₅₀ de 1.03 ± 0.35µg/mL qui était très proche de la IC₅₀ du BHA utilisé comme standard (1.05 ± 0.01µg/mL). Pour l'extrait AI, l'activité antioxydante la plus élevée était enregistré dans le test de chélation des ions avec une IC₅₀ de 4.52 ± 3.47µg/mL comparée avec celle du standard EDTA 3.47 ± 0.35µg/mL) suivie par le test de DPPH avec une valeur d'IC₅₀ de 6.12 ± 2.42µg/mL comparée avec celles du BHT (22.32 ± 1.19 µg/mL) et du BHA [(5.73 ± 0.41µg/mL) utilisés comme standards. Une bonne activité antioxydante à été notée pour l'extrait CI pour les test β-carotène et chélation des ions avec des IC₅₀ de 4.64±3.44µg/mL et 2.28 ± 0.36µg/mL respectivement.

Concernant l'activité antibactérienne, une bonne activité a également été enregistrée pour les deux extrait AI et CI, en effet ces derniers avaient une action inhibitrice contre *s.aureuse* ainsi que *B.substillis* avec des diamètres d'inhibition différents pour différentes concentrations.

Les résultats préliminaires de ce criblage ont permis de mettre en évidence les potentialités antioxydantes et antibactériennes de cette espèce qui sont liées aux différents composés identifiés ce qui est en accord avec des travaux antérieurs qui ont établi cette liaison.

Dans la deuxième partie et qui concerne l'étude phytochimique et biologique portée sur l'acide isocostique, un principe actif isolé à partir de l'espèce *Dittrichia viscosa* a permis dans un premier temps, l'extraction et l'isolement du composé en question à partir de l'extrait acétonique de la partie aérienne et cela par différentes méthodes d'extraction tel que l'extraction à froid employée pour la précipitation de la chlorophylle ainsi que l'extraction

acide utilisée pour affiner et cibler uniquement les acides sesquiterpéniques, ce composé a ensuite été identifié après analyse des spectres RMN ^1H et RMN ^{13}C .

Après isolement, purification et identification de l'acide isocostique, nous avons étudié le caractère apoptotique de l'acide isocostique en déterminant son pouvoir pro-oxydant, sa capacité à générer l'anion superoxyde ainsi que son effet sur le gonflement mitochondrial dont les résultats du DPPH ont démontré que l'acide isocostique avait un effet pro-oxydant ce qui a été soutenu et affirmé par sa capacité à générer l'anion superoxyde à différente concentrations (10^{-1} , 10^{-3} , and $10^{-5}\mu\text{M}$) ce qui pouvait conduire en effet à un effet apoptotique de ce dernier. Les conséquences de l'action de l'acide isocostique sur la perméabilité des mitochondries avaient démontrés qu'après incubation de ce dernier avec les suspensions mitochondriale isolées à partir du foie des rats, le gonflement mitochondrial est augmenté et plus spécialement aux concentrations de 10^{-1} et $10^{-5}\mu\text{M}$ ce qui confirme que la perméabilité a été altérée, ces résultats nous ont porté à déterminer l'activité antiproliférative de l'acide isocostique par le test MTT sur quatre lignées cellulaires: U118, CACO2, SKOV3 et HDF qui a justement révélé l'effet remarquable de ce dernier sur la prolifération cellulaire en ayant une propriété cytotoxique dose-dépendante surtout sur la lignée U118 qui était la plus sensible avec une IC₅₀ de $72,32\ \mu\text{g/ml}$ où la prolifération était clairement diminuée entre $100\mu\text{g}$ ($41,7321\pm 2.0903\%$) et $200\mu\text{g}$ ($3,8973\pm 0,63123\%$) suivie de la lignée HDF dont la viabilité est également diminuée entre les concentrations $100\mu\text{g}$ ($54.2629\pm 1.8133\%$) et $200\mu\text{g}$ ($11.6809\pm 0.1508\%$) avec une IC₅₀ de $86.19\ \mu\text{g/ml}$ et enfin les deux lignées Skov3 et CaCo-2 avec des valeurs d'IC₅₀ de $85.5\ \mu\text{g/ml}$ ainsi que $113.4\ \mu\text{g/ml}$ respectivement.

Les résultats de cette 2^{ème} partie concordent avec les travaux antérieurs réalisés sur le pouvoir des molécules de cette espèce et plus spécialement les sesquiterpènes à avoir une action anticancéreuse, de plus la présence de certains groupement chimiques tels que; groupes méthyle et groupes carbonyles confèrent à ce sesquiterpène un caractère apoptotique qui aboutira par la suite à une action cytotoxique sur la prolifération de certaines lignées cellulaires.

Conclusion générale et perspectives

Les travaux réalisés dans cette étude contribuent à la valorisation de deux espèces issues de la flore Algérienne qui est qualifiée comme une des plus riches au monde possédant différentes plantes employées en médecine traditionnelle. Les investigations phytochimiques et biologiques se sont portées sur les deux espèces : *Iris unguicularis* Poir. ainsi que l'espèce *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter en faisant appel à des outils chimiques pour établir les profils phytochimiques ainsi que pour l'identification des principes actifs tout en réalisant les différents tests biologiques. En effet, à l'issue de ces travaux plusieurs composés ont été identifiés dans les deux espèces sélectionnées ainsi que des résultats satisfaisants enregistrés pour les différentes activités biologiques testées pour ces deux dernières.

L'analyse phytochimique réalisée sur les extraits des rhizomes de l'espèce *Iris unguicularis* a permis de quantifier le taux des polyphénols totaux et des flavonoïdes ainsi qu'à révéler la présence de 70 composés identifiés par LC-MS/MS IT-TOF ainsi que la présence de divers composés phénoliques identifiés par la LC-MS/MS réalisée selon une méthode validée par l'emploi de 37 standards représentés par des acides phénoliques et des flavonoïdes répartis sur les trois extraits AI, CI et BI. Il faut noter que 5 de ces composés sont signalés pour la première fois dans ce genre et qui sont: l'acide quinique, l'acide 4-OH-benzoïque, l'acide sinapinique, la nicotiflorine et l'apigertine.

Pour les activités biologiques, des résultats remarquables ont été notés pour les deux activités antioxydante et antibactérienne alors que ceux de l'activité anti-Alzheimer, sont négatifs.

Les résultats de ces activités nous ont permis de constater que les rhizomes de cette espèce étaient nettement plus actifs que la partie aérienne. Cependant, la détermination de l'activité antioxydante par le test de chélation des ions ainsi que celui du piégeage du radical DPPH a révélé une bonne activité pour l'extrait AI avec des IC₅₀ très intéressantes par comparaison avec les standards. L'extrait CI avait également une bonne activité pour les deux tests, β-carotène et chélation des ions.

Les deux extraits AI et CI ont montré une activité antibactérienne notable et intéressante contre les deux souches *S.aureus* et *B.subtilis* avec des diamètres d'inhibitions différents.

Les investigations phytochimiques réalisées sur la partie aérienne de l'espèce *Dittrichia viscosa* ont conduits à l'isolement, la purification et l'identification de l'acide

Conclusion générale et perspectives

isocostique par la RMN (^1H et ^{13}C), ce composé a montré un pouvoir pro-oxydant intéressant caractérisé par son effet sur la génération de l'anion superoxyde ce qui le rendait justement capable d'avoir un caractère apoptotique ce qui a été indiqué par l'effet de cet acide sesquiterpénique sur le gonflement mitochondrial qui a augmenté suite à une altération membranaire. Les résultats de l'activité antiproliférative de l'acide isocostique par le test MTT sur quatre lignées cellulaires: U118, CACO2, SKOV3 et HDF a révélé l'effet inhibiteur de ce dernier sur la prolifération cellulaire en ayant une propriété cytotoxique dose-dépendante surtout sur la lignée U118 qui était la plus sensible avec une IC₅₀ de 72,32 µg/ml.

Compte tenu des résultats obtenus de cette étude préliminaire on a pu constater la relation complémentaire qui existe entre l'utilisation des plantes en médecine traditionnelle ainsi que les investigations phytochimiques et biologiques sur ces dernières ce qui amène à la valorisation des biomasses naturelles afin de préserver leur biodisponibilité et biodiversité, c'est pour cela que pour des études ultérieures, il serait important d'envisager certaines réalisations:

En effet pour la biomasse endémique (*Iris unguicularis* Poir.), des travaux plus profonds sur les principes actifs de cette espèce seront mis en marche surtout l'isolement et la caractérisation des produits purs par différentes techniques et évaluer leurs activités antioxydante et antibactérienne dans le but de connaître la ou les molécules responsables ces deux effets. D'une autre part, nous procéderons à la recherche des métabolites secondaires typiques du genre *Iris* et qui d'après la bibliographie sont les isoflavonoïdes.

En ce qui concerne l'acide isocostique isolé de l'espèce *Dittrichia viscosa* (L.) Greteur. et dans le but de mieux connaître les mécanismes d'action de ce composé d'autres paramètres seront mis en œuvre tels que:

- La mesure de production d'autres radicaux libres tel que le radical OH.
- La mesure des dégâts cellulaires par d'autres paramètres comme par exemple; La mesure du taux du glutathion « GSH » cytosolique.
- Evaluation de l'expression des protéines (Bcl2, Bax, Hsp90 et P-gp) par électrophorèse et immunodétection par Western blot.

Résumés

ملخص

يهدف العمل الحالي إلى تعزيز نباتات التراب الجزائري من خلال الدراسة الفيتوكميائية للنبتتين : *Iris unguicularis* Poir. و *Dittrichia viscosa* (L.) Grueter,

من خلال تحليل LC-MS IT-TOF على مختلف مستخلصات النبتة (*Iris unguicularis* Poir, AI, CI, BI) تمكنا إحصاء 70 مركبا كيميائيا، في حين مكن تحليل LC-MS / MS وفقا لطريقة مضبوطة ومثبتة من الكشف على 17 مركبا فينولياً حيث أن المستخلصين الأغنى كانا AI و CI ، المستخلص AI كان أساسا من : acide 4-OH-benzoïque ، acide p-coumarique و acide protocatechuique ، syringinique من : acide férulique و naringinie. كما أظهرت النتائج كذلك أن هذان المستخلسان لهما فعالية عالية ضد الأكسدة ونمو البكتيريا.

تم تحديد بنية المركب acide isocostique المعزول من *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter بواسطة تقنية الرنين النووي المغناطيسي (¹H و ¹³C). أظهرت نتائج الفعالية البيولوجية لهذا المركب عن قدرته على التسبب في موت الخلايا المبرمج من ناحية و ذلك من خلال تأثيره كمؤكسد الذي يسمح له بإنتاج الأكسيد الفائق ومن ناحية أخرى من خلال تأثيره على انتفاخ الميتوكوندريا. كما أظهرت نتائج اختبار MTT على مختلف الخلايا U118 ، Caco-2 ، HDF و SKOV-3 أن مركب acide isocostique له تأثير ملحوظ على تكاثر الخلايا من خلال التسبب في سمية خلوية تعتمد على الجرعة خاصة على خلايا U118 حيث لوحظ انخفاض واضح لتكاثر هذه الأخيرة خاصة بين 100 ميكروغرام و 200 ميكروغرام مع قيمة التثبيط النصفى المقدرة ب 72.32% ميكروغرام / مل.

الكلمات المفتاحية : *Iris unguicularis* Poir. ، *Dittrichia viscosa* (L.) Grueter, acide isocostique ، فعالية مضاد الأكسدة ، مضاد للبكتيريا ، النشاط السام للخلايا ، LC-MS/MS ، مركبات فينولية

Abstract

The present work aims to the valorization of Algerian flora by phytochemical et biological investigations on two species : *Iris unguicularis* Poir. and *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter. This study allowed to identify several phytochemical compounds and to record satisfactory results for different biological activities tested for this two species.

LC-MS IT-TOF analysis of the different extracts (AI, CI et BI) of *Iris unguicularis* Poir. species led to the quantification of 70 compounds, while the LC-MS/MS analysis accomplished by a previously validated method by using 37 standards revealed the presence of 17 phenolic compounds and the richest extracts were, AI and CI, AI extract was mainly composed by: 4-OH-benzoic acid (2218.2 µg analyte/g extract), syringinic acid (1218.6 µg analyte/g extract), protocatechuique acid (1080. 4 µg analyte/g extract) and p-coumaric acid (1071.2 µg analyte/g extract), the CI extract was mainly composed by: naringinia (1453.4 µg analyte/g extract) and ferulic acid (1088, 41 µg analyte/g extract). Results showed also the high antioxidant an antibacterial activities of these extracts .

Structural elucidation of isocostic acid isolated from the species *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter, was performed by NMR technique (¹H and ¹³C). The results of activities carried out on this compound revealed its apoptotic effect by acting as pro-oxidant which allows to generate the superoxide anion in one hand and on the other hand by its effect on mitochondrial swelling. The viability of cells via MTT assay tested against U118, Caco-2, SKOV-3 and HDF lines showed that isocostic acid had a significant effect on cell proliferation by causing a dose-dependent cytotoxicity especially against U118 line in which proliferation is clearly decreased between 100µg and 200 µg with an IC50 of 72.32 µg/ml.

Key words: *Iris unguicularis* Poir., *Dittrichia viscosa* (L.) Grueter, phenolic compounds, isocostic acid, LC-MS/MS, antioxidant activity, antibacterial activity, cytotoxic activity.

Résumé

Le présent travail a pour but la valorisation de la flore Algérienne par des investigations phytochimiques et biologiques sur les deux espèces; *Iris unguicularis* Poir. et *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter. Cette étude a permis d'identifier plusieurs composés phytochimiques et d'enregistrer des résultats satisfaisants pour les différentes activités biologiques testées pour les deux espèces.

L'analyse par LC-MS IT-TOF des différents extraits (AI, CI et BI) de l'espèce *Iris unguicularis* Poir. a permis de quantifier 70 composés tandis que l'analyse par la LC-MS-MS réalisée selon une méthode validée par l'emploi de 37 standards a révélé la présence de 17 composés phénoliques dont les plus riches étaient les extraits AI et CI. En effet, l'extrait AI était majoritairement constitué de: l'acide 4-OH-benzoïque (2218.2 µg analyte/g extrait), l'acide syringinique (1218.6 µg analyte/g extrait), l'acide protocatechuique (1080.4 µg analyte/g extrait) et l'acide *p*-coumarique (1071.2 µg analyte/g extrait), l'extrait CI quant à lui était majoritairement composé de: naringinie (1453,4 µg analyte/g extrait) et d'acide férulique (1088, 41 µg analyte/g extrait). Les résultats ont également montré que ces extraits avaient une activité antioxydante et antibactérienne élevées.

L'élucidation structurale de l'acide isocostique isolé de l'espèce *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter était réalisée par la technique RMN (^1H et ^{13}C). Les résultats des activités réalisées sur ce composé avaient révélé son pouvoir apoptotique d'une part, par son effet pro-oxydant qui lui permet de générer l'anion superoxyde et d'autre part par son effet sur le gonflement mitochondrial. La viabilité des cellules via le test MTT testée sur les lignées U118, Caco-2, SKOV-3 et HDF avait montré que l'acide isocostique avait un effet notable sur la prolifération cellulaire en provoquant une cytotoxicité dose-dépendante surtout sur la lignée U118 dans laquelle la prolifération est clairement diminuée entre 100µg et 200 µg avec une CI50 de 72,32 µg/ml.

Mots clés: *Iris unguicularis* Poir., *Dittrichia viscosa* (L.) Grueter, composés phénoliques, acide isocostique, LC-MS/MS, activité antioxydante, activité antibacterienne, activité cytotoxique.

Références

- [1] Leistner, O.A., 2000. Seed plants of southern Africa: Families and genera. *Strelitzia* 10. NBI. Pretoria.
- [2] Quezel, P., Santa, S., 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions Désertiques Méridionales. Tom II. CNRS. p. 221.
- [3] Belouahem, D., Belouahem, F., Belair, G., 2009. Floristic biodiversity and vulnerability of *Glutinousaulnaies* in Numidia Algeria (NE Algeria). *Eur.J Res.* 32, 329-361.
- [4] Kovalev, V.N., Zatyl'nikova, O.A., 2013. A new isoflavone from *Iris pseudoacorus*. *Chem Nat Comp.* 49, 34-35.
- [5] Wang, H., Yanmei, C., Changqi, Zhao., 2010. Flavonoids of the Genus *Iris* (Iridaceae). *Mini-Rev.Med.Chem.* 10, 643-661.
- [6] Wirginia, K.K., Sieniawska, E., Jarosław, W., Otgonbataar, U., Paweł, G., Krystyna, S.W., 2015. Major secondary metabolites of Iris spp. *Phytochem Rev.* 14, 51 80.
- [7] Singh, N., Mahmood, U., Kaul, V.K., 2004. A new alkylated benzoquinone from rhizomes of Iris Kumaonensis. *Nat.Prod.Res.* 20, 75-78.4.
- [8] Hacibekiroglu, I., Kolak, U., 2012. Screening Antioxidant and Anti cholinesterase Potential of Iris albicans Extracts, *Arab.J.Chem.* 8, 264-268.
- [9] Wei, Y., Shu, P., Honga, J., Qin, M., 2012. Qualitative and quantitative evaluation of phenolic compounds in Iris dichotoma Pall. *Phytochem Analysis.* 23, 197-207.
- [10] Ibrahim, S.R.M., Mohamed, G.A., Al-Musayeib, N.M., 2012. New Constituents from the rhizomes of Egyptian Iris germanica L. *Molecules.* 17, 1420-3049.
- [11] Rahman, A.U., Nasim, S., Baig, I., Bilger, S., Ilkay, O., Filiz, A., Choudhary, M.I., 2003. Anti-inflammatory isoflavonoids from rhizome of Iris germanica. *J. Ethnopharmacolo.* 86, 177-180.
- [12] Yuan, C., Wang, J., Chen, S., Luo, S., Xu, X.M., 2008. Study on the chemical constituents of Iris tectorum Maxim. *NPRD.* 20, 444-449.
- [13] Shang, H.Q., Qin, M.J., Wu, J.R., 2007. Constituents of rhizomes of *Iris tectorum*. *Chin. J.Nat.Med.* 5, 312-314.
- [14] Singab, A.N.B., Ahmed, A., A.H., Sinkkonen, J., Ovcharenko, V., Pihlaja, K., 2006. Molluscicidal Activity and New Flavonoids from Egyptian Iris germanica L.Z. *Naturforsch, C: Biosci.* 61, 57-63.
- [15] Wang, H., Yanmei, C., Changqi, Z., 2010. Flavonoids of the Genus *Iris* (Iridaceae). *Mini-Rev. Med.Chem.* 10, 643-661.

- [16] Fang, R., Houghton, P.J., Hylands, P.J., 2005. Cytotoxic effects of compounds from Iris tectorum on human cancer cell linds. *J.Ethnopharmacol.* 118, 257-263.
- [17] Miyake, Y., Ito, H., Yoshida, T., 1997. Identification of iridials as piscicidal components of Iridaceous plants and their conformations associated with CD spectra. *Can.J.Chem.* 75, 734-741.
- [18] Mizuno, T., Okuyama, Y., Iwashina, T., 2012. Phenolic compounds fom iris rossi and their chemotaxonomic and systhaciematic significance. *Biochem.Sys.Ecol.* 44, 157 – 160.
- [19] Burcu, B., Aysel, U., Nurdan, S., 2015. Antimicrobial, antioxidant and antimutagenic properties of Iris albicans. *Ind.Crop.Prod.* 69, 480-484.
- [20] Moein, M.R., Khan, S.I., Ali, Z., Ayatollahi, S.A., Kobarfard, F., Nasim, S., Choudhary, M.I., Khan, I.A., 2008. Flavonoids from Iris songarica and their antioxidant and Estrogenic activity. *Planta.* 74, 1492-1495.
- [21] Rigano, D., Formisano, C., Grassia, G., Perrone, A., Piacente, D., Vuotto, M.L., Senatore, F., 2007. Antioxidant flavonoids and isoflavonoids from rhizomes of Iris pseudopumila. *Planta Medica.* 73, 1-4.
- [22] Rahman, A.U., Nasim, S., Baig, I. 2003. Anti-inflammatory isoflavonoids from rhizome of Iris germanica. *J.Ethnopharmacol.* 86, 177-180.
- [23] Conforti, F., Rigano, D., Menichini, F., Loizzo, M.R., Senatore, F., 2008. Protection against neurodegenerative diseases of *Iris pseudopumila* extracts and their constituents. *Fitoterapia.* 80, 62-67.
- [24] Mosihuzzman , M., Naheed, S., Hareem, S., Talib, S., Abbas G., Khan, S.N., Choudary, M.I., Sener, B., Tareen, R.B., Israr, M., 2013. Studies on α -glucosidase inhibition and anti-glycation potential of Iris loczyi and *Iris unguicularis*. *Life Sci.* 92, 187-192.
- [25] Gaamoune, S., Nouioua, W., Amor, L., Asian, I., 2016. Evaluation of antioxidant and antifungal activities of methanolic aerial part extract of Iris unguicularis Poiret. *J.Plant.Sci.* 6, 18-23.
- [26] Ahmed, A., Mohamed Abou El-Hamd, H., Olga, T., Alexandra, P., Hassan.Mohamed, E., Mohamed El-Magharby, A., Klaus-Peter, Z. 2003. Terpenes from *Inula verbascifolia*. *Phytochemistry.* 62, 1191-1194.
- [27] Seca, A.M.L., Grigore, A., Pinto, D.C.G.A., Silva, A.M.S., 2014. The genus Inula and their metabolites: from ethnopharmacological to medicinal uses. *J. Ethnopharmacol.* 154, 286–310.
- [28] Anderberg, A.A., 1991. Taxonomy and phylogeny of the tribeInuleae (Asteraceae). *Plant Syst.Evol.* 176, 75–123.
- [29] Djerroumi, A., Nacef , M., 2004. 100 plantes medicinal d'Algérie. Edd Palais du livre. p83.

- [30] Hamdi Pacha, Y., Benayech, F., Benayech, S. 1993. Caractéristiques moléculaires et effets anti-bactériens de centaurea pullata et Inula viscosa. J.Appl.Microbiol. 3, 183-186.
- [31] Benayache, S., Benayach, F., Dendougui, H., Jay, M., 1991. Plantes médicinales et phytothérapie. Tome XXV. n°4, pp 170-176.
- [32] Walter, S.J., Christopher, S.C., Elizabeth, A.K., Peter, S., 2002. Btanique systématique, 1ere edition, De Boeck Université s.a. Paris.
- [33] Okuda, T., 1986. (Ed), *Enceclopedie of Natural Medicine*. Vol 1, Hirokawa, Tokyo, p 64,
- [34] Yu, N.J., zahao, Y.M., zhang, Y.Z., Li, Y.F., 2006. Japonicins A and B from the flowers of Inala japonica, J Asian Nat Prod Res. 8, 385-390.
- [35] Shouxin, L., He, L., Weiying, Y., Li, Z., Naisheng, B., Chi-Tang, H., 2005. Design, synthesis and anti tumor acitivity of (2-O-alkyloxime-3-phenyl)-propionyl-1-O-acetylbritannilactone esters. Bioor. Med. Chem. 13, 2783-2789.
- [36] Dendougui, H., 1989. Etude phytochimique et de la phase butanolique de l'espèce Inula crithmoides L. Thèse de magister, Université de Constantine. p 39
- [37] Bicha, S., 2003. Etude de l'effet de la pollution du sol par les métaux sur l'accumulation des secondaires de l'exsudat chloroforme de Inula viscosa (compositae). Thèse de magister, Université de Constantine.
- [38] Ahmed, A., Abou El-Hamd, H.M., Olga, T., Alexandra, P., Hassan.Mohamed, E., Mohamed. El-Magharby, A., Klaus-Peter, Z., 2003. Terpenes from *Inula verbascifolia*. Phytochemistry. 62, 1191-1194.
- [39] Ghantous, A., Gali-Muhtasib, H., Vuorela, H., Saliba, N.A., Darwiche, N., 2010. What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials, Drug Discov. Today 15, 668– 678.
- [40] Kreuger, M.R.O., Grootjans, S., Biavatti, M.W., Vandenabeele, P., D'Herde, K., 2012. Sesquiterpene lactones as drugs with multiple targets in cancer treatment: focus on parthenolide. Anticancer. Drugs 23, 883-896.
- [41] Yang, J., 1991. Infraspecific variation in plant and the exploring methods. Journal of Wuhan Botanical Research. 9, 185-195.
- [42] Konishi, T., Shimada, Y., Nagao, T., Okabe, H., Konoshima, T., 2002. Antiproliferative sesquiterpene lactones from the roots of Inula helenium. Biol Pharm Bull.25, 1370-1372.
- [43] Danino, O., Gottlied, H.E., Grossman, S., Bergman, M., 2009. Food.Res. Int. 42, 1273-1280.
- [44] Babulka, P., 2011. Synthèse des ressources botaniques dans la pratique médicale humaine et vétérinaire en Hongrie. Phytothérapie. 9, 290–296.

- [45] Danino, O., Gottlieb, H.E., Grossman, S., Bergman, M., 2009. Antioxidant activity of 1,3-dicaffeoylquinic acid isolated from *Inula viscosa*. *Food Res.Int.* 42, 1273-1280.
- [46] Maoz, M., Kashman, Y., Neeman, I., 1999. Isolation and Identification of a New Antifungal Sesquiterpene Lactone from *Inula viscosa*. *Planta Med.* 65, 281-282.
- [47] Hernandez, V., Recio, M., Manez, S., Guiner, R., Rios, I., 2007. Effects of naturally occurring dihydroflavonols from *Inula viscosa* on inflammation and enzymes involved in the arachidonic acid metabolism. *Sci.dir.* 81, 480-488.
- [48] Chen, C.N., Huang, H.H., Wu, C.L., Lin, C.P., Hsu, J.T., Hsieh, H.P., Chuang, S.E., Lai, G.M., 2007. Isocostunolide, a sesquiterpene lactone, induces mitochondrial membrane depolarization and caspase-dependent apoptosis in human melanoma cells. *Cancer Lett.* 246, 237-252.
- [49] Shtacher, Y., Kashman, J., 1970. 12-Carboxy eudesma-3,11(13)-diene. Novel sesquiterpenic acid with a narrow antifungal spectrum. *J.Med.Chemi.* 13, 1221-1223.
- [50] Fontana, G., La Rocca, S., Passannanti, S., Pia Paternostro, M., 2013. Sesquiterpene compounds from *Inula viscosa*. *Nat.Prod.Res.* 9,824-827.
- [51] Abu Zarga, M.H., Sabri, S.S., Hamed, E.M., Khanfar, M.A., Zeller, K., Rahman, A., 2003. A new eudesmane type sesquiterpene from *Inula viscosa*. *Natural Product Research.* 17, 99-102.
- [52] Ceccherelli, P., Curini, M., Marcotullio, M.C., Menghini, A., 1985 *Phytochemistry*. 24, 2987-2989.
- [53] W.H.Talib, A.M. Mahasneh, 2010., Antiproliferative activity of plant extracts used against cancer in traditional medicine. *Sci Pharm.* 78, 33-45.
- [54] Rozenblat, S., Grossman, S., Bergman, M., Gottlieb, H., Cohen, Y., Dovrat, S., 2008. Induction of G 2/M arrest and apoptosis by sesquiterpene lactones in human melanoma cell lines. *Biochem.Pharmacol.* 75, 369-382.
- [55] Barouki R., 2006. stress oxydant et vieillissement . M/S. 22, 266-72.
- [52] Jenkins, A.J., Hill, M.A, Rowley K.G., 2007. Diabetes and Oxidant stress. Atherosclerosis and Oxidant Stress. A new Perspective. Ed Holtzman J.L. pp 123-160.
- [53] Hlliwell, B., Gutteridge, J., 2000. Reactive species as useful biomolecules. *Free Radic.Bio. Med.* 467-481.
- [54] Bonnefont-Rousselot, D., Thérond, P., Beaudeux, J.L., Peynet, J., Legrand, A., Deltre, J. 2001. Vieillissement et stress oxydant. Quels marqueurs potentiels ?. *Ann. Biol. Clin.* 49, 453-459.

- [55] Inoue, M., Sato, E.F., Nishikawa, M., Park, A.M., Kira, Y., Imada, I., Utsumi, K., 2003. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr.Med.Chem.* 10, 2495-505
- [56] Vignais, P.V., 2002. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell.Mol.Life.Sci.* 59, 1428-59.
- [57] Orient, A., Donko, A., Szabo, A., Leto, T.L., Geiszt, M., 2007. Novel sources of reactive oxygen species in the human body. *Nephrol. Dial. Transplant.* 22, 1281-8.
- [58] Govindarajan, R., Vijayakumar, M., Pushpangadan, P., 2005. Antioxidant approach to disease management and the role of "Rasayana" herbs of Ayurveda. *J. Ethnopharmacol.* 99, 165-178.
- [59] Wardman, P., Candeias, L.P., 1996. Fenton chemistry: an introduction. *Radiat Res.* 145, 523-531.
- [60] Favier., A., 2003. Le stress oxydant: Interet conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. Mécanismes biochimiques. *L'act Chim.* 108-115.
- [61] Jaques, B., André, R., 2004. Biochimie métabolique Ed Ellipses. Paris. pp 217-219- 220-223-225.
- [62] Hennebelle, T., Sahpaz, S., Bailleul, F., 2004. Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothér.* 1, 3-6.
- [63] Rehman, A., Nourooz , J., Moller , W. et al. 1999. Increased oxidative damage to all DNA bases in patients with type II diabetes mellitus. *FEBS Lett.* 448, 120-122.
- [64] Atawodi, S.E., 2005. Antioxidant potential of African Plants. *African J. of Biotec.* 4: 128-133.
- [65] Georgetti, S.R., Casagrande, R., Di Mambro, V.M., Azzolini Ana., E.C.S., Fonseca Maria, J.V., 2003. Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescence method. *AAPS Pharm Sci.* 5, 111-115
- [66] Heo, H.J., Kim, Y.j., Chung, D., Kim, D.O., 2007. Antioxidant capacities of Individual and Combined Phenolics in a Model System. *Food Chem.* 104, 87-92.
- [67] Cano, N., Barnoud, D., Schneider, S.M., Vasson, M.P., Hasselmann, M., Leverve, X. 2006. *Traité de nutrition artificielle de l'adulte.* Ed Springer, p 255.
- [68] Zelko, I.N., Marian, T.J., Folz, R.J. 2002. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD(SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Rad Biol & Med.* 33, 337-349.
- [69] Nicholls, P., 2012. Clasical catalase: Ancient and modern. *Arch.Biochem.Biophys.* 525, 95-101.

- [70] Akbas, S.H., Yegin, A., Ozben, T., 2005. Effect of pentylenetetrazol-induced epileptic seizure on the antioxidant enzyme activities, glutathione and lipid peroxidation levels in rat erythrocytes and liver tissues. *Clin. Biochem.* 38, 1009-14.
- [71] Meister, A., H.R., Katyare, S.S., Patel, M.A. 2008. Ageing-induced alterations in lipid/phospholipid profiles of rat brain liver mitochondria: implications for mitochondrial energy-linked functions. *J Membr Biol.* 221, 51-60.
- [72] Powers, S.K., Jackson, M.J., 2008. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev.* 88, 1243-1276.
- [73] Evans, W.J., 2000. Vitamin E, vitamin C, and exercise. *Am. J. Clin. Nutr.* 72, 647- 652.
- [74] Singh, U., Devaraj, S., Jialal, I., 2005. Vitamin E, Oxidative stress, and inflammation. *Ann Rev of Nut.* 25, 151-175.
- [75] Van Stijn, M.F., Ligthart-Melis, G.C., Boelens, P.G., Scheffer, P.G., Teerlink, T., Twisk., J.W., Houdijk, P., Van Leeuwen, P.A., 2008. Antioxidant enriched enteral nutrition and oxidative stress after major gastrointestinal tract surgery. *World Gastroenterol.* 14, 6960-9.
- [76] Causs, C., 2005. Les secrets de santé des antioxydants: C'est naturel, c'est ma santé. Ed Alpen s.a.m, p 30.
- [77] Rahman, K., 2007. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin Interv Aging.* 2, 219-36.
- [78] Fusco, D., Colloca, G., Lo Monaco, M.R., Cesari, M., 2007. Effects of antioxidant supplementation on the aging process. *Clin Interv Aging.* 2, 377-87.
- [79] Bauer, W.J., Badoud, R., Loliger, J. & Etournaud, A., 2010. Science et technologie des aliments: Principes de chimie des constituants et de technologie des procédés. Ed PPUR Presses Polytechniques, p212.
- [80] Laughton, M.J., Halliwell, B., Evans, P.J., Robin, J. & Hoult, S., 1989. Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenols quercetin, gossypol and myricetin. *Biochem Pharmacol.* 38, 2859-2865.
- [81] Apak, R., Guclu, K., Demirata, B., Ozyurek, M., Celik, E., Bektasoglu, B., Berker, K.I. & Ozyurt, D., 2007. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules.* 12, 1469- 1547.
- [82] Sokmenl, B.B., Aydin, S. & Kinalioglu, K., 2012. Antioxidant and antibacterial properties of a lichen species *Diploschistes scruposus* (Schreb.) Noman. *IUFS J . Biol.* 71, 43-51.
- [83] Jovanovic, S.V., Steenken, S., Tasic, M., Marjanovic, B., Simic M.G., 1994. Flavonoids as antioxidants. *J. Am. Chem. Soc..* 116, 4846-4851.

- [84] Dangles, O., 2012. Antioxidant activity of plant phenols: chemical mechanisms and biological significance. *Curr.Or.Chem.* 16, 692-714.
- [85] Lin, C., Chen, C., Liang, Y., Lin, J., 2002. Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294, 167-172.
- [86] Pietta, P.G., 2000. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.*.. 63, 1035- 1042.
- [87] Van Acker S.A.B.E. et coll., 1996 . *Free Radical. Biol. Med.*, 20, 331-342.
- [88] Jones, J.D., Dangel, J.L., 2006. The plant immune system. *Nature*, 22, 1050-1044.
- [89] Gibbons, S., 2008. Phytochemicals for bacterial resistance-strengths, weakness and opportunities. *Planta Med*, 74, 594-602.
- [90] Richard, S., Steel-Moor, L., Goodwin, A.C., 2007. *Antimicrobial susceptibility testing protocols* Ed Goodwin Boca Raton: CRC Press, pp77.
- [91] Barros, L., Calhelha, R.C., Vaz, J.A., Ferreira, I.C.F.R., Baptista, P., Estevinho, L.M., 2007. Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portugues wild *edible mushrooms* methanolic extracts. *EUR FOOD RES TECHNOL.* 225, 151-156.
- [92] CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility testing for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A7, Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, PA, Vol.26, Issue: 2, 2006.
- [93] Jawetz, E., Melnick, J.J., Adelberg, E.A., 1973. *Microbiologie médicale*, Ed Presses Université Lava, p 629.
- [94] Harley, J.P., Klein, D.A., Prescott, L.M., Sherwood, L.M., Willey, J.M, Woolverton, C.J., 2010. *Microbiology*, Ed. De Boeck. p 101
- [95] Talbert, M., Willoquet, G., Gervais, R., 2008., *Guide pharmaco*. Ed Lamarre. p 774.
- [96] Yala, D., Merad, A.S., Mohamedi, D., Ouar Korich, M.N., 2001. Classification et mode d'action des antibiotiques. Médecine du Maghreb n°91.
- [97] Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A., 2003. La chimiothérapie antimicrobienne. In. *Microbiologie*; 2^{ème} ed. Bruxelles. pp 806-811.
- [98] Zomahoun, C., 2005. Evaluation de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées des infections urinaires au laboratoire de bactériologie du centre national hospitalieruniversitaire-Hunert Koutoukou Maga (C.N.H.U.H.K.M). Thèse de doctorat d'état, Univeristé du Mali. p 91.
- [99] Normark, BH., Normark, S., 2002. Evolution and spread of antibiotic resistance. *J Intern Med*. 252, 91-106.
- [100] Baudry, C., Brézellec, H., 2006. *Microbiologie, Immunologie, Groupe liaison*, p 126

- [101] Harborne, J.B., Williams, C.A., 2002. Advances in flavonoid research since 1993. *Phytochemistry*. 55, 481-504.
- [102] Bruneton, J., 1999. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Technique & Documentation, Paris, pp 721-741.
- [103] Cushnie, T.P.T., Lamb, A.J., 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents*. 26, 343-356.
- [104] Lee, H., Gambette, P., Barkat-Defradas, M., 2010. Utilisation de l'analyse textuelle automatique dans la recherche sur la maladie d'Alzheimer. Colloque international des jeunes chercheurs en Didactique des langues et en linguistique, Grenoble.
- [105] Martin, A., Fedio, P., 1983. Word production and comprehension in Alzheimer's disease: the breakdown of semantic knowledge. *Brain Lang*. 19, 124-141.
- [106] Flicker, C., Ferris, S.H., Crook, T., Bartus, R.T., 1987. Implications of memory and language dysfunction in the naming deficit of senile dementia. *Brain Lang*. 31, 187- 200.
- [107] Cheung, J., Rudolph, M.J., Burshteyn, F., Cassidy, M.S., Gary, E.N., Love, J., Franklin, M.C., Height, J.J., 2012. Structures of human Acetylcholinesterase in Complex with Pharmacologically important Ligands. *J.Med.Chem*. 55, 10282-10286
- [108] Darvesh, S., Grantham, D., D.L., Hopkins, D.A., 1998. Distribution of Butyrylcholinesterase in the human Amygdala and Hippocampal Formation. *J.Comp.Neuro*. 393, 374-390.
- [109] Roberts, R., 2003. Maladie d'Alzheimer: au-delà de la seule hypothèse cholinergique. Autres systèmes de neurotransmission et modulation des récepteurs nicotiniques. La lettre du pharmacologue. 17, 23-30.
- [110] Houghton, P.J., Ren, Y., Howes, M.J., 2006. Acetylcholinesterase inhibitors of plant and fungi. *Nat.Prod.Rep*. 23, 181-199.
- [111] Iijima, S., Greig, n.h., Garofalo, P., Spangler, E.L., Helelr, B., Brossi, A., Ingram, D.K., 1993. Penserine: a physostigmine derivate that is long-acting inhibitor of cholinesterase and demonstrates a wide dose range for attenuating a scopolamine-induced learning impairment of rats in a 14-unit tmaze. *Psychopharmacology*, 112, 415-420.
- [112] Al-Jafari, A.A., Kamal, M.A., Greig, N.H., Perry, E.R., 1998. Kinetics of human erythrocyte acetylcholinesterase inhibition by a novel derivate of physostigmine: phenserine. *Biochem. Bioph.Res.Co*. 248, 180-185.
- [113] Bruneton, J., 1999. Phrmacognosie-Phytochimie, Plantes Medicinales, 3ème Edition, Ed Tec et Doc Lavoisier, p 1120
- [114] Knapp, M.J., Knopman, D.S., Solomon, P.R., 1994. The tacrine study group, A 30-week randomized controlled trial of high dose tacrine in patients with Alzheimer's disease. *J.Am.Med.Assoc*. 271, 985-991.

- [116] Rogers, S.L., Friedhoff, L.T., 1997. Donepezil provides long-term clinical benefits for patients with Alzheimer's disease (AD). *J.Neurol Sci.*, 1, 195-219.
- [117] Rogers, S.L., Farlow, M.R., Dooy, R.S., 1998. Donepezil study group. A 24-week, double-blind, pharmaco-controlled trial of donepezil in patients with Alzheimer's disease. *Neurology*. 50, 136-145.
- [118] Sramek, J.J., Frackiewics, E.J., Cultler, N.R., 2000. Review of the acetylcholinesterase inhibitor galanthamine. *Expert OPIN. iNV. Drug.* 9, 2393-2402.
- [119] Maelicke, A., Samochocki, M., Jostock, R., R., Fehrenbacher, A., Ludwig, J., Albuquerque, E.X., Zerlin, M., 2001. Allosteric sensitization of nicotinic receptors by galantamine, a new treatment strategy for Alzheimer's disease. *Biol. Psychiat.* 49, 297-288.
- [120] Woodruff-Pak, D.S., Vogel, R.W., Wenk, G.L., 2001. Galantamine: effect on nicotinic receptor binding acetylcholinesterase inhibition, and learning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 2089-2094.
- [121] Lopez, S., Bastida, J., Viladomat, F., Codina, C. 2002., Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and Narcissus extracts. *Life Sci.* 71, 2521- 2529.
- [122] Sultana, R., Boyd-Kimball, D.A., Poon, H.F., Cai, J., Pierce, W.M., Klein, J.B., Markesberry, W.R., Butterfield, D.A., 2006. Oxidative modification and down- regulation of Pin 1 Alzheimer's disease Hippocampus: a redox proteomics analysis. *Neurobiol Aging*. 27, 918-925.
- [123] Janciauskienė, S., Wright, H.T., Lindgren, S., 1999. Fibrillar Alzheimer's amyloid peptide Abeta (1-42) stimulates low density lipoprotein binding and cell association, free radical production and cell cytotoxicity in PC12 cells. *Neuropeptides*, 33, 510-516.
- [124] Albarracín, S.L., Stab, B., Casas, Z., Sultachan, J.J., Samudio, I., Gonzalez, L., Capani, F., Morales, L., Barreto, G.E., 2012. Effects of natural antioxidants in neurodegenerative disease. *Nutr. Neurosci.* 5, 1-9.
- [125] Karp, G., 2010. Biologie moléculaire et cellulaire. Ed de Boeck, Bruxelle, p 818.
- [126] McDonald, J.A., Pinheiro, E.M., Montell, D.J., 2003. A PDGF/VEGF homolog is sufficient to guide border cells and interacts genetically with Taiman. *Development*, 13, 3469-3478.
- [127] Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000. The hallmarks of cancer cell. *Cell*, 100, 57-70
- [128] Rai, N.K., Tripathi, K. Sharma, D., Shukla, V.K., 2005. Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *Int J Law Extrem Wounds.* 4, 138-144
- [129] Wood, W., Turmaine, M., Weber, R., Camp, V., Maki, R.A., McKercher, S.R., Martin, P., 2000. Mesenchymal cells engulf and clear apoptotic footplate cells in macrophageless PU. 1 null mouse embryos, 127. 5245-5252.

- [130] Neurath MF, Finotto S, Fuss I., Boirivant M, Galle PR, Strober W. 2001. Regulation of T-cell apoptosis in inflammatory bowel disease : to die or not to die, that is the mucosal question. *Trends Immunol.* 22 : P. 21-26.
- [131] Barinaga M. 1998. Is apoptosis key in Alzheimer's disease ? *Science*. 281 : P.1303 - 1304.
- [132] Brenner, C. and G. Kroemer 2000. Apoptosis. Mitochondria--the death signal integrators. *Science* 289: 1150-1.
- [133] Roy, N., Q. L. Deveraux, R. Takahashi, G. S. Salvesen et J C. Reed. 1997. «The cIAP-I and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases .*Embo J.* vol.16,no23:P.6914-6925.
- [134] Roy, N., Q. L. Deveraux, R. Takahashi, G. S. Salvesen et J C. Reed. 1997. «The cIAP-I and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases .*Embo J.* vol.16,no23:P.6914-6925.
- [135] Adams, J. M., and Cory, S. 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281, 1322-6.
- [136] Cory S, Adams JM. 2002. at Rev Cancer. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch . 2 :p. 647-656.
- [137] Cory, S., and Adams, J. M. 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*. 2, 647-56.
- [138] Adams, J. M., and Cory, S. 2001. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci*. 26, 61-6.
- [139] Kroemer, G., and Reed, J. C. 2000. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med*. 6, 513-9.
- [140] Merino, R., Ganan, Y., Macias, D., Rodriguez-Leon, J., and Hurle, J. M. (1999). Bone morphogenetic proteins regulate interdigital cell death in the avian embryo. *Ann N Y Acad Sci*. 887, 120-32.
- [141] Elimadi, A., Morin, D., Sapena, R., Chauvet-Monges, A.M., Crevat, A., Tillement, J.P.1997. Comparison of the effects of cyclosporine A and trimetazidine on Ca^{2+} -dependent mitochondrial swelling, *Fundam Clin Pharmacol*, 11, 440-447.
- [142] Lariche, N., Lahouel, M., Benguedouar, L., Zellagui, A. 2017. Ferulenol, a Sesquiterpene Coumarin, Induce Apoptosis via Mitochondrial Dysregulation in Lung Cancer Induced by Benzo[a]pyrene: Involvement of Bcl2 Protein, Anti- Cancer Agents Med Chem, 17, 1357-1362.
- [143] Lahouel, M., Amedah, S., Zellagui, A., Touil, A., Rhouati, S., Benyache, F., Leghouchi E., Bousseboua, H. 2006. The Interaction of New Plant Flavonoids with Rat

Liver Mitochondria: Relation between the Anti- and Pro-oxydant Effect and Flavonoids Concentration, Phytotherapy, 61, 347–355.

[144] Pitt, J.J., 2009. Principles and applications of liquid chromatography mass spectrometry in clinical biochemistry. Clin Biochem Rev, 30, 19-34.

[145] Dass, C., 2007. Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry, Jhon Wiley & Sons Publishers, Wiley. Inter. science. p 5.

[146] Wilm, M., Mann, M., 1996. Analytical properties of nanoelectrospray ion source. Anal Chem, 35, 804-17.

[147] Karas, M., Hillenkamp, F., 1988. Laser desorption ionization of protein with molecular masses exceeding 10, 000 daltons. Anal Chem. 60, 2299-301.

[148] Gross, J.H, 2004. Mass spectrometry: a textbook. Springer verlag, Berlin Heidelberg New York, pp 536.

[149] Dreisewerd, K., Schurenberd, M., Karas, M., Hillenkamp, F., 1995. Influence of the laser intensity and spot size on the desorption of molecules and ions in matrix-assisted laser desorption/ionization with a uniform beam profile. I. J. Mass. I. J. Mass. Spectrom of Ion Phys, 141, 127-148.

[150] Hoffmann, E., Stroobant, V., 2005. Spectrometrie de masse. Cours et exercices corrigés., Dunod ed.Vol Third edition, Paris, p 425.

[151] Wiley, W., McLaren, I., 1955. Time-of-flight mass spectrometry improved resolution. Rev Sci Instrum, 26, 1150-1157.

[152] Mamyrin, B.K., Shmikk, d.V., Zagulin, V.A., 1973. The mass-reflectron, a new nonmagnetic time-of-flight mass spectrometer with high resolution Sov.Phys. JETP, 37 (45)

[153] Hofmann, E., Charette, J., Stroobant., V., 1999. Spectrométrie de masse: exercices corrigés, Dunod. 2ème édition. Définition LC MS

[154] Watson, I.T., Sparkman, O.D., 2007. Introduction of Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation. (4th EDS), Jhon Wiley & Sons Ltd, West Sussex, England.

[155] Niessen., W.M.A., 2000. MS-MS and MSⁿ, dans Encyclopedia of Spectroscopy and spectrometry (Lindon J.C ., Tranter G.E., Holmes J.L. EDS) Academia Press, 1404- 1410.

[156] Quelles utilisations de la spectrométrie de masse de type Maldi-Tof en microbiologie médicale ? Rev Fr Lab. 416, 61-65.

[157] Cheillan, D., 2004. La spectrométrie de masse en tandem appliquée au dépistage néonatal des maladies héréditaires du métabolisme ; le point sur les méthodes actuelles. Ann Biol Clin, 62, 269-77.

- [158] Cheillan, D., 2004. La spectrométrie de masse en tandem appliquée au dépistage néonatal des maladies héréditaires du métabolisme ; le point sur les méthodes actuelles. Ann Biol Clin, 62, 269-77.
- [159] Vogeser, M., Parkhofer, K.G., et al, 2007. Liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS)-techniques and applications in endocrinology. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 115, 559-70.
- [160] Latifou, L., 2005. Etude phytochimique et activite biologique de substances naturelles isolees de plantes beninoises" universite louis pasteur strasbourg faculte de pharmacie.
- [161] Freeman, R., 1988. Molecular Smelictureby Two-DimensionaL NMR specirscopt J. Mol. Struct, 173, 17-30.
- [162] Ribéreau-Gayon, P, 1968. Les composés phénoliques des végétaux, Dunod Éd. Paris
- [163] Singleton,V.L., Rossi, J.A.J., 1965. Colorunetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. AJEV, 16, 144-58.
- [164] Topçu, G., Ay, A., Bilici, A., Sarıkürkcü, C., Öztürk, M., Ulubelen, 2007. A new from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. Food Chem., 103, 816- 822.
- [165] Yilmaz, M.A., Yener, I., Akdeniz, M., 2018. A comprehensive LC-MS/MS method validation for the quantitative investigation of 37 fingerprint phytochemicals in *Achillea* species: A detailed examination of *A. coarctata* and *A. monocephala*. J Pharm Biomed Anal., 154, 413-424.
- [166] Blois, M.S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable Free Radical Nature, 1958, 181, 1119- 1200.
- [167] Öztürk, M., Gülsen, T., Ozturk, F.A., Duru, M.E., 2014. The Cooking Effect on Two Edible Mushrooms in Anatolia: Fatty Acid Composition, Total Bioactive Compounds, antioxidant and Anticholinesterase Activities. Rec. Nat. Prod, 89-194.
- [168] Decker, E.A., Welch, B., 1990. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. J. Agric. Food Chem, 38, 674-677.
- [169] Apak, R., Guclu, K., Ozyurek, M., Karademir, S.E., 2004. Novel total antioxidant capacity index dietary polyphenols and vitamins C and E, Using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. J. Agric. Food Chem, 52, 7970-7981.
- [170] Decker, E.A.; Welch, B., 1990. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. J. Agric. Food Chem, 38, 674-677.
- [171] Biondi, D., Cianci, P.A., Geraci, C., Ruberto, G., 1993. Antimicrobial and chemical composition of essential oils from Sicilian aromatic plants. FLAVOUR FRAG J, 8, 331-337.

- [172] Ellman, G.L., Courtney, K.D, Andres, V., Featherston, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholiesterase activity. *Biochem Pharmacol*, 7, 88-95.
- [173] Rustin, P., Chretien, D., Bourgeron, T., Gerard, B., Rotig, A., Saudubray, J.M., Munnich., 1994. Biochemical and molecular investigations in resperatory chain deficiencies, *Clin.Chim.Acta*, 228, 35-51.
- [174] Zini, R., Morin, C., Bertelli, A., Bertelli, A. Tillement J. P., 1999. Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain. *Drugs Exp. Clin. Res*, 25, 87–97.
- [175] Marco, G.J., 1968. A rapid method for evaluation of antioxidants. *J Am Oil Chem Soc*, 45, 594-598.
- [176] Remila, S., Atmani-Kilani ., D., elemasure., S., Connat., J.L., Azib., L., Richard ., R., Atmani., D., 2015. Antioxidant, cytoprotective, anti-inflammatory and anticancer activities of Pistacia lentiscus (Anacardiaceae) leaf and fruit extracts. *Eur. J. Integr. Med.*xx-xx
- [177] Kassak, P., 2012. Secondary metabolites of the chosen Genus Iris species. *Acta Univ. Agric.et Silvic. Mendelianae Brun.* 8, 269-280.
- [178] Cai, Y.Z., Luo, Q., Mei, S., Corke, H., 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci.*, 74, 2157-2184.
- [179] Cavia-Saiz, M., Bustos, M.D., Pilar-Izquierdo, M.C., Ortega, N., Perez-Mateos, M., Muniz, P., 2010. Antioxidant properties, radical scavenging activity and biomolecule protection capacity of flavonoid naringenin and its glycoside naringin: a comparative study. *J. Sci. Food Agric.*, 90, 1238-1244.
- [180] Sandhar, H., Kumar, B., Prasher, S., Tiwari, P., Salhan, M., Sharma, P.A., 2011. Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *IPS*, 1, 25-41.
- [181] Rauha, JP., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kähkönen, M., Kujala, T., Pihlaja, K., Vuorela, H., Vuorela, P., 2000. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int. J. Food Microbiol.*, 56, 3-12.
- [182] Dominik, S., 2015. Anticholinesterase activity of selected phenolic acids and flavonoids – interaction testing in model solutions. *AAEM*, 22, 690-694.
- [183] Boyd, M.R., 1997. The NCI in vitro anticancer drug discovery screen: concept, implementation, and operation, in: Teicher, B.A. (ED.), *Anticancer Drug Development Guid: Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval*, Human Press Totowa, NJ, pp. 23-42.

Contribution à l'enquête ethnobotanique

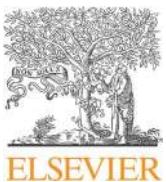
Préambule

La médecine traditionnelle a connue un regain d'intérêt et d'attention dans le monde entier et en particulier dans les pays en voie de développement. Selon l'OMS, près de 80 % des pays en voie de développement dans le continent africain se réfèrent aux pratiques traditionnelles pour se soigner. En effet ces différents savoirs sont transmis oralement de génération en génération par des praticiens traditionnels et constituent un patrimoine important d'où l'utilité des enquêtes ethnobotaniques qui sont considérées comme un outil de sauvegarde de ces savoirs. L'approche ethnobotanique, se définit donc comme étant une discipline permettant le recensement des usages traditionnels des plantes médicinales en constituant une base de données qui les documentent, bien que ces pratiques traditionnelles sont très anciennes en Algérie, les études ethnobotaniques demeurent minimes et ne sont réalisées que dans quelques régions telles que le sahara central, le nord-est et l'ouest ainsi que la partie centrale du nord alors qu'elles sont presque absentes dans d'autres régions.

C'est dans ce contexte que nous avons choisi comme zone d'étude les deux villes de Constantine et Mila où la phytothérapie est très sollicitée et aucune enquête n'a été réalisé. Pour cela, un interview a été accompli auprès de 45 herboristes et 35 personnes de la population locale âgés de 60 ans et plus, la première partie du questionnaire été consacré aux informations sur la personne interrogée, par ailleurs la deuxième partie renfermait des informations sur les plantes (nom vernaculaire et partie utilisée, méthode de préparation, effets thérapeutiques). Les données regroupées ont été analysées par des indices quantitative: Facteur de la fréquence de citation (RFC), valeur d'utilisation (UV), facteur de consensus des informateurs (ICF), ainsi que le facteur de niveau de fidélité (Fl) qui permet d'indiquer la fréquence de l'utilisation des espèces végétales pour une catégorie de maladie particulière. Les résultats avaient montré que 102 plantes ont été citées appartenant à 90 genres distribuées à travers 53 familles dont les plus citées sont: Lamiaceae (30%), Apiaceae (13%) et Asteraceae (10%). Par comparaison aux autres régions de l'Algérie et le bassin méditerranéen aussi, de nouvelles espèces ainsi que de nouvelles utilisations thérapeutiques ont été recensées répartis sur 14 catégories de maladie enregistrées. Cependant, les valeurs de RFC et d'UV les plus élevées ont été enregistrés pour *Origanum glandulosum* Desf , alors que la valeur de Fl la plus élevée été enregistré par *Tilia Cordata* Mill (100%) suivit par *Artemisia herba alba* Asso (95.74%) pour le traitement des troubles digestifs. En outre cette étude a permis de démontrée

les parties de plantes les plus utilisées qui étaient les feuilles (55%) suivies des fleurs (29%) puis les graines (22%), pour les modes de préparation les plus fréquents nous citons, l'infusion (72%), la décoction (45%) et enfin le cataplasme (13%).

Cette étude a montré que les habitants de la zone d'étude avaient des connaissances importantes sur l'utilisation des plantes ce qui constitue une source d'information permettant de créer des bases de données répertoriant ces différentes informations, c'est ainsi que la mise en œuvre des études ethnobotaniques représente un cadre de référence idéale pour la sauvegarde de cet héritage qui permet la valorisation de ces ressources naturelles qui peuvent servir d'autres discipline telle que: la pharmacie, la médecine, la biologie et la chimie.



Ethnobotanical investigations on plants used in folk medicine in the regions of Constantine and Mila (North-East of Algeria)



Rayene Ouelbani ¹, Souheir Bensari ¹, Toma Nardjes Mouas ^{1,*}, Douadi Khelifi ^{1,*}

Laboratory of Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales GBBV, Faculty of Nature and Life Sciences, University Frères Mentouri Constantine 1, Algeria

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 May 2016

Received in revised form

1 August 2016

Accepted 12 August 2016

Available online 31 August 2016

Keywords:

Medicinal plants

Mediterranean ethnomedicine

Constantine

Mila

Quantitative indices

Chemical compounds studied in this article:

Rhoeagenine (PubChem CID: 609840)
Isorhoeagin (PubChem CID: 12304371)
Chrysin (PubChem CID: 5281607)
Vitexin (PubChem CID: 5280441)
Isovitexin (PubChem CID: 25202038)
Kaempferol (PubChem CID: 5280863)
Harman (PubChem CID: 5281404)
Harmine (PubChem CID: 5280953)
Harmaline (PubChem CID: 5280951)
Palmitic Acid (PubChem CID: 985)
Apigenin (PubChem CID: 5280443)
Myristic Acid (PubChem CID: 11005)
Hordatines A (PubChem CID: 45485025)
Hordatines B (PubChem CID: 7219363)
Aloe-emodin (PubChem CID: 10207)
Emodin (PubChem CID: 3220)
Chrysophanol (PubChem CID: 10208)
Physcion (PubChem CID: 10639)
Germacrene D (PubChem CID: 5317570)
Germacrene A (PubChem CID: 9548705)
Eudesm-11-en-4a-ol (PubChem CID: 91747515)
Neoline (PubChem CID: 120682)
Sembusine A (PubChem CID: 100930481)
Ursolic acid (PubChem CID: 64945)
Oleanolic acid (PubChem CID: 10494)
Chlorogenic acid (PubChem CID: 1794427)
Syringic acid (PubChem CID: 10742)
2-Nonanone (PubChem CID: 13187)
2-Undecanone (PubChem CID: 8163)
1-methyl-4-methoxy-2-quinolone

ABSTRACT

Ethno-pharmacological relevance: Constantine and Mila regions have been investigated in an ethnobotanical study for the first time. A total of 102 medicinal plants have been cited to treat human ailments. Twenty-eight new species of 31 common plants with 151 new therapeutic applications and 12 new cited species including one endemic specie *Zygophyllum cornutum* Coss were found as compared to other Algerian regions. In addition, to the best of our knowledge, 369 new medicinal uses of 75 known plants, were reported for the first time in the Mediterranean basin.

Aim of the study: This study is aimed at contributing to safeguard world cultural heritage and document ethnomedicinal uses of plants in Algeria and the Mediterranean basin; data on the national and global uses in the world were obtained to extract new potential species for further phytochemical and clinical investigations.

Materials and methods: The survey was carried out in two cities in the northeast of Algeria: Constantine and Mila. It was based on semi-structured interviews of 79 local informants. Data were analyzed using quantitative indices, namely, informant consensus factor, fidelity level (FL), use value (UV), and relative frequency citation (RFC), to evaluate the reliability and richness of herbal knowledge in the region.

Results: The interviewed persons used 102 plant species belonging to 90 genera and distributed among 53 families, represented mainly by Lamiaceae, Apiaceae, and Asteraceae (30%, 13%, and 10%, respectively), which were used to treat 14 ailment categories. The category of most frequent ailments (16%) was digestive disorders (diarrhea, constipation, and stomach bloating). The highest RFC was found for *Origanum glandulosum* Desf. With regard to the fidelity level, a higher FL was found for *Tilia cordata* Mill. (100%), followed by *Artemisia herba alba* Asso. with an FL of 95.74% and *Punica granatum* L. with an FL of 93.09% to treat gastrointestinal system diseases, and *Aloe* sp. L. with an FL of 96.67% for skin diseases. The highest UV was found for *Origanum glandulosum* Desf. (2.280). Moreover, new medicinal uses were recorded for the first time in Algeria and Mediterranean regions.

Conclusion: The present study has highlighted the rich herbal knowledge about newfound medicinal plants and their new uses in the Mediterranean region, which could be useful not only in facilitating other studies such as phytochemical and pharmacological investigations and upgrading the sources of biomolecules beneficial to people but also in reopening discussion on pharmacovigilance in herbal medicine as an imperative requirement for local authorities.

© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

* Corresponding authors.

E-mail addresses: rayene.ouelbani@gmail.com (R. Ouelbani), souheir.ben@gmail.com (S. Bensari), mouas_nardjes@yahoo.fr (T.N. Mouas), Dkhelifi@yahoo.fr (D. Khelifi).

¹ All authors contributed equally.

(PubChem CID: 182073)
Daphnoretin (PubChem CID: 5281406)
Isoadiantone (PubChem CID: 3041569)
Linalool (PubChem CID: 6549)
Neryl acetate (PubChem CID: 1549025)
Capric acid (PubChem CID: 2969)
Undecyl alcohol (PubChem CID: 8184)
Tridecanoic acid (PubChem CID: 12530)
Coriandrin (PubChem CID: 119586)
Dihydrocoriandrin (PubChem CID:
14134312)
Coriandrone A (PubChem CID: 15126295)
Coriandrone B (PubChem CID: 15126296)
Coriandrone C (PubChem CID: 101995280)
Coriandrone D (PubChem CID: 101995281)
Coriandrone E (PubChem CID: 101995282)
Caffeic acid (PubChem CID: 689043)
Glycitin (PubChem CID: 187808)
Limonene (PubChem CID: 22311)

p-Cymen-8-ol (PubChem CID: 14529)
Terpinen-4-ol (PubChem CID: 11230)
cis-Calamenene (PubChem CID: 6429077)
trans-Bejarol (PubChem CID: 6429169)
cis-Bejarol (PubChem CID: 6429172)
Quercetin (PubChem CID: 5280343)
Kaempferol (PubChem CID: 5280863)
Betanin (PubChem CID: 11953901)
Luteolin (PubChem CID: 5280445)
Apigenin (PubChem CID: 5280443)
Colchicine (PubChem CID: 6167)
Cosmosiin (PubChem CID: 5280704)
Hypolaetin-8-glucoside (PubChem CID:
5318255)
p-Coumaric acid (PubChem CID: 637542)
Saffranal (PubChem CID: 61041)
Dihydroeugenol (PubChem CID: 17739)
Thymoquinone (PubChem CID: 10281)
Eugenol (PubChem CID: 3314)
Thymol (PubChem CID: 6989)
Carvacrol (PubChem CID: 10364)
Cinnamtannin B1 (PubChem CID: 475277)
 α -Pinene (PubChem CID: 6654)
Paclitaxel (PubChem CID: 36314)

1. Introduction

Over the centuries, human traditions have developed the knowledge and use of medicinal plants (Fakchich and Elachouri, 2014). Presently, and despite the progress achieved in medicine, the majority of population, especially in developing countries, refer to herbal traditional practices to cure themselves, but this knowledge that belongs essentially to traditional practitioners is still transmitted orally (Baba Aissa, 1991; Boudjelal et al., 2013); thus, this herbal traditional practice is at risk of disappearing without being safeguarded (Boudjelal et al., 2013; Magwedé et al., 2014; Benarba et al., 2015). Ethnobotany is defined as the study of relationships between humans and plants; several active compounds used in modern medicine are derived from ethnobotanical information, which is mostly based on popular and traditional medicinal knowledge (Boudjelal et al., 2013). In Algeria, several ethnopharmacological surveys were recently carried out in some areas such as the central Sahara and central part of the North and Northwest Algeria (Gonzalez-Tejero et al., 2008; Hammiche and Maiza, 2006; Boudjelal et al., 2013; Sarri et al., 2014; Benarba et al., 2015), while such surveys are almost or completely lacking in other regions. In this context, we have chosen as a study area the two cities of Constantine and Mila, which in our knowledge have never been ethnobotanically explored. Traditional herbal medicine in both cities is much used by the population who believes in their efficacy or do not have enough money to afford modern medicine, or it is simply that they prefer this kind of soft medicine with less side effects. Moreover, these traditional practices in Algeria are very ancient, and historically, Algeria and in particular the two cities of Constantine and Mila were in

contact with many civilizations (Berber, Greco-Roman, Arab, Ottoman, and French), where the use of plants was by nature essential and of prime necessity for maintaining health. Such use allowed the development of the knowledge of medicinal plants through ideas inherited from antiquity. Travelers also have been significantly involved in the transfer of knowledge owing to the contact between the Mediterranean countries and those of the Far East. Therefore, the documentation of traditional use of medicinal plants (Benarba et al., 2015) in a region contributes in one part to the knowledge of plant biodiversity and in the second part to using this knowledge for other social and scientific interventions. The aim of this study was also to document ethnomedicinal uses of plants in the region for several purposes: establish the actual herbal knowledge in the region, safeguard cultural heritage as recognized by the UNESCO in 2003 (Pieroni et al., 2006), and analyze ethnobotanical information using quantitative indices of informant consensus factor (ICF), fidelity level (FL), use value (UV), and relative frequency citation (RFC), and then compare all these data with those of other Mediterranean regions to enrich databases and to exploit them for further scientific and social investigations.

2. Materials and methods

2.1. Interview

The survey was conducted on 45 herbalists and 34 persons from the local population (60 years old and above) belonging to the two cities. Informants were made aware of the scope of the study and

prior informed consent was requested verbally (Rosenthal, 2006). The interview was conducted without time limit or pressure to allow the informants to answer questions naturally (Akerreta et al., 2007), following the ISE code of ethics (www.ethnobiology.net/ethics.php). This work was performed using a pre-prepared questionnaire on papers, in which the first part was dedicated to personal information: gender, age, educational level (primary, secondary, academic), while the second one gathered information concerning medicinal plants such as vernacular name (dialectal Arabic or Tamazight or literary Arabic), the parts used, preparation method, and therapeutic uses by asking them the following questions:

- Which plant do you know, use, or have used for medicinal purposes?
- How do you use these plants (plant part, preparation, mode of administration)?
- Where did you get the plant?
- What is, in your opinion, the efficacy of these plants?
- Did this plant have side effects?

The language used during the interview was Arabic or French, depending on the educational and cultural level of the interrogated person. With regard to the place, people from the local population were interviewed at their homes and the herbalist at their local places.

The survey conducted on medicinal uses was valid only if the same plant was cited at least three times by different persons independently (Al-Qura'n, 2009; Boudjelal et al., 2013).

The recorded specimens were showed to herbalists and then identified by experimenting botanists in our laboratory, where vouchers were deposited (Table 2).

For identification and recording botanical taxa (scientific, vernacular common names, and synonyms), we used these books as standard botanical references on Algerian flora:

- Flore de l'Algérie, Ancienne Flore d'Alger Transformée* (Battandier and Trabut, 1888, 1893).
- Index Synonymique et Bibliographique de la Flore d'Afrique du Nord* (Dobignard and Chatelain, 2010, 2011, 2012).

- *Les Plantes Médicinales en Algérie* (Kaddem, 1990).
- *Medicinal Plants in Algeria* (Baba Aissa, 1991).
- *Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales* (Quezel and Santa, 1962–1963).

We also used the online database WWW.theplantlist.org for checking the scientific names and synonyms of plants.

2.2. Study area

Constantine city is situated in the high plateau in the northeast of Algeria at 637 m altitude (Fig. 1) between the coast and Sahara oasis; it covers a surface area of 22.970 ha that is partitioned into 12 sectors. Situated at 87 km off the Mediterranean coast, the city enjoys a continental climate: cold and humid in winter and hot and dry in summer. It is an important crossroad, linking the high plateau to the coast (www.andi.dz/PDF/monographies/Constantine.pdf). Mila city is close to Constantine at a distance of only 50 km; it is a natural continuation of the Constantine region domain (Fig. 1) at 464 m of altitude and 33 km from the Mediterranean Sea. It is also in the eastern part of the Atlas Tell. It is governed by three microclimates: humid in northern mountain reliefs and median part, semi-dry to sub-humid in the median part of the wilaya, and semi-dry in the high plains (www.andi.dz/PDF/monographies/Mila.pdf). These two cities are characterized by a very varied flora, which attracted the early attention of botanists such as Hebenstreit, Poiret, and Shaw (Andrien, 2013). But it is post the French occupation that the flora was studied in details by Bové (1837), Durrieu de Maisonneuve (1842), Battandier and Trabut (1888), Maire (1958) and Quezel and Santa (1962), leaving us with the first specialized works that are being used as botanical references to date. On the basis of this, more than 218 species of different vegetable families such as Liliaceae, Labieae, Rosaceae, and Oléaceae have been counted, including four endemic species for Constantine (*Silene cirtensis*, *Crepis patula*, *Bellevalia mauritanica*, and *Iris unguicularis*) and one species for Mila (*Erodium cheilanthisfoli*) (Quezel and Santa, 1962–1963). On the territory of the two wilayas, there is an important area of forests that covers 13% of the total surface area (27,566 ha) of Constantine and 9.68% of

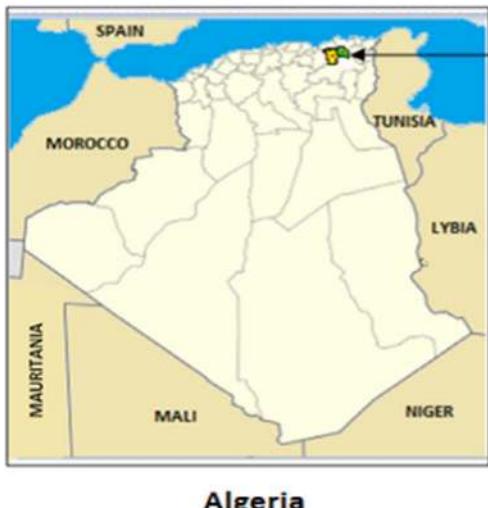


Fig. 1. Location of the two study areas (Constantine and Mila, Northeast Algeria).

the total surface area (36.674, 7 ha) of Mila. These two forest heritages contain varied species: pine of Aleppo (*Pinus halepensis* Mill.), Eucalyptus (*Eucalyptus* sp.), Cork oak (*Quercus suber* L.), and Holm oak (*Quercus ilex* L.) as well as the species introduced such as *Pinus nigra* sp., *Eucalyptus globulus*, and *Cupressus arizonica*.

The two areas studied possess remarkable economic potentialities: agriculture with a predominance of cereal culture; the rest is partitioned between feeds, dried vegetables, and arboriculture, supported by considerable water resources: pluviometry reaching up to 506 mm to 1067 mm/year (<http://climate-data.org/>). This water potential was strengthened by the building of the Beni-Hroun's dam in Mila's wilaya. These two cities also benefit from important mechanical, construction material, food processing, and pharmaceutical industries as well as breeding and animal production. With regard to tourist potential, these cities are linked to archeological, historical, and cultural heritage: numidian graves, roman ruins, ottoman castles and mosques, and traditional thermal springs with considerable therapeutic virtues – Tleghma and Beni haroun hammam, Rhumel's gorges (www.interieur.gov.dz).

2.3. Data analysis

The recorded data were transferred in our own internally prepared database using common software (Excel) and then analyzed and compared with several national and international ethnopharmacological references (articles, books, reviews in electronic databases: Science Direct, PubMed, and Google Scholar) to extract similarities, differences, and new uses of unknown or famous medicinal plants. The calculation of the following quantitative indices was very helpful for interpreting this entire information.

2.3.1. Informant consensus factor (ICF)

ICF is calculated with the following formula (Trotter and Logan, 1986; Heinrich et al., 1998):

$$\text{ICF} = (N_{ur} - N_t)/(N_{ur} - 1),$$

where N_{ur} refers to the total number of use reports for each ailment category and N_t is the number of taxa used in that category. This value indicates the extent of homogeneity in the information between the informants. ICF values will be low (near 0) if plants are chosen randomly or if informants do not exchange information about their use. The values will be high (close to 1) if there is a well-defined selection criterion in the community and/or if information is exchanged between informants.

2.3.2. Fidelity level (FL)

FL index was calculated using the following formula (Friedman et al., 1986):

$$\text{Fl}(\%) = (N_p/N \times 100),$$

where N_p refers to the number of informants citing the use of the plant for a particular ailment category and N is the total number of informants citing the plant for any ailment category. A high FL value indicates high frequency of use of the plant species for treating a particular ailment category by the informants of the studied area. It is interesting to determine the most ideal species used in the treatment of a specific ailment category (Musa et al., 2011).

2.3.3. Frequency citation (FC) and relative frequency citation (RFC)

The FC was obtained using the following formula: $\text{FC} = (\text{Number of times a particular species was mentioned})/\text{total number of times that all species were mentioned}) \times 100$ (Tahira et al., 2015); it is used for a better relative expression of citations. The RFC was

calculated by the following formula:

$$\text{RFC} = \text{FC}/N (0 < \text{RFC} < 1).$$

This index is obtained by dividing the number of informants mentioning a useful species FC or frequency of citation by the total number of informants in the survey (N) without bearing in mind the used categories (Vitalini et al., 2013).

2.3.4. Use-value (UV)

UV was calculated according to the following formula (Musa et al., 2011):

$$\text{UV} = \Sigma U/n,$$

where U is the number of used reports cited by each informant for a given plant species and n is the total number of informants interviewed for a given plant. It demonstrates the relative importance of plants known locally. The relative importance of each species that the informants provided information for is also called cultural importance index (Pardo de Santayana et al., 2007).

Note. The RFC, FC, Fl, and UV were calculated for the most cited plant.

3. Results and discussion

3.1. Demographic characteristics of informants

The demographic data are reported in Table 1.

Seventy-nine informants were interviewed and divided into six different age groups (30–40, 41–50, 51–60, 61–70, 71–80, and 81–90 years), including 45 herbalists and 34 persons belonging to the local population (family and acquaintances 60 years old and above).

For the majority of women in the local population (91%), the age range of 61–70 (56%) with an average age of 65.5 years was the most dominantly represented. For herbalists, the most dominant age range was "30–40" with the average age being 35 years.

Comparing these two dominant average ages in the present study with the ages in other Mediterranean studies, it was found that in the local population, 65.5 years is close to the average age observed in the European areas (Cyprus, 63; Italy, 63; Spain, 65; Albania, 68) and nearly close to those in Morocco and Egypt of 55 and 50, respectively (Gonzalez-Tejero et al., 2008); in the majority of the men among herbalists (93%), 35 years was the lowest, compared with the ages in all the Mediterranean countries. This could indicate that the herbal heritage in the two cities can be better conserved in the future with this young educated

Table 1

Demographic features of the informants and number of cited medicinal plants by age group and educational level.

	Number of informants		Number of cited plants
	Herbalists	Local people	
Total			102
Age years			
30–40	45	34	
41–50	24		68
51–60	7		84
61–70	8		89
71–80	6	19	66
81–90		12	40
		3	12
Educational level			
Primary	6		
Secondary	30		87
Academic	9		82
			79

generation, and it could be transferred from the local population to the young herbalists.

3.2. Medicinal plant diversity

A total of 102 plants species and 90 genera distributed over 53 families were cited as having therapeutic properties ([Supplementary material](#)), especially Lamiaceae, Apiaceae, and Asteraceae (30%, 13%, and 11%, respectively) ([Fig. 2](#)). This could be due to the high content of phenolic and flavonoid compounds responsible for antioxidant activity in Lamiaceae, Asteraceae, and Apiaceae (Miliauskasa et al., 2004; Khled Khoudjaa et al., 2014; Maulidiani et al., 2014; Brahmi et al., 2015; Martinsa et al., 2016). The reported species belonged to herbs (51%), shrubs (25%), trees (13%), under shrubs (4%), small bushes, and climbers (2%); similar results in Pakistan reported that the most frequent habitat was herbs and shrubs (Ghulam et al., 2015). However, in Qatar, the most frequent habitat was herbs and trees (Prakash et al., 2015); these similarities or differences are explained by the nature of the flora, the climate, and mostly the geographic position of these countries. The diversity of medicinal plants reported in our study and that of Mascara (141 plants) (Benarba et al., 2015) could be considered important compared with the other studies carried out in Algeria, such as the study of the Tassili N'Ajjer (80 plants) (Hammiche and Maiza, 2015) and the region of M'sila (58 plants) (Boudjelal et al., 2013), whereas this diversity was lower than the diversity found in the surveys of some Mediterranean countries: 335 plants (Spain) (Parada et al., 2009), 224 plants (Spain) (Benitez et al., 2010), 222 plants (Turkey) (Güzel et al., 2015), 148 plants (Morocco) (Fakchich and Elachouri, 2014), and 121 plants (Balearic Islands) (Carrió and Vallès, 2012). This difference could be explained by the expanse of the studied area, soil nature, climate, or a difference in survey methodology. The dominance of botanical families was close to the dominance found in the Algerian (Boudjelal et al., 2013; Benarba et al., 2015; Hammiche and Maiza, 2015) and Mediterranean studies (Gonzalez-Tejero et al., 2008; Benitez et al., 2010; Fakchich and Elachouri, 2014; Tuttolomondo et al., 2014a, 2014b).

All the recorded species have the same vernacular name in all the municipalities of Constantine and Mila. This indicates a great homogeneity of vernacular nomenclature in the region, which represent the first and the most important aspect of the safe use of herbal medicine, i.e., to have the same identification of the plant everywhere.

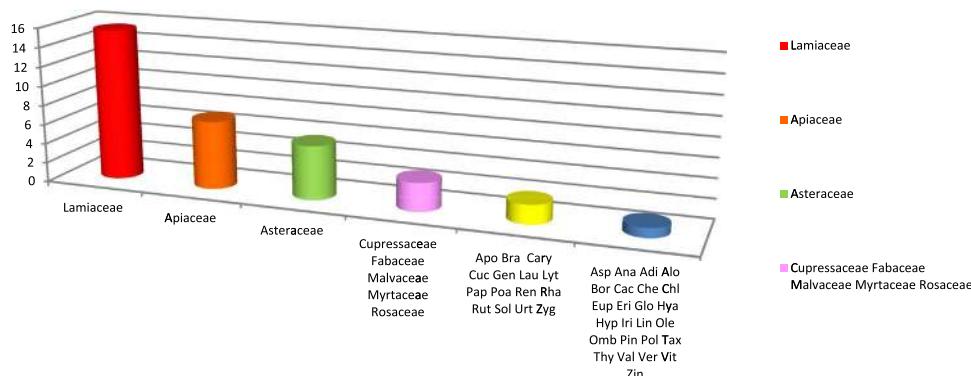


Fig. 2. Botanical families of the medicinal plants. Apo: Apocynaceae, Bra: Brasicaceae, Cary: Caryophyllaceae, Cuc: Cucurbitaceae, Gen: Gentianaceae, Lau: Lauraceae, Lyt: Lythraceae, Pap: Papaveraceae, Poa: Poaceae, Ren: Renonculaceae, Rha: Rhamnaceae, Rut: Rutaceae, Sol: Solanaceae, Urt: Urticaceae, Zyg: Zygophyllaceae. Asp: Asphodelaceae, Ana: Anacardiaceae, Adi: Adianthaceae, Alo: Aloaceae, Bor: Boraginaceae, Cac: Cactaceae, Che: Chenopodiaceae, Chl: Cholchicaceae, Eup: Euphorbiaceae, Eri: Eriaceae, Glo: Globulariaceae, Hy: Hyacinthaceae, Hyp: Hypoestaceae, Iri: Iridaceae, Lin: Linaceae, Ole: Oleaceae, Omb: Ombellifères, Pin: Pinaceae, Pol: Polygonaceae, Tax: Taxaceae, Thy: Thymeleaceae, Val: Valerianaceae, Ver: Verbenaceae, Vit: Vitaceae, Zin: Zingiberaceae.

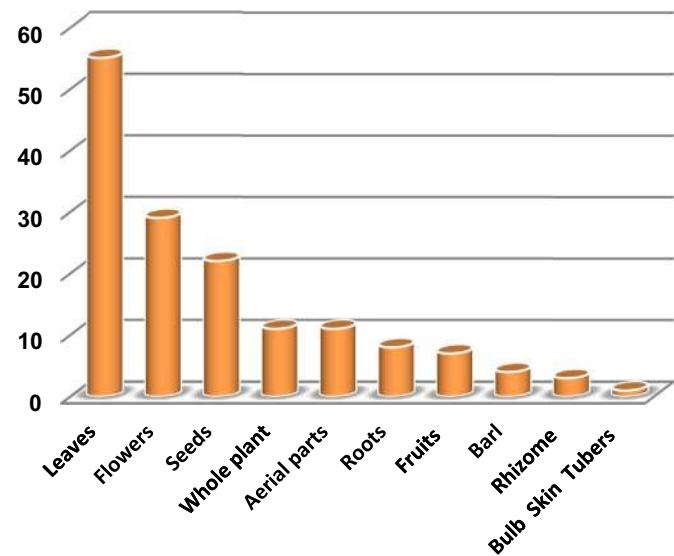


Fig. 3. Plant parts used by informants for medicinal purposes.

■ Infusion ■ Decoction ■ Poultice ■ Maceration ■ Oil

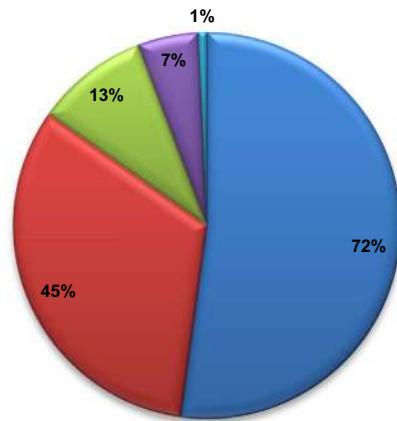


Fig. 4. Methods of herbal medicinal preparation used by the informants.

3.3. Parts of medicinal plants used

Data on different plant parts used in traditional medicine are indicated in [Fig. 3](#). Those that are used the most are leaves (55%),

Table 2

New medicinal plants cited for the first time by Algerian herbalists and population compared with regional and global regions.

Family, plant name,	Vernacular and/or voucher specimen codes.	Arabic name	Used parts	Preparation method	Toxicity from the present study	Medicinal uses	Use value	Active compounds	References
Adiantaceae <i>Adiantum capillus Veneris L.</i>	الرجافة : Al rajeyfa : (GBBV PH/ 001)		L	I		Ulcer, urinary system diseases.	0.6	Isoadiantone isoadiantol-B 3amethoxy-4-hydroxyfilicane 3a-hydroxy,4-methoxy Filicane filicane derivative Quercetin-3-O-b-D-glucoside	Zedan et al. (2011)
Apiaceae <i>Coriandrum sativum L.</i>	Kousbour: كوسبر (GBBV PH/ 002)		S	D/I		Menstruation, rheumatism, anemia, appetite, digestive disorders, cardiovascular problems vertigo, migraine, cough, anti-inflammatory, urinary system diseases, tranquilizer wounds, antispasmodic, atherosclerosis.	1.389	Linalool, neryl acetate γ -terpinene, α -pinene, geranyl acetate. Aromatic acids (decenoic acid E-11-tetradecenoic acid, capric acid undecyl alcohol, tridecanoic acid, and undecanoic acid) Isocoumarins (coriandrin and dihydrocoriandrin coriandrone A and B, coriandrones C, D, and E) Polyphenolics (Caffeic acid, protocatechinic acid, and glycitin)	Asgarpanah and Kazemivash (2012)
Apocynaceae <i>Vinca major L.</i>	Anakiya kabira : عائقية كبيرة (GBBV PH/ 003)		L/FI	I		Cardiovascular diseases.	1	Alkaloids : (10 Methoxyraucaffrinoline, 11 Methoxyburnamin), saponins, , phenolic compounds, carbohydrates and sterols.	Boga et al. (2011)
Asteraceae <i>Dittrichia viscosa</i> , (L.) Greuter (GBBV pH/ 004)	Magramen: مقرامن		L/FI	I/C			1.276	Limonene, Linalool, p-Cymen-8-ol, terpinen-4-ol, p-Mentha-1(7),2-dien-8-ol, cis Calamenene, trans-Bejarol, cis-Bejarol-	Blanc et al. (2005)
Brassicaceae <i>Arctium atlanticum</i> (Pomel) H.Lindb.	Arkatyoun : اركطيون		R/L	I/D		Externally: anti-hair fall. Internally: purification, hypoglycemic activate the sweat gland antibiotic, digestive disorders dermatological diseases.	1.368		
Boraginaceae <i>Pulmonaria officinalis L.</i>	Riawiya makhzenia : مخزنية رنوة (GBBV PH/ 006)		Fl/L/R	I		Hypoglycemic, respiratory system diseases.	1.3	Quercetin, Kaempferol	Malinowska (2013)
Cactaceae <i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) (Mill.)	Al hendi : الهندي (GBBV PH/ 007)		Fl	I		Respiratory system diseases, hemorrhoids.	0.956	Betanin, indicaxanthin, polyphenols, flavonols .	Daniella et al. (2002)

Table 2 (continued)

Family, plant name,	Vernacular and/or الاسماء العلمية	Used	Preparation	Toxicity	Medicinal uses	Use value	Active compounds	References
							Isorhamnetin 3-O-(600-O-E feruloyl), neohesperidoside, (6R)-9,10-dihydroxy- 4,7-megastigmadien megastigmadien-3-one-9-O- b-D glucopyranoside b-D Glucopyranoside. (6S)-9,10-dihydroxy-4,7 megastigmadien	Muhammad et al. (2006)
Caryophyllaceae								
<i>Spergularia rubra</i> (L.) J. Presl & C. Presl. (GBBV PH/ 008)	Bsat al moulouk: بساط المولوك	Fl	I/M		Diuretic and kidney pains, stones, liver, cholesterol.	1.029	Luteolin, apigenin, chrysoeriol derivatives, 7-O-glycosyl-6, 8-diC glycosyl flavone. 6,8-diC-glycosyl flavones. 2"-O-glycosyl-6-C-glycosyl flavone	Federico et al. (2011)
<i>Saponaria officinalis</i> L. (L.) J. Presl & C. Presl. (GBBV pH/ 009)	Sabounia makhzenia : صابونية مخزنية	L/R	I/C		Skin diseases.	1	Triterpenoid saponins (saponariosides).	Zhonghua et al. (1999)
<i>Colchicum autumnale</i> auct. Lib (GBBV PH/ 010)	Sourenjen al khareef/ الشمعة/الشميري	AER. P.	I	Tox.	Stomachache, tranquilizer, ocular inflammation	1	Alkaloids colchicine and colchicoside	Poutaraud and Girardin. (2002)
Cupressaceae								
<i>Cupressus sempervirens</i> L. (GBBV PH/ 011)	Sarou: صرو	Fl	I/D		Burns and wounds, digestive disorders, respiratory system diseases, articular system diseases, diuretic, gynecological diseases, cardiovascular diseases.	1.143	Cosmosiin, caffeic acid, and p-coumaric acid ,	Nabaweya et al. (2007)
Gentianaceae								
<i>Gentiana lutea</i> L. (GBBV PH/ 012)	Jantiana safra: جانبانا صفراء	S/Fl/L	I		Digestive disorders, sexual tonic appetite, rheumatism dermatological problems	0.805	Xanthone glycosides (7 hydroxy –3-methoxy- 1-O primeverosyl xanthone and 1 hydroxy-3-methoxy-7-O primeverosylxanthone Triterpenoids(2,3-seee-3 oxours-12-en-2-oic acid, , 2,3-seco and betulin3-O-palmitat)	Hayashi and Yamagishi (1988) Yoshitaka et al. (2003)
Hyacinthaceae								
<i>Urginea/ Drimia maritima</i> (L.) Stearn (GBBV PH/ 013)	Ansel: عنصل	Bu/R	I	TOX.	Rheumatism, kidney inflammation tumors, ulcer, influenza, diuretic, cardiovascular diseases	1.111	Bufadienolides dihydroquercetin-4' monoglucosideide quercetin-3 monoglucoside	Masaru et al. (2001) Fernandez et al. (1971)
Iridaceae								
<i>Crocus sativus</i> L. (GBBV PH/ 014)	Zaafran zirai زعفران زراغي:	Fl			Immune system, tonic ocular affections gynecological diseases, insomnia and tranquilizer stomachache	1.286	Crocin and Safranal	Hossein et al. (2007)
Lamiaceae								
<i>Melissa officinalis</i> L. (GBBV PH/ 015)	Al milissa: الملمسا	L	I		Digestive disorders, neurological disorders,	1.4	Total polyphenol, total flavonoid, and terpenoides	Carnat et al. (1998)

<i>Mentha viridis</i> (L.) L. (GBBV PH/ 016)	Naanaa: نعناع	L	I/D	respiratory system diseases, urinary system diseases, osteoarthritis and rheumatism, cardiovascular diseases, sunstroke, migraine, throat pain headache, antispasmodic wounds and acne	1.41	β-myrcene, γ -terpinene, linalool, dihydroeugenol.	Mounira et al. (2009)
<i>Origanum vulgare</i> L. (GBBV PH/ 017)	Zaatar: زعتر	L		Digestive disorders, respiratory . system diseases, antibiotic, analgesic, immune system, diuretic, cardiovascular diseases, gum.		Thymoquinonec, Eugenol, Thymol, Carvacrol	Milos et al. (2000)
Lauraceae							
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume (GBBV PH/ 018)	Al karfa: القرفة	Ba	I	Menstruations.	1	(E)-Cinnamaldehyde, Benzaldehyde (E)-Cinnamyl acetate, Limonene, Eugenol, a-Pinene	Mehmet et al. (2010)
Papaveraceae							
<i>Papaver rhoeas</i> L. (010_44)	Khashkhash manthour: خشخاش مثمر	L	D	Tranquillizer for children and el- derly, burns, antibacterial, uricemia, respiratory system diseases, bladder,	1.256	Rhoeagenine, Isorhoeadine	Rey et al. (1992)
Passifloraceae							
<i>Passiflora incarnata</i> L. (GBBV PH/ 019)	Nouar al saa: نوار الساعة	L	D	Tranquillizer.	1.099	C – glycosidic flavonoids Chrysin , Vitexin, Isovitexin , Kaempferol Harman Harmine, Harmaline; Palmitic Acid, ; Apigen- in; Myristic Acid	Qimin et al. (1991) Miroddi et al. (2013)
Poaceae							
<i>Elymus repens</i>	Al qazmeer : القزمير	Rh	I	Digestive disorders, diuretic and kidney stones.	0.996		
(GBBV PH/ 020)							
Polygonaceae							
<i>Rheum palmatum</i> L. (GBBV PH/ 021)	Rawend kefi : راوند كفيف	AER. P.	I/D	Digestive disorders, cancer, appetite, dermatological problems, men- struation pain antibiotic,	1, 006	Aloe-emodin, Emodin, Chrysophanol, Physcion	Wang et al. (2016)
Ranunculaceae							
<i>Aconitum napellus</i> L. (GBBV PH/ 022)	Al bish : البيش	R/Wh. P.	D	Tox.	1.023	neoline, napelline, isotalatizidine, karakoline senbusine A, senbusine C, aconitine, taurenine	Kiss et al. (2013)
Rosaceae							
<i>Crataegus oxyacantha</i> L. (GBBV PH/ 023)	Al zaarour al shaek : الزارور الشاءك	Fl/L	I	Cardiovascular diseases, insomnia, vertigo, cholesterol regulation and hy- poglycemic, diuretic.	1.300	Heptahydroxyflavan glycoside procyanidins Ursolic acid, Oleanolic acid	Bersin et al. (1955) Bilia et al. (2007) Verma et al. (2007)

Table 2 (continued)

Family, plant name,	Vernacular and/or Arabic name	Used	Preparation	Toxicity	Medicinal uses	Use value	Active compounds	References
Ruscaceae								
<i>Ruscus aculeatus</i> L. (GBBV PH/ 024)	As beri shaek: اس بري شاڪ	Fl/L	I/D		Urinary system, digestive disorders, cardiovascular diseases, antispasmodic, sinusitis, psoriasis.	1.016	1-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 2)-6-O-acetyl- <i>b</i> -D-galactopyranosylx- $1\beta,3\beta,22j,26$ -tetrahydroxy-furost-5(6)-en-26-O- <i>b</i> -D-glucopyranoside	Combarieu et al. (2002)
Scrophulariaceae								
^a <i>Digitalis lanata</i> Ehrh. (GBBV PH/ 025)	Koumia sofia: قمعية صوفية	S/L	I	Tox.	Antispasmodic, wounds, stones, flatulence.	0.542	cardiac glycosides	Pellati et al. (2009)
Solanaceae								
<i>Atropa belladonna</i> L. (GBBV PH/ 026)	Sit el housn: سنت الحسن	L/Aer. P.	I		Digestive disorders, neurological affections, rheumatism, analgesic, eyes, tranquilizer szudorific, decreases salivary secretions.	0.354	Δ -N-Methylornithine	Hedges and Herbert (1981)
Tiliaceae								
<i>Thymelea hirsuta</i> (L.) Endl (GBBV PH/ 027)	Al metnen: المتنان	R/S	I		Cysts, sterility.	1.102	Daphnoretin and β -sitosterol- β -D-glucoside	Rizk and Rimpler (1972)
Zygophyllaceae								
^a <i>Zygophyllum cornutum</i> Coss. (GBBV PH/ 028)	Aggaya: عقاية	Wh. P./L/Fl/ Aer. P.	I/D		Hypoglycemic, digestive disorders, itching, respiratory system diseases, cardiovascular diseases.	0.65	Ursane type saponins	Betina-Bencharif et al. (2013)

Abbreviations:

Used parts: L: leaves; Ba: bark; Fr: fruits; Fl: flowers; R: roots; Rh: rhizome; S: seeds; Tub: tuber; Wh.P.: whole plant; Aer. P.: aerial part.

Preparation method: D: decoction; I: infusion; M: maceration; O: oil; C: cataplasma; Inh: inhalation.**Toxicity:** Tox.^a New plants reported for the first time in other countries.

Table 3

List of medicinal plants most frequently cited and currently used by informants with use value (UV).

Taxa	Family	Nb. of interviews in which it was cited	FC (%)	RFC	Use value (UV)
<i>Origanum glandulosum</i> Desf.	Lamiaceae	57	72.15	0.91	2.280
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Lamiaceae	49	62.02	0.78	2.040
<i>Artemisia herba alba</i> Asso.	Asteraceae	47	59.49	0.75	1.765
<i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	Fabaceae	45	56.96	0.72	1.933
<i>Punica granatum</i> L.	Lythraceae	43	54.43	0.69	1.325
<i>Anthemis nobilis</i> L.	Asteraceae	41	51.90	0.66	2.244
<i>Ocimum basilicum</i> L.	Lamiaceae	41	51.90	0.66	1.439
<i>Myrtus communis</i> L.	Myrtaceae	41	51.90	0.66	1.586
<i>Salvia officinalis</i> L.	Lamiaceae	40	50.63	0.64	1.875
<i>Nigella damascena</i> L.	Ranunculaceae	40	50.63	0.64	1.350
<i>Mentha viridis</i> (L.) L.	Lamiaceae	39	49.37	0.62	1.410
<i>Lawsonia inermis</i> L.	Lythraceae	36	45.57	0.58	1.139
<i>Parietaria officinalis</i> L.	Urticaceae	36	45.57	0.58	0.888
<i>Pistacia lentiscus</i> L.	Anacardiaceae	36	45.57	0.58	1.083
<i>Coriandrum sativum</i> L.	Apiaceae	36	45.57	0.58	1.389
<i>Lavandula officinalis</i> L.	Lamiaceae	35	44.30	0.56	2.143
<i>Lepidium sativum</i> L.	Apiaceae	34	43.04	0.54	1.794
<i>Juniperus oxycedrus</i> L.	Brassicaceae	34	43.04	0.54	1.264
<i>Spergularia rubra</i> (L.) Presl & C. Presl.	Caryophyllaceae	34	43.04	0.54	1.029
<i>Mentha pulegium</i> L.	Lamiaceae	33	41.77	0.53	1.303
<i>Laurus nobilis</i> L.	Lauraceae	33	41.77	0.53	0.115
<i>Eucalyptus globulus</i> Labill.	Myrtaceae	33	41.77	0.53	0.115
<i>Ruta graveolens</i> L.	Rutaceae	33	41.77	0.53	1.212
<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	Fabaceae	32	40.51	0.51	1.687
<i>Ceratonia siliqua</i> L.	Fabaceae	32	40.51	0.51	1.062
<i>Centaurium erythraea</i> Rafn	Gentianaceae	32	40.51	0.51	1.219
<i>Origanum majorana</i> L.	Lamiaceae	31	39.24	0.50	1.903
<i>Hordeum vulgare</i> L.	Poaceae	31	39.24	0.50	1.194
<i>Crataegus azarolus</i> L.	Rosaceae	31	39.24	0.50	1.032
<i>Crataegus oxyacantha</i> L.	Rosaceae	30	37.97	0.48	1.300
<i>Urtica dioica</i> L.	Urticaceae	30	37.97	0.48	1.600
<i>Aloe</i> sp. L.	Aloaceae	30	37.97	0.48	1.333
<i>Ricinus communis</i> L.	Euphorbiaceae	30	37.97	0.48	1.567
<i>Dittrichia viscosa</i> (L.) Greuter	Asteraceae	29	36.71	0.46	1.276
<i>Thapsia garganica</i> L.	Apiaceae	29	36.71	0.46	0.828
<i>Peganum harmala</i> L.	Zygophyllaceae	28	35.44	0.45	1.357
<i>Ajuga iva</i> L.Schreb	Lamiaceae	28	35.44	0.45	1.393
<i>Marrubium vulgare</i> L.	Lamiaceae	28	35.44	0.45	1.179
<i>Crocus sativus</i> L.	Iridaceae	27	34.18	0.43	1.286
<i>Anacyclus pyrethrum</i> (L.) Lag.	Asteraceae	26	32.91	0.42	0.846
<i>Globularia alypum</i> L.	Globulariaceae	26	32.91	0.42	0.654
<i>Anethum graveolens</i> L.	Apiaceae	25	31.64	0.40	1.360
<i>Capparis spinosa</i> (L.) A. Rich.	Capparaceae	25	31.64	0.40	0.760
<i>Ecballium elaterium</i> L.	Cucurbitaceae	24	30.38	0.38	1
<i>Cupressus sempervirens</i> L.	Cupressaceae	21	26.58	0.33	1.143
<i>Aesculus hippocastanum</i> L.	Hippocastanaceae	20	25.31	0.32	1.750
<i>Mentha x piperita</i> L.	Lamiaceae	20	25.31	0.32	1.500
<i>Ruta montana</i> L.	Rutaceae	20	25.31	0.32	0.800
<i>Tilia cordata</i> Mill.	Tiliaceae	20	25.31	0.32	1.400
<i>Zygophyllum cornutum</i> Coss.	Zygophyllaceae	20	25.31	0.32	0.650

followed by flowers (29%), and finally seeds (22%). The frequent use of leaves in traditional medicine was found in several ethnobotanical surveys (Parada et al., 2009; Benítez et al., 2010; Carrió and Vallès, 2012; Tahira et al., 2015; Tuttolomondo et al., 2014a; Benarba et al., 2015; Güzel et al., 2015); this dominance does not mean that the other parts are not rich or less rich in active compounds, because it is well known that the whole plant contains the active compounds. This can be explained by the fact that most informants have inherited traditional knowledge rather than scientific knowledge (Boudjelal et al., 2013). However, the use of leaves more than other parts may be due to the abundance of these compared with the other parts (Yemele et al., 2015); they present fewer difficulties in collecting them (Giday et al., 2009) and for plant conservation (Kadir et al., 2012, 2013), because collecting the whole plant might cause its disappearance (Telefo et al., 2004).

3.4. Method of preparation

We noted that two modes of administration are prescribed: internal (infusion, decoction, and maceration) and external use (cataplasm and oil). Infusion is the most used method (72%) followed by decoction (45%) (Fig. 4). Similar results were obtained in previous ethnobotanical surveys carried out in Algeria and other parts of the world (Parada et al., 2009; Benítez et al., 2010; Boudjelal et al., 2013; Fakchich and Elachouri, 2014; Tuttolomondo et al., 2014a, 2014b; Tahira et al., 2015; Benarba et al., 2015; Hammiche and Maiza, 2015; Güzel et al., 2015). These two methods are the most used because extraction of active substances using heat is faster (Kayani et al., 2015), while the percentages of use of cataplasm, maceration, and oil were 13%, 7%, and 1%, respectively. Most of these preparations use water as a liquid extractor (Mood, 2008; Andrade-Cetto, 2009). Sixteen of the 102

Table 4

Categories of wild medicinal plants in Constantine and Mila with associated informant consensus factor.

No.	Illness categories	Number of taxa	Number of use report	Informant consensus factor (ICF)	Incidence ^a (%)
		(Nt)	(Nur)		
1	Skin diseases	39	153	0.75	9
2	Gastrointestinal system diseases	73	594	0.87	16
3	Urinary system, gynecologic, and men reproductive diseases	67	242	0.73	14
4	Respiratory system diseases	51	170	0.70	13
5	Cardiovascular diseases	35	115	0.70	8
6	Metabolic system	35	120	0.71	8
7	Eye infections	6	12	0.54	2
8	Articular system diseases and traumatic muscular	34	108	0.69	9
9	Tumors or cancer	11	15	0.29	2
10	Inflammations	14	41	0.68	3
11	Immune system	9	12	0.27	2
12	Nervous system diseases	33	229	0.86	8
13	Oral sphere	15	24	0.39	3
14	General health	45	275	0.84	10

Note: The same species may be listed in several ailment category.

1. Skin diseases: dermatose, eczema, psoriasis, wounds, gall, itching, burns, open pores, anti-spots, insect bite.
2. Gastrointestinal: stomachache, flatulences, gastric and intestinal ulcer, jaundice and liver problems, bile, hemorrhoids, diarrhea, wormer, colopathy, pancreas activation, acid reflux.
3. Urinary system, Gynecological and men reproductive diseases: kidney stones, kidney inflammation, bladder, prostate, diuretic, menstruation, female sterility, menopause, postpartum, male sterility, and sexual weakness.
4. Respiratory system diseases: allergy, asthma, influenza, cough, angina, pharyngitis, lung diseases, noise, throat pain.
5. Cardiovascular diseases: hypertension, palpitations, heart disorders, blood circulation, varicose veins.
6. Metabolic system: atherosclerosis, diabetes, gout, cholesterol regulation.
7. Eye infection: everything about eye ailments.
8. Articular system diseases and traumatic muscular: rheumatism, osteoarthritis, fracture, bones and articulation pain, muscle pain.
9. Tumors and cancer: everything about cancer.
10. Inflammation: anti-inflammatory properties.
11. Immune system: everything about immune system ailments.
12. Nervous system diseases: Alzheimer, insomnia, tranquilizer, neurological disorders, phobia, anxiety.
13. Problems of oral sphere: gum, teeth.
14. General health: endocrinology system, tonic, analgesic, antipyretic, antibacterial, antifungal, and antispasmodic properties, secretions, purification, memory, headache, edema, ear pain, sudorific.

^a As percentage of records on the total of 467 records.

reported plants (16%) were cited by herbalists as being used in a mixture with other adjuvants such as honey, olive oil, dates, and milk. Honey was the most used adjuvant (70%), followed by olive oil (23%) and finally milk (7%). The addition of honey makes it easier to ingest plants having a bitter taste (e.g. *Artemisia campestris* L. subsp. *Eu-campestris* Briq. and Cav. used with honey) or optimizes the action of the plants. Furthermore, the addition of olive oil to the plant improves its therapeutic effect or protects the body from side effects (*Thapsia garganica* L. with olive oil protects the skin from its urticant properties). In addition to these preparation modes, many plants (12%) have culinary use in the population: *Carum carvi* L., *Coriandrum sativum* L., *Cuminum cyminum* L., *Crocus sativus* L., *Ocimum basilicum* L., *Lavandula stoechas* L., *Mentha pulegium* L., *Mentha x piperita* L., *Cinnamomum zeylanicum* Blume, *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry, *Nigella damascena* L., *Zingiber officinale* Roscoe (Table 2).

3.5. Most frequently cited plant species and medicinal uses

In this study, the most cited plants were those that had at least 20 or more citations (Table 3). Plants that treat three ailments and more (86%) represent the majority, followed by plants that treat single ailments (8%), and finally those that treat two ailments (6%), which represent the lowest frequency.

The high frequency of citations of medicinal plants can be explained by the fact that these plants are the best known and have long been used by the majority of informants, representing a source of reliability. In the present study, the highest number of citations was for *Origanum glandulosum* Desf. (57 citations) used in the treatment of gastrointestinal system diseases; we found the same genus in other Mediterranean regions: Albania (*Origanum*

vulgare) and Morocco (*Origanum majorana*) (Gonzalez-Tejero et al., 2008), followed by *Rosmarinus officinalis* L. (49 citations) and *Artemisia herba alba* Asso. (47 citations), which were used for the same system illnesses. We also found the same use for *Artemisia herba alba* Asso. in another Algerian survey (Gonzalez-Tejero et al., 2008). *Spergularia rubra* (L.) J. Presl & C. Presl. (34 citations) was used for the treatment of urinary system, gynecologic, and reproductive diseases. We noted also a high citation for *Eucalyptus globulus* Labill. (33 citations), which was used for the treatment of respiratory system disease; the same plant is reported in Mascara survey (Benarba et al., 2015). As indicated by the informants, the different therapeutic uses of medicinal plants are used to treat 13 categories of different diseases (general health is considered as a category of unclassified injuries in consideration of traditional medicine; hence, it is not considered in the comparison) (Table 4). The category of gastrointestinal diseases (16%) was treated first similar to that observed in a majority of the surveys in many Mediterranean regions: Albania, Cyprus, Italy, Egypt, and Morocco (Gonzalez-Tejero et al., 2008); the second category was urinary, gynecologic, and reproductive diseases (14%). Respiratory diseases formed the third category (11%). This corresponds well to acute and chronic diseases being communally treated by herbal medicine (Gonzalez-Tejero et al., 2008).

3.6. New reports and new uses

On comparing our results with other ethnobotanical studies in Algerian regions, 28 new species were found, including 12 newly reported species in other regions in the world (Table 2). Besides, 159 new medicinal uses in a total of 31 known plants were noted from our survey for the first time in the region (Table 5), and there

Table 5

New medicinal uses compared with other ethnobotanical studies in Algerian regions.

Plant	Medicinal use from the present study	Medicinal use from other Algerian region studies	References
<i>Anethum graveolens</i> L.	Lactation, antioxidant, weight loss	Diuretic, hepatic diseases. Bad breath, insomnia.	Boudjelal et al. (2013) Benarba et al. (2015)
<i>Nerium oleander</i> L.	Analgesic, gum.	Antitumor, leishmanicidal, eczema. Skin diseases: Diabetes, hair loss, fever, headaches, Syphilis, abortive toothache Respiratory system.	Boudjelal et al. (2013) Hammiche and Maiza, (2006) Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Artemisia herba alba</i> Asso. <i>subsp. eu-campestris</i> Briq. And Cav.	Analgesic, respiratory system diseases, blood purification, cancer.	Antidiabetic, antispasmodic, carminative, eczema. Digestive system, others.	Boudjelal et al. (2013) Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Artemisia campestris</i> L. <i>subsp. eu-campestris</i> Briq. And Cav.	Weight loss, antidote, antispasmodic, wound, kidneys.	Antidiabetic, antihypertensive. Goiter, cough, bronchitis. Postpartum care: analeptic, spasms and aid to menstruation, helminthiases, stomach and liver diseases, healing, vulnary mycosis, dandruff.	Boudjelal et al. (2013) Benarba et al. (2015) Hammiche and Maiza, (2006)
<i>Anthemis nobilis</i> L.	Analgesic, menstruation balance and their pain, appetite, weight loss, cardiovascular diseases, respiratory diseases, immune system diseases, antispasmodic, headache.	Anti-inflammatory, sedative, eczema.	Boudjelal et al. (2013)
<i>Anacyclus pyrethrum</i> (L.) Lag.	Respiratory system diseases, spermatozooids, tonic, flatulence	Female sterility, cough, cancer.	Benarba et al. (2015)
<i>Capparis spinosa</i> L.	Dermatological problems, influenza, varicose veins	Rheumatismic pains, headache.	Hammiche and Maiza, (2006)
<i>Citrullus colocynthis</i> (L.) Schrader	Rheumatism, hypoglycemic, coagulant, urinary system diseases, gynecological diseases.	Antihypertensive, antitumor. Musculare.	Boudjelal et al. (2013) Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Juniperus oxycedrus</i> L.	Urinary system diseases, digestive disorders, respiratory system diseases, antihypertensive, hypoglycemic, migraine, rheumatism, articular system diseases, dermatological diseases.	Anti-inflammatory, eye infections.	Boudjelal et al. (2013)
<i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	Anti-inflammatory, appetite, immune system diseases, digestive disorders, metabolic system diseases, , lactation, respiratory system diseases, anemia, diuretic, wounds.	Diabetes, tonic, analeptic, blood cleaning. Nutritional.	Hammiche and Maiza, (2006) Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Centaurium erythraea</i> Rafn	Hypoglycemic, blood purification, cancer, eyes, appetite, antihypertensive.	Antipyretic, digestive disorders.	Boudjelal et al. (2013)
<i>Globularia alypum</i> L.	Gynecological diseases, blood purification, antiseptic, excitant, antifungal, wounds, respiratory system diseases.	Antidiabetic, leishmanicidal, digestive disorders, eczema Constipation, diabetes, fever, mycosis. Digestive system.	Boudjelal et al. (2013) Hammiche and Maiza, (2006) Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Ocimum basilicum</i> L.	Antispasmodic, antiseptic, antifungal, weight loss, digestive disorders, migraine, fever, antiaging, diuretic, lactation, dermatological problems.	Flu, hypertension, laryngitis cough, stomachache, goiter analgesic. Sensory, mental nervous, cardiovascular system.	Benarba et al. (2015) Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Memory, anemia, antidepressive, cholesterol, asthma, teeth, wart.	Antihypertensive, hepatic diseases, antitumoral, eczema. Cardiovascular system.	Boudjelal et al. (2013) Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Salvia officinalis</i> L.	Nervous system diseases, muscles pain, headache, memory, analgesic, antispasmodic, wounds, influenza, rheumatism, cholesterol, gynecological diseases, teeth.	Antidiabetic, antihypertensive, weight loss, eczema. Digestive system.	Boudjelal et al. (2013) Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Ajuga iva</i> L.Schreb	Sterility and uterus purification, nervous system diseases, memory, anti-transpiring, obesity, rheumatism, hormonal system, anemia, anti bacterial, cancer, respiratory system diseases, kidneys inflammation, cholesterol, teeth.	Antidiabetic, antihypertensive, leishmanicidal, digestive disorders, eczema. Thyroid problems. Mental nervous.	Boudjelal et al. (2013) Benarba et al. (2015) Gonzalez-Tejero et al. (2008)

Table 5 (continued)

Plant	Medicinal use from the present study	Medicinal use from other Algerian region studies	References
<i>Marrubium vulgare</i> L.	Tonic, fever, analgesic, antispasmodic, migraine, wound, cardiovascular system diseases, respiratory system diseases.	Antidiabetic, leishmanicidal, digestive disorders. Digestive system, nutritional.	Boudjelal et al. (2013) Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Mentha pulegium</i> L.	Respiratory system diseases, digestive disorders, mouth and gum, tranquilizer.	Antihypertensive, antispasmodic Digestive system.	Boudjelal et al. (2013) Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Origanum glandulosum</i> Desf.	respiratory system diseases, anti biotic, analgesic, immune system, diuretic.	Antihypertensive, digestive disorders.	Boudjelal et al. (2013)
<i>Teucrium polium</i> L.	Wound, coagulant.	Chills, fever. Digestive system.	Hammiche and Maiza, (2006) Gonzalez-Tejero et al. (2008) Benarba et al. (2015)
<i>Lawsonia inermis</i> L.	Migraine, antimicrobial, bones, eyes, tranquilizer.	Kidney diseases.	
<i>Malva sylvestris</i> L.	Urinary system diseases, asthma and cough, uterus pain, mouth diseases.	Anti-inflammatory, weight loss. Skin, digestive system.	Boudjelal et al. (2013) Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Myrtus communis</i> L.	Digestive disorders, urinary system disorders, hormones, tranquilizer.	Antihypertensive. Cancer. Skin.	Boudjelal et al. (2013) Benarba et al. (2015) Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Olea europaea</i> L.	Cholesterol regulation.	Hypoglycemic, antihypertensive, eczema. Musculare, sensory, digestive, cardiovascular system.	Boudjelal et al. (2013) Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Papaver somniferum</i> L. subsp. <i>setigerum</i> (DC.) Arcang.	Hypnotic, anesthetic, muscle relaxant.	Analgesic.	Benarba et al. (2015)
<i>Rhamnus alaternus</i> L. subsp. <i>alaternus</i>	Nervous system disorders, hypoglycemic and cholesterol, cancer, stomachache, headache.	Hepatic diseases. Skin.	Boudjelal et al. (2013) Benarba et al. (2015)
<i>Zizyphus lotus</i> (L.) Lam.	Stomachache, urinary system diseases.	Anti inflammatory, wound healing, eczema.	Boudjelal et al. (2013)
<i>Thymelea hirsuta</i> (L.) Endl	Cyst.	Leishmanicidal, vermifuge, eczema. Female sterility.	Boudjelal et al. (2013) Benarba et al. (2015)
<i>Taxus baccata</i> L.	Anemia, tranquilizer, cardiovascular diseases.	Reproductive system.	Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Urtica dioica</i> L.	Rheumatism, anemia, thyroid problems. Urinary system diseases, dermatological problems, anemia, coagulant, suprarenal gland.	Antidiabetic, anti-inflammatory. Digestive system.	Boudjelal et al. (2013) Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Valeriana officinalis</i> L.	Nervous system diseases, headache, teeth, menopause disorders, colopathy.	Hypertension.	Benarba et al. (2015)
<i>Vitis vinifera</i> L.	Varicose veins, wounds and burns, prostate.	Cancer, anemia, digestive disorders, memory. Digestive system.	Benarba et al. (2015) Gonzalez-Tejero et al. (2008) Benarba et al. (2015)
<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	Anti-inflammatory.	Cough, allergies, blood circulation, appetite, digestive disorders, liver diseases, kidney diseases, hypertension, hypercholesterolemia, female sterility, aphrodisiac, increasing immunity, rheumatism.	Benarba et al. (2015)
<i>Peganum harmala</i> L.	Sudorific, blood purification, antispasmodic, memory, respiratory system diseases.	Antidiabetic, antihypertensive. Rheumatisms, back pains, fever, lips sore, herpes, emmenagogue, diabetes, jaundice, helminthiases, nervous disorders, just married sexual weakness.	Boudjelal et al. (2013) Hammiche and Maiza, (2006)

Table 5 (continued)

Plant	Medicinal use from the present study	Medicinal use from other Algerian region studies	References
		Mental nervousness cardiovascular system.	Gonzalez-Tejero et al. (2008)

were 369 new therapeutic applications of 75 known plants compared with those in other regions in the world (Table 6). We observed these new medicinal uses for one species in many ailment categories. On the national level, we can cite the following examples:

- The present survey indicated that *Anthemis nobilis* L. was used in cardiovascular diseases, respiratory diseases, and immune system diseases and more, although it is only used as an anti-inflammatory and sedative and in eczema, according to Boudjelal et al. (2013).
- Rhamnus alaternus* L. subsp. *alaternus* used for nervous system disorders, hypoglycemic, cholesterol, and cancer in the present study were indicated by Boudjelal et al. (2013) and Benarba et al. (2015) to be used in hepatic diseases and anemia, respectively.
- On the Mediterranean plan, we can cite the following:
- Syzygium aromaticum* L. (L.) Merr. and L.M. Perry (used for urinary system diseases, tranquilizer, respiratory system diseases, hypoglycemia, and others) is used as an aphrodisiac and for mouth sore odor according to Merzouki et al. (2000) and Güzel et al. (2015), respectively.
- Pinus sylvestris* L. (used for cancer prevention, urinary system, articulation pain, and others) were indicated to be used as an antitussive and pertussis by Güzel et al. (2015).
- Ruta graveolens* L. (used in rheumatism, diuretic, nervous system diseases, menstruation pain, ear pain, cardiovascular diseases, metabolic disorders, and others) were reported to be used for intestinal worms and digestive and respiratory system diseases by Tuttolomondo et al. (2014b) and Gonzalez-Tejero et al. (2008), respectively.
- We can also add *Artemisia herba alba* Asso. for respiratory system diseases and cancer and *Citrullus colocynthis* (L.) for urinary system diseases, the medicinal uses of which are new in Algeria and in the world compared with those given by Merzouki et al. (2000), Said et al. (2002), Gonzalez-Tejero et al. (2008), Boudjelal et al. (2013), and Fakchich and Elachouri (2014).

These comparisons with other ethnobotanical studies in the neighboring and Mediterranean regions showed new therapeutic uses have been reported in the present survey; thus, it would be interesting to conduct some clinical assays to attest them.

Some of the new medicinal plants attract our attention because their medicinal uses agree with scientific research works; the others should be studied pharmacologically to prove their clinical efficacy and safety. Two of the newly reported plants in national and different regions in the world are as follows:

- Spergulariarubra* (L.) Presl and C. Presl. with an Fl of 88.83% and UV of 1.029 are used for urinary system, gynecological, and reproductive diseases; its traditional use correlates with chemical and pharmacological studies, especially for diuretic, hypoglycemic, and antihypertensive properties and as cholesterol-lowering agents in many species for the genus of *Spergularia* (De Tommasi et al. 1998; Jouad et al. 2003).
- Another interesting new plant at the international level is *Zygophyllumcornutum* Coss, an endemic specie, with a UV of 0.650 and an FL of 65% as the frequently cited plant indicated for treating metabolic system illness, which could be very

interesting for further phytochemical and clinical studies, like *Zygophyllumgaetulum*, the scientific study of which supports potential clinical utility in the treatment of diabetes mellitus (Jaouhari et al. 1999).

With regard to quantitative indices, we found on the national level two interesting species with a high UV:

- Mentha x piperita* L (1.500) and *Mentha viridis* (L) L. (1.410) are two plants rich in sesquiterpenes reputed for their antiseptic, analgesic, and diuretic properties and their stimulating digestive and tranquilizer effects (Bruneton, 1999); for the first plant, leaves are used in infusion or decoction, particularly for digestive disorders and as tranquilizer. The second plant is used in infusion or decoction of leaves as a tranquilizer, analgesic, antiseptic, and diuretic.
- At the international level, we can cite the following:
- Rheum palmatum* L. with an UV of 1.350 and *Crataegus oxyacantha* L. with an UV of 1.300 and an FL of 86.66% are used for treating cardiovascular diseases.
- Spergularia rubra* (L.) J. Presl and C. Presl with an UV of 1.090 and an FL of 88.23% are used for urinary system diseases.
- Crataegus azarolus* L. has an UV of 1.032.

At the national level, we note hypocholesterolemic activity of olive leaves as a new use, which is recorded for the first time in Algeria; in addition, some new recoded plants that usually had culinary use in Algeria as condiments or spices, such as *Laurus nobilis* L., *Coriandrum sativum* L., *Mentha x piperita* L., *Cinnamomum zeylanicum* Blume, *Nigella damascenna* L., *Mentha viridis* (L.) L., and *Origanum vulgare* L., are reported for the first time to be having therapeutic uses compared with the findings in all the national surveys; this confirms the rich knowledge of the herbalists in the region.

A few species that were considered as toxic were recorded by herbalists. Despite the toxicity, the plants have active substances responsible for therapeutic effects, but at a lower dosage (Blackwell, 1990); generally species that are considered toxic are used externally. Consequently, this category of plants should be on a special list controlled and sold with sanitary authorization, and this should be the role of pharmacovigilance, which is defined by the World Health Organization as a science or a set of activities related to the detection, evaluation, and understanding and prevention of the risk of adverse effects (or other problems) related to drugs marketed for payment or free title. Hence, pharmacovigilance is essential for collecting reliable information on the safety of medicinal plants for the development of appropriate guidelines for safe effective use (Shaw et al., 2012).

3.7. Quantitative analyses of ethnomedicinal data

3.7.1. Informant consensus factor

The ICF was calculated for each ailment category and the range was from 0.07 to 0.87 (Table 4). The highest ICF (0.87) was reported for gastrointestinal system diseases with 78 species and 594 uses were reported, followed by nervous system diseases (0.86). The high ICF values indicate a high homogeneity of knowledge between the informants. Concerning the highest ICF of gastrointestinal system diseases, the same result was found in the

Table 6

New medicinal uses compared with other ethnobotanical studies in neighboring and Mediterranean countries.

Plant	Medicinal use from the present study	Medicinal use from studies of other Mediterranean and neighboring regions	References
<i>Pistacia lentiscus</i> L.	Edema, urinary system diseases, genital disorders, dermatological problems.	Emetic and gastric lavage, tooth care, halitosis, labor pains, and asthma. Digestive system, diabetes, cardiovascular diseases. Jaundice and respiratory problems. Digestive problems	Merzouki et al. (2000) Fakchich and Elachouri (2014) Said et al. (2002) Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Anethum graveolens</i> L.	Lactation, respiratory diseases, nervous system diseases, antioxidant, weight loss.	Food poisoning, sorcery.	Merzouki et al. (2000)
<i>Pimpinella anisum</i> L.	Pain, newborn, lactation.	Digestive, diuretic, spasmolytic, expectorant, stimulant, carminative and tooth care. Digestive system, cardiovascular diseases, respiratory system diseases. Gases, gastralgia, digestive disorder.	Merzouki et al. (2000) Fakchich and Elachouri (2014) Benitez et al. (2010)
<i>Cuminum cyminum</i> L.	Tranquilizer, analgesic, cough, antispasmodic, rheumatism, lactation.	Stomachache, intestine pain, headache and fertility. nutritional, digestive problems, others.	Said et al. (2002) Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	Analgesic, antispasmodic, rheumatism and muscular problems, lactation, weight loss.	Digestive system, diabetes, cardiovascular diseases. Digestive disorders. Gas, digestive disorder, gastralgia, cold. Intestinal regulation, indigestion, carminative. Digestive problems mental nervous, respiratory system kidney, nutritional.	Fakchich and Elachouri (2014) Tuttolomondo et al. (2014a) Benitez et al. (2010) Güzel et al. (2015) Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Carum carvi</i> L.	Antioxidant, appetite, salivary secretions, lactation, rheumatism, tranquilizer, wart.	Labor pains, dyspepsia, spasmolytic, carminative digestive. Digestive system, diabetes.	Merzouki et al. (2000) Fakchich and Elachouri (2014)
<i>Coriandrum sativum</i> L.	Menstruation, rheumatism, anemia, appetite, cardiovascular problems, vertigo, migraine, cough, anti-inflammatory, tranquilizer, wounds, antispasmodic, atherosclerosis.	To remove bad spirit. Digestive system, urinary system, allergy. Stomach pains, gastritis ulcer, Heart disorders. Intestinal inflammation, weight loss and intestinal gas.	Merzouki et al. (2000) Fakchich and Elachouri (2014) Güzel et al. (2015) Said et al. (2002)
<i>Cuminum cyminum</i> L.	Tranquilizer, analgesic, cough, antispasmodic, rheumatism, lactation.	Gastric pains, carminative and sudorific. Stomach pain. Carminative Digestive problems.	Merzouki et al. (2000) Tuttolomondo et al. (2014b) Güzel et al. (2015) Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Artemisia campestris</i> L. subsp. <i>eu-campestris</i> Briq. And Cav.	Weight loss, antidote, antispasmodic, wound, kidneys.	Baldness.	Benitez et al. (2010)
<i>Nerium oleander</i> L.	Analgesic, gum.	Food poisoning, calefacient and diuretic. Diabetes, mouth problems, skeleton-muscular system problems. Resolvent (warts, pimples). Hemorrhoid, rheumatism pains, skin diseases. Respiratory system, skin, others.	Merzouki et al. (2000) Fakchich and Elachouri (2014) Tuttolomondo et al. (2014a) Said et al. (2002) Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Lepidium sativum</i> L.	Rheumatism and bone problems, antioxidant, goiter, tonic, memory, dermatological problems, diuretic, hypoglycemic, antibiotic, tumors, immune system, appetite, anemia, anti-hair loss.	Migraine. Digestive system problems, cardiovascular diseases, respiratory system diseases.	Merzouki et al. (2000) Fakchich and Elachouri (2014)
<i>Capparis spinosa</i> L.	Skin problems.	Cholagogue. Diabetes. Appetizer, emmenagogue inflamed or suppurating wounds, antiseptic. Deafness, back diseases, female infertility. Nutritional, digestive, cardiovascular, and	Merzouki et al. (2000) Fakchich and Elachouri (2014) Güzel et al. (2015) Said et al. (2002) Gonzalez-Tejero et al. (2008)

Table 6 (continued)

Plant	Medicinal use from the present study	Medicinal use from studies of other Mediterranean and neighboring regions	References
<i>Citrullus colocynthis</i> (L.) Schrader	Coagulant, urinary system diseases.	respiratory system. Diabetes, rheumatic pains, tuberculosis, syphilis and spasmolytic Diabetes, circulatory system problems, cholesterol regulation. Liver diseases and diabetes Muscular, digestive, reproductive and respiratory system. Rheumatic pains, depurative, diuretic and emetic.	Merzouki et al. (2000) Fakchich and Elachouri (2014) Said et al. (2002) Gonzalez-Tejero et al. (2008) Merzouki et al. (2000)
<i>Saponaria officinalis</i> L.	Dermatological diseases.	Rheumatic pains, depurative, diuretic and emetic.	Merzouki et al. (2000)
<i>Artemisia herba alba</i> Asso.	Analgesic, respiratory system diseases, blood purification, tranquilizer, cancer.	For rheumatic pains and helminthiasis, incense in ritual and magic practices. Digestive system problems, diabetes, dermatological problems. Nervous system, heart diseases, sexual weakness and diabetes.	Merzouki et al. (2000) Fakchich and Elachouri (2014) Said et al. (2002)
<i>Dittrichia viscosa</i> , (L.) Greuter	Cough, antifungal, hemorrhoids, rheumatism, fever, anti-inflammatory, immune system, osteoarthritis.	Digestive system problems others. Digestive system problems, diabetes, cardiovascular problems. Hematomas, wounds, swelling. Contusion, bone fracture, calluses and skin hardness, injury. Asthma, shortness of breath, kidney stones, hemostatic, inflamed or suppurating wounds, antiseptic. Muscle relaxation and infertility.	Gonzalez-Tejero et al. (2008) Fakchich and Elachouri (2014) Tuttolomondo et al., (2014a), (2014b) Benitez et al. (2010) Güzel et al. (2015) Said et al. (2002)
<i>Atriplex halimus</i> L. <i>Anacyclus pyrethrum</i> (L.) Lag.	Thyroid Respiratory system diseases, spermatozooids, tonic, flatulence, wart.	Heart diseases and diabetes Digestive system problems, diabetes, allergy.	Gonzalez-Tejero et al. (2008) Said et al. (2002) Fakchich and Elachouri (2014)
<i>Ecballium elaterium</i> (L.) A. Rich.	Hemorrhoids, migraine, rheumatism, cardiovascular diseases, bladder, asthma, uricemia, scabies, respiratory system, and urinary system problems.	Emetic and poison Fistulas, hematomas, wounds. Liver diseases, jaundice and sinusitis. Mental nervous system.	Merzouki et al. (2000) Tuttolomondo et al. (2014a) Said et al. (2002) Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Cupressus sempervirens</i> L.	Burns and wounds, respiratory system diseases, articular system diseases, diuretic, gynecological diseases.	Hemorrhoids, baldness, otalgia. Digestive, cardiovascular system, skin.	Benitez et al. (2010) Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Juniperus oxycedrus</i> L.	Digestive disorders, respiratory system diseases, antihypertensive, hypoglycemic, migraine, rheumatism, articular system diseases.	Odontalgia, pain, eczema undefined, appetizer. Cystitis	Benitez et al. (2010) Güzel et al. (2015)
<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	Cardiovascular diseases, nervous system diseases, diuretic, anti-inflammatory.	Cough. Digestive system problems, respiratory system problems, allergy. Cold, cough Constipation, Cold. Expectorant, stomach pains, gastritis ulcer intestinal regulation, indigestion, antidiabetic, menstrual pains, mouth sores odor. Fever, ulcer, kidney diseases and asthma. Respiratory, digestive and reproductive system.	Merzouki et al. (2000) Fakchich and Elachouri (2014) Tuttolomondo et al. (2014a) Benitez et al. (2010) Güzel et al. (2015) Said et al. (2002) Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Ricinus communis</i> L.	Sterility, breast pain, urine alcalinisation, lactation.	To treat cow jaundice. Fever, dermatological problems, skeleton-muscular system problems. Digestive disorder, cold. Laxative. Hair loss Hair loss and skin diseases Mental nervous system.	Merzouki et al. (2000) Fakchich and Elachouri (2014) Benitez et al. (2010) Tuttolomondo et al. (2014b) Güzel et al. (2015) Said et al. (2002) Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Marrubium vulgare</i> L.	Tonic, fever, analgesic, antispasmodic, migraine.	Dermatological problems, digestive problems, respiratory	Fakchich and

Table 6 (continued)

Plant	Medicinal use from the present study	Medicinal use from studies of other Mediterranean and neighboring regions	References
<i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	Anti-inflammatory, appetite, immune system diseases, lactation, diuretic, anemia, wounds.	system, Pmusq. Cough, bronchitis. Expectorant, tonic, biliary stimulation and for bronchitis and menstrual pains. Hypercholesterolemia, cough, gastralgia, herpes, erysipelas. Stomach pain and inflammation, bronchitis, nervous system and asthma, eye inflammation. Respiratory, digestive, cardiovascular system nutritional, skin.	Elachouri (2014) Tuttolomondo et al. (2014a, 2014b) Merzouki et al. (2000) Benitez et al. (2010) Said et al. (2002) Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Ceratonia siliqua</i> L.	Rheumatism, blood purification, antihypertensive, cough, salivary secretions, appetite.	Digestive system problems, diabetes, respiratory system diseases. Diabetes, sexual weakness, stomach and intestinal pain Digestive system.	Fakchich and Elachouri (2014) Said et al. (2002) Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Centaurium Erythraea</i> Rafn	Blood purification, cancer, eyes, appetite, antihypertensive.	Stomachic and intestinal winds. Hemorrhoids, Diarrhea. Anemia, invigorating, palpitation, aphrodisiac, anticancer. Diabetes. Nutritional, digestive system.	Merzouki et al. (2000) Benitez et al. (2010) Güzel et al. (2015) Said et al. (2002) Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Globularia alypum</i> L.	Gynecological diseases, blood purification, anti septic, excitant, anti fungal, wounds, respiratory system diseases.	stomachache, digestive, for helminthiasis and biliary. Diabetes, tonic. Fever. Skin, others, digestive system.	Merzouki et al. (2000) Fakchich and Elachouri (2014) Tuttolomondo et al. (2014b) Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Drimia maritima</i> (L.) Stearn	Rheumatism, kidney inflammation, ulcer, Cardiovascular diseases.	Febrifuge, diuretic, sedative, hemorrhoids and cancer. Warts, skin problems. Contusions, hematomas, wounds. Skin diseases. Cardiovascular skin, muscular, respiratory system.	Merzouki et al. (2000) Benitez et al. (2010) Tuttolomondo et al. (2014a) Said et al. (2002) Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Aesculus hippocastanum</i> L.	Gynecological diseases, diuretic, immune system diseases, shaking.	Hemorrhoids, odontalgia. Cardiovascular, respiratory system.	Benitez et al. (2010) Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Crocus sativus</i> L.	Immune system, memory, cancer, ocular affections, insomnia and tranquilizer, stomachache.	Tonic and laxative. Microbial infection, respiratory system diseases, head problems. Odontalgia, dysmenorrhea.	Merzouki et al. (2000) Fakchich and Elachouri (2014) Benitez et al. (2010)
<i>Ocimum basilicum</i> L.	Antispasmodic, antiseptic, antifungal, weight loss, migraine, fever, antiaging, diuretic, lactation.	Depression, migraine, stomach and intestinal ache. Sensory, mental nervousness, cardiovascular, skin.	Said et al. (2002) Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Memory, anemia, antidepressive, cholesterol, asthma, teeth, wart.	Spasmolytic, diuretic, carminative and sedative. Asthma. Cold, cough, circulatory problems, gastritis, bronchitis, hypercholesterolemia, hyperglycemia, gout, obesity, varicose veins, prostatism, pain, rheumatism, injury, baldness, hoarseness, mouth infections, herpes, appetizer, stomach pains, gastritis ulcer, diuretic-anti-edemic, anticancer. Skin, nutritional, muscular, cardiovascular, sensory, mental nervousness, respiratory system.	Merzouki et al. (2000) Tuttolomondo et al. (2014a, 2014b) Benitez et al. (2010) Gonzalez-Tejero et al. (2008)

Table 6 (continued)

Plant	Medicinal use from the present study	Medicinal use from studies of other Mediterranean and neighboring regions	References
<i>Salvia officinalis</i> L.	Muscle pain, headache, memory, analgesic, anti-spasmodic, wounds, rheumatism, cholesterol, gynecological diseases.	Liver disorders, toothache, gingivitis, cold, cough, bronchitis, fever. Respiratory, digestive system, mental nervous.	Tuttolomondo et al. (2014a, 2014b) Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Teucrium polium</i> L.	Wound, coagulant.	Digestive system problems. Appetizer, antidiabetic, menstrual pains, antipyretic, colic spasms, invigorating. Kidney, liver diseases, diabetes, stomach and intestine pain and inflammation. Digestive system.	Fakchich and Elachouri (2014) Güzel et al. (2015) Said et al. (2002) Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Ruscus aculeatus</i> L.	Digestive disorders, cardiovascular diseases, anti-spasmodic, sinusitis, psoriasis.	Asthma, shortness of breath, diuretic, anti edemic, Kidney Stones. Kidney and gall bladder stones, lack of appetite and cholesterol.	Güzel et al. (2015)
<i>Ajuga iva</i> L.Schreb	Sterility and uterus purification, memory, anti-transpiring, obesity, hormonal system, anemia, antibacterial, kidneys inflammation, cholesterol.	Carminative, stomachache, rheumatic pains, ritual practices. Cardiovascular diseases, digestive system problems, respiratory system diseases. Injury, contusion. Mental nervousness, skin.	Merzouki et al. (2000) Fakchich and Elachouri (2014) Benitez et al. (2010) Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Lavandula officinalis</i> L. <i>Lavandula latifolia</i> L.	Teeth, suckle, digestive disorders. Digestive disorders, antihypertensive, rheumatism, antiseptic, hypoglycemic, asthma and cough, anti-spasmodic, acne and wound.	Urinary system, asthma and nervous system. Pain, aphrodisiac.	Said et al. (2002) Benitez et al. (2010)
<i>Lavandula stoechas</i> L.	Depression.	Rheumatisms. Digestive system problems, cholesterol regulation, diabetes. Diabetes; digestive disorder, ulcer, cough, kidney stones, hypercholesterolemia, cold, circulatory problems, rheumatism. Analgesic, Sedative, lowering cholesterol, hypotensive, expectorant. Skin, digestive, respiratory cardiovascular system, musculare diseases.	Merzouki et al. (2000) Fakchich and Elachouri (2014) Benitez et al. (2010) Güzel et al. (2015) Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Melissa officinalis</i> L.	Respiratory system diseases, urinary system diseases, osteoarthritis and rheumatism, sunstroke, antispasmodic, wound and acne, throat pain.	Circulatory problems, nervousness, diarrhea. Stomach pains, gastritis ulcer, sedative. Stomach, intestine pain and inflammation, calming of nerves and headache. Mental nervous, digestive, cardiovascular system.	Benitez et al. (2010) Güzel et al. (2015) Said et al. (2002) Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Mentha pulegium</i> L.	Mouth and gum, tranquilizer.	Digestive disorder, gastralgia, dysmenorrhea, circulatory problems, cough, kidney stones, hyperglycemia, helminthiasis, abortive, postpartum infections. Cystitis, muscle joint pains, colic spasms. Digestive, respiratory, reproductive system.	Benitez et al. (2010) Güzel et al. (2015) Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Mentha x piperita</i> L.	Fever, articulary pain, migraine.	Headache Mental nervousness, respiratory, digestive system.	Benitez et al. (2010) Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Origanum majorana</i> L.	Noise, rheumatism, thyroid, respiratory system diseases, cholesterol and hypoglycemic.	Gastric pains, headache and insomnia. Digestive system problems, cancer, cardiovascular diseases. Menstruation regulator, migraine and nervous system Digestive system, others.	Merzouki et al. (2000) Fakchich and Elachouri (2014) Said et al. (2002) Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Laurus nobilis</i> L.	Nervous system diseases, cardiovascular diseases, hypoglycemic, tonic, dialysis.	Liver, pancreas and digestive diseases, face care. Skeleton–muscular system problems. Digestive, refreshing. Gas, cough. Skin diseases and cancer, hair loss, burns.	Merzouki et al. (2000) Fakchich and Elachouri (2014) Tuttolomondo et al. (2014a) Benitez et al. (2010) Said et al. (2002)

Table 6 (continued)

Plant	Medicinal use from the present study	Medicinal use from studies of other Mediterranean and neighboring regions	References
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume	Menstruations.	Skin, others, digestive, respiratory system. Spasmolytic, stimulant and for gastric pains.	Gonzalez-Tejero et al. (2008) Merzouki et al. (2000)
<i>Linum usitatissimum</i> L.	Hypoglycemic and cholesterol, cancer prevention, weight loss, headache, anti-inflammatory.	Laxative, diuretic and vermifuge. Digestive system problems, respiratory system problems, allergy. Antitussive, Intestinal regulation, indigestion, blood thinner.	Merzouki et al. (2000) Fakchich and Elachouri (2014) Güzel et al. (2015)
<i>Punica granatum</i> L.	Diseases, antiseptic, anemia, gum and teeth.	Respiratory, digestive system, skin. Intestinal antiseptic and hemostatic, stomatitis, peptic ulcer, eczema. Digestive system problems, dermatological problems, diabetes. Cough, pain. Digestive system, kidney.	Gonzalez-Tejero et al. (2008) Merzouki et al. (2000) Fakchich and Elachouri (2014) Benitez et al. (2010) Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Lawsonia inermis</i> L.	Migraine, antimicrobial, bones, eyes, tranquilizer.	Hair tonic, emetic Dermatological problems, digestive system problems, headache. Fungal diseases, hair loss.	Merzouki et al. (2000) Fakchich and Elachouri (2014) Güzel et al. (2015)
<i>Malva sylvestris</i> L.	Urinary system diseases, uterus pain.	Hemorrhoids, asthma, cough, common colds and analgesic. Dermatological problems, power problems.	Merzouki et al. (2000) Fakchich and Elachouri (2014)
<i>Syzygium aromaticum</i> L. (L.) Merr. and L.M. Perry	Urinary system diseases, tranquilizer, appetite, headache, analgesic, respiratory system diseases, hypoglycemic, stomachache.	Aphrodisiac. Mouth sores odor.	Merzouki et al. (2000) Güzel et al. (2015)
<i>Althaea officinalis</i> L.	Digestive disorders, cystitis, urinary system diseases, mouth diseases.	Circulatory problems, dermatitis. Respiratory system.	Benitez et al. (2010) Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Myrtus communis</i> L.	Urinary system disorders, hormones, tranquilizer.	Lowering cholesterol, antidiabetic, diaper rashes, inflamed or suppurating wounds, antiseptic, mouth sores odor, antipyretic. Stomach, headache, intestine pain and inflammation. Skin, digestive, respiratory system.	Güzel et al. (2015) Said et al. (2002) Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Papaver rhoeas</i> L.	Antibacterial, uricemia.	Sedative, analgesic, spasmolytic, cough and pulmonary diseases. Allergy, dermatological problems, Pathologies of the urinary system. Sedative. Nervousness, baldness, eye infection Antitussive, antipyretic Respiratory, digestive system.	Merzouki et al. (2000) Fakchich and Elachouri (2014) Tuttolomondo et al. (2014a, 2014b) Benitez et al. (2010) Güzel et al. (2015) Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Hordeum vulgare</i> L.	Tonic, fractures, tranquilizer.	Diabetes, allergy, fever.	Fakchich and Elachouri (2014)
<i>Pinus sylvestris</i> L.	Cancer prevention, urinary system, stomachache, varicose veins, articulations pain.	Nutritional, kidney digestive, respiratory system. Antitussive, pertussis.	Gonzalez-Tejero et al. (2008) Güzel et al. (2015)
<i>Rhamnus alaternus</i> L. subsp. Alaternus	Nervous system disorders, hypoglycemic and cholesterol, dermatological problems, cancer, headache.	Liver diseases. Nutritional, digestive, cardiovascular system.	Said et al. (2002) Gonzalez-Tejero et al. (2008)

Table 6 (continued)

Plant	Medicinal use from the present study	Medicinal use from studies of other Mediterranean and neighboring regions	References
<i>Nigella damascena</i> L.	Immune system, anti-inflammatory, anemia, migraine and headache, sexual tonic, rheumatism, hypoglycemic, gum, appetite, cardiovascular diseases, antispasmodic.	Carminative and menstrual pains. Pathologies of the digestive system, Pathologies of the respiratory system, allergy. Gall-bladder infection Mental nervous, respiratory system.	Merzouki et al. (2000) Fakchich and Elachouri (2014) Benitez et al. (2010) Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Rosa canina</i> L.	Tranquilizer, open pores.	Eye disinfectant, eye wash, digestive. Sensory, skin, muscular digestive, respiratory system.	Tuttolomondo et al. (2014a) Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Crataegus azarolus</i> L.	Nervous system diseases, digestive disorders, diuretic, muscles relaxing, fever, cough.	Cardiovascular diseases, sexual weakness, cancer and diabetes. Cardiovascular system.	Said et al. (2002) Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Ruta montana</i> L.	Sterility, antimicrobial, appetite, sudorific.	Ear infection, diuretic, vermifuge, rheumatism. Digestive disorder, helminthiasis, ulcer, odontalgia chilblains, abortive.	Merzouki et al. (2000) Benitez et al. (2010)
<i>Ruta graveolens</i> L.	Rheumatism, appetite, antibiotic, antimicrobial, antispasmodic, anti-inflammatory, sexual tonic, diuretic, nervous system diseases, menstruation pain, ear pain, analgesic, cardiovascular diseases, metabolic disorders.	Intestinal worms Digestive, respiratory system.	Tuttolomondo et al. (2014b) Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Ruscus aculeatus</i> L.	Digestive disorders, cardiovascular diseases, anti-spasmodic, sinusitis, psoriasis.	Asthma, shortness of breath diuretic, anti-edemic, kidney Stones. Kidney and gall bladder stones, lack of appetite and cholesterol.	Güzel et al. (2015) Said et al. (2002)
<i>Salix alba</i> L.	Stomachache.	Skeleton–muscular system problems. Hernia. Mental nervous.	Fakchich and Elachouri (2014) Benitez et al. (2010) Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Thymelea hirsuta</i> (L.) Endl	Cyst, sterility.	Problems of the sphere buccodentaire, pathologies of the respiratory system. Skin diseases.	Fakchich and Elachouri (2014) Said et al. (2002)
<i>Tilia cordata</i> Mill.	Digestive disorders, hypoglycemic, wounds, cardiovascular diseases diseases, tumors, headache.	Respiratory system, mental nervous.	Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Atropa belladonna</i> L.	Digestive disorders, rheumatism, analgesic, eyes, tranquilizer, sudorific, decreases salivary secretions.	stimulant and aphrodisiac.	Merzouki et al. (2000)
<i>Urtica dioica</i> L.	Thyroid problems, anemia, coagulant, suprarenal gland.	Pathologies of the urinary system, allergy, diabetes. Anti-dandruff, rheumatism pain.	Fakchich and Elachouri (2014) Tuttolomondo et al., (2014a), (2014b) Benitez et al. (2010)
		Undefined: diuretic, obesity, circulatory problems, liver disease, cold, hyperglucemia, circulatory problems, prostatism, rheumatism, hypercholesterolemia, Undefined: calcium Undefined: invigorating, baldness, sores, varicose veins. Hair loss, anti-dandruff, rheumatism pains, eczema, stomach pains, gastritis, ulcer, hemorrhoid invigorating, anticancer.	Güzel et al. (2015)
		Nutritional, skin, muscular, respiratory, digestive, cardiovascular system kidney.	Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Valeriana officinalis</i> L.	Headache, teeth, menopause disorders, colopathy.	Insomnia, nervousness.	Benitez et al. (2010)
<i>Verbena officinalis</i> L.	Tranquilizer, immune system, antispasmodic, post-partum, lactation.	Hematomas, wounds. Injury. Menstruations. Liver diseases, stomach pain, fever, menstrual cramps.	Tuttolomondo et al. (2014a) Benitez et al. (2010) Güzel et al. (2015) Said et al. (2002)

Table 6 (continued)

Plant	Medicinal use from the present study	Medicinal use from studies of other Mediterranean and neighboring regions	References
<i>Vitis vinifera</i> L.	Varices, prostate.	Nutritional, skin, muscular.	Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Datura stramonium</i> L.	Digestive system diseases, pulmonary pathologies.	Helminthiasis, mouth infections, cold, baldness. Menstrual cramps and period regulation	Benitez et al. (2010) Said et al. (2002)
<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	Anti-inflammatory.	Nutritional, skin, muscular respiratory, digestive system. Narcotic, sedative, emetic and poison.	Gonzalez-Tejero et al. (2008)
<i>Peganum harmala</i> L.	Sudorific, blood purification, memory, respiratory system diseases.	Aphrodisiac Pathologies of the respiratory system, cold problems, Pathologies of the digestive system.	Merzouki et al. (2000)
		Spasmolytic and anti-helminthic, seeds are placed onto fire and the smoke is directed to the nose. Fumigation is also used in ritual and magic practices.	Merzouki et al. (2000)
		Dermatological problems, digestive system problems, skeleton-muscular system problems, skin diseases, wounds and lice.	Fakchich and Elachouri (2014)
		Mental nervous, cardiovascular, digestive system.	Gonzalez-Tejero et al. (2008)

study of Mascara (Benarba et al., 2015). Gastrointestinal system diseases have been reported to have the highest ICF in other surveys such as in Pakistan (Ghulam et al., 2015), Morocco (Fakchich and Elachouri, 2014), and Italy (Tuttolomondo et al., 2014a, 2014b). The highest ICF for gastrointestinal system diseases can be explained by its high incidence in both study areas, which is probably related to an unhealthy lifestyle. The clinical signs of these diseases are common and are more easily identified by traditional healers (Punnam Chander et al., 2014), who have always focused on the maintenance of the digestive system, the dysfunction of which is associated with the most chronic and degenerative diseases. The lowest ICF values were observed for diseases of the oral cavity (0.39), followed by tumors or cancers (0.29), and finally the immune system (0.27).

3.7.2. Relative frequency citation (RFC)

The RFC was calculated for the most cited plant and the range was from 0.32 to 0.91 (Table 3). The plant species with the highest RFC were *Origanum glandulosum* Desf. (0.91), *Rosmarinus officinalis* L. (0.78), *Artemisia herba alba* Asso. (0.75), *Trigonella foenum-graecum* L. (0.72), *Punica granatum* L. (0.69), *Anthemis nobilis* L., *Ocimum basilicum* L., *Myrtus communis* L. (0.66), *Salvia officinalis* L., and *Nigella damascenna* L (0.62). These different plants have been cited by at least 40 informants out of 79 (more than half of the informants); they represent the most common and solicited medicinal plants by the population of the two cities of Constantine and Mila.

3.7.3. Fidelity level (FL)

FL has been calculated for the most cited plants (50 plants), and we considered those plants whose FL was between 50 and 100 (42 plants) as important and significant (Table 7). Four out of fourteen disease categories consists of plants having an FL lower than 50 (infectious diseases, inflammations, tumors or cancer, eye infections, and problems of the oral sphere). Only one plant had the highest FL of 100%: *Tilia cordata* Mill was used for nervous system diseases, unlike some other studies in which the number of plants with an FL of 100% was higher (Tahira et al., 2015; Benarba et al., 2015; Ghulam et al., 2015); the same plant was indicated to be used for mental nervous system in another survey carried out in Spain (Gonzalez-Tejero et al., 2008). However, four plants had a

high FL (between 93.09 and 96.67). Two of them were used to treat gastrointestinal system diseases: *Artemisia herba alba* Asso. with an FL of 95.74% and *Punica granatum* L. with an FL of 93.09%, while the FL of the latter (in the same category) was lower in the Mascara survey (50%). It is also indicated to be used for the digestive system in another Algerian survey and Albania (Gonzalez-Tejero et al., 2008). *Eucalyptus globulus* Labill was used for respiratory system diseases having an FL of 93.93%; the same plant in the same category had an FL of 100% in the survey of Mascara (Benarba et al., 2015) and had the same use in Albania (Gonzalez-Tejero et al., 2008), and finally *Aloe* sp. L. with an FL of 96.67% had use in skin diseases. Four categories of disease, each containing one single plant with an FL equal to 50 or more, are observed: *Crataegus oxyacantha* L. with an FL of 86.66% for cardiovascular diseases, followed by *Origanum majorana* L. with an FL of 70.97%, *Thapsia garganica* L. with an FL of 58.62%, and finally *Crocus sativus* L. with an FL of 51.85% for articular system diseases, traumatic injuries, and immune system. The high fidelity of medicinal plants confirmed the preference of the use of these plants more than the others used in the same category and their frequent use by informants of the two areas studied.

3.7.4. Use value (UV)

In this study, the UV range was from 0.115 to 2.280; the species having high UV were *Origanum glandulosum* Desf (2.280) and *Anthemis nobilis* L. (2.244), followed by *Lavandula officinalis* L. (2.143) and finally *Rosmarinus officinalis* L. (2.040). The high UV of each plant implies that these plants are the most recommended, used, and known by the informants, which implies the importance of plants. However, least UVs were reported for *Laurus nobilis* L. and *Eucalyptus globulus* L. with UV of 0.115; this low UV can be explained by the fact that the informants possess limited knowledge of the therapeutic uses of these plants or that they only mention the most known and effective uses.

4. Conclusion

The present ethnobotanical and pharmacological survey is the first one in Constantine and Mila (Northeast Algeria), which could contribute in safeguarding world cultural heritage as well as

Table 7
Fidelity level values for the most cited plants.

Ailment Category	Plants	FL (%)
Gastrointestinal system diseases	<i>Origanum glandulosum</i> Desf.	73.68
	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	71.43
	<i>Artemisia herba alba</i> Asso.	95.74
	<i>Punica granatum</i> L.	93.09
	<i>Anthemis nobilis</i> L.	51.22
	<i>Myrtus communis</i> L.	80.49
	<i>Laurus nobilis</i> L.	54.54
	<i>Mentha pulegium</i> L.	57.57
	<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	81.25
	<i>Ceratonia siliqua</i> L.	81.25
	<i>Centaurium erythraeae</i> Rafn	68.75
	<i>Origanum majorana</i> L.	51.61
	<i>Ajuga iva</i> L.Schreb	50
	<i>Anethum graveolens</i> L.	92
Respiratory system diseases	<i>Ecballium elaterium</i> (L). A. Rich.	62.50
	<i>Cupressus sempervirens</i> L.	52.38
	<i>Mentha x pulegium</i> L.	75
	<i>Ruta montana</i> L.	50
	<i>Eucalyptus globulus</i> Labill.	93.93
	<i>Anacyclus pyrethrum</i> (L.) Lag.	62.50
	<i>Cupressus sempervirens</i> L.	57.14
	<i>Thapsia garganica</i> L.	58.62
	<i>Parietaria officinalis</i> L.	83.33
	<i>Spergularia rubra</i> (L.) J. Presl & C. Presl.	88.23
	<i>Hordeum vulgare</i> L.	74.19
	<i>Origanum majorana</i> L.	70.97
	<i>Crataegus oxyacantha</i> L.	86.66
Articular system diseases and traumatic injuries	<i>Centaurium erythraeae</i> Rafn	65.62
	<i>Ajuga iva</i> L.Schreb	78.57
	<i>Zygophyllum cornutum</i> Coss.	65
	<i>Tilia cordata</i> Mill.	100
	<i>Crocus officinalis</i> L.	51.85
	<i>Lawsonia inermis</i> L.	50
	<i>Aloe</i> sp. L.	96.67
	<i>Ricinus communis</i> L.	76.66
	<i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	66.66
	<i>Salvia officinalis</i> L.	52.50
	<i>Mentha viridis</i> (L.) L.	53.85
	<i>Lavandula officinalis</i> L.	51.43
	<i>Eucalyptus globulus</i> Labill.	60.60
Urinary system, gynecologic, and reproductive diseases	<i>Ceratonia siliqua</i> L.	50
	<i>Peganum harmala</i> L.	57.14
	<i>Marrubium vulgare</i> L.	57.14

gathering precious information to create a national database and enrich those already existing, contributing through writing Algerian pharmacopeia, which is still transmitted orally.

The results of this survey showed basically that herbalists and the local population have important and considerable knowledge as indicated by the variety of species used to treat several ailments, which can be a precious source for gathering more ethnobotanical and pharmacological information in the Mediterranean region and compare how civilizations and traditions may affect the whole basin's herbal knowledge; this can also serve science in many fields: pharmacy, medicine, biology, and chemistry.

Finally, we would like to take the opportunity to advise local authorities that the concept of pharmacovigilance should be applied to natural drugs as has been done for synthetic ones; consequently, herbal medicine should have regular quality and clinical controls by approved regulatory organizations to prove their efficacy and safe use.

Acknowledgments

We would like to thank all the people who helped in gathering information for questionnaires (herbalists and local population) and botanical data (La Conservation des Forest) of Constantine and Mila. We also thank Dr. Eric Manoury for revising the English version of the article.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.08.016>.

References

- Akerreta, S., Cavero, R.Y., Calvo, M.I., 2007. First comprehensive contribution to medical ethnobotany of Western Pyrenees. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 3, 26.
- Al-Qura'n, S., 2009. Ethnopharmacological survey of wild medicinal plants in Showbak, Jordan. An ethnopharmacology survey. *J. Ethnopharmacol.* 123, 45–50.
- Andrade-Cetto, A., 2009. Ethnobotanical study of the medicinal plants from Tlanchinol, Hidalgo, México. *J. Ethnopharmacol.* 122, 163–171.
- Andrien, J., 2013. Flore de la Région de Constantine, ed. Forgotten Books (Original work published 1894), London.
- Asgarpanah, J., Kazemivash, N., 2012. Phytochemistry, pharmacology and medicinal properties of *Coriandrum sativum* L. *J. Pharm. Pharmacol.* 6 (31), 2340–2345.
- Baba Aissa, F., 1991. Medicinal plants in Algeria, in Bouchène and Ad. Diwan (Eds.), Identification, description of active ingredient properties and traditional use of common plants in Algeria, Algiers, pp.1–181.
- Battandier, J.A., Trabut, L.C., 1888. Flore de l'Algérie, Ancienne flore d'Alger transformée, ed. Adolphe Jourdan, Alger.
- Battandier, J.A., Trabut, L.C., 1893. Flore de l'Algérie, ed. Adolphe Jourdan, Alger.
- Benarba, B., Belabid, L., Righi, K., Bekkar, A., Eloussi, M., Khaldi, A., Hamimed, A., 2015. Ethnobotanical study of medicinal plants used by traditional healers in Mascara (North West of Algeria). *J. Ethnopharmacol.* 175, 626–637.
- Benitez, G., Gonzalez Tejero, M.R., Molero-Mesa, J., 2010. Pharmaceutical ethnobotany in the western part of Granada province (southern Spain): ethnopharmacological synthesis. *J. Ethnopharmacol.* 129, 87–105.
- Bersin, T., Muller, A., Schwarz, H., 1955. Ingredients of *Crataegus oxyacantha* L. III. Heptahydroxyflavan glycoside. *Arzneimittelforschung* 5 (8), 490–491.
- Bilia, A.R., Eterno, F., Bergonzi, M.C., Mazi, G., Vincieri, F.F., 2007. Evaluation of the content and stability of the constituents of mother tinctures and tinctures: the case of *Crataegus oxyacantha* L. and *Hieracium pilosella* L. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44 (1), 77–78.
- Blackwell, W.H., 1990. Poisonous and Medicinal Plants. Prentice-Hall International, Inc, Englewood Cliffs, New Jersey (USA).
- Boudjelal, A., Henchir, C., Sari, M., Sarri, D., Hendel, N., Benkhaled, A., Ruberto, G., 2013. Herbalists and wild medicinal plants in M'Sila (North Algeria): an ethnopharmacology survey. *J. Ethnopharmacol.* 148, 395–402.
- Boga, M., Kolak, U., Topcu, B.G., Bahadori, F., Kartal, M., Farnsworth, Norman R., 2011. Two new indole alkaloids from Vinca herbacea L. *Phytochem. Lett.* 4, 399–403.
- Bruneton, J., 1999. Pharmacognosie: Phytochimie, Plantes Médicinales. Tec & Doc, Paris.
- Carnat, A.P., Carnat, A., Fraisse, D., Lamaison, J.L., 1998. The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *Officinalis*) tea. *J. Pharma Acta Helv.* 72, 301–305.
- Carrió, E., Vallés, J., 2012. Ethnobotany of medicinal plants used in Eastern Mallorca (Balearic Islands, Mediterranean Sea). *J. Ethnopharmacol.* 14, 1021–1040.
- De Tommasi, N., Piacente, S., Gacs-Baitz, E., De Simone, F., Pizza, C., Aquino, R., 1998. Triterpenoidsapomins from *Spergulariaramosa*. *J. Nat. Prod.* 61, 323.
- Dobignard, A., Chatelain, C., 2010. Index synonymique et bibliographique de la flore d'Afrique du nord, 4 Volumes, Conservation des jardins botaniques, Genève.
- Dobignard, A., Chatelain, C., 2011. Index synonymique et bibliographique de la flore d'Afrique du nord, 4 Volumes, Conservation des jardins botaniques, Genève.
- Dobignard, A., Chatelain, C., 2012. Index synonymique et bibliographique de la flore d'Afrique du nord. Genève, 4 Volumes, Conservation des jardins botaniques, Genève.
- Fakchich, J., Elachouri, M., 2014. Ethnobotanical survey of medicinal plants used by people in Oriental Morocco to manage various ailments. *J. Ethnopharmacol.* 154, 76–87.
- Fernandez, M., Vega, F.A., Arrupe, T., Renedo, J., 1971. Flavonoids of Squill, *Urginea maritima*. *J. Phytochem.* Rep. 11, 1534.
- Friedman, J., Yaniv, Z., Dafni, A., Palewitch, D., 1986. A preliminary classification of the healing potential of medicinal plants, based on a rational analysis of an ethnopharmacological field survey among Bedouins in the Negev Desert, Israel. *J. Ethnopharmacol.* 16, 275–287.

- Ghulam, Y., Mushtaq, A., Shazia, S., Alharrasi, A., Javid, H., Zafar, M., Rehman, S., 2015. Ethnobotany of medicinal plants in the Thar Desert (Sindh) of Pakistan. *J. Ethnopharmacol.* 163, 43–59.
- Giday, M., Asfaw, Z., Woldou, Z., 2009. Medicinal plants of the Meinit ethnic group of Ethiopia: an ethnobotanical study. *J. Ethnopharmacol.* 124, 513–521.
- Gonzalez-Tejero, M.R., Casares-Porcel, M., Sánchez-Rojas, C.P., Ramiro-Gutiérrez, J.M., Molero-Mesa, J., Pieroni, A., Giusti, M.E., Censorii, E., de Pasquale, C., Della, A., Paraskeva-Hadjichambi, D., Hadjichambis, A., Houmani, Z., El-Demerdash, M., El-Zayat, M., Hmamouchi, M., ElJohrig, S., 2008. Medicinal plants in the Mediterranean area: synthesis of the results of the project Rubia. *J. Ethnopharmacol.* 116, 341–357.
- Güzel, Y., Güzelşemme, M., Miski, M., 2015. Ethnobotany of medicinal plants used in Antakya: a multicultural district in Hatay Province of Turkey. *Ethnopharmacology* 174, 118–152.
- Hammiche, V., Maiza, K., 2006. Traditional medicine in Central Sahara: pharmacopeia of Tassili N'ajjer. *J. Ethnopharmacol.* 105, 358–367.
- Hayashi, T., Yamagishi, T., 1988. Two xanthone glycosides from Gentiana lutea. *J. Phytochem.* 27, 3696–3699.
- Hedges, S.H., Herbert, R.B., 1981. δ-N-methylornithine: a natural constituent of *A苍ropa belladonna*. *Phytochemistry* 20, 2064–2065.
- Heinrich, M., Ankli, A., Frei, B., Weimann, C., Sticher, O., 1998. Medicinal plants in Mexico: healers' consensus and cultural importance. *Soc. Sci. Med.* 47, 1859–1871.
- Jaouhari, J.T., Lazrek, H.B., Seddik, A., Jana, M., 1999. Hypoglycaemic response to *Zygophyllumgaetulum* extracts in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Ethnopharmacol.* 64, 211–217.
- Joudah, H., Lemhadri, A., Maghrani, M., Zeggwagh, N.A., Eddouks, M., 2003. Cholesterol-lowering activity of the aqueous extract of *Spergulariapurpurea* in normal and recent-onset diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 87, 43–49.
- Kaddem, S.E., 1990. Les plantes médicinales en Algérie, ed. Bouchène, Oued Zenati, Algérie.
- Kadir, M.F., Bin Sayeed, M.S., Mia, M., 2012. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used by indigenous and tribal people in Rangamati, Bangladesh. *J. Ethnopharmacol.* 144, 627–637.
- Kadir, M.F., Bin Sayeed, M.S., Mia, M., 2013. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used by traditional healers in Bangladesh for gastrointestinal disorders. *J. Ethnopharmacol.* 147, 148–156.
- Kayani, S., Ahmad, M., Sultana, S., Khan Shinwari, Z., Zafar, M., Yaseen, G., Hussain, M., Bibi, T., 2015. Ethnobotany of medicinal plants among the communities of Alpine and Sub-alpine regions of Pakistan. *J. Ethnopharmacol.* 164, 186–202.
- Khled khoudjaa, N., Boulekache-Makhlof, L., Madani, K., 2014. Antioxidant capacity of crude extracts and their solvent fractions of selected Algerian Lamiaceae. *J. Ind. Crops Prod.* 52, 177–182.
- Kiss, T., Orvos, P., Bánsághi, S., Forgo, P., Jedlinszki, N., Tálosi, L., Hohmann, J., Csúpor, D., 2013. Identification of diterpene alkaloids from *Aconitum napellus* subsp. Firmum and GIRK channel activities of some Aconitum alkaloids. *Fitoterapia* 90, 85–93.
- Magwedde, K., Tshishikhawe, M.P., Luseba, D., Bhat, R.B., 2014. Ethnobotanical survey of medicinal plants used in treatment of ticks. *Int. J. Exp. Bot.* 83, 155–165.
- Malinowska, P., 2013. Effect of flavonoids content on antioxidant activity of commercial cosmetic plant extracts. *Herba Pol.* 6, 64–75.
- Maulidiani, Abas, F., Khatib, A., Shaari, K., Laijs, N.H., 2014. Chemical characterization and antioxidant activity of three medicinal Apiaceae species. *J. Ind. Crops Prod.* 55, 238–247.
- Merzouki, A., Ed-derfoufi, F., Molero Mesa, J., 2000. Contribution to the knowledge of Rifian traditional medicine. II: Folk medicine in Ksar Lakbir district (NW Morocco). *J. Fitoter.* 71, 278–307.
- Milos, M., Mastelic, J., Jerkovic, I., 2000. Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*). *I. Food Chem.* 71, 79–83.
- Musa, M.S., Abdelaasool, F.E., Elsheikh, E.A., Ahmed, L., Mahmoud, A.E., Yagi, S.M., 2011. Ethnobotanical study of medicinal plants in the Blue Nile State, South-eastern Sudan. *J. Med. Plants Res.* 5, 4287–4297.
- Mood, S.G., 2008. A contribution to some ethnobotanical aspects of Birjand flora (Iran). *Pak. J. Bot.* 40, 1783–1791.
- Nabaweya, A.I., El-Seedi, H.R., Desoky Mohammed, M.M., 2007. Phytochemical investigation and hepatoprotective activity of *Cupressus sempervirens* L. leaves growing in Egypt. *J. Nat. Prod. Res.: Former. Nat. Prod. Lett.* 21, 857–866.
- Parada, M., Carrió, E., Bonet, M.A., Vallès, J., 2009. Ethnobotany of the Alt Empordà region (Catalonia, Iberian Peninsula) Plants used in human traditional medicine. *J. Ethnopharmacol.* 124, 609–618.
- Pardo de Santiana, M., Tardio, J., Blanco, E., Carvalho, A.M., Lastra, J.J., San Miguel, E., Morales, R., 2007. Traditional knowledge of wild edible plants used in the northwest of the Iberian Peninsula (Spain and Portugal): a comparative study. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 3, 27.
- Pellati, F., Bruni, R., Bellardi, M.G., Bertaccini, A., Benvenuti, S., 2009. Optimization and validation of a high-performance liquid chromatography method for the analysis of cardiac glycosides in *Digitalis lanata*. *J. Chromatogr. A* 1216, 3260–3269.
- Pieroni, A., Giusti, M.E., de Pasquale, C., Lenzarini, C., Censorii, E., Gonzalez-Tejero, M.R., Sánchez-Rojas, C.P., Ramiro-Gutiérrez, J.M., Skoula, M., Johnson, C., Sarapaki, A., Della, A., Paraskeva-Hadjichambi, D., Hadjichambis, A., Hmamouchi, M., El-Johrig, S., El-Demerdash, M., El-Zayat, M., Al-Shahaby, O., Houmani, Z., Mekious, S., 2006. Circum Mediterranean cultural heritage and medicinal plant uses in traditional healthcare: a field survey in eight selected areas within the RUBIA project. *J. Ethnopharmacol.* 116, 341–357.
- Poutaraud, A., Girardin, P., 2002. Alkaloids in Meadow Saffron, *Colchicum autumnale* L. *J. Herbs Spices Med. Plants* 9, 63–79.
- Prakash, C., Phondani, A., Bhatt, E., Elsarrag, Y.A., Horr, 2015. Ethnobotanical magnitude towards sustainable utilization of wild foliage in Arabian Desert. *J. Ethnopharmacol.* . <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtcme.2015.03.003>
- Punnam Chander, M., Kartick, C., Gangadhar, J., Vijayachari, P., 2014. Ethnomedicine and health care practices among Nicobarese of Car Nicobar An indigenous tribe of Andaman and Nicobar Islands. *J. Ethnopharmacol.* 158, 18–24.
- Quezel, P., Santa, S., 1962&1963. Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Dé-sertiques Méridionales, 2Tomes. Centre National de la Recherche Scientifique, Paris.
- Rey, J.P., Levesque, J., Pousset, J.L., 1992. Analytical studies of isorhoeidine and rhoeagine in petal extracts of *Papaver rhoeas* L. using high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 596, 276–280.
- Rizk, A.M., Rimpler, H., 1972. Isolation of daphnoretin and β-sitosterol-β-D-glucoside from *Thymelea hirsuta*. *Phytochemistry* 11, 473–475.
- Rosenthal, J.P., 2006. Politics, culture, and governance in the development of prior informed consent in indigenous communities. *Curr. Anthropol.* 47, 119–142.
- Said, O., Khalil, K., Fulder, S., Azaizeh, H., 2002. Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel, the Golan Heights and the West Bank region. *Ethnopharmacological synthesis*. *J. Ethnopharmacol.* 83, 251–265.
- Sarri, M., Mouyeta, F.Z., Benziane, M., Cherieta, A., 2014. Traditional use of medicinal plants in a city at steppic character (M'sila, Algeria). *J. Pharm. Pharmacogn. Res.* 2 (2), 31–35.
- Shaw, D., Graeme, L., Duez, P., Williamson, E., Chan, K., 2012. Pharmacovigilance of herbal medicine. *J. Ethnopharmacol.* 140 (3), 513–518.
- Tahira, B., Mushtaq, A., Rsool Bakhsht, T., Niaz, M., Rukhsana, J., UrRehman, S., Shazia, S., Zafar, M., Ghulam, Y., 2015. Ethnobotany of medicinal plants in district Mastung of Balochistan province-Pakistan. *J. Ethnopharmacol.* 157, 79–89.
- Telefo, P.B., Moundipa, P.F., Tchouanguep, F.M., 2004. Inductive effects of the leaf mixture extract of *Aloe buettneri*, *Justicia insularis*, *Dicliptera verticillata* and *Hibiscus macranthus* on in vitro production of oestradiol. *J. Ethnopharmacol.* 90, 225–230.
- Trotter, R.T., Logan, M.H., 1986. Informant consensus: a new approach for identifying potentially effective medicinal plants. In: Etkin, N.L. (Ed.), *Plants in Indigenous Medicine and Diet*. Redgrave Publishing Company, Bedford Hills, New York, pp. 91–112.
- Tuttolomondo, T., Licata, M., Leto, C., Bonsangu, G., Gargano, M.L., Venturella, G., La Bella, S., 2014a. Ethnobotanical investigation on wild medicinal plants in the Monti Sicani Regional Park (Sicily, Italy). *J. Ethnopharmacol.* 153, 568–586.
- Tuttolomondo, T., Licata, M., Leto, C., Bonsangu, G., Gargano, M.L., Venturella, G., La Bella, S., 2014b. Popular uses of wild plant species for medicinal purposes in the Nebrodi Regional Park (North-Eastern Sicily, Italy). *J. Ethnopharmacol.* 157, 21–37.
- Verma, S.K., Jain, V., Verma, D., Khamesra, R., 2007. *Crataegus oxyacantha*-a Cardioprotective Herb. *J. Herb. Med. Toxicol.* 1, , pp. 65–71.
- Vitalini, S., Iriti, M., Puricelli, C., Ciuchi, D., Segale, A., Fico, G., 2013. Traditional knowledge on medicinal and food plants used in Val San Giacomo (Sondrio, Italy) An alpine ethnobotanical study. *J. Ethnopharmacol.* 145, 517–529.
- Wang, Z., Hu, J., Du, H., He, S., Li, Q., Zhang, H., 2016. Microwave-assisted ionic liquid homogeneous liquid–liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography for the determination of anthraquinones in *Rheum palmatum* L. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 125, 178–185.
- Yemele, M.D., Telefo, P.B., Lienou, L.L., Tagne, S.R., Fodouop, C.S.P., Goka, C.S., Lemfack, M.C., Moundipa, F.P., 2015. Ethnobotanical survey of medicinal plants used for pregnant women's health conditions in Menoua division-West Cameroon. *J. Ethnopharmacol.* 160, 14–31.

Nom et prénom : Bensari Souheir	Date de soutenance : 27-10-2021
Thème : Etude et valorisation des plantes médicinales algériennes; Contribution à une enquête ethnobotanique et investigations phytochimiques et biologiques sur les deux plantes: <i>Iris unguicularis</i> Poir. et <i>Dittrichia viscosa</i> (L.) Greuter.	
Diplôme : Doctorat 3 ^{ème} cylce	
Résumé : Le présent travail a pour but la valorisation de la flore Algérienne par des investigations phytochimiques et biologiques sur les deux espèces; <i>Iris unguicularis</i> Poir. et <i>Dittrichia viscosa</i> (L.) Greuter. Cette étude a permis d'identifier plusieurs composés phytochimiques et d'enregistrer des résultats satisfaisants pour les différentes activités biologiques testées pour les deux espèces. L'analyse par LC-MS IT-TOF des différents extraits (AI, CI et BI) de l'espèce <i>Iris unguicularis</i> Poir. a permis de quantifier 70 composés tandis que l'analyse par la LC-MS-MS réalisée selon une méthode validée par l'emploi de 37 standards a révélé la présence de 17 composés phénoliques dont les plus riches étaient les extraits AI et CI. En effet, l'extrait AI était majoritairement constitué de: l'acide 4-OH-benzoïque (2218.2 µg analyte/g extrait), l'acide syringinique (1218.6 µg analyte/g extrait), l'acide protocatechuique (1080.4 µg analyte/g extrait) et l'acide <i>p</i> -coumarique (1071.2 µg analyte/g extrait), l'extrait CI quant à lui était majoritairement composé de: naringinie (1453,4 µg analyte/g extrait) et d'acide férulique (1088, 41 µg analyte/g extrait). Les résultats ont également montré que ces extraits avaient une activité antioxydante et antibactérienne élevées. L'élucidation structurale de l'acide isocostique isolé de l'espèce <i>Dittrichia viscosa</i> (L.) Greuter était réalisée par la technique RMN (¹ H et ¹³ C). Les résultats des activités réalisées sur ce composé avaient révélé son pouvoir apoptotique d'une part, par son effet pro-oxydant qui lui permet de générer l'anion superoxyde et d'autre part par son effet sur le gonflement mitochondrial. La viabilité des cellules via le test MTT testée sur les lignées U118, Caco-2, SKOV-3 et HDF avait montré que l'acide isocostique avait un effet notable sur la prolifération cellulaire en provoquant une cytotoxicité dose-dépendante surtout sur la lignée U118 dans laquelle la prolifération est clairement diminuée entre 100µg et 200 µg avec une CI50 de 72,32 µg/ml. Mots clés: <i>Iris unguicularis</i> Poir., <i>Dittrichia viscosa</i> (L.) Grueter, composés phénoliques, acide isocostique, LC-MS/MS, activité antioxydante, activité antibactérienne, activité cytotoxique.	
Laboratoire de recherche : Génétique, Biochimie et biotechnologie végétale- UFMC-1	
Président : A.BENSEGUENI	Prof. UFM Constatine 1
Directeur de thèse : D.KHELIFI	Prof. UFM Constatine 1
Co- directeur de thèse : T.N.MOUAS	MCA. UFM Constatine 1
Examinateurs : A.ZELLAGUI	Prof. Université Larbi Ben M'hidi. Oum El Bouaghi
I.BELLIL	MCA. UFM Constatine 1