

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

Université Frères Mentouri Constantine-1
Faculté des Sciences Exactes-Département de Chimie.



N^o d'ordre :.....

N^o de série :.....

THESE

Présentée pour l'obtention
Du diplôme de Doctorat en Sciences

Spécialité : Chimie organique

Option : Phytochimie

Par

Redouane LEMOUI

Intitulé

**Métabolites secondaires et principes actifs.
Détermination structurale de ces principaux composés naturels issus d'espèces
endémiques de la région de Tébessa et de la Kabylie.**

Devant le jury

Pr. Salah AKKAL	Université Frères Mentouri Constantine-1	Président
Dr. Samira BENYAHIA	Ecole Supérieure des Technologies Industrielles-Annaba	Rapporteur
Pr. Ramdane SEGHIRI	Université Frères Mentouri Constantine-1	Examineur
Dr. Lotfi BENMEKHBI	Université Salah Boubnider Constantine-3	Examineur
Dr. Ouahiba BENAÏSSA	Université Mostefa Benboulaïd Batna-2	Examinatrice
Dr. Sabrina BICHA	Université Frères Mentouri Constantine-1	Examinatrice

Année universitaire : 2018/2019

Dédicaces

Je dédie cette thèse

A mon père et ma mère, j'espère que vous trouverez ici le fruit de vos nombreux sacrifices. Je prie dieu pour qu'il vous prête longue vie et bonne santé.

A mes frères et sœurs que j'aime énormément.

A toute ma famille.

A mes collègues.

A toute personne qui me connais.

Redouane.

Remerciements

Avant toute chose, je tiens à remercier Allah le tout puissant, pour m'avoir donnée la force et la patience durant ces longues années d'étude.

J'ai eu la chance d'effectuer ce travail dans trois laboratoires de recherches :

- ✓ *A l'unité de recherche de Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques, de l'université des Frères Mentouri-Constantine-1, sous la direction des Professeurs **Fadila BENAYACHE** et **Samir BENAYACHE**. Je tiens à leur exprimer mes sincères remerciements pour m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire.*
- ✓ *Au Laboratoire «Plant Research» de l'université «Cankiri Karatekin-Turkie» sous la direction du Professeur **Ibrahim DEMIRATS** pour qui j'exprime ma profonde gratitude et mon attachement respectueux*
- ✓ *A l'université «Degli Studi di Salerno Department of BioMedical and Pharmaceutical Sciences FARMABIOME» sous la direction du Professeur **Luca RASTRELLI** et du Docteur **Patrizia PICERNO** qui ont été d'un chaleureux accueil et d'une aide précieuse durant mon stage.*

*Mes remerciements les plus vifs s'adressent à mon directeur de thèse **Dr. Samira BENYAHIA** de l'Ecole Supérieure des Technologies Industrielles-Annaba qui m'a honoré en acceptant de diriger ce travail. Je lui exprime mes sentiments de reconnaissances les plus sincères pour sa précieuse aide ses encouragements et ses conseils.*

*Je tiens à remercier **Pr. Salah AKKEL** de l'université des Frères Mentouri Constantine-1 d'avoir accepté de présider le jury de ma soutenance de thèse, qu'il trouve ici toutes mes expressions respectueuses.*

*J'adresse également mes remerciements au **Pr. Ramdane SEGHIRI** de l'université des Frères Mentouri Constantine-1 et **Dr. Lotfi BENMEKHBI** de l'université Salah Boubnider Constantine-3 pour avoir accepté de juger ce travail.*

*Je remercie également **Dr. Ouahiba BENAÏSSA** de l'université Mostefa Benboulaïd Batna-2 et **Dr. Sabrina BICHA** de l'université des Frères Mentouri Constantine-1 d'avoir accepté de faire partie du jury et d'examiner cette thèse.*

*Je remercie chaleureusement mon collègue, **Dr. Labib NOMAN** de l'université des Frères Mentouri Constantine-1, qui malgré la distance a toujours répondu présent à mes sollicitations.*

*Je remercie ma collègue, **Dr. Amina BOUDJADA** de l'Université des Frères Mentouri Constantine-1, pour les échanges scientifiques qu'on a pu partager. Recevez ici l'expression de ma gratitude et mon profond respect.*

*Mes remerciements vont également aux **Dr. Rebbas KHELLAF** de l'Université de M'Sila et **Dr. Khaled BOUCHAMA** de l'Université des Frères Khenchla, pour leur contribution à l'identification de nos espèces.*

Je remercie mes collègues et amis pour les sympathiques moments qu'on a passé ensemble, en particulier : Abd Erahmane, Mohamed, Ahmed, Seif Eddine, Omar, Ammar, Yazid, Seif, Tarek, Tarek, Hicham, Siham, Fairouz, Madjda, Khawla, Sarah, Houria, Ilham, Nawel, et bien d'autres encore Meriem, Fatine, Wassila, Adra, Ammar, Elhadj, Kadi, Bilal, Nabil, Issam, Zoubir.

Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont à toute personne qui a participé de près ou de loin dans la réalisation de ce travail.

Abréviations et symboles

AcOEt	Acétate d'éthyle
BuOH	Butanol
MeOH	Méthanol
CH ₂ Cl ₂	Dichlorométhane
H ₂ O	Eau distillée
CHCl ₃	Chloroforme
CD ₃ OD	Méthanol tétradeutéié
DMSO -d ₆	Diméthylsulfoxyde deutéré
CCM	Chromatographie sur couche mince
COSY	Correlated Spectroscopy
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
ppm	Unité de δ (partie par million)
RMN- ¹ H	Résonance magnétique nucléaire du proton
RM- ¹³ C	Résonance Magnétique Nucléaire du carbone 13
δ_C	Déplacement chimique du carbone en ppm
δ_H	Déplacement chimique du proton en ppm
<i>s</i>	Singulet
<i>t</i>	Triplet
<i>d</i>	Doublet
<i>dd</i>	Doublet de doublets
<i>J</i> (Hz)	Constante de couplage exprimée en Hertz
MS	Mass Spectroscopy
HR	Haute Résolution
<i>t_R</i>	Temps de rétention
Glc	Glucose
Rha	Rhamnose
DPPH	Radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle
IC ₅₀	Concentration inhibitrice a 50%
E. Coli	Esherichia coli
ANOVA	Analyse de variance
ATCC	American Type Culture Collection
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences

Table des matières

Introduction générale.....	1
Références bibliographiques.....	3

Chapitre 1 : Généralités et données bibliographiques

I. La famille des Berberidaceae.....	4
I.1. Introduction bibliographique sur la famille des Berbéridaceae.....	4
I.1.1. Généralité.....	4
I.1.2. Description Botanique.....	4
I.2. Introduction bibliographique sur le genre <i>Berberis</i>	4
I.2.1. Généralité.....	4
I.2.2. Description botanique.....	5
I.2.3. Utilisation en médecine traditionnelle.....	5
I.2.4. Propriétés pharmacologiques des espèces du genre <i>Berberis</i>	5
I.2.5. Etude phytochimique antérieure sur les espèces du genre <i>Berberis</i>	11
I.3. Présentation de l'espèce <i>Berberis hispanica</i>	15
I.3.1. Classification dans la systématique botanique.....	15
I.3.2. Description botanique et répartition.....	15
I.3.3. Utilisation médicinale.....	15
II. La famille des Lamiaceae.....	16
II.1. Introduction bibliographique sur la famille des Lamiaceae.....	16
II.1.1. Généralité.....	16
II.1.2. Description botanique.....	16
II.2. Introduction bibliographique sur le genre <i>Stachys</i>	17
II.2.1. Généralité.....	17
II.2.2. Propriétés pharmacologiques des espèces du genre <i>Stachys</i>	17
II.2.3. Etude phytochimique antérieurs sur les espèces du genre <i>stachys</i>	19
II.3. Présentation de l'espèce <i>Stachys brachyclada</i>	31
II.3.1. Classification dans la systématique botanique.....	31
II.3.2. Description botanique et répartition.....	31
Références bibliographiques.....	33

Chapitre 2 : Description des travaux

I. Etude phytochimique de l'espèce <i>Berberis hispanica</i>	53
I.1. Récolte de la matière végétale.....	53
I.2. Extraction.....	53
I.3. Séparation chromatographique.....	54
I.3.1. Etude de l'extrait acétate d'éthyle.....	54
I.3.1.1. Séparation chromatographique sur colonne.....	54
I.3.1.2. Etude de deux fractions de la colonne chromatographique.....	55
a) La fraction F2.....	55
b) La fraction F4.....	55
I.3.2. Etude de l'extrait <i>n</i> -BuOH.....	56
II. Etude phytochimique de l'espèce <i>Stachys brachyclada</i>	57
II.1. Récolte de la matière végétale.....	57
II.2. Extraction.....	57
II.3. Séparation chromatographique.....	58
II.3.1. Etude de l'extrait méthanolique.....	58
II.3.1.1. Séparation chromatographique sur colonne.....	58
II.3.1.2. Etude de trois fractions de la colonne chromatographique.....	59
a) La fraction F 7.....	59
b) La fraction F8.....	60
c) La fraction F12.....	60
III. Etude biologique des extraits et produits de l'espèce <i>Berberis. Hispanica</i>	60
III.1. Analyse quantitative des composés phénoliques.....	60
III.1.1. Dosage des polyphénols totaux (TCP).....	60
III.1.1.1. Principe.....	60
III.1.1.2. Protocole.....	60
III.1.2. Dosage des flavonoides (TCF).....	61
III.1.2.1. Principe.....	61
III.1.2.2. Protocole.....	61
III.2. Evaluation de l'activité antioxydante par le test DPPH.....	61
III.3. Evaluation de l'activité antibactérienne.....	62
III.4. Evaluation de l'activité antiproliférative.....	63
III.4.1. Conditions de la culture cellulaire.....	63

III.4.2. Préparation de la solution.....	63
III.5. Analyses statistiques.....	64
Références bibliographiques.....	65

Chapitre 3 : Résultats et discussion

I. Activité biologique.....	66
I.1. Dosage des polyphénols totaux (TCP).....	66
I.2. Dosage des flavonoïdes.....	66
I.3. Evaluation de l'activité antioxydante.....	67
I.4. Activité antibactérienne.....	69
I.5. Evaluation de l'activité antiproliférative.....	70
II. Identification des produits isolés de <i>Berberis hispanica</i>	71
II.1. Identification des produits isolés de l'extrait AcOEt de <i>B.hispanica</i>	71
II.1.1. Elucidation structurale du produit Bh-1.....	71
II.1.2. Elucidation structurale du produit Bh-2.....	76
II.1.3. Elucidation structurale du produit Bh-3 isolé de l'extrait n-BuOH de <i>B. hispanica</i>	81
II.2. Propriétés biologique de la tamarixétine et de la rutine de l'espèce <i>B.hispanica</i>	86
III. Identification des produits isolés de <i>Stachys brachyclada</i>	88
III.1. Identification des produits isolés de l'extrait MeOH de <i>S.brachyclada</i>	88
III.1.1. Elucidation structurale du produit Sb-1.....	88
III.1.2. Elucidation structurale du produit Sb-2.....	93
III.1.3. Elucidation structurale du produit Sb-3.....	98
III.1.4. Elucidation structurale du produit Sb-4.....	105
III.1.5. Elucidation structurale du produit Sb-5.....	107
Références bibliographiques.....	109
Conclusion générale.....	111

Liste des tableaux

Tableau 1 : Activité pharmacologique des espèces du genre <i>Berberis</i>	6
Tableau 2 : Les composés isolés de différentes espèces du genre <i>Berberis</i>	12
Tableau 3 : Usages et propriétés de quelques espèces du genre <i>Stachys</i>	18
Tableau 4 : Les composés isolés de différentes espèces du genre <i>Stachys</i>	19
Tableau 5 : Les noms des différents principes actifs du genre <i>stachys</i>	30
Tableau 6 : Fractions issues de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait AcOEt des parties aériennes de l'espèce <i>B.hispanica</i>	55
Tableau 7 : Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait <i>n</i> -BuOH des parties aériennes de l'espèce <i>B. hispanica</i>	56
Tableau 8 : Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait méthanol des parties aériennes de <i>S. brachyclada</i>	59
Tableau 9 : Polyphénols totaux des différents échantillons de <i>B. hispanica</i>	66
Tableau 10 : Flavonoïdes totaux de <i>B. hispanica</i>	66
Tableau 11 : Inhibition du radical DPPH par les extraits de <i>B. hispanica</i>	67
Tableau 12 : Inhibition du radical DPPH par les fractions de <i>B. hispanica</i>	68
Tableau 13 : Activité antibactérienne de l'extrait acétate d'éthyle de <i>B. hispanica</i>	69
Tableau 14 : Activité antibactérienne de l'extrait <i>n</i> -butanol de <i>B. hispanica</i>	69
Tableau 15 : Données RMN- ¹ H (600 MHz, DMSO-d ₆) du produit Bh-1	72
Tableau 16 : Données RMN- ¹³ C (150 MHz, DMSO-d ₆) du produit Bh-1	72
Tableau 17 : Données RMN ¹ H (600 MHz, DMSO-d ₆) du produit Bh-2	77
Tableau 18 : Données RMN ¹³ C (150 MHz, DMSO-d ₆) du produit Bh-2	77
Tableau 19 : Données RMN ¹ H (600 MHz, DMSO-d ₆) du produit Bh-3	82
Tableau 20 : Données RMN- ¹³ C (150 MHz, DMSO-d ₆) du produit Bh-3	82
Tableau 21 : Données RMN- ¹ H (600 MHz,) du produit Sb-1	89
Tableau 22 : Données RMN ¹³ C (150 MHz, CD ₃ OD) du produit Sb-1	90
Tableau 23 : Données RMN ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) du produit Sb-2	94
Tableau 24 : Données RMN ¹³ C (150 MHz, CD ₃ OD) du produit Sb-2	95
Tableau 25 : Les données de la RMN-1D et 2D (600 MHz, CD ₃ OD) du produit Sb-3	100
Tableau 26 : Données RMN- ¹ H (600 MHz,CD ₃ OD) du produit Sb-4	105
Tableau 27 : Données RMN- ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) du produit Sb-5	107

Liste des figures

Figure 1 : Les diverses activités pharmacologiques du genre <i>Berberis</i>	6
Figure 2 : Les majors constituants chimiques des différents espèces du genre <i>Berberis</i>	11
Figure 3 : Les principes actifs les plus importants de <i>Berberis</i>	14
Figure 4 : <i>Berberis hispanica</i>	15
Figure 5 : Les diverses activités pharmacologiques des espèces du genre <i>Stachys</i>	18
Figure 6 : Les principes actifs les plus importants de <i>Stachys</i>	29
Figure 7 : <i>Stachys Brachyclada</i>	31
Figure 8 : Les caractéristiques morphologiques de <i>Stachys Brachyclada</i>	32
Figure 9 : Protocole d'extraction des parties aériennes de l'espèce <i>B. hispanica</i>	53
Figure 10 : Diagrammes des masses et rendements des extraits obtenus.....	54
Figure 11 : Diagramme récapitulatif de séparation de l'extrait AcOEt de <i>B. hispanica</i>	55
Figure 12 : Diagramme de séparation de l'extrait <i>n</i> -BuOH de <i>B. hispanica</i>	57
Figure 13 : Diagrammes des masses et rendements des extraits obtenus.....	57
Figure 14 : Protocole d'extraction des feuilles de l'espèce <i>S. brachyclada</i>	58
Figure 15 : Activité antiradicalaire (DPPH) des extraits de <i>B. hispanica</i>	67
Figure 16 : Activité antiradicalaire (DPPH) des fractions de <i>B. hispanica</i>	68
Figure 17-a : Activité antiproliférative de l'extrait <i>n</i> -BuOH de la <i>B. hispanica</i> contre les cellules HeLa.....	70
Figure 17-b : Activité antiproliférative de la fraction T45-47 de l'espèce <i>B. hispanica</i> contre les cellules HeLa.....	70
Figure 18 : Spectre RMN- ¹ H du produit Bh-1	73
Figure 19 : Spectre RMN- ¹ H étalé du produit Bh-1	74
Figure 20 : Spectre de corrélation homonucléaire COSY du composé Bh-1	74
Figure 21 : Spectre de corrélation hétéronucléaire HSQC du composé Bh-1	75
Figure 22 : Spectre de corrélation hétéronucléaire HMBC du composé Bh-1	75
Figure 23 : Spectre RMN- ¹ H du produit Bh-2	78
Figure 24 : Spectre RMN- ¹ H étalé du produit Bh-2	79
Figure 25 : Spectre de corrélation homonucléaire COSY du composé Bh-2	79
Figure 26 : Spectre de corrélation hétéronucléaire HSQC du composé Bh-2	80
Figure 27 : Spectre de corrélation hétéronucléaire HMBC du composé Bh-2	80

Figure 28 : Spectre RMN- ¹ H du produit Bh-3	83
Figure 29 : Spectre RMN- ¹ H étalé du produit Bh-3	84
Figure 30 : Spectre de corrélation hétéronucléaire HSQC du composé Bh-3	84
Figure 31 : Spectre de corrélation hétéronucléaire HMBC du composé Bh-3	85
Figure 32-a : Activité antiproliférative de la Tamarixétine de <i>B. hispanica</i> contre les cellules HeLa.....	86
Figure 32-b : Activité antiproliférative de la Rutine de <i>B. hispanica</i> contre les cellules HeLa.....	86
Figure 33 : Le traitement de l'activité antiproliférative pendant 24h et 48h.....	87
Figure 34 : Spectre RMN- ¹ H du produit Sb-1	91
Figure 35 : Spectre RMN- ¹ H étalé du produit Sb-1	91
Figure 36 : Spectre de corrélation hétéronucléaire HMBC du composé Sb-1	92
Figure 37 : Spectre RMN- ¹ H du produit Sb-2	96
Figure 38 : Spectre RMN- ¹ H étalé du produit Sb-2	96
Figure 39 : Spectre de corrélation hétéronucléaire HSQC du composé Sb-2	97
Figure 40 : Spectre de corrélation hétéronucléaire HMBC du composé Sb-2	97
Figure 41 : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé Sb-3	101
Figure 42 : Spectre RMN- ¹ H du produit Sb-3	102
Figure 43 : Spectre RMN- ¹ H étalé du produit Sb-3	102
Figure 44 : Spectre hétéronucléaire HSQC étalé du produit Sb-3	103
Figure 45 : Spectre homonucléaire Cosy du produit Sb-3	103
Figure 46 : Spectre hétéronucléaire HMBC étalé du produit Sb-3	104
Figure 47 : Spectre RMN- ¹ H du produit Sb-4	106
Figure 48 : Spectre RMN- ¹ H du produit Sb-5	108

Introduction générale

Introduction générale

Aujourd'hui et malgré les progrès réalisés en médecine, plusieurs populations ont recours aux plantes pour se soigner, soit par inaccessibilité aux médicaments prescrits par la médecine moderne, soit parce que ces plantes ont donné des résultats thérapeutiques très encourageants et à moindres effets secondaires remarquables lors de leur utilisation, soit parce qu'elles sont moins agressives et moins nocives pour l'organisme.

Plus de 120 composés provenant de plantes sont aujourd'hui utilisés en médecine moderne et près de 75% d'entre eux sont utilisés selon leur usage traditionnel.

Selon certains auteurs, les composés d'origine naturelle présentent l'avantage d'avoir une très grande diversité de structures chimiques et ils possèdent aussi un très large éventail d'activités biologiques [1].

Les propriétés antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début du 20^{ème} siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser [2].

L'étude de la chimie des plantes est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté. Cela tient principalement au fait que le règne végétal représente une source importante d'une immense variété de molécules bioactives [3].

La flore Algérienne avec ses 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques dont 15% endémiques [4], ce potentiel floristique d'intérêt biomédical a poussé les chercheurs Algériens à explorer ces ressources sur le plan phytochimique ainsi que sur le plan pharmacologique.

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation des plantes algériennes par la recherche des substances naturelles d'origines végétales à activités biologiques lancé par notre laboratoire depuis une vingtaine d'années où plusieurs molécules nouvelles ont été isolées et déterminées. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'étude des deux espèces *Berberis hispanica* (Berberidaceae) et *Stachys brachyclada* (Lamiaceae), en fixant comme principal objectif, l'extraction, la séparation et l'identification des métabolites secondaires ainsi que l'évaluation de leurs activités biologiques.

Introduction générale

Ce manuscrit est divisé en trois chapitres :

- Un premier chapitre où nous présentons la description botanique et l'étude bibliographique de la famille, des genres et des espèces étudiées.
- Un deuxième chapitre qui sera consacré à la présentation de nos travaux de séparation et de purification des métabolites secondaires et les méthodes utilisés pour les analyses quantitatives des composés phénoliques et les activités étudiés (activité antioxydante, antibactérienne et anti proliférative ainsi sur).
- Un troisième chapitre consacré à la discussion des résultats obtenu dans l'évaluation biologique et la détermination structurale des métabolites secondaires isolés des deux espèces en combinant les différentes méthodes spectroscopiques (SM, RMN mono et bidimensionnelles).
- Enfin une conclusion générale synthétisera l'apport de ce travail.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- Bérubé-Gagnon J. (2006). Isolation et identification de composés antibiotiques des écorces de *Picea mariana*. Mémoire comme exigence partielle de la maîtrise en ressources renouvelables. Québec.
- 2- Yano Y., Satomi M., Oikawa H. (2006). Antimicrobial effect of spices and herbs on *Vibrio parahaemolyticus*. *International J Food Microbiology*, 111, 6-11.
- 3- Ferrari J. (2002). Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des Thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles: *Gnidia involucrata* Steud. ex A. Rich. Thèse de doctorat. Lausanne.
- 4- Quezel P., Santa S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I, C.N.R.S. Paris.

Chapitre 1

Généralités et données bibliographiques

I. La famille des Berberidaceae

I.1. Introduction bibliographique sur la famille des Berbérédaceae

I.1.1. Généralité

Les plantes de la famille des berbérédacées dont le terme botanique est berberidaceae, est une famille de moyenne importance qui rassemble d'après la dernière révision de la classification phylogénétique 701 espèces classées en 18 genres. Cette famille a pour caractéristique commune de présenter une teinte jaune due à la berbérine (alcaloïde) qu'elle renferme. Les berbérédacées sont principalement une famille d'arbustes avec quelques herbacées disséminée. On la retrouve principalement dans les zones tempérées du nord et sur les montagnes subtropicales [1].

I.1.2. Description Botanique

Herbes ou arbustes vivaces à feuilles caduques ou sempervirentes, parfois rhizomateuses, dont les tiges sont avec ou sans épines. Feuilles alternes, opposées ou fasciculées, simples, 2-3-foliolées, ou 1-3-pennées ou 2-3 (-4)-ternées. Stipules présentes ou absentes et nervation pennée ou palmée. Inflorescences terminales ou axillaires, racèmes, cymes, ombelles (ou pseudo-ombelles), épis ou panicules, ou fleurs solitaires ou en paires, fleurs pédicellées ou sessiles. Fleurs bisexuées, discrètes ou voyantes, radialement symétriques; glandesstipitale absentes (sauf pour *Vancouveria*); bractéoles sépaloïdes 0-9; périanthe parfois absent (*Achlys*), plus fréquemment présent, 2 ou 3-mères, ou sépales et pétales s'inter changeant (*Nandis*); sépales 6, distincts, souvent pétaloïdes et colorées, non éperonnées; pétales 6-9, distinctes, plans ou à capuchon; nectaire présent; étamines 6; anthères déhiscentes par des valves ou des fentes longitudinales; ovaire supérieur, apparemment 1-carpellate; placentation marginale ou apparente basale; style présent ou absent ; parfois persistant dans les fruits comme un bec. Follicules de fruits, baies ou utricules. Graines 1-50, parfois arilles; l'endosperme abondant; embryon grand ou petit; graines matures élevées sur la tige allongée de Caulophyllum [2].

I.2. Introduction bibliographique sur le genre *Berberis*

I.2.1. Généralité

Le genre *Berberis* (Epine-vinette) appartient à la famille des Berberidaceae et comprend principalement des plantes médicinales importantes et sauvages [3]. Le genre compte près de 500 espèces végétales dicotylédones appartenant à la famille des Berbérédacées originaires principalement d'Asie et d'Amérique du sud. Quelques espèces sont européennes et nord-américaines. Son nom viendrait du nom arabe du fruit de ces plantes et le

qualificatif "vinette" français est une appellation populaire de l'Oseille. En France depuis le 19^{ème} siècle, l'épine-vinette a été fortement éradiquée à cause de son rôle dans la propagation de la rouille noire du blé.

I.2.2. Description botanique

Ce sont des arbustes épineux à feuillage caduc, persistant ou semi-persistant [4], hauts de 60 centimètres (variétés naines) à 3 mètres. Leurs feuilles principales se transforment en épines solitaires ou groupées. Les feuilles des espèces persistantes sont ovales, elliptiques ou oblongues, celles des espèces caduques sont ovales et se parent de belles couleurs automnales. Selon les espèces, elles sont vertes ou rouges, mates ou lustrées. Les *berbérís* fleurissent au printemps. Leurs fleurs sont jaunes orangés ou violacés, groupées en grappes, fascicules, cymes ou ombelles. Elles présentent un calice de 6 à 12 sépales, d'une corolle de 6 pétales et d'un pistil qui se transforme en baie jaune orangé, rouge à noire selon les espèces. Ces baies, légèrement toxiques avant maturité (comestibles une fois mûres mais acides), apparaissent à l'automne et persistent sur la plante tout l'hiver.

I.2.3. Utilisation thérapeutique

Les plantes du genre *Berberis* ont une place importante dans divers systèmes de médecine traditionnelle dans le monde entier, grâce à leurs propriétés médicinales efficaces. L'ancienne littérature ayurvédique de l'Inde enregistre des utilisations de *Rasaut* (Jus concentré), un extrait de tige ou de racine de *Berberis* sp. Les utilisations spécifiques de *Rasaut* pour guérir les maladies oculaires et les ulcères indolents ont acquis une grande renommée. Dans la pharmacopée britannique, l'alcaloïde (berbérine), principe actif de plusieurs espèces de *Berberis* et de *Mahonia*, a été incorporé pour son utilisation réussie dans le traitement des plaies orientales et on pensait que son action était aussi puissante que la quinine. Les racines des espèces de *Berberis* sont utilisées comme antipériodiques, antipyrétiques. L'écorce est utilisée comme tonique et anti-périodique. Certaines espèces de ce genre sont également connues pour leurs activités cardiovasculaires, hépatoprotectrices, antimicrobiennes et anticancéreuses [5].

I.2.4. Propriétés pharmacologiques des espèces du genre *Berberis*

Les plantes du genre *Berberis* possèdent des activités médicinales immenses, quelques espèces de ce genre ont été examinées pour leurs activités biologiques. Les résultats expérimentaux ont montré un large effet, dont les activités pharmacologiques des espèces de ce genre sont résumées dans la figure-1 et reportés dans le tableau-1.

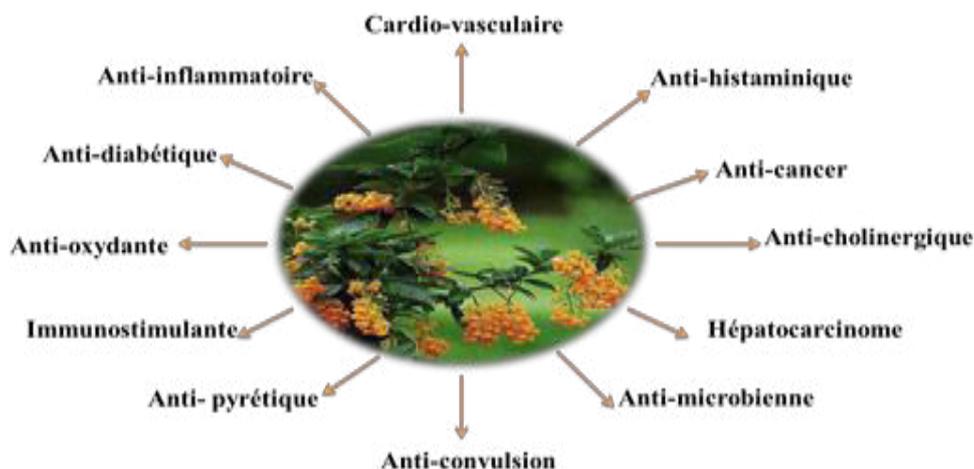


Figure-1 : Les diverses activités pharmacologiques du genre *Berberis*

Tableau-1 : Activité pharmacologique des espèces du genre *Berberis*

Activités	Source (espèce)	Partie de la plante	<ul style="list-style-type: none"> • Type d'extrait • Fraction • Isolat testé 	<ul style="list-style-type: none"> • Procédures expérimentales • Animaux • Organisme étudié • Type d'étude 	Références
Cardio-vasculaire	<i>B. darwinii</i>	L'écorce des tiges	Extrait méthanolique	Essai sur l'inhibition in vitro de l'acétylcholinestérase.	[6]
	<i>B. aristata</i>	Racines	Extrait aqueux du méthanol	Rats	[7]
	<i>B. lycium</i>	L'écorce des tiges	Extrait hydroalcoolique	Cochons d'Inde	[8]
		L'écorce des racines	Extrait hydroalcoolique	Cochons d'Inde	[9]
		Racines	Berbèrine isolée	Les techniques de micro électrode ont été utilisées pour enregistrements intracellulaires de la membrane transmembranaire potentiels électriques sur canin Purkinje cardiaque et fibres musculaires ventriculaires et sur les fibres auriculaires du lapin.	[10]
		Racines	Berbèrine isolée	Cochons d'Inde	[11]

Tableau-1 (suite) : Activité pharmacologique des espèces du genre *Berberis*

Activités	Source (espèce)	Partie de la plante	<ul style="list-style-type: none"> • Type d'extrait • Fraction • Isolât testé 	<ul style="list-style-type: none"> • Procédures expérimentales • Animaux • Organisme étudié • Type d'étude 	Références
Cardio-vasculaire	<i>B. orthobotrys</i>	L'écorce des racines	Berbamine isolée	Cochons d'Inde	[12]
		L'écorce des racines	Berbamine isolée	Lapins et rats	[8]
		L'écorce des racines	Berbamine isolée	Cochons d'Inde	[13, 14]
	<i>B. chitria</i>	L'écorce des racines	Berbèrine isolée	Cochons d'Inde	[15]
	<i>B. chilensis</i>	L'écorce des racines	Alcaloïde total	Activité électrique du stimulateur cardiaque de grenouille.	[16]
		L'écorce des racines	Alcaloïde total	Cochons d'Inde	[17]
		L'écorce des racines	Berberidine isolée et tétrahydroberbérine	Les muscles des rats	[18]
	<i>B. paraspecta</i>	Racines	Extraits aqueux	Test de la membrane chorioallantoïque (CAM), culture in vitro de cellules endothéliales artérielles bovines (BAEC) et dosage du cristal violet.	[19]
	Anti-inflammatoire	<i>B. aristata</i>	Racines	Extraits aqueux du méthanol	Les rats
<i>B. vulgaris</i>		Racines	Extrait éthanolique	Œdème de patte induite par la carraghénane et le zymosane.	[21]
		L'écorce des racines	Extrait méthanolique	Œdème induit par la carraghénine et sérotonine.	[22]
		L'écorce des racines	Berbèrine isolée	Prolifération cellulaire et activation de NF- κ B. Les niveaux de protéines de ICAM-1, TGF- β 1, iNOS et FN chez le rat par western blot.	[23]

Tableau-1 (suite) : Activité pharmacologique des espèces du genre *Berberis*

Activités	Source (espèce)	Partie de la plante	<ul style="list-style-type: none"> • Type d'extrait • Fraction • Isolat testé 	<ul style="list-style-type: none"> • Procédures expérimentales • Animaux • Organisme étudié • Type d'étude 	Références
Anti-inflammatoire	<i>B. crataegina</i>	L'écorce des racines	Berbèrine isolée	Neuro inflammation induite par le LPS et l'IFN- γ dans les cellules de la microglie.	[24]
		L'écorce des racines	Berbèrine isolée	Expression de l'oxyde nitrique (NO) et haute mobilité la mise en boîte de groupe 1 (HMGB1) dans macrophages induits par les lipopolysaccharides (LPS).	[25]
Système central nerveux	<i>Berberis</i> sp.	L'écorce des racines	Berbèrine isolée	Effets comportementaux chez les chats conscientssouris, Pentobarbitone, Toxicité à l'amphétamine, Seuil de la douleur.	[26]
Anti-convulsion	<i>B. integerri-ma</i>	Racines	Extrait méthanolique, etHydro-méthanoli-que et des fractions du chloroforme	Pentylenetetrazole (PTZ) et maximale modèles de saisie induite par électrochoc (MES).	[27]
Anti-histaminique Anti-cholinergique	<i>B. vulgaris</i>	Fruits	Extrait aqueux	Cochon d'Inde	[28]
Anti-microbienne	<i>B. vulgaris</i>	Racines	Berbèrine isolée	Modèle de boucle intestinale	[29]
	<i>B. chitria</i>	Racines	Extrait aqueux et alcoolique	Antimicrobienne	[30]

Tableau-1 (suite) : Activité pharmacologique des espèces du genre *Berberis*

Activités	Source (espèce)	Partie de la plante	<ul style="list-style-type: none"> • Type d'extrait • Fraction • Isolât testé 	<ul style="list-style-type: none"> • Procédures expérimentales • Animaux • Organisme étudié • Type d'étude 	Références
Anti-microbienne	<i>B. heterophylla</i>	Feuilles, tiges et racines	Extrait aqueux	Test in vitro sur Gram positif et Gram négatif avec différents bactéries et champignons.	[31]
	<i>B. aetnensis</i>	Racines et Feuilles	Extrait éthéré, méthanolique et chloroformique	Test in vitro sur Gram positif et Gram négatives avec différentes bactéries	[32]
Hepato-protecteur	<i>Berberis</i> sp.	Racines	Chlorure de berbérine isolé	Les rats	[33]
	<i>B. integerrima</i>	L'écorce des racines	berbérine isolé	CCl ₄ qui est un solvant très toxique modèle de toxicité induite.	[34]
		L'écorce des racines	berbérine isolé	TNF- α , COX-2 et iNOS dans CCL4, modèle de toxicité induite.	[35]
	<i>B. aristata</i> ,	L'extrait brut	Extrait éthanolique	Abcès amibien du foie chez les hamsters dorés et dans les études de modulation immunitaire.	[36]
	<i>B. aristata</i> ,	L'extrait brut	Extrait éthanolique	Activité amibicide in vitro contre Entamoeba histolytica.	[37]
Anti-cancer	<i>Berberis</i> sp.	Racines	berbérine isolé	Activité sur AP-1 en utilisant un test de gène rapporteur dans les cellules d'hépatome humain.	[38, 39]
	<i>B. amurensis</i>	L'écorce des racines	Berbamine isolée	Apoptose de Gleevec-sensible et des cellules Ph + CML résistantes.	[40]
	<i>B. koreana</i>	L'écorce des racines	Extrait aqueux	Les lignées cellulaires cancéreuses humaines A549, AGS, MCF-7 et Hep 3B.	[41]
Hépatocarcinome	<i>Berberis</i> sp.	Racines	berbérine isolé	Actions anticancéreuses dans le carcinome hépatocellulaire Cellules SMMC-7721.	[42]
		Racines	berbérine isolé	Expressions d'ARNm de MMP-1 et MMP-9 par Pcr en temps réel.	[43]

Tableau-1 (suite) : Activité pharmacologique des espèces du genre *Berberis*

Activités	Source (espèce)	Partie de la plante	<ul style="list-style-type: none"> • Type d'extrait • Fraction • Isolat testé 	<ul style="list-style-type: none"> • Procédures expérimentales • Animaux • Organisme étudié • Type d'étude 	Références
Hépatocarcinome	<i>Berberis</i> sp.	Racines	berbérine isolé	Apoptose induite par la streptozotocine chez les souris. les îlots pancréatiques à travers la régulation négative. Taux d'expression du gène Bax/Bcl-2.	[44]
Anti-pyrétique	<i>Berberis</i> sp.	Racines	Sulfate de berbérine isolé	Modèle in vivo sur des rats, les chiens, les lapins et les cobayes Porc.	[45]
Immuno-stimulante	<i>Berberis</i> p.	fruits	berbérine isolé	I.P. injection de berbamine chez des souris inoculées avec le virus de la grippe.	[46]
	<i>B. koreana</i>	L'écorce des racines	Extrait aqueux	Immuno essai	[47]
Liaison Fertilité et activité	<i>B. vulgaris</i>	Feuilles	Extrait d'acétone	Effet in vivo sur l'utérus du cochon d'Inde, chat et lapin.	[48]
	<i>B. chitria</i>	Les racines	Palmitine isolée	Administré par voie orale aux chiens pendant 60 jours à vérifier la déficience du premier et du secondaire spermatocyte et allongés spermatides (stades IV-VIII).	[49]
Anti-oxydante	<i>Berberis</i> sp.	Les racines	Berbamine isolée	Estimation colorimétrique du malonaldéhyde (MDA) méthode de formation et ESR Spin technique de piégeage.	[50]
Anti-diabétique	<i>B. vulgaris</i>	Les Fruits et les racines	Extrait aqueux, éthanolique	Les rats	[51, 52]
Urolithiase (lithiase rénale)	<i>B. vulgaris</i>	L'écorce des racines	Extrait aqueux et m-ethanolique	Modèle animal de lithiase urinaire, développé en rats Westar mâles en ajoutant 0,75% d'éthylène glycol dans l'eau potable.	[53, 54]
Ostéo-lytique et Hypercholestérolémique	<i>B. aristata</i>	Racines	Berbérine	Les rats	[55-58]

I.2.5. Etude phytochimique antérieure sur les espèces du genre *Berberis*

Dans le genre *Berberis* la majorité des constituants chimiques sont présents dans les racines et les tiges et il ya des variations de produits chimiques qui existent aussi dans les feuilles des différentes espèces de ce genre. Ceux-ci comprennent les alcaloïdes, les flavonoïdes, terpénoïdes, anthocyanes, stérols, vitamines, lignines, caroténoïdes, protéines et lipides qui ont été isolés et caractérisés de différentes espèces de *Berberis* [59].

Les alcaloïdes sont les principaux constituants bioactifs de ce genre et les plus fréquents sont la berbérine, berbamine, columbamine, palmatine, la jatrorrhizine et l'oxyacanthine [60, 61-63] et sont situés principalement dans les tissus corticaux des racines et des tiges. L'écorce des vieilles racines contient la plus forte concentration d'alcaloïdes protoberbériques [5].

Alors que la plupart des études phytochimiques sont effectuée sur les tiges et les racines des plantes du genre *Berberis*, il y a d'autres travaux qui ont été réalisés sur les feuilles, fruits et fleurs. Divers composés polyphénoliques comme l'acide caféique, la quercétine, mératine, acide chlorogénique et rutine ont été extraits des fleurs de *B. aristata*. Les Constituants chimiques présents dans les fruits ont un potentiel nutraceutique et fournissent plusieurs avantages pour la santé [4]. En outre, les lignines ont été isolés des tiges et feuilles de ces plantes [64]. Les principaux constituants chimiques de différentes espèces du genre *Berberis* sont illustrés dans la figure-2 et la diversité chimique des différents espèces de *berberis* est indiquée dans le tableau-2.

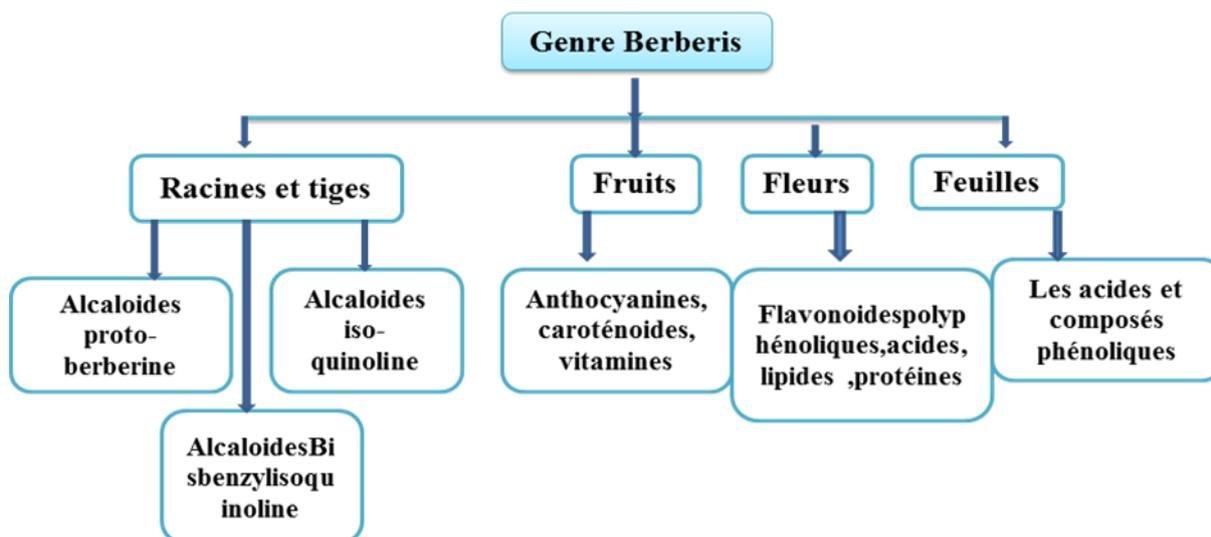


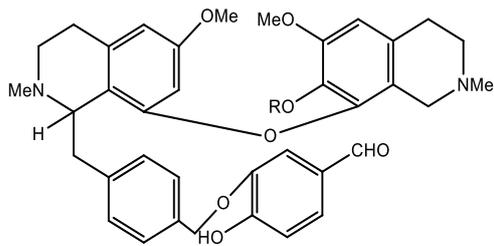
Figure-2 : Les majors constituants chimiques des différents espèces du genre *Berberis*

Tableau-2 : Les composés isolés de différentes espèces du genre *Berberis*

Espèces	Composés isolés	Références
<i>B. aristata</i>	✓ Karachine, taxilamine.	[65, 66]
<i>B. asiatica</i>	✓ Berbérine, palmitine, jatrorrhizine, tetrahydropalmitine, berbamine, oxyberberine et oxyacanthine.	[61, 67]
<i>B. chitria</i>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Une base d'aporphine-o-méthyl corydine N-oxide, avec berbérine, palmitine, jatrorrhizine et oxyacanthine. ✓ Hentriacontane, triacontane, alcool cétéarylique, β-sitosterol, dihydrokaempferol, quercétine, acide oleique, stérique, palmitique et acide linoléique. ✓ Alcaloïdes : chitrienne A, B, C. ✓ Glucose, fructose et rhamnose. ✓ Dihydropalmitine N-oxide (I) jatrorrhizine. ✓ Berlambine lambertine, berbamine, berbérine, berbamine, yuziphine (un nouvel alcaloïde), columbamine, palmitine et hydroxyacanthine. ✓ Umbellatine, berbérine et berbamine.	[68-72]
<i>B. lycium</i>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Trois nouveaux alcaloïdes : babérine, chlorhydrate de berbéricine, berbericine hydroiodide ✓ Deux alcaloïdes d'artefact ; berbérine-chloroforme, palmitine-chloroforme avec oxyberberine. ✓ Umbellatine, berbérine et berbamine. ✓ Chlorure de berbérine. ✓ Trois nouvelles seco-bisbenzylisoquinolines, sindamine (base monophénolique) $C_{37}H_{38}O_8N_2$, punjabine (base monophénolique secodimer) $C_{35}H_{32}O_7N_2$, Gilgitine (base monophénolique secodimer) $C_{36}H_{34}O_8N_2$. ✓ La punjabine et la gilgitine. ✓ (+)-Kara-koramine $C_{25}H_{27}O_5N$, chénabine monophénolique $C_{37}H_{40}O_7N_2$ et diphénolique, jhelumine $C_{36}H_{38}O_7N_2$. 	[73-77]
<i>B. pachycantha</i>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Oxyacanthine, oxyberbérine, berbamine-C_6H_6, isotétrandrine, jatrorrhizine, magnoflorine picrate, isodide. ✓ Deux pigments anthocyaniques ont été isolés et identifiés : gonidin-3-glucoside et cyanidine-3-glucoside. 	[78, 79]
<i>B. concinna</i>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ La berbérine et la palmitine ont été isolées sous forme de dérivés tétrahydro. ✓ Alcaloïde 9,9-diméthyltétracosan-6-one ✓ $Me(CH_2)_4COCH_2CH_2CMe_2(CH_2)_{14}Me$ 	[80, 81]
<i>B. corearia</i>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 1,4-bis (2'-hydroxy-5'-méthylphényl)-butan-1,4- dione (I)(cétone). ✓ Une nouvelle cétone : 7-méthyltétracosane- 6-one (II), avec la berbérine. ✓ Anthocyanines –cyanidine, pélargonidine, petunidine, peonidine et delphinidine aglicones délimité avec le glucose et la rutinose. 	[82-84]
<i>B. vulgaris</i>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 8 pigments ont été identifiés avec un pourcentage de caroténoïdes totaux : β-carotène, lutéine, zéaxanthine, chrysanthemaxanthine, flavoxanthine, auroxanthin, capsanthin. ✓ Tanin, hydrates de carbone, acides organiques, substances pectiques et la vitamine C. ✓ Thalifoline, oxyberberine, chilénine, baluchistanamine, tejedine, obaberine, isotétrandrine, oxycanthine, berbamine, aromoline, obamegine, thaligrisine, atrorrhizine chloride, chlorure de palmitine, chlorure de berberine. 	[85-87]

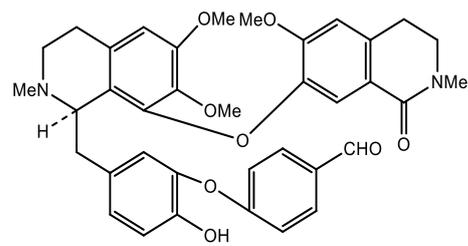
Tableau-2 (suite) : Les composés isolés de différentes espèces du genre *Berberis*

Espèces	Composés isolés	Références
<i>B. kawakamii</i>	✓ Berberine, isotétrandrine, jatrorrhizine, berberine, Shobakunine et picrate de magnolosine.	[88]
<i>B. mingetsensis</i>	✓ Berbamine-C ₆ H ₆ ajouté, isotétrandrine, oxyberberine, berberine et shobakunine.	[88]
<i>B. calliobotrys</i>	✓ Une nouvelle aporphine dimérique benzyloisoquinoline-Khyberinepakistanamine, 1-0-méthylpakistanine, pakistanine, chitraline et kalashine.	[89]
<i>B. orthobotrys</i>	✓ Un nouveau dimère kalashine avec la pakistanamine et pakistanine.	[89]
<i>B. umbellata</i>	✓ Un alcaloïde C ₂₀ H ₂₀ O ₃ : 2,5-bis(2'-méthoxy-5'-méthylphényl) furane (I).	[90]
<i>B. brandisiana</i>	✓ Un nouveau alcaloïde (+) - berbamine-2'-β-N-oxyde (C ₃₇ H ₄₀ N ₂ O ₇) avec berbamine, palmitine, (+) berberine, thalifoline, (+) réticuline, (+) apoglaziovine, (+) isoboldine et (+) isotétrandrine.	[91]
<i>B. pseudoumbellata</i>	✓ Berbérine et palmitine, bisbenzyloisoquinoline (oxyaoanthine) et <i>o</i> -méthyl oxyacanthine.	[92]
<i>B. floribunda</i>	✓ Oxyacanthine, berbamine, berbérine, épiberberine, palmitine, dihydrocoridaline, jatrorrhizine et coulambine.	[93]
<i>B. laurina</i>	✓ Deux nouveaux alcaloïdes <i>o</i> -méthyl iso-thalicberine et l'autre est lauberine. ✓ Deux nouveaux alcaloïdes phénoliques qui ont été nommé Espinine et Espinidine. ✓ L'alcaloïde hydrastinine.	[94-96]
<i>B. baluchistanica</i>	✓ Une base libre baluchistanamine. ✓ Phénolique aorphine benzyloisoquinoline (pakistanine), proaporphine benzyloisoquinoline (pakistanamine).	[97, 98]
<i>B. amursensis</i>	✓ La berbamine, une nouvelle base tertiaire phénolique, hydroxy berbérine, la jatrorrhizine, la shobakunine, berbérine, l'acide férulique et l'acide vanillinique.	[99]
<i>B. thunbergii</i>	✓ Deux picrates : picrate de jatrorrhizine, picrate de monoflore.	[100]
<i>B. tschonoskyana</i>	✓ Oxyacanthine, obamegine, oxyberberine, une nouvelle base tertiaire non phénolique, obabérine, jatrorrhizine, magnoflorine, shobakunine, obamagine.	[101]
<i>B. koreana</i>	✓ Berberine, palmitine, oxyacanthine, berbamine.	[102]
<i>B. tabiensis</i>	✓ L'alcaloïde bisbenzyltétrahydroisoquinoline (Tabienine).	[103]
<i>B. coletioides</i>	✓ L'alcaloïde pronuciferine N-oxide.	[104]
<i>B. waziristanica</i>	✓ Berberine, oxyberberine, karachine, corydaldine, méthylcorydaldine, méthyl-6,7-diméthoxy-isoquinoline, aromoline, pakistanine, waziristanine.	[105]

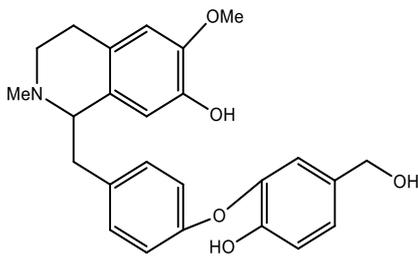


(+) Chenabine
R= Me
(+) Jhelumine
R = H

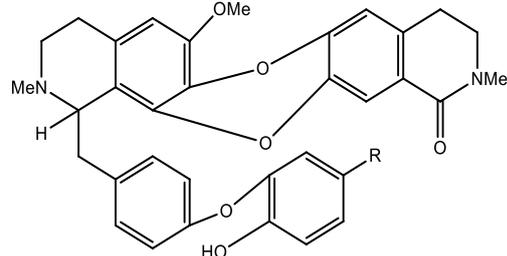
Berberine-chloroform
R, R'=-OCH₂O-,
R'=H,CCl₃
Palmatine -chloroform
R, R=Ome, R'=H,CCl₃
Oxy-berberine
R,R= -OCH₂O -, R'=O



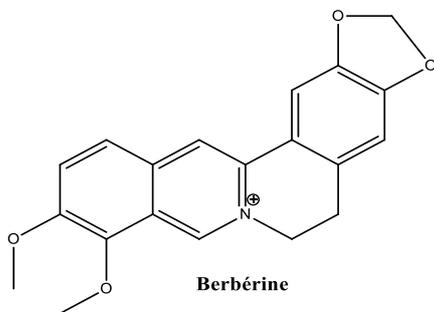
Sindamine



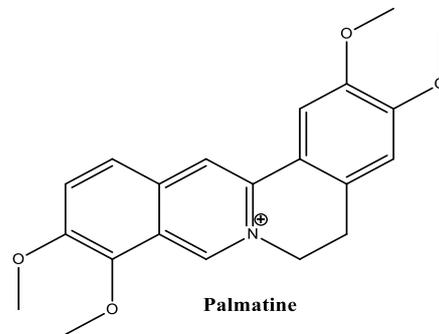
Karakoramine



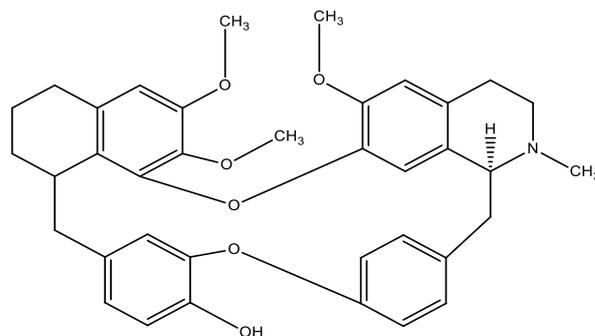
Punjabine
R = CHO
Gilgitine
R = COOMe



Berbérine



Palmatine



Berbamine

Figure-3 : Les principes actifs du genre *Berberis*

I.3. Présentation de l'espèce *Berberis hispanica*

I.3.1. Classification dans la systématique botanique

- Royaume : Plantae
- Ordre : Ranunculales
- Famille : Berberidaceae
- Genre : *Berberis*

Synonyme : *Berberis australis* Hochr, *Berberis vulgaris* subsp, *hispanica* (Boiss. & Reut.) Malag.



Figure-4 : *Berberis hispanica*

I.3.2. Description botanique et répartition

Berberis hispanica est un arbuste appartenant à la famille Berberidaceae et au genre *Berberis*. C'est l'une des plantes médicinales depuis plus de 2500 ans. On retrouve cet arbuste dans les régions tempérées et subtropicales. Il est distribué dans les régions du sud-ouest de la Méditerranée couvrant le nord de l'Afrique et la moitié sud de la péninsule ibérique. Il apparaît de 1000 m jusqu'à 2000 m d'altitude. Il se trouve sur des haies de montagnes surplombant la Méditerranée. C'est un buisson à rameaux anguleux, à feuilles fasciculées.

Les fleurs de couleurs jaunes forment une inflorescence racémique et en grappe de 3 à 9 fleurs attachées dans une longue panicule. Chaque fleur mesure environ 6 mm de diamètre.

Les intérieurs des fleurs sont avec des nectars à la base, elles contiennent généralement six étamines. Les fruits bacciforme, bleuâtre à bleu noir [106-108] mesurent 1 cm de long et sont recouverts de cire. La période de floraison de la plante, elle est entre le mois d'avril et juin.

I.3.3. Utilisation médicinale

En médecine l'espèce *B.hespanica* est utilisé contre les douleurs et l'élimination des calculs rénaux [109]. Toutes les parties de la plante ont des propriétés médicinales [110-112]

telles les activités : antioxydante, antiinflammatoire [113], cardiovasculaire [114], tonique, antiémétique, antipyrétique, antiprurigineuse et cholagogue. Elle a été parfois utilisée dans la cystite biliaire, la lithiase biliaire, la jaunisse, la dysenterie, la leishmaniose et la malaria [110-112]. Son activité est due principalement à des alcaloïdes isoquinoléiques [115-117] comme la berbérine [118], largement utilisée dans la médecine chinoise.

A ce jour, un seul alcaloïde a pu être identifié (Berberine tannate) [119] à partir de l'espèce *B. hispanica*, c'est pour cette raison qu'on s'est intéressé à l'étude de cette espèce.

II. La famille des Lamiaceae

II.1. Introduction bibliographique sur la famille des Lamiaceae

II.1.1. Généralité

Les Labiées (Lamiacées) constituent une importante famille de plantes angiospermes dicotylédones herbacées ou légèrement ligneuses et comprennent, selon les auteurs, de 233 à 263 [120] genres et de 6900 à 7200 espèces [120,121] qui se répartissent sur tout le globe. C'est une famille très importante en Algérie, représentée par 28 genres et 146 espèces. La plupart des plantes de cette famille sont partiellement ligneuses, formant des arbustes (très rarement des arbres). C'est la famille des aromatiques utilisées tant en cuisine qu'en parfumerie ou pharmacie également, comme par exemple (la ballote, le basilic, la bugle, l'hysope, la lavande, la marjolaine, la mélisse,...). Il s'agit d'une vaste famille, très typique du monde végétal, et qui possède une importance économique due à la production des huiles essentielles [122] et de miel (les miels de lavande, et de romarin sont réputés). Cette famille est très répandue dans les régions tempérées et surtout méditerranéennes [123].

II.1.2. Description botanique

Ce sont généralement des plantes herbacées odorantes, à tiges quadrangulaires, feuilles en général, opposées sans stipules. Le plus souvent hermaphrodites, les fleurs pentamères [124] sont généralement réunies en cymes axillaires plus ou moins contractées simulant souvent des verticilles, ou encore condensées au sommet des tiges, et simulant des épis fruit constitué par 4 akènes plus ou moins soudés par leur face interne [125].

Cette famille est donc caractérisée par :

- Une corolle gamopétale irrégulière à deux lèvres, la supérieure formée de deux pétales, l'inférieure de trois.
- Quatre étamines dont deux plus longues.
- Ovaire de deux carpelles recoupés par une cloison et comprenant ainsi quatre loges à une graine chacun (tétrachaine).

➤ Des feuilles opposées et, souvent, une tige de section carrée.

Ce sont des plantes à essences dont l'odeur se dégage une fois broyées. En effet la localisation des huiles essentielles est très externes, elles se forment dans des poils à essence et se localisent sous la cuticule qui se soulève.

II.2. Introduction bibliographique sur le genre *Stachys*

II.2.1. Généralité

Le genre *Stachys* (*Epiaire*) comporte 200-300 espèces de plantes vivaces répandues dans une grande partie du globe, il est considéré comme le plus grand genre de la famille des Lamiaceae [126]. Le genre *Stachys* représente 14 espèces de plantes vivaces répandues dans l'Algérie, 4 d'entre elles sont endémiques.

Plantes annuelles à racines grêles, dépourvues de rejets stériles et vivaces à souche épaisse émettant en général des rejets stériles [127]. Leur nom de genre, qui rappelle la forme de leur inflorescence, vient du mot grec *Stachys*, qui signifie « épi » [128].

II.2.2. Propriétés pharmacologiques des espèces du genre *Stachys*

La recherche bibliographique menée sur l'intérêt biologique des espèces du genre *Stachys* montre qu'elles ont des propriétés thérapeutiques et sont utilisées en médecine traditionnelle.

Dans ce qui suit, nous allons citer quelques exemples d'espèces de très grande importance pharmacologique :

- Les plantes de ce genre ont longtemps été appliquées dans la médecine populaire pour traiter les tumeurs des organes génitaux, les tumeurs inflammatoires, les ulcères et la toux [129].
- Des études pharmacologiques ont confirmé que les extraits de plantes ou de composants appartenant au genre *Stachys* exercent diverses activités : anti-inflammatoire et antinéphrétique [130,131], effet sur la hyaluronidase [132], hypotensive [133], antibactérienne [134], antitoxique [135], antihépatique [136] et anti-anoxie [137].

Les diverses activités pharmacologiques du genre *Stachys* sont résumées dans la figure-5 et les propriétés de quelques espèces de ce genre sont regroupés dans le tableau-3.

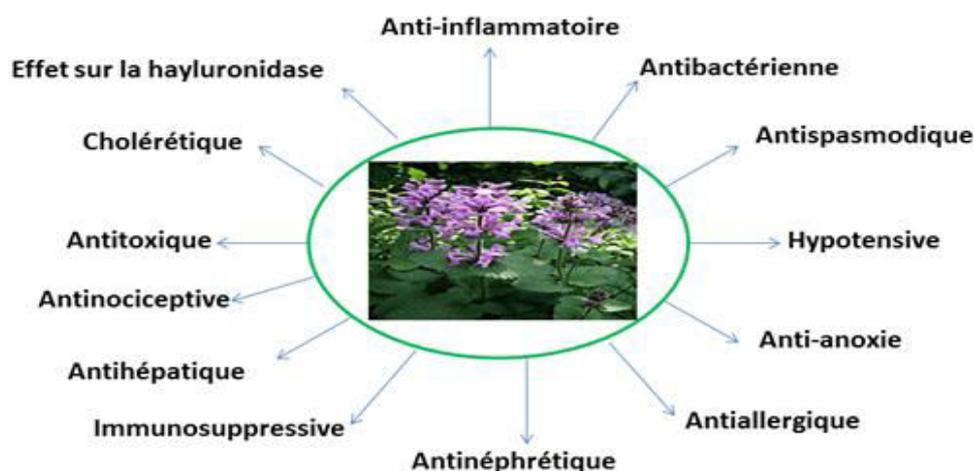


Figure-5 : Les diverses activités pharmacologiques des espèces du genre *Stachys*

Tableau-3 : Usages et propriétés de quelques espèces du genre *Stachys*

Usages et propriétés	Espèces	Références
✓ Action sur l'insomnie et l'anxiété.	<i>S. lavandulifolia</i> Vahl.	[138, 139]
✓ Le traitement des troubles immunitaires.		[140]
✓ Traiter les troubles gastriques et l'ulcère gastroduodénal provoqué par <i>Helicobacter Pylori</i> .	<i>S. alopecuros</i> (L.) Bentham	[141]
✓ Activité anti-anoxie.	<i>S. sieboldii</i> Miq.	[137]
✓ Activité de la hyaluronidase.		[132]
✓ Activité immunosuppressive.		[142]
✓ Antispasmodique et pour le traitement des blessures.	<i>S. palustris</i> L. <i>S. sylvatica</i> L.	[143]
✓ Traiter les infections, l'asthme, les affections rhumatismales et d'autres troubles inflammatoires.	<i>S. inflata</i> Benth.	[144]
✓ Antiseptique, astringent, tonique, vermifuge, digestif, légèrement sédatif. ✓ Faible capacité de piéger les radicaux libres, mais exposées une ✓ Forte capacité en vue de réduire les métaux de transition et l'inhibition de l'oxydation des lipides.	<i>S. officinalis</i>	[145]
✓ Antinociceptive et anti-inflammatoire.	<i>S. byzanthina</i> C. Koch.	[146]
✓ La décoction des feuilles de cette plante est utilisée comme un antibiotique, et sert à traiter la grippe et le froid.	<i>S. schtschegleevii</i> Sosn.	[129]
✓ Activité antioxydante.	<i>S. spruneri</i> , <i>S. alpina</i> , <i>S. officinalis</i> , <i>S. palustris</i> , <i>S. recta</i> subsp. <i>recta</i> , <i>S. recta</i> subsp. <i>subcrenata</i> , <i>S. salviifolia</i> et <i>S. sylvatica</i>	[147,148]
	<i>S. alpina</i> , <i>S. officinalis</i> , <i>S. macrantha</i> , <i>S. recta</i> , <i>S. annua</i> et <i>S. sylvatica</i> L.	[149]

Tableau-3 (suite) : Usages et propriétés de quelques espèces du genre *Stachys*

Usages et propriétés	Espèces	Références
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Stimule la sécrétion biliaire hépatique, ✓ Augmente la formation de la bile, et de la bilirubine, (possède une activité cholérétique). 	<i>S. neglecta</i> L.	[150]
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Stimulent la capacité de la libération de la bile du foie, diminuant la concentration des acides biliaires et de bilirubine. 	<i>S. recta</i> L. et <i>S. neglecta</i> L.	[151]
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Propriétés de contracter les muscles de l'utérus. 	<i>S. lanata</i>	[152]
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Effet antiallergique. 	<i>S. riederi</i>	[153]
	var. <i>japonica</i> Miq	[154]
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Lymphocytes humains ✓ Effets protecteurs sur les dommages de l'ADN. 	<i>S. macrantha</i>	[155]

II.2.3. Etude phytochimique antérieurs sur les espèces du genre *stachys*

Le nombre d'études réalisées sur le genre *stachys*, a conduit à l'identification structurale d'un nombre considérable de métabolites secondaires, appartenant à des séries chimiques extrêmement variées.

En effet ce genre a montré sa richesse en composés phénoliques de type flavonique, les iridoïdes, les diterpenes, glycosides phényléthanoïdes, les acides gras ainsi que d'autres composés, qui sont rassemblés dans le tableau-4. Quant aux structures des principes actifs les plus importants du genre *Stachys*, ils sont regroupés dans la figure-5.

Tableau-4 : Les composés isolés de différentes espèces du genre *Stachys*

Composés isolés	Espèces	Références
Harpagide	<i>S. officinalis</i> , <i>S. alpine</i> , <i>S. Corsica</i> , <i>S. germanica</i> , <i>S. germanica</i> subsp. <i>Salviifolia</i> , <i>S. glutinosa</i> , <i>S. grandidentata</i> , <i>S. palustris</i> , <i>S. recta</i> , <i>S. spinosa</i> , <i>S. alopecuros</i> subsp. <i>divulosa</i>	[156-164]
7- β -Hydroxy-harpagide	<i>S. germanica</i> subsp. <i>salviifolia</i>	[160]
Ajugol	<i>S. germanica</i> subsp. <i>salviifolia</i> , <i>S. grandidentata</i> <i>S. spinosa</i>	[160, 163, 164]
5-Alloxy-aucubin	<i>S. germanica</i> subsp. <i>Salviifolia</i> , <i>S. glutinosa</i> <i>S. lavandulifolia</i>	[160, 162, 165]
Ajugoside	<i>S. officinalis</i> , <i>S. alpine</i> , <i>S. germanica</i> , <i>S. recta</i>	[157, 156]
Aucubin	<i>S. alpine</i> , <i>S. germanica</i> , <i>S. palustris</i> , <i>S. recta</i>	[157, 158, 156]
Acetylharpagide	<i>S. officinalis</i> , <i>S. alopecuros</i> subsp. <i>Divulosa</i> , <i>S. alpine</i> , <i>S. Corsica</i> , <i>S. germanica</i> , <i>S. glutinosa</i> <i>S. recta</i>	[157, 158, 161, 159, 162]

Tableau-4 (suite) : Les composés isolés de différentes espèces du genre *Stachys*

Composés isolés	Espèces	Références
Harpagoside	<i>S. alpine</i> , <i>S. germanica</i> , <i>S. recta</i>	[157, 156]
Monomelittoside	<i>S. glutinosa</i> , <i>S. grandidentata</i>	[162, 163]
Melittoside	<i>S. glutinosa</i> , <i>S. grandidentata</i>	[162, 163]
Catalpol	<i>S. grandidentata</i>	[163]
Stachyoside E	<i>S. lanata</i>	[166]
Stachyoside F	<i>S. lanata</i>	[166]
Stachyoside G	<i>S. lanata</i>	[166]
Stachyoside H	<i>S. lanata</i>	[166]
7-O-Acetyl-8-epi-loganic acid	<i>S. spinosa</i>	[164]
Allobetonoside	<i>S. glutinosa</i> , <i>S. macrantha</i>	[167, 161, 162, 168]
Teuhircoside	<i>S. alopecuros subsp. divulsa</i>	[161]
4'-O- β -D-Galactopyranosyl-Teuhircoside (19)	<i>S. alopecuros subsp. divulsa</i>	[161]
Abietadiene	<i>S. sprumeri</i>	[169]
Abieta-7,13-dien-3-one	<i>S. plumosa</i> , <i>S. sprumeri</i>	[170, 169]
Abietal	<i>S. sylvatica</i>	[171]
Abietatriene	<i>S. candida</i> , <i>S. chrysantha</i> , <i>S. ionica</i> , <i>S. germanica</i> , <i>S. glutinosa</i> , <i>S. mentifolia</i> <i>S. plumosa</i> , <i>S. sprumeri</i> , <i>S. sylvatica</i> <i>S. swainsonii subsp. argolica</i> , <i>S. swainsonii subsp. melangavica</i> <i>S. swainsonii subsp. scyronica</i> , <i>S. swainsonii subsp. swainsonii</i>	[172, 169, 173, 174, 170, 175]
Abieta-8,11,13-trien-7-one	<i>S. methifolia</i> , <i>S. plumosa</i>	[173, 176]
Andalusol	<i>S. arborescens</i> , <i>S. arborescens subsp. paulii</i> <i>S. foetens</i>	[177-179]
Andalusol-18-monoacetate	<i>S. foetens</i>	[179]
Andalusol-6-monoacetate	<i>S. foetens</i>	[179]
Annuanone	<i>S. annua</i> , <i>S. atherocalix</i> , <i>S. balansae</i> , <i>S. iberica</i> <i>S. inflata</i> , <i>S. palustris</i> , <i>S. silvatica</i>	[180, 181]
Athonolone	<i>S. athoa</i>	[182]
Atisideritol	<i>S. pusilla</i>	[183-185]
Barbatol	<i>S. arborescens</i>	[177]
Benuol	<i>S. reverchonii</i> , <i>S. serrata</i>	[186, 187]
Betolide	<i>S. bulgarica</i> , <i>S. germanica</i> , <i>S. officinalis</i> <i>S. plumosa</i> , <i>S. silvatica</i> , <i>S. thracica</i> , <i>S. scardica</i>	[188, 189]
Betonicolide	<i>S. officinalis</i>	[190]
Betonicoside A	<i>S. officinalis</i>	[190]
Betonicoside B	<i>S. officinalis</i>	[190]

Tableau-4 (suite) : Les composés isolés de différentes espèces du genre *Stachys*

Composés isolés	Espèces	Références
Betonicoside C	<i>S. officinalis</i>	[190]
Betonicoside D	<i>S. officinalis</i>	[190]
Borjatriol	<i>S. funkiana, S. mugronensis</i>	[191]
Canadiol	<i>S.athoa, S. discolor, S. soluta</i>	[182, 192]
Candicandiol	<i>S. candicans, S. infernalis</i>	[193]
Candidiol	<i>S. soluta, S. zafræ</i>	[192, 194]
Canditriol	<i>S. infernalis</i>	[193]
Candol A	<i>S. soluta</i>	[192]
Candol A acetate	<i>S. trojana</i>	[195]
Candol B	<i>S. argyrea, S.flavovirens, S. soluta</i>	[196, 197]
Conchitriol	<i>S. angustifolia, S. pusilla, S. reverchonii, S. serrata, S. tragoriganum</i>	[198, 184, 185, 186, 187, 199]
Dehydroabietal	<i>S. chrysantha, S. sprumeri, S. swainsonii subsp. Argolica, S. swainsonii subsp. Melangavica S. swainsonii subsp. Scyronica</i>	[172, 169]
Dehydroabietol	<i>S. plumosa</i>	[176]
4-epi-Dehydroabietol	<i>S. candida, S. chrysantha, S. sprumeri S. swainsonii subsp, argolica, S. swainsonii subsp, melangavica S. swainsonii subsp, scyronica</i>	[172, 169]
Dehydroabietane	<i>S. discolor, S. lotsyi subsp, mascaensis, S. soluta</i>	[192]
6-Deoxyandalusal	<i>S. arborescens subsp, paulii, S. varoi S. varoi subsp, nijarensis, S. varoi subsp.oriensis</i>	[178, 200, 201, 202]
6-Deoxyandalusoic acid	<i>S. arborescens subsp, paulii S. varoi subsp. oriensis</i>	[178, 200]
6-Desoxyandalusol	<i>S. arborescens, S. arborescens subsp, paulii S. varoi, S. varoi subsp. oriensis</i>	[177, 178, 201, 200]
18-Deoxyandalusol	<i>S. arborescens subsp, paulii</i>	[178]
6-Deoxyandalusol	<i>S. distans, S. arborescens, S. arborescens subsp. Paulii, S. hirsuta subsp. Nivalis, S. ionica S. plumosa, S. varoi subsp, cuatrecasatii S. varoi subsp. oriensis</i>	[203, 204, 178, 205, 206, 200]
Distanol	<i>S. distans</i>	[207]
Distanol-7,18-diacetate	<i>S. arguta</i>	[208]
Distanol-7-monoacetate	<i>S. dichotoma</i>	[209]
3 α -Acetoxy-19-Kaur-16-en-oic acid	<i>S. lanata</i>	[210]
3 α ,19-Dihydroxy-ent-Kaur-16-ene	<i>S. lanata</i>	[210]
3 α ,7 β -Dihydroxy-ent-Kaur-16-ene	<i>S.athoa</i>	[182]
6 β ,18-Dihydroxy-ent-Kaur-16-ene	<i>S. silvatica</i>	[211]
7 β ,18-Dihydroxy-15-oxo-ent-Kaur-16-ene	<i>S. caesarea</i>	[212]

Tableau-4 (suite) : Les composés isolés de différentes espèces du genre *Stachys*

Composés isolés	Espèces	Références
11 α ,18-Dihydroxy-ent-Kaur-15-ene	<i>S. chamaedrifolia</i>	[213]
11a,18-Dihydroxy-ent-Kaur-16-ene	<i>S. arborescens</i> , <i>S. recta</i> <i>S. aegyptiaca</i>	[214, 215]
1 α -Hydroxy-7 β -acetoxy-15 α ,16aepoxy-ent-Kaurane	<i>S. stricta</i>	[216]
3 α -Hydroxy-19-Kaur-16-enoic acid	<i>S. lanata</i>	[210]
6 β -Hydroxy-ent-Kaur-16-ene	<i>S. silvatica</i>	[211]
ent-Kaur-16-ene	<i>S. lotsyi subsp, mascaensis</i>	[192]
Kaur-15-ene	<i>S. sprumeri</i>	[169]
Kaur-16-ene	<i>S. balansae</i> , <i>S. solute</i> , <i>S. laetivirens</i> <i>S. methifolia</i> , <i>S. plumose</i> , <i>S. recta</i> , <i>S. sylvatica</i> <i>S. chamaedrifolia</i> , <i>S. discolor</i> , <i>S. hirsute</i> , <i>S. huber-morathii</i> , <i>S. lotsyi subsp.mascaensis</i> <i>S. lurida</i> Aránguez and <i>S. soluta</i>	[217, 192, 218, 173, 219, 171, 213, 220, 221]
Epicandiciandiol-7-monoacetate	<i>S. argosphacelus subsp, spicata</i> , <i>S. argyrea</i> , <i>S. athoa</i> , <i>S. brevidens</i> , <i>S. chamaedrifolia</i> , <i>S. discolor</i> , <i>S. gulendami</i> , <i>S. hirsute</i> , <i>S. kuegleriana</i> , <i>S. lotsyi subsp, mascaensis</i> , <i>S. lurida</i> <i>S. niveotomentosa</i> , <i>S. rubiflora</i> , <i>S. sipylea</i> , <i>S. soluta</i> , <i>S. stricta</i> , <i>S. trojana</i>	[192, 196, 182, 222, 213, 220, 209, 216, 195]
Epicandiciandiol-7 β -acetate-18-palmitate	<i>S. lotsyi subsp, mascaensis</i> , <i>S. soluta</i>	[192]
Epicandiciandiol-18-monoacetate	<i>S. argyrea</i>	[196]
Epicandiciandiol-18-palmitate	<i>S. lotsyi subsp, mascaensis</i> , <i>S. soluta</i>	[192]
Episinferral	<i>S. soluta</i>	[192]
Episinferral-7 β -acetate	<i>S. soluta</i>	[192]
Episinferral	<i>S. soluta</i>	[192]
Epoxyandiol A Epoxyisocandiol A acetate	<i>S. trojana</i>	[195]
Epoxyisofoliol	<i>S. biflora</i> , <i>S. pauli</i>	[223, 224]
Epoxyisolinearol	<i>S. biflora</i> , <i>S. congesta</i> , <i>S. roeseri</i> , <i>S. sipylea</i> <i>S. theezans</i>	[223, 225, 209, 226]
Epoxyisolidol	<i>S. biflora</i>	[223]
Epoxyisideritriol	<i>S. sicula</i>	[227, 228]
Epoxyisiderol	<i>S. arguta</i> , <i>S. caesarea</i> , <i>S. condensate</i> , <i>S. dichotoma</i> , <i>S. distans</i> , <i>S. Euboea</i> , <i>S. glacialis</i> <i>S. leptoclada</i> , <i>S. roeseri</i> , <i>S. scardica</i> , <i>S. sicula</i> <i>S. syriaca</i> , <i>S. stricta</i> , <i>S. tmolea</i>	[208, 221, 229, 209, 207, 230, 231, 225, 232, 228, 216, 233]
Eubol	<i>S. arguta</i> , <i>S. caesarea</i> , <i>S. Euboea</i> , <i>S. funkiana</i> <i>S. leptoclada</i> , <i>S. leucantha subsp, meridionalis</i> <i>S. scardica</i> , <i>S. sicula</i> , <i>S. stricta</i> , <i>S. tmolea</i>	[208, 212, 230, 225, 234, 235, 232, 227, 228, 216, 233]
15-epi-Eubol	<i>S. arguta</i> , <i>Eubotriol</i> <i>S. arguta</i> , <i>S. caesarea</i> <i>S. crispata</i> , <i>S. euboea</i> , <i>S. ilicifolia</i> , <i>S. leptoclada</i> <i>S. leucantha subsp, meridionalis</i> , <i>S. stricta</i> , <i>S. tmolea</i> .	[208, 212, 199, 230, 225, 235, 216, 233]

Tableau-4 (suite) : Les composés isolés de différentes espèces du genre *Stachys*

Composés isolés	Espèces	Références
Flavovirol	<i>S. pusilla</i> subsp. <i>flavovirens</i>	[236, 237]
Foliol	<i>S. akmanii</i> , <i>S. almeriensis</i> , <i>S. argyrea</i> , <i>S. athoa</i> <i>S. arborescens</i> , <i>S. biflora</i> , <i>S. chamaedrifolia</i> , <i>S. congesta</i> , <i>S. flavovirens</i> , <i>S. funkiana</i> , <i>S. granatensis</i> subsp. <i>nijarensis</i> <i>S. hirsuta</i> subsp. <i>Nivalis</i> , <i>S. incana</i> subsp. <i>Virgata</i> , <i>S. lagascana</i> , <i>S. leucantha</i> , <i>S. leucantha</i> var. <i>flavovirens</i> <i>S. leucantha</i> var. <i>incana</i> , <i>S. linearifolia</i> , <i>S. luteola</i> , <i>S. ochroleuca</i> , <i>S. niveotomentosa</i> , <i>S. stricta</i>	[222, 194, 196, 182, 214, 238, 223, 213, 239, 240, 197, 234,194, 205, 241, 242, 243, 244, 236, 245, 213, 216]
Foliol triacetate	<i>S. huber-morathii</i>	[221]
Funkiol	<i>S. funkiana</i>	[246]
Isoandalusol-6-monoacetate	<i>S. foetens</i>	[179]
Isocandol A acetate	<i>S. trojana</i>	[195]
Isocandol B	<i>S. trojana</i>	[195]
Isofoliol	<i>S. akmanii</i> , <i>S. biflora</i> , <i>S. chamaedrifolia</i> , <i>S. euboea</i> <i>S. flavovirens</i> , <i>S. funkiana</i> , <i>S. incana</i> subsp. <i>virgata</i> <i>S. lagascana</i> , <i>S. leucantha</i> , <i>S. paulii</i> , <i>S. theezans</i>	[222, 223, 213, 230, 197, 246, 242, 243, 244, 224, 226]
Isoleucanthol	<i>S. biflora</i> , <i>S. hirsute</i> , <i>S. lagascana</i> , <i>S. leucantha</i>	[223, 220, 242, 243, 244]
Isolinearol	<i>S. akmanii</i> , <i>S. biflora</i> , <i>S. condensata</i> , <i>S. crispata</i> <i>S. flavovirens</i> , <i>S. funkiana</i> , <i>S. hirsute</i> , <i>S. lagascana</i> <i>S. leucantha</i> , <i>S. scardica</i> , <i>S. sipylea</i> , <i>S. varoi</i>	[222, 223, 229, 199, 197, 246, 220, 242, 243, 244, 232, 209, 201]
Isopimara-8,15-diene	<i>S. glutinosa</i> , <i>S. plumosa</i>	[175, 219]
Isopimara-9(11),15-diene	<i>S. glutinosa</i> , <i>S. sprumeri</i> , <i>S. swainsonii</i> subsp. <i>Swainsonii</i>	[247, 169]
2-Hydroxy-isophytol	<i>S. soluta</i>	[192]
Isopusillatriol	<i>S. pusilla</i> , <i>S. valverdei</i>	[245, 242]
Isopusillatriol-14,18-diacetate	<i>S. pusilla</i> subsp. <i>flavovirens</i>	[236, 237]
Isopusillatriol-14-monoacetate	<i>S. pusilla</i> , <i>S. valverdei</i>	[245, 242]
Isopusillatriol-3,14-diacetate	<i>S. pusilla</i> subsp. <i>flavovirens</i>	[236, 237]
Isopusillatriol 3-monoacetate	<i>S. pusilla</i> subsp. <i>flavovirens</i>	[236, 237]
Isosideritol	<i>S. angustifolia</i> , <i>S. pusilla</i>	[198, 184, 185]
Isosidol	<i>S. biflora</i> , <i>S. flavovirens</i> , <i>S. funkiana</i> , <i>S. hirsuta</i> <i>S. lagascana</i> , <i>S. leucantha</i> , <i>S. sipylea</i> , <i>S. varoi</i>	[223, 197, 246, 220, 242, 243, 244, 209, 201]
Jabugodiol	<i>S. arborescens</i> subsp. <i>paulii</i> , <i>S. varoi</i> subsp. <i>nijarensis</i>	[178, 202]
13-epi-Jabugodiol	<i>S. plumosa</i> <i>S. arborescens</i> subsp. <i>Paulii</i> , <i>S. varoi</i> subsp. <i>nijarensis</i>	[206, 178, 202]
13-epi-Jabugotriol	<i>S. arborescens</i> subsp. <i>paulii</i> , <i>S. varoi</i> subsp. <i>nijarensis</i>	[178, 202]

Tableau-4 (suite) : Les composés isolés de différentes espèces du genre *Stachys*

Composés isolés	Espèces	Références
Jativatriol	<i>S. angustifolia</i> , <i>S. pusilla</i> , <i>S. reverchonii</i> , <i>S. serrata</i> , <i>S. tragoriganum</i>	[198, 184, 185, 186, 187, 199]
Jativatriol- 1,12-diacetate	<i>S. pusilla</i>	[184, 185]
Jativatriol- 1,17-diacetate	<i>S. pusilla</i>	[184, 185]
Jativatriol- 1-monoacetate	<i>S. pusilla</i> , <i>S. tragoriganum</i>	[184, 185, 199]
Jativatriol- 12-monoacetate	<i>S. pusilla</i> , <i>S. reverchonii</i>	[184, 185, 186]
Labd-13-en-8,15-ol	<i>S. menthifolia</i>	[173]
Labd-13(16),14-dien-8-ol	<i>B. alopecuros</i>	[173]
epi-Laurenene	<i>S. germanica</i> , <i>S. glutinosa</i>	[248, 247]
ent-13-epi-Manoyl oxide 18-acid	<i>S. ilicifolia</i>	[199]
Manoyl oxide	<i>S. byzantina</i> , <i>S. candida</i> , <i>S. chrysantha</i> , <i>S. glutinosa</i> <i>S. ionica</i> , <i>S. lavandulifolia</i> , <i>S. pilifera</i> , <i>S. plumosa</i> <i>S. sprumeri</i> , <i>S. sylvatica</i> <i>S. swainsonii subsp. argolica</i> , <i>S. swainsonii subsp.</i> <i>Melangavica</i> , <i>S. swainsonii subsp. scyronica</i> <i>S. swainsonii subsp. swainsonii</i>	[249, 172, 175, 169, 250, 170, 171]
13-epi-Manoyl oxide	<i>B. alopecuros</i> , <i>S. byzantina</i> , <i>S. germanica subsp. Heldreichii</i> , <i>S. ionica</i> , <i>S. lavandulifolia</i> , <i>S. menthifolia</i> , <i>S. sprunerii</i> , <i>S. sylvatica</i> , <i>S. swainsonii subsp. argolica</i> <i>S. swainsonii subsp. melangavica</i> <i>S. swainsonii subsp. scyronica</i> <i>S. swainsonii subsp. swainsonii</i>	[173, 249, 169, 171]
16-Hydroxy-ent-13-epi- Manoyl oxide	<i>S. javalambrensis</i>	[251]
Lagascatriol	<i>S. angustifolia</i> , <i>S. serrata</i> , <i>S. tragoriganum</i>	[252, 187, 199]
Lagascol	<i>S. serrata</i>	[187]
Leucanthol	<i>S. biflora</i> , <i>S. crispata</i> , <i>S. granatensis subsp. nijarensis</i> <i>S. hirsuta</i> , <i>S. hirsuta subsp. Nivalis</i> , <i>S. lagascana</i> <i>S. leucantha</i> , <i>S. leucantha subsp. incana</i> <i>S. leucantha subsp. meridionalis</i> , <i>S. zafrae</i>	[223, 199, 220, 205, 242, 243, 244, 194, 235]
Leucanthol- 3-monoacetate	<i>S. biflora</i> , <i>S. crispata</i> <i>S. granatensis subsp. nijarensis</i> <i>S. leucantha subsp. meridionalis</i> , <i>S. varoi</i> , <i>S. zafrae</i>	[223, 199, 194, 235, 201]
Leucanthol- 18-monoacetate	<i>S. biflora</i> , <i>S. crispata</i> , <i>S. granatensis</i> <i>S. granatensis subsp. nijarensis</i> <i>S. hirsuta subsp. Nivalis</i> , <i>S. leucantha subsp. incana</i> <i>S. leucantha subsp. meridionalis</i> , <i>S. scardica</i> <i>S. varoi</i> , <i>S. zafrae</i>	[223, 199, 253, 194, 205, 235, 232, 201, 194]
Leucanthol- 7,18-diacetate	<i>S. crispata</i> , <i>S. Granatensis</i> , <i>S. granatensis subsp. nijarensis</i> , <i>S. zafrae</i>	[199, 194]
Linearol	<i>S. akmanii</i> , <i>S. almeriensis</i> , <i>S. arborescens</i> , <i>S. argyrea</i> , <i>S. athera</i> , <i>S. biflora</i> , <i>S. brevidens</i> <i>S. congesta</i> , <i>S. crispata</i> , <i>S. flavovirens</i> , <i>S. funkiana</i> <i>S. granatensis subsp. nijarensis</i> , <i>S. gulendami</i>	[222, 194, 214, 238, 196, 182, 223, 240, 199, 197, 234]

Tableau-4 (suite) : Les composés isolés de différentes espèces du genre *Stachys*

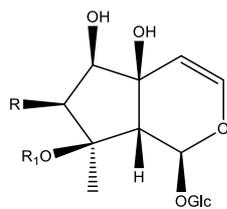
Composés isolés	Espèces	Références
Linearol	<i>S. hirsute</i> , <i>S. hirsuta</i> subsp. <i>Nivalis</i> <i>S. huber-morathii</i> , <i>S. lagascana</i> , <i>S. leptoclada</i> <i>S. leucantha</i> , <i>S. leucantha</i> var. <i>flavovirens</i> <i>S. leucantha</i> var. <i>incana</i> , <i>S. leucantha</i> var. <i>meridionalis</i> , <i>S. linearifolia</i> <i>S. luteola</i> , <i>S. niveotomentosa</i> , <i>S. rubiflora</i> , <i>S. stricta</i> , <i>S. theezans</i> , <i>S. varoi</i> , <i>S. zafrae</i>	[220, 205, 221, 242, 243, 244, 245, 236, 194, 235, 213, 222, 216, 226, 201]
Pimaradiene	<i>S. cretica</i> subsp. <i>Cretica</i> , <i>S. plumosa</i> <i>S. swainsonii</i> subsp. <i>argolica</i>	[173, 176, 169]
Phyt-1-ene	<i>S. soluta</i>	[192]
cis-Phytol	<i>S. menthifolia</i> , <i>S. soluta</i> , <i>S. recta</i>	[173, 192]
trans-Phytol	<i>S. obtusirena</i> , <i>S. officinalis</i> , <i>S. plumose</i> , <i>S.</i> <i>scardica</i> <i>S. sylvatica</i> , <i>S. swainsonii</i> subsp. <i>argolica</i> <i>S. swainsonii</i> subsp. <i>melangavica</i> <i>S. swainsonii</i> subsp. <i>scyronica</i>	[250, 170, 169]
Phytol acetate	<i>S. lavandulifolia</i>	[249]
Phytol nonadecanoate	<i>S. byzantina</i>	[254]
(+)-Plumosol	<i>S. plumosa</i>	[206]
Pusillatetrol	<i>S. pusilla</i> , <i>S. valverdei</i>	[245, 242]
Pusillatetrol 14,18-diacetate	<i>S. pusilla</i> subsp. <i>flavovirens</i>	[236, 237]
Pusillatetrol 14-monoacetate	<i>S. pusilla</i> subsp. <i>flavovirens</i>	[236, 237]
Pusillatetrol 3,7-diacetate	<i>S. pusilla</i> subsp. <i>flavovirens</i>	[236, 237]
Pusillatetrol 7,18-diacetate	<i>S. pusilla</i> subsp. <i>flavovirens</i>	[236, 237]
Pusillatetrol 7-monoacetate	<i>S. pusilla</i> , <i>S. valverdei</i>	[245, 242]
Pusillatriol	<i>S. pusilla</i> , <i>S. valverdei</i>	[245, 242]
Pusillatriol 14-monoacetate	<i>S. pusilla</i> subsp. <i>flavovirens</i> , <i>S. valverdei</i>	[236, 237, 242]
Pusillatriol 7-monoacetate	<i>S. grandiflora</i> , <i>S. pusilla</i> , <i>S. pusilla</i> subsp. <i>flavovirens</i>	[256, 245, 236, 237]
Ribenol	<i>S. mucronata</i> , <i>S. canariensis</i> , <i>S. javalambrensis</i> <i>S. varoi</i> , <i>S. hirsuta</i> subsp. <i>Nivalis</i> , <i>S. varoi</i> subsp. <i>cuatrecasasii</i> , <i>S. varoi</i> subsp. <i>Nijarensis</i> , <i>S. hirsuta</i> subsp. <i>nivalis</i> <i>S. varoi</i>	[256, 258, 251, 201, 205, 259, 202]
Ribenone	<i>S. mucronata</i> , <i>S. lotsyi</i> , <i>S. lotsyi</i> subsp. <i>mascaensis</i>	[256, 192]
Roseostachenol	<i>S. rosea</i>	[259]
Roseostachenone	<i>S. rosea</i>	[260]
Roseostachone	<i>S. rosea</i>	[260]
Roseotetrol	<i>S. rosea</i>	[259]

Tableau-4 (suite) : Les composés isolés de différentes espèces du genre *Stachys*

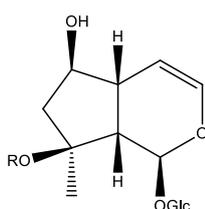
Composés isolés	Espèces	Références
Sandaracopimar α -8(14),15-diene	<i>S.swainsonii subsp.argolica</i>	[169]
Sclarene	<i>S. glutinosa, S. ionica, S.swainsonii subsp.scyronica</i>	[247,169]
Sclareol	<i>S. ionica, S. sylvatica, S.swainsonii subsp.scyronica</i>	[169,170]
13-epi-Sclareol	<i>S. rosea</i>	[260]
Serradiol	<i>S. granatensis, S. pusilla, S. reverchonii, S. serrata, S. tragoriganum</i>	[253, 184,185, 186, 187, 199]
Sicanadiol	<i>S. argosphacelus subsp.spicata, S. lotsyi subsp.mascaensis</i>	[192]
Sidendrodiol	<i>S. argosphacelus subsp.spicata, S. lotsyi subsp.mascaensis</i>	[192]
Sidendrodiol-18-acetate	<i>S. argosphacelus subsp.spicata, S. discolor, S. soluta</i>	[192]
Sideridiol	<i>S. akmanii, S. argyrea, S. chamaedrifolia, S. condensata, S. congesta, S. dichotoma, S. distans, S. erythrantha, S. euboea, S. grandiflora, S. hirsuta, S. huber-morathii, S. ilicifolia, S. incana subsp.virgata, S. lacaitae, S. libanotica, S. lurida, S. pauli, S. perfoliata, S. roeseri, S. sicula, S. sipylea, S. syriaca, S. stricta, S. theezans, S. trojana, S. varoi subsp. oriensis</i>	[222, 196, 213, 229, 240, 209, 262, 230 255, 220, 221, 199, 194, 224, 225, 228, 209, 216, 226, 195, 200]
Sideripol	<i>S. sicula</i>	[228]
Sideritol	<i>S. angustifolia, S. reverchonii, S. serrata</i>	[198, 186, 187]
Sideritol-1,17-diacetate	<i>S. pusilla</i>	[184, 185]
Sideritol-1-monoacetate	<i>S. pusilla, S. tragoriganum</i>	[184, 185, 199]
Sideritriol	<i>S. perfoliata, S. sicula</i>	[261, 227, 228]
Siderol	<i>S. arborescens, S. arborescens subsp.paulii, S. argyrea, S. arguta, S. caesarea, S. chamaedrifolia, S. condensata, S. congesta, S. dichotoma, S. distans, S. euboea, S. foetens, S. glacialis, S. hirsute, S. hirsuta subsp. nivalis, S. hyssopifolia, S. huber-morathii, S. javalambrensis, S. lacaitae, S. libanotica, S. lurida, S. perfoliata, S. pusilla subsp.flavovirens, S. roeseri, S. scardica, S. sicula, S. sipylea, S. syriaca, S. stricta, S. tmolea, S. trojana, S. varoi</i>	[262, 258, 196, 208, 221, 213, 229, 240, 209, 230, 263, 220, 205, 213, 221, 264, 194, 261, 237, 225, 232, 228, 216, 195, 201]
Siderol palmitate	<i>S. congesta</i>	[240]
Siderone	<i>S. sicula</i>	[227, 228]
Sideroxol	<i>S. akmanii, S. arguta, S. condensata, S. congesta, S. dichotoma, S. distans, S. euboea, S. ilicifolia, S. gulendami, S. elptoclada, S. roeseri, S. rubiflora, S. scardica, S. sicula, S. stricta, S. syriaca, S. theezans</i>	[222, 208, 229, 240, 209, 199, 232, 228, 226, 216]
Sidofunkiol	<i>S. funkiana</i>	[246]
Villenolone	<i>S. chamaedrifolia</i>	[239]
Villenolone-19-monoacetate	<i>S. chamaedrifolia</i>	[239]

Tableau-4 (suite) : Les composés isolés de différentes espèces du genre *Stachys*

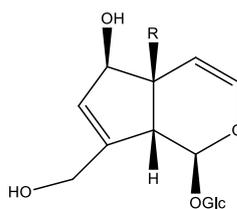
Composés isolés	Espèces	Références
Sidol	<i>S. akmanii</i> , <i>S. almeriensis</i> , <i>S. arborescens</i> , <i>S. argyrea</i> , <i>S. athoa</i> , <i>S. biflora</i> , <i>S. congesta</i> , <i>S. flavovirens</i> , <i>S. funkiana</i> , <i>S. granatensis subsp. nijarensis</i> <i>S. hirsuta subsp. Nivalis</i> , <i>S. huber-morathii</i> <i>S. lagascana</i> , <i>S. leptoclada</i> , <i>S. leucantha</i> <i>S. leucantha var. flavovirens</i> , <i>S. leucantha var. incana</i> , <i>S. linearifolia</i> , <i>S. luteola</i> , <i>S. niveotomentosa</i> , <i>S. rubiflora</i> , <i>S. sipylea</i> , <i>S. theezans</i> , <i>S. varoi</i> , <i>S. zafræ</i>	[222, 194, 214, 238, 196, 182, 223, 240, 197, 234, 205, 221, 242, 243, 244, 245, 236, 213, 222, 209, 226, 201]
Sinfernal	<i>S. almeriensis</i>	[194]
Sinfenol	<i>S. arborescens</i>	[214, 238]
Stachone	<i>S. annua</i> , <i>S. atherocalix</i> , <i>S. iberica</i> , <i>S. inflata</i> <i>S. palustris</i> , <i>S. sylvatica</i>	[265, 181]
Stachylone	<i>S. annua</i> , <i>S. atherocalix</i> , <i>S. balansae</i> , <i>S. iberica</i> <i>S. inflata</i> , <i>S. palustris</i> , <i>S. sylvatica</i>	[265, 181]
Stachysic acid	<i>S. sylvatica</i>	[211]
Stachysolone	<i>S. annua</i> , <i>S. aegyptiaca</i>	[266, 267]
Stachysolone-7-monoacetyl	<i>S. annua</i> , <i>S. recta</i>	[268, 215]
Stachysolone-13-monoacetyl	<i>S. annua</i>	[268]
Stachysperoxide	<i>S. aegyptiaca</i> , <i>S. aegyptiaca</i>	[269, 267]
Tartessol	<i>S. grandiflora</i> , <i>S. pusilla subsp. flavovirens</i>	[255, 236, 237]
Thunbergol	<i>S. plumosa</i>	[176]
Tobarol	<i>S. pusilla</i> , <i>S. reverchonii</i> , <i>S. serrata</i> , <i>S. tragoriganum</i>	[184, 185, 186, 187, 199]
cis-Totarol	<i>S. plumosa</i>	[176]
Trachinodiol	<i>S. discolor</i> , <i>S. lotsyi subsp. mascaensis</i>	[192]
Trachinodiol 7 β -acetate	<i>S. argosphacelus subsp. spicata</i> , <i>S. discolor</i> <i>S. kuegleriana</i> , <i>S. lotsyi subsp. mascaensis</i> , <i>S. soluta</i>	[192]
Ucriol	<i>S. sicula</i>	[227, 228]
Varodiol	<i>S. varoi</i> , <i>S. varoi subsp. cuatrecasasii</i> <i>S. varoi subsp. nijarensis</i>	[201, 270, 202]
Varodiol 3-monoacetate	<i>S. varoi</i> , <i>S. varoi subsp. cuatrecasasii</i>	[201, 270]
Varodiol 12-monoacetate	<i>S. varoi</i> , <i>S. varoi subsp. cuatrecasasii</i>	[201, 258]
Varodiol diacetate	<i>S. varoi</i> , <i>S. varoi subsp. cuatrecasasii</i>	[201, 258]
Varol	<i>S. javalambrensis</i> , <i>S. varoi</i> , <i>S. varoi subsp. cuatrecasasii</i> , <i>S. varoi subsp. oriensis</i>	[251, 201, 258, 200]
Varol acetate	<i>S. javalambrensis</i>	[251]
Vierol	<i>S. discolor</i> , <i>S. soluta</i>	[192]
Villenatriol	<i>S. chamaedrifolia</i>	[239]
Villenatriol-19-monoacetate	<i>S. chamaedrifolia</i>	[239]
Villenatriolone	<i>S. chamaedrifolia</i>	[239]
Villenol	<i>S. chamaedrifolia</i>	[239]
Villenol-19-monoacetate	<i>S. chamaedrifolia</i>	[239]



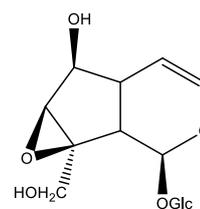
- 1 R= H, R1= H
 2 R= OH, R1= H
 7 R= H, R1= Ac
 8 R= H, R1= cinnamoyl



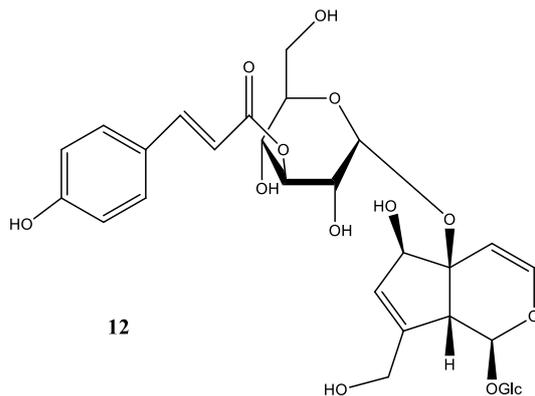
- 3 R= H
 5 R= Ac



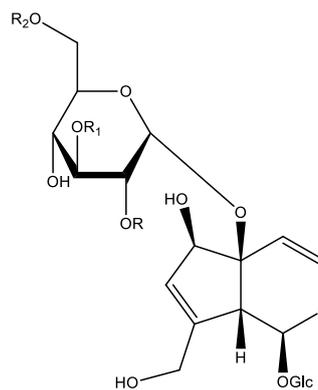
- 6 R= H
 4 R= O-allose
 9 R= OH
 10 R= O-glucose



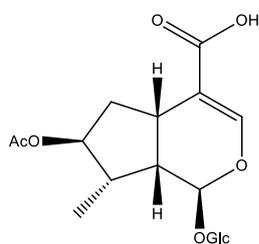
11



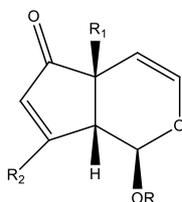
12



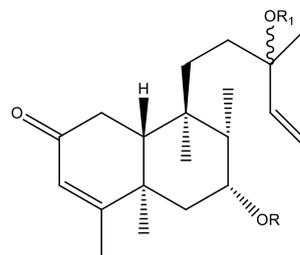
- 13 R= R2= H, R1= O-p-(Z)-coumaroyl
 14 R= R1= H, R2= O-p-(E)-coumaroyl
 15 R= O-p-(E)-coumaroyl, R1= R2= H



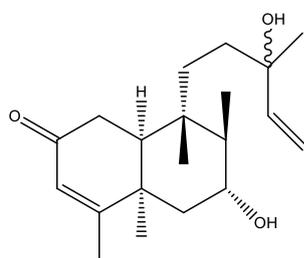
16



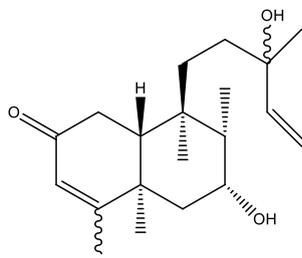
- 17 R= Glc, R1= Me, R2= CH2OH
 18 R= Glc, R1= OH, R2= Me
 19 R= 4'-O-β-D-galactopyranosyl, R1= OH, R2= Me



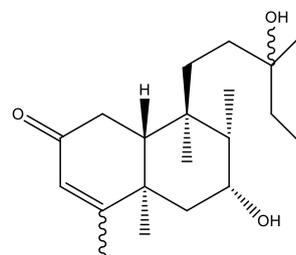
- 20 R= R1= H
 21 R= R1= Ac
 22 R= Ac, R1= H
 23 R= H, R1= Ac



24



25



26

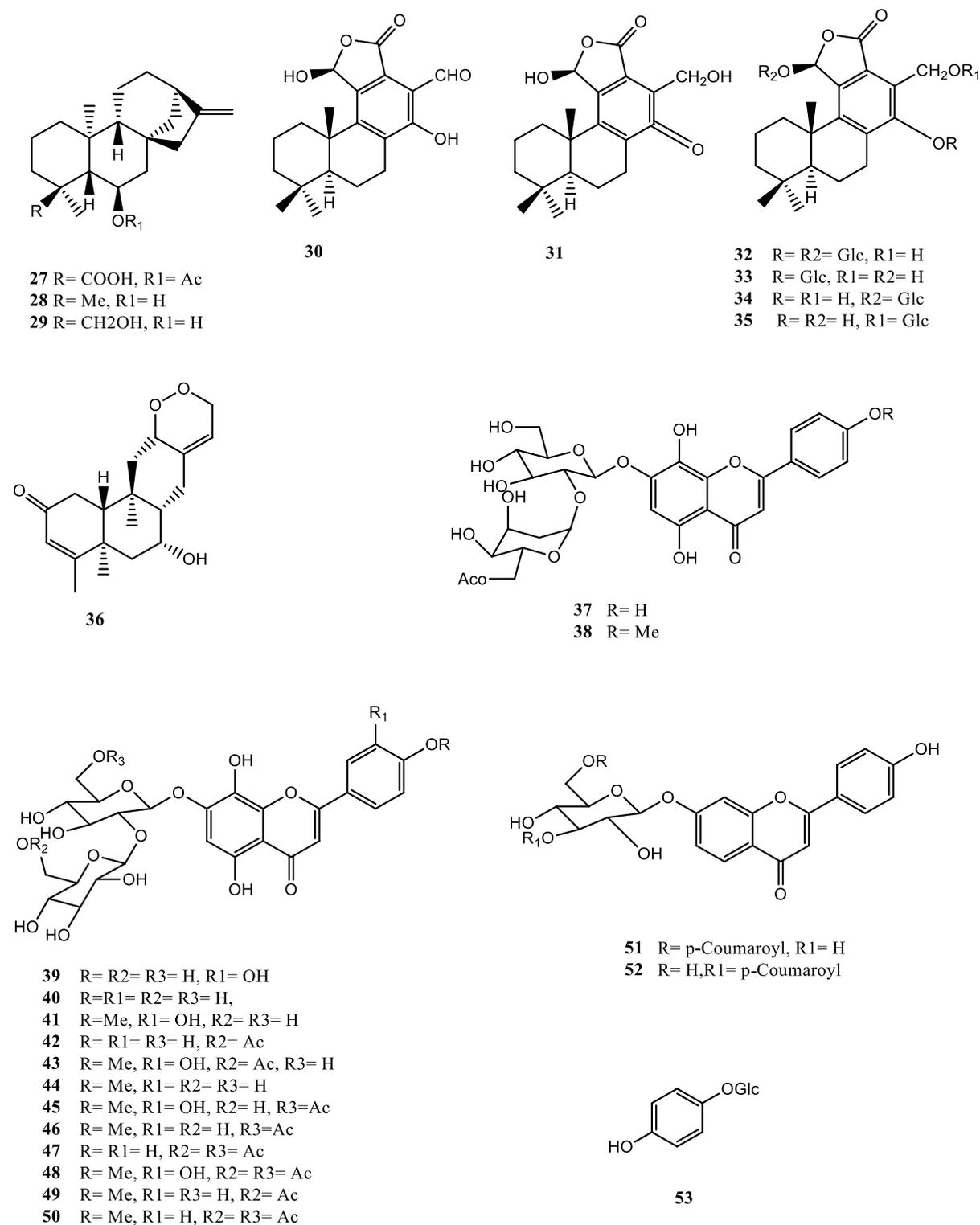


Figure-6 : Les principes actifs les plus importants de *Stachys*

Tableau-5 : Les noms des différents principes actifs du genre *stachys*

	Noms
(1)	Harpagide
(2)	7- β -Hydroxy-harpagide
(3)	Ajugol
(4)	5-Alloxyloxy-aucubine
(5)	Ajugosid
(6)	Aucubin
(7)	Acetylharpagide
(8)	Harpagoside
(9)	Monomelittoside
(10)	Melittoside
(11)	Catalpol
(12)	Stachyoside E
(13)	Stachyoside F
(14)	Stachyoside G
(15)	Stachyoside H
(16)	7-O-Acetyl-8-epi-acide loganique
(17)	Allobetonoside
(18)	Teuhircoside
(19)	4'-O- β -D-Galactopyranosyl-Teuhircoside
(20)	Stachysolone
(21)	diacetyl-stachysolone
(22)	7-monoacetyl-stachysolone
(23)	13-monoacetyl-stachysolone
(24)	Annuanone
(25)	Stachylone
(26)	Stachone
(27)	Acide stachysique
(28)	6 β -hydroxy-ent-kaur-16-ène
(29)	6 β ,18-dihydroxy-ent-kaur-16-ène
(30)	Betolide
(31)	Betonicolide
(32-35)	Betonoside
(36)	Stachysperoxide
(37)	Isoscutellarein-7-O-(6'''-O-acetyl)- β -D-allopyranosyl-(1''' \rightarrow 2'')- β -D-glucopyranoside
(38)	Isoscutellarein 40-éther méthylique 7-O- (6'''-O-acetyl)- β -D-allopyranosyl(1''' \rightarrow 2'')- β -D-glucopyranoside
(39-52)	Flavonoïdes
(53)	Arbutine

II.3. Présentation de l'espèce *Stachys brachyclada*

II.3.1. Classification dans la systématique botanique

- Royaume : Plantae
- Division : Magnoliophyta
- Classe : Magnoliopsida
- Sous-classe : Asteridae
- Famille : Lamiaceae
- Sous-famille : Lamioideae
- Genre : *Stachys*



Figure-7 : *Stachys Brachyclada*

II.3.2. Description botanique et répartition

Le *Stachys brachyclada*, dont les caractéristiques morphologiques sont indiquées dans la figure-8, est une petite plante herbacée qui abonde sur les sables et les rochers maritimes sur tout le parcours de la baie d'Oran (Algérie). Par le fait de sa récente découverte elle devient une espèce nouvelle pour la flore européenne et ne peut être confondue qu'avec l'espèce *Stachys hirta*, dont le savant botaniste de Noë en avait fait primitivement une simple variété *parviflora*. On la distinguera toutefois de l'espèce *S. hirta* par :

- ✓ Ses feuilles hispides-pubescentes non recouvertes de longs poils soyeux.
- ✓ Ses inférieures et ses caulinaires sont de dimensions plus réduites, plus brièvement pétiolées, plus régulièrement crénelées, cordées ou subréunifformes et non ovales-ovoïdes,
- ✓ Ses fleurs de moitié plus petites, blanches et non jaunes et du double ou même du triple plus grandes ;
- ✓ Ses calices moins velus, à dents plus courtes et plus brièvement aristées,
- ✓ Sa couleur verte persistante même après sa dessiccation [271].

L'époque de la floraison de la plante se situe entre la période d'Avril et juin.

Quant à ses caractéristiques morphologiques, ils sont illustrés dans la figure-8 ci après.

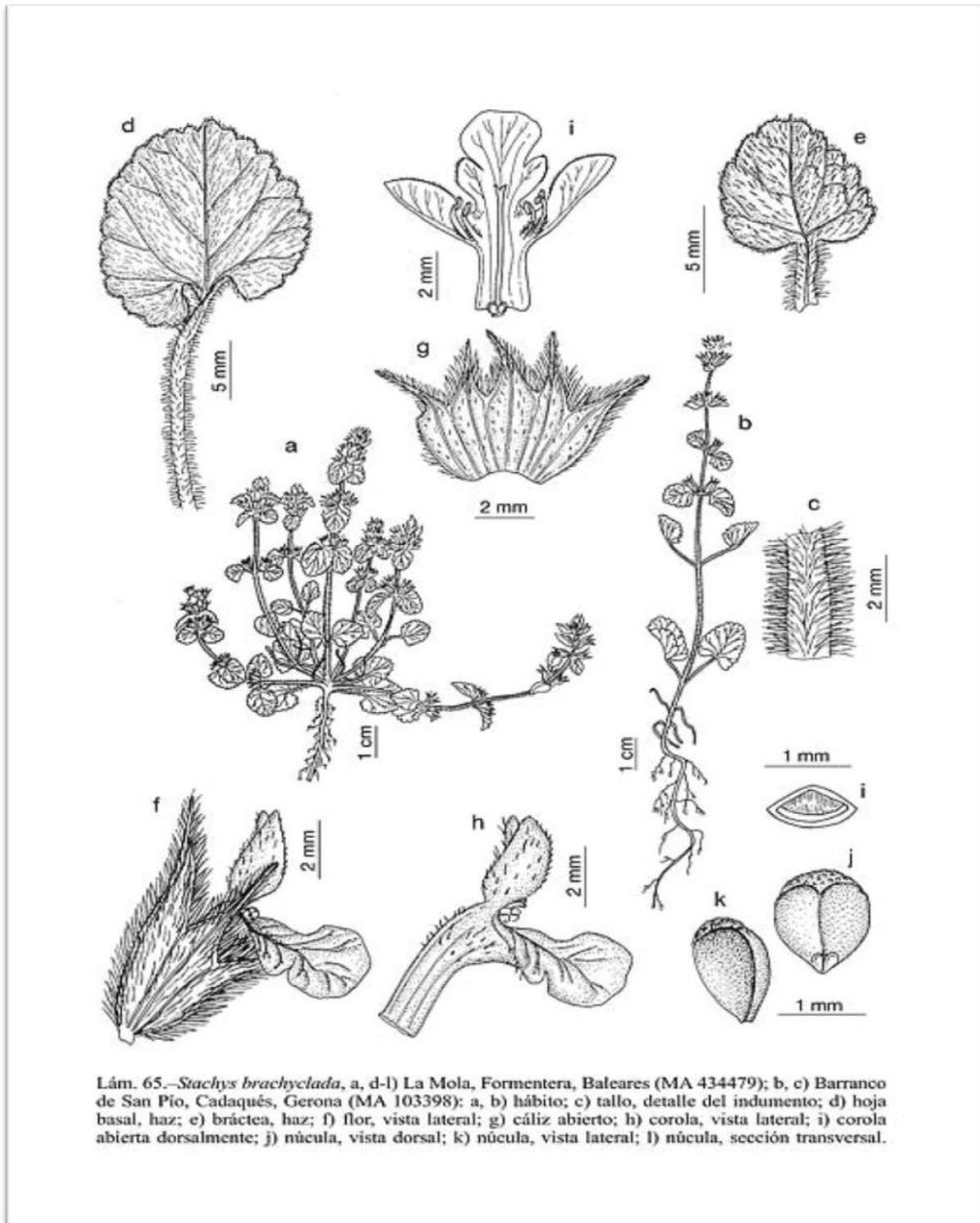


Figure-8 : Les caractéristiques morphologiques de *Stachys Brachyclada*

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- Junsheng Y., David E., Boufford & Anthony R. Brach. (2011). Berberidaceae. In Wu, Z. Y., P. H. Raven & D. Y. Hong, eds. Flora of China, 19.
- 2- Whetstone R.D., Atkinson T.A., Spaulding D.D. (1997). Berberidaceae Jussieu. In Flora of North America Editorial Committee (Eds.) Flora of North America of Mexico, Magnoliophyta : Manoliideae and Hamamelideae, New York and Oxford. On-line version, 3.
- 3- Syed M. J., Sanjeev K., Savita R.,-Santosh K., Raghbir C. (2014). Gupta Cytogenetics of Four Species of Genus *Berberis* L. (Berberidaceae Juss.) from the Western Himalayas. The Japan Mendel Society. Cytologia, 79, 111–117.
- 4- Ibrahim K., Syed N., Muhammad A., Zabta K. S. (2016). Phytopharmacological and ethnomedicinal uses of the Genus *Berberis* (Berberidaceae). Tropical Journal of Pharmaceutical Research September, 15, 2047-2057.
- 5- Sharad S., Manjoosha S., Ankita M., Garima P. (2015). AKS Rawat a review on biological and chemical diversity in *berberis* (berberidaceae) *EXCLI Journal*, 14, 247-267.
- 6- Habtemariam S. (2011). The therapeutic potential of *Berberis darwinii* stem-bark: quantification of berberine and invitro evidence for Alzheimer's disease therapy. *Nat Prod Comm*, 6, 1089-90.
- 7- Yogesh H.S., Chandrashekhar V.M., Katti H.R., Ganpaty S., Raghavendra H.L., Gowda G.K. (2011). Antiosteoporotic activity of aqueous-methanol extract of *Berberis aristata* in ovariectomized rats. *J Ethnopharmacol*, 134, 334-8.
- 8- Fang D., Zong X., Jain M., Zhoce S., Jiang M. (1986). Antifibrillatory effect of berberine. *Zhongguo Yaobi Xuebao*, 7, 321-4.
- 9- Wang Y., Yao X., Tan Y. (1987). Effect of berberine on physiologic properties of isolated guinea pig myocardium. *Zhongguo Yaoli Xuebao*, 8, 220-3.
- 10- Neto F.R. (1993). Electro pharmacological effects of berberine on canine cardiac purkinje fibers and ventricular muscle and atrial muscle of the rabbit. *Brit J Pharmacol*, 108, 534-7.
- 11- Wang Y., Tan Y., Sheng B. (1993). Effect of berberine on cardiac arrhythmic following coronary artery occlusion and its mechanism. *Zhongguo Yaolixue Yu Delixue Zazhi*, 7, 8-11.
- 12- Li F., Bao L., Li W. (1985). The effects of berberine on isolated guinea pig atria. *Yazozue Xuebao*, 20, 859-62.
- 13- Li B.Y., Yang B.I., Zhang Y.C., Li W.H. (1991). Hemodynamic study of berbamine and verapamil in isolated guinea pig hearts. *Asia Pacific J Pharmacol*, 6, 37-42.

- 14- Li N., Li W., Li Y. (1986). Effects of berberine on isolated myocardium of guinea pigs and humans. *Zhongguo Yaoli Xuebao*, 7:222-6.
- 15- Xiong C., Fang D. (1989). Effect of jatrorrhizine on isolated guinea pig atria. *Zhongguo Yaolixue Yu Dulixue Zazhi*, 3:255-8.
- 16- Morales M.A., Gallards L.R., Martinez J.L., Puelda R.S., Hernandez D.A. (1989). Effects of 7-O demethylisothalicberine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid of *B. chitensis* on electrical activity of frog candice pacemaker cells. *General Pharmacol*, 20:621-5.
- 17- Morales M.A, Gonzalez E., Torres R., Martinez J.L. (1993). Cardiodepressor effects of 7-O demethylisothalicberine, bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated from *Berberis chilensis*. *Arch Med Res*, 24, 177-81.
- 18- Han B., Lice G., Zhao S. (1990). Effects of berberine and tetra hydroberberine on α adrenoceptors. *Zhongguo YaokeDatue Xuebao*, 25, 309-11.
- 19- Wang S., Zhengui Z., Yinqi W., Yijun Y., Daifu Z., Weihsu F.(2004). Angiogenesis and anti-angiogenesis activity of Chinese medicinal herbal extracts. *Life Sci*, 74, 2467-78.
- 20- Akhter M.H., Sabir M., Bhide N.K. (1977). Anti-inflammatory effect of Berberine on rats injected locally with cholera toxin. *Indian J Med Res*, 65,133-44.
- 21- Invanovska N., Philipov S. (1996). Study on the anti-inflammatory action of *Berberis vulgaris* root extract, alkaloid fraction and pure alkaloids. *Int J Immunopharmacol* ,18, 553-61.
- 22- Yeilada E., Küpeli E. (2002). *Berberis crataegina* DC. Root exhibits potent anti-inflammatory, analgesic and febrifuge effects in mice and rats. *J Ethnopharmacol*, 79,237-48.
- 23- Jiang Q., Liu P., Wu X., Liu W., Shen X., Lan T. (2011). Berberine attenuates lipopolysaccharide-induced extracellular matrix accumulation and inflammation in rat mesangial cells: Involvement of NF- κ B signaling pathway. *Mol Cell Endocrinol.* , 331,34-40.
- 24- Yeh W.L. (2012). Berberine induces heme oxygenase-1 up-regulation through phosphatidylinositol 3-kinase/AKT and NF-E2-related factor-2 signaling pathway in astrocytes. *Inter Immunopharmacol*, 12, 94-100.
- 25- Lee D., Bae J., Kim Y.K., Gil M., Lee J.Y, Park C.S. (2013). Inhibitory effects of berberine on lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase and the high mobility group box 1 release in macrophages. *Biochem Biophys Res Comm*, 431,506-11.

- 26- Shanbhag S.M., Kulkarni H.J., Gaitonde B.B. (1970). Pharmacological actions of Berberine on the central nervous system. *Jap J Pharmacol*, 20,482-7.
- 27- Hosseinzadeh H., Ramezani M., Shafaei H., Taghiabadi E. (2013). Anticonvulsant effect of *Berberis integerrima* L.root extracts in mice. *J Acupunct Meridian Stud*, 6, 12-7.
- 28- Shamsa F., Ahmadiani A., Khosrokhava R. (1999). Antihistaminic and anticholinergic activity of barberry fruit (*Berberis vulgaris*) in the guinea-pig ileum. *J Ethnopharmacol.* , 64,161-6.
- 29- Sack B.R., Frochlich L.J. (1982).Berberine inhibits internal secretory response of *Vibrio cholera* and *E. coli* enterotoxins. *Infect Immunol*, 35, 471-5.
- 30- Dobhal M.P., Negi G.S., Joshi B.C.(1988). Chemical investigation and biological activity of *B. chitria* Han. *Himalayan Chem Pharm Bull*, 5, 41-6.
- 31- Freile M.L., Giannini F., Pucci G., Sturniolo A., Rodero L., Pucci O. (2003). Antimicrobial activity of aqueous extracts and of berberine isolated from *Berberis heterophylla*. *Fitoterapia*, 74, 702-5.
- 32- Musumeci R., Speciale A., Costanzo R., Annino A., Ragusa S., Rapisarda A. (2003). *Berberis aetnensis* C. Presl.extracts: antimicrobial properties and interaction with ciprofloxacin. *Int J Antimicro Agents*, 22, 48-53.
- 33- Chan M.Y. (1977). The effect of berberine on bilirubin extraction in the rat. *Comp Med East-West*, 5,161-8.
- 34- Jamshidzadeh A., Niknahad H. (2006). Hepatoprotective activity of *Berberis integerrima* extract in rats treated withCCl4: In vitro and in vivo studies. *Toxicol Lett*, 164,310.
- 35- Domitrović R., Jakovac H., Blagojević G. (2011). Hepatoprotective activity of berberine is mediated by inhibition of TNF- α , COX-2, and iNOS expression in CCl4- intoxicated mice. *Toxicology*, 280, 33-43.
- 36- Sohni Y.R., Bhatt R.M. (1996). Activity of a crude extract formulation in experimental hepatic amoebiasis and immunomodulation studies. *J Ethnopharmacol*, 54,119-24.
- 37- Sohni Y.R, Kaimal P., Bhatt R.M. (1995). The antiamebic effect of a crude drug formulation of herbal extracts against *Entamoeba histolytica* in vitro and vivo. *J Ethnopharmacol*, 1, 43-52.
- 38- Fukuda K., Hibiya Y., Moutoh M., Koshiji M., Akao S., Fujiwara H. (1999a). Inhibition of activator protein 1 activity by berberine in human hepatoma cells. *Planta Med*, 65, 381-3.

- 39- Fukuda K., Hibiya Y., Moutoh M., Koshiji M., Akao S., Fujiwara H. (1999b). Inhibition by berberine of cyclooxygenase-2 transcriptional activity in human colon cancer cells. *J Ethnopharmacol*, 66, 227-33.
- 40- Xu R., Qinghua D., Yingzi Y., Xiaoying Z., Xiaoxian G., Dong W. (2006). Berbamine: A novel inhibitor of bcr/abl fusion gene with potent anti-leukemia activity. *Leuk Res*, 30, 17-23.
- 41- Qadir S.A., Kwon M.C., Han J.G., Ha J.H., Chung H.S., Ahn J. (2009). Effect of different extraction protocols on anticancer and antioxidant activities of *Berberis koreana* bark extracts. *J Biosci Bioeng*, 107, 331-8.
- 42- Li Q., Zhang Li., Zu Y., Liu T., Zhang B., He W. (2013). Generation of reactive oxygen species by a novel berberine–bile acid analog mediates apoptosis in hepatocarcinoma SMMC-7721 cells. *Biochem Biophys Res Comm*, 433, 432-7.
- 43- Kim S., Han J., Lee S.K., Choi M.Y., Kim J., Lee J. (2012). Berberine suppresses the TPA-induced MMP-1 and MMP-9 expressions through the inhibition of PKC- α in breast cancer cells, *J Surg Res*, 176, 21-9.
- 44- Chueh W.H., Lin J.Y. (2012). Berberine, an isoquinoline alkaloid, inhibits streptozotocin induced apoptosis in mouse pancreatic islets through down-regulating Bax/Bcl-2 gene expression ratio. *Food Chem*, 132, 252-60.
- 45- Sabir M., Akhter M.H., Bhide N.K. (1978). Further studies on pharmacology of Berberine. *Indian J Physiol Pharmacol*, 22, 9-23.
- 46- Li J., Sui W. (1986). Influence of berberine on immune fraction in mice infected with influenza virus. *Zhongguo Yaoli Xuebao*, 7, 475-9.
- 47- Qadir S.A., Kwon M.C., Han J.G., Lee H.Y. (2008). Normal and high-pressure extraction of bioactive compound from fruit of Korean barberry (*Berberis koreana*). A comparison. *J Biotechnol*, 136, 61.
- 48- Aliev R.K., Yuzbashinskaya P.A. (1953). Nature of chemical compounds of barberry leaves and the effect of a preparation made from them on the contractility of smooth muscles of the uterus. *Doklady Akad Nank Azerbaldzhan SSR*, 9, 306-7.
- 49- Gupta R.S., Dixit V.P. (1989) Testicular cell population dynamics following palmitine hydroxide treatment in mole dogs. *J Ethnopharmacol*, 25, 151-7.
- 50- Ju H., Han Z. (1990). Anti-oxidant effect of berberine. *Zhongguo Yaoli Xuebao*, 11, 539-41.

- 51- Rajaei Z., Hajzadeh M., Shafiee S., Alavinejhad A., Samarghandian S. (2011). Effect of barberry fruit (*Berberis vulgaris*) on serum glucose and lipids in streptozotocindabetic rats. *Clin Biochem*, 44, 334.
- 52- Meliani N., Dib M., Allali H., Tabti B. (2011). Hypoglycaemic effect of *Berberis vulgaris* L. in normal and streptozotocin- induced diabetic rats. *Asian Pacific J Trop Biomed*, 1, 468-71.
- 53- Jyothilakshmi V., Thellamudhu G., Kumar A., Khurana A., Nayak D., Kalaiselvi P. (2013). Preliminary investigation on ultra high diluted *B. vulgaris* in experimental urolithiasis. *Homeopathy*, 102, 172-8.
- 54- Bashir S., Gilani A.H. (2011). Antiuro lithic effect of berberine is mediated through multiple pathways. *Eur J Pharmacol*, 651, 168-75.
- 55- Zhou X., Zhang C., Wang X., An B., Zhang P., Zhu Z. (2012). Berberine inhibits lipopolysaccharide and polyethyleneparticle-induced mouse calvarial osteolysis in vivo. *J Surg Res*, 173, 47-52.
- 56- Rahigude A.B., Kaulaskar S.V., Bhutada P.S. (2012). Possible therapeutic potential of berberine in diabetic osteopathy. *Med Hypotheses*, 79, 440-4.
- 57- Dong F.C., Hong Y., Liu M., Hao Y.Z., Yu H.S., Liu Y. (2011). Berberine attenuates cardiac dysfunction in hyperglycemic and hypercholesterolemic rats. *Eur J Pharmacol*, 660, 368-74.
- 58- Huang Z., Dong F., Li S., Chu M., Zhou H., Lu Z. (2012). Berberine-induced inhibition of adipocyte enhancer binding protein 1 attenuates oxidized low-density lipoprotein accumulation and foam cell formation in phorbol 12-myristate 13-acetate-induced macrophages. *Eur J Pharmacol*, 690, 164-9.
- 59- Bhardwaj D., Kaushik N. (2012). Phytochemical and pharmacological studies in genus *Berberis*. *Phytochemistry reviews*, 11, 523-542.
- 60- Srivastava S., Srivastava M., Misra A. (2015). A review on biological and chemical diversity in *Berberis* (Berberidaceae).
- 61- Karimov A. (1993). *Berberis* alkaloids. *Chemistry of natural compound*, 29, 415-438.
- 62- Valencia E., Weiss I., Firdous S. (1984). The isoindolobenzazepine alkaloids. *Tetrahedron*, 40, 3957-3962.
- 63- Rajasekaran A., Pokhriyal R., Singh Y. (2009). Quantitative estimation of berberine in roots of different provenances of *Berberis aristata* DC by HPLC and study of their antifungal properties. *Pharmacognosy Magazine*, 5, 355.

- 64- Torres R., Dellemonache F., Marinibettolo G. (1979). Biogenetic relationships between lignans and alkaloids in *Berberis* genus-lignans and berbamine from *Berberis chilensis*. *Planta Medica* (Germany, FR).
- 65- Blasko G., Murugesan N., Freyer A.J., Shamma M. (1982). Karachine: An unusual protoberberine alkaloid. *J Am Chem Soc*, 104, 2039-41.
- 66- Potdar D., Hirwani R.R, Dhulap S. (2012). Phyto-chemical and pharmacological applications of *Berberis aristata*. *Fitoterapia*, 83, 817-30.
- 67- Chandra P., Purohit A.N. (1980). Berberine contents and alkaloid profile of *Berberis* species from different attitudes. *Biochem Syst Ecol*, 8, 379-80.
- 68- Bhakuni D.S., Shoeb A., Popli S.P. (1968). Studies in medicinal plants: Part I – Chemical constituents of *B. asiatica* Roxb. *Indian J Chem*, 6, 123.
- 69- Hussain F.A, Shoeb A. (1958). Isoquinoline derived alkaloids from *B. chitria*. *Phytochemistry*, 24, 633.
- 70- Ghosh R., Mukherjee K., Roychawdhery P., Kalayman L.D. (1993). Structure of an antimalarial alkaloid, jatrorrhizine. *Acta Crystallogr Sect C. Cryst Struct Commun*, 49, 1665-7.
- 71- Yasupov M.M., Karimov A., Lnlfullin K.L. (1990). Alkaloids of *B. vulgaris* XII. *Khim Prir Soedin*, 1, 128-9.
- 72- Ali M.N., Khan A.A. (1978). Pharmacognostic studies of *B. lycium* Royal, and its importance as a source of rawmaterial for the manufacture of berberine in Pakistan. *Pakistan J For*, 28, 25-7.
- 73- Ikram I.M., Ensanul H.M., Warsi S.A. (1966). Alkaloids of *B. lycium*. *Pakistan J Sci Ind Res*, 9, 343-6.
- 74- Miana G.A. (1973). Tertiary dihydroprotoberberine alkaloids of *B. lycium*. *Phytochemistry*, 12, 1822-3.
- 75- Datta S.C., Nigam M.C., Virmani O.P., Siddiqui M.S. (1976). Cold process for production of berberine hydrochloride from *Berberis* roots. *Indian For*, 139, 204.
- 76- Leet J.E., Hussain S.F., Minard R.D., Shamma M., Sindamine ., Punjabine., Giligitine. (1982). Three new secobisbenzylisoquinoline alkaloids. *Heterocycles*, 19, 2355-60.
- 77- Leet J.E., Slango V., Hussain S.F., Shamma M., Chenabine., Jheumine. (1983). Secobisbenzylisoquinolines or simple isoquiniline-benzylisoquinolines dimmers 7. *Heterocycles*, 20, 425-9.
- 78- Tomita M., Yong T.H. (1960). Alkaloids of Berberidaceous plants: Alkaloids of *B. thcibergii*, *B. kawakamii* and *B. mingetsensis*. *Yakugaku Zasshi*, 80, 845-51.

- 79- Du C.T., Francis F.J. (1974). Anthocyanins of contoneaster and barbery. *Hortic Sci*, 9, 40.
- 80- Tiwari K.P. (1977). Masood M. 9, 9-dimethyl tetracosane 6- one from *B. concina*. *Proc Nat Acad Sci India, Sec A*, 48, 76-8.
- 81- Tiwari K.P., Masood M. (1978). Alkaloidal constituents of *B. concina* and *B. acanthifolium*. *Chem Abstr*, 89, 1763334.
- 82- Tiwari K.P., Masood M. (1979). Chemical constituents of *B. coriaria* Royle. *J Indian Chem Soc*, 56, 310-1.
- 83- Majumdar P., Saha S. (1978). 1, 4-Bis (2'-Hydroxy-5'-methylphenyl) - Butan-1, 4-Dione - a bigenetically rare typeof phenolic of *B. coriaria*. *Phytochemistry*, 17, 1439-40.
- 84- Vereskovskii V.V., Sapiro D.K. (1985) Chromatographic study of anthocyanin pigment in the fruits of some berberyspecies. *Khim Prir Soedin*, 4, 569-70.
- 85- Wierzchowski Z., Budicz M. (1969). Carotenoids of the berries of *B. vulgaris*. *Lublin - Polpnia Section C*, 14, 382-405.
- 86- Parlamarchulk A.S., Bondarenko V.E., Grazhevich V.Y., Guletskaya V.N. (1973). Biochemical composition of *B. vulgaris*. *Chem Abstr*, 79, 134326 a.
- 87- Suau R., Rico R., Romero M.L. (1998). Isoquinoline alkaloids from *Berberis vulgaris* sub. *Australis*. *Phytochemistry*, 49, 2545-9.
- 88- Tsang-Hsiumg Y., Lu S. (1960). Alkaloids of *B. kawakamii* and *B. mingetsensis*. *Japanese Pharm Soc*, 80, 847-9.
- 89- Hussain S.F., Shamma M. (1980). Kalashine A novel type aporphine-benzylisoquinoline alkaloid. *TetrahedronLett*, 21, 3315-8.
- 90- Masood M., Tiwari K.P. (1981). 2-5 Bis- (2'-methaxy-5'-methylphenyl)- furan, 1 rare type of compound from *B.umbellata*. *Phytochemistry*, 20, 295-6.
- 91- Hussain F.A., Siddiqui M.I., Khan L., Frayer A.J., Guinaudean H., Shamma M. (1986). Berbamine 2'- α -N-oxide, anew bisbenzyl isoquinolive from *B. brandisiana*. *J Nat Prod*, 49, 538-9.
- 92- Pant N., Garg H.S., Bhakuni K. (1986). Chemical constituents of *B. pseudoambalata*. *Fitoterapia*, 51, 427-8.
- 93- Chatterjee R. (1953). Studies on Indian berberidaceae from botanical, chemical and pharmacological aspects. *RecentBot Survey India*, 16, 1-86.
- 94- Falco M.R., De-varies J.X., Maccio Z., Bick I.R.C. (1969). Alkaloids of *B. laurina* Billb. II. Two new phenolic Biscoclaurine alkaloids. *Experientia*, 25, 1236-7.

- 95- Falco M.R., De-varies J.X., De-Brovetta A.G, Maccio Z., Rebuffo S., Bick I.R.C. (1968). Two new alkaloids from *B. laurina* Billb. (1). Tetrahedron Lett, 16, 1953-9.
- 96- Krets W. (1956). *Hydrastis* and *B. laurina* hydrastinine. Tribuna Farm (Brazil), 24, 30-1.
- 97- Shamma M., Moniot J.L., Yao S.Y., Miana G.A., Ikram M. (1972). Pakistanine and Pakistanamine, two novel dimeric Isoquinoline alkaloids. J Am Chem Soc, 94, 1381-2.
- 98- Shamma M., Foy J.E., Miana G.A. Baluchistanamine.(1974). A novel type dimeric isoquinoline alkaloid. J Am ChemSoc, 96, 7809-10.
- 99- Tomita M., Kugo T. (1955). Alkaloids of Berberidaceous plants - VII. Alkaloids of *B. amurensis* var. japonica from Bretschneideri-I. J Pharm Soc Japan, 75, 753-5.
- 100- Tomita M., Kikuchi T. (1956). Alkaloids of berberidaceous plants - IX: Alkaloids of *B. thrunbergii*. J Pharm SocJapan, 76, 597-9.
- 101- Tomita M., Kugo T. (1956). Alkaloids of Berberidaceous plants - XIX: Alkaloids of *B. tschonoskyana* I. Isolation of bases. Yakugak Zasshi, 79, 317-21.
- 102- Pavel P. (1965). Phytochemical investigation of *Berberis koreana*. Farmacia, 13, 21-8.
- 103- Quevedo R., Valderrama K., Murillo B.M., Laverde M., Fajardo V.(2008). A new bisbenzyl tetrahydro isoquinoline alkaloid from *Berberis tabiensis* (Berberidaceae). Biochem Syst Ecol, 36, 812-4.
- 104- Fajardo V., Araya M., Cuadra P., Oyarzun A., Gallardo A., Cueto M. (2009). Pronuciferine N-oxide, a proaporphine N-oxide alkaloid from *Berberis coletiioides*. J Nat Prod, 72, 1355-6.
- 105- Hussain A. (1992). Studies on constituents of *Berberis waziristanica* and CD studies of chiral metal complexes. Thesis. Pakistan: University of Karachi.
- 106- Dobignard A. (2009). Base de données des plantes à fleurs d'Afrique (version 3.1). Conservatoire et Jardin botaniques de la Ville de Genève and South African National Biodiversity Institute, Pretoria, juillet.
- 107- Fennane M., Ibn Tattou M., Mathez J., Ouyahya A., El Oualidi J. (1999). Flore pratique du Maroc, 2, 558 .
- 108- Valdés B., Rejdali M., Achhal El Kadmiri A., Jury S.L., Montserrat J.M. (2002). Catalogue des plantes vasculaires du Nord du Maroc, incluant des clés d'identification. Volume 1. Madrid : Consejo Superior d'Investigaciones Científico, pp. 496.
- 109- Arayne M.S., Sultana N., Bahadur S.S. (2007). The berberis story: *Berberis vulgaris* in therapeutics. - Pak. J. Pharm. Sci, 20, 83-92.
- 110- Aynehchi Y. (1986). Pharmacognosy and medicinal plants of Iran. - Tehran: Tehran University Press, pp. 1041.

- 111- Nafissi A. (1990). Foods and drinks' properties. - Isfehan: Isfehan Univ. Press, pp.150.
- 112- Zargari A. (1983). Medicinal Plants. - Tehran: Tehran University Press, pp. 68.
- 113- Local Food-Nutraceuticals Consortium - Understanding local Mediterranean diets: a multidisciplinary pharmacological and ethnobotanical approach. - Pharmacol. Res., (2005), 52, 353-366.
- 114- Fatehi M., Saleh T.M., Fatehi-Hassanabad Z., Farrokhfal K., Jafarzadeh M., Davodi S. (2005). A pharmacological study on *Berberis vulgaris* fruit extract. J. Ethnopharmacol, 102, 46-52.
- 115- Amin A.H., Subbaiah T.V., Abbasi K.M. (1969). Berberine sulfate: antimicrobial activity, bioassay, and mode of action. - Can. J. Microbiol, 15, 1067-1076.
- 116- Petcu P., Goina T. (1970). Neue Methoden zur Extrahierung des Alkaloide aus *Berberis vulgaris*. - Planta Med, 18, 372-375.
- 117- Shamsa F., Ahmadiani A., Khosrokhavar R. (1999). Antihistaminic and anticholinergic activity of barberry fruit (*Berberis vulgaris*) in the guinea-pig ileum. J. Ethnopharmacol, 64, 161-166.
- 118- Imanshahidi M., Hosseinzadeh H. (2008). Pharmacological and therapeutic effects of *Berberis vulgaris* and its active constituent, berberine. - Phytother. Res, 22, 999-1012.
- 119- Ibtissem A., Smain C., Youcef H.P., Walter L. (2017). Isolation of berberine tannate using a Chromatography activity-guided fractionation from root bark of *Berberis hispanica* Boiss. & Reut. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, doi.org/10.1080/10826076.2017.1381850.
- 120- Heywood V. H., Brumitt R. k., Culham A., Seberg O.(2007). Flowering plant families of the world. Royal botanic Gardens, Kew.
- 121- Grayer R. J., Eckert M. R., Veitch N. C., Kite G. C. (2003). The chemotaxonomic significance of two bioactive caffeic acid esters, Nepetoidins A and B, in the Lamiaceae. Phytochemistry, 64, 519-528.
- 122- Guignard J. L., Pelt J. M. (2001). Botanique Systématique moléculaire.12e édition. Masson, Paris.
- 123- Guignard J. L., Dupont F. (2004).Botanique Systématique moléculaire. 13e édition. Masson, Paris.
- 124- Meyer S., Reeb C., Bosdeveix R. (2004). Botanique Biologie et Physiologie Végétales. Editions Maloine, Paris.
- 125- MESSAILI B. (1995). Botanique, systématique des spermaphytes. OPU (Ed). Alger, 91, pp. 169

- 126-** Rechinger K.H., Hedge I.C. (1982). Flora Iranica. Akademische Druck Verlagsanstalt, Graz Austria, 360-361.
- 127-** Quezel P., Santa S. (1963). La nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II, Ed. CNRS, Paris, 360-361.
- 128-** Rivolier C. (1977). Secrets et vertus des plantes médicinales. Selection du Reader's Digest, S.A.
- 129-** Duke A. J. (1986). Handbook of Medicinal Herbs, CRC Press, Boca Raton, pp. 457.
- 130-** Hayashi K., Nagamatsu T., Ito M., Hattori T., Suzuki Y. (1994a). Acteoside, a component of *Stachys sieboldii* MIQ, may be a promising antinephritic agent (1): effect of acteoside on crescentic-type anti-GBM nephritis in rats. Japanese J. Pharma, 65, 143-51.
- 131-** Skaltsa H., Bermejo P., Lazari D., Silvan A.M., Skaltsounis A.L., Sanz A., Abad M.J. (2000). Inhibition of prostaglandin E2 and leukotriene C4 in mouse peritoneal macrophages and thromboxane B2 production in human platelets by flavonoids from *Stachys chrysantha* and *Stachys candida*. Biol. Pharm. Bull, 23, 47–53.
- 132-** Takeda Y., Fujita T., Satoh T., Kakegawa H. (1985). On the glucosidic constituents of *Stachys sieboldii* Miq. and their effects on hyaluronidase activity. Yakugaku Zasshi, 105, 955–959.
- 133-** Takeda Y., Zhang H., Masuda T., Honda G., Otsuka H., Sezik E., Yesilada E., Sun H. (1997). Megastigmane Glucosides From *Stachys Byzantina*. Phytochemistry, 44, 1335-1337.
- 134-** Skaltsa H.D., Lazari D.M., Chinou I.B., Loukis A.E. (1999). Composition and antibacterial activity of the essential oils of *Stachys candida* and *S. chrysantha* from southern Greece [letter]. Planta Med, 65, 255–256.
- 135-** Zinchenko T. V., Voitenko G. N., Lipkan G. N. (1981). Antiinflammatory, antitoxic and hypoazothemic effects of the drug stachyrene from *Stachys recta*. Farmakologiyai Toksikologiya (Moscow), 44, 191-194.
- 136-** Savchenko V.M., Khvorostinka V.M. (1978). Effects of a preparation from *Stachys inflata* on the course of experimental hepatitis in rats. Farm-Zh-Kiev, 33, 50–53.
- 137-** Yamahara J., Kitani T., Kobayashi H., Kawahara Y. (1990). Studies on *Stachys sieboldii* MIQ. II. Antianoxic activity and active constituents. Kyoto Pharm. Univ., Kyoto, Japan. Yakugaku Zasshi, 110, 932-935.

- 138- Rabbani M., Sajjadi S.E., Zarei. H.R. (2003). Anxiolytic effects of *Stachys lavandulifolia* Vahl on the elevated plus-maze model of anxiety in mice. *J. Ethnopharm*, 89, 271–276.
- 139- Rabbani M., Sajjadi S.E., Jalali A. (2005). Hydroalcohol extract and fractions of *Stachys lavandulifolia* Vahl: Effects on spontaneous motor activity and elevated plus-maze behaviour. *Phytotherapy Research*, 19, 854–858.
- 140- Basaran A.A., Yu T.W., Plewa M.J., Anderson D. (1996). In investigation of some Turkish herbal medicines in *Salmonella typhimurium* and in the COMET assay in human lymphocytes. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 16, 125-138.
- 141- Stamatis G., Kyriazopoulos P., Golegou S., Basayiannis A., Skaltsas S., Skaltsa H. (2003). In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of Greek herbal medicines. *J. Ethnopharm*, 88, 175–179.
- 142- Nishimura H.N., Sasaki N.H., Inagaki N., Chin M., Mitsuhashi H. (1991). Nine phenethyl alcohol glycosides from *Stachys sieboldii*. *Phytochemistry*, 30, 965-969.
- 143- Gruenwald J., Brendler T., Jaenicke C. (2000). *PDR for herbal Medicines*, 2nd ed. Medical Economics Company, Montvale, NJ, pp. 832.
- 144- Maleki N., Garjani A., Nazemiyeh H., Nilfouroushan N., Eftekhari Sadat A.T., Allameh, Z., Hasannia N.(2001). Potent anti-inflammatory activities of hydroalcoholic extract from aerial parts of *Stachys inflata* on rats. *J. Ethnopharm*, 75, 213–218.
- 145- Matkowski A., Piotrowska M. (2006). Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae. *Fitoterapia*, 77, 346–353.
- 146- Khanavi M., Sharifzadeh M., Hadjiakhoondi A., Shafiee A. (2005). Phytochemical investigation and anti-inflammatory activity of aerial parts of *Stachys byzanthina* C. Koch. *J. Ethnopharm*, 97, 463–468.
- 147- Couladis M., Tzakou O., Verykokidou E., Harvala C. (2003). Screening of some Greek aromatic plants for antioxidant activity. *Phytotherapy Research*, 17, 194-195.
- 148- Vundac V.B., Brantner A.H., Plazibat M. (2007). Content of polyphenolic constituents and antioxidant activity of some *Stachys* taxa. *Food Chemistry*, 104, 1277–1281.
- 149- Radnai E.H., Czige Sz., Zupkó I., Falkay Gy., Mathe I. (2006). Comparison of antioxidant activity in enzyme-independent system of six *Stachys* species. *Fitoterapia*, 31, 21.
- 150- Pasechnik I.Kh., Zinchenko T.V., Garbarets M. A., Gorodinskaya V. Ya. (1971). Choleric properties of flavonoids of *Stachys recta* and *Stachys neglecta*. *Farm. Zh.* (Kiev), 26, 64-69.

- 151-** Pasechnik I. Kh. (1969). Choleric properties of medicinal agents obtained from hedge nettle. *Farmakol. Toksikol. (Moscow)*, 32, 575- 577.
- 152-** Karaev A. I., Aliev R. K., Yuzbashinskaya P. A. (1955). The chemical composition of the wooly hedge-nettle grass and water-mint leaves and effect of its compounds on the contracting properties of uterus muscles. *Dokl. Akad. Nauk Azerb. SSR*, 11, 187-193.
- 153-** Shin T.Y.(2004). *Stachys riederi* inhibits mast cell-mediated acute and chronic allergic reactions. *Immunopharm. Immunotoxicol*, 26, 621-30.
- 154-** Kim S.H., Kim D.K., Eom D.O., Park J.S., Lim J.P., Kim S.Y., Shin H.Y., Kim S.H., Shin T.Y.(2003). Anti-allergic effect of aqueous extract of *Stachys riederi* var. *japonica* Miq. *in vivo* and *in vitro*. *Nat. Prod. Sci*, 9, 44-48.
- 155-** Aydin S., Basaran A.A., Basaran N. (2004). The protective effects of some phenylethanoid glycosides on the mitomycin C induced DNA strand breakage. *Hacettepe Universites: Eczacilik Fakultesi Dergisi*, 24, 01-11.
- 156-** Háznagy-Radnai E., Balogh Á., Czigle S., Máthé I., Hohman J., Gábor B. (2012). Antiinflammatory activities of Hungarian *Stachys* species and their iridoids. *Phytother. Res*, 26, 505–509.
- 157-** Haznagy-Radnai E., Czigle S., Janicsak G., Mathe I. (2006). Iridoids of *Stachys* species growing in Hungary. *J. Planar Chromatogr. –Mod. TLC*, 19, 187–190.
- 158-** Haznagy-Radnai E., Rethy B., Czigle S., Zupko I., Weber E., Martinek T., Falkay G., Máthé I. (2008). Cytotoxic activities of *Stachys* species. *Fitoterapia*, 79, 595–597.
- 159-** Serrilli A.M., Ramunno A., Piccioni F., Serafini M., Ballero M. (2005). Flavonoids and iridoids from *Stachys corsica*. *Nat. Prod. Res*, 19, 561–565.
- 160-** Venditti A., Bianco A., Nicoletti M., Quassinti L., Bramucci M., Lupidi, G., Vitali, L.A., Petrelli D., Papa F., Vittori S., Lucarini D., Maleci Bini L., Giuliani C., Maggi F. (2013a). Phytochemical analysis, biological evaluation and micromorphological study of *Stachys alopecuros* (L.) Benth. subsp. *divulsa* (Ten.) Grande endemic to central Apennines, Italy. *Fitoterapia*, 90C, 94–103.
- 161-** Venditti A., Serrilli A.M., Di Cecco M., Ciaschetti G., Andrisano T., Bianco A. (2013b). Phytochemical composition of polar fraction of *Stachys germanica* L. subsp. *salviifolia* (Ten.) Gams, a typical plant of Majella National Park. *Nat. Prod. Res*, 27, 190–193.
- 162-** Serrilli A.M., Ramunno A., Piccioni F., Serafini M., Ballero M., Bianco A. (2006). Monoterpenoids from *Stachys glutinosa* L. *Nat. Prod. Res*, 20, 648–652.

- 163-** Muñoz O., Peña R.C., Montenegro G. (2001). Iridoids from *Stachys grandidentata* (Labiatae). *Z. Naturforsch, C* 56, 902–903.
- 164-** Kotsos M., Aligiannis N., Mitaku, S., Skaltsounis A.L., Charvala C. (2001). Chemistry of plants from Crete: stachyspinoside, a new flavonoid glycoside and iridoids from *Stachys spinosa*. *Nat. Prod. Lett*, 15, 377–386.
- 165-** Delazar A., Delnavazi M.R., Nahar L., Moghadam S.B., Mojarab M., Gupta A., Williams A.S., Rahman M.M., Sarker S.D. (2011). Lavandulifolioside B: a new phenylethanoid glycoside from the aerial parts of *Stachys lavandulifolia* Vahl. *Nat. Prod. Res.* 25, 8–16.
- 166-** Murata T., Endo Y., Miyase T., Yoshizaki F. (2008). Iridoid glycoside constituents of *Stachys lanata*. *J. Nat. Prod.* 71, 1768–1770.
- 167-** Jeker M., Sticher O., Calis I., Ruedi P. (1989). Allobetonicoside and 6-O-acetylmiosporoside: two new iridoid glycosides from *Betonica officinalis* L. *Helv. Chim. Acta*, 72, 1787–1791.
- 168-** Çalis I., Başaran A.A., Saracog˘lu I., Stcher O. (1992). Iridoid and phenylpropanoid glycosides from *Stachys macrantha*. *Phytochemistry*, 31, 167–169.
- 169-** Skaltsa H.D., Mavrommati A., Constantinidis T. (2001). A chemotaxonomic investigation of volatile constituents in *Stachys* subsect. *Swainsonianae* (Labiatae). *Phytochemistry*, 57, 235–244.
- 170-** Grujic-Jovanovic S., Skaltsa H.D., Marin P., Sokovic M. (2004). Composition and antibacterial activity of the essential oil of six *Stachys* species from Serbia. *Flavour Frag. J.* 19, 139–144.
- 171-** Radnai E., Dobos A., Veres K., Tòth L., Mathé I., Janicsak G., Blunden G. (2003). Essential oils in some *Stachys* species growing in Hungary. *Acta Hort.* 597, 137–142.
- 172-** Skaltsa H.D., Lazari D.M., Chinou I.B., Loukis A.E. (1999). Composition and antibacterial activity of the essential oils of *Stachys candida* and *S. chrysantha* from southern Greece. *Planta Med.* 65, 255–256.
- 173-** Skaltsa H.D., Demetzos C., Lazari D., Sokovic M. (2003). Essential oil analysis and antimicrobial activity of eight *Stachys* species from Greece. *Phytochemistry*, 64, 743–752.
- 174-** Grujic-Jovanovic S., Marin P.D., Dzamic A., Ristic M. (2008). Composition of the essential oil of *Stachys germanica* from Serbia. *Chem. Nat. Compd.* 44, 670–672.

- 175-** Mariotti J.P., Costa J., Bianchini A., Bernardini A.F., Casanova J. (1997). Composition and variability of the essential oil of *Stachys glutinosa* L. from Corsica (France). *Flavour Frag. J.*, 12, 205–209.
- 176-** Petrovic S., Ristic M., Milenkovic M., Kukic J., Antic-Stankovic J., Niketic M. (2006). Composition and antimicrobial activity of essential oil of *Stachys plumosa* Griseb. *Flavour Frag. J.*, 21, 250–252.
- 177-** López M.A., von Carstenn-Lichterfelde C., Rodríguez B., Fayos J., Martínez-Ripoll M. (1977). Andalusol, a new diterpenoid from a *Sideritis arborescens* Salzm. subspecies. Chemical and X-ray structure determination. *J. Org. Chem.*, 42, 2517–2518.
- 178-** García-Granados A., Martínez A., Onorato M.E. (1985b). Diterpenes from *Sideritis arborescens* subsp. *paulii*. *Phytochemistry*, 24, 517–521.
- 179-** García-Alvarez M.C., Rodríguez B., (1980). Diterpenoids from *Sideritis foetens*. *Phytochemistry*, 19, 2405–2407.
- 180-** Popa D.P., Orgiyan T.M., Kharitov Kh.Sh., 1974. Structure of annuanone. *Chem. Nat. Compd.* 10, 324–330.
- 181-** Derkach A.I. (1998). Biologically active substances of some species of the genus *Stachys* L. of the flora of the Ukraine. *Rastitel'nye Resursy*, 34, 57–61.
- 182-** Topçu G., Gören A.C., Yildiz Y.K., Tümen G. (1999). Ent-kaurene diterpenes from *Sideritis athena*. *Nat. Prod. Lett.*, 14, 123–129.
- 183-** García-Granados A., Parra A., Peña A., Saenz de Buruaga A., Saenz de Buruaga J.M., Valverde, S. (1980a). Atisideritol, a new ent-atis-13-ene from a *Sideritis pusilla* (Lag.) Pau. subsp. *Tetrahedron Lett.*, 21, 3611–3612.
- 184-** García-Granados A., Parra A., Peña A., Saenz de Buruaga A., Saenz de Buruaga J.M. (1981b). Nuevos acetatos diterpénicos de una subespecie de *Sideritis pusilla* (Lag.) Pau. *Anal. Quím.*, 77C, 19–21.
- 185-** García-Granados A., Parra A., Peña A., Saenz de Buruaga A., Valverde S., (1981c). Componentes minoritarios de una subespecie de *Sideritis pusilla* (Lag.) Pau. *Anal. Quím.*, 77C, 48–51.
- 186-** Márquez C., Panizo F.M., Rodríguez B., Valverde S. (1975). A new diterpene acetate from *Sideritis reverchonii*. *Phytochemistry*, 14, 2713–2714.
- 187-** De Quesada T., Rodríguez B., Valverde S. (1975). Four new diterpenes from *Sideritis serrata*. *Phytochemistry*, 14, 517–519.

- 188-** Bankova V., Koeva-Todorovska J., Stambolijaska T., Ignatova-Groceva M.D., Todorova D., Popov S. (1999). Polyphenols in *Stachys* and *Betonica* species (Lamiaceae). *Z. Naturforsch*, C 54, 876–880.
- 189-** Tkachev V.V., Nikonov G.K., Atovmyan L.O., Kobzar Zinchenko T.V. (1987). Chemical and X-ray structural investigation of a new diterpene lactone betolide. *Chem. Nat. Compd*, 23, 673–678.
- 190-** Miyase T., Yamamoto R., Ueno A. (1996a). Betonicosides A–D and betonicolide from the roots of *Stachys officinalis*. *Chem. Pharm. Bull*, 44, 1610–1613.
- 191-** Rodríguez B., Valverde S. (1973). Borjatriol, a new diterpenoid from *Sideritis mugronensis* Borja (Labiatae). *Tetrahedron*, 29, 2837–2843.
- 192-** Fraga B.M., Hernandez M.G., Fernandez C., Santana J.M.H. (2009). A chemotaxonomic study of nine Canarian *Sideritis* species. *Phytochemistry*, 70, 1038–1048.
- 193-** Fraga B.M., Bressa C., Fernández C., González P., Guillermo R., Hernández, M.G. (2008). Diterpenes from *Sideritis infernalis* and *Sideritis candicans*. *Z. Naturforsch*, 63, 595–599.
- 194-** García-Granados A., Lizana F., Martínez A., Onorato M.E., Saenz de Buruaga A., Saenz de Buruaga J.M., Socorro O. (1983). Diterpenos de *Sideritis lacaitae* Font Quer, *Sideritis almerienses* Pau, *Sideritis granatensis* (Pau) Font Quer sp. *nijarensis* O. Socorro et I. Tárrega, *Sideritis zafrae* O. Socorro y *Sideritis leucantha* Cav. var. *incana* Font Quer. *Anal. Quím*, 79C, 460–461.
- 195-** Topçu G., Gören A.C., Kiliç M., Yildiz Y.K., Tümen G. (2002b). Diterpenes from *Sideritis trojana*. *Nat. Prod. Lett*, 16, 33–37.
- 196-** Topçu G., Gören A.C., Kiliç T., Yildiz Y.K., Tümen G. (2001). Diterpenes from *Sideritis argyrea*. *Fitoterapia*, 72, 1–4.
- 197-** Escamilla E.M., Rodríguez B., 1980. Diterpenoides y flavonas de *Sideritis flavovirens* Rouy. *Anal. Quím*, 76C, 189–190.
- 198-** von Carstenn-Lichterfelde, C., Valverde S., Rodríguez B. (1974). Two new stachenederivatives from *Sideritis angustifolia* (Labiatae). *Aust. J. Chem*, 27, 517–529.
- 199-** Carrascal I., Rabanal R.M., Márquez C., Valverde S. (1978). Diterpenos de *Sideritis*. Diterpenos de *S. crispata*, *S. ilicifolia* y *S. tragoriganum*. *Anal. Quím*, 74, 1547–1550.
- 200-** García-Granados A., Martínez A., Molina A., Onorato M.E. (1986). Terpenoid from *Sideritis varoi* subsp. *oriensis*. *Phytochemistry*, 25, 2171–2173.

- 201-** Algarra J., Garcia-Granados A., Saenz de Buruaga A., Saenz de Buruaga J. (1983). Terpenic components of Spanish Labiatae. Part 11. Diterpenoids from *Sideritis varoi*. *Phytochemistry*, 22, 1779–1782.
- 202-** Cabrera E., García-Granados A., Quecuty M.A., 1988. Terpenoids from *Sideritis varoi*. *Phytochemistry*, 27, 183–185.
- 203-** Piozzi F., Paternostro M.P., Servettaz O., Arnold N.A. (2002). Occurrence of (+)-6-desoxyandalusol in *Stachys ionica* and *Stachys distans*. *Biochem. Syst. Ecol*, 30, 887–889.
- 204-** Rodriguez B., von Carstenn-Lichterfelde C., 1979. 6-Deoxyandalusol, a new diterpenoid from *Sideritis arborescens* Salzm. subsp. *Anal. Quim*, C 75, 110–111.
- 205-** Cabrera E., Garcia-Granados A., Saenz de Buruaga A., Saenz de Buruaga J. (1983). Terpenic components of Spanish Labiatae. Diterpenoids from *Sideritis hirsuta* subsp. *nivalis*. *Phytochemistry*, 22, 2779–2781.
- 206-** Paternostro M.P., Maggio A.M., Piozzi F., Servettaz O. (2000). Labdane diterpenes from *Stachys plumosa*. *J. Nat. Prod*, 63, 1166–1167.
- 207-** Venturella P., Bellino A., Marino M.L. (1989). A diterpene, distanol, from *Sideritis distans*, *Phytochemistry*, 28, 1976–1977.
- 208-** Ertas A., Öztürk M., Boga M., Topçu G. (2009). Antioxidant and anticholinesterase activity evaluation of ent-kaurene diterpenoids from *Sideritis arguta*. *J. Nat. Prod*, 72, 500–502.
- 209-** Topçu G., Gören A.C., Kiliç M., Yildiz Y.K., Tümen G. (2002a). Diterpenes from *Sideritis siphylea* and *Sideritis dichotoma*. *Turk. J. Chem*, 26, 189–194.
- 210-** Piozzi F., Savona G., Hanson J.R. (1980). Kaurenoid diterpenes from *Stachys lanata*. *Phytochemistry*, 19, 1237–1238.
- 211-** Popa D.P., Pasechnik G.S. (1974). Structure of stachysic acid. A new diterpenoid of kaurane series. *Chem. Nat. Compd*, 10, 454–457.
- 212-** Halfon B., Gören A.C., Ertas A., Topçu G. (2011). Complete ¹³C NMR assignments for ent-kaurane diterpenoids from *Sideritis* species. *Magn. Reson. Chem*, 49, 291–294.
- 213-** Rodríguez B., Valverde S., Cuesta R., Peña A. (1975). Diterpenes from three *Sideritis* species. *Phytochemistry*, 14, 1670–1671.
- 214-** García-Granados A., Parra-Sánchez A., Peña-Carrillo A. (1980c). Estudio de la *Sideritis arborescens* (var. *arborescens*) Salzm. *Anal. Quím*, 76, 98–100.
- 215-** Adinolfi M., Barone G., Lanzetta R., Laonigro G., Mangoni L., Parrilli M. (1984). Diterpenes from *Stachys recta*. *J. Nat. Prod*, 47, 541–543.

- 216-** Kiliç T. (2006). Isolation and biological activity of new and known diterpenoids from *Sideritis stricta* Boiss. & Heldr. *Molecules*, 11, 257–262.
- 217-** Cakir A., Duru M.E., Harmandar M., Izumi S., Hirata T. (1997). The volatile constituents of *Stachys recta* L. and *Stachys balansae* L. from Turkey. *FlavourFrag. J*, 12, 215–218.
- 218-** Duman H., Kartal M., Altun L., Demirci B., Hüsnü Can Baser K. (2005). The essential oil of *Stachys laetivirens* Kotschy & Boiss. ex Rech. fil., endemic in Turkey. *Flavour Frag. J*, 20, 48–50.
- 219-** Radulovic N., Lazarevic J., Ristic N., Palic R. (2007). Chemotaxonomic significance of the volatiles in the genus *Stachys* (Lamiaceae): essential oil composition of four Balkan *Stachys* species. *Biochem. Syst. Ecol*, 35, 196–208.
- 220-** López-Gómez M.A., Márquez C., Rabanal R.M., Valverde S. (1979). Diterpenos de *Sideritis hirsuta*. Estudio mediante RMN de C-13 de diterpenos de ent-kaur-15-eno y ent-kaur-16-eno. *Anal. Quím*, 75, 911–915.
- 221-** Baser K.H.C., Bondi M.L., Bruno M., Kirimer N., Piozzi F., Tümen, G., Vassallo N. (1996). An ent-kaurane from *Sideritis huber-morathii*. *Phytochemistry*, 43, 1293–1295.
- 222-** Bondi M.L., Bruno M., Piozzi F., Baser K.H.C., Simmonds M.S.J. (2000). Diversity and antifeedant activity of diterpenes from Turkish species of *Sideritis*. *Biochem. Syst. Ecol*, 28, 299–303.
- 223-** García-Alvarez M.C., Rodríguez B. (1976). Epoxy-isosidol: a new diterpenoid from *Sideritis biflora*. *Phytochemistry*, 15, 1994–1995.
- 224-** Rodríguez B., Valverde S. (1976). Epoxy-isofoliol, a new diterpenoid from *Sideritis paulii*. *Anal. Quím*, 72, 189–190.
- 225-** Venturella P., Bellino A., (1977b). Diterpenes from Greek *Sideritis* species. *Fitoterapia*, 48, 3–4.
- 226-** Venturella P., Bellino A., Piozzi F. (1975). Diterpenes from *Sideritis theezans*. *Phytochemistry*, 14, 1451–1452.
- 227-** Piozzi F., Venturella P., Bellino A., Selva A. (1969). Struttura del sideritriolo. *Gazz. Chim. Ital*, 99, 582–587.
- 228-** Venturella P., Bellino A., Marino M.L. (1978). New diterpenes from *Sideritis sicula*. *Phytochemistry*, 17, 811–812.
- 229-** Kiliç T., Çarıkçı S., Topçu G., Aslan I., Gören A.C. (2009). Diterpenoids from *Sideritis condensata*. Evaluation of chemotaxonomy of *Sideritis* species and insecticidal activity. *Chem. Nat. Compd*, 45, 918–920.

- 230-** Venturella P., Bellino A. (1977a). Eubotriol and eubol, new diterpenes from *Sideritis euboica*. *Experientia*, 33, 1270–1271.
- 231-** Gonzalez A.G., Fraga B.M., Hernández M.G., Luis J.G., Núñez A. (1974). Componentes de la *Sideritis glacialis*. Algunas reacciones del siderol. *Anal. Quím*, 70, 730–732.
- 232-** Venturella P., Bellino A. (1979). Isolation and partial synthesis of ent-18-acetoxykaur-16-ene-3b, 7a, 15b-triol from *Sideritis scardica*. *Phytochemistry*, 18, 1571–1572.
- 233-** Çarikçi S., Çol C., Kiliç T., Azizoglu A., (2007). Diterpenoids from *Sideritis tmolea*. *Rec. Nat. Prod*, 1, 44–50.
- 234-** García-Granados A., Garrido J.A., Parra A., Peña A. (1979). Estudio de la *Sideritis funkiana* Willk. *Anal. Quím*, 75, 780–781.
- 235-** García-Granados A., Martínez P.A., Parra A. (1982). Diterpenos de *Sideritis leucanthavar. meridionalis* Font-Quer. *Anal. Quím*, 78C, 410–412.
- 236-** García-Granados A., Martínez A., Onorato M.E., Socorro O. (1984a). Diterpenos de *Sideritis pusilla* (Lange) Pau subsp. *flavovirens* (Rouy) Malagarriga y *Sideritis leucantha* Cav. var. *flavovirens* Rouy. *Anal. Quím*, 80, 175–177.
- 237-** García-Granados A., Martínez A., Onorato M.E., Socorro O. (1984b). Diterpenoids from *Sideritis pusilla* Pau subsp. *flavovirens*. *Phytochemistry*, 23, 607–610.
- 238-** García-Granados A., Parra A., Peña A. (1981a). Determinación de estructura por ¹H RMN de alta resolución (360 MHz) de un 11,18-dihidroxi kaur-16-eno, un nuevo diterpeno de la *Sideritis arborescens* (*arborescens*) Salzm. *Anal. Quím*, 77C, 239–242.
- 239-** Rodríguez B. (1978a). New labdane diterpenoids from *Sideritis chamaedryfolia*. *Phytochemistry*, 17, 281–286.
- 240-** Topçu G., Ertas A., Öztürk, M., Dinçel D., Kiliç, T., Halfon B. (2011). Ent-kauran diterpenoids isolated from *Sideritis congesta*. *Phytochem. Lett*, 4, 436–439.
- 241-** Rodríguez, B., 1978b. Diterpenes de *Sideritis incana* L. subsp. *virgata* Desf. *Anal. Quím*. 74, 157.
- 242-** De Quesada T.G., Rodríguez B., Valverde S. (1974). Diterpenes from *Sideritis lagascana* and *Sideritis valverdei*. *Phytochemistry*, 13, 2008.
- 243-** De Quesada T.G., Rodríguez B., Valverde S. (1972a). Leucanthol and isoleucanthol, two new diterpenoids from *Sideritis leucantha* Cav. (*Labiatae*). *Anal. Quím*, 68, 1467–1468.

- 244-** De Quesada T.G., Rodríguez B., Valverde S., Huneck S. (1972b). Six new diterpenes from *Sideritis leucantha* Cav. and *Sideritis linearifolia* Lam. *Tetrahedron Lett*, 22, 2187–2190.
- 245-** De Quesada T.G., Rodríguez B., Valverde S. (1973). Estudio sobre diterpenos del género *Sideritis*. Nuevos componentes minoritarios de *S. pusilla* (Lage) Pau. *Anal. Quím*, 69, 1201–1202.
- 246-** García-Granados A., Parra A., Peña A., Valverde S. (1980b). Funkiol y sidofunkiol, dos productos minoritarios de *Sideritis funkiana* Willk. *Anal. Quím*, 76C, 178–179.
- 247-** Pintore G., Chessa M., Manconi P., Zanetti, S., Deriu A., Tirillini B. (2006). Chemical composition and antimicrobial activities of essential oil of *Stachys glutinosa* from Sardinia. *Nat. Prod. Commun*, 1, 1133–1136.
- 248-** Haznagy-Radnai E., Cziglee Sz. Máté I. (2007). Analysis of the essential oil of downy woundwort (*Stachys germanica* L.). *Acta Fac. Pharm. Univ. Comenianae*, 54, 78–83.
- 249-** Morteza-Semnani K., Akbarzadeh M., Changizi S. (2006). Essential oils composition of *Stachys byzantina*, *S. inflata*, *S. lavandulifolia* and *S. laxa* from Iran. *Flavour Frag. J*, 21, 300–303.
- 250-** Javidnia K., Rezai H., Miri R., Jafari A. (2006). Composition of the essential oil of *Stachys obtusifolia* Bois. from Iran. *J. Essent. Oil Res*, 18, 146–148.
- 251-** Pang L., de las Heras B., Hout J.R.S. (1996). A novel diterpenoid labdane from *Sideritis javalambrensis* inhibits eicosanoid generation from stimulated macrophages but enhances arachinodate release. *Biochem. Pharmacol*, 51, 863–868.
- 252-** Martín-Panizo F.M., Rodríguez B., Valverde S. (1972). Lagascatriol, a new diterpenoid from *Sideritis angustifolia* Lag. *Anal. Quím*, 68, 1463–1465.
- 253-** García-Granados A., Saenz de Buruaga A., Saenz de Buruaga J.M., Socorro O. (1984c). Diterpenos de *Sideritis granatensis* (Pau) Font-Quer. *Anal. Quím*, 80, 172–174.
- 254-** Khanavi M., Sharifzadeh M., Hadjiakhoondi A., Shafiee A. (2005). Phytochemical investigation and anti-inflammatory activity of aerial parts of *Stachys byzantina* C. Koch. *J. Ethnopharmacol*, 97, 463–468.
- 255-** Rabanal R.M., Rodríguez B., Valverde S. (1974). Tartessol, a new diterpene from *Sideritis grandiflora* Salzm. *Experientia*, 30, 977–978.
- 256-** Fazio C., Paternostro M.P., Passannanti S., Piozzi F. (1994b). Further neoclerodan diterpenoids from *Stachys rosea*. *Phytochemistry*, 37, 501–503.

- 257- Gonzalez A.G., Fraga B.M., Hernandez M.G., Luis J.G. (1973). New diterpenes from *Sideritis canariensis*. *Phytochemistry*, 12, 1113–1116.
- 258- Garcia-Granados A., Martinez A., Molina A., Onorato M.E., Rico M., Saenz deBuruaga A., Saenz de Buruaga J.M. (1985a). Terpenic components of Spanish *Labiatae*. Diterpenoids and from *Sideritis varoi* subsp. *cuatrecasii*: carbon-13.
- 259- Fazio C., Passannanti S., Paternostro M.P., Arnold N.A. (1994a). Diterpenoids from *Stachys mucronata*. *Planta Med*, 60, 499.
- 260- Fazio C., Passannanti S., Paternostro M.P., Piozzi F. (1992). Neo-Clerodane diterpenoids from *Stachys rosea*. *Phytochemistry*, 31, 3147–3149.
- 261- Bruno M., Piozzi F., Arnold N.A., Baser K.H.C., Tabanca N., Kirimer N. (2005). Kaurane diterpenoids from three *Sideritis* species. *Turk. J. Chem*, 29, 61–64.
- 262- Von Carstenn-Lichterfelde C., Rodríguez B., Valverde S. (1975). Barbatol, a new diterpenoid from a *Sideritis arborescens* Salzm. subspecies. *Experientia*, 31, 757–758.
- 263- García-Granados A., Martínez A., Onorato M.E., Parra A., Recondo M.B., Rivas F., Arrebola M.L., Socorro O. (1994). Products with biological activity obtained from *in vitro* micropropagated *Sideritis foetens*. *Phytochemistry*, 35, 645–650.
- 264- Alcaraz M.J., Ferrandiz M.L. (1990). Diterpenoids from *Sideritis javalambrensis* Pau., *Plantes Med. Phytother*, 24, 82–86.
- 265- Popa D.P., Orgiyan T.M. (1974). Minor diterpenoids of *Stachys annua*. *Chem. Nat. Compd*, 10, 410.
- 266- Orgiyan T.M., Popa D.P. (1969). Diterpenoids from *Stachys annua*. *Chem. Nat. Compd*, 5, 5–6.
- 267- Melek F.R., Radwan A.S., El-Ansari M.A., El-Gindi O.D., Hilal S.H., Genenah A.A. (1992). Diterpenes from *Stachys aegyptiaca*. *Fitoterapia*, 63, 276.
- 268- Popa D.P., Orgiyan T.M., Samek Z., Dolejs L. (1972). Structure of stachysolone., *Chem. Nat. Compd*, 8, 292–295.
- 269- Mohamed A.E., Mohamed N.S. (2013). A new trans-neoclerodane diterpene from, *Stachys aegyptiaca*. *Nat. Prod. Res*, doi.org/10.1080/14786419.2013.830217.
- 270- García-Granados A., Molina A., Sáenz de Buruaga A., Sáenz de Buruaga J.M. (1985c). Sesquiterpenes from two subspecies of *Sideritis varoi*. *Phytochemistry*, 24, 97–101.
- 271- Gautier M.G. (1891). Quelques Plantes Rares Ou Nouvelles Des Pyrénées-Orientales, *Bulletin de la Société Botanique de France*, DOI: 10.1080/00378941.1891.10839593

Chapitre 2

Description des travaux

I. Etude phytochimique de l'espèce *Berberis hispanica*

I.1. Récolte de la matière végétale

La récolte du matériel végétal a été effectuée au mois de juillet 2009 dans la région de Tikejda. Après séchage dans un endroit sec à l'abri des rayons solaires, les parties aériennes sont broyées puis pesées (963 g).

I.2. Extraction

L'extraction utilisée pour cette espèce repose sur les quatre étapes principales suivantes :

- ✓ Macération de la matière végétale sèche dans mélange alcool-eau, trois fois avec renouvellement du solvant ;
- ✓ Concentration du macéra ;
- ✓ Dilution à chaud de l'extrait hydro alcooliques avec de l'eau distillée;
- ✓ Une série d'extraction par partage est effectuée sur la solution aqueuse obtenue dans une ampoule à décanter par confrontation avec des solvants non miscibles à l'eau et de polarité croissante ;
- ✓ Les phases organiques sont séchées sur du sulfate de sodium anhydre afin d'éliminer toute trace d'eau.

Le protocole d'extraction est résumé dans la figure-9.

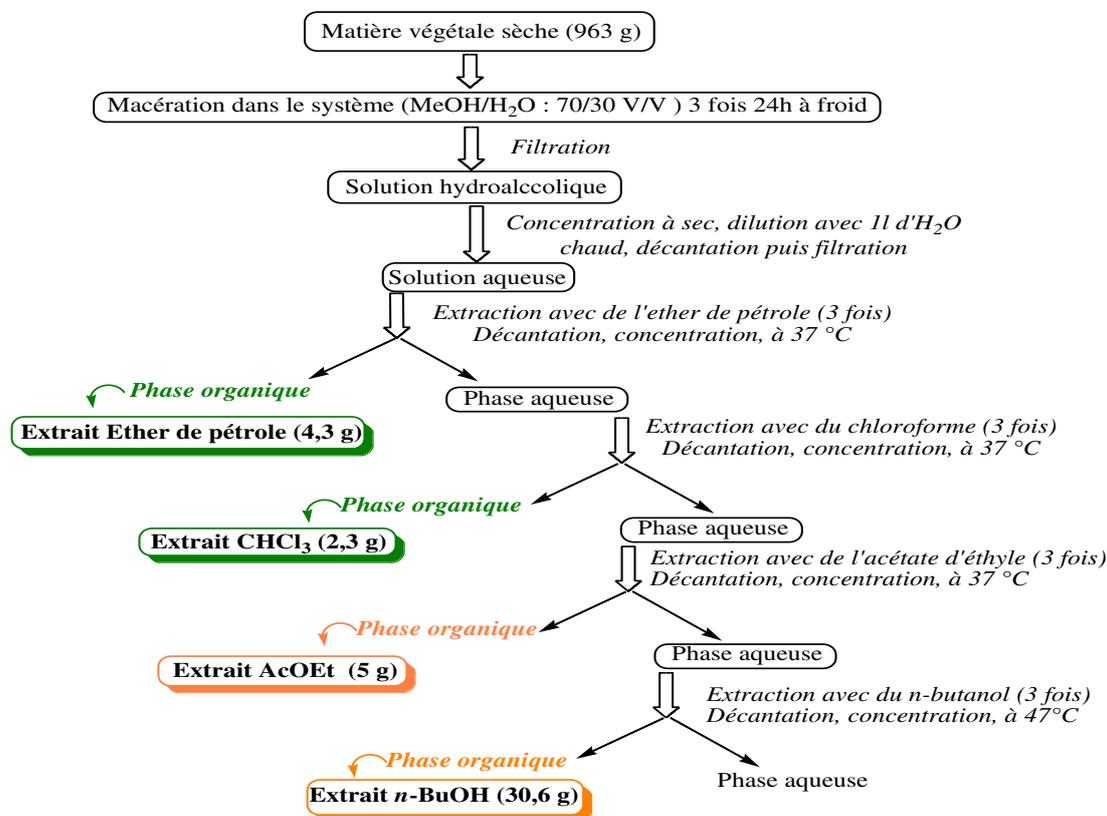


Figure-9: Protocole d'extraction des parties aériennes de l'espèce *B.hispanica*

Le diagramme des masses (figure-10) des quatre extraits obtenus indique un rendement plus important pour l'extrait butanolique.

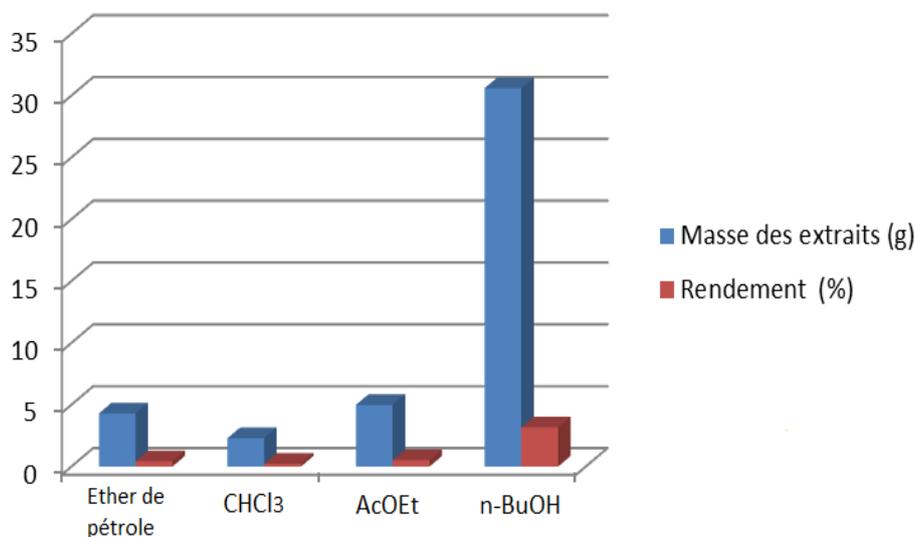


Figure-10 : Diagrammes des masses et rendements des extraits obtenus

Par ailleurs l'analyse quantitative des polyphénols totaux présents dans les deux extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol ainsi que leurs évaluations biologiques montre des résultats très intéressants qui seront discutés dans le chapitre trois.

Pour ces raisons, notre intérêt s'est donc porté sur le fractionnement uniquement des deux extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol.

I.3.Séparation chromatographique

I.3.1.Etude de l'extrait acétate d'éthyle

La séparation de l'extrait acétate d'éthyle, a été effectuée sur une colonne de gel de silice avec le système d'éluion (CHCl₃-acétone), car il a montré une meilleure séparation des produits.

I.3.1.1. Séparation chromatographique sur colonne

Une masse d'environ 5g a été déposée sur une colonne de gel de silice (40-60 μ m) préparée dans l'acétone. L'éluion a été réalisée avec un gradient de polarité du système (acétone-CHCl₃) dans les proportions (1/3 ; v/v) et avec un fractionnement tous les 25ml. Le suivi de ces fractions a été effectué par CCM, les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365nm).

Le résultat de ce fractionnement est rassemblé dans le tableau-6.

Tableau-6 : Fractions issues de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait AcOEt des parties aériennes de l'espèce *B. hispanica*

Fractions	Lots	Masse (mg)
F1	1-5	35
F2	6-9	490
F3	10-18	550
F4	19-25	190
F5	26-31	230
F6	32-36	800
F7	37-41	450
F8	42-44	320
F9	45-48	610
F10	49-51	480
F11	52-53	270
F12	54-55	180
F13	56	220

La colonne chromatographique nous a permis d'obtenir 13 fractions regroupées selon leurs ressemblances. Le choix s'est porté sur deux fractions F2 et F4 pour les tests chromatographiques intéressants et également la simplicité de leur séparation et leurs poids relativement importants.

I.3.1.2. Etude de deux fractions de la colonne chromatographique

a) La fraction F2

Une quantité de la fraction F2 qui est sous forme d'un précipité jaune, de masse 450 mg, a subi une purification sur plaque de gel de silice (HF-254), en utilisant le système d'éluion (acétone-chloroforme : 1/4; v/v), et a permis d'aboutir à un produit pur **Bh-1** (4 mg).

b) La fraction F4

La fraction F4 (150 mg) a subi une purification sur plaque de gel de silice (HF-254) comme la fraction précédente, en utilisant le système (acétone-chloroforme : 2/4 ; v/v) comme phase mobile, et a donné le produit pur **Bh-2** (3,5 mg).

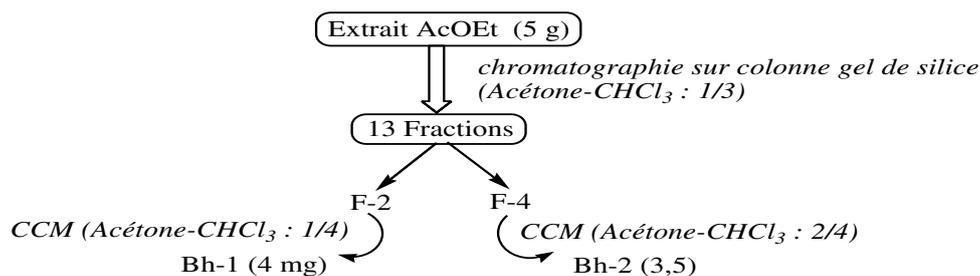


Figure-11 : Diagramme récapitulatif de séparation de l'extrait AcOEt de *B. hispanica*

I.3.2. Etude de l'extrait *n*-BuOH

Une masse d'environ 25g a été soumise à un fractionnement préliminaire sur une colonne de gel de silice (40-60 μ m) préparée dans l'hexane, l'élution a été réalisée par l'introduction progressive des solvants dichlorométhane, éthyleacétate, méthanol avec un gradient de polarité de chaque système de solvant, à savoir : (Hexane /CH₂Cl₂ : 100/0 \rightarrow 0/100), puis (CH₂Cl₂/AcOEt : 100/0 \rightarrow 0/100) en terminant par (AcOEt/MeOH : 100/0 \rightarrow 0/100).

Le fractionnement effectué tous les 25 ml a permis d'obtenir 65 lots dont le suivi est testé sur plaques CCM visualisées sous lumière UV (254 et 365nm).

L'ensemble des fractions avec leurs poids, est rassemblé dans le tableau-7.

Tableau-7 : Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait *n*-BuOH des parties aériennes de l'espèce *B.hispanica*

Système d'élution	Fractions	Lots	Masse (mg)
Hexane (100%)	F1	1-8	210
Hexane/ CH ₂ Cl ₂ (80/20)	F2	9-14	650
Hexane/ CH ₂ Cl ₂ (60/40)	F3	15-28	900
Hexane/ CH ₂ Cl ₂ (50/50)	F4	29-31	1100
Hexane/ CH ₂ Cl ₂ (20/80)	F5	32-38	1400
CH ₂ Cl ₂ (100%)	F6	39-44	2450
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (80/20)	F7	45-47	1500
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (60/40)	F8	48-53	1500
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (50/50)	F9	54-56	1100
AcOEt (100%)	F10	57-60	1200
AcOEt/MeOH (80/20)	F11	61-62	950
AcOEt/MeOH (60/40)	F12	63-64	820
MeOH (100%)	F13	65	700

Le test chromatographique sur couche mince de la fraction F7 étant intéressant, son sous fractionnement est effectué sur une colonne de gel de silice, en utilisant le système d'élution (CHCl₃/MeOH : 100/0 \rightarrow 0/100) suivi de tests CCM pour chacune des 25 sous-fractions obtenues.

La sous fraction F7-18 a été sélectionnée pour purification sur plaque préparative de gel de silice, en utilisant le système : (AcOEt/MeOH/H₂O : 7,5/1/1 ; v/v/v), pour donner le produit pur **Bh-3**(2,8 mg).

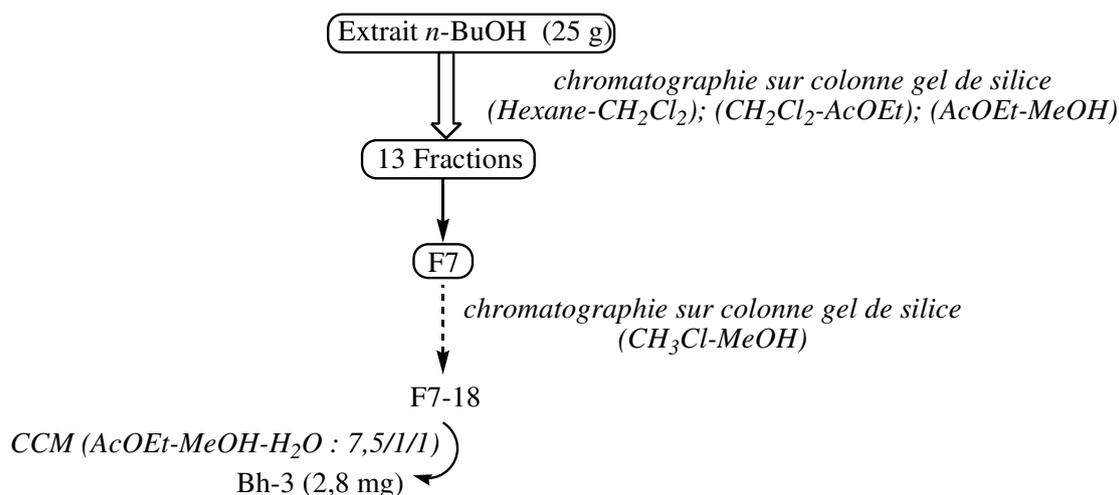


Figure-12 : Diagramme de séparation de l'extrait *n*-BuOH de *B.hispanica*

II. Etude phytochimique de l'espèce *Stachys brachyclada*

II.1. Récolte de la matière végétale

Les parties aériennes de la plante *S.brachyclada* ont été récoltées de la Wilaya de Tebessa région Est d'Algérie, au mois de juillet 2016 et identifiées par Mr. Bouchamakhled (enseignant à l'université de Khenchla). Le matériel végétal a été séché à l'ombre à une température ambiante de 25°C.

II.2. Extraction

Après broyage de 93 g des feuilles sèches de l'espèce *S.brachyclada*, la matière végétale a subi un protocole d'extraction différent de la plante précédente. En effet la macération de la matière végétale a été effectuée dans trois types de solvants différents et de polarité croissante qui sont : l'hexane, le chloroforme suivi en dernier par le méthanol. Pour chaque macération l'opération est répétée trois fois avec renouvellement du solvant et les filtrats sont combinés et concentrés à sec, sous vide à basse température (< 45°C). Après concentration on a obtenu 3 extraits en quantité appréciable (figure-13).

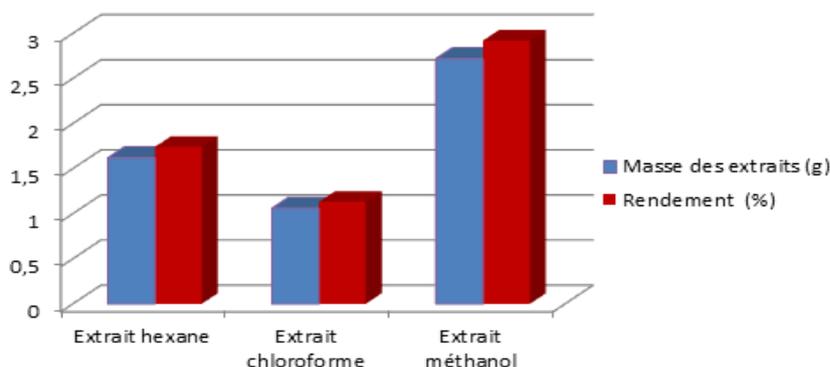


Figure-13: Diagrammes des masses et rendements des extraits obtenus

L'organigramme d'extraction de la figure-14 montre les différentes étapes du processus utilisé.

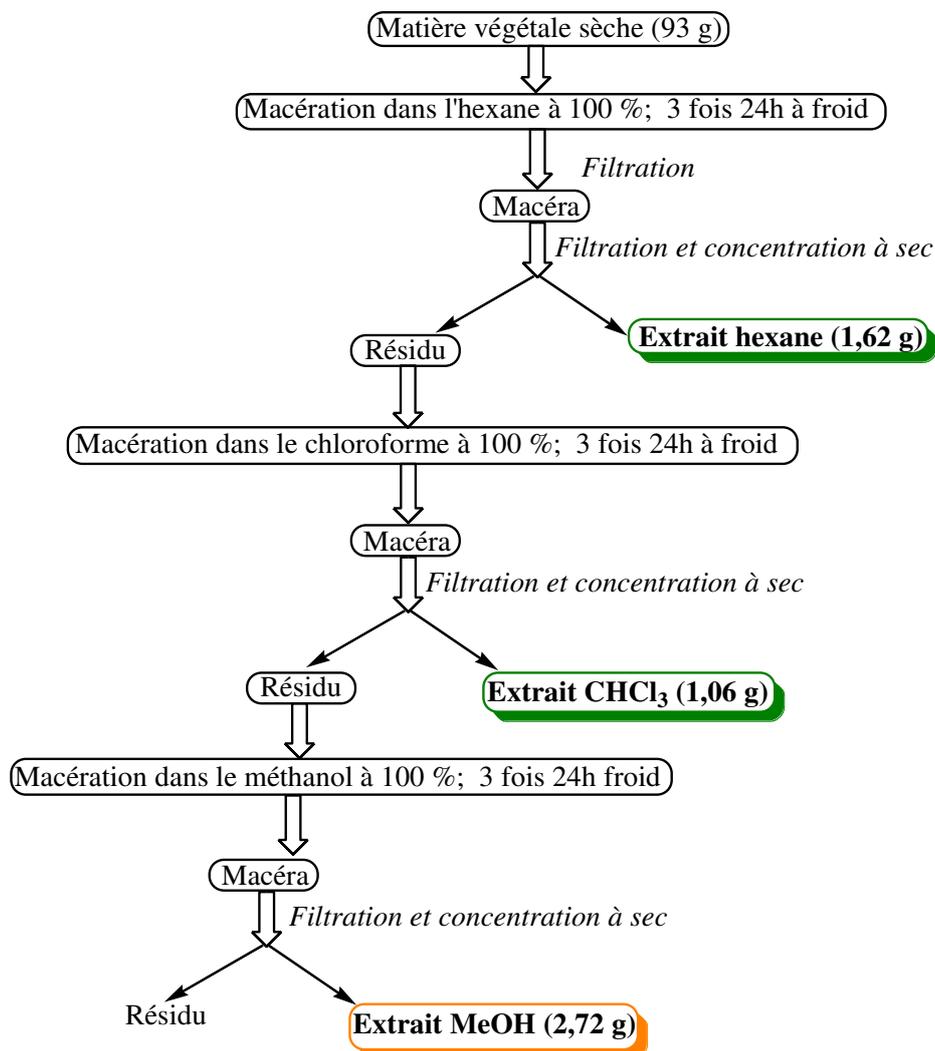


Figure-14 : Protocole d'extraction des feuilles de l'espèce *S.brachyclada*

II.3. Séparation chromatographique

D'après les tests chromatographiques avec plusieurs systèmes de différentes polarités sur les trois extraits obtenus on a choisis de séparer l'extrait méthanolique pour sa richesse en produit.

II.3.1. Etude de l'extrait méthanolique

II.3.1.1. Séparation chromatographique sur colonne

Un premier fractionnement de l'extrait méthanol (2,13g) a été réalisé par chromatographie sur une colonne de Sephadex LH-20, éluée par MeOH (100%) avec un débit de 0,5 mL/min.

Cette séparation nous a permis de collecter 43 lots de 8 ml puis les fractions avec les mêmes R_f sont regroupées après une analyse CCM avec le système suivant : (*n*-BuOH/AcOH/H₂O : 65/15/25).

Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau-8 : Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait méthanol des parties aériennes de *S. brachyclada*

Fractions	Lots	Masse (mg)
F1	1-3	30.70
F2	4-5	50
F3	6-9	350
F4	10-14	250
F5	15 -16	110
F6	17-23	290
F7	24-30	200
F8	31- 33	40.10
F9	34	50.60
F10	35-39	20.70
F11	40 -41	70
F12	42	110
F13	43	10

Parmi les fractions obtenues, on a choisi la séparation des fractions (F7, F8, F12). Ce choix est établi par rapport à leurs poids et richesse en métabolites secondaires.

II.3.1.2. Etude de trois fractions de la colonne chromatographique

La séparation des fractions a été faite par chromatographie semi-préparative en phase inverse à haute pression (RP-HPLC) avec élution isocratique. Elle a été réalisée avec un système de pompage Waters 590 équipé d'un détecteur d'indice de réfraction Waters R401, d'une colonne Luna C-8 (250 x 10,00 mm) Phenomenex, Inc. et d'un injecteur Rheodyne (100 μ L).

a) La fraction F 7

Les composants de la fraction **F7** (200mg) ont été séparés par chromatographie semi-préparative en phase inverse à haute pression (RP-HPLC) en colonne C-8 avec le système (MeOH/H₂O : 5,0/5,0) comme phase mobile. Cette séparation effectuée en 7 injections (50 μ L/ injection), nous a permis d'isoler les produits **Sb-1** (1,2 mg) retenu avec un temps de rétention de ($t_R = 13$ min).

b) La fraction F8

La fraction **F8** (40 mg) a été purifiée par (RP-HPLC) en colonne C-8 avec le système (MeOH/H₂O : 5,0 / 5,0). Cette purification effectuée en 4 injections (50 µL/ injection), nous a permis d'isoler le produit **Sb-2** (1mg) retenu avec un temps de rétention de ($t_R = 21$ min).

c) La fraction F12

Les composants de la fraction **F12** (110 mg) ont été séparés par (RP-HPLC) en colonne C-8, on utilisant le système (MeOH/H₂O : 5,5 / 4,5) comme phase mobile.

Cette opération a été effectuée en 4 injections (50 µL/ injection) et nous a permis d'isoler les produits **Sb-3** (5,8 mg), **Sb-4** (1 mg), **Sb-5** (2,8 mg) avec un temps de rétention respectif de ($t_R = 9$ min, $t_R = 19$ min, $t_R = 35$ min).

III. Etude biologique des extraits et produits de l'espèce *Berberis. hispanica*

III.1. Analyse quantitative des composés phénoliques

Les analyses quantitatives des polyphénols totaux, des flavonoïdes des différents extraits et fractions sont déterminées à partir des équations de la régression linéaire des courbes d'étalonnages et exprimées en (µg d'équivalent/mg) de la matière végétale sèche. La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes des plantes leur sont attribuées.

III.1.1. Dosage des polyphénols totaux (TCP)

III.1.1.1. Principe

Les polyphénols totaux ont été déterminés par spectrophotométrie en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu. Le réactif de Folin-Ciocalteu couleur jaune est constitué d'un mélange de deux acides : acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et acide phosphomolybdique (H₃PMO₁₂O₄₀). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols pour former un complexe bleu stable d'oxydes de tungstène et de molybdène. La coloration produite, dont l'absorption maximum est au voisinage de 760 nm, est proportionnelle à la quantité des composés phénoliques présents dans les extraits végétaux.

III.1.1.2. Protocole

La méthode adoptée pour le dosage des composés phénoliques totaux est celle décrite par Singleton [1], avec une légère modification.

Un volume de 100 µL de chaque solution de nos extraits et fractions butanolique a été introduit à l'aide d'une micropipette dans des tubes à essai, suivis de l'addition de 500 µL du

réactif folin-ciocalteu (10 fois dilué dans l'eau distillée). Après incubation pendant 2 minutes, 2 mL de carbonate de sodium à 20% ont été ajoutées, puis les solutions ont été secouées immédiatement puis maintenues à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante. L'absorbance de chaque solution a été déterminée à 760 nm.

L'acide gallique est le standard utilisé pour établir la courbe d'étalonnage à partir de laquelle la concentration des polyphénols totaux des extraits est calculée. Le résultat est exprimé en μg d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait (μg EAG/mg d'extrait).

III.1.2. Dosage des flavonoïdes(TCF)

III.1.2.1. Principe

Le dosage des flavonoïdes totaux est basé sur un test colorimétrique utilisant le trichlorure d'aluminium AlCl_3 avec lequel ils forment des complexes acides stables soit avec le groupement carbonyle en position C-4, soit avec le groupement hydroxyle en C-3 ou C-5 des flavones et des flavonols. Par ailleurs, AlCl_3 peut également former des complexes acides labiles avec les groupements orthodihydroxyles éventuellement présents sur le noyau A et/ou B des flavonoïdes [2].

III.1.2.2. Protocole

La méthode adoptée pour le dosage des flavonoïdes est celle décrite par Singleton [1], avec une légère modification.

Une masse de 1 milligramme de notre extrait est dissoute dans un volume de 1 mL de méthanol pour obtenir une solution d'extrait. Une prise de 1 mL de cette solution a été mélangée avec un volume de 1 mL de la solution trichlorure d'aluminium méthanolique à (2%). Le mélange est laissé à l'obscurité pendant une heure, puis la lecture est effectuée à 420 nm. La quercétine est le standard utilisé pour établir la courbe d'étalonnage à partir de laquelle la concentration des flavonoïdes totaux des extraits est calculée. Le résultat est exprimé en μg d'équivalents de la quercétine par milligramme d'extrait (μg EAG/mg d'extrait).

III.2. Evaluation de l'activité antioxydante par le test DPPH

L'activité antioxydante des différents extraits et fractions de *B. hispanica* est testée par la méthode de piégeage du radical libre DPPH.

L'activité du DPPH a été mesurée selon le protocole décrit par Blois [3]. Le principe de cette méthode est la réduction du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) de couleur violette en 2,2 diphényl-1-picrylhydrazine de couleur jaune. Le DPPH absorbe à 517 nm, mais lors de

la réduction par un antioxydant, son absorption diminue brièvement. Une solution de 0,4 mM de DPPH est préparée dans le méthanol et 160 µL de cette solution ont été ajoutés à 40 µL d'échantillon dilué dans des solutions de méthanol à des concentrations différentes.

Trente minutes plus tard, l'absorbance a été mesurée à 517 nm. Le BHT et l'acide ascorbique ont été utilisés comme normes anti-oxydantes pour la comparaison de l'activité avec les extraits utilisés. La faible valeur d'absorbance de la réaction du mélange indique une activité de piégeage des radicaux libres supérieure.

La capacité à piéger le radical DPPH a été calculée selon l'équation suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = \left[\frac{(A_{\text{Blanc}} - A_{\text{Extrait}})}{A_{\text{Blanc}}} \right] \times 100$$

✓ A_{Blanc} est l'absorbance de la réaction contenant que les réactifs.

✓ A_{Extrait} est l'absorbance de la réaction contenant les réactifs et l'extrait.

L'étude de la variation de l'activité antiradicalaire en fonction de la concentration des extraits permet de déterminer la concentration qui correspond à 50% d'inhibition (IC_{50}), plus la valeur de (IC_{50}) est faible plus l'extrait est puissant vis-à-vis des radicaux libres.

III.3. Evaluation de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des différents extraits de *B.hispanicaa* été examinée contre une gamme de micro-organismes par la méthode de diffusion sur disque [4,5].

- **Bactéries à Gram positif** : *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).
- **Bactérie à Gram négatif** : *Acinetobacter oxy* (ATCC19606), *E.coli* (ATCC25922), *Proteus mirabilis* (ATCC35659), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC700603), *Pseudomonas Aeruginosa* (ATCC 27853).

Les souches proviennent du laboratoire de microbiologie de la faculté de médecine de l'université de Badji-Mokhtar.

Chaque bactérie a étéensemencée dans le milieu de culture Mueller-Hinton, puis de trois à cinq colonies isolées ont été prélevées et introduites dans une bouteille contenant le bouillon nutritif stérile. Le dénombrement des germes en vue de définir les concentrations bactériennes a été effectué par la technique de dilution.

Pour effectuer le test, des disques de papier filtre de 6mm de diamètre imprégné de 20µL d'extraits solubilisés dans le DMSO (1mg/disque) sont déposés à la surface d'un milieu gélosé en boîte de pétri (3 disques par boîte) qui a été déjà inoculés avec les microorganismes testés.

Les boîtes sont laissées 1h à température ambiante puis retournées et incubées à 37°C pendant 18 à 24h. Après incubation le diamètre des zones d'inhibition est mesuré en (mm).

III.4. Evaluation de l'activité antiproliférative

Le cancer est une maladie qui fait, il représente la 2^{ème} cause de mortalité dans les pays développés et devient également un problème majeur de santé dans les pays en développement.

Dans le domaine ethnopharmacologique les chercheurs se sont intéressés à isoler et identifier des substances naturelles à partir des plantes médicinales possédant des propriétés pharmacologiques. C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'activité antiproliférative de *B.hispanica*.

L'activité antiproliférative de l'extrait *n*-BuOH, des fractions F45-47 et des deux flavonoïdes (Rutin, Tamarixétine), a été menée sur une lignée de cellules cancéreuses mammaires de type HeLa (carcinome du col de l'utérus humain) en utilisant le système xCELLigence.

III.4.1. Conditions de la culture cellulaire

Les cellules HeLa (carcinome du col de l'utérus humain) ont été cultivées régulièrement dans une atmosphère saturée en humidité contenant 5% de CO₂ à 37°C et dans un milieu de culture Eagle modifié par Dulbecco (DMEM, Sigma). Ce milieu de culture doit contenir 10% (v/v) du sérum de veau foetal et 2% de pénicilline-streptomycine.

Dans le flacon de culture, des cellules HeLa ont été détachées du fond du flacon de 10 mL de solution de trypsine-EDTA. Après le détachement, 10 mL du milieu de culture ont été ajoutés dans le ballon et homogénéisés délicatement. Cette suspension a été transférée dans des tubes Falcon. Après la centrifugation (600 rpm, 5 minutes), 5 mL du milieu de culture ont été ajoutés au surnageant. La concentration des cellules du surnageant a été évaluée par le compteur de cellules CEDEX HiRes en utilisant le bleu de Trypan.

III.4.2. Préparation de la solution

50 µL du milieu de culture ont été ajoutés dans chaque puits d'une plaque de 96 qui a été laissée dans une hotte pendant 15 min, puis dans un incubateur durant 15 minutes afin de permettre aux électrodes de s'équilibrer avec le milieu de culture. Après cette période, une mesure de fond a été effectuée. 100 µL de la suspension des cellules ($2,5 \times 10^4$ cellules / 100 µL) ont été ajoutés dans les puits et en laissant les trois derniers comme témoins, puis déposés sous la hotte durant 30 min. La mesure a été effectuée pendant 80 min dans le système xCELLigence.

Après cette étape, nos solutions de (*n*-BuOH, F45-47, rutine, tamarixétine) préparées avec le DMSO avec une concentration inférieure à 1% dans chacun des puits et le milieu de culture, ont été ajoutées aux puits pour obtenir des concentrations finales dans chaque puit.

A la fin, le volume final des puits était de 200 μ Ly compris le milieu. La période de mesure principale a été de 48 h initiée par intervalles de 10 min.

III.5. Analyses statistiques

Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne \pm SD d'analyses en trois essais. Les valeurs de IC₅₀ sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition = f (concentrations)].

Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le SPSS 11,5 (SPSS, Chicago, IL), les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification sont effectuées avec le test ANOVA univarié. L'analyse de corrélation de Pearson a été utilisée pour comparer le contenu phénolique total et l'activité antioxydante des fractions.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- Singleton V.L., Rossi J.A.(1965).Colorimetry of total phenolics with phosphor-molybdic-phosphotungstic acid reagent.American Journal of Enology and Viticulture,16, 144-158.
- 2- Chang C., Yang M., Wen H.,Chern J.(2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods.J. Food Drug Analysis, 10, 178-182.
- 3- Blois M.S.(1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature, 181, 1199-1200.
- 4- Toudert N., Djilani S.E., Djilani A.(2009). Antimicrobial Activity of Flavonoids of *Ampelodesma Mauritanica*.American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture, 3, 227-228.
- 5- Nascimento G.G.F., Locatelli J., Freitas P.C., Silva G.L. (2000).Antibacterial activity of plant extracts and phytochemical on antibiotic resistant bacteria. Brazilian Journal of microbiology, 31, 247-256.

Chapitre 3

Résultats et discussions

I. Activité biologique

I.1. Dosage des polyphénols totaux

Les résultats de ce dosage (tableau-9) qui montre une richesse en polyphénols dans les deux extraits, indique que l'extrait butanolique est plus riche que l'extrait acétate d'éthyle.

Parmi les fractions butanoliques, la plus forte teneur en composés phénoliques totaux a été trouvée dans la fraction **36** (442,5 µg) (tableau-9).

Tableau-9: Polyphénols totaux des différents échantillons de *B. hispanica*

Extraits/Fraction	Total phénolique (µg EAG/mg d'extrait)
AcOEt	384,91 ± 1,49
<i>n</i>-BuOH	500,83 ± 2,28
T21	178,1 ± 0,9
T41	214,5 ± 0,9
T45-47	169,5 ± 0,5
T36	442,5 ± 0,6
T26	44,5 ± 0,8
T31	14,3 ± 0,7

Les valeurs sont la moyenne de trois mesures ± écart type.

I.2. Dosage des flavonoïdes

Le tableau-10 montre que les deux extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol sont riches en flavonoïdes en quantités presque similaires.

Tableau-10 : Flavonoïdes totaux de *B. hispanica*

Extraits	Total flavonoïdes (µg EAG/mg d'extrait)
AcOEt	115,58 ± 1,82
<i>n</i> -BuOH	126,01 ± 2,00

Les valeurs sont la moyenne de trois mesures ± écart type.

I.3. Evaluation de l'activité antioxydante

Les résultats de l'activité anti radicalaire au DPPH sont représentés par les valeurs de la concentration d'inhibition de 50% (IC_{50}).

Les valeurs de (IC_{50}) présentées dans les tableaux-11 et 12, nous permettent d'évaluer et de comparer l'efficacité des extraits.

Il faut rappeler que plus la valeur de la IC_{50} est faible, plus l'extrait est puissant vis-à-vis des radicaux libres.

Tableau-11 : Inhibition du radical DPPH par les extraits de *B. hispanica*

Extraits	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Acétate d'éthyle	79,81
<i>n</i> -butanol	136,18
Acide ascorbique	62,29

Les valeurs sont la moyenne de trois mesures \pm écart type.

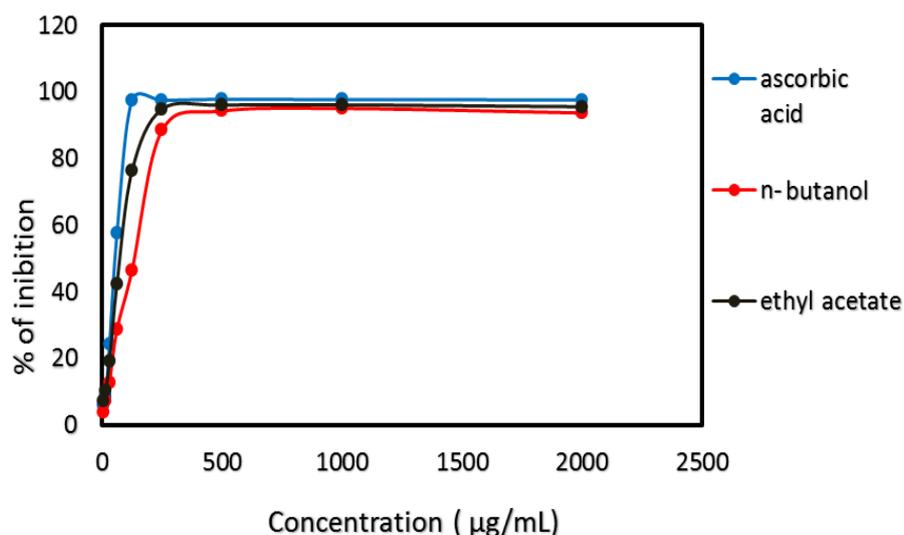


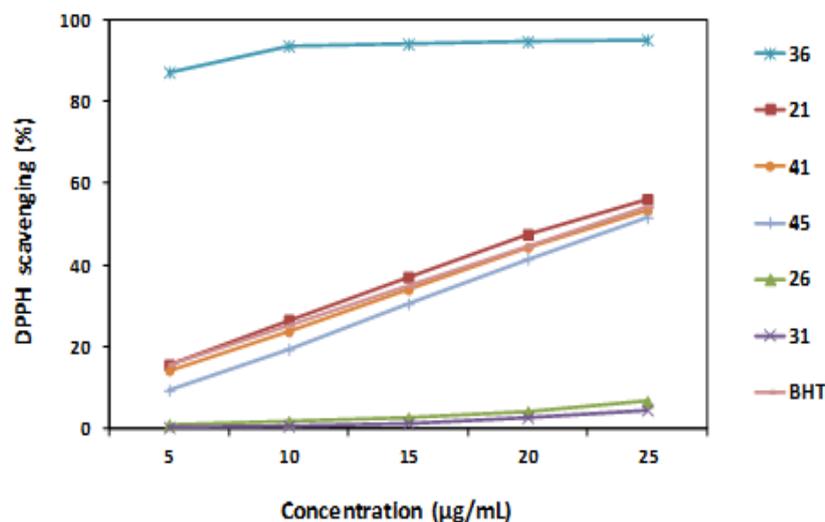
Figure-15 : Activité antiradicalaire (DPPH) des extraits de *B. hispanica*

L'extrait acétate d'éthyle ($IC_{50} = 79,81 \mu\text{g/mL}$) a montré un pouvoir réducteur important et proche du standard acide ascorbique ($IC_{50} = 62,29 \mu\text{g/mL}$). Par contre l'extrait *n*-BuOH ($IC_{50} = 136,18 \mu\text{g/mL}$) été moins actif par rapport au standard.

Tableau-12 : Inhibition du radical DPPH par les fractions de *B. hispanica*

Fractions	IC ₅₀ µg/mL
T21	23,77 ± 0,23
T41	22,80 ± 0,45
T45-47	24,11 ± 0,54
T36	<5
T26	98,45 ± 0,51
T31	>100
BHT	23,14 ± 0,06

Les valeurs sont la moyenne de trois mesures ± écart type.

**Figure-16 :** Activité antiradicalaire (DPPH) des fractions de *B. hispanica*

- ✓ La fraction T36 (IC₅₀ < 5 µg/mL) a montré un effet de piégeage des radicaux plus élevé que l'antioxydant synthétique BHT (IC₅₀ = 23,14 ± 0,16 µg/mL).
- ✓ Les fractions T21 (IC₅₀ = 23,77 ± 0,23), T41 (IC₅₀ = 22,80 ± 0,45 µg/mL), T45-47 (IC₅₀ = 24,11 ± 0,54 µg/mL) ont montré une bonne activité, presque égale au standard BHT (IC₅₀ = 23,14 ± 0,16 µg/mL).
- ✓ Les fractions T26 (IC₅₀ = 98,45 ± 0,51 µg/mL), T31 (IC₅₀ > 100 µg/mL) sont moins actifs par rapport au standard BHT (IC₅₀ = 23,14 ± 0,16 µg/mL).

Dans cette étude comparative entre les extraits et les fractions, une corrélation significative ($R = 0,945$; $p < 0,01$) a été observée entre la teneur totale en composés phénoliques et l'activité de piégeage du DPPH des fractions, cela nous indique que les composés phénoliques sont principalement responsables de cette activité.

Une seule étude sur l'activité antioxydante de *B.hispanica* est similaire à nos résultats [1].

I.4. Activité antibactérienne

Les résultats de l'activité antibactérienne des extraits acétate d'éthyle, *n*-butanol de *B.hispanica* sont regroupés dans les tableaux-(13 et 14). Les valeurs indiquées (mesurées en mm) sont les moyennes de trois mesures.

Tableau-13 : Activité antibactérienne de l'extrait acétate d'éthyle de *B. hispanica*

Micro-organismes	Extrait acétate d'éthyle (mg/mL)					
	3,125	6,25	12,5	25	50	100
<i>Acinetobacter.oxy</i>	5,83 ± 0,17	6,03 ± 0,06	6,33 ± 0,06	9,76 ± 0,25	10,23 ± 0,21	15,03 ± 0,15
<i>Staphylococcus aureus</i>	5,83 ± 0,15	5,93 ± 0,06	5,96 ± 0,06	6,10 ± 0,10	6,13 ± 0,12	6,26 ± 0,25
<i>E.coli</i>	6,76 ± 0,12	6,03 ± 0,06	6,13 ± 0,15	6,16 ± 0,15	7,06 ± 0,12	12,16 ± 0,21
<i>Enterococcusfaecalis</i>	5,90 ± 0,10	5,90 ± 0,10	6,33 ± 0,31	11,93 ± 0,12	12,10 ± 0,17	14,96 ± 0,15
<i>Proteus mirabilis</i>	5,90 ± 0,10	5,93 ± 0,06	6,10 ± 0,10	6,20 ± 0,20	6,30 ± 0,26	10,03 ± 0,06
<i>Klebsiellapneumoniae</i>	5,80 ± 0,17	5,90 ± 0,10	6,20 ± 0,20	8,10 ± 1,73	10,06 ± 0,12	15,03 ± 0,06
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	5,83 ± 0,15	5,96 ± 0,06	6,03 ± 0,06	6,13 ± 0,15	10,13 ± 0,15	14,03 ± 0,06

Tableau-14 : Activité antibactérienne de l'extrait *n*-butanol de *B. hispanica*

Micro-organismes	Extrait <i>n</i> -butanol (mg/mL)					
	3,125	6,25	12,5	25	50	100
<i>Acinetobacter.oxy</i>	6,20 ± 0,20	8,10 ± 0,17	13,83 ± 0,15	14,10 ± 0,10	14,30 ± 0,26	15,20 ± 0,20
<i>Staphylococcus aureus</i>	5,80 ± 0,26	6,06 ± 0,21	6,16 ± 0,15	6,20 ± 0,26	6,26 ± 0,25	10,03 ± 0,06
<i>E.coli</i>	7,23 ± 0,25	8,00 ± 0,30	12,86 ± 0,15	13,23 ± 0,25	14,26 ± 0,31	14,90 ± 0,06
<i>Enterococcusfaecalis</i>	5,83 ± 0,15	6,13 ± 0,15	10,86 ± 0,12	13,43 ± 0,25	13,96 ± 0,15	14,13 ± 0,15
<i>Proteus mirabilis</i>	5,73 ± 0,25	5,83 ± 0,15	5,86 ± 0,15	6,20 ± 0,17	6,33 ± 0,31	6,36 ± 0,32
<i>Klebsiellapneumoniae</i>	5,83 ± 0,10	6,10 ± 0,25	7,23 ± 0,21	8,16 ± 0,15	14,00 ± 0,20	15,40 ± 0,36
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	5,83 ± 0,15	6,26 ± 0,25	6,93 ± 0,06	7,20 ± 0,20	13,03 ± 0,06	15,20 ± 0,21

Les parties aériennes des extraits ont généralement montré une activité accrue avec une augmentation de la concentration contre les bactéries Gram-positives et les bactéries Gram-négatives.

D'après ces tableaux les deux extraits bruts ont présenté l'activité la plus élevée contre *Klebsiella pneumoniae* et *Acinetobacter.oxy* (15 mm à 100 mg/mL). L'extrait brut d'acétate d'éthyle a montré presque les mêmes effets avec différentes concentrations par rapport à *Staphylococcus aureus* strain.

I.5. Evaluation de l'activité antiproliférative

L'activité antiproliférative de l'extrait *n*-BuOH et la fraction T45-47 évalués contre les cellules HeLa en utilisant l'instrument xCELLigence, est présentée dans les figures 17-a,b suivantes :

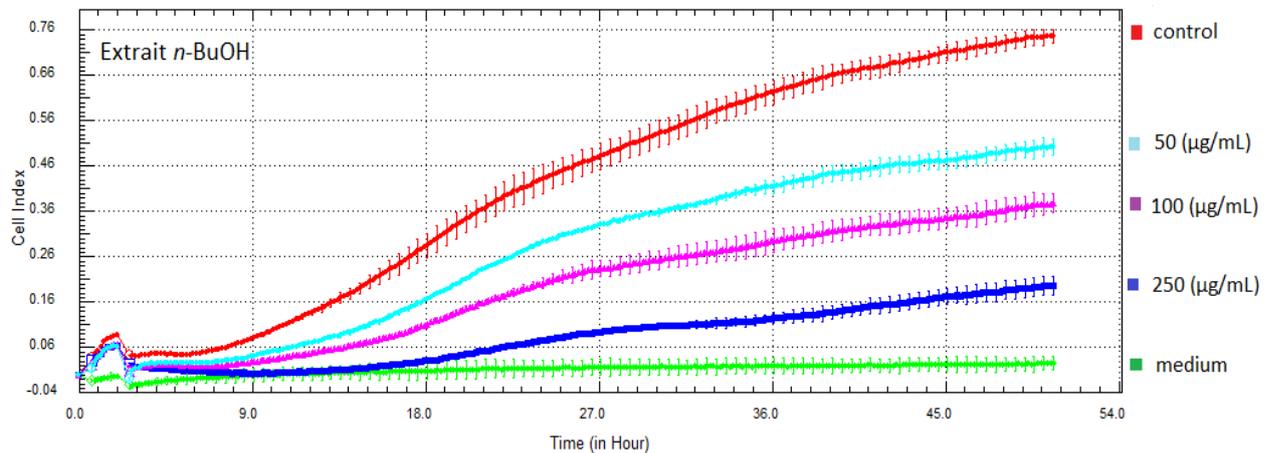


Figure-17-a : Activité antiproliférative de l'extrait *n*-BuOH de la *B. hispanica* contre les cellules HeLa

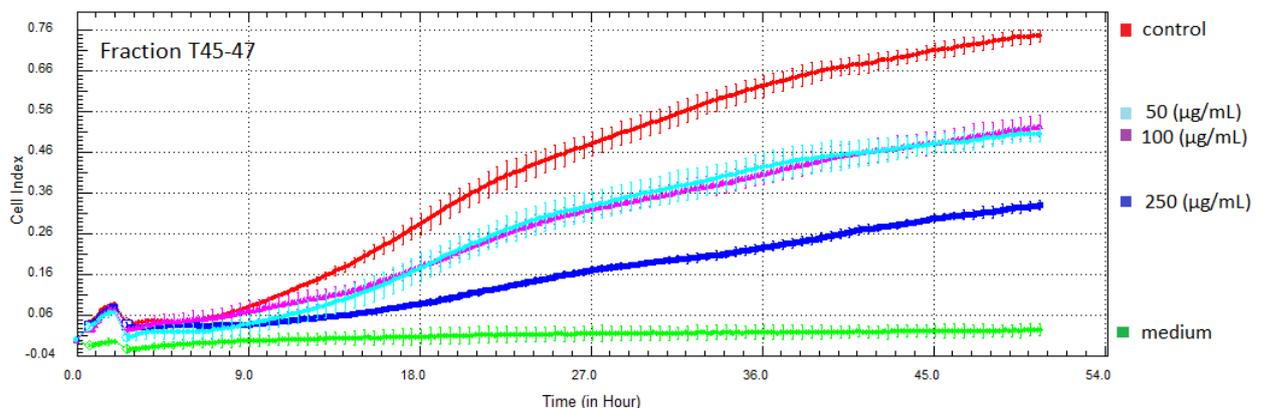


Figure-17-b : Activité antiproliférative de la fraction T45-47 de l'espèce *B. hispanica* contre les cellules HeLa

Ces figures montrent que l'extrait *n*-butanol et la fraction T45-47 présentent un effet dépendant de la dose et du temps.

B. hispanica a montré une activité antiproliférative importante contre les cellules HeLa cela pourrait être due à la présence de composés anticancéreux dans cette espèce qui ont besoin d'être isolés et identifiés prochainement pour plus d'investigation.

II. Identification des produits isolés de *Berberis hispanica*

Les structures des produits isolés ont été élucidées par les techniques spectroscopiques (SM, RMN 1D, RMN 2D) et par comparaison avec les données de la littérature.

II.1. Identification des produits isolés de l'extrait AcOEt de *B.hispanica*

II.1.1. Elucidation structurale du produit Bh-1

a) Propriétés physico-chimiques

Formule brute : C₁₆H₁₂O₇.

Quantité du produit : 4 mg.

Aspect : poudre jaune.

Fluorescence sous lampe UV: Jeune

b) Données spectroscopiques

L'examen du spectre RMN ¹H (600 MHz dans DMSO-d₆) (Fig.18, Fig.19) montre les cinq protons caractéristiques d'un flavonoïde : Deux signaux à $\delta_H = 6,17$ ppm (1H, *d*, *J* = 1,76 Hz) et à $\delta_H = 6,45$ ppm (1H, *d*, *J* = 1,7 Hz), qui sont caractéristiques de protons aromatiques. Ils correspondent respectivement à H-6 et H-8 du cycle A des flavonoïdes. D'autre part pour le cycle B du flavonoïde, on observe un signal du proton H-6' qui sort à $\delta_H = 7,67$ ppm sous forme d'un doublet de doublet (*dd*, *J* = 8,8 Hz et 2,3 Hz). Le premier doublet correspond à un couplage avec le proton H-5' en ortho qui lui, résonne à $\delta_H = 6,92$ ppm (*d*, *J* = 8,8 Hz). Le deuxième doublet, correspond à un couplage avec le proton H-2' en méta (*d*, *J* = 2,3 Hz) qui résonne à $\delta_H = 7,73$ ppm. Ceci nous a permis de constater que le noyau B est trisubstitué. On observe aussi un pic sortant à $\delta_H = 3,82$ ppm, correspondant à trois protons sous forme de singulet. On peut de ce fait affirmer que l'on se trouve en présence d'un groupement méthoxyle.

Par ailleurs, on observe un pic sortant à $\delta_H = 12,45$ ppm ; ceci est caractéristique d'une fonction OH en position 5, au voisinage d'un groupement carbonyle.

L'attribution des déplacements chimiques des protons aromatiques ainsi les carbones sont corroborée par les expériences homonucléaire COSY et hétéronucléaire HSQC.

La mesure de l'expérience COSY (Fig-20), présente les corrélations entre les protons H-5' et H-6' ainsi qu'entre H-6 et H-8.

Sur le spectre hétéronucléaire HSQC (Fig-21), on a pu identifier les carbones : (C-6) situés à $\delta_C = 98,69$ ppm, (C-8) à $\delta_C = 94,09$ ppm, (C-2') à $\delta_C = 112,25$ ppm, (C-5') à

$\delta_C = 116,05$ ppm et (C-6') à $122,24$ ppm. Ces carbones sont corrélés, respectivement, avec les protons résonnants à $\delta_H = 6,17$ ppm (H-6), $\delta_H = 6,45$ ppm (H-8), $\delta_H = 7,73$ ppm (H-2'), $\delta_H = 6,92$ ppm (H-5'), et à $\delta_H = 7,67$ ppm (H-6').

Ce spectre montre aussi la corrélation entre les trois protons apparaissent à $\delta_H = 3,82$ ppm et le carbone localisé à $\delta_C = 56,26$ ppm.

Dans le spectre HMBC (Fig-21), on observe une tache de corrélation entre le proton H-5' et le carbone C-4', comme on remarque une autre tâche de corrélation entre les protons du groupement méthoxyle et le carbone C-4', ceci confirme que le groupement méthoxyle est lié au carbone C-4'.

L'ensemble de ces données est représenté dans les tableaux suivants :

Tableau-15 : Données RMN- ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) du produit **Bh-1**

δ (ppm)	Intégration	Multiplicité (J-Hz)	Attribution
12.45	1H	<i>s</i>	5-OH
10.76	1H	<i>s</i>	7-OH
9.72	1H	<i>s</i>	3-OH
9.40	1H	<i>s</i>	3'-OH
7.73	1H	<i>d</i> (2.3)	H-2'
7.67	1H	<i>dd</i> (8.8-2.3)	H-6'
6.92	1H	<i>d</i> (8.8)	H-5'
6.45	1H	<i>d</i> (1.7)	H-8
6.17	1H	<i>d</i> (1.7)	H-6
3.82	3H	<i>s</i>	4'-OCH ₃

Tableau-16 : Données RMN- ^{13}C (150 MHz, DMSO- d_6) du produit **Bh-1**

δ (ppm)	Attribution	δ (ppm)	Attribution
175.05	C-4	122.24	C-6'
164.52	C-7	122.39	C-1'
161.24	C-5	116.06	C-5'
156.65	C-9	112.25	C-2'
149.25	C-4'	103.36	C-10
147.80	C-3'	98.69	C-6
146.96	C-2	94.09	C-8
132.00	C-3	56.26	4'-OCH ₃

Sur la base de ces données et par comparaison avec les données de la littérature [2], le composé **Bh-1** est identifié comme étant la : **3, 5, 7, 3'-tétrahydroxy-4'-méthoxyflavone** ou **Tamarixétine**.

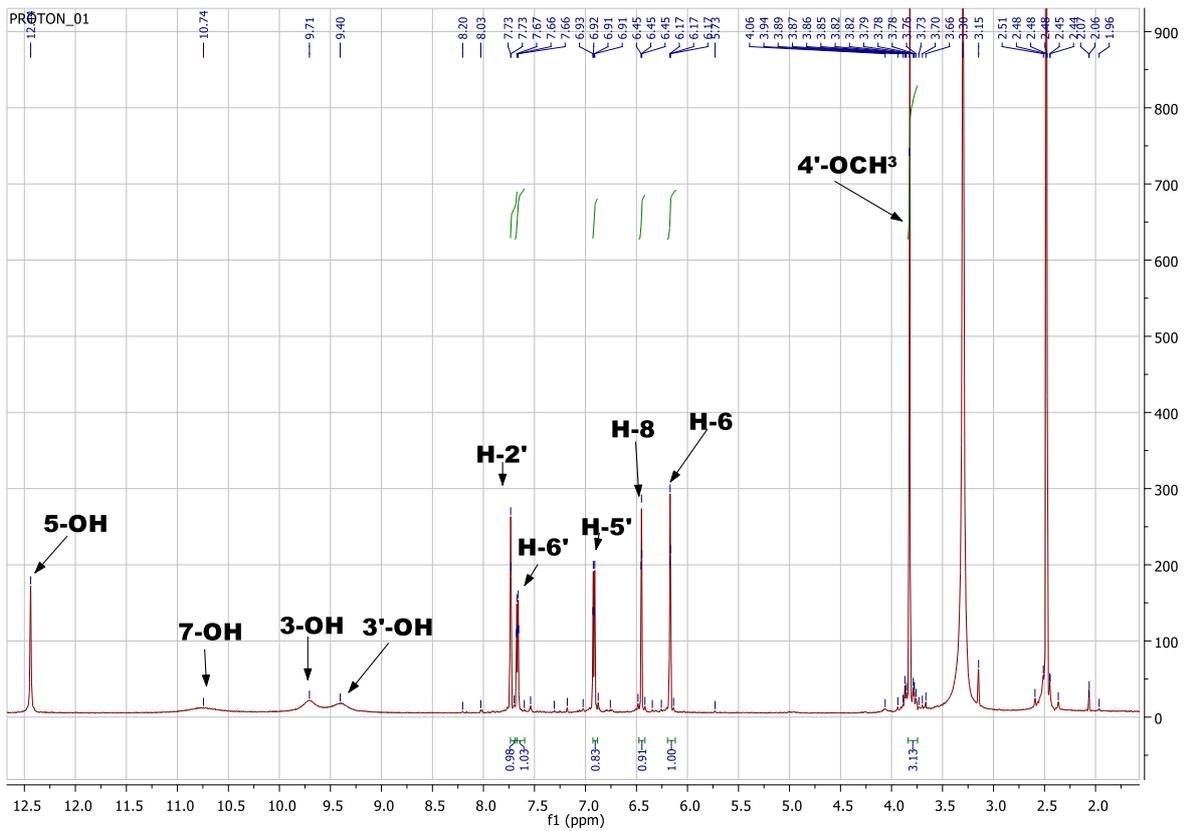
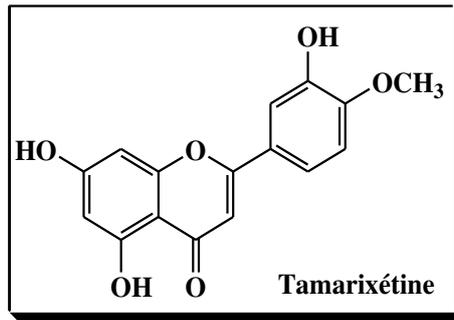


Figure-18 : Spectre RMN-¹H du produit Bh-1

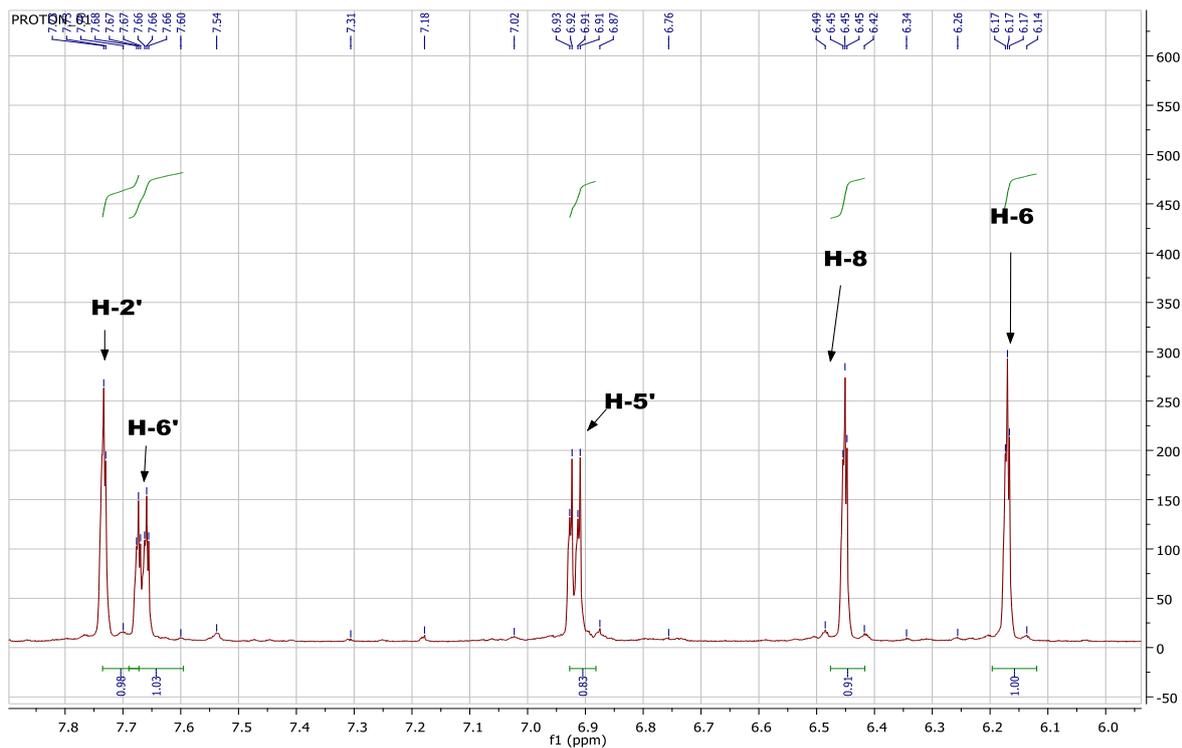


Figure-19 : Spectre RMN- ^1H étalé du produit Bh-1

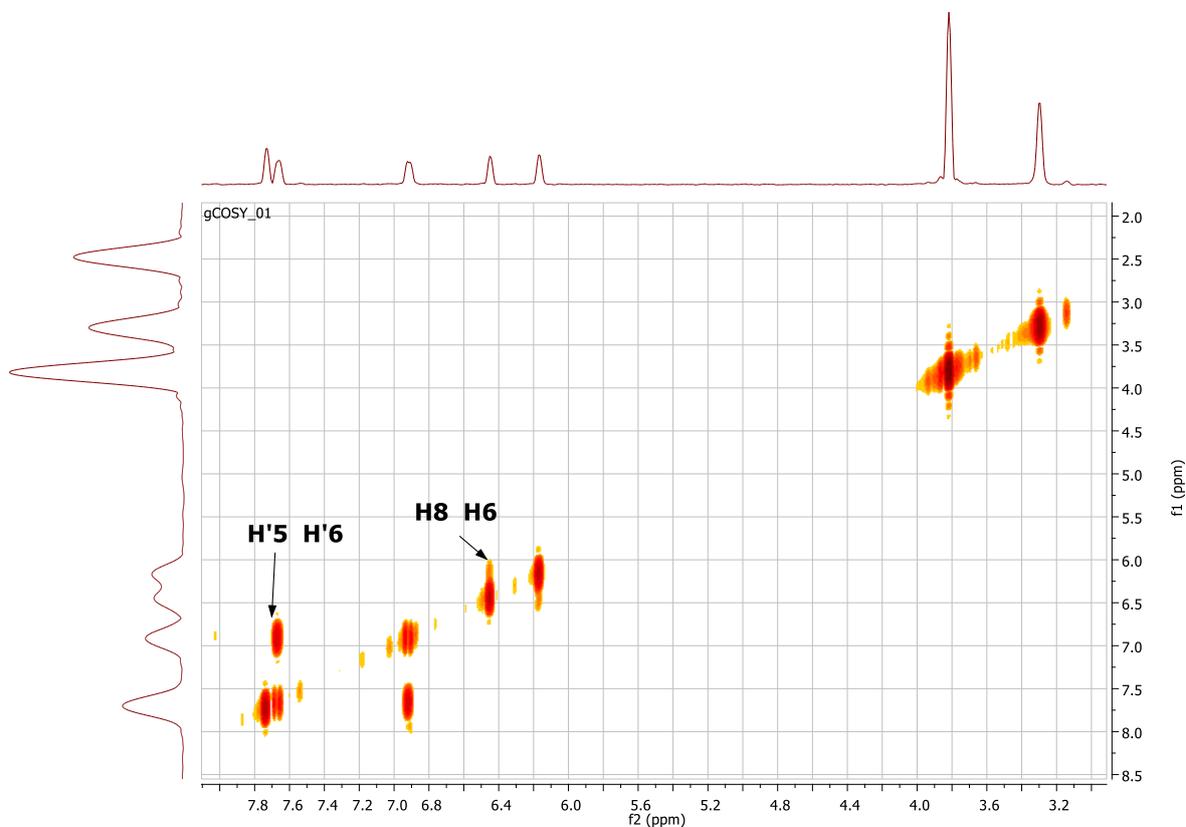


Figure-20 : Spectre de corrélation homonucléaire COSY du composé Bh-1

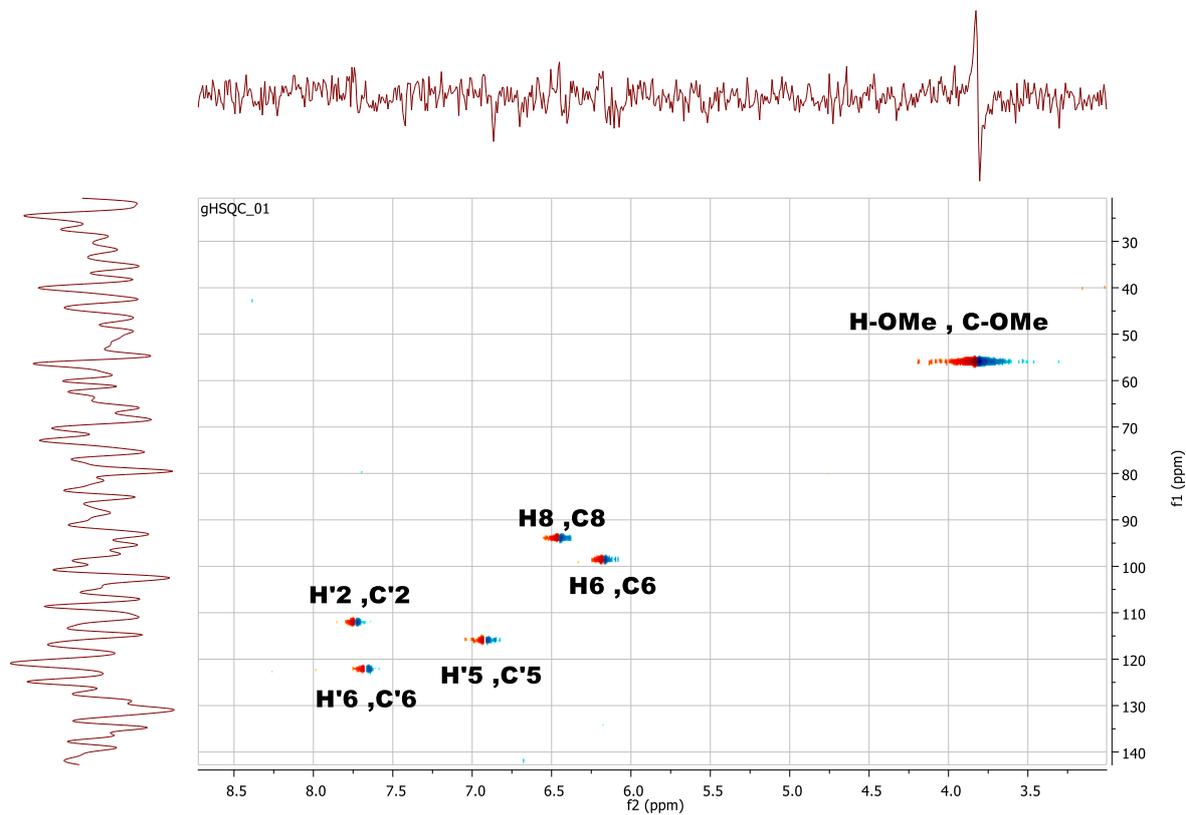


Figure-21 : Spectre de corrélation hétéronucléaire HSQC du composé Bh-1

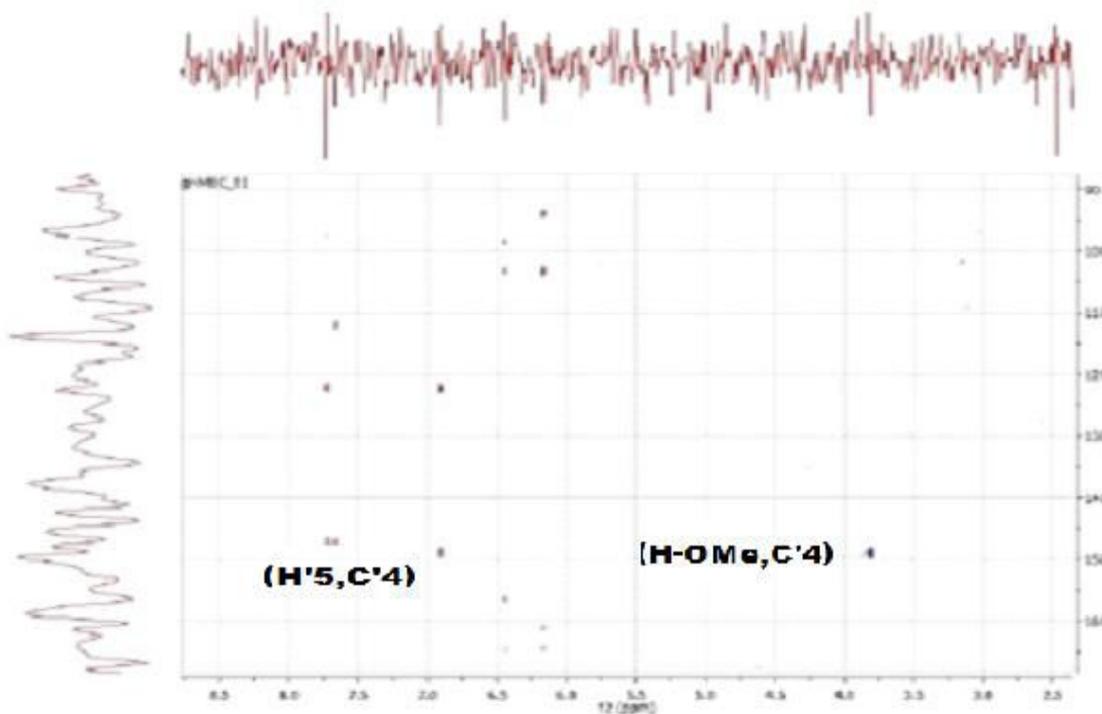


Figure -22 : Spectre de corrélation hétéronucléaire HMBC du composé Bh-1

II.1.2. Elucidation structurale du produit Bh-2

a) Propriétés physico-chimiques

Formule brute : $C_9H_8O_4$.

Quantité du produit : 3.5 mg.

Aspect : poudre jaune.

Fluorescence sous lampe UV: Noire-violette.

b) Données spectroscopiques

L'examen du spectre RMN 1H (600 MHz dans DMSO- d_6) (Fig-23, Fig-24), montre qu'il s'agit d'un composé aromatique dont le cycle benzénique est caractérisé par :

- ✓ Deux doublets à $\delta_H = 6.16$ ppm et $\delta_H = 7.40$ ppm ayant la même constante de couplage $J = 15.8$ Hz. La valeur de constante de couplage indique une configuration *trans* de ces protons.
- ✓ Un doublet à $\delta_H = 6.74$ ppm qui ne peut être attribué qu'au proton H-5 car la valeur de la constante de couplage $J = 8,2$ Hz indique la présence d'un proton en *ortho*.
- ✓ Un doublet de doublet à $\delta_H = 6.94$ ppm $J = 8,2-2.3$ Hz attribuable au proton H-6.
- ✓ Un doublet à $\delta_H = 7.0$ ppm donnant un couplage *méta* avec $J = 2.3$ Hz attribuable au proton H-2.

L'attribution des carbones est corroborée par les expériences hétéronucléaire HSQC et HMBC.

L'analyse du spectre COSY (Fig-25), présente les corrélations entre les protons H-7 et H-8.

Quant à l'analyse du spectre relatif à l'expérience HSQC (Fig-26), elle permet l'attribution des signaux des protons aux atomes de carbone correspondants ainsi :

- ✓ Le H-8 permet l'attribution du signal à $\delta_C = 115.57$ ppm à l'atome de carbone C-8 ;
- ✓ Le H-7 permet l'attribution du signal à $\delta_C = 144.98$ ppm à l'atome de carbone C-7 ;
- ✓ Le H-2 permet l'attribution du signal à $\delta_C = 115.07$ ppm à l'atome de carbone C-2 ;
- ✓ Le H-5 permet l'attribution du signal à $\delta_C = 116.18$ ppm à l'atome de carbone C-5 ;
- ✓ Le H-6 permet l'attribution du signal à $\delta_C = 121.55$ ppm à l'atome de carbone C-6.

L'élucidation structurale de ce composé par une analyse du spectre HMBC (Fig-27) montre :

- ✓ Deux taches de corrélations entre le proton H-8 $\delta_H = 6.16$ ppm et les carbones à $\delta_C = 126.14$ et 168.28 ppm attribuable aux carbones C-1 et C-9, respectivement.

- ✓ Quatre taches de corrélations entre le proton H-5 $\delta_{\text{H}} = 6.74$ ppm et les carbones à $\delta_{\text{C}} = 121.55, 126.14, 145.99$ et 148.56 ppm attribuables aux carbones C-6, C-1, C-3 et C-4, respectivement.
- ✓ Trois taches de corrélations entre le proton H-6 à $\delta_{\text{H}} = 6.94$ ppm et les carbones à $\delta_{\text{C}} = 115.07, 144.98$ et 148.56 ppm attribuable aux carbones C-2, C-7 et C-4, respectivement.
- ✓ Trois taches de corrélations entre le proton H-2 à $\delta_{\text{H}} = 7.0$ ppm et les carbones à $\delta_{\text{C}} = 121.55, \delta_{\text{C}} = 145.99$ et 148.56 ppm attribuable aux carbones C-6, C-3 et C-4, respectivement.
- ✓ Quatre taches de corrélations entre le proton H-7 à $\delta_{\text{H}} = 7.40$ ppm et les carbones à $\delta_{\text{C}} = 115.07, 121.55, 126.14$ et 168.28 ppm attribuables aux carbones C-2, C-6, C-1 et C-9, respectivement.

L'ensemble de ces données est représenté dans les tableaux suivants :

Tableau-17 : Données RMN ^1H (600 MHz, DMSO-d₆) du produit **Bh-2**

δ (ppm)	Intégration	Multiplicité (J(Hz))	Attribution
9.10-9.50	3H	<i>s</i>	3, 4, 9-OH
7.40	1H	<i>d</i> (15.8)	H-7
7.00	1H	<i>s</i>	H-2
6.94	1H	<i>d</i> (8.2-2.3)	H-6
6.74	1H	<i>d</i> (8.2)	H-5
6.16	1H	<i>d</i> (15.8)	H-8

Tableau-18 : Données RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO-d₆) du produit **Bh-2**

δ (ppm)	Attribution
168.28	C-9
148.56	C-4
145.99	C-3
144.98	C-7
126.14	C-1
121.55	C-6
116.18	C-5
115.57	C-8
115.07	C-2

Sur la base de ces données et par comparaison avec les données de la littérature [3], le produit **Bh-2** est identifié comme étant l'**Acide caféique**.

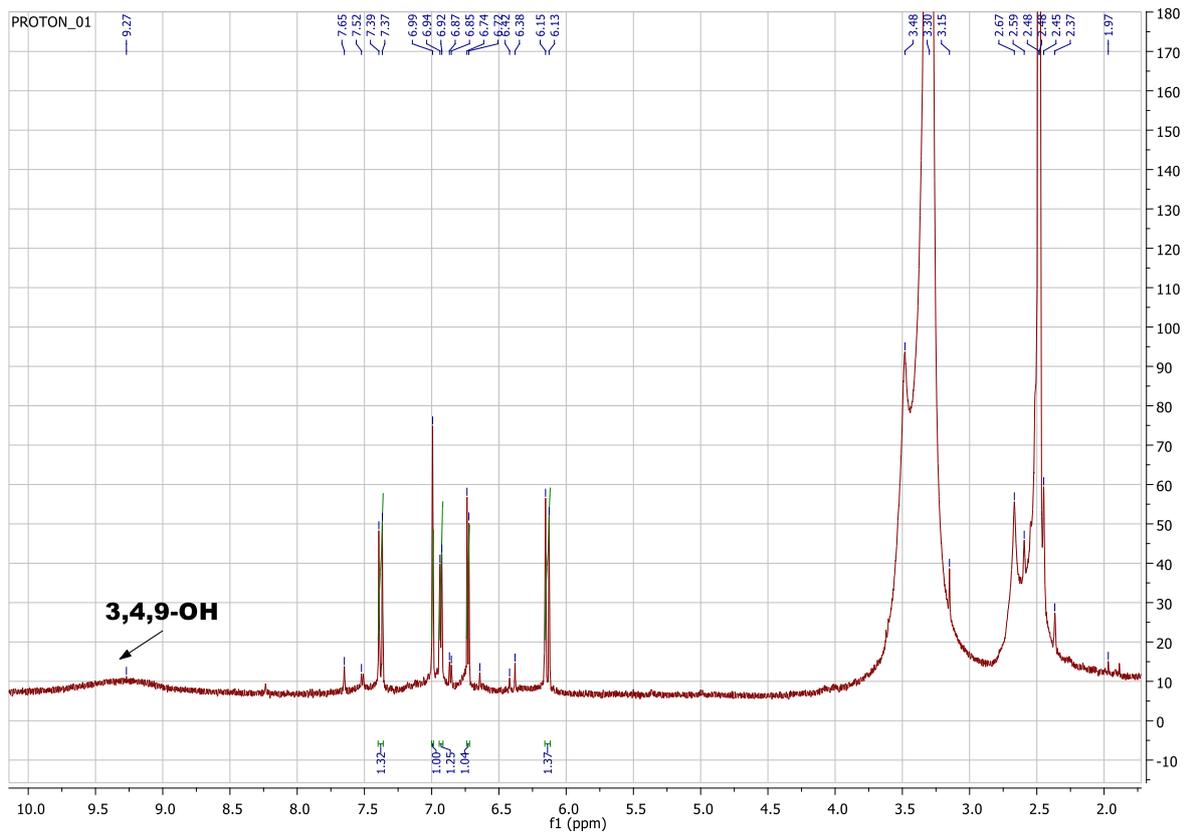
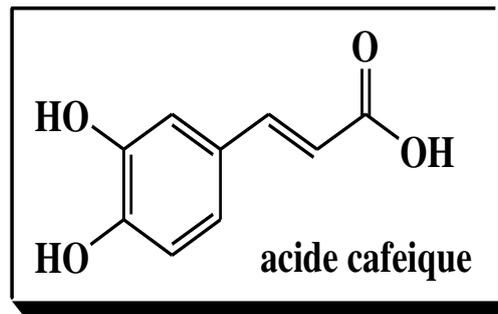


Figure-23 : Spectre RMN-¹H du produit **Bh-2**

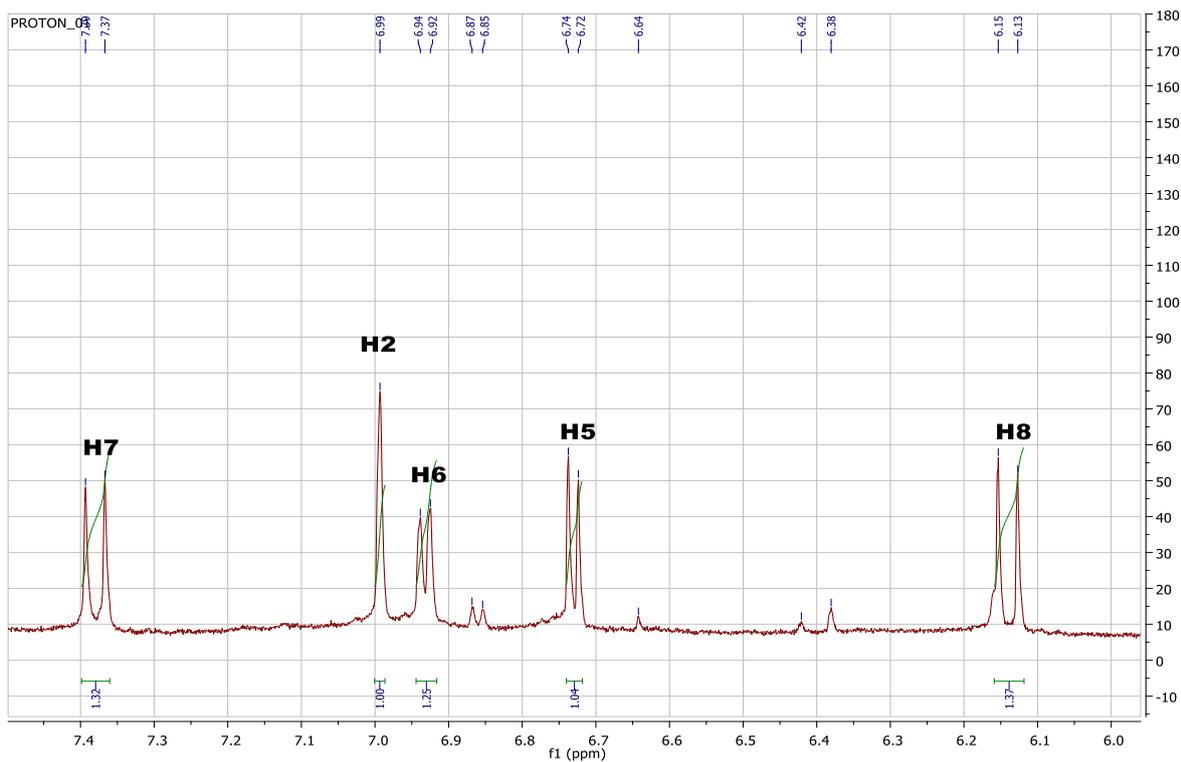


Figure-24 : Spectre RMN-¹H étalé du produit **Bh2**

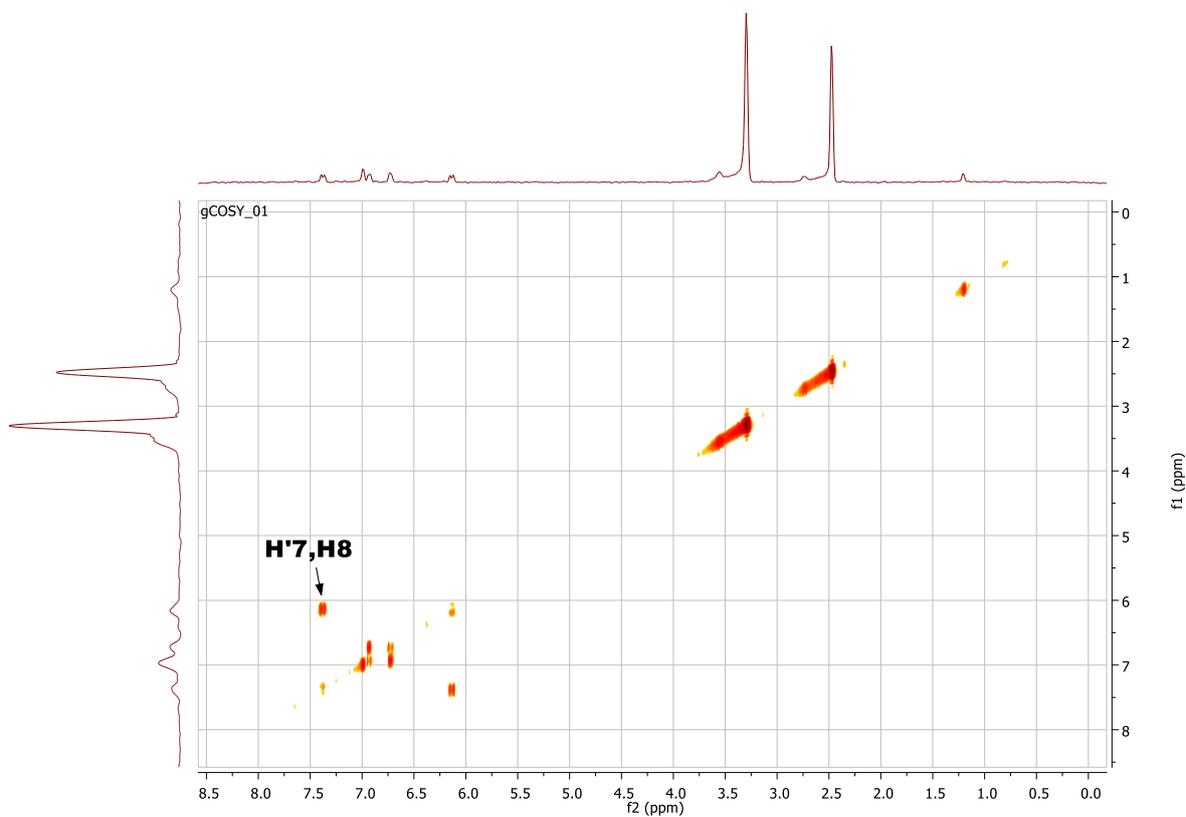


Figure-25 : Spectre de corrélation homonucléaire COSY du composé **Bh-2**

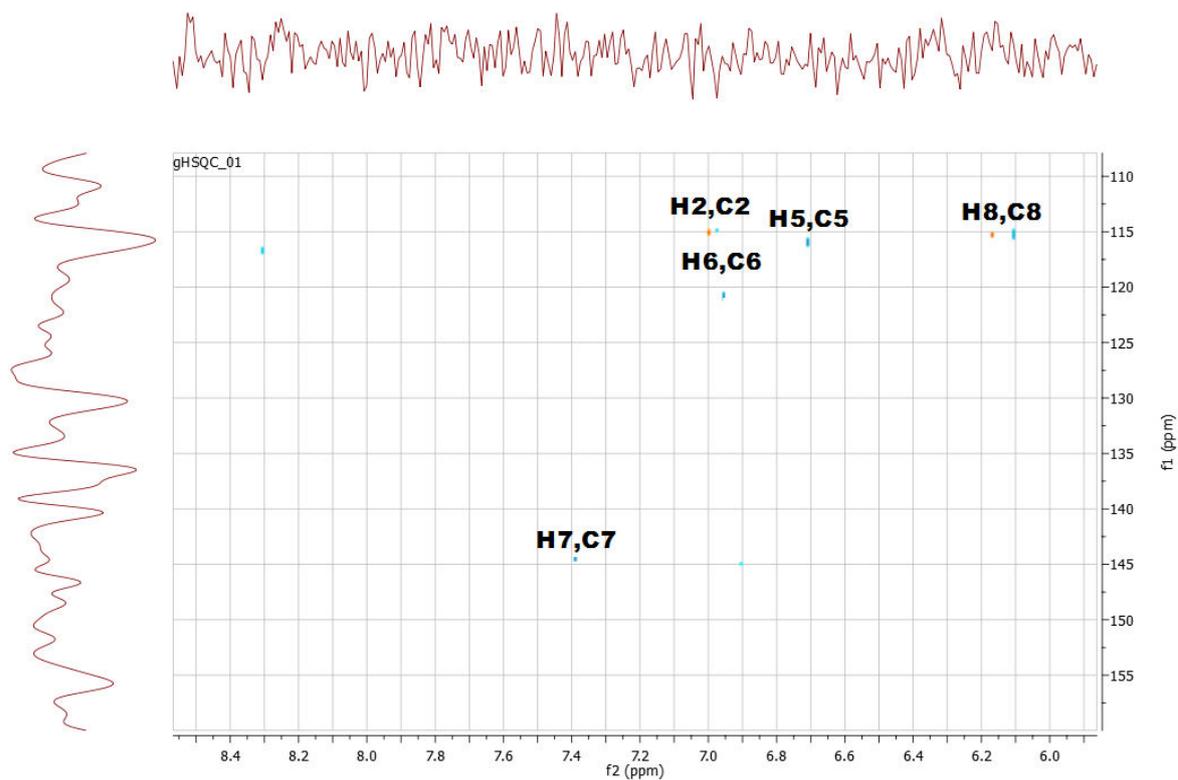


Figure-26 : Spectre de corrélation hétéronucléaire HSQC du composé Bh-2

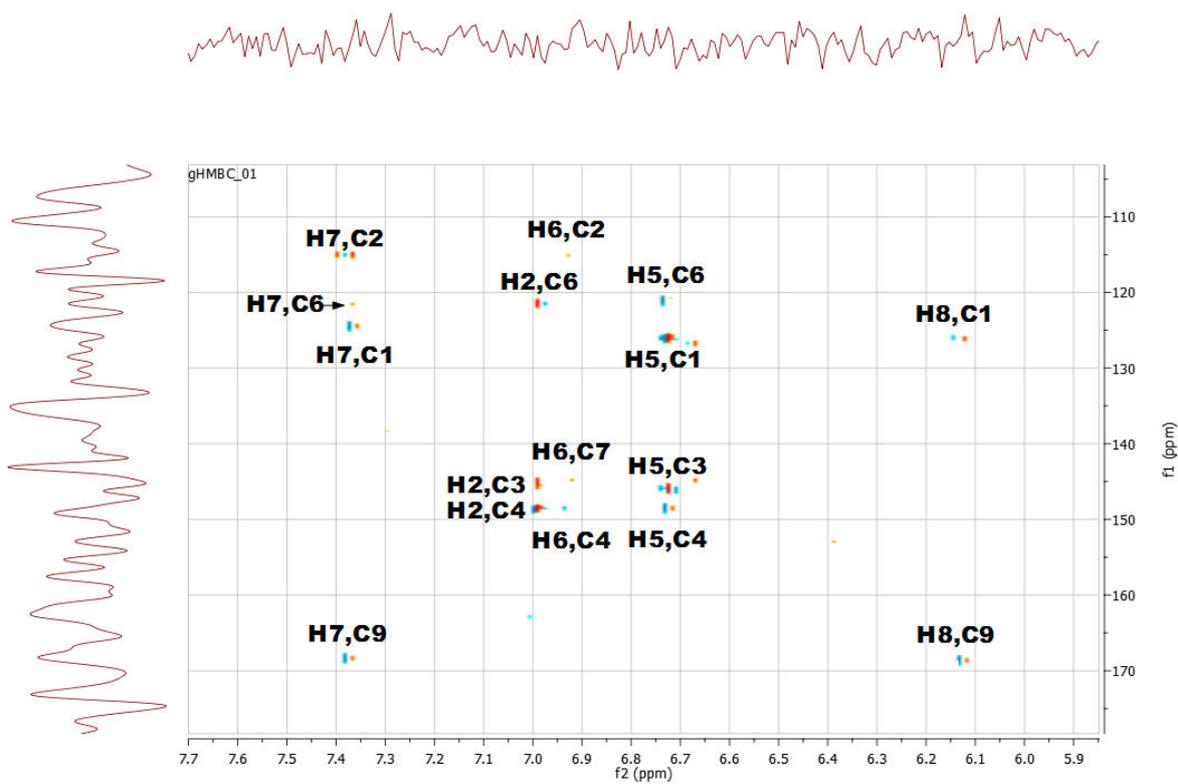


Figure-27 : Spectre de corrélation hétéronucléaire HMBC du composé Bh-2

II.1.3. Elucidation structurale du produit Bh-3 isolé de l'extrait n-BuOH de *B. hispanica*

a) Propriétés physico-chimiques

Formule brute : $C_{27}H_{30}O_{16}$.

Poids moléculaire : 609 g/mol.

Quantité du produit : 2.8 mg.

Aspect : poudre jaune.

Fluorescence sous lampe UV : Noire-violette.

b) Données spectroscopiques

Le spectre RMN- 1H (600 MHz dans DMSO- d_6) (Fig-28, Fig-29) montre les cinq protons aromatiques caractéristiques du squelette de la quercétine [4] :

- ✓ Deux doublets d'intégration 1H chacun, le premier à $\delta_H = 6.13$ ppm ($J = 1,7$ Hz), le second à $\delta_H = 6.32$ ppm ($J = 1,7$ Hz) attribuables à H-6 et H-8, respectivement, pour le cycle A.
- ✓ Un doublet d'intégration 1 H à $\delta_H = 7.49$ ppm ($J = 1.7$ Hz) attribuable à H-2'.
- ✓ Un doublet dédoublé d'intégration 1H à $\delta_H = 7.52$ ppm ($J = 8.$ et 1.7 Hz) attribuable à H-6'.
- ✓ Un autre doublet d'intégration 1H à $\delta_H = 6.80$ ppm ($J = 8.2$ Hz) attribuable à H-5'. Ces trois signaux confirment la di-substitution du noyau B de l'aglycone.

En dehors des signaux correspondants à la génine, l'analyse du spectre de RMN 1H permet de repérer deux protons anomériques résonnant à 5,29 ppm (d , $J = 7,6$ Hz) et 4,37 ppm (d , $J = 1,7$ Hz). Ces données suggèrent la présence de deux unités osidiques.

L'analyse du spectre HSQC (Fig-30) permet d'identifier les deux sucres comme étant :

- ✓ Un glucopyranose à partir de l'anomère à 5,29 ppm, caractérisées par les protons H-2, H-3, H-4 et H-5 trans-diaxiaux,
- ✓ Un rhamnopyranose à partir de l'anomère à 4,37 ppm, caractérisées par son méthyl doublet à 0,98 ppm (d , $J = 6,4$ Hz, H- 6''').

Le spectre HMBC (Fig-31), montre des corrélations entre le proton H-6'' du glucose (Glc), et le carbone C-1''' du rhamnose (Rha) et inversement entre le carbone C-6'' du glucose (dont le déplacement chimique déblindé à 67,39 ppm indique qu'il porte un substituant OR) et le proton H-1''' du rhamnose (Rha) mettant en évidence la liaison : α -rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β - glucopyranosyl (rutinose).

Le rutinose est fixé sur la génine quercétine en position 3 comme l'atteste la corrélation HMBC entre le carbone C-3 et le proton anomérique H-1'' du glucose.

L'attribution des carbones a été élucidée à partir des spectres HMBC et HSQC et elle est représentée dans le (tableau-20).

L'ensemble de ces données est représenté dans les tableaux suivant :

Tableau-19 : Données RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) du produit **Bh-3**

δ (ppm)	Intégration	Multiplicité (J (Hz))	Attribution
7.52	1H	<i>dd</i> (8.2-1.7)	H-6'
7.49	1H	<i>d</i> (1.7)	H-2'
6.80	1H	<i>d</i> (8.2)	H-5'
6.32	1H	<i>d</i> (1.7)	H-8
6.13	1H	<i>d</i> (1.7)	H-6
5.29	1H	<i>d</i> (7.6)	H-1''
3.68	1H	<i>d</i> (10.56)	H _b -6''
3.18-3.27	1H	<i>m</i>	H _a -6''
3.03-3.28	3H	<i>m</i>	H-2'', H-3'', H-4'', H-5''
4.37	1H	<i>d</i> (1.76)	H-1'''
3.40	1H	<i>dd</i> (2.9-1.7)	H-2'''
3.30	1H	<i>dd</i> (9.3-2.9)	H-3'''
3.25	1H	<i>m</i>	H-5'''
3.08	1H	<i>m</i>	H-4'''
0.98	3H	<i>d</i> (6.4)	H-6'''

Tableau-20 : Données RMN- ^{13}C (150 MHz, DMSO- d_6) du produit **Bh-3**

δ (ppm)	Attribution	δ (ppm)	Attribution
177.44	C-4	101.23	C-1'''
166.50	C-7	99.69	C-6
161.49	C-5	94.32	C-8
157.00	C-9	76.96	C-5''
156.79	C-2	76.29	C-3'''
149.52	C-4'	74.05	C-2''
145.51	C-3'	72.35	C-4'''
133.58	C-3	70.99	C-3''''
121.98	C-6'	70.79	C-2'''
121.23	C-1'	70.73	C-4''
116.61	C-2'	68.69	C-5'''
115.80	C-5'	67.39	C-6''
103.54	C-10	18.13	C-6'''
101.97	C-1''		

Enfin, la comparaison des données chromatographiques et spectrales avec la littérature [5,6] et la co-chromatographie du produit **Bh-3** avec témoin (la rutine) dans plusieurs systèmes CCM nous a confirmé que le produit **Bh-3** est une Quercétine-3-*O*-rhamnosyl (1-6)-glucoside (**Quercétine-3-*O*-rutinoside** ou **rutine**).

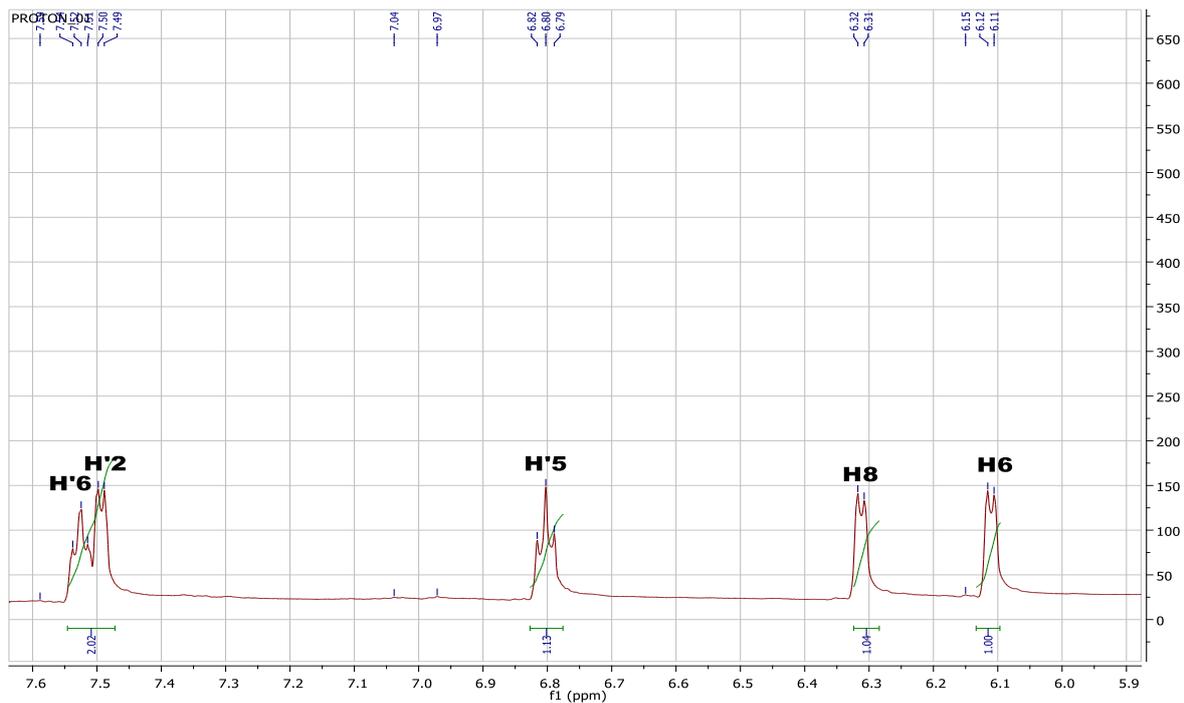


Figure-29 : Spectre RMN- ^1H étalé du produit **Bh-3**

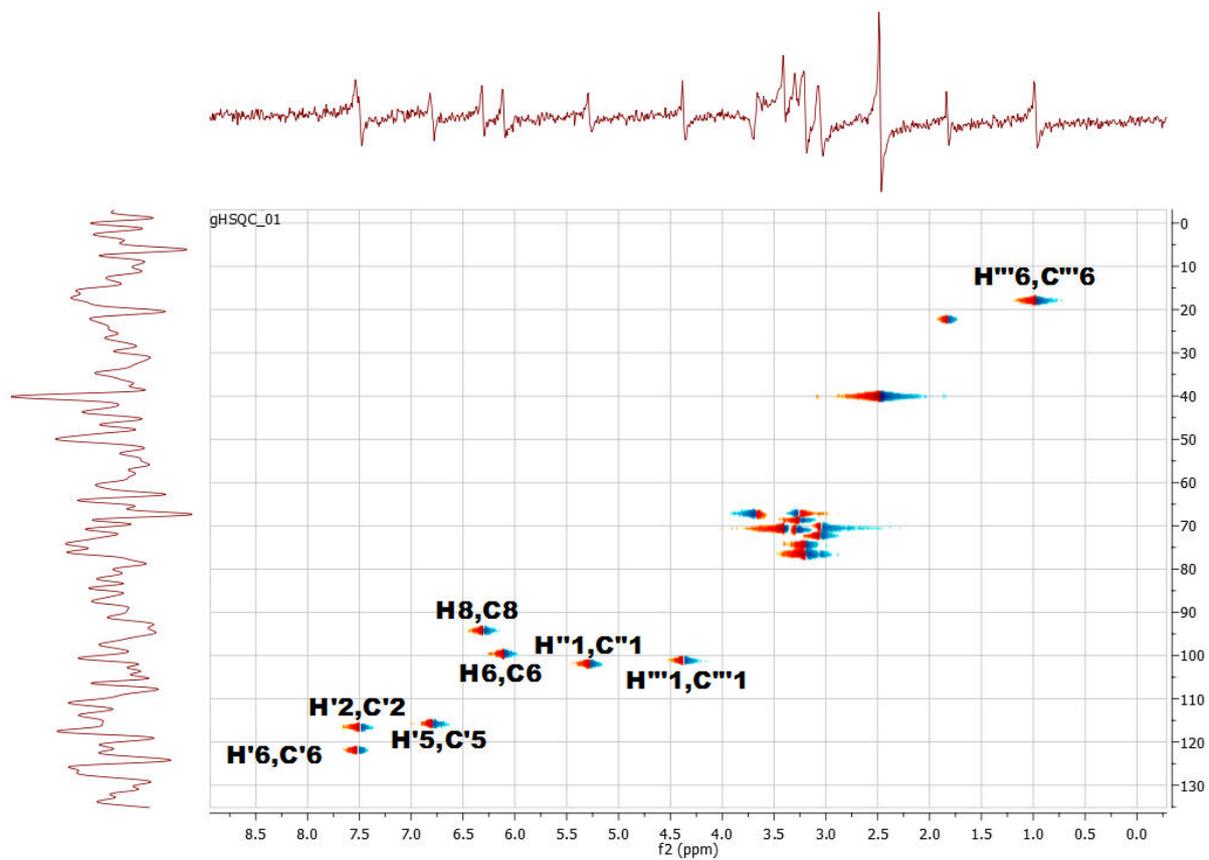


Figure-30 : Spectre de corrélation hétéronucléaire HSQC du composé **Bh-3**

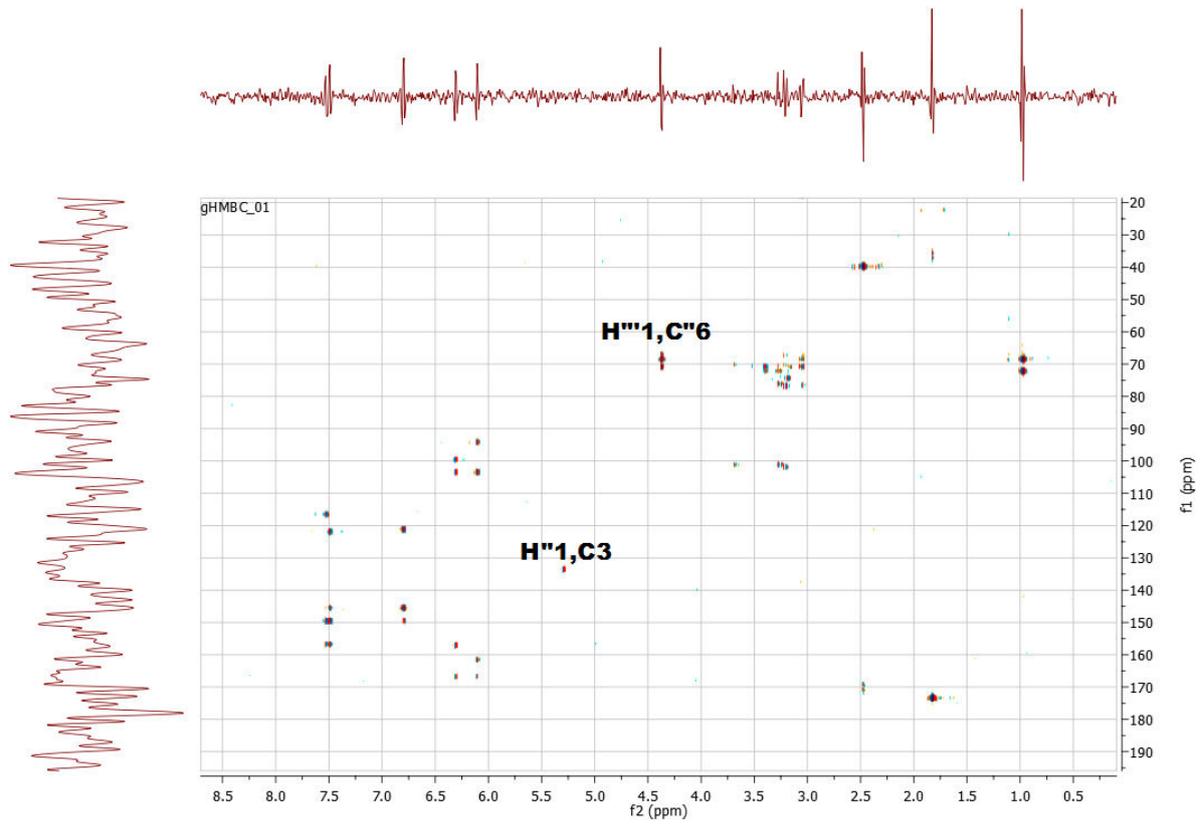


Figure-31 : Spectre de corrélation hétéronucléaire HMBC du composé Bh-3

II.2. Propriétés biologique de la tamarixétine et de la rutine de l'espèce *B. hispanica*

Les tests de l'effet antiprolifératif effectué sur la tamarixétine et la rutine ont été concluants et significatifs.

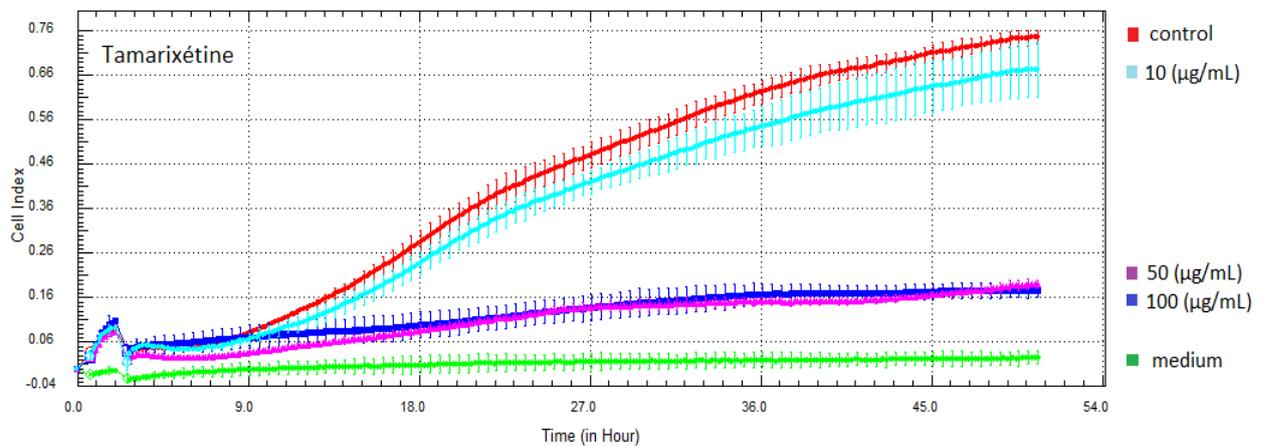


Figure-32-a : Activité antiproliférative de la tamarixétine de *B. hispanica* contre les cellules HeLa

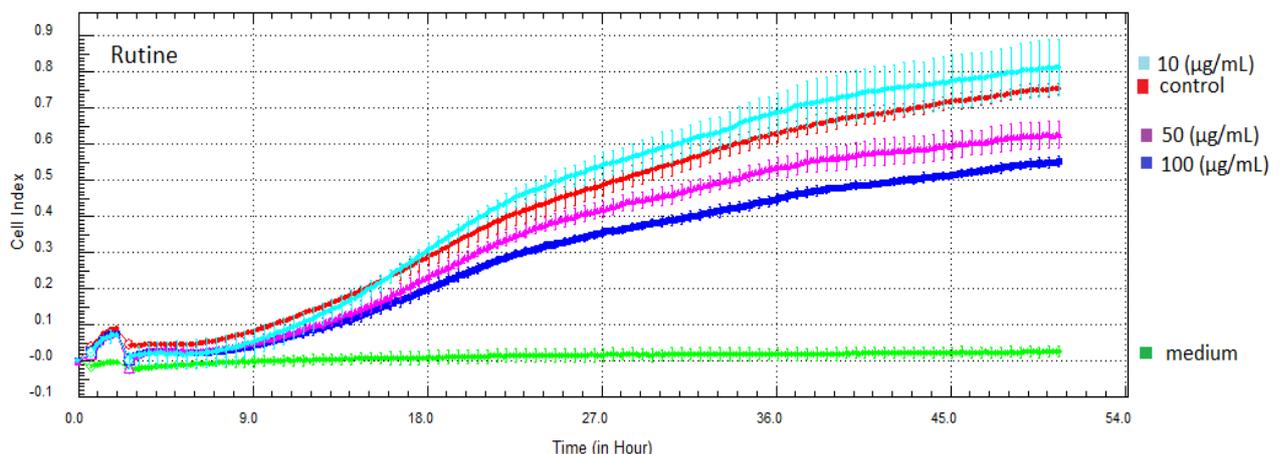


Figure-32-b : Activité antiproliférative de la rutine de *B. hispanica* contre les cellules HeLa

- ✓ D'après les figure-32-a et b : La tamarixétine a montré un effet antiprolifératif significatif contre les cellules HeLa ($CI_{50} < 50 \mu\text{g} / \text{mL}$), tandis que la rutine a montré un faible effet cytotoxique ($CI_{50} > 100 \mu\text{g} / \text{mL}$).
- ✓ Quant à la figure-33, elle montre l'effet antiprolifératif de la Tamarixétine et la Rutine sur les cellules HeLa pendant 24 h et 48 h après le traitement aux concentrations de 10,50 et 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
- ✓ D'après cette figure, la tamarixétine a un effet inhibiteur d'environ 80% à la concentration la plus élevée de 100 ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

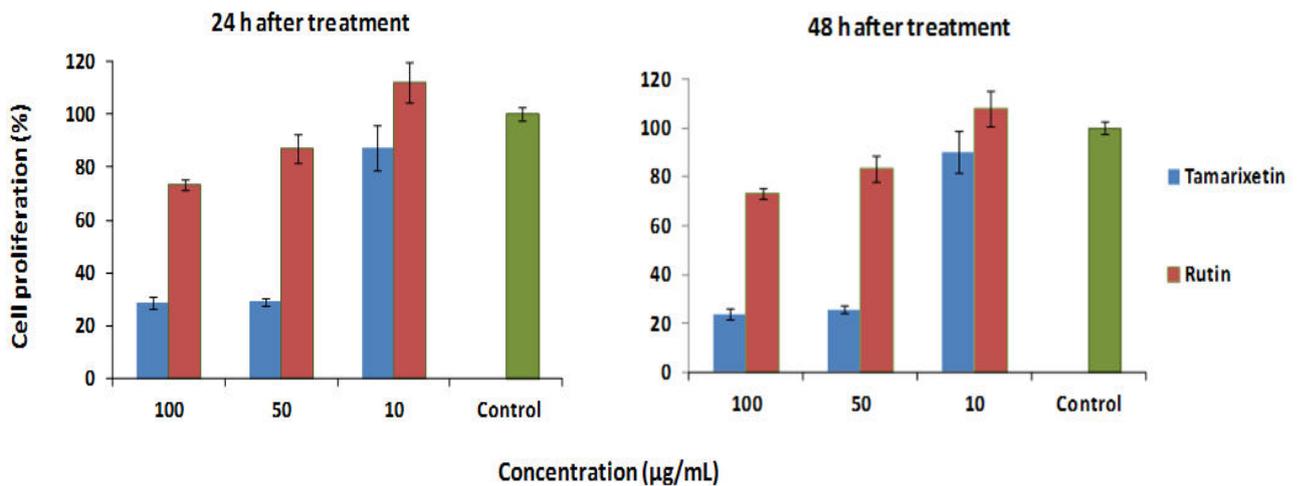


Figure-33: Le traitement de l'activité antiproliférative pendant 24h et 48h

D'après [7], les composés phénoliques provenant de sources naturelles sont maintenant intéressants en raison de leurs probables activités anticancéreuses. On a trouvé dans notre étude que la tamarixétine a un effet significatif contre les cellules HeLa.

D'autre recherche proche de la nôtre concernant les effets de la tamarixétine sur la viabilité de certaines lignées cellulaires tumorales humaines, montrent que la tamarixétine était cytotoxique contre les cellules leucémiques et en particulier les cellules K562 / ADR. La tamarixétine présente, également, une activité antiproliférative importante contre les lignées cellulaires cancéreuses du sein (MCF-7), du côlon (Caco-2) et du pancréas (BxPC-3) [8]. Cette capacité inhibitrice était liée d'une manière générale à sa concentration et son temps d'incubation [9].

La rutine isolée à partir de *B. hispanica* a montré une activité dépendante du temps et de la dose sur les cellules HeLa. Certaines études ont montré que la rutine présentait un effet dépendant de la dose et du temps sur les lignées cellulaires U-937 et HT-60 [10] et le gliome [11], elle a montré également des effets cytotoxiques sur plusieurs cellules cancéreuses humaines [12,13].

D'autre recherche [14], ont montré que les flavonoïdes avec un groupe hydroxyle glycosylé comme la rutine, naringinene ne sont pas efficaces sur les lignées cellulaires cancéreuses du côlon humain.

III. Identification des produits isolés de *Stachys brachyclada*

L'élucidation des structures a été établie par les différentes méthodes spectroscopiques (SM, RMN 1D, RMN 2D) et par comparaison avec les données de la littérature.

III.1. Identification des produits isolés de l'extrait MeOH de *S. brachyclada*

III.1.1. Elucidation structurale du produit Sb-1

a) Propriétés physico-chimiques

Formule brute : $C_{28}H_{32}O_{17}$

Quantité du produit : 1.2 mg

Aspect : poudre jaune

Fluorescence sous lampe UV: Noire-violette.

b) Données spectroscopiques

Le spectre RMN 1H enregistré dans CD_3OD à 600 MHz (Fig-34, Fig-35), montre la présence des signaux caractéristiques d'un flavonoïde :

✓ Deux doublets d'intégration chacun 1H, le premier à $\delta_H = 6.81$ ppm ($J = 1.9$ Hz), le second à $\delta_H = 6.53$ ppm ($J = 1.9$ Hz) attribuable à H-8 et H-6 respectivement.

✓ Un singulet observé à $\delta_H = 6.63$ ppm dû à la résonance de H-3, pour le cycle A.

En revanche, dans le cycle B on trouve deux doublets d'intégration chacun 1H à $\delta_H = 6.93$ ppm ($J = 8.3$ Hz) et à $\delta_H = 7.45$ ppm ($J = 8.4$ Hz) attribuable à H-5' et H-6' respectivement, et un dernier signal sous forme de singulet d'intégration 1H à $\delta_H = 7.43$ ppm attribuable à H-2'. Ceci indique une disubstitution du cycle B en 3' et 4'.

L'examen du spectre de RMN 1H de la partie osidique a permis d'observer deux doublets, l'un à $\delta_H = 5.25$ ppm avec une constante de couplage ($J = 6.7$ Hz) et l'autre à $\delta_H = 5.0$ ppm avec une constante de couplage ($J = 7.9$ Hz) attribuables à deux protons anomériques, ce qui indique la présence de deux type du sucre.

Pour déterminer la nature du sucre, on a eu recours à l'hydrolyse acide de ce composé. Nous avons procédé à une co-chromatographie sur plaque analytique on utilisant le système acétone-eau (9/1) en présence d'échantillons authentiques des sucres, et il est apparu que les sucres sont le glucose et l'allose.

Détermination des points de jonction des différents fragments :

✓ Le signal déblindé à ($\delta_C = 83.4$ ppm) correspondant au carbone C-2 du glucose, indique que ce dernier est attaché à l'aglycone et que l'allose est attaché au carbone C-2 du glucose. Ceci est confirmé par l'examen du spectre HMBC (Fig-36) où on distingue d'une

part une tache de corrélation entre le proton anomérique H-1'' du glucose ($\delta_H = 5.25$ ppm) et le carbone C-7 de l'aglycone ($\delta_C = 164.3$ ppm), montrant la glycosylation en C-7. D'autre part une tache de corrélation entre le proton anomérique H-1''' de l'allose ($\delta_H = 5.0$ ppm) et le carbone C-2 du glucose ($\delta_C = 83.4$ ppm).

- ✓ Le signal du carbone 6 de l'allose à une valeur déblindée dans le champ faible de 4.8 ppm à celle qui est prévue ($\delta_H = 64.8$ ppm à la place de $\delta_C = 60$ ppm), indique une acétylation à ce niveau.
- ✓ Les signaux des protons H-6a''' et H-6b''' et H-5''' observés à des champs faibles ($\delta = 3.56 - 3.99$ ppm) confirme l'acétylation au niveau du carbone 6.
- ✓ L'observation de deux signaux, l'un à $\delta_C = 172.5$ ppm et l'autre $\delta_C = 20.1$ ppm, sont attribuables au carbonyle et au méthyle de l'acéthyle de l'allose [15].

Le spectre HMBC (Fig-36) permet de compléter l'attribution des carbones de ce composé et ils sont représentés dans le (tableau-22).

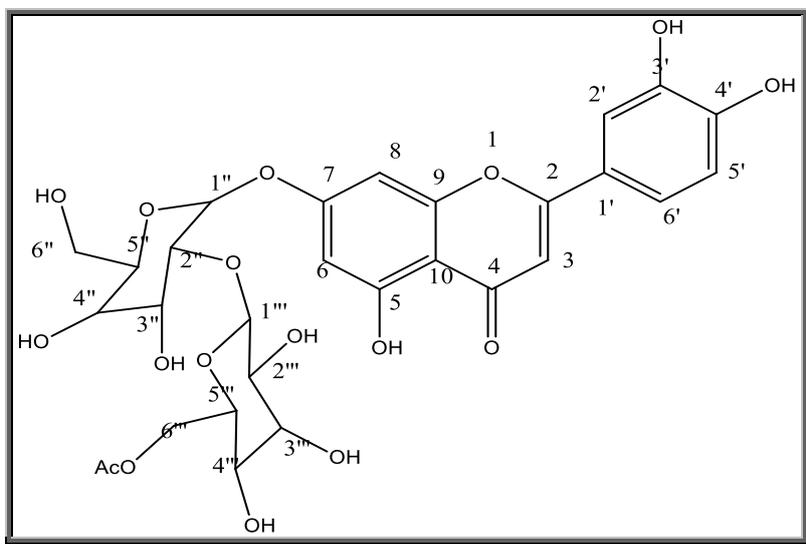
Tableau-21 : Données RMN-¹H (600 MHz,) du produit **Sb-1**

δ (ppm)	Intégration	Multiplicité (J (Hz))	Attribution
7.45	1H	<i>d</i> (8.2)	H-6'
7.43	1H	<i>s</i>	H-2'
6.93	1H	<i>d</i> (8.2)	H-5'
6.81	1H	<i>d</i> (1.9)	H-8
6.63	1H	<i>s</i>	H-3
6.53	1H	<i>d</i> (1.9)	H-6
5.25	1H	<i>d</i> (6.7)	H-1''
5.00	1H	<i>d</i> (7.9)	H-1'''
4.15	1H	<i>m</i>	H-3'''
3.92-3.99	1H	<i>m</i>	H-6'''
3.76-3.86	1H	<i>m</i>	H-6''
3.83	1H	<i>m</i>	H-2'''
3.57-3.74	1H	<i>m</i>	H-5''
3.71	1H	<i>m</i>	H-2''
3.56	1H	<i>m</i>	H-3'', H-5'''
3.49	1H	<i>m</i>	H-4'', H-4'''
2.0	3H	<i>s</i>	CH ₃ (Ac)

Tableau-22 : Données RMN ^{13}C (150 MHz, CD_3OD) du produit **Sb-1**

δ (ppm)	Attribution	δ (ppm)	Attribution
189.8	C-4	103.1	C-1'''
172.5	C=O (Ac)	101.2	C-6
167.7	C-2	100.0	C-1''
164.3	C-7	83.4	C-2''
162.5	C-5	77.8	C-3'',C-5''
158.7	C-9	73.1	C-2'''
151.5	C-4'	70.7	C-4''
146.8	C-3'	68.0	C-5'''
123.3	C-1'	67.8	C-3'''
116.7	C-5'	67.0	C-4'''
115.5	C-6'	64.8	C-6'''
114.3	C-2'	61.8	C-6''
107.4	C-10	20.1	$\text{CH}_3(\text{Ac})$
104.2	C-8,C-3		

Les données spectroscopique combinées permettent d'identifier la structure du composé **Sb-1** comme étant : **Lutéoline--7-O- β -D-allopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-glucopyranoside**.



Lutéoline-7-O- β -D-allopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-glucopyranoside

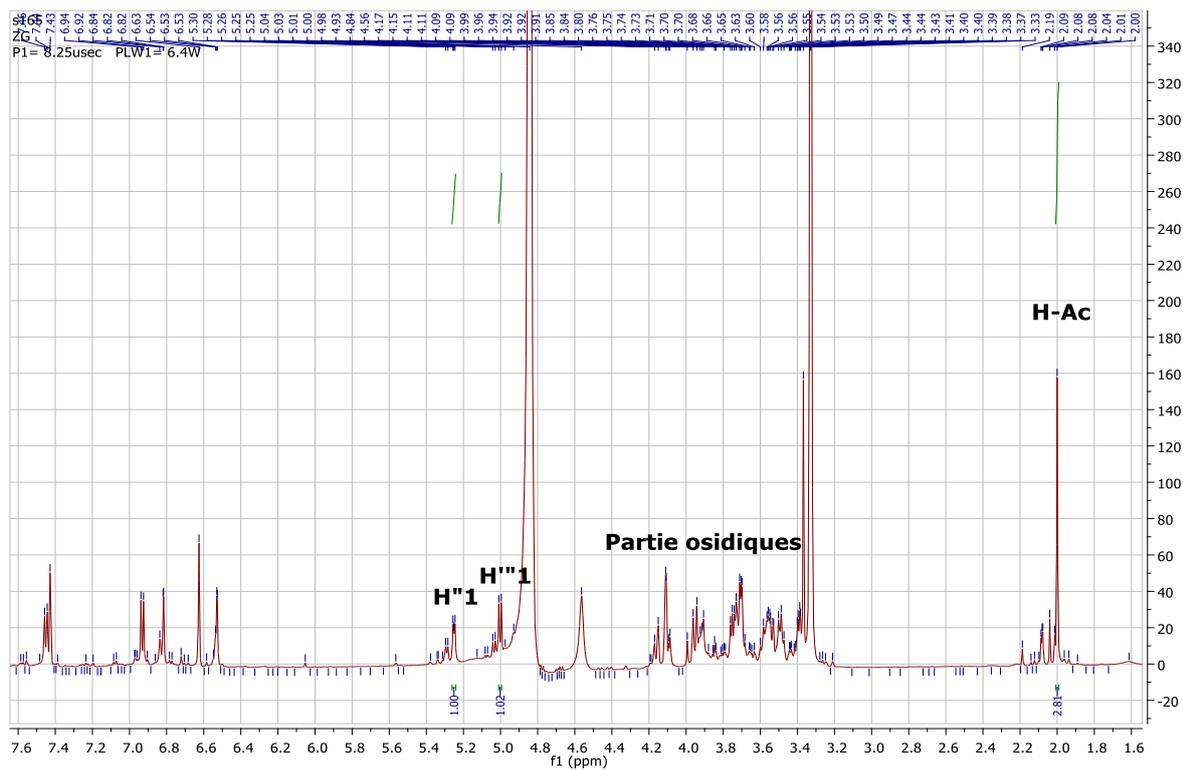


Figure-34 : Spectre RMN-¹H du produit Sb-1

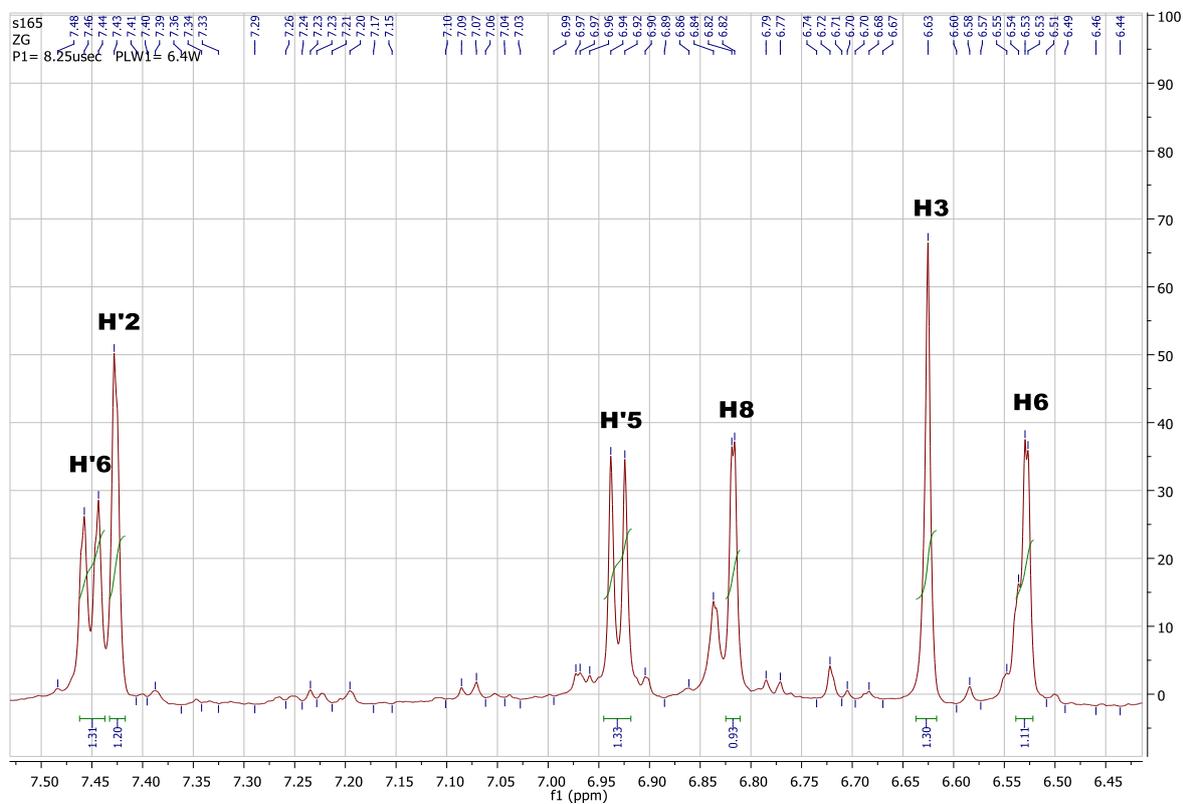


Figure-35 : Spectre RMN-¹H étalé du produit Sb-1

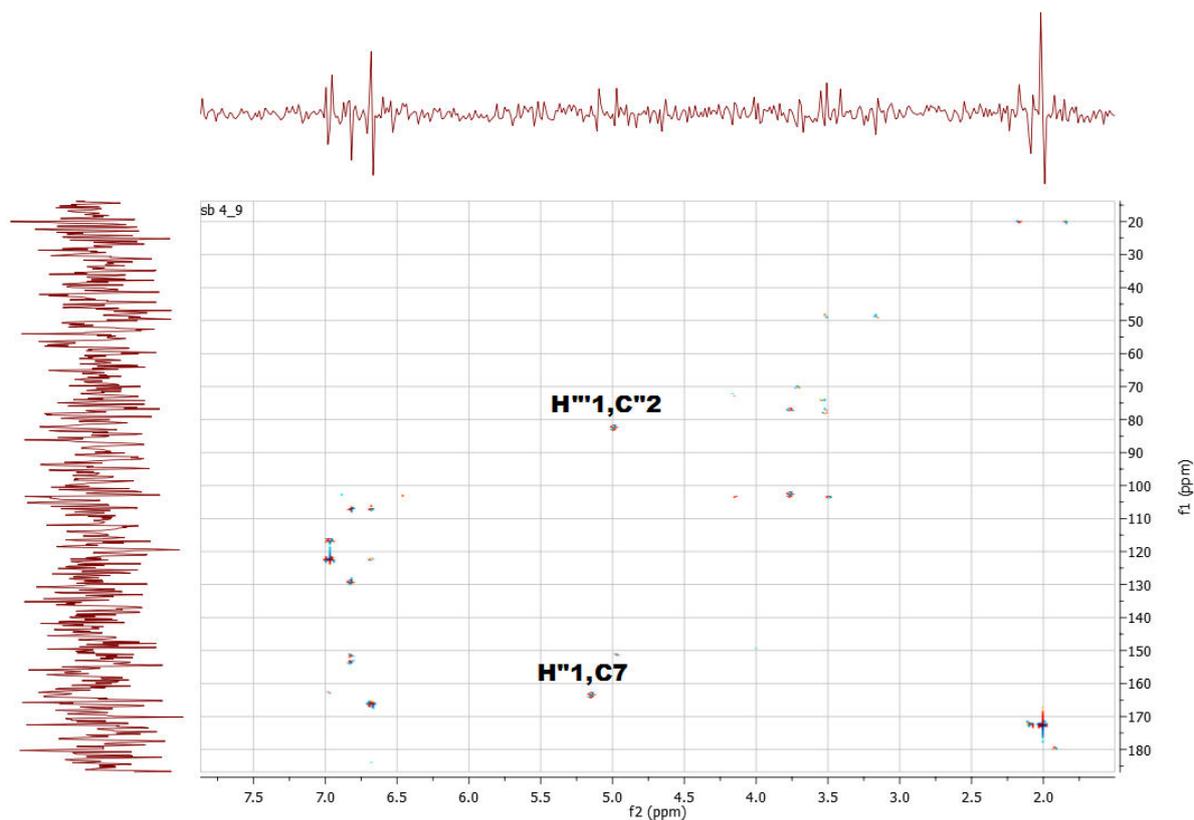


Figure-36 : Spectre de corrélation hétéronucléaire **HMBC** du composé **Sb-1**

III.1.2. Elucidation structurale du produit Sb-2

a) Propriétés physico-chimiques

Formule brute : $C_{29}H_{32}O_{17}$.

Quantité du produit : 1.3 mg

Aspect : poudre jaune

Fluorescence sous lampe UV: Noire- violette.

b) Données spectroscopiques

Le spectre RMN- 1H enregistré dans CD_3OD à 600 MHz (Fig-37, Fig-38), montre :

- ✓ Un doublet qui apparait à $\delta_H = 6.96$ ppm avec une constante de couplage ($J = 8.8$ Hz) permettant l'attribution de ce signal d'intégration 2H à H-3' et H-5'. De même la constante de couplage ($J = 8.8$ Hz) du doublet qui apparait à $\delta_H = 7.96$ ppm permet l'attribution de ce signal d'intégration 2H à H-2' et H-6'.
- ✓ Un singulet à $\delta_H = 6.67$ ppm correspond au proton qui est corrélé à l'atome de carbone dont le signal apparait à $\delta_C = 103$ ppm (Spectre HSQC, Fig-39) ne peut être attribué qu'au proton H-3.
- ✓ Un singulet à $\delta_H = 6.81$ ppm correspond soit au proton H-6 ou au proton H-8. Toutefois le spectre HSQC (Fig-39), montre que ce proton est corrélé au carbone dont le signal apparait à $\delta_C = 101.4$ ppm, il ne peut être donc attribué qu'au carbone C-6 [16].

L'examen du spectre de RMN 1H de la partie osidique a permis d'observer deux doublets, l'un à $\delta_H = 4.96$ ppm avec une constante de couplage ($J = 7.86$ Hz) et l'autre à $\delta_H = 5.05$ ppm avec une constante de couplage ($J = 7.52$ Hz) attribuables à deux protons anomériques et ils sont liés à des carbones résonnant respectivement à $\delta_C = 102.44$ ppm et $\delta_C = 103$ ppm (Spectre HSQC).

L'examen des plaques CCM après l'hydrolyse acide a permis de montrer que l'un des hexoses est un glucose et l'autre et l'allose.

Les spectres HSQC et HMBC permettent de compléter l'attribution des carbones de ce composé.

Détermination des points de jonction des différents fragments :

- ✓ Le signal déblindé à ($\delta_C = 83.4$ ppm) correspondant au carbone 2 du glucose, indique que ce dernier est attaché à l'aglycone et que l'allose est attaché au carbone 2 du glucose, ce qui serait confirmé par l'examen du spectre HMBC (Fig-40), ou on distingue d'une part une tache de corrélation entre le proton anomérique du glucose

($\delta_H = 4.96$ ppm) et le carbone C-7 de l'aglycone $\delta_C = 151.9$ ppm, montrant la glycosylation en C-7, et d'autre part une tache de corrélation entre le proton anomérique de l'allose ($\delta_H = 5.05$ ppm) et le carbone 2 du glucose ($\delta_C = 83.4$ ppm).

- ✓ Le signal du carbone 6 de l'allose à une valeur déblindée dans le champ faible de 2.2 ppm à celle qui est prévue ($\delta_H = 62.2$ ppm à la place de $\delta_C = 60$ ppm), indique une acétylation à ce niveau.
- ✓ Les signaux des protons H-6a''' et H-6b''' et H-5''' observés à des champs faibles ($\delta = 3.81$ -4.0 ppm) confirme l'acétylation au niveau du carbone 6.
- ✓ L'observation de deux signaux, l'un à $\delta = 172.8$ ppm et l'autre $\delta = 20.3$ ppm, sont attribuables au carbonyle et au méthyle de l'acéthyle de l'allose [15].

L'ensemble de ces données et représentées dans les tableaux suivant :

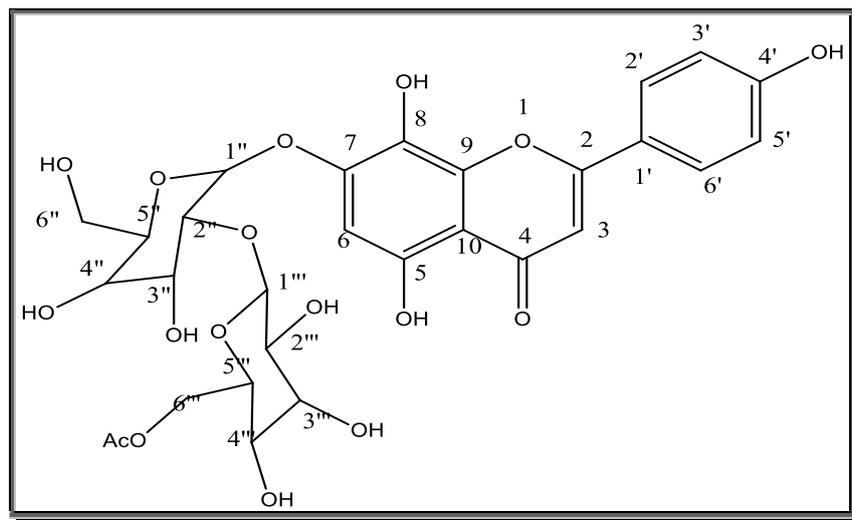
Tableau-23 : Données RMN ^1H (600 MHz, CD_3OD) du produit **Sb-2**

δ (ppm)	Intégration	Multiplicité (J (Hz))	Attribution
7.96	2H	<i>d</i> (8.88)	H-2', H-6'
6.96	2H	<i>d</i> (8.88)	H-3', H-5'
6.81	1H	<i>s</i>	H-6
6.67	1H	<i>s</i>	H-3
5.05	1H	<i>d</i> (7.86)	H-1'''
4.96	1H	<i>d</i> (7.52)	H-1''
4.14	1H	<i>m</i>	H-3'''
4.0-3.95	1H	<i>m</i>	H-6'''
3.84-3.67	1H	<i>m</i>	H-6''
3.81	1H	<i>t</i>	H-5'''
3.80	1H	<i>m</i>	H-2'''
3.75	1H	<i>t</i>	H-2''
3.70	1H	<i>m</i>	H-3''
3.54	1H	<i>S</i>	H-5''
3.52	1H	<i>m</i>	H-4'''', H-4''
2	3H	<i>s</i>	$\text{CH}_3(\text{Ac})$

Tableau-24 : Données RMN ^{13}C (150 MHz, CD_3OD) du produit **Sb-2**

δ (ppm)	Attribution	δ (ppm)	Attribution
183.4	C-4	102.44	C-1''
172.8	C=O (Ac)	101.4	C-6
166.1	C-2	83.4	C-2''
163.13	C-4'	77.9	C-5''
153.7	C-5	77.8	C-3''
151.9	C-7	73.0	C-2'''
145.4	C-9	72.0	C-5'''
130.2	C-6', C-2'	71.9	C-3'''
129.5	C-8	70.0	C-4''
122.8	C-1'	68.3	C-4'''
116.9	C-3', C-5'	62.4	C-6''
107.4	C-10	62.2	C-6'''
103.0	C-3, C-1'''	20.30	$\text{CH}_3(\text{Ac})$

Enfin, on comparant les données de ce produit avec la littérature [16], on a pu identifier le composé **Sb-2** comme étant : **L'isoscutellareine-7-O-(6'''-O-acétyl- β -D-allosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucoside**.



Isoscutellareine-7-O-(6'''-O-acétyl- β -D-allosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucoside

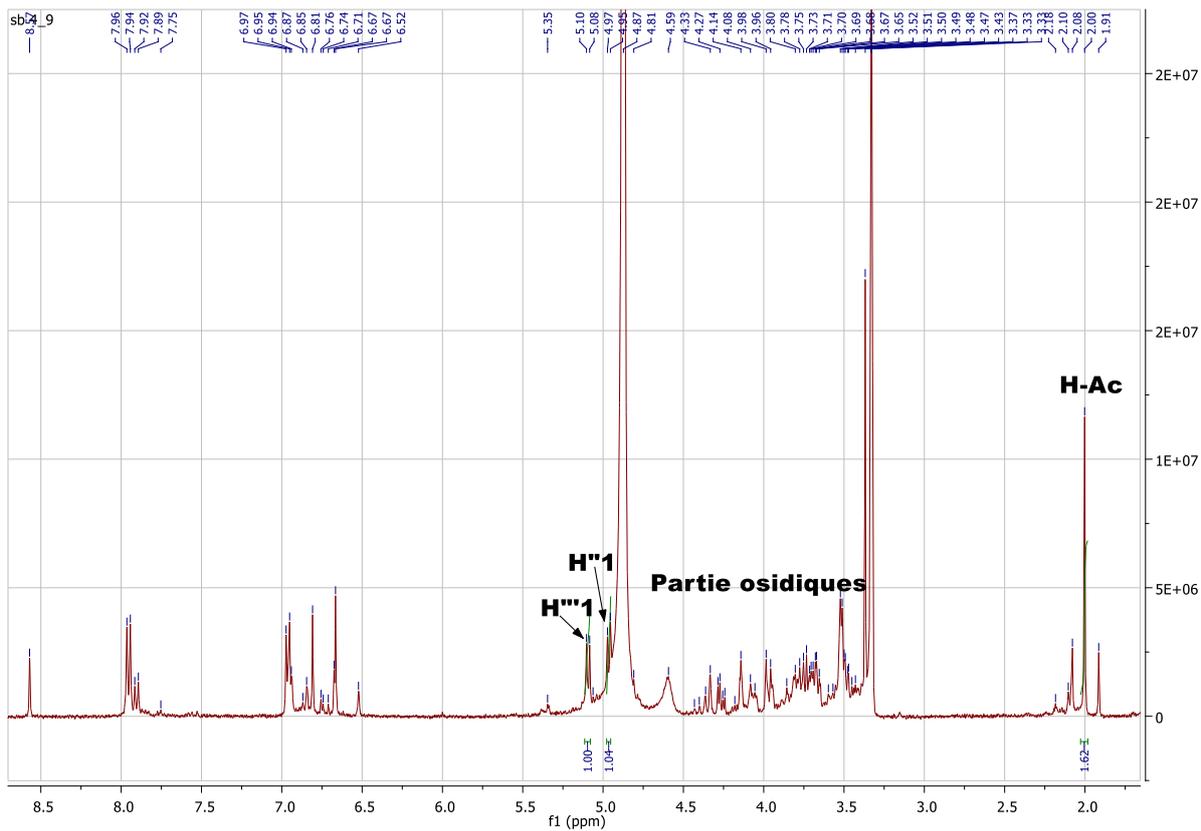


Figure-37 : Spectre RMN-¹H du produit Sb-2

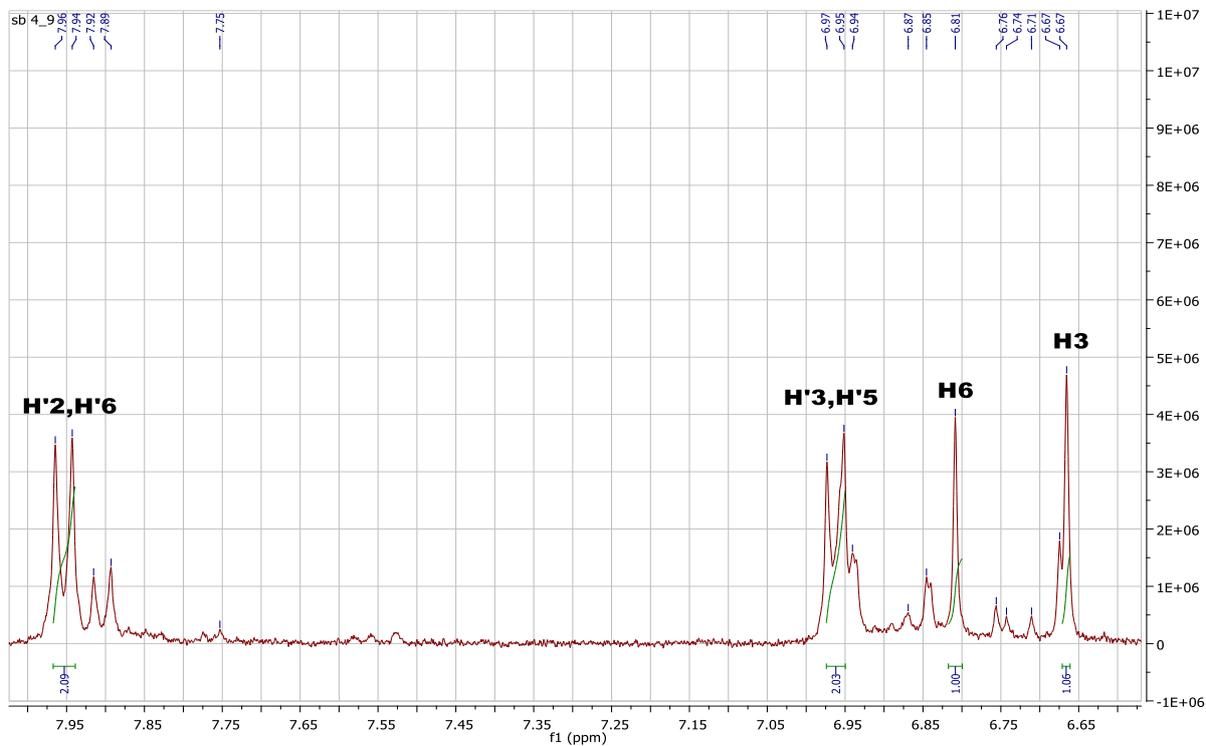


Figure-38 : Spectre RMN-¹H étalé du produit Sb-2

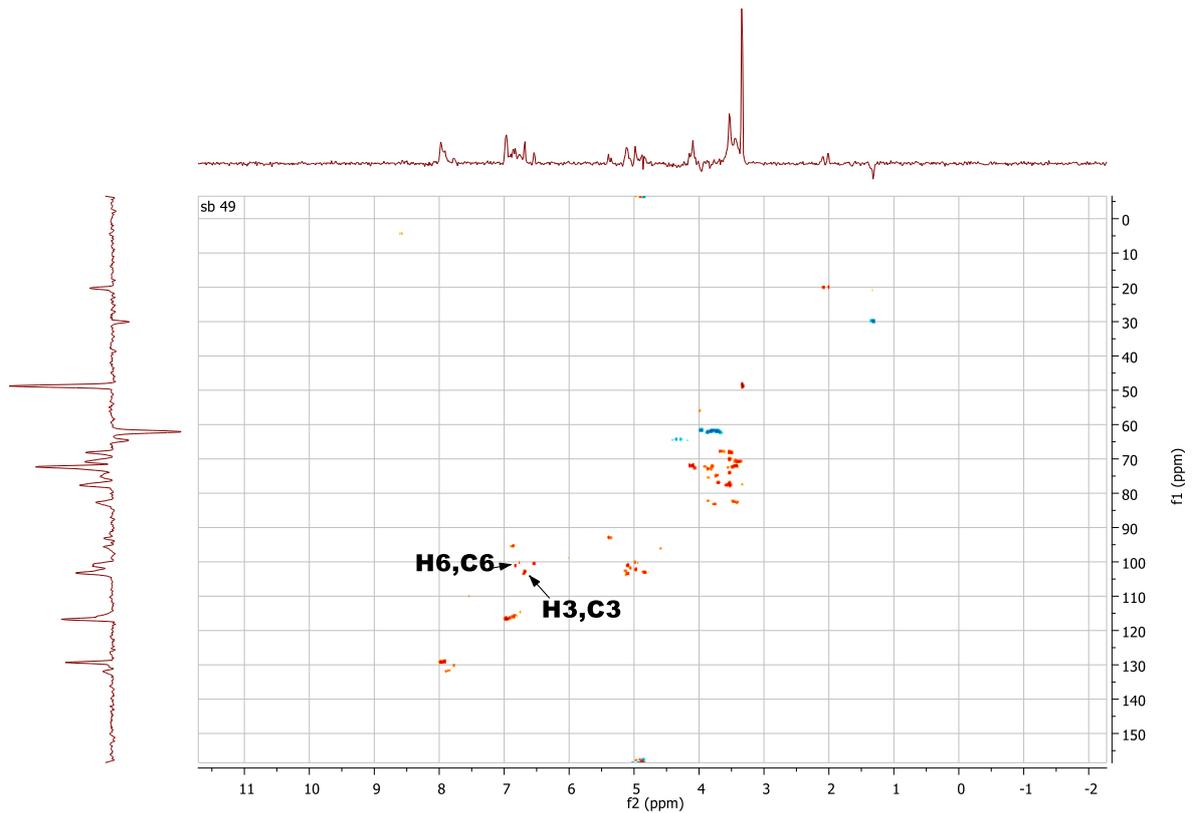


Figure-39 : Spectre de corrélation hétéronucléaire HSQC du composé Sb-2

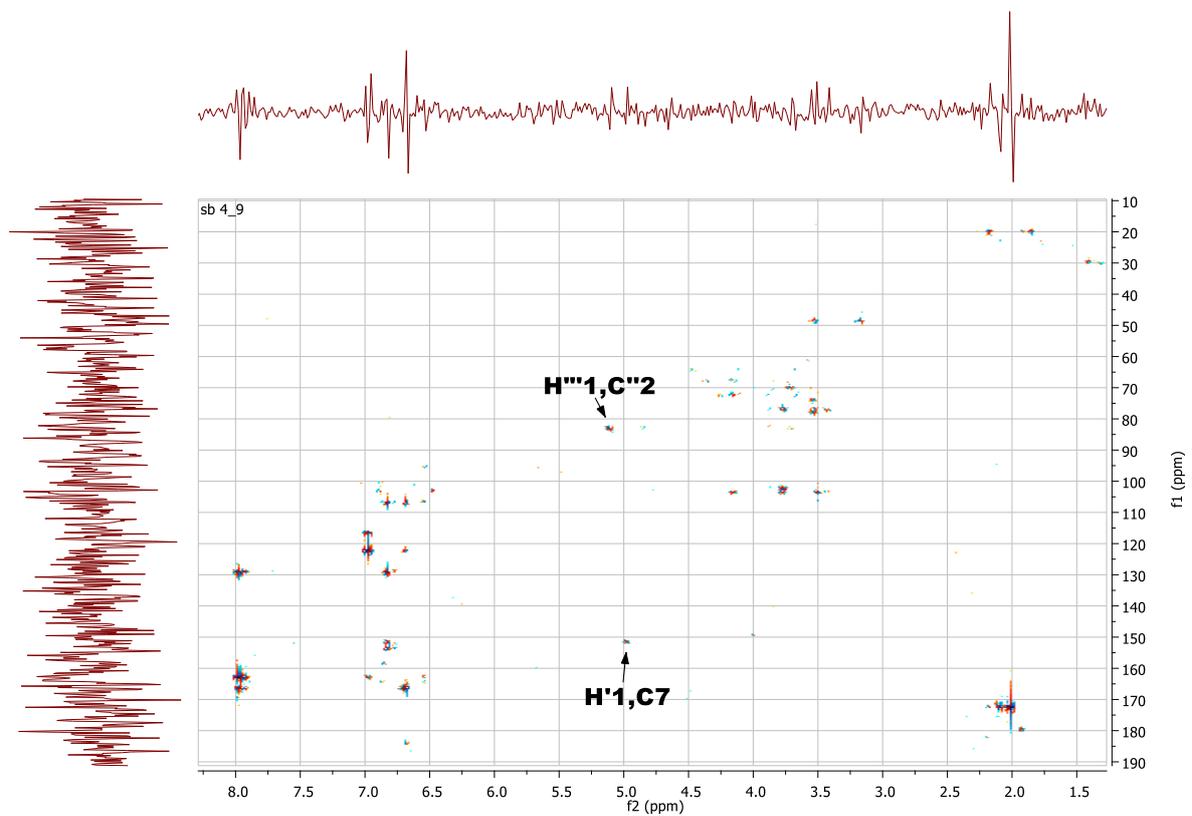


Figure-40 : Spectre de corrélation hétéronucléaire HMBC du composé Sb-2

III.1.3. Elucidation structurale du produit Sb-3

a) Propriétés physico-chimiques

Formule brute : $C_{60}H_{52}O_{24}$

Quantité du produit : 5.8 mg

Aspect : Poudre jaune.

Fluorescence sous lampe UV: Noire-violette à 365 nm et il a donné une couleur jaune après avoir été pulvérisé par l'acide sulfurique et chauffé à 100 ° C , probabilité d'une flavone ou d'un flavonol.

b) Données spectroscopiques

Le spectre de masse haute résolution HR-ESI-MS du composé Sb-3 (Fig-41), montre un ion pseudo-moléculaire a m/z 1179,2749 $[M+Na]^+$ (calculé 1179,2746), correspondant à une masse moléculaire égale à 1157 *uma* en accord avec la formule brute $C_{60}H_{52}O_{24}$.

Selon les spectres hétéronucléaires HSQC et HMBC, il y a 60 atomes de carbone (Fig.44, Fig.46) dont : 36 carbones aromatiques, 4 carbones qui appartiennent à des fonctions carbonyle, 4 carbones oléfiniques, 4 carbones aliphatiques et 12 carbones glucosidiques.

De la constante de couplage des protons, (Fig.43), comme dans le tableau-25, on observe :

- ✓ Seize protons aromatiques qui ont des constantes de couplage du système ortho appartenant à quatre cycles benzéniques.
- ✓ Quatre protons aromatiques qui ont des constantes de couplage du système méta.
- ✓ Quatre protons de groupements méthines qui ont des constantes de couplage du système cis de deux chacun.
- ✓ Deux protons anomères et 10 protons oxyméthine qui appartiennent aux fragments de sucre.

L'analyse RMN- 1H (Fig-42, Fig-43) indique qu'il existe 38 protons selon l'intégration des protons. L'existence de deux signaux des protons anomères est confirmé par l'analyse HSQC (Fig-44), dont il a eu deux fragments de sucre, le premier proton anomère est à 5,20 ppm (1H, *d*, $J = 7,2$ Hz), le second à 5,01 ppm (1H, *d*, $J = 7,2$ Hz) qui appartiennent aux carbones C-1" ($\delta_C = 101.1$ ppm) et C-1"a ($\delta_C = 100.4$ ppm) respectivement.

L'existence des signaux singulets distingués à H-3 et H-3a indique qu'il existe un flavonoïde de type di-flavone, à partir de la constante de couplage des protons H-6 à 6,48 ppm (1H, *d*, $J = 1,7$) et H-8 à 6,45 ppm (1H, *d*, $J = 1,7$ Hz) et avec la constante de couplage des protons

H-2 'et H-6' à 7,58 ppm (2H, *d*, *J* = 8,2 Hz), H-3'et H-5' à 6.76 ppm (2H, *d*, *J* = 8,2 Hz) on confirme l'existence de l'apigénine.

En revanche, la constante de couplage des protons H-6a à 6,24 ppm (1H, *d*, *J* = 1,75 Hz) et H-8a à 6,64 ppm (1H, *d*, *J* = 1,7 Hz), ainsi que la constante de couplage des protons H-2'a et H-6'a à 7,71 ppm (2H, *d*, *J* = 8,5 Hz), H-3'a et H-5'a à 6,87 ppm (2H, *d*, *J* = 8,4 Hz) indiquent qu'il existe une autre squelette d'apigénine qui confirme la suggestion d'une diflavone (diapigénine).

En outre, la constante de couplage des protons H-2''' et H-6''' à 6,47 ppm (2H, *d*, *J* = 7,5 Hz) H-3''' et H-5''' à 6,37 ppm (2H, *d*, *J* = 7,5 Hz), avec les protons H-2'''a et H-6'''a à 6,55 ppm (2H, *d*, *J* = 8,2 Hz) H-3'''a et H-5'''a à 6,45 ppm (2H, *d*, *J* = 8,2 Hz) suggèrent qu'il existe deux noyaux benzéniques substitués en position para.

La mesure du spectre COSY (Fig.45), indique les corrélations entre les protons de méthine situés à H-8''' ($\delta_H = 3,80$ ppm), H-8'''a ($\delta_H = 3,90$ ppm) H-7''' ($\delta_H = 4,12$ ppm) et H-7'''a ($\delta_H = 4,12$ ppm), confirme que le composé contient un cyclobutane qui renforce la suggestion des données précédentes (il existe deux cycles benzéniques); ces protons appartiennent à la structure de l'acide truxinique.

Le spectre HMBC (Fig.46) confirme cette structure qui élucide le lien entre la position des sucres et le cycle benzénique. Dans un premier temps, on trouve des fragments entre le diflavone et le sucre, il a été montré une corrélation entre le proton anomérique H-1'' ($\delta_H = 5,20$ ppm) et C-7 ($\delta_C = 163,5$ ppm) ce qui confirme la glycosylation en position 7, il a également montré une corrélation entre H-6'' $_{\beta}$ ($\delta_H = 4,45$ ppm) et H-6'' $_{\alpha}$ ($\delta_H = 4,12$ ppm) du même sucre et la fonction carbonyle en C-9''' ($\delta_C = 171,7$ ppm). La même chose pour l'autre sucre, il existe une corrélation entre le proton anomérique H-1''a ($\delta_H = 5,01$ ppm) et C-7a ($\delta_C = 163,7$ ppm), également la même chose pour ce sucre qui est lié à une autre fonction carbonyle C-9'''a ($\delta_C = 173,12$ ppm) par corrélations avec les protons H-6''a $_{\beta}$ ($\delta_H = 4,45$ ppm) et H-6''a $_{\alpha}$ ($\delta_H = 4,80$ ppm), on trouve aussi des corrélations entre les protons de méthines H-8''' ($\delta_H = 3,80$ ppm) et H-8'''a ($\delta_H = 3,90$ ppm) du cycle cyclobutane avec les fonctions carbonyle C-9''' ($\delta_C = 171,7$ ppm) et C-9'''a ($\delta_C = 173,12$ ppm) respectivement. Enfin la corrélation entre les protons de cyclobutane H-7''' ($\delta_H = 4,12$ ppm) et H-7'''a ($\delta_H = 4,12$ ppm) avec les carbones aromatiques C-1''' ($\delta_C = 127,22$ ppm) et C-1'''a ($\delta_C = 128,87$ ppm) confirme la structure de la fraction acide truxinique.

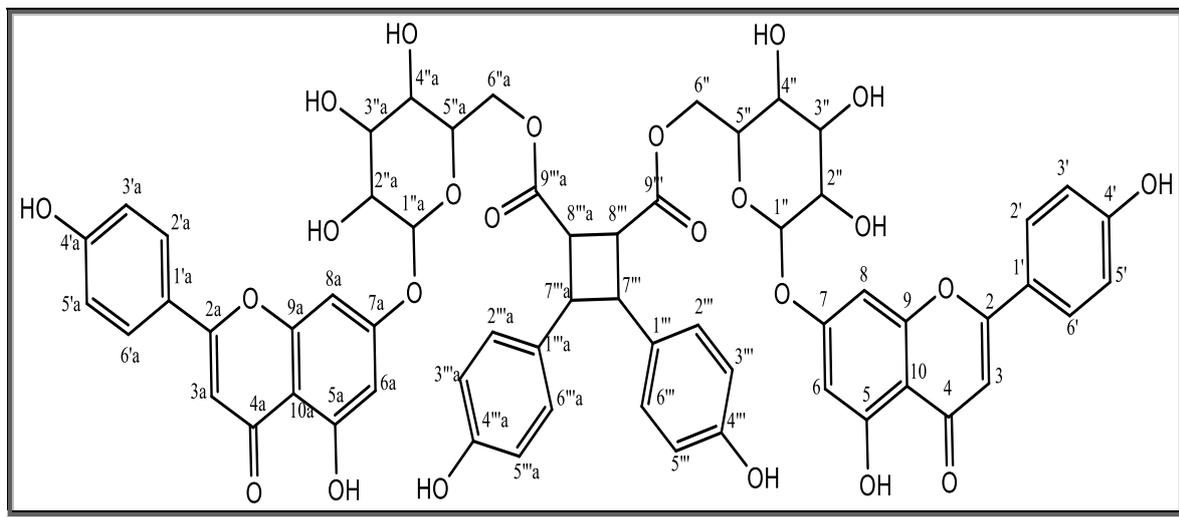
Tableau-25 : Les données de la RMN-1D et 2D (600 MHz, CD₃OD) du produit Sb-3

	δ_H (ppm) (mul. <i>J</i> (Hz))	δ_C (ppm)	HMBC		δ_H (ppm) (mul. <i>J</i> (Hz))	δ_C (ppm)	HMBC
2	-	166.4		2a	-	166.2	
3	6.37 (<i>s</i>)	103.9		3a	6.41 (<i>s</i>)	104.2	
4	-	183.4		4a	-	183.4	
5	-	162.7		5a	-	162.7	
6	6.48 (<i>d</i> , 1.7)	100.5		6a	6.24	100.1	
7	-	163.5		7a	-	163.7	
8	6.45 (<i>d</i> ,1.7)	95.6		8a	6.64	95.7	
9	-	156.4		9a	-	156.4	
10	-	106.8		10a	-	107.1	
1'	-	122.6		1'a	-	122.9	
2'	7.58 (8.2)	129.5		2'a	7.71 (<i>d</i> , 8.5)	129.4	
3'	6.76 (<i>d</i> , 8.2)	116.7		3'a	6.87 (<i>d</i> , 8.5)	117.0	
4'	-	162.7		4'a	-	162.9	
5'	6.76 (<i>d</i> , 8.2)	116.7		5'a	6.87 (<i>d</i> , 8.5)	117.0	
6'	7.58 (<i>d</i> , 8.2)	129.5		6'a	7.71 (<i>d</i> , 8.5)	129.4	
1''	5.20 (<i>d</i> , 6.4)	101.1		1''a	5.01 (<i>d</i> , 7.8)	100.4	
2''	3.65	74.3		2''a	3.56	74.6	
3''	3.65	77.9		3''a	3.50	77.8	
4''	3.36	72.9		4''a	3.33	71.87	
5''	3.88	75.3		5''a	4.12	75.20	
6''α	4.12 (<i>dd</i> ,11.22- 6.73)	65.50	171.7	6''$\alpha\alpha$	4.80 (<i>d</i> ,9.9)	66.40	171.7
6''β	4.45 (12.72)	65.50	171.7	6''$\alpha\beta$	4.45 (<i>d</i> ,10.9)	66.40	171.7
1'''	-	128.60		1'''a	-	128.60	
2'''	6.47 (<i>d</i> , 7.52)	129.65	128.60	2'''a	6.55 (<i>d</i> , 8.2)	129.65	128.60
3'''	6.37 (<i>d</i> ,7.52)	115		3'''a	6.45 (<i>d</i> , 8.2)	115	
5'''	6.37 (<i>d</i> ,7.52)	115		5'''a	6.45 (<i>d</i> ,8.2)	115	
6'''	6.47 (<i>d</i> ,7.52)	129.65	128.60	6'''a	6.55 (<i>d</i> ,8.2)	129.65	128.60
7'''	4.12 (<i>d</i> ,10.93)	44.6	128.60	7'''a	4.12 (<i>d</i> ,10.5)	44.6	128.60
8'''	3.80 (<i>d</i> ,10.93)	44.5	171.7	8'''a	3.90 (<i>d</i> ,10.5)	44.6	171.7
9'''	-	173.9		9'''a	-	174.8	

Selon les valeurs de déplacement chimique des carbones quaternaires aux positions C4', C4'a, C5 et C5a de l'apigénine à $\delta_C = 162,7$ ppm, $\delta_C = 162,9$ ppm, $\delta_C = 162.7$ ppm, $\delta_C = 162.7$ ppm respectivement. De même, les atomes de carbone quaternaires de l'acide truxinique aux positions C4''' et C4'''a à $\delta_C = 164$ ppm, $\delta_C = 161,70$ ppm et $\delta_C = 160,08$ ppm respectivement,

indiquent que les substituants de ces positions sont des groupes hydroxyles correspondant à la masse moléculaire 1157 *uma* et à la formule moléculaire $C_{60}H_{52}O_{24}$.

Le composé **Sb-3** d'après ces analyses et par comparaison à la littérature [17], a été déterminé en tant que : **Diapigenin-7-glycoside-p, p'-dihydroxytruxinate (stachysétine)**.



Stachysétine

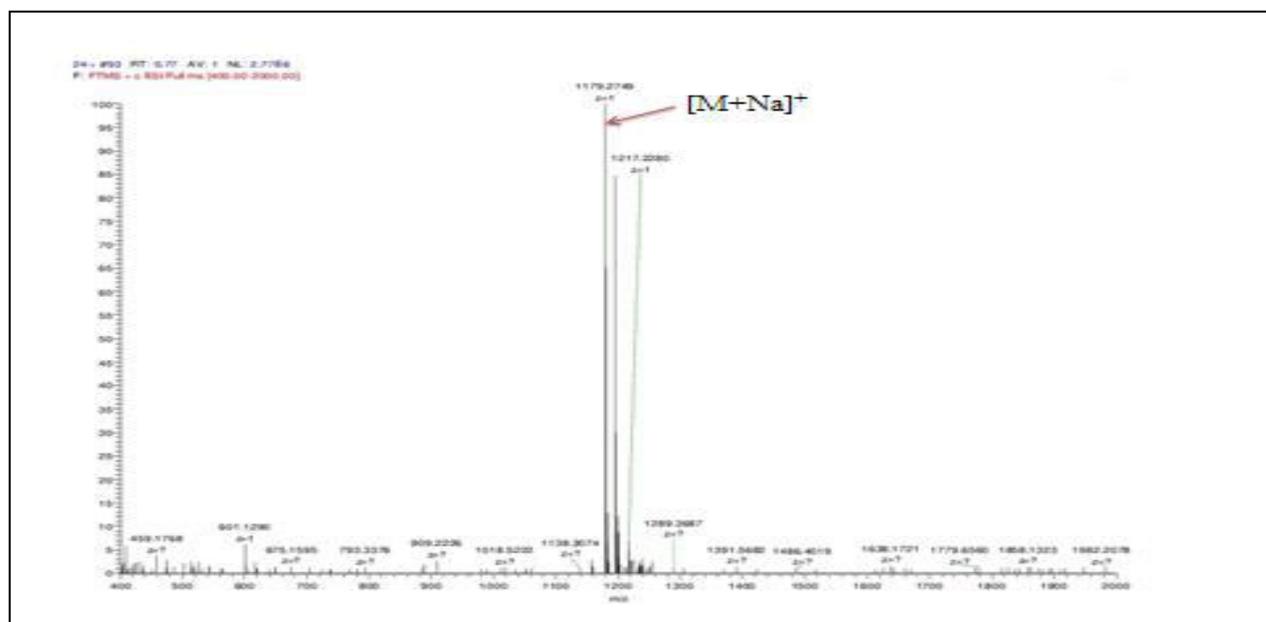


Figure-41 : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé **Sb-3**

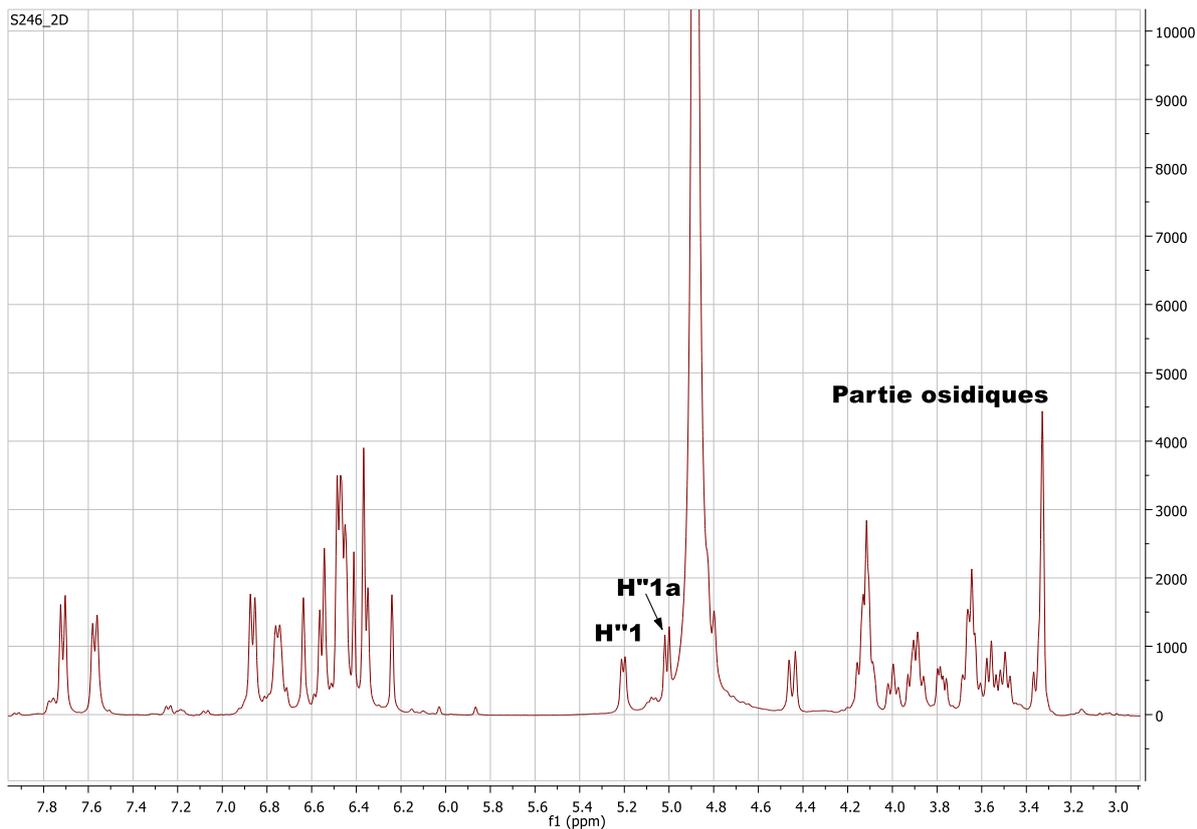


Figure-42 : Spectre RMN-¹H du produit Sb-3

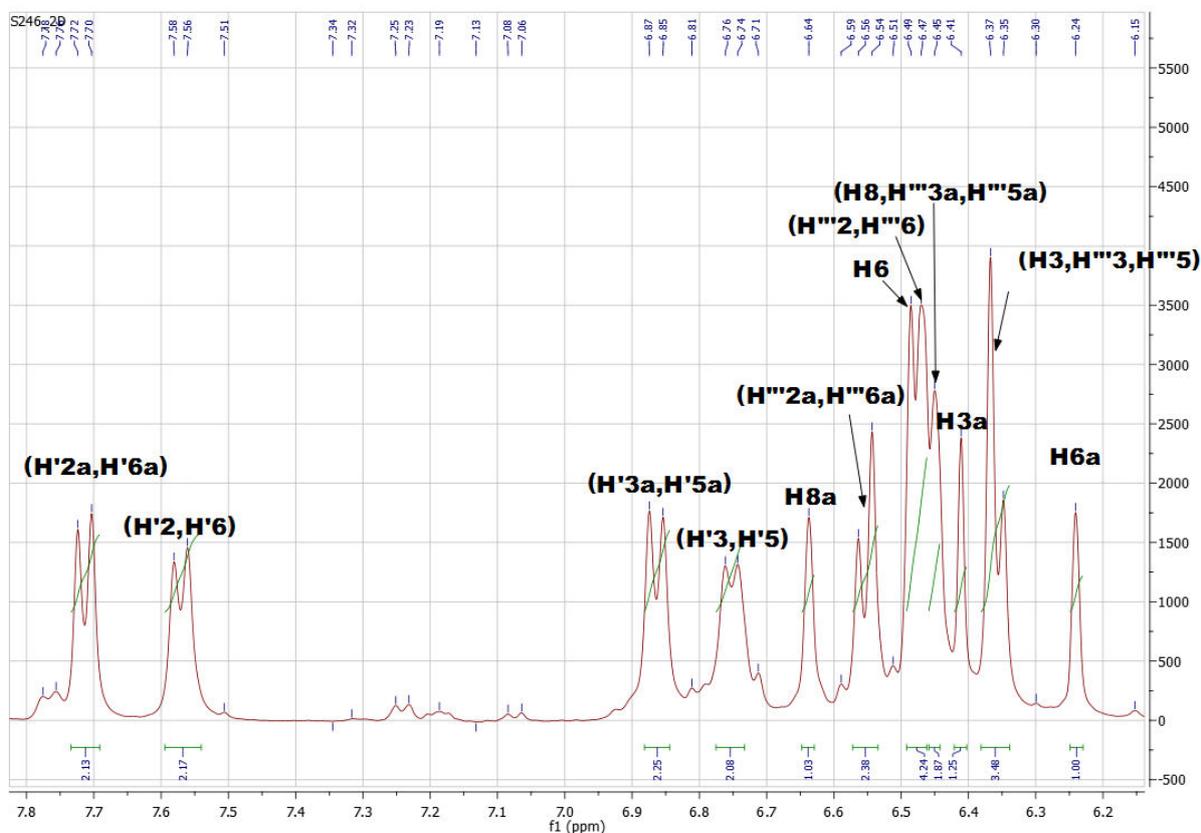


Figure-43 : Spectre RMN-¹H étalé du produit Sb-3

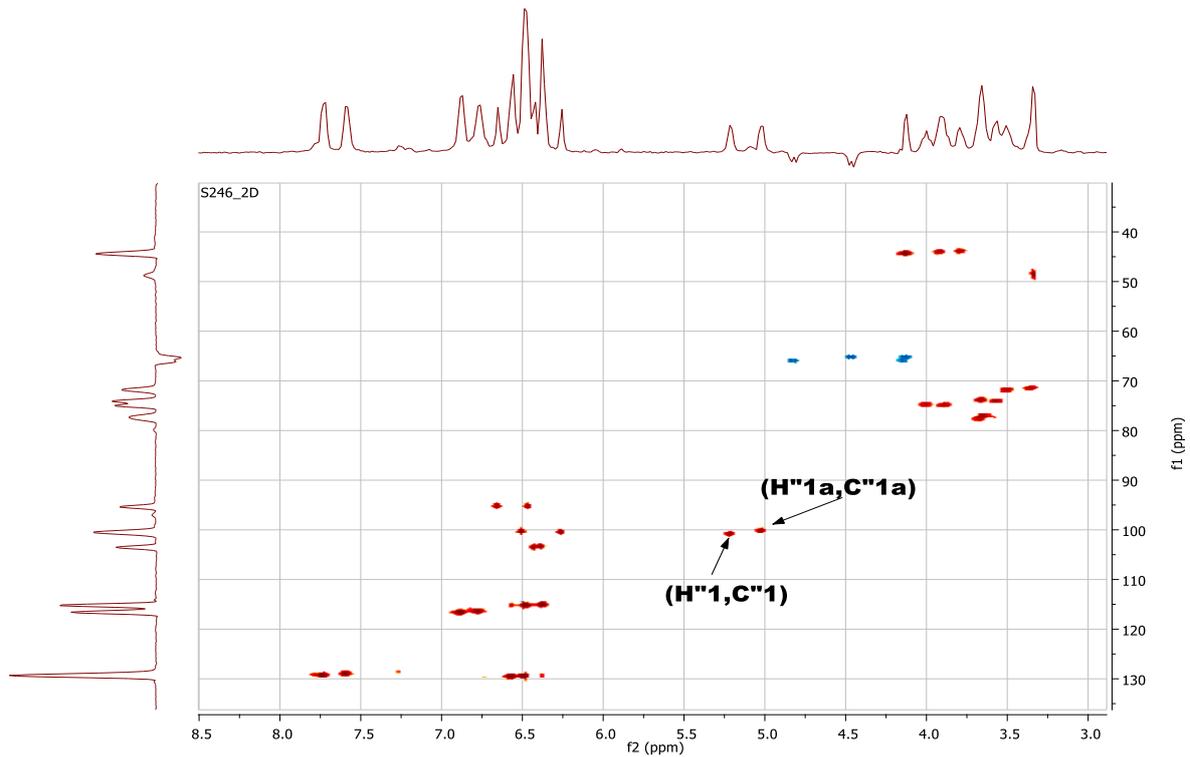


Figure-44 : Spectre hétéronucléaire HSQC étalé du produit Sb-3

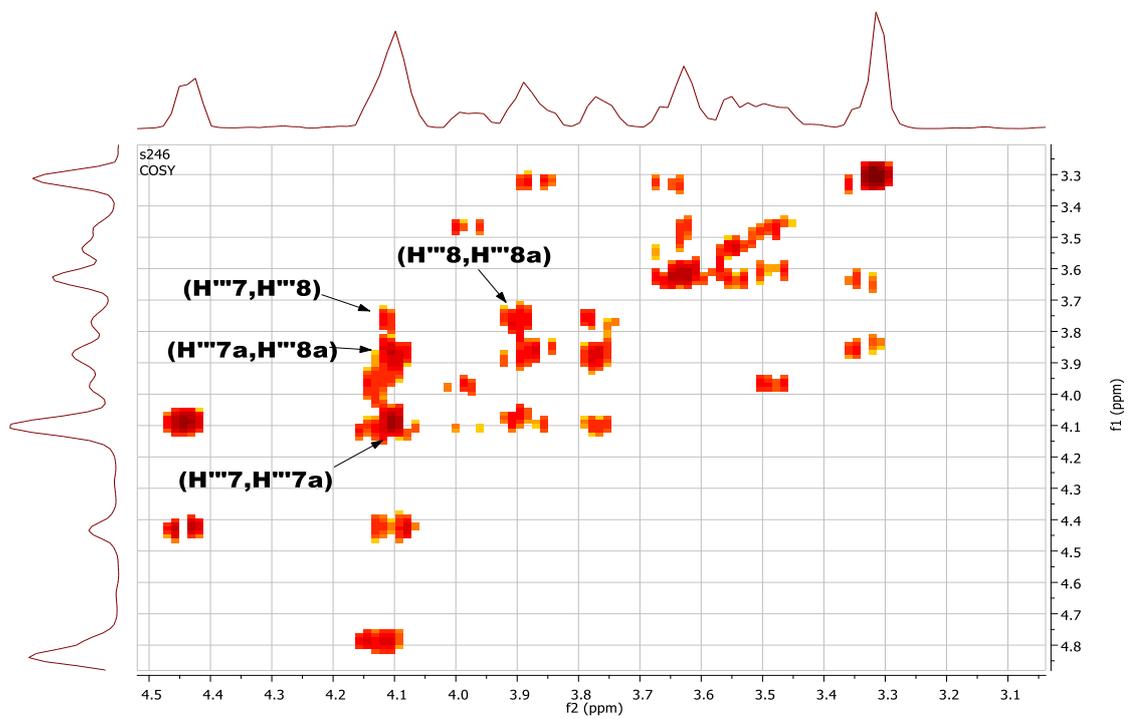


Figure-45 : Spectre homonucléaire Cosy du produit Sb-3

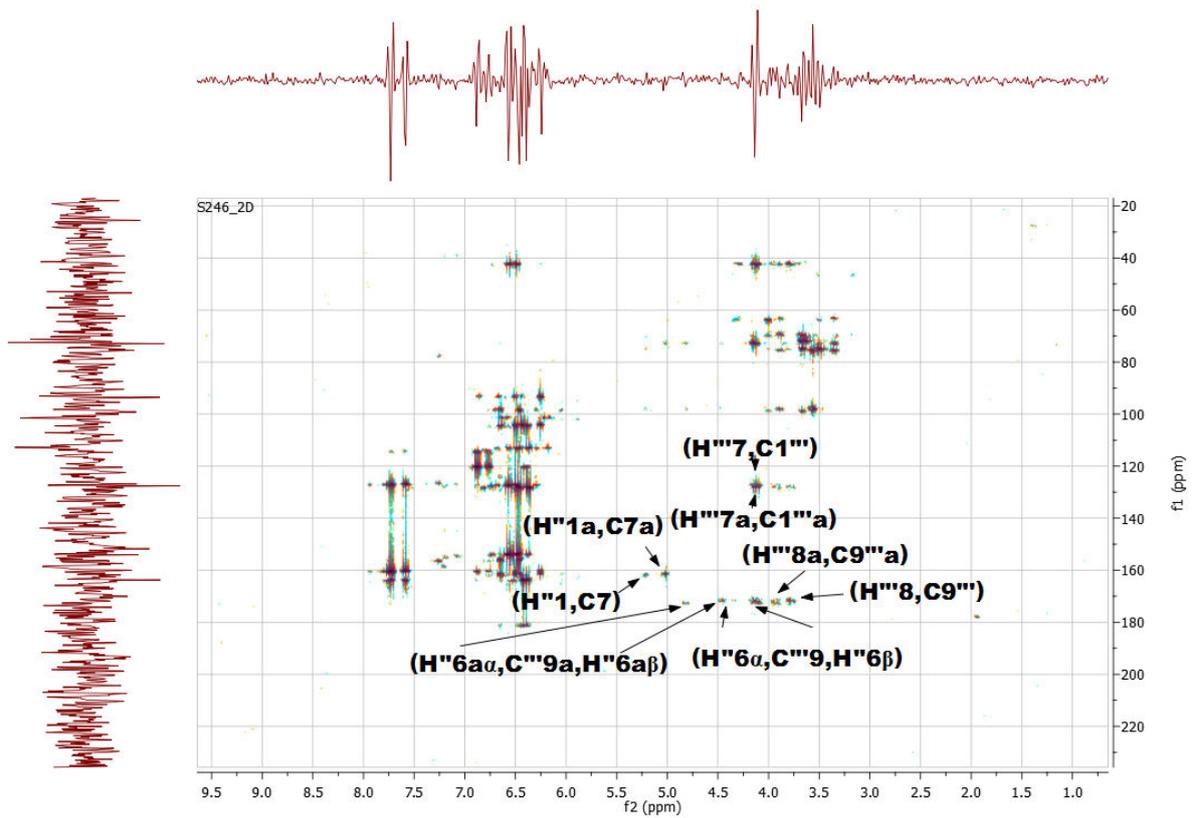


Figure-46 : Spectre hétéronucléaire HMBC étalé du produit Sb-3

III.1.4. Elucidation structurale du produit Sb-4

a) Propriétés physico-chimiques

Formule brute : C₁₅H₁₀O₆

Quantité du produit : 1 mg

Aspect : Poudre jaune

Fluorescence sous lampe UV : violette, caractéristique aux flavones.

b) Données spectroscopiques

L'examen du spectre RMN-¹H enregistré dans CD₃OD à 600 MHz (Fig-47) montre :

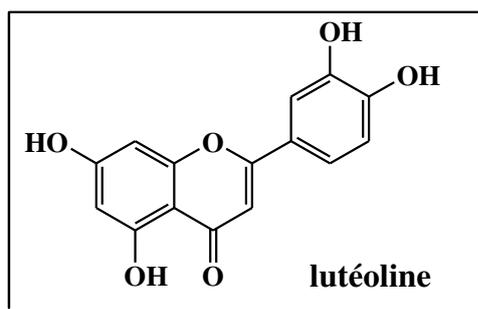
- ✓ Un signal à 6,47 ppm sous forme d'un singulet d'intégration 1H attribuable à H-8.
- ✓ Un singulet à 6,63 ppm d'intégration 1H attribuable à H-3, ce qui permet d'opter pour une structure de type flavone.
- ✓ Un autre signal à 6,21 ppm sous forme de singulet d'intégration 1H attribuable à H-6, confirmant ainsi l'hydroxylation des positions 5 et 7 du cycle A.
- ✓ Le signal qui apparaît à 6,93 ppm ($J = 8,3$ Hz) sous forme d'un doublet d'intégration 1H, est attribuable à H-5'.
- ✓ Le signal à 7,43 ppm ($J = 1,9$ Hz) sous forme d'un doublet d'intégration 2H, est attribuable à H-2' et H-6', confirmant ainsi l'hydroxylation des positions 3' et 4' du cycle B.

L'ensemble de ces données est reporté dans le tableau-26.

Tableau-26 : Données RMN-¹H (600 MHz, CD₃OD) du produit **Sb-4**

δ(ppm)	Intégration	Multiplicité (J (Hz))	Attribution
7.43	2H	<i>d</i> (1,9)	H-2', H-6'
6.93	1H	<i>d</i> (8.3)	H-5'
6.63	1H	<i>s</i>	H-3
6.47	1H	<i>s</i>	H-8
6.21	1H	<i>s</i>	H-6

En comparant ces données avec celle de la littérature [18,19] on a pu établir la structure du produit Sb-4 comme étant le 5, 7, 3', 4'-tétrahydroxyflavone, généralement appelé **Lutéoline**.



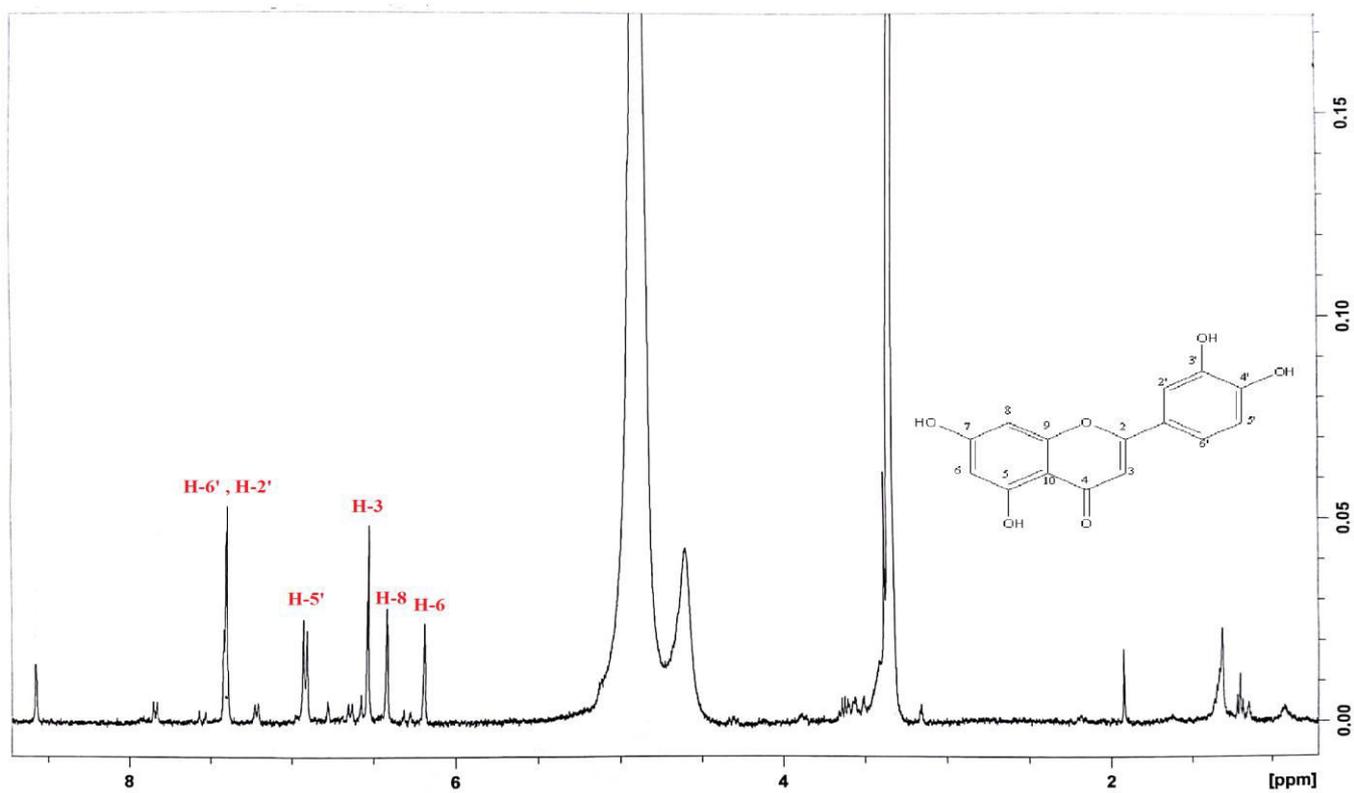


Figure-47 : Spectre RMN- ^1H du produit Sb-4

III.1.5. Elucidation structurale du produit Sb-5

a) Propriétés physico-chimiques

Formule brute : C₁₅H₁₀O₅

Quantité du produit : 1.8 mg

Aspect : Poudre jaune.

Fluorescence sous lampe UV: Noire-violette.

b) Données spectroscopiques

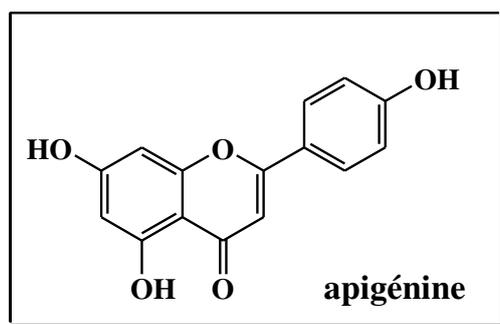
L'examen du spectre RMN-1H enregistré dans DMSO-d₆ à 600 MHz (Fig-48) montre :

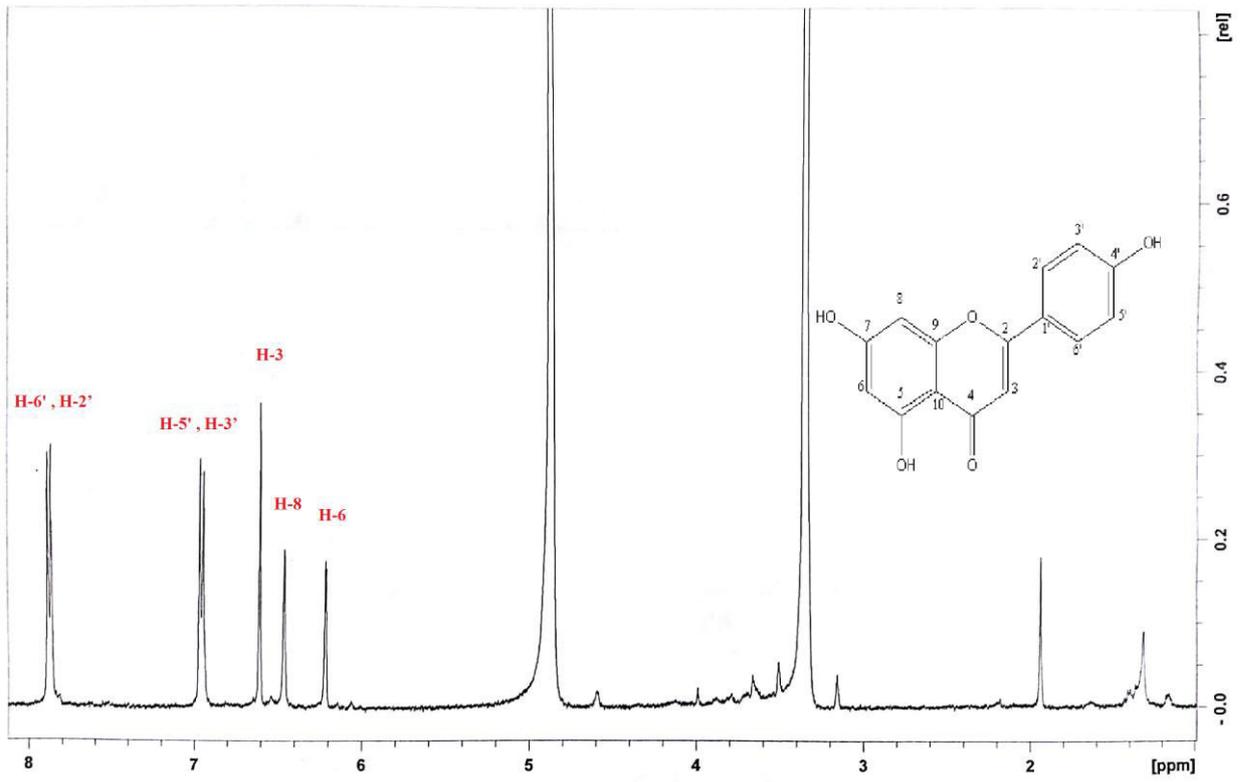
- ✓ Un singulet à 6,60 ppm attribuable à H-3, ce qui confirme la structure d'une flavone.
- ✓ Deux doublets d'intégration 1H chacun avec une constante de couplage de ($J = 2,1\text{Hz}$), le premier à 6,48 ppm, le second à 6, 20 ppm attribuables à H-8 et H-6 respectivement.
- ✓ Un signal à 7,89 ppm qui apparaît sous forme de doublet ($J = 9,0\text{ Hz}$) d'intégration 2H, permet l'attribution de ce signal à H-2' et H-6'.
- ✓ Un signal à 6,95 ppm qui apparaît sous forme de doublet ($J = 9,0\text{ Hz}$) d'intégration 2H, permet l'attribution de ce signal à H-3' et H-5'. L'ensemble de ces données est reporté dans le tableau-27.

Tableau-27 : Données RMN-¹H (600 MHz, CD₃OD) du produit **Sb-5**

δ (ppm)	Intégration	Multiplicité (J (Hz))	Attribution
7.89	2H	<i>d</i> (9.0)	H-2', H-6'
6.95	2H	<i>d</i> (9.0)	H-5', H-3'
6.60	1H	<i>s</i>	H-3
6.48	1H	<i>d</i> (2.1)	H-8
6.20	1H	<i>d</i> (2.1)	H-6

D'après ces données et par comparaison avec la littérature [20] le produit Sb-5 n'est autre que l'Apigénine.





RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- El-Youbi A.E.H., Bousta D., Jamoussi B., Greche H., El Mansouri L., Benjilali J., Soidrou SH. (2012b). Activités antioxydante, apoptotique et antiproliférative de *Tetraenagaetula* (Emb. & Maire) Beier&Thulin et de *Berberishispanica* Boiss. & Reut. originaires du Maroc. *Phytothérapie*, 10, 151-160.
- 2- Barrero A. F., Haidour A., Munoz-Dorado M., Akssira M., Sedqui A., Mansour I. (1998). *Phytochemistry*, 48, 1237-1240.
- 3- Chang-Ho J, Hee R.J, Gwi N.C., Dae-Ok K., Uk L., Ho J.H. (2011). Neuroprotective and anti-oxidant effects of caffeic acid isolated from *Erigeron annuus* leaf. *Chenese medecine*, 25, 1-9.
- 4- Markham K.R. (1982). *Techniques of Flavonoid Identification*. Academic Press. London.
- 5- Rastrelli L., Saturnino P., Schettino O., Dini A. (1995). Studies on the Constituents of *Chenopodium pallidicaule* (Canihua) Seeds. Isolation and Characterization of two new flavonol glycosides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2020-2024.
- 6- Bourama N., Byung-Hun U., Lobstein A., Weniger B., Koné M., Anton R. (2004). Flavonoides de *Tephrosia deflexa* et *Tephrosia albifoliolis*. *Comptes Rendus de Chimie*, 7, 993-996.
- 7- Greenwell M., Rahman P.K.S.M. (2015). Medicinal Plants: Their Use in Anticancer Treatment. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6, 4103-4112.
- 8- Nicolini F., Burmistrova O., Marrero MT., Torres F., Hernández C., Quintana J., Estevez, F. (2014). Induction of G2/M phase arrest and apoptosis by the flavonoid tamarixetin on human leukemia cells. *Molecular carcinogenesis*, 53, 939-950.
- 9- Delgado L., Fernandes I., González-Manzano, S., de Freitas V., Mateus N., Santos-Buelga, C. (2014). Anti-proliferative effects of quercetin and catechin metabolites. *Food & function*, 5, 797-803.
- 10- Srinivasan R., Natarajan D., Shivakumar M.S. (2016). In vitro evaluation of antioxidant, antiproliferative potentials of bioactive extract-cum-rutin compound Isolated from *Memecylonedule* leaves and its molecular docking study. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 6, 43-58.

- 11-** Santos B.L., Silva A.R., Pitanga B.P.S., Sousa C.S., Grangeiro M.S., Fragomeni B.O., Coelho P.L.C., Oliveira M.N., Menezes-Filho N.J., Costa M.F.D., El-Bachá R.D.S., Velozo E.S., Sampaio G.P., Freire S.M., Tardy M., Costa S.L. (2011). Antiproliferative, proapoptotic and morphogenic effects of the flavonoid rutin on human glioblastoma cells. *Food chemistry*, 127, 404-411.
- 12-** Alonso-Castro A.J., Domínguez F., García-Carrancá A. (2013). Rutin exerts antitumor effects on nude mice bearing SW480 tumor. *Archives medical research*, 44, 346-351.
- 13-** Ben-Sghaier M., Pagano A., Mousslim M., Ammari Y., Kovacic H., Luis, J. (2016). Rutin inhibits proliferation, attenuates superoxide production and decreases adhesion and migration of human cancerous cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 84, 1972-1978.
- 14-** Kuntz S., Wenzel U., Daniel H. (1999). Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *European journal of nutrition*, 38, 133-142.
- 15-** Markham K.R., Chari V.M. (1982). Carbon-13 NMR spectroscopy of flavonoids. In: *The Flavonoids: Advances in Research* (Harborne, J.B., Mabry, T.J.). Chapman & Hall, London.
- 16-** Lenherr A., Lahloub M.F., Sticher O. (1984). Three flavonoid glucosides containing acetylated allose from *Stachys recta*. *Phytochemistry*, 23, 2343-2345.
- 17-** Mohamad A.E., Mohamad A.N., Nabel A. M. S. (1995). Stachysetin, a diapiogenin-7-glucoside-p,p'-dihydroxy-truxinate from *Stachys aegyptiaca*. *Phytochemistry*, 40, 1543-1548.
- 18-** Harborne J.B. (1994). *The flavonoids Advances in research since 1986*. Editions Chapman & Hall. Cambridge.
- 19-** Agrawal P.K. (1989). *Carbon-13 NMR of flavonoids*. Central Institute of Medical and Aromatic Plants, India. Edition Elsevier, New York.
- 20-** Mulinacci N., Vincieri F.F., Baldi A., Romani A. (1995). Mass Spectrometric Methodologies in Plant Analysis : the Case of Flavonols in *Sedum telephium L.* *Juice*, 9, 963-967.

Conclusion générale

Conclusion

Conclusion générale

Dans le but de rechercher de nouveaux composés naturels à intérêt thérapeutique, deux plantes algériennes endémiques, *Berberishispanica* (Berberidaceae) et *Stachysbrachyclada* (Lamiaceae) ont été soumis à une investigation phytochimique et biologique.

Nos travaux d'extraction des parties aériennes de l'espèce *B. hispanica*, suivis de séparation chromatographiques successives (CC, CCM), nous ont permis d'isoler et d'identifier trois composés décrit pour la première fois dans l'espèce *hispanica* :

❖ Deux composés obtenus de la phase AcOEt :

1) Un flavonoïde la **tamarixétine**.

2) Un acide phénolique l'**acide caféique**.

❖ Un flavonoïde obtenu de la phase *n*-BuOH :

3) Quercétine-3-O-rutinoside (**Rutine**).

Le dosage quantitatif des polyphénols totaux de l'espèce *B. Hispanica* par le réactif de Folin-Ciocalteu a révélé que l'extrait *n*-BuOH est plus riche en polyphénols que l'extrait AcOEt.

Le dosage quantitatif des flavonoïdes en utilisant le réactif $AlCl_3$ a révélé que les deux extraits AcOEt et *n*-BuOH sont riches en flavonoïdes avec des quantités presque similaires.

Le potentiel antioxydant des extraits acétate d'éthyle et *n*-BuOH de l'espèce *B. hispanica* a été testé par la méthode de piégeage du radical libre DPPH dont l'extrait AcOEt a montré la meilleure activité.

L'activité antibactérienne des extraits AcOEt et *n*-BuOH de *B. hispanica* a été examinée contre une gamme de micro-organismes par la méthode de diffusion sur disque.

Ces deux extraits ont présenté la meilleure activité antibactérienne contre *Klebsiella pneumoniae* et *Acinetobacter oxy*.

L'activité antiproliférative de l'extrait *n*-BuOH, de l'une de ses fractions (F7) ainsi que des deux flavonoïdes (tamarixétine, rutine) de l'espèce *B. hispanica* a été menée sur une lignée de cellules cancéreuses mammaires de type HeLa (carcinome du col de l'utérus humain) en utilisant le système xCELLigence.

Les résultats ont montré que l'extrait *n*-BuOH présente une bonne activité vis-à-vis des cellules HeLa ; quant à la tamarixétine elle a montré un effet antiprolifératif significatif comparé à la rutine qui a montré un faible effet cytotoxique.

Conclusion

D'autre part, l'investigation phytochimique effectuée sur les feuilles de l'espèce *S. brachyclada* a conduit à la séparation de cinq flavonoïdes de la phase méthanolique décrit pour la première fois dans cette espèce:

- 1) **Lutéoline-7-O- β -D-allopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-glucopyranoside**
- 2) **Isoscutellareine-7-O- β -D-allopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-glucopyranoside**
- 3) **Stachysetine**
- 4) **Apigénine**
- 5) **Lutéoline**

Les structures moléculaires des composés isolés ont été élucidées principalement par l'utilisation des techniques spectroscopiques mono et bidimensionnelle : RMN ^1H , RMN ^{13}C , COSY, HSQC et HMBC, par la spectrométrie de masse à haute résolution tout en comparant nos données expérimentales avec celles de la littérature.



BJP

Bangladesh Journal of Pharmacology

Research Article

**Isolation of phytoconstituents and
evaluation of biological potentials of
Berberis hispanica from Algeria**

Isolation of phytoconstituents and evaluation of biological potentials of *Berberis hispanica* from Algeria

Redouane Lemoui¹, Samira Benyahia¹, Labib Noman², Ilham Bencherchar¹, Feyza Oke-Altuntas³, Khellaf Rebbas⁴, Samir Benayache¹, Fadila Benayache¹ and Ibrahim Demirtas²

¹Unité de Recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques. Université Frères Mentouri, Constantine, Route d'Ain El Bey 25000, Constantine, Algérie;

²Laboratory of Plant Research, Department of Chemistry, Faculty of Science, Cankiri Karatekin University, Cankiri, Turkey; ³Department of Biology, Faculty of Science, Gazi University, Ankara 06500, Turkey; ⁴Université de M'Sila, 28000 M'Sila, Algérie.

Article Info

Received: 26 March 2018
Accepted: 4 June 2018
Available Online: 7 June 2018
DOI: 10.3329/bjp.v13i2.36133

Cite this article:

Lemoui R, Benyahia S, Noman L, Bencherchar I, Oke-Altuntas F, Rebbas K, Benayache S, Benayache F, Demirtas I. Isolation of phytoconstituents and evaluation of biological potentials of *Berberis hispanica* species from Algeria. Bangladesh J Pharmacol. 2018; 13: 179-86.

Abstract

The aim of this study was to isolate the phytoconstituents and evaluate the biological activities of *Berberis hispanica*. Three phenolic compounds (tamarixetin, caffeic acid and rutin) were isolated from *B. hispanica*. The structures of the pure compounds were elucidated by spectroscopic and mass-spectrometric analyses, including 1D-, 2D-NMR, and HPLC-TOF/MS. In addition, antimicrobial, anti-oxidant and anti-proliferative effects of the extracts, some fractions and isolated compounds were evaluated. The extracts of *B. hispanica* were evaluated against six bacterial strains and exhibited the highest activity against *Klebsiella pneumonia* (15 mm at 100 mg/mL). Fraction T36 (IC₅₀<5 µg/mL) from the *n*-butanol extract displayed higher radical scavenging activity than butylated hydroxytoluene. The isolated compounds were evaluated for their anti-proliferative effects against human cervical adenocarcinoma (HeLa) cell line by real time cell analyzer assay and tamarixetin exhibited the remarkable effect (IC₅₀<50 µg/mL) on HeLa cells. This study supports the documented medicinal effects of *B. hispanica*.

Introduction

Plant is considered as nature's chemical factory for providing the chemical compounds, and as a source of novel therapeutic compounds (Arora et al., 2003). Several studies have been reported on the antibacterial and anti-oxidant activities of the plant extracts, which may be due to the presence of the natural phenolic compounds (Silva et al., 2010; Prakash et al., 2009). Phenolic compounds play important roles in plants and disease resistance (Servili and Montedoro, 2002; Silva et al., 2006).

The genus *Berberis* (Berberidaceae) includes about 500 species distributed largely in Europe, Northeastern

region of the United States, Asia and Africa (Harish, 2012; Mokhber-Dezfuli et al., 2014). Many studies have been reported on the medicinal properties of this genus. It has been employed in cholecystitis, cholelithiasis, jaundice, dysentery, leishmaniasis, malaria, gall stones, hypertension, ischemic heart disease, cardiac arrhythmias and cardiomyopathies (Mokhber-Dezfuli et al., 2014). Different types of chemical constituents were found in the *B. jaeschkeana* and *B. thunbergii* species such as alkaloids, glycosides, flavonoids, steroids, saponins reducing sugars and terpenoids (Hussain et al., 2016; Alamzeb et al., 2013).

The plant *B. hispanica* is a deciduous thorny shrub. The infusion of the stem bark of this plant has been used in



traditional medicine to treat the gastro-intestinal infections, inflammation, liver and biliary disorders (El-Youbi et al., 2012a; Bellakhdar, 1997). But, a few studies have been reported on its biological activities and phytochemical analysis (El-Youbi et al., 2012b).

Therefore, this study was undertaken in order to investigate the biological activities of the extracts from *B. hispanica* by various methods, along with to isolate and identify its secondary metabolites, and to evaluate the antiproliferative effect of the isolated phenolic compounds on the growth of HeLa cell lines by xCELLigence method.

Materials and Methods

General experimental procedure

NMR measurements were performed on a Bruker Avance III spectrometer in DMSO- d_6 , $CDCl_3$ or CD_3OD (1H -NMR 600 MHz; ^{13}C -NMR 150 MHz). Chemical shifts were given in ppm with tetramethylsilane (TMS) as an internal standard. HPLC-TOF/MS spectrum was recorded in the negative ion mode on an Agilent 6210 spectrometer. ESI-MS analyses were performed in the positive ion mode within the m/z range 100–2000, using a LTQ XL Linear Ion Trap 2D instrument (Thermo Scientific, USA) equipped with Xcalibur® software (Thermo Scientific, USA). Column chromatography was carried out on silica gel (Merck, 60–230 mesh) in glass columns in open atmosphere pressure. For thin-layer chromatography, silica gel F254 (Merck) precoated plates were used. Compounds were detected under UV (254 nm) and sprayed with 5% ceric sulfate H_2SO_4 reagent, followed by heating at 105°C for 1–2 min.

Collection and identification of plant material

The aerial parts of *B. hispanica* were collected from the Cherea Mountain in July 2009 and was identified by Prof. Rebbas Khelaf, Department of Botany, Faculty of Science, M'Sila University, Algeria.

Extraction of plant material

The aerial parts of *B. hispanica* (963 g) were macerated at room temperature with ethanol–water (7:3, v/v) for three days to obtain the crude extract (87 g). The crude extract of ethanol–water (7:3, v/v) was dissolved in the distilled water (1 L), and first extracted with petroleum ether to yield (4.3 g), after that the aqueous was extracted with chloroform to obtain (2.3 g), then with ethyl acetate (6.1 g). Finally with *n*-butanol to yield (30.6 g). The ethyl acetate extract (5 g) was subjected on a silica gel column eluted with acetone–chloroform (1:3, v/v) to obtain 56 fractions (S), the precipitate from fraction S8 was purified by TLC eluted with acetone–chloroform (1:4, v/v) to afford compound **1** (tamarixetin). Fraction S24 was precipitated and purified by the TLC eluted with acetone–chloroform (2:4, v/v) to

afford the compound **2** (caffeic acid). The *n*-butanol extract (25 g) was then loaded on a silica gel column. The column was eluted with hexane–dichloromethane (100:0:0:100), and dichloromethane–ethyl acetate (100:0:0:100), after that by ethyl acetate–methanol (100:0:0:100) solvent systems, which yielded 69 fractions (T), the fractions T45, T46 and T47 were combined (10 g), then loaded to a silica gel column, and eluted with chloroform–methanol (100:0:0:100) solvent systems, which yielded 25 fractions (X). Fraction X18 was purified by the TLC eluted with ethyl acetate–methanol–water (7.5:1:1, v/v/v) to afford compound **3** (rutin).

Chemicals used in the biological tests

Anhydrous sodium carbonate, Folin-Ciocalteu's phenol reagent, methanol were purchased from the Merck (Germany). 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), gallic acid, 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol (BHT), dimethyl sulfoxide (DMSO), trypsin-EDTA, fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin and Dulbecco's modified Eagle's medium-high glucose (DMEM-HG) were purchased from Sigma-Aldrich GmbH (Germany). All other chemicals were analytical grade and obtained from either Sigma or Merck.

Determination of anti-oxidant activity

Radical scavenging activity was determined according to the method described elsewhere (Blois, 1958). The solution of DPPH in methanol (0.004%) was prepared fresh daily and 1 mL of this solution in methanol was mixed with 1 mL of sample solution of varying concentrations. Each mixture was kept in the dark for 30 min at room temperature and the absorbance was measured at 517 nm against a blank on a UV visible light spectrophotometer (Rayleigh, UV-2601). BHT was used as a positive control. Scavenging of DPPH radical was calculated according to the formula:

$$\text{Radical scavenging \%} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

Determination of total phenolic content

Total phenolic contents of the samples were analysed according to the Folin–Ciocalteu method (Singleton and Rossi, 1965). Briefly, 0.1 mL of sample solution, 0.2 mL of 50% Folin–Ciocalteu's reagent and 1 mL of 2% Na_2CO_3 was mixed in a tube. Then, the mixture was incubated at room temperature for 45 min. The absorbance of each mixture was measured at 760 nm. The same procedure was also applied to the standard solutions of gallic acid. Total phenolic contents were expressed as μg gallic acid equivalents per mg of the samples.

Determination of total flavonoids content

The total flavonoid content was determined by the method of aluminum trichloride using quercetin as a reference (Singleton et al., 1965). 1 mL of ethyl acetate and *n*-butanol extracts of aerial parts (1 mg/mL) was

mixed with 1 mL of 2% methanolic aluminum trichloride solution. The absorbance at 420 nm was read after 1 hour. All determinations were realized in couple. The absorption of quercetin standard solutions (15.6 to 1000 µg/mL) was measured in the same conditions. The results are expressed as equivalent quercetin µQE/mg of extract.

Determination of antibacterial activity

The following strains of bacteria were used as test microorganisms: *Acinetobacter oxy*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* ATTC 700603 and *Pseudomonas aeruginosa* ATTC 27853. These microorganisms were obtained from the Microbiology Laboratory, Faculty of Medicine, Badji Mokhtar University.

The dried extract was dissolved in sterile dimethyl sulfoxide (DMSO). Disc diffusion method was used to investigate the antimicrobial activity of the extracts (Toudert et al., 2009; Nascimento et al., 2000). The agar gel (MHA) was treated with the appropriate microorganism suspension (each microorganism was inoculated at a concentration of 10⁶ colony forming units per mL), and the antimicrobial activities of the extracts that penetrate into the agar by diffusion was measured. The assays were based on the use of sterile discs filter paper (6 mm diameter) impregnated with 20 µL of the extract solution to be examined and allowed to dry at room temperature. A sterile disc impregnated with DMSO was used as a negative control. After incubation for 24 hours at 37°C, all plates were observed for zone of growth inhibition and the diameter of these zones was measured in millimeters. All experiments were performed in triplicates.

Determination of antiproliferative activity

Antiproliferative effects of the samples (rutin, tamarixetin, fraction T45-47 and *n*-butanol extract) were investigated on HeLa cell lines by xCELLigence real-time cell analyzer-single plate (RTCA-SP) instrument (Roche Applied Science, Switzerland) (Oke-Altuntas et al., 2016). Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with 10% fetal bovine serum and 2% penicillin-streptomycin was used as the cell culture medium. First, 50 µL of the medium was added to each of a 96-well E-plate and kept in the hood for 15 min and then in an incubator for 15 min to allow the electrodes to equilibrate with the culture medium. The E-plate was inserted in the RTCA station of the incubator and a background measurement was taken, 100 µL HeLa cell suspensions were then added to the wells to obtain a 2.5 × 10⁴ cell/well concentration in each well except three. 100 µL of medium was added to these three wells instead of the cell suspension. After 30 min, the E-plate was inserted in the RTCA station and a second set of measurements was initiated for 80 min. After this step, solutions of the samples that were prepared with

DMSO (final concentration of DMSO was less than 1% in each of the wells) and medium were added to the wells to obtain final concentrations in each well, respectively. Upon completion, the final volume of the wells was 200 µL including the medium. After this, the main measurement period of 48 hours was initiated in 10 min intervals in triplicate.

Statistical analysis

The results were expressed as means ± standard deviations (SD). Statistical analyses were performed using the SPSS 11.5 (USA). Differences among means were done by analysis of variance (ANOVA). Pearson's correlation analysis was used for comparisons of total phenolic contents and the anti-oxidant activity of the fractions.

Results

Identification of isolated compounds

All the compounds shown in Figure 1 were isolated for the first time from this plant, and the spectral data led to identification of two flavonoids and phenolic acid:

Tamarixetin (1): yellow powder. ¹H-NMR (DMSO-d₆, 600 MHz): 3.82 (3H, s, 4'-OCH₃), 6.17 (1H, d, J = 1.76 Hz, H-6), 6.45 (1H, d, J = 1.76 Hz, H-8), 6.92 (1H, d, J = 8.80 Hz, H-5'), 7.67 (1H, dd, J = 8.80-2.35 Hz, H-6'), 7.73 (1H, d, J = 2.35 Hz, H-2'), 9.40 (1H, s, 3'-OH), 9.72 (1H, s, 3-OH), 10.76 (1H, s, 7-OH), 12.45 (1H, s, 5-OH); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 150 MHz): 56.26 (4'-OCH₃), 94.09 (C-8), 98.69 (C-6), 103.36 (C-10), 112.25 (C-2'), 116.06 (C-5'), 122.39 (C-1'), 122.24 (C-6'), 132.00 (C-3), 146.96 (C-2), 147.80 (C-3'), 149.25 (C-4'), 156.65 (C-9), 161.24 (C-5), 164.52 (C-7), 175.05 (C-4). Molecular formula C₁₆H₁₂O₇. (Saewan et al., 2011).

Caffeic acid (2): yellow powder. ¹H-NMR (DMSO-d₆, 600 MHz): 6.16 (1H, d, J = 15.85 Hz, H-8), 6.74 (1H, d, J = 8.22 Hz, H-5), 6.94 (1H, dd, J = 8.22-2.35 Hz, H-6), 7.00 (1H, d, J = 2.35 Hz, H-2), 7.40 (1H, d, J = 15.85 Hz, H-7), 9.10-9.50 (3H, s, 3, 4, 9-OH); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 150 MHz): 115.07 (C-2), 115.57 (C-8), 116.18 (C-5), 121.55 (C-6), 126.14 (C-1), 144.98 (C-7), 145.99 (C-3), 148.56 (C-4), 168.28 (C-9). Molecular formula C₉H₈O₄ (Bhatt, 2011).

Rutin (3): yellow powder. HPLC-TOF/MS [M-H]⁻ at m/z 609, ¹H-NMR (DMSO-d₆, 600 MHz): 0.98 (3H, d, J = 6.46 Hz, H-6'''), 3.08 (1H, m, H-4'''), 3.25 (1H, m, H-5'''), 3.30 (1H, dd, J = 9.39-2.93 Hz, H-3'''), 3.40 (1H, dd, J = 2.93-1.76 Hz, H-2'''), 4.37 (1H, d, J = 1.76 Hz, H-1'''), 3.03-3.28 (3H, m, H-2'', H-3'', H-4'', H-5''), 3.18, 3.27 (1H, m, H_α-6''), 3.68 (1H, d, J = 10.56 Hz, H_β-6''), 5.29 (1H, d, J = 7.63 Hz, H-1''), 6.13 (1H, d, J = 1.76 Hz, H-6), 6.32 (1H, d, J = 1.76 Hz, H-8), 6.80 (1H, d, J = 8.22 Hz, H-5'), 7.49 (1H, d, J = 1.76 Hz, H-2'), 7.52 (1H, dd, J = 8.22-1.76 Hz, H-6'); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 150 MHz): 18.18 (C-6'''), 67.39 (C-6''), 68.69 (C-5'''), 70.73 (C-4'''), 70.79 (C-2'''), 70.99 (C-3'''),

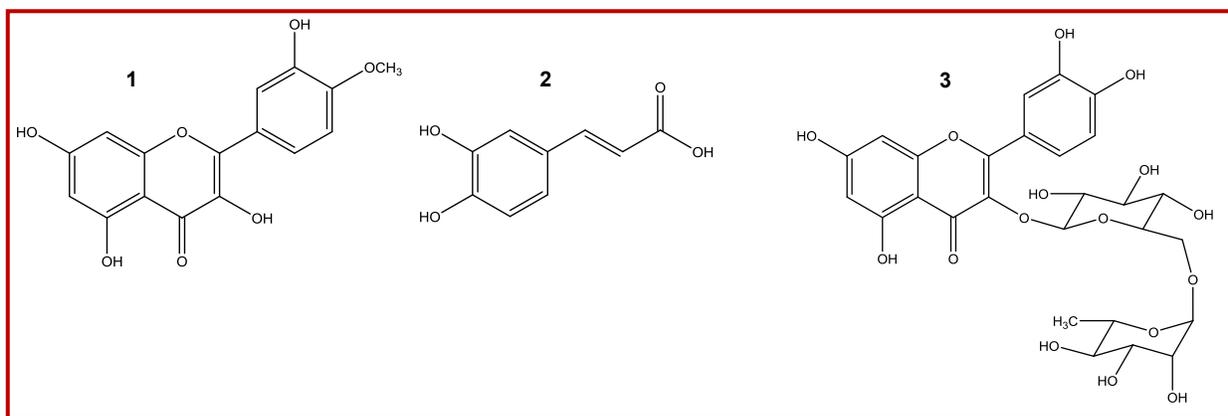


Figure 1: The structures of the isolated compounds

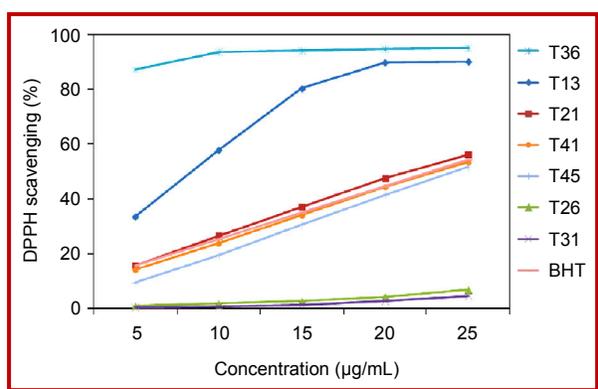
Table I			
Radical scavenging activity and total phenolic/flavonoids contents of the extracts			
Extract	DPPH scavenging IC ₅₀ (μg/mL)	Total phenolic content (μg/mg)	Total flavonoids content (μg/mg)
Ethyl acetate	79.8	384.9 ± 1.5	115.6 ± 1.8
<i>n</i> -Butanol	136.2	500.8 ± 2.3	126.0 ± 2.0
Ascorbic acid	62.3	NS	NS

72.35 (C-4'''), 74.05 (C-2''), 76.29 (C-3'''), 76.96 (C-5''), 94.32 (C-8), 99.69 (C-6), 101.23 (C-1'''), 101.97 (C-1''), 103.54 (C-10), 115.80 (C-5'), 116.61 (C-2'), 121.23 (C-1'), 121.98 (C-6'), 133.58 (C-3), 145.51 (C-3'), 149.52 (C-4'), 156.79 (C-2), 157.00 (C-9), 161.49 (C-5), 166.50 (C-7), 177.44 (C-4). Molecular formula is C₂₇H₃₀O₁₆. Spectral data were compared with published literature (Sintayehu et al., 2016).

Anti-oxidant activity

Ethyl acetate extract (IC₅₀ = 79.8 μg/mL) showed higher radical scavenging effect than the *n*-butanol extract (IC₅₀ = 136.2 μg/mL) (Table I). The highest free radical scavenging was observed for fraction T36 (IC₅₀ < 5 μg/mL) and this fraction exhibited higher DPPH scavenging activity than the synthetic anti-oxidant BHT (IC₅₀ = 23.1 ± 0.2 μg/mL) (Figure 2).

On the other hand, total phenolic and flavonoid contents of the extracts were also determined. *n*-Butanol extract contained higher phenolic and flavonoid contents than ethyl acetate extract (Table I). Among the fractions, the highest total phenolic content was found in fraction T36 (442.5 μg) isolated from the *n*-butanol extract. The contents of total phenolic compounds in the tested fractions ranged between 14.3 to 442.5 μg/mg (Table II). A significant correlation (R = 0.945, p < 0.01) was observed between the total phenolic content and DPPH scavenging activity of the fractions indicating

Figure 2: DPPH scavenging activity of the fractions from *n*-butanol extract at tested concentrations

phenolic compounds were primarily responsible for this activity.

Antimicrobial activity

The results of the antibacterial activity of the crude *n*-butanol and ethyl acetate extracts of *B. hispanica* are

Table II		
Radical scavenging activity and total phenolics contents of the fractions*		
Fractions	DPPH scavenging IC ₅₀ (μg/mL)	Total phenolic content μg GAE/mg extract
T21	23.8 ± 0.2 ^b	178.1 ± 0.9 ^d
T41	22.8 ± 0.5 ^b	214.5 ± 0.9 ^b
T45- 47	24.1 ± 0.5 ^b	169.5 ± 0.5 ^e
T36	<5	442.5 ± 0.6 ^a
T26	98.5 ± 0.5 ^d	44.5 ± 0.8 ^f
T31	>100	14.3 ± 0.7 ^g
BHT	23.1 ± 0.1 ^b	ND
EDTA	ND	ND

*Values represent averages ± standard deviations for triplicate experiments. Values in the same column with different superscripts are significantly (p < 0.05) different, ND: Not determined

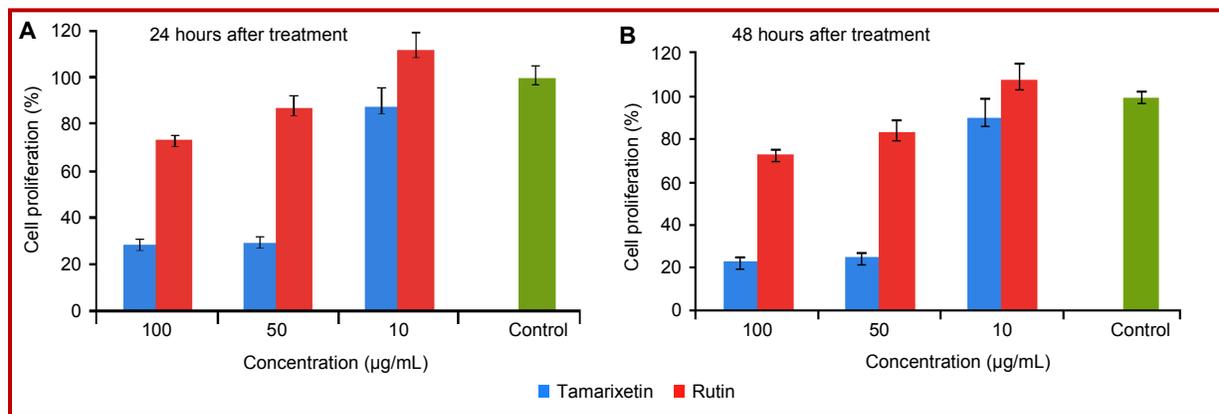


Figure 4: Cell proliferation (%) for 24 and 48 hours after the sample treatment at tested concentrations

were elucidated as tamarixetin (1), caffeic acid (2) and rutin (3). In addition, anti-oxidant, antimicrobial and anti-proliferative activities of the samples from *B. hispanica* were evaluated. The extracts and fractions showed remarkable radical scavenging activity, especially fraction T36 exhibited higher radical scavenging effect than synthetic anti-oxidant BHT. To the best of our knowledge, there is only one study on *B. hispanica* about its anti-oxidant activity in the literature. Similar to our study, in the study of El-Youbi et al. (2012b), the aqueous extract of *B. hispanica* exhibited higher radical scavenging effect than BHT.

Berberis species is known to contain a variety of phenolic compounds which exhibit antibacterial potency (Birdsall and Kelly, 1997; Meenakshi et al., 2007). Both of the extracts have shown occurrence of phenolic and flavonoids content and that antibacterial actions may be due to their compounds content or could be belongs to the isolated compounds (tamarixetin and caffeic acid) from ethyl acetate extract of *B. hispanica*, which had been reported to inhibit the growth of different and same bacterial strains in this study (Sultanova et al., 2001; Alves et al., 2013), along with the presence of rutin compound in the *n*-butanol extract could be concluded that the antibacterial activity of this extract belongs to rutin (Basile et al., 2000). The result supports previously reported studies on antimicrobial activity of ethanol and water extracts from the root bark of *B. hispanica* against *M. smegmatis*, *M. aurum* and *S. aureus* activity (Amina et al., 2014; Ibtissem et al., 2017). The antibacterial results and occurrence of flavonoids and phenolic acid in crude extracts of *B. hispanica* are interest to discover new active plant compounds, and lead us to isolate more compounds for evaluate the antimicrobial activity of these extracts.

In this study, tested compounds inhibited the proliferation of HeLa cells in a dose- and time-dependent manner. Polyphenolic compounds from natural sources are currently of interest due to their possible anti-cancer activities (Greenwell et al., 2014). However, anti-proliferative effects of tamarixetin on human tumor

cells have a few assessed. In the present study, we examined the effects of tamarixetin on the growth of human cervical cell line and found that it displays significant anti-proliferative effect. Similar to our study, Nicolini et al. (2013) investigated the effects of tamarixetin on viability of some human tumor cell lines and found that it was cytotoxic against leukemia cells and in particular P-glycoprotein-overexpressing K562/ADR cells. They indicated that tamarixetin inhibited proliferation in a concentration- and time-dependent manner, induced apoptosis and blocked cell cycle progression at G2-M phase. Delgado et al. (2014) reported that quercetin and its methylated metabolites including tamarixetin had significant anti-proliferative activity against breast (MCF-7), colon (Caco-2) and pancreas (BxPC-3) cancer cell lines.

On the other hand, in this study, rutin isolated from *B. hispanica* exhibited time and dose-dependent activity on HeLa cells. Some studies have been reported that rutin exhibited a dose- and time-dependent effect on U-937 and HT-60 (Srinivasan et al., 2016) and glistoma (Santos et al., 2011) cell lines. Rutin has also shown cytotoxic effects on several human cancer cells (Alonso-castro et al., 2011; ben-Sghaer et al., 2016). However, Kuntz et al. (1999) found that the flavonoids with glycosylated hydroxyl group (rutin, naringin) were not effective on human colon cancer cell lines. The remarkable anti-proliferative activity by *B. hispanica* extract and fraction against human cervical cell line in our study might be due to the presence of anti-cancerous compounds, need to be isolated and identified for more investigation.

Conclusion

Tamarixetin, rutin and caffeic acid were isolated from *B. hispanica*. Tamarixetin exhibited a powerful cytotoxic effect on HeLa cells. Moreover, the crude extracts of *B. hispanica* exhibited remarkable antibacterial and anti-oxidant activities. This study supports the documented medicinal effects of *B. hispanica* and opens up the possibilities of pharmaceutical applications.

Conflict of Interest

All authors have completed the ICMJE uniform disclosure form and declare no support from any organization for the submitted work.

Acknowledgement

This study was supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique (MESRES-Alger, Algeria); Turkish State Planning Organization [grant number DPT2010K120720]; and Cankiri Karatekin University. The authors also acknowledge the help of Dr. Merve Banu Koc in performing the xCELLigence studies.

References

- Alamzeb M, Khan MR, Ali S, Shah SQ, Rashid M. Antimicrobial properties of extracts and compounds isolated from *Berberis jaeschkeana*. *Bangladesh J Pharmacol*. 2013; 8: 107-09.
- Alonso-Castro AJ, Domínguez F, García-Carrancá A. Rutin exerts antitumor effects on nude mice bearing SW480 tumor. *Arch Med Res*. 2013; 44: 346-51.
- Alves MJ, Ferreira ICFR, Froufe HJC, Abreu RMV, Martins A, Pintado M. Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies. *J Appl Microbiol*. 2013; 115: 346-57.
- Amina CH, Abdellatif H, Suzanna D, Saad I, Mohammed I. *In vitro* evaluation of the antimycobacterial activity and fractionation of *Berberis hispanica* root bark. *J Pure Appl Microbiol*. 2014; 8: 917-25.
- Arora S, Kaur K, Kaur S. Indian medicinal plants as a reservoir of protective phytochemicals, *Teratog Carcinog Mutagen*. 2003; 23: 295-300.
- Basile A, Sorbo S, Giordano S, Ricciardi L, Ferrara S, Montesano D, Cobianchi RC, Vuotto ML, Ferraro L. Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativa* leaves. *Fitoterapia* 2000; 71: 110-16.
- Bellakhdar J. Moroccan traditional medicine, In: Ibis Press (eds), France, 1997, p 112.
- Ben-Sghaier M, Pagano A, Mousslim M, Ammari Y, Kovacic H, Luis J. Rutin inhibits proliferation, attenuates superoxide production and decreases adhesion and migration of human cancerous cells. *Biomed Pharmacother*. 2016; 84: 1972-78.
- Birdsall TC, Kelly GS. Berberine: Therapeutic potential of an alkaloid found in several medicinal plants. *Altern Med Rev*. 1997; 2: 94-103.
- Blois MS. Anti-oxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 1958; 181: 1199-200.
- Delgado L, Fernandes I, González-Manzano S, de Freitas V, Mateus N, Santos-Buelga C. Anti-proliferative effects of quercetin and catechin metabolites. *Food Function*. 2014; 5: 797-803.
- El-Youbi AEH, Ouahidi I, Aarab L. *In vitro* immunomodulation effects of the aqueous and protein extracts of *Berberis hispanica* Boiss and Reut. (Family Berberidaceae). *J Med Plant Res*. 2012a; 6: 4239-46.
- El-Youbi AEH, Bousta D, Jamoussi B, Greche H, El Mansouri L, Benjilali J, Soidrou SH. Activités anti-oxydante, apoptotique et anti-proliférative de *Tetraena gaetula* (Emb. & Maire) Beier & Thulin et de *Berberis hispanica* Boiss. & Reut. originaires du Maroc. *Phytothérapie* 2012b; 10: 151-60.
- Greenwell M, Rahman PKSM. Medicinal Plants: Their use in anti-cancer treatment. *Int J Pharm Sci Res*. 2015; 6: 4103-12.
- Harish CA. Genus *Berberis* and Berberine HPLC: An overview. *J Biol Active Prod Nat*. 2012; 2: 256-64.
- Hussain N, Adhikari A, Ahmad MS, Wahab A, Ali M, Choudhary MI. Two new prenylated flavonoids from the roots of *Berberis thunbergii* DC. *Nat Prod Res*. 2016; 31: 785-90.
- Ibtissem A, Smain C, Youcef HP, Walter L. Isolation of berberinetannate using a chromatography activity-guided fractionation from root bark of *Berberis hispanica* Boiss. & Reut. *J Liq Chromatogr Relat Technol*. 2017; 40: 894-99.
- Kuntz S, Wenzel U, Daniel H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *Eur J Nutr*. 1999; 38: 133-42.
- Meenakshi S, Sharad S, Rawat AKS. Antimicrobial activities of Indian *Berberis* species. *Fitoterapia* 2007; 78: 574-76.
- Mokhber-Dezfuli N, Saeidnia S, Gohari AR, Kurepaz-Mahmoodabadi M. Phytochemistry and pharmacology of *Berberis* species. *Pharmacogn Rev*. 2014; 8: 8-15.
- Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemical on antibiotic resistant bacteria. *Brazilian J Microbiol*. 2000; 31: 247-56.
- Nicolini F, Burmistrova O, Marrero MT, Torres F, Hernández C, Quintana J, Estevez F. Induction of G2/M phase arrest and apoptosis by the flavonoid tamarixetin on human leukemia cells. *Mol Carcinog*. 2014; 53: 939-50.
- Oke-Altuntas F, Demirtas I, Tufekci AR, Koldas S, Gul F, Behcet L, Gecibesler HI. Inhibitory effects of the active components isolated from *Satureja boissieri* Hausskn. Ex Boiss. on human cervical cancer cell line. *J Food Biochem*. 2016; 40: 499-506.
- Prakash V, Mishra PK, Mishra M. Screening of medicinal plant extracts for anti-oxidant activity. *J Med Plant Res*. 2009; 3: 608-12.
- Santos BL, Silva AR, Pitanga BPS, Sousa CS, Grangeiro MS, Fragomeni BO, Coelho PLC, Oliveira MN, Menezes-Filho NJ, Costa MFD, El-Bachá RDS, Velozo ES, Sampaio GP, Freire SM, Tardy M, Costa SL. Antiproliferative, proapoptotic and morphogenic effects of the flavonoid rutin on human glioblastoma cells. *Food Chem*. 2011; 127: 404-11.
- Servili M, Montedoro G. Contribution of phenolic compounds in virgin olive oil quality. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2002; 104: 602-13.
- Silva NCC, Fernandes Júnior A. Biological properties of

- medicinal plants: A review of their antimicrobial activity. *J Venom Anim Toxins Tropical Dis.* 2003; 16: 402-13.
- Silva S, Gomes L, Leitão F, Coelho AV, Boas LV. Phenolic compounds and anti-oxidant activity of *Olea europaea* L. fruits and leaves. *Food Sci Tech Int.* 2006; 12: 385-96.
- Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphormolybdic-phosphotungstic acid reagent. *Am J Enol Vitic.* 1965; 16: 144-58.
- Srinivasan R, Natarajan D, Shivakumar MS. *In vitro* evaluation of anti-oxidant, antiproliferative potentials of bioactive extract-cum-rutin compound isolated from *Memecylon edule* leaves and its molecular docking study. *J Biol Active Prod Nat.* 2016; 6: 43-58.
- Sultanova N, Makhmoor T, Abilov ZA, Parween Z, Omurkamzinova VB, Rahman AU, Choudhary MI. Anti-oxidant and antimicrobial activities of *Tamarix ramosissima*. *J Ethnopharmacol.* 2001; 78: 201-05.
- Toudert N, Djilani SE, Djilani A. Antimicrobial activity of flavonoids of *Ampelodesma mauritanica*. *American-Eurasian J Sustainable Agric.* 2009; 3: 227-28.
- Yamaguchi F, Ariga T, Yoshimura Y, Nakazawa H. Antioxidative and anti-glycation activity of garcinol from *Garcinia indica* fruit rind. *J Agric Food Chem.* 2000; 48: 180-85.
-

Author Info

Ibrahim Demirtas (Principal contact)
e-mail: ibdemirtas@gmail.com

Summary

The present work focuses on a phytochemical and a biological study of two endemic Algerian species, *Berberis hispanica* from the family Berberidaceae and *Stachys brachyclada* from the family Lamiaceae.

The phytochemical study of the ethyl acetate and *n*-butanol extracts of the aerial parts of the *Berberis hispanica* species has led to the isolation and identification of a phenolic acid, the first isolated caffeic acid in this species and two flavonoids:

- ✓ Tamarixetin;
- ✓ Rutin.

The structural identification has been performed using spectroscopic analysis techniques (MS, ¹H NMR, ¹³C NMR), supported by a comparison with literature data.

As for the biological study of AcOEt extracts, *n*-BuOH and flavonoid tamarixetin of this species, it has given interesting results.

The *n*-BuOH extract has shown a better richness in polyphenols and flavonoids compared to the AcOEt extract.

The two extracts; AcOEt and *n*-BuOH have demonstrated a very good antibacterial activity with respect to the *Klebsiella pneumonia* strain (15 mm to 100 mg/ml).

As for the antioxidant activity of these two extracts, it has been evaluated by the free radical scavenging method (DPPH) and has shown that the AcOEt extract (IC₅₀ = 79,8 μg/mL) has a better activity compared with the *n*-BuOH extract (IC₅₀ = 136, 2 μg/ml).

In addition, the antiproliferative activity of the flavonoid tamarixetin indicates a good response against HeLa cells (carcinoma of the human uterine cervix).

Concerning the phytochemical study of the MeOH extract of the aerial parts of the second *Stachysbrachyclada* species, it has led to the separation and purification of five flavonoids isolated for the first time in the species, namely:

- ✓ Stachysetin ;
- ✓ Lutéoline-7-O-β-D-allopyranosyl-(1→2)-glucopyranoside ;
- ✓ Isoscutellareine-7-O-β-D-allopyranosyl-(1→2) glucopyranoside ;
- ✓ Apigénine ;
- ✓ Lutéoline.

Their identification has been carried out by combining our spectroscopic data (MS, 1D and 2D NMR) with those of the literature.

ملخص

ركز هذا العمل على دراسة الخصائص الكيميائية والبيولوجية لاثنتين من الأنواع النباتية المحلية الجزائرية و هما *Berberis hispanica* التي تنتمي إلى عائلة Berberidaceae و *Stachys brachyclada* التي تنتمي إلى عائلة Lamiaceae .

أظهرت الدراسة الكيميائية على مستخلصات خلات الإيثيل (AcOEt) و البوتانول (*n*-BuOH) للجزء الهوائي للنوع *Berberis hispanica* وجود حامض الكافيين (حمض فينولي) حيث تعد هذه أول مرة يتم فيها عزل هذا الحمض من هذه النبتة و اثنتين من مركبات الفلافونويد وهما tamarixetin و rutine ، حيث تم الكشف عن البنية الجزيئية لمختلف المركبات باستخدام تقنيات التحليل الطيفي (MS، 1H NMR، 13C NMR) و تمت مقارنة البيانات المحصل عليها مع تلك الموجودة في المراجع المتخصصة.

أما بالنسبة للدراسة البيولوجية لمستخلصات AcOEt، *n*-BuOH و tamarixetine فقد أعطت نتائج مثيرة للاهتمام.

أظهر مستخلص *n*-BuOH محتوى عاليا من مركبات البوليفينول و الفلافونويد مقارنةً مع مستخلص AcOEt. في حين برهن مستخلص EtOAc عن نشاطية مضادة للأكسدة (اختبار DPPH) في حدود $IC_{50} = 79,8 \mu g/ml$ و هي أفضل من تلك التي أظهرها مستخلص *n*-BuOH ($IC_{50} = 136,2 \mu g/ml$) بالإضافة إلى ذلك أظهر هذان المستخلصان نشاطاً مضاداً للبكتيريا جيداً ضد البكتيريا من نوع *Klebsiella pneumonia* (15 mm à 100 mg/mL)

فيما يتعلق بالنشاط المضاد لتكثير الخلايا أظهرت tamarixetine نشاطاً مثبطاً عاليا على الخلايا من نوع HeLa (سرطان عنق الرحم البشري).

في نفس السياق مكنت الدراسة الكيميائية على مستخلص MeOH للجزء الهوائي لنبتة *Stachys brachyclada* من فصل وتنقية خمسة (05) مركبات فلافونويد عزلت لأول مرة من هذه النبتة وهي:

Stachysetin ; lutéoline-7-O- β -D-allopyranosyl-(1→2)-glucopyranoside ;
isoscutellareine-7-O- β -D-allopyranosyl-(1→2) glucopyranoside ;
apigénine ;lutéoline

حيث تم الكشف عن البنية الجزيئية لمختلف المركبات باستخدام تقنيات التحليل الطيفي (SM, RMN 1D 2D) و تمت مقارنة البيانات المحصل عليها مع تلك الموجودة في المراجع المتخصصة.

Résumé

Le présent travail a porté sur une étude phytochimique et biologique de deux espèces algériennes endémiques, la *Berberis hispanica* de la famille des Berberidaceae et la *Stachys brachyclada* de la famille des Lamiaceae.

L'étude phytochimique des extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol des parties aériennes de l'espèce *Berberis hispanica*, a conduit à isoler et identifier un acide phénolique l'acide caféique isolé pour la première dans cette espèce et deux flavonoïdes :

✓ tamarixétine ;

✓ rutine.

L'identification structurale a été effectuée grâce aux techniques d'analyses spectroscopiques (SM, RMN¹H, RMN¹³C), appuyée par une comparaison avec les données de la littérature.

Quant à l'étude biologique des extraits AcOEt, *n*-BuOH et du flavonoïde tamarixétine de cette espèce, elle a donné des résultats intéressants.

L'extrait *n*-BuOH a montré une meilleure richesse en poly-phénols et flavonoïdes par rapport à l'extrait AcOEt. Les deux extraits AcOEt et *n*-BuOH ont montré une très bonne activité antibactérienne vis-à-vis de la souche *Klebsiella pneumonia* (15 mm à 100 mg/mL).

Quant à l'activité antioxydante de ces deux extraits, elle a été évaluée par la méthode du piégeage du radical libre DPPH et a montré que l'extrait AcOEt (IC₅₀ = 79,8 µg/mL) présente une meilleure activité par rapport à l'extrait *n*-BuOH (IC₅₀ = 136,2 µg/ml).

Par ailleurs, l'activité antiproliférative du flavonoïde tamarixétine indique une bonne réponse vis-à-vis des cellules HeLa (carcinome du col de l'utérus humain).

Concernant l'étude phytochimique de l'extrait MeOH des parties aériennes de la seconde espèce *Stachys brachyclada*, elle a conduit à la séparation et purification de cinq flavonoïdes isolés pour la première fois dans l'espèce, à savoir :

✓ Stachysetin ;

✓ lutéoline-7-O-β-D-allopyranosyl-(1→2)-glucopyranoside ;

✓ isoscutellareine-7-O-β-D-allopyranosyl-(1→2) glucopyranoside ;

✓ apigénine ;

✓ lutéoline.

Leurs identification a été effectuée en combinant nos données spectroscopiques (SM, RMN 1D et 2D) avec ceux de la littérature.