

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ DES FRERES MENTOURI CONSTANTINE 1
FACULTÉ DES SCIENCES EXACTES
DÉPARTEMENT DE CHIMIE

N° d'ordre 25 / OS / 2020
Série 03 / CH / 2020

THESE PRESENTEE
POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN SCIENCES EN CHIMIE
UNIVERSITE UFMC1

Spécialité : Chimie Organique
Option : Phytochimie

THEME

***Anacyclus pyrethrum* (L.) Cass. [Asteraceae] , *Pistacia lentiscus* L. [Anacardiaceae] et *Acanthus mollis* L. [Acanthaceae] d'Algérie :
Caractérisation phytochimique et exploration de propriétés
biologiques.**

Par M^{me} Hamimed Souad, Ep BenMabrouk

Soutenu le 18 / 06 / 2020

Devant le jury:

Présidente	Z. KABOUCHE	Prof., U. Frères Mentouri, Constantine 1.
Directeur de Thèse	A. BELKHIRI	Prof., U. Salah Boubnider, Constantine 3.
Examineur	S. AKKAL	Prof., U. Frères Mentouri, Constantine 1.
Examineur	A.ZELLAGUI	Prof., U. L'arbi ben M'hidi-OEB.
Examineur	N.BOULEBDA	MCA, U. Mohamed-Cherif Messaadia – Souk Ahras.

Remerciements :

Avant tout, je remercie **Allah** Le Tout Puissant qui m'a Donné cette volonté et le courage pour pouvoir parcourir tout ce chemin durant mes années d'études.

Ces recherches ont été réalisées au niveau du laboratoire de Pharmacognosie, sous la direction de Monsieur **Belkhir Abdelmalik**, Professeur à l'université Salah Boubnider, Constantine 3, Département de Pharmacie, Constantine. Je tiens à vous exprimer toute ma gratitude pour avoir encadré ce travail pendant ces années, pour m'avoir guidée tout en me laissant libre dans mes choix. Je tiens à vous exprimer également toute ma gratitude pour les nombreuses heures investies dans la correction du présent manuscrit.

Je remercie Mme **Kabouche Zahia**, Professeure à l'université des frères Mentouri, Département de Chimie, Constantine 1, responsable de ma promotion. Je tiens à la remercier vivement pour avoir accepté de présider ce jury.

Je remercie également les Professeurs **Akkal Salah** (Université des frères Mentouri, Département de Chimie, Constantine 1) et **Zellagui Amar** (Université de Larbi ben M'hidi, Département de Biologie, Oum El Bouaghi), pour m'avoir honorée en jugeant ce travail.

Je tiens particulièrement à exprimer ma gratitude à Mr. **Boulebda Nadji**, Maître de Conférence A, biologiste et pharmacologue à Université Mohamed-Cherif Messaadia – Souk Ahras. Qu'il trouve ici toute ma reconnaissance et ma gratitude pour ses nombreux conseils dans le domaine de biologie et surtout dans le suivi des tests biologiques.

Merci aux membres du laboratoire Biologia Vegetale Plante Officinali, Département de Pharmacie, Université de Salerno, Italie, pour leur aide dans la réalisation de certaines analyses RMN. Merci Ida Apostolico, Lucia Caputo, Lucéia Souza, Alessandra Gaeta, Donato Del Monte, Osvaldo Aequaviva, Mattia Mautone, Luigi Aliberti, Loredana Valeria Scarcella et Laoura.

Un grand merci à ma chère Trifa Warda pour nos fous rires, nos moments qu'on a partagés pendant ces années au Laboratoire.

Mes collègues de l'Université Larbi Ben M'hidi Oum El Bouaghi : Dr Hazourli AbdelKrim, M^{me} Dammane Dabih Wafa et Monsieur Dr Goumeidane Faycal, chef de Département SM, qui m'a toujours conseillée et soutenue.

Et enfin, il y a les compagnons de route, ceux avec qui l'on a partagé les joies du quotidien, les doutes. Je suis heureuse de vous avoir rencontrés. A tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre, ont contribué à l'aboutissement de ce travail.

Dédicaces :

A ma famille qui m'a toujours soutenue dans mes choix. Merci Maman, Merci Papa, Merci mes Sœurs, mon Frère, mes neveux et mes nièces. C'est avec vous que j'ai partagé mes joies, mes peines, vous m'avez soutenue grâce à votre présence, sourire et amitié.

A mon mari pour sa bonne compréhension des mérites de mon travail, et son soutien moral. A ma belle mère pour l'encouragement de continuer mon travail.

Dédicace spéciale pour toi ma fille “ **Djouri** ” pour quel pouvoir tu été accordée, tout ce que j'ai fait pour toi, tu es mes rêves pour demain.

Souad

Sommaire :

Liste des tableaux.-----	i
Liste des figures.-----	iii
Abréviations.-----	v
Introduction générale.-----	1

Première Partie : Etude Bibliographique.

Chapitre 1 : Revue Bibliographique des Plantes étudiées.

A: Description des feuilles d' <i>Acanthus mollis</i> :	
A.1 Présentation d' <i>Acanthus mollis</i> :	
A.1.1 Caractères morphologiques.-----	5
A.1.2 Utilisations traditionnelles.-----	7
A.2 Etudes antérieures sur <i>Acanthus mollis</i> :	
A.2.1 Travaux chimiques sur les feuilles <i>Acanthus mollis</i> .-----	8
A.2.2 Propriétés biologiques des feuilles d' <i>Acanthus mollis</i> .-----	9
B: Description des racines d' <i>Anacyclus pyrethrum</i> :	
B.1 Présentation d' <i>Anacyclus pyrethrum</i> :	
B.1.1 Caractères morphologiques.-----	10
B.1.2 Utilisations traditionnelles.-----	12
B.2 Etudes antérieures sur <i>Anacyclus pyrethrum</i> :	
B.2.1 Travaux chimiques sur les racines d' <i>Anacyclus pyrethrum</i> .-----	12
B.2.2 Propriétés biologiques des racines d' <i>Anacyclus pyrethrum</i> .-----	15
C: Description des feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> :	
C.1 Présentation de <i>Pistacia lentiscus</i> :	

C.1.1 Caractères morphologiques.-----	17
C.1.2 Utilisations traditionnelles.-----	18
C.2 Etudes antérieures sur <i>Pistacia lentiscus</i> :	
C.2.1 Travaux chimiques sur les feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> .-----	19
C.2.2 Propriétés biologiques des feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> .-----	21

Chapitre 2 : Méthodes d'évaluation Biologiques utilisées.

A: Activité Cytotoxique :

A.2.1 Les Tests de cytotoxicité.-----	24
A.2.2 Critères de test de toxicité.-----	24
A.2.3 Test de toxicité sur le modèle d' <i>Artemia salina</i> :	
A.2.3.1 Description d' <i>Artemia salina</i> .-----	26
A.2.3.2 Principe.-----	26
A.2.4 Avantages et inconvénients du Test sur <i>Artemia salina</i> .-----	27

B: Activité Antioxydante :

B.2.1 Antioxydant.-----	28
B.2.2 Evaluation des propriétés Antioxydantes :	
B.2.3.1 Méthode de DPPH (2,2-Diphenyl-picrylhydrazyl) :	
B.2.3.1.1 Principe de la méthode (Réaction entre le radical libre DPPH• et l'antioxydant).-----	28
B.2.3.1.2 Méthode qualitative : chromatographie sur couche mince de silice.-----	30
B.2.3.1.3 Méthode quantitative.-----	30
B.2.3.2 Méthode du thiocyanate de fer (FTC).-----	30
B.2.3.3 Méthode de test Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) <i>in vitro</i> . -----	31
B.2.3.4 Méthode de Dosage ABTS. -----	32
B.2.3.5 Méthode de Dosage de la phycoérythrine. -----	32
B.2.3.6 Capacité antioxydante totale (CAT). -----	33

Chapitre 3 : Métabolites Secondaires isolés et identifiés : Les alkamides

3.1 Définition et Généralités sur les alkamides.-----	35
3.2 Classification des alkamides.-----	35
3.3 Les alkamides des la famille Asteraceae.-----	37
3.4 Biosynthèse des alkamides .-----	38
3.5 Bioactivité des alkamides.-----	41

Deuxième Partie : Matériel et Méthodes.

2.1 Matériel végétal.-----	43
2.2 Extraction et préparation des extraits bruts.-----	43
2.3 Méthodes de criblage phytochimique :	
2.3.1 Réactions de caractérisation des extraits bruts et des fractions.-----	45
2.3.2 Caractérisation des Fractions.-----	46
2.4 Fractionnement par CC de l'extrait actif AcOEt de APY.-----	48
2.5 Méthode d'identification physico – chimique (Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire).-----	53
2.6 Dosages des flavonoïdes et des tanins :	
2.6.1 Dosage des flavonoïdes.-----	53
2.6.2 Dosage des tanins.-----	54
2.7 Activités biologiques :	
2.7.1 Activité cytotoxique :	
2.7.1.1 Préparation des Artémias.-----	54
2.7.1.2 Evaluation du test de cytotoxicité.-----	55
2.7.2 Étude de l'activité anti – radicalaire (Méthode au DPPH).-----	57
2.7.3 Test statistique.-----	57

Troisième Partie : Résultats et Discussion.

Section I : Caractérisation phytochimique préliminaire :

I.3.1 Obtention des extraits bruts.-----	59
I.3.2 Criblage phytochimique préliminaire des extraits bruts.-----	60
I.3.3 Criblage chromatographique par CCM.-----	62

Section II : Criblage biologique :

II.3.4 Evaluation de l'activité cytotoxique sur le modèle <i>Artemia salina</i> . -----	65
II.3.5 Evaluation de l'activité antioxydante par la méthode DPPH. -----	70
II.3.6 Dosage des flavonoïdes et des tanins dans les extraits méthanoïques pour les trois espèces.-----	77

Section III : Caractérisation et fractionnement bioguidé de l'extrait actif (AcOEt) A.
pyrethrum :

III.3.7 Étude de la fraction F.21. -----	81
III.3.8 Étude de la fraction F.27. -----	82
III.3.9 Étude de la fraction F.28. -----	82
III.3.9.1 Purification de la sous – fraction F.28.7. -----	82
III.3.9.2 Purification de la sous – fraction F.28.9.-----	83
III.3.10 Identification des composés isolés de l'extrait actif AcOEt (APY) :	
III.3.10.1 Identification du composé A. -----	83
III.3.10.2 Identification du composé B. -----	86
III.3.10.3 Identification du composé C. -----	89
III.3.10.4 Identification du composé D. -----	92
III.3.10.5 Identification du composé E. -----	94
III.3.10.6 Identification du composé F. -----	97
III.3.10.7 Identification du composé G. -----	100
III.3.10.8 Identification du composé H. -----	102
III.3.10.9 Identification du composé I. -----	105
III.3.10.10 Identification du composé J. -----	108
Conclusion.-----	113
Références Bibliographiques.-----	115

Liste des Tableaux :

Tableau 1. 1 :	Classification d' <i>Acanthus mollis</i> .-----	6
Tableau 1. 2 :	Métabolites secondaires identifiés dans l'espèce AMO.-----	8
Tableau 1. 3 :	Activités biologiques des feuilles d'AMO.-----	9
Tableau 1. 4 :	Classification d' <i>Anacyclus pyrethrum</i> .-----	11
Tableau 1. 5 :	Métabolites secondaires identifiés dans les racines d'APY.-----	13
Tableau 1. 6 :	Activités biologiques et pharmacologiques des racines d'APY.--	16
Tableau 1. 7 :	Classification de <i>Pistacia lentiscus</i> .-----	17
Tableau 1. 8 :	Métabolites secondaires identifiés dans l'espèce PLE.-----	20
Tableau 1. 9 :	Activités biologiques de l'espèce PLE.-----	22
Tableau 2. 1 :	Informations sur les espèces étudiées.-----	43
Tableau 2. 2 :	Tests employés pour les réactions en tube.-----	45
Tableau 2. 3 :	Réactifs chimiques pour la révélation des CCM.-----	47
Tableau 2. 4 :	Conditions de la CCM pour le Composé A.-----	49
Tableau 2. 5 :	Conditions de la CCM pour les Composés : B ; H ; G et J.-----	50
Tableau 2. 6 :	Conditions de la CCM pour le Composé E.-----	51
Tableau 2. 7 :	Conditions de la CCM pour les Composés D, F, C et I.-----	53
Tableau 2. 8 :	Paramètres de culture des <i>Artémias</i> .-----	55
Tableau 3. 1 :	Masse et rendement des extraits végétaux.-----	59
Tableau 3. 2 :	Profil métabolique des extraits végétaux.-----	61
Tableau 3. 3 :	Mortalité des larves exprimé en pourcentage en fonction des concentrations.-----	66
Tableau 3. 4 :	Valeurs des CL ₅₀ des différents extraits après 24 h.-----	69
Tableau 3. 5 :	Activité antioxydante des extraits des racines d'APY.-----	70
Tableau 3. 6 :	Activité antioxydante des extraits des feuilles de d'AMO.-----	72
Tableau 3. 7 :	Activité antioxydante des extraits des feuilles de d'PLE.-----	74
Tableau 3. 8 :	Activité antioxydante de l'acide ascorbique.-----	76
Tableau 3. 9 :	Valeurs des IC ₅₀ des différents extraits.-----	76
Tableau 3. 10 :	Teneurs en flavonoides et tanins et valeurs des IC ₅₀ des extraits méthanoliques. -----	77
Tableau 3. 11 :	Pourcentage de mortalité des fractions à différents concentrations. -----	80

Tableau 3. 12 :	Couleurs observé sur CCM pour le Composé A.-----	83
Tableau 3. 13 :	Données chromatographies du Composé A.-----	83
Tableau 3. 14 :	Données chromatographies du Composé B.-----	86
Tableau 3. 15 :	Couleurs observé sur CCM pour le Composé C.-----	89
Tableau 3. 16 :	Données chromatographies du Composé C.-----	90
Tableau 3. 17 :	Données chromatographies du Composé D.-----	92
Tableau 3. 18 :	Données chromatographies du Composé E.-----	94
Tableau 3. 19 :	Données chromatographies du Composé F.-----	97
Tableau 3. 20 :	Données chromatographies du Composé G.-----	100
Tableau 3. 21 :	Données chromatographies du Composé H.-----	103
Tableau 3. 22 :	Données chromatographies du Composé I.-----	106
Tableau 3. 23 :	Données chromatographies du Composé J.-----	108

Liste des Figures :

Figure 1. 1 :	Représentation des feuilles d' <i>Acanthus mollis</i> .-----	7
Figure 1. 2 :	Les benzoxazinoides détectés dans les feuilles d' <i>Acanthus mollis</i> .-----	9
Figure 1. 3 :	Représentation des racines d' <i>Anacyclus pyrethrum</i> .-----	11
Figure 1. 4 :	Les alkamides d' <i>Anacyclus pyrethrum</i> .-----	14
Figure 1. 5 :	Représentation des feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> .-----	18
Figure 1. 6 :	Représentation d' <i>Artemia salina</i> .-----	26
Figure 1. 7 :	Structure chimique du radical libre DPPH•.-----	29
Figure 1. 8 :	Propriétés structural des alkamides.-----	36
Figure 1. 9 :	Résidus aminés R ₂ des alkamides aliphatiques de la famille Asteraceae.-----	38
Figure 1. 10 :	Schéma de la biosynthèse des alkamides.	40
Figure 2. 1 :	Schéma d'extraction en mode gradient des plantes de cette étude.-----	44
Figure 2. 2 :	Schéma de fractionnement de l'extrait actif APY AcOEt.-----	48
Figure 2. 3 :	Schéma de purification de la fraction F.21.-----	49
Figure 2. 4 :	Schéma de purification de la fraction F.27.-----	50
Figure 2. 5 :	Schéma de purification de la fraction F.28.-----	51
Figure 2. 6 :	Schéma de purification de la sous – fraction F.28.7 et F.28.9.---	52
Figure 2. 7 :	Le montage de préparation d' <i>Artémia salina</i> .-----	55
Figure 3. 1 :	Rendement d'extraction obtenue pour les différents extraits. ---	60
Figure 3. 2 :	CCM préliminaires des extraits apolaires dans les systèmes A et B.-----	63
Figure 3. 3 :	CCM préliminaires des extraits apolaires dans les systèmes C et D.-----	64
Figure 3. 4 :	Pourcentage de mortalité des larves d' <i>Artemia salina</i> pour les extraits des trois plantes.-----	67
Figure 3. 5 :	Activité antioxydante des extraits des racines d' <i>A.pyrethrum</i> .---	71
Figure 3. 6 :	Activité antioxydante des extraits des feuilles d' <i>A.mollis</i> .-----	73
Figure 3. 7 :	Activité antioxydante des extraits des feuilles de <i>P.lentiscus</i> .----	75
Figure 3. 8 :	Dosage en flavonoides et en tanins des extraits méthanoliques	

	des espèces.-----	77
Figure 3. 9 :	Courbes d'étalonnage de la Quercétine et de la Catéchine.-----	78
Figure 3. 10 :	Chromatographie d'extrait AcOEt (APY), avant et après la révélation.-----	79
Figure 3. 11 :	Pourcentage de mortalité des fractions issue de l'extrait AcOEt (APY).-----	80
Figure 3. 12 :	Spectre RMN ¹ H du composé A (300 MHz, CDCl ₃).-----	84
Figure 3. 13 :	Structure proposée du composé A (300 MHz, CDCl ₃).-----	86
Figure 3. 14 :	Spectre RMN ¹ H du composé B (300 MHz, CDCl ₃).-----	87
Figure 3. 15 :	Structures proposées du composé B (300 MHz, CDCl ₃).-----	89
Figure 3. 16 :	Spectre RMN ¹ H du composé C (300 MHz, CDCl ₃).-----	90
Figure 3. 17 :	Structure du composé C (300 MHz, CDCl ₃).-----	92
Figure 3. 18 :	Spectre RMN ¹ H du composé D (300 MHz, CDCl ₃).-----	93
Figure 3. 19 :	Structure du composé D (300 MHz, CDCl ₃).-----	94
Figure 3. 20 :	Spectre RMN ¹ H du composé E.-----	95
Figure 3. 21 :	Structure proposée du composé E (300 MHz, CDCl ₃).-----	97
Figure 3. 22 :	Spectre RMN ¹ H du composé F (300 MHz, CDCl ₃).-----	98
Figure 3. 23 :	Structure du composé F (300 MHz, CDCl ₃).-----	99
Figure 3. 24 :	Spectre RMN ¹ H du composé G (300 MHz, CDCl ₃).-----	100
Figure 3. 25 :	Structure proposée du composé G (300 MHz, CDCl ₃).-----	102
Figure 3. 26 :	Spectre RMN ¹ H du composé H (300 MHz, CDCl ₃).-----	103
Figure 3. 27 :	Structure proposée du composé H (300 MHz, CDCl ₃).-----	105
Figure 3. 28 :	Spectre RMN ¹ H du composé I (300 MHz, CDCl ₃).-----	106
Figure 3. 29 :	Structure du composé I (300 MHz, CDCl ₃).-----	107
Figure 3. 30 :	Spectre RMN ¹ H du composé J (300 MHz, CDCl ₃).-----	109
Figure 3. 30 :	Structures proposées du composé J (300 MHz, CDCl ₃).-----	111

Liste des Abréviations :

AMO	<i>Acanthus mollis</i>
<i>A.mollis</i>	<i>Acanthus mollis</i>
AcOEt	Acétate d'éthyle
APY	<i>Anacyclus pyrethrum</i>
<i>A.pyrethrum</i>	<i>Anacyclus pyrethrum</i>
BSLT	Test de létalité des crevettes de saumure
BAW	butanol / acide acétique / eau (4:1:5)
CC	Chromatographie sur colonne
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CL ₅₀	Concentration Létale 50
CHCl ₃	Chloroforme
CDCl ₃	Chloroforme déterré
d	doublet
DCM	dichlorométhane
DE	Diéthyl éther
DPPH	2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle
E.P	Ether de pétrole
F	Fraction
Hex	Hexane
HL60	Human promyelocytic leukemia strain
IC ₅₀	Concentration inhibitrice 50
J	Constante de couplage
M	Multiplet
MCF7	Brest cancer strain
MeOH	Méthanol
Moy	Moyenne
<i>P</i>	Facteur statistique de comparaison de populations
PLE	<i>Pistacia lentiscus</i>
<i>P. lentiscus</i>	<i>Pistacia lentiscus</i>
ppm	Partie par million
R _f	Rapport frontal
RMN ¹ H	Résonance Magnétique Nucléaire du proton

S	Singulet
SD	+/- écart type
T	Toluène
t	Triplet
v	volume
δ	déplacement chimique
A; B ; C ; D ; E ; F ; G ; H ; I et J	symbole utilisé pour les composés isolés

Introduction générale

Les plantes médicinales constituent des ressources précieuses pour la majorité des populations rurales et urbaines en Afrique et représentent le principal moyen par lequel les individus se soignent. Malgré les progrès de la pharmacologie, l'usage thérapeutique des plantes médicinales est très présent dans certains pays du monde et surtout les pays en voie de développement (Hadjadj, K *et al.*, 2019).

Chaque plante possède de façon naturelle, une variété de moyens de défense constitutifs. Ces mécanismes varient d'une plante à l'autre, car ils sont très souvent le résultat d'une adaptation temporelle à des conditions climatiques ou environnementales particulières. Ainsi, les feuilles des plantes poussant dans des zones tropicales auront tendance à être recouvertes d'une cuticule plus épaisse que celles poussant sous des climats pluvieux. De la même façon, les plantes aromatiques qui poussent à l'état sauvage dans les pays méditerranéens ont une concentration plus élevée en métabolites secondaires (huiles essentielles) en raison de leur adaptation à une certaine sécheresse du sol sur une longue période. La résistance passive, responsable de la protection des plantes à la plupart des agents pathogènes et des prédateurs auxquels elles sont confrontées en permanence, existe donc chez toutes les plantes, mais à des degrés divers (Benhamou, N *et al.*, 2012).

Dans le cadre de notre travail, nous avons sélectionné trois plantes, connues pour leur emploi en médecine traditionnelle. Les trois espèces concernées sont : *Anacyclus pyrethrum* L., *Acanthus mollis* L. et *Pistacia lentiscus* L. En raison de leur usage répandu en médecine traditionnelle et du peu d'information de nature chimique et/ou biologique publiées sur ces plantes, leur investigation phytochimique et biologique est entreprise dans la présente étude.

Concernant les racines d'*Anacyclus pyrethrum* L. à l'issue d'un travail préliminaire, ont révèlent la présence d'une diversité de molécules intéressantes, dont les triterpènes, qui reste non suffisamment caractérisés d'un point de vue phytochimique et potentiel pharmacologique. Les deux autres espèces sont aussi peut étudiés.

L'objectif ultime de cette étude est d'évaluer le potentiel cytotoxique des trois plantes et d'isoler les molécules impliquées dans l'activité. Pour atteindre ce but, trois objectifs spécifiques ont été fixés :

- Caractériser le matériel végétal et procéder à une extraction exhaustive de leurs métabolites par différents (gradient) solvants ;
- Procéder à une caractérisation phytochimique préliminaire des extraits et évaluer leur potentiel cytotoxique utilisant le test BSL, en plus de leur activité antioxydante par le DPPH ;
- Procéder au fractionnement bioguidé du ou des extraits les plus actifs, l'isolement et caractérisation des molécules impliquées dans l'activité.

Le manuscrit comporte trois grandes parties :

Une première partie organisée en trois chapitres consacrés à une description botanique des plantes étudiées, et une revue bibliographique des données sur leurs constituants chimiques et leurs propriétés pharmacologiques. Cette partie comprend aussi une description des méthodes biologiques utilisées et une présentation sommaire du métabolisme des alkamides.

Une deuxième partie qui décrit le matériel et les méthodes utilisés.

La troisième partie regroupe l'ensemble des résultats obtenus, suivis de leur discussion.

Le manuscrit comprend dans sa partie finale une conclusion, les références bibliographiques et des annexes.

Première Partie :

Etude Bibliographiques

Chapitre 1 : Revue
Bibliographique
des Plantes étudiées.

Introduction :

On observe aujourd'hui, un grand intérêt pour l'étude des remèdes populaires et la recherche de nouveaux médicaments issus de la pharmacopée traditionnelle. En effet de nombreux travaux ont été consacrés à l'inventaire de l'arsenal thérapeutique dans différents pays, notamment les pays du Maghreb (Cheriti, A *et al.*, 2005 ; Belouahem, A.Dj *et al.*, 2009).

Compte tenu de la variété et de la richesse de la flore Algérienne, ainsi que du nombre de plantes locales ayant fait l'objet d'investigations cliniques (Hadjadj, K *et al.*, 2019), il nous a semblé intéressant d'étudier quelques unes de ces plantes déjà utilisées en médecines traditionnelle.

Au cours de ce travail, nous avons choisi trois plantes médicinales : *Acanthus mollis* (Acanthacées) ; *Anacyclus pyrethrum* (Astéracées) et *Pistacia lentiscus* (Anacardiacees).

Cette partie se propose de décrire les aspects botaniques, ethnobotaniques, chimiques et biologiques liés à ces trois plantes.

A : Description d'*Acanthus mollis* :

A.1 Présentation d'*Acanthus mollis* :

A.1.1 Caractères morphologiques :

Acanthus mollis est une plante herbacée vivace de la famille des Acanthacées, originaire de la région méditerranéenne (Matos, P *et al.*, 2018), aussi appelée acanthe molle ou acanthe à feuilles larges. Elle est utilisée comme plante ornementale et médicinale (Jara, C *et al.*, 2017), connue pour ses feuilles ayant servi de motif architectural, c'est une plante herbacée vivace originaire de la région méditerranéenne du Portugal et du nord-ouest de l'Afrique aux Balkans et pour ses feuilles ressemblent aux pieds d'un ours (en anglais elle se nomme « Bear's Breeches », du fait que elle offre une jolie floraison abondante et durable de juin à septembre, est l'une des premières espèces cultivées de plantes de jardin (Tomas, R

et al., 2009). L'Acanthe à feuilles molles présente une touffe évasée, son genre vient du mot grec (*akantha*) qui signifie épine, en référence aux bords dentelés des feuilles de certaines espèces, composée d'un feuillage semi-persistant et très décoratif. De très grandes feuilles (30-80 cm de long), molles, à divisions larges, lobées dentées, vert brillant (Wolf, B.R *et al.*, 1985). Commune dans les lieux frais du tell Algérien et également cultivée. La croissance reste verte toute l'année dans les climats doux. Les feuilles sont inclinées avec des épines. Tiges de beau, pâle lilas et blanc, les fleurs apparaissent au début de l'été et peuvent atteindre une hauteur de quatre à cinq pieds, les fleurs peuvent être coupées pour des arrangements à l'intérieur ou séchées.

La position systématique de l'*Acanthe* est décrite comme suit (Tableau 1.1) :

Tableau 1.1 : Classification d' *Acanthus mollis*.

Classification de Cronquist 1981		Classification APG III (2009)	
Règne	Plantae		
Sous – règne	<i>Tracheobionta</i>		
Division	<i>Magnoliophyta</i>	Cladus	<i>lamiidees</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>	Ordre	<i>Lamiales</i>
Sous – classe	<i>Asteridae</i>	Famille	<i>Acanthaceae</i>
Ordre	<i>Scrophulariales</i>	Genre	<i>Acanthus</i>
Famille	<i>Acanthaceae</i>	Espèce	<i>Acanthus mollis</i>
Genre	<i>Acanthus</i>		
Nom binominal			
<i>Acanthus mollis</i> L., 1753			

Les noms communs et vernaculaires (autres dénominations) :

Nom Français : Acanthe molle, Acanthe

Nom Anglais : Bear's breeches

Nom Arabe :

بخباخ / شوك اليهود / رجل الدب



Figure 1.1 : Représentation des feuilles d'*Acanthus mollis*. (source : *google image*)

A.1.2 Utilisations traditionnelles :

Les espèces du genre *Acanthus* sont traditionnellement utilisées pour les plaies. L'Acanthe molle est utilisée comme diurétique, anti-inflammatoire et apaisante des muqueuses du tube digestif et du tractus urinaire et en externe pour la cicatrisation des plaies et des brûlures (Matos, P *et al.*, 2018). Les feuilles et les racines sont préparées en bain contre les irritations de la peau pour soulager les brûlures utilisés Infusion / Cataplasme (Rhattas, M *et al.*, 2016) et en lavement contre les maladies infectieuses du colon et les hémorroïdes. Sa sève, réputée pour être tonifiante et stimulante, était réservée aux guerriers qui en buvaient avant de partir au combat. *Acanthus mollis* a été utilisé comme un guérisseur de plaies et pris en interne pour apaiser les muqueuses dans les voies digestives et urinaires. Elle est également un remède précieux dans les fièvres trépidantes, car il restaure l'humidité radicale à la consommation. Il a été beaucoup utilisé comme diurétique.

En Malaisie, la feuille de la plante guérissait les rhumatismes, les névralgies et les plaies de flèche empoisonnées; au Bangladesh, les feuilles sont utilisées dans le traitement du cancer ; en Inde, la racine est utilisée pour traiter la toux et hépatite, lèpre, paralysie, teigne, rhumatismes, problèmes de peau, morsure de serpent, leucorrhée, leucémie, etc. hydropisie ; différentes parties de la plante, fruit, feuille, écorce et racine, sont utilisées dans la guérison de l'asthme, du diabète, de l'hépatite, de l'inflammation et du rhumatisme (Rekha, B *et al.*, 2017).

A.2 Etudes antérieures sur *Acanthus mollis* :

A.2.1 Travaux chimiques sur les feuilles *Acanthus mollis* :

De nombreux groupes de composés potentiellement intéressants ont été trouvés de cette espèce (Tableau 1.2). Il s'agit essentiellement de flavonoïdes, lignanes et benzoxazinoides (Makowska, B *et al.*, 2015). Malgré les travaux cités la chimie de cette espèce demeure insuffisamment étudiée (Matos, P *et al.*, 2018).

Tableau 1.2 : Métabolites secondaires identifiés dans l'espèce AMO.

Partie de plante	Métabolites secondaires	Références
graines	Glucoside de 2,4-dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIBOA-GLC)	Wolf, B.R <i>et al.</i> , 1985 ; Hermann, M.N., 1988
la plante entière	Flavonoïdes, acides hydroxamiques cycliques et dérivés de la benzoxazolinone.	Masouda, E.A <i>et al.</i> , 2004 Tomas, R <i>et al.</i> , 2009
feuilles, fleurs et racines	Glucoside de 2,4-dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-one et 1,4-benzoxazin-3-one	Kimberly, P E <i>et al.</i> , 1995 Wahidulla, S <i>et al.</i> , 2001 ; Héctor, R.B <i>et al.</i> , 2004 ; Chang-Hong Huo <i>et al.</i> , 2005
fleurs et feuilles	Anthraquinones, flavonoïdes et phénols.	Jara, C <i>et al.</i> , 2017
feuilles	2,4-dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-one, dérivés d'acides hydroxamiques et phénoliques cycliques	Kanchanapoom, T <i>et al.</i> , 2001 ; Kanchanapoom, T <i>et al.</i> , 2006 ; Matos, P <i>et al.</i> , 2019

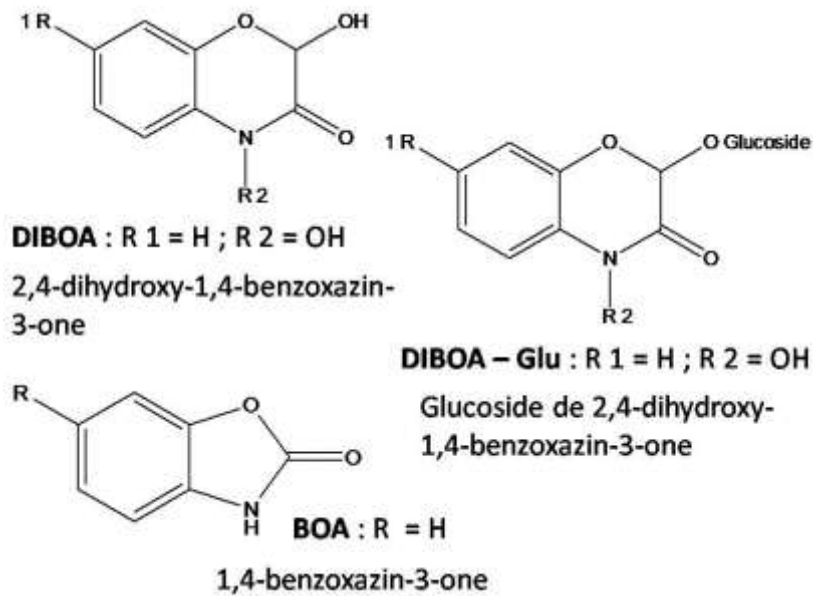


Figure 1.2 : Les benzoxazinoïdes détectés dans les feuilles d' *Acanthus mollis*.

A.2.2 Propriétés biologiques des feuilles d' *Acanthus mollis* :

Les études pharmacologiques systématiques sur le genre ont donné une reconnaissance remarquable à leurs utilisations ethno médicinales dans la gestion des soins de santé (Rekha, B *et al.*, 2017). Les rapports d'ethnopharmacologie indiquent que les extraits ont une activité anti-inflammatoire (Jara, C *et al.*, 2017).

Sur le volet biologique comme sur le volet chimique, l'Acanthe molle fait l'objet de peux d'études, des études relativement récente rapportent que les feuilles d'AMO possèdent des propriétés antioxydantes, antifongiques, Analgésiques et anti-inflammatoires (Tableau 1.3).

Tableau 1.3 : Activités biologiques des feuilles d'AMO.

activité biologique	Références
Antioxydantes et antifongiques	Jara, C <i>et al.</i> , 2017
Analgésiques et anti-inflammatoires	Matos, P <i>et al.</i> , 2018
Antioxydantes et anti-inflammatoires	Matos, P <i>et al.</i> , 2019

B : Description d'*Anacyclus pyrethrum* :

B.1 Présentation d' *Anacyclus pyrethrum* :

B.1.1 Caractères morphologiques :

Anacyclus pyrethrum ou Pyrèthre d'Afrique est une plante de la famille Asteraceae, espèce herbacée et vivace endémique (Kalam, M.A *et al.*, 2015), elle est originaire de la région méditerranéenne d'Afrique du Nord et de l'Algérie (Tauheed, A *et al.*, 2017), les différentes parties de la plante sont décrites comme suit :

- Racines longues, épaisses, fibreuses, brunes à l'extérieur, blanches à l'intérieur ;
- Tiges nombreuses couchées sur le sol, simples ou peu rameuses ;
- Feuilles finement découpées, délicates et pubescentes ;
- Fleurs avec un cœur jaune, des pétales blanches à l'intérieur et mauves à l'extérieur (Elazzouzi ,H *et al.*, 2014).

La position systématique du Pyrèthre d'Afrique est décrite comme suit (Tableau 1.4) :

Tableau 1.4 : Classification d' *Anacyclus pyrethrum*.

Classification de (L.)Link, 1822		Classification APG IV	
Règne	Plantae	Cladus	<i>euasterids II</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>	Ordre	Asterales
Classe	<i>Magnoliopsida</i>	Famille	<i>Asteraceae</i>
Ordre	<i>Asterales</i>	Sub famille	Asteroideae
Famille	<i>Asteraceae</i>	tribus	Anthemideae
Genre	<i>Anacyclus</i>	Genre	<i>Anacyclus</i>
Nom binominal		Espèce	<i>Anacyclus pyrethrum</i>
<i>Anacyclus pyrethrum</i> L., 1822			

Les noms communs et vernaculaires (autres dénominations) :

Nom Français : Pyrèthre d'Afrique

Nom Anglais : Pellitory / Pyrethrum Root

Nom Arabe : القنطس

Dans la grande flore méditerranéenne, *Anacyclus pyrethrum* L. (Asteraceae), communément appelé "pyrèthre africain" ou "Tigenthast" par les Marocains (Kalam, M.A *et al.*, 2015 ; Elazzouzi ,H *et al.*, 2014).



Figure 1.3 : Représentation des racines d' *Anacyclus pyrethrum*. (source : google image)

B.1.2 Utilisations traditionnelles :

La médecine traditionnelle en Algérie utilise depuis des siècles les racines d'*A. pyrethrum* pour le traitement des infections respiratoires et le traitement des maladies hépatiques. Partout en Algérie, la racine est utilisée comme sternutatoire, sialagogue et diaphorétique. Il est considéré comme un tonique pour le système nerveux (Beloued, A.,1998, Baba Aissa, F.,1999). Il est également utilisé dans les infections respiratoires et dans le traitement de la maladie du foie (Selles, Ch *et al.*, 2012 a et b ; Daoudi, A *et al.*, 2019).

Les racines d'APY dans la médecine traditionnelle indienne a été largement utilisée comme un aphrodisiaque et comme un médicament pour le rajeunissement et la vitalité, Il a été rapporté que l'administration orale de la poudre des racines a des actions aphrodisiaques de sorte que chez les rats mâles, l'administration d'extraits d'*A. pyrethrum* riches en alkamides pour améliorer leurs comportements sexuels (Shahraki, M.R *et al.*, 2015). Il a été rapporté que la racine d'*A. pyrethrum* a des activités antibactériennes et anti-inflammatoires et est connue pour ses propriétés insecticides (Selles, Ch *et al.*, 2012 a et b).

B.1.3 Etudes antérieures sur *Anacyclus pyrethrum* :

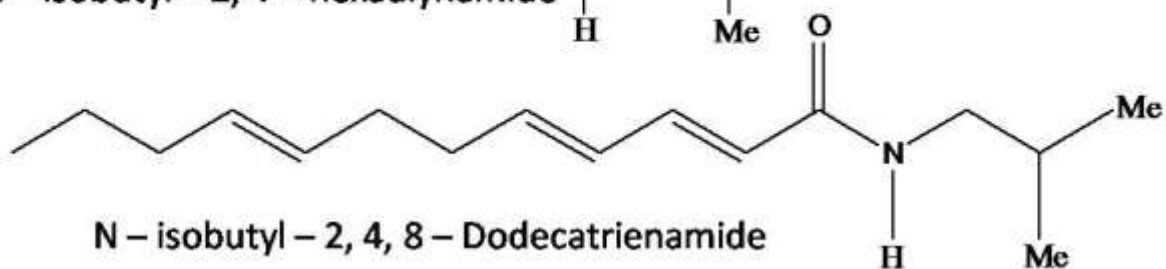
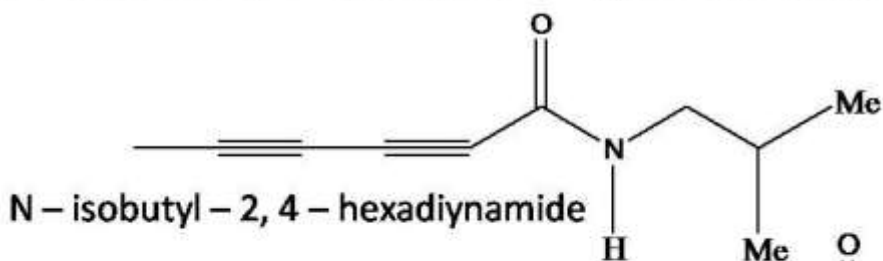
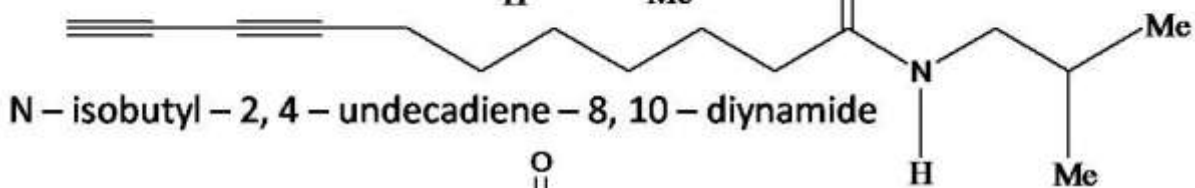
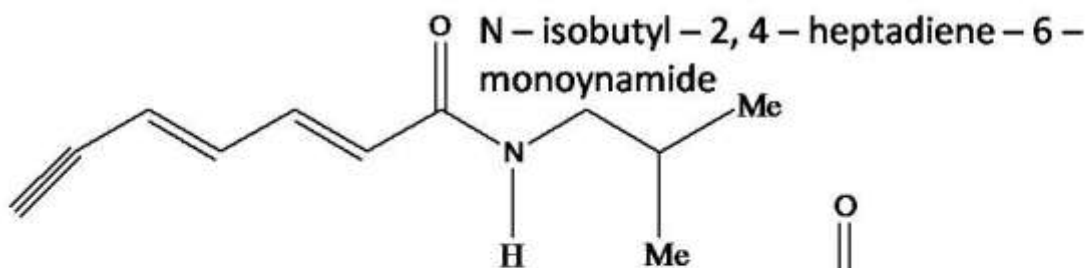
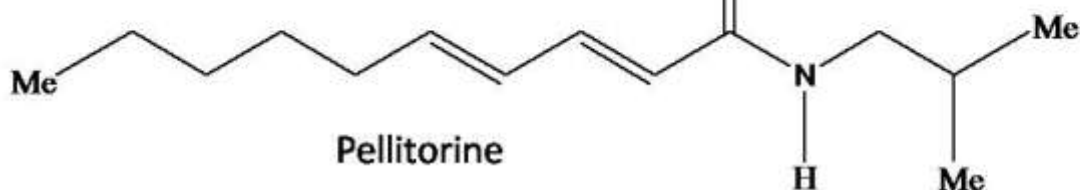
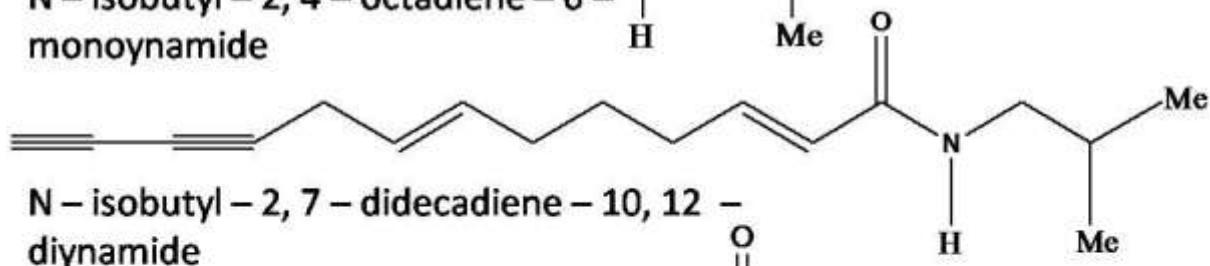
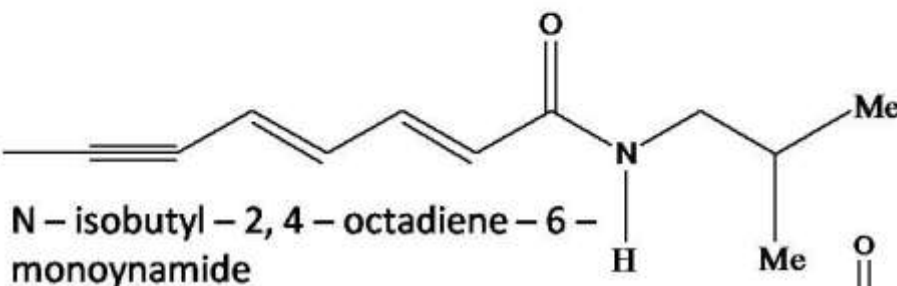
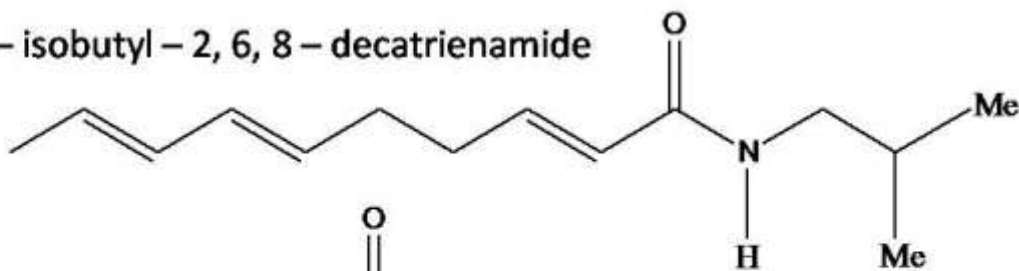
B.1.3.1 Travaux chimiques sur les racines d' *Anacyclus pyrethrum* :

L'espèce *Anacyclus pyrethrum* a fait l'objet des investigations chimiques, signalant la présence de nombreux types de métabolites secondaires récapitulés dans le tableau 1.5 :

Tableau 1.5 : Métabolites secondaires identifiés dans les racines d'APY.

Métabolites secondaires	Références
l'huile essentiel du pyrèthre d'Algérie est dominée par le germacrene-D	Usmani, A <i>et al.</i> , 2016
la pellitorine , N- isobutyldienedynamide, polysaccharides hydrocarboline, inuline, des traces d'huile volatile et sesamine.	Kalam, M.A <i>et al.</i> , 2015 Daoudi, A <i>et al.</i> , 2019
dans l'extrait n-hexane [acide linoléique (34,102%), acide hexadécanoïque (32,916%), acide oléique (20,000%) et acide linoléique (5,329%)]. dans l'extrait du chloroforme [acide linoléique (42,427%), de l'acide hexadécanoïque (40,952%) et de l'acide oléique (11,250%)]	Gulnar, K <i>et al.</i> , 2014
trois acides gras, un stérol et dix amides insaturés, principalement la pellitorine	Lieselotte, V <i>et al.</i> , 2014 ; Deepak, K.S <i>et al.</i> , 2015
six N-alkylamides	Sharma, V <i>et al.</i> , 2013
anacycline, phényléthylamide, inuline, amides polyacétyléniques I-IV , sesamine , tanins, des traces d'huiles essentielles et pyrèthrine	Syed, M.A.Z <i>et al.</i> , 2013 ; Selles, Ch <i>et al.</i> , 2012 A et B ; Sujith, , K <i>et al.</i> , 2011

N – isobutyl – 2, 6, 8 – decatrienamide



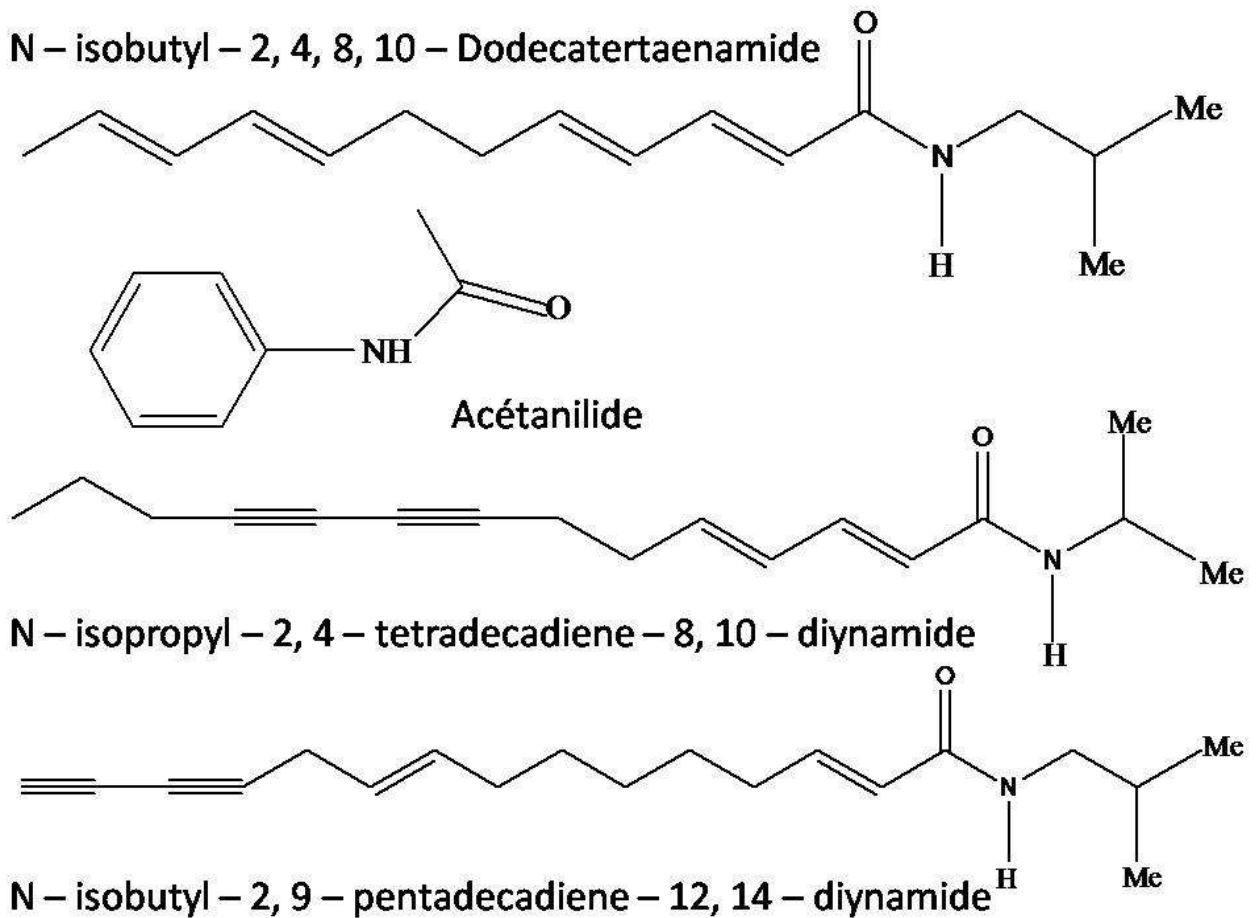


Figure 1.4 : les Alkamides d' *Anacyclus pyrethrum*. (Althaus, J.B *et al.*, 2014 ; Elazzouzi ,H *et al.*, 2015)

B.1.3.2 Propriétés biologiques des racines d' *Anacyclus pyrethrum* :

Selon la bibliographie, un nombre important de travaux biologiques sont signalés dans des revues spécialisées (Tableau 1.6)

Tableau 1.6 : Activités biologiques et pharmacologiques des racines d'APY.

activité biologique	Références
Aphrodisiaque, Anti-rhumatismal et anti-arthritique ,Anti-bactérien et anti-viral , Antibiotique , Anti-catarrhal , Carminatif , Digestif , Diurétique , Emménagogue , Vermifuge , Sialagogue.	Kishor, K.V <i>et al.</i> , 2012 ; Usmani, A <i>et al.</i> , 2016
Anti-inflammatoire, anabolisant et aphrodisiaque, tonique et stimulant des nerfs, anti-épilepsie, stimulant des gencives.	Kalam, M.A <i>et al.</i> , 2015
propriétés pharmacocinétiques cutanées locales des N-alkylamides végétaux, pellitorine et anacycline.	Lieselotte, V <i>et al.</i> , 2015
Anti-inflammatoires, antibactériennes et insecticides, aphrodisiaque; anti-rhumatismes, anti-sciatiques, le rhume et les névralgies.	Monika, P <i>et al.</i> , 2012 ; Monika, P <i>et al.</i> , 2013 ; Elazzouzi ,H <i>et al.</i> , 2014
les acides gras identifiés dans différents extraits ont montré un fort effet inhibiteur sur PTP1B.	Gulnar, K <i>et al.</i> , 2014
sialagogue et est fréquemment utilisé pour les maux de dents.	Selles, Ch <i>et al.</i> , 2012 a et b
amélioration dans le comportement sexuel des rats mâles.	Sharma, V <i>et al.</i> , 2013
antimicrobienne (<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> et <i>Staphylococcus aureus</i>).	Vikas, S <i>et al.</i> , 2010 ; Ajay, k <i>et al.</i> , 2012
antibactérienne (<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> et <i>Klebseilla pneumoniae</i>)	Daoudi, A <i>et al.</i> , 2019
propriétés immunostimulantes.	Bendjeddou, D <i>et al.</i> , 2010

C : Description de *Pistacia lentiscus* :

C.1 Présentation de *Pistacia lentiscus* :

C.1.1 Caractères morphologiques :

Pistacia lentiscus L. est une plante de la famille Anacardiaceae, espèce spontanée très connue en Méditerranée (Benhammou, N *et al.*, 2007 ; Cherbal, A *et al.*, 2012). Le pistachier lentisque couramment appelé « Drou » en arabe local (On l'appelle aussi arbre à mastic car sa sève est utilisée pour l'obtention d'une gomme à odeur prononcée), est un arbrisseau ramifié de trois mètres de hauteur, à odeur de résine fortement âcre (Bammou, M *et al.*, 2015). Arbuste à feuilles persistantes, avec des parties mâles et femelles, qui présente une forte odeur de résine, mesurant de 1 à 5 mètres. Il arrive à sa hauteur maximale à 40-50 ans. Dans les zones appropriées, qui lui permettent de pousser librement, il atteint souvent les 7 mètres de haut. Les feuilles sont alternées, tannées et en forme de plume, avec des pétioles ailés et cinq à six paires de petites feuilles vertes foncées.

Tableau 1.7 : Classification de *Pistacia lentiscus*.

Classification de (L.)Link, 1822		Classification APG III (2009)	
Règne	Plantae	Cladus	Malyidees
Division	<i>Magnoliophyta</i>	Ordre	sapindales
Classe	<i>Magnoliopsida</i>	Famille	<i>Anacardiaceae</i>
Ordre	<i>Sapindales</i>	Genre	<i>Pistacia</i>
Famille	<i>Anacardiaceae</i>	Espèce	<i>Pistacia lentiscus</i>
Genre	<i>Pistacia</i>		
Nom binominal			
<i>Pistacia lentiscus</i> L., 1753			

Les noms communs et vernaculaires (autres dénominations) :

Nom Français : Pistachier lentisque

Nom Anglais : Mastic Tree

Nom Arabe : الضررو



Figure 1.5 : Représentation des feuilles de *Pistacia lentiscus*. (source : google image)

C.1.2 Utilisations traditionnelles :

Les vertus thérapeutiques de cette espèce sont connues depuis l'antiquité, où les anciens égyptiens ont utilisé le mastic du *Pistacia lentiscus* L. pour l'embaumement. Le lentisque constitue une source principale de la production d'oléorésine. Cette résine est utilisée comme antiseptique du système respiratoire et peut être bénéfique dans le traitement d'ulcères de l'estomac, contre l'hypertension, dans le traitement d'eczémas, de diarrhées, de jaunisses, d'asthmes, et comme antipyrétique et anti-inflammatoire (Beloued, A.,1998, Baba Aissa, F.,1999, Benhammou, N *et al.*, 2007). Les médecines traditionnelles pratiquées de part et d'autre des rives de la méditerranée, attribuent au lentisque des vertus dans le traitement des ulcères, l'hypertension, la toux, les maux de gorge, l'eczéma, des calculs rénaux et la jaunisse. Le mastic de *Pistacia* a été utilisé par les guérisseurs traditionnels pour le soulagement des douleurs abdominales, des maux d'estomac, la dyspepsie et l'ulcère gastroduodéal (Bammou, M *et al.*, 2015).

Le Lentisque est astringent, cicatrisant, diurétique, antitussif, sa résine est utilisée pour les maux d'estomac ou en fumigation contre la fièvre. Son huile sert pour les massages contre les maux de dos, les varices et les jambes lourdes. Le Lentisque entre dans la composition de remèdes pour améliorer la digestion. Sa gomme était mâchée durant l'Antiquité, notamment pour purifier l'haleine.

Le lentisque a été largement utilisé en médecine traditionnelle décrit comme efficace. Il agit comme sédatif de la toux et des spasmes bronchiques, corrige l'atonie de l'estomac et de l'intestin, améliore l'appétit et abaisse la fièvre. Le décocté de la plante est d'ailleurs efficace pour le traitement du diabète, de l'hypertension et des néphropathies. De nombreuses autres études ont démontré une gamme élargie des activités biologiques de cette plante à savoir l'effet anti-inflammatoire. Traitement de différents types de maladie telle que : Affection oculaire, soin des cheveux, affection cutané, Antimigraineux (Rhattas, M *et al.*, 2016).

Différentes parties de ces espèces ont été utilisées en médecine traditionnelle à des fins diverses, telles que les affections toniques, aphrodisiaques, antiseptiques, antihypertensives et la gestion des troubles dentaires, gastro-intestinaux, du foie, des voies urinaires et des voies respiratoires (Bozorgi, M *et al.*, 2013).

C.1.3 Etudes antérieures sur *Pistacia lentiscus* :

C.1.3.1 Travaux chimiques sur les feuilles de *Pistacia lentiscus* :

En raison de sa large utilisation en médecine traditionnelle, les différentes parties de cette espèce ont fait l'objet de plusieurs études phytochimiques afin d'identifier leurs principes actifs. Ces études consacrées essentiellement au mastic ont montré la présence de flavonoïdes, des huiles essentielles, ainsi que des triterpénoïdes (Marner, F.J *et al.*, 1991; Papageorgiou, V.P *et al.*, 1997). Cependant, on ne trouve que peu d'études qui se sont intéressées aux composés chimiques des feuilles et des fruits (Tableau 1.8).

Tableau 1.8 : Métabolites secondaires identifiés dans l'espèce PLE.

Partie de plante	Métabolites secondaires	Références
feuilles, fruits et racines	flavonoïdes, tanins et anthocyanines, notamment dans les feuilles	Youcef, Y.K <i>et al.</i> ,2007; Zitouni, A <i>et al.</i> , 2016
feuilles	teneur totale en phénol (122,72 ± 1,16 mg GAE / g) et en flavonoïdes (18,41 ± 0,43 mg QE / g).	Bouyahya, A <i>et al.</i> , 2018
feuilles	huile grasse (myrcène, limonène, terpinen-4-ol, α -pinène, β -pinène, α -phellandrène, sabinène, p-cymène et γ -terpinène).	Benhammou, N <i>et al.</i> , 2007
fruits	acide oléique (50 -72%), acide palmitique (23,2%) et acide linoléique (21,7%), les autres acides gras sont retrouvés en faible quantités [acide palmitoléique (1.3%), stéarique (1.1%), linoléique (0.8%), gadoléique (0.2%) et arachidique (trace)]. Quatre stérols dans l'huile fixe : β -sitostérol (90%), lecamestérol, le cholestérol et le stigmastérol	Trabelsi, H <i>et al.</i> , 2012
graines	rendement en huile 10,41%. Les valeurs d'acide et d'acide gras libre indiquent que l'huile a une faible acidité	Boukeloua, A <i>et al.</i> , 2012
fruits	analyse par GC-MS et leurs quantités de protéines totales [palmitique (25,75 ± 0,82, 25,44 ± 0,65) et les acides linoléiques (20,59 ± 0,03, 20,27 ± 0,81)] étaient les principaux acides gras.	Boukeloua, A <i>et al.</i> , 2016
feuilles	glycosides de flavonoles [quercetine, myricetine, luteoline ainsi que l'isoflavone genisteine], 6 à 7% du gallotannins de faible poids moléculaire, a savoir l'acide gallique et les dérivés d'acide quinique 5-O-, 3,5-O-di- et 3,4,5-O-trigalloyl	Romani, P <i>et al.</i> , 2002
feuilles	terpinene-4-ol (41.24%) and α -terpineol (7.31%), α -pinene (9.48%), limonene (09.11%), β -myrcene (10.5%), p-cymene (8.67%) and α -phellandrene (2.20%), β -caryophyllene (12.62%)	Anastasia, T <i>et al.</i> ,2007 ;Hamiani, A <i>et al.</i> , 2016
feuilles, fruits et racines	terpènes, composés phénoliques, fatty acides et stérols	Bozorgi, M <i>et al.</i> , 2013

C.1.3.2 Propriétés biologiques des feuilles de *Pistacia lentiscus* :

Plusieurs études ont signalé que l'huile essentielle des parties aériennes de *Pistacia lentiscus* L. possède des propriétés antifongiques et antibactériennes appréciables. L'huile fixe de fruits du lentisque est souvent utilisée comme un remède d'application externe locale sous forme d'onguent pour soigner les brûlures ou les douleurs dorsales (Bammou, M *et al.*, 2015).

Tableau 1.9 : Activités biologiques de l'espèce PLE.

Partie de plante	activité biologique	Références
feuilles, tiges, fruits et racines	tous les extraits de feuilles, de tiges et de racines ont révélé une puissante capacité antioxydante totale et des activités élevées pour éliminer le radical DPPH, réduire le pouvoir et inhiber l'oxydation du β -carotène. Les fruits présentent les valeurs les plus faibles d'activité antioxydante.	Zitouni, A <i>et al.</i> , 2016
feuilles	l'huile essentielle et les différents extraits testés sont dotés d'une activité antibactérienne considérable contre : <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Proteus mirabilis</i> .	Bammou, M <i>et al.</i> , 2015
feuilles	capacité antiradicalaire de l'huile ($IC_{50} = 37,38 \mu\text{g} / \text{ml}$).	Bouyahya, A <i>et al.</i> , 2018
feuilles	Le test DPPH montre que l'huile essentielle possède une activité antiradicalaire.	Nabila, B <i>et al.</i> , 2008 ; Hamiani, A <i>et al.</i> , 2016
feuilles	inhibant différentes phases de l'inflammation.	Bouriche, H <i>et al.</i> , 2008
Fruits	effet potentiel de l'huile grasse et de sa fraction insaponifiable sur la cicatrisation des plaies cutanées chez le rat.	Boulebdou, N <i>et al.</i> , 2009
graines	toxicité aiguë d'huile fixe chez les souris.	Boukeloua, A <i>et al.</i> , 2012
Fruits	activité cicatrisante significative plus élevée dans l'huile grasse par rapport à la cire.	Boukeloua, A <i>et al.</i> , 2016
Fruits	effet de l'huile grasse sur le processus de guérison et son innocuité pour la peau et les muqueuses chez le modèle de lapin.	Djerrou, Z <i>et al.</i> , 2013
feuilles, tiges, fruits et racines	antioxydants, antimicrobiens, antiviraux, anticholinestérasés, anti-inflammatoires, antinociceptifs, antidiabétiques, antitumoraux, antihyperlipidémiques, anti-athérosclérotiques et hépatoprotecteurs, ainsi que leurs effets bénéfiques dans les troubles gastro-intestinaux.	Nabila, B <i>et al.</i> , 2013 ; Bozorgi, M <i>et al.</i> , 2013

Chapitre 2 : Méthodes d'évaluation biologiques utilisées.

A : Activité Cytotoxique :

Le principe général des tests de cytotoxicité consiste à mesurer, lors d'expositions à une substance, un ou différents effets critiques sur des cellules en culture, tels que : survie des cellules, atteintes morphologiques de la cellule et atteintes du fonctionnement de la cellule (émission de lumière, inhibition de la synthèse d'ARN, inhibition de mobilité ...) (Geethaa, S *et al.*, 2010 ; Gadir, S.A., 2012).

A.2.1 Les tests de cytotoxicité :

L'étude bibliographique réalisée a montré que divers essais de cytotoxicité ont été mis en œuvre. De façon schématique, 2 types d'essais :

- ① Sur la survie ou le développement des cellules (ce sont des essais faciles à mettre en œuvre),
- ② Sur des altérations des fonctions cellulaires.

Un objectif clé pour les toxicologues est d'identifier les essais *in vitro* et *in vivo* pouvant être utilisés pour prévoir les effets toxiques. De plus, des tests *in vitro* et *in vivo* sont nécessaires pour mieux développer les techniques de dépistage plus rapidement (Hartl, M *et al.*, 2000 ; Rajabi, S *et al.*, 2015).

A.2.2 Critères de test de toxicité :

La toxicité des extraits d'herbes exprimée en valeurs de CL₅₀ est généralement valorisée soit par rapport à Meyer ou à l'indice de toxicité de Clarkson.

Selon l'indice de toxicité de Meyer : (Meyer, B.N *et al.*, 1982)

1. les extraits contenant les CL₅₀ < 1000 µg / mL sont considérées comme toxiques.
2. tandis que les extraits CL₅₀ > 1000 µg / mL sont considérés comme non toxiques.

Critère de toxicité de Clarkson : les extraits dont la :

1. CL₅₀ est supérieure à 1000 µg / mL sont non toxiques.
2. CL₅₀ est de 500 - 1000 µg / mL sont peu toxiques.

3. CL₅₀ de 100 - 500 µg / mL sont moyennement toxiques.
4. CL₅₀ est 0 - 100 µg / mL sont hautement toxiques.

A.2.3 Test de toxicité sur le modèle d'*Artemia salina* :

C'est un essai biologique sur la létalité des crevettes de saumure, fondé sur la capacité de tuer les crevettes de saumure d'élevage connu sous le nom : *Artemia salina* nauplii, le bio-essai a été proposé par Michael en 1959 et ce dernier développé en 1981 par Vanhaecke (Gadir, S.A ., 2012). L'essai est considéré comme un outil pour l'évaluation préliminaire de la toxicité des extraits de plantes, métaux lourds et pesticides, et un outil très utile pour l'isolement de composés bioactifs à partir d'extraits de plantes (Gadir, S.A ., 2012). Cet essai a été adopté par de nombreux laboratoires, comme méthode d'estimation préliminaire de toxicité. *Artemia salina* est l'un des tests les plus précieux organismes disponibles pour les essais d'écotoxicité, et de criblage des extraits à la recherche de substances potentiellement toxiques (Rajabi, S *et al.*, 2015).

La létalité *in vivo* dans un simple organisme zoologique, tel que le test de létalité des crevettes de saumure (BSLT) pourrait être utilisé comme un outil simple pour guider le dépistage et fractionnement d'extraits de plantes physiologiquement actifs.

Le dosage de la BSL est reconnu comme un test général pour le criblage de composés bioactifs (McLaughlin, J. L., 1991 ; Mackeen, M.M *et al.*, 2000 ; Carballo, J.L *et al.*, 2002), la technique est décrite comme facile à maîtriser, coûte peu et utilise une petite quantité de matériel d'essai (Mclaughlin, J.L *et al.*, 1988). Depuis son introduction en 1982, par Meyer (Meyer, B.N *et al.*, 1982), il apparaît que le test BSL est prédictif de la cytotoxicité et a été utilisé successivement pour le fractionnement guidé par bio analyse d'agents cytotoxiques et anti tumoraux actifs, comme indiqué par plusieurs auteurs (Solís, P.N *et al.*, 1993 ; Carballo, J.L *et al.*, 2002 ; Mongelli, E *et al.*, 2002). Le National Cancer Institute (NCI, USA) a démontré une corrélation significative entre le dosage de la saumure et de la crevette et l'inhibition de la croissance *in vitro* de lignées de cellules tumorales solides humaines (Anderson, J.E *et al.*, 1991).

A.2.3.1 Description d'*Artemia salina* :

Les jeunes larves de crevettes sont appelées nauplii (nauplii; singulier nauplius), environ 22 mm de long, sont assez grandes pour observer sans haute grossissement et assez petit pour éclore en quantité énorme sans espace de travail étendu dans un laboratoire (Bahuguna, A *et al.*, 2017 ; Quazi, S.S *et al.*, 2017). Les mâles sont plus petits, mais plus fort et plus actif que les femelles, les mâles ont un corps translucide et sont parfois bleu-vert, les femelles sont de couleur marron / rouge. Ils sont excellents comme matériel pédagogique zoologique pour laboratoires, ils sont des organismes supérieurs pour essais d'insecticides, Ce crustacé fait preuve d'une grande sensibilité contre une large gamme de composés.

		<u>Classification :</u>
<u>Nom anglais :</u>		<u>Phylum :</u> Arthropodes
Brine shrimp		<u>Classe :</u> Crustacés
		<u>Ordre :</u> Anostracés
<u>Nom scientifique :</u>		<u>Famille :</u> Artemidae
<i>Artemia salina</i>		<u>Genre :</u> Artemia Leach
		1819



Figure 1.6 : Représentation d'*Artemia salina*. (Win Aung, Kh.Kh *et al.*, 2001)

A.2.3.2 Principe :

L'essai biologique de détermination de la létalité des crevettes de saumure est un bio-essai complet pour les composés bioactifs d'origine naturelle et synthétique. Par cette méthode les extraits des plantes, les fractions ainsi que les composés purs peuvent être testés pour leur bio-activité. Le procédé utilise la létalité *in vivo* dans un organisme zoologique simple " Brine nauplii " comme moyen de contrôle pour le dépistage des extraits. Le test présente l'avantage d'être rapide (24 heures), peu coûteux et simple. Il utilise facilement un grand nombre d'organismes pour validation statistique et ne nécessite aucun équipement spécial et une quantité relativement

petite d'échantillon (2-20 mg ou moins) (Sirintorn, P *et al.*, 2004 ; Asaduzzaman, Md *et al.*, 2015).

A.2.4 Avantages et inconvénients du Test sur *Artemia salina* :

L'essai de toxicité sur *Artemia salina* est un système pratique pour la surveillance des activités biologiques de différentes espèces de plantes. Bien que cette méthode ne fournisse aucune information adéquate en ce qui concerne le mécanisme de l'action toxique, c'est une méthode très utile pour l'évaluation du potentiel toxique de divers extraits de plantes.

Cette méthode fournit des données de dépistage préliminaires pouvant être étayé par des bio-essais plus spécifiques une fois que l'actif des composés ont été isolés.

Ce test présente plusieurs avantages qui peuvent être résumés comme suit (Mentor, R.H *et al.*, 2014) :

- ✓ Rapidité : la surveillance pourrait être étendue à maximum 60 heures, mais dans la plupart des cas, les données pour les calculs de la CL₅₀ sont obtenues après 24 heures d'exposition.
- ✓ Simplicité : aucune formation spéciale requise pour le l'équipement et le dosage.
- ✓ exigences minimales : pas de techniques aseptiques, pas de équipement, relativement peu d'essais un échantillon est nécessaire et un grand nombre d'organismes de test du même âge et physiologique condition peut être facilement obtenue pour commencer la tester.
- ✓ Robustesse : les kystes sont commercialement et facilement disponibles pour que les tests puissent être effectués dans le monde entier avec le même matériau d'origine et sans aucun problème d'approvisionnement.
- ✓ Peu coûteux : la quantité de kystes requise par test est très faible, de sorte que le prix du produit biologique le matériau est négligeable.

B : Activité Antioxydante :

B.2.1 Antioxydants :

Les antioxydants, seules molécules pouvant protéger l'organisme vivant des dommages causés par les radicaux libres, peuvent prévenir la plupart des affections chroniques comme la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, l'artériosclérose, la polyarthrite chronique ou encore les cancers. Une des solutions est de compléter le régime alimentaire avec des composés antioxydants ; ainsi les formulations à base d'antioxydants sont considérées comme les moyens de prévention contre les affections chroniques. Ce qui intensifie les recherches sur de nouvelles molécules antioxydantes naturelles issues de plantes (Kplolali, Y. A . A *et al.*, 2010).

B.2.2 Evaluation des propriétés Antioxydantes :

B.2.2.1 Méthode de DPPH(2,2-Diphenyl-picrylhydrazyl) :

B.2.2.1.1 Principe de la méthode (Réaction entre le radical libre DPPH• et l'antioxydant) :

Le composé chimique 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyle (α,α -diphenyl- β -picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (Figure 1.7). Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères, i.e. DPPH• reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire. La délocalisation provoque aussi la couleur bleue bien caractéristique de la solution de DPPH•. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration bleue, due à une recombinaison des radicaux DPPH•, mesurable par spectrophotométrie à 515 - 518 nm (Luciana, L.M *et al.*, 2001 ; Mahmoudi, M *et al.*, 2009).

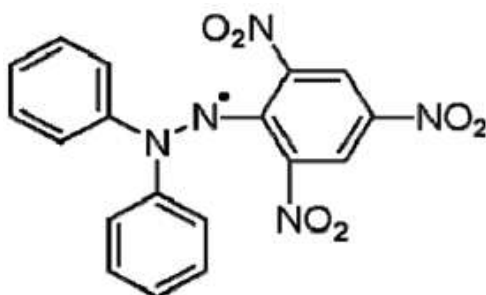
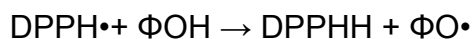


Figure 1.7 : Structure chimique du radical libre DPPH•.

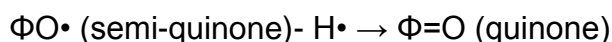
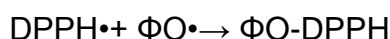
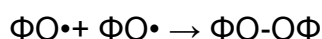
Le piégeage des radicaux libres par des antioxydants est tributaire de deux types de mécanismes:

- 1 – la libération de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle (cinétique rapide de certains acides et dérivés phénoliques)
- 2 – la libération d'un électron (cinétique lente des dérivés glycolyses et des anthocyanes).

Dans le cas des composés phénoliques (Φ -OH), le mécanisme principal d'action est le piégeage des radicaux libres par le transfert de l'atome H sur le DPPH• alors transforme en une molécule stable DPPHH (Ojeil, A et al., 2010) :



Plusieurs voies réactionnelles sont alors possibles qui forment des structures plus ou moins stables :



La capacité anti-radicalaire (capacité à fixer des radicaux libres, donc à arrêter la propagation de la réaction en chaîne) ne peut être mesurée directement, mais par contrôle de l'effet de la réactivité. Plusieurs facteurs influent sur le potentiel antioxydant et la cinétique de réduction, notamment les conditions de la réaction (temps, rapport Antioxydant/DPPH•, type de solvants, pH) et le profil phénolique en particulier.

B.2.2.1.2 Méthode qualitative : chromatographie sur couche mince de silice :

Les échantillons ont été dilués dans de l'éthanol pur à 0,4 - 0,2 - 0,1 - 0,05 et 0,01 mg/mL

- ✓ *Contrôles positifs* : Le BHT (antioxydant synthétique : Butyl hydroxytoluène) a été utilisé comme contrôle positif aux mêmes concentrations.
- ✓ *Dépôt des échantillons* : Les aliquots (10µL d'échantillon ou de contrôles positifs) ont été déposés sur la plaque de silice. Après séchage, la plaque a été complètement trempée dans un bac contenant une solution de DPPH (0,4 mM), puis relevée 10 secondes après le trempage, posée sur du papier filtre (Whatman) et finalement séchée. Des taches blanches apparaissent reflétant le pouvoir antiradicalaire (Ojeil, A *et al.*, 2010).

B.2.2.1.3 Méthode quantitative :

Les échantillons ont été dilués dans de l'éthanol pur à différentes dilutions 50 - 10 - 5 et 1 mg/mL.

- ✓ *Contrôles positifs* : une solution de 1 mg/mL de contrôles positifs (BHT) a été préparée.
- ✓ *Dosage quantitatif au DPPH des composés phénoliques totaux* : 450 µL de tampon Tris-HCl (50 mM, pH 7,4) sont versés dans un tube de 2 mL. 50 µL des échantillons à étudier ou des contrôles (concentration connue) ont été ajoutés au tampon. 1,5 mL de la solution de DPPH à 0,1 mM, ont été ajoutés au mélange.

Le tout a été incubé pendant 30 minutes à température ambiante. L'absorbance est lue à 517 nm contre un blanc préparé avec du méthanol pur (Ojeil, A *et al.*, 2010).

B.2.2.2 Méthode du thiocyanate de fer (FTC) :

Les échantillons ont été dilués dans de l'éthanol pur à une dilution de 0,1 mg/mL.

- ✓ *Contrôles positifs* : Une solution de 1 mg/mL de contrôles positifs (BHT : hydroxyle toluène butyle) a été préparée.

-
- ✓ Un contrôle négatif a été également préparé contenant tous les réactifs à l'exception des composés phénoliques totaux ou l'agent antioxydant.
 - ✓ *Evaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques* : A 3,9 mL d'eau distillée, 4 mL d'extraits ou de contrôles positifs sont ajoutés à une concentration de 0,1 mg/mL. 4 mL d'émulsion d'acide linoléique à 2,52% et 8 mL de tampon phosphate Na_2HPO_4 à 0,05M, pH 7 sont respectivement ajoutés. Le mélange a été placé après agitation au four à 400C dans l'obscurité. Une heure après l'incubation, 9,7 mL d'éthanol à 75%, 0,1 mL de thiocyanate d'ammonium à 30% et 0,1 mL des solutions incubées sont mélangés avec 0,1 mL de Chlorure de fer II (FeCl_2) à 0,02 M . L'absorbance est mesurée à 500 nm exactement 3 minutes après l'ajout de FeCl_2 .

Toutes les 24 heures, les 5 dernières étapes de la manipulation sont répétées et ce jusqu' à 72 heures (Antolovich, M *et al.*, 2002).

B.2.2.3 Méthode de test Ferric Reducing Ability of Plasma

(FRAP) *in vitro* :

Cette méthode est déterminée en utilisant la technique d' Oyaizu, M .,1986, basée sur la réaction chimique de la réduction du Fe^{3+} présent dans le complexe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en Fe^{2+} . La réaction est révélée par le virement de la couleur jaune du fer ferrique (Fe^{3+}) en couleur bleue verte du fer ferreux (Fe^{2+}). Cette capacité réductrice peut servir comme un indicateur

significatif d'une activité antioxydante potentielle d'un composé.

Les différentes concentrations des extraits dans l'eau distillée (1 mL) sont mélangées avec 2.5 mL de la solution tampon phosphate (0.2 M, pH 6.6) et 2.5 mL de ferricyanure de potassium [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] (1%). Les mélanges sont incubés à 50°C pendant 20 min. Après, 2.5 mL de l'acide trichloracétique (10%) est additionné. Ce dernier mélange est centrifugé à 3000 tours pendant 10 min. A la fin, 2.5 mL de surnageant de chaque concentration est mélangé avec 2.5 mL de l'eau distillée et 0.5 mL de $\text{FeCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$ (0.1%).

L'absorbance est mesurée à 700 nm. L'augmentation de l'absorbance dans le milieu réactionnel, indique l'augmentation de la réduction de fer. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif.

La valeur de CI_{50} (mg / mL) qui est la concentration des antioxydants, nécessaire pour réduire 50% de la concentration initiale des ions ferriques, est un indice utilisé pour comparer et exprimer la puissance des capacités réductrices des substances bioactives. L'acide gallique est utilisé comme contrôle positif dans cette technique dans les mêmes conditions expérimentales (Kplolali, Y. A . A *et al.*, 2010 ; Kholkhal, F *et al.*, 2013).

B.2.2.4 Méthode de Dosage ABTS :

La procédure basée sur l'inhibition de la production du radical ABTS (2, 2 A-Azinobis(3-hylbenzthiazoline)-6-sulfonic acid), présente une solubilité dans l'eau et une stabilité chimique élevées. C'est un substrat de la peroxydase qui, lorsqu'il est oxydé en présence de H_2O_2 , génère un cation radical métastable avec un spectre d'absorption et capacité d'absorption molaire élevée à 414 nm. Cependant, il existe des d'absorption secondaires dans des régions de longueur d'onde de 645, 734 et 815 nm.

L'accumulation de $ABTS^{4+}$ peut être inhibée par la présence d'un antioxydant dans le milieu réactionnel, dans une mesure et sur une période correspondant à l'activité antioxydante. La capacité relative des antioxydants donneurs d'hydrogène à piéger $ABTS^{4+}$ générés en phase aqueuse peut être mesurée par spectrophotométrie, par mesure dans le proche infrarouge à 734 nm, Le test ABTS a été utilisé pour mesurer l'activité antioxydante totale dans les substances pures, dans les fluides corporels et dans les matières végétales (Antolovich, M *et al.*, 2002).

B.2.2.5 Méthode de Dosage de la phycoérythrine :

Les protéines hautement fluorescentes b-phycoérythrine et R-phycoérythrine (PE), dérivées de nombreuses espèces d'algues rouges, ont été utilisées comme cibles

des dommages des radicaux libres. Les radicaux pyroxyles générés par la décomposition thermique de l'AAPH (2,2A-Azobis (2-amidinopropane) hydrochloride) éteignent la fluorescence de la phycoérythrine en ajoutant un antioxydant qui réagit rapidement avec les radicaux pyroxyles inhibe la perte d'intensité de fluorescence et cette inhibition est proportionnelle à l'activité antioxydante. La phycoérythrine est également utilisée pour évaluer l'efficacité des antioxydants contre les radicaux hydroxyles. Les radicaux hydroxyles sont générés à partir d'un système situé sur des sites de liaison du cuivre sur des macromolécules. La réaction provoque des lésions macromoléculaires spécifiques au site.

L'inhibition de l'oxydation par un antioxydant peut être examinée en retardant la perte de fluorescence, l'inhibition étant proportionnelle à l'activité anti-oxydante. Les résultats finaux peuvent être calculés en utilisant les différences de surfaces sous les courbes de dégradation de la phycoérythrine entre le blanc et un échantillon et sont exprimées en équivalents trolox (Antolovich, M *et al.*, 2002).

B.2.2.6 Capacité antioxydante totale (CAT) :

Ce test est évalué par la méthode de phosphomolybdène (Prieto., P *et al.*, 1999). Il est basé sur la réduction de Molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate MoO_4^{2-} en molybdène Mo (V) MoO^{2+} , en présence de l'extrait pour former un complexe vert de phosphate/ Mo(V) à pH acide.

Un volume de 0.3 mL de chaque extrait est mélangé avec 3 mL de la solution du réactif (0.6 M acide sulfurique, 28 mM phosphate de sodium et 4 mM molybdate d'ammonium). Les tubes sont incubés à 95°C pendant 90 min. Après refroidissement, l'absorbance des solutions est mesurée à 695 nm, contre le blanc qui contient 3 mL de la solution du réactif et 0.3 mL du méthanol, dans les mêmes conditions. La capacité antioxydante totale est exprimée en milligramme équivalents acide ascorbique par gramme de la matière sèche (mg EAA/ g MS). Les expériences sont répétées 3 fois.

**Chapitre 3 : Métabolites
Secondaires Isolées et
identifiés : Les alkamides**

Introduction :

Les métabolites secondaires sont des molécules ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante. Ils y jouent différents rôles, dont celui de moyen de défense contre les agressions externes. Dans ce chapitre, nous présenterons l'aspect structural et biosynthétique des alkamides qui constituent les catégories les plus importantes des métabolites secondaires séparés et identifiés dans ce présent travail. Les alkamides comprennent plus de 200 composés apparentés. Il y a des études révélant beaucoup d'informations utiles sur la structure, la chimie et l'activité biologique de cette nouvelle classe de composés (Alina, M.C *et al.*, 2007). Cependant, il existe un manque d'informations sur la répartition naturelle et leurs conséquences (Ramirez-Chavez, E *et al.*, 2011).

3.1 Définition et Généralités sur les alkamides :

Les alkamides représentent une classe de produits naturels avec une diversité structurale remarquable et un large spectre de bioactivités (Molina, T.J *et al.*, 1999 ; Althaus, J *et al.*, 2017).

3.2 Classification des alkamides :

Structurellement, les alkamides naturels ont généralement un résidu amine aliphatique, cyclique ou aromatique, et une chaîne saturée ou insaturée en C8 à C18 (y compris les doubles ou triples liaisons, ou les deux), qui peut également être aromatique. La nature de l'acide (longueurs de chaîne carbonée, niveau d'insaturation, stéréochimie, etc.) et les résidus d'amine sont caractéristiques de chaque famille et genre de plantes, de sorte que ces caractéristiques servent de critères chimiotaxonomiques (Althaus, J.B *et al.*, 2017). Comme l'atome d'azote des alkamides ne fait pas partie d'un cycle hétérocyclique, ces composés sont classés comme proto-alcaloïdes ou pseudo-alcaloïdes.

Malgré l'architecture moléculaire relativement simple des alkamides, ces produits naturels présentent une grande variabilité structurale et une gamme importante d'activités biologiques, telles que les activités immun modulatrices, antimicrobiennes, antivirales, larvicides, insecticides, diurétiques, piquantes et analgésiques (Clifford, L.J *et al.*, 2002).

Du point de vue chimique, les N-alkylamides sont clairement une classe hétérogène de molécules structurellement différentes. Actuellement, il n'existe pas de système de classification formel cohérent pour les N-alkylamides, et différents sous-groupes sont utilisés par les différents groupes de recherche, par ex. N-isobutyl-, 2-méthylbutyl-, isopentyl-, phényléthylamides et tyramides. Selon certains auteurs les N-alkylamides sont constitués d'une partie acide et d'une partie amino (figure 1.8).

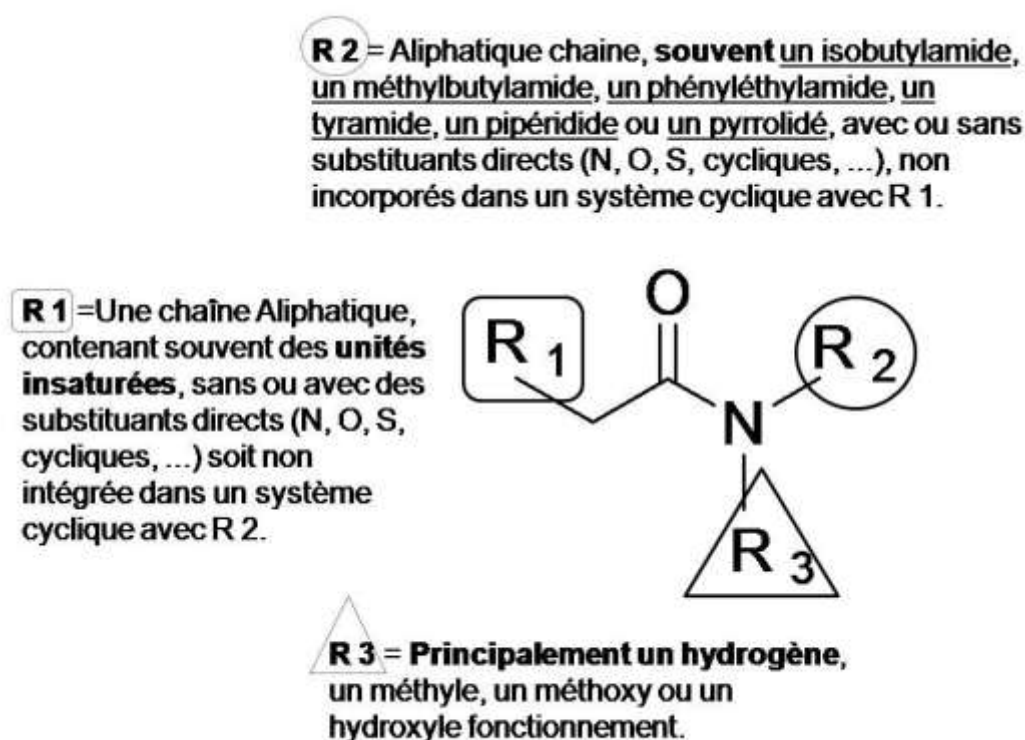


Figure 1.8 : Propriétés structural des alkamides.

Le groupe R₁ correspond à la partie acide gras. La classification proposée est construite à partir de des deux parties R₁ et R₂ qui sont caractérisées par une série de groupes méthyle répétés. Pour les deux parties, treize groupes similaires sont définis. Ils peuvent différer en longueur, degré, lieu et configuration de l'insaturation. Ils peuvent posséder des hétéroatomes et des systèmes carboxyliques et / ou hétérocycliques (qu'ils soient aromatiques et / ou substitués).

Le chloroforme est le meilleur solvant pour l'extraction des alkamides, bien que le méthanol et l'éthanol aient été utilisés. Les alkamides purs sont sensibles à l'oxydation et la polymérisation des doubles et triples liaisons se produit pendant le

séchage, la manipulation et stockage de ces composés. Ils sont des substances chimiques prometteuses, des entités pharmacologiques utiles dans le traitement de plusieurs maladies importantes.

3.3 Les alkamides des la famille des Asteraceae :

Les alkamides sont des métabolites secondaires comprenant plus de 200 composés apparentés largement distribués dans les plantes. Ces amides ont été trouvés dans autant de 10 familles de plantes: Aristolochiaceae, **Asteraceae**, Brassicaceae, Convolvulaceae, Euphorbiaceae, Menispermaceae, Piperaceae, Poaceae, Rutaceae et Solanaceae. Plusieurs espèces contenant des niveaux élevés de Les alkamides se trouvent dans les **Asteraceae**, Piperaceae, et Rutaceae (Ramirez-Chavez, E *et al.*, 2004).

Bien qu'aucune classe de constituants ne soit unique à la famille, les Asteraceae ne ressemblent à aucune autre famille botanique par la diversité métabolique qui la caractérise : Sesquiterpène lactones , alcools triterpéniques pentacycliques, composés acétyléniques dérivés d'acides gras, flavonols méthylés et flavones (Lalone, C.A *et al.*, 2007).

Les alkamides sont présents notamment dans certains taxons (*Aaronsohnia*, *Achillea*, *Acmella*, *Anacyclus*, *Artemisia*, *Echinaceae*, *Heliopsis*, *Spilanthes*, *Salmea*, *Sanvitalia* et *Wedelia*) de la famille des Asteraceae. Les études sur les alkamides d'Asteraceae ont été étendues à *Anacyclus pyrethrum* L. et à constituants alkamides. D'un point de vue phylogénique, *Anacyclus pyrethrum* est étroitement apparenté à *Achillea ptarmica* L. au sein de la tribu Anthemideae d'Asteraceae, et les deux espèces sont connues pour contiennent un motif structural similaire aux alkamides (Althaus, J *et al.*, 2017).

Ces genres partagent la capacité biogénétique de combiner les résidus d'acide oléfinique et acétylénique C 8 à C 18 (à l'exception de C 17) avec les plus répandus N-isobutyle, N-2-méthylbutyle, N-phénéthyle et amines cycliques pipéridinyle (pipéridide), 2,3- déhydro-pipéridinyle (pipéridéide), pyrrolidinyle et pyrrolidyle. Cependant, d'autres amides mineurs comprenant des résidus N-4-méthylbutyle, N-tyramidyle et O-méthyl-tyramidyle ont également été trouvés (figure 1.9).

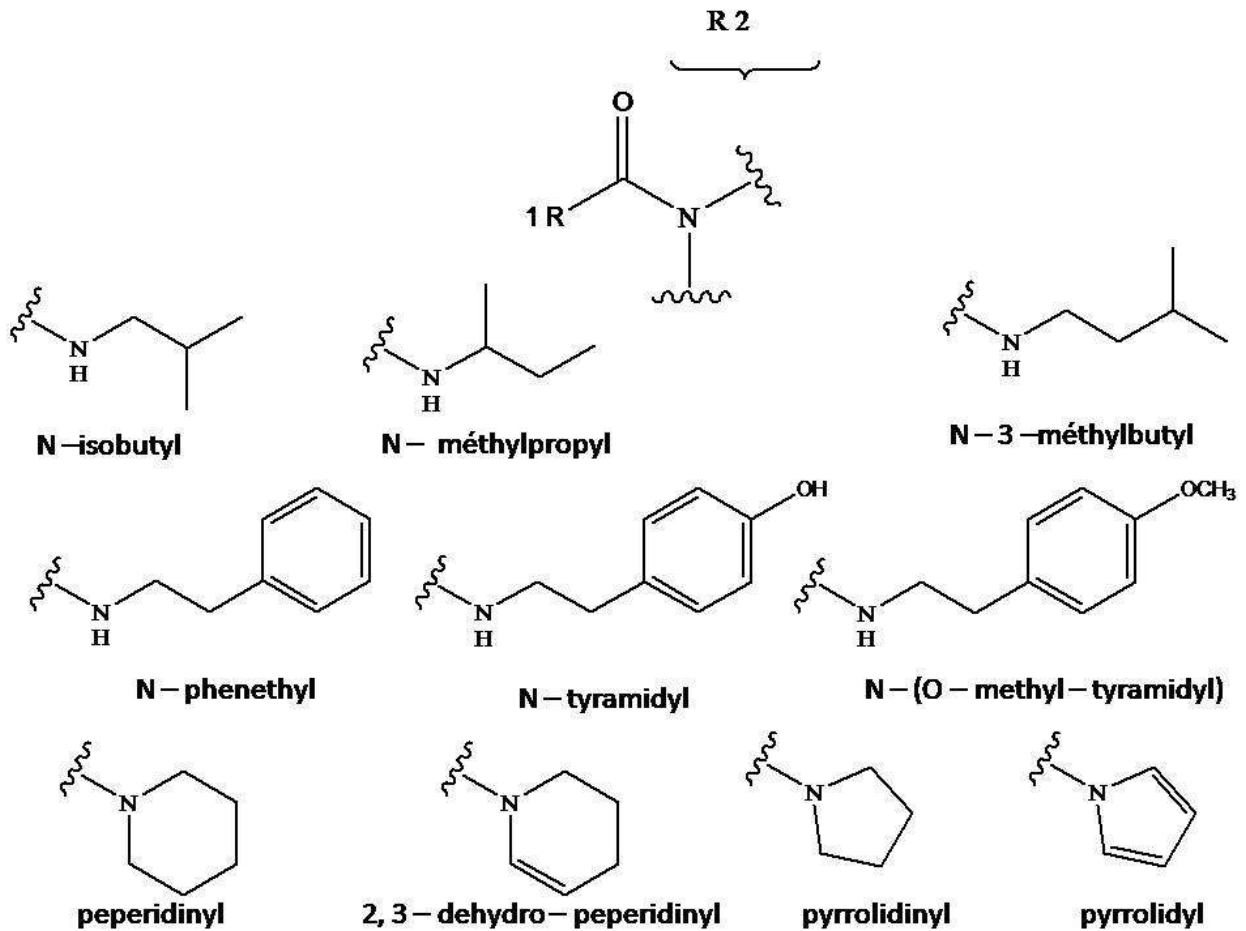


Figure 1.9 : Résidus aminés R₂ des alkamides aliphatiques de la famille des Asteraceae.

Actuellement, les alkamides les plus couramment rencontrés dans la famille des astéracées comprennent les C10, C11 et acides à résidus à longue chaîne C12, qui représente environ 72% de la concentration aliphatique. Le deuxième groupe le plus important de ces ressources naturelles produites comprend les acides résiduels à longue chaîne C14 et C18, constituant environ 13% de l'Alkamides Asteraceae. La plupart des études phytochimiques ont été menées avec les genres *Achillea*, *Acmella*, *Anacyclus*, *Sphilantes*, *Echinaceae* et *Heliopsis* (Sugey, L.M et al., 2011).

3.4 Biosynthèse des alkamides :

Les alkamides représentent une classe unique de produits naturels qui d'un point de vue biogénique sont formés en combinant deux voies différentes métabolique. La partie acide provient d'un acide gras de longueur de chaîne moyen à long pouvant aller de huit à dix-huit atomes de carbone, généralement aliphatique ou linéaire; ceci

lorsqu'il est condensé avec un acide aminé et par décarboxylation concomitante, aboutit à la production d'un alkamide. Les amides dont la chaîne acide est aliphatique en fonction du type de liaisons non saturées qu'ils présentent, peuvent être séparés en deux groupes: les alkamides oléfiniques (avec au moins une double ligature) et les alkamides acétyléniques (avec au moins une triple ligature) ; Seuls des alkamides aliphatiques et acétyléniques ont été trouvés dans le genre *Heliopsis*. Un autre ensemble est constitué d'amides ayant des cycles homo ou hétérocycliques, ce type de structure est observé de manière particulièrement diverse dans la famille Piperaceae et comprend plusieurs alcaloïdes (Garcia-Chavez, A *et al.*, 2004).

Les plantes appartenant aux familles des Asteraceae, des Convolvulaceae, des Euphorbiaceae, des Menispermaceae et des Rutaceae se spécialisent dans la biosynthèse d'alkamides avec des résidus aliphatiques. L'analyse chimique de ces espèces a révélé que les alkamides aliphatiques sont les composants les plus importants et caractéristiques de plusieurs plantes d'Asteraceae sur la base du nombre de composés isolés de chaque plante et du rendement obtenu pour chaque alkamide (Sugey, L.M *et al.*, 2011).

Les voies de biosynthèse des N-alkylamides les plus importantes, que sont tous constitués d'un fragment d'acide gras et d'une partie amine qui sont combinés via une liaison amide (Boonen, J *et al.*, 2012).

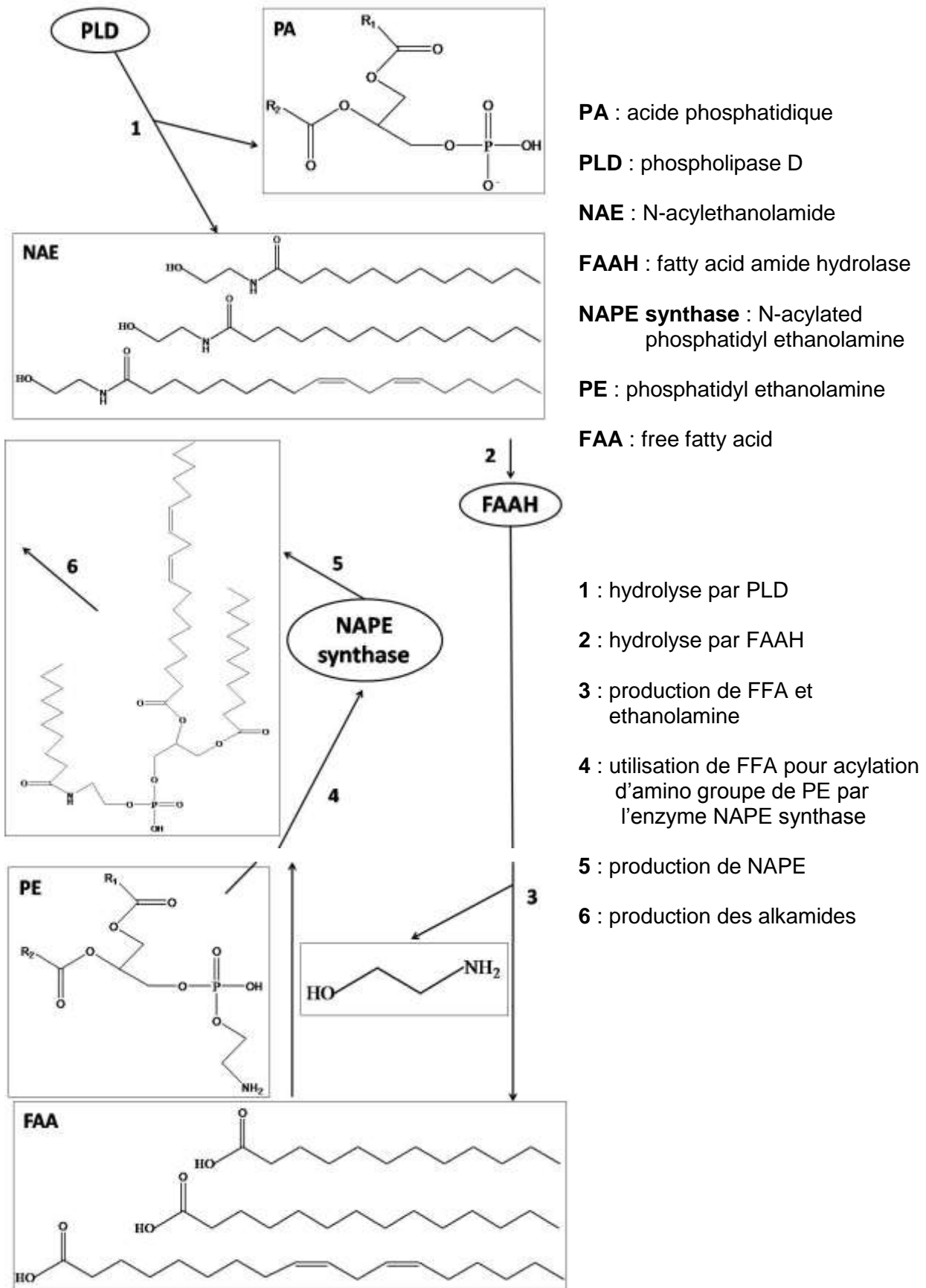


Figure 1.10 : Schéma de la biosynthèse des alkamides. (Alina, M, C *et al.*, 2007)

3.5 Bioactivité des alkamides :

Les alkamides sont des composés bioactifs, qui ont été conçus pour constituer des composés de première importance pour la protection des plantes et les produits biocides actuellement retrouvés plus de 25 familles (Boonen, J *et al.*, 2012).

Ils sont démontrés sur des modèles expérimentaux des effets sialagogues, antitussifs et analgésiques (Garcia-Chavez, A *et al.*, 2004), anti-inflammatoires (Lalone, C.A *et al.*, 2007), insecticide, antifongique, molluscicide et antimicrobien (Ramirez-Chavez, E *et al.*, 2011).

Les alkamides d'*Achillea ptarmica* L., Asteraceae ont montré une activité contre *Plasmodium falciparum* et *Trypanosoma brucei rhodesiense*, agents responsables du paludisme tropical et de la trypanosomose humaine africaine (Althaus, J *et al.*, 2017). Parmi les multiples effets pharmacologiques des alkamides, sa propriété anticancéreuse est la plus prometteuse. Ainsi, de nombreux alkamides isolés des Asteraceae et d'autres familles botaniques se sont révélés présenter une activité cytotoxique *in vitro* contre les lignées cellulaires cancéreuses (Usmani, A *et al.*, 2016). Il convient de noter que la pellitorine a montré une forte activité cytotoxique contre les lignées cellulaires HL60 (souche de leucémie promyélocytaire humaine) et MCT-7 (souche de cancer de Brest), avec des valeurs IC_{50} de 13,0 $\mu\text{g} / \text{mL}$ et 1,8 $\mu\text{g} / \text{mL}$, respectivement (Ee, G.C *et al.*, 2010).

D'autres alkamides, comme la capsaïcine induisent l'apoptose des lignées cellulaires cancéreuses de la prostate, tandis que la pharnilatine le fait pour celles du mélanome cutané, ainsi que pour les poumons, les ovaires et le côlon. Ces rapports et beaucoup impliquant d'autres alkamides, font de ce type de composés un groupe relativement nouveau et prometteur de produits naturels comme source de nouveaux agents anticancéreux (Boonen, J *et al.*, 2012).

Deuxième *Partie* :

Matériels et Méthodes.

2.1 Matériel végétal :

Le matériel végétal a été récolté dans les conditions décrites dans le Tableau 2.1. Les plantes ont été identifiées par le Pr Hocine Laouer (Laboratoire de Valorisation des Ressources Naturelles Biologique, Université Ferhat Abbes Sétif). Les vouchers spécimens ont été déposés dans le laboratoire Pharmacognosie et de Botanique (Département de Pharmacie, Université Salah Boubnider, Constantine 3).

Tableau 2.1 : Informations sur les espèces étudiées.

Plantes	Date de Récolte	Lieu de Récolte	N ° vouchers spécimen
<i>Anacyclus pyrethrum</i>	-	Source commerciale	AN – 00301R
<i>Acanthus mollis</i>	Juin 2010	Skikda (Stora)	AM – 00309F
<i>Pistacia lentiscus</i>	Juin 2010	Ain Smara (Chattaba)	AN – 00311F

2.2 Extraction et préparation des extraits bruts :

Le matériel végétal séché a été pulvérisée à l'aide d'un broyeur à couteaux avant d'être extrait selon le protocole décrit dans la figure 2.1. Pratiquement, la poudre de chacune des plantes a été extraite par macération à froid (2 X 1500 mL) successive par 4 solvants de polarité croissante : Les extraits obtenus ont été désignés E.P (Extrait éther pétrolique), CHCl₃ (Extrait chloroformique), AcOEt (Extrait d'acétate d'éthyle) et MeOH (Extrait méthanolique).

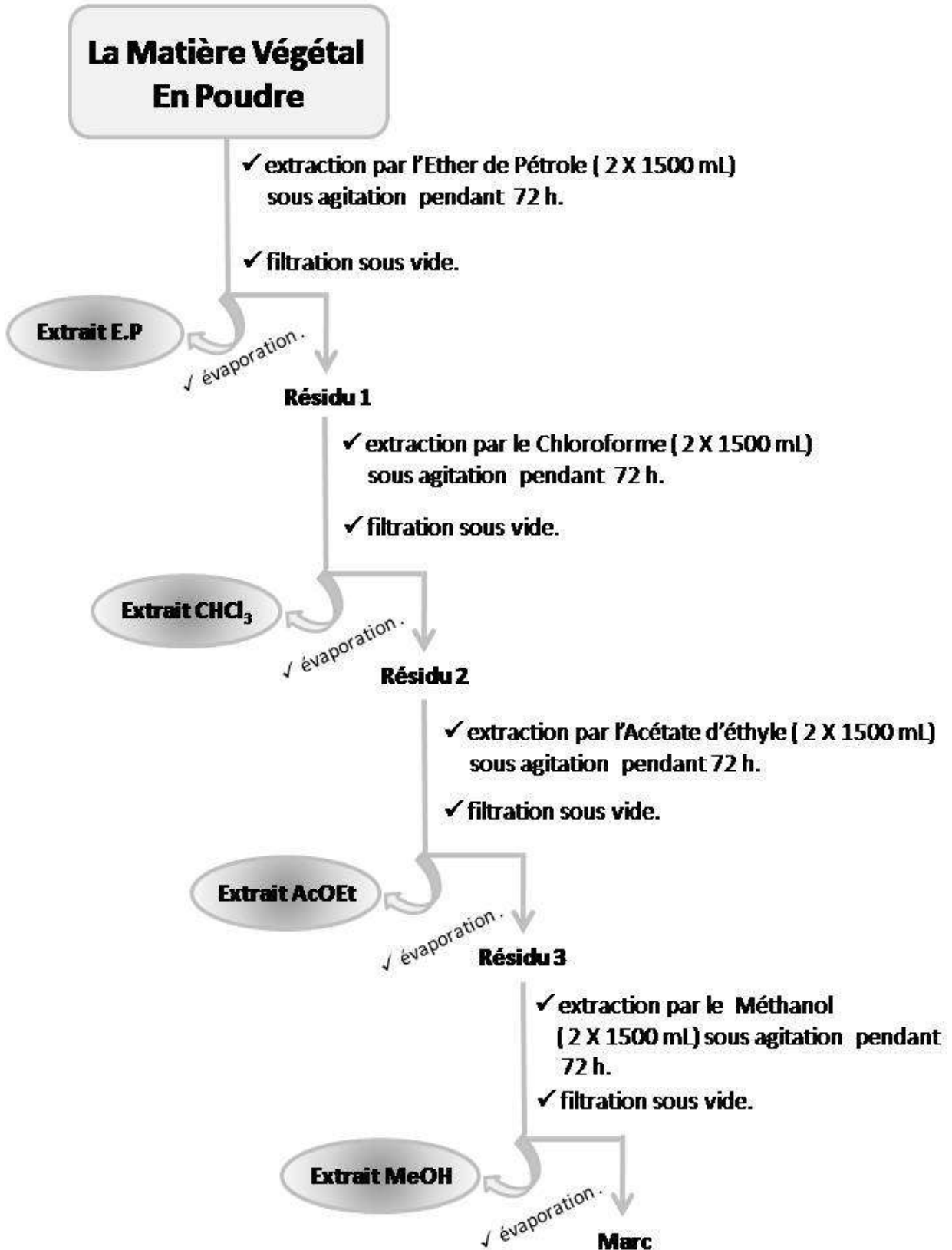


Figure 2.1 : Schéma d'extraction en mode gradient des plantes de cette étude.

2.3 Méthodes de criblage phytochimique :

2.3.1 Réactions de caractérisation des extraits bruts et des fractions :

Les différents extraits obtenus des plantes ont été soumis à des tests de caractérisation pour établir leur profil phytochimique. À cet effet des réactions générales et spécifiques (test en tube, CCM) ont été utilisées (Tableau 2.2 et 2.3) pour rechercher les principaux groupes de métabolites secondaires bio actifs.

Tableau 2.2 : Tests employés pour les réactions en tube.

Les Phytocomposés	Test	References
Anthocyanines	Une petite quantité d'extrait est traité par NaOH, puis l'observation d'une couleur bleu vert.	Janat, A.M.B <i>et al.</i> , 2008; Thmaraiselvi, L.P <i>et al.</i> , 2012
Coumarines	1 mL d'extrait + 1 mL de la solution KOH en éthanol, l'apparence du précipité indique la présence des coumarines.	Saroj, K <i>et al.</i> , 2011; Swrdhini, S.P <i>et al.</i> , 2011
Flavonoïdes	<u>Test 1 (H₂SO₄)</u> : traitement d'extrait par H ₂ SO ₄ concentré, puis l'observation de la couleur orange. <u>Test 2 (acétate de Plomb)</u> : une petite quantité d'extrait est traité par l'acétate de Plomb, puis l'observation de la formation d'un précipité blanc.	Shahid, U.D.A.F <i>et al.</i> , 2009; Thmaraiselvi, L.P <i>et al.</i> , 2012
Saponines	1 mL d'extrait + 9 mL d'eau distillé, puis Secoué vigoureusement, l'apparence d'une mousse stable indique la présence des saponines (la formation d'une mousse persistance).	Saroj, K <i>et al.</i> , 2011; Vaghasiya, R.Y <i>et al.</i> , 2011
Stérols	Traitement d'extrait par l'éthanol et H ₂ SO ₄ puis l'observation de la couleur bleu violet ou une couleur verte.	Sahoo, A.M <i>et al.</i> , 2001; Thmaraiselvi, L.P <i>et al.</i> , 2012

Tanins	<p><u>Test 1</u>: 10 mL d'extrait + quelques gouttes du réactif FeCl₃, puis l'observation de la formation d'un précipité bleu noir. <u>Test 2</u> : 1 mL d'extrait + quelques gouttes de 10 % d'acétate de Plomb, puis l'observation de la formation d'un précipité indique la présence des tanins.</p>	<p>Shahid, U.D.A.F <i>et al.</i>, 2009; Israel, A.U <i>et al.</i>, 2011 ; Saroj, K <i>et al.</i>, 2011)</p>
Terpènes	<p>2 mL d'extrait + 1 mL du chloroforme + quelques gouttes de l'anhydride acétique + H₂SO₄ concentré additionné sur les parois du tube de test, puis l'observation de la couleur rouge – marron indique la présence des terpènes.</p>	<p>Saroj, K <i>et al.</i>, 2011</p>

2.3.2 Caractérisation des Fractions :

La chromatographie sur couche mince (CCM) a été utilisée pour établir le profil métabolique des extraits et des fractions et pour vérifier l'état de pureté des produits séparés. Les analyses ont été réalisées en phase normale sur des plaques d'aluminium recouverte de gel de Silice 60 F₂₅₄ (Merck) d'épaisseur 0,25 mm et de dimension 10 X 5 cm. Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre saturées avec l'éluant approprié. Cette phase mobile est constituée d'un mélange binaire, tertiaire ou quaternaire de solvants selon le type de séparation souhaitée. Dans notre cas, les systèmes de solvants pour les différentes classes de composés sont les suivants :

- | | |
|---|-----------------------------------|
| ① E.P / AcOEt / Acide formique (70 : 30 : 0.5) | ⑤ Hex/DCM (9 : 1) |
| ② T/ AcOEt /CycloHex/ Acide formique (24 : 6 : 3 : 0.5) | ⑥ HCl ₃ /MeOH (8 : 2) |
| ③ CycloHex/DE (3 : 7) | ⑦ CHCl ₃ (100 %) |
| ④ Hex/ AcOEt (7 : 3) | ⑧ CHCl ₃ /MeOH (6 : 4) |

La lecture des plaques CCM s'effectue en lumière visible et sous UV (254 et 356 nm), avant et, dans certains cas, après révélation par les réactifs appropriés.

Les réactifs utilisés sont décrits dans le tableau 2.3 :

Tableau 2.3 : Réactifs chimiques pour la révélation des CCM.

Réactifs	Mode de préparation	References
Acide Sulfurique 10 % (Réactif universel)	Solution d'acide sulfurique 10 %, après la pulvérisation mettre la plaque CCM pendant une dizaine de minutes à l'étuve à 100 ° C *.	Macek, K., 1972 ; Harbone, J.B <i>et al.</i> , 1984 et Wagner, H <i>et al.</i> , 1984
Réactif au Sulfate de Cérium (Réactif universel)	4 g de sulfate de cérium, 200 litres d'eau distillée, 50-70 ml de H ₂ SO ₄ , après la pulvérisation mettre la plaque CCM pendant une dizaine de minutes à l'étuve à 100 ° C *.	
Vanilline Sulfurique (Stérols et Terpènes)	Mélanger une solution éthanolique d'acide sulfurique et une solution éthanolique de vanilline à 1 %, après la pulvérisation mettre la plaque CCM pendant une dizaine de minutes à l'étuve à 100 ° C *.	
Réactifs de Liebermann – Burchard (Stérols et Terpènes)	Une première solution composée d'un mélange à volume égal (5 ml) d'acide sulfurique et l'anhydride acétique, à cette solution on rajoute 50 ml d'éthanol absolu. La préparation est effectuée à froid dans de la glace, après la pulvérisation mettre la plaque CCM pendant une dizaine de minutes à l'étuve à 100 ° C *.	
Réactif à Anisaldéhyde (Stérols, Terpènes et Alkamides)	Mélanger 0,5 ml d'anisaldéhyde (4 – méthoxybenzaldéhyde) avec 10 ml d'acide acétique glacial. Ajouté 85 ml de méthanol puis mélanger. Ajouter 5 ml d'acide sulfurique concentré, la solution ainsi obtenue est homogénéisée et gardée à 4 ° C pendant toute la durée d'utilisation. Après la pulvérisation mettre la plaque CCM pendant une dizaine de minutes à l'étuve à 100 ° C *.	
Réactifs à l'AlCl ₃ (Tanins et Flavonoïdes)	2 g sont dissous dans 10 ml d'eau et dilués à 200 ml avec de l'éthanol, la plaque est pulvérisée puis chauffée à 100 ° C pendant 10 min.	

Légende : * Plusieurs colorations apparaissent en fonction du type de composés.

2.4 Fractionnement par CC de l'extrait actif AcOEt de APY :

Une colonne en verre (diam 2.6 cm, long 30 cm) contenant de gel de silice (type 60, 230-400 mesh, Merck) a été utilisée pour fractionner 6 g de l'extrait actif Ae issu des racines d'*Anacyclus pyrethrum* comme illustré par la Figure 2.2. Des fractions de 100 mL au nombre de 50 ont été collectées.

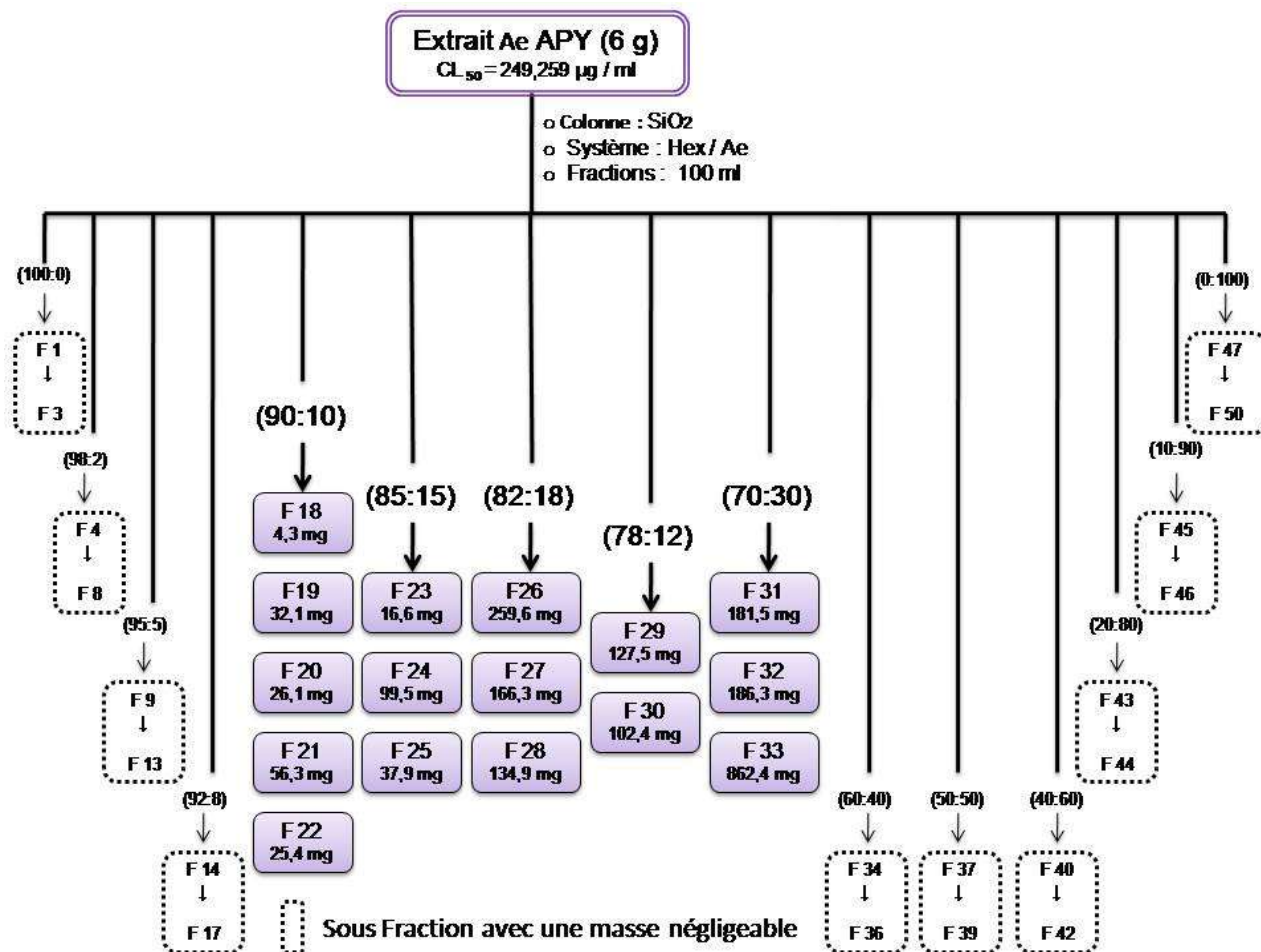


Figure 2.2 : Schéma de fractionnement de l'extrait actif APY AcOEt.

Les fractions F.21, F.27 et F.28 ont été ensuite purifiées sur des micro - colonnes contenant de gel de silice (type 60, 230-400 mesh, Merck) (diam : 0,70 cm et 08 cm de long). Chaque fraction est éluée avec un système approprié comme décrit dans les sections suivantes :

La fraction F.21 : une masse (55 mg) a été fractionnée comme illustré par la Figure 2.3. Des sous - fractions de 25 mL au nombre de 28 ont été ainsi collectées et analysées par CCM.

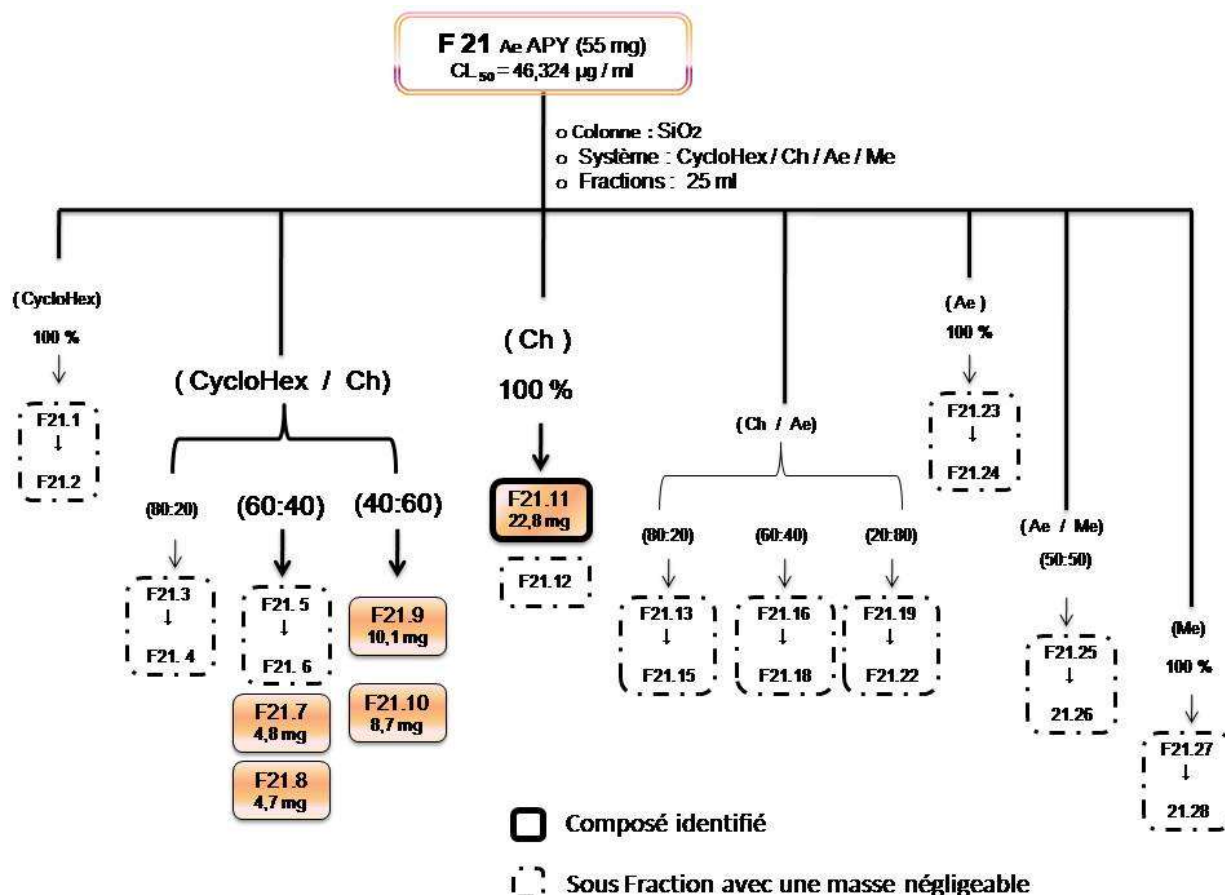


Figure 2.3 : Schéma de purification de la fraction F.21.

Une fois que les sous – fractions ont été isolées et caractérisées nous avons vérifié leur pureté. Parmi les sous – fractions obtenues avec des masses importantes, seulement F.21.11 semble intéressante, de part la présence d’une mono – tache sur CCM définie par le composé A, suite à deux essais chromatographiques (Tableau 2.4).

Tableau 2.4 : Conditions de la CCM pour le Composé A.

Système	Mélange de solvants	(v : v)
1	CycloHex / AcOEt	(6 :4)
2	E.P/ AcOEt / Acide formique	(70 :30 :0,5)

Adsorbant : gel de silice.

La fraction F.27 : une masse (160 mg) a été fractionnée comme illustré par la Figure 2.4, Des sous – fractions de 25 mL au nombre 40 ont été ainsi collectées et suivi par CCM.

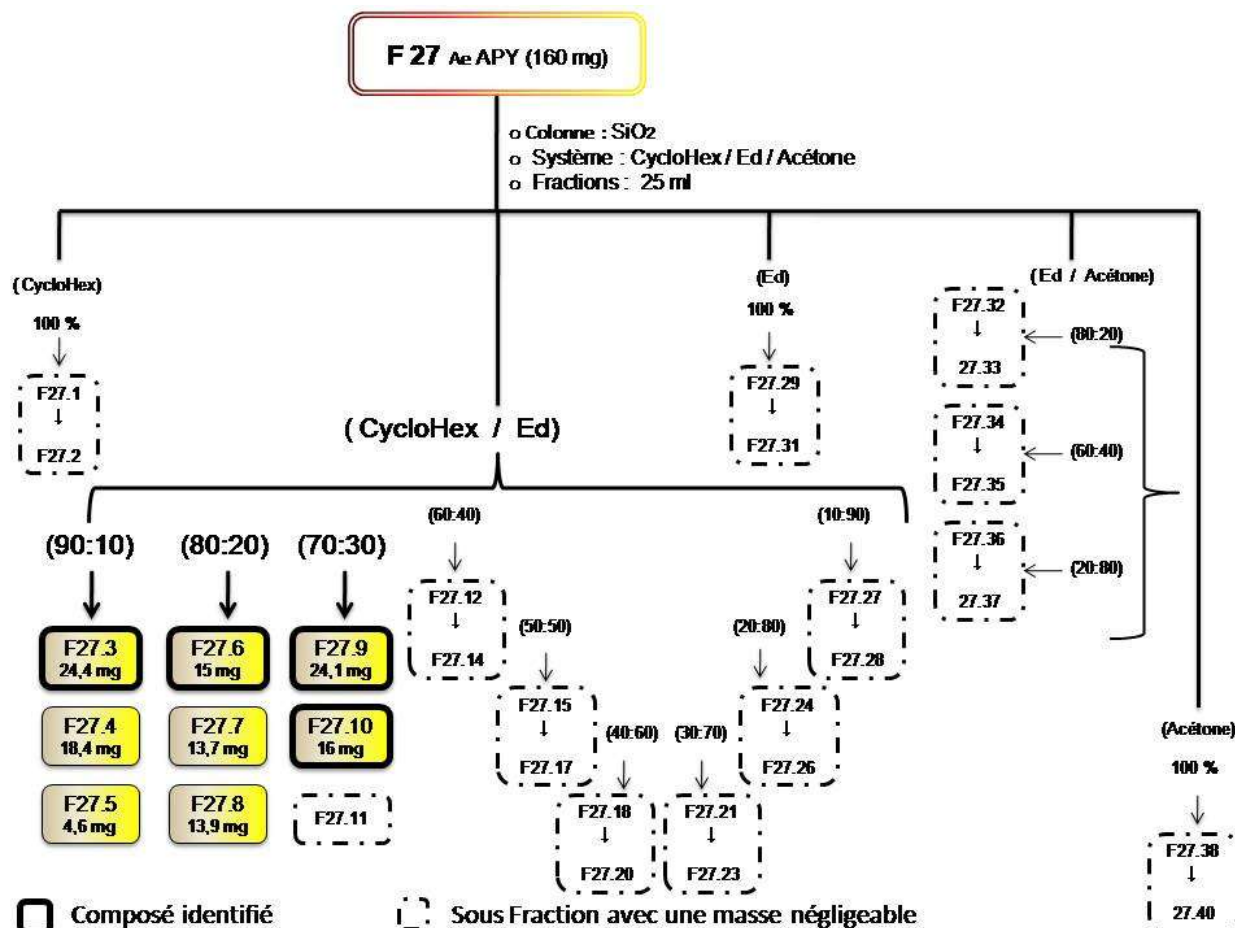


Figure 2.4 : Schéma de purification de la fraction F.27.

Après le fractionnement, les profils métaboliques des sous – fractions avec des masses importantes : F.27.3 ; F.27.6 ; F.27.9 et F.27.10, a été établis sur la base de plusieurs essais chromatographiques (Tableau 2.5), ils sont appariés sous forme d'une mono – tache sur CCM, ces composés nommés respectivement : **B ; H ; G et J**.

Tableau 2.5 : Conditions de la CCM pour les Composés : B ; H ; G et J.

Système	Mélange de solvants	(v : v : v)	Composés
1	Hex / CHCl ₃ / Acide formique	(1 : 3 : 0,5)	B
2	E.P / AcOEt / Acide formique	(70 : 30 : 0,5)	B ; G ; J
3	T / AcOEt / CycloHex / Acide formique	(24 : 6 : 3 : 0,5)	B ; G ; H ; J
4	CycloHex / DE	(8 : 2)	G ; H ; J

Adsorbant : gel de silice.

La fraction F.28 : une masse (130 mg) a été fractionnée comme illustré par la Figure 2.5. Des sous – fractions de 25 mL au nombre de 36 ont été ainsi collectées et analysée par CCM.

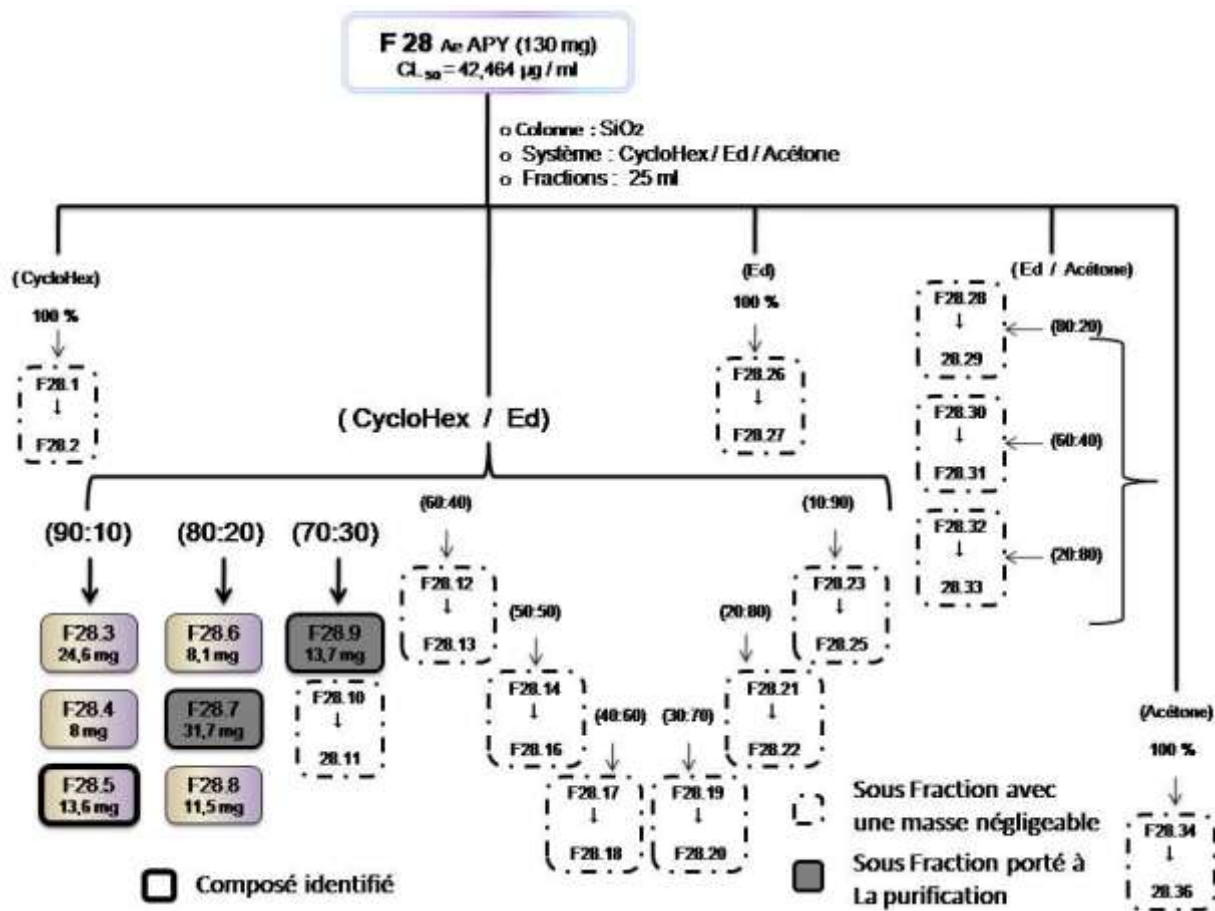


Figure 2.5 : Schéma de purification de la fraction F.28.

Les sous – fractions avec des masses importantes : F.28.5 ; F.28.7 et F.28.9 semblent intéressantes, mais sauf F.28.5 apparié sous forme d'une mono – tache sur CCM (Tableau 2.6). Une caractérisation phytochimique a été réalisée pour la mise en évidence de famille chimique de ce composé nommé **E**. Les deux sous – fractions F.28.7 et F.28.9 sont à nouveau purifiées.

Tableau 2.6: Conditions de la CCM pour le Composé E.

Systeme	Mélange de solvants	(v : v : v)
1	CycloHex / DE	(6 : 4)
2	E.P/ AcOEt / acide formique	(70 : 30 : 0,5)
3	T/ CHCl ₃ / acide formique	(2 : 8 : 0,5)

Adsorbant : gel de silice.

La purification a été effectuée sur des micro - colonnes contenant de gel de silice (type 60, 230-400 mesh, Merck) (diam : 0,70 cm et 08 cm de long). Chaque sous - fraction est éluée comme suit :

La sous - fraction F.28.7 : une masse (31.7 mg) a été fractionnée comme illustré par la Figure 2.6. Des sous - fractions de 25 mL au nombre 14 ont été collectées et suivi par CCM et révélées aux réactifs utilisés cité précédemment.

De même façon, La sous - fraction F.28.9 : une masse (13.7 mg) a été fractionné aussi. Des sous - fractions de 25 ml au nombre de 14 ont été collectées et suivi par CCM. La Figure 2.6 résume les différentes étapes.

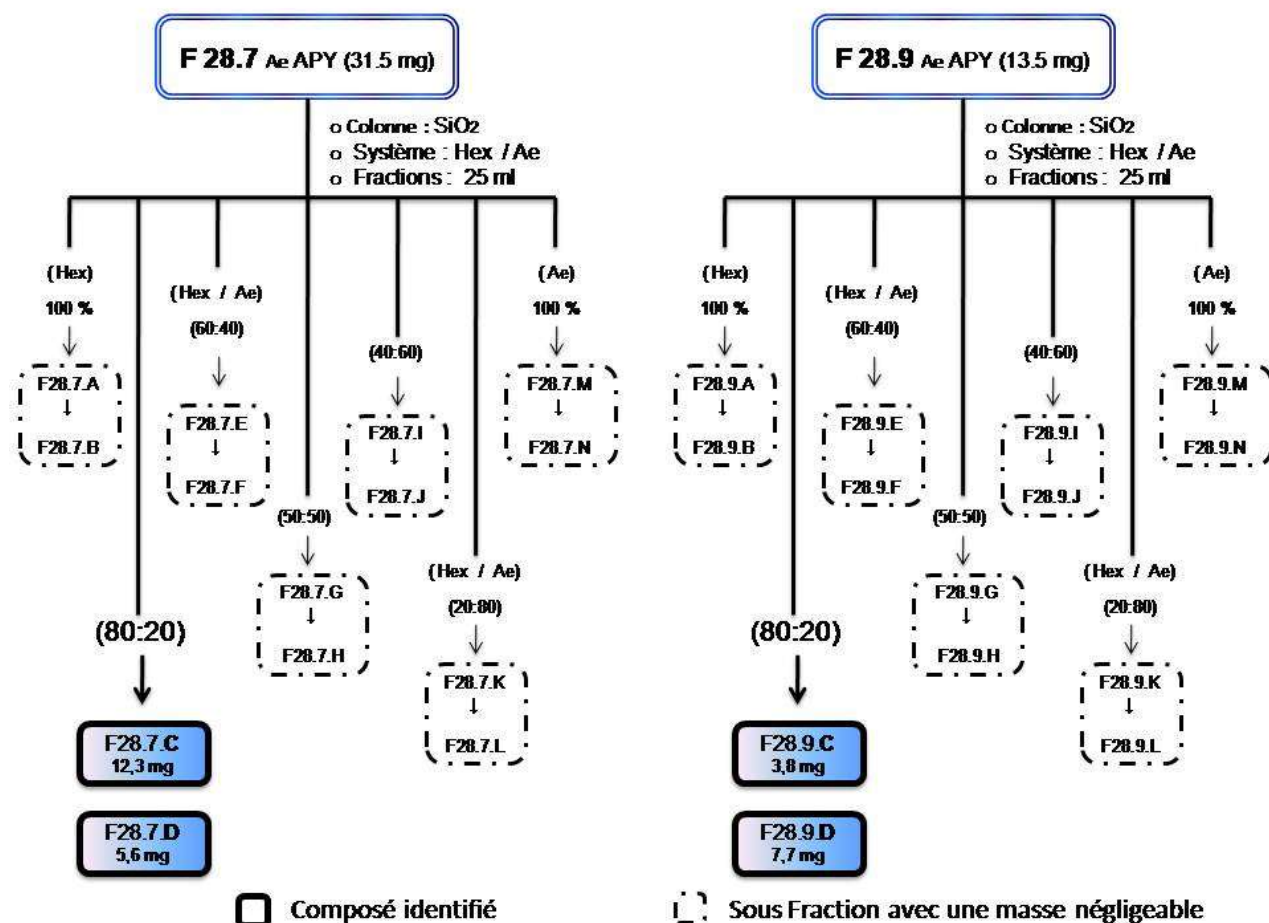


Figure 2.6 : Schéma de purification de la sous - fraction F.28.7 et F.28.9.

Les sous – fractions qui présentent des composés majoritaires sont : F.28.7.C ; F.28.7.D ; F.28.9.C et F.28.9.D, ils présentent le même profil en CCM (Tableau 2.7). Ces composés nommés respectivement : **D, F, C et I.**

Tableau 2.7 : Conditions de la CCM pour les Composés D, F, C et I.

Système	Mélange de solvants	(v : v : v)
1	Hex / AcOEt	(1 : 3)
2	Hex / CHCl ₃ / Acide formique	(1 : 3 : 0,5)
3	E.P / AcOEt / Acide formique	(70 : 30 : 0,5)

Adsorbant : gel de silice.

2.5 Méthode d'identification physico – chimique (Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire) :

Les spectres de résonance magnétique nucléaire, en mode ¹ H, ont été réalisés sur un appareil BRÜKER 300 MHz (département de Pharmacie, Université Salerno, Italie). Les déplacements chimiques sont exprimés en partie par million (ppm), les constantes de couplage J sont exprimées en Hertz (Hz).

2.6 Dosages des flavonoïdes et des tanins :

2.6.1 Dosage des flavonoïdes :

La méthode du trichlorure d'aluminium est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les extraits. Un mélange de volume 1 mL, constitué de chaque échantillon additionné de la solution standard préparées dans le méthanol (1 V / V), est ajouté à 1mL de la solution d'AlCl₃ (2% dans le méthanol). Après 10 min, l'absorbance a été mesurée à 510 nm et la concentration des flavonoïdes est déduite à partir de la gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (0 – 35 µg / mL) et est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg.eq.Q/g) (Talbi, H *et al.*, 2015 ; Bougandoura, N *et al.*, 2012).

2.6.2 Dosage des tanins :

Le principe de ce dosage est basé sur la fixation du groupement aldéhydique de vanilline sur le carbone 6 du cycle A de la catéchine pour former un complexe chromophore rouge qui absorbe à 500 nm (Kholkhal, F *et al.*, 2013 ; Alain, D.P.B *et al.*, 2011). Pratiquement, à un volume de 400 µL de chaque extrait ou standard, on ajoute 3 ml de vanilline (4%) dissout dans le méthanol et 1,5 mL d'acide hydrochlorique concentré. Après 15 min d'incubation, l'absorbance est mesurée à 500 nm. La concentration des tanins condensés est déduite à partir de la gamme d'étalonnage établie avec la catéchine (0 – 30 µg / mL) par un gramme d'extrait (mg.eq.C/g) (Martin – Tanguy, J *et al.*, 1976 ; Silanikove, N *et al.*, 1996).

2.7 Activités biologiques :

2.7.1 Activité cytotoxique :

2.7.1.1 Préparation des *Artémias* :

L'éclosion des larves de crevette d'eau salée s'effectue dans les conditions décrites dans le tableau 2.8, en utilisant de dispositif expérimental décrit dans la figure 2.8. Des cystes (2 g) sont mis à éclore dans une cuve en verre dans de l'eau salé sous fort bullage. L'éclosion s'effectue à partir de 24 heures (Indabawa, I.I., 2009 ; McLaughlin, J. L *et al.*, 1998). Les larves (naupliis) sont utilisées 24 à 48 heures après l'éclosion.

Tableau 2.8 : Paramètres de culture des *Artémias* (Pisutthanan, S *et al.*, 2004).

Paramètres	Conditions	Remarques
Température	Préférable de la maintenir entre 25 et 30 °C à l'aide d'une résistance électronique thermo – plongeur	Si ce paramètre n'est pas respecté le métabolisme du cystes est stoppé de façon irréversible
Salinité	Favorable à 38 g / L	Les Artémia sont des petites crevettes vivent en milieu salé, elles sont très tolérante au taux de salinité
Aération	Système d'Aération	Permet d'Homogénéiser le milieu et de favoriser l'éclosion
Eclairage	Une lumière artificielle continue	Favorise un meilleur rendement

La figure 2.7 montre le montage effectué dans notre laboratoire pour la préparation des *Artémias* :

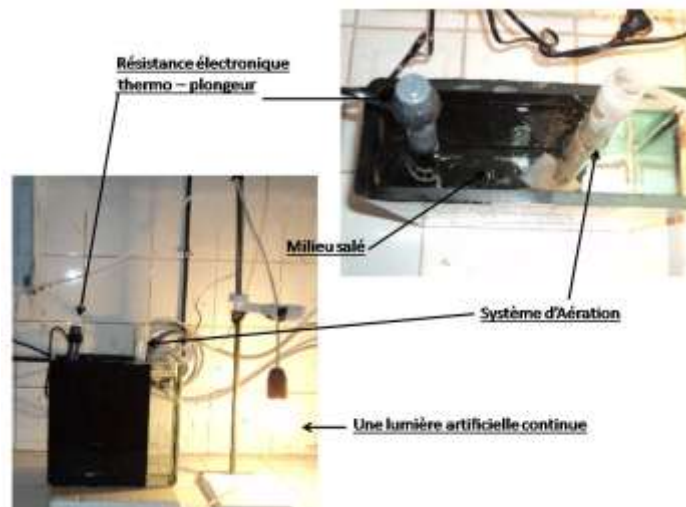


Figure 2.7 : Le montage de préparation d'*Artémia salina*. (Photo personnelle)

2.7.1.2 Evaluation du test de cytotoxicité :

Le test est réalisé dans des plaques multi puits (4X3 puits) selon la procédure décrite précédemment (Pisutthanan, S *et al.*, 2004 ; Manilal, A *et al.*, 2009).

Une solution mère de l'extrait est préparée dans de l'eau salée, additionnée de 1 % de DMSO (DMSO : eau salé 1 % ; 99 %) (McLaughlin, J. L *et al.*, 1998 ; Claudio, J.B *et al.*, 2006 ; Mentor, R.H *et al.*, 2014). Dans chacun des puits est déposé un nombre de 10 naupliis, puis un volume approprié de la solution mère de l'extrait. Le volume final dans le puits est ajusté à 5 mL pour obtenir les concentrations suivantes : 1, 10, 50, 100, 250, 500 et 1000 µg/mL. Le test est répété quatre fois pour chaque traitement. Nos résultats est comparés par rapport au contrôle négatif qui contient uniquement des larves placées dans de l'eau salée. Une évaluation préalable du potentiel toxique du DMSO vis-à-vis des naupliis a révélé l'absence de mortalité dans les mêmes conditions opératoires, comparé avec les données bibliographiques. Ce résultat est en accord avec des précédents travaux (Mentor, R.H *et al.*, 2014).

Après 24 heures d'incubation, le comptage des larves mortes a été effectué à l'aide d'une loupe selon une méthode décrite précédemment (Manilal, A *et al.*, 2009). La mortalité est définie lorsque chaque larve ne présente plus de mouvement pendant au moins 10 secondes. Le pourcentage de mortalité des larves est déduit de l'équation suivante :

$$\% \text{ de Mortalité} = [(\text{nbre total des larves} - \text{nbre des larves vivantes}) / \text{nbre total larves}] \times 100$$

Les résultats sont exprimés en valeur moyenne du % de mortalité (Moyenne \pm SD) calculée sur la base de quatre répétitions. La comparaison entre groupes est faite par le test de *t*-student. Le niveau de signification entre groupes traité et non traité est fixé à $p < 0,05$.

La Concentration Létale CL₅₀ a été déterminée par la méthode graphique arithmétique grâce au logiciel Biostat 2009. La cytotoxicité est considérée comme significative lorsque la valeur de CL₅₀ est inférieure à 1000 µg / mL (Abdul, R.M.S., *et al* 2010 ; Oladimeji, H.O., *et al* 2006).

2.7.2 Étude de l'activité anti – radicalaire (Méthode au DPPH) :

La mesure de l'activité antiradicalaire des extraits de plantes a été effectuée par le test au 2, 2'-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) comme précédemment écrit (Luciana, L.M *et al.*, 2001; Kouamé, J *et al.*, 2009 Alain, Ph.B *et al.*, 2011). Une série de dilutions (12.5 ; 25 ; 50 et 100 µg / ml) dans le méthanol est préparée en utilisant les extraits de plantes ou de l'acide ascorbique (antioxydant de référence). Pour chaque concentration, un volume de 0.5 ml de l'extrait est additionné à 1 ml de DPPH (20 mg / L) préparé dans le méthanol. Après homogénéisation, le mélange est incubé pendant 15 minutes à la température ambiante (25 °C), et à l'abri de la lumière. Chaque essai est répété trois fois.

L'absorbance est lue à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre contre un « blanc » qui ne contient que du méthanol. Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH est calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ Inhibition par DPPH} = [(A - B) / A] \times 100.$$

Avec ; A : la densité optique du blanc et B : la densité optique d'échantillon
(Nooman, A.K *et al.*, 2008 ; Manas, B *et al.*, 2010 ; Lagnika, L *et al.*, 2011).

La concentration inhibitrice 50 (CI₅₀) qui représente la concentration de l'extrait de la plante ou de l'acide ascorbique, responsable de 50% d'inhibition des radicaux DPPH, est déterminée à partir du graphique représentant le pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations des extraits ou de l'acide Ascorbique.

2.7.3 Test statistique :

La représentation graphique des données a été réalisée grâce au logiciel Graph Pad Prism 5.03. La valeur moyenne de quatre répétitions (test de cytotoxicité) et de trois répétitions (méthode au DPPH et le dosage des composé phénoliques) est exprimé en valeur moyenne ± SD calculé par le logiciel Origin 6.0, la différence entre deux valeurs est considérée comme significative lorsque $P < 0,05$.

Troisième Partie :

Résultats et Discussion.

SECTION I : Caractérisation phytochimique préliminaire :**I.3.1 Obtention des extraits bruts :**

La provenance du matériel végétal, ainsi que les protocoles d'extraction sont décrits dans la partie expérimentale. L'épuisement successif des plantes séchées par des solvants de polarité croissante [éther de pétrole (E.P), Chloroforme (CHCl₃), Acétate d'éthyle (AcOEt) puis méthanol (MeOH)] a permis l'épuisement des parties végétales. Le résultat des extractions successives est détaillé dans le Tableau 3.1 et la figure 3.1.

Tableau 3.1 : Masses et rendements des extraits végétaux.

Espèces	Partie végétative (masse)	Extraits (masse en g / %)
<i>Anacyclus pyrethrum</i>	Racines (250 g)	E.P (22.78 / 09.11) CHCl ₃ (18.05 / 07.22) AcOEt (29.75 / 11.90) MeOH (56.28 / 22.00)
<i>Acanthus mollis</i>	Feuilles (300 g)	E.P (22.59 / 07.53) CHCl ₃ (12.78 / 04.26) AcOEt (13.47 / 04.49) MeOH (96.84 / 32.28)
<i>Pistacia lentiscus</i>	Feuilles (250 g)	E.P (17.10 / 06.84) CHCl ₃ (16.92 / 06.77) AcOEt (10.38 / 04.15) MeOH (75.95 / 30.38)

Légende : E.P: éther de pétrole ; CHCl₃: Chloroforme ; AcOEt : Acétate d'éthyle ; MeOH : Méthanol

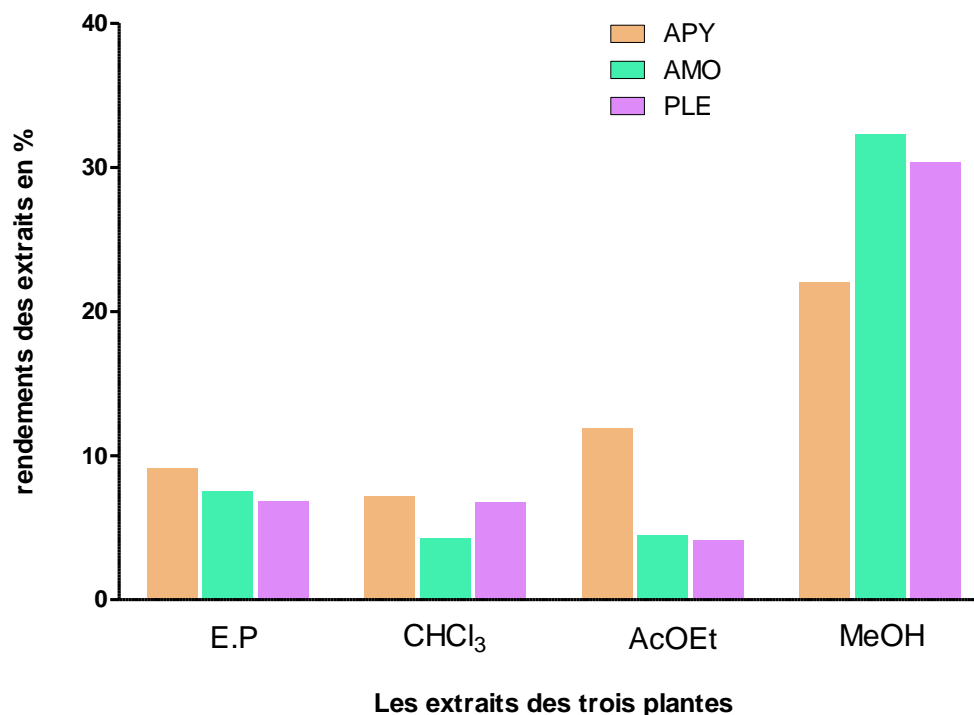


Figure 3.1 : Rendement d'extractions obtenues pour les différents extraits.

Comme le montre les rendements d'extraction, les extraits alcooliques (méthanol) ont donné les taux les plus élevés avec 32,28 %, 30,38% et 22,00 % pour *A.mollis*, *P. lentiscus* et *A. pyrethum*, respectivement.

I.3.2 Criblage phytochimique préliminaire des extraits bruts :

Dans le but d'établir le profil métabolique des extraits bruts par rapport aux différents groupes de substances secondaires bioactifs ciblés (Anthocyanines, Coumarines, Flavonoïdes, Saponines, Stéroïdes, Tanins et les Terpènes), un screening phytochimique a été réalisé utilisant des techniques phytochimiques standards de révélation (Harbone, J.B., 1984 et Wagner *et al.*, 1984).

Le tableau 3.2 récapitule les résultats obtenus.

Tableau 3.2 : Profil métabolique des extraits végétaux.

Plantes	Extraits	Groupes Chimiques						
		Anthocyanines	Coumarines	Flavonoïdes	Saponines	Stéroïdes	Tanins	Terpènes
<i>Anacyclus pyrethrum</i>	E.P	-	-	+	-	-	-	-
	CHCl ₃	-	-	+	-	+++	-	++
	AcOEt	-	++	+	-	+	-	+
	MeOH	-	+++	++	+	-	++	+
<i>Acanthus mollis</i>	E.P	-	-	-	-	+	-	-
	CHCl ₃	-	-	-	-	+++	-	-
	AcOEt	-	-	-	-	+	-	+
	MeOH	++	+++	++	+++	-	+++	++
<i>Pistacia lentiscus</i>	E.P	-	-	-	-	++	-	-
	CHCl ₃	-	-	-	-	+++	-	+
	AcOEt	++	-	+	-	-	-	-
	MeOH	+++	+++	+++	++	-	+++	++

Légende : +++ : Abondant ; ++ : Présence Modérée ; + : Faible ; - : non détecté

E.P : éther de pétrole ; CHCl₃ : Chloroforme ; AcOEt : Acétate d'éthyle ; MeOH : Méthanol

L'investigation a montré que :

➤ Dans le cas des racines d'*A.pyrethrum* :

- la majorité des métabolites secondaires potentiellement actifs ciblés se concentrent dans les extraits moyennement très polaires.
- pour leur part, les anthocyanines sont absents dans les quatre types d'extraits.

➤ Dans le cas des feuilles d'*A.mollis* :

- A l'exception des stéroïdes, les groupes de métabolites secondaires recherchés se retrouvent plus dans l'extrait le plus polaire (méthanol).
- Pour sa part, l'extrait de chloroforme semble très riche en stéroïdes.

➤ Dans le cas des feuilles de *P.lentiscus* :

- dans l'extrait de méthanol à l'exception des stéroïdes, les tests ont révélé la présence notable à modérée de l'ensemble des autres groupes de métabolites secondaires ciblés.

– pour sa part, les stéroïdes sont notamment présents dans l'extrait de chloroforme et non détectable dans l'extrait du méthanol.

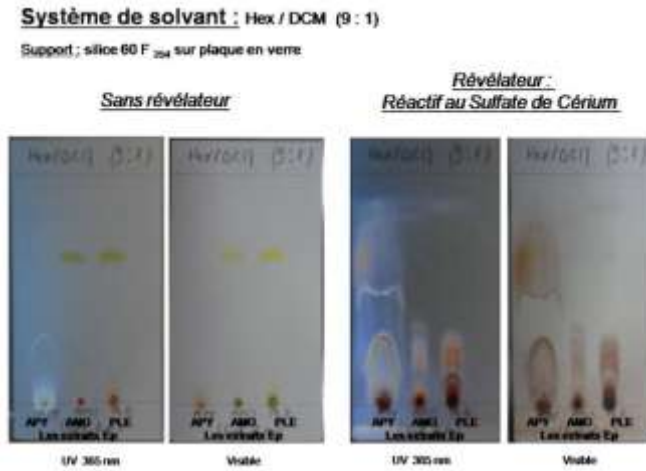
En conclusion, deux remarques peuvent être faites sur les profils des extraits bruts :

En général, par rapport aux différents groupes métaboliques ciblés, les trois extraits alcooliques bruts se distinguent des autres extraits (E.P, CHCl₃, AcOEt) par leur richesse relative en coumarines, flavonoïdes, saponines, tanins et de terpénoïdes. Pour leur part, les stéroïdes sont surtout présents dans les extraits de chloroforme. Les extraits obtenus par l'éther de pétrole présentent des matières extraites les plus faibles comparées aux autres extraits (CHCl₃, AcOEt et MeOH)

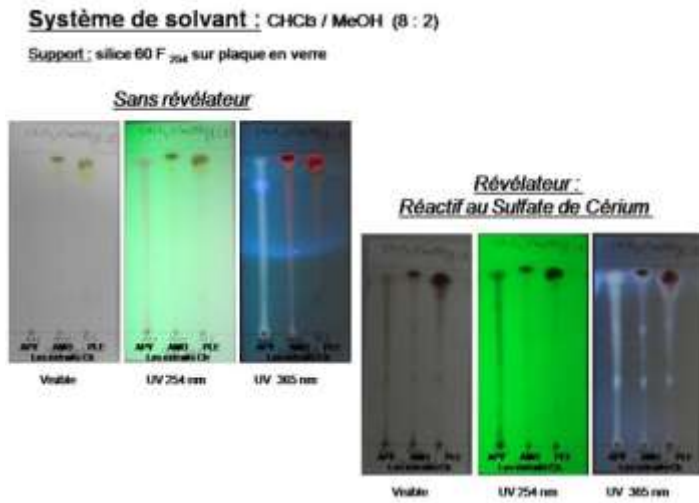
I.3.3 Criblage chromatographique par CCM :

Une analyse chromatographiques sur couche mince a été menée sur les extraits de différentes polarités de chacune des plantes utilisant différents systèmes d'éluant avec comme révélateur, le sulfate de Cérium (réactif général). Les figures 3.2 et 3.3 récapitulent les profils chromatographiques obtenus avec chacun des extraits dans les différents solvants.

A : Les extraits apolaires (Ep) chez les trois espèces



B : Les extraits moyennement polaires (Ch) chez les trois espèces



Système de solvant : CHCl₃ (100 %)
Support : silice 60 F₂₅₄ sur plaque en verre

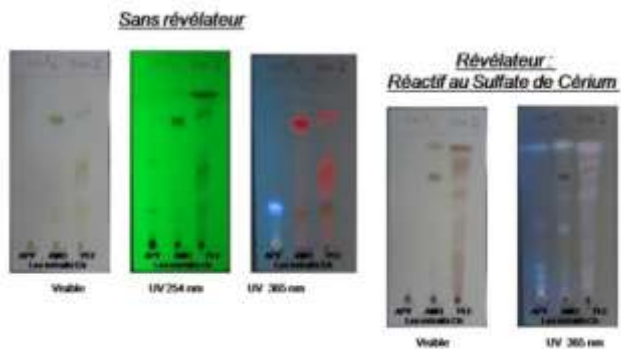
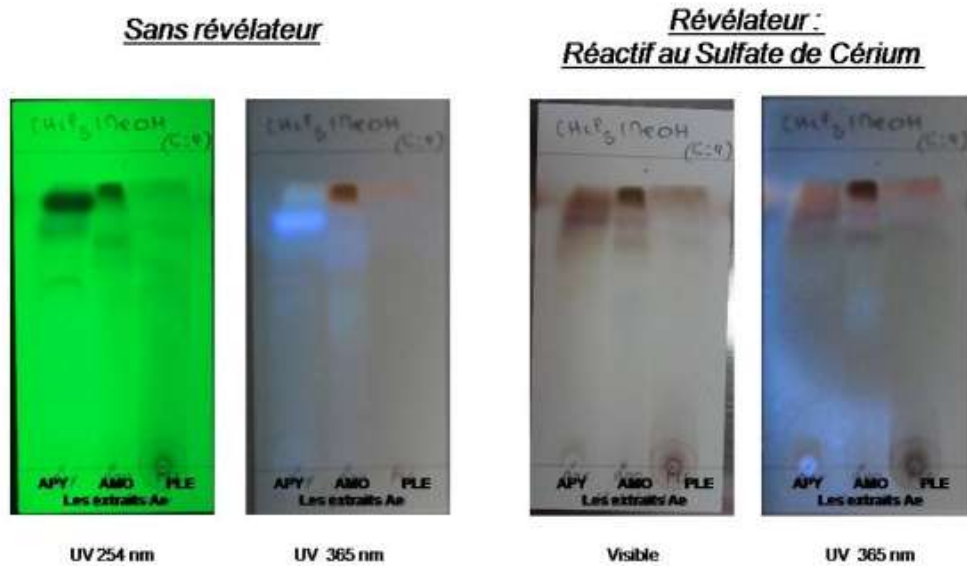


Figure 3.2 : CCM préliminaires des extraits apolaires dans les systèmes solvants A et B.

C : Les extraits polaires (Ae) chez les trois espèces

Système de solvant : CHCl₃ / MeOH (6 : 4)

Support : silice 60 F₂₅₄ sur plaque en verre



D : Les extraits polaires (Me) chez les trois espèces

Système de solvant : BAW

Support : silice 60 F₂₅₄ sur plaque en verre

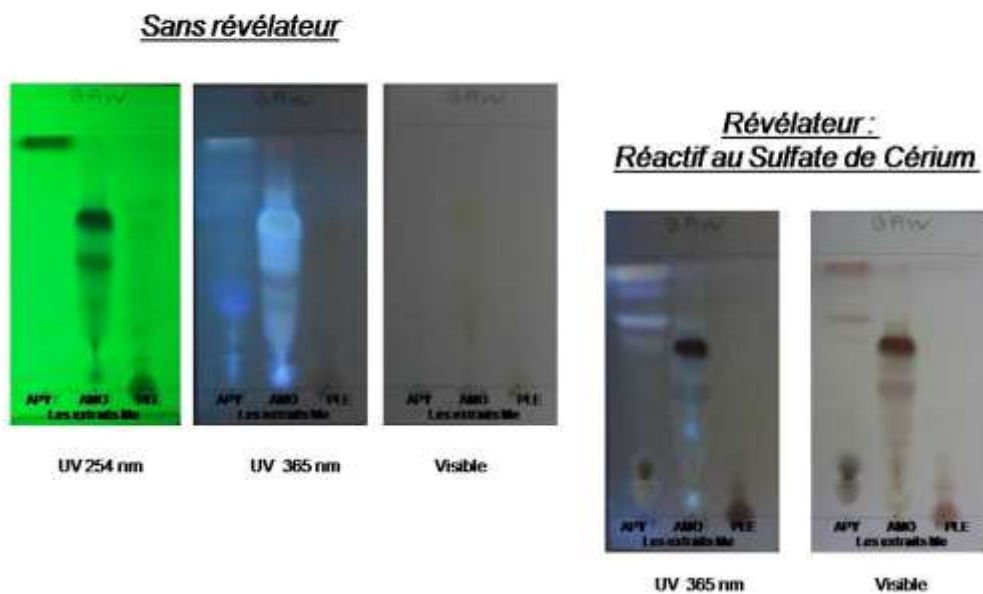


Figure 3.3 : CCM préliminaires des extraits polaires dans les systèmes solvants C et D.

A l'issue du criblage chromatographique des différents extraits (E.P, CHCl₃, AcOEt et MeOH) obtenus des trois plantes, il peut être observé que les profils métaboliques lus à partir des chromatogrammes réalisés sont similaires quant à leurs conclusions aux réactions de révélation effectuées préalablement sur tubes. Notamment, un nombre important de taches a été observé dans les extraits alcooliques, avec une quantité moindre dans les extraits d'acétate d'éthyle et de chloroforme. Pour sa part, les extraits d'éther de pétrole présentent le moins de taches observées, ce qui est indicatif de la faible capacité extractive de ce solvant.

SECTION II : Criblage biologique :

II.3.4 Evaluation de l'activité cytotoxique sur le modèle *Artemia salina* :

Les extraits végétaux (E.P, CHCl₃, AcOEt et MeOH) ont été soumis au test de mortalité d'*Artemia salina* (BSLT) pour évaluer leur potentiel toxique (CL₅₀). Pour cela, différentes concentrations des extraits ont été testées, à savoir : 1, 10, 50, 100, 250, 500 et 1000 µg / mL. Les valeurs des pourcentages de mortalité des larves en fonction des concentrations utilisées sont exprimées dans le tableau 3.3 et la figure 3.4.

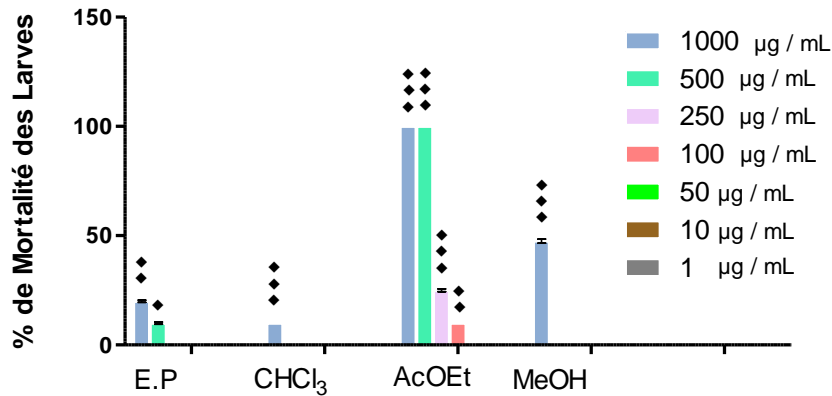
Tableau 3.3 : Mortalité des larves exprimée en pourcentage en fonction des concentrations

Espèces	Extraits [§]	% Mortalité ± SD ^α (lecture après 24h) concentration (µg/mL)						
		1	10	50	100	250	500	1000
<i>A. pyrethrum</i>	E.P	—	—	—	—	—	10 ± 0,5♦	20 ± 0,5♦♦
	CHCl ₃	—	—	—	—	—	—	10 ± 00
	AcOEt	—	—	—	10 ± 00	25 ± 0,58♦♦♦	100 ± 00♦♦♦	100 ± 00♦♦♦
	MeOH	—	—	—	—	—	—	47,5 ± 0,96♦♦♦
<i>A. mollis</i>	E.P	—	—	—	—	—	—	10 ± 0,5♦
	CHCl ₃	—	—	—	—	—	20 ± 0,58♦♦	60 ± 0,96♦♦♦
	AcOEt	—	—	—	—	05 ± 0,58	10 ± 0,82♦	100 ± 00♦♦♦
	MeOH	—	—	—	—	07,5 ± 0,96	10 ± 0,58♦♦	100 ± 00♦♦♦
<i>P. lentiscus</i>	E.P	—	—	—	—	—	—	—
	CHCl ₃	—	—	—	—	—	—	10 ± 0,82♦
	AcOEt	—	—	—	—	100 ± 00♦♦♦	100 ± 00♦♦♦	100 ± 00♦♦♦
	MeOH	—	—	—	—	22,5 ± 1,26♦	100 ± 00♦♦♦	100 ± 00♦♦♦
Contrôle Négatif		—						

Légende : — : absence de mortalité ; § (E.P: éther de pétrole ; CHCl₃ : Chloroforme ; AcOEt : Acétate d'éthyle ; MeOH : Méthanol)

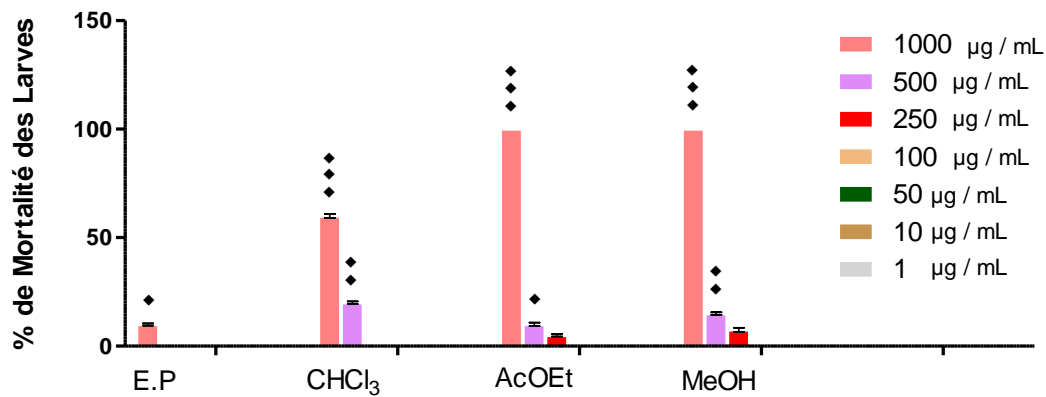
α : Moyenne de 4 répétitions portant chacune sur 10 individus (n = 10). Extrait versus contrôle négatif : (♦) P<0.05 ; (♦♦) P<0.01 ; (♦♦♦) P<0.001.

activité cytotoxique des Extraits d'APY



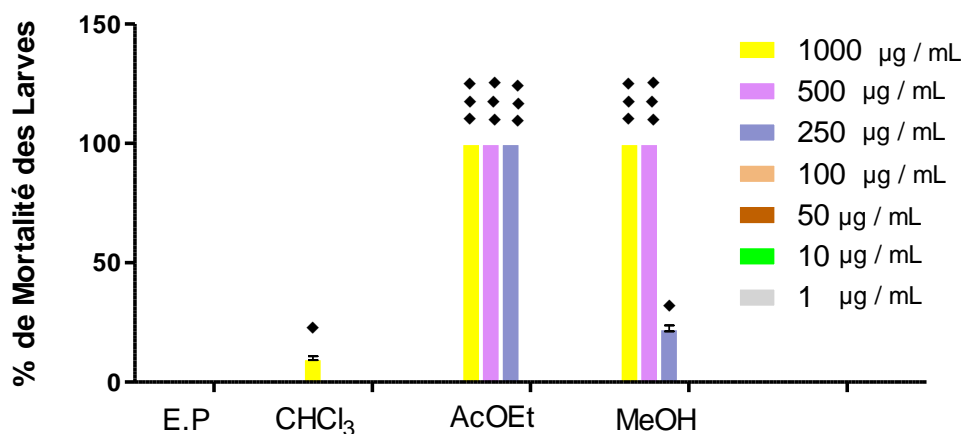
Les valeurs sont significatives : (♦) $P < 0.05$; (♦♦) $P < 0.01$; (♦♦♦) $P < 0.001$ [les extraits vs le Contrôle Négatif].

activité cytotoxique des Extraits d'AMO



Les valeurs sont significatives : (♦) $P < 0.05$; (♦♦) $P < 0.01$; (♦♦♦) $P < 0.001$ [les extraits vs le Contrôle Négatif].

activité cytotoxique des Extraits de PLE



Les valeurs sont significatives : (♦) $P < 0.05$; (♦♦♦) $P < 0.001$ [les extraits vs le Contrôle Négatif].

Figure 3.4 : Pourcentage de mortalité des larves d'*Artemia salina* pour les extraits des trois plantes.

- Les taux de mortalité enregistrés avec les extraits de l'E.P des trois espèces sont très faibles et ne dépassent pas 20% quelque que soit la dose utilisée.
- Les extraits chloroformiques des racines d'APY et des feuilles de PLE ont induit une faible mortalité qui ne dépassent pas 10 % à la concentration la plus élevée (1000 µg/mL). Cependant l'extrait de chloroforme des feuilles d'AMO provoque des mortalités significatives par rapport au contrôle négatif de 20 % à 500 µg/mL, et passe à 60 % à 1000 µg/mL ($p < 0,001$).
- L'extrait d' AcOEt de feuilles de PLE induit la mortalité totale des larves à partir de 250 µg/mL. Pour sa part, ce taux de mortalité observé pour PLE n'est atteint pour les extraits d'APY et AMO que pour des concentrations de 500 et 1000 µg/mL, respectivement.
- L'extrait de MeOH de feuilles de PLE induit la mortalité totale des larves à partir de 500 µg/ml. Pour sa part, ce taux de mortalité observé pour PLE n'est atteint pour l'extrait d'AMO que pour une concentration de 1000 µg/mL. A cette dernière concentration, l'extrait d'APY provoque seulement 47,5 % de mortalité des larves de crevettes.

Les valeurs de CL_{50} obtenues pour les extraits testés sont exprimées dans le tableau 3.4.

Tableau 3.4 : Valeurs des CL₅₀ des différents extraits après 24 h.

Espèces	Extraits	CL ₅₀ [◇] (µg/mL)
<i>A. pyrethrum</i>	E.P	2044,649 ^{NT}
	CHCl ₃	1391,693 ^{NT}
	AcOEt	249,259 ^{HT}
	MeOH	999,714 ^{MT}
<i>A. mollis</i>	E.P	1391,693 ^{NT}
	CHCl ₃	847.846 ^{MT}
	AcOEt	590.524 ^{MT}
	MeOH	554,246 ^{MT}
<i>P. lentiscus</i>	E.P	-
	CHCl ₃	1391.693 ^{NT}
	AcOEt	136.990 ^{HT}
	MeOH	254.220 ^{HT}

Légende :

- : absence de mortalité ; ◇ : valeur des CL₅₀ calculée par le logiciel BioStat 2009 ; Extraits : (E.P: éther de pétrole ; CHCl₃: Chloroforme ; AcOEt : Acétate d'éthyle ; MeOH : Méthanol) ; Niveau de toxicité selon Meyer, B.N *et al.*, 1982 , Oladimeji, H.O *et al.*, 2006 [NT : Non Toxique (CL₅₀ > 1000 µg/mL) ; MT : Moyennement Toxique (500 < CL₅₀ < 999 µg/mL) ; HT : Hautement Toxique (CL₅₀ < 500 µg/mL)].

Selon les valeurs des CL₅₀ et en tenant compte de l'échelle de toxicité établie auparavant (Meyer, B.N *et al.*, 1982 , Oladimeji, H.O *et al.*, 2006), on peut distinguer 3 catégories d'extraits :

- Catégorie 1 (hautement toxique) : AcOEt de PLE et d'APY et MeOH de PLE
- Catégorie 2 (moyennement toxique) : MeOH, AcOEt, CHCl₃ d'AMO et MeOH d'APY
- Catégorie 3 (non toxique) : CHCl₃ de PLE et d'APY, E.P d'AMO et d'APY

Des travaux antérieurs ont rapporté des seuils de CL₅₀ utilisant le test de toxicité sur les larves d'*Artemia salina* pour des extraits alcooliques de la résine de *P. lentiscus* et des racines d'*A.pyrethrum* de 2,5 et 460 µg/mL, respectivement (Alluri, V.K *et al.*, 2005). Pour sa part, l'extrait de dichlorométhane des racines d'*Acanthus pubecens* a montré une CL₅₀ = 38,9 µg/mL (Moshi, M.J *et al.*, 2010), d'une autre part, l'extrait méthanolique des fleurs d' *Acanthus ilicifolius* a montré une CL₅₀ = 22 µg/mL (Muhamad, F *et al.*, 2013).

II.3.5 Evaluation de l'activité antioxydante par la méthode DPPH :

La capacité antioxydante des l'extraits bruts des trois espèces a été évaluée pour une gamme de concentrations de 12,5 µg / ml à 100 µg / mL, selon les procédures décrites dans la partie matériels et méthodes. Les résultats pour APY, AMO et PLE sont décrits dans les tableaux (3.5), (3.6) et (3.7) et figures (3.5), (3.6) et (3.7), respectivement.

– Potentiel antioxydant des racines d'*A.pyrethrum* :

Tableau 3.5 : Activité antioxydante des extraits des racines d'APY.

Extraits	Conc (µg / mL)	% d'Inhibition de DPPH				Moy IC ₅₀ ± SD (µg / mL)	équation
		% (1)	% (2)	% (3)	Moy % ± SD*		
E.P	12.5	11.62	12.37	12.07	12.02 ± 00.38	562.88 ± 178.95	y = 0.059 x + 12.68 R ² =0.761
	25	17.14	14.61	14.61	15.45 ± 01.46		
	50	17.44	17.44	17.29	17.39 ± 00.09		
	100	17.59	17.44	17.88	17.64 ± 00.22		
CHCl ₃	12.5	04.43	03.77	03.55	03.92 ± 00.46	254.41 ± 37.18	y = 0.222 x + 1.281 R ² =0.984
	25	07.54	08.09	07.21	07.61 ± 00.44		
	50	10.53	10.64	11.31	10.83 ± 00.42		
	100	24.28	23.39	23.84	23.84 ± 00.45		
AcOEt	12.5	05.21	00.22	01.55	02.33 ± 02.59	150.79 ± 03.14	y = 0.311 x + 3.106 R ² =0.824
	25	15.08	09.09	12.08	12.08 ± 02.99		
	50	25.83	25.39	25.61	25.61 ± 00.22		
	100	32.59	29.16	30.82	30.86 ± 01.72		
MeOH	12.5	38.60	40.20	41.70	40.17 ± 01.55	56.97 ± 03.10	y = 0.201 x + 38.55 R ² =0.978
	25	43.30	44.30	42.90	43.50 ± 00.72		
	50	47.20	50.20	51.00	49.47 ± 02.00		
	100	59	58.60	57.60	58.40 ± 00.72		

Légende : E.P: éther de pétrole ; CHCl₃ : Chloroforme ; AcOEt : Acétate d'éthyle ; MeOH : Méthanol ;
☆ : Moyenne de 3 répétitions.

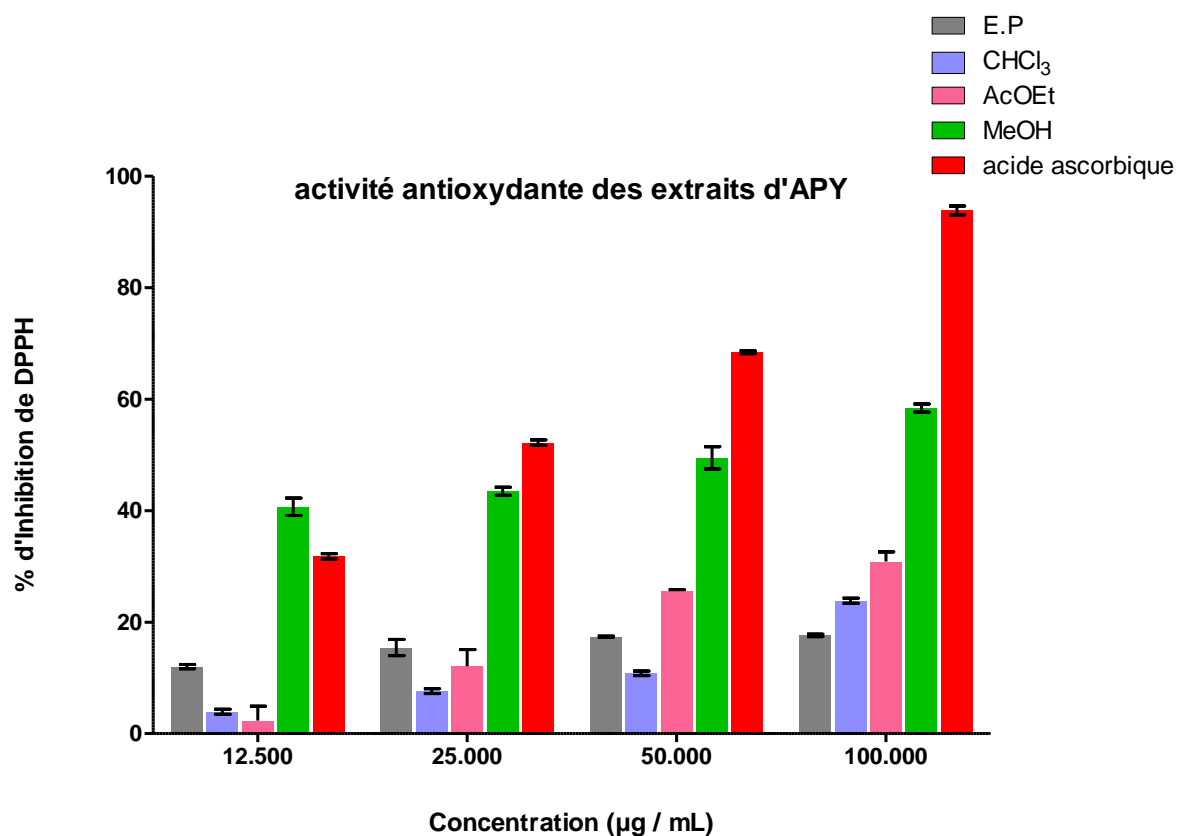


Figure 3.5 : Activité antioxydante des extraits des racines d' *A.pyrethrum*.

Les résultats du pouvoir antioxydant des extraits des racines d'APY testés montrent des profils similaires d'activité ne dépasse pas 40 % à différentes concentrations, sauf l'extrait méthanolique qui montre un seuil d'inhibition de 50 % pour des concentrations situées entre 50 et 100 µg / mL. Selon les valeurs des IC₅₀ obtenus, les extraits d'APY sont doués d'un pouvoir antioxydant faible, à l'exception de l'extrait méthanolique où le IC₅₀ est de 56.97 ± 3.10 µg / mL. Cette valeur est relativement faible à celle de l'acide ascorbique (29.46 ± 0.19 µg / mL).

– Potentiel antioxydant des feuilles d'*A. mollis* :

Tableau 3.6 : Activité antioxydant des Extraits des feuilles d'AMO.

Extraits	Conc ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	% d'Inhibition de DPPH				Moy IC ₅₀ \pm SD	équation
		% (1)	% (2)	% (3)	Moy % \pm SD [☆]		
E.P	12.5	37.70	32.10	32.80	34.20 \pm 03.05	55.63 \pm 03.61	y = 0.206 x + 38.54 R ² =0.641
	25	50.20	52.00	48.90	50.37 \pm 01.56		
	50	51.60	52.70	52.80	52.37 \pm 00.67		
	100	55.70	59.00	55.80	56.83 \pm 01.87		
CHCl ₃	12.5	33.04	23.73	30.60	29.12 \pm 04.83	48.80 \pm 1.16	y = 0.698 x + 15.94 R ² =0.932
	25	34.04	37.69	36.81	36.18 \pm 01.90		
	50	40.24	39.02	40.13	39.80 \pm 00.67		
	100	90.13	89.69	89.02	89.61 \pm 00.56		
AcOEt	12.5	24.29	19.67	14.90	19.62 \pm 04.69	34.02 \pm 2.60	y = 0.664 x + 27.27 R ² =0.760
	25	52.75	52.01	51.86	52.21 \pm 00.48		
	50	76.01	76.60	76.45	76.35 \pm 00.31		
	100	86.14	85.84	85.69	85.89 \pm 00.23		
MeOH	12.5	51.00	51.00	51.00	51.00 \pm 00	12.83 \pm 0.51	y = 0.417 x + 44.65 R ² =0.965
	25	55.00	59.40	55.20	56.53 \pm 02.48		
	50	61.00	60.70	61.20	60.97 \pm 00.25		
	100	83.40	90.60	90.80	88.27 \pm 04.22		

Légende : E.P: éther de pétrole ; CHCl₃ : Chloroforme ; AcOEt : Acétate d'éthyle ; MeOH : Méthanol ;
☆ : Moyenne de 3 répétitions.

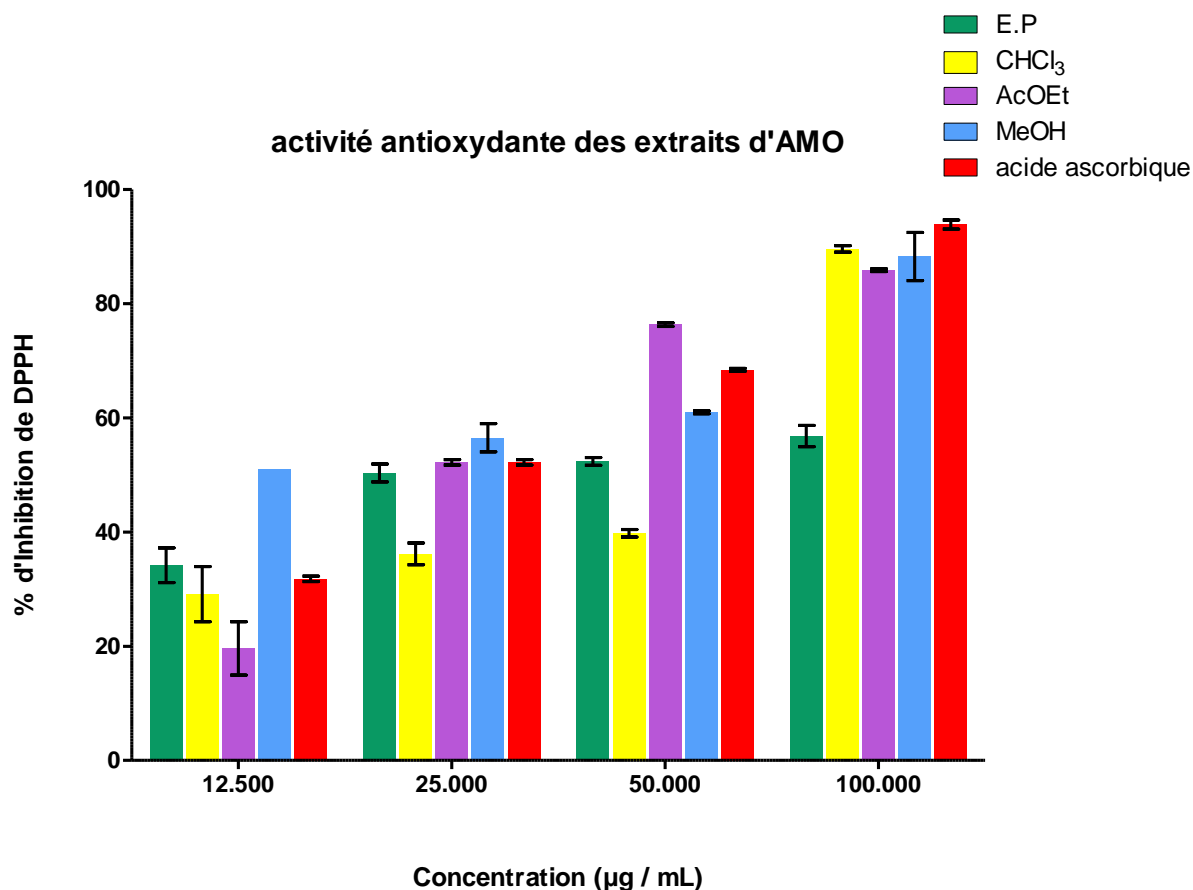


Figure 3.6 : Activité antioxydante des extraits des feuilles d' *A.mollis*.

Les extraits et l'acide ascorbique ont montré une capacité antiradicalaire variable. L'extrait méthanolique se distingue par un effet inhibiteur de 50 % mesuré dès la concentration la plus faible (12,5 µg / mL). Pour leur part, les extraits (E.P et AcOEt) ont inhibé de 50 % les radicaux DPPH dès la concentration 25 µg / mL.

L'extrait méthanolique des feuilles d'AMO a présenté l'activité anti-radicalaire la plus élevée avec une valeur de IC₅₀ de 12.83 ± 0.51 µg / mL, valeur inférieure à celle de l'acide ascorbique (29.46 ± 0.19 µg / mL).

– Potentiel antioxydant des feuilles de *P.lentiscus* :

Tableau 3.7 : Activité antioxydante des extraits des feuilles de PLE.

Extraits	Conc (µg / mL)	% d'Inhibition de DPPH				Moy IC ₅₀ ± SD	équation
		% (1)	% (2)	% (3)	Moy % ± SD*		
E.P	12.5	32.40	33.70	34.40	33.50 ± 01.01	66.05 ± 01.71	y = 0.291 x + 30.78 R ² =0.976
	25	36.40	36.80	38.70	37.30 ± 01.09		
	50	46.80	46.70	50.10	47.87 ± 01.93		
	100	58.80	59.00	58.40	58.73 ± 00.31		
CHCl ₃	12.5	14.75	16.69	19.37	16.94 ± 02.32	49.35 ± 02.85	y = 0.785 x + 11.35 R ² =0.983
	25	38.89	31.59	36.66	35.71 ± 03.74		
	50	59.46	45.01	49.18	51.22 ± 07.44		
	100	88.38	89.12	88.97	88.82 ± 00.39		
AcOEt	12.5	04.99	06.76	06.43	06.06 ± 00.94	54.69 ± 00.47	y = 1.044 x – 7.098 R ² =0.927
	25	09.98	09.42	08.54	09.31 ± 00.73		
	50	63.30	59.53	60.31	61.05 ± 01.99		
	100	91.79	91.13	91.57	91.50 ± 00.34		
MeOH	12.5	49.00	46.70	46.80	47.50 ± 01.30	22.69 ± 03.06	y = 0.245 x + 44.44 R ² =0.962
	25	52.30	50.90	51.40	51.53 ± 00.71		
	50	53.70	53.80	53.20	53.57 ± 00.32		
	100	71.40	71.00	68.60	70.33 ± 01.51		

Légende : E.P : éther de pétrole ; CHCl₃ : Chloroforme ; AcOEt : Acétate d'éthyle ; MeOH : Méthanol ;
☆ : Moyenne de 3 répétitions.

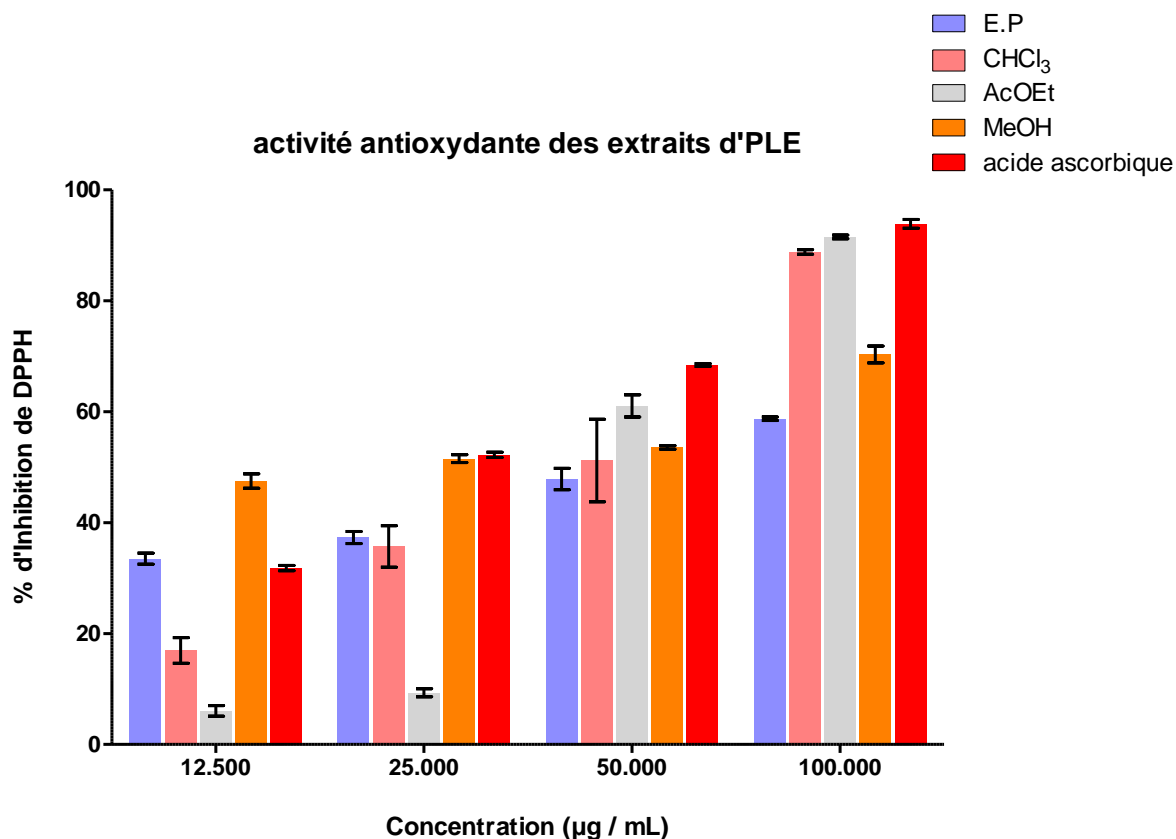


Figure 3.7 : Activité antioxydante des extraits des feuilles de *P.lentiscus*.

Selon les valeurs obtenues l'extrait de MeOH des feuilles de PLE a inhibé 50 % des radicaux de DPPH dès la concentration de 25 µg/ mL. Alors que le même potentiel antiradicalaire est atteint pour les autres extraits (CHCl₃ et AcOEt) mais à une concentration de 50 µg/ mL.

Les valeurs des IC₅₀ mesurées pour les extraits sont exprimées dans le tableau 3.9. Il peut être observé que l'IC₅₀ de l'extrait MeOH (22,69 ± 3,06 µg / mL) est nettement inférieure à celle des autres extraits (49,35 ± 2,85 et 66,05 ± 1,71 µg / mL) et celle de l'acide ascorbique (29,46 ± 0,19 µg / mL).

Tableau 3.8 : Activité antioxydante de l'acide ascorbique.

Conc ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	% d'Inhibition de DPPH				Moy IC ₅₀ \pm SD	Equation
	% (1)	% (2)	% (3)	Moy % \pm SD		
12.5	31.45	32.34	31.59	31.79 \pm 00.48	29.46 \pm 00.19	y = 0.662 x + 30.35 R ² = 0.950
25	52.76	52.01	51.86	52.21 \pm 00.48		
50	68.55	68.55	68.11	68.40 \pm 00.25		
100	94.78	93.29	93.59	93.89 \pm 00.79		

Tableau 3.9 : valeurs des IC₅₀ des différents extraits.

Espèces	Extraits [§]	Moy IC ₅₀ \pm SD [¶] ($\mu\text{g} / \text{mL}$)
<i>A.pyrethrum</i>	E.P	562,88 \pm 178,95 ♦♦••●
	CHCl ₃	254,41 \pm 37,18 ♦♦♦••●●
	AcOEt	150,79 \pm 3,14 ♦♦♦••●●
	MeOH	56,97 \pm 3,10 ♦♦♦•***
<i>A.mollis</i>	E.P	55,63 \pm 3,61♦♦♦•■■■
	CHCl ₃	48,80 \pm 1,16 ♦♦♦•■■■
	AcOEt	34,02 \pm 2,60 ♦•■■■
	MeOH	12,83 \pm 0,51 ♦♦♦
<i>P.lentiscus</i>	E.P	66,05 \pm 1,71 ♦♦♦•♦♦♦
	CHCl ₃	49,35 \pm 2,85 ♦♦♦•♦♦♦
	AcOEt	54,69 \pm 0,47 ♦♦♦•♦♦♦
	MeOH	22,69 \pm 3,06 ♦•**
acide ascorbique		29,46 \pm 0,19

Légende : § (E.P : éther de pétrole ; CHCl₃ : Chloroforme ; AcOEt : Acétate d'éthyle ; MeOH : Méthanol). ¶ : Moyenne de 4 répétitions portant chacune sur 10 individus (n = 10).

Les valeurs sont significatives :

(♦) P<0.05 ; (♦♦) P<0.01 ; (♦♦♦) P<0.001 : les extraits des plantes APY, AMO et PLE vs acide ascorbique

(●●) P<0.01 ; (●●●) P<0.001 : autres extraits E.P, CHCl₃ et AcOEt vs extrait MeOH APY

(■■■) P<0.001 : autres extraits E.P, CHCl₃ et AcOEt vs extrait MeOH AMO

(♦♦♦) P<0.001 : autres extraits E.P, CHCl₃ et AcOEt vs extrait MeOH PLE

(♦♦♦) P<0.01 ; (♦♦♦♦) P<0.001 : autres extraits MeOH PLE et APY vs extrait MeOH AMO

A la lecture du tableau 3.9, il peut être observé ce qui suit :

- Seuls les extraits méthanoliques d'AMO et PLE présentent un IC₅₀ inférieur à celui de l'acide ascorbique.
- Les pouvoirs réducteurs des extraits méthanoliques des feuilles d'AMO et PLE sont largement supérieurs à ceux des autres extraits de moindre polarité (E.P, CHCl₃ et

AcOEt), de même ces extraits alcoolique se révèlent douer d'un pouvoir antioxydant significativement supérieur à celui de l'acide ascorbique.

II.3.6 Dosage des flavonoïdes et des tanins dans les extraits méthanoïques pour les trois espèces :

Le criblage phytochimique préliminaire réalisé sur les extraits alcooliques des trois plantes a révélé la présence de différents groupes de composés phénoliques (section I tableau 3.2 page 62). Pour cette raison un dosage quantitatif des principaux groupes phénoliques (flavonoïdes, tanins) a été effectué. Les résultats sont exprimés dans le tableau 3.10 et figure 3.7. Les courbes de calibration afférant à ce dosage sont illustrées dans la figure 3.8.

Tableau 3.10 : Teneurs en flavonoïdes et tanins et valeurs des IC₅₀ des extraits méthanoliques.

Extraits méthanoliques	Teneur en Flavonoïdes (mg.eq.Q/g) ▼	Teneur en Tanins (mg.eq.C/g) *	IC ₅₀ (µg / mL)
<i>A.pyrethrum</i>	02,78 ± 0,22	09,49 ± 0,05	56,97 ± 3,10
<i>A.mollis</i>	03,40 ± 0,26	08,35 ± 0,09	12,83 ± 0,51
<i>P.lentiscus</i>	03,15 ± 0,08	29,43 ± 0,38	22,69 ± 3,06

Légende : valeurs obtenues représentant la moyenne de 3 répétitions
 (▼) : mg équivalent de Quercétine par gramme d'extrait méthanoliques ;
 (*) : mg équivalent de Catéchine par gramme d'extrait méthanoliques

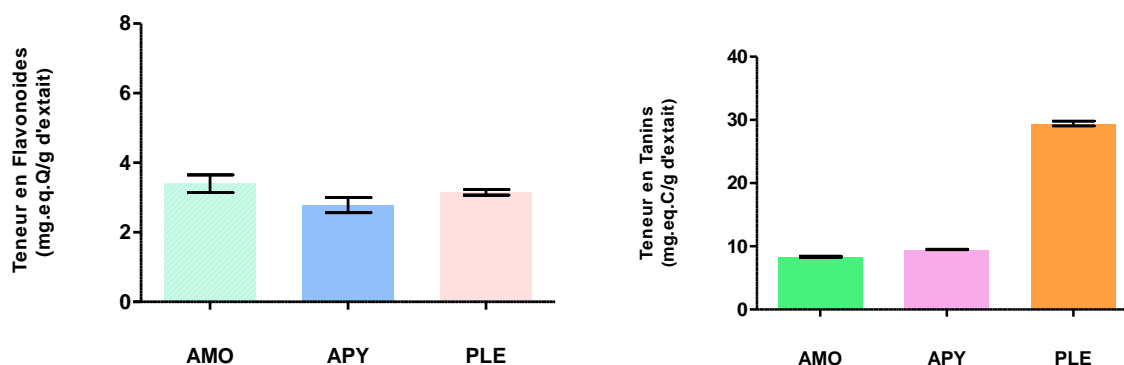


Figure 3.8 : Dosage en flavonoïdes et en tanins des extraits méthanoliques des espèces.

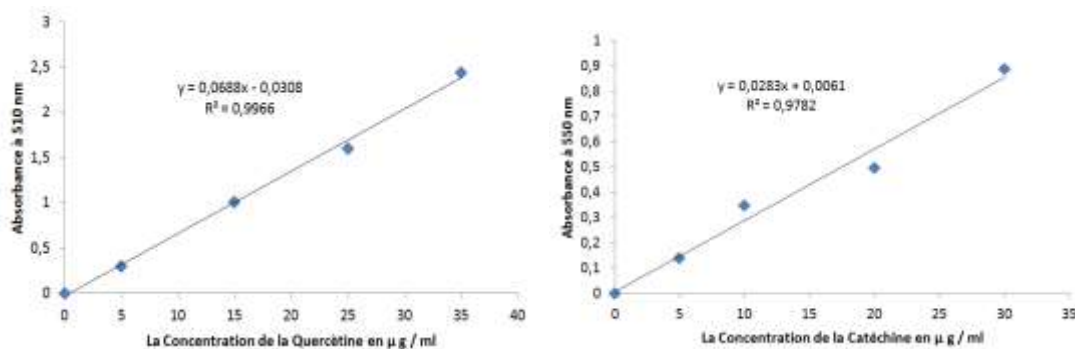


Figure 3.9 : Courbes d'étalonnage de la Quercétine et de la Catéchine.

A la lecture du tableau 3.10, il ressort que :

– la teneur en flavonoïdes totaux est comparable dans les trois extraits MeOH d'APY AMO et PLE ($2,78 \pm 0,22$; $3,40 \pm 0,26$ et $3,15 \pm 0,08$ mg.eq.Q/g, respectivement). Ces valeurs restent modestes par rapport à celles d'autres plantes (Hamad, H *et al.*, 2011)

– le contenu en tanins dans l'extrait MeOH de PLE ($29,43 \pm 0,38$ mg.eq.C/g) est supérieur par rapport à ceux des autres extraits MeOH d'APY et AMO ($9,49 \pm 0,05$ et $8,35 \pm 0,09$ mg.eq.C/g, respectivement).

Selon certaines études, il existe une corrélation entre le potentiel antioxydant et le contenu en composés phénoliques (Boudechiche, L.M *et al.*, 2014). En effet, les flavonoïdes, tanins et d'autres groupes de composés phénoliques ont la capacité de neutraliser les radicaux oxygénés libres (Antolovich, M *et al.*, 2002).

Selon une étude faite sur les racines d'*A.pyrethrum*, la quantité en flavonoïdes trouvée dans l'extrait éthanoïque ($29,65 \pm 0,83$ mg.eq.Q/g) a été corrélée à un potentiel antioxydant élevé de $55,83 \pm 1,92$ (Sujith, K *et al.*, 2011).

En ce qui concerne les feuilles de *P. lentiscus*, les composés phénoliques simples correspondent à une quantité de 216.289 ± 20.62 mg.eq.G/g (Beghlal, D *et al.*, 2016). D'autres auteurs ont obtenu une quantité supérieure dans les feuilles de *P. lentiscus* qui correspond à 588 mg.eq.G/g (Gardeli, C *et al.* 2008).

Selon les résultats de Cherbal, A., *et al* 2012, l'extrait méthanolique contient des contenus en flavonoïdes [$38,7 \pm 0,02$ mg.eq.Q/g] et en tanins [$175,3 \pm 1,07$ mg.eq.T/g]. Ces données sont plus élevées que celles trouvées dans d'autres études, y compris la présente étude, pour l'extrait méthanolique des feuilles.

Bien que nos résultats montrent que le potentiel antioxydant des l'extrait alcoolique AMO dépasse largement ceux des autres extraits (PLE et APY), aucune relation directe entre leurs contenus en flavonoïdes et tanins ne peut être faite.

SECTION III : Caractérisation et fractionnement bioguidé de l'extrait actif (AcOEt) *A. pyrethrum* :

Le criblage préliminaire des extraits bruts a montré que l'extrait des racines d'APY obtenu avec l'acétate d'éthyle était doué du pouvoir cytotoxique ($CL_{50} = 249,26 \mu\text{g/mL}$) le plus important comparé aux autres extraits (voir section II, page 69).

Les résultats du criblage phytochimique par CCM de l'extrait AcOEt d'APY ont montré une composition chimique complexe essentiellement représentée probablement par les triterpènes et les alkamides (figure 3.10).

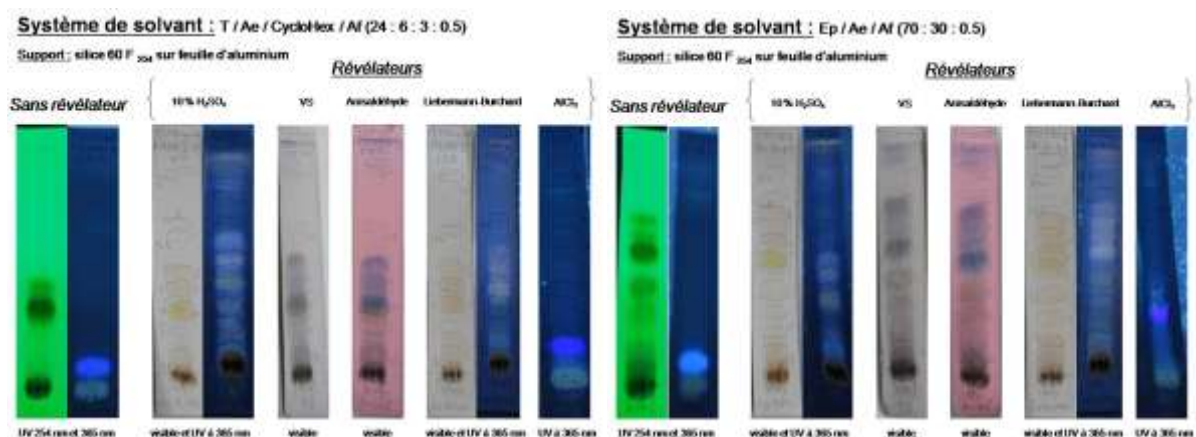


Figure 3.10 : Chromatogramme d'extrait AcOEt (APY), avant et après la révélation.

Le fractionnement chromatographique bioguidé de l'extrait AcOEt a conduit à 50 fractions. Les fractions F.1 à F.17 et F.34 à F.50 ont fourni un résidu à l'évaporation négligeable en masse. Seules l'étude des F.18 à F.33 ont fait l'objet d'analyses phytochimique et biologique (mesure du potentiel cytotoxique) plus approfondies.

Le résultat de l'évaluation du potentiel cytotoxique des fractions sélectionnées (F.19, F.21, F.24, F.26, F.28 et F.33) est synthétisé dans le tableau 3.11 et la figure 3.11.

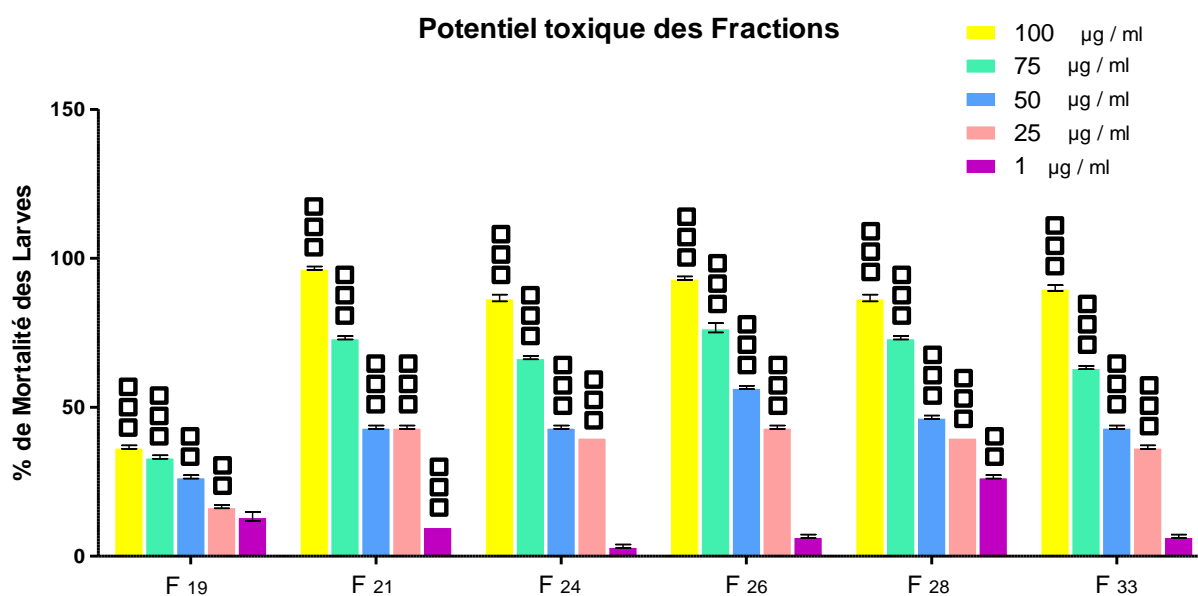
Tableau 3.11 : Pourcentage de Mortalité des fractions à différents concentration.

Fractions	% Mortalité \pm SD [⚡] (lecture après 24h) concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)					CL ₅₀ [◇] ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
	1	25	50	75	100	
F ₁₉	13,33 \pm 1,52	16,66 \pm 0,58 ^{□□}	26,66 \pm 0,58 ^{□□}	33,33 \pm 0,58 ^{□□□}	36,66 \pm 0,58 ^{□□□}	145,581 _{NT}
F ₂₁	10 \pm 00 ^{□□□□}	43,33 \pm 0,58 ^{□□□□}	43,33 \pm 0,58 ^{□□□□}	73,33 \pm 0,58 ^{□□□□}	96,66 \pm 0,58 ^{□□□□}	46,326 _{HT}
F ₂₄	03,33 \pm 0,58	40 \pm 00 ^{□□□□}	43,33 \pm 0,58 ^{□□□□}	66,66 \pm 0,58 ^{□□□□}	86,66 \pm 1,15 ^{□□□□}	52,766 _{MT}
F ₂₆	06,66 \pm 0,58	43,33 \pm 0,58 ^{□□□□}	56,66 \pm 0,58 ^{□□□□}	76,66 \pm 1,53 ^{□□□□}	93,33 \pm 0,58 ^{□□□□}	43,715 _{HT}
F ₂₈	26,66 \pm 0,58 ^{□□}	40 \pm 00 ^{□□□□}	46,66 \pm 0,58 ^{□□□□}	73,33 \pm 0,58 ^{□□□□}	86,66 \pm 1,15 ^{□□□□}	42,464 _{HT}
F ₃₃	06,66 \pm 0,58	36,66 \pm 0,58 ^{□□□□}	43,33 \pm 0,58 ^{□□□□}	63,33 \pm 0,58 ^{□□□□}	90 \pm 01 ^{□□□□}	52,834 _{MT}
Contrôle Négatif	—					

Légende : — : Pas de Mortalité observée ; ⚡ : Moyenne de 3 répétitions portant chacune sur 10 individus. Signification par rapport au Contrôle Négative : (□□) P<0.01 ; (□□□□) P<0.001 [toutes les fractions vs Contrôle Négatif].

◇ : valeur de CL₅₀ calculée par le logiciel BioStat 2009 ;

Niveau de toxicité selon l'échelle de Meyer, B.N *et al.*, 1982 [NT : Non Toxique (CL₅₀ > 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ; MT : Moyennement Toxique (50 < CL₅₀ < 99 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ; HT : Hautement Toxique (CL₅₀ < 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)].



Les valeurs sont significatives : (□□□□) P<0.001 [les fractions vs le Contrôle Négatif].

Figure 3.11 : Pourcentage de mortalité des fractions issue de l'extrait AcOEt (APY).

Les données montrent que :

- Les pourcentages de mortalité des larves augmentent avec les concentrations.
- Les fractions F.21 et F.28 ont provoqué des mortalités significatives dès 1 µg / mL par rapport au control.
- Pour leur part, les autres fractions (F.19, F.24, F.26 et F.33) ont induit des mortalités significatives par rapport au control à partir de 25 µg / mL.

Les valeurs des CL₅₀ obtenues montrent, d'une part que seule la fraction F.19 est douée d'un pouvoir cytotoxique faible selon l'échelle de Meyer, B.N *et al.*, 1982, et d'autre part, les potentiels toxiques des fractions F.21 à F.33 sont importants mais comparables.

L'investigation phytochimique des fractions F.21 à F.33 a montré que les fractions F.24, F.26 et F.33 sont des mélanges complexes. A l'opposé, les fractions F.21 et F.28 ont montré un profil chromatographique sur plaques CCM caractérisé par la présence de quelques taches bien séparées.

Au vue des toxicités importantes de ces deux dernières fractions (F.21 et F.28) et de la relative simplicité de leur composition, il a été décidé d'approfondir leurs études phytochimiques, en vue d'isoler leurs constituants majoritaires.

III.3.7 Étude de la fraction F.21 :

Un total de 55 mg de F.21 a été utilisé pour le fractionnement sur une colonne de gel de silice pour colonne, avec un gradient de cycloHexane : Chloroforme : Acétate d'éthyle et Méthanol (100 % : 0 : 0 : 0 à 0 % : 0 : 0 : 100 %) pour donner 28 fractions.

La fraction F.21.11 a montré la présence d'un composé majoritaire (dénomination **A** de masse 22.8 mg), alors que les autres fractions ont montré un profil complexe F.21.7 – F.21.10 ou un résidu faible à l'évaporation.

III.3.8 Étude de la fraction F.27 :

La fraction F.27 présente le même profil chromatographique que F.28. A partir de cette fraction F.27 (160 mg), un fractionnement a été réalisé sur une petite colonne de gel de silice en phase normale utilisant un gradient d'un mélange cycloHexane : Diéthyl éther : Acétone (100 % : 0 : 0 à 0 % : 0 : 100 %) pour donner quarante sous - fractions. La purification des sous - fractions les plus importantes en quantité, à savoir F.27.3 à F.27.11 a permis de séparer quatre composés dénommés **B** (24.4 mg) ; **H** (15 mg) ; **K** (16 mg) et **G** (24.1 mg).

III.3.9 Étude de la fraction F.28 :

La fraction F.28 (130 mg) est fractionnée de la même façon que F.27 pour séparer les principaux taches et éliminer les traces des pigments résiduels. Trente six sous - fractions sont obtenus dont les plus importantes en quantité sont sept de F.28.3 à F.28.9. L'étude des sous – fractions F.28.5, F.28.7 et F.28.9 a été réalisé en priorité (profil chromatographique simple), pour aboutir à l'isolement de leur(s) constituant(s). La sous – fraction F.28.5 a permis d'isoler directement un composé cristallisable dénommé **E** (13.6 mg), alors que les deux autres sous – fractions F.28.7 et F.28.9 ont nécessité un fractionnement sur colonne supplémentaire.

III.3.9.1 Purification de la sous – fraction F.28.7 :

L'examen de la sous fraction F.28.7 par CCM utilisant les réactifs vanilline sulfurique et l'anisaldéhyde nous a permis de déterminer la nature alkamide des deux principaux constituants.

Le fractionnement de la totalité de la quantité F.28.7, soit 31.7 mg, sur une colonne de gel de silice en utilisant un gradient de Hexane : Acétate d'éthyle (100 % : 0 à 0 % : 100 %) a abouti à l'isolement de deux composés nommés **D** (12.3 mg) et **F** (05.6 mg).

III.3.9.2 Purification de la sous – fraction F.28.9 :

La même procédure de purification que précédemment a été entreprise avec F.28.9 (13.7 mg) pour aboutir à deux autres composés de nature alkamides identifiés comme **C** (07.7 mg) et **I** (03.8 mg).

III.3.10 Identification des composés isolés de l'extrait actif Ae (APY) :

III.3.10.1 Identification du composé A :

Le composé A (22,8 mg) se présente sous forme d'une substance amorphe jaune, isolé de la sous – fraction F21.11. L'information recueillie des essais chromatographique montre sa nature terpénique. L'observation des CCM effectué en lumière visible et sous UV (254 et 365 nm) montre plusieurs couleurs (Tableau 3.12).

Tableau 3.12 : Couleurs observé sur CCM pour le Composé A.

observation	Avant révélation	Après révélation		
		VS	Lieber	Anis
Visible	invisible	Rose violette	violette	bleue violette
Sous UV	Invisible [○] et [□]	-	orangée [□]	orangée [□]

VS : le réactif de Vanilline Sulfurique; Lieber : le réactif de Liebermann Burchard; Anis : le réactif à l'Anisaldéhyde ; UV : (°) 254 nm et (□) 365 nm

Tableau 3.13 : Données chromatographiques du Composé A.

Système de Solvants	
CycloHex / AcOEt (6 :4) ; (v : v)	E.P/ AcOEt / Acide formique (70 :30 :0,5) ; (v : v : v)
Rf	0,60
	0,64

Adsorbant : gel de silice.

L'analyse du spectre RMN ¹H du composé A a permis d'assigner un certain nombre de signaux, ceci par comparaison aux données bibliographiques. Nos données

spectrales et chromatographiques présentent de nombreux points communs avec celles de triterpènes déjà isolés de la même espèce (Hamimed, S., 2009).

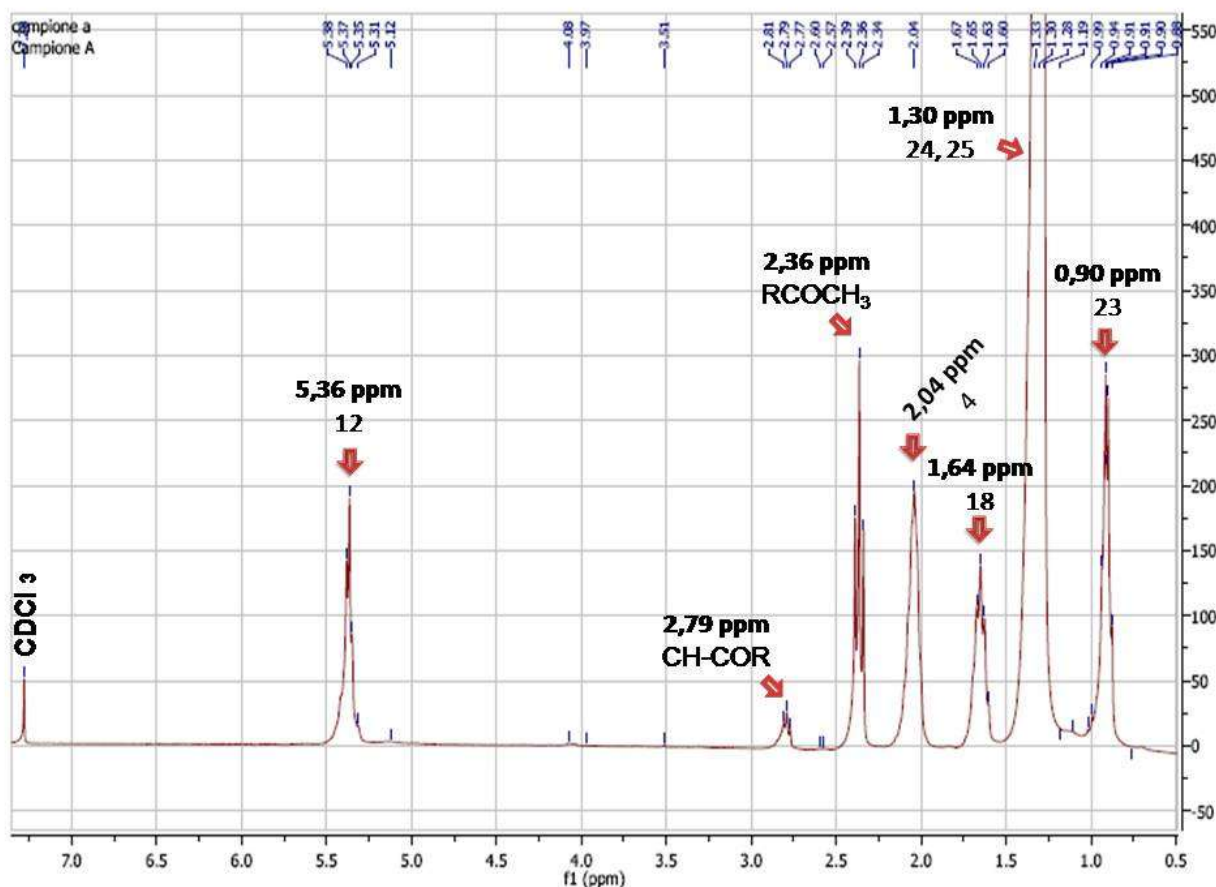


Figure 3.12 : Spectre RMN ^1H du composé A (300 MHz, CDCl_3).

Le composé A présente des éléments structuraux qui caractérisent les triterpènes :

- ✓ Dans la région blindée, 2 signaux sont observés : 1 groupe de méthyle sous forme de doublet à 0,90 ppm et 2 groupes méthyles sous forme d'un singulet à 1,30 ppm. Le singulet observé correspondent à deux groupements de méthyles, certainement en 24 accompagné de celui en 25, 26, 29 ou 30 (Ahmed, S.M *et al.*, 2004). Ce qui nous suggère un profil de substitution différent par rapport aux triterpènes déjà isolés de cette même espèce (Hamimed, S., 2009). Le signal de méthyle sous forme de doublet à 0,90 ppm est celui du méthyle 23, porté par un carbone tertiaire possédant un proton. Ce qui permet de dire que le composé A appartient à la série Fridelane.

Il faut savoir que le type de squelette de la série Fridelane est caractérisé par la présence de deux méthyles, Me-23 en C4 et Me-24 en C5 (Ahmed, S.M *et al.*, 2004;

Chiy, R.C *et al.*, 2008 ; Igoli, J.O *et al.*, 2008). L'absence de signal dans la région (δ 0,8-1,37 ppm), relatif au proton du carbone C-3, peut être interpréter, comme étant une indication sur l'état d'oxydation du C-3. Celui-ci pourrait être un carbonyle C=O (Ahmed, S.M *et al.*, 2004; Anwer, S.M *et al.*, 2008). En l'absence d'autres analyses, il peut être postulé (selon des considérations biogénétiques) que le carbone en C3 est oxydé en groupement carbonyle (C=O).

- ✓ Le signal déblindé observé à 2,04 ppm s'intégrant en un proton, correspond au proton H – 4 vient confirmer d'une part que ce triterpène pentacyclique appartient bien à la série Fridelane, et d'autre part, que ce proton est en voisine d'un groupement C=O.
- ✓ Le signal centré à 5,36 ppm, sous forme d'un double de doublet et s'intégrant pour 1 proton, est celui d'un proton oléfinique de la double liaison C12 – C13 (Dosseh, Ch *et al.*, 1980 ; Adnyana, K.I *et al.*, 2000; Kuo, Y.H *et al.*, 2000). La présence de la double liaison atteste que le composé A appartient au groupe des Fridelènes insaturés ou à la série 12 – Fridelène (Ahmed, S.M *et al.*, 2004; Thanakijcharoenpath, W *et al.*, 2007 ; Igoli, J.O *et al.*, 2008). D'un autre côté, cette hypothèse est renforcée par l'absence du signal correspondant au Me 27, qui est très significatif chez les Friedelènes insaturés (Hamimed, S., 2009).
- ✓ Le signal observé à 1.64 ppm s'intégrant en un proton, correspond au proton H – 18 (Dosseh, Ch *et al.*, 1980 ; Ahmed, S.M *et al.*, 2004).
- ✓ L'examen du spectre RMN 1H, dans la région caractéristique des méthyles du squelette triterpénique, permet de conclure quant à l'absence des méthyles en position C 14 et C17 (Me 26 et Me 28). D'après la littérature ces positions sont souvent occupées par des groupements fonctionnels (Druet, D *et al.*, 1986).

Le composé A présente également des éléments qui caractérise les groupements fonctionnels, il s'agit d'un signal autour de 2.36 ppm, s'intégrant en trois protons, correspond au RCOCH₃. D'après la littérature (Druet, D *et al.*, 1986) ce groupement pourrait être en position C 17. Un autre signal est observé à 2.79 ppm, s'intégrant en un proton, est correspondrait au CH – COR. A ce stade, les données recueillies suggèrent que le composé A est un triterpène pentacyclique avec des radicaux au niveau des carbones 14 et 20 :

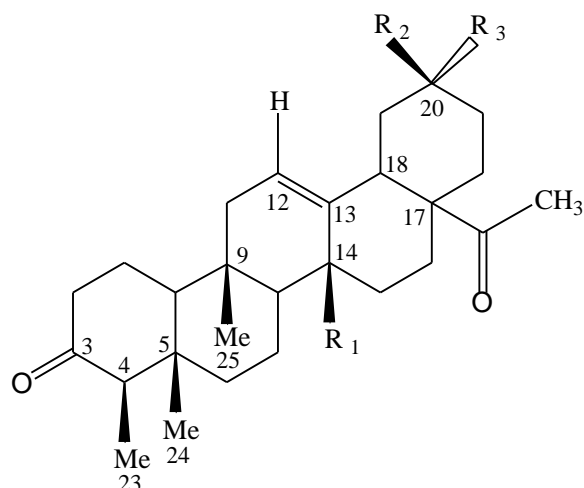


Figure 3.13 : Structure proposée du composé A (300 MHz, CDCl₃).

III.3.10.2 Identification du composé B :

Le composé B (24,4 mg) se présente sous forme d'une substance amorphe blanche, isolé de la sous - fraction F27.3. L'information recueillie des essais chromatographique suggèrent la même nature chimique que celle du composé A ; c.-à-d. un composé de nature terpénique. L'observation des CCM effectués en lumière visible et sous UV (254 et 365 nm) montre plusieurs couleurs (Tableau 3.12).

Tableau 3.14 : Données chromatographiques du Composé B.

Système de Solvants		
Hex / CHCl ₃ / Acide formique (1 : 3 : 0,5) ; (v : v : v)	E.P / AcOEt / Acide formique (70 : 30 : 0,5) ; (v : v : v)	T / AcOEt / CycloHex / Acide formique (24 : 6 : 3 : 0,5) ; (v : v : v)
Rf 0,15	0,49	0,44

Adsorbant : gel de silice.

L'analyse du spectre RMN ¹H du composé B, présenté dans la figure 3.13, a permis d'assigner un certain nombre de signaux, ceci par comparaison aux données bibliographiques.

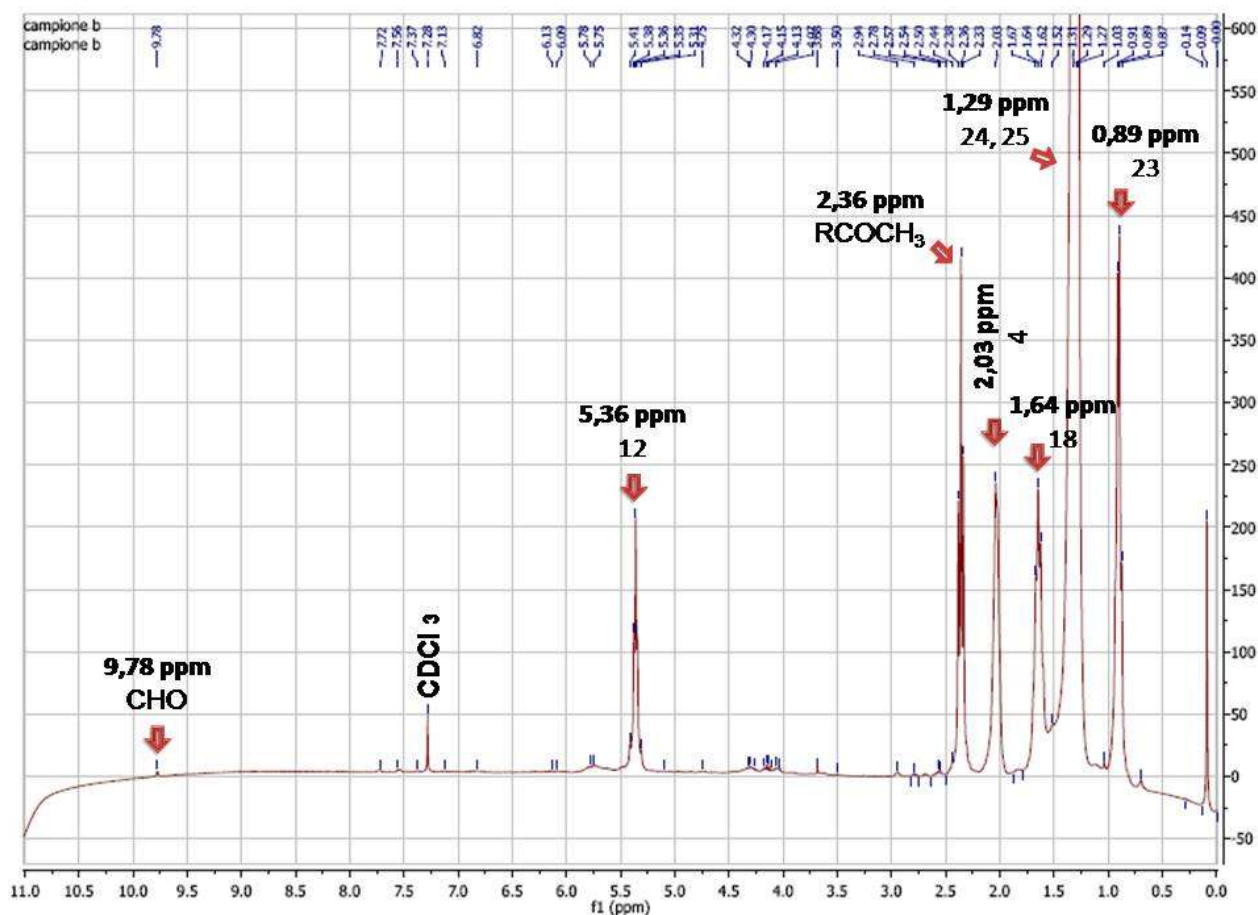


Figure 3.14 : Spectre RMN ^1H du composé B (300 MHz, CDCl_3).

Le composé B présente des éléments structuraux qui caractérisent les triterpènes :

- ✓ Dans la région blindée, 2 signaux sont observés : 1 groupe de méthyle sous forme de doublet à 0,89 ppm et 2 groupes méthyles sous forme d'un singulet à 1,29 ppm.

Le singulet observé correspondent à deux groupements de méthyles, certainement en 24 accompagné de celui en 25, 26, 29 ou 30 (Ahmed, S.M et *al.*, 2004). Ce qui nous suggère un profil de substitution différent par rapport aux triterpènes déjà isolés de cette même espèce (Hamimed, S., 2009). Le signal de méthyle sous forme de doublet à 0,90 ppm est celui du méthyle 23, porté par un carbone tertiaire possédant un proton. Ce qui permet de dire que le composé B appartient à la série Fridelane. Ce signal est similaire dans le triterpène isolé à savoir le composé A.

Ce type de squelette pentacyclique est caractérisé par la présence de deux méthyles, Me-23 en C4 et Me-24 en C5 (Ahmed, S.M *et al.*, 2004; Chiy, R.C *et al.*, 2008 ; Igoli, J.O *et al.*, 2008).

- ✓ Le signal déblindé observé à 2,03 ppm s'intégrant en un proton, correspond au proton H – 4 vient confirmer d'une part que ce triterpène pentacyclique appartient bien à la série Fridelane, et d'autre part, que ce proton est en voisine d'un groupement C=O. Ce signal est similaire dans le triterpène isolé à savoir le composé A.
- ✓ Le signal centré à 5,36 ppm, sous forme d'un double de doublet et s'intégrant pour 1 proton, est celui d'un proton oléfinique (Dosseh, Ch *et al.*, 1980 ; Adnyana, K.I *et al.*, 2000; Kuo, Y.H *et al.*, 2000). La présence de la double liaison en C12 – C13, atteste que le composé B appartient au groupe des Fridelènes insaturés ou à la série 12 – Fridelène (Ahmed, S.M *et al.*, 2004; Thanakijicharoenpath, W *et al.*, 2007 ; Igoli, J.O *et al.*, 2008). D'un autre côté, cette hypothèse est renforcée par l'absence du signal correspondant au Me 27, qui est très significatif chez les Friedelènes insaturés (Hamimed, S., 2009).
- ✓ Le signal observé à 1.64 ppm, s'intégrant en un proton, correspond au proton H – 18 (Dosseh, Ch *et al.*, 1980 ; Ahmed, S.M *et al.*, 2004). Ce signal est similaire à celui observé dans le triterpène précédent (composé A).
- ✓ L'examen du spectre RMN 1H, dans la région caractéristique des méthyles du squelette triterpénique, permet de conclure quant à l'absence des méthyles en position C 14 et C17 (Me 26 et Me 28). D'après la littérature (Druet, D *et al.*, 1986). Ces positions sont souvent occupées par des groupements fonctionnels.

Le composé B présente des éléments qui caractérisent les groupements fonctionnels. Il s'agit d'un signal autour de 2.36 ppm, s'intégrant en trois protons, correspond à un groupement RCOCH₃. L'apparition d'un signal sous forme de singulet à 9,78 ppm, s'intégrant en 1 proton, est compatible selon la littérature à celui d'un proton attaché à un carbone porteur d'une fonction aldéhyde (Kuo, Y.H *et al.*, 2000). Selon des critères biogéniques, l'oxydation chez les triterpènes peut être en position 3, 17 et/ou 30. L'absence de signal dans la région (δ 0,8-1,37 ppm),

relatif au proton du carbone C-3, peut être interprétée, en l'absence d'autres données, comme étant une indication sur l'état d'oxydation du C-3. Celui-ci pourrait être un carbonyle C = O (Ahmed, S.M *et al.*, 2004 ; Hamimed, S., 2009). Donc, le groupement aldéhyde pourrait être porté en position C 17 ou 30.

On absence d'autres analyses, et sur la base des seules données spectrales (^1H RMN) nous postulons que le composé B correspond à l'une des deux formules suivantes :

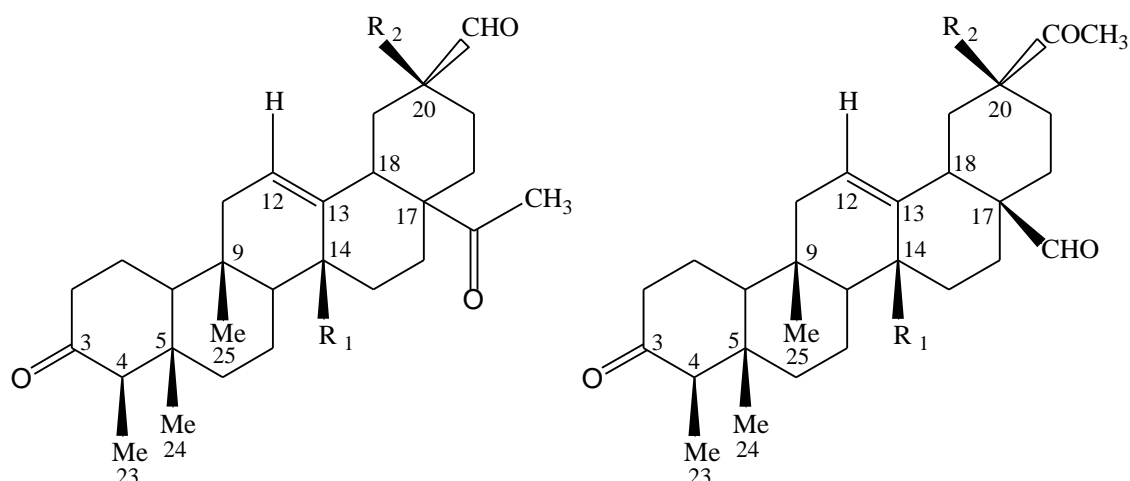


Figure 3.15 : Structures proposées du composé B (300 MHz, CDCl_3).

III.3.10.3 Identification du composé C :

Le composé C (7,7 mg) se présente sous forme des cristaux blancs, isolé de la sous – fraction F28.9.D. L'information recueillie des essais chromatographiques suggère une alkamide. L'observation des CCM effectué en lumière visible et sous UV (254 et 365 nm) montre plusieurs couleurs (Tableau 3.15).

Tableau 3.15 : Couleurs observé sur CCM pour le Composé C.

observation	Avant révélation	Après révélation	
		VS	Anis
Visible	Invisible	rose violette	violet foncé
Sous UV	sombre $^{\circ}$	-	violet foncé $^{\square}$

VS : le réactif de Vanilline Sulfurique ; Anis : le réactif à l'Anisaldéhyde

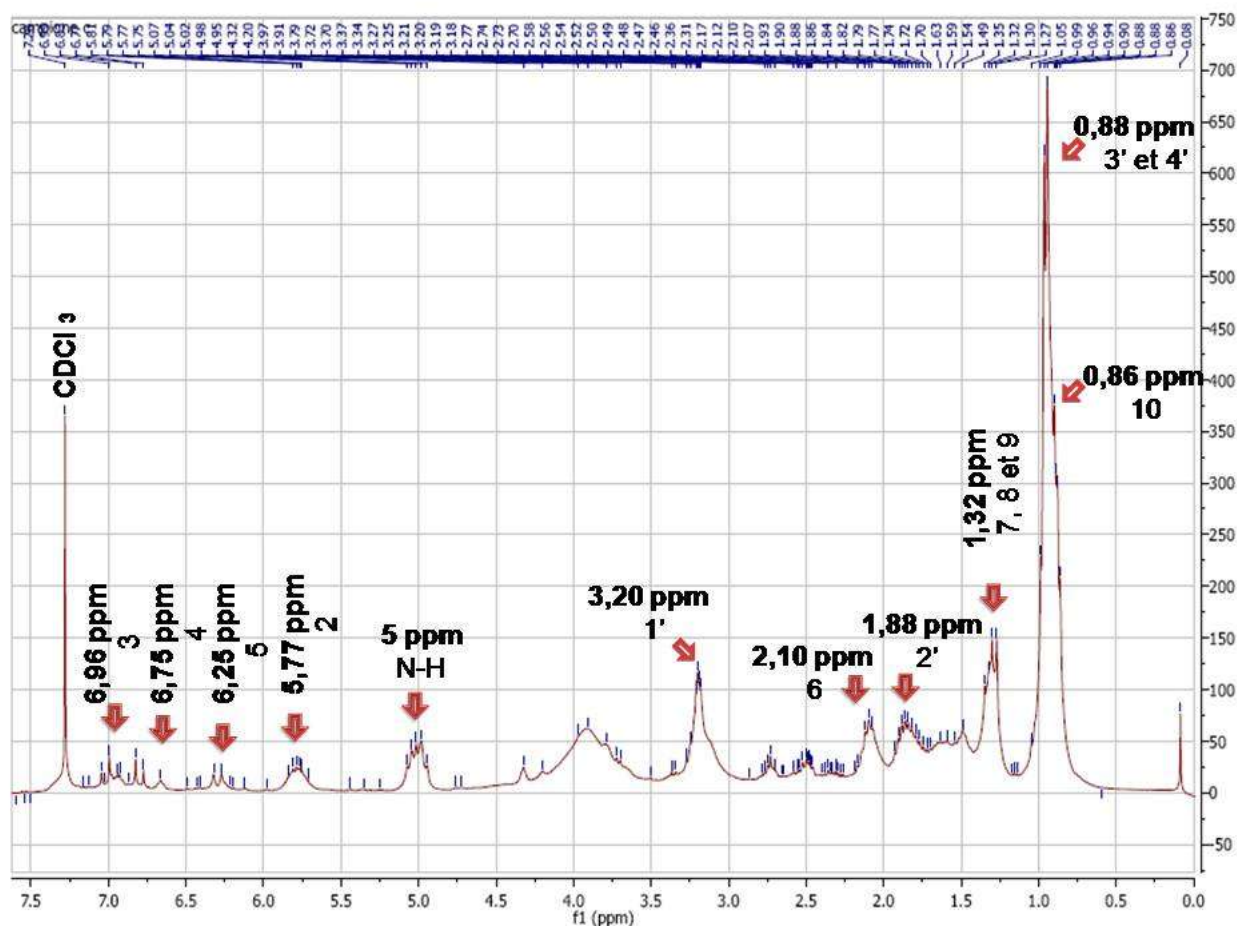
UV : ($^{\circ}$) 254 nm et ($^{\square}$) 365 nm

Tableau 3.16 : Données chromatographiques du composé C.

Système de Solvants			
	Hex / AcOEt (1 :3) ; (v : v)	Hex / CHCl ₃ / Acide formique (1 :3 :0,5) ; (v : v : v)	E.P / AcOEt / Acide formique (70 :30 :0,5) ; (v : v : v)
Rf	0,45	0,07	0,50

Adsorbant : gel de silice.

L'analyse du spectre RMN ¹H du composé C, présenté dans la figure 3.16, a permis d'assigner un certain nombre de signaux, ceci par comparaison aux données bibliographiques.

Figure 3.16 : Spectre RMN ¹H du composé C (300 MHz, CDCl₃).

Le composé C présente des éléments structuraux qui caractérisent les alkamides :

- ✓ Les protons éthyléniques : les signaux dans la région de champ bas comprennent des pics assignables aux protons oléfiniques, à savoir : δ 5.77,

6.25, 6.75 et 6.96 ppm ont été attribués aux H-2, H-5, H-4 et H-3, respectivement. Sur la base de leur déplacement chimique, on peut déduire la présence d'un système oléfinique 2,4 – dienamide. Cette oléfine représente l'une des caractéristiques chimiotaxonomiques du genre *Anacyclus* (Harald Greger., 1978 ; Trevor Robinson., 1991). La présence de cette insaturation a été associée à la toxicité des alkamides vis-à-vis des insectes (Molina, T.J *et al.*, 1999 ; Shihua, W *et al.*, 2004 ; Yuan, B.Ch *et al.*, 2015 ; Narjara, S *et al.*, 2016 ; Althaus, J.B *et al.*, 2017).

✓ L'hydrogène amide : Un singulet large δ 5,00 ppm d'un proton a été attribué à un proton amide des alkamides (Shihua, W *et al.*, 2004 ; Ying, Ch *et al.*, 2005; Althaus, J.B *et al.*, 2014 ; Yuan, B.Ch *et al.*, 2015 ; Narjara, S *et al.*, 2016 ; Althaus, J.B *et al.*, 2017).

✓ Les groupements alkyles : Les pics dans la région des champs hauts sont ceux de groupements méthyles : un signal résonnant à 0,88 ppm (6H), sous forme de singulet, est celui des deux alkyles primaires de N – isobutylamide à savoir CH₃ – 4* et CH₃ – 3*. Un autre signal à 1,88 ppm (1H) sous forme de multiplet correspond au proton attaché au C2* de nature tertiaire (un méthine), indiquant la présence vraisemblable de N – isobutylamide.

Un signal de déplacement chimique à 3,20 ppm (2H), sous forme de doublet de doublet, correspond aux deux protons attachées au C1* d'un N-isobutylamide.

Il semble que la fonctionnalité 2-méthyle par rapport à une isobutyle puisse également jouer un rôle dans l'efficacité des alkamides en tant que composés insecticides (Clifford, L.J *et al.*, 2002).

Le reste des protons de la chaîne aliphatique se présente comme suit :

- un multiplet autour de 1,32 ppm (6H) correspond aux protons des trois alkyles secondaires à savoir : CH₂ – 7 ; CH₂ – 8 et CH₂ – 9.

- un multiplet autour de 2,10 ppm (2H) correspond aux protons CH₂ – 6.

- le dernier signal résonne à 0,86 ppm (3 H) est affecté aux protons du méthyle CH₃ – 10.

En l'absence d'autres données, le composé C a été identifié comme : N – isobutyldeca-2,4-dienamide (figure 3.17). Cet alkamide, connu aussi sous le nom de “ Pellitorine ” a été auparavant isolé des racines du pyrèthre (Boli, P.M *et al.*, 1994 ; Shannon, E.B *et al.*, 2001 ; Hiserodt, R.D *et al.*, 2004 ; Lieselotte, V *et al.*, 2014 (A) ; Deepak, K.S *et al.*, 2015 ; Shahraki, M.R *et al.*, 2015 ; Althaus, J.B *et al.*, 2017).

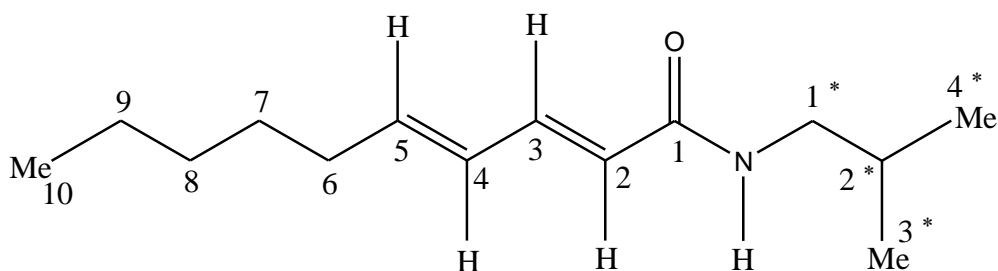


Figure 3.17 : Structure du composé C (300 MHz, CDCl₃).

III.3.10.4 Identification du composé D :

Le composé D (12,3 mg) se présente sous forme des cristaux blanc, isolé de la sous – fraction F28.7.C. L'information recueillie des essais chromatographiques suggère un alkamide. L'observation des CCM effectuée en lumière visible et sous UV (254 et 365 nm) montre plusieurs couleurs (Tableau 3.15).

Tableau 3.17 : Données chromatographiques du Composé D.

Système de Solvants			
	Hex / AcOEt (1 :3) ; (v : v)	Hex / CHCl ₃ / Acide formique (1 :3 :0,5) ; (v : v : v)	E.P / AcOEt / Acide formique (70 :30 :0,5) ; (v : v : v)
Rf	0,51	0,13	0,57

Adsorbant : gel de silice.

L'analyse du spectre RMN ¹H du composé D, visible à la figure 3.18, présente des signaux similaires à ceux du composé C, mais avec une différence notable. En effet, on observe une différence au niveau de la position des oléfines et la nature de l'alkyle attaché à l'atome d'azote.

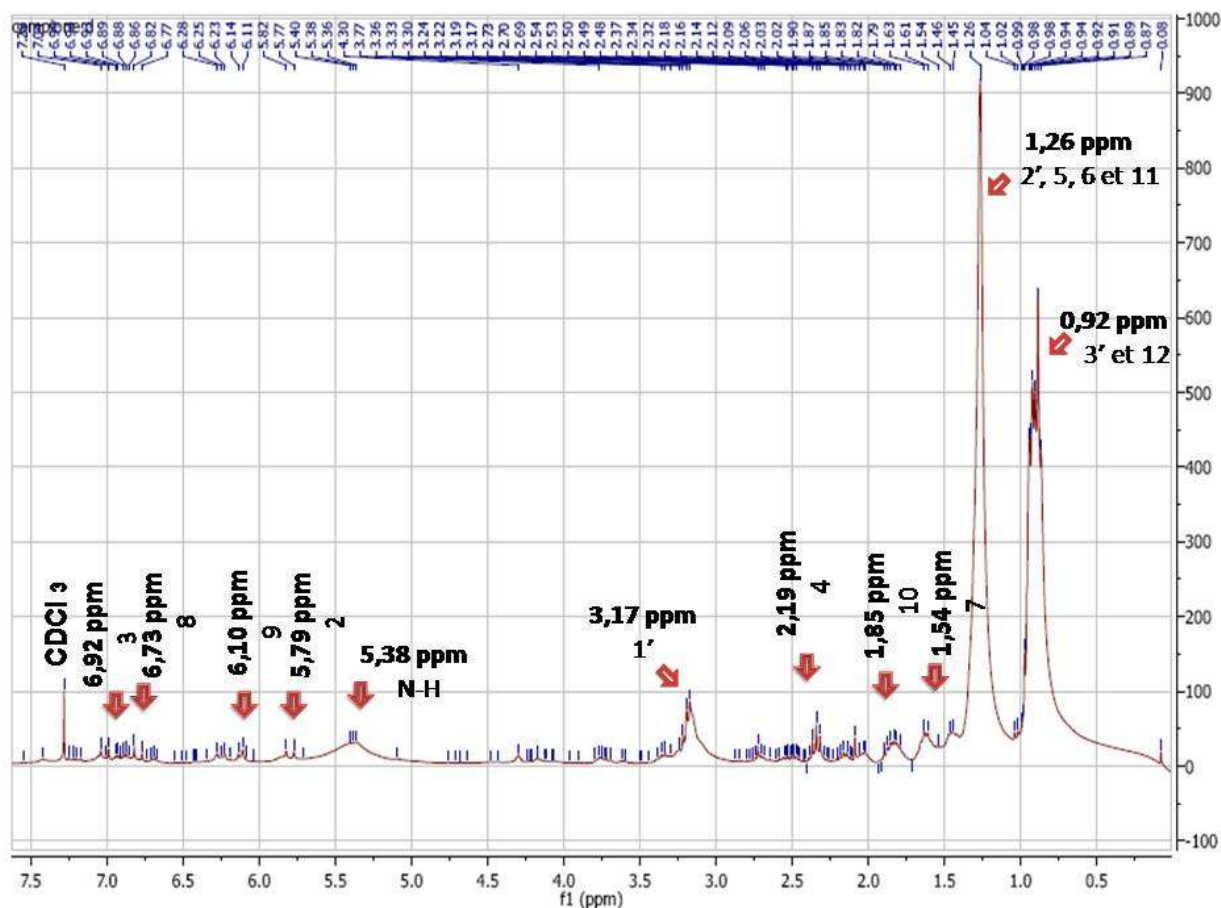


Figure 3.18 : Spectre RMN ^1H du composé D (300 MHz, CDCl_3).

Le composé D présente des éléments structuraux qui caractérisent les alkamides :

- ✓ Les protons éthyléniques : les signaux des protons oléfiniques : δ 5.79, 6.10, 6.73 et 6.92 ppm ont été attribués aux H-2, H-9, H-8 et H-3; respectivement. Grâce à leur déplacement chimique ; on peut déduire la présence d'un système oléfinique 2,8 – dienamide (Harald Greger., 1978 ; Trevor Robinson., 1991).
- ✓ L'hydrogène amide : Un singulet large δ 5,38 ppm d'un proton a été attribué à un proton amide des alkamides (; Shihua, W *et al.*, 2004 ; Yuan, B.Ch *et al.*, 2015 ; Narjara, S *et al.*, 2016 ; Althaus, J.B *et al.*, 2017).
- ✓ Les groupements alkyles : le signal qui résonne à 0,92 ppm (3 H) est celui des trois protons du méthyle en position 3*. Les signaux à 3,17 ppm (2H) et 1,26 ppm (2H) sont respectivement attribuables à CH – 1* et CH – 2*. Ces signaux sont compatibles avec ceux d'une N – propylamide.

Le reste des signaux de la chaîne aliphatique sont affecté comme suit :

- un multiplet au tour de 1,26 ppm (6H) correspond aux alkyles secondaires Blindés à savoir : CH₂ – 5, CH₂ – 6 et CH₂ – 11.
- trois autres multiplet au tour de 1,54 ppm (2H), 1,85 ppm (2H) et 2,19 ppm (2H) correspond aux alkyles secondaires dé blindés à savoir : CH₂ – 7, CH₂ – 10 et CH₂ – 4, respectivement.
- le dernier signal résonne à 0,92 ppm (3 H) est affecté aux protons du Méthyle CH₃ – 12.

Comparant les données de RMN ¹H avec des données précédemment publiées, le composé D a été identifié comme : le N – propylododeca-2,8-diénamide.

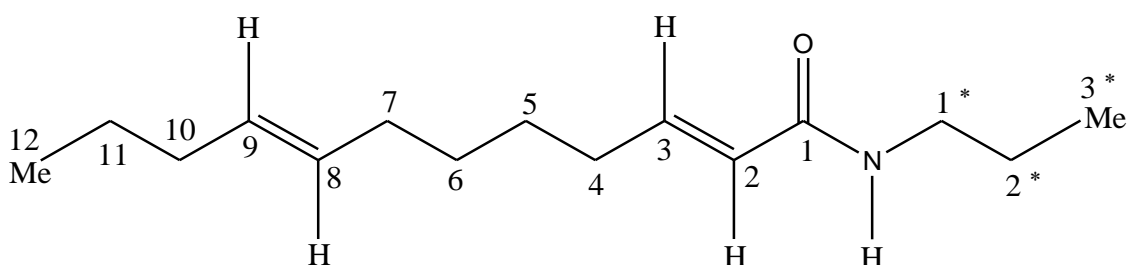


Figure 3.19 : Structure du composé D (300 MHz, CDCl₃).

III.3.10.5 Identification du composé E :

Le composé E (13,6 mg) se présente sous forme de cristaux de couleur jaune pâle, isolé de la sous – fraction F28.5. L'information recueillie des essais chromatographiques suggèrent la même nature chimique que celle du composé A et B ; c.-à-d. un composé de nature terpénique. L'observation des CCM effectué en lumière visible et sous UV (254 et 365 nm) montre plusieurs couleurs (Tableau 3.12).

Tableau 3.18 : Données chromatographiques du Composé E.

Système de Solvants			
	CycloHex / DE (8 : 2) ; (v : v)	E.P / AcOEt / Acide formique (70 : 30 : 0,5) ; (v : v : v)	T / CHCl ₃ / Acide formique (2 : 8 : 0,5) ; (v : v : v)
Rf	0,15	0,49	0,16

Adsorbant : gel de silice.

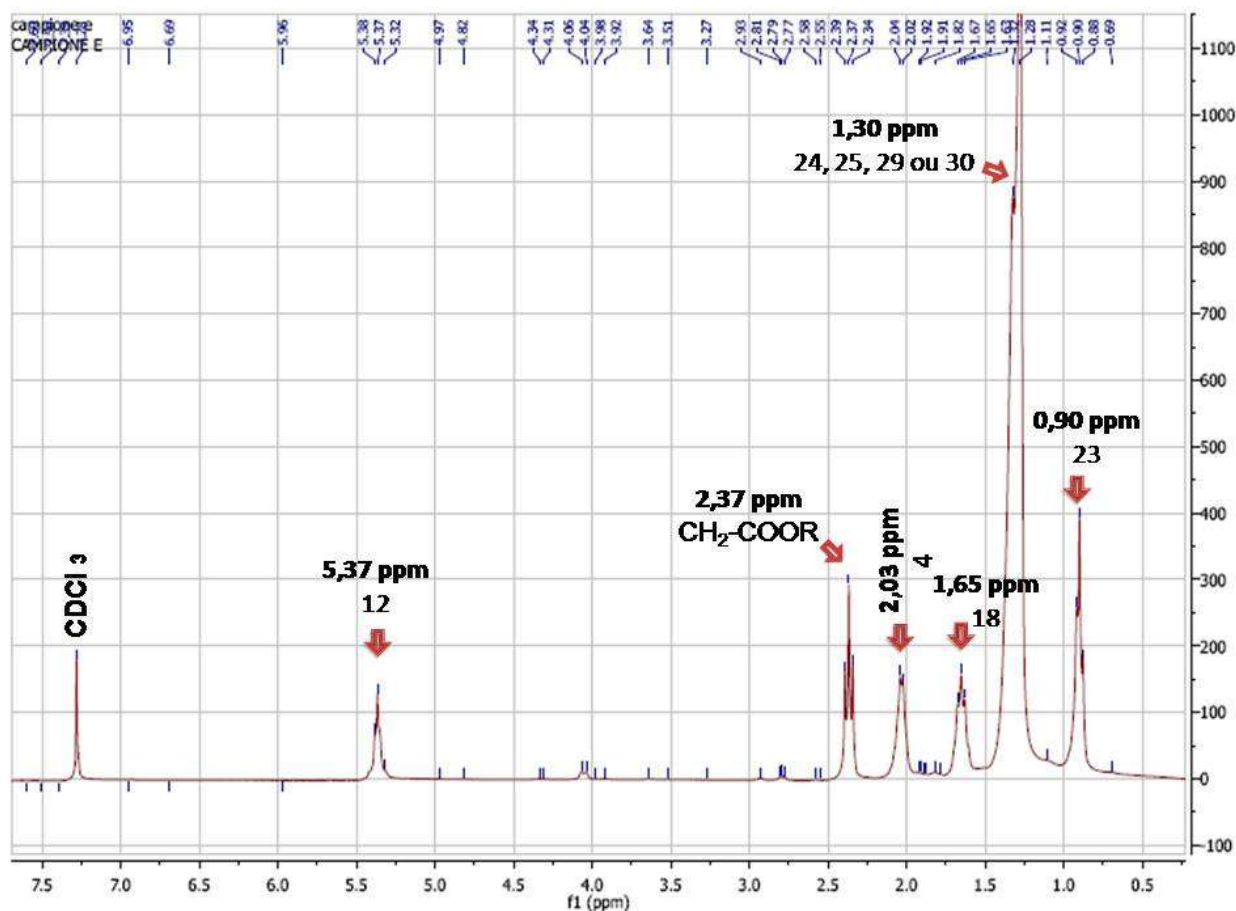


Figure 3.20 : Spectre RMN ^1H du composé E.

Le composé E présente des éléments structuraux qui caractérisent les triterpènes :

- ✓ Dans la région blindée, 2 signaux sont observés : 1 groupe de méthyle sous forme de doublet à 0,90 ppm et 2 groupes méthyles sous forme d'un singulet à 1,30 ppm.

Le singulet observé correspondent à deux groupements de méthyles, certainement en 24 accompagné de celui en 25, 26, 29 ou 30 (Ahmed, S.M *et al.*, 2004). Ce qui nous suggère un profil de substitution différent par rapport aux triterpènes déjà isolés de cette même espèce (Hamimed, S., 2009). Le signal de méthyle sous forme de doublet à 0,90 ppm est celui du méthyle 23, porté par un carbone tertiaire possédant un proton. Ce qui permet de dire que le composé E appartient à la série Fridelane. Ce signal est similaire à celui observé dans les triterpènes précédents (composés A et B).

Ce type de squelette pentacyclique est caractérisé par la présence de deux méthyles, Me-23 en C4 et Me-24 en C5 (Ahmed, S.M *et al.*, 2004; Chiy, R.C *et al.*,

2008 ; Igoli, J.O *et al.*, 2008). L'absence de signal dans la région (δ 0,8-1,37 ppm), relatif au proton du carbone C-3, peut être interprétée, comme étant une indication sur l'état d'oxydation du C-3. Celui-ci pourrait être un carbonyle C=O (Ahmed, S.M *et al.*, 2004; Anwer, S.M *et al.*, 2008). Donc, En ce qui concerne la nature du groupement de la position 3, seule la présence d'un groupement carbonyle (C=O), directement attaché au cycle en C – 3, est établie (selon des considérations biogénèse).

- ✓ Le signal déblindé observé à 2,03 ppm s'intégrant en un proton, correspond au proton H – 4 vient confirmer d'une part que ce triterpène pentacyclique appartient bien à la série Fridelane, et d'autre part, que ce proton est en voisine d'un groupement C=O. Ce signal est similaire dans les autres triterpènes isolés à savoir les composés : A et B.

- ✓ Le signal centré à 5,37 ppm, sous forme d'un double de doublet et s'intégrant pour 1 proton, est celui d'un proton oléfinique (Dosseh, Ch *et al.*, 1980 ; Adnyana, K.I *et al.*, 2000; Kuo, Y.H *et al.*, 2000). La présence de la double liaison en C12 – C13, atteste que le composé E appartient au groupe des Fridelènes insaturés ou à la série 12 – Fridelène (Ahmed, S.M *et al.*, 2004; Thanakijicharenpath, W *et al.*, 2007 ; Igoli, J.O *et al.*, 2008). D'un autre côté, cette hypothèse est renforcée par l'absence du signal correspondant au Me 27, qui est très significatif chez les Friedelènes insaturés (Hamimed, S., 2009).

- ✓ Le signal observé à 1.65 ppm s'intégrant en un proton, correspond au proton H – 18. Ce signal est comparable avec les données fournis par la littérature (Dosseh, Ch *et al.*, 1980 ; Ahmed, S.M *et al.*, 2004). Ce signal est similaire à celui des autres triterpènes isolés (composés : A et B).

- ✓ L'examen du spectre RMN 1H, dans la région caractéristique des méthyles du squelette triterpénique, permet de conclure quant à l'absence des méthyles en position C 14 et C17 (Me 26 et Me 28). D'après la littérature (Druet, D *et al.*, 1986) ces positions sont souvent occupées par des groupements fonctionnels.

Le composé E présente également un élément qui caractérise un groupement fonctionnelle : il s'agit d'un signal autour de 2.37 ppm, s'intégrant en deux protons, qui pourrait correspondre au $\text{CH}_2 - \text{COOR}$, en position C 17 d'après la littérature (Druet, D *et al.*, 1986).

A ce stade, les données recueillies suggèrent que le composé E est un tritrepène pentacyclique avec des radicaux au niveau des carbones 14 et 20. Sa structure partielle pourrait se présentée comme suit :

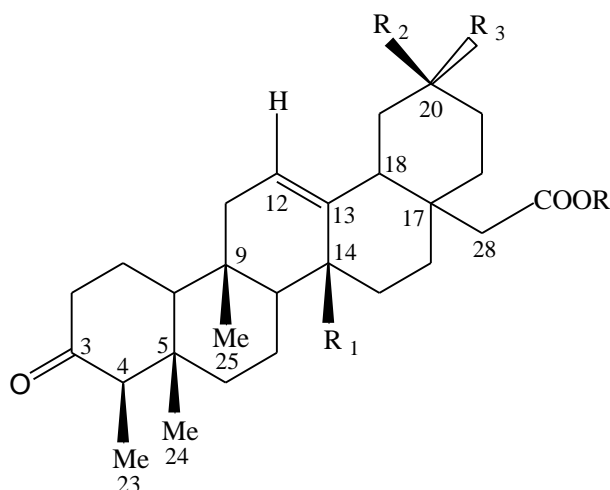


Figure 3. 21 : Structure proposée du composé E (300 MHz, CDCl_3).

III.3.10.6 Identification du composé F :

Le composé F (05,6 mg) se présente sous forme des cristaux blancs, isolé de la sous – fraction F28.7.D. L'information recueillie des essais chromatographique suggèrent la nature chimique d'alkamide. L'observation des CCM effectués en lumière visible et sous UV (254 et 365 nm) montre plusieurs couleurs (Tableau 3.15).

Tableau 3.19 : Données chromatographiques du Composé F.

Système de Solvants			
	Hex / AcOEt (1 :3) ; (v : v)	Hex / CHCl_3 / Acide formique (1 :3 :0,5) ; (v : v : v)	E.P / AcOEt / Acide formique (70 :30 :0,5) ; (v : v : v)
Rf	0,52	0,15	0,55

Adsorbant : gel de silice.

Le spectre RMN ^1H du composé F (Annexe 3), présente des signaux similaires à ceux du composé C, mais avec une différence notable. En effet, on observe une différence au niveau de la position de la 2^{ème} insaturation.

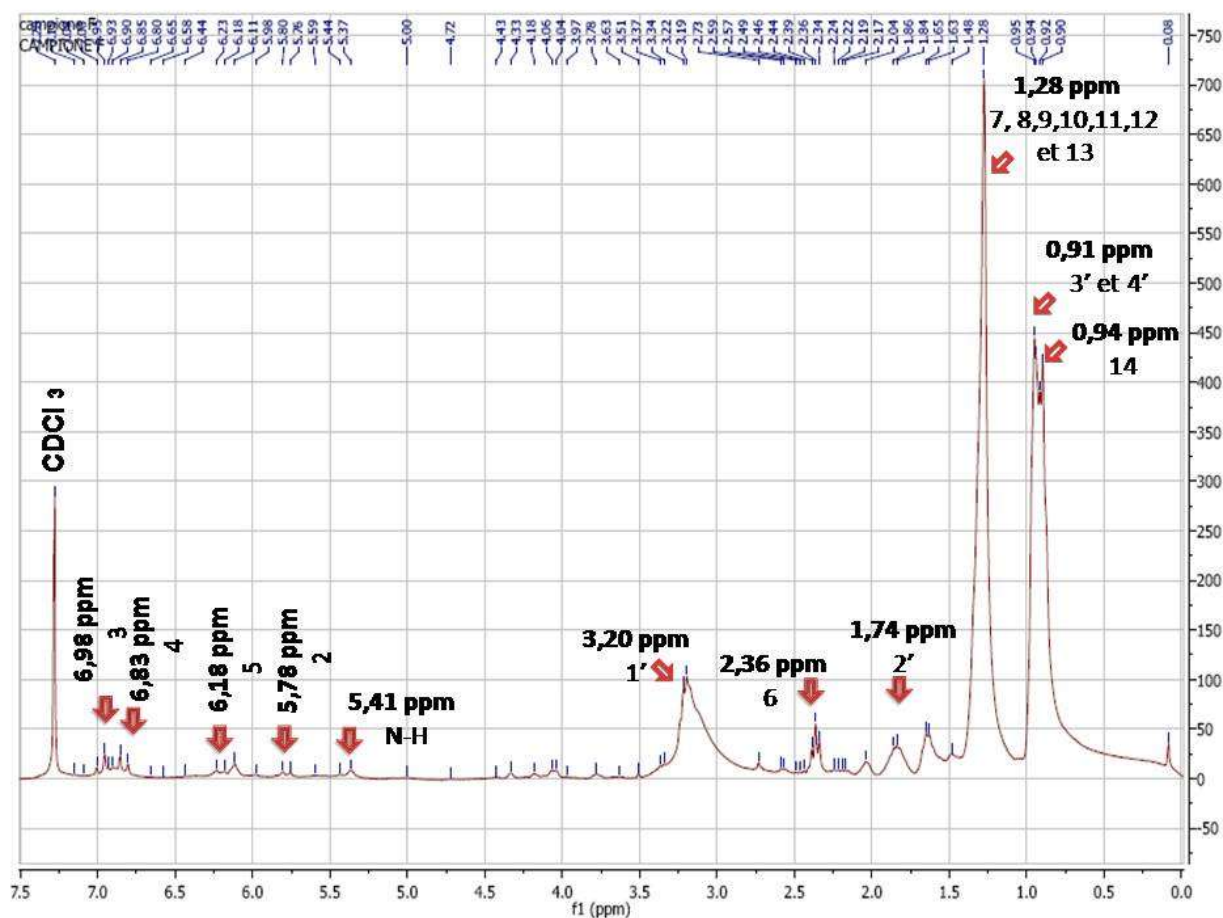


Figure 3.22 : Spectre RMN ^1H du composé F (300 MHz, CDCl_3).

Le composé F présente des éléments structuraux qui caractérisent les alkamides :

- ✓ Les protons éthyléniques : les signaux dans la région de champ bas comprennent des pics assignables aux protons oléfiniques, à savoir : δ 5.78, 6.18, 6.83 et 6.98 ppm ont été attribués aux H-2, H-5, H-4 et H-3; respectivement, grâce à leur déplacement chimique ; comme mentionné précédemment, on peut déduire la présence d'un système oléfinique 2,4 – dienamide, (Harald Greger., 1978 ; Trevor Robinson., 1991 ; Ying, Ch *et al.*, 2005 ; Yuan, B.Ch *et al.*, 2015).
- ✓ L'hydrogène amide : Un singulet large δ 5,41 ppm d'un proton a été attribué à un proton amide des alkamides (Shihua, W *et al.*, 2004 ; Kraus, G.A *et al.*,

2006 ; Cruz, I *et al.*, 2014 ; Yuan, B.Ch *et al.*, 2015 ; Narjara, S *et al.*, 2016 ; Althaus, J.B *et al.*, 2017).

Les groupements alkyles : Les pics dans la région des champs hauts sont ceux de groupements méthyles : un signal résonnant à 0,91 ppm (6H), sous forme de singulet, est celui des deux alkyles primaires de N-isobutylamide à savoir $\text{CH}_3 - 4^*$ et $\text{CH}_3 - 3^*$. Un autre signal à 1,74 ppm (1H) sous forme de multiplet correspond au proton attaché au $\text{C}2^*$ de nature tertiaire (un méthine), indiquant la présence vraisemblable de N-isobutylamide. Un signal de déplacement chimique à 3,20 ppm (2H), sous forme de doublet de doublet, correspond aux deux protons attachés au $\text{C}1^*$ d'un N-isobutylamide.

Le reste des protons de la chaîne aliphatique se présente comme suit :

- un multiplet autour de 1,28 ppm (14H) correspond aux sept alkyles Secondaires blindés à savoir : $\text{CH}_2 - 7$; $\text{CH}_2 - 8$; $\text{CH}_2 - 9$; $\text{CH}_2 - 10$; $\text{CH}_2 - 11$; $\text{CH}_2 - 12$ et $\text{CH}_2 - 13$.
- un signal autour de 2,36 ppm (2H) correspond aux protons $\text{CH}_2 - 6$.
- le dernier signal résonne à 0,94 ppm (3H) est affecté aux protons du Méthyle $\text{CH}_3 - 14$.

Comparant les données de RMN ^1H avec des données précédemment publiées, le composé F a été identifié comme : le N – isobutyltétradeca-2,4-dienamide.

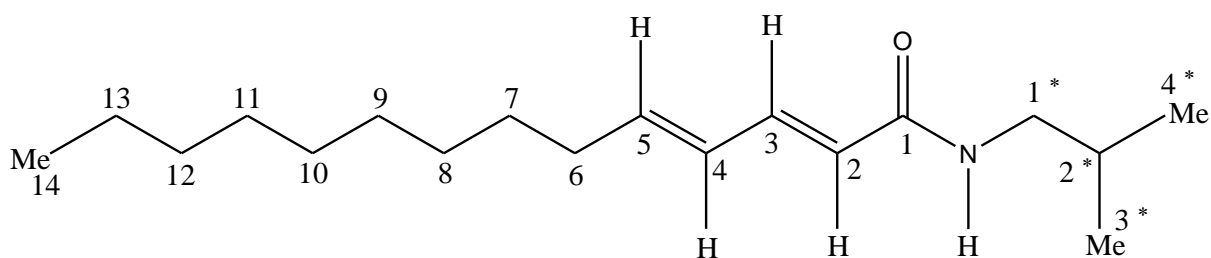


Figure 3. 23 : Structure du composé F (300 MHz, CDCl_3).

III.3.10.7 Identification du composé G :

Le composé G (24,1 mg) se présente sous forme de cristaux blancs, isolé de la sous – fraction F27.9. L'information recueillie des essais chromatographique suggèrent la même nature chimique que celle du composé A, B et E ; c.-à-d. un composé de nature terpénique. L'observation des CCM effectués en lumière visible et sous UV (254 et 365 nm) montre plusieurs couleurs (Tableau 3.12).

Tableau 3.20 : Données chromatographiques du Composé G.

Système de Solvants			
	CycloHex / DE (8 : 2) ; (v : v)	E.P / AcOEt / Acide formique (70 : 30 : 0,5) ; (v : v : v)	T / AcOEt / CycloHex / Acide formique (24 : 6 : 3 : 0,5) ; (v : v : v : v)
Rf	0,44	0,40	0,49

Adsorbant : gel de silice.

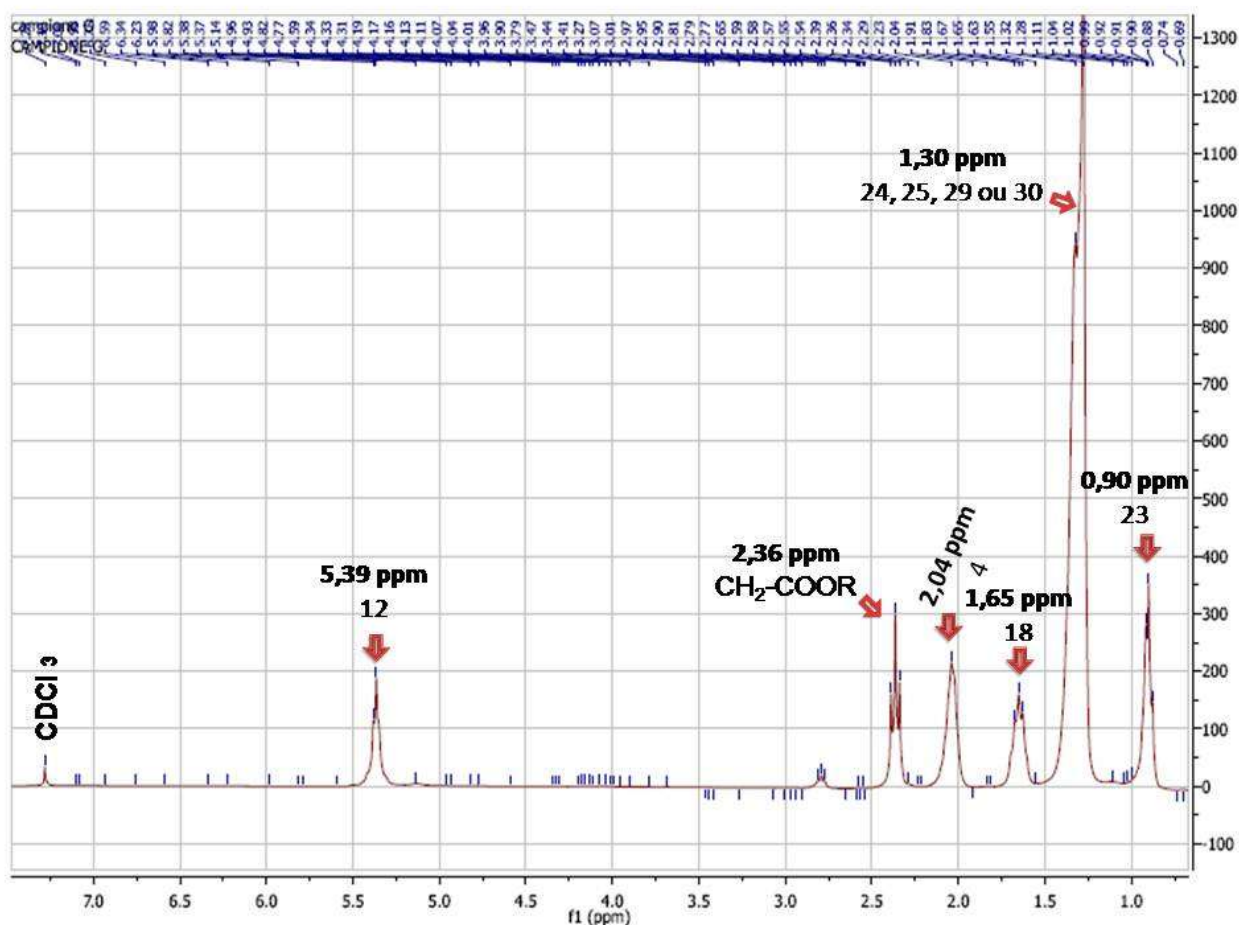


Figure 3.24 : Spectre RMN ^1H du composé G (300 MHz, CDCl_3).

Le composé G présente des éléments structuraux qui caractérisent les triterpènes :

- ✓ Dans la région blindée, 2 signaux sont observés : 1 groupe de méthyle sous forme de doublet à 0,90 ppm et 2 groupes méthyles sous forme d'un singulet à 1,30 ppm. Le singulet observé correspondent à trois groupements de méthyles peut être ceux en 24, 25 ou 26, 29 et 30 (Ahmed, S.M *et al.*, 2004). Ce qui nous suggère un profil de substitution différent par rapport aux triterpènes déjà isolé de cette même espèce (Hamimed, S., 2009). Le signal de méthyle sous forme de doublet à 0,90 ppm est celui du méthyle 23, porté par un carbone tertiaire possédant un proton. Ce qui permet de dire que le composé E appartient à la série Fridelane. Ce signal est similaire dans les autres triterpènes isolés à savoir les composés : A, B et E.

Ce type de squelette pentacyclique est caractérisé par la présence de deux méthyles, Me-23 en C4 et Me-24 en C5 (Ahmed, S.M *et al.*, 2004; Chiy, R.C *et al.*, 2008 ; Igoli, J.O *et al.*, 2008). L'absence de signal dans la région (δ 0,8-1,37 ppm), relatif au proton du carbone C-3, peut être interpréter, comme étant une indication sur l'état d'oxydation du C-3. Celui-ci pourrait être un carbonyle C=O (Ahmed, S.M *et al.*, 2004; Anwer, S.M *et al.*, 2008). Donc, En ce qui concerne la nature du groupement de la position 3, seule la présence d'un groupement carbonyle (C=O), directement attaché au cycle en C – 3, est établie (selon des considérations biogénèse).

- ✓ Le signal observé à 2,04 ppm s'intégrant en un proton, corressepond au proton H – 4 vient confirmer que ce composé appartient à la série Fridelane. Ce signal est similaire dans les autres triterpènes isolés à savoir les composés : A ; B et E.
- ✓ Le signal centré à 5,39 ppm, sous forme d'un double de doublet et s'intégrant pour 1 proton, est celui d'un proton oléfinique (Dosseh, Ch *et al.*, 1980 ; Adnyana, K.I *et al.*, 2000; Kuo, Y.H *et al.*, 2000). La présence de la double liaison en C12 – C13, atteste que le composé G appartient au groupe des Fridelènes insaturés ou à la série 12 – Fridelène (Ahmed, S.M *et al.*, 2004; Thanakijicharoenpath, W *et al.*, 2007 ; Igoli, J.O *et al.*, 2008). D'un autre côté,

cette hypothèse est renforcée par l'absence du signal correspondant au Me 27, qui est très significatif chez les Friedelènes insaturés (Hamimed, S., 2009).

- ✓ Le signal observé à 1.65 ppm s'intégrant en un proton, correspond au proton H – 18 ce signal est comparable avec les données fournis par la littérature (Dosseh, Ch *et al.*, 1980 ; Ahmed, S.M *et al.*, 2004). Ce signal est similaire dans les autres triterpènes isolés à savoir les composés : A ; B et E.
- ✓ L'examen du spectre RMN 1H, dans la région caractéristique des méthyles du squelette triterpénique, permet de conclure quant à l'absence des méthyles en position C 14 et C17 (Me 26 et Me 28). D'après la littérature (Druet, D *et al.*, 1986) ces positions sont souvent occupées par des groupements fonctionnels.

Le composé G présente également un élément qui caractérise un groupement fonctionnelle, il s'agit d'un signal autour de 2.36 ppm, s'intégrant en deux protons, correspond au CH₂ – COOR, d'après la littérature (Druet, D *et al.*, 1986) peut être le substituant en position C 17.

L'ensemble de ces signaux sont similaires à ceux du composé E. Donc, nous données d'RMN n'a permis que de proposée la structure partielle suivante :

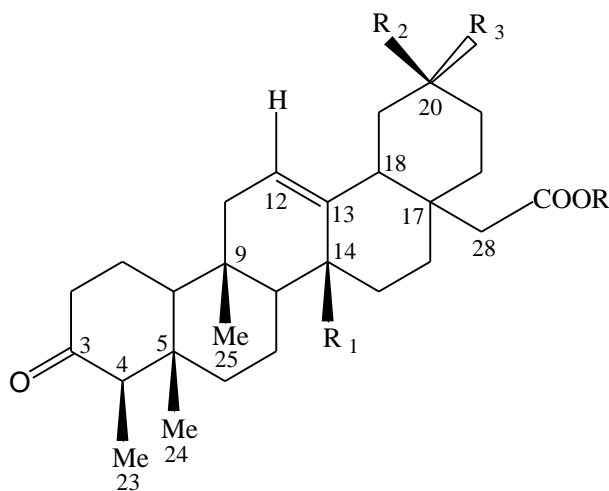


Figure 3.25 : Structure proposée du composé G (300 MHz, CDCl₃).

III.3.10.8 Identification du composé H :

Le composé H (15 mg) se présente sous forme d'une substance amorphe jaune foncé, isolé de la sous – fraction F27.6. L'information recueillie des essais chromatographiques suggèrent la même nature chimique que celle du composé A, B,

E et G ; c.-à-d. un composé de nature terpénique. L'observation des CCM effectués en lumière visible et sous UV (254 et 365 nm) montre plusieurs couleurs (Tableau 3.12).

Tableau 3.21 : Données chromatographiques du Composé H.

Système de Solvants	
CycloHex / DE (8 : 2) ; (v : v)	T/ AcOEt / CycloHex / Acide formique (24 : 6 : 3 : 0,5) ; (v : v : v : v)
Rf	0,59
	0,39

Adsorbant : gel de silice.

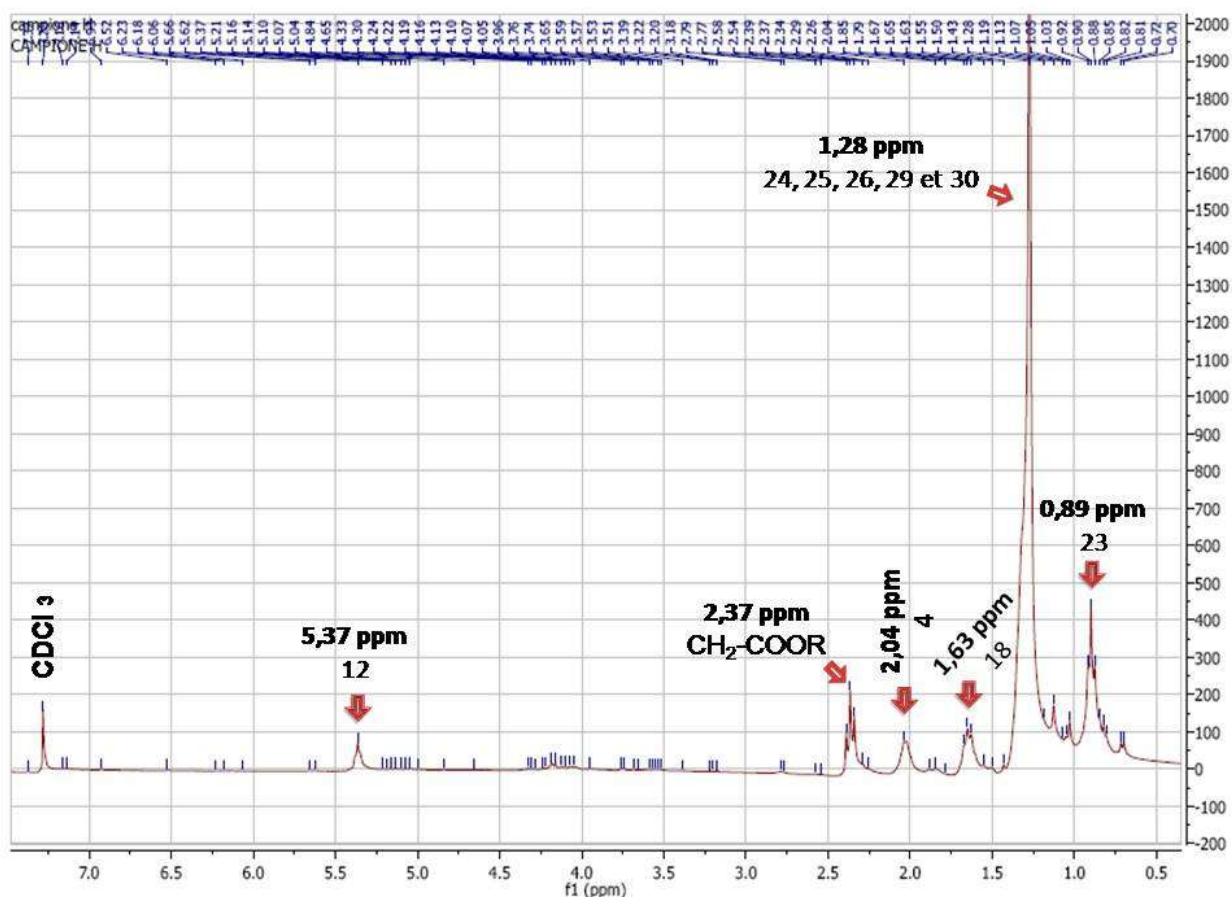


Figure 3.26 : Spectre RMN ^1H du composé H (300 MHz, CDCl_3).

Le composé H présente des éléments structuraux qui caractérisent les triterpènes :

- ✓ Dans la région blindée, 2 signaux sont observés : 1 groupe de méthyle sous forme de doublet à 0,89 ppm et 5 groupes méthyles sous forme d'un singulet à 1,28 ppm. Le singulet observé correspond aux groupements de

méthyles 24, 25, 26, 29 et 30 en C5, C9, C14 et C20, respectivement (Ahmed, S.M *et al.*, 2004 ; Hamimed, S., 2009). Le signal de méthyle sous forme de doublet à 0,90 ppm est celui du méthyle 23, porté par un carbone tertiaire possédant un proton. Ce qui permet de dire que le composé H appartient à la série Fridelane. Ce type de squelette pentacyclique est caractérisé par la présence de deux méthyles, Me-23 en C4 et Me-24 en C5 (Ahmed, S.M *et al.*, 2004; Chiy, R.C *et al.*, 2008 ; Igoli, J.O *et al.*, 2008). On observe la majorité des groupements de méthyles qui caractérisent les triterpènes, c'est une différence notable par rapport aux autres composés à savoir : A, B, E et G.

L'absence de signal dans la région (δ 0,8-1,37 ppm), relatif au proton du carbone C-3, peut être interprétée, comme étant une indication sur l'état d'oxydation du C-3. Celui-ci pourrait être un carbonyle C=O (Ahmed, S.M *et al.*, 2004; Anwer, S.M *et al.*, 2008). En ce qui concerne la nature du groupement de la position 3, seule la présence d'un groupement carbonyle (C=O), directement attaché au cycle en C3, est établie (selon des considérations biogénèse).

- ✓ Le signal observé à 2,04 ppm sous forme de singulet, s'intégrant en un proton, correspond au proton H – 4. Ceci vient confirmer que ce composé appartient à la série Fridelane. Ce signal est similaire dans les autres triterpènes isolés à savoir les composés : A ; B ; E et G.
- ✓ Le signal centré à 5,37 ppm, sous forme de singulet, s'intégrant en 1 proton, est celui d'un proton oléfinique (Dosseh, Ch *et al.*, 1980 ; Adnyana, K.I *et al.*, 2000; Kuo, Y.H *et al.*, 2000). La présence de la double liaison en C12 – C13, permet d'émettre l'hypothèse que le composé H appartient au groupe des Fridelènes insaturés ou à la série 12 – Fridelène (Ahmed, S.M *et al.*, 2004; Thanakijicharoenpath, W *et al.*, 2007 ; Igoli, J.O *et al.*, 2008). D'un autre côté, cette hypothèse est renforcée par l'absence du signal correspondant au Me 27, qui est très significatif chez les Friedelènes insaturés (Hamimed, S., 2009).
- ✓ Le signal observé à 1.63 ppm s'intégrant en un proton, correspond au proton H – 18. Ce signal est comparable avec les données fournis par la littérature

(Dosseh, Ch *et al.*, 1980 ; Ahmed, S.M *et al.*, 2004). Ce signal est similaire à celui des autres triterpènes isolés (composés : A ; B ; E et G).

- ✓ L'examen du spectre RMN 1H, dans la région caractéristique des méthyles du squelette triterpénique, permet de conclure quant à l'absence du méthyle en position C17 (Me 28). D'après la littérature, cette position est souvent occupée par un groupement fonctionnel (Druet, D *et al.*, 1986).

Le composé H présente également un élément qui caractérise un groupement fonctionnelle, il s'agit d'un signal autour de 2.37 ppm, s'intégrant en deux protons, correspond au CH₂ – COOR, d'après la littérature (Druet, D *et al.*, 1986) peut être celui du substituant en position C 17.

En absence d'autres méthodes d'identification, la structure du composé H pourrait présentée comme suit :

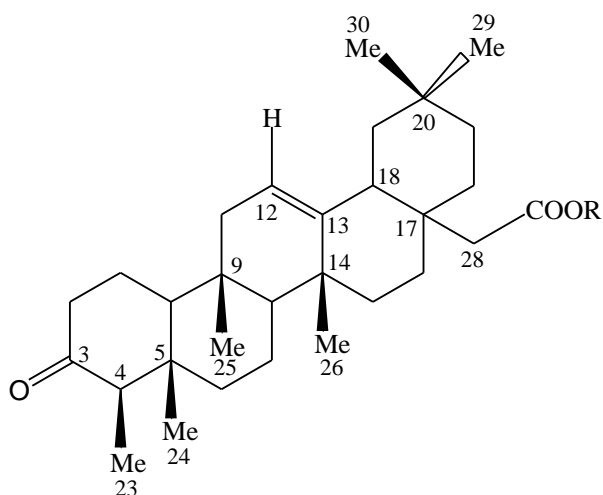


Figure 3.27 : Structure proposée du composé H (300 MHz, CDCl₃).

III.3.10.9 Identification du composé I :

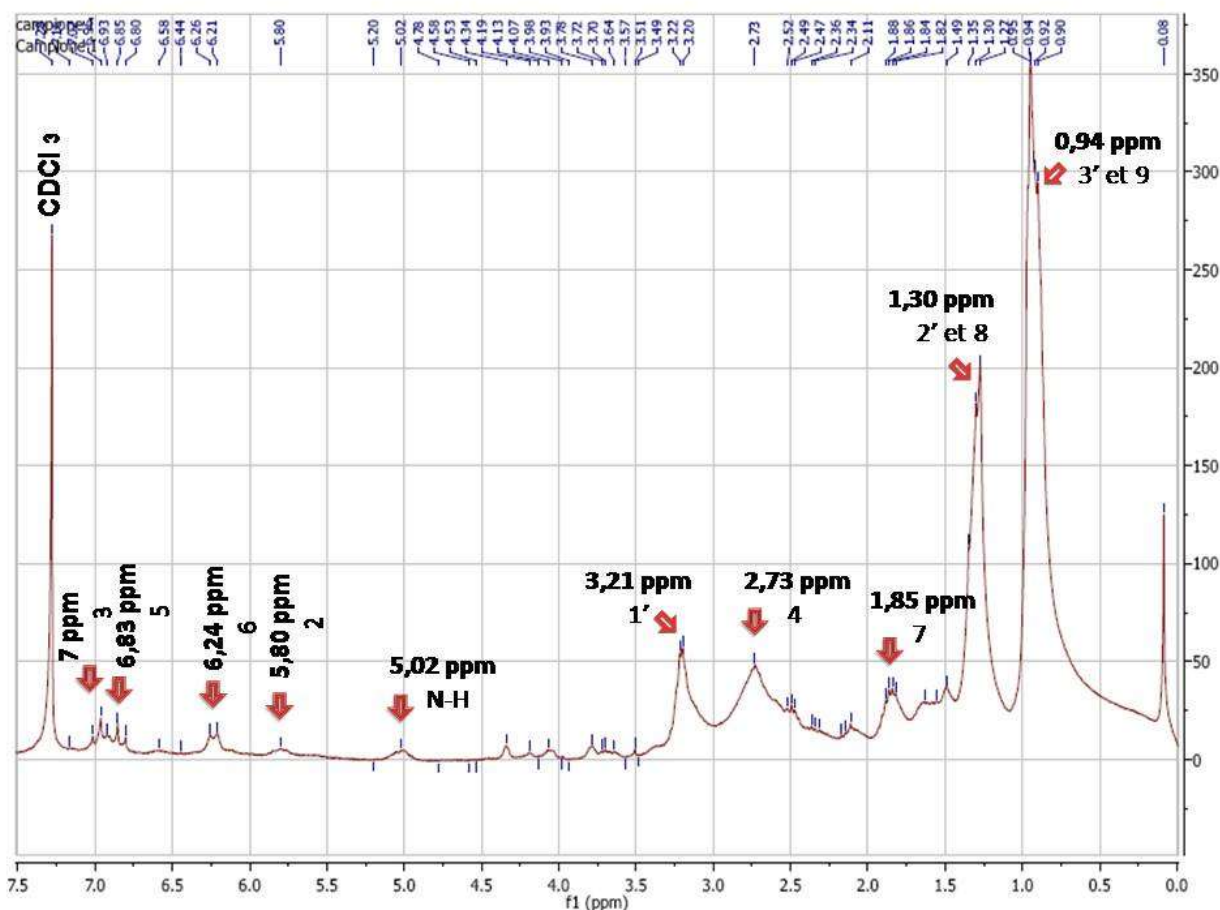
Le composé I (03,8 mg) se présente sous forme des cristaux blancs, isolé de la sous – fraction F28.9.C. L'information recueillie des essais chromatographique suggèrent la nature chimique d'alkamide. L'observation des CCM effectué en lumière visible et sous UV (254 et 365 nm) montre plusieurs couleurs (Tableau 3.15).

Tableau 3.22 : Données chromatographiques du Composé I.

Système de Solvants			
	Hex / AcOEt (1 :3) ; (v : v)	Hex / CHCl ₃ / Acide formique (1 :3 :0,5) ; (v : v : v)	E.P / AcOEt / Acide formique (70 :30 :0,5) ; (v : v : v)
Rf	0,47	0,09	0,48

Adsorbant : gel de silice.

Le spectre RMN ¹ H du composé I, présente des signaux similaires à ceux du composé D, mais avec une différence notable. En effet, on observe une différence au niveau de la position de la 2^{ème} insaturation et la longueur de la chaîne.

Figure 3.28 : Spectre RMN ¹ H du composé I (300 MHz, CDCl₃).

Le composé I présente des éléments structuraux qui caractérisent les alkamides :

- ✓ Les protons éthyléniques : les signaux des protons oléfiniques : δ 5.80, 6.24, 6.83 et 7.00 ppm ont été attribués aux H-2, H-6, H-5 et H-3; respectivement. Grâce à leur déplacement chimique ; on peut déduire la présence d'un système oléfinique 2,5 – dienamide (Harald Greger., 1978 ; Trevor Robinson., 1991).
- ✓ L'hydrogène amide : Un singulet large δ 5,02 ppm d'un proton a été attribué à un proton amide des alkamides (Shihua, W *et al.*, 2004 ; Ying, Ch *et al.*, 2005 ; Yuan, B.Ch *et al.*, 2015 ; Narjara, S *et al.*, 2016 ; Althaus, J.B *et al.*, 2017).
- ✓ Les groupements alkyles : le signal qui résonne à 0,94 ppm (3 H est celui des trois protons du méthyle en position 3*. Les signaux à 3,21 ppm (2H) et 1,30 ppm (2H) sont respectivement attribuables à CH – 1* et CH – 2*, Ces signaux sont compatibles avec ceux d'une N – propylamide.

Le reste des signaux de la chaîne aliphatique sont affecté comme suit :

- un signal au tour de 1,30 ppm (2H) correspond au alkyle secondaire blindé à savoir : CH₂ – 8.
- deux autres multiplet au tour de 1,85 ppm (2H) et 2,73 ppm (2H) correspond aux alkyles secondaires dé blindés à savoir : CH₂ – 7 et CH₂ – 4.
- le dernier signal résonne à 0,94 ppm (3 H) est affecté aux protons du Méthyle CH₃ – 9.

Comparant les données de RMN ¹H avec des données précédemment publiées, le composé I a été identifié comme : le N – propylnona-2,5-diénamide.

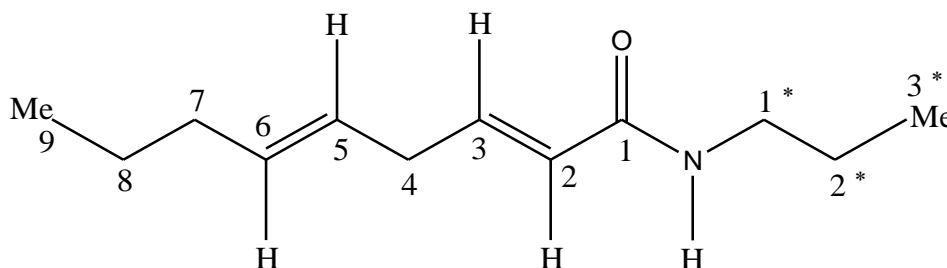


Figure 3.29 : Structure du composé I (300 MHz, CDCl₃).

III.3.10.10 Identification du composé J :

Le composé J (16 mg) se présente sous forme d'une substance amorphe blanche, isolé de la sous – fraction F27.10. L'information recueillie des essais chromatographique suggèrent la même nature chimique que celle du composé A, B, E, G et H ; c.-à-d. un composé de nature terpénique. L'observation des CCM effectuée en lumière visible et sous UV (254 et 365 nm) montre plusieurs couleurs (Tableau 3.12).

Tableau 3.23 : Données chromatographiques du Composé J.

Système de Solvants			
	CycloHex / DE (8 : 2) ; (v : v)	E.P / AcOEt / Acide formique (70 : 30 : 0,5) ; (v : v : v)	T / AcOEt / CycloHex / Acide formique (24 : 6 : 3 : 0,5) ; (v : v : v : v)
Rf	0,36	0,49	0,47

Adsorbant : gel de silice.

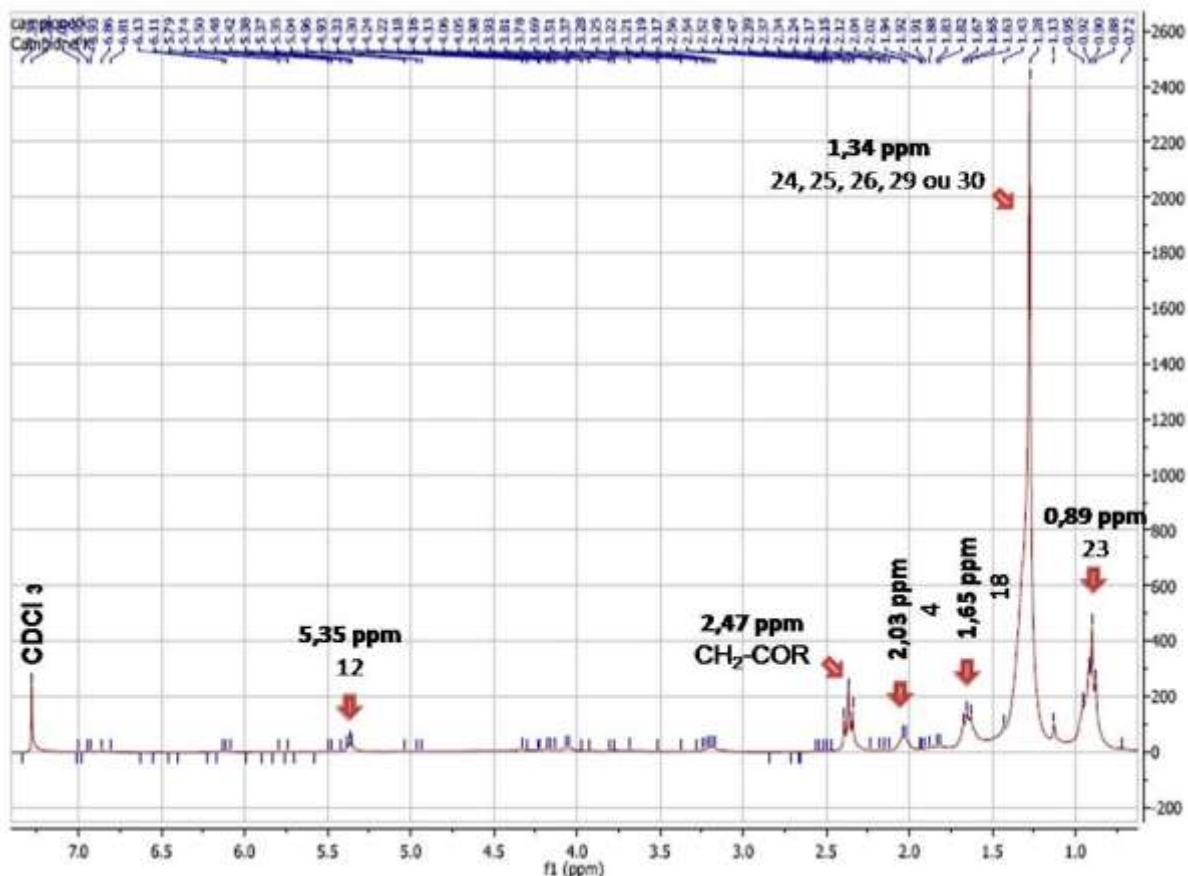


Figure 3.30 : Spectre RMN ^1H du composé J (300 MHz, CDCl_3).

Le composé J présente des éléments structuraux qui caractérisent les triterpènes :

- ✓ Dans la région blindée, 2 signaux sont observés : 1 groupe de méthyle sous forme de doublet à 0,89 ppm et 4 groupes méthyles sous forme d'un singulet à 1,34 ppm. Le singulet observé correspond aux groupements de méthyles 24, 25, 26. Ces groupements sont accompagnés d'un méthyle soit le 29 ou 30 porté par le C20 (Ahmed, S.M *et al.*, 2004 ; Hamimed, S., 2009). Le signal de méthyle sous forme de doublet à 0,89 ppm est celui du méthyle 23, porté par un carbone tertiaire (C4) possédant un proton. Ce qui permet de dire que le composé J appartient à la série Fridelane. Ce type de squelette pentacyclique est caractérisé par la présence de deux méthyles, Me-23 en C4 et Me-24 en C5 (Ahmed, S.M *et al.*, 2004; Chiy, R.C *et al.*, 2008 ; Igoli, J.O *et al.*, 2008). On observe presque la majorité des groupements de méthyles qui caractérise les triterpènes,

L'absence de signal dans la région (δ 0,8-1,37 ppm), relatif au proton du carbone C-3, peut être interprétée, comme étant une indication sur l'état d'oxydation du C-3. Celui-ci pourrait être un carbonyle $\text{C}=\text{O}$ (Ahmed, S.M *et al.*, 2004; Anwer, S.M

et al., 2008). En ce qui concerne la nature du groupement de la position 3, seule la présence d'un groupement carbonyle (C=O), directement attaché au cycle en C – 3, est établie (selon des considérations biogénèse).

- ✓ Le signal observé à 2,03 ppm s'intégrant en un proton, correspond au proton H – 4 vient confirmer que ce composé appartient à la série Fridelane. Ce signal est similaire dans les autres triterpènes isolés à savoir les composés : A ; B ; E ; G et H.
- ✓ Le signal centré à 5,35 ppm, sous forme de singulet s'intégrant pour 1 proton, est celui d'un proton oléfinique. La présence de la double liaison en C12 – C13, permet d'émettre l'hypothèse que le composé J appartient au groupe des Fridelènes insaturés ou à la série 12 – Fridelène. D'un autre côté, cette hypothèse est renforcée par l'absence du signal correspondant au Me 27, qui est très significatif chez les Fridelènes insaturés (Hamimed, S., 2009).
- ✓ Le signal observé à 1.65 ppm s'intégrant en un proton, correspond au proton H – 18. Ce signal est comparable avec les données fournis par la littérature (Dosseh, Ch *et al.*, 1980 ; Ahmed, S.M *et al.*, 2004). Ce signal est similaire à celui des autres triterpènes isolés (composés : A ; B ; E ; G et H).
- ✓ L'examen du spectre RMN 1H, dans la région caractéristique des méthyles du squelette triterpénique, permet de conclure quant à l'absence du méthyle 28 en position C17. D'après la littérature, cette position est souvent occupées par un groupement fonctionnel (Druet, D *et al.*, 1986).

Le composé J présente également un élément qui caractérise un groupement fonctionnelle, il s'agit d'un signal autour de 2.47 ppm, s'intégrant en deux protons, correspond au CH₂ – COR'. Selon la littérature ce groupement pourrait être attaché en position C 17 (Druet, D *et al.*, 1986).

En absence d'autres méthodes d'identification, nous proposons l'une des deux structures suivantes :

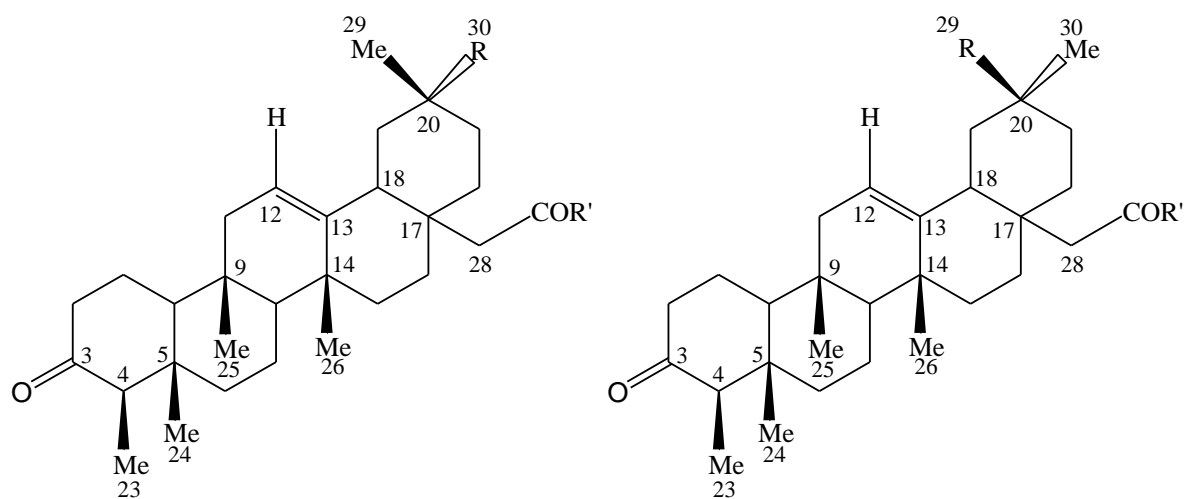


Figure 3.31 : Structures proposées du composé J (300 MHz, CDCl₃).

Conclusion

Ce présent travail concerne trois plantes médicinales traditionnelles, à savoir *Anacyclus pyrethrum* (L.) [Asteraceae], *Pistacia lentiscus* (L.) [Anacardiaceae] et *Acanthus mollis* (L.) [Acanthaceae]. Leurs potentiel antioxydant et cytotoxique a fait l'objet d'une évaluation utilisant des modèles expérimentaux, à savoir les tests DPPH et BSL, respectivement.

Les criblages phytochimiques et biologiques des extraits bruts ont révélé :

Sur le plan chimique une diversité métabolique remarquable, caractérisée par la présence de nombreux groupes de métabolites secondaires bioactifs ;

Sur le plan biologique des activités antioxydante et cytotoxique intéressantes à prospecter.

Sur le test du DPPH utilisé, les pouvoirs réducteurs des extraits méthanoliques des feuilles d'*Acanthus mollis* et *Pistacia lentiscus* se sont révélés largement supérieurs par rapport aux autres extraits des mêmes plantes, et aussi nettement supérieur à celui de l'acide ascorbique (antioxydant témoin). Pour sa part, les extraits des racines d'*Anacyclus pyrethrum* se sont révélés moins actifs que ceux des plantes précédentes, mais toujours une supériorité de l'effet de l'extrait alcoolique par rapport aux autres extraits. Les polyphénols en général sont bien connus pour leur effet antiradicalaire important. Leur présence dans les extraits alcooliques pourrait être associée aux pouvoirs antioxydants mesurés dans ces extraits.

Sur le modèle BSL, des extraits de deux plantes se sont révélés particulièrement cytotoxiques. Il s'agit des extraits d'acétate éthylique de *Pistacia lentiscus* et d'*Anacyclus pyrethrum*. Des précédentes études ont montré que l'extrait alcoolique des racines d'*Anacyclus pyrethrum* exerce des activités sur des lignées de cellules cancéreuses colorectales humaines, en ciblant l'apoptose et la métastase. Dès lors nos résultats sur le potentiel cytotoxique de cette espèce semblent indiquer que l'extrait d'éthyle acétate des racines d'*Anacyclus pyrethrum* renferme des molécules à pouvoir cytotoxique. Le fractionnement bioguidé de cet extrait a permis d'isoler quatre alkamides et six triterpènes. Parmi les alkamides identifiés figure un alkamide de type isobutyle, appelée péllitorine. Cette molécule est connue pour exhiber des fortes activités cytotoxiques sur des lignées cellulaires cancéreuses (HL60 et MCT-

7). Les trois autres alkamides, à savoir, N-propyldodeca-2,8-diénamide, N-isobutyltétradeca-2,4-dienamide et N-propylnona-2,5-diénamide, non pas été évaluées pour leur pouvoir cytotoxique.

Ce travail a permis une meilleure connaissance du profil métabolique des deux espèces et leurs potentiels cytotoxique et antioxydant. Un alkamide potentiellement cytotoxique (pellitorine) a été isolé des racines d'*Anacyclus pyrethrum*, ce qui pourrait appuyée, selon certaines citations, l'utilisation en médecine traditionnelle de cette plante comme anticancéreux. D'autre part, bien que le test BSL est décrit comme essai général pour la détection de substances bioactives, dans notre étude il apparait comme utile dans la détection de fractions et l'isolement des substances cytotoxiques (pellitorine). Ainsi, notre approche basée sur le test BSL dans le fractionnement de l'extrait actif Ae d'*Anacyclus pyrethrum* a été fructueuse, et ainsi supporte l'utilité de cet essai comme prè-test de détection de substance cytotoxique.

Les futures études devraient :

- explorer en profondeur les structures des molécules déjà isolées par des techniques spectrales plus performantes pour confirmer leurs structures chimiques ;
- étudier le contenu chimique des autres extraits et fractions qui se sont révélées cytotoxiques (*Anacyclus pyrethrum* et *Pistacia lentiscus*) ;
- évaluer le potentiel cytotoxique des trois alkamides et des autres substances isolées (cas des triterpènes) sur des lignées de cellules cancéreuses et saines. Envisager par la suite une étude de structure-activité sur les alkamides isolées par rapport à l'activité cytotoxique.
- Etablir le profil biologique des extraits des plantes sur une batterie d'activités autres que celles déjà explorées.

Références

Bibliographiques

A

Abdul, R.M.S., Soundararajan, V., Sreenivasan, S., Lachimanan, Y.L., Yuet, P.K., Yee, L.L., Lai, N.S et Yeng, C. Acute Oral Toxicity and Brine Shrimp Lethality of *Elaeis guineensis* Jacq., (Oil Palm Leaf) Methanol Extract. *Molecules*. **2010**, 15, 8111 – 8121.

Adnyana, K.I., Tezuka, Y., Banskota, H.A., Tran, Q.K et Kadita, S. Quadranosides VI-XI, Six New Triterpene Glucosides from the Seeds of *Combretum quadrangulare*. *Chem.Pharm.Bull* . **2000**, 48, 1114 – 1120.

Ahmed, S.M., Sandra, G et Gustavo, B. Antinociceptive activity of triterpenes isolated from *Clusia ellipticifolia*. *Rev.Col.Cienc.Quim. Farm.* **2004**, 33, 156 – 162.

Alain, D.P.B., Banga, B.G., Adou, F.Y., Jean, D.G et Allico, J.J. Activité antioxydantes des dix plantes medicinales de la pharmacopée ivoirienne. *Sciences et Nature*. **2011**, 8, 1 – 11.

Alina, M, C et José-Lopez, B. Cannabinoid-like signaling and other new developmental pathways in plants. *International Journal of Plant Developmental Biology*. **2007**, 1, 34 – 41.

Alluri, V.K., Tayi, V.N.R., Dodda, S., Mulabagal, V., Hsin-Sheng, T et Gottumukkala, V.S. Assessment of Bioactivity of Indian Medicinal Plants using Brine Shrimp (*Artemia salina*) Lethality Assay. *International Journal of Applied Sciences and Engineering*. **2005**, 3, 125 – 134.

Anastasia, T., Katerina, G., Eleni, M., Prokopios, M et Eugenia, T. Composition and Enantiomeric Analysis of Essential Oil of the Fruits and Leaves of *Pistacia vera* from Greece. *Molecules*. **2007**, 12, 1233 – 1239.

Anderson, J.E., Goetz, C.M., Mclaughlin, J.L et Suffness, M. A blind comparison of simple benchtop bioassay and human tumour cell cytotoxicities as antitumor prescreens. *Phytochem Analysis*. **1991**, 2, 107 – 118.

Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., Mcdonald, S et Robards, K. Methods for testing antioxidant activity. *The Royal Society of Chemistry*. **2002**, 127, 183 – 198.

Anwer, S.M., Mohtasheem, M., Azhar, I., Ahmed, W.S et Bano, H. Chemical Constituents from *Melilotus officinalis*. *Journal of Basic and Applied Sciences*. **2008**, 4, 89 – 94.

Ajay, k., Usha, V, et Ritesh. Antimicrobial activity of alcoholic extract of *Anacyclus pyrethrum* (Akarakara). *Indian Journal of Plant Sciences*. **2012**, 1, 120 – 123.

Alliri, V.K., Tayi, V.N.R., Dadda, S., Mulabagal, V., Hsin-Sheng, T et Gottumukkala, S. Assessment of Bioactivity of Indian Medicinal Plants using Brine Shrimp (*Artemia salina*) Lethality Assay. *International Journal of Applied Science and Engineering*. **2005**, 3, 125 – 134.

Althaus, J.B., Malyszek, C., Kaiser, M., Brun, R et Schmidt, Th.J. Alkamides from *Anacyclus pyrethrum* L. and Their in Vitro Antiprotozoal Activity. *Molecules*. **2014**, 22, 796 – 804.

Althaus, J.B., Kaiser, M., Brun, R et Schmidt, Th.J. Antiprotozoal activity of *Achillea ptarmica* (Asteraceae) and its main alkamides constituents. *Molecules*. **2017**, 19, 6428 – 6438.

Asaduzzaman, Md., Sohel, R, Md., Raqibul, H, S, M., Monir, H et Nittananda, D. Cytotoxic (Brine Shrimp Lethality bioassay) and Antioxidant investigation of *Barringtonia Acutangula* (L.), . *International Journal of Pharma Sciences and Research*. **2015**, 6, 1179 – 1185.

B

Baba Aissa, F. 1999. *Encyclopedie des plantes utiles*, Edas Edition, Alger

Bahuguna, A., Khan, I., Bajpai, V.K et Kang, S.Ch. MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. *Bangladesh J Pharmcol*. **2017**, 12, 115 – 118.

Bammou, M., Daoudi, A., Slimani, I., Najem, M., Bouiamrine, E.L., Ibijbijen, J et Nassiri, L . Valorisation du lentisque «*Pistacia lentiscus* L.» : Étude ethnobotanique, Screening phytochimique et pouvoir antibactérien. *Journal of Applied Biosciences*. **2015**, 86, 7966 – 7975.

Beghlel, D., El Bairi, K., Marmouzi, I., Haddar, L et Boukilli, M. Phytochemical, organoleptic and ferric reducing properties of essential oil and ethanolic extract from *Pistacia lentiscus* (L). *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. **2016**, 6, 305 – 310.

Beloued, A. 1998. *Plantes médicinales d'Algérie*. OPU, Alger

Belouahem, A.Dj., Belouahem, F et Bélair, G. Biodiversité Floristique et Vulnérabilité des Aulnaies Glutineuses de la Numidie Algérienne (N.E Algérie). *European Journal of Scientific Research*. **2009**, 32, 329 – 361.

Bendjeddou, D., Lalaoui, K et Satta, D. Immunostimulating activity of the hot water – soluble polysaccharide extracts of *Anacyclus pyrethrum*, *Alpinia galangal* and *Citrullus colocynthis*. *Journal of Ethnopharmacology*. **2010**, 88, 155 – 160.

Benhammou, N et Atik, B, F. Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* L . de deux stations de la région de Tlemcen (Algérie). Actes du congrès international des 22 – 24 mars **2007**, Maroc, 281 – 285.

Bhatt, D., Jethva, Kh et Zaveri, M. *In-Vitro* cytotoxicity screening of the selected ethnomedicinal plants for their activity on Breast Cancer. *Int.J.Pharm.Sci.Res et al*. **2016**, 41, 273 – 277.

Boli, P.M ., Virinder, S.P ., Tyagi, O.D., Ashok, P., Jesper, W et Olsen, C.E. Some

recent isolation studies from potential insecticidal *Piper* species. Pure and Appl Chem. **1994**, 66, 2339 – 2342.

Boonen, J., Bronselaer, A., Nielandt, J., Veryser, L., Tré, G et Spiegeleer, B. Alkamid database : Chemistry, occurrence and functionality of plant N – alkylamides. Journal of Ethnopharmacology. **2012**, 142, 563 – 590.

Boudechiche, L.M., Cherif, M., Boudechiche, L. et Sammar,F. Teneurs en composés primaires et secondaires des feuilles d'arbustes fourragers de la région humide d'Algérie. Revue Méd.Vét. **2014**, 165, 344 – 352.

Bougandoura, N et Bendimerad, N. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp. Nepeta* (L.) Briq. Nature et Technologie. **2012**, 03, 14 – 19.

Boukeloua, A., Belkhiri, A., Djerrou, Z., Bahri, L., Boulebda, N., et Hamdi Pacha, Y. Acute Toxicity of *Opuntia Ficus Indica* and *Pistacia Lentiscus* Seed Oils in Mice. Afr J Tradit Complement Altern Med. **2012**, 9, 607 – 611.

Boukeloua, A., Belkhiri, A., Yilmaz, A.M., et Temel, H. Chemical profiling and total thickness-excised wound-healing activity of *Pistacia lentiscus* L. fruits growing in Algeria. Cogent Biology. **2016**, 2, 1 – 5.

Boulebda, N., Belkhiri, A., Belfadel, F., Bensegueni, A., et Bahri, L. Dermal Wound Healing Effect of *Pistacia lentiscus* Fruit's Fatty Oil. Pharmacognosy Research. **2009**, 1, 66 – 71.

Bouriche, H ., Saidi, A ., Ferradji, A., Belambri, S.A., et Senator, A. Anti-inflammatory and immunomodulatory properties of *Pistacia lentiscus* extracts. Applied Pharmaceutical Science. **2016**, 06, 140 – 146.

Bozorgi, M., Memariani, Z., Mobli, M., Surmaghi, M.H.S., Ardekani, M.R.Sh et Rahimi, Roja. Five *Pistacia* species (*P. vera*, *P. atlantica*, *P. erebinthus*, *P. khinjuk* and *P. lentiscus*) : A review of their traditional uses, phytochemistry and pharmacology. Scientific World Journal. **2013**, ID 219815, 33 pages.

Bruneton, J. Pharmacognosie, Phytochimie et Plantes médicinales, 3 ème Edition, Tec et Doc, Paris. **1999**.

C

Carballo, J.L., Hernández-Inda, Z.L., Pérez, P., et García-Grávalos, M.D. A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. BMC Biotechnol. **2002**, 2, 17 – 21.

Chang-Hong Huo ., Bin Wang ., Wen-Han Lin et Yu-Ying Zhao . Benzoxazinones from *Acanthus ilicifolius*. Biochemical Systematics and Ecology. **2005**, 33, 643 – 645.

Chen, J., Chen, B., Tian, J et Wu, F. Two New Pentacyclic Triterpenes from *Sabia parviflora*. Chinese Chemical Letters. **2002**, 13, 345 – 348.

Cherbal, A., Kebieche, M., Madani, Kh et El – Adaw, H . Extraction and Valorization of Phenolic Compounds of Leaves of Algerian *Pistacia lentiscus*. Asian Journal of Plant Sciences. **2012**, 11, 131 – 136.

Cheriti, A ., Belboukhari, N et Hacini, S. Savoir traditionnel et valorisation des plantes medicinales du sud ouest Algerien. Annales de l'Université de Bachar. **2005**, N 1 ,ISSN : 1112 – 6604.

Chiy, R.C., Hung, W.C et Chi, I.C. D:C-Friedooleanane Type Triterpenoids from *Lagenaria siceraria* and Their Cytotoxic Activity. Chem. Pharm. Bull. **2008**, 56, 385- 388.

Claudio, J.B., Anibal, G.A., Marta, E.Y., Dardo, A.M., Mabel, D.G., Ana, G.R., Aurelio, S., Guillermo,M.T et Emiliano, F. Evaluation of Cytotoxic and Mitodepressive Activity of Aqueous Extracts from Thirteen Argentine Medicinal Plants. Acta Farm. Bonaerense. **2006**, 25, 555 – 559.

Clifford, L.J., Nair, M.G ., Rana, J et Dewitt, D.L. Bioactivity of alkamides isolation from *Echinacea purpurea* (L.) Moench. Phytomedicine. **2002**, 9, 249 – 253.

Cruz, I ., Cheetham, J.J., Arnason, J.T., Yack, J.E et Smith, M.L. Alkamides from *Echinacea* disrupt the fungal cell wall – membrane complex. Phytomedicine. **2014**, 21, 435 – 442.

D

Daoudi, A., Najem, M., Bachiri,L., Ibijbijen,J et Nassiri, L. Monographies des plantes à haute fréquence d'utilisation en pharmacopée traditionnelle au Moyen Atlas Central Maroc. J.Anim.Plant Sci. **2019**, 40, 6712 – 6730.

Deepak, K.S., Shradha, N et Shashi, B.B. Micropropagation of *Anacyclus pyrethrum* and Chemical Profiling of the regenerated Plants for Pellitorine, the Active Principale. Plant Cell Tiss Organ Cult. **2015**, 122, 249 – 255.

Djerrou, Z., Bensari, C., Bachtarzi,K., Djaalab, H., Riachi, F., Maameri, Z et Hamdi Pacha, Y. Safety and effecacity of *Pistacia lentiscus* L. fruit's fatty oil for the treatment of dermal burns : Asynthesis report. Int.J.Med.Arom.Plants. **2013**, 3, 464 – 469.

Dosseh, Ch., Moretti, Ch., Tessier, A.M et Delaveau, P. Etude chimique des feuilles de *Byrsonima verbascifolia* Rich. Ex juss. Plantes médicinales et phytothérapie. **1980**, 3, 136 – 142.

Druet, D., Comeau, L et Jean, P.Z. Structure de l'opigenine: triterpènes entacyclique isole d'*Opilia celtidifolia*. Can.J.Chem. **1986**, 64, 295 – 299.

E Elazzouzi ,H., Aminata, S., Fatima, E., Amar, B., Mohamed, A.E.B et Touriya, Z. Phytochemical Sudy of *Anacyclus pyrethrum* (L.) of Middle Atlas (Marocco), and *in vitro* study of antibacterial activity of *pyrethrum*. Advances in Natural and Applied Sciences. **2014**, 8, 131 – 140.

Elazzouzi ,H., Khennouchi, S., Bentayeb, A., Fatima, E., et Touriya, Z. Effets biocides des alcaloides extraits des raciness d'*Anacyclus pyrethrum* (L.) (Asteracées) sur *Callosobruchus maculates* (Fab.) (Coléoptera : Bruchidae). International Journal of Innovation and Applied Studies. **2015**, 13, 756 – 774.

Ee, G.C., Lim, C.M., Rahmani, M., Shaari, K et Bong, C.F. Pellitorine, a potential anti-cancer lead compound against HL60 and MCT-7 cell lines and microbial transformation of piperine from *Piper Nigrum*. Molecules. **2010**, 15, 2398 – 404.

G

Gadir, S.A . Assessment of bioactivity of some Sudanese medicinal plants using brine shrimp (*Artemia salina*) lethality assay. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. **2012**, 12, 5145 – 5148.

Garcia-Chavez, A., et Molina-Torres, E.R. El Género *Heliopsis* (Heliantheae; Astaraceae) en México Y Las Alcamidas presents en sus raices. Acta Botanica Mexicana. **2004**, 69, 115 – 131.

Gardeli, C., Papageorgiou, V., Mallouchos, A., Kibouris, T et Michael Komaitis. Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L. : Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. Food Chemistry. **2008**, 107, 1120 – 1130.

Geethaa, S., Surash, R., Sreenivasan, S., Mohd, N.M., Sabariah, I et Sharif, M.M. Brine Shrimp Lethality and Acute Oral Toxicity Studies on *Swietenia mahagoni* (Linn.)Jacq.seed Methanolic extract. Pharmacognosy Research. **2010**, 2, 215 – 220.

Gulnar, K ., Kasim, Ma., Qing, L ., Gulmira, K et Akber,H. Study on component and PTP1B inhibition activity of fatty acids of *Anacyclus pyrethrum* (L) DC. Tianran Chanwa Yanjiu Yu Kaifa. **2014**, 26, 1835 – 1838.

H

Hamad, H., Ibrahim, H., Gonaid, M et Mojahidul, I. Comparative phytochemical and antimicrobial investigation of some plant growing in Al Jabal Al Akhdar. Journal of Natural Product and Plant Resource. **2011**, 3, 90 – 95.

Hamiani, A., Kambouche, N et Bellahouel,S. Chemical Composition and Antioxidant Potential of *Pistacia lentiscus* L. Essential Oil from Oran (Algeria). Bioscience and Biotechnology. **2016**, 7, 539 – 544.

Hamimed, S. **2009** . Mémoire de Magister : Caractérisation chimique des

principes à effet antidermatophyte des racines d'*Anacyclus pyrethrum* L., Université Mentouri 1 Constantine.

Harald Greger. Comparative Phytochemistry and Systematics of *Anacyclus*. Biochemical Systematics and Ecology. **1978**, 8, 11 – 17.

Harbone, J.B. Phytochemical Methods. A Guide to modern Techniques of Plants Analysis, second sediton. **1984**.

Hartl, M et Humpf, H.U. Toxicity assessment of fumonisins using the Brine Shrimp (*Artemia salina*) bioassay. Food and Chemical Toxicology. **2000**, 38, 1097 – 1102.

Héctor, R.B., Sylvia, V.C et José San, M. Contents of 1,4-Benzoxazin-3-ones and 2-Benzoxazolinone from *Stenandrium dulce* (Nees). Z.Narurforsch. **2004**, 59, 177 – 180.

Hermann Niemeyer M. Hydroxamic acids (4-Hydroxy-1,4-Benzoxazin-3-ones), defence chemicals in the gramineae. Phytochemistry. **1988**, 27, 3349 – 3358.

Hiserodt, R.D ., Barry,M.P., Michael, C et Dewis, M. Proposed mechanisms for the fragmentation of doubly allylic alkenamides (Tingle compounds) by low energy collisional activation in a triple quadrupole mass spectrometer. J Am Soc Mass Spectrom. **2004**, 15, 1462 – 1470.

I

Igoli, J.O et Gray, A.I. Friedelanone and other triterpenoids from *Hymenocardia acida*. International Journal of Physical Sciences. **2008**, 3, 156 – 158.

Indabawa, I.I. Detection and Toxicological study of Microcystin by Brine Shrimp assay from *Microcystis aeruginosa* isolated from Kano Burrow pits. Bioscience Research Communications. **2009**, 21, 209 – 214.

Israel,A.U., Ogali, R.E., Akaranta,O et Obot, I.B. Extraction and Characterization of coconut (*Cocos nucifera* L.) coir dust. Songklanakarinn J.Sci.Technol. **2011**, 33, 717 – 724.

J

Janat, A.M.B., Koffi, M.K., Yves, A.B., Marc, G.D.B., Tra, J.Z.B., Véronique, M et Bensen, B.B. Phytocompounds of the Extracts of Four Medicinal Plants of Côte D'ivoir and Assessment of their Potential Antioxidant by Thin Layer Chromatography.European Journal of Scientific Research. **2008**, 24, 219 – 228.

Jara, C ., Leyton, M., Osorio, M., Silva, V., Fleming, F., Marilyn, P., Madrid, A et Mellado, M. Antioxidant, phenolic and antifungal profiles of *Acanthus mollis* (Acanthaceae). Natural Product Research. **2017**, 31, 1 – 4.

José, L.B ., Gustavo, A.H., Enrique, R.Ch., Jorge, M.T et Luis, H.E. Novel signals for plant development. Current Opinion in Plant Biology. **2006**, 9, 523 – 529.

K

Kalam, M.A., Karim, M.A., Anzar, M.A., Sofi, G et Shahzad, A. Aqer Qerha (*Anacyclus pyrethrum* DC.) a nobel drug of Unani System of medicine-a review. International Journal of Pharmacognosy (Panchkula, India). **2015**, 2, 116 – 122.

Kanchanapoom, T., Mohamed, S.K., Ryoji, K., Chayan, P., Yoshikazu, H et Kazuo, Y. Benzoxazinoid glucosides from *Acanthus ilicifolius*. Phytochemistry. **2001**, 58, 637 – 640.

Kanchanapoom, T., Noiarsa, P., Otsuka, H et Ruchirawat, S. Chemical Constituents of *Acanthus volubilis* Wall. Biochemical Systematics and Ecology. **2006**, 34, 442 – 445.

Kholkhal, F., Lazouni, H.A., Bendahou, M., Boublenza, I., Chabane, S.D et Chouch, T. Etude phytochimique et évaluation de l'activité anti-oxydante de *Thymus ciliatus* ssp. *Coloratus*. Afrique Science. **2013**, 9, 151 – 158.

Kimberly, P., Praveen, K et Willian, S.Ch. Cyclic hydroxamic acids in dicotyledonous plants. Biochemical Systematics and Ecology. **1995**, 23, 781 – 785.

Kishor, K.V et Lalitha, G.K. Pharmacognostical Studies on the Root of *Anacyclus pyrethrum* DC. Indian Journal of Natural Products and Resources. **2012**, 3, 518 – 526.

Kouamé, J., Gnoula, C., Palé, E., Bassolé, H., Guissou, I.P., Simporté, J et Nikiéma, J.B. Etude des propriétés cytotoxiques et anti-radicalaires d'extraits de feuilles et de galles de *Guiera senegalensis* J.F. Gmel (Combretaceae). Science et Technique. **2009**, 32, 9 – 23.

Kplolali, Y. A . A., Quashie, A.M., Agbonon, I et Koumaglo, K. Activités antioxydantes *in vitro* des feuilles de *Crataeva Adansonii*. Rev Ivoir Sci Technol. **2010**, 16, 153 – 164.

Kraus, G.A ., Jaehoon, B., Lankun, W., et Wurtele, E. Synthesis and natural distribution of anti-inflammatory alkaloids from *Echinacea*. Molecules. **2006**, 11, 758 – 767.

Kuo, Y.H et Chiang, Yi.M. Six New Ursane and Oleanane Type Triterpenes from the Aerial Roots of *Ficus microcarpa*. Chem.Pharm.Bull. **2000**, 48, 593 – 596.

L

Lalone, C.A., Hammer, K.D.P., Wu, L., Bae, J., Leyva, N., Liu, Y., Solco, A.K.S., Kraus, G.A., Murphy, P.A., Wurtele, E.S., Kim, O.K., Seo, K., Widrlechner, M.P et Birt, D.F. *Echinacea* Species and Alkaloids Inhibit Prostaglandin E₂ Production in RAW264.7 Mouse Macrophage Cells. Agricultural and Food Chemistry. **2007**, 55, 7314 – 7322.

Lagnika, L., Anago, E et Sanni, A. Screening for antibacterial, antioxidant activity and toxicity of some medicinal plants used in Benin folkloric medicine. Journal of

Medecinal Plants Research. **2011**, 5, 773 – 777.

Lieselotte,V., Lien, T., Nathalie, R., Kathelijne, P., Christian, B et Art, D.S. Quantitative transdermal behavior of pellitorine from *Anacyclus pyrethrum* extract. Journal of Phytomedicine. **2014 (a)**, 21, 1801 – 1807.

Lieselotte, V ., Everyser, W ., Lien, Taevernier., Verbeke, F., Joshi, T., Tatke, P et Bart, D.S. N – alkylamides : from plant to brain. Functional Foods in Health and disease. **2014 (b)**, 4, 264 – 275.

Lieselotte,V., Lien, T., Nathalie, R., Blondeel, Ph., et Bart, S. Implementation of a single quad MS detector in high-throughput transdermal research of plant extracts. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. **2015**, 115, 594 – 602.

Luciana, L.M., Fabio, S.M., Gilda, G.L., Alexandre, S.R., Tereza, C.S., Cintia, S.C et Suzana, G.L. Screening of Brazilian Plant Extracts for Antioxidant Activity by the Use of DPPH Free Radical Method. Phytotherapy Research. **2001**, 15, 127 – 130.

M

Macek, K. Pharmaceutical application of Thin – Layer and Paper Chromatography. New York. **1972**.

Mackeen, M.M., Ali, A.M., Lajis, N.H., Kawazu, K., Hassan, Z et Amran, M. Antimicrobial, antioxidant, antitumour-promoting and cytotoxic activities of different plant part extracts of *Garcinia atroviridis* Griff. Ex T. Anders. J Ethnopharmacol. **2000**, 72, 395 – 402.

Mahmoudi, M ., Ebrahimzadeh, M.A., Ansaroudi,F., Nabavi,S.F et Nabavi,S.M. Antidepressant and antioxidant activities of *Artemisia absinthium* L. at flowering stage. African Journal of Biotechnology. **2009**, 8, 7170 – 7175.

Makowska, B., Bakera, B et Rakoczy, T.M. The genetic background of benzoxazinoid biosynthesis in cereals. Acta Physiol Plant. **2015**, 37, 176 – 188.

Manas, B., Rajesh, Y., Raja,K.V., Praveen, B et Mangamma.K. Extraction Phytochemical Screening and In-Vitro Evaluation of Anti-Oxidant Properties of *Commicarpus chinesis* (Aqueous Leaf Extract). International Journal of Pharma and Bio Sciences. **2010**, 4, 537 – 547.

Manilal, A., Sujith, S., Seghal, K.G., Selvin, J et Shakir, Ch. Cytotoxic Potentials of Red Alga, *Laurencia brandenii* Collected from Indian Coast. Global Journal of Pharmacology. **2009**, 3, 90 – 94.

Marner, F.J., Freyer,A et Lex,J. Triterpenoids from gum mastic, the resin of *Pistacia lentiscus*. Phytochemistry. **1991**, 30, 3709 – 3712.

Martin – Tanguy, J., Vermorel, M., Lenoble, M et Martin, C. Les Tanins des grains de sorgho. Importance dans l'utilisation digestive de l'azote chez le rat en

croissance. *Ann.Biol.anim.Bioch.Biophys.* **1976**, 6, 879 – 890.

Masouda, E.A., Mohamed, I.A.S., Maged, S.A.K., Amina, M.S.E.S et Nabil, A.A.S. Alkaloids and Flavone Acyl Glycosides from *Acanthus arboreus*. *J.Braz.Chem.Soc.* **2004**, 15, 1 – 5.

Matos, P., Figueirinha, A., Paranhos, A., Nunes, F., Cruz, P., Geraldes, C.F.G.C., Cruz, M.T et Batista, M.T. Bioactivity of *Acanthus mollis* contribution of benzoxazinoids and phenylpropanoids. *J Ethnopharmacology.* **2018**, 227, 198 – 205.

Matos, P., Figueirinha, A., Ferreira, I., Cruz, M.T et Batista, M.T. *Acanthus mollis* L. leaves as source of anti-inflammatory and antioxidant phytoconstituents. *Natural Product Research.* **2019**, 33, 1824 – 1827.

McLaughlin, J.L et Rogers, L.L. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Information Journal.* **1988**, 32, 513 – 24.

McLaughlin, J.L. Assays for bioactivity. In: Hostettmann K (Ed), *Methods in Plant Biochemistry*. London: Academic Press. **1991**, 6, 1 – 33.

McLaughlin, J. L., Rogers, L.L et Anderson, J.E. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Information Journal.* **1998**, 32, 513 – 524.

Mentor, R.H ., Blagica, J et Tatjana, K.P. Toxicological evaluation of plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. *Macedonian pharmaceutical bulletin.* **2014**, 60, 9 – 18.

Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E et McLaughlin, J.L. Brine Shrimp : A convenient general bioassay for active plant constituents. *Medecinal Plant Research.* **1982**. 45, 31 – 34.

Molina, T.J., Garcia, Ch.A et Ramirez, Ch.E. Antimicrobial properties of alkamides present in flavouring plants traditionally used in Mesoamerica : affinin and capsaicin. *Journal of Ethnopharmacology.* **1999**, 64, 241 – 248.

Mongelli, E, Pomilio., A.B., Sanchez, J.B., Guerra, F.M et Massanet, G.M. ent-Kaur-16-en-19-oic acid, a KB cells cytotoxic diterpenoid from *Elaeoselinum foetidum*. *Phytotherapy Research.* **2002**, 16, 387 – 398.

Monika, P., Jogender, M., Reeta, K.H., Sujata, J et Yogendra, K.G. Root extract of *Anacyclus pyrethrum* ameliorates seizures, seizure-induced oxidative stress and cognitive impairment in experimental animals. *Epilepsy Research.* **2012**, 98, 157 – 165.

Monika, P., Jogender, M., Reeta, K.H., Manjari, T et Yogendra, K.G. Effect of *Anacyclus pyrethrum* On Pentylenetetrazole – Induced kindling, spatial Memory Oxidative Stress and Rho – Kinase II Expression in Mice. *Neurochem Res.* **2013**,

38, 547 – 556.

Moshi, M.J., Inncent, E., Otieno, J.N., Magadula, J.J., Nondo, R.S.O., Otieno, D.F., Wensheit, A et Mbabazi, P. Antimicrobial and brine shrimp activity of *Acanthus pubescens* root extracts. Tanzania Journal of Health Research. **2010**, 12, 171 – 175.

Mudi, S.Y et Salisu, A. Studies on Brine Shrimp Lethality and Activity of stem bark extract of *Acacia Senegal* l. On respiratory tract pathogenic bacteria. International Journal of Biomedical and Health Sciences. **2009**, 5, 139 – 143.

N

Nabila, B., Fawzia, A.B et Tatjana, K.P. Aantioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlanticus* extracts. African Journal of Pharmacy and Pharmacology. **2008**, 2, 022 – 028.

Narjara, S ., Julia,S., Alan Diego, C., Santos, A.B ., Sandjo, L., Marcel, K., Schmidt, Th.J et Biavatti, M.W. A new Alkamide with an endoperoxide structure from *Acmella ciliata* (Asteraceae) and its in Vitro antiplasmodial activity. Molecules. **2016**, 21, 765 – 770.

Nooman, A.K., Ashok, K.S., Atif, A.O., Zaha, E.A et Husni, F. Antioxidant Activity of some Common Plants. Turk J Biol. **2008**, 32, 51 – 55.

O

Ojeil, A ., El Darra, N., El Haji, Y., Bou Mouncef, P., Rizk, T.J et Maroun, R.G. Identification et caractérisation de composes phénoliques extraits du Raisin Château Ksara. Lebanese Science Journal. **2010**, 11, 117 – 131.

Oladimeji, H.O., Nia, R et Essien, E.E. In – vitro Anti – Microbial and Brine Shrimp Lethality Potential of the Leaves and Stem of *Calotropis procera* (Ait). African Journal of Biomadical Research. **2006**, 9, 205 – 211.

Oyaizu, M. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. Japanese journal of Nutrition, **1986**, 44, 307 – 315.

P

Papageorgiou, V.P., Bakola, Ch.N.M et Apazidou, K.K. Gas chromatography mass spectroscopic analysis of the acidic triterpenic fraction of mastic gum. Journal of chromatography. **1997**, 729, 263 – 273.

Pisutthanan, S ., Plianbangchang, P., Pisutthanan, N., Ruanruay, S et Muanrit,O. Brine Shrimp Lethality Activity of Thai Medecinal Plants in the Family Meliaceae . Naresuan University Journal. **2004**, 12, 13 – 18.

Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. Analytical Biochemistry, **1999**, 269,

337 – 341.

Q

Quazi, S.S ., Chowdhury, F.A et Misbahuddin,M. Brine shrimp lethality assay. Bangladesh J Pharmacol. **2017**, 12, 186 – 189.

R

Rajabi, S ., Ramazani, A., Hamidi, M et Najji, T. *Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences. **2015**, 23, 105 – 111.

Ramirez-Chavez, E ., Lopez-Bucio, J., Herrera-Estrella et Molina-Torres,J. Alkamides isolated from plants promote growth and Alter root development in Arabidopsis. Emir.J.Plant Physiol. **2004**, 134, 1058 – 1068.

Ramirez-Chavez, E ., Molina-Torres,J et Rios-Chavez. Natural distribution and alkamides production in *Acmella radicans*. Emir.J.Food Agric. **2011**, 23, 275 – 282.

Rekha, B., Adhikari, P.P., Kumar, A., Raaman, N et Sharma, G.D. Ethnomedicinal, Phytochemical and Pharmacological Aspects of genus *Acanthus*. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. **2017**, 9, ISSN 0975-1491.

Rhattas, M ., Douira, A et Zidane, L. Etude ethnobotanique des plants médicinales dans le parc national de Talassemtane (Rif occidental du Maroc). J.Appl.Biosci. **2016**, 97, 9187 – 9211.

Romani, P., Pinelli, C., Galardi, N., Mulinacci, M et Tattini. Identification and quantification of galloyl derivatives, flavonoid glycosides and anthocyanins in leaves of *Pistacia lentiscus* L. Phytochem Anal. **2002**, 13, 79 – 86.

S

Sahoo, A.M., Chakraborti, C.K., Nayak, S et Kayal, S. Correlation Between Phytochemical Screening and In Vitro Antibacterial Activity Study Of *Rosa Indica* Linn.Leaves. IJRAP. **2001**, 2, 1595 – 1597.

Saroj, K., Vaibhav, M., Savita, B et Shrinivas, D.T. Antimicrobial Activity and Phytochemical Screening of srial Extracts from Leaves of *Aegle marmelos* (Linn.). Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research. **2011**, 68, 687 – 692.

Selles, Ch., Dib, M.A., Allali, H et Tabti, B. Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of solvent extracts of *Anacyclus pyrethrum* L., from Algeria. Mediterranean Journal of Chemistry.**2012** (a), 2, 408 – 415.

Selles, Ch., Benali, O., Tabti, B., Larabi, L et Harek, Y. Green corrosion inhibitive

action of aqueous extract of *Anacyclus pyrethrum* L., for the corrosion of mild steel in 0,5 M H₂SO₄. J.Mater.Environ.Sci.**2012** (b), 3, 206 – 219.

Shahid, U.D.A.F.M et Mohammad, A.B. Phytochemical Screening Plant Growth Inhibition and Antimicrobial Activity Studies Of *Xylocarpus Granatum*. Malaysian Journal Pharmaceutical Sciences. **2009**, 7, 9 – 21.

Shahraki, M.R., Shahraki, S., Arab, M.R et Shahraki, P.M. The Effects of Aqueous Extract of *Anacyclus pyrethrum* On Sperm Count and Reproductive Organs in Adult Male Rats. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences. **2015**, 17, 42 – 46.

Shannon, E.B ., Iniyal, I., Bernard, R.B et Arnason, J.T. Methyl jasmonate increases reported alkamides and ketoalkene / ynes in *Echinacea pallid* (Asteraceae). Phytochemistry. **2001**, 57, 417 – 420.

Sharma, V., Boonen, J., Spiegeleer, B et Dixit, V.K. Androgenic and Spermatogenic activity of alkylamide-Rich Ethanol solution extract of *Anacyclus pyrethrum* DC. Phytotherapy Research. **2013**, 27, 99 – 106.

Shihua, W ., Cuirong, S., Saifeng, P., Yanbin, L et Yuanjiang, P. Preparative isolation and purification of amides from the fruits of *Piper longum* L. by upright counter-current chromatography and reversed-phase liquid chromatography. Journal of chromatography A. **2004**, 1040, 193 – 204.

Silanikove, N., Gilboa, N., Perevolotsky, A et Nitsan, Z. Goats fed tannin-containing leaves do not exhibit toxic syndromes. Small Ruminant Research. **1996**, 21, 195 – 201.

Sirintorn, P., Pinyupa, P., Nisit, P., Siriluk, R et Onrudee, M. Brine Shrimp Lethality Activity of Thai Medicinal Plants in the Family Meliaceae. Naresuan University Journal. **2004**, 12, 13 – 18.

Solís, P.N., Wright, C.W., Anderson, M.M., Gupta, M.P et Phillipson, J.D. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina*. Plant Med. **1993**, 59, 250 – 257.

Sugey, L.M ., Berenice, A.A., et Yolanda, R.M. Minor alkamides from *Heliopsis longipes* S.F. Blake (Asteraceae) fresh roots. .Phytochemistry Letters. **2011**, 4, 275 – 279.

Sujith, K., Ronald, D.C et Suba, V. Antioxidant Activity of Ethanolic Root Extract of *Anacyclus pyrethrum*. International Research Journal of Pharmacy. **2011**, 12, 222 – 226.

Swadhini, S.P., Santhosh, R., Uma, C., Mythili, S et Sathiavelu, A. Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity of Five Medicinal Plants Against *Myrothecium* SP. International Journal of Pharma and Bio Sciences. **2011**, 2, 975 – 999.

Syed, M.A.Z., Shadab, A.P., Surender, S., Shakir, J., Farhan, J.A et Roop, K.K.

Anticonvulsant, antioxytic and Neurotoxicity Profil of Aqarqarha (*Anacyclus pyrethrum*) DC (Compositae) Root Ethanolic Extract. *Pharmacology and Pharmacy*. **2013**, 4, 535 – 541.

T

Talbi, H., Boumaza, A., El – moustafa, K., Talbi, J et Hilali, A. Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physic-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa* L. . *Mater.Environ.Sci*. **2015**, 6, 1111 – 1117.

Tauheed, A., Hamiduddin et Akhtar, A. Aqarqarha (*Anacyclus pyrethrum* DC.) A potent drug in *unani* medicine : A review on its historical and phyto – pharmacological perspective. *Pharmaceutical and Scientific Innovation*. **2017**, 6, 22 – 28.

Thamaraiselvi, P.L et Jayanthi, P. Preliminary studies on Phytochemicals and Antimicrobial Activity of solvent extracts of *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. *Asian Journal of Plant Science and Research*. **2012**, 2, 115 – 122.

Thanakijcharoenpath, W et Theanphong, O. Triterpenoids from the stem of *Diospyros glandulosa*. *Thai J.Pharm*. **2007**, 3, 1 – 8.

Tomas, R., Rezanka, P et Sigler, K. Glycosides of arylnaphthalene lignans from *Acanthus mollis* having axial chirality. *Phytochemistry*. **2009**, 70, 1049 – 1054.

Trabelsi, H., Cherif, O.A., Sakouhi,F., Villeneuve, P., Renaud, J., Barouh,N., Boukhchina, S et Mayer, P. Total lipid content fatty acids and 4 desmethylsterols accumulation in developing fruit of *Pistacia lentiscus* L. growing wild in Tunisia. *Food Chemistry*. **2012**, 131, 434 – 440.

U

Usmani, A ., Khushtar,M., Arif,M., Aftab, M.S., Prakash,S et Mujahid, M. Pharmacognostic and phytopharmacology study of *Anacyclus pyrethrum* : An insight. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. **2016**, 6, 144 – 150.

V

Vaghasiy, R.Y., Dave, R et Chanda, S. Phytochemical Analysis of Some Medicinal Plants from Western Region of India. *Research Journal of Medicinal Plant*. **2011**, 5, 567 – 576.

Vikas, S., Mayank, T., Nagendre, S.C et Vinod, K.D. Effects of petroleum ether extract of *Anacyclus pyrethrum* DC. On sexual behavior in male rats. *Journal of Chinese Integrative Medicine*. **2010**, 8, 767 – 772.

W

Wagner, H., Bladt, S et Zgainski, E.M. *Plant Drug Analysis*, Springer, Berlin. **1984**.

Wahidulla, S et Bhattacharjee. Benzoxazinoids from *Acanthus illicifolius*. J.Indian Inst.Sci. **2001**, 81, 485 – 490.

Win Aung, Kh.S., New Ni, Th., Shwe, K et Myint, T. Evaluation of the bioactivities of some Myanmar medicinal plants using Brine Shrimp (*Artemia salina*) toxicity Test. J.Myan.Acad;Tech. **2001**, 1, 105 – 112.

Wolf, B.R., Spencer, G.F et Plattner, D.R. Benzoxazolinone, 2,4-dihydroxy-1,4-Benzoxazin-3-one and its Glucoside from *Acanthus mollis* seeds Inhibit velvetleaf germination and Growth. Journal of Natural Products. **1985**, 48, 59 – 63.

Y

Ying, Ch ., Tong, F., Tao, T., Jinghua, Y., Yung, Ch ., Wang, M., Kim, L., Scalzo, R et Wang, X. Macrophage activating effects of new alkamides from the roots of *Echinacea* species. J. Nat. Prod. **2005**, 68, 773 – 776.

Youcef, Y.K., Massoud, A., Babak, E., Soheila, M.B et Mahnaz, S.J. Inhibitory Effects of a Flavonoid – Rich Extract of *Pistacia vera* Hull on Growth and Acid Production of Bacteria Involved in Dental Plaque. International Journal of Pharmacology. **2007**, 3, 219 – 226.

Yuan, B.Ch ., Huang, L.R., Meng, Ch.H., Tung, Y.W., Ching,Y.Ch., Shyng, S.Y., Yang, Ch.W et Fang, R.Ch. Alkylamides of *Acmella oleracea*. Molecules. **2015**, 20, 6970 – 6977.

Z

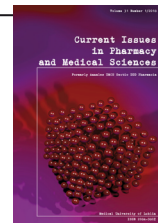
Zitouni, A., Belyagoubi, B.N., Ghembaza, N., Toul Fethi, A et Bekkara, F. Assesment of phytochemical composition and antioxidant prperties of Extracts from the Leaf, Stem, Fruit and Root of *Pistacia lentiscus* L. Pharmacognosy and Phytochemical Research. **2016**, 8, 627 – 633.



Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences

Formerly ANNALES UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA, SECTIO DDD, PHARMACIA

journal homepage: <http://www.curipms.umlub.pl/>



Bioactivity-guided isolation of alkamides from a cytotoxic fraction of the ethyl acetate extract of *Anacyclus pyrethrum* (L.) DC. roots.

SOUAD HAMIMED^{1,2,5}, NADJI BOULEBDA³, HOCINE LAOUER⁴, ABDELMALIK BELKHIRI^{1,2*}

¹ Laboratoire de Pharmacognosie, Faculté de Médecine, Université Salah Bounider, Constantine 3, Algérie

² Laboratoire de Pharmacologie and Toxicologie, INSV – Khroub, Université Mentouri Constantine 1, Algérie

³ Laboratoire de Pharmacologie, ISAV – Université Mohamed-Cherif Messaadia – Souk Ahras, Algérie

⁴ Laboratoire de Valorisation des Ressources Naturelles Biologiques. Université Ferhat Abbes Sétif, Algérie

⁵ Université Larbi Ben M'hidi O.E.B, Algérie

ARTICLE INFO

Received 09 November 2017

Accepted 19 April 2018

Keywords:

Artemia salina,
DL50,
fractionation,
alkamides,
pellitory.

ABSTRACT

Introduction. The alcohol extract of Pellitory (*Anacyclus pyrethrum*) roots has been previously shown to exert anticancer activities on the Human Colorectal Cancer Cell Line (HCT) by targeting apoptosis, metastasis and cell cycle arrest. However, the nature of the cytotoxic molecules associated with this activity remains unexplored.

Aims. This study aims to reinvestigate Pellitory root extract as regard to its cytotoxic activity and to proceed to a bioguided fractionation to explore its active fraction and to give new insight in their phytochemical constituents.

Methods. Powdered roots were subjected to repeated extraction with Petroleum ether (Pe), Chloroform (Ch), Ethyl acetate (Ea) and Methanol (Me). Pellitory extracts were then screened for cytotoxic activity using the Brine Shrimp Lethality (BSL) bioassay.

Results. Ea extract exhibited a marked cytotoxic activity, with LC50 of 249.26 µg/mL in the BSL bioassay. The remaining extracts (Pe,Ch,Me) treated groups exhibited no or low mortality in the range of tested concentrations (1-1000 µg/mL). BSL assay-guided chromatographic fractionation of Ea active Extract revealed a highly cytotoxic fraction (F11) with LC50 of 42.5 µg/mL. Multistep purifications of the active F11 fraction afforded four alkamides, namely N-isobutyldeca-2,4-dienamide or Pellitorine (I), N-propyldeca-2,8-dienamide (II), N-isobutyltetradeca-2,4-dienamide (III) and N-propylnona-2,5-dienamide (IV).

Conclusions. This study suggests that cytotoxic activity is localized mainly in the ethyl acetate extract (Ea) of pellitory roots. BSL assay fractionation of this active extract leads to the isolation of four alkamides, including pellitorine (I). While this isobutyl alkamide has previously shown strong cytotoxic activities against human cancer cell lines, the other compounds (II to IV) were not previously reported as cytotoxic. Subsequently, the isolated alkamides will be considered in future study as candidates for in depth in-vitro evaluation of their cytotoxicity against cancer and normal cell lines. Finally, through this study, BSL assay demonstrate again its usefulness as bench-top assay in exploring plant extracts for cytotoxic compounds.

Abbreviations

BSL (Brine Shrimp Lethality), Ch (Chloroform), DMSO (Dimethyl sulfoxide), Ea (Ethyl acetate), HCT (Human Colorectal Cancer Cell Line), MCT-7 (Brest cancer strain),

Me (Methanol), HL60 (Human promyelocytic leukemia cell line), Pe (Petroleum ether).

INTRODUCTION

Pellitory (*Anacyclus pyrethrum* (L.) DC., syn.: *Anacyclus officinarum* Hayne), is a perennial procumbent herb which

* Corresponding author

e-mail: abdelmalik.belkhiri@univ-constantine3.dz

belongs to the Asteraceae family. The species is widely distributed in North Africa, and elsewhere in the Mediterranean region, in India and in Arabian countries [1]. The root of pellitory is well-known as a medicinal drug. It is used in the ayurvedic and unani systems of medicine for its medicinal properties, such as anti-rheumatic, odontalgia, antibacterial, antiviral, carminative, anti-catarrh, digestive, emmenagogue, febrifuge, vermifuge, sialagogue and anti-cancer [2-8]. In the North Africa region, this herbal drug is known as “*Guentess*”, and is indicated among other therapeutic applications, in respiratory infections and in the treatment of hepatic disorders [9-11].

Scientific studies has revealed that extracts from the root exhibit antibacterial, antinociceptive, anti-inflammatory, immunostimulating and antioxidant activities [7,12,13]. Moreover, the phytochemical screening of *Anacyclus pyrethrum* has led to the identification of various secondary metabolites such as alkaloids, tannins, flavonoids, coumarins and lignanes [12]. This species also contains saponins, sesamin, inulin, gum and traces of essential oil [13]. The most important chemical markers present in its root are N-alkamides with pellitorine and polysaccharides [14-16]. Furthermore, LC-MS N-alkamides profiling of an ethanolic *Anacyclus pyrethrum* root extract reported thirteen N-alkamides, including N-isobutyldeca-2,4-dienamide (Pellitorine) and N-isobutyltetradeca-2,4-dienamide [14].

Recent studies showed that *Anacyclus pyrethrum* extract have cytotoxic activity, and can successfully induce apoptosis in human colorectal cancer lines HCT cells [17,18]. Although, these experimental results give relatively some credence to the reported ethnobotanical use of the plant as anticancer [8], the identity of the active compounds associated with this effect is still unknown so far.

On the basis of this information, we decided to investigate *Anacyclus pyrethrum* roots extracts using brine shrimp lethality (BSL) assay as a predictive test for cytotoxicity [19]. This bioassay will be used to monitor the fractionation steps of the active extract and give new insight in its bioactive fractions and their phytochemical constituents. The isolated compounds can subsequently be tested in future studies using specific antitumor assays of interest.

MATERIALS AND METHODS

Solvents and Reagents

All substances were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co (Strasbourg, France) unless otherwise stated.

Plant material

Anacyclus pyrethrum (L) DC. (Asteraceae) roots were collected nearby Constantine, Algeria. The plant was identified by a Taxonomist (Pr.H. Laouer, Setif University) and voucher specimen (Ref. AN-00301R) was deposited for

future reference in the herbarium at the laboratory of botany, University SB Constantine 3, Algeria.

Extraction method

Pellitory extracts were obtained from the air-dried roots (250 g finely ground), by successive maceration (2×1.5 L) with petroleum ether (Pe), chloroform (Ch), ethyl acetate (Ea) and methanol (Me). The extractive solutions were evaporated to dryness under vacuum to obtain 22.8 g (Pe), 18.0 g (Ch), 29.8 g (Ea) and 56.3 g (Me) extracts. Table 1 shows the corresponding yields of the crude extracts, expressed as percentage (w/w) dry powder.

Table 1. Cytotoxicity profile of pellitory extracts

Treatment	Symb	Yield# (%)	Mortality, expressed as percentage Δ						LC 50 (µg/mL)	Toxicity profile ¥	
			Concentration (µg/mL)								
			1	10	50	100	250	500			1000
Petroleum ether	(Pe)	9.12	-	-	-	-	-	10 ±0.5*	20.0 ±0.5**	2044.65	n/T
Chloroform	(Ch)	7,60	-	-	-	-	-	-	10.0 ±0.0	1391.69	n/T
Ethyl acetate	(Ae)	11.92	-	-	-	10.0 ±0.0	25.0 ±0.6***	100.0 ±0.0	100.0 ±0.0	249.26	T
Methanol	(Me)	22.52	-	-	-	-	-	-	47,5 ±1.0***	1000.0	n/T

#: yield (Percentage w/w, dry matter)

Δ: Values of mortality after 24h, expressed as mean +/- SD (n=4)

(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001): value vs negative control (1% DMSO)

-: no mortality of nauplii was recorded

¥: LC 50 ≥1000 µg/ml is considered nontoxic (n/T). LC50<1000 µg/ml is toxic (T)

Phytochemical screening

Chemical screening of crude extracts, fractions and sub-fractions were carried out using well-established staining and precipitation reactions for major groups of bioactive natural products [20].

Thin layer chromatography (TLC) control of fractions and isolated compounds was carried out on precoated silica gel 60F₂₅₄ aluminium plates (5×10 mm, ft = 0.25 mm, Merck Germany). Different solvent mixtures were used (S1/hexane:dichloromethane (9:1), S2/hexane:ethyl acetate (8:2), S3/chloroform:methanol (8:2) and S4/chloroform:methanol (6:4)) and chromatograms were visualized by exposure under UV254/365 light, and by spraying with p-anisaldehyde and vanillin sulfuric reagents followed by heating [20, 21].

Fractionation of Ea extract and isolation of compounds

According to the results of the BSL screening assay (Table 1), ethyl acetate extract (Ea) was selected as the most active (LC = 249.26 µg mL⁻¹) compared to other extracts (Pe, Ch, Me) and, hence, was subjected to chromatographic fractionation. The Ea extract (6 g) was dissolved into small volume (5 ml) of ethyl acetate and the solution was subjected to a LC column (26 mm diameter × 300 mm height) filled with silica gel (type 60Å, 230-400 mesh ASTM, Merck). Elution was carried out with mixtures of hexane and ethyl acetate (90:10®70:30) of increasing polarity as described in Figure 1. Fifteen (50) fractions (100 ml each) were collected.

After TLC control using the different solvent systems S1 to S4 and staining with vanillin sulphuric and p-anisaldehyde reactifs [20], chromatographic fractions with similar TLC patterns were combined to afford sixteen (16) fractions

(F₁-F₁₆), as shown in Figure 1. Subsequent BSL assay screening revealed that the fractions F₄ (56.3 mg), F₈ (37.9 mg), F₉ (259.6 mg), F₁₁ (134.9 mg) and F₁₆ (862.4 mg) were highly active (LC<100 µg mL⁻¹).

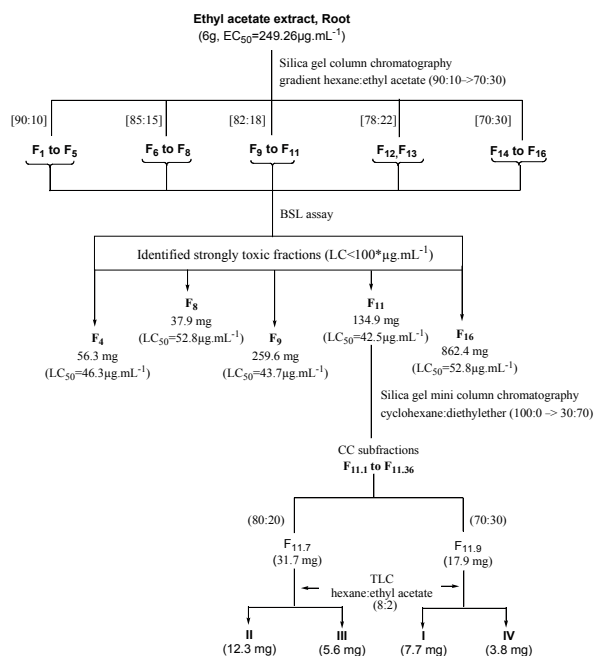


Figure 1. Flow chart of BSL assay-guided fractionation of cytotoxic ethyl acetate extract of *Anacyclus pyrethrum* roots

A phytochemical screening showed a homogeneity in the composition of the fraction F₁₁ (LC = 42.5 µg mL⁻¹), with mainly alkalimides compounds as revealed upon staining with anisaldehyde reagent [20]. Fraction F₁₁ (LC = 42.5 µg mL⁻¹) was subsequently applied to a mini LC column chromatography (15 mm diameter × 200 mm height), filled with silica gel (high purity grade 40, 70-230 mesh ASTM, Merck), and eluted with mixtures of increasing polarity of cyclohexane and diethylether (100:0 to 100:100), as described in Figure 1. Thirty six (36) subfractions (F_{11.1} to F_{11.36}) were obtained and monitored by TLC. Alkalimides were purified by preparative TLC silica gel plates (20×20, Merck) using solvent system S2 from subfraction F_{11.7} (compounds II and III with 12.3 mg and 5.6 mg) and from Subfraction F_{11.9} (compounds I and IV with 7.7 mg and 3.8 mg). Compounds purity was assessed by TLC silica gel using three solvent mixtures of different polarity: hexane:ethyl acetate (2:1), Hexane: chloroform:formic acid (2:6:1) and petroleum ether:ethylacetate:formic acid (7:30:1).

Structural identification

The structures of compounds (I-VI) were characterized by 1H-NMR (BRÜKER Avance 300 MHz, Salerno University, Italy) and comparison with relevant data from bibliography. Samples were dissolved in CDCl₃.

Compound (I): White crystals; 1H-NMR δ (CDCl₃, 300 MHz) ppm: 0.86 (3H, m, H-10), 0.88 (6H, d, H-3'), 1.32 (6H, m, H-7, H-8 and H-9), 1.88 (1H, m, H-2'), 2.10 (2H, m, H-6), 3.20 (2H, m, H-1'), 5.00 (1H, br s, N-H), 5.77 (1H, m, H-2), 6.25 (1H, m, H-5); 6.75 (1H, m, H-4); 6.96 (1H, m, H-3).

Compound (II): White crystals; 1H-NMR δ (CDCl₃, 300 MHz) ppm: 0.92 (6H, t, H-3' and H-12), 1.26 (8H, m, H-2', H-6, H-5 and H-11), 1.54 (2H, dd, H-7), 1.85 (2H, m, H-10), 2.19 (2H, m, H-4), 3.17 (2H, d, H-1'), 5.38 (1H, br s, N-H), 5.79 (1H, m, H-2), 6.10 (1H, m, H-9); 6.73 (1H, m, H-8); 6.92 (1H, m, H-3).

Compound (III): White crystals; 1H-NMR δ (CDCl₃, 300 MHz) ppm: 0.91 (6H, d, H-3'), 0.94 (3H, m, H-14), 1.28 (14H, m, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12 and H-13), 1.74 (1H, dd, H-2'), 2.36 (2H, t, H-6), 3.20 (2H, m, H-1'), 5.41 (1H, br s, N-H), 5.78 (1H, m, H-2), 6.18 (1H, m, H-5); 6.83 (1H, m, H-4); 6.98 (1H, m, H-3).

Compound (IV): White crystals; 1H-NMR δ (CDCl₃, 300 MHz) ppm: 0.94 (6H, m, H-3' and H-9), 1.30 (4H, d, H-2' and H-8), 1.85 (2H, m, H-7), 2.73 (2H, m, H-4), 3.21 (2H, d, H-1'), 5.02 (1H, br s, N-H), 5.80 (1H, m, H-2), 6.24 (1H, m, H-6); 6.83 (1H, m, H-5); 7.00 (1H, m, H-3).

Brine shrimp lethality (BSL) assay

Eggs of brine shrimp (*Artemia salina*) (Sera®, Bosnia-Herzegovina) were hatched in aqueous brine solution (3.8 g/L at 27-28°C). After 48 hours, the brine shrimp nauplii freed from egg shells were ready for the assay.

The BSL assay was conducted as described earlier with some modifications [22-25]. Briefly, pellitory samples (crude extracts and fractions) were tested at various concentrations (1-1000 µg/mL) in a brine solution containing 1% DMSO (v/v). A suspension solution of 10 nauplii were drawn through a glass capillary and placed in each compartment of a 12-well microplate. Negative control wells contained 1% DMSO in salty water. Pellitory solutions and control were tested in tetraplicate (n=4).

After 24h, the microplates were then examined under light, using a dissection microscope. The number of dead larvae was counted. Nauplii were considered dead if they did not exhibit any internal or external movement during several seconds of observation [26,27].

The percentage of mortality (% M) was calculated by the following formula as previously reported [28]:

$$(\% \text{ lethality}) = \frac{\text{Total nauplii} - \text{alive nauplii}}{\text{Total nauplii}} \times 100$$

Lethal concentration (LC50) values were determined Finney's Probit regression analysis [29]. The lethality of the extracts on the brine shrimp was classified as previously reported [30,31]: LC50 < 1000 µg/mL was "toxic", LC50 = 500-1000 µg/mL was "weakly toxic", LC50 = 100-500 µg/mL was "moderately toxic", and LC50 < 100 µg/mL was "strongly toxic".

Statistics analysis

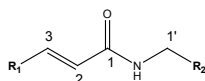
The data were collected from repeated measures (n = 4), and the results were reported as the mean ± standard deviation (SD). Data were analysed using Microsoft Excel 2007 (Redmond, WA, USA) and Microcal 6.0 (Microcal Software®, Inc.) for windows. The level of statistical significance between treated and untreated groups (control) was assessed by Tukey's test. The significance threshold was set at p < 0.05.

RESULTS

Pellitory roots extraction with solvents of different polarities yielded extractive materials of different physical consistencies. Both chloroform (Ch) and ethyl acetate (Ea) extracts were of powdery aspect, while those of methanol (Me) and petroleum ether (Pe) were greasy to resinous. Extracts are expressed with by yields, and are reported with their respective cytotoxic activity on the Brine Shrimp Lethality (BSL) assay in Table 1.

The Ae extract of the Pellitory treated group showed 100% mortality at the concentration of 500 µg/mL. The remaining extracts (Pe,Ch,Me) treated groups exhibited no or low mortality in the range of tested concentrations (1-1000 µg/mL). No lethality was found in the negative control (DMSO) group.

The BSL screening of Pellitory extracts showed that the most nauplii mortality was localized in the ethyl acetate extract (Ea), which displayed an LC50 = 249.3 µg/mL. To further investigate the active Ea extract, BSL assay-guided chromatographic fractionation (Figure 1) led to sixteen fractions, among which fraction F11 was revealed to be highly cytotoxic, with LC50 = 42.5 µg/mL. Multistep purifications of the active F11 afforded four compounds (I-IV) (Figure 2).



Compound names	R ₁	R ₂
(I) N-isobutyldeca-2,4-dienamide (Pellitorine)	CH ₃ (CH ₂) ₄ -CH=CH-	-CH(CH ₃) ₂
(II) N-propyldodeca-2,8-dienamide	CH ₃ (CH ₂) ₂ -CH=CH-(CH ₂) ₄ -	-CH ₂ CH ₃
(III) N-isobutyltetradeca-2,4-dienamide	CH ₃ (CH ₂) ₈ -CH=CH-	-CH(CH ₃) ₂
(IV) N-propylnona-2,5-dienamide	CH ₃ (CH ₂) ₂ -CH=CH-CH ₂ -	-CH ₂ CH ₃

Figure 2. Alkamides and their chemical structures

Compound I was isolated as white crystals. The 1-H NMR spectrum exhibited characteristic signals for a N-isobutylamide group at δ 3.20 ppm (2H, m, H-1'), δ 1.88 ppm (1H, m, H-2') and δ 0.88 ppm (6H, d, H-3'), together with amide proton signal at δ 5.00 ppm (1H, br s) as previously reported for isobutylamide groupe [32]. In the low field region four olefinic methines signals (1H, m) are observed at δ 5.77 (H-2), 6.25 (H-5), 6.75 (H-4) and 6.96 (H-3) ppm. Multiplet signals at δ 1.32 (6H) and 2.10 (2H) are compatible with the germinal protons (H-7, H-8 and H-9) and H6, respectively. High field signals at δ 0.86 (3H, t) is compatible with one methyl protons (H-10). The structure of compound I is assigned to the well-known pellitorine or N-isobutyldeca-2,4-dienamide, on the basis of H-NMR data which were in full agreement with literature values [33-38].

Compound II was isolated as white crystals. The 1-H NMR spectrum exhibited signals for a N-propylamide group: δ 3.17 ppm (2H, H-1'), δ 1.26 ppm (2H, H-2') and δ 0.92 ppm (3H, H-3'), together with that at δ 5.38 ppm (1H, br s) assigned to the amide proton. Four olefinic methines signals were observed at δ 5.79, 6.10, 6.73 and 6.92 ppm (1H each) as previously reported for isolated

double bonds in alkamides [39]. On the basis of this reference, we deduced the presence of two double bonds in position 2 and 8. By comparing the 1H NMR data with previously published data, compound II was identified as: N-propyldodeca-2,8-dienamide.

Compound III was isolated as white crystals. The 1-H NMR spectrum exhibited characteristic signals for a N-isobutylamide group at δ 3.20 ppm (2H), δ 1.74 ppm (1H) and δ 0.91 ppm (6H), together with amide proton signal at δ 5.41 ppm (1H, br s) as previously reported [40]. Four olefinic methine signals are observed at δ 5.78, 6.18, 6.83 and 6.98 ppm (1H each), which are compatible with the presence of two double bonds conjugated with the amide carbonyl as previously recorded for alkamides [32,40]. On the basis of previously 1-H NMR published data, compound III is identified as: N-isobutyltetradeca-2,4-dienamide.

Compound IV was isolated as white crystals. The 1-H NMR spectrum was some points similar to that of compound II. It shows signals for a N-propylamide group: δ 3.21 ppm (2H), δ 1.30 ppm (2H) and δ 0.94 ppm (3H), together with that at δ 5.41 ppm (1H, br s) assigned to the amide proton as previously reported [40]. The four olefinic methine signals were observed at δ 5.80, 6.24, 6.83 and 7.00 ppm (1H), as recorded for alkamides with double conjugations in position 2 and 5 [40]. By comparing the 1-H NMR data with previously published data [32,40], compound 3 was identified as: N-propylnona-2,5-dienamide.

DISCUSSION

Pellitory (*Anacyclus pyrethrum*) roots has been known since ancient times and has been and is used as medicinal plant applied – among other ailments – against cancer [8]. Of special pharmacological interest, pellitory produces several N-alkamides [14], which are secondary metabolites in plants. Because of their wide structural diversity, these compounds have attracted several research groups to study their pharmacological behaviours [41]. Numerous reports have dealt with the anesthetic, analgesic and anti-inflammatory, but also with the anticholinesterase, antidiabetic, antiparasitic, anticancer, molluscicidal, antiprotozoal and insecticidal activities of N-alkamides [36,41,42].

Among the multiple pharmacological effects of alkamides, its anticancer property is the most promising. Thus, many alkamides isolated from the Asteraceae and other botanical families were shown to exhibit *in vitro* cytotoxic activity against cancer cell lines [7,41,42].

Worth noting is the pellitorine (occurring in pellitory roots) has been shown to have strong cytotoxic activities against HL60 (Human promyelocytic leukemia strain) and MCT-7 (Brest cancer strain) cell lines, with IC50 values of 13.0 µg/mL and 1.8 µg/mL, respectively [43]. Piplartine and analogues have exhibited potent effects in human breast carcinoma MCF-7 cells, whilst being relatively non-toxic to non-tumorigenic MCF-10a cells [44,45]. Other alkamides, as capsaicin was reported to induce the apoptosis of prostate cancer cell lines [46], while pharnilatin did so for those of skin melanoma, as well as lung, ovary and colon [47]. These reports and many involving others alkamides, make these

type of compounds a relatively new and promising group of natural products as source of new anticancer agents [41].

BSL assay is recognized as a general test for bioactive compounds screening [19,48-53]. The technique is described as easily mastered, costs little, and utilizes small amount of test material [50]. Since its introduction in 1982, by Meyer and al. [30], it appears that BSL test is predictive of cytotoxicity and has been successively employed for bioassay-guided fractionation of active cytotoxic and antitumor agents as reported by several authors [48,52-56]. A significant correlation between the brine shrimp assay and *in vitro* growth inhibition of human solid tumor cell lines has been demonstrated by the National Cancer Institute (NCI, USA) [51].

In our toxicity evaluation of pellitory root's extracts (Pe, Ch, Ea, Me), the BSL test showed that the most of the nauplii mortality was localized in the ethyl acetate extract (Ea), which displayed an LC₅₀ = 249.3 µg/mL. This value is considered as "toxic" [30,31], and hence bioguided fractionation of Ea active extract of *Anacyclus pyrethrum* root was undertaken and revealed a highly cytotoxic fraction (F₁₁) with LC₅₀ of 42.5 µg/mL. Multistep purifications of the active (F₁₁) fraction have afforded four alkalimides (Figure 2): namely N-isobutyldeca-2,4-dienamide or pellitorine (I), N-propyldodeca-2,8-dienamide (II), N-isobutyltetradeca-2,4-dienamide (III) and N-propylnona-2,5-dienamide (IV). The compounds (I) and (III) were previously reported from *A. pyrethrum* roots and other species [14]. The two remaining alkalimides (II) and (IV) are isolated for the first time from pellitory, but were cited previously in the natural alkalimides database [41].

In our study, the BSL test appears to be effective in the detection of potentially toxic fractions containing N-alkalimides, such as pellitorine a well known cytotoxic agent [43]. Hence, our approach of using the *Artemia salina* mortality test to guide the fractionation of the pellitory root Ea extract was productive, and thus supports its appropriateness as a pre-screening tool for cytotoxic compounds.

CONCLUSION

Pellitory roots have been cited as a cancer remedy in folk medicine. Recent study have shown that pellitory alcoholic extract have cytotoxic activity against human colorectal cancer cell lines. Our study suggests that cytotoxic activity is localized in the ethyl acetate extract (Ea) of pellitory root, and this effect might be associated with the presence of alkalimides, pellitorine and its analogues (II-IV). Although pellitorine (I) has previously shown strong cytotoxic activities against human cancer cell lines, no studies have been reported on cytotoxic activities of other isolated compounds (II to IV). Subsequently, these alkalimides will be considered in future study as candidates for in depth *in vitro* evaluation of their cytotoxicity against cancer and normal cell lines. Finally, through this study, BSL assay demonstrate again its usefulness as bench-top assay in exploring plant extracts for cytotoxic compounds.

REFERENCES

1. Kishor KV, Lalitha GK. Pharmacognostical studies on the root of *Anacyclus pyrethrum* DC. *Indian Journal of Natural Products and Resources*. 2012;3:518-26.
2. Puri HS. *Rasayana – Ayurvedic herbs for longevity & rejuvenation*. Vol. 2. London: Taylor & Francis; 2003:20-1.
3. Sharma V, Thakur M, Chauhan NS, Dixit VK. Effects of petroleum ether extract of *Anacyclus pyrethrum* DC. on sexual behavior in male rats. *Journal of Chinese Integrative Medicine*. 2010;8(8):767-72.
4. Pahuja M, Mehla J, Reeta KH, Joshi S, Gupta YK. Root extract of *Anacyclus pyrethrum* ameliorates seizures, seizure-induced oxidative stress and cognitive impairment in experimental animals. *Epilepsy Research*. 2012;98(2-3):157-65.
5. Pahuja M, Mehla J, Reeta KH, Tripathi M, Gupta YK. Effect of *Anacyclus pyrethrum* on pentylenetetrazole-induced kindling, spatial memory oxidative stress and rho-kinase II expression in mice. *Neurochem Res*. 2013;38(3):547-56.
6. Veyser L, Taevernier L, Roche N, Peremans K, Burvenich C, De Spiegeleer B. Quantitative transdermal behavior of pellitorine from *Anacyclus pyrethrum* extract. *Phytomedicine*. 2014;21(14): 1801-07.
7. Usmani A, Khushtar M, Arif M, Siddiqui MA, Sing SP, Mujahid M. Pharmacognostic and phytopharmacology study of *Anacyclus pyrethrum*: an insight. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2016;6(3):144-50.
8. Singh A. *Compendia Of World's Medicinal Flora*. Boca Raton: CRC Press; 2006: 58-9.
9. Bellakhdar J. *La pharmacopée marocaine traditionnelle: Médecine arabe ancienne et savoirs populaires*. Paris: Ibis Press; 1997.
10. Boulos L. *Medicinal plants of North Africa*. Michigan: Reference Publications, Inc; 1983.
11. IUCN. *A guide to medicinal plants in North Africa*. Malaga: Centre for Mediterranean Cooperation; 2005.
12. Sujiet K, Darwin CR, Suba V. Antioxidant activity of ethanolic root extract of *Anacyclus pyrethrum*. *International Research Journal of Pharmacy*. 2011;2(12):222-6.
13. Singh DK, Nirwan S, Babbar SB. Micropropagation of *Anacyclus pyrethrum* and chemical profiling of the regenerated plants for pellitorine, the active principle. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 2015; 122(1):249-55.
14. Boonen J, Sharma V, Dixit VK, Burvenich C, De Spiegeleer B. LC-MS N-alkylamide profiling of an etanolic *Anacyclus pyrethrum* root extract. *Planta Med*. 2012;78:1784-95.
15. Hinz B, Woelkart K, Bauer R. Alkalimides from *Echinacea* inhibit cyclooxygenase-2 activity in human neuroglioma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007;360(2): 441-6.
16. Shahraki MR, Shahraki S, Arab MR, Shahrakipour M. The Effects of Aqueous Extract of *Anacyclus pyrethrum* on sperm count and reproductive organs in adult male rats. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*. 2015;17(2):42-6.
17. Mohammadi A, Mansoori B, Chaghakaboodi K, Baradaran B. Cytotoxic effects of *Anacyclus pyrethrum* plant extract in oral cancer cell (KB cell line). *J Urmia Univ Med Sci*. 2016;27(4): 257-65.
18. Mohammadi A, Mansoori B, Baradaran PC, Baradaran SC, Baradaran B. *Anacyclus Pyrethrum* extract exerts anticancer activities on the human colorectal cancer cell line (HCT) by targeting apoptosis, metastasis and cell cycle arrest. *J Gastrointest Cancer*. 2017;48(4):333-40.
19. McLaughlin JL. *Assays for bioactivity*. In: *Hostettmann K (Ed), Methods in Plant Biochemistry*, Vol.6, London: Academic Press; 1991:1-33.
20. Wagner H, Bladt S. *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. 2 edition. Berlin: Springer-Verlag; 2011.
21. Harborne JB. *Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plant analysis*. London: Chapman and Hall Ltd; 1984.
22. Bidau CJ, Amat AG, Yajia ME, Marti DA, Gimenez MD, Riglos AG and al. Evaluation of cytotoxic and mitodepressive activity of aqueous extracts from thirteen Argentine medicinal plants. *Acta Farm. Bonaerense*. 2006;25(4):555-9.

23. Lagnika L, Anago E, Sanni A. Screening for antibacterial, antioxidant activity and toxicity of some medicinal plants used in Benin folkloric medicine. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2011;5(5):773-7.
24. Syahmi AR, Vijayarathna S, Sasidharan S, Latha LY, Kwan YP, Lau YL and al. Acute oral toxicity and brine shrimp lethality of *Elaeis guineensis* Jacq., (oil palm leaf) methanol extract. *Molecules*. 2010; 15(11):8111-21.
25. Salawu KM, Ajaiyeoba EO, Ogbale OO, Adeniji JA, Faleye TC, Agunu A. Antioxidant, brine shrimp lethality and antiproliferative properties of gel and leaf extracts of *Aloe schweinfurthii* and *Aloe vera*. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*. 2017;23(4):1-10.
26. Pisutthanana S, Plianbangchang P, Pisutthanana N, Ruanruaya S, Muanrita O. Brine shrimp lethality activity of Thai medicinal plants in the family Meliaceae. *Naresuan University Journal*. 2004; 12(2):13-8.
27. Sahgal G, Ramanathan S, Sasidharan S, Mordi MN, Ismail S, Mansor SM. Brine shrimp lethality and acute oral toxicity studies on *Swietenia mahagoni* (Linn.) Jacq. seed methanolic extract. *Pharmacognosy Research*. 2010;2(4):215-20.
28. Hartl M, Humpf HU. Toxicity assessment of fumonisins using the brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay. *Food and Chemical Toxicology*. 2000;38(12):1097-102.
29. Hamidi MR, Jovanova B, Panovska TK. Toxicological evaluation of the plant products using brine shrimp (*Artemia salina* L.) model. *Macedonian Pharmaceutical Bulletin*. 2014;60(1):9-18.
30. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*. 1982;45(5):31-4.
31. Oladimeji HO, Nia R, Essien EE. *In vitro* antimicrobial and brine shrimp lethality potential of the leaves and stem of *Calotropis procera* (Ait). *African Journal of Biomedical Research*. 2006;9:205-11.
32. Rosario SL, Da Silva AJ, Parente JP. Alkamides from *Cissampelos glaberrima*. *Planta Med*. 1996;62(4):376-7.
33. Rios-Chavez P, Ramirez-Chavez E, Armenta-Salinas C, Torres-Molina J. *Acmella radicans* var. *radicans*: *In vitro* culture establishment and alkamide content. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 2003;39:37-41.
34. Wu S, Sun C, Pei S, Lu Y, Pan Y. Preparative isolation and purification of amides from the fruits of *Piper Longum* L. by upright counter – current chromatography and reversed – phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography*. 2004;1040(2):193-204.
35. Olah Z, Redei D, Pecze L, Vizler C, Josvay K, Forgo P and al. Pellitorine, an extract of *Tetradium daniellii*, is an antagonist of the ion channel TRPV1. *Phytomedicine*. 2017;34: 44-9.
36. Althaus JB, Kaiser M, Brun R, Schmidt TJ. Antiprotozoal activity of *Achillea ptarmica* (Asteraceae) and its main alkamide constituents. *Molecules*. 2014;19(5): 6428-38.
37. Cheng YB, Liu RH, Ho MC, Wu TY, Chen CY, Lo IW and al. Alkamides of *Acmella oleracea*. *Molecules*. 2015;20:6970-7.
38. Silveira N, Saar J, Santos AD, Barison A, Sandjo LP, Kaiser M and al. A new alkamide with an Endoperoxide structure from *Acmella ciliate* (Asteraceae) and its *in vitro* antiplasmodial activity. *Molecules*. 2016;21(6):765-70.
39. Elazzouzi H, Khenouchi S, Bentayeb A, Elhilali F, Zair T. Effets biocides des alcaloides extraits des racines d'*Anacyclus pyrethrum* L. (Asteracées) sur *Callosobruchus maculatus* (Fab.) (Coleoptera: Bruchidae). *International Journal of Innovation and Applied Studies*. 2015;13(4):756-74.
40. Chen Y, Fu T, Tao T, Yang J, Chang Y, Wang M and al. Macrophage activating effects of new alkamides from the roots of *Echinacea* species. *J. Nat. Prod*. 2005;68(5):773-6.
41. Boonen J, Bronselaer A, Nielandt J, Veryser L, De Tré G, De Spiegeleer B. Alkamid database: Chemistry, occurrence and functionality of plant N-alkylamides. *J Ethnopharmacol*. 2012;142 (3):563-90.
42. Rios MY. Natural Alkamides: Pharmacology, Chemistry and Distribution. In: *Drug Discovery Research in Pharmacognosy*, Omboon Vallisuta and Suleiman M. Olimat (eds). China: InTech; 2012:107-44.
43. Ee GC, Lim CM, Rahmani M, Shaari K, Bong CF. Pellitorine, a potential anti-cancer lead compound against HL60 and MCT-7 cell lines and microbial transformation of piperine from *Piper Nigrum*. *Molecules*. 2010;15(4):2398-404.
44. Bezerra DP, Pessoa C, de Moraes MO, Saker-Neto N, Silveira ER, Costa-Lotuf LV. Overview of the therapeutic potential of pipartine (piperlongumine). *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013;48(3):453-63.
45. Meegan MJ, Nathwani S, Twamley B, Zisterer DM, O'Boyle NM. Piperlongumine (Piplartine) and Analogues: Antiproliferative Microtubule-Destabilising Agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2017;125:453-63.
46. Luo XJ, Peng J, Li YJ. Recent advances in the study on capsaicinoids and capsinoids. *European Journal of Pharmacology* 2011;650:1-7.
47. Kim KH, Choi SU, Son MW, Lee KR. Two new phenolic amides from the seeds of *pharbitis nil*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2010;58:1532-5.
48. Carballo JL, Hernández-Inda ZL, Pérez P, García-Grávalos MD. A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnol*. 2002;2:17-21.
49. Harwig J, Scott PM. Brine shrimp (*Artemia salina* L.) larvae as a screening system for fungal toxins. *Appl Microbiol*. 1971;21(6): 1011-6.
50. McLaughlin JL, Rogers LL. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Information Journal*. 1988;32:513-24.
51. Anderson JE, Goetz CM., McLaughlin JL, Suffness M. A blind comparison of simple benchtop bioassay and human tumour cell cytotoxicities as antitumor prescreens. *Phytochem Analysis*. 1991;2:107-11.
52. Solís PN, Wright CW, Anderson MM, Gupta MP, Phillipson JD. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina*. *Plant Med*. 1993;59:250-2.
53. Mackeen MM, Ali AM, Lajis NH, Kawazu K, Hassan Z, Amran M and al. Antimicrobial, antioxidant, antitumour-promoting and cytotoxic activities of different plant part extracts of *Garcinia atroviridis* Griff. Ex T. Anders. *J Ethnopharmacol*. 2000;72:395-402.
54. Zhao G, Hui Y, Rupprecht JK, McLaughlin JL, Wood KV. Additional bioactive compounds and trilobacin, a novel highly cytotoxic acetogenin, from the bark of *Asimina triloba*. *Journal of Natural Products*. 1992;55:347-56.
55. Rieser MJ, Gu ZM, Fang XP, Zeng L, Wood KV, McLaughlin JL. Five novel mono-tetrahydrofuran ring acetogenins from the seeds of *Annona muricata*. *Journal of Natural Products*. 1996;59: 100-8.
56. Mongelli E, Pomilio AB, Sanchez JB, Guerra FM, Massanet GM. ent-Kaur-16-en-19-oic acid, a KB cells cytotoxic diterpenoid from *Elaeoselinum foetidum*. *Phytotherapy Research*. 2002;16:387-8

Résumé

Ce présent travail effectué sur trois plantes médicinales traditionnelles, vise à établir leurs profils phytochimiques et biologiques. Il s'agit des racines d'*Anacyclus pyrethrum* (L.) [Asteraceae]; des feuilles de *Pistacia lentiscus* (L.) [Anacardiaceae] et des feuilles d'*Acanthus mollis* (L.) [Acanthaceae]. Leurs potentiels antioxydant et cytotoxique a fait l'objet d'une évaluation sur des modèles *in-vitro* et *in-vivo*, en utilisant les tests de DPPH et la mortalité des larves (*Artemia salina*), respectivement. Le criblage phytochimique des extraits montre la richesse de ces espèces en métabolites appartenant à différents groupes de substances bioactives. Sur le modèle DPPH utilisé, les pouvoirs réducteurs des extraits méthanoliques des feuilles d'*Acanthus mollis* et *Pistacia lentiscus* se sont révélés largement supérieurs par rapport aux autres extraits et aussi nettement supérieur à celui de l'acide Ascorbique (antioxydant témoin). Ces extraits alcooliques potentiellement antioxydants ont exhibé des contenus importants en flavonoïdes totaux et tanins totaux de [03,397 ± 0,255 ; 03,152 ± 0,081(mg.eq.Q/g)] et [08,345 ± 0,090 ; 29,428 ± 0,378 (mg.eq.C/g)], respectivement. L'évaluation de la cytotoxicité des extraits des trois plantes, a révélé une toxicité importante des extraits d'éthyle acétate de *A. pyrethrum* et *P. lentiscus* avec des valeurs de CL₅₀ 249,259 et 136,990 µg / ml, respectivement. Le travail de criblage bioguidé de l'extrait d'éthyle acétate de *A. pyrethrum* a permis de séparer et d'identifier au moyen de méthode spectroscopique ¹H RMN plusieurs composés, en l'occurrence des 6 triterpènes à noyau fridélène et 4 alkamides, dont la pellitorine.

Mots clés : *Acanthus mollis* ; *Anacyclus pyrethrum* ; *Pistacia lentiscus* ; *Artemia salina* ; DPPH.

Abstract

This study is aimed to establish the phytochemical and biological profiles of three traditional medicinal plants : roots of *Anacyclus pyrethrum* (L.) [Asteraceae], leaves of *Pistacia lentiscus* (L.) [Anacardiaceae] and leaves of *Acanthus mollis* (L.) [Acanthaceae]. The antioxidant and cytotoxic potentials of extracts of these plants were evaluated using DPPH and Brine Scrimp larval mortality (*Artemia salina*) assays, respectively. Phytochemical screening shows the richness of these species in bioactive metabolites belonging to different natural groups. On the DPPH model used, the reducing powers of the methanolic extracts of the leaves of *A.mollis* and *P.lentiscus* were significantly higher compared to the other extracts and to that of ascorbic acid (positive control). These potentially antioxidant alcohol extracts exhibited significant total flavonoids and total tannins contents of [03.397 ± 0.255 ; 03.152 ± 0.081 (mg.eq.Q/g)] and [08.345 ± 0.090 ; 29.428 ± 0.378 (mg.eq.C/g)], respectively. Cytotoxicity evaluation of extracts of the three species revealed a high toxicity of both ethyl acetate extracts from *A. pyrethrum* and *P. lentiscus* with values of CL₅₀ 249,259 and 136,990 µg / ml, respectively. Cytotoxicity guided screening of acetate extract from *A. pyrethrum* led to the separation and identification using ¹H NMR of several compounds namely 6 triterpenes and 4 alkaloids, including pellitorin.

Keywords: *Acanthus mollis* ; *Anacyclus pyrethrum* ; *Pistacia lentiscus* ; *Artemia salina* ; DPPH.

ملخص:

تم هذا العمل على ثلاث نباتات تستعمل في الطب التقليدي من أجل إبراز المسار الكيميائي والبيولوجي، لهذا الغرض استعملنا جذور APY أوراق كل من PLE و AMO في تقييم الفعل المضاد للأكسدة باختبار DPPH وكذا اختبار السمية الخلوية داخل الكائن الحي .

وقد أظهر المسح الفتوكيميائية غنى الأنواع النباتية قيد الدراسة بالمواد الأيضية الثانوية، وقد تبين من خلال النتائج ان اختبار الأكسدة للجذور الحرة للمستخلصات الميثانولية لأوراق AMO و PLE أفضل بكثير مقارنة مع المستخلصات الأخرى كذا من المركب المرجعي فيتامين C .

أظهرت هذه المقتطفات الكحولية المضادة للأكسدة محتويات كبيرة في الفلافونون الكلي و العفص الكلي

(غ/ع - eq) 3.152 ± 0.081 ; 3.397 ± 0.255 و (غ/ع - c) 29.428 ± 0.378 , 8.345 ± 0.090

على التوالي :

تقييم السمية الخلوية لمستخلصات النباتات الثلاثة كشف عن سمية كبيرة لمستخلصات ايثيل الاسيتات من *A.pyrethrum* و *P.lentiscus* من قيم IC_{50} 249.259 و 136.950 ميكروغرام / مل على التوالي.

أتاحت أعمال الفرز ذات المستخلص ايثيل الاسيتات *A. pyrethrum* إمكانية الفصل وتحديد العددي عن المركبات باستخدام طريقة التحليل الطيفي بالزيت المغناطيسي النووي منها 6 تربينات من نواة فريديلين و 4 الكاميدات منها pellitorine

الكلمات المفتاحية :

.DPPH; *Artemia salina*; *Pistacia lentiscus* ; *Anacyclus pyrethrum* ; *Acanthus mollis*