

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



UNIVERSITE FRERES MENTOURI CONSTANTINE 1
FACULTÉ DES SCIENCES EXACTES
DÉPARTEMENT DE CHIMIE

N° d'ordre : 09/CH/2020

Série : 51/D3C/2020

THÈSE

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

Spécialité : Chimie organique

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

Par

NIHED DJEMAM

THÈME

**ETUDE PHYTOCHIMIQUE ET PHARMACOLOGIQUE
DE DEUX PLANTES SAHARIENNES**

Helianthemum Lippii et Cymbopogon schoenanthus

Devant le jury :

Pr. ZAMA Djamila	Université Frères Mentouri, Constantine1	Présidente
Pr. BENAYACHE Samir	Université Frères Mentouri, Constantine1	Directeur de thèse
Pr. BENAYACHE Fadila	Université Frères Mentouri, Constantine1	Rapporteuse pour la soutenance
Pr. BOUMAZA Ouahiba	Université Frères Mentouri, Constantine1	Examinatrice
Pr. ZELLAGUI Amar	Université Larbi Ben M'Hidi, Oum El Bouaghi	Examineur
Pr. MORATO Manuela	Université de Porto, Portugal	Examinatrice

18 Novembre 2020

اللَّهُمَّ صَلِّ وَسَلِّمْ وَبَارِكْ عَلَى سَيِّدِنَا مُحَمَّدٍ

Dedicace

اللهم لك الحمد الذي أنت أهله على
نعم ما كنت قط لها أهلاً متى أزددت
تفضلاً كأني « « تقصيراً تزيديني
بالتقصير أستوجب الفضلا

A mes chers parents qui ont été mon plus grand soutien, qui m'ont toujours soutenu contre vents et marées tout au long de mon existence. Merci de m'avoir encouragé dans les moments difficiles de ma vie et encore plus d'avoir cru en moi.

A mes chers frères qui m'ont tant aimé et soutenu Didou et Ramy

A la joie de notre famille Anes

A mon cher grand père Babali, qui attendait avec impatience ce jour-là. Que dieu te garde pour nous.

A l'âme de mes grands-mères et grand père

A mes tantes et oncles, cousins et cousines des familles Djemam et Kimouche

A mes chers amis et amies

A toute l'équipe Ness El Khir Constantine pour leur encouragement constant, merci d'avoir donné le souffle à ma vie.

A tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail, auxquelles je présente ma profonde gratitude.

A tous ceux qui sont présents dans mon cœur et que je n'ai pas pu citer.

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégés, et le fruit de votre soutien infailible

Remerciements

Je remercie Dieu d'avoir donné à l'homme le pouvoir de raisonner et d'exploiter les vérités de l'univers.

Ce travail de thèse a atteint son terme grâce à l'assistance et à la collaboration de nombreuses personnes. Je profite de cette occasion de gratitude et de reconnaissance pour remercier tous ceux qui de loin ou de près ont contribué.

En premier lieu, je tiens à remercier Monsieur Benayache Samir. Professeur au département de chimie, faculté des sciences exactes, Université Constantine1 directeur de l'unité de recherche Valorisation des ressources naturelles, molécules bioactives et analyses Physicochimiques et biologiques (VARENBIOMOL) d'avoir accepté de diriger et de suivre ce travail avec disponibilité, patience, bienveillance, et pour ses nombreux conseils qu'il a su me prodiguer tout au long de ce doctorat.

Ma profonde gratitude va à Madame Manuela Morato Professeur au laboratoire de pharmacologie à la faculté de pharmacie, Université de Porto. Elle a bien voulu diriger mes travaux d'étude pharmacologique en me faisant bénéficier de son expérience, de ses compétences, de sa sagesse, de ses encouragements, de ses conseils et en m'accordant la liberté et la confiance. Je tiens à la remercier au plus profond de mon cœur pour son soutien dans l'achèvement de ma thèse.

Sans Oublier l'aide précieuse de Mme. Céu Pereira et Mme. Mónica Caldas pour leur excellente assistance technique. Et Melle Mariana Gomes pour son amitié, son aide précieuse et son soutien constant.

Je remercie vivement Madame Benayache Fadila, Professeure au département de chimie, faculté des sciences exactes Université Constantine 1 directrice du laboratoire de phytochimie et analyses physicochimique et biologiques, de m'avoir fait l'honneur d'être la rapporteuse pour la soutenance, et pour l'intérêt qu'elle a porté à mon travail. Qu'elle soit assurée de ma profonde gratitude.

Je remercie également Madame Zama Djamila, Professeure à L'Université des frères Mentouri, Constantine 1, pour sa gentillesse et pour le grand honneur qu'elle me fait, en acceptant de présider le jury désigné pour ma thèse.

Je souhaite exprimer mes remerciements à Madame Boumaza Ouahiba Professeure à l'Université des frères Mentouri, Constantine 1, qui m'honore en acceptant de faire partie du jury de ma thèse.

Ma gratitude va également à Monsieur Zellagui Amar Professeur à l'Université Larbi Ben M'Hidi, Oum El Bouaghi, pour avoir aimablement accepté de juger ce travail.

Je remercie le Docteur Ignacio Brouard à l'Instituto des Productos Naturales y Agrobilogia, La Laguna, Tenerife. Pour son accueil dans son laboratoire ainsi que l'enregistrement des spectres RMN mono et bidimensionnelles.

Ma profonde reconnaissance et mes grands remerciements sont adressés au Professeure Sonia Piancente à Dipartimento di Farmacia, Universita Degli Studi di Salerno. De m'avoir accueillie dans son laboratoire en m'offrant tous les moyens pour réaliser mon travail, Madame Milena Maussulo pour l'enregistrement des spectres RMN ainsi l'identification des produits isolés. Sans oublier l'aide précieux de Melle Virginia Mirra.

Merci à tous mes collègues de l'unité de recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyse Phytochimiques et Biologiques.

Je voudrais aussi remercier toutes personnes ayant contribuées à la réalisation de cette thèse, toutes les personnes avec lesquelles j'ai travaillé ou simplement discuté. Elles ont toutes leur place ici.

Abbreviations et acronymes

ACh	Acétylcholine
AChE	Acétylcholinestérase
AcOEt	Acétate d'éthyle
AlCl₃	Chlorure d'aluminium
BuOH	Butanol
CCM	Chromatographie sur couche mince
CC	Chromatographie sur colonne
CHCl₃	Chloroforme
CDCl₃	Chloroforme deutéré
CD₃OD	Méthanol deutéré
CD₃COCD₃	Acétone deutérée
CO₂	Dioxyde de carbone
COSY	Correlated Spectroscopy
Cq	Carbone quaternaire
¹³C	Carbone 13
<i>d</i>	Doublet
<i>dd</i>	Doublet de doublets
<i>ddd</i>	Doublet de doublets de doublets
<i>dt</i>	Doublet de triplets
DEPT	Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	Diméthyl Sulfoxyde
DPPH	Diphenylpicrylhydrazyle
ESI	Electro-spray ionisation
EtOH	Ethanol
F	Fraction
Glu	Glucose
GC	Chromatographie phase gazeuse
GC-MS	Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse
GC-FID	Chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme
H₃BO₃	Acide borique
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance /pression
HMBC	Heteronuclear Multiple Bonding Connectivity
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
EC50	Concentration effet à 50%
δ	Déplacement chimique
<i>J</i> :	Constante de couplage
KCl	Chlorure de potassium
LC	Chromatographie en phase liquide
LC-MS	Une HPLC couplée avec la spectrométrie de masse
m	Multiplet
M	Masse
Me	Méthyle
<i>m/z</i>	Masse / charge électrique
<i>m</i>	Multiplet
NaOAc	Acétate de sodium

Abreviations et acronymes

NaOH	Hydroxyle de sodium
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
OH	Hydroxyle
OMe	Méthoxyle
Rf	Facteur de retardement
RMN ¹H	Résonance magnétique nucléaire du proton
RMN ¹³C	Résonance magnétique nucléaire du carbone treize
ROESY	Rotational Frame Overhauser Effect Spectroscopy
RP-HPLC :	HPLC avec une colonne phase inverse
s:	Singulet
SiO₂	Silice
SM	Spectroscopie de masse
SMIE	Spectrométrie de masse sous impact électronique
t	Triplet
td	Triplet de doublets
t_R	Temps de rétention
UV	Ultraviolet
UV-B	Ultraviolet (315-280 nm)
δ_H	Déplacement chimique du proton
δ_C	Déplacement chimique du carbone

Les unités couramment utilisées sont citées ci-dessous :

Hz	Hertz
MHz	Méga Hertz
mM	Millimolaire
ppm	Partie par million
µg	Microgramme
µg EQ/mg d'extrait	Microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait
µg EAG/mg d'extrait	Microgramme d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait
µM	Micromolaire

SOMMAIRE

Introduction générale.....	1
Chapitre I : Synthèse bibliographique	
1. Introduction.....	5
2. Etude bibliographique de la première espèce	5
2.1. Description de la famille des <i>Cistaceae</i>	5
2.1.1. Répartition géographique.....	5
2.1.2. Description botanique.....	6
2.1.3. Classification botanique.....	7
2.1.4. Utilisation en médecine traditionnelle.....	8
2.1.5. Activité biologique.....	9
2.2. Description du genre <i>Helianthemum</i>	9
2.2.1. Répartition géographique.....	9
2.2.2. Description botanique.....	10
2.3. Propriétés biologiques et pharmacologiques.....	11
2.3.1. Utilisation en médecine traditionnelle.....	11
2.3.2. Activités biologiques.....	12
2.4. Investigations phytochimiques.....	13
3. Etude bibliographique de la deuxième espèce.....	22
3.1. Description de la famille des <i>Poaceae</i>	22
3.1.1. Répartition géographique.....	22
3.1.2. Description botanique.....	27
3.1.3. Classification botanique.....	24
3.2. Description du genre <i>Cymbopogon</i>	25
3.2.1. Répartition géographique.....	25
3.2.2. Description botanique.....	25
3.3. Propriétés biologiques et pharmacologiques.....	27
3.3.1. Utilisation en médecine traditionnelle.....	27
3.3.2. Activités biologiques.....	30
a) Activité antioxydante.....	30
b) Activité antimicrobienne.....	30
c) Activité anti-acétylcholinestérase.....	30
d) Effet protecteur.....	30
e) Effets anthelminthiques et insecticides.....	31
f) Dose.....	33
3.4. Propriétés pharmacologiques.....	34
3.5. Investigations phytochimiques.....	36
3.6. Etudes de la composition des huiles essentielles.....	42
4. Conclusion.....	46

Chapitre II : Etude phytochimique

1. Introduction.....	48
2. Investigation phytochimique de l'espèce <i>Helianthemum lippii</i>	48
2.1. Critères de choix de la matière végétale.....	48
2.2. Place dans la systématique botanique.....	48
2.3. Description botanique de l'espèce.....	49
2.4. Distribution géographique.....	50
2.5. Usage en médecine traditionnelle.....	51
2.6. Protocole expérimental.....	51
2.6.1. Récolte du matériel végétale.....	51
2.6.2. Extraction.....	51
2.6.3. Matériels et méthodes chromatographique utilisés pour l'étude phytochimique.....	54
2.6.4. Etude phytochimique de l'extrait Chloroforme.....	55
2.6.4.1. Fractionnement de la phase chloroforme.....	55
2.6.4.2. Purification des fractions de la phase chloroforme.....	57
a) Etude de la fraction F5-2.....	57
3. Investigation phytochimique de l'espèce <i>Cymbopogon schoenanthus</i>	57
3.1. Critères de choix de la matière végétale.....	57
3.2. Place dans la systématique botanique (Quezel et Santa 1962).....	58
3.3. Description botanique de l'espèce.....	58
3.4. Distribution géographique.....	59
3.5. Usage en médecine traditionnelle.....	59
3.6. Protocole expérimental.....	60
3.6.1. Récolte du matériel végétale.....	60
3.6.2. Extraction.....	60
3.6.3. Etude phytochimique du Précipité des racines.....	64
3.6.3.1. Fractionnement du précipité.....	64
3.6.3.2. Séparation des composés du précipité des racines.....	66
a) Etude de la fraction FP-15.....	67
b) Etude de la fraction FP-17 (proportion 1).....	68
c) Etude de la fraction FP-17 (proportion 2).....	69
d) Etude de la fraction FP-20.....	69
4. Conclusion.....	70

Chapitre III : interprétation des résultats

1. Introduction.....	71
2. Elucidation structurale des produits isolés de l'extrait chloroforme de <i>Helianthemum lippii</i>	71
2.1. Elucidation structurale du composé 1 et 2.....	71

3. Elucidation structurale des produits isolés du précipité des racines de <i>Cymbopogon schoenanthus</i>	74
3.1. Elucidation structurale du composé (3)	74
3.2. Elucidation structurale du composé (4)	82
3.3. Elucidation structurale du composé (5)	90
3.4. Elucidation structurale du composé (6)	94
4. Conclusion.....	99

Chapitre IV : Analyse chromatographique

1. Etude de la composition des huiles essentielles de <i>Cymbopogon schoenanthus</i>	101
1.1. Matériels et méthodes.....	101
a) Matière végétale.....	101
b) Extraction de l'huile essentielles.....	101
c) Analyse par GC.....	101
d) Analyse par GC-MS.....	102
1.2. Résultats et discussion.....	102
1.3. Conclusion.....	106
2. Analyse des extraits par HPLC-TOF/MS.....	107
2.1. Matériels et méthodes.....	107
2.2. Résultats et discussion.....	108
2.3. Conclusion.....	111

Chapitre V : Etude pharmacologique

1. Introduction.....	112
2. Etude de l'activité biologique.....	112
2.1. Matériels et méthodes.....	112
2.2. Evaluation de l'activité proliférative (Efficacité d'inhibition des dommages à l'ADN).....	112
2.3. Évaluation de l'activité anticancéreuse à l'aide du système xCELLigence.....	113
2.3.1. Culture cellulaire et préparation de la suspension cellulaire.....	113
2.3.2. Préparation de solutions d'extraits.....	113
2.3.3. Préparation de E-Plate 96 et traitement.....	113
2.4. Résultats et discussion.....	114
2.4.1. Evaluation de l'activité antioxydante.....	114
2.4.2. Evaluation de l'activité anticancéreuse.....	116
2.4.2.1. <i>Helianthemum lippii</i>	116
2.4.2.2. <i>Cymbopogon schoenanthus</i>	118
2.5. Conclusion.....	119
3. Etude pharmacologique.....	120
3.1. Côlon distal.....	121
3.3.1. Anatomie.....	121
3.1.2. Contraction du muscle lisse colique.....	122
3.2. Matériels et méthodes.....	123

3.2.1. Produits chimiques et préparation des solutions.....	123
3.2.2. Animaux et préparations de tissus.....	124
3.2.3. Préparation des extraits.....	124
a) Extraits de <i>Helianthemum lippii</i>	124
b) Extraits de <i>Cymbopogon schoenanthus</i>	125
3.3. Protocole expérimental.....	125
3.4. Analyse statistique.....	126
3.5. Résultats.....	126
3.5.1. Résultats des extraits de <i>Helianthemum lippii</i>	126
3.5.1.1. Effet des extraits sur le ton basal du côlon distal.....	126
3.5.1.2. Effet des extraits sur la précontraction induite par KCl.....	127
3.5.1.3. Effet des extraits sur la précontraction induite par Ach.....	128
3.5.2. Résultats des extraits de <i>Cymbopogon schoenanthus</i>	130
3.5.2.1. Effet des extraits sur le ton basal du côlon distal.....	130
3.5.2.2. Effet des extraits sur la précontraction induite par KCl.....	133
3.5.2.3. Effet des extraits sur la précontraction induite par Ach.....	135
3.6. Discussion.....	138
3.6.1. <i>Helianthemum lippii</i>	140
3.6.2. <i>Cymbopogon schoenanthus</i>	
3.7. Etude de comparaison de l'effet sur le colon distal entre les extraits AcOEt et <i>n</i> -BuOH de <i>H. lippii</i> et <i>C. schoenanthus</i>	142
3.7.1. Effet sur le ton basal du colon distal.....	142
3.7.2. Effet sur la précontraction induite par KCl 50 mM et Ach (1-3 µM).....	143
3.7.3. Analyse de la variance bidirectionnelle pour la détection d'interaction entre les extraits.....	145
3.7.4. Evaluation de l'effet des composés majeurs identifiés dans les extraits.....	146
3.7.5. Discussion des résultats.....	149
3.8. Conclusion.....	151
Conclusion générale	186
Références bibliographiques.....	155
Annexe I.....	169
Annexe II.....	170
Annexe III.....	171
Annexe IV.....	172
Annexe V.....	173
Données complémentaires.....	174
Résumé	185

INTRODUCTION

GENERALE

Introduction générale

Depuis des dizaines d'années, les scientifiques et l'industrie pharmaceutique ont utilisé des produits naturels (NP) comme source de recherche de nouveaux médicaments ou de leurs précurseurs, visant à traiter des maladies ou des symptômes qui n'ont pas encore été traités efficacement (1).

Entre 2005 et 2010, la Food and Drug Administration (FDA) et l'Agence européenne des médicaments (EMA) ont approuvé 19 médicaments dérivés de produits naturels, tels que Trabectedin (Yondelis TM) et Cannabidol (Sativex®), pour le cancer et le traitement des douleurs, respectivement (2).

La phytothérapie est l'une des plus anciennes formes de soins de santé connues de l'homme. Environ la moitié des médicaments approuvés de 1998 à 2007 sont basés sur des produits naturels et treize médicaments liés aux produits naturels ont été approuvés de 2005 à 2007 (3).

Bien que la médecine moderne soit bien développée presque partout dans le monde, une proportion non négligeable de la population dans les pays en développement compte encore sur les tradipraticiens, les plantes médicinales et les médicaments à base de plantes pour leurs soins de base.

En outre, au cours des décennies passées, l'intérêt public pour les thérapies naturelles a considérablement augmenté dans les pays industrialisés, en même temps que l'utilisation des plantes médicinales et des médicaments à base de plantes (4).

Les plantes médicinales sont importantes pour la recherche pharmacologique et l'élaboration des médicaments, non seulement lorsque les constituants des plantes sont utilisés directement comme agents thérapeutiques, mais aussi comme matières premières pour la synthèse de médicaments ou comme modèles pour les composés pharmacologiquement actifs.

En vue d'assurer la conservation et la disponibilité de ces plantes pour l'avenir, la réglementation de leur exploitation et de leur exportation est essentielle, tout comme la coopération et la coordination au niveau international (5).

Les métabolites secondaires des plantes n'ont aucun rôle fondamental dans le maintien des processus de vie de la plante elle-même, mais ils sont importants pour que la plante interagisse

Introduction générale

avec son environnement pour l'adaptation et la défense. Cependant, nous commençons à comprendre le rôle crucial joué par eux dans la croissance et le développement des plantes. Dans les plantes supérieures, une grande variété de métabolites secondaires est synthétisée à partir de métabolites primaires (par exemple des glucides, des lipides et des acides aminés). Ils sont nécessaires à la défense des plantes contre les herbivores et les agents pathogènes. Souvent, ils peuvent conférer une protection contre les stress environnementaux (6).

Pour beaucoup de plantes médicinales d'intérêt courant, l'un des principaux axes de recherche à ce jour est le domaine de la phytochimie, la pharmacognosie et l'horticulture. Dans le domaine de la phytochimie, les plantes ont été étudiées pour leurs métabolites bioactifs qui ont été séparées et soumises à des analyses structurales détaillées. La recherche dans la pharmacognosie des plantes médicinales a impliqué également des essais de bioactivité, identification de mode d'action potentiel et le ciblage des sites des composés bioactifs (7).

L'Algérie chevauche entre deux empires floraux : l'Holarctis (Situé en Europe, une grande partie en Asie, l'Amérique du Nord et également au nord de l'Afrique) et le Paleotropis (couvre une grande partie de l'Afrique à l'exception de ses extrémités nord et au sud du continent, l'Inde, l'Asie du sud et l'Indonésie. Cette position lui confère une flore très diversifiée par des espèces appartenant à différents éléments géographiques.

Sur les 3139 espèces (5402 taxons en comptant les sous espèces, les variétés et les formes) décrites par Quezel et Santa (1962) (8) dans la nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Zeraia (1983) (9) dénombre 289 espèces assez rares, 647 rares, 640 très rares, 35 rarissimes et 168 endémiques (8).

La médecine traditionnelle basée sur l'utilisation des plantes médicinales pour le traitement de nombreuses maladies, continue à être utilisée, et au cours de ces dernières années sa popularité n'a fait qu'augmenter. Les pratiques de la médecine traditionnelle varient grandement d'un pays à l'autre et d'une région à l'autre.

A l'heure actuelle, la recherche de nouveaux médicaments d'origine naturelle passe par l'inventaire des plantes et l'examen systématique de leur activité biologique. Un des guides du chimiste dans la problématique d'une recherche phytochimique est la recherche de l'empirisme et plus particulièrement aux usages traditionnels liés aux activités humaines

Introduction générale

En outre, les sols sahariens composés d'un substrat minéral développent une activité microbienne. Ainsi conçues, les plantes médicinales sahariennes pourraient posséder des molécules antibactériennes et antifongiques à spectre d'action intéressant.

Notre travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation de la flore locale d'intérêt thérapeutique, utilisée en médecine traditionnelle. C'est dans cette optique que se place ce présent travail. En se basant sur les résultats d'une enquête ethnopharmacologique effectuée auprès de la population autochtone de la région de Béchar nous avons choisi deux plantes pour notre étude.

La méthode globale de travail que nous avons adoptée, est basée sur une action pluridisciplinaire, visant une valorisation des plantes sahariennes et permettant de relier conformément les éléments d'information apportés par les ethnobotanistes, au travail des chimistes et des biologistes. Les deux plantes que nous avons retenues sont *Helianthemum lippii* et *Cymbopogon schoenanthus*.

Le choix de ces deux plantes a été guidé d'une part par les indications d'usage traditionnel, et d'autre part par le fait qu'*Helianthemum Lippii* n'a pas fait l'objet d'investigations chimiques et biologiques, quant à *Cymbopogon schoenanthus* seulement l'étude de la composition de ses huiles essentielles a été reportée dans la littérature.

Notre manuscrit rapporte les travaux réalisés répartis en cinq chapitres :

Le premier chapitre est consacré à un rappel bibliographique concernant les deux familles Cistaceae et Poaceae, ainsi que leur utilisation en médecine traditionnelle.

Le chapitre décrira les différentes familles des métabolites secondaires isolés des deux familles Cistaceae et Poaceae. Notamment les flavonoïdes, les sesquiterpènes et les composés phénoliques.

Le second chapitre comprend l'étude phytochimique de *Helianthemum lippii* (Cistaceae) et *Cymbopogon schoenanthus* (Poaceae). Nous aborderons les étapes de cette investigation commençant par la macération, le fractionnement, jusqu'à la purification des produits isolés.

Ensuite on reportera dans le troisième chapitre les résultats obtenus suivis de discussions, concernant les produits isolés ; Ces études combinent les résultats d'analyse par RMN ¹H et ¹³C, RMN 2D, (COSY, HSQC, HMBC).

Introduction générale

Au quatrième chapitre nous aborderons l'étude de la composition des huiles essentielles de *Cymbopogon schoenanthus*, on reportera ensuite les résultats d'une analyse HPLC-TOF / MS des extraits AcOEt et *n*-BuOH des deux espèces.

On termine avec un dernier chapitre concernant l'étude pharmacologique. Tout d'abord, nous décrirons l'évaluation et la recherche d'activité des extraits AcOEt et *n*-BuOH : l'activité antioxydante (efficacité d'inhibition des lésions de l'ADN), ainsi que l'activité anticancéreuse à l'aide du système xCELLigence. Ensuite on déterminera l'effet des différents extraits ; effectuée sur les tissus du côlon distale chez les rats femelles Wistar. Dans lequel on évalue l'effet des extraits sur le ton basal du muscle, sur le muscle précontracté avec KCl 50mM et Ach (1-3 μ M), et on termine par une étude de comparaison entre les extraits AcOEt et *n*-BuOH de *C. schoenanthus* et *H. lippii* en essayant de déterminer les principaux composants responsables de cet effet.

L'ensemble des résultats de nos travaux est terminé par une conclusion générale.

CHAPITRE I

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Introduction

Bremness et al ; disaient dans leur livre les plantes aromatiques et médicinales que “ Les plantes nous relient au passé, au présent et à l’avenir. Nous les associons à des appétissantes nourritures, à des savoirs utiles, à des histoires mystérieuses et à des pratiques sacrées. Chaque élément à cette tapisserie colorée avive les autres mais, sous les fils, la trame est verte. Car la plante est à l’origine de tout ce charme “. (10)

La botanique expose la fonction de chaque partie de la plante, et la chimie analyse ses composants pour isoler ses principes actifs (11). Une étude approfondie sur ces plantes nous aidera à identifier leurs composants actifs et comprendre leurs mécanismes d’action responsables des activités biologiques et la raison qui justifie leur utilisation en médecine traditionnelle.

2. Etude bibliographique de la première espèce

2.1. Description de la famille des *Cistaceae*

2.1.1. Répartition géographique

La famille des Cistacées est une famille de plantes dicotylédones originaire du bassin méditerranéen d’Asie occidentale, d’Afrique du nord, et secondairement des Amériques. Elle est classée dans l’ordre des Violales puis dans celui des Malvales (12) qui regroupe 8 genres renfermant environ 200 espèces : *Helianthemum*, *Cistus*, *Crocantemum*, *Fumana*, *Halimium*, *Hudsonia*, *Lechea* et *Tuberaria* (13-15).

Tableau I.1 : les genres *Helianthemum*, nombre d’espèces et leurs distributions

Genre	Nombre d’espèces	Distribution	References
<i>Helianthemum</i>	≈ 110	Europe centrale et méridionale, Russie, Asie centrale, Afrique du Nord (Algérie, Maroc, Tunisie, Lybie...) et peu en Amérique	(14, 16, 17)
<i>Cistus</i>	≈ 21 espèces	Europe méridionale principalement dans les régions méditerranéennes, en Afrique du Nord	(14, 15, 18-20)
<i>Fumana</i>	≈ 9 espèces	Toute l’Europe méridionale et les régions méditerranéennes	(15, 21, 22)

<i>Halimium</i>	≈ espèces	8	Europe méridionale, Afrique du Nord occidentale et principalement dans la région méditerranéenne occidentale	(15, 23, 24)
<i>Hudsonia</i>		2 espèces	Amérique du Nord	(15, 25, 26)
<i>Tuberaria</i> (= <i>Xolantha</i>)	≈ espèces	12	Répartie en Europe occidentale et méridionale du Nord, et principalement dans les régions méditerranéennes	(15, 27-29)
<i>Crocanthemum</i>	≈ espèces	20	La cote atlantique des deux Amériques, Californie, Mexique	(15, 26)

On peut trouver à l'état spontané et en horticulture des hybrides de *Cistus*, d'*Helianthemum*, d'*Halimium* à fleur et couleur diverse de même entre les deux taxons *Cistus* et *Halimium* qui sont placés dans le genre hybride *Halimiocistus* (30-32).

2.1.2. Description botanique

La famille des Cistacées est l'une des plus difficiles à étudier du point de vue phytochimique. Son nom provient de celui des Cistes donné à ces plantes par Joseph Pitton de Tournefort du mot grec : « kisthos » signifiant capsule (33, 34).

Les études les plus importantes sur cette famille sont celles de Willkomm (35), Grosser (36) et Janchen (37). Engler & Prantl (38) a cité les Cistaceae à l'ordre Parietales, étroitement lié aux Tamaricaceae et aux Bixaceae. Hutchinson (39) a assigné Cistaceae à l'ordre Bixales, ce qui suggère une relation plus étroite avec Urticales et Thymelaeales. Takhtajan (40, 41) et Tutin et al. (42) a renvoyé les Cistaceae à Violales, en rapportant celles-ci à Theales et Passiflorales. Pour l'instant, il n'y a pas d'accord général sur la façon de subdiviser la famille. Willkomm (35) l'a divisé en deux sous-familles, les Cistoideae et les Lechidioideae sur la base de la structure des organes reproducteurs. À son tour, la sous-famille de Cistoideae a été subdivisée en plusieurs tribus et sous-tribus, avec des genres propres. Janchen (37) a divisé la famille en trois tribus (Cistaceae, Hudsonieae et Lichidieae).

Dans la «Flore de l'URSS», la famille Cistaceae a été traitée par Yuzepchuk (43) qui a accepté le système par Janchen(37) comme la tentative la plus réussie et a donc adhéré à elle en subdivisant les genres en sous-genres et en sections.

Les tribus Hudsonieae et Lichidieae sont monotypes; La tribu Cistaceae se compose de deux sous-tribus, à savoir Cistinae, contenant les genres *Cistus*, *Halimium*, *Crocanthemum*, *Tuberaria* et *Helianthemum*, et *Fumanina*, contenant un genre, *Fumana* (39).

Dans le nouveau système de Takhtajan (44). Cistaceae, Bixaceae et Cochlosperniaceae, qui sont liées non seulement par la structure de leurs fleurs, leurs grains de pollen et leur xylème secondaire, mais aussi par l'anatomie de leurs graines, sont considérés comme un ordre séparé Bixales (ou Cistales s.str.) Dans le superordre Malvanae. Takhtajan a reconnu trois tribus : Cisteae (*Cistus*, *Halimium*, *Crocanthemum*, *Tuberaria*, *Helianthemum*, *Fumana*), Hudsonieae (*Hudsonia*) et Lechidieae (*Lechea*) dans les Cistaceae familiales.

Elles sont arbustives ou herbacées pérennes ou annuelles poilues ou velues, avec un réceptacle en forme de cône surbaissé, portant de bas en haut périanthe, l'androcée et le gynécée. Portant des feuilles (28, 33) souvent opposées, entières, ou ordinairement stipulées ; des fleurs axillaires ou terminales, solitaires, en épis ou arrangées en cymes (inflorescence simple partant du même point) racémiformes ou paniculiformes. Leur calice (enveloppe extérieure de la fleur) est à trois ou cinq divisions très profondes, tantôt égales, tantôt inégales, a préfloraison contournée ; leur Corolle (enveloppe intérieur de la Fleur) à cinq pétales libres très caduques est très délicates, étalées en rose et sessiles, également contournées, mais généralement sens inverse du calice (13, 21, 30, 45).

2.1.3. Classification botanique : Selon GUIGNARD,(46)

Tableau.I.2 : Classification botanique de la famille des Cistaceae

Classification	
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Eudicots ou Eudicotylédones
Sous classe	Rosidées (Eurosidées)
Ordre	Malvales
Famille	Cistaceae
Genres	<i>Helianthemum</i>
Espèces	sp.

2.1.4. Utilisation en médecine traditionnelle

Toutes les Cistacées (surtout *Cistus*) sont fréquemment employées en médecine traditionnelle pour leurs propriétés analgésiques, antimicrobiennes, antitumorales, antivirales, anti-inflammatoires, antifongiques, anti-ulcéreuses, antioxydantes, neurotoniques et régulatrices du système nerveux parasympathique et gastroprotectrices (47-49). Elles sont aussi utilisées pour traiter les lésions cutanées.

Certaines espèces secrètent à la surface des feuilles et des rameaux des huiles essentielles (33) comme le ladanun ou labdanum ; jadis utilisées en médecine traditionnelle et considérées comme un remède puissant, stimulant, résolutif, cicatrisant, antiulcéreux, anticatarrhal emménagogue (33, 50).

Aujourd'hui, le labdanum est utilisé en cosmétique pour son action anti-âge. L'huile essentielle de ciste contribue à ralentir l'apparition des rides. Elle a aussi des propriétés excellentes pour une régénération rapide des cellules de la peau. Les espèces les plus utilisées sont : *C. ladanifer*, *C. monspeliensis* et *C. creticus* (33, 50, 51)

Les fleurs et les feuilles d'*Halimium halimifolium* sont utilisées en médecine traditionnelle comme tisane pour calmer les contractions chez la femme enceinte et traiter les douleurs gastro-intestinales (24).

En Algérie et au Maroc, les feuilles de *C. albidus* L. sont utilisées comme agent digestif et consommées sous forme de tisanes (52).

En Allemagne, des préparations d'extraits de feuilles de *C. creticus* administrées à des patients atteints de borréliose semblent avoir un effet antibactérien (53).

En Espagne, les infusions de feuilles et de fleurs de *C. ladanifer* sont un remède pour les maux d'estomac, la diarrhée, l'inflammation, et pour nettoyer les blessures. Les extraits foliaires de *C. clusii* sont utilisés pour renforcer les cheveux (54).

En Turquie, les feuilles de *C. salviifolius* sont digérées sous forme d'infusion pour combattre le cancer (47).

Autres utilisations :

En artisanat, les branches dures de *C. ladanifer* sont utilisées dans la fabrication d'outils ou de pièces de menuiserie (Tabourets, ...etc) et également comme bois de chauffage.

Les graines pilées de la plupart des cistes sont consommées dans les compagnes marocaines, comme amuse-gueule et utilisées comme chapelure dans la préparation des gâteaux (52).

2.1.5. Activité biologique

Toutes les espèces de la famille Cistaceae sont fréquemment employées dans la médecine traditionnelle pour leurs propriétés antimicrobiennes, antitumorales, antivirales, anti-inflammatoires, antifongiques, antiulcers, antioxydantes, et activités spasmolytiques et hypotensives (55, 56).

Les extraits de *C. villosus* présentent une activité antimicrobienne plus intéressante que ceux de *C. monspeliensis* sur *Staphylococcus aureus* et *Candida glabrata* (55).

2.2. Description du genre *Helianthemum*

2.2.1. Répartition géographique

Tableau.I.3 : Répartition géographique des espèces du genre *Helianthemum* en Algérie

Espèces	Localisation	Références
<i>H.aegyptiacum, H. racemosum</i>	Tell Algérien	(16)
<i>H. apertum</i>	Atlas saharien oranais (sud de Tlemcen, Naama...), hauts plateaux Algériens.	(16, 57, 58)
<i>H. cinereum</i>	Grande kabylie, Sahel, Hauts plateaux, et l'Atlas saharien oranais, hauts plateaux algérois	(16, 59)
<i>H. guttatum</i>	Régions semi-arides d'Algérie, Sahel oranais ; la grande et petite kabylie.	(16, 60-62)
<i>H. ellipticum</i>	Sahara septentrional et central	(16, 63)
<i>H. hirtum</i>	Steppes pierreuses des hauts plateaux et du Sahara (Naama, El Bayadh...)	(16)
<i>H. kahiricum</i>	Sahara septentrional (Pâturages rocaillieux désertiques)	
<i>H. ledifolium</i>	Clairières des forêts, champs incultes, pâturages (Mostaganem, Oran...)	(64-66)
<i>H. lippü</i>	Sahara septentrional et central	(16)
<i>H. pilosum, H. origanifolium</i>	Sahel d'Oran	

<i>H. polyanthum</i>	Atlas tellien algérois et oranais	(16, 59)
<i>H. pomeridianum</i>	Sahel d'Oran	(16, 62)
<i>H. salicifolium</i>	Secteurs algérois, oranais et du Sahara septentrional (Biskra)	(16)
<i>H. sanguineum</i>	Tell constantinois, Atlas tellien algérois, Sahel oranais	(16, 59)
<i>H. squamatum</i>	Tell constantinois, Oran	(16)
<i>H. virgatum</i>	Secteur oranais	(16, 57, 59)
<i>H. viscarium</i>	Terrains arides du littoral	(16, 59)

2.2.2. Description botanique

Le genre *Helianthemum* a un aspect qui le rapproche des cistes, les feuilles non dentées pouvant être stipulées ou non, un calice à 5 sépales. Les fleurs à 5 pétales jaunes, blanches ou rouges à aspect assez chiffonné comme de la soie fripée moins fugaces et plus fragiles que celles des cistes, elles ne durent au maximum que huit à dix heures. Les sépales, sont persistants et restent quelquefois pendant toute la mauvaise saison. La floraison est souvent estivale mais peut être parfois plus précoce et démarre en avril. Ses étamines sont nombreuses, et toutes fertiles (16, 32, 67, 68).

Les hélianthèmes (nommés aussi fleurs du soleil, Herbe d'or ou Hyssope de garrigue) sont des petits arbustes, sous-arbrisseaux ou herbacées pérennes ou annuelles. Leur nom vient du grec « helios » qui veut dire soleil et « anthos » signifiant fleur. Les hélianthèmes sont également des plantes du soleil par leur milieu de vie et ce n'est qu'en pleine lumière que leurs fleurs s'ouvrent (69-71).

Selon Quezel et Santa (1963) (72), les espèces d'hélianthèmes sont appelées aussi « Ergiga », « Fegga », « Serd », « Zefzel » et les espèces annuelles « Qecis el terfas », « Oum el terfas ». Environ 40 espèces sont présentes en Algérie, les plus communes sont indiquées dans le Tableau.I.3.

Le genre *Helianthemum* comprend environ 110 espèces ligneuses, chaméphytiques (17) ; réparties surtout dans le bassin méditerranéen (13, 73) souvent de façon grégaire dans des prairies basiques, chaudes et même sèches ou sur des sols sablonneux, rocailleux dans les montagnes. Toutefois, certaines espèces ont une distribution plus excentrique, les unes vers l'Asie centrale : *H. songoricum*), les autres vers le nord de l'Europe : *H. nummularium*, *H.*

oelandicum, au nord de l'Afrique et à l'Ouest de l'Asie *H. lippii*, au Canada *H. canadense* (74, 75).

2.3. Propriétés biologiques et pharmacologiques

2.3.1. Utilisation en médecine traditionnelle

Comparativement à d'autres espèces, *H. glomeratum* a montré des effets antibactériens, antiprotozoaires et anti-giardiales, pour traiter les troubles gastro-intestinaux comme les diarrhées et les dysenteries (76, 77). Concernant l'activité antioxydante, cette propriété a été prouvée par la littérature chez *H. ledifolium* (78).

Les taxons d'*Helianthemum* (Cistaceae) ont traditionnellement servi de remède naturel à la médecine traditionnelle par les habitants de l'Espagne et des Amériques. Les taxons sont des sous-arborescences à feuilles persistantes ou semi-persistantes qui sont largement distribués dans les régions tempérées et subtropicales de l'hémisphère nord, avec le centre de la diversité dans la région méditerranéenne. Les feuilles et les fleurs de différents taxons d'*Helianthemum* sont traditionnellement utilisés comme anti-inflammatoires, anti-ulcéreux, antiparasitaires, antimicrobiens, analgésiques, cytotoxiques et vasodilatateurs et pour soigner les plaies. (79-83)

Ces plantes sont ingérées comme des décoctions et des thés pour des problèmes gastro-intestinaux. Elles sont également transformées en pommades et appliquées directement sur les plaies ou les brûlures infectées (84).

Cependant, le nombre d'études phytochimiques et biologiques rapportées sur les taxons d'*Helianthemum* dans le bassin méditerranéen est encore limité. Les feuilles de *H. cinereum* subsp. *Rotundifolium*, *H. Hirtum*, *H. apenninum*, *H. marifolium* subsp. *marifolium*, *H. marifolium* subsp. *origanifolium* et *H. syriacum*, sont utilisées dans des préparations médicinales traditionnelles en Espagne, contre diverses affections y compris les traitements contre les brûlures, la cicatrisation et les affections liées à l'estomac (79, 85), qui comprennent la diarrhée et la gastro-entérite. Parmi ces taxons, *H. cinereum* subsp. *rotundifolium* et *H. syriacum* sont largement utilisés comme infusions digestives connues sous le nom de « té de monte » (thé de montagne) et « té moro o té de campo » (thé moulu ou thé de champ), respectivement (86).

Une autre espèce, *H. glomeratum*, une herbe médicinale endémique qui a gagné en popularité avec le nom « cenicilla », a été utilisée pour traiter les douleurs abdominales, les maladies diarrhéiques infectieuses, les douleurs d'estomac, les parasites et la dysenterie (87-89).

Au Mexique, diverses espèces d'hélianthèmes sont employées pour traiter la diarrhée des ulcères peptiques, la dysenterie et la giardiose. Des extraits foliaires méthanoliques d'*H. glomeratum* testés sur des souris femelles allaitantes infectées expérimentalement par *Giardia lamblia* ont une activité anti-giardiale (76). Selon ces auteurs, ces résultats ouvrent les perspectives de développement de nouvelle phytothérapie anti-giardiale.

Les hélianthèmes notamment *H. vulgare* ont comme propriété d'assainir la peau, de resserrer les pores, ils assèchent les imperfections et même unifient le teint (33). Au Canada, *H. canadense* est utilisée pour ses vertus médicinales comme astringent et tonique. Historiquement, elle a été utilisée pour traiter la tuberculose, la diarrhée, la dysenterie et la syphilis (74).

2.3.2. Activités biologiques

Les extraits méthanoliques des parties aériennes de *H. glomeratum* ont montré des propriétés antibactériennes, antifongiques et antiprotozoaires (87-89).

Les extraits foliaires de *C. villosus* présentent une activité antimicrobienne plus intéressante que ceux de *C. monspeliensis* sur *Staphylococcus aureus* et *Candida glabrata* (90).

Il été reporté que les extraits méthanol et chloroforme de *H. lippii* (L.) (syn. *Helianthemum sessiliflorum*), présentent des activités analgésiques et anti-inflammatoires significatives (91).

L'extrait méthanol de *H. lippii*, qui contient des quantités élevées de flavonoïdes et de composés phénoliques, a montré une activité anti-oxydante cohérente et significative. L'effet Scavenger élevé de l'extrait Méthanol peut être dû à des groupes hydroxyles existants dans la structure chimique des composés phénoliques qui constituent les éléments nécessaires au piégeage des radicaux. Cet effet scavenger de radicaux libres peut donc servir d'action préventive possible pour les maladies. L'extrait a également montré des activités antibactériennes (*S. aureus*) et antifongiques (*C. albicans*) (92, 93).

D'après Alsabri et al, (2013) ; l'extrait méthanol de *H. lippii* a considérablement réduit l'ulcère induit par l'éthanol. L'extrait montre une protection contre les lésions distinctes produites par l'administration de l'éthanol. (92).

À notre connaissance, il n'y a pas de travail reporté antérieurement sur l'activité antitumorale de *H. lippii*. Cette étude indique les probables potentiels antitumoraux antimicrobiens des extraits alcooliques des feuilles de *H. lippii*. Les auteurs indiquent qu'il est nécessaire de

poursuivre l'étude de cette plante afin d'identifier et d'isoler son (ses) principe (s) actif (s) anticancéreux. Les résultats de l'étude devront également être confirmés en utilisant des modèles *in vivo* (94).

L'extrait méthanol de l'espèce *H. lippii* exerce une faible activité antibactérienne vis-à-vis des souches *Escherichia. Coli*, *Pseudomonas. Aeruginosa*, *Klebsiella. Pneumoniae* et *Enterococcus. Faecalis*. La souche *K.pneumoniae* présente une résistance pour ces extraits. C'est également le cas pour *E. coli* et *E.faecalis* (95).

2.4. Investigations phytochimiques

Les travaux antérieurs ont montré que la famille des Cistaceae possède un potentiel phytomédicinal important (96), notamment pour des espèces telles que *H. lippii* (91) et *H. glomeratum* (87-89) Le screening phytochimique préliminaire de *H. lippii* a révélé la présence de flavonoïdes, de tanins, de glycosides, de phénoliques simples, de sucres réducteurs libres et de saponines (91).

Bien que dans cette famille, de nombreuses espèces aient été étudiées, peu de travaux ont concerné l'espèce *H. lippii* (L.).

Des polyphénols tels que des tanins et des flavonoïdes ont été détectés dans l'extrait méthanol de l'espèce *H. lippii* (97, 98). Ces derniers sont responsables de l'effet scavenger des radicaux libres et des propriétés anti-inflammatoires (93).

L'augmentation significative de l'activité anti-ulcéreuse de l'extrait méthanol de *H. lippii* peut être attribuée à la présence de flavonoïdes (quercétine), de tanins, de saponines glycosides et de composés phénoliques. Les flavonoïdes figurent parmi les composés cytoprotecteurs dont l'efficacité anti-ulcérogène a été rapportée (99-101).

Des travaux appuient et valident l'utilisation locale de différents taxons d'*Helianthemum* pour le traitement des maladies de la peau, de la fièvre et des infections gastro-intestinales qui peuvent être causées par les microorganismes testés. Ces propriétés sont principalement attribuées à la présence de composés bio-actifs tels que les tanins et les flavonoïdes extraits de ces taxons d'*Helianthemum* qui peuvent servir d'ingrédients dans des formulations cosmétiques ou pharmaceutiques ou les produits d'hygiène (102).

Tableau I.4: Métabolites secondaires isolés du genre *Helianthemum*

Composés	Espèces	Références
Flavan-3-ol 1	<i>H. glomeratum</i>	(80)
(+)-cyclooolivil 2	<i>H. sissiliflorum</i>	(103)
Acide Vanillique 3	<i>H. sissiliflorum</i>	(103)
Nicotiflorine 4	<i>H. sissiliflorum</i>	(104)
Acide Gallique 5	<i>H. sissiliflorum</i>	(103)
Trans Tiliroside 6	<i>H. kahiricum</i> <i>H. glomeratum</i> <i>H. sissiliflorum</i>	(105) (76, 103, 104, 106-108) (103, 104)
β-sitostérol 7	<i>H. sissiliflorum</i>	(103)
Kaempférol-3-O-vicianoside 8	<i>H. sissiliflorum</i>	(104)
Acide benzoïque 9	<i>H. sissiliflorum</i>	(103)
3-O-[(3'',6''-di-O-para coumaroyl)-β-D-glucopyranosyl]-Kaempférol 10	<i>H. kahiricum</i>	(105)
(-)-épigallocatechine 11	<i>H. sissiliflorum</i> <i>H. glomeratum</i>	(103, 108)
β-D-fructofuranosyl-(2'',1')-β-D-fructofuranosyl-(2'-1)-α-D-glucopyranoside 12	<i>H. sissiliflorum</i>	(104)
Isolaricireinol 9'-O-β-D-glucopyranoside 13	<i>H. sissiliflorum</i>	(104)
Acide (-)-pinéllique 14	<i>H. sissiliflorum</i>	(103)
Acide Protocatéchuique 15	<i>H. sissiliflorum</i> <i>H. Ruficomum</i>	(103) (109)
Rutine 16	<i>H. sissiliflorum</i>	(104)
Quercétine 17	<i>H. violaceum</i> <i>H. syriacum</i> <i>H. squamatum</i> <i>H. polygonoides</i> <i>H. oelandicum</i> <i>H. alypoides</i> <i>H. apenninum</i> <i>H. asperum</i> <i>H. cinereum</i> <i>H. hirtum</i>	(102)

	<i>H. marifolium</i>	(82, 108)
	<i>H. glomeratum</i>	
Prinsepiol 18	<i>H. sissiliflorum</i>	(103)
(-)-catechine 19	<i>H. sissiliflorum</i>	(103)
Néoisorutine 20	<i>H. sissiliflorum</i>	(104)
Acide p-hydroxybenzoïque 21	<i>H. sissiliflorum</i>	(103)
B-coumaryole-trans tiliroside 22	<i>H. kahiricum</i>	(110)
Kaempferol3-O-(3,6-di-O-trans-β-coumaryole)glucopyranoside 23	<i>H; kahiricum</i>	(110)
Cis-tiliroside 24	<i>H. glomeratum</i>	(82)
	<i>H. ruficomum</i>	(109)
Myricitrine 25	<i>H. sissiliflorum</i>	(103)
(-)-épigallocatechine gallate 26	<i>H. glomeratum</i>	(103, 108)
	<i>H. sissiliflorum</i>	
1-O-acétyl prinsepiol 27	<i>H. sissiliflorum</i>	(103)
Isorhamnétine 28	<i>H. oelandicum</i>	
	<i>H. squamatum</i>	(102, 111)
	<i>H. syriacum</i>	
	<i>H. lavandulaefolium</i>	
(-)-gallocatechine 29	<i>H. sissiliflorum</i>	(103)
(-)-épicatechine 30	<i>H. glomeratum</i>	(76)
	<i>H. sissiliflorum</i>	(103)
β-D-fructofuranosyl-(2-1)-α-D-glucopyranoside 31	<i>H. sissiliflorum</i>	(104)
Quercitrine 32	<i>H. sissiliflorum</i>	(103)
	<i>H. glomeratum</i>	(107)
Daucostérol 33	<i>H. sissiliflorum</i>	(103)
Lutéoline 34	<i>H. oelandicum</i>	(102)
β-D-fructofuranose 35	<i>H. sissiliflorum</i>	(104)
Vicénine-2 36	<i>H. sissiliflorum</i>	(104)
Kaempférol 37	<i>H. violaceum</i>	
	<i>H. syriacum</i>	(102)
	<i>H. squamatum</i>	
	<i>H. polygonoides</i>	
	<i>H. oelandicum</i>	
	<i>H. alypoides</i>	
	<i>H. glomeratum</i>	(76, 106, 108)

	<i>H. asperum</i>	
	<i>H. cinereum</i>	
	<i>H. hirtum</i>	
	<i>H. apenninum</i>	
1-O-éthyl-β-D-glucopyranoside 38	<i>H. sissiliflorum</i>	(104)
Hovétrichoside 39	<i>H. sissiliflorum</i>	(104)
Isoquercitrine 40	<i>H. sissiliflorum</i>	(103)
	<i>H. glomeratum</i>	(107)
Astragaline 41	<i>H. sissiliflorum</i>	(103)
	<i>H. glomeratum</i>	
	<i>H. ruficomum</i>	(109)
Picéine 42	<i>H. ruficomum</i>	(109)
Acide parahydroxybenzoïque 43	<i>H. confertum</i>	(112)
Methyle galate 44	<i>H. confertum</i>	(112)

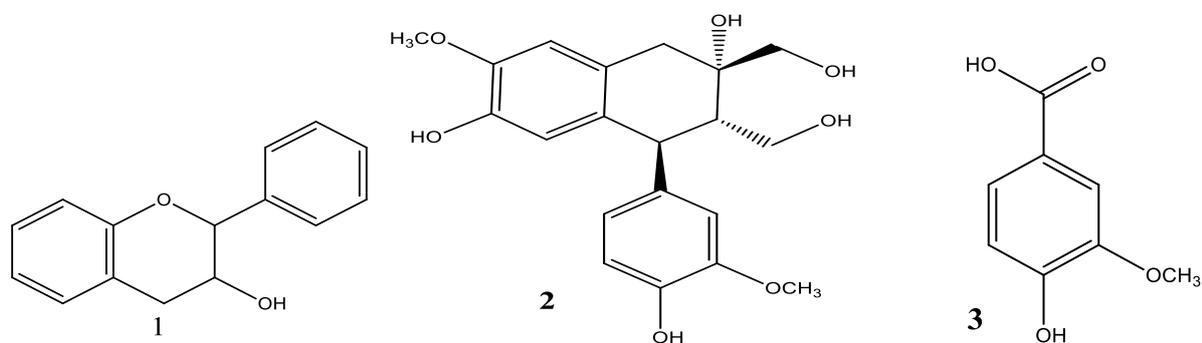


Figure I.1. Structures des composés isolés du Genre *Helianthemum*

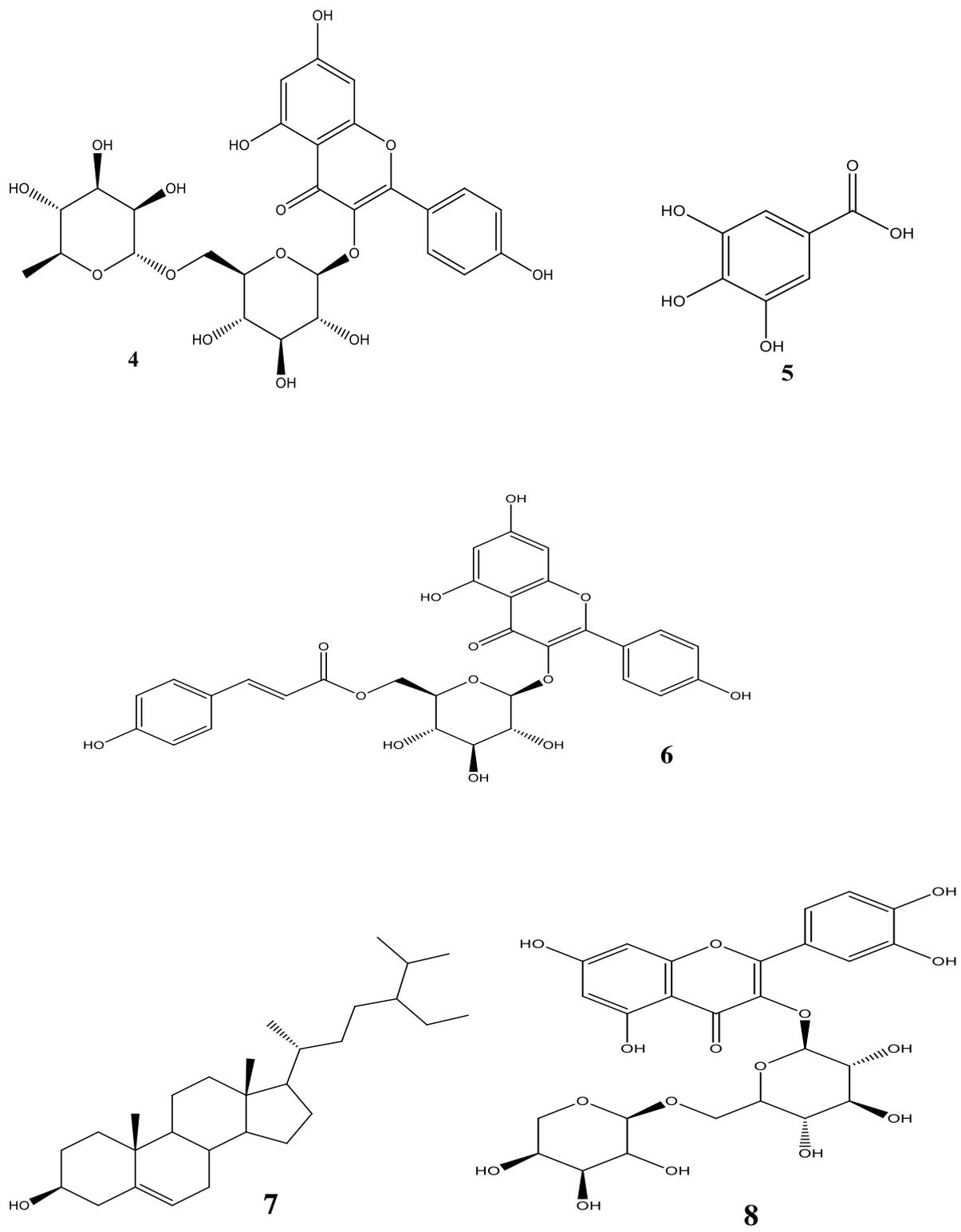


Figure I.1. Structures des composés isolés du Genre *Helianthemum*

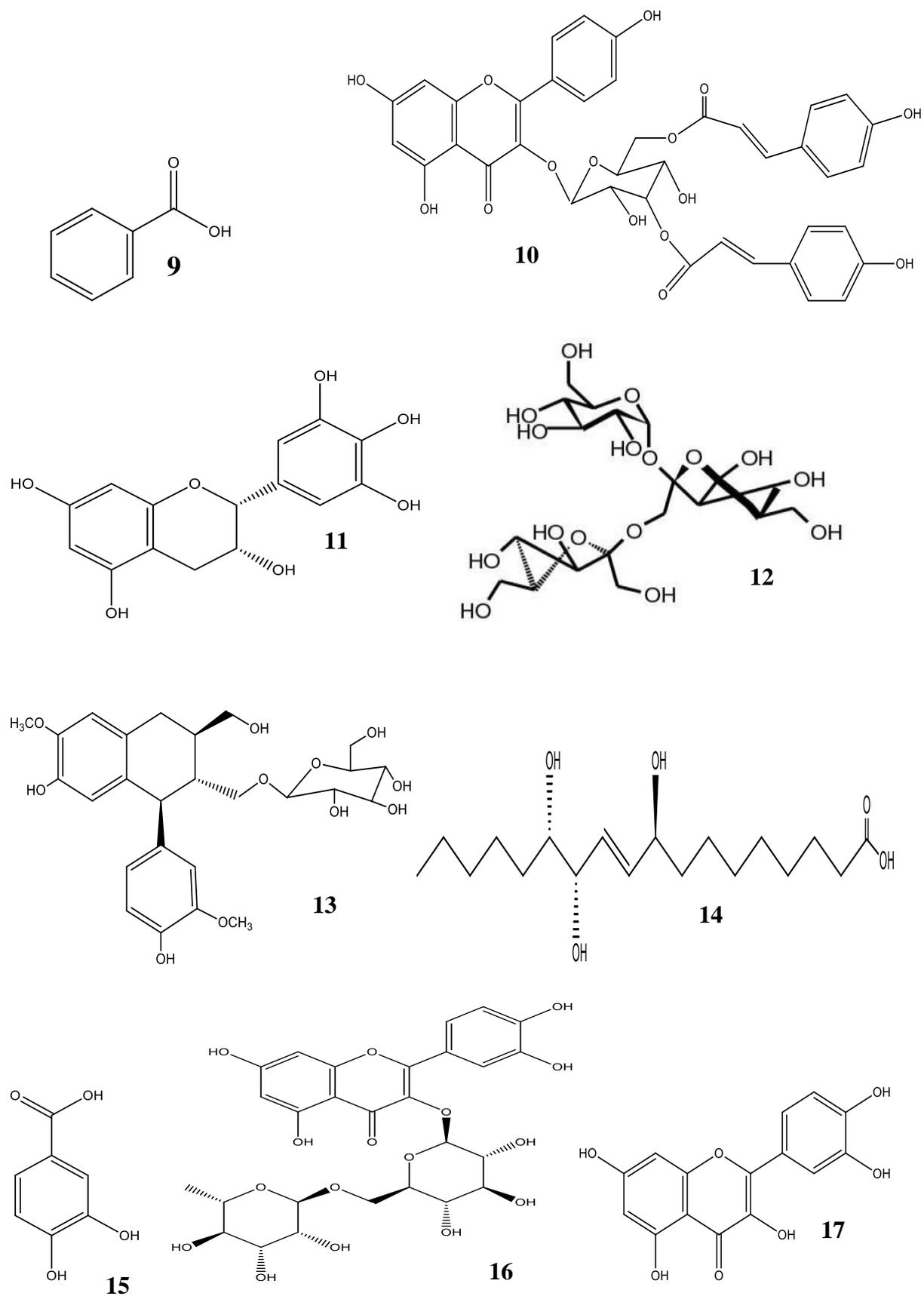


Figure I.1. Structures des composés isolés du Genre *Helianthemum* (suite)

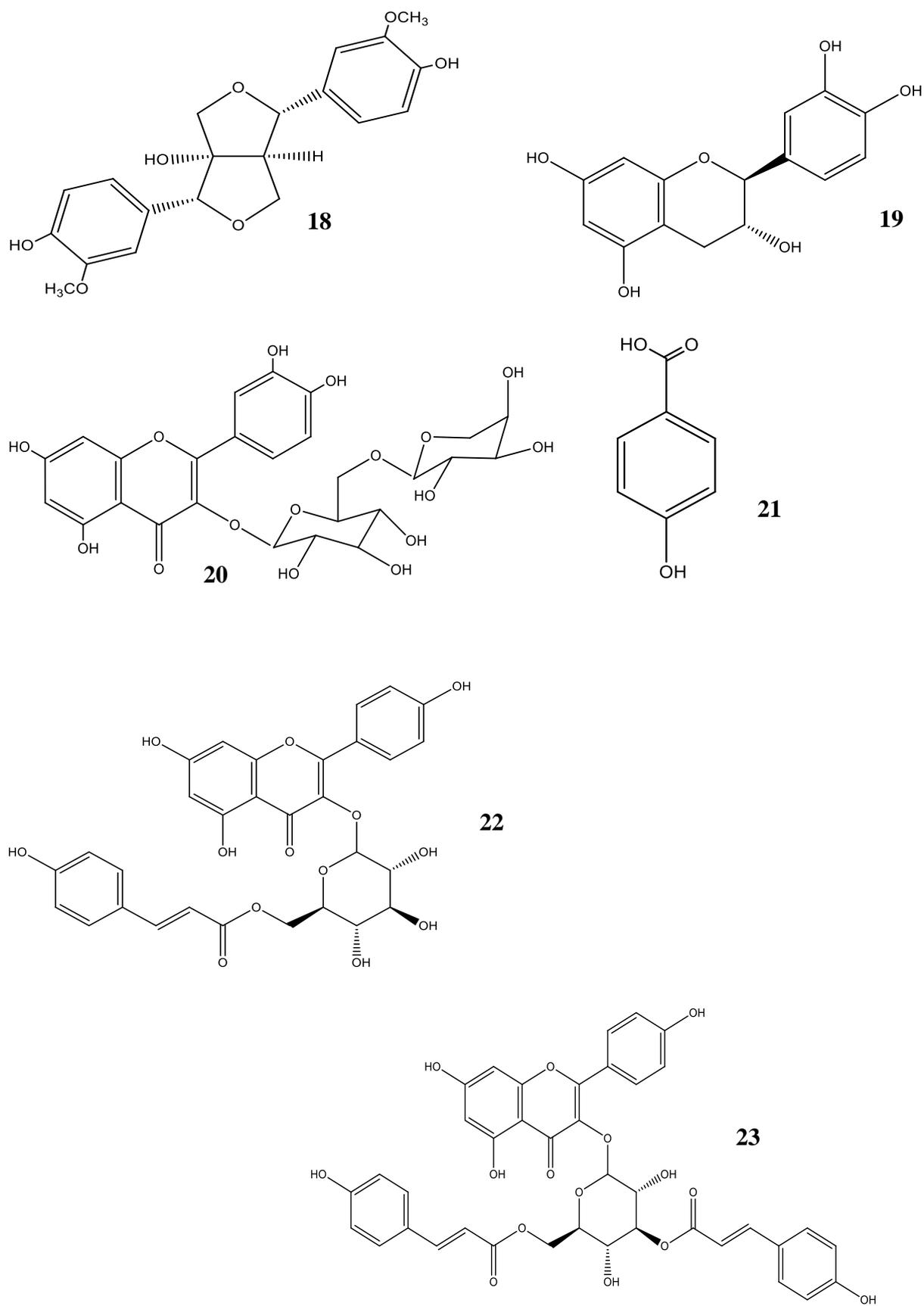


Figure I.1. Structures des composés isolés du Genre *Helianthemum* (suite)

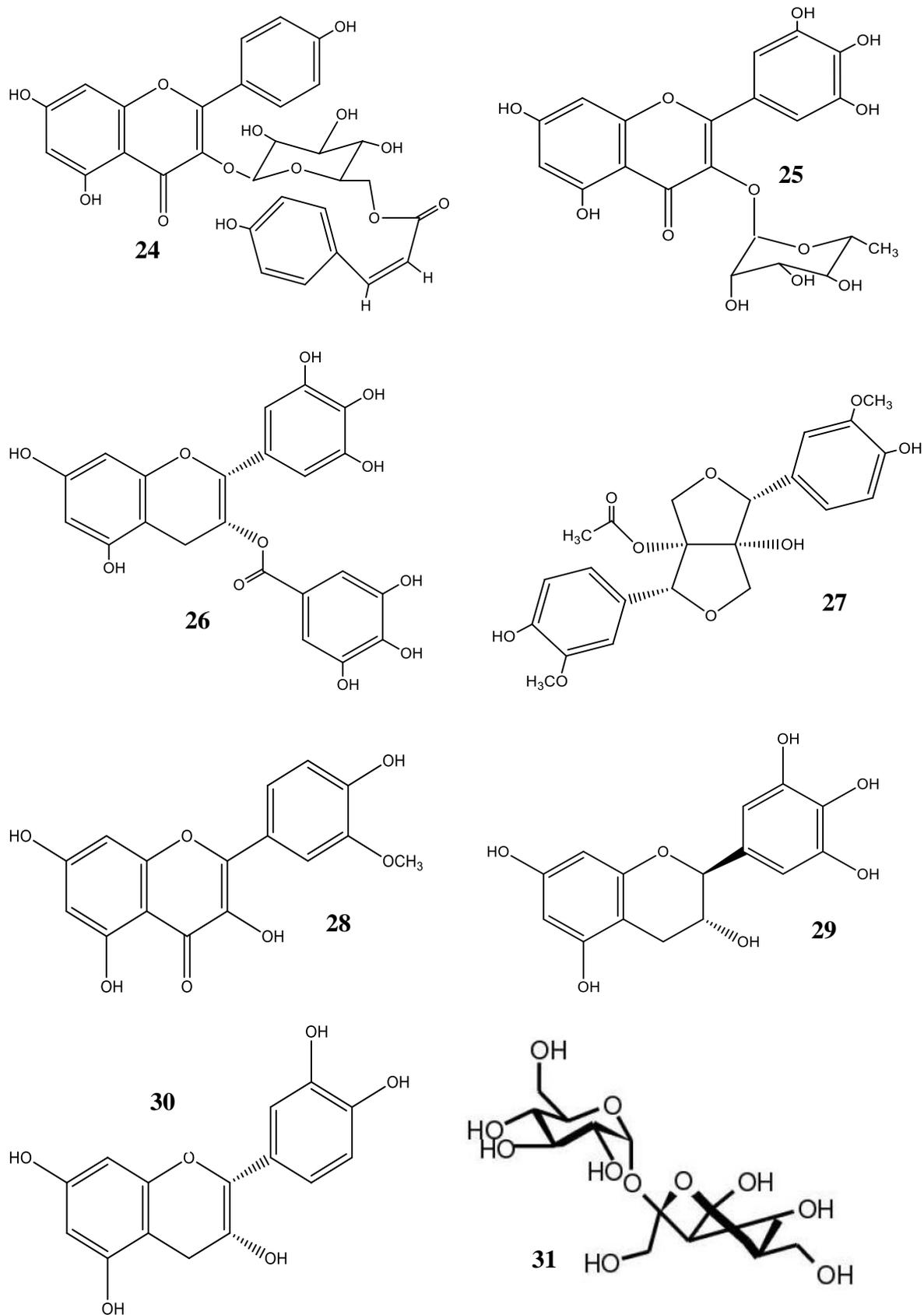
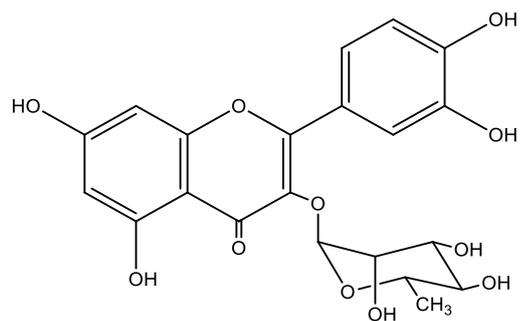
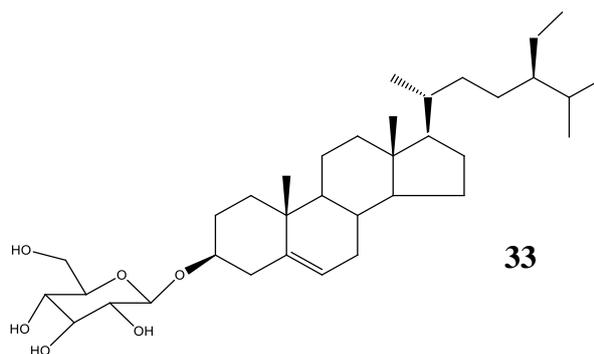


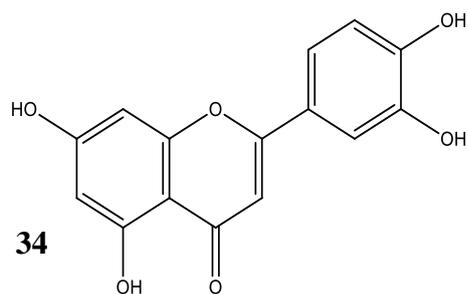
Figure I.1. Structures des composés isolés du Genre *Helianthemum* (suite)



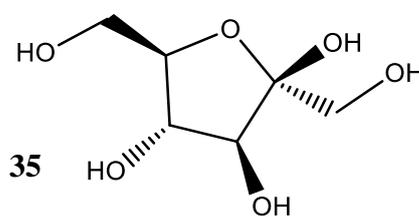
32



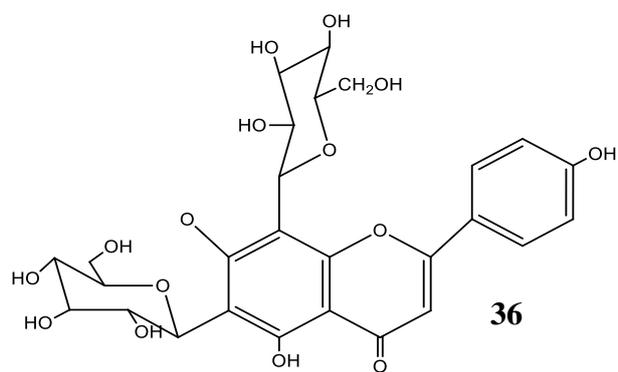
33



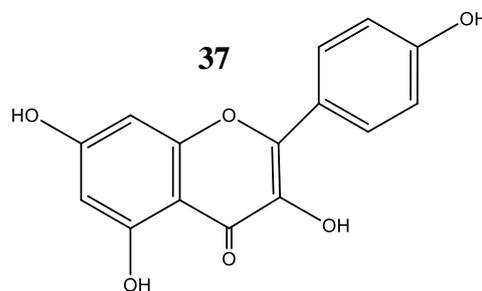
34



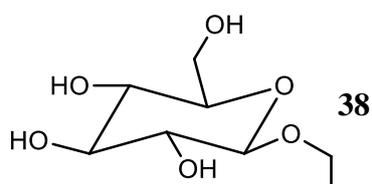
35



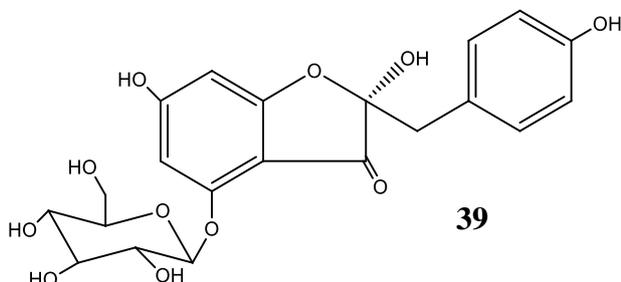
36



37



38



39

Figure I.1. Structures des composés isolés du Genre *Helianthemum* (suite)

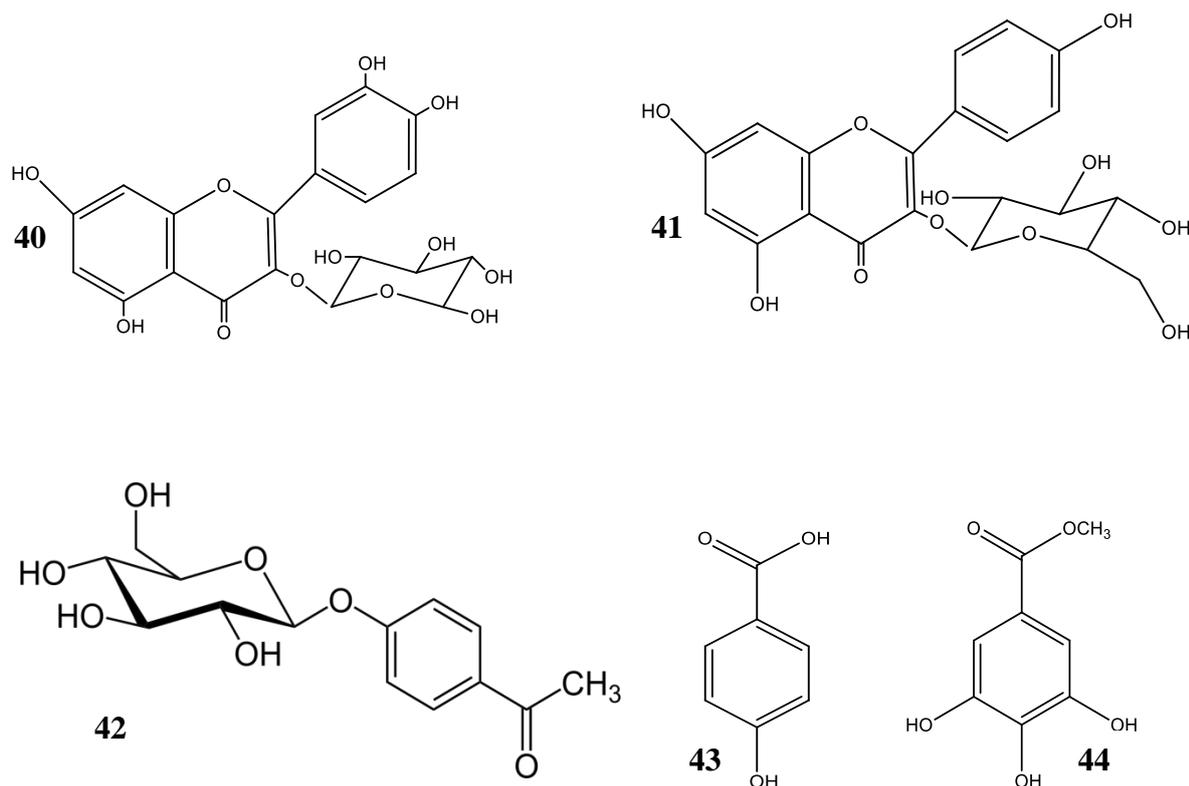


Figure I.1. Structures des composés isolés du Genre *Helianthemum* (suite)

3. Etude bibliographique de la deuxième espèce

3.1. Description de la famille des *Poaceae*

3.1.1. Répartition géographique

Les Poaceae sont la principale source de nourriture au monde. Ils se classent parmi les cinq premières familles de plantes à fleurs en termes de nombre d'espèces, mais elles sont clairement la famille la plus abondante et la plus importante de la flore de la Terre. Les espèces poussent sur tous les continents, dans le désert, dans les habitats d'eau douce et marins et à toutes les altitudes sauf les plus élevées. Les communautés végétales dominées par les graminées représentent environ 24% de la végétation de la Terre.

Il y a environ 10 000 espèces de graminées, la plupart d'entre elles étant confinées à un seul continent. Une exception, l'espèce cosmopolite *Phragmites australis*, herbe de roseau géante, a la plus large gamme géographique de toutes les plantes à fleurs. Cette espèce remarquablement polyvalente s'étend du nord au sud dans une large bande autour de la Terre entre les latitudes 70° N et 40° S et est la plus abondante dans les régions tempérées du Vieux Monde; cependant,

elle n'est pas originaire de l'extrême sud de l'Amérique du Sud, du bassin amazonien, de la Nouvelle-Zélande, de la Polynésie et de certaines parties de l'Australie.(113)

Les humains ont joué un rôle important dans l'expansion de nombreuses herbes, y compris les mauvaises herbes telles que *Digitaria sanguinalis* (digitaire sanguine), *Echinochloa crus-galli* (Panic des marais, Pied-de-coq), et *Poa annua* (pâturin annuel). L'endémisme, ou répartition géographique restreinte, est assez commun parmi les graminées, en particulier à l'extrémité sud des continents et sur les chaînes de montagnes. Près de 800 genres d'herbacées tombent dans trois modèles de répartition. Près des trois quarts sont confinés à l'un des sept centres de distribution de base: Afrique, Australie, Eurasie au nord de l'Himalaya, Asie du Sud et du Sud-Est, Amérique du Nord, Amérique du Sud tempérée et Amérique tropicale. Environ un cinquième des genres englobent des schémas de distribution encore plus larges dans les régions tempérées ou tropicales du monde. *Brachyeletrum erectum* illustre ce dernier schéma de répartition. Cette plante attrayante habite les régions boisées de l'est de l'Amérique du Nord et de l'Asie de l'Est, une tendance commune à de nombreux groupes végétaux qui représenteraient les vestiges d'une répartition encore plus continue autour de la zone tempérée nord.

De l'avis général, les poacées se regroupent en sept groupes principaux. Ces sous-familles sont plus ou moins distinctes dans les caractéristiques structurelles (en particulier dans l'anatomie des feuilles) et la répartition géographique. La sous-famille Bambusoideae se différencie des autres graminées par son anatomie et sa structure spécialisée, des rhizomes bien développés (tiges souterraines), des tiges souvent ligneuses et des fleurs inhabituelles. Bien que l'aire de répartition géographique de la sous-famille se situe entre les latitudes 48° N et 47° S, jusqu'à 4 000 mètres d'altitude, y compris les régions à hiver neigeux, elle est la plus répandue dans les forêts tropicales. Le noyau des herbes de cette sous-famille comprend deux groupes principaux plus ou moins distincts: les bambous, ou graminées, qui sont membres de la canopée des forêts tropicales et d'autres types de végétation, et les herbes herbacées des Bambusoideae, qui sont limités au sous-bois de la forêt tropicale. Sur les 1 000 espèces de bambous, un peu moins de la moitié sont originaires du Nouveau Monde. Toutefois, près de 80% de la diversité totale de la sous-famille herbacée Bambusoideae se retrouve dans les néotropiques. Les forêts côtières et humides de Bahia, un état du Brésil, abritent la plus grande diversité de bambous et l'endémisme du nouveau monde (113).

3.1.2. Description botanique :

Quatrième pour le nombre d'espèces, cette famille est la plus importante à travers le monde d'un point de vue écologique et économique. Avec 7 sous-familles, 715 genres et 1200 espèces.

Plantes herbacées ou rarement ligneuses, à port caractéristique (graminiforme). Fleurs très réduites, hypogynes, insérées de façon distique sur l'axe de l'inflorescence partielle (épillet), généralement entourées chacune de deux bractées souvent très développées ; périgone nul ou 2 à 3 écailles très réduites (glumellules ou lodicules) interprétées comme un périgone rudimentaire ; étamines : rarement moins ou plus gynécées, théoriquement à 3 carpelles, mais en fait 1 -carpellé, à ovaire uniloculaire ; un seul ovule, basal.

Tige (chaume) simple ou rameuse, cylindrique, creuse ou plus rarement pleine, à nœuds pleins. Une seule feuille à chaque nœud, constituée par un limbe et une gaine, cette dernière entourant la tige, à bords libres (gaine fendue) ou plus ou moins soudés entre eux. A nervures parallèles, plus prononcées que les autres. Souvent, présence d'une ligule, membrane soudée à la face du sommet de la gaine, qu'elle dépasse plus ou moins longuement ; plus rarement, ligule nulle ou représentée par des poils. Fleurs hermaphrodites, ou parfois unisexuées, ou encore à organes sexuels plus ou moins avortés (fleurs rudimentaires ou neutres), groupées en épillets. Ceux-ci réunis en épis, en grappes ou en panicules. Chacun des épillets munis à la base de deux bractées, les glumes, une inférieure et une supérieure, parfois réduites à une seule ou rarement presque nulles. Épillet composé d'une ou de plusieurs fleurs fertiles, alternes et insérées sur un rachis en deux rangées, souvent accompagnées de fleurs stériles ou de fleurs rudimentaires. Chaque fleur est munie de deux bractées, les glumelles, rarement réduites à une seule. Glumelle inférieure (lemme) ayant un nombre impair de nervures, mutique ou munie d'une arête, celle-ci implantée sur le dos ou au sommet du lemme. Glumelle supérieure. (paléa ou paléole) plus étroite, souvent membraneuse. À la base des organes sexuels, 2 (parfois 3 ou 0) petites écailles, libres ou soudées entre elles (glumellules ou lodicules), assimilables à un périgone très réduit. Étamines : parfois 2 ou 1, rarement 6 ; anthères fixées au filet par leur dos, bilobées, à lobes libres à chaque extrémité et plus ou moins divergents. Carpelles 2 à 3 ; ovaire supère ; 1 loge et 1 ovule, Styles ; 1 à 2, rarement 3, libres ou plus ou moins soudés entre eux à la base, rarement soudés jusqu'au sommet. Fruit : un caryopse, c'est-à-dire un akène à graine soudée à la paroi interne, rarement un akène ordinaire. Famille cosmopolite, comprenant env. 10 000 espèces, parmi lesquelles de nombreuses céréales et herbes fourragères (114).

3.1.3. Classification botanique :

Tableau.I.5 : Classification botanique de la famille des Poaceae

Classification	
Embranchement	Spermaphytes
Classe	Liliopsida
Ordre	Cyperales
Famille	Poaceae

3.2. Description du genre *Cymbopogon*

3.2.1. Répartition géographique

C. schoenanthus est originaire d'Asie tropicale en particulier l'Inde. Cependant, elle a été distribuée en Asie (Irak, Oman, Arabie Saoudite et Yémen) et en Afrique (Algérie, Égypte, Libye, Maroc, Djibouti, Éthiopie, Somalie, Soudan, Kenya, Bénin, Burkina Faso, Ghana, Guinée, Mali, Mauritanie, Niger, Nigéria, Sénégal et Togo) (115).

3.2.2. Description botanique

Position systématique (Quezel et Santa 1962)(16)

Tableau.I.6 : Description botanique du genre *Cymbopogon*

Classification	
Embranchement	Spermaphytes
Classe	Liliopsida
Ordre	Cyperales
Famille	Poaceae
Espèce	<i>Cymbopogon schoenanthus</i> (L)
Noms vernaculaires	(Lemmad)

Synonymes

Andropogon eriophorus Willd. *Andropogon circinnatus* Hochst. ex Steud., *Andropogon iwarancusa* subsp. *laniger*, *Andropogon lanigerum* Desf., *Andropogon mascatensis* G et., *Andropogon nardoides* Nees, *Andropogon schoenanthus* var. *versicolor*, *Andropogon versicolor*, *Cymbopogon circinnatus*, *Cymbopogon schoenanthus* subsp. *velutinus* Cope, *Cymbopogon versicolor*, *Sorghum schoenanthus* (L.) Kuntze, *Trachypogon schoenanthus* (L.) Nees (116).

Origine du nom

Le mot *Cymbopogon* est dérivé du Grec *kumbe* (bateau) est *pogon* (pain), se référant aux inflorescences à plusieurs arêtes et aux spathes en forme de bateau (96)

Noms communs: (115)

Tableau.I.7 : Classification des noms communs selon la langue

langue	Noms communs
Arabe	Ethkher, Tibn Makkah, Hashishat El Gamal, Halfa Bar, Sinbel Al-Arab, Askhabar, Abo Rekba.
Anglais	Camel grass, Camel hay, Geranium grass, Camel hay grass, Lemon-scented grass, Sweet cane, Sweet rush, Spikenard oil.
Français	Herbe des chameaux, Herbe à Chameau Citronnelle de Madagascar.
Hindi	Aghin ghās, Agiyā ghās, Atigandha, Bujina, Buraro, Gandhel, Gandhel Mirchiagand, Palakhari, Rohisha, Rousaghas, Rusaghas, Saundhiya, Sugani.
Portugais	Capim-cheiroso (Brésil), Capim-cidreira (Brésil), Capim-cidrilho, Capim-ciri, Capim-de-cheiro, Capim-limão.
Espagnol	Pasto de camellos.
Suédois	Kamelgräs

Description botanique

Les espèces du genre *Cymbopogon* sont trouvées dans la région de Ghardaïa. Cette graminée pousse en touffes denses de 30 à 40 cm de haut, comprenant plusieurs rejets, à souche aromatique. Tiges nombreuses et courtes. Feuilles étroites, longues, souples d'abord, puis

coriaces et s'enroulent sur elles-mêmes. Tiges florales nombreuses, dressées et très longues. Epis plus ou moins teinté de violet. Toute la plante, mais surtout sa partie inférieure dégage une odeur puissante et très agréable en se desséchant. Période de végétation épiaison en avril-mai (16).

Habitat: en pieds isolés sur sols caillouteux, et dans les ravins (117).

3.3. Propriétés biologiques et pharmacologiques

3.3.1 Utilisation en médecine traditionnelle

Les feuilles fraîches sont utilisées dans la salade et les recettes traditionnelles. Le thé est considéré comme une boisson saine et rafraîchissante qui est consommée dans le monde entier comme substitut à d'autres variétés de thé en raison de son arôme agréable et son goût (118). Le thé à base de feuilles de citronnelle est utilisé comme antispasmodique, analgésique, anti-inflammatoire, antipyrétique, diurétique et sédatif. La citronnelle est cultivée pour le bon parfum de ses feuilles, et est utilisée pour aromatiser la crème pour gâteaux (119) ; Les effets de l'inclusion alimentaire de la citronnelle sur les performances de croissance des poulets à griller et en tant qu'alternative viable pour les promoteurs de croissance d'antibiotiques ont été évalués (120).

De plus, la citronnelle (*C. pendulus*) est généralement reconnue comme un additif alimentaire sûr et a été approuvé par la Food and Drug Administration pour être utilisée dans les aliments (FDA, GRAS, 21 CFR 182.60). le citral a été enregistré par la Commission européenne comme aromatisant dans les denrées alimentaires car son utilisation ne représente aucun risque pour la santé du consommateur (121).

Le tableau I.8 résume l'utilisation de quelques espèces de *Cymbopogon* en médecine traditionnelle classées selon le pays, le nom commun ainsi que les parties utilisées.

Tableau I.8 : classement des différentes espèces *Cymbopogon*, leurs nom commun, régions, partie utilisée et effets

Espèces	Région	Nom commun	Parties	Utilisation	References
<i>C. nardus (L.) Rendle</i>	Inde	Huile de citronnelle	Feuilles	Insectifuge et comme parfums	(122)
<i>C. parkeri Stapf</i>	Pakistan	Citronelle	Aériennes	Antiseptique et traitement d'estomac	(123)
<i>C. excavatus Hoscht</i>	Afrique du sud	Pain-levé de Herbe de térébenthine	Gaines	Insecticide	(124)
<i>C. olivieri (Boss)</i>	Pakistan	Pupitar	Aériennes	Pyrénétiq ue, vom i, diurétique, rhumatismal et comme condiment antipaludéen.	(125, 126)
<i>C. validus (Stapf)</i>	Afrique de l'est et du sud	Bluegrass africain	Huiles essentielles	Toner pour la peau, anti-âge chez les hommes, fumigeant et pour le contrôle des rongeurs	(127)
<i>C. winterianus (Jowitt)</i>	Brésil	Herbe de Java	Feuilles charnues	Traitement d'épilepsie et d'anxiété	(128)
<i>C. marginatus (Steud.)</i>	Afrique du sud	Herbe parfumée au citron	Racines	Ils sont utilisés comme anti-mites	(129)
	Inde	Citronelle	Aériennes	Fièvre, troubles digestifs	(130)
<i>C. citratus Stapf</i>	Nigeria	Citronelle	Feuilles	Diabète, inflammation et troubles nerveux	(131)
	Argentine	Limonaria	Feuilles	Contre le rhume	(132)
	Cuba	Canasanta	Feuilles	et la grippe, les troubles digestifs, les troubles gastriques et la décoction avec d'autres plantes contre le paludisme	(133)
	Costa Rica	Thé à l'herbe	Feuilles	Pour soulager la toux, carminative, expectorante et dépurative	(134)

	Colombia	Limonaria	Rhizome	Il est mâché et utilisé comme brosse à dents et pour la lutte antiparasitaire.	(135) (136)
	Brésil	Capimsanto	Feuilles	Anxiolytique et anti-hypertensive	(137)
	Trinidad et Tobago	Herbe de la fièvre	Herbe et rhizomes	Les thés sont utilisés pour traiter le rhume, la grippe, la fièvre et le diabète	(137)
<i>C. giganteus</i> (Hochst) Chiov.	Cameroon	Tsauri	Decoctions de feuilles et fleurs	Toux et hypertension artérielle	(138)
<i>C. ambiguous</i> (Hack.) A. Camus.	Australie	Citronnelle native	Feuilles et tiges	Remède contre les maux de tête, infections pulmonaires, crampes musculaires et la gale	(139, 140)
<i>C. procerus</i> (R.Br.) Domin	Australie	Herbe odorante	Feuilles et tiges	Les feuilles et la tige sont pilées et utilisées comme lavage corporel médicamenteux ; utilisé pour le mal de tête	(141)
<i>C. flexuosus</i> (Nees ex Steud.) Wats.	Inde	Citronnelle	Feuilles	Produit de beauté, antiseptique et traitement de fièvre	(142)
<i>C. pendulus</i> (Nees ex Steud.) Wats.	Inde	Citronnelle	Feuilles	Antiseptique et pour la parfumerie	(143)
<i>C. schoenanthus</i> (L.) Sreng	Arabie Saoudite	Ethkher	Feuilles	Antidiarrhéique, pour traiter la fièvre, le traitement de la jaunisse et tonique	(144)
<i>C. obtectus</i> (S.T. Blake)	Australie Centrale	Tetes soyeuses	Mixture	Rhume et grippe, maux de tête, fièvre et mal de gorge	(140)

<i>C. proximus</i> (Stapf.)	Egypte	Halfabar	Feuilles	Expulsion de calculs rénaux et urétéraux	(145)
<i>C. refractus</i> (R.Brown) A. Camus.	Australie	Herbe de fil de fer barbelé	Feuilles	Alimentation pour animaux	(146)
<i>C. densiflorus</i> (Steud.) Stapf	Congo	Citronnelle	Feuilles et rhizome	Employé contre l'asthme, l'épilepsie, les crampes abdominales et les douleurs et aussi pour interpréter les rêves des sorciers.	(147, 148)
<i>C. jwarancusa</i> (Jones) Schult.	Egypte	Le limon	La plante entière	Condiment et à usage médicinal	(149)

3.3.2. Activités biologiques

a) Activité antioxydante

L'activité antioxydante des huiles essentielles à partir des feuilles fraîches, des feuilles fraîches et séchées et des racines de *C. schoenanthus* a été testée en utilisant la méthode de blanchiment au mélange : β -carotène-acide linoléique. Les meilleurs résultats ($IC_{50} = 0,47 \pm 0,04$ mg/ml) ont été obtenus avec les feuilles fraîches de plantes collectées dans la région désertique du sud de la Tunisie (150).

L'extrait aqueux, riche en proanthocyanidines et les extraits organiques de *C. schoenanthus* provenant de trois sites différents dans le sud de la Tunisie ont été testés pour leur activité antioxydante. L'activité antioxydante mesurée par dosage DPPH a montré que l'extrait de proanthocyanidine présentait une activité antioxydante supérieure à celle de l'extrait aqueux. La concentration de l'extrait fournissant une inhibition de 50% (IC_{50}) variait de $16,4 \pm 6,8$ pg / ml à $26,4 \pm 6,8$ pg / ml. L'activité antioxydante a également été déterminée en utilisant le test de blanchiment au mélange β -carotène / acide linoléique. Les meilleurs résultats ($IC_{50} = 0,11 \pm 0,10$ mg / ml) ont été obtenus avec l'extrait de proanthocyanidine des plantes collectées dans la région désertique (Dhibat) en Tunisie (119).

L'activité antioxydante des huiles essentielles de *C. schoenanthus* a été mesurée par dosage DPPH. Les résultats de l'effet antioxydant variaient de 36,0% à 73,8% (2 µl d'huile essentielle par ml de solution test) (150).

b) Activité antimicrobienne

L'huile de *C. schoenanthus* testée a montré une forte activité antimicrobienne contre toutes les espèces de micro-organismes, ce qui peut expliquer l'efficacité du traitement traditionnel pour guérir les maladies des voies urinaires, les maladies digestives et les soins post-partum. Les propriétés antimicrobiennes *in vitro* de l'huile essentielle de *C. schoenanthus* de la région d'illizi (extrême sud-est de l'Algérie), ont été montrées contre divers microorganismes. Ceci peut s'expliquer par la proportion élevée de pipéritone. Ce composant a été trouvé dans de nombreuses plantes comme *Cymbopogon schoenanthus* et *Eucalyptus* spp. La pipéritone isolée de *C. schoenanthus* au Togo était essentiellement un énantiomère (+) comme on l'observe généralement chez *Cymbopogon* spp. (151, 152).

L'activité antimicrobienne a été principalement expliquée par la présence de sesquiterpènes oxygénés et de monoterpènes. L'effet synergique des composants des huiles essentielles est un domaine prometteur qui pourrait conduire à l'optimisation d'une bioactivité donnée (153).

Un extrait aqueux, un extrait riche en proanthocyanidines et des extraits organiques de pousses de *C. schoenanthus* provenant de trois sites différents dans le sud de la Tunisie ont été testés pour leur activité antimicrobienne. Les extraits de proanthocyanidines ont montré une bonne activité antimicrobienne contre *Streptococcus sobrinus* à faible concentration (MIC = 4 mg/ml) (119).

L'extrait éthanol et l'extrait chloroforme de la plante étaient actifs contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. Cependant, l'extrait éthanol était plus actif contre *Escherichia coli*, tandis que l'extrait chloroforme était plus actif contre *Staphylococcus aureus* (154).

Cependant, l'extrait de parties aériennes de *C. schoenanthus* a montré une activité contre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* (155).

L'activité antimicrobienne de *C. schoenanthus* a été évaluée contre trois bactéries pathogènes (*Staphylococcus aureus* MARSA, *Escherichia coli* et *Salmonella typhi*) et cinq espèces fongiques communes (*Aspergillus. flavus*, *Aspergillus. niger*, *Cochliobolus. spicifer*, *Fusarium. dimerum*, *Mucor. circinelloides*) (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*,

Trichophyton verrucosum et *Trichophyton* spp.), ainsi que des champignons dermatophytiques (*Alternaria alternata*, *Cochliobolous spicifer*, *Stachybotrys atra* var *microspora* et *Ulocladium botrytis*) *Microsporium canis*). L'extrait aqueux de *C. schoenanthus* a montré une activité antimicrobienne contre les champignons et bactéries testés, tandis que *F. dimerum*, *Ulocladium botrytis*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *Epidermophyton floccosum* et *Microsporium canis* ont toléré les extraits aqueux. Les extraits organiques (méthanol, acétate d'éthyle et *n*-butanol) sont plus efficaces que l'extrait aqueux, ils présentent une activité antifongique plus élevée contre les champignons testés, mais *A. flavus*, *F. dimerum*, *S. atra* var. *microspora*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *E. floccosum*, *M. canis*, *T. rubrum* et *T. verrucosum* ont toléré ces extraits. L'extraction organique de *C. schoenanthus* a montré une activité antibactérienne élevée contre toutes les bactéries pathogènes testées (*Staphylococcus aureus* MARSA, *Salmonella typhi* et *Escherichia coli*) (156).

c) **Activité anti-acétylcholinestérase**

L'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase des huiles essentielles à partir de feuilles fraîches, de feuilles séchées et de racines de *C. schoenanthus* a été étudiée. L'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase (CI₅₀ = 0,26 ± 0,03 mg / ml) la plus importante a été testé sur l'huile essentielle des feuilles fraîches de la région montagneuse du sud de la Tunisie (150).

d) **Effet protecteur**

Le potentiel préventif de l'extrait éthanol de *C. schoenanthus* (CSEE) a été étudié *in vitro* et *in vivo* contre les troubles du stress. Il a été évalué dans la cytotoxicité induite par H₂O₂ chez la souris et le stress dans les cellules de neuroblastome humain SH-SY5Y. L'effet de la CSEE sur le comportement des animaux était concordant avec une régulation significative des niveaux de corticostérone et de cortex cérébral de la catécholamine (dopamine, adrénaline et noradrénaline) dans le sang. Les résultats ont également démontré que le prétraitement des cellules de neuroblastome SH-SY5Y avec CSEE à 1/2000, 1/1000 et 1/500 v / v dilutions, ont significativement inversé la neurotoxicité induite par H₂O₂. De plus, les traitements CSEE ont significativement inversé l'expression de la protéine de choc thermique dans les cellules transformées par HSP47 soumises à une contrainte thermique (42 ° C pendant 90 min) et l'expression d'ARNm de HSP27 et HSP90 dans du SH-SY5Y traité avec H₂O₂ (157).

Un traitement oral quotidien avec *C. schoenanthus* (1 ml d'extrait) a significativement corrigé l'incidence de la néphrotoxicité (BUN, créatinine et différences de niveau de calcium). De plus, une étude a montré une activité diurétique très puissante pour *C. schoenanthus*. Elle a

montré qu'après trois jours d'expériences, cinq rats traités avec l'acide glycolique seulement étaient morts. Le reste des animaux ont survécu et semblaient en bonne santé. Les auteurs ont conclu que l'extrait de *C. schoenanthus* a un effet prophylactique dans la formation de calculs d'oxalate (158).

e) Effets anthelminthiques et insecticides

Le potentiel anthelminthique de l'huile essentielle de *C. schoenanthus* a été évalué chez des agneaux infectés expérimentalement par *Haemonchus contortus*. Aucune réduction statistiquement significative de la numération des oeufs fécaux, du volume des cellules tassées ou du nombre total de vers n'a été observée après les traitements. De plus, aucune différence statistique entre les moyennes de groupe pour les taux sanguins d'urée, de créatinine, d'albumine, de phosphatase alcaline, d'aspartate aminotransférase et de gamma glutamyl transférase n'a été trouvée (159).

L'activité insecticide de l'huile essentielle brute extraite de *C. schoenanthus* et de son constituant principal (pipéritone) a été évaluée à différents stades de développement de *Callosobruchus maculatus*. La pipéritone était plus toxique pour les adultes avec une valeur CL50 de 1,6 $\mu\text{mol} / \text{L}$ contre 2,7 $\mu\text{mol} / \text{L}$ obtenue avec l'extrait brut. La pipéritone a inhibé le développement des œufs nouvellement pondus et des larves de nouveau-nés, mais elle était moins toxique que l'extrait brut chez les individus se développant à l'intérieur des graines (160).

Les résultats ont montré que *C. schoenanthus* était une source prometteuse, pour le contrôle vecteur du paludisme anophèle au Bénin. L'efficacité de l'huile essentielle a probablement été attribuée à sa composition chimique dans laquelle des composés majeurs et / ou mineurs ont montré des activités insecticides sur divers parasites et vecteurs de maladies tels que les anophèles (161).

f) Dose

Il n'y avait pas de dose prouvée sûre ou efficace de citronnelle pour les adultes. Traditionnellement, 1-2 cuillères à café de citronnelle dans environ 180 ml d'eau bouillante sont utilisés sous forme de tisane. Deux grammes d'herbe de citronnelle, coupée et en poudre dans une tasse d'eau bouillante, a également été prise oralement. 140 milligrammes d'huile de citronnelle dans une capsule une fois par jour pendant 90 jours ont été utilisés par voie orale chez des patients hyperlipidémiques. Pour le muguet, un demi-paquet (12,5 millilitres) de citronnelle séchée a été utilisé pour faire une infusion avec 500 millilitres d'eau bouillante. La perfusion a été bouillie pendant 10 minutes et refroidie. Pour le premier traitement, les patients

ont bu 125 millilitres d'infusion de citronnelle et ensuite 250 millilitres deux fois par jour pendant un total de 10 jours (une infusion fraîche a été effectuée toutes les 24 heures) (162).

3.4. Propriétés pharmacologiques

Tableau I.9 : Effet pharmacologique des espèces *Cymbopogon*

Espèces	Pharmacologie	Activité	Références
<i>Cymbopogon</i>			
<i>C. citratus</i>	Cytotoxique	Présente une toxicité élevée vis-à-vis des cellules CHO (ovaire d'hamster chinois) ($IC_{50} = 10,63 \mu\text{g} / \text{ml}$) et modérément toxique contre les cellules 138 (W138) de la lignée cellulaire fibroblastique humaine ($IC_{50} = 39,77 \mu\text{g} / \text{ml}$).	(163)
	Insecticide	CL_{50} de $48,6 \mu\text{l} / \text{L}$ contre les larves de mouches domestiques	(164)
	Effets neurocomportementaux	Capacité d'être actif comme agent sédatif, anxiolytique et anticonvulsivant	(165)
	Antitrypanosomal	Activité modeste contre <i>Trypanosoma brucei</i> $IC_{50} = 1,837 \pm 0,13 \mu\text{g} / \text{ml}$	(163)
	Anti-diabétique	Présente une activité contre le diabète de type 2 induit par le poloxamère 407 (DT2) chez des rats Wistar	(164)
	HIV/AIDS	Comme un contrôle très efficace pour le muguet buccal chez les victimes du VIH / SIDA en Afrique du Sud	(166)
	Activité larvicide	Il montre une inhibition et un taux de mortalité élevés contre la larve de <i>A. aegypti</i>	(167)

	Activité chimio préventive	Inhibe la phase précoce de l'hépatocarcinogénèse chez le rat	(168)
	Anti-inflammatoires	L'extrait d'hexane inhibe l'expression d'iNOS (oxyde nitrique synthase inductible), la production de NO (oxyde nitrique) et diverses voies induites par le LPS (lipopolysaccharide)	(167)
	Antioxydant (DPPH)	36% -73,8% d'activité par 2 µl d'huile	(150)
C. schoenanthus	Inhibiteur de l'acétylcholineestérase	IC ₅₀ = 0.26 ± 0.03 mg ml ⁻¹	(150)
	Antifongique	2,7 µl / L obtenu pour CL ₅₀ contre <i>Callosobruchus maculatus</i>	(160)
C. winterianus	Molluscicide	LC90 = 97,0 mg / L et CL ₅₀ = 54,0 mg / L	(169)
	Larvicidal	CL ₅₀ = 181,0 mg / L	(169)
	Anti-fongique	Inhibition de la croissance de 15 souches de <i>Candida albicans</i> à des concentrations de 625 µg / ml et de 1250 µg / ml	(170)
C. giganteus	Antimicrobien	Forte activité contre les bactéries gram ⁺ et gram ⁻	(138)
	Citotoxique	Faible cytotoxicité contre les cellules CHO et la lignée cellulaire de fibroblastes humains non cancéreux (W138)	(163)
	Antitrypanosomique	IC ₅₀ = 0,25 ± 0,11 µg / ml contre <i>Trypanosoma brucei</i>	(163)
	Antiplasmodial	Haute activité avec IC ₅₀ ≤ 20 µg / L	(163)

<i>C. pendulus</i>	Antifongique	Forte activité contre <i>Microsporium audouinii</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> et <i>Epidermophyton floccosum</i> à 100% pour toutes les espèces	(171)
<i>C. flexuosus</i>	Chimiopréventive	Activité <i>in vivo</i> puissante contre les tumeurs d'Ehrlich et de Sarcoma-180.	(172)
<i>C. densiflorus</i> Stapf	Antibactérien	Bactéries à Gram négatif. Les MIC se situaient entre 250 et 500 ppm pour la Gram-positif et entre 500 et 1000 ppm pour les bactéries Gram-négatif.	(173)
<i>C. ambiguus</i>	Inflammatoire	Inhibition de la libération de sérotonine plaquettaire humaine induite par l'ADP dans la cellule.	(139)
<i>C. nardus</i>	Antibactérien	Les valeurs de CMI variaient de 0,244 µg / ml à 0,977 µg / ml lors d'essais contre les isolats bactériens	(174)
<i>C. nervatus</i>	Activité molluscicide	Inhibition de <i>Biomphalaria pfeifferi</i> à une DL ₅₀ de 213.099 ppm dépendante de la dose	(175)
<i>C. oliveri</i>	Antimicrobien	Présente une excellente activité antimicrobienne contre les organismes gram ± ve	(125)

3.5. Investigations phytochimiques

Cymbopogon schoenanthus contient des flavonoïdes comme la tricine, des flavones C-glycosylées, luteferol et apigiferol (176).

La littérature met en évidence la présence de terpènes (177), de tanins, de saponines, de saponines glycosides, de flavonoïdes, d'alcaloïdes, de triterpènes, de baumes, de glycosides cardiotoniques, de glycosides, de stéroïdes et d'huiles volatiles (154, 178).

Les tanins aident à la guérison de blessures d'après Triaz et al.,(179) et possèdent également des propriétés astringentes et antimicrobiennes. Selon Okwu et al.,(180) les flavonoïdes sont connus pour protéger contre les allergies, le diabète, les inflammations, le paludisme, les agrégations plaquettaires et les infections microbiennes.

En conséquence, il peut y avoir une base scientifique pour l'utilisation de *C. schoenanthus* (l'herbe à chameau ou Camel grass en anglais) comme aliment médicinal au Ghana, au Niger et dans le Nord du Nigeria. Un glycoside a été retrouvé à l'état de trace, il serait utilisé pour le traitement des maladies cardiaques (179).

Tableau.I.10: Métabolites secondaires isolés du genre *Cymbopogon*

Composés	Espèces	Références
Flavonoïdes		
Isorientine 45	<i>C. parkeri</i>	(181)
Tricine 46		
Lutéoline 47		
Lutéoline 7-O-glucoside (cynaroside) 48		
Isoscoparine 49		
2''-O-rhamnosyl isoorientine 50		
Quercétine		
Kaempférol		
Apigénine 51	<i>C. citratus</i>	(182)
Elimicine 52		
Catéchol 53		
Acide chlorogénique 54		
Acide caféique 55		
Hydroquinone 56		
Eugenol (4-allyl-2-methoxyphanol) 57		
Eugenol methylether (4-allyl-1,2-dimethoxy benzene) 58	<i>C. ambiguus</i>	(182)
Trans-iso-elemicine (1,2,3-trimethoxy-5-(1-propenyl) benzene) 59		
Terpenoïdes non volatils		
Cymbodiacétal 60	<i>C. martini</i>	(183)
Cymbopogone 61	<i>C. citratus</i>	(184)
Cymbopogonol 62		

Terpenoides volatils

Néral 63	<i>C. citratus</i>	(185, 186)
Géranial 64		(187)
Pipéritone 65	<i>C. parkeri</i>	(140)
	<i>C. olivieri</i>	(140)
Cis-<i>p</i>-mentha-1(7), 8-dien-2-ol 66	<i>C. giganteus</i>	(138)
trans-<i>p</i>-mentha-1(7), 8-dien-2-ol 67		
γ-2-carene 68	<i>C. proximus</i>	(188)
Linalol 69	<i>C. nardus</i>	(174)
Limonène 70	<i>C. schoenanthus</i>	(188)
	<i>C. giganteus</i>	(189, 190)
Géraniol 71	<i>C. winterianus</i>	(128, 169)
Citronellal 72		

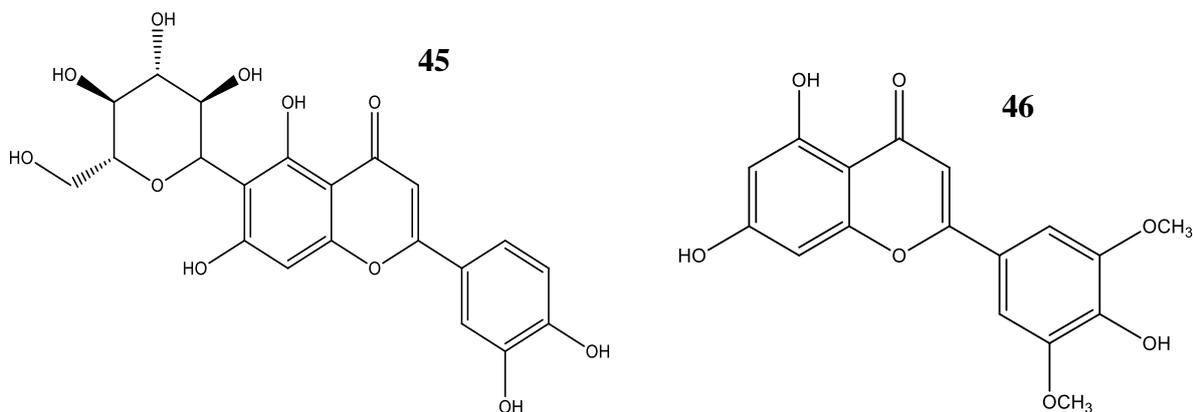


Figure I.2 : Structures des métabolites secondaires isolés du genre *Cymbopogon*

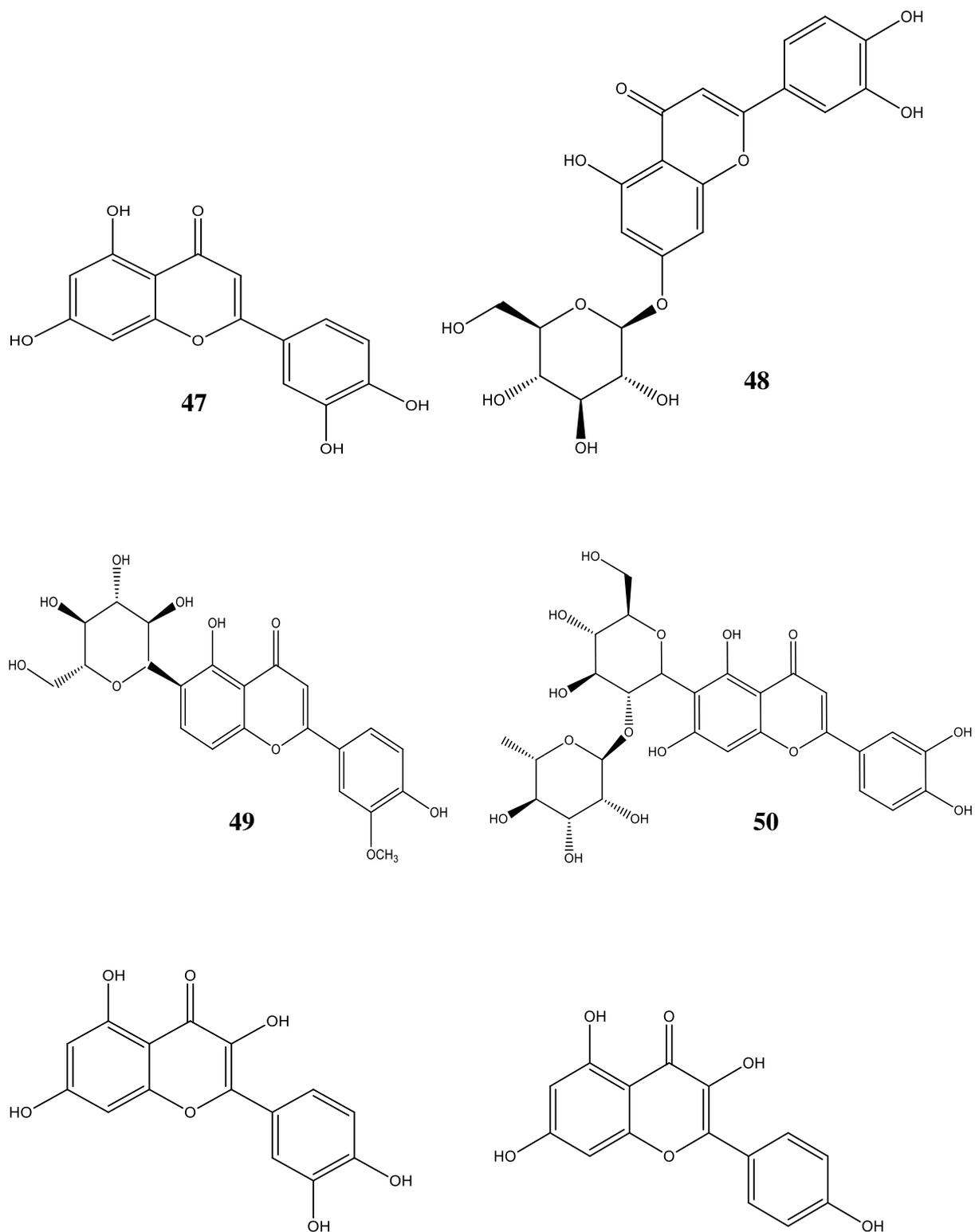


Figure I.2 : Structures des métabolites secondaires isolés du genre *Cymbopogon* (suite)

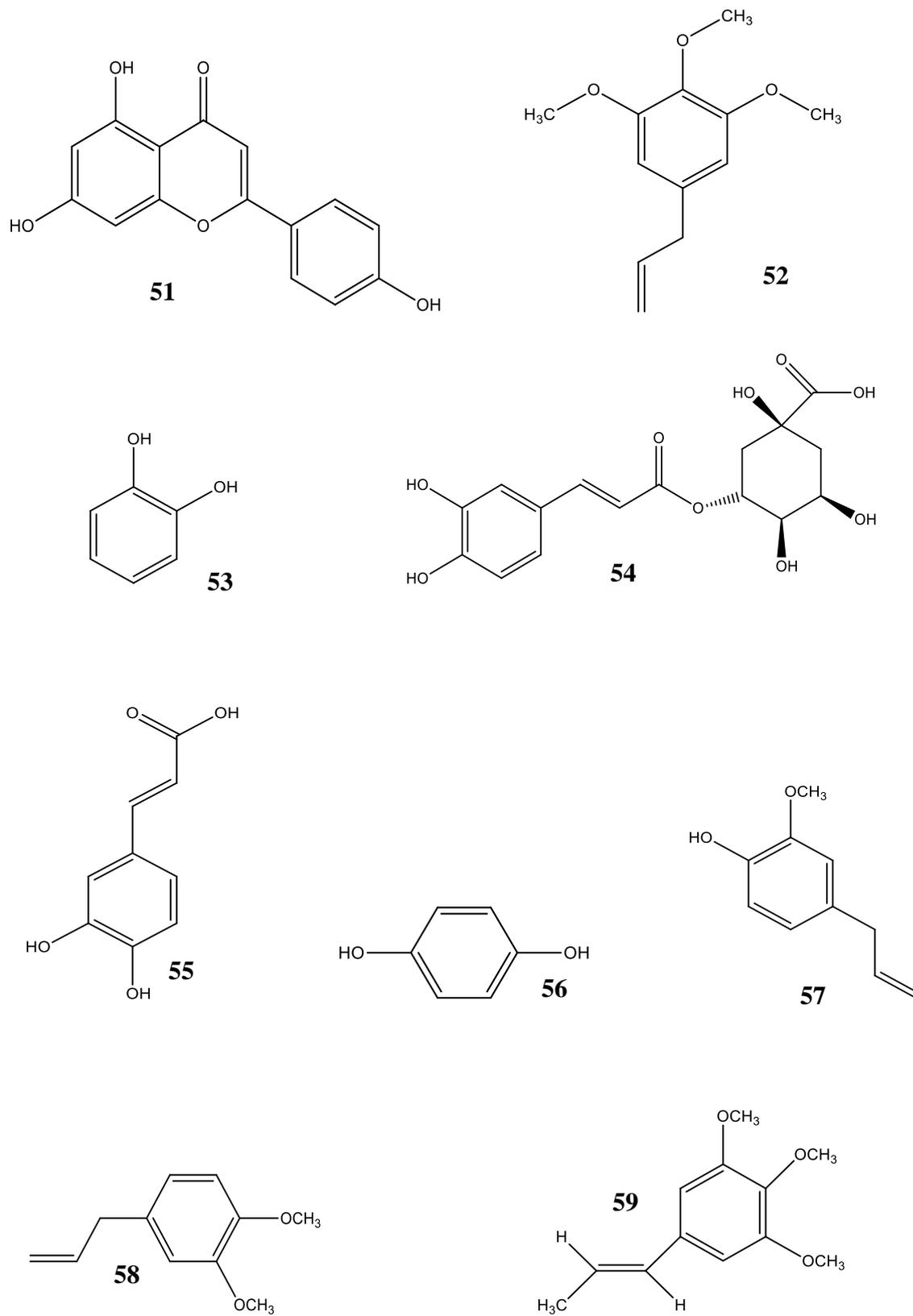


Figure I.2 : Structures des métabolites secondaires isolés du genre *Cymbopogon* (suite)

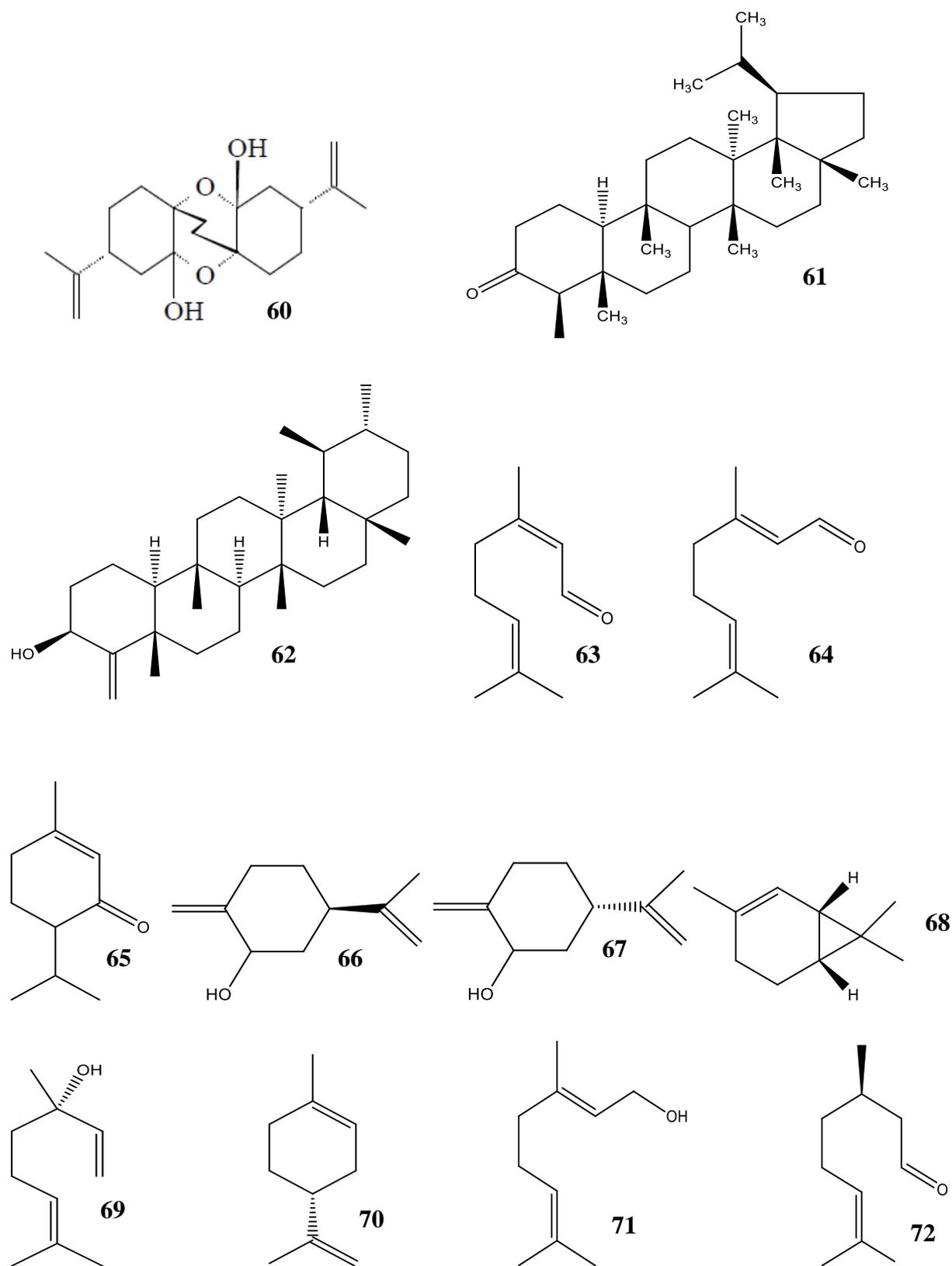


Figure I.2 : Structures des métabolites secondaires isolés du genre *Cymbopogon* (suite)

3.6. Etudes de la composition des huiles essentielles

Différents chémotypes d'espèces de *Cymbopogon* contiennent divers composés majeurs tels que le citral, le géraniol, le citronellole, la pipéritone et l'élémine. Dans la littérature, la majorité des *C. citratus* analysés a montré un pourcentage remarquablement élevé de neral et de géraniol. L'analyse des espèces de *C. citratus* du Brésil (185), de l'Inde (186), d'Afrique de l'Ouest et de l'Est (186, 189, 191-195) et d'Asie (187) a montré des valeurs élevées de chémotypes neral et géraniol. Un trait distinctif spécial entre *C. citratus* originaires d'Afrique (Burkina Faso, Nigéria et le Togo) est la quantité élevée de myrcène observée chez eux (189, 191-195).

Une forte occurrence de pipéritone a été trouvée dans les huiles de *C. parkeri* et *C. olivieri* d'Iran. Jiroveltz et al. (138) ont rapporté une présence importante de cis-p-mentha-1, 8-dien-2-ol et son isomère le trans-p-mentha-1, 8-dien-2-ol dans les huiles de *C. giganteus* du Cameroun. Ces composants sont également prédominants dans d'autres espèces de *Cymbopogon*. Les composés prédominants d'autres espèces sont le δ -2-carène pour *C. proximus* du Cameroun (196), le linalol du *C. nardus* de Malaisie (174), le limonène chez *C. schoenanthus* (Tunisie) et *C. giganteus* (Burkina Faso) (189) et l'élémicine à partir des huiles de *C. pendulus* d'Inde (197). L'observation de l'huile de *C. winterianus* de différentes parties du Brésil a montré deux chémotypes majeurs basé sur la quantité de géraniol et de citronellal (128, 169, 190, 198).

Tableau.I.11 : Composition des huiles essentielles du genre *Cymbopogon*

Composés	Espèces	Région/ Pays	Majeur %	Référence
Neral	<i>C. flexuosus</i>	Inde	30.0	(199)
		Burkina Faso	34.6	(189)
		Inde (Bilhar)	29.8	(186)
		Brésil (Nord)	30.1	(185)
		Egypte	34.98	(200)
		Zambie	29.4	(193)
		Kenya	33.31	(194)
	<i>C. giganteus</i>	Bénin	19.93	(185)
		Nigeria	26.5	(191)
	<i>C. citratus</i>	Angola	28.26	(201)

		Malaisie	50.81	(202)
		Congo	36.24	(195)
		Brésil	4.53	(128)
		Cote d'ivoire	32.5	(192)
		Mali	26.3	(192)
		Iran	30.95	(187)
Geranyl acétate	<i>C. flexuosus</i>	Inde	12.0	(199)
Linalol	<i>C. flexuosus</i>	Inde	2.6	(199)
	<i>C. winterianus</i>	Inde	1.5	(164)
	<i>C. martini</i>	Inde	2.0	(203)
	<i>C. nardus</i>	Malaisie	11.0	(174)
Garaniol	<i>C. winterianus</i>	Inde	23.9	(164)
	<i>C. martini</i>	Inde	84.16	(203)
	<i>C. winterianus</i>	Brésil	32.82	(128)
Citronellal	<i>C. winterianus</i>	Inde	32.7	(164)
	<i>C. nardus</i>	Malaisie	29.6	(174)
	<i>C. winterianus</i>	Brésil	36.19	(128)
Citronellol	<i>C. winterianus</i>	Inde	15.9	(164)
	<i>C. winterianus</i>	Brésil	11.34	(128)
Myrcene	<i>C. citratus</i>	Burkina Faso	11.0	(189)
		Egypte	15.69	(200)
		Zambie	18.0	(193)
		Bénin	27.83	(204)
		Nigeria	25.3	(191)
		Angola	10.57	(201)
		Cote d'ivoire	18.1	(192)
		Mali	9.1	(192)
Selina-6-en-4-ol	<i>C. citratus</i>	Brésil	27.8	(185)
α-Cadinol	<i>C. citratus</i>	Brésil	8.2	(185)
Piperitone	<i>C. olivieri</i>	Iran	72.8	(125)
	<i>C. parkeri</i>	Iran	80.8	(123)
	<i>C. proximus</i>	Burkina Faso	59.1	(196)
4-Carene	<i>C. olivieri</i>	Iran	11.8	(123)

Germacrene-D	<i>C. parkeri</i>	Iran	5.1	(122)
δ-2-Carene	<i>C. proximus</i>	Burkina Faso	22.3	(196)
β-Phellandrene	<i>C. schoenanthus</i>	Tunisia	13.4	(150)

Mc Laughlin et al., ont suggéré que toute étude sur les extraits de plantes et / ou les huiles essentielles devrait inclure des tests de toxicité, car les composés bioactifs sont presque toujours toxiques à fortes doses. Leurs résultats ont indiqué que huit composants identifiés de l'huile représentaient 79,9% de la composition d'huile essentielle. Ces composés appartenaient à deux classes principales : les monoterpènes et les sesquiterpènes. Cependant, la proportion de sesquiterpènes (46,6%) était supérieure à celle des monoterpènes (14,6%) (205).

Tableau I.12: Composition des huiles essentielles de *Cymbopogon schoenanthus*
(Travaux antérieurs)

Composés	Références
2-Undécanone	(206)
3,7-Diméthyl-2,6-octadiène-1-al (citrail)	
cis-Paramenth-2-én-1-ol	
trans-Para-menth-2-én-ol	
Elemol	
cis-Pipéritol	
trans-Pipéritol	
Carène	(160)
cis-Pinène hydraté	
trans-Pinène hydraté	
Terpinéol	
Eudesmol	
β-Eudésmol	
γ-Elémol	
Oxyde de caryophyllène	
α-Eudesmol	
caryophyllène	

pipéritone (207)

J-2-Carène

J-2-Carène limonène (150)

β -Phellandène

δ -Terpinène

α -Terpinéol

Geraniol (208)

Geranial

Neral

β -Caryophyllene

**4-Hydroxy-4-méthyl-pentan-2-one
déhydro-1,8-cinéole** (209)

δ -2-Carène

p-Cymène

(Z) β -Ocimène

%, p-Mentha-1,5-diène-8-ol

α -Terpinéol

trans-Pipéritol

Nérol

β -Caryophyllène,

Germacrène

Germenol,

Pipéritone

α -Eudésmol

δ -Cadinène

Oxyde de caryophyllène

γ -Eudésmol

épi- α -Cadinol

Sélénylène- β

**4 - isopropyl - 1 - methyl - 2 - cyclohexen
- 1 - ol (cis)** (210)

**4 - isopropyl - 1 - methyl - 2 - cyclohexen
- 1 - ol (trans)**

**Cyclohexane methanol, 4-ethylene- $\alpha,\alpha,4$ -
trimethyl-3-(1-methylethenyl)-
,[1R(1 α , 3 α ,4 β)]**

4. Conclusion

La synthèse des données bibliographiques des deux genres *Helianthemum* et *Cymbopogon* nous a confirmé leur richesse en métabolites secondaires, ainsi que leur rôle important en médecine traditionnelle.

D'après la recherche bibliographique aucune étude phytochimique ou biologique n'a été effectuée sur les extraits de l'espèce *Helianthemum lippii*. Ceci nous a encouragés à entreprendre cette étude.

Par contre, pour l'espèce *Cymbopogon schoenanthus*, seule la composition chimique des huiles essentielles a été reportée, et aucune étude phytochimique n'a été réalisée sur les extraits hydroalcooliques. D'autre part, d'après la littérature ; l'étude biologique a concerné des espèces de différents pays dans le monde mais aucune n'a été faite sur l'espèce poussant en Algérie. Ceci nous a poussés à l'étudier dans le cadre de ce travail.

CHAPITRE II

ETUDE PHYTOCHIMIQUE

1. Introduction

De nos jours le développement de la technologie concernant principalement les méthodes d'analyse de substances naturelles isolées des plantes rend la tâche plus aisée, mais ceci n'assure en aucun cas la nouveauté de ces derniers. C'est ce qui nous a incités à bien choisir l'espèce à étudier et suivre une méthode pour la présélection en se reposant sur les connaissances ethnobotaniques locales, la connaissance de la thérapie traditionnelle nord-africaine et le manque de données scientifiques publiées. Ceci nous donne une bonne chance d'avoir l'opportunité d'élucider de nouvelles structures moléculaires.

2. Investigation phytochimique de l'espèce *Helianthemum lippii*

2.1. Critères de choix de la matière végétale

- Cette espèce appartient au genre *Helianthemum* (Cistaceae) traditionnellement utilisé comme anti-inflammatoire, anti-ulcérogène, cicatrisant, antiparasitaire, antimicrobien, analgésique, cytotoxique et vasodilatateur (79-81, 83, 88, 107)
- Les plantes sahariennes sont soumises à des conditions de stress hydrique et photochimique (rayonnement UVA et UVB). Elles s'intègrent dans l'environnement en produisant des métabolites secondaires spécifiques qui les protègent contre ce stress oxydatif prolongé.
- L'absence d'études phytochimique et biologique sur cette espèce.

2.2. Place dans la systématique botanique

Selon (Quezel et Santa,(16) ; Dupont et Guignard, (211)) APG III

Tableau II.1 : Classification botanique de l'espèce *Helianthemum lippii*

Reigne	Plantae
Embranchement	Phanérogames ou Spermaphytes
Classe	Endicots
Ordre	Malvales
Famille	Cistacées
Genre	<i>Helianthemum</i>
Espèce	<i>Helianthemum lippii</i> (L) Pers

Noms vernaculaires

Rguig, Hashma, Khudhr, Rugrug,
(212)

2.3. Description botanique de l'espèce

C'est une plante polymorphe en buisson imbriqué ne dépassant guère 50 cm. Un arbrisseau vivace très rameux à feuilles sessiles couvertes de très courts poils ce qui donne une couleur blanchâtre à la plante. L'écorce des rameaux est également blanchâtre. Les feuilles comportent deux stipules. Les fleurs sont petites, jaunes et sessiles. C'est une espèce qui se répartit dans tout le Sahara, les pâturages désertiques, les rocailles et les sables (16). C'est au pied de cette plante que pousse le Terfas (*Terfezai ovalispora*), délicieuse truffe blanche.

Helianthemum lippii L, (*H. lippii*) est une petite brosse vivace, présente un intérêt écologique, économique et pastoral important et joue un rôle essentiel dans la lutte contre la désertification et la stabilisation des sites vulnérables (96). En outre, elle présente un intérêt médicinal car la poudre ou la compresse de la partie aérienne est utilisée pour traiter les lésions cutanées. Cette plante est généralement associée à des truffes désertiques. Elle est la plante hôte de plusieurs espèces de truffes désertiques, qui ont un intérêt à des fins alimentaires, médicales et économiques, le développement des populations rurales et locales (212-214), et en particulier *Terfezia boudieri* Chatin et *Tirmania nivea* (Desf) (214). La présence de *H. lippii* est en régression continue. Cette plante est fortement altérée au fait du surpâturage et du défrichage (215).

De plus, les truffes désertiques sont une source inexploitée de composés thérapeutiques qui ont des effets anti-inflammatoires, immunosuppresseurs, anti-mutagènes et anti-cancérogènes (216, 217). En outre, il a été montré que celles-ci contiennent des composés avec des activités antioxydantes et antiradicalaires (218).



Figure II.1: *Helianthemum lippii*

2.4. Distribution géographique

H. lippii est une espèce en voie d'extinction, rare et endémique du bassin occidental de la mer Méditerranée (219).

Les truffes désertiques poussent dans des terres arides et semi-arides, en particulier dans les pays de la Méditerranée, en particulier les pays d'Europe du Sud, y compris l'Espagne, le Portugal, l'Italie, la France, la Hongrie et la Turquie (220-224), l'Afrique du Nord qui s'étend de la Mauritanie à l'Egypte (214, 225-228), et le Moyen-Orient (212, 229, 230). Cependant, certaines espèces de truffes désertiques ont également été trouvées au Botswana, en Afrique du Sud (217, 231, 232) et en Amérique du Nord (217, 232).

2.5. Usage en médecine traditionnelle

H. lippii, est une plante qui est utilisée traditionnellement en Libye comme traitement antimicrobien. Elle appartient à la famille des plantes des Cistaceae qui sont utilisées pour traiter les lésions cutanées et est connue pour présenter des propriétés gastro-protectrices (233).

D'après notre enquête ethnobotanique auprès de la population de la région d'étude, cette plante est employée pour calmer les douleurs des règles menstruelles (76).

2.6. Protocole expérimental

2.6.1. Récolte du matériel végétale

Le matériel végétal a été récolté dans le sud-ouest de l'Algérie dans la région de Bechar en avril 2012 et authentifié par M. Mohamed Benabdelhakem, directeur de l'agence de préservation des ressources naturelles de Bechar. Un spécimen (HL / 13/04/12) a été déposé au niveau de l'herbier de l'unité de recherche VARENBIOMOL, Université Frères Mentouri Constantine 1. Après séchage de la plante dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires, elle a été coupée en petits morceaux et pesées (1500 g). Les produits chimiques qui ont été utilisés pour les essais, étaient de qualité analytique.

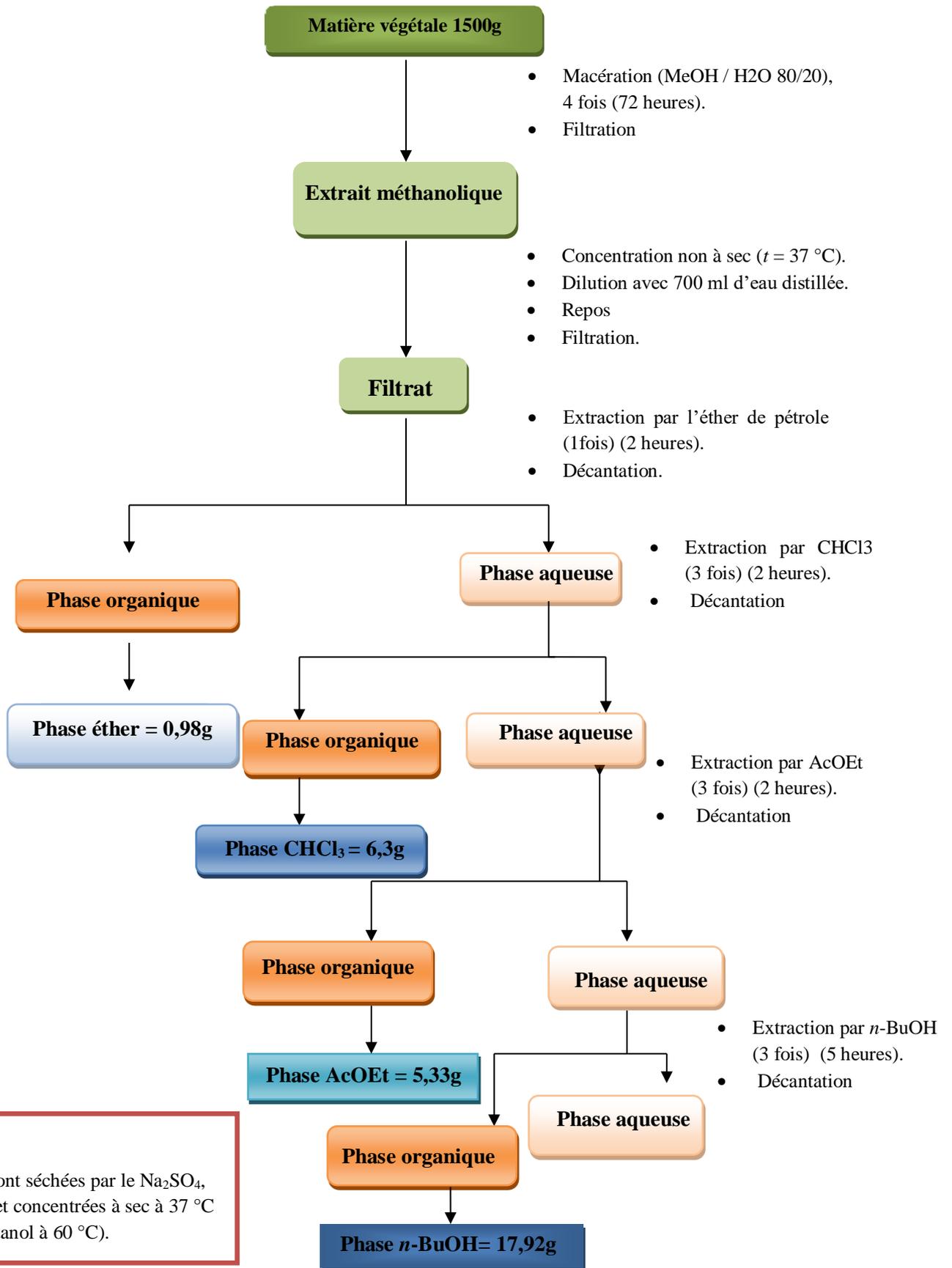
2.6.2. Extraction

La plante entière était mise à macérer dans un mélange hydroalcoolique (Méthanol/Eau) (80:20, v/v) pendant 48 heures. L'opération a été répétée trois fois avec renouvellement du solvant, et a duré à chaque fois 48 heures.

Après filtration, les trois solutions hydroalcooliques ont été réunies puis concentrées sous vide à une température n'excédant pas 38°C. L'extrait obtenu a été dilué avec l'eau distillée à raison de 400 ml pour 1 kg de matière sèche sous agitation magnétique. La solution obtenue, a été laissée au repos pendant une nuit au frais puis filtrée.

Le filtrat a subi une extraction de type liquide-liquide dans une ampoule à décanter, en utilisant des solvants de polarité croissante, en commençant par le chloroforme, ensuite l'acétate d'éthyle, et en dernier le *n*-butanol. Les phases organiques récupérées ont été séchées avec Na₂SO₄ anhydre puis filtrées, concentrées sous pression réduite à sec et pesées. Le processus

d'extraction est résumé par l'organigramme reporté dans la Figure II.2. Les rendements des phases organiques sont donnés dans le Tableau II.2.



Remarque :
 Les phases sont séchées par le Na₂SO₄, puis filtrées et concentrées à sec à 37 °C (extrait *n*-butanol à 60 °C).

Figure II.2. Récapitulatif de l'extraction hydro alcoolique de l'espèce *H. lippii*

Tableau II.2: Rendement des phases

Matière végétale	Phase	Masse (g)	Rendement (%)
1500g	Ether de pétrole	0,98	0,06
	Chloroforme	6,3	0,42
	Acétate d'éthyle	5,33	0,35
	<i>n</i> -Butanol	17,92	1,19

2.6.3. Matériels et méthodes chromatographiques utilisés pour l'étude phytochimique

➤ **Solvants utilisés**

L'éther de pétrole, le chloroforme, l'acétate d'éthyle, le *n*-butanol, le méthanol, l'éthanol, l'acétone.

➤ **Révéléateur**

La révélation a été réalisée à l'anisaldéhyde préparée comme suit : on mélange 0.5 ml d'anisaldéhyde (4-méthoxybenzaldéhyde) avec 10 ml d'acide acétique glacial. On ajoute 85 ml de méthanol et on termine par 5 ml d'acide sulfurique concentré. La solution ainsi obtenue est homogénéisée et gardée à 04 °C pendant toute la durée d'utilisation. On pulvérise la plaque puis on chauffe à 100 °C pendant 10 minutes. Ce dernier peut être examiné à la lumière UV (365 nm).

Dans d'autres cas on utilise l'acide sulfurique pour la révélation.

➤ **Chromatographie analytique sur couche mince (CCM)**

Les analyses des extraits, des fractions et des produits séparés, ont été faites sur plaques CCM avec la silice comme phase stationnaire, le type de plaques est 60 GF254 Merck, 0.1 mm sur support d'aluminium ou en verre (20 × 20 cm) et Merck RP-18 F254 (phase inverse).

➤ **Chromatographie d'adsorption sur colonne (CC)**

Une colonne ouverte, le gel de silice est de granulométrie moyenne : 0.063– 0.200 mm (70–230 mesh), Merck H60. Une colonne ouverte, avec le sephadex comme support.

➤ **HPLC**

Quelques fractions des extraits de *Cymbopogon schoenanthus* ont été étudiées par HPLC Waters avec une colonne knauer C-18 (Europher 80, Saulentechnik 300 mm x 8 mm de diamètre, 5 µm), l'éluant est le mélange Méthanol-Eau (MeOH/H₂O), DAD 200-350, avec un débit de 2 ml/min. L'identification initiale de la fraction de composés phénoliques a été réalisée sur la base des spectres UV enregistrés sur le détecteur DAD au cours d'une analyse chromatographique.

➤ **RMN**

Les spectres RMN ¹H et ¹³C ont été enregistrés dans CD₃OD sur un spectromètre Bruker DRX 400 travaillant à 400 MHz pour ¹H et à 100 MHz pour la RMN ¹³C.

L'investigation phytochimique de *Helianthemum lippii* a été faite par le fractionnement des extraits obtenus puis la purification en utilisant les différentes techniques de chromatographie, puis procéder à l'élucidation structurale des métabolites isolés à l'aide des techniques d'analyses variées soit la spectrophotométrie (UV-visible), spectroscopie (RMN 1D et 2D) et la spectrométrie de masse. Notre étude s'est portée sur l'extrait Chloroforme vu sa richesse en composés phénoliques

2.6.4. Etude phytochimique de l'extrait Chloroforme

L'extrait chloroforme a subi des séparations successives afin d'isoler des molécules pures. En commençant par la recherche sur plaques CCM analytiques du système d'élution donnant une meilleure séparation aboutissant au mélange *n*-hexane/Acétone (4/2).

2.6.4.1. Fractionnement de la phase chloroforme

Environ 6 g de l'extrait chloroforme ont été dissous dans le méthanol est mélangé avec une petite quantité de gel de silice pour colonne, l'ensemble est séché sous vide, puis pulvérisé jusqu'à l'obtention d'une poudre homogène. Cette dernière est déposée sur la colonne de gel de silice, préparée dans le *n*-hexane. La masse de gel de silice utilisée est de 210 g. L'élution a été effectuée par le *n*-hexane enrichi progressivement avec l'acétone. Les fractions obtenues sont regroupées suivant la similitude de leur profil chromatographique sur des plaques CCM, qui après développement dans des cuves en verre avec des systèmes appropriés, ont été visualisées sous lampe UV à 254 et 365 nm, puis révélées et chauffées pendant 1 min à 100 °C.

Les lots présentant la même composition ont été réunis conduisant à 45 fractions. Les résultats de l'opération sont regroupés dans le tableau Tableau II.3.

Tableau II.3 : Résultats de la séparation par CC de la phase CHCl₃ de *H. lippii*

Lots	Fractions	Système d'élution (%)		Poids de fraction (mg)	Volume des lots (ml)
		n-hexane	Acétone		
1-8	F0-1	100	0	10.60	800
9-16	F0-2	100	0	12.84	800
17-23	F1-1	99	1	22.45	700
24-29	F1-2	99	1	37.54	600
30-35	F1-3	99	1	39.65	600
36-41	F2-0	98	2	33.86	600
42-49	F2-1	98	2	42.32	800
50-56	F2-2	98	2	40.87	700
57-63	F4-1	96	4	34.87	600
64-69	F4-2	96	4	45.54	600
70-75	F4-3	96	4	67.79	600
76-81	F5-1	95	5	89.43	600
82-94	F5-2	95	5	108.54	1300
95-101	F6-1	94	6	132.54	700
102-107	F6-2	94	6	178.67	600
108-114	F6-3	94	6	156.98	700
115-121	F7-1	93	7	54.76	700
122-134	F7-2	93	7	123.98	1300
135-141	F8-1	92	8	54.34	700
142-147	F8-2	92	8	76.87	600
148-154	F8-3	92	8	65.43	700
155-180	F9	91	9	34.87	600
181-193	F10	90	10	179.65	1300
194-200	F11-1	89	11	74.98	700
201-207	F12-2	89	11	57.09	700
208-214	F12-3	89	11	46.98	700
215-234	F13-1	85	15	200.65	2100
235-253	F13-2	85	15	198.76	1900
254-273	F14	83	17	259.65	3100
274-290	F15	82	18	132.98	1700
291-309	F16	81	19	168.97	1900
310-349	F17	80	20	175.78	1900
350-368	F18	78	22	268.43	2200
369-387	F19	76	24	248.07	2800
388-407	F20	74	26	179.54	2000
408-427	F21	72	28	173.98	2000
428-447	F22	70	30	386.65	2100
448-467	F23	65	35	352.98	2100
468-486	F24	60	40	298.55	2100
487-505	F25	55	45	376.87	2000

506-524	F26	50	50	354.98	2000
525-543	F27	45	55	352.98	2000
544-561	F28	40	60	387.54	2000
562-578	F29	30	70	387.68	1900
579-596	F30	0	100	276.65	1700

II.6.4.2. Purification des fractions de la phase chloroforme

La richesse de l'extrait et la difficulté de séparation des bandes indétectables sous lampe UV-visible et donc la nécessité de révélation des plaques pour la visibilité des composés. On a eu recours à la chromatographie préparative sur plaques et à la recristallisation.

a) Etude de la fraction F5-2

Elle renferme des cristaux sous forme d'aiguilles, son test sur CCM avec le système (Hexane/Acétone ; 7 :3) a révélé la présence de plusieurs produits, une tâche violette apparait après révélation (invisible sous l'UV 254 et 365 nm), après plusieurs lavages avec du méthanol, puis l'acétone on a obtenu le composé **F5-3** (3mg ; produits **1** et **2**) (solubles dans le CHCl₃).

3. Investigation phytochimique de l'espèce *Cymbopogon schoenanthus*

3.1. Critères de choix de la matière végétale

- *Cymbopogon schoenanthus* est connue pour ses propriétés analgésiques et antipyrétiques (234, 235), utilisée pour traiter la toux (236). En outre, elle a été utilisée comme tonique (235), pour ses effets anti-inflammatoire, diaphorétique, emménagogue, astringent, et sédatif (237, 238). De plus, elle a été utilisée comme diurétique et chez les personnes souffrant de plusieurs rhumatismes (181, 236) ou la jaunisse (236). Concernant le tractus gastro-intestinal, elle a été utilisée comme antispasmodique (119, 145, 235, 239-241) et digestif (206, 242, 243).
- Les espèces de ce genre sont connues pour leur accumulation des métabolites secondaires de type polyphénols, saponines, glycosides de saponine, alcaloïdes, triterpènes, des baumes, glycosides cardiaques, stéroïdes et des huiles volatiles (154, 178).
- L'adaptation de cette plante saharienne aux conditions de vie au désert.
- Aucune étude n'a été reportée auparavant sur *Cymbopogon schoenanthus* concernant sa composition chimique. Seule la composition et les activités de ses huiles essentielles a

fait l'objet de plusieurs publications (150, 152, 153, 159, 160, 176, 177, 206-208, 210, 244).

➤ **3.2. Place dans la systématique botanique (Quezel et Santa 1962) (8)**

Tableau II.4 : Classification botanique de l'espèce *Cymbopogon schoenanthus*

Embranchement	Spermaphytes
Classe	Liliopsidées
Ordre	Cyperales
Famille	Poaceae
Espèce	<i>Cymbopogon schoenanthus</i> (L.)
Noms vernaculaires	(Lemmad)

3.3. Description botanique de l'espèce

Les espèces *Cymbopogon* sont trouvées dans la région de Ghardaïa. Cette graminée pousse en touffes denses de 30 à 40 cm de haut, comprenant plusieurs rejets, à souche aromatique. Tiges nombreuses et courtes. Feuilles étroites, longues, souples d'abord, puis coriaces et s'enroulant sur elles-mêmes. Tiges florales nombreuses, dressées et très longues. Epis plus ou moins teinté de violet. Toute la plante, mais surtout sa partie inférieure dégage une odeur puissante et très agréable en se desséchant. Période de végétation épiaison en avril-mai (8).

Habitat: en pieds isolés sur sols caillouteux, dans les lits d'oued et les ravins (117).





Figure II.3: *Cymbopogon schoenanthus*

3.4. Distribution géographique

C. schoenanthus est originaire d'Asie tropicale en particulier l'Inde. Cependant, elle est distribuée en Asie (Irak, Oman, Arabie Saoudite et Yémen) et en Afrique (Algérie, Égypte, Libye, Maroc, Djibouti, Éthiopie, Somalie, Soudan, Kenya, Bénin, Burkina Faso, Ghana, Guinée, Mali, Mauritanie, Niger, Nigéria, Sénégal et Togo) (245).

3.5. Usage en médecine traditionnelle

C. schoenanthus est très réputée pour ses vertus médicinales. En Pharmacopée : ses gaines foliaires et ses souches sont utilisées sèches ; en infusion comme diurétique et pour donner de l'appétit et en décoction pour soigner les troubles intestinaux et les intoxications alimentaires. Intérêt pastoral: plante broutée par les chèvres et les dromadaires (117).

Cette plante est une herbe aromatique consommée dans les salades et utilisée pour préparer des recettes de viande traditionnelles (150).

La plante a été utilisée en médecine traditionnelle comme antihelminthique, antidiarrhéique, antirhumatismale, carminative, diaphorétique, stomachique, diurétique, eménagogue, antipyrétique, pour le traitement de la jaunisse et comme tonique. Elle a également été utilisée pour l'anorexie ; comme astringent, sudorifique et pour soigner les blessures des dromadaires. Au Maroc et en Egypte, une infusion des fleurs et de la plante entière a été utilisée comme fébrifuge, diurétique, antirhumatismale et antigestive (237, 246) ; Elle est aussi administrée pour traiter des maladies digestives : aérophagie, flatulence et

diminution urinaire, boisson analeptique pour les femmes enceintes après l'accouchement, contre la mauvaise haleine et les furoncles (238).

C. schoenanthus a été utilisée au Soudan pour le traitement de la goutte, de l'inflammation de la prostate, des maladies rénales et des douleurs d'estomac (247). De plus, *C. schoenanthus* est utilisée dans le traitement du rhume, de l'épilepsie, des crampes abdominales et des douleurs, ainsi que dans les produits culinaires et les parfums (173).

3.6. Protocole expérimental

3.6.1. Récolte du matériel végétal

Le matériel végétal a été récolté dans le sud-ouest de l'Algérie dans la région de Bechar en avril 2012 et authentifié par M. Mohamed Benabdelhakem, directeur de l'agence de préservation des ressources naturelles de Bechar. Un spécimen (CS/124/17/04/12) a été déposé au niveau de l'herbier de l'unité de recherche VARENBIOMOL, Université Frères Mentouri Constantine 1. Après séchage de la plante dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires. Elle a été coupée en petits morceaux, divisée en deux parties ; racines et tiges et pesées (1500 g) pour chaque partie. Les produits chimiques qui ont été utilisés pour les essais, étaient de qualité analytique.

3.6.2. Extraction

La plante a été séparée en deux parties ; racines et tiges. Chaque partie a été mise à macérer dans un mélange hydroalcoolique Ethanol/Eau (70 :30, v/v) pendant 48 heures. L'opération a été répétée trois fois avec renouvellement du solvant, et a duré 48, 72 et 96 heures respectivement.

Après filtration, les trois solutions hydroalcooliques sont réunies puis concentrées sous vide à une température n'excédant pas 38°C. L'extrait obtenu est dilué avec de l'eau distillée à raison de 400 ml pour 1 kg de matière sèche sous agitation magnétique. La solution ainsi obtenue, est laissée pendant une nuit au frais puis filtrée.

Le filtrat subit une extraction de type liquide-liquide dans une ampoule à décanter, en utilisant des solvants de polarité croissante, en commençant par le chloroforme, ensuite l'acétate d'éthyle, et en dernier le *n*-butanol. Les phases organiques récupérées ont été séchées avec Na₂S₀₄ anhydre puis filtrées, concentrées sous pression réduite à sec et pesées. Le processus

d'extraction est résumé par l'organigramme reporté dans la Figure II.4 et Figure II.5. Les rendements des phases organiques des deux parties sont donnés dans le Tableau II.5 et le tableau II.6.

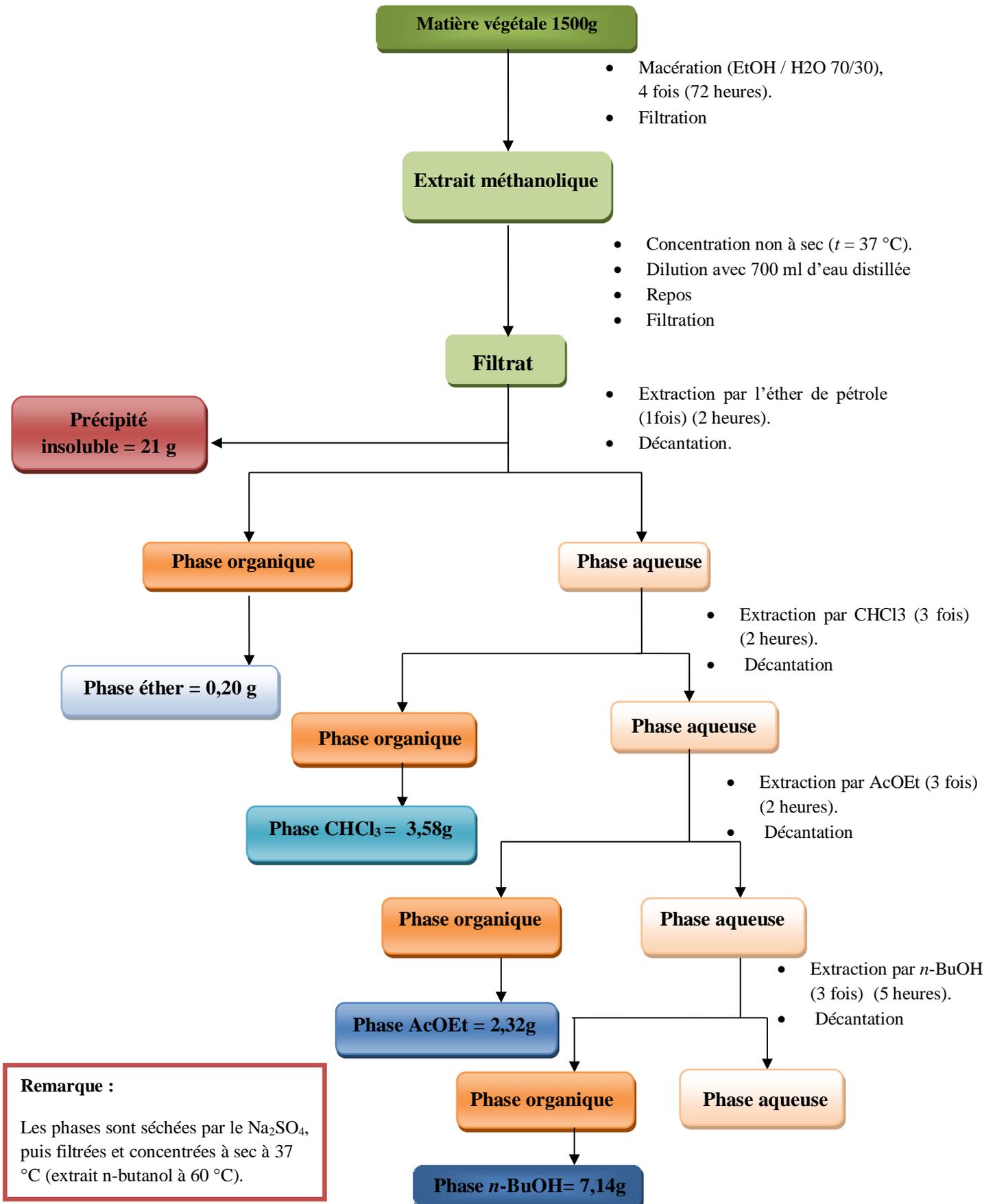


Figure II.4. Extraction de l'espèce *Cymbopogon schoenanthus* (Racines)

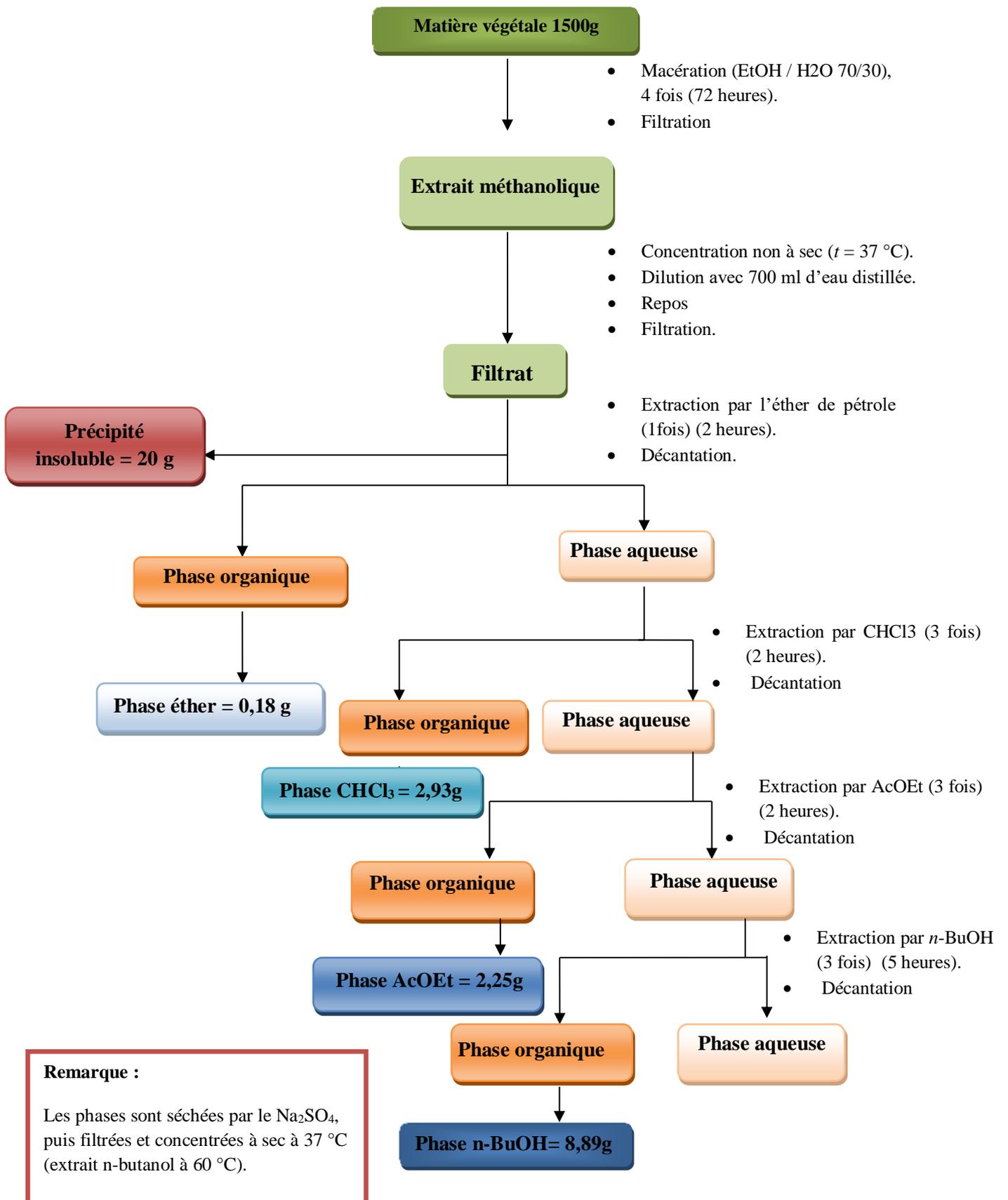


Figure II.5. Extraction de l'espèce *Cymbopogon schoenanthus* (Parties aériennes)

Tableau II.5: Rendement des phases des racines

Matière végétale	Phase	Masse (g)	Rendement (%)
1500g	Ether de pétrole	0,20	0,01
	Chloroforme	3,58	0,23
	Acétate d'éthyle	2,32	0,15
	<i>n</i> -Butanol	7,14	0,47
	Précipité	21,25	1,41

Tableau II.6: Rendement des phases des parties aériennes

Matière végétale	Phase	Masse (g)	Rendement (%)
1500g	Ether de pétrole	0,18	0,01
	Chloroforme	2,93	0,19
	Acétate d'éthyle	2,25	0,15
	<i>n</i> -Butanol	8,89	0,59
	Précipité	20,87	1,39

Après analyse sur plaque CCM, les extraits Ether, CHCl₃, AcOEt et *n*-BuOH des racines et des parties aériennes ont été regroupés ensemble ; vu la similitude de leur composition.

3.6.3. Etude phytochimique du Précipité des racines

Le précipité des racines a subi des séparations successives afin d'isoler les molécules pures. En commençant par la recherche sur plaques CCM analytiques du système d'élution donnant une meilleure séparation. Ce dernier est le *n*-hexane/Acétone (8/2).

3.6.3.1. Fractionnement du précipité

Environ 10 g du précipité des racines ont été dissous dans le méthanol est mélangés avec une petite quantité de gel de silice pour colonne, l'ensemble est séché sous vide, puis pulvérisé jusqu'à l'obtention d'une poudre homogène. Cette dernière est déposée sur la colonne de gel de silice, préparée dans le *n*-hexane. La masse de gel de silice utilisée est de 300 g. L'élution a été effectuée par le *n*-hexane enrichi progressivement avec l'acétone. Les fractions obtenues

sont regroupées suivant la similitude de leurs profils chromatographique sur des plaques CCM, qui après développement dans des cuves en verre avec des systèmes appropriés, ont été visualisées sous lampe UV à 254 et 365 nm, puis révélées et chauffées pendant 1 min à 100 °C, les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau II.7**.

Tableau II.7 : Résultats de la séparation par CC du précipité des racines de *C. schoenanthus*

Lots	Fractions	Système d'élution		Masse (mg)	Volume (ml)
		n-Hexane	Acétone		
1-6	FP0-1	100	0	11.40	700
7-12	FP0-2	98	2	28.90	600
13-16	FP1-1	98	2	30	400
17-30	FP1-2	97	3	42.34	1400
31-34	FP1-3	96	4	24.89	400
35-37	FP2-0	96	4	49.60	300
38-44	FP2-1	96	4	864	700
45-48	FP2-2	94	6	107.70	400
49-52	FP4-1	94	6	89.90	400
53-54	FP4-2	94	6	133.90	200
55-58	FP4-3	94	6	89.90	400
59-63	FP5-1	92	8	48.80	500
64-77	FP5-2	92	8	70.60	1400
78-89	FP6-1	90	10	334.9	1300
90-101	FP6-2	87	13	220.40	1100
102-115	FP6-3	85	15	272.40	1400
116-123	FP7-1	82	18	216	800
124-129	FP7-2	82	18	332.50	600
130-133	FP8-1	82	18	79.70	400
134-143	FP8-2	80	20	154.70	1000
144-155	FP8-3	75	28	170.40	1200
156-171	FP9	72	28	327.70	1600
172-175	FP10	68	37	64.65	400

176-179	FP11-1	68	37	73.58	400
80-188	FP12-2	65	35	103.89	900
189-194	FP12-3	60	40	64.10	600
195-200	FP13-1	55	45	99.90	600
201-208	FP13-2	55	45	66.40	800
209-216	FP14	50	50	75.80	800
217-222	FP15	50	50	40	600
223-240	FP16	40	60	138.60	1800
241-248	FP17	35	65	89.69	900
249-262	FP18	30	70	44.24	1400
263-270	FP19	25	75	84.35	800
271-290	FP20	20	80	183.44	2000
291-301	FP21	10	90	137.20	1100
302-305	FP22	0	100	68.50	400

3.6.3.2. Séparation des composés du précipité des racines

❖ Profil chromatographique des fractions du précipité des racines

La plaque a été éluée dans le système $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9/1) et révélée avec l'anisaldéhyde et chauffée pendant 3min à 100°C .

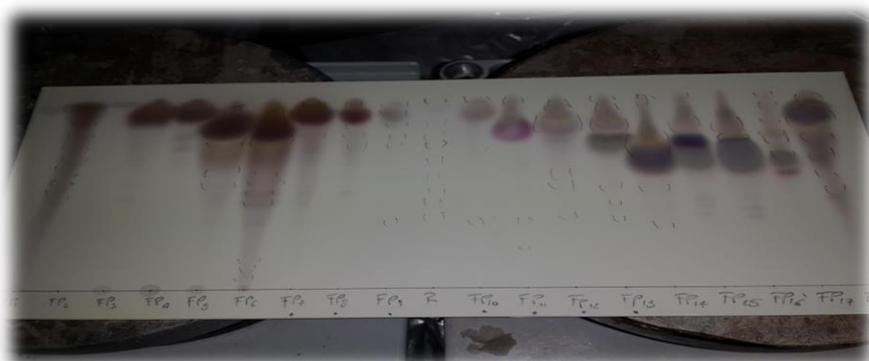


Figure II.6: profil chromatographique des fractions issues du précipité des racines

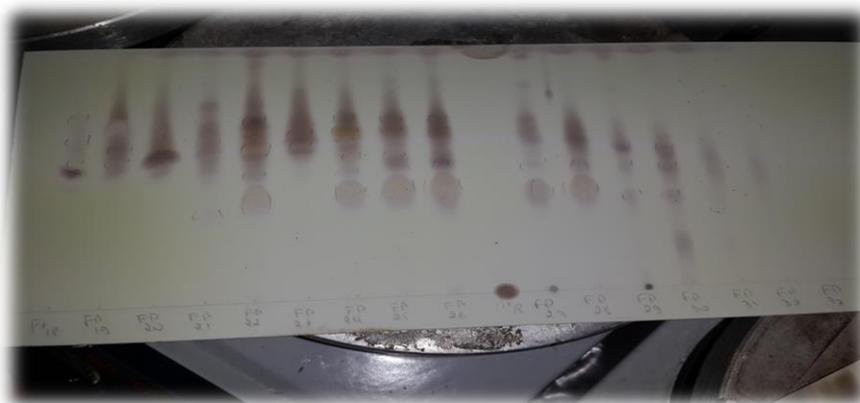


Figure II.6: profil chromatographique des fractions issues du précipité des racines (suite)

Les fractions issues de cette chromatographie sur colonne ont été analysé par HPLC semi-préparative, en utilisant comme phase mobile le mélange Méthanol/Eau à diverses proportions.

a) Etude de la fraction FP-15

La meilleure détection a été obtenue à la proportion (70 :30). Cette opération mène à l'obtention du chromatogramme présenté dans la figure II.7. Nous avons injecté la fraction 2 fois avec un temps total d'une injection de 34 min. les résultats relatifs à cette séparation sont rassemblés dans le tableau II.8.

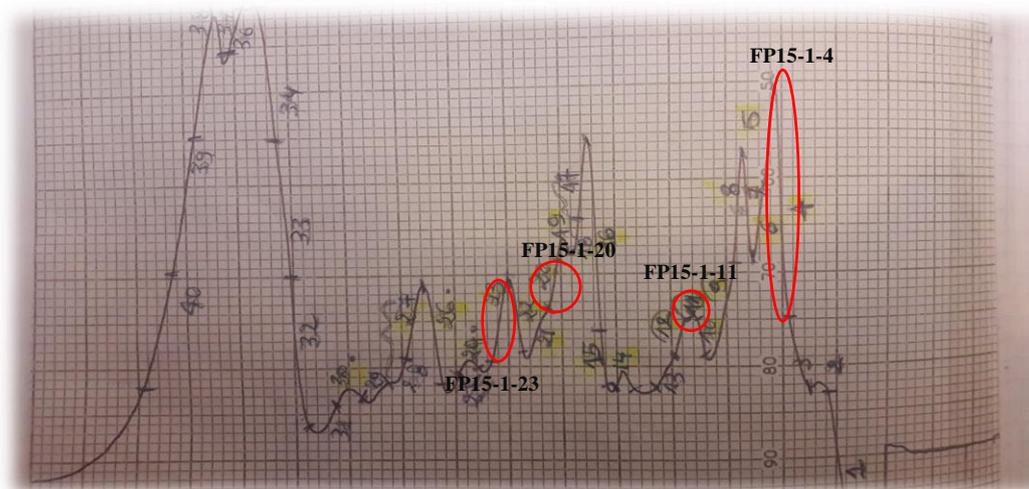


Figure II.7 : chromatogramme de la fraction FP15

Tableau II.8 : résultats de séparation de la fraction FP15

Sous fraction	Temps de rétention		Remarques
	T_R (min)		
FP15-1-4	4		Mélange
FP15-1-11	7,5		Mélange
FP15-1-20	12		Produit pur, le composé 3 (4mg)
FP15-1-23	14		Mélange

b) Etude de la fraction FP-17 (proportion 1)

La meilleure détection a été obtenue à la proportion (70 :30). Cette opération mène à l'obtention du chromatogramme présenté dans la figure II.8. Nous avons injecté la fraction 2 fois avec un temps totale d'une injection de 32 min. les résultats relatifs à cette séparation sont rassemblés dans le tableau II.9.

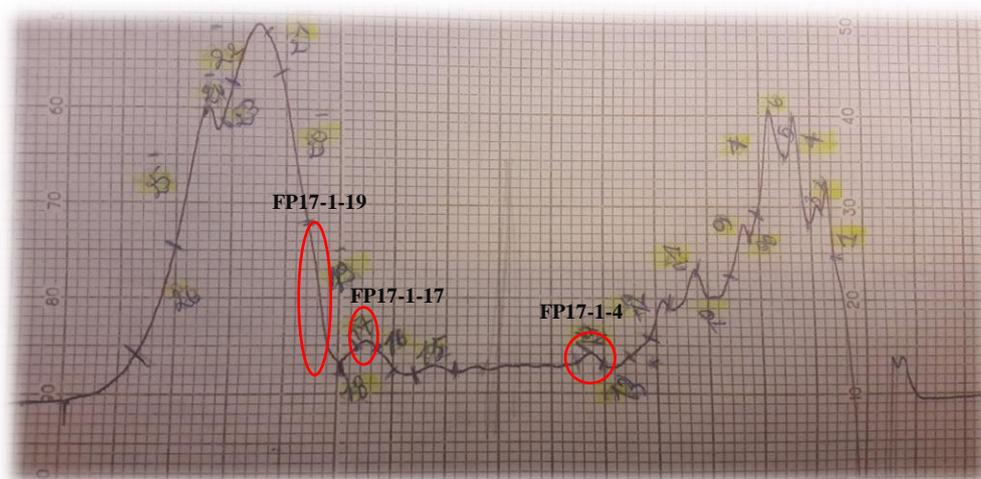


Figure II.8: chromatogramme de la fraction FP17(1)

Tableau II.9: résultats de séparation de la fraction FP17(1)

Sous fraction	Temps de rétention		Remarques
	T_R (min)		
FP17-1-4	4		Mélange
FP17-1-17	20		Mélange
FP17-1-19	21		Produit pur, le composé 4 (6,7mg)

c) Etude de la fraction FP-17 (proportion 2)

La meilleure détection a été obtenue à la proportion (65 :35). Cette opération mène à l'obtention du chromatogramme présenté dans la figure II.9. Nous avons injecté la fraction 1 fois avec un temps totale d'une injection de 53 min. les résultats relatifs à cette séparation sont rassemblés dans le tableau II.10.

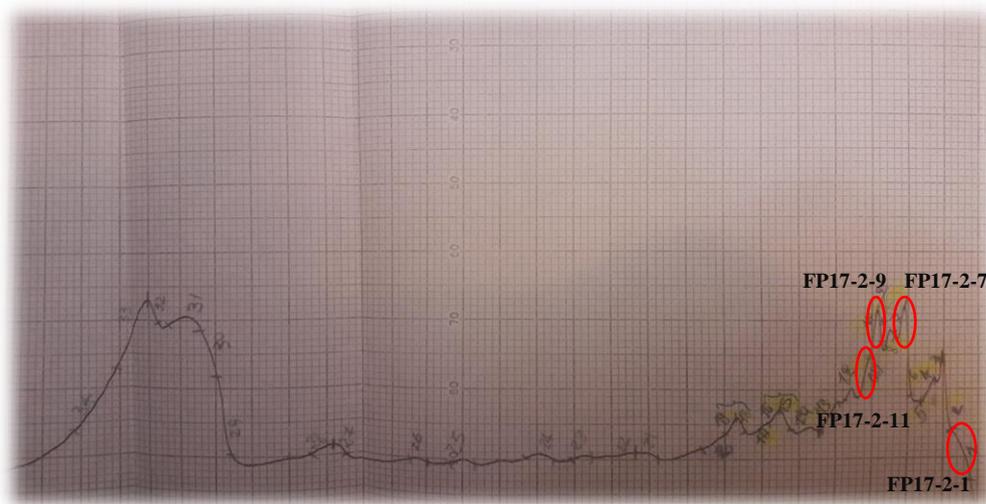


Figure II.9 : chromatogramme de la fraction FP17(2)

Tableau II.10: résultats de séparation de la fraction FP17(2)

Sous fraction	Temps de rétention		Remarques
	T_R (min)		
FP17-2-1	2		Produit pur, le composé 5 (1,4mg)
FP17-2-7	5		Mélange
FP17-2-9	6,5		Composé 5 (1,1mg)
FP17-2-11	7		Composé 5 (1,3mg)

d) Etude de la fraction FP-20

La meilleure détection a été obtenue à la proportion (65 :35). Cette opération mène à l'obtention du chromatogramme présenté dans la figure II.10. Nous avons injecté la fraction 4 fois avec un temps totale d'une injection de 24 min. les résultats relatifs à cette séparation sont rassemblés dans le tableau II.11.

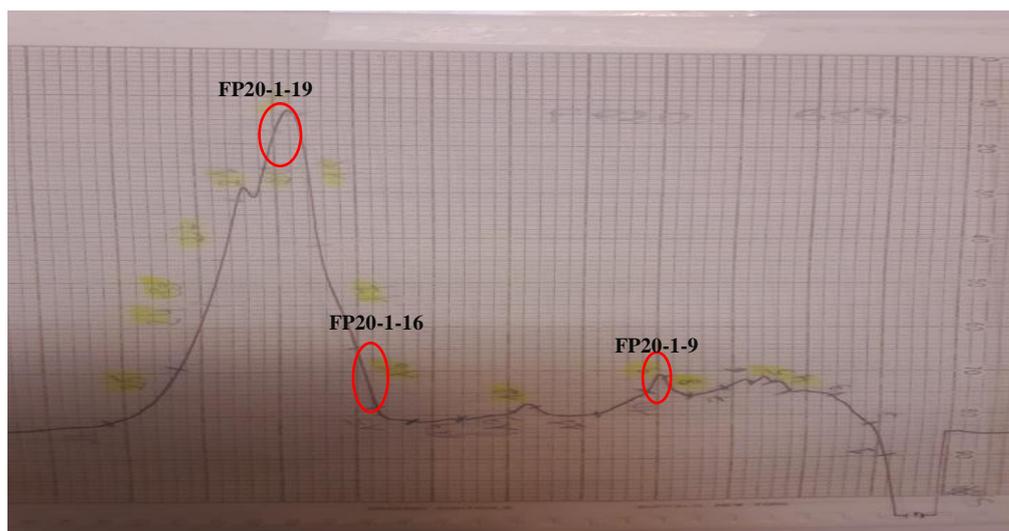


Figure II.10 : chromatogramme de la fraction FP20

Tableau II.11: résultats de séparation de la fraction FP20

Sous fraction	Temps de rétention		Remarques
	T_R (min)		
FP20-1-9	2		Mélange
FP20-1-16	5		Mélange
FP20-1-19	6,5		Produit pur, le composé 6 (2,1mg)

4. Conclusion

L'investigation phytochimique de *H. lippii* et *C. schoenanthus* en utilisant les différentes méthodes chromatographiques, nous a permis d'isoler 4 produits. Ces derniers ont été soumis aux analyses physico-chimiques afin d'en établir les structures. Les résultats et discussion des analyses de ces composés sont développés dans le chapitre III.

CHAPITRE III

INTERPRETATION DES RESULTATS

1. Introduction

Les produits obtenus des espèces étudiées sont soumis à des analyses structurales pour identifier et déterminer leurs structures chimiques.

2. Elucidation structurale des produits isolés de l'extrait chloroforme de *Helianthemum lippii*

2.1. Elucidation structurale des composés 1 et 2

Ce produit a été isolé à partir de la phase chloroforme sous-forme de cristaux (aiguilles blanches) de la fraction F5-1.

L'examen du spectre RMN ^1H (figure III.1.1) enregistré dans le CDCl_3 ainsi que son spectre étalé (figure III.1.2) et (figure III.1.3), montre la présence de signaux caractéristiques d'un squelette de type stéroïde que l'on peut identifier par comparaison avec la littérature (248) : Il s'agit d'un mélange de β -sitostérol et de stigmastérol.

- ✓ Deux singulets d'intégration 3H chacun à $\delta\text{H}=0,67$ et $1,15$ ppm, attribuables aux protons des méthyles CH_3 -18 et CH_3 -19 respectivement.
- ✓ Trois doublets à $\delta\text{H}=0,93$ ppm ($J = 6,5\text{Hz}$), $\delta\text{H}=0,84$ ppm ($J = 6,4\text{Hz}$) et $\delta\text{H}=0,81$ ppm ($J = 6,4\text{Hz}$), correspondent respectivement aux protons des méthyles CH_3 -21, CH_3 -27 et CH_3 -26.
- ✓ Un doublet large à $\delta\text{H}=5,35$ ppm d'intégration 1H ($J = 6,4\text{Hz}$) correspond à un proton oléfinique le H-6.
- ✓ Un multiplet d'intégration 1H à $\delta\text{H}=3,45$ ppm attribuable à un proton géminé d'un groupement hydroxyle, il s'agit du proton H-3 d'un stérol.

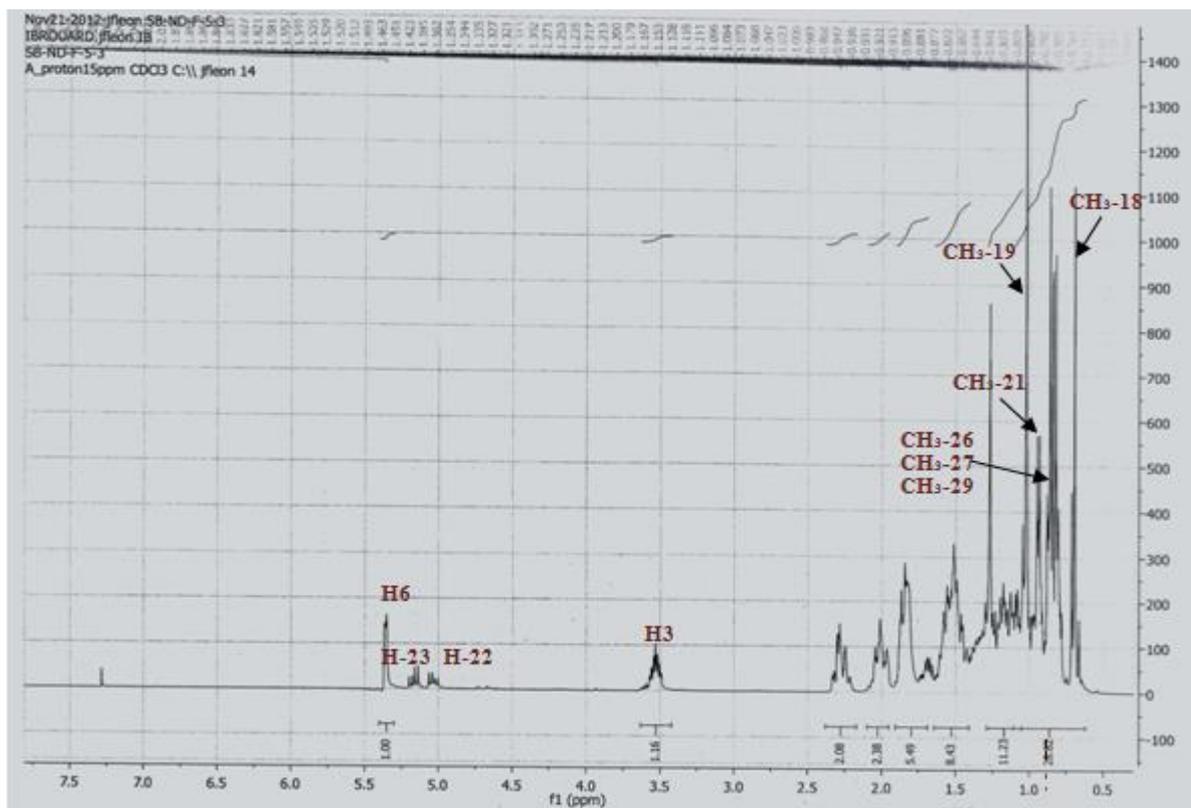


Figure III.1.1 : Spectre RMN H^1 du composé 1 et 2 (400MHz, $CDCl_3$, δ ppm)

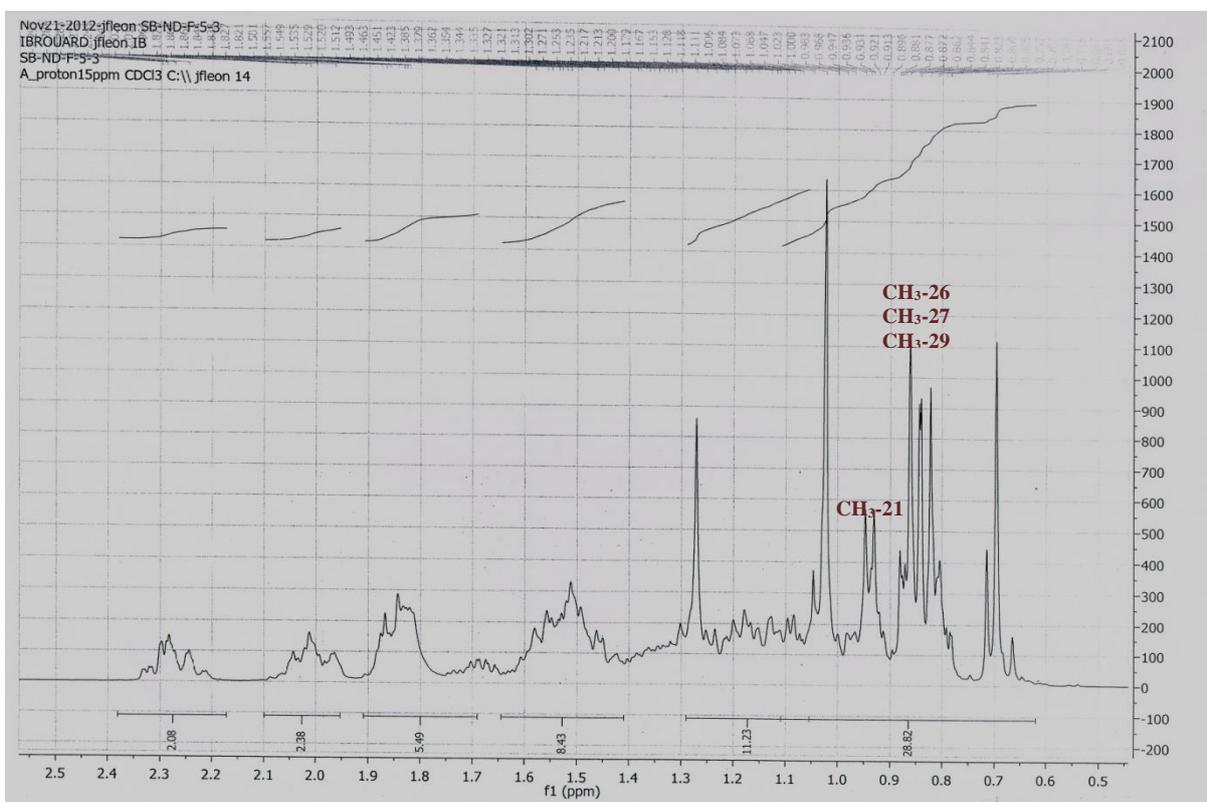


Figure III.1.2 : Spectre RMN H^1 étalé des composés 1 et 2 (400 MHz, $CDCl_3$, δ ppm)

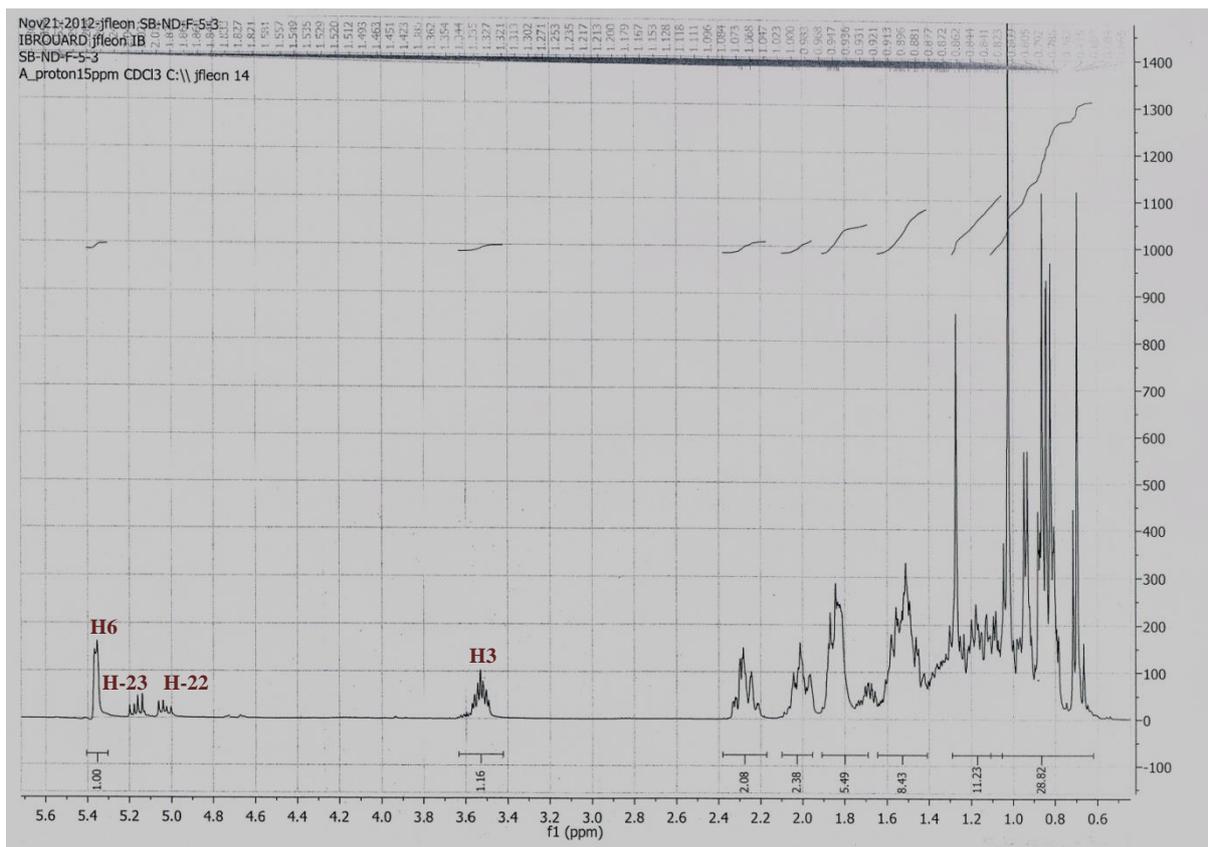


Figure III.1.3 : Spectre RMN H^1 étalé des composés 1 et 2 (400 MHz, $CDCl_3$, δ ppm)

La présence de deux protons vinyliques sous-forme de doublet dédoublé à $\delta H = 5,02$ ppm ($J = 15,1 ; 8,1$ Hz) et $\delta H = 5,16$ ppm ($J = 15,1 ; 8,4$ Hz) attribuables aux protons oléfiniques de la chaîne latérale en C-17 du stigmastérol (protons éthyléniques des positions C-23 et C-22 respectivement).

La comparaison de l'ensemble de ces données spectrales avec ceux retrouvés dans la littérature, en tenant compte les intégrales des signaux relatifs à H-3, H-6, H-22 et H-23 dans le spectre proton (Figure III.1.1), montre que si H-3 et H-6 ont une intégrale d'environ 1 chacun, H-22 et H-23 donnent une intégrale d'environ 0,50 chacun. Ceci oriente vers la présence d'un mélange de 50% de β -sitostérol (composé 1) et de 50% le stigmastérol (composé 2) (249).

Le composé β -sitostérol a été trouvé précédemment dans l'espèce *Helianthemum sissiliflorum* (Cistaceae) (103).

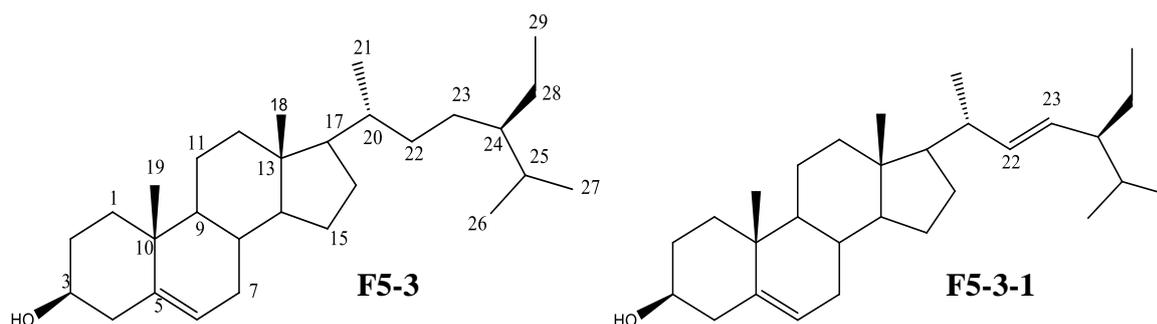
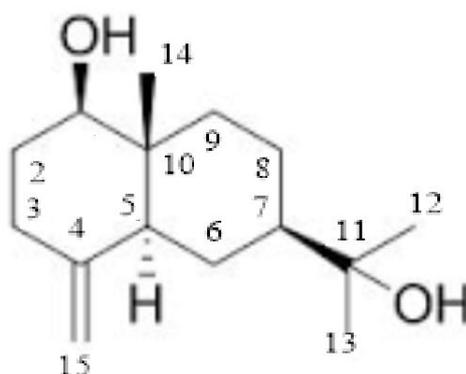


Figure III.2 : La structure des composés 1 et 2, le β -sitostérol et le stigmastérol

3. Elucidation structurale des produits isolés du précipité des racines de *Cymbopogon schoenanthus*

3.1. Elucidation structurale du composé (3)



Le composé 3 a été obtenu de la fraction FP15-1-20 sous forme de poudre blanche.

L'analyse des données de la RMN ^1H , ^{13}C et HSQC révèle la présence de :

- ✓ Trois singulets d'intégration 3H, ($\delta_{\text{H}} = 0,78, 1,22$ et $1,21$ ppm), attribuables à trois méthyles tertiaires. Les deux derniers sont voisins d'un groupement oxygéné ($\delta_{\text{C}} = 26,3 ; 26,6$ et $10,4$ ppm)
- ✓ Six méthylènes à ($\delta_{\text{H}} = 1,58$ et $1,78$) ; ($1,72$ et $1,23$) ; ($1,28$ et $1,60$) ; ($1,16$ et $2,00$) ; ($2,15$ et $2,33$) ppm ; ($\delta_{\text{C}} = 22,9 ; 25,6 ; 32,6 ; 35,6 ; 38,9$ ppm) dont un éthyléniques ($\delta_{\text{H}} = 4,78$ et $4,55$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 106,6$ et $150,7$ ppm).
- ✓ Trois methines ($\delta_{\text{C}} = 48,6$ et $50,0$ ppm) dont un hydroxylé ($\delta_{\text{H}} = 3,33$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 79$ ppm).

- ✓ Trois carbones quaternaires ($\delta_C=35.4$ ppm) dont un sp^2 ($\delta_C= 150.7$ ppm) et un oxygéné ($\delta_C= 73.3$ ppm).

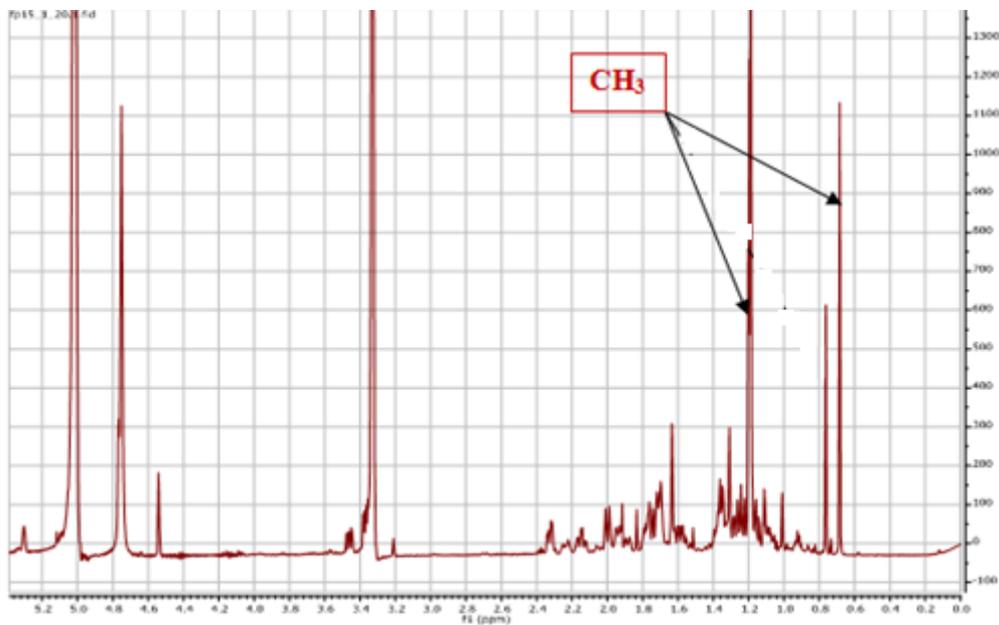


Figure.III.3.1 : Spectre RMN 1H (CD3OD, 600 MHz, δ ppm) du composé 3

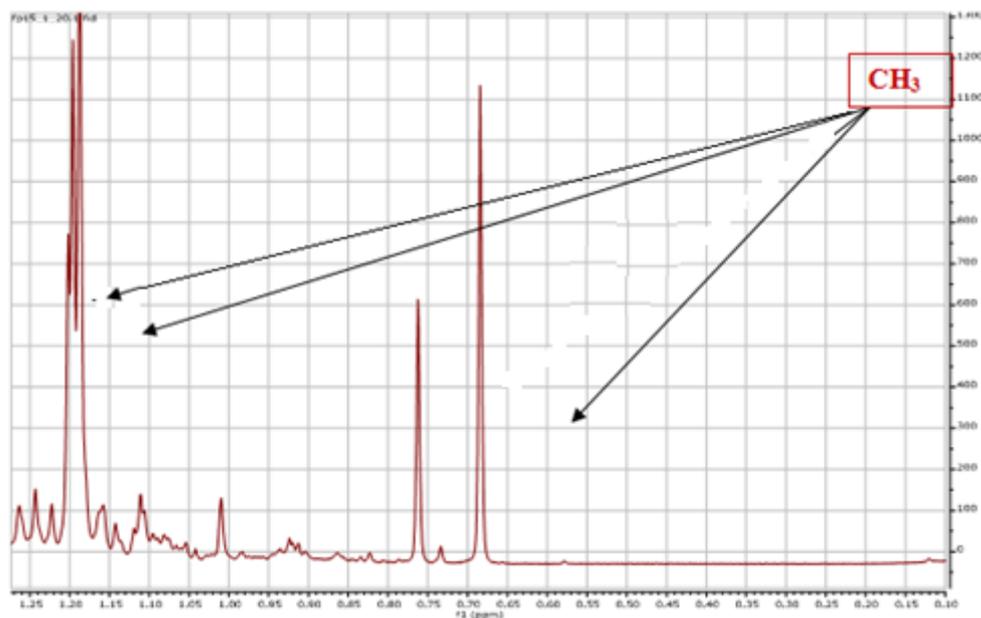


Figure.III.3.2 : Spectre RMN 1H étalé (CD3OD, 600 MHz, δ ppm) du composé 3

On aura ainsi une formule brute : $C_{15}H_{26}O_2$ qui est celle d'un sesquiterpène bicyclique dihydroxylé ; les deux fonctions oxygénées ne peuvent être que des hydroxyles compte tenu du nombre de carbones présents ainsi que leurs déplacement chimique..

- Par ailleurs les données ^{13}C du composé 3 sont identiques avec celle de l'hydroxy- -eudesmol comme le montre le tableau III.1.

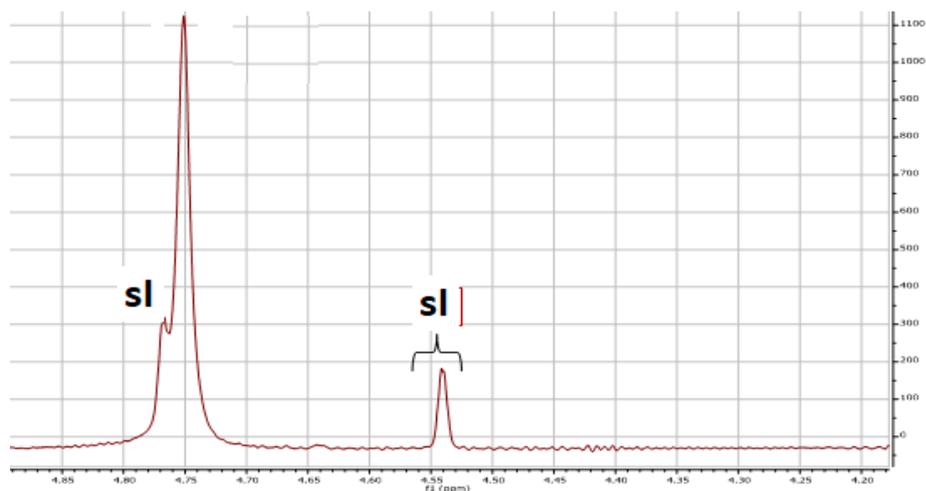


Figure III.3-3 : Spectre RMN 1H étalé (CD3OD, 600 MHz, δ ppm) du composé 3

- Un carbone tertiaire hydroxylé à ($\delta_C = 73.3$ ppm).

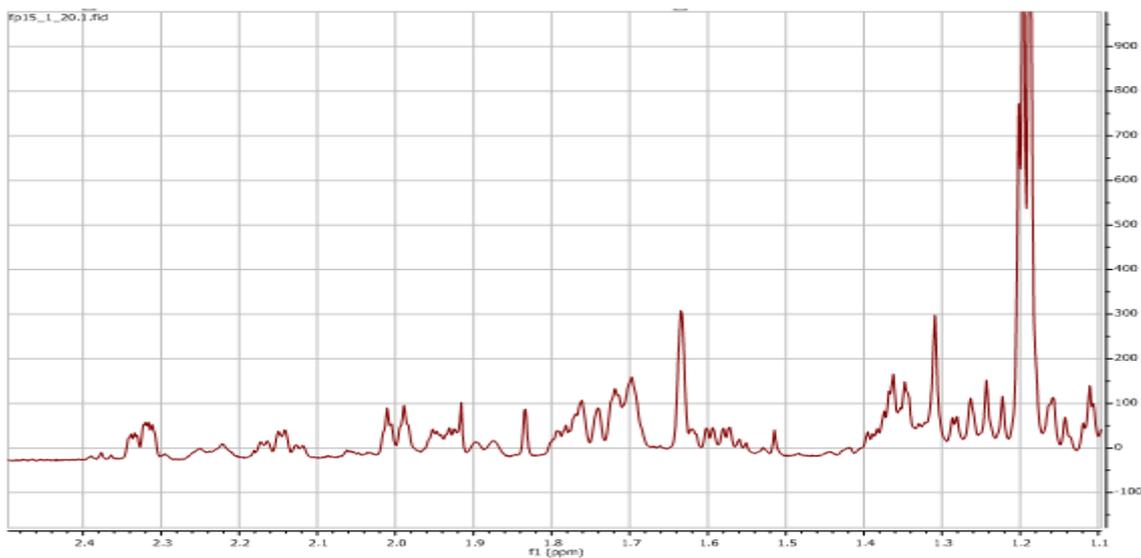


Figure III.3.4: Spectre RMN 1H étalé (CD3OD, 600 MHz, δ ppm) du composé 3

- ✓ Un triplet de doublet à ($\delta_H = 2.15$ ppm ($J = 5.1, 13.5$)), et un doublet de doublet de doublet à ($\delta_H = 2.33$ ppm ($J = 2.0, 4.6, 12.9$)) ; ($\delta_C = 35.6$ ppm).

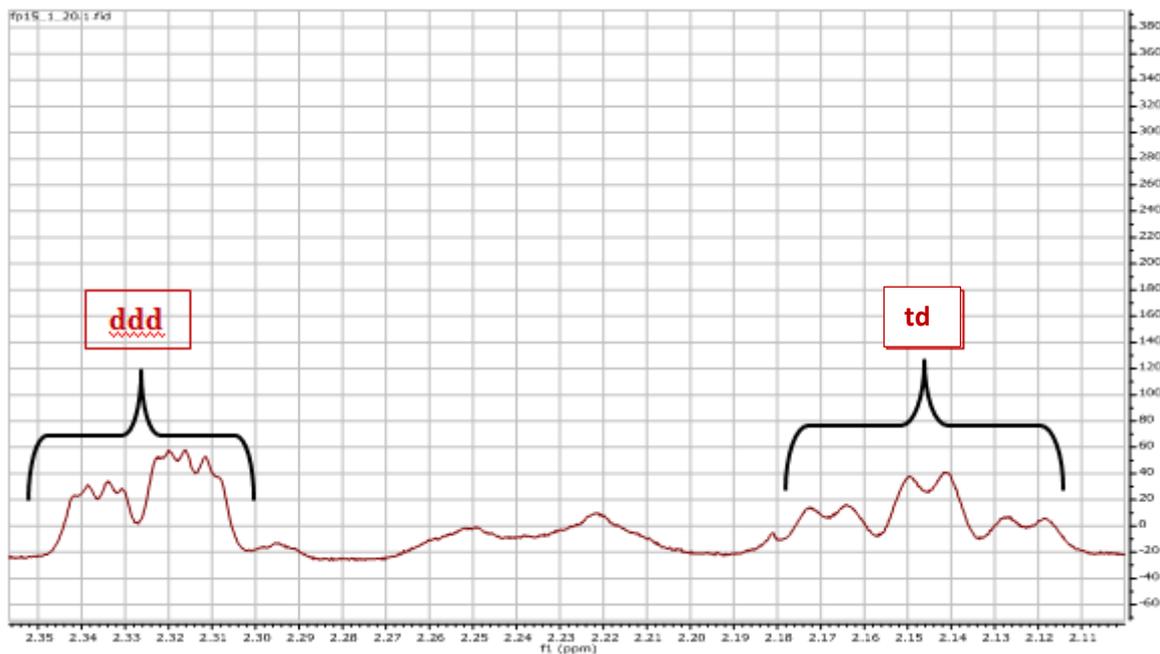


Figure III.3.5 : Spectre RMN 1H étalé (CD3OD, 600 MHz, δ_{ppm}) du composé 3

- ✓ Un doublet de triplet à ($\delta_{\text{H}}= 1.16\text{ppm}$ ($J= 3.0, 12.3$)), et un doublet de triplet à ($\delta_{\text{H}}= 2.00$ ppm ($J= 12.3, 3.6$)), ($\delta_{\text{C}}= 38.1$ ppm).

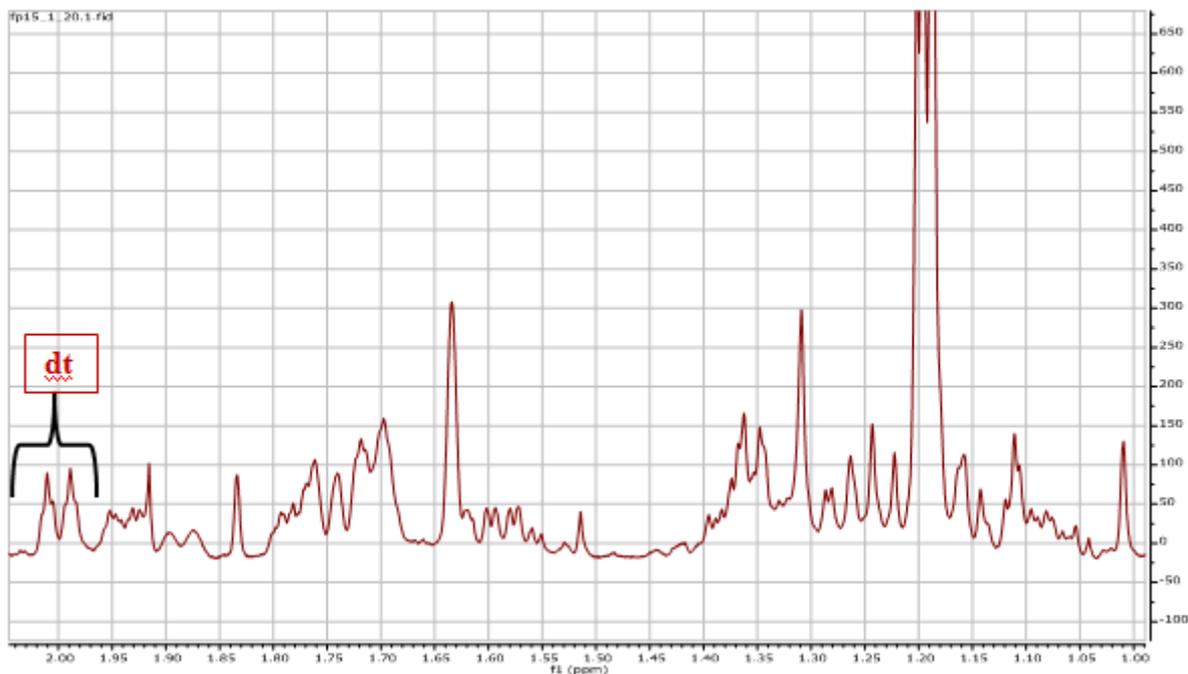


Figure III. 3.6 : Spectre RMN 1H étalé (CD3OD, 600 MHz, δ_{ppm}) du composé 3

- Deux méthynes à ($\delta_{\text{C}}= 48.6$ et 50.0 ppm).

- Un signal sous forme de multiplet attribuable à un méthine hydroxylé à ($\delta_H = 3.33$ ppm ; $\delta_C = 79$ ppm).

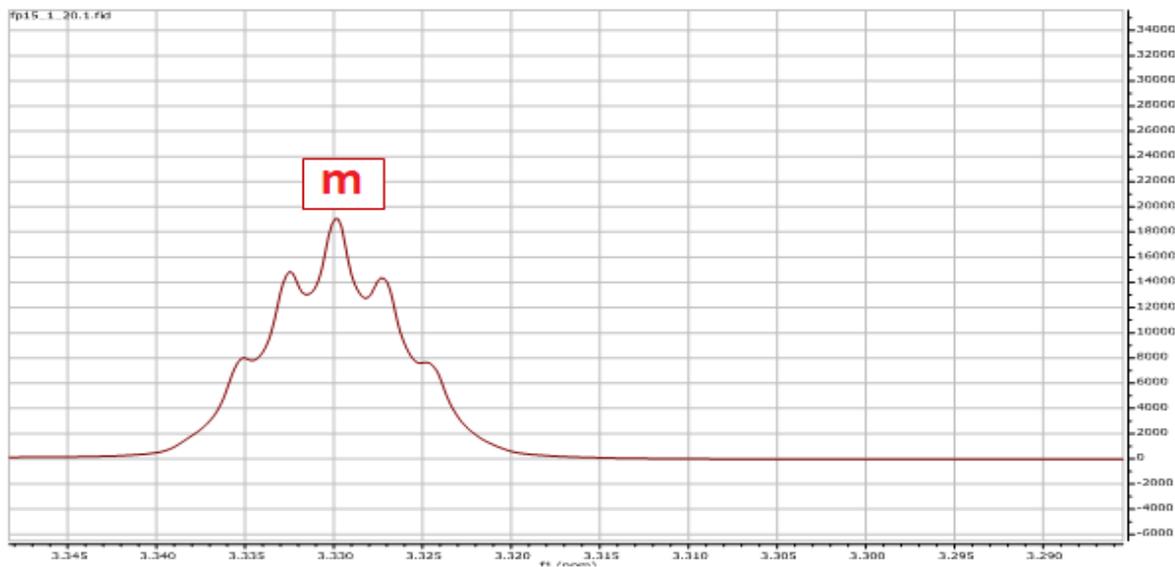


Figure III.3-7 : Spectre RMN 1H étalé (CD3OD, 600 MHz, δ ppm) du composé 3

- Un carbone quaternaire à ($\delta_C = 35.4$ ppm).

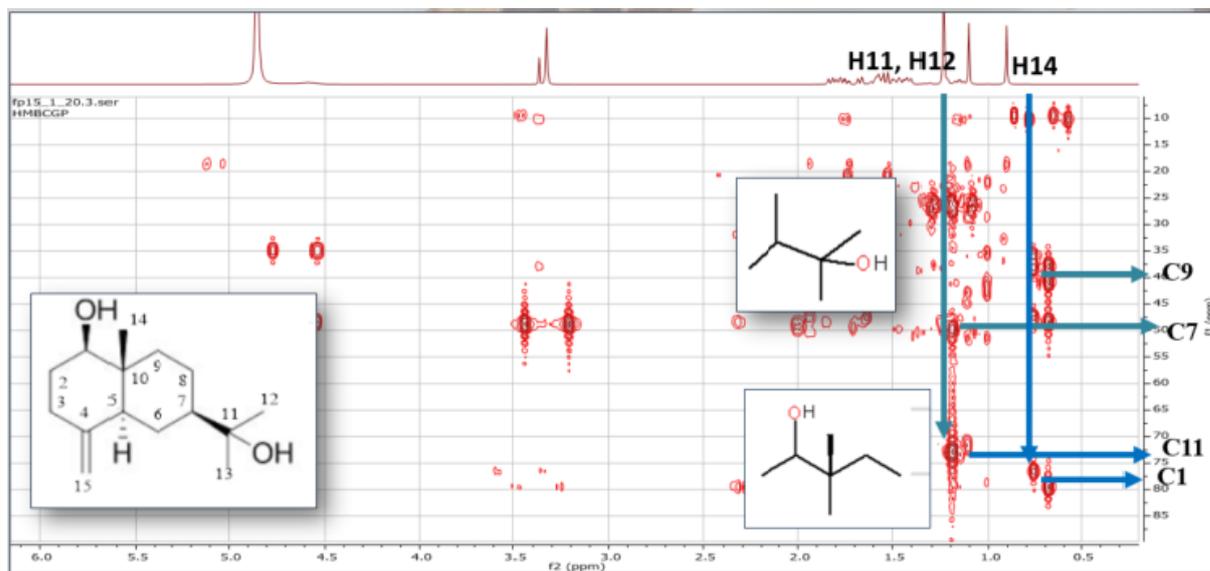


Figure III.4.1 : Spectre HMBC (CD3OD, 600 MHz, δ ppm) du composé 3

Les corrélations dans les spectres HMBC montre

- Un méthyle à 0,78 ppm qui est un méthyle angulaire d'après son déplacement chimique il est donc à l'intersection des deux cycles du sesquiterpénoïde. Il corrèle dans le spectre HMBC avec un CH oxygéné à 79 ppm et avec un CH₂ à 38,1 ppm.
- Les deux méthyles déblindés à 1,21 et 1,22 ppm corrèlent avec un carbone quaternaire oxygéné et avec un CH à 50 ppm.

Ces informations-là: un sesquiterpène bicyclique dihydroxylé, ajoutés à la présence de la double liaison exocyclique orientent de manière non équivoque vers la structure de l'hydroxy-beta-eudesmol

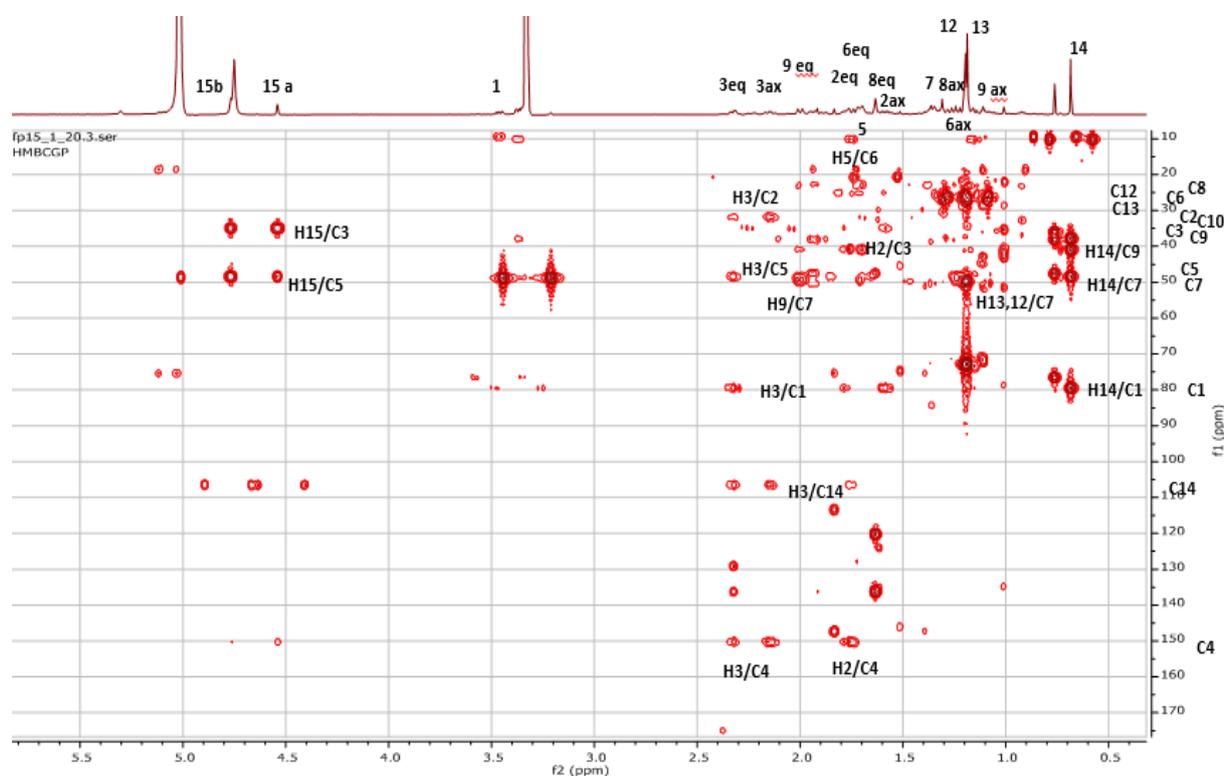


Figure III.4.2 : Spectre HMBC (CD₃OD, 600 MHz, δppm) du composé 3

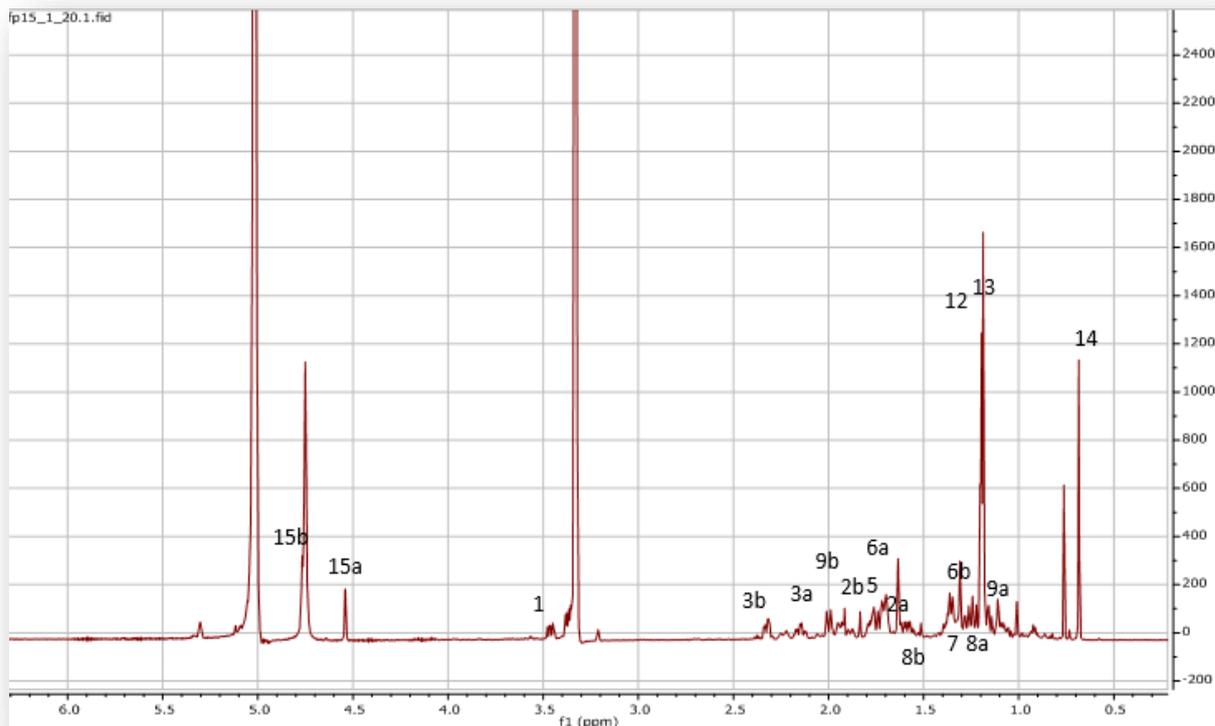


Figure III.5 : Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 600 MHz, δppm) du composé 3

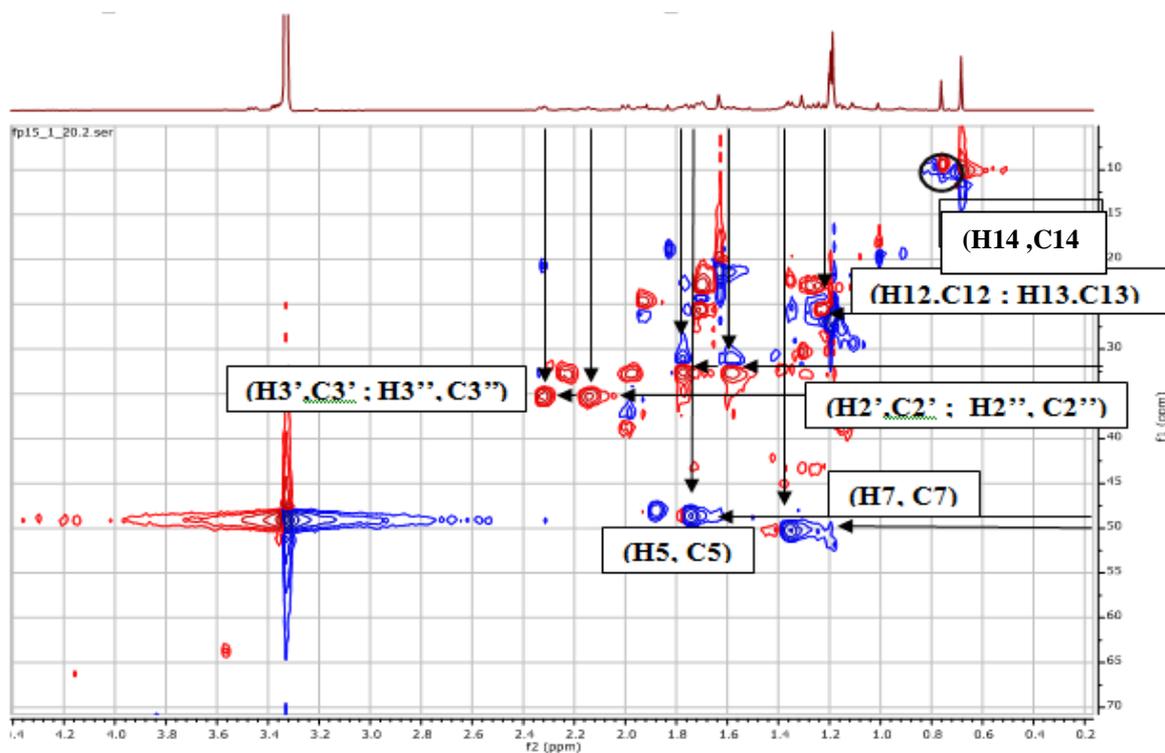


Figure III.6 : Spectre HSQC étalé (CD_3OD , 600 MHz, δppm) du composé 3

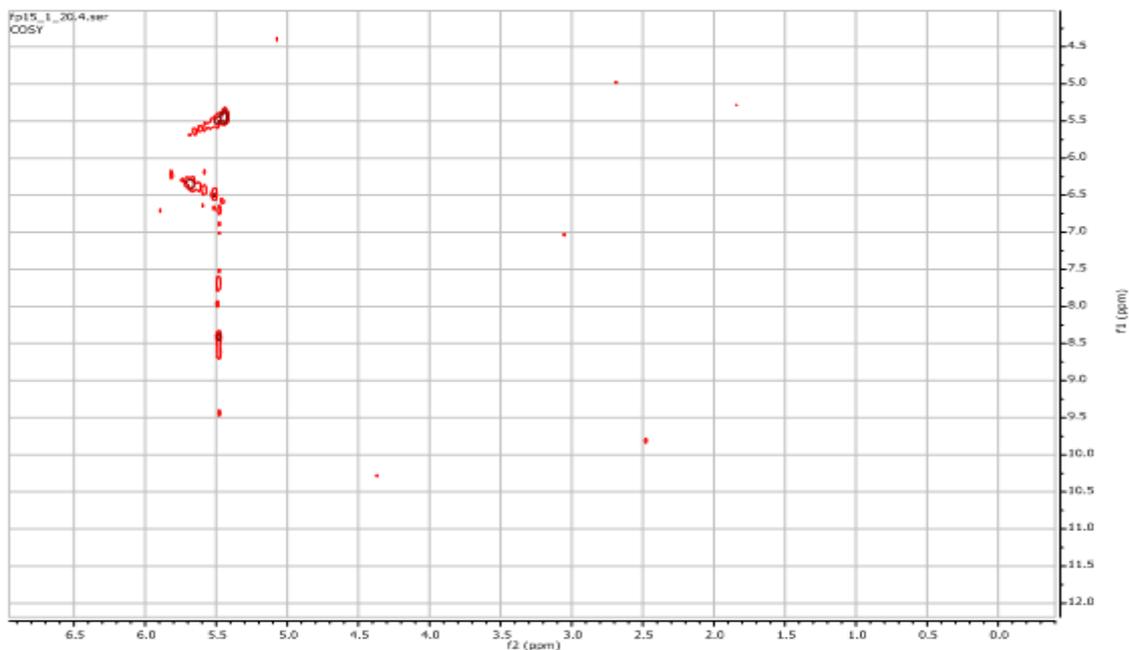


Figure III.7 : Spectre COSY (CD₃OD, 600 MHz, δ ppm) du composé 3

Les données relatives aux spectres RMN RMN H¹ et C¹³ de ce composé sont reportées dans le tableau III.1.

Tableau III.1: les données de la spectroscopie RMN H¹ et C¹³ (CD₃OD, 600 MHz, δ ppm) du composé 3

Position	δ_{H} (ppm)	J (Hz)	δ_{C} (ppm)
1	3.33	dd (4.5, 12.0)	79.0
2	1.58	m	32.6
	1.78	m	
3	2.15	td (5.1, 13.5)	35.6
	2.33	ddd (2.0, 4.6, 12.9)	
4	-	-	150.7
5	1.76	m	48.6
6	1.72	m	25.6
	1.23	m	
7	1.36	m	50.0
8	1.28	m	22.9
	1.60	m	
9	1.16	td (3.0, 12.3)	38.1
	2.00	dt (12.3, 3.6)	
10	-	-	35.4
11	-	-	73.3
12	1.21	s	26.3
13	1.22	s	26.6
14	0.78	s	10.4
15	4.78	d (1.1)	106.6
	4.55	d (1.1)	

La stéréochimie du composé est déterminée par NOESY:

- Les pics croisés entre H-1 ($\delta_H=3.33\text{ppm}$) et H-9 β ($\delta_H=2.00\text{ppm}$), ainsi qu' H-9 β ($\delta_H=2.00\text{ ppm}$) et H-7 β ($\delta_H= 1.36\text{ppm}$) (250) révèlent que l'hydroxyle en C-1 et le groupement propanol en C-7 sont orientés en position α (251).
- Les pics croisés entre Me-14 ($\delta_H=0.78\text{ppm}$) et H-6 α ($\delta_H=1.72\text{ ppm}$), et entre H-14 et H-8 α ($\delta_H=1.28\text{ppm}$) permettent d'attribuer le groupement méthyle au C-10 en α .

Selon les données de la littérature le composé sera le : (1S,4a a)-4-Methylene-6-b-(1-hydroxy-1-methylethyl)-8a b-methyl-decahydronaphthalene-1b-ol 1S, 7S, 10S- eudesm-4(14)-en-1 α -11 α -diol (hydroxy- β -eudesmol)

Ce composé a été isolé auparavant de *Litsea Verticillata* Hance (Lauraceae) (250) . Il est nouveau pour la famille des Poaceae.

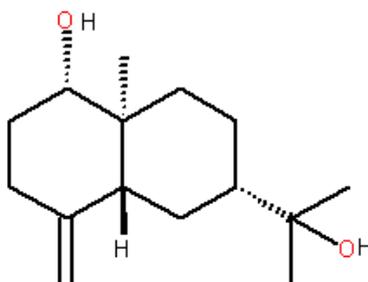
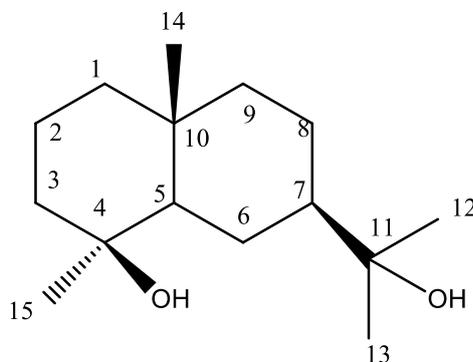


Figure III.8 : La structure du composé 3, (1S,4a a)-4-Methylene-6-b-(1-hydroxy-1-methylethyl)-8a b-methyl-decahydronaphthalene-1b-ol 1S, 7S, 10S- eudesm-4(14)-en-1 α -11 α -diol (hydroxy- β -eudesmol)

3.2. Elucidation structurale du composé (4)



Le composé 4 a été obtenu de la fraction FP17-1-19 sous forme de poudre blanche

L'analyse simultanée des spectres RMN H^1 , HSQC et HMBC ainsi que la comparaison du spectre proton du composé 4 avec celle du produit 3 montre l'apparition d'un méthyle supplémentaire dans le composé 4 et la disparition des signaux des protons oléfiniques ainsi que la disparition du signal du proton hydroxylé. Le méthyle supplémentaire apparaissant à 1,12 ppm

Le spectre RMN H^1 révèle la présence de quatre singulets d'intégration 3H chacun, attribuables à quatre groupement méthyles à (δ_H = 0.92, 1.12, 1.21 et 1.22 ppm) qui sont les protons des Me-14, Me-15, Me-12 et Me-13 respectivement.

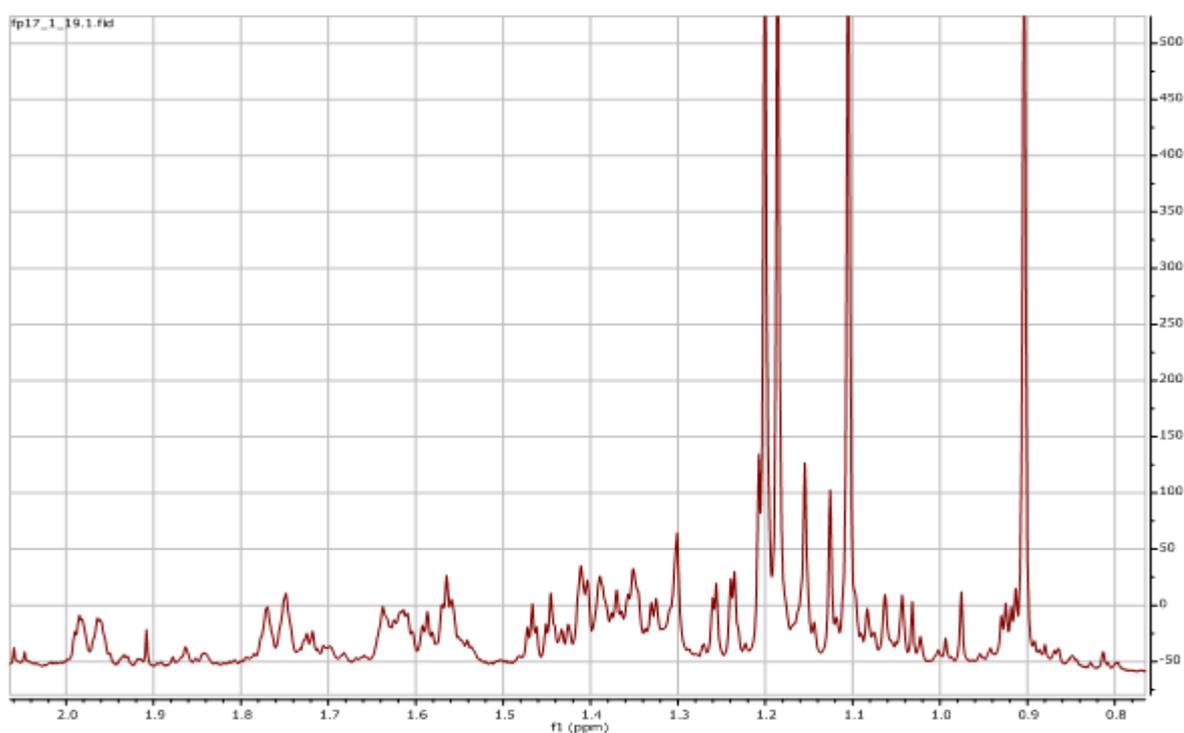


Figure III.9.1 : Spectre RMN $1H$ (CD $_3$ OD, 600 MHz, δ ppm) du composé 4

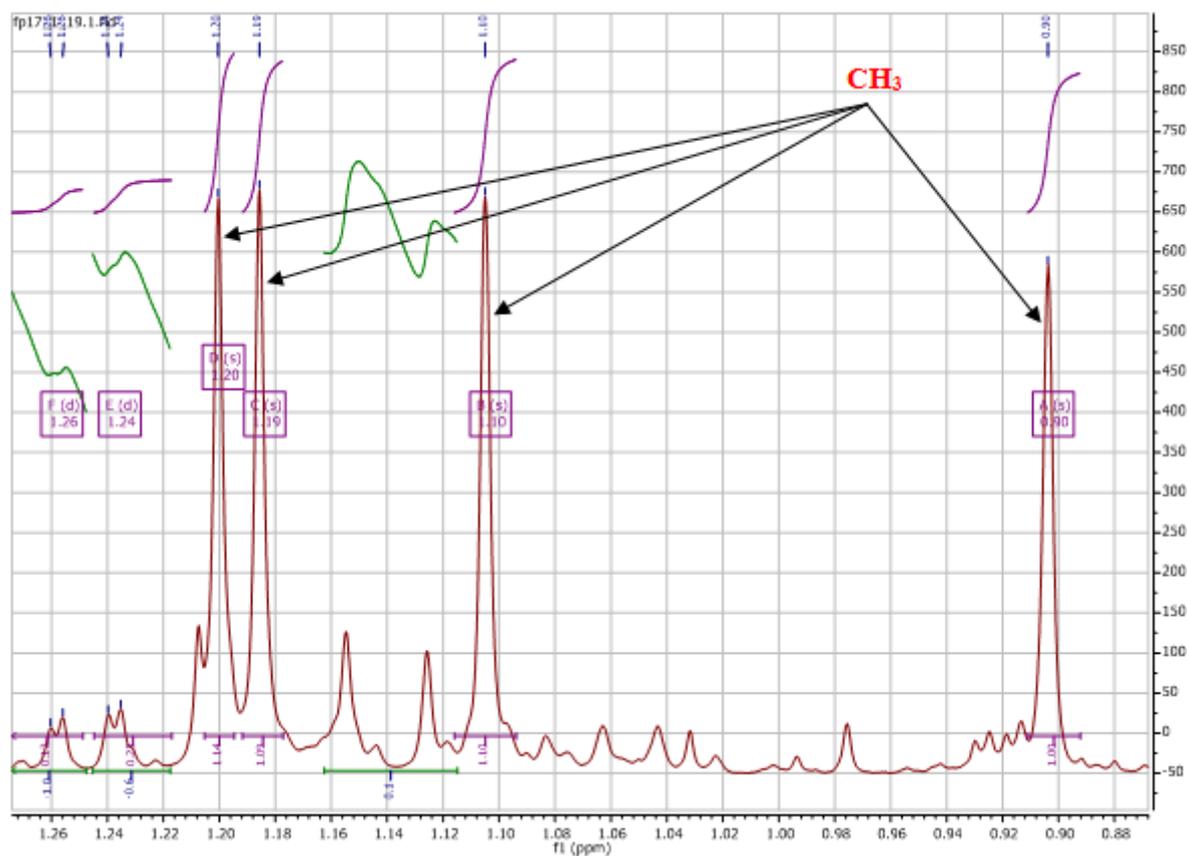
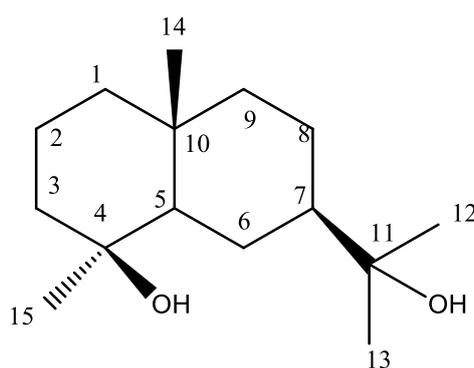


Figure III.9.2 : Spectre RMN 1H étalé (CD₃OD, 600 MHz, δ ppm) du composé 4

Le spectre a aussi indiqué l'absence de protons oléfiniques et leur remplacement par un CH₃ porté par un carbone oxygéné. Ceci oriente vers la structure de l'isodonesesquitin A, cryptomeridiol ou 4 α , 11-dihydroxy-7-epi-eudesmandiol.



Un doublet de doublet a été observé à $\delta_{\text{H}}=1.27$ ppm ($J=2.7, 12.7$), et deux multiplets ont été observés à $\delta_{\text{H}}=1.06$ et 1.98 ppm attribuables à H6 α et H6 β respectivement.

La présence de quatre méthyles singulets dans un sesquiterpénoïde suggère une structure d'une squelette Eudesmane sesquiterpénoïde (252).

Le spectre HSQC a révélé que les protons responsables du déplacement chimique à ($\delta_{\text{H}}=1.21$ et 1.22 ppm) sont dus à des groupes diméthyle géminés.

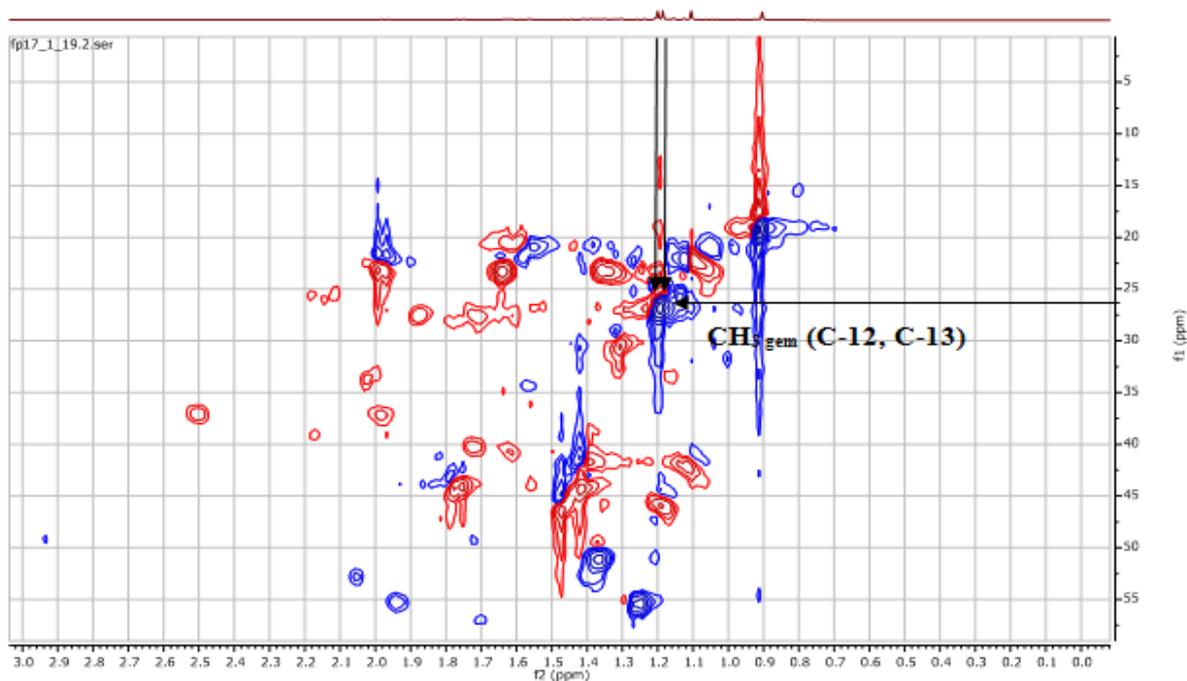


Figure III.10.1: Spectre HSQC (CD3OD, 600 MHz, δ_{ppm}) du composé 4

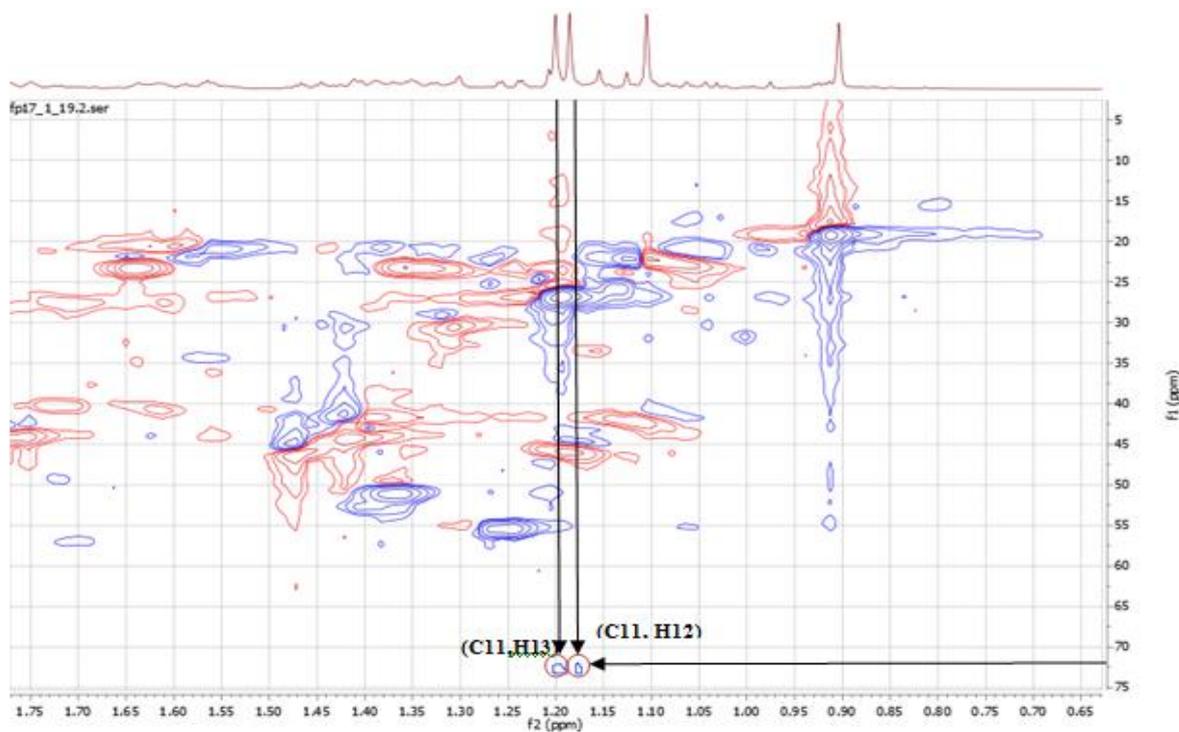


Figure III.10.2 : Spectre HSQC étalé (CD3OD, 600 MHz, δ_{ppm}) du composé 4

D'après le spectre HMBC on remarque la présence de deux carbones quaternaires très déblindés à ($\delta_C = 73.4$ et 73.2 ppm) ce qui suggère leur attachement à un atome fortement électro-négatif comme un oxygène.

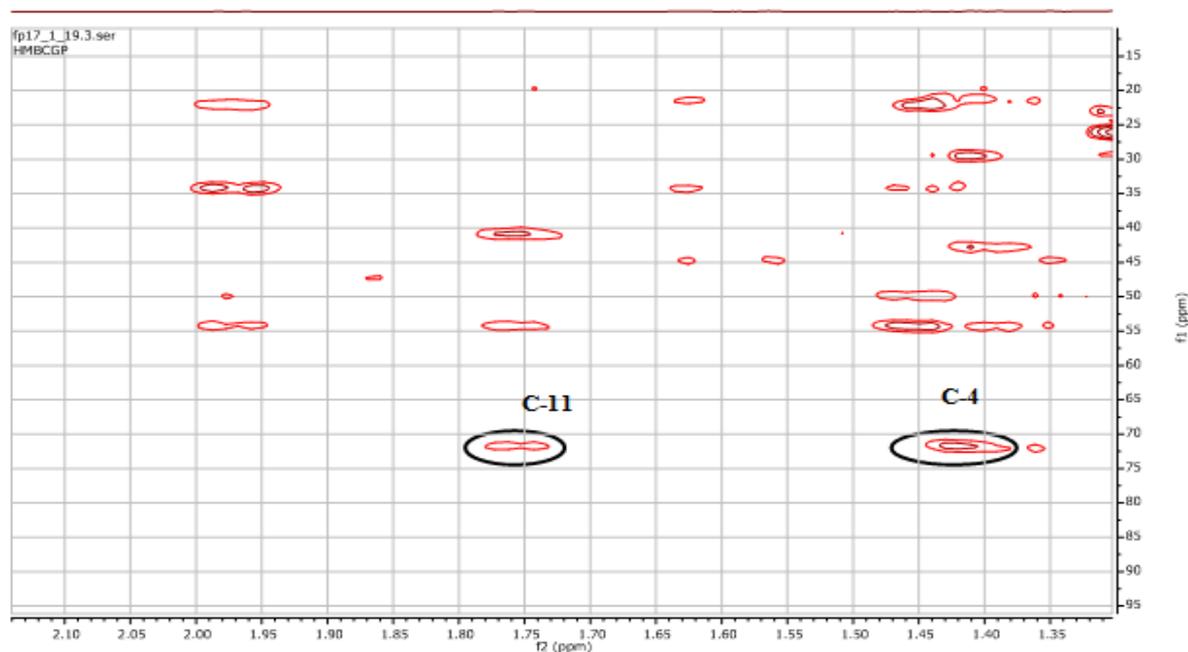


Figure III.11.1 : Spectre HMBC (CD₃OD, 600 MHz, δ ppm) du composé 4)

Le déplacement des méthyles à ($\delta_H = 1.11, 1.21$ et 1.22) dans le spectre proton était aussi indicatif de leur attachement à un carbone oxygéné.

Les résultats de RMN 2D, H^1 étaient en accord avec la structure proposée d'un sesquiterpénoïde de type eudesmane.

Les multiplicités de signaux de protons se chevauchant ont été déterminées à partir de J résolue des spectres RMN 2D, tandis que le spectre COSY-45 établit les interactions de couplage entre les protons vicinaux

Une paire de pics croisés a été observée à $\delta_H = 1.06$ et 1.27 ppm et à $\delta_H = 1.98$ et 1.27 ppm montrant les interactions de couplage des protons en H-6 α et H-6 β avec ceux de H-5.

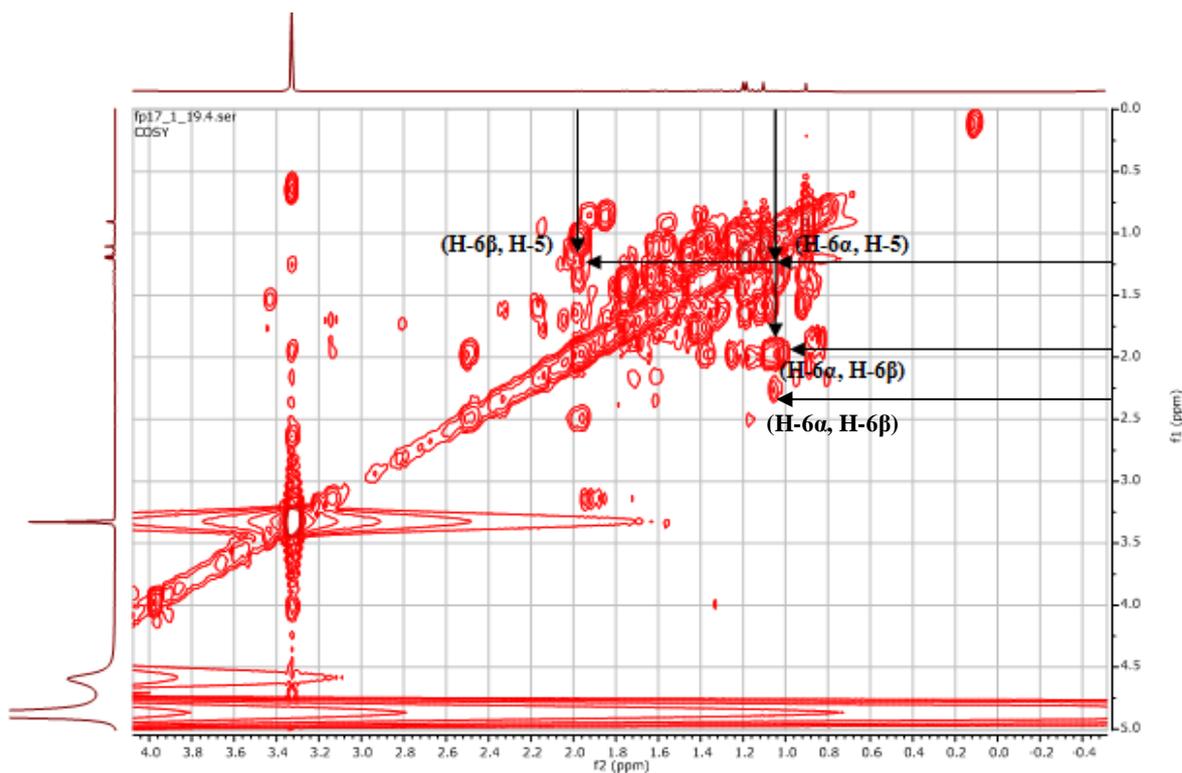


Figure III.12.1 : Spectre COSY étalé (CD3OD, 600 MHz, δ ppm) du composé 4

Un pic croisé entre H-6 α et H-6 β a également été observé dans le spectre COSY-45. Il a également montré une interaction de couplage vicinal de H-6 α et H-6 β avec H-7 à $\delta = 1,65$ ppm.

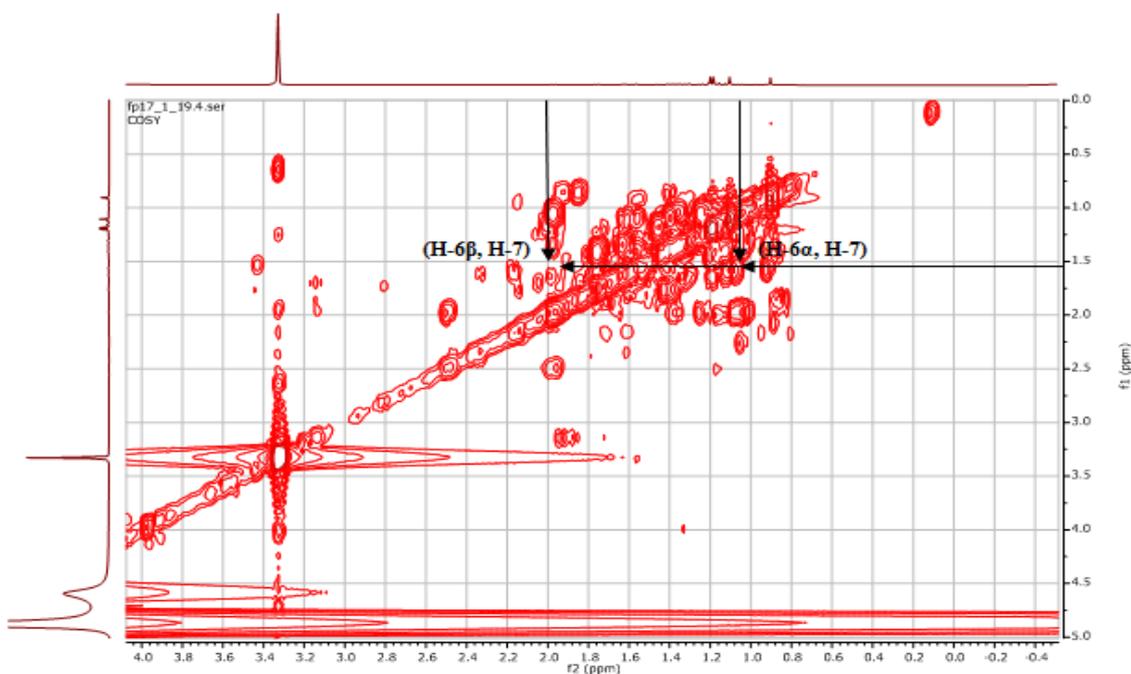


Figure III.12.2 : Spectre COSY étalé (CD3OD, 600 MHz, δ ppm) du composé 4

Les protons portés par le C-1 à $\delta = 1,11$ ppm sont voisins des protons portés par le C-2 à $\delta = 1,44$ ppm, et ce dernier a montré un couplage vicinal avec les protons C-3 à $\delta = 1,43$ ppm.

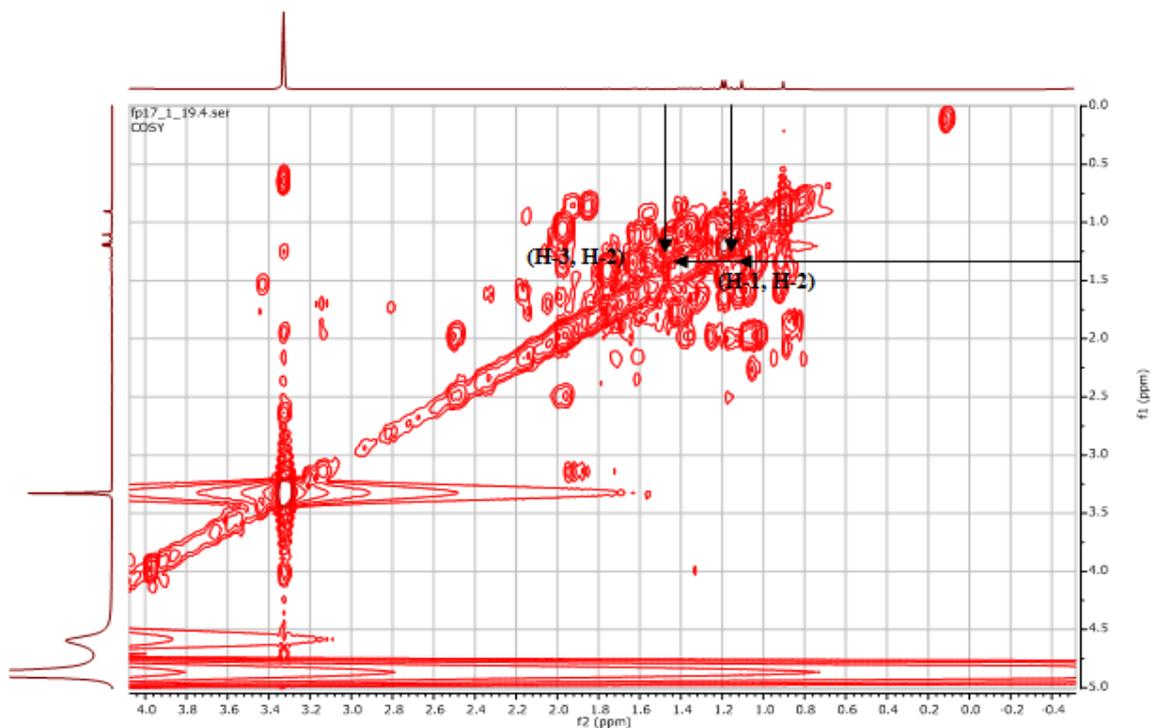


Figure III.12.3 : Spectre COSY étalé (CD3OD, 600 MHz, δ ppm) du composé 4

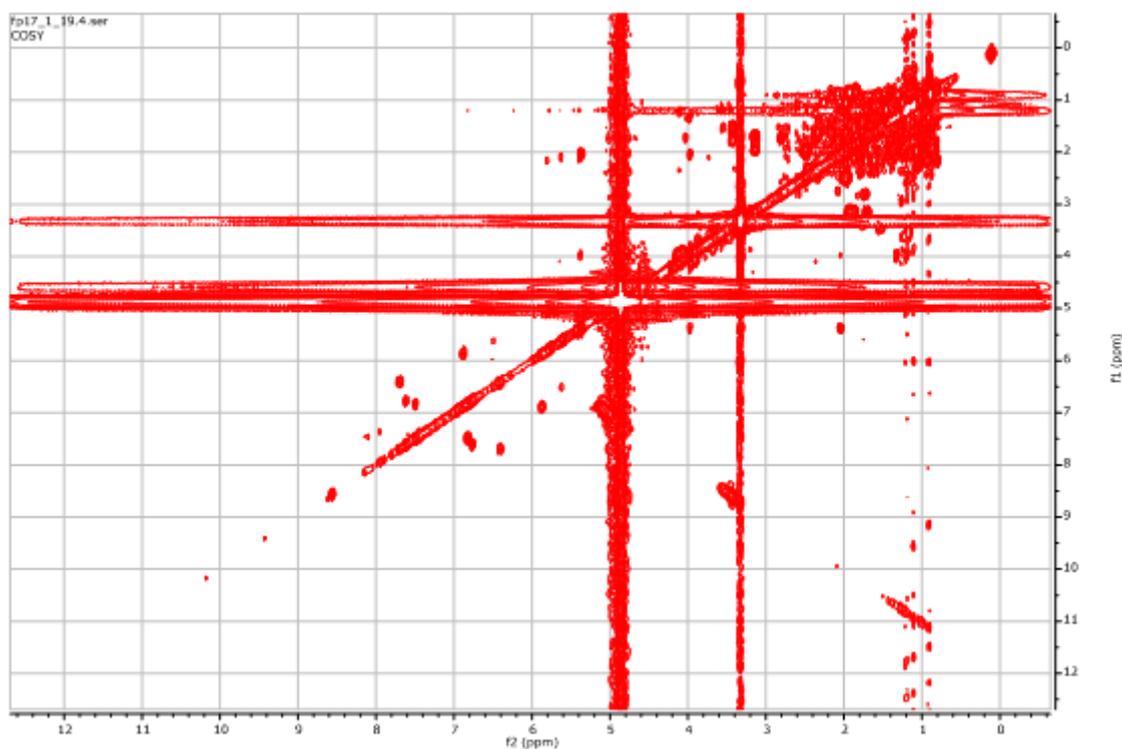


Figure III.12.4 : Spectre COSY (CD3OD, 600 MHz, δ ppm) du composé 4

Les corrélations révélées par la HMBC, COSY et HSQC suggèrent un système decaline caractéristique d'un eudesmane (253, 254).

Les données relatives aux spectres RMN H^1 et C^{13} de ce composé sont reportées dans le tableau III.2

Tableau III. 2: les données de la spectroscopie RMN H^1 et C^{13} (CD₃OD, 600 MHz, δ ppm) du composé 4

Position	δ_H (ppm)	J (Hz)	δ_c (ppm)
1	1.11	m	41.8
	1.40	m	
2	1.57	m	20.5
	1.44	m	
3	1.43	m	43.6
	1.76	d (11.6)	
4	-		73.4
5	1.27	dd(2.7, 12.7)	55.2
6	1.06	m	22.3
	1.98	m	
7	1.38	t (11.4)	51.3
8	1.37	m	23.0
	1.65	m	
9	1.22	d (2.0)	46.0
	1.43	-	
10	-		35.2
11	-		73.2
12	1.21	s	27.0
13	1.22	s	27.2
14	0.92	s	18.9
15	1.12	s	22.0

La stéréochimie du composé ; un système decalin fusionnée en cis, a été vérifiée par l'expérience NOE différence. L'irradiation à δ 0,92 (H-14) a entraîné l'augmentation du signal de H-5 à δ = 1.27 (7. 14%), et l'irradiation à δ = 1.12 (H-15) a entraîné l'augmentation de l'intensité du signal de H-7 à δ = 1.38 (2.82%), ce qui a confirmé que le méthyle en C-10 et le proton en C-5 étaient orientés en β et le méthyle en C-4 et le proton en C-7 étaient orientés en α .(253)

La configuration relative à C-4 a été confirmée par comparaison avec le 4-épi-plucheinol (255). Les différentes valeurs dans le spectre RMN ^{13}C à C-4, C-5 (256, 257), a révélé que le composé était un isomère du cryptomeridiol (257). La structure du composé a été établie comme étant le: 4 α , 11-dihydroxy-7-epimer-eudesmandiol (252).

Les données spectrales sont proches de celles reportées pour le 7-epi-cryptomeridiol (258, 259)

Ce composé a été isolé auparavant de *Pluchea arguta* Boiss. (*compositae*)(253), de *Laggera pterodonta* (*asteraceae*)(260, 261). Il est nouveau pour la famille des Poaceae

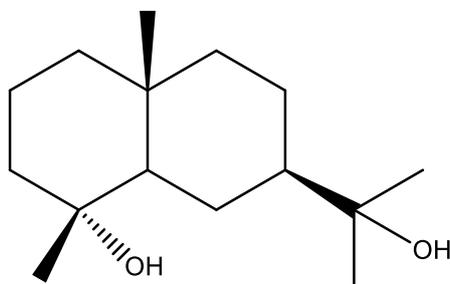
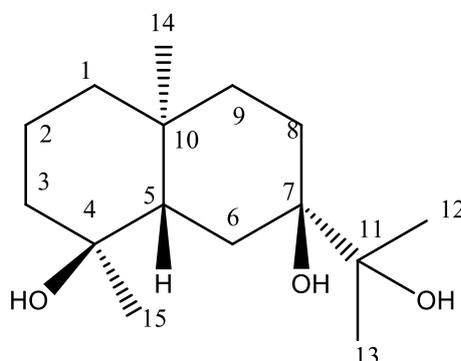


Figure III.13: La structure des composés 4

4 α , 11-dihydroxy-7-epimer-eudesmandiol (7-epi-cryptomeridiol)

3.3. Elucidation structurale du composé (5)



Le composé (5) a été obtenu de la fraction FP17-2-1 sous forme de poudre blanche

Le spectre RMN proton du composé 5 est très voisin du composé 4 avec la présence de quatre méthyles portés par des carbones quaternaires oxygénés à 1,25 ppm pour les méthyles 12 et 13 et à 1,12 ppm pour le méthyle 15. Le spectre carbone ^{13}C montre la présence d'un carbone quaternaire supplémentaire par rapport au composé 4 à $\delta_{\text{C}} = 76,8$ ppm donnant des corrélations dans le spectre HMBC avec les protons des méthyles C12 et C13. Ce qui conduit à la structure du 4 β ,7 β ,11-entioeudesmantriol

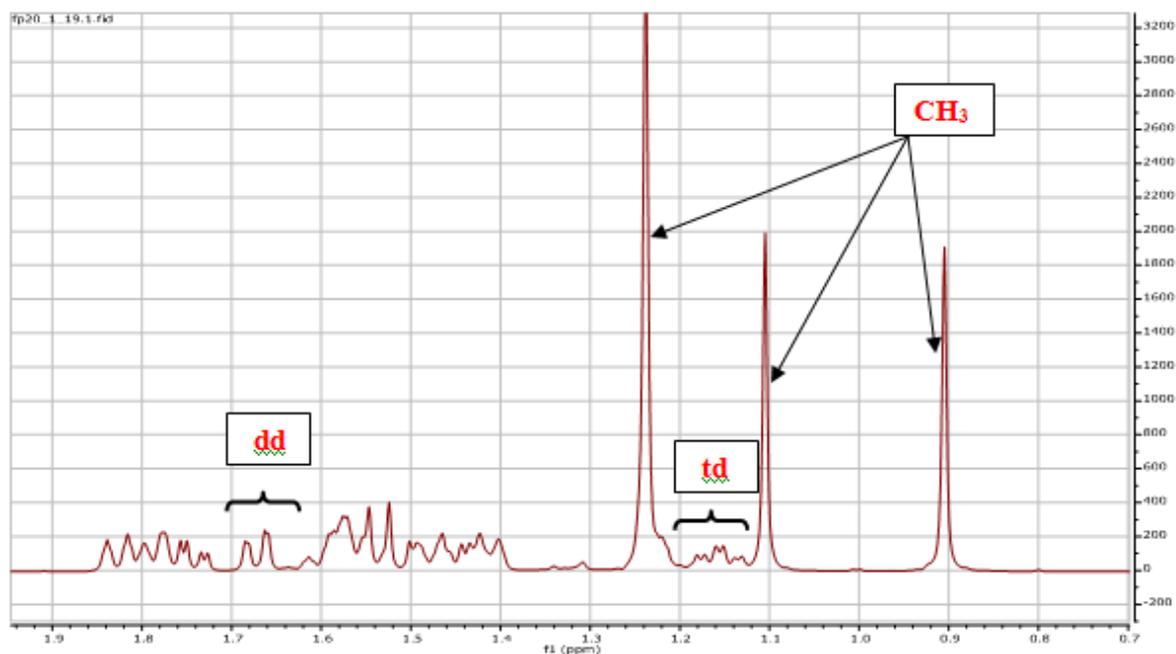


Figure III.14 : Spectre RMN H^1 (CD_3OD , 600 MHz, δ_{ppm}) du composé 5

Des études RMN 2D incluant les spectres HMBC et HSQC ainsi que la comparaison avec les données du composé FP17-1-19 ont permis la détermination de la structure planaire.

La présence d'un groupement isopropyle est indiquée par le fait que les protons méthyles résonnent à ($\delta_H = 1.25-1.25$ ppm), les carbones C-12 et C-13n corrélerent avec les carbones quaternaires oxygénés à ($\delta_C = 76.8$ ppm C-7) et ($\delta_C = 75.6$ ppm C-11) dans le spectre HMBC.

L'autre carbone oxygéné à ($\delta_C = 71.8$ ppm) est attribué au carbone C-4 d'après ses corrélations HMBC avec H-2, H-3, H-5, H-6 et H-15.

Les protons méthyles à ($\delta_H = 0.92$ et 1.12 ppm) sont attribués à H-14 et H-15 respectivement, d'après leur spectre HMBC et HSQC.

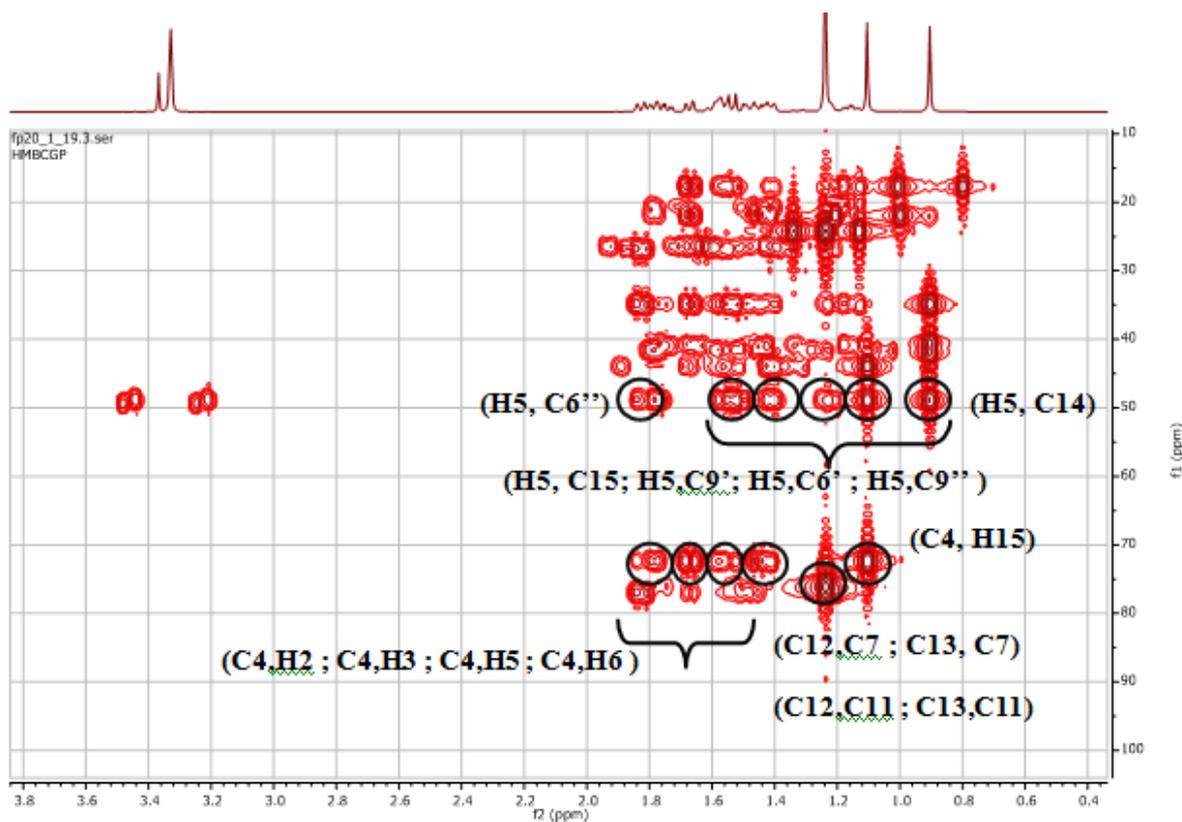


Figure III.15 : Spectre HMBC (CD₃OD, 600 MHz, δ ppm) du composé 5

Le signal RMN H¹ à ($\delta_{\text{H}}= 1.68$ ppm) sous forme de doublet de doublet ($J= 13.0- 2.3$ Hz) est assigné à H-5 par ses pics croisés avec C-4, C-6, C-7, C-9, C-10, C-14 et C-15 dans le spectre HMBC. Tandis que le signal à ($\delta_{\text{H}}= 1.19$ ppm) sous forme de triplet de doublet ($J= 12.8- 4.4$ Hz) est attribué au H-1.

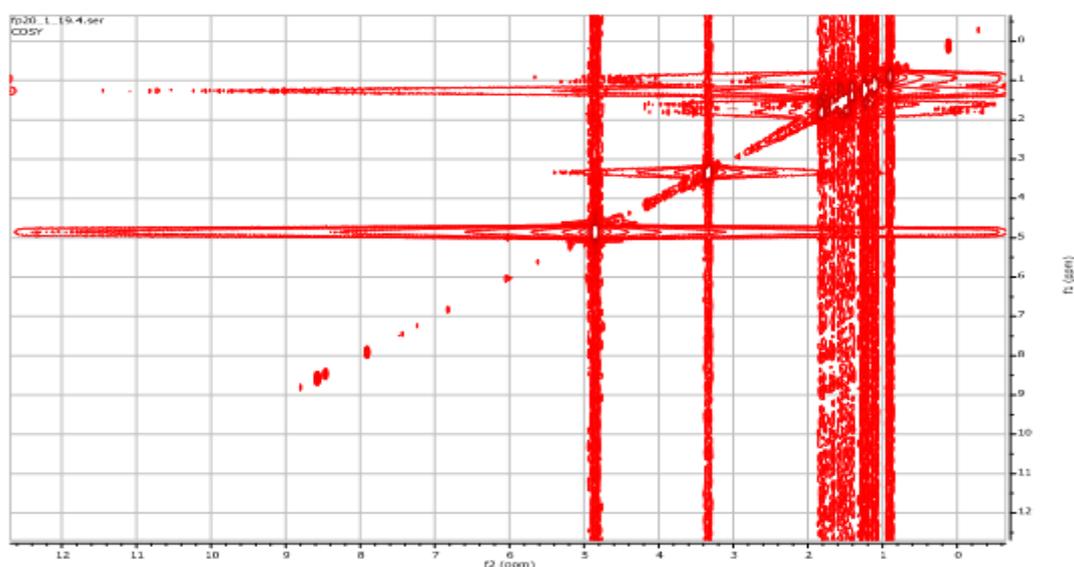


Figure III.16 : Spectre COSY (CD₃OD, 600 MHz, δ ppm) du composé 5

Les données relatives aux spectres RMN H^1 et C^{13} de ce composé sont reportées dans le tableau III.3

Tableau III.3: les données relatives de la spectroscopie RMN H^1 et C^{13} (CD $_3$ OD, 600 MHz, δ ppm) du composé 5

Position	δ_H (ppm)	J (Hz)	δ_C (ppm)
1	1.40	m	41.0
	1.19	td (4.4-12.8)	
2	1.50	m	20.8
	1.58	m	
3	1.80	m	44.4
	1.45	m	
4	-	-	71.8
5	1.68	dd(2.3, 13.0)	48.5
6	1.43	m	26.1
	1.83	m	
7	-	-	76.8
8	1.55	m	26.2
	1.48	m	
9	1.22	m	40.7
	1.56	m	
10	-	-	34.3
11	-	-	75.6
12	1.25	s	23.6
13	1.25	s	23.6
14	0.92	s	18.2
15	1.12	s	22.9

Après toutes ses données on peut considérer la structure comme un 4,7,11-eudesmantriol.

Une étude de diffraction monocristalline des Rayons X a été effectuée pour déterminer sa stéréochimie, elle confirme la structure déduite par les données RMN. (262)

La configuration à H-5, C-11 (isopropyle), C-14 (méthyle), et C-15 (méthyle) est $-\beta$, $-\alpha$, $-\alpha$, et α . Ce qui était conforme avec celle d'un enantio-eudesmantriol (253, 263-265).

Il a été clairement indiqué que H-5 et C-14 (méthyle) sont sur deux côtés différents d'un fragment a-b trans decaline. (262)

La structure élucidée est celle du : 4β , 7β , 11-enantioeudesmantriol.

Ce composé a été isolé auparavant de *Coleus forskohlii* (Willd.) Briq. (Labiatae)(262). Il est nouveau pour la famille des Poaceae.

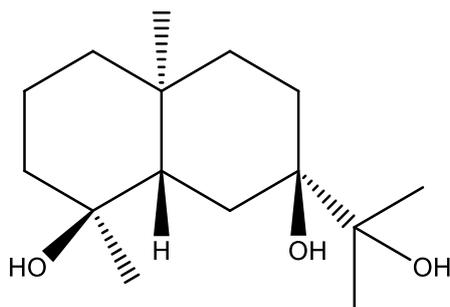
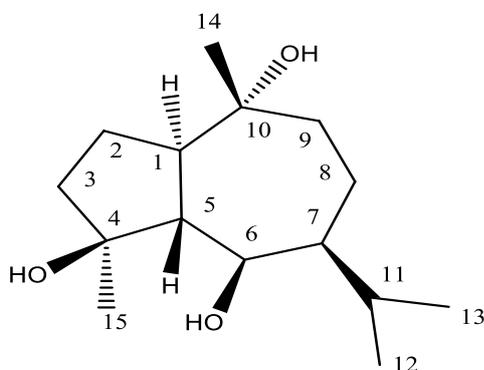


Figure III.17: La structure du composé 5

4 β , 7 β , 11-*enantioeudesmantriol* (Pterodontriol)

3.4. Elucidation structurale du composé (6)



Le composé **6** a été obtenu des trois fractions FP20-1-19, FP 17-2-9 et FP 17-2-11 sous forme de poudre blanche.

Selon les spectres RMN H^1 et C^{13} (Tableau III.4) qui ont montré des signaux compatibles avec un squelette de type guaiane sesquiterpène.

L'analyse des données RMN 2D ont montré la présence de carbones parmi lesquelles on distingue :

- Quatre méthyles à (δ_C = 21,1, 20,4, 20,8, et 22.,6 ppm).
- Quatre méthylènes à (δ_C = 23,6, 41,4, 21,3, et 48,2 ppm).
- Cinq méthines à (δ_C = 47,8, 56,2, 52,8, et 30,8 ppm) dont un hydroxylé à 71,2 ppm.
- Deux carbones quaternaires à (δ_C = 81,4 et 75,2 ppm).

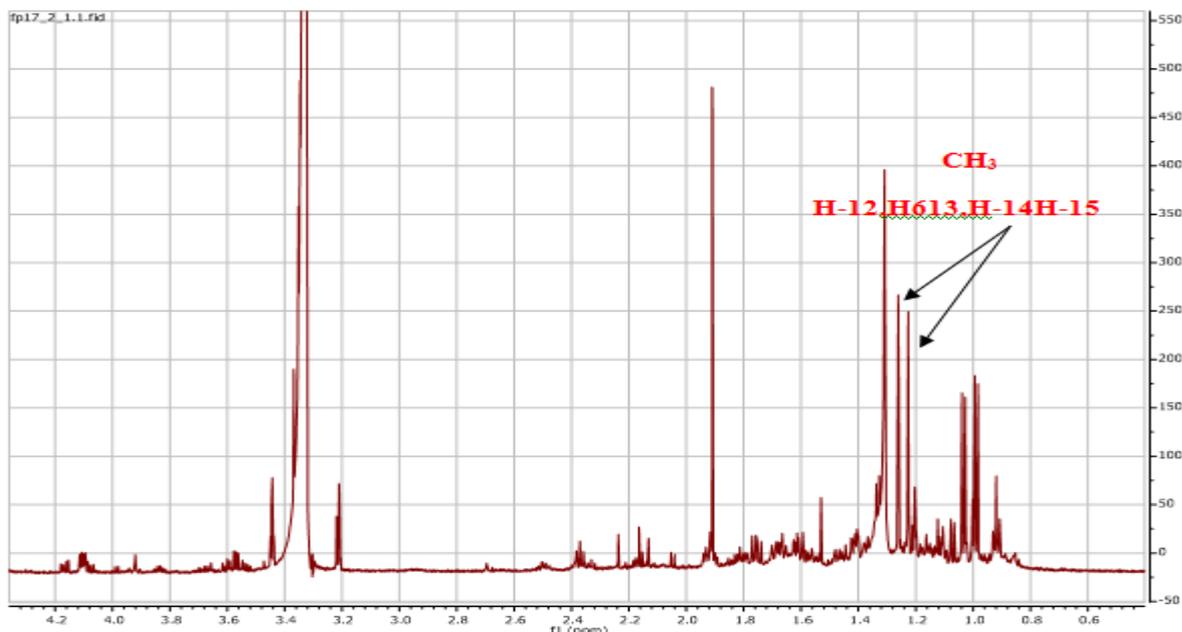


Figure III.18: Spectre RMN H^1 (CD 3 OD, 600 MHz, δ ppm) du composé 6

Le groupement hydroxyle est en position C-6 β à cause de l'irradiation de son proton géminé ($\delta_H = 4.1$ ppm H-6 α)

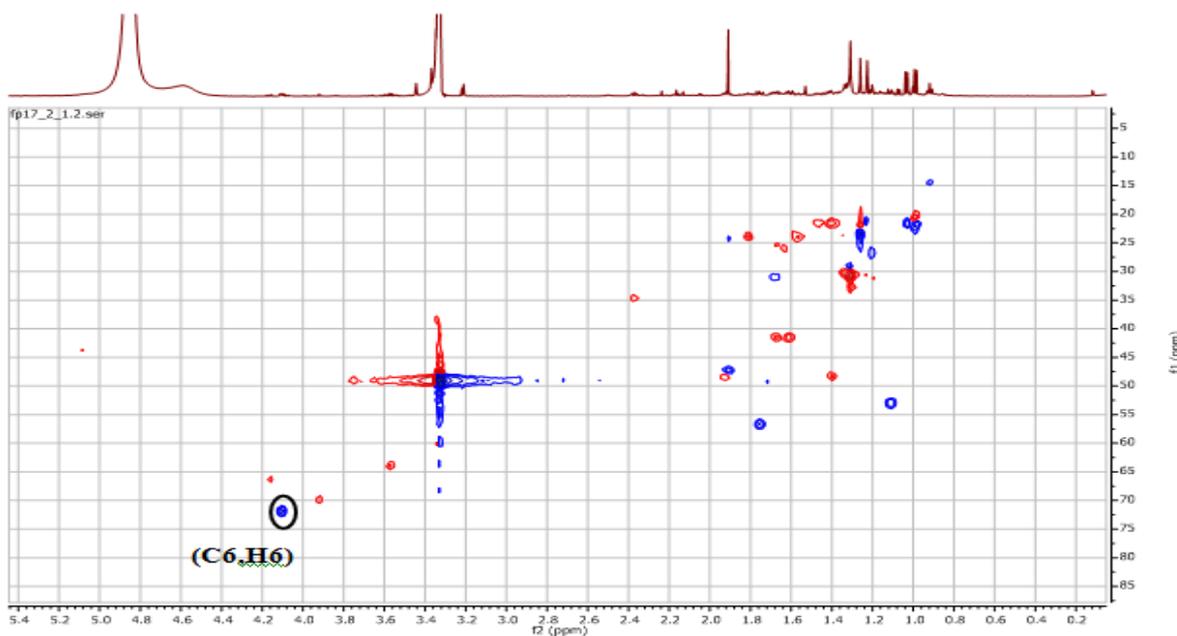


Figure III.19: Spectre HSQC (CD 3 OD, 600 MHz, δ ppm) du composé 6

Un signal à ($\delta_H = 1.76$ ppm) ($J = 8.1 - 10.7$ Hz) s'est transformé en doublet de doublets dd (8.1 Hz) ce qui confirme que ce signal est dû au proton H-5 β et aussi que la jonction du noyau guaiane est trans ($J_{5\beta-1\alpha} = 8.1$ Hz).

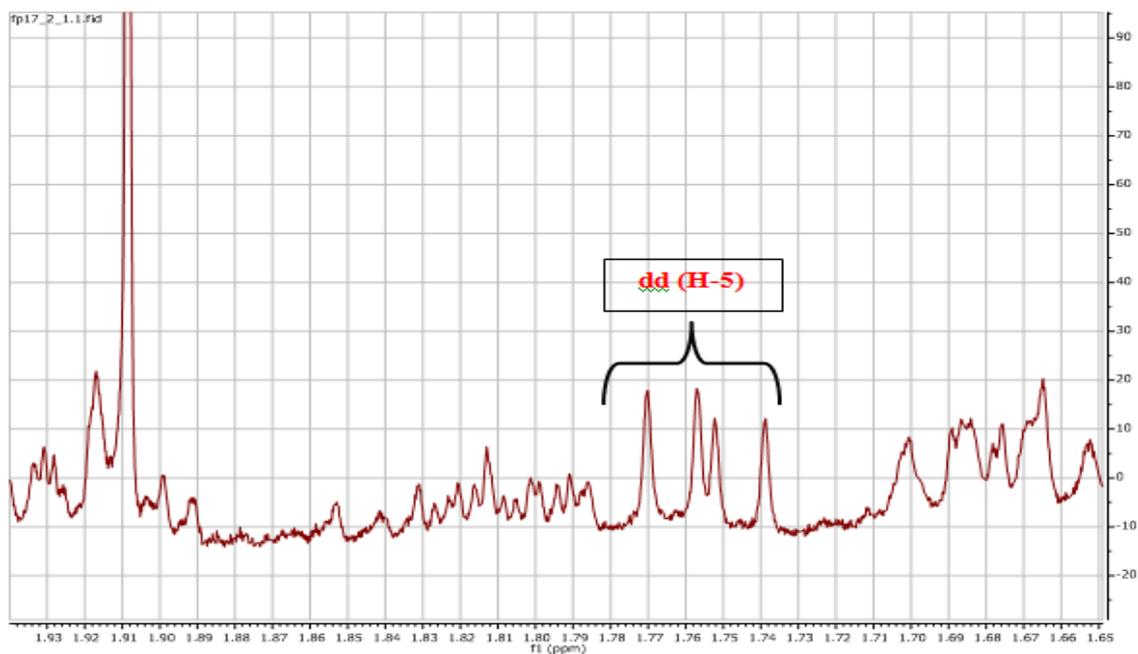


Figure III.20.1: Spectre RMN H^1 étalé (CD₃OD, 600 MHz, δ_{ppm}) du composé 6

La présence du groupe isopropyle est indiquée par le fait que les protons méthyles (H-12 et H-13) résonnaient à ($\delta_H = 1.01$ et 0.99 ppm).

Deux groupement hydroxyles tertiaires en position C-4 et C-10 à ($\delta_C = 81.4$ et 75.2 ppm) et un autre groupe hydroxyle secondaire à ($\delta_C = 71.2$ ppm) placé entre deux méthynes ($\delta_H = 4.11$ ppm) donnant un signal de doublet de doublets ($J = 4.2$ - 8.1 Hz).

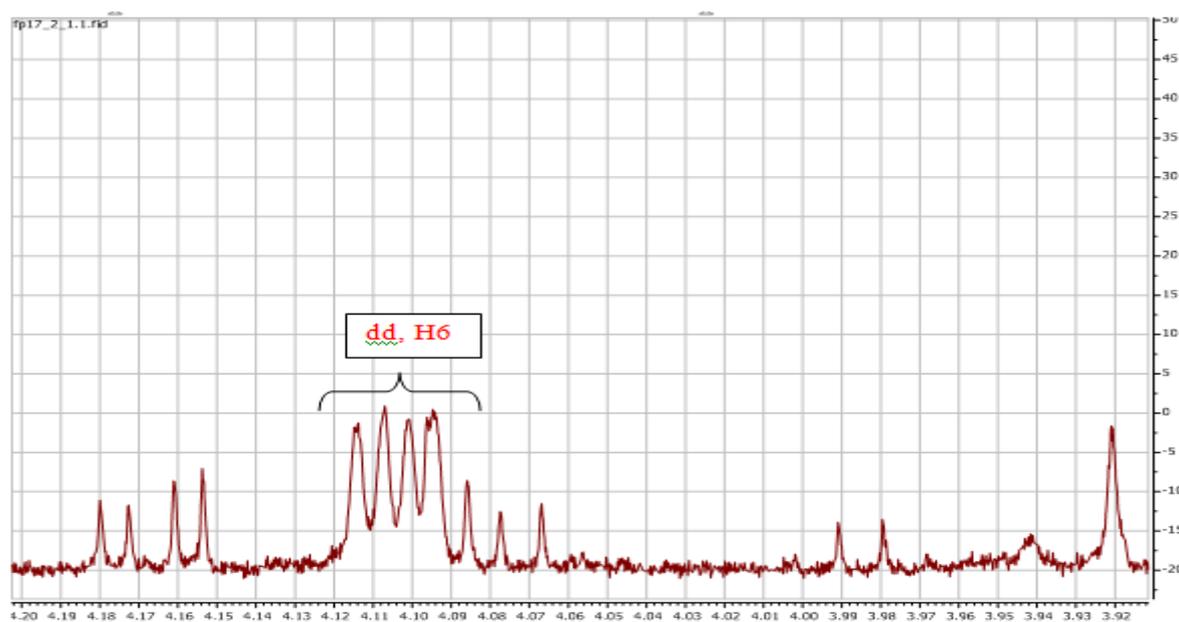


Figure III.20.2: Spectre RMN H^1 étalé (CD₃OD, 600 MHz, δ_{ppm}) du composé 6

Les signaux des groupes méthyles attachés à un carbone totalement substitué et portant un alcool tertiaire ($\delta_{\text{H}}= 1.24$ et 1.27 ppm) sont attribués au H-14 et H-15 respectivement d'après leur spectre HSQC et HMBC.

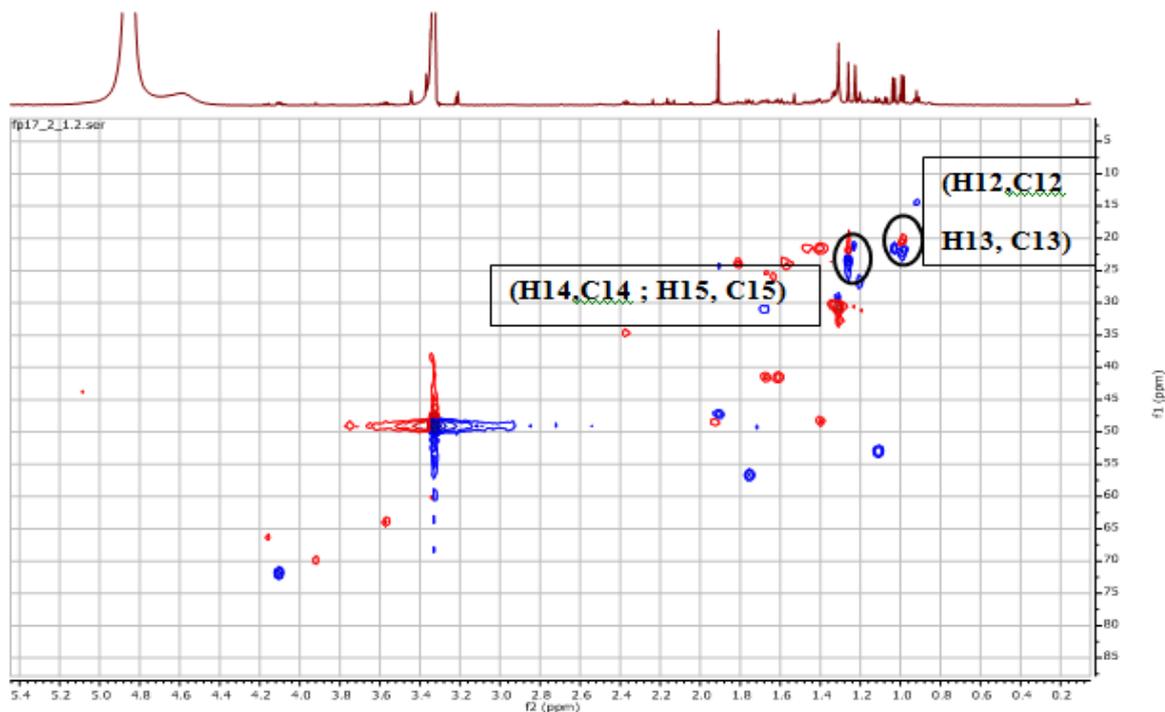


Figure III.21: Spectre HSQC (CD₃OD, 600 MHz, δ ppm) du composé 6

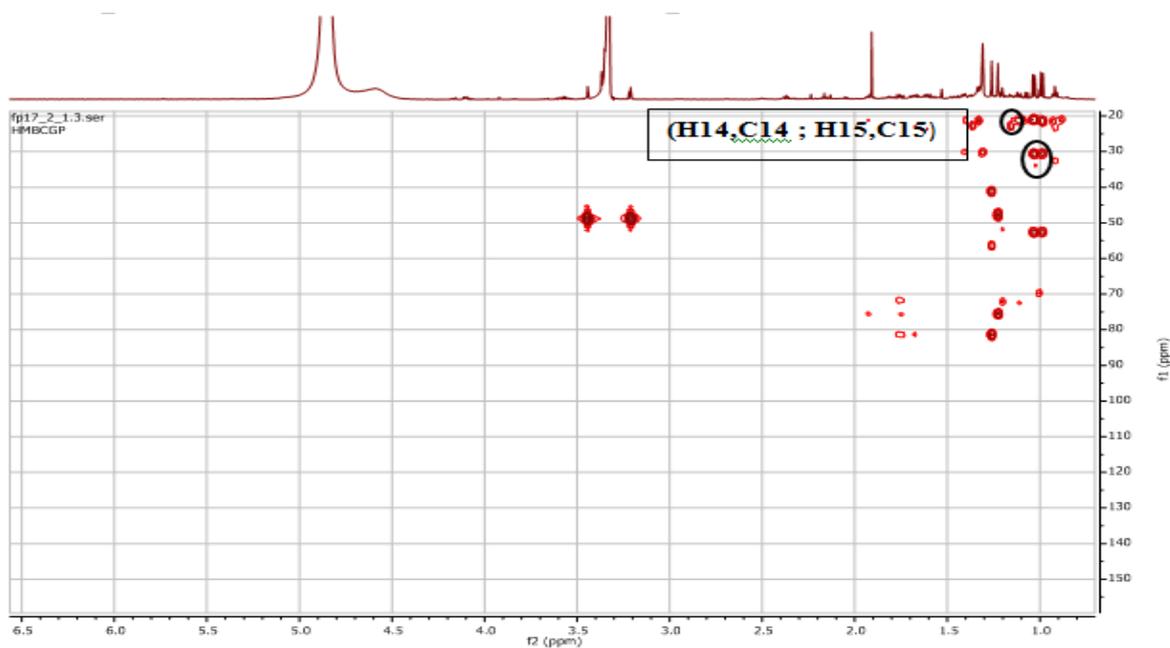


Figure III.22: Spectre HMBC (CD₃OD, 600 MHz, δ ppm) du composé 6

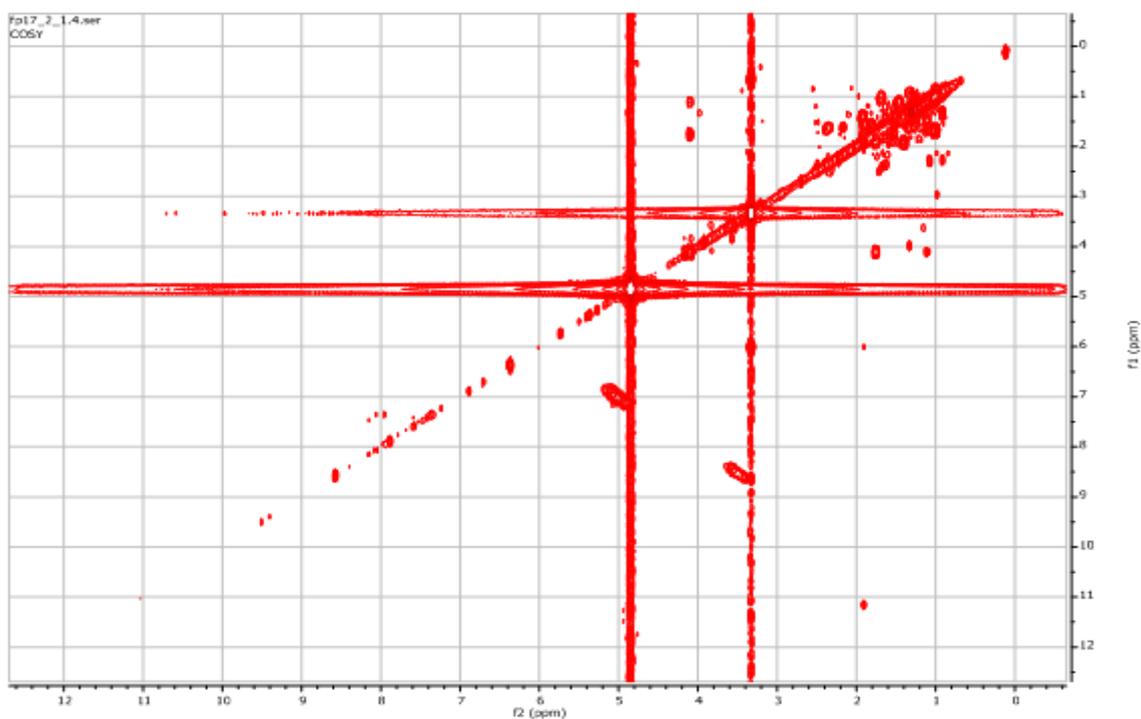


Figure III.23: Spectre COSY (CD₃OD, 600 MHz, δ ppm) du composé 6

Les données relatives aux spectres RMN RMN H¹ et C¹³ de ce composé sont reportées dans le tableau III.4

Tableau III.4: Les données relatives de la spectroscopie RMN H¹ et C¹³ (CD₃OD, 600 MHz, δ ppm) du composé 6

Position	δ_{H} (ppm)	J (Hz)	δ_{C} (ppm)
1	1.92	m	47.8
2	1.57	m	23.6
	1.82	m	
3	1.61	m	41.4
	1.68	m	
4	-	-	81.4
5	1.76	d (8.1, 10.7)	56.2
6	4.11	dd (4.2, 8.1)	71.2
7	1.11	m	52.8
8	1.41	m	21.3
	1.48	m	
9	1.42	m	48.2
	1.90	m	
10	-	-	75.2
11	1.69	m	30.8
12	1.01	d (6.9)	21.1
13	0.99	d (6.9)	20.4
14	1.24	s	20.8
15	1.27	s	22.6

Il est évident qu'il s'agit d'un composé 4,6,10-trihydroxy.

L'atome de carbone en C-14 résonant à ($\delta_C = 20.8$ ppm) est presque identique à un dérivé guaiane qui est de configuration 10α hydroxy qui a été déterminé par analyse de rayons-X. (266).

Ceci est en accord avec le déplacement chimique du C-5 ($\delta_C = 56.2$ ppm) γ trans effet du 10α du groupement hydroxyle (267).

La structure élucidée est celle du : $4\beta,6\beta,10\alpha$ -trihydroxy guaiane sesquiterpène connu sous le nom Teuclatriol.

Ce composé a été isolé auparavant de *Teucrium leucocladum* (labiatae) (267). Il est nouveau pour la famille des Poaceae.

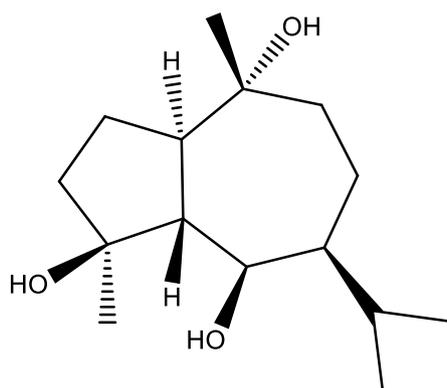


Figure III.24 : La structure du composé 6

$4\beta,6\beta,10\alpha$ -trihydroxy guaiane sesquiterpène (Teuclatriol).

4. Conclusion

L'investigation phytochimique du précipité des racines de *Cymbopogon schoenanthus* et de l'extrait Chloroforme de *Helianthemum lippii* ; deux espèces endémiques du Sahara appartenant à la famille des Cistaceae et des Poaceae respectivement ; a permis d'isoler et d'identifier 6 composés par utilisation de différentes méthodes spectroscopiques (RMN 1D et 2D). Il s'agit de :

- Deux stérols
 - ✓ Stigmastérol
 - ✓ β - Sitostérol
- Quatre sesquiterpenes
 - ✓ (1S,4a a)-4-Methylene-6-b-(1-hydroxy-1-methylethyl)-8a b-methyl-decahydronaphthalene-1b-ol 1S, 7S, 10S- eudesm-4(14)-en-1 α -11 α -diol (hydroxy- β -eudesmol)
 - ✓ 4 α , 11-dihydroxy-7-epimer-eudesmandiol (7-epi-cryptomeridiol)
 - ✓ 4 β , 7 β , 11-enantioeudesmantriol (Pterodontriol)
 - ✓ 4 β ,6 β ,10 α -trihydroxy guaiane sesquiterpène (Teuclatriol).

Tous ces composés mis à part les stérols sont isolés pour la première fois de l'espèce *Cymbopogon schoenanthus*, ainsi que pour la famille des Poaceae.

CHAPITRE IV

ANALYSE

CHROMATOGRAPHIQUE

1. Etude de la composition des huiles essentielles de *Cymbopogon schoenanthus*

Les huiles essentielles sont très utilisées en aromathérapie, en pharmacie, en parfumerie et en cosmétique. Leur utilisation est liée à leurs différentes activités biologiques reconnues.

Les plantes aromatiques sont réputées pour leur richesses en composés phénoliques, et une corrélation existe entre la biosynthèse et l'accumulation de flavonoïdes et la production d'huiles essentielles (268).

1.1. Matériels et méthodes

a) Matière végétale

Cymbopogon schoenanthus a été collectée au mois d'avril 2011, dans la région de Bechar au Sud-Ouest de l'Algérie. La plante a été séchée à l'ombre. L'identification a été faite par Monsieur Benabdelhakem directeur de l'agence de préservation des ressources naturelles à Béchar. Cette espèce a été reportée sous le numéro (CS/17/04/12) dans l'herbier de l'unité de recherche VARENBIOMOL, à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1.

b) Extraction de l'huile essentielle

Les racines et les parties aériennes (250 g) de *C. schoenanthus* ont été soumises à une distillation à la vapeur dans un appareil Kaiser Lang pendant trois heures. L'huile essentielle obtenue a été recueillie et séchée sur du sulfate de sodium anhydre et maintenue à 4° C jusqu'à l'analyse. Le rendement de l'huile a été calculé par rapport au poids sec de la plante.

c) Analyse par GC

L'huile essentielle a été analysée sur un chromatographe en phase gazeuse Agilent (GC-FID) modèle 6890, équipé d'une colonne capillaire de silice fondue HP-5MS (5% -diphényl-95% diméthylpolysiloxane, 25 m x 0.25 mm, épaisseur du film 0.25 µm), programmé de 50° C (5 min) à 250° C à 3° / min et maintenu pendant 10 min. La température de l'injecteur et du détecteur d'ionisation de flamme étaient respectivement de 280 et 300° C. L'huile essentielle a été diluée dans de l'acétone (3,5% v / v) et injectée en mode split (1/60), l'hélium a été utilisé comme gaz vecteur (1,0 mL / min). Des solutions d'alcane standards (C8-C20) ont été analysées dans les mêmes conditions pour calculer les indices de rétention (RI) avec l'équation de Van del Dool et Kratz.

d) Analyse par GC-MS

La spectrométrie de masse a été réalisée sur un appareil Agilent (GC-MS) modèle 7890/5975 équipé d'une colonne capillaire HP-5MS (25 mx 0,25 mm, épaisseur du film 0,25 μm) programmée dans les mêmes conditions que pour le GC-FID. L'ionisation du spectromètre de masse (MS) a été réglée en mode d'impact d'électrons positifs à 70 eV et le multiplicateur d'électrons a été établi à 2200 V. Les températures de source d'ions et de quadripôle MS étaient respectivement de 230° C et 180° C. Les données spectrales de masse ont été acquises en mode balayage dans la gamme m/z 33-450. Les constituants de l'huile essentielle ont été identifiés en faisant correspondre leurs spectres de masse et leurs indices de rétention (RI) avec ceux de référence des composés de banques telles que Adams (269) et McLafferty & Stauffer (270).

Les proportions des composés identifiés ont été calculées par normalisation interne.

1.2. Résultats et discussion

La distillation par entraînement à la vapeur de l'huile essentielle de *Cymbopogon schoenanthus* a donné un liquide visqueux. Le rendement de distillation à la vapeur est de 0,93% (p / p), par rapport au poids sec de la plante.

L'analyse et l'identification des composés de l'huile essentielle ont été réalisées en utilisant la (GC-MS). Au total, cinquante-neuf constituants ont été déterminés, représentant environ 96,977% de l'huile essentielle de *C. schoenanthus*.

Le profil chimique général de l'huile essentielle, la teneur en pourcentage et les indices de rétention des constituants sont résumés dans le tableau IV.1, figures IV.1. et IV.2.

Les principaux constituants de l'huile sont les suivants : le 1-terpéneol (12,8%), le α -pinéne (10,7%), l'élémol (10,7%), le menth-2-ène-1-ol trans (8,3%), le β -eudesmol (7,7%) et le transpiperitol (7,5%).

Les autres constituants majeurs sont le calarène (4%), le α -selinène (3,5%), le limonène (3%) et le sabinène (2%)

Les hydrocarbures monoterpéniques représentent (26,7%) tandis que la fraction sesquiterpénique représente la fraction la plus importante (40,8%). La fraction oxygénée représente (28,9%) du total de la composition d'huile.

La composition chimique de l'échantillon est différente de celles des échantillons de l'inde (piperitone 64,7%) (271), Brésil (cis et trans para-menth—ène-ol 17,8 ; 10,83%) (206, 208),

Togo (piperitone 61%) (160), Burkina Faso (alpha eudesmol 27,4% ; T-muurobol 27,07 %) (207) et de la Tunisie (limonene 26% ; delta terpinene 21,2%) (150). Notre échantillon peut être classé comme chemotype monoterpénique (55,9 %) et sesquiterpenique (40,8%).

Ces résultats sont très différents de ceux obtenus précédemment sur l'huile de cette espèce provenant de deux échantillons de la région de Tebessa (Est algérien) (210) indiquant que le composé principal était le 4-isopropyl-1-methyl-2-cyclohexen-1-ol (Cis) et (Trans) respectivement.

Tableau IV.1 : composition des huiles essentielles de *Cymbopogon schoenanthus*

N° Pick	RT	RI	Composés	%
Monoterpenes hydrocarbures				26,734
1.	10,299	1137	α -pinene	10,7
2.	10,895	1168	camphène	0,174
3.	12,667	1346	α -terpinene	7,509
4.	12,906	1387	α -phelandrène	1,158
5.	13,273	1412	carene	0,554
6.	13,542	1436	paracymène	0,348
7.	13,705	1469	limonène	3,001
8.	13,756	1471	sabinene	2,041
9.	13,933	1489	(Z) β -ocimène	0,742
10.	14,286	1511	(E) β -ocimène	0,343
11.	15,561	1621	terpinolene	0,164
Monoterpenes oxygénés				29,911
12.	16,688	1745	fenchol endo	0,172
13.	16,907	1778	1-terpineol	12,801
14.	17,456	1867	menth-2-ène-1-ol trans	8,343
15.	18,303	1915	endo-borneol	0,248
16.	18,767	1959	para-cymène-8-ol	0,131
17.	19,073	1986	α -terpineol	6,375
18.	19,438	2013	Trans-piperitol	7,513
19.	19,827	2053	Nerol	0,122
20.	20,546	2147	géraniol	0,422
21.	20,689	2175	Piperitone	0,297
Sesquiterpens				40,827
22.	22,875	2374	δ -élémente	0,078
23.	23,964	2476	Geranyl propanoate	0,115

24.	24,	2521	β -Elémène	1,008
25.	25,	2589	Cascarilladiène	0,133
26.	25,	2622	γ -élémente	0,11
27.	25,	2631	β -Gurjunène	0,179
28.	25,	2644	α -Guaiène	0,072
29.	26,	2704	1S cis-Calamene	0,223
30.	26,	2719	τ -Murolène	0,106
31.	26,	2748	Germacrène-D	0,481
32.	26,	2753	β -Sélinène	0,305
33.	26,	2759	δ -Sélinène	0,192
34.	26,	2767	α -Sélinène	0,398
35.	27,	2791	α -Bulnésène	0,151
36.	27,	2811	γ -Cadinene	0,399
37.	27,	2827	δ - Cadinène	0,861
38.	27,	2865	Selina-4(15),7-diène	0,091
39.	28,	2904	Elemol	10,682
40.	28,	2921	Germacrène B	0,275
41.	28,	2945	Germacrène D-4-ol	0,223
42.	29,	2976	trans-6,11-dimethyl-3,8-oxomethanobicyclo(6.3.0)undeca-4,6-diène	0,275
43.	29,	3022	2-naphtalenemethanol	0,396
44.	29,	3043	ar-himachalene	0,265
45.	29,	3076	Calarène	4,131
46.	30,	3089	isopathulenol	0,497
47.	30,	3102	γ -Eudesmol	1,678
48.	30,	3119	Valencène	1,414
49.	30,	3127	Cadinol Epi alpha	0,434
50.	30,	3129	Agarospinol	0,628
51.	30,	3136	α -muurolol	0,156
52.	30,	3148	Allo-Aromadendrène	0,129
53.	30,	3154	β -Eudesmol	7,726
54.	30,	3176	Selina3,7(11) Diène	0,211
55.	30,	3185	(2-(2-methyl-2-propenyl)3,5,6-trimethylbenzoquinone	1,988
56.	31,	3245	cis-carveol	0,354
57.	31,	3254	(-)- α selinene	3,552
58.	31,	3276	Farnesol 2	0,152
59.	33,	3319	cis-eudesm-6-en-11-ol	0,264
Total identifié				96,977%

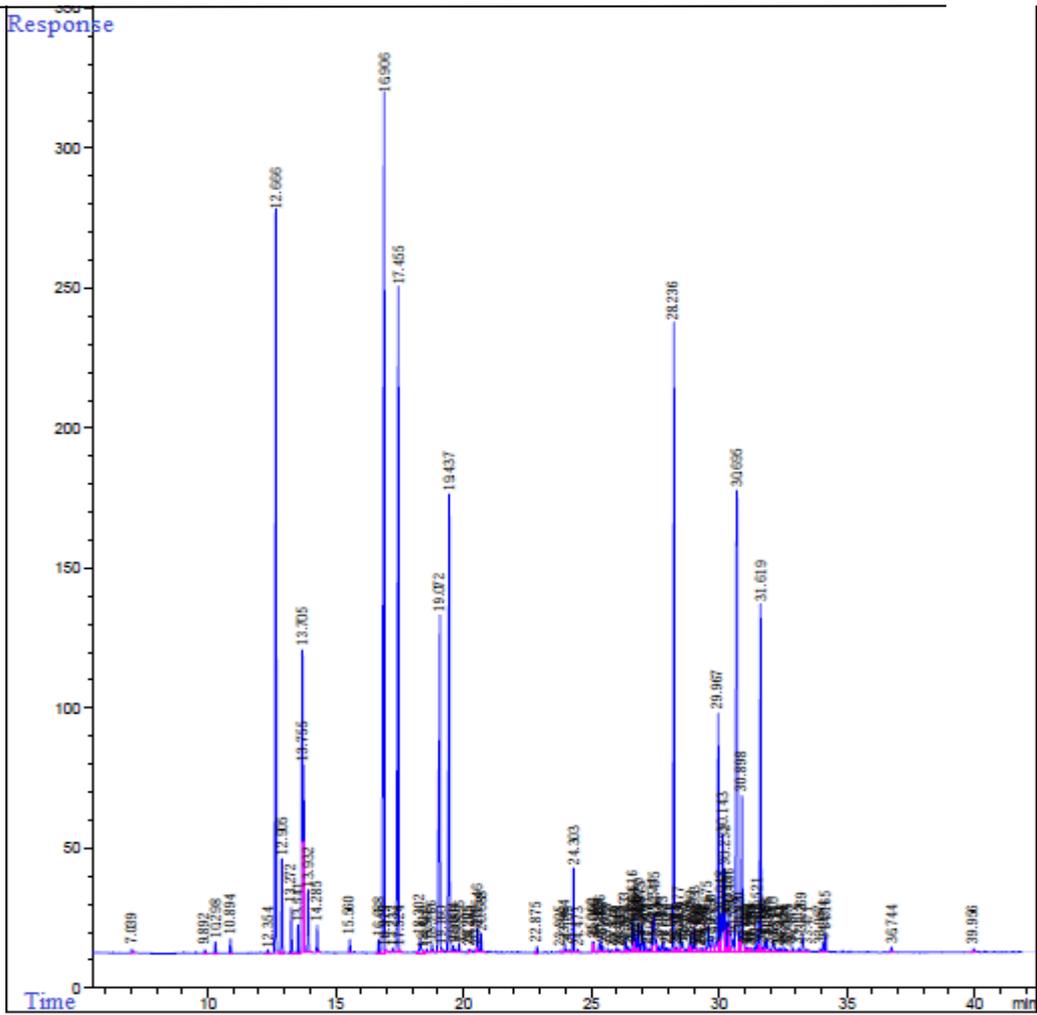


Figure IV.1. GC-FID (0-42min) Chromatogramme des huiles essentielles de *Cymbopogon schoenanthus*.

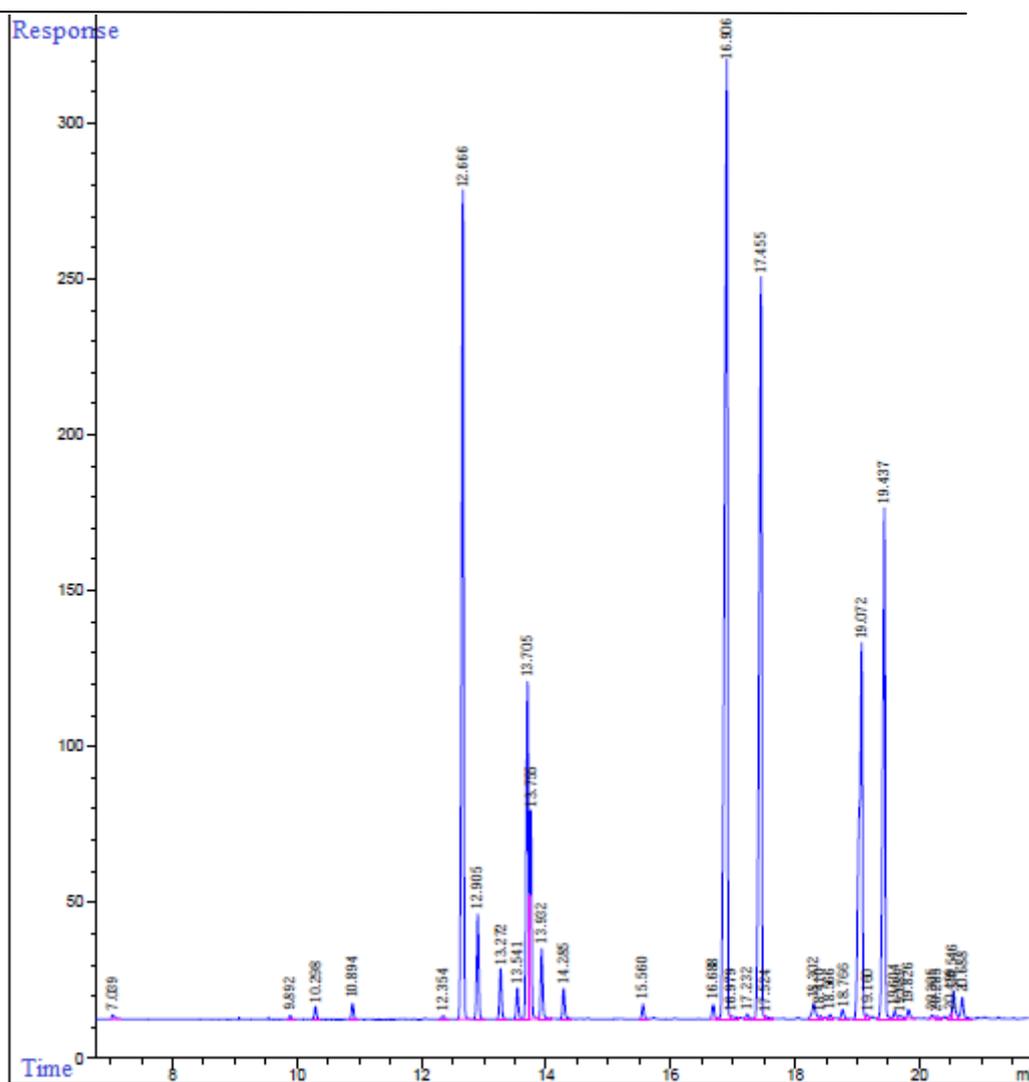


Figure IV.2. GC-FID-1 (0-24min) Chromatogramme des huiles essentielles de *Cymbopogon schoenanthus*.

1.3. Conclusion

Nous rapportons pour la première fois la composition en huile essentielle de *Cymbopogon schoenanthus* récoltée dans la région de Béchar au sud-ouest de l'Algérie. L'analyse par GC-FID et GC-MS a permis l'identification de cinquante-neuf constituants représentant 96,977% de l'huile totale. Les principaux composants étaient : le 1-terpéneol (12,8%), le α -pinène (10,7%), l'elemol (10,7%), le menth-2-ène-1-ol trans (8,3%), le β -eudesmol (7,7%) et le transpiperitol (7,5%). La fraction sesquiterpénique atteignait les environs de 50% de la composition de l'huile.

Ces résultats sont également différents de ceux obtenus précédemment sur l'huile de cette espèce provenant de deux échantillons de la région de Tebessa (Est algérien) (a-terpinene 15% ; delta terpinene 19% ,4-isopropyl-1-methyl-hexen-1-ol 15% et p-menth-ène-4-ol 21%).(210)

Ces différences qualitatives et quantitatives dans la composition des huiles peuvent être dues à plusieurs facteurs, notamment : la région géographique, la période de la récolte ainsi que les conditions et la méthode d'extraction.

2. Analyse des extraits par HPLC-TOF / MS

L'étude a été portée sur les extraits AcOEt et *n*-BuOH de *Helianthemum lippii* et *Cymbopogon schoenanthus*.

2.1. Matériels et méthodes

La chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse avec un analyseur de temps de vol (HPLC-TOF / MS), réalisée au Plant Research Laboratory de l'Université Çankiri Karatekin en Turquie, a permis d'analyser la teneur en composés phénoliques de différents extraits végétaux (AcOEt et *n*-BuOH de *C. schoenanthus*, AcOEt et *n*-BuOH de *H. lippii*).

Le système HPLC 1260 Infinity d'Agilent Technologies avec colonne ZORBAX SBC18 (4,6 x 100 mm, 3,5 µm) est couplé à un spectromètre de masse muni d'un analyseur à temps de vol MS 6210 (TOF) comme détecteur. Les phases mobiles A et B étaient respectivement de l'eau ultra pure contenant 0,1% d'acide formique et de l'acétonitrile. Le débit était de 0,6 ml / min et la température de la colonne était de 35 °C.

Des solutions mères des 23 composés phénoliques standards (2,5 ppm) et des extraits bruts séchés des deux plantes (200 ppm) ont été préparés dans du méthanol à température ambiante. Les échantillons ont été filtrés en passant à travers un filtre PTFE (0,45 µm) par un injecteur pour éliminer les particules. Le volume d'injection était de 10 µl et le programme du solvant était le suivant : 0 min 10% B; 0-1 min 10% B; 1-20 min 50% B; 20-23 min 80% B; 23-25 min 10% B; 25-30 min 10% B.

Le mode d'ionisation de l'instrument MS-TOF était électrospray (ES) négatif avec une température de gaz de 325 °C, un débit de gaz de 10,0 l / min et un nébuliseur de 40 (psi). La

teneur en composés phénoliques des extraits a été déterminée en comparant les temps de rétention et les valeurs m / z des extraits avec ceux des composés phénoliques classiques.

2.2 Résultats et discussion

L'analyse par HPLC a révélé la présence de phénols et de flavonoïdes dans les quatre extraits testés dans cette étude (deux de *C. schoenanthus* et deux de *H. lippii*). (Figure IV.3)

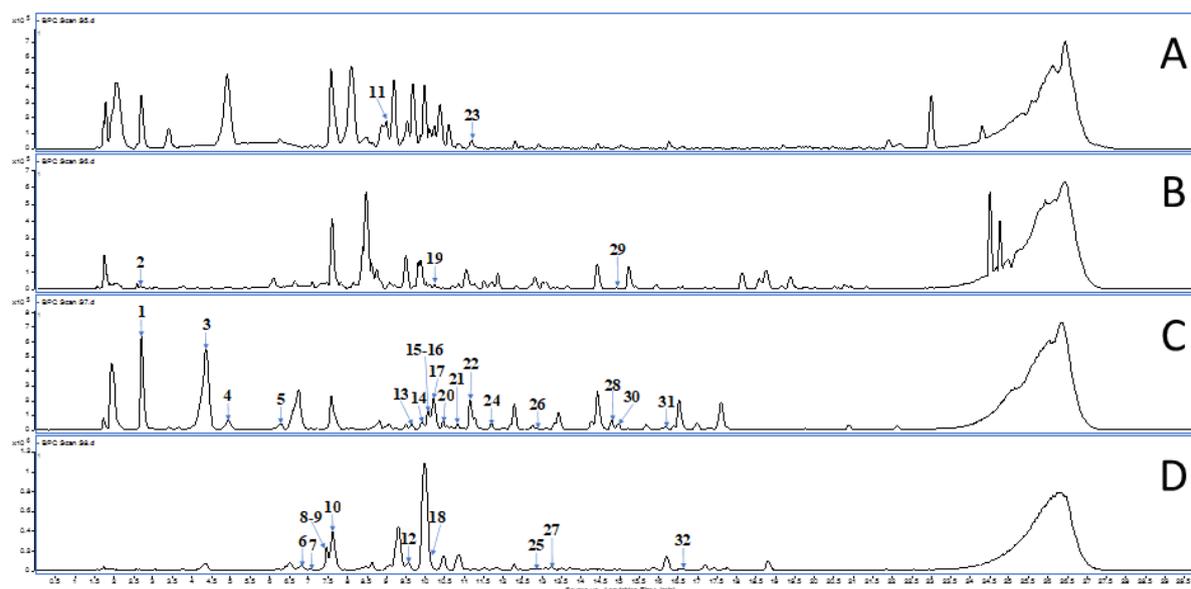


Figure IV.3 : Chromatogrammes des extraits (A) AcOEt et (B) *n*-BuOH de *C.schoenanthus* et des extraits (C) AcOEt et (D) *n*-BuOH de *H.lippii*. Les numéros de 1 à 32 sont des phénols et des flavonoïdes détectés dans les extraits correspondants par HPLC-TOF/MS (Tableau IV.2)

Compte tenu des composés phénoliques étudiés, il a été constaté que *H. lippii* avait un contenu phénolique plus riche que *C. schoenanthus* (Tableau IV.2)

Le principal composé trouvé dans l'extrait *n*-BuOH de *H. lippii* était l'acide vanillique (37% ; Tableau IV.2), bien qu'il soit également riche en acide gentisique et en acide 4-hydroxybenzoïque (14% pour les deux Tableau IV.2). Alors que les quantités d'acide férulique, d'acide caféique et d'acide syringique étaient également très pertinentes (9%, 8% et 4%, respectivement ; tableau VI.2).

De manière différente, l'extrait AcOEt de *H. lippii* était riche en acide gentisique (41% ; tableau IV.2), mais également abondant en acide gallique et acide vanillique, (17% et 11%, respectivement ; tableau IV.2). Les quantités d'acide sinapique et de catéchines étaient

également très appropriées et similaires dans cet extrait (8% et 7%, respectivement ; tableau IV.2).

La diosmine était le principal composé trouvé dans l'extrait *n*-BuOH de *C. schoenanthus* (72% ; tableau IV.2). L'extrait AcOEt de *C. schoenanthus* était assez riche en catéchines (38% ; tableau IV.2), mais également en rutine, acide gallique et acide sinapique (20%, 17% et 15%, respectivement ; tableau IV.2). Plusieurs autres phénols et flavonoïdes ont été trouvés dans les quatre extraits et sont énumérés dans le tableau IV.2.

Le 4-hydroxybenzaldéhyde, la taxifoline, l'apigétrine, le resvératrol et la silibinine ont été trouvés en traces dans la plupart des extraits.

Tableau IV.2 : Phénols et flavonoïdes présents dans les différents extraits

TR (min)	Composés	Formule	<i>m/z</i> [M-H] ⁻	Codes	<i>Extraits C. schoenanthus</i>		<i>extraits H. lippii</i>	
					AcOEt mg/kg (%)	<i>n</i> -BuOH mg/kg (%)	AcOEt mg/kg (%)	<i>n</i> -BuOH mg/kg (%)
2,56	Acide gallique	C ₇ H ₆ O ₅	169.0258	1	11,27 (17,31)	0,13 (0,22)*	91,08(17,02)	0,87 (0,13)*
2,69	Acide fumarique	C ₄ H ₄ O ₄	115.0130	2	0,25 (0,38)	0,95 (1,63)	0,29 (0,05)	tr
4,34	Acide gentisique	C ₇ H ₆ O ₄	153.0296	3	1,63 (2,50)	2,51 (4,29)	221,42 (41,38) [#]	92,78 (13,74)*. [#]
5,27	Acide chlorogénique	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.1060	4	0,24 (0,37)	3,02 (5,17)	1,12 (0,21)	2,75 (0,41)
6,24	Catéchine	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.0882		24,90 (38,24)	0,52 (0,89)*	37,06 (6,93) [#]	2,36 (0,35)*
6,79	4-Hydroxy Acide benzoïque	C ₇ H ₆ O ₃	137.0344	5	0,08 (0,12)	0,52 (0,89)	16,51 (3,09)	91,79 (13,60) *. [#]

7,19	Protocate Acide catéchuique	C ₇ H ₆ O ₄	153.0296		0,27 (0,41)	1,00 (1,71)	2,82 (0,53)	5,85 (0,87)
7,47	Acide caffeique	C ₉ H ₈ O ₄	179.0467	6	0,05 (0,08)	0,36 (0,62)	0,69 (0,13)	52,76 (7,82) *.#
7,57	Acide vanillique	C ₈ H ₈ O ₄	167.0467	7	1,24 (1,90)	1,43 (2,45)	59,09 (11,04) [#]	251,32 (37,23) *.#
7,78	Acide syringique	C ₉ H ₁₀ O ₅	197.0580	8	0,42 (0,65)	1,92 (3,28)	5,38 (1,01)	27,38 (4,06)
9,06	Rutine	<u>C₂₇H₃₀O₁₆</u>	609.1718	9	12,94 (19,87)	0,91 (1,56)*	4,54 (0,85) [#]	0,29 (0,04)
9,66	4-hydroxy- benzaldehyde	C ₇ H ₆ O ₂	121.0387		tr	tr	tr	16,92 (2,51)
9,67	Polydatine	C ₂₀ H ₂₂ O ₈	389.1429		tr	tr	1,35 (0,25)	0,04 (0,01)
9,88	Scutellarine	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	461.0937	10	tr	tr	21,91 (4,09)	0,74 (0,11)
10,02	Quercetine-3 -β-D-glucoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463.1092		tr	0,11	2,56 (0,48)	1,92 (0,28)
10,04	Acide sinapique	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	223.0746	11	9,56 (14,68)	tr	44,15 (8,25)	2,63 (0,39)*
10,12	Diosmine	<u>C₂₈H₃₂O₁₅</u>	607.1461	13	0,68 (1,04)	42,10 (72,03)	4,24 (0,79)	19,17 (2,84) [#]
10,14	Naringine	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	579.1968	12	tr	tr	5,21 (0,97)	1,33 (0,20)
10,15	Acide féruilique	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	193.6240	14	0,05 (0,08)	1,38 (2,36)	0,20 (0,04)	63,96 (9,84)*
10,38	Taxifoline	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	303.0672		tr	tr	1,28 (0,24)	tr
10,71	Hesperidine	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	609.2079		0,05 (0,08)	tr	0,21 (0,04)	tr
10,99	Apigétrine	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431.1189		tr	tr	2,67 (0,50)	tr
11,03	Neohesperid- ine	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	609.2083		0,12 (0,18)	tr	0,12 (0,02)	tr

11,56	Acide rosmarinique	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	359.10		0.10(0.15)	0.03(0.05)	1.97(0.37)	0.22(0.03)
12,77	Morine	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301.0516		0,28 (0,43)	0,59 (1,01)	1,45 (0,27)	3,07 (0,45)
12,80	Resvératrol	C ₁₄ H ₁₂ O ₃			tr	tr	0,27 (0,05)	tr
13,36	Acide salicylique	C ₇ H ₆ O ₃	137.0344		0,64 (0,98)	tr	5,79 (1,08)	7,50 (1,11)
14,80	Quercetine	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301.0517		tr	0,06 (0,10)	2,00 (0,37)	tr
14,88	Silibinine	C ₂₅ H ₂₂ O ₁₀	481.1364		tr	0,51 (0,87)	tr	tr
14,94	Acide cinnamique	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	147.0552		0,15 (0,23)	0,43 (0,74)	0,57 (0,11)	2,29 (0,34)
15,84	Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.0564		0,12 (0,18)	tr	1,10 (0,21)	0,81 (0,11)
16,23	Diosmetine	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	399.0725	15	0,17 (0,26)	tr	tr	26,49 (3,92)
				TOTAL	65.21(100)	58.48 (100)	537.05 (100)	675.24 (100)

Teneur des extraits de plantes en composés phénoliques exprimée en mg / kg de plante sèche (et%). tr: quantité de traces. * p <0,05 vs l'autre extrait de la même plante ; #p <0,05 vs le même extrait de l'autre plante.

L'acide protocatéchuïque, la catéchine et l'acide salicylique ont un faible capacité d'ionisation et bien que, ils ont été trouvés dans les extraits (comme le montre le tableau IV.2), les pics ne sont pas visibles dans les chromatogrammes, comme le montre la figure IV.3.

2.3. Conclusion

L'analyse HPLC-TOF / MS des extraits *n*-BuOH et AcOEt de *C. schoenanthus* et *H. lippii* et a montré la présence de 32 acides phénoliques et flavonoïdes qui étaient présents en proportion différente dans chaque extrait.

CHAPITRE V

ETUDE PHARMACOLOGIQUE

1.Introduction

Les plantes médicinales sont à la fois un produit fini destiné à la consommation et une matière première pour l'obtention de substances actives. Elles représentent une source de revenu non négligeable pour de nombreuses populations (272).

Vu la diversité et la gravité des maladies qu'induit le stress oxydant, plusieurs équipes de chercheurs se sont investis dans la recherche de nouveaux antioxydants en vue de lutter contre le stress oxydant et ses pathologies associées (273).

Notre étude est portée sur la famille des Cistaceae et des Poaceae, plus précisément *Helianthemum lippii* et *Cymbopogon schoenanthus*. La première endémique au Sahara septentrional et central (72) et l'autre d'une distribution plus large qui s'étend en Asie (Irak, Oman, Arabie Saoudite et Yémen) et en Afrique, Djibouti, Éthiopie, Somalie, Soudan, Kenya, Bénin, Burkina Faso, Ghana, Guinée, Mali, Mauritanie, Niger, Nigéria, Sénégal et Togo (245).

2. Etude de l'activité Biologique

L'étude biologique a été portée sur les extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol des deux espèces. Commençant par le test d'activité antioxydante en utilisant une méthode basée sur le test d'Efficacité d'inhibition des dommages à l'ADN puis l'évaluation de l'activité anticancéreuse à l'aide du système xCELLigence contre deux lignées cellulaires : PC3 (Cancer de la prostate humain) et HeLa (Carcinome du col de l'utérus humain).

2.1. Matériels et méthodes

2.2. Evaluation de l'activité antioxydante (Efficacité d'inhibition des dommages à l'ADN)

La capacité des extraits de plantes (AcOEt et *n*-BuOH de *C. schoenanthus*, AcOEt et *n*-BuOH de *H. lippii*) à inhiber les dommages oxydatifs de l'ADN a été testée au Plant Research Laboratory de l'Université Çankiri Karatekin en Turquie, en utilisant l'ADN plasmidique photolysé aux UV en présence de peroxyde d'hydrogène H₂O₂) (274).

Dans la première étape, l'ADN plasmidique 46966 a été extrait d'*Escherichia coli*. Ensuite, des aliquotes de 1 µl de plasmide 46966 (200 µg / ml) ont été placées dans deux groupes de microtubes d'ependorff. Dans le premier groupe, 50 µg des différents extraits (AcOEt et *n*-BuOH de *C. schoenanthus*, AcOEt et *n*-BuOH de *H. lippii*) ont été ajoutés séparément suivis

de 4 µl de H₂O₂ à 3% et dans le second groupe seulement 4 µl de H₂O₂ à 3% et ce groupe a servi comme témoin irradié (CR).

La séparation de l'ADN a été réalisée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%. Tous les échantillons ont été soumis aux puits de gel d'agarose dans l'ordre. Des échantillons de contrôle non irradiés (C0) et de contrôle irradié (CR) sont placés dans les premiers puits, respectivement. Après migration, le gel d'agarose est photographié en utilisant un système d'imagerie en gel. (Lourmat-Vilber) (275).

2.3. Évaluation de l'activité anticancéreuse à l'aide du système xCELLigence

L'activité anticancéreuse des différents extraits (AcOEt et *n*-BuOH de *C. schoenanthus*, AcOEt et *n*-BuOH de *H. lippii*) a été évaluée contre deux lignées cellulaires, PC3 et HeLa en utilisant l'instrument xCELLigence RTCA.

2.3.1. Culture cellulaire et préparation de la suspension cellulaire

Les deux lignées cellulaires PC3 (cancer de la prostate humaine) et HeLa (carcinome du col de l'utérus humaine) ont été cultivées dans du milieu d'aigle modifié de Dulbecco (DMEM, Sigma), additionné de 10% (v / v) de sérum fœtal bovin (Sigma, Allemagne) et 2 % de solution de pénicilline / streptomycine (Sigma, Allemagne) à 37 ° C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO₂.

2.3.2. Préparation des solutions d'extraits

Les extraits de plantes (AcOEt et *n*-BuOH de *C. schoenanthus*, AcOEt et BuOH de *H. lippii*) ont été dissous séparément dans du DMSO jusqu'à une concentration finale de 20 mg / ml pour préparer des solutions mères. Les solutions mères ont ensuite été stockées à 4°C dans l'obscurité.

2.3.3. Préparation de E-Plate 96 et traitement

Deux plaques E 96 stériles ont été préparées, l'une pour PC3 et l'autre pour les cellules HeLa. Tout d'abord, 50 µl du milieu de culture DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) ont été ajoutés à tous les puits de chaque plaque et laissés dans la chambre d'écoulement pendant 15 minutes, puis dans l'incubateur pendant 15 minutes supplémentaires. Après cette période,

une mesure du nombre de cellules a été effectuée pour confirmer que le milieu nutritionnel n'est pas contaminé par des cellules.

Ensuite, 100 μl de la suspension de cellules ($2,5 \times 10^4$ cellules / 100 μl) ont été ajoutés dans tous les puits de plaques sauf les trois derniers qui ont été utilisés comme contrôle négatif (contiennent un milieu de culture sans cellules). Les plaques sont laissées dans la chambre d'écoulement pendant 30 min. Après cette période, ils ont été insérés dans la station xCELLigence dans l'incubateur et une mesure a été effectuée pendant 80 min. Ensuite, 25 μl de chaque solution d'extrait ont été mélangés avec 475 μl de milieu. Ensuite, 50, 20 et 10 μl de ces solutions ont été ajoutés aux puits respectivement pour des concentrations de 250, 100 et 50 μg / ml. Enfin, le volume a été complété dans les puits à 200 μl avec du milieu de culture DMEM. Trois puits dans chaque plaque avec des cellules ne sont pas traités, utilisés comme contrôle positif. Les plaques ont été insérées dans la station xCELLigence dans l'incubateur et la mesure a été démarrée pendant 48 h.

2.4. Résultats et discussion

2.4.1. Evaluation de l'activité antioxydante

Dans la présente étude, l'activité antioxydante des extraits de plantes a été évaluée en utilisant un test d'efficacité d'inhibition des dommages de l'ADN. Avec une dose de 50 μg , les extraits *n*-BuOH et AcOEt de la plante *Helianthemum lippii* procurent une protection complète de l'ADN plasmidique 46966 contre les dommages oxydatifs causés par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) photolysé par les rayons UV. Pour les deux extraits, une seule bande a été détectée en électrophorèse sur gel d'agarose, identique à celle obtenue avec l'échantillon témoin non irradié (C0). Cette bande représentait la forme native de l'ADN circulaire super-enroulé. Cependant, l'échantillon de contrôle irradié non traité (CR) présentait deux bandes en électrophorèse sur gel d'agarose différentes de celles obtenues avec le témoin non irradié (C0). Ces deux bandes représentent des fragments d'ADN plasmidique endommagés par les radicaux hydroxyles ($\text{OH} \bullet$) générés par la photolyse du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par rayonnement UV (figure V.1).

Avec la même dose de 50 μg , les extraits de *n*-BuOH et AcOEt de *Cymbopogon schoenanthus* n'ont montré aucun effet protecteur contre les dommages oxydatifs. Les échantillons traités avec cet extrait présentaient deux bandes dans un gel d'agarose, proches de

celles de l'échantillon de contrôle irradié non traité (CR), représentent des fragments d'ADN plasmidique endommagés (figure V.1).

De nombreuses études ont suggéré que les dommages oxydatifs de l'ADN (L'oxydation des bases nucléaires ; beaucoup plus la guanine) peuvent être un facteur de risque important pour une variété de maladies, y compris le cancer (276-280). Un taux élevé de 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine (8-OHdG) radical a été révélé dans les échantillons de patients par rapport aux témoins en bonne santé (276, 280). Il a été suggéré que l'hormonothérapie associée à des antioxydants inhibe la progression du cancer par la réduction du stress oxydatif causé par les dommages oxydatifs de l'ADN (281).

La différence entre les effets des deux plantes médicinales sur les dommages oxydatifs de l'ADN peut s'expliquer par la teneur ainsi que la nature des composés phénoliques. Les résultats CLHP (tableau IV.2) montrent que les extraits d'*Helianthemum lippii* contiennent un taux élevé de phénols par rapport aux extraits de *Cymbopogon schoenanthus*. En effet, les composés phénoliques et plus particulièrement les flavonoïdes sont bien connus par leur propriété antioxydante qui est largement étudiée et qui est fréquemment citée comme étant la propriété clé de prévention et / ou de réduction du stress chronique directement liée à plusieurs maladies. En effet, les composés phénoliques peuvent exercer leur activité antioxydante via plusieurs mécanismes. Ils sont capables de piéger directement les ERO à travers leur groupe hydroxyle, chélater les ions métalliques comme les ions de cuivre et de fer qui sont responsables de la production d'ERO (réaction de Fenton), d'inhiber les enzymes générant ROS tels que myéloperoxydase (MPO), NADPH oxydases et xanthine oxydase et également de stimuler d'autres enzymes ayant une activité antioxydante comme la catalase et la superoxyde dismutase (282, 283).

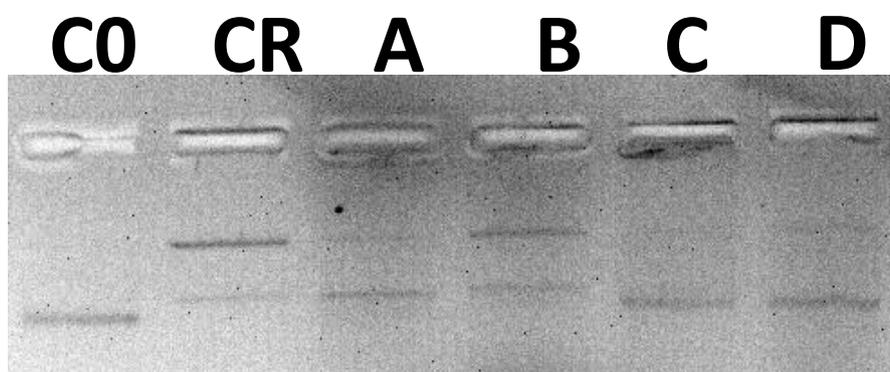


Figure V.1: Effet des différents extraits sur la protection de l'ADN plasmidique 46966 contre les dommages oxydatifs provoqués par H₂O₂ photolysé aux UV. C0 = ADN non irradié non

traité, CR = ADN non traité et irradié aux UV, A = ADN irradié aux UV traité avec *n*-BuOH *C. schoenanthus*, B = ADN irradié aux UV traité avec AcOEt *C. schoenanthus*, C = ADN irradié aux UV traité avec *n*-BuOH *H. lippii*, D = ADN irradié aux UV traité avec AcOEt *H. lippii*.

2.4.2. Evaluation de l'activité antiproliférative

L'activité anticancéreuse des extraits de plantes a été évaluée contre deux lignées cellulaires PC3 et HeLa.

2.4.2.1. *Helianthemum lippii*

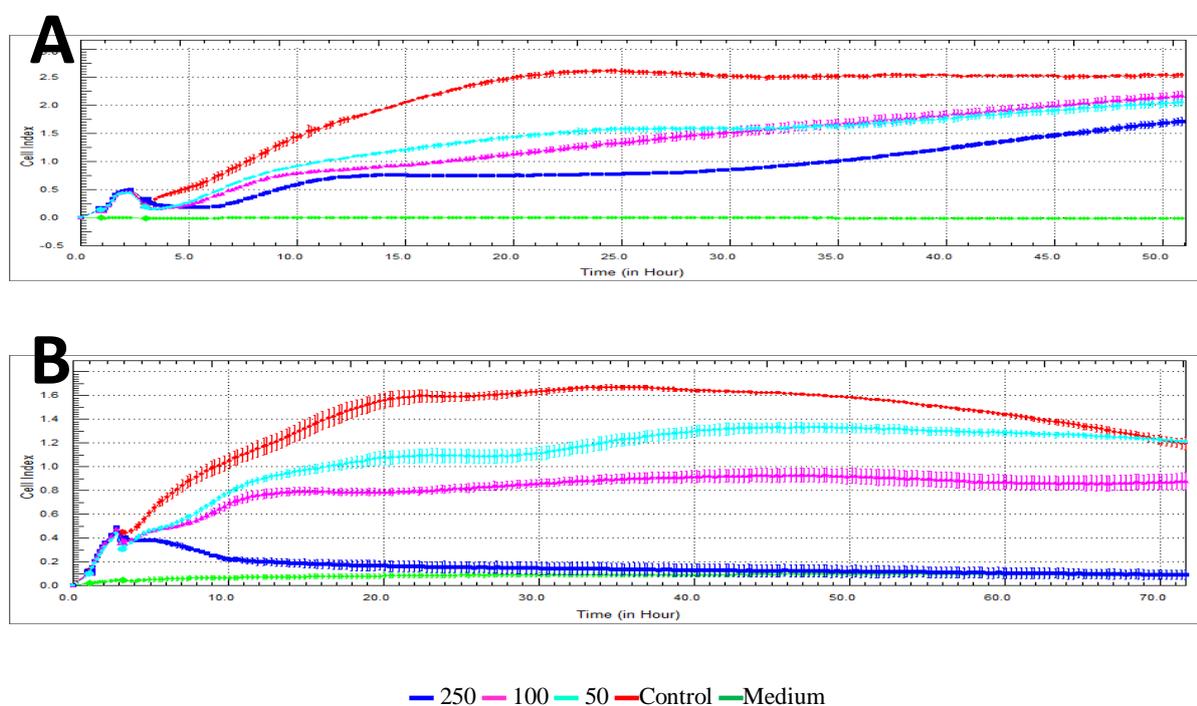


Figure V.2: Activités antiprolifératives de l'extrait AcOEt de *Helianthemum lippii* contre les lignées cellulaires PC3 (A) et HeLa (B). Chaque substance a été testée deux fois en triple en utilisant l'instrument xCELLigence RTCA. Plusieurs concentrations d'extrait ont été appliquées aux cellules représentées par des couleurs différentes (50, 100, 250 µg / ml).

Les résultats de l'essai antiprolifératif ont montré que l'extrait AcOEt de l'espèce *Helianthemum lippii* inhibait de manière significative la prolifération des lignées cellulaires PC3 ainsi que des lignées cellulaires HeLa. Cependant, l'effet de cet extrait était plus puissant dans les lignées cellulaires HeLa. Un effet antiprolifératif dépendant de la dose a été observé dans les deux lignées cellulaires. Un traitement de 24 heures par 50, 100 et 250 µg / ml d'extrait inhibait respectivement 40%, 48% et 70% des lignées cellulaires PC3 et inhibait respectivement

35,71%, 57,14% et presque 100% des lignées cellulaires HeLa. L'effet de l'extrait dans les lignées cellulaires HeLa contrairement à PC3 a continué après les premières 24 heures et a persisté pendant toute la période de l'expérience (figure V.2).

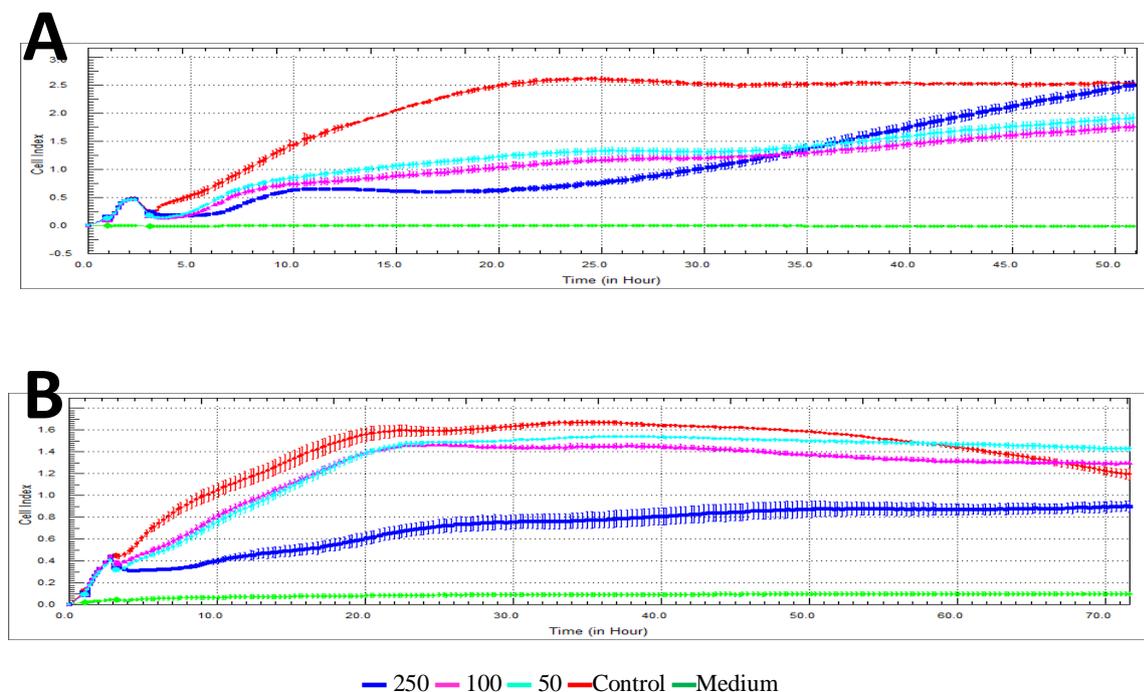


Figure V.3: Activités antiprolifératives de l'extrait de *n*-BuOH de *Helianthemum lippii* contre les lignées cellulaires PC3 (A) et HeLa (B). Chaque substance a été testée deux fois en triple en utilisant l'instrument xCELLigence RTCA. Plusieurs concentrations d'extrait ont été appliquées aux cellules représentées par des couleurs différentes (50, 100, 250 µg / ml).

Des effets antiprolifératifs dépendant de la dose ont été observés en traitant les lignées cellulaires PC3 et HeLa par l'extrait au *n*-butanol de l'espèce *Helianthemum lippii*. Cependant, l'effet de l'extrait était plus intéressant dans les lignées cellulaires PC3 que dans les lignées cellulaires HeLa. Un traitement de 24 heures par 50, 100 et 250 µg / ml d'extrait a inhibé respectivement 46,66%, 53,83% et 70% des lignées cellulaires PC3. Cependant, un traitement de 24 heures par 50 et 100 µg / ml d'extrait a inhibé seulement 6,49% des lignées cellulaires HeLa et 250 µg / ml d'extrait ont inhibé seulement 58,44% des lignées cellulaires HeLa.

Dans le total, la plante *Helianthemum lippii* a montré plus d'un effet antiprolifératif intéressant dans PC3 que dans les lignées cellulaires HeLa particulièrement à une concentration élevée (250 µg / ml) (Figure V.3). Cet effet antiprolifératif peut être dû à la richesse de cette plante en composés phénoliques connus pour jouer un rôle important dans le traitement du cancer. Les effets anticancéreux des polyphénols ont été observés dans plusieurs organes,

notamment l'estomac, le duodénum, le côlon, le foie, les poumons, la glande mammaire, la peau et la prostate. De nombreux polyphénols, tels que les pro anthocyanidines, les flavonoïdes, le resvératrol, les tanins, l'épigallocatechine-3-gallate, l'acide gallique et l'anthocyanine, ont été testés; tous ont montré des effets anticancéreux et protecteurs bien que leurs mécanismes d'action se soient révélés différents (282, 284).

2.4.2.2. *Cymbopogon schoenanthus*

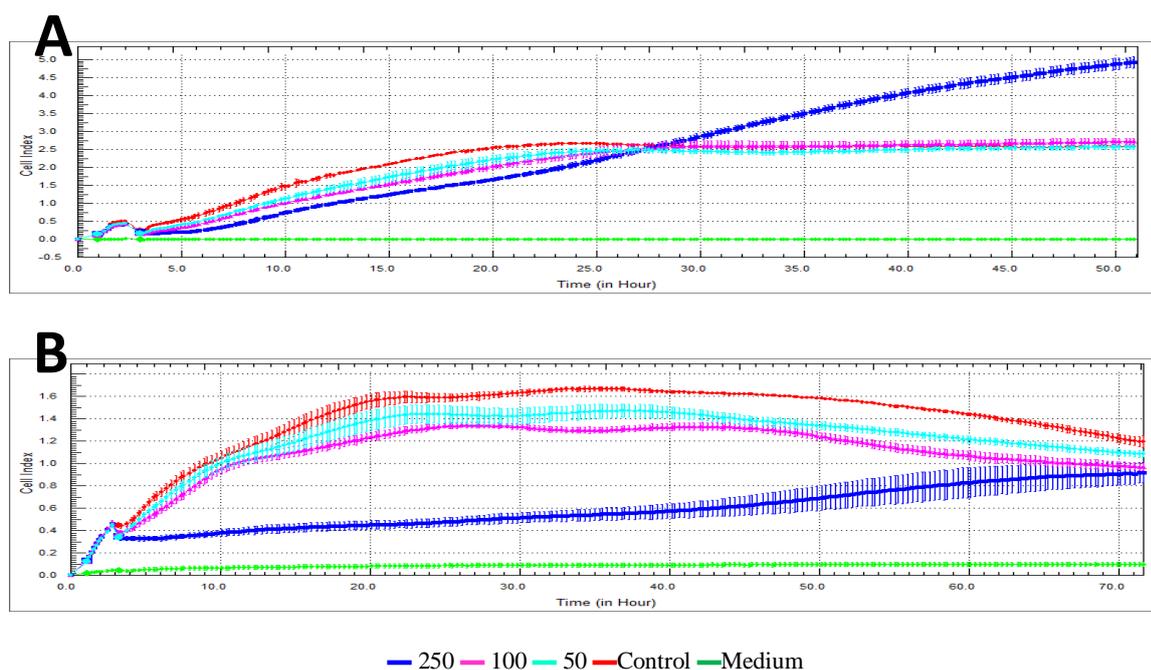


Figure V.4: Activités antiprolifératives de l'extrait AcOEt de *Cymbopogon schoenanthus* contre les lignées cellulaires PC3 (A) et HeLa (B). Chaque substance a été testée deux fois en triple en utilisant l'instrument xCELLigence RTCA. Plusieurs concentrations d'extrait ont été appliquées aux cellules représentées par des couleurs différentes (50, 100, 250 µg / ml).

Le résultat de xCELLigence a montré que l'extrait d'acétate d'éthyle de la plante *Cymbopogon schoenanthus* a un faible effet antiprolifératif dans la lignée cellulaire PC3 mais un effet important dans la lignée cellulaire HeLa à forte concentration. L'effet de cet extrait était très faible à 50 et 100 µg / ml dans les deux lignées cellulaires pendant toute la durée de l'expérience. Cependant, la concentration élevée, 250 µg / ml, de cet extrait a inhibé 23,07% de la lignée cellulaire PC3 et 75% de la lignée cellulaire HeLa dans les 24 premières heures (figure V.4).

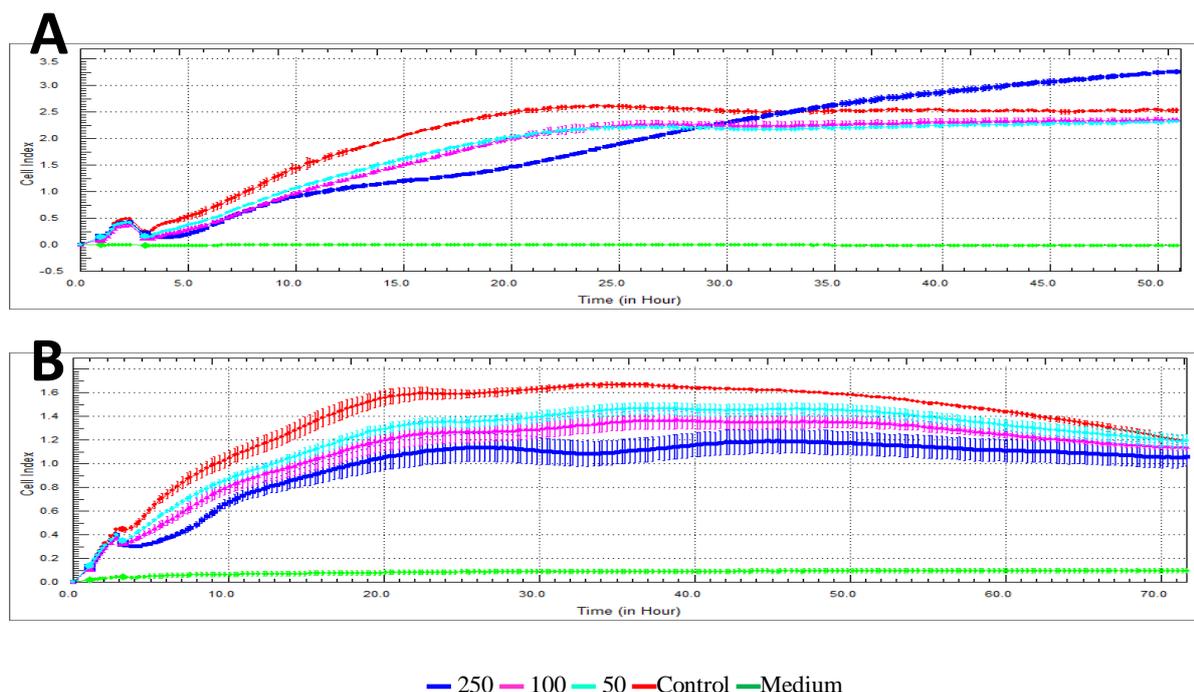


Figure V.5: Activités antiprolifératives de l'extrait *n*-BuOH de *Cymbopogon schoenanthus* contre les lignées cellulaires PC3 (A) et HeLa (B). Chaque substance a été testée deux fois en triple en utilisant l'instrument xCELLigence RTCA. Plusieurs concentrations d'extrait ont été appliquées aux cellules représentées par des couleurs différentes (50, 100, 250 µg / ml).

L'extrait *n*-butanol de la plante *Cymbopogon schoenanthus* a montré un effet antiprolifératif dépendant de la dose contre les deux lignées cellulaires. Cependant cet effet reste modeste. 50 et 100 µg / ml d'extrait ont inhibé 20% de la lignée cellulaire PC3 dans les 20 premières heures et 250 µg / ml d'extrait ont inhibé seulement 40% des cellules après la même période. 50 et 100 µg / ml de l'extrait inhibaient respectivement 13,33 et 20% de la lignée cellulaire HeLa et 250 µg / ml de l'extrait inhibaient 33,33% des cellules après 24 heures (figure V.5).

Au total, la plante *Cymbopogon schoenanthus* a montré plus d'effet antiprolifératif dans les lignées cellulaires HeLa que dans les lignées cellulaires PC3. Le meilleur effet a été observé à haute concentration (250 µg / ml) (Figure V.4).

2.5. Conclusion

L'évaluation biologique des extraits AcOEt et *n*-BuOH des deux espèces *Helianthemum lippii* et *Cymbopogon schoenanthus* a montré qu'une dose de 50 µg, les extraits de la première espèce procurent une protection complète de l'ADN plasmidique 46966 contre les dommages

oxydatifs causés par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) photolysé par les rayons UV. Tandis qu'avec la même dose, les extraits de la deuxième espèce n'ont montré aucun effet protecteur contre les dommages oxydatifs.

Par ailleurs, *Cymbopogon schoenanthus* a montré plus d'effet antiprolifératif sur les lignées cellulaires HeLa que sur les lignées cellulaires PC3. Alors que *Helianthemum lippii* a montré plus d'un effet antiprolifératif intéressant dans PC3 que dans les lignées cellulaires HeLa particulièrement à une concentration élevée (250 µg / ml).

Cette particularité observée pour l'espèce *Helianthemum lippii* sur l'effet antioxydant et l'effet antiprolifératif est due à sa composition polyphénolique à un taux plus élevé que celui de l'espèce *Cymbopogon schoenanthus*.

3. Etude pharmacologique

Ce travail a été réalisé au laboratoire de pharmacologie du département des sciences pharmaceutiques de la faculté de pharmacie de l'université de Porto, sous la supervision du professeur Manuela Morato, qui effectue des recherches à long terme sur la distribution et la fonction de plusieurs composants du système angiotensine (RAS) dans divers tissus.

Le côlon est innervé par le système nerveux sympathique et parasympathique et sa mobilité résulte de leur coopération. En face de la plupart des autres tissus, dans le tractus gastro-intestinal, le système nerveux parasympathique provoque la contraction du muscle lisse tandis que le système nerveux sympathique détend le muscle lisse. Le système nerveux parasympathique contrôle la motilité du tractus gastro-intestinal en libérant son médiateur, l'acétylcholine (ACh).

Dans le présent travail, nous avons cherché à caractériser l'effet de plusieurs extraits de *Helianthemum lippii* et *Cymbopogon schoenanthus* sur le côlon distal du rat afin de rechercher un mécanisme putatif qui pourrait soutenir son intérêt clinique.

L'étude concerne l'effet des extraits issus des deux espèces sur des tissus de colon distal (descendant) des rats. Le protocole expérimental est toujours le même sauf que pour l'espèce *Helianthemum lippii*, l'étude était portée sur l'extrait Acétate d'éthyle et *n*-butanol ; tandis que pour l'espèce *Cymbopogon schoenanthus* on a étudié les extraits : Chloroforme, Acétate d'éthyle, *n*-butanol, les précipités des extraits bruts des racines et des parties aériennes.

3.1. Colon distal

3.1.1. Anatomie

Le gros intestin (intestinum crassum) se compose de 3 parties principales (Figure V.1) :

- Le caecum (intestinum caecum) est la partie qui se connecte à l'intestin grêle ; au caecum se trouve l'appendice vermiforme (appendice vermiformis).
- Le côlon est la partie la plus longue du gros intestin et il se divise dans le côlon ascendant attaché au caecum dans la partie droite de la cavité abdominale, le côlon transverse, qui passe sous l'estomac et le foie du côté droit au côté gauche du corps et le côlon descendant, qui descend du côté gauche du corps jusqu'au petit bassin et continue avec le côlon sigmoïde, qui est S- courbe et va au milieu du bassin.
- La partie terminale du gros intestin est le rectum qui expose le gros intestin à la surface du corps et se termine dans le canal anal (anus)

Ces trois parties sont parfaitement enroulées dans la cavité abdominale et sont liées par la flexion colique droite (hépatique) (flexura coli dextra), entre le côlon ascendant et transversal, et la flexion colique gauche (splénique) (flexura coli sinistra), localisée entre le côlon transverse et le côlon descendant (285).

L'apport sanguin au gros intestin est assuré par les artères mésentériques qui proviennent de l'aorte, tandis que le retour veineux du gros intestin est soutenu par les veines mésentériques qui s'écoulent vers la circulation portale et, ensuite, par la veine hépatique et la partie inférieure. La veine cave, au coeur.

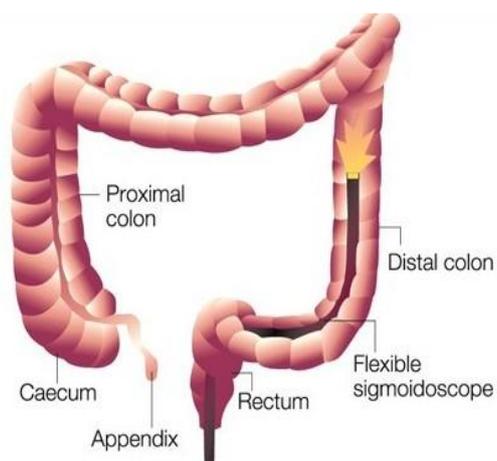


Figure. V.6 : Anatomie du gros intestin.

La fonction principale du gros intestin est de compléter l'absorption et d'éliminer les résidus non digérés. Chez l'homme, chaque jour, environ 1500 ml de chyme arrivent dans le côlon où l'eau, les ions et les acides biliaires sont absorbés. Le colon est colonisé par la microflore symbiotique et cette microflore est responsable de la production de vitamines, principalement de la vitamine K, mais aussi de la vitamine B1 et de la vitamine B2. En conséquence de l'absorption d'eau, le chyme devient progressivement plus rigide, formant les selles éliminées quotidiennement (environ 100 à 300 g / jour). Les selles sont éliminées par la fonction des couches musculaires lisses ainsi que des sphincters anaux internes et externes, dont le contrôle est involontaire et volontaire, respectivement (286).

3.1.2. Contraction du muscle lisse colique

La fonction du côlon dépend principalement de l'action des deux couches de muscle lisse : longitudinale et circulaire. En effet, le muscle longitudinal fournit des mouvements propulsifs totaux (péristaltisme) qui sont importants pour faire avancer le contenu du côlon. D'autre part, le muscle circulaire fournit des mouvements locaux, segmentatifs et balancés qui contribuent au mélange du chyme (286). Le côlon est innervé par le système nerveux entérique (ENS), un réseau neuronal complexe, considéré par certains comme l'une des trois sous-catégories du système nerveux autonome (287). Le tonus de ces muscles est contrôlé par les systèmes nerveux et humoral : le plexus myentericus Auerbachii contrôle la motilité tandis que le plexus submucosus Meissneri contrôle la sécrétion de mucus et la vascularisation locale. Les deux plexus sont également reliés au système nerveux sympathique et parasympathique (286).

Ainsi, le côlon est innervé à la fois par le système nerveux parasympathique et le système nerveux sympathique, dont les principaux neurotransmetteurs sont respectivement l'ACh et la noradrénaline (NA). Contrairement à la plupart des autres organes, dans le côlon, l'ACh se lie aux récepteurs de l'ACh (en particulier les récepteurs muscariniques de type 3 (M3) sur les cellules musculaires lisses, provoquant une contraction. En revanche, NA active à la fois les adrénorécepteurs α_2 et β_2 provoquant une relaxation de la cellule musculaire lisse (286). Ainsi, la motilité colique est le résultat d'un équilibre entre les effets sympathiques et parasympathiques sur les cellules musculaires lisses.

3.2. Matériels et méthodes

3.2.1. Produits chimiques et préparation des solutions

La plupart des composés utilisés pour le travail expérimental ont été obtenus auprès de Sigma-Aldrich, Etats-Unis sauf pour : NaCl (produits chimiques VWR, Belgique), KCl, CaCl₂, glucose, NaHCO₃, acide ascorbique (Pancreac Quimica, Espagne), NaH₂PO₄ × H₂O, Na₂EDTA. (MERCK, Allemagne). Le candésartan était un cadeau aimable du Dr Fredrik Palm (Université d'Uppsala, Suède).

ACh - poudre de chlorure d'acétylcholine a été dissoute dans de l'eau distillée aux concentrations nécessaires. La solution mère était préparée chaque semaine et stockée au réfrigérateur.

Solution de Krebs - La solution de Krebs a été préparée selon le tableau 1 en utilisant de l'eau distillée comme solvant

Composés	g/l	mM
NaCl	69	118
KCl	3,6	4,8
CaCl ₂	2,8	2,5
MgSO ₄	2,96	1,2
NaH ₂ PO ₄	1,65	1,2
Glucose	2,2	11,1
NaHCO ₃	2,1	25
Na ₂ EDTA	0,0112	0,03
Acide citrique	0,0528	0,3

Tableau V.1 : Préparation de la solution Krebs

La solution Krebs + KCl – a été préparée selon le **tableau V.2** en utilisant l'eau distillée comme solvant.

Composés	g/l	mM
KCl	93,2	125
CaCl ₂ ×2H ₂ O	2,8	2,5
MgSO ₄ ×7H ₂ O	2,96	1,2

NaH₂PO₄×2H₂O	1,65	1,2
Glucose	2,2	11,1
NaHCO₃	2,1	25
Na₂EDTA	0,0112	0,03

Tableau V.2 : Préparation de la solution Krebs avec KCl 125 mM

3.2.2. Animaux et préparations des tissus

Les expériences ont été réalisées en utilisant des rats femelles Wistar Han (ICBAS-Porto animal facility, Portugal) âgées de 13 à 20 semaines. Les animaux ont été logés dans des conditions standard de température (21°C), d'humidité (40-60%) et de cycles alternatifs de lumière et d'obscurité (12h / 12h), avec un accès libre à la nourriture et à l'eau. Toutes les expériences ont été réalisées conformément aux lignes directrices de l'Union européenne pour la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (directive 2010/63 / UE et décision 1999/575 / CE) et portugaises (DGAV, Portugal).

Les animaux ont été sacrifiés par décapitation et après une laparotomie médiane, un segment du côlon distal (environ 8 cm) a été excisé et doucement rincé avec la solution de Krebs-Henseleit pour se libérer du contenu luminal. Le segment du côlon a été coupé en bandes d'environ 2 cm de long, orientées le long des fibres musculaires longitudinales et montées dans des bains d'organes de 10 ml remplis de solution de Krebs-Henseleits chaude (37 ° C) oxygénée (95% O₂, 5% CO₂). Un fil de coton a été utilisé pour fixer les tissus au fond du bain, tandis qu'un autre a fixé le tissu à un transducteur (UGO BASILE S.R.I., Italie, modèle 7004). Les réponses isométriques ont été enregistrées sur un polygraphe (UGO BASILE S.R.I., Italie, modèles 7050 et 7070). Les tissus ont été étirés passivement jusqu'à une tension initiale de 1 g.

3.2.3. Préparation des extraits

a) Extraits de *Helianthemum lippii*

Les extraits acétate d'éthyle et *n*-Butanol ont été dissous dans du DMSO. Ensuite, tous les extraits ont été dilués dans de l'eau pour avoir des solutions mères de 300 mg/ml. L'ajout cumulatif de DMSO à un maximum de 1% et l'ajout du Tween80 se sont avérés n'avoir aucun effet significatif sur le côlon isolé dans nos données préliminaires et dans des études antérieures (288).

b) Extraits de *Cymbopogon schoenanthus*

Les extraits acétate d'éthyle et *n*-Butanol ont été dissous dans du DMSO tandis que l'extrait Chloroforme, précipité des racines et précipité des extraits méthanoliques des parties aériennes ont été dissous dans du DMSO avec quelques gouttes de Tween80. Ensuite, tous les extraits / précipités ont été dilués dans de l'eau pour avoir des solutions mères de 300 mg/ml. L'ajout cumulatif de DMSO à un maximum de 1% et l'ajout du Tween80 se sont avérés n'avoir aucun effet significatif sur le côlon isolé dans nos données préliminaires et dans des études antérieures (288).

3.3. Protocole expérimental

Après le montage, on a laissé les tissus s'équilibrer pendant 1 heure en les lavant toutes les 15 minutes. Après la période d'équilibration, les tissus ont été stimulés avec du KCl 125 mM ou de l'Acétylcholine 1-3 μ M. Ensuite, après une période de lavage de 30 minutes, des courbes de concentration-réponse cumulatives (10 μ g /ml à 30 mg / ml) aux différents extraits ont été obtenues. Dans certaines expériences, l'effet des extraits a été testé directement sur le ton basal et la réponse correspondante a été calculée en% de la réponse initiale au KCl (125 mM). L'effet des extraits a également été évalué sur une pré-contraction induite par KCl 50 mM ou Acétylcholine 1-3 μ M. Dans ces protocoles, la réponse de chaque extrait a été calculée en% de la précontraction stable correspondante induite par KCl- ou acétylcholine.

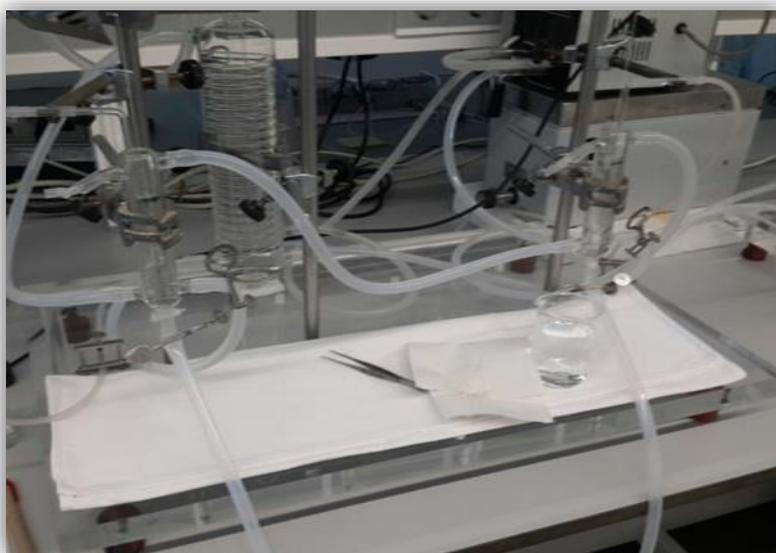


Figure V.7. Montage du bain organique

3.4. Analyse statistique

Pour chaque extrait, les valeurs Emax (effet maximum) et CE50 (concentration de l'extrait provoquant 50% de la réponse maximale) ont été calculées en utilisant le logiciel GraphPad Prism, version 7.00 pour Windows.

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne \pm erreur-type de la moyenne (SEM). L'analyse statistique a été réalisée en utilisant l'analyse de variance à un facteur (ANOVA) suivie des tests de comparaison multiple de Tukey; une valeur de p inférieure à 0,05 a été considérée comme statistiquement significative.

3.5. Résultats

3.5.1. Résultats des extraits de *Helianthemum lippii*

3.5.1.1. Effet des extraits sur le ton basal du colon distal

Chacun des extraits AcOEt et *n*-BuOH de *H. lippii* ont provoqué une relaxation dépendante de la concentration du tonus basal du côlon distal du rat (figure V.14.A) et également du tissu précontracté induit par KCl et Ach (figure V.14.B Lippii et figure V.14.C respectivement). Il n'y avait pas de différence entre les deux extraits concernant Emax sur le ton basal, bien que la CE50 de l'extrait AcOEt fût inférieure à celle de l'extrait *n*-BuOH (figure V.14.A et tableau V.3).

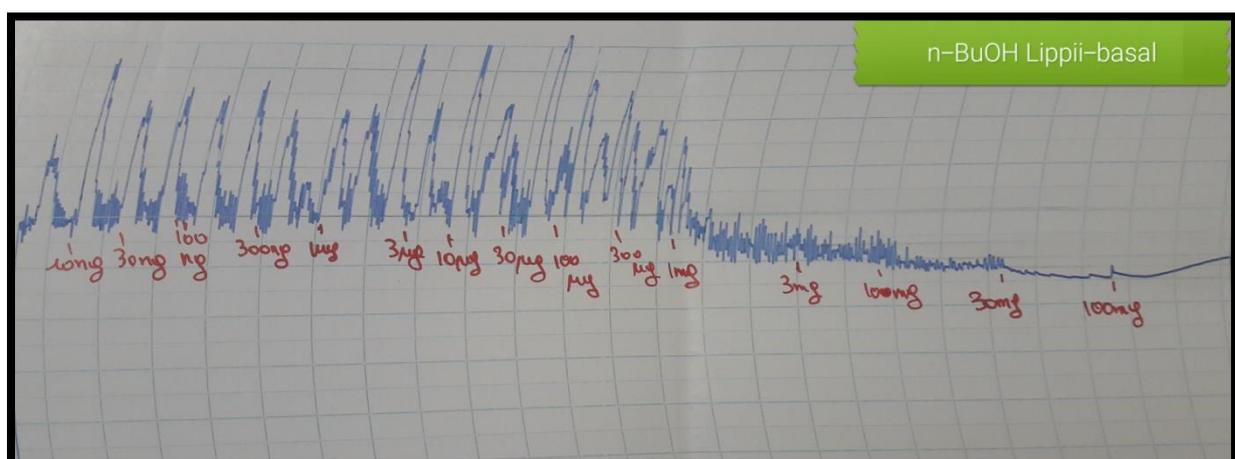


Figure V.8 : Effet de l'extrait *n*-BuOH de *H. lippii* sur le ton basal du colon distal du rat

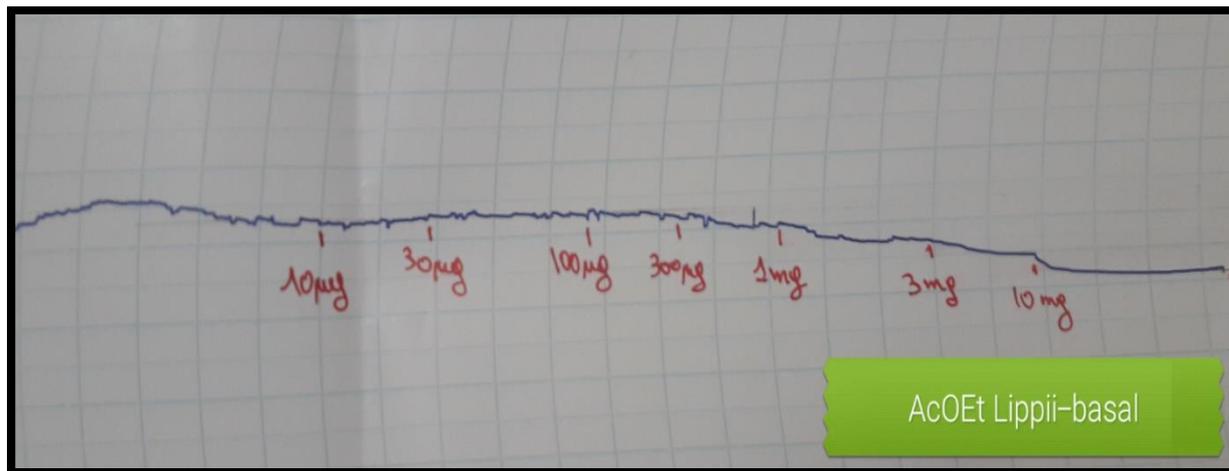


Figure V.9 : Effet de l'extrait AcOEt de *H. lippii* sur le ton basal du colon distal du rat

3.5.1.2. Effet des extraits sur la précontraction induite par KCl

Différemment, dans le tissu précontracté par KCl (50mM), Le Emax de l'extrait AcOEt était plus élevé que celui de l'extrait *n*-BuOH (figure V.14.B et tableau V.3). Ce qui est intéressant, c'est que l'extrait AcOEt a inversé le ton colonique induit par KCl (50 mM) (figure V.14.B et tableau V.3).

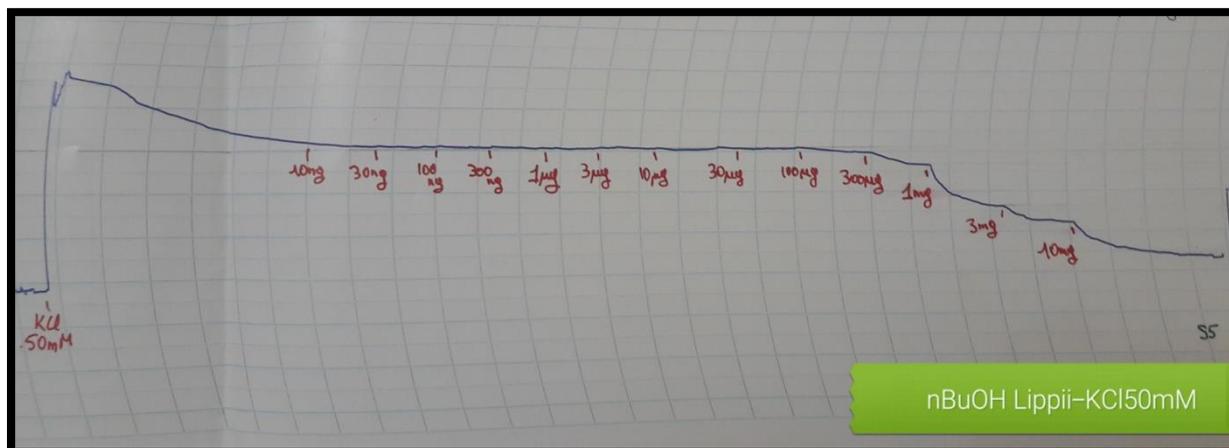


Figure V.10 : Effet de l'extrait *n*-BuOH de *H. lippii* sur la précontraction induite par KCl (50mM) du colon distal du rat

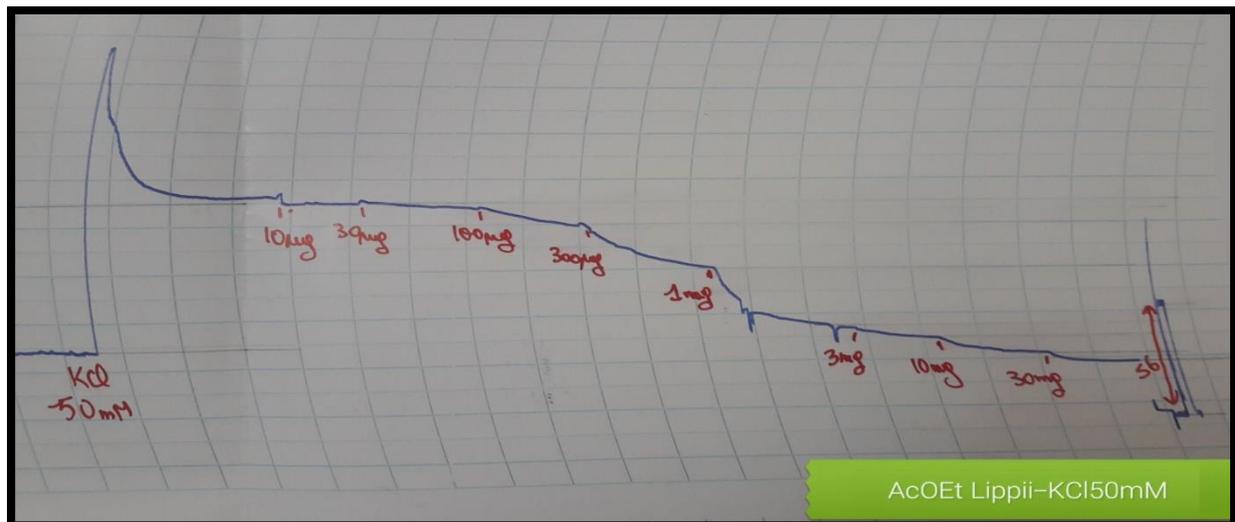


Figure V.11 : Effet de l'extrait AcOEt de *H. lippii* sur la précontraction induite par KCl (50mM) du colon distal du rat).

3.5.1.3. Effet des extraits sur la précontraction induite par Ach

Il n'y avait pas de différence dans le Emax des deux extraits sur ce protocole (Fig. V.14.B et Tableau V.3). Les deux extraits provoquaient une relaxation marquée du côlon distal du rat induite par Ach (1-3 μ M), ce qui apportait le ton du muscle lisse à des valeurs inférieures au niveau de base (avant précontraction induite par Ach) (figure V.14.C et tableau V.3); le Emax était similaire pour les deux extraits. Cependant, l'EC50 de l'extrait AcOEt était inférieure à celui de l'extrait *n*-BuOH (figure V.14.C et tableau V.3).

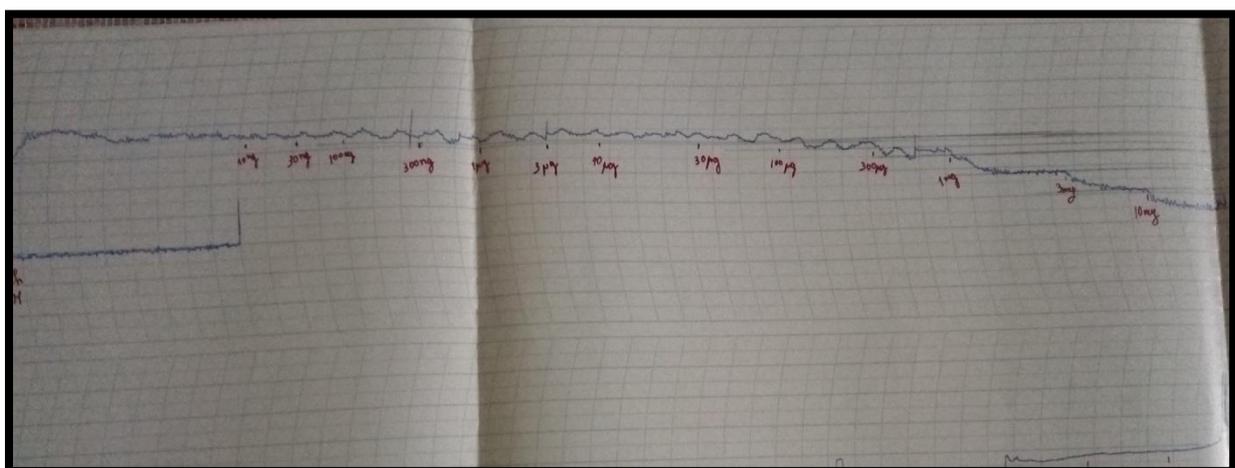


Figure V.12 : Effet de l'extrait *n*-BuOH de *H. lippii* sur la précontraction induite par Ach (1-3 μ M) du colon distal du rat

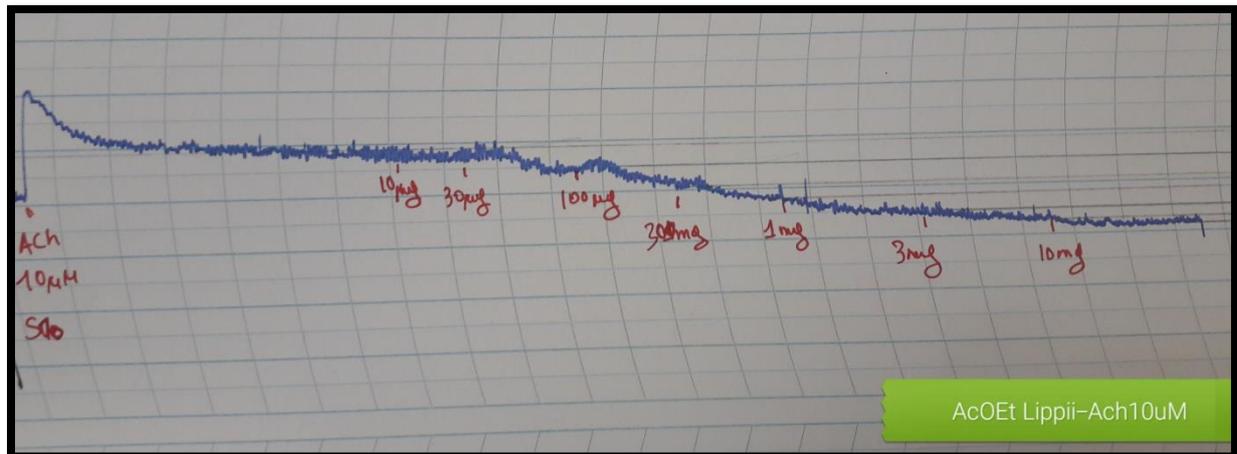


Figure V.13 : Effet de l'extrait AcOEt de *H. lippii* sur la précontraction induite par Ach (1-3 μ M) du colon distal du rat

Tableau V.3 : Emax (%) et CE50 (mg/ml) valeur des extraits *n*-BuOH et AcOEt de *Helianthemum lippii* sur le ton basal, précontraction induite par KCl-ou- Ach du colon distal du rat

	Emax (%)			EC50 (mg/ml)		
	<i>n</i> -BuOH	AcOEt	p valeur	<i>n</i> -BuOH	AcOEt	p valeur
Ton Basal	35.59±4.69	25.31±2.21	0.08	1,74±0,25	0,37±0,06	0,001
Précontraction induite par KCl	67,50±8,11	117,05±6,84	0,0034	1,03±0,2 1	0,99±0,26	0,9155
Précontraction induite par Ach	127,79±15,96	150,80±18,85	0,4143	1,41±0,33	0,40±0,11	0,009

Valeurs exprimées en \pm S.E.M de 6 expériences différentes.

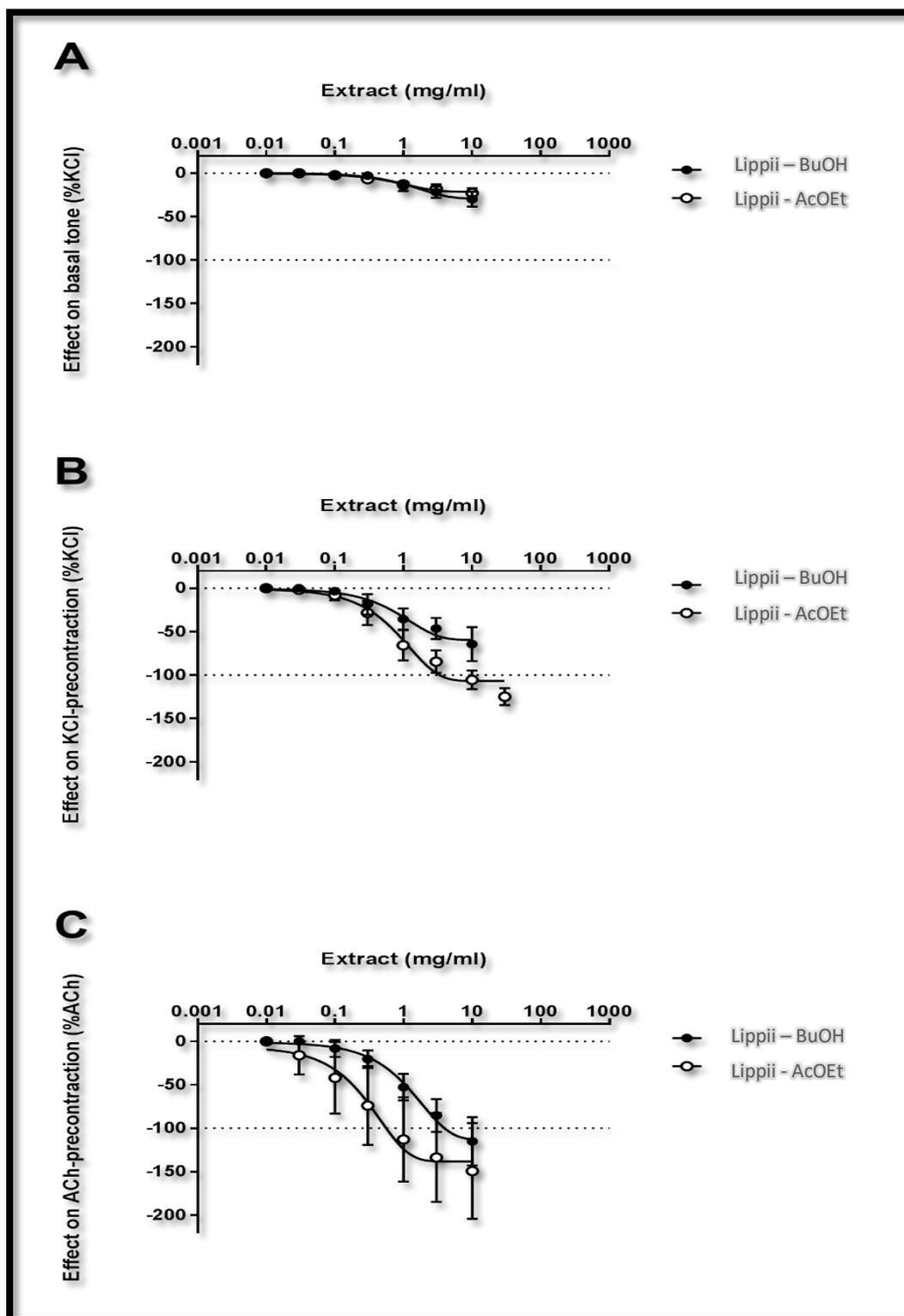


Figure V.14. Courbes concentration-réponse des extraits acétate d'éthyle (AcOEt) et *n*-Butanol, (*n*-BuOH) de l'espèce *Helianthemum Lippii* sur le ton basal (A), précontraction induite par KCl (50mM) (B) ou Ach (1-3 μ M) (C) du colon distal du rat.

3.5.2. Résultats des extraits de *Cymbopogon schoenanthus*

3.5.2.1. Effet des extraits sur le ton basal du colon distal

Tous les extraits de *C. schoenanthus* ont provoqué une relaxation dépendante de la concentration du ton basal du côlon distal du rat (figure V.27). Concernant l'effet direct sur le ton basal, tous les extraits ont diminué le ton basal sans aucune différence dans l'Emax (figure V.27 et tableau V.4). Cependant, il y avait des différences dans l'EC50 entre les différents extraits (figure V.27 et tableau V.4) : le EC50 de l'extrait *n*-BuOH ($9,11 \pm 4,85$ mg / ml) était supérieure à celui de l'extrait AcOEt ($0,73 \pm 0,52$ mg / ml ; $p < 0,05$), l'extrait CHCl₃ ($0,86 \pm 0,35$ mg / ml, $p < 0,01$) et le précipité des parties aériennes ($0,67 \pm 0,38$ mg / ml, $p < 0,05$).

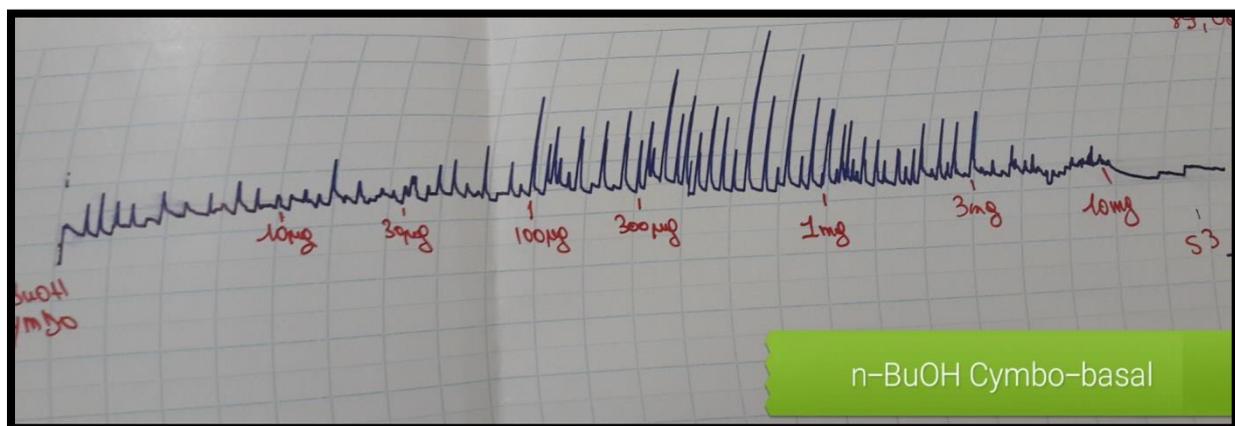


Figure V.15 : Effet de l'extrait *n*-BuOH de *C. schoenanthus* sur le ton basal du colon distal du rat

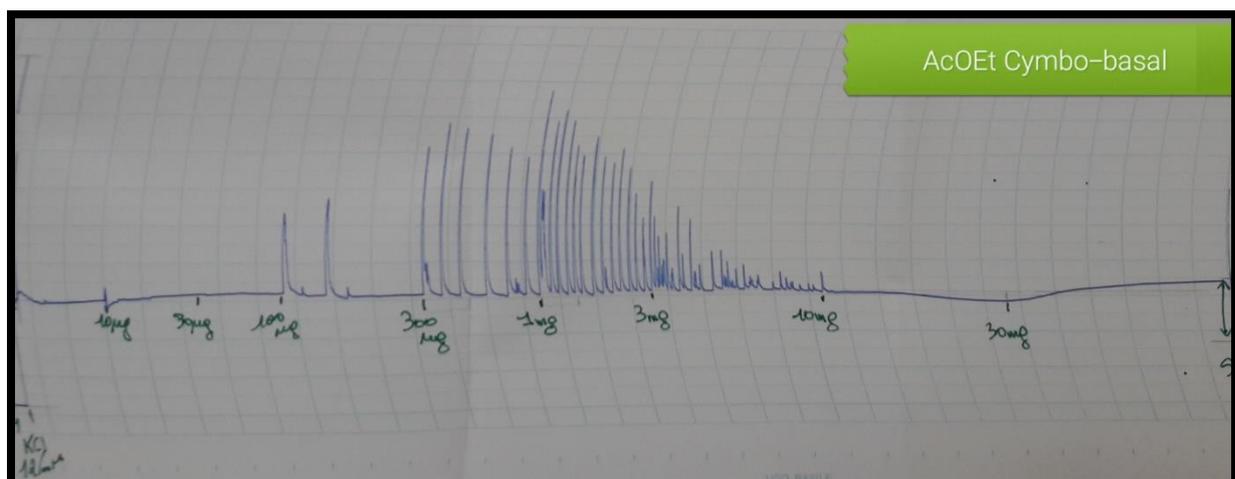


Figure V.16 : Effet de l'extrait AcOEt de *C. schoenanthus* sur le ton basal du colon distal du rat

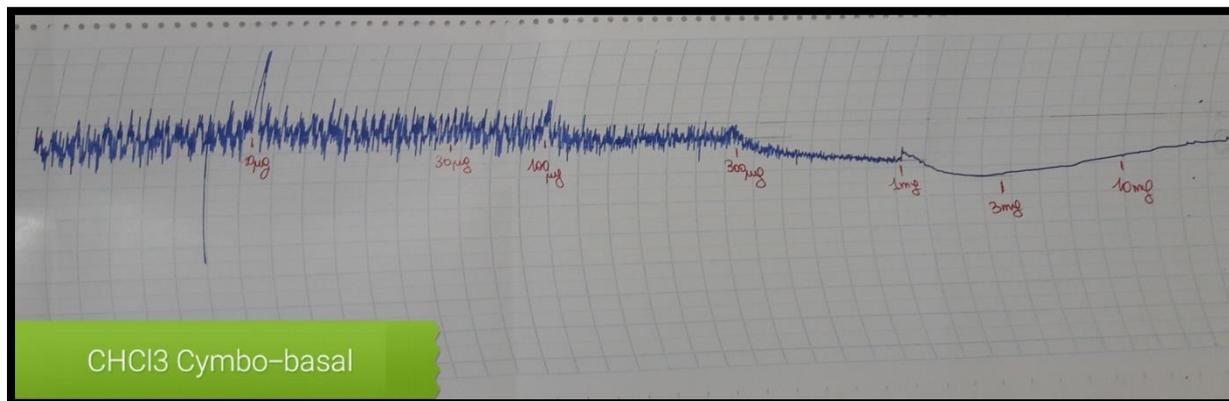


Figure V.17 : Effet de l'extrait CHCl₃ de *C. schoenanthus* sur le ton basal du colon distal du rat

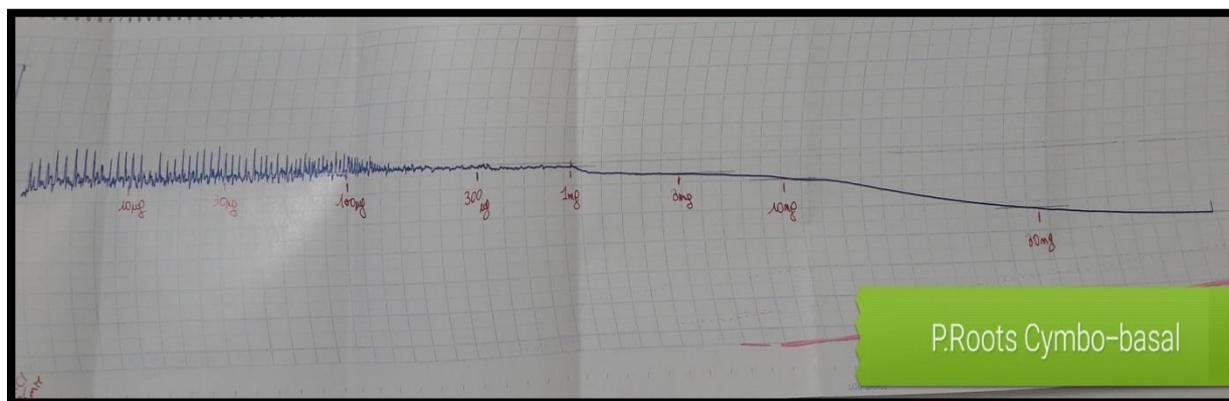


Figure V.18 : Effet du Précipité Racines de *C. schoenanthus* sur le ton basal du colon distal du rat

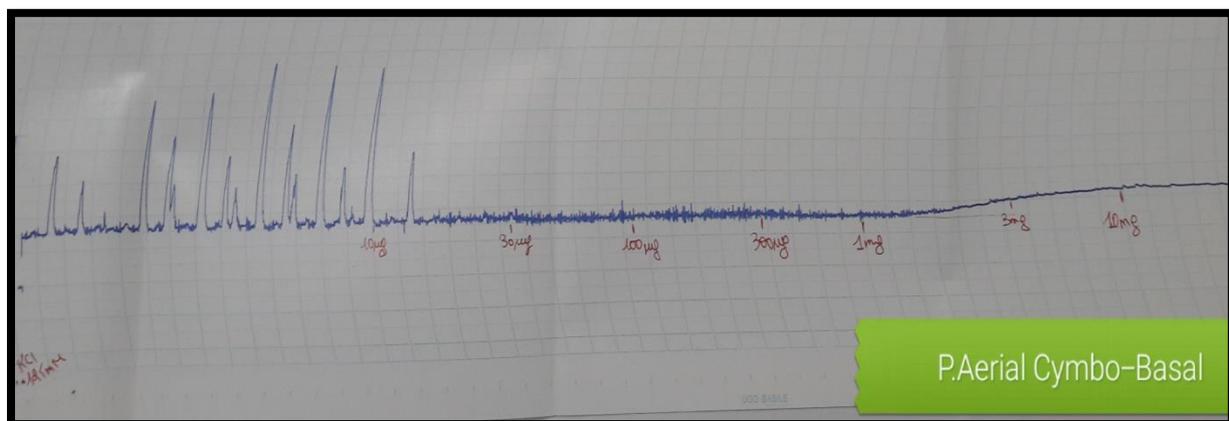


Figure V.19 : Effet du Précipité Parties aériennes de *C. schoenanthus* sur le ton basal du colon distal du rat

3.5.2.2. Effet des extraits sur la précontraction induite par KCl

Chacune des précontractions induites par KCl (50mM) ont également été diminuées par tous les extraits de manière dépendante de la concentration, bien que le profil de la réponse soit différent entre les extraits (figure V.28.A). Sauf pour l'extrait *n*-BuOH, tous les extraits ont totalement inversé le ton du côlon induit par KCl 50 mM (figure V.28.A et tableau V.4). En effet, l'extrait de *n*-BuOH était celui qui présentait le plus faible E_{max} ($69,75 \pm 9,40\%$) de précontraction induite par le KCl, qui était significativement plus faible que celle de l'extrait AcOEt ($120,87 \pm 10,08\%$, $p < 0,05$) et l'extrait $CHCl_3$ ($132,42 \pm 8,71\%$; $p < 0,01$). Les EC_{50} des extraits *n*-BuOH ($0,34 \pm 0,10$ mg / ml) et AcOEt ($0,31 \pm 0,06$ mg / ml) étaient similaires, mais supérieurs à ceux des trois autres extraits ($CHCl_3$: $0,03 \pm 0,004$ mg / ml, $p < 0,01$; P. Racines : $0,03 \pm 0,01$ mg / ml, $p < 0,01$; P. Aériennes: $0,03 \pm 0,005$ mg / ml, $p < 0,01$).

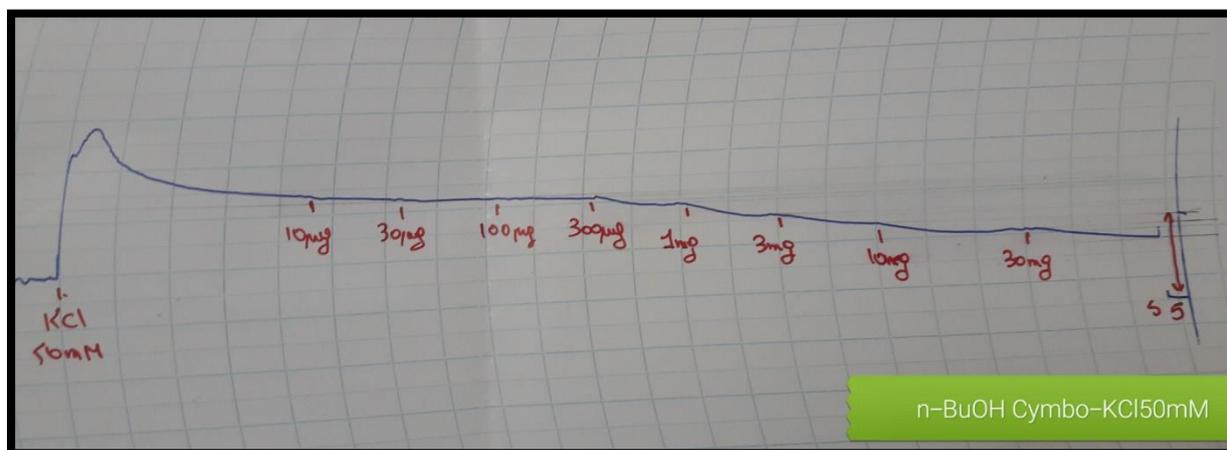


Figure V.20 : Effet de l'extrait *n*-BuOH de *C. schoenanthus* sur la précontraction induite par KCl (50 mM) du colon distal du rat

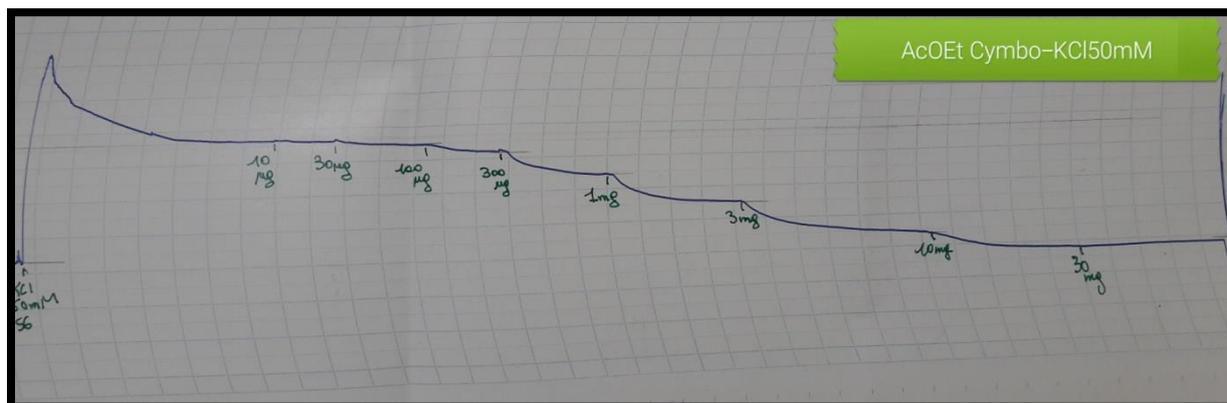


Figure V.21 : Effet de l'extrait AcOEt de *C. schoenanthus* sur la précontraction induite par KCl (50 mM) du colon distal du rat

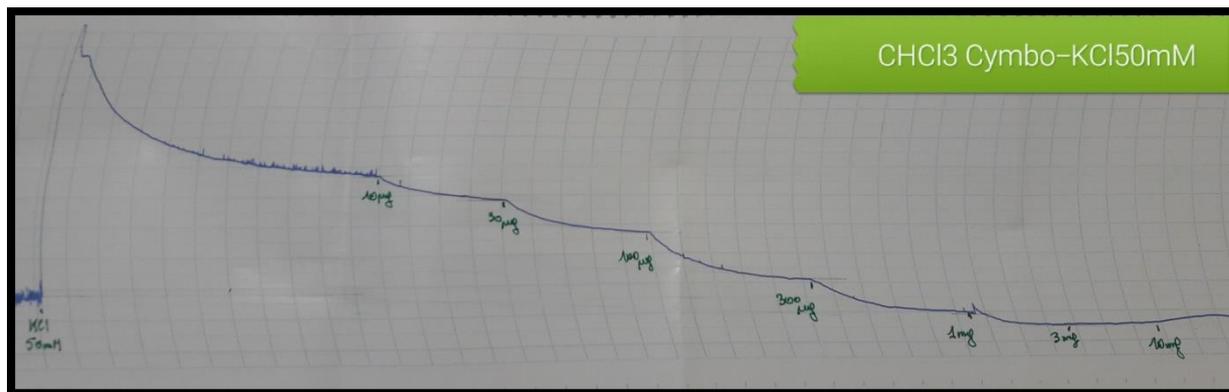


Figure V.22 : Effet de l'extrait CHCl_3 de *C. schoenanthus* sur la précontraction induite par KCl (50 mM) du colon distal du rat

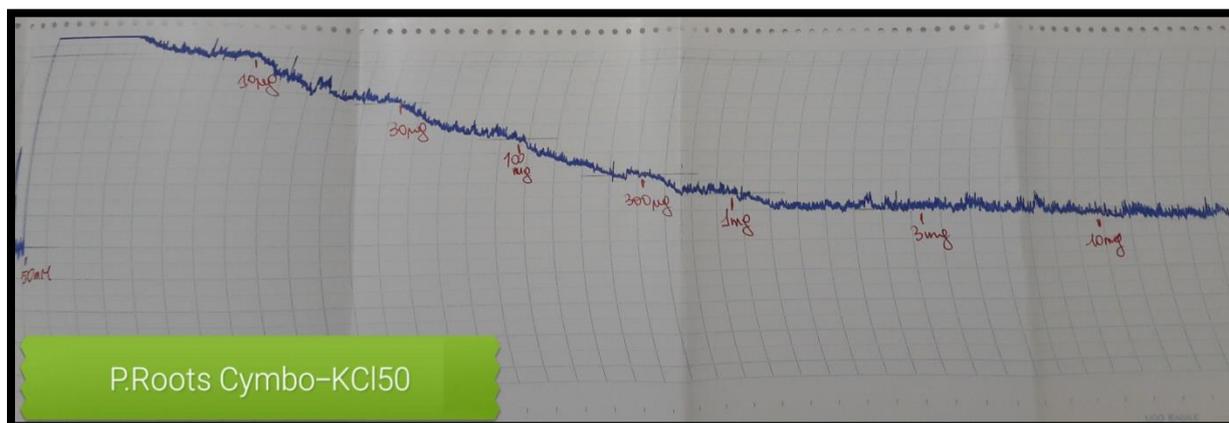


Figure V.23 : Effet du précipité Racines de *C. schoenanthus* sur la précontraction induite par KCl (50 mM) du colon distal du rat

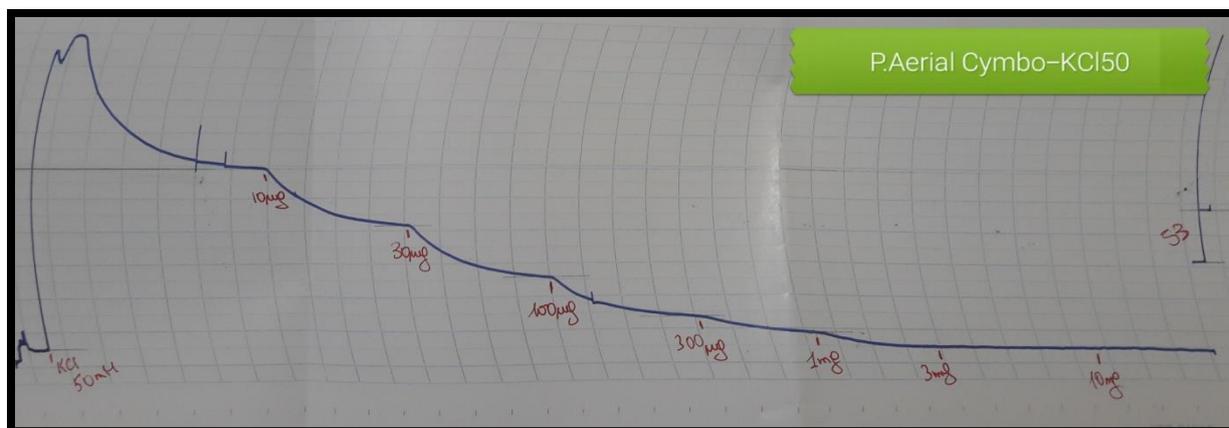


Figure V.24 : Effet du précipité Parties aériennes de *C. schoenanthus* sur la précontraction induite par KCl (50 mM) du colon distal du rat

3.5.2.3. Effet des extraits sur la précontraction induite par Ach

De même, tous les extraits ont totalement inversé la contraction du côlon distal du rat induite par Ach (1-3 μ M, Fig. V.28 B et Tableau V.4). Même si l'extrait *n*-BuOH a donné le plus faible E_{max} et l'extrait AcOEt a le E_{max} le plus élevé ($99,46 \pm 9,83\%$ vs $143,98 \pm 6,26\%$, $p < 0,05$). Il n'y avait pas d'autres différences dans le E_{max} entre les extraits avec précontraction induite par l'Ach (figure V.28.B et tableau V.4). Concernant la EC_{50} , les extraits *n*-BuOH et AcOEt ont montré des valeurs de EC_{50} similaires ($1,10 \pm 0,51$ mg / ml vs $1,31 \pm 0,15$ mg / ml, respectivement, $p > 0,05$), supérieures à celles des trois autres extraits (CHCl₃: $0,04 \pm 0,01$ mg / ml, $p < 0,05$; P. Racines: $0,03 \pm 0,01$ mg / ml, $p < 0,05$; P. Aérienne: $0,03 \pm 0,01$ mg / ml, $p < 0,05$).

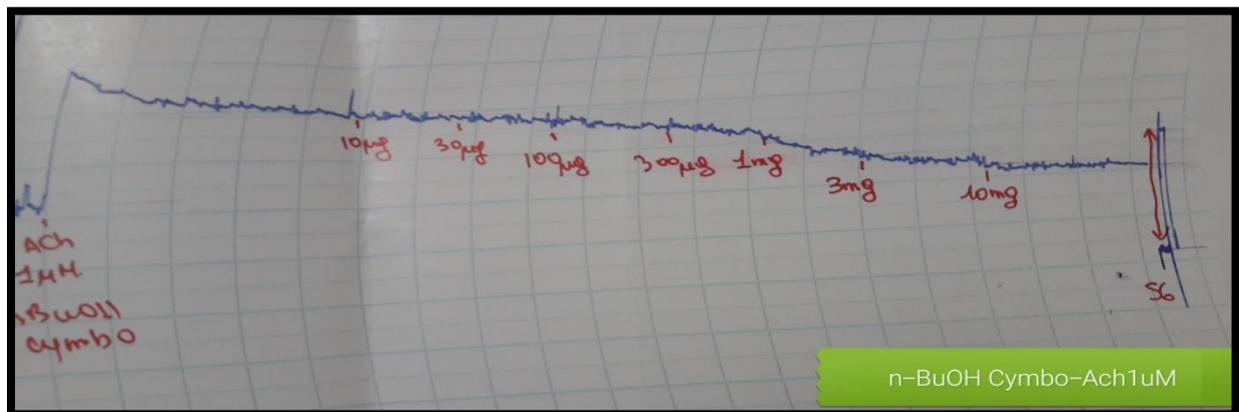


Figure V.25: Effet de l'extrait *n*-BuOH de *C. schoenanthus* sur la précontraction induite par Ach (1-3 μ M) du colon distal du rat

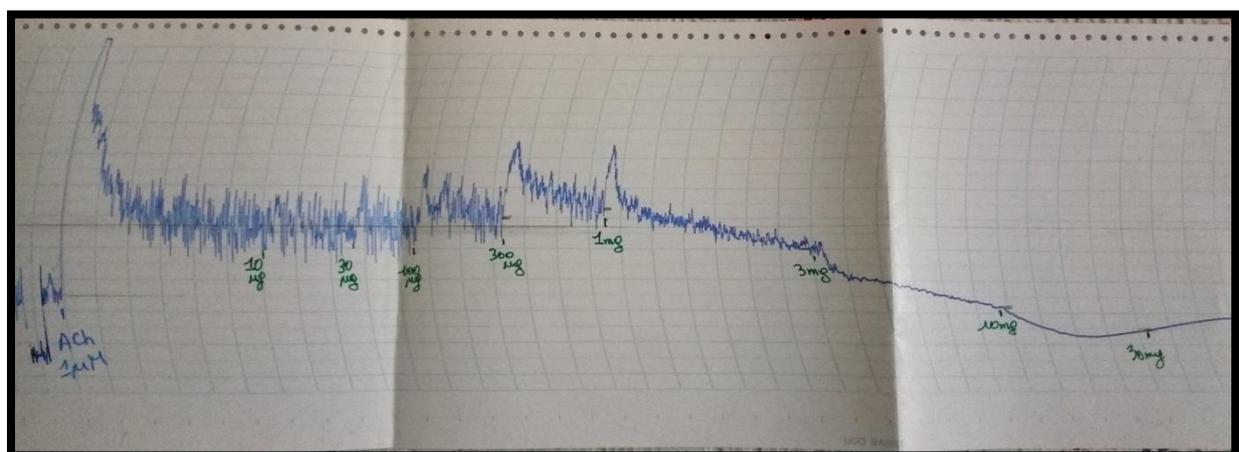


Figure V.26: Effet de l'extrait AcOEt de *C. schoenanthus* sur la précontraction induite par Ach (1-3 μ M) du colon distal du rat Les autres données des autres extraits et précipités ont été analysés et enregistrés par un logiciel et non sur papier.

Tableau V.4 : Valeurs Emax (%) et EC50 (mg/ml) des extraits *n*-BuOH, AcOEt, CHCl₃, P. Racines et P. P aériennes de *C. shoenanthus* sur le ton basale, contraction induite par KCl- ou- Ach sur le colon distal du rat.

	Emax (%)	Valeur p	EC50(mg/ml)	Valeur p
Ton basale		0.1105		0.0093
<i>n</i> -BuOH	15.90±3.40		9.11±4.85	
AcOEt	4.95±1.31		0.73±0.52	
CHCl ₃	24.25±4.67		0.86±0.35	
P. Racine	18.56±3.89		4.26±1.27	
P. P aériennes	21.41±5.65		0.67±0.38	
Précontraction induite par KCl				
<i>n</i> -BuOH	69,75±9,40	0,0034	0,34±0,10	0,0001
AcOEt	120,87±10,08		0,31±0,06	
CHCl ₃	132,42±8,71		0,03±0,00	
P. Racines	108,67±16,97		0,03±0,01	
P. P aériennes	112,24±6,00		0,03±0,00	
Précontraction induite par Ach				
<i>n</i> -BuOH	99,46±9,83	0,0338	1,10±0,51	0,0012
AcOEt	143,98±6,26		1,31±0,15	
CHCl ₃	126,23±5,14		0,04±0,01	
P. Racines	126,22±13,45		0,03±0,01	
P. P aériennes	123,06±4,79		0,03±0,01	

Valeurs exprimées en ±S.E.M de 6 expériences différentes.

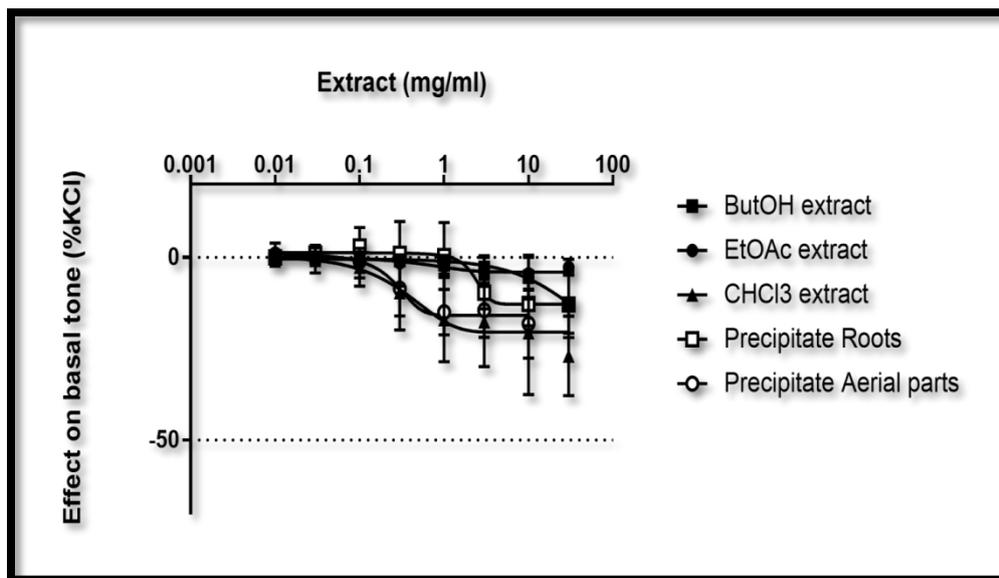


Figure V.27 : Courbes concentration-réponse des extraits chloroforme (CHCl_3), acétate d'éthyle (EtOAc), *n*-Butanol (ButOH) et des précipités des racines (Precipitate Roots) et des parties aériennes (Precipitate Aerial parts) de *Cymbopogon schoenanthus* sur le ton basal du colon distal du rat.

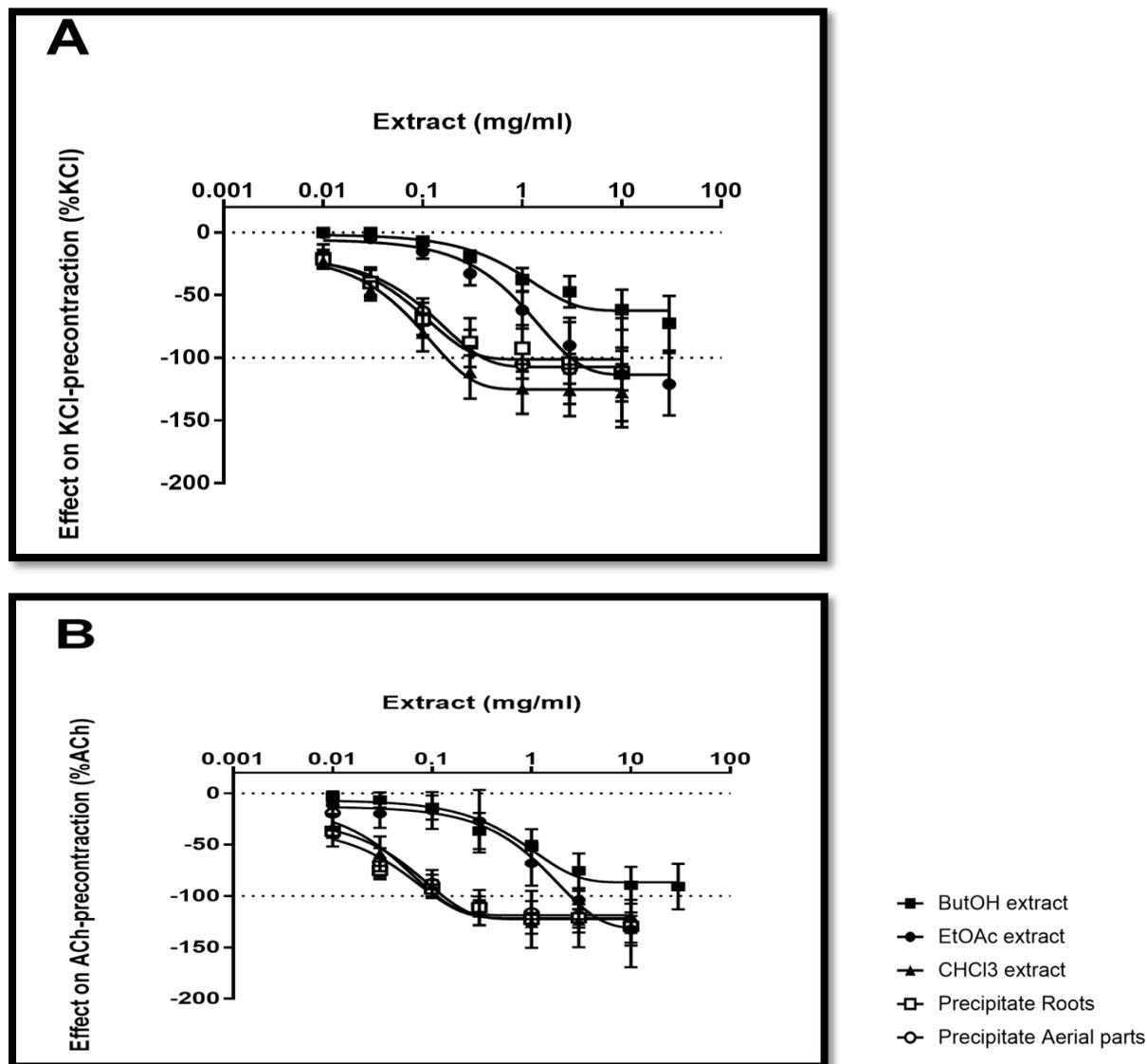


Figure V.28 : Courbes concentration-réponse des extraits chloroforme (CHCl_3), acétate d'éthyle (EtOAc), *n*-Butanol (*n*-BuOH) et des précipités des racines (Precipitate Roots) et des partie aériennes (Precipitate Aerial) de *Cymbopogon schoenanthus* sur la précontraction induite par KCl (50 mM) -ou- Ach (1-3 μ M) du colon distal du rat.

3.6. Discussion

La présente étude montre, pour la première fois, que plusieurs extraits de plantes Algériennes *H. lippii* et *C. schoenanthus* provoquent une relaxation marquée sur le côlon distal du rat.

3.6.1. *Helianthemum lippii*

H. lippii est largement utilisée en médecine traditionnelle algérienne pour plusieurs pathophysiologies de brûlures, de troubles respiratoires et digestifs ou d'hémorroïdes (102) à la

diarrhée infectieuse (80, 81, 88, 102, 107), vraisemblablement en raison de ses effets antiseptiques, analgésiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires (102). La plante est ingérée sous forme de décoction et de thé pour des problèmes gastro-intestinaux, mais aussi dans des cataplasmes et des pommades et appliquée directement sur les plaies infectées ou les brûlures (84). Bien que ces pratiques passent de génération en génération, il n'y a presque aucune preuve scientifique pour soutenir les utilisations folkloriques de *H. lippii*. Ainsi, cette étude contribue à commencer à démêler les mécanismes qui soutiennent les effets connus de *H. lippii*. Nous avons testé deux extraits (*n*-BuOH et AcOEt) de la plante sur la réactivité du côlon distal du rat puisque nous avons focalisé notre attention sur son utilisation dans des conditions gastro-intestinales.

Nos résultats suggèrent que les deux extraits *n*-BuOH et AcOEt de *H. lippii* relaxent le côlon distal du rat en interférant avec la neurotransmission cholinergique, à savoir en bloquant les récepteurs muscariniques M2 et / ou M3 situés sur les cellules musculaires lisses, qui est le mécanisme clé déclenchant la contraction colique (289, 290). Nous proposons ce mécanisme putatif parce que les deux extraits ont provoqué une relaxation marquée du côlon distal du rat qui a été pré-contracté avec Ach. En effet, pour les deux extraits, l'effet était assez fort pour inverser totalement la précontraction induite par Ach. L'effet des extraits pourrait également résulter du blocage des canaux Ca^{2+} dépendants de la tension, puisqu'ils ont également relâché le côlon distal du rat qui a été pré-contracté avec du KCl (291). Cette interférence des extraits de *H. lippii* avec la neurotransmission cholinergique et les courants Ca^{2+} semble être marquée et même opérer sur la régulation du ton tonique colonique, puisque les deux extraits provoquent une relaxation légère et similaire du ton basal du côlon distal du rat. La relaxation sur les tissus précontractés avec l'Ach a amené le ton du côlon au-dessous des niveaux de base. Cet effet relaxant marqué de *H. lippii* peut représenter un mécanisme par lequel il soulage les troubles digestifs, comme la douleur abdominale ou les conditions associées à une motilité altérée, comme la diarrhée.

La source exacte des effets rapportés ici pour les deux extraits est limitée par le manque d'informations précises sur la composition phytochimique. La présence de flavonoïdes, de tanins, de glycosides, de composés phénoliques simples, de sucres réducteurs libres et de saponines a été identifiée dans un extrait méthanolique de *H. lippii* (92). En outre, il a été trouvé que les composés phénoliques totaux, les flavonoïdes et les tanins sont présents dans l'extrait acétate d'éthyle de *H. lippii* (292). Nos données pourraient résulter de l'équilibre entre l'effet des composants relaxants et contractiles des extraits testés. En effet, il est connu que les

flavonoïdes d'une grande variété de plantes inhibent la motilité intestinale (293-295), étant capables de relaxer l'iléon du rat (296). Cependant, les saponines peuvent contracter des préparations d'estomac isolées (297). Des études futures avec des contrôles synthétiques appropriés seront très importantes pour déterminer cette question, qui sera également très pertinente pour expliquer les différences que nous avons pu trouver entre les deux extraits : l'extrait AcOEt était plus efficace en relaxant la précontraction induite par KCl que l'extrait *n*-BuOH, et était plus puissant en relaxant à la fois le ton basal et le côlon précontracté par l'Ach.

3.6.2. *Cymbopogon schoenanthus*

C. schoenanthus est une graminée indigène en Asie (8) mais a été distribuée en Afrique, notamment en Algérie (115), où elle a été utilisée en médecine traditionnelle. Ses utilisations sont très larges et comprennent des problèmes gastro-intestinaux, des états douloureux et inflammatoires (237), des maladies infectieuses (161, 208, 237, 298, 299), rénales (144), et le stress (157) Particulièrement en ce qui concerne les problèmes gastro-intestinaux, *C. schoenanthus* a été utilisée car elle a des effets antispasmodiques (119), anti-diarrhéiques et anti-flatulents (237, 238), Cependant, il n'y a presque aucune information sur les mécanismes putatifs soutenant l'utilisation de *C. schoenanthus* en médecine traditionnelle. Dans cette étude, nous avons contribué à éclaircir cette question en testant plusieurs extraits de la plante sur le côlon distal du rat, afin de chercher une explication pour son utilisation dans les pathologies gastro-intestinales.

Nous avons effectué trois protocoles expérimentaux afin d'évaluer l'effet des extraits directement sur le ton basal du muscle lisse du côlon et sur le ton colique induit par KCl et Ach. La transmission cholinergique est le mécanisme le plus important de la contraction colique (289), par la libération de Ach et l'activation subséquente des récepteurs muscariniques M2 et M3 dans le muscle lisse du côlon (290). Dans notre étude, les extraits de *C. schoenanthus* ont été ajoutés après une pré-contraction induite par Ach stable, ils l'ont totalement inversé. Ces résultats suggèrent que certains composants de *C. Schoenanthus* pourraient avoir la capacité de bloquer les récepteurs muscariniques M2 et / ou M3, inhibant ainsi les contractions induites par Ach. Une étude *in vitro* utilisant l'huile essentielle des feuilles fraîches de *C. schoenanthus* de la région montagneuse du sud de la Tunisie a montré une activité acétylcholinestérase (150). Puisque nous avons utilisé l'Acétylcholine pour la précontraction de certaines préparations et que nous n'avons pas utilisé d'inhibiteur de l'acétylcholinestérase, nous ne pouvons exclure la possibilité que la diminution du ton musculaire lisse observée après l'ajout des extraits aux

préparations précontractées induites par Ach soit une conséquence de dégradations d'Acétylcholine.

Lorsque les extraits de *C. schoenanthus* ont été ajoutés après une pré-contraction induite par KCl stable, ils ont également totalement inversé cette pré-contraction (seul l'extrait de *n*-BuOH a inversé la précontraction induite par KCl de manière moindre). Le KCl à 50 mM provoque la contraction du muscle lisse en ouvrant des canaux Ca^{2+} dépendants de la tension, favorisant ainsi l'entrée du Ca^{2+} dans la cellule et par conséquent, la contraction du muscle lisse (291). Ainsi, nos résultats suggèrent que *C. Schoenanthus* a des composants qui ont la capacité de bloquer les canaux Ca^{2+} , inhibant ainsi les contractions induites par le KCl. Ces éléments pourraient être les mêmes que ceux ayant une activité anticholinergique ou autres. Une étude avec le vérapamil, un bloqueur des canaux calciques, a montré une fréquence réduite de contractions géantes migratrices de l'intestin grêle enflammé et la diarrhée associée (300).

De façon surprenante, tous les extraits testés ont provoqué une relaxation directe du ton musculaire lisse basal du côlon distal du rat. Nous n'avons aucune explication pour cela maintenant. Cependant, puisque le ton basal du côlon dépend généralement de la transmission cholinergique et des courants Ca^{2+} , il est possible que les composants de *C. schoenanthus* bloquent la régulation tonique du ton du muscle lisse du côlon, provoquant ainsi une relaxation du tonus basal. Fait intéressant dans ce contexte, tous les extraits (excepté le *n*-BuOH) ont donné des effets maximums supérieurs à 100% (jusqu'à 143%) sur les précontractions induites par KCl et Ach, ce qui indique que le ton musculaire lisse descendait à des niveaux inférieurs plus bas que la ligne basale originale.

La composition de *C. schoenanthus* n'est pas complètement élucidée, mais les données de la littérature mettent en évidence la présence de terpènes (177), tanins, saponines, saponines, flavonoïdes, alcaloïdes, triterpènes, baumes, glycosides cardiotoniques, glycosides, stéroïdes et huiles volatiles (154, 178). Avec les protocoles utilisés dans notre étude, nous ne pouvons pas dire quels composants sont responsables des relaxations observées du muscle lisse du rat. Cependant, certains des composants rapportés comme étant présents dans *C. schoenanthus* ont été identifiés comme capables de moduler le ton musculaire lisse. Par exemple, les flavonoïdes peuvent se détendre (296) et inhiber les contractions spontanées (301) de l'iléon du rat, contribuant ainsi aux effets antispasmodiques rapportés précédemment (293-295). En outre, les flavonoïdes provoquent une relaxation endothélium-dépendante de l'aorte de rat (302) et des bandes de corps caverneux (303). D'autre part, les saponines peuvent contracter des

préparations gastriques isolées (297) et les glycosides cardiaques contractent le jéjunum isolé (304). D'autres composants, comme les alcaloïdes (305-307) ou les huiles volatiles (308) ont été signalés comme ayant des effets contractiles et relaxants.

Dans notre étude, le profil de l'effet relaxant n'était pas le même pour tous les extraits. Bien qu'il n'y ait pas de différences dans l'effet maximal induit sur le tonus basal, l'extrait *n*-BuOH était généralement moins efficace que les autres extraits, la différence étant statistiquement significative par rapport à l'extrait AcOEt. L'extrait *n*-BuOH était également le moins puissant dans la diminution du tonus basal du côlon. Ces résultats différentiels reflètent probablement la nature des composés extraits par les différents solvants utilisés. La caractérisation de la composition des différents extraits et dosages fonctionnels en utilisant des composés purifiés pourrait clarifier les différences observées.

Les différents extraits de *C. schoenanthus* testés ont provoqué une relaxation marquée du côlon distal de rat isolé, soit directement appliqué sur le tonus basal, soit lors des tests sur pré-contraction induite par KCl et Ach. Ces résultats soutiennent l'utilisation de *C. schoenanthus* en médecine traditionnelle, à savoir en tant qu'antispasmodique pour les maladies gastro-intestinales.

3.7. Etude de comparaison de l'effet sur le colon distal entre les extraits AcOEt et *n*-BuOH de *C. schoenanthus* et *H. lippii*

3.7.1. Effet sur le tonus basal du colon distal

Les extraits AcOEt et *n*-BuOH de *C. schoenanthus* et *H. lippii* ont provoqué une relaxation dépendante de la concentration du tonus basal du côlon distal du rat (Fig V.29)

Concernant l'effet direct sur le tonus basal, les extraits AcOEt et de *n*-BuOH de *H. lippii* ont diminué le tonus basal du côlon distal du rat plus marqué que les extraits correspondants de *C. schoenanthus* (Fig. V.29 et Tableau V.5). De plus, l'extrait *n*-BuOH de *C. schoenanthus* a diminué le tonus basal nettement plus que l'extrait AcOEt de cette plante (Fig. V.29 et Tableau V.5). Il n'y avait aucune différence dans l'effet relaxant de l'extrait AcOEt et l'extrait *n*-BuOH de *H. lippii* (Fig.V.29 et Tableau V.5). Concernant la puissance des extraits, nous n'avons pu observer que l'extrait AcOEt de *H. lippii* qui était plus puissant que l'extrait AcOEt de *C. schoenanthus* (Fig. V.29 et Tableau V.5).

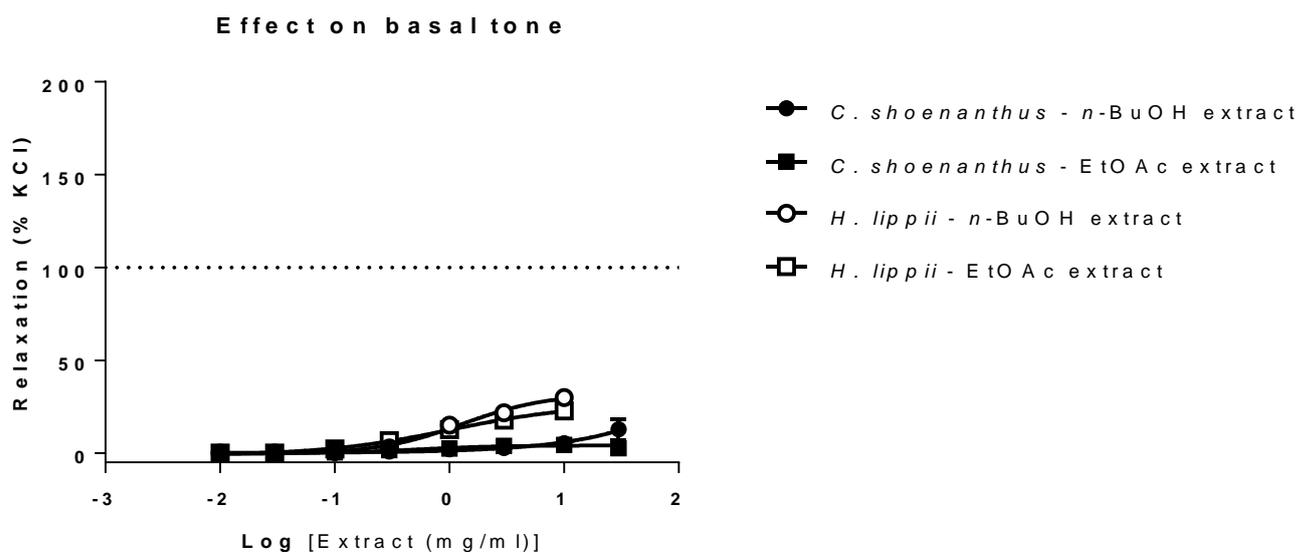


Figure V.29 : Courbes concentration-réponse des extraits d'acétate d'éthyle (AcOEt) et de *n*-Butanol (*n*-BuOH) de *C. schoenanthus* et *H. lippii* sur le ton basal du côlon distal du rat. Résultats exprimés en% de la contraction induite par 125 mM de KCl. $n = 5-7$ rats dans chaque groupe.

Tableau V.5 : Effet maximal (E_{max} ; %) et concentration de l'extrait provoquant 50% de la réponse maximale (CE_{50} ; mg / ml) pour les extraits *n*-BuOH et AcOEt de *C. schoenanthus* et de *H. lippii* sur le ton basal du côlon distal du rat.

	Extraits <i>C. schoenanthus</i>		Extraits <i>H. lippii</i>	
	<i>n</i> -BuOH	AcOEt	<i>n</i> -BuOH	AcOEt
Ton basal				
E_{max} (%)	15.90±3.40	4.96±1.31*	35.59±4.69 [#]	25.31±2.21 [#]
CE_{50} (mg/ml)	9.11±4.85	0.73±0.52	1.74±0.25	0.37±0.06*

Les valeurs sont moyennes \pm S.E.M., $n = 5-7$ rats dans chaque groupe. * $p < 0,05$ par rapport à l'extrait *n*-BuOH correspondant ; [#] $p < 0,05$ vs l'extrait correspondant de *C. schoenanthus*.

3.7.2. Effet sur sur la précontraction induite par KCl (50 mM) et Ach (1-3 μ M)

La précontraction induite par KCl et Ach du côlon distal du rat a également été diminuée par tous les extraits étudiés de manière dépendante de la concentration, bien que le profil de la réponse a été différent entre les extraits (figure V.30 et tableau V.6).

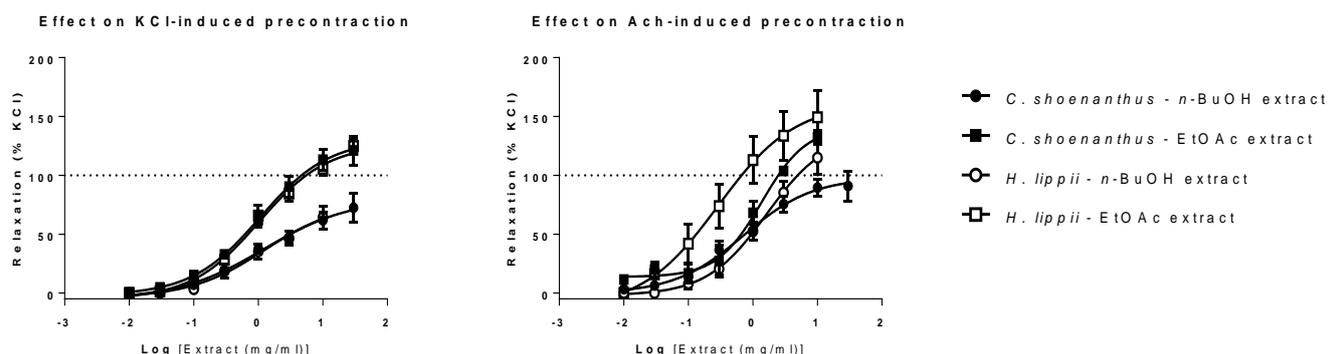


Figure V.30 : Courbes de concentration-réponse des extraits d'acétate d'éthyle (AcOEt) et de *n*-Butanol (*n*-BuOH) de *C. schoenanthus* et *H. lippii* sur le côlon distal du rat précontracté avec KCl 50 mM (à gauche) ou Ach (1- 3 μ M ; à droite). Résultats exprimés en% du niveau de précontraction. n = 5-7 rats dans chaque groupe.

Les extraits AcOEt de *C. schoenanthus* et *H. lippii* ont totalement inversé la précontraction induite par KCl (50 mM) et Ach (1- 3 μ M) du côlon distal du rat (Fig. V.30 et Tableau V.6). Quant aux extraits de *n*-BuOH des deux plantes, ils ont retourné l'effet sur le côlon précontracté Ach mais pas sur le côlon qui a été précontracté avec KCl (Fig.V.30 et Tableau V.6). En effet, l'extrait *n*-BuOH était celui qui présentait la valeur la plus basse de E_{max} sur la précontraction induite par le KCl ($69,75 \pm 9,40\%$ et $67,50 \pm 8,11\%$ pour *C. schoenanthus* et *H. lippii*, respectivement)

La relaxation provoquée par les extraits AcOEt était plus élevée que celle provoquée par les extraits *n*-BuOH (Fig.V.28 et Tableau V.6), mais l'effet maximum était similaire pour chaque extrait des deux plantes différentes (Fig.V.28 et Tableau V.6). En ce qui concerne la contraction induite par le KCl, les valeurs CE_{50} des extraits AcOEt et *n*-BuOH de *H. lippii* étaient plus élevées que les valeurs CE_{50} des extraits correspondants de *C. schoenanthus* (Fig. V.28 et Tableau V.6). Cependant, les valeurs de CE_{50} de l'extrait AcOEt de *H. lippii* étaient

inférieures à celles de l'extrait AcOEt de *C. schoenanthus* (Fig. V.28 et Tableau V.6) lorsque nous avons comparé la contraction induite par Ach.

Tableau V.6. Effet maximal (E_{max} ; %) et concentration de l'extrait provoquant 50% de la réponse maximale (CE_{50} ; mg / ml) pour les extraits de *n*-BuOH et AcOEt de *C. schoenanthus* et de *H. lippii* sur le côlon distal du rat précontracté avec KCl 50 mM ou Ach 1-3 μ M.

	<i>Extraits C. schoenanthus</i>		<i>Extraits H. lippii</i>	
	<i>n</i> -BuOH	AcOEt	<i>n</i> -BuOH	AcOEt
KCl-precontraction				
E_{max} (%)	69.75±9.40	120.90±10.08*	67.50±8.11	117.10±6.84*
CE_{50} (mg/ml)	0.34±0.10	0.31±0.06	1.03±0.21 [#]	0.99±0.27 [#]
Ach-precontraction				
E_{max} (%)	99.46±9.83	144.00±6.26*	127.80±15.96	150.80±18.85
CE_{50} (mg/ml)	1.10±0.51	1.31±0.15	1.41±0.33	0.40±0.11 ^{*,#}

Les valeurs sont moyennes \pm S.E.M., n = 5-7 rats dans chaque groupe. * p <0,05 par rapport à l'extrait de *n*-BuOH correspondant ; [#]p <0,05 vs l'extrait correspondant de *C. schoenanthus*.

3.7.3. Analyse de la variance bidirectionnelle pour détection d'interaction entre les extraits

Une analyse de variance bidirectionnelle a montré qu'il n'y avait pas d'interaction entre les deux facteurs étudiés (plante et extrait) pour E_{max} ou CE_{50} pour l'effet relaxant sur le ton basal, la précontraction induite par le KCl (50 mM) ou l'Ach (1- 3 μ M (tableau V.7)

Tableau V.7. Analyse bidirectionnelle de la variance (ANOVA) de l'effet des deux extraits (AcOEt et *n*-BuOH) des deux plantes (*C. schoenanthus* et de *H. lippii*).

2-way ANOVA			
	Interaction	Plante	Extrait
Ton basal			
E_{\max} (% KCl)	0.9221	<0.0001	0.0068
CE_{50} (mg/ml)	0.1249	0.0934	0.0397
KCl-precontraction			
E_{\max} (% KCl)	0.9347	0.7524	<0.0001
CE_{50} (mg/ml)	0.9754	0.0005	0.8380
Ach-precontraction			
E_{\max} (% KCl)	0.4092	0.2188	0.0352
CE_{50} (mg/ml)	0.0862	0.3741	0.2483

3.7.4. Evaluation de l'effet des composés majeurs identifiés dans les extraits

Nous avons également évalué l'effet de certains composés majeurs identifiés (Chapitre IV, tableau IV.2) ; sur la précontraction induite par Ach du côlon de rat. Acide gallique (1,7 mg / ml; présent dans l'extrait AcOEt de *C. schoenanthus* et *H. lippii*), Acide 4-hydroxybenzoïque (1,4 mg / mL; présent dans l'extrait *n*-BuOH de *H. lippii*), acide sinapique (1,5 mg / mL; présent dans l'extrait AcOEt de *C. schoenanthus*), et la diosmine (7,2 mg / ml; le principal composé trouvé dans l'extrait *n*-BuOH de *C. schoenanthus*) ont complètement neutralisé la précontraction induite par l'Ach et ont encore diminué le ton basal du muscle lisse du côlon de 11%, 32%, 64% et 92%, respectivement (Fig.V.31).

L'acide gentisique, à une concentration semblable à celle présente dans l'extrait *n*-BuOH de *C. schoenanthus* (0,4 mg / mL), n'a pas modifié la précontraction induite par Ach. Cependant, il a complètement neutralisé la précontraction induite par Ach et a encore diminué le ton basal du muscle lisse du côlon de 9% et 42% à des concentrations similaires à celles présentes dans les extraits *n*-BuOH (1,4 mg / mL) et AcOEt (4,1 mg / mL) de *H. lippii* (Fig.V.32).

L'acide vanillique n'a pas non plus modifié la précontraction induite par Ach à une concentration semblable à celle présente dans l'extrait *n*-BuOH de *C. schoenanthus* (0,2 mg / mL). Mais, il a contrecarré la précontraction induite par Ach à 1,1 mg / mL (présent dans l'extrait AcOEt de *H. lippii*) et a encore diminué le ton basal du muscle lisse du côlon de 28% à 3,7 mg / mL (présent dans l'extrait *n*-BuOH de *H. lippii*) (Fig.V.32). La rutine n'a eu aucun effet à 2 mg / mL (présente dans l'extrait *n*-BuOH de *C. schoenanthus*) mais elle a diminué le ton basal du muscle lisse du côlon à 0,2 mg / mL (présent dans l'extrait AcOEt de *C. schoenanthus*) (Fig.V.32).

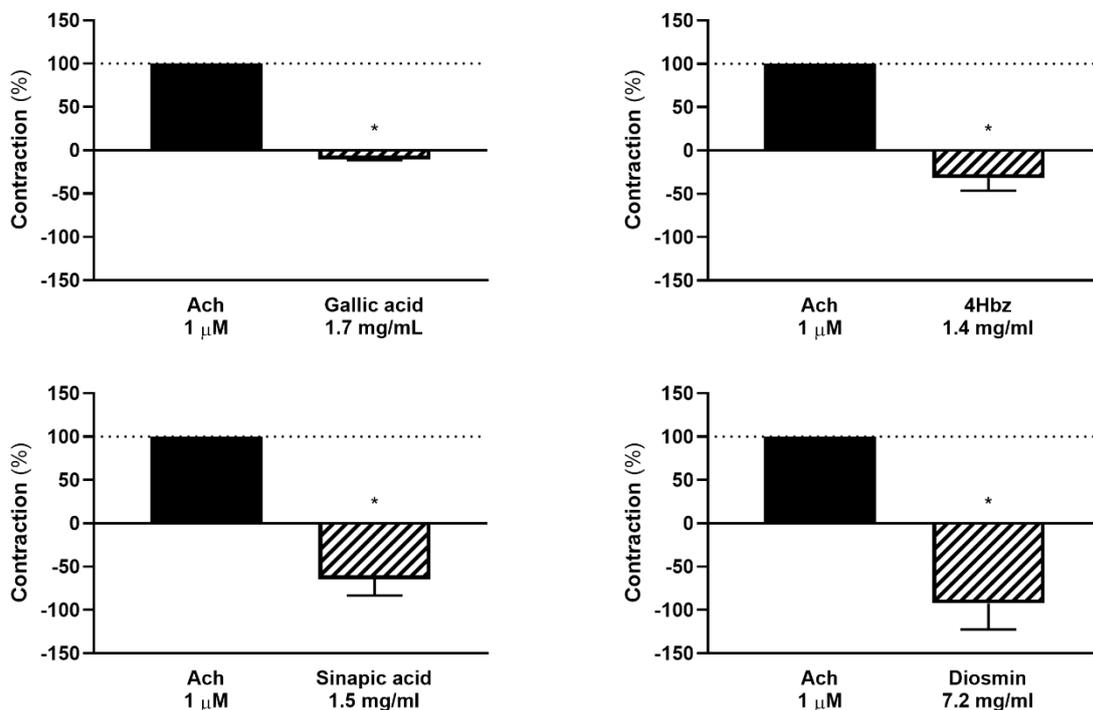


Figure V.31 : Effet relaxant de l'acide gallique 1,7 mg / ml (en haut à gauche), de l'acide 4-hydroxybenzoïque 1,4 mg / ml (en haut à droite), de l'acide sinapic 1,5 mg / ml (en bas à gauche) et de la diosmine (7,2 mg / ml) sur le côlon distal de rat précontracté avec Ach (1-3 μ M). Résultats exprimés en% du niveau de précontraction. n = 3 rats dans chaque groupe.

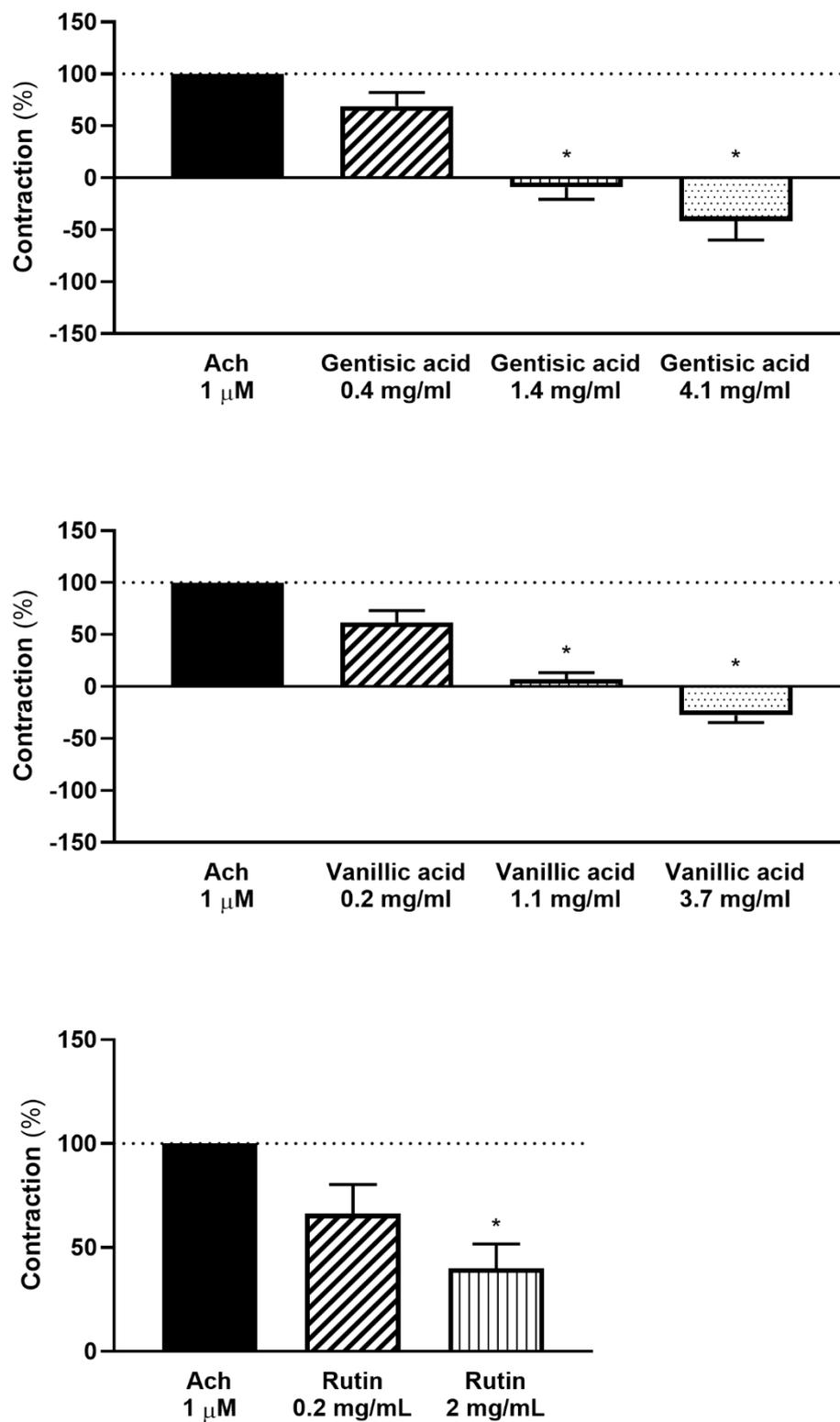


Figure V.32: Effet relaxant de l'acide gentisique (en haut), de l'acide vanillique (au milieu) et de la rutine (en bas) sur le côlon distal du rat précontracté avec Ach (1-3 μ M). Résultats exprimés en% du niveau de précontraction. n = 3 rats dans chaque groupe

3.7.5. Discussion des résultats

Notre étude a permis de caractériser la composition de ces extraits, dont les différences pourraient être associées à l'effet fonctionnel observé.

Dans cette étude, nous avons contribué à soutenir l'utilisation de *C. schoenanthus* et *H. lippii* dans les problèmes gastro-intestinaux, plus précisément ceux qui affectent le côlon, comme la diarrhée ou les spasmes. En effet, bien que *C. schoenanthus* et *H. lippii* soient utilisées en médecine traditionnelle, sous forme d'infusions, de décoctions ou de poudre, pour le traitement des problèmes gastro-intestinaux, il n'y avait presque aucune information sur l'effet soutenant leur utilisation. *C. schoenanthus* a été utilisée en médecine traditionnelle parce qu'elle avait des effets antispasmodiques (119), anti-diarrhéiques et anti-flatulents (237, 238)

Pour atteindre notre objectif, nous avons préparé et caractérisé des extraits AcOEt et *n*-BuOH des deux plantes. Comme il n'y avait aucune information sur l'effet de ces extraits sur le côlon, après caractérisation des extraits, nous avons mené trois protocoles expérimentaux afin d'obtenir des informations globales sur l'effet des extraits directement sur le ton basal du muscle lisse colique et sur le ton colique induit par KCl et Ach.

Dans notre étude, les extraits AcOEt ou *n*-BuOH de *C. schoenanthus* et *H. lippii* ont totalement inversé la précontraction induite par Ach. L'extrait AcOEt de *C. schoenanthus* et *H. lippii* a également totalement inversé la précontraction induite par KCl. Différemment, l'extrait *n*-BuOH des deux plantes a diminué la précontraction induite par le KCl mais ne l'a pas abolie. Nous avons choisi de précontracter le côlon distal avec Ach et KCl car ce sont des contracturants cruciaux du côlon. En fait, la transmission cholinergique est le mécanisme le plus pertinent de contraction colique (289) par la libération d'Ach et l'activation subséquente des récepteurs muscariniques M2 et M3 dans le muscle lisse colique (290). De plus, le KCl à 50 mM provoque une contraction indépendante du récepteur du muscle lisse en ouvrant des canaux Ca^{2+} dépendants de la tension, favorisant ainsi l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule et, par conséquent, la contraction du muscle lisse (291). Nous n'avons pas testé l'effet direct des composés isolés vraisemblablement identifiés sur les précontractions induites par Ach ou KCl. Pourtant, nos résultats suggèrent que certains composants des extraits AcOEt et *n*-BuOH de *C. schoenanthus* et *H. lippii* pourraient avoir la capacité de bloquer les récepteurs muscariniques M2 et / ou M3 et / ou les canaux Ca^{2+} , antagonisant ainsi les induits par Ach et / ou contractions induites par KCl (respectivement).

Les composants de l'extrait *n*-BuOH semblent être moins efficaces dans la précontraction induite par KCl. À l'avenir, avec des expériences utilisant des composés isolés, il pourrait être possible de savoir si ces composants ayant une capacité de blocage des canaux calciques sont les mêmes que ceux ayant une activité anticholinergique ou autres. Fait intéressant, une étude *in vitro* utilisant l'huile essentielle des feuilles fraîches de *C. schoenanthus* de la région montagneuse du sud de la Tunisie a montré une activité anti acétylcholinestérase (150). Étant donné que nous avons utilisé Ach pour la précontraction de certaines préparations et que nous n'avons pas utilisé d'inhibiteur de l'acétylcholinestérase, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que la diminution du ton du muscle lisse observée après l'ajout des extraits aux préparations induites par l'Ach soit une conséquence de la dégradation de Ach. Également pertinente, une étude avec le vérapamil, un bloqueur des canaux calciques, a montré une fréquence réduite des contractions migratoires géantes de l'intestin grêle enflammé et de la diarrhée associée (300).

Les résultats différentiels obtenus dans cette étude reflètent probablement la composition différente des extraits testés. Les résultats de l'analyse HPLC-TOF / MS des extraits AcOEt et *n*-BuOH de *C. schoenanthus* et *H. lippii* suggèrent la présence de différents polyphénols, à savoir les acides phénoliques et les flavonoïdes, comme indiqué précédemment dans d'autres études (92, 154, 178, 292). D'autres études de la littérature ont également signalé la présence de terpènes (177), de tanins, de saponines, de glycosides de saponine, d'alcaloïdes, de triterpènes, de baumes, de glycosides cardiaques, de glycosides, de stéroïdes et d'huiles volatiles (154, 178) dans des extraits de *C. schoenanthus*. Concernant *H. lippii*, il a également été signalé la présence de tanins, glycosides, sucres réduits libres et saponines (92, 292).

Certains des composés identifiés dans les extraits testés ont été décrits comme des relaxants du muscle lisse du rat, en particulier les flavonoïdes (296, 301-303). À l'opposé, les saponines peuvent contracter des préparations d'estomac isolées (297) et les glycosides cardiaques contractent le jéjunum de rat isolé (304). D'autres composants, comme les alcaloïdes (305-307) ou les huiles volatiles (308) auraient des effets contractiles et relaxants.

Nos données fonctionnelles résultent très probablement de l'équilibre entre l'effet des composants relaxants et contractiles de chacun des extraits testés et des interactions entre les composants de chaque extrait. De plus, d'un point de vue translationnel, l'identification du principal composé actif devrait également prendre en compte la biodisponibilité des composants en solution aqueuse, car il s'agit de l'usage traditionnel habituel de ces plantes.

L'effet relaxant de l'extrait AcOEt de *C. schoenanthus* pourrait être lié, au moins en partie, à la présence de la catéchine (309, 310), de la rutine (150, 311) l'acide sinapique (312) et l'acide gallique (313). Nos données fonctionnelles avec certains des principaux composés identifiés ont montré que la capacité relaxante de ces composés pouvait être classée comme acide sinapique > acide gallique > rutine. Fait intéressant, bien que la rutine soit l'un des composants prédominants, elle est peu absorbée en raison de la métabolisation par la microflore intestinale (314). De plus, la biodisponibilité de la catéchine (315), de l'acide gallique (316) et de l'acide sinapique (317) est faible par rapport à d'autres composants moins prédominants du même extrait ou des autres. Remarquablement, l'extrait *n*-BuOH de *C. schoenanthus* était essentiellement le plus riche en diosmine (en fait, c'était le seul composant pertinent identifié dans cet extrait), qui a également un effet vasorelaxant dans différents modèles expérimentaux de maladies cardiovasculaires (318, 319) et sa biodisponibilité est connue comme élevée (320). En utilisant notre protocole, nous avons montré que la diosmine provoquait une relaxation très marquée du côlon de rat tandis que d'autres composants mineurs comme les acides gentsique ou vanillique ou la rutine n'avaient aucun effet aux concentrations présentes dans cet extrait.

Différemment, les acides gentsique et vanillique représentent ensemble plus de 50% de la composition de chaque extrait de *H. lippii* et les deux extraits de *H. lippii* ont provoqué une relaxation plus marquée du côlon distal du rat que ceux de *C. schoenanthus*. Ces composés ont été décrits comme capables d'induire une relaxation des muscles lisses (321, 322) et en particulier l'acide vanillique a une biodisponibilité élevée (323). De plus, l'acide gallique s'est avéré être un autre composant des extraits AcOEt des deux plantes, et il a également été décrit comme un vasodilatateur pertinent (313). Aussi pour ces composés, nous avons montré des preuves directes qu'ils sont de puissants relaxants du côlon de rat, l'ordre de classement étant l'acide gentsique > acide gallique > acide vanillique dans l'extrait AcOEt et l'acide 4-hydroxybenzoïque > acide vanillique > acide gentsique dans l'extrait *n*-BuOH.

3.8. Conclusion

Dans cette étude, tous les extraits ont montré un effet relaxant marqué sur le côlon distal de rat isolé qui pourrait représenter un mécanisme sous-jacent à l'utilisation traditionnelle de ces plantes pour les conditions gastro-intestinales.

Les deux extraits (AcOEt et *n*-BuOH) des deux plantes ont provoqué une relaxation marquée du côlon distal de rat isolé, soit lorsqu'ils sont appliqués directement sur le ton basal ou lorsqu'ils

sont testés sur la précontraction induite par KCl et Ach, ce qui est probablement lié à la composition de chaque extrait.

Ces résultats commencent à éclairer scientifiquement l'utilisation de *C. schoenanthus* et *H. lippii* comme plantes pertinentes pour soulager les affections gastro-intestinales, comme les douleurs abdominales ou la diarrhée. Cependant, des études plus détaillées sont nécessaires pour déterminer les composés et / ou les métabolites exacts responsables de l'effet observé et le mécanisme impliqué.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Notre travail est porté principalement à la détermination de la composition chimique, l'activité biologique et à l'étude pharmacologique de *Helianthemum lippii* et *Cymbopogon schoenanthus*, deux plantes sahariennes endémiques.

Leur endémisme ainsi que leurs usages en médecine traditionnelle étaient les principaux critères de sélection pour notre étude.

L'investigation phytochimique des deux espèces a mené à l'isolement et l'identification de six métabolites secondaires. Ce résultat a été basé sur les différentes techniques chromatographiques (CC, CCM, CLHP). Les métabolites secondaires issus des extraits CHCl_3 pour *H. lippii* et le précipité des racines pour *C. schoenanthus* sont répartis comme suit :

- Deux stérols :
 - ✓ Stigmastérol
 - ✓ β - Sitostérol
- Quatre sesquiterpenes :
 - ✓ (1S,4a a)-4-Methylene-6-b-(1-hydroxy-1-methylethyl)-8a b-methyl-decahydronaphthalene-1b-ol 1S, 7S, 10S- eudesm-4(14)-en-1 α -11 α -diol (hydroxy- β -eudesmol)
 - ✓ 4 α , 11-dihydroxy-7-epimer-eudesmandiol (7-epi-cryptomeridiol)
 - ✓ 4 β , 7 β , 11-enantioeudesmantriol (Pterodontriol)
 - ✓ 4 β ,6 β ,10 α -trihydroxy guaiane sesquiterpène (Teuclatriol).

Tous ces composés mis à part les stérols sont isolés pour la première fois de l'espèce *Cymbopogon schoenanthus*, ainsi que pour la famille des Poaceae.

L'identification de ces composés a été réalisée par la combinaison des différentes méthodes spectrales telles que : la RMN 1D (^1H et ^{13}C) et la RMN 2D (COSY, HSQC et HMBC), avec une comparaison avec les données de la littérature.

L'analyse chromatographique des huiles essentielles de *Cymbopogon schoenanthus* a montré que les hydrocarbures représentaient 26,7% tandis que la fraction sesquiterpène atteignait 40%. Ces résultats obtenus sont différents de ceux décrits précédemment sur l'huile de cette espèce.

L'analyse HPLC-TOF / MS portée sur les extraits AcOEt et *n*-BuOH des deux espèces ; a suggéré la présence de 32 acides phénoliques et flavonoïdes qui étaient présents en proportion différente dans chaque extrait.

Il s'est avéré qu'avec une dose de 50 µg, les extraits de *n*-BuOH et AcOEt de la plante *Helianthemum lippii* procurent une protection complète de l'ADN plasmidique 46966 contre les dommages oxydatifs causés par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) photolysé par les rayons UV. Tandis qu'avec la même dose, les extraits de *n*-BuOH et AcOEt de *Cymbopogon schoenanthus* n'ont montré aucun effet protecteur contre les dommages oxydatifs. Par ailleurs, la plante *Cymbopogon schoenanthus* a montré plus d'effet antiprolifératif dans les lignées cellulaires HeLa que dans les lignées cellulaires PC3. Alors que *Helianthemum lippii* a montré plus d'effet antiprolifératif intéressant dans PC3 que dans les lignées cellulaires HeLa particulièrement à une concentration élevée (250 µg / ml). Cette particularité observée dans *Helianthemum lippii* sur l'effet antioxydant ainsi l'effet antiprolifératif est probablement dû à sa composition en polyphénols dont on trouve le taux élevé par rapport à celui de *Cymbopogon schoenanthus*.

L'étude pharmacologique a été portée sur les différents extraits des deux espèces, et leur effet de relaxation sur le tissu du colon distal du Rat Wistar. Tous les extraits ont montré un effet relaxant marqué sur le côlon distal de rat isolé qui pourrait représenter un mécanisme sous-jacent à l'utilisation traditionnelle de ces plantes pour les conditions gastro-intestinales. Ces résultats commencent à démêler le soutien scientifique à l'utilisation de *C. schoenanthus* et *H. lippii* comme plantes pertinentes pour soulager les affections gastro-intestinales, comme les douleurs abdominales ou la diarrhée.

Les résultats obtenus tout au long de ce travail justifient l'utilisation des deux espèces en médecine traditionnelle. Des études plus approfondies nous aideront à bien comprendre les métabolites responsables de l'effet et le mécanisme impliqué.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

1. Harvey AL, Edrada-Ebel R, Quinn RJ. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2015;14(2):111.
2. Mishra BB, Tiwari VK. Natural products: an evolving role in future drug discovery. *European journal of medicinal chemistry*. 2011;46(10):4769-807.
3. Harvey AL. Natural products in drug discovery. *Drug discovery today*. 2008;13(19-20):894-901.
4. Xiaorui Z. . Programme de Médecine traditionnelle. Organisation Mondiale de la santé. 1998.
5. Jayasuriya D. The regulation of medicinal plants-a preliminary review of selected aspects of national legislation. Unpublished Report. 2013.
6. Seigler DS. *Plant secondary metabolism*: Springer Science & Business Media; 2012.
7. Briskin DP. Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. *Plant physiology*. 2000;124(2):507-14.
8. Quezel P, Santa S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales-v. 1-2. 1962.
9. Zeraïa L. Protection de la flore. Liste et localisation des espèces assez rares, rares et rarissimes Station Centrale de Recherche en Ecologie Forestière, Alger, Algérie. 1983.
10. Bremness L, Fletcher N, Ward M, Griggs P, Desgranges T, Baudoux M, et al. Les plantes aromatiques et médicinales:[700 espèces]: Larousse; 1996.
11. Lesley B. *Herbs*. Dorling Kindersley limited, London. 1994.
12. Allen MF, Swenson SW, Querejeta JI, Egerton-Warburton LM, Treseder KK. Ecology of mycorrhizae: A conceptual framework for complex interactions among plants and fungi. *Annu Rev Phytopathol*. 2003; 41:271-303.
13. Arrington JM, Kubitzki K. Flowering plants, Dicotyledons Malvales, Capparales and Non-betalain Caryophyllales. Ed Kubitzki in Springer, Berlin. 2003: 62-70.
14. Guzman B, Vargas P. Long distance colonization of the western Mediterranean by *Cistus Ladanifer* (Cistaceae) despite the absence of special dispersal mechanisms. *J Biogeogr*. 2009 a;36:954-68.
15. Guzman B, Vargas P. Historical biogeography of Plastid rbcL and trnL-trnF sequences. *Org Divers Evol*. 2009 b;9:83-99.
16. Quézel P, Santa S. Nouvelle Flore de l'Algérie et de régions désertiques méridionales, Tome 2. Ed CNRS, Paris. 1963:571-1170.
17. Stevanović V, Matevski V, Tan K. *Helianthemum marmoreum* (Cistaceae), a new species from the central Balkans. *Bot Serb*. 2009;33(1):13-9.
18. Ellul P, Boscow M, Nicente O, Moeno V, Rosello J. Intra- and Interspecific variation in DNA content in *Cistus* (Cistaceae). *Ann Bot*. 2002;90:345-51.
19. Guzman B, Vargas P. Systematics, Character evolution, and biogeography of *Cistus* L. (Cistaceae) based on ITS, trnL-trnF, and matK sequences. *Phylogenet Evol*. 2005;37:644-60.
20. El Alaoui-Faris F, Mrabet N, Tahiri H. Nombre chromosomique et caryotype de *Cistus Ladanifer* Subsp. *Africanus dansereau* (Cistaceae). *Lagascalia*. 2009;29:23-7.
21. Güemes J. A new species of *Fumana* (Cistaceae) from Rif Morocco. *Folia Geobot*. 1999;34:363-72.
22. Toth S, Révay A. *Oncopodium lidiae* sp. nov. (Hypomycetes) on *Fumana procumbens* from Hungary. *Mycologia Balcanica*. 2011;8:89-91.
23. Zunzunegui M, Baco FL, Diaz Barradas MC, Novo FG. Seasonal changes in phytochemical efficiency in leaves of *Halimium halimifolium*, a mediterranean semideciduous shrub. *Photosynthetica*. 1999;37(1):13-31.
24. Zaiter L, Bouheroum M, Hammoud L, Sarri D, Benayache S, Leon F, et al. Phytochemical study of *Halimium halimifolium*. *Chem Nat Compd*. 2012;47(6):1023-4.
25. Massicote HB, Peterson RL, Melville LH, Tackaberry LE. *Hudsonia ericoides* and *Hudsonia tomentosa*: Anatomy of mycorrhizas of two members in the Cistaceae from Eastern Canada. *Botany*. 2010;88:607-16.

26. Cyveyrel L, Leclercq J, Demoly J-P, Agnan Y, Quèbre N, Pélissier C, et al. Molecular systematics, character evolution, and pollen morphology of *Cistus* and *Halimium* (Cistaceae). *Plant Syst Evol.* 2011;295(23-54).
27. Gallego MJ, Aparicio A. Karyological study in the genus *Tuberaria* sect. *Scorpioides* (Cistaceae): taxonomic and evolutionary inferences. *Plant Syst Evol.* 1993;184:11-25.
28. Herrera J. Lifetime fecundity and floral variation in *Tuberaria guttata* (Cistaceae), a mediterranean annual. *Plant Ecol.* 2004;172:219-25.
29. Castro M, Fraga P, Torres N, Rossello JA. Cytotaxonomical observations on flowering plants from Balearic Islands. *Ann Bot Finnici.* 2007;44(409-415).
30. Brizicky G.K. The genera of Cistaceae in the southeastern United States. *J Arnold Arbor.* 1964; 45:346-57.
31. Demoly J-P. Les hybrides binaires rares du genre *Cistus* L. (Cistaceae). *Anales Jard Bot Madrid.* 1996;54:241-54.
32. Beauvais M, Retournerard D, Prat J-Y. *Le traité Rustica des techniques du jardin.* Ed Rustica, France. 2010:416.
33. Baillon H. *Histoires des plantes, Monographie des Bixacées: Cistacées et Violacées.* Librairie Hachette, Paris. 1872:356.
34. Achille R. *Nouveaux éléments de botanique.* Onzième Ed, Librairie F Savy, Paris. 1876:712.
35. Heinrich MW. *Icones et descriptiones plantarum novarum criticarum et rariorum Europae austro-occidentalis praecipue Hispaniae.* T 2 - A H Payne, Leipzig (Lipsiae). 1856.
36. Grosser W. Cistaceae. In: *Das Pflanzenreich IV H14* (ed A Engler), S 1-161 - W Engelmann, Leipzig. 1903.
37. Janchen E. Cistaceae. In: *Die Natürlichen Pflanzenfamilien 2nd ed* (ed A Engler & K Prantl) Bd 21: 289-313- W Engelmann, Leipzig. 1925.
38. Engler A, Prantl K. *Die Natürlichen Pflanzenfamilien - lien Bd 21 2nd ed - W Engelmann Leipzig.* 1925.
39. Hutchinson J. *The families of flowering plants arranged according to a new system based on probable phylozeny.* Dicotyledons 2nd ed- Clarendon Press, Oxford. 1959;1:206-7.
40. Takhtajan AL. *System and phylogeny of flowering plants.* Nauka, Moskva-Leningrad (in Russian) 1966/1967.
41. Takhtajan AL. *Flowering plants: Origin and dispersal.* Nauka, Leningrad (in Russian). 1970.
42. Tutin TG, Heynood VH, Buges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, et al. *Flora Europea.* Univ Press, Cambridge. 1968; 2.
43. Yuzepchuk SV. Cistaceae. In: *Flora USSR* (ed B K Shishkin & E G Bobrov) Edit Acad Sci USSR, Moskva-Leningrad (in Russian). 1949 15:327-49.
44. Takhtajan AL. *Systermna hlargnoliophytorum.* Nauka, Leningrad (in Russian). 1987.
45. Raynaud C. *Atlantemum Raynaud, un nouveau genre pour la famille des Cistaceae.* *Anales Jard Bot Madrid.* 1987; 44(2):309-17.
46. Guignard J-L. *Botanique Systématique moléculaire* Ed Masson (12 ème édition), Paris. 2001:290.
47. Balşar S, Dogan Y, Mert HH. A study on the soil-Plant Interactions of some *Cistus* L. Species distributed in West Australia. *Turk J Bot.* 2002;26:149-59.
48. Ustun O, Gurbuz I, Kusmenoglu S, Turkoz S. Fatty acid content of three *Cistus* species growing in Turkey. *Chem Nat Compd.* 2004;40(6):526-8.
49. Madesis P, Konstantinidou E, Tsaftaris A, Nianiou-Obeidat I. Micropropagation and shoot regeneration of *Cistus creticus* ssp. *Creticus*. *J A P S.* 2011;01(08):54-8.
50. Deforce K. The historical use of ladanum. Polynological evidence from 15th and 16th century cesspits in northern Belgium. *Veget Hist Archaeobot.* 2006;15:145-8.
51. Demetzos C, Anastaski T, Perdetzoglou D. A chemometric interpopulation study of the essential oils of *Cistus creticus* L. growing in crete (Greece). *Z Naturforsch.* 2002;57C:89-94.
52. Ait Youssef M. *Plantes médicinales de Kabylie.* Ed Ibis Press, Paris. 2006:349
53. Hutschenreuther A, Birkemeyer C, Grotzinger K, Straubinger RK, Rauwald HW. Growth inhibiting activity of volatile oil from *Cistus creticus* L. against *s.s in vitro*. *Pharmazie.* 2010;65 (4):290-5.

54. Crepsio MJM, Cardenal Galvan JA, Peral Pacheco D, Vallejo Villalobos JR. Jara pringosa (*Cistus ladanifer*), usos, Utilidades y curiosidades en Extremadura. Revista de Estudios Extremeños, Tomo LXV. 2009;3:1637-50.
55. Bouamama H, Noel T, Villard J, Benharref A, Jana M. Antimicrobial activities of the leaf extracts of two Moroccan *Cistus* L. species. J Ethnopharmacol. 2006;104:104-7.
56. Barbosa E, Calzada F, Campos R. *In vivo* anti-giardial activity of three flavonoids isolated of some medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of diarrhea. J Ethnopharmacol. 2007;109:552-4.
57. Aboura R. Comparaison phyto-écologique des atriplexaies situées au nord et au sud de Tlemcen. Mém Magister, Univ Abou Bakr Belkaid, Tlemcen. 2006:210.
58. Ghezlaoui B-E, Benabadji N, Benmansour D, Merzouk A. Analyse des peuplements végétaux halophytes dans le Chott El-Gharbi (Oranie-Algérie). Acta Bot Malac. 2011;36:113-24.
59. Bouazza M, Mahboubi A, Loisel R, Benabadji N. Bilan de la flore de la région de Tlemcen (Oranie-Algérie). Forêt méditerranéenne. 2001;t. XXII(2):130-6.
60. Fortas Z. Etude de trois espèces de terfez: caractères culturels et cytologie du mycélium isolé et associé à *Helianthemum guttatum*. Thèse Doctorat d'état, Univ Oran Es-sénia (Algérie), INRA de Clermont-Ferrand (France). 1990:166.
61. Fortas Z, Chevalier G. caractéristiques de la germination des ascospores de *Terfezia arenaria* (Moris) Trappe, récoltée en Algérie. Cryptog Mycol. 1992 13:21-9.
62. Medjahdi B, Ibn Tattou M, Barkat D, Benabedli K. La flore vasculaire des Monts des Trara (Nord Ouest Algérie). Acta Botanica Malacitana. 2009;34:57-75.
63. Sahki A, Sahki R. Le Hoggar, promenade botanique. Ed Atelier Esopé, Lyon,. 2004:311
64. Hadjadj-Aoul S. Les peuplements de tetraclinis sur le littoral d'Oran (Algérie). Ecologia Mediterranea. 1991;17:63-78.
65. Aibeche C. Caractéristiques écologiques et mycologiques d'une espèce de terfez du littoral ouest algérien. Essai de mycorhization contrôlée avec sa plante-hôte naturelle *Helianthemum guttatum*. Mém Magister, Univ Oran, Es-Sénia. 2008:85.
66. Zitouni F. Etude des associations mycorhiziennes entre quatre espèces de terfez et diverses plantes Cistacées et ligneuses en conditions contrôlées. Mém Magister, Univ Oran. 2010:264.
67. Ghazanfar SA. A new species of *Helianthemum* (Cistaceae) from the Sultanate of Oman. Willdenowia. 2002:69-72.
68. Brullo S, Giusso del Galdo GP, Sciandrello S, editors. *Helianthemum sicanorum* (Cistaceae), a new species from Sicily. Anales del Jardín Botánico de Madrid; 2007: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
69. Lagrange B. Cours d'étude pharmaceutique. Jansen HJ et C, Imprimeurs-Librairie, Paris. 1794;Tome 2:456.
70. Laguesse A. Promenades botaniques, première série. Ed. Manière-Loquin, Dijon. 1877:280.
71. Brizicky GK. The genera of Cistaceae in the southeastern United States. J Arnold Arbor. 1964;45(3):346-57.
72. Quézel P, Santa S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. 1963.
73. Aragón CF, Escudero A. Mating system of *Helianthemum squamatum* (Cistaceae), a gypsophile specialist of semi-arid Mediterranean environments. Bot Helv. 2008;118(2):129-37.
74. Newell RE. Nova Scotia provincial status report on rockrose (Canada frostweed)(*Helianthemum canadense* (L.) Michx.): Department of Natural Resources; 2007.
75. Daur I. Plant flora in the rangeland of western Saudi Arabia. Pak J Bot. 2012;44:23-6.
76. Barbosa E, Calzada F, Campos R. Anti-giardial activity of methanolic extracts from *Helianthemum glomeratum* Lag. and *Rubus coriifolius* Focke in suckling mice CD-1. J Ethnopharmacol. 2006;108(3):395-7.
77. Buzzini P, Turchetti B, Ieri F, Goretti M, Branda E, Mulinacci N, et al. Catechins and proanthocyanidins: naturally occurring O-heterocycles with antimicrobial activity. Bioactive Heterocycles IV. 10: Springer; 2007. p. 239-63.
78. Tawaha K, Alali FQ, Gharaibeh M, Mohammad M, El-Elimat T. Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. Food chem. 2007;104(4):1372-8.

79. Rivera D, Odon C. Ethnopharmacology of Murcia (SESpain). Actesdu2^a Colloque Européen d'Ethnopharmacologie et de la 11^a Conférence internationale d'Ethnomédecine, Heidelberg. 1993:24.
80. Meckes M, Calzada F, Tapia-Contreras A, Cedillo-Rivera R. Antiprotozoal properties of *Helianthemum glomeratum*. *Phytother Res.* 1999;13(2):102-5.
81. Ocaña AMF. Estudio etnobotánico en el Parque Natural de las Sierras de Cazorla, Segura y Las Villas. Investigación química de un grupo de especies interesantes: Universidad de Jaén; 2000.
82. Barbosa E, Calzada F, Campos R. *In vivo* anti-giardial activity of three flavonoids isolated of some medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of diarrhea. *J Ethnopharmacol.* 2007;109(3):552-4.
83. Rigat M, Bonet MÀ, Garcia S, Garnatje T, Valles J. Studies on pharmaceutical ethnobotany in the high river Ter valley (Pyrenees, Catalonia, Iberian Peninsula). *J Ethnopharmacol.* 2007;113(2):267-77.
84. Verde A. Guía de las plantas medicinales de Castilla-La Mancha. 2008.
85. Verde A, de Castro On, Nuñez R. Etnobotánica en las sierras de Segura y Alcaraz: Instituto de Estudios Albacetenses de la Excm. Diputación de Albacete; 1998.
86. de Santayana MP, Blanco E, Morales R. Plants known as té in Spain: an ethno-pharmaco-botanical review. *J Ethnopharmacol.* 2005;98(1-2):1-19.
87. Meckes M, Villarreal ML, Tortoriello J, Berlin B, Berlin EA. A microbiological evaluation of medicinal plants used by the Maya people of Southern Mexico. *Phytother Res.* 1995;9(4):244-50.
88. Meckes M, Torres J, Calzada F, Rivera J, Camorlinga M, Lemus H, et al. Antibacterial properties of *Helianthemum glomeratum*, a plant used in Maya traditional medicine to treat diarrhoea. *Phytother Res.* 1997;11(2):128-31.
89. Calzada F, Alanis AD, Meckes M, Tapia-Contreras A, Cedillo-Rivera R. In vitro susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to some medicinal plants used by the people of Southern Mexico. *Phytother Res.* 1998;12(1):70-2.
90. Bouamama H, Noel T, Villard J, Benharref A, Jana M. Antimicrobial activities of the leaf extracts of two Moroccan *Cistus* L. species. *Journal of ethnopharmacology.* 2006;104(1-2):104-7.
91. Ermeli N, Alsabri S, Bensaber S, Mohamed S, Zetrini A, Aburas K, et al. Screening of analgesic and anti-inflammatory activities for two Libyan medicinal plants: *Helianthemum lippii* and *Launaea residifolia*. *J Chem Pharm Res.* 2012;4(9):4201-5.
92. Alsabri SG, Rmeli NB, Zetrini AA, Mohamed SB, Meshri MI, Aburas KM, et al. Phytochemical, anti-oxidant, anti-microbial, anti-inflammatory and anti-ulcer properties of *Helianthemum lippii*. *J Pharmacogn Phytochem.* 2013;2(2):86-96.
93. Yokozawa T, Chen CP, Dong E, Tanaka T, Nonaka G-I, Nishioka I. Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Biochem Pharmacol.* 1998;56(2):213-22.
94. Bensaber SM, Mrema IA, Jaeda MI, Gbaj AM. Cytotoxic activity of *Helianthemum lippii*. *Methods.* 2014;8(1):92-4.
95. Nedjmi A, Soussou A. Caractéristiques biochimiques de quelques plants spontanées médicinales à travers des différents modes de séchage. Thèse en biologie végétale, Université Kasdi Merbah, Ouargla. 2014.
96. Díez J, Manjón JL, Martín F. Molecular phylogeny of the mycorrhizal desert truffles (*Terfezia* and *Tirmania*), host specificity and edaphic tolerance. *Mycologia.* 2002;94(2):247-59.
97. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 1999;12(4):564-82.
98. Cowan M, Horst E, Luengpailin S, Doyle R. Inhibitory Effects of Plant Polyphenoloxidase on Colonization Factors of *Streptococcus sobrinus* 6715. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(9):2578-80.
99. Craciunescu O, Constantin D, Gaspar A, Toma L, Utoiu E, Moldovan L. Evaluation of antioxidant and cytoprotective activities of *Arnica montana* L. and *Artemisia absinthium* L. ethanolic extracts. *Chem Cent J* 2012;6(1):97.
100. Kim Y-S, Lee S-J, Hwang J-W, Kim E-K, Kim S-E, Kim E-H, et al. In vitro protective effects of *Thymus quinquecostatus* Celak extracts on t-BHP-induced cell damage through antioxidant activity. *Food Chem Toxicol.* 2012;50(11):4191-8.
101. Nam J-W, Seo E-K. Structural characterization and biological effects of constituents of the seeds of *Alpinia katsumadai* (*Alpinia Katsumadai* Seed). *Nat Prod Commun.* 2012;7(6):795-8.

102. Rubio-Moraga Á, Argandoña J, Mota B, Pérez J, Verde A, Fajardo J, et al. Screening for polyphenols, antioxidant and antimicrobial activities of extracts from eleven *Helianthemum* taxa (Cistaceae) used in folk medicine in south-eastern Spain. *J Ethnopharmacol.* 2013;148(1):287-96.
103. Benabdelaziz I, Haba H, Lavaud C, Harakat D, Benkhaled M. Lignans and other constituents from *Helianthemum sessiliflorum* Pers. *Rec Nat Prod.* 2015;9(3):342.
104. Benabdelaziz I, Marcourt L, Benkhaled M, Wolfender J-L, Haba H. Antioxidant and antibacterial activities and polyphenolic constituents of *Helianthemum sessiliflorum* Pers. *Nat Prod Res.* 2017;31(6):686-90.
105. Aberkane M, Bouzergoune F, Mosset P, Bitam F. Phytochemical study of *Helianthemum karihicum*. International Conference on Chemical, Environmental and Biological Sciences Penang, Malaysia. 2012:33.
106. Calzada F, Lopéz R, Meckes M, Cedillo-Rivera R. Flavonoids of the aerial parts of *Helianthemum glomeratum*. *Int J Pharmacogn Phytochem Res.* 1995;33(4):351-2.
107. Calzada F, Alanís AD. Additional antiprotozoal flavonol glycosides of the aerial parts of *Helianthemum glomeratum*. *Phytother Res.* 2007;21(1):78-80.
108. Amaral FM, Ribeiro MNS, Barbosa-Filho JM, Reis AS, Nascimento FR, Macedo RO. Plants and chemical constituents with giardicidal activity. *Rev Bras Farmacogn.* 2006;16:696-720.
109. Chemam Y, Benayache S, Marchioni E, Zhao M, Mosset P, Benayache F. On-line screening, isolation and identification of antioxidant compounds of *Helianthemum ruficomum*. *Molecules.* 2017;22(2):239.
110. Bouzergoune F, Bitam F, Aberkane M, Mosset P, Fetha M, Boudjar H, et al. Preliminary phytochemical and antimicrobial activity investigations on the aerial parts of *Helianthemum kahiricum*. *Chemistry of Natural Compounds.* 2013;49(4):751-2.
111. Ferreres F, Tomás-Barberán FA, Gil MI, Tomás-Lorente F. An HPLC technique for flavonoid analysis in honey. *J Sci Food Agric.* 1991;56(1):49-56.
112. Chemam Y, Benayache F. Valorisation de plantes sahariennes endémiques du genre *Helianthemum*-Activité antioxydante: Thèse de doctorat: Université des Frères Mentouri Constantine.
113. Poaceae Ltdgdlf. <https://www.aquaportail.com/taxonomie-famille-151-poaceae.html> Consulté le 04.07.2020.
114. Mauhin F. Les poacées. Société royale Cercles des Naturalistes de Belgique asbl, Section ATTIRE D'AILES, Cercles des neutralistes de Belgique. 2010.
115. United States Department of Agriculture (USDA) A, National Genetic Resources Program. Germplasm Resources Information Network-(GRIN) National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. Consulté le 16-10-2015.
116. The Plant List Twlops. <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-406274> Consulté le 07-09-2018.
117. Chehma A. Catalogue des plantes spontanées du Sahara septentrional algérien. Edition Dar Elhouda; 2006.
118. Akande I, Samuel T, Agbazue U, Olowolagba B. Comparative proximate analysis of ethanolic and water extracts of *Cymbopogon citratus* (lemongrass) and four tea brands. *Plant Sci Res.* 2011;3(4):29-35.
119. Khadri A, Neffati M, Smiti S, Falé P, Lino ARL, Serralheiro MLM, et al. Antioxidant, antiacetylcholinesterase and antimicrobial activities of *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng (lemon grass) from Tunisia. *LWT - Food Sci Technol.* 2010;43(2):331-6.
120. Mmereole F. Effects of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) leaf meal feed supplement on growth performance of broiler chicks. *Int J Poult Sci.* 2010;9(12):1107-11.
121. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int J Food Microbiol.* 2004;94(3):223-53.
122. Noor S, Latip H, Lakim M, Syahirah A, Bakar A, editors. The Potential of Citronella Grass, *Cymbopogon Nardus* as Biopesticide Against *Plutella xylostella* Faculty of Plantation and Agrotechnology, Universiti Teknologi MARA, 40450 Shah Alam. Proceedings of the UMT 11th International Annual Symposium on Sustainability Science and Management, Kuala Terengganu, Malaysia; 9–11 July 2012.
123. Bagheri R, Mohamadi S, Abkar A, Fazlollahi A. Essential oil compositions of *Cymbopogon parkeri* STAPF from Iran. *PJBS.* 2007;10(19):3485-6.

124. Govere J, Durrheim D, Baker L, Hunt R, Coetzee M. Efficacy of three insect repellents against the malaria vector *Anopheles arabiensis*. *Med Vet Entomol*. 2000;14(4):441-4.
125. Mahboubi M, Kazempour N. Biochemical activities of Iranian *Cymbopogon olivieri* (Boiss) Bor. essential oil. *Indian J Pharm Sci*. 2012;74(4):356-60.
126. Hadjiakhoondi A, Vatandoost H, Jamshidi A, Amiri EB. Chemical constituents of efficacy of *Cymbopogon olivieri* (Boiss) Bar essential oil against malaria vector, *Anopheles stepensi*. *DARU J Pharm Sci*. 2003;11(3):125-8.
127. Kepe T. Land restitution and biodiversity conservation in South Africa: the case of Mkambati, Eastern Cape Province. *Can J Afr Stud*. 2004;38(3):688-704.
128. Leite BL, Souza TT, Antonioli AR, Guimarães A, Siqueira RS, Quintans JS, et al. Volatile constituents and behavioral change induced by *Cymbopogon winterianus* leaf essential oil in rodents. *Afr J Biotechnol*. 2011;10(42):8312-9.
129. Secoy D, Smith A. Use of plants in control of agricultural and domestic pests. *Econ Bot*. 1983;37(1):28-57.
130. Jeong M-R, Park PB, Kim D-H, Jang Y-S, Jeong HS, Choi S-H. Essential oil prepared from *Cymbopogon citrates* exerted an antimicrobial activity against plant pathogenic and medical microorganisms. *Mycobiology*. 2009;37(1):48-52.
131. Aibinu I, Adenipekun T, Adelowotan T, Ogunsanya T, Odugbemi T. Evaluation of the antimicrobial properties of different parts of *Citrus aurantifolia* (lime fruit) as used locally. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2007;4(2):185-90
132. HiLGERT NI. Plants used in home medicine in the Zenta River basin, Northwest Argentina. *J Ethnopharmacol*. 2001;76(1):11-34.
133. Valdés AF-C, Martínez JM, Lizama RS, Gaitén YG, Rodríguez DA, Payrol JA. In vitro antimalarial activity and cytotoxicity of some selected cuban medicinal plants. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 2010;52(4):197-201.
134. Morton JF. *Atlas of Medicinal Plants of Middle America, Bahamas to Yucatan*; Charles C. Thomas:Springfield, IL, USA. 1981.
135. Olivero-Verbel J, Nerio LS, Stashenko EE. Bioactivity against *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae) of *Cymbopogon citratus* and *Eucalyptus citriodora* essential oils grown in Colombia. *Pest Manag Sci*. 2010;66(6):664-8.
136. Moreira FV, Bastos JF, Blank AF, Alves PB, Santos MR. Chemical composition and cardiovascular effects induced by the essential oil of *Cymbopogon citratus* DC. Stapf, Poaceae, in rats. *Rev Bras Farmacogn* 2010;20(6):904-9.
137. Mahabir D, Gulliford MC. Use of medicinal plants for diabetes in Trinidad and Tobago. *Rev Panam Salud Publica*. 1997;1:174-9.
138. Jirovetz L, Buchbauer G, Eller G, Ngassoum MB, Maponmetsem PM. Composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon giganteus* (Hochst.) chiov. essential flower, leaf and stem oils from Cameroon. *J Essent Oil Res*. 2007;19(5):485-9.
139. Grice ID, Rogers KL, Griffiths LR. Isolation of bioactive compounds that relate to the anti-platelet activity of *Cymbopogon ambiguus*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2011;2011.
140. Dayalan AM. Traditional Aboriginal Medicine Practice in the Northern Territory. In *Proceedings of the International Symposium on Traditional Medicine, Awaji Island, Japan*. 11–13 September 2000.
141. Smith NM. Ethnobotanical field notes from the Northern Territory, Australia. *J Adel Bot Gard* 1991:1-65.
142. Desai MA, Parikh J. Microwave assisted extraction of essential oil from *Cymbopogon flexuosus* (Steud.) Wats.: a parametric and comparative study. *Separation Science and Technology*. 2012;47(13):1963-70.
143. Jayasinha P. *Medicinal and Aromatic Plant Series*. Industrial Technology Institute: Colombo, Sri Lanka. 1999:1–32.

144. Al-Ghamdi SS, Al-Ghamdi AA, Shammah AA. Inhibition of calcium oxalate nephrotoxicity with *Cymbopogon schoenanthus* (Al-Ethkher). *Drug metablett*. 2007;1(4):241-4.
145. El-Askary HI, Meselhy MR, Galal AM. Sesquiterpenes from *Cymbopogon proximus*. *Molecules*. 2003;8(9):670-7.
146. Beeftalk. In *Taking Stock of Your Future*. Queensland Government: Queensland, Australia. 2011;37:1–24.
147. Takaisi-Kikuni N, Krüger D, Gnann W, Wecke J. Microcalorimetric and electron microscopic investigation on the effects of essential oil from *Cymbopogon densiflorus* on *Staphylococcus aureus*. *Microbios*. 1996;88(354):55-62.
148. De Smet PA. Some ethnopharmacological notes on African hallucinogens. *J Ethnopharmacol*. 1996;50(3):141-6.
149. El-Bakry AA, Abdel-Salam AM. Regeneration from embryogenic callus and suspension cultures of the wild medicinal plant *Cymbopogon schoenanthus*. *Afr J Biotechnol* 2012;11(43):10098-107.
150. Khadri A, Serralheiro M, Nogueira J, Neffati M, Smiti S, Araujo M. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of essential oils from *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng. Determination of chemical composition by GC–mass spectrometry and ¹³C NMR. *Food chem*. 2008;109(3):630-7.
151. Abdelgaleil SA, Abbassy MA, Belal A-SH, Rasoul MAA. Bioactivity of two major constituents isolated from the essential oil of *Artemisia judaica* .L. *Bioresour technol*. 2008;99(13):5947-50.
152. Bossou AD, Ahoussi E, Ruysbergh E, Adams A, Smaghe G, De Kimpe N, et al. Characterization of volatile compounds from three *Cymbopogon* species and *Eucalyptus citriodora* from Benin and their insecticidal activities against *Tribolium castaneum*. *Industrial Crops and Products*. 2015;76:306-17.
153. Alitonou GA, Avlessi F, Tchobo F, Noudogbessi J-P, Tonouhewa A, Yehouenou B, et al. Chemical composition and biological activities of essential oils from the leaves of *Cymbopogon giganteus* Chiov. and *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng (Poaceae) from Benin. *IJBCS*. 2012;6(4):1819-27.
154. Mohammad Ali R. Antibacterial and phytochemical screening of *Lepidium sativum* and *Cymbopogon schoenanthus*. BSc thesis, Faculty of Science, Khartoum University. 2012.
155. EL-Kamali HH, EL-Amir MY. Antibacterial activity and phytochemical screening of ethanolic extracts obtained from selected Sudanese medicinal plants. *Curr Res J Biol Sci*. 2010a;2(2):143-6.
156. Sabry A, El-Zayat S, El-Said A, Abdel-Motaal F, Magraby T. Mycoflora associated with Halfa-bar leaves and stems (*Cymbopogon schoenanthus* L. Sprengel), in vitro the antimicrobial activity of the plant leaves and stems secondary metabolites. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 2014;3(2):874-82.
157. Ben Othman M, Han J, El Omri A, Ksouri R, Neffati M, Isoda H. Antistress effects of the ethanolic extract from *Cymbopogon schoenanthus* growing wild in Tunisia. *Evidence-based complementary and alternative medicine*. 2013;2013.
158. Al Haznawi A, Attar A, Abdulshakoor A, Ramadan M. Inhibition of calcium oxalate nephrotoxicity with *Cymbopogon schoenanthus* (Al-Ethkher). MSc thesis Faculty of Applied Medical Sciences, Saudi Arabia 2007.
159. Katiki L, Chagas A, Takahira RK, Juliani H, Ferreira J, Amarante AFTd. Evaluation of *Cymbopogon schoenanthus* essential oil in lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol*. 2012;186(3-4):312-8.
160. Ketoh GK, Koumaglo HK, Glitho IA, Huignard J. Comparative effects of *Cymbopogon schoenanthus* essential oil and piperitone on *Callosobruchus maculatus* development. *Fitoterapia*. 2006;77(7-8):506-10.
161. Bossou AD, Mangelinckx S, Yedomonhan H, Boko PM, Akogbeto MC, De Kimpe N, et al. Chemical composition and insecticidal activity of plant essential oils from Benin against *Anopheles gambiae* (Giles). *Parasites vectors*. 2013;6(1):337.
162. Living Naturally LCc, Cymbopogon nardus), .
<http://www.kidswellness.com/ns/DisplayMonograph.asp?storeID=464477254e3a4415b459127000e2b4ae&DocID=bottomline-lemongrass> . Consulté le 17-09-2016.
163. Kpoviessi S, Bero J, Agbani P, Gbaguidi F, Kpadonou-Kpoviessi B, Sinsin B, et al. Chemical composition, cytotoxicity and in vitro antitrypanosomal and antiplasmodial activity of the essential oils of four *Cymbopogon* species from Benin. *J Ethnopharmacol*. 2014;151(1):652-9.
164. Wany A, Jha S, Nigam VK, Pandey DM. Chemical analysis and therapeutic uses of citronella oil from *Cymbopogon winterianus*: A short review. *Int J Adv Res* 2013;1(6):504-21.

165. Blanco M, Costa C, Freire A, Santos Jr J, Costa M. Neurobehavioral effect of essential oil of *Cymbopogon citratus* in mice. *Phytomedicine*. 2009;16(2-3):265-70.
166. Wright S, Maree J, Sibanyoni M. Treatment of oral thrush in HIV/AIDS patients with lemon juice and lemon grass (*Cymbopogon citratus*) and gentian violet. *Phytomedicine*. 2009;16(2-3):118-24.
167. Cavalcanti ESB, Morais SMD, Lima MAA, Santana EWP. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2004;99(5):541-4.
168. Puatanachokchai R, Kishida H, Denda A, Murata N, Konishi Y, Vinitketkumnuen U, et al. Inhibitory effects of lemon grass (*Cymbopogon citratus*, Stapf) extract on the early phase of hepatocarcinogenesis after initiation with diethylnitrosamine in male Fischer 344 rats. *Cancer Lett*. 2002;183(1):9-15.
169. Rodrigues KAdF, Dias CN, do Amaral FMM, Moraes DF, Mouchrek Filho VE, Andrade EHA, et al. Molluscicidal and larvicidal activities and essential oil composition of *Cymbopogon winterianus*. *Pharm Biol*. 2013;51(10):1293-7.
170. Oliveira WAd, Pereira FdO, Luna GCDGd, Lima IO, Wanderley PA, Lima RBd, et al. Antifungal activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor against *Candida albicans*. *Braz J Microbiol* 2011;42(2):433-41.
171. Pandey MC, Sharma J, Dikshit A. Antifungal evaluation of the essential oil of *Cymbopogon pendulus* (Nees ex Steud.) Wats. cv. Praman. *Flavour Fragr J* 1996;11(4):257-60.
172. Sharma PR, Mondhe DM, Muthiah S, Pal HC, Shahi AK, Saxena AK, et al. Anticancer activity of an essential oil from *Cymbopogon flexuosus*. *Chem Biol Interact*. 2009;179(2-3):160-8.
173. Takaisi-Kikuni N, Tshilanda D, Babady B. Antibacterial activity of the essential oil of *Cymbopogon densiflorus*. *Fitoterapia*. 2000;71(1):69-71.
174. Wei LS, Wee W. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon nardus* citronella essential oil against systemic bacteria of aquatic animals. *Iran J Microbiol*. 2013;5(2):147.
175. EL-Kamali HH, EL-Nour RO, Khalid SA. Molluscicidal activity of the essential oils of *Cymbopogon nervatus* leaves and *Boswellia papyrifera* resins. *Curr Res J Biol Sci*. 2010b;2(2):139-42.
176. Heiba H, Rizk A. Constituents of *Cymbopogon* Species. *Qatar Univ Sci Bull* 1986;6:53-75.
177. Hellali N, Hadj-Mahammed M. Analyse par GC-MS de l'huile essentielle de la plante *Cymbopogon shoenanthus* de la région de Illizi, obtenue par hydrodistillation assistée par micro-ondes. *PCBS J*. 2008;2(1):5.
178. Amina R, Aliero B, Gumi A. Phytochemical screening and oil yield of a potential herb, camel grass (*Cymbopogon schoenanthus* Spreng.). *Eur J Exp Biol*. 2013;2(3):15-9.
179. Trease GE, Evans WC. *A Text Book of Pharmacognosy*. Bailliere Tindall Ltd, London, United Kingdom. 1996;14th edition.
180. Okwu DE, Omodiromiro DO. *Biol Res*. 2005;3(1):40-4.
181. Rizk A, Hammouda F, Ismail S, Kamel A, Rimpler H. Constituents of plants growing in qatar part xxvii: flavonoids of *cymbopogon parkeri*. *Qatar Univ Sci J* 1995;15(33-35).
182. Cheel J, Theoduloz C, Rodríguez J, Schmeda-Hirschmann G. Free radical scavengers and antioxidants from Lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.). *J Agr Food Chem* 2005;53(7):2511-7.
183. Bottini AT, Dev V, Garfagnoli DJ, Joshi P, Lohani H, Mathela C, et al. Isolation and crystal structure of a novel dihemiactal bis-monoterpenoid from *Cymbopogon martinii*. *Phytochemistry*. 1987;26(8):2301-2.
184. Hanson SW, Crawford M, Koker ME, Menezes FA. Cymbopogonol, a new triterpenoid from *Cymbopogon citratus*. *Phytochemistry (UK)*. 1976;15:1074-5.
185. Andrade EHA, Zoghbi MdGB, Lima MdP. Chemical composition of the essential oils of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf cultivated in North of Brazil. *J Essent Oil-Bear Plants*. 2009;12(1):41-5.
186. Bharti SK, Kumar A, Prakash O, Krishnan S, Gupta AK. Essential oil of *Cymbopogon citratus* against diabetes: Validation by in vivo experiments and computational studies. *J Bioanal Biomed*. 2013;5:194-203.
187. Farhang V, Amini J, Javadi T, Nazemi J, Ebadollahi A. Chemical composition and antifungal activity of essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. against three *Phytophthora* species. *Greener J Biol Sci*. 2012;3:292-8.
188. Menut C, Bessiére JM, Samaté D, Djibo AK. Aromatic plants of tropical west Africa. XI. chemical composition, antioxidant and antiradical properties of the essential oils of three *Cymbopogon* species from Burkina Faso. *J Essent Oil Res*. 2011;12:37-41.

189. Bassolé I, Lamien-Meda A, Bayala B, Obame L, Ilboudo A, Franz C, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination. *Phytomedicine*. 2011;18(12):1070-4.
190. Rabehaja DJ, Raelison G, Ihandriharison H, Ramanoelina PA, Casanova J, Tomi F. Volatile components from *Cymbopogon giganteus* (Hochst) Chiov var. *madagascariensis* (A. Camus). *J Essent Oil Bear Pl*. 2010;13(5):522-7.
191. Kasali AA, Oyedeji AO, Ashilokun AO. Volatile leaf oil constituents of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. *Flavour Fragr J*. 2001;16(5):377-8.
192. Sidibé L, Chalchat J-C, Garry R-P, Lacombe L, Harama M. Aromatic Plants of Mali (IV): Chemical Composition of Essential Oils of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf and *C. giganteus* (Hochst.) Chiov. *J Essent Oil Res*. 2001;13(2):110-2.
193. Chisowa EH, Hall DR, Farman DI. Volatile constituents of the essential oil of *Cymbopogon citratus* Stapf grown in Zambia. *FLAVOUR FRAG J*. 1998;13(1):29-30.
194. Matasyoh JC, Wagara IN, Nakavuma JL. Chemical composition of *Cymbopogon citratus* essential oil and its effect on mycotoxigenic *Aspergillus* species. *Afr J Food Sci*. 2011;5(3):138-42.
195. Loumouamou A, Biassala E, Silou T, Ntondele-Nsansi P, Diamouangana J, Nzikou J, et al. Characterisation of a giant lemon grass acclimatised in the Congo-Brazzaville. *Adv J Food Sci Technol*. 2010;2(6):312-7.
196. Menut C, Bessiere J, Samate D, Djibo A, Buchbauer G, Schopper B. Aromatic plants of tropical west Africa. XI. chemical composition, antioxidant and antiradical properties of the essential oils of three *Cymbopogon* species from Burkina Faso. *J Essent Oil Res*. 2000;12(2):207-12.
197. Shahi AK, Sharma SN, Tava A. Composition of *Cymbopogon pendulus* (Nees ex Steud) Wats, an elemicin-rich oil grass grown in Jammu region of India. *J Essent Oil Res*. 1997;9(5):561-3.
198. Quintans-Júnior LJ, Souza TT, Leite BS, Lessa MN, Bonjardim LR, Santos MR, et al. Phytochemical screening and anticonvulsant activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Poaceae) leaf essential oil in rodents. *Phytomedicine* 2008;15:619–24.
199. Chowdhury SR, Tandon P, Chowdhury A. Chemical composition of the essential oil of *Cymbopogon flexuosus* (Steud) Wats. growing in Kumaon Region. *Flavour Fragr J*. 2010;13(5):588-93.
200. Hanaa AM, Sallam Y, El-Leithy A, Aly SE. Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as affected by drying methods. *Ann Agric Sci*. 2012;57(2):113-6.
201. Soares M, Vinha A, Barreira S, Coutinho F, Aires-Goncalves S, Oliveira M, et al. *Cymbopogon citratus* EO antimicrobial activity against multi-drug resistant Gram-positive strains and non-albicans-*Candida* species. *Microbial pathogens and strategies for combating them: Science, Technology and Education*. 2013:1081-6.
202. Ranitha M, Nour AH, Sulaiman ZA, Nour AH. A Comparative study of Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil extracted by microwave-assisted hydrodistillation (MAHD) and conventional hydrodistillation (HD) method. *Int J Chem Eng Appl* 2014;5(2):104-8.
203. Dubey V, Mallavarapu G, Luthra R. Changes in the essential oil content and its composition during palmarosa (*Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats. var. motia) inflorescence development. *Flavour Fragr J* 2000;15(5):309-14.
204. Gbenou JD, Ahounou JF, Akakpo HB, Laleye A, Yayi E, Gbaguidi F, et al. Phytochemical composition of *Cymbopogon citratus* and *Eucalyptus citriodora* essential oils and their anti-inflammatory and analgesic properties on Wistar rats. *Mol Biol Rep*. 2013;40(2):1127-34.
205. Mclaughlin JL, Rogers LL, Anderson JE. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Inf J*. 1998;32(2):513-24.
206. Sousa EMBDd, Câmara APC, Costa WA, Costa ACJ, Oliveira HNM, Galvão EL, et al. Evaluation of the extraction process of the essential oil from *Cymbopogon schoenanthus* with pressurized carbon dioxide. *Braz Arch Biol Technol*. 2005;48(SPE):231-6.
207. Yentema O, Alioune O, Dorosso SA. Chemical composition and physical characteristics of the essential oil of *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng of Burkina Faso. *J Appl Sci*. 2007;7(4):503-6.

208. Katiki L, Chagas A, Bizzo H, Ferreira J, Amarante AFTd. Anthelmintic activity of *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* and *Mentha piperita* essential oils evaluated in four different in vitro tests. *Vet Parasitol.* 2011;183(1-2):103-8.
209. Bothon F, Gnanvossou D, Noudogbessi J, Hanna R, Sohounhloue D. *Bactrocera Cucurbitae* response to four *Cymbopogon* species essential oils. *J Nat Prod.* 2013;6:147-55.
210. Hadeif D, Saidi M, Yousfi M, Moussaoui Y. GC/MS Analysis of Essential Oils of *Cymbopogon schoenanthus* and *Origanum majorana* L. Grown in Eastern Algeria. *ASIAN J CHEM* 2015;27(10):3575 - 8.
211. Dupont F, Guignard J-L. *Botanique: Les familles des plantes*: Elsevier Health Sciences; 2012.
212. Mandeel QA, Al-Laith AAA. Ethnomycological aspects of the desert truffle among native Bahraini and non-Bahraini peoples of the Kingdom of Bahrain. *J Ethnopharmacol.* 2007;110(1):118-29.
213. Plenchette C, Duponnois R. Growth response of the saltbush *Atriplex nummularia* L. to inoculation with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *J Arid Environ.* 2005;61(4):535-40.
214. Slama A, Fortas Z, Neffati M, Khabar L, Boudabous A. Etude taxinomique de quelques *Ascomycota* hypogés (Terfeziaceae) de la Tunisie méridionale. *Bulletin trimestriel de la Société mycologique de France.* 2006;122(2-3):187-95.
215. Aïdoud A, Le Floch É, Le Houérou HN. Les steppes arides du nord de l'Afrique. *Science et changements planétaires/Sécheresse.* 2006;17(1):19-30.
216. A. Hannan M, Al-Dakan AA, Aboul-Enein HY, Al-Othaimen AA. Mutagenic and antimutagenic factor (s) extracted from a desert mushroom using different solvents. *Mutagenesis.* 1989;4(2):111-4.
217. Kagan-Zur V, Roth-Bejerano N, Sitrit Y, Morte A. Desert truffles. Phylogeny, physiology, distribution and domestication, *Soil biology.* Springer, Berlin. 2014;10(1007):978-3.
218. Al-Laith AAA. Antioxidant components and antioxidant/antiradical activities of desert truffle (*Tirmania nivea*) from various Middle Eastern origins. *J Food Compos Anal.* 2010;23(1):15-22.
219. Escudero A, Martínez I, De la Cruz A, Otálora M, Maestre F. Soil lichens have species-specific effects on the seedling emergence of three gypsophile plant species. *J Arid Environ.* 2007;70(1):18-28.
220. Janex-Favre M, Parguey-Leduc A, Rioussel L. L'ascocarpe hypogée d'une terfez Française (*Terfezia leptoderma* Tul., Tuberales, Discomycetes). *Bulletin trimestriel de la Société Mycologique de France.* 1988;104(3):145-78.
221. El-Kholy H. *Genetical and Physiological Studies on Truffles* (Ph.D.thesis). Cairo University, Egypt. 1989.
222. Gücin F, Dülger B. The researches on the Keme truffle *Terfezia boudieri* Chatin that is edible and showing antimicrobial activities. *Ekoloji.* 1997;23:27-33.
223. Ławrynowicz M, Markowicz M, Milenković M, Ivančević B. *Terfezia terfezioides*-a new hypogeous fungus for Balkan Peninsula. *Acta Mycol* 1997;32(2):233-8.
224. Moreno G, Diez J, Manjon J. *Picoa lefebvrei* and *Tirmania nivea*, two rare hypogeous fungi from Spain. *Mycol Res.* 2000;104(3):378-81.
225. Malençon G. *Champignons hypogés du nord de l'Afrique*: Verlag nicht ermittelbar; 1973.
226. Bokhary H. Desert truffles" Al-Kamah" of the kingdom of Saudi Arabia. 1. Occurrence, identification and distribution. *Arab Gulf J Sci Res.* 1987;5(2):245-55.
227. Khabar L, NAJIM L, JANEX-FAVRE M-C, PARGUEY-LEDUC A. Contribution à l'étude de la flore mycologique du Maroc. Les truffes marocaines (Discomycètes). *Bulletin trimestriel de la Société mycologique de France.* 2001;117(3):213-29.
228. Fortas Z. Diversité des espèces de terfèz (truffesdesables) des zone sarides algériennes. Oral Presentation at International Conference EcoSys-09. University of Ouargla, Algeria, 13–15 December 2009.
229. Alsheikh A, Trappe J. Desert truffles: the genus *Tirmania*. *Trans Brit Mycol Soc.* 1983;81(1):83-90.
230. Al-Ruqaie IM. Effect of different treatment processes and preservation methods on the quality of truffles: I. Conventional methods (drying/freezing). *PJBS.* 2002;5(10):1088-93.
231. Marasas W, Trappe JM. Notes on southern African tuberales. *Bothalia.* 1973;11(1/2):139-41.
232. Trappe JM, Sundberg WJ. *Terfezia gigantea* (Tuberales) in North America. *Mycologia.* 1977;69(2):433-7.
233. Ustün O, Özçelik B, Akyön Y, Abbasoglu U, Yesilada E. Flavonoids with anti-Helicobacter pylori activity from *Cistus laurifolius* leaves. *J ethnopharmacol.* 2006;108(3):457-61.

234. Mohsin A, Shah A, Al-Yahya M, Tariq M, Tanira M, Ageel A. Analgesic, antipyretic activity and photochemical screening of some plants used in traditional Arab system of medicine. *Fitoterapia*. 1989;60:174-7.
235. Oliver-Bever B. Medicinal plants in tropical West Africa: Cambridge university press; 1986.
236. Alitonou GA. Huiles essentielles extraites de plantes aromatiques acclimatées au Bénin: étude chimique, évaluation biologique et applications potentielles: Montpellier 2; 2006.
237. Africa AGTm pin. *Cymbopogon schoenanthus*. IUCN Centre for Mediterranean Cooperation, Malaga, Spain. 2005:21-2.
238. Hammiche V, Maiza K. Traditional medicine in Central Sahara: pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. *J Ethnopharmacol*. 2006;105(3):358-67.
239. Tackholm V, Drar M. Students' flora of Egypt. 2nd Edition Cairo: Cairo University. 1956:888.
240. Abdel-Moneim F, Ahmed Z, Fayez M, Ghaleb H. Constituents of local plants. *Planta medica*. 1969;17(03):209-16.
241. Locksley H, Fayez M, Radwan A, Chari V, Cordell G, Wagner H. Constituents of local plants. *Planta Med*. 1982;45(05):20-2.
242. Ketoh GK, Glitho AI, Huignard J. Susceptibility of the bruchid *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) and its parasitoid *Dinarmus basalis* (Hymenoptera: Pteromalidae) to three essential oils. *J Econ Entomol*. 2002;95(1):174-82.
243. Koba K, Poutouli P, Nenonene Y, Songai M, Raynaud C, Sanda K. Chemical composition and anti-termite activity of three tropical essential oils against termite species *Trinervitermes geminatus*. *Sci Technol*. 2007;5:39-46.
244. Musa A, Aleiro B, Aleiro A, Tafinta Y. Larvicidal and insecticidal effect of Camelgrass (*Cymbopogon schoenanthus*) oil on anopheles mosquito. *Ann Bio Sci* 2014;2(1):19-22.
245. USDA A, National Genetic Resources Program. Germplasm Resources Information Network-(GRIN) National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. Consulté le 16-10-2015.
246. Atyat A. Production and processing of medicinal and aromatic plants in the Arab world. Arab Institute for Research and Publishing, Beirut. 1995:138-41.
247. El-Ghazali GE, El-Tohami MS, El-Egami AA. Medicinal plants of the Sudan: medicinal plants of northern Kordofan: National Centre for Research, Medicinal & Aromatic Plants Research Institute; 1994.
248. Chaturvedula VSP, Prakash I. Isolation of stigmaterol and β -sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*. *International Current Pharmaceutical Journal*. 2012;1(9):239-42.
249. Pierre LL, Moses MN. Isolation and characterisation of stigmaterol and β -sitosterol from *Odontonema strictum* (acanthaceae). *J Innov Pharm Biol Sci*. 2015;2:88-96.
250. Hoang VD, Tan GT, Zhang H-J, Tamez PA, Van Hung N, Cuong NM, et al. Natural anti-HIV agents—part I:(+)-demethoxyepiexcelsin and verticillatol from *Litsea verticillata*. *Phytochemistry*. 2002;59(3):325-9.
251. Su B-N, Takaishi Y, Yabuuchi T, Kusumi T, Tori M, Takaoka S. The structures and absolute configurations of macrophyllic acids A–E, five new rearranged eudesmane sesquiterpene acids from the bark of *Inula macrophylla*. *Tetrahedron Lett*. 2000;41(14):2395-400.
252. Shun-Hua W, Hong-Jie Z, Zhong-Wen L, Han-Dong S. Terpenoids from *Isodon grandifolia* var. *atuntzensis*. *Phytochemistry*. 1993;34(4):1176-8.
253. Ahmad VU, Farooqui TA, Fizza K, Sultana A, Khatoon R. Three new eudesmane sesquiterpenes from *Pluchea arguta*. *J Nat Prod*. 1992;55(6):730-5.
254. Ando M, Arai K, Kikuchi K, Isogai K. Synthetic studies of sesquiterpenes with a cis-fused decalin system, 4. Synthesis of (+)-5 β H-eudesma-3, 11-diene, (-)-5 β H-eudesmane-4 β , 11-diol, and (+)-5 β H-eudesmane-4 α , 11-diol, and structure revision of a natural eudesmane-4, 11-diol isolated from *Pluchea arguta*. *J Nat Prod*. 1994;57(9):1189-99.
255. Ahmad VU, Fizza K. 4-epiplucheinol, a sesquiterpene from *Pluchea arguta*. *Phytochemistry*. 1986;25(4):949-50.
256. Evans FE, Miller DW, Cairns T, Baddeley GV, Wenkert E. Structure analysis of proximadiol (cryptomeridiol) by ¹³C NMR spectroscopy. *Phytochemistry*. 1982;21(4):937-8.
257. Irwin M, Geissman TA. Sesquiterpene alcohols from *Artemisia pygmaea*. *Phytochemistry*. 1973;12(4):849-52.

258. Akinbo A. Chemical investigation of *Lagueria alata*. Nig J Basic Appl Sci. 1999;33:171-5.
259. Egharevba HO, Okwute SK, Okogun JI, Igoli J. A new bioactive Pterodondiol from *laggera pterodonta* (DC) Sch.Bip. Int J Appl Res Nat Prod. 2012;1(3):45-53.
260. Liu Y-B, Jia W, Gao W-Y, Zhao A-H, Zhang Y-W, Takaishi Y, et al. Two eudesmane sesquiterpenes from *Laggera pterodonta*. J Asian Nat Prod Res 2006;8(4):303-7.
261. Zhao Y, Yue J, Lin Z, Ding J, Sun H. Eudesmane sesquiterpenes from *Laggera pterodonta*. Phytochemistry. 1997;44(3):459-64.
262. Shan Y, Wang X, Zhou X, Kong L, Niwa M. Two minor diterpene glycosides and an eudesman sesquiterpene from *Coleus forskohlii*. Chem Pharm Bull. 2007;55(3):376-81.
263. Zhao Y, Yue J-M, He Y-N, Lin Z-W, Sun H-D. Eleven new eudesmane derivatives from *Laggera pterodonta*. J Nat Prod. 1997;60(6):545-9.
264. Zhao A, Zhu Y, Wei J. Chemical study on *Laggera pterodonta*. Chin Pharm J. 1995;30:264-5.
265. Li S L, Din J K. Acta Botanica Yunnanica. 1993;15:303-5.
266. Kuroyanagi M, Ueno A, Ujiiie K, Sato S. Structures of sesquiterpenes from *Curcuma aromatica* SALISB. Chem Pharm Bull. 1987;35(1):53-9.
267. Bruno M, Maria C, Rodríguez B, Omar AA. Guiane sesquiterpenes from *Teucrium leucocladum*. Phytochemistry. 1993;34(1):245-7.
268. Cody V, Middleton EJ, Harborne JB, Beretz A. Plant Flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, Cellular and Medicinal Properties. Prog Clin Biol Res 1988;280:45-55.
269. Adams R. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. JAM SOC MASS SPECTR. 1997;6(8):671-2.
270. McLafferty FW. The Wiley/NBS registry of mass spectral data 1989.
271. Shahi AK, Tava A. Essential oil composition of three *Cymbopogon* species of Indian Thar desert. J Essent Oil Res. 1993;5(6):639-43.
272. Bouzid W, Yahia M, Abdeddaim M, Aberkane M, Ayachi A. Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de l'aubépine monogyne. LSJ. 2011;12(1):59-69.
273. Bidie AP, N'Guessan BB, Yapo AF, N'Guessan JD, Djaman AJ. Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne. Sciences & Nature. 2011;8(1-2):1-12.
274. Russo A, Izzo A, Cardile V, Borrelli F, Vanella A. Indian medicinal plants as antiradicals and DNA cleavage protectors. Phytomedicine. 2001;8(2):125-32.
275. Lourmat V. FLUO-LINK 312.
276. Kumar A, Pant MC, Singh HS, Khandelwal S. Assessment of the redox profile and oxidative DNA damage (8-OHdG) in squamous cell carcinoma of head and neck. J Cancer Res Ther. 2012;8(2):254.
277. Kuo H-W, Chou S-Y, Hu T-W, Wu F-Y, Chen D-J. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) and genetic polymorphisms in breast cancer patients. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen. 2007;631(1):62-8.
278. Dandona P, Thusu K, Cook S, Snyder B, Makowski J, Armstrong D, et al. Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. The Lancet. 1996;347(8999):444-5.
279. Lezza A, Mecocci P, Cormio A, Beal MF, Cherubini A, Cantatore P, et al. Area-specific differences in OH8dG and mtDNA4977 levels in Alzheimer disease patients and aged controls. J Anti Aging Med. 1999;2(3):209-16.
280. Collins AR, Gedik CM, Olmedilla B, Southon S, Bellizzi M. Oxidative DNA damage measured in human lymphocytes: large differences between sexes and between countries, and correlations with heart disease mortality rates. FASEB J 1998;12(13):1397-400.
281. Miyake H, Hara I, Kamidono S, Eto H. Oxidative DNA damage in patients with prostate cancer and its response to treatment. J Urol 2004;171(4):1533-6.
282. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. Sci World J. 2013;2013.
283. Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouysegu L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. Angew Chem Int Ed Engl. 2011;50(3):586-621.
284. Li A-N, Li S, Zhang Y-J, Xu X-R, Chen Y-M, Li H-B. Resources and biological activities of natural polyphenols. Nutrients. 2014;6(12):6020-47.

285. Čihák R, Grim M, Druga R, Helekal I. Anatomie: Grada; 2002.
286. Rokyta R. Fyziologie pro bakalářská studia v medicíně, přírodovědných a tělovýchovných oborech: ISV; 2000.
287. Harrington AM, Hutson JM, Southwell BR. Cholinergic neurotransmission and muscarinic receptors in the enteric nervous system. *Progr Histochem Cytochem*. 2010;44(4):173-202.
288. Ajay M, Gilani A-uH, Mustafa MR. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. *Life Sci*. 2003;74(5):603-12.
289. Mañé N, Viais R, Martínez-Cutillas M, Gallego D, Correia-de-Sá P, Jiménez M. Inverse gradient of nitregeric and purinergic inhibitory cotransmission in the mouse colon. *Acta Physiol*. 2016;216(1):120-31.
290. Lecci A, Santicioli P, Maggi CA. Pharmacology of transmission to gastrointestinal muscle. *Curr Opin Pharmacol*. 2002;2(6):630-41.
291. Brading AF. How do drugs initiate contraction in smooth muscles. *Trends Pharmacol Sci*. 1981;2:261-5.
292. Badria F, Hetta M, Sarhan RM, El-Din ME. Lethal effects of *Helianthemum lippii* (L.) on *Acanthamoeba castellanii* cysts *in vitro*. *Korean J Parasitol*. 2014;52(3):243.
293. Tona L, Kambu K, Ngimbi N, Mesia K, Penge O, Lusakibanza M, et al. Antiamoebic and spasmolytic activities of extracts from some antidiarrhoeal traditional preparations used in Kinshasa, Congo. *Phytomedicine*. 2000;7(1):31-8.
294. Weimann C, Göransson U, Pongprayoon-Claeson U, Claeson P, Bohlin L, Rimpler H, et al. Spasmolytic effects of *Baccharis conferta* and some of its constituents. *J Pharm Pharmacol* 2002;54(1):99-104.
295. Heinrich M. Ethnobotany and natural products: the search for new molecules, new treatments of old diseases or a better understanding of indigenous cultures? *Curr Top Med Chem*. 2003;3(2):141-54.
296. Mendel M, Chłopecka M, Dziekan N, Karlik W. Antispasmodic effect of selected Citrus flavonoids on rat isolated jejunum specimens. *Eur J Pharmacol*. 2016;791:640-6.
297. Mendel M, Chłopecka M, Dziekan N, Karlik W, Wiechetek M. Participation of cholinergic pathways in α -hederin-induced contraction of rat isolated stomach strips. *Phytomedicine*. 2012;19(7):591-5.
298. Yagi S, Babiker R, Tzanova T, Schohn H. Chemical composition, antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities of essential oils from aromatic plants growing in Sudan. *Asian Pac J Trop Med*. 2016;9(8):763-70.
299. de Souza Chagas AC, de Barros LD, Cotinguiba F, Furlan M, Giglioti R, de Sena Oliveira MC, et al. In vitro efficacy of plant extracts and synthesized substances on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitol Res* 2012;110(1):295-303.
300. Lee C-W, Sarna SK, Singaram C, Casper MA. Ca²⁺ channel blockade by verapamil inhibits GMCs and diarrhea during small intestinal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1997;273(4):G785-G94.
301. Mata R, Rojas A, Acevedo L, Estrada S, Calzada F, Rojas I, et al. Smooth muscle relaxing flavonoids and terpenoids from *Conyza filaginoides*. *Planta med*. 1997;63(01):31-5.
302. Wang H-P, Lu J-F, Zhang G-L, Li X-Y, Peng H-Y, Lu Y, et al. Endothelium-dependent and-independent vasorelaxant actions and mechanisms induced by total flavonoids of *Elsholtzia splendens* in rat aortas. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2014;38(2):453-9.
303. Hnatyszyn O, Moscatelli V, Rondina R, Costa M, Arranz C, Balaszczuk A, et al. Flavonoids from *Achyrocline satureioides* with relaxant effects on the smooth muscle of Guinea pig corpus cavernosum. *Phytomedicine*. 2004;11(4):366-9.
304. Botha C, Gehring R, Van Rooyen J, Venter D. The effect of three bufadienolide cardiac glycosides on contraction of isolated rat jejunum. *OJVR*. 2002;69(3):243-6.
305. Dalziel J, Dunstan K, Finch S. Combined effects of fungal alkaloids on intestinal motility in an *in vitro* rat model. *Anim Sci J*. 2013;91(11):5177-82.
306. Ishizuka M, Koga I, Zaima K, Kaneda T, Hirasawa Y, Hadi AHA, et al. Vasorelaxant effects on rat aortic artery by two types of indole alkaloids, naucline and cadamine. *J Nat Med*. 2013;67(2):399-403.
307. Lo MW, Matsumoto K, Iwai M, Tashima K, Kitajima M, Horie S, et al. Inhibitory effect of Iboga-type indole alkaloids on capsaicin-induced contraction in isolated mouse rectum. *J Nat Med*. 2011;65(1):157-65.
308. Reiter M, Brandt W. Relaxant effects on tracheal and ileal smooth muscles of the guinea pig. *Arzneimittel-Forschung*. 1985;35(1A):408-14.

309. Bhardwaj P, Khanna D, Balakumar P. Catechin averts experimental diabetes mellitus-induced vascular endothelial structural and functional abnormalities. *Cardiovasc Toxicol*. 2014;14(1):41-51.
310. Ihm S-H, Lee J-O, Kim S-J, Seung K-B, Schini-Kerth VB, Chang K, et al. Catechin prevents endothelial dysfunction in the prediabetic stage of OLETF rats by reducing vascular NADPH oxidase activity and expression. *Atherosclerosis*. 2009;206(1):47-53.
311. Li Q, Niu S, Wang R, Li Y, Zhang R, Zhu D. Mechanisms that underlie the induction of vasodilation in pulmonary artery by rutin. *Int Angiol*. 2012;31(6):557-64.
312. Baker LA, Horbury MD, Greenough SE, Allais F, Walsh PS, Habershon S, et al. Ultrafast photoprotecting sunscreens in natural plants. *J Phys Chem Lett*. 2016;7(1):56-61.
313. de Oliveira LM, de Oliveira TS, da Costa RM, de Souza Gil E, Costa EA, Passaglia RdCAT, et al. The vasorelaxant effect of gallic acid involves endothelium-dependent and-independent mechanisms. *Curr Vasc Pharmacol*. 2016;81:69-74.
314. Pashikanti S, de Alba DR, Boissonneault GA, Cervantes-Laurean D. Rutin metabolites: novel inhibitors of nonoxidative advanced glycation end products. *Free Radic Biol Med* 2010;48(5):656-63.
315. Cai Z-Y, Li X-M, Liang J-P, Xiang L-P, Wang K-R, Shi Y-L, et al. Bioavailability of tea catechins and its improvement. *Molecules*. 2018;23(9):2346.
316. Konishi Y, Hitomi Y, Yoshioka E. Intestinal absorption of p-coumaric and gallic acids in rats after oral administration. *J Agric Food Chem*. 2004;52(9):2527-32.
317. Feliciano RP, Mills CE, Istas G, Heiss C, Rodriguez-Mateos A. Absorption, metabolism and excretion of cranberry (poly) phenols in humans: a dose response study and assessment of inter-individual variability. *Nutrients*. 2017;9(3):268.
318. Paredes MD, Romecín P, Atucha NM, O'Valle F, Castillo J, Ortiz M, et al. Beneficial effects of different flavonoids on vascular and renal function in L-NAME hypertensive rats. *Nutrients*. 2018;10(4):484.
319. Paredes MD, Romecín P, Atucha NM, O'Valle F, Castillo J, Ortiz MC, et al. Moderate effect of flavonoids on vascular and renal function in spontaneously hypertensive rats. *Nutrients*. 2018;10(8):1107.
320. Campanero MA, Escolar M, Perez G, Garcia-Quetglas E, Sadaba B, Azanza JR. Simultaneous determination of diosmin and diosmetin in human plasma by ion trap liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry: application to a clinical pharmacokinetic study. *J Pharm Biomed Anal*. 2010;51(4):875-81.
321. Cunha J, Campestrini F, Calixto J, Scremin A, Paulino N. The mechanism of gentisic acid-induced relaxation of the guinea pig isolated trachea: the role of potassium channels and vasoactive intestinal peptide receptors. *Braz J Med Biol Res* 2001;34(3):381-8.
322. Lin Y-T, Wu B-N, Wu J-R, Lo Y-C, Chen L-C, Chen J. Vasomolol: an ultra short-acting and vasorelaxant vanilloid type β 1-adrenoceptor antagonist. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1996;28(1):149-57.
323. McKay DL, Chen C-YO, Zampariello CA, Blumberg JB. Flavonoids and phenolic acids from cranberry juice are bioavailable and bioactive in healthy older adults. *Food chem*. 2015;168:233-40.

ANNEXES

ANNEXE I

Concentration d'extrait	Volume requis	Concentration dans le bain organique
10mg/ml	10	10µg/ml
	20	30µg/ml
	70	100µg/ml
30mg/ml	20	300µg/ml
	70	1mg/ml
100mg/ml	20	3mg/ml
	70	10mg/ml
300mg /ml	200	30mg/ml
	700	100mg/ml

Le volume de la dilution, a été ajouté au bain organique, pour obtenir la concentration souhaitée de l'extrait.

ANNEXE II

Enregistrement du polygraphe

1g	_____	7 mm
x (g)	_____	38mm
$x = 38/7 \approx 5,43$		

Un exemple du calcul – Transfert de la réponse de millimètres en gramme.

5,43 g	_____	26,67 mg
x (g)	_____	1000 mg
$x = 5,43/26,67 \times 1000 = 203,55 \text{ (g/g)}$		

Un exemple de calcul – Evaluation de la réponse selon le poids du tissu

ANNEXE III

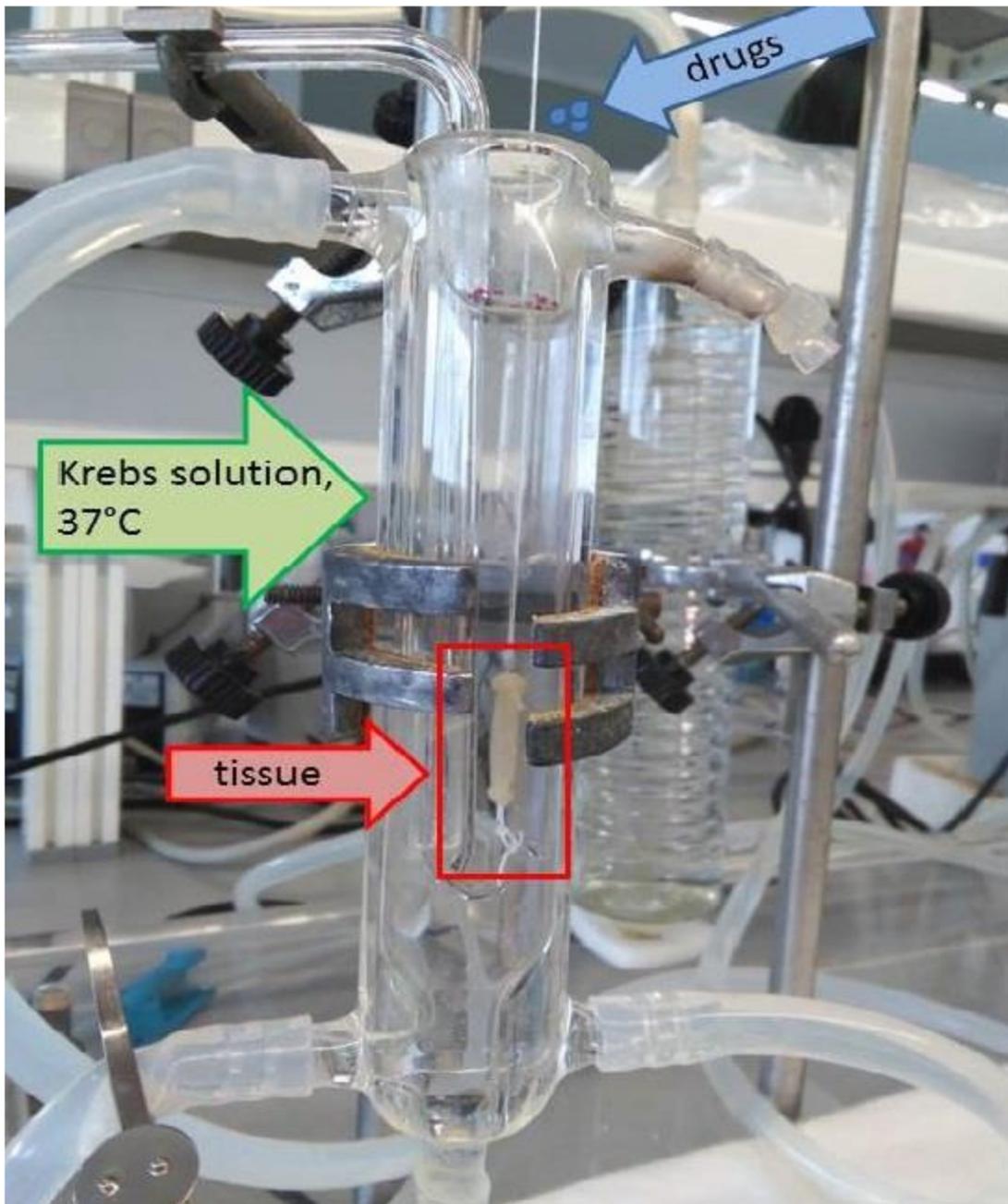


Figure V.33 : Bain organique avec le tissu monté, rempli avec la solution Krebs (37°C)

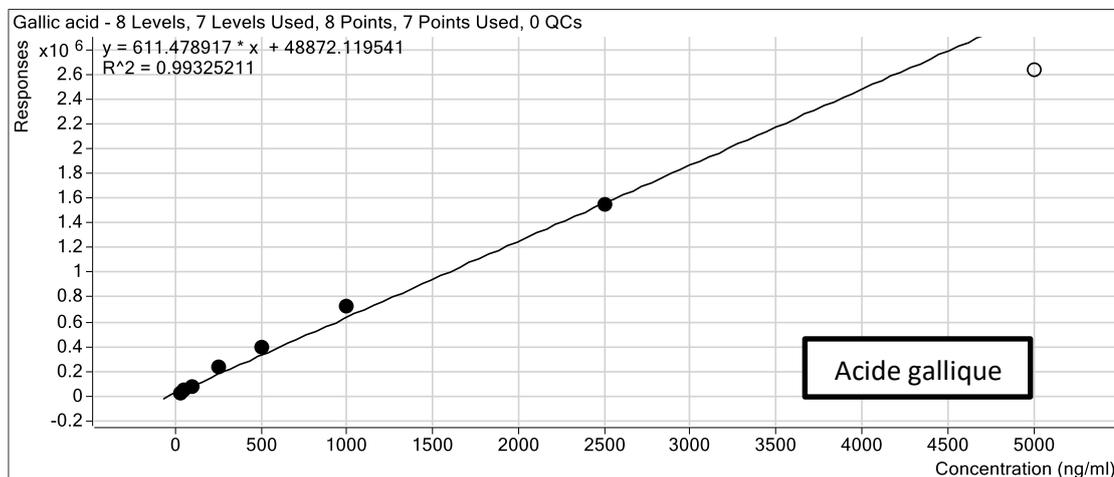
ANNEXE IV



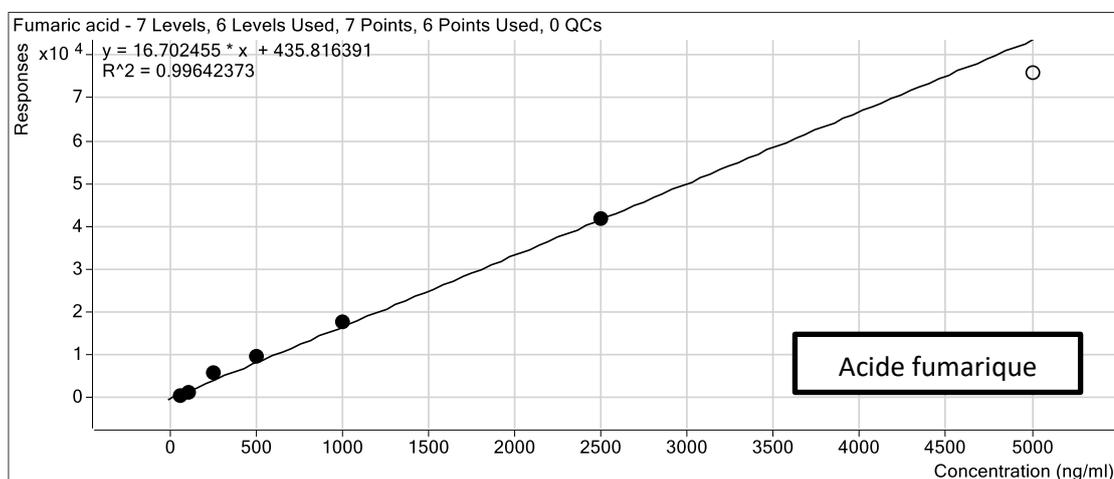
Figure V.34 : Bain organique avec le tissu monté, rempli avec l'extrait de plante.

Données complémentaires

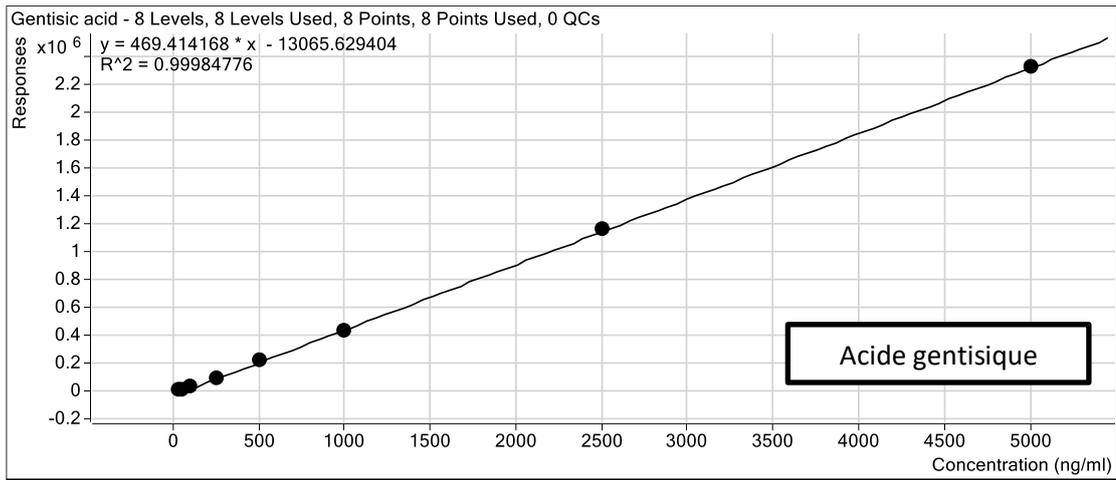
Courbes d'étalonnage obtenues avec des étalons des différents phénols et flavonoïdes trouvés dans les différents extraits.



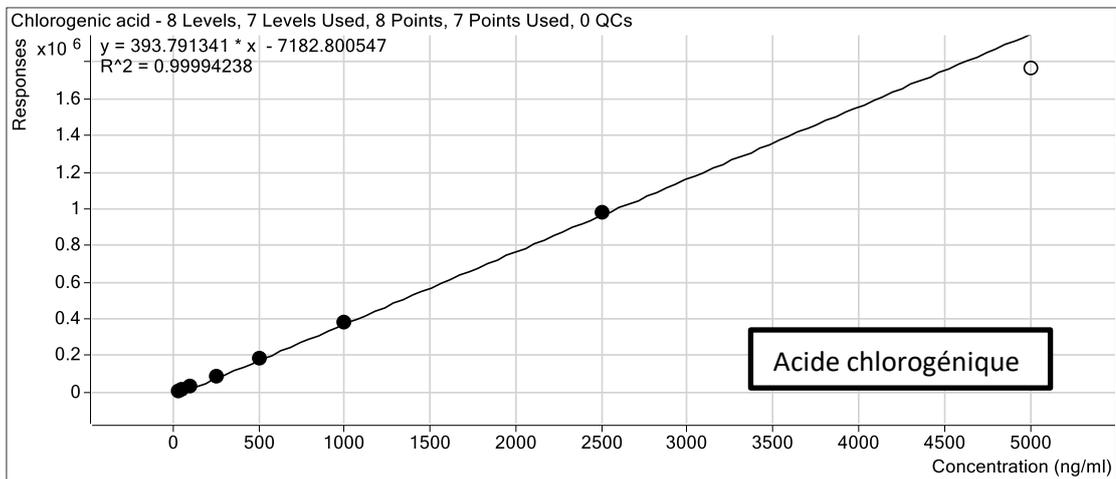
Supplément Figure 1. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique



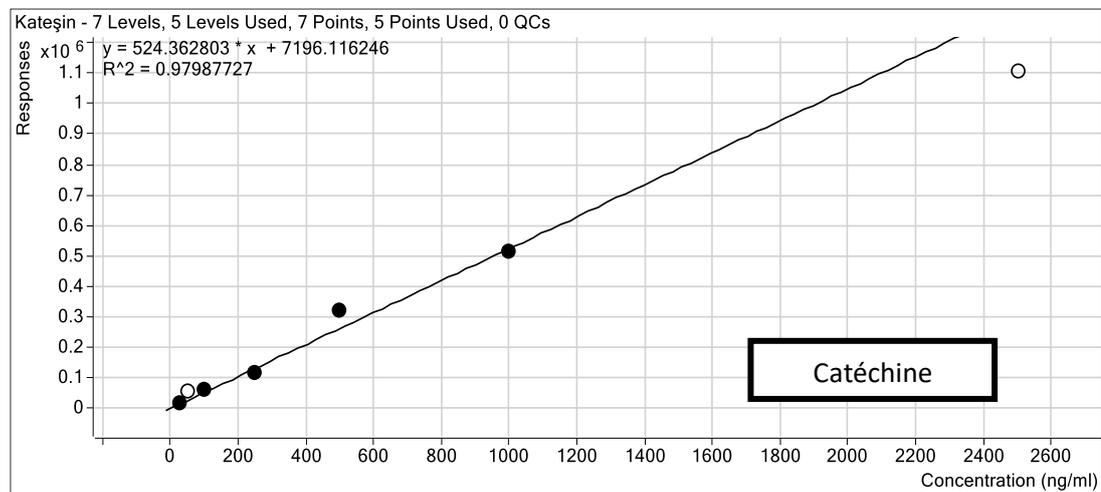
Supplément Figure 2. Courbe d'étalonnage de l'acide fumarique



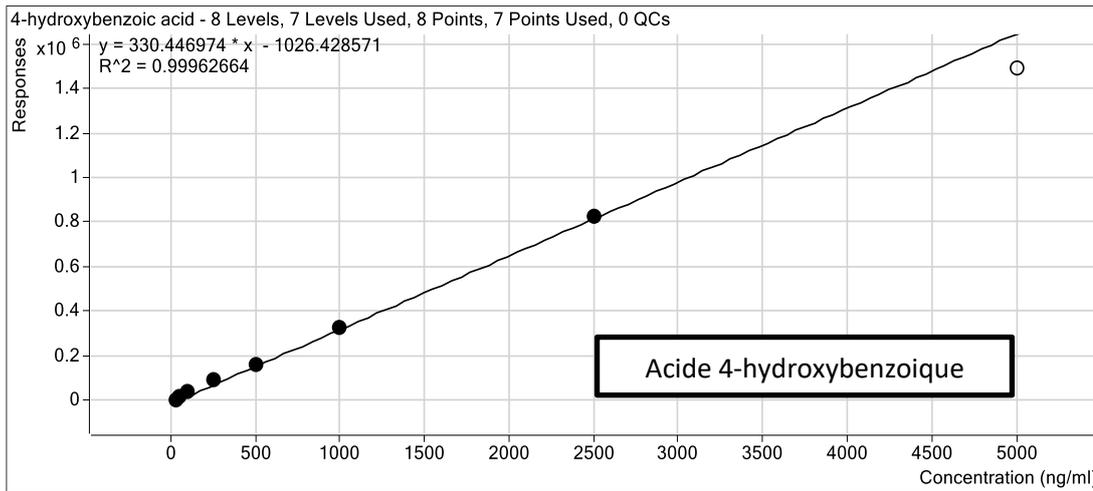
Supplément Figure 3. Courbe d'étalonnage de l'acide gentisique



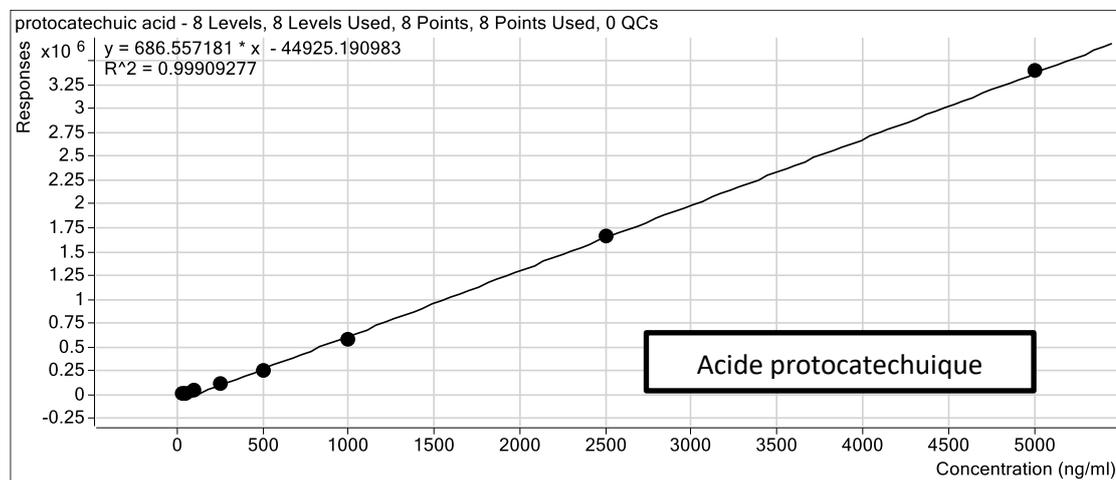
Supplément Figure 4. Courbe d'étalonnage de l'acide chlorogénique



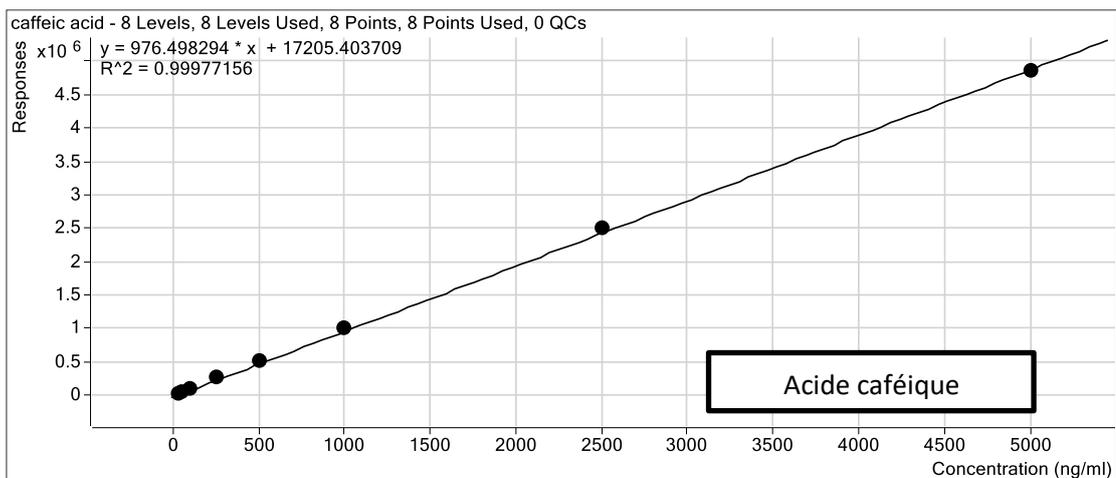
Supplément Figure 5. Courbe d'étalonnage de la catéchine



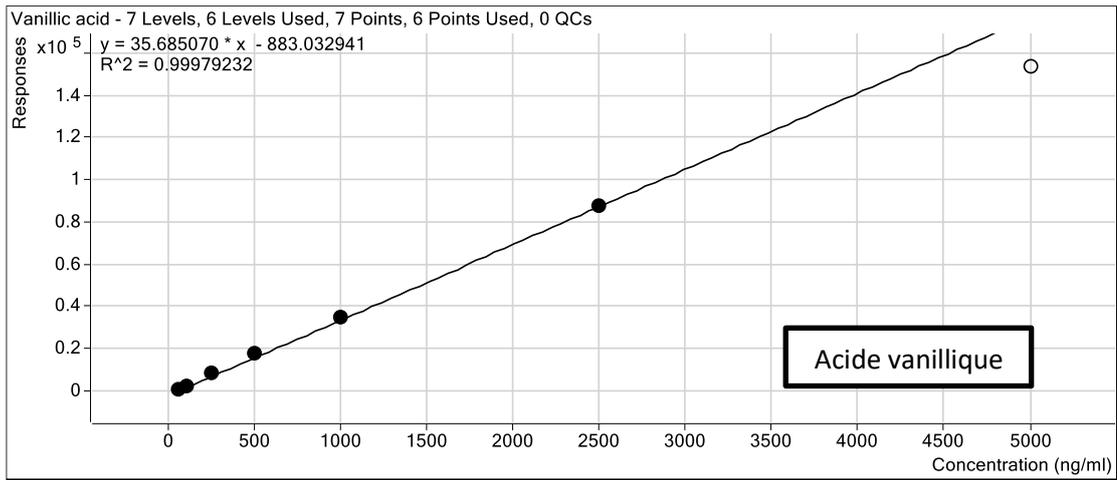
Supplément Figure 6. Courbe d'étalonnage de l'acide 4-hydroxybenzoïque



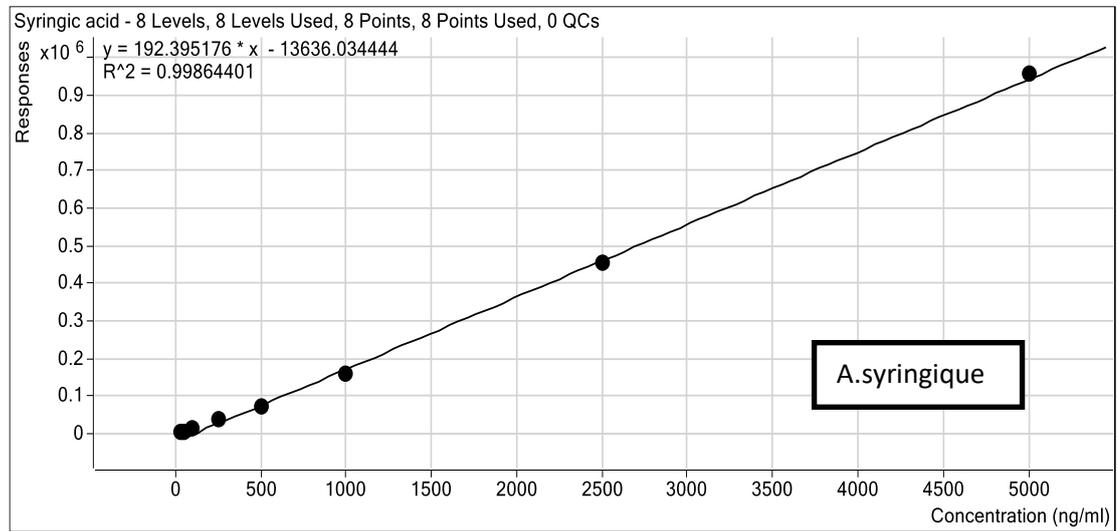
Supplément Figure 7. Courbe d'étalonnage de l'acide protocatechuique



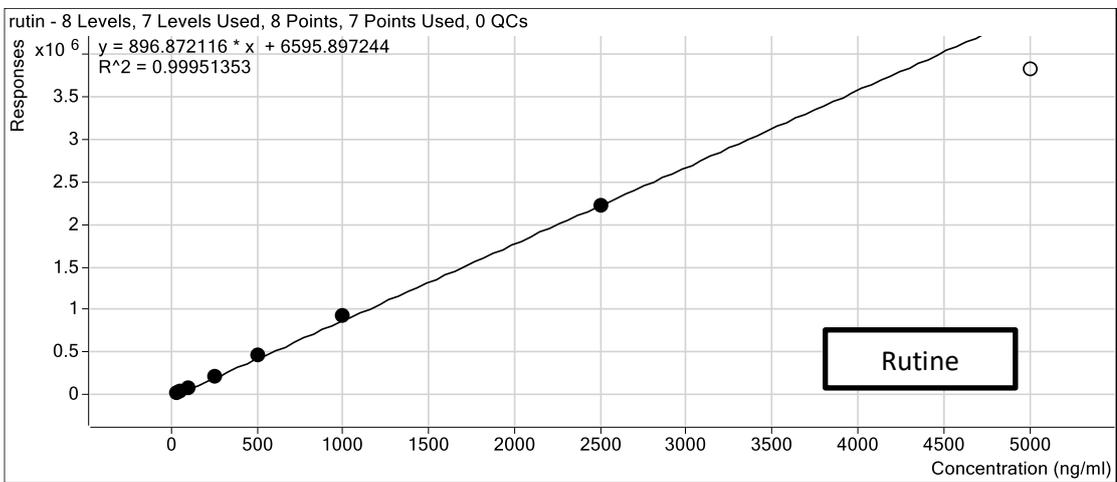
Supplément Figure 8. Courbe d'étalonnage de l'acide caféique



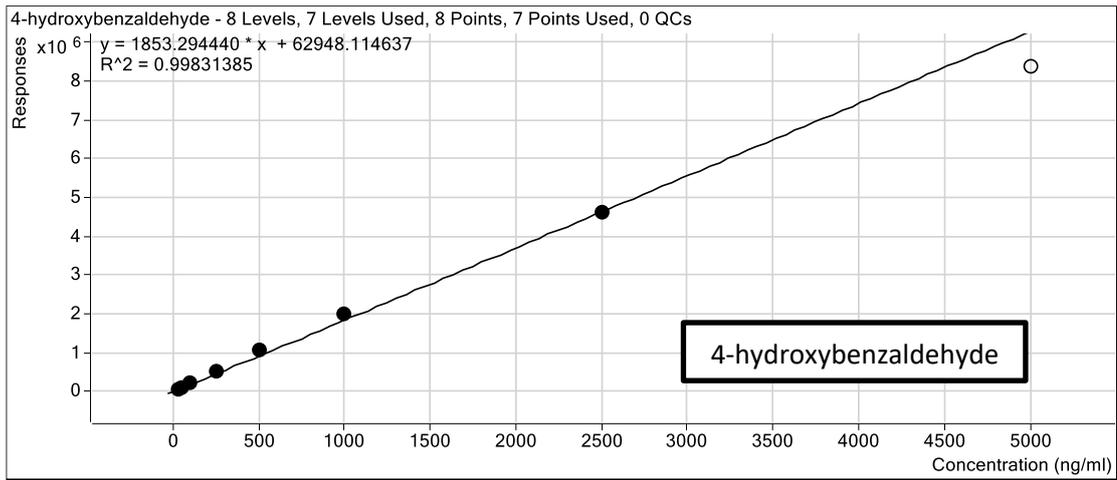
Supplément Figure 9. Courbe d'étalonnage de l'acide vanillique



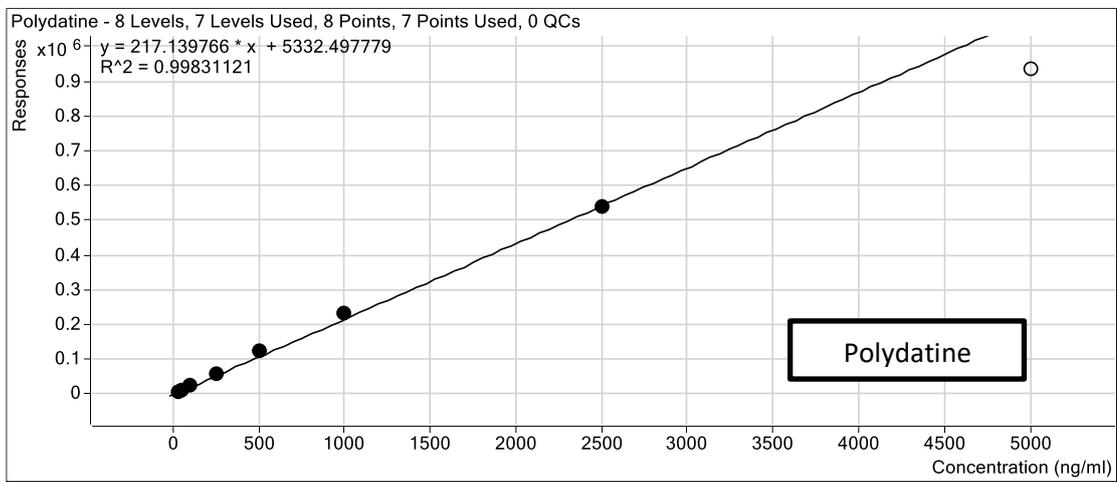
Supplément Figure 10. Courbe d'étalonnage de l'acide syringique



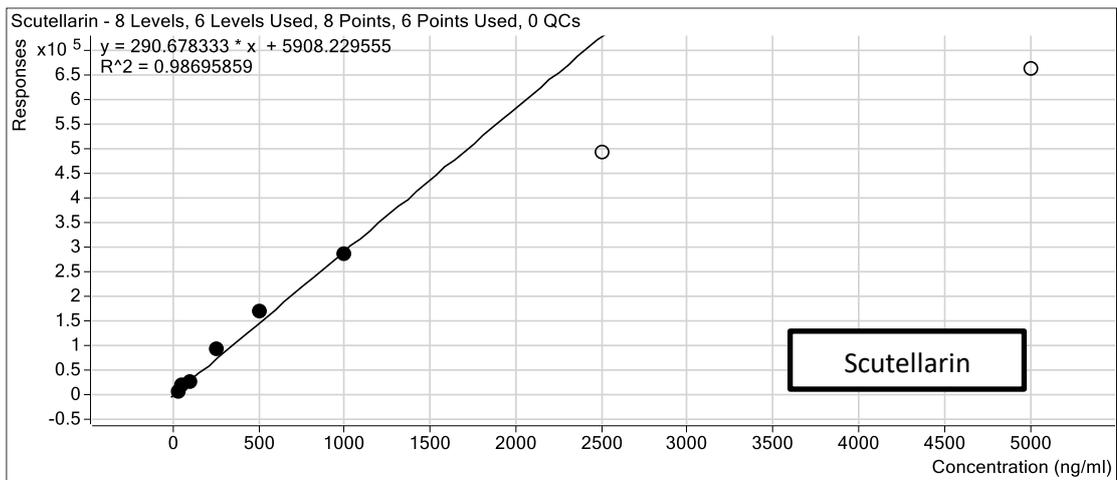
Supplément Figure 11. Courbe d'étalonnage de la rutine



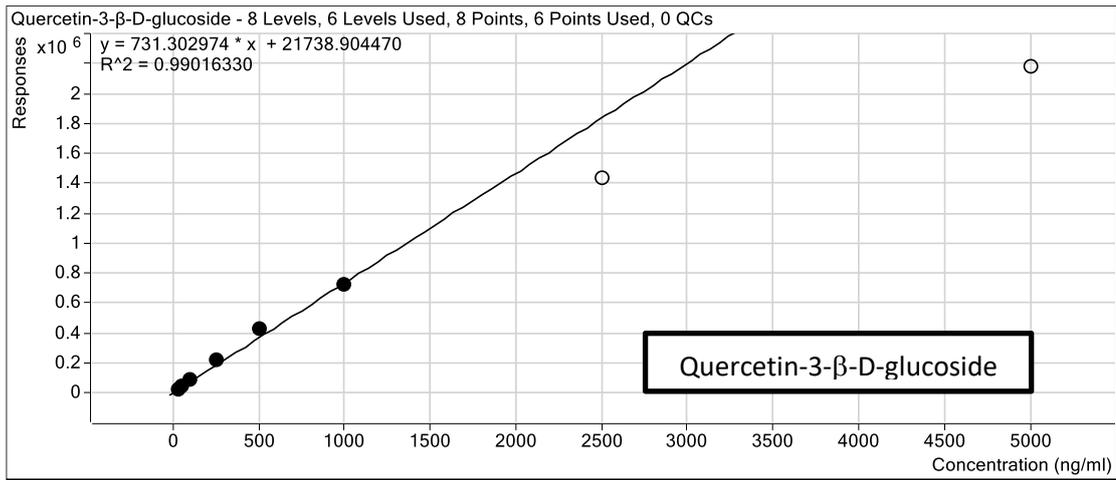
Supplément Figure 12. Courbe d'étalonnage du 4-hydroxybenzaldéhyde



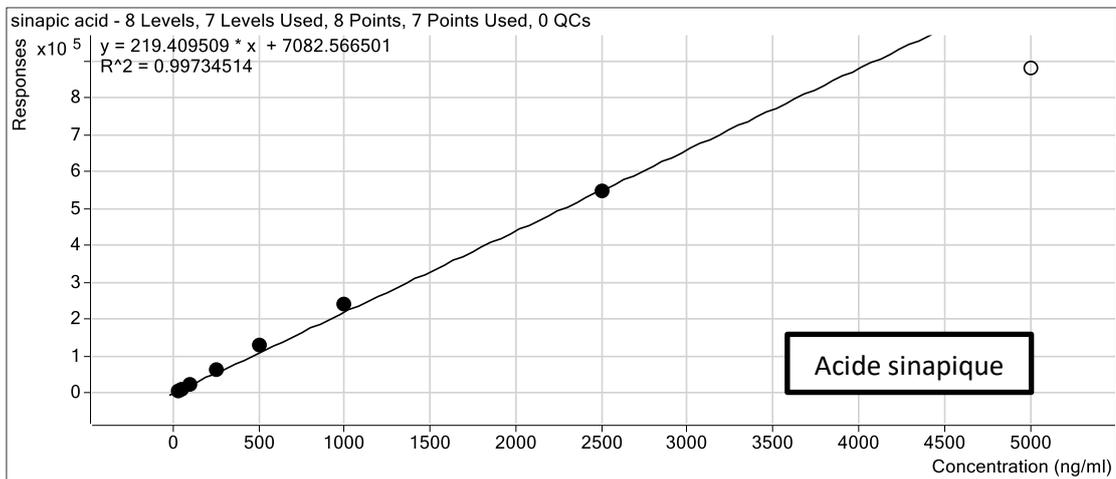
Supplément Figure 13. Courbe d'étalonnage du polydatine



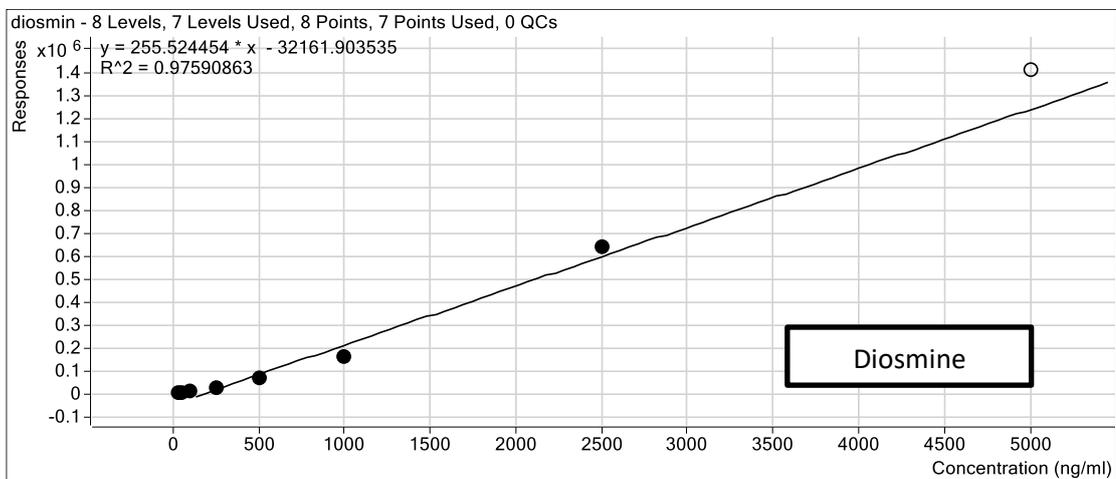
Supplément Figure 14. Courbe d'étalonnage de la scutellarin



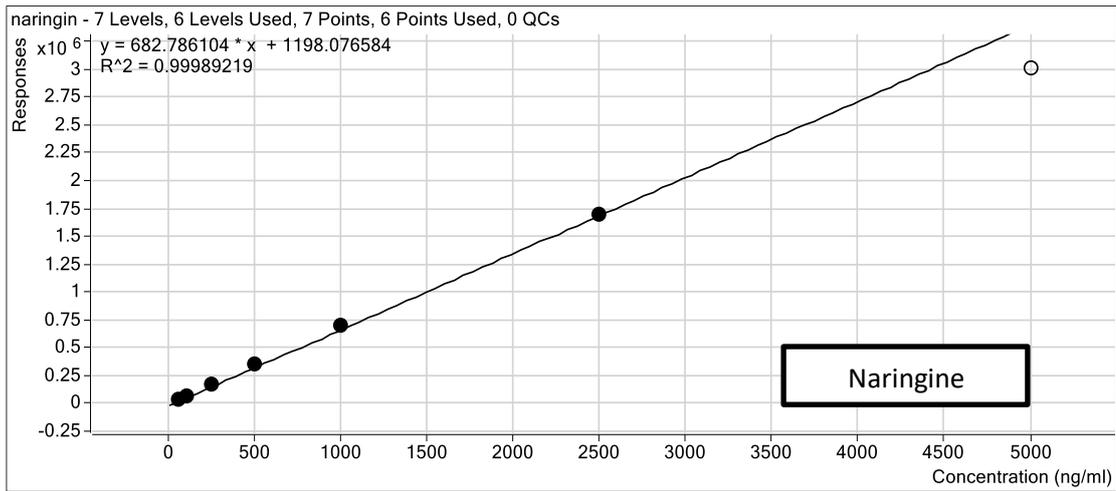
Supplément Figure 15. Courbe d'étalonnage de la quercetine-3-β-D-glucoside



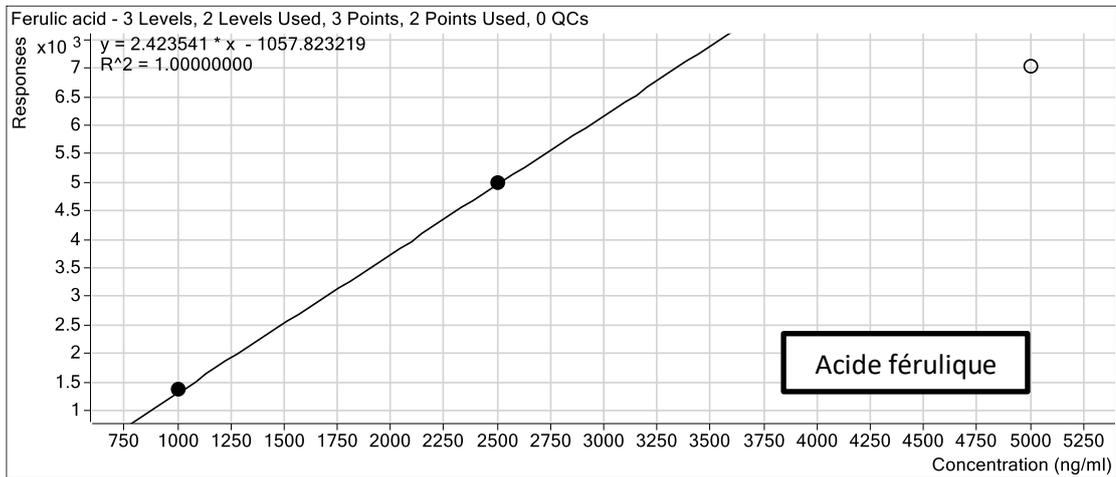
Supplément Figure 16. Courbe d'étalonnage de l'acide sinapique



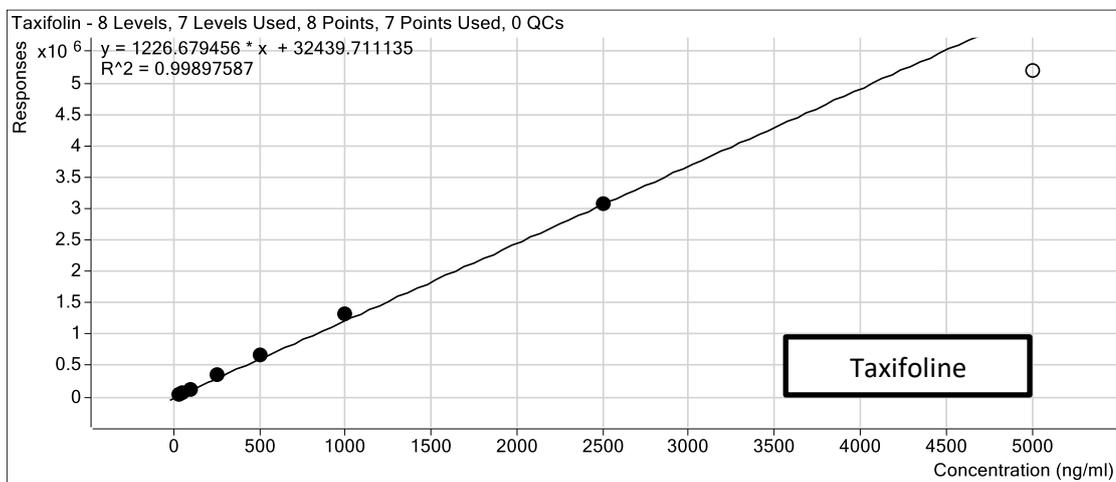
Supplément Figure 17. Courbe d'étalonnage de la diosmine



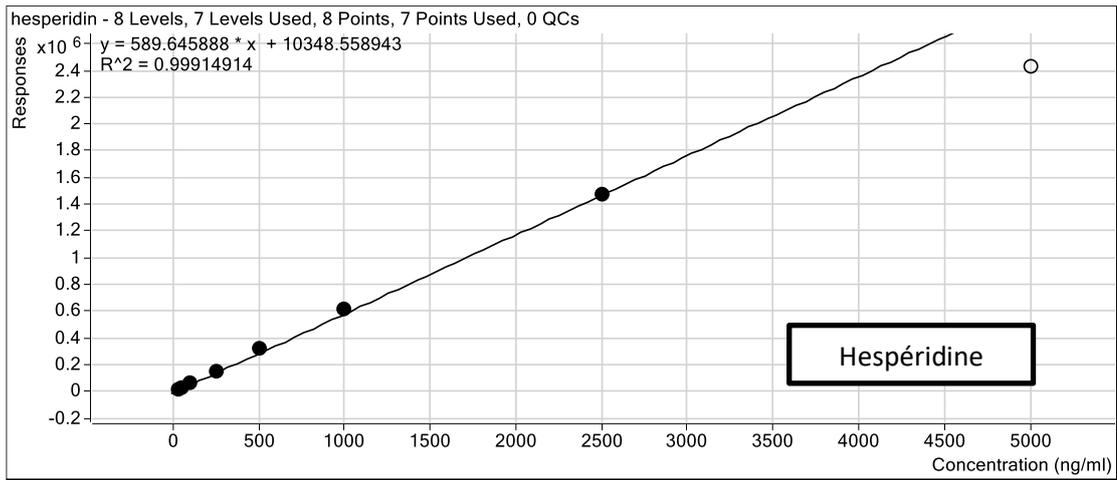
Supplément Figure 18. Courbe d'étalonnage de la naringine



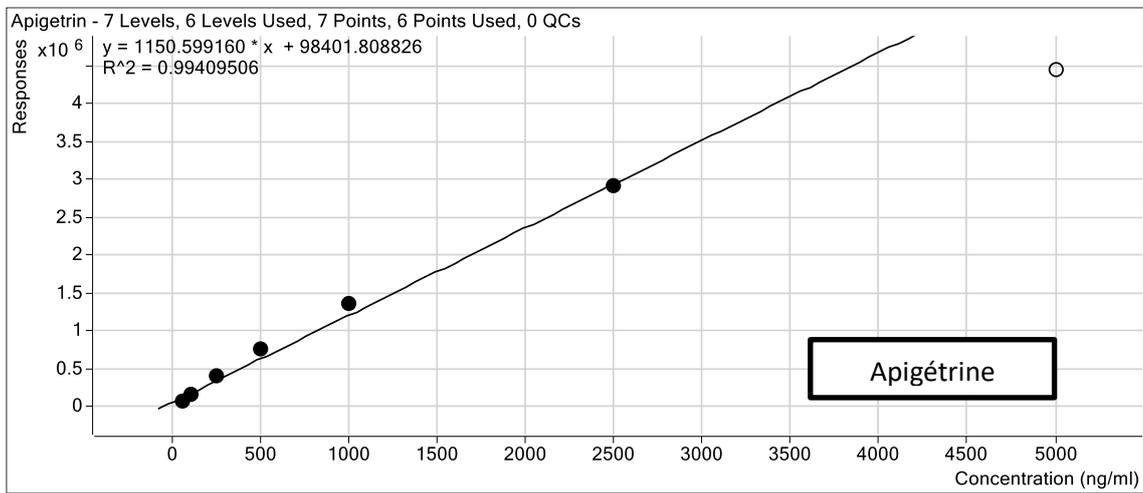
Supplément Figure 19. Courbe d'étalonnage de l'acide férulique



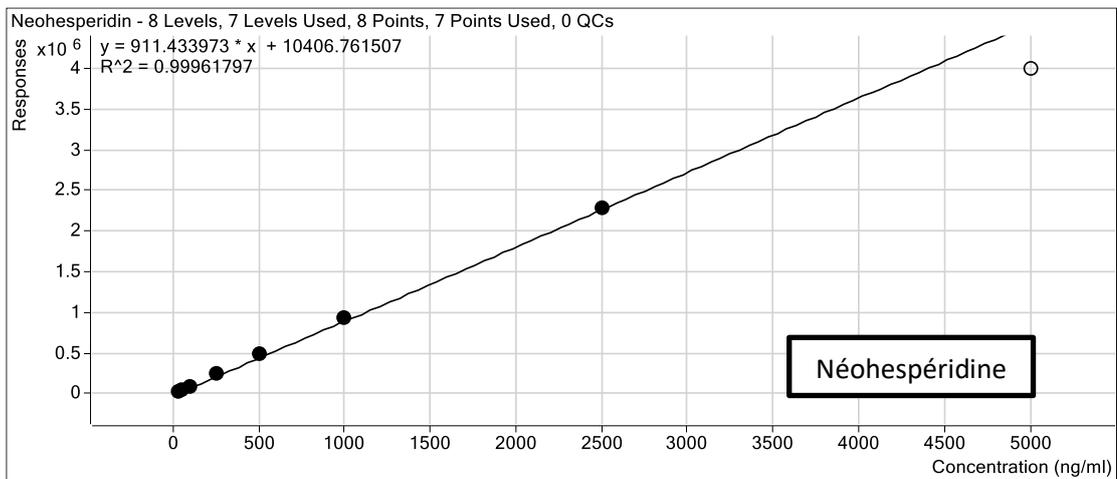
Supplément Figure 20. Courbe d'étalonnage de la taxifoline



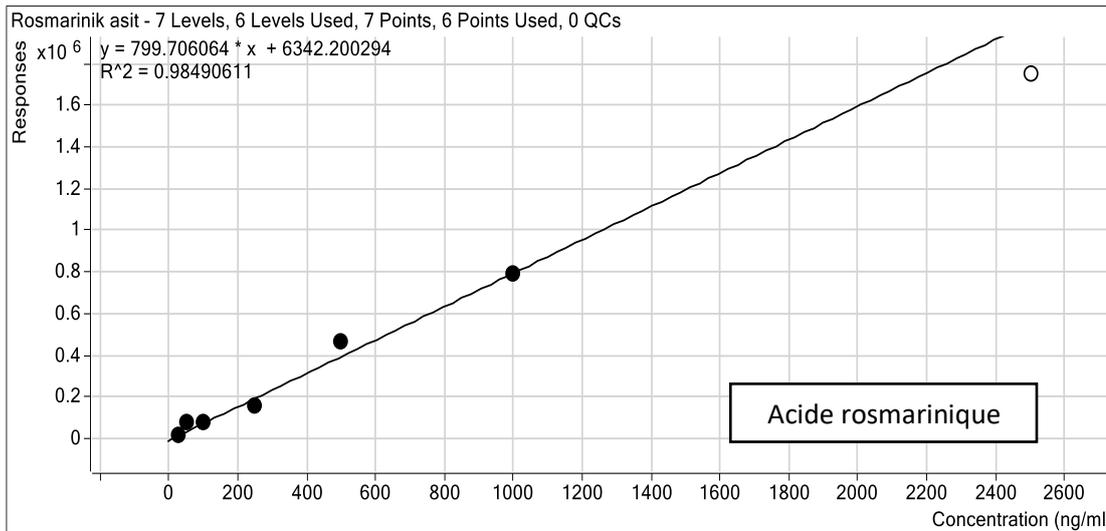
Supplément Figure 21. Courbe d'étalonnage de l'hespéridine



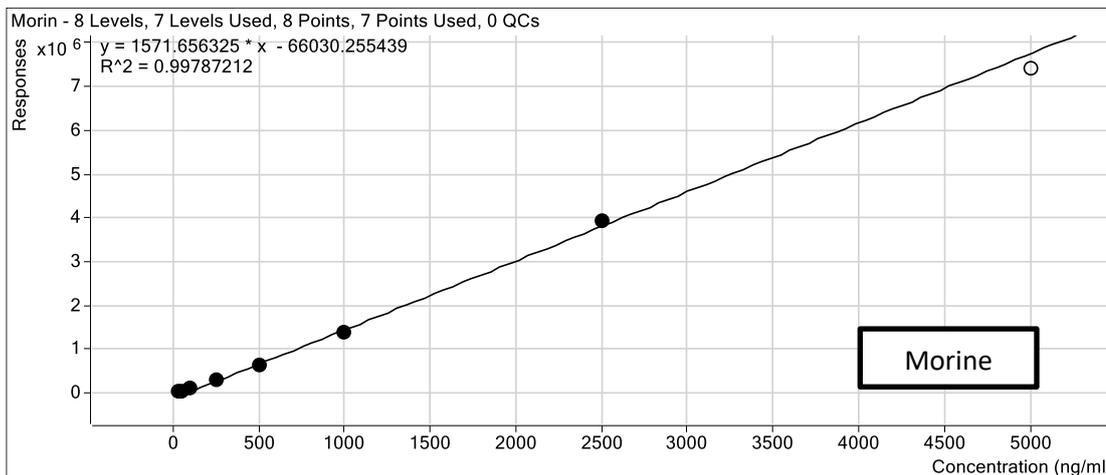
Supplément Figure 22. Courbe d'étalonnage de l'apigétrine



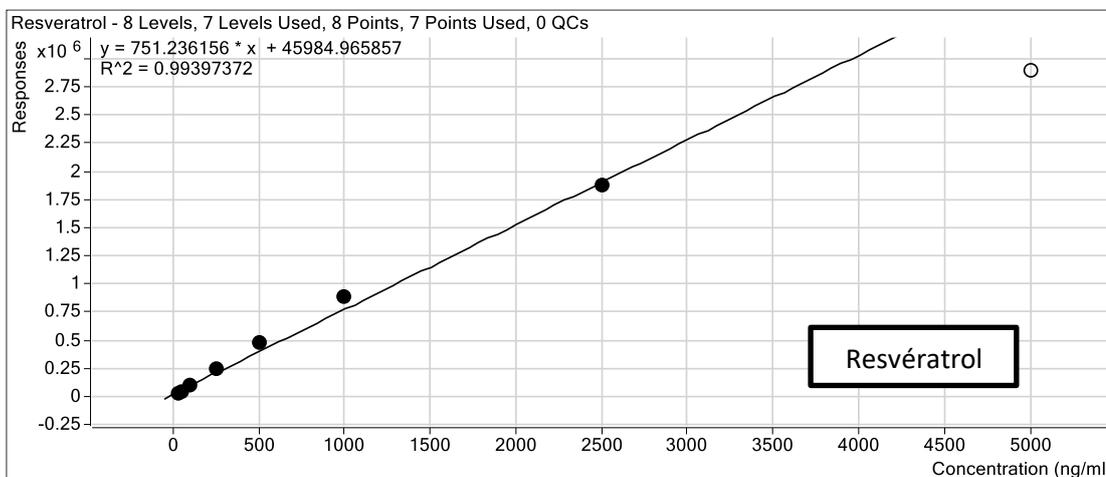
Supplément Figure 23. Courbe d'étalonnage de la néohespéridine



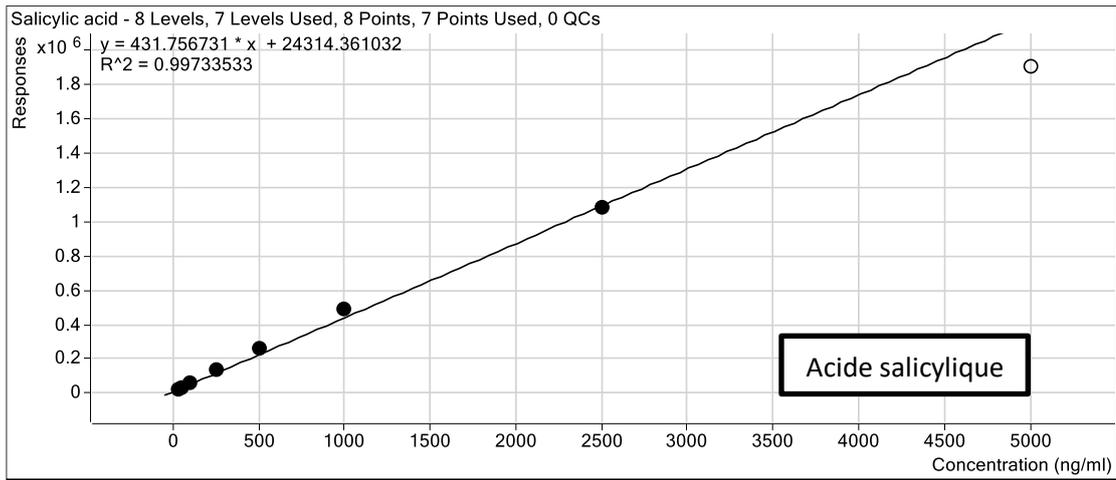
Supplément Figure 24. Courbe d'étalonnage de l'acide rosmarinique



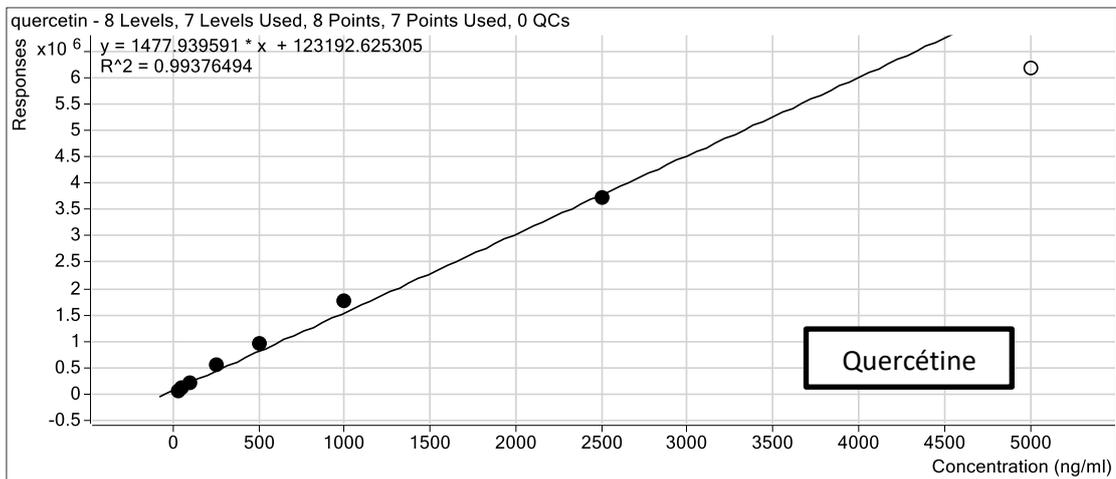
Supplément Figure 25. Courbe d'étalonnage de la morine



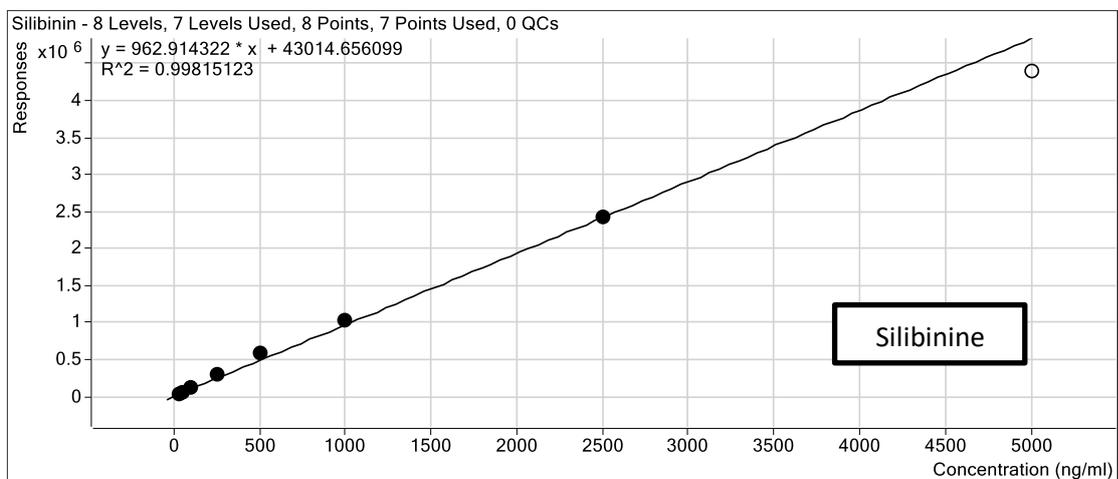
Supplément Figure 26. Courbe d'étalonnage du resvératrol



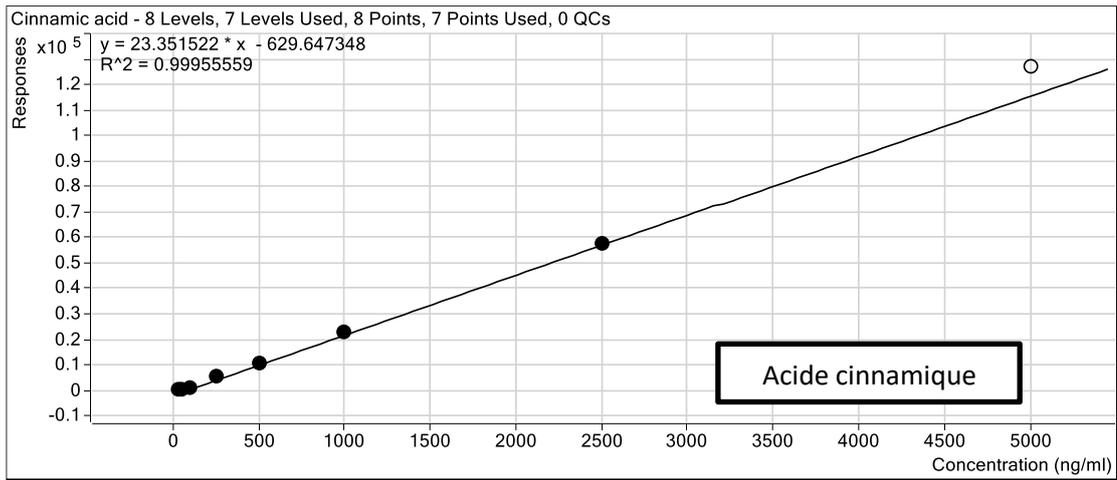
Supplément Figure 27. Courbe d'étalonnage de l'acide salicylique



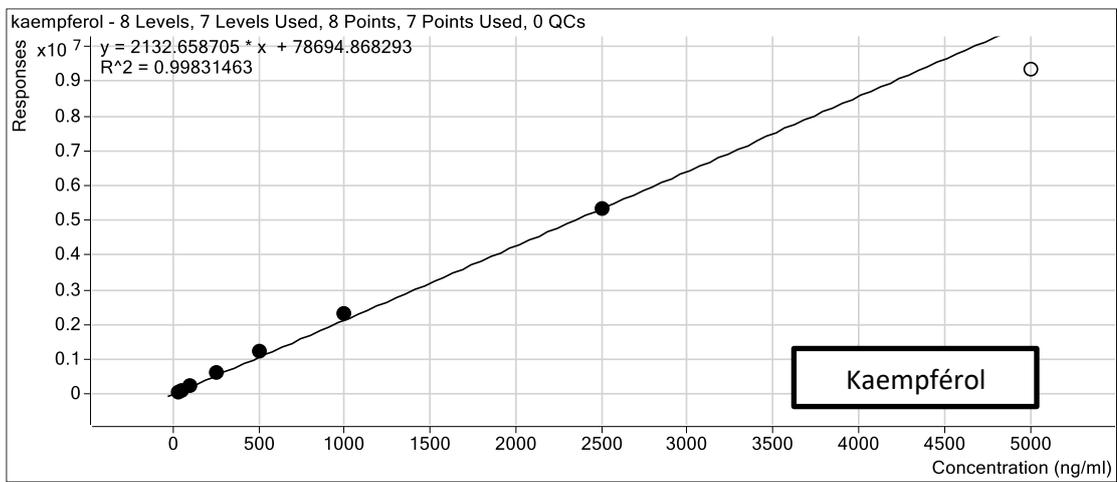
Supplément Figure 28. Courbe d'étalonnage de la quercétine



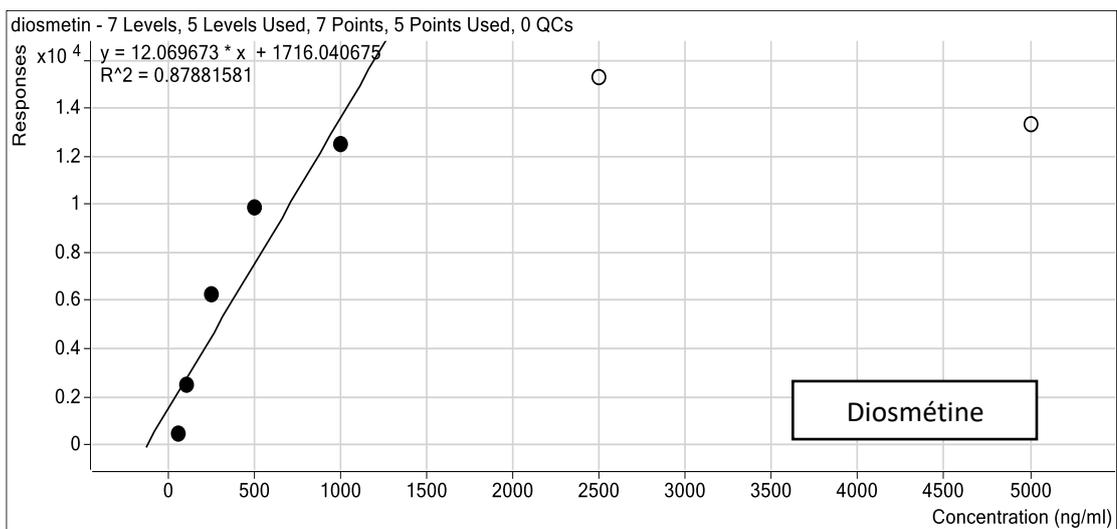
Supplément Figure 29. Courbe d'étalonnage de la silibinine



Supplément Figure 30. Courbe d'étalonnage de l'acide cinnamique



Supplément Figure 31. Courbe d'étalonnage du kaempférol



Supplément Figure 32. Courbe d'étalonnage de la diosmétique

Résumé

Le présent travail est consacré à l'étude phytochimique, biologique et pharmacologique de deux espèces endémiques sahariennes ; *Helianthemum lippii* (Cistaceae) et *Cymbopogon schoenanthus* (Poaceae).

L'extraction des deux espèces suivie par les séparations chromatographiques (CC, CCM et HPLC semi-préparative), ont conduit à isoler et identifier à l'aide des méthodes spectroscopiques (RMN 1D et 2D) 6 composés parmi lesquels deux stérols, ainsi que quatre sesquiterpènes : le Stigmastérol, le β -Sitostérol, le (1S,4aa)-4Methylene-6-(1-hydroxy-&-methylethyl)-8a-b-methyl-decahydroydronaphtalene-Ab-ol 1S, 7S, 10S, le eudesm-4(14)-en-1 α -11 α -diol(hydroxy- β -eudesmol), 4 α , 11-dihydroxy-7-epimer-eudesmandiol (7-epi-cryptomeridiol), le 4 β , 7 β , 11-enantioeudesmantriol (Pterodontriol), et le 4 β ,6 β ,10 α -trihydroxy guaiane sesquiterpène (Teuclatriol).

L'analyse chromatographique des huiles essentielles de *Cymbopogon schoenanthus* a montré que les hydrocarbures représentaient 26,7% tandis que la fraction sesquiterpène atteignait 40%. L'analyse HPLC-TOF/MS des extraits AcOEt et *n*-BuOH des deux espèces a suggéré la présence de 32 acides phénoliques et flavonoïdes en différentes proportions.

L'Efficacité d'inhibition des dommages à l'ADN et l'évaluation de l'activité anticancéreuse portée sur les extraits AcOEt et *n*-BuOH des deux espèces a démontré une particularité observée dans *Helianthemum lippii* sur l'effet antioxydant ainsi l'effet antiprolifératif.

L'étude pharmacologique a été portée sur l'effet des extraits sur le colon distal des rats Wistar ; qui ont montré un effet relaxant marqué sur le côlon distal isolé du rat qui pourrait représenter un mécanisme sous-jacent à l'utilisation traditionnelle de ces plantes pour les conditions gastro-intestinales.

Des études plus approfondies nous aiderons à bien comprendre les métabolites responsables de l'effet et mécanisme impliqué.

Mots clés : *Helianthemum lippii*, *Cymbopogon schoenanthus*, séparations chromatographiques, méthodes spectroscopiques, huiles essentielles, analyse HPLC-TOF/MS, activité antioxydante, activité anticancéreuse, colon distal du rat, effet relaxant.

Abstract

This work is devoted to the phytochemical, biological and pharmacological study of two endemic Saharan species; *Helianthemum lippii* (Cistaceae) and *Cymbopogon schoenanthus* (Poaceae).

The extraction of the two species followed by the chromatographic separations (CC, CCM and HPLC semi-preparative), led to isolate and identify using spectroscopic methods (1D and 2D NMR) 6 compounds among which two sterols, as well as four sesquiterpenes: Stigmasterol, β - Sitosterol, (1S,4aa)-4Methylene-6-(1-hydroxy-&-methylethyl)-8a-b-methyl-decahydroydronaphthalene-Ab-ol 1S, 7S, 10S, eudesm-4(14)-en-1 α -11 α -diol(hydroxy- β -eudesmol), 4 α , 11-dihydroxy-7-epimer-eudesmandiol (7-epi-cryptomeridiol), 4 β , 7 β , 11-enantioeudesmantriol (Pterodotriol), 4 β ,6 β ,10 α -trihydroxy guaiane sesquiterpène (Teuclatriol).

Chromatographic analysis of the essential oils of *Cymbopogon schoenanthus* showed that the hydrocarbons represented 26.7% while the sesquiterpene fraction reached 40%. The HPLC-TOF / MS analysis of the AcOEt and *n*-BuOH extracts of the two species suggested the presence of 32 phenolic acids and flavonoids which were present in different proportions

The efficacy of inhibiting DNA damage and the evaluation of the anticancer activity carried out on the EtOAc and *n*-BuOH extracts of the two species demonstrated a particularity observed in *Helianthemum lippii* on the antioxidant effect and thus the antiproliferative effect.

The pharmacological study was carried out on the effect of the extracts on the distal colon of Wistar rats; which have shown a marked relaxing effect on the isolated distal colon of the rat which could represent an underlying mechanism for the traditional use of these plants for gastrointestinal conditions.

Further studies will help us understand the metabolites responsible for the effect and mechanism involved.

Key words: *Helianthemum lippii*, *Cymbopogon schoenanthus*, chromatographic separations, spectroscopic methods, essential oils, HPLC-TOF / MS analysis, antioxidant activity, anticancer activity, rat distal colon, relaxing effect

ملخص

كرس هذا العمل للدراسة الفيتوكيميائية والبيولوجية والفارماكولوجية لنبتتين أصليتين من الصحراء الجزائرية؛ هي *Helianthemum lippii* (Cistaceae) و *Cymbopogon schoenanthus* (Poaceae).

عملية استخلاص النبتتين تبعها فصل كروماتوغرافي (العمود، الطبقة الرقيقة، HPLC) و التي مكنتنا من عزل 6 مركبات 2 ستيرول و 4 سيسكويتربينات، تم التعرف البنيوي لها باستعمال مختلف طرق التحليل الطيفي (RMN 1D, 2D).

Stigmastérol, β - Sitostérol, (1S,4aa)-4Methylene-6-(1-hydroxy-&-methylethyl)-8a-b-methyl-decahydroxydronaphtalene-Ab-ol 1S, 7S, 10S, eudesm-4(14)-en-1 α -11 α -diol(hydroxy- β -eudesmol), 4 α , 11-dihydroxy-7-epimer-eudesmandiol (7-epi-cryptomeridiol), 4 β , 7 β , 11-enantioeudesmantriol (Pterodontriol), 4 β ,6 β ,10 α -trihydroxy guaiane sesquiterpène (Teuclatriol).

التحليل الكروماتوغرافي للزيوت الأساسية لـ *Cymbopogon schoenanthus* أوضح أن الهيدروكربونات تمثل 26.7% في حين أن السيسكويتربينات قاربت 40%. تحليل HPLC-TOF/MS الخاص بمستخلص أسيتات الايثيل و مستخلص البوتانول للنبتتين، حدد وجود 32 حمض فينولي بالإضافة للفلافونويدات بنسب متفاوتة.

دراسة النشاط البيولوجي (كثافة تثبيط تلف الحمض النووي و النشاط المضاد للسرطان) الخاص بمستخلص أسيتات الايثيل و مستخلص البوتانول للنبتتين، أوضح لنا خصوصية لنبتة *Helianthemum lippii* بالنسبة للخاصية المضادة بالإضافة لخاصية ضد تكاثر الخلايا السرطانية

الدراسة الفارماكولوجية للمستخلصات أجريت على القولون النازل لفئران Wistar، و التي أظهرت استرخاء ملحوظا للقولون النازل المعزول للفأر. والذي يمكن أن يمثل آلية أساسية للاستخدام التقليدي لهذه النباتات في مشاكل الجهاز الهضمي. سوف تساعدنا المزيد من الدراسات على فهم المركبات المسؤولة عن التأثير والآلية المعنية.

الكلمات المفتاحية:

Helianthemum lippii, *Cymbopogon schoenanthus*, التحليل الكروماتوغرافي، طرق التحليل الطيفي، تحليل HPLC-TOF/MS، الزيوت الأساسية، النشاط المضادة للأوكسدة، النشاط المضاد للسرطان، القولون النازل، تأثير الاسترخاء.

ARTICLE
PUBLIE



Characterization of ethyl acetate and *n*-butanol extracts of *Cymbopogon schoenanthus* and *Helianthemum lippii* and their effect on the smooth muscle of the rat distal colon



Nihed Djemam^{a,b}, Somia Lassed^{b,c}, Fatih Gül^d, Muhammed Altun^d, Marisa Monteiro^a, Daniela Menezes-Pinto^a, Samir Benayache^b, Fadila Benayache^b, Djamila Zama^b, Ibrahim Demirtas^d, Manuela Morato^{a,*}

^a Laboratory of Pharmacology, Department of Drug Sciences, and LAQV@REQUIMTE, Faculty of Pharmacy, University of Porto, Portugal

^b Unité de Recherche: Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques, Département de Chimie, Université des Frères Mentouri Constantine 1, 25000, Constantine, Algeria

^c Laboratoire de Physiologie Animale, Département de Physiologie Animale, Université des Frères Mentouri Constantine 1, 25000, Constantine, Algeria

^d Plant Research Laboratory, Department of Chemistry, Çankırı Karatekin University, Uluysazi Campus, Çankırı, Turkey

ARTICLE INFO

Keywords:

Cymbopogon schoenanthus
Helianthemum lippii
HPLC-TOF/MS analysis
Rat distal colon
Smooth muscle relaxation

ABSTRACT

Ethnopharmacology relevance: *Cymbopogon schoenanthus* (*C. schoenanthus*) and *Helianthemum lippii* (*H. lippii*) are Saharan species found in the South West of Algeria, in the region of Bechar. Both plants are used in traditional medicine to treat gastrointestinal disorders.

Objective: The aim of our study was to characterize the composition of the ethyl acetate (EtOAc) and *n*-Butanol (*n*-BuOH) extracts of *C. schoenanthus* and *H. lippii*, and to elucidate and compare their effect on the reactivity of the rat distal colon.

Main methods: The plants were macerated in a hydroalcoholic solution. After concentration, the aqueous solutions of the residues were submitted to liquid-liquid extractions to obtain EtOAc and *n*-BuOH extracts. The phenolic and flavonoid content of the extracts was determined by high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry with a time of flight analyzer (HPLC-TOF/MS). The effect of the extracts was tested on the rat distal colon, namely on the basal tone and on KCl- and Ach-induced precontracted preparations.

Results: HPLC-TOF/MS identified 32 phenols and flavonoids in the extracts. The four extracts relaxed the rat distal colon, the effect being noticed on the basal tone and on the KCl- and Ach-induced precontractions. The EtOAc and the *n*-BuOH extracts of *H. lippii* decreased the basal tone of the rat distal colon more markedly than the correspondent extracts of *C. schoenanthus*. Moreover, the *n*-BuOH extract of *C. schoenanthus* decreased the basal tone more markedly than the EtOAc extract of this plant but there was no difference between extracts of *H. lippii*. The EtOAc extracts of both *C. schoenanthus* and *H. lippii* totally reverted both the KCl- and the Ach-induced precontraction of the rat distal colon. However, the *n*-BuOH extracts of the two plants reverted the Ach-precontracted colon but not the colon that has been precontracted with KCl.

Conclusion: Extracts of *H. lippii* contain a higher level of phenols compared to the extracts of *C. schoenanthus*. All extracts of *C. schoenanthus* and *H. lippii* caused marked relaxation of the isolated rat distal colon, either when applied directly or when tested over KCl- and Ach-induced precontraction. These results give support to the use of *C. schoenanthus* and *H. lippii* in traditional medicine, namely for gastrointestinal diseases.

* Corresponding author. Rua Jorge Viterbo Ferreira, 228, 4050-313, Porto, Portugal.

E-mail addresses: djemamn@gmail.com (N. Djemam), lasseds2009@yahoo.fr (S. Lassed), fatihgul3018@gmail.com (F. Gül), maltun80@gmail.com (M. Altun), mmem89@gmail.com (M. Monteiro), daniela.menezes@gmail.com (D. Menezes-Pinto), sbenayache@yahoo.com (S. Benayache), fbenayache@yahoo.fr (F. Benayache), atrouzl@umc.edu.dz (D. Zama), idemirtas@karatekin.edu.tr (I. Demirtas), mmorato@ff.up.pt, moratomanuela@gmail.com (M. Morato).

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112613>

Received 3 January 2019; Received in revised form 24 November 2019; Accepted 21 January 2020

Available online 23 January 2020

0378-8741/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Cymbopogon Schoenanthus (L.) Spreng. (*C. schoenanthus*, common name lemongrass) is native to tropical Asia (especially India) but it has been distributed along Asia and Africa, namely Algeria (USDA, 2015). The harvest generally occurs in April and May (Quézel and Santa, 1962). It has been used in traditional medicine for a broad spectrum of conditions like common colds (Alitonou, 2006) due to analgesic and antipyretic properties (Mohsin et al., 1989; Olivier-Bever, 1986), as a tonic (Olivier-Bever, 1986), anti-inflammatory, diaphoretic, emenagogue, astringent, and sedative (Hammiche and Maiza, 2006; IUCN, 2005), as diuretic (El-Askary et al., 2003) and for rheumatic disorders (Alitonou, 2006; Rizk et al., 1983) or jaundice (Alitonou, 2006). *C. schoenanthus* is also useful as an antiseptic/disinfectant (Olivier-Bever, 1986; Rizk et al., 1983), and there are some reports on its insecticidal activity (Ketoh et al., 2002; Koba et al., 2007). As so, *C. schoenanthus* is used in infectious conditions (Alitonou, 2006; Menut et al., 2000; Olivier-Bever, 1986) due to its antimicrobial activity (EL-Kamali and EL-Amir, 2010; Khadri et al., 2010), and in the antidotal treatment of snakebite and scorpion sting (Al-Asmari et al., 2017). Concerning the gastrointestinal tract, it has been used as antispasmodic (Abdel-Moneim et al., 1969; Boulos, 1983; El-Askary et al., 2003; Khadri et al., 2010; Locksly et al., 1982; Olivier-Bever, 1986; Tackholm, 1974), digestive (de Sousa et al., 2005; Ketoh et al., 2002; Koba et al., 2007), stomachic and disinfectant (Olivier-Bever, 1986), and in both gastric and intestinal conditions like diarrhea, gastralgia, aerophagia and flatulence (Hammiche and Maiza, 2006; IUCN, 2005).

Helianthemum lippii (L.) Pers. (*H. lippii*) has become endangered, now being only found as part of the endemic flora of the western basin of the Mediterranean Sea (Escudero et al., 2007). The leaves and flowers of different *Helianthemum* taxa are traditionally used in folk medicine as antiseptic, analgesic and anti-inflammatory (Alsabri et al., 2013), to treat burns, respiratory and digestive disorders, hemorrhoids, and fever (Rigat et al., 2007). Also, the *Helianthemum* taxa are frequently used to treat infectious diarrhea possibly due to its antimicrobial activity (Alsabri et al., 2013; Calzada et al., 1995; Calzada and Alanis, 2007; Meckes et al., 1998, 1999; Rigat et al., 2007).

To the best of our knowledge, the phytochemical characterization of both *C. schoenanthus* and *H. lippii* has not been totally described. It is known that the essential oils of *C. schoenanthus* are rich in oxygenated monoterpenes (74.6%), particularly piperitone (72.6%), but also monoterpen hydrocarbons (11.30%), oxygenated sesquiterpenes (9.79%) like cryptomeridiol, and sesquiterpene hydrocarbons (1.48%) (Abdel-Moneim et al., 1969; Hellali and Hadj-Mahammed, 2008; Locksly et al., 1982). Moreover, chemical analysis showed that *C. schoenanthus* also contained proanthocyanidins (Khadri et al., 2010), tannins, saponins, saponin glycosides, flavonoids, alkaloids, triterpens, balsams, cardiac glycosides, glycosides, steroids and volatile oils (Amina et al., 2013; Mohammad Ali, 2012). The ethyl acetate extract (EtOAc) of *H. lippii* revealed the presence of total phenolic compounds, flavonoids, flavonol glycosides, and tannins (Badria et al., 2014; Calzada and Alanis, 2007). The methanolic extract of *H. lippii* showed the presence of polyphenols (flavonoids, tannins), glycosides, simple phenolics, free reduced sugars, and saponines, and the absence of free anthraquinones, steroids, terpenoids or alkaloids (Alsabri et al., 2013). Particularly, flavonoids as kaempferol and quercetin (Calzada et al., 1995), and flavonol glycosides as tilioside, astragaloside and isoquercitrin (Calzada and Alanis, 2007) have been isolated from the aerial parts of *Helianthemum glomeratum* Lag.

In the present work, we aimed to characterize the phenolic and flavonoid composition of the EtOAc and *n*-BuOH extracts of both plants *C. schoenanthus* and *H. lippii*, and to study and compare their functional effect on the reactivity of the rat distal colon, in order to look for a putative mechanism that could support its clinical interest, namely in treating diarrhea.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and preparation of solutions

All the solvents used in maceration, extraction, or HPLC studies (MeOH, EtOH, Petroleum ether, CHCl₃, EtOAc, *n*-BuOH, H₂O₂, formic acid and acetonitrile) were obtained from Sigma-Aldrich. Also, the compounds used for the functional assay were obtained from Sigma-Aldrich (USA), except for NaCl (VWR chemicals, Belgium), KCl, CaCl₂, glucose, NaHCO₃, ascorbic acid (Panreac Quimica, Spain), NaH₂PO₄ × H₂O, and Na₂EDTA (MERCK, Germany).

Acetylcholine and KCl stock solutions were prepared every week and stored at 4 °C. Krebs-Henseleit solution was prepared on every day of experiment (mM): NaCl 118, KCl 4.8, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.2, NaH₂PO₄ 1.2, Glucose 11, NaHCO₃ 25, Na₂EDTA 0.03, citric acid 0.3.

2.2. Plant materials

C. schoenanthus and *H. lippii* were harvested in the South West of Algeria, in the region of Bechar, in April 2011 and 2012, respectively. The plants were dried under a shade until complete dryness. The plant materials were identified by M. Mohamed Benabdelhakem, director of the preservation agency of natural resources in Bechar, Algeria. These species were indexed under the numbers CS/124/17/04/12 for *C. schoenanthus* and HL/13/04/12 for *H. lippii*, in the herbarium of the research unit VARENBIOMOL, University des Frères Mentouri Constantine 1.

2.3. Preparations of the extracts

C. schoenanthus was macerated at room temperature with EtOH/H₂O (80–20, v/v) and *H. lippii* with MeOH/H₂O (80–20, v/v) for 24 h, 48 h and 72 h. After filtration, the filtrates were concentrated in vacuum (up to 35 °C) and dissolved in distilled H₂O. The aqueous solutions were filtered and extracted successively with petroleum ether, CHCl₃, EtOAc and *n*-BuOH. Then, all the organic phases were dried with Na₂SO₄, filtered, and concentrated in vacuum up to 35 °C to obtain the dry extracts. For the purpose of this study, only the EtOAc and *n*-BuOH extracts were used. For the functional assay, these extracts were dissolved in the smallest needed volume of DMSO and then diluted in distilled H₂O to have stock solutions of 300 mg/ml. Cumulative addition of DMSO to a maximum of 1% was found to have no significant effect on isolated colon in our preliminary data and in previous studies (Ajay et al., 2003).

2.4. HPLC-TOF/MS analysis

High performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry with a time of flight analyzer (HPLC-TOF/MS) was conducted in the Plant Research Laboratory at Çankiri Karatekin University in Turkey, to analyze the phenolic content of different plants extracts. This analysis used the Agilent Technologies 1260 Infinity HPLC System with ZORBAX SBC18 column (4.6 × 100 mm, 3.5 µm) coupled to MS 6210 time-of-flight detector (TOF), with the mobile phases A and B being ultrapure water solutions with 0.1% formic acid and acetonitrile, respectively. The working flow rate was 0.6 ml/min and the column temperature was 35 °C. Stock solutions of the 32 standard phenolic compounds (2.5 ppm) and dried crude extracts of the two plants (200 ppm) were prepared in MeOH at room temperature. Samples were filtered through a PTFE filter (0.45 µm) by an injector, to remove particulates. The injection volume was 10 µl, and the solvent program was as follows: 0–1 min 10% B; 1–20 min 50% B; 20–23 min 80% B; 23–25 min 10% B; 25–30 min 10% B. The ionization mode of the MS-TOF instrument was electrospray (ES) negative with a gas temperature of 325 °C, a gas flow rate of 10.0 l/min and a nebulizer of 40 psi. The phenolic content of extracts was determined by comparing the

retention times and m/z values of extracts with that of standard phenolic compounds, allowing for a tentative identification, as previously performed (Kulabas et al., 2018).

2.5. Functional assay and calculations

Experiments were performed using female Wistar Han rats (ICBAS-Porto animal facility, Portugal) with 13–20 weeks. The animals were housed under standard conditions of temperature (21 °C), humidity (40–60%) and alternative cycles of light and dark (12 h/12 h), with free access to food and water. All experiments were performed in accordance with the European Union guidelines for the protection of animals used for scientific purposes (Directive, 2010/63/EU and Decision, 1999/575/EC) and Portuguese guidelines (DGAV, Portugal). Animals were sacrificed by decapitation and, after a midline laparotomy; a segment of the distal colon (approximately 8 cm) was excised and gently flushed with Krebs-Henseleit solution to get free of the luminal content. The colon segment was cut in strips of about 2 cm long, which were oriented along the longitudinal muscle fibers and mounted in 10 ml organ baths filled with warmed (37 °C) oxygenated (95% O₂, 5% CO₂) Krebs-Henseleit solution. A cotton thread was used to fix the tissues to the bottom of the bath, while another fixed the tissue to an isometric transducer (UGO BASILE S.R.I., Italy, Model 7004). Isometric responses were recorded on a polygraph (UGO BASILE S.R.I., Italy, Model 7050 and 7070). The tissues were stretched passively to an initial tension of 1 g. After mounting, tissues were allowed to equilibrate for 1 h, being washed every 15 min. After the equilibration period, tissues were stimulated with KCl 125 mM or Acetylcholine (Ach) 1–3 μM. Then, after a 30 min washing period, cumulative concentration-response curves (10 μg/ml to 30 mg/ml) to the extracts were obtained. In some experiments, the effect of the extracts was tested directly on the basal tone and the corresponding response was calculated as a % of the initial response to KCl (125 mM). The effect of the extracts was also evaluated over a precontraction induced by KCl 50 mM or Ach 1–3 μM. Finally, the effect of some identified major principles was also tested over Ach-induced precontraction. The concentration of each compound tested was determined by the % in which it was present in the extract and considering that the maximum effect of the extract was obtained with 10 mg/mL (concentration of the extract). In all protocols, the response of each extract was calculated as a % of the correspondent stable precontraction induced by KCl or Ach, respectively.

2.6. Statistical analysis

For each functional experiment, E_{max} (maximum effect) and EC₅₀ values (concentration of the extract causing 50% of the maximum response) were calculated using GraphPad Prism software, version 7.00 for Windows. All the values were expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). Statistical analysis was performed using unpaired Student's *t*-test. Also, 2-way ANOVA was used to look for interaction between plant and extract. A *p* value of less than 0.05 was considered statistically significant.

3. Results and discussion

3.1. Plant extracts and HPLC profiles

HPLC-TOF/MS analysis suggested the presence of phenols and flavonoids in the four extracts tested in this study (two from *C. schoenanthus* and two from *H. lippii*; Fig. 1).

Our quantitative analysis suggested that *H. lippii* was richer in phenolic compounds than *C. schoenanthus* (Table 1). The major compound found in the *n*-BuOH extract of *H. lippii* was vanillic acid (37%; Table 1), although this extract was also similarly rich in gentisic and 4-hydroxybenzoic acids (14% for both; Table 1), while the quantity of ferulic, caffeic and syringic acids were also relevant (9%, 8% and 4%,

respectively; Table 1). Differently, the EtOAc extract of *H. lippii* was mostly rich in gentisic acid (41%; Table 1) but also abundant in gallic and vanillic acids (17% and 11%, respectively; Table 1). The quantities of sinapic acid and catechin were also very proper and similar in this extract (8% and 7%, respectively; Table 1). Diosmin was the major compound found in the *n*-BuOH extract of *C. schoenanthus* (72%; Table 1). The EtOAc extract of *C. schoenanthus* was quite rich in catechin (38%; Table 1) but also in rutin, gallic and sinapic acids (20%, 17% and 15%, respectively; Table 1). Several other phenols and flavonoids were found in the four extracts and are listed in Table 1. 4-Hydroxybenzaldehyde, taxifolin, apigetrin, resveratrol and silibinin were found in trace amounts in most of the extracts.

Content in phenolic compounds of the four plant extracts expressed in mg/kg of dry plant (and %). tr: trace amount. **p* < 0.05 vs the other extract of the same plant; #*p* < 0.05 vs the same extract of the other plant.

Protocatechuic acid, catechin and salicylic acid have low ionization capacity and although, they were found in the extracts (as seen in Table 1), the peaks are not visible in the chromatograms, as seen in Fig. 1.

3.2. Functional assay on the rat distal colon

The EtOAc and the *n*-BuOH extracts of both *C. schoenanthus* and *H. lippii* caused concentration-dependent relaxation of the basal tone of the rat distal colon (Fig. 2).

Concerning the direct effect on the basal tone, the EtOAc and the *n*-BuOH extracts of *H. lippii* decreased the basal tone of the rat distal colon more marked than the correspondent extracts of *C. schoenanthus* (Fig. 2 and Table 2). Moreover, the *n*-BuOH extract of *C. schoenanthus* decreased the basal tone more markedly than the EtOAc extract of this plant (Fig. 2 and Table 2). There was no difference in the relaxant effect of the EtOAc and the *n*-BuOH extracts of *H. lippii* (Fig. 2 and Table 2). About the potency of the extracts, we could only observe that the EtOAc extract of *H. lippii* was more potent than the EtOAc extract of *C. schoenanthus* (Fig. 2 and Table 2).

The KCl- and Ach-induced precontraction of the rat distal colon were also decreased by all the extracts studied in a concentration-dependent way, although the profile of the response was different between the extracts (Fig. 3 and Table 3).

The EtOAc extracts of both *C. schoenanthus* and *H. lippii* totally reverted both the KCl- and the Ach-induced precontraction of the rat distal colon (Fig. 3 and Table 3). As for the *n*-BuOH extracts of the two plants, they reverted the Ach-precontracted colon but not the colon that has been precontracted with KCl (Fig. 3 and Table 3). Indeed, the *n*-BuOH extract was the one that presented the lower E_{max} over KCl-induced precontraction (69.75 ± 9.40% and 67.50 ± 8.11% for *C. schoenanthus* and *H. lippii*, respectively). The relaxation caused by the EtOAc extracts was higher than that caused by the *n*-BuOH extracts (Fig. 3 and Table 3), but the maximum effect was similar for each extract of the two different plants (Fig. 3 and Table 3). Regarding KCl-induced contraction, the EC₅₀ values of both the EtOAc and *n*-BuOH extracts of *H. lippii* were higher than the EC₅₀ values of the correspondent extracts of *C. schoenanthus* (Fig. 3 and Table 3). However, the EC₅₀ values of the EtOAc extract of *H. lippii* was lower than that of the EtOAc extract of *C. schoenanthus* (Fig. 3 and Table 3) when we compared Ach-induced contraction.

Two-way analysis of variance showed that there was no interaction between the two factors studied (plant and extract) for the E_{max} or the EC₅₀ either for the relaxant effect on the basal tone, KCl-induced or Ach-induced precontraction (Table 4).

We also evaluated the effect of some identified major principles on Ach-induced precontraction of the rat colon. Gallic acid (1.7 mg/mL; present in the EtOAc extract of both *C. schoenanthus* and *H. lippii*), 4-hydroxybenzoic acid (1.4 mg/mL; present in the *n*-BuOH extract of *H. lippii*), sinapic acid (1.5 mg/mL; present in the EtOAc extract of *C.*

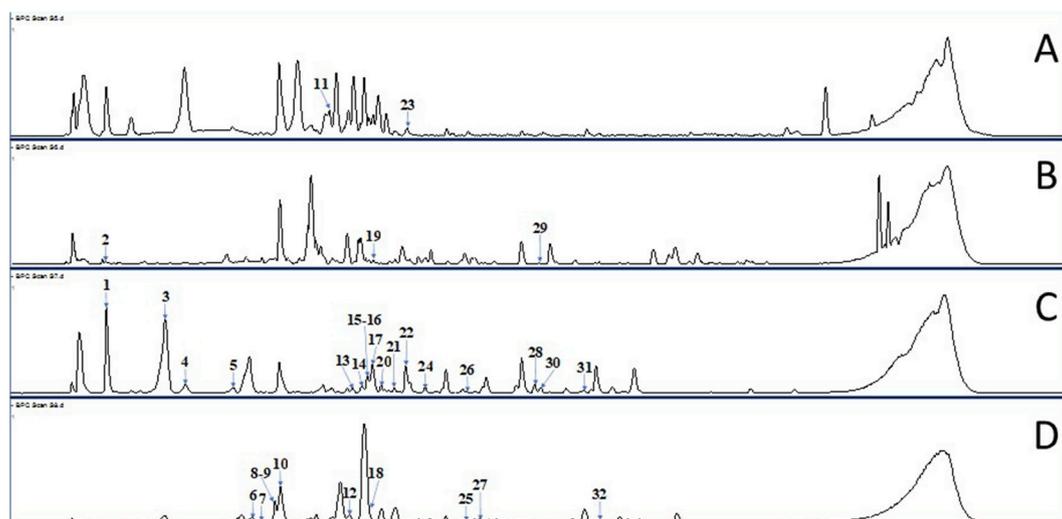


Fig. 1. Chromatograms of (A) EtOAc and (B) *n*-BuOH extracts of *C. schoenanthus* and of (C) EtOAc and (D) *n*-BuOH extracts of *H. lippii*. The chromatographic conditions are described under Materials and Methods. The numbers 1 to 32 are phenols and flavonoids detected in the corresponding extracts by HPLC-TOF/MS (Table 1).

schoenanthus), and diosmin (7.2 mg/mL; the main compound found in the *n*-BuOH extract of *C. schoenanthus*) completely counteracted the Ach-induced precontraction and further decreased baseline colonic smooth muscle tone by 11%, 32%, 64% and 92%, respectively (Fig. 4). Genistic acid, at a concentration resembling that present in the *n*-BuOH extract of *C. Schoenanthus* (0.4 mg/mL), did not alter Ach-induced precontraction. However, it completely counteracted the Ach-induced precontraction and further decreased baseline colonic smooth muscle tone by 9% and 42% in concentrations resembling those present in the *n*-BuOH (1.4 mg/mL) and EtOAc (4.1 mg/mL) extracts of *H. lippii* (Fig. 5). Vanillic acid also did not alter Ach-induced precontraction at a concentration resembling that present in the *n*-BuOH extract of *C. Schoenanthus* (0.2 mg/mL). But, it counteracted Ach-induced precontraction at 1.1 mg/mL (present in the EtOAc extract of *H. Lippii*) and further decreased baseline colonic smooth muscle tone by 28% at 3.7 mg/mL (present in the *n*-BuOH extract of *H. Lippii*) (Fig. 5). Rutin had no effect at 2 mg/mL (present in the *n*-BuOH extract of *C. Schoenanthus*) but it decreased colonic smooth muscle tone at 0.2 mg/mL (present in the EtOAc extract of *C. Schoenanthus*) (Fig. 5).

4. Discussion

The present study shows, for the first time, that the EtOAc and the *n*-

BuOH extracts of the Algerian *C. schoenanthus* and *H. lippii* cause marked relaxation of the rat distal colon. Also, our study characterized the composition of these extracts, whose differences might be associated with the functional effect observed.

In this study, we contributed to support the use of *C. schoenanthus* and *H. lippii* in gastrointestinal problems, more precisely those that affect the colon, like diarrhea or spasms. Indeed, although both *C. schoenanthus* and *H. lippii* are used in folk medicine, as infusions, decoctions or powder, for the treatment of gastrointestinal problems, there is almost no information on the effect supporting their use. *C. schoenanthus* has been used in folk medicine because it has anti-spasmodic (Khadri et al., 2010), anti-diarrhea and anti-flatulent (Hammiche and Maiza, 2006; IUCN, 2005) effects. *H. lippii* is also widely used for digestive disorders, hemorrhoids, infectious diarrhea (Calzada and Alanis, 2007; Meckes et al., 1998, 1999), presumably due to its antiseptic, analgesic, antipyretic and anti-inflammatory effects (Alsabri et al., 2013). To accomplish our goal, we prepared and characterized EtOAc and *n*-BuOH extracts of both plants. As there was no information on the effect of these extracts on the colon, after characterization of the extracts, we conducted three experimental protocols in order to gain global information on the effect of the extracts directly on the basal tone of colonic smooth muscle and on the colonic tone induced by KCl and Ach.

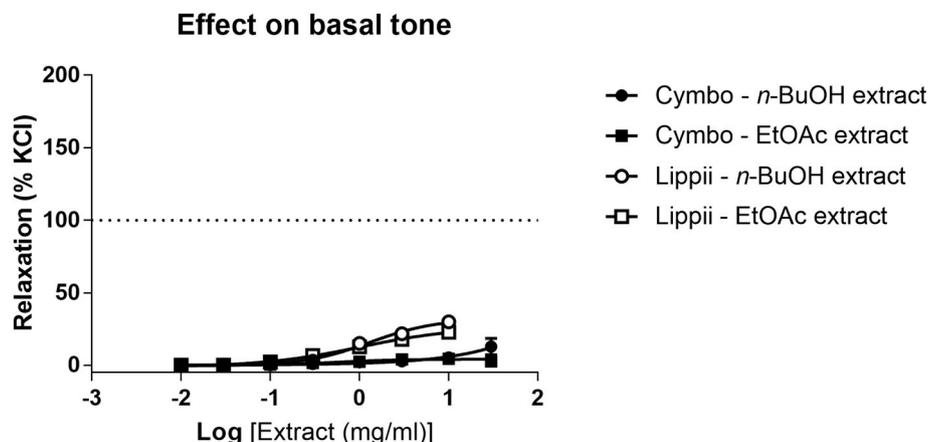


Fig. 2. Concentration-response curves of the Ethyl acetate (EtOAc) and *n*-Butanol (*n*-BuOH) extracts of *C. schoenanthus* and *H. lippii* on the basal tone of the rat distal colon. Results expressed as % of the contraction induced by 125 mM KCl. n = 5–7 rats in each group.

Table 1
Phenols and flavonoids found in the different extracts.

RT (min)	Compounds	Formula	m/z [M-H] ⁻	Codes	C. schoenanthus extracts		H. lippii extracts	
					EtOAc mg/kg (%)	BuOH mg/kg (%)	EtOAc mg/kg (%)	BuOH mg/kg (%)
2,56	Gallic acid	C ₇ H ₆ O ₅	169.0258	1	11,27 (17,31)	0,13 (0,22)*	91,08 (17,02)	0,87 (0,13)*
2,69	Fumaric acid	C ₄ H ₄ O ₄	115.0130	2	0,25 (0,38)	0,95 (1,63)	0,29 (0,05)	tr
4,34	Gentisic acid	C ₇ H ₆ O ₄	153.0296	3	1,63 (2,50)	2,51 (4,29)	221,42 (41,38) [#]	92,78 (13,74)*, [#]
5,27	Chlorogenic acid	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.1060	4	0,24 (0,37)	3,02 (5,17)	1,12 (0,21)	2,75 (0,41)
6,24	Catechin	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.0882		24,90 (38,24)	0,52 (0,89)*	37,06 (6,93) [#]	2,36 (0,35)*
6,79	4-Hydroxybenzoic acid	C ₇ H ₆ O ₃	137.0344	5	0,08 (0,12)	0,52 (0,89)	16,51 (3,09)	91,79 (13,60)*, [#]
7,19	Protocatechuic acid	C ₇ H ₆ O ₄	153.0296		0,27 (0,41)	1,00 (1,71)	2,82 (0,53)	5,85 (0,87)
7,47	Caffeic acid	C ₉ H ₈ O ₄	179.0467	6	0,05 (0,08)	0,36 (0,62)	0,69 (0,13)	52,76 (7,82)*, [#]
7,57	Vanillic acid	C ₈ H ₈ O ₄	167.0467	7	1,24 (1,90)	1,43 (2,45)	59,09 (11,04) [#]	251,32 (37,23)*, [#]
7,78	Syringic acid	C ₉ H ₁₀ O ₅	197.0580	8	0,42 (0,65)	1,92 (3,28)	5,38 (1,01)	27,38 (4,06)
9,06	Rutin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609.1718	9	12,94 (19,87)	0,91 (1,56)*	4,54 (0,85) [#]	0,29 (0,04)
9,66	4-hydroxybenzaldehyde	C ₇ H ₆ O ₂	121.0387		tr	tr	tr	16,92 (2,51)
9,67	Polydatine	C ₂₀ H ₂₂ O ₈	389.1429		tr	tr	1,35 (0,25)	0,04 (0,01)
9,88	Scutellarin	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	461.0937	10	tr	tr	21,91 (4,09)	0,74 (0,11)
10,02	Quercetin-3-β-D-glucoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463.1092		tr	0,11	2,56 (0,48)	1,92 (0,28)
10,04	Sinapic acid	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	223.0746	11	9,56 (14,68)	tr	44,15 (8,25)	2,63 (0,39)*
10,12	Diosmin	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	607.1461	13	0,68 (1,04)	42,10 (72,03)*	4,24 (0,79)	19,17 (2,84) [#]
10,14	Naringin	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	579.1968	12	tr	tr	5,21 (0,97)	1,33 (0,20)
10,15	Ferulic acid	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	193.6240	14	0,05 (0,08)	1,38 (2,36)	0,20 (0,04)	63,96 (9,84)*
10,38	Taxifolin	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	303.0672		tr	tr	1,28 (0,24)	tr
10,71	Hesperidin	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	609.2079		0,05 (0,08)	tr	0,21 (0,04)	tr
10,99	Apigetrin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431.1189		tr	tr	2,67 (0,50)	tr
11,03	Neohesperidin	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	609.2083		0,12 (0,18)	tr	0,12 (0,02)	tr
11,56	Rosmarinic acid	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	359.10		0,10 (0,15)	0,03 (0,05)	1,97 (0,37)	0,22 (0,03)
12,77	Morin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301.0516		0,28 (0,43)	0,59 (1,01)	1,45 (0,27)	3,07 (0,45)
12,80	Resveratrol	C ₁₄ H ₁₂ O ₃			tr	tr	0,27 (0,05)	tr
13,36	Salicylic acid	C ₇ H ₆ O ₃	137.0344		0,64 (0,98)	tr	5,79 (1,08)	7,50 (1,11)
14,80	Quercetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301.0517		tr	0,06 (0,10)	2,00 (0,37)	tr
14,88	Silibinin	C ₂₅ H ₂₂ O ₁₀	481.1364		tr	0,51 (0,87)	tr	tr
14,94	Cinnamic acid	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	147.0552		0,15 (0,23)	0,43 (0,74)	0,57 (0,11)	2,29 (0,34)
15,84	Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.0564		0,12 (0,18)	tr	1,10 (0,21)	0,81 (0,11)
16,23	Diosmetin	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	399.0725	15	0,17 (0,26)	tr	tr	26,49 (3,92)
				TOTAL	65.21 (100)	58.48 (100)	537.05 (100)	675.24 (100)

In our study, the EtOAc or *n*-BuOH extracts of both *C. schoenanthus* and *H. lippii* totally reverted the precontraction induced by Ach. The EtOAc extract of both *C. schoenanthus* and *H. lippii* also totally reverted the KCl-induced precontraction. Differently, the *n*-BuOH extract of both plants decreased the KCl-induced precontraction but did not abolish it. We choose to precontract the distal colon with Ach and KCl because these are crucial contractants of the colon. In fact, cholinergic transmission is the most relevant mechanism of colonic contraction (Mane et al., 2016) through the release of Ach and subsequent activation of muscarinic M₂ and M₃ receptors in the colonic smooth muscle (Lecci et al., 2002). Moreover, KCl at 50 mM causes receptor-independent contraction of the smooth muscle by opening voltage-dependent Ca²⁺ channels, thus promoting the entrance of Ca²⁺ in the cell and, consequently, smooth muscle contraction (Brading, 1981). We did not test the direct effect of the isolated presumably identified compounds on Ach- or KCl-induced precontractions. Still, our results suggest that some components of the EtOAc and *n*-BuOH extracts of both *C. schoenanthus* and *H. lippii* might have the capacity to block muscarinic M₂ and/or M₃ receptors and/or Ca²⁺ channels, thus antagonizing Ach-

induced and/or KCl-induced contractions (respectively). The components extracted by *n*-BuOH seem to be less effective in KCl-induced precontraction. In the future, with experiments using isolated compounds, it might be possible to know whether these components with calcium channel blocking capacity are the same as those with anticholinergic activity or others. Interestingly, an *in vitro* study using the essential oil of the fresh leaves of *C. schoenanthus* from the mountain region of southern Tunisia showed an acetylcholinesterase activity (Khadri et al., 2008). Since we used Ach for precontraction of some preparations and we did not use an inhibitor of acetylcholinesterase, we cannot rule out the possibility that the decrease in smooth muscle tone observed after the extracts were added to Ach-induced precontracted preparations is a consequent of degradation of Ach. Also relevant, a study with verapamil, a calcium channel blocker, showed a reduced frequency of giant migrating contractions of the inflamed small intestine and the associated diarrhea (Lee et al., 1997).

Surprisingly, the two extracts of both plants decreased the basal tone of the rat distal colon and some, when applied over Ach-precontracted tissues actually brought colonic tone below the baseline

Table 2

Maximum effect (E_{max}; %) and concentration of the extract causing 50% of the maximum response (EC₅₀; mg/ml) for the *n*-BuOH and EtOAc extracts of *C. schoenanthus* and of *H. lippii* on the basal tone of the rat distal colon.

	C. schoenanthus extracts		H. lippii extracts	
	<i>n</i> -BuOH	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	EtOAc
Basal tone				
E _{max} (%)	15.90 ± 3.40	4.96 ± 1.31*	35.59 ± 4.69 [#]	25.31 ± 2.21 [#]
EC ₅₀ (mg/ml)	9.11 ± 4.85	0.73 ± 0.52	1.74 ± 0.25	0.37 ± 0.06*

Values are mean ± S.E.M., n = 5–7 rats in each group. *p < 0.05 vs the corresponding *n*-BuOH extract; [#]p < 0.05 vs the correspondent extract of *C. schoenanthus*.

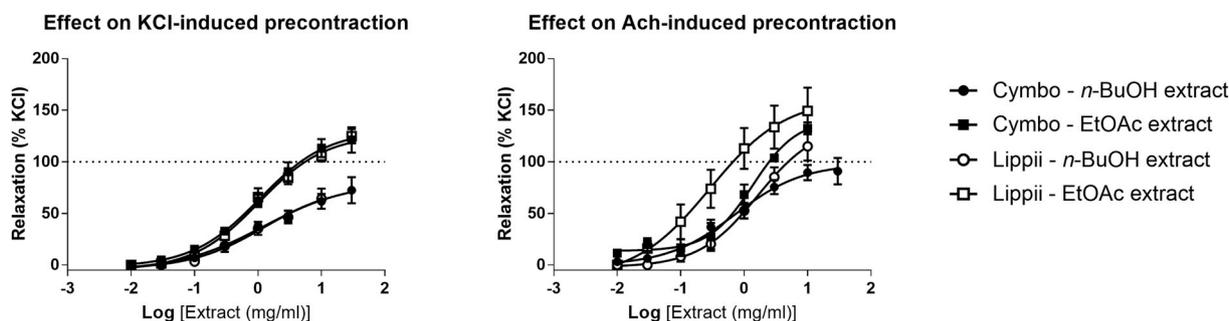


Fig. 3. Concentration-response curves of the Ethyl acetate (EtOAc) and *n*-Butanol (*n*-BuOH) extracts of *C. schoenanthus* and *H. lippii* on the rat distal colon precontracted with KCl 50 mM (left) or Ach (1–3 μM; right). Results expressed as % of the precontraction level. n = 5–7 rats in each group.

levels. We have no explanation for this now. However, since colonic basal tone is generally dependent on cholinergic transmission and Ca²⁺ currents, it is possible that components of *C. schoenanthus* and *H. lippii* block the tonic regulation of colonic smooth muscle tone, thus causing relaxation of the basal tone.

The differential results obtained in this study probably reflect the different composition of the extracts tested. The results of the HPLC-TOF/MS analysis of the EtOAc and *n*-BuOH extracts of *C. schoenanthus* and *H. lippii* suggested the presence of different polyphenols, namely phenolic acids and flavonoids, as previously reported in other studies (Alsabri et al., 2013; Amina et al., 2013; Badria et al., 2014; Mohammad Ali, 2012). Other studies from the literature have also reported the presence of terpenes (Hellali and Hadj-Mahammed, 2008), tannins, saponins, saponin glycosides, alkaloids, triterpens, balsams, cardiac glycosides, glycosides, steroids and volatile oils (Amina et al., 2013; Mohammad Ali, 2012) in extracts from *C. schoenanthus*. Concerning *H. lippii*, it has also been reported the presence of tannins, glycosides, free reduced sugars and saponins (Alsabri et al., 2013; Badria et al., 2014).

Some of the compounds identified in the tested extracts have been described as relaxants of the rat smooth muscle, particularly the flavonoids (Hnatyszyn et al., 2004; Mata et al., 1997; Mendel et al., 2016; Wang et al., 2014). Oppositely, saponins can contract isolated stomach preparations (Mendel et al., 2012) and cardiac glycosides contract the isolated rat jejunum (Botha et al., 2002). Other components, like the alkaloids (Dalziel et al., 2013; Ishizuka et al., 2013; Lo et al., 2011) or the volatile oils (Reiter and Brandt, 1985) have been reported to have both contractile and relaxant effects.

Our functional data most probably result from the balance between the effect of relaxant and contractile components of each extracts tested and of the interactions between the components of each extract. Furthermore, from a translational perspective, the identification of the main active compound should also take into account the biodisponibility of the components in aqueous solution, since it is the usual folk use of these plants. The relaxant effect of the EtOAc extract of *C. schoenanthus* might be related, at least in part, to the presence of

Table 3

Maximum effect (E_{max}; %) and concentration of the extract causing 50% of the maximum response (EC₅₀; mg/ml) for the *n*-BuOH and EtOAc extracts of *C. schoenanthus* and of *H. lippii* on the rat distal colon precontracted with KCl 50 mM or Ach 1–3 μM.

	<i>C. schoenanthus</i> extracts		<i>H. lippii</i> extracts	
	<i>n</i> -BuOH	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	EtOAc
KCl-precontraction				
E _{max} (%)	69.75 ± 9.40	120.90 ± 10.08*	67.50 ± 8.11	117.10 ± 6.84*
EC ₅₀ (mg/ml)	0.34 ± 0.10	0.31 ± 0.06	1.03 ± 0.21 [#]	0.99 ± 0.27 [#]
Ach-precontraction				
E _{max} (%)	99.46 ± 9.83	144.00 ± 6.26*	127.80 ± 15.96	150.80 ± 18.85
EC ₅₀ (mg/ml)	1.10 ± 0.51	1.31 ± 0.15	1.41 ± 0.33	0.40 ± 0.11 ^{*,#}

Values are mean ± S.E.M., n = 5–7 rats in each group. *p < 0.05 vs the corresponding *n*-BuOH extract; [#]p < 0.05 vs the correspondent extract of *C. schoenanthus*.

Table 4

Two-way analysis of variance (ANOVA) of the effect of both extracts (EtOAc and *n*-BuOH) of the two plants (*C. schoenanthus* and of *H. lippii*).

	2-way ANOVA		
	Interaction	Plant	Extract
Basal tone			
E _{max} (%KCl)	0.9221	< 0.0001	0.0068
EC ₅₀ (mg/ml)	0.1249	0.0934	0.0397
KCl-precontraction			
E _{max} (%KCl)	0.9347	0.7524	< 0.0001
EC ₅₀ (mg/ml)	0.9754	0.0005	0.8380
Ach-precontraction			
E _{max} (%KCl)	0.4092	0.2188	0.0352
EC ₅₀ (mg/ml)	0.0862	0.3741	0.2483

catechin (Bhardwaj et al., 2014; Ihm et al., 2009), rutin (Amira et al., 2008; Li et al., 2012) and sinapic acid (Baker et al., 2016), besides gallic acid (de Oliveira et al., 2016). Our functional data with some of the major identified compounds showed that the relaxant capacity of these compounds might be ranked as sinapic acid > gallic acid > rutin. Interestingly, although rutin is one of the predominant components, it is little absorbed because of metabolization by the gut microflora (Pashikanti et al., 2010). Also, the bioavailability of catechin (Cai et al., 2018), gallic acid (Konishi et al., 2004) and sinapic acid (Feliciano et al., 2017) is low compared to other less predominant components of the same or of the other extracts. Remarkably, the *n*-BuOH extract of *C. schoenanthus* was essentially the most rich in diosmin (actually it was the only relevant component identified in this extract), which also has a vasorelaxant effect in different experimental models of cardiovascular disease (Paredes et al., 2018a, b) and its bioavailability is known high (Campanero et al., 2010). Using our protocol, we showed that diosmin caused a very marked relaxation of the rat colon while other minor components like genisteic or vanillic acids or rutin had no effect at

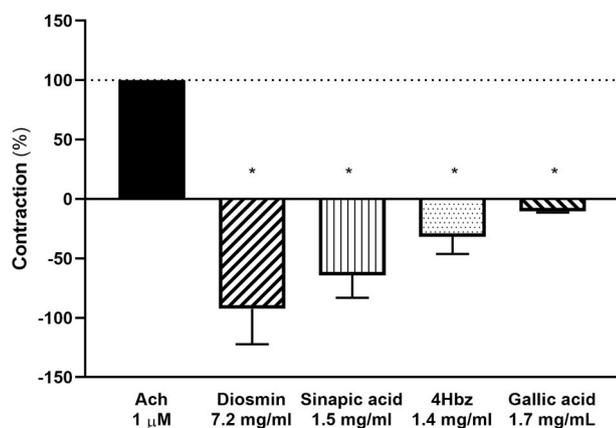


Fig. 4. Relaxant effect of diosmin (7.2 mg/mL), sinapic acid (1.5 mg/mL), 4-hydroxybenzoic acid (1.4 mg/mL), and gallic acid (1.7 mg/mL) on the rat distal colon precontracted with Ach (1–3 μ M). Results expressed as % of the precontraction level. n = 3 rats in each group.

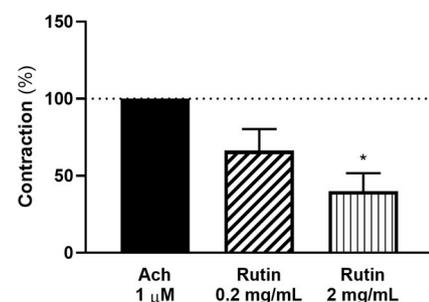
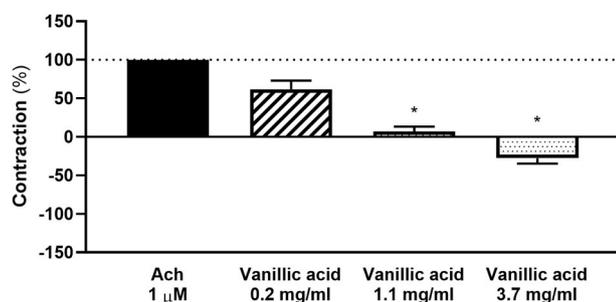
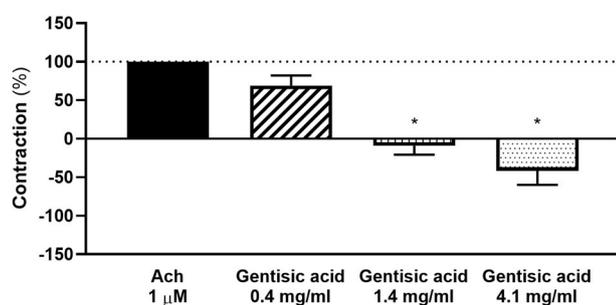


Fig. 5. Relaxant effect of gentic acid (top), vanillic acid (middle) and rutin (bottom) on the rat distal colon precontracted with Ach (1–3 μ M). Results expressed as % of the precontraction level. n = 3 rats in each group.

concentrations present in this extract. Differently, gentic and vanillic acids together represent more than 50% of the composition of each extract of *H. lippii* and both extracts of *H. lippii* caused a more marked

relaxation of the rat distal colon than those from *C. schoenanthus*. These compounds have been described as capable of inducing smooth muscle relaxation (Cunha et al., 2001; Lin et al., 1996) and particularly vanillic acid has a high bioavailability (McKay et al., 2015). Moreover, gallic acid was found to be another relevant component of the EtOAc extracts of both plants, and it has also been described as a relevant vasodilator (de Oliveira et al., 2016). Also for this compounds we have shown direct evidence of being potent relaxants of the rat colon, the ranking order being gentic acid > gallic acid > vanillic acid in the EtOAc extract, and 4-hydroxybenzoic acid > vanillic acid > gentic acid in the *n*-BuOH extract.

5. Conclusion

HPLC-TOF/MS analysis of both *n*-BuOH and EtOAc extracts of *C. schoenanthus* and *H. lippii* suggested the presence of 32 phenolic acids and flavonoids which were present in different proportion in each extract. Both extracts of the two plants caused marked relaxation of the isolated rat distal colon, either when applied directly on the basal tone or when tested over KCl- and Ach-induced precontraction, which is probably related to the composition of each extract. These results start to unravel scientific support for the use of *C. schoenanthus* and *H. lippii* as relevant plants to alleviate gastrointestinal conditions, as abdominal pain or diarrhea. However, more detailed studies are necessary to determine the exact compounds and/or metabolites responsible for the observed effect and the mechanism involved.

Funding

Manuela Morato is grateful to the project UID/QUI/50006/2013-POCI/01/0145/FEDER/007265 with support from FCT/MEC through national funds and co-financed by FEDER, under the Partnership Agreement PT2020. Nihed Djemam was supported by an Erasmus grant (Erasmus Mundus Grant Action 2, BATTUTA Project, BT16DM3434).

CRediT authorship contribution statement

Nihed Djemam: Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Writing - original draft. **Marisa Monteiro:** Formal analysis, Investigation, Writing - original draft. **Daniela Menezes-Pinto:** Formal analysis, Investigation, Writing - original draft. **Samir Benayache:** Conceptualization, Resources, Writing - review & editing. **Fadila Benayache:** Conceptualization, Writing - review & editing. **Djamila Zama:** Formal analysis, Investigation. **Ibrahim Demirtas:** Formal analysis, Resources, Writing - review & editing. **Manuela Morato:** Conceptualization, Formal analysis, Resources, Writing - review & editing, Funding acquisition.

Acknowledgments

The authors thank Mrs. Céu Pereira and Mrs. Mónica Caldas for excellent technical assistance.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112613>.

References

- Abdel-Moneim, F.M., Ahmed, Z.F., Fayed, M.B., Ghaleb, H., 1969. Constituents of local plants. XIV. The antispasmodic principle in *Cymbopogon proximus*. *Planta Med.* 17 (3), 209–216. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1099848>.
- Ajay, M., Gilani, A.U., Mustafa, M.R., 2003. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. *Life Sci.* 74 (5), 603–612. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.06.039>.
- Al-Asmari, A., Manthiri, R.A., Abdo, N., Al-Duaiji, F.A., Khan, H.A., 2017. Saudi

- medicinal plants for the treatment of scorpion sting envenomation. *Saudi J. Biol. Sci.* 24 (6), 1204–1211. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.10.010>.
- Alitonou, G., 2006. Huiles essentielles extraites de plantes aromatiques acclimatées au Bénin : étude chimique, évaluation biologique et applications potentielles, vol. 2. Université des Sciences et Techniques de Montpellier, pp. 279.
- Alsabri, S.G., Rmeli, N.B., Zetrini, A.A., Mohamed, S.B., Meshri, M.I., Aburas, K.M., Bensaber, S.M., Mrema, I.A., Mosbah, A.A., Allahresh, K.A., Hermann, A., Gbaj, A., 2013. Phytochemical, anti-oxidant, anti-microbial, anti-inflammatory and anti-ulcer properties of *Helianthemum lippii*. *J. Pharmacogn. Phytochem.* 2 (2), 86–96.
- Amina, R.M., Aliero, B.L., Gumi, A.M., 2013. Phytochemical screening and oil yield of a potential herb, camel grass (*Cymbopogon schoenanthus* Spreng.). *Cent. Euro. J. Exp. Bio.* 2 (3), 15–19.
- Amira, S., Rotondo, A., Mule, F., 2008. Relaxant effects of flavonoids on the mouse isolated stomach: structure-activity relationships. *Eur. J. Pharmacol.* 599 (1–3), 126–130. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.09.021>.
- Badria, F.A., Hetta, M.H., Sarhan, R.M., Ezz El-Din, M.H., 2014. Lethal effects of *Helianthemum lippii* (L.) on *Acanthamoeba castellanii* cysts in vitro. *Kor. J. Parasitol.* 52 (3), 243–249. <https://doi.org/10.3347/kjp.2014.52.3.243>.
- Baker, L.A., Horbury, M.D., Greenough, S.E., Allais, F., Walsh, P.S., Habershon, S., Stavros, V.G., 2016. Ultrafast photoprotecting sunscreens in natural plants. *J. Phys. Chem. Lett.* 7 (1), 56–61. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcclett.5b02474>.
- Bhardwaj, P., Khanna, D., Balakumar, P., 2014. Catechin averts experimental diabetes mellitus-induced vascular endothelial structural and functional abnormalities. *Cardiovasc. Toxicol.* 14 (1), 41–51. <https://doi.org/10.1007/s12012-013-9226-y>.
- Botha, C.J., Gehring, R., Van Rooyen, J.M., Venter, D., 2002. The effect of three bufadienolide cardiac glycosides on contraction of isolated rat jejunum. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 69 (3), 243–246.
- Boulos, L., 1983. Medicinal Plants of North Africa. Reference Publications, Inc., Algonac, Michigan.
- Brading, A.F., 1981. How do drugs initiate contraction in smooth muscles? *Trends Pharmacol. Sci.* 2, 261–265.
- Cai, Z.Y., Li, X.M., Liang, J.P., Xiang, L.P., Wang, K.R., Shi, Y.L., Yang, R., Shi, M., Ye, J.H., Lu, J.L., Zheng, X.Q., Liang, Y.R., 2018. Bioavailability of tea catechins and its improvement. *Molecules* 23 (9). <https://doi.org/10.3390/molecules23092346>.
- Calzada, F., Alanis, A.D., 2007. Additional antiprotozoal flavonol glycosides of the aerial parts of *Helianthemum glomeratum*. *Phytother. Res.* 21 (1), 78–80.
- Calzada, F., Lopéz, R., Meckes, M., Cedillo-Rivera, R., 1995. Flavonoids of the aerial parts of *Helianthemum glomeratum*. *Int. J. Pharmacogn.* 33 (4), 351–352. <https://doi.org/10.3109/13880209509065393>.
- Campanero, M.A., Escolar, M., Perez, G., Garcia-Quetglas, E., Sadaba, B., Azanza, J.R., 2010. Simultaneous determination of diosmin and diosmetin in human plasma by ion trap liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry: application to a clinical pharmacokinetic study. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 51 (4), 875–881. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.09.012>.
- Cunha, J.F., Campestrini, F.D., Calixto, J.B., Scremin, A., Paulino, N., 2001. The mechanism of gentisic acid-induced relaxation of the Guinea pig isolated trachea: the role of potassium channels and vasoactive intestinal peptide receptors. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34 (3), 381–388.
- Dalziel, J.E., Dunstan, K.E., Finch, S.C., 2013. Combined effects of fungal alkaloids on intestinal motility in an in vitro rat model. *J. Anim. Sci.* 91 (11), 5177–5182. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-6449>.
- de Oliveira, L.M., de Oliveira, T.S., da Costa, R.M., de Souza Gil, E., Costa, E.A., Passaglia Rde, C., Filgueira, F.P., Ghedini, P.C., 2016. The vasorelaxant effect of gallic acid involves endothelium-dependent and -independent mechanisms. *Vasc. Pharmacol.* 81, 69–74. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2015.10.010>.
- de Sousa, E., Câmara, A.P.C., Costa, W.A., Costa, A.C.J., Oliveira, H.N.M., Galvão, E.L., Marques, M.M.O., 2005. Evaluation of the extraction process of the essential oil from *Cymbopogon schoenanthus* with pressurized carbon dioxide. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 48, 231–236. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132005000400028>.
- El-Askary, H.I., Meslehy, M.R., Galal, A.M., 2003. Sesquiterpenes from *Cymbopogon proximus*. *Molecules* 8 (9), 670–677. <https://doi.org/10.3390/80900670>.
- EL-Kamali, H., EL-Amir, M.Y., 2010. Antibacterial activity and phytochemical screening of ethanolic extracts obtained from selected Sudanese medicinal plants. *Curr. Res. J. Biol. Sci.* 2 (2), 143–146.
- Escudero, A., Martínez, I., de la Cruz, A., Otálora, M.A.G., Maestre, F.T., 2007. Soil lichens have species-specific effects on the seedling emergence of three gypsophile plant species. *J. Arid Environ.* 70 (1), 18–28. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2006.12.019>.
- Feliciano, R.P., Mills, C.E., Istas, G., Heiss, C., Rodriguez-Mateos, A., 2017. Absorption, metabolism and excretion of cranberry (Poly)phenols in humans: a dose response study and assessment of inter-individual variability. *Nutrients* 9 (3). <https://doi.org/10.3390/nu9030268>.
- Hammiche, V., Maiza, K., 2006. Traditional medicine in central sahara: pharmacopoeia of tassili N'ajjer. *J. Ethnopharmacol.* 105 (3), 358–367.
- Hellali, N., Hadj-Mahammed, M., 2008. Analyse par GC-MS de l'huile essentielle de la plante *Cymbopogon schoenanthus* de la région de Illizi, obtenue par hydrodistillation assistée par micro-ondes. *PhytoChem. BioSub. J.* 21 (1), 5.
- Hnatyzyan, O., Moscatelli, V., Rondina, R., Costa, M., Arranz, C., Balaszczuk, A., Coussio, J., Ferraro, G., 2004. Flavonoids from *Achyrocline satureioides* with relaxant effects on the smooth muscle of Guinea pig corpus cavernosum. *Phytomedicine* 11 (4), 366–369.
- Ihm, S.H., Lee, J.O., Kim, S.J., Seung, K.B., Schini-Kerth, V.B., Chang, K., Oak, M.H., 2009. Catechin prevents endothelial dysfunction in the prediabetic stage of OLETF rats by reducing vascular NADPH oxidase activity and expression. *Atherosclerosis* 206 (1), 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2009.01.036>.
- Ishizuka, M., Koga, I., Zaima, K., Kaneda, T., Hirasawa, Y., Hadi, A.H., Morita, H., 2013. Vasorelaxant effects on rat aortic artery by two types of indole alkaloids, naucline and cadamine. *J. Nat. Med.* 67 (2), 399–403. <https://doi.org/10.1007/s11418-012-0689-0>.
- IUCN, I.U.F.C.o.N., 2005. A Guide to Medicinal Plants in North Africa (Malaga, Spain). IUCN Centre for Mediterranean Cooperation, Malaga, Spain.
- Ketoh, G.K., Glitho, A.I., Huignard, J., 2002. Susceptibility of the bruchid *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: bruchidae) and its parasitoid *Dinarmus basalis* (Hymenoptera: pteromalidae) to three essential oils. *J. Econ. Entomol.* 95 (1), 174–182.
- Khadri, A., Neffati, M., Smiti, S., Fale, P., Lino, A.R.L., Serralheiro, M.L.M., Araujo, M.E.M., 2010. Antioxidant, antiacetylcholinesterase and antimicrobial activities of *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng (lemon grass) from Tunisia. *LWT - Food Sci. Technol. (Lebensmittel-Wissenschaft - Technol.)* 43, 331–336. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.08.004>.
- Khadri, A., Serralheiro, M.L.M., Nogueira, J.M.F., Neffati, M., Smiti, S., Araújo, M.E.M., 2008. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of essential oils from *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng. Determination of chemical composition by GC-mass spectrometry and ¹³C NMR. *Food Chem.* 109 (3), 630–637. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.070>.
- Koba, K., Poutouli, P., Nenonen, Y., Songai, M.S., Raynaud, C., Sanda, K., 2007. Chemical composition and anti-termite activity of three tropical essential oils against termite species *Trinervitermes Geminatus* (Wasmann). *J. Sci. Technol.* 5 (2), 39–46.
- Konishi, Y., Hitomi, Y., Yoshioka, E., 2004. Intestinal absorption of p-coumaric and gallic acids in rats after oral administration. *J. Agric. Food Chem.* 52 (9), 2527–2532.
- Kulabas, S.S., Ipek, H., Tufekci, A.R., Arslan, S., Demirtas, I., Ekren, R., Sezerman, U., Tumer, T.B., 2018. Ameliorative potential of *Lavandula stoechas* in metabolic syndrome via multitarget interactions. *J. Ethnopharmacol.* 223, 88–98. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.04.043>.
- Lecci, A., Santicoli, P., Maggi, C.A., 2002. Pharmacology of transmission to gastro-intestinal muscle. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2 (6), 630–641.
- Lee, C.W., Sarna, S.K., Singaram, C., Casper, M.A., 1997. Ca²⁺ channel blockade by verapamil inhibits GMCs and diarrhea during small intestinal inflammation. *Am. J. Physiol.* 273 (4), G785–G794. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1997.273.4.G785>.
- Li, Q., Niu, S., Wang, R., Li, Y., Zhang, R., Zhu, D., 2012. Mechanisms that underlie the induction of vasodilation in pulmonary artery by rutin. *Int. Angiol.* 31 (6), 557–564.
- Lin, Y.T., Wu, B.N., Wu, J.R., Lo, Y.C., Chen, L.C., Chen, I.J., 1996. Vasomolol: an ultra short-acting and vasorelaxant vanilloid type beta 1-adrenoceptor antagonist. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 28 (1), 149–157.
- Lo, M.W., Matsumoto, K., Iwai, M., Tashima, K., Kitajima, M., Horie, S., Takayama, H., 2011. Inhibitory effect of Iboga-type indole alkaloids on capsaicin-induced contraction in isolated mouse rectum. *J. Nat. Med.* 65 (1), 157–165. <https://doi.org/10.1007/s11418-010-0478-6>.
- Locksly, H.D., Fayed, M.B.E., Radwan, A.S., Chari, M.V., Cordel, G.A., Wagner, H., 1982. Constituents of local plants XXV. Constitution of the antispasmodic principle of *Cymbopogon prooximus*. *Planta Med.* 45, 20.
- Mane, N., Viais, R., Martinez-Cutillas, M., Gallego, D., Correia-de-Sa, P., Jimenez, M., 2016. Inverse gradient of nitric and purinergic inhibitory cotransmission in the mouse colon. *Acta Physiol.* 216 (1), 120–131. <https://doi.org/10.1111/apha.12599>.
- Mata, R., Rojas, A., Acevedo, L., Estrada, S., Calzada, F., Rojas, I., Bye, R., Linares, E., 1997. Smooth muscle relaxing flavonoids and terpenoids from *Conyza filaginoides*. *Planta Med.* 63 (1), 31–35.
- McKay, D.L., Chen, C.Y., Zampariello, C.A., Blumberg, J.B., 2015. Flavonoids and phenolic acids from cranberry juice are bioavailable and bioactive in healthy older adults. *Food Chem.* 168, 233–240. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.062>.
- Meckes, M., Calzada, F., Tapia-Contreras, A., Cedillo-Rivera, R., 1999. Antiprotozoal properties of *Helianthemum glomeratum*. *Phytother. Res.* 13 (2), 102–105.
- Meckes, M., Torres, J., Calzada, F., Rivera, J., Camorlinga, M., Lemus, H., Rodríguez, G., 1998. Antibacterial properties of *Helianthemum glomeratum*, a plant used in maya traditional medicine to treat diarrhoea. *Phytother. Res.* 12 (2), 128–131. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199703\)11:2 <128::AID-PTR55>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199703)11:2 <128::AID-PTR55>3.0.CO;2-N).
- Mendel, M., Chlopecka, M., Dziekan, N., Karlik, W., 2016. Antispasmodic effect of selected Citrus flavonoids on rat isolated jejunum specimens. *Eur. J. Pharmacol.* 791, 640–646. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.10.006>.
- Mendel, M., Chlopecka, M., Dziekan, N., Karlik, W., Wiechetek, M., 2012. Participation of cholinergic pathways in alpha-hederin-induced contraction of rat isolated stomach strips. *Phytomedicine* 19 (7), 591–595. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2012.02.011>.
- Menut, C., Lamaty, G., Bessière, J.M., Molanguit, T., Ayedoun, M.A., Sossou, P.V., Sohounhoute, K.D., Djossou, L., Houenou, J.G., 2000. Aromatic plants of tropical west Africa. X. Volatile constituents of zanthoxylum zanthoxyloides lam. leaves and fruit pericarps from Benin. *J. Essent. Oil Res.* 12 (1), 33–35. <https://doi.org/10.1080/10412905.2000.9712035>.
- Mohammad Ali, R.M., 2012. Antibacterial and Phytochemical Screening *Lepidium Sativum* and *Cymbopogon Schoenanthus*. Faculty of Science. Khartoum University-Libya.
- Mohsin, A., Shah, A.H., Al-Yahya, M.A., Tariq, M., Tanira, M.O.M., Ageel, A.M., 1989. Analgesic, antipyretic activity and phytochemical screening of some plants used in traditional Arab system of medicine. *Fitoterapia* 60, 174–177.
- Olivier-Bever, B., 1986. Medicinal Plants in Tropical West Africa. Cambridge University Press.
- Paredes, M.D., Romecin, P., Atucha, N.M., O'Valle, F., Castillo, J., Ortiz, M.C., Garcia-Estan, J., 2018a. Beneficial effects of different flavonoids on vascular and renal function in L-NAME hypertensive rats. *Nutrients* 10 (4). <https://doi.org/10.3390/nu10040484>.
- Paredes, M.D., Romecin, P., Atucha, N.M., O'Valle, F., Castillo, J., Ortiz, M.C., Garcia-

- Estan, J., 2018b. Moderate effect of flavonoids on vascular and renal function in spontaneously hypertensive rats. *Nutrients* 10 (8). <https://doi.org/10.3390/nu10081107>.
- Pashikanti, S., de Alba, D.R., Boissonneault, G.A., Cervantes-Laurean, D., 2010. Rutin metabolites: novel inhibitors of nonoxidative advanced glycation end products. *Free Radic. Biol. Med.* 48 (5), 656–663. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.11.019>.
- Quézel, P., Santa, S., 1962. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales.
- Reiter, M., Brandt, W., 1985. Relaxant effects on tracheal and ileal smooth muscles of the Guinea pig. *Arzneimittelforschung* 35 (1A), 408–414.
- Rigat, M., Bonet, M.A., Garcia, S., Garnatje, T., Valles, J., 2007. Studies on pharmaceutical ethnobotany in the high river ter valley (pyrenees, catalonia, iberian peninsula). *J. Ethnopharmacol.* 113 (2), 267–277.
- Rizk, A., Heiba, H.I., Sandra, P., Mashaly, M., Bicchi, C., 1983. Constituents of plants growing in Qatar : V. Constituents of the volatile oil of *cymbopogon parkeri*. *J. Chromatogr. A* 279, 145–150. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)93612-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)93612-X).
- Tackholm, V., 1974. *Students' Flora of Egypt*, second ed. Cairo University, Cairo.
- USDA, A.R.S., 2015. USDA, ARS, National Genetic Resources Program. Germplasm Resources Information Network-(GRIN). National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland, USA.
- Wang, H.P., Lu, J.F., Zhang, G.L., Li, X.Y., Peng, H.Y., Lu, Y., Zhao, L., Ye, Z.G., Bruce, I.C., Xia, Q., Qian, L.B., 2014. Endothelium-dependent and -independent vasorelaxant actions and mechanisms induced by total flavonoids of *Elsholtzia splendens* in rat aortas. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 38 (2), 453–459. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.07.019>.