

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université de Ghardaia**



**Faculté des Sciences de la Nature et de Vie et Sciences de la Terre**

**Département de Biologie**

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de**

**MASTER**

**Filière : Science biologiques**

**Spécialité : Biochimie appliquée**

**Par : - KADI Mouna**  
**- BENHDID Inasse**

**Thème**

**Contribution à l'étude chimique et biologique de la plante**  
***Zilla macroptera* Coss.**

Soutenu publiquement, le 15 /06/ 2022, devant le jury composé de :

M. MAHAMEDI Alla Eddine	Maitre Assistant A	Univ. Ghardaia	Président
M. BELGUIDOUM Mahdi	Maitre de Conférence B	Univ. Ghardaia	Directeur de mémoire
M <sup>elle</sup> DJOUZA Loubna	Maitre de Conférence B	Univ. Ghardaia	Co-directeur de mémoire
M <sup>me</sup> BOUTARFAIA Amira	Maitre Assistant B	Univ. Ghardaia	Examineur 1

**Année universitaire : 2021-2022**

# Remerciements

Au nom d'Allah, le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux

Avant toute chose, je remercie dieu.

Je tiens tout d'abord à remercier très sincèrement mon directeur de mémoire Dr. BELGUIDOUM Mahdi et mon co-directeur Dr. DJOUZA Loubna pour l'encadrement, l'orientation, pour leurs patience, disponibilité et surtout leurs judicieux conseils.

Je remercie madame BOUTRFAIA Amira pour avoir accepté d'examiner ce travail. Je remercie monsieur MAHAMEDI Alla Eddine d'avoir accepté de présider le jury de notre mémoire.

Je remercie mes très chers parents , KADI Chikh et HASSAN Fatma , qui ont toujours été la pour moi. Je remercie mes sœurs Amira et Imane et Maya et mes frère Alaa et Mohamed pour leurs encouragements et leurs soutien inestimable.

Je désire aussi remercier mon grand frère MOUSSAOUI Latife et BEN SALEM Ayoubé pour leurs encouragements.

Un grand merci a mon amie MOULAY OMAR Hafsa qui m'a apporté de l'aide au laboratoire.

Enfin je remercie mes amies Tina , Bakhta, Rihabe, Randa ,Hadjira, Khadija pour leurs encouragement.

# Dédicaces

Cet mémoire est dédié...

À mes chers parents, source d'amour et d'encouragement.

À mes frères,

À mes sœurs et leurs époux,

À mon petit chers bébé joud,

À tous mes amis,

À ma belle-famille,

Kadi et Benhdid .

## Liste des abréviations

**A** : Absorbance

**DPPH** : diphényl picryl-hydrazyl.

**CI<sub>50</sub>** : Concentration d'Inhibition A 50 %.

**CCM** : Chromatographie sur couche mince.

**ATCC** : American Type Culture Collection.

**mg EAG/g** : milligrammes équivalent d'acide gallique par gramme de l'extrait sec.

**mg EQ/g** : milligrammes équivalent de quercetine par gramme de l'extrait sec.

## Résumé

Ce travail vise à étudier quantitativement et qualitativement la composition chimique de la plante *Zilla macroptera coss* en estimant son activité biologique, afin d'identifier les molécules bioactives et trouver l'utilité. Trois extraits de la plante ont été obtenus après macération puis extraction liquide-liquide avec des solvants de polarités croissantes. L'analyse quantitative de ces extraits a été assurée par la détermination de la teneur en polyphénols et en flavonoïdes. Ensuite l'activité biologique a été évaluée par la voie de l'activité antioxydante en utilisant trois méthodes et par la voie de l'activité biologique en utilisant la méthode de diffusion de puits contre deux souche *Escherichia coli* et *staphylococcus aureus*. Une analyse qualitative a été effectuée par chromatographie sur couche mince (CCM) puis on a tenté de séparer l'extrait acétate d'éthyle sur colonne en gel de silice.

L'extrait brut de *Zilla macroptera coss* a montré une activité antibactérienne surtout avec la souche *Escherichia coli*. Les différents extraits ont montré une bonne activité antioxydante, cela peut être relié à la teneur en polyphénols et en flavonoïdes, alors que ces substances sont considérées comme des agents antioxydants qui ont été particulièrement étudiés en raison de leur utilisation dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires pour leurs effets bénéfiques pour la santé.

**Mots clés :** *Zilla macroptera coss*, polyphénols, flavonoïdes, activité antioxydante , activité antibactérienne.

## الملخص

يهدف هذا العمل إلى الدراسة الكمية والنوعية للتركيبية الكيميائية لنبات *Zilla macroptera coss* بتقدير النشاط البيولوجي ، من أجل تحديد الجزئيات النشطة بيولوجيًا وإيجاد استخداماتها. تم الحصول على ثلاثة مستخلصات من النبتة بعد نقع واستخلاص سائل-سائل بمذيبات ذات قطبية متزايدة. تم التأكد من التحليل الكمي لهذه المستخلصات من خلال تحديد محتوى البوليفينول والفلافونويد . ثم تم تقدير افعالية البيولوجية عبر النشاط المضاد للأكسدة باستخدام ثلاث طرق وعبر الفعالية المضادة للبكتيريا بواسطة طريقة الانتشار الجيد ضد سلالتين من الإشريكية القولونية والمكورات العنقودية الذهبية . تم إجراء تحليل نوعي بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة ومن ثم قمنا بمحاولة لفصل مستخلص اسيتاتالإيثيل باستخدام عمود الفصل وهلام السيليكا.

أظهر مستخلص نبات *Zilla macroptera coss* نشاطاً مضاداً للبكتيريا خاصة مع سلالة الإشريكية القولونية وحتى المستخلصات المختلفة أظهرت نشاطاً جيداً مضاداً للأكسدة ، وقد يكون هذا مرتبطاً بمحتوى البوليفينول والفلافونويد ، بينما تعتبر هذه المواد من العوامل المضادة للأكسدة التي تم تحديدها بشكل خاص تمت دراستها نظراً لاستخدامها في المجالات الصيدلانية والتجميلية والغذائية لما لها من آثار صحية مفيدة.

**الكلمات الأساسية:** *Zilla macroptera coss*، البوليفينول، الفلافونويد ، نشاط مضاد للأكسدة، النشاط المضاد للبكتيريا.

## **Abstract:**

This work aims to quantitatively and qualitatively study the chemical composition of *Zilla macroptera coss* by estimating the biological activity, in order to identify the bioactive molecules and find their uses. Three extracts of the plant were obtained after maceration followed by liquid-liquid extraction with solvents of increasing polarity. The quantitative analysis of these extracts was ensured by the determination of polyphenol and flavonoid contents. Then the biological activity was evaluated through antioxidant activity pathway using three methods and through the antibacterial activity pathway using the well diffusion method against two strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. A qualitative analysis was carried out by thin layer chromatography (TLC), and then we tried to separate the ethyl acetate extract on silica gel column.

The extract of *Zilla macroptera coss* showed antibacterial activity especially with the *Escherichia coli* strain. The different extracts showed good antioxidant activity, this may be related to the content of polyphenols and flavonoids, while these substances are considered as antioxidant agents which have been particularly studied due to their use in the pharmaceutical, cosmetic and food fields for their beneficial health effects.

**Key words:** *Zilla macroptera coss*, polyphenols, flavonoids, antioxidant activity, antibacterial activity.

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01 :</b>	Les Souches bactériennes testées.....	15
<b>Tableau 02 :</b>	Résultats du criblage phytochimique.....	19
<b>Tableau 03 :</b>	Rendements des extraits de <i>Zilla macroptera</i> .....	20
<b>Tableau 04 :</b>	Contenu en polyphénols des différents extraits de <i>zilla macroptera cosss</i> en mgAG/g.....	21
<b>Tableau 05 :</b>	Dosage des flavonoïdes des différents extraits de <i>zilla macroptera cosss</i> .....	22
<b>Tableau 06 :</b>	CI <sub>50</sub> des différents extraits de <i>zilla macroptera cosss</i> .....	25
<b>Tableau 07 :</b>	CI <sub>50</sub> des différents extraits de <i>zilla macroptera cosss</i> .....	27
<b>Tableau 08 :</b>	IC <sub>50</sub> des différents extraits de <i>zilla macroptera cosss</i> .....	30
<b>Tableau 09 :</b>	Les résultats obtenus d' <i>E. coli</i> .....	31
<b>Tableau 10 :</b>	Les résultats obtenus de <i>S. aureus</i> .....	31

## Liste des Figures

<b>Figure N° 01 :</b>	Photo de <i>Zilla macroptera</i> .....	9
<b>Figure N° 02 :</b>	Processus de filtration et d'évaporation de solvant.....	10
<b>Figure N° 03 :</b>	Protocole d'extraction de <i>Zilla macroptera</i> .....	11
<b>Figure N° 04 :</b>	Réaction de test DPPH ( <b>Belguidoum, 2018</b> ). .....	13
<b>Figure N° 05 :</b>	Schéma sur la réaction de la réduction du fer .....	13
<b>Figure N° 06 :</b>	<i>E. coli</i> (à gauche) et <i>S. aureus</i> (à droite).....	14
<b>Figure N° 07 :</b>	Les cultures jeunes d' <i>E. Coli</i> et de <i>S.Aureus</i> .....	15
<b>Figure N° 08 :</b>	La série de dilutions.....	16
<b>Figure N° 09 :</b>	Les résultats de criblage phytochimique.....	19
<b>Figure N° 10 :</b>	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique .....	20
<b>Figure N° 11 :</b>	Dosage des phénols totaux de <i>Zilla macroptera coss</i> .....	21
<b>Figure N° 12 :</b>	Courbe d'étalonnage de la Quercetine.....	22
<b>Figure N° 13 :</b>	Dosage des flavonoïdes de <i>zilla macroptera coss</i> .....	23
<b>Figure N° 14 :</b>	activité antiradicalaire de l'acide ascorbique.....	23
<b>Figure N° 15 :</b>	Courbe d'inhibition du DPPH par l'extrait dichlorométhane .....	24
<b>Figure N° 16 :</b>	Courbed'inhibition du DPPH par l'extrait d'acétate d'éthyle.....	24
<b>Figure N° 17 :</b>	Courbe d'inhibition du DPPH par l'extraitde butanol .....	24
<b>Figure N° 18 :</b>	L'activité antiradicalaire: de <i>zilla macroptera</i> .....	25
<b>Figure N° 19 :</b>	Activité réduction de fer pour l'acide ascorbique.....	26
<b>Figure N° 20 :</b>	Courbe de l'activité réductrice du fer pour l'extrait dichlorométhane.....	26
<b>Figure N° 21 :</b>	Courbe de l'activité réductrice du fer pour l'extrait acétate d'éthyle .....	26
<b>Figure N° 22 :</b>	Courbe de l'activité réductrice du fer pour l'extrait butanol .....	27
<b>Figure N° 23 :</b>	Courbe standardde l'activité réductrice du fer pour l'acide ascorbique .....	27
<b>Figure N° 24 :</b>	Comparaison du pouvoir réducteur du fer pour les différents extraits de <i>Z. macroptera</i> .....	28
<b>Figure N° 25 :</b>	Courbe de l'activité antioxydantetotale pour l'extrait dichlorométhane.....	28
<b>Figure N° 26 :</b>	Courbe de l'activité antioxydantetotale pour l'extrait acétate d'éthyle .....	29
<b>Figure N° 27 :</b>	Courbe de l'activité antioxydantetotale pour l'extraitbutanol .....	29
<b>Figure N° 28 :</b>	Courbe standard de l'activité antioxydantetotale pourl'acide ascorbique .....	29
<b>Figure N° 29 :</b>	Activité antioxydant totale de <i>zilla macroptera coss</i> .....	30
<b>Figure N° 30 :</b>	Photo de l'activité antibactérienne.....	31
<b>Figure N° 31 :</b>	Test CCM des extraits ether du pétrole, dichlorométhane, acétate d'éthyle et butanol sous lampe UV (365 nm) et révélateur chimique (vanilline sulfurique).....	32
<b>Figure N° 32 :</b>	Colonne chromatographique de l'extrait acétate d'ethyle .....	32
<b>Figure N° 33 :</b>	Résultats de la colonne de l'extrait acétate d'éthyle .....	33

# Table des matières

<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>IV</b>
<b>RESUME.....</b>	<b>V</b>
<b>المخلص .....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT:.....</b>	<b>VI</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>VIII</b>
<b>I. INTRODUCTION.....</b>	<b>2</b>
<b>II. MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>9</b>
<b>1. Matériel .....</b>	<b>9</b>
1.1. La plante zilla macroptera coss.....	9
1.2. Réactifs chimiques.....	9
1.3. Les souches bactériennes .....	9
<b>2. Méthodes .....</b>	<b>9</b>
2.1. Criblage photochimique .....	9
2.2. Préparation des extraits.....	10
2.3. Analyse quantitative .....	12
2.3.1. Dosage des phénols totaux.....	12
2.3.2. Dosage des flavonoïdes.....	12
2.3.3. Activité biologique .....	12
<b>2.1. Analyse chromatographique .....</b>	<b>16</b>
<b>III. RESULTATS ET DISCUSSIONS.....</b>	<b>19</b>
<b>1. RESULTATS .....</b>	<b>19</b>
1.1. Criblage phytochimique .....	19
1.2. Rendement d'extraction .....	20
1.3. Dosage des phénols totaux .....	20
1.4. Dosage des flavonoïdes.....	21
1.5. L'activité antiradicalaire .....	23
1.6. Réduction de fer .....	26
1.7. Activité antioxydant totale .....	28

<b>1.8. Activité antibactérienne.....</b>	<b>31</b>
<b>1.9. Analyse chromatographique .....</b>	<b>32</b>
<b>2. DISCUSSIONS .....</b>	<b>34</b>
<b>IV. CONCLUSION.....</b>	<b>37</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>38</b>

# **Introduction**

## I. Introduction

La résistance des microorganismes aux antibiotiques classiques peut résulter soit de mutations soit de l'acquisition de gènes de résistance conférant la résistance à un ou plusieurs antibiotiques. Pour faire face à ce problème, une orientation vers un renouvellement constant des principes actifs est impérative (**Mwambete, 2009**). Les molécules recherchées doivent posséder diverses autres propriétés chimiques et utiliser de nouveaux mécanismes d'action pour lutter contre ces microbes pathogènes (**Mada et al., 2013**). D'après **Marin et Chrestin (2007)**, la source la plus intéressante de molécules entrant dans la formulation des médicaments pharmaceutiques sont les plantes d'intérêt médical de biomolécules quasi inépuisables.

En Algérie, les plantes sahariennes spontanées d'un nombre d'environ 650 espèces végétales dont 162 espèces endémiques (**Ozenda, 1958**), sont considérées comme l'une des ressources phytogénétiques d'intérêt agronomique, économique, écologique et également stratégique (**UNESCO, 1960**). Elles sont connues pour leur résistance à plusieurs facteurs de stress, elles pourraient constituer un réservoir de nouvelles biomolécules naturelles, efficaces, potentiellement utiles comme antioxydants dans des conditions climatiques extrêmes (**Bouaziz et al., 2009**). Ces molécules retardent ou inhibent l'oxydation éventuellement par des radicaux réactifs (**Kim et al., 2003**).

La famille des Brassicaceae appelée également les crucifères, la majorité de ses espèces se trouvent dans les climats frais, notamment dans les régions froides « tempérées de l'hémisphère nord » (**Ozenda, 1977**). Des plantes majoritairement variables ; annuelles, bisannuelles ou vivaces (**Quezel, 1963**).

C'est une des familles des plantes d'intérêt économique (**Rafael et al. 2005; Yanivet al. 1991**), certaines sont comestibles soit par leurs feuilles telles que les moutardes (*Brassica nigra*) (**Yanivet et al., 1991**), leurs bourgeons axillaires, par leur tige, par leur racine (*Raphanus sativus* : radis) ou encore par leur inflorescence (*Brassica oleracea* ssp *botrytis* : choux-fleur)

D'autres sont une source des huiles végétales (oléagineuses) : *Brassica oleracea* L. à graine d'un taux de 45 à 50 % d'huile. (**Yaniv et al., 1991**). Cette famille englobe également des plantes cultivées dans les jardins comme plantes ornementales, plus spécifiquement : les alyssons (*Alyssum* ou *Lobularia*), les girofles (*Erysimum*).

En médecine traditionnelle, cette famille est utilisée pour le traitement des maladies de l'intestin (**Bellakhdar, 1997**), des maladies de la peau en usage externe (**Smadi, 2006**), des maladies cardiaques et pour soulager les fièvres (**Zhen-Huan et al., 1998**) et également des cancers des poumons et des reins (**Pan et al. (2004), Brennan et al. (2005)**)

Selon **Cronquist (1988)**, le genre *Zilla* appartient à la famille des brassicacées, l'ordre des carrarales, la sous classe des dillenidae, la classe des magnoliopsida « dicotylédones ». *Zilla macroptera* Coss est une des espèces de ce genre, considérée parmi les plantes médicinales utilisées par la population saharienne dans la pharmacopée traditionnelle pour diverses maladies, les parties aériennes sont utilisées pour traiter les rhumatismes. C'est une plante vivace, épineuse, très rameuse, poussant en grandes touffes pouvant atteindre plus d'un mètre de longueur. Feuilles larges, un peu charnues, vertes, disposées sur les jeunes rameaux bien souples. La plante devient rapidement ligneuse et perd toutes ses feuilles, elle peut résister à une sécheresse sévère et repousse ensuite. Fleurs rose mauve, pouvant se trouver en très grand nombre (**Chehma, 2006**). Plante endémique du Sahara algérienne (**Ozenda, 1991**). Se rencontre en grandes touffes sur les terrains sablo graveleux des lits d'oueds et des dépressions au Sahara septentrional. Concernant la période de végétation : c'est en janvier- février que se fait la floraison

D'après **Chehma (2006)** les poils de cette plante sont à éviter, car ils sont très irritants. Dans le temps, elle était réduite en poudre et ajoutée au tabac. Concernant son intérêt pastoral : elle est broutée par les dromadaires, verte ou sèche, et ses fruits sont très appréciés. Selon **Berreghioua et al. (2014)**, *Zilla macroptera* à un intérêt médical, utilisée par la population locale pour diverses maladies tel que les troubles gastriques et des douleurs d'estomac, les diarrhées, des douleurs du foie et du pancréas

Le genre *Zilla* a fait l'objet de certaines études chimiques et biologiques ayant portés sur :

L'activité antibactérienne de *Zilla macroptera* (**Berreghioua et al., 2014**), des investigations phytochimique et antibactérienne sur la même espèce (**Berreghioua, 2016; Berreghioua et Cheriti, 2022**), une enquête ethno médicale, criblage phytochimique et activité antibactérienne de différents extraits de *Zilla macroptera* (**Berreghioua et al., 2013**). Une étude sur les Flavones et flavones glucoronide de *Zilla macroptera* L. (**Berreghioua et al., 2015**), une étude phytochimique et biologique (**Berhail Boudouda, 2014**), sur la composition chimique de l'huile essentielle de *Zilla Macroptera* Coss (**Sekkoum et al., 2015**). A propos de la capacité

antioxydante totale, pouvoir réducteur et voltamétrie cyclique de l'extrait aqueux de *Zilla macroptera* (Keffouset *al.*, 2016), sur l'activité antibactérienne et antioxydante (Bouchouka *et al.*, 2012) et sur l'optimisation du pouvoir réducteur pour test d'activité antioxydante et application sur deux plantes médicinales (Keffous *et al.*, 2019)

Au sein du protoplasme des cellules végétales les réactions chimiques continuent qui se déroulent donnent lieu à deux sortes de produits ; des métabolites primaires et secondaires. Un métabolite primaire est directement impliqué dans la croissance, le développement et la reproduction normale d'un organisme ou d'une cellule. Il a une fonction physiologique 'fonction intrinsèque'. Les métabolites primaires comportent les acides aminés, les lipides, les carbohydrates et les acides nucléiques.

Contrairement au métabolite primaire, un métabolite secondaire n'intervient pas directement dans ces processus physiologiques fondamentaux (indispensables) d'un organisme, mais nécessaires à leur survie, possède typiquement une fonction écologique importante (fonction relationnelle). Il est plus spécifique aux plantes, bactéries, champignons et certains groupes animaux. On retrouve ces composés phyto-chimiques dans des compartiments particuliers ou à des moments précis de la vie. Ce composé n'est pas totalement différent du métabolite primaire. Les métabolites secondaires dérivent parfois des mêmes voies de biosynthèse et certains, comme la chlorophylle et la lignine ont des fonctions indispensables pour la croissance de la plante, et pourraient donc faire partie des métabolites primaires.

Au temps présent, plus de 100 000 métabolites secondaires ont été identifiées, chaque végétal produit au moins une centaine de molécules différentes. Les métabolites secondaires ont des rôles très variés, servant à la défense (sécrétions amères ou toxiques pour les prédateurs) (Bell 1980; Pincemail *et al.*, 2007) ou au contraire, peuvent attirer certaines espèces ayant des rôles bénéfiques (pollinisateurs). Ou encore permettant la communication entre les plantes, par des messages d'alerte par exemple, ou faire partie de la structure de la plante (tanins et lignine).

Les métabolites secondaires se classent en groupes différents : les composés phénoliques, terpéniques, azotés et composés hétérosides. Concernant les « polyphénols » ou « composés phénoliques » ont un poids moléculaire élevé, largement distribués dans le règne végétal, d'après Ojeilet *al.* (2010), ils sont présents dans divers fruits et légumes et manifestent des activités antioxydantes et antiradicalaires (Vinson & Hontz, 1995) qui seraient à l'origine de la lutte contre les agressions de l'oxygène provoquant de nombreuses maladies, ce qui suscite

de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer (**Weiguang *et al.*, 2005**), des maladies inflammatoires (**Aruoma, 1994**), neurodégénératives (**Ramassamy, 2006**), et cardiovasculaires (**Leifert & Abeywardena, 2008**). Ils sont des molécules aromatiques constituées d'un groupement phényle (C6) et d'un hydroxyle (-OH). Ils sont caractérisés, comme l'indique le nom, par la présence de plusieurs groupements phénoliques associés en structures plus ou moins complexes. Dans cette famille on peut distinguer les acides phénoliques les flavonoïdes et les tanins (et lignines). La plupart de ces composés phénoliques dérivent d'acides aminés aromatiques : la tyrosine et la phénylalanine.

- **L'acide phénolique** ou acide-phénol est un composé organique possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Ces acides ont des propriétés anti-oxydantes. Ils peuvent contribuer à prévenir l'apparition de plusieurs maladies (cancers, maladies cardiovasculaires et maladies liées au vieillissement) en neutralisant les radicaux libres de l'organisme.
- **Les flavonoïdes** (ou bioflavonoïdes) forment une grande sous-classe des polyphénols (plus de 6000 flavonoïdes), presque toujours hydrosolubles ; sont des métabolites secondaires partageant tous une même structure de base à 15 atomes formée par deux cycles aromatiques reliés par trois carbones (C6-C3-C6). Découverts par Albert Szent-Györgyi en 1936. Nommés également vitamine P, du fait de leur normalisation efficace de la perméabilité des vaisseaux sanguins. Ils sont responsables des pigmentations des végétaux 'fleurs et fruits' en particulier, le jaune et l'orange (**Fofié *et al.*, 2017**) et représentent une source importante d'antioxydants dans notre alimentation. Basant sur la conformation de cette structure centrale et d'après **Zaiter (2017)** on peut distinguer dans les flavonoïdes des sous-classes ; les flavones, flavonols, flavanonols, flavanone, aurone et chalcone qui peuvent à leurs tours se diviser en d'autres sous-classes. Parmi les propriétés que les flavonoïdes possèdent, la protection des plantes contre les radiations ultraviolettes, la lutte contre les infections virales et bactériennes et. Agissent comme des pigments ou des co-pigments. Donnants des goûts amers et astringents éloignant les animaux herbivores. Les pigments colorés des fleurs servent à attirer les insectes pollinisateurs. Selon **Ghedira (2005)** ; ils pourraient exercer plusieurs activités biologiques, entre autres des propriétés antioxydantes, vasculoprotectrices, anti-ulcéreuses, antihépatotoxiques, anti-allergiques, anti-inflammatoires et même antitumorales significatives et également des activités antifongiques, antivirales et antidiarrhéiques.

- **Les tanins** : sont des polyphénols polaires de masse moléculaires oscillant entre 500 et 3000 Da. Caractérisés par leur capacité antioxydante et leur propriété thérapeutique. La synthèse de ce composé est un des moyens de lutte contre les agressions des microorganismes phytopathogènes (bactéries, champignons, virus) et des prédateurs (insectes, mammifères herbivores) (**Mueller-Harvey *et al.*, 2018**). Ils sont classés en deux catégories, largement répandus chez les végétaux supérieurs : Tannins hydrolysables et non hydrolysables « condensés ». Sur le plan chimique, ils sont constitués soit de polyol (glucose le plus souvent) des acides phénoliques soit d'oligomères ou polymères de flavanoides.

De point de vue biochimique, ce sont des composés phénoliques faisant précipiter les protéines (**Scalbert, 1991**), expliquant la sensation d'assèchement. Ont des propriétés antioxydantes, (protection cardio-vasculaire à doses modérées) et protectrices contre les toxicités induites par différents agents (UV les métaux lourds, les pollutions...)

- **Les terpénoïdes** « terpènes » des molécules variées des métabolites secondaires chez les végétaux, à nombre de carbones multiple de 5 « l'isoprène est le précurseur » (**Wise et Croteau, 1999**), Ce sont des lipides synthétisés à partir de l'acétyl-CoA « molécules hydrophobes ». D'un nombre de 20 000 molécules connues avec comme motif commun cette base isoprène. Au niveau des épines, des racines et des feuilles dans les vacuoles que les terpénoïdes sont stockés. Ils sont une classe d'hydrocarbures, produits par de nombreuses plantes « les conifères par exemple ». Ce sont des composants majeurs de la résine et de l'essence végétale et les métazoaires « terpènes » (phéromones et hormones sesquiterpéniques des Hexapodes, diterpènes d'organismes aquatiques. Leur squelette de carbone « arrangé linéairement ou sous forme des cycles » est constitué d'unités d'isoprène reliées entre elle. La formule brute générale est  $(C_5H_8)_n$

Généralement les terpénoïdes sont pour la plupart des anti-herbivores. A effets différents selon la plante, ils peuvent provoquer des convulsions, des allergies de la peau. D'un goût amer et peuvent également inhiber les microsymbioses de l'appareil digestif empêchant les insectes de se nourrir. Ils présentent une toxicité pour les insectes et les mammifères. A titre d'exemple les pyréthroïdes du chrysanthème qui agissent comme des insecticides (**Taiz et Zeiger, 2006**).

Les terpénoïdes sont utiles également au développement de la plante (peuvent stimuler la croissance des feuilles). Les diterpènes sont des hormones végétales impliquées dans beaucoup de réponses de la plante, elles provoquent aussi un allongement de la tige. Les caroténoïdes, sont des précurseurs de quelques vitamines (vit. A). Les dérivés terpéniques sont des constituants des huiles essentielles. Ils entrent dans la composition de divers médicaments « à visée décongestionnante » ou « à visée antiseptique et expectorante » (**Larivière *et al.*, 2005**). Le taxol, extrait de l'écorce, est un agent anti-cancéreux. Il inhibe la division cellulaire par stabilisation de la tubuline et du fuseau mitotique.

Notre étude consiste à étudier quantitativement et qualitativement la composition chimique de cette plante en estimant son activité biologique, afin d'identifier les molécules bioactives et trouver des applications pour cette plante endémique, non valorisée.

# **Matériel et méthodes**

## II. Matériel et méthodes

### 1. Matériel

#### 1.1. La plante *Zilla macroptera* coss

La plante *Zilla macroptera* (Brassicaceae) endémique du Sahara Algérien a fait l'objet de notre étude, où la récolte a été effectuée au mois de Mars de l'année 2022 dans la région de Ghardaïa. Le matériel végétal fraîchement récolté est séché puis coupé en petits morceaux.



Figure N° 01 : Photo de *Zilla macroptera*

#### 1.2. Réactifs chimiques

Les réactifs utilisés sont: DPPH (1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl), le réactif de Folin-Ciocalteu, l'acide ascorbique, l'acide gallique,  $AlCl_3$  (trichlorure d'aluminium), la quercétine, les solvants utilisés sont : l'éther du pétrole, l'éthanol, le dichlorométhane, Acétate d'éthyle, n- butanol et l'eau distillée.

#### 1.3. Les souches bactériennes

*Escherichia coli* (ATCC 8739) et *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) .

### 2. Méthodes

#### 2.1. Criblage photochimique

Le criblage a été réalisé sur deux extraits alcoolique et aqueux de *Zilla macroptera* coss, les tests menés visent à mettre en évidence la présence des principaux pigments, on a :

- La détection de Saponines :  
on ajoute quelque ml de l'extrait aqueux et bien mélangé.
- La détection de Flavonoïdes :  
Quelque ml de l'extrait alcoolique plus quelque goutte HCl et Mg.
- La détection de Stéroïdes :  
200 mg plante plus 10ml chloroforme après la filtration.

- La détection de Phénols :  
on ajoute quelque ml de l'extrait alcoolique plus quelque goutte de  $\text{FeCl}_3$  (5 %).
- La détection de Terpenoides :  
0,5 g plant plus 2 ml chloroforme plus 3 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$
- La détection de Tanins :  
quelque ml de l'extrait aqueux plus quelque goutte  $\text{FeCl}_3$  (0,1 %) .  
2 ml d'extrait plus quelque goutte de l'acétate de plomb.
- La détection de Sucre réducteur :  
Quelque goutte de l'extrait aqueux plus Fehling A et B
- La détection de Coumarines :  
2 ml de l'extrait aqueux plus 3 ml NaOH (10 %)

## 2.2. Préparation des extraits

Nous avons procédé à l'extraction des principes actifs en utilisant 340 g de la plante sèche et coupée en petits morceaux. Cette extraction solide liquide a été effectuée par macération à froid une seule fois dans l'éther de pétrole puis deux fois dans un mélange hydroalcoolique contenant 70 % éthanol et 30 % eau distillée avec renouvellement de solvant chaque 24 heures. Le macérat a été récupéré par filtration simple puis le solvant a été chassé à l'aide d'un évaporateur rotatif. L'extrait brut obtenu a subi une extraction liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par le dichlorométhane puis par l'acétate d'éthyle et finalement par le n-butanol. Les phases organiques obtenues sont concentrées à sec, pesées puis dissoutes dans l'éthanol pour donner les différents extraits destinés à notre étude. A la fin de l'opération, nous avons obtenu trois extraits à savoir l'extrait de dichlorométhane, l'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait butanolique.



Figure N° 02 : Processus de filtration et d'évaporation de solvant

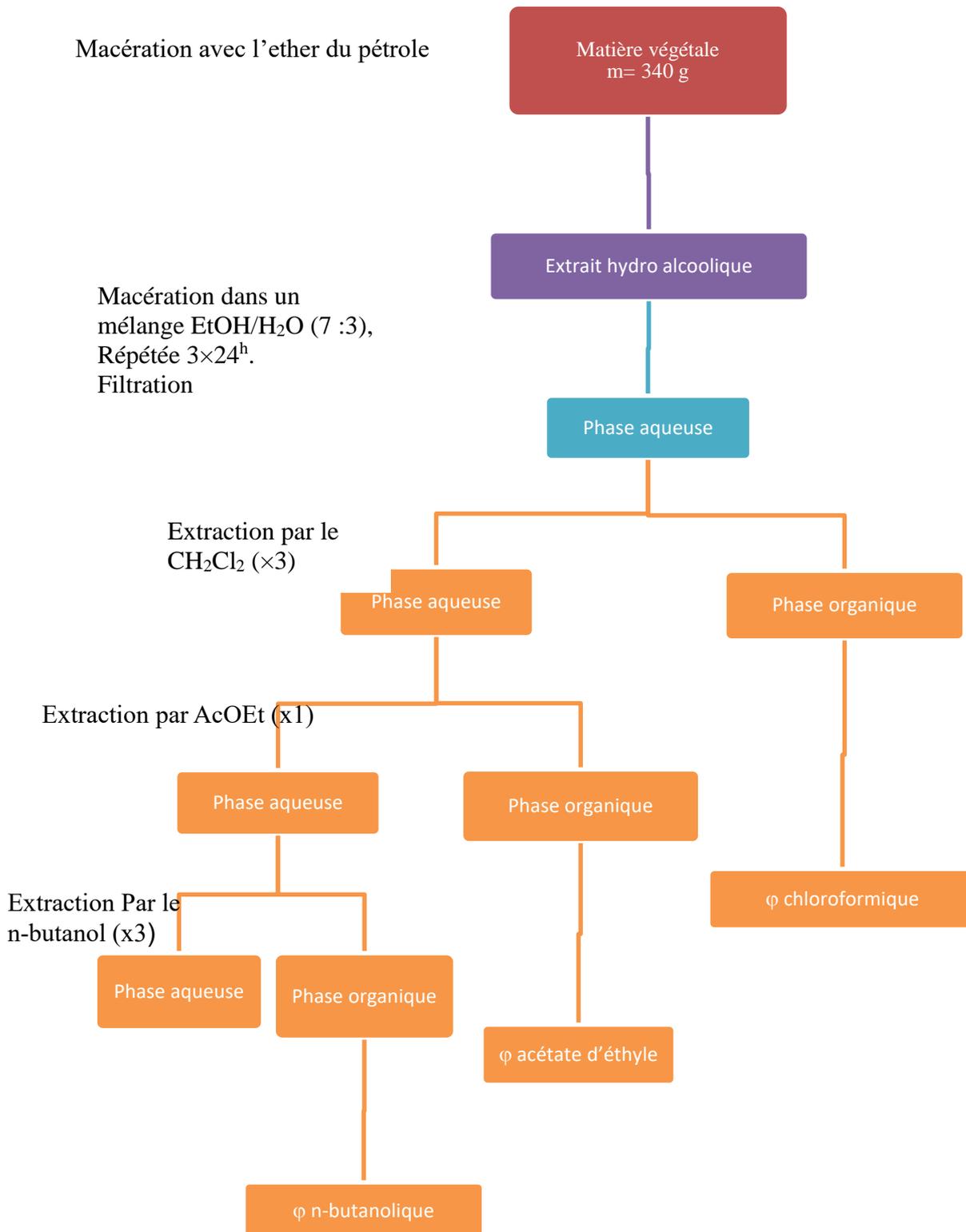


Figure N° 03 : Protocole d'extraction de *Zilla macroptera*

### 2.3. Analyse quantitative

L'analyse quantitative des polyphénols et des flavonoïdes a été effectuée par spectrophotométrie, cette dernière est une méthode qui consiste à mesurer l'absorbance généralement en solution afin de déterminer la concentration de l'espèce colorée; plus l'échantillon est concentré, plus il absorbe la lumière uv-visible.

#### 2.3.1. Dosage des phénols totaux

Le dosage est réalisé selon la méthode de Singleton et Rossi en utilisant le réactif de folin-Siocalteu (Chang *et al.*, 2001). 0,5 ml de réactif de Folin (10 fois dilué) est ajouté à 0,1 ml d'échantillon ou standard (préparés dans éthanol) avec des dilutions convenables. Après 5 min, 2 ml d'une solution de carbonate de sodium sont additionnés au milieu réactionnel. Après 30 min d'incubation à température ambiante l'absorbance est mesurée à 760 nm. La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique.

#### 2.3.2. Dosage des flavonoïdes

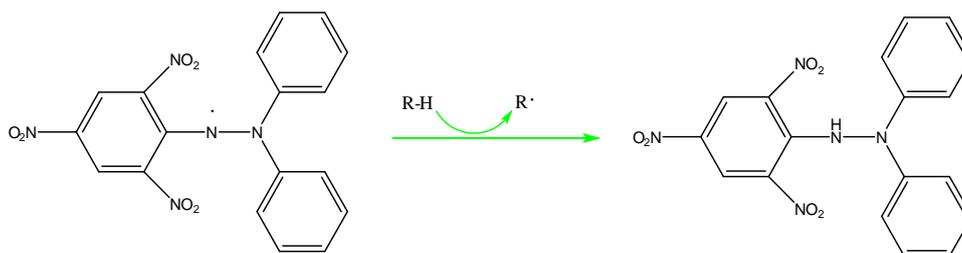
Le dosage est réalisé en utilisant la méthode du trichlorure d'aluminium (Wang *et al.*, 2008) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les extraits de *Zilla macroptera coss.* à 0,5 ml d'échantillon ou standard (préparés dans éthanol) avec des dilutions convenables, est ajouté 0,5 ml de la solution d' $AlCl_3$  (2 % dans l'éthanol). Après 30 minutes de réaction, l'absorbance est lue à 415 nm. La concentration des flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercitrine.

#### 2.3.3. Activité biologique

Les activités biologiques ont été assurées par deux voies dont la première est par l'activité antioxydante en utilisant trois méthodes différentes et par l'activité antibactérienne en utilisant la méthode de diffusion de puits:

##### 2.3.3.1. l'activité anti-radicalaire

L'activité de piéger les radicaux libre a été mesurée par la méthode de DPPH (Hsu *et al.*, 2006), de l'activité antioxydant des extraits de *Zilla macroptera coss.* Dans ce test les antioxydants réduisent le diphenyl picryl-hydrazyl ayant une couleur violette en un composé jaune, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (Figure 04).



**Figure N° 04 :** Réaction de test DPPH (Belguidoum, 2018).

0,5 ml des solutions d'extraits ont été ajoutés à 0,5 ml DPPH (0,9 g /l préparée dans éthanol). Parallèlement, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 0,5ml d'éthanol avec 0,5 ml de la solution méthanolique de DPPH. La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc préparé pour chaque concentration à 517nm après 30 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons et pour chaque concentration. L'activité anti radicalaire est estimée selon l'équation ci-dessous :  

$$\% \text{ d'activité anti radicalaire} = [(\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon}) / \text{Abs contrôle}] \times 100$$
 Les valeurs de l'EC50 ont été déterminées graphiquement par la régression linéaire.

### 2.3.3.2. Réduction de fer

Le pouvoir réducteur a été déterminé par la méthode de réduction de fer (Oyaizu *et al.*, 1986),. La méthode de la réduction du fer est basée sur la réduction de fer ferrique en sel de fer par les antioxydants qui donnent la couleur bleu (Belguidoum, 2018) selon la figure 05.



**Figure N° 05 :** Schéma sur la réaction de la réduction du fer

On ajoute 1 ml de l'extrait à différentes concentrations (dilué avec l'eau distillé) est mélangé avec 2,5ml d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5ml d'une solution de ferricyanure de potassium  $\text{K}_3\text{Fe(CN)}_6$  à 1 %. L'ensemble est incubé au bain-marie à 50°C pendant 30 min ensuite, 2,5 ml d'acide trichloracétique à 10 % sont ajoutés pour stopper la réaction. Un aliquote (2,5 ml) de solution résultante est combinée avec 2,5ml d'eau distillée et 0,5ml d'une solution aqueuse de  $\text{FeCl}_3$  (Chlorure ferrique) à 0,1 %. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil (spectrophotomètre UV-Visible).

Le contrôle positif est représenté par un standard d'un antioxydant; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés.

#### 2.3.3.3. Activité antioxydant totale

L'activité antioxydante totale a été déterminée par la méthode de phosphomolybdenum (Matkowski *et al.*, 2006). On ajoute 0,1 ml de l'extrait ou standard (acide ascorbique) à différentes concentrations (dilué avec l'eau distillé) est mélangé avec 1 ml de réactif ce dernier est préparé en mélangeant de acide sulfurique 0,6 M et phosphate de sodum 28 mM et molybdate d'ammonium 4 mM. L'ensemble est incubé au bain-marie à 95°C pendant 1h30 min après la lecture à 695 nm.

#### 2.3.3.4. Activité antibactérienne

Le test antimicrobien est réalisé par la méthode de diffusion de puits. Deux souches bactériennes pathogènes référentielles de l'American Type Culture Collection (ATCC) Gram positive et Gram négative ont été choisies pour leur pathogénicité élevée, utilisées pour évaluer l'activité antibactérienne de l'extrait de *Zilla macroptéra* sont *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. Elles ont été fournies par les responsables du laboratoire de Microbiologie Appliquée (FNSVT, Université Ghardaïa).

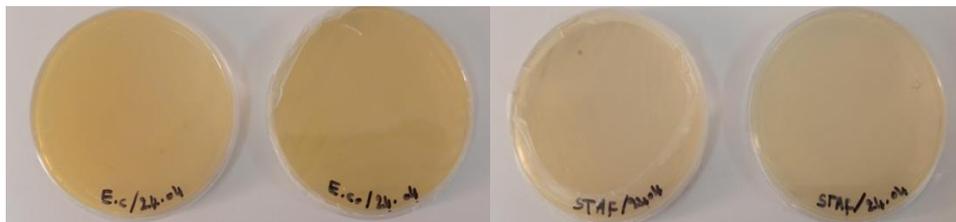


Figure N° 06 : *E. coli* (à gauche) et *S. aureus* (à droite)

Tableau 01 : Les Souches bactériennes testées

Souche	Référence	Type de bactérie	Famille	Pathologies causées
<i>Staphylococcus aureus</i>	29213	Gram+	Staphylococcaceae	Chez l'homme, <i>S.aureus</i> provoque l'infection cutanées ou muqueuses et l'infection septicémiques Chez les animaux domestique <i>S.aureus</i> implique dans infections intramammaire de la fougère en lactation ( <b>Sutra et al., 1994</b> )
<i>Escherichia coli</i>	8739	Gram-	Enterobacteriaceae	Chez l'homme, provoque diverses infections intestinales Chez les animaux ; des diarrhée hémorragique aigue ( <b>Pohlet et al., 1993</b> )

Les souches bactériennes ont été réactivées afin d'obtenir des cultures jeunes en phase de croissance exponentielle. Elles ont été repiquées sur gélose de Muller Hinton et incubées à 37 °C pendant 24 h.

Figure N° 07 : Les cultures jeunes d'*E. Coli* et de *S.Aureus*

Plusieurs colonies de chaque culture pure ont été prélevées et suspendues dans 5 ml d'eau physiologique stérile (9 %) pour obtenir une turbidité équivalente à 0.5 McFarland (**Bauer et al., 1966**). Ces suspensions utilisées aux ensemencements par écouvillonnage.

On a préparé 3 concentrations (100%, 75% et 50 %)

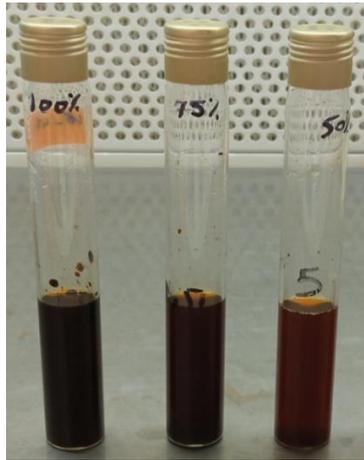


Figure N° 08 : La série de dilutions

Pour l'étude de l'activité antimicrobienne de l'extrait aqueux vis-à-vis des bactéries testées, la méthode de diffusion des puits a été suivie

La gélose de Muller-Hinton en surfusion est aseptiquement coulée dans des boîtes de Pétri à raison de 15 ml par boîte. Après solidification, un écouvillon stérile imbibé par la suspension bactérienne est étalé à la surface de la gélose à 3 reprises, en tournant la boîte à environ 60° après chaque application dans le but d'avoir une distribution homogène de l'inoculum. La concentration de l'inoculum est équivalente à 0.5 McFarland (*Bauer et al., 1966*).

Le pouvoir antimicrobien de l'extrait aqueux est recherché en utilisant 3 concentrations différentes. Trois puits « 5 mm de diamètre » ont été mis à chaque boîte. L'extrait, la kanamycine « control positif » et l'eau distillée « control négatif » ont été mis aseptiquement dans le premier, le deuxième et le 3<sup>ème</sup> puits respectivement.

Les boîtes ont été conservées à l'obscurité à 4°C pendant 1 h, pour permettre la diffusion des extraits du disque au milieu sans croissance microbiennes, ensuite ont été incubées pendant 24 heures à 37°C. L'effet de l'extrait sur les bactéries est évalué par mesure des diamètres des zones d'inhibition formée autour des puits à l'aide d'une règle.

### 2.1. Analyse chromatographique

Les trois extraits obtenus ainsi que la phase ether du pétrole ont été analysés sur des plaques de chromatographie sur couche mince (CCM). Différents tests ont été effectués afin de trouver le bon système d'élution dont le meilleur était :

Dichlorométhane / éthanol	(10/1)	pour l'extrait Dichlorométhane
Dichlorométhane / éthanol	(5/1)	pour l'extrait acétate d'éthyle
Dichlorométhane / éthanol	(2/1)	pour l'extrait butanolique

Ensuite on a procédé à la séparation de l'extrait acétate (masse = 100 mg) sur une colonne chromatographique en utilisant le gel de silice comme phase stationnaire et un mélange dichlorométhane/éthanol comme système d'éluion en commençant par 100 % Dichlorométhane puis on augmente la polarité progressivement en ajoutant l'éthanol.

## **Résultats et discussions**

### III. Résultats et discussions

#### 1. Résultats

##### 1.1. Criblage phytochimique

Les résultats du criblage phytochimique sont démontrés dans la figure 09 :



**Figure N° 09 :** Les résultats de criblage phytochimique

De droite à gauche : test de détection des saponines, test de détection des flavonoïdes, test de stéroïdes, test de phénols, test de terpenoïdes, test de tanins, test des Sucre réducteur et test de détection des Coumarines .

Les résultats du criblage phytochimique obtenus sont résumés dans le tableau 02 où la présence est marquée par un (+) et l'absence est marquée par un (-).

**Tableau 02 :** Résultats du criblage phytochimique

<i>Métabolites secondaires</i>	<b>Résultats</b>
<i>Saponines</i>	-
<i>Flavonoïdes</i>	+
<i>Stéroïdes</i>	-
<i>Phénols</i>	+
<i>Terpenoïdes</i>	+
<i>Tanins</i>	+
<i>Sucre réducteur</i>	-
<i>Coumarines</i>	+

### 1.2. Rendement d'extraction

Les rendements d'extraction sont ordonnés dans le tableau suivant :

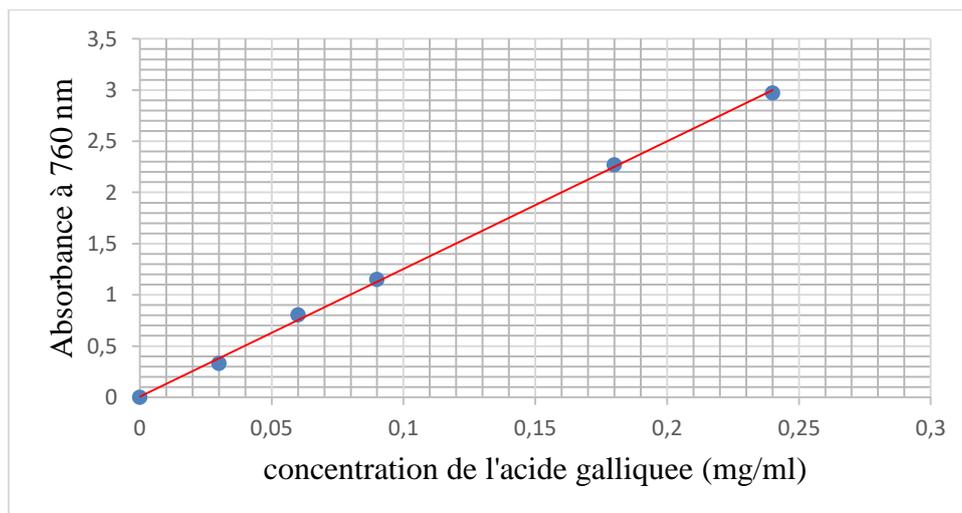
**Tableau 03** : Rendements des extraits de *Zilla macroptera*

<i>Extrait</i>	Dichlorométhane	Acétate d'éthyle	n-butanol
<i>Poids (g)</i>	0,31	0,69	1,45
<i>Rendement (%)</i>	0,091	0,202	0,426

On observe depuis les résultats du tableau 03 que le meilleur rendement d'extraction est enregistré au niveau de l'extrait butanolique puis l'extrait acétate d'éthyle et en dernière position l'extrait dichlorométhane.

### 1.3. Dosage des phénols totaux

Led dosage des phénols totaux a été effectué par la méthode de **Chang et al. (2001)**. Une série de dilution de l'acide gallique de 0,03 mg/ml jusqu'à 0,3 mg/ml a été préparé pour tracer la courbe d'étalonnage comme la démontre la figure 10 :



**Figure N° 10** : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

L'absorbance des extraits a été mesuré en suivant le même protocole et en remplaçant l'acide gallique par nos trois extraits. Afin de calculer les teneurs en polyphénols totaux on utilise l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique avec une corrélation linéaire  $R^2 = 0.999$  et la formule mathématique suivante :

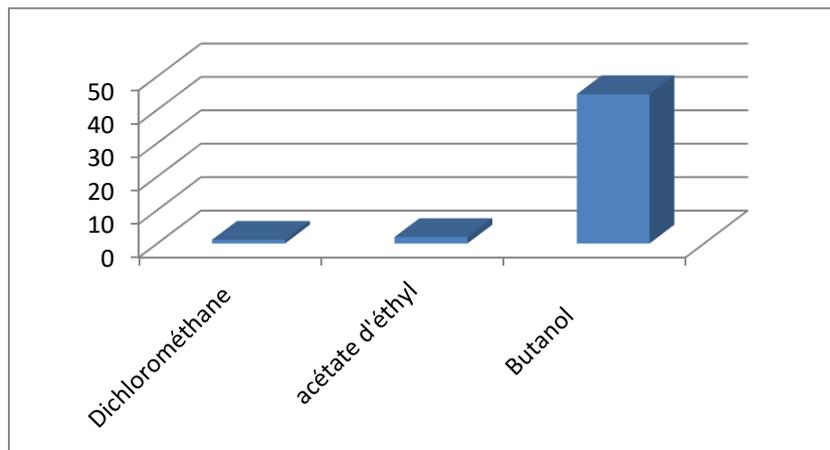
$$\text{Teneur en Phénols totaux} = \frac{\text{Absorbance} \times \text{Nombre de dilution} \times \text{Volume d l'extrait}}{\text{Pente de la courbe d'étalonnage} \times \text{masse de la plante}}$$

Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme de l'extrait sèc (mg EAG/g). Les résultats sont représentés dans le tableau 04.

**Tableau 04 :** Contenu en polyphénols des extraits de *Zilla macroptera* en mgAG/g

<i>Extrait</i>	<b>Moyenne ± erreur SD</b>
<i>Dichlorométhane</i>	1,106 ± 0,471
<i>acétate d'éthyle</i>	1,910 ± 1,279
<i>Butanol</i>	44,675 ± 1,224

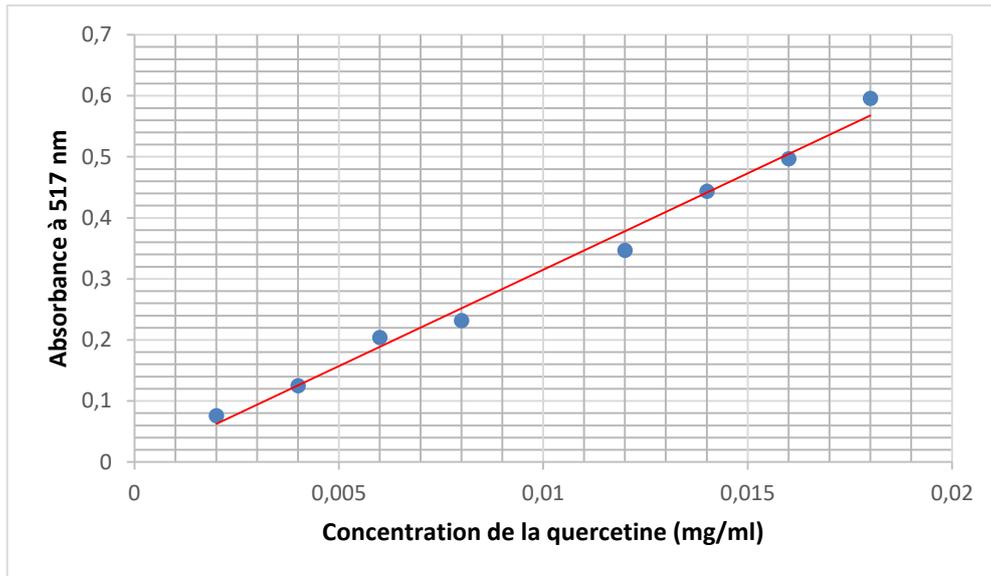
En comparant les résultats des trois extraits (Figure 11) on constate que l'extrait butanolique a démontré la plus grande teneur en phénols totaux suivie par l'acétate et en dernière place l'extrait de dichlorométhane. On remarque aussi que les deux extraits de dichlorométhane et d'acétate d'éthyle ont un contenu proche par contre l'extrait butanolique est 40 et 23 fois plus riche que celui de dichlorométhane et d'acétate d'éthyle respectivement.



**Figure N° 11 :** Dosage des phénols totaux de *Zilla macroptera coss*

#### 1.4. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été effectué par la méthode de **Wang et al. (2008)**. Une série de dilution de la quercétine de 0,002 mg/ml jusqu'à 0,2 mg/ml a été préparée pour tracer la courbe d'étalonnage comme la démontre la figure 12 :



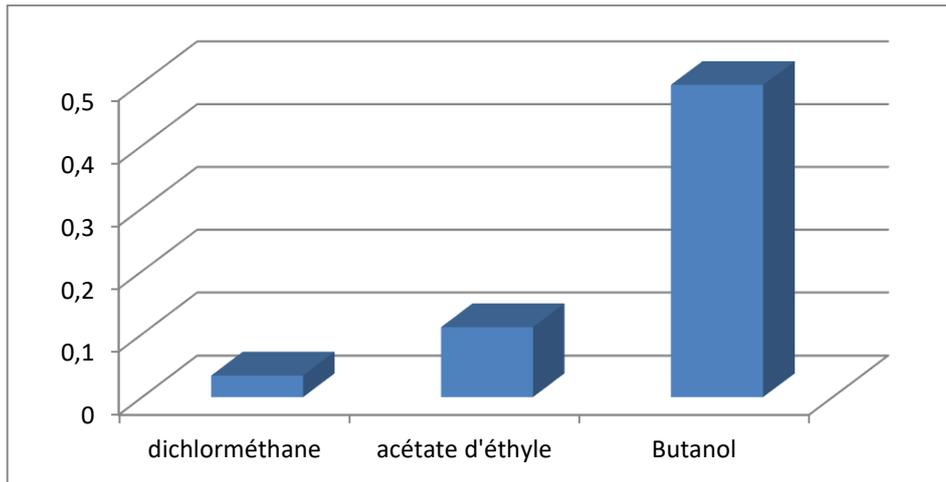
**Figure N° 12 :** Courbe d'étalonnage de la Quercétine

La teneur en flavonoïdes a été mesurée en remplaçant la quercétine par nos trois extraits. On utilise l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de la quercétine avec une corrélation linéaire  $R^2 = 0,989$ . Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent de quercétine par gramme de l'extrait sec (mg EQ/g). Les résultats sont représentés dans le tableau 05 :

**Tableau 05 :** Dosage des flavonoïdes des différents extraits de *Zilla macroptera* *cosss*

<i>Extrait</i>	<b>Moyenne ± erreur SD</b>
<i>Dchlorométhane</i>	0,034 ± 0,022
<i>acétate d'éthyle</i>	0,110 ± 0,019
<i>Butanol</i>	0,496 ± 0,348

En observant la teneur en flavonoïdes dans les trois extraits (Figure 13) on constate que l'extrait butanolique est le plus riche en flavonoïdes suivie par l'acétate et en dernière place l'extrait de dichlorométhane. On remarque aussi que l'extrait butanolique est 14 et 4 fois plus riche que celui de dichlorométhane et d'acétate d'éthyle respectivement.



**Figure N° 13 :** Dosage des flavonoïdes de *zilla macroptera coss*

### 1.5. L'activité antiradicalaire

L'activité d'inhibition du radical stable DPPH a été enregistrée par la mesure d'absorbance de chaque série de dilution pour chaque extrait contre un contrôle.



**Figure N° 14 :** Activité antiradicalaire de l'acide ascorbique

Ces valeurs d'absorbance nous ont permis de calculer le pourcentage d'inhibition pour chaque extrait à l'aide de la formule mathématique suivante :

$$I \% = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100$$

où :

$A_0$  : est l'absorbance du contrôle

$A$  : est l'absorbance de l'échantillon

Les résultats obtenus nous ont permis de tracer les courbes de l'inhibition en fonction de la concentration pour chaque extrait comme le démontrent les figures 15, 16 et 17 :

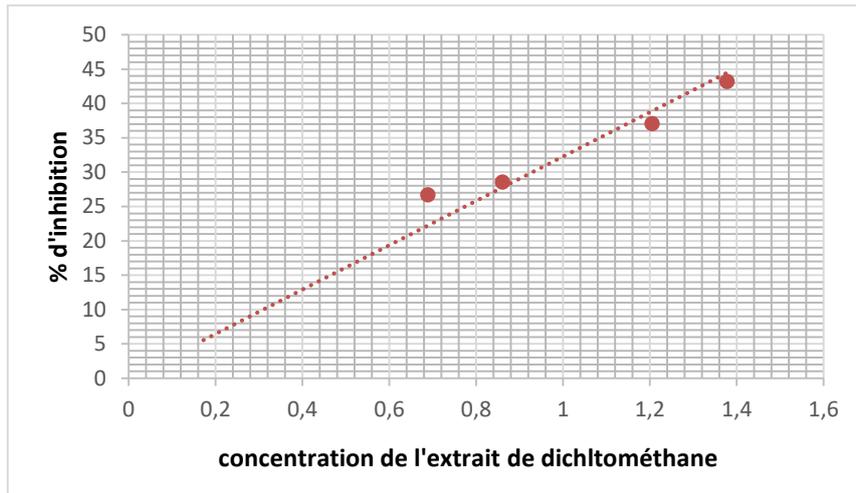


Figure N° 15 : Courbe d'inhibition du DPPH par l'extrait dichlorométhane

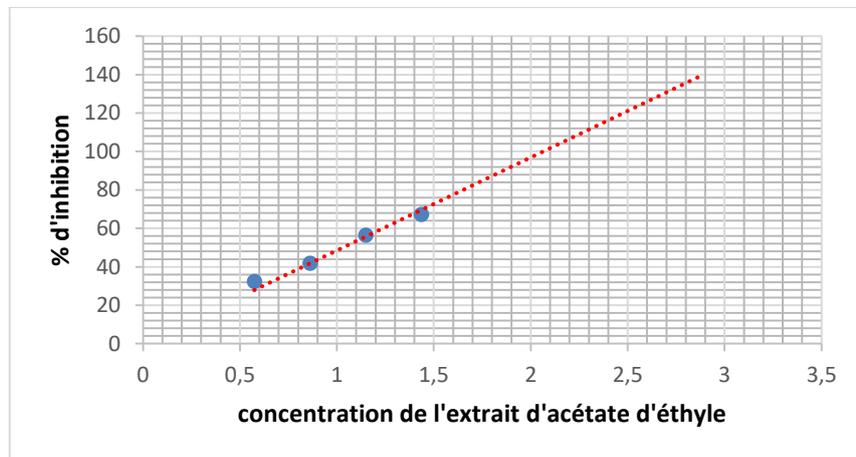


Figure N° 16 : Courbe d'inhibition du DPPH par l'extrait d'acétate d'éthyle

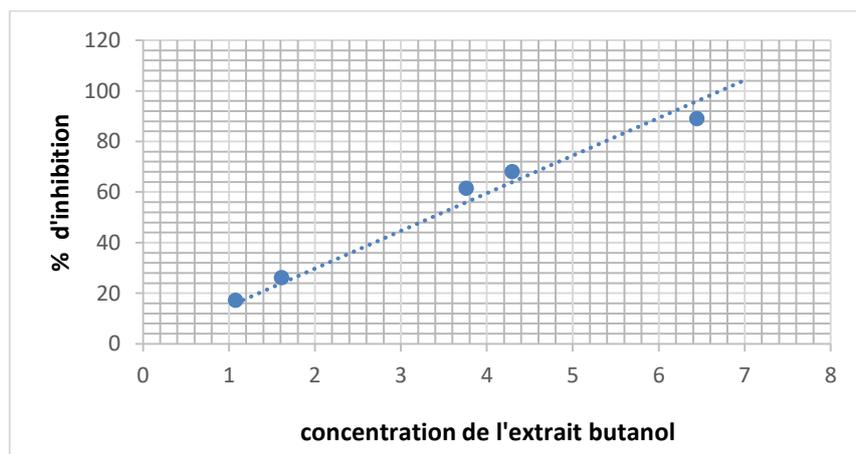


Figure N° 17 : Courbe d'inhibition du DPPH par l'extrait de butanol

Apartir de ces courbes, nous avons pu tirer les équations mathématiques pour chaque extrait qui s'écrit comme suit :

$$I \% = k C$$

Afin que nous puissions comparer les activités de nos extraits on a calculer la valeur  $CI_{50}$ , qui est la concentration inhibitrice neutralisant 50 % des radicaux libres, en utilisant la formule suivante :

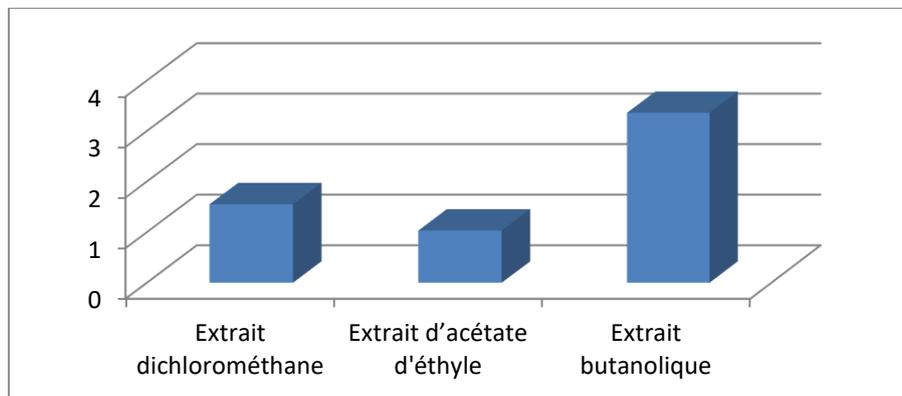
$$50 \% = k CI_{50}$$

Les valeurs des  $CI_{50}$  de nos extraits et le standard la vitamine C sont récapitulées dans le tableau 06 :

**Tableau 06 :**  $CI_{50}$  des différents extraits de *zilla macroptera* *cosss*

<i>Les extraits</i>	<b>IC<sub>50</sub> mg/ml</b>
<i>Extrait dichlorométhane</i>	1,55
<i>Extrait d'acétate d'éthyle</i>	1,03
<i>Extrait butanolique</i>	3,36
<i>Acide ascorbique</i>	0,014

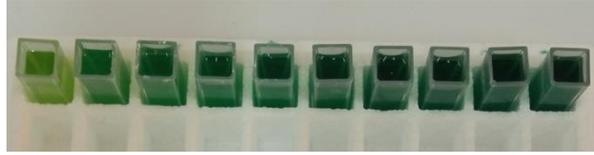
Les trois extraits ont démontré une bonne activité antiradicalaire dont l'extrait acétate d'éthyle était le meilleur inhibiteur de radicaux libres suivi par l'extarait dichlorométhane et en dernière position l'extrait butanolique (Figure 18). Nous rappelons que plus la valeurs de  $IC_{50}$  est petite plus l'activité est forte.



**Figure N° 18 :** L'activité antiradicalaire: de *zilla macroptera*

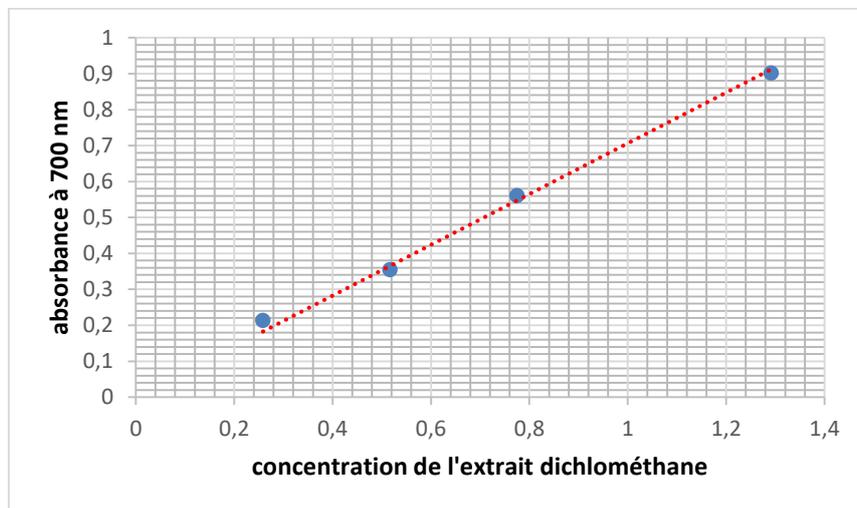
### 1.6. Réduction de fer

L'activité réductrice du fer des extraits a été estimée par la mesure d'absorbance de chaque série de dilution pour chaque extrait.

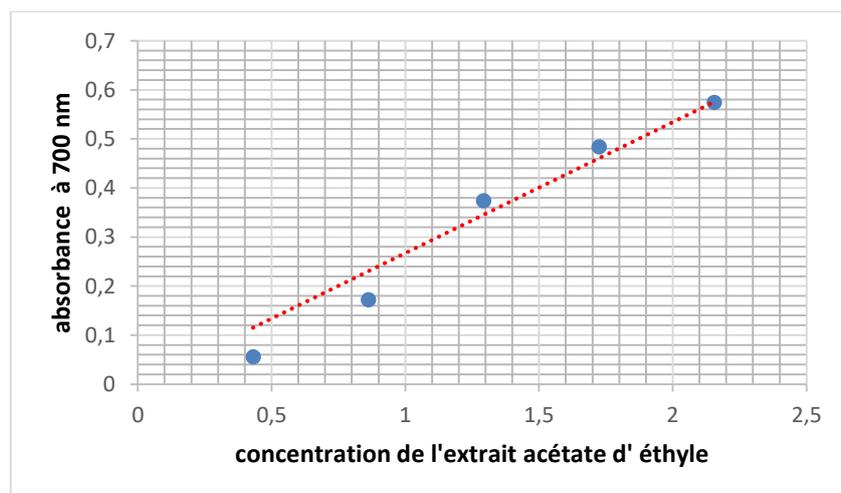


**Figure N° 19 :** Activité réduction de fer pour l'acide ascorbique

Ces résultats sont démontrés sous forme de courbes d'absorbance en fonction de concentration comme le montre les figures 20, 21, 22 et 23 :



**Figure N° 20 :** Courbe de l'activité réductrice du fer pour l'extrait dichlorométhane



**Figure N° 21 :** Courbe de l'activité réductrice du fer pour l'extrait acétate d'éthyle

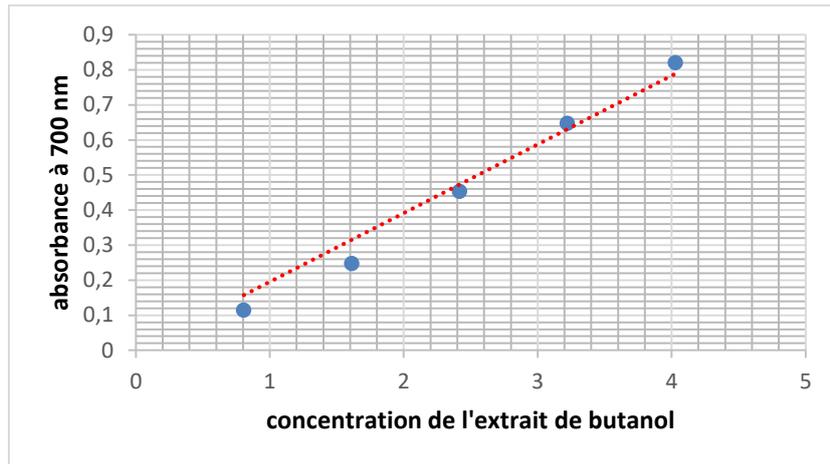


Figure N° 22 : Courbe de l'activité réductrice du fer pour l'extrait butanol

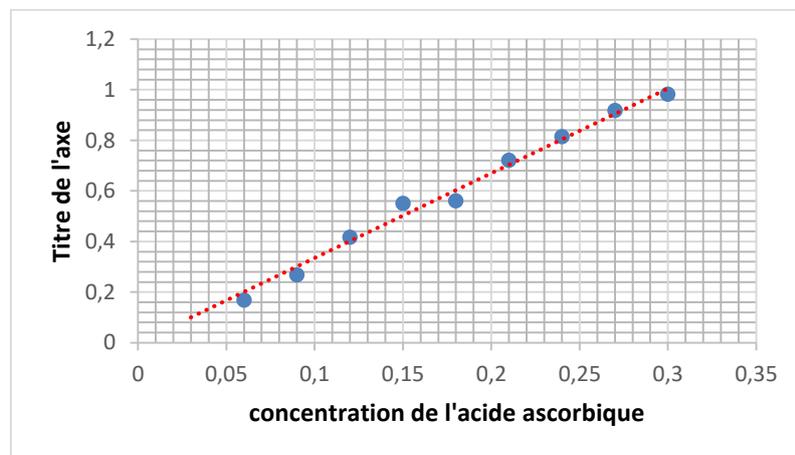


Figure N° 23 : Courbe standard de l'activité réductrice du fer pour l'acide ascorbique

Pour faire une comparaison entre nos extraits et le standard, nous avons calculé les  $CI_{50}$  en admettant que la  $CI_{50}$  est la concentration qui va donner une absorbance égale à  $A=0,05$ . Les valeurs de  $CI_{50}$  pour les trois extraits et le standard vitamine C sont illustrés dans le tableau 07 :

Tableau 07 :  $CI_{50}$  des différents extraits de *Zilla macroptera* cosss

Les extraits	$IC_{50}mg/ml$
Extrait dichlorométhane	0,7
Extrait d'acétate d'éthyle	1,75
Extrait butanolique	2,5
Acide ascorbique	0,15

D'après les résultats du tableau 7, on peut généraliser que tous les extraits ont manifesté une très bonne activité réductrice du fer. L'extrait de dichlorométhane a montré la plus petite valeur de  $CI_{50}$  suivi de l'extrait de l'acétate et en dernière position l'extrait du butanol (Figure 24). On remarque que l'extrait dichlorométhane est deux fois et demi plus active que l'extrait acétate d'éthyle et trois fois et demi plus active que l'extrait butanolique. On observe aussi que l'antioxydant naturel (acide ascorbique) est plus de 4 fois, plus de 11 fois et plus de 16 fois plus efficace que l'extrait de dichlorométhane, acétate d'éthyle et butanol respectivement.

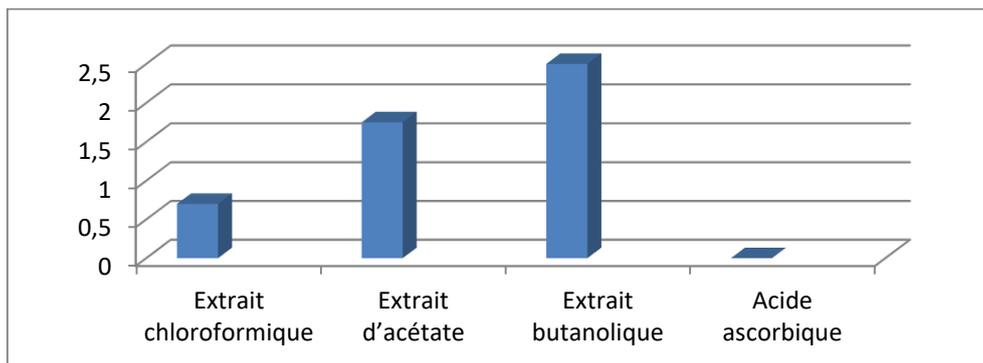


Figure N° 24 : Comparaison du pouvoir réducteur du fer pour les extraits de *Z. macroptera*

### 1.7. Activité antioxydant totale

Les résultats de l'activité antioxydant totale ont été estimés de la même manière que pour la réduction de fer où des courbes d'absorption en fonction des concentrations ont été tracées pour chaque extrait, comme le montre les figures 25, 26, 27 et 28 :

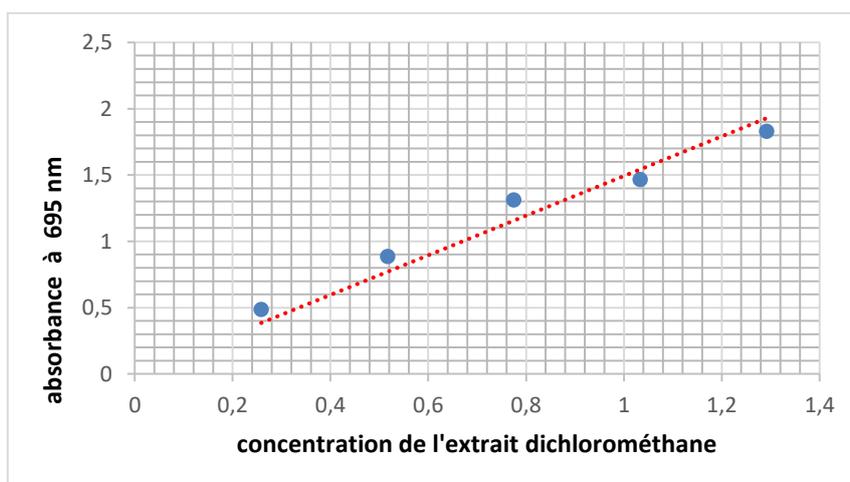


Figure N° 25 : Courbe de l'activité antioxydant totale pour l'extrait dichlorométhane

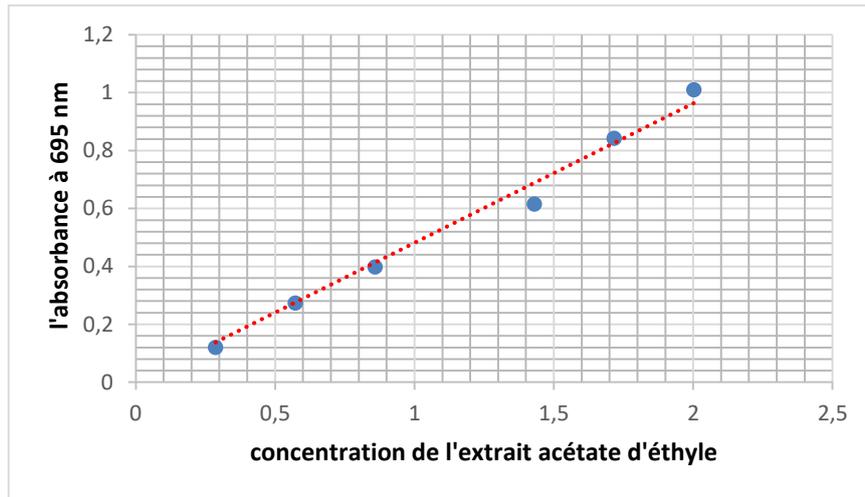


Figure N° 26 : Courbe de l'activité antioxydantetotale pour l'extrait acétate d'éthyle

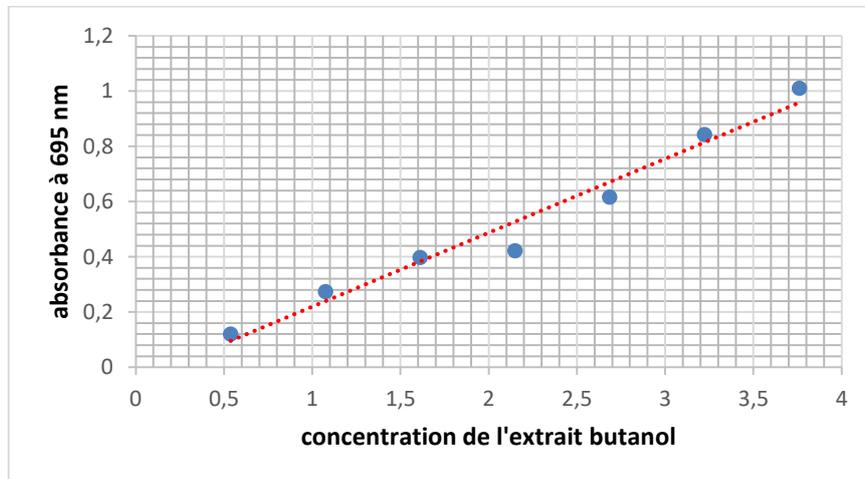


Figure N° 27 : Courbe de l'activité antioxydantetotale pour l'extraitbutanol

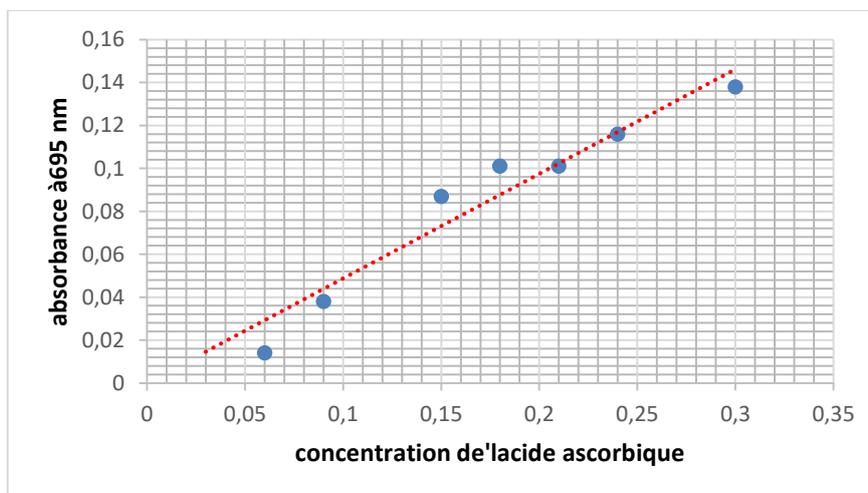


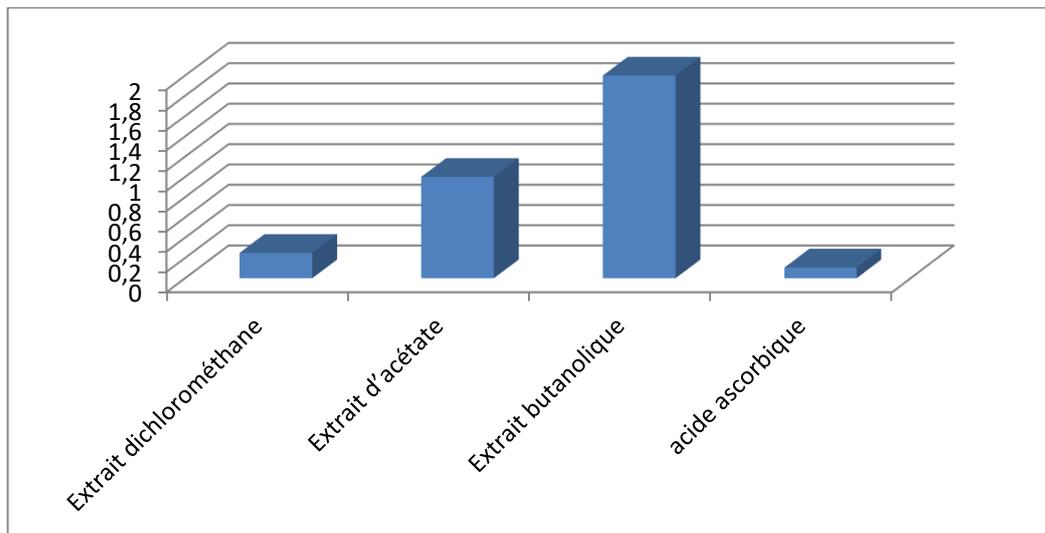
Figure N° 28 : Courbe standard de l'activité antioxydantetotale pour l'acide ascorbique

Pour faire une comparaison entre nos extraits et le standard , nous avons calculé les  $CI_{50}$  en admettant que la  $CI_{50}$  est la concentration qui va donner une absorbance égale à  $A=0,050$ . Les valeurs de  $CI_{50}$  pour les trois extraits et le standard acide ascorbique sont illustrés dans le tableau 08 :

**Tableau 08 :**  $IC_{50}$  des différents extraits de *Zilla macroptera* Coss

<i>Les extraits</i>	<b><math>IC_{50}</math> <math>\mu\text{g/ml}</math></b>
<i>Extrait dichlorométhane</i>	0,25
<i>Extrait d'acétate</i>	1
<i>Extrait butanolique</i>	2
<i>Acide ascorbique</i>	0,106

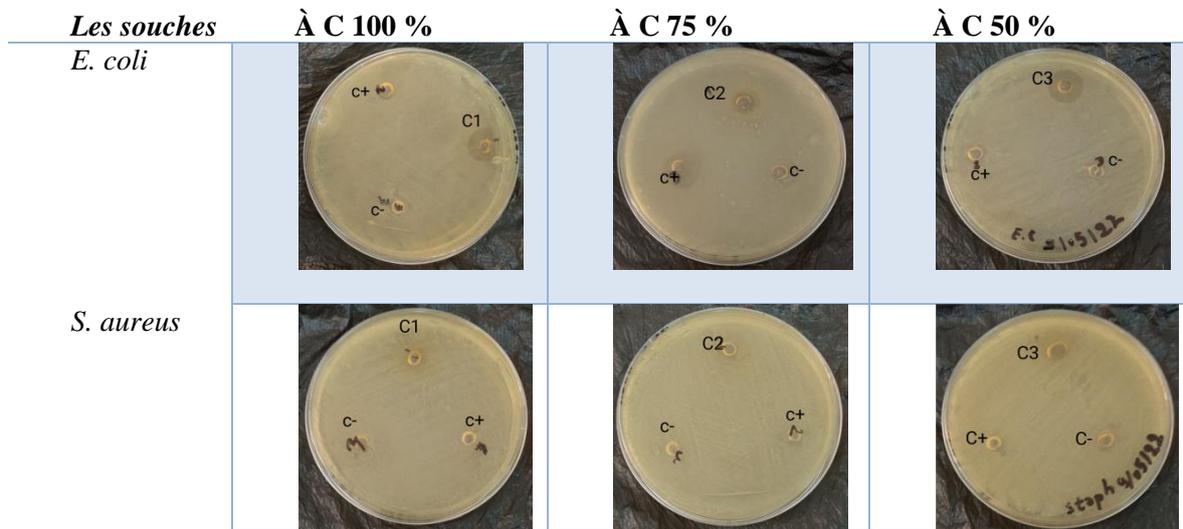
D'après les résultats du tableau 06 on remarque l'extrait dichlorométhane est le plus actif suivi par l'extrait acétate d'éthyle puis l'extrait butanolique. On aperçoit aussi que l'extrait dichlorométhane est quatre fois et huit fois plus actif que l'extrait acétate d'éthyle et l'extrait butanolique respectivement (figure 29).



**Figure N° 29 :** Activité antioxydant totale de *Zilla macroptera* Coss

**1.8. Activité antibactérienne**

Les résultats de l'activité antibactérienne de la plante contre les deux espèces bactériennes ‘Gram négatif et positif’ sont présentés par la figure 29 et les tableaux 9 et 10 :



**Figure N° 30 :** Photo de l'activité antibactérienne

**Tableau 09 :** Les résultats obtenus d'*E. coli*

<i>Les concentrations</i>	100 %	75 %	50 %
<i>Les trois puits</i>	C1	C2	C3
<i>diamètre</i>	15 mm	8 mm	14 mm

**Tableau 10 :** Les résultats obtenus de *S. aureus*

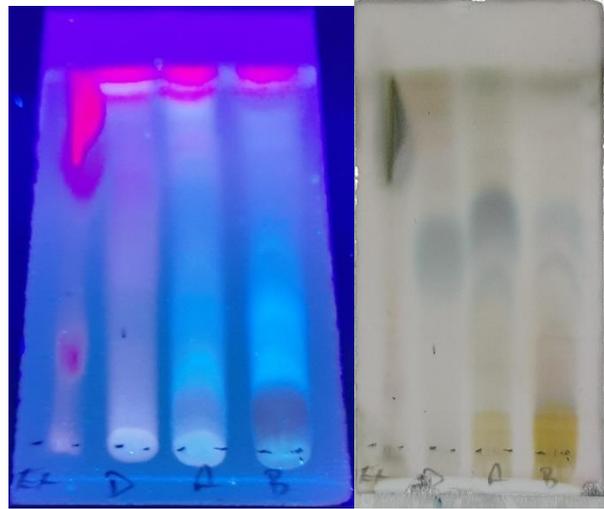
<i>Les concentrations</i>	100%	75%	50%
<i>Les trois puits</i>	C1	C2	C3
<i>diamètre</i>	10 mm	-	-

La taille de la zone d'inhibition varie en fonction la souche bactérienne utilisée et les propriétés antibactériennes du *Z.macroptera* Coss (Tableau 09 et 10).

Pour *E. coli* toutes les concentrations en extrait « 100 %, 75 %, 50 % » ont induit une zone d'inhibition  $\geq 3$  mm autour des puits donc elles sont considérées comme ayant une activité antibactérienne. Alors que pour la deuxième souche « *S aureus* » l'extrait brut a montré une activité mais plus faible que sur la première.

**1.9. Analyse chromatographique**

Les tests CCM (Figure 26) montrent clairement que nos trois extraits ainsi que la phase éther du pétrole ont une composition chimique différente. Cette différence se manifeste par des spots présentes dans un extrait et absentes dans un autre.



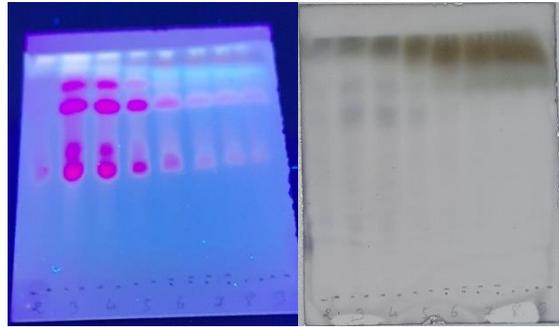
**Figure N° 31 :** Test CCM des extraits éther du pétrole, dichlorométhane, acétate d'éthyle et butanol sous lampe UV (365 nm) et révélateur chimique (vanilline sulfurique)

Une tentative de séparation des métabolites secondaires contenus dans les extraits de *Z. macroptera* a été faite. 100 mg de l'extrait acétate d'éthyle a été séparée sur une colonne remplie de gel de silice avec l'utilisation d'un système de solvant composé de dichlorométhane/éthanol en mode graduant comme le montre la figure 31.



**Figure N° 32 :** Colonne chromatographique de l'extrait acétate d'éthyle

Nos résultats (Figure 32) étaient limités à cause de la faible masse de l'extrait puisque les extraits ont été consommés lors l' évaluation des activités.



**Figure N° 33 :** Résultats de la colonne de l'extrait acétate d'éthyle

## 2. Discussions

Le criblage phytochimique confirme la présence des saponines, flavonoides, phénol et tannis. Cela est en total accordance avec les résultats des criblages effectués sur *Z. macroptera* (Berreghioua, 2016) et sur *Z. spinosa* (Suleiman *et al.*, 2020).

Les rendements d'extraction des solvants utilisés (dichlorométhane, acétate déthyle et butanol) étaient entre 0,091 et 0,426 %. En comparant ces rendement avec les travaux de Berreghioua (1 – 3,01 %) qui a utilisés le meme protocole avec notre travail on envisage que nos valeurs sont trop bas (Berreghioua, 2016).

Le contenu en phénols totaux varie entre 1,106 et 44,675 mg EAG/g extrait et le contenu en flavonoides varie entre 0,034 et 0,496 mg EQ/g extrait. L'extrait butanolique contient plus de phénols totaux et falovonoides que celui trouvé dans l'extrait aqueux brut de *Z. macroptera* de la région de Béchar (89 µgEAG/g et µg12 EQ/g) (Keffous *et al.*, 2016) et plus que l'extrait brut hydrométhanolique et hydroéthanolique de l'espèce *Z. spinosa* de l'égypte (31,10; 30,17 mg EAG/g extrait et 11,2mg EQ/g ; 7,4mg EQ/g) (Suleiman *et al.*, 2020), par contre nos extraits contiennent moins de phénols totaux et flavonoides que celui trouvé dans les fruits de *Z. macroptera* qui s'avère très riche avec une quantité égale à 423,94 mg EAG/g extrait et 119,48mg EQ/g (Bouchouk *et al.*, 2012).

Pour l'activité antiradicalaire, les valeurs de CI<sub>50</sub> de nos extraits varie de 1,03 à 3,36 mg/ml. Ces résultats sont trop inférieurs au pouvoir inhibiteur trouvé dans des différents extraits de *Z. macroptera* (de 15 - 205 µg/ml) (Berhail (2014) ; Keffous *et al.* (2016)) et dans *Z. spinosa* (29 ; 52,17 µg/ml) (Suleiman *et al.*, 2020)

Les diffétents extraits ont démontré un ordre similaire dans l'activité antioxydante totale et la réduction du fer, cela est du à la similitude du mécanisme d'action des deux protocoles qui est basé sur le transfert d'électrons.

L'idée de ce travail est de séparer l'extrait hydroalccolique de la plante *Z. macroptera* par une extraction liquide liquide, cette étape permait l'obtention de trois extrait de composition différente en se basant sur le principe de la polarité. Cet technique est considéré comme étape primordiale afin que nous puissions déterminer la nature chimique des métabolites secondaires responsable de l'activité biologique observée.

Tout cela est justifié par la différence enregistrée au niveau des résultats des trois extraits. Nous pouvons conclure que la différence enregistrée dans les valeurs des rendements, des dosages et des activités est principalement due à la différence de la composition chimique des métabolites secondaires contenus dans chaque extrait.

La richesse de la plante *Z. macroptera* en composés phénoliques tels que les flavonoïdes est responsable de l'activité biologique, comme le démontre le travail de thèse de Berhail il a pu séparer et identifier les composés suivants : Dehydrodicoumaroyl alcool-4-O-β-D-galactoside ; cistanoside B, 5-méthoxydehydrodicoumaroyl alcool-4-O-β-D-glucoside et 5-hydroxycatalpol et D-mannitol (**Berhail, 2014**). Nous trouvons aussi le travail de **Berregioua** qui a pu isoler et identifier les flavonoïdes suivants : 4', 5, 7-trihydroxyisoflavone (genistéine) ; 4', 5, 7-trihydroxyflavone (Apigénine) ; 8, 4' -diméthoxy, 5, 7 - dihydroxyflavone ; 7 - O - glucosyl apigénine ; 3', 4', 5, 7 - tétrahydroxyflavone (lutéoline) ; 5, 7 - dihydroxyflavone (chrysin) ; 5, 3' - dihydroxy - 6, 8, 4', 5'-tétraméthoxy - 7 - [2''''(4''''-méthyl pentyl)6'''' - méthyl-cyclohexyl]vinyloxy] flavone (**Berregioua, 2016**).

Concernant l'activité antibactérienne, les résultats trouvés prouvent les résultats de **Bouchouka et al. (2012)** et de **Berregioua et al. (2014)**, confirmant ainsi que les souches à Gram positif et négatif étaient sensibles à l'extrait de cette plante. Ces propriétés antibactériennes sont dues à la présence des flavonoïdes (**Cushnie et al., 2005**). Des études complémentaires sont recommandées afin d'isoler, d'identifier, de caractériser et d'élucider les structures des composés bioactifs d'intérêt.

# **Conclusion**

## **IV. Conclusion**

Les plantes médicinales représentent une source très riche de substances bioactives naturelles et de composés tels que les flavonoïdes. Une étude des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes a été effectuée sur les extraits de *Zilla macroptera coss* qui appartient à la famille de Brassicaceae.

L'extraction des molécules a été effectuée par extraction liquide-liquide en utilisant plusieurs solvants de polarité croissante (le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle, et le n-butanol) ce qui permet la séparation des différentes classes des métabolites secondaires tel que les flavonoïdes.

Les différents extraits obtenus ont été analysés quantitativement pour leurs contenus en polyphénols et flavonoïdes totaux, où l'extrait butanolique contient la teneur la plus élevée en flavonoïdes et en composés phénoliques pour *Zilla macroptera coss*,

Les extraits de *Zilla macroptira* ont montrés une bonne activité antioxydante, cela peut être lié à leur contenu en composés phénoliques et flavonoïdiques.

L'activité antibactérienne étudiée selon la méthode de diffusion de puits, a montré que les extraits de *zilla macroptera coss* ont un effet antibactérien contre la souche *Escherichia coli* (ATCC8739) plus que la souche *Staphylococcies aureus* (ATCC29213).

Dernièrement, une analyse qualitativement par chromatographie sur couche mince (CCM) a été effectuée. Cette technique a permis de visualiser les molécules de chaque extrait puis on a tenté de séparer ces molécules.

Afin d'approfondir ce travail, il a été marqué comme perspective d'extraire une plus grande quantité de la plante *Zilla macroptera* puis procéder à sa séparation de ces composantes ainsi que tester leurs activités biologiques.

## **Références bibliographiques**

## Références bibliographiques

- Aruoma, O.I. (1994). Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 32, 671-683.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C. and Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American journal of clinical pathology*, 45(4), 493.
- Belguidoum M. (2018). Etude de métabolites secondaires et quelques activités de plantes algériennes de la famille Zygophyllaceae. Thèse de doctorat. Université de Ouargla. 238p
- Bell E. A. (1980). The physiological role(s) of secondary (natural) products. In: The biochemistry of plants. A comprehensive treatise. Secondary plant products. Conn E. E. (Eds.), *Academic Press*, 7, 1-20.
- Bellakhdar J. (1997). " La pharmacopée marocaine traditionnelle. Medecine arabe ancienne et savoir populaire", *Ibis presse*, 213-224.
- Berhail Boudouda H. (2014). Etude phytochimique et biologique des espèces *Biscutellaraphanifolia*, *Zillamacroptera*, *Inulagraveolens* et *Inulaviscosa*. Thèse de doctorat, Université Constantine, 231p
- Berreghioua A., Cheriti A. & Belboukhari N. (2014). Antibacterial activity of *Zilla macroptera* extracts from Algerian Sahara, *Phytochemistry & Bioactives Substances Journal*. 8(2), 92-96.
- Berreghioua A. (2016). Investigation phytochimique sur des extraits bioactifs de deux brassicaceae médicinales du sud algerien : *Moricandiaarvensis* et *Zillamacroptera*. Thèse de doctorat, Université Abou bakrbelkaid –Tlemcen, 257p
- Berreghioua A. et Cheriti A. (2022). *Zilla macroptera*: Investigations Phytochimique et antibactérienne. Editions universitaires européennes.
- Berreghioua A., Cheriti A. and Belboukhari N. (2013). "Ethnomedical survey, phytochemical screening and antibacterial activity of different extracts from *Zilla macroptera*". 4<sup>o</sup> phytochem & BioSub. 1 et 2 décembre, Bechar, Algerie. (Poster)
- Berreghioua A., Cheriti A. and Belboukhari N. (2015). Flavone and flavone glucoronide from *Zilla macroptera* L. (Brassicaceae) growing in Algerian Sahara. *Der Pharma Chemica*, 7(8):197-201.
- Bouaziz M., Dhouib A., Loukil S., Boukhris M., Sayadi S. (2009). Polyphenols content, antioxidant and antimicrobial activities of extracts of some wild plants collected from the south of Tunisia. *African Journal of Biotechnology* 8 (24), 7017-7027.
- Brennan, P.; Hsu, C.C.; Moullan, N.; Szeszenia-Dabrowska, N.; Lissowska, J.; Zaridze, D.; Rudnai, P.; Fabianova, E.; Mates, D.; Bencko, V.; et al. (2005). Effect of cruciferous vegetables on lung cancer in patients stratified by genetic status: A mendelian randomisation approach. *Lancet*, 366, 1558–156

## Références bibliographiques

- Bouchouka EL., Djilani A., Bekkouche A. (2012). Antibacterial and antioxidant activities of three endemic plants from Algerian Sahara. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*. 1(11), 61-65.
- Chang, E. C. (2001). Optimism & pessimism: Implications for theory, research, and practice. *American Psychological Association*.
- Chehma A. (2006). Catalogue des plantes spontanées du Sahara septentrional algérien, Univ UKMO, 141p
- Cronquist A. (1988). "The evolution and classification of flowering plants". Columbia University Press, New-York.
- Cushnie T.P.T. and Lamb A.J. 2005. "Antimicrobial activity of flavonoids". *International Journal of Antimicrobial Agents*; 26: 343-356.
- Fofié N. B. Y., Kouakou L. P. M. S., Coulibaly, K.Sanogo, R.Koné-Bamba D.; (2017). Composition en sels minéraux et en métabolites secondaires de *Ziziphus mauritiana* Lam., une plante antihyperglycémiant. *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie*, 044, 30 – 35.
- Ghedira K. (2005). Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 4, 162-169.
- Hsu B., Coupar I. M., Ng K. (2006). Antioxidant activity of hot water extract from the fruit of the Doum palm, *Hyphaene thebaica*, *Food Chemistry*, 98(2), 317-328.
- Kaur S., Mondal P., (2014). Study of total phenolic and flavonoid content, antioxidant activity and antimicrobial properties of medicinal plants. *Journal of Microbiology & Experimentation*, 1(1), 23–28.
- Kim D. O., Chun O.K., Kim Y.J., Moon H.-Y., Lee C.Y. (2003). Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6509-6515.
- Keffous, F., Belboukhari, N., Djaradi, H., Cheriti, A., Sekkoum, K., & Y Aboul-Enein, H. (2016). Total antioxidant capacity, reducing power and cyclic voltammetry of *Zilla Macroptera* (Brassicaceae) Aqueous extract. *Current Bioactive Compounds*, 12(1), 39-43.
- Keffous F., Belboukhari N, Djaradi H, Rebizi N.M., Cheriti A, Sekkoum K & Aboul-Enein H Y. (2019). Optimization of the reducing power for antioxidant activity test and application on two medicinal plants; *Phytochemistry & Bioactives Substances Journal*, 13(2), 81-85.
- Larivière A., Miremont-Salamé G., Bertrand S., Couchouren F. et Haramburu F., avec la participation du département de l'évaluation des produits cosmétiques biocides et tatouages de l'Afssaps. (2005). Des terpènes dans les cosmétiques : à propos de deux cas de convulsions\* Terpenes in Cosmetics: Two Cases of Seizures. *Thérapie*, 60 (6), 607-609.
- Leifert, W.R, Abeywardena, M.Y. (2008). Cardioprotective actions of grape polyphenols. *Nutrition Research*, 28: 729–737.

## Références bibliographiques

- Mada S. B., Garba A., Mohammed H. A., Muhammad A., Olagunju A. and Muhammad A. B. (2013). Antimicrobial activity and phytochemical screening of aqueous and ethanol extracts of *Momordica charantia* L. leaves. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(10), 579-586
- Maiza K., Brace De Le Perriere R. A. et Hammiche V. (1993). Pharmacopée traditionnelle saharienne : Sahara septentrional. Actes du 2e colloque Européen d'Ethnopharmacologie et de la 11e Conférence internationale d'Ethnomédecine, Heidelberg: 169-171.
- Marin B. et Chrestin H. (2007). La valorisation des plantes médicinales. Fond documentaires ORSTOM.
- Matkowski, A., & Piotrowska, M. (2006). Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae. *Fitoterapia*, 77(5), 346-353.
- Mueller-Harvey, I., Bee, G., Dohme-Meier, F., et al.(2018). Benefits of condensed tannins in forage legumes fed to ruminants: importance of structure, concentration and diet composition. Invited review. *Crop Science*, 59, 861-885.
- Mwambete K. D. (2009). The in vitro antimicrobial activity of fruit and leaf crude extracts of *Momordica charantia*: a tanzania medicinal plant, *African Health Sciences*, 9 (1), 34-39
- Ojeil A., El Darra N., El Hajj Y., BouMouncefP., Rizk T J et Maroun R G. (2010). Identification et caractérisation de composés phénoliques extraits du raisin chateauxara. *Lebanese Science Journal*, 11(2), 117-131
- Ozenda P. (1958). Flore du Sahara : septentrional et central, Paris Centre National de la Recherche Scientifique
- Ozenda P. (1977). "Flore du sahara", Ed.CNRS, 250-259, Paris, France
- Ozenda P. (1991). Flore et végétation de Sahara. 3eme édition CNRS Editions. Paris p. 66, 271;
- Pan S.Y., Ugnat A.M. (2004). "A case control study of diet and the risk of ovarian cancer" *Cancer epidemiol Biomarkers Prev* , 13(9):1521-7.
- Pincemail, J., Degruneb, F., Voussurec, S., Malherbec, C., Paquotd, N., Defraigne, J.O. (2007). Effet d'une alimentation riche en fruits et légumes sur les taux plasmatiques en antioxydants et des marqueurs des dommages oxydatifs. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 21, 66-75.
- Pohl, P., Oswald, E., Van Muylem, K., Jacquemin, E., Lintermans, P., & Mainil, J. (1993). *Escherichia coli* producing CNF1 and CNF2 cytotoxins in animals with different disorders. *Veterinary Research*, 24(4), 311-315.
- Quezel P. et Santa S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales", Tome II, 387-398, Paris France.
- Oyaizu M. (1986). Studies on products of the browning reaction: antioxidative activities of browning reaction, *Japanese Journal of Nutrition*, 44(6), 307-315.

## Références bibliographiques

- Rafael F., Elina C. et Mercedes R. C. (2005). "Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales". *Phytochemistry*, 66 (12):175-185.
- Ramassamy, C. (2006). Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. *European Journal of Pharmacology*, 545: 51–64.
- Scalbert A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30, 3875-3883.
- Sekkoum K., Belboukhari N., Cheriti A., Aboulenein H. (2015). Chemical Composition Of The Essential Oil Of *Zilla Macroptera* Coss. From Algerian Sahara. *Current Bioactive Compounds*, 11(5), 100-103.
- Smadi A. (2006). Etude de l'extrait chloroformique d' *Oudneya africana*" mémoire de magister Université El-Hadj Lakhdar, Batna, Algérie.
- Suleiman M. H. A. and Ateeget A. A., (2020). Antimicrobial and Antioxidant Activities of Different Extracts from Different Parts of *Zilla spinosa* (L.) Prantl, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Volume 2020.
- Sutra, L., & Poutrel, B. (1994). Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology*, 40(2), 79-89.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Fisiologia vegetal* (Vol. 10). Universitat Jaume I.
- UNESCO, (1960). Les plantes médicinales des régions arides. *Recherche sur les zones Arides*. Vol. (13), Paris, 99 p.
- Vinson, J.A., Hontz, B.A. (1995). Phenol antioxidant index: comparative antioxidant effectiveness of red and white wines. *Journal of agricultural and food chemistry*, 43, 401-403.
- Wang H., Gao X. D., Zhou G. Cai C, L., Yao W. B. (2008). In vitro and in vivo antioxidant activity of aqueous extract from *Choerospondias axillaris* fruit, *Food Chemistry*, 106(3),888-895.
- Weiguang, Y., Joan, F., Casimir, C.A. (2005). Study of anticancer activities of muscadine grape phenolics in vitro. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53, 8804–8812.
- Wise, M.L., Croteau, R. (1999). *Comprehensive Natural Products Chemistry: Isoprenoids Including Carotenoids and Steroids*. Cane, DE, Ed.
- Yaniv Z., Elber Y., Zur M. and Shafferman D. (1991). "Differences in fatty acid composition of oils of wild cruciferae seed". *Phytochemistry*, 30, 841-843
- Zaiter A. (2017). Étude de la phytochimie de 12 plantes de la région Lorraine en fonction de la granulométrie de poudres super fines. Agronomie. Université de Lorraine, 2017.
- Zhen-Huan L., Shoji Y., Toshihiro N., Tai-Bao S., Jin-Zhe, X. (1998). *Phytochemistry*, 49 (6), 1801-1803