



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministre de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Larbi Tebessi-Tebessa

Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de biologie appliquée

N° d'ordre :.....

N° de série :.....

Mémoire présenté pour l'obtention du diplôme de

Master

Filière : Sciences biologiques

Option : Toxicologie

Thème :

Etude quantitative des composés phénoliques des extraits de deux plantes médicinales (*Thymus ciliatus* Desf. et *Rhanterium suaveolens* Desf.) et évaluation in vitro de leur activité antioxydante et anti-Alzheimer

Présenté et soutenue par :

Oumaima DAGHBOUDJ

Roumaissa NAOUI

Souad MOUAIA

Devant les membres du jury :

Président : Dr. Taher GHOUDJIL

Université Larbi Tebessi-Tebessa

Promotrice : Dr. Nadia DJERMANE

Université Larbi Tebessi-Tebessa

Examineur : Dr. AMMAR BENLAKHAL

Université Larbi Tebessi-Tebessa

Année universitaire 2021-2022

(بِسْمِ اللّٰهِ الرَّحْمٰنِ الرَّحِیْمِ)

Remerciements

Tout d'abord, nous remercions, du plus profond de notre cœur, **Dieu** le tout puissant de nous avoir donné le courage et la volonté d'achever ce travail.

Nous remercions, très chaleureusement **Mme Djermane Nadia** (Maître de conférence « B » à l'Université cheikh Larbi Tebessi) notre promotrice, on tient vivement à lui exprimer notre profonde reconnaissance et notre gratitude pour sa disponibilité, sa patience et sa compréhension. Merci pour vos précieux conseils et votre soutien à tous les instants, et surtout merci pour vos qualités scientifiques et humaines qui resteront à jamais un bon exemple pour nous.

Nous remercions la présidente du jury, **Mr.Goudjil Tahar** (Maître de conférence « B » à l'Université cheikh Larbi Tebessi d'avoir accepté de présider le jury. Nous remercions également **Mr.Benlakhel Ammar** (Maître assistant « A » à l'Université cheikh Larbi Tebessi) de nous avoir honorés en examinant notre travail.

Nos remerciements vont à tous ceux qui ont participé, de près ou de loin à l'attribution de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à mes parents aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour Dont ils ne cessent de me combler. Que dieu leur procure bonne santé et longue vie.

Ma mère qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutiens tous, pour toute son assistance et sa présence dans mon cœur, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

Mon père, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutient permanent venu de toi.

A mon cher frère *Lazher* et mes sœurs *Bouthaina, khouloud* les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous.

A ma deuxième famille « Mes ami(e)s » « *Souad, Oumaima, Ayoub, Lamis, Balkis, Salma, Hiba, Asma* » qui m'ont apporté la force, la joie, le bonheur, ils m'ont toujours comblé avec leurs présences, et amour.

Naoui Roumaissa

Dédicace

Je dédie ce travail Aux êtres les plus chers : Mes parents pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études

A ma mère

que dieu lui fasse miséricorde, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutiens tous, pour toute son assistance et sa présence dans mon cœur, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

A mon père

Toute l'encre, du monde ne pourrait suffire pour exprimer mes sentiments envers un être très cher. Vous avez toujours été mon école de patience, de confiance et surtout d'espoir et d'amour. Vous êtes et vous resterez pour moi ma référence, la lumière qui illumine mon chemin. Ce travail est le résultat de l'esprit de sacrifice dont vous avez fait preuve, de l'encouragement et le soutien que vous ne cessez de manifester, j'espère que vous y trouverez les fruits de votre semence et le témoignage de ma grande fierté de vous avoir comme père. J'implore Dieu, tout puissant, de vous accorder une bonne santé, une longue vie et beaucoup de bonheur.

A mes chers frères : Imed et Ayoub et

A ma petite belle eline et ma chère hasna et amina

A ma deuxième famille « Mes amis » :

«Balkis, achouak , douaa ,roumaissa souad , salma et hiba »

Oumaima daghboudj

Dédicace

Je dédie ce travail à

À ma chère ma mère

Pour son amour, son affection et sa patience. Le secret de mon bonheur et la source de ma force qui a sacrifié sa vie pour notre succès, que Dieu vous bénisse pour la vie.

À mon père

qui a toujours été pour moi un exemple du père respectueux. Je suis fier de porter ton nom

A mes très chers frères **Ali et Mourad** et mes sœurs **houria , hanen, afef, fatma oumaïma , najet mounia et bouthaina**. Mes chères manel , sana et mes petites bébés **ala jouri ranim rasim** et tantes Zina , Hadya , nadia et dalila les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous.

A ma deuxième famille « Mes ami(e)s » qui m'ont apporté la force, la joie, le bonheur, ils m'ont toujours comblé avec leurs présences, et Amour.

«**Ikram , oumaïma , balkis , roumaïssa, zayneb, salma , hiba ,lamis, , abir , asma , amel , bouthaina ,hasna , manel, nabih, houssein , taki , ramzi , ali , zaki et lamine** », je vous aime énormément.

Mouaia Souad

LISTE DES ABBREVIATIONS ET SYMBOLES

ABTS	L'acide 2,2- azino- bis
ADN	Acides désoxyribonucléique
ATP	Acides ribonucléique
ACHE	L'acétylcholinestérase
BCHE	Butyrylcholinestérase
DPPH	Diphényl-1-picrylhyd-razyl
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
C°	Degré Celsius
ERO	Espèces Réactives Oxygéné
EGA	Equivalent Acide galique
EQ	Equivalent Quercetine
FT	Flavonoïde totaux
g	Gramme
H	Heure
H+	Hydrogéné
HE	Huile Essentiel
H2O	Eau
H2O2	Peroxyde d'hydrogène
HOO	Radical hydroperxyle
R	Radical
RO	Radical alkoxyde
RL	Radicaux Libres
ROO	Radical peroxide
ROOH	Hydro peroxide
<i>R.suaveolans</i>	<i>Rhantrium Suaveolans</i>
M	Masse en gramme de l'extrait sec / huile essentielle résultant
M0	Masse en gramme de matériel végétale à traiter
ml	Millilitre
mm	Millimètre
min	Minute
MA	Maladie d'Alzheimer
MeOH	Extrait Méthanolique
N	Azote
NA	Non Actif
NO	Radical Oxyde nitrique
NT	Non Tsté
NAD+	Nicotinamide adénine di nucléotide

NADPH	Nicotinamide d'Adénosine D inucléatide P hosphate
ORAC	Acronyme pour oxygen R adical A bsorbance C apacity
O2	Anion super oxide
OH	R adical d' hydrogène
PT	P olyphénols T otaux
Q	Coenzyme
SO	S tress O xydatif
SM	S olution M ère
T.ciliatus	T hymus c iliates
TBARS	T hiobarbituric Acid R eactive S ubstance
UV	Ultra-violet
Ug	M icrogramme
Ul	M icrolitre
%	P ourcentage

LISTE DES TABLEAUX

Titre de tableau	Page
Tableau 01 : principales classes des composées phénoliques	4
Tableau 02 : Dérivés d'acide hydroxybenzoïque	5
Tableau 03 : Dérivés d'acide hydroxycinnamique	5
Tableau 04 : Les classes des terpenoïdes	12
Tableau 05 : Principales sources des radicaux libres (endogènes et exogènes)	17
Tableau 06 : Les principaux radicaux libres	18
Tableau 07 : Classification de l'espèce <i>Thymus ciliatus</i>	25
Tableau 08 : Classification de l'espèce <i>Rhanterium suaveolans</i>	26
Tableau 09 : Rendements des huiles essentielles et des divers extraits bruts en pourcentage par rapport au poids total	34
Tableau 10 : Teneurs en polyphénols totaux et flavonoïdes totaux des extraits de <i>R.suaveolans</i> et <i>T.ciliatus</i>	36
Tableau 11 : Activité antioxydante des extraits de <i>R.suaveolans</i> :	38
Tableau 12 : Activité antioxydante des extraits de <i>T.ciliatus</i>	40
Tableau 13 : Inhibition de butyrylcholinestérase par les HEs et les extraits bruts de <i>R.suaveolans</i>	41
Tableau 14 : Inhibition de butyrylcholinestérase par les HEs et les extraits bruts de <i>T.ciliatus</i>	43

LISTES DES FIGURES

Titre de figure	Page
Figure 1 : structures de l'enchaînement benzo-y-pyrone	6
Figure 2 : structure chimique de l'acide gallique	6
Figure 3 : structure chimique de tanins condensés	7
Figure 4 : Principaux types structuraux d'alcaloïdes.	10
Figure 5 : La molécule d'isoprène	11
Figure 6 : l'origine et les conséquences biologiques du stress oxydant	16
Figure 7 : Représentation photographique de la plante <i>T.ciliatus</i>	25
Figure 8 : Représentation photographique de la plante <i>R.suaveolans</i>	26
Figure 9 : Protocole de préparation des extraits bruts par macération	27
Figure 10 : Appareil d'hydro distillation type Clevenger	28
Figure 11 : Lecteur de microplaque	33
Figure12 : Pourcentages des extraits de <i>R.suaveolans</i> et <i>T.ciliatus</i>	34
Figure 13 : Courbe d'étalonnage de quercetine	36
Figure 14 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique	36
Figure 15 : Résultats du dosage des Flavonoïdes de <i>R.suaveolans</i> et <i>T.ciliatus</i>	36
Figure 16 : Résultats du dosage des polyphénols de <i>R.suaveolans</i> et <i>T.ciliatus</i>	37
Figure 17 : Résultats des tests antioxydants sur les extraits de <i>R.suaveolans</i> sur microplaque	38
Figure 18 : Résultats des tests antioxydants sur les extraits de <i>T.ciliatus</i> sur microplaque	40
Figure19 : Résultats Anti-butyrylcholinestérase des extraits de <i>R.suaveolans</i> sur microplaque	42
Figure20 : Résultats Anti-butyrylcholinestérase des extraits de <i>T.ciliatus</i> sur microplaque	43

SOMMAIRE

Remerciements

Sommaire

Liste des abréviations et symboles

Liste des figures

Liste des tableaux

Résumé

المخلص

Abstract

INTRODUCTION GENERALE.....1

SYNTHESE BIBLIOGAFIQUE

CHAPITRE I : GENIRALITEE SUR LES METABOLITES SECONDAIRES

I.1.Généralité.....	3
I.2.Les polyphénols	3
I.2.1.Définition	3
I.2.2.Classification :	3
c. Alcools phénoliques	6
a.Tanins hydrolysables	6
b.Tanins condensés.....	7
I.2.3.La Biosynthèse des polyphénols	7
I.2.3.1.Voie de l'acétate	7
I.2.3.2.Voie de l'acide shikimique	7
I.2.4.Propriété médicinale de polyphenols	8
I.3.Les composés azotés	8
I.3.1.Définition	8
I.3.2.Répartition botanique et localisation	9
I.3.3.Classification.....	9
I.3.3.1. Les alcaloïdes vrais	9
I.3.3.2.Les pseudo-alcaloïdes	9

I.3.3.3.Les proto-alcaloïdes	9
I.3.4.Propriétés physiques et chimiques des alcaloïdes	10
I.4.Les terpènes	11
I.4.1.Définition	11
I.4.2.Structure	11
I.4.3.Localisation et classification	11
1.4.4. Les huiles essentielles	12
1.4.4.1. Définition	12
1.4.4.2. Composition chimique des Huiles essentielles	12
1.4.4.3. Production des huiles essentielles	13
1.4.4.4. Utilisations des huiles essentielles	14
1.4.4.5. Methodes d'extraction des huiles essentielles	14
a. D'hydro distillation	14
b. Entraînement à la vapeur d'eau	14

CHAPITRE II : LE STRESSE OXYDATIF ET LA MALADIE D'ALZHEIMER

II.1.Le stress oxydatif.....	15
II.1.1.Généralité.....	15
II.1.2.Définition de stress oxydatif.....	15
II.1.3.Origine du stress oxydatif.....	15
II.1.4.Les conséquences du stress oxydant.....	15
II.1.5. Les radicaux libres.....	16
II.1.5.1.Définition.....	16
II.1.5.2. Principe source de productions des radicaux libre	16
a.Production endogène (interne)	17
b.Source exogène (externes)	17
II.1.5.3.Les différents types des ROS.....	17
II.1.5.4. Rôles biologique des radicaux libres	18
II.1.5.5.Les systèmes antioxydants.....	20
II.1.5.5.1.Les systèmes antioxydants enzymatiques.....	20
II.1.5.5.1 a - Systèmes antioxydants enzymatiques endogènes:.....	20
II.1.5.5.1. Les Systèmes antioxydants non enzymatiques :	20
II.1.5.5.1 a - Systèmes antioxydants endogènes :.....	20

II.1.5.5.1 b- Systèmes antioxydants exogènes:	21
II.2.La maladie d'Alzheimer	21
II.2.1.Définition.....	21
II.2.2.Anatomopathologie	22
II.2.2.Les cholinestérasés	22
II.2.2.1. L'acétylcholinestérase (AChE).....	22
a.Définition.....	22
b.Rôle	22
II.2.2.2. La Butyrylcholinestérase :	23
a.Définition.....	23
b.Rôle	23
II.2.3.Traitement de la maladie d'Alzheimer	24
II.2.3.1.Traitements médicamenteux	24
aLes anticholinestérasiques.....	25
b.Les antiglutamates :.....	25

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES

I.1.Matériel.....	25
I.1.1.Matériel végétal	25
I.1.1.1.Récolte des plantes choisies.....	25
I.1.1.2.Description des plantes choisies	25
a. La plante <i>Thymus ciliatus</i> Desf.	25
b. plante <i>Rhanterium suaveolens</i> Desf.	26
I.2.Méthodes.....	27
I.2.1.Extraction du matériel végétal	27
I.2.1.1.Préparation des extraits végétaux.....	27
I.2.1.2.Calcul de rendement des extraits	28
I.2.1.3.Extraction des huiles essentielles.....	28
I.2.1.4.Calcul du rendement d'extraction.....	28
I.2.2. Dosage des poly phénols totaux et des flavonoïdes totaux.....	28
I.2.2.1.Dosage des poly phénols totaux.....	28

I.2.2.2.Dosage des flavonoïdes totaux.....	29
I.2.3.Activité biologique des extraits	30
I.2.3.1.Evaluation de l'activité antioxydante.....	30
I.2.3.1.1.Méthode de DPPH	30
I.2.3.1.2.Méthode d'ABTS.....	30
I.2.3.1.3.Méthode de réduction de l'ion ferrique	31
I.2.3.1.4.Méthode du CUPRAC	31
I.2.3.1.5.Méthode de chélation du fer	32
I.2.3.1.6.Méthode de phénanthroline.....	33
I.2.3.2.Evaluation de l'Activité anti-Alzheimer.....	33

CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION

II. Résultats et discussion.....	34
II.1.Rendement d'extraction	34
II.2.Dosage de polyphénols totaux et Flavonoïdes totaux:	35
II.3.Activité antioxydante	38
II.3.1.La plante <i>R.suaveolans</i>	38
II.3.2.La plante <i>T.ciliatus</i>	40
II.4.1.La plante <i>R.suaveolans</i>	42
II.4.2.La plante <i>T.ciliatus</i>	43

CONCLUSION GENERALE

Annexes

Références bibliographiques

المخلص

تتوفر الجزائر على ثروة نباتية هائلة ، لم يتم التحقيق منها على المستويات الكيميائية النباتية ، و في هذا السياق منطقتين مختلفتين من الجزائر، (T.ciliatus و R. Suaveolans) تم التحصل على نوعين من النباتات تحت اسم لذلك تهتم دراستنا بتحديد التركيب الكيميائي والأنشطة البيولوجية لمستخلصات هذه النباتات .

تم فحص محتويات البوليفينول الكلي والفلافونويد الكلي للمستخلصات و أظهرت اختبارات الجرعات أن المستخلصات الميثانولية والمائية لنبتين تمثل أغنى المستخلصات، و تم تقدير النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات CUPRAC، تقليل الطاقة ، إزالة معدن ثقيل من الحديد ، ABTS ، DPPH) باستخدام ست طرق مختلفة التي تتمثل في أظهرت النتائج أن مستخلصات نباتين قطبيين ، ومذيب متوسط القطبية (المستخلص المائي (Phenanthroline و والميثانولي والأسيتون) أعطت أفضل نتائج الفعالية المضادة للأكسدة مع جميع الفحوصات التي أجريت تقريبًا تليها مستخلصات المذيب الضعيف. قطبي (ثنائي كلورو ميثان وزيت أساسي). تم اختبار النشاط المضاد للزهايمر من خلال تقييم أظهرت النتائج قدرة معنوية كبيرة لجميع مستخلصات (BChE) القوة المضادة للأنزيم ضد بوتريل كولينستراز ، حيث (IC50 = 34.75 ± 1.99) لتثبيط بوتيل كولينستريز ، أعلى مقارنة بالغالانثامين المستخدم كمعيار T.ciliatus يساوي 0.26 ± 0.20 ميكروغرام / مل. ومع ذلك ، أظهر IC50 أظهر مستخلص ثنائي كلورو ميثان أكبر سعة مع تبلغ IC50 ± 4.14 نشاطًا قويًا مع قيم R. suaveolans الزيت العطري ، وثنائي كلورو ميثان ومستخلص الأسيتون من 0.40 ؛ 1.70 ± 13.57 و 1.93 ± 18.28 ميكروغرام / مل على التوالي وأظهرت المستخلصات المائية والميثانولية أقل من 1.98 ± 191.79 و 0.96 ± 145.05 ميكروغرام / مل على التوالي IC50s نشاط مع

الكلمات المفتاحية: زيت أساسي، مستخلصات خام ، نشاط مضاد للأكسدة ، نشاط مضاد للزهايمر

RESUME

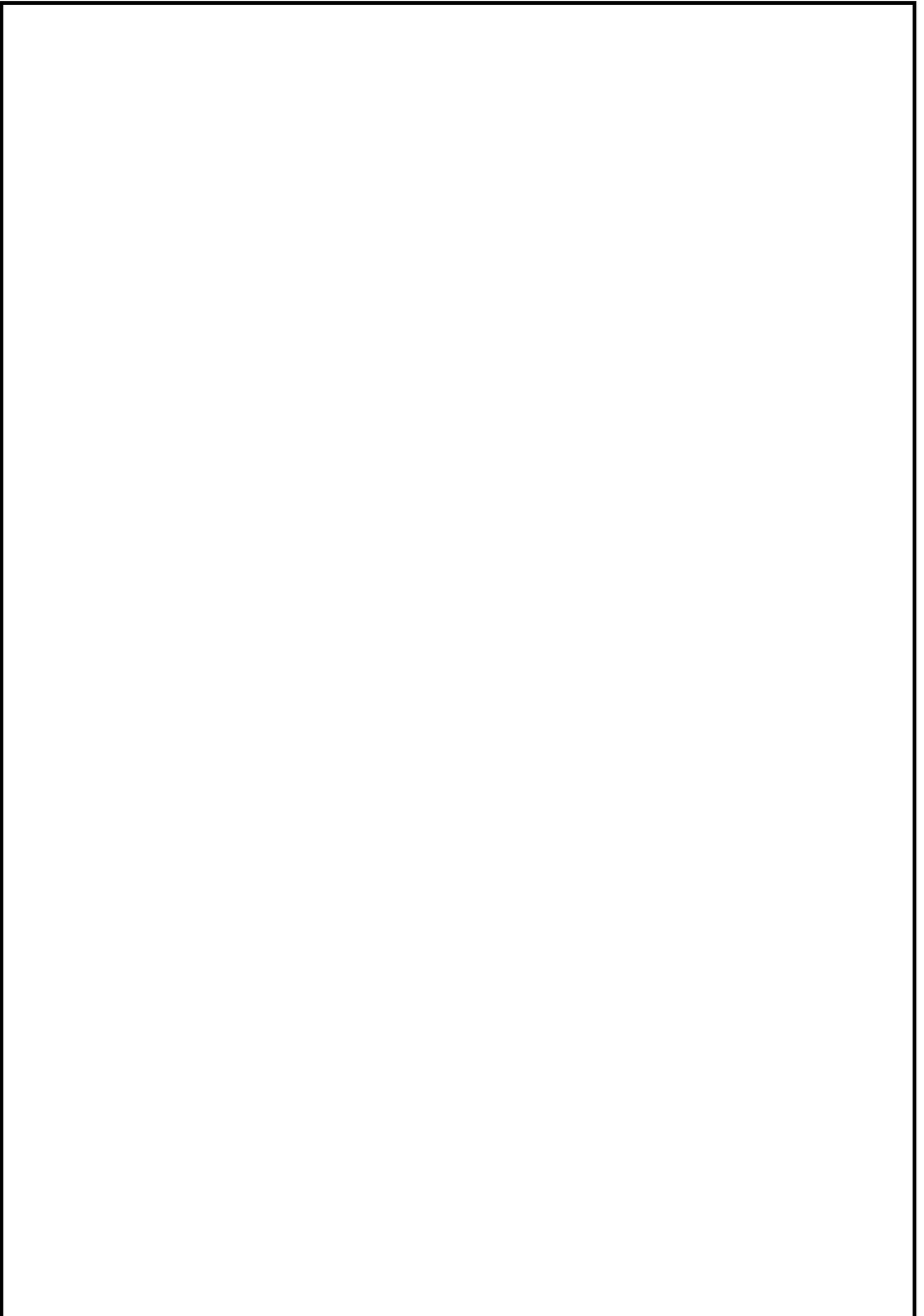
En Algérie, plusieurs espèces de plantes sont encore peu ou pas investiguées sur les plans phytochimiques et pharmacologiques. Dans ce contexte, deux espèces *R.suaveolans* et *T.ciliatus* récoltée dans deux régions différentes de l'Algérie a fait l'objet de cette étude. Alors, notre étude s'intéresse à la détermination de la composition chimique et des activités biologiques des extraits de ces plantes. Les teneurs en polyphénols totaux et les flavonoïdes totaux des extraits ont été dosés. Les tests de dosage ont montré que les extraits méthanoliques et aqueux de deux plantes représentent les extraits les plus riches. L'activité antioxydante des extraits a été estimée par l'utilisation de six méthodes différentes DPPH, ABTS, pouvoir réducteur, chélation du Fer, CUPRAC et Phenanthroline. Les résultats ont montré que les extraits de deux plantes du solvant polaire, et moyennement polaire (l'extrait aqueux, méthanolique et acétonique) ont donné les meilleurs résultats de l'activité antioxydante avec presque tous les tests réalisés suivis par les extraits du solvant faiblement polaire (Dichlorométhane et l'huile essentielle). L'activité anti-Alzheimer a été testée par l'évaluation du pouvoir anti enzymatique contre la butyrylcholinestrase (BChE). Les résultats ont montré une capacité très importante de tous les extraits de *T.ciliatus* à inhiber la butyrylcholinestrase, plus élevée comparativement à la galanthamine utilisé comme standard ($IC_{50}=34,75\pm 1,99$), dont l'extrait de Dichlorométhane a manifesté la plus grande capacité avec une IC_{50} égale à $0,26\pm 0,20$ $\mu\text{g/ml}$. Cependant, L'huile essentielle, l'extrait de dichlorométhane et d'acétone de *R.suaveolans* ont présentés une forte activité avec des valeurs d' IC_{50} de $4,14\pm 0,40$; $13,57\pm 1,70$ et $18,28\pm 1,93$ $\mu\text{g/mL}$ respectivement et les extraits aqueux et méthanolique ont montré la plus faible activité avec des IC_{50} de $191,79\pm 1,98$ et $145,05\pm 0,96$ $\mu\text{g/ml}$ respectivement.

Mots clés : Huile essentielle, extraits bruts, activité anti-oxydante, activité anti-Alzheimer.

ABSTRACT

In Algeria, several plant species are still little or not investigated on the phytochemical and pharmacological levels. In this context, two species *R. adpressum* and *T. ciliatus* harvested in two different regions of Algeria were the subject of this study. So our study focuses on determining the chemical composition and biological activities of the extracts of these plants. The total polyphenols and flavonoids in the extracts were determined. Assays have shown that the methanol and aqueous extracts of two plants are the richest extracts. The antioxidant activity of the extracts was estimated by the use of six different methods DPPH, ABTS, reductive power, iron chelation, CUPRAC and Phenanthroline. The results showed that the extracts of two plants of the polar solvent, and medium polar (aqueous, methanolic and acetonitrilic extract) gave the best results of antioxidant activity with almost all tests performed followed by extracts of the low polar solvent (Dichloromethane and essential oil). The anti-Alzheimer activity was tested by the evaluation of the anti-enzymatic potency of butyrylcholinesterase (BChE). The results showed a very important ability of all extracts of *T. ciliatus* to inhibit butyrylcholinesterase, higher compared to the galanthamine used as standard ($IC_{50}=34.75 \pm 1.99$), whose Dichloromethane extract showed the greatest capacity with an IC_{50} equal to $0.26 \pm 0.20 \mu\text{g/ml}$. However, essential oil, dichloromethane extract and acetone from *R. suveolans* showed strong activity with IC_{50} values of 4.14 ± 0.40 ; 13.57 ± 1.70 and $18.28 \pm 1.93 \mu\text{g/mL}$ respectively and the aqueous and methanolic extracts showed the lowest activity with IC_{50} of 191.79 ± 1.98 and $145.05 \pm 0.96 \mu\text{g/ml}$ respectively.

Key words: essential oil, anti-oxidant activity, anti- Alzheimer activity



INTRODUCTION

GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Les plantes médicinales sont des plantes qui auraient une activité pharmaceutique très importante pouvant conduire à des emplois thérapeutiques, cela grâce à la présence d'un certain nombre de substances bioactives dans la plupart agissent sur l'organisme humain (Naghibi et al., 2005).

Les substances bioactives sont retrouvés dans toutes les parties de plantes, mais ils sont distribués différemment selon leurs rôles, cette distribution varie d'une plante à l'autre (Bruneton 2009). Elles sont produits en faible quantités dans des compartiments particuliers et à des moments précis de la vie d'une plante, mais plus de 200000 molécules ont été identifiées en composés phénoliques, alcaloïdes, terpéniques et autres (Amas., 1997).

Le stress oxydatif représente l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression d'espèces réactives oxygénés (ERO) (cheeseman et salter 1993), il est définie comme un déséquilibre entre les processus biochimiques de production des ERO, il est le premier et principale cause des plusieurs maladies tels que le cancer, le vieillissement simultané et l'Alzheimer.

Les recherches sur des nouveaux traitements possibles dans l'espoir de protéger notre santé et même guérir ces différentes maladies se basent actuellement sur des médicaments à base de plantes médicinales qui sont généralement moins ou sans effets indésirables.

L'Algérie est le plus grand pays riverain de la méditerranée, il est reconnu par sa diversité variétale en plantes médicinales et aromatiques ainsi que leurs diverses utilisations populaires dans l'ensemble des terroirs du pays, ce sont des savoir-faire ancestraux transmis de génération en génération chez les populations le plus souvent rurales (Ilbert et al., 2016).

Ainsi, dans notre étude et dans le but de rechercher des nouvelles substances bioactives à base des plantes médicinales, nous avons valorisé deux plantes médicinales algériennes d'intérêt thérapeutique, il s'agit de l'espèce *Thymus ciliatus* de la famille des Lamiacées et l'espèce *Rhanterium suaveolens* de la famille des Astéracées.

Le travail que nous avons effectué sur ces espèces dans le cadre de notre mémoire de master est reporté dans ce manuscrit après une introduction générale, sous forme de deux parties.

La première partie est bibliographie subdivisée en deux chapitres, le premier expose des généralités sur les métabolites secondaires, et le deuxième chapitre est articulé sur le stress oxydatif et la maladie d'Alzheimer.

La deuxième partie est expérimentales subdivisée en deux chapitres, le premier chapitre renferme les travaux expérimentaux effectués sur les espèces sélectionnées, et le deuxième chapitre est consacrée à la présentation et la discussion des résultats obtenus.

Enfin ce travail s'achève par une conclusion générale et des perspectives pour le futur...

Les travaux réalisés dans le cadre de ce mémoire sont :

- ✓ Identification et collecte des espèces choisies
- ✓ Préparation des extraits végétaux
- ✓ Estimation de teneur de polyphénols totaux et flavonoïdes totaux des extraits préparés en utilisant des méthodes de dosage sur microplaque.
- ✓ Evaluation *in vitro* des activités biologiques des extraits préparés (Huiles essentielles, extraits aqueux, méthanoliques, acetoniques et extraits de dichloromethane), il s'agit de l'activité antioxydante en utilisant six tests différents : DPPH, ABTS, la chélation du fer, FRAP, CUPRAC et phénanthroline, et activité anti-Alzheimer en déterminant l'effet inhibiteur vis-à-vis l'enzyme butyrylcholinestérase.

SYNTHESE
BIBLIOGAFAIQUE

I.1.Généralité

Les végétaux produisent des substances chimiques de structures variées comme les métabolites primaires et secondaires (**Edeas et al, 2007**).

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées par les végétaux mais ils ne participent pas directement au métabolisme végétale, ils pouvaient jouer un rôle dans les défense contre les herbivores et dans les relations entre les plantes et leur environnement (**Lutge et al., 2002 ; Abderrazak et Joe., 2007**).

Il existe plus de 200000 métabolites secondaires classés selon leur appartenance chimique variée (composés phénoliques, composés azotés et composés terpéniques) qui représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des différents domaines pharmacologiques ou agroalimentaires (**Macheix et al., 2005**)

I.2.Les polyphénols

I.2.1.Définition

Les polyphénols, dénommés aussi composés phénoliques, sont des métabolites secondaires plus importants chez toutes les plantes vasculaires (**lebhan, 2005**), ils regroupent plus de 8000 substances chimiques (**Bam Forth ,1999**).

Sont des molécules aromatiques biologiquement actives, constitués d'un groupement phényle et d'un groupement hydroxyle (-OH). On peut nommer dans cette famille les flavonoïdes, les acides phénoliques et les tanins. (**Karoune, 2016 ; Bruneton, 1999**). Ils sont présents partout dans les racines, les tiges, les fleurs, les feuilles de tous les végétaux. Les principales sources alimentaires sont les fruits, les légumes, les boissons (vin rouge, le café, les jus de fruits), les céréales, les graines oléagineuses et les légumes secs (**Macheix et al, 2005**)

I.2.2.Classification

Les composés phénoliques sont classés selon le nombre d'atome de carbone dans le squelette de base, ces structures peuvent être sous forme libres ou liées à l'ester ou hétérosides (**Bruneton, 1999**). Les différents classes de ces composés phénoliques, et les plantes qui les renfermant sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau 01 : Principales classes des composées phénoliques (**Bruneton, 1999 ; Hannebelle, 2006**).

Nombre d'atome de carbone	Squelette de base	Classe	Plantes	Exemples
6	C6	Phénols simples	Busserole	Cathécol, hydroquinone
7	C6-C1	Acides phénols benzoïques	Artichaut saule	Acide gallique, Acide salysalique, vaniline
8	C6-C2	Acétophénones	saule	3-acétyl6-méthoxybenzaldehyde
9	C6-C3	Acides phénols cinnamiques	Romarin marronnier d'inde	Acide coumarique Acide caféique
10	C6-C4	Naphtoquinones	Dosera.spp .	shikonine
13	C6-C1-C6	Xanthones	Racine de gentiane , centaurée	Bellidifoline, mangoctine
14	C6-C2-C6	Stiblénes	Raisin, pin	Hydrangénol, pinosylvine
15	C6-C3-C6	Flavonoïdes iso flavonoïdes	Ginkgo Thym camomille	Quercétine, Roténoïde
18	(C6-C3)2	Lignanes	Chardon	Matarésinol
30	(C6-C3-C6)2	Bi flavonoïdes	Carcinia hypeicum	Amentoflavone hinokiflavone
N	(C6-C3-C6) n	Tanins condensés (proanthocyanidols)	Marronnier d'inde, vigne	Aesculitanins

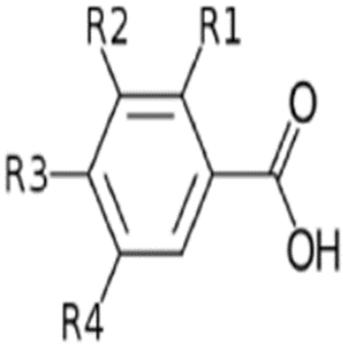
I.2.2.1. Les polyphénols simples

a. Acide phénoliques:

Les acides phénoliques sont divisés en deux classes :

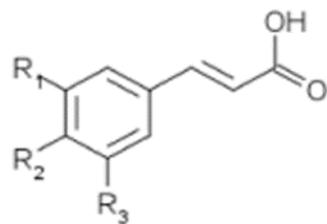
- ✓ Les dérivés de l'acide hydroxy benzoïques (**Tableau02**) : sont composés d'un noyau benzénique et présentent une structure de base est (C6-C1) (**Chira, 2008**).

Tableau 02: Dérivés d'acide hydroxybenzoïque (Macheix, 2005)

	R1 =R2 =R3=R4=H	acide benzoïque (non phénolique)
	R1=R2=R4=H, R3=OH	acide p-hydroxy benzoïque
	R1=R4=H, R2=R3=OH	acide protocatéchinique
	R1=R4=H, R2=OCH3, R3=OH	acide vanillique
	R1=H, R2=R3=R4=OH	acide gallique
	R1=H, R2=R4=OCH3, R3=OH	acide syringique
	R1=OH, R2=R3=R4=H	acide salicylique
	R1=R4=OH, R2=R3=H	acide gentisique

- ✓ Les dérivés de l'acide hydroxycinnamiques (**Tableau 03**): représentent une classe très importante dont la structure de base est (C6-C3) (Macheix et Al, 2005).

Tableau 03: Dérivés d'acide hydroxycinnamique (Macheix et al ; 2005)

	R1=R2=R3=H	acide cinnamique (non phénolique)
	R1=RH, R2=OH	acide p-cinnamique
	R1=R2=OH, R3=H	acide caféique
	R1=OCH3, R2=OH, R3=H	acide férulique
	R1=R3=OCH3, R2=OH	acide sinapique

b. Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux (Havsteen, 2002). Ils dérivent de l'enchaînement benzo-pyrone (**Figure 05**) et peuvent être classés selon la nature des différents substituant présents sur les cycles de la molécule et du degré de saturation (Erlund, 2004).

Les flavonoïdes au sens strict sont des composés dont la substitution par un noyau benzénique se fait en position 2. Les composés présentant une substitution en position 3 sont désignés par le terme Iso flavonoïdes (Erlund, 2004 ; Ghedira, 2005).

Selon la nature de l'hétérocycle C, on distingue : Les flavones et les flavonols, sont les composés flavonoïdiques les plus répandus dont notamment : la quercétine, le kaempférol, la myricétine et l'apigénine ; les flavanones (naringénine) ; les flavanols (catéchine) ; les dihydroflavanols (dihydrokaempférol, dihydroquercétine) et les dihydroflavan-3,4-diols (leucopélargonidol, leucocyanidol), sont considérés comme des flavonoïdes minoritaires en raison de leur distribution naturelle restreinte les flavonoïdes peuvent se présenter sous forme d'aglycones ou génies (entités dépourvues de reste osidique) ou d'hétérosides (portant un ou plusieurs résidus osidiques) (**Havsteen, 2002**)

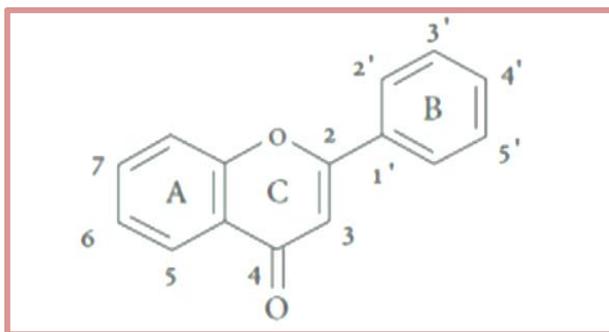


Figure 01 : structure de l'enchaînement benzo-y-pyrone (**Erlund, 2004 ; Ghedira, 2005**)

c. Alcools phénoliques

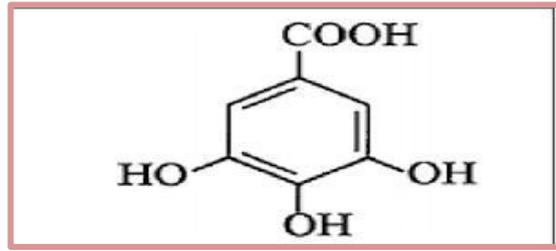
Un alcool phénolique est un composé organique, possédant un hydroxyle phénolique et un alcool aliphatique Ces composés sont très abondants dans l'olive (fruit et feuille) (**Micolv et al., 2005 ; Silva et al., 2010**)

I.2.2.2. Les polyphénols complexes (Les tanins)

Les tanins sont des polyphénols polaires solubles dans l'eau, d'origines végétales (**coran, 1999**). Leur poids moléculaire est compris entre 5000 et 3000 datons. Ils représentent une classe très importante de polyphénols localisés dans les vacuoles (**Alguilera-Carbo et al., 2008**).

a. Tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables sont des oligo ou des polyesters d'un sucre et d'un nombre variable d'acide phénol. Le sucre est très généralement le D-glucose et l'acide phénol est soit

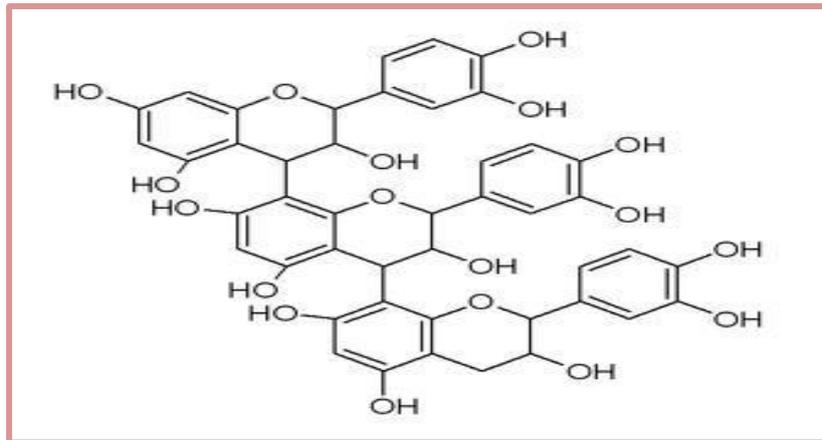


l'acide gallique dans le cas des gallotanins soit l'acide éllagique dans le cas des tanins classiquement dénommés éllagitanins (Bruneton, 2009).

Figure 02 : structure chimique de l'acide gallique (Bruneton, 2009)

b. Tanins condensés

Les tanins condensés se diffèrent fondamentalement des tanins hydrolysables car ils ne possèdent pas de sucre dans leurs molécules et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes. Il s'agit des polymères flavaniques constituées d'unité de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons Carbone- carbone (Bruneton, 2009)



Figurer 03 : structure chimique de tanins condensés (Bruneton, 2009)

I.2.3.La Biosynthèse des polyphénols

La Biosynthèse des polyphénols se fait par deux voies principales :

I.2.3.1.Voie de l'acétate :

La voie de l'acétate de ces polyphénols à des poly B-coesters (poly acétates) de longueur variable, menant par cyclisation à des composés polycycliques tels que les ihydroxy-1-8 anthraquinones ou les naphtoquinones. (Bruneton 1999 : naczk et shahidi 2004)

I.2.3.2.Voie de l'acide shikimique

Dans cette voie, l'érythrose 4-phosphate et le phosphoénol pyruvate sont proutés par les hydrates de carbone lors de la dégradation par la voie des pentoses phosphate et la glycolyse respectivement (**Hassan, 1994, Dewick, 1995**).

De plus, la diversité structurale des composés poly phénoliques due à cette double origine biosynthétique, et la possibilité d'une participation simultanée des deux voies dans l'élaboration de composés d'origine mixte comme les flavonoïdes (**Martin et Andriantsitohaina 2002**).

I.2.4. Propriété médicamenteuse de polyphénols

- ✓ Les polyphénols sont les antioxydants les plus abondants dans nos régimes alimentaires, Ils possèdent des propriétés antioxydantes, capables de piéger les radicaux libres générés en permanence par notre organisme (**Middleton, Karindaswami et Theoharides, 2000**).
- ✓ Les composés phénoliques sont principalement répartis dans deux compartiments : la paroi et les vacuoles. (**Bénard, 2009**) Au niveau tissulaire la localisation des polyphénols est liée à leur rôle dans la plante et peut être caractéristique, au sein même des feuilles (**Tomas-Barberan and Espin, 2001, Sarni-Marchado, 2006**)
- ✓ Ils sont absorbés à travers la barrière intestinale et parviennent au niveau de tissus cibles.
- ✓ Interviennent dans la prévention des maladies cancéreuses et cardiovasculaires (**Havsteen, 1993**).

I.3. Les composés azotés

I.3.1. Définition

Au début du XIX^{ème} siècle, la notion d'alcaloïdes est inventée à partir du mot « alcali » qui signifie « base » et le suffixe « iode » synonyme de « comme ». Il n'existe pas de définition simple, courte et précise de ces molécules et il est parfois difficile de les distinguer des autres métabolites azotés naturels. (**Jean, 2009**).

Winterstein et Tier ont défini les alcaloïdes comme étant des composés à azote hétérocyclique, synthétisés à partir d'acides aminés ou de leurs dérivés immédiats, à

distribution restreinte ; possédant une toxicité plus au moins grande, agissant principalement sur le SNC (Aniszewski, 2015). Ces substances renferment toujours du carbone, de l'hydrogène, de l'azote, et le plus souvent de l'oxygène, Leur nom se termine typiquement par « ine » (Kalla, 2012).

Les alcaloïdes font partie des métabolites secondaires. Ils présentent une source de molécules bioactives ayant plusieurs intérêts biologique, pharmacologique et écologique , mais possèdent aussi des effets toxiques. (Dr SAHRAOUI)

I.3.2.Répartition botanique et localisation

- ✓ Les alcaloïdes sont rares chez les bactéries (pyocyanine de *Pseudomonas aeruginosa* et toxines de cyanobactéries), et les champignons (les ergotines de l'ergot de seigle).
- ✓ Présentent principalement chez de nombreux végétaux, en particulier chez les Angiospermes, surtout dans les familles suivantes : Liliaceae, Papavéraceae, Rutaceae, Fabaceae, Loganiaceae, Apocynaceae, Rubiaceae, Solanaceae...
- ✓ Tous les organes peuvent en contenir : racine (ipéca), feuilles (coca), fruit (pavot), écorce (quinquina), graine (colchique) ...
- ✓ Ils sont stockés au niveau des vacuoles soit sous forme de sels (citrates, malates, tartrates...) ou sous formes de combinaison avec les tanins.
- ✓ Leur teneur est très variable, généralement faible entre 1‰ à 3% (du poids sec). Parfois des teneurs supérieurs à 10% (écorce de quinquina).(Dr SAHRAOUI)

I.3.3.Classification

I.3.3.1. Les alcaloïdes vrais

Ce sont des substances d'origine naturelle (principalement végétale), azotées (l'atome d'azote inclus dans un système hétérocyclique), plus ou moins basiques, donnant des réactions de précipitation avec certains réactifs « réactifs généraux des alcaloïdes », bio génétiquement formés à partir des acides aminée et douées, à faible dose, de propriétés pharmacologiques marquées. (Dr SAHRAOUI)

I.3.3.2.Les pseudo-alcaloïdes

Présentent les caractéristiques des alcaloïdes vrais mais ne sont pas des dérivés des acides aminés, par exemple : les alcaloïdes terpéniques.

I.3.3.3.Les proto-alcaloïdes

CHAPITRE I : GENERALITE SUR LES METABOLITES SECONDAIRES

Sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique, mais ils sont élaborés à partir d'acides aminés, par exemple : sérotonine, mescaline (**Dr SAHRAOUI**)

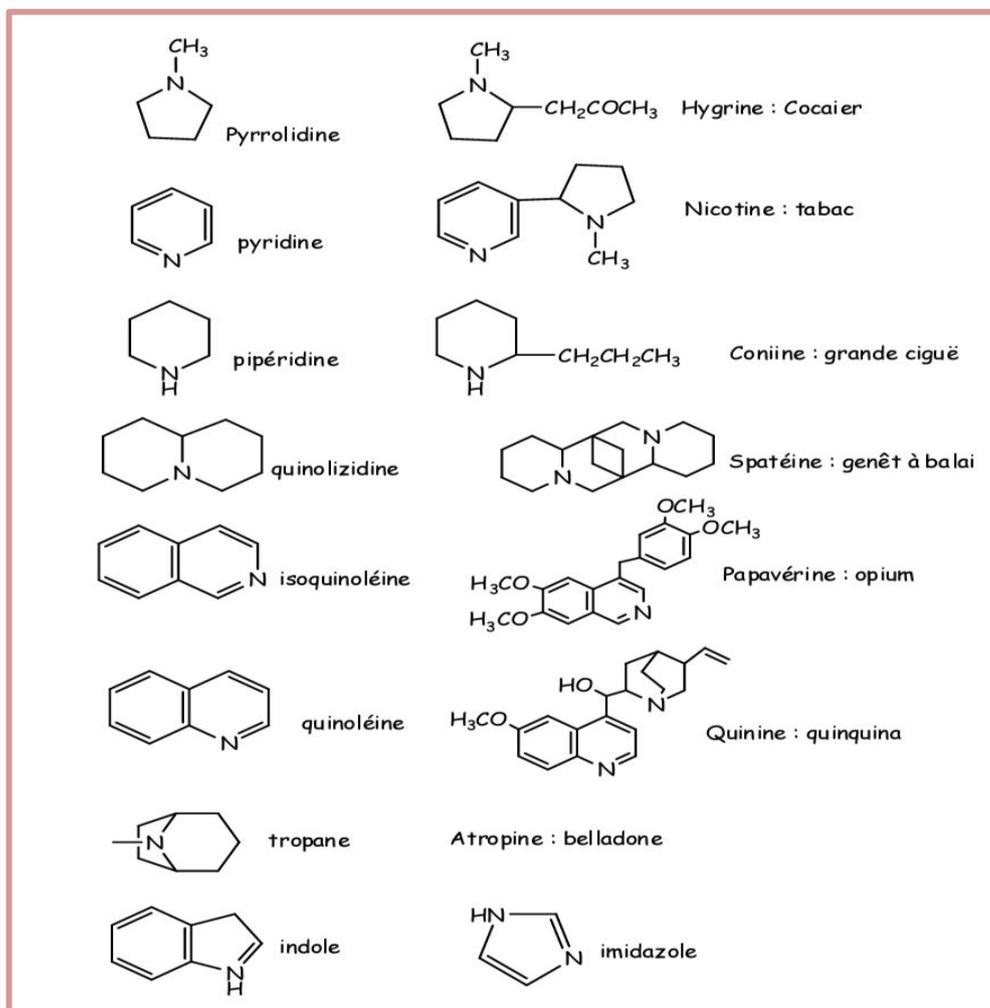


Figure 04 : Principaux types structuraux des alcaloïdes.

I.3.4. Propriétés physiques et chimiques des alcaloïdes

Les alcaloïdes ne constituent pas un groupe homogène de corps comparables à celui des protéines, glucides, lipides ; ce sont des composés complexes, aux formules compliquées. Tous les alcaloïdes renferment de l'azote N, de l'hydrogène H₂ et du Carbone C. La plupart contiennent de l'O₂, comme la morphine : C₁₇ H₁₉NO₃, la codéine C₁₈H₂₁NO₃, l'atropine C₁₇H₂₃NO₃, la cocaïne C₁₇H₂₁NO₄, la quinine C₂₀H₂₄N₂O₂.

Ce sont généralement des solides cristallisables, peu solubles dans l'eau, solubles dans le chloroforme, l'éther, l'alcool, le toluène, et l'éther de pétrole. La présence d'azote les rapproche des amines, et leur réaction générale plus ou moins accusée est une réaction alcaline, c'est justement ce qui rappelle leur nom "alcaloïde". Leur solution bleuit la teinture

rouge de tournesol, ils précipitent par les tanins et l'acide picrique. Ils montrent des colorations particulières en présence de divers réactifs : par exemple, l'acide sulfovanidique colore en rouge l'atropine en orange, la quinine en vert, la colchicine en brun. (Besch, 1845 et Chesn, 1857).

I.4. Les terpènes

I.4.1. Définition

Ce sont des molécules hydrocarbonées produites particulièrement au niveau des organes foliaires. Les différentes voies métaboliques dont ils sont issus sont la glycolyse, le cycle de Krebs et la voie du shikimate, ainsi que la voie du méthylérythritol phosphate (MEP) (Soualeh et soulimani, 2016).

L'unité de base des terpènes est l'isoprène en cinq carbones. On trouve, selon le nombre de cette unité, les monoterpènes C10 (2 unités), les sesquiterpènes C15 (3 unités), les diterpènes C20 (4 unités), les sesterpènes C25 (5 unités), les triterpènes, les stéroïdes C30 (6 unités), les tetraterpènes C40 (8 unités) et les polyterpènes (C10) n avec $n > 8$ (Richter, 1993).

I.4.2. Structure

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure soit cyclique soit à chaîne ouverte, leur formule brute est $(C_5H_x)_n$ dont le x est variable en fonction du degré d'insaturation de la molécule et n peut prendre des valeurs de 1 à 8 sauf dans les polyterpènes qui comprennent plus de cent unités isopréniques comme dans le cas du caoutchouc. La molécule de base est l'isoprène de formule C_5H_8 . Le terme terpénoïde désigne un ensemble de substances présentant le squelette terpénique avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhyde, cétone, acide, lactone, etc.) (Oureshi .N ; Porter.J .W 1981), (Spurgeon.S. L.)

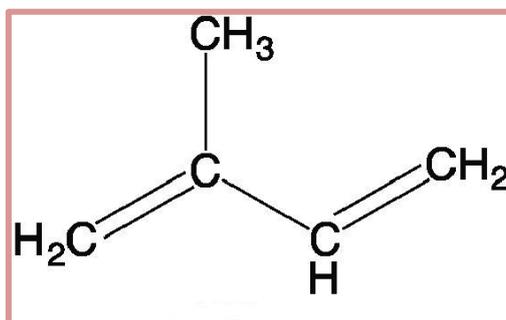


Figure 05 : La molécule d'isoprène

I.4.3. Localisation et classification

Les terpènes sont fréquemment trouvés dans les huiles essentielles de plantes. Ils sont universellement présents en faible quantité dans les organismes vivants, où ils jouent de

nombreux rôles essentiels dans la physiologie des plantes ainsi que des fonctions importantes dans toutes les membranes cellulaires. Les différentes fonctions de terpènes produits naturels dans le monde naturel ont été examinées (**Cram et Mahmoud, 1968 ; Ourisson, 1990**).

Dans le règne végétal, les terpénoïdes sont classés dans la catégorie des métabolites secondaires (avec les flavonoïdes et les alcaloïdes). Leur classification est basée sur le nombre de répétition de l'unité de base isoprène (**Tableau 02**) :

Tableau 04: Les classes des terpènes

Terpènes	Unités isopréniques	Atomes de carbone
Monoterpènes	2	10
Sesquiterpènes	3	15
Diterpènes	4	20
Sesterpenes	5	25
Triterpènes	6	30
Caroténoïdes	8	40
Caouchou	>100	>500

1.4.4. Les huiles essentielles

1.4.4.1. Définition

Les huiles essentielles (HE) sont des substances pures et naturelles, huileuses, volatiles, d'odeur et de saveur généralement fortes, donc de nature hydrophobe (**Belaiche, 1979 ; Wichtel et Anton, 1999**). Largement répandues dans le règne végétal, une huile essentielle est un « produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement de finie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique appropriée sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition » (**Pharmacopée européenne, 2008**).

Dans la plante, les huiles essentielles peuvent être stockées dans divers organes ; fleurs, feuilles, écorces, bois, racines, rhizomes, fruits ou graines (**Hernandez Ochoa, 2005**).

1.4.4.2. Composition chimique des Huiles essentielles :

Comme toute substance, Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de constituants, se caractérisent par une composition chimique analysable et très variable, qui peuvent contenir environ (20 à 60) composants avec des concentrations différentes et sont caractérisées, généralement, par deux ou trois composants majoritaires représentant (20 /70%) de l'huile essentielle totale, alors que les autres composés se trouvent sous forme de traces.

Les constituants des huiles essentielles appartiennent de façon quasi exclusive à deux principaux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : les terpènes et les composés aromatiques (**Bakkali et al, 2008**).

1.4.4.3. Production des huiles essentielles

L'hydro distillation l'entraînement à la vapeur d'eau est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles. A la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter. De la vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse la matière végétale située au-dessus d'une grille.

Durant le passage de la vapeur à travers le matériel, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange « eau + huile essentielle ». Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique : l'huile essentielle. L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile. L'hydrodiffusion est une variante de l'entraînement à la vapeur.

Le montage de type Schilcher est composé de quatre parties principales :

- ✓ le réacteur, un ballon dans lequel on introduit la matière végétale et l'eau.
- ✓ la colonne, un cylindre en verre placé au-dessus du réacteur qui recueille la phase
- ✓ vapeur.
- ✓ le réfrigérant dans lequel se recondensent les vapeurs.
- ✓ le vase florentin où vont se séparer la phase organique (huile essentielle) et la phase aqueuse (eau florale). Ce système peut être équipé d'un recyclage ou cohobage : un principe de siphon renvoie l'eau florale du vase florentin vers le réacteur. Un simple robinet au bas du vase permet de recueillir l'huile essentielle à la fin de la réaction.

Le milieu réactionnel constitué par la matière végétale et l'eau est porté à ébullition grâce à un chauffe-ballon.

La température est limitée par la température d'ébullition de l'eau 100°C. La composition chimique des huiles essentielles dépend largement de l'influence des conditions d'hydro distillation sur l'essence contenue dans la plante.

1.4.4.4. Utilisations des huiles essentielles

En Pharmacie : Les huiles essentielles utilisées en nature ont de nombreux : - activité antiseptique locale externe ou interne (pulmonaire, rénale) : Huiles essentielles eucalyptus ou huiles essentielles de pine.

✓ **En parfumerie :** De nombreux parfums sont toujours d'origine naturelle et certaines huiles essentielles constituent des bases de parfums irremplaçables (exemple : Rose et Jasmin). 2

✓ **Dans les industries agro-alimentaires :** Depuis le début des années quatre-vingt, la part du naturel dans l'aromatisation des produits alimentaires ne cesse de croître aux dépens des compositions aromatiques de synthèse. A côté des dérivés de transformations des fruits, les huiles essentielles ont vraisemblablement encore une marge de progression prévisible des produits néo naturels (produits de fermentation et de bioconversion) (**Rhayour .K**)

1.4.4.5. Methodes d'extraction des huiles essentielles :

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des huiles essentielles, parmi elles on peut citer :

a. D'hydro distillation :

La méthode par hydro distillation est traditionnellement et la plus anciennement utilisée et la plus simple. Le principe de cette technique consiste à immerger le matériel végétal à traiter dans un alambic rempli d'eau placé sur une source de chaleur qui est ensuite portée à ébullition à pression atmosphérique. La chaleur permet l'éclatement des cellules et la libération des molécules odorantes, ensuite les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par différence de densité (**Bruneton, 1999**).

b. Entraînement à la vapeur d'eau

L'entraînement à la vapeur d'eau est une méthode affirmée pour l'obtention des huiles essentielles, Dans cette technique le matériel végétal ne macère pas directement dans

l'eau. Durant le passage de la vapeur d'eau à travers la plante, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action des vapeurs pour former un mélange eau et huile en deux phase, une phase organique et une phase aqueuse. Cette méthode permet d'éviter certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant affecter la qualité des huiles essentielles (**Bruneton, 1999**).

II.1. Le stress oxydatif

II.1.1. Généralité

L'oxygène de l'air ambiant est essentiel à la vie des êtres vivants. Paradoxalement, en trop grande concentration, l'O₂ peut engendrer du stress oxydatif (SO) en augmentant la production de radicaux libres (RL), ce qui endommage les membranes cellulaires. Cette augmentation de RL très réactifs est arrêtée par la synthèse de plusieurs molécules antioxydantes endogènes, assurant ainsi un système de défense pour l'organisme. Lorsque la production des RL s'accroît en proportion plus grande que la synthèse d'antioxydants, l'organisme s'expose à un état de SO. Le SO est néfaste pour l'organisme, il est potentiellement impliqué dans le développement de plus d'une centaine de pathologies. (Bryant, Ryder *et al.*, 2003 ; Bloomer, Goldfarb *et al.*, 2006 ; Tauler, Aguiló *et al.*, 2006).

II.1.2. Définition de stress oxydatif

Le stress oxydant représente l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression d'espèces réactives oxygénées (ERO) (Cheeseman et Salter, 1993). Il est défini comme un déséquilibre entre les processus biochimiques de production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et ceux qui sont responsables de leur contrôle et élimination (Sayre *et al.*, 2008 ; Bloomer *et al.*, 2008 ; Browne *et al.*, 2008 ; Power *et al.*, 2010). Ce déséquilibre peut se produire quand le système de défense antioxydant est surmené par l'augmentation des oxydants ou lorsque les défenses sont affaiblies par une carence d'apport et/ou de production d'antioxydants (Kirschvink *et al.*, 2008). Ce déséquilibre endommage des macromolécules, des cellules, des tissus, des organes et l'organisme dans l'ensemble. Une fois qu'il y a des dégâts à ces macromolécules, leurs fonctions essentielles dans le métabolisme cellulaire sont changées aboutissant à la manifestation de beaucoup de maladies (Kumar *et al.*, 2017). L'équilibre ou homéostasie redox est perturbé et les cellules deviennent vulnérables aux attaques par les ERO (Mac Laren, 2007).

II.1.3. Origine du stress oxydatif

Le stress oxydatif peut avoir diverses origines, telle que un déficit nutritionnel en antioxydants ou la surproduction endogène inflammatoire (Magder, 2006), ou intoxication aux métaux lourds (mercure, cadmium, plomb), anomalies génétiques (mauvais codage pour une protéine), irradiations UV, rayons X... (Pincemail *et al.*, 2002).

II.1.4. Les conséquences du stress oxydant

Les conséquences biologiques du stress oxydant seront extrêmement variables selon le type cellulaire et la dose. De légers stress augmenteront la prolifération cellulaire et l'expression de protéines d'adhésion, alors que de forts stress provoqueront l'oxydation des protéines, l'ADN et les membranes des cellules, des stress moyens faciliteront l'apoptose, une nécrose et des stress violents désorganiseront la membrane cellulaire, entraînant des lyses immédiates. De nombreuses autres anomalies biologiques sont induites par le stress oxydant : carcinogénèse, malformation des fœtus, mutation, fibrose, dépôt de protéines anormales, dépôt de lipides oxydés formation d'auto-anticorps, immunosuppression (Favier, 2003).

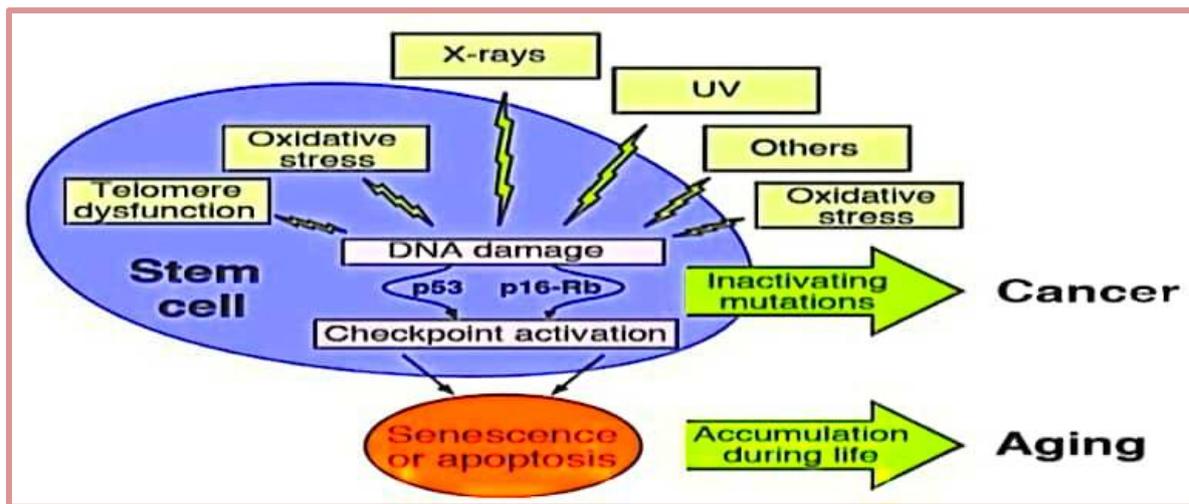


Figure 06 : l'origine et les conséquences biologiques du stress oxydant

II.1.5. Les radicaux libres

II.1.5.1. Définition

Un radical libre est une espèce chimique « libre », contenant un ou plusieurs électrons non appariés (célibataires) dans son orbitale atomique sur la couche électronique la plus externe. capable d'exister sous forme indépendants. Sa durée de vie est très courte (quelques millisecondes voir quelques nanosecondes). les électrons sont des corpuscules chargés électriquement et qui par un mouvement de rotation sur eux-mêmes (Pillou, 2014).

II.1.5.2. Principe source de productions des radicaux libre

Les sources principales de ces radicaux libres sont représentées dans Le tableau suivant :

Tableau 05 : principales sources des radicaux libres (Delattre, J., Beaudoux, J. L., & Bonnefont-Rousselot, D. (2005))

Sources des radicaux libres	
Endogène	Exogène
NADPH oxydase	Toxiques environnementaux
Chaines respiratoires mitochondriales	Radiations ionisantes
Peroxisomes	Radiations UV
Cytochromes P450	Champ électrique
Xanthine Oxydase	Xénobiotiques pro-oxydants
Cyclo-oxygénases	Cytokines pro-inflammatoires
Lipo- oxygénases	

a. Production endogène (interne)

Les radicaux libres sont formés le plus souvent à partir de l’oxygène d’où leur appellation : espèces réactives oxygénées (ERO). L’origine endogène des ERO est principalement les chaines respiratoires mitochondriales des cellules des organismes aérobies (environ 2 % de l’oxygène consommé au niveau mitochondrial sont transformés en ERO particulièrement réactionnelle), le dysfonctionnement du système enzymatique ou par manque d’antioxydants dans l’organisme et la réaction inflammatoire qui est une source importante de radicaux oxygénés produits directement par les cellules phagocytaires activées, qui sont le siège d’un phénomène appelé « Explosion oxydative » consistant à l’activation du complexe NADPH oxydase (Puppo et Helliwell, 1988).

b. Source exogène (externes)

Il provient de : pollution, tabac, ozone, métaux lourds, polluants alimentaires (engrais, additifs), graisses saturées des aliments, excès de sucres, alcool, drogues, exposition prolongée au soleil et des ultras violets (Favier, 2003).

II.1.5.3. Les différents types des ROS

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer trois groupes (Favier, 2003) :

- ✓ Les radicaux primaires, qui constituent un ensemble restreint de composés radicalaires et dérivent de l’oxygène par des réductions à un électron tels l’anion super oxyde $O_2^{\bullet-}$, et le radical Hydroxyle OH^{\bullet} , ou de l’azote tel le monoxyde d’azote NO^{\bullet} . Ils jouent un rôle particulier en physiologie.

CHAPITRE II : LE STRESSE OXYDATIF ET LA MALADIE D'ALZHEIMER

- ✓ Les radicaux secondaires se forment par réaction des radicaux primaires sur les composés Biochimiques de la cellule.
- ✓ D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène, comme l'oxygène Singulier (O_2), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde ($ONOOH$), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux.

Tableau 06 : Les principaux radicaux libres (Haton, 2005).

Oxygène	O_2
Oxygène singulier	$1O_2$
Anion super oxyde	$O_2^{\bullet-}$
Radical hydroxyle	OH
Radical hydroperoxyle	HOO
Radical peroxyde	ROO
Hydro peroxyde	$ROOH$
Radical alkoxyde	RO^{\bullet}
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Radical oxyde nitrique	NO

II.1.5.4. Rôles biologique des radicaux libres

Les ERO jouent divers rôles physiologiques importants, elles constituent l'arsenal de défense contre les agents pathogènes comme dans la phagocytose des bactéries par les cellules polynucléaire et seraient impliquées dans la régulation des repenses de la croissance cellulaire comme seconds messagers (Deby et al, 2002). Elles sont utiles aussi dans la régulation des gènes et participent au fonctionnement de certains enzymes (Favier, 2006). La vasodilatation capillaire, le fonctionnement de certains neurones, ou encore la fécondation de l'ovule et enfin, la destruction par apoptose des cellules tumorale qui sont des processus naturels nécessitant la présence de radicaux libre (Favier, 2003).

II.1.5.5. Les systèmes antioxydants

II.1.5.5.1. Les systèmes antioxydants enzymatiques

II.1.5.5.1 a - Systèmes antioxydants enzymatiques endogènes

Les principaux systèmes enzymatiques antioxydants, les plus efficaces chez les mammifères ainsi que chez les plantes sont la superoxyde dismutase, la catalase et le glutathion peroxydase [Mates et al., 1999; Sharma et al., 2012]. Le rôle majeur du superoxyde dismutase ou SOD est de catalyser la dismutation des ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire. La catalase, essentiellement présente dans les peroxysomes et dans les érythrocytes, est capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire l'activité du glutathion peroxydase, ou GPx, est de détoxifier le peroxyde d'hydrogène et d'autres hydroperoxydes d'origine lipidique en couplant la réduction de l'hydroperoxyde avec l'oxydation d'un substrat réducteur [Delattre et al., 2005d]. D'autres enzymes jouent un rôle non négligeable dans la lutte antioxydante, l'ensemble formant un système complexe : glutathion réductase, thioredoxine reductase, glutathion transferase

II.1.5.5.1. Les Systèmes antioxydants non enzymatiques

II.1.5.5.1 a - Systèmes antioxydants endogènes

Les systèmes antioxydants non-enzymatiques endogènes incluent de nombreux thiols dont le majoritaire est le glutathion, largement présent sous forme réduite, qui est capable de réagir, in vitro, avec les radicaux HO•, RO₂•, RO•, 1O₂, ONOO-, des radicaux centrés sur le carbone, mais aussi l'acide hypochloreux HOCl. Le glutathion est aussi capable de participer à l'activité enzymatique qui, elle, détoxifie le peroxyde d'hydrogène et d'autres hydroperoxydes (McCall et Frei, 1999; Masella et al., 2005; Delattre et al., 2005d). Les deux formes, oxydée et réduite, de l'acide lipoïque (non présentée sur le schéma), autre composé appartenant aux thiols, présentent des propriétés antioxydantes in vitro en piégeant les HO•, RO₂•, l'HOCl et l'1O₂. En se liant à des métaux comme le fer et le cuivre, il permet de les désactiver d'un point de vue catalytique, et a la capacité de régénérer certains antioxydants endogènes et exogènes [Packer et al., 2001; Panfili et al., 2003; Smith et al., 2004]. L'acide urique, présent sous forme urate à pH physiologique, possède des propriétés antioxydantes in vitro contre les HO• et RO₂•, tout comme la bilirubine, les mélanines et la mélatonine [Delattre et al., 2005d].

II.1.5.5.1 b- Systèmes antioxydants exogènes

Les antioxydants chimiques exogènes, comprennent majoritairement les vitamines C et E, les caroténoïdes et des composés phénoliques [McCall et Frei, 1999]. La vitamine C ou acide ascorbique est une molécule hydrosoluble présente dans la plupart des fruits et légumes (non synthétisée par l'Homme). Elle est connue pour son action protectrice contre l'oxydation membranaire [Retsky et al., 1999]. Son caractère antioxydant provient de sa forme ionisée abondante (AscH⁻) qui peut aisément réagir avec des radicaux et produire le radical ascorbate tricarbonyle (AscH[•]), stabilisé par résonance. Du fait de son très faible pK, la forme non protonée radicalaire faiblement réactive est privilégiée (Asc[•]20) [Valko et al., 2006]. La vitamine E est le terme générique utilisé habituellement pour désigner les différents tocophérols et tocotriénols (ensemble de 8 molécules dont 4 tocophérols et 4 tocotriénols,). Ce sont de bons antioxydants alimentaires, mais surtout leur rôle physiologique chez l'Homme, comme protecteurs des structures membranaires et des lipoprotéines ou pour lutter contre le stress oxydant, est très important. Elle prévient l'apparition d'hydroperoxydes en piégeant les radicaux LOO[•] [Kaiser et al., 1990; Yoshida et al., 1993]. Les caroténoïdes (Car) sont des pigments issus des plantes et microorganismes, et sont regroupés en deux grandes familles : les carotènes et les xanthophylles . On en dénombre environ 600 présents dans la nature. L'activité antioxydante de ceux-ci est liée à leur longue chaîne polyénique qui leur permet de réagir avec les radicaux ROO[•], HO[•], O₂^{•-}, R[•]. (Valko et al., 2006). Les composés phénoliques (Ph), et en particulier les flavonoïdes, sont des métabolites secondaires des plantes caractérisés par une structure commune de type 2-phénylbenzopyrane. Leur capacité antioxydante réside dans leur faculté à « terminer » les chaînes radicalaires par des mécanismes de transfert d'électrons et de protons, et à chélater les ions des métaux de transition capables de catalyser la peroxydation lipidique. [Schroeter et al., 2002; Leopoldini et al., 2011)

II.2. La maladie d'Alzheimer

II.2.1. Définition

La maladie d'Alzheimer est une affection dégénérative du système nerveux central entraînant une perte progressive des fonctions cognitives, notamment de la mémoire, et des troubles comportementaux. La maladie a été décrite pour la première fois par le psychiatre et anatomopathologiste allemand, Aloïs Alzheimer en 1906, dans une publication décrivant les altérations anatomiques du cerveau d'une patiente de 51 ans, Auguste D. Depuis, les

recherches n'ont cessé de se développer et permettent aujourd'hui de considérer la maladie d'Alzheimer comme la principale cause de démence chez la personne âgée. (Laper., 2010)

II.2.2. Anatomopathologie

La maladie d'Alzheimer se caractérise sur le plan neuropathologique par la présence de deux types de lésions en quantité importante dans les régions hippocampiques et corticales associatives, à savoir la dégénérescence neurofibrillaire et la présence de plaques séniles. La dégénérescence neurofibrillaire est due aux paires de filaments en hélice, constitués d'amas de protéine tau, anormalement phosphorylées (Delacourte et al, 1990). La dégénérescence neurofibrillaire dans le cortex évolue de manière stéréotypée et hiérarchisée : elle débute tout d'abord dans la région hippocampique et s'étend progressivement vers le cortex temporal, puis dans les régions associatives (cortex préfrontal), et enfin dans l'ensemble du cortex (Delacourte, 1998). Les plaques séniles représentent des dépôts au niveau central de substance amyloïde et sont constituées de fragments de dendrites et d'astrocytes dégénérés (Patry-Morel, 2006). Elles se forment dans l'ensemble du cortex cérébral de manière diffuse. Ces deux types de lésions ont pour conséquence la destruction neuronale et entraînent la perte progressive des fonctions cognitives et de l'intégrité intellectuelle.

La maladie d'Alzheimer se caractérise également par une atrophie cérébrale importante et sur le plan neurobiologique par un déficit en acétylcholine dû à la destruction du noyau de Meynert et à la perte synaptique et neuronale (Duyckaerts, Colle, Delatour & Hauw, 2002).

II.2.2. Les cholinestérases

II.2.2.1. L'acétylcholinestérase (AChE)

a. Définition

L'acétylcholinestérase est une enzyme extrêmement rapide : selon l'espèce, elle est capable d'hydrolyser son substrat entre 1000 et 20000 fois par seconde, cela fait d'elle une des enzymes les plus rapides de la nature avec une efficacité catalytique estimée à environ $1.5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, la diffusion des substrats et des produits vers et à partir de son site, constitue pratiquement l'étape limitante de la réaction catalytique [hasinoff 1982 ; Quinn 1987 ; Rosenberry 1975]. Le temps de vie du complexe enzyme substrat est alors négligeable en comparaison du temps moyen nécessaire à la rencontre de deux entités.

b. Rôle

On distingue deux rôles de l'AChE :

- ✓ Rôle classique est exprimée dans de nombreux tissus mais c'est à la jonction neuro musculaire ou dans les synapses reliant certains neurones qu'elle remplit son rôles le mieux connu, le rôle de l'AChE requiert une grande efficacité.
- ✓ Rôle non classique : l'AChE joue également des rôles autres que celui de la transmission de l'influx nerveux au sein des synapses cholinergique (**silman 2005**). Il semble que tous ces rôles non classiques impliquent spécifiquement le PAS.

La caractérisation du PAS a été confirmée par les structures des complexes de l'AChE avec le décéméthonium (**Harel 1993**), la fasciculine (**bourne 1995 ; Harel 1995 ; kryger 2000**), le propidium et d'autres inhibiteurs spécifiques du PAS (**bourne 2003 ; bourne 2004**) ainsi que par dynamique moléculaire (**Cavalli 2004**).

L'AChE est une enzyme extrêmement rapide, pourtant son site actif est enfoui au fond d'une gorge étroite et profonde. Le première structure tridimensionnelle d'une AChE à être résolu fut celle d'une raie du pacifique, torpédo California (TC). (**Sussman 1991**).

La structure atomique de l'AChE a permis de mettre en évidence deux régions essentielles à l'enzyme, située de part et d'autre de la gorge qui pénètre l'enzyme jusqu'à son centre le site actif au fond et le site périphérique à l'entrée.

II.2.2.2. La Butyrylcholinestérase :

a. Définition :

La butyrylcholinestérase (BChE) appartient au même classe structurale des protéines, la famille des estérases/lipases, comme acétylcholinestérase (AChE, EC 3.1.1.7). Elles sont sérine hydrolases qui partagent une structure substantielle similitudes, mais diffèrent dans les spécificités de substrat et sensibilités aux inhibiteurs 1,2. La BChE peut, contrairement à l'AChE, hydrolyser efficacement les plus gros esters de choline tels que butyrylcholine et benzoylcholine. (**Louis et Missouri, 2018**).

b. Rôle :

L'existence « normale » d'individus possédant des variants silencieux pour la BChE (absence de la protéine ou présence de protéine ! inactive) suggère que cette enzyme n'a pas de fonction vitale chez l'être humain.

Des études sur des souris dont le gène codant pour l'AChE a été délété, montrent que la BChE sous certaines conditions pallie l'absence d'AChE au niveau du système nerveux notamment comme protecteur d'un excès d'Ache (**Li, Stribley et al., 2000 ; Girard, Bernard et al., 2007**).

Néanmoins, ce n'est pas son seul rôle (**Blondet, Carpentier et al., 2010**). D'après certaines études la BChE serait un acteur clé pendant le développement embryonnaire au niveau de la neurogenèse notamment (**Chatonnet et Lockridge, 1989 ; Mack et Robitzki, 2000**). Comme il n'existe pas de carboxylestérase dans le plasma humain, on reconnaît à la BChE une importance pharmacologique dans la détoxification plasmatique des composés estérifiés tels que la succinylcholine, l'aspirine, l'héroïne, la cocaïne (**Li, Sedlacek et al. 2005**). Par exemple, la succinylcholine, employée comme curare de courte durée est uniquement hydrolysée par la BChE.

Chez certains patients, une mutation (D70G) à du site actif de l'enzyme altère l'affinité pour ce substrat. L'emploi de la succinylcholine entraîne alors des apnées prolongées (Masson, Legrand et al. 1997 ; Mollerup and Gatke 2011).

La BChE est également la principale enzyme connue pour la dégradation de la cocaïne (**Lynch, Mattes et al., 1997**). Des études actuelles ont pour objet la modification de la BChE afin de lui conférer une meilleure activité cocaïne hydrolase (**Xue, Ko et al., 2011**).

Enfin, tout comme l'AChE, la BChE réagit irréversiblement avec les composés organophosphorés. Cela lui confère la capacité de piéger les OP et d'agir comme un bioépurateur naturel. De nombreuses études dans ce sens continuent à être menées (**Masson, Nachon et al., 2008 ; Nachon, Carletti et al., 2011**)

II.2.3. Traitement de la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer représente en France un enjeu majeur de santé publique étant donné son caractère incurable, la perte d'autonomie pour les activités de la vie quotidienne et sa forte prévalence. C'est pour cela que depuis plusieurs années, plusieurs hypothèses ont été élaborées afin de mettre au point un traitement efficace. Pour l'instant sur le marché il existe seulement deux molécules permettant d'améliorer la prise en charge: les anticholinestérasiques et les antiglutamates (la mémantine). Ces traitements sont avant tout symptomatiques et n'influencent pas l'évolution de la maladie, c'est à dire qu'ils ne sont pas « disease modifiers ».

La mémantine (Ebixa®) est le seul traitement indiqué chez les patients au stade sévère de la maladie d'Alzheimer ; elle est également préconisée au stade modérément sévère et, depuis 2005 au stade modéré. Son efficacité a été démontré à la dose de 20mg/jour dans les études contre placebo et en association avec le donépézil (**Tariot.P, 2004**).

II.2.3.1. Traitements médicamenteux

Les thérapies anti-amyloïde sont les principaux traitements en cours d'évaluation dans des essais cliniques qui ciblent la pathologie amyloïde sont des anticorps monoclonaux anti-amyloïdes, des vaccins anti-amyloïdes, et des inhibiteurs de -sécrétase (**Schenk D, et al**)

a. Les anticholinestérasiques

L'action des anticholinestérasiques est d'inhiber les cholinestérasiques au niveau du cerveau. Cela se traduit donc par une augmentation de la concentration en acétylcholine dans les synapses du cerveau secondaire au prolongement de l'acétylcholine endogène libérée par les terminaisons nerveuses présynaptiques. Il existe deux types de cholinestérasiques : l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase. L'acétylcholinestérase prédominante au niveau central est la principale responsable du libéré de l'acétylcholine dans le cerveau alors que la butyrylcholinestérase a essentiellement une action périphérique, qui peut être alors à l'origine d'effets indésirables périphériques (**A.imVivier, et al 2000**).

b. Les antiglutamates :

Cette classe thérapeutique, apparue en 2002, ne contient qu'un seul médicament : la mémantine. Il est indiqué chez les patients plus avancés, des stades modérément sévères à sévère de la maladie d'Alzheimer. Les antiglutamates visent à bloquer les récepteurs du glutamate, molécule responsable d'une excitation toxique du système nerveux. Ils ont pour effet de retarder la perte des fonctions cognitives allant parfois jusqu'à les améliorer chez certains patients. On note aussi des effets positifs sur les activités quotidiennes et les troubles du comportement. La mémantine est par ailleurs bien tolérée par les malades (**A.imVivier, et al 2000**).

PARTIE
EXPERIMENTALE

I.1.Matériel

I.1.1.Matériel végétal

I.1.1.1.Récolte des plantes choisies

Les plantes d'étude ont été récoltées pendant la période de floraison, au mois d'Avril de l'année 2020 dans la région de djebel taraf (wilaya d'Oum El-Bouaghi) pour l'espèce *T.ciliatus*, et au mois de Mai de l'année 2020 dans la région de Boussaâda (Wilaya de M'sila) pour l'espèce *R.suaveolans*. Après la cueillette, les parties aériennes des deux plantes ont été séchées dans un endroit sec et aéré, Ensuite ces parties sont finement broyées et pesées pour la préparation de différents extraits.

I.1.1.2.Description des plantes choisies

a. La plante *Thymus ciliatus* Desf.

Plante à feuilles florales vertes différentes des feuilles caulinaires en général fortement dilatées à leur portion inférieure. Epis florifères larges de 16-20 mm. Fleurs plus grandes à corolle plus longuement experte. Calice à dents de la lèvre supérieure lancéolées, 2-3 fois plus longues que larges. Plante assez rare et elle est endémique de l'Afrique du nord (Quezel et Santa, 1962-1963).



Figure 07 : Représentation photographique de la plante *T.ciliatus*
La plante *Thymus ciliatus* est classée comme suit (Quezel et Santa, 1962-1963):

Tableau 07 : Classification de l'espèce *Thymus ciliatus*

Règne	<i>Plantae</i>
Embranchement	<i>Magnoliophyta</i>
Sous-embranchement	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre	<i>Lamiales</i>
Famille	<i>Lamiaceae</i>
Genre	<i>Thymus</i>
Espèce	<i>Thymus ciliatus</i> Desf.

b. La plante *Rhanterium suaveolens* Desf.

Sous-arbrisseaux canescents, multicaules, à feuilles petites, alternes, entières ou dentées. Rameaux dressés et en touffes, divariqués. Capitules terminaux, petits et solitaires, hétérogames, multifides, radiés. Fleurs jaunes, les marginales ligulées à ligules unisériées, femelles et 3-dentées; les centrales tubuleuses et hermaphrodites. Involucre campanulé, à bractées imbriquées sur plusieurs rangs, coriaces, lancéolées. Réceptacle plan ou un peu convexe, ±paléacé. Akènes étroits, cylindriques, à 4-5 côtes; les marginaux situés à l'aisselle de paillettes et en général chauves; les centraux à aigrette constituée par 4-6 soies ± dilatées au sommet et plumeuses . Plante des Pâturages désertiques et elle est endémique de l’Afrique du nord (Quezel et Santa, 1962-1963).



Figure 08: Représentation photographique de la plante *R.suaveolans*

La plante *Rhanterium suaveolans* est classée comme suit (Quezel et Santa, 1962-1963) :

Tableau 08 : Classification de l’espèce *Rhanterium suaveolans*

Règne	<i>Plantae</i>
Embranchement	<i>Magnoliophyta</i>
Sous-embranchement	<i>Magnoliophytina</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre	<i>Asterales</i>
Famille	Asteraceae
Genre	<i>Rhanterium</i>
Espèce	<i>Rhanterium suaveolans</i> Desf.

I.2.Méthodes

Dans notre étude, la préparation de différents extraits de nos plantes a été effectuée au niveau du laboratoire pédagogique de l'université de Tebessa. Cependant, le dosage des flavonoïdes et des polyphénols ainsi que l'évaluation des activités biologiques de ces extraits ont été réalisées au niveau du laboratoire de biochimie du Centre de Recherche en Biotechnologie de Constantine (CRBt).

I.2.1.Extraction du matériel végétal

I.2.1.1.Préparation des extraits végétaux

Les extraits utilisés au cours de notre travail sont préparés par macération, 20g de la poudre végétale sont mise en macération à température ambiante avec 200 ml du solvant sélectionnée (l'eau distillée, méthanol, acétone, et dichlorométhane). L'extraction est réalisée 3 fois pendant 24h. Après la macération chaque extrait est filtré par filtration sous vide. Le filtrat récupéré est ensuite séché à sec à l'aide d'un rota vapeur ou un lyophilisateur selon le solvant utilisé.

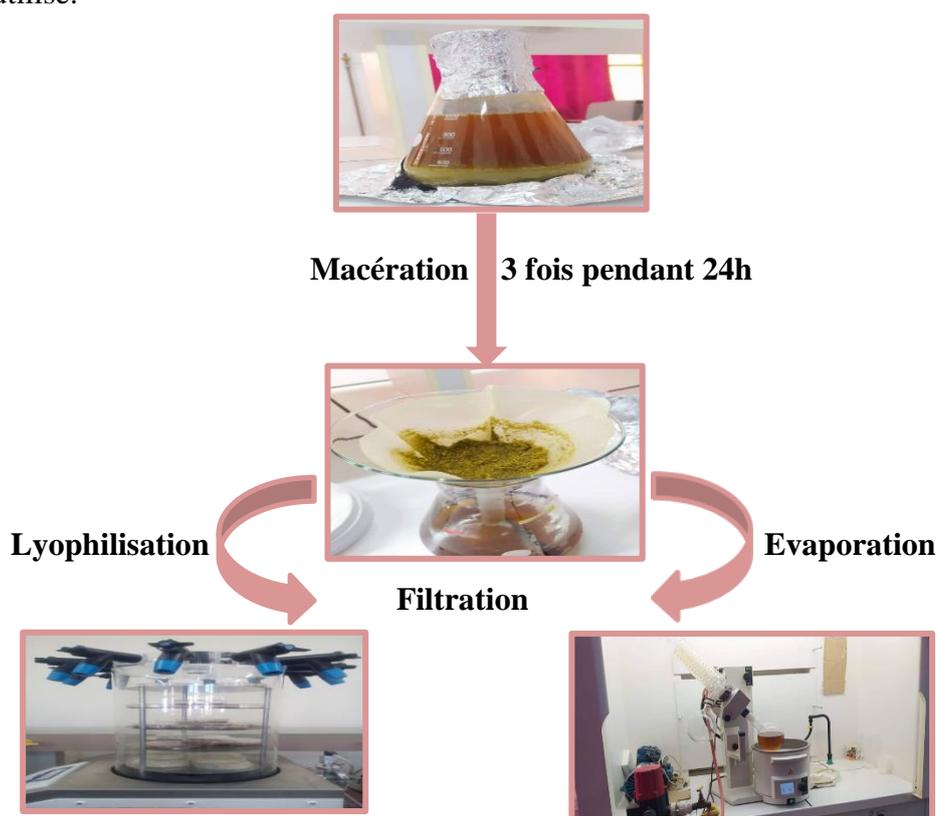


Figure 09 : Protocole de préparation des extraits bruts par macération.

I.2.1.2. Calcul de rendement des extraits

Le rendement d'extraction est calculé par rapport au poids total de la poudre végétale. Le rendement en pourcentage (%) est défini comme étant le rapport entre la masse d'extrait et celle de la plante sèche en poudre. Il est calculé par la formule suivante :

$$R(\%) = (P_b / P_a) \times 100$$

P_b : poids d'extrait brut.

P_a : poids de la plante sèche en poudre

I.2.1.3. Extraction des huiles essentielles

Pour chaque plante, 100 gramme de la poudre végétale de la partie aérienne a été soumise à l'hydro distillation pendant trois à quatre heures dans un appareil de type Clevenger. La vapeur d'eau condensée obtenue conduit à deux phases, une phase organique est appelée huile essentielle et une phase aqueuse est appelée eaux aromatiques ou hydrolat aromatique. La récupération de l'huile est réalisée par décantation. L'huile essentielle recueillie a été traitée par le sulfate de sodium (Na_2SO_4) pour éliminer les traces d'eau. L'essence ainsi obtenue est mise dans des flacons sombres et conservés à 4⁰C.



Figure 10 : Appareil d'hydro distillation type Clevenger

I.2.1.4. Calcul du rendement d'extraction

Le rendement d'extraction pour les huiles essentielles ou les extraits bruts a été calculé par la formule suivante :

$$R(\%) = M / M_0 \times 100$$

(R) : Rendement exprimé en %.

M : Masse en gramme de l'extrait sec/ huile essentielle résultant

M_0 : Masse en gramme du matériel végétal à traiter

I.2.2. Dosage des poly phénols totaux et des flavonoïdes totaux

I.2.2.1. Dosage des poly phénols totaux

La quantification des polyphénols totaux de nos extraits est déterminée en utilisant la méthode colorimétrique du réactif Folin Ciocalteu (un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique). Lors de l'oxydation des polyphénols d'extrait, le réactif est réduit en un mélange d'oxyde bleu de tungstène et de molybdène qui absorbe dans le visible à 765nm. La coloration produite est proportionnelle à la teneur en polyphénols totaux présente dans les extraits. La méthode de dosage réalisée est celle qui décrite par **Muller et ces co-auteurs (2010)**.

Les étapes de procédure sont résumées comme suit :

- ❖ Déposer 20 µl d'extrait de plante à tester dans une microplaque 96puits (les extraits sont préparés à une concentration de 1mg/ml).
- ❖ Additionner un volume de 100µl de FCR dilué (1 :10)
- ❖ Additionner un volume de 75 µl de carbonate de sodium (7,5%)
- ❖ Mettre le mélange à l'obscurité pendant 2h
- ❖ Lecture de l'absorbance à 765 nm contre un blanc (le blanc est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par le solvant utilisé (Méthanol ou l'eau distillée)).

I.2.2.2.Dosage des flavonoïdes totaux

La quantification des flavonoïdes totaux de nos extraits est déterminée par la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium (AlCl₃). Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes des extraits qui absorbe dans le visible à 510 nm. La coloration produite est proportionnelle à la teneur en flavonoïdes totaux présente dans les extraits. La méthode de dosage utilisée est celle qui décrite par **Topçu et ces co-auteurs (2007)** avec quelques modifications.

Les étapes de procédure sont résumées comme suit :

- ❖ Déposer un volume de 50 µl d'extrait de plante à tester(les extraits sont préparés à une concentration de 1mg/ml).
- ❖ Ajouter un volume de 130 µl de MeOH
- ❖ Ajouter un volume de 10 µl (CH₃COOK) et 10 µl (Al(NO₃)₂, 9H₂O)
- ❖ Incubation du mélange pendant 40 mn
- ❖ Lecture de l'absorbance à 415 nm contre un blanc (le blanc est préparé en remplaçant les réactifs par le méthanol (50µl extrait + 150µl méthanol)).

I.2.3. Activité biologique des extraits

I.2.3.1. Evaluation de l'activité antioxydante

Dans notre travail nous avons évalué le pouvoir antioxydant *in vitro* de nos extraits en réalisant des méthodes colorimétriques différentes : DPPH, ABTS, Chélation du fer, réduction de l'ion ferrique, CUPRAC et réduction du ligand phénanthroline.

I.2.3.1.1. Méthode de DPPH

La détermination de l'activité antioxydante de nos extraits contre le radical DPPH se fait par la méthode de **Blois (1958)**. Le DPPH est un radical porte la couleur violette, en présence d'un composé antioxydant donneur d'atomes d'hydrogène, il perd sa couleur violette et il devient jaune (forme réduite, 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazine) (**Brand-Williams et al., 1995**).

Les étapes de procédure sont résumées comme suit :

- ❖ Déposer un volume de 160 µl d'une solution de DPPH dans une microplaque 96 puits (Dissoudre 6 mg de DPPH dans un volume de 100 ml de méthanol)
- ❖ Additionner un volume de 40 µl d'extrait à tester (les extraits sont préparés à une concentration de 4mg/ml).
- ❖ Lecture de l'absorbance du mélange à 517
- ❖ Le BHA et le BHT sont utilisés comme standard

L'activité antioxydante de DPPH a été exprimée en pourcentage et calculée par l'équation suivante :

$$\text{Effet antioxydant de DPPH (\%)} = (A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}} / A_{\text{contrôle}}) * 100$$

La concentration d'extrait fournissant 50% d'activité de piégeage des radicaux (IC50) a été calculée à partir du graphe de DPPH.

I.2.3.1.2. Méthode d'ABTS

La détermination de l'activité antioxydante de nos extraits contre le radical ABTS est déterminée par la méthode de **Re et ses co-auteurs (1999)**. Le radical ABTS préformé est généré par l'oxydation de la molécule stable d'ABTS avec le persulfate de potassium. Cette formation se traduit par l'apparition d'une coloration vert bleu intense. En présence d'un agent antioxydant donneur d'hydrogène, le passage du radical ABTS à la forme non radicalaire s'accompagne de la disparition de cette coloration mesurée à une longueur d'onde de 734 nm.

Les étapes de procédure sont résumées comme suit :

- ❖ Déposer un volume de 160 µl d'une solution d'ABTS dans une microplaque 96 puits
- ❖ Ajouter un volume de 40 µl d'extrait de plante à tester
- ❖ Incubation du mélange pendant 10 mn
- ❖ Lecture de l'absorbance du mélange à 734 nm
- ❖ Le BHA et le BHT sont utilisés comme standard

L'activité antioxydante d'ABTS⁺ a été exprimée en pourcentage et calculée par l'équation suivante :

$$\text{Effet antioxydant d'ABTS I (\%)} = (A \text{ controle} - A \text{ echantillon} / A \text{ controle}) * 100$$

La concentration d'extrait fournissant 50% d'activité de piégeage des radicaux (IC50) a été calculée à partir du graphe d'ABTS.

I.2.3.1.3.Méthode de réduction de l'ion ferrique

L'activité de réduction de l'ion ferrique est déterminée par la méthode de **Oyaizu (1986)** avec une légère modification. En présence d'un composé antioxydant ayant un potentiel réducteur, le ferricyanure de potassium $\text{Fe}^{3+}(\text{CN}^-)_6$ se transforme en ferrocyanure de potassium $\text{Fe}^{2+}(\text{CN}^-)_6$, qui réagit à son tour avec le chlorure ferrique pour donner lieu à un complexe qui a une absorption maximale à 700 nm (**Jayanthi et Lalitha, 2011**).

Les étapes de procédure sont résumées comme suit :

- ❖ Déposer un volume de 10 µl d'extrait de plante à tester dans une microplaque 96 puits
- ❖ Additionner un volume de 40 µl de phosphate buffer (pH 6.6)
- ❖ Additionner un volume de 50 µl de potassium ferricyanide (1%) (1 g de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ dans 100 ml H_2O)
- ❖ Incuber le mélange à 50 C⁰ pendant 20mn
- ❖ Ajouter un volume de 50 µl de tri-chloroaceticacid (10%) (1 g de TCA dans 10 ml H_2O)
- ❖ Ajouter un volume de 40 µl d'eau distillée et 10 µl de ferricchloride (0.1%) (0,1 g de FeCl_3 dans 100 ml H_2O)
- ❖ Lecture à 700 nm.
- ❖ Le BHA est utilisé comme standard

Les résultats sont calculés à titre de A0,5 : Concentration indiquant 0,50 d'absorbance. (µg / ml).

I.2.3.1.4.Méthode du CUPRAC

L'activité antioxydante de nos extraits par la méthode du CUPRAC est déterminée par **Apak et ses co-auteurs (2004)**. La présence des composés réducteurs dans les extraits provoque la réduction de Cu(II) dans le complexe Cu(II)-Nc afin de donner la forme réduite Cu(I)-Nc. La couleur jaune-orange est due au composé Cu(I)-Nc formé. Elle permet de mesurer la réduction des ions cuivriques Cu(II) en ions cuivreux Cu(I).

Les étapes de procédure sont résumées comme suit :

- ❖ Déposer un volume de 40 µl d'extrait de plante à tester dans une microplaque 96 puits
- ❖ Ajouter un volume de 60 µl de solution 1 (m = 1,927 g Acetate d'ammonium (ACNH₄) + 25 ml (H₂O))
- ❖ Ajouter un volume de 50 µl de solution 3 (m = 0,039 g (Neocupronin) + 25 ml (EtOH))
- ❖ Ajouter un volume de 50 µl de solution 2(m = 0,042625 g (Cu Cl₂, 2H₂O) + 25 ml (H₂O))
- ❖ Incuber le mélange pendant 1 heure
- ❖ Lecture à 450nm
- ❖ Le BHA et le BHT sont utilisés comme standard

Les valeurs A_{0,5} sont estimées à partir des courbes d'absorbance.

I.2.3.1.5.Méthode de chélation du fer

L'activité antioxydante de nos extraits par la méthode de chélation du fer est déterminée selon **Deckeret Welch (1990)**.

Les étapes de procédure sont résumées comme suit :

- ❖ Déposer un volume de 40 µL de MeOH et 40 µl d'extrait à tester dans une microplaque 96 puits.
- ❖ Additionner un volume de 40 µl de solution 1(m = 4 mg (Fe⁺²) [0,2 Mm FeCL₂, 2H₂O] + 100 ml (H₂O))
- ❖ Additionner un volume de 80 µl de solution 2 (m = 2,5 mg (0,5 Mm Ferrozinin) + 10 ml (H₂O))
- ❖ Attendre 10 mn
- ❖ Lecture de l'absorbance du mélange à 593 nm contre un blanc (le blanc est le mélange de FeCl₂et de Ferene),
- ❖ l'EDTA est utilisée comme standard.

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

$$I\% = [(Abs\ control - Abs\ test) / Abs\ control] \times 100$$

Les résultats ont été calculés à titre d'IC50 : Concentration d'inhibition de 50% des radicaux.

I.2.3.1.6.Méthode de phénanthroline

L'activité antioxydante de nos extraits par la méthode de phénanthroline est déterminée selon **Szydłowska-Czerniaka (2008)**

Les étapes de procédure sont résumées comme suit :

- ❖ Déposer un volume de 10 µl d'extrait de plante à tester dans une microplaque 96 puits
- ❖ Ajouter un volume de 50 µl de FeCl₃ (0.2%)
- ❖ Ajouter un volume de 30 µl de Phénanthroline (0.5%)
- ❖ Ajouter un volume de 110µl de MeOH
- ❖ Incubation du mélange à l'obscurité pendant 20 min à 30°C
- ❖ Lecture de l'absorbance du mélange à 510 nm.
- ❖ Le BHT est utilisé comme standard

Les résultats sont calculés à titre de A_{0,5} : Concentration indiquant 0,50 d'absorbance. (µg / ml).

I.2.3.2.Evaluation de l'Activité anti-Alzheimer

L'activité inhibitrice de la butyrylcholinestérase par nos extraits est déterminée par la méthode d'**Ellman et ses co-auteurs (1961)**

Les étapes de procédure sont résumées comme suit :

- ❖ Mettre un volume de 150 µL du tampon phosphate (pH 8.0) dans une microplaque à 96 puits
- ❖ Ajouter un volume de 10 µL d'extrait de plante à tester
- ❖ Ajouter un volume de 20 µL de BchE
- ❖ Incuber à 25 C⁰ pendant 15 mn
- ❖ Ajouter un volume de 10 µL de DTNB (0.5 mM)
- ❖ Ajouter un volume de 10 µL de butyrylthiocholinechlorure (0.2 mM)
- ❖ Lecture à 412 nm, pour 0 mn et 15 mn contre un blanc (éthanol avec le tampon phosphate (pH 8.0))
- ❖ Le Galantamine est utilisé comme standard.

Le pourcentage d'inhibition de l'enzyme BChE est déterminé par la formule suivante :

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

E : l'activité de l'enzyme sans extrait

S : l'activité de l'enzyme avec l'extrait



Figure 11 : Lecteur de microplaque

II. Résultats et discussion

II.1.Rendement d'extraction

Les rendements d'extraction des huiles essentielles et des extraits bruts de la partie aérienne de nos plantes sont mentionnés dans le tableau et la figure suivants :

Tableau 09 : Rendements des huiles essentielles et des divers extraits bruts en pourcentage par rapport au poids total.

Type d'extrait	Rendement %	
	<i>R.suaveolans</i>	<i>T.ciliatus</i>
Aqueux	5.9 %	3.4 %
Methanolique	10.14 %	8.95 %
Acetonique	2.95	3.9 %
Dichlorométhane	2 %	2.7 %
Huile essentielle	0.31 %	0.23 %

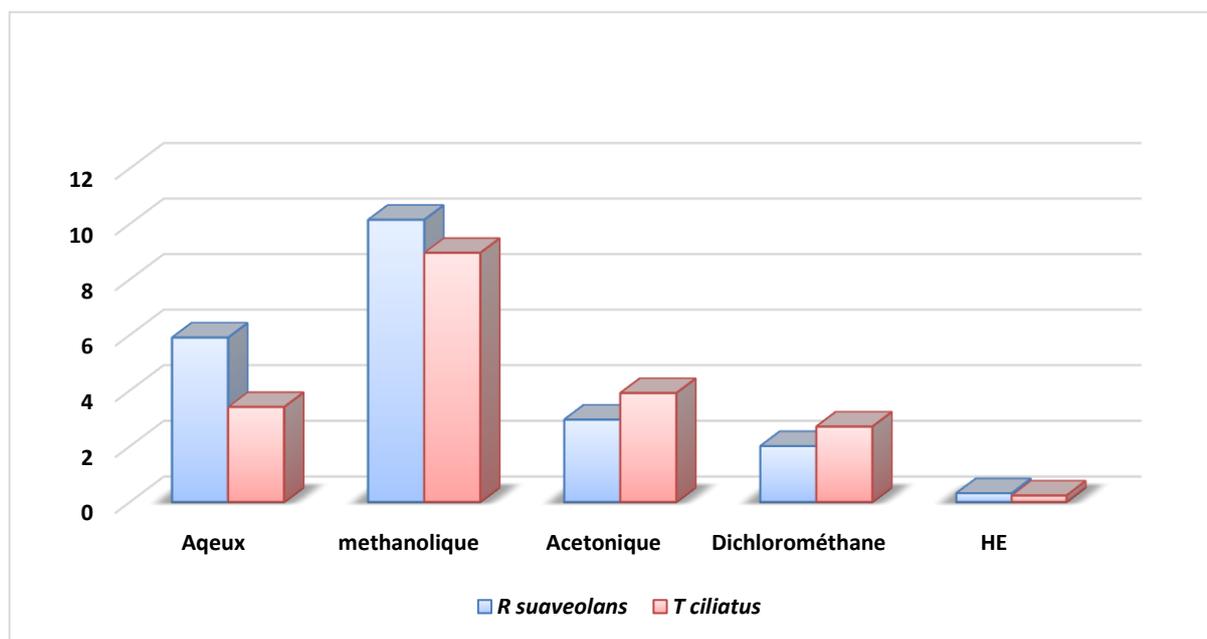


Figure12 : Pourcentages des extraits de *R.suaveolans* et *T.ciliatus*

D'après les résultats mentionnés dans le tableau 09 et la figure 12 Le rendement en huile essentielle de la plante *R.suaveolans* est supérieur à celui de la plante *T.ciliatus* avec une valeur de 0.31% et 0.23% respectivement, sachant que la méthode d'extraction (Hydrodistillation), et le poids du matériel végétal utilisés sont les mêmes pour les deux

plantes, ce qui signifie que le rendement d'extraction dépend avant tout de type de la plante étudiée.

Notre valeur en rendement de l'HE de *R.suaveolans* est supérieure par rapport à celle de **Chemsa et ses collaborateurs (2016)**, où le rendement en HE des parties aériennes de la plante récoltée dans la région du Sahara algérienne a donné un taux de l'ordre de 0.14 %, tandis que le rendement des fleurs de la même espèce originaire de la Tunisie est de 0.22 % (**Ben Salah et al. 2009**). Egalement, Notre résultat sur le rendement en HE concernant la plante *T.ciliatus* est différent avec des résultats antérieurs. Notre rendement est beaucoup plus inférieur à celui obtenu par **Bousmaha-Marroki et al. (2007)**, à partir de *T.ciliatus* récoltés dans différentes régions de Tlemcen (3.0 et 5.1% (P/P)), et par **Giordani et al. (2008)** à partir de différentes espèces de thym y compris l'espèce *Thymus ciliatus* originaire de Djebel Ansel à Guelma (2 et 3% (P/P)). De même, **Amarti et al. (2010)** ont rapporté que le rendement en HE pour la partie aérienne de la même espèce originaire du Maroc est de l'ordre de (1.2% : P/P).

Le rendement en huiles essentielles dépend de plusieurs facteurs, à savoir le moment de la récolte (végétatif, floraison ou post-floraison). (**Salle et pelletier, 1991 ; Flück, 1942, Bounatirou et al., 2007**), les différents organes végétaux (**Fellah et al., 2006 ; Staniszewska et al., 2005**), la nature et l'origine géographique de la plante (**Garnero,1975 ; Benayed, 2008**) et la technique d'extraction (**khajeh et al., 2004 ; Glisic et al., 2007 ; Garnero,1975**).

En ce qui concerne les extraits bruts, Les rendements d'extraction pour les deux plantes avec le solvant du méthanol sont supérieurs à ceux de l'eau distillée, de l'acétone et de DCM. Selon (**Seidel, 2005**), les alcools ont la capacité d'augmenter la perméabilité des parois cellulaires en facilitant l'extraction d'un plus grand nombre de molécules polaires, de moyenne et de faible polarité, ce qui confirme nos résultats. Les différents extraits organiques de nos plantes renferment des taux en rendement décroissants : Extrait méthanolique>Extrait Acetonique>Extrait Dichloromethane, ce qui signifie que les teneurs en extraits varient en fonction de polarité du solvant d'extraction utilisé, la technique d'extraction joue également un rôle important dans le taux de rendement en extrait.

II.2.Dosage de polyphénols totaux et Flavonoïdes totaux:

La quantité en polyphénols totaux est déterminée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique ($y = a x + b$). Elle est exprimée en microgramme (μg) équivalent acide gallique par milligramme (mg) d'extrait. Alors que la quantité en flavonoïdes totaux est déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y = a$

CHAPITRE II : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

x) réalisé par le standard la quercétine. Elle est exprimée en microgramme (μg) équivalent quercétine par milligramme (mg) d'extrait.

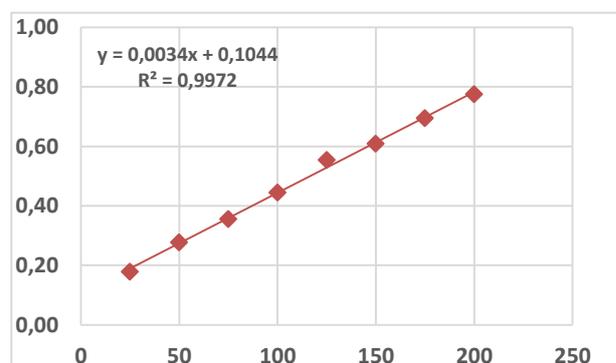
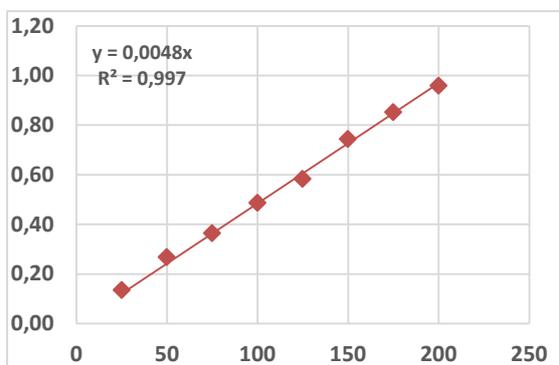


Figure 13 : Courbe d'étalonnage de quercétine **Figure 14** : Courbe d'étalonnage d'acide gallique

Le taux en polyphénols et flavonoïdes totaux dans les extraits de nos plantes est représentés dans le tableau et les figures suivants :

Tableau 10 : Teneurs en polyphénols totaux et flavonoïdes totaux des extraits de *R.suaveolans* et *T.ciliatus*

Type d'extrait	<i>R.suaveolans</i>		<i>T.ciliatus</i>	
	Polyphénols totaux (μg EAG/mg extrait)	Flavonoïdes totaux (μg EQ/mg extrait)	Polyphénols totaux (μg EAG/mg extrait)	Flavonoïdes totaux (μg EQ/mg extrait)
Aqueux	89,11 \pm 1,92	28,75 \pm 2,94	286,5 \pm 0,62	29,11 \pm 1,69
Methanolique	146,13 \pm 2,39	18,07 \pm 0,81	326,27 \pm 2,80	54,68 \pm 3,97
Acetonique	82,75 \pm 2,183	11,71 \pm 1,98	163,11 \pm 0,41	24,14 \pm 1,14
Dichlorométhane	78,56 \pm 1,87	08,75 \pm 1,94	25,69 \pm 3,84	6,25 \pm 0,00

Chaque valeur représente la moyenne \pm SD, EGA : Equivalent Acide galique, EQ : Equivalent Quercétine

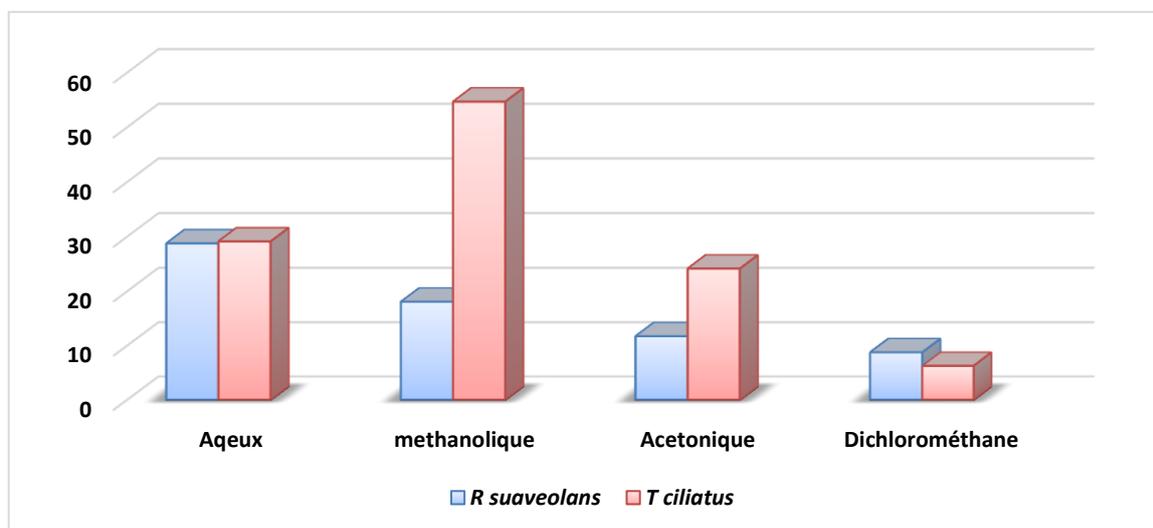


Figure 15 : Résultats du dosage des Flavonoïdes de *R.suaveolans* et *T.ciliatus*

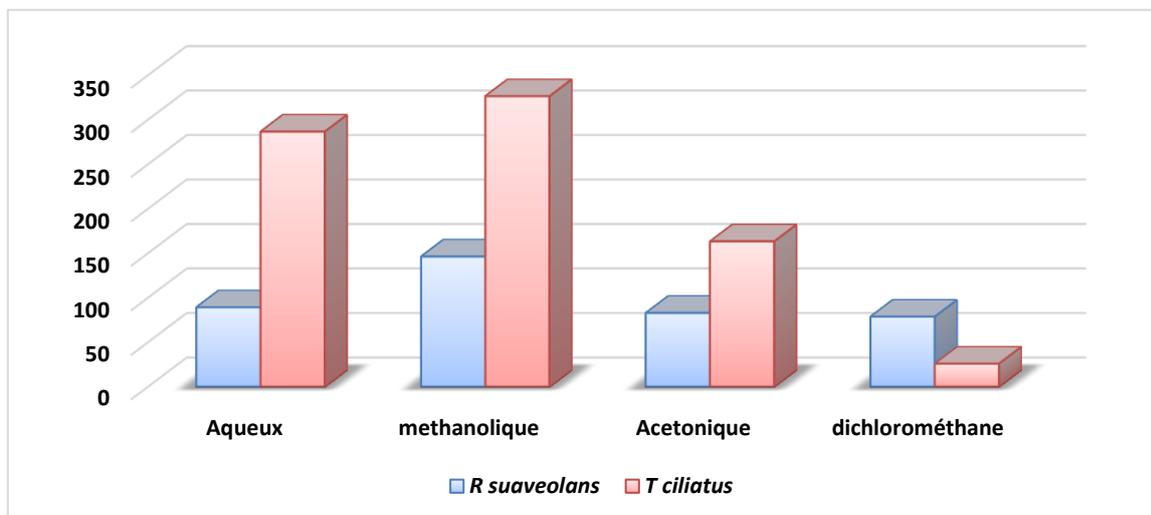


Figure 16 : Résultats du dosage des polyphénols de *R.suaveolans* et *T.ciliatus*

Les résultats représentés dans le tableau 10 et la figure 16 montrent que les différents extraits de la partie aérienne de nos plantes renferment des taux en polyphénols décroissants : Extrait méthanolique > Extrait aqueux > Extrait Acetonique > Extrait Dichloromethane. Les extraits méthanoliques possèdent la meilleure teneur en polyphénols totaux ($326,27 \pm 2,80$; $146,1324 \pm 2,39$ µg EAG/mg extrait) comparé avec les autres extraits. Ceci pourrait être dû au fait que le solvant du méthanol solubilise la plupart des composants phénoliques de plantes. Il est à noter également que la teneur en polyphénols dépend du type du solvant utilisé ainsi que le type de la plante mis en œuvre. Selon **Falleh et al. (2008)**, le méthanol est le solvant approprié pour une plus haute récupération de polyphénols.

Nos résultats concernant les polyphénols de l'extrait méthanolique sont supérieurs à ceux rapportés par d'autres auteurs pour l'espèce *R.suaveolans* récoltée du Sahara algérienne en mai de Mai (**Chemsa et al. 2016**). Cependant, (**Bouaziz et al. 2009**), ont montré la richesse en polyphénols de la même espèce récoltée du Sahara tunisienne en mai de Novembre. Ce résultat pourrait être dû à la différence de la saison et la région de récolte de la plante.

Pour les flavonoïdes, et concernant la plante *T.ciliatus*, le taux estimé a montré que l'extrait méthanolique possède la plus grande valeur ($54,68 \pm 3,97$ µg EQ/mg extrait) suivi par l'extrait aqueux ($29,11 \pm 1,69$ µg EQ/mg extrait), puis l'extrait acetonique ($24,14 \pm 1,14$ µg EQ/mg extrait) et en dernier l'extrait dichlorométhane ($6,25 \pm 0,00$ mg EQ/g d'extrait), cela signifie que les résultats du dosage des flavonoïdes totaux sont conformes avec ceux des polyphénols totaux.

Pour la plante *R.suaveolans*, Le taux en flavonoïdes totaux calculé a révélé que l'extrait aqueux a la plus grande teneur ($28,75 \pm 2,94 \mu\text{g EQ/mg}$ extrait), suivi par l'extrait méthanolique ($18,07 \pm 0,81 \text{ mg EQ/g}$ d'extrait), tandis que l'extrait acétonique et dichloroformethane présentent des teneurs faibles en flavonoïde totaux avec un taux de ($11,71 \pm 1,98$ et $08,75 \pm 1,94 \mu\text{g EQ/mg}$ extrait) respectivement. La grande teneur en flavonoïdes de l'extrait aqueux suivi par l'extrait méthanolique peut être attribuée à la structure des flavonoïdes qui peuvent être sous la forme de glycosides et ainsi plus solubles dans l'eau et l'alcool (Méthanol) par rapport aux autres solvants. Selon **Seidler-Lozykowska (2013)**, l'eau et le méthanol sont des solvants qui extraient essentiellement les flavonoïdes glycosylés, ceci est en accord avec nos résultats.

II.3. Activité antioxydante:

Dans notre étude, nous avons utilisé six tests afin d'évaluer l'activité antioxydante *in vitro* : DPPH, ABTS, pouvoir réducteur, chélation du Fer, Cuprac et Phenanthroline, ces tests sont différents les uns des autres sur le plan de leurs principes, les conditions expérimentales et leur potentiel antioxydant via les extraits. Les résultats de différents tests sont exprimés en (IC50) ou en (A0, 5).

II.3.1. La plante *R.suaveolans*:

Les résultats des tests antioxydant sur les extraits de la plante *R.suaveolans* sont présentés dans la figure et le tableau 11.

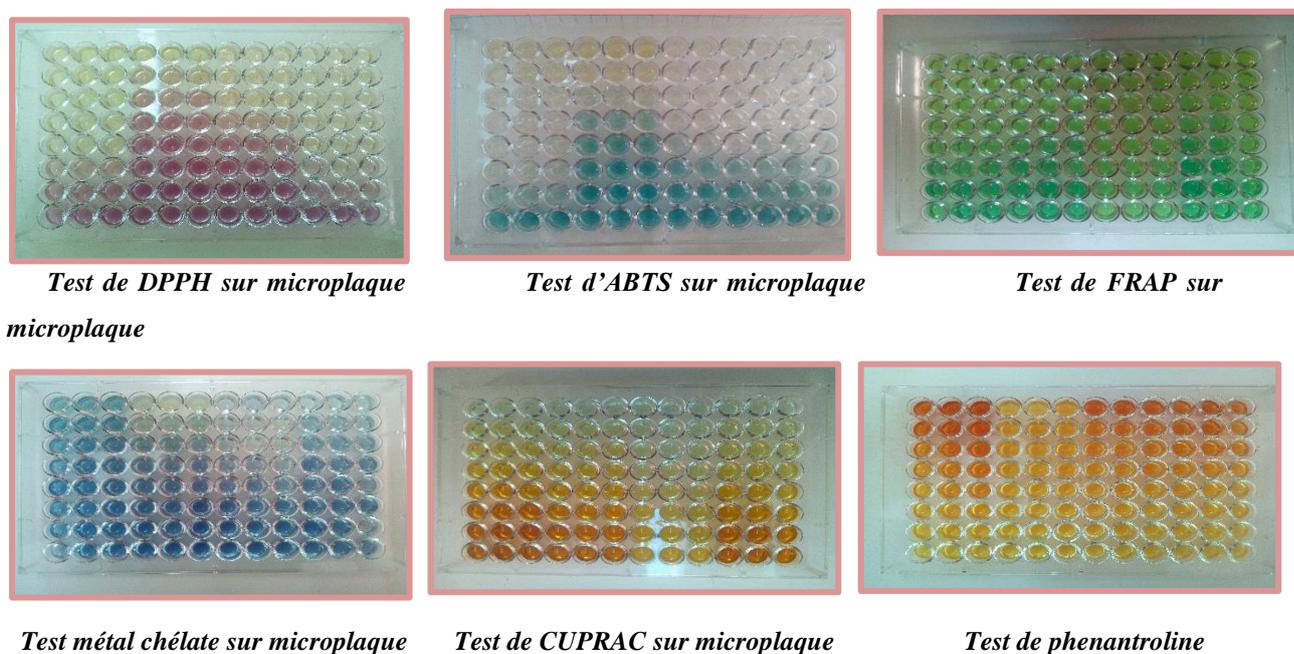


Figure 17 : Résultats des tests antioxydants sur les extraits de *R.suaveolans* sur microplaque

CHAPITRE II : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Tableau 11 : Activité antioxydante des extraits de *R.suaveolans*

Type d'extrait	DPPH IC50 (µg/mL)	ABTS IC50 (µg/mL)	Pouvoir réducteur A0.5 (µg/mL)	Metal chelate IC50 (µg/mL)	CUPRAC A0.5 (µg/mL)	Phenanthroline A0.5 (µg/mL)
Aqueux	80,66±1,03	26,54±0,58	153,23±28,43	89,52±0,82	40,52±0,81	245,00±4,16
Methanolique	4,06±0,51	24,11±1,03	79,80±1,20	297,39±1,62	22,11±1,93	161,04±0,13
Acetonique	42,66±0,64	2,62±0,13	68,36±4,39	> 800	38,46±1,63	80,16±2,06
Dichlorométhane	>800	101,32±0,20	>200	> 800	108,37±7,35	>800
Huile essentielle	>800	528,19±1,88	>200	> 800	>800	>800
Standard						
BHA	6.14±0.41	1.81±0.10	9.29 ± 0.22	NT	5.35±0.71	NT
BHT	12.99±0.41	1.29±0.30	NT	NT	8.97±3.94	5.28 ± 0.34
EDTA	NT	NT	NT	8.57 ± 0.14	NT	NT

Chaque valeur représente la moyenne ±SD, NT : Non testé.

Les résultats représentés dans le tableau montrent que l'activité antioxydante de la partie aérienne de la plante *R.suaveolans* varie considérablement entre les différents extraits ainsi que les différents tests utilisés.

L'extrait aqueux est plus efficace dans le piégeage du radical ABTS avec une valeur d'IC50 de 26,54±0,58 µg/ml, et dans la réduction du cuivre et du fer avec une IC50 de 40,52±0,81 et 89,52±0,82 µg/ml respectivement, Tandis que, il possède le pouvoir antioxydant le plus faible vis-à-vis le test de DPPH, de chélation du fer et de phénantroline.

L'extrait méthanolique a montré un effet plus important dans la neutralisation du radical DPPH (IC50 : 4,06±0,51µg/ml), et du radical ABTS (IC50 : 24,11±1,0351µg/ml), dans la réduction des ions du cuivre et du fer, dont les valeurs d'IC50/A0.5 sont respectivement (22,11±1,93 et 79,80±1,20 µg/ml). Cependant, il a montré un effet moyen pour la phénantroline et la chélation du fer comparativement aux autres extraits. Exceptionnellement, cet extrait présente un pouvoir à neutraliser le radical DPPH supérieur à celui du standard BHA.

L'extrait acétonique possède la meilleure activité anti-radical ABTS et DPPH avec des valeurs d'IC50 respectives de (2,62±0,13 et 42,66±0,64 µg/ml), cet extrait a montré également un effet intéressant dans la réduction des ions de cuivre, du fer, et de phénantroline enregistrant des valeurs d'IC50/AC50 respectives de (38,46±1,63 ; 68,36±4,39 ; 80,16±2,06).

L'extrait de Dichlorométhane et de l'huile essentielle de *R.suveolans* montre une activité antioxydante très faible avec presque tous les tests utilisés comparativement aux autres extraits.

D'une manière générale, les extraits du solvant polaire, et moyennement polaire qui sont l'extrait aqueux, méthanolique et acétonique ont donné les meilleurs résultats de l'activité antioxydante avec presque tous les tests réalisés suivis par les extraits du solvant faiblement polaire qui sont l'extrait de Dichlorométhane et l'huile essentielle, ce qui signifie que le pouvoir antioxydant des extraits est proportionnel à la polarité des solvants utilisés. Ceci est en accord avec les résultats de **Chemsa et ses collaborateurs (2015)** qui ont trouvé que l'extrait méthanolique des Fleurs de *R.suaveolans* récolté du sahara algérienne a un effet piègeur de radicaux DPPH et réducteur des ions du cuivre plus grand que celui de l'huile essentielle.

Dans une autre étude précédente qui a été réalisée par (**Bouaziz et al.2009**), l'activité antioxydante de *R.suveolans* tunisienne a été réalisée par le test de DPPH et uniquement pour l'extrait de MeOH, le résultat a montré un effet un effet piègeur de radicaux DPPH très important (IC50 : $1,09 \pm 0,19 \mu\text{g/mL}$).

Le grand pouvoir antioxydant enregistré avec nos extraits polaires est attribué à leur richesse en composés phénoliques. nos résultats sont en accord avec ce qui est annoncé dans la bibliographie par plusieurs auteurs que le pouvoir antioxydant d'un extrait dépend de sa teneur en composés phénoliques (**Amri et al., 2015 ; Guettaf et al., 2016, Djermane et al.,2020...**).

II.3.2.La plante *T.ciliatus*

Les résultats des tests antioxydant sur les extraits de la plante *T.ciliatus* sont présentés dans la figure 15 et le tableau 12.



CHAPITRE II : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Test métal chélate sur microplaque Test de CUPRAC sur microplaque Test de phenantroline
Figure 18 : Résultats des tests antioxydants sur les extraits de *T.ciliatus* sur microplaque

Tableau 12 : Activité antioxydante des extraits de *T.ciliatus*

Type d'extrait	DPPH IC50 (µg/mL)	ABTS IC50 (µg/mL)	Pouvoir réducteur A0.5 (µg/mL)	Metal chelate IC50 (µg/mL)	CUPRAC A0.5 (µg/mL)	Phenanthroline A0.5 (µg/mL)
Aqueux	123,10±5,15	21,57±0,25	>200	90,81±1,57	56,40±1,80	163,09±2,70
Methanolique	10,99±0,59	21,23±0,39	161,66±27,27	351,08±8,67	8,69±3,50	89,36±1,27
Acetonique	50,62±0,54	16,99±2,11	133,43±3,08	>800	41,58±1,66	170,57±0,47
Dichlorométhane	>800	808,21±16,56	>200	>800	181,74±11,06	>800
Huile essentielle	>800	303,71±7,63	>200	145,04±1,23	464,83±3,69	>800
Standard						
BHA	6.14±0.41	1.81±0.10	9.29 ± 0.22	NT	5.35±0.71	NT
BHT	12.99±0.41	1.29±0.30	NT	NT	8.97±3.94	5.28 ± 0.34
EDTA	NT	NT	NT	8.57 ± 0.14	NT	NT

Chaque valeur représente la moyenne ±SD

Les résultats représentés dans le tableau ci-dessous (Tab.) montrent que les extraits polaires et moyennement polaires de *T.ciliatus* ont montré une capacité importante de piégeage du radical ABTS avec des valeurs d'IC50 de 16,99±2,11 ; 21,23±0,39 et 21,57±0,25 µg/mL enregistrés respectivement avec les extraits acetonique , methanolique et aqueux, et du radical DPPH avec des valeurs d'IC50 de 10,99±0,59 et 50,62±0,54 µg/mL enregistrés respectivement avec les extraits acetonique et methanolique. Cependant, une activité de piégeage faible de ce radical est remarquée avec l'extrait aqueux. Ces extraits ont également montré une capacité considérable dans la réduction des ions du cuivre et de phenantroline, et une capacité faible dans la réduction et la chélation du fer.

Les extraits apolaires de *T.ciliatus* qui sont l'extrait de Dichloromethane et l'extrait de l'huile essentielle ont donné une capacité antioxydante nulle ou très faible avec tous les tests réalisés, Toutefois, ces extraits exercent une activité remarquable dans la chélation du fer avec une valeur IC50 de 145,04±1,23 µg/ml pour l'huile essentielle, et dans la réduction du cuivre avec une valeur IC50 de 181,74±11,06 µg/ml pour l'extrait de Dichloromethane.

Dans une étude précédente qui a été réalisée par (Tefiani, 2015), l'activité antioxydante de *T.ciliatus* récolté de Tlemcen a été effectuée par de nombreux tests (radical

hydroxyle, ORAC, DPPH, ATBS, TBARS, H₂O₂) et uniquement pour l'extrait de l'huile essentielle, l'efficacité de cette huile essentielle a été remarquée seulement dans le test de piégeage du radical hydroxyle. Ceci est en accord avec nos résultats, ou l'effet antioxydant de l'huile essentielle de notre étude est noté seulement avec trois tests parmi six tests réalisés et avec des valeurs d'IC₅₀ très faibles.

II.4. Activité anticholinestérase

L'activité anticholinestérase *in vitro* des extraits de nos plantes a été évaluée vis-à-vis l'enzyme butyrylcholinestérase. Les résultats de l'Activité Anti- butyrylcholinestérase sont exprimés en IC₅₀ (la concentration d'inhibition à 50 %). La galantamine est utilisée comme une substance de référence.

II.4.1. La plante *R. suaveolans*

Les résultats des tests anticholinestérase de différents extraits de la plante *R. suaveolans* sont présentés dans la figure 16 et le tableau 13.



Figure 19 : Résultats Anti-butylcholinestérase des extraits de *R. suaveolans* sur microplaque.

Tableau 13 : Inhibition de butyrylcholinestérase par les HEs et les extraits bruts de *R. suaveolans*

Type d'extrait	Pouvoir inhibiteur de butyrylcholinestérase							
	6,25µg	12,5µg	25µg	50µg	100µg	200 µg	400 µg	IC50 µg/mL
Aqueux	33,22±3,98	36,04±2,88	42,03±1,08	42,99±0,71	45,32±1,07	50,45±0,44	54,41±3,45	191,79±1,98
Methanolique	28,88±1,36	35,83±3,92	42,93±2,71	43,98±3,33	47,56±0,96	52,75±2,14	59,51±2,62	145,05±0,96
Acetonique	37,09±1,60	48,17±2,09	53,52±0,36	55,15±1,73	61,31±5,31	63,35±2,22	70,51±3,70	18,28± 1,93
Dichlorométhane	46,47±0,69	54,10±3,06	57,94±2,22	60,91±1,23	64,51±1,02	67,31±2,38	74,08±2,88	4,14±0,40
Huile essentielle	42,63±5,37	57,07±0,87	59,74±1,14	66,84±3,23	69,81±2,87	77,62±0,68	78,40±0,93	13,57± 1,70
Galantamine	3,26± 0,62	6,93 ± 0,62	24,03±2,94	45,13±2,60	63,87±2,85	73,57±0,77	78,95±0,58	34,75±1,99

Chaque valeur représente la moyenne ±SD

Les résultats mentionnés dans le Tab. , montrent que l'extrait de dichlorométhane de *R.suaveolans* possède une forte activité inhibitrice vis-à-vis l'enzyme BChE, avec une valeur d'IC50 de $4,14 \pm 0,40$ $\mu\text{g/ml}$, suivie par l'extrait de l'huile essentielle, puis l'extrait acétonique avec des valeurs d'IC50 égales à $13,57 \pm 1,70$ et $18,28 \pm 1,93$ $\mu\text{g/mL}$ respectivement. Cette activité est supérieure à celle du standard la Galantamine dont l'IC50 est de l'ordre de $34,75 \pm 1,99$ $\mu\text{g/ml}$. Par contre, les extraits aqueux et méthanolique de *R.suveolans* ont montré la plus faible activité avec des IC50 de $191,79 \pm 1,98$ et $145,05 \pm 0,96$ $\mu\text{g/ml}$ inférieure à celle du standard.

L'activité anticholinestérase des extraits de *R.sauveolans* a été déjà signalée dans la littérature par **Chemsa et ces co-auteurs, (2015)**. Ces auteurs ont montré que l'extrait méthanolique de *R.sauveolans* récoltée du Sahara algérienne a donné une activité inhibitrice modérée contre les enzymes l'AChE et la BChE, dont les valeurs d'IC50 étaient de $168,76 \pm 0,62$ et $54,79 \pm 1,89$ $\mu\text{g/mL}$ respectivement. Par contre, l'extrait de l'HE était inactif contre ces enzymes. Ceci n'est pas en accord avec les résultats de notre étude où notre extrait de l'HE présente une activité inhibitrice très importante vis-à-vis l'enzyme BChE. Cette différence de résultat pourrait être expliquée par la nature des composés terpéniques présents dans ces huiles.

II.4.2. La plante *T.ciliatus*

Les résultats des tests anticholinestérase de différents extraits de la plante *T.ciliatus* sont présentés dans la figure 17 et le tableau 14.



Figure 20 : Résultats Anti-butrylcholinestérase des extraits de *T.ciliatus* sur microplaque

Tableau 14 : Inhibition de butrylcholinestérase par les HEs et les extraits bruts de *T.ciliatus*

Type d'extrait	Pouvoir inhibiteur de butrylcholinestérase							
	6,25 μg	12,5 μg	25 μg	50 μg	100 μg	200 μg	400 μg	IC50 $\mu\text{g/mL}$

CHAPITRE II : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Aqueux	44,18±2,25	49,49±2,24	51,96±1,44	54,04±1,98	54,80±0,30	56,02±0,80	65,45±3,84	19,82±0,45
Methanolique	43,50±4,38	51,13±0,97	54,04±3,17	58,12±1,92	60,12±2,88	61,34±3,23	74,13±4,26	14,23±0,40
Acetonique	48,20±0,37	56,02±4,19	68,41±1,40	72,04±1,76	75,04±2,08	80,18±2,13	90,17±3,07	6,69±0,62
Dichlorométhane	50,60±0,57	74,84±2,65	81,29±3,74	82,98±0,12	83,25±0,91	93,16±3,91	96,60±4,10	0,26±0,20
Huile essentielle	50,33±0,16	64,22±0,25	69,92±2,27	73,12±3,33	76,79±2,96	85,81±2,77	92,84±0,92	2,96±0,80
Galantamine	3,26± 0,62	6,93± 0,62	24,03±2,94	45,13±2,60	63,87±2,85	73,57±0,77	78,95±0,58	34,75±1,99

Chaque valeur représente la moyenne ±SD

D'après le tableau ci-dessus, nos résultats montrent une capacité très importante de tous les extraits de *T.ciliatus* comme inhibiteur de l'enzyme Butyrylcholinestérase. L'extrait de Dichlorométhane a manifesté la plus grande capacité à inhiber la butylcholinestérase avec une IC50 égale à 0,26±0,20 µg/ml, suivie par l'extrait de l'HE avec une IC50 égale à 2,96±0,80 µg/ml, puis l'extrait acétonique, l'extrait methanolique, et en dernier l'extrait aqueux enregistrant des valeurs d'IC50 perspectives (6,69±0,62 ; 14,23±0,40 ; 19,82±0,45 µg/ml). Ce qui signifie que le l'activité anti-BChE de nos extraits est proportionnel à la polarité de solvants utilisés. Ces résultats ont permis de classer les extraits comme suit : Extrait de Dichlorométhane > Extrait de l'huile essentielle > Extrait de l'acétone > Extrait méthanolique > Extrait aqueux. Les effets de tous ces extraits sont plus efficaces que le standard (galanthamine, IC50 = 34,75 ± 1,99µg/ml).

D'après la littérature la plupart des inhibiteurs connus de l'enzyme AChE et BChE soient des alcaloïdes, et les terpènes (Murray et al., 2013). Actuellement, nombreuses études ont été réalisées pour identifier d'autres composés naturels pouvant avoir une activité anticholinestérase importante. Nous notons, l'étude de Houghton et ses collaborateurs, (2006), ces auteurs ont montré que plusieurs composés, autres que les alcaloïdes, et les terpènes présentent une grande capacité d'inhiber les enzymes cholinestérases tels que, les composés phénoliques, les flavonoïdes et les coumarines. Ainsi, nos résultats confirment encore le rôle des polyphénols et des terpènes dans l'activité anticholinestérase.

CONCLUSION
GENERALE

CONCLUSION GENARALE

Les travaux présentés dans ce manuscrit s'inscrivent dans la continuité de valoriser les plantes aromatiques de la flore locale d'intérêts thérapeutiques. Deux plantes médicinales présentes et récoltées dans deux régions différentes de l'Algérie ont été mises en œuvre. Dans un premier volet, nous avons fait l'extraction des huiles essentielles par la méthode d'hydro distillation, et préparé des extraits bruts par macération en utilisant des solvants de polarité différente. Le rendement en huile essentielle de la plante *R.suaveolans* est supérieur à celui de la plante *T.ciliatus* avec une valeur de 0.31% et 0.23% respectivement, cependant, Une rentabilité importante a été remarquée dans les extraits bruts avec le méthanol, supérieure à celle de l'eau distillée, de l'acétone et de DCM pour les deux plantes.

Le dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux des extraits par des méthodes colorimétriques a été réalisé. Nos résultats ont montré que les extraits méthanoliques et aqueux de deux plantes possèdent la meilleure récupération en polyphénols et flavonoïdes totaux que les autres extraits.

Dans un deuxième volet abordé par ce travail une activité antioxydante et activité anti cholinestérase sont effectuées *in vitro*.

L'activité antioxydante des HEs et des extrait bruts a été réalisée par six méthodes différentes, à savoir : le piégeage du radical libre DPPH•, l'ABTS, le pouvoir réducteur, métal chélate, CUPRAC, et phenanthroline. Nos résultats ont montré que les extraits polaires, et moyennement polaires (aqueux, méthanoliques et acétoniques) possèdent la meilleur activité antioxydante comparativement aux extraits faiblement polaires (dichlorométhane et huiles essentielles) dans les deux plantes.

L'activité anticholinestérase des HEs et des extrait bruts a été réalisée vis-à-vis l'enzyme butyrylcholinestérase. Nos résultats ont montré que l'activité anticholinestérase dans la plante *R. suavelans* de tous les extraits a donné une forte activité inhibitrice contre l'enzyme BChE ($IC_{50}=4,14\pm 0,40$ à $18,28\pm 1,93$ $\mu\text{g/mL}$) sauf l'huile essentielle est inactif. Par contre la plante *T. ciliatus* a révélé que l'activité antich-butylcholinestérase est plus élevée comparativement à la galanthamine utilisé comme standard ($IC_{50}=34,75\pm 1,99$), dont l'extrait de Dichlorométhane a manifesté la plus grande capacité ($IC_{50}= 0,26\pm 0,20$ $\mu\text{g/m}$), suivi par l'extrait d'huile essentielle , acétonique , méthanolique et aqueux respectivement.

Les résultats obtenus dans ce travail confirment le rôle des extraits de nos plantes dans l'activité antioxydante et anti-alzaheimer, et ainsi indiquent une utilisation possible de

ces plantes en phytothérapie. Mais ces résultats ne constituent qu'une petite partie dans le domaine de recherche des nouveaux traitements à base des plantes sur les maladies impliquées dans le stress oxydant, il serait intéressant de compléter cette étude par la purification et l'identification des principes actifs et la réalisation d'une étude *in vivo*, et également l'évaluation d'autres propriétés biologiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**A**

Ahkang, S., Jang, YJ et Park, H. (1998). Effets doubles in vivo de la vitamine C sur les lésions pulmonaires induites par le paraquat : dépendance aux métaux libérés par les tissus endommagés. Recherche sur les radicaux libres , 28 (1), 93-107.

Amarti, F., Satrani, B., Ghanmi, M., Farah, A., Aafi, A., Aarab, L., ... & Chaouch, A. (2010). Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc. BASE.

Amarti, F., Satrani, B., Ghanmi, M., Farah, A., Aafi, A., Aarab, L., ... & Chaouch, A. (2010). Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc. BASE.

Amas., 1997, Food and Agricultural Research Council, Reduit, Mauritius

Amri O., Elguiche R., Tahrouch S., Zekhnini A. and Hatimi A. (2015). Antifungal and Antioxidant Activities of Some Aromatic and Medicinal Plants from the Southwest of Morocco. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 7(7): 672-678.

(Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé, édition AFSSAPS2008, s].

B

Bakkali, F., Averbek, S., Averbek, D. et Idaomar, M. (2008). Effets biologiques des huiles essentielles - une revue. Toxicologie alimentaire et chimique , 46 (2), 446-475.

Bamforth, CW (1999). Brume de bière. Journal de l'American Society of Brewing Chemists, 57 (3), 81 90.

BELAICHE, P. (1979). Traité de phytothérapie et d'aromathérapie-TOME I- l'aromatogramme, vol. 1, 3 vol. Paris: MALOINE SA.

Benayad, N. (2008). Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines: moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées. Projet de thèse de Doctorat de l'Université Mohammed V-Agdal, 61.

Bensakhria, A. (2018). Le stress oxydatif. Toxicologie générale, 70-86.

Bernard, J. M., & Goodyear, R. K. (2009). Fundamentals of clinical supervision (4th Ed.). Upper Saddle River, NJ : Merrill.

Bernard, JM et Goodyear, RK (2005). de Supervision Clinique. Supervision en counseling : enjeux interdisciplinaires et recherche , 24 (1-2), 3.

Bernard, M., & Czygan, F. C. (1999). Plantes thérapeutiques: tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. M. Wichtl, & R. Anton (Eds.). Tec & Doc; Ed. médicales internationales.

Bisoli, E., Garcez, WS, Hamerski, L., Tieppo, C., & Garcez, FR (2008). Triterpènes pentacycliques bioactifs des tiges de *Combretum laxum*. *Molécules* , 13 (11), 2717-2728.

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. *Afr J Biotechnol.* 8:7017–7027.

Bouaziz, M., Dhouib, A., Loukil, S., Boukhris, M., & Sayadi, S. (2009). Teneur en polyphénols, activités antioxydantes et antimicrobiennes d'extraits de quelques plantes sauvages récoltées dans le sud de la Tunisie. *Revue africaine de biotechnologie* , 8 (24).

Bounatirou S., Smiti S., Miguel M. G., Faleiro L., Rejeb M. N., Neffati M., Costa M. M., Figueiredo A. C., Barroso J. G. & Pedro L. G. (2007). Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. *Et Link. Food chemistry*, 105: 146-155.

Bounatirou, S., Smiti, S., Miguel, MG, Faleiro, L., Rejeb, MN, Neffati, M., ... & Pedro, LG (2007). Composition chimique, activités antioxydantes et antibactériennes des huiles essentielles isolées du *Thymus capitatus* Hoff tunisien. *et Lien. Chimie alimentaire* , 105 (1), 146-155.

Bourrel, C. (1993). Analyse chimique, activités biostatiques et antioxydantes d'extraits de plantes aromatiques sélectionnées (Doctoral dissertation, Toulouse, INPT).

Bousmaha-Marroki L., Atik B.F., Tomi F. & Casanova J. (2007). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. ssp. eu-ciliatus Maire from Algeria. *Journal of Essential oil Research*, 19(5): 490-493.

Bousmaha-Marroki L., Atik B.F., Tomi F. & Casanova J. (2007). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. ssp. eu-ciliatus Maire from Algeria. *Journal of Essential oil Research*, 19(5): 490-493.

Brand-williams W., Cuvelier M.E. and Berset C. (1995). Use of a Free Radical Method to evaluate Antioxidant Activity. *Lebensmittel- Wissenschaft & Technologie*, 28 :25-30.

Bruneton, J. (1993). Pharmacognosie: phytochimie plantes médicinales (No. 581.634 B7).

C

Catalano, A., Rodilossi, S., Caprari, P., Coppola, V., & Procopio, A. (2005). La 5-lipoxygénase régule l'arrêt de la croissance semblable à la sénescence en favorisant l'activation de p53 dépendante des ROS. *La revue EMBO* , 24 (1), 170-179.

Charpentier, B., & Hamon-Lorleac'h, F. (2008). Guide du préparateur en pharmacie. Elsevier Masson.(1)

Cheeseman, KH et Slater, TF (1993). Une introduction à la biochimie des radicaux libres. *Bulletin médical britannique* , 49 (3), 481-493.

Chemsa, A. E., Erol, E., Öztürk, M., Zellagui, A., Özgür, C., Gherraf, N., & Duru, M. E. (2016). Chemical constituents of essential oil of endemic *Rhanterium suaveolens* Desf. growing in Algerian Sahara with antibiofilm, antioxidant and anticholinesterase activities. *Natural Product Research*, 30(18), 2120-2124.

Chemsa, AE, Erol, E., Öztürk, M., Zellagui, A., Özgür, C., Gherraf, N. et Duru, ME (2016). Constituants chimiques de l'huile essentielle de *Rhanterium suaveolens* endémique Desf. poussant dans le Sahara algérien avec des activités antibiofilm, antioxydante et anticholinestérasique. *Recherche sur les produits naturels* , 30 (18), 2120-2124.

Chira, K., Suh, J. H., Saucier, C., & Teissède, P. L. (2008). Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*, 6(2), 75-82.

Cram. D. G. and Mahmoud,G. S, 1968, Chimie organique.

D

Dacosta, Y. (2003). Les phytonutriments bioactifs: 669 références bibliographiques. Ed. Yves Dacosta.

Deby-Dupont, G., Deby, C., & Lamy, M. (2002). Données actuelles sur la toxicité de l'oxygène. *Réanimation*, 11(1), 28-39.

Delattre, J., Beaudoux, J. L., & Bonnefont-Rousselot, D. (2005). Radicaux libres et stress oxydant(aspects biologiques et pathologiques).

Delattre, J., Beaudoux, J. L., & Bonnefont-Rousselot, D. (2005). Radicaux libres et stress oxydant(aspects biologiques et pathologiques).

Djermane, N., Gali, L., Arhab, R., Gherraf, N., Bensouici, C., Erenler, R., ... & Abdessamed, A. (2020). Chemical composition and in vitro evaluation of antioxidant, antimicrobial, and enzyme inhibitory activities of *Erucaria uncata* and *Thymeleae hirsuta*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 29, 101834.

E

Ece, A., Gürkan, F., Çelik, F., Boşnak, M., Yel, S., Balık, H. et Erel, Ö. (2007). Paraoxonase, activité antioxydante totale et taux de peroxyde chez l'enfant marasmique : relations avec la leptine. *Biochimie clinique*, 40 (9-10), 634-639.

Edeas, M. (2007). Les polyphénols et les polyphénols de thé. *Phytothérapie*, 5(5), 264-270.

En ligne Ourisson, G. (1990). Le rôle général des terpènes et leur importance globale. *Chimie pure et appliquée*, 62 (7), 1401-1404.

Erlund, I. (2004). Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition research*, 24(10), 851-874.

F

Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M. and Abdely C. (2008). Phenolic Composition of *Cynara cardunculus* L. Organs and their Biological Activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331: 372-379.

Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., & Abdely, C. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331(5), 372-379.

Favier, A. (2006, November). Stress oxydant et pathologies humaines. In *Annales pharmaceutiques françaises* (Vol. 64, No. 6, pp. 390-396). Elsevier Masson.

Fellah S., Romdhane M. and Abderraba M. (2006). Extraction et Etude des Huiles Essentielles de la *Salvia officinalis*. L Cueillie dans Deux Regions Differentes de La Tunisie. *Journal de la société Algérienne de Chimie*, 16 (2) : 193-202.

Fellah, S., Romdhane, M., & Abderraba, M. (2006). Extraction et étude des huiles essentielles de la *Salvia officinalis*. 1 cueillie dans deux régions différentes de la Tunisie. *Journal-Societe Algerienne De Chimie*, 16(2), 193.

Fiorucci, S. (2006). Activités biologiques de composés de la famille des flavonoïdes: Approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire (Doctoral dissertation, Université de Nice Sophia-Antipolis (UNS)).

Flück H. (1942). Nos plantes Médicinales. Traduit par Weitzel R., librairie Payot, Lausanne, pp. 8-14.

Flück, H. (1942). Nos plantes médicinales: description à la portée de tous et indications sur leurs principes actifs, leur action, leur emploi, leur récolte et leur culture. Payot.

G

Garnero J., (1975). Quelques problèmes rencontrés au cours de l'obtention, du contrôle et de l'étude de la composition des huiles essentielles. Journée de dermato-pharmacie (Nice), 105-126.

Garnero J., (1975). Quelques problèmes rencontrés au cours de l'obtention, du contrôle et de l'étude de la composition des huiles essentielles. Journée de dermato-pharmacie (Nice), 105-126.

Gershenzon, J., & Dudareva, N. (2007). La fonction des produits naturels terpéniques dans le monde naturel. *Biologie chimique de la nature* , 3 (7), 408-414.

Gershenzon, J., & Dudareva, N. (2007). La fonction des produits naturels terpéniques dans le monde naturel. *Biologie chimique de la nature* , 3 (7), 408-414.

Ghedira, K. (2005). Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 3(4), 162-169.

Giordani R., Hadeff Y. & Kaloustian J. (2008). Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. *Fitoterapia*, 79: 199-203.

Giordani, R., Hadeff, Y., & Kaloustian, J. (2008). Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. *Fitoterapia*, 79(3), 199-203.

Glisic S.B., Misic D.R., Stamenic M.D., Zizovic I.T., Asanin R.M. and Skala D.U. (2007). Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Carrot Fruit Essential Oil: Chemical Composition and Antimicrobial Activity. *Food Chemistry*, 105 (1): 346-352.

Goto, M., Ueda, K., Hashimoto, T., Fujiwara, S., Matsuyama, K., Kometani, T. et Kanazawa, K. (2008). Un mécanisme de formation de la 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine médié par la 2'-désoxythymidine peroxydée. *Biologie radicalaire libre et médecine* , 45 (9), 1318-1325.

Guettaf S., Abidli N., Kariche S., Bellebcir L. and Bouriche H. (2016). Phytochemical Screening and Antioxidant Activity of Aqueous Extract of *Genista Saharæ* (Coss. & Dur.). *Der Pharmacia Lettre*, 8 (1): 50-60.

H

Haslam, E., & Cai, Y. (1994). Polyphénols végétaux (tanins végétaux) : métabolisme de l'acide gallique. *Rapports sur les produits naturels* , 11 , 41-66.

Havsteen, BH (2002). La biochimie et la signification médicale des flavonoïdes. *Pharmacologie & thérapeutique* , 96 (2-3), 67-202.

Hennebelle, T. (2006). Investigation chimique, chimiotaxonomique et pharmacologique de Lamiales productrices d'antioxydants: *Marrubium peregrinum*, *Ballota larendana*, *Ballota pseudodictamnus* (Lamiacées) et *Lippia alba* (Verbénacées) (Doctoral dissertation).

Hernandez Ochoa, L. R. (2005). Substitution de solvants et matières actives de synthèse par un combiné «solvant/actif» d'origine végétale (Doctoral dissertation).

Houghton, PJ, Ren, Y. et Howes, MJ (2006). Inhibiteurs de l'acétylcholinestérase des plantes et des champignons. *Rapports sur les produits naturels* , 23 (2), 181-199.

ISO 690

J

Jayanthi P. and Lalitha P. (2011). Reducing Power of the Solvent Extracts of *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3: 126-128.

Jean, B. (2009). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.). Lavoisier.

K

Kaiser, S., Di Mascio, P., Murphy, ME et Sies, H. (1990). Piégeage physique et chimique de l'oxygène moléculaire singulet par les tocophérols. *Archives de biochimie et biophysique* , 277 (1), 101-108.

Khajeh, M., Yamini, Y., Sefidkon, F. et Bahramifar, N. (2004). Comparaison de la composition de l'huile essentielle de *Carum copticum* obtenue par extraction au dioxyde de carbone supercritique et méthodes d'hydrodistillation. *Chimie alimentaire* , 86 (4), 587-591.

Kohen, R., & Nyska, A. (2002). Revue invitée : Oxydation des systèmes biologiques : phénomènes de stress oxydatif, antioxydants, réactions redox et méthodes pour leur quantification. *Pathologie toxicologique* , 30 (6), 620-650.

Kumar, R. S., Narasingappa, R. B., Joshi, C. G., Girish, T. K., Rao, U. J. P., & Danagoudar, A. (2017). Evaluation of *Cassia tora* Linn. against oxidative stress-induced DNA and cell membrane damage. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 9(1), 33.

L

L3-BPV-FSNV-UFMS BIOCHIMIE VEGEAIE chap. 3 métabolisme secondaire)
Qureshi. N ; Porter. J. W, 1981, Biosynthesis of isoprenoid Compounds, Porter. J. W,

Lee, SH, Oe, T. et Blair, IA (2001). Décomposition induite par la vitamine C des hydroperoxydes lipidiques en génotoxines endogènes. *Sciences* , 292 (5524), 2083-2086.

Leopoldini, M., Russo, N. et Toscano, M. (2011). La base moléculaire du mécanisme de travail des antioxydants polyphénoliques naturels. *Chimie alimentaire* , 125 (2), 288-306.

Leroy, V. Exploitation des potentiels thérapeutiques de la phytohamacoppe traditionnelle algerienne : etude de quelques lques plantes a activité CICATRISANTE.(4)

Lytvyn, Y., Perkins, BA et Cherney, DZ (2015). L'acide urique comme biomarqueur et cible thérapeutique dans le diabète. *Journal canadien du diabète* , 39 (3), 239-246.

(LES ALCALOIDES-Cours de pharmacognosie Dr SAHRAOUI 3eme année pharmacie (1))

M

Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR presses polytechniques.

MacLaren, D. (2007). *Advances in sports and exercise science series. Nutrition and sport. Antioxidants and free radicals.* Published by Elsevier's Health Sciences Rights Department: Philadelphia, 153-75.

Madhuri, S., & Pandey, G. (2009). Certaines plantes médicinales anticancéreuses d'origine étrangère. *Science actuelle* , 779-783.

Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., & Giovannini, C. (2005). Nouveaux mécanismes des composés antioxydants naturels dans les systèmes biologiques : implication du glutathion et des enzymes apparentées au glutathion. *Le Journal de la biochimie nutritionnelle* , 16 (10), 577-586.

Matés, JM, Pérez-Gómez, C., & De Castro, IN (1999). Enzymes antioxydantes et maladies humaines. *Biochimie clinique* , 32 (8), 595-603.

Mazat, J. P., & Ransac, S. (2010). Le complexe bc1 de la chaîne respiratoire mitochondriale fonctionne selon l'hypothèse du cycle Q de Mitchell-La preuve par une approche stochastique?. *médecine/sciences*, 26(12), 1079-1086.

McCall, MR, & Frei, B. (1999). Les vitamines antioxydantes peuvent-elles réduire sensiblement les dommages oxydatifs chez l'homme ?. *Free Radical Biology and Medicine* , 26 (7-8), 1034-1053.

Middleton, E., Kandaswami, C., & Theoharides, TC (2000). Les effets des flavonoïdes végétaux sur les cellules de mammifères : implications pour l'inflammation, les maladies cardiaques et le cancer. *Revue pharmacologique*, 52 (4), 673-751.

Murray, A.P., Faraoni, M.B., Castro, M.J., Alza, N.P., Cavallaro, V., 2013. Natural AChE inhibitors from plants and their contribution to Alzheimer's disease therapy. *Curr. Neuropharmacol.* 11, 388–413.

N

Nacz, M., & Shahidi, F. (2004). Extraction et analyse des composés phénoliques dans les aliments. *Journal of chromatography A*, 1054 (1-2), 95-111.

Nationale Supérieure des Ingénieurs en Arts Chimiques et Technologiques.

O

Ourisson, G, 1990, *Pure Appl Chem*, 62, 1401.

P

Packer, L., Kraemer, K., & Rimbach, G. (2001). Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition*, 17(10), 888-895.

Panda, K., Chattopadhyay, R., Ghosh, M. K., Chattopadhyay, D. J., & Chatterjee, I. B. (1999). Vitamin C prevents cigarette smoke induced oxidative damage of proteins and increased proteolysis. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(9-10), 1064-1079.

Panfili, G., Fratianni, A., & Irano, M. (2003). Méthode de chromatographie liquide à haute performance en phase normale pour le dosage des tocophérols et des tocotriénols dans les céréales. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (14), 3940-3944.

Paravicini, TM, & Touyz, RM (2008). NADPH oxydases, espèces réactives de l'oxygène et hypertension : implications cliniques et possibilités thérapeutiques. *Soins du diabète*, 31 (Supplément_2), S170-S180.

Pillou, F (2014). « Radicaux libres – Définition », *Journal des Femmes*

Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., & Defraigne, J. O. (2002). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16(4), 233-239.

Puppo, A., & Halliwell, B. (1988). Formation de radicaux hydroxyle à partir de peroxyde d'hydrogène en présence de fer. L'hémoglobine est-elle un réactif biologique de Fenton ?. *Journal biochimique*, 249 (1), 185-190.

Q

Quezel, P., & Santa, S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales (No. 581.965 Q8).

Qureshi, N. (1981). Biosynthesis of isoprenoid compounds, eds. Porter, JW & Spurgeon, SL.

R

Retsky, K. L., Chen, K., Zeind, J., & Frei, B. (1999). Inhibition of copper-induced LDL oxidation by vitamin C is associated with decreased copper-binding to LDL and 2-oxo-histidine formation. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(1-2), 90-98.

Rhayour, K. (2002). Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*.(2)

Richter, G. (1993). Métabolisme des végétaux: physiologie et biochimie (No. 581.13 R53).

S

Salah, H. B., Bouaziz, H., & Allouche, N. (2019). Chemical composition of essential oil from *Rhanterium suaveolens* Desf. and its antimicrobial activity against foodborne spoilage pathogens and mycotoxigenic fungi. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 22(3), 592-603..

Salle J.L. et Pelletier J. (1991). Les huiles Essentielles, Synthèse d'Aromathérapie et Introduction à la Sympathicothérapie. Ed. Frison-Roche, pp.19-45.

Sayre, LM, Moreira, PI, Smith, MA et Perry, G. (2005). Ions métalliques et modification oxydative des protéines dans les maladies neurologiques. *Annali dell'Istituto superiore di sanita* , 41 (2), 143-164.

Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., ... & Seubert, P. (1999). Immunization with amyloid- β attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*, 400(6740), 173-177.

Schroeter, H., Boyd, C., Spencer, JP, Williams, RJ, Cadenas, E., & Rice-Evans, C. (2002). Signalisation MAPK dans la neurodégénérescence : influences des flavonoïdes et de l'oxyde nitrique. *Neurobiologie du vieillissement* , 23 (5), 861-880.

Sharma, P., Jha, AB, Dubey, RS et Pessarakli, M. (2012). Espèces réactives de l'oxygène, dommages oxydatifs et mécanisme de défense antioxydant chez les plantes dans des conditions stressantes. *Revue de botanique* , 2012 . 1-26.

Shi, H., Noguchi, N., & Niki, E. (2001). Méthode galvinoxyl pour normaliser l'activité de don d'électrons et de protons. Dans *Methods in enzymology* (Vol. 335, pp. 157-166). Presse académique.

Soualeh, N., & Soulimani, R. (2016). Huiles essentielles et composés organiques volatils, rôles et intérêts. *Phytothérapie*, 14(1), 44-57.

Spurgeon. S. L. Eds ; Wiley : New York, 1, 47-94

Staniszewska M., Kula J., Wieczorkiewicz M. and Kusewicz D. (2005). Essential Oils of Wild and Cultivated Carrots - the Chemical Composition and Antimicrobial Activity. *Journal of Essential Oil Research*, 17 (5): 579-583

Staniszewska, M., Kula, J., Wieczorkiewicz, M., & Kusewicz, D. (2005). Essential oils of wild and cultivated carrots—the chemical composition and antimicrobial activity. *Journal of Essential Oil Research*, 17(5), 579-583.

T

Tariot, P., Farlow, M., & Grossberg, G. (2004). La mémantine ajoutée au donépézil dans le traitement de la maladie d'Alzheimer. *Minerva*, 3(9), 147-149.

Tefiani, C. (2015). Les propriétés biologiques des huiles essentielles de *Curcuma longa*, *Ammoides verticillata* et *Thymus ciliatus* sp. eu-ciliatus. Thèse de Doctorat en sciences de l'université de Mostaganem.

V

Valko, M., Rhodes, CJB, Moncol, J., Izakovic, MM et Mazur, M. (2006). Radicaux libres, métaux et antioxydants dans le cancer induit par le stress oxydatif. *Interactions chimico-biologiques*, 160 (1), 1-40.

Vamecq, J., Vallée, L., Storme, L., Gelé, P., & Bordet, R. (2004). Les acteurs immédiats du stress oxydatif. *La Lettre du pharmacologue* (Boulogne), 18(1), 16-23.

Vivier, A., Hida, H., & Mallon, A. C. (2000). Les anticholinéstatiques centraux dans le traitement de la maladie d'Alzheimer. *Lyon Pharmaceutique*, 51(2), 92-109.

Yoshida, H., Kajimoto, G. et Emura, S. (1993). Effets antioxydants des d-tocophérols à différentes concentrations dans les huiles pendant le chauffage par micro-ondes. *Journal de l'American Oil Chemists' Society*, 70 (10), 989-995.

Z

ZERGUI, F. Z. (2016). Contribution à l'étude phytochimique et possibilités de valorisation d'une espèce dunaire du littoral oranais *Matthiola sinuata* (L). RBr. 1812 (Doctoral dissertation).

Site web :

https://www.doctissimo.fr/html/dossiers/alzheimer/sa_4594_traitements.htm

(extrait de Fondation pour la Recherche Médicale en France, de Lorenzo Tiren (19), avec l'accord de la FRM : <https://www.frm.org/alzheimer/alzheimer-que-se-passe-t-il-dans-le-cerveau.html>)L'acétylcholinestérase (AChE) Facteurs de risque (8)

