



République Algérienne Démocratique et Populaire



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Larbi Tébessi-Tébessa-

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

Département : Sciences de la matière



**MEMOIRE DE MASTER**

Domaine : Sciences de la matière

Filière : Chimie

Option : Chimie des produits naturel

**THEME :**

**Screening phytochimique et évaluation des activités  
Biologiques d'une plante Algérienne**

« *Anacyclus Valentinus.L.* »

Présenté par :

**Saoud Ikram**

**Bakhouche Abir**

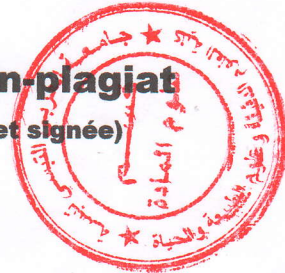
Devant le jury :

<b>Elhassasna Souhir</b>	<b>MAA</b>	<b>U. Larbi Tébessi</b>	<b>Président</b>
<b>Omar Tebboub</b>	<b>MAA</b>	<b>U. Larbi Tébessi</b>	<b>Encadreur</b>
<b>Soudani Kaouthar</b>	<b>MAA</b>	<b>U. Larbi Tébessi</b>	<b>Examineur</b>

**Date de soutenance : 21/ 09/ 2020**



**Déclaration sur l'honneur de non-plagiat**  
(A joindre obligatoirement au mémoire, remplie et signée)



Nous soussignons

Nom, Prénom : *Bakhouche Abir* ..... & ..... *Saoud Ibrahim* .....

N° de carte d'étudiant : (1) *M.201534030205* ..... (2) *M.201534025260* .....

Régulièrement inscrit(e) en **Master** au **Département Sciences de la matière**

Année universitaire : **2019/2020**

Domaine: **Sciences de la matière**

Filière : **Chimie**

Spécialité: ..... *Chimie Des Produits Naturels* .....

Intitulé du mémoire : ..... *Screening phytochimique et évaluation des activités biologiques d'une plante Algérienne « Anacyclus Valentinus L. »* .....

Attestons que notre mémoire est un travail original et que toutes les sources utilisées ont été indiquées dans leur totalité. Nous certifions également que nous n'avons ni recopié ni utilisé des idées ou des formulations tirées d'un ouvrage, article ou mémoire, en version imprimée ou électronique, sans mentionner précisément leur origine et que les citations intégrales sont signalées entre guillemets.

Sanctions en cas de plagiat prouvé :

Les étudiants seront convoqués devant le conseil de discipline, les sanctions prévues selon la gravité du plagiat sont :

- L'annulation du mémoire avec possibilité de le refaire sur un sujet différent.
- L'exclusion d'une année du master.
- L'exclusion définitive.

18 أكتوبر 2020

Fait à Tébessa, le .....

Signature des étudiants(es) :

(1) :

(2) :



نظرا للمصادقة على امضاء السيد / *خضر في*

18 أكتوبر 2020  
رئيس المجلس العلمي البدي

رئيس المجلس العلمي البدي  
و بتفويض من الأستاذ : *فوسني*



UNIVERSITE DE TEBESSA

République Algérienne Démocratique et Populaire



UNIVERSITE DE TEBESSA

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Larbi Tébessi-Tébessa-

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

Département : Sciences de la matière

**MEMOIRE DE MASTER**

**Domaine : Sciences de la matière**

**Filière : Chimie**

**Option : Chimie des produits naturel**

**THEME :**



**Screening phytochimique et évaluation des activités  
Biologiques d'une plante Algérienne**

*« Anacyclus Valentinus.L. »*

Présenté par :

**Saoud Ikram**

**Bakhouche Abir**

Devant le jury :

**Elhassasna Souhir**

**MAA**

**U. Larbi Tébessi**

**Président**

**Omar Tebboub**

**MAA**

**U. Larbi Tébessi**

**Encadreur**

**Soudani Kaouthar**

**MAA**

**U. Larbi Tébessi**

**Examineur**

**Date de soutenance : 21/ 09/ 2020**



Université Larbi Tébessi- Tébessa

Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie

Département : Sciences de la Matière

Filière : Chimie

Spécialité : Chimie des Produits Naturels

Année universitaire 2019/2020



## Formulaire de levée de réserves après soutenance d'un Mémoire de Master

### Données d'identification du candidat (e) :

Nom et prénom du candidat : Baldouche Abir

Intitulé du Sujet : Screening phytochimique et évaluation des  
activités biologiques d'une plante Algérienne (Anacyclus Valentimus)

### Données d'identification du membre de jury :

Nom et prénom : EL HASSASNA Souhir

Grade : MAA

Lieu d'exercice : Université Larbi Tébessi- Tébessa

Vu le procès-verbal de soutenance du mémoire sus cité comportant les réserves suivantes :

R.A.S

Et après constatation des modifications et corrections suivantes :

R.A.S

Je déclare en ma qualité de président de jury de soutenance que le mémoire cité remplit toutes les conditions exigées et permet au candidat de déposer son mémoire en vue de l'obtention de l'attestation de succès.

Le 20/10/2020

Président de jury de soutenance : (Nom/Prénom et signature)

EL HASSASNA Souhir

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

# Remerciement

Avant tout, nous remercions **ALLAH** le tout-puissant pour nous avoir donné la volonté, la santé et le courage pour réaliser ce travail. Nous remercions sincèrement notre encadreur : monsieur **Omar Tebboub** qu'il trouve ici l'expression de notre profonde reconnaissance tout pour nous avoir accordé sa confiance que pour nous avoir guidé dans notre travail tout au long de ce semestre, pour ses conseils et ses commentaires ainsi que pour son bienveillance. Un grand merci à tous nos enseignants, nos professeurs qui nous ont formés, et pour toute la sollicitude qu'elle nous a manifestée, nous lui exprimons toute notre reconnaissance. Nous voudrions exprimer notre gratitude aux professeurs : madame **Elhassasna Souhir** et madame **Soudani Kaouther** pour avoir accepté d'examiner ce mémoire.

Nous remercions tous les membres du laboratoire de chimie de Tébessa et particulièrement : Monsieur Majid ingénieur du laboratoire et **Rafik, Fawzi** qui nous a accompagné tout le long de cette expérience professionnelle avec beaucoup de gentillesse et de patience, nous n'oublions pas CRBT laboratoire du Constantine, qu'il nous permet de finir ce travail.

# *Dédicace*

Nous avons le grand plaisir de dédier ce mémoire, qui est le couronnement de toutes les années d'études et qui n'auraient pas pu s'achever sans votre disponibilité, conseils, aides et encouragements.

## *Nos parents*

Aux personnes qui nous ont aidés et encouragés, qui étaient toujours à nos côtés et qui nous ont accompagnés durant toute la durée de nos études, nous n'oublions pas nos chers amis.

A tous nos professeurs qui nous ont permis d'accumuler les connaissances nécessaires à l'accomplissement de ce travail et pour lesquels nous gardons une grande admiration.

*Abir& Ikram*

## ***Liste des abréviations :***

**%** : Pourcentage.

**PAM** : le programme alimentaire mondial.

**BC**: before Christ.

**V/V**: volume

**SPSS**: statistical package for the social sciences.

**cm** : centimètre.

**A. valentinus** : Anacyclus valentinus.

**ADN** : Acide désoxyribonucléique.

**ROS** : Espèces réactives dérivées de l'oxygène (Reactive oxygen species).

**AChE** : acétylcholinestérase.

**Ppb** : Parts per billion.

**PH** : potentiel d'hydrogène.

**USA**: United States.

**ACh**: acetylcholine.

**g** : gramme.

**ml** : Millilitre.

**h** : heure.

**MeOH** : Méthanol.

**UV** : Ultraviolet.

**nm** : Nano mètre.

**CCM** : Chromatographie sur couche mince.

**Na cl** : chlorure de sodium.

**Fecl3** : Chlorure ferrique.

**HCl** : Acide chlorhydrique.

**NH<sub>4</sub> OH**: hydroxyde d'ammonium.

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**: Acide sulfurique.

**FCR** : Folin–Ciocalteu reagent.

**mg** : milligramme.

**µl** : Micro litre.

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** : le carbonate de sodium.

**Al<sup>+3</sup>** : cation d'aluminium



**Ag<sup>+</sup>** : ion Argent

**MM** : millimole

**AgNO<sub>3</sub>** : le nitrate d'argent

**min** : minute

**°C** : Degré CELSIUS.

**DPPH** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle.

**BHT** : Hydroxy toluène butyle.

**BHA** : Hydroxyanisole butyle.

**ABTS** : Acide 2,2-azino-bis

**K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>** : le persulfate de potassium.

**M** : masse.

**H<sub>2</sub>O** : Eau.

**g/mol** : masse molaire.

**V** : volume.

**BChE** : Butyrylcholinesterase

**DTNB** : réactif d'Ellman (C<sub>14</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub>).

**Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>** : Hydrogénophosphate de sodium

**NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** : Dihydrogénophosphate de sodium

**NaHCO<sub>3</sub>** : Bicarbonate de sodium

**NaCl** : Chlorure de sodium

**R**: Rendement.

**Snp**: silver nanoparticle

**Cuprac**: cupric reducing antioxydant capacity

**GSH**: glutathione

**OH**: hydroxyl

**OP**: organophosphoré.

**C**: carbamates.

**ROS**: reactive Oxygen species.

**GPx** : glutathion peroxydase.

**SOD** : super oxyde dismutase.

**IC** : concentration inhibitrice

## *Liste des figures :*

<b>Figure 1 :</b> Quelques exemples de glucides.....	7
<b>Figure 2 :</b> Exemple de molécule d'acide gras.....	8
<b>Figure 3 :</b> Exemple d'amidon.....	8
<b>Figure 4 :</b> Exemples de quelques flavonoïdes.....	10
<b>Figure 5 :</b> Exemple d'éléments de tanins... ..	11
<b>Figure 6 :</b> Quelques exemples de coumarines.....	11
<b>Figure 7 :</b> La structure des stéroïdes.....	12
<b>Figure 8 :</b> Des éléments de mono terpènes.....	13
<b>Figure 9 :</b> Vitamine K1 .....	13
<b>Figure 10 :</b> Squelettes de base des tri-terpènes .....	14
<b>Figure 11 :</b> Squelettes des tétra-terpènes.....	14
<b>Figure 12 :</b> Photo de « <i>Anacyclus Vlentinus.L</i> » .....	19
<b>Figure 13 :</b> Photo de « <i>Anacyclus Valentinus.L</i> » .....	19
<b>Figure 14 :</b> Carte chorologique pour la distribution de <i>Anacyclus Valentinus.L</i> .....	20
<b>Figure 15 :</b> Carte géographique de la zone de récolte.....	33
<b>Figure 16 :</b> Carte géographique de la zone de récolte.....	34
<b>Figure 17 :</b> Structure chimique de radicale libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) [10] .....	44
<b>Figure 18 :</b> Réaction de test DPPH (2.2 Diphényl 1 picryl hydrazyl) .....	44
<b>Figure 19 :</b> Structure chimique d'ABTS.....	46
<b>Figure 20 :</b> Réduction de Neocupronin/Copper (II) complexe.....	47
<b>Figure 21 :</b> Acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque), DTNB ou réactif d'Ellman.....	49
<b>Figure 22 :</b> Plaque CCM de l'extrait 01 sous la lumière UV .....	57
<b>Figure 23 :</b> Plaque CCM de l'extrait 03 sous la lumière UV .....	57
<b>Figure 24 :</b> plaque CCM de l'extrait 02 sous la lumière UV .....	58
<b>Figure 25 :</b> Représentation de la courbe linéaire de l'acide gallique (courbe d'étalonnage) .....	58
<b>Figure 26 :</b> Représentation du taux de flavonoïdes par la courbe linéaire de Quercétine.....	59

<b>Figure 27</b> : Microplaque de dosage du DPPH .....	<b>60</b>
<b>Figure 28</b> : Le pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations .....	<b>61</b>
<b>Figure 29</b> : Microplaque de dosage de l'ABTS.....	<b>62</b>
<b>Figure 30</b> : Le pourcentage d'inhibition d'ABTS en fonction des concentrations.....	<b>63</b>
<b>Figure 31</b> : Microplaque de dosage de CUPRAC .....	<b>64</b>
<b>Figure 32</b> : Le pourcentage d'inhibition de CUPRAC en fonction des concentrations.....	<b>65</b>
<b>Figure 33</b> : Microplaque de dosage de Phenanthroline.....	<b>66</b>
<b>Figure 34</b> : Le pourcentage d'inhibition de Phenanthroline en fonction des concentrations.....	<b>67</b>
<b>Figure 35</b> : Microplaque de dosage de SNP.....	<b>68</b>
<b>Figure 36</b> : Activité antiradicalaire (SNP) des extraits <i>d'Anacyclus Valentinus.L</i> .....	<b>68</b>
<b>Figure 37</b> : Microplaque de dosage d'anticholinésterase.....	<b>69</b>

## ***Liste des tableaux :***

<b>Tableau 1 :</b> Taxonomie du <i>Anacyclus valentinus</i> . L.....	<b>20</b>
<b>Tableau 2 :</b> Principaux antioxydants non enzymatiques et sources alimentaires associées..	<b>24</b>
<b>Tableau 3 :</b> Composition des solvants pour l'analyse par CCM des extraits bruts.....	<b>37</b>
<b>Tableau 4 :</b> préparation de solution tampon.....	<b>50</b>
<b>Tableau 5 :</b> Résultats des tests préliminaires .....	<b>54</b>
<b>Tableau 6 :</b> rendements des extraits .....	<b>57</b>
<b>Tableau 7 :</b> Taux des polyphénols totaux dans l'extrait MeOH .....	<b>59</b>
<b>Tableau 8 :</b> Taux des flavonoïdes totaux dans l'extrait MeOH .....	<b>59</b>
<b>Tableau 9 :</b> Inhibition du radical DPPH par l'extrait MeOH.....	<b>61</b>
<b>Tableau10 :</b> Inhibition du radical ABTS par l'extrait MeOH.....	<b>62</b>
<b>Tableau 11 :</b> Inhibition du radical CUPRAC par l'extrait MeOH.....	<b>64</b>
<b>Tableau 12 :</b> Inhibition du radical Phenanthroline par l'extrait MeOH.....	<b>66</b>
<b>Tableau 13 :</b> IC <sub>50</sub> µg/ml SNP par l'extrait MeOH .....	<b>68</b>

## ***Liste des schémas :***

<b>Schéma 1 :</b> Formation d'un acide aminé.....	<b>7</b>
<b>Schéma 2 :</b> L'hydrolyse de l'acétylcholine.....	<b>27</b>
<b>Schéma 3 :</b> Extraction par les solvants organiques de la partie aérienne <i>d'Anacyclus Valentinus.L</i> .....	<b>36</b>

# *Sommaire*

## *Sommaire :*

---

Remerciement.....	
Dédicace.....	
Résumé.....	
Abstract.....	
Liste des abréviations.....	i
Liste des figures.....	iii
Liste des tableaux.....	v
Liste des schémas.....	vi
Introduction général.....	1
Références.....	3

### *Chapitre I : Généralités sur les produits naturels.*

I. Historique.....	4
II. Composition chimique de plante.....	6
II.1. Les métabolites primaires.....	6
II.1.1. Les glucides.....	6
II.1.2. Les peptides.....	7
II.1.3. les lipides .....	7
II.1.4. Les amidons.....	8
II.2. Les métabolites secondaires.....	9
II.2.1. Les composés phénoliques .....	9
II.2.1.1. Flavonoïdes.....	9
II.2.1.2. Tanins.....	10
II.2.1.3. Coumarines.....	11
II.2.2. Les composés terpéniques.....	12
II.2.2.1. Stéroïdes.....	12
II.2.2.2. Terpenoïdes.....	12
II.2.2.2.1. Mono terpène.....	12
II.2.2.2.2. Diterpènes .....	13
II.2.2.2.3. Tri terpènes .....	13
II.2.2.2.4. Tétra terpènes .....	14

## *Sommaire :*

---

III. Utilisations du plantes médicinales .....	15
IV. Orientation des recherches actuelles .....	16
V. Présentation des objectifs.....	17
I. Aspects Botaniques.....	18
I.1. Famille Astraceae.....	18
I.2. Genre Anacylus .....	18
I.3. Espèce Anacylus Valentinus.L.....	18
I.3.1.Classification taxonomique et répartition géographique.....	19
I.3.2.Aspects phytochimique .....	21
I.3.3. Aspects pharmacologiques.....	21
VII. Généralité sur les activités biologiques .....	22
1.Activité antioxydant .....	22
1.1. Introduction.....	22
1.2.Le stress Oxydant .....	22
1.3.Les radicaux libres .....	22
1.4. Les antioxydants .....	23
1.4.1.Les antioxydants endogènes (enzymatique) .....	23
1.4.2.Les antioxydants exogènes (non enzymatique) .....	24
1.5.Mécanisme d'action des antioxydants .....	25
2.Activité Anticholinésterase .....	25
2.1.Les cholinestérases.....	25
2.2.L' acétylcholinestérase .....	26
2.3.Le site actif .....	27
2.4.L'hydrolyse de l'acétylcholine .....	27
2.5. Caractérisation de l'activité cholinestérasique .....	28
Références bibliographiques.....	29

### *Chapitre II : Matériels et Méthodes*

I. Matériels et méthodes.....	33
I.1. Matériels.....	33
I.1.1.Matière végétale .....	33
I.1.2. Extraction par les solvants.....	35



## *Sommaire :*

---

II.Méthode chromatographique.....	37
III.Tests préliminaires de screening phytochimique.....	37
III.1.Macération à l'eau distillée.....	38
III.1.1. Recherche d'amidons.....	38
III.1.2.Recherches des saponosides.....	38
III.1.3. Recherche des tannins galliques .....	38
III.1.4.Recherche des anthocyanes .....	38
III.2.Macération à l'éthanol .....	38
III.2.1. Recherche des Flavonoïdes .....	38
III.2.2. Recherche des tanins cathéchiques.....	38
III.2.3.Recherche des composés réducteurs.....	39
III.2.4.Recherche des coumarines.....	39
III.3.Macération à l'acide sulfurique (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) .....	39
III.3.1. Recherche d'alcaloïdes .....	39
III.3.2.Recherche d'hétérosides .....	39
IV.Dosages des métabolites secondaires.....	40
IV.1.Dosage des polyphénols totaux.....	40
IV.1.1.Principe de la réaction.....	40
IV.1.2.Mode Opérateur.....	40
IV.2.Dosage de flavonoïdes totaux.....	41
IV.2.1. Principe de la réaction.....	41
IV.2.2.Mode opératoire.....	42
V.Détermination des activités biologiques .....	43
V.1.Determination de l'activité antioxydant.....	43
V.1.1.Méthode de <i>SNP</i> .....	43
V.1.1.1.Principe de la réaction.....	43
V.1.1.2.Mode opératoire.....	43
V.1.2.Piégeage de radical libre DPPH.....	44
V.1.2.1. Test de DPPH .....	44
V.1.2.2. Principe de la réaction.....	45
V.1.2.3.Mode opératoire.....	45
V.1.2.4.Méthodes de calcul .....	45
V.1.3.Test d'ABTS.....	46

## *Sommaire :*

---

V.1.3.1.Principede la réaction .....	46
V.1.3.2.Mode opératoire.....	46
V.1.4.CUPRAC.....	47
V.1.4.1. Test de CUPRAC.....	47
V.1.4.2.Principe de la réaction.....	47
V.1.4.3.Mode opératoire.....	47
V.1.5.Phenanthroline .....	48
V.1.5.1.Principe de la réaction.....	48
V.1.5.2. Mode opératoire.....	48
V.2.Détermination de l'activité anticholinésterase.....	49
V.2.1.Principede la réaction.....	49
V. 2.2.Mode opératoire(1).....	50
V. 2.3 .Mode opératoire(2).....	51
Références bibliographiques.....	52

### *Chapitre III : résultats et discussion*

I.Résultas et discussion de screening phytochimique .....	54
II. Extraction.....	56
II.1. Rendement des Extraits phénoliques.....	57
II.2. Analyse des extraits par CCM.....	57
III. Résultats du dosage des polyphénols et de flavonoïdes.....	58
III.1. Résultat du dosage des polyphénols.....	58
III.2. Résultat du dosage des flavonoïdes.....	59
IV. Résultats des activités biologiques .....	60
IV.1 Résultats de l'activité antioxydant.....	60
IV.1.1. Activité anti radicalaire du DPPH .....	60
IV.1.2. Activité du piégeage de l'ABTS .....	62
IV.1.3. Activité antioxydant CUPRAC .....	65
IV.1.4. Activité antioxydant de Phenanthroline .....	67
IV.1.5. Activité antioxydant de SNP .....	69
IV.2. Résultat de l'activité anticholinésterase .....	70

## *Sommaire :*

---

Conclusion générale.....	71
--------------------------	----

# Introduction Générale



## ***Introduction générale :***

A travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales dans l'objectif de vaincre la souffrance et d'améliorer la santé des hommes [1], sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques, il était difficile de définir les molécules responsables de l'action pharmacologique. Au cours des dernières années, plusieurs raisons ont mené au rétablissement de l'usage des plantes médicinales. Elles sont d'abord d'un coût inférieur aux médicaments de synthèse, puis elles arrivent à un moment où le public est désillusionné devant la médecine moderne.

Par ailleurs, actuellement, la maîtrise des infections bactériennes et fongiques devient complexe à cause d'une utilisation anarchique, abusive des antibiotiques en santé humaine et animale. L'émergence de bactéries et de champignons résistants à de nombreux antibiotiques conventionnels pose un grave problème de santé publique. Ces agents infectieux multi-résistants sont néfastes surtout chez les sujets vulnérables tels que les enfants, les vieillards et les personnes immunodéprimées. La problématique de la résistance aux antibiotiques interpelle les communautés scientifiques, car il est important de trouver de nouveaux agents antimicrobiens naturels en se référant aux plantes utilisées dans le traitement de maladies infectieuses en médecine traditionnelle.

La valeur médicinale des plantes est de plus en plus démontrée scientifiquement, ce qui constitue un argument de taille pour leur utilisation en médecine. Ainsi, l'industrie des plantes médicinales est devenue, en peu de temps, le secteur de l'industrie pharmaceutique connaissant la plus forte croissance annuelle avec 15 à 20 % [2].

De nos jours, nous comprenons de plus en plus, que les principes actifs des plantes médicinales sont souvent liés aux produits des métabolites secondaires, qui sont largement utilisés en thérapeutique, comme des agents préventifs anti-inflammatoires, antimicrobiens, antiseptiques, diurétiques, mais essentiellement antioxydants qui défendent contre le stress oxydatif [3]. [4].

Dans un pays regorgeant d'une richesse très importante en flore comme l'Algérie, la valorisation de la filière des plantes médicinales est devenue indispensable. Le Sahara algérien, le plus vaste et le plus chaud des déserts du monde, possède dans sa partie Nord, le Sahara septentrional, une végétation diffuse et clairsemée [5]. Certaines d'entre elles ont fait l'objet d'études phytochimiques et ont abouti à l'identification de principes actifs [6] ; [7] ; [8]. C'est dans le cadre de la valorisation de notre patrimoine naturel que s'inscrit notre étude. L'espèce que nous avons étudiée est : *Anacyclus valentinus* de la famille d'*Astéracée*. Cette

plante est surtout reconnue en thérapeutique traditionnelle pour leurs propriétés remarquables. Et leur richesse en produits du métabolisme secondaire et particulièrement en polyphénols et flavonoïdes. Notre travail a pour objectif principal d'étudier l'effet antioxydant et l'effet anticholinésterase de la plante *Anacyclus valentinus*.

**La démarche poursuivie dans la réalisation de ce mémoire consiste à faire un travail comportant :**

**1.** Une analyse bibliographique élargie sur :

- la phytothérapie et les plantes médicinales
- les plantes sahariennes Algériennes
- l'activité antioxydante et anticholinésterase.
- un rappel des données botaniques sur la plante testée.

**2.** La partie expérimentale avec la description du matériel végétal et les méthodes utilisées.

Celles-ci comprennent :

- le screening phytochimique
- une analyse quantitative de différents composés chimiques (polyphénols et des flavonoïdes) susceptibles d'avoir une activité pharmacologique
- Evaluation de l'activité antioxydante.
- Evaluation de l'activité anticholinésterase.

**3.** Résultats et discussion et enfin, nous terminerons par une conclusion.

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE :**

- [1] **Amin M, Sara S.** « Etude phytochimique et évaluation des activités biologiques de la plante *Calligonum azel* Maire du Sahara Algérien ». 2018.
- [2] **Mizuki I, Osawa N, Tsutsumi T. Thrips.** « (Thysanoptera: Thripidae) on the flowers of a dioecious plant, *Dioscorea japonica* (Dioscoreaceae). » *The Canadian Entomologist* 2005.p.712-5.
- [3] **Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E.** « Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. » *Plant science* 2001.p.839-51.
- [4] **Kar A.** « Pharmacognosie and Pharma biotechnologie ». Ed 2007.p.1-30.
- [5] **Ozenda P.** « Flore de Sahara » (3e édition mise à jour et augmentée). » du CNRS, Paris 1991.p662.
- [6] **Moussaoui F, Zellagui A, Segueni N, Touil A, Rhouati S.** « Flavonoid constituent from Algerian *Launaea resedifolia* and their antimicrobial activity. » *Records of Natural Products* »2010. p.4.
- [7] **Babaamer ZY, Sakhri L, Al-Jaber HI, Al-Qudah MA, Abu Zarga MH.** « Two new taraxasterol-type triterpenes from *Pergularia tomentosa* growing wild in Algeria *Journal of Asian natural products research*». 2012.p.1137-43.
- [8] **Sekkoum K, Belboukhari N, Cheriti A.** « New flavonoids from bioactive extract of Algerian medicinal plant *Launaea Arborescent*. » *Asian Pacific journal of tropical biomedicine* 2014.p.267-71.

# **Chapitre I : Généralités sur Les produits Naturels**





### ***I. HISTORIQUE :***

Selon l'histoire des peuples, les P.A.M. ont toujours occupées une place importante dans l'alimentation, en médecine et pour la composition des parfums. D'après l'historique des plantes médicinales et aromatiques, la Chine fut le berceau de la phytothérapie. L'empereur Chen-Nong (2800 avant Jésus-Christ) consigne sa connaissance des plantes médicinales dans un livre, le Pen Ts'ao qui regroupe plus de cent plantes. Ce livre fi autorité jusqu'au 16ème siècle où il est revu et corrigé par un médecin et pharmacologue Li Che Tehen qui recense alors 1000 plantes médicinales. En Inde, L'Ayurveda, le livre sacré écrit par Bahamas révèle les secrets de la langue vie grâce aux plantes aromatiques aux usages thérapeutique et culinaire. Trente siècles avant notre, (célèbre médecin connaissait déjà l'Arte de l'anesthésie à l'aide du chanfreiner ainsi que l'usage des plantes aromatiques pour la santé et la diététique [1]. Au Moyen-Orient, 4000 BC, les Sumériens usaient des plantes médicinales et aromatiques. Les Arabes conservèrent pendant des millénaires le monopole du commerce des épices et contribuèrent largement au progrès des techniques d'extraction des huiles et parfums. En Egypte, vers 2700 BC, les plantes aromatiques étaient vendues à prix d'or. Les Egyptiens fabriquaient des produits aromatiques comme huiles, eaux parfumées, produit de beauté, mais aussi des préparations destinées à l'embaumement des momies. Les rempilent recelaient de véritables laboratoires de parfums et de nombreuses recettes sont parvenues jusqu'à nous sous forme de hiéroglyphes. Mais beaucoup d'entre elles reste énigmatique jusqu'à ce jour et font l'objet beaucoup de sujets de recherches. Pour les Hébreux qui héritèrent des connaissances des Egyptiens, les substances Aromatiques figuraient parmi les offrandes qu'apportèrent Les rois mages à l'enfant Jésus. Les huiles étaient réservées aux prêtres et au service Divin. En Grèce, XII BC les marchands phéniciens ramenaient de leurs voyages des épices, des encens. On retrouve des noms de la mythologie grecque sur certaines plantes comme l'achillée meilleure feuille, la centaurée la pivoine (Paeonia). Les plantes aromatiques servent à la médecine psychosomatique, à la magie, Hippocrate de Cos (460-377 BC) écrit l'œuvre Corpus hypocratatum en 72 livres. Ils traitent entre autres de la maladie sortant de sons aura magique et avec des indications naturelles d'auto guérison. Il conseille l'usage des plantes aromatiques [2]. À l'époque d'Alexandre le Grand le commence des épices sont à sa pointe culminant, l'Alexandrie devient, avec sa bibliothèque de 700 000 volumes et son jardin aromatiques, le phare de la science antique d'Euclide à Théophraste. Les Romains consommaient beaucoup d'épices et de plantes aromatiques, des ouvrages comme Histoire Naturelle universelle (Pline L'Ancien à et DE Materiamedica où sont recensées 519 espèces de plantes (Dioscoride

médecin 1er siècle après Jésus-Christ), cet ouvrage fait autorité pendant plus de 1000 ans. Les Romains usaient quotidiennement de bains aromatiques, lotions, onguents, crèmes parfumées. Un progrès décisif dans l'histoire de la pharmacie est apportée un siècle plus tard par Galien (médecin des empereurs). La galénique (mode de préparation des médicaments) est instaurée par lui. À cette époque, les plantes étaient de toutes fêtes et aucun plat n'était servi sans accompagnement d'épices et condiments. Les Gaulois avaient un bon herbier, le gui planté rituel utilisé par les druides côtoyait dans la vie quotidienne les simples aromatiques locales (ail, armoise, fenouil, Laurier, menthe, thym ...) et d'autres apportées par les conquérants romains. En Amérique, les Aztèques, les Mayas, les Incas et les habitants de la forêt tropicale avaient une parfaite connaissance des plantes médicinales et aussi des drogues et plantes toxiques [2]. En Afrique la médecine traditionnelle utilise depuis des millénaires les plantes médicinales. Plusieurs milliers de produits ont été recensés.

Au Moyen Âge, après la chute de l'empire romain, l'Europe connaît un retour à la barbarie, un déclin général de savoir et une longue période d'obscurantisme. Il faudra attendre l'apport des Arabes pour assister à une véritable renaissance [2]. Vers le 12<sup>ème</sup> siècle, les croisades relancent les échanges entre l'Europe et le Moyen-Orient et contribuent à la renaissance italienne, le commerce des épices renaît. Concernant les Arabes et les musulmans en particulier ; ils ont développé la médecine d'une façon très surprenante. Rappelons : DJABER IBN HAYAN et RAZI : puis IBN SINA (980, 1037) qui avait décrit plusieurs traités à ce sujet, le plus célèbre était « KANOUN EL TIB (les lois de la médecine) » [3].

## **II. COMPOSITION CHIMIQUE DE PLANTE :**

Lorsqu'on observe bien la plante on distingue qu'elle possède une faculté que l'homme n'a pas, grâce à ses racines elle réussit à puiser dans le sol les éléments nutritifs et à les transformer par ses facultés de photosynthèse. De par le code génétique de cette créature, la croissance et les éléments constitutifs de la Plante vont être très variables. Pour une même espèce végétale, nous allons retrouver certaines constantes dans la composition de cette plante ; néanmoins, des variations vont avoir lieu à cause des différences de l'environnement. Si les conditions idéales ont réuni la plante va être pleine d'énergie vitale et de santé sinon, comme l'homme, elle peut souffrir de carences, d'excès et de maladies de toute nature. La connaissance de la composition chimique des plantes est indispensable pour la compréhension de leurs activités biologique ou pharmacologique.

Ces richesses naturelles se divisent en deux grands métabolismes :

*\* Les métabolites primaires*

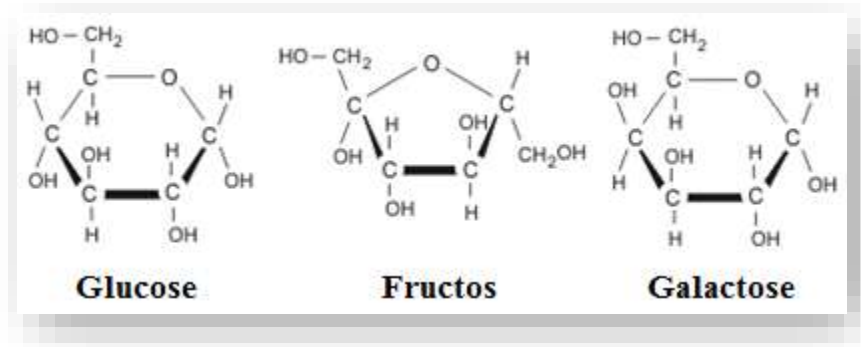
*\*Les métabolites secondaires.*

### **II. 1. Les métabolites primaires :**

#### **II. 1. 1. Les glucides :**

Les glucides sont des molécules organiques forment 1 à 2 % de la masse cellulaire, elles contiennent du carbone (C), de l'hydrogène (H) et de l'oxygène (O). Ces deux derniers atomes sont présents dans le même rapport 2 :1 que dans l'eau, c'est pourquoi les glucides sont parfois appelés des hydrates de carbone. Ces molécules sont caractérisées par la présence de chaînes carbonées porteuses de groupements hydroxyles, et de fonctions aldéhydes ou cétoniques. En fonction de leurs volumes et de leurs solubilités les glucides sont classés en monosaccharides ou oses (1 sucre), en disaccharides ou osides (2 sucres) et en polysaccharides ou polyosides (plusieurs sucres). La figure 1 représente un exemple de quelques glucides.

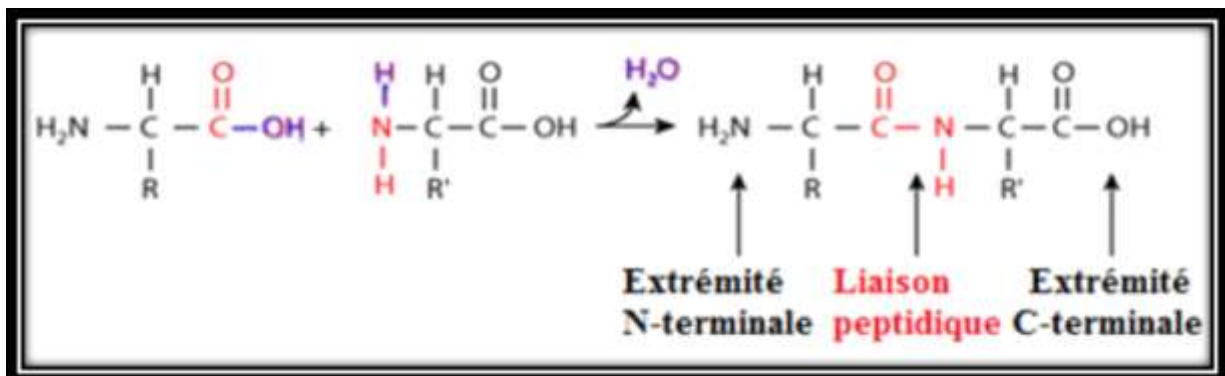
Les monosaccharides sont les unités de base de tous les autres glucides. En règle générale, plus la molécule de glucide est grosse, moins elle est soluble dans l'eau [4].



**Figure 1.** Quelques exemples de glucides

### **II. 1. 2. Les peptides :**

Un peptide est un composé formé d'enchaînement d'acides  $\alpha$ -aminés. Lorsqu'un grand nombre (plus d'une dizaine) d'acide  $\alpha$ -aminés sont reliés entre eux, la macromolécule est appelée protéine. Les acides aminés sont reliés entre eux par une liaison peptide comme illustré sur le schéma 1, il s'agit d'une liaison amide obtenue par réaction d'une fonction acide carboxylique et d'une fonction amine libérant une molécule d'eau. Les quatre atomes (C, N, O et H) sont dans un même plan et les liaisons sont coplanaires [5].



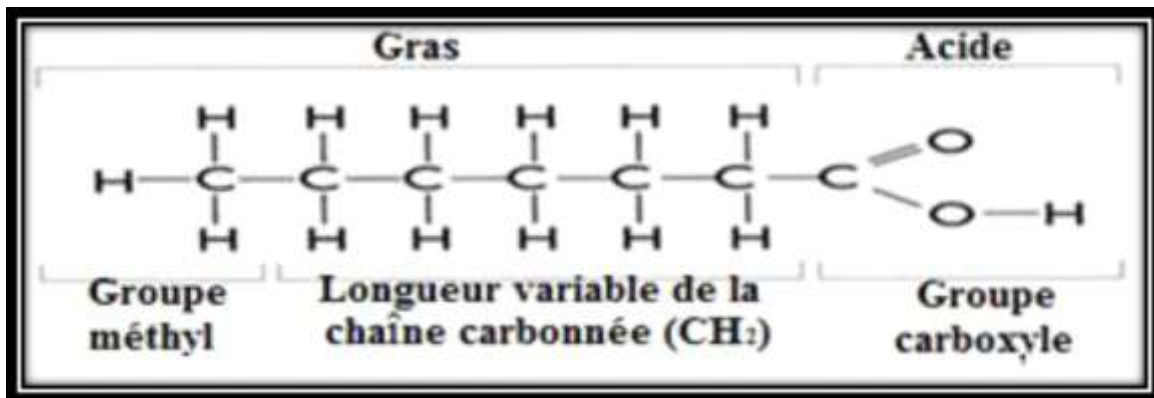
**Schéma 1.** Formation d'un acide aminé.

### **II. 1. 3. Les lipides :**

Le terme lipide est en général utilisé pour décrire des molécules à caractère hydrophobe et soluble dans des solvants organiques. Cette définition peut convenir à différentes classes moléculaires telles que les acides gras, les terpènes, les caroténoïdes ou les stérols. Dans cette partie, seuls les acides gras et leurs dérivés seront abordés, les autres classes étant issues du métabolisme secondaire seront évoquées par la suite.

Les lipides qui sont de nature hydrophobe se retrouvent principalement dans les fractions huileuses de la plante. L'argousier a la particularité de produire deux types d'huile, qui diffèrent par leur composition métabolique, l'une issue des parties charnues du fruit (pulpe et peau) et l'autre issue des graines. La quantité d'huile varie considérablement dans les parties tendres (de 1 à 35 %) en fonction de la variété, de l'origine géographique et de la maturation des fruits, alors que la quantité d'huiles dans les graines, moins assujetties à variation, est d'environ 10 % [6].

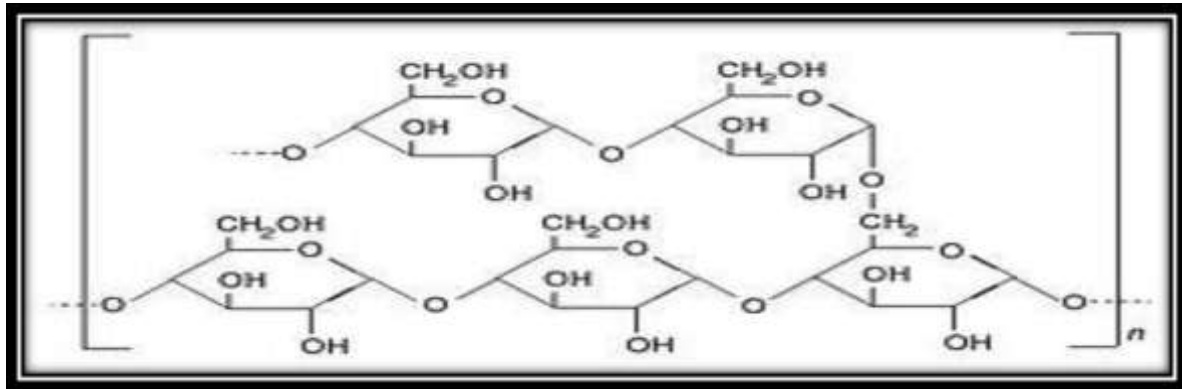
Des lipides polaires ont été caractérisés dans les fruits avec la présence de phospholipides et de galactolipides représentant respectivement 61 et 39 % de ceux-ci. Les phospholipides majoritaires sont le phosphatidylglycérol et le siphosphophatidylethanolamine, alors que le monogalactosyldiacylglycérol et le digalactosyldiacylglycérol constituent les galactolipides majoritaires [7]. La figure 2 représente un exemple d'acide gras.



**Figure 2.** Exemple de molécule d'acide gras.

#### **II. 1. 4. Les amidons :**

L'amidon est la principale forme de réserve glucidique des végétaux. Il est présent dans toutes les parties de la plante et existe sous la forme d'une structure organisée correspondant à un homopolymère presque pur de D-glucose. La figure 3 illustre un exemple d'amidon.



**Figure 3.** Exemple d'amidon.

## **II. 2. Les métabolites secondaires :**

Cette deuxième famille est formée de composés phénoliques, de composés azotés "Alcaloïdes", de terpénoïdes et de stéroïdes.

### **II. 2. 1. Les composés phénoliques :**

Les composés phénoliques constituent une famille de molécules organiques largement présente dans le règne végétal, ils regroupent : les phénols, les coumarines, les flavonoïdes, les tanins et les quinones.

#### **II. 2. 1. 1. Flavonoïdes :**

Les flavonoïdes sont des produits disponibles dans le règne végétal. Ils représentent une source importante d'antioxydants dans notre alimentation couramment consommée quotidiennement sous forme de fruits, légumes et boissons comme le thé. Ce sont des pigments végétaux simples ou glycosylés forment une sous-classe des polyphénols, garantissant la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Ils présentent un squelette de base à 15 atomes de carbone, fait de deux cycles benzéniques reliés par une chaîne en 3 carbones. Le pont à C3 entre les deux phényles forme généralement un troisième cycle appelé pyrone.

Ces molécules sont capables d'articuler l'activité de certaines enzymes et de changer le comportement de plusieurs systèmes cellulaires, suggérant qu'ils pourraient exercer une multitude d'activités biologiques, notamment des propriétés antioxydantes, vasculoprotectrices, antihépatotoxiques, antiallergiques, anti-inflammatoires, et même anti tumorales significatives [8].

La distinction des sous-classes des flavonoïdes se fait sur la conformation de leur structure. On peut distinguer notamment des molécules illustrant différentes propriétés comme : les flavones (flavone apigénol 1), les flavonols (quercétol 2), les flavanonols ou dihydroflavonol (dihydroquercétol 3), les flavanones (2,3-dihydro-2-phenylchromen-4-one 4), les aurones (hispidol 5), les chalcones (l'isoliquiritigénine 6) (figure 4) [9].

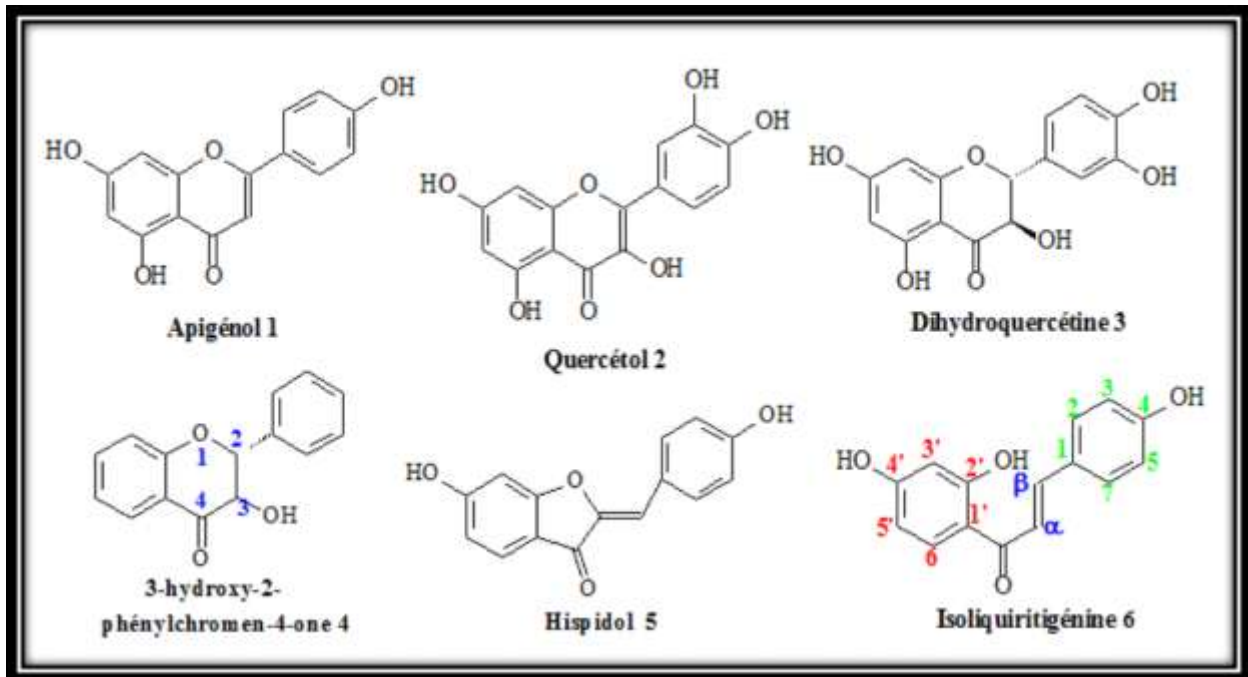


Figure 4. Exemples de quelques flavonoïdes.

### II. 2. 1. 2. Tanins :

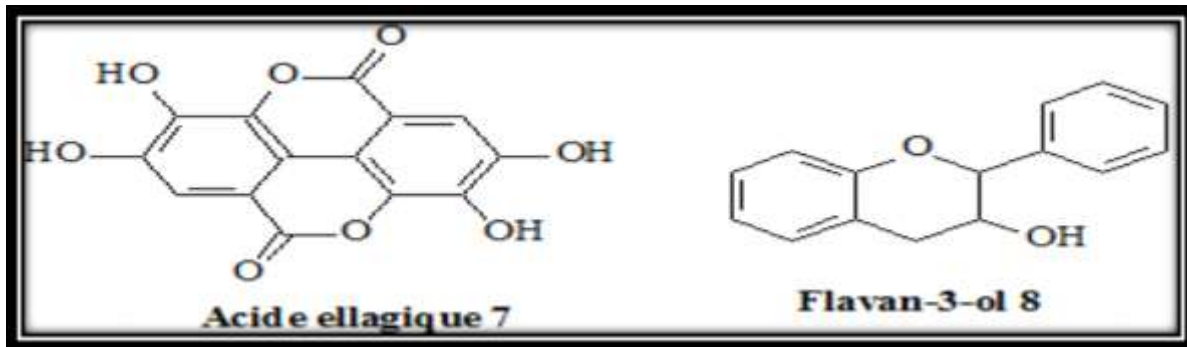
Les tanins du châtaignier (*Castanea* sp.), ont été utilisés pour rendre la peau animale fraîche et résistante à l'eau et à la chaleur. Ces propriétés sont dues à l'aptitude de ces composés à se combiner aux macromolécules (et donc aux fibres de collagène de la peau). Ceci explique la précipitation des protéines, de la cellulose et des pectines par les tanins. En 1962, les tanins sont définis comme des composés phénoliques hydrosolubles, ayant la propriété de précipiter la gélatine et d'autres protéines et de se colorer par les sels ferriques.

Aujourd'hui, on distingue :

a) *-Les tanins hydrolysables* : esters d'un sucre (généralement le glucose) et de l'acide gallique ou de l'acide ellagique 7 (figure 5).

b) *-Les tanins condensés ou proanthocyanidols* : non hydrolysables résultant de la polymérisation d'unités flavan-3-ols 8 (figure 6). Ils forment dans les vacuoles des solutions pseudo colloïdales et peuvent aussi se fixer au niveau des lignines, renforçant encore l'imputrescibilité du bois. Il est noté que les tanins disparaissent lorsque les fruits atteignent

leurs maturations ce qui montre que comme d'autres composés phénoliques, ils peuvent être réutilisés par la plante [9].



**Figure 5.** Exemple d'éléments de tanins.

### **II. 2. 1. 3. Coumarines :**

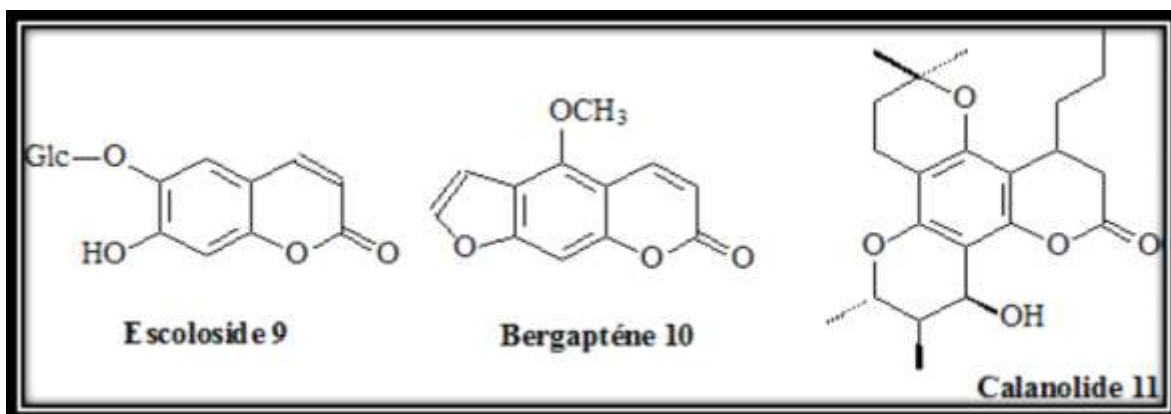
Historiquement le nom de coumarine vient de "Cumaru" qui est le nom dans une langue amazonienne, de l'arbre de Tonka "Fabaceae" dont les fèves contiennent 1 à 3 % de coumarine. Ce sont des substances naturelles aromatiques, dotées d'odeurs qui se rapprochent de la vanilline largement employées en parfumerie.

Les plus simples de cette famille se trouvent dans différentes essences de plantes comme la lavande, la cannelle de Chine ... etc., comme on peut les trouver dans le miel et le thé vert.

Cependant les plus complexes sont cités chez les "Apiaceae" et les "Rutaceae". D'un point de vue médical ces composés étaient utilisés comme anti-œdémateux.

On peut distinguer notamment des molécules illustrant différentes propriétés comme :

Escoside 9, Bergaptène 10 et Calanolide 11 La figure 6 [10].



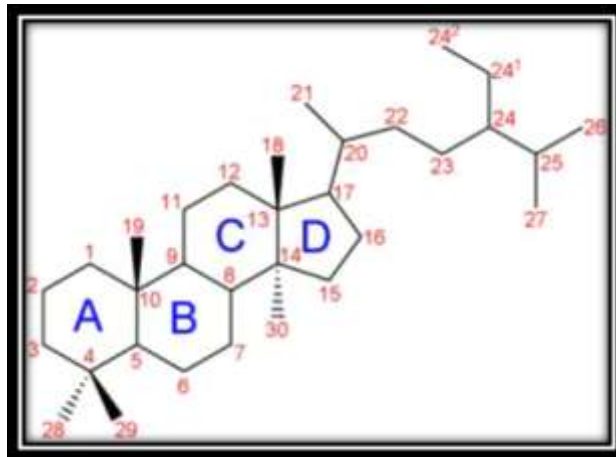
**Figure 6.** Quelques exemples de coumarines.



**II. 2. 2. Les composés terpéniques :**

**II. 2. 2. 1. Stéroïdes :**

Constituent un groupe de lipides dérivant de triterpénoïdes (lipides à 30 atomes de carbone), majoritairement le squalène. Ils se caractérisent par un noyau cyclopentanophénanthrénique (stérane) hydrophobe partiellement ou totalement hydrogéné. Habituellement, les carbones C10, C13 sont liés à un groupe méthyle -CH<sub>3</sub> et le carbone C17 à un groupe alkyle (Figure 7) [11].



**Figure 7.** La structure des stéroïdes

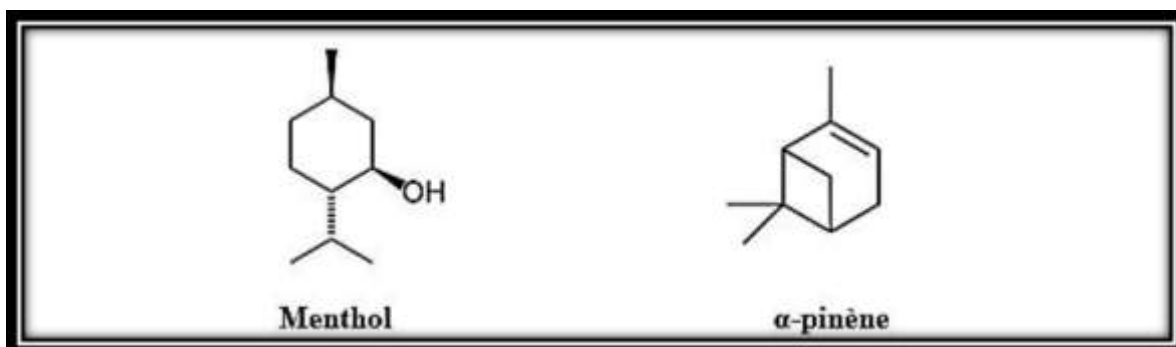
**II. 2. 2. 2. Terpénoïdes :**

Les terpénoïdes forment une grande classe de composés organiques. Cette famille regroupe : les mono terpènes, les Diterpènes, les triterpènes, stéroïdes, les tétra-terpènes, les sesquiterpènes, les hétérosides et les poly terpènes.

**II. 2. 2. 2. 1. Mono terpènes :**

Les mono terpènes, les isoprénoïdes C<sub>10</sub>, sont une grande famille de produits naturels qui sont surtout connus comme constituants des huiles essentielles et oléorésines défensives des plantes aromatiques. En plus des rôles écologiques dans l'attraction des pollinisateurs, l'allélopathie et la défense des plantes, les mono terpènes (Menthol,  $\alpha$ -pinène.) sont largement utilisés dans les industries alimentaire, cosmétique et pharmaceutique. L'importance de ces produits végétaux a conduit à la définition de nombreuses voies de biosynthèse des mono terpènes, au clonage des gènes pertinents et au développement de techniques de transformation génétique pour les plantes productrices de mono terpènes d'importance agronomique. L'ingénierie métabolique de la biosynthèse des mono terpènes dans la menthe poivrée de la plante modèle a entraîné une augmentation du rendement et une amélioration de

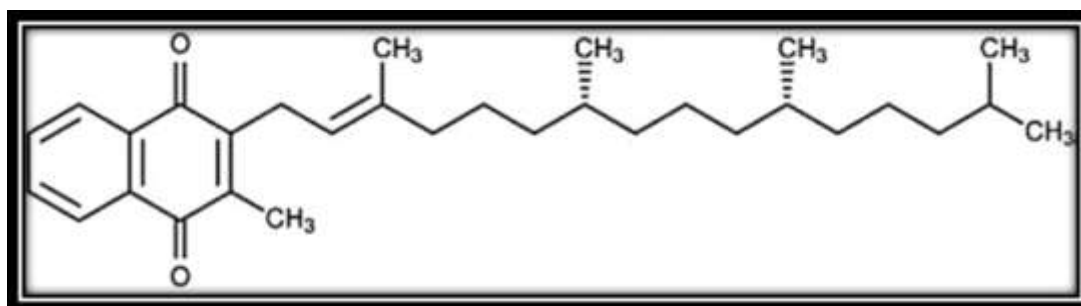
la composition de l'huile essentielle, et a également fourni des stratégies pour manipuler la production d'arômes et de parfums, et la défense des plantes. [12].



**Figure 8.** Des éléments de mono terpènes

### **II. 2. 2. 2. Diterpènes :**

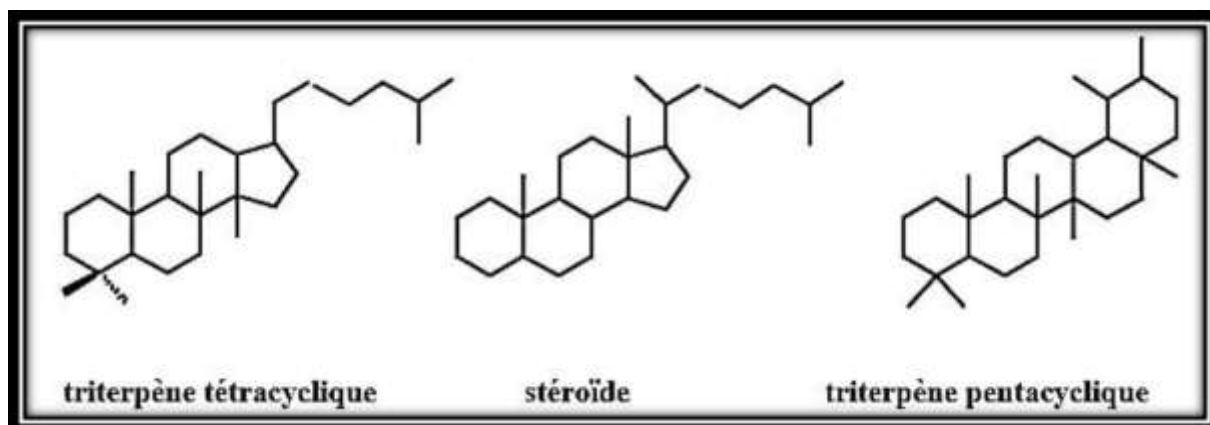
Ce sont des composés terpéniques à vingt carbones. On distingue parmi les dérivés di terpéniques la queue phytol des chlorophylles et du phyllo quinone (vitamine K1) [13]. (Figure 9).



**Figure 9.** Vitamine K1

### **II. 2. 2. 3. Tri terpènes :**

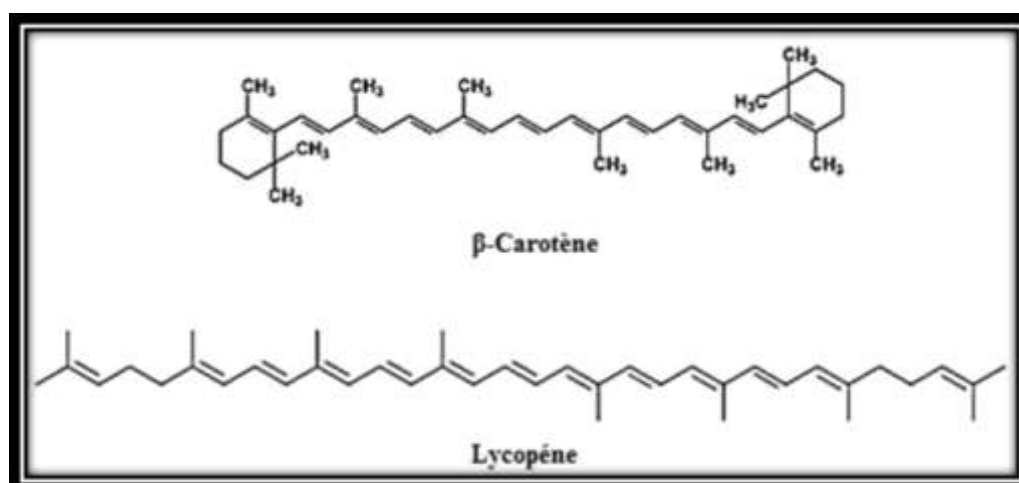
Ils contiennent trente carbones innés de la cyclisation de l'époxysqualène ou du squalène. Les stéroïdes peuvent être considérés comme des triterpènes tétra-cycliques ayant perdu au moins trois méthyles. Leur intérêt thérapeutique est immense, car ils peuvent être utilisés comme des cardiotoniques, des saponines spirostaniques qui constituent les squelettes de base des contraceptifs, ou comme anti-inflammatoires [13]. La figure 10 montre les squelettes de base des triterpènes.



**Figure 10.** Squelettes de base des triterpènes

#### **II. 2. 2.2. 4. Tétra-terpènes :**

Ces composés sont formés de quarante carbones, on distingue : les caroténoïdes avec leurs nuances photosynthétiques majeurs (bêta-carotène) mais également des pigments aux propriétés antioxydantes comme le lycopène de la tomate [13] (Figure 11).



**Figure 11.** Squelettes des tétra-terpènes

### **III. Utilisations des plantes médicinales :**

Pourquoi se soigner par les plantes ? Intuitivement nous sommes tous capables de répondre à cette question. Etant donné que se soigner par les plantes, c'est se soigner de manière naturelle en respectant son corps et surtout son cerveau, parce que cela est plus doux et plus profond à la fois.

La phytothérapie, du grec phyto et thérapie, l'art de soigner par les plantes, mais n'importe quelles plantes, les plantes médicinales. Ce sont toutes les plantes qui contiennent une ou de substances pouvant être utilisées à des fins thérapeutiques ou qui sont des précurseurs dans la synthèse de drogues utiles. Une telle définition devrait inclure d'après Sofowora (2010) [14], les cas suivants :

\*plante ou parties de plantes à usage médicinal dans des préparations galéniques (décoctions, infusions, etc. ...) comme les corses de bourdaines.

\*plantes utilisées pour l'extraction des substances pures soit pour usage médicinal direct ou l'hémi-synthèse de composés médicinaux (par exemple hémi-synthèse d'hormones sexuelles à partir de la diogénine obtenue de tubercules de *Dioscorea*)

\*aliments, épices et plantes parfumerie à usage médicinal comme le gingembre

\*plantes microscopiques (champignons, actinomycètes) employées pour l'isolement des produits pharmaceutiques en particulier d'antibiotiques. On peut citer l'ergot du seigle (*claviceps purpurea*) ou *streptomyces griseus*

\*plantes à fibres (comme le coton, le lin, le jute) utilisées pour la préparation de pansements chirurgicaux.

***IV. ORIENTATION DES RECHERCHES ACTUELLES :***

Dû aux nombreux principes actifs que renferment ces plantes médicinales qui ont des activités thérapeutiques synergiques ou complémentaires, une attention particulière et croissante a été portée aux procédés utilisés pour l'extraction, l'étude et l'exploitation de ces principes contenus dans ces créatures pour les reproduire synthétiquement et les utilisés de nos jours dans divers produits de consommation.

En effet, leur utilisation est encouragée, car les produits équivalents issus de synthèses chimiques, ont mauvaise presse parmi le grand public. Les plantes représentent une source de principes actifs inépuisable et renouvelable, dont l'usage traditionnel et médical est connu depuis bien longtemps. Il existe donc un besoin de production de substances bioactives isolées, concentrées et purifiées, pour une utilisation dans un large champ d'application (cosmétiques, pharmaceutiques, additifs nutritionnels.) [15].

**V. PRÉSENTATION DES OBJECTIFS :**

Il s'agissait d'une étude expérimentale qui s'est étalée sur une période de 3 mois allant dans les laboratoires. Les feuilles, l'écorces d'*Anacyclus Valentinus.L*, séchées bien, ont été extraites par macération dans le mélange Diéthyléther 100% (v/v) et le diéthyl/méthanol (70/30) % après avec le méthanol 100%. Les extraits obtenus ont fait l'objet d'une analyse phytochimique et leurs activités biologiques.

L'activité antioxydant a été évaluée par les tests de la réduction de cuivre, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, 2,2'-azino-bis (acide 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique). Phenanthroline, radical nitrique et métal chélate. Aussi nous n'oublions pas l'activité Anticholinésterasique qui lui fait par la méthode d'Ellman Pour suivre l'évaluation d'enzyme et de l'extrait.

Analyse des données s'est faite grâce au logiciel de statistique SPSS 18 pour Windows, qui nous a permis à l'aide du t-test de Student pour les échantillons appariés, de pouvoir comparer les moyennes de nos différents extraits.

## **I. Aspects botaniques :**

### **I.1.Famille Asteraceae :**

La famille des *Astéracées* représente l'une des taxons les plus importants du règne végétal. Elle est principalement représentée par des espèces vivaces. Les feuilles sont le plus souvent alternes, mais aussi opposées ou radiales, bractées, simples ou parfois composées [16]. Les fleurs ont la caractéristique commune d'être réunies en capitules, c'est-à-dire serrées les unes aux autres [16] ; [17]. La famille des *Astéracées* (Compositae) compte à peu près 900 genres avec plus de 13000 espèces [18].

### **I.2. Genre Anacyclus :**

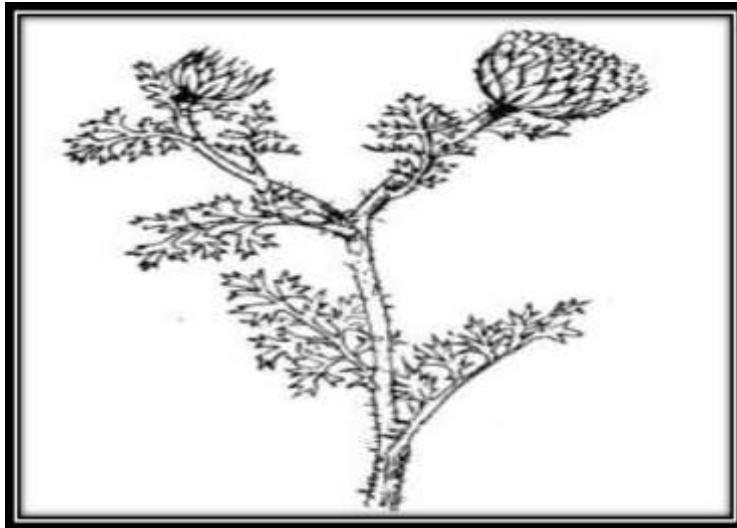
Le genre *Anacyclus* regroupe des espèces à capitules composés en principe des fleurs extérieures ligulées et des fleurs intérieures tubulées [19]. La principale particularité du genre est la présence d'ailes aplaties entourant les fruits et faisant penser à des paires d'oreilles, ce sont des plantes annuelles, à feuilles alternes embrassantes, profondément divisées. La tige portant le capitule s'épaissit en dessous de celui-ci. L'involucre est formé de bractées inégales, se recouvrant en partie, ne portant pas d'appendice terminal. Le taxon *Anacyclus*, tel que défini à l'origine par Linné (voir classification), en Algérie le genre *Anacyclus* est représenté par deux espèces, à savoir *Anacyclus pyrethrum* (L.) Link et *Anacyclus clavatus* (Pers) [20].

### **I.3.Espèces Anacyclus valentinus. L :**

La principale particularité du genre *Anacyclus* est la présence d'ailes aplaties entourant les fruits. L'espèce, objet de notre travail, dont la floraison est entre juin – août est une plante annuelle, à tige de 10 à 40 cm de hauteur, dressée et plus ou moins velue. Cette dernière, en s'épaississant au sommet, porte un capitule hémisphérique à fleur jaune toute tubuleuse. Les feuilles de la plante sont bipennatiséquées à lobes étroits mucronulés et les fruits sont des akènes [21], [22].



**Figure 12.** Photo de « *Anacyclus Vlentinus.L* »



**Figure 13.** Photo de « *Anacyclus Valentinus.L* »

***1.3.1. Classification taxonomique et répartition géographique :***

La position taxonomique d'*A. valentinus* a été citée dans la flore Fournier (1947), [23] sous le code 3871 et dans la flore Tison & De Foucault (2014), [24] sous le code 0380.



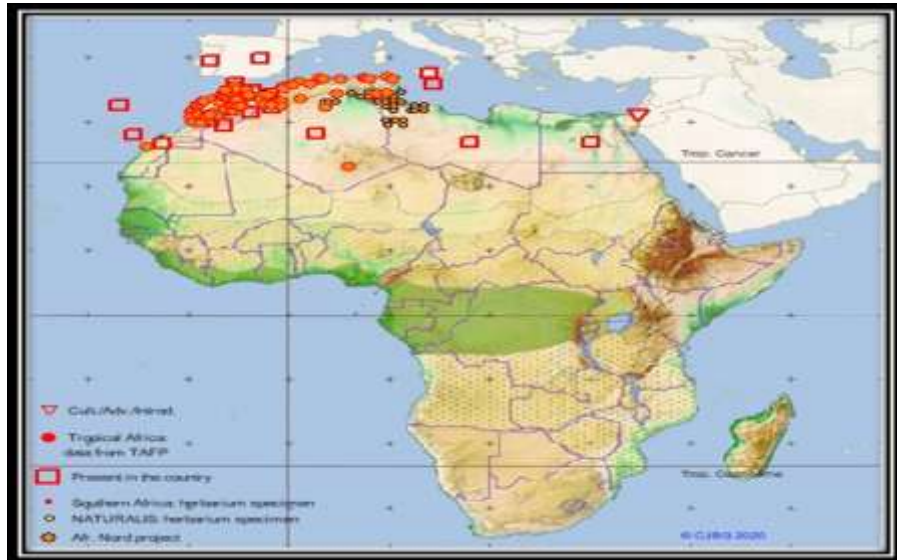


Figure 14. Carte chronologique pour la distribution de *Anacyclus valentinus.L*

Tableau 1 : Taxonomie du *Anacyclus valentinus. L*

<i>Catégorie</i>	<i>Classement</i>
Règne	<i>Plantae</i>
Embranchement	<i>Spermaphytes</i>
Sous-Embranchement	<i>Angiospermes</i>
Classe	<i>Dicotylédones</i>
Sous Classe	<i>Gamopétales</i>
Ordre	<i>Asterales</i>
Famille	<i>Asteraceae</i>
Genre	<i>Anacyclus</i>
Espèce	<i>A. valentinus L.</i>

La dénomination de cette plante diffère d'un pays à l'autre. Elle est nommée en France anacycle de valence, en Italie camomilla de Valencia et en Espagne manzanilla corda [25]. En Algérie, la plante est connue sous le nom vernaculaire « Guertoufa », " قرطوفة ". [26].

L'anacycle de valence est commune dans le bassin méditerranéen et en Afrique septentrionale. Elle pousse spontanément sur les sols argileux des lieux incultes et sur les bords des chemins dans les Pyrénées [22].

### **\*Distribution :**

Espagne, Ligurie, Afrique septentrionale. [27].

**\*Floraison :** mars -juillet. [27].

### **I.3.2. Aspects phytochimiques :**

Le genre *Anacyclus* a fait l'objet de quelques investigations chimiques, signalant la présence de nombreux types de métabolites secondaires à savoir les triterpènes, les stéroïdes, les coumarines, les lignanes, les poly acétylènes (alkamides) et les flavonoïdes [28].

Cependant, l'anacycle de valence est l'espèce la moins étudiée parmi celles du genre *Anacyclus*. En effet, Harald (1978) [28] a pu isoler à partir des feuilles de cette plante trois types de flavonoïdes : Lutéoline-7-glucoside, 7-rhamnosylglucoside, quercétine-7-glucoside.

### **I.3.3. Aspects pharmacologiques :**

Les espèces appartenant au genre *Anacyclus* ont fourni de nombreuses propriétés tels que l'effet insecticide [29], antibactérien [30] et antifongique [31] Chez la population autochtone, *A. valentinus* est souvent utilisée dans les préparations culinaires, mais elle est également administrée pour les maux d'estomac [21]. Les travaux réalisés par Hocine et Zaouias en 2006 et par Ata et Ghrib en 2007, sur l'huile essentielle de cette espèce ont prouvé son activité antimicrobienne contre les bactéries *Escherichia coli*, *Staphylocoques aureus* et *Aspergillus* Sp).

Les travaux antérieurs réalisés sur les plantes de la famille des *Asteraceae* en particulier celles appartenant au genre *Inula* et *Anacyclus* ont mis en évidence leur richesse en métabolites secondaires tels que les huiles essentielles et les flavonoïdes. C'est ainsi, que toute cette richesse dans l'usage thérapeutique traditionnel des plantes médicinales, nous a encouragé à étudier quelques activités biologiques des deux espèces algériennes *Inula viscosa* et *Anacyclus valentinus*.

## **VII. Généralité sur les activités étudiées :**

### **1. Activité antioxydant :**

#### **1.1. Introduction :**

La génération des espèces réactives de l'oxygène dénommées ROS (Réactive Oxygène Spécifs) se produit naturellement au cours de la respiration cellulaire [32]. L'appellation ROS n'est pas restrictive. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit : radical super oxyde  $O_2^{\cdot -}$ , radical hydroxyle  $OH^{\cdot}$ , monoxyde d'azote  $NO^{\cdot}$ , mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante : l'oxygène singlet  $^1O_2$ , peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ , peroxydinitrite  $ONOO^-$  [33]. Ces derniers endommagent la vie cellulaire en causant l'oxydation des lipides, des protéines et de l'acide désoxyribonucléique (ADN). L'évolution de cette oxydation semble être la cause de plusieurs maladies telles que le diabète, le cancer, les infections inflammatoires, les maladies cardiaques et accélère le processus de vieillissement [33].

#### **1.2. Le stress oxydant :**

Le stress oxydatif réfère à une perturbation dans la balance métabolique cellulaire durant laquelle, la génération d'oxydants accable le système de défense antioxydant, que ce soit par une augmentation de la production d'oxydants et/ou par une diminution des défenses antioxydantes. Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, citons la surproduction endogène d'agents pro oxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (tabac, alcool, médicaments, rayons gamma, rayons ultraviolets, herbicides, ozone, amiante, métaux toxiques). L'accumulation des espèces oxygénées réactives a pour conséquence l'apparition de dégâts cellulaires et tissulaires souvent irréversibles dont les cibles biologiques les plus vulnérables sont les protéines les lipides et l'acide désoxyribonucléique [34].

#### **1.3. Les radicaux libres :**

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié (électrons célibataires). Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se ré-apparier, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne. C'est typiquement ce qui se passe lors de la peroxydation lipidique [35]. Les radicaux libres, dérivés du métabolisme, sont produits dans toutes les cellules, même si certaines en fabriquent des quantités plus importantes (par exemple les macrophages pendant la phagocytose). Les principaux radicaux libres présents dans les cellules aérobies, notamment

les cellules humaines, sont l'oxygène, les ions super oxydes, les radicaux hydroxyles, le peroxyde d'hydrogène et les métaux de transition. Les radicaux libres présents dans la cellule oxydent les molécules (molécules se trouvant à l'intérieur des cellules, en particulier des lipides), ce qui provoque la mort des cellules. Toute fois le corps humain possède des mécanismes de défense contre les effets des radicaux libres. Ce sont les enzymes qui dégradent les peroxydes et les métaux de transition et des protéines ou d'autres molécules qui emprisonnent les radicaux libres [36].

### ***1.4. Les antioxydants :***

Les antioxydants sont des molécules oxydables qui, en agissant comme donneurs d'hydrogène vis-à-vis d'un radical hydroperoxyde, interrompent la réaction en chaîne de formation des peroxydes [37]. Ce sont des composés capables de minimiser efficacement les rancissements, retarder la peroxydation lipidique, sans effet sur les propriétés sensorielles et nutritionnelles du produit alimentaire [38]. Les antioxydants sont pour la plupart synthétiques (hydroquinone, pyrogallol, acide gallique et gallate), et sont rajoutés aux huiles dans l'industrie alimentaire. Ils peuvent par contre être présents à l'état naturel dans les huiles végétales (vitamine E, polyphénols de l'olivier et du chêne, flavonoïdes, certaines huiles essentielles) [37].

#### ***1.4.1. Les antioxydants endogènes (enzymatiques) :***

Ce sont des enzymes ou protéines antioxydants (Super oxyde dismutase, Catalase et Glutathion peroxydase) élaborés par notre organisme avec l'aide de certains minéraux. Elles sont présentes en permanence dans l'organisme, mais leur quantité diminue avec l'âge [39].

- ***La super oxyde dismutase (SOD) :*** accélère la dismutation de l'anion super oxyde en peroxyde d'hydrogène, il existe plusieurs iso enzymes de SOD ; SOD ferreux (Fe-SOD), SOD à cuivre (Cu-SOD) et SOD à manganèse (Mn-SOD) [40].

- ***La catalase :*** présente en particulier dans les hématies et les peroxysomes hépatiques. Elle agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire [40].

- ***La glutathion peroxydase (GPx) :*** La glutathion peroxydase joue un rôle très important dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène, de l'hydroperoxyde résultant de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras en couplant la réduction de ces dérivés réactifs avec l'oxydation de substrats réducteurs comme le glutathion (GSH) [40].

#### ***1.4.2. Les antioxydants exogènes (non enzymatiques) :***

Les antioxydants exogènes, vu leur efficacité, leur faible coût et leur disponibilité, sont largement utilisés dans les aliments comme additifs dans le but de prévenir la rancidité.

Cependant, leur sécurité est très discutée car ils génèrent un besoin de recherche comme matières de substitution d'après des sources naturelles comme antioxydants de la nourriture [41]. Plusieurs substances peuvent agir en tant qu'antioxydants in vivo ont été proposées. Elles incluent : la vitamine E, l'acide ascorbique, la  $\beta$ -carotène, les flavonoïdes, les composés phénoliques. Elles peuvent stabiliser les membranes en diminuant leur perméabilité et elles ont également une capacité de lier les acides gras libres [42]. Les sources alimentaires de ces antioxydants naturels sont présentées dans le tableau 2.

**Tableau 2 :** Principaux antioxydants non enzymatiques et sources alimentaires associées [42].

<i>Principaux nutriments</i>	<i>Sources alimentaires</i>
<i>Antioxydants</i>	
Vitamine C	Agrumes, melon, brocoli, fraise, kiwi, chou, poivron
Vitamine E	Huile : de tournesol, de soja, de maïs Beurre, œufs, noix.
$\beta$ -carotène	Légumes et fruits orangés, et vert foncés
Sélénium	Poissons, œufs, viande, céréales, volaille
Zinc	Viande, pain complet, légumes verts, huîtres, produits Laitiers
Flavonoïdes	Fruits, légumes, thé vert
Acides phénoliques	Céréales complètes, baies, cerises
Tanins	Lentilles, thé, raisins, vin
Métabolisme de cystéine, glutathion	Caséine, Lactalbumine (petit-lait), produits laitiers Brocoli, chou œufs, poissons, viande

### **1.5. Mécanisme d'action des antioxydants :**

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulier, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la chélation des métaux de transition [43].

Selon leur mode d'action, les antioxydants sont classés en deux catégories :

- ***Système de défense primaire*** : comme la catalase, le glutathion (GSH). Ces antioxydants préviennent la production de ROS en limitant la phase d'initiation des réactions d'oxydation. Ils agissent donc en prévention.

- ***Système de défense secondaire*** : à titre exemple les tocophérols, sont capables de piéger directement les radicaux oxydants et sont ainsi des antioxydants « briseurs » de la chaîne radicalaire bloquant ainsi les réactions de propagation [44].

### ***2. Activité Anticholinésterase :***

#### ***2.1. Les cholinestérases : marqueurs de contamination***

Pendant plusieurs dizaines d'années l'inhibition des cholinestérases a été le seul outil de diagnostic, chez l'homme, des intoxications accidentelles ou volontaires par les insecticides organophosphorés (OP) et les carbamates (C). En effet, les accidents liés à la manipulation, aux stades de fabrication ou d'utilisation de ces substances, et les cas de suicide par ingestion sont assez fréquents.

Puis le développement récent des biomarqueurs axés sur l'étude des réponses biologiques des organismes exposés aux contaminants a fourni les outils biochimiques essentiels à la mise en place de projets de surveillance des effets biologiques de la pollution. Le développement et la validation in situ de telles techniques sont l'objet de contraintes particulières telles que la spécificité de la relation entre le polluant et la réponse biologique, la connaissance des variabilités naturelles de la réponse et le choix de l'espèce cible (ou bioindicateur).

Parmi ces outils nouveaux appliqués à l'environnement on retrouve l'utilisation des cholinestérases, et notamment de l'acétylcholinestérase, et son inhibition en tant qu'indicateur d'exposition aux effets neurotoxiques de certains polluants.

L'inhibition peut être exploitée de deux manières :

- - en tant que biomarqueurs des effets d'une exposition à des inhibiteurs in situ. Cet usage des cholinestérases nécessite de disposer d'espèces dites sentinelles ou bioindicatrices capturées dans le milieu et répondant à un certain nombre de contraintes liées à la surveillance. Dans ce contexte il s'agit d'analyser les niveaux d'activité AChE de ces animaux sur différentes zones et de les comparer.
- - en tant qu'indice de qualité des eaux ou des sédiments. Dans ce cas les incubations d'échantillons d'eau ou d'extraits de sédiment avec des cholinestérases, in vitro, permettent de mettre en évidence des traces d'inhibiteurs dans les différents compartiments du milieu marin à des niveaux de l'ordre du ppb. Les enzymes sont généralement immobilisées sur une

membrane et couplée à un transducteur (pH mètre) sous la forme de biocapteurs déjà largement utilisés dans la détection des insecticides organophosphorés et carbamates.

Si les cholinestérases sont l'objet d'importantes recherches, à la fois sur le plan fondamental et sur le plan médical, ces enzymes ont été peu étudiées chez les organismes marins si on excepte le poisson torpille (*Torpedo marmorata*). Sur le plan fondamental, la compréhension des mécanismes de formation du complexe enzyme-substrat ou enzyme-inhibiteur, l'implication de chacun des acides aminés formant le site actif dans cette relation, la structure tridimensionnelle de la gorge active et le polymorphisme important de ces enzymes sont sujets de programmes de recherche importants notamment en France, aux USA et en Israël. L'expression du polymorphisme de l'enzyme et de son ancrage éventuel à partir de la connaissance du gène sont l'objet de travaux importants. Sur le plan médical, le rôle primordial de ces enzymes dans la transmission de l'influx nerveux, leur implication dans la maladie d'Alzheimer et le fait qu'elles soient la cible de nombreux composés neurotoxiques industriels, domestiques ou militaires sont le thème de recherche de nombreux laboratoires civils et des armées.

### ***2.2. L'acétylcholinestérase :***

Dans les jonctions neuromusculaires et interneuronales, la terminaison nerveuse libère un médiateur chimique, l'acétylcholine, qui va permettre la transmission de l'influx nerveux. L'acétylcholinestérase, en inactivant rapidement l'acétylcholine, permet au système de revenir immédiatement à son état de repos. L'inhibition de l'acétylcholinestérase par de nombreux neurotoxiques dont les OP et C va provoquer l'accumulation de l'acétylcholine dans l'espace synaptique et l'acétylcholine accumulée maintient une transmission permanente de l'influx nerveux qui conduit à la tétanie musculaire et la mort.

Comme on l'a vu précédemment, l'AChE posséderait d'autres fonctions, non cholinergiques, encore mal connues [45]. Selon [46], de nombreux arguments suggèrent que cette enzyme joue un rôle de médiateur chimique de l'activité neuronale : la présence d'acétylcholinestérase catalytiquement inactive dans le réticulum endoplasmique de certaines cellules (du muscle et du cerveau de poulet par exemple), la forte concentration d'AChE dans des zones à faible activité cholinergique (certaines régions du cerveau) et l'existence de fortes proportions de formes solubles. D'autres évidences telles que l'ouverture des canaux  $K^+$  et l'inactivation des canaux  $Na^+$  directement par l'acétylcholinestérase conforteraient cette hypothèse. **Greenfield** [47] met en évidence la modification de l'excitabilité de certains neurones par l'AChE bien que

celle-ci soit inhibée par un organophosphoré et donc que le site actif n'est pas impliqué dans ce rôle.

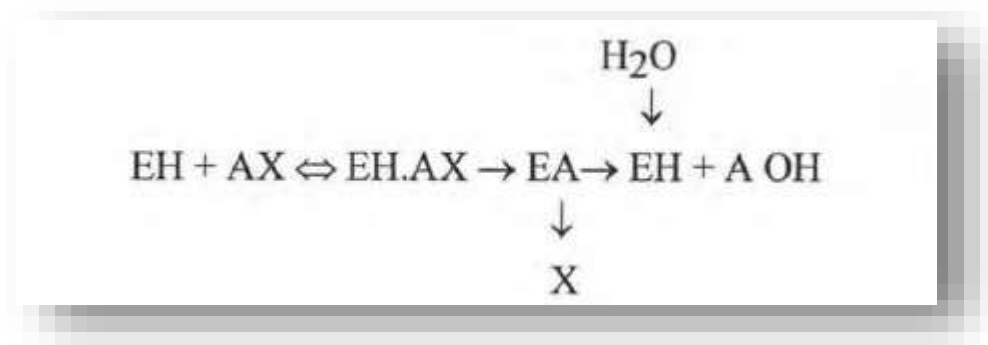
### **2.3. Le site actif :**

Récemment, l'étude de la structure en trois dimensions du site stérique par cristallographie, modélisation, mutagenèse dirigée et marquage d'affinité [48] a clarifié notre compréhension des mécanismes moléculaires de l'activité catalytique de l'enzyme et de son inhibition notamment sur le rôle de chacun des acides aminés constituant le site catalytique.

Ce site actif, élément dynamique de l'Ache, est composé de deux sous-sites : le site estérasique et le site anionique. Le site estérasique est le site d'acétylation par l'acétylcholine du groupement hydroxyle (OH) de la sérine. L'Ache est une sérine hydrolase et la catalyse du substrat comprend une étape d'acylation-d'acylations sur la sérine du site actif qui se situe en position variable selon les espèces.

### **2.4. L'hydrolyse de l'acétylcholine (ACh) :**

L'hydrolyse de l'acétylcholine se déroule selon le schéma général suivant :



**Schéma 2.** L'hydrolyse de l'acétylcholine

Sur le site anionique de l'Ache (EH) vient se fixer l'ammonium quaternaire de l'acétylcholine (AX). Cette fixation oriente le substrat vers le site estérasique de l'enzyme. Le groupement ester de l'acétylcholine réagit alors avec l'hydroxyle de la sérine du site actif conduisant à la formation du complexe enzyme-substrat (EH.AX) particulièrement instable, puis d'une acétylcholinestérase acétylée (EA) très réactive. En présence d'eau, la dé acétylation de l'enzyme aboutit à la libération de choline (X) et la formation d'acide acétique (A OH). Un nouveau cycle catalytique prend place.



**2.5. Caractérisation de l'activité cholinestérasique :**

Pour de nombreux auteurs la mesure de l'activité acétylcholinestérase est le meilleur indice de contamination par les pesticides organophosphorés et carbamates [49].

L'utilisation d'une activité enzymatique à des fins de diagnostic nécessite à la fois une connaissance approfondie de l'enzyme et de sa variabilité naturelle mais aussi une définition précise des conditions d'extraction, de conservation des extraits et de mesure de l'activité et son intégration dans des programmes de surveillance appliqués au milieu marin entraîne un certain nombre de contraintes telles que :

- la mise au point d'un outil analytique de dosage de l'activité AChE simple, sensible, rapide et économiquement raisonnable.
- la nécessité de caractériser l'activité AChE chez les espèces dites sentinelles en fonction de la nature des zones à surveiller.

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE :**

- [1] **Bouziane Z.** « Contribution à l'étude ethnobotanique des plantes médicinales de la région d'Azail (Tlemcen–Algérie) » 2017.
- [2] **Bruneton J.** « Pharmacognosie. Phytochimie Plantes médicinales, Paris », Ed Tec-Doc 1999.
- [3] **Bellakhdar J.** « La pharmacopée marocaine traditionnelle. Médecine arabe ancienne et savoirs populaires » 1997. p.189.
- [4] **Zouaoui M.** « Étude de l'impact des enzymes exogènes sur la digestibilité des acides aminés chez le porc et le poulet : approche par méta-analyse. » 2018.
- [5] **Eddine ZD.** « Etude phytochimique de la plante Marrubium vulgare L et l'effet des extraits issus de la plante sur les calculs rénaux » 2017.
- [6] **Yang B, Kallio H.** «Composition and physiological effects of sea buckthorn (Hippophae) lipids. Trends in Food Science & Technology»2002. p.160-7.
- [7] **Pintea A, Marpeau A, Faye M, Socaciu C, Gleizes M.** «Polar lipid and fatty acid distribution in carotenolipoprotein complexes extracted from sea buckthorn fruits». Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques 2001.p.293-8
- [8] **Bengherbi A, Benmedjdoub S, Tafinine ZE.** « Evaluation de l'activité antioxydante du miel additionné d'un fruit sec. » 2018.
- [9] **Krief S.** « Métabolites secondaires des plantes et comportement animal : surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (Pan troglodytes Schweinfurth) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées : Museum national d'histoire naturelle-MNHN PARIS » ; 2003.
- [10] **Hamimed S.** « Caractérisation chimique des principes à effet antidermatophyte des racines d'Anacyclus pyrethrum L. Mémoire de Magister en chimie organique », Université Mentouri Constantine, Algérie 2009.p.66-89.
- [11] **Moss G.** « Nomenclature of steroids (Recommendations 1989). Pure and Applied Chemistry »1989. p.1783-822.
- [12] **Mahmoud SS, Croteau RB.** « Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. Trends in plant science » 2002;7.p.366-73.
- [13] **Gravot A.** « Introduction au métabolisme secondaire chez les végétaux. Equipe pédagogique Physiologie Végétale, UMR » 2008. p.118.

- [14] **Sofowora A.** « Plantes médicinales et médecine traditionnelle d’Afrique : KARTHALA Editions » ; 2010.
- [15] **Penchev PI.** « Étude des procédés d’extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions » 2010.
- [16] **Pichot C, El Maataoui M.** « Flow cytometric evidence for multiple ploidy levels in the endosperm of some gymnosperm species. Theoretical and Applied Genetics » 1997. p.865-70.
- [17] **Osborn RW, De Samblanx GW, Thevissen K, Goderis I, Torrekens S, Van Leuven F, et al.** « Isolation and characterization of plant defenses from seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae. FEBS letters » 1995.p.257-62.
- [18] **Trease G, Evans W.** « Pharmacognosy, Bailliere Tindall, Eastbourne. » UK; 1983.
- [19] **Lloyd JU.** History of the Vegetable Drugs of the Pharmacopeia of the United States: JU & CG Lloyd » 1911.
- [20] **Julien A.** « Flore de la région de Constantine : L. Marle (N. Audrino) » 1894.
- [21] **Larbi KS, MEDDAH B, MEDDAH ATT, SONNET P.** « Central Analgesic Property of Extracts and Essential Oils from *Inula viscosa* and *Anacyclus valentinus* (Asteraceae) In Westar Rats. J Appl Environ Biol Sci » 2016. p.72-7.
- [22] **Julve P. ff. Baseflor.** « Index botanique, écologique et chronologique de la Flore de France. » Version 2015. Programme Catminat. 1998.
- [23] **Dahmoune Z, Hamdache S.** « Etude ethnobotanique de quatre plantes médicinales *Artemisia herba alba* A, *Charthamus caeruleus* L, *Inula viscosa* et *Marrubium vulgare* L au niveau de la région de Maâtkas et de Kadiria et mise en application de *Charthamus caeruleus* » L : Université Mouloud Mammeri ; 2017.
- [24] **Tison J-M, de Foucault B.** « Flora gallica : flore de France : Biotope » ; 2014.
- [25] **Adelman-McCarthy JK, Agüeros MA, Allam SS, Anderson KS, Anderson SF, Annis J, et al.** « The fifth data release of the Sloan Digital Sky Survey. The Astrophysical Journal Supplement Series » 2007.p.172:634.
- [26] **Maiza K. Brac de la Perrière RA, Hammiche V.** « Pharmacopée traditionnelle saharienne: Sahara septentrional 2nd proc of European Conf on Ethno pharmacology & 11th Into Conf of Ethnomedecine Heidelberg », France 1993. p. 169-71.
- [27] « Projet de numérisation de la flore de L'Abbé Coste par le réseau Tela botanica - 2011 »
- [28] **Greer H.** « Comparative phytochemistry and systematics of *Anacyclus*. Biochemical Systematics and Ecology » 1978. p.11-7.

[29] **Elmorsi M, Hassanein A.** « Corrosion inhibition of copper by heterocyclic compounds. Corrosion science» 1999.p.2337-52.

[30] **Selles C, ib MEA, Djabou N, Beddou F, Muselli A, Tabti B, et al.** « Antimicrobial activity and evolution of the composition of essential oil from Algerian *Anacyclus pyrethrum* L. through the vegetative cycle. Natural product research» 2013.p.2231-4.

[31] **Boungab K, Tadjeddine A, Belabid L, Fortas Z, Lazrag F.** « Antifungal activity of extracts of *Anacyclus valentinus* L. on phytopathogenic fungi. 4ème Conférence Internationale sur les Méthodes Alternatives en Protection des Cultures Evolution des cadres réglementaires européen et français Nouveaux moyens et stratégies Innovantes, Nouveau Siècle, Lille, France, 8-10 mars 2011 : Association Française de Protection des Plantes (AFPP) » ; 2011. p. 230-8.

[32] **Tarnawski M, Depta K, Grejciun D, Szelepin B.** « HPLC determination of phenolic acids and antioxidant activity in concentrated peat extract—a natural immunomodulatory. » Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2006.p.182-8.

[33] **Dasgupta N, De B.** « Antioxidant activity of some leafy vegetables of India: A comparative study. » Food chemistry 2007.p.471-4.

[34] **Smirnoff N.** « Ascorbate, tocopherol and carotenoids: metabolism, pathway engineering and functions. Antioxydants and reactive oxygen species in plants » 2005.p.53-86.

[35] **Dacosta Y.** « Les phytonutriments bioactifs : 669 références bibliographiques : Ed. Yves Dacosta » ; 2003.

[36] **CHELGHOU M F.** « Extraction de la catéchine à partir du thé vert et étude de son activité antioxydante » 2015.

[37] **De Magalhaes P, Pereira B, Sartoratto A, De Oliveira J, Debrunner N.** « New hybrid lines of the antimalarial species *Artemisia annua* L. II WOCMAP Congress Medicinal and Aromatic Plants, Part 3: Agricultural Production, Post-Harvest Techniques, Biotechnology» 5021997. p. 377-82.

[38] **Pokonry J, Yanishlieva N, Gordon H.** « Les antioxydants dans les aliments. Les applications pratiques. Wood head Publishing limited. CRC Press. Cambridge Angleterre»; 2001.

[39] **Mika A, Minibayeva F, Beckett R, Lüthje S.** « Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species. Phytochemistry Reviews »2004. p.173-93.

[40] **Piquet M-A, Hébuterne X.** « Nutrition en pathologie digestive : Doin » ; 2007.

[41] **Wang L, Yen J-H, Liang H-L, Wu M-J** «. Antioxidant effect of methanol extracts from lotus plumule and blossom (*Nelumbo nucifera* Gertn.). » *Journal of food and drug Analysis* 2003.p.60-6.

[42] **Koechlin-Ramonatxo C.** « Oxygen, oxidative stress and anti-oxidant supplementation, or another way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition clinique et métabolisme* » 2006. p.165.

[43] **Favier A.** « Le stress oxydant. L'actualité chimique » 2003.

[44] **Buettner GR.** « The Pecking Order of Free Radicals and Antioxidants: Lipid Peroxidation, -Tocopherol, and Ascorbate. » *Archives of biochemistry and biophysics* 1993.p.535-43.

[45] **Toutant J-P, Massoulié J.** «Cholinesterases: tissue and cellular distribution of molecular forms and their physiological regulation. » *The Cholinergic Synapse: Springer; 1988.* p. 225-65.

[46] **Appleyard ME.** « Acetylcholinesterase induces long-term potentiation in CA1 pyramidal cells by a mechanism dependent on metabotropic glutamate receptors. » *Neuroscience letters* 1995.p.25-8.

[47] **Greenfield SA.** « A noncholinergic action of acetylcholinesterase (AChE) in the brain: from neuronal secretion to the generation of movement. » *Cellular and molecular neurobiology* 1991.p.55-77.

[48] **Weise C, Kreienkamp H-J, Raba R, Pedak A, Aaviksaar A, Hucho F.** «Anionic subsites of the acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: affinity labelling with the cationic reagent N, N-dimethyl-2-phenyl-aziridinium. » *The EMBO journal* 1990.p.3885-8.

[49] **Holland HT, Coppage DL, Butler PA.** «Use of fish brain acetylcholinesterase to monitor pollution by organophosphorus pesticides. » *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 1967.p.156-62

# **Chapitre II : Matériels Et méthodes**



### ***I. Matériels et méthodes :***

Ce travail a été réalisé au laboratoire de la chimie, Labo de science exacte, science de la nature et de la vie, Université l'Arbi Tébessi et au centre de recherche en Biotechnologie, Constantine (CRBT).

Ce chapitre est subdivisé en deux parts :

- La première concerne la préparation des extraits, l'analyse phytochimique qualitative, le dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes totaux.
- La deuxième porte sur l'évaluation de l'activité anticholinésterase vis-à-vis de différentes enzymes, activité antioxydant à partir de quelque méthode concernée (réduction du Abts Dpph ...etc.).

### ***I.1. Matériels :***

#### ***I.1.1. Matière végétal :***

Pour la préparation des extraits, nous nous sommes intéressés à la partie aérienne de la plante *Anacyclus Valentinus* dont les tiges et feuilles. Cette plante a été récoltée au mois de juillet 2019 dans la région saharienne (Marmouthia) qui est situé au sud de wilaya de Tébessa. Elle a été ensuite conservée à une température ambiante et à l'abri de la lumière presque 25 jours.



Figure 15. Carte géographique de la zone de récolte.



Figure 16. Carte géographique de la zone de récolte.



### *I.2. Extraction par les solvants :*

La méthode d'extraction que nous avons adoptée est la macération successive par trois solvants organiques de polarité croissante ; il s'agit, diéthyl éther, diéthylether/méthanol et de méthanol.

La quantité de solvant doit être appropriée à la quantité de matière végétale à extraire. Dans notre cas 300g de la plante est broyés et extraits dans 1300 ml diéthyl éther. L'extraction est effectuée au sombre et à une température ambiante, pendant 24h. Après, la filtration se fait par un coton se met dans un entonnoir, le matériel végétal est encore extrait par le même solvant et de même façon pendant 48h, les filtrats sont additionnés et concentrés à sec par un évaporateur rotatif.

La matière végétale est soumise à une autre extraction dans les mêmes conditions mais avec d'autres solvants, il s'agit de diéthylether/méthanol et de méthanol.

Cette série d'extractions a permis d'obtenir trois extraits organiques bruts : extrait de diéthylether(diEt), extrait de diéthylether/méthanol (diEt/meth) et extrait de méthanol (MeOH).

**Le schéma 3** illustre le protocole opératoire ainsi que les différents solvants employés pour l'obtention des différents extraits recherchés.

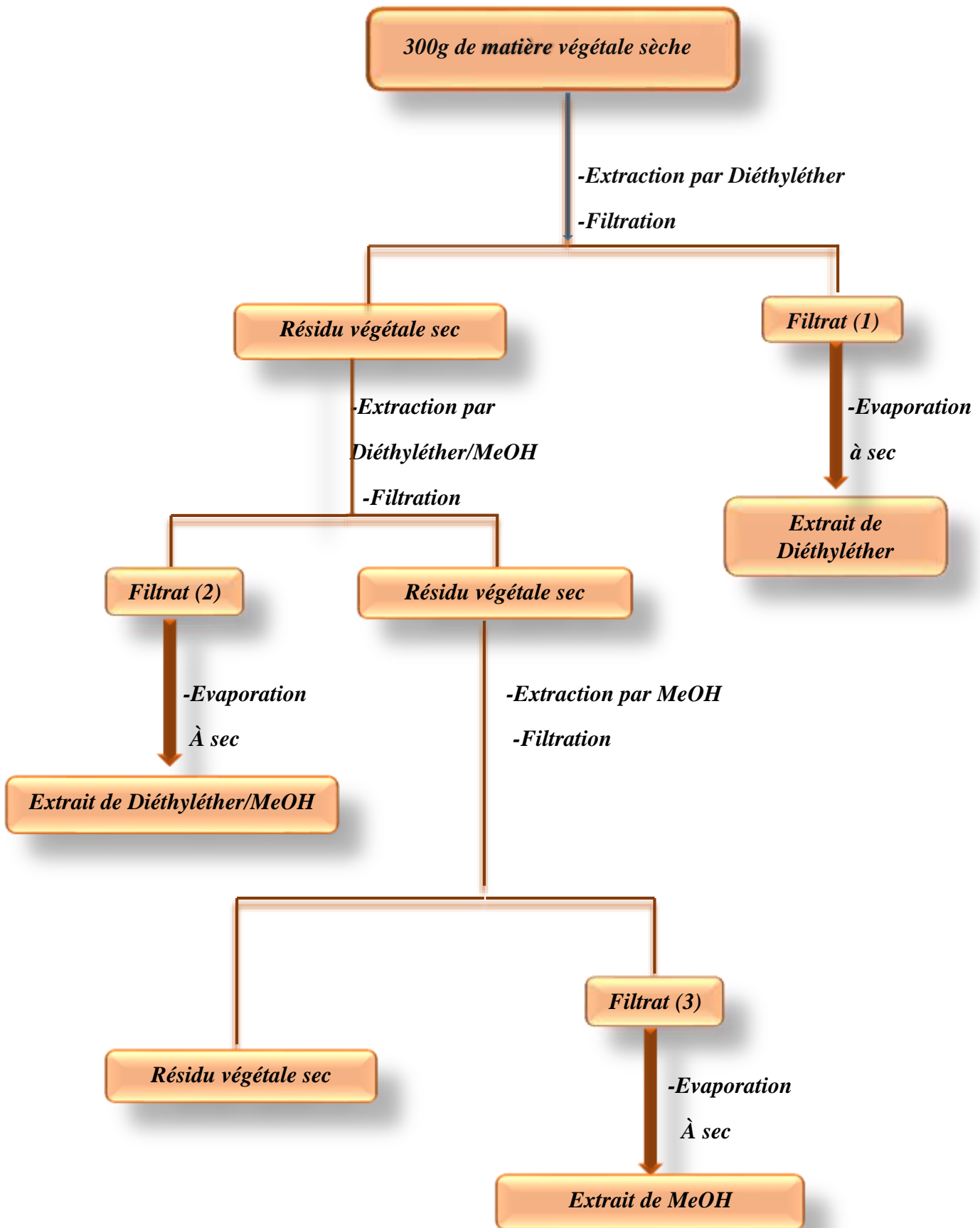


Schéma 3 : Extraction par les solvants organiques de la partie aérienne d'Anacyclus Valentinus.L

**II. Méthode chromatographique :**

Les plaques chromatographiques en couche mince analytiques ont été obtenues de source commerciale (Merck). Elles sont constituées d'une plaque d'aluminium recouverte d'un gel de silice 60F254. Après leur développement, les chromatogrammes sont examinés, à la lumière du jour et sous lampe UV à 254 et 366 nm. Elles sont révélées ensuite par les réactifs de détection.

**Tableau 3 : Composition des solvants pour l'analyse par CCM des extraits bruts.**

<i>L'extrait testé</i>	<i>Mélange du solvant</i>	<i>Pourcentage</i>
<i>1-Methanoliques</i>	<i>Chloroforme/Diéthyléther</i>	<i>5 :5</i>
	<i>Chloroforme</i>	<i>10</i>
	<i>Chloroforme/Méthanol</i>	<i>5 :5</i>
<i>2-Diéthyléther /Méthanol</i>	<i>Chloroforme/Hexane/Diéthyléther</i>	<i>5 :2,5 :2,5</i>
	<i>Chloroforme</i>	<i>10</i>
	<i>Chloroforme/Diéthyléther</i>	<i>5 :5</i>
<i>3-Diéthyléther</i>	<i>Chloroforme/Diéthyléther</i>	<i>5 :5</i>
	<i>Chloroforme/Hexane/Diéthyléther</i>	<i>5 :2,5 :2,5</i>

**III. Tests preliminaries de screening phytochimique:**

La détection des différentes familles de composés chimiques existant dans la plante est l'un des objectifs essentiels de l'examen phytochimique. Ceci constitue la première étape de la recherche des molécules actifs présentent dans la plante étudiée.

Les tests phytochimiques sont basés sur des essais de solubilités, des réactions de coloration et de précipitation, ainsi que des examens sous lumière ultraviolette.

Dans notre travail, nous avons exposé le matériel végétal aux différents voies de macérations.

Les extraits utilisés pour les tests ont été obtenus après une ébullition à reflux pendant une heure, de 50 g du matériel végétal dans 300 ml de solvant, suivie d'une filtration [1].

**III. 1. Macération a l'eau distillée :****III. 1. 1. Recherche d'amidons :**

Le test effectué consiste à chauffer 5 ml de l'extrait aqueux avec 10 ml d'une solution saturée de NaCl dans un bain-marie jusqu'à ébullition. Ensuite on a ajouté le réactif d'amidon.

- Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleu violacé [1].

**III. 1. 2. Recherche des saponosides :**

La détection des saponosides est réalisée en ajoutant 1,5 ml d'eau distillé à 2 ml de l'extrait aqueux, puis la solution est fortement agitée. Après 20 minutes la teneur en saponosides est évaluée [1].

- Pas de mousse = test négatif.
- Mousse moins de 1 cm = test faiblement positif.
- Mousse de 1-2 cm = test positif.
- Mousse plus de 2 cm = test très positif.

**III. 1. 3. Recherche des tanins galliques :**

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant à 1 ml de l'extrait aqueux 1 ml d'eau distillée et 1 à 2 gouttes de solution diluée de  $FeCl_3$ .

- L'apparition d'une coloration bleu-vert indique la présence des tanins galliques [1].

**III. 1. 4. Recherche des anthocyanes :**

Leur présence est révélée en traitant 2 ml HCl (2N) ensuite ajoutant quelques gouttes de  $NH_4OH$ .

- Un test positif révélé par une coloration rose-rouge qui vire au bleu violacée [2], [3].

**III. 2. Macération a l'éthanol :****III. 2. 1. Recherche des flavonoïdes :**

La recherche des flavonoïdes est effectuée par un traitement de 5 ml d'extrait éthanolique avec 1 ml d'HCl concentré et de 0,5 g de tournures de magnésium.

- La présence des flavonoïdes est mise en évidence si une couleur rose ou rouge se développe après 3 minutes [1].

**III. 2. 2. Recherche des tanins cathéchiques :**

La présence des tanins est effectuée en ajoutant à 1 ml d'extrait éthanolique 2 ml d'eau distillée et 2 à 3 gouttes de solution diluée de  $FeCl_3$ .

- Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration verte ou bleu-vert [1].

**III. 2. 3. Recherche des composés réducteurs :**

Leurs détections consistent à traiter 1 ml d'extrait éthanolique avec 2 ml d'eau distillée et 20 gouttes de liqueur de Fehling, puis chauffer le tous.

- Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge-brique [1].

**III.2. 4. Recherche des coumarines :**

Leur détection consiste à évaporer à sec 5 ml de la solution éthérique extraite. Dissoudre le résidu obtenu dans 1 ml d'eau chaude, puis diviser le volume en deux parties. Prendre le demi volume comme témoin et ajouter à l'autre volume 0,5 ml de NH<sub>4</sub>OH (10 %), ensuite mettre deux tâches sur un papier filtre et les examiner sous la lumière UV.

- La présence des coumarines est indiquée par une fluorescence intense [1].

**III.3. Macération a l'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) :**

Ajouter 10 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dilué (1/10) à 10g de la poudre végétale dans un erlenmeyer de 250ml. Laisser agiter et macérer pendant 24h à la température ambiante du laboratoire.

Après filtrer sur papier lavé à l'eau distillée de manière à obtenir environ 10 ml de filtrat [2].

**III.3.1. Recherche d'alcaloïdes :**

1ml de filtrat +5 gouttes du réactif de Wagner s'il apparait un précipité brun c'est qu'on est en présence d'alcaloïdes [2].

**III.3.2. Recherche d'hétérosides :**

Pour ces composés leurs détections se fait comme suite :

- Evaporer 10 ml d'extrait éthanolique à sec.
- Dissoudre le résidu obtenu dans 0,5 ml d'anhydride acétique et 0,5 ml de chloroforme, puis filtrer.
- Traiter le filtrat par la réaction de Liebermann-Burchardt.

Si cette réaction donne des colorations :

- Verte bleue : présence d'hétérosides stéroïdiques.
- Verte violette : présence d'hétérosides tri terpéniques [1].

**IV. Dosages des métabolites secondaires :****IV.1. Dosage des polyphénols totaux :****IV.1.1. Principe de la réaction :**

La teneur en polyphénols totaux est déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu [4] selon une méthode de dosage sur microplaque [5].

Le réactif FCR, constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ), est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en mélange d'oxydes de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ). La coloration bleue produite est proportionnelle à la teneur en phénols totaux et possède une absorption maximum aux environs de 750 -765 nm.

**\*Instrument utilisés :**

Un lecteur microplaque

**\*Réactifs utilisés :**

- 1- Eau distillé, Méthanol
- 2- FCR (Folin-Ciocalteu réactif)
- 3-  $Na_2CO_3$  de 7,5% (Carbonate de sodium)
- 4- Acide Gallique
- 5- Extrait de plante

**V.1.2. Mode opératoire :****1- Préparation de Carbonate de sodium ( $Na_2CO_3$ ) à 7,5% :**

Prendre 7,5 gramme de  $Na_2CO_3$  et sont dissouts dans 100 ml d'eau distillé.

**2- Préparation de l'extrait de plante :**

Une masse de 1 mg d'extrait est dissoute dans un volume de 1 ml de l'eau distillée (ou Méthanol)

**3- Préparation de Folin Ciocalteu (FCR) dilué 10 fois :**

Prendre 1ml de la solution FCR concentré (2M) est complété à 10ml avec l'eau distillée (9ml).

**\*Procédure :**

Prendre 20  $\mu$ l d'extrait de plante, puis ajouter 100 $\mu$ l de FCR dilué (1 :10) et 75  $\mu$ l de carbonate de sodium (7,5%) puis mettre le mélange à l'obscurité pendant 2h en fin faire la lecture à 765 nm. Un blanc est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par le solvant utilisé (Méthanol).

**\*Gamme d'étalonnage :**

Préparation de la gamme d'étalon de l'acide gallique :

On prend 0,5 mg de l'acide gallique et on le dissout dans 5 ml de Méthanol pour obtenir la solution S1 (0,2mg/ml). Les dilutions sont préparées dans des eppendorfs comme la suite :

25µg/ml	→	25µl de S1+ 175µl de MeOH
50 µg /ml	→	50µl de S1+ 150µl de MeOH
75µg/ml	→	75µl de S1+ 125µl de MeOH
100µg/ml	→	100µl de S1+ 100µ de MeOH
125µg /ml	→	125µl de S1+ 75µl de MeOH
150µg /ml	→	150µl de S1+ 50µl de MeOH
175 µg /ml	→	175µl de S1+ 25µl de MeOH
200µg /ml	→	200µl de S1

Prendre 20µl de chaque dilution sont transférés dans une microplaque, puis ajouter 100µl FCR (1 :10) et 75µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7,5%), faire incubation 2h, faire lecture à 765nm.

**IV.2. Dosage des flavonoïdes totaux :****IV.2.1. Principe de la réaction :**

Le dosage des flavonoïdes dans les extraits est basé sur la formation d'un complexe entre Al<sup>+3</sup> et les flavonoïdes. La méthode de **Topçu [6]** est utilisée avec quelques une détermination sur microplaque 96 puits.

**\*Instrument utilisés :**

Un lecteur microplaque (Perkin Elmer, Enspire) est utilisé pour la mesure de l'absorbance

**\*Réactifs utilisés :**

- 1- Méthanol
- 2- Eau distillé
- 3- 10% nitrate d'aluminium (Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, 9H<sub>2</sub>O)
- 4- 1 M Potassium acétate (CH<sub>3</sub>COOK)
- 5- Quercétine (Flavonoïde)
- 6- Extrait de plante

**IV.2.2. Mode opératoire :****\*Préparation des solutions :**

Pour 1 M Potassium acétate ( $\text{CH}_3\text{COOK}$ ) on dissout 9.80 grammes de ( $\text{CH}_3\text{COOK}$ ) dans 100 ml d'eau distillée pour obtenir la solution S1 Pour 10% nitrate d'aluminium ( $\text{Al}(\text{NO}_3)_3, 9\text{H}_2\text{O}$ ) on pèse 10g de ce produit dans 100ml d'eau distillée.

**\*Préparation de l'extrait de plante :**

Une masse de 1 milligramme d'extrait est dissoute dans un volume de 1 ml de méthanol pour obtenir la solution (S2).

**\*Procédure :****A- Pour l'extrait :**

Prendre 50  $\mu\text{l}$  (S2) (extrait de plante) puis ajouter 130  $\mu\text{l}$  (MeOH) ,10  $\mu\text{l}$  (S1) ( $\text{CH}_3\text{COOK}$ ) et 10  $\mu\text{l}$  ( $\text{Al}(\text{NO}_3)_2, 9\text{H}_2\text{O}$ ). Attendre 40 mn faire la lecture à 415 nm. Un blanc échantillon est préparé en remplaçant les réactifs par le méthanol (50 $\mu\text{l}$  extrait + 150 $\mu\text{l}$  méthanol).

**B- Pour l'étalon :****\*Préparation de la gamme d'étalon de la Quercétine :**

On prend 1 mg de la Quercétine et on le dissout dans 5 ml de méthanol pour obtenir la solution 0,2mg/ml Sm.

**\*Les dilutions sont préparées dans des eppendorfs comme la suite :**

Quercétine (25)  $\longrightarrow$  25  $\mu\text{l}$  Sm + 175  $\mu\text{l}$  MeOH

Quercétine (50)  $\longrightarrow$  50  $\mu\text{l}$  Sm+ 150 $\mu\text{l}$  MeOH

Quercétine (75)  $\longrightarrow$  75  $\mu\text{l}$  Sm + 125 $\mu$  MeOH

Quercétine (100)  $\longrightarrow$  100  $\mu\text{l}$  Sm + 100 $\mu\text{l}$  MeOH

Quercétine (125)  $\longrightarrow$  125  $\mu\text{l}$  Sm + 75 $\mu\text{l}$  MeOH

Quercétine (150)  $\longrightarrow$  150  $\mu\text{l}$  Sm + 50 $\mu\text{l}$  MeOH

Quercétine (175)  $\longrightarrow$  175 $\mu\text{l}$  Sm + 25 $\mu\text{l}$  MeOH

Quercétine (200)  $\longrightarrow$  200 $\mu\text{l}$  Sm + 0 MeOH

Prendre 50  $\mu\text{l}$  de chaque dilution sont transférés dans une microplaque 96 puits puis ajouter 130  $\mu\text{l}$  (MeOH) ,10  $\mu\text{l}$  (S1) ( $\text{CH}_3\text{COOK}$ ) et10  $\mu\text{l}$  ( $\text{Al}(\text{NO}_3)_2, 9\text{H}_2\text{O}$ ). Attendre 40 mn faire la lecture à 415 nm.



***V. Déterminations des activités biologiques :******V.1. Déterminations de l'activité Antioxydant :******V.1.1. Méthode de SNP :******V.1.1.1. Principe de la réaction :***

L'activité Métal Chélate est déterminée selon la méthode de Mustafa Özyürek, [7]

Elle se base pour Réduction de l'Ag<sup>+</sup> en nanoparticules d'argent sphériques Ag<sup>0</sup>

***\*Réactifs utilisés :***

- 1- Silver nitrate (AgNO<sub>3</sub>)
- 2- Trisodium citrate(Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>)

***V.1.1.2. Mode opératoire :******\*Préparation :***

- Silver nitrate (10mM) or (1 mM) (préparer 0.170 g dans un 100 ml (H<sub>2</sub>O))
- Trisodium citrate (1%) (préparer 1 g dans un 100 ml (H<sub>2</sub>O))

***\*Préparation de la solution SNP :***

Prendre 50 ml of (AgNO<sub>3</sub> (1.0 mM)) est chauffé pendant 10 min puis 5 ml de Trisodium citrate (1%) est ajouté goutte à goutte jusqu'au changement de la couleur vers le jaune pâle, après la solution est laissé à température ambiante pour refroidissement

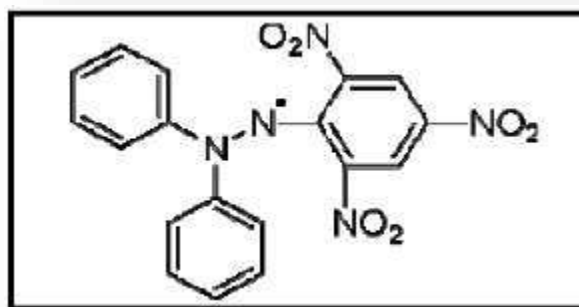
***\*Procédure :***

Prendre 20 µl extrait puis ajouter 130 µL (solution SNP) et 50 µl H<sub>2</sub>O, l'incubation à 25 °C pendant 30 min faire la lecture à 423 nm. Le Trolox est utilisé comme standard.

### V. 1.2. Piégeage du radical libre DPPH :

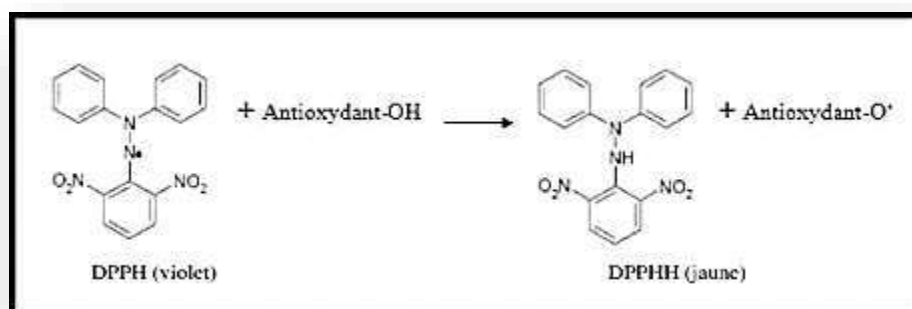
#### V. 1.2.1. Test de DPPH :

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques [8]. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote [9].



**Figure 17.** Structure chimique de radicale libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) [10]

La réduction du radical libre DPPH° (2,2'-diphényle-1-picryl hydrazyl) par un antioxydant peut être suivie par spectrométrie UV-Visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par les antioxydants [11]. En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH. (2.2 Diphényl 1 picryl hydrazyl) de couleur violette se réduit en 2.2 Diphényl 1 picryl hydrazine de couleur jaune [12].



**Figure 18.** Réaction de test DPPH (2.2 Diphényl 1 picryl hydrazyl)

### **V. 1.2.2. Principe de la réaction :**

L'activité antiradicalaire libre est déterminée par spectrophotométrie par le dosage du DPPH [8], le  $\alpha$ -tocophérol, BHT et le BHA sont utilisés comme standards antioxydants.

#### **\*Instrument utilisés :**

Un lecteur de microplaque à 96 puits de volume 200  $\mu$ l pour chaque puits

#### **\*Réactifs utilisés :**

- 1- Méthanol
- 2- DPPH
- 3-  $\alpha$ -tocopherol
- 4- BHA
- 5- BHT
- 6- Extrait de plante

### **V.1.2.3. Mode opératoire :**

Dissoudre 6 mg de DPPH dans un volume de 100 ml de méthanol, le radical DPPH est dissous dans le méthanol et gardé à  $-20^{\circ}\text{C}$  à l'abri de la lumière. L'absorbance est 0.5 nm (517 nm) dans le spectrophotomètre.

#### **\*Procédure :**

Prendre 160 $\mu$ l (DPPH) puis ajouter 40  $\mu$ l (extrait) faire la lecture 517nm

### **V.1.2. 4. Méthode de calcul :**

L'évaluation de l'activité antiradicalaire est exprimée en pourcentage selon la relation suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = (\text{Abs 1} - \text{Abs 2}/\text{Abs 1}) \times 100$$

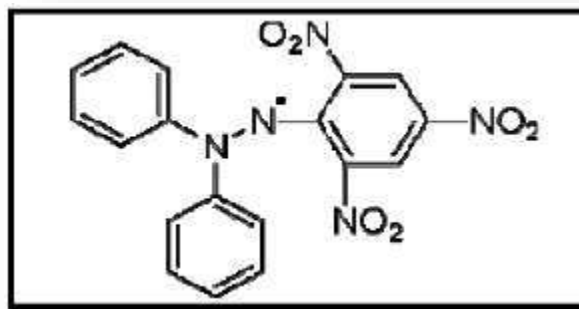
Abs 1 : Absorbance du contrôle.

Abs 2 : Absorbance de l'extrait.

Les résultats expérimentaux sont exprimés selon la moyenne des valeurs.

**V. 1.3. ABTS « scavenging activity »:****V. 1.3. 1. Test d'ABTS:**

ABTS forme également un radical libre relativement stable, qui décolore sous sa forme non-radicalaire. Dans cette méthode, un antioxydant est ajouté à un ABTS préformé solution radical et après une période de temps fixe le reste  $ABTS^{\bullet+}$  est quantifié par spectrophotométrie à 734 nm [13]. Le spectrophotométrique analyse de l'activité de piégeage  $ABTS^{\bullet+}$  déterminé selon la méthode de **Re et al** [14].



**Figure 19.** Structure chimique d'ABTS

**V. 1.3. 2. Principe de la réaction :**

L'activité ABTS est déterminée par la méthode de **Re et al** [14]

**\*Instrument utilisé :**

Un spectrophotomètre à cuve de volume 3 ml ou un lecteur à microplaque

**\*Réactifs utilisés :**

- 1-  $K_2S_2O_8$
- 2- ABTS
- 3- Eau distillé
- 4- Ethanol
- 5- BHA
- 6- BHT

**V.1.3.3. Mode opératoire :****\*Procédure :**

A partir de l'ABTS et du persulfate de potassium  $K_2S_2O_8$  : les deux produits en solution aqueuse sont mélangés et mis à l'abri de la lumière pendant 12- 16H ; l'absorbance de la solution ainsi obtenue est ajustée par (Ethanol ou  $H_2O$ ) à  $0.700 \pm 0.020$  à 734 nm avant l'usage.

(ABTS<sup>+</sup>) → « prendre 19,2 mg (7 mM) ABTS puis ajouter 5 ml H<sub>2</sub>O » et « 3,3 mg (2.45 mM) (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) puis ajouter 5 ml H<sub>2</sub>O. ». Attendre 16 heure à l'abri de la lumière

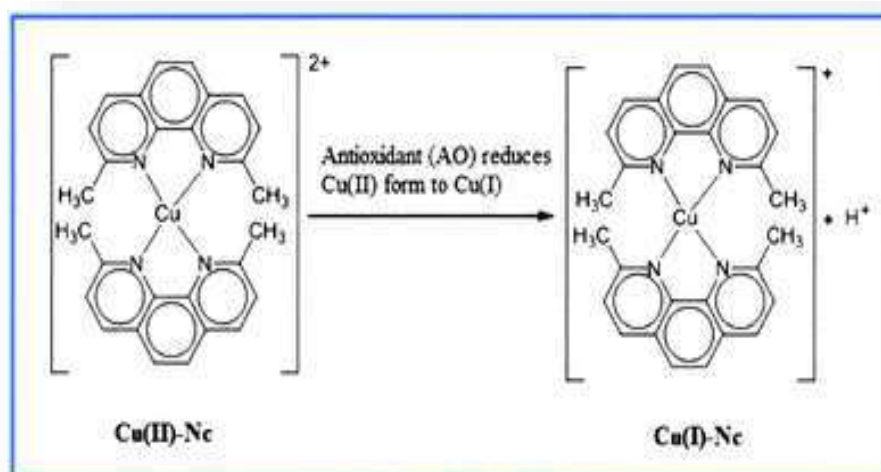
**\*Procédure :**

Prendre 160 µl (ABTS+), puis ajouter 40 µl (extrait), l'attendre 10 mn, faire la lecture à 734 nm

### **V. 1.4. Méthode de CUPRAC: Cupric reducing antioxidant capacity:**

#### **V. 1.4.1. Test de CUPRAC:**

Le Cupric reducing antioxidant capacity est déterminé par la méthode CUPRAC [15] Ce test est basé sur les modifications des caractéristiques d'absorption du complexe Neocupronin (Nc) cuivre (II) lorsqu'il est réduit par un antioxydant<sup>2</sup>. Le potentiel de réduction de l'échantillon ou de l'étalon convertit efficacement Cu<sup>+2</sup> en Cu<sup>+1</sup>, changeant ainsi l'absorbance maximum, comme elle est montrée dans la figure20. Ce complexe de cuivre réduit donne une absorption maximum à 450 nm [7].



**Figure 20.** Réduction de Neocupronin/Copper (II) complexe

#### **V. 1.4.2. Principe de la réaction :**

Le Cupric reducing antioxidant capacity est déterminé par la méthode CUPRAC, **Apak et al.** [15]

**\*Instrument utilisés :** lecteur de microplaque

### V.1.4.3. Mode opératoire :

1-Procédure :

\*Préparation des solutions :

- prendre  $m = 1,927$  g Acétate d'ammonium ( $\text{ACNH}_4$ ), puis ajouter 25 ml ( $\text{H}_2\text{O}$ ) → S1 transparent (PH=7.0)
- prendre  $m = 0,042625$  g ( $\text{Cu C}_{12}, 2\text{H}_2\text{O}$ ), puis ajouter 25 ml ( $\text{H}_2\text{O}$ ) → S2 bleu
- prendre  $m = 0,039$  g (Neocupronin) puis ajouter 25 ml (MeOH) → S3

2- Procédure :

Prendre 40  $\mu\text{l}$  extrait, puis ajouter «60  $\mu\text{l}$  (S1) + 50  $\mu\text{l}$  (S3) +50  $\mu\text{l}$  (S2) », l'attendre 1 heure, faire la lecture à 450nm

\*Les données :

$M(\text{Cu C}_{12}, 2\text{H}_2\text{O}) = 170,50$  g/mol

$M(\text{ACNH}_4) = 77$  g/mol

$M(\text{Neocupronin}) = 208,27$  g/mol

### V.1.5. Phenanthroline :

#### V.1.5.1. Principe de la réaction :

La 1,10-phénanthroline (o-phen) est utilisée dans l'enseignement pour caractériser l'ion ferreux  $\text{Fe}^{2+}$  en formant le tris (1,10-phénanthroline) Fe II appelé encore ferroïne :  $[\text{Fe}(\text{o-phen})^3]^{2+}$ , complexe rougeorangé. Il a été montré dans l'article précédent [16] peut aussi être oxydé en tris (1,10-phénanthroline) Fe III ou ferriïne :  $[\text{Fe}(\text{o-phen})^3]^{3+}$ , complexe de couleur bleue. Ainsi, le couple  $[\text{Fe}(\text{o-phen})^3]^{3+} / [\text{Fe}(\text{o-phen})^3]^{2+}$  ou ferriïne / ferroïne constitue un indicateur redox dont le potentiel standard est égal à 1,06 V. La 1,10-phénanthroline est un chélatant par ses deux atomes d'azote donneurs de doublets électroniques, notamment vis-à-vis du fer II et du fer III. Et cela est moins connu, une base de **BRONSTED**.

L'activité de Phenanthroline est déterminée par la méthode de **Szydłowska-Czerniaka** [17]

\*Instrument utilisés :

Un lecteur de microplaque à 96 puits de volume 200  $\mu\text{l}$  pour chaque puits

\*Réactifs utilisés :

- 1- Phenanthroline
- 2- Ferric chloride  $\text{FeCl}_3$
- 3- MeOH, Eau distillée
- 4- BHT

5- BHA

**V.1.5.2. Mode opératoire :****\*Préparation :**

- Phenanthroline (0.5%) : prendre 0.05g de 1,10-Phenanthroline dans 10ml de MeOH
- Ferric chloride FeCl<sub>3</sub> (0.2%) : prendre 0.02g de FeCl<sub>3</sub> dans 10ml de H<sub>2</sub>O

**\*Procédure :**

- prendre 10 µl extrait puis ajout 50 µl FeCl<sub>3</sub> (0.2%) ,30 µl Phenanthroline (0.5%) et 110µl MeOH. L'incubation à l'obscurité pendant 20 min à 30°C, faire la lecture à 510 nm. Le BHT est utilisé comme standard.

**V.2. Détermination de l'activité Anti cholinestérase :**

L'activité cholinestérasique est mesurée au niveau de trois compartiments : sang total dilué au 1/100, plasma dilué au 1/20 et érythrocytes dilués au 1/100 par la méthode colorimétrique de Ellman [18]. Le substrat utilisé est l'iodure de butyryl thiocholine (pour BChE), qui est hydrolysé respectivement en acide butyrique et en thiocholine, Le groupement thiol de la thiocholine réduit le DTNB en TNB (acide 5-thio (2-nitrobenzoïque)), composé jaune qui possède une absorbance maximale à 412-415 nm. L'augmentation de la coloration dans le temps indique la formation de thiocholine qui est le reflet de l'activité de l'enzyme, selon la réaction suivante :

BChE

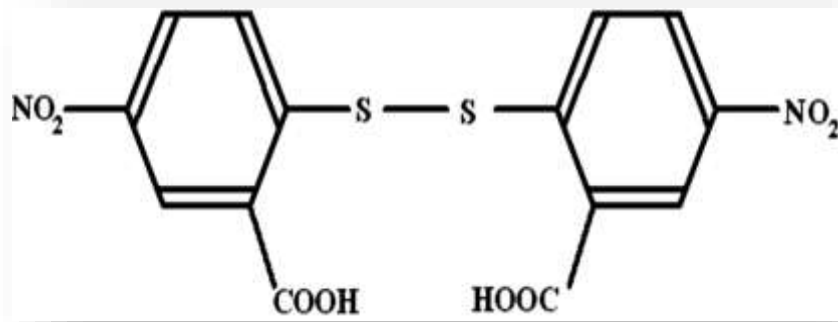


**BTC** : Iodure de butyryl thiocholine

**TC** : thiocholine

**DTNB** : dithiodinitrobenzène

**TNB** : thionitrobenzène



**Figure 21.** Acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque), DTNB ou réactif d'Ellman.

### **V.2.1. Principe de la réaction :**

L'activité Acetylcholinesterase et butyrylcholinesterase inhibitory activités est déterminée par la méthode d'Ellman [18]

#### **\*Instrument utilisé :**

Un spectrophotomètre à cuve de volume 3 ml ou un lecteur à microplaque

#### **\*Réactifs utilisés :**

- 1-  $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$
- 2-  $\text{NaH}_2\text{PO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$
- 3-  $\text{NaHCO}_3, \text{NaOH}$
- 4- DTNB
- 5- ACI (Acetylthiocholine iodide)
- 6- BuCI (S-Butyrylthiocholine iodide)
- 7- AChE
- 8- BChE
- 9- Galanthamine
- 10- Eau distillé, Ethanol

### **V.2.2. Mode opératoire (1) :**

#### **\*Procédure :**

#### **\*Solution tampon :**

1-prendre 8,890 g de ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$ ) dans un 500 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  → V1

2-prendre 1,56 g de ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$ ) dans un 100 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  → V2

Mélange « V1 +V2 » → Solution Tampon comme le montre le tableau suivant

On ajoute du NaOH pour augmenter la valeur du PH



PH	5,8	6,2	6,4	6,6	6,8	7	7,2	7,4	7,6	7,7	8
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (ml)	92	81,5	73,5	62,5	51	39	38	19	13	8,5	5,3
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (ml)	8	18,5	26,5	37,5	49	61	72	81	87	91,5	94,5

**Tableau 4** : préparation de solution tampon**\*Préparation DTNB (5,5'-Dithiobis (2-nitro-benzoic acid)) Solution:**

Prendre 16 mg DTNB dans un 1 ml Tampon (PH=7), puis ajouter 7,5 mg NaHCO<sub>3</sub> dans un 1 ml Tampon (PH=7), 2 ml Tampon (PH=7) et 4 ml Tampon (PH=8) → volume total 8 ml

**\*Préparations ACI (Acetylthiocholine iodide) substrate Solution :**

Prendre 16 mg ACI dans un 4 ml H<sub>2</sub>O dans un 4 ml Tampon (PH =8)

**\*Préparation BuCI (S-Butyrylthiocholine iodide) substrate Solution:**

Prendre 4 mg BuCI dans un 4 ml H<sub>2</sub>O dans un 4 ml Tampon (PH =8)

**V.2.3. Mode opératoire (2) :**

**\*Préparation des enzymes :**

**1- AChE Solution :**

- Prendre 0,2 mg AChE +dans un 4 ml Tampon (PH=8) pour donner la solution A
- Mettre 20 µl de la solution A dans 20 eppendorfs
- Prendre un seul eppendorfs qui contient 20 µl de la solution A puis ajouter 3 ml Tampon de PH = 8, faire le contrôlé l'absorbance à 412 nm qui doit être entre 0.4-0.5

**2- BChE Solution :**

- Prendre 0,2 mg AChE dans un 1 ml Tampon (PH=8) pour donner la solution A
- Mettre 20 µl de la solution A dans 20 eppendorfs
- Prendre un seul eppendorfs qui contient 20 µl de la solution A et on ajoute 2 ml Tampon de PH = 8 + contrôlé l'absorbance à 412 nm qui doit être entre 0.4-0.5

**\*Procédure :**

Prendre 150 µL « 100 Mm » sodium phosphate buffer (pH 8.0) puis ajouter 10 µL d'extrait solution dissous dans l'éthanol a différentes concentrations + 20 µL AChE ( $5.32 \times 10^{-3}$  U) ou BChE ( $6.85 \times 10^{-3}$  U) solution. Incubé a 25°C pendant 15 mn après additionner 10 µL de DTNB (0.5 mM) et 10 µL de acetylthiocholine iodide (0.71 mM) ou 10 µL de butyrylthiocholine chloride (0.2 mM).

Le pourcentage d'inhibition d'AChE ou BChE enzymes est déterminé par rapport au blanc (éthanol avec le phosphate buffer pH 8) par la formule  $(E - S) / E * 100$ .

E : l'activité de l'enzyme sans extrait / S : l'activité de l'enzyme avec l'extrait

Le Galanthamine est utilisé comme référence.

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE:**

- [1] **Mazari K, Bendimerad N, Bekhechi C.** «Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Algerian *Juniperus phoenicea* L. and *Cupressus sempervirens* L». *Journal of Medicinal Plants Research* 2010.p.959-64.
- [2] **BAZIN B, THEVENOT R, BURSAUX C, PARIS J.** «Effect of nomegestrol acetate, a new 19-nor-progesterone derivative, on pituitary-ovarian function in women. »*BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 1987.p.1199-204.
- [3] **Rougeul A, Bouyer J, Dedet L, Debray O.** «Fast somato-parietal rhythms during combined focal attention and immobility in baboon and squirrel monkey. » *Electroencephalography and clinical neurophysiology* 1979.p.46:310-9.
- [4] **Singleton VL, Rossi JA.** «Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. » *American journal of Enology and Viticulture* 1965; 16.p.144-58.
- [5] **Müller L, Gnoyke S, Popken AM, Böhm V.** « Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. » *LWT-Food Science and Technology* 2010.p.992-9.
- [6] **Topçu G, Ay M, Bilici A, Sarıkürkcü C, Öztürk M, Ulubelen A.** « A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*». *Food Chemistry* 2007.p.816-22.
- [7] **Mustafa Özyürek, Nilay Güngör, Sefa Baki, Kubilay Güçlü, and Reşat Apak.** « Development of a Silver Nanoparticle-Based Method for the Antioxidant Capacity Measurement of Polyphenols», *Analytical Chemistry* 2012
- [8] **Blois MS.** «Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. » *Nature* 1958.p.1199-200.
- [9] **Popovici C, Saykova I, Tylkowski B.** « Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. » 2010.
- [10] **Atmani D, Chaher N, Berboucha M, Ayouni K, Lounis H, Boudaoud H, et al.** « Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. » *Food Chemistry* 2009.p.303-9.
- [11] **Molyneux P.** «The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. » *Songklanakarin J sci technol* 2004.p.211-9.
- [12] **Maataoui B, Hmyene A, Hilali S.** « Activités anti radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie [*Opuntia ficus indica*]. » *Lebanese science journal* 2006.p.3-8.
-

- [13] **Ak T, Gülçin İ.** Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. » *Chemico-biological interactions* 2008.p.27-37.
- [14] **Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C.** « Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. » *Free radical biology and medicine* 1999.p.1231-7.
- [15] **Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Karademir SE.** «Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of Neocupronin: CUPRAC method. » *Journal of agricultural and food chemistry* 2004.p.7970-81.
- [16] **BERGOUNHOU C, DENIEL M, LEVY G.** «Protonation de la 1, 10-phénanthroline. »
- [17] **Szydłowska-Czerniak A, Dianoczki C, Recseg K, Karlovits G, Szlyk E.** « Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. » *Talanta* 2008.p.899-905.
- [18] **Ellman GL, Courtney KD, Andres Jr V, Featherstone RM.** « A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. » *Biochemical pharmacology* 1961.p.88-95.

# **Chapitre III : Résultats Et Discussion**



**I. Résultats et discussion de screening phytochimique :**

Les essais chimiques de caractérisation portent sur la recherche, dans les parties aériennes (fleurs et tiges) de la plante *Anacyclus valentinus* des principaux groupes de substances chimiques de métabolisme secondaire. Ils permettent d'avoir des informations préliminaires sur la composition chimique de la matière végétale, en utilisant principalement des réactions en tubes (réactions de coloration et /ou des réactions de précipitation). Les résultats sont classés selon :




\*Une réaction positive est représentée par : +.



\*L'absence de la substance est représentée par : -.

Les résultats de la mise en évidence de quelques métabolites secondaires dans la plante *Anacyclus valentinus* traduisent dans le tableau ci-dessous

**Tableau 5 :** Résultats des tests préliminaires

		<b>Test appliqué :</b>	<b>Résultats</b>
<b>Les métabolites secondaires :</b>			
<b>Les amidons :</b>	Test au réactif D'amidon		-
	<b>Les saponosides :</b>	Test à la mousse	+ 
<b>Les tanins galliques :</b>	Test au chlorure De fer		+ 

<b>Les anthocyanes :</b>	Test de Folin Ciocalteu	-
<b>Les flavonoïdes :</b>	Test de Shenoda	+ 
<b>Les tanins cathéiques :</b>	Test au chlorure De fer	+ 
<b>Les composés réducteurs :</b>	Test de Fehling	-
<b>Les coumarines :</b>	Test de Pechman	+ 

<b>Les alcaloïdes :</b>	Test au réactif De Wagner	+ 
<b>Les hétérosides tri terpéniques :</b>	Test de Salkouski	+ 

## II. Extraction :

L'extraction de l'espèce *Anacyclus valentinus* par macération successive dans trois solvants et la partition entre les différents solvants nous ont permis d'obtenir les extraits suivants :

- **Extrait diéthylother :** obtenue après affrontement par le diéthyl éther, ce dernier qui permet d'extraire des composés apolaires.
- **Extrait diéthylother/ méthanol :** obtenue après affrontement par le diéthylother/méthanol, ce dernier qui permet d'extraire les composés moyennement polaires.
- **Extrait Méthanolique :** obtenue après affrontement par le méthanol, ce dernier qui permet d'extraire les molécules polaires.



**II.1. Rendement des Extraits :**

Le rendement le plus élevé est l'extrait Du Méthanolique à 9.49%, suivi par l'extrait du diéthylether/méthanol à 4.643%, l'autre extrait du diéthylether a été obtenu avec un faible rendement de 1.79%.

**Tableau 6 :** rendements des extraits

<i>Extraits</i>	<i>Extrait01 :</i> <i>Diéthylether</i>	<i>Extrait02 :</i> <i>Diéthylether/ Méthanol</i>	<i>Extrait03 :</i> <i>Méthanol</i>
<i>Rendements</i>			
<b>R</b>	1.790%	4.643%	9.497%

**II.2. Analyse des extraits par CCM :**

Pour chaque extrait obtenu, nous avons prélevé une prise infiniment petite et la diluée dans un solvant convenable, les solutions diluées ainsi obtenues ont été analysés par CCM en utilisant des différents mélanges d'éluant.

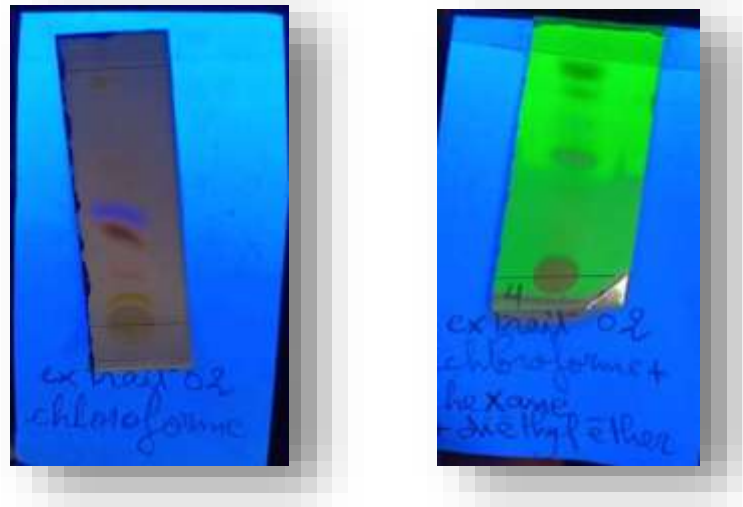
La plaque CCM est soumise sous la lumière UV pour examiner la richesse des extraits



**Figure22.** Plaque CCM de l'extrait 01  
Sous la lumière UV



**Figure23.** Plaque CCM de l'extrait 03  
sous la lumière UV

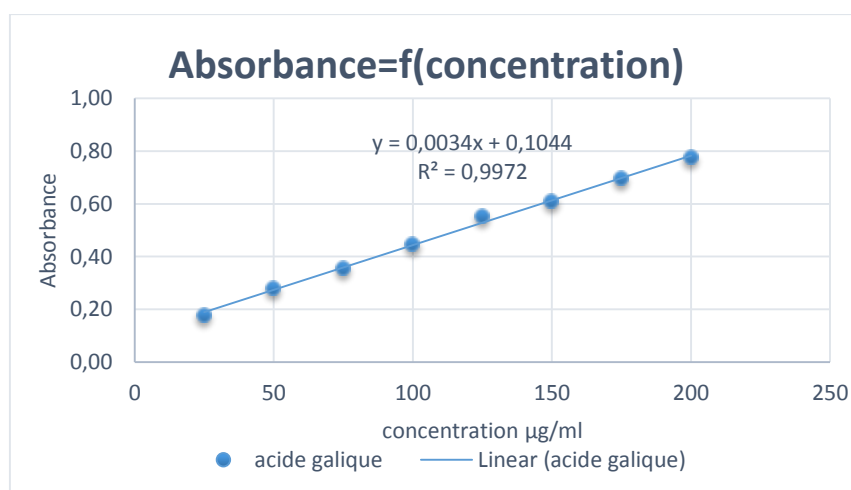


**Figure 24.** plaque CCM de l'extrait 02 sous la lumière UV

### **III. Résultats du dosage des polyphénols et des flavonoïdes :**

#### **III. 1. Résultat du dosage des polyphénols :**

La détermination de la teneur en polyphénols dans l'extrait MeOH est estimée par la méthode de Folin- Ciocalteu. La quantité de polyphénols correspondante a été exprimée par une courbe d'étalonnage linéaire qui a été rapportée en microgramme d'équivalents de l'étalon utilisé (acide gallique) par milligramme d'extrait ( $\mu\text{gEAG}/\text{mg}$ ) et déterminé par l'équation de type :  $Y=0,0034x+0,1044$  avec  $R^2=0,9972$ . La courbe est représentée dans la figure suivante :



**Figure 25.** Représentation de la courbe linéaire de l'acide gallique (courbe d'étalonnage).

Les résultats concernant les quantités des polyphénols présents dans l'extrait sont reportés dans le tableau suivant :

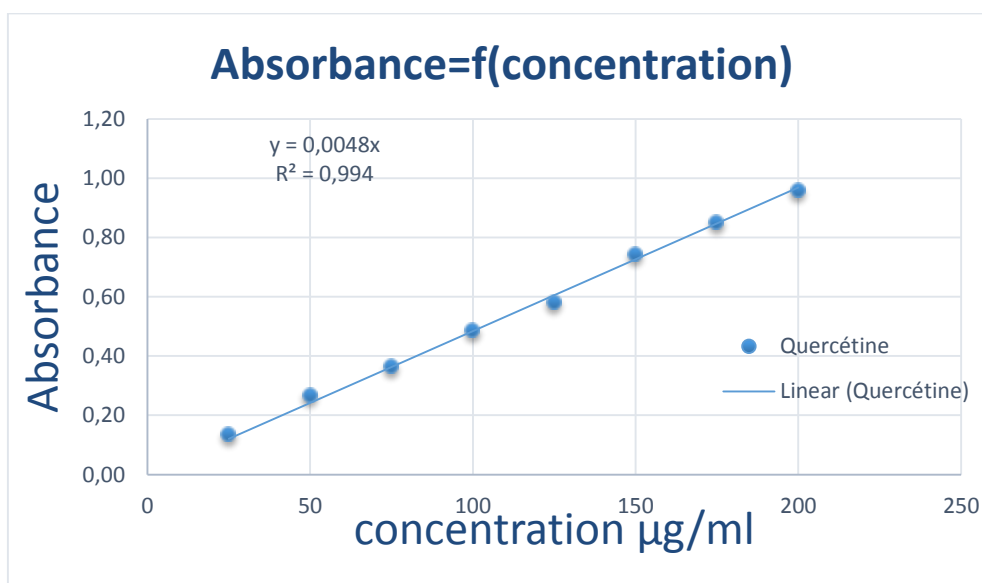
**Tableau 7 :** Taux des polyphénols totaux dans l'extrait MeOH

Extrait :	MeOH :
TPC « polyphénols » ( $\mu\text{gEAG/mg}$ )	273.41178 $\pm$ 23.90

### III. 2. Résultat du dosage des flavonoïdes :

La teneur en flavonoïdes a été déterminée par la méthode du trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) pour l'extrait et a été rapportée en  $\mu\text{g}$  d'équivalent de Quercétine /mg d'extrait. Les résultats sont exprimés en fonction de la courbe d'étalonnage qui suit une équation de type :

$Y=0,0048x$  sachant que  $R^2=0,994$ . La courbe est représentée dans la figure suivante :



**Figure 26.** Représentation du taux de flavonoïdes par la courbe linéaire de Quercétine.

La quantification des flavonoïdes dans l'extrait a été représentée dans le tableau suivant :

**Tableau 8 :** Taux des flavonoïdes totaux dans l'extrait MeOH

Extrait :	MeOH :
TFC « flavonoïdes » ( $\mu\text{gEQ}/\text{mg}$ )	206.5972 $\pm$ 6.85

Les résultats obtenus montrent que l'extrait MeOH est plus riche en polyphénols qu'en flavonoïdes. Il est à noter que généralement, les polyphénols sont largement distribués dans le règne végétal et sont les métabolites secondaires les plus abondants dans les plantes. Ce résultat, est en accord avec beaucoup d'autres études, qui montrent que la plus grande proportion des composés phénoliques se trouve dans les extraits polaires.

#### ***IV. Résultats des activités biologiques :***

##### ***IV. 1. Résultat de l'activité antioxydant :***

L'activité antioxydant exprime la capacité de réduction des radicaux libres, ces radicaux libres sont tant décrits dans diverses pathologies. Dans le but de pallier le système de défense endogène, les recherches s'orientent dans la découverte des molécules antioxydantes.

Ainsi pour évaluer l'activité antioxydant de notre extrait, nous avons employé :

##### ***IV.1.1. Activité anti radicalaire du DPPH :***

L'activité antioxydante de notre extrait a été évaluée en suivant la réduction du radical DPPH qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517.

Pour l'étude de l'extrait de notre espèce, les antioxydants standards utilisés sont le BHA, le BHT et le  $\alpha$ -Tocophérol.

La figure 27 représente le pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations des standards et de l'extrait Méthanolique.

##### **➤ Calcule d'IC50 :**

IC50 : Pour chaque extrait nous avons déterminé la valeur IC50 qui est la concentration de

L'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH. Les pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations de l'extrait testées et les standards.

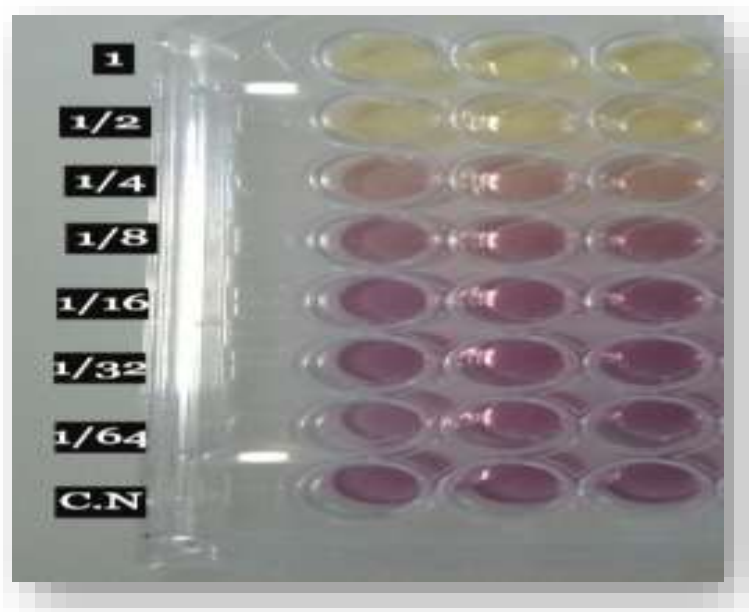
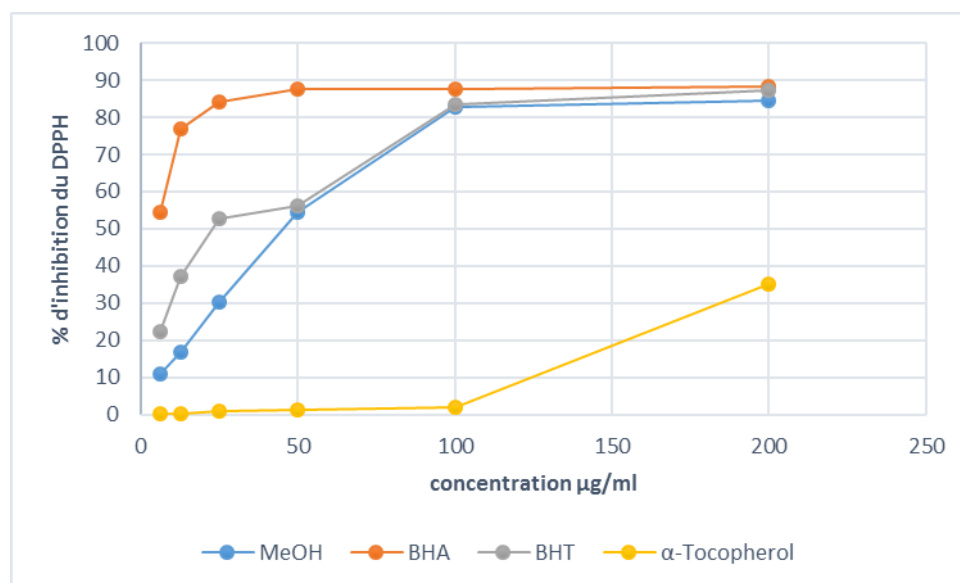


Figure 27. Microplaques de dosage du DPPH

Tableau 9 : Inhibition du radical DPPH par de l'extraits MeOH.

Extraits	3.125 µg	6.12 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	IC50 µg/ml
<b>% Inhibition</b>								
<b>MeOH</b>	20,67± 10,61	10,91± 1,19	16,84± 1,50	30,18± 0,73	54,45± 5,95	82,64± 0,39	84,60± 0,37	49,80± 3,77
<b>BHA</b>	28,95± 1,16	54,33± 1,59	76,76± 1,65	84,09± 0,35	87,53± 0,82	87,73± 0,15	88,43± 0,23	5,73± 0,41
<b>BHT</b>	11,69± 1,88	22,21± 1,30	37,12± 1,80	52,63± 2,70	56,02± 0,53	83,60± 0,23	87,28± 0,26	22,32± 1,19
<b>α-Tocophérol</b>	0,16± 0,00	0,21± 0,03	0,35± 0,03	0,73± 0,03	1,37± 0,08	1,81± 0,09	34,93± 2,38	0,11± 0,00



**Figure 28.** Le pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations

✓ on observe que la valeur de l'IC<sub>50</sub> de l'extrait méthanolique ( $49,80 \pm 3,77$ ) est plus grande que les valeurs de IC<sub>50</sub> des standards BHA ( $5,073 \pm 0,41$ ), BHT ( $22,32 \pm 1,19$ ) et tocopherolrol ( $0,11 \pm 0,00$ ) donc L'extrait méthanolique a présenté une faible activité antiradicalaire par rapport standards malgré sa richesse en polyphénols.

#### ***IV. 1.2. Activité du piégeage de l'ABTS :***

La méthode d'ABTS est basée sur la capacité d'une molécule à piéger le radical ABTS●<sup>+</sup> de couleur bleu pour le convertir à la forme non radicalaire sans couleur Pour déterminer les valeurs IC<sub>50</sub>, nous avons tracé les courbes de variations de Pourcentages d'inhibition (I%) avec les concentrations d'extrait.

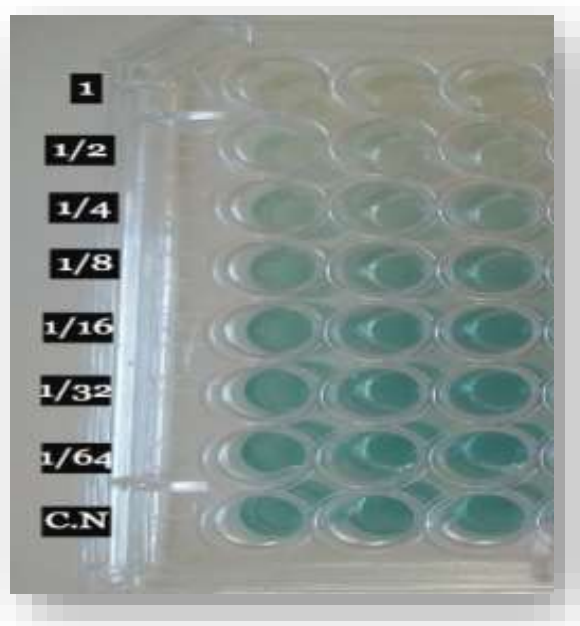
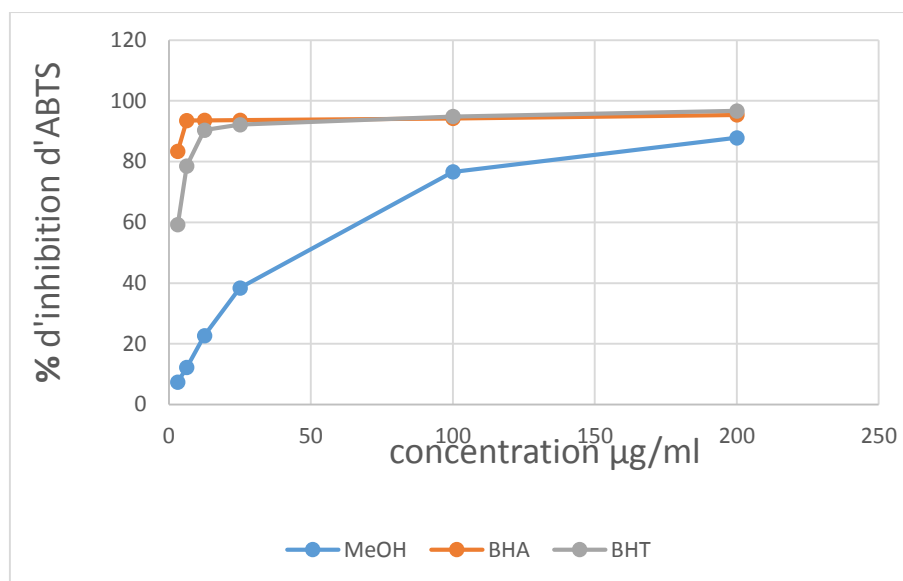


Figure 29. Microplaque de dosage de l'ABTS

Tableau 10 : Inhibition du radical ABTS par l'extrait *MeOH*.

Extraits	3.125	6.12	12.5	25	50	100	200	IC50
	% Mg	% µg	% µg	% µg	% µg	% µg	% µg	% µg/ml
Inhibition								
<b>MeOH</b>	7.42±	12.25±	22.70±	38.44±	58.91±	76.64±	87.85±	42.03±
	2.92	376	1.92	1.24	3.08	2.62	2.01	2.38
<b>BHA</b>	83.42±	93.52±	93.58±	93.63±	93.63±	94.20±	95.39±	1.81±
	4.09	0.09	0.09	0.16	0.9593	0.90	2.62	0.10
<b>BHT</b>	59.22±	78.55±	90.36±	92.18±	37±	94.87±	96.68±	1.29±
	0.59	3.43	0.00	1.27	0.86	0.87	0.39	0.30



**Figure 30.** Le pourcentage d'inhibition d'ABTS en fonction des concentrations

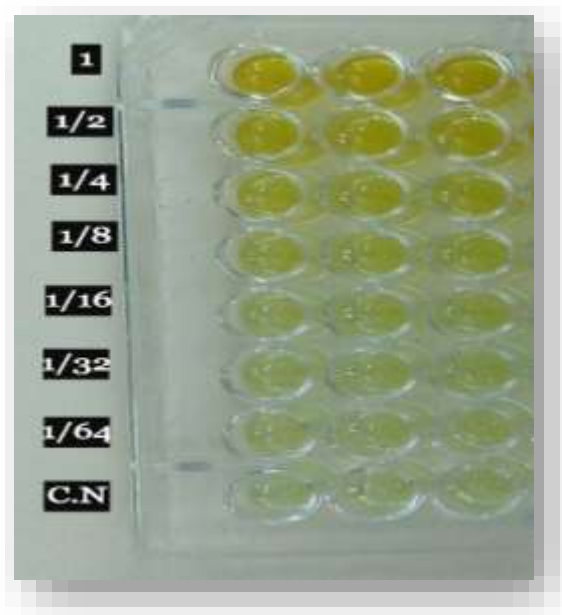
✓ Ce test confirme les résultats du test précédent, l'activité antiradicalaire de l'extrait méthanolique ( $IC_{50} = 42.03 \pm 2.38$ ) est plus faible que l'activité des standards BHA  $IC_{50} (1.81 \pm 0.10)$  BHT  $IC_{50} (1.29 \pm 0.30)$ .



**IV. 1.3. Activité antioxydant CUPRAC :**

La méthode CUPRAC est basée sur la réduction de  $Cu^{+2}$  en  $Cu^{+1}$  par des réducteurs (Antioxydants) présents dans l'extrait (Nemati et al. 2017).

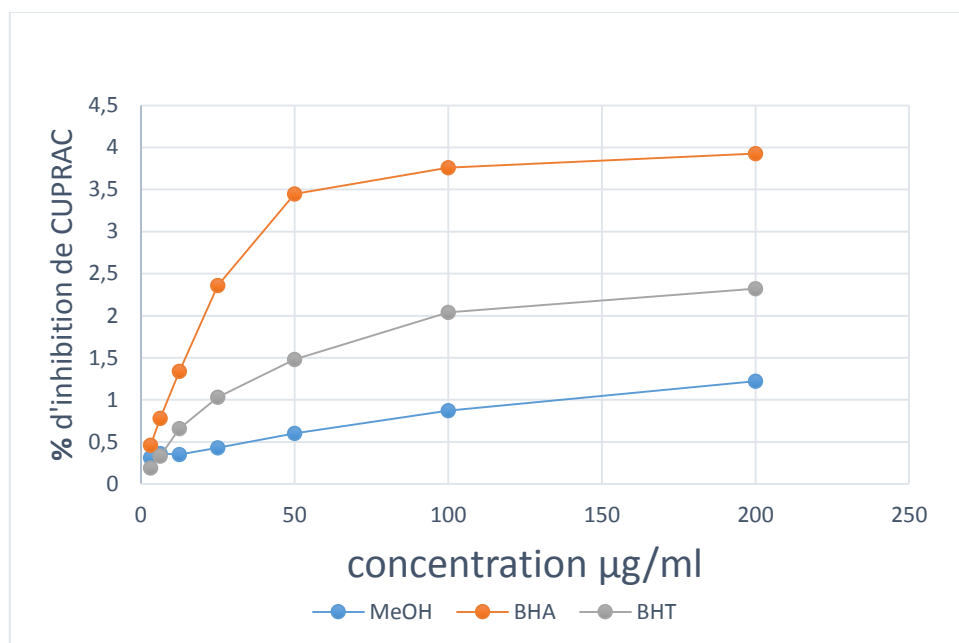
La couleur jaune-orange est due au composé  $Cu(I)$ -Nc formé. Les essais sont répétés trois fois



**Figure 31.** Microplaque de dosage de CUPRAC

**Tableau 11 :** Inhibition du radical CUPRAC par l'extrait MeOH.

Extraits	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200	A0.50
	µg	µg	µg	µg	µg	µg	µg	µg/mL
% Inhibition								
<b>MeOH</b>	0,31±	0,36±	0,35±	0,43±	0,60±	0,87±	1,22±	35.26±
	0.04	0.06	0.01	0.01	0.01	0.05	0.05	1.40
<b>BHA</b>	0.46±	0.78±	1.34±	2.36±	3.45±	3.76±	3.93±	3.64±
	0.00	0.01	0.08	0.17	0.02	0.03	0.01	0.19
<b>BHT</b>	0.19±	0.33±	0.66±	1.03±	1.48±	2.04±	2.32±	9.62±
	0.01	0.04	0.07	0.07	0.09	0.14	0.28	0.87



**Figure 32.** Le pourcentage d'inhibition de CUPRAC en fonction des concentrations

✓ L'effet réducteur de l'extrait est présenté par la valeur de concentration à l'absorbance 0.50, l'extrait Méthanolique présente la concentration la plus grande avec une valeur de ( $IC_{50} = 35.26 \pm 1.40$ )  $\mu\text{g/ml}$  comparativement aux standards, on peut dire que l'extrait Méthanolique a révélé d'être capable de réduire le cuivre.

Toutefois les deux standards BHA  $IC_{50}$  ( $3.64 \pm 0.19$ ) BHT  $IC_{50}$  ( $9.62 \pm 0.87$ ) montrent un pouvoir réducteur de cuivre plus important que celui de l'extrait Méthanolique.

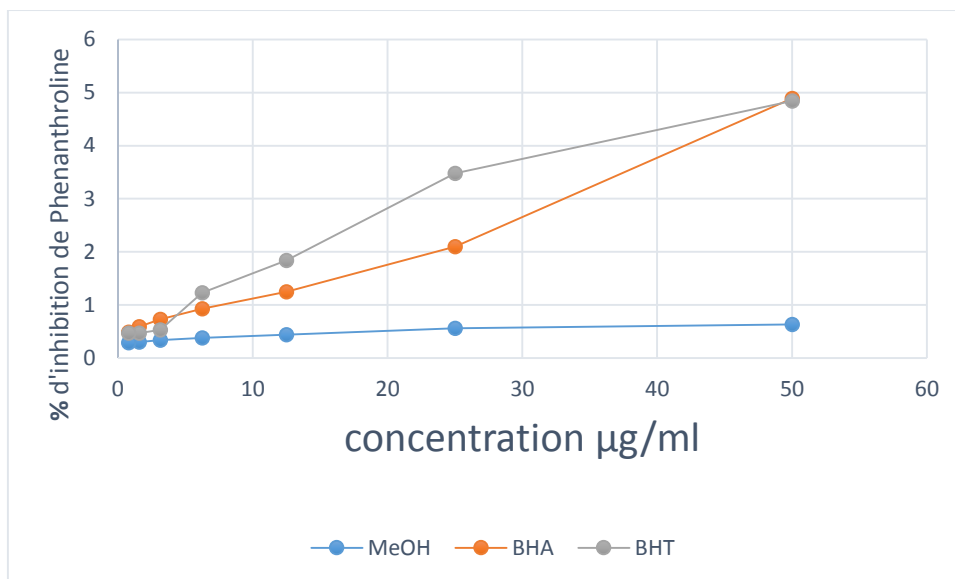
IV. 1.4. Activité antioxydant de Phenanthroline :



Figure 33. Microplaque de dosage de Phenanthroline

Tableau 12 : Inhibition du radical Phenanthroline par l'extrait MeOH.

Extraits	0.78125 1.5625 3.125 6.25 12.5 25 50 A0.50								
	%	µg	µg	µg	µg	µg	µg	µg	µg/mL
Inhibition									
MeOH	0,29±	0,30±	0,34±	0,38±	0,44±	0,56±	0,63±	19.83±	
	0.00	0.00	0.02	0.00	0.01	0.05	0.24	3.01	
BHA	0,49±	0,59±	0,73±	0,93±	1,25±	2,10±	4,89±	0,93±	
	0,01	0,01	0,02	0,01	0,04	0,05	0,06	0,07	
BHT	0,47±	0,47±	0,53±	1,23±	1,84±	3,48±	4,84±	2,24±	
	0,01	0,01	0,03	0,02	0,01	0,03	0,01	0,17	



**Figure 34.** Le pourcentage d'inhibition de Phenanthroline en fonction des concentrations

✓ L'extrait méthanolique a présenté une faible activité antiradicalaire de ( $IC_{50} = 19.83 \pm 3.01$ ), en comparaison avec les standards BHA  $IC_{50} (0,93 \pm 0,07)$  BHT  $IC_{50} (2,24 \pm 0,17)$ .

IV. 1.5. Activité antioxydant de SNP :



Figure 35. Microplaque de dosage de SNP

Tableau 13 : IC<sub>50</sub> μg/mL SNP par l'extrait MeOH.

Extraits :	MeOH :	Trolox :
IC <sub>50</sub> μg/mL	82.19±1.04	0.67±0.01

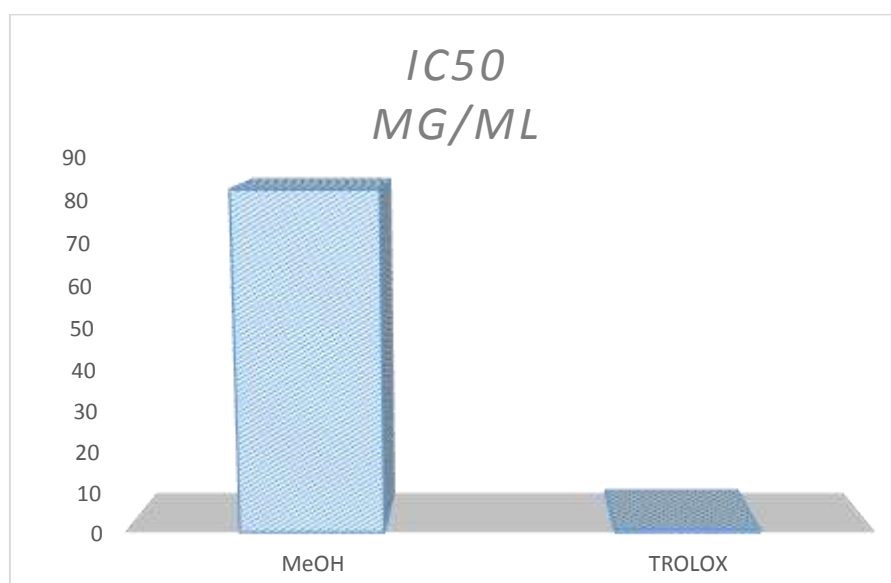
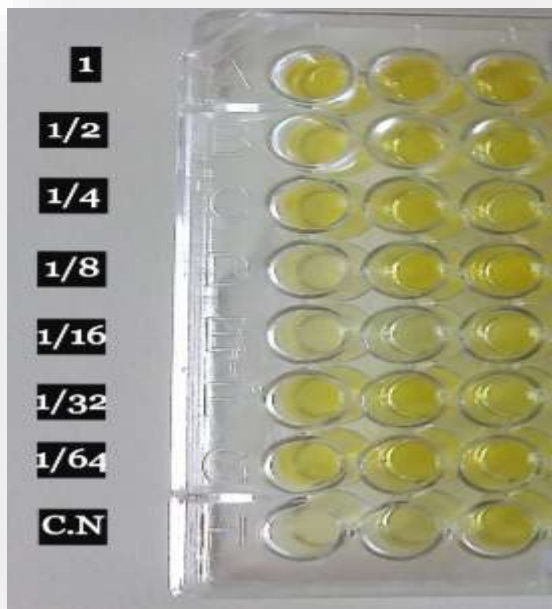


Figure 36. Activité antiradicalaire (SNP) des extraits d'*Anacyclus Valentinus.L*

✓ L'extrait méthanolique a présenté une très faible activité antiradicalaire de (IC 50 = 82.16± 1.04), en comparaison avec le standard Trolox IC<sub>50</sub>(0.67±0.01).

**IV. 2. Résultat de l'activité anticholinésterase :**

L'apparition de la couleur jaune indique que cet extrait ne possède aucune activité Anticholinésterase (figure 37)



**Figure 37.** Microplaque de dosage d'anticholinésterase

Notre résultat, concernant la famille des *Astraceae* plus exactement l'espèce : *Anacyclus* *Valentinus.L* montre aucune capacité d'inhibition de l'Ache.

# *Conclusion*

## *Générale*



### Conclusion générale :

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. Une étude des propriétés antioxydante et anticholinésterase d'une plante appartient à la famille des *Astraceas* très fréquemment employée en Algérie.

L'objectif principal de notre travail est d'évaluer la plante spontanée d'une famille largement utilisée en médecine traditionnelle. Sélectionnées parmi les espèces les moins étudiées, en tenant compte de leur nature endémique. Ce travail est donc une contribution à une meilleure connaissance du *Anacyclus valentinus* algérien.

D'abord, un screening phytochimique, les résultats montrent une composition riche et variée en métabolites secondaires, des flavonoïdes, coumarines, alcaloïdes tanins, triterpènes, et des saponosides. Ensuite L'extraction des principes actifs est effectuée par trois solvants qui sont: diéthyloether, diéthyloether/méthanol et le méthanol , le rendement le plus élevé est de l'extrait méthanolique à 9.497% , suivi par l'extrait de diéthyloether/ méthanol à 4.643% , l' autre extrait obtenu ( diéthyloether) a été avec un faible rendement qui est 1.79% ..Le pouvoir anti radicalaire d' extrait testée (MeOH) a été déterminé par les méthodes de DPPH ,ABTS , CUPRAC , Phenanthroline et SNP dont les résultats montrent que l' extrait MeOH possèdent une faible activité antioxydante par rapport au standards étudiés ,mais elle reste acceptable par rapport aux autres extraits végétales. Ces méthodes ont confirmé les propriétés puissantes que possèdent les polyphénols à piéger les radicaux libres, la détermination des taux des polyphénols et flavonoïdes a été basé sur des méthodes colorimétrique et les résultats ont révélés une richesse en polyphénols beaucoup plus importante qu'en flavonoïde.

Les résultats des tests de l'activité anticholinésterase appliqué sur notre extrait montrent aucune capacité d'inhibition de l'AchE.

Notre étude de la plante médicinale *Anacyclus valentinus* est très riche en différents composés métaboliques et présente une activité antioxydante acceptable antioxydante dans le domaine pharmaceutique.



# Résumé

Dans le cadre de la découverte de nouveaux antioxydants à partir des sources naturelles, nous nous sommes intéressés dans ce travail à l'étude et l'évaluation des propriétés antioxydants de l'extrait (MeOH) de plante *Anacyclus valentinus* par quelques méthodes (DPPH, ABTS, CUPRAC, Phenanthroline et SNP).

Les résultats obtenus de l'évaluation de l'activité antioxydant ont donné une bonne efficacité antioxydante de l'extrait méthanolique (MeOH), pour DPPH (IC<sub>50</sub>%=49.80µg/ml), pour ABTS (IC<sub>50</sub>=42.03µg/ml) et pour CUPRAC (IC<sub>50</sub>= 35.26µg/ml), pour Phenanthroline (IC<sub>50</sub>=19.83g/ml), pour SNP (IC<sub>50</sub>=82.16g/ml).

Le dosage quantitatif des flavonoïdes et des polyphénols témoigne la richesse de l'extrait méthanoliques (MeOH) en polyphénols et plus qu'en flavonoïdes.

Pour les résultats de l'activité anticholinésterase nous avons réalisé les tests d'activité anticholinésterase sur notre extrait pour faire comparer avec galanthamine, L'action thérapeutique des 'inhibiteurs cholinésterase est essentiellement due à l'inhibition de l'acétylcholinésterase, on observe qu'il n'a aucune capacité d'inhibition de l'Ache donc la plante *Anacyclus valentinus* n'a pas une activité cholinésterase.

**Mot clés :** *Anacyclus valentinus*, activité antioxydant, activité anticholinésterase, polyphénols, flavonoïde, Dpph, Cuprac, ABTS, SNP, Phenanthroline.

# Abstract

As part of the discovery of new antioxidants from the sources natural, we are interested in this work in the study and evaluation of antioxidant properties of metanolic extract of *Anacyclus valentinus* *Anacyclus valentinus* by some methods (DPPH, ABTS, CUPRAC, Phenanthroline and SNP).

The results obtained from the evaluation of the antioxidant activity gave a good antioxidant efficacy of metanolic extract (MeOH), for DPPH (IC<sub>50</sub>% = 49.80µg / ml), for ABTS (IC<sub>50</sub> = 42.03µg / ml) and for CUPRAC (IC<sub>50</sub> = 35.26µg / ml), for Phenanthroline (IC<sub>50</sub> = 19.83g / ml), for SNP (IC<sub>50</sub> = 82.16g / ml)

The quantitative dosage of flavonoids and polyphenols testifies to the richness of methanol extract in polyphenols and more than in flavonoids.

For results of anticholinesterase activity, we carried out the anticholinesterase activity tests on our extract to compare with galanthamine, the therapeutic action of cholinesterase inhibitors is essentially due to the inhibition of acetylcholinesterase, it is observed that there is no capacity to inhibit | Therefore, the plant *Anacyclus valentinus* does not have cholinesterase activity.

**Keywords:** *Anacyclus valentinus*, antioxidant activity, anticholinesterase activity, polyphenols, flavonoids, Dpph, Cuprac, ABTS, SNP, Phenanthroline.

# ملخص

كجزء من اكتشاف مضادات الأكسدة الجديدة من المصادر طبيعية ، نحن مهتمون في هذا العمل بدراسة وتقييم الخصائص المضادة للأكسدة للمستخلص الميثانولي (MeOH) لنبته *Anacyclus valentinus* بخمسة طرق كيميائية (DPPH و ABTS و CUPRAC و Phenanthroline و SNP) أعطت النتائج التي تم الحصول عليها من تقييم النشاط المضاد للأكسدة فعالية جيدة مضادة للأكسدة للمستخلص الميثانولي (MeOH) DPPH (IC<sub>50</sub> = 49.80 % / ميكروغرام / مل) ، ABTS (IC<sub>50</sub> = 42.03 / ميكروغرام / مل) وكوبراك (IC<sub>50</sub> = 35.26 / ميكروغرام / مل) ، للفينانثرولين (IC<sub>50</sub> = 19.83 / مل) ، من أجل (IC<sub>50</sub> = 82.16 / مل) SNP.

تشهد التقدير الكمي للمركبات الفلافونويدية والبوليفينول على ثراء المستخلص الميثانولي (MeOH) بالبوليفينول وبكمية اقل بالمركبات الفلافونويدية. لم يظهر المستخلص الميثانولي أي نشاط تثبيطي ضد الزهايمر.

**الكلمات المفتاحية:** *Anacyclus valentinus* ، نشاط مضاد للأكسدة ، البوليفينول ، الفلافونويد ، Dpph ، Cuprac ، ABTS ، SNP ، الفينانثرولين.