

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA



FACULTE DE SCIENCES  
DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE ET BIOCHIMIE  
FILIERE : BIOLOGIE  
OPTION : BIOCHIMIE APPLIQUEE

**Mémoire présenté pour obtenir du diplôme  
Master académique**

**Par : FILLALI Imene  
AKRIB Nassiba  
AMARA Assia**

**Intitulé**

**Evaluation colorimétrique *in vitro* des activités  
antioxydante, antidiabétique et anti-Alzheimer des extraits  
de la plante *Ptychotis verticillata* L.**

**Promoteur  
Président  
Examineur**

Dr. BOUHADDA Amina  
Dr. HARRAR Abdnasser  
Dr. SAGHIRA Bisset

Univ-MB, M'sila  
Univ-MB, M'sila  
Univ-MB, M'sila

**Année universitaire : 2021 /2022**

# **Remerciement**

*Ce mémoire n'aurait pas pu être ce qu'il est, sans l'aide d'ALLAH qui nous a donné la force afin de l'accomplir.*

*Tout d'abord nous tenons surtout à adresser nos plus vifs remerciements à notre promotrice **Dr. BOUHADDA Amina**, université de M'sila, qui nous a fait l'honneur de réaliser ce travail sous sa direction.*

*Nos remerciements s'adressent aussi à l'équipe du centre de recherche en biotechnologie (CRBt) à Constantine où nous avons réalisé la pratique de notre recherche, sous l'orientation du **Dr. kADI Imededdine**, laboratoire de pharmacologie-Toxicologie*

*Nous tenons à exprimer notre vive reconnaissance à **Dr. HARRAR Abdnasser** et **Dr. SAGHIRA Bisset**, Maîtres de conférences à l'Université Mohamed Boudiaf de M'sila, pour avoir accepté de juger ce travail et nous honorer de leurs présences.*

*Nous remercions toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

*Un grand merci à tous*

# ***Dédicace***

*Je dédie ce travail à :*

*Les deux personnes les plus chères dans ma vie, mon père  
HASSAN et ma Mère BHAIJJA.*

*À mon cher mari IMEDEDINE*

*À mon très cher enfant YAZEN*

*À mes très chères Sœurs HOUDA et TAKOUA*

*À tous ceux qui me donnaient des encouragements et  
me souhaitaient du succès*

***IMENE***

# ***Dédicace***

*Avant toutes choses*

*Je remercie **ALLAH**, le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience pour réaliser ce travail.*

*Les deux personnes les plus chères à mon cœur, **mon père et ma Mère**, qui m'ont soutenue dans mes études, et pour leurs encouragements et leur amour.*

*À mon très cher mari **Ali**, en signe d'amour et de gratitude pour m'avoir supporté, soutenu et surtout compris en permanence, pour ces sacrifices, ces encouragements, sa fidélité et sa gentillesse. Sans lui, je ne saurais pu progresser et en arriver à l'achèvement de ce travail.*

*À mes très chères petits enfants, **Ahmed et KHadidja, CHahira** qui m'ont porté bonheur.*

*À ma belle-famille pour leur soutien moral et leur gentillesse.*

*À mes collègues de promotion Mastes Biochimie appliquée.*

**ASSIA**

# *Dédicace*

*A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, qu'Allah te garde, à toi mon père.*

*A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ; maman que j'adore.*

*A toi mon frère Hacem Qui m'a aidé et supporté dans les moments difficiles.*

*A mes chères sœurs :Soumia & Sakina*

*A ma merveilleuse nièce Quds & mon neveu adoré Muhamed*

*A mon adorable petite sœur Mizou qui n'a pas cessé de m'encourager et soutenir tout au long de mes études. Qu'Allah la protège et l'offre la chance et le bonheur.*

*A ma brillante tante :Fadila Pour son soutien moral et ses conseils précieux tout au long de mes études.*

*A ma chère trinôme Assia et toute sa famille*

*A ma chère trinôme Imene et son mari Dr Imad Kadi et leur adorable fils, Yazen*

*A ma source d'inspiration, mes formidables cadets de l'école des cadets de la Nation promo 2018-2022*

*A mes amies géniales :Nadia, Selma, Houyam, Amria, Fatima, Amel, Hala& Ratiba qui m'ont toujours encouragé*

*A toute ma famille, et a tous mes autres ami(e)s,*

*A tous ceux que j'aime et ceux qui m'aiment.*

**NOSSAIBA**

# Liste des figures

## Chapitre 01

Fig. I. 01 : La diversité fonctionnelle des métabolites secondaire.....	03
Fig. I. 02 : Classification structurale des polyphénols.....	05
Fig. I. 03 : Structure chimique de certaines molécules de type Alcaloïdes.....	06
Fig. I. 04 : Structure chimique de certaines molécules de type proto-alcaloïdes.....	07
Fig. I. 05 : Structure chimique de certaines molécules de type Pseudo-alcaloïdes.....	08
Fig. I. 06 : Classification des terpènes suivant le nombre d'unités d'isoprènes.....	11
Fig. I. 07 : <i>Ptychotis verticillata</i> L. en image.....	13

## Chapitre 02

Fig. II. 01 : Passage de l'état stable au radical libre et sa stabilisation de nouveau.....	15
Fig. II. 02 : Mécanisme d'action des antioxydants .....	19
Fig. II. 03 : Structures chimiques de quelques antioxydants synthétiques.....	20
Fig. II. 04 : Origine du stress oxydatif.....	21
Fig. II. 05 : Mécanisme de dysfonctionnement métabolique dans le DT 01.....	23
Fig. II. 06 : Mécanisme de dysfonctionnement de l'homéostasie du glucose dans le DT 02.....	23

## Chapitre 03

Fig. III. 01 : Schéma général de l'extraction et le fractionnement des extraits étudié.....	27
Fig. III. 02 : mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon (DPPH).....	28
Fig. III. 03 : mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon (ABTS).....	28
Fig. III. 04 : mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon (FRAP).....	29
Fig. III. 05 : mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon (Phenanthroline).....	29
Fig. III. 06 : mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon (SNP).....	30
Fig. III. 07 : mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon (Anti-AChE).....	32
Fig. III. 08 : mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon (Urease).....	32

## Chapitre 04

Fig. IV. 01 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	34
Fig. IV. 02 : Courbe d'étalonnage de la Quercétin.....	34
Fig. IV. 03 : Teneurs en Phénols totaux des extraits étudiés .....	35
Fig. IV. 04 : Teneur en Flavonoïdes totaux des extraits étudiés.....	35
Fig. IV. 05 : Valeurs IC <sub>50</sub> des extraits étudiés dans le piégeage du radical DPPH.....	39
Fig. IV. 06 : Valeurs IC <sub>50</sub> des extraits étudiés dans le piégeage du radical ABTS.....	39
Fig. IV. 07 : Valeurs A <sub>0.5</sub> des extraits étudiés dans la méthode de FRAP.....	44
Fig. IV. 08 : Valeurs A <sub>0.5</sub> des extraits étudiés dans la méthode de Phenanthroline.....	44
Fig. IV. 09 : Valeurs A <sub>0.5</sub> des extraits étudiés dans la méthode SNP.....	45

# Liste des Tableaux

## Chapitre 01

<b>Tableau I. 01</b> : présentation de quelque classes d'alcaloïdes avec leurs précurseurs.....	09
<b>Tableau I. 02</b> : classification structurale des terpénoïdes.....	10

## Chapitre 02

<b>Tableau II. 01</b> : Principales ERO radicalaires et non-radicalaires .....	17
<b>Tableau II. 02</b> : Les systèmes antioxydants endogènes et exogènes.....	18
<b>Tableau II. 03</b> : Exemples des pathologies liées au stress oxydatif.....	22

## Chapitre 03

<b>Tableau III 01</b> : l'organisation de microplaque dans le test d'inhibition de $\alpha$ -amylase.....	31
<b>Tableau III 02</b> : mode de remplissage de microplaque dans le test de $\alpha$ -amylase.....	31
<b>Tableau III 03</b> : Fonction normale de produit utilisée dans le calcul de la SPF.....	33

## Chapitre 04

<b>Tableau IV. 01</b> : Rendement d'extraction des extraits étudiés.....	34
<b>Tableau IV. 02</b> : teneur en Phénols totaux et flavonoïdes des extraits étudiés.....	35
<b>Tableau IV. 03</b> : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH.....	37
<b>Tableau IV. 04</b> : Pourcentages d'inhibition du radical ABTS.....	38
<b>Tableau IV. 05</b> : tableau récapitulatif des valeurs IC50 ( $\mu\text{g/ml}$ ).....	39
<b>Tableau IV. 06</b> : les absorbances des différents extraits dans la méthode FRAP.....	41
<b>Tableau IV. 07</b> : les absorbances des différents extraits dans la méthode de Phenanthroline.....	42
<b>Tableau IV. 08</b> : les absorbances des différents extraits dans la méthode SNP.....	43
<b>Tableau IV. 09</b> : tableau récapitulatif des valeurs A 0.5 ( $\mu\text{g/ml}$ ).....	44
<b>Tableau IV. 10</b> : les pourcentages d'inhibition de l' $\alpha$ -amylase par les extraits étudiés.....	47
<b>Tableau IV. 11</b> : les pourcentages d'inhibition de l'AChE.....	48
<b>Tableau IV. 12</b> : coefficient de protection solaire des extraits étudiés.....	49
<b>Tableau IV. 13</b> : les coefficients de protection solaire des extraits étudiés.....	51

## *Liste des abréviations*

<b>ROS /ERO</b>	Les espèces réactives de l'oxygène.
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique.
<b>BHA</b>	hydrox-yanisole butylé.
<b>BHT</b>	hydroxy-toluene butylé
<b>NO</b>	oxyde d'azote
<b>SOD</b>	superoxydes dismutases.
<b>CAT</b>	Catalase.
<b>GPx</b>	Glutathion peroxydase.
<b>GR</b>	Glutathion réductase.
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxygène
<b>OH•</b>	Radical hydroxyle.
<b>Fe<sup>2+</sup></b>	Fer ferreux.
<b>Cu<sup>2+</sup></b>	Ion cuivrique.
<b>Fe<sup>3+</sup></b>	Fer ferrique.
<b>HOCl</b>	Acide hypochlorique.
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peroxyde d'hydrogène.
<b>O<sub>2</sub><sup>*-</sup></b>	Anion superoxyde.
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	Oxygène singulier.
<b>GSH</b>	Glutathion.
<b>DPPH</b>	2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl.
<b>ABTS</b>	2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)
<b>FRAP</b>	Ferric Reducing Antioxidant Power.
<b>IC50</b>	Concentration inhibitrice de 50 %.
<b>K<sub>3</sub>Fe (CN)<sub>6</sub></b>	Ferricyanure de potassium.
<b>FeCl<sub>3</sub></b>	Chlorure de fer.
<b>HCl</b>	Acide chlorhydrique.
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Eau.
<b>MA</b>	maladie d'Alzheimer.
<b>AChE</b>	Acétylcholinestérase.

يعتبر الامن الصحي أولوية أساسية تركز عليها المشاريع البحثية للدولة الجزائرية، نظرا للتأثيرات الاقتصادية والاجتماعية المكلفة التي تسببها الأمراض المزمنة بمختلف أصنافها. كما يؤكد الخبراء في هذا الجانب الى ضرورة تفعيل استراتيجيات جديدة والبحث عن بدائل دوائية فعالة خاصة منها ذات المصدر الطبيعي النباتي. تشير التقارير العلمية الى الارتباط الوثيق بين الامراض المزمنة وظاهرة الاجهاد التأكسدي لما لها من دور في التسبب أو في مضاعفة تأثير هذه الامراض والتي نذكر منها تحديدا مرض السكري والأمراض العصبية. الى جانب ذلك، تعتبر المركبات الطبيعية مصدرا فعالا ودائما لاكتشاف عناصر دوائية جديدة، نظرا لما يتميز به من تنوع البنية الكيميائية، فعالية التأثير وقلة الاثار السلبية. في هذه الدراسة نتطرق الى استخلاص المركبات الفعالة لنبته طبية مع تحديد تركيبها من Polyphénols و flavonoides. ونشاطها مضاد الاكسدة باستعمال تقنيات تعديل الجذور الحرة DPPH و ABTS. وكذا تقنيات ارجاع الحديد والفضة في التقنيات، Phenanthroline, FRAP, SNP على التوالي. كما تطرقنا الى دراسة تثبيط العينات للنشاط الانزيمي لكل من  $\alpha$ -amylase و AChE مع تحديد مؤشر الحماية من الاشعة فوق البنفسجية الشمسية. النتائج المحصل عليها أعطت كميات معتبرة من Polyphénols و flavonoides خاصة بالنسبة للمستخلصات acetaté d'éthyle, hydroalcoolique. هذا الاخير أعطى أفضل النتائج في تعديل الجذور الحرة DPPH و ABTS. في جانب اخر، المستخلصات المدروسة أعطت نتائج متوسطة في تقنيات ارجاع الحديد والفضة في، Phenanthroline, FRAP, SNP حيث سجل مستخلص الـ acetaté d'éthyle أفضل النتائج مقارنة بالبقية، في حين تبقى كل النتائج بعيدة عن المقارنة بالمركبات المرجعية. من جهة أخرى اعطى النشاط المضاد لانزيم AChE نتائج معتبرة خاصة للمستخلص Chloroformique. في حين كان المستخلص الخام الأفضل في تثبيط الـ  $\alpha$ -amylase من بين كل المستخلصات المدروسة. فيما يخص مؤشر الحماية من الأشعة الشمسية فقط أعطت المستخلصات المدروسة نتائج ممتازة في هذا الجانب. النتائج المحصل عليها تبرز أهمية النبتة المختارة للدراسة في إعطاء بدائل حقيقية ذات مصدر طبيعي يمكن الاستفادة منها في الميادين الطبية، الغذائية والصناعية

الكلمات المفتاحية: المركبات الطبيعية، مضادات الأكسدة، الاجهاد التأكسدي، السكري، الزهايمر.

**Abstract**

Public health experts launched several research programs in the context of the Algerian health security. One of the most interesting areas is the use of natural products as complementary or alternative medicines. Algerian traditional medicine offered several endemic plants, which are considered as sources of powerful active ingredients against oxidative stress, diabetes and neurodegenerative diseases such as Alzheimer. On the technical level, we evaluated the total content of phenols and flavonoids and the antioxidant activity of four extracts of the plant *Ptychotis verticillata* L. using standard methods, *in vitro*, the scavenging of DPPH and ABTS radicals, the reduction of iron (FRAP and Phenanthroline) and Silver (SNP). In addition, type 2 antidiabetic activity was characterized through the inhibition of  $\alpha$ -amylase and the anti-Alzheimer activity via the inhibition of acetylcholinesterase. Finally, the sun protection factors (SPF) was evaluated for each sample. The obtained results showed considerable levels of total phenols and flavonoids, especially for hydroalcoholic extract and ethyl acetate extract. In the antioxidant activities, the results showed moderate activities for the tested extracts in DPPH and ABTS methods, exceptionally the ethyl acetate extract which is comparable to the BHA and BHT. In parallel, our samples showed variable activities in FRAP, Phenanthroline and SNP methods. Ethyl acetate extract exhibited the best effect while chloroform exhibited the weakest. On the other hand, the inhibitory activity of enzymes showed that the crude extract inhibited potentially the  $\alpha$ -amylase, in a dose-dependent manner, while the chloroform extract was the most potent in the inhibition of acetylcholinesterase. In addition, our extracts showed excellent sun protection factors. The obtained results confirmed the traditional use of the selected plant in Algeria and enhanced the therapeutic virtues of its extracts. They also opened multiple perspectives in the near future.

**Keywords:** Antioxidant, oxidative stress, Alzheimer, T2DM, *Ptychotis verticillata*

**Résumé**

Les experts de la santé publique ont lancé plusieurs programmes de recherches dans le cadre de la sécurité sanitaire algérienne. L'un des axes les plus intéressants est la recherche des alternatifs naturels qui peuvent être utilisés d'une manière complémentaires ou alternative à l'utilisation des médicaments de synthèse dans le marché. La médecine traditionnelle algérienne nous offre plusieurs plantes endémiques qui sont considérées comme sources des principes actifs puissants afin de lutter contre le stress oxydatif, le diabète et les maladies neurodégénératives comme l'Alzheimer. Ce travail s'insère dans le cadre de connaissance et valorisation des produits naturels vivants notamment dans la neutralisation du stress oxydatif et la maîtrise des maladies Diabète type 2 et l'Alzheimer. Sur le plan technique, nous avons évalué d'une part, le contenu en phénols et flavonoïdes totaux et l'activité antioxydante de quatre extraits de la plante *Ptychotis verticillata* L. par des méthodes standards, *in vitro*, le piégeage des radicaux DPPH et ABTS, la réduction des fer (FRAP et Phenanthroline) et d'Argent (SNP). D'autre part, nous avons caractérisé l'activité antidiabétique de type 2 via l'inhibition de l' $\alpha$ -amylase et l'activité anti-Alzheimer via l'inhibition de l'acétylcholinestérase. Ce travail a été finalisé par une étude des facteurs de protections solaire. Les résultats obtenus ont montré des teneurs intéressants en phénols et flavonoïdes totaux particulièrement pour l'extrait hydro-alcoolique et l'extrait d'acétate d'éthyle. A propos de l'activité antioxydante, les résultats ont montré des activités moyennes à modérées pour les extraits testés à l'exception de l'extrait d'acétate d'éthyle qui est comparable aux références BHA et BHT dans les méthodes de neutralisation des radicaux DPPH et ABTS. Parallèlement, nos échantillons ont présenté des activités variables dans les méthodes FRAP, Phenanthroline et SNP. L'extrait d'acétate d'éthyle a présenté le meilleur effet tandis que le chloroformique est le plus faible. L'ensemble des échantillons sont loin à être comparés avec standards BHA et BHT. D'autre part, l'activité inhibitrice des enzymes a montré que l'extrait brut a inhibé fortement l' $\alpha$  amylase, d'une manière dose-dépendante, Tandis que l'extrait chloroformique est le plus intéressant dans l'inhibition de l'acétylcholinestérase. En plus, nos extraits ont donné des excellents facteurs de protections solaire. Les résultats obtenus confirment l'usage traditionnel de la plante sélectionnée en Algérie, ils valorisent les vertus thérapeutiques de ses extraits. Ils ouvrent également des perspectives multiples qui permettent d'approfondir nos études dans ce domaine.

**Mots clés :** Antioxydants, Apiaceae, stress oxydatif, Alzheimer, DT2

# Sommaire

Remerciements	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
الملخص	
Abstract	
Résumé	
Introduction générale.....	01

## *Synthèse bibliographique*

### *Chapitre 01 : Les métabolites secondaires*

1. Les produits naturels.....	03
1.1. Description générale.....	03
1.2. Les composés phénoliques.....	04
1.2.1. Généralités.....	04
1.2.2. Classification.....	04
1.3. Les alcaloïdes.....	05
1.3.1. Généralités.....	05
1.3.2. Sources des Alcaloïdes.....	06
1.3.3. Classification des Alcaloïdes.....	06
a. Classement des alcaloïdes selon leurs origines biosynthétiques...	07
b. Classement des alcaloïdes d'après leur structure chimique.....	08
1.4. Les composés terpéniques.....	09
1.4.1. Généralités .....	09
1.4.2. Classifications des terpènes.....	09
2. Intérêts des produits naturels.....	11
2.1. Dans le domaine médical.....	11
2.2. Dans le domaine agroalimentaire.....	11
2.3. Dans le domaine cosmétique.....	12
3. Description de la plante : <i>Ptychotis verticillata</i> L.....	13
3.1. Etude botanique et géographique .....	13
3.2. Intérêts thérapeutiques et pharmacologiques.....	14

### *Chapitre 02 : Le stress oxydatif*

1. Les radicaux libres.....	15
1.1. Description générale.....	15
1.2. Source des radicaux libres.....	15
1.2.1. Sources endogènes.....	15
1.2.2. Sources exogènes.....	16
1.3. Classifications.....	16

2. Les antioxydants.....	17
2.1. Description générale.....	17
2.2. Sources des antioxydants.....	18
2.2.1. Antioxydants endogènes.....	18
2.2.2. Antioxydants exogènes.....	19
2.3. Classification des antioxydants.....	20
2.3.1. Antioxydants d'origine naturelle.....	20
2.3.2. Antioxydants d'origine synthétique .....	20
3. Le stress oxydatif.....	20
3.1. Généralités.....	20
3.2. Effets néfastes sur la santé humaine.....	21
4. Stress oxydatif et maladies chroniques.....	22
4.1. Le Diabète.....	22
4.1.1. Généralités.....	22
4.1.2. Diabète type 01.....	22
4.1.3. Diabète type 02.....	23
4.1.4. Modes de traitement .....	24
4.2. L'Alzheimer.....	24
4.2.1. Généralités.....	24
4.2.2. Modes de traitement .....	24
5. L'évaluation de l'activité antioxydante.....	25
5.1. L'étude <i>in vivo</i> .....	25
5.2. L'étude <i>in silico</i> .....	25
5.3. L'étude <i>in vitro</i> .....	25

### ***Chapitre 03 : Matériels et méthodes***

1. Collection du matériel végétal.....	26
2. Préparation de la matière première.....	26
3. Extraction des principes actifs.....	26
4. Quantification des composés phénoliques.....	26
5. Dosage des flavonoïdes.....	27
6. L'évaluation <i>in vitro</i> de l'activité antioxydante.....	28
6.1. Piégeage du radical DPPH.....	28
6.2. Piégeage du radical ABTS.....	28
6.4. Activité du pouvoir réducteur (FRAP).....	29
6.5. Activité de réduction par formation du complexe Fe <sup>+2</sup> -Phenanthroline.....	29
6.6. Activité de réduction de l'Ag <sup>+</sup> en nanoparticule d'Argent sphériques.....	30
7. Activité inhibitrice des enzymes.....	31
7.1. Activité antidiabétique via l'inhibition de l' $\alpha$ -amylase.....	31
7.2. Activité anti-Alzheimer via l'inhibition de l'acétylcholinestérase.....	32
7.3. L'Activité inhibitrice de l'Uréase.....	32
8. Activité protectrice vis-à-vis les rayonnements solaires.....	33
9. Etude statistique.....	33

## ***Chapitre 04 : Résultats et discussion***

1. Rendements d'extraction.....	34
2. Dosage des phénols totaux et flavonoïdes.....	34
3. Activité antioxydante.....	37
3.1. Activité de piégeage du radical libre DPPH.....	37
3.2. Activité de piégeage du radical libre ABTS.....	38
3.3. Activité de pouvoir réducteur (FRAP).....	41
3.4. Activité de réduction du complexe Fe <sup>+2</sup> -Phenanthroline.....	42
3.5. Activité de réduction des nanoparticules d'Argent (SNP) .....	43
4. Activité inhibitrice des enzymes.....	47
4.1. L'activité antidiabétique via l'inhibition de l' $\alpha$ -amylase.....	47
4.2. L'activité anti-Alzheimer via l'inhibition de l'acétylcholinestérase.....	48
4.3. L'activité inhibitrice de l'Urease.....	49
5. L'activité protectrice vis-à-vis la lumière solaire.....	51

## ***Conclusion générale et perspectives***

1. Conclusion générale.....	52
2. Perspectives.....	53

## ***Annexes***

*Introduction  
générale*

## *Introduction générale*

A l'échelle mondiale, l'impact socio-économique des maladies chroniques s'aggrave progressivement. Les responsables de la santé publique focalisent la lumière sur les stratégies thérapeutiques appliquée actuellement vis-à-vis ce genre de maladies. Le diabète, le cancer et les maladies neurologique et autres nécessitent des nouvelles modalités de gestion, soit sur le plan des traitements disponibles actuellement dans le marché, soit dans la recherche des nouvelles alternatives naturelles qui rendent les pratiques médicales plus efficaces.

L'analyse étiologique de ce genre de maladies nous a montré l'intervention directe ou indirecte du stress oxydatif dans l'apparition et/ou l'aggravation de ces maladies. Le stress oxydatif est un climat d'agression structurale, en chaînes, des biomolécules et d'organites cellulaires aboutissant aux dysfonctionnements aigus et/ou chroniques à l'échelle moléculaire, tissulaire et organique. Le stress oxydatif n'est pas une maladie en soi, il est potentiellement impliqué dans de nombreuses maladies, comme facteur déclenchant ou associé, à des complications parfois lourdes plus particulièrement dans le diabète et l'Alzheimer.

Le diabète s'installe progressivement dans la communauté algérienne est devient un problème majeur de la santé publique. La fédération internationale du diabète a montré des chiffres terrifiants des personnes touchées en Afrique du nord et plus particulièrement en Algérie. Ce genre des maladies métaboliques chroniques apparait en plusieurs formes, mais celui de type 2 est le plus fréquent et représente environ 90% des cas de diabète (**Mouraux et Dorchy, 2005 ; Villar et Zaoui, 2010**). Parallèlement, La maladie d'Alzheimer apparait sous forme de déficience cognitive progressive notamment chez les patients âgés. C'est maladie neurodégénérative qui nécessite des stratégies thérapeutiques particulières qui sont parfois insupportables (**Cummings et Cole, 2002**).

Les produits naturels, notamment d'origine végétale, sont considérés comme des alternatives médicales ayant des propriétés pharmacologiques indiscutables. Leurs disponibilités, et efficacités thérapeutiques stimulent les malades et les praticiens de santé à les exploiter, en tant que produits alternatifs et/ou complémentaire, dans l'amélioration de la pratique médicale. Les chercheurs dans le secteur de la santé réalisent des investigations visant à développer des alternatifs à partir des plantes utilisées en médecine traditionnelle, en réalisant des études phytochimiques, pharmaco-toxicologiques et cliniques approfondies pour la mise au point de médicaments d'origine naturel de haute qualité (**Ghalem et Mohamed, 2014**).

Dans ce travail, nous avons travaillé sur une plante utilisée dans la médecine traditionnelle algérienne, *Ptychotis verticillata L.* pour faire :

- L'extraction fractionnée des métabolites actifs en quatre fractions, hydroalcoolique, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le n-butanol.
- Le dosage des métabolites secondaires (Phénols et Flavonoïdes totaux)
- Evaluer l'activité antioxydante, par des méthodes convenables, piégeage du radical libre DPPH, Piégeage du radical ABTS, Activité du pouvoir réducteur (FRAP), Activité de réduction par formation du complexe Fe<sup>+2</sup>-Phenanthroline, activité de réduction des nanoparticules d'Argent (SNP)
- Estimer l'activité inhibitrice de nos extraits sur deux enzymes particulières, l' $\alpha$ -amylase qui liée au diabète type 02 et la butyrylcholinestérase liée au maladie d'Alzheimer

Ce manuscrit en est subdivisé en trois parties. La première consiste à une étude bibliographique traitant l'aspect structural et pharmacologique des produits naturels, ainsi que la notion du stress oxydatif et ses effets sur la santé humaine. Dans la deuxième partie, nous avons évoqué le cadre technique et méthodologique des différentes activités étudiées, *in vitro*. La troisième partie est consacrée au côté expérimental dans laquelle nous avons présenté et discuté les résultats obtenus. Le travail est clôturé par une conclusion générale et des perspectives.

## ***Chapitre 01***

# ***Produits naturels d'origine végétale***

## 1. Les produits naturels

### 1.1. Description générale

Les plantes se caractérisent par leurs capacités à produire, d'une manière autonome, d'une large gamme des composés différents à l'échelle structural et fonctionnel. Ces éléments, d'une part, participent directement ou indirectement à la croissance et le développement de la plante, et d'autre part, jouent un rôle majeur, notamment dans l'autodéfense et l'adaptation à l'environnement. Cette dernière catégorie de produits sont collectivement appelés les métabolites secondaires végétaux. (Ouassou *et al.*, 2019).

Les métabolites secondaires sont des composés chimiques non directement impliqués au processus vitaux et au développement, mais ils ont autres rôles complémentaires tels que la protection des végétaux contre les herbivores et les microbes, l'attraction des animaux pollinisateurs ...etc. (fig. I. 01). Ces molécules phytochimiques se caractérisent par une grande diversité structurale, ils sont regroupés en trois principales catégories : les terpènes, les composés phénoliques et les alcaloïdes (ou composés azotés). Chacune de ces classes renferme des groupes chimiques multiples et possède des activités et des applications diverses dans les différents domaines. (Salam et Quave, 2018).

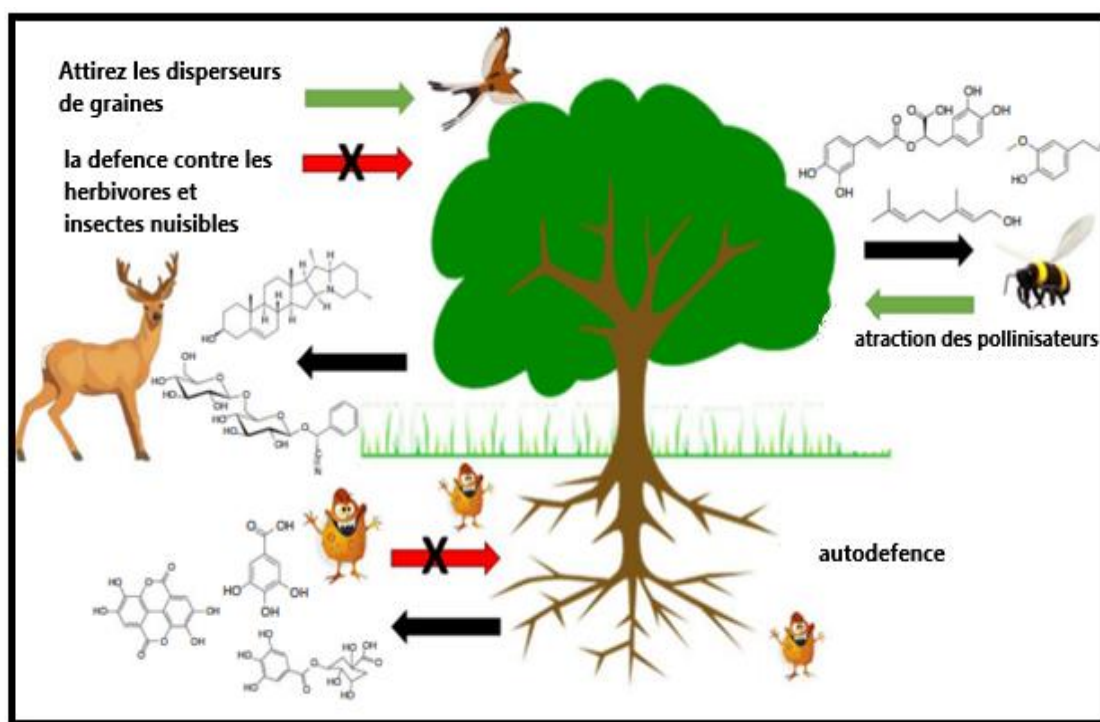


Fig. I. 01 : la diversité fonctionnelle des métabolites secondaire (Salam et Quave, 2018).

## **1.2. Les composés phénoliques**

### **1.2.1. Généralités**

Les composés phénoliques ou les polyphénols, phénylpropanoïdes, constituent une vaste famille de métabolites secondaires largement abondants dans le monde végétal, environ 8000 types ont été rapportés dans la littérature (**Cory *et al.*, 2018**). Ils sont localisés dans toutes les parties et les tissus des plantes (racines, fleurs, tiges, feuilles ... etc.) et dans les différents types (légumes, fruits, céréales ...etc.). Ils jouent un rôle impératif dans les applications industrielles et thérapeutiques (**Rasouli *et al.*, 2017**). Comme leurs noms l'indiquent, les polyphénols sont des composés aromatiques contenant des groupes hydroxyles phénoliques (alcools aromatiques), associés aux structures plus ou moins complexes (**Alves-Santos *et al.*, 2020**). Ils ont montré plusieurs activités biologiques et pharmacologiques intéressantes (**Teng et Chen, 2019**).

### **1.2.2. Classification des polyphénols**

Plusieurs milliers de polyphénols ont été identifiés dans le règne végétal. Sur le plan structural, ils sont des molécules aromatiques caractérisés par la présence d'au moins d'un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle libre ou lié à une autre fonction: éther, ester, hétéroside. En fonction du nombre d'unités phénoliques dans leur structure moléculaire, les groupes substituants et/ou les types des liaisons entre les unités phénoliques sont classés communément comme :

- Flavonoïdes, les plus répandus et les plus étudiés dont plus de 6000 structures différentes, caractérisés par une structure de base C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> et divisés en six groupes : flavonols, flavanols, flavones, flavanones, isoflavones et anthocyanes.
- Non flavonoïdes y compris les lignanes, stilbènes et tanins
- Acides phénoliques divisés en deux groupes l'acide hydroxycinnamique et l'acide hydrobenzoïque (**Fig. I. 02**)(**Denise *et al.*, 2020**).

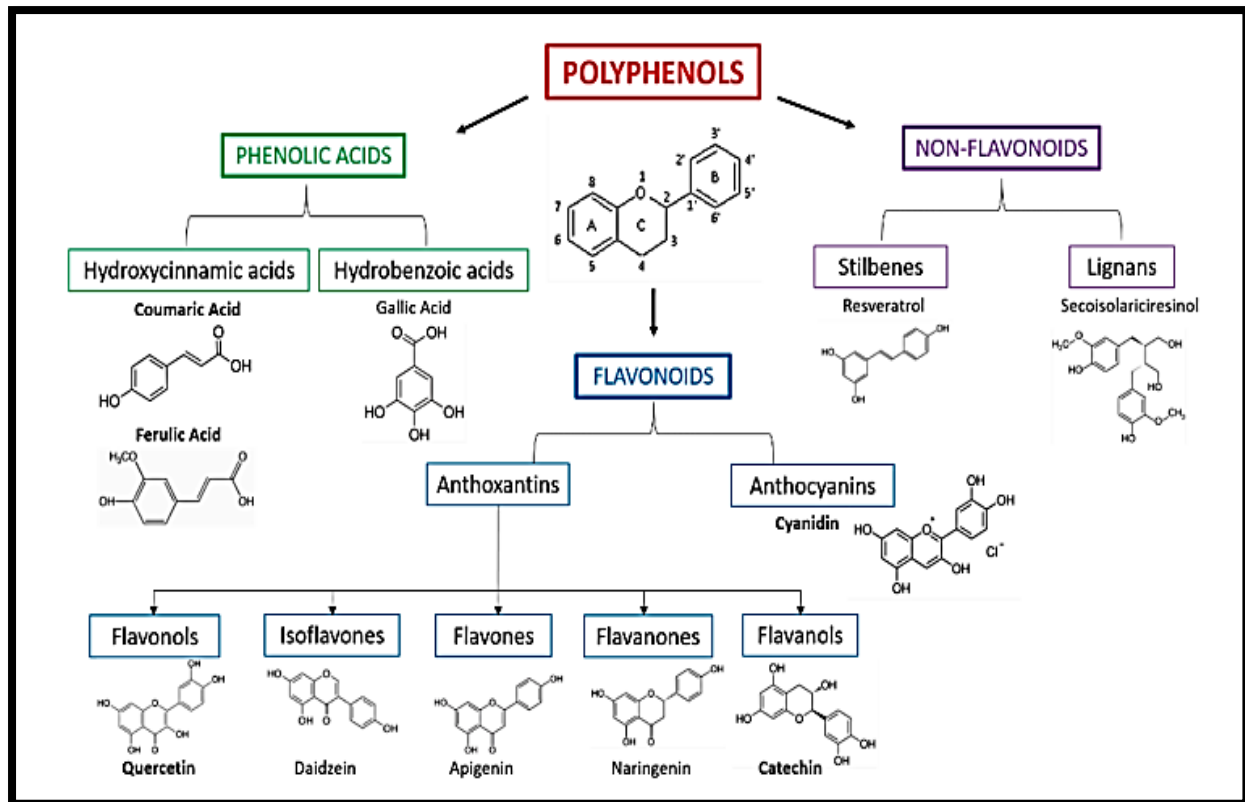


Fig. I. 02 : Classification structurelle des polyphénols (Denise *et al.*, 2020).

### 1.3. Les alcaloïdes

#### 1.3.1. Généralités

Au début de XIX<sup>e</sup> siècle le mot Alcaloïdes a été introduit par W. MEISNER pour indiquer des substances naturelles réagissant comme des bases, comme des *alcalis* (de l'arabe *al kaly*, la soude et du grec *eidos*, l'aspect) (Bruneton, 2009). Ce sont des substances azotées basiques d'origine naturelle. Elles ont des activités biologiques intéressantes, C'est pourquoi ils entrent comme principe actif dans la composition de nombreux médicaments (comme la morphine ou la codéine qu'ils ont un effet analgésiques). la plupart des présentent un caractère toxique, et à cause de cette toxicité, les plantes les utilisent dans leurs systèmes de défense contre les herbivores et les pathogènes (Chelain, Lubin-Germain, & Uziel, 2015).

Selon (Eguchi, *et al.*, 2017), Il existe 12000 alcaloïdes avec des structures chimiques connues. Winterstein et Ties (Aniszewski, 2007) ont généralisé les caractéristiques communes des alcaloïdes dans les points suivants :

- Une toxicité plus ou moins importante, elle apparait principalement sur le système nerveux central ;
- Une structure chimique à caractère basique;
- La présence structurale de l'azote hétérocyclique;
- La Biosynthèse à partir d'acides aminés ou de leurs dérivés immédiats ;
- Une distribution limitée dans la nature.

### 1.3.2. Sources des Alcaloïdes

Les alcaloïdes, d'origine végétale, sont extraits de la plupart des plantes à fleurs (8,7 % des phanérogames, dicotylédones). Ils ont également d'autres origines naturelles mais non végétales, telles que les champignons (ex. : ergine de l'ergot du seigle), les mousses (ex. : lycopodine de *Lycopodium complanatum*), les bactéries (ex. : pyocyanine de *Pseudomonas aeruginosa*) et des animaux supérieurs (ex. : adrénaline, castoramine du muse) (Milcent, 2003).

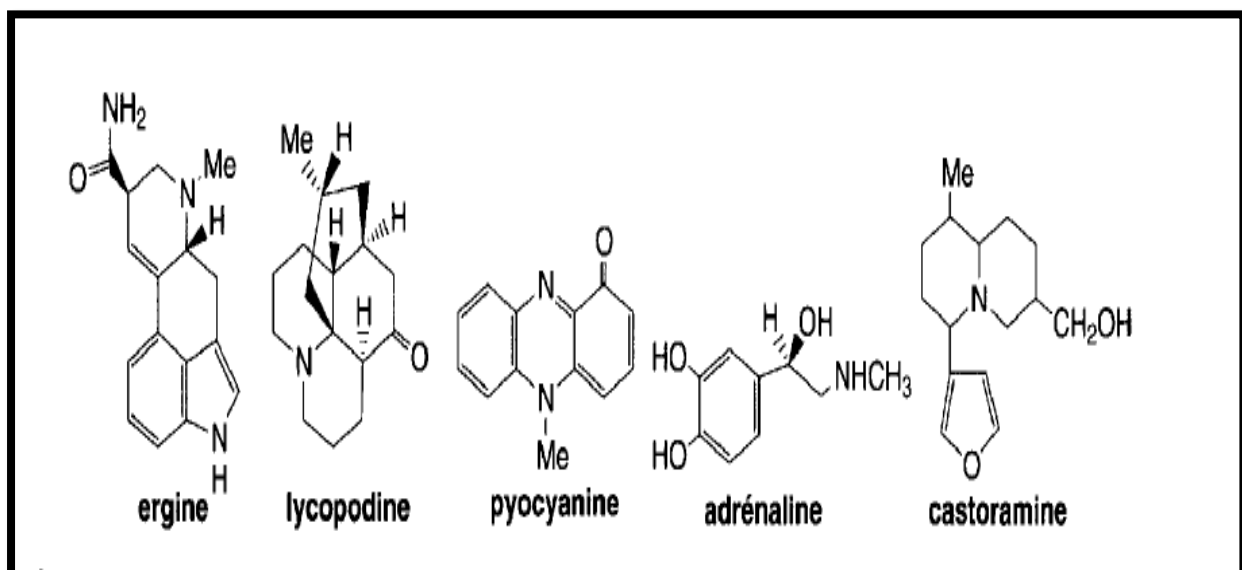


Fig. I. 03: Structure chimique de certaines molécules de type Alcaloïdes (Porras *et al.*,2020)

### 1.3.3. Classification des Alcaloïdes

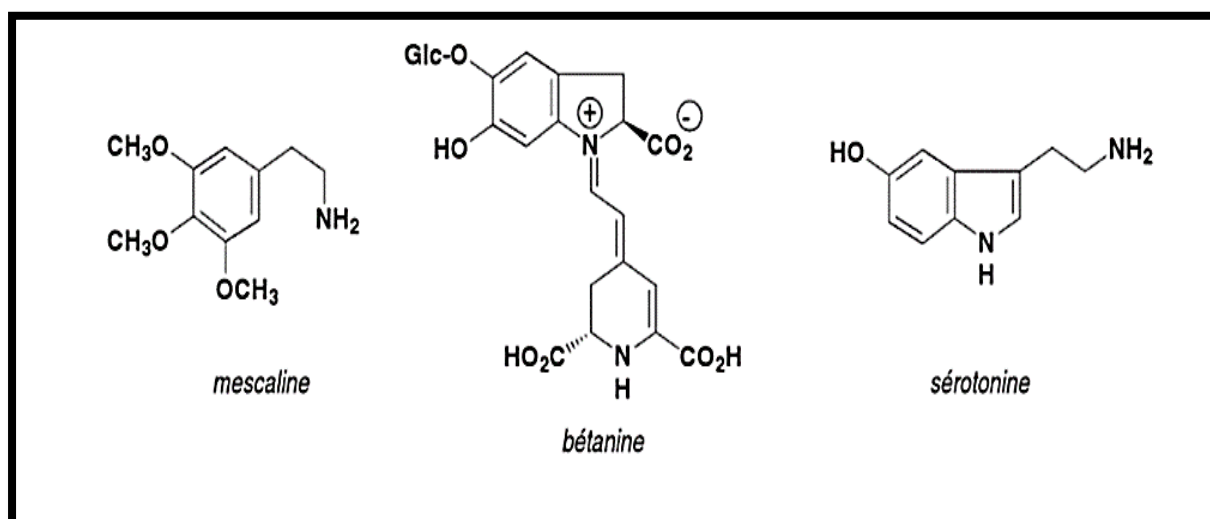
Plusieurs critères ont été utilisés dans la classification des Alcaloïdes y compris, la structure chimique, l'activité biologique et écologique et les voies de biosynthèse (Aniszewski, 2007)

**a. Classement des alcaloïdes selon leurs origines biosynthétiques**

Les alcaloïdes sont généralement classés en fonction de leur précurseur moléculaire commun, utilisé dans la construction moléculaire. D'un point de vue structurel, Il existe trois principaux types des alcaloïdes, les alcaloïdes vrais, les Proto-alcaloïdes et les pseudo-alcaloïdes.

La biosynthèse des alcaloïdes vrais s'effectue à partir des acides aminés, ils comportent un atome d'azote dans un système hétérocyclique, ce qui lui donne le caractère basique, Leurs précurseurs primaires sont des acides aminés tels que L-Ornithine, L-Lysine, L-phénylalanine /L-Tyrosine , L-Tryptophane et L-Histidine. Ce sont des substances hautement réactives même à faibles doses. Les Alcaloïdes vrais peuvent se produire dans les plantes : à l'état libre, sous forme de sels et de N-oxydes. A titre d'exemple des alcaloïdes vrais biologiquement actifs, la cocaïne, la quinine , le dopamine et la morphine . (**Aniszewski, 2007**)

Les protoalcaloïdes sont des dérivés d'acides aminé dont l'atome d'azote ne fait pas partie d'un hétérocycle. Cependant, ils sont souvent appelés amines biologiques, ils sont généralement solubles dans l'eau (**Milcent, 2003**). cette définition peut englober plusieurs substances, les acides simples tels que la sérotonine, le mescaline de peyotl, la cathéonine de thé des Abyssins, et les bétaines (ex :bétanine) (**Bruneton, 2009**).



**Fig. I 04:** Structure chimique de certaines molécules de type proto-alcaloïdes

Les pseudoalcaloïdes sont des substances dont le squelette carboné de base ne se dérive pas d'acides aminés (Aniszewski, 2007). Ils sont en majeure partie basiques. Les représentants principaux de cette classe d'alcaloïdes sont les alcaloïdes stéroïdiens et les purines (Milcent, 2003). En réalité, ils sont connectés aux voies des acides aminés comme ils peuvent également être le résultat de réactions d'amination et de transamination de différentes voies liées aux précurseurs d'acides aminés. D'autre part, les pseudo-alcaloïdes peuvent être dérivés de précurseurs d'acides non aminés ou l'atome N est inséré dans la molécule dans un stade relativement tardif. Laconiine, la capsaïcine, l'éphédrine, la solanidine, la caféine, la théobromine et la pinidine font partie de cette catégorie. (Aniszewski, 2007)

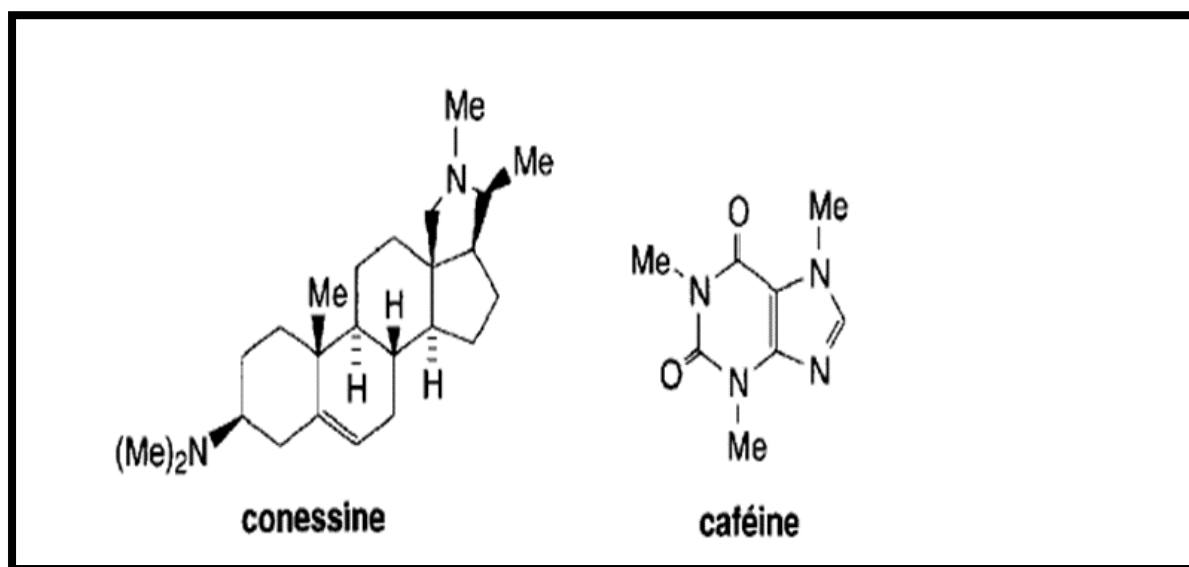


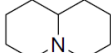
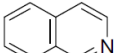



Fig. I 05: Structure chimique de certaines molécules de type Pseudo-alcaloïdes

#### b. Classement des alcaloïdes d'après leur structure chimique

Les alcaloïdes sont aussi classés selon leurs structures chimiques. On peut distinguer 12 principales classes d'alcaloïdes, les tropaniques, les pyrrolizidiniques, les quinolizidiniques, les indolizidiniques, les pipéridiniques, les pyridiniques, les isoquinoléiques, les indoliques, les quinoléiques, les imidazoliques, les terpéniques, et les bases puriques. La majorité des alcaloïdes sont dérivés d'acides aminés tels que la lysine, le tryptophane, la tyrosine, et l'ornithine. Ces acides aminés sont décarboxylés en amines couplées à d'autres squelettes carbonés. Le tableau ci-dessous mentionne quelques classes d'alcaloïdes avec leurs précurseurs (Chelain, Lubin-Germain, & Uziel, 2015)

Tableau I. 01 : Présentation de quelque classes d'alcaloïdes avec leurs précurseurs

Classe	Structure	précurseur	Exemple
pyrrolidine		Ornithine	Nicotine
pyrrolizidine		Ornithine	Retrorsine
quinolizidine		Lysine	Lupinine
Isoquinoline		Tyrosine	Codéine, morphine
Indole		Tryptophane	Strychnine

## 1.4. Les composés terpéniques

### 1.4.1. Généralités

Les terpènes, sont une classe d'hydrocarbures produits par de nombreuses plantes. Ce sont des substances naturelles organiques, volatiles ou non, qui représentent une grande famille de molécules du métabolisme primaire et secondaire (**Breitmaier, 2006**). En plus de leurs intérêts pharmacologiques, les terpénoïdes jouent plusieurs rôles regroupés en trois catégories, fonctionnels, de défense et de communication. Les terpénoïdes sont considérés comme des produits dont la structure moléculaire contenant des squelettes de carbone constitués d'unités d'isoprène (2-méthylbuta-1,3-diène). L'isoprène contient cinq atomes de carbone et, par conséquent, le nombre d'atomes de carbone dans un terpénoïde est un multiple de cinq. (**Vavitsas, 2018**). Les terpénoïdes volatils, de faible poids moléculaire, peuvent être isolés de leurs sources naturelles par distillation, un processus essentiel pour l'isolement des ingrédients de parfumerie. Les produits terpéniques ont des fonctions biologiques importantes. D'une part, ils sont essentiels à la croissance et au développement des plantes (par exemple, les phytohormones gibbérellines), et d'autre part, ils représentent des outils importants dans les diverses interactions des plantes avec l'environnement (**Eran et Krishna, 2006**).

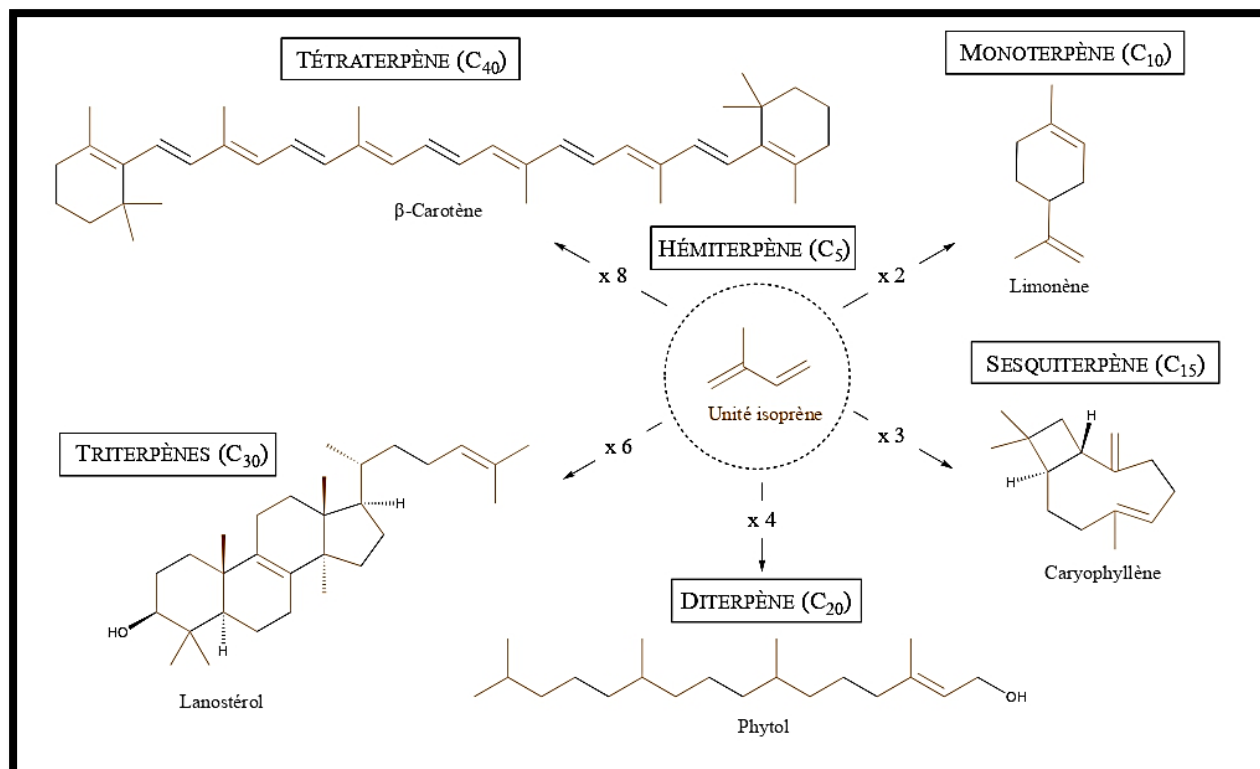
### 1.4.2. Classifications des terpènes

La classification de composés terpéniques est basée, principalement, sur le nombre d'atomes de carbone et le nombre d'unités isoprènes contenus dans leurs structures chimiques (**Tableau I. 02**)

Tableau I. 02 : Classification structurale des terpénoïdes.

Nom	Nombre d'unités d'isoprène	Nombre d'atome de carbone
Hémiterpénoïdes	01	05
Monoterpénoïdes	02	10
Diterpénoïdes	04	20
Sesquiterpénoïdes	03	15
Sesterterpénoïdes	05	25
Triterpénoïdes	06	30
Tétraterpénoïdes	08	40
Polyisoprénoïdes	>08	>40
Caroténoïdes	08	40

Les héli-terpènes contiennent une seule unité isoprène, le plus représentatif est donc l'isoprène lui-même, composé très volatil. Les mono-terpènes sont constitués de deux unités isoprènes, ce sont les composés principaux des huiles essentielles, des parfums et des épices. Les sesquiterpènes se composent de trois unités isoprènes et sont également fréquemment trouvés dans les huiles essentielles. Les mono-terpènes ainsi que les sesquiterpènes sont des composés très volatils, même si les sesquiterpènes oxydés ont tendance à être moins volatils, ils jouent un rôle dans la défense des plantes ainsi que pour attirer les pollinisateurs (**Maldonado-Bonilla et al., 2008**). Les di terpènes sont constitués de 4 unités isoprènes. Les diterpènes ne sont pas volatils, peuvent être des hormones de la plante tels que l'acide gibbérellique, ils peuvent intervenir dans le mécanisme de défense de la plante. Les triterpènes sont composés de 6 unités isoprènes, ce sont des molécules non volatiles qui peuvent être localisés dans les membranes cellulaires des plantes tels que les stérols. Les tri-terpènes incluent aussi les saponines, les stéroïdes ainsi que les glycosides cardiotoniques. Les tétraterpènes sont des molécules composées de 8 unités isoprènes. Cette dernière classe des terpènes regroupe les caroténoïdes, molécules possédant un grand nombre de doubles liaisons conjuguées et étant ainsi responsable des pigments jaune/orangé de la plante.



**Fig. I. 06** : Classification des terpènes suivant le nombre d'unités d'isoprènes.

## 2. Intérêts des produits naturels

### 2.1. Dans le domaine médical

Les produits naturels ont plusieurs activités pharmacologiques qui peuvent être bénéfiques sur le plan thérapeutique dans le traitement des maladies. Ils sont des composants actifs largement utilisés dans de nombreuses médecines traditionnelles (**Hunter, 2008**). De plus, il est possible de préparer des analogues synthétiques d'origine naturelle, améliorés sur le plan de l'efficacité et la sécurité. Par conséquent, les produits naturels sont souvent utilisés comme des points de départ pour la découverte de médicaments (**Bhat et al., 2005**). Actuellement, plus de 80 % des médicaments étaient fabriqués à partir de ressources naturelles, environ 60 % des médicaments anticancéreux et 75% des composés anti-infectieux sont des composés à base de substances naturelles ou leurs dérivés. (**Fabiano-Tixier & Culioli, 2013**)

### 2.2. Dans le domaine agroalimentaire

Les métabolites secondaires ont été utilisés comme des compléments alimentaires, des composés colorants, (anthocyane, caroténoïde), acidulant, exhausteur de goût, tel que les

aromes (safran, vanille), édulcorants (stéviolosides), substances à goût amer (capsaïcine), texturant, conservateurs alimentaires antibactériens et antioxydants, émulsifiant, tensioactif, ou épaississant dans l'industrie alimentaire. Les métabolites secondaires d'origine végétale commercialement utiles sont les caroténoïdes, les alcaloïdes et les terpénoïdes, les phénylpropanoïdes et des composés plus spécifiques tels que corilagine, L'acide ellagique, vincristine,  $\alpha$  et  $\beta$ - farnésènes. **(Gök, Kalinkara, & Erdoğan, 2013)**

### **2.3. Dans le domaine cosmétique**

Les plantes et leurs dérivés sont d'importance majeure dans le marché de l'industrie cosmétique qui évolue rapidement. Les applications des plantes et des extraits de plantes dans les cosmétiques sont largement répandues, ils peuvent être utilisés comme des additifs d'hydratation, de blanchiment, de bronzage, des colorants, dans les crèmes solaires, dans le balayage radical, antioxydants, immunostimulants, produits de lavages, des conservateurs et épaississants, etc. plusieurs plantes sont utilisées pour des fins cosmétiques comme la spirule, l'*Aloe vera*, le calendula, le ginkgo, le ginseng, l'iris, la valériane, la sauge, la lavande, le thym, la menthe poivrée, les agrumes, la pêche, la goyave, l'avocat, le blé, l'orge, etc. **(Schürch, Blum, & Züllig, 2007).**

**3. Description de la plante : *Ptychotis verticillata* L.**

**3.1. Etude botanique et géographique**

*Ptychotis verticillata* Nûnkha (Famille *Apiaceae*), autrement connu sous le nom Ammoides pusilla (Brot.) Breistr., *Psychotis ammoides* Koch, *Ammoides verticillata* Briq. et *Petroselinum ammoides* Rchb. C'est une plante C'est une Ombellifère (Apioïdées), annuelle, à racine grêle, pivotante ; tige dressée, striée, grêle, à nombreux rameaux étalés, de petites fleurs blanches penchées avant la floraison, sans rosette de feuilles basales. Les fruits, schizocarpes, sont ovoïdes de moins de 1 mm de long (**Benoit, 2011**). C'est une espèce herbacée aromatique (10–35 cm de haut) répandue en Afrique du Nord. Cette Petite plante médicinale pousse spontanément en Afrique du Nord, Maroc Algérie, Tunis et la Lybie, fréquemment cultivée en Inde et au Perse. Elle est retrouvée également dans tout le bassin méditerranéen.



**Fig. I. 07 : *Ptychotis verticillata* L. en image (Lahcen, 2011)**

La taxonomie de la plante est représentée comme suit :

- Règne : Végétal
- Embranchement : Spermatophytes
- S/ Embranchement : Angiospermes
- Classe : Dicotylédones
- Ordre : Apiales
- Famille : Apiacées ou Ombellifères
- Genre : Ammoïdes ou Ptychotis
- Espèce : pusilla ou verticillata

**3.2. Intérêts thérapeutiques et pharmacologiques**

Cette espèce est actuellement utilisée en médecine populaire comme fébrifuge, elle a des propriétés antispasmodiques, antiseptiques et antidiabétiques. Les chercheurs ont montré les propriétés antimicrobiennes et antifongiques des huiles essentielles. Elle est utilisée comme perfusion pour traiter les maux de tête, la fièvre, la grippe et la diarrhée. Elle est utilisée aussi pour traiter le diabète et l'hypertension, **(Bnouham, Benalla, Asehrou, & Berrabah, 2012)**. Bien que la composition chimique de cette plante n'ait fait l'objet que de quelques investigations, les huiles se sont révélées riches en thymol. L'analyse par GC et GC/MS a donné 46 constituants, parmi lesquels le thymol (44,5 %), le c-terpinène (32,9 %) et le p-cymène (13,5 %) étaient les plus abondants. **(Ouariachi, et al., 2010)**. Une étude Algérienne en 2014 de la partie aérienne de la plante a montré la richesse de cette espèce en composés polyphénoliques, les flavonoïdes, les saponines, les anthocyanes, les terpènes, les stérols et les tannins. Cette plante est dépourvue totalement en Alcaloïdes. **(Oumsaad et al, 2011)**.

## ***Chapitre 02***

# ***Le stress oxydatif***

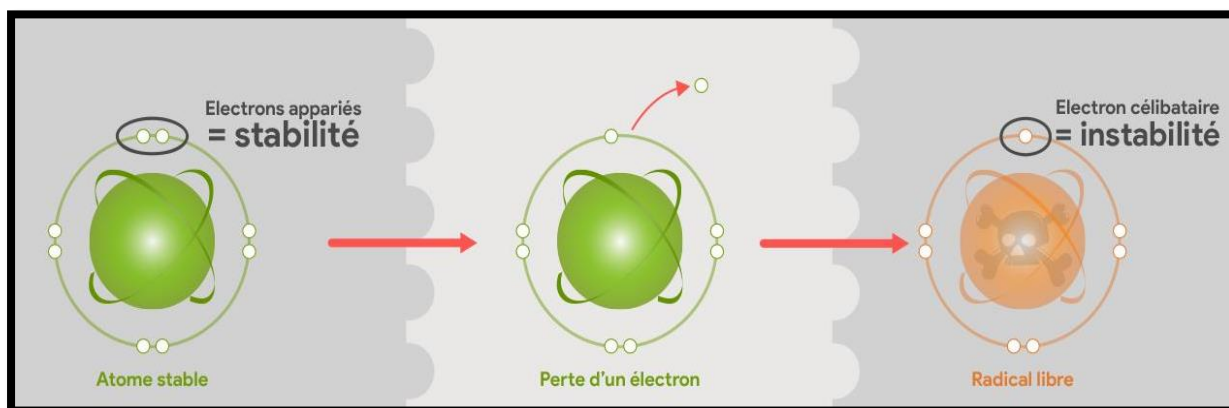
## 1. Les radicaux libres

### 1.1. Description générale

Sur le plan chimique, un radical est défini comme toute espèce chimique (atome, molécule ou ion) contenant un électron non apparié dans une orbitale atomique externe, ce caractère lui confère une grande instabilité réactionnelle. Cette instabilité entraîne certaines propriétés chimiques communes à la plupart des radicaux. (Nuñez *et al.*, 2018).

Les radicaux libres se produisent d'une manière continue dans les cellules, suite aux réactions physiologiques standards catalysées ou non par les enzymes, les mouvements électroniques de la chaîne respiratoire mitochondriale (Faitg *et al.*, 2017), la production excessive des superoxydes pendant la phagocytose, la production de NO par l'endothélium. Dans certains cas pathologiques, la production devient anormale, dommageable, et sans objectif physiologique. (Di Meo et Venditti, 2020).

Les radicaux libres dérivés d'oxygène sont les plus importants dans les processus pathologiques, ils sont instables et très réactifs tels que le radical hydroxyle, le radical anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, l'oxygène singulet, l'hypochlorite, le radical oxyde nitrique et le radical peroxydinitrite. (Trüeb, 2015).



**Fig. II. 01.** Passage de l'état stable au radical libre et sa stabilisation de nouveau

### 1.2. Source des radicaux libres

Généralement, il existe deux sources essentielles d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) dans les systèmes biologiques.

#### 1.2.1. Sources endogènes

La respiration cellulaire (le transfert d'électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale) est le principal processus de production endogène d'EROs dans le système vivant (Faitg *et al.*, 2017). En plus, plusieurs autres phénomènes peuvent intervenir dans

cette production tels que l'oxydation au niveau du réticulum endoplasmique, l'activité des enzymes du système redox y compris la NADPH oxydase, la xanthine oxydase, monoamine oxydase, tyrosine hydroxylase, L-amino oxydase, Diamine oxydase, glycolate oxydase, alpha-hydroxyacide oxydase et L-Gluconolactone oxydase. En parallèle, la synthèse des prostaglandines durant la réponse inflammatoire, l'auto-oxydation de l'adrénaline, l'activité des cellules phagocytaires et le cytochrome P450 ...etc. peuvent être pris en considération. (Nuñez *et al.*, 2018).

### 1.2.2. Sources exogènes

Les sources *ex-vivo* sont généralement des facteurs environnementaux tels que les pollutions, certains produits chimiques ainsi que des contaminations par des métaux lourds (Nuñez *et al.*, 2018). Les constituants des radiations de l'ozone, les gaz d'échappement des moteurs, certains médicaments, les pesticides, les métaux de transition, consommation de l'alcool, les polluants, la fumée, et les inflammations d'origine externe sont d'autres sources d'EROs (Di Meo et Venditti, 2020).

### 1.3. Classifications des radicaux libres

Différentes formes de classification, selon les plusieurs critères, peuvent être considérées. Nous discutons dans cette partie la classification suivante :

- **Radicaux libres primaires** : formés par la procédure le transfert d'électrons à l'atome d'oxygène. Ils ont une durée de vie moyenne a très courte (Di Meo et Venditti, 2020).
- **Radicaux libres secondaires** : Ils formés lors du transfert de l'un des radicaux primaires à un atome d'une molécule organique ou par l'interaction de deux radicaux primaires entre eux. Ils sont caractérisés par une durée de vie moyenne plus longue que les précédents. (Di Meo et Venditti, 2020).
- **Intermédiaires stables des radicaux libres** : ce sont des molécules chimiquement stables, mais ils peuvent être des précurseurs de formation des formes radicalaires (Di Meo Sergio et Venditti, 2020).

Le **tableau II. 01**, en dessous, nous permettra d'avoir un aperçu sur les différentes formes des radicaux libres et des espèces réactives. Une diversité qui s'étend à l'ensemble de notre corps (Durand *et al.*, 2013).

**Tableau II. 01** : Principales ERO radicalaires et non-radicalaires (Durand *et al.*, 2013).

Espèces réactives de l'oxygène (ERO)	
Radicalaire	Non radicalaire
✓ Anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ )	✓ Peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ )
✓ Hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ )	✓ Acide hypochlorique ( $HOCl$ )
✓ Hydroperoxyde ( $HO_2^{\cdot}$ )	✓ Ozone ( $O_3$ )
✓ Peroxyle ( $RO_2^{\cdot}$ )	✓ Oxygène singulet ( $^1O_2$ )
✓ Alkoxyde ( $RO^{\cdot}$ )	✓ Hydroperoxyde ( $ROOH$ )
✓ Dioxyde de carbone ( $CO_2^{\cdot-}$ )	✓ Peroxynitrite ( $ONOO^-$ )

## 2. Les antioxydants

### 2.1. Description générale

Un antioxydant est une espèce moléculaire qui peut agir pour atténuer ou prévenir la formation de radicaux libres dans l'organisme. Ils neutralisent efficacement toute molécule radicalaire ou ayant le potentiel de se transformer en un radical libre (Ighodaro et Akinloye, 2017). Ils sont définis également comme « toute substance qui retarde, empêche ou supprime les dommages oxydatifs d'une molécule cible » (Shahidi et Zhong, 2015). Ces composés, naturels ou synthétiques, peuvent contribuer à l'atténuation partielle ou totale des dommages résultants au stress oxydatif. (Trüeb, 2015).

Antioxydants peuvent être, soit d'origine endogène, soit exogène. On distingue également les antioxydants de type enzymatique tels que la superoxyde dismutase SOD, la catalase CAT et la glutathion peroxydase GPx...etc (Marinari *et al.*, 2019), et les antioxydants de type non enzymatiques tels que l'acide ascorbique, l' $\alpha$ -tocophérol, la céruloplasmine, l'albumine, ils forment un réseau important dans la protection cellulaire vis-à-vis les dommages causés par les radicaux libres (Nuñez *et al.*, 2018). Les antioxydants agissent par plusieurs mécanismes, direct ou indirect, Ils sont interdépendants (Shahidi et Zhong, 2015).

Tab. II. 02 : Les systèmes antioxydants endogènes et exogènes (Durand *et al.*, 2013).

Les systèmes enzymatiques	Les systèmes non enzymatiques
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <b>Elimination de l'anion superoxyde</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Les superoxydes dismutases</li> </ul> </li> <li>➤ <b>Elimination du peroxyde d'hydrogène</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Les peroxydases hémiques <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Catalase</li> </ul> </li> <li>✓ Les peroxydases non hémiques <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Glutathion peroxydases</li> <li>▪ Glutathion réductase</li> <li>▪ Peroxyrédoxines</li> <li>▪ Thiorédoxine Réductase</li> </ul> </li> </ul> </li> <li>➤ Régulation intracellulaire de la Concentration en fer libre</li> <li>➤ Internalisation via les récepteurs à Transferrine</li> <li>➤ Stockage par la ferritine</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <b>Elimination de l'anion superoxyde</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Les vitamines Cet E</li> <li>✓ Les flavonoïdes</li> <li>✓ Les caroténoïdes</li> <li>✓ L'ubiquinone (coenzyme Q10)</li> </ul> </li> <li>➤ <b>Elimination du peroxyde d'hydrogène</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Les vitamines Cet E</li> <li>✓ Le glutathion(GSH)</li> <li>✓ La Thiorédoxine</li> </ul> </li> </ul>

## 2.2. Sources des antioxydants

### 2.2.1. Antioxydants endogènes

L'organisme vivant possède un système de défense enzymatique et non enzymatique. Nous discutons dans cette partie les enzymes les plus puissantes dans ce système.

#### • Superoxyde dismutases (SOD)

Les SOD, des métalloprotéines, catalysent la dismutation mono-électronique du  $O_2^-$  en dioxygène et  $H_2O_2$ . Elle existe sous deux formes : une cytoplasmique nécessite comme cofacteur, les ions de cuivre et de zinc (CuZnSOD) et l'autre mitochondriale utilise le manganèse comme cofacteur (MnSOD) (Di Meo et Venditti, 2020).

#### • La catalase (CAT)

La CAT une enzyme puissante, elle est présente presque dans tous les tissus vivants. Elle utilise soit le fer soit le manganèse comme cofacteur et catalyse la dégradation ou la réduction du deux molécules de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) en eau et en oxygène moléculaire (Ighodaro et Akinloye, 2017).

• **Glutathion peroxydases (GPx)**

La glutathion peroxydase, de détoxification du peroxyde d'hydrogène et d'autres hydroperoxydes résultant de l'oxydation de la matière grasse. (Fraipont et Preiser, 2016). Elle a un rôle crucial dans l'inhibition de la peroxydation des lipidique et la protection donc des tissus du stress oxydatif (Ighodaro et Akinloye, 2017).

2.2.2. Antioxydants exogènes

Plusieurs molécules d'origine exogènes, particulièrement alimentaires, sont considérées comme des antioxydants puissants, les vitamines, les caroténoïdes, les flavonoïdes nutriments, les composés naturels, ...etc. Notons à titre d'exemples, les plus courants:

• **La Vitamine C**

La vitamine C, ou acide ascorbique, est une molécule à caractère hydrophile très répandue dans de nombreux fruits et légumes. Elle joue un rôle essentiel dans la lutte contre les ERO et le renouvellement du vit E. elle a un rôle crucial dans là de glutathion et l'α tocophérol à partir de leurs formes radicalaires. (Manuelian et al., 2021).

• **La Vitamine E**

L'alfa-tocophérol est le plus abondant de ses formes isomériques (α, β, γ et δ). On le trouve dans les huiles d'origine végétales (arachides, soja, chardon, tournesol, olive pressé à froid), les amandes, les graines, le lait, les œufs, les légumes à feuilles vertes. (Manuelian et al., 2021).

• **Flavonoïdes**

Les flavonoïdes sont les composés poly phénoliques les plus puissants. Leurs activités II peuvent être des chélateurs des métaux en prévenant ainsi la production des EROs (Shahidi et Zhong, 2015).

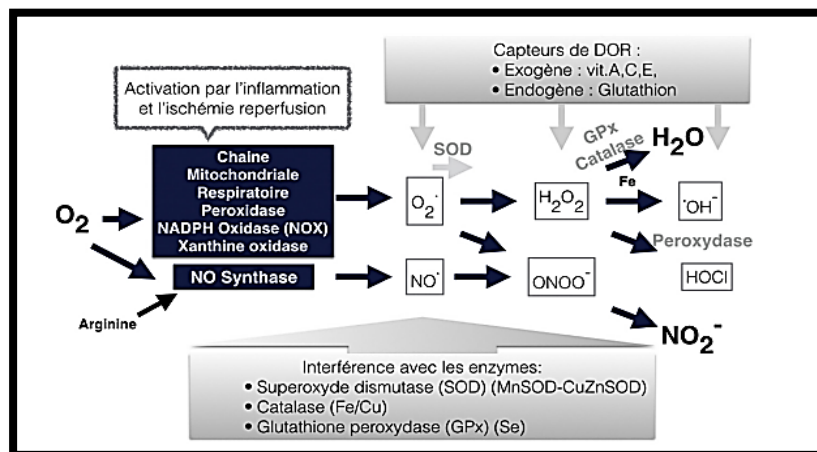


Fig. II. 02: Mécanisme d'action des antioxydants

### 2.3. Classification des antioxydants

Plusieurs critères ont été utilisés dans la classification des antioxydants. Généralement, leur mode d'action, leur localisation cellulaire et leur origine sont les plus utilisés. Deux grandes classes, synthétiques et naturels sont discutés dans la partie suivante.

#### 2.3.1. Antioxydants d'origine naturelle

Plusieurs substances peuvent être d'origine naturelle non synthétique. Elles incluent le bêta carotène, l'albumine, l'acide urique, les œstrogènes, les polyamines, les flavonoïdes, l'acide ascorbique, les composés phénoliques, la vitamine E...etc. elles peuvent atténuer l'agression de la matière vivante en évitant toutes sortes de dégradation pathologique et peroxydation lipidique. (Shahidi et Zhong, 2015).

#### 2.3.2. Antioxydants d'origine synthétique

Les antioxydants synthétiques, tel que le butylhydroxyanisole (BHA), butylhydroxytoluène (BHT) gallate propylée (PG) et le tétrabutylhydroquinone (TBHQ) sont largement utilisés comme conservateurs puissants dans le secteur de l'industrie alimentaire et pharmaceutique, ils sont efficaces et moins chers que les antioxydants naturels. Cependant, plusieurs rapports ont discuté profondément leurs effets secondaires qui sont parfois lourds. (Shahidi et Zhong, 2015 ; Fraipont et Preiser, 2016).

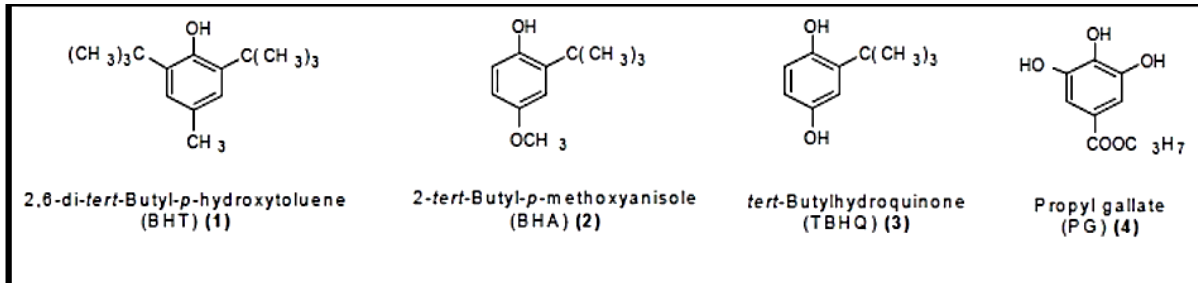


Fig. II. 03: Structures chimiques de quelques antioxydants synthétiques

## 3. Le stress oxydatif

### 3.1. Généralités

Le stress oxydatif est défini comme un état de déséquilibre entre la production de substances oxydantes qui sont principalement des EROs et la capacité neutralisation par des antioxydants en faveur des EROs. (Baudin, 2020). Ce déséquilibre est dû soit à une surproduction d'espèces EROs soit à un déficit en antioxydants, ou les deux à la fois (Fig. II. 04) (Méhats *et al.*, 2017). Plusieurs conditions conduisent à l'apparition de ce désordre y inclus l'exposition au polluants ou métaux lourds, lésion d'ischémie-reperfusion, les états hypermétaboliques, tels que l'hyperthyroïdie, et activité physique (Di Meo et Venditti, 2020).

Le stress oxydant est processus pathologique intervient dans le phénomène du vieillissement et de nombreuses maladies comme les cancers, les maladies inflammatoires, les maladies neurologiques...etc (Chene *et al.*, 2016 ; Marinari *et al.*, 2019 ; Zahir *et al.*, 2020).

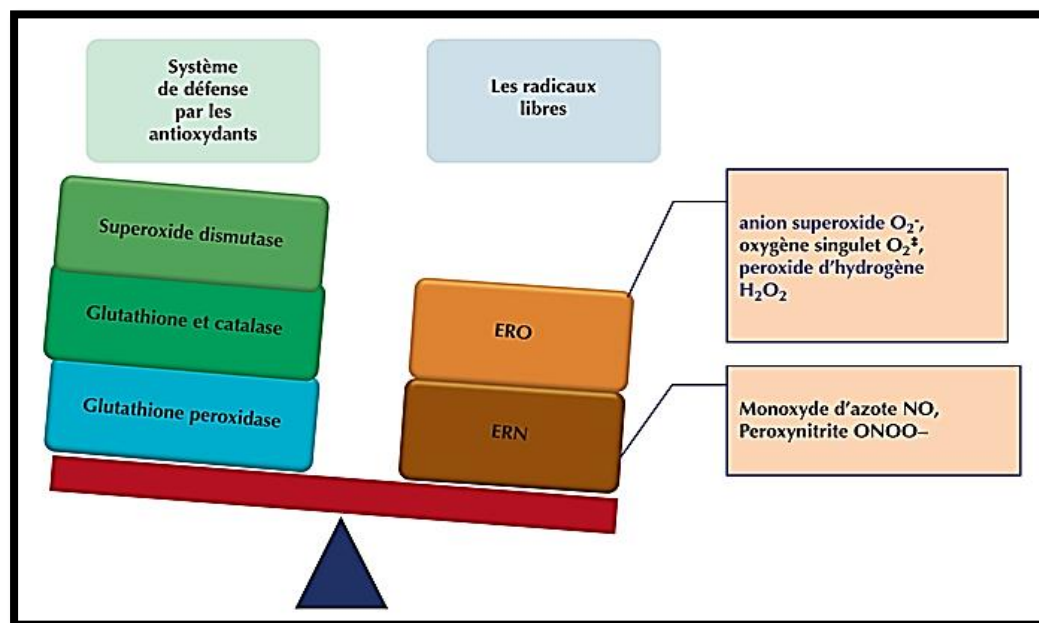


Fig. II. 04 : Origine du stress oxydatif (Belaïch *et al.*, 2015)

### 3.2. Effets néfastes sur la santé humaine

Le stress oxydatif provoque plusieurs effets indésirables sur la santé de la population générale et de certains patients souffrants des maladies, d'origine métabolique, chroniques et aiguës. Il est prouvé que plusieurs micronutriments antioxydants sont importants dans la prévention du cancer, des maladies cardiovasculaires, de certaines maladies oculaires et du vieillissement (Chene *et al.*, 2016 ; Marinari *et al.*, 2019). Chez le patient agressé, les suppléments antioxydants sont associés à une atténuation des défaillances organiques (rein, paumons) et de plusieurs complications d'origine infectieuse. Le stress oxydant potentialise l'apparition de maladies plurifactorielles comme le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes, les maladies cardio-vasculaires etc. Pour se protéger, un arsenal d'antioxydants ont été organisés, des enzymes (superoxyde dismutase, catalase et glutathion-peroxydase), des vitamines (A, E et C) ainsi que certaines molécules accessoires (acide urique, bilirubine et mélatonine) (Baudin, 2020).

Tableau II. 03 : Exemples des pathologies liées au stress oxydatif (Bensakhria, 2018)

Maladies ou le stress oxydatif est la cause primordiale	Maladies ou le stress oxydatif est le facteur déclencheur	Maladies entraînant un stress oxydatif secondaire
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cancer,</li> <li>• Auto-immunité</li> <li>• Cataracte</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Maladies d'Alzheimer</li> <li>• Stérilité masculine</li> <li>• Rhumatismes</li> <li>• Athéromes</li> <li>• Asthmes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diabète</li> <li>• Insuffisance rénale</li> <li>• Maladies de Parkinson</li> </ul>

#### 4. Stress oxydatif et maladies chroniques

##### 4.1. Le Diabète

###### 4.1.1. Généralités

Le diabète est une maladie chronique liée à l'insuffisance pancréatique à produire suffisamment d'insuline ou à l'utilisation inadéquate de l'insuline synthétisé (Lebreton *et al.*, 2020). Le diabète est un désordre métabolique caractérisé par une hyperglycémie chronique et une perturbation des métabolismes glucidique, lipidique et protéique. Il peut être provoqué par une sécrétion inadéquate d'insuline et/ou l'altération de son activité. Plusieurs types de diabète ont été déterminés: type 1, type 2, diabète gestationnel et les autres types parmi lesquels ceux d'origine génétique. (Tan-Chen *et al.*, 2020). Le stress oxydatif est un acteur déclenchant et/ou secondaire du diabète, il peut intervenir dans le déclin de l'insulinosécrétion et l'installation de l'insulinorésistance, ou dans la survenue des complications métaboliques (Baudin, 2020)

###### 4.1.2. Diabète type 01

Le DT 01 est une maladie qui se caractérise par une destruction abusive des cellules  $\beta$  productrices d'insuline par plusieurs mécanismes y inclus les processus auto-immuns. Cette forme de carence absolue en insuline est apparue chez 5 à 10 % des cas diabétiques (Brownlee, 2015). La surproduction des radicaux libres dans les systèmes biologiques peut être un facteur déclenchant ou associé au diabète. Plusieurs études ont rapporté la production excessive des produits de la peroxydation lipidique (diènes conjugués, hydroperoxydes d'acides gras et MDA) dans le plasma des personnes diabétiques (Boitard, 2020).

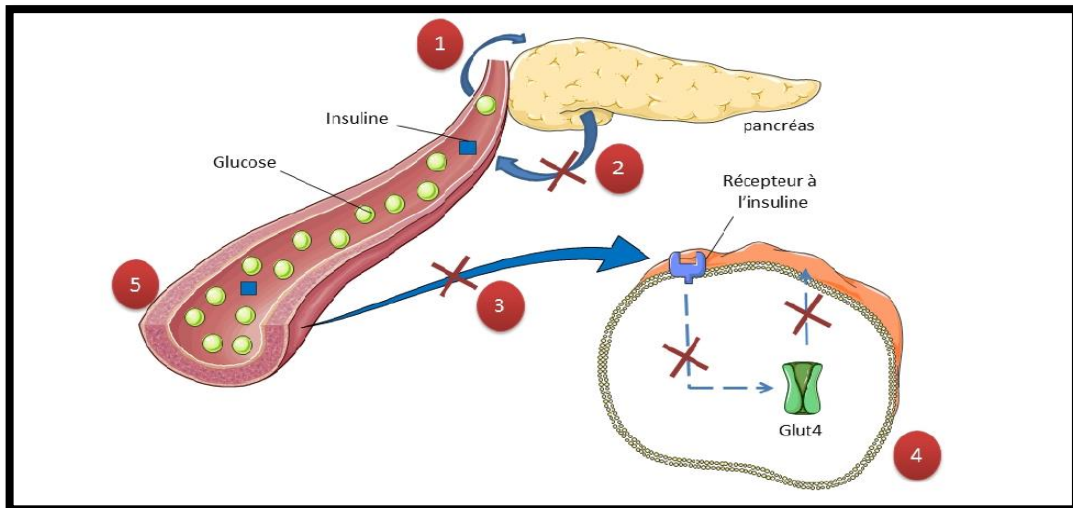


Fig. II. 05: Mécanisme de dysfonctionnement métabolique dans le DT 01

#### 4.1.3. Diabète type 02

C'est la forme la plus commune de diabète, elle est probablement hétérogène à une pathogénie complexe associant des facteurs multigéniques et d'environnementaux. Elle se caractérise par une résistance à l'action de l'insuline au niveau tissulaire (Boitard, 2020). C'est une forme non insulino-dépendante (DNID), caractérisée par une insulino-résistance qui peut aller vers une insulino-pénie et par conséquent une hyperglycémie chronique. Le dysfonctionnement du métabolisme de la matière grasse est un facteur de risque déterminant aboutissant à l'insulinorésistance et, chez les sujets prédisposés, au diabète de type 2. Plusieurs anomalies lipidiques peuvent être relevées (Ahren, 2010).

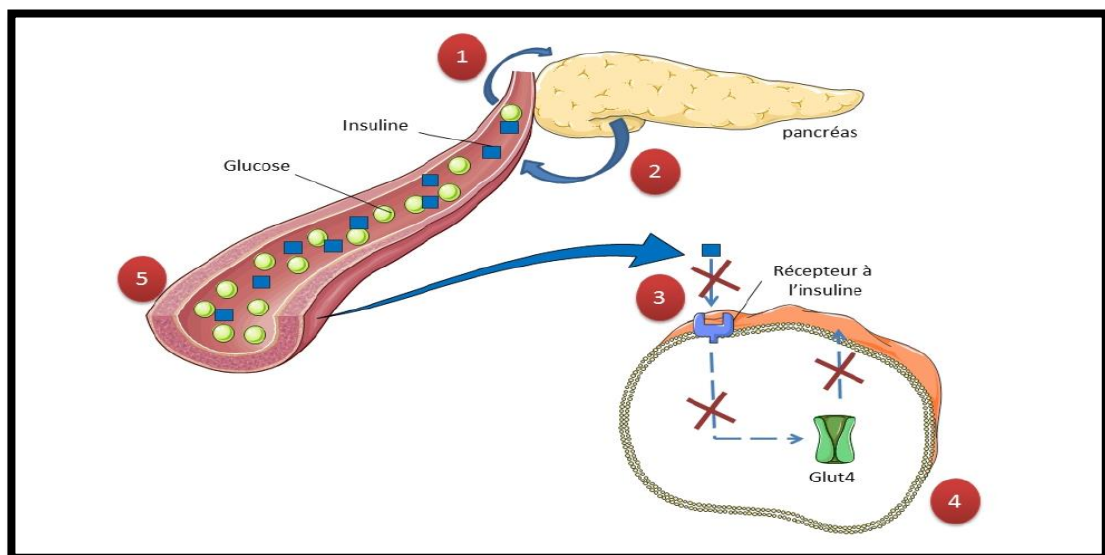


Fig. II. 06: Mécanisme de dysfonctionnement de l'homéostasie du glucose dans le DT 02

#### **4.1.4. Modes de traitement**

Pour un meilleur gestion glycémique des patients diabétiques (type 1 et 2), il est important de contrôler d'une manière adéquate leurs régime alimentaire. L'alimentation équilibrée avec une réduction du poids sont souvent nécessaires. Cette modification du régime doit être accompagnée avec médecins nutritionnistes ou de diététiciens (**Ahren, 2010**). Sur le plan thérapeutique, plusieurs médicaments à base d'insuline ou non peuvent être utilisés seules ou en combinaison afin de gérer l'état du malade à court et à long terme. (**Ivers et al., 2019**)

### **4.2. L'Alzheimer**

#### **4.2.1. Généralités**

La maladie d'Alzheimer est une problématique neurodégénérative majeure de santé publique, elle est largement désaminée dans la population âgée avec la sévérité de son tableau clinique et l'absence de traitement curatif. Cette forme pathologique se caractérise histologiquement par la présence de plaques séniles et la dégénérescence neurofibrillaire. (**Knopman et al., 2021**).

Les espèces réactives oxygénés sont impliqués dans plusieurs aspects du vieillissement, Ils provoquent des agressions tissulaires graves au niveau cérébral. Les cellules cérébrales des sont soumises à un stress oxydatif intense et inhabituelle, ce qui aggrave les dommages subis par les neurones et leur mort (**Butterfield et Halliwell, 2019**). Des analyses histologiques ont montré que les neurones en voie de dégénérescence présentaient des taux élevés d'oxydation des protéines, des lipides membranaires et de l'ADN (III-1, III-2, III-3). Les produits de peroxydation lipidique sont accumulés dans les neurones associés à des plaques amyloïdes. Certains s'accumulent même dans le LCR et peuvent être considéré comme marqueurs clinique de la progression chronique du processus dégénératif (**Pohanka, 2018**). Physiologiquement, les taux de protéine  $\beta$  amyloïde et de fer sont augmenté avec des perturbations de l'activité des enzymes antioxydantes sont aussi rapportés. (**Leuba G et al., 2011**)

#### **4.2.2. Modes de traitement**

Le traitement des cas d'Alzheimer est complexe. Le contrôle social de l'entourage des patients est essentiel. Les stratégies médicamenteuses cherchent à traiter les troubles cognitifs, contrôler la progression et maintenir l'autonomie dans les activités de la vie quotidienne. Les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (IACHÉ) et la mémantine sont actuellement les traitements de première intention. Autres substances actives sont administrées pour améliorer la circulation et l'oxygénation cérébrale. (**Leuba G et al., 2011**). L'efficacité d'un traitement est supérieure

dans les stades précoces de la maladie. L'immunothérapie est stratégie thérapeutique pratiquée actuellement pour éliminer la bêta-amyloïde, via l'injection d'anticorps spécifiquement dirigés contre ce peptide (immunothérapie passive), ou des vaccins (immunothérapie active). Autres thérapies non médicamenteuses sont également pratiquées pour but d'éviter l'isolement de la personne et à l'aider dans sa vie quotidienne (Delrieu et Vellas, 2020).

## **5. L'évaluation de l'activité antioxydante**

### **5.1. L'étude *in vivo***

L'activité antioxydante peut être évaluée *in vivo* en utilisant un modèle de l'expérimentation animal. Elle peut être évaluée sur le plan comportemental, physiologique et histologique mais généralement le suivi de l'activité enzymatique (CAT, Px, GTX...etc.) durant un cas de stress induite et/ou l'évaluation des teneurs des molécules liées au stress oxydatif et la peroxydation lipidique sont les mécanismes les plus utilisés par les praticiens.

### **5.2. L'étude *in silico***

Actuellement, les avancées en bio-informatique développent plusieurs stratégies pour l'évaluation de l'activité antioxydante. Les études en QSAR 2D et 3D, le docking moléculaire et la dynamique moléculaire deviennent des outils principaux pour la prédiction et l'évaluation des propriétés antioxyfantes

### **5.3. L'étude *in vitro***

Des nombreuses méthodes sont utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits naturels ou des produits synthétiques. La plupart de ces méthodes sont basées sur un transfert des protons (DPPH, ABTS, ...etc.), des électrons (FRAP, CUPRAC, SNP, Phenanthroline...etc.) ou un mécanisme de chélation métallique dans le milieu réactionnel. Ces transferts sont suivis par des variations colorimétriques détectables par spectrophotométrie.

## ***Chapitre 03***

# ***Matériels et méthodes***

### **1. Récolte et collection du matériel végétal**

La plante, sélectionnée pour cette étude, a été collectée dans la période du printemps de la région nord-est de l'Algérie. Elle a été identifiée par le Dr. Kadi Imededdine, maître de recherche au centre de recherche en biotechnologie (CRBt, Constantine) en présence d'un botaniste de l'université des frères Mentouri, Constantine.

### **2. Préparation de la matière première**

La totalité de la partie aérienne collectée a été séchée pendant deux semaines dans un endroit sec, à l'abri de toute source de lumière et chaleur. Ensuite, cette matière végétale a été broyée, à l'aide d'un broyeur convenable, en particules fines orientées vers l'extraction. Un spécimen d'herbier a été archivé à l'Herbarium du centre de recherche en biotechnologie.

### **3. Extraction des principes actifs**

Pour l'extraction des produits naturels, une masse de 100 g de la matière première a été mis en extraction solide-liquide dans une solution hydro-alcoolique méthanol-eau (70/30) sous agitation magnétique pendant 48 heures avec trois répétition en renouvelant le solvant à chaque répétition. Le mélange obtenu a été filtré (papier filtre Whatman n°4) et séché par un Rotavapor (35°C / 130 mbar) en diminuant la pression jusqu'à (0 mbar) pour éliminer les traces d'eau à basse température.

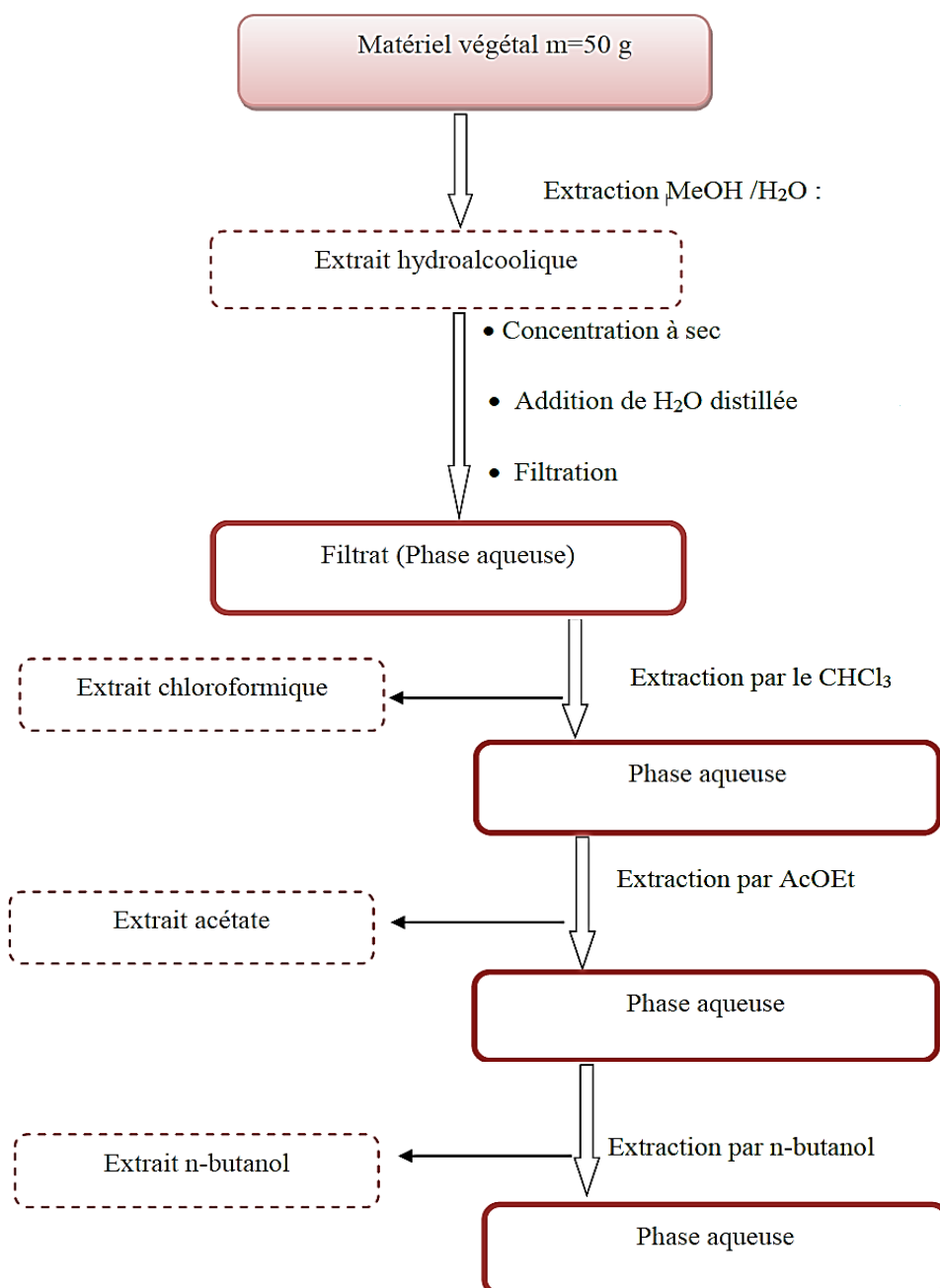
Pour le fractionnement, L'extrait hydroalcoolique obtenu a été solubilisé dans l'eau distillée en respectant le rapport (100 ml/10g) sous agitation pendant 24h. ensuite, nous avons procédé à l'extraction liquide-liquide, à l'aide d'une ampoule à décanter, en utilisant trois solvants de polarité croissante, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le n-butanol.

### **4. Quantification des composés phénoliques**

La méthode classique de Folin-Ciocalteu (FCR), adopté au microplaque de 96 puits, a été utilisée pour estimer Le teneur en polyphénols totaux (**Singleton *et al.*, 1965**). Le milieu réactionnel contient 20 µl d'extrait (1 mg /1 ml de méthanol) ajouté à 100 µl de FCR dilué (1:10) et 75 µl de carbonate de sodium (7,5%). Le mélange a été incubé à l'obscurité pendant 2 heures à température ordinaire du laboratoire. L'absorbance a été déterminée à 765 nm contre un blanc (en remplaçant l'extrait par le solvant utilisé). Ce genre de quantification nécessite la préparation d'une courbe d'étalonnage de l'acide gallique de la même manière. Les résultats sont exprimés en µg équivalent de l'acide gallique par mg d'extrait.

## 5. Dosage des flavonoïdes

La méthode décrite par Topçu *et al.*, (2007), adopté au microplaque de 96 puits, a été sélectionné pour le dosage des flavonoïdes (Topçu *et al.*, 2007). Brièvement, 50 µl de l'échantillon a été mélangé avec 130 µl de méthanol, 10 µl d'acétate de potassium et 10 µl de nitrate d'aluminium. Le mélange a été incubé a la température ambiante pendant 40 min. la lecture d'absorbance a été réalisée à 415 nm. Une courbe d'étalonnage de Quercétine a été préparée de la même manière. Les résultats sont exprimés en µg équivalent de Quercétine par mg d'extrait.



**Fig. III. 01** : Schéma général de l'extraction et le fractionnement des extraits étudiés.

## 6. L'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante

Différentes méthodes ont été utilisées pour estimer l'activité antioxydante de nos extraits

### 6.1. Piégeage du radical stable DPPH

La méthode standard du piégeage du radical stable DPPH a été sectionné selon la procédure classique décrite par **Blois *et al.*, 1958**. En utilisant une microplaque à 96 puits, un volume de 160  $\mu\text{l}$  du DPPH $\cdot$  (A=0.7) a été mélangé avec 40  $\mu\text{l}$  de différentes concentrations de l'échantillon. Le mélange a été incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant 30 min. L'absorbance du mélange a été mesurée à 517 nm. Le BHA, le BHT et l' $\alpha$ -tocophérol ont été utilisés comme des molécules de référence. Le pourcentage d'inhibition a été calculé selon la formule suivante:

$$\% \text{ inhibition} = \frac{A(\text{control}) - A(\text{extrait})}{A(\text{control})} \times 100$$

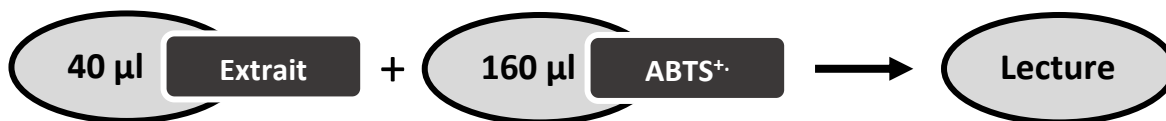


**Fig. III. 02** : mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon(DPPH)

### 6.2. Piégeage du radical ABTS

La procédure de piégeage du radical ABTS est similaire à celle du DPPH, en utilisant la méthode décrite par **Re *et al.*, 1999**. Brièvement, dans une microplaque à 96 puits, nous avons mis 160  $\mu\text{l}$  d'ABTS $\cdot+$  (préparé à l'aide d'un catalyseur chimique pendant 16h, A=0.7) en réaction avec 40  $\mu\text{l}$  de différentes concentrations de l'extrait à tester. Le mélange a été incubé à température ordinaire pendant 10 min et l'absorbance a été mesurée à 734 nm. Le BHA et le BHT ont été utilisés comme standards. Le pourcentage d'inhibition a été calculé selon la même formule précédente:

$$\% \text{ inhibition} = \frac{A(\text{control}) - A(\text{extrait})}{A(\text{control})} \times 100$$



**Fig. III. 03** : mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon(ABTS)

### 6.3. Activité du pouvoir réducteur (FRAP)

La capacité des extraits à transférer les électrons afin de réduire le  $\text{Fe}^+$  a été évaluée selon la méthode d'Oyaizu *et al.*, 1986. Le mélange réactionnel contient 10  $\mu\text{l}$  de l'extrait, 40  $\mu\text{l}$  d'une solution tampon phosphate (pH 6,6) et 50  $\mu\text{l}$  d'une solution de ferricyanide de potassium (1%). L'ensemble a été maintenu à l'étuve (50°C) pendant 20 min. Ensuite, nous avons ajouté 50  $\mu\text{l}$  d'acide tri-chloroacétique (10%) pour stopper la réaction, 40  $\mu\text{l}$  d'eau distillée et 10  $\mu\text{l}$  d'une solution de chlorure de fer anhydre (0,1%). L'absorbance des mélanges a été mesurée à 700 nm contre un blanc préparé de la même manière, en remplaçant l'extrait par le méthanol. Les vitamines C et E ont été utilisés comme standards et Les résultats ont été calculés à titre de  $A_{0,50}$  ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

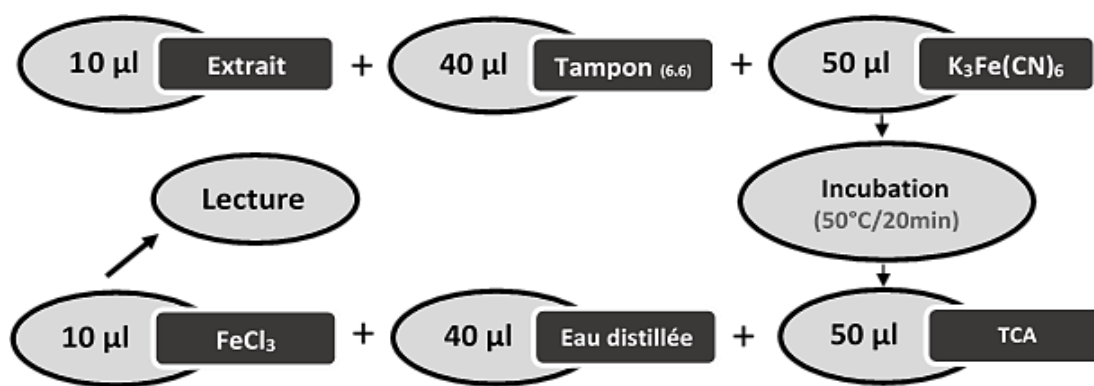


Fig. III. 04 : mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon(FRAP)

### 6.4. Activité de réduction par formation du complexe $\text{Fe}^{+2}$ -Phénanthroline

Cette méthode est presque similaire à celle du pouvoir réducteur avec la formation des complexes  $\text{Fe}^{+2}$ -Phénanthroline. La méthode décrite par Szydłowska-Czerniak *et al.*, 2008 a été sélectionnée. Brièvement, 10  $\mu\text{l}$  de l'extrait a été mélangé avec 50  $\mu\text{l}$  de chlorure de fer anhydre (0,2%), 30  $\mu\text{l}$  de phénanthroline (0,5%) et 110  $\mu\text{l}$  de méthanol. L'ensemble a été incubé à température de laboratoire pendant 20 min. L'absorbance a été mesurée à 510 nm. Le BHA et le BHT ont été utilisés comme standards et les résultats ont été calculés à titre de  $A_{0,5}$

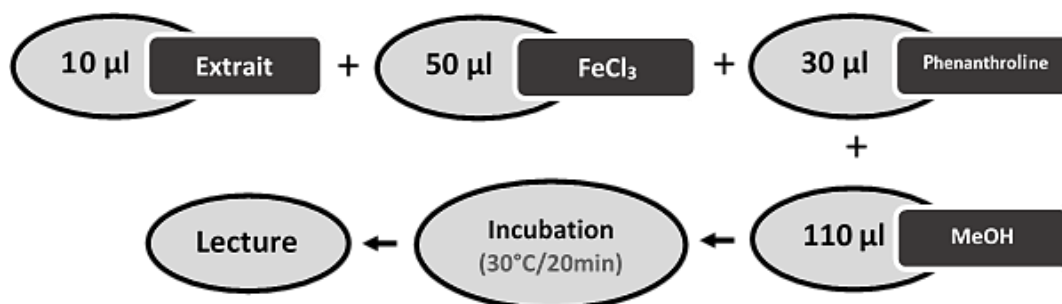
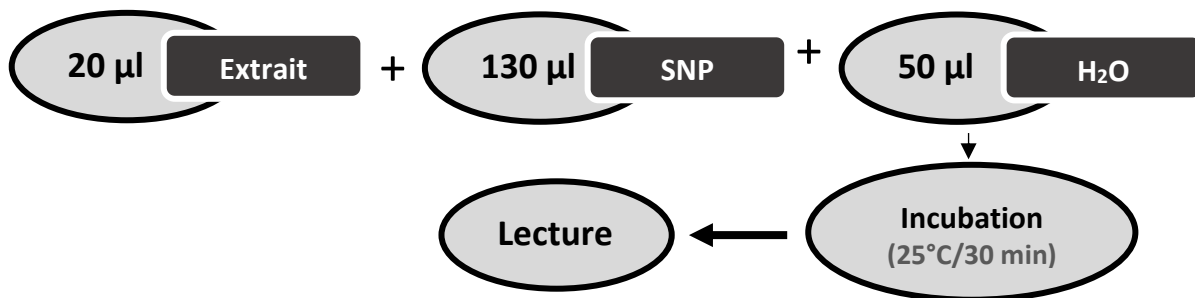


Fig. III. 05 : mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon(Phénanthroline)

### 6.5. Activité de réduction de l'Ag<sup>+</sup> en nanoparticule d'Argent sphérique

L'activité de réduction de l'Ag<sup>+</sup> en nanoparticules d'argent sphériques a été déterminée selon la méthode de **Mustafa Özyürek et al., 2012**. 50 mL of (AgNO<sub>3</sub> (1.0 mM)) a été chauffé pendant 10 min, puis 5 ml de Trisodium citrate (1%) a été ajouté goutte à goutte jusqu'à le changement de la couleur vers le jaune pâle, après la solution est laissée à température ambiante pour refroidissement. Pour le remplissage de la plaque, 20 µl d'extrait a été mélangé avec 130 µl de la solution SNP et 50 µl d'eau distillée. L'ensemble a été incubé pendant 30 min à 25°C. le Trolox est utilisé comme standard.



**Fig. III. 06** : mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon(SNP)

7. Activité inhibitrice des enzymes

7.1. Activité antidiabétique via l'inhibition de l'α-amylase

L'inhibition de l'α-amylase, *in vitro*, a été déterminée selon la méthode décrite par Zengin *et al.*, 2014. Brièvement, on a mélangé 25 µl de l'échantillon avec 50 µl d'une solution d'α-amylase (1U) et l'ensemble a été incubé pendant 10 min à 37°C. Ensuite, 50 µl d'amidon (0,1%) a été additionné. Une deuxième incubation du mélange est incubé 10 minutes à 37°C a été réalisée. Après incubation, on a ajouté 25 µl d'acide hypochlorique (HCl, 1M) et 100 µl d'iodure de potassium iode (IKI). La lecture de l'absorbance a été fait à 630 nm. L'acarbose a été utilisé comme standard.

La formule, en dessous, permet de calculer Le pourcentage d'inhibition de l'α-amylase :

$$\% \text{ inhibition} = 1 - \frac{(Ac - Ae) - (As - Ab)}{(Ac - Ae)}$$

- Ac : Absorbance [Amidon+IKI+HCl+MeOH+Tampon]
- Ae : Absorbance [Enzyme+Amidon+IKI+HCL+ MeOH]
- As : Absorbance [Enzyme+Extrait+Amidon+IKI+HCl]
- Ab : Absorbance [Extrait+IKI+ tampon]

Tableau III. 01 : l'organisation de microplaque dans le test d'inhibition de α-amylase

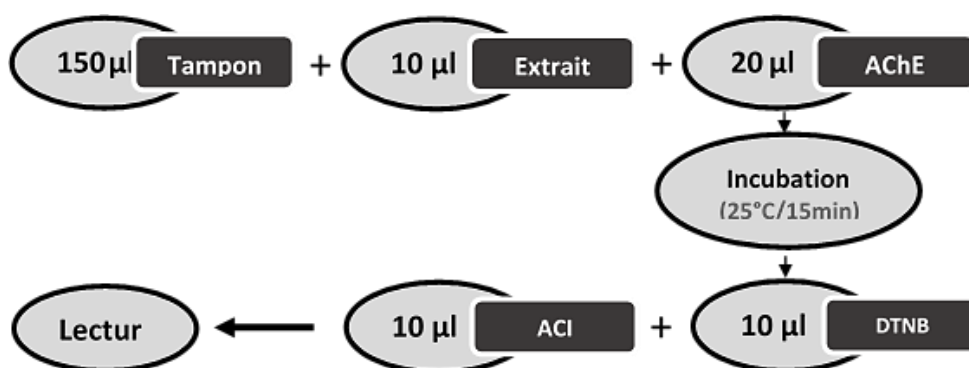
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Extrait 01 (As)			Blanc extrait 01 (Ab)	Extrait 02 (As)			Blanc extrait 02 (Ab)	Extrait 03			Blanc extrait 03 (Ab)
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H	Ae						Ac					

Tableau III. 02 : Mode de remplissage de microplaque dans le test de α-amylase

Extraits	Blanc d'extrait	Ae	Ac
25µl extrait	25µl extrait	25µl MeOH	25µl MeOH
50µl Enzyme	50µl tampon	50µl Enzyme	50µl Tampon
Incubation à 37°C – 10 min			
50µl Amidon	50µl tampon	50µl amidon	50µl amidon
Incubation à 37°C – 10 min			
25µl HCL	25µl tampon	25µl HCL	25µl HCL
100 IKI	100 IKI	100 IKI	100I

### 7.2. Activité anti-Alzheimer via l'inhibition de l'acétylcholinestérase

La méthode développée par **Ellman *et al.*, 1961** reste la plus pratiquée pour l'évaluation de l'activité inhibitrice des cholinestérase AchE et BuChE. Brièvement, 150 µl de tampon phosphate de sodium à (pH 8) (100 mM) a été mélangé avec 10 µl d'extrait et à 20 µl d'enzyme BuChE (6,85 x10<sup>-3</sup> U). Le mélange a été maintenu dans l'étuve (à 25°C) pendant 15 minutes. Ensuite, 10 µl de DTNB (acide 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoïque)) (0,5 mM) et 10 µl acetylthiocholine iodide (0.71 mM) ont été ajoutés. L'absorbance a été mesurée à 412 nm et la galantamine a été utilisée comme standard.

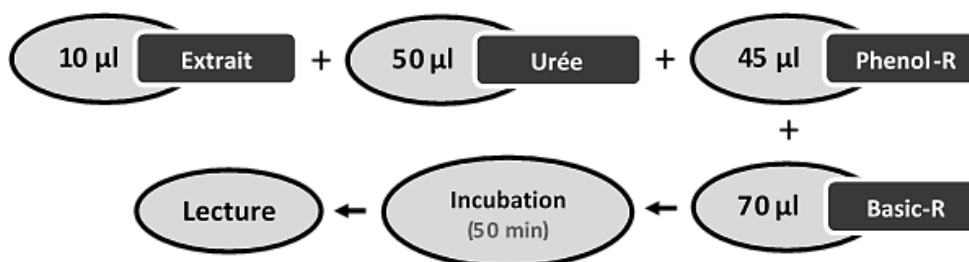


**Fig. III. 07** : mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon(AChE)

### 7.3.L'Activité inhibitrice de l'Uréase

L'activité inhibitrice de l'Uréase a été déterminée selon la méthode décrite par **Weatherburn *et al.*, 1967**. Brièvement, le mélange réactionnel qui contient 25µl d'enzyme, 10µl des différentes concentrations de l'échantillon et 50µl de l'Urée a été incubé à 30°C pendant 15 min. Ensuite, 45µl de phénol reagent et 70µl de basic reagent ont été ajoutés. Après 50 min d'incubation à 30°C, l'absorbance a été mesurée à 630 nm à l'aide d'un lecteur des microplaques (96 puits) et les pourcentages d'inhibition ont été calculés selon la formule :

$$\% \text{ inhibition} = \frac{A(\text{controle}) - A(\text{echantillon})}{A(\text{controle})} \times 100$$



**Fig. III. 08** : mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon(Uréase)

### 8. Activité protectrice vis-à-vis les rayonnements solaires

Le facteur de protection solaire a été estimé selon la méthode décrite par **Dutra et al. 2004**. L'absorbance de 200µl de chaque échantillon (2mg/ml) a été mesurée dans une intervalle de 290 à 320 chaque 5 nm (UV-B), et la valeur du SPF a été calculé par l'équation mathématique de **Mansur**.

$$\text{SPF spectrophotométrique} = \text{CF} \times \sum_{290}^{320} \text{EE}(\lambda) \times \text{I}(\lambda) \times \text{Abs}(\lambda)$$

- EE: spectre d'effet thermique
- I : spectre d'intensité solaire
- Abs: absorbance de l'échantillon
- CF: facteur de correction (= 10)

**Tableau III. 03** : Fonction normale de produit utilisée dans le calcul de la SPF

Longueur d'onde $\lambda$ (nm)	EE ( $\lambda$ )x I( $\lambda$ ) (Normes)
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0837
320	0,0180
Total	1

### 9. Etude statistique

Les résultats obtenus ont été réalisés en trois répétition pour chaque essai, ils sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD. La méthode de régression linéaire a été utilisé pour déterminer les valeurs de **IC<sub>50</sub>** et de **A<sub>0,5</sub>**. En utilisant le logiciel Graphpad Prism 7.0, ANOVA a un seul facteur contrôlé a été utilisé pour les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification statistique, elle est suivi du test post-hoc de tuckey. Le seuil de significativité statistique est considéré a  $\alpha=5\%$ .

## ***Chapitre 04***

# ***Résultats et discussion***

## 1. Rendements d'extraction

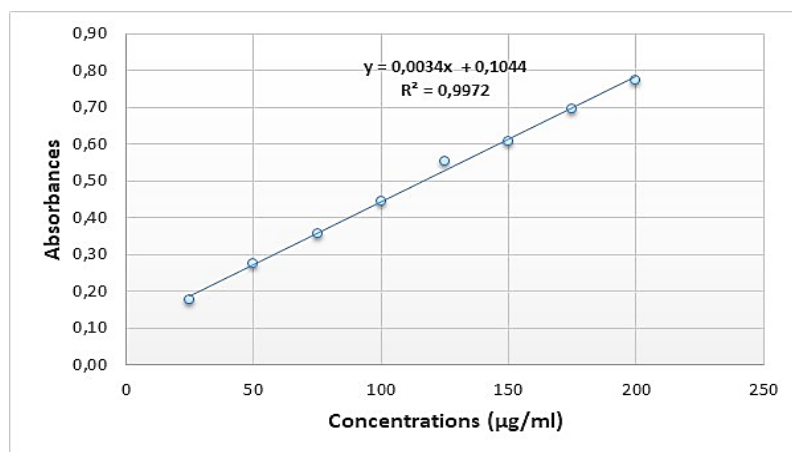
Les rendements d'extraction des quatre extraits étudiés ont été déterminés, en terme de quantité, et représentés dans le **tableau IV. 01** en dessous

**Tab. IV. 01** : Rendement d'extraction des extraits étudiés

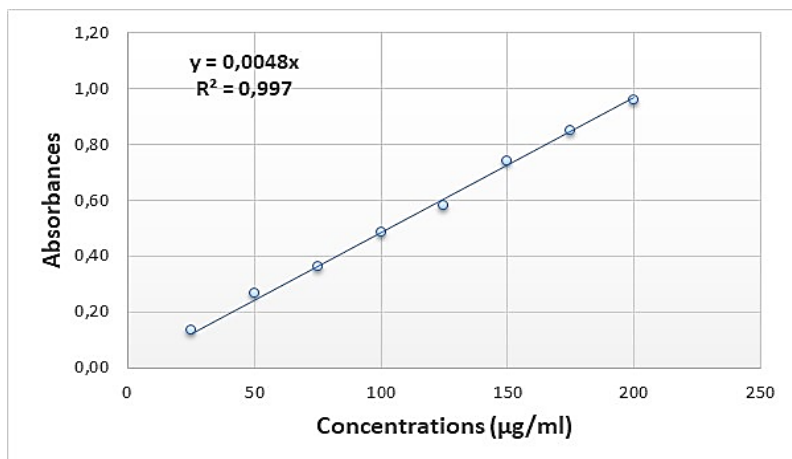
Extrait	Rendement
Extrait hydroalcolique	36.84 %
Extrait Acétate d'éthyle	10.92 %
Extrait chloroformique	06.94 %
Extrait n-butanolique	09.64 %

## 2. Dosage des phénols totaux et flavonoïdes

En utilisant la courbe d'étalonnage de l'acide gallique, montré dans **la figure IV. 01**, et celle de la Quercitine, montré dans **la figure IV. 02**, nous avons déterminé les teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes. Les résultats obtenus ont été organisés dans le **tableau IV. 02** et les **figures IV. 03** et **IV. 04** respectivement.



**Fig. IV. 01** : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique



**Fig. IV. 02:** Courbe d'étalonnage de la Quercétine

Tab. IV. 02 : Teneur en Phénols totaux et flavonoïdes des extraits étudiés

Extraits	$\mu\text{g EAG/ml/mg d'extract}$	$\mu\text{g EQ/ml/mg d'extract}$
Extrait hydroalccolique	410.17 $\pm$ 8.66	91.38 $\pm$ 3.95
Extrait Acétate d'éthyle	372.03 $\pm$ 5.92	85.83 $\pm$ 4.85
Extrait chloroformique	110.34 $\pm$ 7.61	51.31 $\pm$ 2.28
Extrait n-butanolique	181.58 $\pm$ 9.26	71.87 $\pm$ 1.62

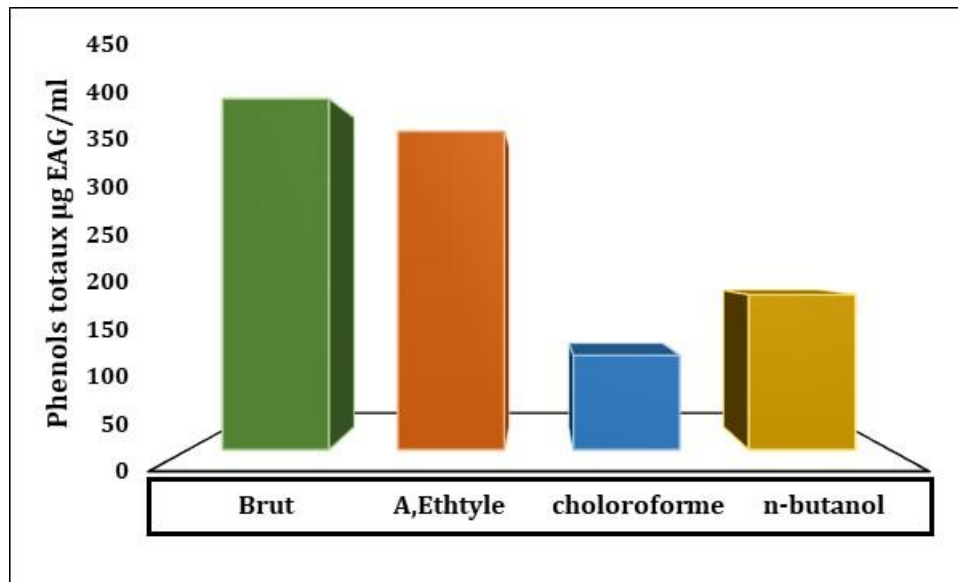


Fig. IV. 03 : Teneurs en Phénols totaux des extraits étudiés

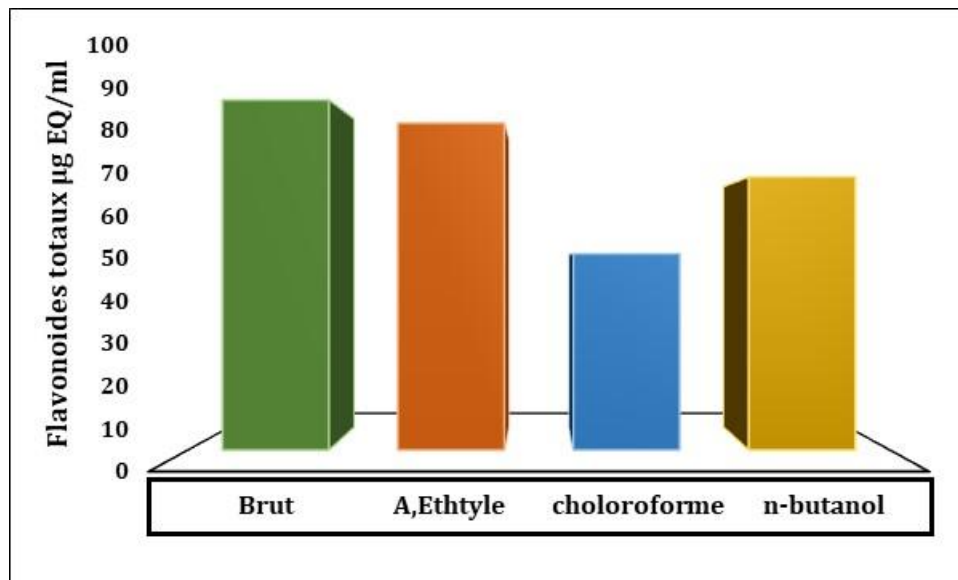


Fig. IV. 04 : Teneur en Flavonoïdes totaux des extraits étudiés

Les résultats obtenus ont montré des rendements d'extraction intéressants pour les différents extraits étudiés notamment pour l'extrait hydroalcoolique, ce qui reflète la richesse de cette plante médicinale en principes actifs (**Tab. IV. 01**).

A l'aide de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique ( $y=0.0034x+0.1044$ ,  $R^2=0.9972$ ), le contenu en composés phénoliques, exprimée en microgrammes équivalent en acide gallique par milligramme d'extrait et par millilitre (**Tab. IV. 02**), a été montré des niveaux considérables en composés phénoliques plus particulièrement pour l'extrait brut qui a présenté la quantité la plus élevée, suivi par les extraits d'acétate d'éthyle, le n-butanolique et le chloroformique respectivement.

Ainsi, la courbe d'étalonnage de la Quercétine ( $y= 0.0048x$ ,  $R^2=0.997$ ) nous a permis de déduire les teneurs en flavonoïdes, exprimés en microgrammes équivalent en Quercétine par milligramme d'extrait et par millilitre. Les résultats obtenus ont montré des valeurs assez intéressantes pour les quatre extraits étudiés. Les deux extraits, bruts et d'acétate d'éthyle, ont représenté les teneurs les plus importants néanmoins le chloroformique est le plus faible (**Tab. IV. 01**).

Plusieurs études ont été rapportées que les composés phénoliques, notamment les flavonoïdes, sont responsables, directement et/ou indirectement, aux différentes activités biologiques et pharmacologiques des extraits végétaux (**Rauf et al., 2016 ; Wasowski et al., 2013**). La partie suivante de ce travail va se focaliser sur les activités antioxydantes et inhibitrice des enzymes des quatre extraits étudiés.

## 3. Activité antioxydante

## 3.1. Activité de piégeage du radical libre DPPH

L'activité inhibitrice du radical DPPH est résumée dans le **tableau IV. 03**

**Tab. IV. 03:** Pourcentages d'inhibition du radical DPPH

Extraits	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	Equivalent BHA
hydroalcoolique	05,20±0.70	11,09±1.46	30,45±1.69	48,00±1.95	67,04±1.00	85,49±0.68	87,05±1.00	<b>123,09±2.75</b>	04.98 %
Acetate E	32,72±1.76	56,35±0.98	80,51±1.47	82,32±0.70	82,90±0.34	84,65±1.35	85,72±0.10	<b>023,86±0.52</b>	25.73 %
Chloroformique	03,19±0.79	5,20±1.01	16,53±2.25	21,90±0.39	50,72±0.79	70,67±0.00	83,61±1.48	<b>198,04±3.41</b>	01.23 %
n-butanolique	08,89±1.27	15,82±1.07	23,39±1.95	34,08±0.96	62,70±1.35	78,76±1.62	85,80±0.77	<b>154,22±2.67</b>	03.98 %
BHA*	76,55± 0,48	79,89± 0,26	81,73±0,10	84,18±0,10	87,13±0,17	89,36±0,19	90,14±0,00	<b>006.14±0.41</b>	//
BHT*	49,09± 0,76	72,63± 2,06	88,73±0,89	94,00±0,31	94,97±0,08	95,38±0,41	95,02±0,23	<b>012.99±0.41</b>	//
A-tocophérol*	37,21±1,82	81,53±1,51	89,23±0,12	89,38±0,19	89,45±0,22	89,99±0,23	89,52±0,33	<b>013.02±5,17</b>	//

• Les résultats sont exprimés sous forme de la moyenne ± SD des trois répétitions pour chaque essai

• (\*) les standards : molécules de références

• BHA : hydrox-yanisole butylé

• BHT : hydroxy-toluene butylé

## 3.2. Activité de piégeage du radical libre ABTS

L'activité inhibitrice du radical ABTS est résumée dans le tableau IV. 04

Tab. IV. 04: Pourcentages d'inhibition du radical ABTS

Extraits	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	Equivalent BHA
hydroalcoolique	16,98±1.46	29,40±0.34	48,12±1.74	68,05±2.64	87,35±1.48	90,84±0.98	90,09±0.55	<b>061.43±2.94</b>	02.94 %
Acetate d'éthyle	46,58±0.79	62,10±0.99	74,86±1.14	90,72±1.36	92,79±0.17	91,81±1.01	93,52±1.38	<b>013.63±1.15</b>	13.27 %
Chloroformique	Nt	14,86±1.43	26,83±0.79	47,21±0.88	71,37±4.67	88,43±2.41	92,04±0.40	<b>122.51±7.78</b>	01.47 %
n-butanolique	34,44±2.67	45,15±5.17	62,78±2.05	76,70±3.18	85,80±1.04	83,57±1.21	88,68±2.18	<b>032.49±4.13</b>	05.57 %
BHA *	92.83±1,42	94.68±0,42	94.95±0,90	95.32±0,25	95.59±0,47	95.83±0,15	95.86±0,10	<b>001.81±0.10</b>	//
BHT *	69.21±0,40	78.23±1,34	88.12±1,28	88,76±3,07	90.85±1,74	90,95±0,51	96.68±0,39	<b>001.29±0.30</b>	//

- Les résultats sont exprimés sous forme de la moyenne ± SD des trois répétitions pour chaque essai
- (\*) les standards : molécules de références
- Nt : non testée
- BHA : hydrox-yanisole butylé
- BHT : hydroxy-toluene butylé

Tab. IV. 05: Tableau récapitulatif des valeurs IC<sub>50</sub> (µg/ml)

	DPPH	ABTS
Extrait hydroalcoolique	123.09±2.75	061.43±2.94
Extrait Acétate d'éthyle	023.86±0.52	013.63±1.15
Extrait Chloroformique	198.04±3.41	122.51±7.78
Extrait n-butanolique	154.22±2.67	032.49±4.13

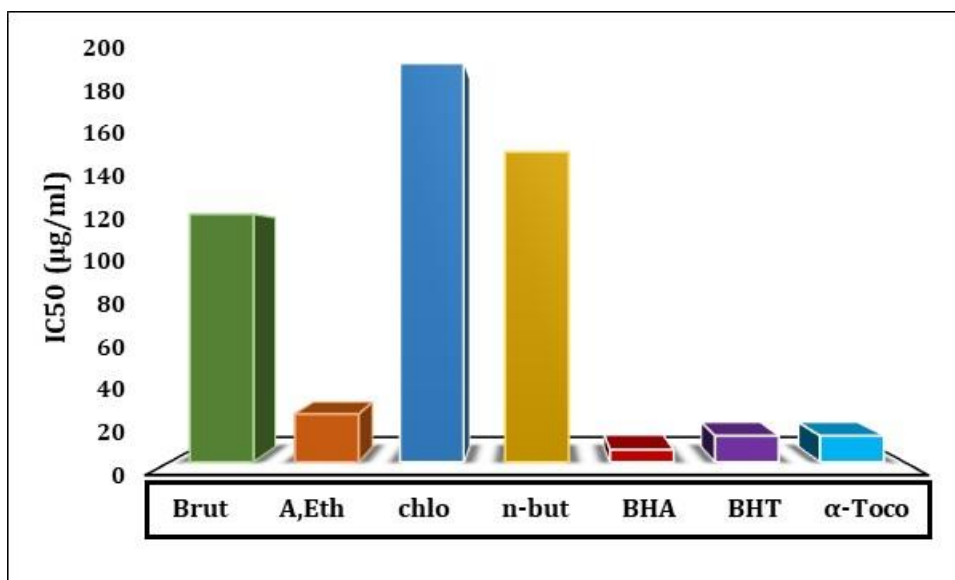


Fig. IV. 05 : Valeurs IC<sub>50</sub> des extraits étudiés dans le piégeage du radical DPPH

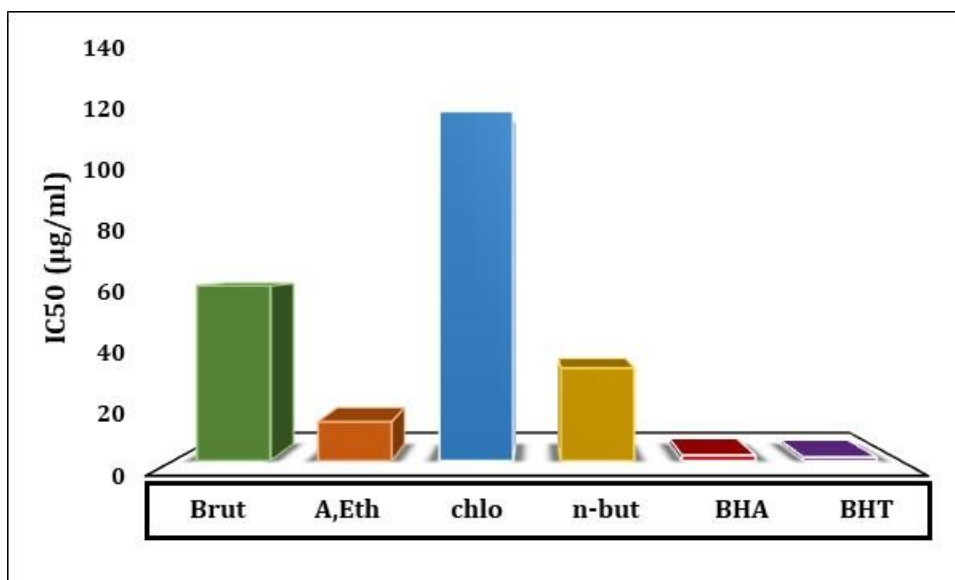


Fig. IV. 06 : Valeurs IC<sub>50</sub> des extraits étudiés dans le piégeage du radical ABTS

Actuellement, l'intervention du stress oxydatif dans l'apparition et le développement des maladies chronique est indiscutable. Le cancer, le diabète, l'insuffisance rénale et hépatique ...etc. viennent à s'installer progressivement dans la communauté en engendrant des impacts socioéconomiques lourds. Parallèlement, l'utilisation des antioxydants synthétiques, a titre préventif ou curatif, participe largement aux plusieurs effets néfastes sur la santé humaine ce qui stimule la communauté scientifique à chercher des produits antioxydants alternatifs, d'origine naturelle et plus particulièrement végétale, afin de lutter contre le stress oxydatif en se protégeant ainsi d'une grande variété de maladies. Dans ce contexte, nous avons évalué le pouvoir antioxydant des extraits naturels, par des méthodes colorimétriques *in vitro*, de la plante médicinale *Ptychotis verticillata* L. Initialement, le test classique de piégeage du radical DPPH est largement utilisé pour évaluer le pouvoir des antioxydants naturels à transférer des protons d'hydrogènes aux radicaux libres. Dans ce test, chaque extrait se caractérise par sa propre valeur d'IC<sub>50</sub> qui caractérise par son pouvoir de neutralisation des radicaux dans le milieu réactionnel. Les résultats obtenus ont montré des activités importantes pour les quatre extraits testés notamment pour l'extrait acétate d'éthyle qui est comparable aux références BHA et BHT. En parallèle, cet extrait a présenté une activité intéressante dans le piégeage du radical ABTS. L'extrait du chloroforme a montré une activité faible dans le piégeage des deux radicaux étudiés. Généralement, les teneurs élevées, de ces extraits, en composés phénoliques, et en flavonoïdes interviennent directement dans les propriétés anti radicalaires enregistrés. L'activité de l'extrait n-butanolique est bien remarquée dans le piégeage de l'ABTS que le DPPH ce qui est lié probablement à la stéréochimie de la molécule ABTS qui est plane et facile à être neutralisé en comparaison de celle de DPPH. En plus, l'activité inhibitrice du radical DPPH dépend, d'une part, du contenu en polyphénols et d'autre part, de certaines propriétés structurales des polyphénols qui les rendent plus sélectives aux DPPH (Sánchez-Vioque *et al.*, 2013), car il ne réagit qu'avec les flavonoïdes contenant des groupes hydroxyles dans le cycle B (Yokozawa *et al.*, 1998), ainsi que les acides aromatiques comportant plus d'un groupe hydroxyle (Von Gadow *et al.*, 1997). Des travaux antérieurs d'Attou *et al.* 2007, et Kılınçarslan *et al.* 2020 ont travaillé sur des plantes du même genre que notre plante et ont donné des résultats presque similaires.

## 3.3. Activité de pouvoir réducteur (FRAP)

Les absorbances des extraits dans la méthode FRAP sont résumées dans le **tableau IV. 06**

**Tab. IV. 06:** les absorbances des différents extraits dans la méthode FRAP

Extraits	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	A <sub>0.5</sub> (µg/ml)	Equivalent A. Ascorbique
hydroalcoolique	0,08±0.01	0,10±0.00	0,13±0.01	0,15±0.00	0,28±0.01	0,46±0.06	0,98±0.03	101.78±4.52	06.65 %
Acetate d'ethyle	0,12±0.01	0,15±0.03	0,23±0.01	0,43±0.01	0,60±0.10	0,98±0.10	1,21±0.09	036.91±3.15	18.34 %
Chloroformique	0,04±0.00	0,05±0.00	0,06±0.01	0,10±0.02	0,30±0.06	0,51±0.03	0,74±0.11	122.25±2.07	05.53 %
n-butanolique	0,05±0.00	0,06±0.01	0,07±0.01	0,13±0.01	0,33±0.03	0,57±0.05	1,13±0.02	081.34±1.22	08.32 %
Acide ascorbique*	0,35±0,05	0,46±0,03	0,84±0,12	0,93±0,30	1,18±0,34	1,37±0,20	1,44±0,21	006.77±1.15	//
α-tocopherol*	0,11±0,00	0,16±0,00	0,21±0,03	0,35±0,03	0,73±0,03	1,37±0,08	1,81±0,09	034.93±2.38	//

• Les résultats sont exprimés sous forme de la moyenne ± SD des trois répétitions pour chaque essai

• (\*) les standards : molécules de références

3.4. Activité de réduction du complexe Fe<sup>2+</sup>-Phenanthroline

Les absorbances dans la méthode de Phenanthroline sont résumées dans le **tableau IV. 07**

**Tab. IV. 07:** les absorbances des différents extraits dans la méthode de Phenanthroline

Extraits	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	A <sub>0.5</sub> (µg/ml)	Equivalent BHA
hydroalcoolique	0,31±0,01	0,31±0,01	0,34±0,01	0,45±0,02	0,61±0,01	0,84±0,03	1,07±0,07	<b>32,66±0,40</b>	02,93 %
Acetate d'éthyle	0,37±0,03	0,37±0,01	0,50±0,05	0,61±0,01	0,89±0,02	1,55±0,08	2,75±0,09	<b>16,06±0,78</b>	05,79 %
Chloroformique	0,32±0,01	0,31±0,01	0,33±0,01	0,34±0,01	0,41±0,01	0,50±0,03	0,71±0,04	<b>97,55±4,80</b>	00,95 %
n-butanolique	0,31±0,00	0,33±0,02	0,38±0,01	0,45±0,01	0,66±0,04	0,92±0,04	1,58±0,04	<b>29,35±2,78</b>	03,16 %
BHA*	0,73±0,02	0,93±0,01	1,25±0,04	2,10±0,05	4,89±0,06	Nt	Nt	<b>00,93±0,07</b>	//
BHT*	0,53±0,03	1,23±0,02	1,84±0,01	3,48±0,03	4,84±0,01	Nt	Nt	<b>02,24±0,17</b>	//

- Les résultats sont exprimés sous forme de la moyenne ± SD des trois répétitions pour chaque essai
- (\*) les standards : molécules de références
- BHA : hydroxy-anisole butylé
- BHT : hydroxy-toluene butylé
- Nt : Non testée

## 3.5. Activité de réduction des nanoparticules d'Argent (SNP)

Les absorbances dans la méthode SNP sont résumées dans le **tableau IV. 08**

**Tab. IV. 08:** les absorbances des différents extraits dans la méthode SNP

Extraits	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	A <sub>0.5</sub> (µg/ml)	Equivalent Trolox
hydroalcoolique	0,35±0.02	0,38±0.05	0,43±0.02	0,50±0.07	0,69±0.03	0,80±0.07	1,18±0.02	<b>041.26±2.57</b>	82.81 %
Acetate d'éthyle	0,41±0.01	0,45±0.01	0,56±0.03	0,69±0.04	0,87±0.02	0,97±0.00	1,12±0.06	<b>016.70±1.24</b>	204.6 %
Chloroformique	0,27±0.01	0,30±0.00	0,32±0.00	0,34±0.01	0,40±0.02	0,48±0.00	0,74±0.00	<b>202.15±0.72</b>	16.90 %
n-butanolique	0,34±0.02	0,37±0.00	0,49±0.01	0,57±0.01	0,74±0.02	0,84±0.02	1,34±0.08	<b>018.49±2.47</b>	184.8 %
Trolox*	0,23±0,00	0,30±0,01	0,43±0,01	0,64±0,03	1,04±0,01	1,90±0,03	2,35±0,01	<b>034.17±1.23</b>	//

- Les résultats sont exprimés sous forme de la moyenne ± SD des trois répétitions pour chaque essai
- (\*) les standards : molécules de références
- Nt : Non testée

Tab. IV. 09: Tableau récapitulatif des valeurs A 0.5 (µg/ml)

	FRAP	Phenanthroline	SNP
Extrait hydroalcoolique	101.78±4.52	32.66±0.40	041.26±2.57
Extrait Acétate d'éthyle	036.91±3.15	16.06±0.78	016.70±1.24
Extrait Chloroformique	122.25±2.07	97.55±4.80	202.15±0.72
Extrait n-butanolique	081.34±1.22	29.35±2.78	018.49±2.47

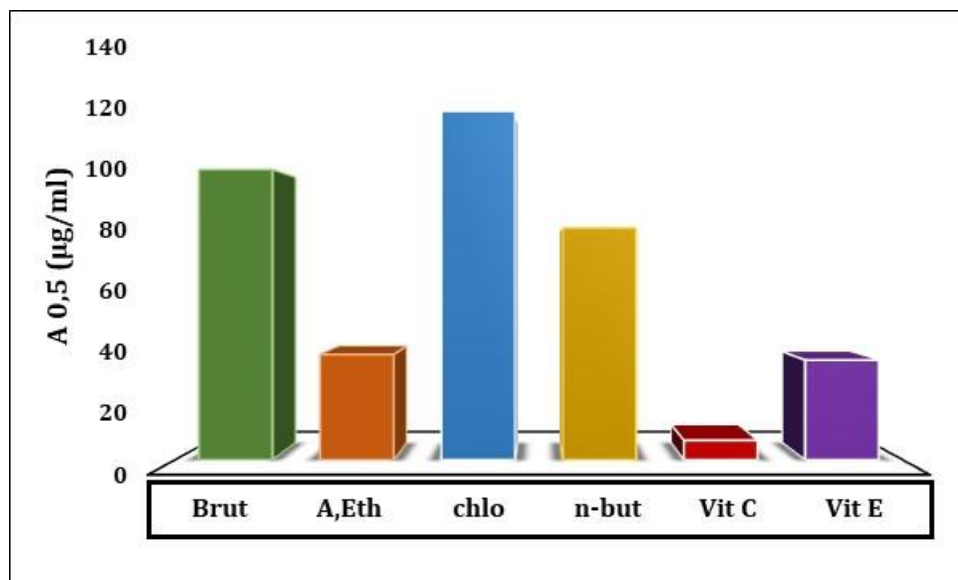


Fig. IV. 07: Valeurs A 0.5 des extraits étudiés dans la méthode de FRAP

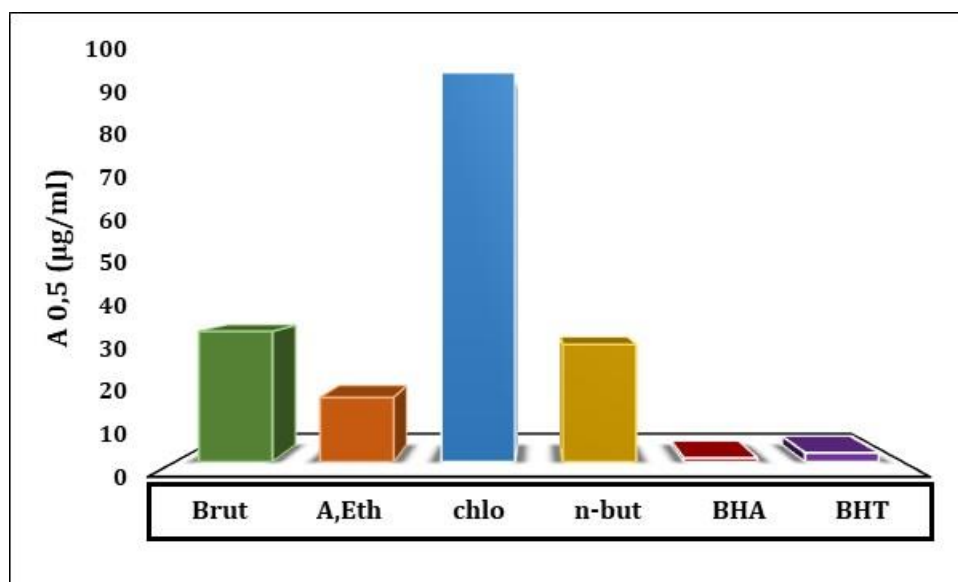
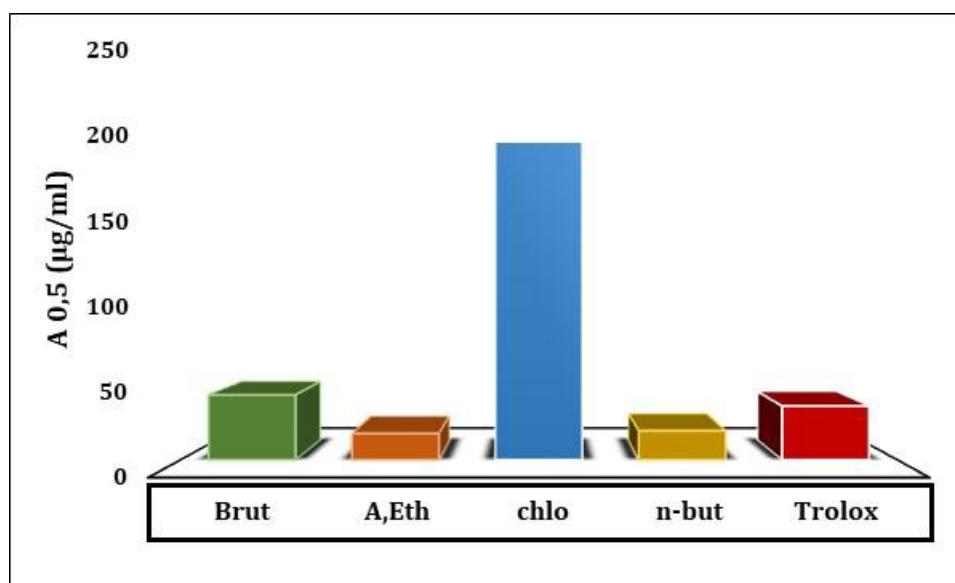


Fig. IV. 08: Valeurs A 0.5 des extraits étudiés dans la méthode de Phenanthroline



**Fig. IV. 09:** Valeurs A<sub>0.5</sub> des extraits étudiés dans la méthode SNP

Dans le contexte de l'activité antioxydante, la capacité des extraits à transférer les électrons en neutralisant ainsi certaines formes métalliques a été évaluée par les trois méthodes FRAP, Phénanthroline et SNP. Dans la méthode de FRAP, l'extrait d'acétate d'éthyle a donné le meilleur effet, il a été comparable avec la vitamine C, suivi par le n-butanolique qui a donné un effet modéré. Les extraits brut et chloroformique ont montré une activité faible (A<sub>0.5</sub> qui dépasse 100 µg/ml). Les standards ont gardé le meilleur effet. Dans cette activité, la présence des réducteurs dans les extraits étudiés permet de réduire le fer ferrique (Fe<sup>+3</sup>) présent dans le ferricyanure de potassium en fer ferreux (Fe<sup>+2</sup>), ce dernier (Fe<sup>+2</sup>) est quantifié en mesurant l'absorbance de la couleur verte intense formée (**Chung *et al.*, 2002**). Le pouvoir réducteur des extraits à évaluer est dose dépendant, plus que l'extrait est riche en polyphénols, plus qu'il a un pouvoir réducteur élevé (**Amarowicz *et al.*, 2004**). En plus, plusieurs critères structuraux que possède les polyphénols influencent l'échange des électrons tels que le nombre et la position de groupes d'hydroxyle aussi bien que le degré de conjugaison de la molécule entière (**Apak *et al.*, 2004**).

Le mécanisme antioxydant dans la méthode de phénanthroline est presque similaire à celui du FRAP. Dans cette méthode l'activité de nos extraits a été clairement apparue, les résultats ont montré que tous les trois extraits brut, acétate d'éthyle et chloroformique sont révélés capables de réduire le fer et de former un complexe Fe<sup>+2</sup>- phénanthroline d'une manière intéressante. L'extrait acétate d'éthyle a présenté le meilleur effet tandis que l'extrait chloroformique est le plus faible. Dans cette activité, la forme Fe<sup>+3</sup> se réduit en Fe<sup>+2</sup> en présence des réducteurs et forme un complexe stable avec la phénanthroline de couleur rouge

intense. Ce dernier complexe a été révélé par spectrophotométrie. Les travaux de **Kılıncarslan et al., 2020** ont montré des niveaux intéressants d'activité antioxydante d'une plante du même genre da la plante étudiée.

Dans la méthode de SNP, les extraits étudiés ont présenté le même comportement que celui enregistré dans les méthodes précédentes FRAP et phénanthroline, le meilleur effet a été enregistré pour l'extrait acétate d'éthyle, le n-butanolique et le brut respectivement. L'extrait chloroformique reste le plus faible en comparaison avec le standard, le trolox.

## 4. Activité inhibitrice des enzymes

4.1.L'activité antidiabétique via l'inhibition de l' $\alpha$ -amylase

Les pourcentages d'inhibition de l' $\alpha$ -amylase sont résumés dans le **tableau IV. 10**.

**Tab. IV. 10:** les pourcentages d'inhibition de l' $\alpha$ -amylase par les extraits étudiés.

Extraits	06.25 $\mu$ g	12.5 $\mu$ g	25 $\mu$ g	50 $\mu$ g	100 $\mu$ g	200 $\mu$ g	400 $\mu$ g	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml)	Equivalent standard
hydroalcoolique	29,86 $\pm$ 0.36	37,12 $\pm$ 0.51	43,42 $\pm$ 0.09	53,74 $\pm$ 2.71	75,93 $\pm$ 2.96	81,44 $\pm$ 0.65	84,94 $\pm$ 0.32	<b>40.79<math>\pm</math>3.08</b>	//
Acetate d'éthyl	19,37 $\pm$ 2.46	25,40 $\pm$ 1.41	27,32 $\pm$ 1.10	29,64 $\pm$ 0.69	33,35 $\pm$ 1.77	36,06 $\pm$ 2.46	38,98 $\pm$ 0.29	> 400	//
Chloroformique	20,94 $\pm$ 2.80	25,57 $\pm$ 0.50	32,10 $\pm$ 3.12	38,35 $\pm$ 2.49	47,15 $\pm$ 2.78	66,26 $\pm$ 0.43	78,96 $\pm$ 0.47	<b>116.63<math>\pm</math>4.24</b>	//
n-butanolique	19,21 $\pm$ 1.59	22,34 $\pm$ 1.53	27,13 $\pm$ 0.79	28,74 $\pm$ 1.40	31,80 $\pm$ 0.47	33,16 $\pm$ 0.11	34,47 $\pm$ 0.53	> 400	//
<hr/>									
Acarbose *	07,76 $\pm$ 0,17	08,08 $\pm$ 0,30	09,46 $\pm$ 0,11	10,70 $\pm$ 0,96	31,81 $\pm$ 2,89	37,21 $\pm$ 3,54	53,05 $\pm$ 1,59	<b>3650,9<math>\pm</math>10,7</b>	//

- Les résultats sont exprimés sous forme de la moyenne  $\pm$  SD des trois répétitions pour chaque essai

- (\*) les standards : molécules de références

## 4.2. L'activité anti-Alzheimer via l'inhibition de l'acétylcholinestérase

Les pourcentages d'inhibition de l'AChE sont résumés dans le **tableau IV. 11**.

**Tab. IV. 11:** les pourcentages d'inhibition de l'AChE

Extraits	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	Equivalent standard
hydroalcoolique	03,94±1.47	11,68±2.31	17,12±2.31	26,22±0.16	36,56±2.21	42,65±1.46	56,62±1.00	<b>151.4±6.63</b>	04.14 %
Acetate d'ethyl	03,58±0.60	08,86±0.40	14,51±1.19	19,68±0.56	26,19±1.24	31,78±0.52	41,05±1.37	> <b>200</b>	//
Chloroformique	09,08±1.46	20,24±0.79	28,85±0.36	39,74±0.55	59,31±1.32	70,42±1.37	70,49±1.29	<b>38.31±1.13</b>	16.36 %
n-butanolique	07,31±1.17	12,74±0.66	20,64±0.93	26,15±0.91	30,83±0.71	34,71±1.37	42,16±1.50	> <b>200</b>	//
Galantamine *	35,93±2,28	43,77±0,00	68,50±0,31	80,69±0,41	85,78±1,63	91,80±0,20	94,77±0,34	<b>06.27±1.15</b>	//

- Les résultats sont exprimés sous forme de la moyenne ± SD des trois répétitions pour chaque essai

- (\*) les standards : molécules de références

## 4.3.L'activité inhibitrice de l'Urease

Les pourcentages d'inhibition de l'Urease sont résumés dans le **tableau IV. 12.**

**Tab. IV. 12 :** les pourcentages d'inhibition de l'Urease

Extraits	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	Equivalent standard
hydroalcoolique	15.07±0.34	18.44±1.54	26.79±0.84	30.25±1.66	39.44±2.03	46.81±0.96	53.26±0.12	<b>162.3±4.91</b>	07.12 %
Acetate d'éthyle	20.71±1.67	28.63±2.86	35.09±1.28	41.66±1.48	49.82±3.22	58.16±1.27	69.32±1.32	<b>52.34±2.18</b>	22.10 %
Chloroformique	11.43±0.72	13.82±0.17	15.94±0.88	20.38±2.65	26.37±0.61	33.86±2.41	38.29±3.25	> 200	//
n-butanolique	12,08±0,94	14,29±2,46	19,05±2,64	24,94±1,42	34,28±2,90	40,09±2,47	46,91±2,34	> 200	//
Thiourea*	4,49±0,78	19,85±2,74	55,64±4,24	94,17±0,15	98,42±0,19	98,49±0,41	98,90±0,05	<b>11.57±0.68</b>	//

- Les résultats sont exprimés sous forme de la moyenne ± SD des trois répétitions pour chaque essai

- (\*) les standards : molécules de références

Les enzymes jouent un rôle crucial dans le déroulement des phénomènes biologiques endogènes, elles catalysent les bio-réactions de synthèse, de dégradation et de transformation à l'échelle moléculaire et cellulaire. Elles sont associées aux plusieurs perturbations métaboliques en provoquant ainsi des dizaines de maladies qui sont parfois lourdes. Plusieurs stratégies thérapeutiques ont été pratiquées par les cliniciens pour la bonne gestion de ce genre de maladies y compris la modulation de l'activité enzymatique à titre préventif et/ou curative. Dans cette partie du travail, nous avons évalué l'activité inhibitrice de nos extraits sur l' $\alpha$ -amylase et la AchE qui sont liées au diabète type 2 et l'Alzheimer, respectivement.

Le diabète, notamment de type 2, est actuellement largement disséminé à l'échelle mondiale, particulièrement chez les personnes âgées et obèses. Il est considéré comme un désordre métabolique associé à des complications graves. Pour une bonne gestion de cette maladie, les cliniciens cherchent à contrôler la glycémie postprandiale des personnes diabétiques via l'inhibition de l'une des enzymes de digestion des carbohydrates comme l' $\alpha$ -amylase. Dans ce cadre, nous avons testé l'activité inhibitrice de l' $\alpha$ -amylase par nos extraits. Les résultats obtenus ont montré que les extraits brut et chloroformique ont fortement inhibé l' $\alpha$ -amylase d'une manière dose-dépendante en comparaison avec l'Acarbose. Les autres extraits ont apparu modérés à faibles. (**Tab. IV. 10**)

La gestion générale des symptômes de l'Alzheimer est basée sur la théorie cholinergique via l'inhibition des cholinestérases AChE et BuChE. Plusieurs médicaments synthétiques, prouvés par FDA, ont été commercialisés dans le marché, mais leurs effets secondaires restent une grande barrière à franchir pour les praticiens de la santé. Plusieurs produits naturels, tels que les alcaloïdes et les huiles essentielles, ont montré une activité inhibitrice intéressante et donc peuvent être considérés comme une source des alternatives puissantes. Nos extraits ont été évalués dans l'inhibition de l'AchE, les résultats obtenus, exprimés en  $IC_{50}$ , (**Tab. IV. 11**) ont montré une activité inhibitrice pour les extraits brut et acétate d'éthyle. Le n-butanolique et le chloroformique ont été apparus moins efficaces en comparaison avec la molécule de référence galanthamine.

5. L'activité protectrice vis-à-vis la lumière solaire

Le tableau IV. 13, en dessous, résume Les facteurs de protection des extraits étudiés vis-à-vis les rayonnements UV de la lumière solaire.

Tab. IV. 13 : les coefficients de protection solaire des extrais étudiés.

Extraits	SPF <sub>1</sub>	SPF <sub>2</sub>	SPF <sub>3</sub>	Moyenne ± SD	Commentaire
Extrait hydroalcoolique	35.30	33.84	34.30	34.48±0.75	Haute protection
Extrait Acétate d'éthyle	34.18	34.35	32.99	33.84±0.74	Haute protection
Extrait Chloroformique	35.32	34.24	35.96	35.18±0.87	Haute protection
Extrait n-butanolique	32.96	32.28	31.10	32.11±0.94	Haute protection
Crème solaire NIVEA®	/	/	/	50,11±0,53	Très Haute protection
Crème solaire VICHY®	/	/	/	44,22±0,35	Très Haute protection

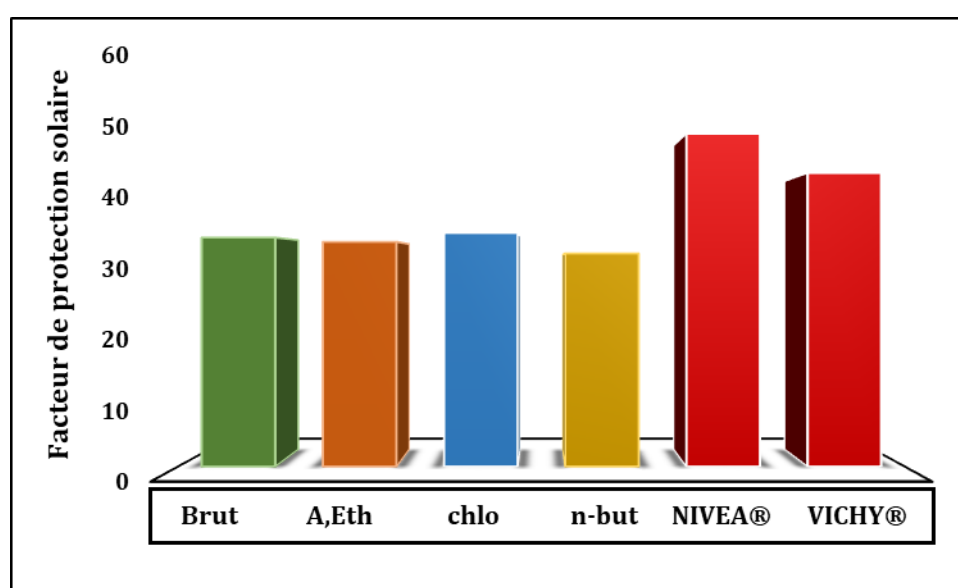


Fig. IV. 10 : Valeurs SPF des extraits étudiés

Les crèmes et les liquides antisolaires sont largement commercialisées en tant que préparations cosmétiques ou pharmaceutiques en vue de se protéger vis-à-vis les rayonnements UV de la lumière solaire, en évitant ainsi les dommages tissulaires. Les préparations utilisées dans ce contexte sont caractérisées par un facteur de protection solaire (SPF) intéressant. Nos extraits ont donné des résultats proches, ils sont généralement de haute protection en comparaison avec les références. Ces extraits sont d'origine saharienne, donc en exposition permanente aux rayonnement solaire, ce qui explique une partie de cette activité protectrice.

*Conclusion générale*  
*Perspectives*

## ❖ Conclusion générale

Les experts de la santé publique ont lancé plusieurs programmes de recherches dans le cadre de la sécurité sanitaire algérienne. L'un des axes les plus intéressants est la recherche des alternatifs naturels qui peuvent être utilisés d'une manière complémentaires ou alternative à l'utilisation des médicaments de synthèse dans le marché. La médecine traditionnelle algérienne nous offre plusieurs plantes endémiques qui sont considérées comme sources des principes actifs puissants afin de lutter contre le stress oxydatif, le diabète et les maladies neurodégénératives comme l'Alzheimer.

Sur le plan technique, nous avons évalué d'une part, le contenu en phénols et flavonoïdes totaux et l'activité antioxydante de quatre extraits de la plante *Ptychotis verticillata* L. par des méthodes standards, *in vitro*, le piégeage des radicaux DPPH et ABTS, la réduction des fer (FRAP et Phenanthroline) et d'Argent (SNP). D'autre part, nous avons caractérisé l'activité antidiabétique de type 2 via l'inhibition de l' $\alpha$ -amylase et l'activité anti-Alzheimer via l'inhibition de l'acétylcholinestérase. Ce travail a été finalisé par une étude des facteurs de protections solaire.

Les résultats obtenus ont montré des teneurs intéressants en phénols et flavonoïdes totaux particulièrement pour l'extrait hydro-alcoolique et l'extrait d'acétate d'éthyle. A propos de l'activité antioxydante, les résultats ont montré des activités moyennes à modérées pour les extraits testés à l'exception de l'extrait d'acétate d'éthyle qui est comparable aux références BHA et BHT dans les méthodes de neutralisation des radicaux DPPH et ABTS. Parallèlement, nos échantillons ont présenté des activités variables dans les méthodes FRAP, Phenanthroline et SNP. L'extrait d'acétate d'éthyle a présenté le meilleur effet tandis que le chloroformique est le plus faible. L'ensemble des échantillons sont loin à être comparés avec standards BHA et BHT.

D'autre part, l'activité inhibitrice des enzymes a montré que l'extrait brut a inhibé fortement l' $\alpha$  amylase, d'une manière dose-dépendante, Tandis que l'extrait chloroformique est le plus intéressant dans l'inhibition de l'acétylcholinestérase. En plus, nos extraits ont donné des excellents facteurs de protections solaire. Les résultats obtenus confirment l'usage traditionnel de la plante sélectionnée en Algérie, ils valorisent les vertus thérapeutiques de ses extraits. Ils ouvrent également des perspectives multiples qui permettent d'approfondir nos études dans ce domaine.

❖ **Perspectives**

- L'intégration d'autres plantes médicinales traditionnellement utilisées
- Elargir la gamme des techniques antioxydantes.
- Analyser les extraits par HPLC-MS-MS pour identifier le contenu moléculaire.
- Appliquer d'autres modalités d'études *in vivo* et *in silico*
- Valoriser l'effet synergique entre les extraits étudiés en réalisant quelques formes de combinaisons

1. Aniszewski, T. (2007). *Alkaloids Secterts of Life Aklaloid Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Roler*. Elsevier.
2. Ahren B. 2010. *Use of DPP-4 inhibitors in type 2 diabetes : focus on sitagliptin. Diabetes metab syndr obes 2010 ; 3 : 31-41.*
3. A, Sharma RK, Fiorino M, Ameen SM (2019). *Natural polyphenols: chemical classification, definition of classes, subcategories, and Structures. Oxford University Press.*
4. Alves-Santos, Aline Medeiros; Sugizaki, Clara Sandra AraÃ°jo; Lima, Glaucia Carielo; Naves, Maria Margareth Veloso (2020). *Prebiotic effect of dietary polyphenols: A systematic review. Journal of Functional Foods, 74(), 104169– . doi:10.1016/j.jff.2020.104169*
5. Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., and Karademir, S.E. (2004). Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry. 52, 7970-7981.*
6. Blois, M.S. (1958). Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature. 181, 1199-1200.*
7. Bhat SV, Nagasampagi BA, Sivakumar M, (2005). *Chemistry of Natural Products, Berlin, Springer, 2<sup>e</sup> éd., p. 840. (ISBN 3-540-40669-7)*
8. Breitmaier, E. (2006). *Terpenes: flavors, fragrances, pharmaca, pheromones. Weinhein, Wiley-VCH.*
9. Bruneton, J. (2009). *Pharmacognosie ,Phytochimie,Plante médicinale(4e éd.). Lavoisier.*
10. Benboubker, H., Philippot, S., Kirsch, G., Aarab, L., & Bagrel, D. (2012). *ActivitØs antioxydantes et cytoprotectrices de substances naturelles :application en chimiothØrapie. ResearchGate, p. 243.*
11. Bnouham, M., Benalla, W., Asehraou, A., & Berrabah, M. (2012). *Antibacterial activity of essential oil from Ptychotis verticillata. Spatula DD, 2, 69-73.*
12. Belaïch, R., Boujraf, S., & Benzagmout, M. (2015). *Impact du stress oxydatif et de l'inflammation sur les patients hémodialysés. Médecine thérapeutique, 21(2), 95-103.*
13. Brownlee M. (2015). *The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. Diabetes 2005, 54:1615–1625. S.A Hamma, N Nouri , I Fergani , A*

14. Lakehal , N Abadi , C Benlatreche .(2015). Biologie des espèces réactives et Stress oxydant. *Jam.* 32 : 48-53.
15. Bensakhria, A. (2018). Le stress oxydatif. *Toxicologie générale*, 70-86.
16. Butterfield, D. A., & Halliwell, B. (2019). Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 20(3), 148-160.
17. Baudin, B. 2020. Stress oxydant et protections antioxydantes. *Revue Francophone Des Laboratoires*, no. 522, p. 22–30. [http:// doi:10.1016/s1773-035x\(20\)30159-3](http://doi:10.1016/s1773-035x(20)30159-3)
18. Boitard, C. (2020). Les diabètes: de la génétique à l’environnement. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, 204(5), 493-499.
19. Chiara Di Lorenzo;Francesca Colombo;Simone Biella;Creina Stockley;Patrizia Restani; (2021). *Polyphenols and Human Health: The Role of Bioavailability* . *Nutrients*, (), –. doi:10.3390/nu13010273
20. Chung, Y.-C., Chang, C.-T., Chao, W.-W., Lin, C.-F., and Chou, S.-T. (2002). Antioxidative Activity and Safety of the 50 Ethanollic Extract from Red Bean Fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *J. Agric. Food Chemistry*. 50, 2454-2458.
21. Chelain, é., Lubin-Germain, N., & Uziel, J. (2015). *Chimie organique 3é Edition*. Paris: Dunod.
22. Chene, G., Caloone, J., Moret, S., Le Bail-Carval, K., Chabert, P., Beaufils, E., ... & Lamblin, G. (2016). L’endométriase est-elle une lésion pré-cancéreuse? Perspectives et implications cliniques. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, 44(2), 106-112.
23. Cory, Hannah; Passarelli, Simone; Szeto, John; Tamez, Martha; Mattei, Josiemer (2018). The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. *Frontiers in Nutrition*, 5(), 87–. doi:10.3389/fnut.2018.00087
24. Cummings, J. L., & Cole, G. (2002). Alzheimer disease. *Jama*, 287(18), 2335-2338.
25. Dutra, E. A., Kedor-Hackmann, E. R. M., & Santoro, M. I. R. M. (2004). Determination of sun protection factor (SPF) of sunscreens by ultraviolet spectrophotometry. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 40(3), 381-385.
26. Durand, D., Damon, M., & Gobert, M. (2013). Le stress oxydant chez les animaux de rente: principes généraux. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 48(5), 218-224.
27. Denise, Beconcini; Felice, Francesca; Fabiano, Angela; Sarmiento, Bruno; Zambito, Ylenia; Di Stefano, Rossella (2020). Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of

- Cherry Extract: Nanosystems-Based Strategies to Improve Endothelial Function and Intestinal Absorption. *Foods*, 9(2), 207–. doi:10.3390/foods9020207
28. Delrieu, J., & Vellas, B. (2020). Les nouveaux traitements de la maladie d'Alzheimer. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, 204(3), 237-247.
29. Di Meo, S., & Venditti, P. (2020). Evolution of the knowledge of free radicals and other oxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020.
30. Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., and Featherstone, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. 7, 88-95.
31. Eran, P., Krishna, P. (2006), Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism : Current Opinion in Plant Biology, vol.9.p.297–30.
32. Eguchi, R., Ono, N., Horai, H., Amin, M.-U., Hirai, A. M., Kawahara, J., . . . Kanaya, S. (2017). Classification of Alkaloid Compounds Based on Subring Skeleton (SRS) Profiling: On Finding Relationship of Compounds with Metabolic Pathways. *Journal of Computer Aided Chemistry*, Vol.18, 58-75, 2.
33. Evano, G. (2008). Synthèse de produits naturels Des acides aminés et du cuivre(I) pour la synthèse d'alcaloïdes cyclopeptidiques. *Recherche et développement*, p. 2.
34. Fabiano-Tixier, A.-S., & Culioli, G. (2013). Chimie des substances naturelles et chimie de l'environnement. ResearchGate, p. 4.
35. Fraipont, V., & Preiser, J. C. (2016). Mise à jour sur l'utilisation des pharmaconutriments chez le patient agressé—première partie: les acides aminés (glutamine, arginine). *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 30(2), 133-141.
36. Faitg, J., Reynaud, O., Leduc-Gaudet, J. P., & Gouspillou, G. (2017). Dysfonctions mitochondriales et vieillissement musculaire—Une mise à jour. *médecine/sciences*, 33(11), 955-962.
37. Gök, S. B., Kalinkara, E. C., & Erdoğan, Y. (2013). the use of secondary metabolites as food additives. *Current Opinion In Biotechnology*.
38. Ghalem, B. R., & Mohamed, B. (2014). Antibacterial activity of essential oil of north west Algerian *Eucalyptus camaldulensis* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Coastal Life Medicine*, 2(10), 799-804.

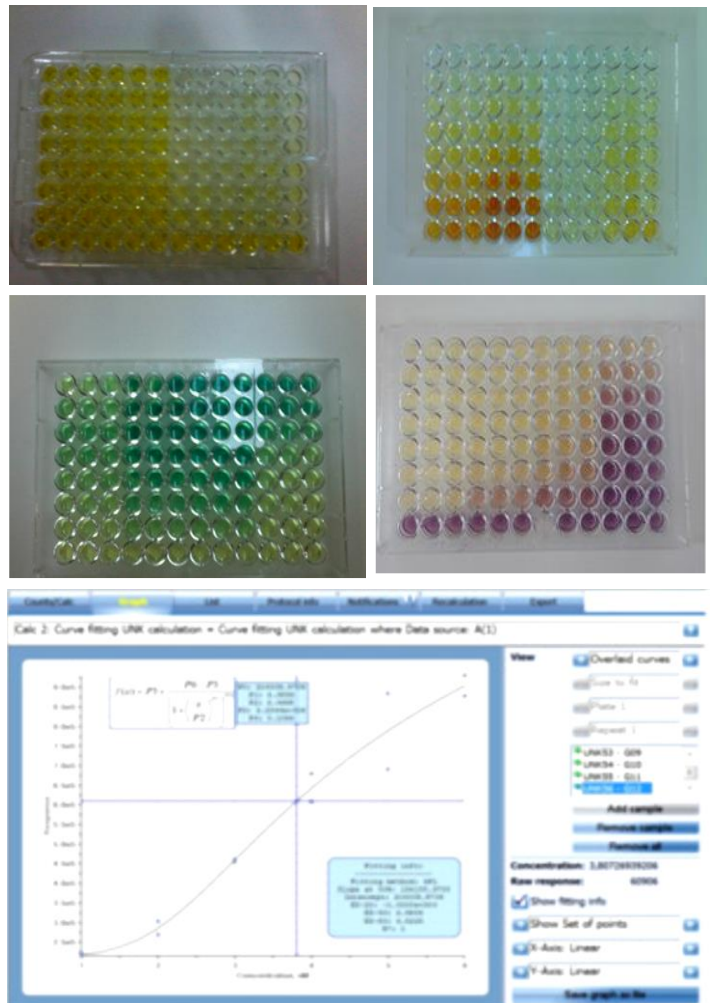
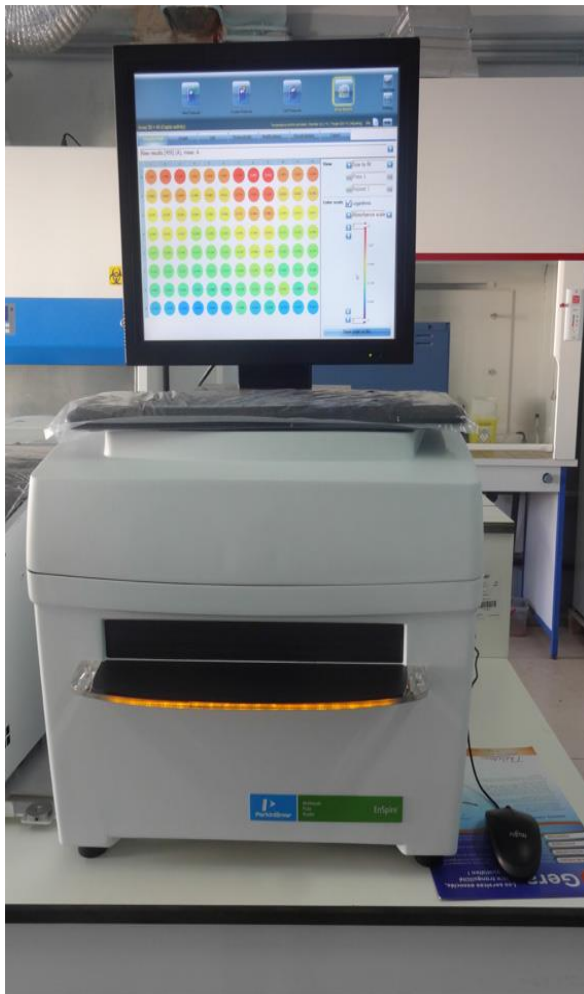
39. Hunter P, (2008). Harnessing Nature's wisdom. Turning to Nature for inspiration and avoiding her follies, *EMBO Reports*, vol. 9, no 9, p. 838–40 (PMID 18762775, PMID 2529361, DOI 10.1038/embor.2008.160)
40. Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria journal of medicine*, 54(4), 287-293.
41. Ivers, N. M., Jiang, M., Alloo, J., Singer, A., Ngui, D., Casey, C. G., & Catherine, H. Y. (2019). Lignes directrices de pratique clinique 2018 de Diabète Canada: Principaux messages à l'intention des médecins de famille qui traitent les patients atteints de diabète de type 2. *Canadian Family Physician*, 65(1), e8-e18.
42. Korkina, L., Kostyuk, V., Potapovich, A., Mayer, W., Talib, N., & Luca, C. D. (2020). Secondary PlantMetabolites for Sun Protective Cosmetics: From Pre-Selection to Product Formulation. *cosmetics*, pp. 1-14.
43. Knopman, D. S., Amieva, H., Petersen, R. C., Chételat, G., Holtzman, D. M., Hyman, B. T., ... & Jones, D. T. (2021). Alzheimer disease. *Nature reviews Disease primers*, 7(1), 1-21.
44. Leuba G., Büla C., Schenk F. 2011. Du vieillissement cérébral à la maladie d'Alzheimer : vulnérabilité et plasticité. Bruxelles: De Boeck Supérieur; 2011.
45. Lebreton, F., Wassmer, C. H., Belofatto, K., Berney, T., & Berishvili, E. (2020). Organoïdes sécréteurs d'insuline-Des «super-îlots» comme premier pas vers le pancréas bioartificiel. *médecine/sciences*, 36(10), 879-885.
46. Milcent, R. (2003). Chimie organique hétérocyclique; Structures fondamentales Chimie et biochimie des principaux composés naturels. *Les Ulis Cedex A, France: EDP Sciences*.
47. Maldonado-Bonilla, L.D., Betancourt-Jiménez, M., Lozoya-Gloria, E. (2008). Local and systemic gene expression of sesquiterpene phytoalexin biosynthetic enzymes in plant leaves, *Eur. J. Plant Pathol.* 121 p. 439–449.
48. Mouraux, T., & Dorchy, H. (2005). Le poids de l'obésité dans le (pré) diabète de type 2 chez les enfants et adolescents: quand et comment le rechercher?. *Archives de pédiatrie*, 12(12), 1779-1784.
49. Méhats, C., Miralles, F., & Vaiman, D. (2017). Nouveaux regards sur la prééclampsie. *médecine/sciences*, 33(12), 1079-1088.

50. Marinari, G., Espitalier-Rivière, C., Fédou, C., Romain, A. J., de Mauverger, E. R., & Brun, J. F. (2019). Activité physique, obésité et cancer du sein: quelles conclusions pratiques?. *Science & Sports*, 34(4), 191-198.
51. Manuelian, C. L., Pitino, R., Simoni, M., Mavrommatis, A., De Marchi, M., Righi, F., & Tsiplakou, E. (2021). Plant Feed Additives as Natural Alternatives to the Use of Synthetic Antioxidant Vitamins on Livestock Mammals' Performances, Health, and Oxidative Status: A Review of the Literature in the Last 20 Years. *Antioxidants*, 10(9), 1461.
52. Nowruzi, B., Sarvari, G., & Blanco, S. (2020). The cosmetic application of cyanobacterial secondary metabolites. *Algal Research*, pp. 1-2.
53. Nuñez, A., Benavente, I., Blanco, D., Boix, H., Cabañas, F., Chaffanel, M., ... & Vento, M. (2018). Oxidative stress in perinatal asphyxia and hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Anales de Pediatría (English Edition)*, 88(4), 228-e1.
54. Ouassou, Malika; Mukhaimar, Maisara; El Amrani, Amal; Kroymann, Juergen; Chauveau, Olivier (2019). *Biosynthèse des glucosinolates indoliques et rôle écologique de leurs modifications secondaires. Comptes Rendus Biologies*, (), S1631069119300393-. doi:10.1016/j.crv.2019.03.005
55. Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*. 44, 307-315.
56. Özyürek, M., Güngör, N., Baki, S., Güçlü, K., & Apak, R. (2012). Development of a silver nanoparticle-based method for the antioxidant capacity measurement of polyphenols. *Analytical chemistry*, 84(18), 8052-8059.
57. Pohanka, M. (2018). Oxidative stress in Alzheimer disease as a target for therapy. *Bratisl. Lek. Listy*, 119(9), 535-543.
58. Porras, Gina; Chassagne, François; Lyles, James T.; Marquez, Lewis; Dettweiler, Micah; Salam, Akram M.; Samarakoon, Tharanga; Shabih, Sarah; Farrokhi, Darya Raschid; Quave, Cassandra L. (2020). *Ethnobotany and the Role of Plant Natural Products in Antibiotic Drug Discovery. Chemical Reviews*, (), acs.chemrev.0c00922-. doi:10.1021/acs.chemrev.0c00922
59. Rasouli H, Farzaei MH, Khodarahmi R. (2017) Polyphenols and their benefits: A review. *International Journal of Food Properties*;20(2):1700-41.

60. Rauf, A., Uddin, G., Siddiqui, B. S., Khan, H., Uzair, S., Shah, A., Khan, A. (2016). Antinociceptive and anti-inflammatory activities of flavonoids isolated from *Pistacia integerrima* galls. *Complementary Therapies in Medicine*, 25, 132–138.
61. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., and Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26, 1231-1237.
62. Salam, Akram M; Quave, Cassandra L (2018). *Opportunities for plant natural products in infection control. Current Opinion in Microbiology*, 45(), 189–194. doi:10.1016/j.mib.2018.08.004
63. Sánchez-Vioque, R., Polissiou, M., Astraka, K., Mozos-Pascual, M. de los, Tarantilis, P., Herraiz-Peñalver, D., and Santana-Méridas, O. (2013). Polyphenol composition, antioxidant, and metal chelating activities of the solid residues from the essential oil industry. *Industrial Crops and Products*. 49, 150-159.
64. Shahidi, F., & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of functional foods*, 18, 757-781.
65. Sharma, R, K., Fiorino, M., Ameen, S, M. (2019) *Natural polyphenols: chemical classification, definition of classes, subcategories, and Structures. Oxford University Press.*
66. Singleton, V.L., and Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16, 144-158.
67. Schürch, C., Blum, P., & Züllli, F. (2007). Potential of plant cells in culture for cosmetic application. *Phytochem Rev Springer*, pp. 1-2.
68. Szydłowskaczerniak, A., Dianoczki, C., Recseg, K., Karlovits, G., and Szlyk, E. (2008). Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta*. 76, 899-905.
69. Teng, H., & Chen, L. (2019). Polyphenols and bioavailability: An update. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(13), 2040-2051.
70. Topçu, G., Ay, M., Bilici, A., Sarıkürkcü, C., Öztürk, M., and Ulubelen, A. (2007). A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry*. 103, 816-822.
71. Trüeb, R. M. (2015). The impact of oxidative stress on hair. *International Journal of Cosmetic Science*, 37, 25-30.

72. Tan-Chen, S., Bourron, O., & Hajduch, É. (2020). Céràmides, acteurs cruciaux dans le développement de l'insulino-résistance et du diabète de type 2. *médecine/sciences*, 36(5), 497-503.
73. Vavitsas, k ., Fabris, M., Vickers, C.E. (2018). Terpenoid metabolic engineering in photosynthetic microorganisms, *Genes (Basel)*. 9. p. 1–19.
74. Villar, E., & Zaoui, P. (2010). Diabète et maladie rénale chronique: ce que nous apprend l'épidémiologie. *Néphrologie & thérapeutique*, 6(7), 585-590.
75. Von Gadow, A., Joubert, E., and Hansmann, C.F. (1997). Comparison of the Antioxidant Activity of Aspalathin with That of Other Plant Phenols of Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*),  $\alpha$ -Tocopherol, BHT, and BHA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45, 632-638.
76. Wasowski, C., Loscalzo, L. M., & Marder, M. (2013). Neuropharmacology In vitro binding affinities of a series of flavonoids for m-opioid receptors. Antinociceptive effect of the synthetic flavonoid 3,3-dibromo flavanone in mice, 72.
77. Yokozawa, T., Chen, C.P., Dong, E., Tanaka, T., Nonaka, G.-I., and Nishioka, I. (1998). Study on the Inhibitory Effect of Tannins and Flavonoids against the 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Radical. *Biochemical Pharmacology*. 56, 213-222.
78. Zengin, G., Sarikurkcu, C., Aktumsek, A., Ceylan, R., and Ceylan, O. (2014). A comprehensive study on phytochemical characterization of *Haplophyllum myrtifolium* Boiss. endemic to Turkey and its inhibitory potential against key enzymes involved in Alzheimer, skin diseases and type II diabetes. *Industrial Crops and Products*. 53, 244-251.
79. Zahir, I., Er-rahmany, A., Es-sadouny, R., & El Hadri, I. (2020). Activités biologiques de *Tetraclinis articulata*: revue de synthèse. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*.

Annexe 01 : lecteur des microplaques a 96 puits utilisé dans différents tests





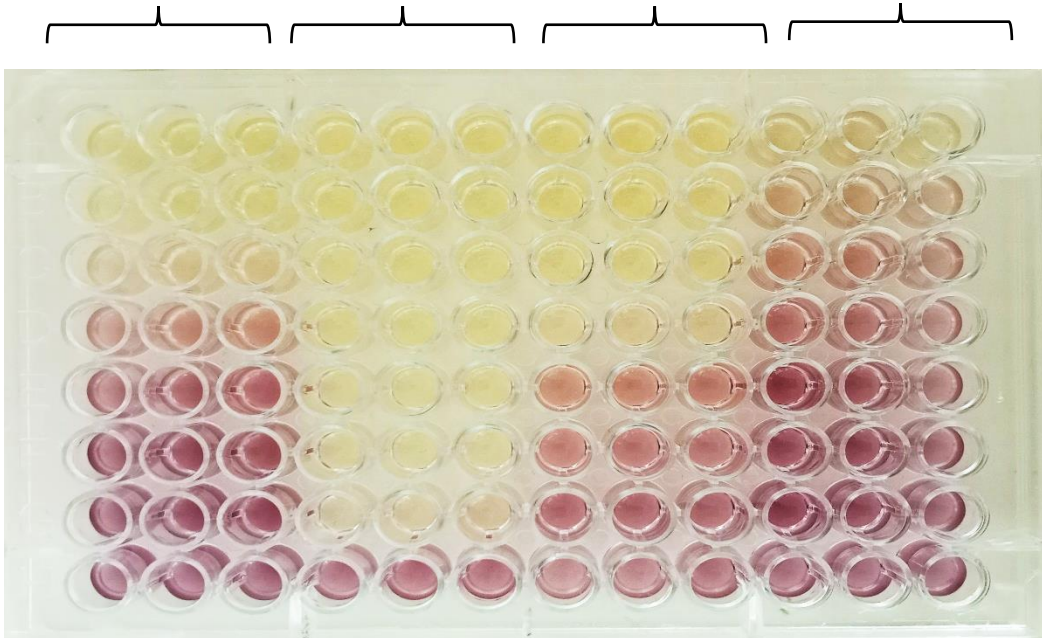
**Annexe 03 : Image de la plaque dans le test du piégeage du DPPH**

**Extrait 1**  
3 répétitions pour  
chaque dose

**Extrait 2**  
3 répétitions pour  
chaque dose

**Extrait 3**  
3 répétitions pour  
chaque dose

**Extrait 4**  
3 répétitions pour  
chaque dose



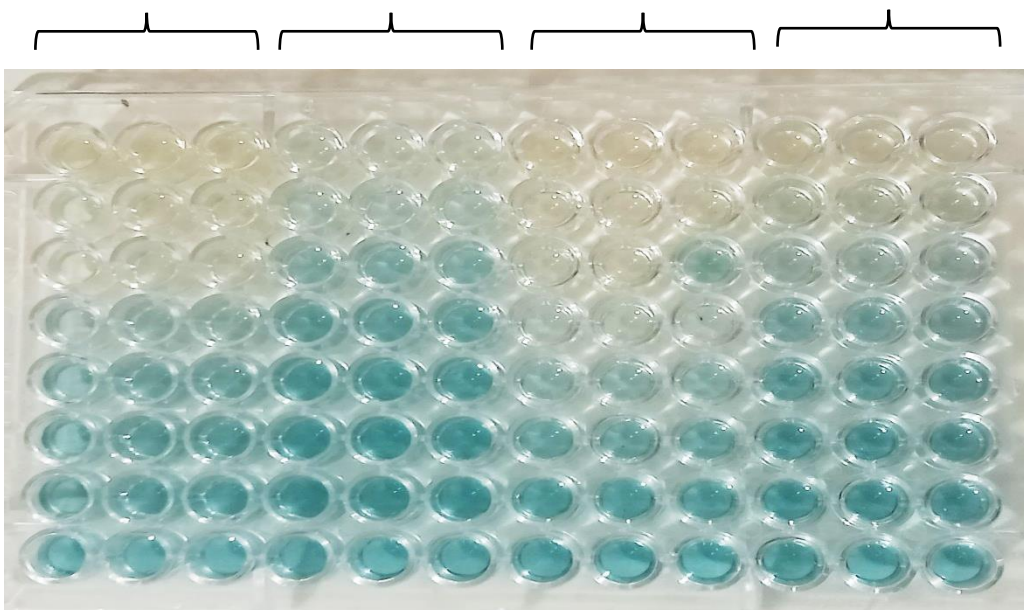
**Annexe 04 : Image de la plaque dans le test du piégeage de l'ABTS**

**Extrait 1**  
3 répétitions pour  
chaque dose

**Extrait 2**  
3 répétitions pour  
chaque dose

**Extrait 3**  
3 répétitions pour  
chaque dose

**Extrait 4**  
3 répétitions pour  
chaque dose



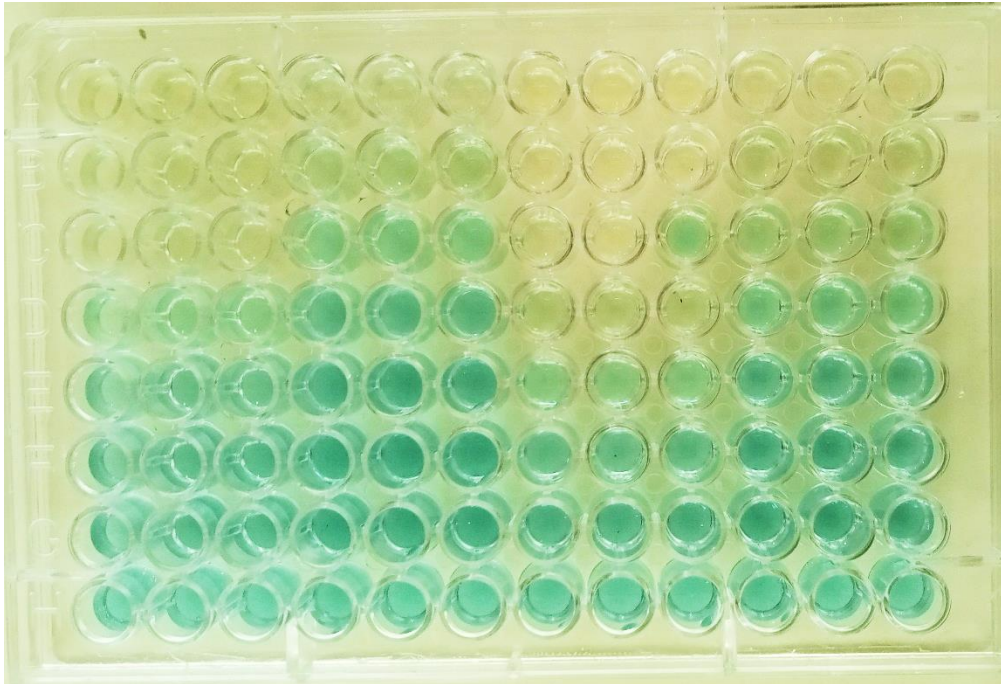
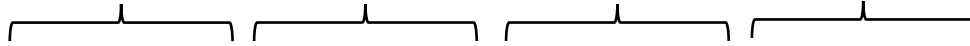
**Annexe 05 : Image de la plaque dans le test du FRAP**

**Extrait 1**  
3 répétitions pour  
chaque dose

**Extrait 2**  
3 répétitions pour  
chaque dose

**Extrait 3**  
3 répétitions pour  
chaque dose

**Extrait 4**  
3 répétitions pour  
chaque dose



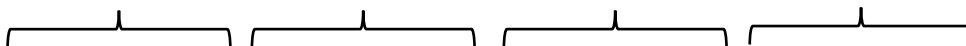
**Annexe 06 : Image de la plaque dans le test du Phenanthroline**

**Extrait 1**  
3 répétitions pour  
chaque dose

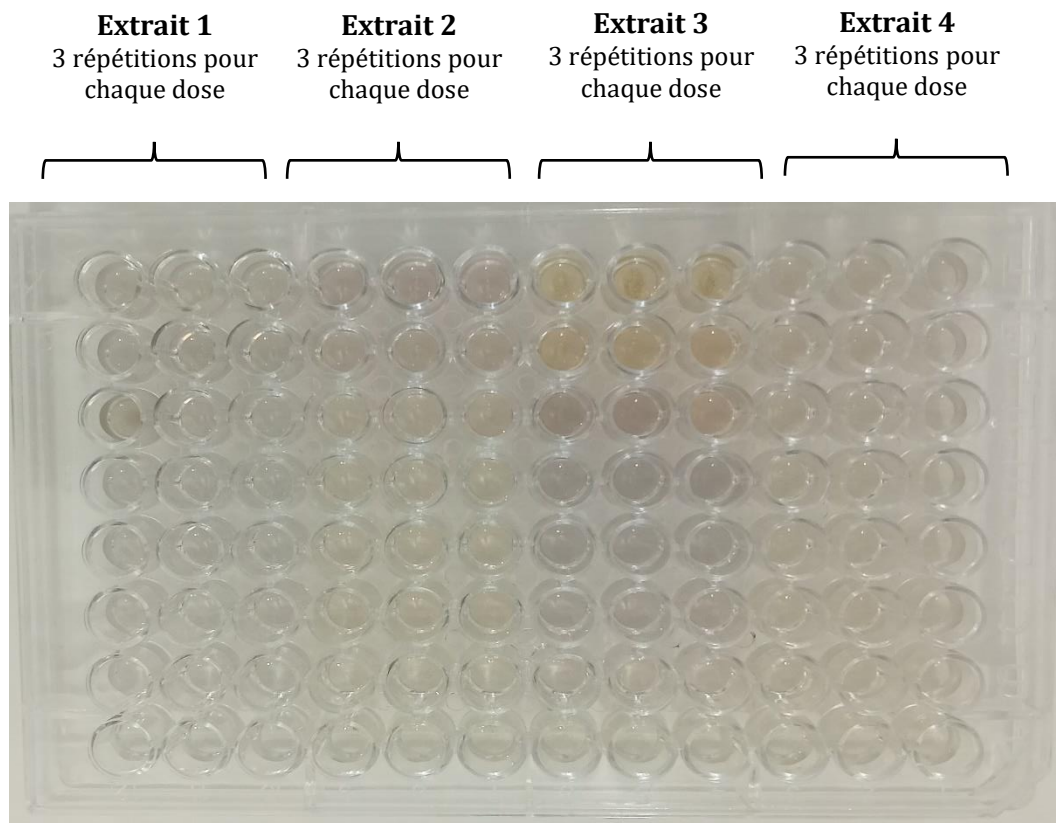
**Extrait 2**  
3 répétitions pour  
chaque dose

**Extrait 3**  
3 répétitions pour  
chaque dose

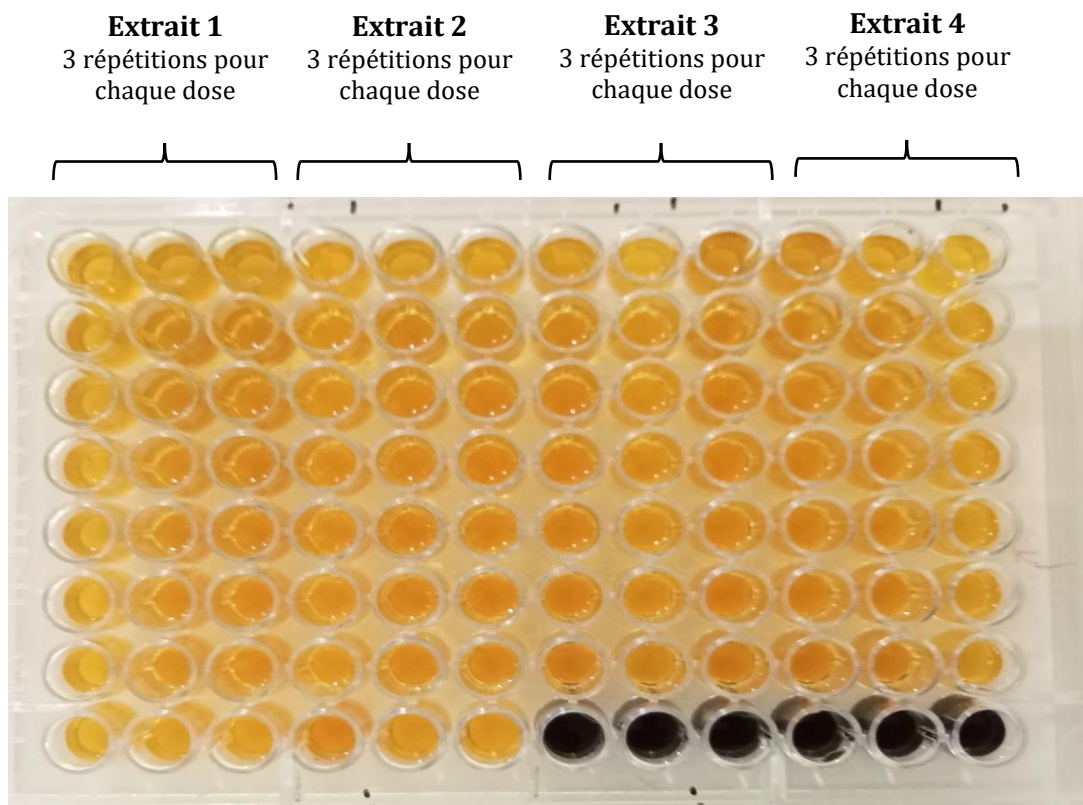
**Extrait 4**  
3 répétitions pour  
chaque dose



**Annexe 07 : Image de la plaque dans le test du SNP**



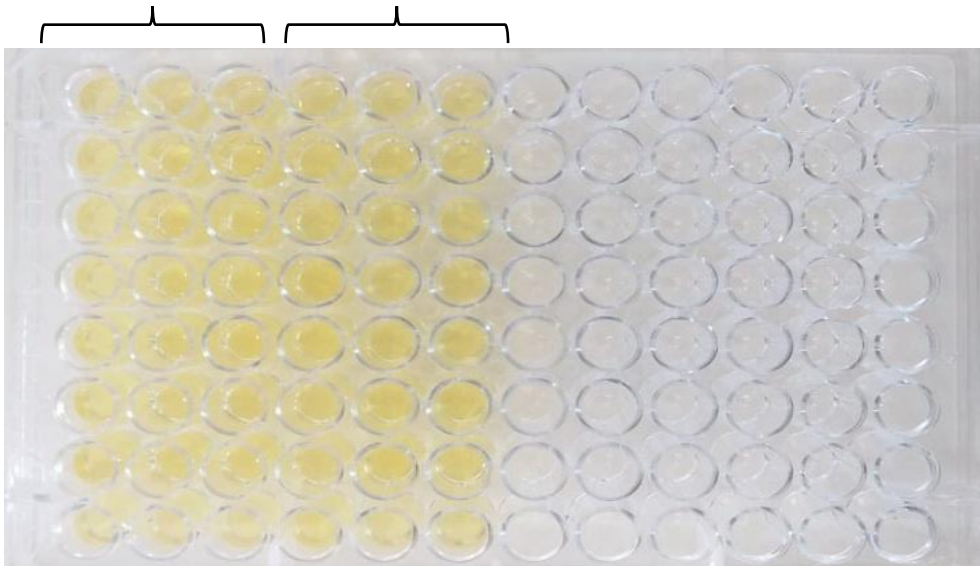
**Annexe 08 : Image de la plaque dans l'activité inhibitrice de l' $\alpha$ -amylase**



**Annexe 09 : Image de la plaque dans l'activité inhibitrice de l'Acétylcholinestérase**

**Extrait 1**  
3 répétitions pour  
chaque dose

**Extrait 2**  
3 répétitions pour  
chaque dose



**Extrait 3**  
3 répétitions pour  
chaque dose

**Extrait 4**  
3 répétitions pour  
chaque dose

