

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 CHIMIE
FILIERE : CHIMIE
OPTION : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

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

**Par : BITAM Firouz
ROUINI Nadjat**

Intitulé

**Evaluation colorimétrique *in vitro* des activités
antioxdante, antidiabétique et anti-Alzheimer des extraits
de la plante *Ajuga iva* L.**

Président

Dr. KHENICHE Abdelhakim

Univ-MB, Msila

Examineur

Dr. HAFFAR Hicham

Univ-MB, Msila

Promoteur

Dr. KADI Imededdine

CRBt, Constantine

Année universitaire : 2020 /2021

REMERCIEMENTS

*Au terme de cet humble travail, nous tenons à exprimer nos remerciements et notre profonde gratitude avant tout à **Dieu** le tout puissant qui nous a donné le courage, la force et la volonté pour réaliser ce mémoire.*

*Nous exprimons notre profonde gratitude au notre promoteur **Dr. KADI Imed Eddine**, chercheur permanent au Centre de Recherche en Biotechnologie, Constantine qui a bien accepté de nous encadrer, nous tenons à exprimer notre reconnaissance pour les orientations, les conseils qu'il a mis à notre disposition tout au long de ce travail malgré ses multiples occupations, il a disposé d'un bout de son temps pour contribuer à nous préparer et à nous lancer dans la recherche.*

*Nous remercions **Dr. KHENICHE Abdelhakim**, président de jury, chef de département de la faculté des sciences de la matière à l'université de MOHAMED BOUDIAF - M'SILA*

*Nous sommes très honorées et tiens à remercier **Dr HAFFAR Hicham** enseignant à l'université MOHAMED BOUDIAF - M'SILA pour avoir accepté d'être les examinateurs de ce travail.*

Nous remercions tous les membres du centre de la recherche Biotechnologie, Constantine. Enfin, un grand merci à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce Travail.



Dédicace

*Mes remerciements vont tout d'abord au mon DIEU
pour la volonté et la patience qu'il m'a donnée
durant ces longues années d'études afin que je puisse
arriver à ce stade.*

Je dédie ce mémoire:

Aux personnes les plus chères au monde :

*Mon père Abdallah et ma mère Zohra, qui donnent le meilleur d'eux pour me voir réussir,
vous êtes la lumière de mes yeux, merci pour votre amour, votre affection, votre soutien et vos
encouragements constants et mutuels. Sans vous je ne serais pas arrivée jusqu'ici. Recevez ici
ma profonde gratitude pour vos innombrables sacrifices. Je vous souhaite une longue et
heureuse vie.*

*A mes chères sœurs « Rima, Hakima, Nassira, Nora » pour leurs amour et soutien. Que Dieu
vous garde pour moi.*

*A mes très chers frères Abbas, Ismail, pour leurs encouragements permanents et soutien
moral.*

*A mon binôme Nadjat, j'ai partagé avec elle les joies et les difficultés au suivi de notre
travail. Merci du fond cœur*

*A mes amies « Amira, assia, kanza, hadjer, Inssaf, soulaf, mbarka, Rana, Nour Elimén,
chaima, imen fellali, wiâam »*

Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible, je vous dis

Merci

Firouz



Dédicace

*Mes remerciements vont tout d'abord au mon DIEU
pour la volonté et la patience qu'il m'a donnée
durant ces longues années d'études afin que je puisse
arriver à ce stade.*

Je dédie ce mémoire:

*A mes chers parents Rouini Cherif et Naili A. pour tous sacrifices, leur amour, leur tendresse,
leur soutien et leurs prières tout au long de mes études.*

*A mes chères sœurs Souhila et Yasmine pour leurs encouragements permanents, et leur
soutien moral.*

A mes chers frères, Salah et Ahmed, Chouaib pour leur appui et leur encouragement.

A toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire.

A mon binôme Firouz Bitam pour sa compréhension et son soutien.

Que ce travail soit

L'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infaillible.

Merci d'être toujours là pour moi.

Nadjet

Liste des figures

Chapitre 01

Fig. I. 01 : Les différentes classes de flavonoïdes	05
Fig. I. 02 : <i>Ahuga iva</i> L. en image.....	11

Chapitre 02

Fig. II. 01 : La neutralisation des radicaux libres par un antioxydant	15
Fig. II. 02 : Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO)	15
Fig. II. 03 : la structure chimique des principaux antioxydants d'origine synthétique	17
Fig. II. 04 : la balance entre les systèmes pro-oxydants et les antioxydants	18
Fig. II. 05 : Présentation schématique de la maladie d'Alzheimer.....	21

Chapitre 03

Fig. III. 01 : schéma général de l'extraction et le fractionnement des extraits étudié.....	24
Fig. III. 02 : mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon (DPPH).....	25
Fig. III. 03 : mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon (ABTS).....	25
Fig. III. 04 : mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon (FRAP).....	26
Fig. III. 05 : mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon (Phenanthroline).....	26
Fig. III. 06 : mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon(SNP).....	27
Fig. III. 07 : mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon(Anti-BuChE).....	29

Chapitre 04

Fig. IV. 01 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	31
Fig. IV. 02 : Courbe d'étalonnage de la Quercétine.....	31
Fig. IV. 03 : Teneurs en Phénols totaux des extraits étudiés	32
Fig. IV. 04 : Teneur en Flavonoïdes totaux des extraits étudiés.....	32
Fig. IV. 05 : Valeurs IC ₅₀ des extraits étudiés dans le piégeage du radical DPPH.....	36
Fig. IV. 06 : Valeurs IC ₅₀ des extraits étudiés dans le piégeage du radical ABTS.....	36
Fig. IV. 07 : Valeurs A _{0.5} des extraits étudiés dans la méthode de FRAP.....	41
Fig. IV. 08 : Valeurs A _{0.5} des extraits étudiés dans la méthode de Phenanthroline.....	41
Fig. IV. 09 : Valeurs A _{0.5} des extraits étudiés dans la méthode SNP.....	42
Fig. IV. 09 : Valeurs SPF des extraits étudiés	47

Liste des Tableaux

Chapitre 01

Tableau I. 01 : Principaux acides hydroxybenzoïques	04
Tableau I. 02 : Principaux acides hydroxycinnamiques	04
Tableau I. 03 : Classification des composés terpéniques.....	08

Chapitre 02

Tableau II. 01 : les espèces réactives d'oxygène et de nitrogène	14
Tableau II. 02 : principaux antioxydants exogènes leurs sources.....	16

Chapitre 03

Tableau III. 01 : l'organisation de microplaque dans le test d'inhibition de α -amylase.....	28
Tableau III. 02 : mode de remplissage de microplaque dans le test de α -amylase.....	28
Tableau III. 03 : Fonction normale de produit utilisée dans le calcul de la SPF.....	30

Chapitre 04

Tableau IV. 01 : Rendement d'extraction des extraits étudiés.....	31
Tableau IV. 02 : teneur en Phénols totaux et flavonoïdes des extraits étudiés.....	32
Tableau IV. 03 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH.....	34
Tableau IV. 04 : Pourcentages d'inhibition du radical ABTS.....	35
Tableau IV. 05 : tableau récapitulatif des valeurs IC ₅₀ (μ g/ml).....	36
Tableau IV. 06 : les absorbances des différents extraits dans la méthode FRAP.....	38
Tableau IV. 07 : les absorbances des différents extraits dans la méthode de Phenanthroline.....	39
Tableau IV. 08 : les absorbances des différents extraits dans la méthode SNP.....	40
Tableau IV. 09 : tableau récapitulatif des valeurs A 0.5 (μ g/ml).....	41
Tableau IV. 10 : les pourcentages d'inhibition de l' α -amylase par les extraits étudiés.....	44
Tableau IV. 11 : les pourcentages d'inhibition de la BuChE.....	45
Tableau IV. 12 : coefficient de protection solaire des extrais étudiés.....	47

Liste des abréviations

ROS /ERO	Les espèces réactives de l'oxygène.
ADN	Acide désoxyribonucléique.
BHA	hydrox-yanisole butylé.
BHT	hydroxy-toluene butylé
NO	oxyde d'azote
SOD	superoxydes dismutases.
CAT	Catalase.
GPx	Glutathion peroxydase.
GR	Glutathion réductase.
O₂	Oxygène
OH•	Radical hydroxyle.
Fe²⁺	Fer ferreux.
Cu²⁺	Ion cuivrique.
Fe³⁺	Fer ferrique.
HOCl	Acide hypochlorique.
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène.
O₂^{*-}	Anion superoxyde.
¹O₂	Oxygène singulier.
GSH	Glutathion.
DPPH	2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl.
ABTS	2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power.
IC₅₀	Concentration inhibitrice de 50 %.
K₃Fe (CN)₆	Ferricyanure de potassium.
FeCl₃	Chlorure de fer.
HCl	Acide chlorhydrique.
H₂O	Eau.
MA	maladie d'Alzheimer.
AChE	Acétylcholinestérase.

الاستراتيجيات الكبرى التي أقرتها المديرية الوطنية للبحث العلمي تتمحور حول ثلاث مستويات رئيسية، الأمن الصحي، الأمن الغذائي، الأمن الطاقوي. يعتبر الأمن الصحي أولوية أساسية نظرا للتأثيرات الاقتصادية والاجتماعية المكلفة التي تسببها الأمراض المزمنة بمختلف أصنافها. تشير الدراسات الى الارتباط المباشر وغير المباشر بين أنواع محددة من هذه الامراض كالسكري والاضطرابات العصبية مع ظاهرة الاجهاد التأكسدي. كما يؤكد المختصون في هذا المجال الى ضرورة تفعيل استراتيجيات محكمة والبحث عن بدائل دوائية فعالة خاصة منها ذات المصدر الطبيعي النباتي حيث تعتبر المركبات الطبيعية مصدرا فعالا ودائما لاكتشاف عناصر دوائية جديدة، نظرا لما يتميز به خصائص السلامة، الفعالية وقلة الاثار السلبية. في هذه الدراسة نتطرق الى تثمين المركبات الفعالة لنبته طبية تدعى *Ajuga iva L.* مع تحديد تركيبها من Polyphénols و flavonoides. ونشاطها مضاد الاكسدة باستعمال تقنيات تثبيط الجذور الحرة DPPH و ABTS. وكذا ارجاع الحديد والفضة في التقنيات، Phenanthroline, FRAP, SNP على التوالي. كما تطرقنا الى دراسة تثبيط العينات النباتية للنشاط الانزيمي لكل من α -amylase و AChE وتحديد مؤشر الحماية من الاشعة فوق البنفسجية الشمسية. النتائج المحصّل عليها أعطت كميات معتبرة من Polyphénols و flavonoides خاصة بالنسبة للمستخلصات. acétaté brut و d'éthyle. هذين المستخلصين أعطيا أفضل النتائج في تعديل الجذور الحرة DPPH و ABTS. في جانب اخر، المستخلص Acétate d'éthyle أعطى أفضل النتائج تقنيات ارجاع الحديد، Phenanthroline, FRAP في حين سجل مستخلص الخام أفضل النتائج مقارنة بالبقية في تقنية ارجاع الفضة SNP. في حين تبقى أفضل النتائج للمركبات المرجعية. من جهة أخرى اعطى النشاط المضاد لانزيم BuChE نتائج معتبرة خاصة للمستخلصين brut و E Acétate في حين كان المستخلص Chloroformique الأفضل في تثبيط α -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

The scientific technical Research was organized into three essential plans, health security, food security and energy security. Experts considered health security a priority due to its social and economic impacts of acute and chronic diseases. The management of these situations requires a good adaptation of current strategies and the search for new therapeutic alternatives. In this context, natural products offered us an inexhaustible source of active ingredients that can be used in the control of oxidative stress, diabetes, Alzheimer's and other forms of disease. The current study was proposed to valorize, on a scientific basis, the therapeutic effects of a medicinal plant *Ajuga iva* L. On the methodological level, we evaluated, the total content of phenols and flavonoids, and the antioxidant activity of four extracts using standard colorimetric methods, in vitro, scavenging of DPPH and ABTS radicals, reduction of iron (FRAP and Phenanthroline) and Silver (SNP). On the other hand, we tested the type 2 antidiabetic activity and the anti-Alzheimer activity through the inhibition of α -amylase and butyrylcholinesterase respectively. This work was finalized by a study of sun protection factors. The obtained results showed interesting contents of total phenols and flavonoids for the crude and ethyl acetate extracts. In the biological activities, the obtained results showed a potent inhibitory activity of the crude and ethyl acetate extracts against DPPH and ABTS radicals. Moreover, Ethyl acetate extract showed the best effect in FRAP methods and Phenanthroline while the crude extract is the most potent in SNP method. Chloroform extract is the weakest in the previous three activities. On the other hand, the chloroform extract greatly inhibited the α -amylase, in a dose-dependent manner, whereas the crude and ethyl acetate extracts are the most interesting in the inhibition of butyrylcholinesterase. In addition, our extracts showed potent sun protection factors. The obtained results enhanced the traditional use of the selected plant in Algeria. They also opened multiple perspectives in this field

Keywords: Antioxidant, oxidative stress, Alzheimer, T2DM, *Ajuga iva* L.

Résumé

La direction générale de la recherche scientifique a organisé la recherche technique en Algérie en trois plans essentiels, la sécurité sanitaire, la sécurité alimentaire et la sécurité énergétique. Les experts considèrent la sécurité sanitaire une priorité grâce à ses impacts sur le plan sociale et économique, notamment avec la dissémination progressive des maladies chroniques. La gestion de ces menaces nécessite une bonne adaptation des stratégies actuelles et la recherche des nouvelles alternatives thérapeutiques sains et puissants. Dans ce contexte, les produits d'origine naturels nous offrent une source inépuisable des principes actifs qui peuvent être exploités dans le control du stress oxydatif, du diabète, d'Alzheimer et d'autres formes de maladies. Ce travail a été proposé dans le cadre de valorisation, sur une base scientifique, des vertus thérapeutique d'une plante médicinale saharienne *Ajuga iva* L. Sur le plan méthodologique, nous avons évalué d'une part, le contenu en phénols et flavonoïdes totaux et l'activité antioxydante de quatre extraits de la plante *Ajuga iva* L. par des méthodes colorimétriques standards, in vitro, le piégeage des radicaux DPPH et ABTS, la réduction des fer (FRAP et Phenanthroline) et d'Argent (SNP). D'autres part, nous avons caractérisé l'activité antidiabétique de type 2 via l'inhibition de l' α -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 du dosage ont montré que l'extrait brut et d'acétate d'éthyle ont donné des teneurs intéressants en phénols et flavonoïdes totaux. Sur le plan des activités, les résultats obtenus ont montré des activités intéressantes pour les extraits brut et d'acétate d'thyle, ils sont comparables aux références BHA et BHT dans les méthodes de neutralisation des radicaux DPPH et ABTS. En parallèle, L'extrait d'acétate d'éthyle a présenté le meilleur effet dans les méthodes FRAP, Phenanthroline, l'extrait brut est le plus puissant dans la méthode SNP, tandis que le chloroformique est le plus faible dans les trois activités précédentes. D'autre part, l'extrait chloroformique a inhibé fortement l'- α amylase, d'une manière dose-dépendante, Alors que les extraits brut et acétate d'éthyle sont les plus intéressants dans l'inhibition de butyrylcholinestérase. En plus, nos extraits ont montré des facteurs de protections solaire intéressants. Les résultats obtenus valorisent l'utilisation traditionnel de la plante sélectionnée en Algérie, Ils ouvrent également des perspectives multiples qui permettent d'approfondir nos études dans ce domaine.

Mots clés : Antioxydants, *Ajuga iva*, 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 d'origine végétale

1. Les produits naturels : généralités.....	03
1.1. Les composés phénoliques.....	03
1.1.1. Généralités.....	03
1.1.2. Classification.....	03
1.1.2.1. les acides phénoliques.....	03
a. Dérivés de l'acide benzoïque.....	04
b. Dérivés de l'acide hydroxycinnamique.....	04
1.1.2.2. les flavonoïdes.....	05
1.1.2.3. les tanins :	05
a. Généralités.....	06
b. Classification	06
1.2. Les alcaloïdes.....	07
1.2.1. Généralités	07
1.2.2. Classification.....	07
1.2.2.1. Les alcaloïdes vrais	07
1.2.2.2. Les pseudo-alcaloïdes.....	07
1.2.2.3. Les proto-alcaloïdes	08
1.3. Les composés terpéniques.....	08
1.4.1. Généralités	08
1.4.2. Classifications des terpènes.....	08
2. Intérêts des produits naturels.....	09
2.1. Dans le domaine médical.....	09
2.2. Dans le domaine agroalimentaire.....	09
2.3. Dans le domaine cosmétique.....	09
2.4. Dans l'industrie pharmaceutique	10
3. Description de la plante : <i>Ajuga iva</i> L.....	11
3.1. Etude botanique et géographique	11
3.2. Intérêts thérapeutiques et pharmacologiques.....	12

Chapitre 02 : Le stress oxydatif

1. Les radicaux libres.....	13
1.1. Description générale.....	13
1.2. Source des radicaux libres.....	13
1.2.1. Sources endogènes.....	13
1.3.1. Sources exogènes.....	13
1.3. Classifications.....	13
1.3.1. Les espèces réactives de l'oxygène.....	13
1.3.2. Les espèces réactives de l'Azote.....	14
2. Les antioxydants.....	14
2.1. Description générale.....	14
2.2. Sources des antioxydants.....	16
2.2.1. Antioxydants endogènes.....	16
2.2.2. Antioxydants exogènes.....	16
2.3. Classification des antioxydants.....	17
2.3.1. Antioxydants d'origine naturelle.....	17
2.3.2. Antioxydants d'origine synthétique	17
3. Le stress oxydatif.....	18
3.1. Généralités.....	18
3.2. Effets néfastes sur la santé humaine.....	19
4. Stress oxydatif et maladies chroniques.....	19
4.1. Le Diabète.....	19
4.1.1. Généralités.....	19
4.1.2. Diabète type 01.....	20
4.1.3. Diabète type 02.....	20
4.1.4. Modes de traitement	20
4.2. L'Alzheimer.....	21
4.2.1. Généralités.....	21
4.2.2. Modes de traitement	21
5. L'évaluation de l'activité antioxydante.....	22
5.1. L'étude <i>in vivo</i>	22
5.2. L'étude <i>in silico</i>	22
5.3. L'étude <i>in vitro</i>	22

Chapitre 03 : Matériels et méthodes

1. Collection du matériel végétal.....	23
2. Préparation de la matière première.....	23
3. Extraction des principes actifs.....	23
4. Quantification des composés phénoliques.....	23
5. Dosage des flavonoïdes.....	24
6. L'évaluation <i>in vitro</i> de l'activité antioxydante.....	25
6.1. Piégeage du radical DPPH.....	25
6.2. Piégeage du radical ABTS.....	25
6.4. Activité du pouvoir réducteur (FRAP).....	26
6.5. Activité de réduction par formation du complexe Fe+2-Phenanthroline.....	26
6.6. Activité de réduction de l'Ag ⁺ en nanoparticule d'Argent sphérique.....	27
7. Activité inhibitrice des enzymes.....	28

7.1. Activité antidiabétique via l'inhibition de l' α -amylase.....	28
7.2. Activité anti-Alzheimer via l'inhibition de la butyrylcholinestérase.....	29
8. Activité protectrice vis-à-vis les rayonnements solaires.....	30
9. Etude statistique.....	30

Chapitre 04 : Résultats et discussion

1. Rendements d'extraction.....	31
2. Dosage des phénols totaux et flavonoïdes.....	31
3. Activité antioxydante.....	34
3.1. Activité de piégeage du radical libre DPPH.....	34
3.2. Activité de piégeage du radical libre ABTS.....	35
3.3. Activité de pouvoir réducteur (FRAP).....	38
3.4. Activité de réduction du complexe Fe+2-Phenanthroline.....	39
3.5. Activité de réduction des nanoparticules d'Argent (SNP).....	40
4. Activité inhibitrice des enzymes.....	44
4.1. L'activité antidiabétique via l'inhibition de l' α -amylase.....	44
4.2. L'activité anti-Alzheimer via l'inhibition de butyrylcholinestérase.....	45
5. L'activité protectrice vis-à-vis la lumière solaire.....	47

Conclusion générale et perspectives

1. Conclusion générale.....	48
2. Perspectives.....	49

Annexes

Introduction générale

Introduction

Actuellement, en face des impacts socio-économiques de la dissémination approfondie des maladies chroniques en Algérie, la direction de recherche scientifique considère la sécurité sanitaire une priorité indiscutable. Plusieurs projets de recherches, sur le plan local et national, sont orientés vers, d'une part, l'adaptation de stratégies d'une manière qu'elles peuvent franchir les différentes barrières, et d'autres part, la recherche des nouvelles opportunités qui nous permettent de bien maîtriser l'état de la santé populaire Algérienne.

De nos jours, Les maladies chroniques viennent à s'installer progressivement dans la communauté, plus particulièrement chez les sujets âgés. Le diabète, le cancer des maladies neurodégénérative et cardiovasculaires sont classées en premier ordre, ils influencent la qualité de vie humaine et engendrent des effets lourds sur les plans sanitaire, sociale et économique. Sur le cadre physiologique, les experts médicaux ont largement rapporté la relation de ces maladies avec le stress oxydatif, durant l'apparition et/ou l'aggravation, ces perturbations des phénomènes redox endogènes agressent l'état interne de l'organisme a l'échelle cellulaires et moléculaire, en perturbant ainsi l'ensemble de ses phénomènes biologiques essentielles.

Le diabète, une problématique métabolique mondiale, influence profondément la qualité de vie des personnes atteints jeunes et vieux. Ce désordre métabolique représente un climat convenable pour l'apparition d'autres formes de complications telles que les problèmes oculaires, la néphropathie diabétique et l'immunodépression et...etc. le diabète type 2, non insulino-dépendant, est le plus disséminé notamment chez les personnes obèses et évolue progressivement vers de diabète type 1. En plus, L'ensemble des traitements et stratégies thérapeutiques adapté dans le traitement du diabète portent plusieurs d'effets secondaires et restent modérément efficaces.

L'Alzheimer est une maladie neurovégétative qui s'installe progressivement chez les patients âgés, elle se caractérise par une perte, plus au moins grave, de mémoire accompagnée a plusieurs troubles cognitives et comportementaux. La théorie cholinergique attribue toutes ces perturbations au déficit de l'acétylcholine dans la partie cholinergique du système nerveux. Plusieurs médicaments, des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase, prouvés par FDA sont commercialisés dans le marché mais leurs effets digestifs et hépatotoxiques sont rapportés.

Les produits naturels représentent une source inépuisable des alternatives médicaux depuis les antiquités. La médecine traditionnelle offre à l'humanité des vertus thérapeutiques intéressants qui nécessitent d'être exploités sur une base scientifique solide. Les produits naturels ont rôle primordial dans d'industrie pharmaceutique, ils peuvent être utilisés directement ou après synthèse ou hemi-synthese, ils sont considérés comme des alternatives puissantes dans la fabrication des médicaments du futur.

Ce travail a été proposé pour évaluer le pouvoir des extraits de la plante *Ajuga iva* L. à neutraliser le stress oxydatif, et aider les patients souffrant de l'Alzheimer et du diabète type 2 par des études détaillées *in vitro*.

Pour ce faire, ce travail a été organisé en quatre chapitres cohérentes. Le premier traite le cadre général des produits naturels, particulièrement les métabolites secondaires, depuis la synthèse jusqu'à la classification et leurs intérêts pharmacologiques. Le deuxième chapitre discute la notion du stress oxydatif avec les différents effets sur la santé humaine, en précisant sa relation avec le diabète et l'Alzheimer. Le troisième chapitre contient l'aspect technique et méthodique, depuis la collection de la plante jusqu'à l'extraction et l'évaluation des activités biologiques. Le dernier chapitre regroupe les résultats obtenus en détails avec une discussion. Ce manuscrit a été clôturé par une conclusion générale et perspectives.

Chapitre 01

Produits naturels d'origine végétale

1. Les métabolites secondaires: généralités

Les métabolites secondaires sont des composés synthétisés par les voies métaboliques normales mais qu'ils n'ont aucuns rôles dans la croissance et la production d'énergie de l'organisme. Ils peuvent être divisés en trois grandes familles naturels : les composés phénoliques, les alcaloïdes et les composés terpéniques. Chacune de ces classes contient une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activité biologique. (Ramakrishna *et al.*, 2011)

1.1. Les composés phénoliques**1.1.1 Généralités**

Les composés phénoliques appartiennent à la classe des métabolites secondaires végétaux. Ils correspondent à la plus grande variété des substances les plus hétérogènes, dont plus de 8000 molécules ont été isolées et identifiées (Hannebelle *et al.*, 2004). L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside (Karakaya, 2004).

Les composés phénoliques jouent un rôle essentiel dans la structure et la protection des plantes (Naczka *et al.*, 2003 ; Stalikas, 2007). Ce sont des métabolites qui sont synthétisés par deux voies d'aromagenèse, la voie shikimate et la voie d'acétate. La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples vers les molécules les plus hautement polymères, les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, les coumarines (Macheix *et al.*, 2005).

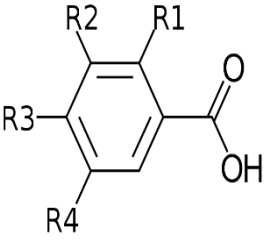
1.1.2 Classifications**1.1.2.1. Les acides phénoliques**

Les acides phénoliques constituent les formes les plus simples des composés phénoliques. Ils se divisent en deux classes, celle qui dérive de l'acide benzoïque avec une structure (C6-C3 ou C6-C1) et celle qui dérive de l'acide cinnamique (C6-C3) (Hollman, 2001).

a. Dérivés de l'acide hydroxybenzoïque

Cette catégorie regroupe les composés dérivés de l'acide benzoïque, ils ont une structure générale de base de type (C6-C1), ils existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides. Les acides hydroxybenzoïques les plus abondants sont répertoriés dans le **Tableau I. 01.**

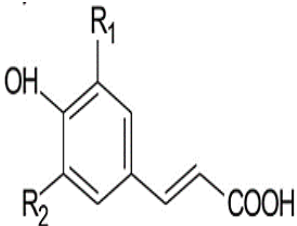
Tab. I. 01 : Principaux acides hydroxybenzoïques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006)

Structure	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Acide phénolique
	H	H	H	H	Acide benzoïque
	H	H	OH	H	Acide hydroxy benzoïque
	H	OH	OH	H	Acide protocatechique
	H	OCH ₃	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
	OH	H	H	OH	Acide gentisique

b. Dérivés de l'acide hydroxycinnamiques

Cette famille regroupe des composés dérivés de l'acide cinnamique. Ils ont une structure générale de base de type (C6-C3), ils existent souvent sous forme combinée avec des molécules organiques. Les degrés d'hydroxylation et de méthylation du cycle benzéniques, conduisent à une réactivité chimique importante de ces molécules. Le **Tableau I. 02.** représente les principaux acides hydroxycinnamiques.

Tab. I. 02: Principaux acides hydroxycinnamiques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006)

Structure	R ₁	R ₂	R ₃	Acide phénoliques
	H	H	H	Acide cinnamique
	H	OH	H	Acide p- coumarique
	OH	OH	H	Acide caféique
	OCH ₃	OH	H	Acide férulique
	OCH ₃	OH	OCH ₃	Acide sinapique

1.1.2.2. Les flavonoïdes

Le nom flavonoïde provient du terme flavus c'est-à-dire jaune (Malešev et Kuntić, 2007), le terme flavonoïdes rassemble une très large gamme de composés naturels généralement polyphénoliques (Panche, 2016), Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux. Sur le plan chimique, Les flavonoïdes sont des dérivés du noyau flavone ou 2-phenyl chromone portant des fonctions phénols libres, éthers ou glycosides. Le noyau flavone est lui-même un dérivé du noyau flavonoïde base (Milane, 2004). Structuralement, les flavonoïdes ont un squelette de base commun constitué de 15 atomes de carbone assemblés en trois cycles nommés A, C et B. Selon la structure du cycle intermédiaire (cycle C), les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes qui sont généralement représenté dans la figure I. 01.

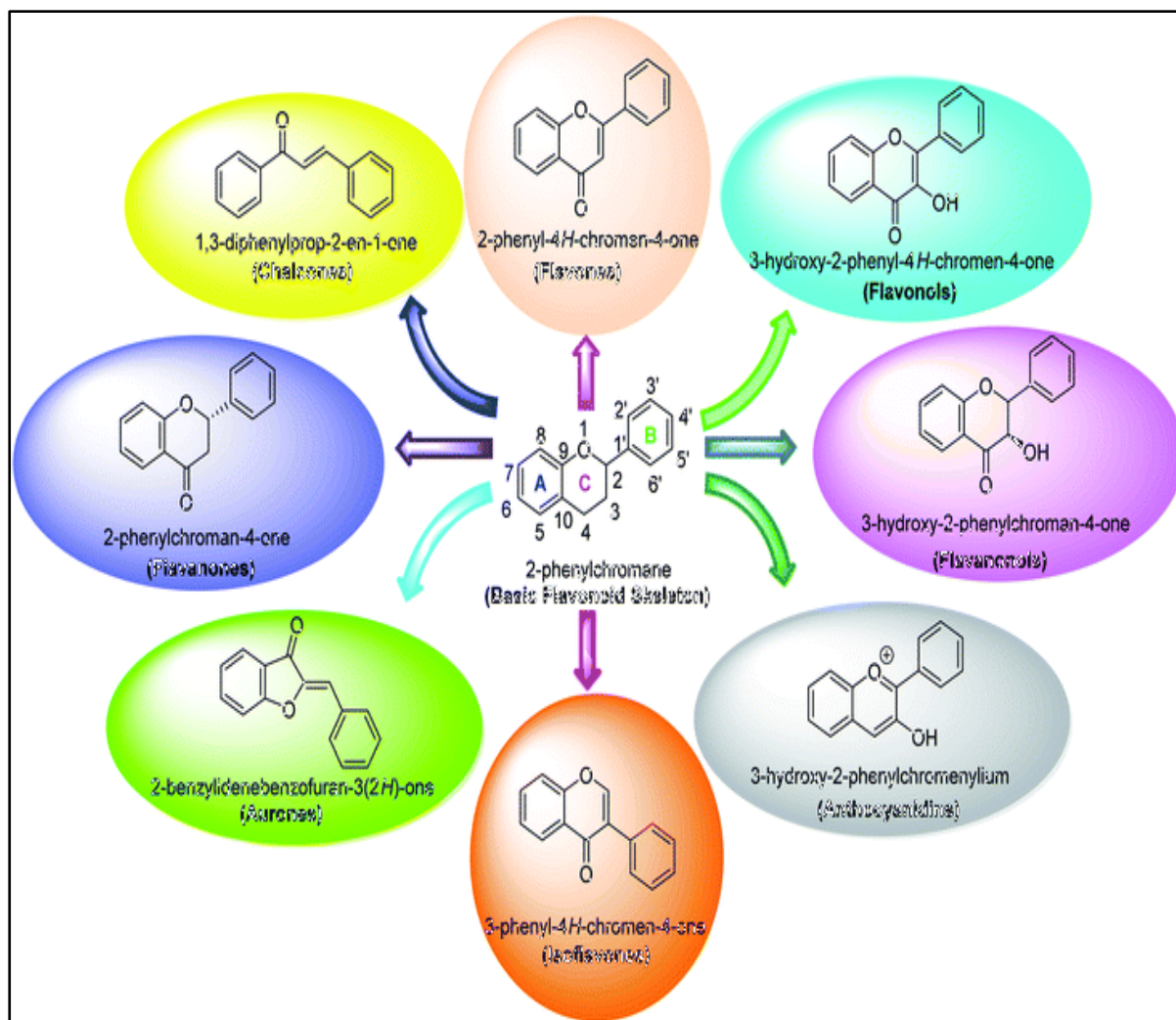


Fig. I. 01 : Les différentes classes de flavonoïdes

1.1.2.3. Les tanins**a. Généralités**

Ce sont des substances d'origine végétale et ont la propriété de tanner la peau, cette propriété de tannage provient de la création de liaisons entre les molécules de tannins et les fibres de collagène. Ils sont solubles dans l'eau et alcool, l'acétone, peu soluble dans l'éther, on les trouve dans plusieurs végétaux tels que les fruits (datte, café, cacao...)

b. Classification

Généralement, les tanins sont divisés en deux grandes groupes.

➤ Les tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables sont constitués de molécules phénoliques simples, ils sont des polyesters d'oses et d'acides phénoliques. Les oses sont trouvés dans ces tanins surtout représentés par le glucose, ces tanins sont de deux types (**Sieniawska, 2017**).

- Les Tanins gallique : Ce sont les tanins hydrolysables les plus simples. L'hydrolyse acide de ces molécules libère l'ose et l'acide gallique.
- Les tannins ellagique : Avec plus de 500 molécules naturelles caractérisées à ce jour, Ce sont des esters de l'acide hexahydroxy-diphénique (HHPD) et de monosaccharide, généralement β -D-glucose
- Les tanins hydrolysables et condensés: une piste pour la réduction de la production du méthane entérique par les ruminants en milieu tropical.

➤ Tanins condensés

Les tanins condensés appelés aussi catéchique, sont des composés phénoliques hétérogènes, ils sont largement répandus dans le règne végétal et l'alimentation humaine (fruits, légumes, boissons ...etc.) (**Perrony, S Ethologie, 2005**). Les décoctions et les autres préparations à base de drogues riches en tannins sont employées le plus souvent extérieurement contre les inflammations de la cavité buccale, les catarrhes, la bronchite, les hémorragies locales, sur les brûlures et les engelures, les plaies, les inflammations dermiques, les hémorroïdes et la transpiration excessive (**Sieniawska, 2017**).

1.2. Les alcaloïdes**1.2.1. Généralités**

Le terme d'alcaloïde a été introduit par W. Meisner au début du XIX^e siècle (1819) pour désigner des substances naturelles et organiques (le plus souvent d'origine végétale), hétérocyclique avec l'azote comme hétéroatome, de structure moléculaire complexe plus ou moins basique présentent généralement de puissants effets physiologiques (**Bruneton, 1999. stockâgit et al., 2002**). Les alcaloïdes sont des substances particulièrement intéressantes pour leurs activités pharmacologiques qui s'exercent dans les domaines les plus variés. Ils sont utilisés dans le traitement des maladies cardiovasculaires, nerveuses, gastro-intestinales de l'homme et des animaux (**Khalid et al, 2004 ; Milne et al, 2004**).

1.2.2. Classification

Depuis leur découverte et jusqu'à maintenant il y a plus de 10 000 alcaloïdes isolés ou détectés à partir de sources végétales, animales ou de micro-organismes. La classification la plus adaptée est basée sur l'origine biogénétique, c'est-à-dire de les classer en trois groupes selon leur précurseur biosynthétique.

1.2.2.1. Les alcaloïdes vrais

Dérivent d'acides aminés et comportent un atome d'azote dans un système hétérocyclique (exemple la strychnine dérivée du tryptophane). Ce sont des substances douées d'une grande activité biologique, même à faibles dose. Ils apparaissent dans les plantes, soit sous forme libre, soit sous forme d'un sel, soit comme N-oxide (**Aniszewski, 2007**)

1.2.2.2. Les pseudo –alcaloïdes

Ne sont pas dérivés d'acides aminés. Ils peuvent cependant être indirectement liés à la voie des acides aminés par l'intermédiaire d'un de leurs précurseurs, ou d'un de leurs postcurseurs (dérivés). Ils peuvent aussi résulter d'amination, ou de réaction de transamination dans une voie connectée avec les précurseurs ou les postcurseurs d'acides (**Aniszewski, 2007**)

1.2.2.3. Les proto- alcaloïdes

Ce sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans le système hétérocyclique, ils ont une réaction basique et élaborés *in vivo* à partir des acides aminés, comme la sérotonine, la mescaline, les bétaines...etc. (Mauro, 2006 ; Aniszewski, 2007)

1.3. Les composés terpéniques

1.3.1. Généralités

Les terpènes et les terpénoïdes sont largement présents chez toutes les plantes. C'est le groupe le plus vaste avec plus de 22000 composés identifiés (Raven et al, 2000). Le terme terpénoïde désigne un ensemble de substances présentant le squelette terpénique avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhyde, cétone, acide, lactone, etc.) (Gonzalez et al., 2012). Les terpènes, également désignés sous la nomination d'isoprénoïdes, Le squelette carboné de ces composés est formellement constitué d'un élément de base commun à squelette ramifié, à cinq atomes de carbone et dérivé de l'isoprène (hémiterpène) : le 2-méthylbuta-1, 3-diène (Guimarães et al., 2014)

1.3.2. Classification

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

Tab. I. 03 : Classification des composés terpéniques

Nom	N° unité 5 x C	Exemple de molécule
Emiterpènes	1	Isoprène
Monoterpènes	2	Aromes volatiles, parfums
Sesquiterpènes	3	Phytoalexines
Diterpènes	4	Phytol, giberellines,
Triterpènes	6	phytoalexines
Tétraterpènes	8	Brassinostéroïdes, stérols de membranes, certaines toxines

2. Intérêts des produits naturels**2.1.Généralités**

En raison de leurs diverses propriétés, les produits naturels sont devenues une matière d'importance économique considérable. En effet, elles sont largement commercialisées, ils présentent un grand intérêt dans divers secteurs industriels pharmaceutiques grâce à leurs pouvoirs antiseptique, analgésique, antispasmodique, apéritif, antidiabétique..., etc. ils sont fréquemment utilisés dans l'industrie alimentaire et cosmétologique, grâce à leurs propriétés anti-oxydantes, et leurs effet aromatisants et odoriférantes. **(Harvey, 2008).**

2.2. Dans le domaine médical

La plupart de nos médicaments sont issus, dérivés ou inspirés de substances naturelles, les métabolites secondaires qui ont des propriétés Anti-inflammatoires, antidépresseurs, antiseptique ...etc. présentent des intérêts thérapeutiques largement exploités à l'échelle industriel. Les propriétés antiseptiques urinaires, antidiabétiques et antifongiques et autres sont fréquemment rapportés. **(Jones *et al.*, 2006)**

2.3.Dans l'agro-alimentaire

Grace à leurs propriétés antiseptiques et aromatisants, les produits naturels sont employés quotidiennement dans les préparations culinaires (ail, laurier, thym...etc.). Ils sont également très prisés en liquoristerie (boissons anisées, Kummel) et en confiserie (bonbons, chocolat...etc.). Leur pouvoir antioxydant leur permet de conserver les aliments en évitant les moisissures, et l'oxydation des matières grasses. **(Verpoorte, 2000)**

2.4.En cosmétologie et parfumerie

Les produits naturels sont utilisés dans l'industrie des parfums et des cosmétiques en raison de leurs propriétés odoriférantes. L'industrie de la parfumerie consomme d'importants tonnages d'essences (60%) en particulier celles de rose, de jasmin, de violette, de verveine...etc. Ils sont aussi consommés en cosmétologie pour parfumer les produits cosmétique tels que les dentifrices, les shampoings, les crèmes solaires, les rouges à lèvres, les savons, les produits d'hygiène, détergents et lessives. **(Arctander, 2017)**

2.5. Dans l'industrie Pharmaceutique

Plus de 40% de médicaments sont à base de composants actifs de plantes, ses propriétés thérapeutiques les rendent des molécules de choix dans l'industrie pharmaceutique. De même, ils peuvent améliorer les préparations galéniques des médicaments et de masquer leurs odeurs désagréables par leurs propriétés aromatisants. **(Jones *et al.*, 2006)**

3. La plante d'étude : *Ajuga iva* L.**3.1. Données botaniques et géographiques**

Ajuga iva L. est une petite plante vivace de 5 à 20 cm de long, à tiges vertes rampantes et velues, à feuilles vertes grisâtres de 14 à 25 mm de longueur, linéaires, denses et couvertes de duvets. Les fleurs sont violettes, roses, ou jaunes, de 20 mm de longueur, la lèvre supérieure de la corole est réduite ou absente et la lèvre inférieure est divisée en trois lobes velus. Les lobes latéraux sont petits, alors que le lobe central est relativement plus large décoré dans sa base par un axe central jaunâtre. (Halimi, 2004)



Fig. I. 02 : *Ahuga iva* L. en image

La classification botanique est organisée selon le détails suivants

- **Règne** : plantae
- **Division** : spermatophyta (Angiospermae)
- **Classe** : Dicotyledones
- **Ordre** : Tubiflorae
- **Famille** : lamiaceae
- **Genre** : *Ajuga*
- **Espèce** : *iva*

C'est une plante aromatique qui pousse dans le sol profond des terres friches à 2700 m d'altitude, dans les régions arides où elle croît dans les champs, très répandue dans les pelouses et les forêts du tell algérien (**Baba Aissa, 2000**). L'ivette musquée pousse dans la période étendue du printemps jusqu'à la fin de l'été. La période de floraison est entre Mai et Juin. Elle est largement distribuée dans la région méditerranéenne : le sud de l'Europe et le nord de l'Afrique, en particulier en Algérie, Maroc, et en Egypte (**Halimi, 2004**).

3.2.Phytochimie at activités biologiques

Sur le plan chimique, *Ajuga iva* L. contient une grande quantité des composés phénoliques ; les flavonoïdes et les tannins, qui sont les meilleurs antioxydants. Elle contient aussi les anthocyanes, les acides phénoliques et d'autres substances en particulier l'ajugarine. Les études phytochimiques ont montrés que l'ivette contient les trois majeurs ecdystéroïdes (makisterone A, 20-hydroxyecdysone et cyasterone), des diterpénoides, des iridoïdes et des saponosides acides (**Bouyahya et al., 2020**). En phytothérapie, elle est utilisée pour une variété des maladies et troubles mentaux, tels que diabète, maux d'estomac et troubles intestinales, entérite, sinusite, des maux de tête, rhumatisme, la goutte, l'asthme, le paludisme, les ulcères, antibactérien et anti-appétant (**taleb –senouci et al.,2009**).

Chapitre 02

Le stress oxydatif

1. Les radicaux libres

1.1. Généralités

Un radical libre est une espèce chimique possédant un électron célibataire (ou non apparié) sur sa couche externe, ce qui les rend réactifs vis-à-vis les molécules voisines. En fait, un radical libre est très instable et réagit rapidement avec d'autres composants, essayant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir la stabilité. Une réaction en chaîne débute lorsqu'un radical libre attaque les biomolécules proches en lui arrachant des électrons, ces dernières molécules deviennent elles-mêmes des radicaux libres (**Favier, 2003**)

1.2. Sources des radicaux libres

1.2.1. Les sources exogènes

Les sources des radicaux libres exogènes sont multiples, elles peuvent être représentées par l'exposition aux ultra-violets, aux ultrasons, à des champs magnétiques, aux métaux lourds, aux agents cancérogènes, au stress, à la pollution, ainsi qu'à la consommation d'alcool, la prise des médicaments, le tabagisme ...etc. (**Favier, 2003 ; Richard, 2013**)

1.2.2. Les sources endogènes

Les radicaux libres ont également des sources endogènes. Durant les réponses inflammatoire, infectieuse et allergique, les cellules engagées produisent plusieurs médiateurs chimiques qui participent directement ou indirectement dans la production de certains radicaux libres. (**Krishnaa et al., 2010**). Parallèlement, l'activité mitochondriale reste une source principale dans ce genre de production avec le peroxyosome, la xanthine oxydase et la NADPH oxydase...etc. (**Ahmed, 2012 ; Maghazal et al., 2012 ; Ihoual et al., 2018**)

1.3. Classifications

1.3.1. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)

On définit les espèces réactive d'oxygène comme étant une famille d'entités chimiques regroupant les radicaux libres ou des espèces moléculaires oxygénées capables de produire des radicaux libres dérivés d'oxygène (**Mukhopadhyay et al., 2016**). Ce genre des radicaux oxygénés représentent la classe la plus importante d'espèces radicalaires générées dans les systèmes vivants, ils sont des dérivés de l'oxygène où certains électrons se trouvent dans un état énergétique excité et très réactionnel, ce qui influence la stabilité d'autres biomolécules en engendrant un stress oxydatif (**Valko et al., 2007**).

1.3.2. Les espèces réactives d'azote (ERN)

Contrairement aux ERO, il y a peu de données sur l'altération induite par les espèces réactives d'azote (**Kocsy et al., 2013**), elles sont considérées comme une sous-classe des radicaux libres qui sont générés par la réaction de l'oxygène avec l'azote. Les ERN incluent des espèces non-radicalaires (acide nitreux, le peroxyxynitrite et alkylperoxyxynitrite) et des espèces radicalaires (l'oxyde nitrique et le dioxyde d'azote) (**Penna et al., 2009**).

Tab. II. 01 : les espèces réactives d'oxygène et de nitrogène (**Devasagayam et al., 2004**)

L'espèce réactive	Symbole	Demi-vie biologique (seconde)
Les espèces réactives de l'oxygène		
anion superoxyde	$O_2^{\bullet -}$	10^{-6} s
radical hydroxyle	$OH \bullet$	10^{-9} s
peroxyde d'hydrogène	H_2O_2	Stable
radical peroxyde	$ROO^{\bullet}$	Seconde
Hydroperoxyde	$ROOH$	Stable
oxygène singulet	$1O_2$	10^{-6} s
Ozone	O_3	Seconde
Les espèces réactives d'azote		
oxyde nitrique	$NO^{\bullet}$	Seconde
Peroxyxynitrite	$ONOO^-$	10^{-3} s
acide peroxyxynitrique	$ONOOH$	Stable
dioxyde de nitrogène	NO_2	Seconde

2. Les antioxydants

2.1. Généralité

Les antioxydants sont définis comme toute substance qui, en faible concentration par rapport au substrat susceptible d'être oxydé, prévient ou ralentit l'oxydation de ce substrat (**Krishnaiah et al., 2011**), ils sont des substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et donc permettent de maintenir des concentrations non cytotoxiques d'espèces réactives de l'oxygène au niveau cellulaire. (**Weber, 2009**)

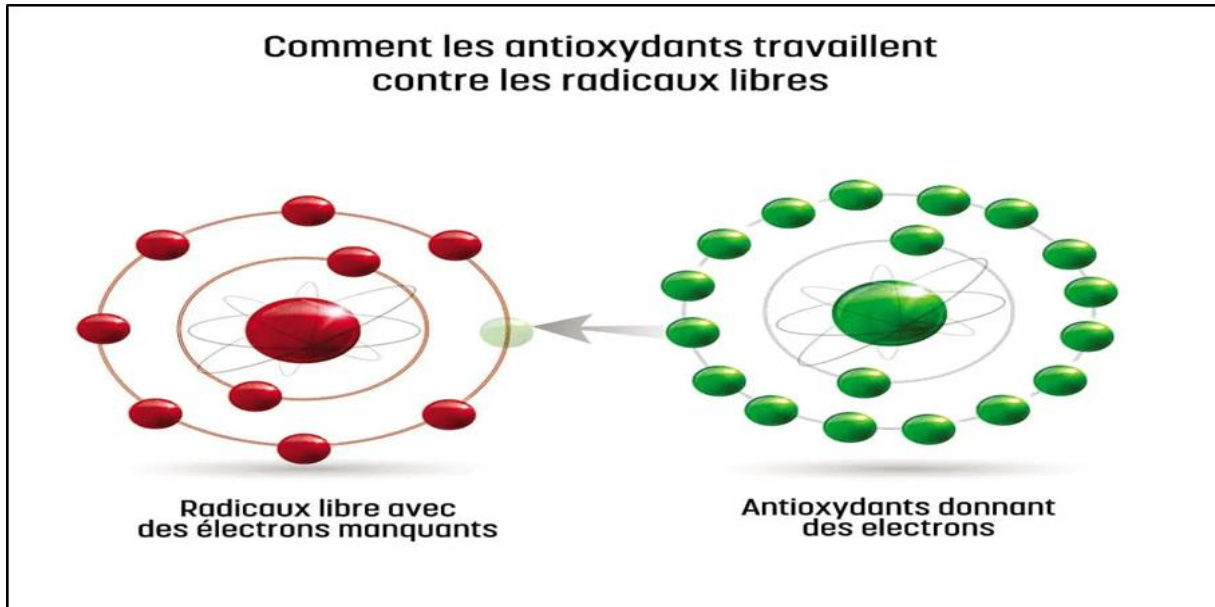


Fig. II. 01: La neutralisation des radicaux libres par un antioxydant

Les antioxydants sont présents dans tous les compartiments de l'organisme, que ce soient intracellulaires, membranaires ou extracellulaires. L'image II. 02, résume les différentes voies de formation et de neutralisation des radicaux libres par les antioxydants.

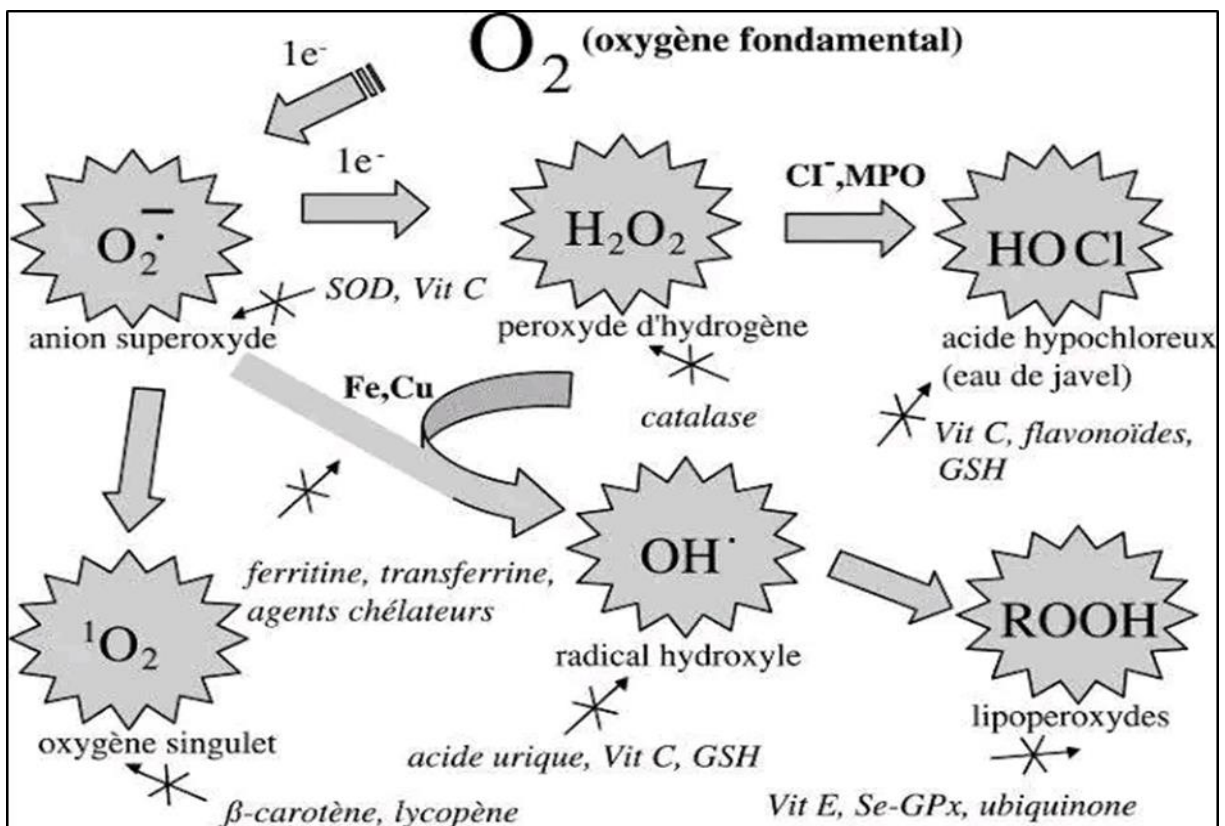


Fig. II. 02: Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par les systèmes de défenses antioxydants (Krishnaiah *et al.*, 2011),

2.2. Sources des antioxydants

2.2.1. Antioxydants endogènes

Les défenses antioxydants endogènes sont composées principalement par des enzymes particulières telles que, le superoxydedismutase (SOD), la catalase(CAT) et le glutathion peroxydase (GPx). Le rôle majeur de superoxydedismutase ou SOD est de catalyser la dismutation des ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire. la catalase ou CAT est capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. Tandis que, l'activité du glutathion peroxydase ou GPx est de détoxifier le peroxyde d'hydrogène et d'autres hydroperoxydes d'origine lipidique en couplant la réduction de l'hydroperoxyde avec l'oxydation d'un substrat réducteur. Autres antioxydants endogènes non enzymatiques peuvent également intervenir dans l'équilibre du balance radicaux libres – antioxydants. (Mishra, 2007)

2.2.2. Antioxydants exogènes

Ces antioxydants sont importants dans la prévention du stress oxydatif et les dommages cellulaires. La plupart de ces composés ne sont pas produits par l'organisme, mais ils sont obtenus à partir de l'alimentation. Ils peuvent être classés en différentes classes dont les polyphénols (acides phénoliques, flavonoïdes...) qui représentent la classe la plus importante, les vitamines (E, C...) les caroténoïdes, et les minéraux (zinc, sélénium...) (Moharram *et al.*, 2014)

Tab. II. 02: principaux antioxydants exogènes leurs sources (koechlin, 2006)

Principaux nutriments antioxydants	Sources alimentaires
Vitamine C	Agrume, melon, brocoli, fraise, kiwi, chou, poivron
Vitamine E	Huile de tournesol, de soja, de maïs, beurre, œufs
B-carotène	Légumes et fruits orangés, et vert foncés
Sélénium	Poisson, œufs viandes, céréales, volaille
Zinc	Viande, pain complet, légumes verts, huîtres, lait
Flavonoïdes	Fruits, légumes, thé vert
Acides phénoliques	Céréales complètes, baies, cerises
Tanins	Lentilles, thé, raisins, vin
Métabolisme de cystéine, glutathion	Caséine, lactalbumine (petit-lait) produits laitiers

2.3. Classification des antioxydants

2.3.1. Antioxydants d'origine naturelle

Ce sont des substances d'origine naturelle, notamment végétales, les plantes médicinales nous fournissent des antioxydants naturels majeurs tels que l'acide ascorbique, Caroténoïdes, Glutathion et Tocophérols, mais les polyphénols restent des molécules antioxydants de choix, ils comprennent les acides phénoliques (gallique et caféique), flavonoïdes (Quercétine et Catéchines) et huile volatiles tels qu'Eugénol, Carvacol, Thymol et Menthol **(Thomas, 2016)**. En plus, Les apports alimentaires journalières nous fournissent des antioxydants puissants dont les plus importants sont vitamine E, vitamine C, vitamine A et les oligoéléments tels que le fer, le sélénium, le zinc, magnésium et cuivre **(Brewer, 2016)**.

2.3.2. Antioxydants d'origine synthétique :

La synthèse d'antioxydants par des moyens industriels fournit une variété d'antioxydants synthétiques tels que BHT (hydroxyanisolebutylé), BHT (hydroxytoluènebutylé), le PG (gallate propylé), le TBHQ (tertiobutylhydroquinones) et les agents chélateurs de métaux comme l'EDTA. Ces éléments synthétiques agissent individuellement ou en combinaison pour assurer une bonne conservation des aliments **(MOUSSOUS, 2012)**. Récemment, les effets toxiques de ces composés apparaissent plus en plus, ce qui limite leurs utilisations par dès les règles législatives et oriente la recherche vers les antioxydants alternatifs naturels **(Gülçin, 2012)**.

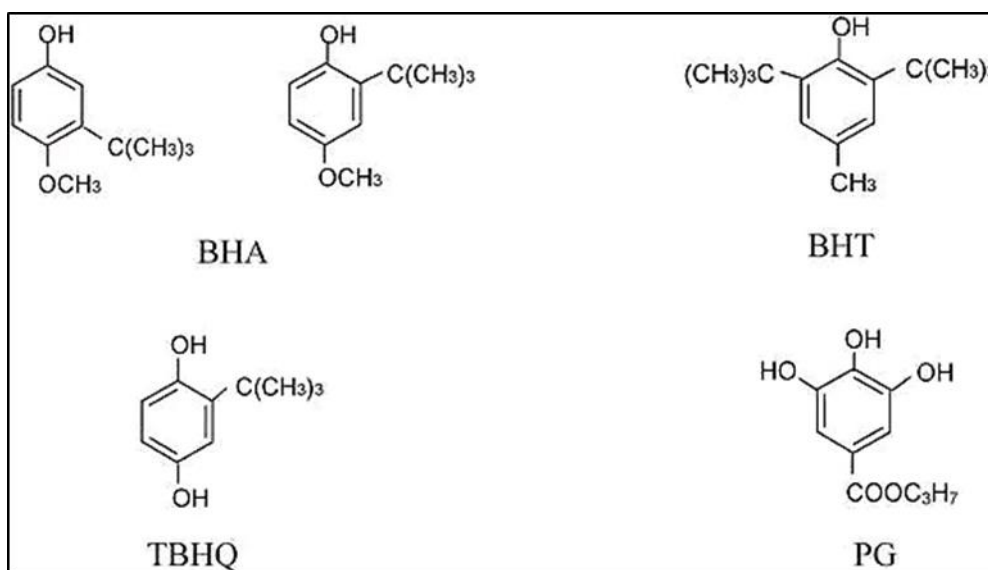


Fig. II. 03: la structure chimique des principaux antioxydants d'origine synthétique.

3. Stress oxydatif

3.1. Généralité

Le stress oxydatif, se définit comme étant un déséquilibre de la balance pro-oxydant-antioxydants en faveur des Oxydants (Atamer *et al.*, 2003). Il définit également comme l'incapacité de l'organisme à se défendre contre les espèces réactives de l'oxygène (ERO) en raison de la perturbation d'équilibre endogène entre ces derniers et les agents oxydants (AO) (Sies, 2017).

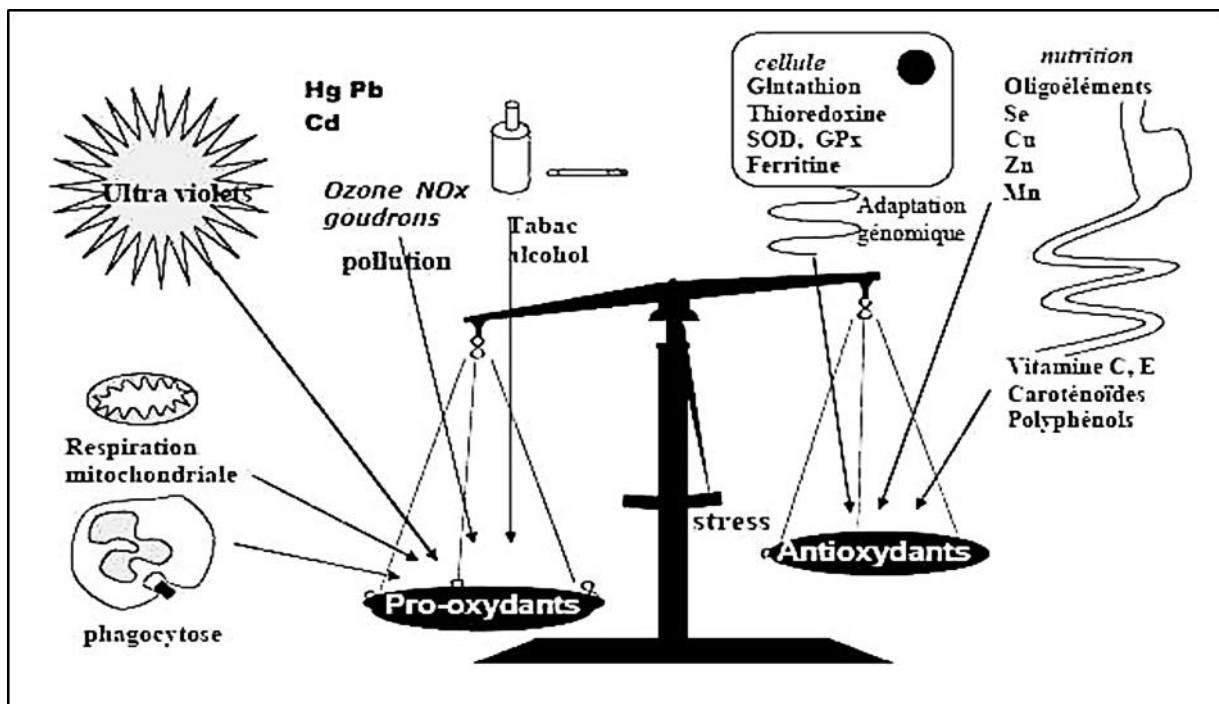


Fig. II. 04 : la balance entre les systèmes pro-oxydants et les antioxydants (Favier, 2006)

Lors d'un stress oxydatif, les radicaux libres réagissent avec les principales macromolécules de la cellule telles que les protéines, les acides gras, les glucides et, les acides nucléiques plus précisément l'acide désoxyribonucléique (ADN) et l'acide ribonucléique (ARN), en générant des dommages de type structurales, fonctionnelles et métaboliques. De cette manière, le stress oxydatif endommage significativement la cellule en altérant ses divers processus biochimiques, ce qui conduit dans la plupart des cas à l'activation du mécanisme de mort cellulaire programmée, appelée apoptose. Le stress oxydatif est aussi l'un des facteurs potentialisant l'apparition de maladies multifactorielles telles que le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires. (Maritim, 2003)

3.2. Effets néfastes sur la santé humaine

La production excessive des radicaux libres provoque des lésions directes sur les molécules biologiques. Il peut participer à l'oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides et des glucides, mais aussi provoquant des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés, notamment lors de l'oxydation des lipides (**Haleng et al., 2007**). Plusieurs recherches ont confirmé l'implication du stress oxydant dans une multitude de maladies, comme le cancer, le cataracte, le sclérose, le syndrome de détresse pulmonaire aigu, l'œdème pulmonaire, le vieillissement accéléré, le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires. (**Haliwell, 2006 ; Valko et al, 2007**).

4. Stress oxydatif et maladies chroniques:

Le stress oxydant est impliqué dans de très nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications de l'évolution, la plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge, car le vieillissement diminue les défenses antioxydants et augmente la production mitochondriale de radicaux (**Sohal et al., 2002**)

4.1. Le Diabète:

4.1.1. Généralités

Le diabète est une maladie chronique caractérisée par une concentration anormalement élevée de sucre dans le sang. L'OMS le définit par une glycémie supérieure à 1,26 g/l (7 mmol/l) à jeun et confirmée par deux prises de sang consécutives. Le diabète est la conséquence de deux mécanismes pathogénique différents, soit un déficit de sécrétion d'insuline par le pancréas, ou bien l'incapacité de l'organisme à utiliser efficacement l'insuline sécrétée. (**Asmat, 2016**)

Le stress oxydatif est superposable à l'hyperglycémie. Plus la glycémie est élevée et prolongée, plus le stress oxydatif est intense et donc plus l'effet sera néfaste sur l'organisme. Ce mécanisme provoque une augmentation de la dégradation du glucose et par conséquent un accroissement du potentiel de membrane mitochondriale accompagné avec une augmentation de la synthèse des radicaux libres. (**Bonnefont, 2004**)

4.1.2. Types de diabète

Les deux mécanismes pathogéniques précédents correspondent à deux types de diabète.

a. Diabète de type 1

Le diabète de type 1 se caractérise par la destruction auto-immune des cellules bêta de pancréas productrices d'insuline via différents processus pathologiques (**Achenbach et al., 2005 ; Reimann et al., 2009**). Plusieurs facteurs génétiques et environnementaux, agissent séparément ou en ensemble pour déclencher la maladie auto-immune (**Asmat, 2016**). Les variations humaines de l'antigène leucocytaire (HLA) situé sur le chromosome 6 peut représenter plus de 50% de l'agrégation familiale dans ce type de diabète (**Riemann et al., 2009**). L'apparition de ce type de diabète est le plus souvent rapide, il se révèle par des symptômes clairs, une polyurie et une polydipsie.

b. Diabète de type 2

Le diabète de type 2 est une maladie d'origine métabolique, elle apparaît grâce à des modifications progressives du métabolisme glucidique. Il se caractérise par une malabsorption du glucose au niveau cellulaire, ce qui provoque une augmentation du glucose sanguin. Ses effets augmentent significativement avec l'âge, les symptômes apparaissent généralement après 40 ans et la maladie est diagnostiquée à l'âge moyen de 65 ans. Il est important de noter que ce diabète doit être différencié de celui de type 1 qui résulte d'une absence d'insuline active. Plusieurs paramètres favorisent l'apparition de ce type, il est corrélé à l'âge et à l'interaction entre le génome et les conditions de vie. De plus, le style de vie, l'hypercholestérolémie et le surpoids sont des facteurs de risque de premier ordre. (**Bonnefont-Rousselot, 2002**)

4.1.3. Modalité de traitement

Le traitement du diabète (type 1 et 2) repose sur l'assimilation de sucre aux cellules et de prolonger la quantité d'insuline nécessaire. Il est géré par différents moyens :

- L'insulinothérapie qui consiste en l'injection d'insuline.
- L'application des règles hygiéno-diétiques classiques (alimentation équilibrée, activités physiques régulière)
- La maîtrise de la glycémie post-prandiale
- Réaliser une surveillance des glycémies capillaires. (**Scheen, 2018**)

4.2. L'Alzheimer

4.2.1. Généralités

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative complexe, c'est une atteinte cérébrale progressive conduisant à la mort neuronale. La meilleure compréhension de la maladie se fait par l'étude de son évolution et l'identification de ses causes et facteurs de risque. Ces éléments sont indispensables au développement de traitements efficaces. Les symptômes cliniques sont considérés comme étant liés à la perte neuronale qui touche principalement l'hippocampe, siège de la mémoire, et les aires néocorticales donnant à la maladie d'Alzheimer son surnom de « maladie de la mémoire ». La cause de la maladie d'Alzheimer est encore inconnue, mais il existe plusieurs facteurs de risque qui contribuent à l'apparition de la maladie comme: l'âge et sexe, le facteur génétique/les antécédents familiaux, la santé mentale et les traumatismes crâniens. **(Christen, 2000)**

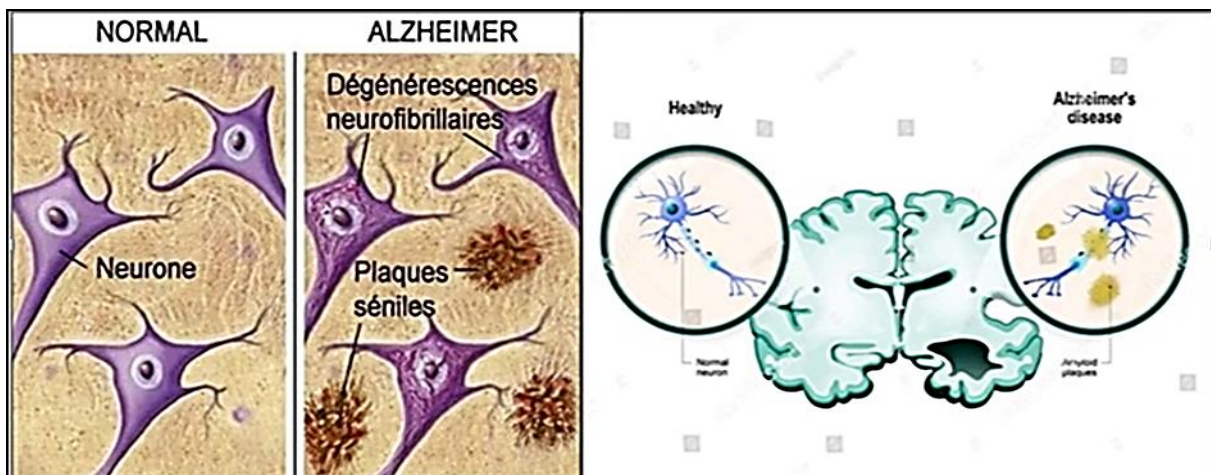


Fig. II. 05 : Présentation schématique de la maladie d'Alzheimer

4.2.2. Modalités de traitement

Il n'existe pas, à l'heure actuelle, des traitements curatifs contre la maladie d'Alzheimer, il est toutefois possible de stabiliser ou d'atténuer temporairement la manifestation des symptômes. Il existe deux classes de médicaments pour une thérapie spécifique, les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (IAChE) et l'antagoniste des récepteurs glutaminergiques NMDA. Quatre médicaments sont prouvés par FDA pour un traitement symptomatique, La Donépézil (Aricept®), la Rivastigmine (Exelon®), la Galantamine (reminyl®), la Mémantine (ebixa®). **(Samanta et al., 2006)**

5. L'évaluation de l'activité antioxydante

5.1. L'étude *in vivo*

L'étude *in vivo* est réalisée au sein d'un organisme vivant, un modèle de l'expérimentation animal. L'évaluation de l'activité antioxydante peut être pratiqué sur des animaux comme les lapins et les souris, en réalisant des études organiques, tissulaires, cellulaires et moléculaire. Ces essais précliniques permettent d'étudier la physiologie liée au stress oxydatif en évaluant les activités des enzymes redox et les marqueurs de dégradation des lipides et protéines. (Alam *et al.*, 2013)

5.2. L'étude *in silico*

L'étude *in silico* désigne une recherche ou un essai effectué au moyen de modèles informatiques, Cette étude est surtout utilisée dans les domaines de la génomique et la bio-informatique pour développer des nouvelles molécules qui possèdent des propriétés thérapeutique ou commerciales et aussi dans la recherche de changement de l'expression des gènes qui peuvent être liés au stress oxydatif.

5.3. L'étude *in vitro*

L'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante est la plus pratiquée dans nos laboratoires. Plusieurs méthodes, basant sur des réactions colorimétriques, sont utilisées selon les différents mécanismes, le transfert des protons (DPPH et ABTS, ...etc.), le transfert des électrons (FRAP, CUPRAC, Phénanthroline, SNP, ... etc.) et la chélation des éléments métalliques comme le fer et autres. Cette évaluation peut être également réalisée sur les enzymes du système redox comme GPx, CAT et Px.

Chapitre 03

Matériels et méthodes

1. Récolte de la matière végétale

La plante médicinale sélectionnée a été collectée en printemps 2021 d'une région particulière du Sahara d'Algérie. Identification botanique a été réalisée par Dr. Kadi Imed Eddine, le directeur de ce travail, avec un botaniste de l'université des frères Mentouri, Constantine.

2. Préparation de la matière première.

La partie aérienne, de plante collectée, a été mis en séchage à température ambiante et à l'abri de la lumière et de toute source d'énergie durant deux semaines. Ensuite, un broyage fin a été effectué en utilisant un broyeur ordinaire. Un spécimen d'herbier a été archivé à l'Herbarium du centre de recherche en biotechnologie.

3. Extraction des principes actifs

Nous avons procédé à l'extraction solide-liquide pour extraire principalement les métabolites secondaires de nos échantillons. Pour se faire, une masse de 100 g de la matière première fine étudiée a été mis en macération à froid dans une solution hydro-alcoolique méthanol-eau (70/30) pendant 48 heures. Ce processus a été répété trois fois avec un renouvellement du solvant. Ensuite, nous avons utilisé un papier filtre de type Whatman n°4 pour filtrer le produit d'extraction. Cette opération a été finalisée par un séchage à l'aide d'un Rotavapor (35°C / 130 mbar) et (35°C / 0 mbar) pour éliminer la totalité du solvant et d'eau dans l'échantillon. L'extrait hydroalcoolique obtenu a été conservé dans un réfrigérateur de 4°C pour une utilisation ultérieure.

Pour le fractionnement, nous avons solubilisé l'extrait brut préparé dans l'eau distillée (100ml/10g) à l'aide d'un agitateur magnétique pendant une nuit. L'extrait solubilisé a été entré dans une série d'extraction liquide-liquide en utilisant trois solvants de polarité croissante, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le n-butanol. **(Schéma III. 01)**

4. Dosage des phénols totaux

La méthode classique du Folin-Ciocalteu (FCR), adaptée au lecteur des microplaques de 96 puits, a été sélectionnée pour estimer le teneur en phénols totaux de nos extraits **(Singleton et al., 1965)**. Dans le mélange réactionnel, 20 µL d'extrait (1 mg / 1 ml de méthanol) a été mélangé à 100 µL de FCR dilué (1/10) et 75 µL de carbonate de sodium (7,5%). L'ensemble a été maintenu à l'obscurité pendant 2 heures à 25°C. L'absorbance a été réalisée à 765 nm contre un blanc préparé de la même manière. L'acide gallique a été utilisé pour tracer la courbe

d'étalonnage. Les résultats sont exprimés en μg équivalent de l'acide gallique par mg d'échantillon (μg EAG/mg).

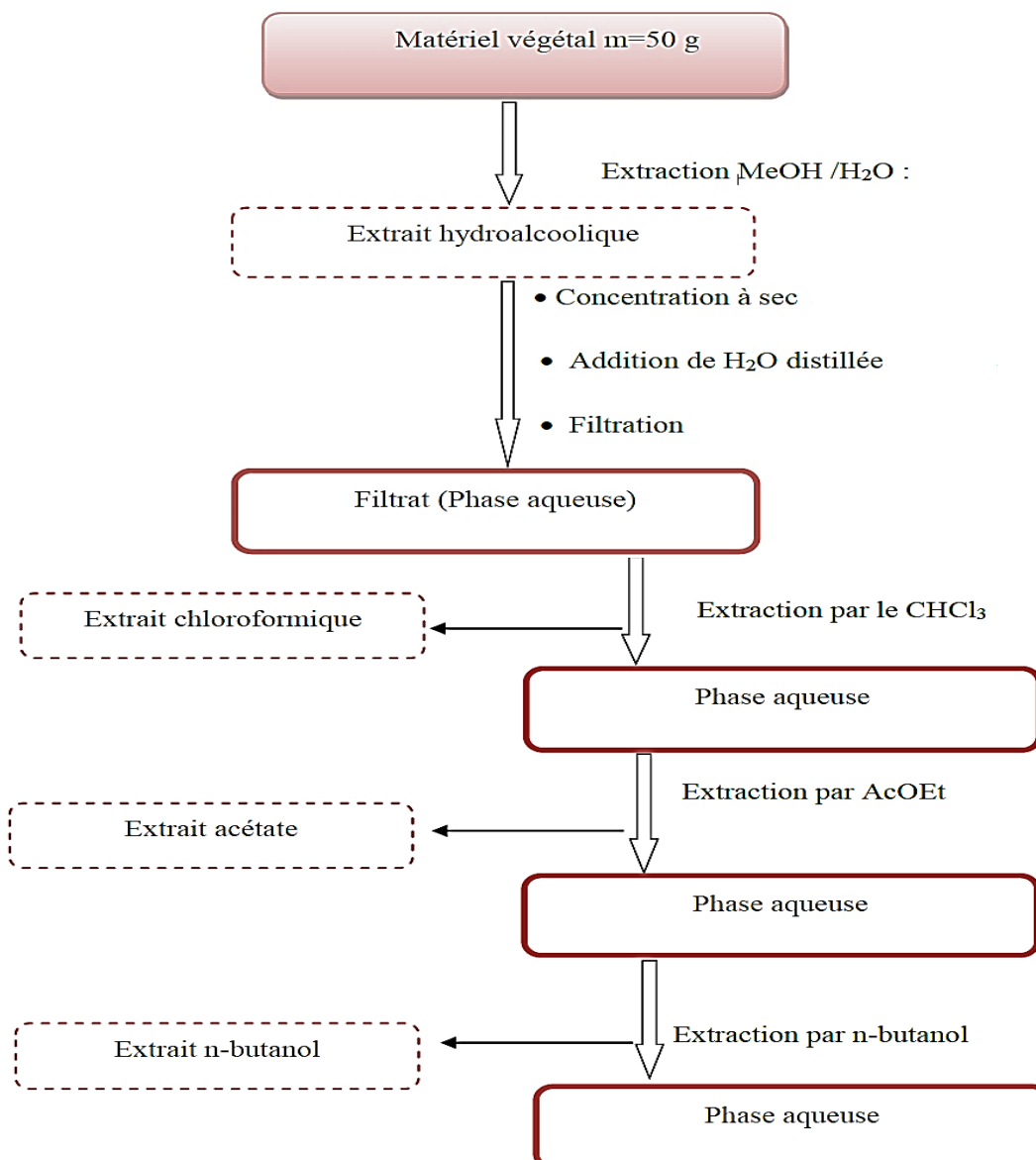


Fig. III. 01 : schéma général de l'extraction et le fractionnement des extraits étudié

5. Dosage des flavonoïdes

La méthode décrite par **Topçu et al., 2007**, adopté au micro-volumes, a été utilisé dosage des flavonoïdes. Dans chaque puits, nous avons mélangé 50 μl de l'échantillon avec 130 μl de méthanol, 10 μl d'acétate de potassium et 10 μl de nitrate d'aluminium. L'ensemble a été mis à température ambiante pendant 40 min. La lecture d'absorbance a été réalisée à 415 nm. La Quercétine, le standard de choix, a été utilisé pour tracer la courbe d'étalonnage, il a été préparé de la même manière que l'échantillon. Les résultats sont exprimés en μg équivalent de Quercétine par mg d'extrait

6. Activité antioxydante

Cinq méthodes ont été pour évaluer l'activité antioxydante, DPPH et ABTS (Mécanisme de transfert des protons) et FRAP, Phénanthroline et SNP (Mécanisme de transfert des électrons).

6.1. Piégeage du radical stable, le DPPH

Le piégeage du radical DPPH est déterminé selon la méthode du **Blois et al 1958**. Dans une microplaque à 96 puits, un volume de 160 µl du DPPH• (A=0.7) a été mélangé, à l'abri de la lumière, avec 40 µl de l'extrait. L'ensemble a été maintenu à une température de 25°C pendant 30 min et l'absorbance a été mesurée à 517 nm. Le BHA, le BHT et la vitamine E ont été utilisés comme standards. La formule, en dessous, permet de déterminer le pourcentage d'inhibition.

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

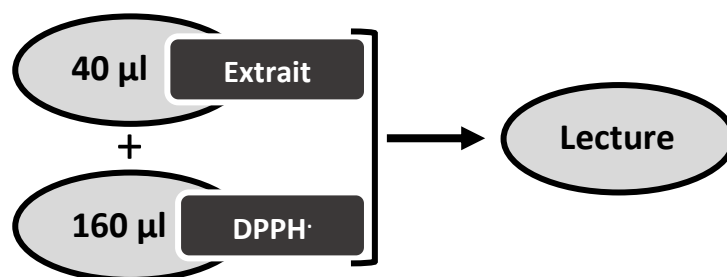


Fig. III. 02 : mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon

6.2. Piégeage du radical ABTS

Selon la méthode de **Re et al., 1999**, nous avons évalué le pouvoir de piégeage du radical ABTS. Dans chaque puit, 160 µl d'ABTS •+ (A=0.7) a été ajouté à 40 µl de l'échantillon. L'ensemble a été maintenu à 25°C pendant 10 min. nous avons mesurée l'absorbance à 734 nm en utilisant le BHA et le BHT comme standards. Le pourcentage d'inhibition a été calculé selon la même formule précédente.

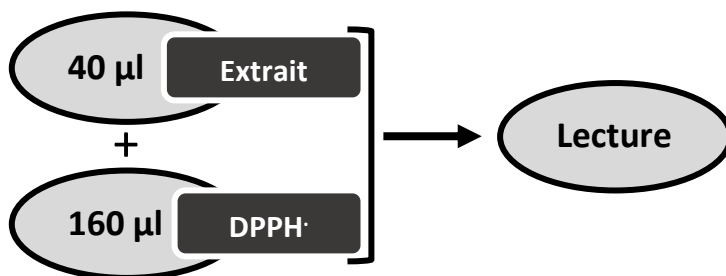


Fig. III. 03 : mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon

6.3. Activité du pouvoir réducteur (FRAP)

La méthode d'Oyaizu détaillée en 1986 a été utilisée. Brièvement, un mélange de 10 μ l de l'extrait, 40 μ l d'une solution tampon phosphate (pH 6,6) et à 50 μ l d'une solution de ferricyanide de potassium (1%) a été incubé dans l'étuve à 50°C pendant 20 min. Après incubation, nous avons ajouté 50 μ l d'acide tri-chloroacétique (10%), 40 μ l d'eau distillée et 10 μ l de chlorure de fer anhydre (0,1%). L'absorbance a été mesurée à 700 nm contre un blanc préparé de la même manière et les résultats ont été calculés à titre de $A_{0,50}$ (μ g/ml). Les vitamines C et E ont été utilisés comme standards.

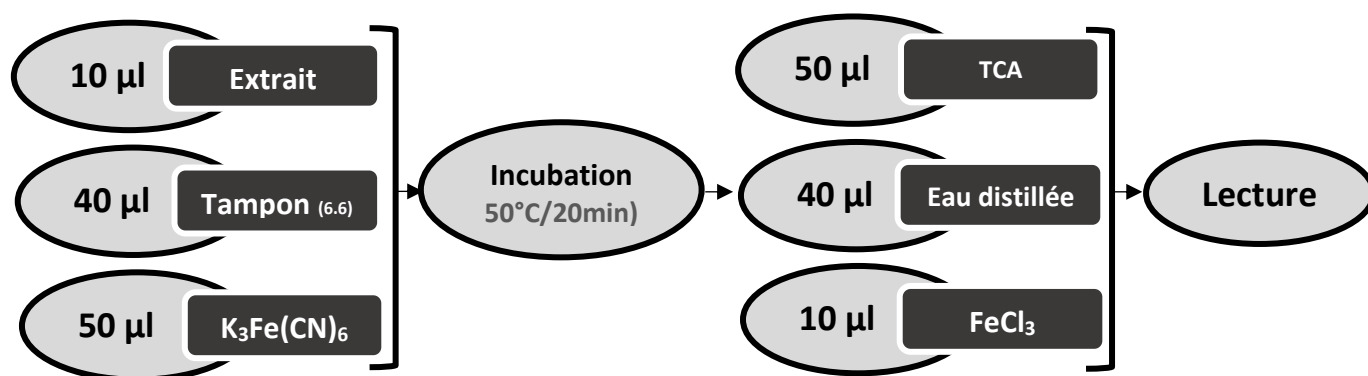


Fig. III. 04 : mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon

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

Sémalrement a celle du FRAP, la méthode de phénanthroline a été utilisée selon par la Szydłowska-Czerniak *et al.*, (2008). Un mélange de 10 μ l de l'échantillon, 50 μ l de chlorure de fer anhydre (0,2%), 30 μ l de phénanthroline (0,5%) et 110 μ l de méthanol a été incubé à 30°C pendant 20 min. L'absorbance a été mesurée à 510 nm. Le BHA et le BHT ont été utilisés comme standards. Les résultats ont été exprimé à titre de $A_{0,50}$

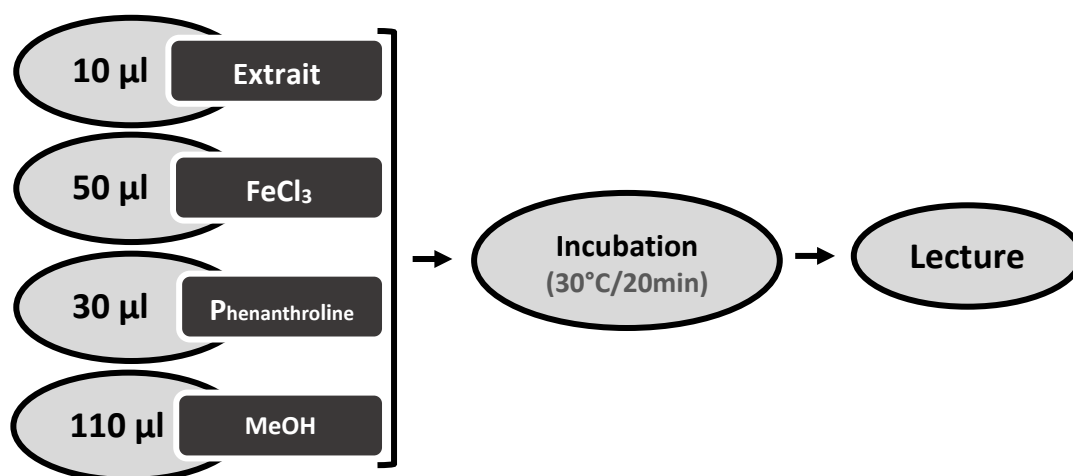


Fig. III. 05 : mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon

6.5. Activité de réduction de l'Ag⁺ en nanoparticule d'Argent sphérique

Selon la méthode décrite par **Mustafa Özyürek *et al.*, 2012**, la réduction de l'Ag⁺ en nanoparticules d'argent sphériques par nos extraits a été évaluée. Une solution contenant 50 mL de (AgNO₃ (1.0 mM)) a été chauffée sur plaque chauffante pendant 10 min. Ensuite, 5 ml de Trisodium citrate (1%) a été ajouté goutte à goutte jusqu'à le virage de la couleur vers le jaune pâle (solution SNP). Après refroidissement, 20µl d'extrait 130µl de la solution SNP et 50µl d'eau distillée ont été mélangés. L'ensemble a été incubé à 25°C pendant 30 min. le Trolox est utilisé comme standard.

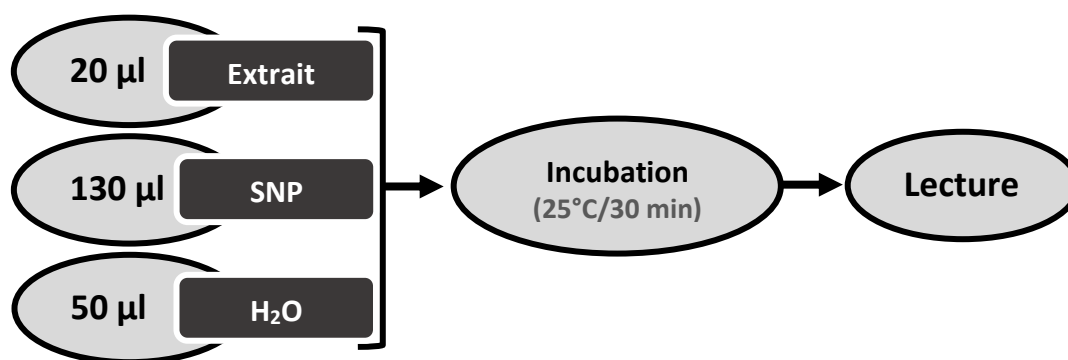


Fig. III. 06 : mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon

7. Activité inhibitrice des enzymes

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

L'inhibition de l' α -amylase a été estimée par la méthode détaillée par **Zengin *et al.*, (2014)** [08]. Nous avons mélangé 25 μ l d'extrait avec 50 μ l d'une solution d' α -amylase (1U), puis incubé pendant 10 min à 37°C. Ensuite, nous avons ajouté 50 μ l d'amidon (0,1%). Une deuxième incubation, pendant 10 minutes à 37°C, a été maintenue. Ensuite, nous avons ajouté 25 μ l d'acide hypochlorique (1M) et 100 μ l d'iodure de potassium iodé. La lecture de l'absorbance a été faite à 630 nm. Le pourcentage d'inhibition de l' α -amylase a été calculé selon la formule suivante :

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

- 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]

Tab. III. 01 : l'organisation de microplaque dans le test 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					

Tab. III. 02 : mode de remplissage de microplaque dans le test de α -amylase

Extraits	Blanc d'extrait	Ae	Ac
25 μ l extrait	25 μ l extrait	25 μ l MeOH	25 μ l MeOH
50 μ l Enzyme	50 μ l tampon	50 μ l Enzyme	50 μ l Tampon

Incubation à 37°C – 10 min

50 μ l Amidon	50 μ l tampon	50 μ l amidon	50 μ l amidon
-------------------	-------------------	-------------------	-------------------

Incubation à 37°C – 10 min

25 μ l HCL	25 μ l tampon	25 μ l HCL	25 μ l HCL
100 IKI	100 IKI	100 IKI	100I

7.2. Activité anti-Alzheimer via l'inhibition de Butyrylcholinestérase

La méthode détaillée par **Ellman *et al.*, (1961)** a été sélectionnée pour évaluer l'inhibition de la butyrylcholinestérase (BuChE). Un mélange de 150 µl de tampon phosphate de sodium à (pH 8) (100 mM), 10 µl d'extrait et à 20 µl d'enzyme buChE ($6,85 \times 10^{-3}$ U) a été incubé pendant 15 minutes à 25°C. 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 utilisé comme standard.

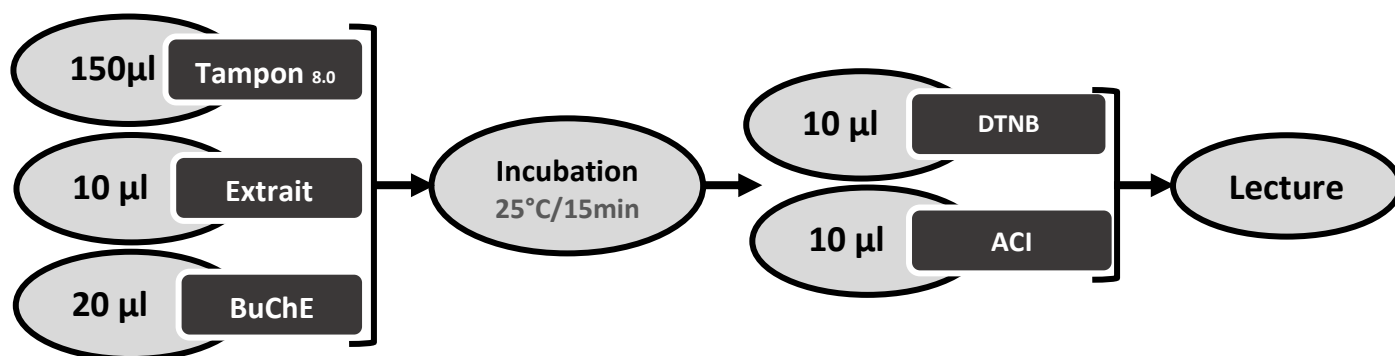


Fig. III. 07 : mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon

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

La méthode de **Mansur *et al.* (1986)** [10 a été utilisé pour estimer l'activité protectrice vis-à-vis la lumière solaire. L'absorbance, dans l'intervalle de 290 à 320 nm, de 200 µl de chaque échantillon (2 mg/ml) a été mesurée et la valeur du SPF est calculée selon l'équation 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)

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

Longueur d'onde λ (nm)	EE (λ)x I(λ) (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 sont exprimés en terme de **IC₅₀** et de **A_{0,5}** ($\mu\text{g/ml}$) par une régression linéaire. Trois répétitions ont été effectuée pour chaque essai et le résultat a été exprimé en moyenne $\pm$ SD. Les comparaisons des moyennes et la détermination des taux de signification statistique ont été fait par l'analyse de variance, ANOVA a un seul facteur contrôlé, suivi par un test post-hoc de tuckey. Les logiciels Graphpad Prism 7.0 et XLSTAT ont été utilisé pour les différents calculs et présentations graphiques. Les différences sont considérées statistiquement significatives a $\alpha=5\%$.

Chapitre 04

Résultats et discussion

1. Rendements d'extraction

Les quatre extraits étudiés ont donné des rendements d'extraction, intéressants en terme de quantité, et résumé dans le **tableau IV. 01** en dessous :

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

Extrait	Rendement
Extrait hydroalcoolique	27.11 %
Extrait Acétate d'éthyle	13.02 %
Extrait chloroformique	08.37 %
Extrait n-butanolique	06.81%

2. Dosage des phénols et flavonoïdes totaux

Le dosage des composés phénoliques et des flavonoïdes à l'aide des courbes d'étalonnage, en se basant sur des réactions colorimétriques, a donné les résultats en dessous. La courbe d'étalonnage de l'acide gallique, montré dans **la figure IV. 01** et celle de la Quercétine, montré dans **la figure IV. 02**, sont utilisées pour déterminer les teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes respectivement. Les résultats obtenus ont été organisés dans **le tableau IV. 02** et **les figures IV. 03** et **IV. 04**.

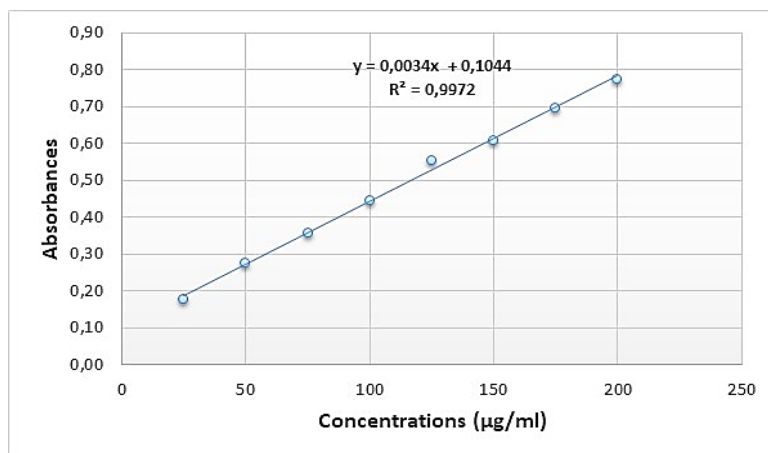


Fig. IV. 01: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

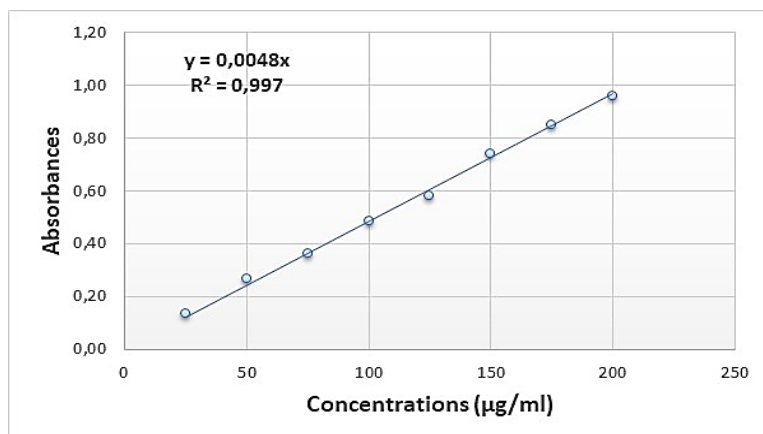


Fig. IV. 02: Courbe d'étalonnage de la Quercétine

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

Extraits	$\mu\text{g EAG/ml/mg d'extract}$	$\mu\text{g EQ/ml/mg d'extract}$
Extrait hydroalccolique	317.52 $\pm$ 6.28	150.62 $\pm$ 4.81
Extrait Acétate d'éthyle	294.03 $\pm$ 5.11	114.84 $\pm$ 3.94
Extrait chloroformique	129.67 $\pm$ 4.08	089.07 $\pm$ 1.66
Extrait n-butanolique	163.08 $\pm$ 4.69	104.32 $\pm$ 2.90

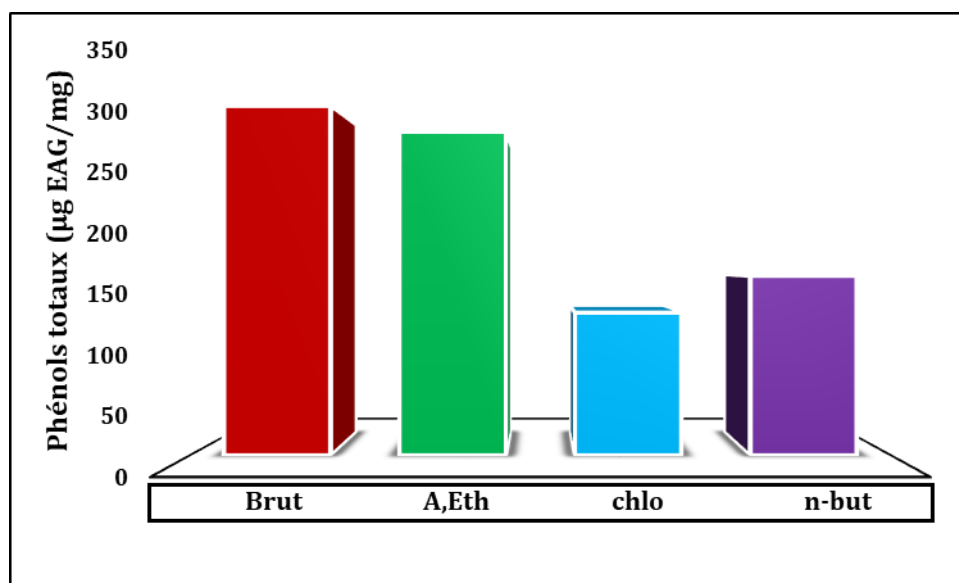


Fig. IV. 03: Teneurs en Phénols totaux des extraits étudiés

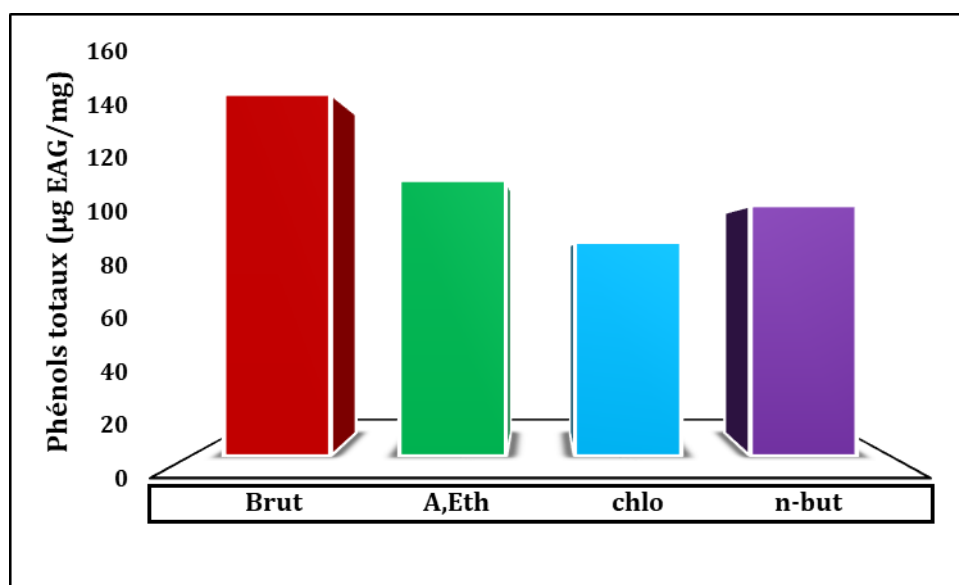


Fig. IV. 04: Teneur en Flavonoïdes totaux des extraits étudiés

L'évaluation des rendement d'extraction, avec les dosages des composés, nous permettra de de déterminer le contenu moléculaire sur les deux plans quantitatif et qualitatif. Les résultats obtenus ont montré des rendements d'extraction intéressants, plus particulièrement pour l'extrait hydroalccolique (27.11 %), ce qui traduise la richesse de cette plante médicinale en produits naturels actifs. **(Tab. IV. 01).**

En utilisant la courbe d'étalonnage de l'acide gallique ($y=0.0034x+0.1044$, $R^2=0.9972$), les quatre extraits étudiés ont donné des contenus intéressants en composés phénoliques, exprimés en microgrammes équivalent de l'acide gallique par milligramme d'extrait et par millilitre de volume **(Tab. IV. 02)**. L'extrait brut a présenté la quantité la plus en composés phénoliques (317.52 ± 6.28), suivi par les extraits d'acétate d'éthyle (294.03 ± 5.11), le n-butanolique (163.08 ± 4.69) et le chloroformique (129.67 ± 4.08) respectivement.

En plus, la courbe d'étalonnage de la Quercétine ($y= 0.0048x$, $R^2=0.997$) est utilisée pour estimer les teneurs en flavonoïdes, exprimés en microgrammes équivalent en Quercétine par milligramme d'extrait et par millilitre de volume. Comme ceux enregistrés pour les phénols totaux, les teneurs en flavonoïdes 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 (150.62 ± 4.81) et (114.84 ± 3.94) respectivement, néanmoins le chloroformique a donné une quantité modérée (089.07 ± 1.66) **(Tab. IV. 02)**.

L'activité biologique des extraits naturels est attribuée dans la plupart des cas aux métabolites secondaires, plus particulièrement aux composés phénoliques y compris les flavonoïdes. Dans la partie suivante de ce travail, nous allons évaluer l'activité biologique et pharmacologique de nos extraits, en commençant par l'activité antioxydante et on terminera par l'activité' inhibitrice des enzymes liées aux maladies lourdes comme le diabète et l'Alzheimer.

3. Activité antioxydante

3.1. Activité de piégeage du radical libre DPPH

Le tableau IV. 03, en dessous, résume les résultats d'inhibition du radical DPPH

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

Extraits	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg	IC ₅₀ (µg/ml)	Equivalent BHA
hydroalcoolique	41.77±1.04	49.06±0.31	62.88±0.09	74.16±3.67	88.23±0.00	91.67±3.58	91.52±2.14	23.19±1.46	26.47 %
Acetate d'éthyl	45.06±2.11	59.37±2.41	72.91±3.86	85.77±3.84	92.67±2.69	94.71±0.05	95.31±2.47	19.38±2.21	31.68 %
Chloroformique	22.08±1.41	34.18±2.16	46.27±1.08	52.43±3.85	63.12±1.79	71.57±3.78	80.22±1.64	86.12±3.07	07.12 %
n-butanolique	27.89±2.81	39.61±0.47	51.88±2.47	64.42±0.22	77.19±2.64	89.28±1.75	92.64±3.41	48.53±3.42	12.65 %
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	006.14±0.41	//
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	012.99±0.41	//
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	013.02±5,17	//

• 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

Le tableau IV. 04, en dessous, résume les résultats d'inhibition du radical ABTS

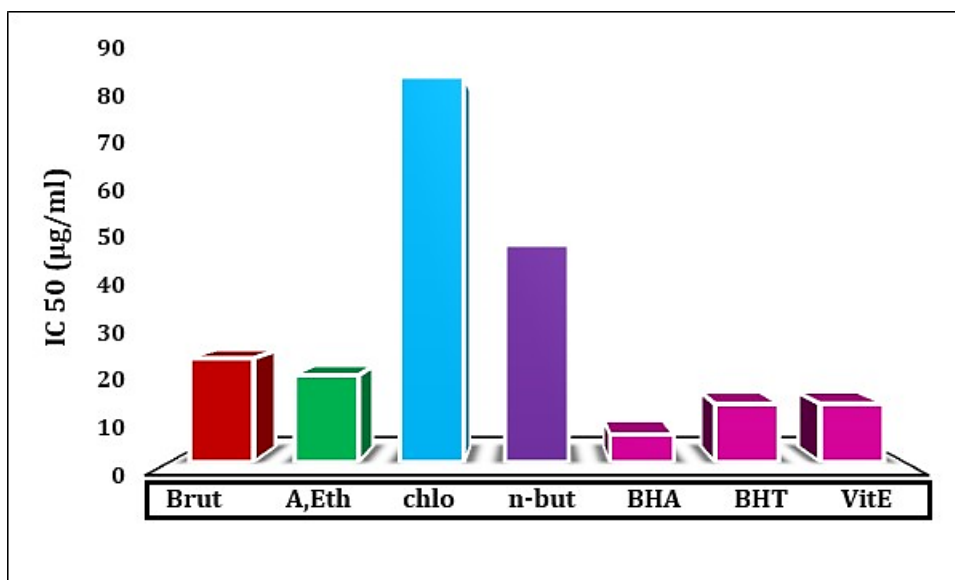
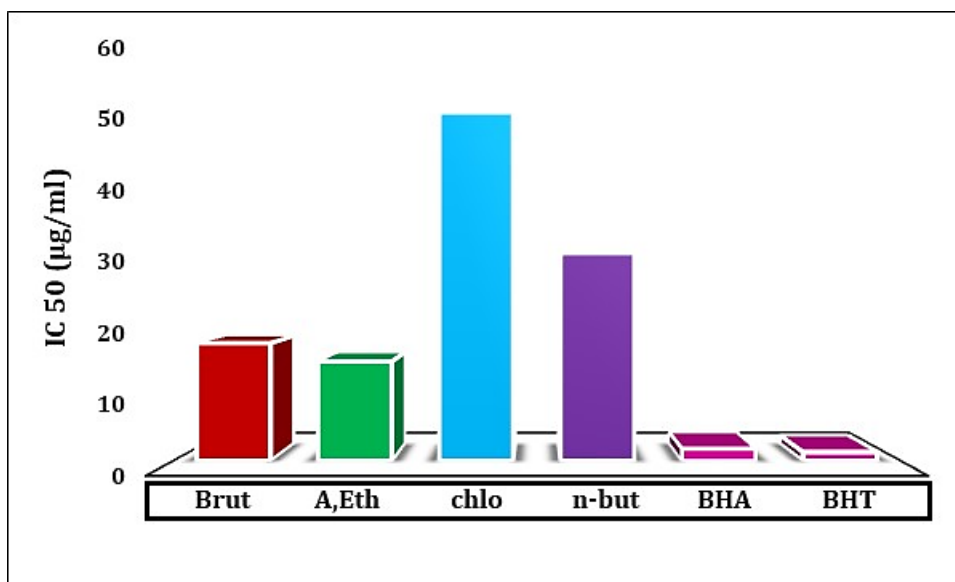
Tab. IV. 04: Pourcentages d'inhibition du radical ABTS

Extraits	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg	IC ₅₀ (µg/ml)	Equivalent BHA
hydroalcoolique	45.93±2.81	59.67±1.42	71.82±2.06	84.25±0.43	92.16±1.67	94.80±0.68	94.37±2.09	17.68±1.53	10.23 %
Acetate d'éthyle	48.66±3.52	67.14±1.03	79.54±0.38	86.95±3.47	93.57±2.49	95.68±1.40	96.74±0.13	14.91±0.38	12.13 %
Chloroformique	24.84±0.51	37.15±0.32	49.11±1.67	61.07±1.16	73.95±0.08	81.25±1.41	89.04±0.00	52.34±3.67	03.45 %
n-butanolique	32.52±2.64	46.28±1.35	60.38±1.05	73.91±1.28	79.22±3.17	88.62±2.07	92.44±0.15	31.19±1.45	05.80 %
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	001.81±0.10	//
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	001.29±0.30	//

- 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

Tableau IV. 05 : tableau récapitulatif des valeurs IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)

	DPPH	ABTS
Extrait hydroalcoolique	23.19±1.46	17.68±1.53
Extrait Acétate d'éthyle	19.38±2.21	14.91±0.38
Extrait Chloroformique	86.12±3.07	52.34±3.67
Extrait n-butanolique	48.53±3.42	31.19±1.45

**Fig. IV. 05 :** Valeurs IC_{50} des extraits étudiés dans le piégeage du radical DPPH**Fig. IV. 06 :** Valeurs IC_{50} des extraits étudiés dans le piégeage du radical ABTS

De nos jours, les maladies chroniques telles que le cancer, le diabète, les maladies cardiovasculaire et neurologiques ...etc. viennent à s'installer progressivement dans la communauté algérienne en engendrant des impacts lourds. Actuellement, plusieurs études récentes confirment l'intervention du stress oxydatif dans l'apparition et le développement de ce genre des maladies, ce qui rend l'utilisation des antioxydants, à titre préventif ou curatif, indispensable. En parallèle, Les antioxydants utilisés comme additifs alimentaires ou conservateurs pharmaceutiques participent largement aux plusieurs effets néfastes sur la santé humaine, ce qui nous stimule à chercher des produits antioxydants alternatifs, d'origine naturelle et plus particulièrement végétale. Ce travail permet l'évaluation du pouvoir antioxydant des extraits naturels, *in vitro* par des méthodes colorimétriques, de la plante Saharienne algérienne *Ajuga iva* L.

Dans ce contexte, le test classique de piégeage du radical stable DPPH est le plus utilisé pour évaluer l'activité antioxydante des extraits naturels. Ils suivi le mécanisme du transfert des protons d'hydrogènes aux radicaux libres. Dans ce test, le niveau d'activité est jugé par sa propre valeur d'IC₅₀, elle caractérise son pouvoir de neutralisation des radicaux dans le milieu réactionnel. Les résultats obtenus ont montré des activités intéressantes pour les extraits hydroalcoolique et acétate d'éthyle qui sont comparables aux références BHA et BHT. En parallèle, ces deux extraits ont présenté l'activité la plus élevée dans le piégeage du radical ABTS. L'extrait du chloroforme, qui a un contenu faible en phénols, a montré une activité modérée dans le piégeage des deux radicaux étudiés. Généralement, les propriétés anti radicalaires enregistrées sont étroitement liées aux teneurs élevés, de ces extraits, en composés phénoliques, et en flavonoïdes. L'effet de l'extrait n-butanolique est moyenne dans le piégeage de l'ABTS et le DPPH. La stéréochimie de la molécule ABTS, qui est plane et facile à être neutralisé en comparaison de celle de DPPH, peut expliquer l'apparition de l'effet antioxydant dans ce test. En plus, l'activité anti-radicalaire vis-à-vis du radical DPPH dépend au contenu total en composés phénoliques et plus précisément aux polyphénols qui ont des structures chimiques particulières (**Sánchez-Vioque et al., 2013**). Cette particularité structurale détermine la sélectivité vis-à-vis le radical, car le DPPH ne réagit qu'avec les flavonoïdes contenant des groupes hydroxyles dans le cycle B (**Yokozawa et al., 1998**), ainsi que les acides aromatiques contenant plus d'un groupe hydroxyle (**Von Gadown et al., 1997**). Plusieurs travaux antérieurs ont caractérisé l'activité anti radicalaire de cette plante, particulièrement ceux de **Senhaji et al., 2020**, et **Boumerfeg et al. (2018)**.

3.3.Activité de pouvoir réducteur (FRAP)

Le tableau IV. 06 résume les valeurs de l'absorbance des extraits dans la méthode FRAP.

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 _{0.5} (µg/ml)	Equivalent A. Ascorbique
hydroalcoolique	0,15±0.09	0,18±0.02	0,22±0.06	0,34±0.02	0,67±0.04	1,22±0.09	1,38±0.12	42.68±2.07	15.86 %
Acetate d'éthyle	0,18±0.02	0,19±0.07	0,26±0.08	0,30±0.00	0,72±0.02	1,61±0.07	1,94±0.10	31.28±1.55	21.64 %
Chloroformique	0,08±0.00	0,12±0.04	0,16±0.03	0,26±0.06	0,36±0.09	0,71±0.08	0,98±0.08	76.94±4.11	08.79 %
n-butanolique	0,10±0.01	0,14±0.02	0,18±0.06	0,28±0.09	0,53±0.10	0,89±0.00	1,21±0.05	48.27±0.97	14.02 %
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⁺²-Phenanthroline

Le tableau IV. 07 résume L'absorbance des extraits dans la méthode de Phenanthroline.

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 _{0.5} (µg/ml)	Equivalent BHA
hydroalcoolique	0,37±0.03	0,42±0.06	0,51±0.03	0,74±0.08	0,92±0.04	1.13±0.10	1,38±0.09	11.95±0.67	07.78 %
Acetate d'ethyle	0,38±0.01	0,45±0.08	0,56±0.01	0,79±0.00	1.08±0.05	1,27±0.09	1.56±0.10	09.21±0.84	16.06 %
Chloroformique	0,18±0.07	0,29±0.03	0,37±0.05	0,48±0.04	0,61±0.03	0,77±0.10	0,95±0.08	29.67±2.91	03.13 %
n-butanolique	0,26±0.02	0,35±0.09	0,43±0.09	0,52±0.05	0,87±0.10	1.03 ±0.12	1,29±0.07	23.44±1.08	03.96 %
BHA*	0,73±0,02	0,93±0,01	1,25±0,04	2,10±0,05	4,89±0,06	Nt	Nt	00,93±0,07	//
BHT*	0,53±0,03	1,23±0,02	1,84±0,01	3,48±0,03	4,84±0,01	Nt	Nt	02,24±0,17	//

- 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)

Le tableau IV. 08 résume l'absorbance des extraits dans la méthode SNP.

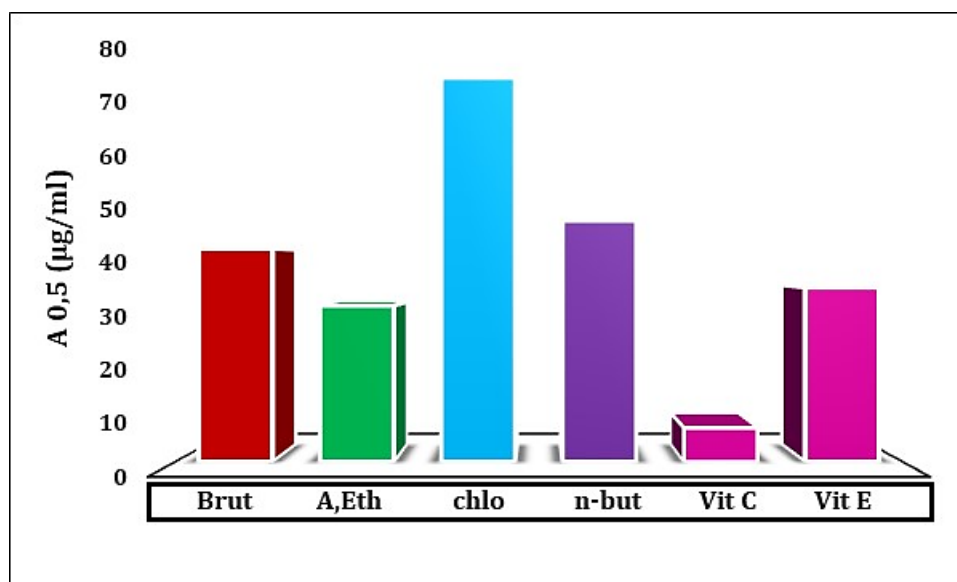
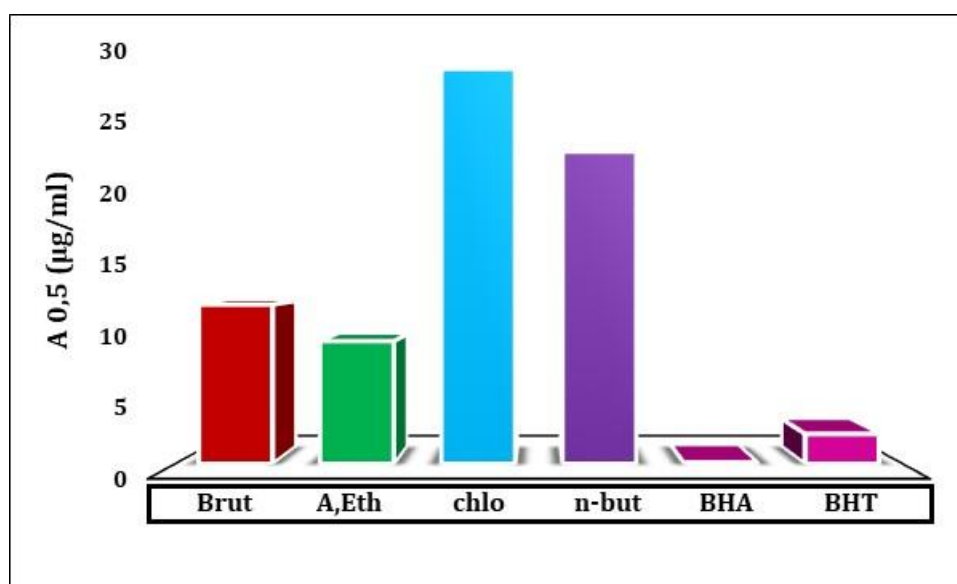
Tab. IV. 08: les absorbances des différents extraits dans la méthode SNP

Extraits	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	A _{0.5} (µg/ml)	Equivalent T _{rolox}
hydroalcoolique	0,32±0.06	0,41±0.07	0,55±0.03	0,81±0.02	1,02±0.01	1,19±0.04	1,34±0.01	021.72±1.08	157.3 %
Acetate d'éthyle	0,22±0.03	0,36±0.08	0,44±0.07	0,52±0.06	0,73±0.08	0,97±0.01	1,16±0.02	046.81±2.64	72.99 %
Chloroformique	0,17±0.03	0,19±0.07	0,31±0.10	0,40±0.06	0,54±0.08	0,77±0.04	0,98±0.05	085.38±2.38	40.02 %
n-butanolique	0,18±0.07	0,26±0.03	0,33±0.04	0,42±0.08	0,57±0.06	0,81±0.03	1,14±0.09	067.38±1.40	50.71 %
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	034.17±1.23	//

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

Tableau IV. 09: tableau récapitulatif des valeurs $A_{0.5}$ ($\mu\text{g/ml}$)

	FRAP	Phenanthroline	SNP
Extrait hydroalcoolique	42.68 $\pm$ 2.07	11.95 $\pm$ 0.67	21.72 $\pm$ 1.08
Extrait Acétate d'éthyle	31.28 $\pm$ 1.55	09.21 $\pm$ 0.84	46.81 $\pm$ 2.64
Extrait Chloroformique	76.94 $\pm$ 4.11	29.67 $\pm$ 2.91	85.38 $\pm$ 2.38
Extrait n-butanolique	48.27 $\pm$ 0.97	23.44 $\pm$ 1.08	67.38 $\pm$ 1.40

**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

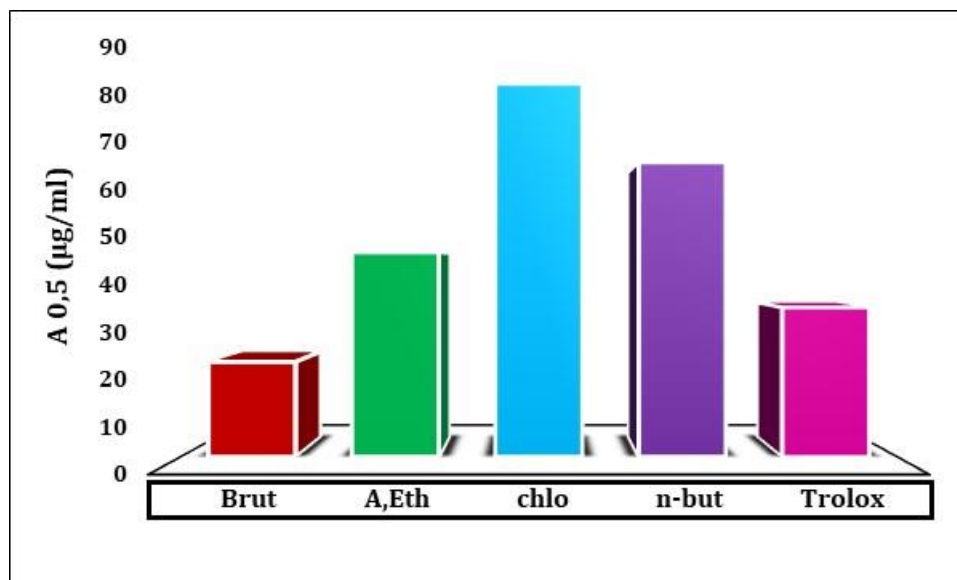


Fig. IV. 09: Valeurs A 0.5 des extraits étudiés dans la méthode SNP

En continuité avec l'évaluation de l'activité antioxydante. Les méthodes FRAP, Phénanthroline et SNP ont été sélectionnées dans ce contexte. Les extraits étudiés ont présenté des activités variables, Les extraits Acétate d'éthyle, l'hydroalcoolique et le n-butanolique ont donné une valeur A 0.5 intéressante dans la méthode FRAP, néanmoins l'extrait chloroformique apparaît faible. Ces résultats sont incomparables avec les molécules de référence BHA et BHT. Il est clair que la variété structurale des produits naturels détermine la qualité de l'activité biologique, plusieurs critères chimiques interviennent dans la procédure du transfert des électrons par les composés phénoliques tels que le nombre et la position des groupements hydroxyles aussi bien que le degré de conjugaison de la molécule (**Chung et al., 2002**). Dans cette méthode, on aura au mécanisme de réduction du fer ferrique (Fe^{+3}) présent dans le ferricyanure de potassium en fer ferreux (Fe^{+2}), le Fe^{+2} peut être évalué en mesurant l'absorbance de la couleur verte formée (**Amarowicz et al., 2004**). Le degré de l'activité est immédiatement proportionnel au contenu des composés phénoliques dans les échantillons à tester, plus que l'extrait est riche en polyphénols, plus qu'il a un pouvoir réducteur élevé (**Apak et al., 2004**).

La méthode de phénanthroline est presque similaire à celle du pouvoir réducteur. Elle permet d'évaluer la capacité des extraits à réduire le fer et de former un complexe Fe^{+2} -phénanthroline en donnant virage du couleur vers le rouge intense. Le meilleur effet a été réservé pour l'extrait d'acétate d'éthyle suivi par l'extrait brut et le n-butanolique respectivement, tandis que l'extrait chloroformique est le plus faible. Le mécanisme réactionnel est basé sur la réduction du Fe^{+3} en Fe^{+2} , ce dernier forme un complexe stable avec la phénanthroline de couleur

rouge. Ce complexe ainsi formé (Fe^{+2} -phénantroline) est révélé par les techniques spectrophotométriques, ce qui détermine le pouvoir réducteur de l'échantillon à tester. Les travaux de **Senhaji et al., 2020** ont montré des niveaux intéressants d'activité antioxydante de la même plante étudiée d'origine marocaine.

Dans la méthode de SNP, les extraits étudiés ont présenté le même comportement que celui enregistré dans les méthodes précédentes FRAP et phénanthroline, l'extrait chloroformique reste le plus faible, tandis que les trois autres extraits ont été plus actifs en comparaison avec le standard.

4. Activité inhibitrice des enzymes

4.1.L'activité antidiabétique via l'inhibition de l' α -amylase

Le tableau IV. 10 résume les pourcentages d'inhibition de l' α -amylase par les extraits étudiés

Tab. IV. 10: les pourcentages d'inhibition de l' α -amylase par les extraits étudiés.

Extraits	06.25 μ g	12.5 μ g	25 μ g	50 μ g	100 μ g	200 μ g	400 μ g	IC ₅₀ (μ g/ml)	Equivalent standard
hydroalcoolique	12.91 $\pm$ 1.30	14.85 $\pm$ 0.64	18.38 $\pm$ 1.06	22.86 $\pm$ 1.90	29.16 $\pm$ 1.37	34.94 $\pm$ 1.55	38.22 $\pm$ 0.17	> 400	//
Acetate d'éthyl	16.29 $\pm$ 1.52	23.07 $\pm$ 0.09	29.52 $\pm$ 2.84	35.19 $\pm$ 2.62	41.62 $\pm$ 1.46	47.63 $\pm$ 3.48	53.67 $\pm$ 3.64	314.21 $\pm$ 5.37	//
Chloroformique	24,37 $\pm$ 2.49	27.64 $\pm$ 0.94	33.09 $\pm$ 0.97	39.47 $\pm$ 1.62	45.08 $\pm$ 1.77	49,68 $\pm$ 2.21	61.19 $\pm$ 1.46	209.70 $\pm$ 3.41	//
n-butanolique	17.64 $\pm$ 0.84	20.11 $\pm$ 2.35	27,84 $\pm$ 1.07	31.64 $\pm$ 0.57	38.07 $\pm$ 1.49	43,46 $\pm$ 2.19	48.09 $\pm$ 1.81	> 400	//
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	3650,9 $\pm$ 10,7	//

- 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 butyrylcholinestérase

Le tableau IV. 11 résume les pourcentages d'inhibition de BuChE des extraits étudiés

Tab. IV. 11: les pourcentages d'inhibition de BuChE

Extraits	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	IC ₅₀ (µg/ml)	Equivalent standard
hydroalcoolique	06.07±0.12	13.62±0.00	18.31±0.09	31.55±2.04	36.84±1.07	54.61±2.23	63.66±2.86	81.94±5.19	07.65 %
Acetate d'éthyle	08,58±0.17	14.34±1.07	20.63±2.74	29,72±1.28	34.09±2.64	51.08±4.97	70.51±3.67	97.55±4.28	06.42 %
Chloroformique	11.07±1.02	15.31±0.46	19,68±1.35	26.83±1.92	31.72±0.68	38.14±2.09	43.91±2.77	> 200	//
n-butanolique	10.97±1.79	13.08±1.77	22.97±2.40	28.61±1.77	34.82±1.24	40.66±2.48	47.08±0.94	> 200	//
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	06.27±1.15	//

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

L'ensemble des phénomènes biologiques endogènes de synthèse, de dégradation ou de transformation sont catalysés par voie enzymatique. Elles assurent le bon fonctionnement des phénomènes biologiques à l'échelle moléculaire et cellulaire. Plusieurs maladies disséminées dans la communauté sont dues, directement ou indirectement, aux dysfonctionnement enzymatiques ce qui rend la modulation de l'activité enzymatique l'une des voies principales pour prévenir et/ou traiter ce genre de maladies. Dans la présente étude, nous avons évalué l'activité inhibitrice de nos extraits sur l' α -amylase et la BuChe et qui sont liées aux deux maladies lourdes le diabète type 2 et l'Alzheimer, respectivement.

Le diabète, un grand désordre métabolique, est largement disséminé dans la population plus particulièrement chez les personnes âgées et les obèses. Il a, fréquemment, des complications graves. Les cliniciens ont adopté plusieurs stratégies pour une bonne gestion de cette maladie, L'une des mécanismes d'aide des personnes souffrant du diabète type 2 est le control de la glycémie postprandiale via l'inhibition de l'une des enzymes de digestion des carbohydrates comme l' α -amylase. Dans ce contexte, nous avons tester l'activité inhibitrice de l' α -amylase par nos extraits. L'extrait chloroformique a donné le meilleur effet inhibiteur suivi par l'extrait d'acétate d'éthyle. Les extrait brut et n-butanolique ont montré un effet modéré (IC_{50} faibles). (**Tab. IV. 10**).

L'inhibition des cholinestérases (AChE et BuChE) est la stratégie la plus pratiquée dans le gestion symptomatique d'Alzheimer. Les inhibiteurs synthétiques et commercialisés par l'industrie pharmaceutique ont beaucoup d'effets secondaires qui sont parfois insupportable. Les produits naturels, tels que les alcaloïdes et certains huiles essentielles, ont montré une bonne activité inhibitrice vis-à-vis ces enzymes, ils peuvent être considérés comme une source des nouveaux alternatifs traitant cette maladie neurodégénérative. Les résultats obtenus, exprimés en IC_{50} , (**Tab. IV. 11**) ont montré une activité inhibitrice considérable, notamment pour les extraits bruts at d'acétate d'éthyle. Le standard, la galanthamine, a donné l'effet le plus important.

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

Le **tableau IV. 12**, en dessous, résume Les facteurs de protection des extraits étudiés vis-à-vis les rayonnements UV de la lumière solaire.

Tab. IV. 12 : les facteurs de protection solaire des extrais étudiés.

Extraits	SPF ₁	SPF ₂	SPF ₃	Moyenne $\pm$ SD	Commentaire
Extrait hydroalcoolique	41.62	42.15	40.89	41.55 $\pm$ 0.44	Très Haute protection
Extrait Acétate d'éthyle	38.51	39.04	38.16	38.57 $\pm$ 0.31	Haute protection
Extrait Chloroformique	36.12	36.47	35.02	35.87 $\pm$ 0.56	Haute protection
Extrait n-butanolique	37.01	38.67	39.03	38.23 $\pm$ 0.81	Haute protection
Crème solaire NIVEA®	/	/	/	50,11 $\pm$ 0,53	Très Haute protection
Crème solaire VICHY®	/	/	/	44,22 $\pm$ 0,35	Très Haute protection

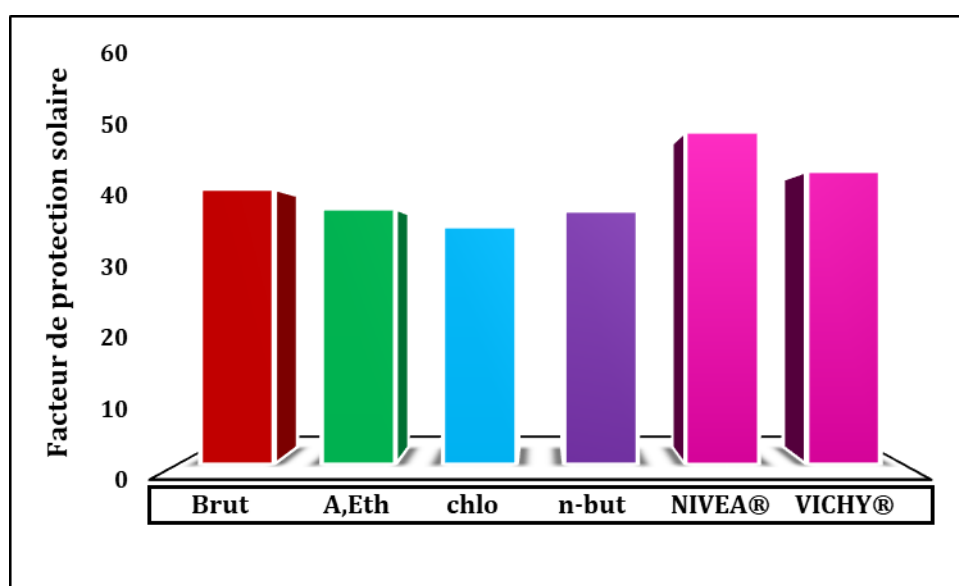


Fig. IV. 10 : Valeurs SPF des extraits étudiés

Les rayonnements UV de la lumière solaire engendrent des dommages cellulaires et tissulaires, parfois graves, durant un contact prolongé avec la peau. A titre de prévention, Les praticiens de la santé fabriquent des préparations cosmétiques et pharmaceutiques comme les crèmes et les liquides antisolaires en vue de nous protéger vis-à-vis ces rayonnements, en évitant ainsi ces dommages tissulaires. Les préparations utilisées dans ce cadre sont caractérisées par un facteur de protection solaire (SPF) important. Nos extraits ont apparus de haute protection, ils sont comparables avec les valeurs de référence. Ces extraits sont d'origine saharienne, donc en exposition permanente aux rayonnements solaires, ce qui explique une partie de cette activité protectrice.

Conclusion générale

Perspectives

❖ Conclusion générale

La direction générale de la recherche scientifique a organisé la recherche technique en Algérie en trois plans essentiels, la sécurité sanitaire, la sécurité alimentaire et la sécurité énergétique. Les experts considèrent la sécurité sanitaire une priorité grâce à ses impacts sur le plan sociale et économique, notamment avec la dissémination progressive des maladies chroniques. La gestion de ces menaces nécessite une bonne adaptation des stratégies actuelles et la recherche des nouvelles alternatives thérapeutiques sains et puissants. Dans ce contexte, les produits d'origine naturels nous offrent une source inépuisable des principes actifs qui peuvent être exploités dans le control du stress oxydatif, du diabète, d'Alzheimer et d'autres formes de maladies. Ce travail a été proposé dans le cadre de valorisation, sur une base scientifique, des vertus thérapeutique d'une plante médicinale saharienne.

Sur le plan méthodologique, nous avons évalué d'une part, le contenu en phénols et flavonoïdes totaux et l'activité antioxydante de quatre extraits de la plante *Ajuga iva* L. par des méthodes colorimétriques standards, *in vitro*, le piégeage des radicaux DPPH et ABTS, la réduction des fer (FRAP et Phenanthroline) et d'Argent (SNP). D'autres part, nous avons caractérisé l'activité antidiabétique de type 2 via l'inhibition de l' α -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 du dosage ont montré que l'extrait brut et d'acétate d'éthyle ont donné des teneurs intéressants en phénols et flavonoïdes totaux. Sur le plan des activités, les résultats obtenus ont montré des activités intéressantes pour les extraits brut et d'acetate d'hytle, ils sont comparables aux références BHA et BHT dans les méthodes de neutralisation des radicaux DPPH et ABTS. En parallèle, L'extrait d'acétate d'éthyle a présenté le meilleur effet dans les méthodes FRAP, Phenanthroline, l'extrait brut est le plus puissant dans la méthode SNP, tandis que le chloroformique est le plus faible dans les trois activités précédentes. D'autre part, l'extrait chloroformique a inhibé fortement l' α amylase, d'une manière dose-dépendante, Alors que les extraits brut et acétate d'éthyle sont les plus intéressants dans l'inhibition de butyrylcholinestérase. En plus, nos extraits ont montré des facteurs de protections solaire intéressants. Les résultats obtenus valorisent l'utilisation traditionnel de la plante sélectionnée en Algérie, Ils ouvrent également des perspectives multiples qui permettent d'approfondir nos études dans ce domaine.

❖ Perspectives

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

1. Achenbach, P., Bonifacio, E., Koczwara, K., Ziegler, A.G. 2005. Natural history of type1 diabetes. Diabetes.
2. Adams, R. P., identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, allured published corporation, Carol Stream, 2nd edition, 2001.
3. Ahmed, B. and R. Ahmed (2012). "Modeling urban land cover growth dynamics using multi-temporal satellite images: a case study of Dhaka, Bangladesh." ISPRS International Journal of Geo-Information1 (1): 3-31.
4. Alam, M. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. Saudi pharmaceutical journal, 21(2), 143-15
5. Aniszewski T., 2007. Alkaloids - Secrets of Life, Alkaloid Chemistry, Biological significance, Applications and Ecological Role, Google eBook. Front Cover
6. Arctander, S. (2017). Perfume and flavor materials of natural origin. Lulu. com.
7. Asgarpanah J. and Kazemivash N. (2012). Phytochemistry, pharmacology and medicinal properties of Coriandrum sativum L. African Journal of Pharmacy and Pharmacology 6(31): 2340-2345
8. Asmat, U., Abad, K., & Ismail, K. (2016). Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review. Saudi pharmaceutical journal, 24(5), 547-553.
9. Atamer A, Bilici A, Yenice N, Selek S, Ilhan N & Atamer Y (2008) The importance of paraoxonase 1 activity, nitric oxide and lipid peroxidation in hepatosteatosi. J Int Med Res 36, 771-776.
10. Baba Aissa, F. (2000). Encyclopédie des plantes utiles, flore d'Algérie et du Maghreb, substances végétales d'Afrique, d'Orient et d'Occident. Ed Librairie moderne Rouiba, 46.
11. Beloued, A. (2012). Plantes médicinales d'Algérie: Offices des publications universitaires.
12. Bonnefont-Rousselot, D. Glucose and reactive oxygen species. Curr Opin Nutr. 2002.
13. Bonnefont-Rousselot D. The role of antioxidant micronutrients in the prevention of diabetic complications. Treat Endocrinol. 2004
14. Bouyahya, A., El Omari, N., Elmeniyi, N., Guaouguaou, F. E., Balahbib, A., El-Shazly, M., & Chamkhi, I. (2020). Ethnomedicinal use, phytochemistry, pharmacology, and toxicology of *Ajuga iva* (L.) schreb. Journal of ethnopharmacology, 258, 112875.
15. Brenton, marie- caulde, mélanie Turgeon, and cathey Gosselin. "Traitements pharmacologiques de la maladie d'Alzheimer et des maladies apparentées." Revue systématique (2015).
16. Brewer, M. S. (2011). Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.

17. Bruneton J (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3^{ème} Edition Technique et documentation Lavoisier. stockâgit et., 2002....
18. Christen, Y. (2000). Oxidative stress and Alzheimer disease. The American journal of clinical nutrition, 71(2), 621S-629S.
19. Col, J., & Tandrón, Y. A. (2008). Neo-Clerodane diterpenoids from Ajuga: structural elucidation and biological activity. Phytochemistry Reviews, 7(1), 25.
20. Cummings, J. L., & Cole, G. (2002). Alzheimer disease. Jama, 287(18), 2335-2338.
21. DELATTRE Jacques; BEAUDEUX Jean-Louis; BONNEFONT-ROUSSELOT Dominique (23 January 2007). Radicaux libres et stress oxydant: Aspects biologiques et pathologiques (broché). Lavoisier.
22. Devasagayam T. B. A., Tilak J. C., Boloor K. K., Sane K. S., Ghaskadbi S. S. and Lele R. D. (2004). Free radical and antioxidants in human health: current status and future prospects. JAPI 52: 794-804.
23. Favier A. Oxidative stress in human disease. Ann. Pharm. Fr. 2006; 64(6): 390-396.
24. Favier, A. (2003). Le stress oxydant. L'actualité chimique, 108(10), 863-832.
25. Gonzalez-Burgos, E., & Gomez-Serranillos, M. P. (2012). Terpene compounds in nature: a review of their potential antioxidant activity. Current medicinal chemistry, 19(31), 5319-5341.
26. Goudable, J., & Favier, A. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. Nutrition clinique et métabolisme, 11(2), 115-120.
27. Guimarães, A. G., Serafini, M. R., & Quintans-Júnior, L. J. (2014). Terpenes and derivatives as a new perspective for pain treatment: a patent review. Expert opinion on therapeutic patents, 24(3), 243-265.
28. Gülçin, I. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. Archives of toxicology, 86(3), 345-391.
29. Haleng J., Pincemail J., Defraigne J.O., Charlier C., Chapelle J.P. (2007). Le stress oxydant. Rev Med Liege. 62 : 10 : 628-638.
30. Halimi A. K. (2004). Les plantes médicinales en Algérie. 1^{ère} édition. BERTI Editions, Alger. Pp : 156-157.
31. Halliwell B. oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? J. neurochem.2006.
32. Harvey, A. L. (2008). Natural products in drug discovery. Drug discovery today, 13(19-20), 894-901.
33. Hennebelle T., Sahpaz S. et Bailleul F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. Phytoth.

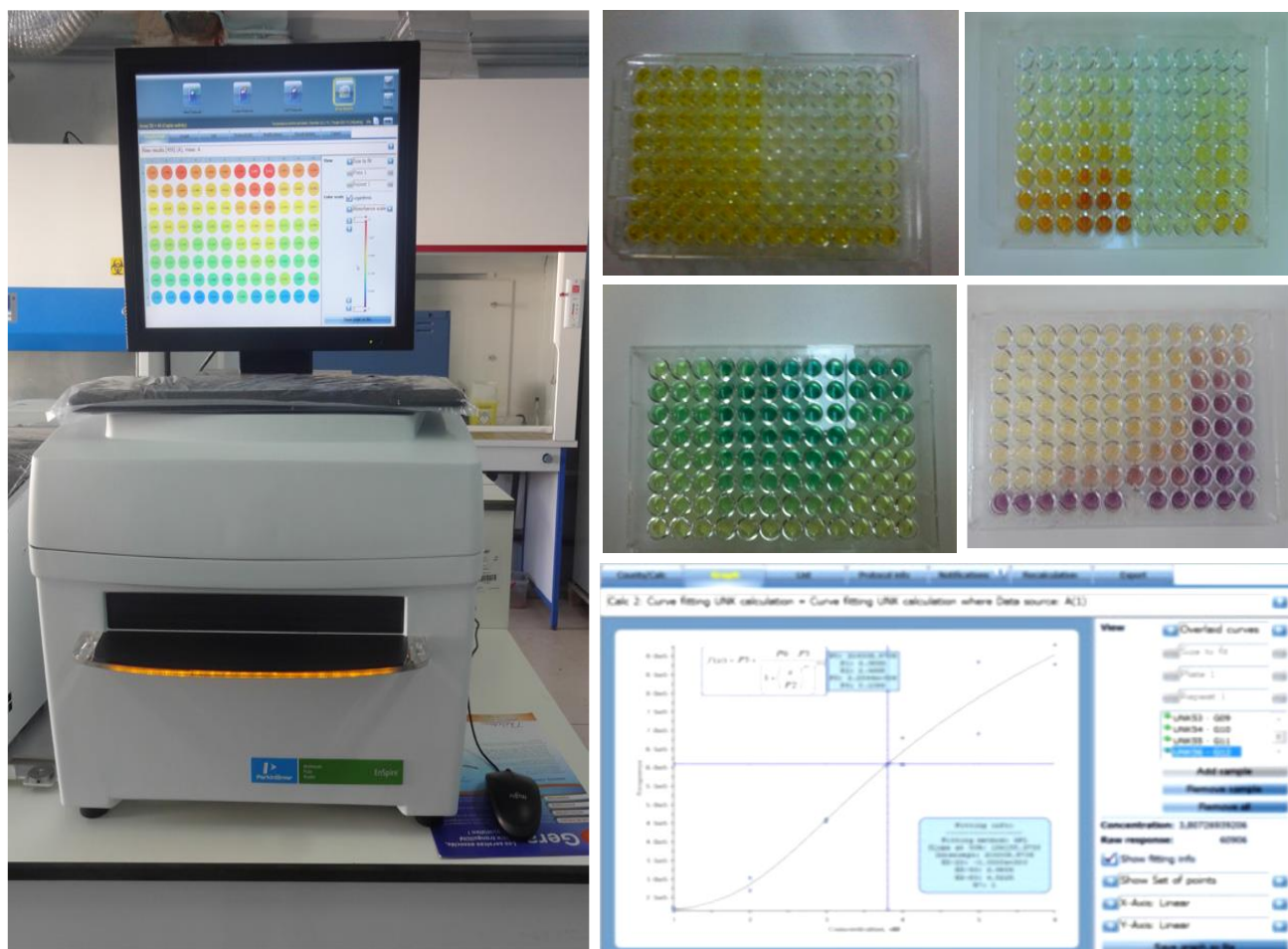
34. Hennebelle T., Sahpaz S. et Bailleul F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytoth.*
35. Hennebelle, T., Sahpaz, S., & Bailleul, F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 2(1), 3-6.
36. Hollman, P. C. H. (2001). Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects?. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(9), 842-852.
37. Ihoual ép Fethi, S. and N. Abidli (2018). Effet d'extrait méthanolique de la plante médicinale *Phlomis samia* sur l'apoptose des cellules cancéreuses HepG2 et MDA MB 468 et sur la cardiotoxicité induite par la Doxorubicine, Université frere mantoré.
38. Jean, B. (2009). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.). Lavoisier.
39. Jones, W. P., Chin, Y. W., & Kinghorn, A. D. (2006). The role of pharmacognosy in modern medicine and pharmacy. *Current drug targets*, 7(3), 247-264.
40. Judge S, Jang Y M, smith A, Smith A, Hagen T, leeuwenburgh C. Age-associated increases in oxidative stress and antioxidant enzyme activities in cardiac interfibrillar mitochondria: implications for the mitochondrial theory of aging. *FASEB J*.
41. karadag, A,ozcelik,B., & saner, S. (2009). Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food anatytical methods*, 2(1), 41-60.
42. Karakaya, S. (2004). Bioavailability of phenolic compounds. *Critical reviews in food science and nutrition*, 44(6), 453-464.
43. Khalid Milane H., 2004. La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat. Strasbourg..Paris, 155p.)
44. Kocsy G., Tari I., Vanková R., Zechmann B., Gulyás Z., Poór P. and Galiba G. (2013). Redox control of plant growth and development. *Plant Science*. [http: dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.07.004](http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.07.004).
45. Krishnaa, A. B., M. V. N. Reddya, G. C. S. Reddya, B. Krishnaa, S. Nayakb and C. S. Reddy (2010). "Synthesis, anti-oxidant and antibacterial properties of diethyl (4-flouro-3- nitro phenylamino) (substituted phenyl) methyl phosphonates." *The International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*1 (3): 873-882.
46. Krishnaiah, D., Sarbatly, R., & Nithyanandam, R. (2011). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and bioproducts processing*, 89(3), 217-233.
47. kuloglu M, atmaa M, Tezcan E, Gecii O, Tunkol H, Ustundag B. antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels in patients with obsessive-compulsive disorder. *Neuropsychobiology* 2002.

48. Leeuwenburgh C, heinecke JW. Oxidative stress and antioxidants in exercise. *Curr Med Chem* 2001, 8:829–838.
49. Leverve, X. (2009). Stress oxydant et antioxydants. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 44(5), 219-224.
50. Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR presses polytechniques.
51. Maghzal, G. J., K.-H. Krause, R. Stocker and V. Jaquet (2012). "Detection of reactive oxygen species derived from the family of NOX NADPH oxidases." *Free Radical Biology and Medicine* 53(10): 1903-1918.
52. Malešev, D. et Kuntić, V. 2007. Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *Journal of the Serbian chemical society.*, 72 (10) : 921-939.
53. Maritim, A. C., Sanders, A., & Watkins Iii, J. B. (2003). Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 17(1), 24-38.
54. Mauro Neves M. ,2007. Synthèse d'alcaloïdes biologiquement actifs : la (+)-anatoxine-a et la (±)-camptothécine thèse de doctorat. University Joseph Fourier – Grenoble
55. Milane H., 2004. La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat. Université de Strasbourg, 268 p.
56. Mishra, V. (2007). Oxidative stress and role of antioxidant supplementation in critical illness. *Clinical laboratory*, 53(3-4), 199-209.
57. Mosca A, lapolla A, Gillery P: Glycemic control in the clinical management of diabetic patients. *Clin Chen lab Med* 2013, 51(4): 753-766.
58. Moufida Rira. Les tanins hydrolysables et condensés: une piste pour la réduction de la production du méthane entérique par les ruminants en milieu tropical. *Agronomie*. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2019. Français.
59. Moussous W. (2012). Activité antioxydante et antiulcéreuse de *carthamus caeruleus* L.
60. Ng F, Berk M, Dean O, bush Al. oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic. *Int. J. Neuropsychoph.* 2008.
61. pak JH, Kim T, Kim MJ, Kim JY, choi H, Kim SA, Tchah H, Reduced expression of 1-cys peroxiredoxin in oxidative stress-induced cataracts. *Exp. Eye Res.* 2006.
62. Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 5.

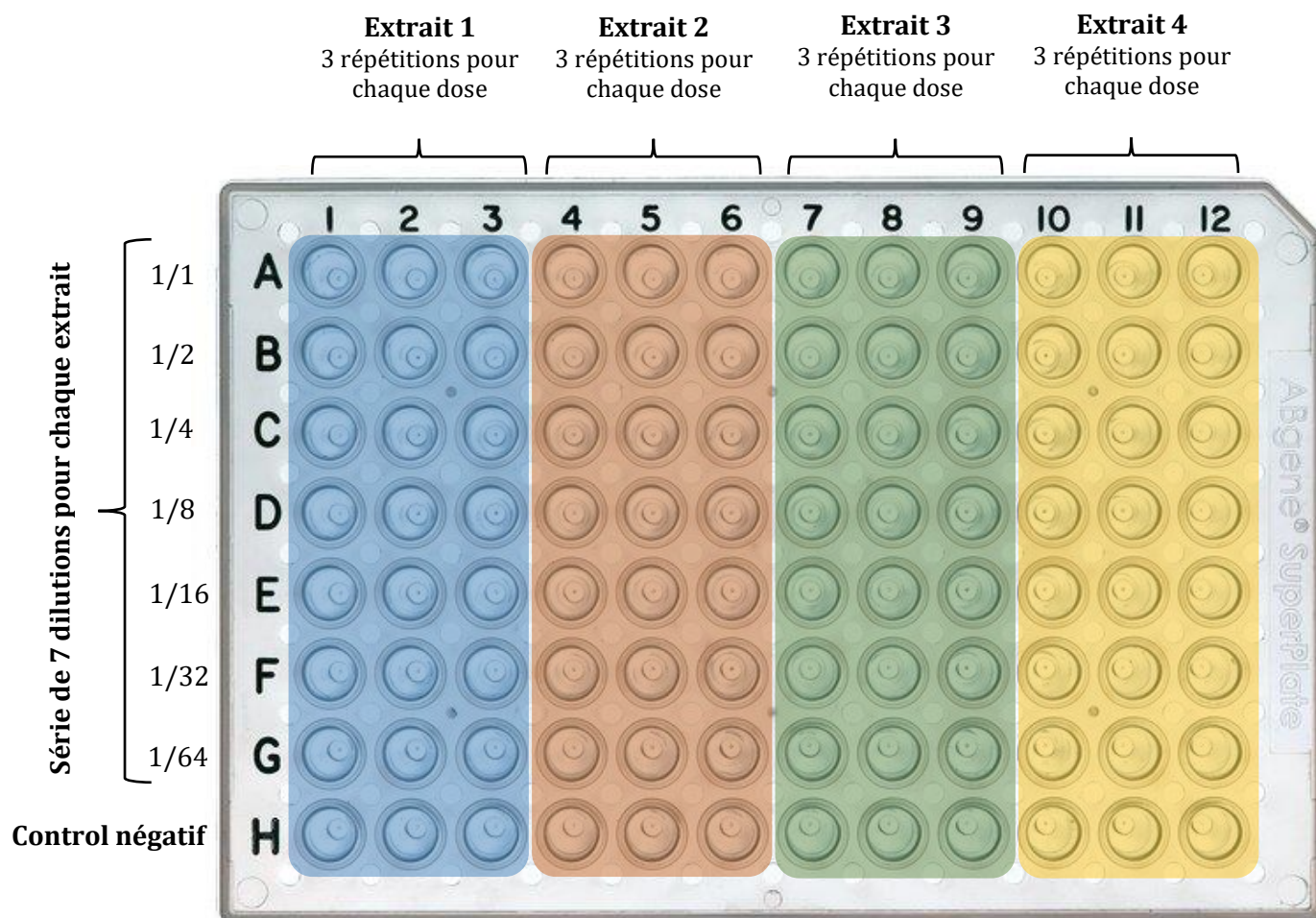
63. Penna C., Mancardi D., Rastaldo R. and Pagliaro P. (2009). Cardioprotection: A radical view free radicals in pre and postconditioning. *Biochimica et Biophysica Acta* 1787: 781-793.
64. Perrony, S la perception gustatives et la consommation des tanins chez le MAKI (lenur catta)thèse de doctorat du muséum national d'histoire naturelle ,discipline Eco.Ethologie ,2005)
65. Pharmacopée Européenne, 5ème Ed, Conseil de l'europe: Strasbourg, 2, 2005, 2667.
66. Ramakrishna, A., Giridhar, P., & Ravishankar, G. A. (2011). Phytoserotonin: a review. *Plant Signaling & Behavior*, 6(6), 800.
67. Raven P. H., Evert R F. et Eichhom S. E. (2000). Biologie Végétale,
68. Reimann, M., Bonifacio, E., Solimena, M., !schwarz, P.E.H., Ludwig, B., Hanefeld, M., Bornstein, S.R. 2009. An update on preventive and regenerative therapies in diabetes mellitus. Pharmacol therapeut.
69. Reimann, M., Bonifacio, E., Solimena, M., !schwarz, P.E.H., Ludwig, B., Hanefeld, M., Bornstein, S.R. 2009. An update on preventive and regenerative therapies in diabetes mellitus. Pharmacol therapeut.
70. Richard, W. (2013). Nouvelle stratégie de fonctionnalisation de surfaces d'électrodes à base de sels de diazonium: application aux capteurs à antioxydants, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier
71. Sahal, R. S, (2002). Rôle du stress oxydatif et de l'oxydation des protéines dans le processus de vieillissement1.
72. Sahraoui w, LES ALCALOIDES. Laboratoire de pharmacognosie
73. Samanta, M. K., Wilson, B., Santhi, K., Kumar, K. S., & Suresh, B. (2006). Alzheimer disease and its management: a review. *American journal of therapeutics*, 13(6), 516-526.
74. Sarni-Manchado P., Cheynier V. 2006. Les polyphénols en agroalimentaire. Lavoisier Tec et Doc (ed). Sciences et techniques agro-al. 61-377.
75. Scheen, A. J. (2018). Place des inhibiteurs des SGLT2 dans le traitement du patient Diabétique de type 2.médeine des maladies Métaboliques, 12(1), 22-30.
76. Shahidi, F., & Naczki, M. (2003). *Phenolics in food and nutraceuticals*. CRC press.
77. Sieniawska, E., & Baj, T. (2017). Tannins. In *Pharmacognosy* (pp. 199-232). Academic Press.
78. Sies, H., Berndt, C., & Jones, D. P. (2017). Oxidative stress. *Annual review of biochemistry*, 86, 715-748.
79. Stalikas, C. D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of separation science*, 30(18), 3268-3295.

80. Taleb-Senouci, D., Ghomari, H., Krouf, D., Bouderbala, S., Prost, J., Lacaille-Dubois, M. A., & Bouchenak, M. (2009). Antioxidant effect of *Ajuga iva* aqueous extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine*, 16 (6-7), 623-631.
81. Thomas, D. (2016). Les antioxydants de nos jours: définition et applications (Doctoral dissertation, Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie, Université de Limoges).
82. University Of Surrey (2007, june 25). In silico cell for TB drug discovery. Science Daily. Retrieved February 12, 20
83. Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T., Mazur M. and Telser J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*.
84. Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D, Mazur M., Telser J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*.
85. Verpoorte, R. (2000). Pharmacognosy in the new millennium: leadfinding and biotechnology. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 52(3), 253-262.
86. Weber B., 2009. Capacité antioxydante totale, antioxydants et marqueurs du stress oxydatif. Laboratoire de Junglinster, Luxembourg.

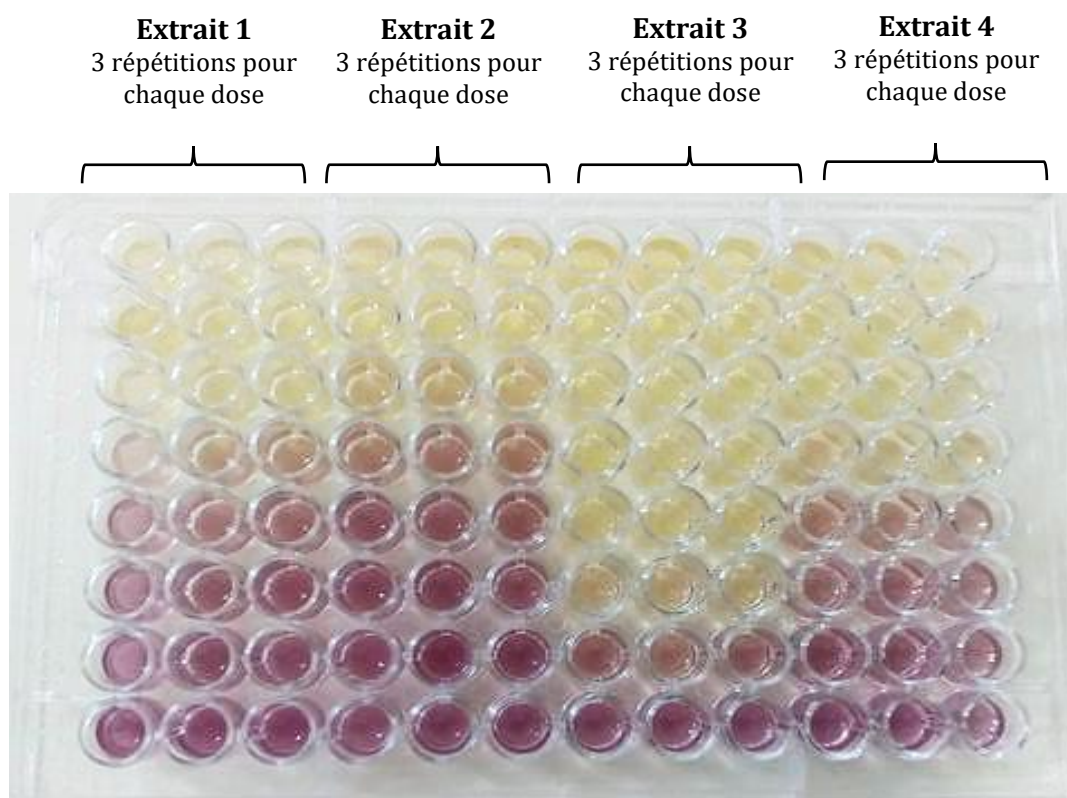
Annexe 01 : lecteur des microplaques a 96 puits utilisé dans différents tests



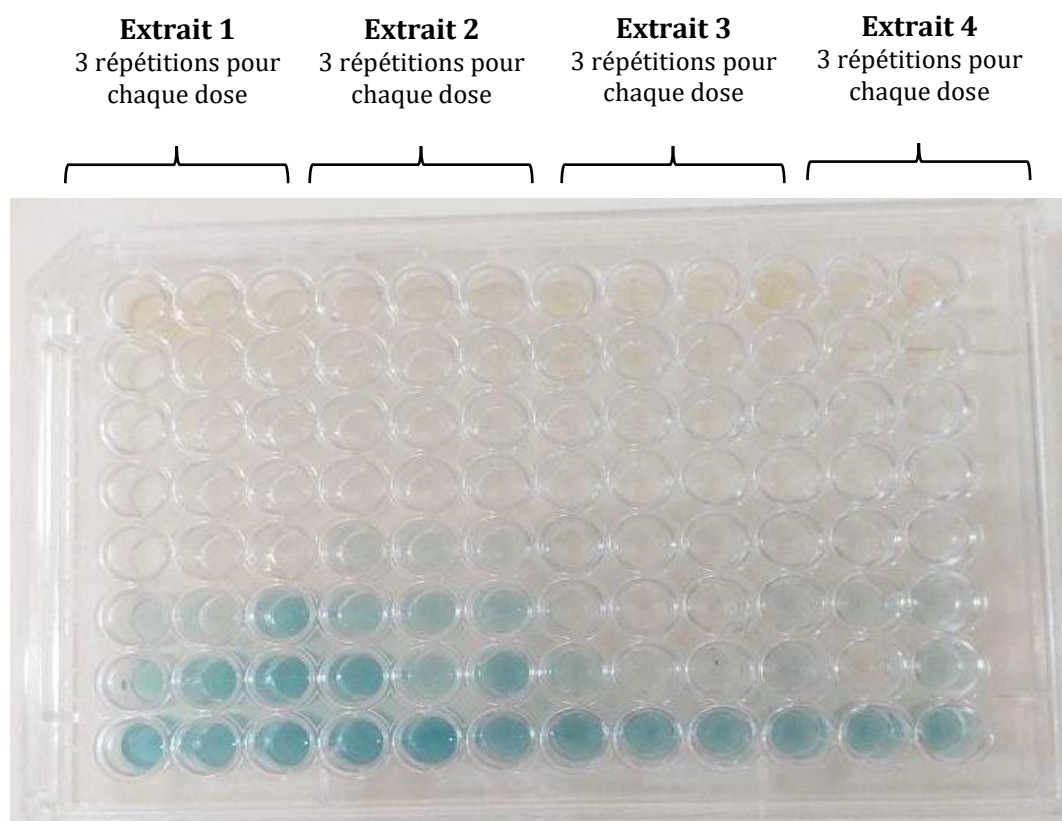
Annexe 02 : Organisation de la microplaque a 96 puits dans les différents tests



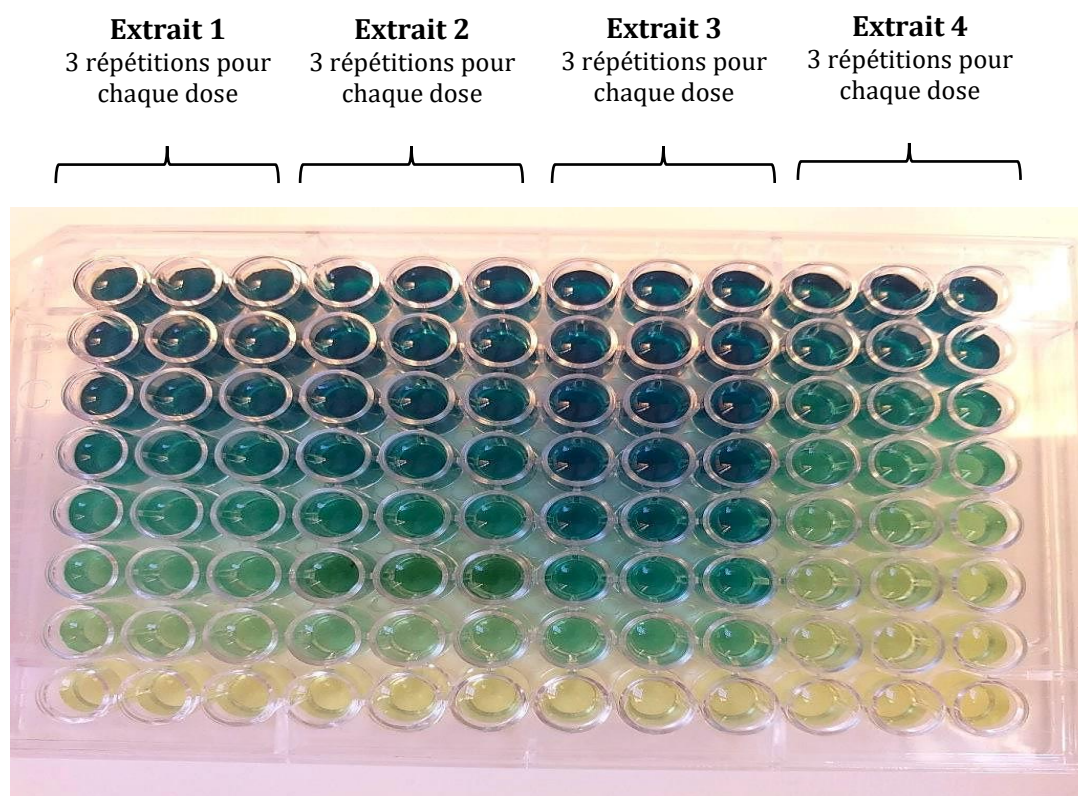
Annexe 03 : Image de la plaque dans le test du piégeage du DPPH



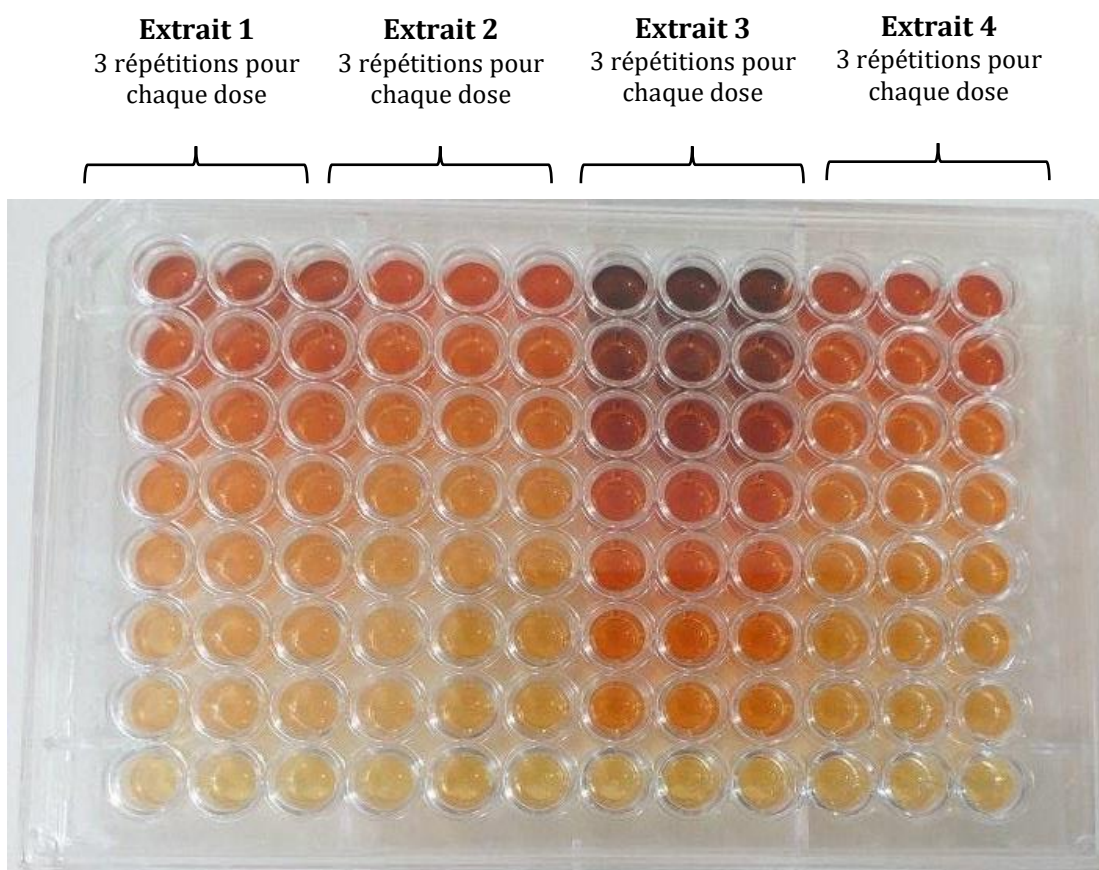
Annexe 04 : Image de la plaque dans le test du piégeage de l'ABTS



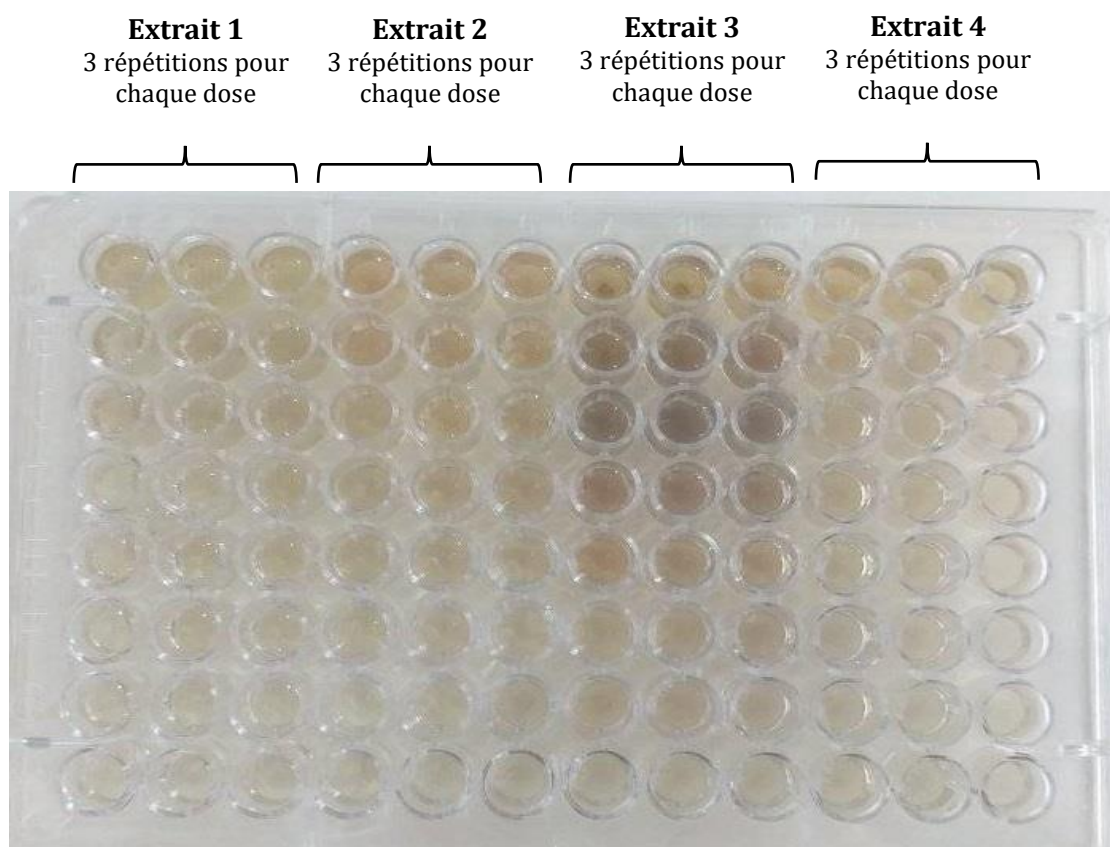
Annexe 05 : Image de la plaque dans le test du FRAP



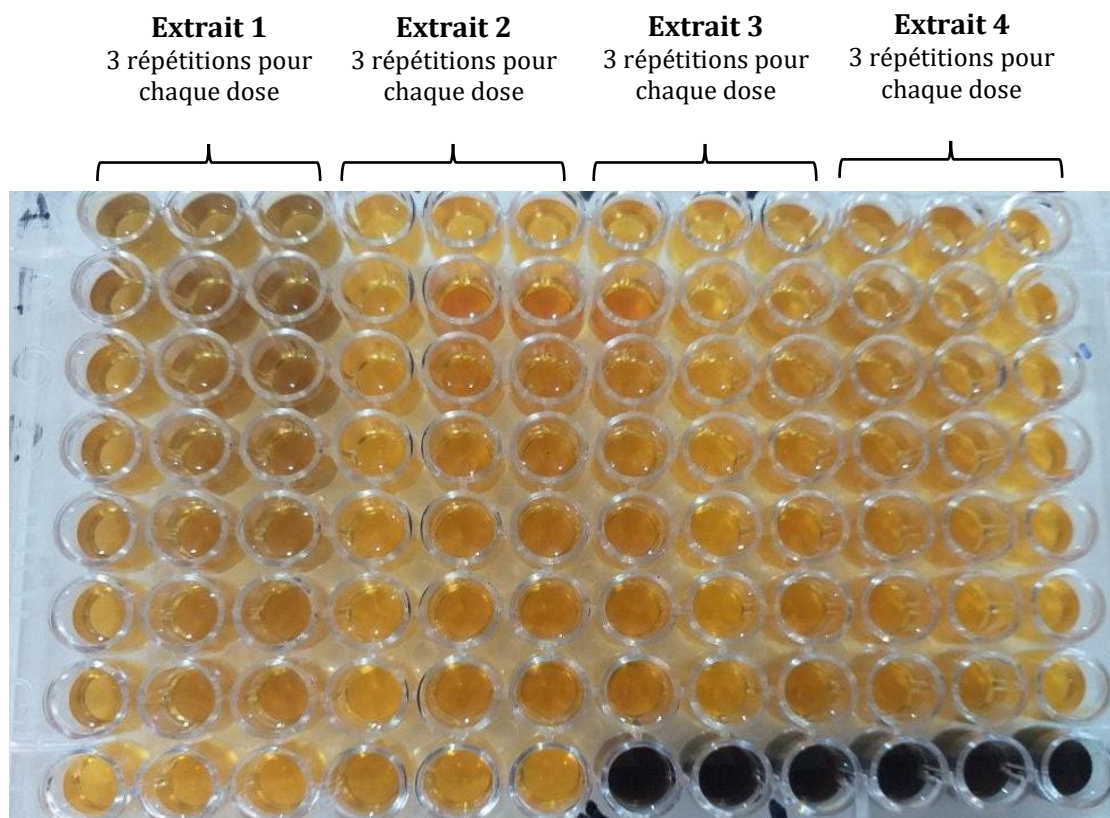
Annexe 06 : Image de la plaque dans le test du Phenanthroline



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



Annexe 08 : Image de la plaque dans l'activité inhibitrice de l' α -amylase



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

