

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 : DJEBLAHI MESSAOUDA**

**Intitulé**

**Evaluation *in vitro* des activités antioxydante,  
antidiabétique et anti-Alzheimer des extraits naturels  
d'une plante de la famille des *Apiaceae***

<b>Promoteur du travail</b>	Dr. KADI Imededdine	CRBt, constantine
<b>Co-promoteur du travail</b>	Dr. Kheniche Abdelhakime	Univ-MB, M'sila
<b>Examineur</b>	Dr. ladghem chikouch M. Dj.	Univ-MB, M'sila
<b>Examineur</b>	Mr. Harrar Abdenassar	Univ-MB, M'sila

**Année universitaire : 2020 /2021**

# *Dédicace*

*A ma mère*

*Je dédie tout particulièrement cette thèse à l'être le plus cher à mon cœur ma mère, symbole de tendresse et de sacrifice pour son soutien morale et assistance inestimable pendant toutes mes longues années d'études et pour tout l'amour qu'elle m'a donnée pour tout ça Merci maman. Que dieu te garde pour nous.*

*A mon père*

*Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que vous méritez pour tous les sacrifices que vous n'avez cessé de consentir, vous avez fait plus qu'aucun père n'a fait pour que ses enfants suivent le bon chemin, je vous dédie ce travail en témoignage de mon profond respect et amour. Que dieu te garde pour nous.*

*Messaouda*

# *Remerciements*

Je dois commencer par exprimer ma profonde gratitude à mon promoteur du travail, Dr. KADI Imededdine, chercheur permanent au Centre de Recherche en Biotechnologie, Constantine. Pour m'avoir constamment guidé pendant cette période et m'apprendre à perfectionner mes compétences, et aussi pour ses qualités humaines inestimables. Je le remercie également pour tous les conseils et l'accompagnement tout au long de la période de préparation du mémoire de fin d'études, tous merci, respect et reconnaissance à vous.

Mes vifs remerciements vont à Dr. KHENICHE Abdelhakim, Co-promoteur de ce travail, MCA à l'Université des Msila, et Ms BENZEGOUTA Nairouz Enseignante à l'Université des Msila, pour leurs conseils judicieux et aide précieuse durant ma période de recherche.

J'adresse mes sincères remerciements aux Dr. ladghem chikouch Mohamed Djamel et Mr. Harrar Abdenassar, de L'université de Msila, pour avoir accepté l'examination de ce travail

Je tiens à remercier Dr. Bensouici Chawki, directeur de Laboratoire au Centre de Recherche en Biotechnologies de Constantine. Etant hébergé au labo pour compléter le côté pratique, je tiens à remercier tous les membres de l'équipe présents.

# Liste des figures

## Chapitre 01

<b>Figure 01</b> : Structure du phénol et d'un polyphénol (kaempférol).....	03
<b>Figure 02</b> : les voies de biosynthèse des composés phénoliques.....	04
<b>Figure 03</b> : Classification des alcaloïdes selon différents critères.....	05
<b>Figure 04</b> : Répartition géographique mondiale des Apiacées.....	08

## Chapitre 02

<b>Figure 01</b> : Les structures chimiques des principaux antioxydants d'origine synthétique.....	09
<b>Figure 02</b> : Aperçu des différentes (ROS) et des antioxydants régulateurs de leur production.....	11
<b>Figure 03</b> : Schéma réactionnel de piégeage de DPPH par un antioxydant.....	12
<b>Figure 04</b> : Schéma réactionnel de piégeage d'ABTS (+) par un antioxydant.....	13
<b>Figure 05</b> : Réduction du complexe chromogène de $Cu^{+}Nc^{-}$ .....	13
<b>Figure 06</b> : Réduction de fer dans la méthode de FRAP.....	14
<b>Figure 07</b> : Formation du complexe Fe+2-phénantroline.....	14

## Chapitre 03

<b>Figure 01</b> : Structure de l' $\alpha$ -amylase en chaînes $\alpha$ et feuilles $\beta$ .....	17
<b>Figure 02</b> : Structure de l'Ache en chaînes $\alpha$ et feuilles.....	17

## Chapitre 04

<b>Figure 01</b> : schéma général de l'extraction et le fractionnement des extraits étudiés.....	19
<b>Figure 02</b> : mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon (DPPH).....	20
<b>Figure 03</b> : mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon (ABTS).....	20
<b>Figure 04</b> : mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon (CUPRAC).....	21
<b>Figure 05</b> : mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon (FRAP).....	21
<b>Figure 06</b> : mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon (Phenanthroline).....	22
<b>Figure 07</b> : mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon (Anti-AChE).....	24

## Chapitre 05

<b>Figure 01</b> : Teneurs en Phénols totaux des extraits étudiés.....	26
<b>Figure 02</b> : Teneur en Flavonoïdes totaux des extraits étudiés.....	26
<b>Figure 03</b> : Valeurs IC <sub>50</sub> des extraits étudiés dans la méthode de piégeage du DPPH.....	30
<b>Figure 04</b> : Valeurs IC <sub>50</sub> des extraits étudiés dans la méthode de piégeage de l'ABTS.....	30
<b>Figure 05</b> : Valeurs A <sub>0.5</sub> des extraits étudiés dans la méthode de CUPRAC.....	35
<b>Figure 06</b> : Valeurs A <sub>0.5</sub> des extraits étudiés dans la méthode de FRAP.....	35
<b>Figure 07</b> : Valeurs A <sub>0.5</sub> des extraits étudiés dans la méthode de Phenanthroline.....	36
<b>Figure 08</b> : Valeurs SPF des extraits étudiés.....	41

# Liste des Tableaux

## Chapitre 01

<b>Tableau 01</b> : distribution géographique des genres de la famille des Apiaceae. ....	06
---	----

## Chapitre 04

<b>Tableau 01</b> : l'organisation de microplaque dans le test de $\alpha$ -amylase.....	23
<b>Tableau 02</b> : mode de remplissage de microplaque dans le test de $\alpha$ -amylase.....	23
<b>Tableau 03</b> : Fonction normale de produit utilisée dans le calcul de la SPF.....	24

## Chapitre 05

<b>Tableau 01</b> : Rendement d'extraction.....	26
<b>Tableau 02</b> : teneur en Phénols totaux et flavonoïdes.....	26
<b>Tableau 03</b> : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH.....	28
<b>Tableau 04</b> : Pourcentages d'inhibition du radical ABTS.....	29
<b>Tableau 05</b> : tableau récapitulatif des valeurs IC50 ( $\mu\text{g/ml}$ ).....	30
<b>Tableau 06</b> : les absorbances des différents extraits dans la méthode CUPRAC.....	32
<b>Tableau 07</b> : les absorbances des différents extraits dans la méthode FRAP.....	33
<b>Tableau 08</b> : les absorbances des différents extraits dans la méthode de Phenanthroline.....	34
<b>Tableau 09</b> : tableau récapitulatif des valeurs A 0.5 ( $\mu\text{g/ml}$ ).....	35
<b>Tableau 10</b> : les pourcentages d'inhibition de l' $\alpha$ -amylase par les extraits étudiés.....	38
<b>Tableau 11</b> : les pourcentages d'inhibition de l'AChE.....	39
<b>Tableau 12</b> : coefficient de protection solaire des extrais étudiés.....	41

## *Liste des abréviations*

<b>ROS</b>	Les espèces réactives de l'oxygène.
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique.
<b>BHA</b>	hydrox-yanisole butylé.
<b>BHT</b>	hydroxy-toluene butylé
<b>PG</b>	gallate propylé.
<b>TBHQ</b>	tertiobutylhydroquinones.
<b>SOD</b>	superoxydes dismutases.
<b>CAT</b>	Catalase.
<b>GPx</b>	Glutathion peroxydase.
<b>GR</b>	Glutathion réductase.
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxygène
<b>OH•</b>	Radical hydroxyle.
<b>Fe<sup>2+</sup></b>	Fer ferreux.
<b>Cu<sup>2+</sup></b>	Ion cuivrique.
<b>Fe<sup>3+</sup></b>	Fer ferrique.
<b>HOCl</b>	Acide hypochlorique.
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peroxyde d'hydrogène.
<b>O<sub>2</sub><sup>*-</sup></b>	Anion superoxyde.
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	Oxygène singulier.
<b>GSH</b>	Glutathion.
<b>DPPH</b>	2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl.
<b>ABTS</b>	2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)
<b>FRAP</b>	Ferric Reducing Antioxidant Power.
<b>IC50</b>	Concentration inhibitrice de 50 %.
<b>K<sub>3</sub>Fe (CN)<sub>6</sub></b>	Ferricyanure de potassium.
<b>FeCl<sub>3</sub></b>	Chlorure de fer.
<b>HCl</b>	Acide chlorhydrique.
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Eau.
<b>DT1</b>	Le diabète de type 1.
<b>DT2</b>	Le diabète de type 2.
<b>MA</b>	maladie d'Alzheimer.
<b>AChE</b>	Acétylcholinestérase.
<b>ADOs</b>	antidiabétiques oraux.
<b>OMS</b>	l'organisation mondiale de la santé

حاليا، تعتبر الأمراض المزمنة بمختلف أصنافها محط بحث مستمر، لتفادي تأثيراتها السلبية من الناحيتين الصحية والاقتصادية، خاصة مع ربطها علميا بظاهرة الاجهاد التأكسدي ودورها في التسبب أو في مضاعفة تأثير هذه الامراض، تحديدا منها مرض السكري والأمراض العصبية. الى جانب ذلك، تعتبر المركبات الطبيعية مصدرا أساسيا يعتمد عليه الباحثون لاكتشاف عناصر دوائية جديدة، نظرا لما تتميز به من تنوع البنية الكيميائية، فعالية التأثير وقلة الاثار السلبية. في هذه الدراسة نتطرق الى استخلاص المركبات الفعالة لنبته طبية مع تحديد تركيبها من Polyphénols و flavonoides . ونشاطها مضاد الاكسدة باستعمال تقنيات تعديل الجذور الحرة DPPH و ABTS . وكذا تقنيات ارجاع Fer و Cuivre في Phenanthroline, FRAP, CUPRAC . كما تطرقنا الى دراسة تثبيط المستخلصات للنشاط الانزيمي لكل من  $\alpha$ -amylase و AChE مع تحديد مؤشر الحماية من الاشعة فوق البنفسجية الشمسية. النتائج المحصل عليها أعطت نتائج معتبرة من Polyphénols و flavonoides خاصة بالنسبة للمستخلصات hydroalcoolique و acétaté d'éthyle. هذين المستخلصين أعطيا أفضل النتائج في تعديل الجذور الحرة DPPH و ABTS . في جانب اخر، المستخلصات المدروسة أعطت نتائج متقاربة في تقنيات ارجاع Fer و Cuivre في Phenanthroline, FRAP, CUPRAC , حيث سجل مستخلص الـ chloroforme أفضل النتائج مقارنة بالبقية، في حين تبقى كل النتائج بعيدة عن المقارنة بالمركبات المرجعية. من جهة أخرى اعطى النشاط المضاد لانزيم AChE نتائج معتبرة خاصة للمستخلصين Acétate d'éthyle و n-butanol. في حين النتائج كانت ضعيفة نسبيا في تثبيط الـ  $\alpha$ -amylase من كل المستخلصات المدروسة. فيما يخص مؤشر الحماية من الأشعة الشمسية فقط أعطت المستخلصات المدروسة نتائج جيدة في هذا الجانب. كل 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، الاجهاد التأكسدي، السكري، الزهايمر، مضادات الأكسدة

**❖ Abstract**

In the Algerian complementary and alternative medicine, many endemic plants were used to treat public diseases. Indeed, the scientific community directed their researches to find new natural products as alternatives of synthetic drugs, especially in chronic diseases such as diabetes, neurologic and cardiovascular ones. In the present study, total phenols and flavonoids of four extracts from a plant of the Apiaceae family were quantified by folin-iocaltaeu and  $AlCl_3$  methods respectively. In addition, the antioxidant activities were studied by standard methods, DPPH and ABTS scavenging methods, Iron and copper reduction via FRAP, Phenanthroline and CUPRAC methods. On the other hand, anti-diabetic and anti-Alzheimer activities were tested via inhibition of  $\alpha$ -amylase and acetylcholinesterase respectively. Finally, the sun protective factor was determined for all studied extracts. Our results showed considerable levels of total phenols and flavonoids, especially for hydroalcoholic extract and ethyl acetate extract. In the antioxidant activity, the results showed significant activities for all tested extracts, particularly for ethyl acetate and hydroalcoholic extracts, which are comparable to the BHA and BHT in DPPH and ABTS scavenging methods. In addition, the studied extracts showed potent activities in CUPRAC, FRAP and Phenanthroline methods, the chloroform extract showed the best effect and all values were low when compared with the reference molecules BHA and BHT. At the same time, in enzymatic activity, extracts showed a moderate inhibition to  $\alpha$ -amylase, in dose-dependent manner. While the inhibition of acetylcholinesterase was important, especially for ethyl acetate and n-butanol extracts. Additionally, the studied extracts exhibited a high-protection against sunlight with high-level protection factors. Our results justify the Algerian traditional use of the studied plant, and enhance the biological and pharmacological effect of their extracts. They also opened multiple perspectives in the near future.

**Keywords:** Antioxidant, Apiaceae, oxidative stress, Alzheimer, T2DM

## **Résumé**

Les produits naturels tiennent une place majeure dans la médecine et alternative complémentaire Algérienne, en répondant aux différents besoins sanitaires. En effet, La communauté scientifique oriente ses travaux de recherche vers une valorisation adéquate des ressources naturelles, en caractérisant leurs effets pharmacologiques notamment avec l'apparition de l'intervention du stress oxydatif dans des variétés des maladies humaines lourdes dans les années récentes. Dans la présente étude, nous avons quantifier les phénols et les flavonoïdes totaux de quatre extraits d'une plante de la famille des apiaceae par les méthodes de folin- iocaltaeu et  $AlCl_3$  respectivement. En plus, nous avons caractérisé d'une part, l'activité antioxydante par des méthodes standards, le piégeage des radicaux DPPH et ABTS, la réduction des fer (FRAP et Phenanthroline) et du cuivre (CUPRAC). D'autres part, nous avons testé l'activité antidiabétique via l'inhibition de l' $\alpha$ -amylase et l'activité anti-Alzheimer via l'inhibition de l'acétylcholinestérase. Nous avons finalisé le travail par étude de l'activité protectrice des extraits vis-à-vis la lumière solaire. Nos résultats ont montré des niveaux considérables en phénols et flavonoïdes totaux notamment pour l'extrait hydro-alcoolique et l'extrait d'acétate d'éthyle. Concernant l'activité antioxydante, les résultats ont montré des activités importantes pour les quatre extraits testés particulièrement pour les deux extraits acétate d'éthyle et hydroalccolique qui sont comparables aux références BHA et BHT dans les méthodes de piégeage des radicaux DPPH et ABTS. En plus, les extraits étudiés ont présenté des activités variables dans les méthodes CUPRAC, FRAP et Phenanthroline, l'extrait chloroformique a présenté le meilleur effet et l'ensembles sont loin à être comparés avec les molécules de référence BHA et BHT. Parallèlement, L'activité inhibitrice des enzymes a montré que nos échantillons ont inhibé modérément l' $\alpha$  amylase, d'une manière dose-dépendante. Tandis que l'inhibition de l'acétylcholinestérase est importante notamment pour les extraits acétate d'éthyle et n-butanolique. En plus, les extraits étudiés ont donné une haute-rotection vis-à-vis la lumière solaire avec des facteurs de protectionde haute niveau. Nos résultats justifient l'usage traditionnel de la plante étudiée en Algérie, et valorise l'effet biologique et pharmacologique des extraits. Ils ouvrent également dans une future proche des perspectives multiples qui nous permettra sans doute d'enrichir le poids scientifique de ce travail.

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

# Sommaire

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

## *Synthèse bibliographique* *Chapitre01 : les métabolites secondaires*

1. Généralités.....	03
2. Description chimique.....	03
2.1 Les composés phénoliques.....	03
2.2 Les alcaloïdes .....	04
2.3 Les terpénoïdes.....	05
3. Propriétés pharmacologiques .....	05
4. Propriétés industrielles.....	05
5. La famille des <i>Apiaceae</i> .....	06
5.1 Généralités.....	06
5.2 Répartition géographique.....	06
5.3 Caractéristiques chimiques et pharmacologiques .....	07

## *Chapitre02 : le stress oxydatif*

1. Description générale .....	08
2. L'impact sur la santé humaine.....	08
3. Les antioxydants.....	08
3.1 Généralités.....	08
3.2 Classification des antioxydants .....	09
3.2.1 Les antioxydants naturels.....	09
3.2.2 Les antioxydants synthétiques.....	09
3.2.3 Les antioxydants endogènes.....	10
3.2.4 Les antioxydants exogènes.....	10
4. Les mécanismes d'action.....	10
4.1 Mécanismes d'action des radicaux libres.....	10
4.2 Mécanismes d'action des antioxydants.....	10
5. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydant.....	12
5.1 L'évaluation in vivo.....	12
5.2 L'évaluation in silico.....	12
5.3 L'évaluation in vitro.....	12
5.3.1 Piégeage du radical libre DPPH.....	12
5.3.2 L'activité de piégeage du radical ABTS.....	13
5.3.3 L'activité de réduction du complexe Cuivre-neocuproïne.....	13
5.3.4 Le pouvoir de réduction des ions de Fer (FRAP).....	14
5.3.5 Activité de réduction du complexe Fe <sup>+2</sup> -Phenanthroline.....	14

### *Chapitre 03 : les maladies chroniques*

1. Les maladies chroniques.....	15
2. Le Diabète.....	15
2.1 Généralités.....	15
2.2 Diabète type 01.....	15
2.3 Diabète type 02.....	15
2.4 Modalités de traitement.....	15
3. L'Alzheimer.....	16
3.1 Généralités.....	16
3.2 Modalités de traitement.....	16
4. Traitement par inhibition des enzymes.....	16
4.1 L' $\alpha$ -amylase.....	16
4.2 L'acétylcholinestérase.....	17

### *Chapitre 04 : Matériels et méthodes*

1. Collection du matériel végétal.....	18
2. Séchage et broyage.....	18
3. Extraction et fractionnement.....	18
4. Dosage des composés phénoliques.....	18
5. Dosage des flavonoïdes.....	18
6. Activité antioxydante.....	20
6.1. Piégeage du radical DPPH.....	20
6.2. Piégeage du radical ABTS.....	20
6.3. Activité de réduction du complexe $\text{Cu}^{+2}$ -Neocuproïne (CUPRAC).....	21
6.4. Activité du pouvoir réducteur (FRAP).....	21
6.5. Activité de réduction par formation du complexe $\text{Fe}^{+2}$ -Phenanthroline.....	22
7. Activité inhibitrice des enzymes.....	23
7.1. Activité antidiabétique via l'inhibition de l' $\alpha$ -amylase.....	23
7.2. Activité anti-Alzheimer via l'inhibition de l'acétylcholinestérase.....	24
8. Activité protectrice vis-à-vis les rayonnements solaires.....	24
9. Etude statistique.....	25

### *Chapitre 05 : Résultats et discussion*

1. Rendements d'extraction.....	26
2. Dosage des composés phénoliques.....	26
3. Dosage des flavonoïdes.....	26
4. Activité antioxydante.....	28
4.1. Activité de piégeage du radical libre DPPH.....	28
4.2. Activité de piégeage du radical libre ABTS.....	29
4.3. Activité de réduction du complexe cuivre-Neocuproïne (CUPRAC).....	32
4.4. Activité de pouvoir réducteur (FRAP).....	33
4.5. Activité de réduction du complexe $\text{Fe}^{+2}$ -Phenanthroline.....	34
5. Activité inhibitrice des enzymes.....	38
5.1. L'activité antidiabétique via l'inhibition de l' $\alpha$ -amylase.....	38
5.2. L'activité anti-Alzheimer via l'inhibition de l'acétylcholinestérase.....	39
6. L'activité protectrice vis-à-vis la lumière solaire.....	41

## *Conclusion générale et perspectives*

1. Conclusion générale.....	42
2. Perspectives.....	43

## *Annexes*

1. Lecteur des microplaques
2. Organisation du microplaque
3. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique
4. Courbe d'étalonnage de Quercétine

# ***Introduction générale***

# *Introduction générale*

De nos jours, des milliers de maladies de différentes catégories viennent à s'installer dans la communauté en engendrant des impacts socioéconomiques lourds. Le cancer, le diabète, les maladies cardiovasculaires et neurologiques occupent l'attention primordiale de la communauté scientifique et orientent les regards vers les modalités de traitements disponibles dans les pratiques médicales actuelles.

L'analyse profonde des étiologies de différentes maladies nous a permis de concentrer la lumière sur une notion fondamentale, le stress oxydatif. Il représente un modèle d'agression des biomolécules et d'organites cellulaires aboutissant à divers troubles fonctionnels aux niveaux moléculaire, cellulaire et organique. Actuellement, Il est bien admis que même si le stress oxydatif n'est pas une maladie en soi, il est potentiellement impliqué dans de nombreuses maladies, comme facteur déclenchant ou associé, à des complications parfois lourdes plus particulièrement le diabète et l'Alzheimer. Le diabète est un problème majeur de santé publique au cours de ces dernières décennies. On estime actuellement qu'il touche 371 millions de personnes dans le monde, 34 millions de personnes en Afrique du nord et moyen orient et 15 millions en Afrique selon la fédération internationale du diabète (IDF). Cette maladie métabolique chronique recouvre différents types, mais celui de type 2 le plus fréquent et représente environ 90% des cas de diabète [1, 2]. En plus, La maladie d'Alzheimer représente 60 à 70% des cas de déficience cognitive progressive chez les patients âgés. La prévalence de la MA double tous les 5 ans après l'âge de 60 ans. Elle nécessite des stratégies thérapeutiques particulières qui sont parfois insupportables [3].

Le monde des produits naturels fournit des alternatives médicales ayant des propriétés pharmacologiques indiscutables. Leurs disponibilités, modalités d'application et sécurité stimulent les malades, les praticiens de santé et les chercheurs à valoriser, sur une base scientifique, les vertus thérapeutiques des composants de la nature, et de faire profiter de ses propriétés dans l'amélioration de la pratique médicale. Plusieurs pays d'Afrique y compris l'Algérie mènent des investigations visant à développer des médicaments à partir des plantes utilisées en médecine traditionnelle, en réalisant des études phytochimiques, pharmacotoxicologiques et cliniques approfondies pour la mise au point de médicaments d'origine naturel de haute qualité [4].

Dans ce travail, nous avons sélectionné une plante de la famille des *Apiaceae* pour faire :

- L'extraction des principes actifs avec un fractionnement de l'extrait brut en trois fractions, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le n-butanol.
- Un dosage des métabolites secondaires existant dans les différentes fractions
- Etudier l'activité antioxydante, par différentes méthodes, piégeage du radical libre DPPH, Piégeage du radical ABTS, Activité de réduction du complexe Cu<sup>+2</sup>-Neocuproïne (CUPRAC), Activité du pouvoir réducteur (FRAP), Activité de réduction par formation du complexe Fe<sup>+2</sup>-Phenanthroline,
- Etudier l'activité inhibitrice des enzymes particulières, Activité antidiabétique via l'inhibition de l' $\alpha$ -amylase et Activité anti-Alzheimer via l'inhibition de l'acétylcholinestérase pour les fractions sélectionnées

Pour ce faire, nous avons subdivisé ce manuscrit en trois parties. La première consiste en une synthèse bibliographique traitant les produits naturels et leurs propriétés pharmacologiques, ainsi que les mécanismes physiologiques et les stratégies thérapeutiques. Dans la deuxième partie, nous avons évoqué l'aspect technique et méthodologique des différentes activités étudiées, *in vitro*. La troisième partie est consacrée au côté expérimental dans laquelle nous avons présenté les résultats obtenus avec une discussion générale. Le travail est clôturé par une conclusion et des perspectives.

# ***Chapitre 01***

## ***Métabolites secondaires***

## 1. Généralités

Les métabolites secondaires sont des molécules qui ne participent pas à la production d'énergie mais s'insèrent généralement dans le système d'interactions entre les plantes et leur environnement. D'une part, les pigments et les arômes (flavonoïdes, caroténoïdes, terpénoïdes...) sont souvent très impliqués dans des relations à bénéfices réciproques établies entre plantes et animaux (pollinisation, dissémination des semences...). D'autre part, la plupart de ces molécules sont biologiquement actives. Les propriétés de ces molécules sont très souvent exploitées dans le cadre des médecines traditionnelles, mais également dans la médecine allopathique moderne à travers l'usage de molécules purifiées ou issues d'hémisynthèses chimiques [5-6]. Les métabolites secondaires sont généralement classés en trois groupes, les composés phénoliques, les alcaloïdes et les terpènes.

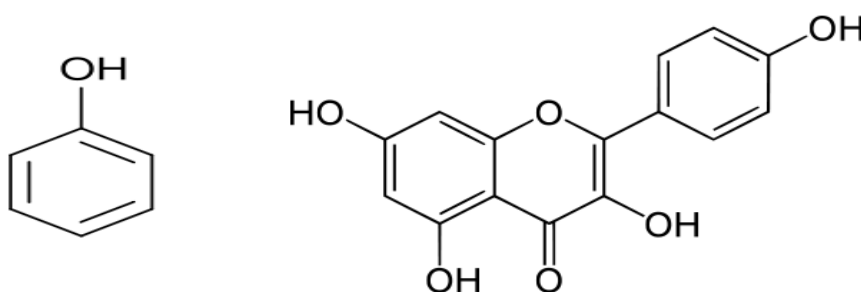
## 2. Description chimique

### 2.1. Les composés phénoliques

Les polyphénols ou les composés phénoliques sont des métabolites secondaires lourds, largement distribués dans le règne végétal. Ils sont des molécules aromatiques constituées d'au moins d'une partie phénolique dans leur structure. Dans cette famille moléculaire, nous citons les acides phénoliques (C6-C1), les acétophénones (C6-C2), les acides phénylacétiques (C6-C2), les acides hydroxy-cinnamiques (C6-C3), les coumarines (C6-C3), les naphthoquinones (C6-C4), les xanthones (C6-C1-C6), les stilbènes (C6-C2-C6) et les flavonoïdes (C6-C3-C6) La plupart de ces composés phénoliques dérivent d'acides aminés aromatiques : la tyrosine et la phénylalanine. [7-8]

Les composés phénoliques sont issus de deux voies biogénétiques différentes

- Voie de l'acide shikimique : acide cinnamique, acide benzénique, coumarines, lignanes...
- Voie de l'acide acétique (polyacétate): chromones, quinones...
- Il y a des composés d'origines mixtes telle que : les flavonoïdes, les tanins



**Fig. 01** : Structure du phénol et d'un polyphénol (kaempférol)

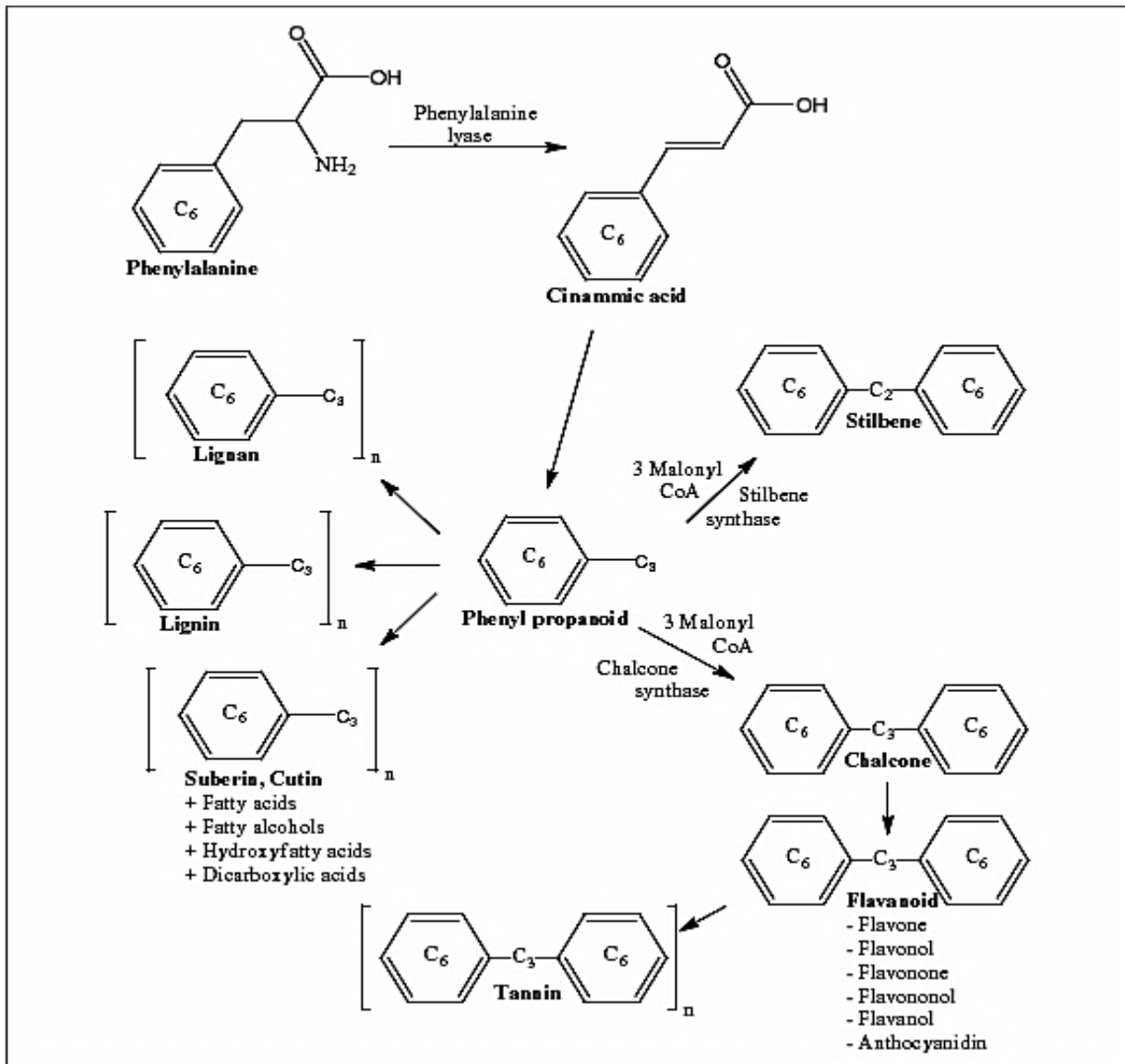


Fig. 02 : les voies de biosynthèse des composés phénoliques

## 2.2. Les alcaloïdes

Ce sont des composés organiques, hétérocycliques contenant de l'azote, d'origine végétale. Elles ont un rôle vital dans la physiologie humaine, toxique ou thérapeutique, Tels que la morphine, la nicotine, la cocaïne et la quinine. Les principaux précurseurs de biosynthèse sont des acides aminés simples comme la tyrosine (Tyr), le tryptophane (Trp), l'arginine (Arg) ou la lysine (Lys). Elles sont stockées dans les cellules végétales au niveau des vacuoles et possèdent de nombreuses propriétés médicales. [7]

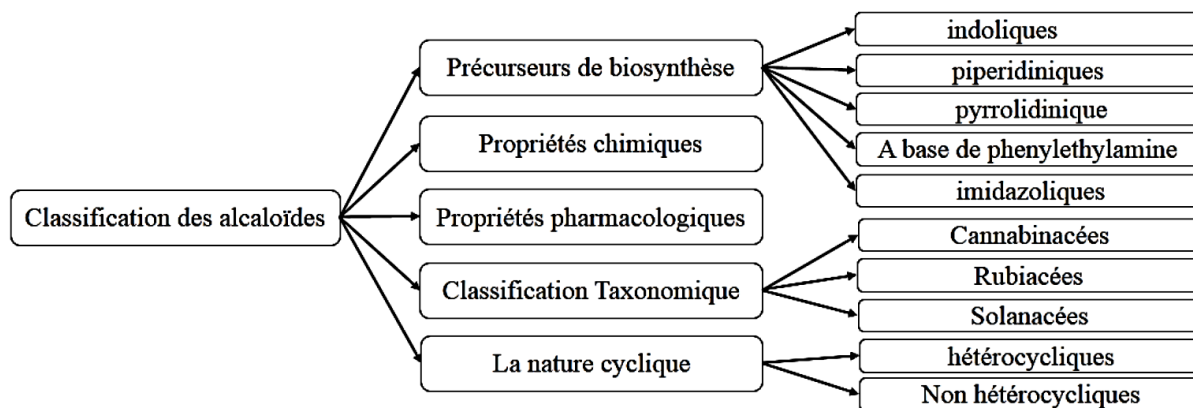


Fig. 03 : Classification des alcaloïdes selon différents critères.

### 2.3. Les terpénoïdes

Les terpénoïdes, ou également appelés isoprénoïdes, est une famille de composés chimiques très vaste qui se caractérisent par un squelette dérivé de l'isoprène. en fonction du nombre de carbones de son squelette, donc en fonction du nombre de molécules d'isoprène nécessaires à leur synthèse, on distingue, les hémiterpènes (C5), les monoterpènes (C10), les sesquiterpènes (C15), les diterpènes (C20), les triterpènes (C30), les caroténoïdes (C40), les polyterpénoïdes pour les composés possédant un nombre plus important d'unité isoprène. Ils ont une grande importance à l'échelle industrielle, agroalimentaire et pharmaceutique [7-8]

### 3. Propriétés pharmacologiques

**Les produits naturels présentent** des activités pharmacologiques très intéressantes et très variées. Les terpénoïdes peuvent être des Antiseptiques, Anti-inflammatoires, Antibactériens, Anxiolytiques, Antidépresseurs et Bronchodilatateurs [3-9]. Plusieurs médicaments utilisés actuellement sont des alcaloïdes naturels, notamment ceux du système nerveux comme les dépresseurs (morphine et scopolamine), les stimulant (caféine, strychnine). Ils améliorent la circulation sanguine cérébrale (vincamine) et agissent en tant que Curarisants, anesthésiques locaux, anti-fibrillants, anti-tumoraux, antipaludique et amoebicides [10]. En plus, les composés phénoliques présentent un intérêt thérapeutique très large, Les propriétés antiseptiques urinaires, anti-inflammatoires, antibactériennes et antifongiques et autres sont fréquemment rapportés[10].

### 4. Propriétés industrielles

Les produits naturels sont largement utilisés dans les différents secteurs industriels. Grace à leurs propriétés pharmacologiques, plusieurs spécialités pharmaceutiques a base ingrédients naturels ont été fabriqués dans les différentes formes galéniques (gélules, aérosols, suppositoires, pommades, ...etc.) [11]. En agroalimentaires, ils sont utilisés en tant que produits

naturels aromatisant pour améliorer les caractéristiques organoleptiques et la conservation des aliments [12]. Dans l'industrie cosmétique, ces huiles naturelles sont considérées comme des parfums dans les produits de Beauté (les crèmes, les savons, les parfums, les shampoings ...etc.) [13]. Récemment, ces caractéristiques dissolvantes (propriétés physiques et thermodynamiques) ont permis de remplacer les solvants à base de pétrole et ouvert, ainsi, une grande fenêtre dans l'industrie verte [14].

## 5. La famille des *Apiaceae*

### 5.1. Généralités

Une famille créée par Antoine Laurent de Jussieu en 1789 sous le nom d'*Umbelliferae*, puis nommée *Apiacées* par John Lindley en 1836 [15]. Selon la classification classique d'Arthur Cronquist, basée sur des caractères morphoanatomiques et chimiques, la famille appartient à la division des *Magnoliophyta* (encore appelées Angiospermes ou plantes à fleurs) [16-17]. En effet, d'autres auteurs classiques tels que Thorne, Dahlgren ou encore Takhtajan, la placent au sein des *Araliales* en raison de caractères morphologiques proches de la famille des *Araliacées*. [18]

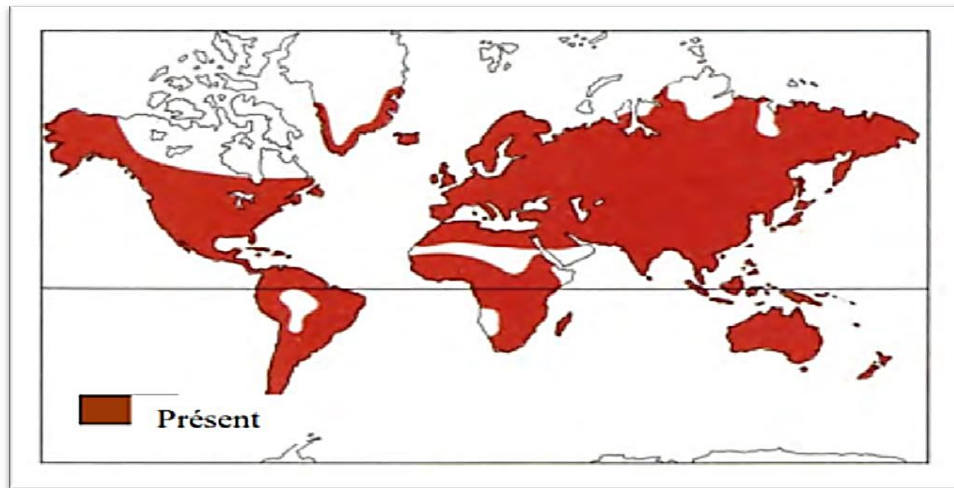
Selon les travaux de Drude, les *Apiacées* sont organisés en 3 sous-familles selon les caractères morphologiques du fruit : les *Apioideae* (sous-famille la plus vaste), les *Hydrocotyloideae* et les *Saniculoideae*. [19].

### 5.2. Répartition géographique

Cette famille rassemble 446 genres et environ 3500 espèces cosmopolites, elle est particulièrement localisée dans les régions tempérées de l'hémisphère nord et des montagnes tropicales [15]. Les genres se répartissent entre les continents, avec une prédominance pour le continent asiatique. La famille des *Apiacées* occupe une place importante dans la flore algérienne où elle est représentée par 56 genres, 130 espèces (dont 24 endémiques) et 26 sous espèces [20]

**Tableau 01 : distribution géographique des genres de la famille des *Apiaceae***

Continent	Genres	Endémiques
Afrique	126	50
Amérique	197	52
Asie	265	159
Australie	36	11
Europe	139	29



**Fig. 04 :** Répartition géographique mondiale des Apiacées [21]

### 5.3. Caractéristiques chimiques et pharmacologiques

La famille des Apiacées se caractérise par une grande diversité en métabolites secondaires et notamment par leurs coumarines et huiles essentielles. Ces dernières sont riches en dérivés phénylpropaniques tels que l'anéthole (*Pimpinella anisum*), l'apiole (*Apium petroselinum*) et la foeniculine (*Foeniculum vulgare*) et en terpènes comme le  $\beta$  caryophyllène, le limonène ou la carvone [20].

La variété moléculaire qu'elle contient lui confère plusieurs applications dans la médecine populaire traditionnelle ou dans la médecine moderne. Certaines espèces ont été utilisées comme toniques, diurétiques, stimulants cardiovasculaires, etc. D'autres pour ses propriétés antibactériennes, hépato-protectrices, vasorelaxantes et anti-tumorales. Autres propriétés anti-oxydantes, anti tumorales et antiinflammatoires ont été rapportées [22].

# ***Chapitre 02***

## ***Le stress oxydatif***

## 1. Description générale

L'oxygène est une molécule essentielle pour la production d'énergie dans la cellule vivante, mais il peut, dans certains cas, être néfaste sur la matière vivante par la formation de radicaux libres et d'espèces réactives oxygénées (ROS). Gershman et Hartmann ont mentionné au milieu des années 1950 la toxicité de l'oxygène et la théorie des radicaux libres pour expliquer le processus de vieillissement. [23]

Le stress oxydatif correspond à un déséquilibre entre la production d'espèces réactives oxygénées et les défenses antioxydants de l'organisme en faveur de la production. L'environnement qui nous entoure, le mode de vie (nutrition, additifs alimentaires, le stress psychique et physique, tabagisme, alcool, pollution ...). Participent directement ou indirectement dans la production d'espèces réactives de l'oxygène et par conséquent, plusieurs maladies liées au vieillissement apparaissent, comme le cancer, le diabète et les maladies cardiovasculaires [24]

## 2. L'impact sur la santé humaine

Le stress oxydatif provoque des dommages oxydatifs à tous les composants cellulaires. Il dégrade les macromolécules comme les lipides, les protéines et participe à l'apparition de nombreuses maladies telles que le cancer, la cataracte, la sclérose latérale amyotrophique, le syndrome de détresse respiratoire aiguë, l'œdème pulmonaire et le vieillissement accéléré. En plus, une relation étroite entre le cancer et le stress oxydatif a été rapportée actuellement, les radicaux libres activent les cancérogènes en conduisant à des lésions de l'ADN, ils amplifient les signaux prolifération et inhibent les antioncogènes. Le stress oxydatif est un des facteurs potentialisant la genèse de maladies plurifactorielles telles le diabète, la maladie d'Alzheimer les rhumatismes et les maladies cardio-vasculaires. [25]

## 3. Les antioxydants

### 3.1. Généralités

Les professionnels de la santé accordent un grand intérêt à l'utilisation des antioxydants dans les domaines biologiques, médicaux, nutritionnels et agrochimiques [9]. Les antioxydants constituent un réseau équilibré des molécules et des enzymes endogènes et exogènes, pouvant empêcher ou retarder l'oxydation de la matière vivante dans une situation de stress oxydatif [27], et par conséquent, la prévention des différentes maladies [28]. Les antioxydants peuvent être classés selon leurs modes d'actions : systèmes enzymatiques, inhibiteurs d'enzymes oxydantes, chélateurs de métaux et piègeurs de radicaux libres. [23-29]

### 3.2. Classification des antioxydants

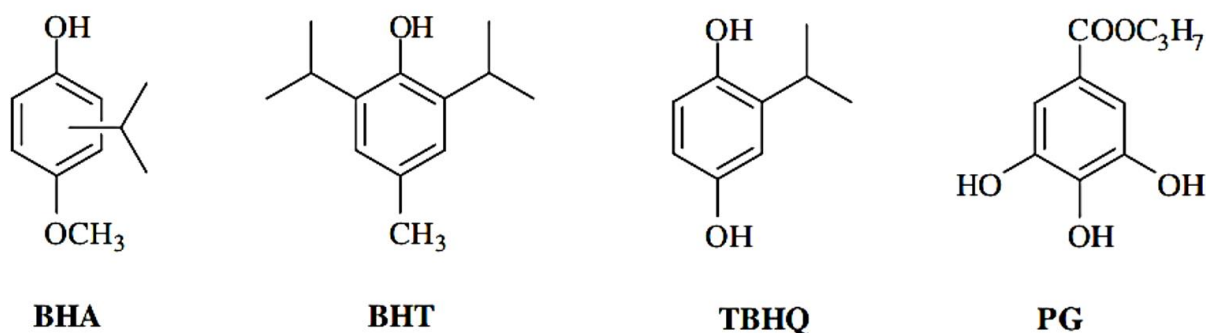
#### 3.2.1. Les antioxydants naturels

Ce sont des substances, d'origine naturelle notamment végétale. Les plantes médicinales regroupent les principaux antioxydants naturels tels que l'acide ascorbique, les caroténoïdes, le glutathion et le tocophérol, mais les polyphénols restent les molécules antioxydantes de choix [27]. Ils regroupent les acides phénoliques (acide gallique et caféique), les terpènes phénoliques (Carnosol et acide Carnosique), les flavonoïdes (Quercétine et Catéchine) et les huiles volatiles (Eugénol, Carvacrol, Thymol et Menthol) [30].

L'alimentation nous apporte des antioxydants puissants, dont les plus importants sont la vitamine E, vitamine C, vitamine A et les oligoéléments comme le fer, sélénium, zinc, magnésium et cuivre [31].

#### 3.2.2. Les antioxydants synthétiques

La synthèse des antioxydants par voie industrielle donne une grande variété d'antioxydants synthétiques tels que le BHA (hydroxyanisole butylé), le BHT (hydroxytoluène butylé), le PG (gallate propylé), le TBHQ (tertiobutylhydroquinones) et les agents chélateurs de métaux comme l'EDTA. Ces éléments synthétiques agissent seuls, ou en combinaison, pour assurer une bonne conservation des aliments [32]. Récemment, il a été prouvé que ces agents synthétiques présentent des propriétés cancérigènes et/ou cytotoxiques ; ce qui a provoqué une limitation de leur utilisation par des règles législatives [33] et orienté la recherche vers des antioxydants issus de produits naturels représentant une alternative bénéfique pour les systèmes biologiques.



**Fig.01** : Les structures chimiques des principaux antioxydants d'origine synthétique

### 3.2.3. Les antioxydants endogènes

L'organisme développe ses propres mécanismes de défense contre le stress oxydatif, en utilisant une multitude d'antioxydants protéiques et non protéiques. La ligne de défense enzymatique regroupe principalement le superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPX), la Glutathion réductase (GR). En plus, des molécules de faibles poids moléculaires (glutathion, ubiquinones et histidine), les oligoéléments (sélénium, cuivre, zinc et manganèse) et des protéines (les transferrines, les thiols et l'albumine), la bilirubine et l'acide urique sont également impliquées [34- 35-36]

### 3.2.4. Les antioxydants exogènes

Cette catégorie des antioxydants regroupe les molécules qui ne sont pas produites par l'organisme mais qui viennent des sources diététiques ou synthétisés dans des laboratoires tels que les composés phénoliques d'origine synthétique (BHT, EDTA), les vitamines (C et E), plusieurs extraits de plantes riches en composés phénoliques (composés phénoliques) et certains épices (romarin, thym et thé). [34]

## 4. Les mécanismes d'action

### 4.1. Mécanismes d'action des radicaux libres

Que ce soit dans des situations physiologiques ou pathologiques, la production excessive des radicaux libres participe par différents mécanismes dans la formulation des maladies. Ils déclenchent la peroxydation des lipides et des lipo-protéines pouvant aboutir à la destruction cellulaire [27]. Parallèlement, les macromolécules ayant des régions électro-déficientes sont susceptibles d'être attaquées par les radicaux libres de haute énergie [30], Ce qui se traduit par des déformations structurales et par conséquent fonctionnelles des systèmes cellulaires avec un déclenchement immédiat de transformations malignes [37]. Elles modulent la transduction du signal cellulaire et agissent directement par la modification des bases de l'ADN et la rupture des liaisons ADN-ADN ou ADN-Protéine [31].

### 4.2. Mécanismes d'action des antioxydants

Les antioxydants naturels et synthétiques agissent par plusieurs mécanismes en fonction de leurs caractéristiques chimiques (le potentiel redox, l'énergie d'activation, la solubilité, ...etc.) et l'emplacement physique dans la protection de la matière vivante [30]. Plusieurs travaux regroupent les principaux mécanismes dans les éléments suivants :

- Barrière physique pour empêcher la génération des « ROS » ou l'accès des « ROS » aux sites biologiques importants.
- Piégeurs chimiques qui absorbent l'énergie des électrons.
- Des systèmes catalytiques qui neutralisent les « ROS ».
- Chélation des ions métalliques pour empêcher la génération des « ROS ».
- La réduction de la concentration localisée en O<sub>2</sub>.
- Balayage des espèces qui déclenchent la peroxydation.
- Inhibiteurs interrompant la propagation de l'auto-oxydation en chaînes.
- La synergie avec des substances non antioxydantes.
- Inhibiteurs des enzymes pro-oxydatives.
- Renforcent l'activité des enzymes antioxydantes.

Au niveau des produits naturels, les composés phénoliques notamment les flavonoïdes, agissent généralement par piégeage des radicaux libres (OH•) et la chélation des métaux, dont l'activité dépend du nombre et de l'emplacement des groupements hydroxyles sur le squelette carbonique [33].

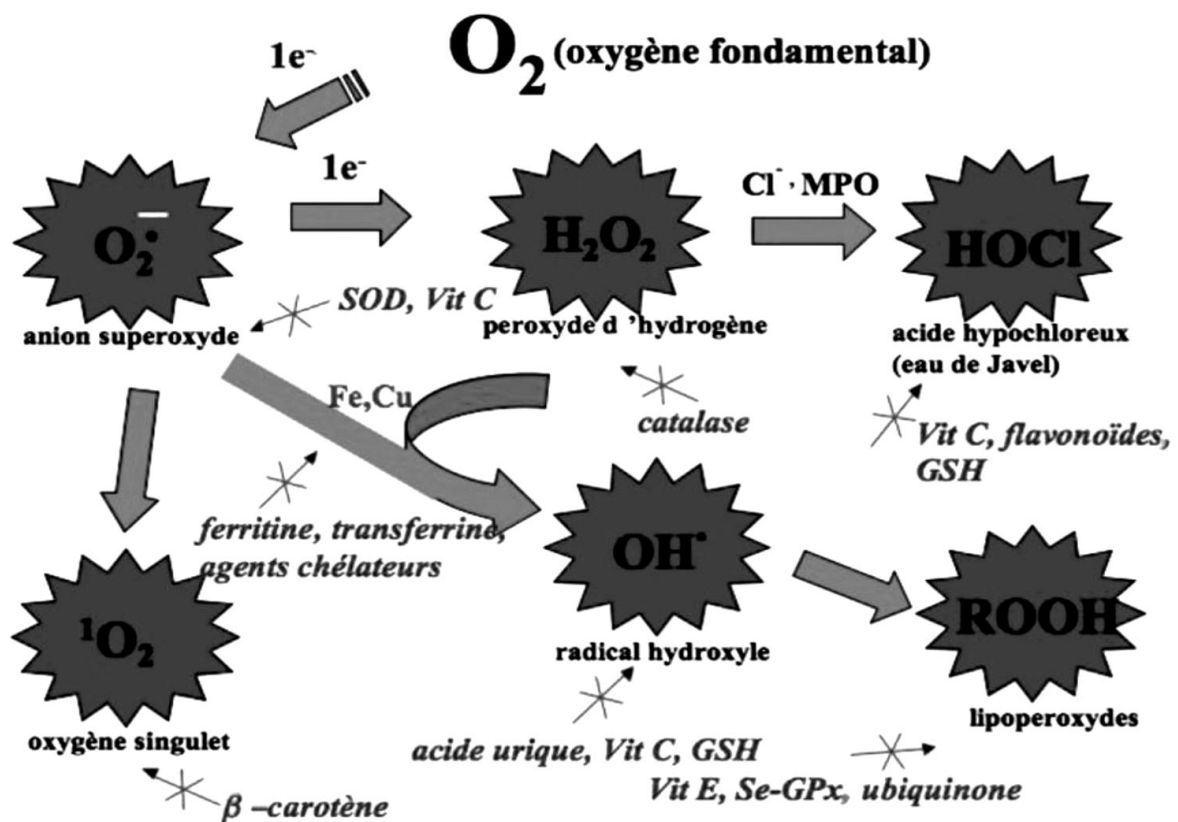


Fig.02 : Aperçu des différentes (ROS) et des antioxydants régulateurs de leur production

## 5. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

### 5.1.L'évaluation *in vivo*

L'évaluation de l'activité antioxydante peut être réalisée sur un modèle de l'expérimentation animal notamment les souris, les rats et les lapins. Elle exige des conditions d'élevage et de manipulation strictes mais c'est une évaluation de choix qui garde le fond scientifique et la qualité de l'expérimentation [35]

### 5.2.L'évaluation *in silico*

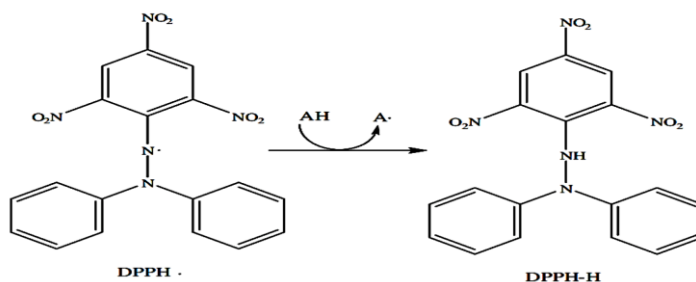
Le développement des outils de bio-informatique offre aux chercheurs une grande opportunité pour développer des nouvelles molécules d'intérêts thérapeutiques ou commerciales. Les études menées *in silico* donnent un aperçu des propriétés physiques et chimiques associées à l'activité antioxydante au niveau moléculaire. Des modèles ont été développés pour construire des molécules prédictives et séparer les liaisons actives et inactives. Les outils *in Silico* nécessitent toujours une validation *in vitro* et *in vivo* [26].

### 5.3.L'évaluation *in vitro*

Nous détaillons dans cette partie les activités qui sont réalisées dans le cadre pratique de ce travail

#### 5.3.1. Piégeage du radical libre DPPH

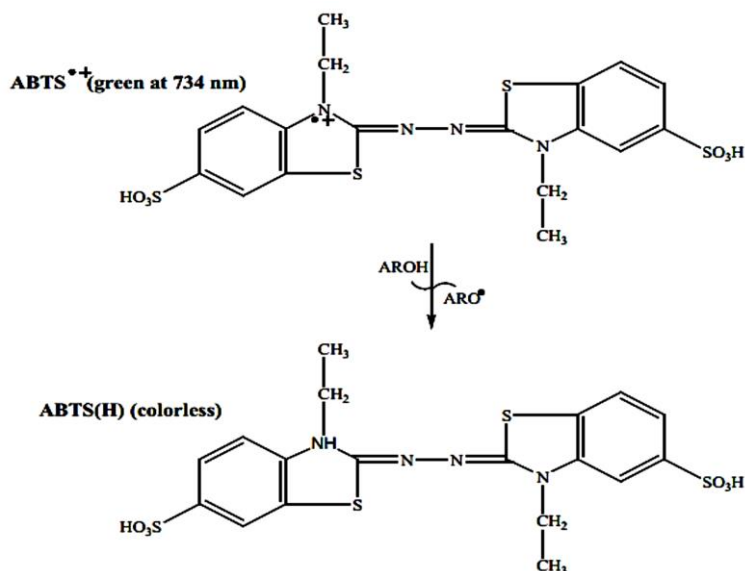
Méthode, classique, détaillée pour la première fois, en 1958. Elle permet d'évaluer le pouvoir de piégeage d'un radical DPPH (1,1- diphenyl-2-picrylhydrazyl) stable grâce à sa délocalisation électronique qui lui donne une couleur violette, avec une bande d'absorption caractéristique  $\lambda$  max autour de 520 nm [38]. La réduction de la forme radicalaire se traduit par une diminution de l'absorbance accompagnée d'une perte de la couleur violette. C'est une méthode fréquente, simple et précise. Elle permet l'évaluation de l'activité des substances hydrophiles et lipophiles, sans l'utilisation d'agents stabilisants [27].



**Fig.03** : Schéma réactionnel de piégeage de DPPH par un antioxydant

### 5.3.2. L'activité de piégeage du radical ABTS

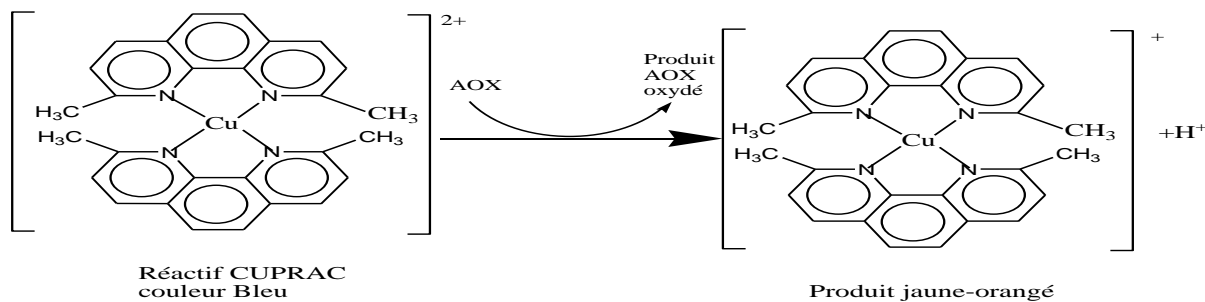
C'est une méthode récente développée par Miller et ses collaborateurs en 1993. Elle permet d'évaluer le pouvoir réducteur d'un radical ABTS (+) produit par l'oxydation enzymatique (peroxydase) ou chimique (dioxyde de manganèse, sulfate de potassium) de l'ABTS [39]. La méthode permet de surveiller la diminution de l'absorbance de l'ABTS (+). Ce chromogène absorbe dans une gamme caractéristique de 600 à 750 nm.



**Fig.04** : Schéma réactionnel de piégeage d'ABTS (+) par un antioxydant

### 5.3.3. L'activité de réduction du complexe Cuivre-neocuproïne

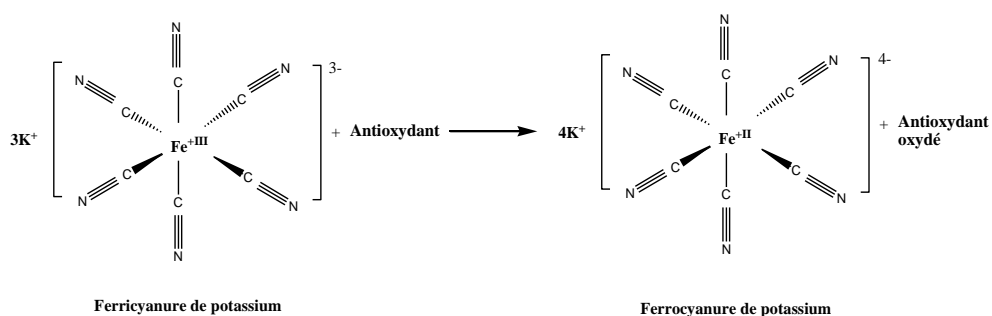
La méthode CUPRAC est basée sur la mesure l'absorbance du complexe cuivre- néocuproïne [Cu<sup>2+</sup>-Nc<sub>2</sub>] formé en raison de la réaction redox entre un antioxydant et le complexe cuivre- néocuproïne. En effet, en présence d'un agent antioxydant, le complexe cuivre- néocuproïne est réduit produisant ainsi un complexe chromogène de Cu<sup>+</sup>-Nc, cette réaction est quantifiée à une longueur d'onde de 450 nm [40].



**Fig.05** : Réduction du complexe chromogène de Cu<sup>2+</sup>-Nc<sub>2</sub>

### 5.3.4. Le pouvoir de réduction des ions de Fer (FRAP)

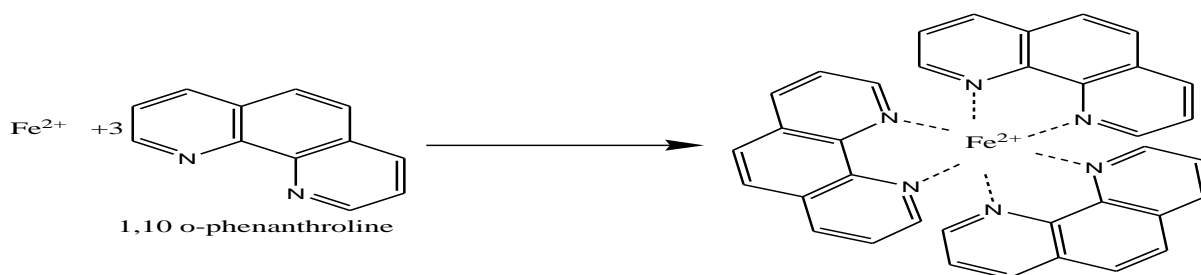
Le test FRAP est un dosage colorimétrique du transfert d'électrons, basée sur l'aptitude des extraits testés à réduire le fer ferrique ( $\text{Fe}^{+3}$ ) présent dans le ferricyanure de potassium ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) en fer ferreux ( $\text{Fe}^{+2}$ ) et la formation de ferrocyanure de potassium ( $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ). Ceci se traduit par le virage de la couleur jaune du ferricyanure de potassium vers une couleur bleue/verte dont l'intensité dépend du pouvoir réducteur de l'antioxydant. L'absorbance du milieu réactionnel est mesurée à 700 nm. [41]



**Fig.06 :** Mécanisme réactionnel du test FRAP.

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

Cette technique est basée sur la formation du complexe  $\text{Fe}^{+2}$ -phénanthroline rouge-orangé suite à une réaction d'oxydoréduction. Ce complexe est soluble à pH basique et peut être mesuré à une absorbance de 510 nm [42].



**Fig.07 :** Formation du complexe  $\text{Fe}^{+2}$ -phénanthroline.

# ***Chapitre 03***

## ***Les maladies chroniques***

## **1. Les maladies chroniques**

L'OMS a défini les maladies chroniques comme des affections de nature physique ou psychique de longue durée et évolutives, avec un retentissement majeur sur la vie quotidienne du patient, responsable à plus de 63% des décès. Différentes formes des maladies chroniques peuvent être rencontrées de gravité variable. Dans cette partie du travail, on a sélectionné deux maladies d'actualité, le diabète et l'Alzheimer.

## **2. Le Diabète**

### **2.1. Généralités**

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS) en 1999, Le diabète est une maladie métabolique dans laquelle l'organisme vivant ne peut pas gérer l'utilisation, le stockage et la néo-génèse du glucose, ce qui se traduit par une hyperglycémie. Généralement le problème est lié principalement à l'insuline, soit par manque de production pancréatique ou par une inefficacité sur les cibles biologiques.

### **2.2. Diabète type 01**

C'est une forme de diabète insulino-déficiente, dans laquelle l'organisme vivant n'est pas capable à produire l'insuline grâce à une mal fonction pancréatique. Cette déficience peut être, d'une part, liés au maladie auto-immune et d'un autre part par évolution du diabète de type 2 (DT2). [43]

### **2.3. Diabète type 02**

C'est forme de diabète insulino-dépendante, dans laquelle l'organisme diabétique produit l'insuline mais avec des quantités insuffisantes. Cette forme peut être évoluée chronologiquement vers le diabète de type 01. [44]

### **2.4. Modalités de traitement**

Le diabète type 1 (DT1) est non insulino-dépendant, donc l'insuline est généralement le traitement de premier ordre. Il peut être accompagné à d'autres médicaments selon l'état du patient. Le traitement du diabète de type 2 (DT2) peut désormais faire appel à une grande variété de médicaments anti hyperglycémifiants, et de nombreux progrès ont été réalisés dans la pharmacothérapie du DT2 au cours des dernières années. Néanmoins, dans toutes les recommandations, la metformine est proposée comme premier choix. Par contre, en cas d'échec de monothérapie, diverses solutions peuvent être considérées. Parmi les antidiabétiques oraux (ADOs), les inhibiteurs des  $\alpha$ -amylase et  $\alpha$ -glucosides (acarbose, miglitol). [45]

### 3. L'Alzheimer

#### 3.1. Généralités

Le terme maladie d'Alzheimer (MA) correspond à un syndrome aux déterminismes physiopathologiques encore incertains et complexes mais pour lequel il est désormais clair que l'avancée en âge est un facteur de risque majeur, 60 à 70% des cas de déficience cognitive progressive chez les patients âgés, et que les processus pathogènes entraînent l'installation progressive de dysfonctionnements et/ou de lésions qui restent totalement asymptomatiques pendant de longues années ; ces anomalies se situeraient alors principalement dans des territoires corticaux de la région temporale interne, plus précisément le cortex entorhinal et transentorhinal [46-47].

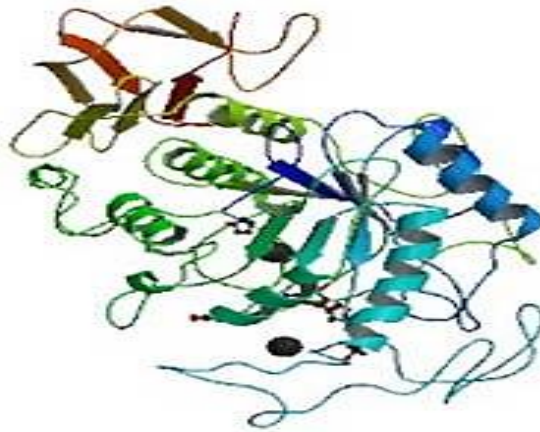
#### 3.2. Modalités de traitement

Les traitements de la MA comprennent les inhibiteurs du cholinestérase, Traitements pathogènes, agents psychotropes, et les interventions psychosociales. Les stratégies thérapeutiques peuvent être également changés au cours de la maladie. Les inhibiteurs du cholinestérase sont les seuls médicaments approuvés par « Food and Drug Administration » des États-Unis comme traitement de la MA. Des preuves suffisantes se sont accumulées pour que celles-ci soient recommandées comme traitement standard de cette maladie. Quatre inhibiteurs sont actuellement disponibles : la tacrine, le donépézil, la rivastigmine et la galanthamine. Les données épidémiologiques suggèrent que les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les traitements hormonaux, les antihistaminiques H<sub>2</sub>, les antihypertenseurs et les statines peuvent diminuer la probabilité de développer la MA. Parallèlement, Les médicaments psychotropes jouent un rôle essentiel dans la gestion des troubles du comportement des patients [47].

### 4. Traitement par inhibition des enzymes

#### 4.1. L' $\alpha$ -amylase

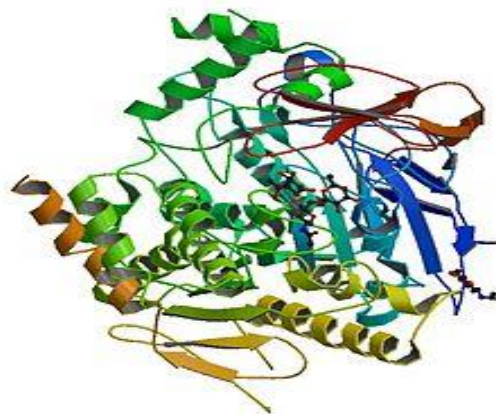
L' $\alpha$ -amylase (E.C.3.2.1.1) est une enzyme hydrolase qui catalyse l'hydrolyse des liaisons  $\alpha$ -1, 4-glycosidiques internes dans l'amidon pour donner des produits comme le glucose et le maltose. C'est un métallo enzyme calcique c'est-à-dire qu'elle dépend de la présence d'un cofacteur métallique pour son activité. La composition d'hydrolysats obtenue après hydrolyse de l'amidon est fortement dépendante de l'effet de la température, des conditions d'hydrolyse et de l'origine de l'enzyme. On trouve que le pH optimal pour l'activité est de 7,0. L' $\alpha$ -amylase est devenue une enzyme d'une importance cruciale dans la réduction de la glycémie postprandiale chez personnes diabétiques de type 2. [48]



**Fig.01 :** Structure de l' $\alpha$ -amylase en chaînes  $\alpha$  et feuilles  $\beta$

#### 4.2. L'acétylcholinestérase

AChE appartient à une grande famille de protéines. En plus de leur rôle classique dans la transmission cholinergique, les ChE sont impliquées dans la prolifération cellulaire, la différenciation, les réponses à diverses insultes dont le stress et la formation d'amyloïdes. L'AChE présente certaines caractéristiques que l'on ne retrouve dans aucune autre enzyme, telles que l'organisation du site actif et le mécanisme catalytique. De nombreuses études ont montré des variations de l'activité de l'AChE et de ses formes moléculaires dans les tissus impliqués dans la MA. Un bon nombre de ces études ont examiné la possibilité que des changements dans la distribution des isoformes de l'AChE puissent représenter un marqueur biochimique de la MA. [49]



**Fig.02 :** Structure de l'Ache en chaînes  $\alpha$  et feuilles

# ***Chapitre 04***

## ***Matériels et méthodes***

### **1. Collection du matériel végétal**

La plante a été collectée dans la période d'avril 2019 de la région El Kala, (skikda) le nord-est de l'Algérie. Elle a été identifiée par Dr. MENNAI imad, maître de conférence, département de chimie, université frères Mentouri, Constantine.

### **2. Séchage et broyage**

Après la collection, la totalité de la partie aérienne (tiges, feuilles et fleurs) a été séchée dans un endroit sec à l'abri de la lumière et la chaleur pendant deux semaines. Ensuite, la partie aérienne a été broyée à l'aide d'un mixeur afin d'obtenir des particules fines. Un spécimen d'herbier a été archivé à l'Herbarium du centre de recherche en biotechnologie.

### **3. Extraction et fractionnement**

Pour l'extraction des principes actifs, une masse de 216 g de la matière sèche de la plante étudiée a été macérée dans une solution hydro-alcoolique méthanol-eau (70/30) pendant 48 heures avec une répétition de trois fois en renouvelant le solvant. L'extrait obtenu a été filtré à l'aide du papier filtre (n°4) et séché par un Rotavapor (35°C / 130 mbar).

L'extrait brut obtenu a été dilué dans l'eau distillée (400ml/1kg) sous agitation magnétique pendant une nuit, et fractionné par extraction liquide-liquide en utilisant 3 solvants de polarité croissante, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le n-butanol. Schéma 01

### **4. Dosage des composés phénoliques**

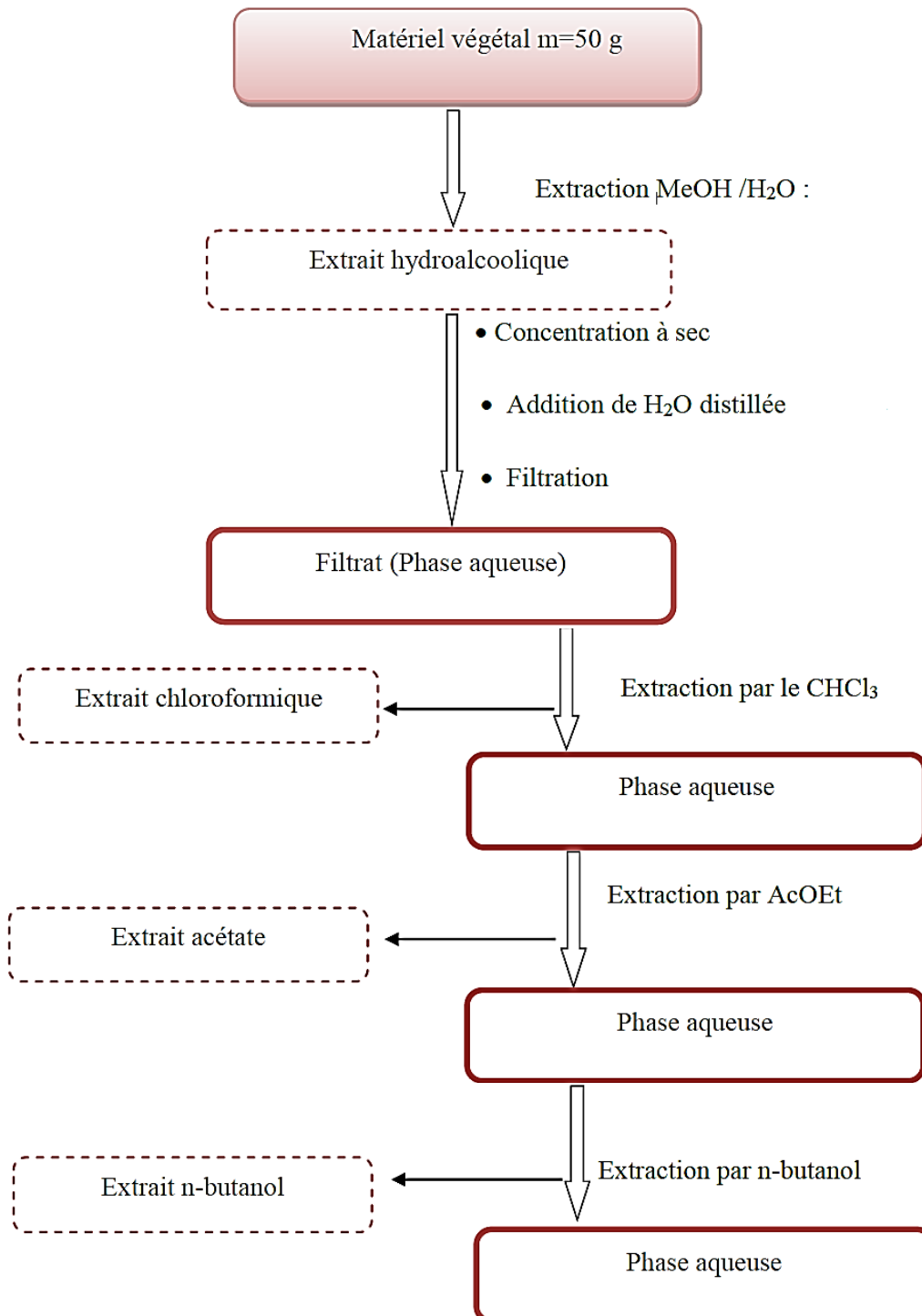
La teneur des polyphénols totaux a été estimée en utilisant la technique classique de Folin-Ciocalteu (FCR) en utilisant une microplaque de 96 puits [50]. Un volume de 20 µl d'extrait (1 mg /1 ml de méthanol) a été ajouté à 100 µl de FCR dilué (1:10). Ensuite un volume de 75 µl de carbonate de sodium (7,5%) a été additionné. Le mélange est laissé à l'obscurité pendant 2 heures à température ambiante. L'absorbance a été déterminée à 765 nm. Un blanc est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par le solvant utilisé (Méthanol). Parallèlement, Une courbe d'étalonnage de l'acide gallique a été préparée. Les résultats sont exprimés en µg équivalent de l'acide gallique par mg d'échantillon.

### **5. Dosage des flavonoïdes**

Le dosage des flavonoïdes a été fait selon la méthode décrite par Topçu et al., (2007) [51]. Dans une microplaque à 96 puits. Un volume de 50 µl de l'échantillon a été mélangé avec

130  $\mu\text{l}$  de méthanol, 10  $\mu\text{l}$  d'acétate de potassium et 10  $\mu\text{l}$  de nitrate d'aluminium. Le mélange a été ensuite maintenu à la température ambiante pendant 40 min puis une lecture d'absorbance a été réalisée à 415 nm.

Une courbe d'étalonnage de Quercétine a été préparée en parallèle. Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{g}$  équivalent de Quercétine par mg d'extrait.



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

## 6. Activité antioxydante

L'activité antioxydante des extraits étudiés a été déterminé par cinq méthodes différentes.

### 6.1. Piégeage du radical DPPH

L'activité antiradicalaire au DPPH est déterminée selon la méthode décrite par Blois (1958) [52]. Brièvement, sur une microplaque à 96 puits, une solution de 160 µl du DPPH• (A=0.7) a été mélangé avec 40 µl de différentes concentrations de l'extrait. Le mélange a été maintenu à une température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 30 min. L'absorbance a été mesurée à 517 nm. Le BHA, le BHT et l'α-tocophérol ont été utilisés comme standards.

Le pourcentage d'inhibition a été calculé selon la formule suivante:

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



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

### 6.2. Piégeage du radical ABTS

L'activité du piégeage du radical ABTS a été déterminée par la méthode de Re et al., (1999) [53]. Sur une microplaque à 96 puits, un volume de 160 µl d'ABTS •+ (A=0.7) a été ajouté à 40 µl de différentes concentrations de l'extrait. Le mélange a été maintenu à température ambiante pendant 10 min. l'absorbance a été mesurée à 734 nm. Le BHA et le BHT ont été utilisés comme standards.

Le pourcentage d'inhibition a été calculé selon la formule suivante:

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



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

### 6.3. Activité de réduction du complexe $\text{Cu}^{+2}$ -Neocuproïne (CUPRAC)

L'activité CUPRAC a été déterminée selon la méthode décrite par d'Apak et al., (2004) [54]. Dans une microplaque, un mélange réactionnel contenant 60  $\mu\text{l}$  d'acétate d'ammonium, 50  $\mu\text{l}$  de chlorure de cuivre, 50  $\mu\text{l}$  de néocuproïne et 40  $\mu\text{l}$  d'extrait en différentes concentrations a été construit. Après une heure d'incubation, l'absorbance a été mesurée à 450 nm. Le BHA et le BHT sont utilisés comme standards. Les résultats ont été calculés à titre de  $A_{0,5}$  ( $\mu\text{g/ml}$ )

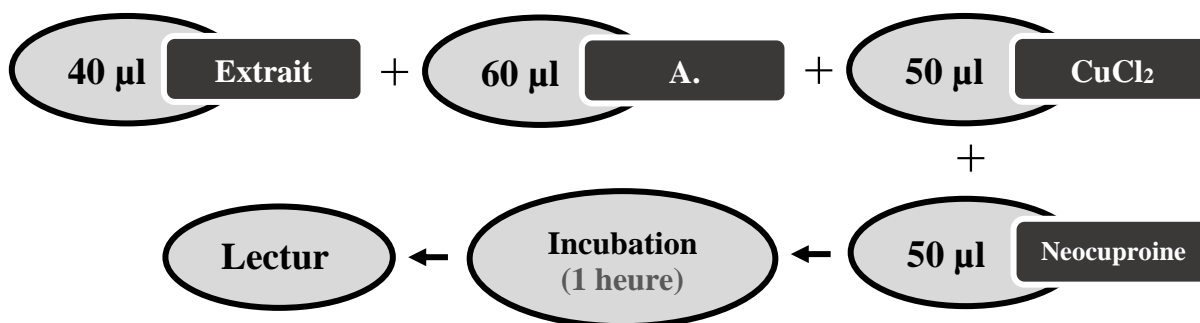


Fig.04 : mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon

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

Le pouvoir réducteur des extraits a été déterminé selon la méthode d'Oyaizu (1986) [55]. 10  $\mu\text{l}$  de l'extrait a été additionné à 40  $\mu\text{l}$  d'une solution tampon phosphate (pH 6,6) et à 50  $\mu\text{l}$  d'une solution de ferricyanide de potassium (1%). L'ensemble a été incubé à l'étuve à 50°C pendant 20 min. Ensuite, 50  $\mu\text{l}$  d'acide tri-chloroacétique (10%) a été ajouté pour stopper la réaction. Enfin, un volume de 40  $\mu\text{l}$  d'eau distillée et 10  $\mu\text{l}$  d'une solution de chlorure de fer anhydre (0,1%) ont été ajoutés. L'absorbance a été mesurée à 700 nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par le méthanol. L'acide ascorbique et l' $\alpha$ -tocophérol ont été utilisés comme standards. Les résultats ont été calculés à titre de  $A_{0,50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ).

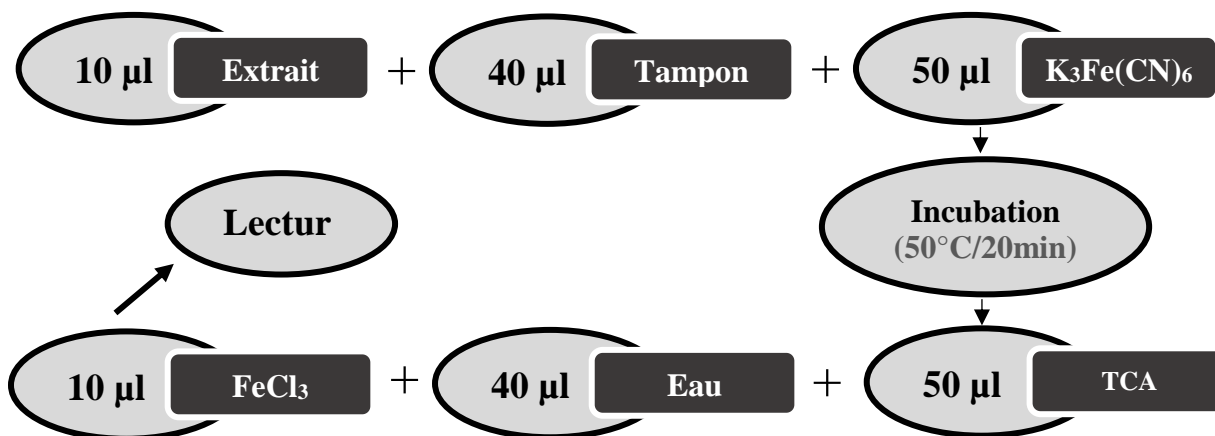
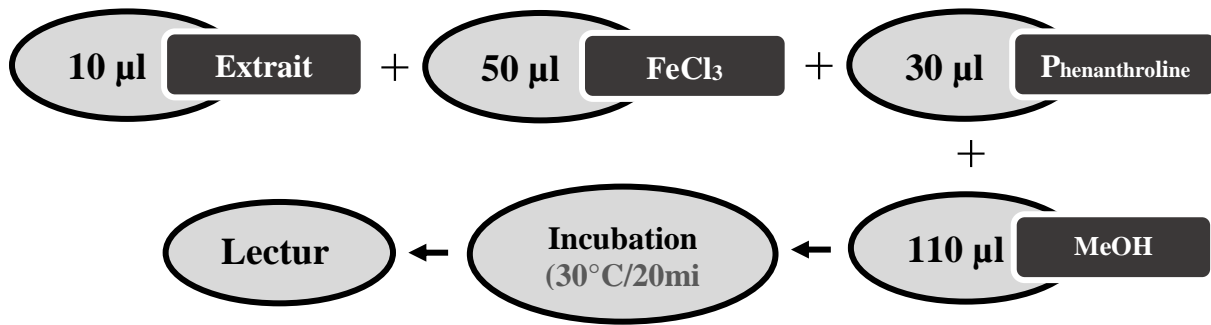


Fig.05 : mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon

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

L'activité de phénanthroline a été déterminée par la méthode décrite par Szydłowska-Czerniak et al., (2008) [56]. 10  $\mu\text{l}$  de l'extrait a été mélangé avec 50  $\mu\text{l}$  de chlorure de fer anhydre (0,2%), 30  $\mu\text{l}$  de phénanthroline (0,5%) et 110  $\mu\text{l}$  de méthanol. Le mélange obtenu a été incubé dans l'étuve à 30°C pendant 20 min et l'absorbance a été mesurée à 510 nm. Le BHA et le BHT ont été utilisés comme standards. Les résultats ont été calculés à titre de  $A_{0,50}$  ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )



**Fig.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'activité inhibitrice de l'alpha -amylase a été déterminée selon la méthode décrite par Zengin et al., (2014) [57]. 25 µl d'extrait a été mélangé avec 50 µl d'une solution d'α-amylase (1U), puis incubé pendant 10 min à 37°C. Ensuite, 50 µl d'amidon (0,1%) a été additionné. Le mélange est incubé une autre fois pendant 10 minutes à 37°C. Après incubation, 25 µl d'acide hypochlorique (1M) et 100 µl d'iodure de potassium iode ont été ajoutés. La lecture de l'absorbance a été fait à 630 nm. L'acarbose a été utilisé comme standard.

Le pourcentage d'inhibition de l'α-amylase a été calculé par 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]

Tableau 01: l'organisation de microplaque dans le test de α-amylase

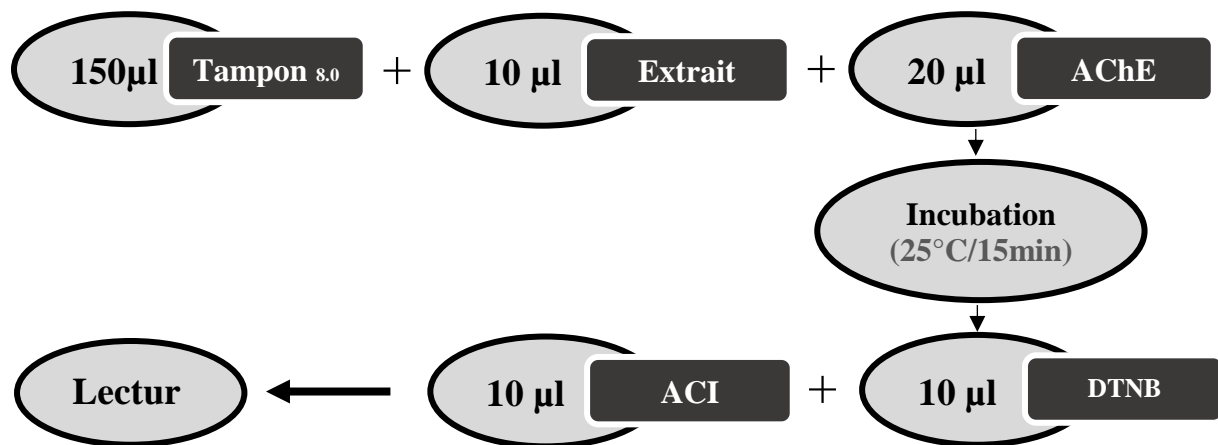
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Extrait 01 (As)			Blanc extrait 01 (Ab)	Extrait 02 (As)			Blanc extrait 02 (Ab)	Extrait 03			Blanc extrait 03 (Ab)
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H	Ae						Ac					

Tableau 02 : mode de remplissage de microplaque dans le test de α-amylase

Extraits	Blanc d'extrait	Ae	Ac
25µl extrait	25µl extrait	25µl MeOH	25µl MeOH
50µl Enzyme	50µl tampon	50µl Enzyme	50µl Tampon
Incubation à 37°C – 10 min			
50µl Amidon	50µl tampon	50µl amidon	50µl amidon
Incubation à 37°C – 10 min			
25µl HCL	25µl tampon	25µl HCL	25µl HCL
100 IKI	100 IKI	100I	101I

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

L'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase (AChE) a été déterminée par la méthode développée par Ellman et al., (1961) [58]. Brièvement, 150 µl de tampon phosphate de sodium à (pH 8) (100 mM) a été ajouté à 10 µl d'extrait et à 20 µl d'enzyme AChE (6,85 x10<sup>-3</sup> U). Le mélange a été incubé pendant 15 minutes à 25°C, puis 10 µl de DTNB (acide 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoïque)) (0,5 mM) ont été ajoutés. Ensuite, la réaction a été initiée par l'addition de 10 µl acetylthiocholine iodide (0.71 mM). L'absorbance a été mesurée à 412 nm. La galantamine a été utilisée comme standard.



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

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

L'activité protectrice vis-à-vis la lumière solaire a été évaluée selon la méthode décrite par Mansur et al. (1986) [59]. L'absorbance de 200 µl de chaque échantillon (2mg/ml) a été mesurée dans l'intervalle de 290 à 320 nm chaque 5 nm (UV-B), et la valeur du SPF est calculée par l'application de l'équation mathématique de Mansur.

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

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

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

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

## 2. Etude statistique

Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD avec trois répétition pour chaque essai. Les valeurs de **IC<sub>50</sub>** et de **A<sub>0,5</sub>** sont calculées par la méthode de régression linéaire. Les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification sont faites par ANOVA a un seul facteur contrôlé suivi par un test post-hoc de tuckey a l'aide du logiciel Graphpad Prism 7.0. Les différences sont considérées statistiquement significatives au seuil de 0,05.

# ***Chapitre 05***

## ***Résultats et discussion***

### 1. Rendements d'extraction

Les rendements d'extraction des extraits, brut et fractionnés, sont regroupés dans le tableau 01

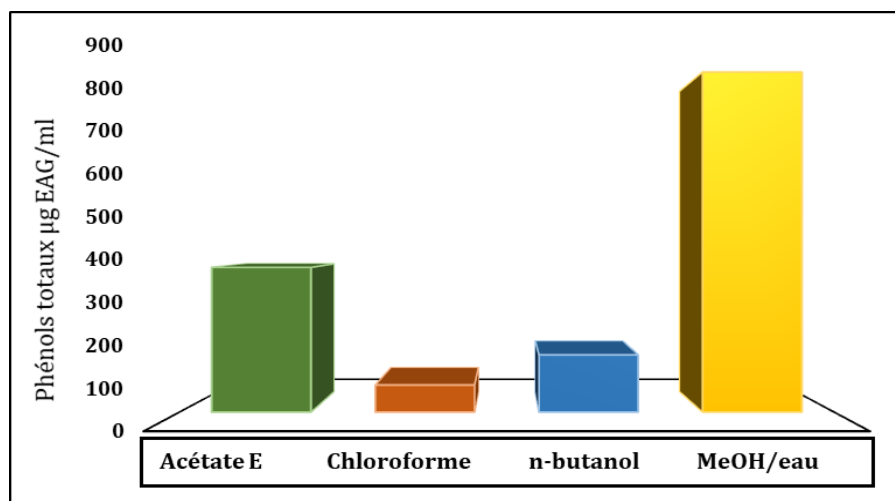
**Tableau 01** : Rendement d'extraction

Extrait	Rendement
Extrait hydroalcolique	31.22 %
Extrait Acétate d'éthyle	08.64 %
Extrait chloroformique	05.12 %
Extrait n-butanolique	06.37 %

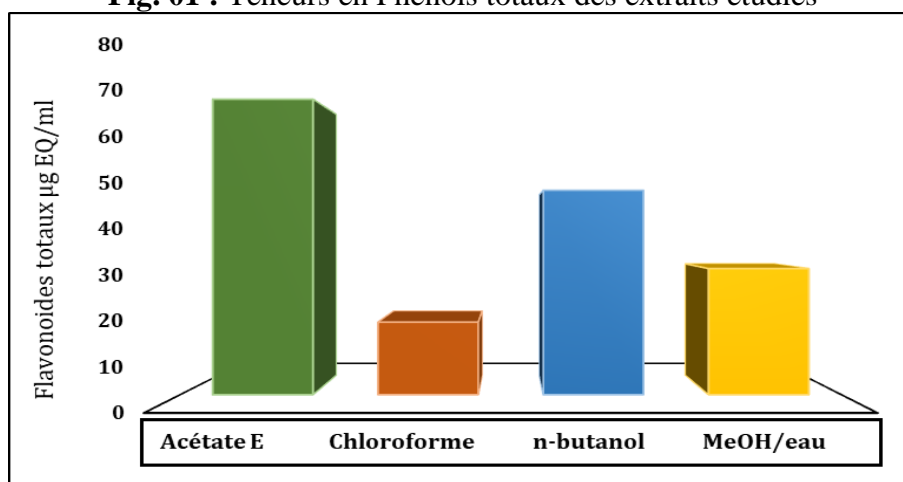
### 2. Dosage des phénols totaux et flavonoïdes

**Tableau 02** : teneur en Phénols totaux et flavonoïdes

Extraits	$\mu\text{g EAG/ml}$	$\mu\text{g EQ/ml}$
Extrait hydroalcolique	874.19 $\pm$ 9.85	30.20 $\pm$ 1.91
Extrait Acétate d'éthyle	372.03 $\pm$ 20.8	70.77 $\pm$ 6.77
Extrait chloroformique	069.39 $\pm$ 5.92	17.36 $\pm$ 1.17
Extrait n-butanolique	146.94 $\pm$ 4.07	48.95 $\pm$ 4.56



**Fig. 01** : Teneurs en Phénols totaux des extraits étudiés



**Fig. 02** : Teneur en Flavonoïdes totaux des extraits étudiés

La plante étudiée a donnée des rendements d'extraction importants, que ce soit pour l'extrait brut ou les autres fractions, ce qui reflète la richesse moléculaire de cette plante (Tab.01).

La teneur des composés phénoliques de chaque extrait a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique ( $y=0.0034x+0.1044$ ,  $R^2=0.9972$ ), et exprimée en microgrammes équivalent en acide gallique par milligramme d'extrait et par millilitre (Tab. 02). Des niveaux considérables en composés phénoliques ont été détectés notamment pour l'extrait hydro-alcoolique qui a présenté le contenu le plus élevé, suivi par les extraits d'acétate d'éthyle, le n-butanolique et le chloroformique respectivement.

Les teneurs, des extraits étudiés, en flavonoïdes, ont été déterminées à l'aide de la courbe d'étalonnage de la Quercétine ( $y= 0.0048x$ ,  $R^2=0.997$ ). Les résultats sont exprimés en microgrammes équivalent en Quercétine par milligramme d'extrait et par millilitre. Ils ont montré des valeurs assez proches entre les quatre extraits étudiés, l'extrait d'acétate d'éthyle représente la teneur la plus importante néanmoins le chloroformique est le plus faible (Tab. 02).

De nombreux travaux ont montré que les composés phénoliques, particulièrement les flavonoïdes, jouent un rôle important dans les différentes propriétés biologiques et pharmacologiques des extrais naturels [60-61], ce qui nous allons le confirmer dans les parties suivantes.

## 3. Activité antioxydante

## 3.1. Activité de piégeage du radical libre DPPH

Les pourcentages d'inhibition du radical DPPH sont organisés dans le tableau 03

Tableau 03: Pourcentages d'inhibition du radical DPPH

Extraits	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	Equivalent BHA
hydroalcoolique	11,23±0.88	16,64±0.11	23,46±2.92	35,24±0.96	64,91±2.39	79,11±1.59	81,53±1.10	149,94±3.30	04.09 %
Acetate d'ethyle	33,84±1.73	57,08±0.96	80,83±1.45	82,62±0.69	83,19±0.33	83,95±1.52	85,04±0.55	023.18±0.52	26.48 %
Chloroformique	02,50±0.55	03,91±1.34	11,87±0.22	17,34±1.54	23,33±0.44	42,37±0.55	71,15±0.00	522.43±1.76	01.17 %
n-butanolique	06,13±1.43	12,57±1.43	19,51±3.53	40,78±0.66	69,50±1.88	85,74±0.67	85,80±0.77	137.38±1.12	04.46 %
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

Les pourcentages d'inhibition du radical ABTS sont organisés dans le tableau 04

Tableau 04: Pourcentages d'inhibition du radical ABTS

Extraits	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	Equivalent BHA
hydroalcoolique	63,69±0.64	69,12±0.15	77,31±0.76	86,03±1.16	94,47±0.65	95,79±0.13	95,82±0.22	<b>013,29±1,44</b>	13.61 %
Acetate d' ethyle	28,15±0.95	45,86±1.62	75,86±1.11	92,74±0.57	95,52±0.48	96,32±0.30	96,42±0.84	<b>029,20±0,67</b>	06.19 %
Chloroformique	10,94±0.43	21,41±1.95	26,27±1.08	37,82±0.61	45,76±0.52	65,11±0.17	74,58±0.82	<b>238,05±1,35</b>	00.76 %
n-butanolique	5,58±1.51	09,02±0.08	19,08±2.78	42,02±2.30	75,28±2.47	90,63±1.13	95,27±0.13	<b>149,94±3,30</b>	01.20 %
BHA *	92.83±1,42	94.68±0,42	94.95±0,90	95.32±0,25	95.59±0,47	95.83±0,15	95,86±0,10	<b>001,81±0,10</b>	//
BHT *	69.21±0,40	78.23±1,34	88.12±1,28	88,76±3,07	90.85±1,74	90.95±0,51	96.68±0,39	<b>001,29±0,30</b>	//

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

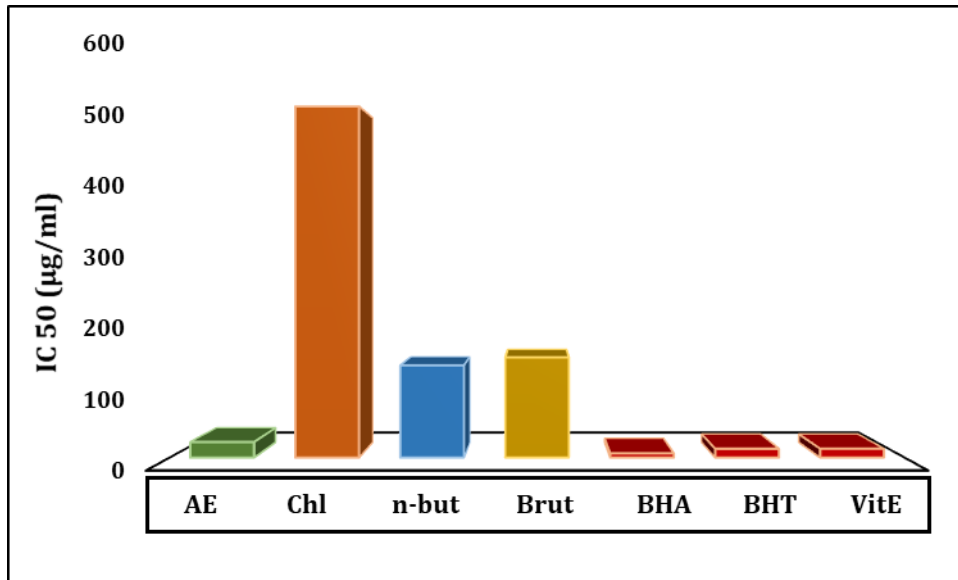
• (\*) les standards : molécules de références

• BHA : hydrox-yanisole butylé

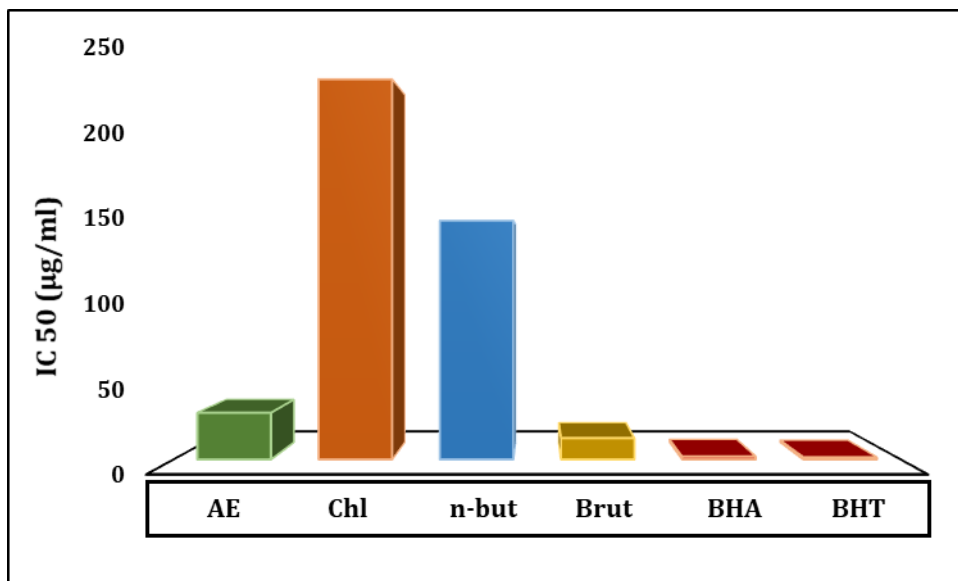
• BHT : hydroxy-toluene butylé

**Tableau 05 :** tableau récapitulatif des valeurs IC<sub>50</sub> (µg/ml)

	DPPH	ABTS
Extrait hydroalcoolique	149.94±3.30	013.29±1.44
Extrait Acétate d'éthyle	023.18±0.52	029.20±0.67
Extrait Chloroformique	522.43±1.76	238.05±1.35
Extrait n-butanolique	137.38±1.12	149.94±3.30



**Fig. 03 :** Valeurs IC<sub>50</sub> des extraits étudiés dans la méthode de piégeage du DPPH



**Fig. 04 :** Valeurs IC<sub>50</sub> des extraits étudiés dans la méthode de piégeage de l'ABTS

De nombreuses études rapportent la participation du stress oxydatif dans les différentes formes des maladies classiques et récentes (cancer, diabète, insuffisance rénale et hépatique ...etc.). Ce fait stimule la communauté scientifique à chercher des produits alternatifs, notamment d'origine naturelle, afin de lutter contre le stress oxydatif et prévenir une grande variété de maladies. Dans ce travail, nous avons évalué le pouvoir antioxydant des extraits naturels d'une plante de la famille des Apiaceae *in vitro*. Premièrement, le test de DPPH est largement utilisé pour apprécier le pouvoir des antioxydants naturels à transférer des protons d'hydrogènes aux radicaux libres. Dans ce test, chaque extrait se caractérise par sa propre valeur d'IC<sub>50</sub> qui caractérise son pouvoir de réduction des radicaux dans le milieu réactionnel. Nos résultats ont montré des activités importantes pour les quatre extraits testés notamment pour les deux extraits acétate d'éthyle et hydroalcoolique qui sont comparables aux références BHA et BHT. En parallèle, ces deux extraits ont présenté une activité intéressante dans le piégeage du radical ABTS particulièrement pour l'extrait hydroalcoolique. Ces activités anti radicalaires sont directement attribuées aux teneurs élevées, de ces extraits, en composés phénoliques, et en flavonoïdes. L'activité de l'extrait hydro-alcoolique est bien remarquée dans le piégeage de l'ABTS que le DPPH ce qui est lié probablement par la stéréochimie de la molécule ABTS qui est plane et facile à être neutralisé en comparaison de celle de DPPH. D'un autre côté, l'activité inhibitrice du radical DPPH n'est pas dépendante du contenu total en polyphénols mais aux polyphénols qui ont des structures chimiques spécifiques [62]. Autrement dit, par la haute sélectivité du DPPH car il ne réagit qu'avec les flavonoïdes contenant des groupes hydroxyles dans le cycle B [63], ainsi que les acides aromatiques comportant plus d'un groupe hydroxyle [64]. Des travaux antérieurs ont montré l'activité anti radicalaire des plantes algérienne de la même famille et genre de notre plante particulièrement ceux d'Attou et al. (2007) [65], et Kılınçarslan et al. (2020) [66].

## 3.3. Activité de réduction du complexe cuivre-Neocuproïne (CUPRAC)

Les valeurs d'absorbance dans la méthode CUPRAC sont organisées dans le tableau 06

Tableau 06 : les absorbances des différents extraits dans la méthode CUPRAC

Extraits	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg	A <sub>0.5</sub> (µg/ml)	Equivalent BHA
hydroalcoolique	0,17±0.01	0,26±0.01	0,42±0.01	0,76±0.03	1,30±0.06	2,26±0.17	3,51±0.31	<b>60.62±1.84</b>	08.82 %
Acetate d'éthyle	0,15±0.01	0,21±0.01	0,31±0.00	0,49±0.02	0,86±0.01	1,37±0.02	2,17±0.03	<b>103.3±2.05</b>	05.17 %
Chloroformique	0,19±0.01	0,30±0.01	0,48±0.01	1,50±0.01	2,52±0.01	3,75±0.18	4,02±0.02	<b>17.43±0.62</b>	30.69 %
n-butanolique	0,15±0.01	0,21±0.02	0,33±0.01	0,62±0.02	1,19±0.01	1,78±0.15	2,95±0.53	<b>78.94±2.24</b>	06.77 %
BHA*	1,12±0,05	1,95±0,31	3,14±0,46	3,58±0,42	3,35±0,20	3,77±0,19	3,92±0,13	<b>05,35±0,71</b>	//
BHT*	1,41±0,03	2,22±0,05	2,42±0,02	2,50±0,01	2,56±0,05	2,86±0,07	3,38±0,13	<b>08,97±3,94</b>	//

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

## 3.4. Activité de pouvoir réducteur (FRAP)

Les valeurs d'absorbance dans la méthode FRAP sont organisées dans le tableau 07

Tableau 07 : les absorbances des différents extraits dans la méthode FRAP

Extraits	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	A <sub>0.5</sub> (µg/ml)	Equivalent A. Ascorbique
hydroalcoolique	0,04±0,00	0,05±0,01	0,06±0,01	0,12±0,01	0,30±0,03	0,52±0,05	1,03±0,02	<b>91.03±2.53</b>	07.43 %
Acetate d'éthyle	0,08±0,01	0,09±0,00	0,11±0,01	0,14±0,00	0,25±0,01	0,42±0,06	0,89±0,03	<b>111.5±4.92</b>	08.76 %
Chloroformique	0,11±0,01	0,14±0,03	0,21±0,01	0,39±0,01	0,59±0,12	0,89±0,09	1,10±0,08	<b>36.42±1.26</b>	18.58 %
n-butanolique	0,04±0,00	0,05±0,00	0,06±0,01	0,09±0,02	0,28±0,05	0,46±0,03	0,67±0,10	<b>121.3±4.12</b>	05.58 %
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	<b>06.77±1.15</b>	//
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	<b>34.93±2.38</b>	//

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

• (\*) les standards : molécules de références

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

Les valeurs d'absorbance dans la méthode de Phenanthroline sont organisées dans le tableau 08

Tableau 08 : les absorbances des différents extraits dans la méthode de Phenanthroline

Extraits	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	A <sub>0.5</sub> (µg/ml)	Equivalent BHA
hydroalcoolique	0,28±0,01	0,30±0,00	0,35±0,04	0,37±0,00	0,48±0,01	0,64±0,02	0,98±0,03	57.03±0.95	01.63 %
Acetate d' ethyle	0,39±0,03	0,47±0,03	0,55±0,09	0,88±0,19	1,45±0,02	2,44±0,09	3,66±0,08	09.23±2.82	10.07 %
Chloroformique	0,31±0,01	0,32±0,02	0,34±0,02	0,36±0,01	0,41±0,01	0,49±0,01	0,66±0,02	105.0±2.25	00.88 %
n-butanolique	0,34±0,03	0,33±0,03	0,43±0,02	0,52±0,02	0,70±0,06	1,44±0,50	1,86±0,01	21.22±0.89	10.55 %
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

Tableau 09 : tableau récapitulatif des valeurs A 0.5 (µg/ml)

	CUPRAC	FRAP	Phenanthroline
Extrait hydroalcoolique	60.62±1.84	91.03±2.53	57.03±0.95
Extrait Acétate d'éthyle	103.34±2.05	111.58±4.92	09.23±2.82
Extrait Chloroformique	17.43±0.62	36.42±1.26	105.09±2.25
Extrait n-butanolique	78.94±2.24	121.38±4.12	21.22±0.89

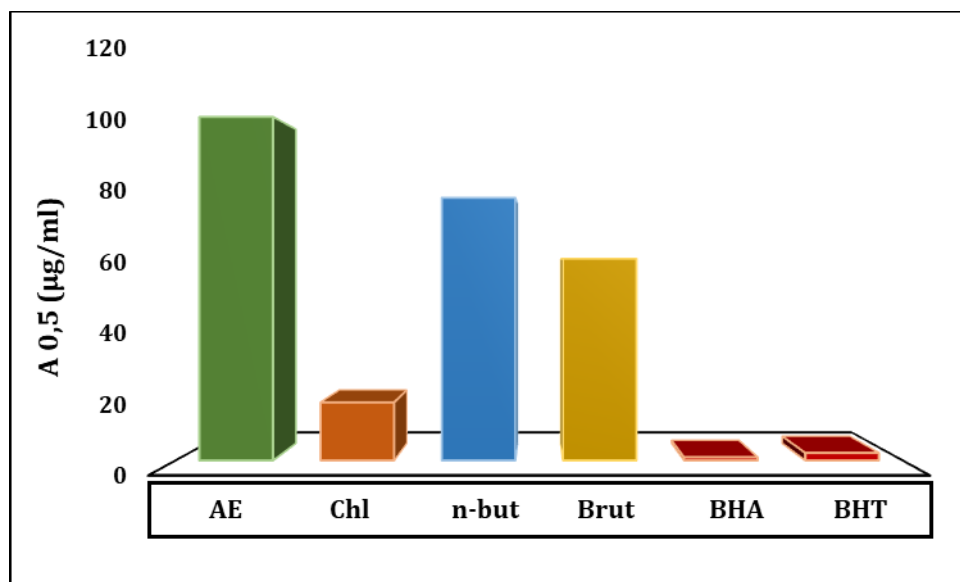


Fig. 05 : Valeurs A 0.5 des extraits étudiés dans la méthode de CUPRAC

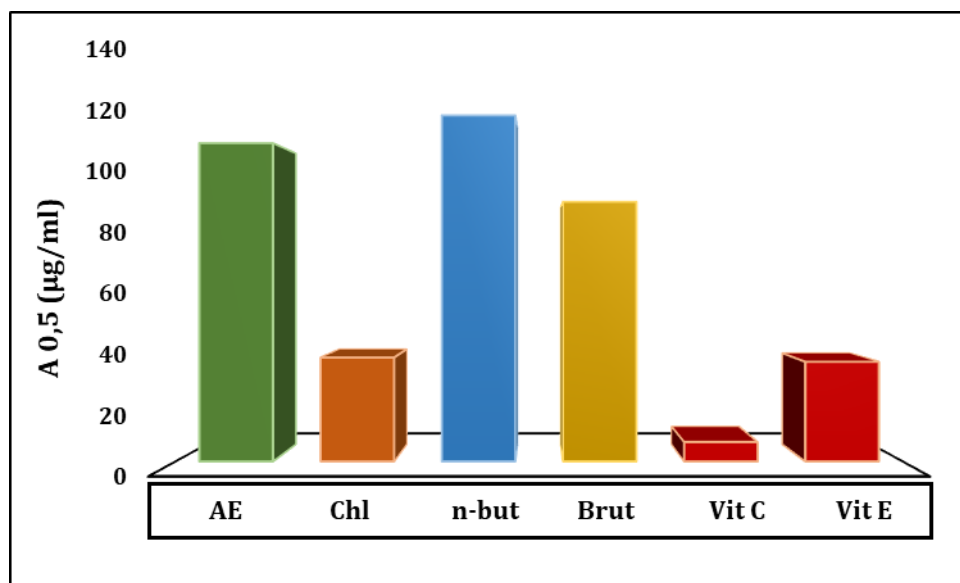
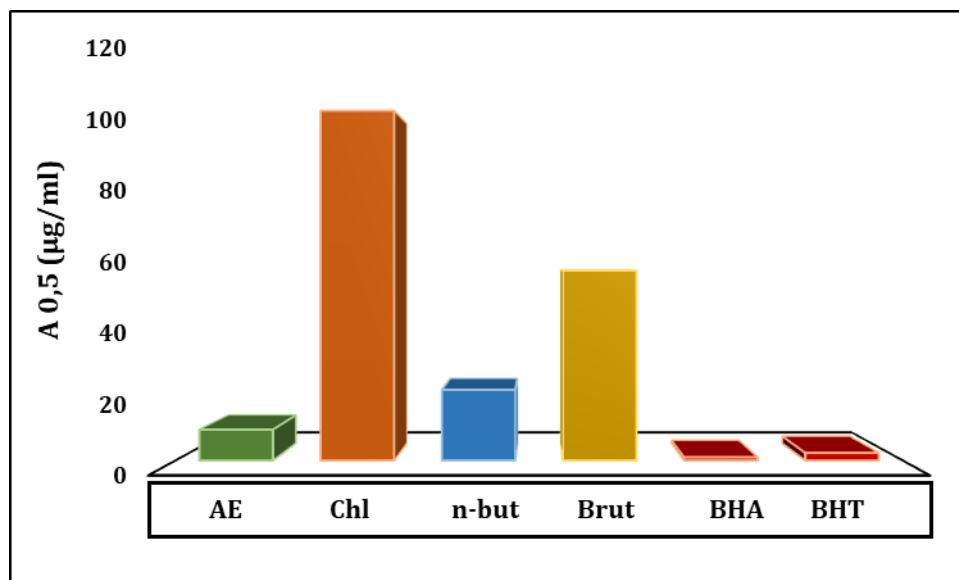


Fig. 06 : Valeurs A 0.5 des extraits étudiés dans la méthode de FRAP



**Fig. 07 :** Valeurs A 0.5 des extraits étudiés dans la méthode de Phenanthroline

Dans la présente étude, les extraits étudiés ont présenté des activités variables dans les méthodes CUPRAC, FRAP et celle du Phenanthroline. L'extrait chloroformique a donné une valeur A 0.5 intéressante dans la méthode CUPRAC, néanmoins les autres trois extraits ont été faibles et l'ensemble est loin à être comparés avec les molécules de référence BHA et BHT. Cette différence d'activité vis-à-vis au complexe cuivre-néocuproïne est due à plusieurs critères que possède les polyphénols tels que le nombre et la position (positions 3', 4' et 5') de groupes d'hydroxyle aussi bien que le degré de conjugaison de la molécule entière (double liaison C2-C3), le groupe carbonyle en position 4 (oxo) et la structure ortho-dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol) qui sont importants pour le transfert facile d'électrons [67].

Dans la méthode de FRAP, les extraits étudiés ont présenté le même comportement que celui enregistré dans la méthode CUPRAC, l'extrait chloroformique a présenté le meilleur effet, comparable à celui de la vitamine E, suivi par l'hydroalcoolique, l'acétate d'éthyle et le n-butanolique respectivement. Les standards ont gardé le meilleur effet. Pour cette activité, la présence des réducteurs dans les extraits de la plante permet de réduire le fer ferrique ( $Fe^{+3}$ ) présent dans le ferricyanure de potassium en fer ferreux ( $Fe^{+2}$ ). Par conséquent, le  $Fe^{2+}$  peut être évalué en mesurant l'absorbance de la couleur bleue formée [68]. Ces mesures nous indiquent les concentrations des polyphénols qui participent à la réaction de réduction du fer. Le pouvoir réducteur des extraits de la plante est dépendant de leur concentration, plus que l'extrait est riche en polyphénols, plus qu'il a un pouvoir réducteur élevé [69].

Les résultats obtenus dans l'activité de phénantroline montrent que tous les extraits sont révélés capables de réduire le fer et de former un complexe  $\text{Fe}^{+2}$ - phénantroline avec des niveaux différents. L'extrait acétatet d'éthyle a présenté le meilleur effet tandis que l'extrait chloroformique est le plus faible. Dans cette activité, la présence des réducteurs dans les extraits de la plante permet de réduire le  $\text{Fe}^{+3}$  en  $\text{Fe}^{+2}$ . Par conséquent, ce dernier forme un complexe stable avec la phénantroline de couleur rouge orangé. Ce complexe  $\text{Fe}^{+2}$ -phénantroline est révélé par la méthode spectrophotométrique, ce qui permet de doser les ions ferreux et donc de déterminer le pouvoir réducteur de l'antioxydant testé. Cette différence du pouvoir réducteur vis-à-vis au complexe  $\text{Fe}^{+2}$ - phénantroline est due à la capacité réductrice des polyphénols en tant qu'antioxydants puissants. Les travaux de Kılınçarslan et al. (2020) ont montré des niveaux intéressants d'activité antioxydante d'une plante de la même famille da la plante étudiée [66].

## 4. Activité inhibitrice des enzymes

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

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

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

Extraits	06.25 $\mu$ g	12.5 $\mu$ g	25 $\mu$ g	50 $\mu$ g	100 $\mu$ g	200 $\mu$ g	400 $\mu$ g	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml)	Equivalent standard
hydroalcoolique	24,23 $\pm$ 0.58	34,59 $\pm$ 0.81	42,92 $\pm$ 0.35	52,59 $\pm$ 2.89	62,59 $\pm$ 2.96	83,92 $\pm$ 2.57	92,29 $\pm$ 1.05	43.82 $\pm$ 0.95	//
Acetate d'éthyle	9,47 $\pm$ 0.34	12,25 $\pm$ 1.01	12,31 $\pm$ 0.81	14,71 $\pm$ 0.30	16,46 $\pm$ 0.20	18,71 $\pm$ 0.03	20,17 $\pm$ 0.07	> 400	//
Chloroformique	12,37 $\pm$ 0.20	14,24 $\pm$ 0.34	15,64 $\pm$ 0.02	18,79 $\pm$ 0.20	24,04 $\pm$ 0.20	34,22 $\pm$ 0.07	37,04 $\pm$ 0.84	> 400	//
n-butanolique	6,54 $\pm$ 0.77	6,75 $\pm$ 0.13	10,08 $\pm$ 0.37	10,00 $\pm$ 0.75	10,45 $\pm$ 0.20	11,61 $\pm$ 0.10	11,98 $\pm$ 0.27	> 400	//
<hr/>									
Acarbose *	07,76 $\pm$ 0,17	08,08 $\pm$ 0,30	09,46 $\pm$ 0,11	10,70 $\pm$ 0,96	31,81 $\pm$ 2,89	37,21 $\pm$ 3,54	53,05 $\pm$ 1,59	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 l'acétylcholinestérase

Les pourcentages d'inhibition de l'AChE sont organisés dans le tableau 11

Tableau 11 : les pourcentages d'inhibition de l'AChE

Extraits	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	Equivalent standard
hydroalcoolique	03,07±0.21	06,49±0.58	07,13±0.52	09,01±0.70	09,11±1.20	14,22±0.80	15,17±0.01	> 200	//
Acetate d' ethyle	07,17±1.04	12,73±0.64	18,80±0.72	30,12±1.18	50,75±0.52	63,39±1.57	77,97±0.02	37.85±1.95	16.56 %
Chloroformique	03,70±0.45	05,05±0.05	05,07±0.06	06,24±0.25	08,43±0.90	11,23±1.17	12,83±0.76	> 200	//
n-butanolique	12,57±0.51	20,42±0.52	32,59±4.19	43,54±0.95	65,53±1.98	82,43±1.65	91,53±0.53	33.53±0.15	18.69 %
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

Les enzymes catalysent les bio-réactions en assurant le bon fonctionnement des phénomènes biologiques à l'échelle moléculaire et cellulaire. Toute perturbation enzymatique est associée à plusieurs maladies qui sont parfois lourdes. La modulation de l'activité enzymatique est une voie intéressante pour prévenir et/ou traiter les maladies associées. Dans la présente étude, nous avons évalué l'activité inhibitrice de nos extraits sur Ache et l' $\alpha$ -amylase qui sont liées aux deux maladies lourdes Alzheimer, le diabète respectivement.

Le diabète, est actuellement, l'un des grands problèmes métaboliques liés à la santé publique. Elle est généralement associée à des complications graves. Afin de contrôler la glycémie postprandiale des personnes diabétiques, les praticiens de santé ont adopté plusieurs stratégies pour une bonne gestion de cette maladie dont une est d'inhiber l'une des enzymes de digestion des carbohydrates comme l' $\alpha$ -amylase. Dans ce contexte, nous avons étudié l'activité inhibitrice de l' $\alpha$ -amylase par nos échantillons. Les extraits étudiés ont inhibé modérément l' $\alpha$ -amylase, d'une manière dose-dépendante, le meilleur effet a été présenté par l'extrait hydroalcoolique mais les valeurs d'IC<sub>50</sub> sont loin à être comparées avec l'Acarbose (Tab. 10).

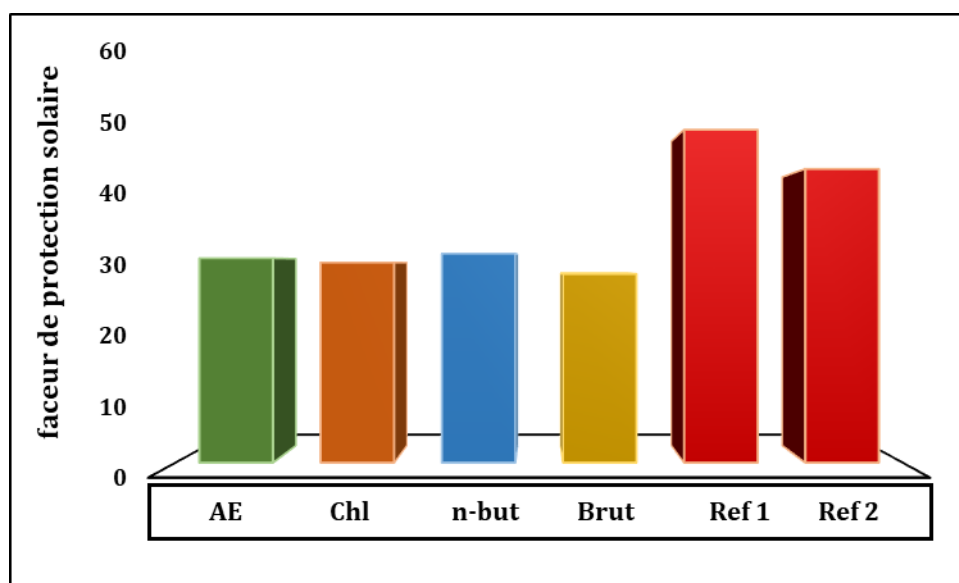
L'inhibition des cholinestérases est une stratégie largement pratiquée dans le traitement symptomatique d'Alzheimer. Plusieurs produits naturels, notamment des huiles essentielles, ont montré une activité inhibitrice de ces enzymes et par conséquent représentent une source des nouveaux traitements de cette maladie neurodégénérative. Nos résultats, exprimés en IC<sub>50</sub>, (Tab.11) ont montré une activité inhibitrice importante, d'une manière dose-dépendante, notamment pour les extraits acétate d'éthyle et n-butanolique, mais elles sont moins efficaces en comparaison avec la molécule de référence galanthamine. D'autres études, sur des plantes de la même famille que la plante étudiée, ont montré des valeurs IC<sub>50</sub> comparables à nos résultats [70-71].

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

Les facteurs de protection des extraits étudiés vis-à-vis les rayonnements UV de la lumière solaire sont organisés dans le tableau 12

**Tableau 12** : coefficient de protection solaire des extraits étudiés

Extraits	SPF <sub>1</sub>	SPF <sub>2</sub>	SPF <sub>3</sub>	Moyenne ± SD	Commentaire
Extrait hydroalcoolique	29,25	28,57	27,39	28,40±0.94	Protection moyenne
Extrait Acétate d'éthyle	31,59	30,13	30,59	30,77±0.75	Haute protection
Extrait Chloroformique	30,47	30,65	29,28	30,13±0.74	Haute protection
Extrait n-butanolique	31,62	30,54	32,25	31,47±0.87	Haute protection
Référence 01	/	/	/	50,11±0,53	Très Haute protection
Référence 02	/	/	/	44,22±0,35	Très Haute protection



**Fig. 08** : Valeurs SPF des extraits étudiés

La détermination du facteur de protection solaire (SPF) nous permettra d'exploiter les extraits étudiés dans des préparations cosmétiques et pharmaceutiques comme les crèmes et les liquides antisolaire. Nos extraits ont été donnés des résultats proches, et qui sont généralement de protection moyenne à modérée en comparaison avec les valeurs de références. Pour améliorer cette activité nous proposons de les mélanger avec d'autres extraits en cherchant l'effet synergique, ou de vérifier l'activité d'autres formes de fractions organiques.

# ***Conclusion générale et perspectives***

## ❖ Conclusion générale

Les produits naturels tiennent une place majeure dans la médecine alternative Algérienne, en répondant aux différents besoins sanitaires. En effet, La communauté scientifique oriente ses travaux de recherche vers une valorisation adéquate des ressources naturelles, avec la caractérisation de leurs effets pharmacologiques. Parallèlement, des variétés des maladies humaines lourdes s'installent graduellement dans les années récentes, notamment après l'apparition de l'intervention du stress oxydatif.

Dans la présente étude, nous avons caractérisé d'une part, l'activité antioxydante de quatre extraits d'une plante de la famille des *apiaceae* par des méthodes standards, le piégeage des radicaux DPPH et ABTS, la réduction des fer (FRAP et Phenanthroline) et du cuivre (CUPRAC). D'autres part, nous avons testé l'activité antidiabétique via l'inhibition de l' $\alpha$ -amylase et l'activité anti-Alzheimer via l'inhibition de l'acétylcholinestérase. Nous avons finalisé le travail par étude de l'activité protectrice des extraits vis-à-vis la lumière solaire.

Nos résultats ont montré des niveaux considérables en phénols et flavonoïdes totaux notamment pour l'extrait hydro-alcoolique et l'extrait d'acétate d'éthyle. Concernant l'activité antioxydante, les résultats ont montré des activités importantes pour les quatre extraits testés particulièrement pour les deux extraits acétate d'éthyle et hydroalccolique qui sont comparables aux références BHA et BHT dans les méthodes de piégeage des radicaux DPPH et ABTS. En plus, les extraits étudiés ont présenté des activités variables dans les méthodes CUPRAC, FRAP et Phenanthroline, l'extrait chloroformique a présenté le meilleur effet et l'ensembles sont loin à être comparés avec les molécules de référence BHA et BHT.

L'activité inhibitrice des enzymes a montré que nos échantillons ont inhibé modérément l' $\alpha$  amylase, d'une manière dose-dépendante. Tandis que l'inhibition de l'acétylcholinestérase est importante notamment pour les extraits acétate d'éthyle et n-butanolique. D'autre part, les extraits étudiés ont donné une haute-protection vis-à-vis la lumière solaire avec des facteurs de protection de haute niveau

Nos résultats justifient l'usage traditionnel de la plante étudiée en Algérie, et valorise l'effet biologique et pharmacologique des extraits. Ils ouvrent également dans une future proche des perspectives multiples qui nous permettra sans doute d'enrichir le poids scientifique de ce modeste travail.

❖ **Perspectives**

- Elargir la zone d'étude en intégrant d'autres espèces endémiques
- Manipuler des autres techniques antioxydantes.
- Multiplier le nombre de fractions étudiées
- Faire pratiquer l'analyse par HPLC avec les différentes sortes de détecteurs. Ceci nous permet de qualifier et quantifier les différents constituants des extraits étudiés.
- Elargir l'étude vers des tests *in vivo* et *in silico*
- Manipuler quelques formes de combinaison entre les extraits afin de chercher une amélioration de l'activité par un effet synergique

***Références  
bibliographiques***

# Références bibliographiques

- [01] Moraux, T., & Dorchy, H. (2005). Le poids de l'obésité dans le (pré) diabète de type 2 chez les enfants et adolescents : quand et comment le rechercher?. *Archives de pédiatrie*, 12(12), 1779-1784
- [02] Villar, E., & Zaoui, P. (2010). Diabète et maladie rénale chronique: ce que nous apprend l'épidémiologie. *Néphrologie & thérapeutique*, 6(7), 585-590.
- [03] Cummings, J. L., & Cole, G. (2002). Alzheimer disease. *Jama*, 287(18), 2335-2338.
- [04] Ghalem, B. R., & Mohamed, B. (2014). Antibacterial activity of essential oil of north west Algerian *Eucalyptus camaldulensis* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Coastal Life Medicine*, 2(10), 799-804.
- [05] Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*. 2001. 161:839–851.
- [06] Rao, SR, Ravinshankar GA. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. 2002. 20:101–153.
- [07] Kumar, S., & Egbuna, C. (2019). *Phytochemistry: An in-silico and in-vitro Update*. Springer Singapore.
- [08] Benslama, A. (2016). Substances d'origine végétale. Université Mohamed Khider-Biskra Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie, Maroc.
- [09] Sahraoui W, LES ALCALOIDES. Laboratoire de Pharmacognosie
- [10] Tranchant, J., Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse, Masson, Paris, 1995
- [11] Adams, R. P., Identification of essential oil components by gaz chromatography/ mass spectrometry, Allured Published Corporation, Carol Stream, 2nd edition, 2001.
- [12] Pharmacopée Européenne, 5eme Ed, Conseil de l'Europe: Strasbourg, 2, 2005, 2667.
- [13] Bassar, K. H. C., Demirci, B., Akalin, E., Oezhatay, N., *Journal of Essential Oil Research*, Composition of the essential oil of *Cachrys alpina* Bieb., 16, 2004, 167.
- [14] Murray, R.D.H., Mendez, J. and Brown, S.A., *The Natural Coumarins*, John wiley & Sons Ltd: New York, 1982
- [15] Chihiro, I., & Hiroshi, F. (1987). Constituents of *Murraya exotica* L. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*.
- [16] Cai, J. N., Basnet, P., Wang, Z. T., Komatsu, K., Xu, L. S., & Tani, T. (2000). Coumarins from the fruits of *Cnidium monnieri*. *Journal of natural products*, 63(4), 485-488.
- [17] Bruneton, J. (1993). *Pharmacognosie: phytochimie plantes médicinales* (No. 581.634 B7).
- [18] Valnet, J. (1984). *Aromathérapie: traitement de maladie par les plantes*. Maloine SA Editeur Paris.
- [19] Heldt, H., Piechulla, B. (2005). *Plant biochemistry*. fourth edition

- [20] Kaloustian, J., & Hadji-Minaglou, F. (2013). La connaissance des huiles essentielles : qualitologie et aromathérapie: Entre science et tradition pour une application médicale raisonnée.
- [21] Tserennadmid, R., Takó, M., Galgóczy, L., Papp, T., Vágvölgyi, C., Geró, L., & Krisch, J. (2010). Antibacterial effect of essential oils and interaction with food components. *Open Life Sciences*, 5(5).
- [22] Raut, J. S., & Karuppayil, S. M. (2014). A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*, 62, 250–264.
- [23] Li, Y., Fabiano-Tixier, A.-S., & Chemat, F. (2014). Essential Oils as Reagents in Green Chemistry.
- [24] Leverage, X. (2009). Stress oxydant et antioxydants. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 44(5), 219-224.
- [25] Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P. (2007). Le stress oxydant. *Revue médicale de Liège*, 62(10), 628-38.
- [26] Nitroxyde, N. O. O., & Peroxynitrite, O. N. O. O. Le Stress oxydant.
- [27] Karadag, A., Ozcelik, B., & Saner, S. (2009). Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods*, 2(1), 41–60.
- [28] Charles, D. J. (2013). Antioxidant properties of spices, herbs and other sources. *Springer 4* (Vol. 9781461443100).
- [29] Berker, K. I., Demirata, B., & Apak, R. (2012). Determination of Total Antioxidant Capacity of Lipophilic and Hydrophilic Antioxidants In the Same Solution by Using Ferric-Ferricyanide Assay. *Food Analytical Methods*, 5(5), 1150–1158.
- [30] 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).
- [31] Brewer, M. S. (2011). Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(4), 221–247.
- [32] MOUSSOUS, W. (2020). Activité Antioxydante et Antiulcéreuse de *Carthamus caeruleus* L.
- [33] Gülçin, I. (2012). Antioxidant activity of food constituents: An overview. *Archives of Toxicology*, 86(3), 345–391.
- [34] Goiris, K., Muylaert, K., Fraeye, I., Foubert, I., De Brabanter, J., & De Cooman, L. (2012). Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *Journal of Applied Phycology*, 24(6), 1477–1486.
- [35] Goudable, J., & Favier, A. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition clinique et métabolisme*, 11(2), 115-120.
- [36] 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), 143-152.
- [37] Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., Chapelle, J. P. (2007). Le stress oxydant. *Rev Med Liege*, 62(10), 628–638.

- [38] Li, Y. (2011). *Antioxidants In Biology and Medicine: Essentials, Advance, and Clinical Applications*. Nova Science Publishers, Inc. ISBN 978-1-61209-466-3
- [39] Szabo, M. R., Idițoiu, C., Chambre, D., & Lupea, A. X. (2007). Improved DPPH determination for antioxidant activity spectrophotometric assay. *Chemical Papers*, 61(3), 214–216.
- [40] Karadag, A., Ozcelik, B., & Saner, S. (2009). Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods*, 2(1), 41–60.
- [41] Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., and Karademir, S.E. (2004). Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 7970-7981.
- [42] Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M., and Brighenti, F. (2003). Total Antioxidant Capacity of Plant Foods, Beverages and Oils Consumed in Italy Assessed by Three Different In Vitro Assays. *Journal of Nutrition*. 133, 2812-2819.
- [43] Adhikamsetty, R.K., Gollapalli, N.R., and Jonnalagadda, S.B. (2008). Complexation kinetics of Fe<sup>2+</sup> with 1,10-phenanthroline forming ferrioxalate in acidic solutions. *International Journal of Chemical Kinetics*. 40, 515-523.
- [44] Radermecker, R., Jandrain, B., Paquot, N., Philips, J. C., Contessi, E., Lavigne, M., ... & Scheen, A. (2003). Prevention des hypoglycémies chez le patient diabétique de type 1. *Revue Médicale de Liège*, 58(6), 361-8
- [45] Scheen, A. J. (2019). Études cardiovasculaires chez le patient diabétique de type 2 à risque: conclusions et impact des essais publiés en 2017-2018. *Médecine des maladies Métaboliques*, 13, S10-S24.
- [46] Scheen, A. J. (2018). Place des inhibiteurs des SGLT2 dans le traitement du patient diabétique de type 2. *Médecine des maladies Métaboliques*, 12(1), 22-30.
- [47] Vellas, B., FITTEN, L., & ALBAREDE, J. (2007). *Maladie d'Alzheimer. L'année gériatrique*, 8
- [48] Cummings, J. L., & Cole, G. (2002). Alzheimer disease. *Jama*, 287(18), 2335-2338.
- [49] Sundarram, A., & Murthy, T. P. K. (2014).  $\alpha$ -amylase production and applications: a review. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 2(4), 166-175.
- [50] Talesa, V. N. (2001). Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Mechanisms of ageing and development*, 122(16), 1961-1969.
- [51] Singleton, V.L., and Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16, 144-158.
- [52] Topçu, G., Ay, M., Bilici, A., Sarıkürkcü, C., Öztürk, M., and Ulubelen, A. (2007). A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry*. 103, 816-822.
- [53] Blois, M.S. (1958). Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*. 181, 1199-1200.

- [54] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., and Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26, 1231-1237.
- [55] Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., and Karademir, S.E. (2004). Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 7970-7981.
- [56] Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*. 44, 307-315.
- [57] Szydłowskaczerniak, A., Dianoczki, C., Recseg, K., Karlovits, G., and Szlyk, E. (2008). Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta*. 76, 899-905.
- [58] Zengin, G., Sarikurcu, C., Aktumsek, A., Ceylan, R., and Ceylan, O. (2014). A comprehensive study on phytochemical characterization of *Haplophyllum myrtifolium* Boiss. endemic to Turkey and its inhibitory potential against key enzymes involved in Alzheimer, skin diseases and type II diabetes. *Industrial Crops and Products*. 53, 244-251.
- [59] Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., and Featherstone, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. 7, 88-95.
- [60] MANSUR, J. S.; BREDER, M. N. R.; MANSUR, M. C. A.; AZULAY, R. D. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *An. Bras. Dermatol.*, Rio de Janeiro, v. 61, p. 121-124, 1986.
- [61] Rauf, A., Uddin, G., Siddiqui, B. S., Khan, H., Uzair, S., Shah, A., Khan, A. (2016). Antinociceptive and anti-inflammatory activities of flavonoids isolated from *Pistacia integerrima* galls. *Complementary Therapies in Medicine*, 25, 132–138.
- [62] Wasowski, C., Loscalzo, L. M., & Marder, M. (2013). Neuropharmacology In vitro binding affinities of a series of flavonoids for m-opioid receptors. Antinociceptive effect of the synthetic flavonoid 3,3-dibromo flavanone in mice, 72.
- [63] Sánchez-Vioque, R., Polissiou, M., Astraka, K., Mozos-Pascual, M. de los, Tarantilis, P., Herraiz-Peñalver, D., and Santana-Méridas, O. (2013). Polyphenol composition, antioxidant, and metal chelating activities of the solid residues from the essential oil industry. *Industrial Crops and Products*. 49, 150-159.
- [64] Yokozawa, T., Chen, C.P., Dong, E., Tanaka, T., Nonaka, G.-I., and Nishioka, I. (1998). Study on the Inhibitory Effect of Tannins and Flavonoids against the 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Radical. *Biochemical Pharmacology*. 56, 213-222.
- [65] Von Gadow, A., Joubert, E., and Hansmann, C.F. (1997). Comparison of the Antioxidant Activity of Aspalathin with That of Other Plant Phenols of Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*),  $\alpha$ -Tocopherol, BHT, and BHA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45, 632-638.
- [66] Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., and Karademir, S.E. (2004). Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using

- Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 7970-7981.
- [67] Chung, Y.-C., Chang, C.-T., Chao, W.-W., Lin, C.-F., and Chou, S.-T. (2002). Antioxidative Activity and Safety of the 50 Ethanolic Extract from Red Bean Fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *J. Agric. Food Chemistry*. 50, 2454-2458.
- [68] Amarowicz, R., Pegg, R.B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., and Weil, J.A. (2004). Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*. 84, 551-562.
- [69] Attou, A., Davenne, D., Benmansour, A. et al. Chemical composition and biological activities of *Ammoides verticillata* essential oil from west Algeria. *Phytothérapie* (2017).
- [70] Kılınçarslan Aksoy, Ö., Mammadov, R. & Seçme, M. Antioxidant activity, phytochemical composition of *Andricus tomentosus* and its antiproliferative effect on Mia-Paca2 cell line. *Mol Biol Rep* 47, 7633–7641 (2020).
- [71] Karakaya, S., Koca, M., Kılıç, C.S. et al. Antioxidant and anticholinesterase activities of *Ferulago syriaca* Boiss. and *F. isaurica* Peşmen growing in Turkey. *Med Chem Res* 27, 1843–1850 (2018).
- [72] Jazayeri, S.B., Amanlou, A., Ghanadian, N. et al. A preliminary investigation of anticholinesterase activity of some Iranian medicinal plants commonly used in traditional medicine. *DARU J Pharm Sci* 22, 17 (2014)

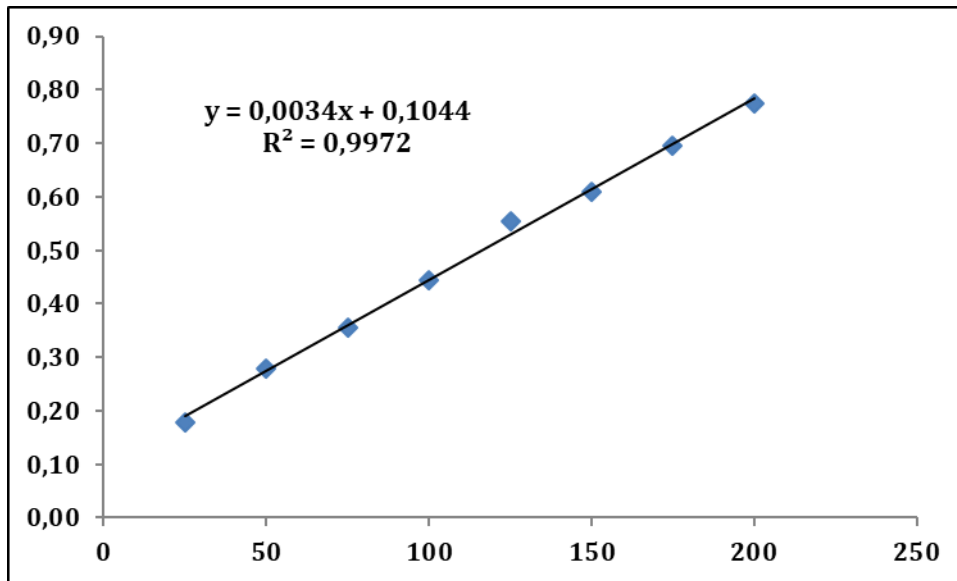


# ***Annexes***





## Annexe 03 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique



## Annexe 04 : courbe d'étalonnage de Quercétine

