



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET
POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية والجزيئية

Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Biochimie Appliquée*

Thème

Etude phytochimique et potentiel antioxydant d'une plante
Algérienne du genre *Cistus* (Cistaceae)

Présenté et soutenu publiquement Le : 02/07/2019

Par

ZERROUGUI LEILA & BEKRAR MANEL

Jury

MOSBAH Asma

MCA. UFM Constantine

Président

BOUTAGHANE Naima

MCA. UFM Constantine

Rapporteur

TENIOU Soumia

MAA. UFM Constantine

Examineur

Année universitaire

2018– 2019

A dédié ce modeste travail

A la mémoire de mes parents

Zui ont été toujours dans mon esprit et dans mon cœur, je vous dédie aujourd'hui ma réussite. Que Dieu, le miséricordieux, vous accueille dans son éternel paradis

A la mémoire de mon beau père Je ne pourrais jamais oublier le respect que j'avais pour vous. Puisse Dieu, le tout puissant vous accueille dans son éternel paradis

*A mon Mari **Med TAHAR**, sources constantes d'encouragement, de soutien, de confiance et d'affection. Un grand merci pour m'avoir permis de réaliser mes longues études et pour tous leurs sacrifices consentis. Sans vous, je n'aurais jamais pu aller jusqu'au bout.*

*A ma grande famille : **ZERROUGUI ET MECHRI**, je cite en particulier ma chère sœur **SAMIA**, mes chers frères **Djamel , Noure-edine , Abdelkarim , Zoheir , Brahim , Ahmed .***

*A ma Belle Famille : **BOUKHELHAL***

*A Ma Très Chère Amie : **Naima***

Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. . En ce jour mémorable, reçoit ce travail en signe de ma vive reconnaissance. Puisse le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour

*A mon amie **Mounia** tes encouragements et ton soutien m'ont toujours été d'un grand secours*

Sans oublier bien sûr mes collègues pour leurs soutiens et sa générosité, ainsi que toutes mes amies, pour leur aide, leur amitié, leur gentillesse et leur soutien moral.

A toute personne également ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Un grand merci à toutes et à tous

LEILA



A dédié ce modeste travail

Je dédie ce modeste travail à

Zui n'aura jamais pu voir le jour sans les soutiens indéfectibles et sans limite de mes chers parents qui ne cessent de me donner avec amour le nécessaire pour que je puisse arriver à ce que je suis aujourd'hui. Que dieux vous protège et que la réussite soit toujours à ma portée pour que je puisse vous combler de bonheur.

Je dédie aussi ce travail à mes chères sœurs Amel, Sanaa et Wissal

Mes chers frères Med Amir, Ahmed Ramy, Habib et Kamel Pour ses soutiens moral et leurs conseils précieux tout le long de mes études

Je le dédie aussi mes neveux et mes nièces

et à tout ceux que j'aime

MANAL



Remerciements

Louange à DIEU, le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux de m'avoir aidé à finir ce modeste travail de recherche.

*Nous tenons à remercier très chaleureusement le Maître de conférences Mme. **BOUTAGHANE Naima** qui nous a permis de bénéficier de leur encadrement. Les conseils qu'elle nous a prodigués, la patience, la disponibilité, la confiance qu'elle nous a témoigné a été déterminante dans la réalisation de notre travail.*

*Nos vifs remerciements Aux membres du jury pour l'honneur qu'ils nous ont fait en jugeant notre travail : Mme. **MOSBAH Asma** d'avoir accepté de présider le jury et Mme. **TENIOU Soumia** d'avoir accepté d'examiner ce manuscrit.*

*Nous tenons à exprimer nos plus vifs remerciements à Mr. **HARIECHE Mohammed** pour la gentillesse, l'aide, les conseils et le temps qu'il nous a consacré durant tout le travail.*

*Un grand remerciement pour Dr. **BENSOUCI Chawki**, responsable du laboratoire de Biochimie au CRBT qui nous a ouvert les portes de son laboratoire durant notre stage.*

*Toutes nos gratitude doivent aller également au Mr. **LACHLAH Hatem** et Mme. **IKHLEF Assia** pour son accueil au sein de leurs laboratoires (analyse alimentaire, bactériologie) au niveau du CRBT et d'avoir mis à notre disposition tout le matériel qui s'y trouve.*

*Nous tenons à remercier très chaleureusement le personnel du laboratoire **LOST (I.C.U Constantine)** et de **l'Institut de Chimie Moléculaire de Reims**.*

Enfin, nous adressons nos plus sincères remerciements à nos parents, frères et sœur ainsi qu'à toute personne qui a contribué, de près ou de loin à la réalisation de ce projet.

Table des matières

Introduction générale.....	1
<i>1^{ère} partie : Recherche Bibliographie</i>	
I.1. Présentation de la famille Cistaceae.....	3
1.1. Généralités.....	3
1.2. Caractéristiques botaniques	4
1.3. Position systématique de la Famille des Cistaceae.....	5
1.4. Etudes chimiques antérieures sur la famille Cistaceae.....	5
2. Présentation du Genre <i>Cistus</i>	5
2.1. Description botanique du genre <i>Cistus</i>	6
2.2. Principaux métabolites secondaires du Genre <i>Cistus</i>	6
2.3. Quelques activités biologiques reconnues.....	8
2.3.1. <i>Cistus</i> en médecine traditionnelle.....	8
2.3.2. Activités biologiques.....	9
II.1. Les composés phénoliques.....	11
II.2. Présentation des flavonoïdes	12
2.1. Généralités.....	12
2.2. Classification des flavonoïdes.....	12
II.3. Propriétés biologiques des flavonoïdes	15
II.4. Propriétés physiologiques des flavonoïdes.....	16
III.1. Stress oxydatif	18
III.2. Les radicaux libres	19
III.3. Différents types des radicaux libres.....	19
3.1. Espèces réactives de l'oxygène (ERO)	19
3.1.1. Les espèces oxygénées réactives radicalaires.....	19
3.1.2. Les espèces oxygénées non radicalaires.....	20
3.2. Espèces réactives azotées (ERN)	20
3.2.1. Espèces radicalaires azotées.....	20
3.2.2. Espèces non radicalaires azotées	20
III.4. Les Antioxydants.....	21
III.5. Les différents systèmes d'antioxydant.....	21
5.1. Système antioxydant endogène enzymatique	21
5.2. Système antioxydant endogène non- enzymatique.....	21
5.3. Systèmes antioxydants exogènes.....	22
III.6. Quelques tests de la capacité antioxydante et antiradicalaire.....	23
6.1. Capacité de piégeage du radical libre DPPH.....	23
6.2. Capacité de piégeage du radical-cation ABTS ⁺	24
6.3. Capacité de réduire l'ion cuprique (CUPRAC).....	24
6.4. Test de blanchissement du β-carotène.....	25
6.5. Test du pouvoir réducteur.....	25
6.6. Test de piégeage du radical Galvinoxyl	25
6.7. Test de l'activité du phénanthroline.....	26

III.7. Maladie d'Alzheimer.....	26
7.1. Définition.....	26
7.2. Formes de la maladie d'Alzheimer.....	26
7.3. Symptômes de la maladie d'Alzheimer.....	27
7.4. Cibles thérapeutique actuelles de l'Alzheimer.....	27
7.4.1. Récepteur de glutamate (NMDA) cible de traitement.....	27
7.4.2. Acétylcholinestérase cible de traitement.....	27
7.5. Cibles thérapeutique potentielles de l'Alzheimer.....	29

2^{ème} partie : Matériels et Méthodes

IV.1. Matériel végétale.....	30
1.1. Description de la zone de la récolte.....	30
1.2. Récolte de la plante du genre <i>Cistus</i>	30
IV.2. Méthodes d'analyses phytochimiques.....	31
2. 1. Chromatographie sur couche mince (CCM).....	31
2. 2. Chromatographie liquide sous vide (VLC).....	31
2. 3. Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP).....	31
IV.3. Méthodes d'analyses physico-chimiques.....	32
3. 1. Spectrométrie UV-Visible.....	32
3. 2. Spectroscopie de RMN.....	32
IV.4. Etude phytochimique de la plante du genre <i>Cistus</i>	33
4.1. Extraction.....	33
4.2. Fractionnement et purification de l'extrait acétate d'éthyle.....	34
IV.5. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes totaux.....	37
5. 1. Dosage des polyphénols totaux.....	37
IV.6. Evaluation de l'activité antioxydante de l'espèce du genre <i>Cistus</i>	38
6.1. Test de piégeage du radical DPPH.....	38
6.2. Test de piégeage de ABTS ⁺	39
6.3. Test de piégeage du radicale Galvinoxyl.....	39
6.4. Test de la capacité antioxydante par réduction de l'ion cuprique.....	40
6.5. Test de la capacité antioxydante par réduction de fer.....	40
6.6. Test de l'activité du phenanthroline.....	40
6.7. Test de blanchiment de β -carotène.....	40
IV.7. Évaluations de l'activité enzymatique.....	41
IV.8. Analyse statistique.....	42

3^{ème} partie : Résultats et Discussions

V.1. Rendement d'extraction.....	43
V.2. Description des profils chromatographiques par CCM et par HPLC.....	44
V.3. Elucidation structurale des composés isolés.....	46
3.1. Elucidation structurale du composé Cs1.....	46
3.2. Elucidation structurale du composé Cs2.....	52
3.3. Elucidation structurale du composé Cs3.....	54
V.4. Dosage des polyphénols et flavonoïdes.....	56
V.5. Evaluation du potentiel antioxydant.....	58
5.1. Test de l'activité scavenger du radical DPPH.....	58
5.2. Test de l'activité scavenger du radical l'ABTS ⁺	60
5.3. Test de piégeage du radicale Galvinoxyl (GOR).....	62
5.4. Test de l'activité réductrice de l'ion cuprique (CUPRAC).....	63
5.5. Test de l'activité réductrice de l'ion ferrique.....	65
5.6. Test de l'activité de phénanthroline.....	67

5.7. Test de blanchissement du β -carotène.....	68
V.6. Évaluations de l'activité enzymatique.....	69
6.1. Evaluation de l'activité anti-AChE et anti- BChE.....	69
Conclusion Générale.....	71
<i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i>	

Acronymes, abréviations et symboles

A: Absorbance

AcOEt: Acétate d'éthyle

AChE: Acétylcholinestérase

APGIV: Angiosperm Phylogeny

ADN : Acide désoxyribonucléique

A_{0,5}: Concentration à A=0,5

ABTS : 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique).

BHA : Butyl-hydroxy-anisole

BHT: Butyl-hydroxy-toluène

BChE : Butérylcholinestérase

Cs: Cistus

CCM: Chromatographie sur couche mince.

CHCl₃: Chloroforme.

CLHP : Chromatographie liquide haute performance.

COSY: Correlated Spectroscopy

CUPRAC: Cupric Réducing Antioxidant Capacity.

DPPH: 2, 2-Di-Phényl-1-Picryl-Hydrazyl.

DTNB: 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoïque acide)

e⁻ : Electron

ERN: Espèces réactives azotées

EOA: Espèces oxygénées activées.

ERO : Espèces réactives oxygénées.

GPx : Glutathion peroxydase

GSH: Glutathion

Hz : Hertz

Ha: Hectare

H₃BO₃: Acide borique

HMBC: Heteronuclear Multiple Bonding Connectivity

HMQC: Heteronuclear Multiple Quantum Connectivity

H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène

HOCl: Acide hypochlorique

ICMR: Institut de Chimie Moléculaire de Reims ICMR (France)

IC₅₀ : Concentration d'inhibition 50.

J (Hz) : Constante de couplage exprimée en Hertz

LOST: Laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutique

MA : Maladie d'Alzheimer

mg: Milligramme

ml : Millilitre

nm: Nanomètre

μl: Microlitre

MeOH: Méthanol.

NBT :Nitrobluetetrazolium

NMDA: N-Methyl-DAspartate

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OST : Obtention de Substances Thérapeutiques

Ppm : Parties par million.

RMN 13C: Résonance Magnétique Nucléaire du carbone.

RMN: Résonance Magnétique Nucléaire.

RMN1H : Résonance Magnétique Nucléaire du proton.

Syn : Synonyme

SOD : Superoxyde dismutase.

TMS: Tétra méthyl silane

δC : Déplacement chimique du carbone en ppm.

δH : Déplacement chimique du proton en ppm.

UV : Ultra-Violet.

VLC : Chromatographie liquide sous vide

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

vitamines C : acide ascorbique

α-TH : α- tocophérol

K₂S₂O₈ : le persulfate de potassium

Liste des tableaux

1ère Partie

Tab. 1 : Distribution géographique des huit taxons des Cistaceae3

Tab. 2 : Classification de la famille de Cistaceae.....5

2ème Partie

Tab. 3 : VLC sur silice normale de l'extrait AcOEt des parties aériennes de *Cistus*..... 35

3ème Partie

Tab. 4 : Les rendements des différents extraits43

Tab. 5 : données spectrales UV du composé **Cs1**.....47

Tab. 6 : Déplacements chimiques en RMN ¹H et RMN ¹³C du composé **Cs1** dans CD₃OD...52

Tab. 7 : Résultats du dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes totaux.....56

Liste des figures

1^{ère} Partie

Fig. 1 : Quelques fleurs et feuilles de plantes de la famille cistaceae.....	4
Fig. 2 : Espèce <i>Cistus ladanifer</i>	6
Fig. 3 : composés flavonoïdiques de type flavonol isolé à partir de <i>C. albanicus</i>	7
Fig. 4 : Structures de flavonoïdes isolés du labdanum de <i>C. ladanifer</i>	7
Fig. 5 : Structures de diterpènes à squelette labdane isolés de <i>C. ladanifer</i>	8
Fig. 6 : Les principales classes de composés phénoliques.....	11
Fig. 7 : Structure de base des flavonoïdes.....	12
Fig. 8 : Différentes classes de Flavonoïdes.....	14
Fig. 9 : Déséquilibre de la balance pro-oxydant / antioxydant.....	18
Fig. 10 : Réduction du radical DPPH.....	23
Fig. 11 : oxydation de l'ABTS par le persulfate de potassium et génération de ABTS ^{•+}	24
Fig. 12 : Réaction de CUPRAC.....	25
Fig. 13 : structure du radical galvinoxyl.....	26
Fig. 14 : Mécanisme chimiques de la méthode d'Ellman.....	28

2^{ème} Partie

Fig 15 : La forêt de Chettabah Ain Smara (Constantine).....	30
Fig .16 : les différentes étapes d'extraction.....	33
Fig. 17 : schéma des étapes de l'extraction des parties aériennes de <i>Cistus</i>	34
Fig 18 : Procédé du fractionnement de l'extrait AcOEt par VLC.....	35
Fig.19 : CCM récapitulatif des fractions de la VLC.....	36
Fig. 20 Chromatogramme du composé Cs 1.....	36
Fig. 21 : Chromatogramme de [F4]	37
Fig. 22 CCM de la fraction [F4].....	37

3^{ème} Partie

Fig. 21 : Profils CCM sur gel de silice normale des extraits d'une espèce du genre <i>Cistus</i>	44
Fig. 22 : Chromatogramme CLHP des extraits méthanolique, d'acétate d'éthyle, butanolique et chloroformique.....	45
Fig. 23 : Série spectrale UV du composé Cs1.....	47
Fig. 24 : Spectres de RMN ¹ H du composé Cs1 dans CD ₃ OD.....	48
Fig. 25 : Spectres de RMN ¹³ C du composé Cs1 dans CD ₃ OD.....	49
Fig. 26 : Spectre HSQC (zone génine) du composé Cs1 dans CD ₃ OD.....	49
Fig. : 27 le spectre COSY H-H	50
Fig. 28 : Spectre HMBC du composé Cs1 dans CD ₃ OD.....	50

Fig. : 29 le carbone C6 est acylé par Coumaroyl.....	51
Fig. 30 : Structure du composé CS1	51
Fig. 31 : Spectres RMN 1H de la zone aromatique du composé Cs2.....	53
Fig. 32 : spectre COSY H-H du composé Cs2	54
Fig. 33 : Structure du composé CS2 Gallocatéchine	54
Fig. 34 Spectre RMN ¹ H du composé Cs3.....	55
Fig. 35 : Structure du composé CS3 Catéchine.....	56
Fig. 36 : courbe étalon de la quercétine pour le dosage de flavonoïdes.....	56
Fig.37 : Détermination du contenu en composés phénolique et flavonoïdiques des différents extraits.....	57
Fig.38 : Courbes des pourcentages d'inhibition du radical DPPH.....	59
Fig. 39 : Photo prises lors du dosage de l'activité antiradicalaire DPPH'.....	59
Fig.40 : IC50 pour l'activité antiradicalaire DPPH'	60
Fig. 41 : Photo prises lors du dosage de l'activité antiradicalaire ABTS	61
Fig. 42 : Courbes des pourcentages d'inhibition du radical ABTS ^{•+}	61
Fig.43 : IC50 pour l'activité antiradicalaire ABTS ^{•+}	61
Fig.44 : Courbes des pourcentages d'inhibition du radical Galvinoxyl.....	62
Fig. 45: IC50 pour l'activité antiradicalaire GOR.....	63
Fig. 46: Courbes des absorbances en fonction des concentrations (CUPRAC).....	64
Fig.47: les A _{0,5} des échantillons testés CUPRAC.....	64
Fig. 48 : Photo prises lors du dosage de l'activité CUPRAC.....	65
Fig.49 : Courbes des absorbances des différents extraits de la plante (test pouvoir réducteur).....	66
Fig.50: A _{0,5} des échantillons testés pour l'activité du pouvoir réducteur.....	66
Fig.51 : Photo prises lors du test du pouvoir réducteur.....	67
Fig.52 : Courbes des absorbances des différents extraits de la plante. (Test du phénanthroline).....	67
Fig. 53: A _{0,5} des échantillons testés pour l'activité phénanthroline.....	68
Fig. 54: Courbes des pourcentages d'inhibition de la peroxydation lipidique.....	69
Fig. 55 : IC ₅₀ pour l'activité β-carotène.....	69
Fig.56 : IC50 pour l'activité anti- AChE et anti-BChE des extraits E1-E5 de la plante du genre <i>Cistus</i>	70

INTRODUCTION GENERALE

Au travers des âges, les plantes ont toujours occupé une place prépondérante dans la vie de l'homme. Toutes les civilisations connues ont utilisé les plantes pour se nourrir, se défendre, se vêtir ou se soigner. L'utilisation thérapeutique des extraordinaires vertus des plantes pour le traitement de toutes les maladies de l'homme est très ancienne et a évolué avec l'histoire et le développement de l'humanité. Les connaissances empiriques accumulées ont permis aux différentes civilisations de prendre les plantes comme source essentielle de médicaments. Ainsi, jusqu'au début du 20^{ème} siècle, presque tous les médicaments étaient à base de plantes (**Waridel P., 2003**).

Le XXe siècle a été marqué par la mise au point de différentes classes de molécules de synthèse dont l'efficacité a permis de faire face aux maladies comme le paludisme, VIH, cancer...etc. Cependant, la recherche de nouveaux agents pharmacologiques actifs via le screening phytochimique et biologique des ressources naturelles a conduit à la découverte d'un grand nombre de médicaments largement utilisés dans le traitement de nombreuses maladies.

Par ailleurs, selon l'Organisation Mondiale de la Santé l'OMS, 80% de la population mondiale emploient les plantes médicinales pour les soins de santé, (**World Health Organisation., 2000**) cela traduit d'une part la difficulté d'accès de ces populations aux soins de la médecine moderne, et d'autre part, les plantes ont souvent montré une efficacité indéniable. Aujourd'hui, le savoir des tradipraticiens est de moins en moins transmis de génération à génération et tend à disparaître.

L'Algérie, en raison de son climat diversifié (méditerranéen, semi-aride et saharien) et la nature de ses sols, possède une flore particulièrement riche et variée en plantes aromatiques, médicinales, toxiques et condimentaires, dont la plupart existe à l'état spontané. Cette flore compte environ 3000 espèces réparties dans 150 familles botaniques parmi lesquelles 15 % sont endémiques (**Quezel., Santa, 1963**). L'exploitation de nouvelles molécules bioactives à partir de ces bioressources et leur utilisation comme une alternative thérapeutique aux molécules synthétiques ayant des effets secondaires souvent néfastes, sont devenues parmi les objectifs prioritaires pour plusieurs laboratoires de recherche et les industries cosmétiques, alimentaires et pharmaceutiques.

Inscrit dans ce contexte, notre travail rentre dans le programme de recherche de laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques (LOST) visant à valoriser la flore locale, nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité antioxydante de la plante

médicinale *Cistus* appartenant à la famille des Cistaceae. Cet intérêt s'explique par la richesse des plantes du genre *Cistus* en métabolites secondaires d'un grand intérêt biologique, comme les polyphénols, les flavonoïdes par (Barros et al., 2013) et les diterpènes (Pascual et al., 1982).

Ce manuscrit est divisé en trois parties :

- ❖ La première partie : concerne la recherche bibliographique, réunit en trois chapitres distincts :
 - Le 1^{er} chapitre, est consacré à un rappel sur les caractéristiques botaniques de la famille Cistaceae et du genre *Cistus*. Les principales études phytochimiques et biologiques antérieures relatives à une espèce appartenant à ce genre seront exposées.
 - Dans le 2^{ème} chapitre nous décrivons quelques composés phénoliques notamment les flavonoïdes, leur définition, leur classification et leurs propriétés biologiques
 - Le 3^{ème} chapitre s'intéresse au stress oxydant, les différents systèmes antioxydant et une présentation générale de quelques tests de la capacité antioxydante. On a défini également la maladie d'Alzheimer.
- ❖ La deuxième partie, est consacrée à la présentation des méthodes d'extraction, du fractionnement et de purification des composés isolés et à l'évaluation des activités antioxydantes et inhibitrice des enzymes.
- ❖ La troisième partie présente les résultats obtenus et leurs discussions.

1^{ERE} PARTIE

I.1. Présentation de la famille Cistaceae

I.1.1. Généralité

La famille Cistaceae (famille du Ciste) est une famille de plantes dicotylédones qui comprend 200 espèces regroupées dans 8 genres (*Cistus*, *Fumana*, *Halimium*, *Helianthemum*, *Tuberaria*, *Crocianthemum*, *Hudsonia* et *Lechea*.) (Maarten et al., 2016 ; Bedoya et al., 2009 ; Guzmán et Vargas., 2009 ; Arrington et Kubitzki., 2003 ; Dansereau., 1939 ; Janchen., 1925) : dont deux principaux, *Helianthemum* (110 espèces) et *Cistus* (20 espèces). En effet, toutes les espèces relevant des cinq premiers genres mentionnés ci-dessus, sont distribuées presque exclusivement dans le bassin méditerranéen. Les espèces constituant les trois derniers genres cités se rencontrent dans les régions tempérées de l'Amérique (Tableau 1).

En Algérie, le ciste est réparti partout sur le tell et le littoral, dans les forêts, broussailles, coteaux secs, terrains siliceux, rocaillieux et calcaires (Beniston et Beniston., 1984).

Tableau 1 : Distribution géographique des huit taxons des Cistaceae

Taxon	Nombre d'espèces	Localisation	Références
<i>Helianthemum</i>	~ 110	Europe centrale et méridionale, Russie, Asie centrale, Afrique du Nord (Algérie, Maroc, Tunisie, Lybie, ...), Amérique	(Guzmán et Vargas., 2009 b), (Stevanović et al., 2009), (Sánchez-Gómez et al., 2011), (Quezel et Santa., 1963)
<i>Cistus</i>	~ 21	Régions méditerranéennes, Afrique du Nord.	(Guzmán et Vargas., 2009 b), (Ellul et al., 2002), (Guzmán et Vargas., 2005), (Kamari et al., 2009)
<i>Crocianthemum</i>	~ 20	Côtes atlantiques d'Amérique (Californie et Mexique).	(Guzmán et Vargas., 2009 b), (Civeyrel et al., 2011)
<i>Lechea</i>	~ 17	Amérique du Nord	(Guzmán et Vargas., 2009 b), (Civeyrel et al., 2011)
<i>Tuberaria</i> [= <i>Xolantha</i>]	~ 12	Régions méditerranéennes occidentales et méridionales du Nord	(Guzmán et Vargas., 2009 b), (Gallego M.J., Aparicio A., 1993), (Castro et al., 2007), (Herrera., 2004)
<i>Fumana</i>	~ 9	Europe méridionale, régions Méditerranéennes	(Quezel et Santa., 1963), (Güemes., 1999), (Toth et Révay., 2011)
<i>Halimium</i>	~ 8	Europe méridionale, Afrique du Nord, région méditerranéenne occidentale.	(Guzmán et Vargas., 2009 b), (Zunzunegui et al., 1999), (Zaiter et al., 2010)
<i>Hudsonia</i>	~ 2	Amérique du Nord.	(Guzmán et Vargas., 2009 b), (Civeyrel et al., 2011), (Massicotte et al., 2010)

Le nom des Cistes (famille des Cistes) est donné à ces plantes par Joseph Pitton de Tournefort du mot grec : « kisthos » signifiant capsule (**Achille et al., 1876 ; Baillon, 1872**). La plupart des membres de cette famille sont très parfumés et ont une odeur douce faisant de cette flore un élément bien apprécié en industrie des parfums et dans les usages ornementaux. En outre, ces espèces peuvent s'adapter facilement aux incendies, qui détruisent de vastes zones forestières, à cause de la résistance de leurs graines ce qui leur permet d'y repeupler rapidement dans la saison suivante (**Ferrandis et al., 1999**).

I .1.2.Caractéristiques botaniques

Les plantes de cette famille sont généralement à fleurs régulières, bisexuées, solitaires ou arrangées en cymes. Elles présentent généralement 5 sépales dont deux plus réduits et 5 pétales (**Fig1**). Les étamines sont nombreuses. L'ovaire est supère glanduleux, rarement uniloculaire, il est composé de trois (chez *Helianthemum*), cinq (*Cistus*) ou 10 carpelles soudés. Chaque loge renferme deux ou plusieurs ovules orthotropes, le style est simple à stigmate globuleux ou ramifié (**Markova., 1975**). Les feuilles sont opposées, simples, stipulées et portent dans de nombreux cas des glandes sécrétrices d'huiles volatiles (*Cistus* et *Helianthemum*) ou des poils glanduleux (**Baillon., 1872 ; Herrera., 1992**).



Figure 1 : Quelques fleurs et feuilles de plantes de la famille cistaceae

Le fruit est une capsule globuleuse coriace ou ligneuse enveloppée dans le calice qui est persistant offrant une, trois, cinq à douze loges et s'ouvrant en trois comme chez les hélianthèmes, cinq ou dix valves (**Fig1**). Il renferme de nombreuses graines munies d'un albumen poudreux ou cartilagineux, et d'un embryon courbé ou circiné, avec des cotylédons

étroits. Leur nombre est de 500 à 1000 graines par capsule (**Guzmán et Vargas, 2009 ; Delgado et al., 2008**).

Certaines espèces sont des partenaires symbiotiques avec des espèces de truffes (*Terfez, Tuber*) tandis que d'autres constituent des plantes pionnières importantes dans les endroits perturbés pour la stabilisation des sols (**Massicotte et al., 2010**).

I.1.3. Position systématique de la Famille des Cistaceae

Selon la classification actuelle des angiospermes (**APGIV : James et al., 2016**) cette famille est située dans l'ordre des Malvales.

Tableau2 : classification de la famille de Cistaceae

	Plantae
Embranchement:	Spermaphytes
Sous-embranchement	Angiospermes
Ordre	Malvales
Famille	Cistaceae

La classification phylogénétique APG IV (2016) incorpore dans cette famille les *Pakaraimaea* (auparavant *Dipterocarpaceae*).

I.1.4. Etudes chimiques antérieures sur la famille Cistaceae

Les recherches bibliographiques réalisées sur cet axe montrent que la majorité d'études phytochimiques effectuées sur un nombre important d'espèces de la famille des Cistaceae certifie la richesse ainsi que la diversité structurale de ces dernières en métabolites secondaires, dont la majorité appartient à la classe des terpènes et phénols, plus précisément les dérivés diterpéniques (**Kalpoutzakis et al., 2003 ; Angelopoulou et al., 2002 ; Robles et Garzino., 2000**) et flavonoïdiques (**Barros et al., 2013 ; Lorente et al., 1992 ; Proksch et Gulz., 1984**). Cependant, seulement deux genres (*Cistus* et *Halimium*) sont bien exploités sur le plan phytochimique

I.2. Présentation du Genre *Cistus*

Cistus est un genre des plantes fleurissante de la famille des Cistaceae, contenant environ 20 espèces. Les cistes sont des arbrisseaux dicotylédones poussant le plus souvent sur le pourtour méditerranéen à travers le moyen orient et également sur les îles canaries. Ils adorent en effet les sols secs (généralement siliceux mais aussi calcaires) et ensoleillés. De plus ils sont pyrophytes ayant la particularité de se régénérer facilement et même de se multiplier après les incendies. Autant dire que les maquis ou les garrigues méditerranéennes, Si souvent touchés

par les feux de forêts, sont tapissés de cistes qui fleurissent entre le printemps et l'été (avril - juin).

I.2.1. Description botanique du genre *Cistus*

Les arbrisseaux ont une hauteur allant de 30 cm à 1 m. Les racines sont peu développées, superficielles. Les feuilles sont opposées, entières, oblongues à lancéolées, mesurant jusqu'à 10cm de long, avec un bord ondulé et une texture collante, de couleur vert foncé à gris-vert selon les espèces.

Les fleurs, blanches ou roses, en coupe comptent 5 pétales à l'aspect chiffonné comme du papier crépon : elles sont solitaires ou groupées en cymes terminales ou axillaires (Quezel et Santa., 1962), leur durée de vie éphémère n'est que de 24h mais elles se renouvellent sans cesse de mai à juillet (Fig2).

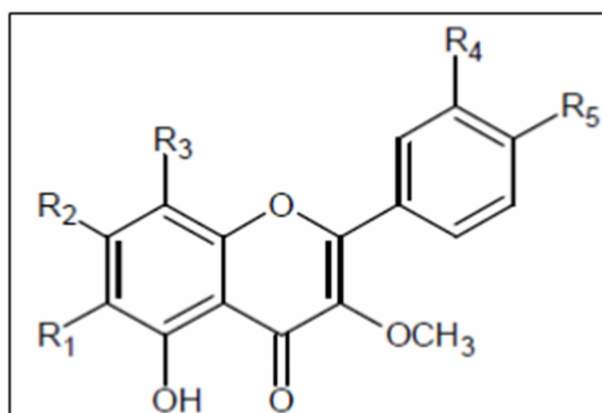


Figure 2 : Espèce *Cistus ladanifer*
<https://jardinage.ooreka.fr/plante/voir/172/ciste>

I.2.2. Principaux métabolites secondaires du Genre *Cistus*

Un grand nombre des espèces du genre *Cistus* ont fait, à ce jour, l'objet d'études chimiques et de très nombreux métabolites secondaires ont été isolés et caractérisés. Les recherches phytochimiques réalisées sur ce genre ont permis de mettre en évidence la domination des composés flavonoïdiques (de type myricétine, apigénine, lutéoline, gossypétine, herbacétine et isorhamnétine) et diterpéniques dont les labdanes et clérodanes forment le plus grand groupe de diterpènes isolés des Cistes (Papaefthimiou et al., 2014). Les pages qui suivent tracent un aperçu non exhaustif, pour ne pas tomber dans le fastidieux, des différents composés rencontrés dans le genre *Cistus*

L'investigation phytochimique de la plante *C. albanicus* a conduit à l'isolement et l'identification de neuf composés flavonoïdiques de type flavonol (**Vogt et al., 1987**).



		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
(1)	Gossypétine 3,7,8,3',4'-pentaméthyl éther	H	OMe	OMe	OMe	OMe
(2)	Gossypétine 3,8,3'-triméthyl éther	H	OH	OMe	OMe	OH
(3)	Herbacétine 3,7,8,4'-tetraméthyl éther	H	OMe	OMe	H	OMe
(4)	Herbacétine 3,8,4'-triméthyl éther	H	OH	OMe	H	OMe
(5)	Herbacétine 3,8-diméthyl éther	H	OH	OMe	H	OH

		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
(6)	Quercétagetine 3,6,3'-triméthyl éther	OMe	OH	H	OMe	OH
(7)	Quercétagetine 3,6-diméthyl éther	OMe	OH	H	OH	OH
(8)	6-hydroxy kaempférol 3,6,4'-triméthyl éther	OMe	OH	H	H	OMe
(9)	6-hydroxy kaempférol 3,6-diméthyl éther	OMe	OH	H	H	OH

Figure 3 : composés flavonoïdiques de type flavonol isolé à partir de *C. albanicus*

Les flavanols nommés catéchine (**34**), gallocatéchine (**35**), épicatechine (**36**) et épigallocatéchine (**37**) et les acides éllagique (**38**), gallique (**39**) et vanillique (**40**) sont les autres composés phénoliques isolés du labdanum de *C. ladanifer* par (**Barros et al. 2013**)

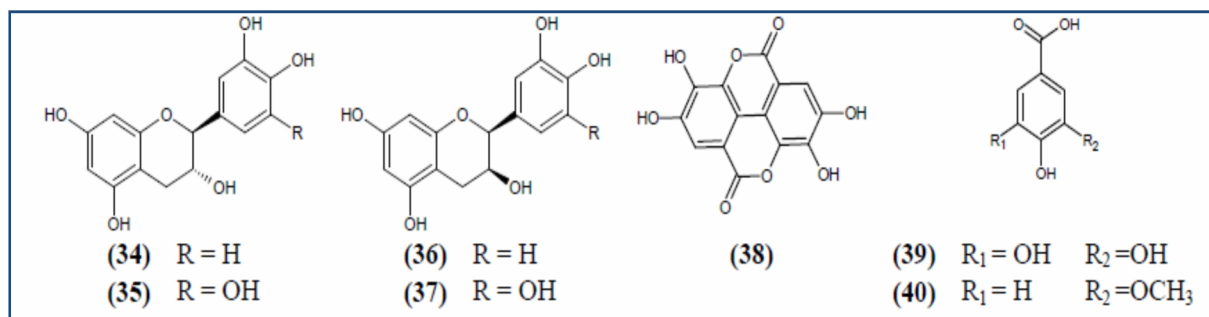


Figure 4: Structures de flavonoïdes isolés du labdanum de *C. ladanifer*

La gomme résine de l'espèce *C. ladanifer* a fait l'objet d'étude en 1982 par T. J. De Pascual et al. (Pascual et al., 1982). Ces travaux ont permis d'identifier plus d'une dizaine de diterpènes à squelette labdane.

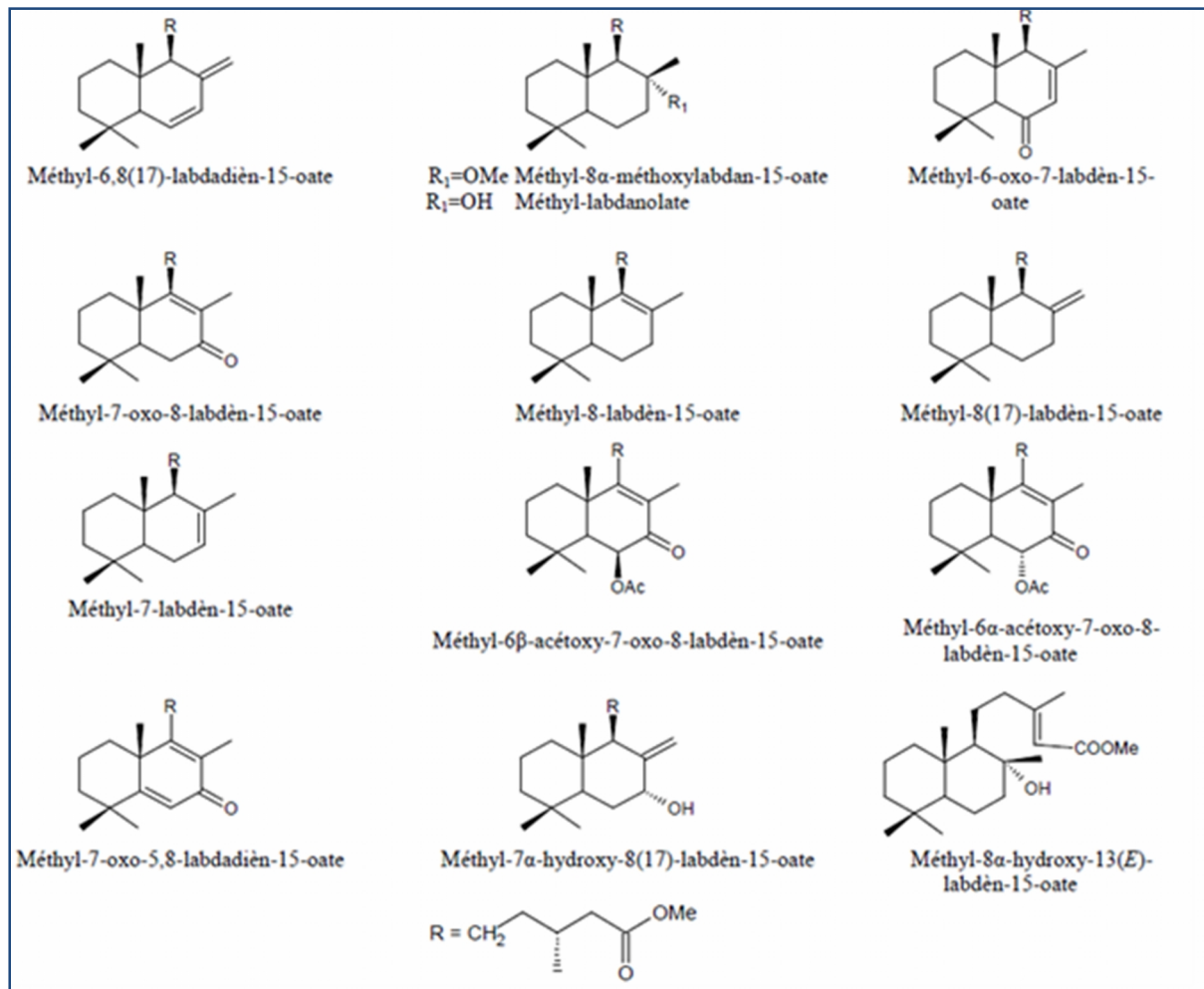


Figure 5 : Structures de diterpènes à squelette labdane isolés de *C. ladanifer*

I.2.3. Quelques activités biologiques reconnues

I.2.3.1. *Cistus* en médecine traditionnelle

Toutes les espèces du genre *Cistus* sont fréquemment utilisées en médecine traditionnelle pour leurs propriétés antimicrobiennes (Chinou et al., 1994 ; Demetzos et al.,1999), antitumorales (Dimas et al.,2000), antivirales (Dimas et al.,2000), et anti-inflammatoires . (Demetzos et al., 2001 ; Singh et al., 1998 ; Yesilada et al., 1997)

Cistus salvifolius possède une activité antifongique et antimicrobienne, surtout vis-à-vis de *Listeria monocytogenes*, d'où son utilisation dans l'aromatization traditionnelle des produits laitiers fermentés (Bayoub et al., 2010). En Turquie, cette espèce est utilisée contre les hémorragies et la bronchite (Bellakhdar., 1998).

Au Maroc, les feuilles de *Cistus albidus* sont utilisées en décoction contre les douleurs gastriques et comme hypoglycémiant, et en infusion dans le thé comme digestif phytothérapie **(Kahouadji., 1995)**

Cistus creticus L. (Syn. *C. incanus* ou *C. villosus*), espèce très répandue sur le pourtour du bassin méditerranéen, est un arbrisseau mesurant environ un mètre. La décoction de ses feuilles agit contre les coliques **(Bellakhdar., 1998)**.

Cistus ladaniferus L. est utilisée à grande échelle par les populations locales du nord du Maroc comme anti-acide, antidiarrhéique et antispasmodique **(Aziz et al., 2006)**. En Espagne, les infusions de ses feuilles et fleurs sont employées comme remède pour soulager les maux gastriques, l'inflammation et nettoyer les blessures **(Crespo Martín et al., 2009)**. La poudre des graines de *Cistus ladaniferus* L associée avec celle de la nigelle (*Nigella sativa*) est largement utilisée Dans la région d'Al Haouz-Rhamna (Maroc) pour traiter le diabète **(Benkhniq et al., 2014)**.

I.2.3.2. Activités biologiques

En corrélation avec les différents usages traditionnels des plantes de la famille Cistaceae **(Bellakhdar., 1997)**, diverses études biologiques ont été menées afin de déterminer les différentes activités biologiques susceptibles d'être exploitées ultérieurement à des fins thérapeutiques. La majorité d'entre elles concernent les effets antioxydant, antimicrobien **(Catalanet al., 2010)**, antiprolifératif **(Benjemia et al.,2013)** , anti-infection **(Bedoya et al.,2009)** ,anti-inflammatoire, antinociceptif **(Kupeliet al .,2007)**,..... etc.

Pour sa part, le genre *Cistus* a fait l'objet de nombreux travaux mettant en évidence des activités variées dont on peut citer : anti-virale (*C. incanus* et *C. populifolius*) **(Abad et al., 1997; Droebner et al., 2007; Ehrhardt et al., 2007)**, antioxydante (*C. ladanifer*) **(Andrade et al., 2009)** et antimicrobienne, *Bouamama et al.*, ont montré que les extraits aqueux et organiques des espèces *C. villosus* L et *C. monspeliensis* L marocaines sont dotés d'un pouvoir antimicrobien intéressant vis-à-vis des microorganismes responsables de beaucoup d'infections chez l'homme **(Bouamama et al., 2006)**.

L'étude du pouvoir antimycobactérien de *Cistus albidus* et *Cistus salvifolius*, a montré que les extraits aqueux et éthanoliques possèdent un effet sur *Mycobacterium smegmatis* et *Mycobacterium aurum*. Cet effet se traduit par l'inhibition totale de la croissance. **(Haouag et al.2005)**

En 2005, une étude a été faite sur cinq espèces de *Cistus* se trouvant en Turky, il s'agit de *C. creticus* L., *C. laurifolius* L., *C. monspeliensis* L., *C. parviflorus* Lam., et *C. salviifolius* L.,

dans cette étude l'activité antibactérienne des extraits : aqueux, méthanolique, chloroformique, avec de l'acétate d'éthyle et le butanol, a été testée sur *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213 and ATCC 25923), *Streptococcus faecalis* (ATCC 29212), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Bacillus cereus* (RSKK 1122), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922), et *Candida albicans* (ATCC 10231). Tous les extraits testés ont inhibé la croissance des bactéries testées sauf *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans* qui ont montré une certaine résistance (**Güvenc et al., 2005**)

II.1. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires qui constituent un des groupes les plus représentés et largement distribués dans le monde végétal avec plus de 8000 structures phénoliques divisés en plusieurs catégories: les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols, les tanins qui sont des produits de la polymérisation des flavonoïdes, les acides phénoliques, les coumarines, les lignanes et d'autres classes existent en nombres considérables (**Fig 6**) (**Dacosta., 2003**). L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside (**Bruneton., 1999**)

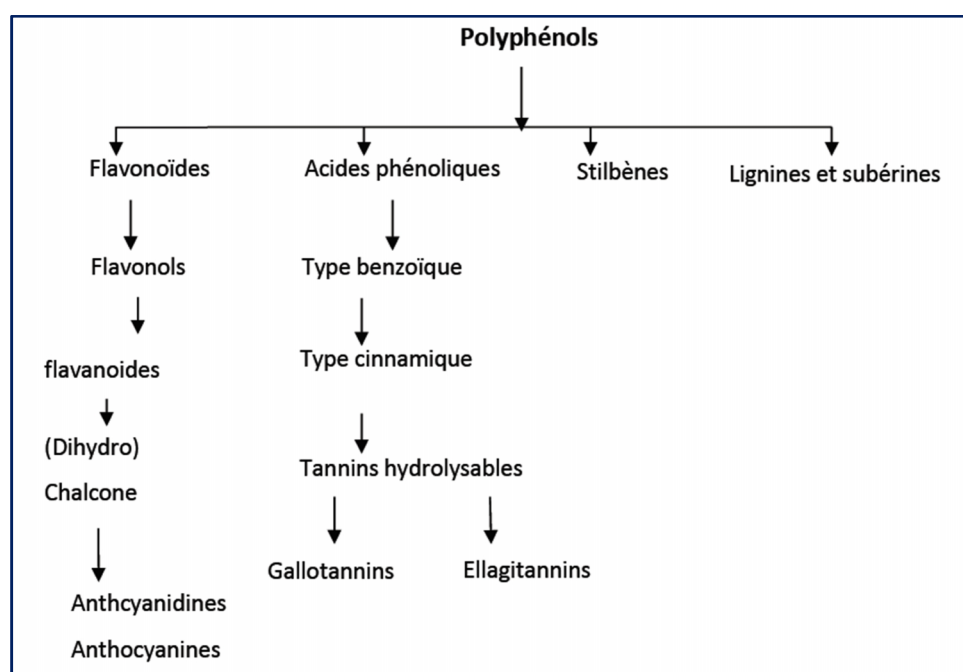


Figure 6 : Les principales classes de composés phénoliques

Les polyphénols sont les antioxydants les plus pressants dans la nature (**Gee et Johnson., 2001**), de nombreuses études sont en faveur d'un impact positif de leur consommation sur la santé. En effet, ils pourraient permettre de prévenir de nombreuses pathologies comme le cancer (**Brown et al., 1998**), les maladies dégénératives et cardio-vasculaires (**Paganga et al., 1999**) effets anti-inflammatoires, ou encore antiviraux (**Yang et al., 2000**). Un encouragement à la consommation d'aliments d'origine végétale riches en composés phénoliques désormais une des principales recommandations en santé publique.

Les composés phénoliques sont commodément classés selon le nombre d'atomes de carbone dans le squelette de base (**Dacosta., 2003**).

II.2. Présentation des flavonoïdes

II.2.1. Généralités

Occupant une place prépondérante dans le groupe des phénols, les flavonoïdes sont des métabolites secondaires ubiquistes des plantes. Plus de 9000 flavonoïdes naturels ont été décrits (Hernández, 2009). On estime que 2 % environ du carbone organique photo synthétisé par les plantes, soit quelques 109 tonnes par an, sont convertis en flavonoïdes (Agrawal et Markham., 1989)

Flavonoïdes (de *flavus*, « jaune » en latin) est le terme générique pour des composés basés sur un squelette à 15 carbones, qui à son niveau le plus simple, consiste en deux cycles phényles, les cycles A et B, connectés par un pont à trois carbones (structure en C₆-C₃-C₆). Le pont en C3 entre les cycles A et B est communément cyclisé pour former le cycle C (Fig7).

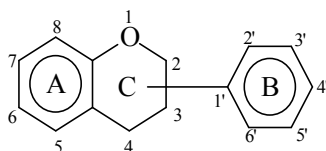


Figure 7 : Structure de base des flavonoïdes.

C'est chez les Angiospermes que la diversité structurale des flavonoïdes est maximale. Ils sont de façon très générale localisés dans les feuilles (dans l'épiderme ou entre l'épiderme et le mésophylle), dans les fleurs (cellules épidermiques) ou encore dans les fruits (tégument externe) (Bruneton., 1999)

II.2.2. Classification des flavonoïdes

Les diverses classes de flavonoïdes diffèrent en fonction de la cyclisation et du degré d'insaturation et d'oxydation du cycle C alors que les composés individuels au sein d'une classe diffèrent par la substitution des cycles A et B. Parmi les nombreuses classes de flavonoïdes présentées (Fig8), nous citerons les principales : anthocyanes, flavanols, flavones, flavanones, isoflavones et proanthocyanidols (Harborne., 1988)

Les flavonoïdes sont souvent hydroxylés en positions 3, 5, 7, 3', 4' et/ou 5'. Un ou plusieurs de ces groupes hydroxyles sont fréquemment méthylés, acétylés, prénylés ou sulfatés. Dans les plantes, les flavonoïdes sont souvent présents sous forme C- ou O-glycosylés ; les formes libres, sans sucres attachés, sont appelées génines. Les O-glycosides, de loin les plus fréquents, portent leurs substituants sur les groupements hydroxyles de la génine, alors que pour les C-glycosides, la liaison se fait directement avec un carbone de la génine, les C-6

et/ou C-8. En effet, la formation de la (ou des) liaison(s) hétérosidique(s) est sous la dépendance de transférases très spécifiques quant au substrat et à la position d'osylation **(Bruneton., 1999)**

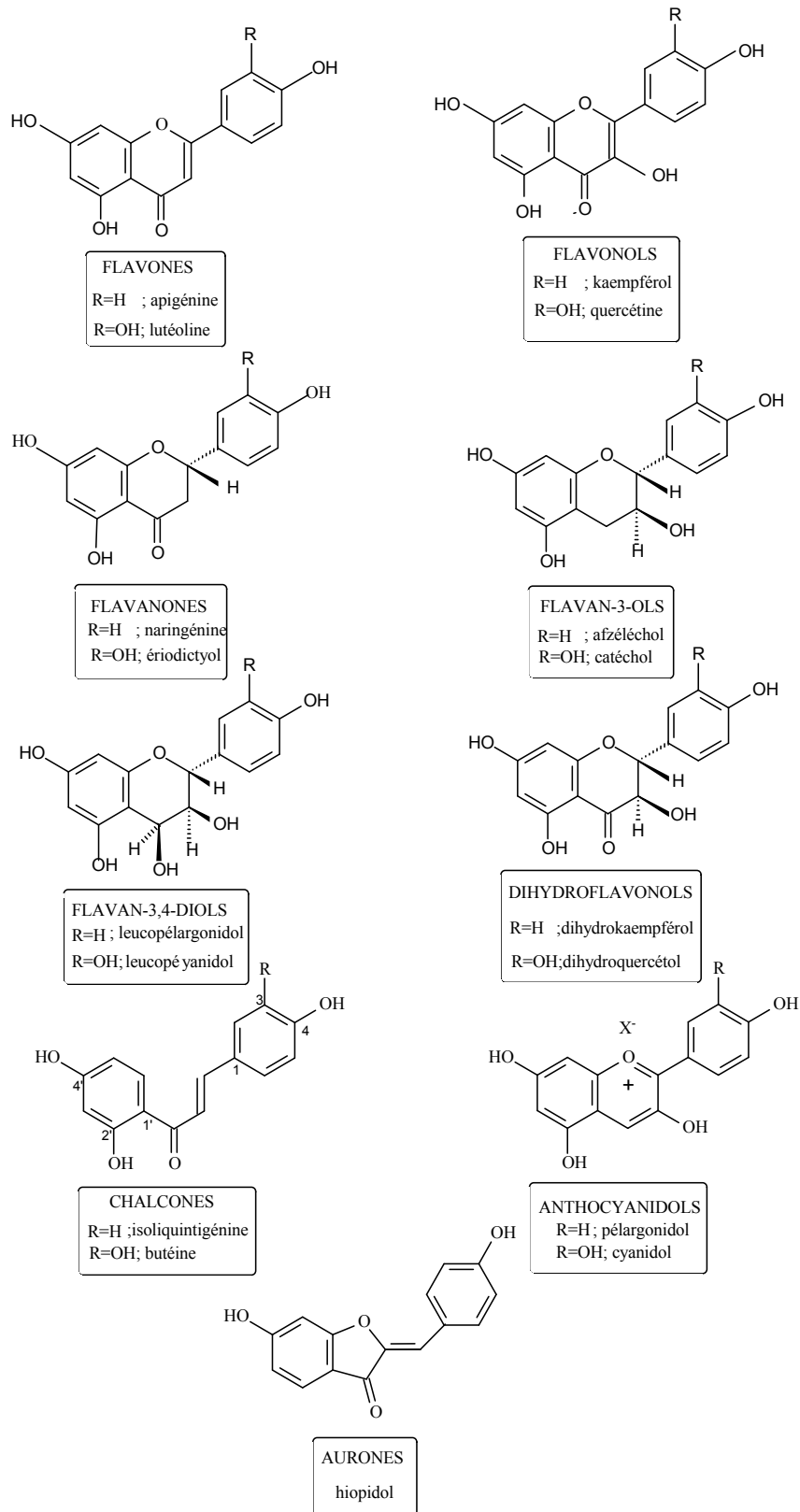


Figure. 8 : Différentes classes de flavonoïdes

Plus de 80 sucres différents ont été trouvés liés aux flavonoïdes des plantes. Parmi eux, le *D*-glucose est de loin le monosaccharide le plus courant, d'autres hexoses, le *D*-galactose et le

D-mannose, ainsi que des pentoses, le *D*-xylose, le *L*-arabinose et le *D*-apiose sont fréquents avec le *L*-rhamnose (seul désoxyhexose) et des acides uroniques (le plus souvent l'acide *D*-glucuronique). On trouve également des disaccharides (une quarantaine dont les plus courants : le rutinose et le néohespéridose), des trisaccharides (environ 30 espèces) et quelques rares tétrasaccharides. Les sucres peuvent à leur tour être substitués par des groupements acyles tels que le malonate ou l'acétate (Hollman., 2000).

II.3. Propriétés biologiques des flavonoïdes :

Connus pour leurs multiples rôles, les composés flavoniques ont attirés l'attention d'un grand nombre de chercheurs de différentes disciplines (biologistes, chimistes, pharmaciens et médecins).

Activité anti-oxydante flavonoïdes :

La propriété fondamentale des flavonoïdes est leur caractère antioxydant. A ce titre, ils agissent à plusieurs niveaux :

- **Piégeage de radicaux**

En raison de leur faible potentiel redox, les flavonoïdes peuvent réduire les radicaux libres très oxydés comme les superoxydes, les radicaux peroxydes ou les radicaux hydroxyles par transfert d'hydrogène (Pietta., 2000)

Les radicaux seraient responsables d'altérations des acides nucléiques et des processus d'altérations, d'initiations et de cancérisation ainsi que de dégradations cellulaires liées à leur réactivité avec les phospholipides membranaires (phénomènes de peroxydation). Ces dommages oxydatifs peuvent être impliqués dans de nombreuses affections : cancers, inflammations chroniques, athéroscléroses...

Ainsi, leur propriété de piègeurs de radicaux implique les flavonoïdes dans la prévention des dommages oxydatifs causés par les ROS sur les molécules cellulaires. De nombreuses études *in vitro* ont montré des activités des flavonoïdes contre les processus inflammatoires et, de ce fait, contre les maladies inflammatoires chroniques et l'arthrose. En empêchant les ROS d'altérer l'ADN, les flavonoïdes limitent les mutations et les processus de carcinogénèses (Merken et Beecher., 2000) De ce fait, ils sembleraient également intervenir dans la prévention de cancers, démences, athérosclérose, hypertension et maladies cardio-vasculaires.

- **Inhibition d'enzymes ou chélation des éléments traces impliqués dans la formation de radicaux :**

Les flavonoïdes inhibent la xanthine oxydase, source biologique importante du radical superoxyde (O₂[•]). Ils sont également connus pour inhiber d'autres enzymes impliquées dans la génération de ROS telles que les cyclooxygénases, les lipooxygénases, ou les monooxygénases microsomiales (Pietta., 2000). Le radical superoxyde réagit avec le peroxyde d'hydrogène (en présence de fer) pour donner par dismutation, des radicaux hydroxyles encore plus toxiques (OH[•]). C'est cette réaction, appelée réaction de Fenton, catalysée par le fer, qui est inhibée par certains flavonoïdes (tels que la quercétine) par une action de chélation du fer (Magnania et al., 2000)

- **Les flavonoïdes possèdent en plus de leur pouvoir antioxydant des propriétés :**

Oestrogénique (isoflavones), anti-hépatotoxique, antispasmodique, antidiarrhéique et anticancérogène et inhibitrice de la croissance des cellules tumorales *in vitro*. Les flavonoïdes sont aussi connus pour leur action sur le tractus gastro-intestinal en tant qu'agents antiulcéreux.

II.4. Propriétés physiologiques des flavonoïdes

Les flavonoïdes possèdent des propriétés colorantes, aromatique, médicinales et cosmétologiques et confèrent à la plante des avantages adaptatifs. De nombreux principes actifs sont bénéfiques à l'homme et à l'animal.

- **Rôle attracteur chez les plantes**

Les pigments responsables des couleurs vives et variées des fleurs, ont non seulement un effet esthétique, mais sont aussi responsables de l'attraction des pollinisateurs (oiseaux et insectes) (Harborne et al., 1978), confirmant le rôle des anthocyanes dans le processus de pollinisation. D'autres auteurs soulignent l'importance des flavonoïdes dans la fertilité des plantes, il sont indispensables dans le développement des gamétophytes mâles (Peggy E Pollak et al., 1992). Des mutations affectant l'enzyme clé chalcone synthétase qui catalyse la biosynthèse des composés phénoliques entraîne l'absence de pigments dans les anthères et une stérilité mâle.

- **Rôle protecteur chez les plantes**

Les flavonoïdes jouent un rôle important dans la défense des plantes contre les agressions parasitaires ou abiotiques, en repoussant certains insectes par leur goût désagréable, peuvent jouer un rôle dans la protection des plantes (Middelton et Kardasnam., 1993). Les flavonoïdes pourraient également permettre aux plantes de survivre sur les sols riches en métaux toxiques comme l'aluminium (Morel, 2011). Ces composés s'accumulent en grandes

quantité dans les tissus périphériques, ils font écran aux UV qui endommagent l'ADN (Stapleton., 1992) et protègent ainsi les tissus internes des tiges et des feuilles.

III.1. Stress oxydatif

L'oxygène moléculaire est un élément crucial pour les organismes vivant en aérobiose, car il permet la production de l'énergie en oxydant la matière organique. Cependant, une fraction de cet oxygène moléculaire (environ 1 à 2 %) peut capter un électron conduisant à la formation des espèces partiellement réduites et fortement toxiques appelées les **radicaux libres** ou encore les **espèces réactives de l'oxygène (ERO)** (Baudin., 2006).

Usuellement, la production des espèces radicalaires reste faible tout en étant indispensables à la vie. En effet, ces substances participent aux processus de défense immunitaire contre les agents pathogènes, elles participent également au fonctionnement de certaines enzymes et neurones, à la transduction de signaux cellulaires, au cycle cellulaire, à la différenciation cellulaire, à la régulation des gènes, à la destruction par apoptose des cellules tumorales,... etc (Dellatre et al., 2005) mais la production accrue des radicaux libres résultante d'un mode de vie non sain (tabagisme, alcoolisme...) et des mauvaises habitudes nutritionnel perturbe considérablement la machinerie cellulaire entraînant ce qu'on appelle le stress oxydatif qui correspond à un déséquilibre entre la génération des espèces oxygénées et les défonce oxydante de l'organisme (Pincemilet al., 1999) soit par déficit en antioxydants (vitamines, oligoéléments, enzymes) ou par une surproduction de radicaux. Le stress oxydatif est souvent responsable des altération moléculaires contribuant à la physiopathologie de nombreux processus pathologique (cancer, maladie cardio-vasculaire) comme facteur déclenchant et à l'accélération du vieillissement cellulaire (Favier., 2003 ; Baudin., 2006).

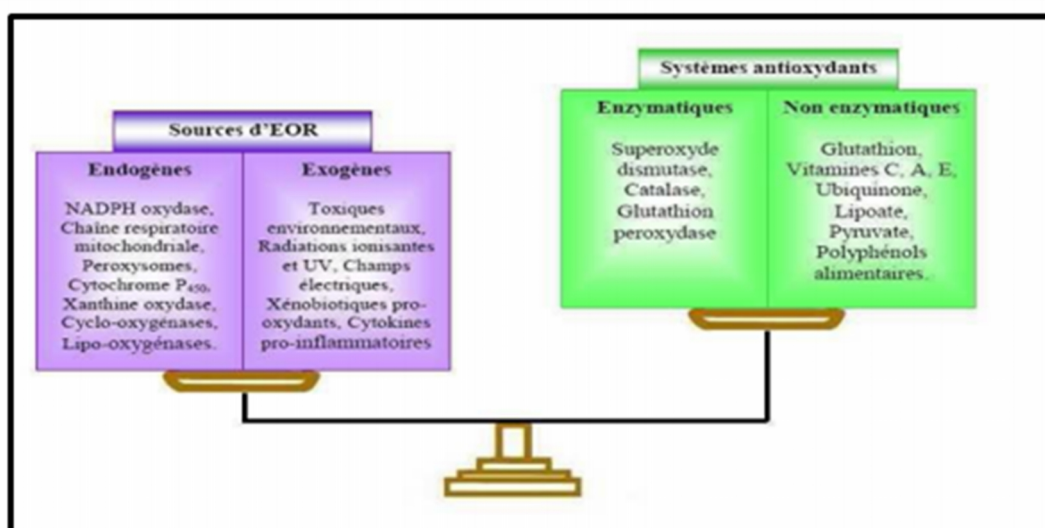


Figure 9 : Déséquilibre de la balance pro-oxydant / antioxydant

III.2. Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des molécules ou atomes qui possèdent un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche externe. Cet état leur confère une instabilité énergétique et cinétique (Lehucher-Michel et al., 2001).

Ses espèces sont produit habituellement par voies endogène durant le métabolisme cellulaire (Kumari et Kakkar., 2008) et sont aussi produites dans des circonstances pathologiques intrinsèques telles que le dysfonctionnement de la mitochondrie et l'involution thymique favorisant l'inflammation chronique (Montagnier., 2009). Des facteurs exogènes à savoir les polluants environnementaux, les radiations, les solvants organiques, le tabac ainsi que les agents pathogènes sont aussi incriminés dans la production des ERO (Ansari., 1997).

III.3. Différents types des radicaux libres

Les radicaux libres partagent pour caractéristique celle d'avoir un électron célibataire sur un atome d'oxygène ou d'azote. Ceci leur confère la dénomination d'espèces réactives de l'oxygène (EOR ou ROS) ou de l'azote (EAR ou RNS).

III.3.1. Espèces réactives de l'oxygène (ERO)

On distingue alors deux grands groupes de molécules réactives impliquées dans le stress oxydant: les espèces radicalaires et les espèces non-radicalaires. La réactivité d'un radical libre varie d'un radical à un autre et dépend de l'environnement où ils se trouvent. Leurs constantes de vitesse réactionnelle sont très élevées (Delattre et al., 2005).

III.3.1.1. Les espèces oxygénées réactives radicalaires

Les espèces réactives de l'oxygènes est une expression utilisé pour décrire un certain nombre des molécules réactives et des radicaux libres dérivés de l'oxygène moléculaire qui sont :

* **L'anion radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)** est le résultat de l'apport d'un électron supplémentaire à la structure initiale de l'oxygène. Malgré une réactivité moyenne, ce radical a quelques cibles privilégiées telles que le cytochrome c (Fe^{3+}) l'ascorbate et surtout le superoxyde dismutase.

* Plus réactif que le précédent, le radical perhydroxyle HO_2^{\cdot} est obtenu après protonation de ce dernier

* La réduction monoélectronique du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 donne naissance au radical hydroxyle HO^{\cdot} et à l'anion basique non radicalaire OH^- en présence d'un catalyseur (réaction de Fenton : $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow HO^{\cdot} + Fe^{3+} + OH^-$). Cette espèce chimique particulièrement réactive joue un rôle majeur dans la peroxydation lipidique et la destruction du matériel génétique (Hennebelle., 2006).

* Le radical peroxyde $\text{RO}_2\cdot$ est un radical secondaire issu de l'addition de l'oxygène sur les radicaux centrés sur le radical $\text{R}\cdot$. Sa réactivité se situe entre l'anion radical superoxyde et le radical hydroxyle.

* Le radical secondaire alkoxyde $\text{RO}\cdot$ est produit suite à la décomposition de l'hydro peroxyde ROH , issu de l'oxydation de substrat RH , par des cations métalliques.

III.3.1.2. Les espèces oxygénées non radicalaires

L'oxygène singulet $^1\text{O}_2$, qui est la forme diamagnétique de l'oxygène, est produit en présence de rayonnement UV ou par les leucocytes. Bien qu'il ne soit pas un radical, il joue un rôle dans le vieillissement cutané et certaines maladies liées à l'âge (Choe et Min., 2005; Hennebelle., 2006).

Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 sous sa forme moléculaire est également toxique, en particulier à cause de sa transformation en radical hydroxyle en présence de cations métalliques Fe^{2+} et Cu^{+2} , lors de réactions de type « Fenton » (Wardman et Candeias., 1996). La myéloperoxydase convertit le peroxyde d'hydrogène en acide hypochlorique (HOCl) à des concentrations physiologiques. Ce dernier peut réagir avec les fonctions aminées des protéines pour former des chloramines (Sumaya Martinez., 2004).

III.3.2. Espèces réactives azotées (ERN)

III.3.2.1. Espèces radicalaires azotées

Le monoxyde d'azote ($\text{NO}\cdot$) a pris une place considérable en biologie. Malgré son rôle protecteur *vis-à-vis* du stress oxydant en limitant la lipoperoxydation et ses effets anti-inflammatoires, il est paradoxalement impliqué dans de nombreuses pathologies telles que le diabète, l'athérosclérose, le cancer et les lésions neuronales dégénératives.

III.3.2.2. Espèces non radicalaires azotées

Caractérisé par sa grande faculté de diffusion dans les membranes cellulaires et sa réactivité moyenne (de l'ordre de quelques secondes *in vivo*), le monoxyde d'azote radicalaire peut aisément réagir avec la plupart des espèces oxygénées et se transformer en dioxyde d'azote (NO_2) ($2 \cdot\text{NO} + \text{O}_2 \rightarrow 2 \text{NO}_2$), lequel peut donner du trioxyde d'azote (N_2O_3) ($\cdot\text{NO} + \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2\text{O}_3$) pour enfin aboutir à un ion nitrate stable (NO_2^-) ($\text{N}_2\text{O}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{NO}_2^- + 2\text{H}^+$). De plus, le monoxyde d'azote forme avec l'ion superoxyde le peroxyde d'azote ($\text{ONOO}\cdot$) ($\cdot\text{NO} + \text{O}_2\cdot^- \rightarrow \text{ONOO}\cdot$), moins réactif que son précurseur azoté, mais responsable de l'oxydation de nombreuses biomolécules (protéines, lipides et acides nucléiques).

III.4. Les Antioxydants

Pour contourner les dommages causés par les ERO et ERN, la cellule fait appel à des systèmes de défense appelés antioxydants ce sont des micro-constituants susceptibles d'inhiber directement la production des espèces réactives, de limiter sa propagation ou les détruire. Ils peuvent agir en réduisant, les radicaux libres, en les piégeant pour former des composés stables ou en séquestrant le fer pour contourner les dommages oxydatifs ce sont les agents redox responsables du maintien de l'équilibre physiologique subtil entre la production et l'élimination des ERO et ERN au sein des systèmes vivant. Le système antioxydant se divise en deux principales catégories, les antioxydants endogènes (molécules issues de la biosynthèse), et les antioxydants exogènes (vitamines, oligoéléments, ou antioxydants de synthèse)

III.5. Les différents systèmes d'antioxydant

Le système antioxydant est réparti en deux groupes principaux exogène et endogène ce dernier lui-même est divisé en deux groupes enzymatique et non-enzymatique

III.5.1. Système antioxydant endogène enzymatique

Les plus efficace chez les mammifère sont le superoxyde dismutase, la catalase et le glutathion peroxydase (Mates et al., 1999; Sharma et al., 2012).

Superoxyde dismutase (SOD): sont une classe d'enzymes apparentées qui catalysent la dismutation des ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire.

Catalases: sont des enzymes localisées dans les peroxysomes, ils transforment le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire.

Glutathion peroxydase (GPx): détoxifie le peroxyde d'hydrogène et d'autres hydroperoxydes d'origine lipidique en couplant la réduction de l'hydroperoxyde avec l'oxydation d'un substrat réducteur (Delattre et al., 2005).

Ces enzymes sont le principal système de protection car elles détruisent non seulement H₂O₂, mais aussi les peroxydes organiques toxiques formés par l'oxydation des acides gras ou du cholestérol. Cependant, d'autres enzymes antioxydants comme les peroxyredoxines, la glutathion transférase, les thioredoxines réductases et les thioredoxines peroxydases sont impliquées dans la défense antioxydante de l'organisme.

III.5.2. Système antioxydant endogène non- enzymatique

Le glutathion : est un tripeptide dont la fonction thiol lui confère un rôle d'antioxydant largement présent sous forme réduite, qui est capable de réagir, *in vitro*, avec les radicaux.

HO[•], RO₂[•], RO[•], ¹O₂, ONOO⁻, des radicaux centrés sur le carbone, mais aussi l'acide hypochloreux HOCl.

Acide lipoïque : Les deux formes, oxydée et réduite, de l'acide lipoïque composé appartenant aux thiols, présentent des propriétés antioxydantes *in vitro* en piégeant nombreuses espèces réactives HO[•], RO₂[•], HOCl et ¹O₂. En se liant à des métaux comme le fer et le cuivre et à la capacité de régénérer certains antioxydants endogènes et exogènes (**Packer et al., 2001; Panfili et al., 2003; Smith et al., 2004**).

L'acide urique : présent sous forme urate à pH physiologique, possède des propriétés antioxydantes *in vitro* contre les HO[•] et RO₂[•] tout comme la bilirubine, les mélanines et la mélatonine (**Delattre et al., 2005**).

Les protéines : tel que la ferritine, douées d'activité antioxydante car elles possèdent une capacité de fixation importante du fer.

III.5.3.Systèmes antioxydants exogènes

Les antioxydants chimiques exogènes, comprennent majoritairement les vitamines C et E, les caroténoïdes et des composés phénoliques (**McCall et Frei., 1999**).

La vitamine C (acide ascorbique): est une molécule hydrosoluble présente dans la plupart des fruits et légumes (non synthétisée par l'Homme). L'ascorbate est un très bon capteur de radicaux libres oxygénés aussi bien hautement réactifs tels que les radicaux OH[•] que très peu réactifs tels que les radicaux O₂⁻. Sa capacité de donner d'électrons dans une large gamme de réactions enzymatiques et non enzymatiques le qualifie de meilleur agent de détoxification des radicaux oxygénés dans la phase aqueuse (**Blokhina et al., 2003**). De plus, l'ascorbate est muni d'une propriété importante : la réparation de deux autres antioxydants, le glutathion (GSH) et α-tocophérol (α-TH) à partir de leurs formes radicalaires. L'ascorbate est recyclé, tout au moins en partie, par dismutation du radical ascorbyle (**Gardès-Albert et al., 2003**).

La vitamine E (α tocophérol) : Parmi les tocophérols naturels, le α-tocophérol (vitamine E) est le plus efficace *in vivo*. Son rôle essentiel est de capter les radicaux lipidiques peroxydes (LOO[•]), alkoxy (LO[•]) et alkyl (L[•]) qui propagent les chaînes de peroxydation lipidique (**Kaiser et al., 1990; Yoshida et al., 1993**).

Les caroténoïdes: constituent une vaste famille de composés qui sont généralement des bons capteurs de radicaux hydroxyles et peroxydes ce qui les rend susceptibles d'inhiber les chaînes de peroxydation lipidique.

Les oligoéléments :(zinc, sélénium, cuivre, manganèse) constituent des co-facteurs nécessaires aux activités des enzymes antioxydantes.

Les polyphénols : puissantes activités antioxydantes des flavonoïdes et d'autres polyphénols associées à leurs propriétés redox permettant d'éliminer les effets d'espèces réactives de l'oxygène (Ketsawatsakul et al., 2000) ainsi que de chélater les différents métaux de transition (Gulcin et al., 2010).

III.6. Quelques tests de la capacité antioxydante et antiradicalaire

Récemment beaucoup d'études ont porté sur l'intérêt des antioxydants naturels en relation avec leurs propriétés thérapeutiques et son utilisation dans les industries alimentaires comme additifs spécialement à partir des plantes. C'est un domaine prometteur et en plein croissance. Des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés plusieurs méthodes ont été mises au point pour déterminer l'activité antioxydante. Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, avec des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, il n'y a pas une méthode universelle par laquelle l'activité antioxydante peut être mesurée quantitativement d'une façon bien précise. Le plus souvent il faut combiner les réponses de tests différents et complémentaires pour avoir une indication sur la capacité antioxydante de l'échantillon à tester (Hua et al., 2008; Tabart et al., 2009)

III.6.1. Capacité de piégeage du radical libre DPPH

Le composé chimique 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH) est un radical stable et présente en solution une absorption spécifique à 517 nm qui confèrent une coloration violette foncée. Cette couleur disparaît lorsqu'il est réduit par un capteur de radicaux. Les absorbances mesurées servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH, qui est proportionnel au pouvoir antiradicalaire de l'échantillon testé (Blois et al., 1958).

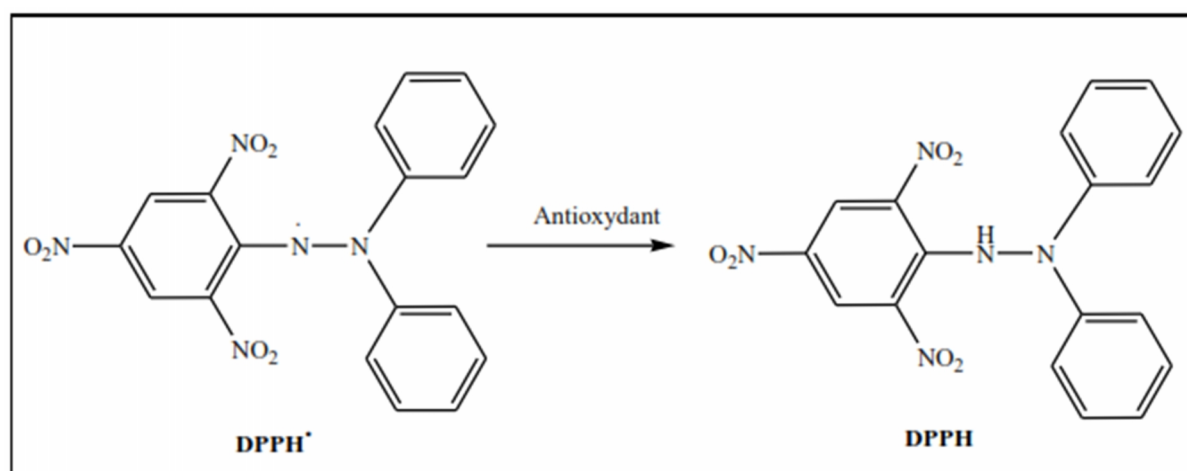


Figure 10 : Réduction du radical DPPH

III.6.2. Capacité de piégeage du radical-cation ABTS^{•+}

Le radical cation de l'acide 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS^{•+}) est stable sous sa forme libre (Rice-Evans *et al.*, 1994; 1995). Il est formé par oxydation de ABTS stable par un oxydant qui est le persulfate de potassium (K₂S₂O₈) ou avec une enzyme de peroxydation pour générer le radical ABTS^{•+} qui présente une coloration vert bleu. La concentration de ce radical peut être déterminée en mesurant l'absorbance à la longueur d'onde appropriée. L'addition d'un antioxydant à une solution de ce radical cation entraîne sa réduction en ABTS[•] et à la décoloration à 734 nm de la solution (Re *et al.*, 1999).

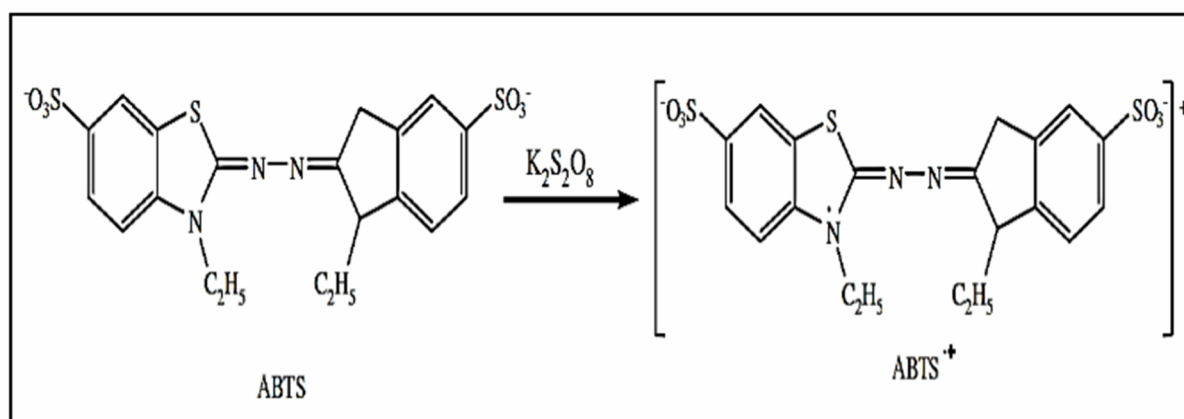


Figure 11 : oxydation de l'ABTS par le persulfate de potassium et génération de ABTS^{•+} (Gülçin, 2012)

III.6.3. Capacité de réduire l'ion cuprique (CUPRAC)

La méthode CUPRAC (Cupric ion Reducing Antioxidant Capacity) est basée sur le suivi de la diminution de l'absorbance accrue du complexe Néocuproéne (NC), cuivre (Cu²⁺) Nc₂-Cu²⁺. En effet, en présence d'un agent antioxydant le Cu²⁺ est réduit en Cu⁺. Cette réaction est quantifiée par spectrophotomètre à une longueur d'onde de 450 nm (Apak *et al.*, 2004).

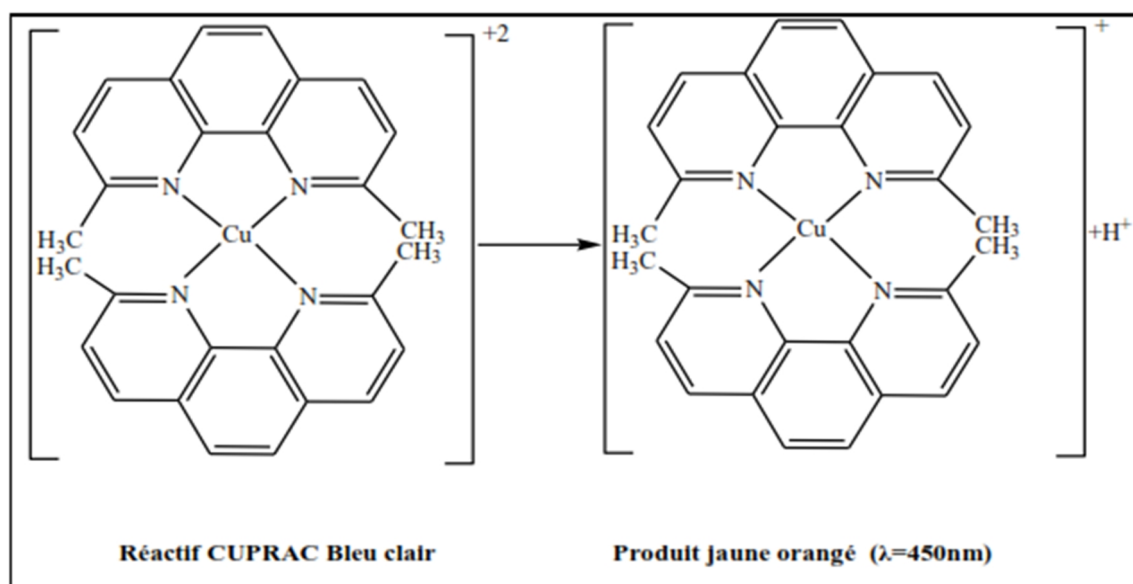


Figure 12 : Réaction de CUPRAC.

III.6.4. Test de blanchissement du β -carotène

Cette méthode est basée sur la perte de la couleur du β -carotène due à la réaction avec des radicaux qui sont formés par l'oxydation de l'acide linoléique. La disparition de cette couleur est suivie par spectrophotométrie à 470 nm. Cependant la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement du β -carotène (Tepe *et al.*, 2006).

III.6.5. Test du pouvoir réducteur

La méthode de la réduction du fer est basée sur la réduction de fer ferrique en fer ferreux par les antioxydants. Les substances qui ont un potentiel réducteur réagissent avec le ferricyanide de potassium pour former le ferrocyanide de potassium qui réagit ensuite avec le chlorure ferrique pour former un complexe fer ferreux qui peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu vert dans le milieu réactionnel à 700 nm.

III.6.6. Test de piégeage du radical Galvinoxyl

Galvinoxyl, un autre radical stable peut être réduit par des capteurs de radicaux libres donneurs d'hydrogène ses solutions jaune ont le maximum d'absorption dans le visible 432 nm. La réduction de ce radical en présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène aboutit à la formation d'une forme non radicalaire provoquant une décoloration à la solution. Le radical galvinoxyl est plus étroitement apparenté aux radicaux oxygène agissant physiologiquement que le DPPH mais il est plus réactif vis-à-vis des composés phénoliques.

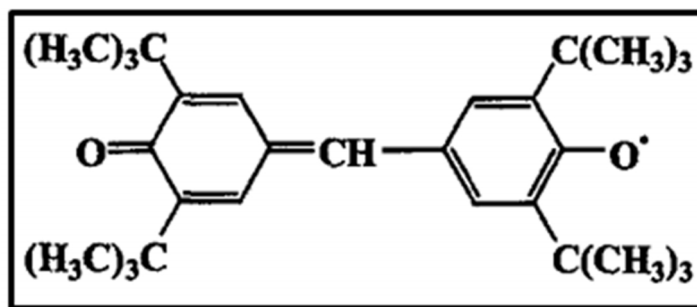


Figure 13 : structure du radical galvinoxyl

III.6.7. Test de l'activité du phénanthroline

La méthode est basée sur la réduction du fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}) se dernier va former un complexe stable avec le phénanthroline de couleur rouge orangé qui peut être dosé par spectrophotomètre à une longueur d'onde de 510 nm. Cette méthode constitue dans certain condition une alternative moins coûteuse au FRAP avec une capacité d'absorption molaire partiellement amélioré et donc une sensibilité (Beker et al., 2007).

III.7. Maladie d'Alzheimer

III.7.1. Définition

La maladie d'Alzheimer (MA) est une pathologie neuro-dégénérative progressive et irréversible du système nerveux centrale. Cette pathologie dont l'étiologie n'est toujours pas connue, est caractérisée par des lésions histopathologiques bien précises qui sont les plaques séniles (dus à l'accumulation du peptide β -amyloïde) et les dégénérescences neurofibrillaires (dus à l'hyperphosphorylation de la protéine tau) et qui sont associées à une perte neuronale avec atrophie corticale. Ces lésions touchent principalement les voies cholinergiques ce qui va entraîner une diminution de l'acétylcholine. Ce dernier est un neurotransmetteur qui joue un rôle important dans le système nerveux central, où il est impliqué dans la mémoire et l'apprentissage. La MA survient tardivement dans la vie, à l'exception de rares cas d'apparition précoce dus à la présence de mutations génétiques familiales. (Derouesné et Selmés., 2005)

III.7.2. Formes de la maladie d'Alzheimer

La Forme sporadique (forme tardive) : C'est la forme la plus courante de la maladie d'Alzheimer elle représente environ 99% de tous les cas. Elle est considérée comme une maladie multifactorielle (l'âge, maladies cardio-vasculaires, le syndrome de down...ect). Donc dans ce cas la maladie n'est associée à aucune mutation connue (Iqbal et Grundke-Iqbal., 2010). Elle se déclare habituellement après l'âge de 65 ans.

La Forme familiale (forme précoce) : Est une forme d'origine génétique d'apparition plus précoce (avant l'âge de 60 ans) elle représente environ 1% des cas.

III.7.3.Symptômes de la maladie d'Alzheimer

- ✓ Troubles de la mémoire
- ✓ Difficulté à effectuer des tâches familières
- ✓ Troubles des gestes (apraxie)
- ✓ Troubles du langage et de la compréhension (aphasie)
- ✓ Troubles de la reconnaissance (agnosie)
- ✓ Désorientation dans l'espace et le temps
- ✓ Errances
- ✓ Troubles de l'abstraction
- ✓ Objets égarés
- ✓ Changements d'humeur ou de comportement
- ✓ Changement de personnalité et manque d'enthousiasme
- ✓ Hallucinations et délires
- ✓ Incontinence

III.7.4.Cibles thérapeutique actuelles de l'Alzheimer

Les traitements spécifiques prescrits à ce jour dans le cadre de la maladie d'Alzheimer sont des traitements symptomatiques qui ciblent directement l'acétylcholinestérase et le récepteur de glutamate NMDA (N-Methyl-DAspartate)

III.7.4.1.Récepteur de glutamate (NMDA) cible de traitement

Dans la MA, il y a une forte augmentation de glutamate au niveau extra cellulaire Son effet est l'activation des récepteurs NMDA (N-Methyl-DAspartate) ce qui provoque un influx de calcium dans les neurones pendant une longue période (**Bliss et Collingridge., 1993**) et donc une accumulation intracellulaire de calcium ce qui en résulte une excitotoxicité neuronale.

Ce processus est à l'origine de l'initiation d'une cascade d'évènements dont la conséquence est la mort neuronale (**Greenamyre et Young, 1989; Greenamyre et Porter., 1994**).

La mémantine est un médicament prescrit dans le traitement des formes modérées à sévères de MA, il protège les neurones de l'excitotoxicité induite par le glutamate. (**Letrilliart1 et Pouchain., 2011**).

III.7.4.2.Acétylcholinestérase cible de traitement

Le principal rôle biologique de l'acétylcholinestérase est la régulation de la transmission de l'influx nerveux en assurant l'hydrolyse rapide de l'acétylcholine au niveau des synapses

cholinergiques centrales et périphériques, afin de permettre aux neurones cholinergiques de revenir à l'état de repos après leur activation par des influx nerveux (Anglais et Webster., 2012).

Chez les personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer, la concentration d'acétylcholine est diminuée, ce qui explique les troubles cognitifs observés. La solution pour augmenter le taux d'acétylcholine au niveau synaptique consiste alors à diminuer sa dégradation, ceci en inhibant l'action de l'acétylcholinestérase (Nourhashémi., 2006).

Il existe aujourd'hui, sur le marché des médicaments qui inhibent l'acétylcholinestérase ce qui limite la diminution de la concentration d'acétylcholine au niveau cérébral et donc d'améliorer les fonctions cérébrales chez les patients (Grossberg., 2003).

- **l'acétylcholinestérase**

L'acétylcholinestérase est une hydrolase de serine, appartenant à la famille de β -estérase (Aldridge et Reiner., 1997). Elle est exprimée dans le système nerveux et sanguin des eucaryotes supérieurs. C'est une enzyme qui s'exprime au sein des synapses dite cholinergique qui utilisent le neurotransmetteur acétylcholine.

L'activité de l'acétylcholinestérase peut être déterminée par la méthode d'Ellman présenté par la figure suivante

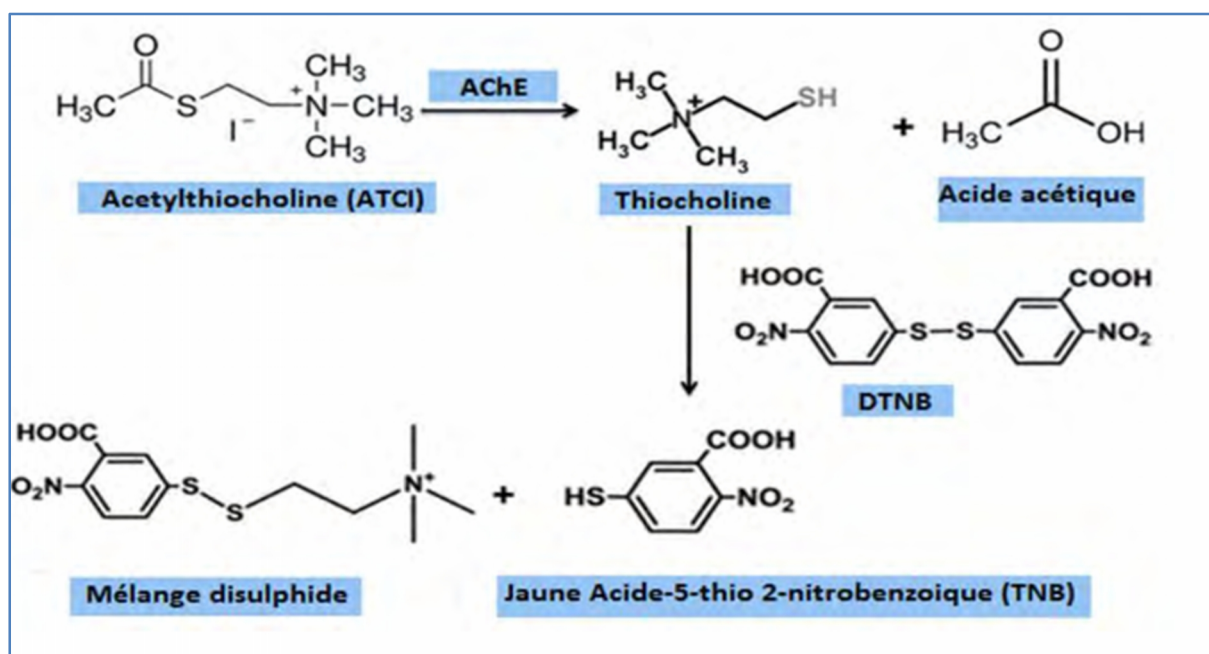


Figure 14 : Mécanisme chimiques de la méthode d'Ellman

Le dosage est basé sur le suivi de l'augmentation de la couleur jaune produite à partir de la thiocholine lorsqu'elle réagit avec le DTNB (5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoïque acide))

(Ellman ., 1961)

III.7.5.Cibles thérapeutique potentielles de l'Alzheimer

Les nouvelles cibles thérapeutiques médicamenteuses identifiées de la maladie d'Alzheimer actuellement en essais cliniques, permettent de lutter non pas uniquement contre les symptômes mais contre les causes de la maladie. Les traitements d'avenir de la maladie d'Alzheimer s'orientent vers ces nouvelles cibles qualifiées dont le peptide AB amyloïde et la protéine tau.

2^{EME} PARTIE

IV.1. Matériel végétale

IV.1.1. Description de la zone de la récolte

La forêt de Chettabah appartient au bassin versant Kebir Rhumel, elle est située à environ 15 km au Sud- Ouest de Constantine, au Sud d'Ibn Ziad, au Nord d'Ain Smara et à l'Est de Oued Athmania. Cette forêt s'étale sur une superficie de 2398 ha avec une diversité floristique inestimable

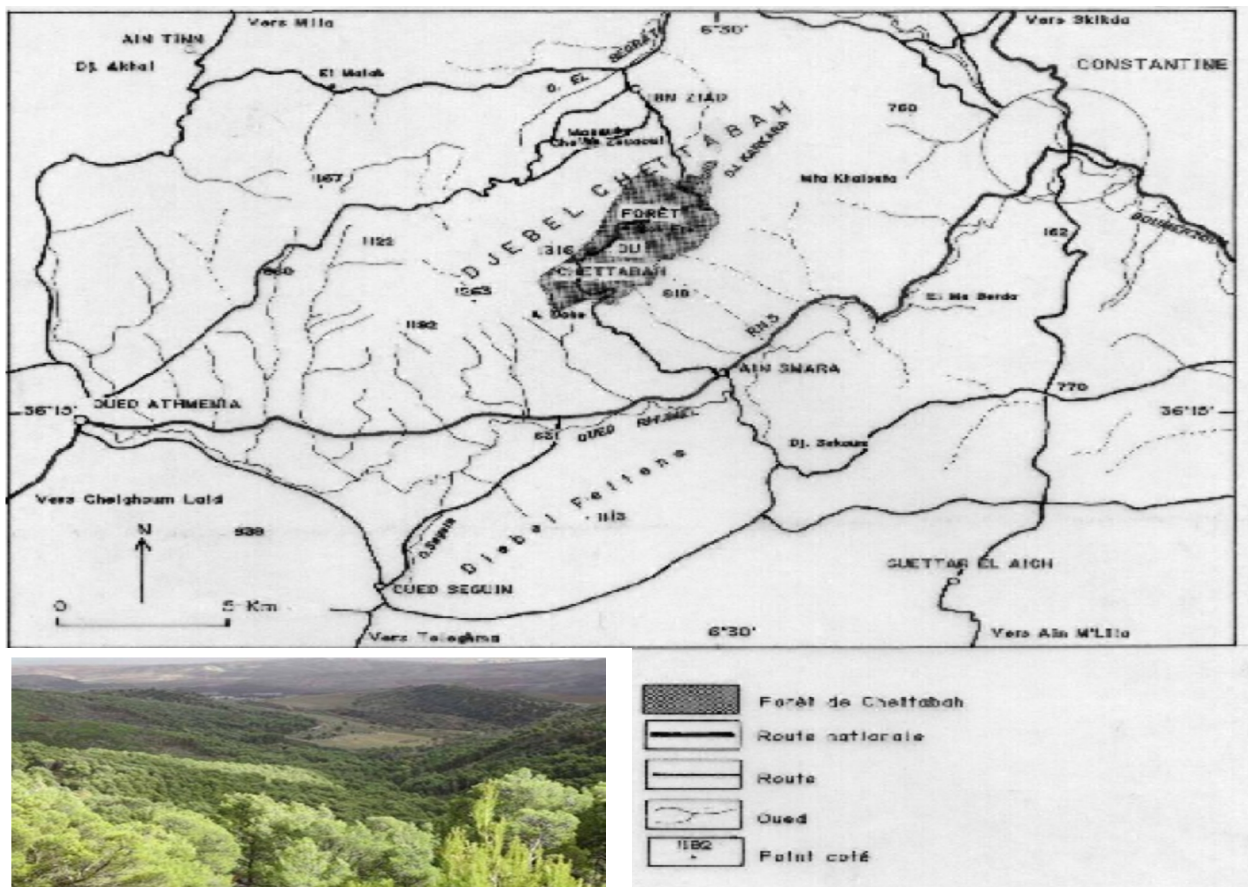


Figure 15 : La forêt de Chettabah Ain Smara(Constantine)

IV.1.2. Récolte de la plante du genre *Cistus*

La plante *Cistus* a été récoltée au mois de Mai 2018 dans la forêt de Chettabah, dans la commune d'Ain Smara(Constantine) L'identification botanique de la plante étudiée a été réalisée par Monsieur KABOUCHE Kamel. Le matériel végétal est conservé et laissé sécher à l'abri de la lumière et de l'humidité. Après séchage, les parties aériennes de cette espèce broyées ont donné 584g de poudre.

IV.2. Méthodes d'analyses phytochimiques

IV.2. 1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les CCM sont utilisées à chaque étape chromatographique pour le suivi et le contrôle des purifications. Les chromatogrammes sur couche mince permettent de vérifier la présence et l'état de pureté des produits suivis. Ces analyses sont réalisées en phase normale sur des plaques d'aluminium prêtes à l'emploi [Kieselgel 60 F254, Merck® 250 µm (20 × 20 cm)].

Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre saturées avec l'éluant approprié. La phase mobile est constituée d'un mélange binaire ou tertiaire de solvants selon le type de séparation souhaitée

Les plaques CCM sont observées sous une lampe UV à 254 et 365 nm. Le révélateur utilisé lors des expériences est la vanilline sulfurique (0.5 g de la vanilline, dissous dans 100 ml du méthanol, plus 1 ml d'acide sulfurique).

IV.2. 2. Chromatographie liquide sous vide (VLC)

Cette technique généralement utilisée pour obtenir un fractionnement grossier de l'extrait brut, est rapide et a surtout l'avantage de consommer moins de solvants comparativement aux méthodes chromatographiques classiques. La silice Kiesel gel Merck (70-230 mesh, 63-200 µm) est conditionnée dans un entonnoir cylindrique filtrant sur verre fritté N° 4.

Les systèmes solvants utilisés doivent traverser l'entonnoir à plusieurs reprises (3 fois) afin d'assurer une bonne élution des molécules et l'épuisement total du gel des molécules ayant une polarité comparable au système solvant utilisé.

IV.2. 3. Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)

CLHP analytique :

L'analyse par chromatographie liquide haute performance (CLHP) analytique est effectuée à l'aide d'un appareillage du laboratoire de pharmacognosie, Institut de Chimie Moléculaire de Reims ICMR (France) constituée d'une chaîne chromatographique Dionex, pilotée par le logiciel Chromeleon version 6.01. La chaîne est équipée d'une pompe quaternaire P580 A avec dégazeur intégré, d'un passeur d'échantillon ASI 100, d'un détecteur UV/Visible à barrette de diodes UVD 170S/340S et d'une colonne thermostatée par un four STH 585. La colonne employée est CLHP analytique: Colonne Dionex C18, 4,6 x 250 mm, de granulométrie 5µ et de porosité 90 Å.

Les conditions d'élution sont :

- Mode : gradient
- Système de solvants : H₂O–ACN
- Débit = 1 ml/min
- Température = 28 °C
- Détection : λ = 205 et 254 nm.

CLHP semi-préparative :

La purification par chromatographie liquide haute performance (HPLC) semi-préparative est effectuée à l'aide d'un appareillage du laboratoire d'Obtention des Substances Thérapeutiques (LOST), Institut de chimie de l'université de Constantine-1, constituée d'une chaîne chromatographique type Shimadzu LC8 muni d'un détecteur UV-Visible à longueur d'onde variable et équipé d'une colonne de type phase inverse (silice greffée C18), avec un diamètre de 2,1cm et 50 cm de longueur.

Les conditions d'élution sont :

- Mode : gradient
- Système de solvants : H₂O–ACN
- Débit = 7 ml/min
- Température = 28 °C
- Détection : λ = 205 et 254 nm.

IV.3. Méthodes d'analyses physico-chimiques

IV.3. 1.Spectrométrie UV-Visible

Les techniques de spectroscopie UV-Visible sont des méthodes simples et rapides qui fournissent des informations sur la nature chimique, les propriétés physico structurales et les caractéristiques optiques des composés. Les spectres UV-Visible du composé isolé est enregistrés dans le MeOH sur un spectrophotomètre de type NICOLET évolution 100.

Au cours de l'évaluation des activités biologiques de nos extraits la lecture de l'absorbance a été effectuée grâce à un lecteur de microplaque Perkin Elmer (En Spire Alpha Plate Reader) multimode . Grâce à son monochromateur le lecteur offre une grande sensibilité aux essais.

IV.3. 2.Spectroscopie de RMN

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone (RMN-¹H et ¹³C) ont été respectivement enregistrés a 600 et 150 MHz (Bruker Avance DRX-600). Le logiciel Topspin 3.2 est utilisé pour le traitement et l'exploitation des données spectrales.

Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm par rapport au tétra méthyl silane (TMS), les constantes de couplage sont exprimées en Hz.

IV.4. Etude phytochimique de la plante du genre *Cistus*

IV.4.1. Extraction

580 g des parties aériennes de la matière végétale préalablement séchées et pulvérisées, sont mis en macération dans un mélange hydroalcoolique (Méthanol/Eau : 80 : 20 V/V), pendant 48 h à la température ambiante .La macération est effectuée 3 fois avec renouvellement de solvants .Le mélange est ensuite filtré et concentré. La phase aqueuse résultante subit une extraction liquide-liquide (**Fig16**), d'abord par le chloroforme (300 ml, 3 fois) puis l'acétate d'éthyle (300 ml, 3 fois) et enfin le butanol (300 ml, 3 fois) (**Fig17**). L'évaporation à sec des phases organiques a permis de recueillir les masses suivantes: 0,46 g pour l'extrait chloroformique, 6,8 g pour l'extrait AcOEt et 24,73 g pour l'extrait butanolique. Les CCM réalisées sur les trois extraits dans différents systèmes de solvants, ont montré une composition chimique plus riche au niveau des extraits acétate d'éthyle et butanolique

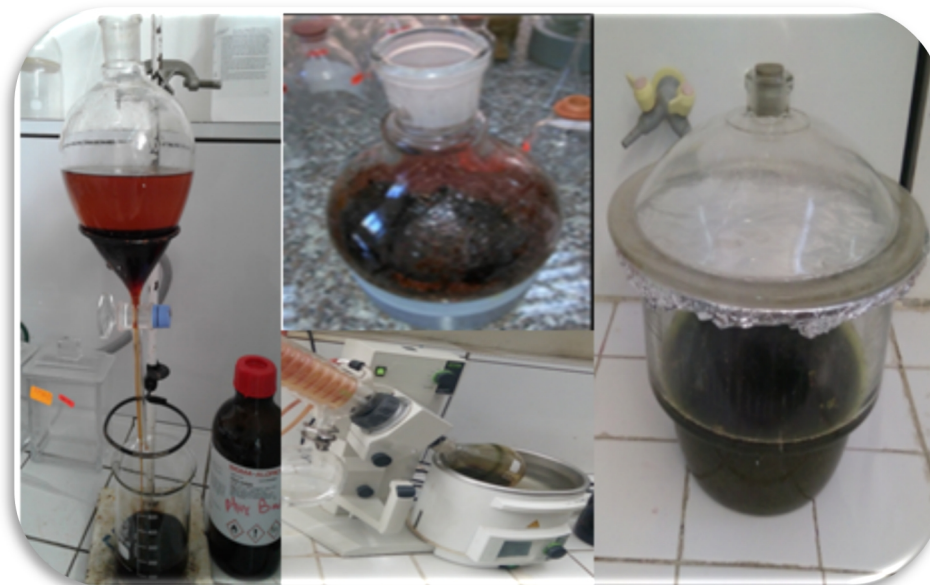


Figure16 : les différentes étapes d'extraction

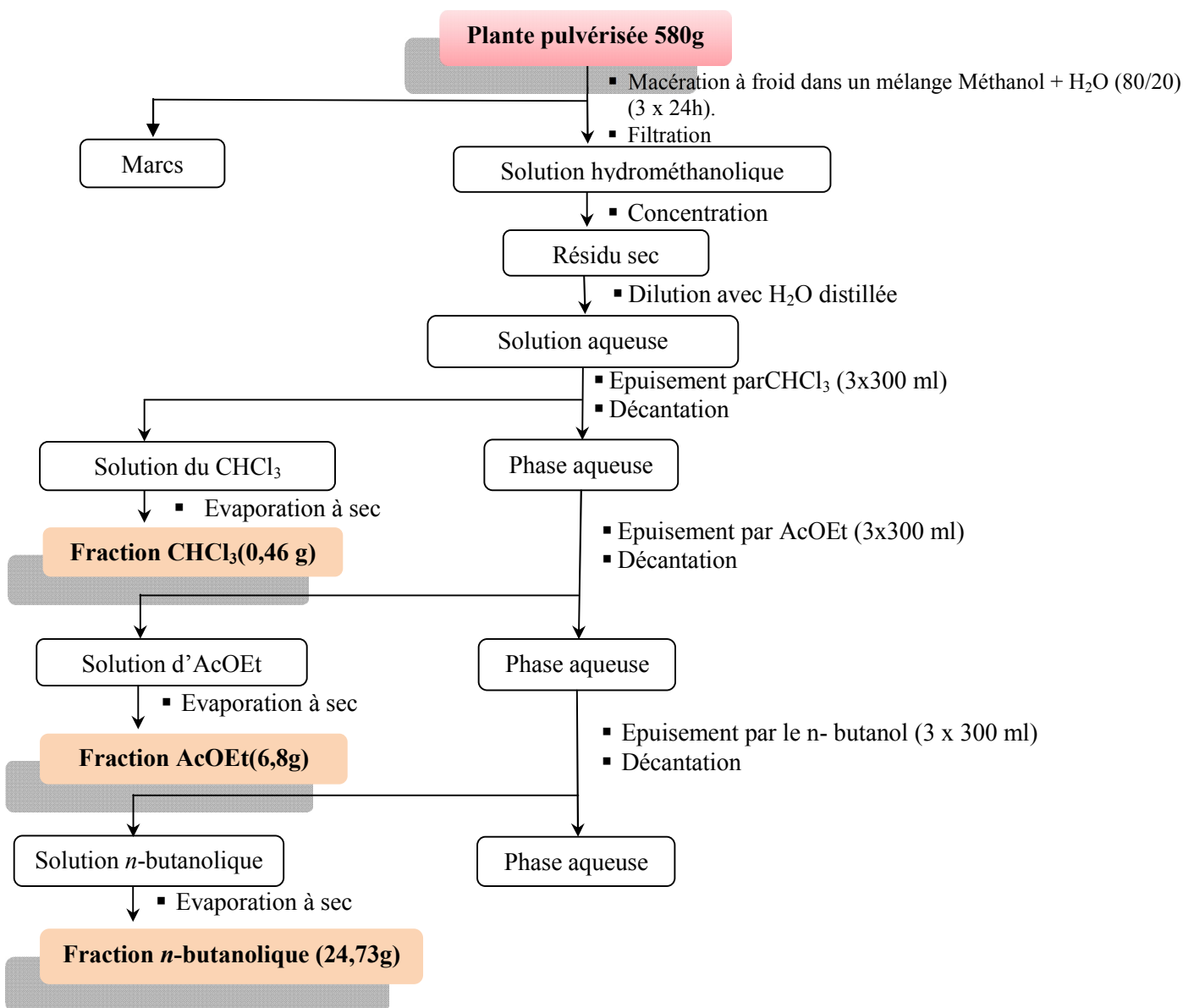


Figure 17 : Schéma des étapes de l'extraction des parties aériennes de *Cistus*.

IV.4.2. Fractionnement et purification de l'extrait acétate d'éthyle

6,8 g de l'extrait AcOEt sont soumis à une chromatographie liquide sous vide (VLC) en utilisant le gel de silice comme phase stationnaire. L'élution est effectuée par le mélange Cyclohexane/AcOEt (100-0 à 0-100), puis par un gradient de méthanol dans l'acétate d'éthyle (0-100 à 100-0) pour donner plusieurs fractions.



Figure 18 : Procédé du fractionnement de l'extrait AcOEt par VLC

Ces fractions subissent une chromatographie sur couche mince (CCM) avec le système d'élution 20/80 : CHCl₃/MeOH. Les CCM obtenues sont visualisées sous la lumière UV à 254 nm puis révélées à la vanilline sulfurique à 1% puis chauffées à 100 °C. Les fractions présentant le même profil CCM sont réunies pour donner **12** fractions majoritaires (**Tableau 3 et Fig19**).

Tableau 3 : VLC sur silice normale de l'extrait AcOEt des parties aériennes de *Cistus*

Eluant: Cyclohexane/AcOEt	Fractions collectées	Masse (g)
50 :50	F1	0,0010
40 :60	F2	0,5383
30 :70	F3	0,4903
20 :80	F4	0,4591
0/100	F5	0,5487
Eluant:AcOEt/ MeOHMeOH		
99:1	F6	1,3740
97 :3		
95 :5	F7	0,2599
90 :10	F8	0,3650
80 :20	F9	0,0023
70 :30	F10	0,0845
0/100	F11	0,0939

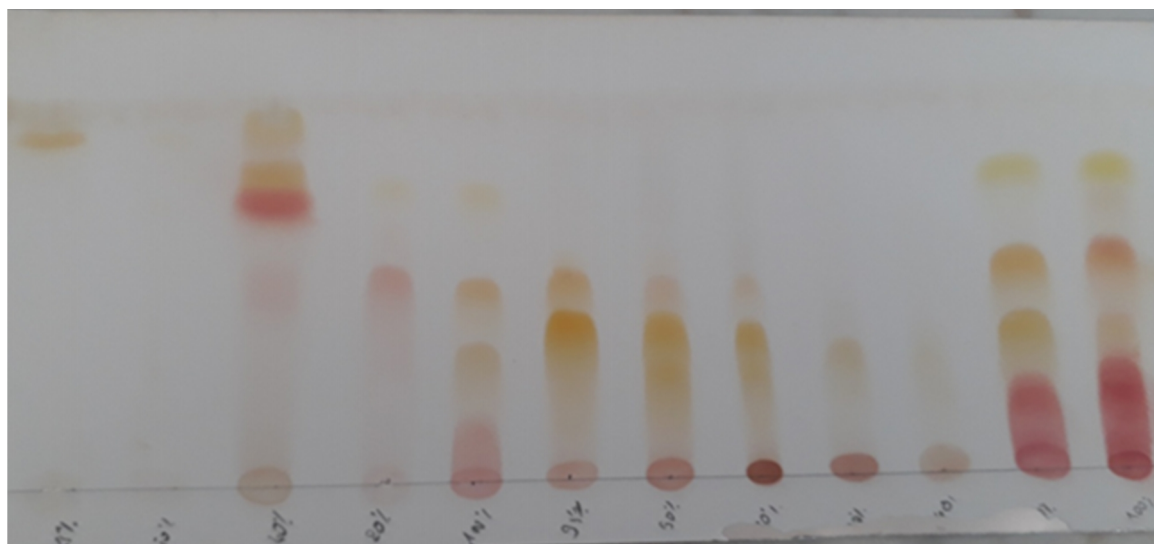


Figure 19 : CCM récapitulatif des fractions de la VLC de l'extrait AcOEt (Système d'élution : CHCl_3 : MeOH : H_2O (80 :20))

La fraction **F6** contient un composé majoritaire qui se précipite dans le méthanol. Cette précipitation conduit à l'isolement du **Cs1** (0,6700 g) qui présente une tache noir sous la lumière UV à 254 nm et se colore en Jaune après pulvérisation de sa CCM par la vanilline sulfurique et chauffage à 100 °C (**Fig 20**).

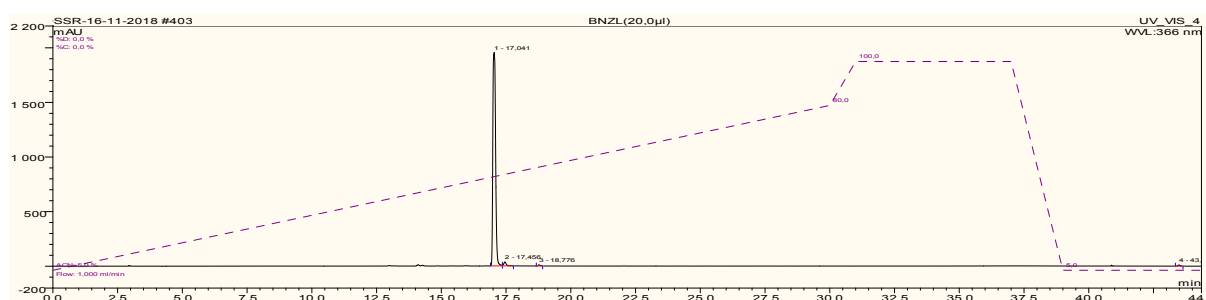


Figure.20 : Chromatogramme du composé **Cs1**

La fraction **F4** a été purifiée par HPLC semi-préparative, en utilisant un gradient de 10% à 70% de CH_3CN pendant 40 min pour donner les composés **Cs2** (0,511g), **Cs3** (0,422g), **Cs4** (0.220 mg) et **Cs5** (0.0067 mg) (**Fig 21-22**).

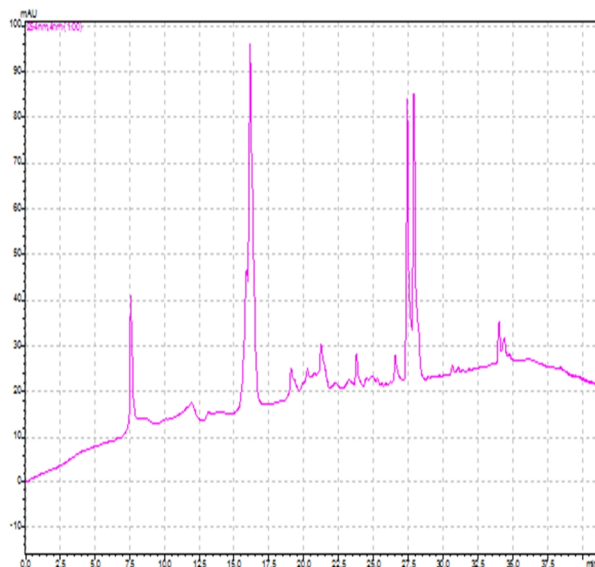


Figure.21 : Chromatogramme de [F4]

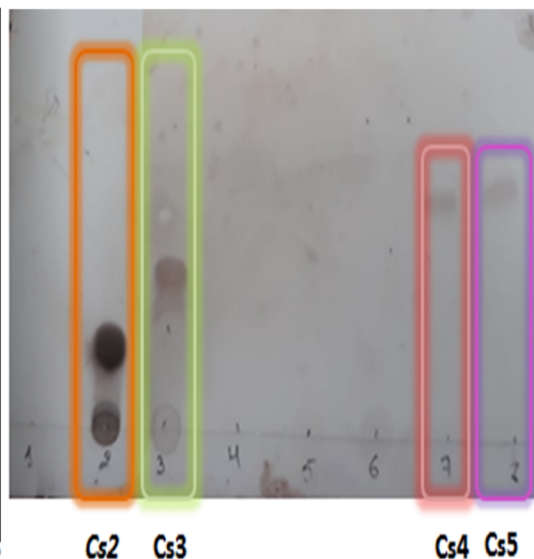


Figure.22 : CCM de la fraction [F4]

IV.5. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes totaux

IV.5. 1. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux des extraits a été déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu (Muller et al., 2010). Une quantité de 20 μl de l'extrait est mélangée avec 100 μl du réactif de Folin-Ciocalteu fraîchement préparé (dix fois dilué), et 75 μl de carbonate de sodium à 7,5 % (Na_2CO_3) a été ajouté. L'ensemble est incubé à température ambiante pendant 120 minutes, et la lecture est effectuée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 765 nm. Une gamme d'étalonnage a été établie avec l'acide gallique à différentes concentrations. Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g). Toutes les manipulations sont réalisées en triple.

IV.5. 2. Dosage des flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes des extraits a été déterminée en utilisant la méthode colorimétrique de (Topçu et al., 2007). Pour ce faire, 130 μl de MeOH ont été ajoutés à 50 μl de l'extrait, 10 μl de potassium d'acétate. Après cinq minutes 10 μl de nitrate d'aluminium ont été additionnés au mélange précédent. Après l'incubation pendant 40 minutes à température ambiante, l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 415 nm contre un blanc.

Une courbe d'étalonnage a été réalisée en parallèle par la quercétine à différentes concentrations dans les mêmes conditions que les échantillons. Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalents de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/mg d'extrait). Toutes les manipulations.

IV.6. Evaluation de l'activité antioxydante de l'espèce du genre *Cistus*

Dans notre étude, la mise en évidence de l'activité antioxydante *in vitro* de nos extraits (brut, chloroformique et butanolique, ainsi que des deux fractions issues de VLC de l'extrait acétate d'éthyle) a été réalisée par sept essais complémentaires à savoir :

- ✚ L'activité antiradicalaire pour le radical libre DPPH[•]
- ✚ L'activité antiradicalaire pour le radical-cation ABTS^{•+}
- ✚ L'activité antiradicalaire pour le radical Galvinoxyl
- ✚ Le pouvoir réducteur de cuivre CUPRAC.
- ✚ Le pouvoir réducteur de fer.
- ✚ L'activité de phénanthroline
- ✚ Test de blanchissement du β-carotène

Les résultats, sauf pour le dosage CUPRAC, phénanthroline et Pouvoir réducteur, ont été enregistrés à la concentration 50% d'inhibition (IC₅₀). L'activité antioxydante des extraits testés a été comparée à celles des standards (le BHA et le BHT).

L'indice IC₅₀ se définit comme étant la concentration nécessaire de l'antioxydant pour piéger 50% de radicaux DPPH[•]/ABTS^{•+}/O₂^{•-} alors que A_{0,5} correspond à la concentration de l'antioxydant pour laquelle l'absorbance vaut 0,5. Ces deux indices sont donnés en µg/ml de milieu réactionnel, du coup la capacité antioxydante d'un échantillon est d'autant plus élevée que son IC₅₀ ou A_{0,5} est petit

IV.6.1. Test de piégeage du radical 2,2-Di-Phényl-1-Picryl-Hydrazyl (DPPH)

L'effet scavenger des extraits brut, chloroformique et butanolique, ainsi que des deux fractions issues de VLC de l'extrait acétate d'éthyle vis-à-vis du radical DPPH est évalué selon la méthode décrite par Blois (1958) avec une légère modification (Öztürket *et al.*, 2011).

Ainsi, 40 µl de chaque échantillon à des concentrations décroissantes, y compris le BHA, ont été additionnés à 160 µl d'une solution méthanolique de DPPH (0,1mM) préalablement déposée dans chacun des puits d'une microplaque. Un témoin négatif est préparé en parallèle en remplaçant les 40 µl d'échantillon par du méthanol. Après une incubation de 30 min à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 517 nm. Les tests sont pratiqués en triplicata.

Le pourcentage de l'activité antiradicalaire de DPPH a été calculé comme suit :

$$\text{APR (\%)} = [(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{Extrait}}) / A_{\text{DPPH}}] \times 100$$

Où A_{DPPH} est l'absorbance de la solution DPPH, et $A_{Extrait}$ est l'absorbance de l'échantillon à une concentration donnée.

IV.6.2. Test de piégeage de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS^{•+})

Ce test est déterminé selon la méthode de (Re et al, 1999) avec une légère modification. Le radical ABTS^{•+} est produit par l'oxydation de l'ABTS (7 mM), par le persulfate de potassium (2,4mM). Ces deux solutions ont été mélangées et conservées 16 heures à l'obscurité et à température ambiante. Le mélange obtenu a été dilué avec le méthanol afin d'avoir une absorbance de $0,7 \pm 0,02$ à 734 nm. 160 μ L de cette solution d'ABTS fraîchement préparée ont été ajoutée à 40 μ L de différentes concentrations de chaque échantillon, ainsi que les standards BHA.

Le blanc est préparé en parallèle suivant le même protocole en remplaçant l'extrait par le méthanol. Après 10 minutes d'incubation, l'absorbance a été mesurée à 734 nm en utilisant le lecteur de microplaque à 96 puits. Chaque analyse a été mesurée trois fois. Le pourcentage de l'activité antiradicalaire est calculé suivant cette formule :

$$AA (\%) = [1 - (A_{Extrait} / A_{blanc})] \times 100$$

IV.6.3. Test de piégeage du radical 2,6-Di-tert-butyl- α -(3,5-di-tert-butyl-4-oxo-2,5-cyclohexadiene-1-ylidene)-p-tolyloxy)(Galvinoxyl)

L'activité du balayage du radical Galvinoxyl[•] a été mesurée par spectrophotométrie selon le protocole décrit par (Shi H et al, 2001). Ainsi, 40 μ L de chaque échantillon à des concentrations décroissantes, y compris le BHA, ont été additionnés à 160 μ L d'une solution méthanolique de Galvinoxyl (0,1mM) préalablement déposée dans chacun des puits d'une microplaque. Un témoin négatif est préparé en parallèle en remplaçant les 40 μ L d'échantillon par du méthanol. Suite à une incubation à température ambiante et à l'obscurité pendant 120 min. L'absorbance est mesurée à 428 nm. On note que chaque dépôt faisait l'objet de trois répétitions. Le pourcentage de l'activité antiradicalaire est calculé suivant cette formule :

$$AA (\%) = [1 - (A_{Extrait} / A_{blanc})] \times 100$$

IV.6.4. Test de la capacité antioxydante par réduction de l'ion cuprique (CUPRAC)

L'activité antioxydante par réduction cuprique (CUPRAC) des extraits a été déterminée selon la méthode de Apak et ces co-auteurs (**Apaket *al.*, 2004**). Pour chaque unité d'une plaque de 96 unités, des solutions ont été ajoutées: 50 µl de Cu(II) (10 mM), 50 µl de neocuproïne (7.5 mM), 60 µl de tampon NH₄Ac (1 M, pH = 7), et 40 µl de chaque échantillon à différentes concentrations. Après une heure de temps et à l'aide d'un lecteur de microplaques, l'absorbance a été enregistrée contre un blanc à 450 nm.

Les résultats ont été calculés à titre de A_{0,5} (µg/ml) correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance.

IV.6.5. Test de la capacité antioxydante par réduction de fer (Pouvoir réducteur)

Le pouvoir réducteur est déterminé par la méthode de (**Oyaizu., 1986**) avec une légère modification. Un volume de 10 µl d'échantillon a été additionné à 40 µl de tampon phosphate pH 6.6 et à 50 µl de potassium ferricyanide (K₃Fe(CN)₆) (1%), après incubation à 50°C pendant 20 min 50 µl de l'acide trichloroacétique (TCA) à (10%) ont été ajoutés avec 40 µl H₂O et 10 µl de chlorure de fer (FeCl₃) 0.1 %.

Un blanc sans échantillon est préparé dans les mêmes conditions. L'enregistrement des absorbances est effectué à une longueur d'onde de 700 nm. L'activité réductrice est ensuite calculée à A = 0,5.

IV.6.6. Test de l'activité du phénanthroline

L'activité de phénanthroline est déterminée par la méthode de (**Szydłowska-Czerniaka, 2008**). Brièvement, 10 µl de chaque échantillon et de BHT sont mélangés à 50 µl de FeCl₃ (0.2%) puis à 30 µl de phénanthroline (0.5%) et 110 µl de MeOH dans chacun des puits de la microplaque. Après avoir soumis les mélanges à une incubation à l'obscurité pendant 20 min, l'absorbance est mesurée à 510 nm. Il faut noter que chaque dépôt est triplé aussi bien pour les extraits que pour le blanc.

IV.6.7. Test de blanchiment de β-carotène couplé à l'auto-oxydation de l'acide linoléique :

Le β-carotène est physiologiquement un composé important reconnu par sa forte activité biologique. Dans l'industrie agro-alimentaire, il est utilisé dans les boissons comme un agent de coloration et sa décoloration indique la réduction de qualité de ces produits (**Bougatef *et al.*, 2009**). Cependant, dans le test du blanchiment du β-carotène, la présence des 11 paires de

doubles liaisons rend le β -carotène extrêmement sensible aux radicaux libres dérivés d'hydroperoxydes qui sont formés à partir de l'oxydation d'acide linoléique dans un système émulsion aqueuse en résultant le blanchiment du β -carotène .

Le test de blanchiment de β -carotène utilisé pour évaluer l'activité antioxydante des extraits de notre plante est celui du **(Marco 1968)**.

0,5 mg β -carotène dans 1 ml de chloroforme a été ajouté à 25 μ l de l'acide linoléique, et 200 mg de Tween 40 mélange d'émulsifiants. Après évaporation du chloroforme sous vide, 100 ml d'eau distillée saturée avec de l'oxygène ($l'H_2O_2$), La solution générée doit avoir une absorbance qui varie entre 0,5 et 0,6. Dans le cas contraire l'absorbance est ajusté en ajoutant de $l'H_2O_2$.

Dans chaque puits de la plaque, 40 μ l de chaque concentration des extraits et du standard ont été ajoutés à 160 μ l de la solution du bêta-carotène, la plaque est incubée par la suite à 45°C min pendant 2 heures et l'absorbance est enregistré à 470. Le BHT, le BHA et l'alpha-tocophérol ont été utilisés comme standards.

Les pourcentages d'inhibition de blanchiment de la β -carotène ont été calculés par la formule suivante :

$$AA (\%) = [1 - (A_{E0} - A_{Et}) / (A_{C0} - A_{Ct})] \times 100$$

A_{E0} : valeur de l'absorbance de la β -carotène en présence de l'extrait mesurée à t=0 min

A_{Et} : valeur de l'absorbance de la β -carotène en présence de l'extrait mesurée à t=120min

A_{C0} : valeur de l'absorbance de la β -carotène en présence de contrôle négatif mesurée à t=0min

A_{Ct} : valeur de l'absorbance de la β -carotène en présence de contrôle négatif mesurée à t=120mn

IV.7.Évaluations de l'activité enzymatique

Les activités acétylcholinestérase (AChE) et butyrylcholinestérase (BChE) ont été mesurées suivant le protocole élaboré par **(Ellmanet al., 1961)**. 150 μ l de tampon phosphate de sodium Ph 8.0 ont été déposés à chaque puits d'une microplaque ,10 μ l d'échantillon de différente concentration ont été ajoutés et un volume de 20 μ l de AChE ($5,32 \times 10^{-3}$ U) ou BChE ($6,85 \times 10^{-3}$ U) a été additionné au mélange ce dernier a été incubé pendant 15 min à 25°C. Par la suite 10 μ l de DTNB et 20 μ l l'iodure d'acétylthiocholine (0,71 mM) ou le chlorure de butyrylthiocholine (0,2 mM) ont été ajoutés au milieu réactionnel. Après 15 min d'incubation à 25°C les hydrolyses de ses substrats ont été suivies par spectrométrie à une longueur d'onde de 412 nm. Les expériences ont été réalisées en triple. La galantamine a été utilisée comme

composé de référence. Le pourcentage d'inhibition de l'AChE ou BChE a été déterminé par comparaison des vitesses de réaction d'échantillons par rapport à l'échantillon témoin. Le pourcentage d'inhibition d'AChE ou BChE enzymes est déterminé par rapport au blanc par la formule suivante

$$AA (\%) = [(A_{\text{contrôle}} - A_{\text{extrait}}) / A_{\text{contrôle}}] \times 100$$

IV.8. Analyse statistique

Le test ANOVA a été utilisé pour les comparaisons statistiques. Les résultats exprimés en moyenne \pm une erreur standard. Tous les calculs ont été effectués au moyen du logiciel EXCELSTAT 2014 sur Windows 7. Les valeurs de $IC_{50}/A_{0,5}$ ainsi que les représentations graphiques ont été réalisées par le logiciel OriginPro 8.

3^{EME} PARTIE

Le processus général de la caractérisation de nouvelles molécules bioactives à partir de matrices complexes telles que les plantes fait intervenir différentes étapes, dont les trois principales sont extraction, le fractionnement et l'identification de composés d'intérêt, toutes guidées par des analyses phytochimiques et des tests biologiques.

V.1. Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction correspond au pourcentage des principes actifs dissouts dans un solvant organique et/ou aqueux utilisé pour l'extraction. Il est déterminé à partir du poids de l'extrait sec par rapport au poids de la matière végétale sèche réduit en poudre. (Abe et al., 2010). Le rendement est exprimé en pourcentage massique par rapport à la quantité de matière sèche selon la formule :

$$R (\%) = [M1/ M0] \times 100$$

R % : Rendement en extraits exprimée en g /100g de matière sèche,

M1 : quantité de l'extrait récupérée exprimée en g,

M0 : quantité de la poudre végétale utilisée pour l'extraction exprimée en g,

Les rendements de chaque extrait de *Cistus.*, exprimés en pourcentage sont présentés dans le tableau 4. Les résultats des rendements obtenus montrent que l'extrait butanolique, a donné le meilleur rendement de 4.23%, suivi par l'extrait acétate d'éthyle avec un rendement de 1.16% .En revanche, l'extrait chloroformique a donné le plus faible rendement, à peine 0.08%.

Tableau 4 : Les rendements des différents extraits.

Matérielle végétale	Extrait	Masse (g)	Rendement %
0.584kg	Chloroformique	0.46	0.08
	Acétate d'éthyle	6.8	1.16
	Butanolique	24.73	4.23

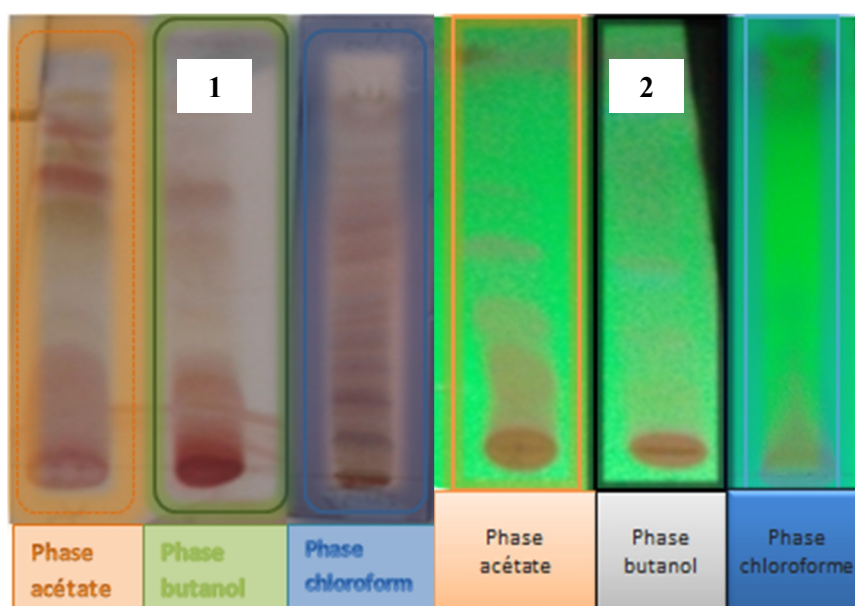
Le rendement en extraits acétate d'éthyle et chloroformique sont faibles par rapport à l'extrait butanolique.

En général, le calcul des rendements permet d'apprécier les extraits totaux qu'on peut tirer de chaque espèce. Ces rendements permettent également d'envisager la quantité d'organes à prélever en cas de besoin pour une éventuelle étude ultérieure, ce qui, rendrait l'utilisation rationnelle.

V.2. Description des profils chromatographiques par CCM et par HPLC

Chaque extrait a été analysé par chromatographie sur couche mince (CCM) et chromatographie liquide haute performance (CLHP) analytique (fig21 /22) afin d'avoir une idée sur la richesse de chaque extraits.

La chromatographie sur couche mince après la révélation par l'UV à 254-365 nm et la vanilline sulfurique a montrée plusieurs taches dans chaque extrait de type flavonoïdes. Ce type de métabolites secondaires a été mis en évidence et purifiés à partir de plusieurs espèces de la famille des Cistaceae (Massicotte et al., 2010)



1 : plaque CCM après révélation. 2 : plaque CCM sous la lampe UV 254.

Figure 21: Profils CCM sur gel de silice normale des extraits d'une espèce du genre *Cistus*

Une fois l'extrait méthanolique, chloroformique, acétate d'éthyle et butanolique sont obtenus, une analyse chromatographique par HPLC a été faite à 280nm avec gradient (H₂O /Acétonitrile) allant de 5% à 60% ACN pendant 40min.

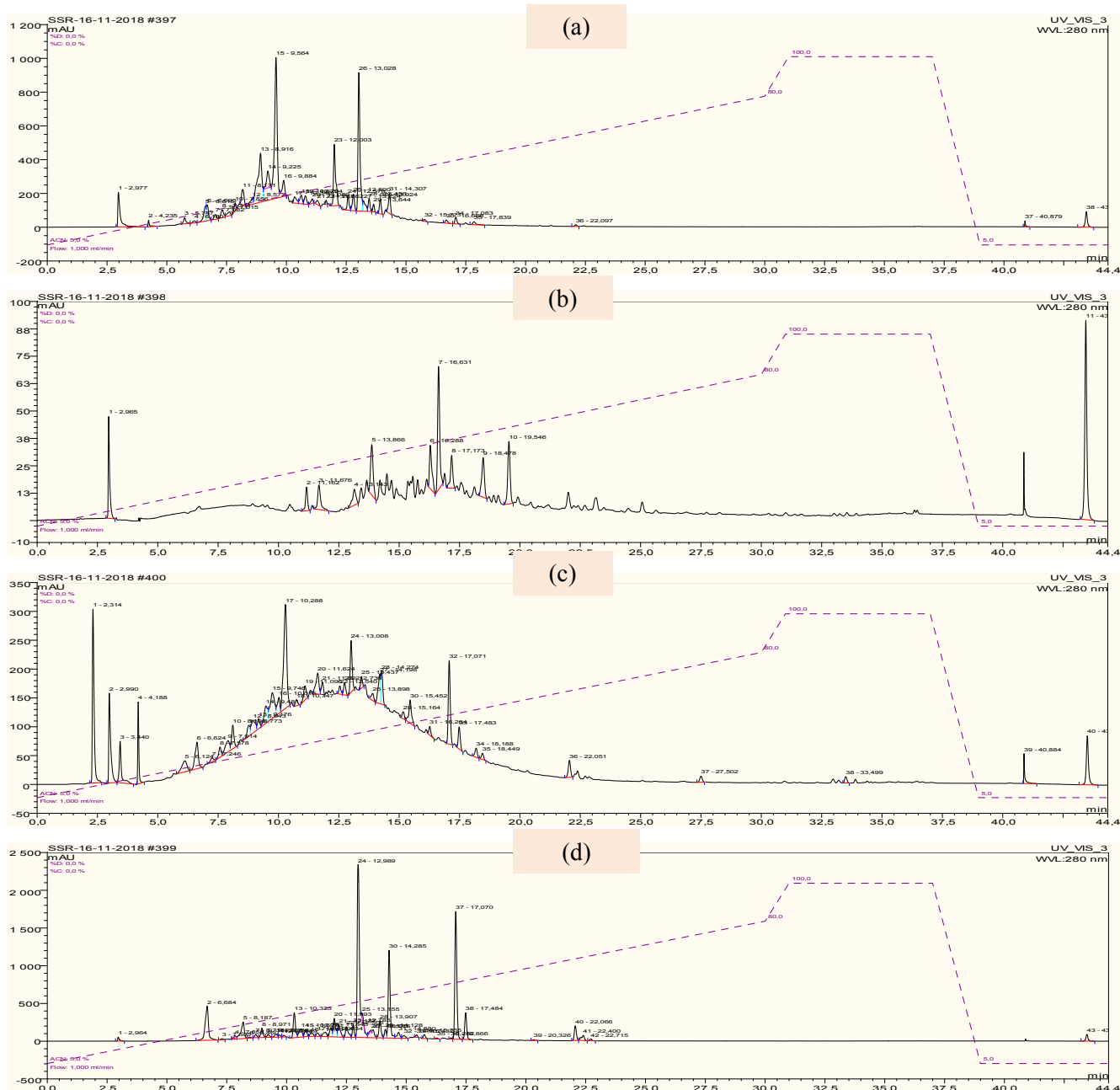


Figure 22 : Chromatogramme CLHP des extraits méthanolique(a), 'acétate d'éthyle (b) butanolique (c)et chloroformique (d) à 280 nm.

L'observation des profils chromatographiques des extraits des parties aériennes de l'espèce du genre *Cistus* par HPLC, montre bien la richesse de ces derniers en métabolites secondaires notamment les composés phénoliques qui ont une bonne absorption à 280 nm (**Fig 22**), Le Chromatogramme de l'extrait butanolique (c) montre également 2 séries de composés :

- ✚ Les composés très polaires qui arrivent en premier lieu de 1 à 10 min.
- ✚ Les composés apolaires qui sortent en dernier de 12 à 40 min.

L'extrait acétate d'éthyle présentant une complexité relativement faible, nous nous sommes intéressés en priorité à cet extrait.

V.3. Elucidation structurale des composés isolés

A partir des sous fractions (A et C) issues de la VLC de l'extrait acétate d'éthyle d'une espèce du genre *Cistus*, nous avons isolé trois flavonoïdes (**Cs1**- **Cs2** - **Cs3**).

Les structures des produits isolés ont été élucidées principalement par l'utilisation des techniques de résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton ¹H et du carbone ¹³C à une dimension, et à séquences multi-impulsionnelles à deux dimensions homonucléaires ¹H-¹H COSY, et hétéronucléaires ¹H-¹³C HSQC, ¹H-¹³C HMBC, aussi par spectrométrie UV-Visible et par comparaison avec les données de la littérature.

V.3. 1.Elucidation structurale du composé Cs1

Le composé **Cs1** purifié sous forme d'une poudre jaune est visible à la lumière UV à 254 et 365 nm. Il montre sur CCM une tache jaune après révélation par une solution acide et chauffage à 100 °C.

La fluorescence sous la lumière UV à $\lambda = 366$ nm de ce composé est noir-violette, indiquant une structure de type flavonol substituée en position 3.

Cette hypothèse structurale est confirmée sur le spectre UV (**Fig23**) enregistré dans le méthanol, par la présence de deux bandes d'absorption maximale à 315 nm (bande I) et 268 nm (bande II).

L'addition de NaOH provoque un déplacement bathochromique ($\Delta\lambda = +55$ nm) pour la bande I, avec une augmentation de son intensité lumineuse indiquant la présence d'un OH libre en position 4' (**Mabry et al., 1970**).

L'ajout de NaOAc montre un effet bathochrome de la bande II de 6 nm par rapport au spectre MeOH confirmant ainsi la présence d'un OH libre en position 7.

Pas de déplacement hypsochrome de la bande I, en comparant les spectres AlCl₃ + HCl et AlCl₃, ce qui prévoit l'absence de système orthodihydroxyle sur le noyau B.

Ces données sont en accord avec celles rapportées dans la littérature pour le kaempférol substitué en position 3 (**Mabry et al., 1970**).

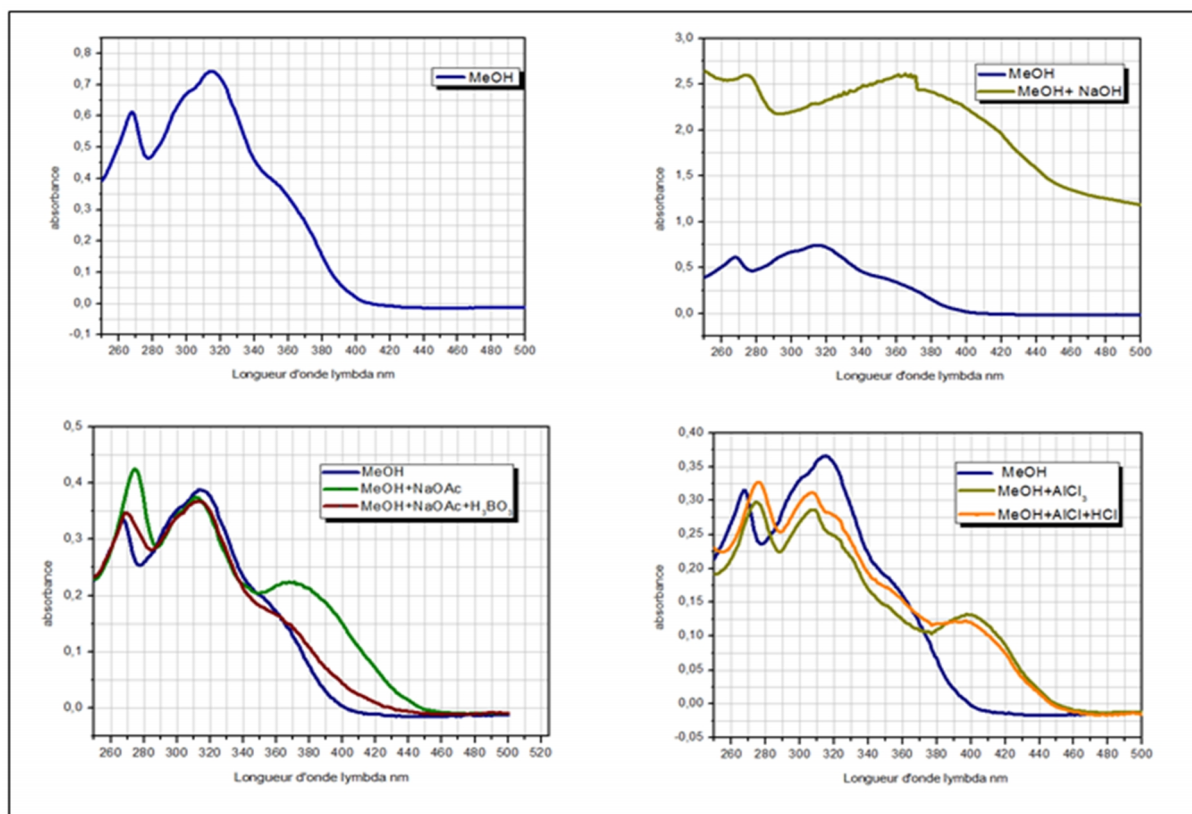
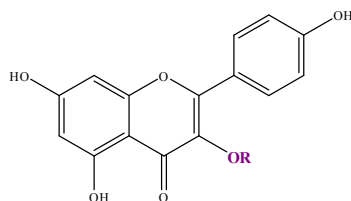


Figure 23 : Série spectrale UV du composé Cs1.

Les données relatives à la série spectrale UV sont rassemblées dans le tableau 5

Tableau 05 : données spectrales UV du composé Cs1.

Réactifs	Bande I (nm) cycle B	Bande II (nm) cycle A
MeOH	315	268
NaOH	370	274
NaOAc	370	274
NaOAc+H ₃ BO ₃	312	269
AlCl ₃	307	275
AlCl ₃ +HCl	307	275

Le spectre RMN 1H (Fig24) du composé Cs1 montre la présence de quatre signaux pour six protons aromatiques caractéristiques de la génine kaempférol :

- deux signaux à δ_H 6,15 (1H, *d*, $J = 2,1$ Hz) et δ_H 6,33 (1H, *d*, $J = 2,1$ Hz) attribuables respectivement aux protons H-6 et H-8 du cycle A du flavonoïde substitué en positions 5 et 7.
- deux signaux déblindés s'intégrant pour deux protons chacun sous forme de deux doublets résonnant à δ_H 8,02 (2H, *d*, $J = 8,9$ Hz) et 6,85 (2H, *d*, $J = 8,9$ Hz), attribuables aux protons H-2'/H-6' et H-3'/H-5' du cycle B parasubstitué.

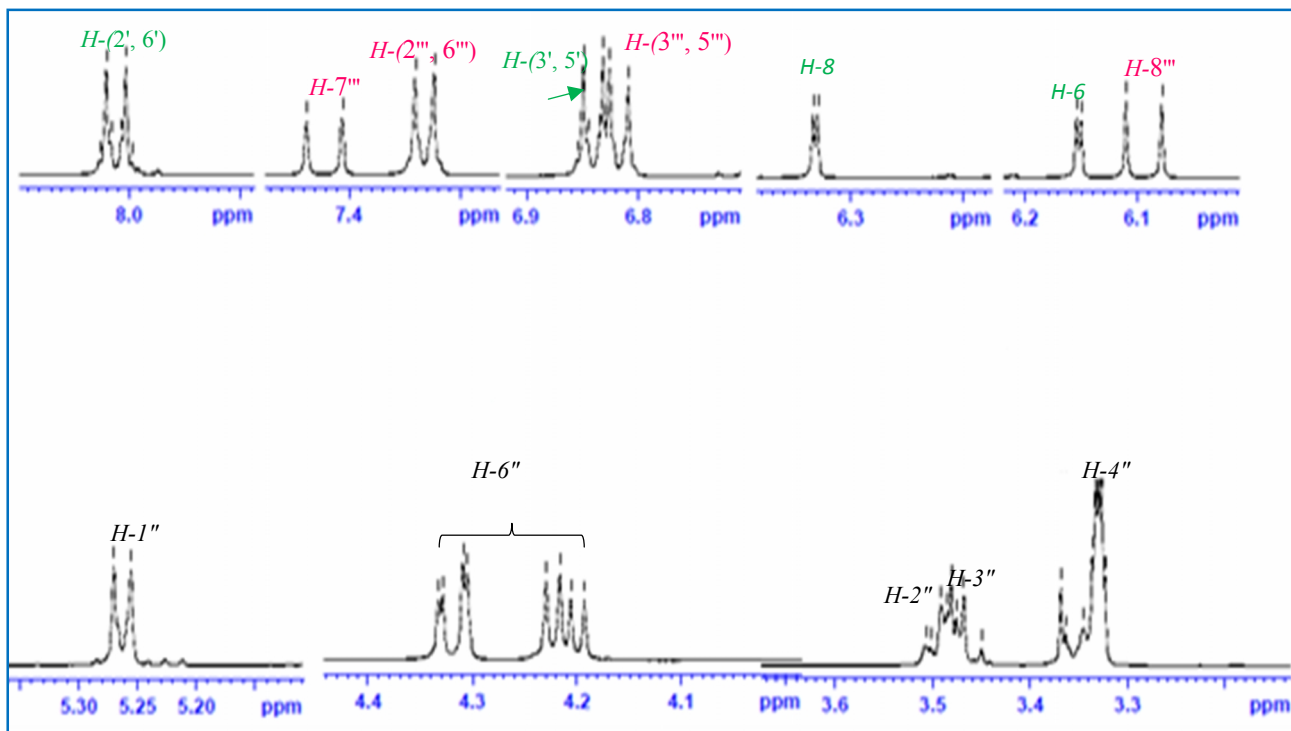


Figure 24 : Spectres de RMN¹H du composé **Cs1** dans CD₃OD.

La nature de ce composé est mise en évidence une fois de plus par l'analyse du spectre RMN ¹³C (**fig 25**) qui révèle l'existence d'un nombre important de signaux entre 93,4 et 178,0 ppm attribués aux carbones aromatiques de ce flavonoïde.

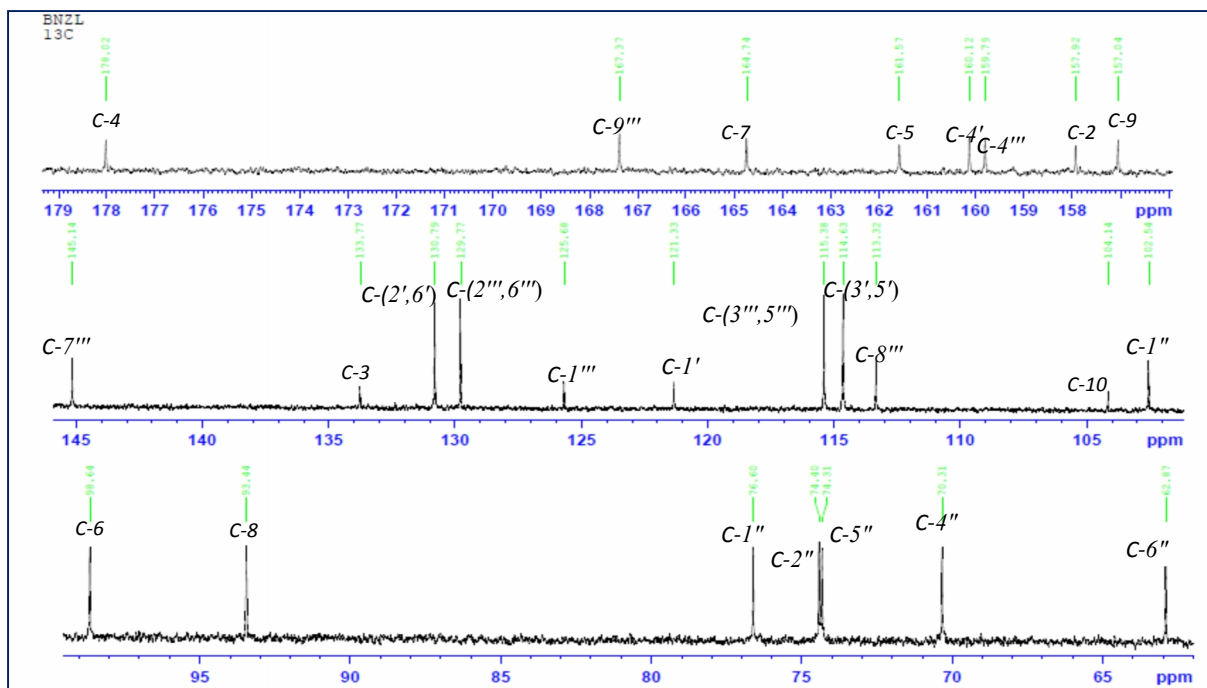


Figure 25 : Spectres de RMN¹³C du composé Cs1 dans CD₃OD.

Les carbones de ces protons sont localisés par l'analyse du spectre HSQC à δ_C 98,6 (C-6), 93,4 (C-8), 130,8 (C-2'/C-6') et 114,6 (C-3'/C-5').

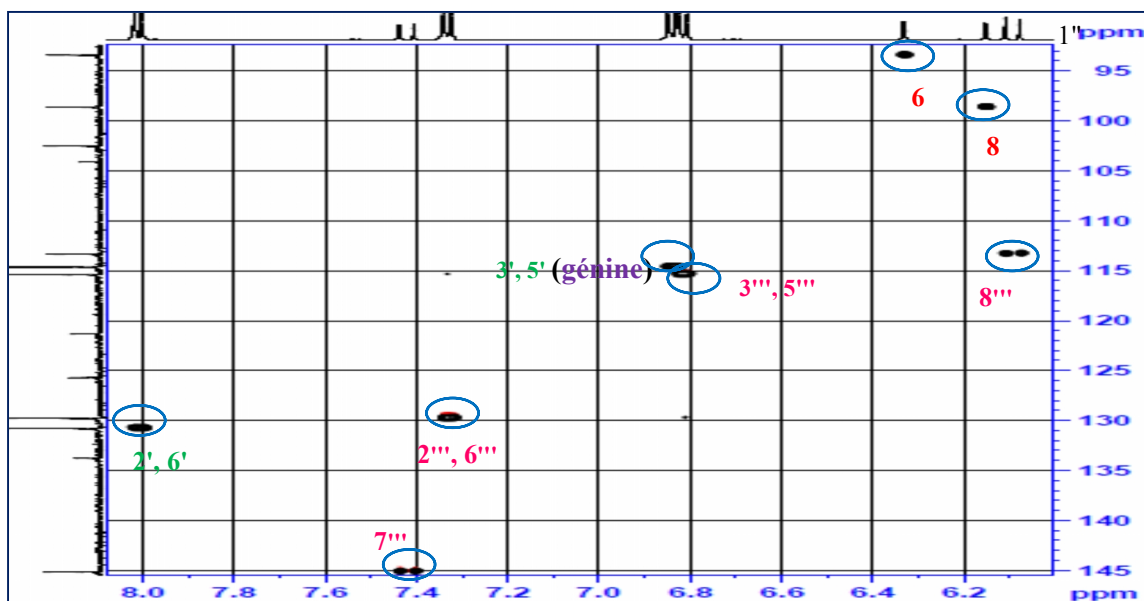


Figure 26 : Spectre HSQC (zone génine) du composé Cs1 dans CD₃OD

Les couplages observés sur le spectre COSY H-H (fig27) de ce composé confirment une fois de plus la présence d'un aglycone de type Kaempférol par les corrélations visualisées entre les protons du système AX du cycle A (H-6/H-8) et entre les protons du système A₂B₂ du cycle B (H-2', H-6'/H-3', H-5').

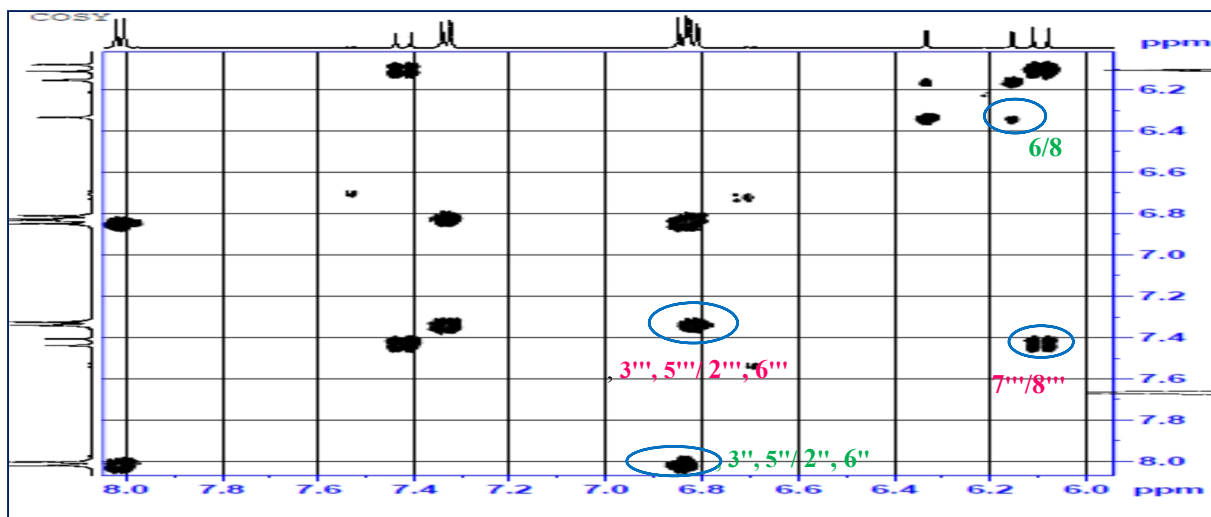


Figure 27: le spectre COSY H-H

En plus des signaux caractéristiques de Kaempférol le spectre de RMN ^1H montre la présence des signaux caractéristiques d'une unité osidique dont le proton anomérique résonne à 5,26 ppm ($d, J = 7,4$ Hz).

L'expérience COSY permet de mettre en évidence la présence de sept protons d'un hexose. Les constantes de couplage vicinales, mesurées à partir du spectre de RMN ^1H sont toutes supérieures à 7 Hz, ce qui indique qu'ils sont tous trans-diaxiaux. Ceci est caractéristique d'un β -D-glucopyranose.

Le glucose est fixé sur la génine kaempférol en position 3 comme l'atteste la corrélation HMBC (Fig 28) entre le carbone C-3 et le proton anomérique H-1'' du glucose.

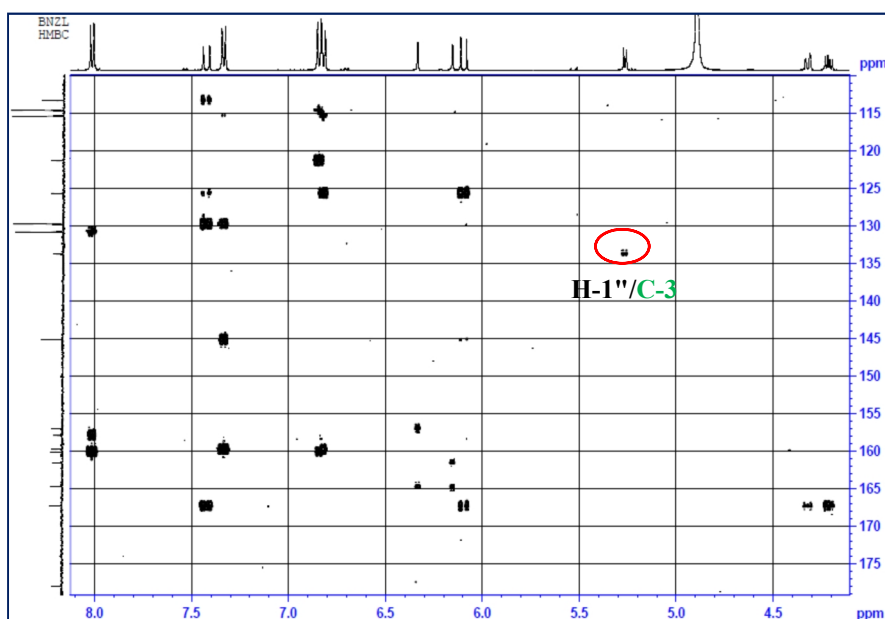
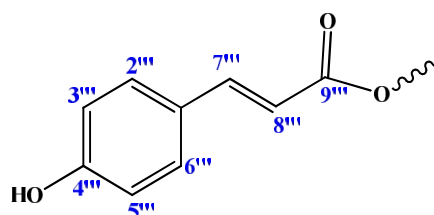


Figure 28 : Spectre HMBC du composé Cs1 dans CD_3OD

En dehors des signaux correspondants à la génine, l'analyse du spectre de RMN ¹H permet de repérer - Un autre système A₂X₂ a δ_H 7.34 ppm (2H, *d*, *J* = 8,6 Hz) et δ_H 6.83 ppm (2H, *d*, *J* = 8.6 Hz), caractéristiques d'un noyau aromatique para-substitue, correspondant aux protons H-2'''/H-6''' et H-3'''/H-5''', respectivement.

- Des signaux des protons oléfiniques a δ_H 6,10 (H-8''') et δ_H 7,43 (H-7''') sont visualises aussi sur le spectre RMN ¹H. De plus la constante de couplage entre leurs doublets (*J* = 15.9 Hz) indiquent une géométrie *trans* d'une liaison β. Ces données attestent de la présence d'un groupement *p*-coumaroyl.



Le déblindage des protons H₂-6''[H- 6''a (δ_H4,22), H-6''b (δ_H 4,32)] du β-D-glucopyranoside indique que le carbone C-6'' est acylé par le groupements coumaroyl.

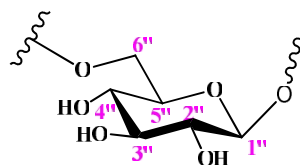


Figure 29 : structure de β-D-glucopyranoside

La corrélation en HMBC entre H₂-6'' du glucose et C-9''' indique que le carbone C-6'' est acylé par le groupement coumaroyl. (Fig 29).

Tous ces résultats comparés avec ceux de la littérature (Donovan et al., 1999) permettent d'identifier la structure du composé Cs1 au **Kaempférol-3-O-[6''-O-(*E*)-*p*-coumaroyl]-β-D-glucopyranoside** connu sous le nom **Tiliroside** (fig 30).

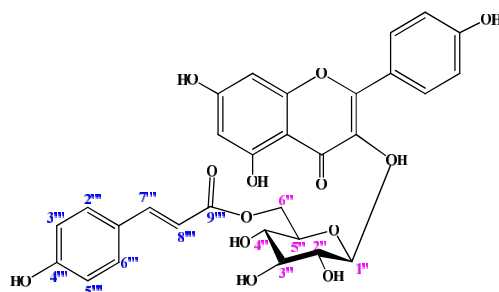


Figure 30 : Structure du composé CS1 Kaempférol-3-O-[6''-O-(*E*)-*p*-coumaroyl]-β-D-glucopyranoside (A Tiliroside)

Tableau6: Déplacements chimiques en RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) du composé Cs1 dans CD₃OD.

Position	δ_C	$\delta_H (m, J= \text{Hz})$		$\delta_H (m, J= \text{Hz})$	δ_C
2	157,9	-	3-O-B-D-Glc		
3	133,8	-	1''	5,26 (<i>d</i> , 7,4)	102,5
4	178,0	-	2''	3,71 (<i>t</i> , 9,5)	76,6
5	161,6	-	3''	3,48 <i>m</i>	74,4
6	98,6	6,15 (<i>d</i> , 2,1)	4''	3,33 <i>m</i>	70,3
7	164,7	-	5''	3,48 <i>m</i>	74,3
8	93,4	6,33 (<i>d</i> , 2,1)	6''	4,22 (<i>dd</i> , 11,7-6,4) 4,32 (<i>dd</i> , 11,7-2,1)	62,9
9	157,0	-	6''-O-(E)-p-coumaroyl		
10	104,1	-	1'''	-	125,7
1'	121,3	-	2'''	7,34(<i>d</i> , 8,6)	129,8
2'	130,8	8,02 (<i>d</i> , 8,9)	3'''	6,83 (<i>d</i> , 8,6)	115,4
3'	114,6	6,85 (<i>d</i> , 8,9)	4'''	-	159,8
4'	160,1	-	5'''	6,83 (<i>d</i> , 8,6)	115,4
5'	114,7	6,85 (<i>d</i> , 8,9)	6'''	7,34 (<i>d</i> , 8,6)	129,8
6'	130,8	8,02 (<i>d</i> , 8,9)	7'''	7,43 (<i>d</i> , 15,9)	145,1
			8'''	6,10 (<i>d</i> , 15,9)	113,3
			9'''	-	167,4

V.3. 2.Elucidation structurale du composé Cs2

Ce composé est isolé aussi sous forme d'une poudre blanche soluble dans le méthanol. Il est visible sur CCM à la lumière UV (254 nm) et se révèle en marron après pulvérisation par une solution acide et chauffage à 100 °C.

La présence d'un squelette flavonoïdique est clairement remarquée sur le spectre RMN¹H (**fig31**) de ce composé par les signaux qui apparaissent dans la zone allant de 6,00 à 7,00 ppm. Parmi ces signaux, deux doublets résonnent à δ_H 5,94 et 5,88 d'intégration¹H chacun et possédant une constante de couplage $J = 2,1$ Hz attribuables respectivement aux protons H-6 et H-8 du cycle A du flavonoïde substitué en positions 5 et 7.

Par ailleurs, il est remarqué sur le spectre RMN ¹H (**fig31**) un signal singulet sortant à δ_H 6,41 d'intégration 2H ne présentant aucun couplage sur le spectre COSY, très caractéristiques de protons magnétiquement équivalents du cycle B 1',3',4',5'-tétrasubstitué d'un flavonoïde.

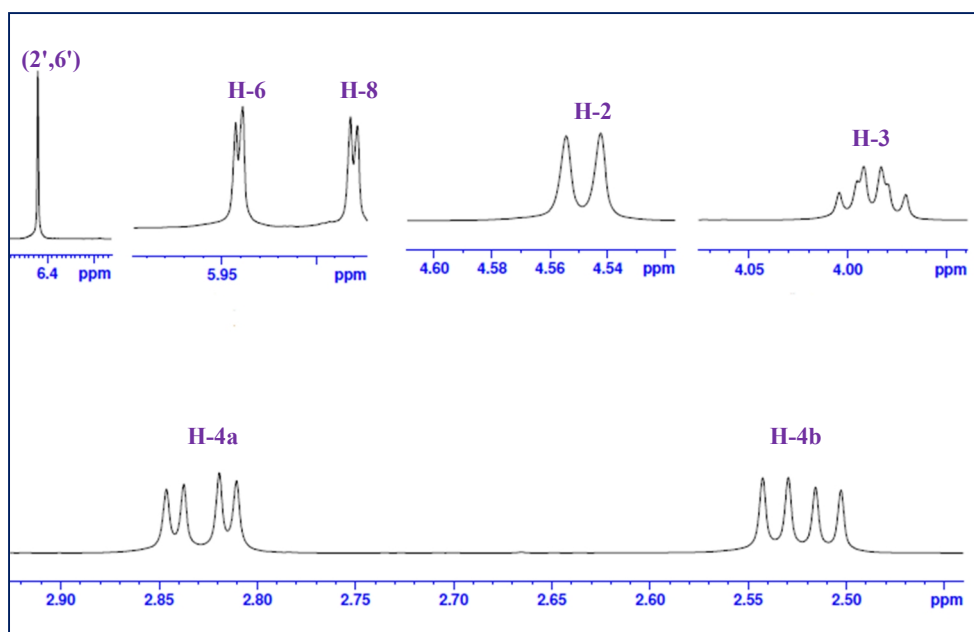


Figure 31: Spectres RMN ^1H de la zone aromatique du composé Cs2

le spectre RMN ^1H (**Fig 31**) montre un signal doublet à 4,55 ppm (1H, *d*, $J = 7,2$ Hz) d'un proton porté par un carbone oxyméthine, deux signaux blindés résonant sous forme de doublet de doublets à $\delta_{\text{H}} 2,52$ (1H, *dd*, $J = 16,2 ; 7,8$ Hz), 2,83 (1H, *dd*, $J = 16,2 ; 5,3$ Hz) caractéristiques de deux protons géminés non équivalents, un signal doublet de doublets de doublets à 3,98 ppm (1H, *ddd*, $J = 9,3 ; 7,8 ; 5,3$ Hz) d'un proton $-\text{CH}-\text{OH}$. Tous ces protons sont très caractéristiques de protons H-2, H-4 et H-3 du cycle C d'un flavanol (**Stobiecki et Popenda., 1994**).

Le spectre COSY H-H (**Fig 32**) confirme la présence de ce système de spins à travers les couplages homonucléaires H-4a ($\delta_{\text{H}} 2,83$, *dd*, $J = 16,2 ; 5,3$ Hz)/H-4b ($\delta_{\text{H}} 2,52$, *dd*, $J = 16,2 ; 7,8$ Hz), H-3 ($\delta_{\text{H}} 3,98$, *ddd*, $J = 9,3 ; 7,8 ; 5,3$ Hz)/ H-2 ($\delta_{\text{H}} 4,55$, *d*, $J = 7,2$ Hz) et enfin H-3/H2.

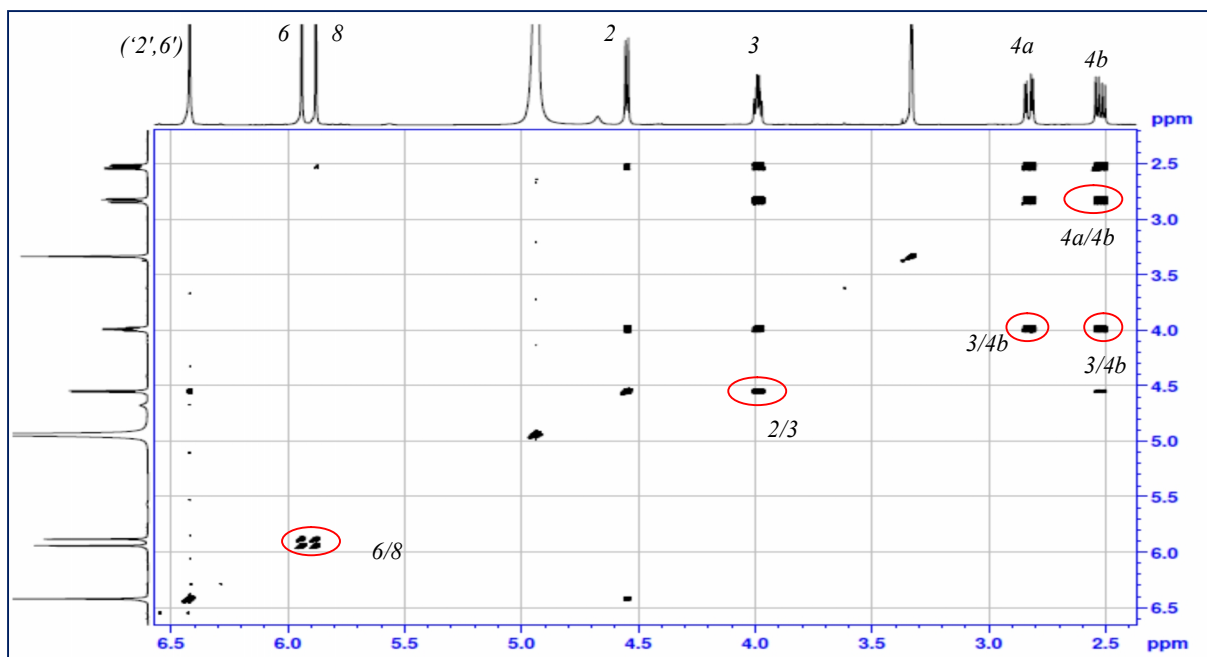


Figure 32 : spectre COSY H-H du composé Cs2

L'analyse combinée des spectres permet de caractériser tous les carbones de composé Cs2 connu sous le nom de gallocatéchine (Fig33) et de formule brute en $C_{15}H_{14}O_7$. Il a été identifié antérieurement dans un nombre important des plantes Cistaceae (Danne et al., 1994 ; Benabdelaziz et al., 2015). On citera *Cistus salvifolius*, *Cistus incanus* et *Helianthemum sessiliflorum*.

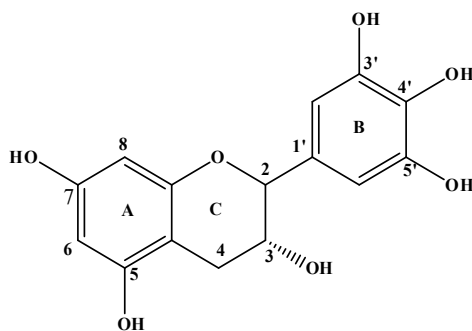


Figure 33 : Structure du composé Cs2 Gallocatéchine

V.3. 3. Elucidation structurale du composé Cs3

Ce composé est isolé aussi sous forme d'une poudre blanche soluble dans le méthanol. Il est visible sur CCM à la lumière UV (254 nm) et se révèle en marron après pulvérisation par une solution acide et chauffage à 100 °C.

Les données obtenues à partir de l'analyse combinée des spectres RMN 1H , et ^{13}C , COSY H-H, de ce composé sont presque identiques à celles du composé Cs2 par la présence de (fig34)

- Deux signaux d'intégration 1H chacun sont attribués aux protons H-6 (δ_H 5,87, *d*, $J = 2,3$ Hz) et H-8 (δ_H 5,94, *d*, $J = 2,3$ Hz) du cycle A
 - Quatre protons aliphatiques : H-2 (δ_H 4,58, *d*, $J = 7,5$ Hz), H-3 (δ_H 4,00, *ddd*, $J = 8,2-7,5-5,4$ Hz), H-4a (δ_H 2,87, *dd*, $J = 16,0-5,4$ Hz) et H-4b (δ_H 2,52, *dd*, $J = 16,0-8,2$ Hz) du cycle C.
- La différence majeure remarquée pour le composé **Cs3** par rapport au composé **Cs2** réside au niveau au niveau du cycle B par la présence de trois protons aromatiques H-2' (δ_H 6,86, *d*, $J = 1,9$ Hz), H-5' (δ_H 6,78, *d*, $J = 8,1$ Hz) et H-6' (δ_H 6,74, *dd*, $J = 8,0-1,9$ Hz).

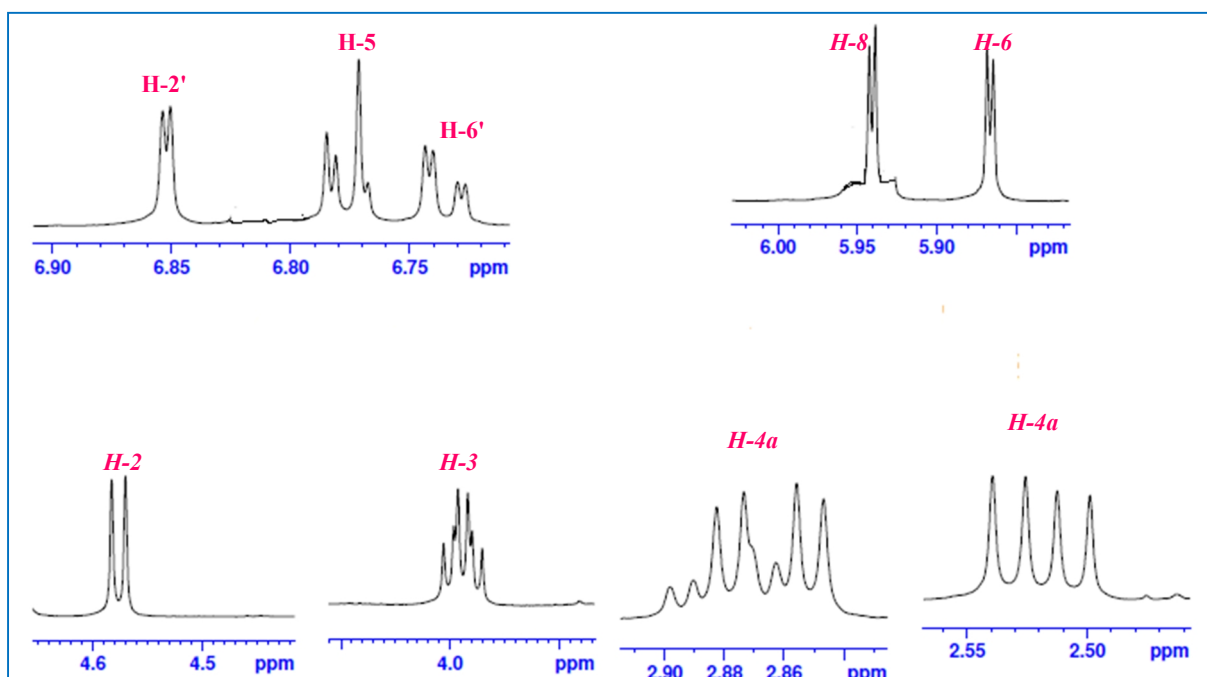


Figure 34 : Spectre RMN ¹H du composé Cs3

Toutes ces caractéristiques spectrales attestent de la nature flavanol de ce composé. Il s'agit donc du catéchine.

L'ensemble des données spectrales accumulées et la comparaison avec celles trouvées dans la littérature (**Donovan et al., 1999**) confirme bien que le présent composé est totalement identique au **catéchine (fig35)**. Ce composé est très répandu dans la famille Cistaceae en général et le genre *Cistus* en particulier où il a été isolé à partir de plusieurs espèces de ce genre telles que *C. ladanifer* (**Barros et al., 2013**), *C. salvifolius* (**Danne et al., 1994**), et *C. incanus* (**Petereit et al., 1991**).

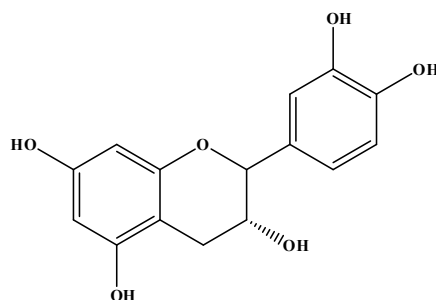


Figure 35 : Structure du composé CS3 Catéchine

V.4. Dosage des polyphénols et flavonoïdes

Les composés phénoliques sont dotés de plusieurs propriétés thérapeutiques, d'ailleurs l'explication de l'efficacité supposée de nombreuses plantes médicinales repose en tout ou partie sur leurs présences dans ces plantes (**Hennebelle et al., 2004**). Les teneurs en polyphénols totaux ont été déterminées par dosage colorimétrique en utilisant le réactif de Folin- Ciocalteu. Les résultats sont exprimés en mg EAG/mg d'extrait en se référant à la courbe d'étalonnage préalablement établie. Les flavonoïdes totaux sont déterminés par La méthode de (**Topçu et al.,2007**), et les résultats sont exprimés en $\mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait en se fondant sur la courbe d'étalonnage établie avec la quercétine (**Fig36**).

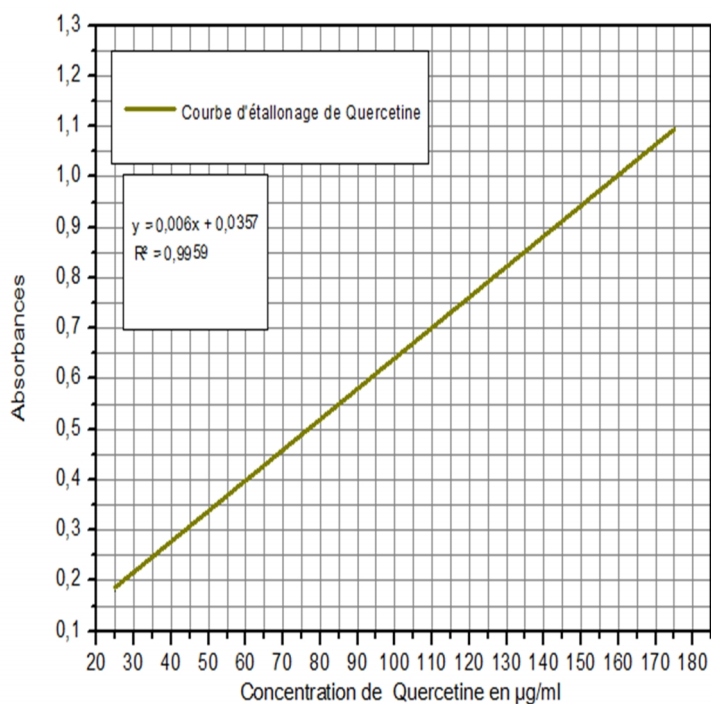


Figure 36 : courbe étalon de la quercétine pour le dosage de flavonoïdes

Les résultats du dosage sont représentés dans le tableau 07

Tableau 07. Résultats du dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes totaux les extraits de *Cistus*.

Extraits	Polyphénols ^(a)	Flavonoïdes ^(b)
Extrait brut (E1)	219,34±1,02	39,93±0,92
Extrait butanolique (E2)	250,2±2,9	65,88±0,85
Extrait chloroformique (E3)	183,48±2,4	-
La fraction A (E4)	810,33±1,86	437,27±1,02
La fraction B (E5)	566,68±2,94	17,49±0,53

(a) μg d'équivalent d'acide gallique par mg d'extrait (μg EAG/mg d'extrait).

(b) μg d'équivalent de quercetine par mg d'extrait (μg EQ/mg d'extrait).

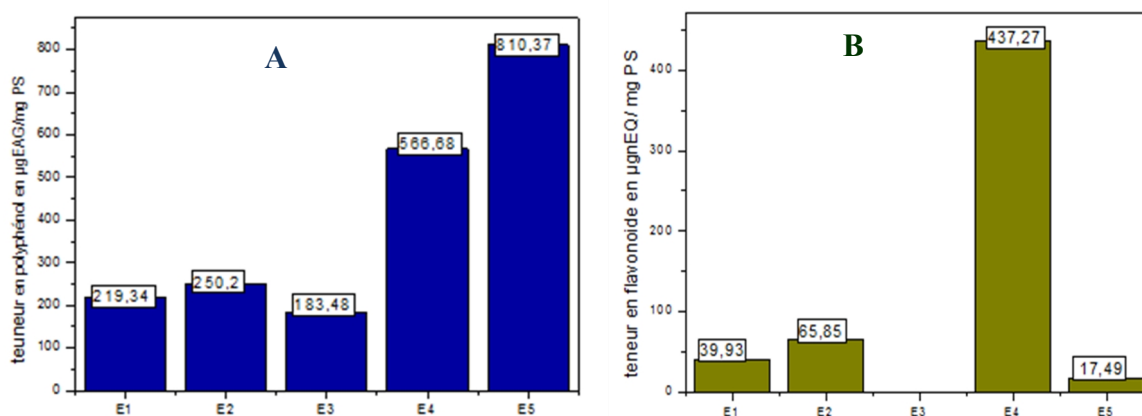


Figure37 : Détermination du contenu en composés phénolique (A) et flavonoïdiques (B) des différents extraits de la plante du genre *Cistus*.

Les résultats du dosage des polyphénols totaux révèlent que la fraction B (E5) est la plus riche en composés phénoliques ($810,33\pm 1,86\mu\text{g}$ EAG/mg d'extrait), suivi par la fraction A (E4) ($566,68\pm 2,94\mu\text{g}$ EAG/mg d'extrait) et l'extrait butanolique (E2) ($250,2\pm 2,9\mu\text{g}$ EAG/mg d'extrait) tandis que l'extrait brut (E1) renferme $219,34\pm 1,02\mu\text{g}$ EAG/mg d'extrait), en revanche l'extrait chloroformique (E3) ne contient que ($183,48\pm 2,4\mu\text{g}$ EAG/mg d'extrait).

La concentration des flavonoïdes dans les extraits de *Cistus* s'est échelonnée de $17,49$ à $437,27\mu\text{g}$ EQ/mg d'extrait. La fraction A contenant la concentration de flavonoïde la plus élevée ($437,27\mu\text{g}$ EQ/mg) contrairement à l'extrait chloroformique (E3) qui ne contient pratiquement pas de flavonoïdes. En effet la teneur des autres extraits varie de $17,49\pm 0,53\mu\text{g}$ EQ/mg à $65,88\pm 0,85\mu\text{g}$ EQ/mg.

Plusieurs facteurs peuvent influencer sur la teneur en composés phénoliques. Des études ont montré que les facteurs extrinsèques (tels que les facteurs géographiques et climatiques), les facteurs génétiques, mais également le degré de maturation de la plante et la durée de stockage ont une forte influence sur le contenu en polyphénols (**Aganga et Mosase., 2001 ; Bouzid et al., 2011**)

V.5. Evaluation du potentiel antioxydant

A travers nos recherches bibliographiques et compte tenu de la complexité de processus d'oxydation, il apparaît clairement qu'une seule méthode n'est pas suffisante pour caractériser le potentiel antioxydant d'un échantillon. Il faut donc combiner les réponses obtenues à l'aide de tests différents et complémentaires. C'est pourquoi notre choix s'est porté sur l'utilisation de sept tests chimiques en l'occurrence la capacité des composés à piéger des radicaux libres (DPPH , ABTS ,galvinoxyl), la peroxydation des lipides (blanchissement de β -carotène), à chélater des métaux de transition (Fer) ,CUPRAC, phénanthroline et à tester le pouvoir réducteur de différents extraits .

Ces tests ont montré visiblement un changement de couleur qui a été analysé par spectrophotométrie à des longueurs d'onde spécifiques.

BHA, BHT et α -tocophérol sont connus pour leurs propriétés antioxydants et sont utilisés comme un control positif.

Nous présentons ci-dessous, les résultats des différentes activités antioxydante de l'extrait brut (E1), l'extrait butanolique (E2), l'extrait chloroformique (E3) ainsi que les deux fractions issus de la VLC ; **A** (E4) et **B** (E5).

V.5. 1. Test de l'activité scavenger du radical DPPH

Cette activité a été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne de son passage de la couleur violette (DPPH) à la couleur jaune (DPPH-H) mesurable à 517 nm. Les résultats figurant sur la figure ci-après (**Fig38**) illustrent les pourcentages de l'activité antiradicalaire des principaux extraits de *Cistus*.

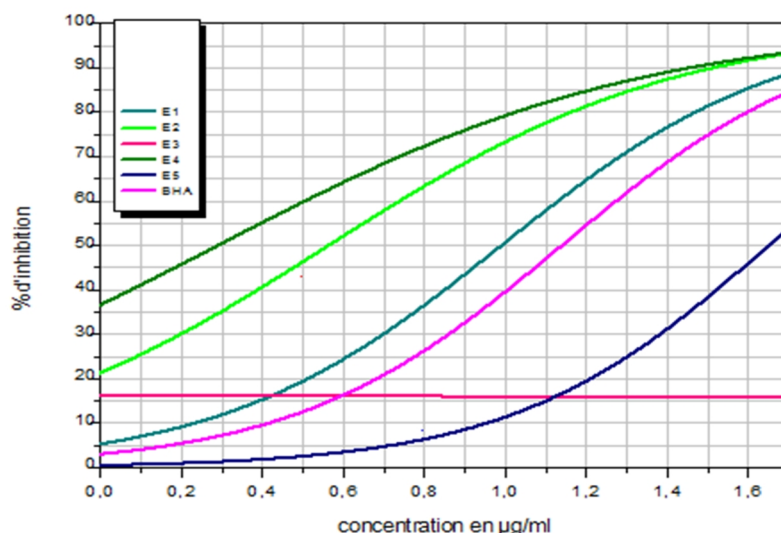


Figure38 : Courbes des pourcentages d'inhibition du radical DPPH

Cette figure révèle que tous les extraits testés ont une activité antiradicalaire dose dépendante vis-à-vis du radical DPPH. Les courbes se caractérisent par une inhibition presque totale du radical DPPH. La (Fig39) montre aussi que la fraction A (E4) présente le pourcentage d'inhibition le plus élevé, il est de l'ordre 82.84%. La même fraction aussi a présenté des teneurs en phénoliques et en flavonoïdes plus élevées.

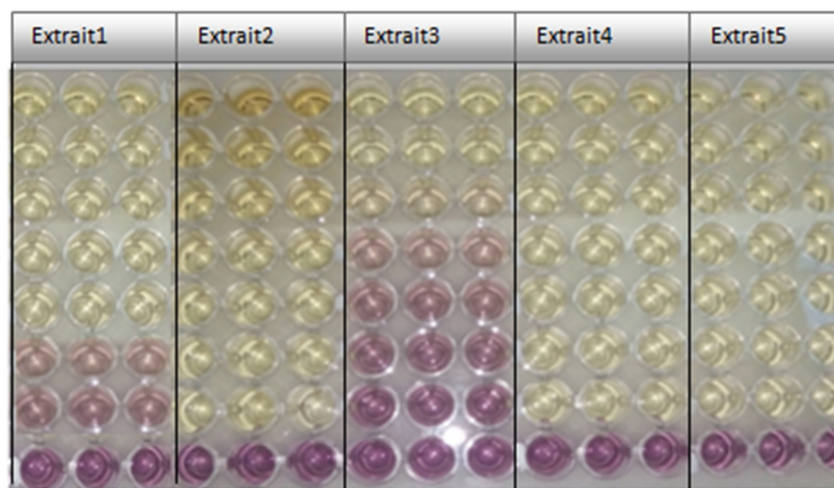


Figure 39 : Photo prises lors du dosage de l'activité antiradicalaire DPPH.

Détermination des IC₅₀

Pour mieux comprendre le pouvoir antioxydant de nos extraits, nous avons déterminé la valeur d'IC₅₀ µg /ml qui est définie comme étant la concentration de l'extrait nécessaire pour piéger 50 % de radical DPPH. Les valeurs d'IC₅₀ de différents extraits, E1-E5 et BHA sont illustrées dans la (Fig 40).

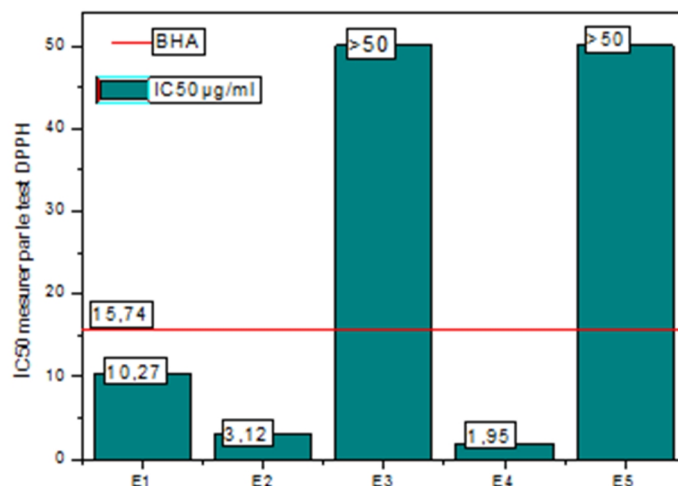


Figure40 : IC₅₀ pour l'activité antiradicalaire DPPH⁺

À partir de l'histogramme on remarque que tous les extraits possèdent un pouvoir antioxydant important qui peut dépasser celui du standard BHA qui est de IC₅₀=15,74±0,47µg/ml C'est le cas de la fraction **A** (E4) qui a une concentration d'inhibition de l'ordre de 1,95 ± 0,31 µg/ml comparable à celle du BHA. Concernant l'extrait butanolique (E2) son potentiel antioxydant est 5 fois plus élevé de celui de BHA avec une valeur IC₅₀= 3,12 ± 0,29 µg/ml et pour l'extrait brute (E1) son IC₅₀est de 10,27± 0,94ce qui montre une activité proche du BHA (15,74±0,47µg/ml). L'extrait chloroformique (E3) et la fraction **B** (E5) s'ont avéré moins actif par rapport aux autres extraits et au BHA avec des IC₅₀ supérieur de 50µg/ml.

Par ailleurs, l'activité antioxydante de notre extrait brut est significativement supérieure à celles des extraits aqueux et méthanolique des feuilles de 11 espèces du genre *Helianthemum* (Cistaceae) obtenues par les travaux de (Rubio-Moraga et al., 2013) avec des IC₅₀ comprises entre 25,3 et 66,2 µg/ml. Selon (Turkmen et al., 2007) les polyphénols semblent être des donateurs efficaces d'hydrogène au radical DPPH, en raison de leur chimie structurale idéale.

V.5. 2. Test de l'activité scavenger du radical l'ABTS^{•+}

Dans cette étude nous avons estimé l'activité antioxydante des différents extraits en utilisant la méthode basée sur la capacité d'une substance à piéger le radical ABTS^{•+} par rapport à l'antioxydant standard (BHA). Les résultats obtenus du test de mesure d'ABTS^{•+}nous ont permis de tracer les graphes de variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de chaque extrait (Fig 41).

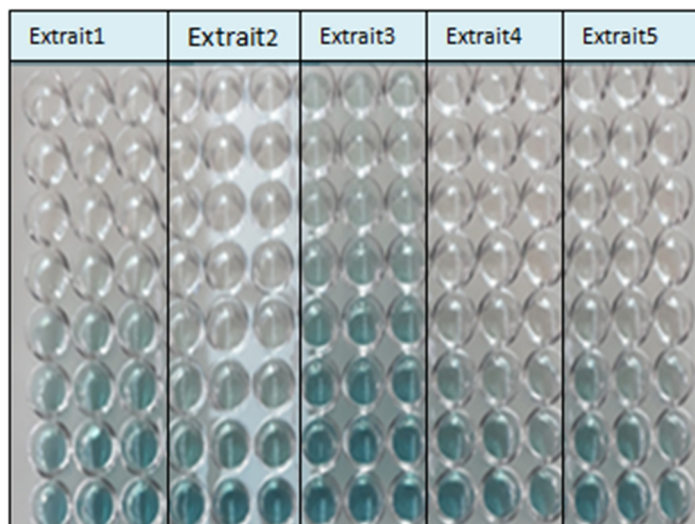


Figure 41 : Photo prises lors du dosage de l'activité antiradicalaire ABTS⁺

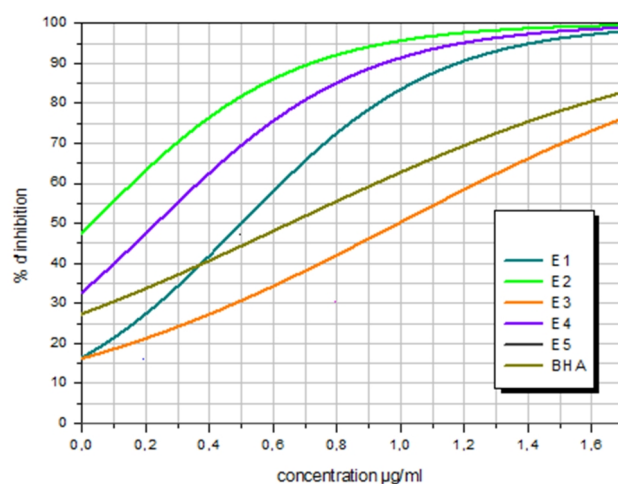


Figure 42 : Courbes des pourcentages d'inhibition du radical ABTS⁺

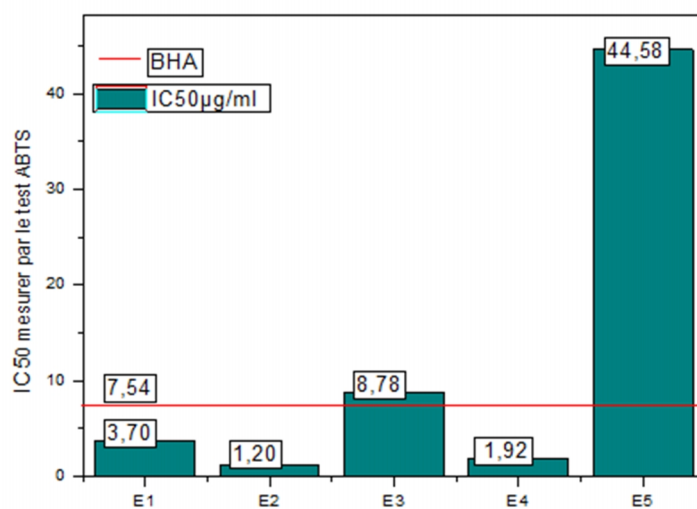


Figure43 : IC₅₀ pour l'activité antiradicalaire ABTS⁺

Les pourcentages d'inhibition des radicaux libre d'ABTS⁺⁺ varient de 9.31% à 93.25%. Ces résultats ont montré que l'extrait butanolique (E2), la fraction **A**(E4) présentent la plus forte activité avec les valeurs IC_{50} $1.20 \pm 0.14 \mu\text{g/ml}$ et $1.92 \pm 0.03 \mu\text{g/ml}$ respectivement possédant donc une activité sept fois plus importante que celle du BHA ($7.54 \pm 0.67 \mu\text{g/ml}$). L'extrait brut (E1) a montré une activité antiradicalaire de l'ordre d' IC_{50} $3.7 \pm 0.26 \mu\text{g/ml}$ de nettement supérieure à celle du standard.

Pour ce qui est de l'extrait chloroformique (E3) il exhibe une IC_{50} de l'ordre de $8.78 \pm 0.22 \mu\text{g/ml}$, s'approchant ainsi à celle du BHA, alors que la fraction **B** (E5) a enregistré l'activité la plus faible avec une valeur d' IC_{50} de $44.55 \pm 3.99 \mu\text{g/ml}$.

Notre extrait brut a également montré une activité antiradicalaire nettement supérieure à celles des extraits aqueux et méthanolique obtenues par (**Rubio-Moraga et al., 2013**) pour leur étude portant sur 11 espèces d'*Helianthemum*(Cistaceae) avec des IC_{50} oscillant entre 6,15 et 108,65 $\mu\text{g/ml}$.

V.5.3. Test de piégeage du radicale Galvinoxyl(GOR)

La capacité des extraits à donner un atome d'hydrogène a été testée en utilisant le radical libre galvinoxyl. Elle était mesurée à 428 nm. Les résultats obtenus du test nous ont permis de tracer les graphes de variation de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de chaque échantillon, nous avons déterminé aussi la valeur d' IC_{50} $\mu\text{g/ml}$. Les valeurs d' IC_{50} de différents extraits, E1-E5 et BHA sont illustrées dans la (**Fig 44**).

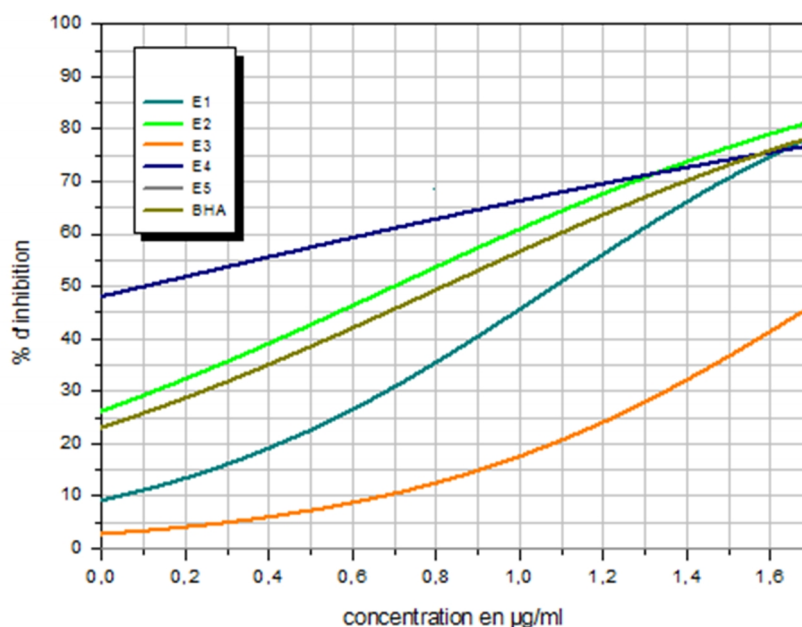


Figure44 : Courbes des pourcentages d'inhibition du radical Galvinoxyl

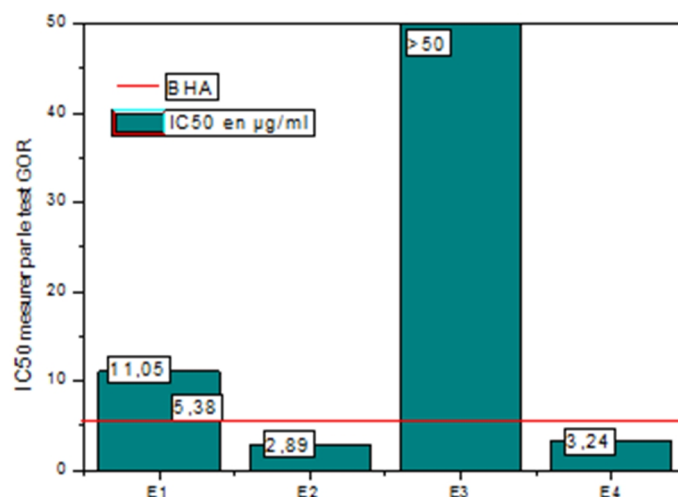


Figure45 : IC₅₀ pour l'activité antiradicalaire GOR

A partir des valeurs d'IC₅₀, on constate qu'à l'exception de la fraction B qui ne présente aucune activité tous les échantillons testés possèdent un potentiel antioxydant intéressant vis-à-vis du radical Galvinoxyl qui peut même dépasser celle de standard BHA qui présente un IC₅₀ de l'ordre de 5,38 ± 0,06 µg/ml. C'est le cas par exemple de l'extrait butanolique (E2) et la fraction A (E4) qui ont une concentration d'inhibition de l'ordre de 2,89 ± 4,19 µg/ml et 3,24 ± 0,11 µg/ml respectivement. D'autre part, l'extrait chloroformique (E3) s'est avéré moins actif par rapport aux autres extraits.

V.5. 4. Test de l'activité réductrice de l'ion cuprique (CUPRAC)

C'est une méthode développée par Apak et al en 2004. Le principe de ce test se base sur la conversion des hydroxyles phénoliques en quinones à travers la réduction du complexe Cu²⁺-Nc, produisant ainsi un complexe chromogène de Cu⁺-Nc qui absorbe à 450 nm. Ce test est colorimétrique et le réactif passant du bleu vert au jaune dans la présence d'antioxydante. Les résultats ont été comparés à un antioxydant standard qui est le BHT.

Les A_{0,5} sont déterminées graphiquement à partir des droites de régression linéaire des absorbances en fonction des concentrations, tracées par le logiciel OriginPro 8. Ces résultats sont représentés sous forme d'un histogramme.

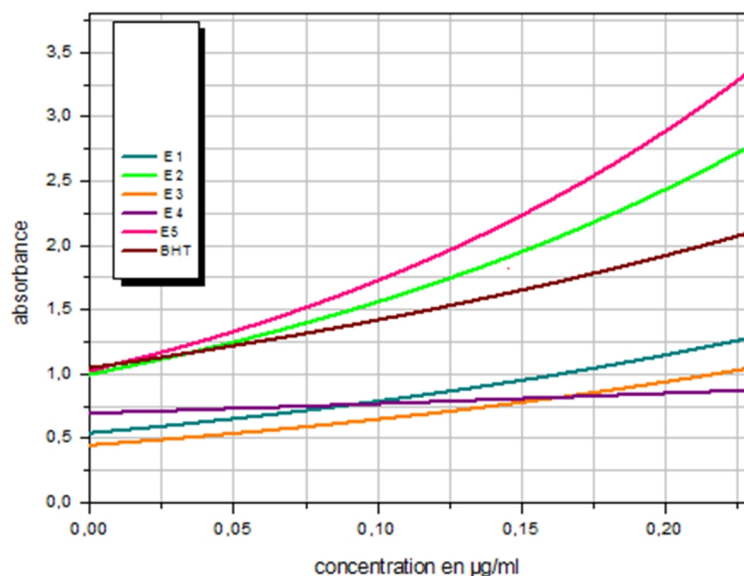


Figure46 : Courbes des absorbances en fonction des concentrations (CUPRAC).

La figure présente les courbes d'absorbance en fonction de concentration de standard et des extraits. Les cinq extraits sont tous révélés capable de réduire le cuivre.

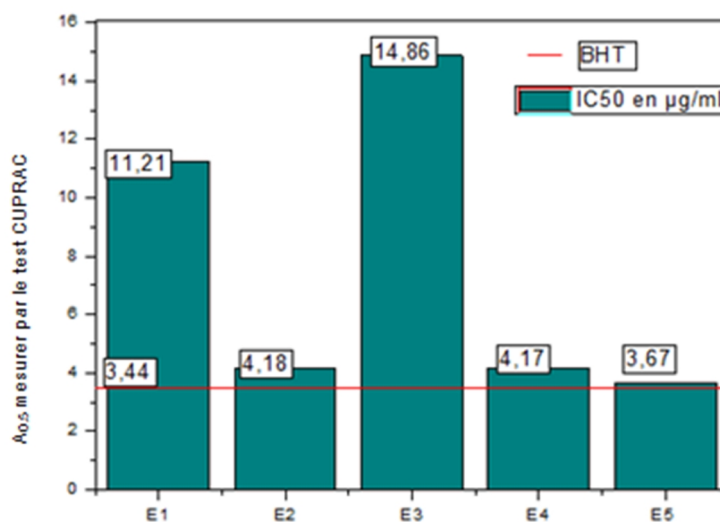


Figure47 : les A_{0,5} des échantillons testés CUPRAC

L'activité CUPRAC indique une relation inverse entre les A_{0,5} et la capacité antioxydante des extraits testés. La (fig48) ci-dessous montre le virage de la couleur par rapport au blanc confirmant ainsi les résultats du test.

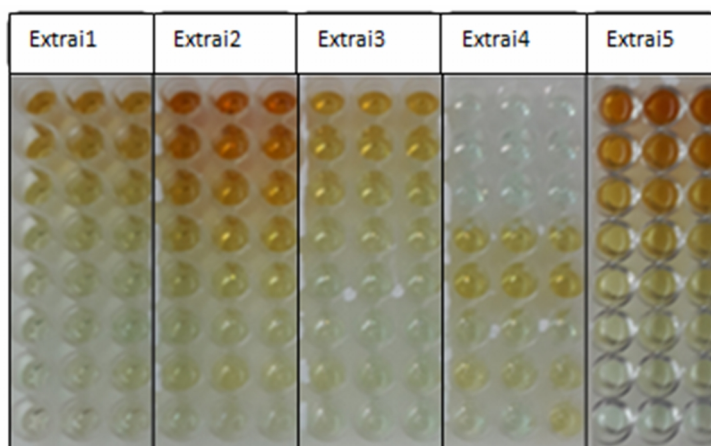


Figure48 : Photo prises lors du dosage de l'activité CUPRAC

A partir de résultats on peut déduire que la fraction **B**(E5), la fraction **A** (E4) et l'extrait butanolique(E2) ont un pouvoir réducteur de cuivre plus important que celui des autres extraits, possédant tous les trois des valeurs $A_{0.5}$ voisine de celle du standard BHT ($A_{0.5}=3.44\pm 0,04 \mu\text{g/ml}$) et qui sont de l'ordre de : $3.67\pm 0.16 \mu\text{g/ml}$ pour la fraction **B** (E5), $4.17 \mu\text{g/ml}$ pour la fraction **A**(E4) et $4.18\pm 0.36 \mu\text{g/ml}$ pour l'extrait butanolique(E2).

L'extrait brute (E1) et chloroformique (E3) ont montré une activité réductrice inférieure à ceux des autres extraits et au standard avec des valeurs de $A_{0.5}$ de $11.21\pm 0.79 \mu\text{g/ml}$ et $14.86\pm 0.88 \mu\text{g/ml}$ respectivement.

V.5. 5. Test de l'activité réductrice de l'ion ferrique (Pouvoir réducteur)

La capacité réductrice des échantillons a été également étudiée à partir de la transformation du fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{+2}). Les résultats ont été déterminés à partir de l'absorbance à 700 nm. L' α -tocophérol a été utilisé comme témoin positif.

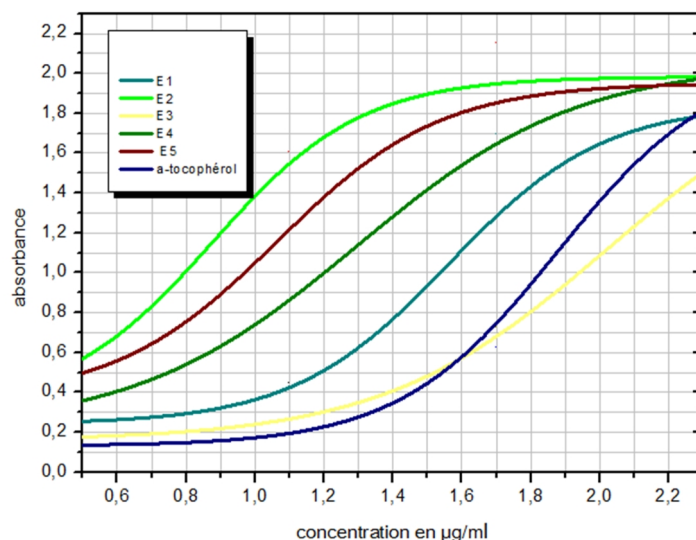


Figure 49 : Courbes des absorbances en fonction des concentrations des différents extraits de la plante (test pouvoir réducteur)

Les résultats des concentrations réductrices des ions Fe^{3+} à 0,5 d'absorbance sont calculés graphiquement, puis représentés par un histogramme

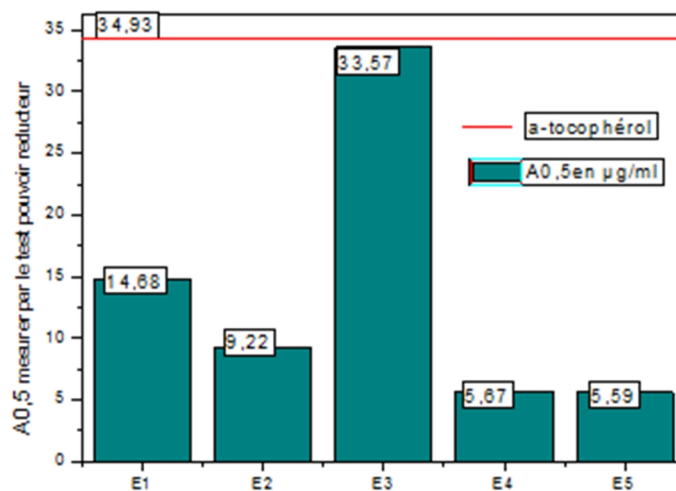


Figure 50 : A_{0,5} des échantillons testés pour l'activité du pouvoir réducteur

Les A_{0,5} obtenus sont inversement proportionnels aux réactions colorimétriques enregistrées. Plus le A_{0,5} est petit, plus la réaction est intense, plus l'échantillon est actif vis-à-vis l'oxydation.

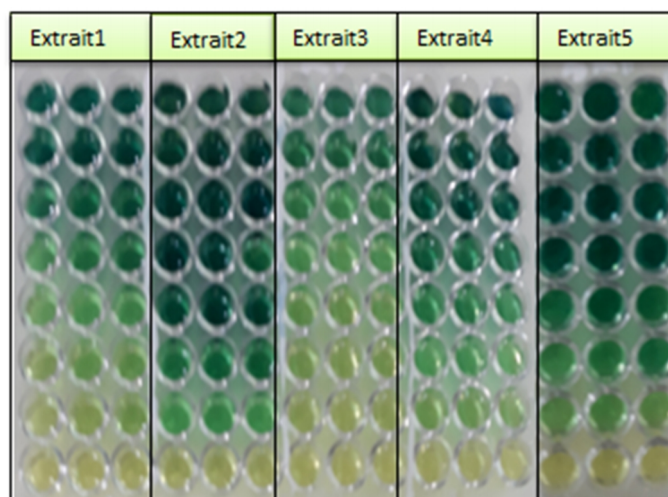


Figure 51 : Photo prises lors du test du pouvoir réducteur

Les résultats d'évaluation de pouvoir réducteur indiquent que les cinq extraits possèdent une grande activité réductrice de l'ion Fe^{3+} et même plus grande que celle du standard α -tocophérol qui a une valeur $A_{0,5}$ égal à $34,93 \pm 2,38 \mu\text{g/ml}$ alors que les données enregistrer avec nos cinq extraits ont mis en évidence des valeurs $A_{0,5}$ égal à $14,68 \pm 2,78 \mu\text{g/ml}$ pour l'extrait brut (E1), $9,22 \pm 1,15 \mu\text{g/ml}$ pour l'extrait butanolique (E2), $33,57 \pm 3,74 \mu\text{g/ml}$ pour l'extrait chloroformique (E3), $5,67 \pm 0,49 \mu\text{g/ml}$ pour la fraction A (E4) et en fin $5,59 \pm 2,13 \mu\text{g/ml}$ pour la fraction B (E5) .

V.5. 6. Test de l'activité du phénanthroline

Les résultats de l'absorbance des échantillons testés, y compris le BHT, sont obtenus après une lecture à 510 nm.

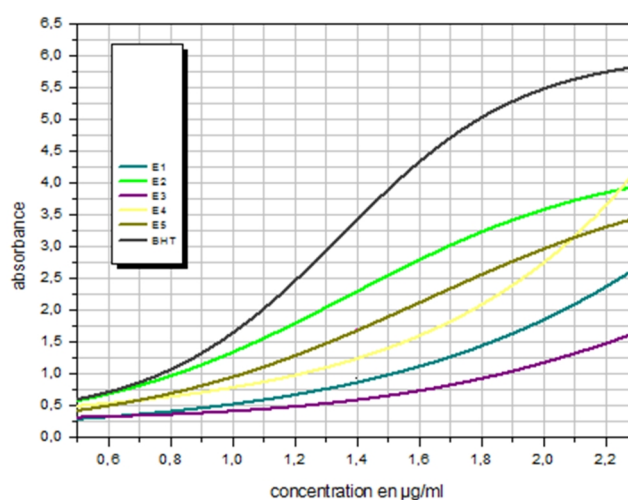


Figure52 : Courbes des absorbances en fonction des concentrations des différents extraits de la plante.
(Test du phénanthroline)

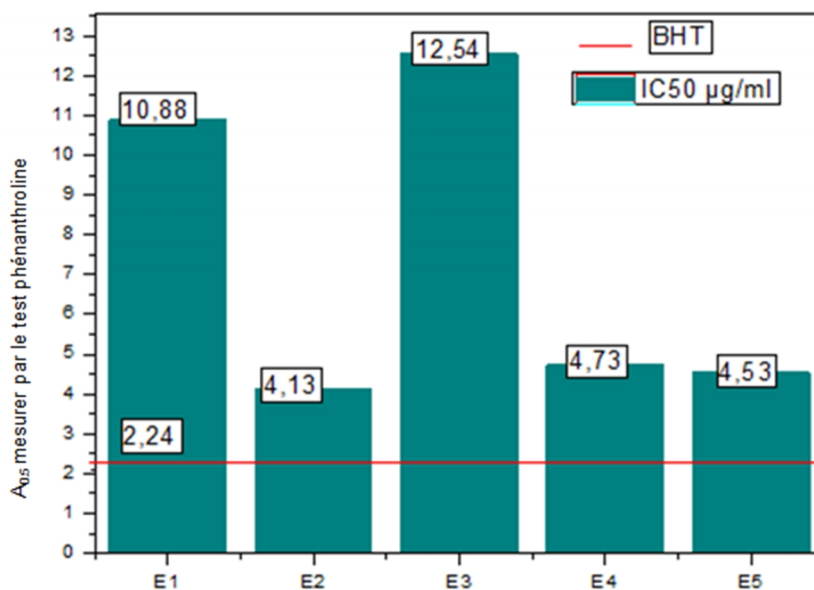


Figure53 : A_{0,5} des échantillons testés pour l'activité phénanthroline.

Les résultats d'évaluation de l'activité antioxydante par le test phénanthroline indique que le standard BHT est le plus actif parmi tous les échantillons avec une valeur de A_{0,5} atteignant A_{0,5} = 2,24±0,14 µg/ml. Le test a révélé aussi que les différents extraits testés possèdent un pouvoir antioxydant assez important. Pour ce qui est de l'extrait butanolique(E2), la fraction A (E4) et la fraction B(E5), elles exhibent des A_{0,5} similaires de l'ordre de A_{0,5} = 4,13±1,19, 4,73±0,73 et IC₅₀ = 4,53±0,22 µg/ml respectivement. Néanmoins, l'extrait brute (E1) (A_{0,5} = 10.88±1.14 µg/ml) et l'extrait chloroformique (E3) ont montré une activité réductrice inférieure à celle des de standard et des échantillons testés.

V.5. 7. Test de blanchissement du β-carotène

Dans ce test, l'oxydation de l'activité linoléique produit des radicaux peroxyde (**Kauret Kapoor, 2002**). Ces radicaux vont par la suite oxyder la β-carotène hautement insaturé entraine ainsi la disparition de sa couleur rouge qui est suivi par spectrophotométrie à 490 nm. Cependant la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés d'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation ainsi que le blanchissement de la β-carotène. Les résultats obtenus par ce test sont illustré dans la (**fig 54**) suivante

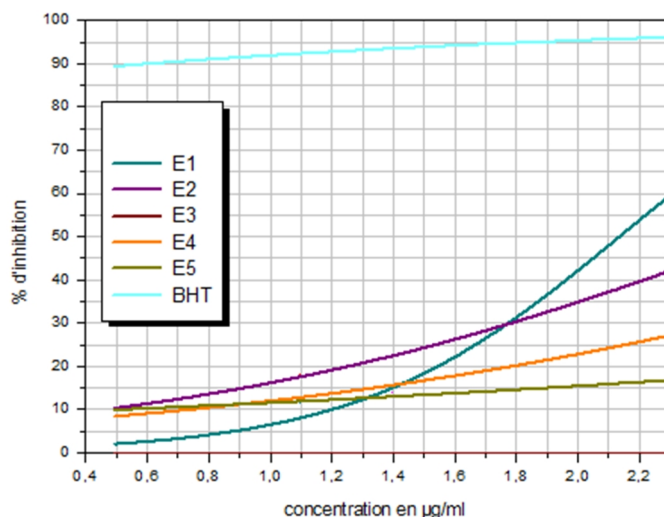


Figure 54: Courbes des pourcentages d'inhibition de la peroxydation lipidique

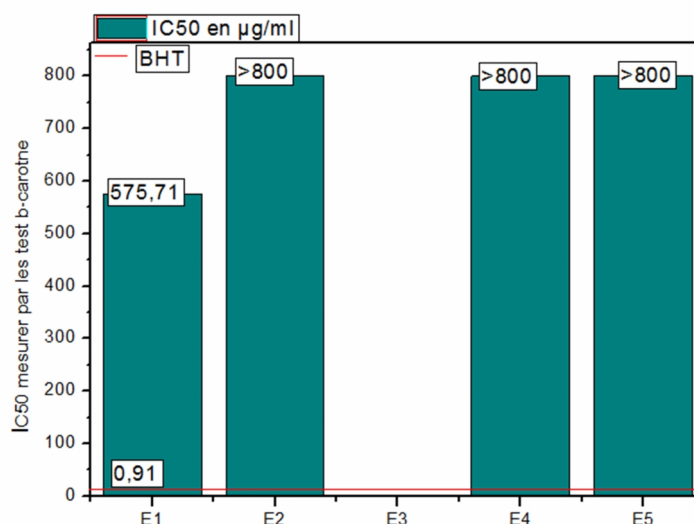


Figure 55 : IC₅₀ pour l'activité β-carotène

Les extraits testés E1-E5 n'ont montré aucune activité de blanchissement du β-carotène avec des IC₅₀ très loin de celui du contrôle positif BHT qui présente une valeur IC₅₀ = 0,91 ± 0,01 µg/ml.

V.6. Évaluations de l'activité enzymatique

V.6.1. Évaluation de l'activité anti-acétylcholinestérase et anti-Butyrylcholinestérase

L'activité anti-cholinestérase et anti-butyrylcholinestérase des extraits E1-E5 de la plante du genre *Cistus* a été réalisée par l'utilisation des enzymes acétylcholinestérase (AChE) et

butyrylcholinestérase (BChE), les résultats de cette étude ont été comparés à ceux de la galantamine (utilisée comme un médicament pour le traitement de la maladie d'Alzheimer).

Les résultats obtenus par ce test sont illustrés dans les (fig 56) suivantes

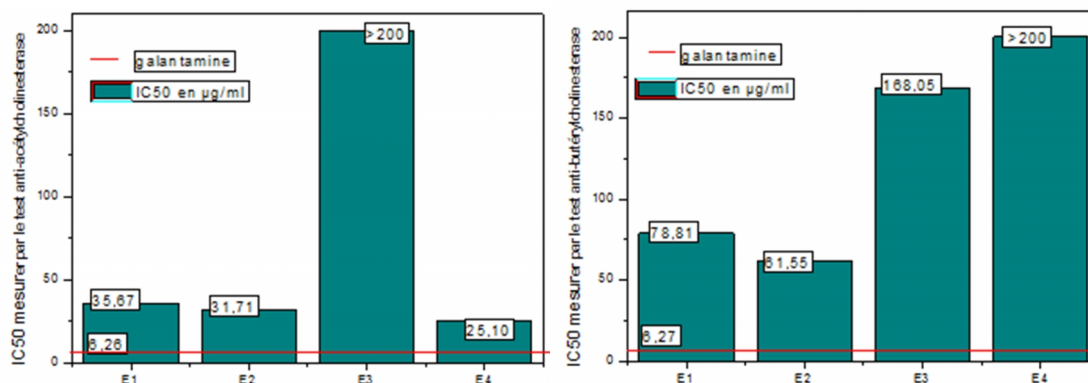


Figure 56 : IC50 pour l'activité anti- acétylcholinestérase et anti-butylcholinestérase des extraits E1-E5 de la plante du genre *Cistus*

Il ressort de cette (fig 56) les extraits E1-E5 présentent une activité anti-cholinestérase et anti-butylcholinestérase faible à modérée, et on constate que les pourcentages d'inhibition des deux enzymes sont proches. Les résultats présentés dans cette étude sont les premières informations sur cette activité. Cependant des études plus profondes devraient être faites

L'extrait 4 qui est le composé **Cs1** a présenté une activité antioxydant très puissante vis-à-vis les sept méthodes utilisées (DPPH, ABTS, GOR, CUPRAC, pouvoir réducteur, phénanthroline et blanchiment du β -carotène) en raison de leur structure, se rapportant en particulier à sa richesse en groupements hydroxyles et la capacité des noyaux aromatiques à supporter une délocalisation électronique.

CONCLUSION GENERALE

Les radicaux libres sont à l'origine de réels problèmes de santé publique à cause de leur implication dans de nombreuses maladies. Beaucoup de travaux de recherches ont été réalisés pour la découverte d'antioxydants à partir de plantes médicinales qui représentent un réservoir de molécules bioactives encore peu exploré. C'est dans ce contexte que le travail que nous avons entrepris a été consacré à l'étude phytochimique et biologique de la plante du genre *Cistus* appartenant à la famille des Cistaceae

L'investigation phytochimique de l'extrait acétate d'éthyle des parties aériennes de cette plante conduit à l'isolement et l'identification de trois composés:

- ❖ **Kaempférol-3-O-[6''-O-(E)-p-coumaroyl]-β-D-glucopyranoside (A Tiliroside) (Cs1)**
- ❖ **Gallocatéchine (Cs 2)**
- ❖ **Catéchine (Cs3)**

La détermination de structure de ces composés a été réalisée à l'aide des techniques spectroscopiques RMN 1D ¹H et ¹³C, RMN 2D (COSY H-H, HSQC et HMBC), UV et par la comparaison avec les données de la littérature.

L'activité antioxydante des différents extraits brute, butanolique et chloroformique et des deux fractions A et B a été évaluée par sept méthodes complémentaires : la méthode de réduction du DPPH, ABTS, GOR, le test phénanthroline, le test CUPRAC, la méthode de pouvoir réducteur et le test blanchissement de β-carotène. Cette évaluation a montré que cette espèce avait un très fort effet scavenging vis-à-vis des radicaux DPPH, ABTS et GOR ainsi qu'un très bon pouvoir réducteur face aux ions cuprique et ferrique, ces effets se sont avérés meilleurs que celui des standards utilisés. Cette activité est liée en grande partie à la composition des extraits et leur richesse en composés phénoliques et flavonoïdes.

En outre, l'activité inhibitrice des enzymes a été déterminée par deux tests basé sur l'inhibition des enzymes (acétylcholine estérase et butyrylcholine estérase). Les échantillons testés ont montré une capacité inhibitrice des enzymes précédemment cités modérée.

Les résultats phytochimiques et biologiques obtenus tout au long de ce travail, ne peuvent qu'encourager l'investigation phytochimique de l'extrait chloroformique et butanolique de cette espèce afin de rechercher de nouvelles molécules à intérêts thérapeutiques.

Enfin l'ensemble de ces résultats obtenus ouvre des perspectives d'utilisation de cette plante pour différents usage et ne constitue qu'un début dans le domaine de la recherche des substances naturelles biologiquement actives. Des essais complémentaires seront nécessaires afin de pouvoir confirmer les activités mises en évidence.

Références Bibliographique

A

- Aganga , A. A., Mosase, K.W. (2001) Tannins content, nutritive value and dry matter digestibility of *Lonchocarpus capussa*, *Ziziphus mucropata*, *Sclerocarya birrea*, *Kirkia acuminata* and *Rhus lancea* seeds. *Anim Feed Sci Technol* 91:107–13.
- Aziz,M ,. Tab,N ,. Karim,A., Mekhfi, H., Bnouham,M., Ziyat,A., A. Melhaoui,A., Legssyer (2006). Relaxant effect pf aqueous extract of *Cistus ladaniferus* on rodent intestinal contractions. *Fitoterapia*, 77: 425-428.
 - Abad, M.J., Bermejo, P., Villar, A., Sanchez Palomino, S., Carrasco, L ,. 1997. Antiviral activity of medicinal plant extracts. *Phytother. Res.* 11, 198–202.
 - Angelopoulou, D., Demetzos, C., Perdetzoglou, D., 2002. Diurnal and seasonal variation of the essential oil labdanes and clerodanes from *Cistus monspeliensis* Leaves. *Biochemical Systematic and Ecology.*, 30, pp 189-203
 - Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E., 2004. *Journal of Agricultur and Food Chemistry.*, 52, pp 70-79.
 - Arrington, JM., Kubitzki, K., 2003. Cistaceae. In : Kubitzki K, Bayer C (eds) The families and genera of vascular plants. Malvales, Capparales and non-betalain Caryophyllales, *Springer Berlin.*, 5, p 68. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-07255-4>
 - Abe, E., Delyle, S.G., Alvarez, J.C., 2010. Liquid-liquid extraction : theory, applications and difficulties. *Annales de Toxicologie Analytique.*, 22 (2), pp 51-59.
 - **Anglais ,Brett .A ,. Webster, Andrew A ,.(2011).** Chapter 132 – Acetylcholinesterase and its Inhibitors.Primer on the Autonomic Nervous System (Third Edition). 631-633
 - Achille, R., 1876. Nouveaux éléments de botanique. Onzième Ed., Librairie F. Savy, Paris. p 712.
 - Ansari ,K, N,. (1997). The free radicals-the hidden culprits-an update. *Indian Journal of Medical Sciences*, 51, 319-336
 - Agrawal, P.K., et Markham, K.R., (1989). Introduction. In *Carbon-13 NMR of flavonoids*. Agrawal, P,K., Ed. Elsevier. Amsterdam. 1-31.
 - Aldridge W.N., et Reine ,E., 1997. Enzyme inhibitors as substrate. North-Holland, ed., Amsterdam. In Al-Rehiayani S.M., 2008. Acetylcholinesterase in selected plant –parasitic nematode: inhibition kinetic and comparative studies. *Pesticide biochemistry and physiology*, 90, 19-25.

B

- Bruneton, J.** (1999). Pharmacognosie-Phytochimie, Plantes médicinales. Techniques et documentation. Lavoisier 3^{ème} édition, Paris
- **Benabdelaziz, I., Haba, H., Lavaud, C., Harakat, D., Benkhaled, M.** (2015). Lignans and Other Constituents from *Helianthemum sessiliflorum* Pers. *Records of Natural Products*, 9 (3): 342-348
 - **Barros, L., Duenas, M., Alves, C., Silva, T. S., Henriques, M. C., Buelga, S., Ferreira I. C. F. R.** (2013). Antifungal activity and detailed chemical characterization of *Cistus ladanifer* phenolic extracts. *Industrial Crops and Products*, 41: 41-45.
 - **Bouزيد, W., Yahia, M., Abdeddaim, M., et al** (2011) Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de l'aubépine monogyne. *Leban Sci J* 12:1
 - **Bayoub, K., Baibai, T., Mountassif, D., et al.** (2010) Antibacterial activities of the crude ethanol extracts of medicinal plants against *Listeria monocytogenes* and some other pathogenic strains. *Afr J Biotechnol* 9(27): 4251-8
 - **Baillon, H.** (1872). Histoire des plantes, Monographie des Bixacées : Cistacées et Violacées. Librairie Hachette, Paris, 356 p.
 - **Bellakhdar, J.** (1998). Pharmacopée traditionnelle marocaine, Médecine arabe ancienne et savoirs populaires. Ibis Press, Paris, 770.
 - **Benkhighe, O., Ben Akka, F., Salhi, S., Fadli, M., Douira, A., Zidane, L.** (2014). Catalogue des plantes médicinales utilisées dans le traitement du diabète dans la région d'Al Haouz-Rhamna (Maroc). *Journal of Animal & Plant Sciences*, 23: 3539-3568.
 - **Beniston, Nt., et Beniston, Ws.** (1984) – Fleurs d'Algérie. *Entreprise Nationale du Livre. Alger*. pp : 97-99.
 - **Bouamama, H., et al.,** (2006). Antimicrobial activity of the leaf extracts of two Moroccan *Cistus* L. species, *Journal of Ethnopharmacology*, Vol 104: 104-107.
 - **Barros, L., Duenas, M., Alves, C. T., Silva, S., Henriques, M., Buelga, C. S., Ferreira, I. C. F. R.** (2013). Antifungal activity and detailed chemical characterization of *Cistus ladanifer* phenolic extracts. *Industrial Crops and Products*, 41: 41-45.
 - **Benjemia, M., M., Kchouk, E., Senator, F., Autore, G., Marzocco, S., Defeo, V., Bruno, M.** (2013). Antiproliferative activity of hexane extract from Tunisian *Cistus libanotis*, *Cistus monspeliensis* and *Cistus villosus*. *Chemistry Central Journal*, 7: 47-53.
 - **Bedoya, L. M., Bermejo, P., Abad, M. J.** (2009). Anti-infectious activity in the Cistaceae family in the Iberian Peninsula. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 9: 519-525.

- **Bellakhder, J.**, (1997). La pharmacopée Marocaine traditionnelle. *Press IBIS, France*.
- **Bellido, T. J. I. S., Marcos, P. I. S., Ruano, L. F., Urones, J. G.** (1982). Labdane diterpenoide from *Cistus ladaniferus*. *Phytochemistry*, 21: 899-901.
- **Barros, L., Duenas, M., Alves, C.T., Silva, S., Henriques, M., Buelga, C.S., Ferreira, I. C. F. R.**, 2013. Antifungal activity and detailed chemical characterization of *Cistus ladanifer* phenolic extracts. *Industrial Crops and Products*, 41, pp 41-45.
- **Blois M.S.**, 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable Free Radical. *Nature*, 4617 (181), pp 1119-1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>.
- **Bliss, TVP., Collingridge, GL.**, (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. 361, (6407). 31-39
- **Berker, K.I., Guçlu, I.K., Tor, R., Apak, Talanta** 72 (2007) 1157.
- **Blokhina, O., Virolainen E and Fagerstedt, K, V.**, (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a Review. *Annals of Botany*, 91, 179-194
- **Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., and Nasri, M.**, (2009). Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*, 114, 1198-1205
- **Brown, J. E., Khodr H., Hider, R. C., et Rice-Evans, C.** (1998). Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions. *Biochem. J.* 330: 1173-1178
- **Bellakhder, J.**, (1997). La pharmacopée marocaine traditionnelle. Ed: Ibis press Paris,
- P 272
- **Baudin, B.**, (2006) Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *Mt Cardio*, 2 (1), 43-52

C

- **Chinou, I., Demetzos, C., Harvala, C., et al.** (1994) Cytotoxic and antibacterial labdane-type diterpenes from the aerial parts of *Cistus incanus* subsp. *creticus*. *Planta Med* 60: 34–6
- **Crespo Martín, J. M., Cardenal Galván, J. A., Peral Pacheco, D. J., Vallejo Villalobos, R.** (2009). Jara pringosa (*Cistus ladanifer*), usos, utilidades y curiosidades en Extremadura. *Revista de Estudios Extremeños*, Tomo LXV; número III, 1637-1650
- **Catalan, E. B., Arroyo, S. F., Saura, D., Guillén, E., Fernandez, A., Carretero, A. S., Micol, V.** (2010). Cistaceae aqueous extracts containing ellagitannins show antioxidant and antimicrobial capacity and cytotoxic activity against human cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 2273-2282.
- **Choe, E., et Min, D. B.** (2005). Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods. *Journal of Food Science* 70(9): R142-R159
- **Civeyrel, L., Leclercq, J., Demoly, J.P., Agnan, Y., Quèbre, N., Pélissier, C., Otto, T.**, 2011. Molecular systematics, character evolution, and pollen morphology of *Cistus* and *Halimium* (Cistaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 295, pp 23-54

D

- **Dacosta, Y.** (2003). Les phytonutriments bioactifs. Ed Yves Dacosta. Paris.
- **Danne, A., Petereit, F., Nahrstedt, A.** (1994). Flavan-3-ols, prodelphinidins and further polyphenols from *Cistus salvifolius*. *Phytochemistry*, 37 (2): 533-538.
- **Donovan, J. L., Luthria, D. L., Stremple, P., Waterhouse A. L.,** (1999). Analysis of (+)-catechin, (-)-epicatechin and their 3'- and 4'-O-methylated analogs a comparison of sensitive methods. *Journal of Chromatography B*, 726: 277-283.
- **Demetzos, C., Stahl, B., Anastasaki, T., et al.** (1999) Chemical analysis and antimicrobial activity of the resins of *Labdanum*, of its essential oil and of the isolated compounds. *Planta Med* 65: 76–8
- **Demetzos, C., Dimas, C., Hatziantoniou, S., et al.** (2001) Cytotoxic and anti-inflammatory activity of labdane and cisclerodane type diterpenes. *Planta Med* 67: 614–8
- **Derouesné, Christian., Selmès, Jacques.,** (2005). La maladie d'Alzheimer: Comportement et humeur. John Libbey Eurotext. Paris. 283p.
- **Dimas, K., Demetzos, C., Angelopoulou, D., et al.** (2000) Biological activity of myricetin and its derivatives against human leukemic cell lines in vitro. *Pharmacol Res* 42: 475–8
- **Droebner, K., Ehrhardt, C., Poetter, A., Ludwig, S., Planz, O.,** 2007. CYSTUS052, a polyphenol-rich plant extract, exerts anti-influenza virus activity in mice. *Antiviral Res.* 76, 1–10.
- **Domingues, F., Duarte, A.P.,** 2009. Bioactive extracts from *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* L. *Ind. Crops Prod.*, doi:10.1016/j.indcrop.2009.1001.1009.
- **Dansereau, P.,** 1939. Monographie du genre *Cistus*. *Boissiera.*, 4, pp 1-90.
- **Delattre, J., Beaudoux, J.L., Bonnefont- Rousselot, D.,** 2005. Radicaux libres et stress oxydant, Aspects biologiques et pathologiques. pp 87-108.
- **Derouesné, Christian., Selmès, Jacques.,** (2005). La maladie d'Alzheimer: Comportement et humeur. John Libbey Eurotext. Paris. 283p.
- **Delattre, J., Beaudoux, J., L., and Bonnefont-Rousselot.** 2005. Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques. Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales, Paris, 1–405
- **Dacosta, Y.** (2003). Les phytonutriments bioactifs. Ed Yves Dacosta. Paris
- **Delgado, J.A., Serrano, J.M., Lopez, F., Acosta, F.J.,** 2008. Seed size and seed germination in the Mediterranean fire-prone shrub *Cistus ladanifer*. *Plant Ecology.*, 197, pp 269-276.

E

- **E**hrhardt, C., Hrinčius, E.R., Korte, V., Mazur, I., Droebner, K., Poetter, A., Dreschers, S., Schmolke, M., Planz, O., Ludwig, S., 2007. A polyphenol rich plant extract, CYSTUS052, exerts anti influenza virus activity in cell culture without toxic side effects or the tendency to induce viral resistance. *Antiviral Res.* 76, 38–47. Andrade, D., Gil, C., Breitenfeld, L., Domingues, F., Duarte, A.P., 2009. Bioactive extracts from *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* L. *Ind. Crops Prod.*, doi:10.1016/j.indcrop.2009.1001.1009.
- **E**llul, P., Boscaiu, M., Vicente, O., Moreno, V., Rosselló, J.A., 2002. Intra- and interspeciWc variation in DNA content in *Cistus* (Cistaceae). *Annals of Botany.*, 90, pp 345–351.
- **E**llman, G.L., Courtney. K.D., Andres. V., Featherstone. R.M., (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*7. 88-**95**

F

- **F**errandis, P., Herrantz, J.M., Martínez-Sánchez, J.J., 1999. Effect of fire on hard-coated Cistaceae seed banks and its influence on techniques for quantifying seed banks. *Plant Ecology.*, 144, pp 103-114.
- **F**avier, A., (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique.* 270, 108-115.

G

- **G**uzmán, B., Vargas, P., 2009 a. Long-distance colonization of the Western Mediterranean by *Cistus ladanifer* (Cistaceae) despite the absence of special dispersal mechanisms. *Journal of Biogeography.*, 36, pp 954-968.
- **G**uzmán, B., Vargas., P., 2005. Systematics, character evolution, and biogeography of *Cistus* L. (Cistaceae) based on ITS, trnL-trnF, and matK sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution.*, 37, pp 644–660.
- **G**allego, M.J., Aparicio, A., 1993. Karyological study in the genus *Tuberaria* sect. *Scorpioides* (Cistaceae) : taxonomic and evolutionary inferences. *Plants Systematics and Evolution.*, 184, pp11-25
- **G**üemes, J., 1999. A new species of *Fumana* (Cistaceae) from Rif Morocco. *Folia Geobotanica.*, 34, pp 363-372.

- **Greenamyre, JT., Porter, RH., (1994)** . Anatomy and physiology of glutamate in the CNS . *Neurology*. 44 . 7-13
- **Greenamyre, JT., Young, AB,(1989)**. Axcitatory amino acids and Alzheimer's disease . *Neurobiology of Aging*. 10 ,(5).593-602
- **Grossberg ,T George., (2003)**. Cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: getting on and staying on. *Curr. Ther. Res.* 64,(4). 216-235.
- **Güvenc ,A., et al., (2005)**. Antimicrobial studies on turkish *cistus* species, *Pharmaceutical biology*. Vol. 43, n°2 : 178-183.
- **Gee, J.M., et Johnson, I.T. (2001)**. Polyphenolic compounds: interactions with the gut and implications for human health. *Current Medicinal Chemistry*. 8: 1-182
- **Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z. et Jore, D., (2003)**. Espèces réactives de l'oxygène, Comment l'oxygène peut-il devenir toxique?. *L'actualité chimique*. 270, 91-96.
- **Gulcin ,I, Huyut ,Z., Elmastas ,M., and Aboul,Enein., H ,Y., (2010)**. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*, 3, 43-53
- **GULCIN ,I., 2012**. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 86(3) : 345-391.

H

- **Herrera, J., 1992**. Flower variation and breeding systems in the Cistaceae. *P1. Syst. Evol.*, 179 : 245-255. **Herrera J., 2004**. Lifetime fecundity and floral variation in *Tuberaria guttata* (Cistaceae), a Mediterranean annual. *Plant Ecology.*, 172, pp 219–225.
- **Hennebelle ,T., Sahpaz ,S., Bailleul ,F (2004)** Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie* 1:3–6
- **Hua,L., Xiaoyu,W., Peihong,L., Yong,L., Hua,W., 2008**. Comparative Study of Antioxidant Activity of Grape (*Vitis vinifera*) Seed Powder Assessed by Different Methods. *J. Food & Drug Anal.*, 16 (6), 67-73.
- **Harborne ,J.B., and Smith D.M. 1978**. Correlation between anthocyanins chemistry and pollinisation ecology in the Polemoniaceae. *Biochemistry Systematic and Ecology*, 6: 127–130.
- **Hennebelle, T., (2006)**. Invest igation chimique, chimiotaxonomique et pharmacologique de Lamiales productrices d'ant ioxydants. *Chimie Organique et Macromoléculaire*. Thèse de Docotrat.
- **Harborne, J.B., (1988)**. The flavonoids, *Advances in research since 1980*. Chapman & Hall. London

- **Hollman**, P.C.H., Arts I.C.W. (2000). Flavonols, flavones and flavanols - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1081-1093.



- **Iqbal** ,Khalid., Grundke-Iqbal ,Inge ,(2010). Alzheimer Disease, a Multifactorial Disorder Seeking Multi-therapies. *Alzheimer's & Dementia* .6 . 420-424



- **James**, W. Byng., et son groupe de chercheurs., 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society.*, 181, pp 1-20. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2009.00996.x>
- **James**, W. Byng., et son groupe de chercheurs., 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society.*, 181, pp 1-20



- **Kamari**, G., Blanché, C., Siljak-Yakovlev, S., 2009. Mediterranean chromosome number reports 19. *Flora Mediterranea.*, 19, pp 313-336.
- **Kalpoutzakis**, E., Aligiannis, N., Skaltsounis, A. L., Mitakou, S., 2003. Cis-clerodane type diterpenes from *Cistus monspeliensis*. *Journal of Natural Products.*, 66, pp 316-319.
- **Kaiser**, S., Di Mascio, P., Murphy, M.E., Sies, H., 1990. Physical and chemical scavenging of singlet molecular oxygen by tocopherols. *Archives of Biochemistry and Biophysics.*, 277(1), pp 101-108
- **Kahouadji** ,MS (1995) Contribution à une étude ethnobotanique des plantes médicinales dans le Maroc oriental : faculté des sciences Oujda, université Mohamed 1er, Thèse, 207 p
- **Kupeli**,E., Yesilada,E. (2007). Flavonoids with anti-inflammatory and antinociceptive activity from *Cistus laurifolius* L. leaves through bioassay-guided procedures. *Journal of Ethnopharmacology*, 112: 524-530.
- **Ketsawatsakul**, U., Whiteman, M., et Halliwell, B., (2000). A reevaluation of the peroxynitrite scavenging activity of some dietary phenolics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 279, 692-699.
- **Kaur** ,C., et Kapoor, H.C., (2002). Antioxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *Food. Sci. Technol.* 37: 153-161

- **Kouame J.A.**,(2009). Etudes des propriétés cytotoxiques et antiradicalaires d'extraits de feuilles et de galles de GUIERA SENEGALENSIS J. F. Gmel (Combretaceae).Thèse (docteur en pharmacie au Burkina Faso).Chapitre 4(p100).
- **Kumari ,A and Kakkar, P.**, (2008). Screening of antioxidant potential of selected barks of Indian medicinal plants by multiple in vitro assays. Biomedical and environmental sciences, 21, 24-29.

L

- **Letrilliart ,Laurent,** Pouchain ,Denis ,(2011).La prise en charge thérapeutique de la maladie d'Alzheimer et des démences apparentées. la revue française de médecine générale.22, (97). 100-108
- **Lehucher,Michel M .P.**, Lesgards J,F., Delubac ,O., Stocker P., Durand ,P., Prost M. (2001). Stress oxydant ET pathologies humaines. Press Med. 30: 1076-1081
- **Lorente, F,T.**, Garcia-Grau, M.M., Nieto, J.L., Barberan, F.A.T., 1992. Flavonoids from Cistus ladanifer bee pollen. Phytochemistry., 31, pp 2027-2029.

M

- **Maarten, J.M.**, Christenhusz., James., W.B., 2016.The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa.*, 261(3), pp 201–217. <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.261.3.1>.
- **Massicotte, H.B.**, Peterson, R.L., Melville, L.H., Tackaberry, L.E., 2010. *Hudsonia ericoides and Hudsonia tomentosa* : Anatomy of mycorrhizas of two members in the Cistaceae from Eastern Canada. *Botany.*, 88, pp 607- 616. <https://doi.org/10.1139/B10-035>.
- **Markova, M.S.**, 1975. Haryosystematische Untersuchungen an den Cistaceae Bulgariens. *Plant Systematics Evolution.*, 123, pp 283-315.
- **Marco,J, G.**, 1968. A rapid method for evaluation of antioxidants. *Amer,J. Oil's. Chem.*, 45, 594-598.
- **Mabry, T.J.**, Markham, K.R., Thomas, M.B. (1970). The systematic identification of flavonoids. Springer- Verlag. Berlin
- **Morel ,S.**, 2011. Etude phytochimique et évaluation biologique de Derris ferruginea Benth. (Fabaceae). Thèse de doctorat, Université d'Angers, France.
- **Müller L.**, Gnoyke S., Popken A.M., V. Böhm ,V., (2010). Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT - Food Science and Technology*, 43:992–999.
- **Montagnier ,L.**, (2009). Oxidative stress in preventive medicine. *Free Radical Research*, 43, 2797.
- **Mates, J. M.**, Pérez-Gomez, C., et De Castro, I. N., (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry* 32(8): 595-603
- **McCall, M. R.** et Frei, B. (1999). Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radical Biology and Medicine* 26(7-8): 1034-1053.

- **Merken**, H.M., Beecher, G.R. (2000). Measurement of food flavonoids by highperformance liquid chromatography: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 577-599.
- **Magnania**, L., Gaydoua, E.M., Hubaudb, J.C., (2000). Spectrophotometric measurement of antioxidant properties of flavones and flavonols against superoxide anion. *Analytica Chimica Acta*, 411, 209-216
- **Middelton,Jr.E.**, ET Kardasnam,C,. The flavonoides, advences in research since 86.ed.J.B.Harborn, Chapman and Hall, London, 617-652, 1993.

N

- **Nourhashémi,F.,(2006).**Actualités et perspectives thérapeutiques de la maladie d'Alzheimer. *La Revue de Médecine Interne*. 27,(8). 585-587

O

- **Öztürk**, M., et KOLAK, U., (2011). Antioxitant and anticholinesterase active constituents from *Micromeria cilicica* by radical-scavenging. *Food Chemistry*. 126, 31-38.
- **Oyaizu** ,M., (1986). Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44 :307–315.

P

- **Pincemail**, J., Meurisse, M., Limet, R., Defraigne, J.O., 1999. L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Cœur, Poumons*, 4(5), pp 45-48
- **Papaefthimiou,D.**, Papanikolaou,A., Falara,V., Givanoudi,S., Kostas,S., Kanellis, A. K. (2014). Genus *Cistus*: a model for exploring labdane-type diterpenes' biosynthesis and a natural source of high value products with biological, aromatic, and pharmacological properties. *Frontiers in Chemistry*, 2: 1-19.
- **Petereit**, F., Kolodziej, H., Nahrstedt, A. (1991). Flavan-3-ols and proanthocyanidins from *Cistus incanus*. *Phytochemistry*, Vol. 30, No. 3, 981-985.
- **Packer**, L., et Weber, S.U., (2001). The role of vitamin E in the emerging field of nutraceuticals. In: Kramer, K., Hoppe, P.P. and Packer, L., *Nutraceuticals in health and disease prevention*. New York (Marcel Dekker). 27-43.
- **Panfili**, G., Frat ianni, A ,. et Irano, M., (2003). Normal phase high-performance liquid chromatography method for the determinat ion of tocopherols and tocotrienols in cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(14): 3940-3944

- **Proksch, P., Gulz, P.G.**, 1984. Methylated flavonoids from *Cistus ladanifer* and *Cistus palhinhae* and their taxonomic implications. *Phytochemistry.*, 23, pp 470-471. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)80359-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)80359-3)
- **Pietta, P., G.**, 2000. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.*, 63, 1035-1042.
- **Peggy E, Pollak, Thomas, V., Yinyuan, M., and Loveline P, T.**, 1993. Chalcone synthase and flavonol accumulation in stigmas and anthers of *Petunia hybrida*. *Plant Physiology*, 102: 925–932

Q

- **Quezel, P., Santa, S.**, 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed. C.N.R.S. Paris. Tome II, pp 700-702.
- **Quezel, P., Santa, S.**, 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. In : CNRS (Ed.), Vol. 1-2. Paris.
- **Quezel, P., Santa, S.**, (1962). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Editions du centre national de la recherche scientifiques, Paris. Tome IS.
- **Quezel, P., Santa, S.**, (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I, C.N.R.S. Paris.

R

- **Robles, C., Garzino, S.**, 2000. Intraspecific variability in the essential oil composition of *Cistus monspeliensis* leaves. *Phytochemistry.*, 53, pp 71-75. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(99\)00460-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00460-4).
- **Rubio-Moraga, A., Argandoña, J., Mota, B., Pérez, J., Verdea, A., Fajardo, J., Gómez-Navarro, J., Castillo-López, R., Ahrazem, O., Gómez-Gómez, L.**, 2013. Screening for polyphenols, antioxidant and antimicrobial activities of extracts from eleven *Helianthemum taxa* (Cistaceae) used in folk medicine in south-eastern Spain., *Journal of Ethnopharmacology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.04.028>.
- **Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., C. Rice- Evans,** 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol & Med.*, 26, 1231-1237.
- **Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M., et Pridham, J. B.** (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*. 22, 375-383

S

- **Stevanović, V., Matevski, V., Tan, K., 2009.** *Helianthemum marmoreum* (Cistaceae), a new species from the Central Balkans. *Botanica Serbica.*, 33, pp 13-19.
- **Sánchez-Gómez, P., Jiménez, J.F., Vera., J.B., 2011.** *Helianthemum motae* (Cistaceae), a new species from southeastern Spain. *Annals of Botany Fennici.*, 48, pp 49-56. <https://doi.org/10.5735/085.048.0107>.
- **Singh, M., Pal, M., Sharma, R.P. (1998)** Biological activity of labdane diterpenes. *Planta Med* 65: 2–8
- **Stobiecki, M., Popena, M. (1994).** Flavan-3-ols from seeds of *Lupinus angustifolius*. *Phytochemistry*, vol 37, No. 6, pp. 1707-1711.
- **Stapleton, A.E., 1992.** Ultraviolet radiation and plants: Burning questions. *The Plant Cell*, 105: 881–889.
- **Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., et Pessarakli, M., (2012).** Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidant defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany* 2012: 1-26.
- **Smith, A. R., Shenvi, S. V., Widlansky, M.J., Suh, H., et Hagen, T. M., (2004).** Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry* 11(9): 1135-1146
- **Sumaya Martinez, M, T., (2004).** Valorisation d'hydrolysats de co-produits de crevettes: étude de l'activité antiradicalaire et antioxydante, fractionnement des substances actives et effet de la glycation. *Microbiologie*. Thèse de Doctorat
- **Shi, H., Noguchi, N., Niki, E., Galvinoxyl method for standardizing electron and proton donation activity. *Methods Enzymol* 2001;335:157-66.**
- **Szydłowska, Czerniaka, A., Dianoczki, C., Recseg, K., Karlovits, G., Szlyk, E., Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta* 2008;76:899-905.**

T

- **Toth, S., Révay, A., 2011.** *Oncopodium lidiae* sp. nov. (Hyphomycetes) on *Fumana procumbens* from Hungary. *Mycologia Balcanica.*, 8, pp 89-91.
- **Turkmen, N., Velioglu, Y.S., Sari, F., Polat, G., 2007.** Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules.*, 12, pp 484-496.
- **Tabart,J., Kevers,C., Pincemail,J., J. Defraigne,J., Dommes, 2009.** Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chem.*, 113, 1226-1233
- **Topçu ,G., Ay ,A., Bilici ,A., Sarikürkcü ,C., Öztürk ,M., and Ulubelen ,A., (2007).** A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry* 103:816–822.
- **Tepe ,B., Sokmen ,M., Akpulat ,HA., Sokmen ,A., (2006)** Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey. *Food Chemistry*, **95**, 200-204

V

- **Vogt,T., Proksch,P., Gulz,P. G., Wollenweber,E., (1987).** Rare 6- and 8-*O*-methylatedepicuticular flavonols from two *Cistus* species. *Phytochemistry*, 26: 1027-1030.

W

- **Waridel ,P (2003).** Investigation phytochimique des plantes aquatiques *Potamogeton pectinatus* ,L, P., *lucens* ,L, P., *perfoliatus* ,L., et *crispus*,P, L., (*Potamogetonaceae*). Thèse de doctorat, Lausanne.

Y

- **Yang ,C.S., Chung ,J.Y., Yang, G.Y., Chhabra, S.K., Lee, M.J.** *Tea and Tea Polyphenols in Cancer Prevention*, Symposium: Diet, Natural Products and Cancer Prevention: Progress and Promise. American Society for Nutritional Sciences, 2000.
- **Yesilada ,E., Ustun ,O., Sezik ,E., et al. (1997)** Inhibitory effects of Turkish folk remedies on inflammatory cytokines: interleukin-1alpha, interleukin-1beta and tumour necrosis factor alpha. *J Ethnopharmacol* 58: 59–73

- Yoshida, H., Kajimoto, G., Emura, S., 1993. Antioxidant effects of d-tocopherols at different concentrations in oils during microwave heating. *Journal of the American Oil Chemists' Society.*, 70(10), pp 989-995.

Z

- Zunzunegui, M., Baco, F.L., Diaz Barradas, M.C., Novo, F.G., 1999. Seasonal changes in phytochemical efficiency in leaves of *Halimium halimifolium*, a mediterranean semideciduous shrub. *Photosynthetica.*, 37 (1), pp 17-31.
- Zaiter, L., Bouheroum, M., Hammoud, L., Sarri, D., Benayache, S., Leon, F., Brouard, I., Bermejo, J., Benayache., 2010. Phytochemical study of *Halimium halimifolium*. *Chemistry of Natural Compounds.*, 47, pp 1023-1024.
- World Health Organisation. 2000. A report of the consultation meeting on traditional and modern medicine: Harmonizing two approaches, Beijing, China: 22-26
- Szydłowska-Czerniaka, A., Dianoczki, C., Recseg, K., Karlovits, G., Szlyk, E., Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta* 2008;76:899-905.

Résumé :

Ce travail est consacré à l'étude phytochimique d'une plante appartenant à la famille Cistaceae. Cette étude a permis l'isolement par les méthodes chromatographiques (VLC, CCM et CLHP) et la caractérisation par les méthodes spectroscopiques [RMN 1D ^1H et ^{13}C , RMN 2D (COSY H-H, HSQC et HMBC), UV] de 3 métabolites secondaires de nature flavonoïdiques.

Les différents extraits (brute, butanolique et chloroformique) ainsi que les fractions A et B ont montré un grand pouvoir antioxydant avec les sept méthodes DPPH, ABTS, GOR, le test phénanthroline, le test CUPRAC, pouvoir réducteur et le test blanchissement de β -carotène, ils ont présenté également une activité anti-enzymatique modérée *vis-à-vis* de deux différentes enzymes (acétylcholinestérase, butyrylcholinestérase).

La composition chimique de l'espèce étudiée est en parfait accord avec celle des plantes du genre *Cistus*. En effet, ce travail de recherche a montré encore une fois que les flavonoïdes, sont les constituants majoritaires du genre.

Mots clés : Cistaceae, *Cistus*, Chromatographie, Flavonoïdes, RMN 1D et 2D, UV-Vis, Activité antioxydante, acétylcholinestérase, butyrylcholinestérase

Abstract :

This work is concerning the phytochemical study of the plant belonging to the family Cistaceae: This study led to the isolation by chromatographic methods (VLC, TLC and HPLC.) and characterization by spectroscopic methods [RMN 1D ^1H and ^{13}C , RMN 2D (COSY H-H, HSQC et HMBC), UV] of 3 flavonoids.

The different extracts (crude, butanolic and chloroformic) as well as the fractions A and B showed a great antioxidant power with the seven methods DPPH, ABTS, GOR, the phenanthroline test. The CUPRAC test, reducing power and the β -carotene bleaching test also exhibited a moderate anti-enzymatic activity against two different enzymes (acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase).

The chemical composition of these species is in full agreement with the plants of the genus *Cistus* which particularly contain flavonoids, which are considered as typical constituents of this genus.

Key words: Cistaceae, *Cistus*, Flavonoids, Chromatography, UV-Vis, 1D and 2D NMR, Antioxidant activity, acetylcholinesterase and butyrylcholinestérase

ملخص:

هذا العمل مكرس للدراسة الكيميائية لنبته تابع للعائلة Cistaceae. سمحت هذه الدراسة بعزل 3 ستقلبات ثانوية من الطبيعة الفلافونويدية باستعمال الطرق الكروماتوغرافية (VLC ، TLC و HPLC) وتحديد بنيتها بواسطة الطرق الطيفية المختلفة الرنين المغناطيسي D1 و D2 (1H ، ^{13}C ، COZY ، HSQC و HMBC) و-UV أظهرت المستخلصات المختلفة (الخام ، البوتانوليك والكلوروفورميك) وكذلك مركبين A و B قوة كبيرة مضادة للأكسدة باستخدام الطرق السبعة DPPH و ABTS و GOR واختبار phenanthroline واختبار CUPRAC والقدرة الإرجاعية واختبار تبيض الكاروتين. كما أظهروا أيضاً نشاطاً معتدلاً مضاداً للإنزيمات ضد انزيمين مختلفين (أستيل كولينستراز ، بوتيريل كولينستريز).

التركيب الكيميائي للأنواع التي تمت دراستها متوافق تماماً مع تكوين نبات جنس Cistus. في الواقع ، لقد أظهر هذا البحث مرة أخرى أن مركبات الفلافونويد هي غالبية مكونات الجنس.

الكلمات المفتاحية: Cistaceae ، Cistus ، كروماتوجرافيا ، فلافونويدات ، الرنين المغناطيسي النووي D1 و D2 ، UV-Vis ، نشاط مضادات الأكسدة ، أستيل كولينستراز ، بوتيريل كولينستراز