



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي



MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

Université des frères Mentouri Constantine
Faculté des sciences de la nature et de la vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة

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.*

Intitulé :

Etude phytochimique et biologique d'une plante Algérienne du genre *Anagallis* (Primulaceae).

Présenté et soutenu :

Le : 15/07/2021

Par :

BAICHE Kenza

&

BOULKROUN Abdel Malek

Jury :

Dr. MOKRANI El Hassen

MCB. UFM Constantine 1

Président

Dr. BOUTAGHANE Naima

MCA. UFM Constantine 1

Rapporteur

Dr. MOSBAH Asma

MCA. UFM Constantine 1

Examineur

Année universitaire :
2020/2021

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE.....	1
-----------------------------------	----------

1^{ère} Partie : RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : ASPECT BOTANIQUE ET ETUDES CHIMIQUES ANTERIEURES

I.1. Ericales	3
I.2. Famille des Primulaceae.....	3
I.2.1. Position systématique de la famille des Primulaceae	4
I.2.1.1. Ancienne	4
I.2.1.2. Actuelle.....	4
I.2.2. Répartition géographique des Primulaceae.....	5
I.2.3. Description botanique de la famille Primulaceae.....	5
I.2.4. Utilisations traditionnelles des Primulaceae.....	7
I.2.5. Etudes chimiques antérieures.....	8
I.2.5.1. Les saponines.....	9
I.2.5.2. Les phytostérols.....	13
I.2.5.3. Les flavonoïdes.....	13
I.2.5.4. Les dérivés benzoquinoniques.....	14
I.3. Présentation du genre <i>Anagallis</i> L.....	16
I.3.1. Description botanique du genre <i>Anagallis</i>	16
I.3.2. Les espèces du genre <i>Anagallis</i> L.....	17
I.3.3. Classification systématique.....	17
I.3.4. Utilisations traditionnelles du genre <i>Anagallis</i>	18
I.3.5. Etudes chimiques antérieures sur le genre <i>Anagallis</i>	18

Chapitre II : METABOLITES SECONDAIRES

II.1. Composés phénoliques.....	20
II.1.1. Définition.....	20
II.2. Flavonoïdes	20
II.2.1. Classification des flavonoïdes	21
II.2.2. La biosynthèse des flavonoïdes	22
II.2.3. Propriétés des flavonoïdes.....	23
II.2.4. Propriétés anti-radicalaires.....	23
II.2.5. Propriétés chélatrices des ions métalliques.....	25
II.2.6. Propriétés antiinflammatoires.....	25
II.2.7. Propriétés anticancéreuses.....	26
II.3. Saponosides.....	26
II.3.1. Généralités.....	26
II.3.2. Classification structurale.....	27
II.3.2.1. Partie aglycone.....	27
II.3.2.2. Partie osidique.....	28
II.3.2.3. Les acides organiques.....	29
II.3.3. Propriétés biologiques des saponosides.....	29

Chapitre III : ACTIVITES BIOLOGIQUES

III.1. Généralités.....	34
III.2. Stress oxydant.....	34
III.3. Origine des radicaux libres.....	35
III.4. Implications pathologiques des EOR.....	36
III.5. Mécanismes de défense contre le stress oxydant.....	36
III.5.1. Systèmes antioxydants endogènes enzymatiques.....	37
III.5.2. Systèmes antioxydants endogènes non-enzymatiques.....	38
III.5.3. Systèmes antioxydants exogènes.....	39
III.6. Mécanismes d'actions des antioxydants.....	40
III.7. Quelques méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante.....	40
III.7.1. Test au DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle)	41
III.7.2. Test de l'activité anti-radicalaire pour le radical ABTS ⁺	42

III.7.3. Test de la capacité antioxydante pour la réduction de cuivre (CUPRAC).....	42
III.8. Inflammation.....	43
III.8.1. L'inflammation aiguë.....	43
III.8.2. L'inflammation chronique.....	46
III.8.3. Les anti-inflammatoires.....	47
III.8.3.1. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens.....	47
III.8.3.2. Les anti-inflammatoires stéroïdiens.....	48
III.8.3.3. Anti-inflammatoire d'origine végétale.....	49

2^{ème} Partie : PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre VI : MATERIELS ET METHODES

IV.1. Aperçu et but du travail.....	50
IV.2. Matériels et méthodes.....	50
IV.2.1. Matériel végétal.....	50
IV.2.1.1. Récolte de la plante du genre <i>Anagallis</i>	50
IV.3. Méthodes d'analyses phytochimiques.....	51
IV.3.1. Méthodes chromatographiques.....	51
IV.3.1.1. Chromatographie sur couche mince (CCM).....	51
IV.3.1.2. Chromatographie liquide sous vide (VLC).....	51
IV.3.1.3. Chromatographie sur colonne ouverte (CC).....	52
IV.3.2. Méthodes d'analyses physico-chimiques.....	52
IV.3.2.1. Spectrophotométrie UV-visible.....	52
IV.4. Etudes phytochimiques de la plante du genre <i>Anagallis</i>	53
IV.4.1. Extraction.....	53
IV.4.2. Fractionnement préliminaire de l'extrait éthanolique brut de la plante du genre <i>Anagallis</i>	53
IV.4.3. Purification.....	55
IV.5. Evaluation de l'activité antioxydante de l'espèce du genre <i>Anagallis</i>	57
IV.5.1. Test de piégeage du radical 2,2-Di-Phényl-1-Picryl-Hydrazyl (DPPH)	57

IV.5.2	Test de piégeage de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS ⁺).....	58
IV.5.3	Test de la capacité antioxydante par réduction de l'ion cuprique (CUPRAC).....	58
IV.6.	Analyse statistique.....	59
IV.7.	Evaluation de l'activité anti-inflammatoire.....	59

Chapitre V : RESULTATS ET DISCUSSION

V.1.	Rendement d'extraction	61
V.2.	Contrôle chromatographique de l'extrait	61
V.3.	Séparation et Purification	62
V.4.	Elucidation structurale des composés isolés	63
V.4.1.	Elucidation structurale du composé An1	63
V.5.	Résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante	66
V.5.1.	Activité antiradicalaire par le Test du 2,2-Di-Phényl-1-Picryl-Hydrazyl (DPPH)	66
V.5.2.	Activité antiradicalaire pour le radical ABTS ⁺ •	68
V.5.3.	Test de la capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC) ..	70
V.6.	Activité anti-inflammatoire <i>in vivo</i>	72
	Conclusion générale	75
	Résumé	
	Références bibliographiques	

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Position systématique de l'ordre Ericales selon l' <i>Angiosperm Phylogeny Group</i>	3
Figure 2	Localisation géographique des Primulaceae.....	5
Figure 3	Les différentes parties de <i>Lysimachia foemina</i> (Primulaceae).....	6
Figure 4	Les différentes parties d' <i>Anagallis arvensis</i> sp. <i>Arvensis</i> (Primulaceae).	17
Figure 5	Structures du 2-phényl chromane ou noyau flavane (à gauche) et du 2-phényl chromone (à droite)	21
Figure 6	Principaux types de flavonoïdes	21
Figure 7	Biogénèse de la chalcone.....	22
Figure 8	Schéma récapitulatif de biogénèse des différentes classes de flavonoïdes	23
Figure 9	Piégeage des espèces réactives dérivées de l'oxygène (R•) par les flavonoïdes et formation d'une structure stable.....	24
Figure 10	Critères structuraux essentiels pour une bonne activité antiradicalaire des flavonoïdes.....	24
Figure 11	Principaux sites impliqués dans la chélation des ions métalliques (Men ⁺)	25
Figure 12	Structures des squelettes stéroïdiques.....	27
Figure 13	Structures des squelettes triterpéniques.....	28
Figure 14	les différents acides organiques rencontrés dans les saponosides.....	29
Figure 15	Représentation du réarrangement supposé des constituants membranaires.	30
Figure 16	la structure d'OSW-1.....	31
Figure 17	la structure de la dioscine.....	32
Figure 18	Formation en cascade des différentes espèces oxygénées réactives à partir du radical superoxyde.....	35
Figure 19	Régulation de la production des espèces oxygénées activées (EOA) par des systèmes antioxydants de défenses primaire et secondaire.....	37
Figure 20	Mécanisme réactionnel entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant (AH).....	41
Figure 21	oxydation de l'ABTS par le persulfate de potassium et génération de ABTS ^{•+}	42

Figure 22	Réduction du complexe chromogène de Cu^{+2} -Nc.....	43
Figure 23	Formation du transsudat et d'exsudat.....	44
Figure 24	Principales étapes de l'inflammation aiguë.....	46
Figure 25	Situation géographique de la wilaya de collecte d' <i>Anagallis</i>	50
Figure 26	Les différentes étapes de macération, filtration et évaporation de l'extrait hydroalcooliques de la plante <i>Anagallis</i>	53
Figure 27	Procédé du fractionnement de l'extrait éthanolique par VLC.....	53
Figure 28	CCM récapitulatif des fractions de la VLC de l'extrait éthanolique brut....	54
Figure 29	CCM récapitulatif des fractions de la VLC de l'extrait éthanolique brut observé sous 365 nm.....	54
Figure 30	Purification de la fraction (A) sur une colonne de gel de silice.....	56
Figure 31	Purification de la fraction (B) sur une colonne de gel de silice.....	56
Figure 32	injection de formol 1% au niveau de la voûte plantaire de la patte droite du rat.....	59
Figure 33	CCM de l'extrait brut de la plante <i>Anagallis</i>	62
Figure 34	les étapes de purification à partir de l'extrait éthanolique.....	63
Figure 35	Formation des complexes avec le chlorure d'aluminium dans un milieu neutre (1) puis acidifié par l'acide HCl (2) pour le composé An1	64
Figure 36	Formation du complexe en présence de H_3BO_3 pour le composé An1	64
Figure 37	la Série spectrale UV du composé An1	65
Figure 38	Courbes des pourcentages d'inhibition du radical DPPH•.....	66
Figure 39	les CI50 des échantillons testés classés par ordre croissant (DPPH).....	67
Figure 40	Photo prises lors du dosage de l'activité antiradicalaire DPPH.....	68
Figure 41	Photo prises lors du dosage de l'activité antiradicalaire ABTS.....	69
Figure 42	Courbe de pourcentage d'inhibition de l'ABTS par différents extraits de la plante.....	69
Figure 43	les IC50 des échantillons testés classés par ordre décroissant (ABTS).	70
Figure 44	les $A_{0,5}$ des échantillons testés classés par ordre croissant (CUPRAC).....	71
Figure 45	Photo prise lors de dosage de l'activité réductrice de l'ion cuivrique (CUPRAC).....	71
Figure 46	Evolution de l'œdème en présence d'un prétraitement par voie intrapéritonéale, après l'injection de le formol.....	72

LISTE DES TABLEUX

Tableux 1	Taxonomie des Primulaceae selon Cronquist.	4
Tableux 2	Taxonomie des Primulaceae selon APG III.	4
Tableux 3	Position taxonomique du <i>Anagallis</i> selon APGIII 2009.	17
Tableau 4	structure des oses liés aux saponines.....	28
Tableau 5	Les principales affections liées à la production des EOR.....	36
Tableau 6	mécanisme d'action de quelques antioxydants.....	40
Tableau 7	VLC sur C ₁₈ de l'extrait éthanolique de l'espèce du genre <i>Anagallis</i>	55
Tableau 8	données spectrales UV du composé An1	65

LISTE DES ABREVIATIONS

µg	Microgramme
µl	Microlitre
1D	Monodimensionnelle
1O₂	Oxygène singulet
2D	Bidimensionnelle
A	Absorbance
A_{0,5}	Concentration à A=0,5
ABTS	2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)
AcOEt	Acétate d'éthyle
ADN	Acide désoxyribonucléique
AH	Antioxydant donneur d'hydrogène
AINS	anti-inflammatoires non stéroïdiens
AIS	anti-inflammatoires stéroïdiens
AlCl₃	Chlorure d'aluminium
APG	Angiosperm Phylogeny Group
BHA	Butyl-hydroxy-anisole
BHT	Butyl-hydroxy-toluène
CC	Chromatographie sur colonne ouverte
CCM	Chromatographie sur couche mince
CHCl₃	Chloroforme
CHI	chalconeisomérase
COX	cyclo-oxygénase
CUPRAC	Cupric Reducing Antioxidant Capacity
DPPH	2,2-Di-Phényl-1-Picryl-Hydrazyl
e⁻	Electron
EOA	espèces oxygénées activées
EOR	Espècesoxygénéesréactives
FAS	FattyAcidSynthase
FLO•	radical flavoxyle
g	Gramme
GPx	Glutathion peroxydase

GR	glucocorticoïdes
GSH	glutathion
H₂O	Eau
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
H₃BO₃	Acide borique
IC₅₀	Concentration d'inhibition à 50%
IL-2	Interleukine-2
LDL	low-density lipoprotein
LOST	Laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques
MeOH	Méthanol
mg	Milligramme
ml	Millilitre
NaOAc	Acétate de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
ng	nanogramme
nm	Nanomètre
NO	Monoxyde d'azote
O₂⁻	anion superoxyde
OH	Radical hydroxyle
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ONOO⁻	Ion peroxynitrite
PMNs	PolyMorphoNucléaires
R•	Piégeage des espèces réactives dérivées de l'oxygène
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RO	Radical alkoxy
RO₂	Radical peroxy
ROOH	hydroperoxydes
RP-18	Reversed phase C ₁₈
Se – GPx	glutathion-peroxydase séléno-dépendante
SOD	superoxyde-dismutase
ssp	Sous espèce
TPA	12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate
UV	Ultra-violet

v/v
VLC

Volume parVolume
Chromatographieliquide sousvide

Remerciement

*Avant toute chose, nous remercions **Allah** le tout puissant, de nous avoir guidé jusqu'à l'achèvement de ce mémoire, et de nous avoir donné la force, le courage et la patience.*

Nous tenons à remercier toutes les personnes qui ont contribué au succès de notre mémoire de fin d'études et qui nous ont aidée lors de la rédaction de ce mémoire.

*Nous souhaiterons avant tout remercier notre encadrante **Madame BOUTAGHANE Naima**, Maitre de conférence A, pour ses relectures, ses corrections et son attention bienveillante pour ce travail et surtout le temps qu'elle a consacré à nous apporter les outils méthodologiques indispensables à la conduite de cette recherche. Son exigence nous a grandement stimulé et a contribué à alimenter notre réflexion en phytochimie.*

*Nous remercions vivement les membres du jury, Monsieur **MOKRANI El Hassen** le président du jury et notre **MENTOR**, il a été une réelle source d'inspiration et un exemple à qui nous devons beaucoup, Merci à Madame **MOSBAH Asma**, Maitre de conférence A, d'avoir accepté de juger notre travail. Nous sommes très touchés à l'honneur que vous nous faites d'être l'examinatrice.*

*Nous remercions également Mademoiselle **DJEBLIA Lamia** pour sa patience, sa disponibilité, ses judicieux conseils et surtout sa bonne humeur qui fut très encourageante.*

Nous tenons à témoigner toute notre reconnaissance aux personnes suivantes, pour leur aide dans la réalisation de ce mémoire :

*Madame **KABOUCHE Zahia** pour son accueil au sein de son laboratoire, Laboratoire d'Obtention des Substances Thérapeutiques (LOST), et d'avoir mis à notre disposition tout le matériel qui s'y trouve.*

*Monsieur **BAHRI El Eid** pour son accueil au sein de l'animalerie, sa disponibilité, sa précieuse aide ainsi que ses qualités humaines qui nous ont grandement touchés.*

*Sans oublier Monsieur **MOKHTARI Mohamed Badereddine**, Monsieur **MESSAOUDI Saber** et Monsieur **DJOUDI Brahim** pour leur soutien moral et leurs encouragements tout au long de notre parcours académique.*

Dédicace



Je dédie ce modeste travail à :

*À mes chers parents **KACIMI Assia** et **BAICHE Kamel***

Ce dédicace est très peu devant votre amour, patience, encouragement et soutien tout au long de mes études, aucun mot ne peut exprimer mes sentiments à ce moment, c'est une fierté que d'être votre fille.

Papa et Mama, vous êtes la lumière de ma vie.

*À mes chers sœurs **Taouba** et **Nesrine**, et à mon petit frère **Abdelmouiz***

*À **Khali Malik**, et sa femme **Samira** la plus belle microbiologiste*

*À mes cousines **Sara**, **Rania** et **Yasmine***

*À mon cousin **Chaouki***

*À mes proches amis sans exception qui m'ont toujours soutenu et encouragé même dans les périodes les plus difficiles surtout **Abdelhak**, **Sami**, **Sidali**, **Ramzi**, **Samy**, **Khaled**, **Aymen** et **Nesrine***

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

Merci !

KENZA

Dédicace

Avec ma gratitude et tout mon amour, Je dédie ce modeste travail

À mes adorables parents « AZZEDINE ET SALIHA »

*À vous mes parents, les plus cher sur terre, à vous qui avez sacrifié
pour mon bonheur et mon bien être.*

*À vos encouragements et vos prières qui m'ont toujours soutenu et
guidé.*

En ce jour, j'espère réaliser l'un de vos rêves.

*Veillez trouver, chers parents, dans ce travail le fruit de votre
dévouement ainsi que l'expression de ma gratitude et mon profond
amour*

Que dieu vous gardes pour moi.

À ceux qui m'ont aidé et m'ont donné joie et bonheur,

Un grand merci à mes frères « Hamdi, Hazem et Hamza »

À ma chère sœur « Nedjla »

À mes belles sœurs « Maha et Fatima »

À mes petits anges « Djad, Ilyne, Sami et Rami »

Je remercie également ma belle « Ines »

*À ma famille, mes proche et à ceux qui me donnent l'amour et
de la vivacité*

*À ceux que j'ai eu la chance de connaître, dans les meilleurs et
pires moments de ma vie.*

MERCI !



ABDEL MALEK

Introduction générale

Introduction générale

Les plantes médicinales ont été, depuis la nuit des temps, l'arsenal thérapeutique de l'homme. Elles connaissent en ce moment un intérêt considérable de la part du public et des chercheurs. Les raisons sont multiples. Dans les pays sous-développés, voire en voie de développement, c'est le moyen le plus utilisé de se faire guérir. Tandis que dans les pays développés, les plantes représentent une source importante pour la recherche pharmacologique et l'élaboration des médicaments, non seulement lorsque les constituants des plantes sont utilisés directement comme agents thérapeutiques, mais aussi comme matières premières pour la synthèse de médicaments ou comme modèles pour de futurs agents thérapeutiques.

Les produits naturels constituent une source importante d'agents thérapeutiques. Actuellement, environ 75 % de médicaments disponibles pour le traitement de diverses maladies dérivent de produits naturels. Nous citerons par exemple la morphine, substance naturelle isolée du latex d'une papaveraceae appelée *Papaver somniferum* et médicament utilisé principalement contre la douleur, est prise actuellement comme référence de choix du point de vue efficacité analgésique. Le taxol isolé de *Taxus brevifolia* ou if d'Amérique, médicament reconnu mondialement pour son action anticancéreuse hautement efficace, constitue également un parfait exemple. Les produits naturels représentent une source extrêmement précieuse pour la production de nouvelles entités chimiques.

Par ailleurs, il est actuellement établi que 20.000 à 30.000 espèces végétales, sur les 500.000 répertoriées mondialement, sont utilisées dans la pharmacopée humaine et pas moins de 75 % de médicaments sont d'inspiration végétale. En dépit du fait indiscutable que les plantes constituent un réservoir de molécules bioactives, le potentiel floristique demeure encore peu exploré.

L'Algérie avec sa situation géographique, sa diversité climatique et sa richesse en flore, offre un terrain propice pour la recherche de nouvelles substances naturelles d'intérêts thérapeutiques et met un pas très important dans la recherche en phytochimie. Plusieurs espèces sont étudiées dans ce domaine, c'est le cas de ce présent travail qui porte sur une investigation phytochimique et biologique de l'espèce endémique du genre *Anagallis*. Cet intérêt s'explique par la richesse des plantes de la famille des Primulaceae en métabolites secondaires d'un grand intérêt

biologique, comme les saponosides triterpéniques (Viqar Uddin *et al.*, 1993; Lavaud *et al.*, 1994; Matsunami *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012), les flavonoïdes (Tokalov *et al.*, 2004; Abubakar *et al.*, 2012) dérivés benzoquinoïques, acides benzoïques et lignanes (Ogwenon *et al.*, 2002).

Une motivation supplémentaire quant à l'étude chimique de cette espèce endémique du genre *Anagallis* tient du fait que cette dernière n'a fait l'objet d'aucune étude phytochimique ni biologique.

Notre travail sera présenté comme suit :

- ✚ **La première partie** concerne la recherche bibliographique, réunit en trois chapitres distincts :
 - **Le 1^{er} chapitre**, consacré aux aspects botaniques inclut une présentation de la famille Primulaceae, et du genre *Anagallis*, leurs activités biologiques, différentes classes de métabolites antérieurement isolés et leur utilisation en médecine traditionnelle.
 - **Le 2^{ème} chapitre**, consacré à l'étude bibliographique des métabolites secondaires (flavonoïdes et saponosides) : leur définition, leur classification ainsi que leur intérêt thérapeutique.
 - **Le 3^{ème} chapitre**, est un aperçu sur le stress oxydant et l'activité anti-inflammatoire.
- ✚ **La deuxième partie** du manuscrit évoque nos travaux personnels menés en deux volets. D'abord : l'extraction, le fractionnement et la purification. Puis, l'évaluation du potentiel antioxydant par la mise au point de trois différents tests à savoir : DPPH, ABTS et CUPRAC et l'activité anti-inflammatoire *in vivo* par le test de l'œdème de la patte de rats.
- ✚ **La troisième partie** est consacrée à la présentation des résultats obtenus suite à cette investigation phytochimique et les tests biologiques.

1^{ère} partie :

Recherche bibliographique



Chapitre I

**Aspect Botanique et études
chimiques antérieures**

I.1. Ericales

Les Ericales constituent un ordre de plantes magnolopsides gamopétales, riche de près de 4500 espèces et d'environ 160 genres (**Bentham et Hooker, 1876; Drude, 1891; Stevens, 1971; Cronquist, 1981; Cronquist, 1988**). Nous traiterons ici la famille des Primulaceae qui renferme le genre végétale *Anagallis* que nous avons étudié.

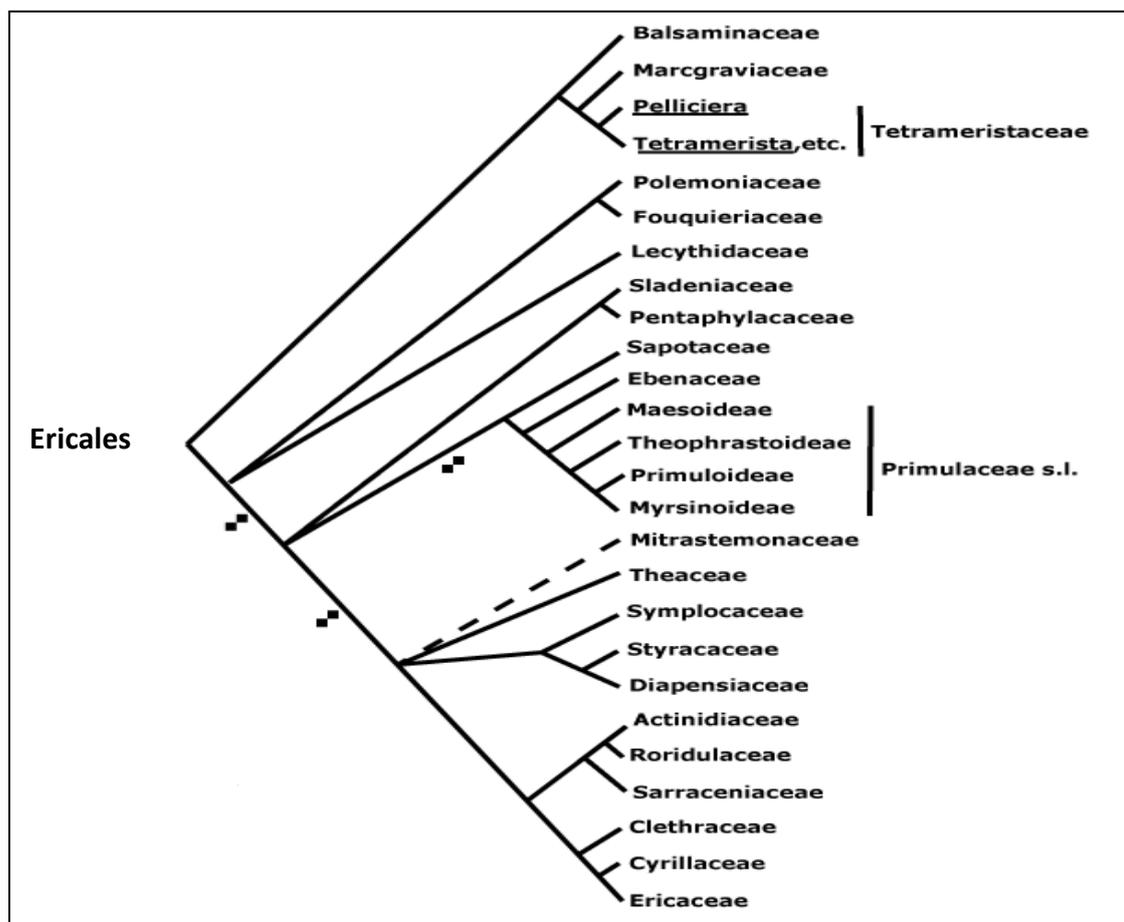


Figure 1: Position systématique de l'ordre Ericales selon l'Angiosperm Phylogeny Group (Stevens, 2012)

I.2. Famille des Primulaceae

Le nom de Primulaceae vient du genre *Primula*, du latin « *primus* », premier, en référence à la floraison très précoce dans l'année de ces plantes (**Dupont et Guignard, 2015**). On connaît des Primulaceae fossiles dès l'Eocène. C'est une famille de plantes dicotylédones appartenant à l'ordre des Ericales. Cette famille a subi des remaniements et se trouve divisée en quatre sous-familles : Maesoideae, Theophrastoideae, Primuloideae et Myrsinoideae. Elle inclue désormais d'anciennes familles comme les Primulaceae *stricto sensu*, les Myrsinaceae et les Theophrastaceae (**Corner, 1961**).

I.2.1. Position systématique de la famille des Primulaceae

I.2.1.1. Ancienne

Du point de vue des classifications systématiques anciennes, la famille des Primulaceae fait partie des dicotylédones et appartient à l'ordre des Primulales (**Tableau 1**) (**Cronquist, 1988**).

Tableau 1 : Taxonomie des Primulaceae selon Cronquist (**Cronquist, 1988**).

Plantae	Tracheobionta
Embranchement	Spermatophyta
Sous-Embranchement	Angiospermae
Classe	Magnolopsida
Sous-classe	Dilleniideae
Ordre	Primulales
Famille	Primulaceae

I.2.1.2. Actuelle

Lors de la parution d'APG II (Angiosperm Phylogeny Group 2003), la situation va évoluer et les trois familles Theophrastaceae, Primulaceae et la plus grande des trois, Myrsinaceae sont dorénavant incluses dans l'ordre des Ericales regroupant 24 familles (**Kallersjö et al., 2000**).

La situation change à nouveau en 2009, année de la parution d'APG III. Ces trois familles sont réunies en une seule, les Primulaceae. Les contours de la famille des Primulaceae sont encore discutés, cependant on peut dire que les Primulacées contiennent environ 2790 espèces réparties en 53 genres (**Xu, Zhenghao, 2017**), de nombreuses espèces sont cultivées comme plantes ornementales.

Tableau 2 : Taxonomie des Primulaceae selon APG III (**Stevens 2012**).

Clade	Angiospermae
Clade	Dicotylédones vraies
Clade	Astridées
Ordre	Ericales
Famille	Primulaceae

L'analyse comparée de séquences géniques de chloroplastes (**Kallersjö et al., 2000**) a montré que les Myrsinaceae et les Primulaceae étaient paraphylétiques. Certains genres (*Anagallis*, *Ardisiandra*, *Coris*, *Lysimachia*, *Trientalis*) appartiennent plus à la voie des Myrsinaceae qu'à

celle des Primulaceae. Dans d'autres classifications récentes, cette famille de plante se rapproche des Plumbaginaceae.

I.2.2. Répartition géographique des Primulaceae

Les Primulacées sont plutôt cosmopolites, présentes presque partout dans le monde, mais particulièrement présentes dans les régions tempérées de l'hémisphère Nord. Elles sont est présentes essentiellement dans des régions froides, tempérées, montagneuses et tropicales, elles sont dites Sub-cosmopolite, mais surtout centrées sur l'hémisphère Nord. La Chine regroupe un peu plus de la moitié des espèces de cette famille, concentrées principalement dans le Sud et l'Ouest du pays.

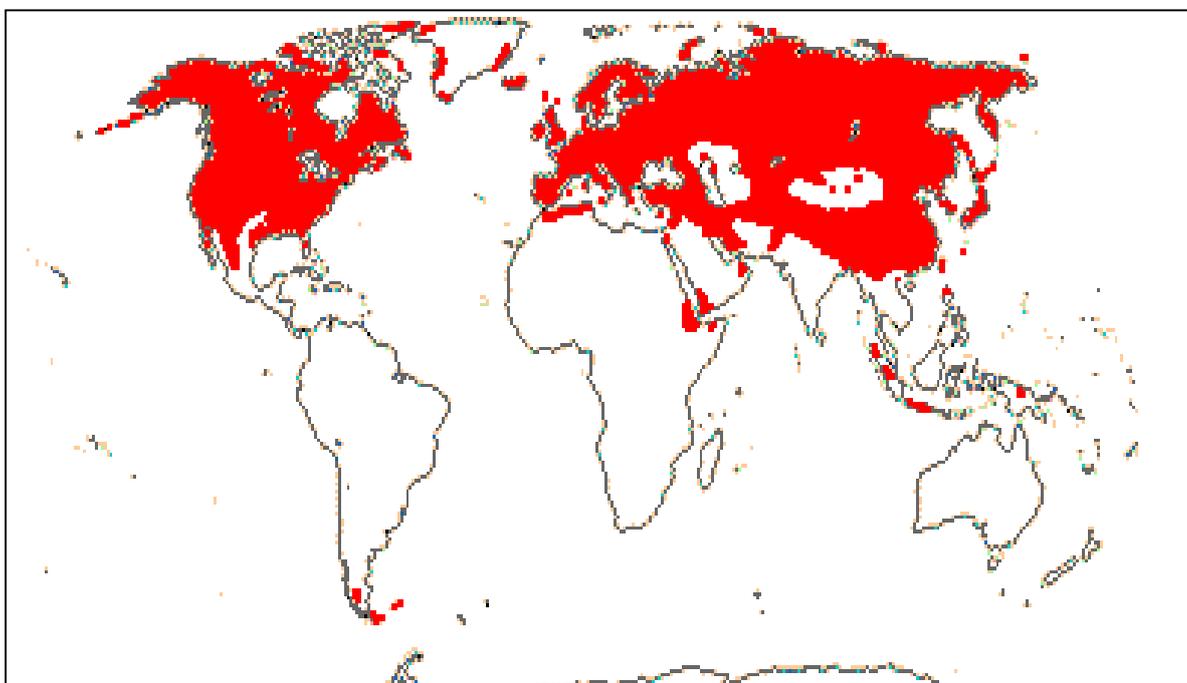


Figure 2 : Localisation géographique des Primulaceae (Stevens 2012).

I.2.3. Description botanique de la famille Primulaceae

Les Primulaceae sont une famille de plantes herbacées annuelles ou vivaces, des régions froides ou tempérées, rarement suffrutescentes. La plupart des espèces vivaces possèdent des rhizomes sympodiaux, comme *Primula*, ou des tubercules comme *Cyclamen*. *Hottonia* est un genre de plantes aquatiques racinées.

- ✚ **Les feuilles** sont alternes, ou opposées chez les Lysimaques et les Mourons rouges et bleus ; chez ces derniers, les fruits sont des pyxides.

- ✚ **La corolle** est gamopétale et, sur 10 étamines, 5 sont fertiles, celles superposées aux pétales. Les 5 autres sont stériles et réduites à de petites lames (staminodes) ou totalement absentes.
- ✚ **L'ovaire et les ovules** : l'ovaire est généralement supère, est uniloculaire alors que les ovules sont situés au centre sur un mamelon situé dans le prolongement du pédicelle floral, la placentation, dite centrale, résulte de la non-différenciation des septums.
- ✚ **Le fruit** est une capsule qui s'ouvre par des dents chez les Primulacées herbacées ou un fruit charnu chez les espèces ligneuses tropicales (**Dupont et Guignard, 2015**).
- ✚ **Les fleurs** sont solitaires et axillaires comme chez *Anagallis*, ou groupées en panicules, en racèmes ou en ombelles souvent terminaux. Dans la plupart des cas, les fleurs, sont hermaphrodites, pentamères et actinomorphes. Chez *Coris*, elles tendent vers la zygomorphie. L'hétérostylie est fréquente, et se rencontre notamment chez les *Primula*.
- ✚ **La pollinisation est assurée par les insectes butineurs** : les graines sont disséminées par le vent lorsqu'elles sont fines, mais aussi parfois par les fourmis (*Cyclamen*).



Figure 3 : Les différentes parties de *Lysimachia foemina* (Primulaceae) [1]

I.2.4. Utilisations traditionnelles des Primulaceae

Certains genres de *Primulaceae* (*Ardisia* ou *Cyclamen*) sont cultivés comme plantes ornementales. Le feuillage persistant de certaines espèces d'*Ardisia* est apprécié au Japon où de nombreux cultivars ont été mis au point (**Kobayashi et de Mejia, 2005**).

Certaines espèces de *Primulaceae* sont comestibles (baies de *Ardisia elliptica* Thunb. ou *A.* (Chinoise, indienne et africaine), par exemple :

❖ *Embelia ribes* et *E.drupacea* sont très répandues dans toute l'Inde ; elles sont connues dans la médecine ayurvédique sous les noms de « Vidanga » et « Ambat » respectivement. Le fruit de Vidanga est la partie la plus utilisée pour des propriétés vermifuge, carminative, stomachiques, anti-diarrhéiques et anthelminthiques (**Prashanth et al., 2001**) et hypoglycémiant, il est utilisé aussi pour ses propriétés contraceptives (**Chaudhury et al., 2001; Kumara Swamy et al., 2007**). Pour Ambat, plusieurs parties sont exploitées : les fruits comme laxatif et antiseptique ; l'écorce comme anthelminthique et les racines pour les maux dentaires.

❖ *Embelia concinna* est une espèce endémique de Madagascar connue sous les noms de *Tanterakala*, *Takasina*, *Kasiana*, ou encore *Sirahazo*, possède des propriétés anthelminthiques, ténifuges et antihémorragiques traditionnellement utilisée par les populations malgaches (**Heitz et Billet, 1973**).

❖ *Embelia schimperi* **Vatke** est une plante traditionnellement employée par les Massai de Tanzanie et du Kenya (**Boegh et al., 1996**) comme traitement antimicrobien et comme l'anthelminthique le plus puissant en particulier contre le tænia. Les activités biologiques de cette plante, confirmées par de nombreuses études, ont été recensées par **Machocho et al.** (**Machocho et al., 2003**).

❖ *Embelia guineensis* **Baker** ou *E. rowlandii* **Gilg**, partager les mêmes applications et sont des succédanées d'*E. schimperi* dans de nombreuses pharmacopées traditionnelles (**Burkill, 1994**). Les racines d'*E. barbeyana* sont utilisées à Madagascar comme vermifuge.

❖ *Ardisia pusilla* est une plante médicinale chinoise appelée « Jiu-Jie-Long » et utilisée pour le traitement de différents cancer (**Lou et al., 2012**). Une étude a confirmé cette propriété sur des cellules cancéreuses du carcinome mucoépidermoïde (**Xu et al., 2013**).

❖ La décoction bouillie des racines *Ardisia crispa* connue chez les communautés malaises sous le nom « hen's eyes », est utilisée pour le traitement des maux auriculaires, la toux, la

fièvre, la diarrhée, les douleurs de la gorge et le thorax et la dysménorrhée chez les femmes (Hamsin *et al.*, 2013).

❖ Les parties aériennes d'*Ardisia kivuensis* sont utilisées contre les maladies vénériennes (Ndonsta, 2011).

❖ *Myrsine africana* qui est largement distribuée en Afrique orientale et centrale mais aussi en Himalaya et en Chine. Cette plante est utilisée en médecine traditionnelle chinoise contre le rhumatisme, la tuberculose pulmonaire, les douleurs dentaires et pour soulager les hémorragies (Azam *et al.*, 2011). Elle est aussi utilisée dans le district Loitokitok, au Kenya, pour le traitement de la constipation, la gonorrhée et comme anthelminthique (Gathuma *et al.*, 2004; Muthee, 2011).

❖ *Myrsine seguinii* entre dans la composition d'une préparation en médecine traditionnelle au Myanmar, en Birmanie, pour le traitement de maladies infectieuses et inflammatoires (Yang, 2014).

❖ *Primula vulgaris* en dehors de son aspect décoratif, elle peut être utilisée comme plante médicinale. Les fleurs, sont utilisées dans des mélanges pectoraux, cependant la plante et particulièrement la racine ont des propriétés analgésiques, antispasmodiques, diurétiques, pectorales et expectorantes. Ses vertus contre les rhumatismes et les spasmes expliquent qu'elle a reçu autre fois le nom d'Herbe de la paralysie.

❖ Plusieurs espèces du genre *Cyclamen* ont été utilisées pour le traitement de maladies inflammatoires, rhumatismales et arthriques (Mohammad *et al.*, 2018).

I.2.5. Etudes chimiques antérieures

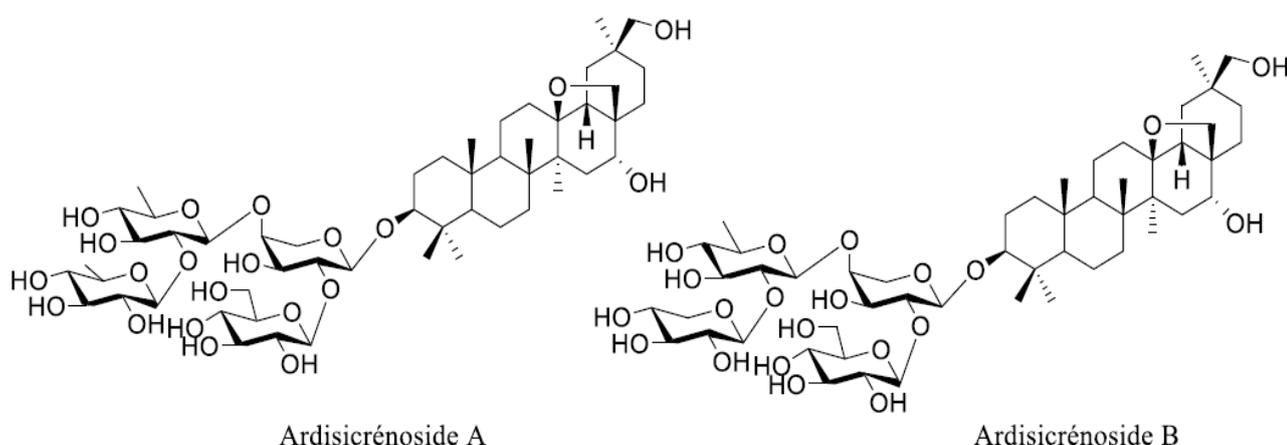
Au vu de leurs utilisations en médecines traditionnelles, plusieurs équipes de recherche se sont intéressées aux plantes de cette famille à la recherche de molécules actives biologiquement. L'ensemble des composés isolés et identifiés à partir de la famille des Primulaceae est très hétérogène. Ainsi, les métabolites secondaires les plus rencontrés sont des : saponines triterpéniques, stérols, flavonoïdes, dérivés benzoquinoniques, acides benzoïques, lignanes et dérivés et lactones et dérivés ... ect, dont nous allons donner quelques exemples de structures.

La composition chimique des espèces de la famille Primulaceae est très diversifiée. Les pages qui suivent en sont l'illustration, avec une mention particulière pour les saponines triterpéniques en raison de leur prédominance.

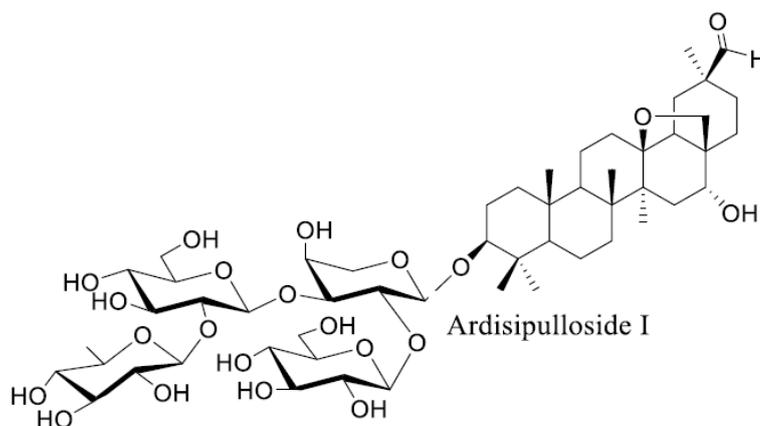
I.2.5.1. Les saponines

- Quatorze ardisicrénosides, notés de A à N, ont été isolées à partir des racines d'*Ardisia Crenata* (Jia *et al.*, 1994a; Jia *et al.*, 1994b; Jia, 1994c; Liu 2011a; Liu, 2011b). L'ardisicrénoside A a aussi été trouvée dans *A. punctata* (Ma *et al.*, 2012) et *A. japonica* (Chang *et al.*, 2007); l'ardisicrénoside B a été identifié à partir d'autres genres :

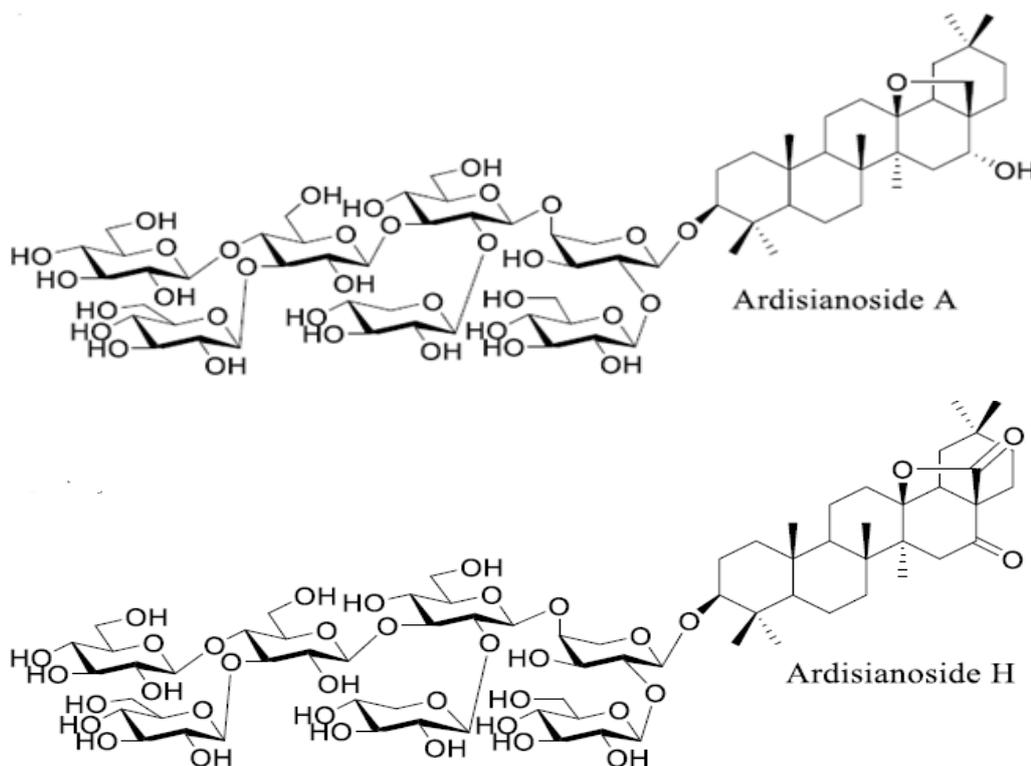
Labisia pumilla (dans les racines, les tiges et les feuilles), et *Lysimachia* (dans les parties souterraines de plusieurs espèces) (Podolak, 2013a).



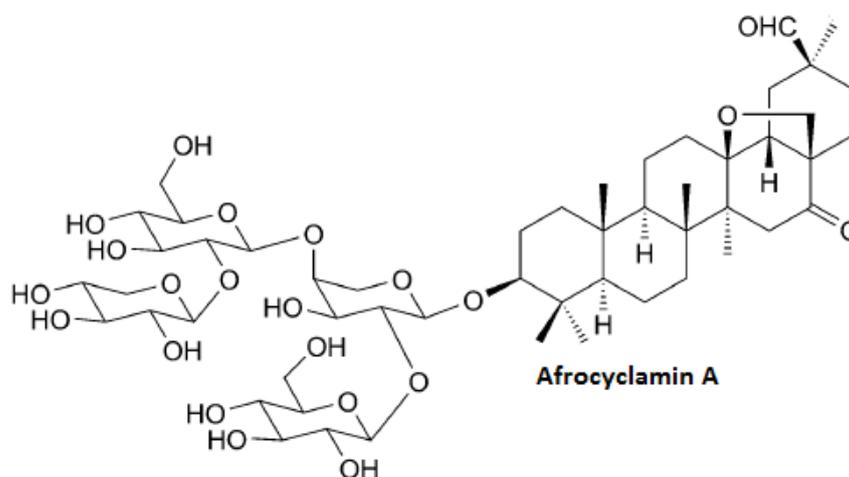
- Cinq saponines triterpéniques Ardisipulloside I à V (Wang, 1996; Miao, 2000; Wang, 2000; Tang, 2009; Tian, 2009) ont été isolées pour la première fois à partir de la plante entière d'*A. pusilla*. L'ardisipulloside I est considéré comme possédant un potentiel anticancéreux car il a démontré une activité inhibitrice du facteur de croissance endothélial (VGEPR), induisant l'apoptose cellulaire (Zhang, 2010).

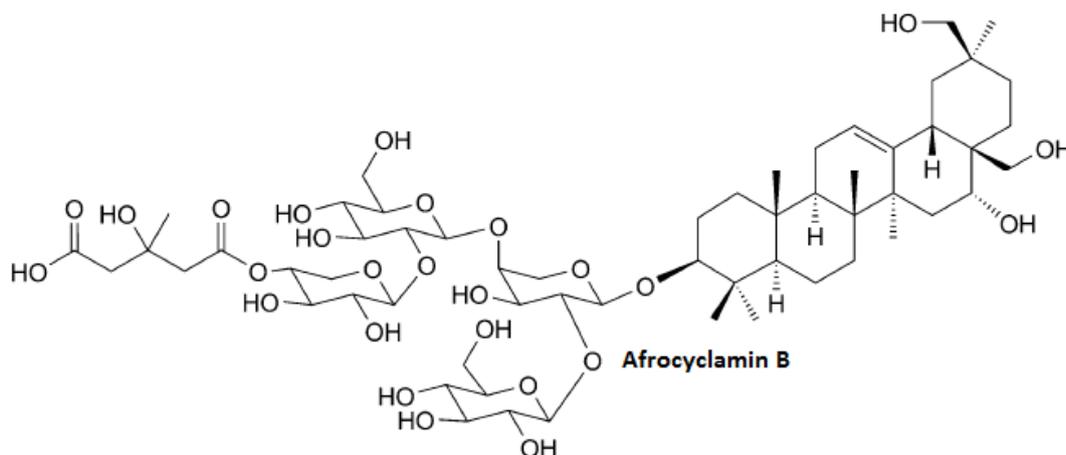


- Onze monodesmosides (A à K) avec un pont 13 β -28 epoxy (ardisianosides A-G) ou 13 β -28 carboxylate (ardisianosides H-J) ont été isolées à partir de plante entière d'*A. japonica*. Certaines de ces saponines ont démontré une activité puissante (de 0,92 à 4,46 mM) antiproliférative contre les cellules Bel-7402 du cancer du foie (Li *et al.*, 2012).

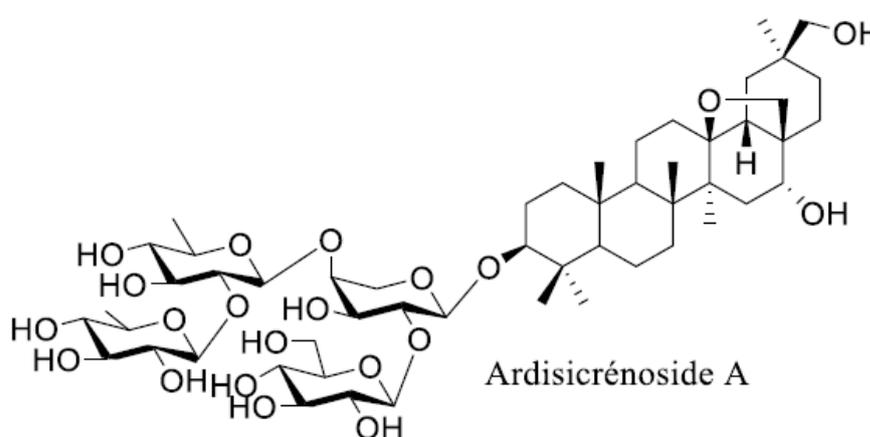
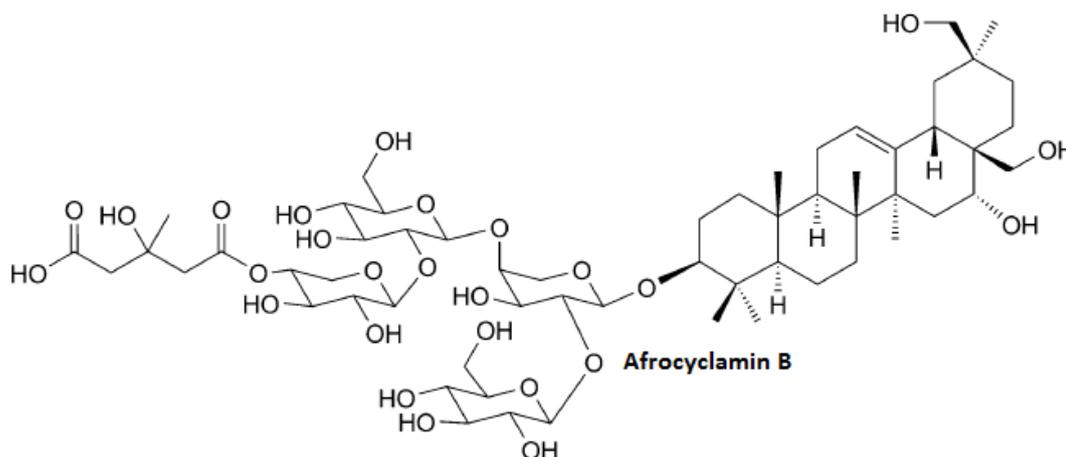


- L'étude phytochimique portant sur les racines de *Cyclamen africanum*, a abouti à l'isolement de cinq saponosides dont deux de nouvelles molécules « Afrocyclamin A » et « Afrocyclamin B ».

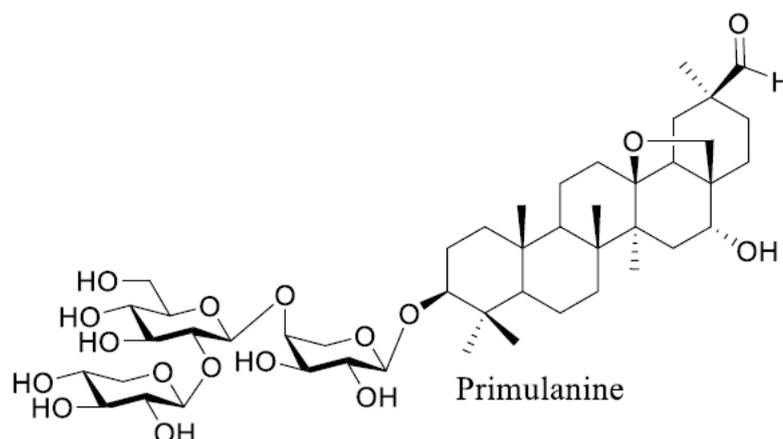




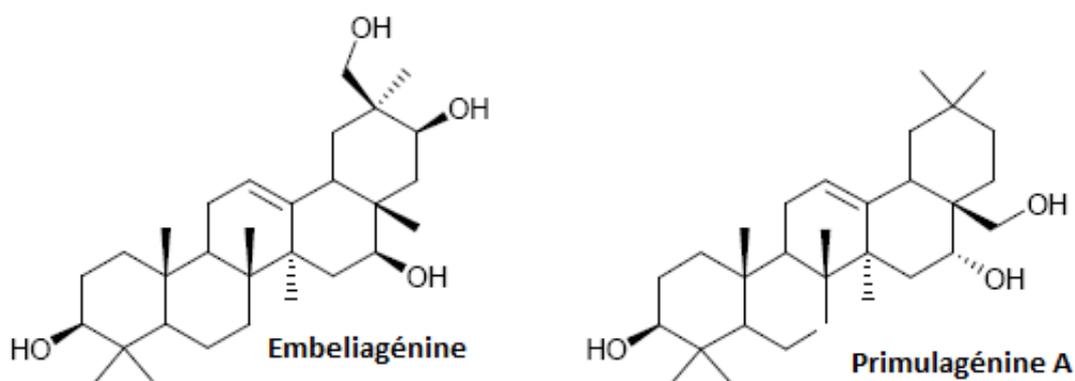
- Les Myrseguenosides D et E ont été isolés en plus de l'*Ardisia crisa* B et l'ardisicrénoside A à partir de *Myrsine seguinii* (Matsunami *et al.*, 2011).



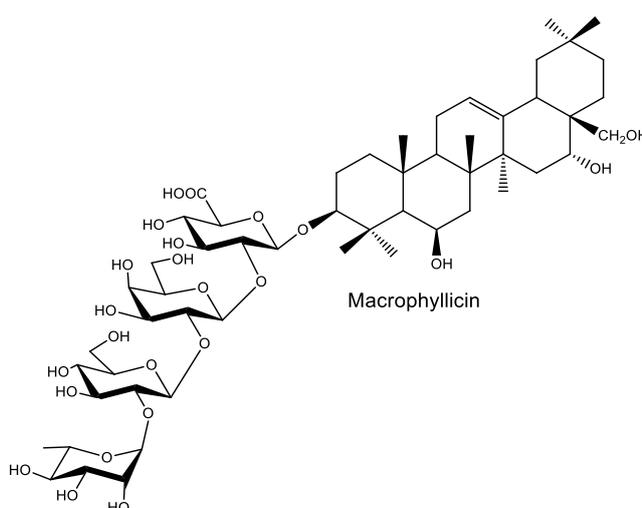
- L'investigation phytochimique de l'espèce *Myrsine pellucida* (Lavaud *et al.*, 1994) a conduit à l'isolement et la caractérisation des deux ardisiacrispines A et B en plus de la primulanine.



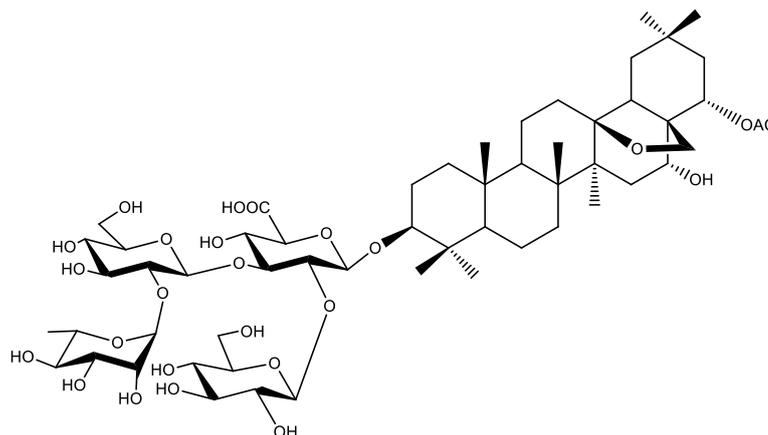
- L'étude en 1973, d'*Embelia concinna* Baker par **Heitz et Billet** a conduit à l'identification de deux triterpènes pentacycliques: la primulagénine A et l'embéliagénine (**Heitz et Billet, 1973**).



- L'investigation chimique menée sur l'espèce *Primula macrophylla* (**Viqar Uddin et al., 1993**) a abouti à l'isolement de macrophylicin.

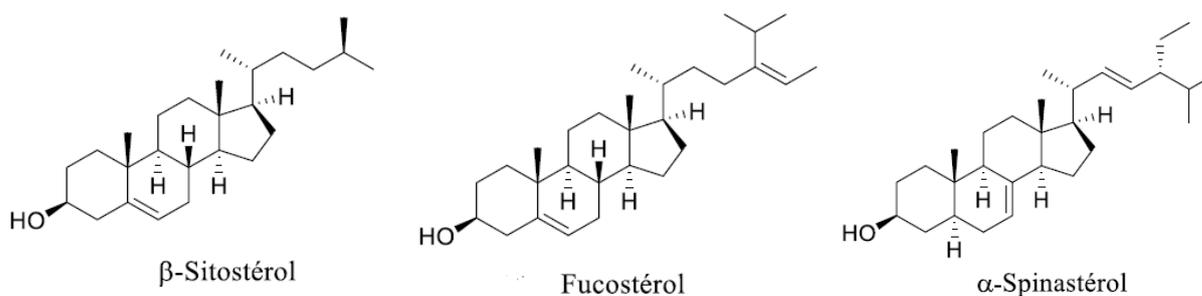


- Une nouvelle saponoside a été isolé à partir de l'espèce *Primula averis* Il s'agit de 22-acétate-Priverosaponin B (**Müller et al., 2006**).



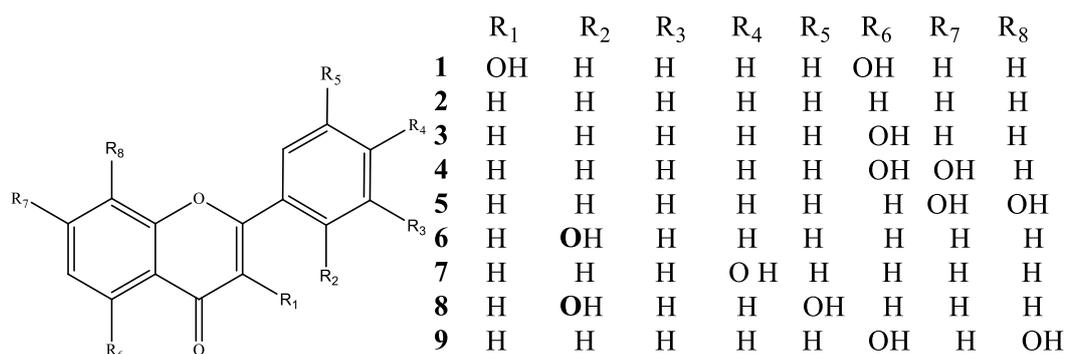
I.2.5.2. Les phytostérols

- Le β -sitostérol a été purifié à partir de l'extrait méthanolique des feuilles et des tiges d'*Ardisia kivuensis* (Ndonsta, 2011), alors que le stigmasterol, le fucostérol et l' α -spinastérol ont été isolés à partir de l'extrait hydroéthanolique d'*Aegicera corniculatum* (Wang, 2014).



I.2.5.3. Les flavonoïdes

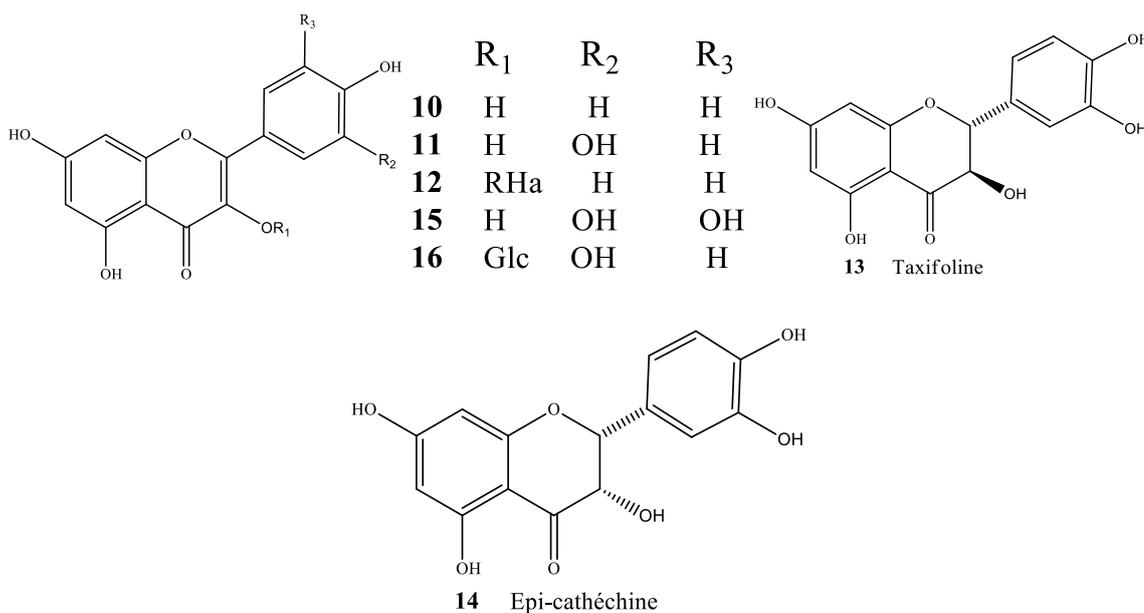
- Les travaux effectués sur les feuilles de quatre espèces du genre *Primula* (*Primula albenensis*, *P. auricula* L., *P. farinosa* L. et *P. halleri*) ont permis d'isoler et d'identifier neuf composés flavonoïdiques : 3,5-dihydroxyflavone (1), flavone (2) (Weller *et al.*, 1953), 5-hydroxyflavone (primuletin) (3) (Geissman, 1962), 5,7-dihydroxyflavone (chrysin) (4) (Lindstedt, 1950), 7,8-dihydroxyflavone (5) (Abubakar *et al.*, 2012), 2'-hydroxyflavone (6) (Bouillant *et al.*, 1971), 4'-hydroxyflavone (7) (Ruiz *et al.*, 1999), 2',5'-dihydroxyflavone (8) (Wollenweber *et al.*, 1988b), 5,8-dihydroxyflavone (primetin) (9) (Tokalov *et al.*, 2004).



Plusieurs espèces du genre *Primula*, ont révélés la présence de plusieurs flavonoïdes dont la kaempférol (**10**) quercitrine (**11**), et leurs dérivés glycosylés.

Les flavanols nommés kaempférol (**10**) la quercitrine (**11**), l'afzéline (**12**), la taxifoline (**13**) et l'épicatéchine (**14**) ont été isolés à partir des feuilles d'*Embelia ribes*.

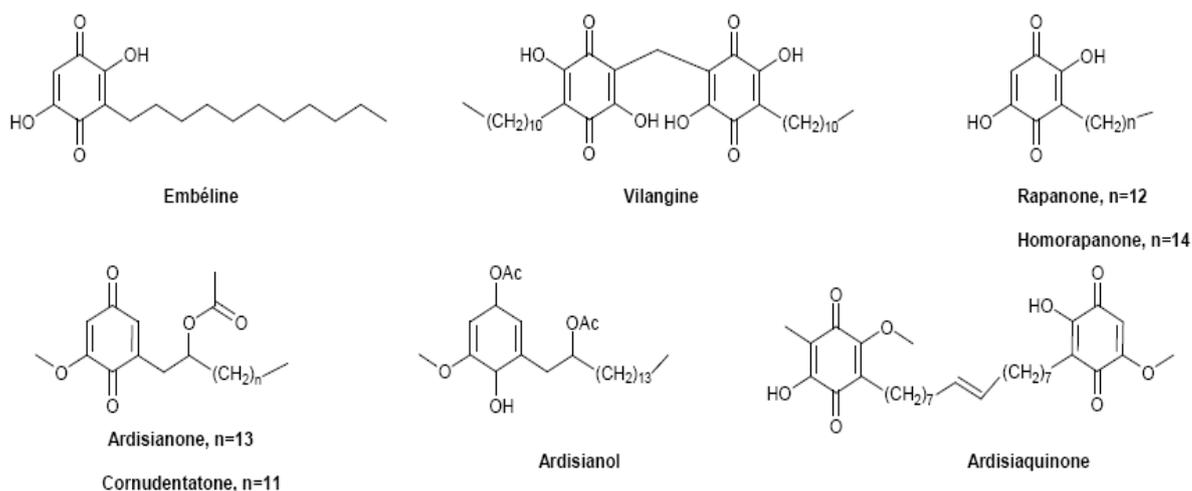
Alors que la myricétine (**15**) et la quercétine-3-*O*- β -D-glucopyranoside (**16**) ont été trouvé dans les fruits d'*A. colorata*.



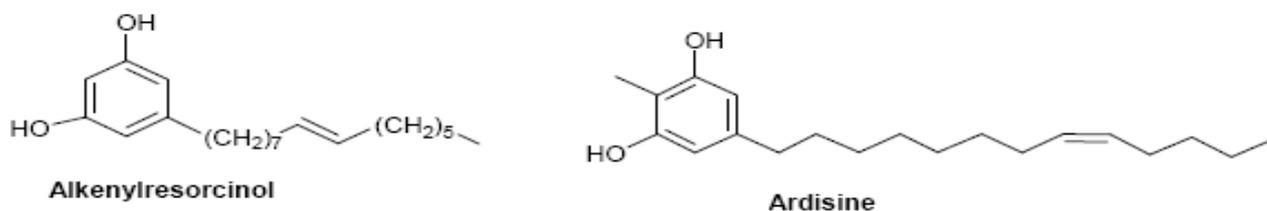
I.2.5.4. Les dérivés benzoquinoïques

Les benzoquinones constituent un trait caractéristique de la famille des Primulaceae. Parmi les plus fréquemment rencontrées, citons l'embéline, la rapanone et la vilangine que l'on retrouve quasi systématiquement dans les genres *Ardisia*, *Myrsine*, *Aegiceras*, *Parathesis* et *Embelia*. Ces composés sont présents dans les feuilles, l'écorce, mais surtout dans les fruits et le bois des Primulaceae.

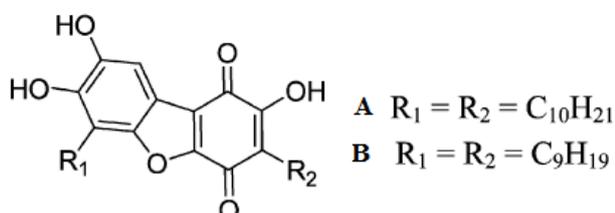
Les benzoquinones sont des composés anti-appétants, antimicrobiens, acaricides, insecticides et nématicides et sont souvent les principes actifs des Primulaceae qui présentent ce type d'activités. L'embéline est souvent considérée comme le principe actif des espèces anthelminthique (Ogweni Midiwo *et al.*, 2002).



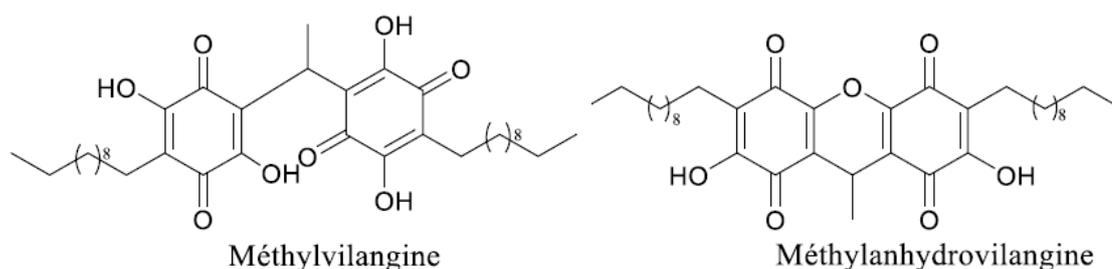
- Certains genres de la famille des Primulaceae peuvent également renfermer des alkyl-résorcinsols ou des alkenyl-résorcinsols qui sont probablement des précurseurs des benzoquinones (Hegnauer, 1990; Kozubek et Tyman, 1999).



- Les dérivés quinoïques Parathesiquinones A et B ont été isolées à partir de l'extrait chloroformique des branches de *Parathesis amplifolia* (Solis, 2006).



- L'étude phytochimique des fruits de *Myrsine africana* a révélé la présence des dérivés benzoquinones telles que la méthylvilangine et la méthylanhydrovilangine.



I.3. Présentation du genre *Anagallis* L

Le genre *Anagallis* L comprend des plantes herbacées vivaces à ou annuelles, avec environ 20 à 25 espèces de plantes à fleurs de la famille des Primulaceae, communément appelées mouron. Le nom botanique vient du mot grec *anagelein* : *ana*, "encore", et *gallein*, "se délecter de", et se réfère à l'ouverture et à la fermeture des fleurs en réponse aux conditions environnementales. Une autre origine possible serait ἀναγλάω (éclater de rire), en raison de son utilisation ancienne dans le traitement de l'hypochondrie.

I.3.1. Description botanique du genre *Anagallis*

D'après **Quezel et Santa** les plantes du genre *Anagallis* sont des plantes grêles et glabres. Les espèces du genre *Anagallis* poussent comme plantes herbacées annuelles ou vivaces de 10-30 cm. Les parties aériennes de la plante sont grêles et glabres (**Quezel et Santa, 1963**) ces espèces, forment des racines traçantes ou seulement des racines fibreuses.

- ✚ **Les tiges** sont verticales ou ascendantes simples ou ramifiées.
- ✚ **Les feuilles** sont opposés, rarement verticillées et parfois avec quelques feuilles alternes à l'extrémité de la tige. Ils sont généralement de forme ovale avec une base cordée.
- ✚ **Les fleurs** sont solitaires à l'aisselle des feuilles, elles sont radialement symétriques avec 5 sépales.
- ✚ **La corolle** se compose d'un tube court et de 5 lobes. Le tube peut être si court que les lobes semblent être des pétales séparés. Ils sont généralement solitaires à l'aisselle des feuilles, mais sont parfois sur de courtes pointes à la fin de la tige.
- ✚ **Les étamines** sont en face des lobes de la corolle. Les filaments staminaux ont des poils bien visibles.
- ✚ **L'ovaire** est supérieur, globuleux et circumscissile près du milieu.



Figure 4 : Les différentes parties d'*Anagallis arvensis ssp arvensis* (Primulaceae) (Burnie, 2001).

I.3.2. Les espèces du genre *Anagallis* L

D'après **Quezel et Santa (1963)** , en Algérie, le genre *Anagallis* compte une dizaine d'espèces qui sont :

- | | |
|--|-------------------------------------|
| 1) <i>A. arvensis</i> L | 2) <i>A. monelli</i> L. |
| 3) <i>ssp. latifolia</i> (L.) Br.-Bl. et M | 4) <i>ssp. collina</i> (Schousb.) M |
| 5) <i>ssp. parviflora</i> (Hoffm. et Link) | 6) <i>ssp. linifolia</i> (L.) M. |
| 7) <i>ssp. platyphylla</i> (Bando) Batt. | 8) <i>A. repens</i> Pomel |
| 9) <i>ssp. phoenicea</i> (Goué.ln)Vollus | 10) <i>A. enella</i> L. |

I.3.3. Classification systématique

La classification botanique du genre *Anagallis* selon APGIII 2009 se présente comme suit :

Tableau 3 : Position taxonomique du *Anagallis* selon APGIII 2009.

Plantae	Tracheobionta
Embranchement	Spermatophyta
Sous-Embranchement	Angiospermae
Classe	Magnolopsida

Sous-classe	Dilleniideae
Ordre	Primulales
Famille	Primulaceae
Genre	<i>Anagallis</i>

I.3.4. Utilisations traditionnelles du genre *Anagallis*

Anagallis arvensis L est une espèce annuelle répandue dans le monde entier, utilisée pour traiter les infections fongiques dans la médecine traditionnelle du nord-ouest Argentin (**Rondina et al., 2010**), et aussi dans d'autres pays, comme l'Inde (**Mitscher, 1975**) ou la Palestine (**Ali-Shtayeh et al., 1998**).

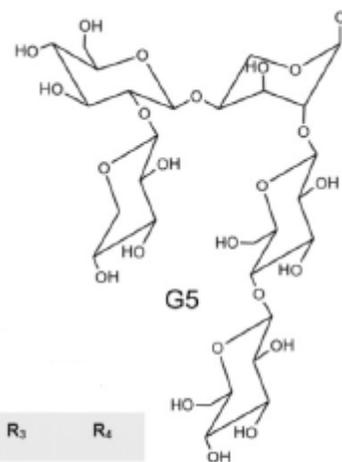
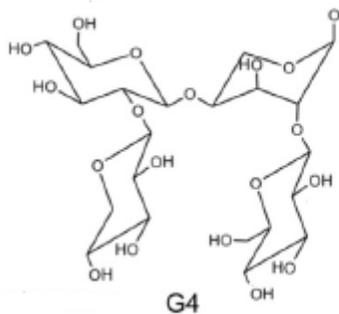
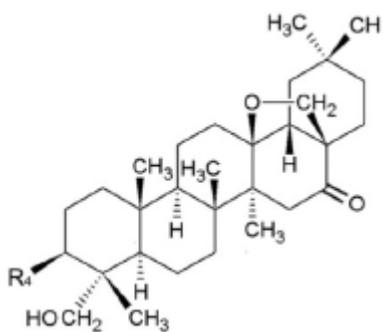
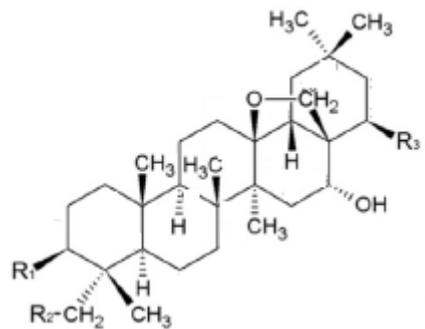
Les parties aériennes de cette espèce sont utilisées pour préparer une pommade pour le traitement des infections externes (**López et al., 2011**). Les feuilles sont consommées crues par l'homme et d'autres mammifères, comme les moutons (**Middleditch, 2012**).

A. arvensis L traditionnellement employée également comme traitement de : l'arthrite (**Burkill, 1985**), le cancer, les infections des voies urinaires (**Gruenwald et al., 2000**), la dépression, la tuberculose, la diphtérie (**Masood et al., 2010**), la goutte, la rage (**Quattrocchi, 2012**), la gonorrhée et les maladies vénériennes (**Moerman, 1998**).

I.3.5. Etudes chimiques antérieures sur le genre *Anagallis*

Les études phytochimiques antérieures relatives aux plantes du genre *Anagallis* sont limitées et concernent principalement sur l'espèce *arvensis* L. Les métabolites secondaires les plus rencontrés sont les : flavonoïdes (**Harborne, 1968; Kawashty et al., 1998**), triterpènes et saponines triterpéniques (**Gairola et al., 2010 ; Rastogi et Mehrotra, 1990; Saini, 2014**).

- Les Anagallisin (A à C) ont été isolés en plus de l'Anagallosaponin VIII (Des glucoanagalloside A) à partir d'*A. arvensis*.



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
I (anagallisin C)	G4	OH	H	
II (anagallisin A)	G5	OH	H	
III (desglucoanagalloside A)	G4	H	CH ₃ CO	
IV (anagallisin B)				G5

Chapitre II

Métabolites secondaires

II.1. Composés phénoliques

II.1.1. Définition

Les polyphénols constituent une famille de molécules organiques largement présente dans le règne végétal. L'élément structural de base qui les caractérise est la présence d'au moins d'un noyau benzénique auquel sont directement liés un ou plusieurs groupes hydroxyles libres ou engagés dans une autre fonction chimique (éther, ester ou encore hétéroside) (**Bruneton, 2009**).

A l'heure actuelle, plus de 10000 composés naturels satisfaisant à ces critères ont été isolés et identifiés (**Mompon et al., 1998**). Selon leurs caractéristiques structurales, ils se répartissent en différentes familles : anthocyanes, coumarines, lignanes, flavonoïdes, tanins, quinones, acides phénoliques, xanthonnes, stilbènes...etc (**Hennebelle et al., 2004**). Ces structures sont des monomères, des polymères ou des composés complexes dont la masse moléculaire peut atteindre 9000 uma (**Harbone, 1993**). Ces métabolites secondaires sont synthétisés par les plantes pendant leur développement, mais aussi comme réponse aux conditions de stress tels que les infections, les blessures, les radiations UV... etc (**Bruneton, 2009**).

II.2. Flavonoïdes

Occupant une place prépondérante dans le groupe des phénols, les flavonoïdes sont des métabolites secondaires ubiquistes des plantes. À l'heure actuelle recensée près de 9000 représentants différents et leur nombre ne cesse d'accroître. On estime que 2 % environ du carbone organique photosynthétisé par les plantes, soit quelques 109 tonnes par an, est converti en flavonoïdes. On les trouve fréquemment et avec une plus grande diversité structurale chez les angiospermes. Ils sont localisés dans divers organes : feuilles, fleurs, fruits et racines (**Harborne, 1977**).

Le terme "flavonoïde" désigne une vaste gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils se caractérisent par un squelette à 15 atomes de carbone 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 C 6-C3-C6). Ils ont une origine biosynthétique commune et possèdent la même structure de base à savoir l'enchaînement 2-phénylchromane (**Figure 5**).

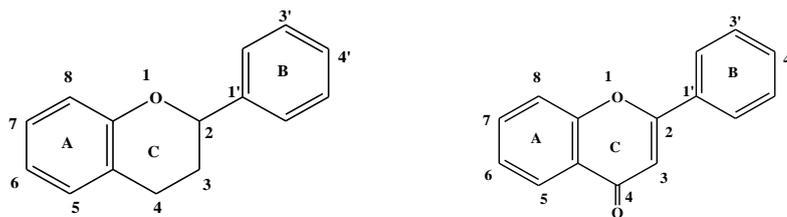


Figure 5 : Structures du 2-phényl chromane ou noyau flavane (à gauche) et du 2-phényl chromone (à droite)

II.2.1. Classification des flavonoïdes

Les flavonoïdes peuvent être classés en plusieurs groupes selon le degré d'oxydation du cycle pyranique C alors que les composés individuels au sein d'une classe se distinguent par les substitutions des cycles A et B. Parmi les nombreuses classes de flavonoïdes, existent : les flavones, flavanols, flavanones, dihydroflavonols, flavan-3-ols, flavane-3,4-diols, chalcones, aurones, anthocyanes et isoflavones.

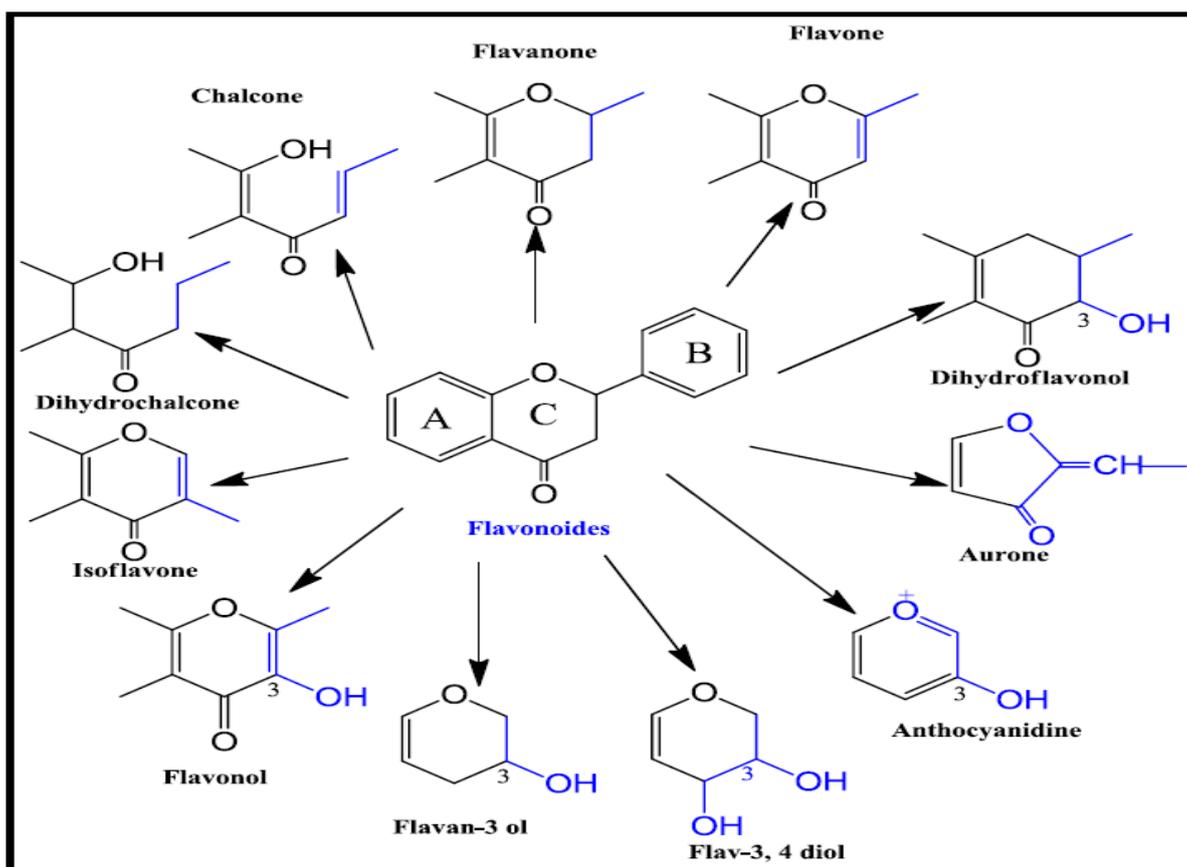


Figure 6 : Principaux types de flavonoïdes

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 peuvent être présents sous les deux formes, C- ou O-glycosylés. La

forme *O*-glycoside est la plus fréquente et s'effectue par la liaison entre un hydroxyle du squelette flavonique et un hydroxyle du sucre (glucose, rhamnose, galactose, arabinose... etc). Pour ce qui est de la forme *C*-glycoside, la liaison se fait directement avec un carbone de la génine, généralement en C-6 ou C-8 (De Rijke, 2006).

II.2.2. La biosynthèse des flavonoïdes

Au plan biosynthétique, les flavonoïdes ont tous une origine biosynthétique commune, ils résultent de la condensation de 3 unités de malonyl-CoA en formant le noyau A, et d'un acide cinnamique activé qui sera à l'origine du noyau B et de la chaîne propanique. Cette condensation est catalysée par la chalcone synthétase (CHS), enzyme-clé dans la formation des flavonoïdes, qui conduit à un précurseur appelé la chalcone (Figure 7).

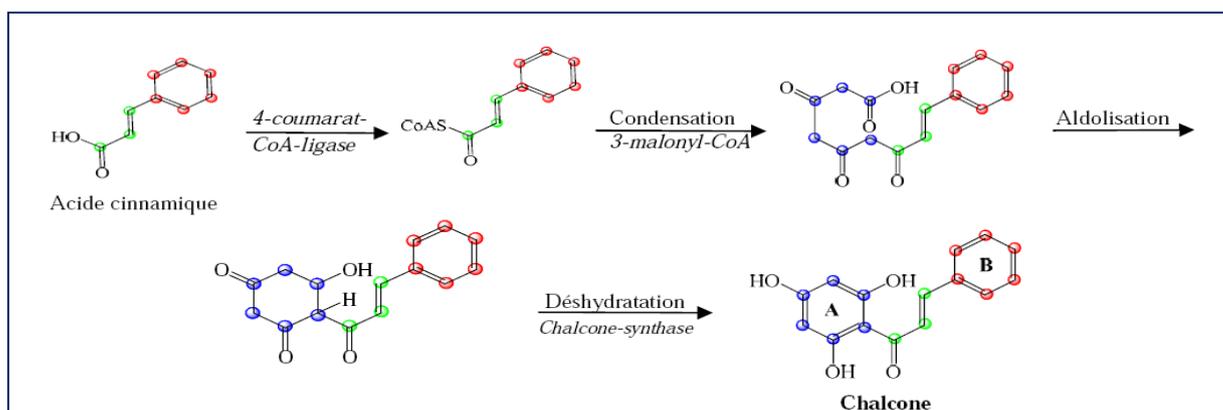


Figure 7 : Biogénèse de la chalcone.

La chalcone se transforme en 2*S*-flavanone (la naringénine), par une réaction stéréospécifique catalysée par l'enzyme chalcone isomérase (CHI). La naringénine va être ensuite métabolisée par une série d'enzymes pour former les différentes classes de flavonoïdes (Figure 8) (Winkel-Shirley, 2001).

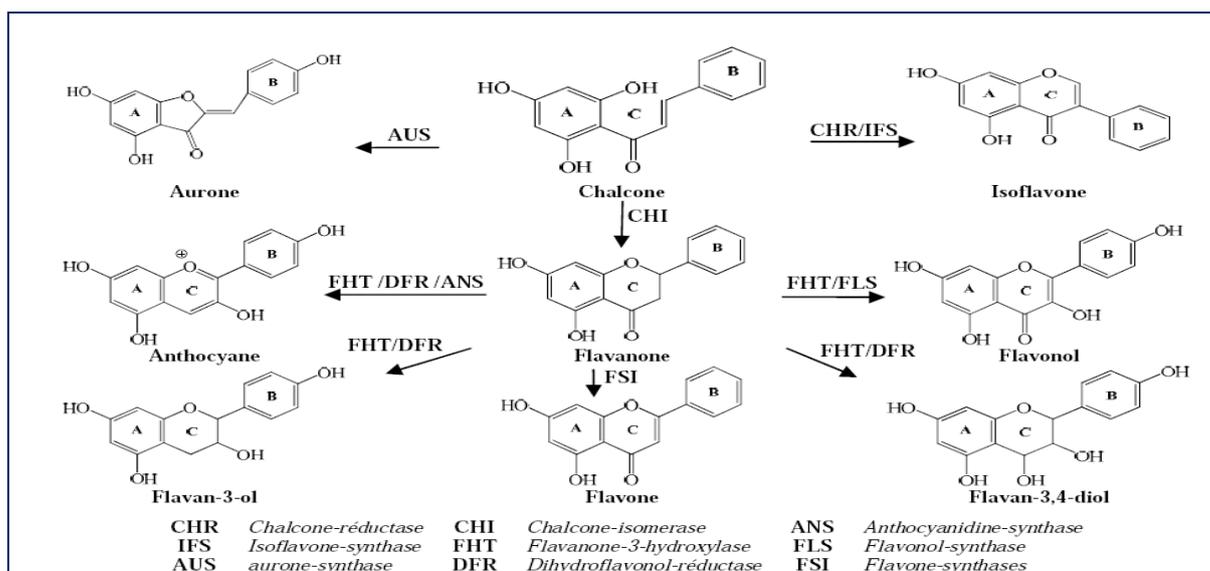


Figure 8 : Schéma récapitulatif de biogénèse des différentes classes de flavonoïdes.

II.2.3. Propriétés des flavonoïdes

Les flavonoïdes forment le groupe le plus répandu de métabolites secondaires, ils suscitent un intérêt thérapeutique croissant. Le potentiel pharmacologique de ces composés est très diversifié, suggérant qu'ils sont capables d'exercer une multitude d'activités biologiques, notamment des propriétés antioxydantes, vasculo-protectrices, anti-allergiques, anti-inflammatoires, anti-bactériennes et même anticancéreuse, mais une importance particulière a été accordée aux propriétés antioxydantes sans négliger leurs propriétés pro-oxydantes (Grotewold, 2007)

II.2.4. Propriétés anti-radicalaires

Les flavonoïdes sont capables de piéger les radicaux libres en formant des radicaux flavoxyles moins réactifs, cette capacité peut être expliquée par leur propriété de donation d'un atome d'hydrogène à partir de leur groupement hydroxyle (**Figure 9**). Cette réaction de piégeage donne une molécule stable (RH) et un radical flavoxyle (FLO•). Ce dernier va subir un changement de structure par résonance ; redistribution des électrons impaires sur le noyau aromatique pour donner des molécules de faible réactivité par rapport aux R•. En outre les radicaux flavoxyles peuvent interagir entre eux pour former des composés non réactifs.

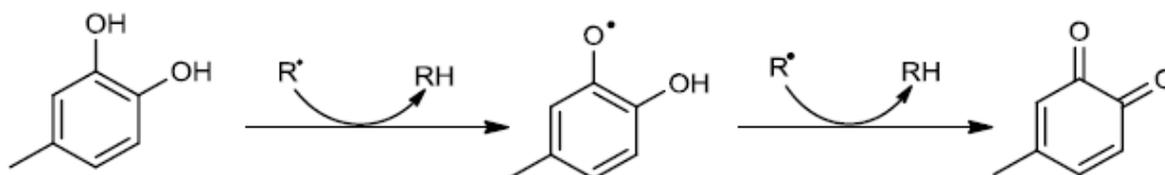
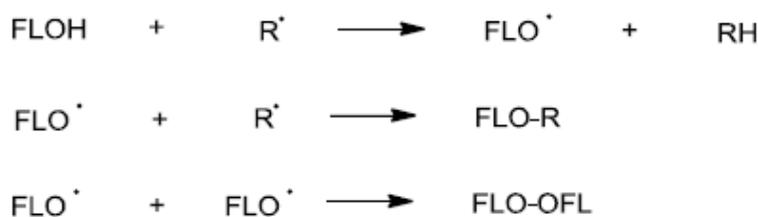


Figure 9 : Piégeage des espèces réactives dérivées de l'oxygène (R^\bullet) par les flavonoïdes et formation d'une structure stable (Tiqwari, 2001).

La propriété anti-radicalaire des flavonoïdes est étroitement liée à leur structure, en particulier au phénomène de résonance électronique stabilisant exercé par les noyaux aromatiques, cette activité nécessite :

- la structure ortho-dihydroxyphénolique du cycle B (3',4' dihydroxy structure), cette structure est importante pour l'activité anti-radicalaire des flavonoïdes possédant un hétérocycle saturé ;
- la double liaison C2-C3 conjuguée avec la fonction 4 oxo qui est responsable de la délocalisation des électrons, en améliorant ainsi la capacité anti-radicalaire ;
- les groupements hydroxyles libres en C3 et C5 (Amić et al., 2003).

A titre d'exemple ; la quercétine et la myricétine répondent à tous ces critères nécessaires pour avoir une activité antiradicalaire efficace et importante (Middleton et al., 2000).

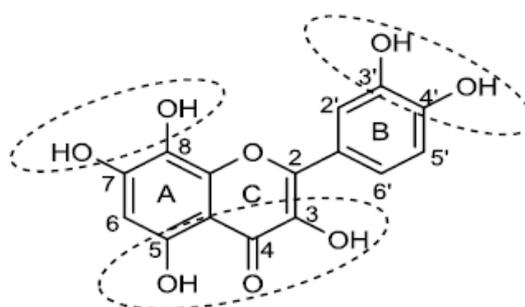


Figure 10 : Critères structuraux essentiels pour une bonne activité antiradicalaire des flavonoïdes (Amić et al., 2003).

II.2.5. Propriétés chélatrices des ions métalliques

Les ions métalliques sont nécessaires pour le fonctionnement des processus biochimiques et physiologiques cellulaires, mais dans certains cas et lorsque leur mécanisme d'action n'est pas bien contrôlé ces mêmes ions peuvent être à l'origine d'une peroxydation lipidique, un stress oxydatif, ou une blessure des tissus, à titre d'exemple Cu^{2+} est un stimulateur de la peroxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL=low-densitylipoprotein) (Tiqwari, 2001).

Grâce à leur structure chimique spécifique, les flavonoïdes peuvent facilement chélater les ions métalliques en créant des composés complexes inactifs (Malešev et Kuntić, 2007). La chélation des ions métalliques nécessite trois sites principaux (Figure 11) :

- site situé entre le groupe 3'-OH et le groupe 4'-OH du cycle B ;
- site situé entre le groupe 3-OH et 4-C=O de l'hétérocycle C ;
- site situé entre le groupe 5-OH du cycle A et le groupe 4-C=O de l'hétérocycle C.

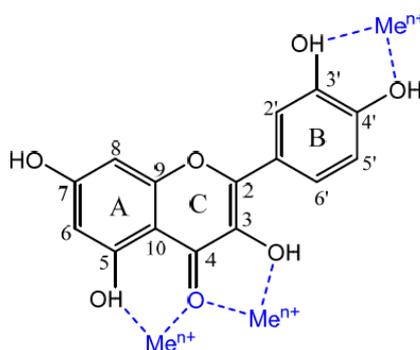


Figure 11 : Principaux sites impliqués dans la chélation des ions métalliques (Me^{n+}) (Tiqwari, 2001).

Les flavonoïdes peuvent également inhiber certains enzymes de type oxydases et enzymes pro-oxydantes notamment la NADPH oxydase enzyme clé du stress oxydatif (Mladinka *et al.*, 2010).

II.2.6. Propriétés anti-inflammatoire

Plusieurs études ont révélé des activités des flavonoïdes contre les processus inflammatoires en inhibant les enzymes de synthèse : la cyclo-oxygénase et la li-oxygénase médiateurs de l'inflammation (Middleton, 1996). De plus ces biomolécules peuvent provoquer l'inhibition

de la peroxydation non-enzymatique des acides gras polyinsaturés nécessaires pour l'activation de ces oxygénases en induisant un effet anti-inflammatoire (**Song et al., 1993**).

Les flavonoïdes peuvent être de bons inhibiteurs de la prolifération des lymphocytes Bet T. Une étude réalisée par **Namoong et all (Namgoong, 1994)** a montré que l'apigénine, la lutéoline, la 7,3',4' hydroxy flavone, le kaempférol, la quercétine et la myricétine sont susceptibles d'inhiber la prolifération des lymphocytes T. De plus la myricétine est active sur les lymphocytes B. Ceci peut être expliqué par le pouvoir de ces flavonoides à inhiber l'activité de la protéine Kinase C et ou la protéine tyrosine kinase.

II.2.7. Propriétés anticancéreuses

D'après **Brusselmans (2005)**, les flavonoïdes : lutéoline, quercétine, kaempférol, apigénine, taxifoline inhibent d'une façon marquée la lipogenèse des cellules cancéreuses. D'autres flavonoïdes sont plutôt capables d'induire l'apoptose. En effet certains flavanols (épigallocatechine-3-gallate) présentent des effets cytotoxiques sur les cellules cancéreuses de prostate. Ces effets sont corrélés avec leur capacité à inhiber les enzymes clés lipogéniques FAS (FattyAcidSynthase) (**Brusselmans et al., 2005**).

D'autres travaux réalisés par **Caltagirone et al. en (2000)** ont montré que l'apigénine et la quercétine ont la capacité d'inhiber la phase de métastase.

L'activité anticancéreuse des flavonoïdes est aussi assurée par l'intervention de plusieurs mécanismes : piégeage des radicaux libres, inhibition du métabolisme d'acide arachidonique, formation d'un complexe inactif avec le carcinogène (**Hertog, 1996**), prévention de l'activation des métabolites carcinogènes, inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses, arrêt du cycle cellulaire des cellules cancéreuses, induction de l'apoptose, inhibition des processus d'angiogénèse.

Les flavonoïdes sont également connus pour leurs diverses activités : antiallergique (**Kawai et al., 2007**), anti-ulcérogène (**Villar et al., 1984**), antibactérienne, antifongique et antivirale (**Orhan et al., 2010; Kaul et al., 1985**), anti-tumorale et anti-VIH (**Wang et al., 1998**).

II.3. Saponosides

II.3.1. Généralités

Les saponines constituent un vaste groupe d'hétérosides très fréquents chez les végétaux. Ils sont caractérisés par leurs propriétés tensioactives car ils se dissolvent dans l'eau en formant des solutions moussantes (Bruneton, 2009). C'est cette propriété qui est utilisée comme test officiel pour estimer leur pourcentage selon la méthode de la Pharmacopée française (détermination de l'indice de mousse). Ce sont des hétérosides de poids moléculaire élevé, qui se composent d'une partie lipophile l'aglycone (ou génine) et d'une partie hydrophile osidique. Cette combinaison d'éléments structuraux polaires et non polaires en leurs molécules explique leur comportement moussant en solution aqueuse. Ils sont principalement produits par les plantes mais aussi par les organismes marins (Avilov *et al.*, 1997).

II.3.2. Classification structurale

Structuralement, les saponines peuvent être classés en deux groupes selon la nature de la génine : les saponines à génines triterpéniques, de loin les plus nombreux existant chez les angiospermes dicotylédones et chez certains animaux marins et celles à génines stéroïdiques, presque exclusivement présentes chez les angiospermes monocotylédones (Bruneton, 2009).

II.3.2.1. Partie aglycone

➤ **Saponosides à génines stéroïdiques**

Ils sont presque exclusivement présents chez les angiospermes monocotylédones et possèdent un squelette de 27 atomes de carbone qui comporte habituellement six cycles. Ce sont des dérivés du noyau furostane et spirostane (Figure 12). Ces saponosides ont généralement un hydroxyle en position 3. Ce dernier est le plus souvent substitué par une chaîne osidique.

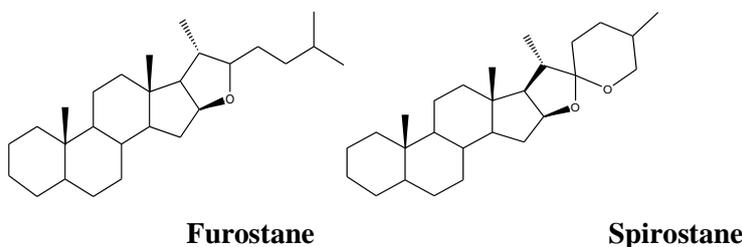


Figure 12 : Structures des squelettes stéroïdiques

➤ Saponosides à génines triterpéniques

Ils sont les plus répandus et possèdent des squelettes pentacycliques dont les plus communs sont les squelettes oléanane, ursane et lupane ainsi que le squelette tétracyclique dammarane (Figure 13) (Bruneton, 1999 ; Hostettmann *et al.*, 1995).

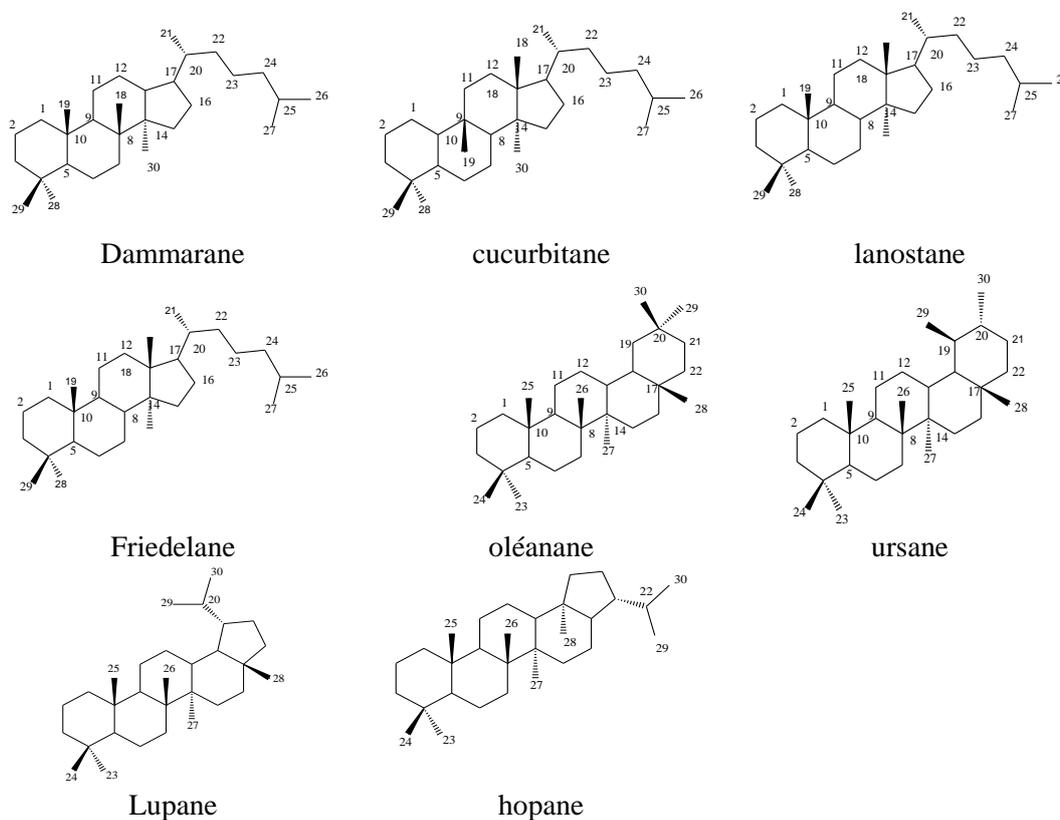


Figure 13 : Structures des squelettes triterpéniques.

II.3.2.2. Partie osidique

Le D-glucose, le D-galactose, le D-xylose, le D-fucose, le D-apiose, le L-arabinose et le L-rhamnose sont les oses les plus fréquemment rencontrés dans la structure des saponosides. La N-acétyl-Dglucosamine, l'acide D-glucuronique, le D-quinovose et le D-apiose sont plus rarement rencontrés (Tableau 4).

Tableau 4 : structure des oses liés aux saponines.

D-glucopyranose	D-galactopyranose	D-xylopyranose	D-fucopyranose

L-arabinopyranose	L-rhamnopyranose	D-glucuronique	D-apirose

III.1.2.3. Les acides organiques:

La partie osidique de certains saponosides ainsi que les fonctions hydroxyles libres des génines peuvent être substituées par des acides aromatiques ou aliphatiques (**Hostettmann *et al.*, 1995**).

Ceux qui sont le plus fréquemment rencontrés sont les suivants :

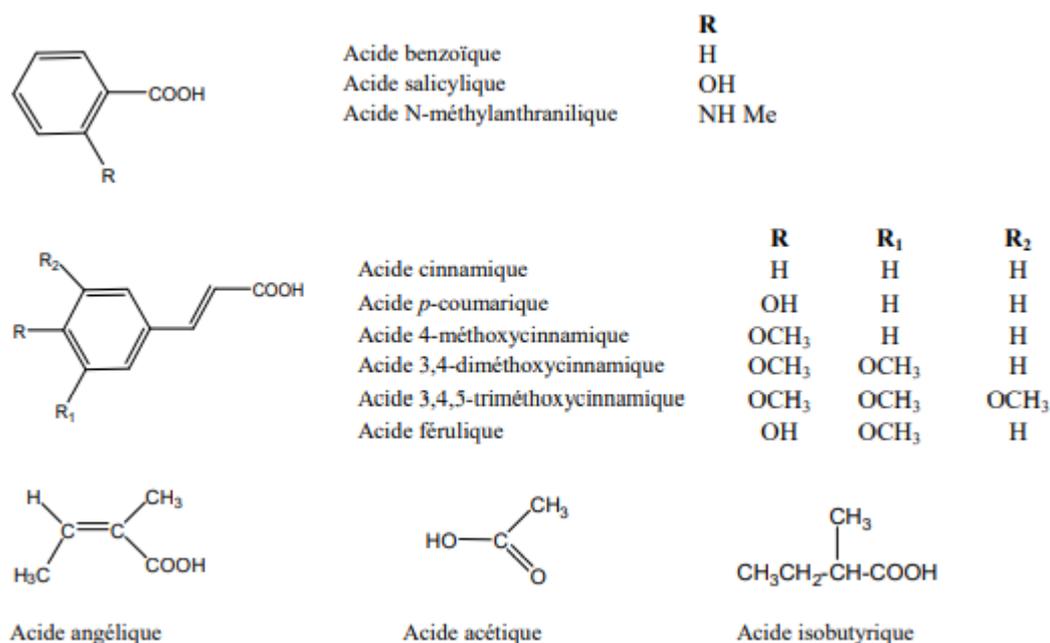


Figure 14 : les différents acides organiques rencontrés dans les saponosides.

II.3.3. Propriétés biologiques des saponosides

Des travaux des scientifiques sur les saponines, il ressort que cette classe de molécules possède des propriétés biologiques et pharmacologiques diverses. On peut citer entre autre des activités molluscicide, anti-inflammatoire, antifongique, antimicrobienne, antiparasitaire, cytotoxique, antitumorale, immunostimulante et immunomodulatrice (**Lacaille-Dubois et Wagner, 1996 et 2000; Lacaille-Dubois, 2005; Hostettmann et Marston, 1995**). Depuis quelques années, des recherches sur des saponines mentionnent également des activités anti-apoptotiques sur

différents types de cellules telles que: Jurkat (lymphocytes T humains leucémiques), teratocarcinome F9, hépatocytes humains, SK-HEP-1, macrophages des tissus périphériques (Lee *et al.*, 1996; Park *et al.*, 1997; Yui *et al.*, 2001; Gaidi *et al.*, 2002).

➤ Effets des saponosides sur les membranes

De nombreux saponosides présentent un pouvoir hémolytique marqué (Kaku *et al.*, 1975; Strobbe *et al.*, 1976; Voutquenne, 1997). Cette propriété est principalement liée à l'interaction des aglycones avec les stérols de la membrane, suivie par une agrégation des groupements oligosaccharidiques induisant un réarrangement de la bicouche lipidique et la formation de pores membranaires (Figure 15) (Melzig *et al.*, 2001). Ceci provoque une fuite des électrolytes et des métabolites et une augmentation de la perméabilité des membranes. Cette propriété est liée à la structure et à la concentration des composés testés. Cependant, il existe des saponosides possédant un faible pouvoir hémolytique voire aucune activité.

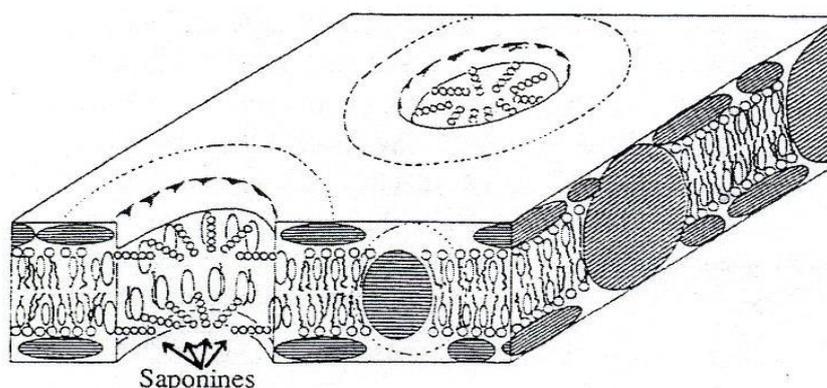


Figure 15: Représentation du réarrangement supposé des constituants membranaires.

La chaîne osidique des saponosides étant située vers l'intérieur du port et la partie génine associée avec le cholestérol membranaire (Melzig *et al.*, 2001).

➤ Activité Molluscicide

Depuis quelques années cette activité retient l'attention de plusieurs chercheurs vu son importance dans le domaine de l'agriculture. Les saponines triterpénoides à squelette hédéragénine isolées de *Sapindus mukorossi* Gaertn (Sapindaceae) ont des effets molluscicides contre l'escargot du pommier (*Pomacea canaliculata*) qui est devenu l'un des principaux parasites du riz et d'autres récoltes aquatiques (Huang *et al.*, 2003).

➤ Activité cytotoxique et antitumorale

Plusieurs saponines triterpéniques et stéroïdiques exercent des activités cytotoxiques avec des valeurs d'IC50 variant entre 1ng/mL à 20 µg/mL selon la nature de la saponine, de la partie

osidique et des lignées cellulaires utilisées. L'apoptose ou suicide cellulaire programmé semble être le mécanisme par lequel la majorité des saponines entraînent la mort des cellules cancéreuses.

De très bonnes revues de littérature ont montré que l'apoptose cellulaire est enclenchée par l'action des saponines sur la membrane mitochondriale induisant l'expression de facteurs pro-apoptotiques (Haridas *et al*, 2001; Lee *et al*, 2005; Zhu *et al*, 2005).

A titre d'exemple :

Le - 3 β ,16 β ,17 α -trihydroxycholest-5-en-22-one-16-O-[(2-O-(4-méthoxybenzoyl)- β -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-2-O-acétyl- α -L-arabinopyranoside] (OSW-1) (Figure 16), un cholestaneacétylé isolé de *Ornithogalum saundersiae*, est l'une des saponines stéroïdiques les plus cytotoxiques connues jusqu'à ce jour. Son IC₅₀ inférieure à 1 nM en fait un agent anticancéreux environ 10 à 100 fois plus puissant que ceux actuellement utilisés en phase clinique comme le taxol.

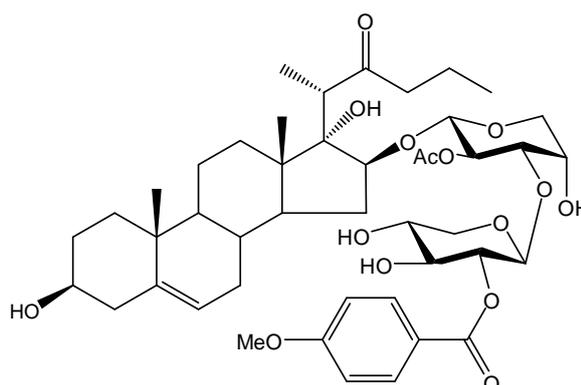


Figure 16 : la structure d'OSW-1.

La saponine stéroïdique, la dioscine, isolée d'un grand nombre de légumes et plantes de la médecine traditionnelle orientale exerce une activité antitumorale ainsi qu'un vaste spectre d'activités biologiques (antivirale, antifongique et anti-inflammatoire).

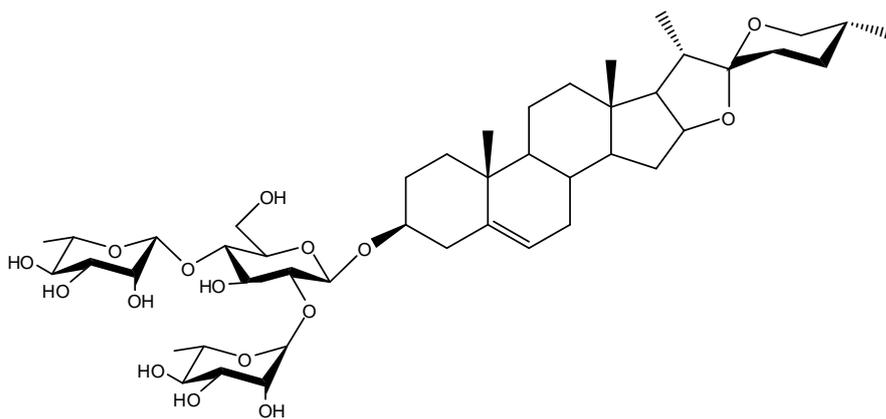


Figure 17 : la structure de la dioscine

➤ **Activité immunomodulatrice**

Actuellement, de nombreux nouveaux vaccins sont en cours de développement parallèlement à l'amélioration des vaccins déjà existants en vue de diminuer le nombre d'injections ainsi que les doses injectées. Il est donc nécessaire d'effectuer des recherches en vue de découvrir de nouvelles molécules qui auront un pouvoir immunostimulant plus important que leurs prédécesseurs. Parmi ces nouvelles molécules, les saponosides semblent être promis à un bel avenir. Nous citerons ici un rappel bibliographique sur les saponosides immunostimulants découverts (Lacaille-Dubois, 1999).

➤ **Activité anti-inflammatoire**

Il existe un certain nombre de rapports de saponines ayant des propriétés anti-inflammatoires. De nombreuses saponines isolées à partir de sources végétales produisent une inhibition de l'inflammation dans le test d'œdème induit par la carraghénine chez la souris (Sparg *et al.*, 2004).

Dans une étude de Just *et al.* (1998), Frutice saponine B, une saponine bidesmosidique avec une fraction saccharidique non ramifiée isolée de *Bupleurum fruticosens* L (Apiaceae), s'est avérée avoir l'activité anti-inflammatoire la plus élevée de toutes les saponines testées dans les tests d'œdème de souris. Just *et al.* (1998) ont suggéré que l'activité anti-inflammatoire des saponines isolées de *Bupleurum fruticosens* est liée à la structure chimique des saponines.

Des études *in vivo* sur des saponines isolées de *Bupleurum rotundifolium* L. (Apiaceae) ont montré une activité anti-inflammatoire contre l'œdème de l'oreille induit par le :

12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA) (Navarro *et al.*, 2001). Sur les sept saponines testées, cinq étaient assez actives dans la réduction de l'œdème de l'oreille induit par le TPA. Les saponines ont produit une réduction de l'œdème dose-dépendante. Seules deux saponines étaient actives dans la réduction de l'inflammation cutanée chronique et ont également provoqué une diminution parallèle de l'infiltration des neutrophiles.

➤ **Autres activités**

Les saponosides sont connus pour leur toxicité envers les animaux à sang froid tels que les poissons. Quelques plantes à saponosides sont ainsi utilisées traditionnellement comme poison de pêche (Alabdul Magid, 2005).

Certains saponosides à squelette cycloartane comme l'oleifolioside A, oleifolioside B, cyclocanthoside E et astragaloside II, isolés tous de l'espèce *Astragalus oleifolius*, sont très actifs contre la leishmaniose (Ozipek *et al.*, 2005).

Un bon nombre de saponosides assurent la défense des végétaux contre l'attaque microbienne, il a été démontré que les trois saponines isolées de *Hedera helix* L. (Araliaceae), l'hédérine (alpha et beta) et hédéracolchiside A1, possèdent une activité antileishmaniale (Delmas, 2000). Les résultats ont montré que ces saponines présentent une forte action antiproliférative dans toutes les étapes de développement du parasite *Leishmania infantum* (Delmas, 2000).

Chapitre III

Activités biologiques

III.1. Généralités

L'oxygène, molécule indispensable à la vie, est susceptible d'entraîner des effets dommageables dans l'organisme via la formation de radicaux libres et d'espèces oxygénées activées (EOA). Ces notions ne sont toutefois pas nouvelles puisque, vers le milieu des années 50, **Gerschman et Hartman** avaient déjà évoqué la toxicité de l'oxygène et la « free radical theory » pour expliquer le processus de vieillissement. **En 1969**, les Américains **McCord et Fridovich** isolent à partir de globules rouges humains, un système enzymatique antioxydant, le Superoxyde dismutase (SOD), capable d'éliminer l'anion superoxyde, démontrant ainsi pour la première fois, que notre organisme produit des EOA. Cette découverte sera le point de départ, dans le monde entier, de nombreuses recherches sur le stress oxydant et les antioxydants (**Haleng et al., 2007**).

III.2. Stress Oxydant

Depuis quelques années, le monde des sciences biologiques et médicales est envahi par un nouveau concept, celui du « **stress oxydant** », c'est-à-dire d'une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive de radicaux oxygénés toxiques, situation que les chercheurs impliquent dans la plupart des maladies humaines.

Le stress oxydatif correspond à une perturbation de l'état oxydant intracellulaire, induite soit par une production excessive de molécules particulièrement nocives qui viennent de l'oxygène que nous respirons pour vivre que l'on appelle les radicaux libres, soit par diminution de la capacité de défenses antioxydantes de l'organisme (**Sorg, 2004**). Ce déséquilibre peut avoir plusieurs origines, citons la surproduction endogène d'agents prooxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (tabac, alcool, médicaments, rayons gamma, rayons ultraviolets, herbicides, ozone, amiante, métaux toxiques) (**Pincemail et al., 2002 ; Sorg, 2004 ; Kœchlin- Ramonatxo, 2006**). Pour rapparer les électrons célibataires, les EOR attaquent toutes molécules susceptibles de donner un électron.

Les protéines les lipides, l'acide désoxyribonucléique et l'ADN sont les cibles biologiques les plus vulnérables à cette agression, ceci a pour conséquence l'apparition de dégâts cellulaires et tissulaires souvent irréversibles. (**Valko et al., 2006**).

III.3. Origine des radicaux libres

Par sa configuration électronique, l'oxygène moléculaire est un radical libre. Il possède en effet deux électrons non appariés. Heureusement, un blocage cinétique limite sa réactivité : les spins de ces deux électrons célibataires sont parallèles lui attribuant une stabilité relativement grande (Asmus et Bonifacic, 2000). Cependant, dans l'organisme une partie de cet oxygène moléculaire peut capter de manière univalente et séquentielle un électron conduisant alors la formation du chef de file des espèces oxygénées réactives : l'anion superoxyde ($O_2 + 1e^- \rightarrow O_2^{\cdot-}$). C'est ainsi que dans la mitochondrie, à l'état physiologique, il existe lors du transport électronique le long de la chaîne respiratoire, une fuite d'électrons au niveau du complexe I et III, à l'origine de la production de l' $O_2^{\cdot-}$. La poussée respiratoire des polynucléaires neutrophiles (respiratory burst) et les oxydases (xanthine oxydase, NO synthase, eicosanoïdes) constituent également des sources cellulaires de la production d'anion superoxyde (Ji, 2001).

Ce radical superoxyde va alors conduire au cours de véritable chaîne d'oxydoréductions à la formation de nombreuses espèces très réactives (Figure 18). Les EOR regroupent non seulement des radicaux libres telles que l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) ou le radical hydroxyle (OH^{\cdot}) mais également des dérivés non radicalaires telles que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou les hydroperoxydes ($ROOH$) (Halliwell et Gutteridge, 1989).

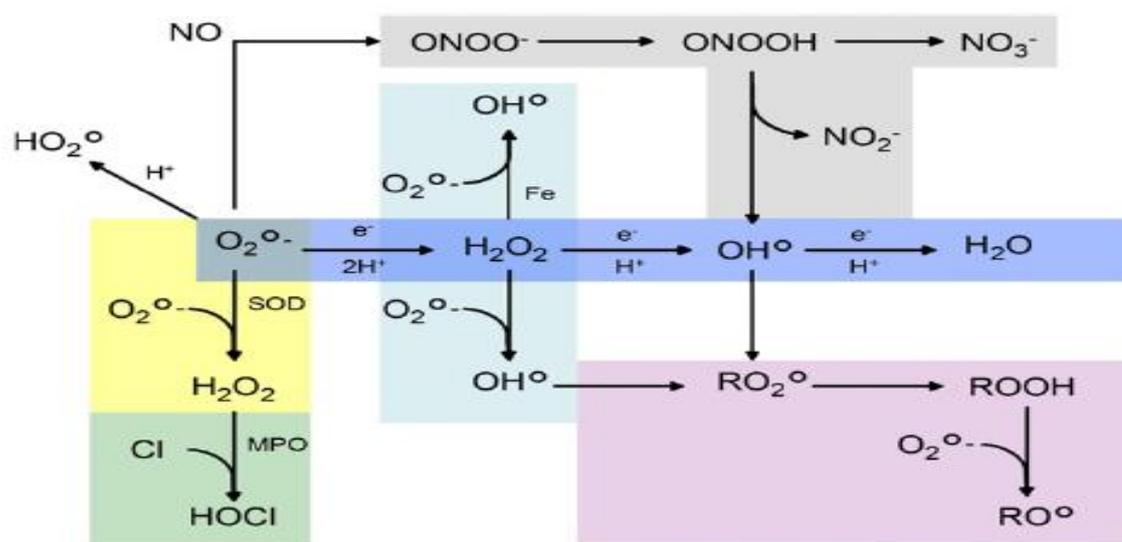


Figure 18 : Formation en cascade des différentes espèces oxygénées réactives à partir du radical superoxyde.

III.4. Implications pathologiques des EOR

Les radicaux libres provoquent des altérations de l'homéostasie cellulaire de l'organisme en raison de leur réactivité très élevée avec divers substrats biologiques. Il faut souligner que le stress oxydant est le facteur principal et originel déclenchant de nombreuses pathologies. C'est le cas des cancers et des maladies neurodégénératives (ataxies, sclérose latérale, maladie d'Alzheimer) (**tableau 5**). Dans de nombreuses autres maladies, le stress oxydant est secondaire à l'établissement de la pathologie, mais participe à ses complications immunitaires ou vasculaires. C'est le cas de maladies infectieuses comme le sida ou le choc septique, le diabète, la maladie de Parkinson ou l'insuffisance rénale (**Favier, 2003 ; 2006**). Le rôle du stress oxydant a également été évoqué même dans des processus physiologiques tel que le vieillissement (**Martinez-Cayuela, 1995; Lehucher-Michel *et al.*, 2001; Sorg, 2004; Valko *et al.*, 2007**).

Tableau (5) : Les principales affections liées à la production des EOR.

Pathologies	Références
Lésions de reperfusion post-ischémique	(Zweier <i>et al.</i>, 2006)
Maladies auto-immunes	(Halliwell <i>et al.</i>, 1990)
Arthrite rhumatoïde	(Ahsan <i>et al.</i>, 2003)
Maladies inflammatoires	(Densiov <i>et al.</i>, 2005)
Athérosclérose	(Harrison <i>et al.</i>, 2003)
Maladies d'Alzheimer, de parkinson	(Sorg, 2004)
Emphysème	(Lehucher Michel <i>et al.</i>, 2001)
Diabète sucré	(Pal Yu, 1994)
Certains cancers	(Valko <i>et al.</i>, 2007)
Anémie drépanocytaire	(Martinez-Cayuela, 1995)

III.5. Mécanismes de défense contre le stress oxydant

Un stress oxydatif peut provoquer un excès des EOR dans le corps humain. Le système de défense antioxydant joue un rôle très important pour le maintien d'un niveau non cytotoxique des radicaux libres. La relation entre le système de défense antioxydant et la gestion du stress est un enjeu intense qui a attiré l'attention des chercheurs. Comme il a déjà été mentionné,

L'antioxydant peut retarder ou empêcher l'oxydation d'autres substances chimiques oxydables. Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances, comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques, mais aussi des molécules antiradicalaires « scavengers », qui piègent les radicaux libres (vitamines antioxydantes A, C, E), thiols et β carotène) (Cano *et al.*, 2007).

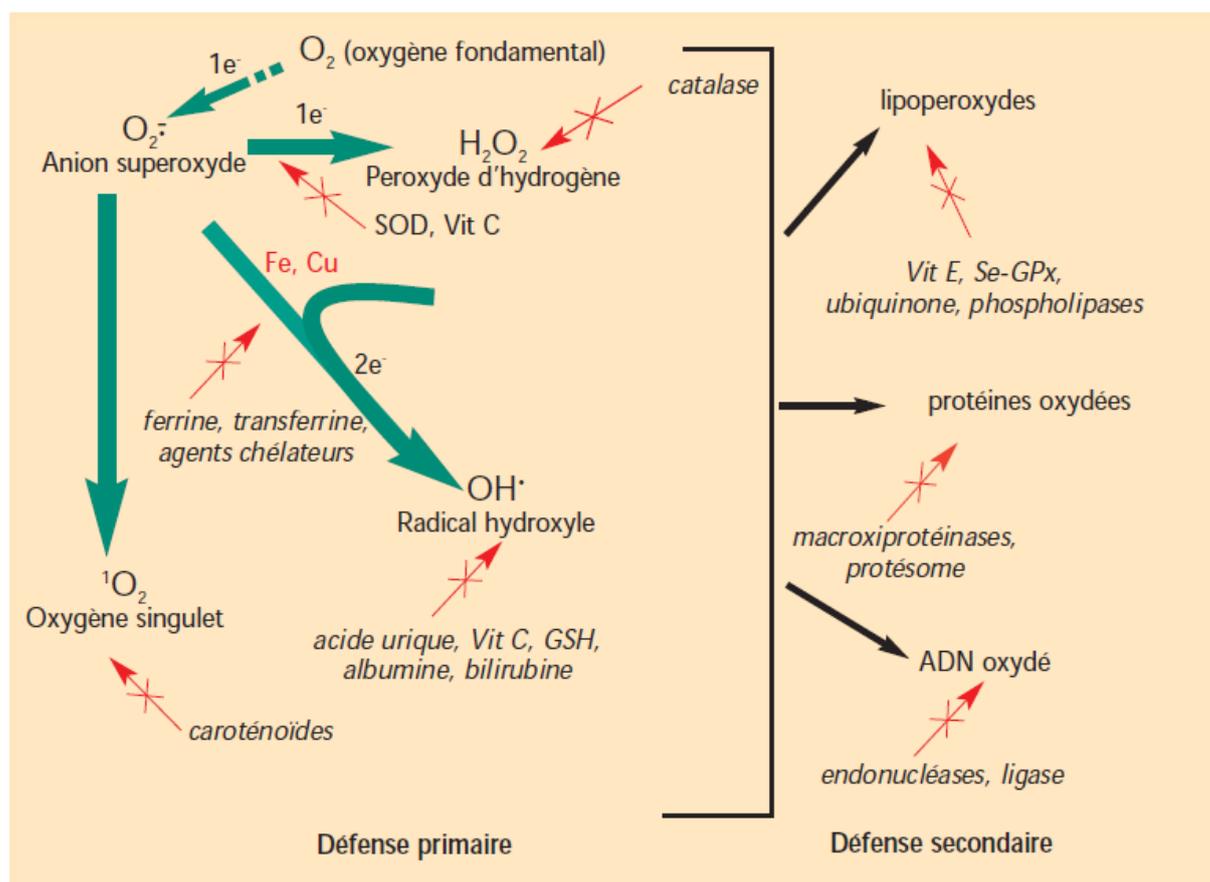


Figure 19 : Régulation de la production des espèces oxygénées activées (EOA) par des systèmes antioxydants de défenses primaire et secondaire. SOD : superoxyde-dismutase ; Se - GPx : glutathion-peroxydase sélénio-dépendante ; GSH : glutathion.

La nature des systèmes antioxydants se diffère selon les tissus et les types cellulaires, l'environnement intracellulaire et les facteurs extérieurs. Les défenses antioxydantes de notre organisme se répartissent en systèmes enzymatiques et systèmes non enzymatiques (Goudable *et al.*, 1997).

III.5.1. Systèmes antioxydants enzymatiques endogène

Les antioxydants enzymatiques (la Superoxyde Dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase et la glutathion réductase) sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les EOR (Garait, 2006).

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

Dans la cellule, on la trouve essentiellement dans le cytosol et les mitochondries. C'est une des défenses antioxydantes les plus importantes de l'organisme (Ichai *et al.*, 2011). Contenant un hème, localisé essentiellement dans les peroxysomes. La catalase est liée au NADPH qui la protège et améliore son activité (Ichai *et al.*, 2011).

➤ **Les thiorédoxines** : Les thiorédoxines sont des enzymes qui réduisent les ponts disulfures. Une fois oxydées à leur tour, elles sont régénérées par la thiorédoxine réductase. Elles peuvent être inhibées par la thioredoxin-interacting protein (Txnip). Cette dernière peut être activée en cas d'hyperglycémie par exemple : une cascade signalétique impliquant la p38 MAP kinase induit l'expression de Txnip, qui inhibe alors l'activité de la thiorédoxine. L'équilibre redox est rompu et on voit apparaître un stress oxydant.

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. Systèmes antioxydants endogènes non enzymatiques

À côté des systèmes enzymatiques, l'organisme possède une seconde ligne de défense, « les piègeurs de radicaux libres », dont l'importance peut être capitale lorsque les activités enzymatiques sont insuffisantes. Le rôle des piègeurs de radicaux libres est de capter l'électron célibataire du radical qu'il rencontre et former un nouveau radical qui sera à son tour régénéré par des systèmes spécifiques en aval, ou détruit et éliminé. Ces piègeurs de radicaux libres peuvent être d'origine endogène (synthétisés par l'organisme), ou pour la majorité apportée par l'alimentation.

➤ **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 a 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. 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).

➤ **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 ainsi que de chélater les différents métaux de transition (**Gulcin et al., 2006**).

➤ **Les xanthones** : La manguiférine est une xanthone qui possède la propriété d'inhibition envers la peroxydation des lipides, ainsi que des propriétés de capteurs de radicaux libres contre les anions super oxydes (**Diallo, 2005**).

III.6. Mécanisme d'action des antioxydants

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulet, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la compléxation d'ions et de métaux de transition (**Favier, 2006**). Les antioxydants naturels semblent contribuer de manière significative à la prévention des maladies telles que le cancer ou encore des maladies cardio-vasculaires (**Diallo, 2005**).

Tableau 6 : mécanisme d'action de quelques antioxydants

	Nature	Mode d'action
Antioxydants non enzymatiques	Vitamine E	Neutralise les radicaux libres
	Vitamine C	Participe à la réaction d'oxydoréduction
	Beta Carotène	Fixation des métaux de transition
Antioxydants enzymatiques	Superoxyde dismutase	Catalyse la dismutation de l'anion superoxyde
	Catalase	Métabolise H ₂ O ₂
	Clutathion peroxydase	Action réductrice sur H ₂ O ₂ et les hydroperoxydes

III.7. Quelques méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

Dans les systèmes biologiques, le stress oxydant est souvent caractérisé par les paramètres suivants (**Powers et Jackson, 2008**) :

- Une augmentation de la formation de radicaux libres ou d'autres oxydants
- Un déséquilibre du statut redox cellulaire

- Une diminution du pool d'antioxydants non-enzymatiques
- Une augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes
- Une augmentation des molécules témoins des dégâts oxydatifs (par exemple sur les lipides, les protéines ou encore l'ADN).

Certaines méthodes pratiques ont été développées afin de mesurer l'activité antioxydante d'une molécule, on peut coupler plusieurs tests. En général, les méthodes pour déterminer la capacité antioxydante totale ont été divisées en deux groupes principaux : les tests basés sur une réaction de transfert d'un seul électron et les tests basés sur un transfert d'atome d'hydrogène (**Prior et al., 2005**).

III.7.1. Test au DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle)

La molécule de DPPH. (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est définie comme un radical libre stable par la vertu de la délocalisation de l'électron disponible, qui provoque la couleur violette profonde, caractérisée par une absorption. Il réagit avec des groupements amine, les phénols et les acides. Quand la solution de DPPH est mélangée à celle d'une substance qui peut donner un atome d'hydrogène ou un électron, alors ceci provoque la forme réduite (DPPH-H) avec la perte de la couleur violette et l'apparition d'une couleur jaune pâle due à la présence de groupement picryl et l'absorbance est lue à 517 nm (**Gülçin et al., 2003**). Le pourcentage de réduction du DPPH est calculé selon la formule suivante :

$$\% = ((\text{Abs C} - \text{Abs E}) / \text{Abs C}) \times 100$$

Abs C : Absorbance du control.

Abs E : Absorbance d'échantillon.

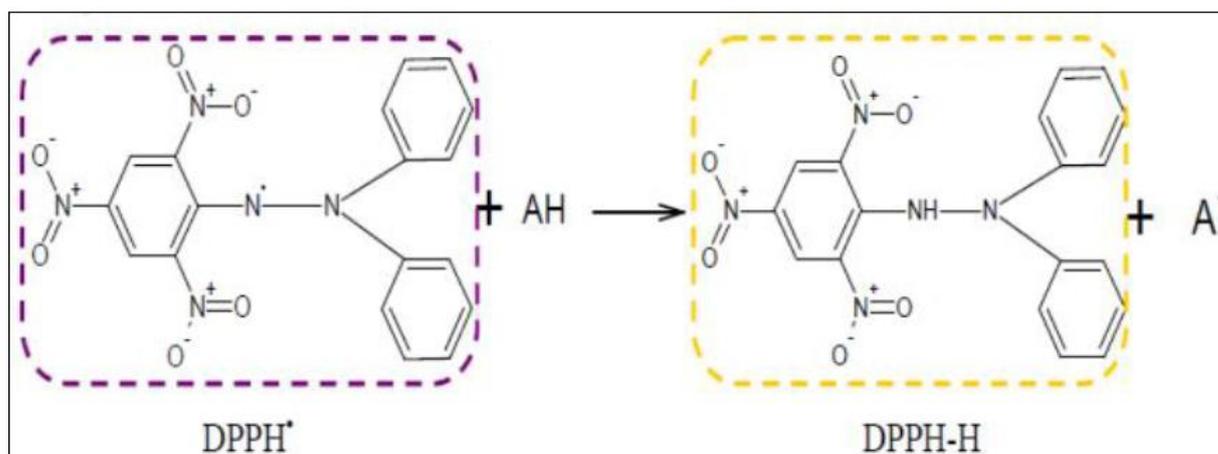


Figure 20 : Mécanisme réactionnel entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant (AH) (**Thomas, 2011**).

III.7.2. Test de l'activité antiradicalaire pour le radical ABTS^{•+}

La méthode est basée sur la capacité des composés à réduire le radical cation ABTS^{•+}, acide 2,2-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique). Le radical est formé par l'oxydation de l'ABTS incolore avec différents composés, comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ou le persulfate de potassium ; Cette réaction est suivie par spectrophotométrie à 734 nm (**Re et al., 1999**).

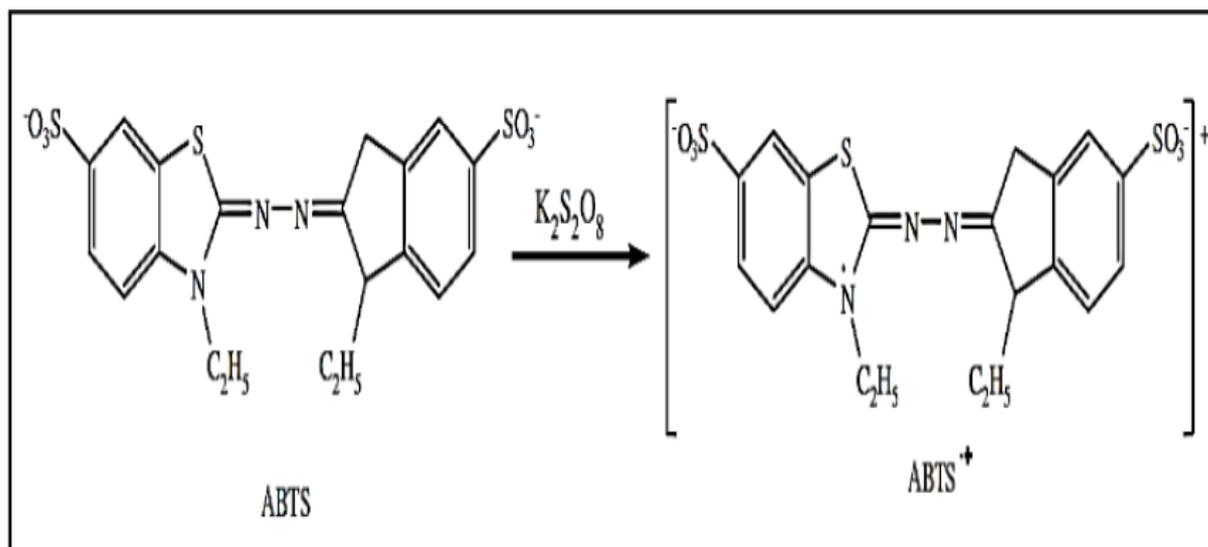


Figure 21 : oxydation de l'ABTS par le persulfate de potassium et génération de ABTS^{•+} (**Gülçin, 2012**).

III.7.3. Test de la capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC)

La méthode CUPRAC (Cupric ion Reducing Antioxidant Capacity) est basée sur le suivi de la diminution de l'absorbance accrue du complexe Néocuproène (NC), cuivre (Cu⁺²) Nc₂-Cu⁺². En effet, en présence d'un agent antioxydant, le complexe cuivre-neocuproène est réduit et cette réaction est quantifiée spectrophotométriquement à une longueur d'onde de 450 nm (**Apak et al., 2004**). Le principe de ce test se base sur la conversion des hydroxyles phénoliques en quinones à travers la réduction du complexe Cu⁺²-Nc, produisant ainsi un complexe chromogène de Cu⁺²-Nc qui absorbe à 450 nm (**Figure 22**).

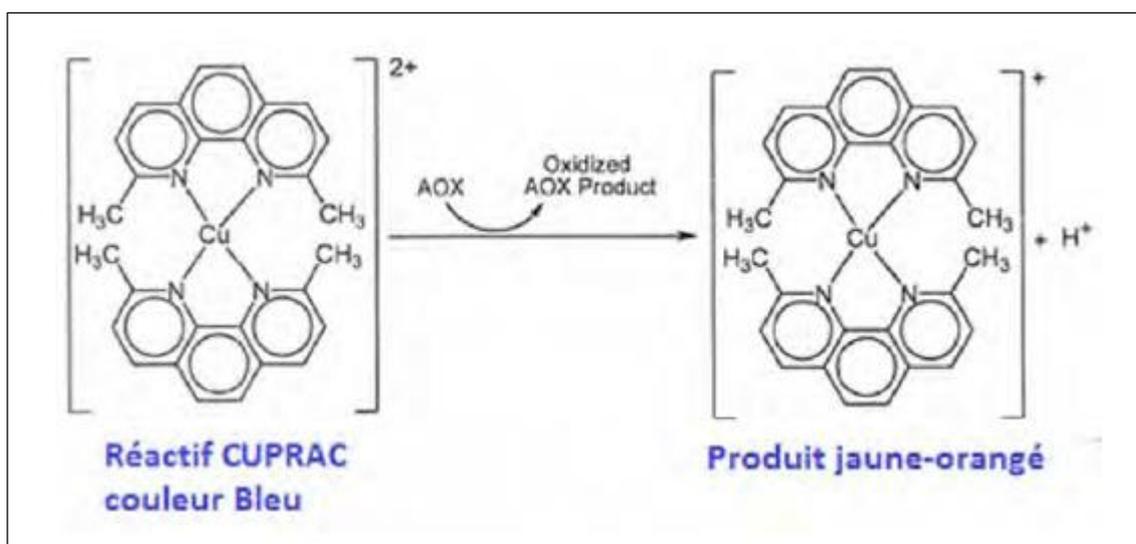


Figure 22 : Réduction du complexe chromogène de Cu^{+2} -Nc.

III.8. Inflammation

L'inflammation est un moyen de défense naturelle des organismes supérieurs contre toute agression extérieure (infection, blessure, agression mécanique, etc...). Elle a pour rôle essentiel l'élimination de l'agent pathogène et la réparation du tissu lésé. L'inflammation se manifeste par quatre signes cardinaux (la rougeur, l'œdème, la chaleur, la douleur) résultant d'une augmentation du flux sanguin, d'une augmentation de la perméabilité capillaire permettant aux compléments, aux anticorps et aux cytokines de franchir la barrière endothéliale et de la migration des leucocytes vers le tissu lésé pour une réparation de la lésion. La réponse inflammatoire se déroule en quatre étapes : la reconnaissance des signaux de danger, le recrutement de cellules sur le site d'infection, l'élimination du pathogène et la résolution de l'inflammation conduisant à un retour à l'homéostasie et à la cicatrisation du tissu lésé (Barton, 2008). En absence d'une résolution, s'installe une inflammation chronique.

III.8.1. L'inflammation aigüe

L'inflammation aigüe est la réponse immédiate de l'organisme à un agent agresseur, c'est une réponse physiologique complexe qui implique la participation des deux branches du système immunitaire : l'immunité innée et l'immunité adaptative. Cette réponse de courte durée (quelques jours). Elle vise l'élimination de l'agent causal du dommage tissulaire et la réparation du tissu affecté (Serhan *et al.*, 2015).

Les inflammations aiguës guérissent spontanément ou avec un traitement, mais peuvent laisser des séquelles si la destruction tissulaire est importante (Charles *et al.*, 2010). L'inflammation aiguë se constitue en trois phases :

Phase vasculaire

Il s'agit d'une vasoconstriction artériolaire, très brève de quelques secondes. Elle est due à l'action du système sympathique, et est très rapidement ressentie puisque douloureuse, expliquée par la libération d'histamine, de sérotonine et de kinine, l'excitabilité des terminaisons nerveuses en est la conséquence et va conforter le processus douloureux. Cette constriction n'est pas innocente sur les plaquettes présentes dans la circulation, laquelle est perturbée. Ces plaquettes vont alors s'activer. Très vite à cette vasoconstriction, va faire suite une vasodilatation des vaisseaux sanguins. Le débit local est augmenté et la perméabilité des capillaires est exacerbée, ce qui explique l'extravasation des cellules sanguines (diapédèse) (Figure 23). Ce qui explique en partie la constitution de la chaleur et de la rougeur. La migration des cellules s'accompagne d'un transfert de plasma qui crée l'œdème.

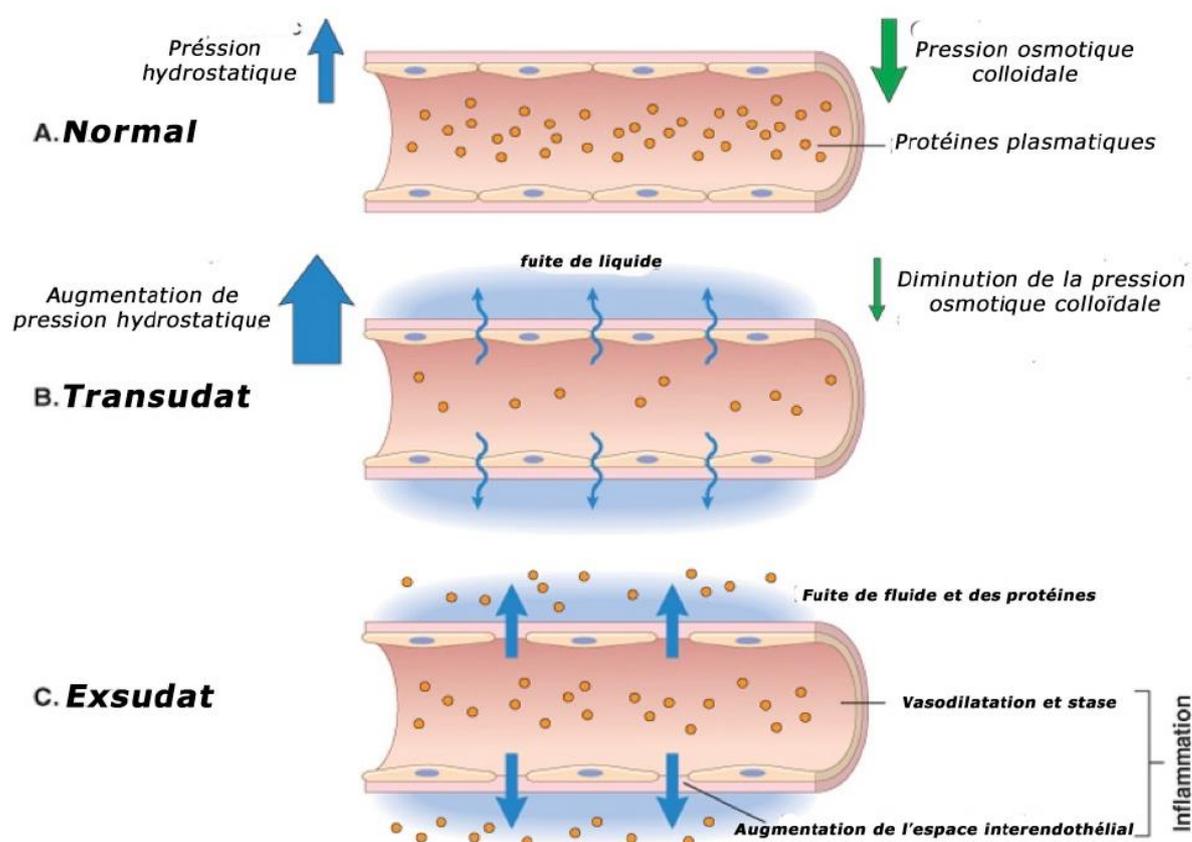


Figure 23 : Formation du transsudat et d'exsudat (Kumar *et al.*, 2007).

La phase cellulaire (recrutement des leucocytes)

Les phénomènes vasculo-exsudatifs initiaux permettent l'arrivée dans le foyer inflammatoire des leucocytes. Les premiers sur place (environ 6 heures) sont les polynucléaires. Les polynucléaires sont les premières cellules qui migrent vers le site enflammé (6 à 24 heures), un peu plus tard et après 24 à 48 heures les monocytes et les lymphocytes sont recrutés. Elles se déplacent alors directement vers l'agent causal de l'inflammation, guidées par un gradient de concentrations de substances dites chimio-attractantes.

La destruction de l'agent pathogène est donc assurée par les polynucléaires qui vont déclencher la phagocytose et la libération de différentes enzymes hydrolytiques (protéase, élastase et de collagénase...etc). Cependant, les macrophages vont nettoyer le foyer inflammatoire et éliminer les débris cellulaires et tissulaires.

Phase de résolution

La phase de résolution, dite de réparation, dépend du degré des lésions tissulaires. En effet, dans les conditions les plus favorables, les agents agresseurs sont éliminés par les PMNs, et les produits de dégradation ainsi que les débris cellulaires sont phagocytés par les macrophages. Les macrophages vont alors sécréter des cytokines et des médiateurs qui vont induire la phase de cicatrisation et de régénération tissulaire. Le retour à un état physiologique consiste dans un premier temps en la réparation de l'endothélium par les cellules endothéliales elles-mêmes, ces cellules pouvant produire et remodeler les éléments de leur stroma (collagène de type I et III) ou de leur lame basale (collagène de type IV et V, laminine). Si l'atteinte est plus sérieuse et entraîne une destruction du tissu atteint, d'autres cellules vont intervenir pour réparer le nouveau tissu. Les macrophages vont participer à l'angiogenèse, mais ce sont surtout les fibrocytes puis les fibroblastes qui vont produire les protéines matricielles des tissus intercellulaires, comme le collagène, la fibronectine et la laminine pour permettre la reconstruction des tissus. Le système de l'angiogenèse est ainsi remis au repos et la réaction inflammatoire peut s'éteindre (Weill *et al.*, 2003).

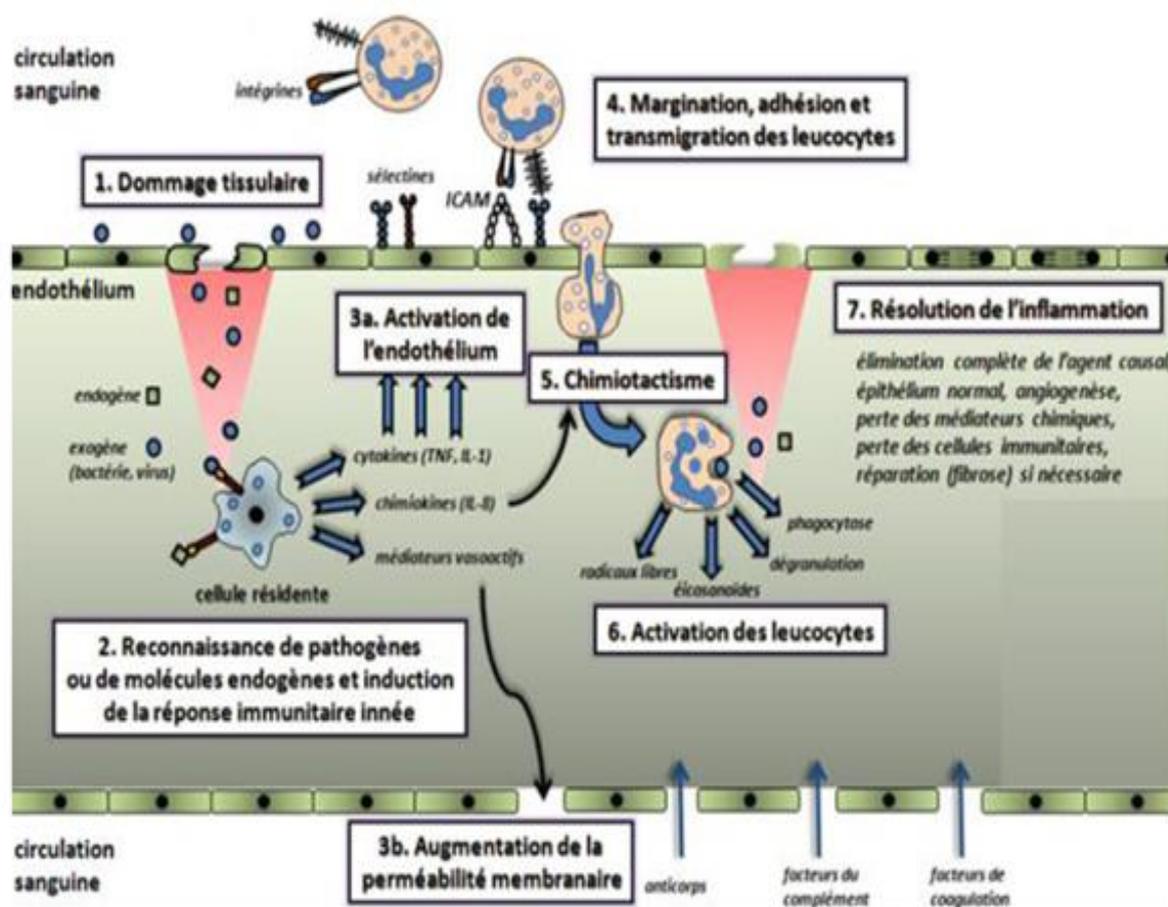


Figure 24 : Principales étapes de l'inflammation aiguë (Funaro *et al.*, 2009).

III.8.2. L'inflammation chronique

L'inflammation chronique correspond à une inflammation n'ayant aucune tendance à la guérison spontanée et qui évolue en persistant ou en s'aggravant pendant plusieurs mois ou plusieurs années. Une infiltration excessive des leucocytes au niveau du site inflammatoire et une mauvaise élimination de l'agent causal de l'inflammation sont à l'origine du développement de l'inflammation chronique (Dorward *et al.*, 2012).

Dans de nombreux cas, la réponse inflammatoire chronique peut persister pendant de longues périodes (plusieurs mois ou années). Elle est considérée comme être causée par l'engagement persistant des réponses de l'immunité innée et acquise, comme dans la polyarthrite rhumatoïde, rejet de l'allogreffe chronique, dans la berylliose, et dans l'inflammation granulomateuse. Il est prouvé que les macrophages dans ces lésions produisent une série de médiateurs pro-inflammatoires qui activent les fibroblastes pour fixer le collagène et activer les autres macrophages et lymphocytes pour libérer des médiateurs responsables des réponses inflammatoires. L'inflammation chronique est initialement déclenchée par des réponses

vasculaires qui impliquent l'apparition de molécules d'adhésion sur la surface des cellules endothéliales qui vont spécifiquement entrainer l'adhésion des lymphocytes et des monocytes, et permettent leur transmigration dans le compartiment extravasculaire (**Charles *et al.*, 2010**). Tout comme dans la réponse inflammatoire aiguë, les lymphocytes et les monocytes, subissent un processus d'activation qui favorise l'adhérence et la transmigration de ces cellules dans le compartiment extravasculaire. En tout type de réponse inflammatoire, les différences entre les types de molécules d'adhésion exprimées sur les cellules endothéliales détermineront le type de leucocytes qui migrent (**Nourshargh *et al.*, 2006; Charles *et al.*, 2010**).

III.8.3. Les anti-inflammatoires

Un anti-inflammatoire est un médicament destiné à combattre une inflammation. Il s'agit d'un groupe de molécules chimiques destinées à traiter, une réaction inflammatoire et les maladies qui en résultent. Ces médicaments ont des structures chimiques très variées. Toutefois, ils présentent des caractères communs :

-Sur le plan pharmacologique : Tous les anti-inflammatoires, inhibent la synthèse des prostaglandines.

-Sur le plan activité : Ils possèdent, en plus de leurs activités anti-inflammatoires, des effets analgésiques et antipyrétiques.

-Sur le plan chimique : Ils présentent des fonctions acides ou des caractères acides.

III.8.3.1. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens

C'est 1860 que l'acide salicylique était synthétisé et en 1875 utilisé pour la première fois dans le traitement du rhumatisme articulaire aigu. en 1946 sont découvertes les pouvoirs anti-inflammatoires de la phénylbutazone, celles de l'indométacine datant de 1963. Ces molécules ouvrent la voie de la classe thérapeutique des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), ainsi dénommés de par leurs propriétés anti-inflammatoires sans avoir l'action des stéroïdes, à la différence des glucocorticoïdes.

Les AINS agissent tous en inhibant une enzyme membranaire, la cyclo-oxygénase (COX). L'inhibition de cette enzyme par les AINS est responsable d'une diminution de production des prostaglandines E2 et I2, médiateurs importants des phénomènes inflammatoires. Mais l'inhibition de ces prostaglandines ainsi que du thromboxane A2 dans l'ensemble des tissus rend compte des effets indésirables potentiels de la plupart des AINS :

Diminution de la protection de la muqueuse gastro-intestinale (responsable d'ulcères gastro-duodénaux) et diminution de l'agrégabilité plaquettaire (responsable d'une augmentation du risque hémorragique).

En 1990, l'équipe de **Needleman** montre l'existence de deux isoformes de cyclo-oxygénase : la COX-1, constitutive, et la COX-2, inductible sous l'action de certains mécanismes pro-inflammatoires. Moins de 10 ans plus tard apparaissaient les premiers anti-inflammatoires dits anti-COX-2 sélectifs, respectant la COX-1, réduisant les risques d'effets secondaires des AINS « classiques » (**Noirez et al., 2000**).

III.8.3.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) ou les glucocorticoïdes constituent une vaste famille de médicaments dérivés du cortisol. Ils représentent le traitement le plus efficace utilisé pour les maladies inflammatoires chroniques tels que l'asthme, l'arthrite rhumatoïde, les maladies inflammatoires de l'intestin et les maladies auto-immunes.

Dans les tissus cibles, les glucocorticoïdes se fixent à leurs récepteurs des glucocorticoïdes (GR) du cytoplasme de la cellule. Après quoi, le complexe récepteur-ligand formé pénètre dans le noyau cellulaire où il se fixe à de nombreux éléments de réponse aux glucocorticoïdes dans la région du promoteur des gènes-cibles. Le récepteur, ainsi fixé à la molécule d'ADN interagit avec les facteurs de transcription basiques, provoquant une augmentation de l'expression génique de gènes-cibles spécifiques. Ce processus est appelé transactivation et conditionne la plupart des effets secondaires métaboliques et cardiovasculaires des glucocorticoïdes.

Le mécanisme opposé est appelé transrépression. Le récepteur hormonal activé interagit avec des facteurs de transcription spécifiques et prévient la transcription des gènes-cibles. Les glucocorticoïdes sont capables d'empêcher la transcription de tous les gènes immuns, incluant celui codant IL-2 (**Barnes, 1998**).

Les glucocorticoïdes ordinaires ne font pas de différence entre la transactivation et la transrépression, et influencent à la fois les gènes immuns "voulus" et ceux "non voulus" régulant les fonctions métaboliques et cardiovasculaires. Actuellement, les efforts de recherche visent à découvrir des glucocorticoïdes agissant sélectivement qui seraient capables de ne réprimer que le système immunitaire.

III.8.3.3. Anti-inflammatoires d'origine végétale

L'existence de substance anti-inflammatoire est connue de très longue date puisque c'est à la fin du premier siècle de notre ère qu'un médecin grec avait découvert les vertus antalgiques des feuilles de saule et parmi les catégories des anti-inflammatoires, on retrouve également les anti-inflammatoires dits « naturels », formés par plusieurs groupes chimiques dont les saponosides et les polyphénols. Beaucoup sont présumés agir en bloquant les voies de la cyclooxygénase et la lipoxycgénase ainsi que par d'autres mécanismes.

En effet, des activités anti-inflammatoires des saponosides, ont été signalées dans plusieurs revues comme celles citées par El Beyrouthy en 2008 (**El Beyrouthy *et al.*, 2008**), et par Lattanzion en 2011 (**Dall'Acqua *et al.*, 2010, Lattanzio *et al.*, 2011**). Certains saponosides forment le point de départ pour la semi- synthèse de médicaments stéroïdiens (**Solignac, 2004**).

2^{ème} partie :

Partie expérimentale

Chapitre IV

Matériels et Méthodes

IV.1. Aperçu et but de travail

Après une recherche bibliographique exhaustive notre espèce du genre *Anagallis* n'a fait l'objet d'aucune étude phytochimique ni biologique antérieures.

Le présent travail a pour but de rechercher de nouvelles molécules et de mettre en évidence les activités biologiques présentes dans cette espèce en vue de valoriser la richesse végétale de l'Algérie en plantes médicinales endémiques.

Après l'extraction de la plante entière du genre *Anagallis*, l'extrait brut a été fractionné par la technique chromatographique sous vide en phase inverse (VLC). Ce fractionnement, suivi de plusieurs étapes de séparation et purification chromatographiques, conduisant à l'isolement de 2 composés naturels purs.

Notre étude a porté aussi sur l'évaluation de l'activité antioxydante par 3 méthodes (DPPH•, ABTS+• et CUPRAC) et l'activité anti-inflammatoire *in vivo* de l'extrait brut éthanolique ainsi que des fractions chromatographiques provenant de cet extrait.

IV.2. Matériel et méthode

IV.2.1. Matériel végétal

IV.2.1.1. Récolte de la plante du genre *Anagallis*

La plante *Anagallis* a été récoltée dans la région de Righia de la wilaya d'El Taref au mois de Mai 2020. La récolte de la plante a été effectuée très soigneusement de manière à ne pas détériorer les éléments organiques et minéraux présents.

L'identification botanique de la plante étudiée a été réalisée par Monsieur KABOUCHE Kamel. Après l'avoir séché dans un endroit sec, le matériel végétal est ensuite réduit en poudre fine à l'aide d'un broyage électrique



Figure 25 : Situation géographique de la wilaya de collecte d'*Anagallis* (Google Earth.,2021) [2].

IV.3. Méthodes d'analyses phytochimiques

IV.3.1. Méthodes chromatographiques

IV.3.1.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince (CCM) est utilisée à chaque étape de notre travail pour faire le suivi et le contrôle des purifications. La chromatographie sur couche mince (CCM), est une méthode d'analyse qui permet d'avoir des informations sur la composition chimique et la pureté des fractions analysées.

Les plaques utilisées durant la réalisation de ce travail sont des plaques prêtes à l'emploi à support en aluminium en phase normale Kieselgel 60 F254 Merck, 250 µm (20x20 cm). Le développement des plaques CCM a été effectué dans des cuves en verre pré-saturées en éluant approprié (un solvant ou un système solvant selon la polarité des molécules que l'on souhaite séparer).

Des systèmes de solvants ont été utilisés pour faire éluer les extraits, et les composés purs sur les plaques CCM, soit des systèmes binaire ou tertiaire solvants selon le type des produits et leurs polarités.

Les systèmes utilisés sont :

CHCl₃: MeOH: H₂O: 70: 30: 5;

CHCl₃: MeOH: 80: 20;

AcOEt : MeOH : H₂O: 100 : 10 : 10.

L'observation des CCM s'effectue en lumière visible et sous UV (254 et 365 nm) dans une chambre noire, avant la révélation par une solution de la vanilline sulfurique (0.5 g de la vanilline, dissous dans 100 ml du méthanol, plus 1 ml d'acide sulfurique). Cela permet de rassembler judicieusement les fractions récoltées suite aux différentes séparations chromatographiques.

IV.3.1.2. 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 greffée Lichroprep RP-18 Merck (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.

La silice conditionnée dans l'entonnoir cylindrique doit avoir un poids 30 fois supérieur de celui de l'extrait à déposer à la surface de la phase stationnaire (pour 1 g d'échantillon on utilise 30 g de silice).

L'élution est réalisée par un système solvant H₂O : MeOH (70 :30 à 0 :100).

IV.3.1.3. Chromatographie sur colonne ouverte (CC)

Pour les chromatographies sur colonnes ouvertes, deux types de phases stationnaires ont été mises en œuvre dans des colonnes en verre. La taille et le diamètre de la colonne sont choisis en fonction de la quantité d'échantillon à purifier et de la résolution souhaitée.

Les phases stationnaires utilisées sont :

- En phase normale, une silice Kiesel gel Merck (70-230 mesh). La quantité de silice utilisée est généralement 40 fois supérieure à la quantité d'échantillon déposé.
- Sur polyamide SC6.

IV.3.2. Méthodes d'analyses physico-chimiques

IV.3.2.1. Spectrophotométrie UV-visible

Les spectres UV-visible des composés ont été mesurés dans le méthanol à l'aide d'un spectrophotomètre (NICOLET évolution 100). Grâce à son monochromateur, le lecteur offre une grande sensibilité aux essais.

Pour l'évaluation de l'activité antioxydante, un lecteur de microplaque de type Perkin Elmer (EnSpire Alpha Plate Reader) multimode, des microplaques en plastique de 96 puits et des micropipettes réglables ont été utilisés au cours de l'exploration de l'activité antioxydante.

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

IV.4.1. Extraction

La plante entière, séchée et broyée (100 g) a été macérée dans un mélange hydro-alcoolique : Ethanol/Eau ; (70: 30 v/v) pendant 24 heures à température ambiante. Cette macération est répétée 3 fois avec renouvellement du système, chaque macération dure 24 heures. Après filtration et concentration à sec à température de 45°C, la solution extractive obtenue est concentrée par évaporation pour donner 24g d'extrait brut. Le protocole suivi figure dans les photos ci-dessous (**Figure 26**).



Figure 26 : Les différentes étapes de macération, filtration et évaporation de l'extrait hydroalcooliques de la plante *Anagallis*

IV.4.2. Fractionnement préliminaire de l'extrait éthanolique brut de la plante du genre *Anagallis*

24g l'extrait éthanolique a été fractionné par chromatographie liquide sous vide (VLC), en phase inverse C₁₈ avec l'éluant H₂O-MeOH (70/30, 60/40, 40/60, 20/80, 0/100 : v/v). Des fractions de 200 ml (*3) sont recueillies pour chaque mélange (**Figure 27**).



Figure 27 : Procédé du fractionnement de l'extrait éthanolique par VLC

Ces fractions subissent une chromatographie sur couche mince (CCM) avec de différents systèmes. Les plaques obtenues sont ensuite observées sous la lumière UV à 254 et 365 nm puis révélées à la vanilline sulfurique à 1% puis chauffées à 100 °C.

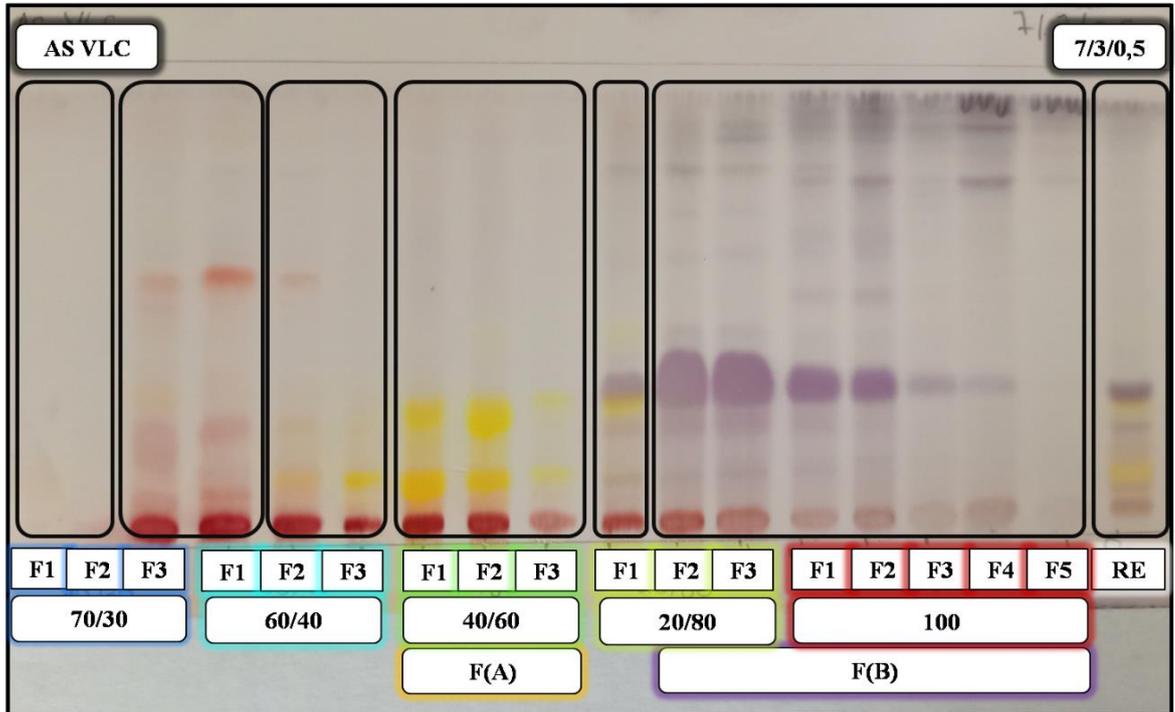


Figure 28 : CCM récapitulatif des fractions de la VLC de l'extrait éthanolique brut.

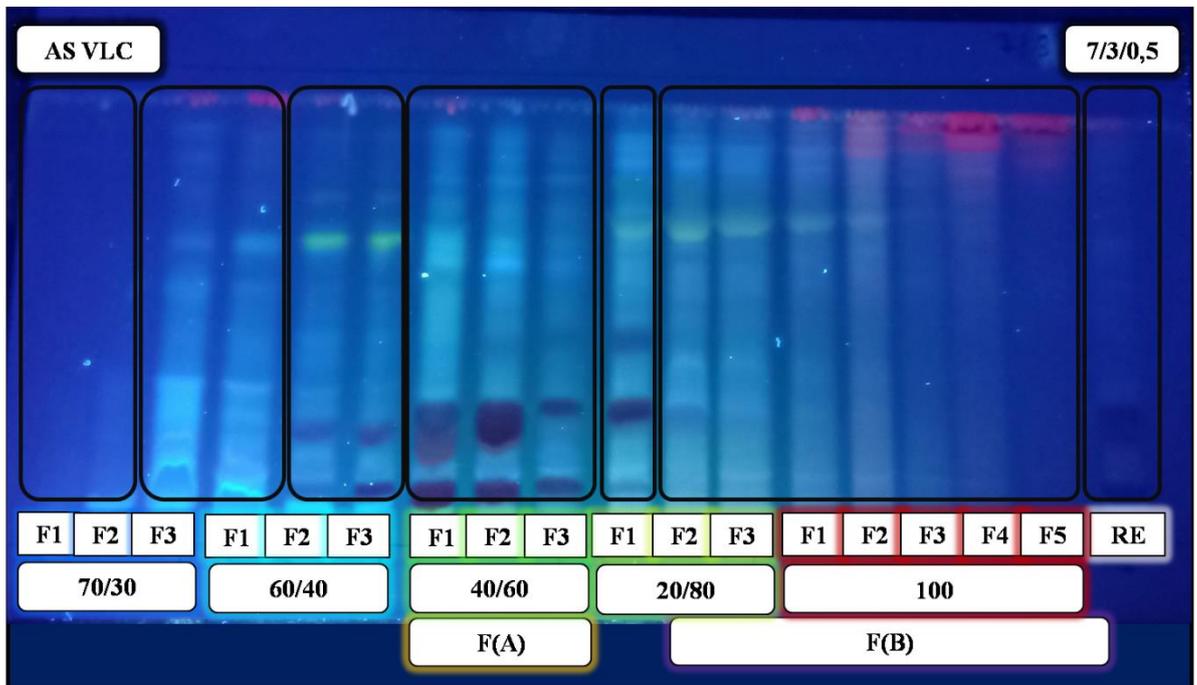


Figure 29 : CCM récapitulatif des fractions de la VLC de l'extrait éthanolique brut observé sous 365 nm.

Tableau 7 : VLC sur C₁₈ de l'extrait éthanolique de l'espèce du genre *Anagallis*.

Fractions collectées	Masse (g)
70 :30 F(1), F(2)	4,00
70 :30 F(3)	0,7918
60 :40 F(1)	
60 :40 F(2), F(3)	0,8521
40 :60 F(1), F(2), F(3)	1,5942
20 :80 F(1)	0,2750
20 :80 F(2), F(3)	3,2707
0 :100 F(1), F(2), F(3), F(4), F(5)	

Une grande similitude est observée entre le profil CCM des trois fractions du système 40 :60, et entre les fractions F20/80 (2) et (3) et les fractions F100 (1), (2), (3), (4) et (5).

- Fraction F (A) : l'ensemble des trois fractions F(1), F(2) et F (3) du système (40 :60)
- Fraction F (B) : l'ensemble des fractions F(2) et F(3) du système (20 :80) et les cinq fractions du système (0 :100).

Nous avons choisi à étudier ces deux fractions car le profil CCM a montré une richesse en flavonoïdes et saponosides.

IV.4.3. Purification

- **Etude de la fraction F(A) :**

La fraction F(A) (1.5 g) est soumise à une chromatographie sur colonne de polyamide. L'élution est réalisée par un mélange de toluène-méthanol (100:0 à 0:100). Les fractions collectées sont réunies selon leur profil en CCM en phase normale effectuée dans le mélange (AcOEt /MeOH/H₂O : 10/1/1) pour donner 60 sous-fractions ainsi que composés **An1** (50mg).



Figure 30 : Purification de la fraction (A) sur une colonne de gel de silice.

• **Etude de la fraction F(B) :**

La fraction F(B) (3g) est chromatographiée sur une colonne de gel de silice en phase normale, l'élution menée dans un mélange CHCl₃-MeOH (98 :2 ; 95 :5 ; 90 :10 ; 80 :20 ; 70 :30 ; 60 :40) a donné le composé **An2**.

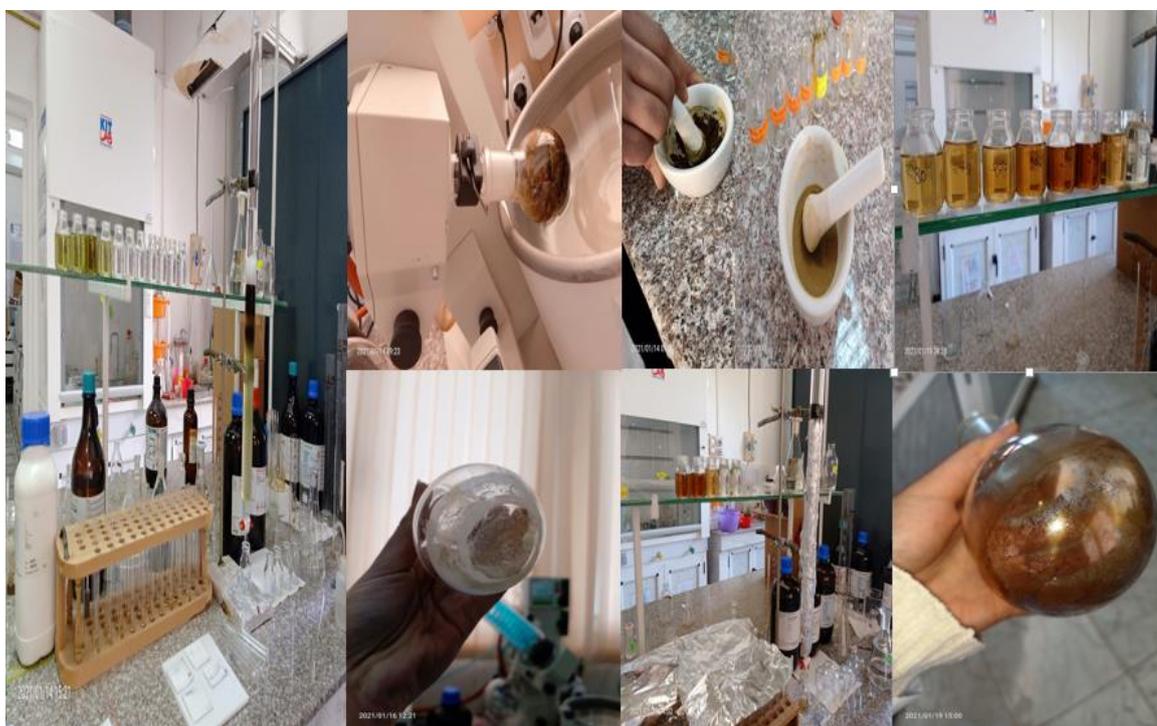


Figure 31 : Purification de la fraction (B) sur une colonne de gel de silice.

IV.5. Evaluation de l'activité antioxydante de l'espèce du genre *Anagallis*

Le choix de l'extraits brut ainsi que la fraction F70/30(3) et le produit An1 pour l'évaluation des activités antioxydante se justifie par leurs richesse en métabolites secondaires et surtout par leurs disponibilité en quantité qui permet de réaliser tous les tests prévoyait.

La mise en évidence du potentiel antioxydant a été réalisée par trois tests complémentaires à savoir :

- L'activité antiradicalaire pour le radical libre DPPH•
- L'activité antiradicalaire pour le radical-cation ABTS+•
- Le pouvoir réducteur de cuivre CUPRAC

Les résultats, sauf pour le dosage du pouvoir réducteur de cuivre (Cupric Reducing Antioxidant Capacity, CUPRAC) 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+• 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.5.1. Test de piégeage du radical 2,2-Di-Phényl-1-Picryl-Hydrazyl (DPPH)

L'activité du balayage du radical DPPH• a été mesurée par spectrophotométrie selon le protocole décrit par (Blois, 1958) avec une légère modification (Öztürk *et al.*, 2011). Ainsi, 40 µl de chaque échantillon à des concentrations décroissantes, y compris le BHA et le BHT, 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. Suite à une incubation à température ambiante et à l'obscurité pendant une trentaine de minutes, l'absorbance est mesuré à 517 nm. On note que chaque dépôt faisait l'objet de trois répétitions.

L'activité de piégeage du radical est calculée en tant que pourcentage de décoloration de DPPH selon cette équation :

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

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

IV.5.2. Test de piégeage de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6- sulfonique) (ABTS•+)

Le protocole suivi pour cette activité est celui décrit par (**Re et al., 1999**) avec des volumes ajustés pour une manipulation sur microplaque de 96 puits.

Le radical cation ABTS•+ a été préparé à partir de l'ABTS•+ (7 mM) et du persulfate de potassium $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (2,45 mM), ces deux produits sont mélangés en solution aqueuse ; le tout est conservé à l'abri de la lumière et dans une température ambiante durant 16h avant l'utilisation. La solution obtenue est ensuite diluée avec l'éthanol pour obtenir une absorbance de $0,7 \pm 0,025$ à 734 nm avant son usage.

Pour cela, 40 μl d'échantillon de chaque concentration sont introduits dans 3 puits alignés sur lesquelles 160 μl de solution ABTS fraîchement préparée sont ajoutés. Cette opération est aussi valable pour les deux standards employés. Un blanc est parallèlement préparé suivant les mêmes volumes tout en mettant du méthanol à la place de l'échantillon testé. L'absorbance est ensuite mesurée à 734 nm après 10 minutes d'incubation à température ambiante et à l'obscurité.

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

IV.5.3. Test de la capacité antioxydante par réduction de l'ion cuprique (CUPRAC)

L'activité antioxydante par réduction cuprique des extraits a été déterminée par la méthode CUPRAC (**Apak et al., 2004**). Dans les plaques 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 NH_4Ac (1 M, pH = 7), et 40 μL de l'extrait à différentes concentrations. Après une heure du temps et à l'aide d'un lecteur de microplaques, l'absorbance a été enregistrée à 450 nm. Les résultats ont été calculés à titre de $A_{0.5}$ ($\mu\text{g} / \text{mL}$) correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance.

IV.6. Analyse statistique

Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyennes \pm déviation standard (SD). Les valeurs de $IC_{50}/A_{0,5}$ ainsi que les représentations graphiques ont été réalisées par le logiciel Origin Pro 8. Plus elles sont petites ces valeurs, plus l'activité antioxydante des extraits est grande.

IV.7. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire

Afin d'évaluer l'effet anti-inflammatoire du traitement par l'extrait éthanolique de la plante entière du genre *Anagallis* un modèle d'inflammation aiguë a été utilisé dans les tests *in vivo*. Ainsi, l'activité anti-inflammatoire a été menée suivant la méthode décrite par (Arzi *et al.*, 2015). L'inflammation aiguë a été induite par l'injection de 0,1 ml d'une suspension de 1% du formol dans l'eau physiologique sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure droite. Les mesures du volume de la patte ont été effectuées avant l'injection du formol et 3 heures après (30, 60, 120, 180 min) l'aide d'un pléthysmomètre.



Figure 32 : injection de formol 1% au niveau de la voûte plantaire de la patte droite du rat.

Trente minutes (30 min) avant l'injection du formol, les différents lots de rats ont reçu, par voie intra-péritoniale les différents traitements :

- ✓ Le lot témoin de 5 rats a reçu 10 ml/Kg de l'eau physiologique.
- ✓ Le lot expérimental de 5 rats a reçu l'extrait éthanolique à la dose de 100 mg/Kg de masse corporelle.
- ✓ Le lot référence de 5 rats a reçu le Diclofenac à la dose de 20 mg/kg.

L'activité anti-inflammatoire a été évaluée en pourcentage de réduction de l'œdème chez des rats traités par rapport aux témoins blancs selon la formule suivante :

$$\% \text{d'inhibition} = 100 \times [(V_t - V_0 \text{ témoin}) - (V_t - V_0) \text{ traité}] / (V_t - V_0) \text{ témoin}$$

- V_0 représente le volume de la patte à $t=0$ (avant injection du formol),
- V_t représente le volume de la patte à un temps (t) quelconque.

Chapitre V

Résultats et Discussion

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,

Le processus de macération nous a permis d'extraire à partir de 100 g (M0) de la plante entière du genre *Anagallis* une masse (M1) de 24 g de couleur marron foncée très visqueuse, qui donne un rendement à l'ordre de **24%**.

En général, le calcul des rendements permet 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. Contrôle chromatographique de l'extrait

Une analyse chromatographique sur couche mince (CCM) a été réalisée sur l'extrait brut obtenu précédemment, en utilisant différents systèmes d'élution à savoir :

AcOEt/MeOH/H₂O (10/1/1) pour l'extrait éther de pétrole, CHCl₃/MeOH (20%) et

CHCl₃/MeOH/H₂O (70/30/5). Les profils CCM de l'extrait brut montre que ce dernier est riche en métabolites secondaires relativement séparables (**Figure 33**).

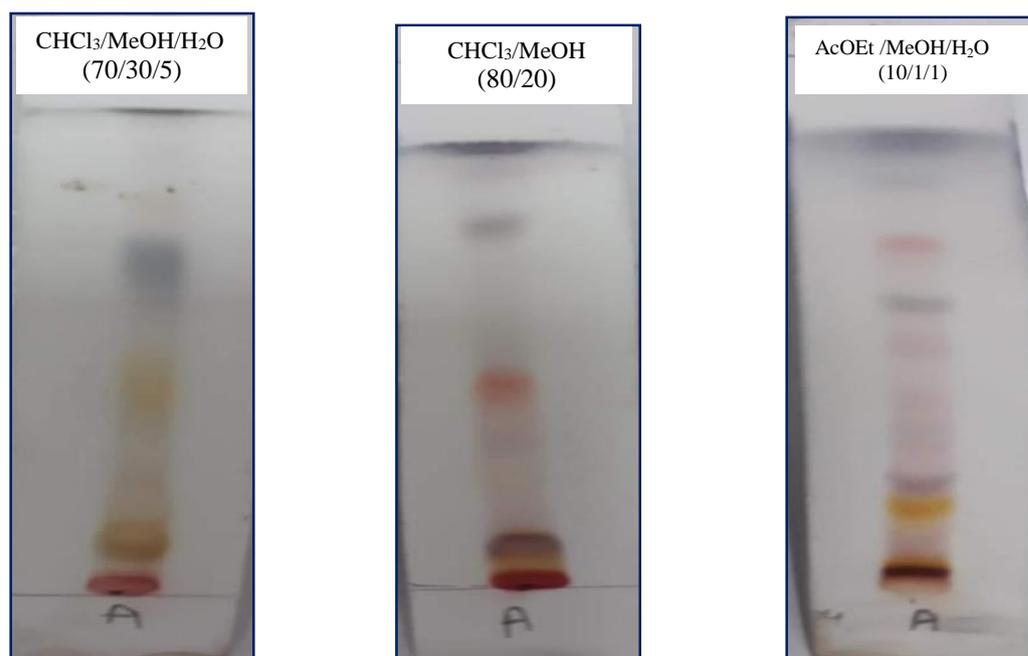


Figure 33 : CCM de l'extrait brut de la plante *Anagallis*.

V.3. Séparation et Purification

24 g d'extrait brut ont été initialement fractionnés par une chromatographie liquide sous vide (VLC) sur gel de silice greffée RP-18. L'éluion effectuée dans un mélange eau-méthanol à différents gradients (70/30 à 0/100) nous a permis de récolter 6 fractions.

La fraction F(A) élue dans un gradient 40/60 et la fraction F(B) élue dans un gradient 20/80 à 0/100 sont jugées riches en flavonides et saponosides après la révélation par l'UV à 254-365 nm et la vanilline sulfurique, d'où notre choix de les soumettre à un fractionnement par une chromatographie sur colonne ouverte (CC) sur gel de polyamide et sur gel de silice, en vue de purifier et d'identifier leurs métabolites.

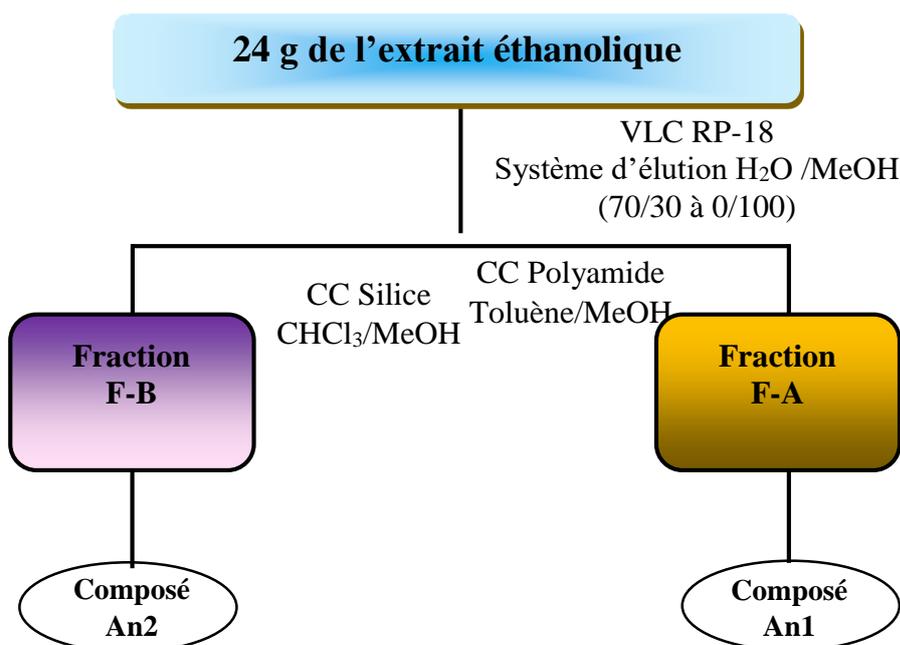


Figure 34 : les étapes de purification à partir de l'extrait éthanolique.

V.4. Elucidation structurale des composés isolés

V.4.1. Elucidation structurale du composé An1

Le spectre UV du composé **An1** (Figure 35), enregistré dans le MeOH montre deux maxima à 362 et 259 nm relatifs respectivement à la bande I et II caractéristiques d'un flavonol-3-OR (Mabry *et al.*, 1970), en plus de la coloration violette noire sous la lampe UV.

L'addition de NaOH provoque un déplacement bathochromique de 47 nm pour la bande I, avec une augmentation de son intensité lumineuse indiquant la présence d'un OH libre en position 4', l'apparition d'une nouvelle bande dans le même spectre indique la présence d'un OH libre en position 7.

L'addition de NaOAc provoque un déplacement bathochromique de la bande II de 13 nm par rapport au spectre MeOH confirmant ainsi la présence d'un OH libre en position 7.

Le déplacement bathochromique de la bande I de 75 nm, observé lorsque le spectre UV est enregistré dans un milieu de MeOH + AlCl₃ comparativement au spectre enregistré dans le MeOH neutre, atteste que ce flavonol porte un groupement hydroxyle libre aussi mais cette fois en position 5 (Figure 36).

La présence du système orthodihydroxy sur le noyau B est expliquée par le déplacement hypsochrome de la bande I (37nm) en comparant les deux spectres AlCl₃ et AlCl₃ + HCl et par

le déplacement bathochrome (19 nm) de la bande I dans le spectre NaOAc + H₃BO₃ par rapport au spectre MeOH.

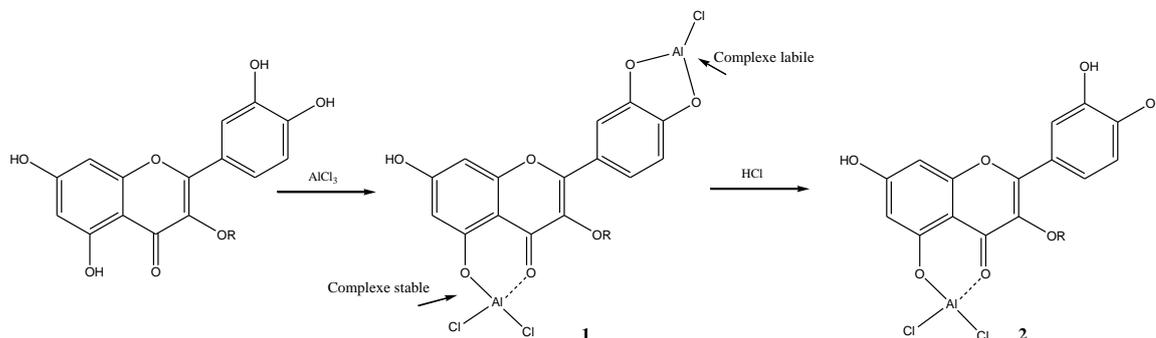


Figure 35 : Formation des complexes avec le chlorure d'aluminium dans un milieu neutre (1) puis acidifié par l'acide HCl (2) pour le composé **An1**.

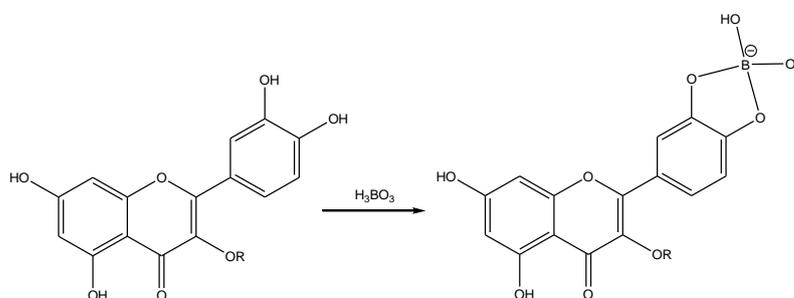
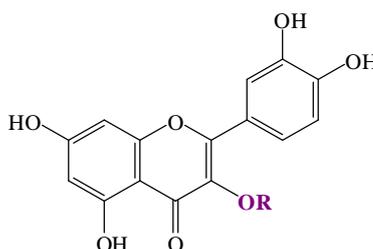


Figure 36 : Formation du complexe en présence de H₃BO₃ pour le composé **An1**.

Ces données spectrales UV sont en accord avec celles rapportées dans la littérature pour la quercétine substituée en position 3 (**Mabry *et al.*, 1970**).

Ces données permettent de proposer au composé **An1**, la structure partielle suivante :



L'identification structurale complète de cette molécule nécessite d'autres méthodes d'analyses comme résonance magnétique nucléaire monodimensionnel RMN 1D bidimensionnel RMN 2D.

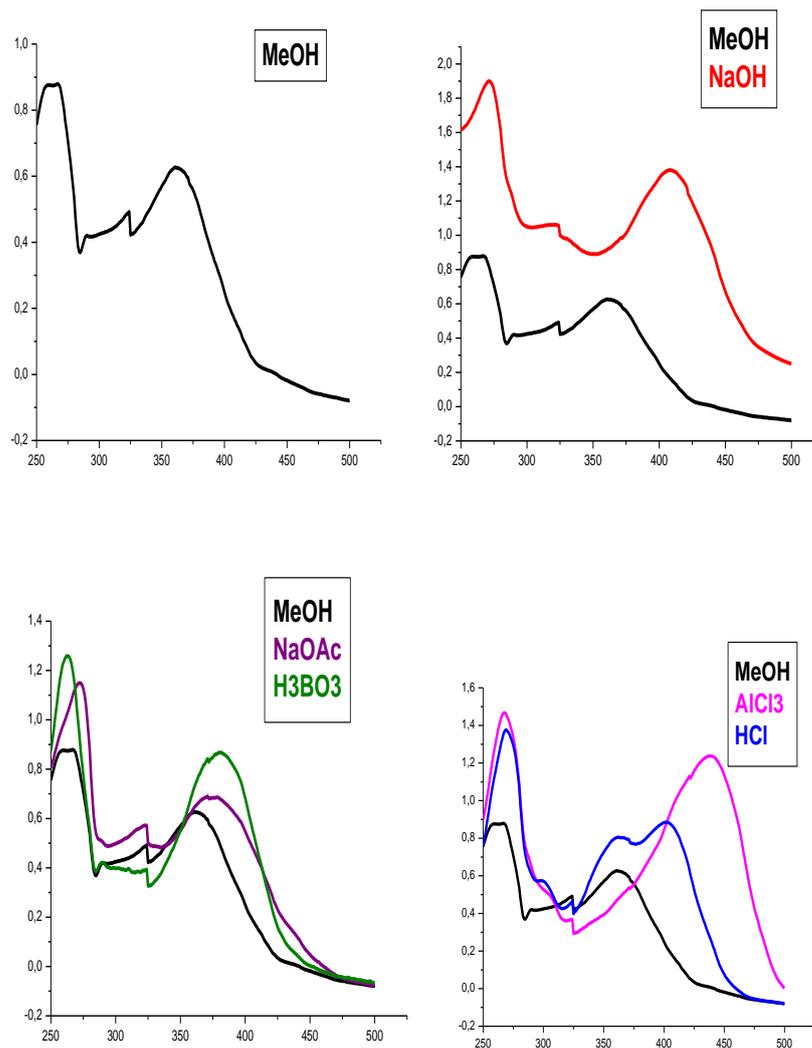


Figure 37 : la Série spectrale UV du composé **An1**.

Tableau 8 : données spectrales UV du composé **An1**.

Solvants-réactifs	λ_{\max}		
	Bande I (nm) cycle B	Bande II (nm) cycle A	Autres bandes
MeOH	362	259	-
NaOH	409	271	325
AlCl₃	439	268	-
AlCl₃ + HCl	402	269	-
NaOAc	376	272	-
NaOAc + H₃BO₃	381	263	-

V.5. Résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante

La capacité antioxydante des extraits végétaux est largement influencée par la composition chimique des extraits et les conditions de la réalisation du test, il apparait clairement qu'une seule méthode n'est pas suffisante pour évaluer 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 trois tests chimiques en l'occurrence la capacité des composés à piéger des radicaux libres (DPPH, ABTS) et la capacité de réduction de cuivre par le teste CUPRAC.

V.5.1. Activité antiradicalaire par le Test du 2,2-Di-Phényl-1-Picryl-Hydrazyl (DPPH)

Le radical DPPH• est généralement l'un des composés le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radical et la simplicité de l'analyse (Bozin *et al.*, 2008).

En effets, les résultats de l'absorbance des échantillons testés, y compris le BHA et le BHT, sont obtenus après une lecture à 517 nm. Ceux-ci ont permis de tracer les courbes de pourcentage d'inhibition de chaque échantillon en fonction de leurs concentrations (Figure 38).

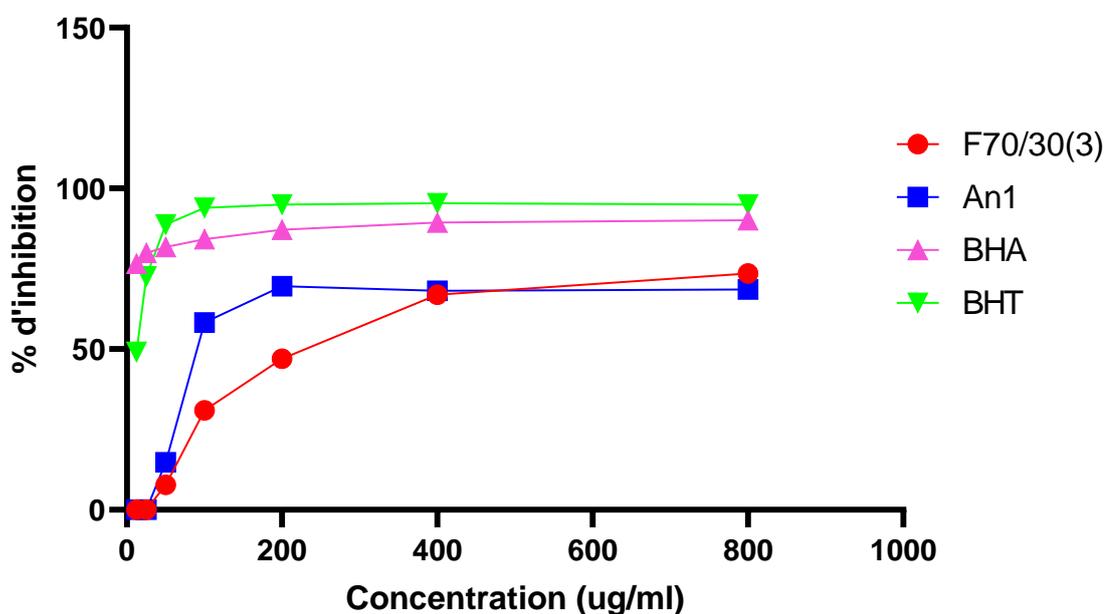


Figure 38 : Courbes des pourcentages d'inhibition du radical DPPH•

La figure 38 révèle que tous les échantillons testés ont une activité anti-radicalaire dose dépendante vis-à-vis du DPPH•, jusqu'à ce qu'ils atteignent la région asymptotique de la courbe

qui se caractérise par une inhibition presque totale des radicaux DPPH'. Cette zone est précoce pour le produit **An1**, BHA et BHT. Elle est un peu tardive pour l'échantillon F70/30(3).

Les résultats du test de piégeage des radicaux DPPH peuvent être présentés de plusieurs manières (Scherer et Godoy, 2009). La plupart des études expriment leurs résultats sous la forme d'une valeur IC₅₀.

Les résultats obtenus ont permis également de déterminer la valeur de l'IC₅₀ (la valeur qui correspond à 50% d'inhibition) afin de pouvoir évaluer l'activité des extraits vis-à-vis du standard.

Les valeurs d'IC₅₀ exprimées en µg/ml sont déterminées graphiquement à l'aide d'un logiciel statistique (OriginePro 8) permettant une analyse de la droite de régression non linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction du logarithme décimal des différentes concentrations préparées. Plus la valeur d'IC₅₀ est petite, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande (Khoudali, 2014).

Les valeurs de l'IC₅₀ de chaque extrait ainsi que celle de BHA et BTH sont classés par ordre décroissant sous forme d'histogramme (Figure 39).

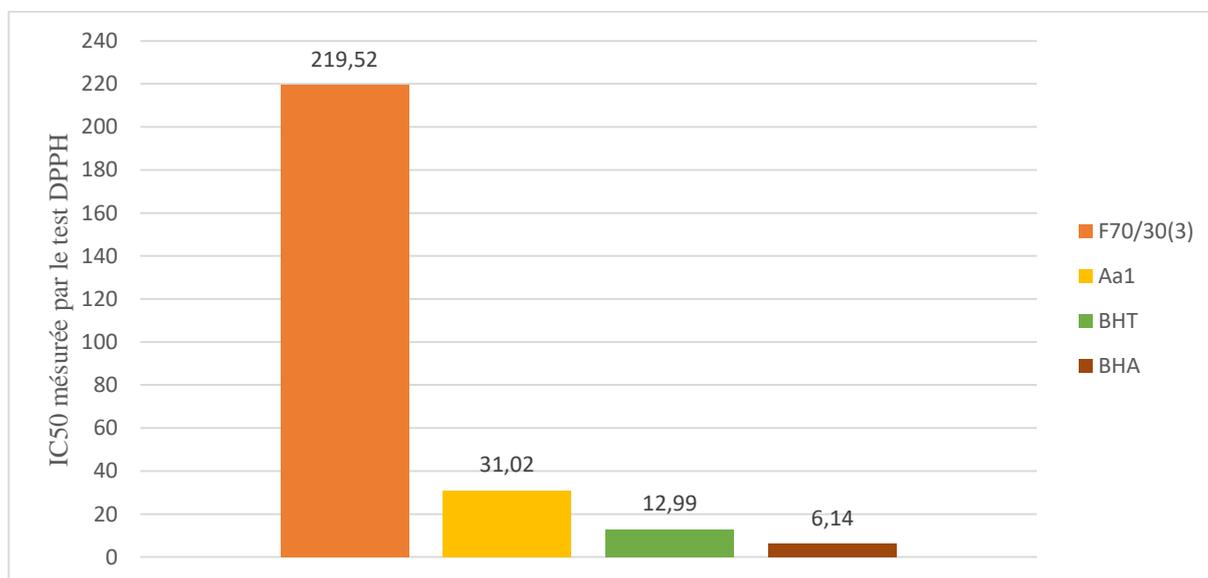


Figure 39 : les CI50 des échantillons testés classés par ordre décroissant (DPPH).

Parmi les échantillons testés, le produit **An1** représente l'échantillon le plus actif avec une IC₅₀ de l'ordre de 31,02 µg/ml suivi par la fraction 70/30 avec une IC₅₀ de 219,52 µg/ml. Cependant, en comparaison avec le standard, tous les échantillons testés s'avèrent moins actifs, par exemple

l'activité antiradicalaire du produit **An1** est 5 fois moins importante de celle de BHA qui présente une IC_{50} égale à 6,14 μ g/ml.

L'extrait brut a enregistré l'activité la plus faible avec une valeur d' IC_{50} qui dépasse 240 μ g/ml.

Les résultats d' IC_{50} , inversement proportionnelles à l'activité antiradicalaire, sont compatibles avec le niveau de décoloration de la solution DPPH (**Figure 40**).

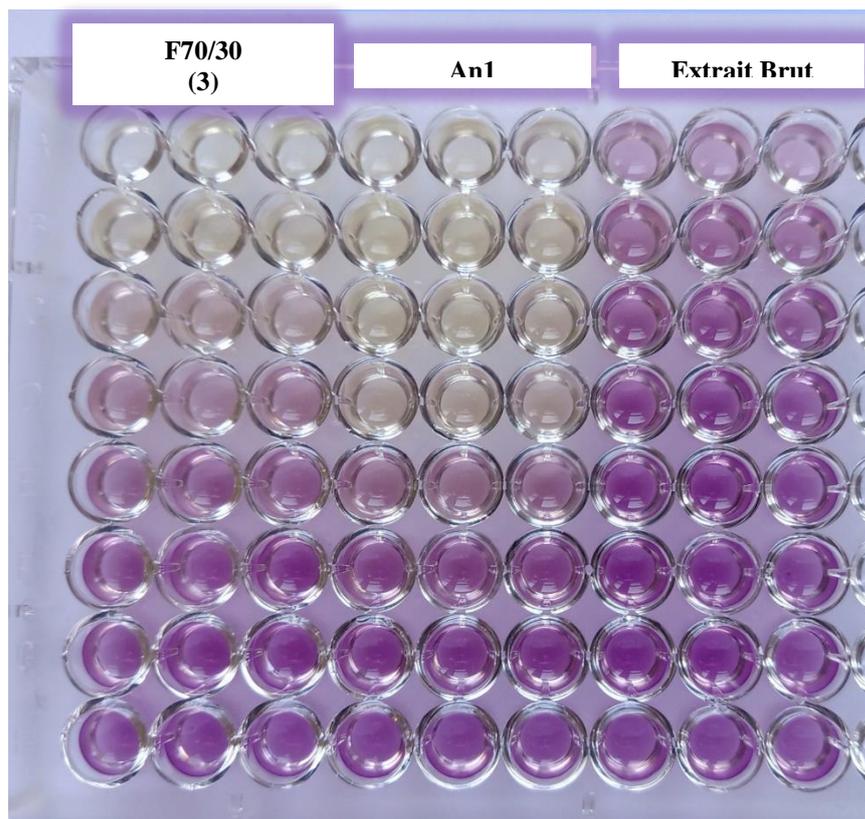


Figure 40 : Photo prises lors du dosage de l'activité antiradicalaire DPPH.

V.5.2. Activité antiradicalaire pour le radical ABTS^{•+}

Cet essai évalue la capacité d'un produit à capturer un radical libre ABTS. Dans ce test, l'ABTS est oxydé par les antioxydants à son radical ABTS^{•+}, qui a une couleur intense. La génération de ce dernier, pour l'évaluation de l'activité antioxydante est importante avant l'ajout des échantillons afin d'éviter l'interférence des composés dans la formation du radical ce qui conduit à une sur estimation de la capacité antioxydante (**Katalinic et al., 2006**).

Après avoir additionné les extraits et les standards, une décoloration de la solution ABTS s'est produite (**Figure 41**), ce qui indique l'existence d'une activité scavenger des échantillons testés.

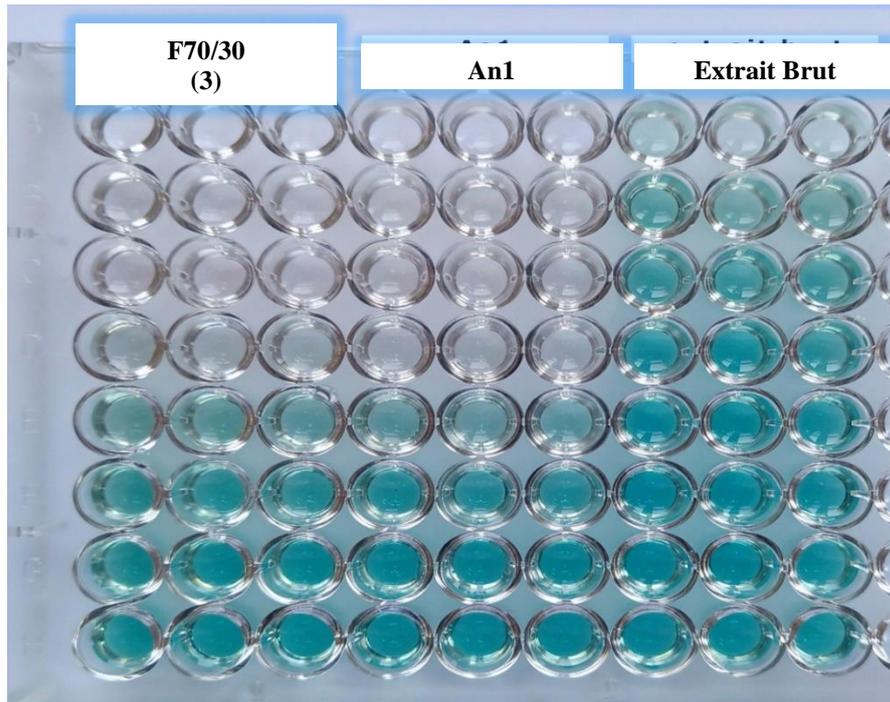


Figure 41 : Photo prises lors du dosage de l'activité antiradicalaire ABTS.

Afin de calculer les concentrations inhibitrices de chaque échantillon à 734 nm, un traitement des résultats de pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations est réalisé par OriginePro 8 (**Figure 42**).

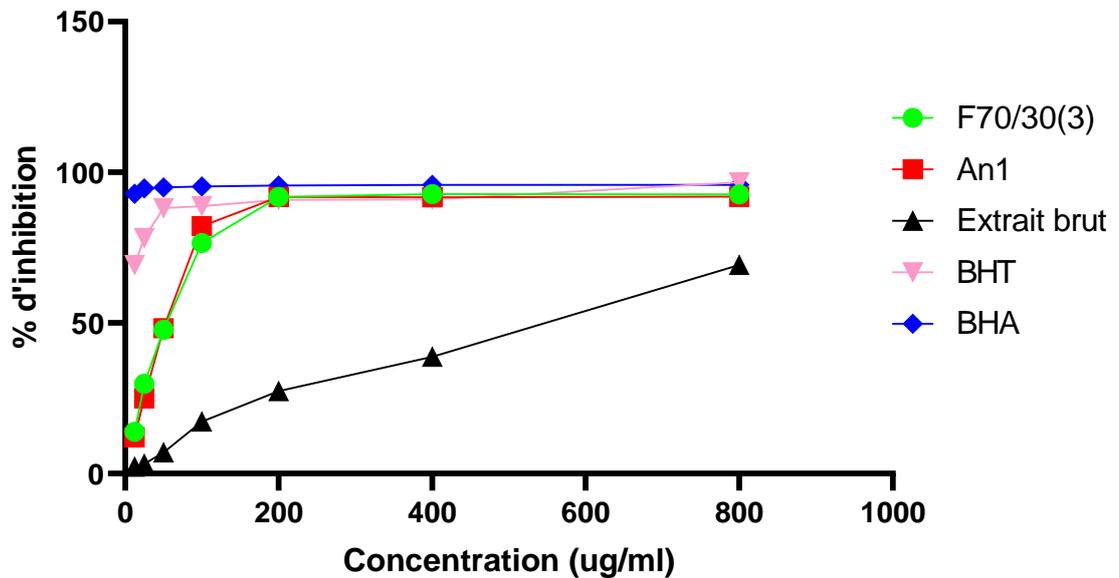


Figure 42 : Courbe de pourcentage d'inhibition de l'ABTS par différents extraits de la plante.

Le test a montré que le produit **An1** possède un pouvoir antioxydant assez important. Ce pouvoir est confirmé par une valeur faible d'IC₅₀ 6.05±4.50 µg/ml et de pourcentage

d'inhibition important. Suivi par la fraction F70/30(3) avec une IC_{50} de l'ordre de $36,17 \pm 0,08$ alors que l'extrait brut a enregistré l'activité la plus faible avec une valeur d' IC_{50} de $441,75 \pm 31,38$ $\mu\text{g/ml}$. En comparaison avec les standards, tous les extraits testés s'avèrent moins actifs (**Figure 43**).

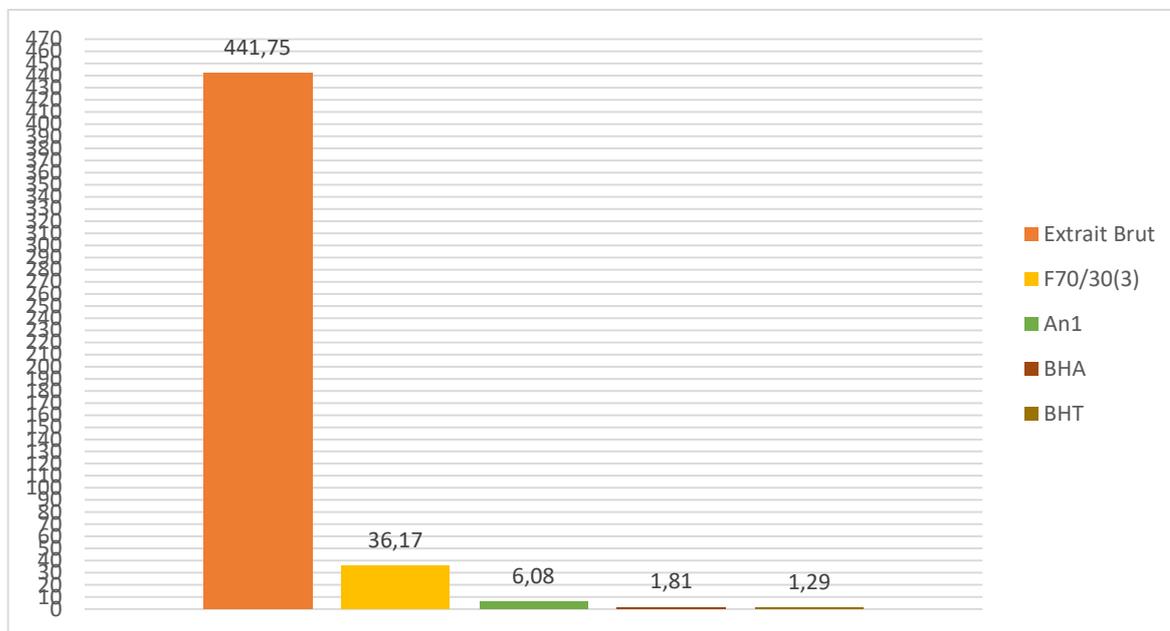


Figure 43 : les IC_{50} des échantillons testés classés par ordre décroissant (ABTS).

V.5.3. Test de la capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC)

C'est une méthode développée par **Apak *et al.* en 2004**. Il est basé sur la conversion des hydroxyles phénoliques en quinones à travers la réduction du complexe Cu^{2+} -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 l'activité des standards BHA et BHT.

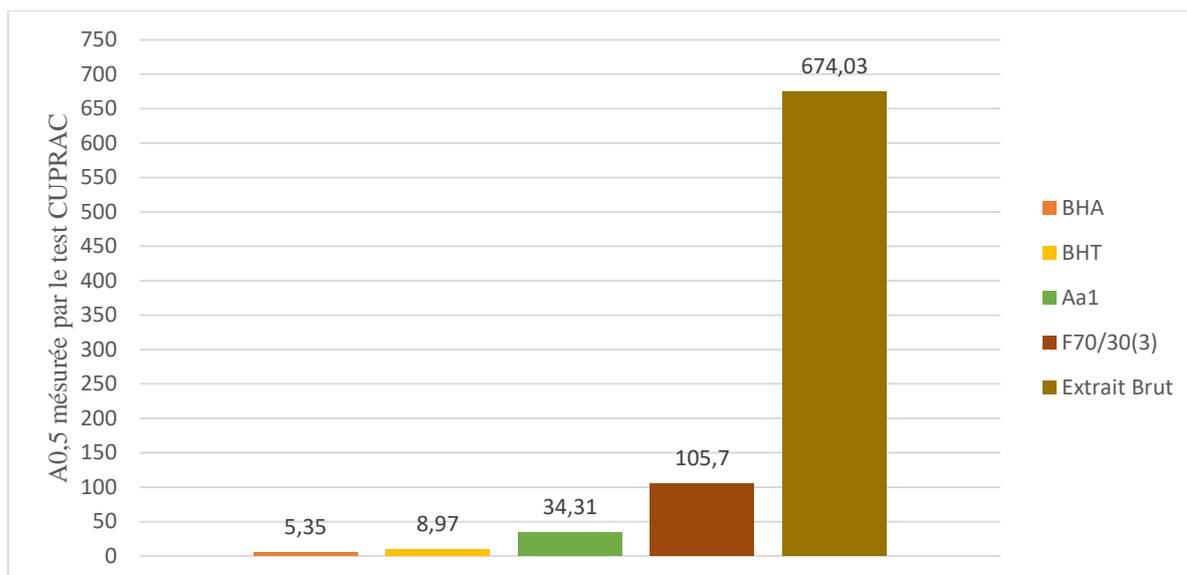


Figure 44 : les A_{0,5} des échantillons testés classés par ordre croissant (CUPRAC).

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

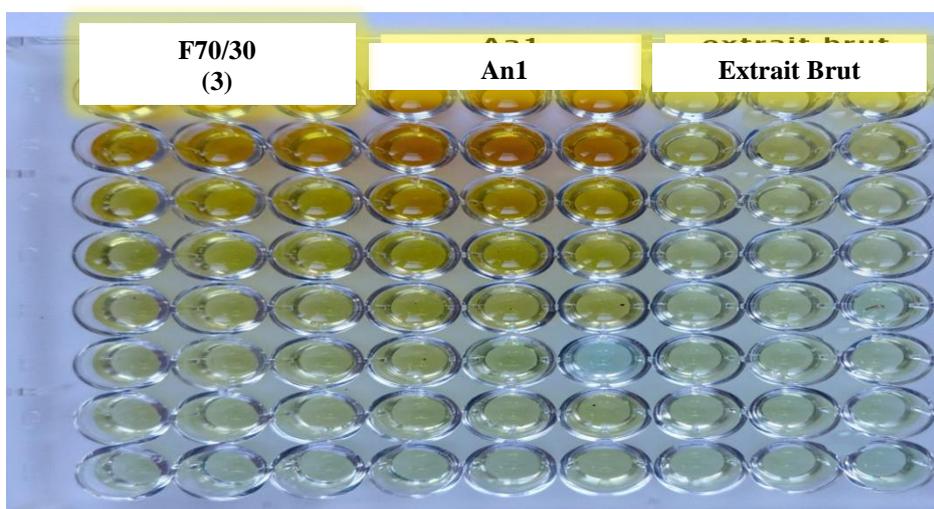


Figure 45 : photo prise lors de dosage de l'activité réductrice de l'ion cuivrique (CUPRAC).

Il ressort de ces résultats, que le produit **An1** présente la plus forte activité avec une absorbance A_{0,5} 34,31±2,96 µg/ml, 34,31±2,96 malgré cela ils demeure moins actifs que le les standards BHA et BHT, suivie par la fraction 70/30 (3) avec une A_{0,5} égale à 105,70±4,80. Néanmoins, l'extrait brut a montré une activité réductrice très faible.

Cependant, aucun des échantillons n'exhibait une activité supérieure à celle des standards antioxydants (BHA et BHT).

L'activité antioxydante des extraits pourrait s'expliquer par leur richesse en substances polyphénoliques et plus particulièrement les composés flavoniques. Ces résultats sont en accord avec les résultats de plusieurs publications, qui ont rapporté une corrélation positive entre tout le contenu phénolique et l'activité antioxydante (**Kadri *et al.*, 2011 ; Ghedadba *et al.*, 2014**).

V.6. Activité anti-inflammatoire *in vivo*

L'inflammation aiguë induite chez le rat par l'injection de formol est un modèle standard et pratique, largement utilisé pour l'évaluation des propriétés anti-inflammatoires de différents agents.

Le mécanisme cellulaire et moléculaire par lequel le formol induit le processus inflammatoire est connu. Elle stimule la libération de l'histamine et de la sérotonine par les mastocytes, débutant par cela une cascade d'évènements qui produisent d'autres médiateurs qui contribuent à l'établissement de la réaction inflammatoire aiguë.

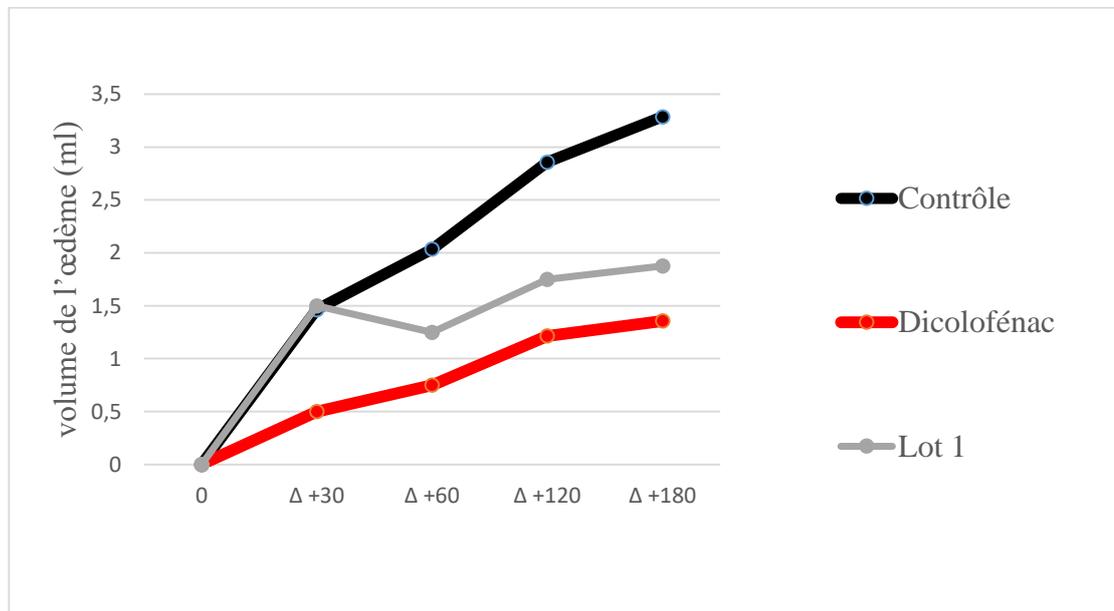


Figure 46 : Evolution de l'œdème en présence d'un prétraitement par voie intra-péritonéale, après l'injection de le formol (0,1 ml; 1%).

Les résultats obtenus ont été comparés à ceux d'un médicament le diclofénac qui est un anti-inflammatoire non stéroïdiens et à ceux du contrôle physiologique. Après l'injection de l'eau physiologique, le formol entraîne une augmentation significative du volume de la patte de rats

de $1,46 \pm 0,32$ de $2,03 \pm 0,04$ et de $2,857 \pm 0,70$ et de $3,258 \pm 0,85$ respectivement à 30 mn, 60 mn et 120 mn et 180mn.

L'injection de diclofénac à la dose de 20 mg/kg par voie intra-péritoniale prévient de façon significative l'augmentation du volume de la patte de rats. Elle est de $0,50 \pm 0,288$, de $0,75 \pm 0,250$ et de $1,214 \pm 0,38$ et $1,357 \pm 0,25$ à 1 et 3 h après l'injection du formol. En ce qui concerne les extraits éthanoliques, ont été faits pour empêcher l'augmentation du volume de la patte de rats. Elle est de $1,5 \pm 0,35$, de $1,25 \pm 0,57$, $1,75 \pm 0,57$, et de $1,87 \pm 0,50$, pendant à 1h30 et 3 h après l'injection de formol. Ces résultats sont significativement différents de ceux du contrôle physiologique (**Figure 46**).

Le résultat obtenus à l'issu de test anti-inflammatoire montrent que l'extrait brut de notre plante réduit de façon appréciable l'œdème induit par le formol. L'inhibition de l'œdème par l'extrait brut de la plante est comparable, à celle de diclofénac. La richesse de l'extrait brut de la plante en différents constituants chimiques peut justifier cette activité.

Dans les conditions expérimentales, le formol a provoqué l'œdème dont le volume est maximal au bout de trois heures (**Singla et Pathak, 1990; Viana et al., 1998**). Le formol provoque l'inflammation locale lorsqu'il est injecté dans l'aponévrose de la plante du pied (**Sen et Nag, 1991; Singh et al., 1997; Suzuki et al., 1996**) tout comme la carragénine (**Bhatt et al., 1977; Ossipov et al., 1995**). La cause de cette réaction inflammatoire est la lésion tissulaire. Cette lésion tissulaire induit la synthèse de l'histamine, des prostaglandines, des leucotriènes (**Ammon et al., 1993**), du PAF (facteur d'activation plaquettaire), des cytokines, du NO (monoxyde d'azote) et du TNF (facteur de nécrose tumorale). L'effet de l'extrait brut de la plante entière du genre *Anagallis* sur l'œdème s'expliquerait par l'inhibition de la synthèse des substances pro-inflammatoires.

Conclusion générale

Conclusion générale

Ce présent travail porte sur l'investigation phytochimique et biologique d'une plante du genre *Anagallis* appartenant à la famille des Primulaceae. Cette dernière est connue par sa richesse en métabolites secondaires, comme les saponosides triterpéniques, les flavonoïdes, les dérivés benzoquinoïques, les acides benzoïques et les lignanes. L'espèce en question n'a fait l'objet d'aucune investigation chimique ni biologique antérieure.

Le fractionnement de l'extrait éthanolique de la plante entière du genre *Anagallis*, la séparation et la purification des biomolécules obtenus An1 et An2 est rendu possible grâce à l'utilisation conjointe des différentes méthodes chromatographiques à savoir :

- ✚ chromatographie liquide sous vide sur phase inverse C18 (VLC).
- ✚ Chromatographie sur colonnes de gel de silice SiO₂ et polyamide
- ✚ chromatographie sur plaques analytique de silice normale (CCM).

La détermination structurale du composé isolé An1 a été réalisée par la méthode d'analyse spectroscopique UV

L'activité antioxydante de l'extrait brut de notre espèce a été évalué à différentes échèles par le test DPPH, ABTS, CUPRAC. Cette activité est liée en grande partie à la composition de l'extrait et des fractions en composés phénoliques, particulièrement flavoniques

De plus, l'administration de l'extrait brut à la dose de 100 mg/kg inhibe le développement aigu de l'œdème de la patte et présente une bonne activité antiinflammatoire mais inférieur à celle du diclofénac en tant que contrôle positif.

L'ensemble de ces résultats montre que les sources naturelles peuvent être un véritable réservoir de molécules originales susceptibles d'être proposées comme modèle pour des travaux de chimie médicinale. Il prouve aussi que notre flore est encore riche et prometteuse dans le domaine des produits naturels.

Résumé

Ce travail de recherche a porté sur l'investigation phytochimique de plante médicinale *Anagallis* appartenant à la famille Primulaceae, ainsi que l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire et antioxydante des extraits végétaux, et le produit isolé **An1**.

Ce travail a permis l'isolement par les méthodes chromatographiques (VLC, CCM, et CC) de 2 métabolites secondaires dont 1 composé de nature flavonoïdique et un saponoside et la caractérisation de produit isolé **An1** par méthode spectroscopique (UV-visible).

Les extraits de la plante ainsi que le produit isolé **An1** ont manifesté un pouvoir antioxydant par les méthodes de DPPH, ABTS et CUPRAC.

L'administration de l'extrait brut à la dose de 100 mg/kg prévient l'œdème aigu de la patte et présente une activité anti-inflammatoire inférieure à celle du diclofénac en tant que contrôle positif.

Mots-clés : Primulaceae, *Anagallis*, VLC, CC, CCM, UV-Visible, flavonoïdes, Saponines, activité antioxydante, activité anti-inflammatoire.

Abstract

This research is focused on the phytochemical investigation of the medicinal plant *Anagallis* belonging to the Primulaceae family and the evaluation of the anti-oxidant and anti-inflammatory activities of crude extracts and isolated compound **An1**.

This work allowed the isolation by chromatographic methods (VLC, CCM, CC), of 2 secondary metabolites including 1 flavonoid and one saponosid, and the characterization of the compound **An1** by spectroscopic analysis (UV-visible).

The extracts of the plant as well as the isolated compound **An1** exhibited an antioxidant power by the methods of DPPH, ABTS and CUPRAC.

The administration of crude extract at the doses of 100 mg/kg prevented significantly acute paw edema and presented a lower anti-inflammatory activity than diclofenac as a positive control.

Keywords: Primulaceae, *Anagallis*, VLC, CC, CCM, UV-Visible, Saponins, Flavonoids, Antioxidant activity, anti-inflammatory activity.

ملخص

يركز هذا البحث على التحليل الكيميائي النباتي للنبات الطبي *Anagallis* الذي ينتمي إلى عائلة Primulaceae وتقييم الأنشطة المضادة للأكسدة والالتهابات للمستخلصات الخام والمركب المعزول **An1**.

سمح هذا العمل بعزل 2 من المركبات الثانوية بما في ذلك 1 flavonoid و saponosid بواسطة الطرق الكروماتوغرافية (CC، CCM، VLC). بالإضافة إلى تحديد التوضيح الهيكلي للمركب المعزول **An1** باستخدام طرق التحليل الطيفي (UV-visible)

أظهرت مستخلصات النبات الخام بالإضافة إلى المركب المعزول **An1** قوة مضادة للأكسدة بواسطة طرق DPPH و ABTS و CUPRAC.

أدى إعطاء المستخلص الخام بجرعات 100 مغ/ كغ إلى منع تطور وذمة القدم الحادة بشكل ملحوظ وقدم نشاطاً مضاداً للالتهابات أقل من Diclofenac كعنصر تحكم إيجابي.

الكلمات الرئيسية: Primulaceae، *Anagallis*، VLC، CC، CCM، UV-Visible، Saponoside، Flavonoide، نشاط مضاد للأكسدة، نشاط مضاد للالتهاب.

Références bibliographiques

-A-

Abubakar, A., Ogbadoyi, E.O., Okogun, J.I., Gbodi, T.I., Ibikunle, G.F., (2012). The identification of putative antitrypanosomal compounds in *Tridax procumbens* extracts. *Int. J. Med. Arom. Plants* 2, 185–194.

Ahsan, H., Ali, A., Ali, R. (2003). Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. *Clinical and experimental immunology*. 131, 398-404.

Apak, R, Guclu, K, Ozyurek, M, Karademir, S.E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, Using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. *J. Agric. Food. Chem.*, 52, 7970–7981.

Alabdul Magid, A., (2005). Etude chimique de deux *Caryocar* de Guyane et d'un *Guioa* de Nouvelle Calédonie. Thèse de doctorat en pharmacie. France.

Ali-Shtayeh, M.S., Yaghmour, R.M.R., Faidi, Y.R., Salem, K., Al-Nuri, M.A., (1998). Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. *J. Ethnopharmacol.* 60 (3), p 265–271.

Amić, D., et al., (2003). Structure-Radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica Chemica Acta*. 76 (1): p. 55-61.

Ammon H. P. T.; Safayhi H.; Mack T.; Sabieraj J., (1993). Mechanism of anti-inflammatory actions of curcumin and bowenolic acids. *Ethnopharmacology*, 38:113-119.

Arzi, A., Olapour, S., Yaghooti, H. & Sistani Karampour, N. (2015). Effect of Royal Jelly on Formalin Induced-Inflammation in Rat Hind Paw. *Jundishapur J. Nat. Pharm. Prod.* 10, 8–11.

Asmus, K.D., Bonifacic, M., (2000). Free radical chemistry. In : Sen CK, Packer L, Hanninen O, editors. *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise*. Amsterdam, *Elsevier.*, p 3-53.

Avilov, S.A., Kalinovsky, A.I., Stonik, V.A., Riguera, R., Jiménez, C. (1997). Koreaside A, a new nonholostane triterpene glycoside from the sea cucumber *cucumaria koraiensis*. *J. Nat. Prod.* 60, 808–810.

Azam, S., et al. (2011). "Anti-spasmodic action of crude methanolic extract and a new compound isolated from the aerial parts of *Myrsine africana*." *BMC Complement Altern Med* 11: 55.

-B-

Barnes Peter J (1998). Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clinical Science*, 94, 557-572.

Barton G M (2008). A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *J Clin Invest*, 118, 413-420.

Bentham. G, Hooker. JD., (1876). genera plantarum. Vol.1, Reeve, Londres, p 57- 102.

Bhatt K. R.; Mehta R. K.; Shrivastana P. N., (1977). A simple method of recording antiinflammatory effects on rat paw oedema .Indian I. of Physiology and Pharmacology, 21: 399-400

Blois M.S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable Free Radical. *Nature*, 4617 (181): 1119-1200.

Boegh H.O., Andreassen J., and Lemmich J. (1996). Anthelmintic usage of extracts of *Embelia schimperi* from Tanzania. *Journal of Ethnopharmacology* 50(1), 35-42.

Bouillant, M., Wollenweber, E., Chopin, J., (1971). Demonstration of 20- hydroxyflavone and 20,5-dihydroxyflavone in the primrose *Primula florindae*. *C.R. Acad. Sci. Ser. D* 273, 1629–1631.

Bozin, B., Mimica, D., B., Ljiljana, S., Simin, N., Samojlik, I., Couladis, M., (2008). Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Properties of *Achillea collina* Becker ex Heimerl *s.l.* and *A. pannonica* Scheele Essential oils. *Molecules*, 13: 2058-2068. DOI: 10.3390/molecules13092058.

Bruneton J., (1999). Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales. 3e éd. Paris ; Londres ; New York : Tec et Doc-Lavoisier.

Bruneton. J (2009). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4ème édition, Lavoisier, Paris, France.

Brusselmans, K., et al., (2005). Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. *Journal of Biological Chemistry*. 280(7): p. 5636-5645.

Burkill, H.M., (1985). The useful plants of West Tropical Africa., Families M– R. Royal Botanic Gardens, Vol. 4, Kew, Richmond, United Kingdom, pp. 969.

Burkill H.M. (1994). *The Useful Plants of West Tropical Africa, Families E-I.* Royal Botanic Gardens. Kew.

BURNIE D, (2001). Fleurs de méditerranée. Paris. P 320

-C-

Cano, N., Barnoud, D., Schneider, S., Vasson, M.P., Hasselmann, M., Leverve, X., (2007). Traité de nutrition artificielle de l'adulte. Paris : Springer-Verlag.

Caltagirone, S ; Rossi, C ; Poggi, A ; Ranelletti, F.O ; Natali, P.G ; Brunetti, Piantelli, M (2000) Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential. *Int J Cancer* 87(4):595-600.

Chang, X., et al. (2007). "Biologically active triterpenoid saponins from *Ardisia japonica*." *J Nat Prod* 70(2): 179-187.

Charles N Serhan, Peter A Ward and Derek W Gilroy (2010). Fundamentals of Inflammation. *Cambridge University Press*, 2-3.

Chaudhury M.R., Chandrasekaran R., and Mishra S. (2001). Embryotoxicity and teratogenicity studies of an ayurvedic contraceptive-pippaliyadi vati. *Journal of Ethnopharmacology* 74(2), 189-193.

Cronquist, A. (1981). An integrated system of classification of flowering plants. Columbia Univ. Press, 248-250.

Cronquist, A. (1988). *The evolution and classification of flowering plants. New York Botanical Garden edition, 2nd edition.*

Corner, E. J. H. (1961). "Traité de Botanique Systématique, Tome I, M. Chadeffaud, L. Emberger, I Tome, in: Les Végétaux non Vasculaires (Cryptogamie). Masson et Cie, Paris (1960), xv." *Transactions of the British Mycological Society* 44(3): 461.

-D-

Dall'Acqua, S., I. Castagliuolo, P. Brun, F. Ditadi, G. Palu and G. Innocenti (2010). "Triterpene glycosides with in vitro anti-inflammatory activity from *Cyclamen repandum* tubers." *Carbohydr Res* 345(5): 709-714.

De Rijke E., Out, P., Niessen, W. M. A., Ariese, F., Gooijer, C., Brinkman, U. A. T., (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A* 1112, p 31–63.

Delattre, J., Beaudoux, J.L., Bonnefont- Rousselot, D., (2005). Radicaux libres et stress oxydant, Aspects biologiques et pathologiques. pp 87-108.

Delmas, F., Di Giorgio, C., Elias, R., Gasquet, M., Azas, N., Mshvildadze, V., Dekanosidze, G., Kemertelidze, E., Timon-David, P., (2000). Antileishmanial activity of three saponins isolated from ivy, alpha-hederin, beta-hederin and hederacolchiside A1, as compared to their action on mammalian cells cultured in vitro. *Planta Med.* 66, 343–347.

Densiov, E.T., Afanas'ev, I.B. (2005) IN: Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology. Eds: Taylor & Francis Group (U.S.A), pp: 703-861.

Diallo Amadou. (2005). Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* Willd. (Myrtaceae). Diplôme d'état pour le grade de docteur en pharmacie. P.16.

Dorward D.A., Lucas C.D., Rossi A.G., Haslett C., Dhaliwal K. (2012). Imaging inflammation : molecular strategies to visualize key components of the inflammatory cascade, from initiation to resolution. *Pharmacology and Therapeutics.* 135, 182-199.

Dupont, F., Guignard, J.-L. (2015). Botanique: Les familles de plantes 16^{ème} Edition. Elsevier Masson.

DRUDE, O. (1891). Ericaceae. Pp. 15–65 in, Die natürlichen Pflanzenfamilien IV(1), eds. A. Engler and K. Prantl. Leipzig: Verlag von Wilhelm Engelmann.

-E-

El. Beyrouthy M., Arnold N., Delelis.-Dusollier. A. and Dupont.F (2008). "Plants used as remedies antirheumatic and antineuralgic in the traditional medicine of Lebanon." *Journal of Ethnopharmacology* 120(3): 315-334.

-F-

Favier A. (2003). Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique.* p108-11.

Favier A. (2006). Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann. Pharm. Fr . Mémoire des Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de Rhamnus alaternus L.* p 64: 390-396.

Funaro A., Ortolan E., Bovino P., Lo Buono N., Nacci G., Parrotta R., Ferrero E., Malavasi, F. (2009). Ectoenzymes and innate immunity: the role of human CD157 in leukocyte trafficking. *Frontiers in Bioscience.* 14, 929-943.

-G-

Gaidi, G., Correia, M., Chauffert, B., Beltramo, J.-L., Wagner, M., Lacaille-Dubois, M.A.(2002). Saponins mediated potentiation of cisplatin accumulation and cytotoxic in human colon cells. *Planta Med.*, 68, 70-72.

Gairola, S., Gupta, V., Bansal, P., Singh, R., and Maithan, M., (2010). Herbal anti-tussives and expectorants- a review. *Int. J. Pharma. Sci. Rev. Res.* 5(2): 5-9.

Garait, B., (2006). Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSODin. Thèse de Doctorat. Grenoble : Université Joseph-Fourier I.

Gardes-Albert M, Bonnefont-Rousselot D, Abedinzadeh Z, Jore D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène : Comment l'oxygène peut-il devenir toxique. *L'actualité chimique*, n°269-270, 91-96.

Gathuma, J. M., et al. (2004). "Efficacy of *Myrsine africana*, *Albizia anthelmintica* and *Hilderbrandtia sepalosa* herbal remedies against mixed natural sheep helminthosis in Samburu district, Kenya." *J Ethnopharmacol* 91(1): 7-12.

Geissman, T.A.,(1962). The Chemistry of Flavonoid Compounds. Pergamon Press, p. 415.

Ghedadba N, Bousselsela H, Hambaba L, Benbia S, Mouloud Y. (2014). Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare* L. *Phytothérapie* 12 : 15–24.

Goudable, J ., Favier, A. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique et Métabolisme.* 11, 115-20.

Grotewold. E. (2007). The science of flavonoids. *Springer Science & Business Media.*

Gruenwald, J., Brendler, T., and Jaenicke, C., (2000). PDR for Herbal Medicines, 2nd ed, Medical Economics Company, Montvale, NJ, USA, pp.35-200.

Gülçin İ, Oktay M, Kirreççi E et Kü frevioğ lu Ö I. (2003). Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chem.* 83, 371- 382.

Gülçin, I., (2006). Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology.*, 217, p213.

Gülcin, I. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of toxicology*, 86(3), 345-391.

-H-

Haleng J, Pincemail J, Defraigne J.O, Charlier C, Chapelle J.P (2007). Le stress oxidant, *Rev Med Liege*, 62, 10 : 628-638.

Haliwell, B., Gutteridge, J.M.C., (1989). *Biology and Medecine. Oxford : Free Radicals in Claenton Prep*, p 543.

Hamsin, D. E., et al. (2013). "The hexane fraction of *Ardisia crispa* Thunb. A. DC. roots inhibits inflammationinduced angiogenesis." *BMC Complement Altern Med* 13: 5.

HARBORNE. J. B., (1968). CORRELATIONS BETWEEN FLAVONOID PIGMENTATION AND SYSTEMATICS IN THE FAMILY PRIMULACEAE. *Phytochemistry Unit, Hartley Botanical Laboratories, The University, Liverpool* 3. Pi15 cchemistry, pp. 1215 to 1230.

Harborne, J. B., (1977). Flavonoids and the Evolution of the Angiosperms .*Biochem. Syst.Ecol.*5, p 7–22.

Harbone. J. B (1993). Introduction to ecological biochemistry. *4ème édition, Academic Press, London, England.*

Haridas V., Higuchi M., Jayatilake G. S., Bailey D., Mujoo K., Blake M. E., Arntzen C.J.etGutterman J. U., (2001a). Avicins: triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Bentham) induce apoptosis by mitochondrial perturbation. *PNAS*, 98, 5821.

Harrison, D., Griendling, K.K., Landmesser, U., Hornig, B., Drexler, H. (2003). Role of oxidative stress in atherosclerosis. *The American Journal of Cardiology*. 91, 7-11.

Hegnauer R. (1990). Chemotaxonomie der Pflanzen. Band IX (Magnoliaceae bis Zygophyllaceae). *BirkhäuserVerlag. Basel.*

Heitz S., and Billet D. (1973). *Embelia concinna* (Myrsinacea) triterpenes. *Comptes Rendus des Séances de l'Académie des Sciences, Série C : Sciences Chimiques* 277(16), 1703-1704.

Hennebelle. T, Sahpaz. S, Bailleul. F (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisation et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 1: 3-6.

Hertog, M.G., (1996). *Epidemiological evidence on potential health properties of flavonoids.* Proceeding of the Nutrition Society., 55: p. 385-397.

Hostettmann K. et Marston A., (1995). *Chemistry and Pharmacology of Natural Products:Saponins.* Cambridge University Press. 117.

Huang, H. C., Liao, S. C., Chang, F. R., Kuo, Y. H., Wu, Y. C., (2003). Molluscicidal saponins from *Sapindus mukorossi*, inhibitory agents of golden apple snails, *Pomacea canaliculata*. *J. Agric. Food Chem.* 51, 4916–4919.

-I-

Ichai Carole, Quintard Hervé, Orban Jean-Christophe. (2011). *Désordres métaboliques et reanimation.* Springer pp. 427-439.

-J-

Ji, LL., (2001). Exercise at old age: does it increase or alleviate oxidative stress *Annals of the New York Academy of Sciences.*, 928, p 236–47.

Jia, Z., et al. (1994b). "Triterpenoid saponins from *Ardisia crenata* and their inhibitory activity on cAMP phosphodiesterase." *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 42(11): 2309-2314.

Jia, Z., et al. (1994a). "Triterpenoid saponins from *Ardisia crenata*." *Phytochemistry* 37(5): 1389-1396.

Jia, Z. K., Kazuo; Nikaido, Tamotsu; Ohmoto, Taichi (1994c). "Two novel triterpenoid pentasaccharides with an unusual glycosyl glycerol side chain from *Ardisia crenata*." *Tetrahedron* 50(41): 11853-11864.

Just, M. J., Recio, M. C., Giner, R. M., Cuellar, M. J., Manez, S., Bilia, A. R., Rios. J. L., (1998). Anti-inflammatory activity of unusual lupane saponins from *Bupleurum fruticosens*. *Planta Med.* 64, 404–407.

-K-

Kadri Adel, Zarai Zied, Békir Ahmed, Gharsallah Néji, Damak Mohamed, Gdoura Radhouane. (2011). Chemical composition and antioxidant activity of *Marrubium vulgare* L essential oil from Tunisia. *Afr J Biotechnol* 10(19): 3908–14.

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.

- Kaku T., Miyata T., Uruno T., Sako I. et Kinoshita A., (1975).** Chemico-pharmacological studies on saponins of *Panax ginseng* C. A. Meyer. II. Pharmacological part. *Arzneimittelforschung*, 25, 539.
- Kallersjö M., Bergquist G. & Anderberg A. (2000).** Generic realignment . New York. on morphological, anatomical and rbcL DNA sequence data. *Bot. J. Linn. Soc.* 122: In primuloïd families in the Ericales s.l. *Am. J. Bot.* 87 (9) : 1335-1341.
- Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., Jukic, M., (2006).** Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*, 94, 550–557.
- Kaul, T. N., Middleton, E., Ogra, P. L., (1985).** Antiviral Effect of Flavonoids on Human Viruses. *J. Med. Virol.* 15, 71–79.
- Kawai, M., Hirano, T., Higa, S., Arimitsu, J., Maruta, M., Kuwahara, Y., Ohkawara, Hagihara. T, Yamadori. K, Shima T, Y., Ogata, Kawase A, Tanaka I T., (2007).** Flavonoids and Related Compounds as Anti-Allergic Substances. *Allergol. Int.* 56,
- Kawashty, S.A., El Garf, I.A., and El Negoumy, S.I., (1998).** Chemosystematics of *Anagallis arvensis* L. (Primulaceae) *Biochem Sys Ecol.* 26 (6), 663-668.
- Khoudali, S. (2014).** Étude de l'activité antioxydante et de l'action anti corrosion de l'extrait méthanolique des feuilles du palmier nain (*Chamaerops humilis* L.) du Maroc Study of antioxidant activity and anticorrosion action of the methanol extract of dwarf palm leaves (*Chamaerops humilis* L.)
- Kobayashi H., and de Mejia E. (2005).** The genus *Ardisia*: a novel source of health promoting compounds and phytopharmaceuticals. *Journal of Ethnopharmacology* 96(3), 347 354.
- Koechlin-Ramonatxo, C., (2006).** Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme.*, 20, pp165–177.
- Kozubek A., and Tyman J.H. (1999).** Resorcinolic Lipids, the Natural Non-isoprenoid Phenolic Amphiphiles and Their Biological Activity. *Chemical Reviews* 99(1), 1-26.
- Kumar Vinay, Abul K Abbas, Nelson Fausto and Richard Mitchell (2007).** Robbins Basic Pathology, 8th Edition, 20-60
- Kumara Swamy H.M., Krishna V., Shankarmurthy K., Abdul Rahiman B., Mankani K.L., Mahadevan K.M., Harish B.G., and Raja Naika H. (2007).** Wound healing activity of embelin isolated from the ethanol extract of leaves of *Embelia ribes* Burm. *Journal of Ethnopharmacology* 109(3), 529-534.

-L-

Lacaille-Dubois M. A. et Wagner H., (1996). A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine*, 2, 363.

Lacaille-Dubois M. A., Hanquet B., Cui Z. H., Lou Z. C. et Wagner H., (1999). A new biologically active acylated triterpene saponin from *Silene fortunei*. *J Nat Prod*, 62, 133.

Lacaille-Dubois, M. A., (2005). Bioactive saponins with Cancer related and immunomodulatory activity: recent developments. In: Attar-Ur-Rahman (Ed.). *Stud.Nat.Prod. Chem.* 32, 209–246.

Lacaille-Dubois, M. A., Hanquet, B., Cui, Z. H., Lou Z. C., Wagner, H. (1999). A new biologically active acylated triterpene saponin from *Silene fortunei*. *Journal of Natural Products*, 62, 133.

Lacaille-Dubois, M. A., Wagner, H., (2000). In Atta-Ur-Rhaman, Editor. Bioactive saponins from plants: an update in studies in Natural Product Chemistry Vol.21. Elsevier Amsterdam, 633–687.

Lattanzio, F., E. Greco, D. Carretta, R. Cervellati, P. Govoni and E. Speroni (2011). "In vivo anti-inflammatory effect of *Rosa canina* L. extract." *Journal of Ethnopharmacology* 137(1): 880-885.

Lavaud, C., et al. (1994). "Triterpene saponins from *Myrsine pellucida*." *Phytochemistry* 37(6): 1671-1677.

Lee, M.-S.; Yuet-Wa, J. C; Kong, S.-K.; Yu, B.; Eng-Choon, V. O.; Nai-CMng, H. W.; Chung-Wai, T. M.; Fung, K.-P. (2005). Effects of polyphyllin D, a steroidal saponin in *Paris polyphylla*, in growth inhibition of human breast cancer cells and in xenograft. *Cancer Biol Ther.*, 4, 1248-1254.

Lee, Y. N., Lee, H. Y., Kim, S. I., Lee, S. K., Park, B. C., Kim, K. W. (1996). *In vitro* introduction of differentiation by gensenosides in F9 Teratocarcinoma cells. *Eur. J.Cancer* .32A, 1420-1428.

Lehucher-Michel, M.P., Lesgards, J.F., Delubac, O., Stocker, P., Durand, P., Prost, M. (2001). Stress oxydant et pathologies humaines. *La Presse médicale*. 30, 1076-1081.

Li, Q., et al. (2012). "13,28-Epoxy triterpenoid saponins from *Ardisia japonica* selectively inhibit proliferation of liver cancer cells without affecting normal liver cells." *Bioorg Med Chem Lett* 22(19): 6120-6125.

Lindstedt, G., 1950. Constituents of pine heartwood. The heartwood of *Pinus aristata* Engelm. *Acta Chem. Scand.* 4, 55–59.

Liu, D.-L. W., Nai-Li; Zhang, Xue; Yao, Xin-Sheng (2011a). "Three New Triterpenoid Saponins from *Ardisia crenata*." *Helvetica Chimica Acta* 94(4): 693-702.

Liu, D. Z., Xue; Wang, Shuping; Wang, Naili; Yao, Xincheng (2011b). "A new triterpenoid saponin from the roots of *Ardisia crenata*." *Chinese Chemical Letters* 22(8): 957-960.

López, V., Jäger, A.K., Akerreta, S., Cavero, R.Y., Calvo, M.I., (2011). Pharmacological properties of *Anagallis arvensis* L. ("scarlet pimpernel") and *Anagallis foemina* Mill. ("blue pimpernel") traditionally used as wound healing remedies in Navarra (Spain). *J.Ethnopharmacol.* 134 (3), p 1014–1017.

Lou, L., et al. (2012). "Ardipusilloside inhibits survival, invasion and metastasis of human hepatocellular carcinoma cells." *Phytomedicine* 19(7): 603-608.

-M-

Ma, C. F., et al. (2012). "[Chemical constituents of *Ardisia punctata*]." *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 37(22): 3422-3425.

Mabry, T.J., Markham, K.R., Thomas, M.B. (1970). The systematic identification of flavonoids. Springer- Verlag. Berlin.

Machocho A.K., Kiprono P.C., Grinberg S., and Bittner S. (2003). Pentacyclic triterpenoids from *Embliaschimperi*. *Phytochemistry* 62(4), 573-577.

Malešev, D. and V. Kuntić, (2007). Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *Journal of the Serbian Chemical Society.* 72 (10): p. 921-939.

Martínez-Cayuela, M. (1995). Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie.* 77, 147- 161.

Masood, A., Akbar, S., Masood, A., and Ganai, B., (2010). Medicinal and aromatic plants from Kashmir Hi malayas, Books on Demand, Germany, pp.34-84.

Matsunami, K., et al. (2011). "Myrseguinosides A-E, five new glycosides from the fruits of *Myrsine seguinii*." *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 59(10): 1274-1280.

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.

Melzig, M. F., Bader, G., Loose, R. (2001). Investigations of the mechanism of membrane activity of selected triterpenoid saponins. *Planta Medica*. 67, 43-48.

Miao, Z.-C. F., Rui; Zhou, Yong-xin; Li, Guan-Yi; Zhang, Qing-Hua (2000). "NMR and Chemical Structure of a New Saponin from *Jiu Jiu*long (*Ardisea Pusilla*)."
Chinese Journal of Organic Chemistry 20(3): 361-366.

Middleton, E. J., (1996). "Biological properties of plant flavonoids: an overview".*Int.J.Pharmacol.* 34 ,5, 344-348.

Middleton, E., C. Kandaswami, and T.C. (2000). Theoharides, The effects of plants flavonoids on mammalian cells: Implication for inflammation, heart disease, and cancer.*Pharmacological Reviews*. 52(4): p. 673-751.

Middleditch, B.S., (2012). *Kuwaiti Plants: Distribution, Traditional Medicine, Pytochemistry, Pharmacology and Economic Value 2.* Elsevier.

Mitscher, L.A., (1975). Antimicrobial Agents from Higher Plants. In: Recent advances in phytochemistry - volume 9. Runcles, V.C. Ed. Plenum Press. New York and London. Pp.250.

Mladinka P., Zatloukalova L., Filipsky T., Hrdina R., (2010). Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *FreeRadical Biology & Medicine*. 49, 963–975.

Moerman, D.E., (1998). *Native American Ethnobotany*, Timber Press, Portland, USA, pp. 45-176.

Mohammad, G., Hameed, I., & Kamal, S. (2018). Anti-inflammatory effects and other uses of *Cyclamen* species. A Review. *Indian Journal of Public Health Research and Development*,9,Products. Cambridge University Press, Cambridge, U.K., pp. 193.

Mompon. B, Lemaire. B, Mengal. P, Surbled. M (1998). Extraction des polyphénols :du laboratoire à la production industrielle. *Edition INRA, Paris, France*.

Müller, A ; Ganzera,M ; Stuppner, H.(2006). Analysis of phenolic glycosides and saponins in *Primula elatior* and *Primula veris* (*primula* root) by liquid chromatography, evaporative light scattering detection and mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 21;1112.

Muthee, J. K. G., D W; Mbaria, J M; Kareru, P G; Mulei, C M; Njonge, F K (2011). "Ethnobotanical study of anthelmintic and other medicinal plants traditionally used in Loitokitok district of Kenya." *Journal of ethnopharmacology* 135(1): 15-21.

-N-

Namgoong S.Y., Son K. H., Chang H.W., Kang. S. S., Kim H. P., (1994). Effects of naturally occurring flavonoids on mutagen-induced lymphocyte proliferation and mixed lymphocyte culture Life Sci., 54, 5, 313-320.

Navarro, P; Giner, R.M ; Recio, M.C ; Máñez, S; Cerdá-Nicolás, M ; Ríos, J. L (2001). In vivo anti-inflammatory activity of saponins from *Bupleurum rotundifolium*. Life Sci 68(10):1199-206.

Ndonsta, B. L. T., Joel S. N.; Csupor, Dezso; Forgo, Peter; Berkecz, Robert; Berenyi, Agnes; Tene, Mathieu; Molnar, Judit; Zupko, Istvan; Hohmann, Judit (2011). "Alkylbenzoquinones with antiproliferative effect against human cancer cell lines from stem of *Ardisia kivuensis*." Phytochemistry Letters 4(3): 227-230.

Noirez, P., O. Agbulut and A. Ferry (2000). "Effet d'un médicament anti-inflammatoire non-stéroïdien sur la régénération musculaire chez le rat." Science & Sports 15(3): 165-167.

Nourshargh Sussan, Fritz Krombach, and Elisabetta Dejana (2006). The role of JAM-A and PECAM-1 in modulating leukocyte infiltration in inflamed and ischemic tissues. *Journal of Leukocyte Biology*, 80, 714-718.

-O-

Ogweni Midiwo J., Yenesew A., Juma B.F., Derese S., Ayoo J.A., Aluoch A.O., and Guchu S. (2002). Bioactive compounds from some Kenyan ethnomedicinal plants: *Myrsinaceae*, *Polygonaceae* and *Psiadia punctulata*. *Phytochemistry Reviews* 1(3), 311-323.

Orhan, D. D., Özçelik, B., Özgen, S., Ergun, F., (2010). Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. *Microbiol. Res.* 165, 496–504.

Ossipov M. H.; Kovelowski C. J.; Porreca F., (1995). The increase in morphine antinociceptive potency produced by carrageenan-induced hindpaw inflammation is blocked by naltrexone, a selective delta-opioid antagonist. *Neuroscience Letter*, 184: 173-176.

Ozipek, M., Donmez, A. A., Calis, I., Brun, R., Ruedi, P. et Tasdemir, D.(2005). Leishmanicidal cycloartane-type triterpene glycosides from *Astragalus oleifolius* *Phytochemistry*, 66, 1168-1173.

-P-

Packer, L., Kraemer, K. et Rimbach, G. (2001). Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition* 17(10): 888-895.

Pal Yu, B. (1994). Cellular defences against damage from reactive oxygen species *Physiopathological Reviews*. 74, 139-155.

Panfili, G., Fratianni, A. et Irano, M. (2003). Normal phase high-performance liquid chromatography method for the determination of tocopherols and tocotrienols in cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(14): 3940-3944.

Park, J. A., Lee, K. Y., Oh, Y. J., Kim, K. W., Lee, S. K. (1997). Activation of capase-3 protease via a Bcl-2 insensitive pathway during the process of gensenosides Rh2-induced apoptosis. *Cancer Lett.* 121, 73-81.

Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., Defraigne, J.O. (2002). Physiological action of antioxidant aaaadefences. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. 16, 233-239.

Podolak, I. K., Paulina; Galanty, Agnieszka; Michalik, Marta (2013a). "Cytotoxic triterpene saponins from the underground parts of six *Lysimachia L.* species." *Biochemical Systematics and Ecology* 47: 116-120.

Powers S. K., Jackson M. J. (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological Reviews* 88(4): 1243–1276.

Prashanth D., Padmaja R., and Samiulla D.S. (2001). Effect of certain plant extracts on alpha-amylase activity. *Fitoterapia* 72(2), 179-181.

Prior R.L. et Cao G. (2005). *In vivo* total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology and Medecine* 27, 1173- 1181.

-Q-

Quattrocchi, U., (2012). *CRC World Dictionary of Medicinal and Poisonous Plants: Common Names.* CRC Press, Taylor and Francis group, Boca Raton, Florida, USA, pp. 269-270.

Quezel, P et Santa, S., (1963). *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales.* Ed. C.N.R.S. Paris. Tome II : 700-702.

-R-

Rastogi, R.P. and Mehrotra, B.N., (1990). Compendium of Indian medicinal plant, Vol. I, 1960.1969, Publication and Information Directorate, New Delhi, India, 1990, pp: 1-497.

Ren, W., et al., (2003). *Flavonoids: Promising anticancer agents.* Medicinal Research Reviews., 23(4): p. 519-539.

Re. Roberta, Pellegrini. Nicoletta, Proteggente. Anna, Ananth, Pannala. Min Yang, and Rice-Evans. Catherine (1999). ANTIOXIDANT ACTIVITY APPLYING AN IMPROVED ABTS RADICAL CATION DECOLORIZATION ASSAY. Free Radical Biology & Medicine, Vol. 26, Nos. 9/10, pp. 1231–1237.

Rondina, R.V., Bandoni, A.L., Coussio, J.D., (2010). Argentine medicinal plants with potential antifungal activity. Dominguezia 26 (1), p 31–39.

Ruiz, E., Donoso, C., González, F., Becerra, J., Marticorena, C., Silva, M., (1999). Phenetic relationships between Juan Fernandez and continental chilean species of Sophora (Fabaceae) based on flavonoid patterns. Bol. Soc. Chil. Quím. 44, 351–356.

-S-

Saini, V.K., (2014). Observation on certain ethnobotanically important plants of Jabalpur district with their medicinal use and chemical composition. *Asian Resonance.* III (I): 51-52.

Scherer R, Godoy HT (2009). Indice d'activité antioxydante (AAI) par la méthode 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl. Food Chem 112:654-658.

Sen T.; Nag C. A. K., (1991). Antiinflammatory evaluation of Pluchea indica root extract. J. of Ethnopharmacology, 33: 135-141.

Serhan C.N., Chiang N., Dalli J. (2015). The resolution code of acute inflammation: novel pro-resolving lipid mediators in resolution. In *Seminars in immunology.* Academic Press. 27 (3), pp 200-215.

Singh S.; Bani S.; Singh S. B.; Gupta B. D.; Banerjee S. K.; Singh B.,(1997). Antinflammatory activity of lupeol. Fitoterapia, LXVIII (1): 9-16.

Singla A. K.; Pathak k.,(1990). Topical antiinflammatory effects of Euphorbia prostrata on carrageenan-induced footpad oedema in mice . Journal. of Ethnopharmacology, 29: 291-294.

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.

Solis, P. N. N., Norio; Olmedo, Dionisio; Hattori, Masao; Gupta, Mahabir P. (2006). "Parathesilactones and parathesiquinones from Branches of *Parathesis amplifolia*." *Pharmaceutical Biology* (Philadelphia, PA, United States) 44((5)): 328-335.

Solignac, M. (2004). "Apport d'un anti-inflammatoire non stéroïdien bioadhésif dans le traitement des pathologies articulaires et péri-articulaires." *La Presse Médicale* 33(14, Part 2): 3-4.

Song J. L., Kun H. S., Hyun P. K., (1993). Antiinflammatory activity of naturally occurring flavone and flavonol glycosides,. *Arch. Pharm. Res.* 16, 25.

Sorg, O. (2004). Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendus Biologies.* 327, 649-662.

Sparg, S. G.,Light, M. E., van Staden, J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*, 94, 219-243.

STEVENS, P. F. (1971). A classification of the Ericaceae: subfamilies and tribes. *Botanical Journal of the Linnean Society* 64: 1–53.

Strobbe R., Charlier G., Debecq J. et Van Aert A., (1976). Studies about the adjuvant activity of saponin fractions in foot and mouth disease vaccine. III. Comparison of the irritant, adjuvant and hemolytic activities of six commercial saponins and their hemolytic fractions obtained by apoptosis. *Cancer Lett.* 121, 73-81. chromatography on sephadex G 100. *Arch Exp Veterinarmed*, 30, 173.

Suzuki T.; Kishimoto Y.; Misawa M., (1996). Formalin-and carrageenan-induced inflammation attenuates place preferences produced by morphine, methamphetamine and cocaine. *Life Science*, 59: 1667-1674.

-T-

Tang, H. F., (2009). "Two new triterpenoid saponins cytotoxic to human glioblastoma U251MG cells from *Ardisia pusilla*." *Chem Biodivers* 6(9): 1443-1452.

Tian, Y. T., Hai-Feng; Qiu, Feng; Wang, Xiao-Juan; Chen, Xiao-Li; Wen, Ai-Dong (2009). "Triterpenoid saponins from *Ardisia pusilla* and their cytotoxic activity." *Planta Medica* 75(1): 70-75.

Tiwari, A.K., (2001). Imbalance in antioxidant defence and human diseases : Multiple approach of natural antioxidants therapy. *Current Science*. 81(9): p. 1179-1181.

Thomas M. (2011). Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification : Application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophaë rhamnoides*), Thèse de Doctorat en Chimie Analytique – Phytochimie l'université d'Orléans.

Tokalov, S.V., Kind, B., Wollenweber, E., Gutzeit, H.O., (2004). Biological effects of epicuticular flavonoids from *Primula denticulata* on human leukemia cells. *J. Agric. Food Chem.* 52, 239–245.

-V-

Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic., M., Mazur, M., (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions.*, 160(1), pp 1-40.

Viana C. F. G.; Aragao A. G. M.; Ribeiro R. A.; Magalhaes J. F. G.; Yale M . R., (1998). Effectsof *Ageratum conyzoides* in nociception and inflammation response induced by zymosan . *Fitoterapia*, LXIX (4): 349-354.

Villar, A., Gasco, M. A., Alcaraz, M. J., (1984). Anti-inflammatory and anti-ulcer properties of hypolaetin-8-glucoside, a novel plant flavonoid. *J. Pharm. Pharmacol.* 36, 820–823.

Viqar Uddin, A; Mohammad, G. S (1993). Macrophylicinin, a saponin from *Primula macrophylla* *J. Nat. Prod.* 1993, 56, 9, 1580–1585.

Voutquenne L., (1997). Saponines et Activités Hémostatique. Saponines et Glycosides de cinq espèces de Sapindaceae. Thèse de Pharmacie.

-W-

Wang, H.K., Xia, Y., Yang, Z.Y., Natschke, S.L., Lee, K.H., (1998). Recent advances in the discovery and development of flavonoids and their analogues as antitumor and anti-HIV agents. *Adv. Exp. Med. Biol.* 439, 191–225.

Wang, L. Z., Qinghua; Zhu, Xiaoyuan (1996). "Determination of two new saponins in *Ardisia pusilla* by TLC scanning." *Zhongguo Yaoxue Zazhi (Beijing)* 31(11): 676-678.

Wang, X. Z., Lingzhen; Wang, Siwang (2000). "Extraction of anticancer saponin from *Ardisia pusilla*." *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu*.

Wang, H. L., Zhiwei; Tian, Guangchao; Ren, Xiangxiang (2014). "Chemical constituents from the bark of *Aegiceras corniculatum*." *Guangdong Huagong* 41(4): 26-27, 38.

Weill B, Batteux F and Dhainaut J (2003). Immunopathologie et réactions inflammatoires. Eds, De Boeck Université (Paris), 12-23.

Wollenweber, E., Mann, K., Iinuma, M., Tanaka, T., Mizuno, M., (1988b). dihydroxyflavone and its 50-acetate – novel compounds from the farinose exudate of *Primula*. *Z. für Naturforsch.* 43, 305–307.

Weller, L.E., Redemann, C.T., Gottshall, R.Y., Roberts, J.M., Lucas, E.H., Sell, H.M., 1953. Antibacterial substances in seed plants active against tubercule Bacilli. *Antibiot. Chemother.* 3, 603–606.

Winkel-Shirley, B., (2001). Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant. Physiol.* 126, 485–493.

-X-

Xu, X. F., et al. (2013). "Ardipusilloside I induces apoptosis by regulating Bcl-2 family proteins in human mucoepidermoid carcinoma Mc3 cells." *BMC Complement Altern Med* 13: 322.

Xu, Z, Chang, L,(2017). Identification and Control of Common Weeds: Volume 3, Zhejiang University Press, Hangzhou and Springer Nature Singapore Pte Ltd.

-Y-

Yang, W. S. J., Deok; Yi, Young-Su; Lee, Byoung-Hee; Kim, Tae Woong; Htwe, Khin Myo; Kim, Young- Dong; Yoon, Kee Dong; Hong, Sungyoul; Lee, Woo-Shin; et al (2014). "Myrsine seguinii ethanolic extract and its active component quercetin inhibit macrophage activation and peritonitis induced by LPS by targeting to Syk/Src/IRAK-1." *Journal of Ethnopharmacology* 151(3): 1165-1174.

Yui, S., Ubukata, K., Hodono, K., Kitahara, M., Mimaki, Y., Kuroda, M., Sashida, Y., Yamasaki, M. (2001). Macrophage-oriented cytotoxic activity of novel triterpene saponins extracted from roots of *Securidaca inappendiculata*. *Int Immunopharmacol.* 1, 1989-2000.

-Z-

Zhang, Y. Q., Youle; Zhang, Jie; Wang, Xiaojuan (2010). "Ardipusilloside I purified from *Ardisia pusilla* competitively binds VEGFR and induces apoptosis in NCI-H460 cells." *Phytomedicine* 17(7): 519-526.

Zhu, J.; Xiong, L.; Yu, B.; Wu, J. (2005). Apoptosis induced by a new member of saponin family is mediated through caspase-8-dependent cleavage of Bcl-2. *Mol. Pharmacol.*, 68, 1831-1838.

Zweier, J.L., Talukder, M.A.H. (2006). The role of oxidants and free radicals in reperfusion Injury. *Cardiovascular Research*. 70,181-190.

Sites-web consultés:

<https://www.genialvegetal.net/-Mouron-bleu-> consulter le 11 juillet 2021 à 11:11.

[https://earth.google.com/web/Maps data](https://earth.google.com/web/Maps+data) © 2018 Google : Consulté le : 08 Mai 2021 à 18 :56.

Année universitaire : 2020/2021

Présenté par : BAICHE Kenza

BOULKROUN Abdel Malek

Etude phytochimique et biologique d'une plante Algérienne du genre *Anagallis* (Primulaceae).

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie Appliquée.

Résumé

Ce travail de recherche a porté sur l'investigation phytochimique de plante médicinale *Anagallis* appartenant à la famille Primulaceae, ainsi que l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire et antioxydante des extraits végétaux, et le produit isolé **An1**.

Ce travail a permis l'isolement par les méthodes chromatographiques (VLC, CCM, et CC) de 2 métabolites secondaires dont 1 composé de nature flavonoïdique et un saponoside et la caractérisation de produit isolé **An1** par méthode spectroscopique (UV-visible).

Les extraits de la plante ainsi que le produit isolé **An1** ont manifesté un pouvoir antioxydant par les méthodes de DPPH, ABTS et CUPRAC.

L'administration de l'extrait brut à la dose de 100 mg/kg prévient l'œdème aigu de la patte et présente une activité anti-inflammatoire inférieure à celle du diclofénac en tant que contrôle positif.

Mots clés : Primulaceae, *Anagallis*, VLC, CC, CCM, UV-Visible, flavonoïdes, Saponines, activité antioxydante, activité anti-inflammatoire.

Laboratoire de recherche : Laboratoire d'Obtention des Substances Thérapeutiques.

Jury d'évaluation :

Président du jury : *Dr. MOKRANI El Hassen* (MCB. UFM Constantine 1)

Rapporteur : *Dr. BOUTAGHANE Naima* (MCA. UFM Constantine 1)

Examineur : *Dr. MOSBAH Asma* (MCA. UFM Constantine 1)

