

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I
Frères Mentouri Constantine I University
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
كلية علوم الطبيعة والحياة
Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire
قسم الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية و الجزيئية

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Biochimie Appliquée*

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

**Etude phytochimique et évaluation des activités biologiques
d'une plante algérienne du genre *Seseli* (Apiacées)**

Présenté par : BENMEKHBI Ahmed Acheraf

Le 12/07/2022

AKKAL Wail

Jury d'évaluation :

Encadreur : MOSBAH Asma (MCA - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 1 : BOUSETLA Ahlem (MCA - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 2 : CHERFIA Radia (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

**Année universitaire
2021 - 2022**

*Remerciements
et dédicaces*

Remerciements

Avant tout nous remercions Dieu « ALLAH » le tout puissant et miséricordieux, de nous avoir donné la santé, la force et la patience durant ces longues années d'études.

Au terme de ce travail, nous tenons à adresser notre vif et sincère remerciement à toutes les personnes qui ont apporté leur aide et leur soutien, en particulier :

Nous tenons à remercier très chaleureusement Docteur Mosbah Asma , Maître de conférences classe A, à accepter de prendre la direction de notre mémoire et pour toutes ses qualités d'encadrement .

Un grand merci également à Docteur BOUSETLA Ahlem , et pour Docteur Lefahal Mostefa , et sans oublier Docteur Nabila Zaabat , pour leur accueil chaleureux au sein du laboratoire , ainsi que pour leur gentillesse, et pour leurs conseils constructifs durant la réalisation des analyses qualitatives et quantitatives de nos échantillons.

Nos vifs remerciements très chaleureusement Docteur BENSOUICI Chawki, Maître de recherche classe A , à accepter de procéder l'évaluation des activités biologiques ,et de avoir nous accueilli au sein de son laboratoire, ainsi que pour sa gentillesse, sa disponibilité, et pour ses conseils constructifs.

Nous tenons à remercier sincèrement, Mme Teniou Soumia , Maître-assistant classe A , à accepter de procéder la partie de docking moléculaire. en débit de ses nombreuses occupations

Nous tenons à remercier chaleureusement , Docteur BOUSETLA Ahlem , Maitre de conférence classe A à l'université Constantine 1 , d'avoir accepté d'être membre de Jury d'évaluation . J'exprime aussi mes profonds remerciements à Docteur CHERFIA Radia , maitre de conférence classe B à l'université Constantine 1 , d'avoir accepté l'évaluation de notre travail.

Un grand remerciement pour Pr. Akkal Salah, qui nous a ouvert les portes et nous a permis de réaliser ce travail au niveau de son laboratoire « l'unité de valorisation de ressources naturelles, Molécules bioactives et Analyses Physicochimiques » à l'université Mentouri, Constantine 1 .

Enfin, merci à tous ceux qui ont contribué directement ou indirectement à ce modeste travail.

DEDICACE

Avec la générosité et l'aide d'ALLAH Le majestueux qui m'a donné la patience, le courage et la santé, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie :

À celui qui ne cesse de se sacrifier pour moi, à ma fierté et mon bonheur, à mon très cher père RACHID. Merci pour ta patience, tes encouragements et tes orientations, durant toutes mes années d'étude. Ce travail, et ce que je suis aujourd'hui sont tous les efforts que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance. Que Dieu te donne une longue et joyeuse vie.

À celle qui m'a donné la tendresse, l'amour, le soutien et la confiance, à la source de mes efforts, à ma très chère maman SAIDA. Avec un énorme plaisir, et une immense joie, je dédie ce travail à toi maman pour ta permanente présence à mes côtés et ton soutien tout au long de ma vie. Que dieu, le tout puissant, te préserve et t'accorde le bonheur, la santé et une longue vie.

À mes chers frères Mohamed Chakib, Mohamed Chouaib, Ahmed Moncef, Moundir Chihab, qui ont toujours soutenu et encouragé durant ces années d'études.

Je dédis aussi projet au membres de ma famille chacun à son Nom (mes oncles, mes tantes...), merci de votre conseil qui m'a donné beaucoup de courage pour affronter tout les obstacles qu'on a rencontré durant notre parcours.

À mon binôme et mon ami WAEL qui a partagé avec moi les moments difficiles et les beaux souvenirs durant ces années d'études. Merci énormément pour ton soutien moral, ta patience et ta compréhension tout au long de ce projet.

À mes chers AMIS. À tous qui aime Ahmed Acheraf et que je respecte.

Ahmed Acheraf

DEDICACE

Tout d'abord louange à Allah qui nous a guidé sur le droit chemin tout au long de nos études et nous a inspiré les bons pas.

Je dédie ce mémoire :

À celle qui m'a toujours comblé par son amour et ces sacrifices, qui m'a consenti et m'a soutenue aux moments les plus difficiles de ma vie, à ma très chère maman « Noura » que je porte dans la prunelle de mes yeux et que je chérisse du plus profond de mon cœur.

Grâce à toi j'ai appris à être ambitieux et courageux

Tous les mots de la terre ne suffiront pas à exprimer ma gratitude et mon amour.

À celui qui m'a servi de conseiller, à un homme que j'admire de plus en plus en découvrant à travers l'âge et le savoir son ultime sacrifice physique et matériel, mon cher papa « Saleh ».
Je te dédie ce travail qui couronne plusieurs années de dur labeur et qui est le fruit de ta confiance et de ton amour. Que dieu te garde pour nous.

À mon cher frère « Karim » et À ma chère soeur « Maroua » Merci pour votre aide votre soutien et vos encouragements incessants, Que l'esprit de famille nous unisse à jamais.

Je remercie de tout cœur mon cher binôme « Acheraf » pour son soutien et pour les bons moments passés ensemble tout au long de mes études et en dehors.

À mes chers amis et mes collègues d'études merci pour les moments que vous avez vécu ensemble et les souvenirs.

Je dédie ce travail Pour toutes les personnes qui ont été toujours près de moi, merci pour vos encouragements, soutient et amour.

Wail

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS ET DEDICACES	I
LISTE DES ABREVIATIONS	II
LISTE DES FIGURES	III
LISTE DES TABLEAUX	IV
INTRODUCTION GENERALE.....	1

CHAPITRE I : FAMILLE DES APIACEES

I. Famille des Apiacées	3
I.1. Généralités	3
I.2. Distribution géographique.....	3
I.3. Classification de la famille des Apiacées	5
I.4. Description botanique	5
I.5. Phytochimie	7
I.6. Phytothérapie	7
I.7. Toxicité	8
I.8. Intérêt économique	8
II. Genre <i>Seseli</i>	9
II.1. Distribution	9
II.2. Morphologie.....	9
II.3. Position systématique	11
II.4. Usage traditionnel	11

CHAPITRE II : METABOLITES SECONDAIRES

I. Métabolites secondaires	12
I.1. Introduction	12
I.2. Rôles des métabolites secondaires	12

I.3. Classification des métabolites secondaires	13
II. Composés Phénoliques	14
II.1. Généralités.....	14
II.2. Structure chimique.....	14
II.3. Classification des composés phénoliques	14
II.3.1. Acides phénoliques.....	16
II. 3.1. 1. Acides hydroxybenzoïques	16
II. 3.1. 2. Acides hydroxycinnamiques.....	17
II. 3. 2. Coumarines	17
II.3.2.1. Structure des coumarines.....	18
II.3.2.1.1. Coumarines simples.....	18
II.3.2.1.2. Coumarines complexes.....	18
II.3.2.1.2.1. furocoumarines.....	18
II.3.2.1.2.2. Pyranocoumarines.....	19
II.3.2.2. Rôle des coumarines dans la plante.....	19
II.3.2.3. Activités biologiques des coumarines.....	19
II.3.3. Flavonoïdes.....	20
II.3.3.1. Classification des flavonoïdes.....	21
II.3.4. Tannins.....	22
II.4. Polyphénols comme antioxydants.....	23
III. Terpénoïdes	24
III.1. Classification des terpénoïdes.....	25
III.2. Activités biologiques des triterpènes.....	26
IV. Alcaloïdes	26
IV.1. Propriétés des alcaloïdes	26

CHAPITRE III : LES ACTIVITES BIOLOGIQUES

I. Activité antioxydante.....	27
I.1. Introduction	27
I.2. Stress oxydant	27
I.3. Radicaux libres	28
I.4. Antioxydants	29
I.4.1. Antioxydants enzymatiques	29
I.4.2. Antioxydants non enzymatiques	29
I.5. Méthode de dosage de l'activité antioxydant	30
II. Activité anticholinestérase	31

CHAPITRE IV : MATERIELS ET METHODES

I. Matériel végétal	33
I.1. Récolte et traitement de la plante	33
I.2. Macération et extraction	33
I.2.1. Extraction par les solvants	33
I.2.2. Calcul du rendement	35
II. Analyse phytochimique	36
II.1. Analyses qualitatives par chromatographie et screening phytochimique.....	36
II.1.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)	36
II.1.2. Chromatographie liquide haute performance (HPLC-UV).....	37
II.1.3. Screening phytochimique	38
II.2. Analyses quantitatives par spectrophotométrie (UV-Visible)	39
II.2.1. Détermination du total en polyphénols	39
II.2.2. Détermination du total en flavonoïdes	40

III. Evaluation des activités biologiques	40
III.1. Evaluation de l'activité antioxydante	40
III.1.1. Piégeage du radical libre DPPH	41
III.1.2. Activité de la réduction du radical-cation ABTS	41
III.1.3. Activité de pouvoir réducteur FRAP	42
III.1.4. Activité de phenanthroline	43
III.1.5. Activité nanoparticules d'argent (SNP)	43
III.2. Evaluation de l'activité anti-cholinestérase	43
III.2.1. Activité anti-cholinestérase	44
III.2.2. Etude in silico d'inhibition de la butyrylcholinestérase	45
III.2.2.1. Docking moléculaire	45
III.2.2.2. Principe de Docking moléculaire	45
III.2.2.3. Programmes utilisés	46
III.2.2.4. Préparation de l'enzyme	46
III.2.2.5. Préparation des molécules	47
III.2.2.6. Docking	48

CHAPITRE V : RESULTATS ET DISCUSSION

I. Rendements des extraits	49
II.1 Analyses qualitatives phytochimique	50
II.1.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)	50
II.1.2. Screening phytochimique	52
II.2. Criblage chimique de l'extrait méthanolique de la plante étudiée par (HPLC-UV)	55
II.3. Teneur en flavonoïdes et en polyphénols	56
II.3.1. Teneur des extraits en polyphénols (TPC)	56

II.3.2. Teneur des extraits en flavonoïdes (TFC)	57
III. Evaluation des activités biologiques	59
III.1. Activités antioxydantes	59
III.1.1. Piégeage du radical libre DPPH	59
III.1.2. Activité du piégeage du cation radical ABTS• ⁺	60
III.1.3. Activité du pouvoir réducteur (FRAP)	62
III.1.4. Activité de réduction par la formation du complexe Fe ⁺² -Phenanthroline	63
III.1.5. Activité nanoparticules d'argent (SNP)	64
III.2. Activité anti-cholinestérase (anti-Alzheimer)	66
III.3. Etude in silico d'inhibition de la butyrylcholinestérase	68
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVE	71
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	V
ANNEXES	VI
RESUMES	VII

LISTE DES ABREVIATIONS

- A_{0.5}** : Concentration indiquant 0,50 d'absorbance
- ABTS** : Sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)
- AChE** : Acétylcholinestérase
- ADN** : Acide désoxyribonucléique
- BChE** : Butyrylcholinestérase
- BHA** : Butyl Hydroxy Anisole
- BHT** : Butyl Hydroxy Toluene
- CI₅₀** : Concentration d'inhibition à 50%
- DPPH** : α,α -diphényl- β -picrylhydrazyl
- EAG** : Équivalent de l'acide gallique
- EQ** : Équivalent de la quercétine
- ERO** : espèces réactives de l'oxygène
- EDCM** : Extrait dichloromethanique de la plante du genre *Seseli*
- EHEX** : Extrait hexanique de la plante *du genre Seseli*
- EMeOH** : Extrait méthanolique de la plante du genre *Seseli*
- EOA** : espèce oxygénée activée
- FCR** : Folin-Ciocalteu
- FRAP** : Pouvoir réducteur
- Fe⁺²** : Fer ferreux.
- HE** : Huile Essentielle
- HIS** : Histidine
- HPLC** : Chromatographie en phase liquide à haute performance
- mmol** : Millimole
- nm** : Nanomètre
- pH**: Potentiel hydrogène
- ppm** : Partie par million
- S** : Seconde
- SD** : Standard de déviation
- SNP** : silver nanoparticles
- TFC** : Contenu total en flavonoïdes
- TPC** : Contenu total en polyphénols
- Trolox** : Acide 3,4-dihydro-6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthyl-2H-1-benzopyran-2-carboxylique
- U** : Unité
- UV** : Ultraviolet

μg : Microgramme

μL : Microlitre

μmol : Micromole

TRP : Tryptophane

TYR : tyrosine

Fe⁺³ : Fer ferrique.

g : Gramme

Kg : Kilogramme

m : Masse

M : Molaire

mg : Milligramme

min : Minute

mL : Millilitre

mM : Millimolaire

MM : Masse molaire

LISTE DES FIGURES

Figure	Titre	Page
1	Répartition géographique mondiale des Apiacées	3
2	Différent organes végétaux du genre <i>Seseli</i>	10
3	Classification des quelques métabolites secondaires	13
4	Squelette de base des composées phénoliques	14
5	Principaux types de acides hydroxybenzoïques	16
6	Principaux types de acides hydroxycinnamiques	17
7	Principaux types de coumarines	18
8	Structure des furocoumarines	18
9	Structure les pyranocoumarines	19
10	Structure chimique de base des flavonoïdes	21
11	Structures chimiques de quelques flavonoïdes	22
12	Stress oxydant	27
13	Voies de formation des espèces réactives de l'oxygène (ERO)	28
14	Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par les systèmes de défenses antioxydantes	29
15	Mécanismes de neurotransmission cholinergique	32
16	Position géographique de la récolte , et la plante récoltée de genre <i>Seseli</i>	33
17	Extraits obtenus à l'aide de différents solvants organiques	34
18	Différentes étapes de l'extraction des parties aériennes de la plante du genre <i>Seseli</i> .	35
19	Tubes d'essai pour dosage du total des polyphénols	39
20	Tubes d'essai pour détermination du total flavonoïdes	40
21	Réaction du radical stable DPPH avec un composé antiradicalaire (AH)	41
22	Mécanisme réactionnel du test FRAP	42

23	Réduction d'Ag ⁺ en nanoparticules (SNP)	43
24	Mécanisme chimiques de la méthode d'Ellman (AChE)	44
25	Structure tridimensionnelle de la BChE par ViewerLite 4.2	46
26	Structure tridimensionnelle par Titan de : (a) limonène , (b) le standard Galantamine, (c) tortuosidine , (d) tortuosinol et aussi (e) α -pinène	47
27	Rendement d'extraction de chaque extrait	49
28	Plaques CCM des trois extraits (EHEX ,EDCM, EMeOH) révélées avec des révélateurs et visualisées sous UV 254 nm et 365 nm	50
29	Une plaque CCM des deux extraits (EHEX ,EDCM) a été visualisée sous UV 365 nm	51
30	Une plaque des deux extraits (EDCM, EMeOH) a été visualisée sous UV 365 nm	51
31	Une plaque CCM de extrait (EMeOH) a été visualisée sous UV 365 nm	51
32	Profil chromatographique enregistré à 254 nm de l'extrait méthanolique analysé par HPLC-UV	55
33	Evaluation de la teneur de polyphénols totaux des extraits de <i>Seseli</i>	56
34	Evaluation de la teneur de flavonoïdes totaux des extraits de <i>Seseli</i>	58
35	Profil de la microplaque de dosage de l'activité anti-radicalaire (DPPH)	59
36	Valeurs des CI ₅₀ du test DPPH.	60
37	Profil de la microplaque de dosage de l'activité antiradicalaire (ABTS).	61
38	Valeurs CI ₅₀ du test ABTS	61
39	Profil de la micoplaque de dosage de l'activité du pouvoir réducteur (FRAP)	62
40	Valeurs des A _{0.5} du test FRAP.	62
41	Profil de la micoplaque de dosage de l'activité de réduction par la formation du complexe Fe ⁺² -phenanthroline	63

42	Valeurs de $A_{0.5}$ du test de phénanthroline	64
43	Profil de la micoplaque de dosage de l'activité nanoparticule d'argent SNP	65
44	Valeurs des $A_{0.5}$ dans le test nanoparticule d'argent SNP	65
45	Profil de la micoplaque de dosage de l'activité inhibitrice de la butyrylcholinestérase (BChE)	66
46	Valeurs de CI_{50} du test inhibition de butyrylcholinestérase (BChE).	67
47	Analyse visuelle réalisée par ViewerLite 4.2 de la position du Tortuosinol dans le site actif de BChE	70
48	Mode de liaisons hydrophobiques du Tortuosinol avec le site actif de BChE par ViewerLite 4.2	70
49	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	Annexe II
50	Courbe d'étalonnage de la Quercétine	Annexe II
51	Représentation schématique de la dilution en série	Annexe II

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Titre	Page
1	Répartition mondiale des genres de la famille Apiacées	4
2	Genres d'Apiacées rencontrés en Algérie	4
3	Position de la famille des Apiacées dans les systèmes de classifications évolutives	5
4	Description botanique des différentes parties d'une plante Apiacées	6
5	Position systématique des Apiacées selon la Classification de Cronquist (1981)	11
6	Classification des polyphénols	15
7	Quelques exemples sur l'activité biologique des coumarines	19
8	Deux groupes des tanins	23
9	Principales activités biologiques des composés phénoliques	24
10	Classification des terpènes et exemples	25
11	Protocole pour préparation des extraits à partir de la plante du genre <i>Seseli</i>	34
12	Résumé des différents systèmes de solvants utilisés sur CCM	37
13	Résumé des tests préliminaires du screening phytochimique	38
14	Rendement d'extraction et caractères de chaque extrait	49
15	Résultats des systèmes de solvants choisis	50
16	Résultats de criblage phytochimique des trois extraits de <i>Seseli</i>	52
17	Teneurs en polyphénols totaux des trois extraits	56
18	Teneurs en flavonoïdes totaux des trois extraits	57
19	Résultats théoriques de l'affinité obtenue par docking des molécules étudiées dans le site actif de la butyrylcholinestérase et leurs relations avec les données expérimentales (IC ₅₀)	68

20	Différentes Verreries utilisées et autres	Annexe I
21	Réactifs utilisés	Annexe I
22	Solvants utilisés et leurs formules	Annexe I
23	Absorbance de l'acide gallique à 765 nm	Annexe II
24	Absorbance de la Quercétine à 430 nm	Annexe II
25	Concentrations de l'échantillon	Annexe II
26	Différent volume utilisé pour chaque degré de ph	Annexe II
27	Pourcentage d'inhibition et la CI_{50} pour le test du radical DPPH	Annexe III
28	Pourcentage d'inhibition et la CI_{50} pour le test du cation radical ABTS	Annexe III
29	Pourcentage d'inhibition et l' $A_{0.5}$ pour le test pouvoir réducteur FRAP	Annexe III
30	Pourcentage d'inhibition et l' $A_{0.5}$ pour le test phénanthroline	Annexe III
31	Pourcentage d'inhibition et l' $A_{0.5}$ pour le test du nanoparticule d'argent	Annexe III
32	Pourcentage d'inhibition et la CI_{50} pour le test de butyrylcholinestérase (BChE)	Annexe III

Introduction

Introduction Générale

Depuis l'antiquité, l'homme utilise les plantes afin de subvenir à ses besoins de base, et notamment la nourriture, les vêtements et les besoins médicaux. Actuellement plus 80% de la population mondiale utilisent les plantes médicinales pour se soigner en conséquence d'une part à l'efficacité de ces dernières, et d'autre part par le manque d'accès aux médicaments prescrits par la médecine moderne (**Galati et al., 1994**). En outre ces médicaments moderne bien que efficace, ils ne sont pas dépourvus des effets indésirables (**Villar et al., 1987**).

Le XXème siècle était la scène de nombreuses recherches de nouvelles molécules bioactives *via* le criblage de ressources naturelles, ceci a résulté dans la découverte d'un grand nombre de médicaments bénéfiques pour le traitement de nombreuses pathologies humaines. Dans les pays tropicaux d'Afrique, plus de 200 000 espèces sur les 300 000 espèces végétales recensées sur la planète ont des vertus médicinales (**Millogo et al., 2005**). Des propriétés pharmacologiques très intéressantes sont attribuées aux plantes médicinales y compris leurs propriétés antalgiques, anti-inflammatoires, antiprolifératives, antiarthritiques, antimicrobiennes, anticholinestérasiques, protectrices des cellules hépatiques. Ces dernières années de nombreux secteurs industriels (cosmétique, pharmaceutique, agroalimentaire) se tournent de nouveau vers l'incorporation des molécules d'origine naturelle avec des caractéristiques chimiques et biologiques originales, dans leurs formulations.

L'Algérie est considérée parmi les pays connus pour leur diversité taxonomique à cause de sa position biogéographique privilégiée et son étendu entre la Méditerranée et l'Afrique sub-saharienne ce qui crée un brassage entre les espèces qui constitue une véritable richesse qui doit être préservée et gérée rationnellement et durablement dans l'objectif de conserver notre diversité biologique et de maintenir les équilibres écologiques déjà fragiles (**Pereira et al., 2003**). On compte plus de 3000 espèces de plantes dont 15% sont endémiques (**Quezel et Santa, 1963**).

Ce travail de recherche vise à évaluer les propriétés phytochimiques et les activités biologiques ; antioxydante et enzymatique, *in vitro*, d'une plante endémique algérienne du genre *Seseli* (Apiacées).

Par la suite, nous avons confirmé l'étude de l'activité enzymatique par une étude théorique, *in silico*, qui cible l'affinité des molécules appartenant de cette plante (Limonène ; α -pinène ; Tortuosinol ; Tortuosidine) envers le site actif de l'enzyme cible (butyrylcholinestérase).

INTRODUCTION GENERALE

Le présent manuscrit est divisé en trois parties : aperçue bibliographique, matériel et méthodes et résultats et discussion.

Dans la première partie, nous présentons une mise au point bibliographique sur la famille des Apiaceae et particulièrement le genre *Seseli*, les métabolites secondaires et les activités : antioxydante et enzymatique .

La seconde partie est la partie expérimentale, dans laquelle nous avons cité les différentes techniques utilisées dans ce travail ; extraction, analyses phytochimiques qualitatives et quantitatives, ainsi que les activités biologiques, *in vitro*, activités antioxydante et anticholinestérase.

La troisième partie consiste en une analyse de résultats obtenus, suivie d'une discussion qui mettra l'emphase sur leur signification par rapport aux données de la littérature, et leur comparaison avec des études antérieures réalisées sur des plantes de la même famille.

Enfin, le manuscrit s'achève avec une conclusion qui permettra de tirer quelques perspectives pour ce travail.

CHAPITRE I

Famille des Apiacées

I. Famille des Apiacées

I.1. Généralités

La famille des Apiacées a été déjà connue depuis les anciennes civilisations chinoise et indienne du Mexique, ainsi que des Grecs et des Romains. Ce fut aussi le premier groupe de plantes faisant l'objet d'une étude systématique publiée par Robert Morison en 1672 (**Heywood et al., 1996**). Cette famille a été créée en 1789 par Antoine Laurent de Jussieu sous le nom d'Umbelliferae, puis nommée Apiacées (basé sur le genre *Apium*) en 1836 par John Lindley (**Botineau, 2010**). Actuellement c'est la terminologie de Lindley (1836) qui fut autorisée. La famille des Apiacées a été largement étudiée, en raison notamment de son importance économique, c'est l'une des familles les plus connues parmi les plantes à fleurs par les botanistes vers la fin du XVI^e siècle.

Les Apiacées anciennement appelées Ombellifères, ce sont des plantes aromatiques grâce à leurs sécrétions d'huiles essentielles, comme son nom l'indique, elle est caractérisée par des rayons d'inflorescence disposés comme ceux d'une ombelle. L'inflorescence est la partie la plus importante de la plante car c'est grâce à elle que la famille des Apiacées est facilement reconnue. Paradoxalement, les espèces de cette famille sont assez difficiles à différencier les unes des autres c'est pourquoi leur détermination doit toujours porter sur des échantillons complets, présentant en particulier des fruits mûrs (**Quezel et Santa, 1963**).

Cette famille riche en métabolites secondaires présente des intérêts économiques et médicaux, comportant des coumarines, des flavonoïdes, des composés acétyléniques et des lactones sesqui-terpéniques, ainsi qu'une grande richesse en huile essentielle dans la quasi totalité de ses organes anatomiques.

I.2. Distribution géographique



Figure 01: Répartition géographique mondiale des Apiacées (**Pimenov et Leonov, 1993**)

Cette famille comprend environ 300 – 455 genres et 3000 – 3750 espèces (Tabanca *et al.*, 2006) se répartissant dans toutes les régions tempérées, avec, toutefois, une prédilection pour l'hémisphère Nord (Figure 1). Les genres présentent une répartition entre les divers continents, avec une prédominance pour le continent asiatique (Pimenov et Leonov, 1993).

Tableau 01 : Répartition mondiale des genres de la famille Apiacées (Nemeth, 2006).

Continent	Genres	Espèces
Europe	139	29
Australie	36	11
Afrique	126	50
Amérique	197	52
Asie	256	159

Dans la flore algérienne la famille des Apiacées occupe une place importante où elle est représentée par 55 genres, 130 espèces (dont 24 endémiques) et 26 sous espèces (Quézel et Santa, 1963).

Tableau 02. Genres d'Apiacées rencontrés en Algérie (Quézel et Santa, 1963).

Genre	Nbre d'espèces	Genre	Nbre d'espèces	Genre	Nbre d'espèces
<i>Ammi</i>	2	<i>Heracleum</i>	1	<i>Ammoïdes</i>	2
<i>Ammiopsis</i>	1	<i>Hippomarathrum</i>	1	<i>Kundmannia</i>	1
<i>Ammodaucus</i>	1	<i>Hohenckria</i>	2	<i>Apium</i>	1
<i>Hydrocotyle</i>	1	<i>Anethum</i>	1	<i>Margotia</i>	1
<i>Anthriscus</i>	2	<i>Magydaris</i>	2	<i>Brachyapium</i>	2
<i>Malabaila</i>	1	<i>Balansaea</i>	1	<i>Peucedanum</i>	3
<i>Bifora</i>	1	<i>Oenanthe</i>	6	<i>Capnophyllum</i>	1
<i>Orlaya</i>	3	<i>Bunium</i>	7	<i>Pimpinella</i>	2
<i>Bupleurum</i>	14	<i>Petroselinum</i>	1	<i>Ridolfia</i>	1
<i>Physocaulos</i>	1	<i>Carum</i>	2	<i>Conium</i>	1
<i>Caucalis</i>	4	<i>Pituranthos</i>	4	<i>Coriandrum</i>	1
<i>Chaerophyllum</i>	1	<i>Reutera</i>	1	<i>Seseli</i>	4
<i>Conopodium</i>	1	<i>Sanicula</i>	1	<i>Daucus</i>	11
<i>Scandix</i>	3	<i>Crithmum</i>	1	<i>Thapsia</i>	3
<i>Cumium</i>	1	<i>Smyrnum</i>	2	<i>Eryngium</i>	7
<i>Sison</i>	1	<i>Echinophora</i>	1	<i>Torilis</i>	2
<i>Elaeoselinum</i>	2	<i>Tinguarra</i>	1	<i>Helosciadium</i>	3
<i>Tordylium</i>	1	<i>Ferula</i>	5		
<i>Foeniculum</i>	1	<i>Turgenia</i>	1		

Un simple regard du contenu de cette liste permet de constater la diversité générique algérienne de cette famille. Les genres *Bupleurum* et *Daucus* sont les plus riches au niveau spécifique avec respectivement 14 et 11 espèces, Alors que la majorité est représentée par une ou deux espèces.

I.3. Classification de la famille des Apiacées

Selon la classification classique d'Arthur Cronquist (Clardy et Walsh, 2004) (Koehn et Carter, 2005), basée sur des caractères morfo-anatomiques et chimiques, la famille appartient à la division des Magnoliophyta (encore appelées Angiospermes ou plantes à fleurs), classe des Magnoliopsida, sous-classe des Rosidae et ordre des Apiales. Cette position systématique est discutée au sein de la communauté scientifique des Botanistes. En effet, d'autres auteurs classiques de référence tels que Thorne, Dahlgren ou encore Takhtajan, la placent au sein des Araliales en raison de caractères morphologiques proches de la famille des Araliacées (Newman et Cragg, 2012).

Une synthèse de la position systématique de la famille des Apiacées selon les principaux auteurs précédemment cités figure dans le **tableau-03** suivant:

Tableau 03 : Position de la famille des Apiacées dans les systèmes de classifications évolutives
(Anonyme 01)

Auteur	Engler	Cronquist	Thorne	Dahlgren	Takhtajan	APGIII
Super-classe						Tricolpées (Eu dicotylédones)
Classe	Dicotyledonae	Magnoliopsida				Tricolpées évoluées
Sous-classe	Archichlamydae	Rosidae	Magnoliidae		Cornidae	Asteridae
Super-ordre			Cornanae	Aralianae		Euastéridées III ou Campanulidées
Ordre	Umbelliflorae	Apiales	Araliales			Apiales
Famille	Umbelliflorae	Apiaceae				

I.4. Description botanique

C'est une famille relativement homogène, caractérisée notamment par son inflorescence typique, l'ombelle. Les fleurs sont blanches ou, plus rarement, jaunâtres, verdâtres ou rosées, quelque fois rougeâtres comme la fleur centrale de l'ombelle de carotte, toujours de dimensions réduites et sont réunies en ombelles simples ou composées), presque toujours pourvues de bractéoles à la base appelées involuclles (Bach et al., 1979).

Les plantes appartenant à la famille des Apiacées sont essentiellement herbacées annuelles, bisannuelles ou le plus souvent vivaces, rarement ligneuses et arbustives, elles ont un plan floral fixe, des fleurs hermaphrodites, rarement dioïques ou polygames, disposées en ombelles, souvent munies à la base d'un verticille de bractées (involucre) ou composées de plusieurs ombelles simples (ombellules), presque toujours pourvues de bractéoles (involucelle) (**Bach et al., 1979**).

Tableau 04 : Description botanique des différentes parties d'une plante Apiacées

les parties de la plante	Description
Tiges	Tiges à entre-noeuds souvent creux, canaux sécréteurs, contenant des huiles essentielles, des résines, des saponines triterpéniques, des coumarines, des polyacétylènes, des monoterpènes et des sesquiterpènes, de l'umbelliférose (un trisaccharide) comme matière de réserve. Ces tiges portent à l'extérieur des sillons dans le sens de la longueur (tiges cannelées) (Bach et al., 1979)
Feuilles	Les feuilles sont alternes, sans stipules, pennées ou palmées et le plus souvent composées à folioles profondément découpées ou lobées, mais certaines espèces ont des feuilles entières (buplèvre par exemple), à nervation pennée à palmée. Les pétioles sont souvent élargis à leur base, engainant la tige (Bach et al., 1979).
l'inflorescence	L'ombelle représente l'inflorescence typique des Apiacées, anciennement appelées pour cette raison Ombellifères. Les ombelles peuvent être simples, munies à leur base d'un verticille de bractées formant un involucre. Les ombelles peuvent également être composées d'ombellules, pourvues à leur base de bractéoles disposées en involucelle (Bach et al., 1979).
Fruit	Le fruit des Apiacées se forme après fécondation ou l'ovaire infère devient un Diakène double (méricarpe indéhiscent).
Organes souterrains	Ce sont souvent des racines pivotantes, dures (persil, fenouil) pouvant même se tubériser (carotte) et ayant au collet une structure de tiges se prolongeant sans discontinuer en un pivot radicaire portant des racelles ou de petite racines secondaires (Bach et al., 1979).
Organisation florale	Les fleurs des Apiacées sont petites, pentamères, leur disposition en inflorescence relativement condensée explique qu'elles soient généralement de petite taille. Leur simplicité et leur régularité caractérisent les Apiacées. Ainsi, la fleur a toujours la même formule florale: 5 S (Sépales) + 5P (Pétales) + 5E (Étamines) + 2C (Carpelles)

I.5. Phytochimie

La famille des Apiacées est connue pour la grande diversité en métabolites secondaires : elles comportent des coumarines, des flavonoïdes, des composés acétyléniques et des lactones sesquiterpéniques. et huiles essentielles ces dernières sont secrétées dans des canaux schizogènes dans tous les organes leur conférant des odeurs et saveurs caractéristiques. Ces propriétés organoleptiques font que de nombreuses espèces sont largement utilisées comme légumes ou condiments. Les huiles essentielles des Apiacées sont riches en dérivés phénylpropaniques tels que l'anéthole (*Pimpinella anisum*), l'apiole (*Apium petroselinum*) et la foeniculine (*Foeniculum vulgare*) et en terpènes comme le β - caryophyllène, le limonène ou la carvone (**Bruneton, 2009**). Quelques molécules ont été identifiées la première fois dans des huiles essentielles d'Apiacées, ainsi leur dénomination en était dépendante tel que le carvone qui a été isolé au début dans l'huile essentielle de *Carum carvi* (**Nemeth, 2006**).

I.6. Phytothérapie

La famille des Apiacées est la famille botanique la plus intéressante en phytothérapie pour le traitement des troubles fonctionnels digestifs (**Filliat, 2012**). Les métabolites secondaires qu'elle contient doivent certainement trouver leurs applications dans la médecine populaire ou dans la médecine moderne. Certaines espèces ont été utilisées comme toniques, diurétiques, stimulants cardiovasculaires, etc. (**Heywood, 1971; Rodriguez et al., 1976 ;Evans et Schmidt, 1980**).

Egalement d'autres espèces sont réputées par des propriétés antibactériennes, comme l'induction de l'apoptose, activités antibactériennes, hépato protectrices, vaso-relaxantes et antitumorales (**Oroojalian et al., 2010**). les graines d'Ammi visnaga ont déjà été utilisées en Egypte ancienne pour leur action de stimulation de la pigmentation de la peau (**Valente et al., 2015**).

Les graines d'Ammi visnaga ont une activité spasmolytique (**Sofowara, 2010**). Cependant, l'*Anethum graveolens* (Aneth) a des propriétés analogues à celle de l'anis et du fenouil, autrement dit antispasmodique digestif, eupeptique, carminatif et diurétique (**Boullard, 2001**). Les souches et le pétiole d'angélique (*Angelica archangelica* L.) sont utilisés en confiserie (sous forme confite) car riches en glucides et principalement ont des propriétés digestives (**Botineau, 2009; Bruneton, 2010**).

I.7. Toxicité

La famille des Apiacées renferme des espèces très toxiques pouvant entraîner la mort par ingestion tel que la grande Cigüe (*Conium maculatum* L.), elle contient de alcaloïdes dérivés de la pipéridine exemple « coniine » est très abondante dans les fruits tandis que l'appareil végétal est riche en

conicéine, son intoxication peut entraîner éblouissement, mydriase, vertige, soif intense, sensation de refroidissement progressif, baisse de la sensibilité de la motilité, paralysé du diaphragme provoquant l'arrêt respiratoire (**Boitineau, 2010**). L'aciguë aquatique (*Cicuta virosa* L.) renferme la cicutoxine. L'intoxication se manifeste par : salivation, vertige, brûlure de la bouche, vomissement, convulsion. Ainsi l'oeinanthesafranée (*Oenanthe crocata* L.) est très toxique, elle renferme un isomère de la cicutoxine : l'oeanthotoxine), les symptômes sont identiques à ceux de l'ingestion de la Ciguë vireuse. Contrairement à la petite Ciguë (*Aethusa cynapium*) qui est moins toxique, les racines renferment des polyines.

Le contact avec certaines plantes alimentaires de la famille des Apiacées comme l'angélique (*Angelica archangelica* L.), le Céleri (*Apium graveolens* L.), le fenouil (*Foeniculum Mill.*), le persil (*Petroselinum crispum* L.), la Livèche (*Levisticum officinale* L.) la grande berce (*Heracleum spondylium* L.) la panais (*Pastinaca saliva* L.) ainsi que la ferule (*Ferule sp.*) et l'exposition aux ultra violets (UV) peut déclencher une dermatite (érythème, brûlures, bulles, vésicules) et qui peuvent être accompagnés de maux de tête voire de fièvre. Elles contiennent des furanocoumarines qui sont des agents photo sensibilisants pouvant entraîner une photo toxicité après exposition au soleil.

I.8. Intérêt économique

Les Apiacées renferment de nombreuses plantes alimentaires et aromatiques (**Spichiger et al., 2004**) : *Anethum graveolens* L.(l'aneth), *Apium graveolens* L.(le céleri), *Carum carvi* L.(le carvi), *Coriandrum sativum* (le coriandre), *Cuminum cyminum* (le cumin), *Daucus carota* (la carotte), *Foeniculum vulgare* (le fenouil), *Pastinaca sativa* L. (le panais), *Petroselinum crispum* (le persil) et *Pimpinella anisum* L. (l'anis).

D'autres Apiacées sont utilisées comme additifs naturels dans l'industrie alimentaire, certaines espèces sont comestibles, telles que : *Daucus carota* (carotte), *Pastinaca sativa* (panais), *Foeniculum vulgare*, etc.

Certaines espèces sont utilisées comme condiments ou épices, comme *Carum carvi* (cumin), *Anethum graveolens* (aneth), *Pimpinella anisum* (anis) *Petroselinum sativum* (persil), *Foeniculum vulgare* var. (fenouil) et *Coriandrum sativum* (coriandre).

D'autres sont utilisées comme arômes pour les boissons, tel est le cas d'*Angelica archangelica* (angélique), *Laserpitium gallicum* et plusieurs espèces d'*Heracleum* (**Doneanu et Anitescu, 1998; Olle et al., 2010**). Certains genres sont cependant très toxiques, comme *Conium* (la grande ciguë, dont on dit qu'elle a été utilisée pour le suicide de Socrate), et *Cicuta* (la ciguë vireuse).

II. Genre *Seseli*

II.1. Distribution

La plupart des espèces de genre *Seseli* distribué dans le Irano-Turonien, Euro-Sibérien et est Méditerranée région géographique (Davis et al, 1988 ; Dogan et al, 2011). Le nombre total de *Seseli* taxons à travers le monde est d'environ 125-140, avec 101 espèces trouve dans en Asie et 9 en Turquie (Pimenov et Leonov, 1993). Selon genre *Seseli* contribuer 10 espèces de flore de la Serbie (Nikolić, 1975). Le genre *Seseli* comprend environ 50 espèces présentes en Europeen Asie, Afrique et en Australie (Anonyme 02).

Seseli est représenté par 9 espèces (*Seseli pimpinelloides* L., *S. montanum* L., *S. glaucum* L., *S. annuum* L., *S. ammoides* L., *S. tortuosum* L., *S. carviflora* L., *S. pyreneacum* L. et *S. laxifragum* L.) dans Species Plantarum, publié en 1753 (Linné, 1753).

II.2. Morphologie

Seseli genre de plantes dicotylédones polypétales de la famille Apiacées (Ombellifères), et de la pentandrie digynie L., les principaux caractères sont les suivants; involucre ou collerette universelle ordinairement nulle involucelles ou collerettes partielles formées d'une ou d'un petit nombre de folioles linéaires ombelle roide composée d'un grand nombre d'ombellules ramassés un peu globuleuses calices à peine visible corolle régulière à cinq pétales cordiformes et égaux cinq étamines à filets subulés terminés par des anthères simple ovaire surmonté de deux styles divergent et terminés par des stigmates obtus fruit petits ovoïdes marqués de cinq côtes et d'autant de valvules (Pierre et Joseph, 1844) (Figure 02).

Les *Seseli* sont des plantes herbacées, à feuilles alternes, une ou deux fois ailées, composées deux folioles étroites , linéaires : leur fleures sont blanches ou quelques fois un peu rougeâtres disposées en ombelle, dont les ombellules sont courtes, ramassées et un peu globuleuses. On en connoît une trentaine d'espèces, la plupart naturellement partie de méridionale l'Europe (Levrault, 1827) (Figure 02).

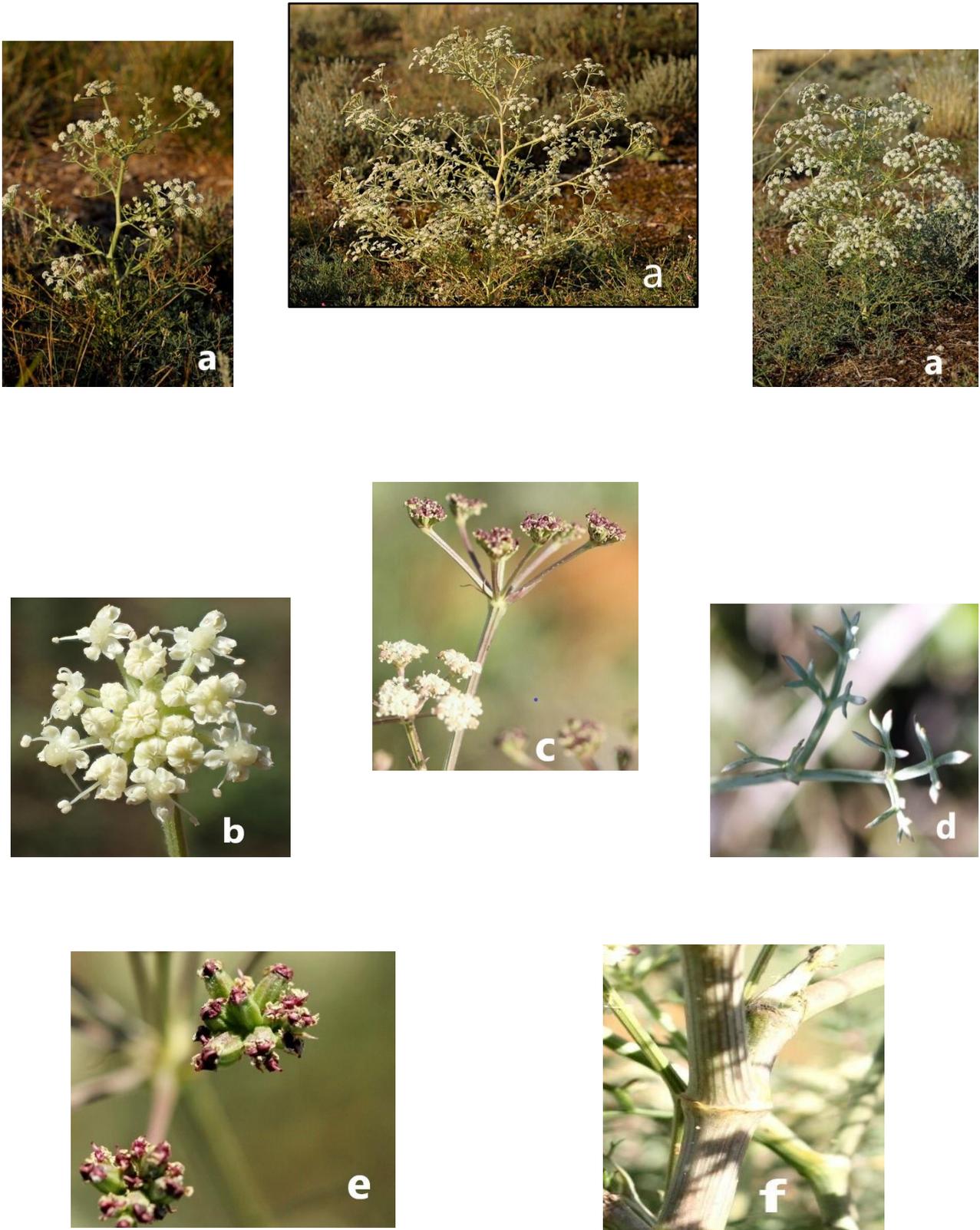


Figure 02. Différent organes végétaux du genre *Seseli*

(a) La plante étudiée, (b) Les fleurs, (c) L'Inflorescences, (d) Les feuilles, (e) Les fruits, (f) les Tiges

II.3. Position systématique

Tableau 05: Position systématique des Apiacées selon la Classification de **Cronquist (1981)**

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Rosidae
Ordre	Apiales
Famille	Apiaceae (L.)
Genre	Seseli

II.4. Usage traditionnel

Les espèces de *Seseli* sont principalement riche en coumarines outre les terpénoïde, les huiles essentielles,...etc (**Barrero et al.,1990 ;Tosun et Özkal, 2003**).Et ont de nombreuses activités pharmacologiques importantes avec des effets curatifs comme dans inflammation, gonflement, rhumatisme, douleur et rhume (**Hu et al., 1990**).

D'autre part, les fruit de *Seseli indicum* auraient été anthelminthiques, propriétés carminative, stomachales et stimulantes (**Tandan et al., 1990**). *Seseli sibiricum* est utilisé pour mélanger des boissons et comme médicament pour le bétail au Cachemire (**Austin et al.,1968**).

De plus, fruits de *Seseli libanotis* étaient un remède local pour la tension artérielle contrôle au Pakistan en plus de son huiles essentielle des fruits a un puissant antimicrobienne (**Syed et al., 1989**) . Alors que *Seseli indicum* présentait un forte répulsive contre les insectes (**Dixit et al., 1992**) et les fongi toxicité (**Chaturvedi et Tripath, 1989**).

Les fruits de *Seseli tortuosum* sont enregistrés comme emménagogue anti-flatulence (**baytop,1999**). De plus les feuilles de *Seseli libanotis* (Kelemkesirou Kelemenkesiren Turc) sont consommé comme légume dans de l'est de la Turquie (**baytop,1994**).

En Turquie ils existe peu d'études sur les espèces de *Seseli* basse sur les coumarines (**Tosun et al., 2005;Tosun, 2006; Tosun et al., 2006a**) et les huiles essentielles (**Baser et al., 2000 ;Kaya et al., 2003 ;Tosun et al., 2005 ;2006b ;2006c**).au paravent, antimicrobiennes (**Tosun et al., 2004**) anti-inflammatoire et anti-noci ceptifs (**Kupeli et al., 2005; Tosun et al., 2009;Chun et al., 2016**).

CHAPITRE II

Métabolites secondaire

I. Métabolites secondaires

I.1. Introduction

Les végétaux supérieurs ont la capacité de synthétiser, par des voies métaboliques complexes des métabolites dits secondaires. Ces composés sont utilisés par les plantes pour diverses fonctions adaptatives notamment en réponse aux stress biotiques et abiotiques qu'ils peuvent subir ou améliorent l'efficacité de la reproduction. **(Thomas. M, 2011).**

Ces métabolites sont situés dans l'un des trois classes, des polyphénols, des alcaloïdes et des terpénoïdes. De nombreuses études ultérieures ont prouvé la bioactivité de ces molécules, citant les activités antitumorale, antivirale, antimicrobienne, antioxydant, anti-inflammatoire, etc. **(Thomas. M, 2011).**

Les composés métaboliques secondaires ne sont pas produits directement au cours de la photosynthèse, mais découlent de réactions chimiques subséquentes. On les appelle donc des métabolites secondaires. Ces composés ne se trouvent pas dans toutes les plantes.

Les métabolites secondaires ont une répartition limitée dans l'organisme de la plante et sont produits en faible quantité, sont d'une variété structurale extraordinaire, plus de 200.000 structures ont été définies. Ces molécules marquent de manière originale, une espèce, une famille ou un genre de plante et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique **(Hartmann. T, 2007).**

I.2. Rôles des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires jouent un rôle très important notamment, en réponse au stress biotique et abiotique qu'ils peuvent subir tels que, les changements de température, la sécheresse, la salinité, la radiation, les herbivores, les infections pathogènes, la défense contre l'attaque des organismes compétitifs dont les bactéries, les champignons, les insectes, les animaux et les autres plantes **(Kliebenstein, 2012; Costa et al., 2013).** Cependant, le rôle écologique le plus important est lié à la fonction reproductrice qui garantit le succès évolutif de toutes les espèces vivantes, les pigments et les composés volatils de ces métabolites peuvent attirer les pollinisateurs et ainsi favoriser la dispersion des graines et la fécondation **(Iriti, 2013)**

Ces molécules jouent un rôle majeur au niveau de la croissance des végétaux et dans la lutte contre des agents pathogènes et des infections. Ils sont importants, non seulement en raison de leur rôle dans la défense contre la prédation par les micro-organismes comme les insectes et les herbivores mais aussi pour leurs propriétés biologiques comme antioxydant, antimicrobien et anti-cancérigènes

ainsi leurs effets thérapeutiques contre plusieurs maladies savoir l'hypertension, le diabète et l'obésité (Aires et al., 2013).

I.3. Classification des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont produits en très faible quantité, il existe plus de 200000 métabolites secondaires classés selon leur appartenance chimique. (Cuendet. M ,1999). Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine (Krief, 2003)

On peut classer les métabolites secondaires en trois grands groupes :

- ✓ Les composés phénoliques
- ✓ Les terpènes
- ✓ Les alcaloïdes

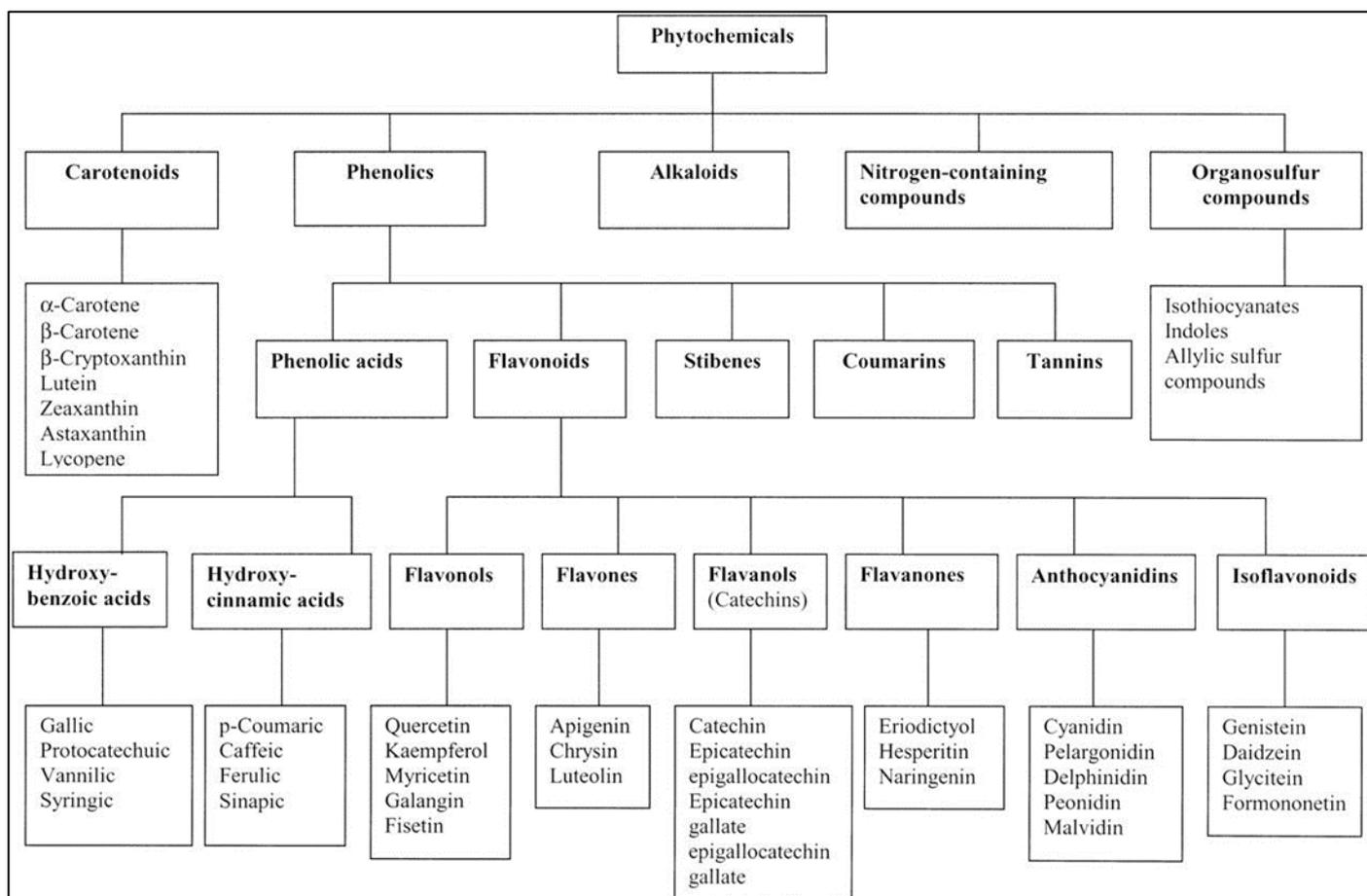


Figure03. Classification des quelques métabolites secondaires (Muanda., 2010).

II. Composés Phénoliques

II.1. Généralités

Le terme polyphénols est introduit en 1980, il remplace le terme ancien de tanin végétal. Les composés phénoliques ou les polyphénols (PP) constituent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal. Ces métabolites secondaires sont présents dans tous les organes des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois).

En fait les polyphénols sont caractérisés par un poids moléculaire élevé et la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside (**Boubekri, 2014**).

II.2. Structure chimique

Les polyphénols sont caractérisés par la présence d'un ou plusieurs groupes hydroxyles liés à un cycle benzénique (**Figure 04**).

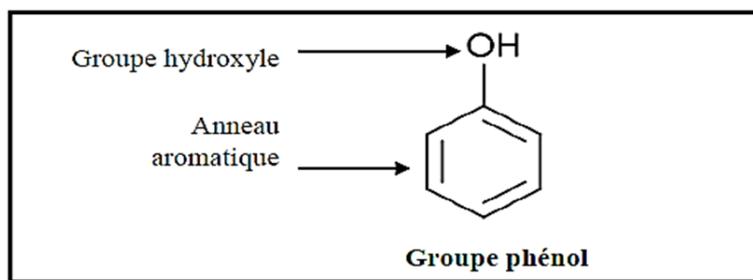


Figure04. Squelette de base des composés phénoliques (**Girotti-Chanu, 2006**).

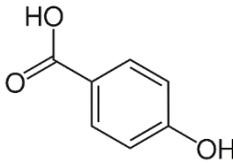
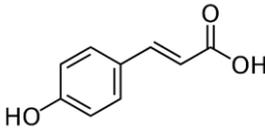
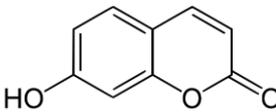
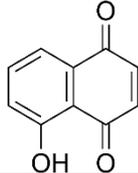
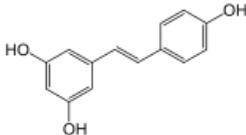
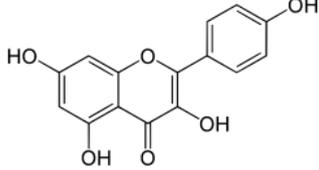
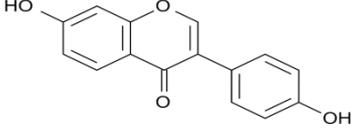
II.3. Classification des composés phénoliques

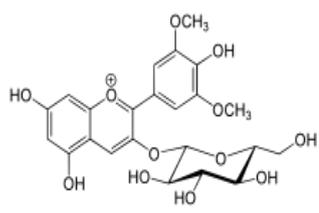
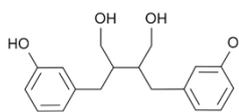
Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires des plantes (**Bruneton ,2009**) et représentent plus de 8000 espèces moléculaires connues. Ils regroupant un vaste ensemble de substances chimiques, avec un noyau aromatique ou benzoïque auquel sont liés à un ou plusieurs groupes hydroxyles, libres ou engagés dans une autre fonction chimique (éther, méthylique, ester,...).

Le phénol est le composé de base de ce groupe et les dérivés portant plusieurs cycles sont appelés les polyphénols. Les polyphénols sont divisés en plusieurs catégories, en fonction du nombre de cycles phénoliques qu'ils contiennent et les fonctions chimiques liées à ces cycles (**Pérez-Pérez et al., 2013**) à savoir: les acides phénoliques, les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols et les tanins qui sont des produits de la polymérisation des flavonoïdes et les

coumarines (Luthria et al., 2006). En se basant sur la structure carbonée de base, on peut dégager quelques principales classes de composés phénoliques suivantes (Tab 06).

Tableau 06: Classification des polyphénols (Bensouici, 2015).

Squelette carboné	Classe	Exemple	Formule
C6	Phénols simples	hydroquinone	
C6-C1	Acides hydroxy benzoïques	Acide parahydroxybenzoïque	
C6-C3	Acides hydroxy cinnamiques	Acide p-coumarique	
	Coumarines	Ombelliférone	
C6-C4	Naphtoquinones	Juglon	
C6-c2-C6	Stilbénoides	Trans-resvératrol	
C6-C3-C6	Flavonoïdes	Kaempférol	
	Isoflavonoïdes	Daidzéine	

	Anthocyanes	Dalchiniol	
(C6-C3) ₂	Lignanes	Entérodiol	

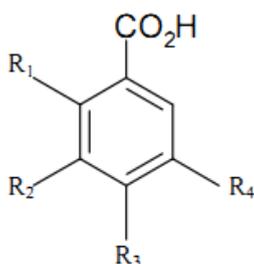
II.3.1. Acides phénoliques

Les acides phénoliques (phénols simples) sont parmi les formes les plus simples des composés phénoliques, sont caractérisés par la présence d'une fonction acide et plusieurs fonctions phénols. Ils sont incolores et plutôt rares dans la nature, sont présents dans un certain nombre de plantes agricoles et médicinales, ils sont formés d'un squelette à sept atomes de carbone (**Psotová et al., 2003**).

Ces composés phénoliques se séparent en deux grandes classes distinctes que sont les acides hydroxybenzoïques (C6-C1) et les acides hydroxycinnamiques (C6-C3).

II.3.1.1. Acides hydroxybenzoïques

Ce groupe comporte les acides dérivés de l'acide benzoïque, ce dernier étant la molécule la plus simple de cet ensemble. Ces molécules existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides (**Thomas, 2016**).



R₁ = R₂ = R₄ = H, R₃ = OH Acide p hydroxybenzoïque

R₁ = R₄ = H, R₂ = R₃ = OH Acide protocatéchique

R₁ = R₄ = H, R₂ = OCH₃, R₃ = OH Acide vanillique

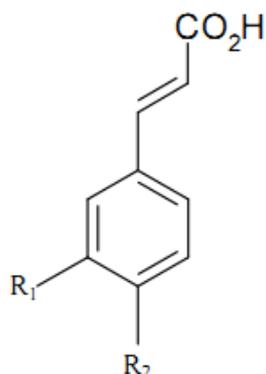
R₁ = H, R₂ = R₃ = R₄ = OH Acide gallique

R₁ = OH, R₂ = R₃ = R₄ = H Acide salicylique

Figure 05 : Principaux types de acides hydroxybenzoïques (**Arimboor et al., 2008**).

II.3.1.2. Acides hydroxycinnamiques

Ces composés sont dérivés directement de l'acide cinnamique qui n'est, lui-même, pas un acide phénolique. Ils sont très largement présents dans l'alimentation (**Thomas, 2016**).



R1 = R2 = H	Acide cinnamique (non phénolique)
R1 = H, R2 = OH	Acide ρ -coumarique
R1 = R2 = OH	Acide caféique
R1 = OCH3, R2 = OH	Acide férulique

Figure 06 : Principaux types de acides hydroxycinnamiques (**Arimboor et al., 2008**).

II.3.2. Coumarines

Historiquement le nom de coumarine vient de « cumaru » qui est le nom dans une langue amazonienne, de l'arbre de Tonka (*Dipteryx odorata* Willd., Fabaceae) dont les fèves contiennent 1 à 3 % de coumarine. Les coumarines ont été isolées pour la première fois en 1820 (**Bruneton, 1999**). Elles sont présentes en quantités plus faibles dans plusieurs plantes comme le mélilot, la sauge sclarée et la lavande.

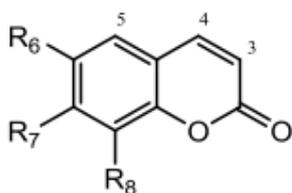
La coumarine et ses dérivés dont plus de 300 structures sont connues, sont accumulés par plus de 70 familles de dicotylédones et 9 familles de monocotylédones. Ils sont présents sous forme libre ou hétérosides dans la plupart des familles de dicotylédones incluant : Apiaceae, Asteraceae, Fabaceae, Moraceae, Rosaceae, Rubiaceae, Rutaceae et Solanaceae (**Bruneton, 2009**).

La coumarine est présente dans divers végétaux, elle dégage une agréable odeur, rappelant la vanilline et contribue à l'odeur de foin coupé. La coumarine est également présente dans la cannelle, principalement la cannelle de Chine (**Bensouici, 2015**).

II.3.2.1. Structure des coumarines

Les coumarines sont des composés phénoliques des végétaux, portant un noyau benzopyrone dans leur structure (Alignan, 2006), Ce sont des 2H-1-benzopyran-2-ones que l'on peut considérer, en première approximation, comme étant les lactones des acides 2-hydroxy-Z-cinnamiques (Bruneton, 1999)

II.3.2.1.1. Coumarines simples



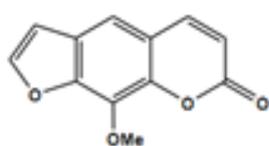
R6= R8= H, R7=OH	Umbélliférone
R6= R7=OH, R8=H	Aesculol
R6=OCH3, R7=OH,R8=H	Scopoléto
R6= OCH3, R7 =R8=OH	Fraxéto
R6=H, R7=R8=OH	Daphnéto

Figure 07: Principaux types de coumarines (Macheix et al., 2005).

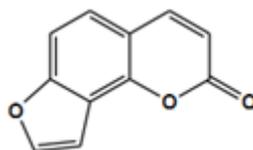
II.3.2.1.2. Coumarines complexes

II.3.2.1.2.1. furocoumarines

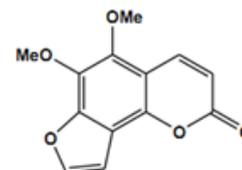
Les furocoumarines (appelées encore furanocoumarines) constituent une famille de composés synthétisés par certaines espèces de végétaux supérieurs. La structure chimique des furanocoumarines est constituée d'un cycle furane fusionné avec la coumarine. L'association peut se faire : soit dans le prolongement de la coumarine (forme linéaire), comme le psoralène et la xanthotoxine soit sur le côté (forme angulaire) comme l'angélicine et la pimpinelline (Harkati, 2011).



Xanthotoxine



Pimpinelline



Angélicine

Figure 08: Structure des furocoumarines (Harkati, 2011)

II.3.2.1.2.2. Pyranocoumarines

Composées formées par la fusion d'un hétérocycle pyrane avec la coumarine.

- ✓ Soit dans le prolongement (forme linéaire) xanthylétine.
- ✓ Soit latéralement (forme angulaire) séseline, visnadine (Harkati ,2011)

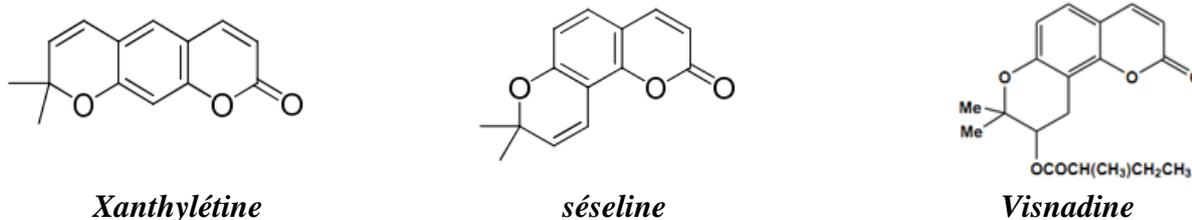


Figure 09 : Structure les pyranocoumarines (Harkati, 2011).

II.3.2.2. Rôle des coumarines dans la plante

Les coumarines sont défensives envers certains organismes comme certains insectes et vertébrés le sol, en particuliers son rôle dans l'inhibition de la croissance de certains champignon sur les feuilles et les fruits ou il est Ils s'accumulent et les coumarines contribuent également à certaines activités métabolique telles que la régulation croissance, comme elles sont connues fioranocomarinate en inhibant la croissance apicale de la racine et sa sécrétion à la surface des graines retarde son apparition (Garcia-Jimenez et al.,2000)

II.3.2.3. Activités biologiques des coumarines

Voici quelques exemples sur l'activité biologique des coumarines (tableau 07) .

Tableau 07: Quelques exemples sur l'activité biologique des coumarines

L'activité	Coumarines	Information	Références
Anti-inflammatoire	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Angélicine ✓ Athamantine ✓ Bergaptène ✓ Herniarine ✓ Impérorine ✓ Ledebouviellole ✓ Psoralène ✓ Scopolétine 	<p>Cette activité dépend de la nature des substituants des coumarines, Plus intéressant, les coumarines peuvent posséder des effets pro inflammatoires : Le psoralène et impérorine à une faible dose possède une activité anti inflammatoire, mais à une forte dose et un effet pro inflammatoire.</p>	<p>(Rouxel, 1989)</p>

Antimicrobienne	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Angélicine ✓ Cichoriine ✓ Ciichoriine acétate ✓ Herniarine ✓ Umbelliprenine 	Ils sont montrés que le groupe hydroxyle libre en position 6 des coumarines est très important pour l'activité antifongique, tandis que le même groupe libre en position 7 est important pour l'activité antibactérienne.	(Rouxel, 1989)
Phototoxicité	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Bergaptène ✓ Isopimpinelline ✓ Peucedanine ✓ Psoralène ✓ Umbélliférone ✓ Xanthotoxine 	Ils sont des photosensibilisateurs dans la gamme de 320-380 nm, une gamme où les acides nucléiques et les protéines cellulaires montrent les bandes d'adsorption faible.	(Crépy, 2006)
Cytotoxicité	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Nifcoumarine ✓ Paepalantine ✓ Seseline ✓ 5-méthoxyseseline ✓ Suberosin ✓ Xanthylétine ✓ Xanthoxylétine 	Cette activité est basée sur les substituants ortho-dihydroxyles, en plus le groupe phényle peut avoir un rôle très important dans cette activité.	(Kostova, 2005)
Inhibiteurs de HIV	<ul style="list-style-type: none"> ✓ (+) Calanolide A ✓ (-) Calanolide B ✓ Cordatolite A ✓ Cordatolite B ✓ Coriandrine ✓ Imperatorine ✓ Suksdorfine 	Quelques coumarines inhibent différents stades du cycle de réplication de HIV.	(Kostova et al., 2006; Spino et al., 1998; Singh et al., 2005)

II.3.3. Flavonoïdes

Le nom flavonoïde provient du terme (flavus, «jaune») en latin) désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (**Bouakaz, 2006**). Ils ont été isolés par le scientifique Chervreul en 1814, mais réellement ont été découverts qu'en 1930 par Albert Szent-Györgyui, désignés sous le nom de vitamine P, en raison de leur efficacité à normaliser la perméabilité des vaisseaux sanguins, cette dénomination fut abandonnée lorsqu'on se rendit compte

que ces substances ne correspondaient pas à la définition officielle des vitamines, il devient clair que ces substances appartiennent aux flavonoïdes (Nijveldt et al., 2001).

Les flavonoïdes sont des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux (Havasteen, 2002), se rencontrent généralement dans toutes les plantes vasculaires, sont localisés dans divers organes : racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits. C'est une grande famille constituée de plus de 4000 variétés de métabolites secondaires ubiquitaires des végétaux (Fang et al., 2007). Dans la plante, les flavonoïdes sont très souvent liés avec des sucres. Les flavonoïdes on parle alors d'hétérosides constitués d'une partie phénolique aglycone ou génine associée à un sucre.

De nombreuses études ont suggéré que les flavonoïdes présentent des activités biologiques y compris la principale propriété initialement reconnue aux flavonoïdes est d'être « *veino-actifs* », c'est-à-dire capables de diminuer la perméabilité des capillaires sanguins et de renforcer leur résistance. Les propriétés cicatrisantes et anti-infectieuses de la propolis étaient entre autre utilisées par les civilisations égyptienne, romaine, grecque et inca (Bruneton, 1999).

II.3.3.1. Classification des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des dérivés benzo- γ -pyran. Leur structure de base est celle d'un diphenylpropane à 15 atomes de carbone (C6-C3-C6), constitué de deux noyaux aromatiques (ou anneaux) que désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, qui désigne la lettre C (Figure 10).

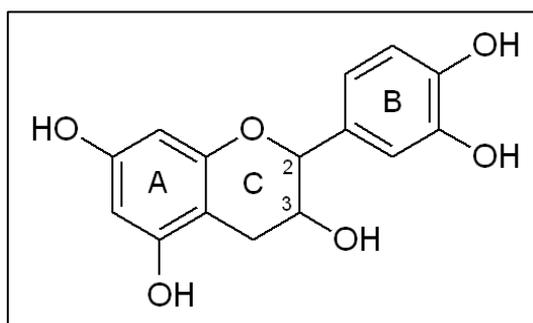


Figure 10. Structure chimique de base des flavonoïdes (Achat, 2013)

La classe des flavonoïdes comporte à elle seule plus de 4000 substances qui ont été isolées et identifiées à partir des milliers des plantes qui peuvent être divisées en plusieurs catégories : Les flavones, les flavonols et les dihydroflavonols, les isoflavonoïdes, les biflavonoides, les flavanones, les flavanols, les flavanediols (leucocyanidines), les anthocyanidines, les chalcones et les dihydrochalcones, les auronnes (Djemai, 2008) (Figure 11).

Classe	Structure générale	Flavonoïde
Flavanol		(+)-catéchine (+)-épicatéchine épigallocatechine gallate
Flavone		chrysine apigénine rutine lutéoline lutéoline glucosides
Flavonol		kaempferol quercétine
Flavanone		myricétine tamarixétine naringine taxifoline hesperidine
Isoflavone		génistine génistéine
Anthocyanidine		apigénidine cyanidine

Figure 11: Structures chimiques de quelques flavonoïdes (Khiredine, 2014)

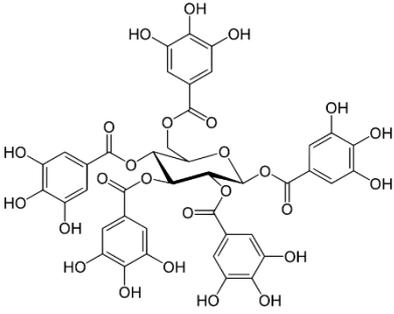
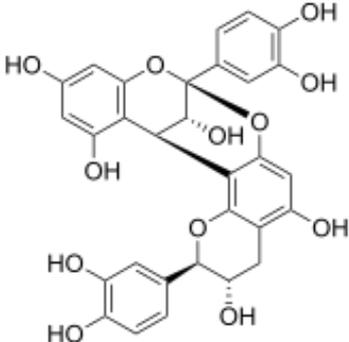
II.3.4. Tannins

Les tannins (ou tanins) sont des polymères phénoliques solubles dans l'eau et ayant un poids moléculaires (PM) entre 500 et 3000. Ils ont l'aptitude à précipiter les alcaloïdes, la gélatine et les protéines (Sereme et al., 2010). Les tanins sont des substances d'origine végétale qui ont la propriété de transformer la peau fraîche en un matériau imputrescible : le cuir (Bruneton, 1999). Cette propriété de tannage provient de la création de liaisons entre les molécules de tannins et les fibres de collagène de la peau. Les tannins sont caractérisés par une saveur astringente et sont trouvés dans toutes les parties de la plante: l'écorce, le bois, les feuilles, les fruits et les racines (Scalbert, 1991).

Grâce à leurs fonctions phénoliques, les tannins sont d'excellents piègeurs de radicaux libres, ainsi, des activités antimutagènes et anticancéreuses ont été attribuées à certains tannins en raison de leur propriété anti-oxydante (Richelle et al., 2001). Certaines drogues à tannins présenteraient des effets antimicrobiens, antifongiques ou antiviraux (Chung et al., 1998 ; Song et al., 2006). On distingue

deux groupes de tannins différents par leur structure et par leur origine biogénétique et sont subdivisées en deux groupes: Tannins hydrolysables et non hydrolysables ou condensés (Okuda et Ito, 2011; Adamczyk et al., 2013) :

Tableau 08 : Deux groupes des tanins

Tannins	Définition	Structure chimique
Tanins Hydrolysables	Il s'agit d'oligo- ou de poly-esters de sucre, souvent le glucose avec des molécules d'acide-phénols. Ils seront alors classés selon la nature de l'acide-phénol en question : les tanins galliques seront dérivés de l'acide gallique alors que les tanins éllagiques seront dérivés de l'acide hexadroxyphénique (Thomas, 2016).	
Tanins Condensés	Ce sont des polymères flavaniques constitués d'unités flavan-3-ols. Ces molécules vont être liées entre elles par des liaisons C-C (type B) ou C-O (type A). Selon la définition, les homo-polymères sont des tanins condensés présentant uniquement des flavan-3-ols alors que les hétéropolymères présenteront des monomères de classes différentes (Thomas, 2016).	

II.4. Polyphénols comme antioxydants

Les composés phénoliques sont capables d'agir comme des antioxydants qui peuvent neutraliser les radicaux libres en donnant un électron ou un atome d'hydrogène. Leurs structures leur confèrent une activité antioxydante aussi importante. Les groupes hydroxyle des polyphénols sont bien des donneurs d'atomes d'hydrogènes ; ils peuvent réagir avec les espèces réactives de l'oxygène et les espèces réactives de l'azote, enfin de réaction, le cycle de génération de nouveaux radicaux est interrompu. Suite à l'interaction avec les espèces réactives initiales, la forme radicalaire de l'antioxydant est produite avec une plus grande stabilité chimique que le radical initial. L'interaction des groupes hydroxyle de composés phénoliques avec les électrons π du noyau benzénique donne aux molécules des propriétés particulières, le plus notamment la capacité à générer des radicaux libres, où le radical est stabilisé par la délocalisation. Le pouvoir antioxydant des composés phénoliques est également attribué à leur capacité à chélater les métaux ioniques impliqués dans la

production de radicaux libres. Cependant, les composés phénoliques peuvent agir comme des pro-oxydants (Tsao, 2010).

Les composants phénoliques sont des molécules biologiquement actives, ils sont largement utilisés en thérapeutique comme vasoconstricteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et antiradicalaires, antimicrobiens (Djemai, 2008).

Tableau 09. Principales activités biologiques des composés phénoliques

Polyphénols	Activités biologiques	Références
Acides Phénols (cinnamiques et benzoïques)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Antibactériennes ✓ Antifongiques ✓ Antioxydantes 	(Halliwell, 1994; Cotelle, 2001). (Muanda, 2010)
Flavonoïdes	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Antitumorales ✓ Anticarcinogènes ✓ Anti-inflammatoires ✓ Hypotenseurs et diurétiques ✓ Antioxydantes 	(Milane, 2004), (Cotelle, 2001) (Marfak, 2003 ; Balasundram, 2006)
Tannins galliques et catéchiques	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Antioxydantes ✓ Antibactériennes 	(Bruneton, 1999), (Perret, 2001) (Peronny, 2005), (Chung et Wei, 2001).

III. Terpénoïdes

Le terme de terpène est attribué à tous les composés possédant une structure moléculaire construite d'un monomère à 5 carbones appelé isoprène de formule C₅H₈. Ces composés, en majorités sont d'origine végétale.

Les isoprénoïdes ou Les terpénoïdes sont des composés issus de la condensation d'unités de base à 5 carbones de type isoprène. On parle également de composés terpéniques ou terpénoïdes.

L'unité monoterpène correspondant à des molécules à 10 carbones formées à partir de deux unités isoprènes. De façon analogue à la famille des composés phénoliques, les isoprénoïdes regroupent à

la fois des molécules de faible poids moléculaire, volatiles et composants principaux d'huiles essentielles, et des molécules hautement polymérisées (Gravot, 2008)

- ✓ Triterpène : Ils sont très répandus dans la nature, formés de 30 atomes de carbones. La plupart des triterpènes sont des alcools, sous forme libre ou glycoside (les saponines) ou ester. Les stérols (cholestérol, squalène...) sont des dérivés de triterpènes
- ✓ Les stéroïdes sont des triterpènes tétracycliques, possèdent moins de 30 atomes de carbone, synthétisés à partir d'un triterpène acyclique (Hopkins, 2003).

III.1. Classification des terpénoïdes

Selon le nombre d'unités isopréniques qui les constituent (tableau 10), on distingue :

Tableau 10: Classification des terpènes et exemples

N	Squelette carboné	Types	Exemples	Références
1	C ₁₀	Monoterpènes	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Géraniol ✓ Mycènes ✓ Thymol 	(Merghem. R, 2009)
2	C ₁₅	Sesquiterpènes	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Farnésène ✓ Zingibrérène ✓ Cadène 	(Merghem. R, 2009)
3	C ₂₀	Diterpènes	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Vitamine A ✓ Phytol ✓ Gibberellines 	(Merghem. R, 2009)
4	C ₃₀	Triterpènes	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Limonine ✓ Acide aléonolique 	(Merghem. R, 2009)
5	C ₄₀	Tétraterpènes	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Caroténoïdes ✓ Lycopène 	(Merghem. R, 2009)
6	C >40	Polyterpènes	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Euphorbiacées ✓ Sapatacées 	(Merghem. R, 2009)

III.2. Activités biologiques des triterpènes

Les activités biologiques des triterpènes sont diverses, ces composés étant reconnus comme antimicrobiens, antimycotiques, virostatiques, toniques, hémolytiques, cytostatiques immunomodulateurs, hépatoprotecteurs, ce qui peut les rendre favorables à l'usage pharmacologique (Muffler et al., 2011), mais la plus importante des activités biologiques des triterpènes est celle d'anti-inflammatoire non-stéroïdienne (Grigoraş, 2012).

IV. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés organiques azotés, basiques, d'origine naturelle ont des masses moléculaires très variables de 100 à 900 g/mol. La plupart des bases nonoxygénées sont liquides à température ordinaire celles qui comportent dans leur formule de l'oxygène sont des solides cristallisables, rarement colorées (Rakotonanahary, 2012). 15% à 30% des alcaloïdes sont extraits des plantes à fleurs. Ils sont généralement synthétisés dans les tissus périphériques des plantes, puis sont stockés dans des compartiments tels que les vacuoles.

IV.1. Propriétés des alcaloïdes :

Les propriétés toxiques ou médicamenteuses des alcaloïdes font de ce groupe de métabolites secondaires un intérêt particulier. Au niveau du système nerveux central Les alcaloïdes ont des effets sur la conscience et la motricité car ils agissent directement sur le système nerveux et à cet effet ils peuvent avoir une action anti spasmodique, mydriatique, anesthésique locale ou analgésique et narcotique (Scoules, 2006). Ils agissent comme dépresseurs (morphine, scopolamine) ou comme stimulants (caféine, strychnine,...), anticholinergiques (atropine). Certains jouent le rôle d'anesthésiques locaux (cocaïne), d'antipaludiques (quinine) (KanounK., 2010).

Les alcaloïdes ont une structure moléculaire hétérocyclique complexe (Badiaga, 2011). Généralement ils sont produits dans les tissus en croissance : jeunes feuilles, jeunes racines. Chez de nombreuses plantes, les alcaloïdes se localisent dans les pièces florales, les fruits ou les graines, ces substances sont trouvées concentrées dans les vacuoles (Krief, 2003).

Le rôle des alcaloïdes dans les plantes est assez peu connu. Certains pourraient intervenir dans les relations de défense plantes-prédateurs (Wichtl et Antone, 1999). Les alcaloïdes en raison de leurs propriétés toxiques ou médicamenteuses, ont toujours présenté pour le pharmacien un intérêt exceptionnel (caféine, cocaïne...) (Guignard et Consson, 1985). Il y a plus de 10000 alcaloïdes connus (Bruneton, 1999).

CHAPITRE III

Activités Biologiques

I. Activité antioxydante

I.1. Introduction

La notion de « radicaux libres », de « stress oxydant » ou d'« antioxydants » est de plus en plus souvent utilisée pour expliquer différentes atteintes pathologiques et leur approche thérapeutique (Leverve, X.,2009). Au début des années 2000, ces notions n'étaient généralement évoquées que dans les congrès scientifiques. Mais ces dernières années, l'industrie pharmaceutique, les laboratoires d'analyses médicales et la presse grand public ont massivement diffusé des informations relatives aux antioxydants, sans parfois l'esprit critique nécessaire (Defraigne, J. O. & Pincemail, J.,2008).

I.2. Stress oxydant

Le stress oxydant est le déséquilibre entre la génération des espèces réactives d'oxygène et la capacité des corps à neutraliser et à réparer les dommages oxydatif (Halimi, 2015).

Dans les systèmes biologiques, le stress oxydant est la conséquence d'un déséquilibre entre la production des radicaux libres et la destruction par des systèmes de défenses anti-oxydantes donc c'est un déséquilibre de la balance antioxydants/pro-oxydant (Aliouat et Boulkelia, 2012).

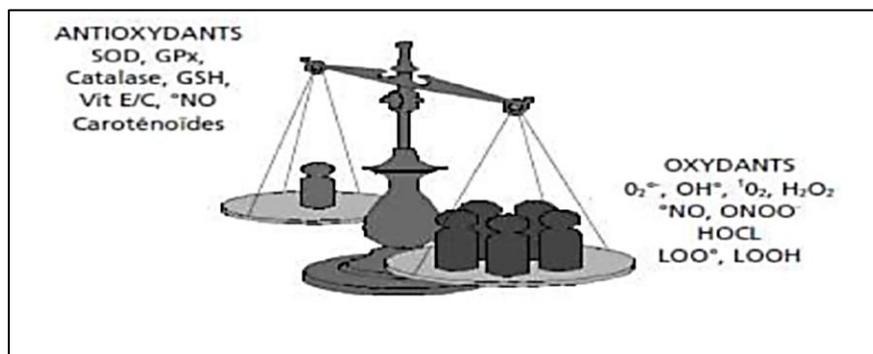


Figure 12: Stress oxydant (Nasri et Hadje Brahim, 2014).

Il déclenche des pathologies nombreuses comme l'athérosclérose, le cancer, les maladies inflammatoires et l'infertilité masculine (Saglam et al., 2008).

Un état de stress oxydant existe lorsqu'au moins une des trois conditions suivantes est présente:

- Excès des espèces réactives d'O₂, N₂ ou Cl₂.
- Défenses insuffisantes (endogènes et exogènes).
- Mécanismes de réparation insuffisants.

Le stress oxydant n'est pas une maladie mais un mécanisme physiopathologique. Un excès d'espèces réactives mal maîtrisé favorisera une maladie ou un vieillissement accéléré.

I.3. Radicaux libres

Les radicaux libres sont également connus sous le nom d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) définies comme toute molécule ou atome ayant un ou plusieurs électrons non appariés, capable d'exister sous forme indépendante, contenant au moins un électron libre sur son enveloppe externe (ou contenant deux électrons de même spin dans un quantum cellulaire). Ceci augmente considérablement sa réactivité par la nécessité de se combiner avec un autre électron pour atteindre la stabilité selon un phénomène d'oxydation (Finaud, J. & al.2006 ; Close,G.L. & al. 2007). Sa durée de vie est très courte (quelques millisecondes, voire quelques nanosecondes) et il est symbolisé par un point qui indique où se trouve l'électron libre (exemple : OH) (Close,G. & al. 2007 ; Sayre,L. & al, 2008 ; Goto,M. & al.2008).

Les radicaux superoxydes ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), les radicaux hydroxyles ($-OH$) et l'oxygène singulet (1O_2) sont des espèces réactives de l'oxygène (ROS) définies de façon commune ; elles sont générées comme sous-produits métaboliques par les systèmes biologiques (Sato,H & al, 2013, Navarro- Yepes, J & al, 2014). Des processus tels que la phosphorylation des protéines, l'activation de plusieurs facteurs de transcription, l'apoptose, l'immunité et la différenciation dépendent tous d'une production et d'une présence appropriées de ROS à l'intérieur des cellules, qui doivent être maintenues à un faible niveau (Rajendran, P. et al. 2014).

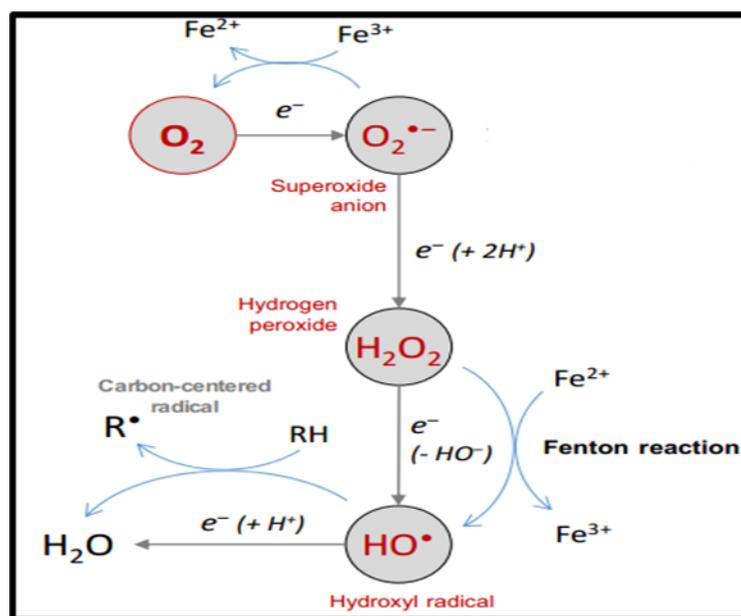


Figure 13 .Voies de formation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Collin, F.,2019).

I.4. Antioxydants

Les antioxydants parfois appelés " piègeurs de radicaux libres " sont toutes les molécules capables d'inhiber la production à faible dose, de limiter la prolifération ou la destruction des espèces réactives de l'oxygène. Ils préviennent les dommages cellulaires causés par des molécules hautement réactives et instables appelées " radicaux libres " (Figure 14) (Shalaby, E. & al.2019 ; Favier,A.2003).

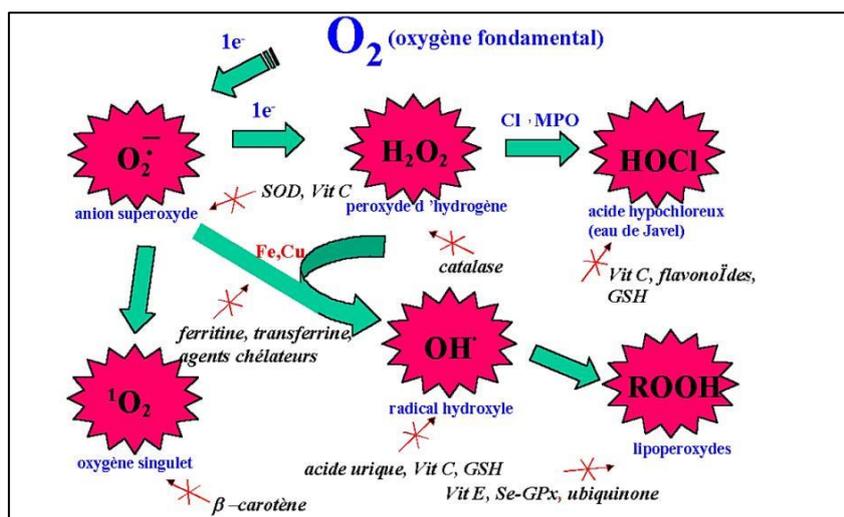


Figure 14 .Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par les systèmes de défenses antioxydantes (Pincemail, J. et al.,2002)

L'organisme est déterminé d'un ensemble de systèmes de défenses antioxydants très efficaces afin de diminuer la concentration des espèces oxydantes dans l'organisme. Les antioxydants sont des systèmes enzymatiques ou non-enzymatiques (Mates et al., 1999).

I.4.1. Antioxydants enzymatiques :

Plusieurs enzymes sont impliquées dans la défense antioxydante. Les enzymes antioxydantes majeures sont le superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx), l'hème oxygénase, les enzymes de biosynthèse et transfert du glutathion, quinone réductase. (Dangles, O., 2020). Aussi bien l'activité que l'expression des gènes codants pour ces enzymes peut être augmentées lors d'un stress oxydant (De Moffarts, B. et al., 2005).

I.4.2. Antioxydants non enzymatiques :

Les antioxydants chimiques non enzymatiques, 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**).

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**).

Caroténoïdes : Leur nom dérive du carotène qui isolé pour la première fois de la racine de la carotte, on trouve les caroténoïdes soit sous forme d'hydrocarbures, soit à l'état de dérivés hydroxylés ou dérivés cétoniques (canthaxantine). Les carotènes sont synthétisés par dimérisation de deux molécules de pyrophosphate de géranyl-géranyl-pp (**Merghem, 2009**).

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**).

Xanthones : La manguiniférine 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**).

I.5. Méthode de dosage de l'activité antioxydant

La plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxylés phénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles (OH•) et super oxydes (O₂•).

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, in vitro et in vivo, l'activité antioxydante par piégeage de différents radicaux, comme les peroxydes ROO• par les méthodes ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) et TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter) ; les ions ferriques par la méthode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter) ; ou les radicaux ABTS• (sel

d'ammonium de l'acide 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique), ainsi que la méthode utilisant le radical libre DPPH• (diphenyl-picrylhydrazyle) (**Anonyme 03**). Les résultats des activités antioxydantes sont généralement exprimés en fonction d'une molécule de référence possédant une grande propriété antioxydante (**Halmi, 2015**).

II. Activité anticholinestérase

La maladie d'Alzheimer (MA) est caractérisée par un déséquilibre neurodégénérative et irréversible qui détruit progressivement les cellules nerveuses du cerveau, l'acétylcholinestérase est une enzyme impliquée dans l'étiologie de cette maladie (**Wang et al., 2007**). La détérioration des cellules nerveuses se traduit par la libération d'une substance appelée Acétylcholine (ACh), dont le rôle est de transmettre les messages entre les cellules du cerveau. Le déficit en Acétylcholine chez les malades est aggravé par l'action d'une enzyme, l'acétylcholinestérase (AChE), qui décompose rapidement l'Acétylcholine. L'AChE est une protéine exprimée au sein des synapses dites cholinergiques qui utilisent le neurotransmetteur ACh. De telles synapses sont retrouvées au niveau des jonctions neuromusculaires, ainsi que dans les zones du cortex en charge des fonctions cognitives (mémoire, orientation, jugement, etc.). L'AChE hydrolyse le neurotransmetteur ACh terminant ainsi la transmission de l'influx nerveux et restaurant, de fait, l'excitabilité de ces synapses (**Colletier, 2006**).

A l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement guérissant la maladie d'Alzheimer, ni même permettant d'arrêter son évolution, il existe cependant des traitements permettant d'atténuer les troubles cognitifs, sans empêcher la progression de la maladie. La plupart agissent sur l'activité cholinergique (**Pepin et Delwaide, 1999**). L'une des solutions pour augmenter le taux d'acétylcholine au niveau synaptique consiste à diminuer sa dégradation, ceci en inhibant l'effet de l'enzyme d'acétylcholinestérase (Fig.15) la galanthamine, un alcaloïde obtenu à partir d'une plante (*Galanthus nivalis* L. Amaryllidaceae) fournit une biodisponibilité orale complète, il est autorisé en Europe pour le traitement de cette maladie, il est bien toléré et améliore de manière significative la fonction cognitive chez les patients (**Lopez et al., 2002**). Des constituants monoterpéniques de nombreuses huiles essentielles ont été étudiés pour leurs effets sur l'AChE, par exemple, les huiles essentielles de *Melissa officinalis* L. et de *Rosmarinus officinalis* L. inhibent l'AChE érythrocytaire in vitro (**Howes et al., 2003**). Ainsi des monoterpènes tels que le géraniol, le δ -3-carène, le α -caryophyllène et le limonène inhibent l'acétylcholinestérase (**Aazza et al., 2011**).

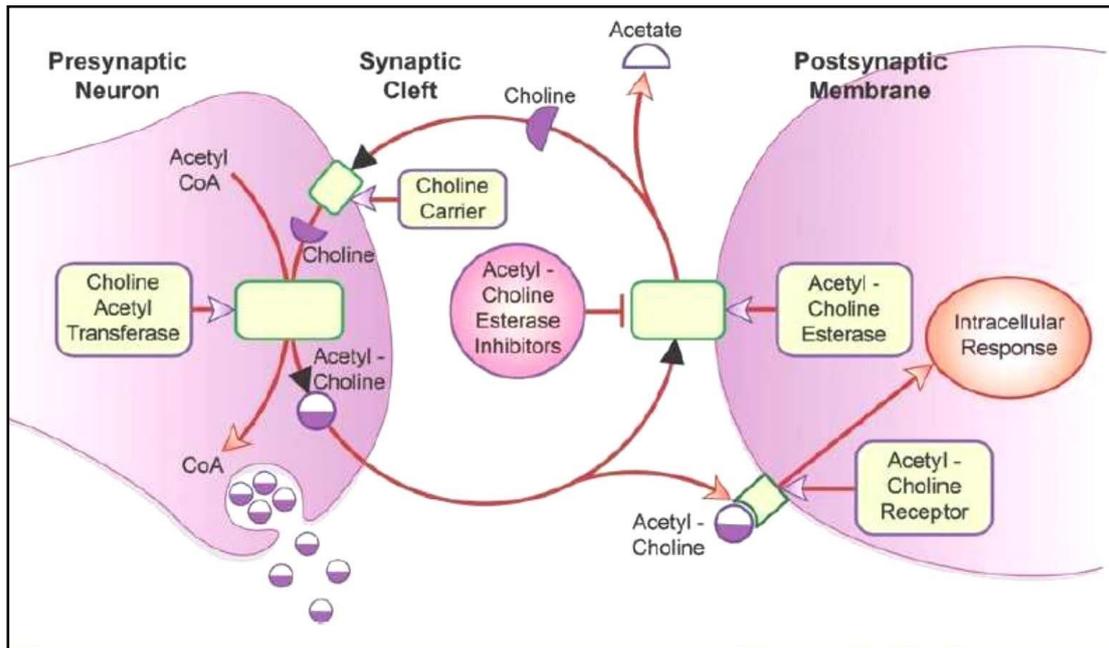


Figure 15 : Mécanismes de neurotransmission cholinergique (Pepin et Delwaide, 1999).

CHAPITRE IV

Matériel et Méthodes

Le présent travail de recherche a été réalisé à l'unité de valorisation de ressources naturelles, Molécules bioactives et Analyses Physicochimiques et laboratoire de Biochimie Appliquée à l'université Frères Mentouri Constantine 1, ainsi que le Centre de Recherche en Biotechnologie (C.R.Bt) de Constantine.

I. Matériel végétal

I.1. Récolte et traitement de la plante

La récolte de la plante de genre *Seseli* (Apiacées) a été effectuée en 2021, dans la région de El Maouane à Sétif (17 km au Nord de Sétif), dont l'altitude est d'environ 1 103 mètres, la plante a été identifiée par Pr. LAOUAR Houcine, Botaniste à l'université Ferhat Abbas, Sétif 1. Après la récolte, la partie aérienne de la plante a été bien nettoyée et lavée, ensuite séchée sous l'ombre dans un endroit bien aéré à une température ambiante et à l'abri de l'humidité.

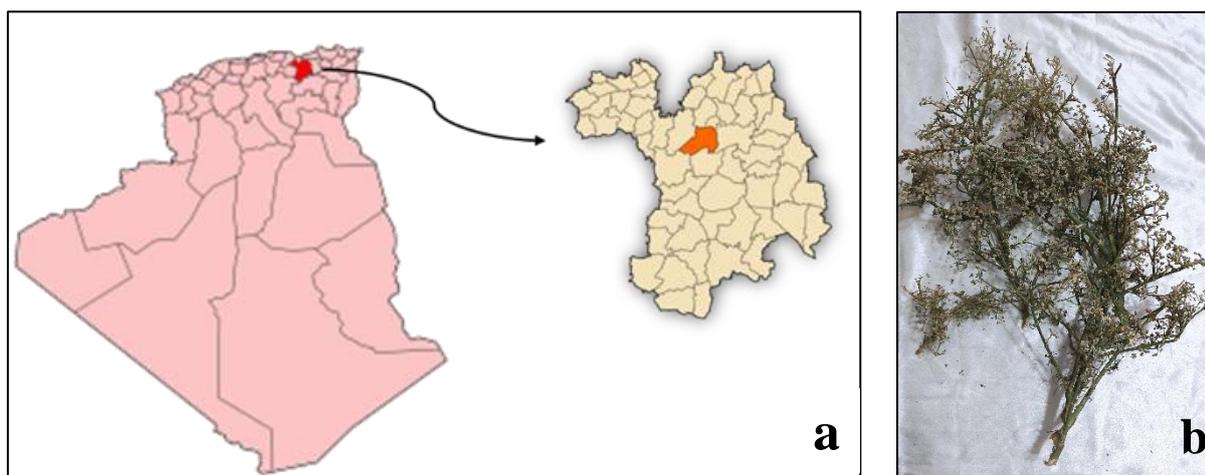


Figure 16 : (a) Position géographique de la récolte , (b) la plante récoltée du genre *Seseli*

I.2. Macération et extraction

I.2.1. Extraction par les solvants

Pour la préparation des extraits, la partie arienne de la plante (Les feuilles) séchée dans un endroit sec à l'abri de la lumière, a été broyé en poudre très fine à l'aide d'un broyeur électrique.

Tableau 11 : Protocole pour préparation des extraits à partir de la plante du genre *Seseli*

Extraction par les solvants	Protocole
Extrait hexanique	Une quantité de 100 g du matériel végétal sont macérés dans un solvant hexane, pendant 24 heures à température ambiante. L'extrait obtenu est filtré sur papier filtre, puis concentrée sous pression réduite à 45°C avec un rotavapeur de type BÜCHI R-210. Cette opération a été répétée trois fois avec renouvellement du solvant. L'extrait brut hexanique est ainsi obtenu.
Extrait dichloromethanique	Le marc de la matière végétale que nous avons utilisée pour préparer l'extrait brut hexanique sont macérés dans un solvant dichlorométhane, pendant 24 heures à température ambiante. l'extrait obtenu est filtré sur papier filtre, puis concentrée sous pression réduite à 45°C avec un rotavapeur de type BÜCHI R-210. Cette opération a été répétée trois fois avec renouvellement du solvant. l'extrait brut dichlorométhane est ainsi obtenu.
Extrait méthanolique	Le marc de la matière végétale que nous avons utilisée pour préparer l'extrait brut dichlorométhane sont macérés dans un solvant méthanol, pendant 24 heures à température ambiante. l'extrait obtenu est filtré sur papier filtre, puis concentrée sous pression réduite à 45°C avec un rotavapeur de type BÜCHI R-210. Cette opération a été répétée trois fois avec renouvellement du solvant. l'extrait brut méthanolique est ainsi obtenu.



Figure 17 : Extraits obtenus à l'aide de différents solvants organiques

- Ce schéma résumer tous les différents étapes de l'extraction de la plante étudiée :

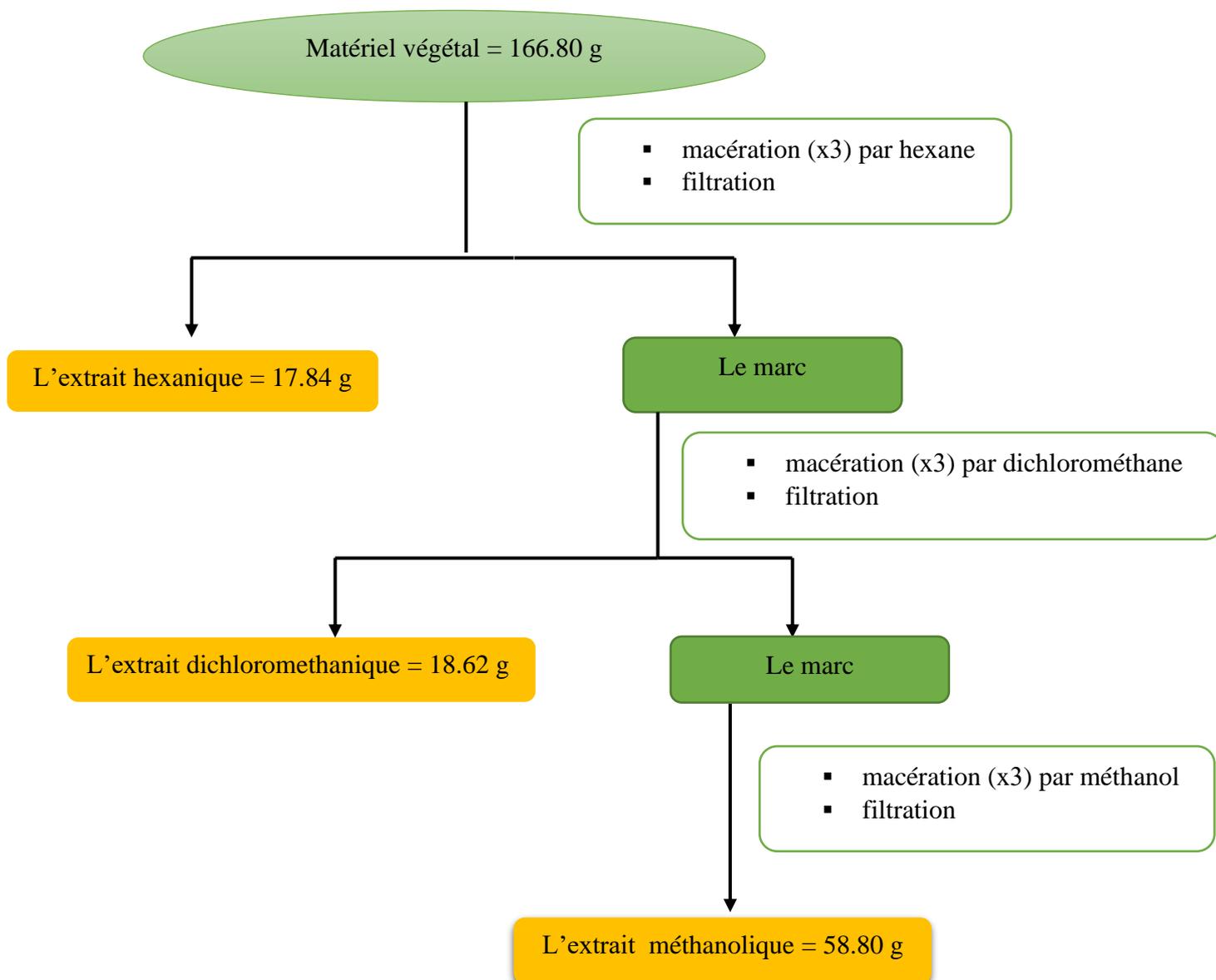


Figure 18 . Différentes étapes de l'extraction des parties aériennes de la plante du genre *Seseli*.

I.2.2. Calcul du rendement

Le rendement d'extraction est le rapport entre le poids des fractions obtenues et le poids de la matière végétale. Il est calculé selon la formule suivante :

$$R\% = \frac{PE}{PMV} \times 100$$

R : rendement

PE : poids de l'extrait (en g)

PMV : poids de matière végétale (en g)

II. Analyse phytochimique

L'objectif de l'étude phytochimique est d'avoir une bonne caractérisation des extraits par la recherche et la détection des différentes classes des métabolites secondaires de notre plante.

II.1. Analyses qualitatives par chromatographie sur couche mince et screening phytochimique

Les tests phytochimiques consistent à détecter les différentes familles de métabolites secondaires existants dans la partie étudiée de la plante par des réactions qualitatives de caractérisation. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou décoloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de composés (Hagerman *et al.*, 2000).

II.1.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

a. Principe de la chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une méthode simple et rapide, utilisée pour la séparation, l'identification et éventuellement le dosage des constituants chimiques dans des mélanges complexes. La séparation des constituants du dépôt se fait dans une cuve : c'est un récipient en verre à l'aide de deux phases :

- La phase mobile : c'est l'éluant. Il est composé d'un solvant unique ou d'un mélange de solvant.
- Une phase stationnaire : c'est un adsorbant maintenu sur une plaque de verre (silica gel)

b. Mode opératoire :

1 / Préparation de la phase stationnaire : le criblage phytochimique a été réalisé sur des chromatoplaques (silica gel 60 F254, 20 x 20 cm, support en aluminium, Merck).

2 / Préparation de la phase mobile : c'est l'éluant, il est composé d'un solvant unique ou d'un mélange de solvant qui migre lentement le long de la plaque en entraînant les composants de l'échantillon déposé.

C/ Révélation des plaques (Visualisation des tâches) : Après le développement et l'évaporation du solvant de migration les tâches sont visualisées soit :

- A l'œil nu
- Sous l'UV à 245nm et à 365nm.
- ❖ selon le type des métabolites secondaires à identifier, deux révélateurs spécifiques ont été utilisés :
- Vapeur de l'ammoniac pour les coumarines.

- un révélateur à base d'acide sulfurique et un révélateur vanillique puis chauffées à 100°C pendant trois minutes pour les terpènes.
- ❖ Les différents systèmes de solvants ont été utilisés en qualité de développants :

Tableau 12 : Résumé des différents systèmes de solvants utilisés sur CCM.

Extraits naturels bruts	Différents systèmes de solvants d'essai
Extrait hexanique + Extrait dichlorométhanique + Extrait méthanolique	<ul style="list-style-type: none"> • (Héxane – AcOEt (7.5 : 2.5 v/v)) • (Héxane – Dichlorométhane (7.5 : 2.5 v/v)) • (Héxane – Dichlorométhane (8 : 2 v/v)) • (Dichlorométhane 10 v)
Extrait hexanique + Extrait dichlorométhanique	<ul style="list-style-type: none"> • (Héxane – AcOEt (9.5 : 0.5 v/v)) • (Héxane – AcOEt (9 : 1 v/v)) • (Héxane – AcOEt (8 : 2 v/v))
Extrait dichlorométhanique + Extrait méthanolique	<ul style="list-style-type: none"> • (Héxane – AcOEt) (7 : 3 v/v) • (Héxane – AcOEt) (8 : 2 v/v) • (Héxane – AcOEt) (6 : 4 v/v)
Extrait méthanolique	<ul style="list-style-type: none"> • (Éther de pétrole - AcOEt (2 : 8 v/v)) • (AcOEt -MeOH-H₂O (9 : 0.5 : 0.5 v/ v/v)) • (AcOEt -MeOH-H₂O (9 : 0.5 : 0.5 v/ v/g)) • (AcOEt 10 v)

II.1.2. Analyse quantitative par Chromatographie liquide haute performance (HPLC-UV)

Le besoin de savoir les profils et d'identifier les composés individuels dans les échantillons exige l'utilisation chromatographie liquide haute performance (HPLC) analytique afin d'avoir une idée sur le nombre de produits à séparer.

La chromatographie en phase liquide a permis de réaliser des analyses qui n'étaient auparavant pas possible avec les techniques sur couche mince ou en phase gazeuse.

a- Principe

L'HPLC fait intervenir deux variables dans la séparation d'un mélange, la phase stationnaire c'est-à-dire la colonne, et la phase mobile c'est-à-dire le ou les solvants. Les interactions entre notre mélange, les particules de la colonne et les solvants employés vont permettre une séparation qui pourra être optimisée en faisant varier surtout la composition de notre phase mobile. Cette dernière est poussée avec pression (pompe) sur la colonne, entraînant le mélange à séparer, et c'est cette pression qui permet de faire passer le solvant à travers de très petites particules à une vitesse raisonnable, ce qui permet d'obtenir une haute résolution. En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic, l'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme. (Yost *et al.*, 1980).

b- Mode opératoire

10 µL de extrait méthanolique a été injecté sur une colonne de type phase inverse (silice greffée C18) à l'aide du gradient CH₃CN : H₂O : HCOOH 1% pendant 35 min. La détection a été effectuée par un détecteur UV-Vis à une longueur d'onde égale 254 nm.

II.1.3. Screening phytochimique

Le screening phytochimique est une analyse qualitative nous a permis de mettre en évidence la présence de métabolites secondaires au niveau des tissus végétaux de la plante étudiée. La détection de ces composés chimiques est basée sur des essais de solubilités des constituants, des réactions de précipitation et de turbidité, un changement de couleur spécifique ou un examen sous la lumière ultraviolette. (Bruneton, J, 1999).

Tableau 13 : Résumé des tests préliminaires du screening phytochimique.

Groupes chimique	Le test	Révélation	Observation de résultats positifs	Références
Polyphénols	Chlorure de fer	2 mL d'extrait + quelques gouttes de FeCl ₃ 5 %	Apparition d'une coloration bleue noirâtre ou verte plus ou moins foncée	(Prakash, V. <i>et al.</i> , 2015)
Flavonoïdes	Shinoda (ou cyanidine)	Quelque mL d'extrait + 5 mL (EtOH) + 1 mL HCl + 5 mg Copeaux de magnésium + attendre 1 ou 2 min	Apparition d'une coloration rouge ou Marron foncé	(Gul, Retal., 2017) ; (Gnahoué, G., <i>et al.</i> , 2015)
Coumarines	Test de confirmation NH ₄ OH	1 mL d'extrait + quelques gouttes de Ammoniaque (NH ₄ OH 20 %)	Apparition d'une Fluorescence bleue sous UV	(Ganatra, S., & Gurubaxani, S., 2016),

Tanins	Test de Stiasny	1 mL d'extrait + 1 mL H ₂ O + quelques gouttes de FeCl ₃ 1 %	Apparition d'une coloration Verdâtre ou bleue noirâtre	(Ganatra, S., & Gurubaxani, S., 2016)
Saponosides	Test de mousse	10 mL d'extrait + 1 mL H ₂ O + agitation	Formation d'une mousse persistante	(Sushama, Raj R.V., 2017)
Alcaloïdes	Test de Dragendorff	2 mL d'extrait + 2 mL Solution de Dragendorff	Formation d'une précipité de coloration Rouge brun	(Sushama, Raj R.V., 2017)
Terpènes et Stérols	Test de Salkowski	5 mL extrait + 1 mL H ₂ SO ₄	Apparition d'une Coloration Rouge avec Coloration brun rougeâtre à l'interphase (un anneau rouge brun)	(Ganatra, S., & Gurubaxani, S., 2016)

II.2. Analyses quantitatives par spectrophotométrie (UV-Visible)

II.2.1. Détermination du total en polyphénols

a. Principe de la réaction

La teneur en polyphénols totaux est déterminée en utilisant le réactif de Folin Ciocalteu (**Singleton et Rossi, 1965**), Le réactif FCR, constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀), est réduit lors de l'oxydation des phénols, en mélange d'oxydes de tungstène (W₈O₂₃) et de molybdène (Mo₈O₂₃). La coloration bleue résultante est proportionnelle à la teneur en phénols totaux, et possède une absorption maximale aux environs de 750 -765 nm.

b. Procédure

Dans un tube d'essai on ajoute 300 µL d'extrait de plante (**Annexe II**) ensuite on ajoute 1500 µL de Folin Ciocalteu (FCR) dilué (**Annexe II**), Après 2 min, 1200 µL de Co₃Na₂ (7,5%) (**Annexe II**) sont ajoutés. puis agité à l'aide d'un agitateur magnétique et on place le mélange à l'obscurité pendant 2h. La lecture est réalisée à 765 nm. Un blanc est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait de plante par le solvant utilisé le méthanol (**Mahmoudi. S et al, 2013**).



Figure 19 : Tubes d'essai pour dosage du total des polyphénols

c. Gamme d'étalonnage

Les concentrations des polyphénols de l'échantillon sont déterminées à partir une gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique ($\mu\text{g/mL}$) (**Annexe II**) (**Mahmoudi. S et al., 2013**).

II.2.2. Détermination du total en flavonoïdes

a. Principe de la réaction

Le chlorure d'aluminium (AlCl_3) forme un complexe très stable avec les groupements hydroxydes OH des flavonoïdes. Ce complexe jaune absorbe la lumière visible à la longueur d'onde $\lambda = 430 \text{ nm}$. (**Bahorun et al., 1996**).

b. Procédure

La détermination des flavonoïdes totaux a été effectuée par la méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl_3), le dosage consiste à prendre un volume de 1 mL d'extrait (**Annexe II**) avec 1 mL d' AlCl_3 (2%) (**Annexe II**) puis agité à l'aide d'un agitateur magnétique, après incubation pendant 10 min à l'obscurité à 37°C , l'absorbance est mesurée à une longueur d'onde 430 nm.



Figure 20 : Tubes d'essai pour détermination du total flavonoïdes

c. Gamme d'étalonnage

Les concentrations des flavonoïdes de l'échantillon sont déterminées à partir une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine ($\mu\text{g/mL}$) (**Annexe II**) . (**Mahmoudi. S et al., 2013**)

III. Evaluation des activités biologiques

III.1. Evaluation de l'activité antioxydante

Il existe plusieurs méthodes pour déterminer l'activité antioxydante. Dans cette étude, les propriétés antioxydantes de l'extrait méthanolique et l'extrait dichlorométhane a été testé par 5 méthodes : piégeage du radical libre DPPH, méthode de Pouvoir réducteur FRAP, l'activité de la réduction du radical-cation ABTS, l'activité phénanthroline, l'activité Nanoparticules d'argent SNP.

III.1.1. Piégeage du radical libre DPPH

a. Principe de la réaction

Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle est un radical libre stable violet en solution ayant une absorbance caractéristique dans l'intervalle de 512 et 517 nm. Cette couleur disparaît rapidement lorsque qu'il est réduit par un composé à propriété anti-radicalaire en diphényle picryl hydrazine ayant une couleur jaune. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu. Cette réduction est mesurable par spectrométrie UV-Visible, en suivant la diminution de l'absorbance à 517 nm (Hara et al.,2018) (Figure 21).

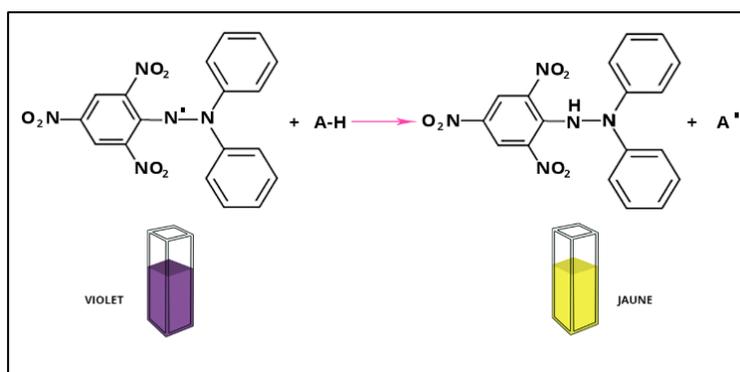


Figure 21. Réaction du radical stable DPPH avec un composé antiradicalaire (AH) (Hara et al.,2018)

b. Mode opératoire

L'activité anti-radicalaire libre est déterminée par spectrophotométrie par le dosage du DPPH (Blois, 1958) l' α -tocophérol, le BHT et le BHA sont utilisés comme des standards.

c. Procédure

Sur une microplaque à 96 puits, une solution de 160 μ l du DPPH (Annexe II) a été mélangé avec 40 μ l de l'échantillon à différentes concentrations (Annexe II). Le mélange a été maintenu à une température ambiante pendant 20 min. L'absorbance a été mesurée à 517 nm.

✓ Le pourcentage d'inhibition a été calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{contrôle}}} \times 100$$

III.1.2. Activité de la réduction du radical-cation ABTS

a. Principe de la réaction

Le piégeage du radical ABTS est l'un des tests les plus utilisés pour la détermination de la concentration des radicaux libres. Il est basé sur la neutralisation d'un radical - cation résultant de

l'oxydation du chromophore synthétique l'acide 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS•). Cette réaction est suivie spectrophotométriquement par la variation de spectre d'absorption (Re et al., 1999). et cette activité est comparé à des antioxydants de références (BHT et BHA).

b. Procédure

Cette activité est déterminé selon la méthode de Re et al., (1999), un volume de 160 µl d'ABTS (Annexe II) a été ajouté à 40 µl de l'extrait dilué dans le méthanol à plusieurs concentrations, la lecture de l'absorbance du milieu réactionnel a été mesurée à 734 nm après 10 min d'incubation L'activité de l'ABTS⁺ est exprimée en pourcentage d'inhibition et calculée par l'équation suivante :

$$ABTS + (\%) = \frac{AC - AE}{AC} \times 100$$

AC : Absorbance contrôle / AE : Absorbance extrait.

III.1.3. Activité de pouvoir réducteur (FRAP)

a. Principe de la réaction

Cette méthode est basée sur l'aptitude d'un antioxydant donné à réduire le fer ferrique (Fe³⁺) présent dans le complexe ferrocyanure de potassium (K₃Fe(CN)₆) en fer ferreux (Fe²⁺). La réaction est révélée par le virement de la couleur jaune du fer ferrique à la couleur bleu-vert du fer ferreux. L'intensité de cette coloration est mesurée par spectrophotométrie à 700 nm (Karagözler et al., 2008) Cette activité est déterminée selon la méthode de Oyaizu (1986) avec une légère modification. (Oyaizu, 1986)

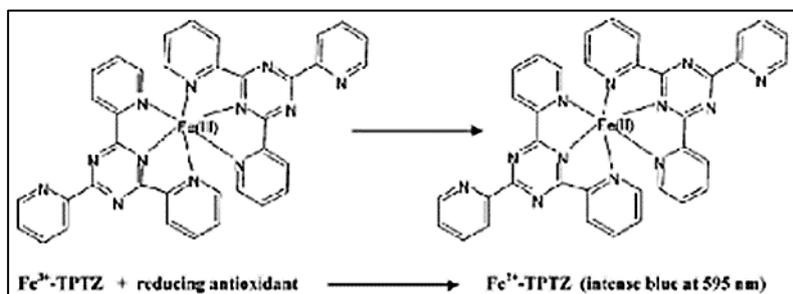


Figure 22 : Mécanisme réactionnel du test FRAP (Karagözler et al., 2008)

b. Procédure

Un volume de 10 µL de différentes concentrations de chaque échantillon est déposé en triplicata sur une microplaque à 96 puits, en ajoutant sur chaque puits un volume de 40 µl d'une solution tampon

phosphate (pH 6,6) (**Annexe II**) et 50 μL d'une solution de ferricyanide de potassium (1%) (**Annexe II**). Après incubation à 50°C pendant 20 minutes, 50 μL d'acide tri-chloroacétique (TCA) 10% (**Annexe II**) sont ajoutés pour stopper la réaction. Enfin, un volume de 40 μL d'eau distillée et 10 μL d'une solution de chlorure de fer (0,1%) (**Annexe II**) sont ajoutés, ensuite la microplaque est insérée dans le spectrophotomètre pour mesurer l'absorption à 700 nm.

III.1.4. Activité de phénanthroline

a. Principe de la réaction

Cette méthode est basée sur la formation de ferroïne par la réduction de Fe^{+3} ($FeCl_3$) en Fe^{+2} en présence d'un composé donneur d'électrons dans l'échantillon qui va réagir avec l'orthophénanthroline pour donner un complexe rouge orange. L'activité phénanthroline est déterminée par la méthode de Szydlowska (**Szydlowska Czerniaka et al., 2008**).

b. Procédure

Un volume de 10 μl de l'extrait à différentes concentrations ont été ajoutés à une solution de 50 μl $FeCl_3$ (0.2%) (**Annexe II**), avec 30 μl phénanthroline (0.5%) (**Annexe II**) et 110 μl de méthanol. Le mélange obtenu est incubé dans l'étuve à 30°C pendant 20 min. La lecture est réalisée à 510 nm.

III.1.5. Activité nanoparticules d'argent (SNP)

a. Principe de la réaction

Une méthode colorimétrique sensible basée sur la réduction d' Ag^+ en nanoparticules d'argent sphériques (SNP) par les polyphénols en présence de citrate trisodique et de grains d'argent a produit une bande d'absorption de résonance plasmonique de surface très intense des SNP à 423 nm. L'absorption plasmonique des SNP permet la détection spectrophotométrie quantitative des polyphénols. (**Özyürek et al., 2012**).

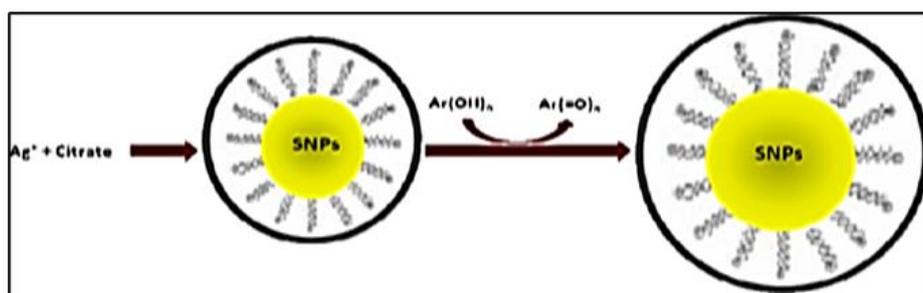


Figure 23 : Réduction d' Ag^+ en nanoparticules (SNP) (**Özyürek et al., 2012**)

b. Procédure

Un volume de 20 µL de l'extrait à différentes concentrations est mélangé avec 130 µL d'une solution SNP (**Annexe II**), et 50 µL d'H₂O. L'ensemble est incubé à l'étuve à 30°C pendant 20 min, La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel a été mesurée à 423 nm.

III.2. Evaluation de l'activité anti-cholinestérase

III.2.1. Activité anti-cholinestérase

a- Principe de la réaction

La butyrylcholinestérase (BChE) est l'enzyme responsable d'hydrolyse le substrat butyrylthiocholine iodure (BuCI) en acide acétique et thiocholine qui peut réagir avec le DTNB, et cette réaction donne naissance à une couleur jaune. (En l'absence d'un inhibiteur enzymatique). Dans cette étude, l'activité anti- Alzheimer des extraits de la plante du genre *Seseli* réside dans sa capacité à inhiber l'hydrolyse le substrat butyrylthiocholine par l'inhibition de l'activité de l'enzyme butyrylcholinestérase. Le mélange reste incolore si l'enzyme est inactivée (existence une inhibition de l'enzyme).

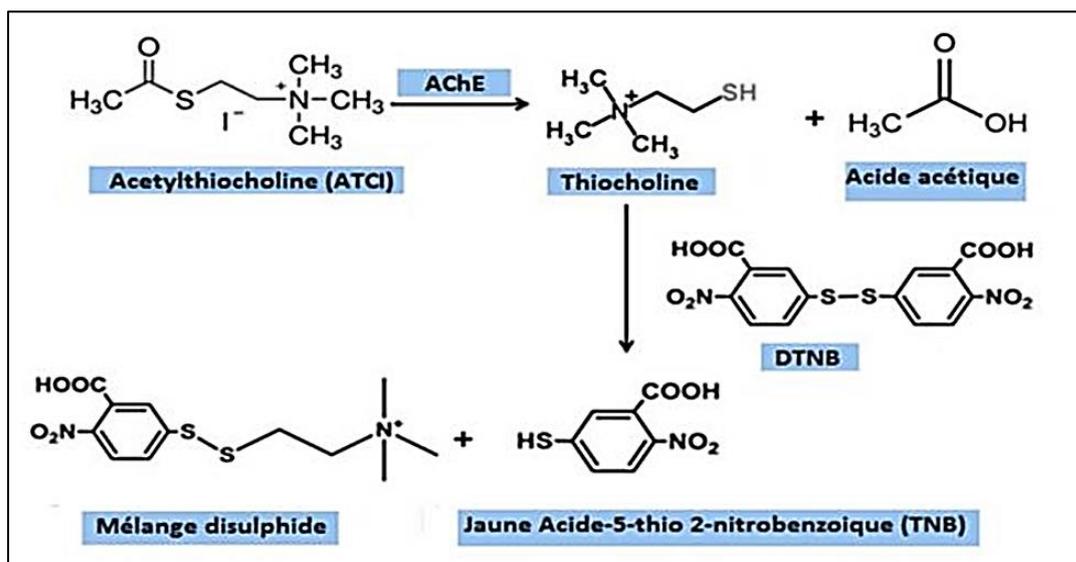


Figure 24 : Mécanisme chimiques de la méthode d'Ellman (AChE)

b. Procédure

L'activité inhibitrice de butyrylcholinestérase (BChE) des extraits de la plante étudiée du genre *Seseli* ont été déterminée par une méthode spectrophotométrique décrite par (Ellman *et al.*, 1961) avec une légère modification. Brièvement, 150 µL de la solution tampon phosphate de sodium (pH=8,0) (**Annexe II**) , 10 µL d'une solution d'échantillon à différentes concentrations (0.0625 à 4 mg/mL) (**Annexe II**) et un volume de 20 µL de la solution enzymatique BChE (**Annexe II**) ont été mélangés et incubés pendant 15 min dans l'étuve à 25C° puis 10 µL de DTNB (**Annexe II**) ont été ajoutés.

La réaction est commencée par l'addition de 10 µL le chlorure de butyrylthiocholine (0.2 mM) (**Annexe II**). L'absorbance de chaque puits est mesurée à 412 nm avec un lecteur de microplaque 96 puits à 0 mn et à 15 min. L'expérience a été réalisée en triple.

Le pourcentage d'inhibition de l'enzyme BChE est déterminé par rapport au blanc (éthanol avec le phosphate buffer pH 8) par la formule :

$$\text{Inhibition BChE (\%)} = \frac{(E - S)}{E} \times 100$$

E : l'activité de l'enzyme sans extrait / S : l'activité de l'enzyme avec l'extrait

III.2.2. Etude *in silico* d'inhibition de la butyrylcholinestérase

III.2.2.1. Docking moléculaire

Le Docking moléculaire (ancrage, amarrage ou arrimage moléculaire en français), *in silico* vise à prédire la structure et l'ensemble des mécanismes et interactions intervenant lors de la formation d'un complexe moléculaire « ligand-protéine » ou « protéine-protéine », à partir des molécules isolées, ce qui est considérablement plus facile à mettre en œuvre, moins cher et plus rapide que l'utilisation des méthodes expérimentales *in vitro*.

Le docking moléculaire vise à prédire la structure d'un complexe moléculaire à partir des molécules extraites, dans lesquelles différentes approches sont combinées pour étudier les modes d'interaction entre deux molécules. Les logiciels de docking sont donc des outils très utiles en biologie, pharmacie et médecine, car la plupart des principes actifs sont de petites molécules (ligand) qui interagissent avec une cible biologique d'intérêt thérapeutique. Le récepteur macromoléculaire étant le plus souvent une protéine, le terme docking seul est couramment employé pour désigner un « docking protéine-ligand ». (Mme.Lalout Wassila ,2016)

III.2.2.2. Principe de Docking moléculaire

Le Docking décrit un processus dans lequel une molécule (ligand) est placée dans le site actif d'une protéine cible dans un espace tridimensionnel (3D). Deux aspects sont importants : la prédiction de l'affinité du complexe [ligand- protéine], et la prédiction de la position correcte du ligand dans le site actif de la protéine. La prédiction d'affinité est liée à différents ligands de la collection, certains conviennent mieux que d'autres. La prédiction de position est liée à la même molécule de ligand mais dans des orientations différentes. (T. Schulz-Gasch et M. Stahl., 2004) (R.Wang et al.,2004).

III.2.2.3. Programmes utilisés

Surflex : le docking a été réalisé en utilisant le programme Surflex 1.3.

Open Babel 2.3.0 : c'est un programme utilisé pour faire la conversion des formats.

Titan : c'est un programme qui permet la construction de tous les groupements chimiques éventuels

Viewerlite 4.2 : nous avons utilisé ce programme pour la visualisation des différentes interactions formées entre les molécules étudiés et le site actif de la butyrylcholinestérase.

ChemWindow : logiciel utilisée pour dessiner les structures des molécules étudiées et le standard Galantamine.

III.2.2.4. Préparation de l'enzyme

Protéine Data Bank ou la PDB est un dépôt pour les données de structure tridimensionnelle (structure 3D) de grandes molécules biologiques telles que les protéines et les acides nucléiques . Les données, généralement obtenues par cristallographie aux rayons X ou par spectroscopie de RMN.

Dans notre étude nous avons utilisées le complexe « 4BDS » , car il s'agit d'une structure correctement définie avec une résolution égale à 2.10 Å et d'un K_{i50} égale à 25nM, ce complexe a été télécharger à partir de la PDB, au format pdb, les deux molécules du complexe (butyrylcholinestérase humaine et la tacrine) ont été bien séparé dans deux fichiers différents, et ils ont été convertis du format pdb au format mol2 en utilisant le programme Open Babel.

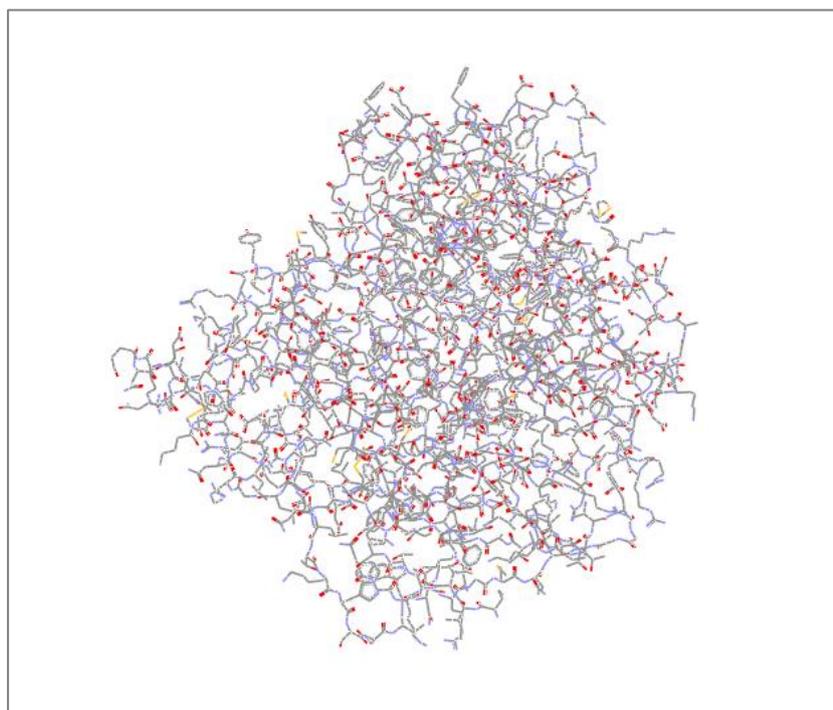


Figure 25 : Structure tridimensionnelle de la BChE par ViewerLite 4.2

III.2.2.5. Préparation des molécules

Les quatre structures des molécules étudiées : l' α -pinène, le limonène, tortuosinol et la tortuosidine ainsi que le standard galantamine ont été construites avec le programme de construction moléculaire Titan, ils sont enregistrées sous format pdb et en ensuite sont convertis en format mol2 par le programme Open Babel.

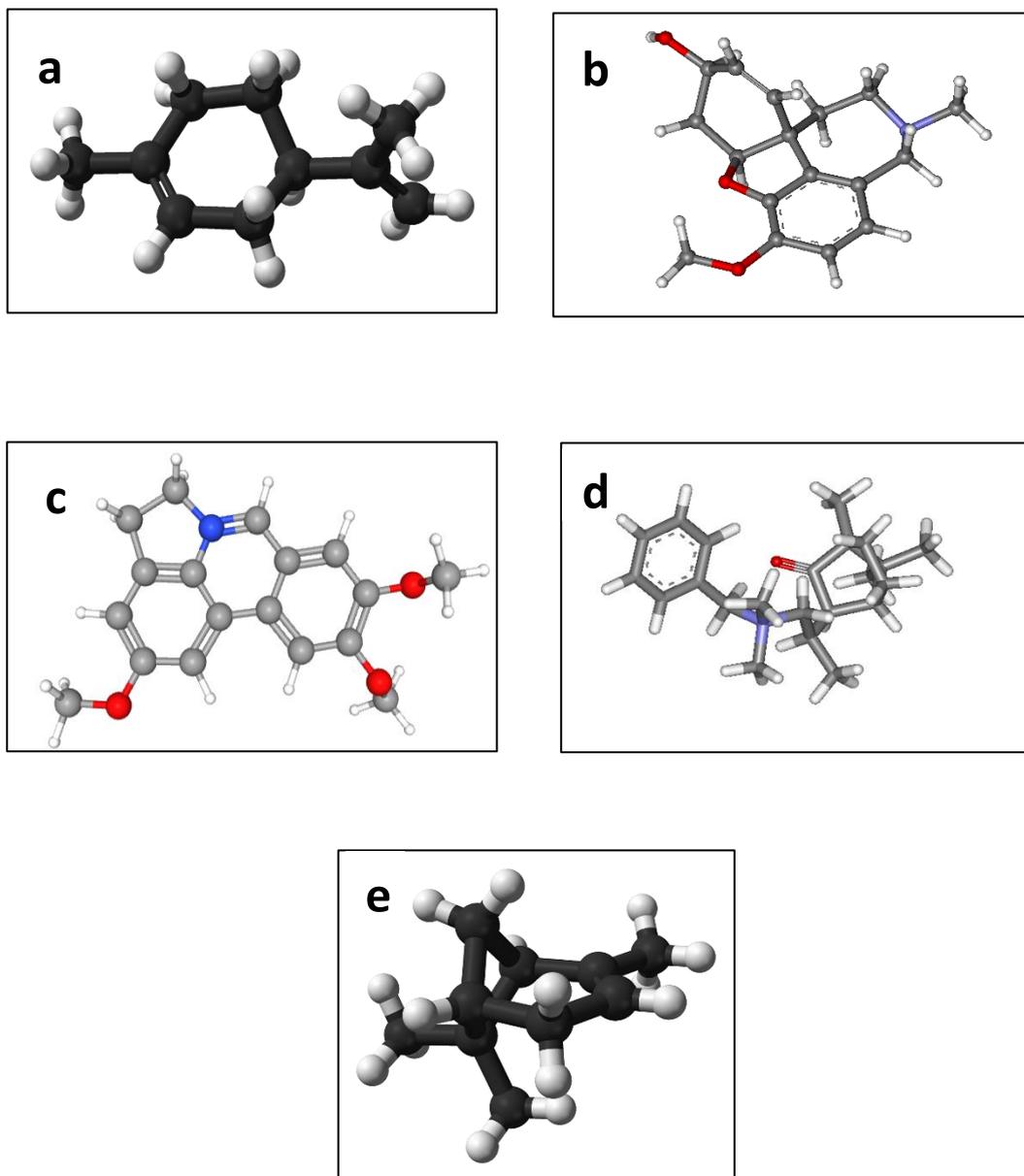


Figure 26 : Structure tridimensionnelle par Titan de : (a) limonène , (b) le standard Galantamine, (c) tortuosidine , (d) tortuosinol et aussi (e) α -pinène

III.2.2.6. Docking

Le docking moléculaire a été réalisé en utilisant le programme (Surflex 1.3) par Trois étapes nécessaires pour le bon fonctionnement de ce programme :

- **1. Identification du site actif (protomol) :**

Cette étape sert à désigner le site actif en utilisant la commande suivante :

Surflex-dock proto ligand.mol2 enzyme.mol2 pl

- **2. Docking du ligand :**

Le docking se fait par une fragmentation du ligand, puis l'assemblage des fragments pour obtenir les meilleures conformations du ligand dans le site actif de l'enzyme. Pour réaliser cette étape il faut utiliser la commande suivante :

Surflex-dock dock ligand.mol2 pl-protomol.mol2 enzyme.mol2

- **3. Traitement du résultat :**

Les résultats pour les dix meilleurs conformères sont fournis dans un même fichier, Chaque conformères possède trois scores :

- Le premier correspond à l'affinité.
- Le second au degré de pénétration impropre du ligand dans la protéine.
- Le troisième correspond au niveau de contribution des interactions polaires.

CHAPITRE V

Résultats

et

Discussion

I. Rendements des extraits

L'extraction est réalisée par macération qui consiste à utiliser des solvants à polarité croissante ; hexane, dichlorométhane et méthanol qui vont permettre la séparation des composés de l'extrait brut selon leur degré de solubilité dans les solvants d'extraction. Cette extraction nous a permis après évaporation des solvants, la récupération des quantités d'extraits solides et l'obtention des trois extraits bruts : l'extrait hexanique, l'extrait dichlorométhane, et l'extrait méthanolique. Le poids récupéré, le rendement calculé, la couleur et l'aspect de chaque extrait, sont représentés dans le tableau 14 et figure 27.

Tableau 14 : Rendement d'extraction et caractères de chaque extrait

Matière végétal	Extraits	Masse (g)	Rendement (%)	Aspect
166.80 g	Extrait hexanique	17.84	10.69	Pâteux
	Extrait dichlorométhane	18.62	11.15	Pâteux
	Extrait méthanolique	58.80	35.25	Visqueux

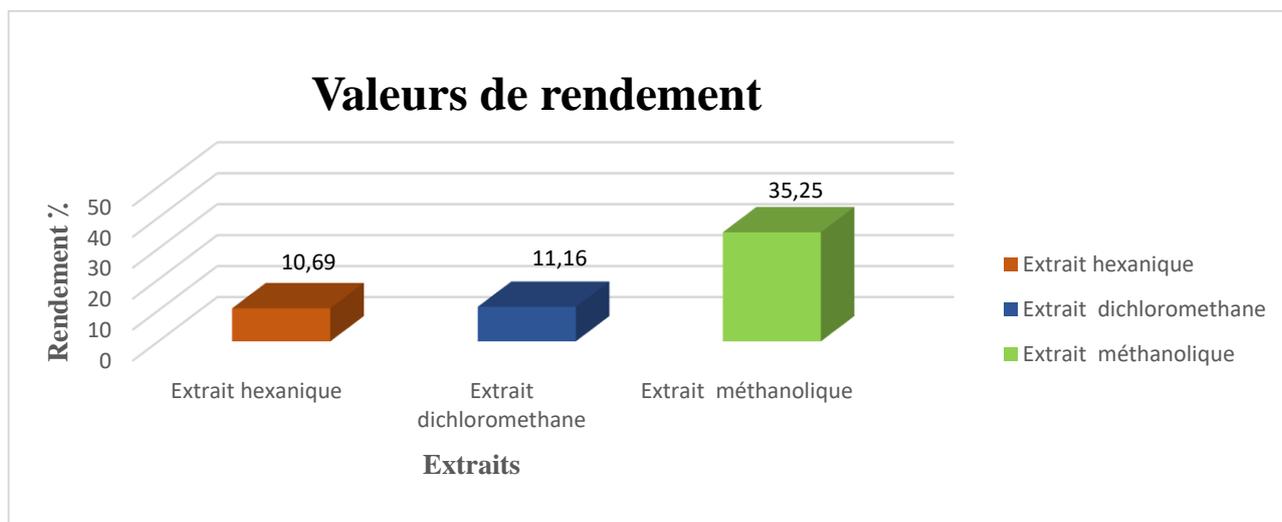


Figure 27. Rendement d'extraction de chaque extrait

Les résultats obtenus montrent une variabilité des rendements entre les trois extraits : l'extrait méthanolique représente le rendement le plus élevé 35.25%, suivi par l'extrait dichlorométhane 11.16%, puis l'extrait hexanique qui possède le rendement le plus bas 10.69%.

Sur la base des résultats obtenus, le rendement d'extraction augmente avec l'augmentation de polarité des solvants utilisés. Cette constatation a été observée dans l'extrait hexanique et l'extrait dichlorométhane (10.69 %), (11.16 %) respectivement, par rapport à l'extrait méthanolique

(35.25%). le rendement d'extraction obtenu avec solvant méthanol est toujours le plus élevé, cela peut s'expliquer par le simple fait que le méthanol est un solvant fortement polaire connue pour extraire une large gamme de molécules dont une quantité importante de composés non phénoliques comme les glucides et les protéines (Bonnaillie et al., 2012). Par la suite, la différence des rendements d'extraction observés pourrait être liée à la région géographique de la plante.

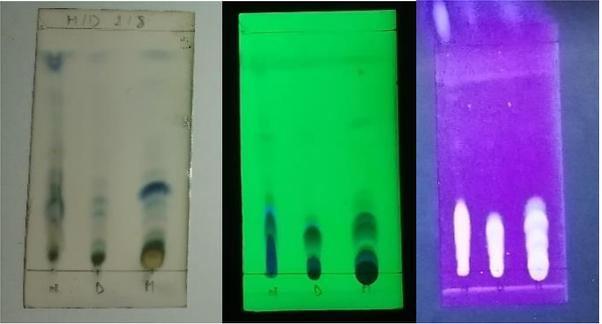
II. Analyse phytochimique

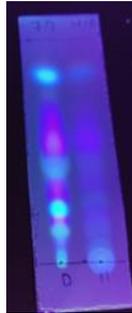
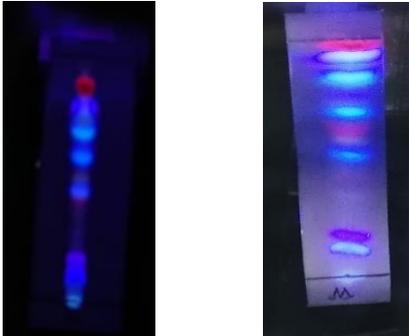
II.1. Analyses qualitatives phytochimique

II.1.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les extraits obtenus (hexanique, dichlorométhane, méthanolique) ont été analysés avec la technique de CCM en utilisant une plaque chromatographique du gel de silice (CCM) avec des systèmes de solvants appropriés afin d'avoir une idée sur le nombre de produits à séparer. La migration des molécules dans les plaques CCM s'effectue selon l'éluant approprié. L'observation se fait sous la lampe UV à 254 et 365 nm suite à l'utilisation de deux révélateurs spécifiques ; un révélateur à base d'acide sulfurique et un révélateur vanillique, puis les plaques sont chauffées à 100°C pendant trois minutes pour les terpènes. D'autre part, l'ammoniac a été utilisé comme un autre révélateur pour les coumarines . Les résultats sont représentés dans le tableau 15, et les figures suivants :

Tableau 15 : Résultats des systèmes de solvants choisis

Extraits bruts testés	Systèmes de solvants choisis	Résultats
Extrait hexanique + Extrait dichlorométhanique + Extrait méthanolique.	(Héxane – DCM) (8 : 2 v/v)	 <p>Figure 28. Plaques CCM des trois extraits (EH, ED, EM) révélées avec des révélateurs et visualisées sous UV 254 nm et 365 nm</p>

<p>Extrait hexanique + Extrait dichlorométhanique</p>	<p>(Héxane – AcOEt) (9.5 : 0.5 v/v)</p>	 <p>Figure 29. Une plaque CCM des deux extraits (EHEX ,EDCM) a été visualisée sous UV 365 nm</p>
<p>Extrait dichlorométhanique + Extrait méthanolique</p>	<p>(Héxane – AcOEt) (7 : 3 v/v)</p>	 <p>Figure 30. Une plaque des deux extraits (EDCM, EMeOH) a été visualisée sous UV 365 nm</p>
<p>Extrait méthanolique</p>	<p>(AcOEt -MeOH-H₂O) (9 : 0.5 : 0.5 v/ v/g)</p>	 <p>Figure 31. Une plaque CCM de extrait (EMeOH) a été visualisée sous UV 365 nm</p>

Les résultats des plaques CCM montrent la présence d'un nombre important des métabolites secondaires à séparés pour les extraits bruts testés dans les différents systèmes d'élution sélectionnés, et plus précisément avec l'extrait méthanolique, le plus riche en des métabolites secondaires. Cela se voit avec le système de solvants (AcOEt – MeOH -H₂O) avec proportion de (9 : 0.5 : 0.5 v/v/g) (figure31), même aussi l'extrait dichlorométhanique riche en métabolites secondaires où ils apparaissent des tâches après le développement et l'évaporation du solvant de migration avec le système de solvants (Héxane – AcOEt) avec proportion (7 : 3 v/v), ils sont

visualisées sous UV 365 nm (figure 30). La richesse de ces extraits en composés chimiques actifs pourrait expliquer leurs utilisations traditionnelles.

La visualisation des plaques sous UV à 254 et 365 nm permet d'observer les couleurs ainsi de distinguer les taches les plus majoritaires pour chaque variétés, bien qu'il y a des tâches qui ne sont pas bien claire grâce à la présence d'une condensation moléculaire.

L'utilisation des réactifs révélateurs a permis l'observation d'autres couleurs tel que l'apparition d'un spot unique de couleur violette en haut de plaque, grâce à l'utilisation d'un révélateur à base d'acide sulfurique et un révélateur vanillique avec chauffage à 100°C , ce qui indique la présence des terpènes . Outre cela l'apparition d'une fluorescence blue sous UV qui définit l'existence des coumarines, ce résultat confirme les résultats obtenus par le Screening phytochimique Plus tard.

II.1.2. Screening phytochimique

Une analyse qualitative des différents extraits a été effectuée dans le but de mettre en évidence les différentes classes de métabolites secondaires qui constituent ces extraits. Toutefois, ce screening phytochimique ne renseigne pas sur la nature des molécules chimiques, mais les tests de caractérisation phytochimique présentent des imprécisions, car ils sont basés en grande partie sur l'analyse qualitative (tableau 16).

Tableau 16 : Résultats de criblage phytochimique des trois extraits de *Seseli*

Métabolites secondaires	Présence /Absence		Résultats			interprétations
	EHEX	-	EHEX	EDCM	EMeOH	
Polyphénols	EHEX	-				Apparition d'une Coloration bleu noirâtre ou verte plus ou moins foncé
	EDCM	++				
	EMeOH	+++				

Flavonoïdes	EHEX	-				Apparition d'une Coloration rouge ou Marron foncé
	EDCM	-				
	EMeOH	+				
Coumarines	EHEX	+				Apparition d'une Fluorescence bleue sous UV
	EDCM	+++				
	EMeOH	+++				
Tanins	EHEX	-				Apparition d'une Coloration Verdâtre ou bleue noirâtre
	EDCM	+				
	EMeOH	+++				
Saponosides	EHEX	-				Formation d'une Une mousse persistante
	EDCM	-				
	EMeOH	-				
Alcaloïdes	EHEX	-				Formation d'un Précipité de coloration Rouge brain
	EDCM	-				
	EMeOH	-				

Terpènes et Stérols	EHEX	++				Apparition d'une Coloration Rouge avec Coloration brun rougeâtre à l'interphase (un anneau rouge brun)
	EDCM	+++				
	EMeOH	+++				

Les résultats phytochimiques sont classés comme suit :

(+++) Réaction très positif : Présence confirmée

(++) Réaction positif : Présence modérée.

(+) Réaction plus au moins positive : Présence faible

(-) Réaction négative : Absences

D'après les résultats du screening phytochimique, nous constatons une richesse relative en métabolites secondaires analysés pour les extraits EDCM et EMeOH par rapport à l'extrait de EHEX qui est considéré comme un extrait pauvre en métabolites secondaires polaires.

Les tannins et les coumarines, même aussi les terpènes ont été trouvés presque dans chaque extrait avec des concentrations élevées, tandis que les flavonoïdes et les polyphénols ont été observés dans les extraits EDCM et EMeOH. D'autre part, l'absence totale des alcaloïdes et des saponosides a été signalée pour tous les extraits étudiés.

Les travaux antérieurs sur le screening phytochimique des plantes du genre *Seseli* ont démontré la présence des coumarines (Tosun et al., 2007) ce qui est compatible à nos résultats.

II.2. Criblage chimique de l'extrait méthanolique de la plante étudiée par HPLC-UV

Le besoin de savoir les profils et d'identifier les composés individuels dans les échantillons exige l'utilisation chromatographie liquide haute performance (HPLC) analytique afin d'avoir une idée sur le nombre de produits à séparer.

L'extrait méthanolique a été analysé par HPLC-UV afin d'obtenir une information sur sa composition en composés phénoliques. En effet, l'analyse du chromatogramme HPLC – UV (Figure 32) a fait ressortir plusieurs composés phénoliques mentionnés par leurs pics et leurs temps de rétention ce qui confirme la richesse de l'extrait analysé en ce type de métabolites secondaires. Il est bien noté aussi que certains d'entre eux sont majoritaires tels que ceux ayant des temps de rétentions : 3.52min, 18.86 min, 20.65 min, et 22.11 min.

L'analyse de l'extrait méthanolique par HPLC-UV , a permis d'obtenir des résultats très intéressants. Cela nous a amené à tester les activités biologiques de cet extrait.

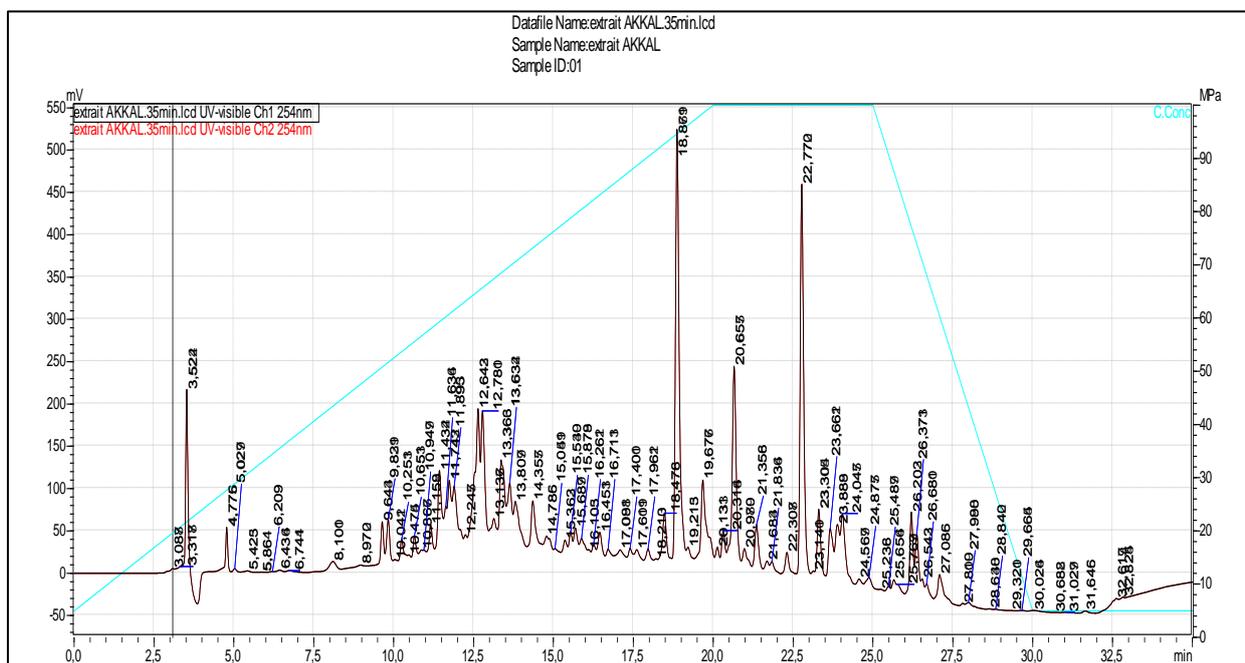


Figure 32: Profil chromatographique enregistré à 254 nm de l'extrait méthanolique analysé par HPLC-UV

II.3. Teneur en flavonoïdes et en polyphénols

II.3.1. Teneur des extraits en polyphénols (TPC)

Le dosage des polyphénols totaux des extraits de la plante étudiée du genre *Seseli* ont été réalisé par la méthode spectrophotométrique de Folin-ciocalteu (FCR). La teneur en polyphénols totaux est exprimée en μg équivalent d'acide gallique par mg d'extrait, en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée par l'acide gallique ($y = 0,01435x + 0,2567$) avec $R^2 = 0,9929$ à une longueur d'onde 765 nm (Annexe II). Les résultats du dosage colorimétrique des composés phénoliques totaux sont présentés dans la (figure 33) et le (tableau 17).

Tableau 17. Teneurs en polyphénols totaux des trois extraits

Extraits	Teneur en polyphénols totaux ($\mu\text{g EAG/ mg}$)
Extrait hexanique	14,272 \pm 1,150
Extrait dichlorométhane	35,909 \pm 0,009
Extrait méthanolique	31,101 \pm 0,070

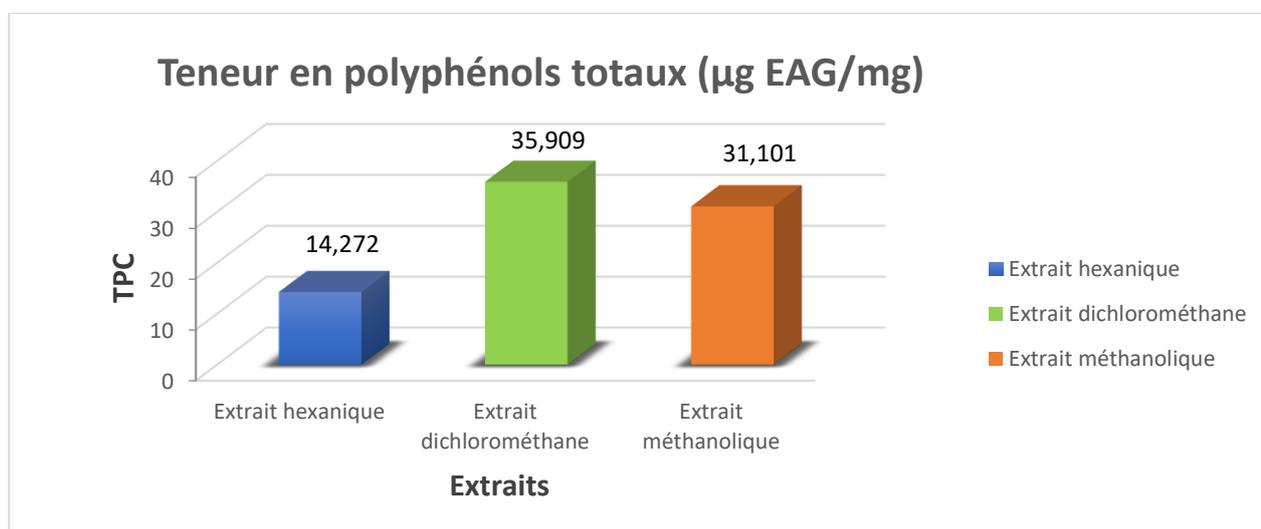


Figure 33. Evaluation de la teneur de polyphénols totaux des extraits de *Seseli*

Les résultats représentés dans la fig. 32 et le tableau 17, montrent que les différents extraits renferment des taux en polyphénols décroissants; extrait dichlorométhane > extrait méthanolique > extrait hexanique. Le profil du dosage des polyphénols totaux obtenus par extrapolation de l'absorbance des extraits sur la courbe d'étalonnage de l'acide gallique montre que l'extrait dichlorométhanique et

l'extrait méthanolique sont les extraits les plus riches en polyphénols avec une teneur de $(35,909 \pm 0,009 \mu\text{g EAG/ mg})$ et $(31,101 \pm 0,070 \mu\text{g EAG/ mg})$ respectivement, suivi par l'extrait hexanique avec le plus faible teneur ($14,272 \pm 1,150 \mu\text{g EAG/ mg}$).

En fait, la solubilité des polyphénols est gouvernée par ; le type du solvant utilisé, leur degré de polymérisation, leur interaction avec d'autres constituants. Pour une plus haute récupération de polyphénols, le méthanol est le solvant approprié (Falleh et al., 2008). Le dosage par le réactif de Folin-Ciocalteu donne donc une évaluation brute de tous les composés phénoliques d'un extrait. Il n'est pas spécifique aux polyphénols, mais beaucoup de composés peuvent réagir avec le réactif, comme dioxyde de soufre, acide ascorbique, les sucres, les amines aromatique, les acides organiques, donnant un taux phénolique apparent élevé (Tawaha et al., 2007 ; Medina-Remón et al., 2009).

D'après les travaux de recherches menés sur le genre *Seseli*, les résultats ont montré que les composés phénoliques constituent principalement de coumarines (Tosun et Özkal, 2003) qui ont émié un effet antioxydant puissant (Torres et al., 2014 ; Pereira et al., 2018; Zhu et al., 2018).

II.3.2. Teneur des extraits en flavonoïdes (TFC)

La détermination quantitative des flavonoïdes dans les extraits de la plante étudiée du genre *Seseli* est réalisée par la méthode de trichlorure d'aluminium, La teneur en flavonoïdes totaux est exprimée en μg équivalent de la quercétine par mg d'extrait, en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée par la quercétine ($y = 0,02554 x + 0,007806$) avec $R^2 = 0,9965$ à une longueur d'onde 430 nm (Annexe II). Les résultats du dosage colorimétrique des composés flavonoïdes totaux sont présentés dans la (figure 34) et le (tableau 18).

Tableau 18 : Teneurs en flavonoïdes totaux des trois extraits

Extraits	Teneur en flavonoïdes totaux ($\mu\text{g EQ/mg}$)
Extrait hexanique	$4,178 \pm 0,137$
Extrait dichlorométhane	$4,158 \pm 0,117$
Extrait méthanolique	$5,058 \pm 0,078$

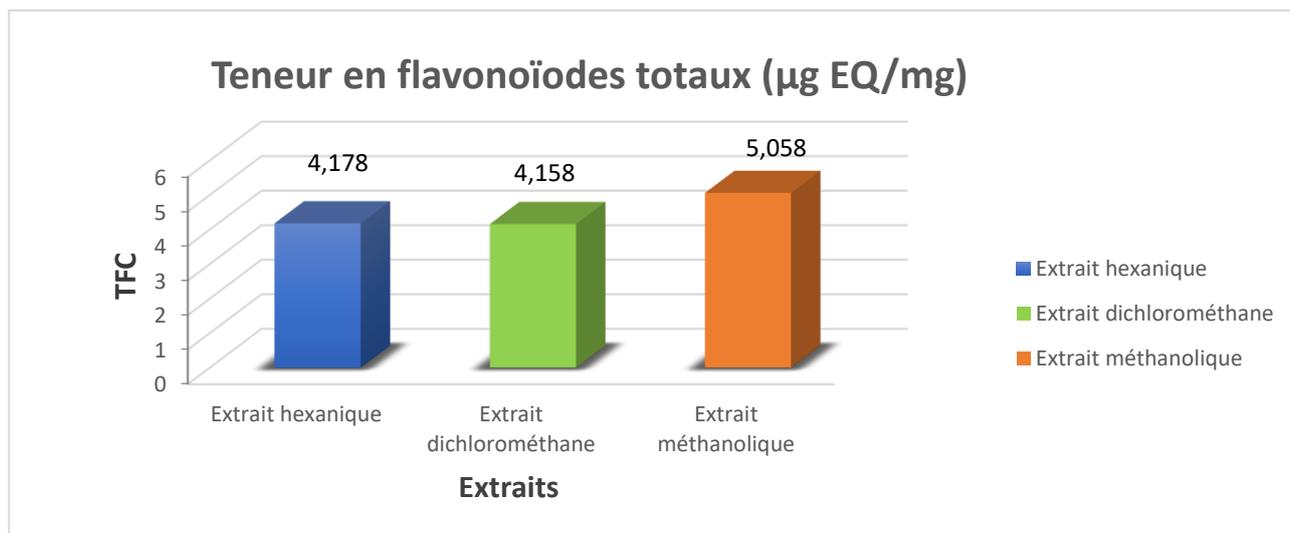


Figure 34. Evaluation de la teneur de flavonoïdes totaux des extraits de *Seseli*

D'après la figure 34 et le tableau 18, On remarque que la teneur des flavonoïdes totaux est presque la même pour les trois extraits ; hexanique ($4,178 \pm 0,137 \mu\text{g EQ/mg}$), Dichlorométhane ($4,158 \pm 0,117 \mu\text{g EQ/mg}$) et méthanolique ($5,058 \pm 0,078 \mu\text{g EQ/mg}$), et l'extrait méthanolique possède la teneur la plus élevée en flavonoïdes en comparaison avec les extraits hexanique et dichlorométhane. Il ressort de ces analyses que les trois extraits (hexanique , dichlorométhanique , méthanolique) sont faibles en quantités des flavonoïdes.

La concentration des flavonoïdes dans les extraits de la plante dépend de la polarité des solvants (Stanković, 2011), le type du standard utilisé peut également changer les résultats (Djeridane et al., 2010). En fait, l'utilisation d'un matériel végétal sec est recommandé du moment que les flavonoïdes (particulièrement les glycosides) peuvent être soumis à une dégradation enzymatique quand le matériel végétal est frais ou non séché (Marston et Hostettmann, 2006).

De plus, les solvants alcooliques sont capables d'augmenter la perméabilité des parois cellulaires en facilitant l'extraction d'un plus grand nombre de molécules polaires, de moyenne et de faible polarité. Selon Seidler-Lozykowska (2013), l'eau et le méthanol sont deux solvants polaires qui extraient particulièrement les flavonoïdes glycosylés et les tannins. Tandis que les flavonoïdes aglycones sont extraits par les alcools ou les mélanges eau-alcool (Marston et Hostettmann, 2006).

III. Evaluation des activités biologiques

III.1. Activités antioxydantes

De différents extraits des plantes sont des sources potentielles des composants chimiques naturels responsables d'activités antioxydantes. À cet effet, plusieurs essais ont été menés par certains auteurs pour évaluer le potentiel antioxydant de ses différents extraits. C'est dans ce contexte que nous avons particulièrement intéressé à la teneur en composés phénoliques dans chaque extrait de *Seseli*. En tant que composés connus comme de bons composés antioxydants, il nous a paru intéressant d'estimer le potentiel antioxydant de l'extrait brut méthanolique et l'extrait dichlorométhane à travers cinq méthodes différentes.

L'acide ascorbique, BHA, BHT et l' α -tocophérol sont connus pour leurs propriétés antioxydantes et ils sont utilisés comme control positif.

III.1.1. Piégeage du radical libre DPPH

L'activité antiradicalaire des extraits vis-à-vis du radical DPPH \cdot a été évaluée par spectrophotométrie à 517 nm, en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune. Dans ce test les résultats ont été comparés aux étalons de référence (BHA, BHT et l' α -tocophérol). Les résultats sont présentés dans l'histogramme illustré dans la figure 36 et tableau 27 (**Annexe III**) :



Figure 35 : Profil de la microplaque de dosage de l'activité anti-radicalaire (DPPH)

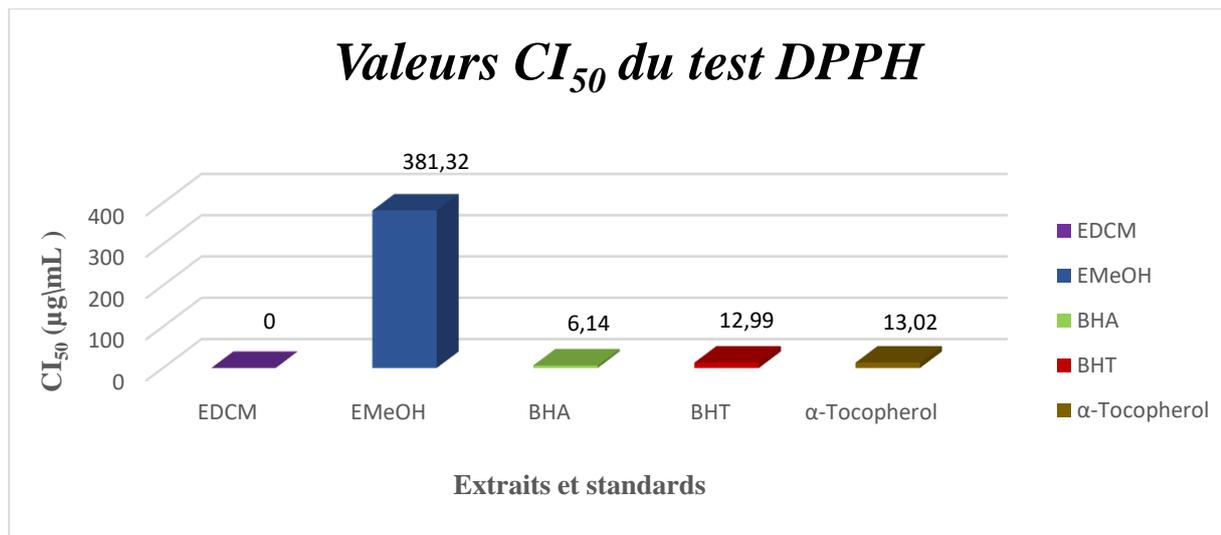


Figure 36. Valeurs des CI_{50} du test DPPH.

- Une valeur plus faible de l' IC_{50} (la concentration du substrat qui cause une inhibition de 50 % de l'activité de DPPH) indique une activité antioxydante plus élevée.

Les résultats représentés dans la figure 36, indiquent que l'extrait méthanolique (EMeOH) possède une très faible activité antiradicalaire ($CI_{50} = 381,32 \pm 0,25 \mu\text{g/mL}$), une activité presque 62 fois moins faible que le standard BHA ($CI_{50} = 6,14 \pm 0,41 \mu\text{g/mL}$) et 30 fois moins faible que le standard BHT et α -Tocopherol ($CI_{50} = 12,99 \pm 0,41 \mu\text{g/mL}$) et ($CI_{50} = 13,02 \pm 5,17 \mu\text{g/mL}$) respectivement, suivi par l'extrait dichlorométhanique (EDCM) avec une valeur de $CI_{50} > 200$ qui ne montre aucune activité antiradicalaire vis-à-vis le radical DPPH en comparaison avec les antioxydants standards BHT, BHA et α tocophérol. Le faible potentiel antioxydant des deux extraits utilisé pourrait être expliqué par la faible teneur en polyphénols et de flavonoïdes.

III.1.2. Activité du piégeage du cation radical ABTS \bullet^+

L'ABTS (acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) est un composé organique stable utilisé dans l'évaluation de l'activité antiradicalaire, avec un pic d'absorption à 734 nm. en présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène, le cation ABTS \bullet^+ subit une réduction et passe de la couleur bleu-vert à un état neutre incolore. Les résultats sont présentés dans l'histogramme illustré dans la figure 38 et tableau 28 (**Annexe III**) :

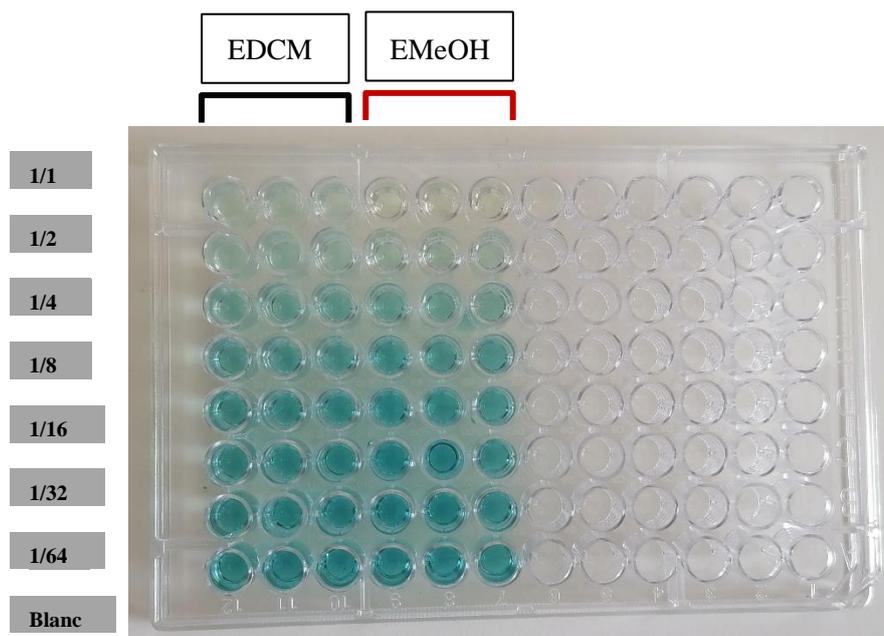


Figure 37 : Profil de la microplaque de dosage de l'activité antiradicalaire (ABTS).

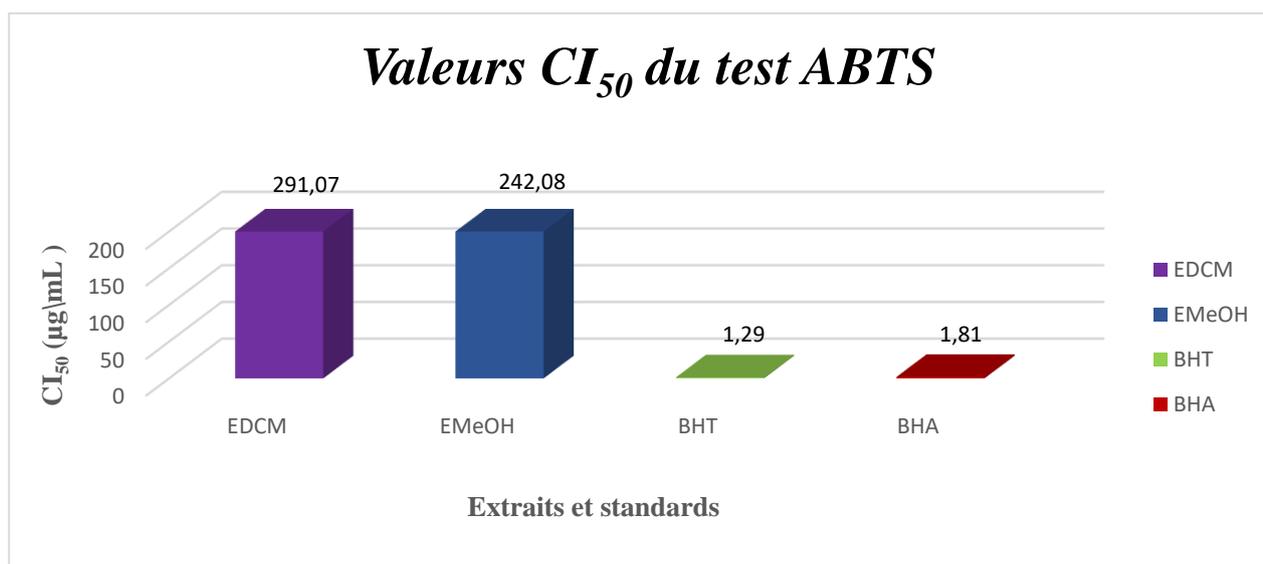


Figure 38. Valeurs CI_{50} du test ABTS

- Une valeur plus faible de l' IC_{50} (la concentration du substrat qui cause une inhibition de 50 % de l'activité de ABTS) indique une activité antioxydante plus élevée.

Les résultats représentés dans la figure 38, montrent que les extraits (EDCM, EMeOH) possèdent une très faible activité anti-radicalaire ($CI_{50}=291,07\pm 6,02 \mu\text{g/mL}$) et ($CI_{50}=242,02\pm 0,65 \mu\text{g/mL}$) respectivement, en comparaison avec les antioxydants BHT, BHA qu'ils sont utilisés comme standards avec des valeurs de CI_{50} très faible ($CI_{50}=1,29\pm 0,30 \mu\text{g/mL}$) et ($CI_{50}=1,81\pm 0,10 \mu\text{g/mL}$) respectivement. La faible activité de deux extraits peut être expliquée par leur manque de propriété de donation d'hydrogène et par conséquent leur faible capacité de neutraliser les radicaux libres.

III.1.3. Activité du pouvoir réducteur (FRAP)

Le suivi de cette activité est basé sur l’aptitude des extraits testés à réduire dans le complexe le fer ferrique (Fe^{+3}) de couleur jaune en fer ferreux (Fe^{+2}) de couleur bleu verte qui a un maximum d’absorbance à 700 nm. En mesurant les valeurs de $A_{0.5}$ et par comparaison avec les standards l’acide ascorbique et α -Tocopherol. Les résultats sont indiqués dans la figure 40 et le tableau 29 (Annexe III) :



Figure 39 .Profil de la micoplaque de dosage de l’activité du pouvoir réducteur (FRAP).

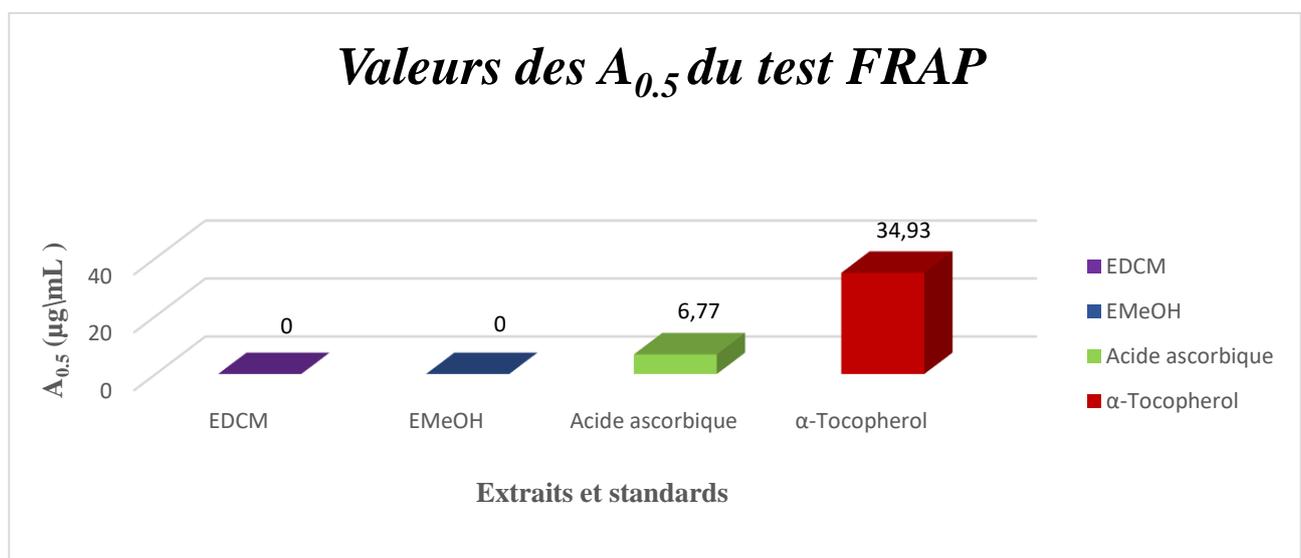


Figure 40 . Valeurs des $A_{0.5}$ du test FRAP.

- Plus la valeur de $A_{0,5}$ est petite plus la capacité de l'antioxydant est meilleur.

Les résultats représentés dans la figure 40, montrent que les extraits (EDCM, EMeOH) ne possèdent pas une activité réductrice significative avec des valeurs de ($A_{0,5} > 200$), en comparaison avec les standards; acide ascorbique et α -Tocopherol qui ont montré une propriété réductrice très élevée avec des valeurs faibles de ($A_{0,5} = 6.77 \pm 1.15 \mu\text{g/mL}$) et ($A_{0,5} = 34.93 \pm 2.38 \mu\text{g/mL}$) respectivement. Par la suite, on peut expliquer la faible activité réductrice des deux extraits (EDCM, EMeOH) par l'absence et/ou la faible concentration des agents réducteurs, qui sont responsables de la propriété de donation d'électrons. De plus, le faible pouvoir réducteur des extraits est probablement dû au nombre réduit de groupement hydroxyle dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneurs d'électrons (Siddhuraju et Becker, 2007).

III.1.4. Activité de réduction par la formation du complexe Fe^{+2} -Phénanthroline

En présence d'un antioxydant, le fer ferrique (Fe^{3+}) est réduit en fer ferreux (Fe^{2+}), ce dernier forme un complexe stable avec la phénanthroline de couleur rouge orange, qui a un maximum d'absorbance à 510 nm. Cette réduction est déterminée par la mesure de valeurs de $A_{0,5}$ des extraits de la plante étudiée du genre *Seseli* et celles des standards BHA et BHT, ce qui a permis d'obtenir les résultats suivants la figure 42 et le tableau 30 (Annexe III) :

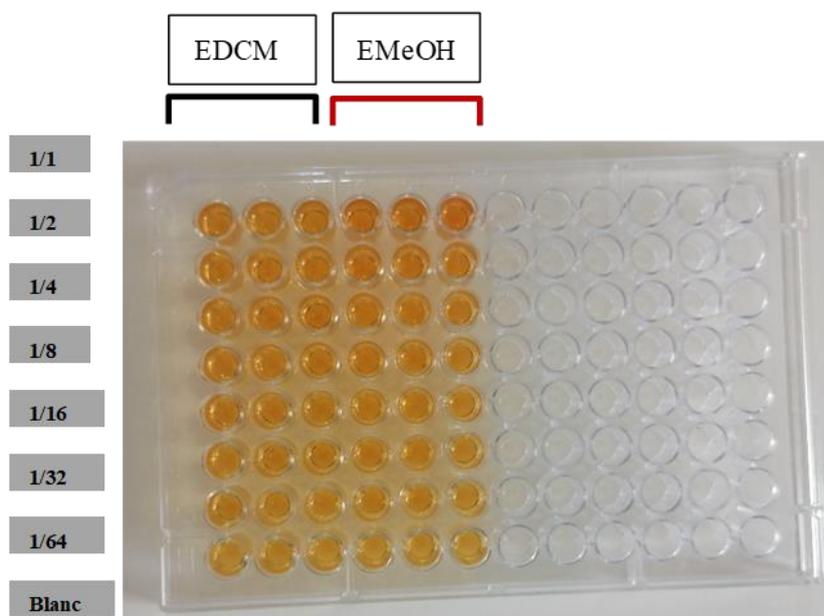


Figure 41. Profil de la micoplaque de dosage de l'activité de réduction par la formation du complexe Fe^{+2} -phenanthroline

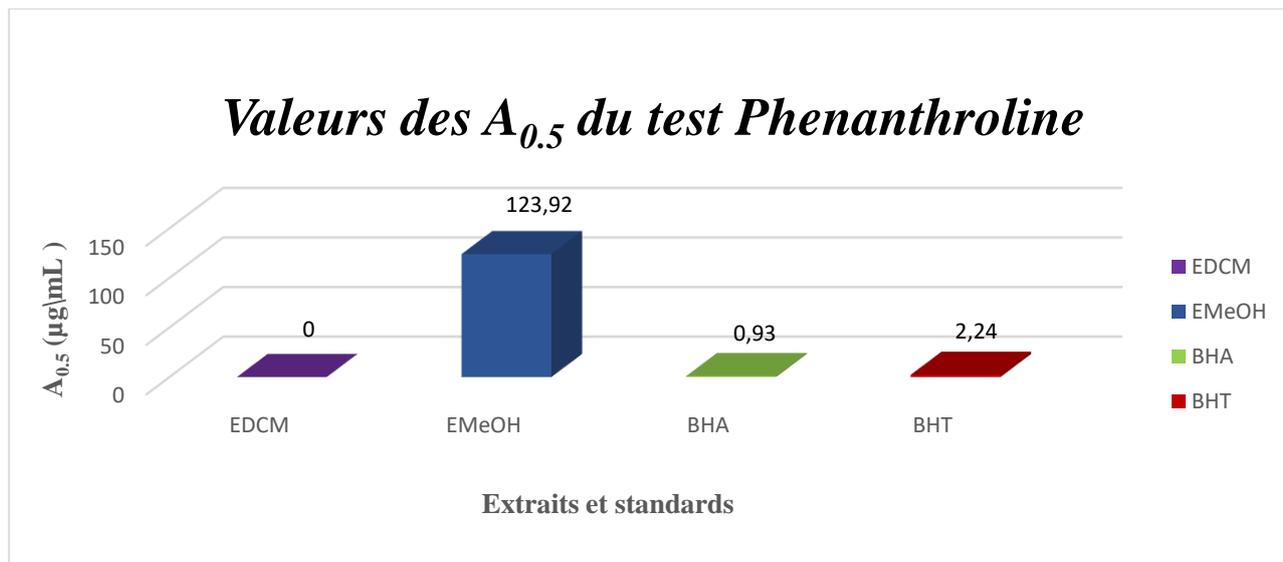


Figure 42. Valeurs de $A_{0.5}$ du test de phénanthroline

- Plus la valeur de l' $A_{0.5}$ est petite, plus la capacité de l'antioxydant est meilleur.

Les résultats représentés dans la figure 42, montrent que l'extrait méthanolique (EMeOH) possède une faible activité réductrice ($A_{0.5}=123,92\pm 0,60 \mu\text{g/mL}$) qui représente une activité presque 133 fois moins faible que le standard BHA ($A_{0.5}=0,93\pm 0,07 \mu\text{g/mL}$) et 55 fois moins faible que le standard BHT ($A_{0.5}=2,24\pm 0,17 \mu\text{g/mL}$), suivi par l'extrait dichlorométhanique (EDCM) avec une valeur de $A_{0.5}>200$ qui indique une absence de l'activité réductrice, en comparaison avec les antioxydants standards BHT et BHA, qu'ils sont utilisés comme standards car ils présentent les propriétés réductrices les plus élevés.

Les profils d'activité réductrice obtenus révèlent que les extraits testés (EDCM, EMeOH) possèdent un potentiel antioxydant très faible et une capacité de capter les radicaux libres presque inexistant, cette absence est liée au manque de la propriété de donation d'électrons, expliquée par l'insuffisance de composés donneurs d'électrons, sachant que la méthode du phénanthroline suit le mode d'action du transfert d'électron (ET). De plus, la faible teneur en polyphénols et flavonoïdes peut expliquer cette activité antioxydante moins prononcée.

III.1.5. Activité nanoparticules d'argent (SNP)

L'activité nanoparticule (SNP) des extraits a été évaluée par spectrophotométrie à 423 nm, en suivant la réduction de l' Ag^+ en nanoparticules d'argent sphérique. Dans ce test les résultats ont été comparés par rapport à l'acide ascorbique et le Trolox. Les résultats sont présentés dans l'histogramme illustré dans la figure 44 et Tableau 31 (Annexe III) :

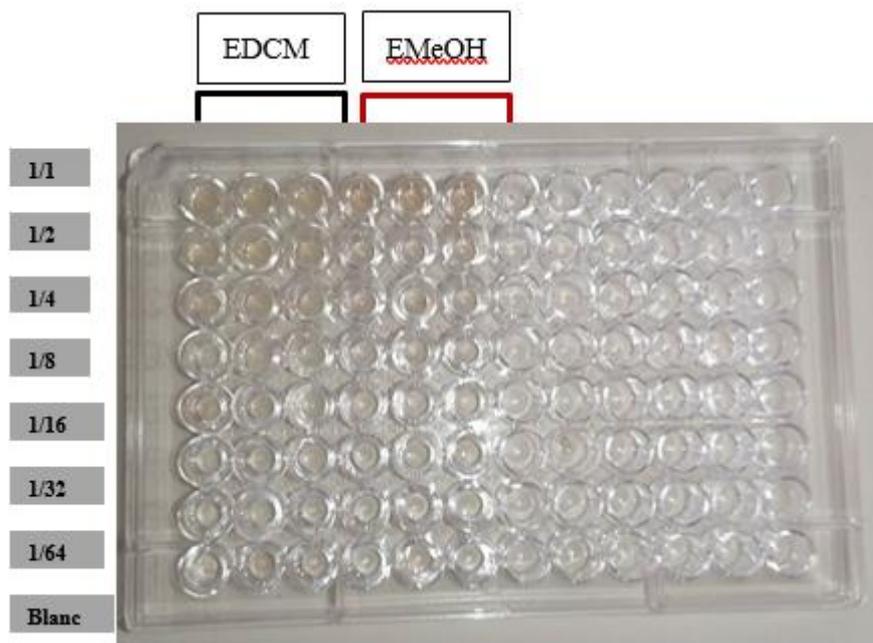


Figure 43 .Profil de la micoplaque de dosage de l’activité nanoparticule d’argent SNP

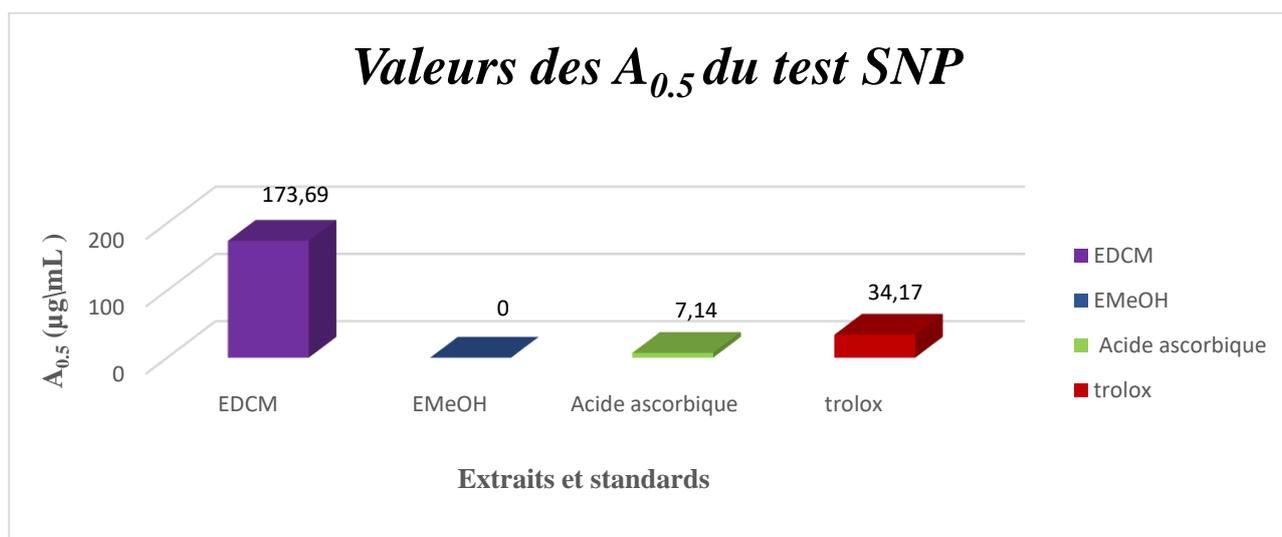


Figure 44. Valeurs des $A_{0.5}$ dans le test nanoparticule d’argent SNP

- Plus la valeur de l' $A_{0.5}$ est petite plus la capacité de l’antioxydant est meilleur.

Les résultats représentés dans la figure 44, montrent que l’extrait dichlorométhanique (EDCM) possède une faible activité réductrice de la nanoparticule d’argent SNP ($A_{0.5} = 173,69 \pm 2,92 \mu\text{g/mL}$) qui représente une activité presque 24 fois moins faible que le standard acide ascorbique ($A_{0.5} = 7.14 \pm 0.05 \mu\text{g/mL}$) et cinq fois moins faible que le standard trolox ($A_{0.5} = 34.17 \pm 1.23 \mu\text{g/mL}$), suivi par l’extrait méthanolique (EMeOH) avec une valeur de $A_{0.5} > 200$, qui indique l’absence de l’activité réductrice de nanoparticule d’argent SNP en comparaison avec les antioxydants standards l’acide ascorbique et le Trolox , possédants des propriétés réductrices très élevés.

On constate que les profils d'activité réductrice obtenus des extraits testés (EDCM , EMeOH) indiquent un potentiel antioxydant très faible et une capacité de capter les radicaux libres presque inexistante, cette absence pourrait être liée au manque de composés donneurs d'électrons, puisque la méthode du nanoparticule d'argent SNP suit le mode d'action du transfert d'électron (ET); aussi bien la faible en polyphénols et flavonoïdes peut expliquer l'activités antioxydante moins prononcée.

III.2. Activité anti- butyrylcholinestérase (anti-Alzheimer)

Nous avons ciblé l'enzyme butyrylcholinestérase (BChE) pour étudier l'activité anti- Alzheimer. Le pouvoir inhibiteur de la butyrylcholinestérase (BChE) a été évalué par la méthode spectrophotométriques d'Ellman et ses collaborateurs, cette activité est basée sur le clivage de butyrylthiocholine par la BChE pour former un anion de couleur jaune dont l'intensité est en fonction de l'activité de l'acétylcholinestérase (**Ellman et al.,1961**). Les résultats sont présentés dans l'histogramme illustré dans la figure 46 et Tableau 32 (**Annexe III**) :

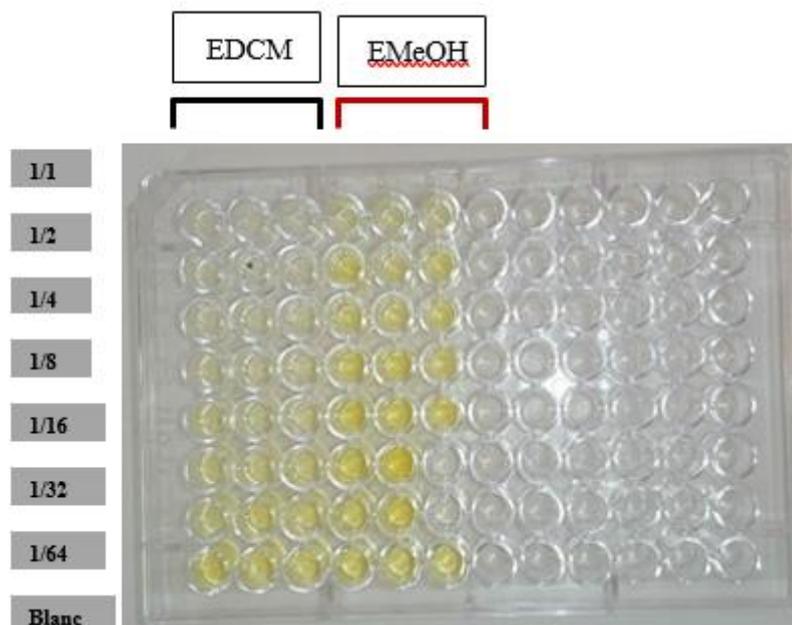


Figure 45. Profil de la micoplaque de dosage de l'activité inhibitrice de la butyrylcholinestérase (BChE).

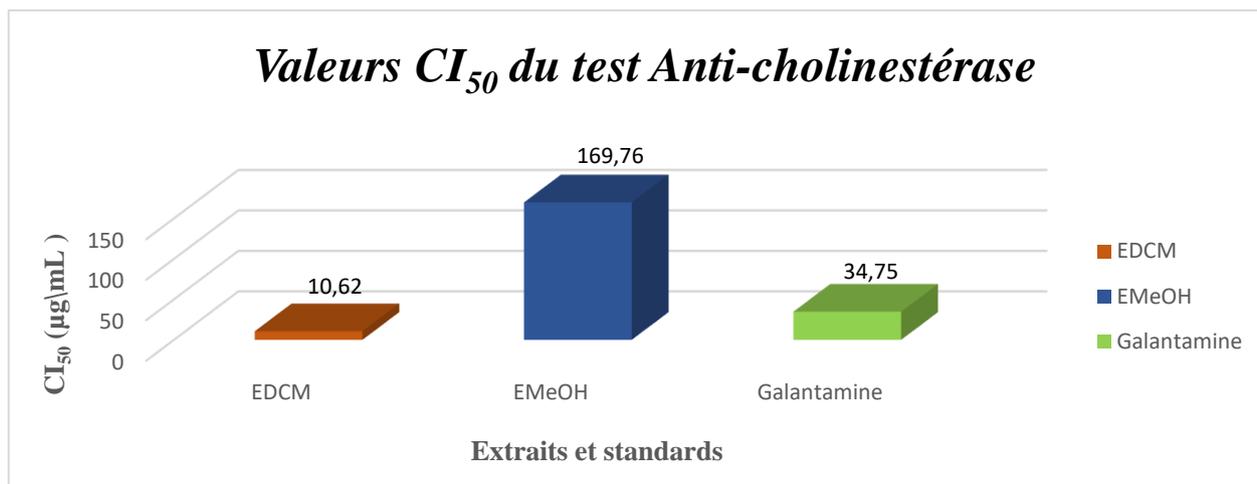


Figure 46. Valeurs de CI_{50} du test inhibition de butyrylcholinestérase (BChE).

- Une valeur plus faible de l' IC_{50} (la concentration du substrat qui cause une inhibition de 50 % de l'activité anti-cholinestérase) indique une activité anti-cholinestérase plus élevée.

Les résultats de la figure 46, qui présentent le pourcentage d'inhibition de la butyrylcholinestérase (BChE), montrent que l'extrait dichlorométhanique (EDCM) possède une très forte activité inhibitrice avec une de $CI_{50}=9,14\pm 1,74 \mu\text{g/mL}$, cette valeur représente une activité presque trois fois supérieure et mieux que le standard Galantamine $CI_{50}=34,75\pm 1,99 \mu\text{g/mL}$, par contre l'extrait méthanolique (EMeOH) possède une faible activité inhibitrice avec une valeur de $CI_{50}=169,76\pm 14,65 \mu\text{g/mL}$, cette dernière reste inférieure à celles du standard Galantamine.

Les profils d'activité inhibitrice de la butyrylcholinestérase (BChE) obtenus révèlent que l'extrait dichlorométhanique (EDCM) possède un potentiel inhibiteur très puissant vers la butyrylcholinestérase (BChE), malgré sa composition en produits apolaires, cela veut dire que les métabolites bioactifs qui sont impliqués dans l'inhibition de l'enzyme (BChE) sont des molécules de faible polarité, et parmi ces molécules apolaires, on peut citer les composants terpéniques, dont les plus importants sont ; l' α -pinène et le β -pinène, le limonène . Pour les composants coumarines, on peut citer quatre dérivés : la tortuosine, la tortuosinine, le tortuosinol et la tortuosidine, qui ont été obtenus au cours de l'étude phytochimique de genre *Seseli*, dont la plupart font partie que des pyranocoumarines (A. Z. Abyshev et D. Z. Abyshev, 1983).

Le screening phytochimique que nous avons fait, a révélé la présence des coumarines et des terpènes. De plus, les résultats qualitatifs des plaques CCM, ont montré la présence de certains composés terpéniques et coumariques .

D'après Orhan et ses collaborateurs (Orhan et al.,2001), Dix-sept dérivés naturels de la coumarine ont été testés contre l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE), Les coumarines testées étaient plus sélectives contre BChE, avec des $IC_{50} = 30,3 \mu\text{g/mL}$, $29,2 \mu\text{g/mL}$, $37,2 \mu\text{g/mL}$ et $50,1 \mu\text{g/mL}$, ce qui signale une inhibition de BChE plus élevée que la référence galanthamine, $IC_{50} = 60,2 \mu\text{g/mL}$. Nos résultats ont révélé que les coumarines pourraient être des composés prometteurs pour la conception de nouveaux candidats-médicaments anti-Alzheimer.

De nombreuses études précédentes ont révélé que le limonène, un composé terpénique, a une activité inhibitrice modérée contre la BChE (W. Chaiyanar et S. Okonogi, 2012), d'autres résultats ont montré que l' α -pinène et le δ -3-carène sont des inhibiteurs puissants de l'AChE (Miyazawa et Yamafuji, 2005). De même, d'autre étude a décrit que l' α -pinène avait l'activité d'inhibition de l'AChE la plus forte suivie par le β -pinène et le limonène, l'étude est effectuée sur les adultes du charançon de *Riz Sitophilusoryzae* (Kim et al.,2013).

III.3. Etude *in silico* d'inhibition de la butyrylcholinestérase

➤ Etude d'interaction :

Dans le but d'étudier le mode de liaison des molécules étudiées dans le site actif de la BChE, nous avons choisi les inhibiteurs qu'ils ont probablement un pourcentage d'inhibition très élevé vers la butyrylcholinestérase (BChE) avec leur IC_{50} expérimentaux . Les résultats du docking des molécules étudiées, dans le site actif de la butyrylcholinestérase sont représenté dans le Tableau 19 .

Tableau 19. Résultats théoriques de l'affinité obtenue par docking des molécules étudiées dans le site actif de la butyrylcholinestérase et leurs relations avec les données expérimentales (IC_{50}).

Molécules	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Affinité (M^{-1})
Limonène	14.07	2.18
α -pinène	23.5	2.34
Tortuosinol	12.96	2.83
Tortuosidine	19,3	2.78
Galantamine	34.75	2.72

Le tableau 19 montre que le score d'affinité du composé « Tortuosinol » est le meilleur par rapport aux autres molécules étudiées, même mieux que le standard Galantamine (2.72 M^{-1}), il présente le meilleur score d'affinité (2.83 M^{-1}). Suivie par un autre composé des coumarines « Tortuosidine » avec un score d'affinité (2.78 M^{-1}). Ces résultats révèlent que les scores d'affinité des quatre molécules étudiées sont en parfait accord avec les résultats expérimentaux des IC_{50} obtenus dans des tests *in vitro*.

Sachant que les résultats expérimentaux des IC_{50} de la butyrylcholinestérase (BChE) obtenus dans d'un test *in vitro* précédemment, montrent que l'extrait dichlorométhanique (EDCM) possède une très forte activité inhibitrice avec une $\text{CI}_{50} = 9,14 \pm 1,74 \text{ } \mu\text{g/mL}$, cette valeur représente une activité presque trois fois supérieure et mieux que le standard Galantamine ($\text{CI}_{50} = 34.75 \pm 1.99 \text{ } \mu\text{g/mL}$). Nous notons que les molécules étudiées : Limonène, α -pinène, Tortuosinol, Tortuosidine qu'ils ont probablement un potentiel inhibiteur très puissant vers butyrylcholinestérase, ont été testés simultanément dans l'extrait dichlorométhanique (EDCM), Cela signifie que l'activité inhibitrice de la butyrylcholinestérase (BChE) obtenue, elle assurée par des molécules de façon simultanée.

Ces résultats s'expriment visuellement par la mise en place de nombreuses interactions de type hydrophobe et hydrogène entre les molécules étudiées et le site actif de la butyrylcholinestérase (BChE) :

Il est utile de rappeler que parmi les quatre molécules analysées, le composé « Tortuosinol » avec le meilleur résultat sur l'affinité d'interaction (2.83 M^{-1}) et sur l' IC_{50} ($12.96 \text{ } \mu\text{g/mL}$), se présente comme l'inhibiteur le plus puissant de la butyrylcholinestérase (BChE), pour cela nous avons choisi ce composé comme modèle afin d'interpréter leurs différentes interactions établies entre l'enzyme et l'inhibiteur.

En fin la molécule « Tortuosinol » est bien positionnée dans le site actif de BChE (Figure 47) où il est stabilisé par de nombreuses interactions hydrophobiques grâce aux acides aminés suivants : TRP82, TRP430, TYR332, HIS488. (Figure 48).

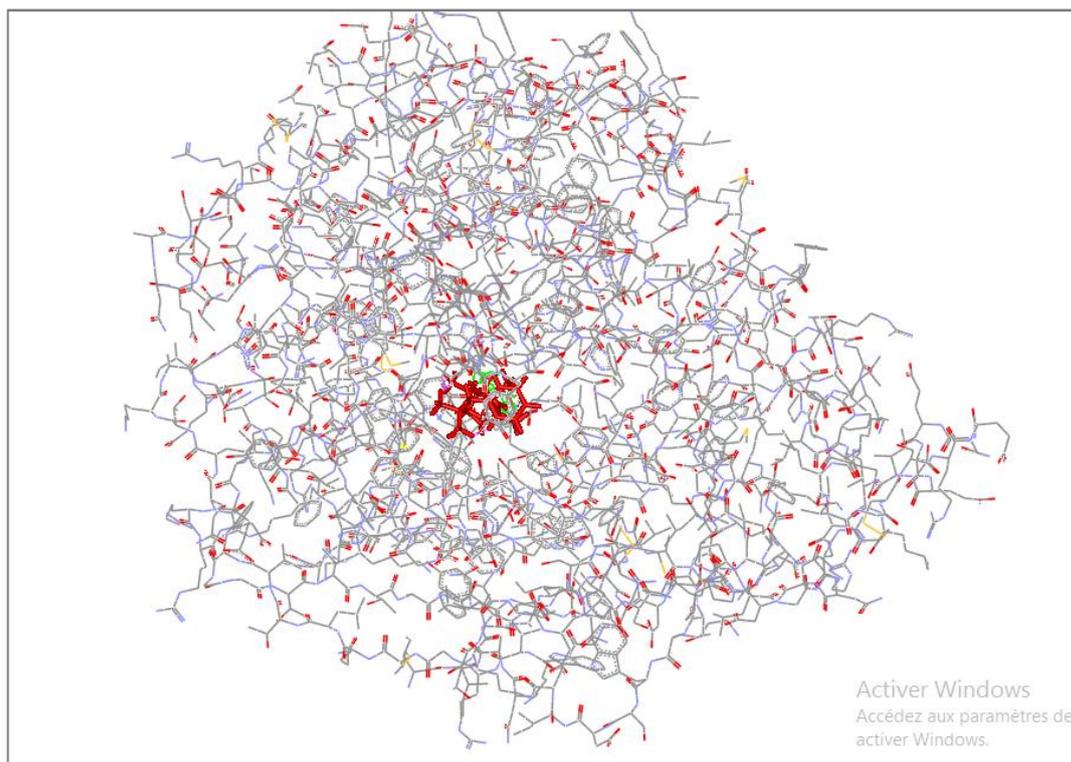


Figure 47. Analyse visuelle réalisée par ViewerLite 4.2 de la position du Tortuosinol dans le site actif de BChE

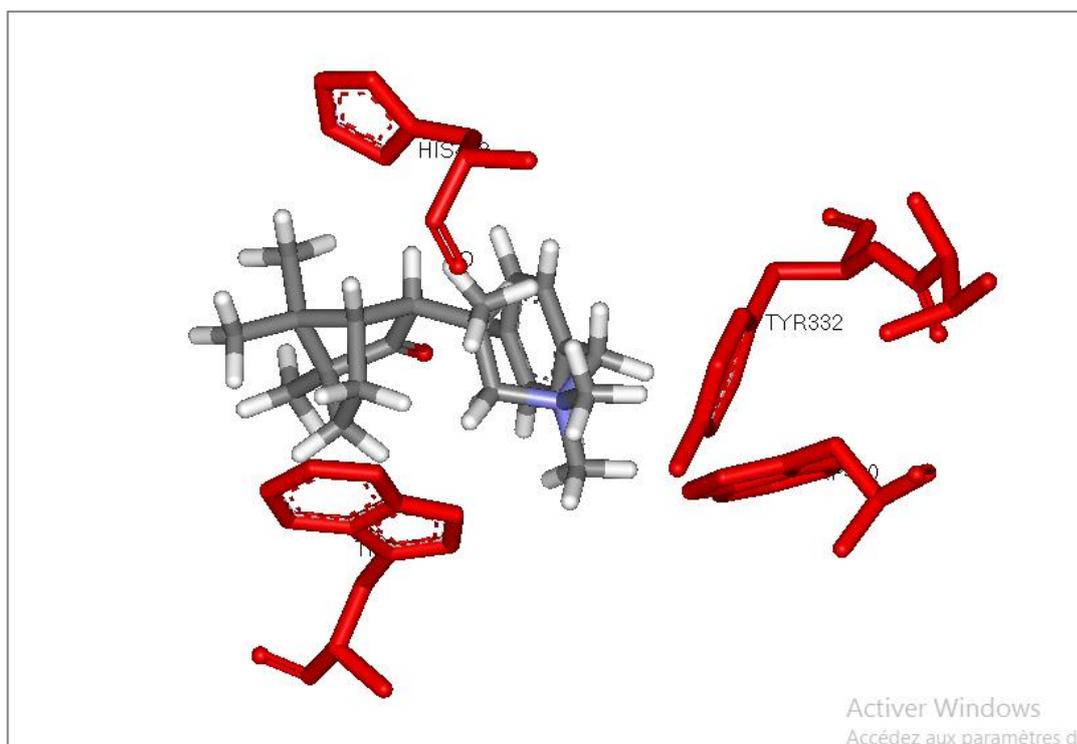


Figure 48. Mode de liaisons hydrophobiques du Tortuosinol avec le site actif de BChE par ViewerLite 4.2

Conclusion

Conclusion générale et perspective

La biodiversité des plantes médicinales, traditionnellement connues dans notre pays, se caractérise par un réservoir assez important de métabolites secondaires avec des caractéristiques thérapeutiques et pharmacologiques particulières qui demandent d'être exploitées par les recherches scientifiques. Dans le cadre de la valorisation des ressources végétales algériennes, la famille des Apiacées est l'une des familles végétales les plus connues pour ses composés biologiques efficaces qui montrent des propriétés phytothérapeutiques significatives.

Ce travail nous a permis en premier lieu de maîtriser des techniques analytiques de base tels que l'analyse qualitative et quantitative des métabolites secondaires issus des extraits d'une plante algérienne du genre *Seseli* qui appartient à la famille des Apiacées, ainsi que, nous avons procédé à l'évaluation de son potentiel antioxydant, et sa efficacité inhibitrice de l'enzyme butyrylcholinestérase.

L'analyse qualitative effectuée par le screening phytochimique et la chromatographie sur couche mince (CCM), nous a permis de révéler la présence de composés phénoliques comme : les coumarines et les composés terpénoïdes dans ces extraits. De plus le criblage chimique par HPLC-UV, nous a permis de confirmer la richesse de l'extrait méthanolique en polyphénols.

Quantitativement, l'évaluation du contenu en polyphénols totaux révèle la présence des quantités importantes en polyphénols dans l'extrait dichlorométhanique. De même nous avons dosé les flavonoïdes et les résultats indiquent que la teneur est faible pour tous les extraits testés (hexanique, dichlorométhanique, méthanolique).

Le potentiel anti-antioxydant des extraits a été déterminé par plusieurs méthodes : les résultats montrent que les deux extraits (dichlorométhanique, méthanolique) possèdent une activité antioxydante très faible par rapport aux standards utilisés (l'acide ascorbique, BHA, BHT et l' α -tocophérol).

L'évaluation de l'efficacité inhibitrice pour l'enzyme butyrylcholinestérase a montré une capacité inhibitrice significative pour l'extrait dichlorométhane par rapport au standard utilisé (galantamine). Pour confirmer ce résultat, nous avons effectué une étude, *in silico*, en utilisant le docking moléculaire. Les résultats montrent que le composé pyranocoumarine « Tortuosinol » possède la

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

meilleure affinité d'interaction (2.83 M^{-1}), de ce fait, on peut le proposer comme un inhibiteur puissant de l'enzyme butyrylcholinestérase (BChE).

L'ensemble de résultats obtenus au cours de notre investigation, constitue une première étape dans la recherche des substances naturelles biologiquement actives. D'après les résultats obtenus, on peut conclure que l'extrait dichlorométhane possède une activité anti-Alzheimer très conséquente.

Comme perspectives on propose les points suivants :

Une étude *in vivo* pour obtenir une vue plus approfondie sur leurs effets biologiques.

Proposition de médicament anti-Alzheimer à base de molécules de cette plante qui possède une activité anti cholinestérase.

Nous envisageons d'utiliser ces résultats comme première étape de la recherche de nouvelles molécules bioactives naturelles pourront répondre aux différents problèmes de la santé et d'être un alternatif des médicaments synthétiques.

*Références
bibliographiques*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- **A. Z. Abyshev et D. Z. Abyshev, nov. 1983**, « The coumarin composition of *Seseli tortuosum* », *Chem. Nat. Compd.*, vol. 19, no 6, p. 668-672, doi: 10.1007/BF00575164.
- **Aazza S., Lyoussi B. and Miguel M. G. (2011)**. Antioxidant and Antiacetylcholinesterase activities of Some Commercial Essential Oils and Their Major Compounds. *Molecules*, 16: 7672-7690.
- **Achat S . (2013)** .Polyphénols de l'alimentation : extraction, pouvoir antioxydant et interactions avec des ions métalliques. Thèse de Doctorat. Université de Béjaia, Université d'Avignon et des pays Vaucluse.
- **Adamczyk B., Kitunen V. and Smolander A. (2013)**. Response of Soil C and transformations to Condensed Tannins and Different Organic N-condensed Tannin Complexes. *Applied Soil Ecology*, 64: 163-170.
- **Aires A., Marques E., Carvalho R., Rosa E. A. S. and Saavedra M. J. (2013)**. Evaluation of Biological Value and Appraisal of Polyphenols and Glucosinolates from Organic Baby leafsalads as Antioxidants and Antimicrobials against important Human Pathogenic Bacteria. *Molecules*, 18: 4651- 4668.
- **Alignan M. (2006)**. Thèse de doctorat, Phoma du tournesol, déterminisme de la tolérance de l'hôte à la maladie, Toulouse.
- **Aliouat, A., Boulkelia, N. (2012)**. Activité antioxydant des extraits des graines de la plante *Nigelle sativa L*, Diplôme de Master en Biochimie Moléculaire et Santé : 26.
- **Arimboor R., Kumar KS. et Arumughan C.(2008)**. Simultaneous estimation of phenolicacids in seabuckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) using RP-HPLC with DAD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47(1), 31-38.

- **Austin PW., Seshadri TR., Sood MS. et VishwaP.(1968).** Components of *Seseli sibiricum*. Constitution and synthesis of sibiricin, a new coumarin. *Tetrahedron* vol. 24; pp. 3247-3253.

B

- **Bach D., Mascré M. et Deysson G. (1979).** Organisation et Classification des Plantes Vasculaires, Cours de Botanique Générale, Quatrième Série. Tome 2, Ed. SEDES, Paris, 540p.
- **Badiaga M. (2011).** Etude Ethnobotanique, Phytochimique et Activités Biologiques de *Nauclea Latifolia* Smith, une Plante Médicinale Africaine Récoltée au Mali. Thèse de Doctorat. Option : Chimie Organique, Université Blaise Pascal – Clermont Ferrand II. 137p.
- **Balasundram N., Sundram K., Samman S. (2006).** Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence and potential uses. *Food chemistry*, 9: 191-203.
- **Barrero A., Mar H. et Arteaga P. (1992).** Sesquiterpenes and phenyl propanoids from *Seseli vaviljanum*. *Phytochemistry*, 31, pp. 203-207.
- **Baytop T. (1994).** Türkçe Bitki Adları Sözlüğü, Atatürk Kültür, Dil ve Tarih Yüksek Kurumu, TDKY 3578, Ankara; TTK Basımevi..
- **Baytop T. (1999).** Türkiye’de Bitkilerle Tedavi. Therapy with Plants in Turkey (Past and Present) (2nd ed). İstanbul; Nobel Medical House.
- **Bensouici C. (2015).** Etude Phytochimique et Evaluation des Activités Biologiques de Deux Plantes du Genre *Sedum* (Crassulaceae). Thèse Doctorat en sciences. Option phytochimie, Université frères Mentouri, Constantine. 221p. with Cu²⁺ ions. *Biochemical Journal*, 330: 1173-1178.

- **Blois M.S., 1958.** Antioxidant determinations by the use of a stable Free Radical. Nature, 4617 (181): 1119-1200.
- **Bonnaillie C., Salacs M., Vassilova E. et Saykova I. (2012).** Etude de l'Extraction de Composés Phénoliques à partir de Pellicules d'Arachide (*Arachis hypogaea* L.). Revue de génie industriel, 7 : 35-45.
- **Botineau M. (2010).** Botanique Systématique et Appliquée des Plantes à Fleurs, Ed. Tec & Doc, Paris, 1335 p.
- **Bouakaz I. (2006).** Etude Phytochimique de la Plante *Genista Microcephala*. Mémoire de Magister. Option : Phytochimie, Université El Hadj Lakhdar, Batna. 124p.
- **Boubekri Ch.(2014).** Etude de l'activité antioxydant des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques. Thèse de Doctorat. Université Mohamed khider de Biskra.
- **Boullard B. (2001).** Plantes Médicinales du Monde, Réalités et Croyances, Ed. ESTEM, Paris, 636p.
- **Bruneton J. (1999).** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales. Tec et Doc, Lavoisier, 3ème édition, Paris, 1120p
- **Bruneton J. (2009).** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales. Tec et Doc, Lavoisier, 4ème édition, Paris. 1292 p.

C

- **Chaturvedi RV. et Tripathi SC .(1989).** Fungotoxic, physicochemical and phytotoxic properties of essential oil of *Seseli indicum* W and A. J Phytopathol.124:316-322.

- **Chun J., Tosun A. et Kim YS.(2016).** Anti-inflammatory effect of corymbo coumarin from *Seseli gummiferum* subsp. *corymbosum* through suppression of NF- κ B signaling pathway and induction of HO-1 expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *Inter Immunopharmacol.*31:207-215.
- **Chung K.T., Wei C.I. and Johnson M.G. (1998).** Are Tannins a Double-Edged sword in Biology and Health. *Trends Food Science. Technology*, 9: 168-175.
- **Chung K-T. and Wei C-I. (2001).** Are tannins a double edged sword in biology and health *Trends in Food Science and Technology*, 9: 168-175.
- **Clardy J. et Walsh C. (2004).** *Nature*, Lesson from natural molecules, 432, 729.
- **Close, G. L., & McArdle, F. (2007).** Antioxidants and free radicals. *Nutrition and Sport*, 153.
- **Colletier J.P. (2006).** Etude des Relations Structure–Dynamique–Fonction au sein de l’Acétylcholinestérase. Thèse Doctorat, Spécialité : Cristallographie et RMN Biologiques, Université Joseph Fourier, Grenoble I. 190p.
- **Collin, F. (2019).** Chemical basis of reactive oxygen species reactivity and involvement in neurodegenerative diseases. *International journal of molecular sciences*, 20(10), 2407.
- **Costa F., Yendo A. C. A., Fleck J. D., Gosmann G. and Fett-Neto A. G. (2013).** Accumulation of a Bioactive Triterpene Saponin Fraction of *Quillaja brasiliensis* leaves is Associated with Abiotic and Biotic Stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 6: 56-62.
- **Cotelle N. (2001).** Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr. Top. Med. Chem.* 1:569-590. (cited in Yakhlaf G, 2009).
- **Crépy MN.(2006).** Dermatoses professionnelles aux végétaux. *Méd Trav.*105:77-90.

- **Cronquist A. (1981)** .An integrated system of classification of flowering plants, Columbia Universitypress, New York.
- **Cuendet. M, (1999)**. Recherche de nouveaux composés capteurs de radicaux libres et antioxydants à partir d'une plante d'Indonésie : « Fagraeablumei» (Loganiaceae) et de trois 90 plantes d'altitude : « Bartsiaalpin» (Scrophulariaceae), « Loiseleuriaprocumbens» (Ericaceae) et Camp, Thèse de doctorat: 24.

D

- **Dangles, O. (2020)**. Le potentiel antioxydant des aliments : mythes et réalités. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 55(4), 176-183.
- **Davis P.H., Mill R.R. et Tan K. (1988)**. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Suppl.1. Edinburgh University Press.
- **De Moffarts, B., Kirschvink, N., Pincemail, J., & Lekeux, P. (2005)**. Impact physiologique et pathologique du stress oxydant chez le cheval. In *Annales de Médecine Vétérinaire*,149(1),1-9 . Annales Medecine Veterinaire.
- **Defraigne, J. O., & Pincemail, J. (2008)**. Stress oxydant et antioxydants: mythes et réalités. *Revue médicale de Liège*, 63, 10-19.
- **Diallo Amadou. (2005)**. Etude de la phytochimie et des activites biologiques de *Syzygium guineense* willd. (myrtaceae). Diplôme d'état pour le grade de docteur en pharmacie. P.16.
- **Dixit V ., Chaturvedi RV.et Tripathi SC. (1992)**. Evaluation of some essential oils against Pulse Bettle (*Callosobruchuschinensis*). *NatlAcadSciLett*. 15:255-257.

- **Djemai Zoughlache. (2008).** Etude de l'activité biologique des extraits du fruit de *Zizyphuslotus* L, mémoire magister, Université -El Hadj Lakhder –Batna.
- **Djeridane A., Yousfi M. and Brunel JM. (2010).** Isolation and Characterization of a NewSteroidDerivative as a PowerfulAntioxidantfrom*Cleome arabica* in Screening the inVitro AntioxidantCapacity of 18 Algerian Medicinal Plants. *Food and ChemicalToxicology*, 48: 2599–60.
- **Dogan H. et Duman NM. (2011).** Pollen morphology of the genus *Seseli* L. (Umbelliferae) in Turkey, *Turk. J. Bot.* 35, 175-182.
- **Doneanu C. et Anitescu G. (1998).** *J. Supercrit. Fluids*, Supercriticalcarbondioxide extraction of *Angelica archangelica* L. root oil, (12), 59-67.

E

- **Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherston, R.M., 1961.** A new and rapidcolorimetricdetermination of acetylcholinesteraseactivity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95.
- **Evans F.J. and Schmidt R.J. (1980).** Plants and Plant Products that Induce Contact Dermatitis. *Plantas medicinales*, (38): 289-316.

F

- **Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M. and AbdellyC. (2008).** Phenolic Composition of *Cynaracardunculus* L. Organs and theirBiologicalActivities. *Comptes Rendus Biologies*, 331: 372-379.
- **Fang F., Li J.M., Pan Q.H. and Huang W.D. (2007).** Determination of Red wine Flavonoids by HPLC and Effect of Aging. *Food Chemistry*, 101: 428- 433.

- **Favier, A. (2003).**Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. Actualité en chimie, pp 108-115.
- **Filliat Paloma. (2012).** Les plantes de la Famille des Apiacées dans les Troubles Digestifs.Thèse de Doctorat. Option: Pharmacie, Université Joseph Fouries, France. 129p.
- **Finaud, J., Lac, G., & Filaire, E. (2006).** Oxidative stress. Sports medicine, 36(4), 327- 358.

G

- **Galati E. M., Monforte M. T., Kirjavainen S., (1994) .**Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid: anti-inflammatory and anal-gesic activity. Farmaco, 40 (11): 709-12.
- **Ganatra, S., &Gurubaxani, S. (2016).** Preliminary Ppytochemical and TLC profiling of Lantana camaraleafextracts. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 8(15), 614-617.
- **Garcia-Jimenez N., Perez-Alonso MJ. et Velasco-Negueruela A. (2000).**Chemical composition of fenneloil, Foeniculumvulgare Miller. from Spain, Journal of Essential OilResearch, 12(2), 159-162.
- **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.
- **Girotti-channu C. (2006).** Etude de la lipolyse et de synthèse des composés du Derme sous l'effet de la Cirsimarine ,Flavone extraite de Microtea Debilis. Thèse de Doctorat .Institut national des sciences appliquées de Lyon.127.

- **Girotti-channu C. (2006).** Etude de la lipolyse et de synthèse des composés du Derme sous l'effet de la Cirsimarine ,Flavone extraite de *Microtea Debilis*. Thèse de Doctorat .Institut national des sciences appliquées de Lyon.127.
- **Gnahoué, G., Béné, K., & Coulibaly, K. (2015).** Etude botanique, screening phytochimique et activité anticandidosique in vitro de *pycnanthusangolensis* (welw.) warb.(myristicaceae). *European Scientific Journal*, 11(36),241-252.
- **Goto, M., Ueda, K., Hashimoto, T., Fujiwara, S., Matsuyama, K., Kometani, T., & Kanazawa, K. (2008).** A formation mechanism for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine mediated by peroxidized 2'-deoxythymidine. *Free Radical Biology and Medicine*, 45(9), 1318-1325.
- **Gravot, A. (2008).** Support de cours sur le métabolisme secondaire (Equipe pédagogique Physiologie Végétale, UMR 118 APBV) Université de Rennes 1 – L2 UE PHR.
- **Grigoraş. C-G, 2012** .Valorisation des fruits et des sous-produits de l'industrie de transformaton des fruits par extraction des composes bioactifs. Thèse doctorat Université Université Vasile Alecsandri de Bacău Disciplines : Chimie. Génie de l'Environnement.
- **Guignard J.L., Cosson L. and Henry M. (1985).** Abrégé de Phytochimie. Ed. Masson Paris, 155-174.
- **Gul, R., Jan, S. U., Faridullah, S., Sherani, S., &Jahan, N. (2017).** Preliminary phytochemical screening, quantitative analysis of alkaloids, and antioxidantactivity of crude plant extractsfromEphedraintermediaindigenous to Balochistan. *The Scientific World Journal*, 2017.
- **Gülçin, I., (2006).** Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology.*, 217,p213.

H

- **Hagerman, A.E., Muller, H. I., Makkar, H.P.S. (2000).** Quantification of tanins in tree foliage. Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture.,Vienna.
- **Halliwell B. (1994).** Free radicals and antioxidants.Nutr.Rev.52:253-265. (cited in Yakhlaf G, 2009).
- **Halmi, S. (2015).** Etude botanique et phytochimique approche biologique et pharmacologique d'opuntia ficus, diplôme de doctorat, biotechnologie végétale. p17,25 .
- **Hara K., Someya T., Sano K., Sagane Y., Watanabe T., Wijesekara R.G.S. (2018).**Antioxidantactivities of traditional plants in Sri Lanka by DPPH free radical-scavengingassay. Data In Brief. 17, 870-875.
- **Harkati B.(2011).** Valorisation et identification structurale des principes actifs de la plante de la famille Asteraceae, Scorzoneraundulata, thèse de doctorat Université Mentouri Constantine.
- **Hartmann T. (2007).** From waste products to Ecochemicals, Fifty Years Research of Plant Secondary Metabolism. Phytochemistry, 68: 2831–2846.
- **Havsteen B. H. (2002).** The Biochemistry and Medical Significance of the Flavonoids. Pharmacology&Therapeutics Journal, 96: 67– 202.
- **Heywood V. H. (1996).** Les Plantes à Fleurs: 306 Familles de la Flore Mondiale, Nathan (Farnand), Paris, 335p.
- **Hopkins.W.G, 2003.** Physiologie végétale. Traduction de la 2e édition, par Serge Rambour Révision scientifique de Charles-Marie Evrard, Américain p 267-283.

- **Howes M.R., Perry N.S.L. and Houghton P.J. (2003).** Plants with Traditional Uses and Activities, Relevant to the Management of Alzheimer's Disease and Other Cognitive Disorders. *Phytotherapy Research*, 17: 1–18.
- **Hu CQ., Chang JJ. et Lee KH. (1990).** Antitumor agents, 115. Seselidiol, a new cytotoxic poly acetylene from *Seseli mairei*. *Journal of Natural Products* vol. 53; pp. 932-935.

I

- **I. E. Orhan et al., août 2021**« Butyrylcholinesterase-inhibiting natural coumarin molecules as potential leads », *Phytochem. Lett.*, vol. 44, p. 48-54, , doi: 10.1016/j.phytol.2021.05.001.
- **Iriti M. (2013).** Plant Neurobiology, a Fascinating Perspective in the Field of Research on Plant Secondary Metabolites. *International Journal Molecules Sciences*, 14(6): 10819-10821.

K

- **K. H. C. Baser, T. Ozek, M. Kurkcuoglu and Z. Aytac (2000).** Essential oil of *Seseli campestre* Besser. *J. Essent. OilRes.* 12, 105-107.
- **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.
- **KanounK., 2010,** Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *MyrtuscommunisL.*(Rayhane) de la région de Tlemcen (Honaine. Université Aboubaker Belkaid, Tlemcen) , p96.
- **Karagözler A., Erdag B., CalmazEmek Y, 2008,** Antioxidantactivity and proline content ofleafextractsfromDorystoechashastate. *Food Chemistry*, 111(2), 400-407p.

- **Kaya, B. Demirci and K. H. C. Baser (2003).** The essential oil of *Seseli tortuosum* L. growing in Turkey, *Flavour Frag. J.* 18, 159-161.
- **Khireddine H.(2014).** Comprimés des poudres de dattes comme support universel des principes actifs de quelques plantes médicinales d'Algérie. Mémoire de magister. Université M'hamed Bougera de Boumerdes.
- **Kim S.W., Kang J. and Park I.K. (2013).** Fumigant toxicity of Apiaceae Essential Oils and their Constituents against *Sitophilus oryzae* and their Acetylcholinesterase Inhibitory Activity. *Journal of Asia Pacific Entomology*, 16: 443–448.
- **Kliebenstein D. J. (2012).** Making New Molecules-Evolution of Structures for Novel Metabolites in Plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 16: 1-6.
- **Koehn FE. et Carter GT. (2005).** *Nature Review Drug Discovery*, The evolving role of natural products in drug discovery, 4,206.
- **Kostova I. (2005).** Synthetic and natural coumarins as cytotoxic agents, *curr. Med. Chem.-Anticancer agents*. 5 : 29-46.
- **Kostova I., Raleva S., Genova P. et Argirova R. (2006).** Structure-Activity relationships of synthetic coumarins as HIV-1 inhibitors. *Bioinorg. Chem. Appl.* 68274 : 1-9.
- **Krief S. (2003).** Métabolites Secondaires des Plantes et Comportement Animal. Thèse. Doctorat, Muséum National d'Histoire Naturelle. 32p.
- **Küpeli E., Tosun A. et Yeşilada E.(2006).** Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Seseli* L. espèce .

L

- **Leverve, X. (2009).** Stress oxydant et antioxydants?. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 44(5), 219-224.
- **Levrault S. (1827).** Dictionnaire des sciences naturels. vol 49, P.46.
- **Lopez S., Bastida J., Viladomat F. and Codina C. (2002).** Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of some *Amaryllidaceae* Alkaloids and Narcissus Extracts. *Life Science*, 71: 2521-2529.
- **Luthria D. L., Mukhopadhyay S. and Krizek D. T. (2006).** Content of Total Phenolics and Phenolic Acids in Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Fruits as Influenced by Cultivar and Solar UV Radiation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 771-777.

M

- **Macheix J J., Fleuriet A. et Jay-Allemand C. (2005).** Les Composés Phénoliques des Végétaux : Un Exemple de Métabolites Secondaires d'Importance Economique. Ed Presses Polytechnologiques et Universitaires Romandes, pp.4-5.
- **Marfak A. (2003).** Radiolyse Gamma des Flavonoïdes. Etude de Leur Réactivité avec Les Radicaux issus des Alcools : Formation de depsides. Thèse de doctorat. Université de LIMOGES. 187 p.
- **Marston A. and Hostettmann K. (2006).** Developments in the Application of Counter-Current Chromatography to Plant Analysis. *Journal of Chromatography A*, 1112(1-2):181-194.
- **Mates, J. M., Perez-Gomez, C., Nunez de Castro I. (1999).** Antioxidant enzymes and human diseases. *ClinBiochem*. 32: 596.

- **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.
- **Medina-Remón A, Barrionuevo-González A, Zamora-Ros R et al (2009).** Rapid Folin–Ciocalteu method using microtiter 96-well plate cartridges for solid phase extraction to assess urinary total phenolic compounds, as a biomarker of total polyphenol intake. *Anal. Chim. Acta* 634, 54–60 .
- **Merghem,R. (2009).** *Éléments de biochimie végétale*. p128, 142.
- **MerghemR.(2009)** *Éléments de biochimie végétale*, Edition bahaeddine.107-133.
- **Milane H. (2004).** La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère peroxydant ou thérapeutiques. Thèse de doctorat. Université Louis Pasteur Strasbourg I.155p.
- **Millogo H., Guisson I. P., Nacoulma O. et Traore A. S. (2005).** Savoir Traditionnel et Médicaments Traditionnels Améliorés. Colloque du 9 décembre. Centre Européen de Santé Humanitaire –Lyon.
- **Miyazawa M. and Yamafuji C. (2005).** Inhibition of Acetylcholinesterase Activity by Tea Tree Oil and Constituent Terpenoids. *Flavour and Fragrance Chemistry*, 20: 617-620.
- **Mme. Lalout Wassila née soufi , (2016)** contribution à la modélisation des interactions dans les biomolécules : cas de la maladie de Parkinson , *Chimie Théorique et Modélisation Moléculaire*, université Aboubekr Belkaid de Tlemcen, , 129 p.
- **Muanda F., 2010.** Identification de polyphénols ,évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. Thèse de doctorat en chimie organique .Université Paul Verlaine-Metz : 55p.
- **Muffler.K; Leipold.D; Scheller.M-C; Haas.C; Steingroewer.J; Bley.T; Neuhaus.H-E; Mirata.M-A; Schrade.J et Ulber.R, 2011 .**Biotransformation of triterpenes. *Process Biochemistry* (Amsterdam, Netherlands), 46, (1), 1-15.

- **Mustafa Özyürek, NilayGüngör , Sefa Baki , KubilayGüçlü, and ReşatApak, 2012** Development of a Silver Nanoparticle-Based Method for the AntioxidantCapacityMeasurement of Polyphenols, Analytical Chemistry.

N

- **Nasri, I., Hadje Brahim, M. (2014).** Apport des thérapeutiques antioxydantes dans le traitement du daibete, diplôme de master en biologie animal. p 22, 25.
- **Navarro-Yepes, J., Zavala-Flores, L., Anandhan, A., Wang, F., Skotak, M., Chandra, N. & Franco, R. (2014).** Antioxidant gene therapy against neuronal cell death. *Pharmacology & Therapeutics*, 142(2), 206-230.
- **Nemeth E. (2006).** Caraway: the Genus Carum. Ed. University of Horticulture and Food IndustrySwitzerland, 1-13.
- **Newman DJ. et Cragg GM. (2012).** Journal of Natural Products, Natural products as sources of new drugs over the period 1981 to 2010, 75, 311.es (Umbelliferae) growing in Turkey.J Ethnopharmacol. 104:310-314.
- **Nijveldt R. J., Van Nood E., Van Hoorn D. E. C., Boelens P. G., Van Norren K. and Van Leeuwen P. A. M. (2001).** Flavonoids: A Review of Probable Mechanisms of Action and Potential Applications. *American Journal of Clinical Nutrition*, 74: 418-425.
- **NikoliéV.(1975).** Seseli L. In: The Flora of FR Serbia, ed. M. Josifović, SANU (Belgrade), pp. 241-249.

O

- **Okuda T. and Ito H. (2011).** Tannins of Constant Structure in Medicinal and Food Plants Hydrolyzable Tannins and Polyphenols Related to Tannins. *Molecules*, 16: 2191-2217.

- **Olle M. et Bender I.(2010).** Agron. Res., The content of oils in umbelliferous crops and its formation, (8), (Special Issue III), 687–696.
- **Oroojalian F., Kasra-Kermanshahi R., Azizi M. and Bassami M.R. (2010).** Phytochemical Composition of the Essential Oils from Three Apiaceae Species and Their Antibacterial Effects on Food-Borne Pathogens. Food Chemistry, 120: 765-770.
- **Oyaizu, M. (1986).** Studies on products of browning reactions:antioxidativeactivities of browning reactionpreparedfrom glucosamine. Japanese Journal of Nutrition, 44, 307–315.

P

- **Pepin J.L. and Delwaide P. (1999).** Actualités Thérapeutiques dans la Maladie d'Alzheimer. Médecine et Hygiène, 57:1546-1550.
- **Pereira R. C., P. Da Gama B. A., Teixeira V. L., Yoneshigue-valentin Y. Y. and Braz. (2003).** Ecological Roles of Natural Products of the Brazilian red seaweed Laurencia Obtuse, Braz. Journal of Biology, 63 (4): 667-672.
- **Pérez-Pérez E., Vit P. and Huq F. (2013).** Flavonoids and Polyphenols in Studies of Honey Antioxidant Activity .International Journal of Medicinal Plant and Alternative Medicine, 1(4): 63-72.
- **Peronny S. (2005).** La perception gustative et la consommation des tannins chez le MAKI (Lemur Catta). These de Doctorat du Museum national d'histoire naturelle. Discipline EcoEthologie. 151p.
- **Perret C. (2001).** Analyses de tannins inhibiteurs de stilbène oxydase produite par Btrytis cinerea Pers.:FR. Thèse de Doctorat. Université de Neuchâtel. 173p.
- **Pierre A. et Joseph D.(1844).** Dictionnaire classique des sciences naturelles, 9vol, Pp.655.

- **Pimenov M. G. and Leonov M. V. (1993).** The Genera of the Umbelliferae: a Nomenclator. Royal Botanic Gardens, Kew, United Kingdom, 156 p.
- **Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., & Defraigne, J. O. (2002).** Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16(4), 233-239.
- **Prakash, V., Saxena, S., Gupta, S., Saxena, A. K., Yadav, R., & Singh, S. K. (2015).** Preliminary phytochemical screening and biological activities of *Adinocardifolia*. *J MicrobBiochemTechnol*, 7, 33-38.
- **Psotova J., Lasovsky J. And Vičara J. (2003).** Metal Chelating properties, Electrochemical Behavior, Scavenging and Cytoprotectives of Six Natural Phenolic. *Biomedical Papers*, 147 (2): 147-153.

Q

- **Quézel P. et Santa S. (1963).** Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques et Méridionales. Tome 2, Ed. Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, 603p.

R

- **R. Wang, Y. Lu, X. Fang, S. Wang, 2004** « An Extensive Test of 14 Scoring Functions Using the PDB bind Refined Set of 800 Protein-ligand Complexes », *J. Chem. Inf. Comp. Sci.*, 44, 2114-2125.
- **Rakotonanahary M. (2012).** *Peumusboldus M. : De la Botanique à la Thérapeutique : Etat des Connaissances en 2012.* Thèse de Doctorat. Option : Pharmacie, Université Joseph Fourier, 96p.

- **Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999.**Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.* 26, 1231–1237.
- **Richelle M, Tavazzi I, and Offord E. (2001).** Comparison of the Antioxidant Activity of Commonly Beverages (Coffee, Cacao, and Tea) Prepared Per Cup Serving. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 3438-3442.
- **Rodriguez E., Towers G.H.N. and Mitchell J.C. (1976).** Biological Activities of Sesquiterpene Lactones. *Phytochemistry*, (15): 1573-1580.
- **Rouxel T.(1989).** Les phytoalexines et leur intervention dans la résistance hypersensible aux champignons phytopathogènes. *Agronomie*. 9 : 529-545.
- **Saglam A, Kadioglu A, Terzi R, Saruhan N. 2008.** Physiological changes in them in post stress emerging Ctenan thesetosa plants under drought conditions. *Russ J Plant Physiol.* 55, 48–53.

S

- **Sato, H., Shibata, M., Shimizu, T., Shibata, S., Toriumi, H., Ebine, T., & Suzuki, N. (2013).** Differential cellular localization of antioxidant enzymes in the trigeminal ganglion. *Neuroscience*, 248, 345-358.
- **Sayre, L. M., Perry, G., & Smith, M. A. (2008).** Oxidative stress and neurotoxicity. *Chemical research in toxicology*, 21(1), 172-188.
- **Scalbert A. (1991).** Antimicrobial Properties of Tannins. *Phytochemistry*, 30: 3875 3883.
- **Scoules M. (2006).** Partitioning and Distribution of Dissolved Copper, Cadmium and Organic Matter in Mediterranean Marine Coastal areas: The Case of a Mucilage Event. *Estuarine coastal and Shelf Sciences*, 67:484-490.

- **Seidler-Lozykowska K., Kedzia B., Karpinska E. and Bocianowski J. (2013).** Microbiological Activity of Caraway (*Carum carvi* L.) Essential Oil Obtained from Different Origin. *Acta Scientiarum Agronomy*, 35(4): 495-500.
- **Sereme A., Millogo-Rasolodimby J., Guinko S. et Nacro M. (2010).** Anatomie et Concentration des Tanins des Plantes Tannifères du Burkina Faso. *Journal des Sciences*, 10 (2): 24-32.
- **Shalaby, E., & Catala, A. (2019).** Antioxidants. BoD—Books on Demand.
- **Siddhuraju P. and Becker K. (2007).** The Antioxidant and Free Radical Scavenging Activities of Processed Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) Seed Extracts. *Food Chemistry*, 101(1): 10-19.
- **Singh IP., Bharate BS., Bhutani KK. (2005).** Anti-HIV natural products. *Curr. sci.* 89 : 269-290.
- **Sofowara A. (2010).** *Plantes Médicinales et Médecine Traditionnelle d’Afrique*, Ed Karthala, Paris, France. 384p.
- **Song JH, Kim SK, Chang KW, Han SK, Yi HK and Jeon JG. (2006).** In vitro Inhibitory Effects of *Polygonum cuspidatum* on Bacterial Viability and Virulence Factors of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Archives Oral Biology*. 51 (12): 1131-1140.
- **Spichiger RE.; Savolainen VV.; Figeat M.; Jeanmonod D. (2004).** *Botanique systématique des plantes à fleurs*, 3^{ème} éd., Presses polytechnique et universitaires romandes, Lausanne.
- **Spino C., Dodier M. et Sotheeswara S. (1998).** Anti-HIV coumarins from *Calophyllum* seed oil. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8 : 3474-3478.
- **Stanković M. S. (2011).** Total Phenolic Content, Flavonoid Concentration and Antioxidant Activity of *Marrubium peregrinum* L. Extracts. *Kragujevac Journal Science*, 33: 63-72.

- **Sushama Raj R.V. (2017).** Preliminary phytochemical screening of *Lantana camara*, L., a major invasive species of Kerala, using different solvents, *Annals of Plant Sciences*, 6(11), 1794-1798.
- **Syed M., Chaudhary FM. et Bhatti MK. (1989).** Antimicrobial activity of the essential oils of the Umbelliferae family. Part VIII. *Seseli libanotis*, *Ligusticum tewartii*, and *Pycnocycla aucheriana* oils. *Pak J Sci Ind Res.* 32:316-319.
- **Szydłowska-Czerwińska A, Dianoczki C, Recseg K, Karlovits G, Szlyk E. 2008** Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta* 2008;76:899-905.

T

- **T. Schulz-Gasch, M. Stahl, 2004** « Scoring Functions for Protein-ligand Interactions: A Critical Perspective », *Drug Discovery Today: Technologies*, 1, 231-239.
- **Tabanca N., Demirci B., Ozek T., Kirimer N., Baser K.H.C., Bedir E., Khan I.A. and Wedge D.E. (2006).** Gas Chromatographic–Mass Spectrometric Analysis of Essential Oils from *Pimpinella* Species Gathered from Central and Northern Turkey. *Journal of Chromatography. A*, 1117: 194–205.
- **Tandan SK., Chandra S., Tripathi HC. et Lal J. (1990).** Pharmacological actions of seselin, a coumarin from *Seseli indicum* seeds. *Fitoterapia*. 61:360-363.
- **Tawaha K., Alali F. Q., Gharaibeh M., Mohammad M. and El-Elimat T. (2007).** Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Selected Jordanian Plant Species. *Food Chemistry*, 104: 1372-1378.
- **Thomas D. (2016).** Les antioxydants de nos jours : définition et applications. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie, Université de Limoges, p29-174.

- **Thomas. M. (2011).** Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification: Application aux molécules bioactives de l'argousier (Hippophaë ramiflora) thèse de doctorat. Université Toulouse.
- **Tosun A. (2006).** Occurrence of coumarins in *Seseli hartvigii* growing in Turkey. Chem Nat Compd.42:608-609.
- **Tosun A. et Özkal N. (2003).** Ankara Ecz. Fack. Derg.vol.32 No.4; pp. 269-284.
- **Tosun A. Özkal N., Baba M. et Okuyama T. (2005).** Pyranocoumarins from *Seseli gummiferum* subsp. *corymbosum* growing in Turkey. Turk J Chem.29:327-334.
- **Tosun A., Akkol EK. et Yeşilada E.(2009).** Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Seseli L.* species (Apiaceae) growing in Turkey. Z Naturforsch C. 64:56-62.
- **Tosun A., Baba M., Kodama T., Nakanishi H. et Okuyama T.(2005).** The composition of essential oils of *Seseli* species growing in Turkey. Nat Med 59:85-90.
- **Tosun A., Doğan E., Duman H., Kürkçüoğlu M. et Başer KHC.(2006).** Essential oil composition of the fruits of *Seseli resinosum* Freyn et Sint. and *Seseli tortuosum L.* growing in Turkey. J EssentOil Res.18:57-59.
- **Tosun A., Kürkçüoğlu M., Doğan E., Duman H. et Başer KHC. (2006).** Essential oil composition of *Seseli petraeum M. Bieb.* and *Seseli andronakii Woron.* growing in Turkey. Flavour Fragrance J. 21:257-259.
- **Tosun A. , Baba M. , Bahadır Ö. et Okuyama T.(2006).** Coumarins isolated from the roots of *Seseli resinosum* in Turkey. Pharm Biol.44:528-533.
- **Tsao R.(2010).** Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. Nutrients. 2:1231-1246.

V

- **Valente J., Zuzarte M., Resende R., Goncalves M.J., Cavaleiro C., Pereira C.F., Cruz M.T.andSalgueiro L. (2015).** Daucus carotasubsp. gummifer Essential Oil as a Natural Source of Antifungal and Anti-inflammatory Drugs. *Industrial Crops and Products*, 65: 361-366.
- **Villar A., Gasco M. A., Alcaraz M. J., (1987).**Some aspects of the inhibitory activity of hypolaetin-8-glucoside in acute inflammation. *J PharmPharmacol*, 39 (7): 502-7.

W

- **W. Chaiyana and S. Okonogi, 2002** “Inhibition of cholinesterase by essential oil from food plant,” *Phytomedicine*, vol. 19, pp. 836–839.
- **Wang H., Zhou G., Gao X., Wang Y. and Yao W. (2007).** Acetylcholinesterase Inhibitory Active Components of *Rhodiola rosea* L. *Food Chemistry*, 105: 24-27.
- **Wicht I M. et Anton R. (1999).** *Plantes Thérapeutiques, Tradition, Pratique Officinale, Sciences et Thérapeutique*, Tec et Doc. Ed. Lavoisier. 692p.

Y

- **Yost, R.W., Ettre, L.S., Conlon, R.D. 1980.** *Practical liquid chromatography. An introduction.* Perkin-Elmer, U.S.A. 255 p.

Anonymes

- **Anonyme 01 :** www.mobot.org/MOBOT/Research/APweb/welcome.html .
- **Anonyme 02 :** www.sardegnaambiente.it.
- **Anonyme 03 :** <http://www.revue-genie-industriel.info>.

Annexes

Annexe I : Matériels et instruments utilisés

I. Matériel utilisé

I.1. Liste d'appareils utilisés



HPLC



Spectrophotométrie
des cuvettes



Lampe UV



Cuve de CCM



Lecteur de
microplaque



Balance électrique



Bac à ultrason



Agitateur vortex



Agitateur magnétique



Ph-mètre



Etuve



Rota-vapeur

I.2. Matériel du laboratoire

Tableau 20: Différentes Verreries utilisées et autres

Béchers	Entonnoirs	Tubes eppendorf	Micropipettes de volumes différents
Ballons	Spatules	Verres de montre	Ampoule à décanté
Flacons	Microplaques	Flacons	Eprouvettes graduées
Micropipettes	Pissettes	Eprouvettes	
Erlenmeyers	Cotton stérile	Verres de montre	
Papier aluminium	Para- film	Portoirs	

I.3. Réactifs chimiques et solvants

I.3.1. Réactifs

Tableau 21: Réactifs utilisés

DPPH	Trichlorure d'aluminium (AlCl ₃)
α -tocophérol	Acide ascorbique
BHT	Galantamine
BHA	H ₂ O
ABTS	CHCl ₃
Persulfate de potassium K ₂ S ₂ O ₈	Nitrate d'aluminium (Al(NO ₃) ₃)
Phosphate buffer	Quercétine
Potassium ferricyanide K ₃ Fe(CN) ₆	Folin-Ciocalteu
Acide trichloracétique (TCA)	Acide phosphotungstique (H ₃ PW ₁₂ O ₄₀)
Chlorure de fer FeCl ₃	Acide phosphomolybdique (H ₃ PMO ₁₂ O ₄₀)
Phénanthroline	Carbonate de sodium (Na ₂ CO ₃)
Acide sulfurique	L'ammoniac
Phénanthroline	l'acide vanillique
Trisodium citrate (1%)	Silver nitrate AgNO ₃
DTNB (5,5,-Dithiobis (2-nitro-benzoic acid))	Trolox
Le substrat butyrylthiocholine iodide (BuCI)	Solution de Dragendorff
L'enzyme butyrylcholinestérase (bche)	L'acide gallique
Copeaux de magnésium	Révéléateur vanillique

I.3.2. Les solvants

Tableau 22 : Solvants utilisés et leurs formules

Solvant	Formule
Hexane	C ₆ H ₁₄
Dichlorométhane	CH ₂ Cl ₂
Méthanol	CH ₃ OH
Acétate d'éthyle	C ₄ H ₈ O ₂
Éther de pétrole	C ₆ H ₁₄
Le chloroforme ou trichlorométhane	CHCl ₃

Annexe II: Préparation des solutions

II . Détermination du total en polyphénols et flavonoïdes

II .1. Total phénolique

- **Préparation de la solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 7,5%**

Cette solution est préparée en dissolvant 7,5 g de Na_2CO_3 dans 100 mL d'eau distillée.

- **Préparation de l'extrait de plante**

Une masse de 30 mg d'extrait est dissoute dans un volume de 30 mL de méthanol.

- **Préparation de Folin Ciocalteu (FCR)**

Dans une fiole jaugée de 10 mL on place 1mL de la solution FCR concentré (2M) et on complète le volume avec de l'eau distillée. Et nous obtenons une solution de FCR dilué (1 mL de solution FCR concentré est diluée dans 9 mL d'eau distillée).

- **Préparation de la gamme d'étalon de l'acide gallique :**

Tableau 23 : Absorbance de l'acide gallique à 765 nm

Concentration $\mu\text{g/mL}$	L'absorbance à 765 nm
6.25	0.293
12.5	0.48
25	0.68
50	1.02
100	1.53
200	3.186

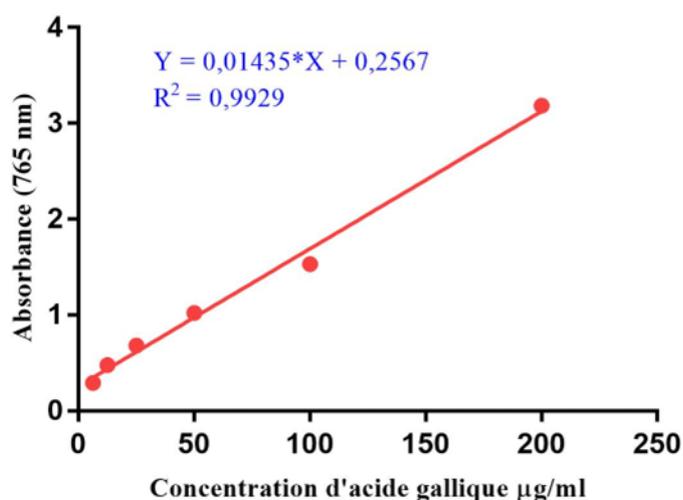


Figure 49. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

II.2. Total flavonoïdes

- **Préparation de la solution Le chlorure d'aluminium (AlCl₃) 2%**

Cette solution est préparée en dissolvant 2 g de (AlCl₃) 2% dans 100 mL de méthanol..

- **Préparation de l'extrait de plante**

Une masse de 30 mg d'extrait est dissoute dans un volume de 30 mL de méthanol.

- **Préparation de la gamme d'étalon de la Quercétine :**

Tableau 24 : Absorbance de la Quercétine à 430 nm

Concentration µg/mL	L'absorbance à 430 nm
1.5	0.007
2.5	0.066
5	0.146
10	0.284
20	0.543
40	1.012

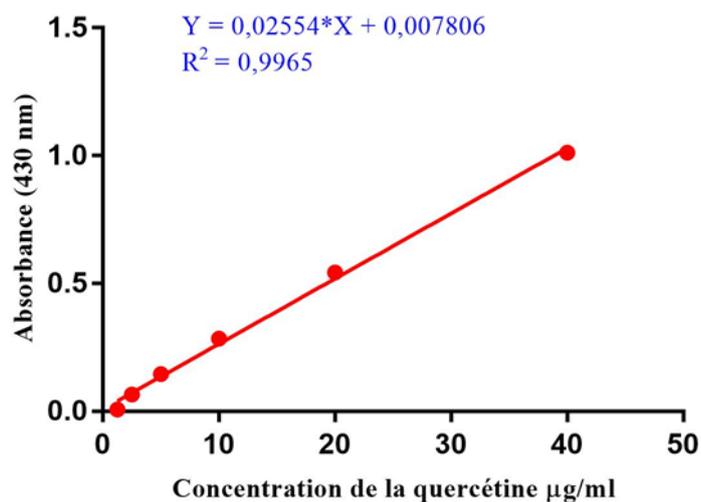


Figure 50. Courbe d'étalonnage de la Quercétine

III. Evaluation des activités biologiques

III.1. Préparation des échantillons

Les concentrations préparées sont utilisées pour toutes les méthodes La concentration des solutions mères de chaque échantillon est exprimée en ppm.

La partie par million (le ppm) est la fraction valant 10^{-6} , c'est-à-dire un millionième

Une quantité de 4 milligrammes de l'extrait méthanolique Ainsi est que l'extrait dichlorométhane ont été dissoutes dans 1 mL du méthanol (Solution mère de 4000 ppm, ou 1000 ppm) respectivement avec

ANNEXES

7 concentrations différentes (une série de dilution de $\frac{1}{2}$) de l'échantillon en ordre décroissant comme suit : (1/1 ,1/2 , 1/4 ,1/8 ,1/16 ,1/32 ,1/64).

Tableau 25 : Concentrations de l'échantillon

	SM 4000 ppm = 4 mg/mL	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
Concentration $\mu\text{g/mL}$	800	400	200	100	50	25	12.5

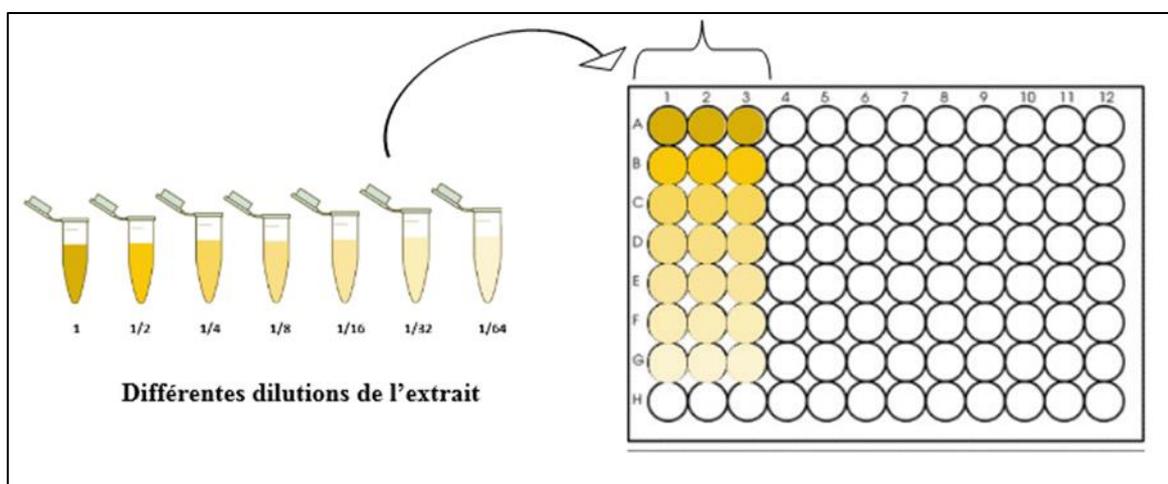


Figure 51 : Représentation schématique de la dilution en série

III.2. Préparation des solutions pour le teste DPPH

Préparation de la DPPH :

On dissout 4 mg de DPPH dans 100 mL de méthanol et on garde le mélange à l'abri de la lumière à 4 °C. L'absorbance enregistrée avec le spectrophotomètre à une longueur d'onde de 517 nm est de 0.5

III.3. Préparation des solutions pour le teste ABTS

Préparation de l'ABTS⁺ :

La solution à 7 mM de l'ABTS préparée en dissolvant 19,2 mg d'ABTS dans 5 mL d'H₂O et la solution à 2.45 mM de persulfate de potassium K₂S₂O₈ préparée en dissolvant 3,3 mg de K₂S₂O₈ dans 5 mL H₂O ,sont mélangés et mis à l'abri de la lumière pendant 16 h.

III.4 .Préparation des solutions pour le teste FRAP

Préparation d'une solution de potassium ferricyanide (1%)

1 g de $K_3Fe(CN)_6$ sont dissous dans dans 100 mL H_2O

Préparation d'une solution de tri-chloro acetic acid (TCA) (10%)

1 g de TCA dans sont dissous dans 10 mL H_2O

Préparation d'une solution de ferric chloride $FeCl_3$ (0.1%)

0,1 g de $FeCl_3$ sont dissous dans dans 100 mL H_2O

III.5. Préparation des solutions de phénantroline et le ferric chloride

- **Préparation d'une solution de phénanthroline à 0.5%**

0.05 g de 1,10-Phénanthroline sont dissous dans 10 mL de méthanol.

- **Préparation d'une solution de chlorure de fer ($FeCl_3$) à 0.2%**

0.02 g de $FeCl_3$ sont dissous dans 10 mL d' H_2O

III.6. Préparation des solutions pour le teste SNP

- **Préparation d'une solution de Silver nitrate**

0.170 g de Silver nitrate sont dissous dans 100 mL de H_2O .

- **Préparation d'une solution de Trisodium citrate (1%)**

1 g de Trisodium citrate (1%) sont dissous dans 100 mL de H_2O .

- **Préparation de la solution SNP :**

50 mL of ($AgNO_3$ (1.0 mM)) est chauffé pendant 10 min puis 5 mL de Trisodium citrate (1%) est ajouté goutte à goutte jusqu'à le changement de la couleur vers le jaune pâle, après la solution est laisser à température ambiante pour refroidissement.

III.7. Procédure pour la préparation des solutions tampon

Solution tampon:

1- 8,890 g de ($Na_2HPO_4, 2H_2O$) + 500 mL de H_2O → V_1

2- 1,56 g de ($NaH_2PO_4, 2H_2O$) + 100 mL de H_2O → V_2

ANNEXES

V1 +V2 → Solution Tampon comme le montre le tableau .On ajoute du NaOH pour augmenter la valeur du PH

Tableau 26. Différent volume utilisé pour chaque degré de pH.

pH	5,8	6,2	6,4	6,6	6,8	7	7,2	7,4	7,6	7,8	8
NaH ₂ PO ₄ (mL)	92	81,5	73,5	62,5	51	39	28	19	13	8,5	5,3
Na ₂ HPO ₄ (mL)	8	18,5	26,5	37,5	49	61	72	81	87	91,5	94,5

III.8 Préparation des solutions pour le teste anti-cholinestérase

- **Préparation de la solution tampon :**

On mélange un volume V1 de (Na₂HPO₄, 2H₂O) (8,890 g dans 500 mL de H₂O) avec un volume V2 de (NaH₂PO₄, 2H₂O) (1,56 g dans 100 mL H₂O) et on ajoute le NaOH pour augmenter la valeur de PH (PH= 5.8 à 8).

- **Préparation de la solution DTNB (5,5,-Dithiobis (2-nitro-benzoic acid)):**

16 mg DTNB + 1 mL (PH=7) + 7,5 mg NaHCO₃ + 1 mL (PH=7) + 2 mL (PH=7) + 4 mL (PH=8)
→ volume total 8 mL

- **Préparation des solutions de substrats:**

la dissolution de 4 mg de butyrylthiocholine iodide (BuCI) dans 4 mL d'eau distillée puis on ajoute 4 mL de solution tampon (PH =8).

- **Préparation des solutions d'enzymes :**

une masse de 0,2 mg BChE est dissolvée dans 1 mL de solution tampon (PH=8) pour donner la solution A, puis on prend 20 µL de cette solution et on ajoute 2 mL de tampon (PH = 8) .

- **Préparation les extraits pour évaluer l'activité anticholinestérase :**

Une quantité de 4 milligrammes de l'extrait méthanolique Ainsi est que l'extrait dichloromethane ont été dissoutes dans 1 mL du méthanol (Solution mère de 4000 ppm, ou 1000 ppm) respectivement avec 7 concentrations différentes (une série de dilution de ½) de l'échantillon en ordre décroissant comme suit : (1/1 ,1/2 , 1/4 ,1/8 ,1/16 ,1/32 ,1/64).

ANNEXES

Annexe III : Pourcentage d'inhibition et absorbance

NA: pas d'absorbance.

Les valeurs exprimées sont des moyennes \pm S.D. de trois mesures parallèles.

Tableau 27. Pourcentage d'inhibition et la CI_{50} pour le test du radical DPPH

Extraits et standards	Test DPPH							
	12.5 μ g	25 μ g	50 μ g	100 μ g	200 μ g	400 μ g	800 μ g	IC_{50} μ g/mL
EDCM	3,04 \pm 3,66	5,13 \pm 0,10	8,31 \pm 2,46	11,89 \pm 0,87	16,94 \pm 2,06	29,48 \pm 1,08	40,77 \pm 4,13	>200
EMeOH	4,51 \pm 1,38	4,91 \pm 1,38	8,54 \pm 1,84	13,36 \pm 2,01	24,82 \pm 2,61	50,75 \pm 4,52	77,99 \pm 3,24	381,32 \pm 0,25
BHA	76,55 \pm 0,48	79,89 \pm 0,26	81,73 \pm 0,10	84,18 \pm 0,10	87,13 \pm 0,17	89,36 \pm 0,19	90,14 \pm 0,00	6.14 \pm 0.41
BHT	49,09 \pm 0,76	72,63 \pm 2,06	88,73 \pm 0,89	94,00 \pm 0,31	94,97 \pm 0,08	95,38 \pm 0,41	95,02 \pm 0,23	12,99 \pm 0,41
α-Tocopherol	37,21 \pm 1,82	81,53 \pm 1,51	89,23 \pm 0,12	89,38 \pm 0,19	89,45 \pm 0,22	89,99 \pm 0,23	89,52 \pm 0,33	13,02 \pm 5,17

Tableau 28. Pourcentage d'inhibition et la CI_{50} pour le test du cation radical ABTS.

Extraits et standards	Test ABTS							
	12.5 μ g	25 μ g	50 μ g	100 μ g	200 μ g	400 μ g	800 μ g	IC_{50} μ g/mL
EDCM	13,77 \pm 2,33	18,30 \pm 1,05	22,78 \pm 0,30	33,23 \pm 2,69	43,29 \pm 0,09	57,83 \pm 1,90	65,80 \pm 2,33	291,07 \pm 6,02
EMeOH	6,00 \pm 2,92	10,33 \pm 2,76	19,44 \pm 2,97	29,40 \pm 4,07	48,57 \pm 2,99	71,72 \pm 1,6	89,84 \pm 0,83	242,02 \pm 0,65
BHT	69,21 \pm 0,40	78,23 \pm 1,34	88,12 \pm 1,28	88,76 \pm 3,07	90,85 \pm 1,74	90,95 \pm 0,51	96,68 \pm 0,39	1,29 \pm 0,30
BHA	92,83 \pm 1,42	94,68 \pm 0,42	94,95 \pm 0,90	95,32 \pm 0,25	95,59 \pm 0,47	95,83 \pm 0,15	95,86 \pm 0,10	1,81 \pm 0,10

Tableau 29. Pourcentage d'inhibition et l' $A_{0.5}$ pour le test pouvoir réducteur FRAP.

Extraits et standards	Test FRAP							
	3.125 μ g	6.25 μ g	12.5 μ g	25 μ g	50 μ g	100 μ g	200 μ g	$A_{0.5}$ μ g/mL
EDCM	0,05 \pm 0,00	0,05 \pm 0,00	0,06 \pm 0,01	0,07 \pm 0,00	0,07 \pm 0,00	0,09 \pm 0,02	0,10 \pm 0,04	>200
EMeOH	0,05 \pm 0,00	0,06 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01	0,09 \pm 0,02	0,11 \pm 0,01	0,18 \pm 0,02	0,33 \pm 0,05	>200
Acide ascorbique	0,35 \pm 0,05	0,46 \pm 0,03	0,84 \pm 0,12	0,93 \pm 0,30	1,18 \pm 0,34	1,37 \pm 0,20	1,44 \pm 0,21	6,77 \pm 1,15
α-Tocopherol	0,11 \pm 0,00	0,16 \pm 0,00	0,21 \pm 0,03	0,35 \pm 0,03	0,73 \pm 0,03	1,37 \pm 0,08	1,81 \pm 0,09	34,93 \pm 2,38

ANNEXES

Tableau 30. Pourcentage d'inhibition et l' $A_{0.5}$ pour le test phénanthroline.

Extraits et standards	Test phénanthroline							
	0.78125	1.5625	3.125 μg	6.25 μg	12.5 μg	25 μg	50 μg	$A_{0.5}$ $\mu\text{g/mL}$
EDCM	0,30±0,01	0,31±0,01	0,34±0,00	0,35±0,00	0,38±0,01	0,41±0,01	0,43±0,02	>200
EMeOH	0,32±0,01	0,34±0,00	0,35±0,02	0,39±0,00	0,40±0,01	0,48±0,01	0,69±0,16	123,92±0.60
BHA	0,49±0,01	0,59±0,01	0,73±0,02	0,93±0,01	1,25±0,04	2,10±0,05	4,89±0,06	0,93±0,07
BHT	0,47±0,01	0,47±0,01	0,53±0,03	1,23±0,02	1,84±0,01	3,48±0,03	4,84±0,01	2,24±0,17

Tableau 31. Pourcentage d'inhibition et l' $A_{0.5}$ pour le test nanoparticule d'argent

Extraits et standards	Test Silver nanoparticules SNP							
	1.5625 μg	3.125 μg	6.25 μg	12.5 μg	25 μg	50 μg	100 μg	$A_{0.5}$ $\mu\text{g/mL}$
EDCM	0,12±0,00	0,13±0,01	0,21±0,06	0,24±0,04	0,42±0,06	0,52±0,01	0,89±0,06	173,69±2,92
EMeOH	0,11±0,00	0,13±0,01	0,14±0,01	0,15±0,01	0,21±0,02	0,19±0,01	0,34±0,02	>200
l'acide ascorbique	0,24±0,00	0,32±0,01	0,45±0,01	0,75±0,01	1,22±0,02	1,90±0,03	2,35±0,01	7,14±0,05
trolox	0,17±0,00	0,20±0,01	0,23±0,00	0,30±0,01	0,43±0,01	0,64±0,03	1,04±0,01	34,17±1,23

Tableau 32 : Pourcentage d'inhibition et la CI_{50} pour le test de butyrylcholinestérase (BChE).

Extraits et standards	Test Butyrylcholinestérase							
	3.125 μg	6.25 μg	12.5 μg	25 μg	50 μg	100 μg	200 μg	IC_{50} $\mu\text{g/mL}$
EDCM	28,53±2,43	44,26±1,48	57,18±3,40	68,78±1,75	77,03±2,94	85,36±3,27	89,96±3,67	9,14±1,74
EMeOH	NA	NA	NA	NA	13,74±0,67	28,61±1,48	59,91±1,35	169,76±14,65
Galantamine	3,26±0,62	6,93±0,62	24,03±2,94	45,13±2,60	63,87±2,85	73,57±0,77	78,95±0,58	34,75±1,99

Résumé

Ce travail est consacré à l'étude phytochimique et l'évaluation de quelques activités biologiques (activités anti- oxydantes, anti- cholinestérase) des extraits d'une plante algérienne du genre *Seseli* qui appartient à la famille des Apiacées.

Les extraits bruts ont été obtenus par macération sur la partie aérienne de la plante en utilisant trois solvants : hexane, dichlorométhane et méthanol.

Les résultats d'analyse phytochimique qualitative ont permis de mettre en évidence la richesse des extraits de cette plante en métabolites secondaires notamment : les coumarines et les terpénoïdes. Aussi bien, nous avons révélé une faible teneur par rapport aux tanins , polyphénols et flavonoïdes. Le criblage chimique par HPLC-UV , nous a permis de confirmer la richesse de l'extrait méthanolique en polyphénols.

L'analyse quantitative de polyphénols et flavonoïdes totaux a montré que les extraits dichlorométhane et méthanolique sont les plus riches avec des teneurs de 35,909 mg EAG/g et 5,058 mg EQ/g respectivement.

L'évaluation du potentiel antioxydant est réalisée en utilisant une variété des tests *in vitro* ; piégeage du radical libre (DPPH) , piégeage du radical libre (ABTS) , Phénantroline, pouvoir réducteur (FRAP), et le SNP. Les extraits de cette plante ont montré un pouvoir antioxydant faible.

L'évaluation de l'activité anti-butyrylcholinestérase nous a permis de dévoilé une capacité inhibitrice très significative pour l'extrait dichlorométhanique par rapport aux standard galantamine ($CI_{50} = 9,14 \pm 1,74 \mu\text{g/mL}$ et $34.75 \pm 1.99 \mu\text{g/mL}$, respectivement).

Les résultats de l'étude, *in silico*, qui consiste à l'inhibition de l'enzyme butyrylcholinestérase avec des molécules appartiennent de cette plante, montrent que le composé pyranocoumarine «Tortuosinol » possède le meilleur résultat de l'affinité d'interaction avec le site actif (2.83 M^{-1}), il se présente comme l'inhibiteur le plus puissant de la butyrylcholinestérase (BChE).

D'après les résultats de cette étude, nous pouvons constater que la plante du genre *Seseli* est une plante riche des coumarines et des terpénoïdes, ceci confère des propriétés biologiques prometteuses pour cette plante. De plus, au vu des résultats de l'activité anti-butyrylcholinestérase , nous pouvons suggérer que cette plante pourrait être utilisée comme une source de molécules bioactives qui peuvent lutter contre la maladie d'Alzheimer.

Mots clés : genre *Seseli* , anti-butyrylcholinestérase , activité antioxydante , HPLC , *in silico*.

ملخص

هذا العمل مكرس لدراسة المحتوى الكيميائي و تقييم لبعض الأنشطة البيولوجية (الأنشطة المضادة للأكسدة anti-butrylcholinestérase) لمستخلصات نبات جزائري من جنس *Seseli* الذي ينتمي إلى عائلة Apiacées.

تم الحصول على عدة مستخلصات عن طريق النقع في الجزء العلوي للنبات باستخدام ثلاثة مذيبات : الهكسان وثنائي كلورو الميثان والميثانول.

سمحت لنا نتائج التحليل الكيميائي النباتي النوعي من إبراز ثراء مستخلصات هذا النبات في المنتجات الثانوية على وجه الخصوص : الكومارين و التربينويد . كذلك ، كشفنا عن المحتوى المنخفض للعفصيات والبوليفينول والفلافونويد. و سمح لنا الفحص الكيميائي بواسطة HPLC-UV ، بتأكيد ثراء مستخلص الميثانول من البوليفينول أظهر التحليل الكمي لمجموع البوليفينول والفلافونويد أن مستخلصات ثنائي كلورو ميثان والميثانول هي الأغنى بمحتويات (5.058 mg EQ /g , 35,909 mg EAG /g) على التوالي.

تم إجراء تقييم نشاط مضادات الأكسدة باستخدام مجموعة متنوعة من الطرق المخبرية ؛ (ABTS) ، (DPPH) ، والفينانثرولين و كذلك عبر (FRAP) و (SNP) . أظهرت النتائج ان مستخلصات هذا النبات لها قدرة منخفضة لخاصية مضادات الأكسدة.

سمح لنا تقييم نشاط anti-butrylcholinestérase بالكشف عن قدرة التثبيطة الكبيرة جدًا لمستخلص ثنائي كلورو ميثان مقارنةً بالغالاتامين (34.75±1.99 µg/mL = CI₅₀ , 9,14±1,74µg/mL) على التوالي.

أظهرت نتائج الدراسة " *in silico* " و التي هي عبارة عن تثبيط إنزيم Butrylcholinestérase (BChE) مع جزيئات تنتمي إلى هذا النبات : أن المركب " Tortuosinol " من نوع بيرانوكومارين لديه أفضل نتيجة قابلية الارتباط تقدر: (2.83 M⁻¹) اتجاه الموقع الفعال ، و يعتبر على أنه المثبط الأقوى لانزيم Butrylcholinestérase .

وفقًا لنتائج هذه الدراسة ، يمكننا القول أن هذا نبات الذي ينتمي إلى جنس *Seseli* هو نبات غني بالكومارين والتربينويدات ، وهذا يعطي خصائص بيولوجية واعدة لهذا النبات. علاوة على ذلك ، في ضوء نتائج المتعلقة بنشاط anti-butrylcholinestérase ، يمكننا أن نقترح أنه يمكن استخدام هذا النبات كمصدر للجزيئات النشطة بيولوجيًا التي يمكن أن تقاوم مرض الزهايمر.

الكلمات المفتاحية : جنس *Seseli* ، anti-butrylcholinestérase ، نشاط مضاد للأكسدة ، HPLC ، *in silico*

Abstract

This work is devoted to the phytochemical study and evaluation of some biological activities (anti-oxidant, anti-cholinesterase) from extracts of an Algerian plant of the genus *Seseli* which belongs to the apiaceae family.

The crude extracts were obtained by maceration on the aerial part of the plant using three solvents: hexane, dichloromethane and methanol.

The results of qualitative phytochemical analysis have made it possible to highlight the richness of the extracts of this plant in secondary metabolites including: coumarins and terpenoids. As well, we revealed the low content compared to tannins, polyphenols and flavonoids. Chemical screening by HPLC-UV, allowed us to confirm the richness of the methanolic extract in polyphenols.

Quantitative analysis of total polyphenols and flavonoids showed that dichloromethane and methanolic extracts are the richest with contents of 35.909 mg EAG/g and 5.058 mg EQ/g respectively.

The assessment of antioxidant potential is carried out using a variety of *in vitro* tests; free radical trapping (DPPH), free radical trapping (ABTS), phenantroline, reducing power (FRAP), and SNP. Extracts of this plant have shown low antioxidant power.

The evaluation of the anti-butyrylcholinesterase activity allowed us to reveal a very significant inhibitory capacity for the dichloromethanic extract compared to galantamine standards ($CI_{50} = 9.14 \pm 1.74 \mu\text{g/mL}$ and $34.75 \pm 1.99 \mu\text{g/mL}$, respectively).

The results of the study, *in silico*, which consists in the inhibition of the enzyme butyrylcholinesterase with molecules belonging to this plant, show that the pyranocoumarin compound "Tortuosinol" has the best result of the affinity of interaction with the active site (2.83 M^{-1}), it presents itself as the most powerful inhibitor of butyrylcholinesterase (BChE).

From the results of this study, we can see that the plant of the genus *Seseli* is a plant rich in coumarins and terpenoids, this gives promising biological properties to this plant. In addition, given the results of the anti-butyrylcholinesterase activity, we can suggest that this plant could be used as a source of bioactive molecules that can fight Alzheimer's disease.

Keywords : genus *Seseli*, anti-butyrylcholinesterase, antioxidant activity, HPLC, *in silico*.

Année universitaire : 2021-2022

Présenté par : BENMEKHBI Ahmed Acheraf
AKKAL Wail

Etude phytochimique et évaluation des activités biologiques d'une plante algérienne du genre *Seseli* (Apiacées)

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

Résumé

Ce travail est consacré à l'étude phytochimique et l'évaluation de quelques activités biologiques (activités antioxydantes, anti-cholinestérase) des extraits d'une plante algérienne du genre *Seseli* qui appartient à la famille des Apiacées.

Les extraits bruts ont été obtenus par macération sur la partie aérienne de la plante en utilisant trois solvants : hexane, dichlorométhane et méthanol.

Les résultats d'analyse phytochimique qualitative ont permis de mettre en évidence la richesse des extraits de cette plante en métabolites secondaires notamment : les coumarines et les terpénoïdes. Aussi bien, nous avons révélé une faible teneur par rapport aux tanins, polyphénols et flavonoïdes. Le criblage chimique par HPLC-UV, nous a permis de confirmer la richesse de l'extrait méthanolique en polyphénols.

L'analyse quantitative de polyphénols et flavonoïdes totaux a montré que les extraits dichlorométhane et méthanolique sont les plus riches avec des teneurs de 35,909 mg EAG/g et 5,058 mg EQ/g respectivement.

L'évaluation du potentiel antioxydant est réalisée en utilisant une variété des tests *in vitro* ; piégeage du radical libre (DPPH), piégeage du radical libre (ABTS), phénantroline, pouvoir réducteur (FRAP), et le SNP. Les extraits de cette plante ont montré un pouvoir antioxydant faible.

L'évaluation de l'activité anti-butyrylcholinestérase nous a permis de dévoiler une capacité inhibitrice très significative pour l'extrait dichlorométhane par rapport aux standard galantamine ($CI_{50} = 9,14 \pm 1,74 \mu\text{g/mL}$ et $34.75 \pm 1.99 \mu\text{g/mL}$, respectivement).

Les résultats de l'étude, *in silico*, qui consiste à l'inhibition de l'enzyme butyrylcholinestérase avec des molécules appartenant de cette plante, montrent que le composé pyranocoumarine «Tortuosinol» possède le meilleur résultat de l'affinité d'interaction avec le site actif (2.83 M^{-1}), il se présente comme l'inhibiteur le plus puissant de la butyrylcholinestérase (BChE).

D'après les résultats de cette étude, nous pouvons constater que la plante du genre *Seseli* est une plante riche des coumarines et des terpénoïdes, ceci confère des propriétés biologiques prometteuses pour cette plante. De plus, au vu des résultats de l'activité anti-butyrylcholinestérase, nous pouvons suggérer que cette plante pourrait être utilisée comme une source de molécules bioactives qui peuvent lutter contre la maladie d'alzheimer.

Mots-clefs : genre *Seseli*, anti-butyrylcholinestérase, activité antioxydante, HPLC, *in silico*.

Laboratoires de recherche : Laboratoire de Biochimie Appliquée (Université Frères Mentouri, Constantine 1)

Encadreur : MOSBAH Asma (MCA - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 1 : BOUSETLA Ahlem (MCA - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 2 : CHERFIA Radia (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).