



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET
POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine 1

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية والجزينية

Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

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

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Biochimie Appliquée*

Thème

Etude phytochimique et activité antioxydante d'une plante algérienne du genre *Anthericum* (Liliaceae)

Présenté et soutenu publiquement

Le : 27/06/2018

Par

DJEBLIA Lamia & BELGHOBSI Nour El Houda

Jury

Président du jury : MOSBAH Asma

MCA. UFM Constantine 1

Rapporteur : BOUTAGHANE Naima

MCA. UFM Constantine 1

Examineur : KHALFALLAH Assia

MCA. UFM Constantine 1

Année universitaire

2017– 2018

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Mes parents. Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour dont ils ne cessent de me combler. Que dieu leur procure bonne santé et longue vie.

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur : **Maman** que j'adore.

A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, que dieu te garde pour moi, à toi **mon Père**.

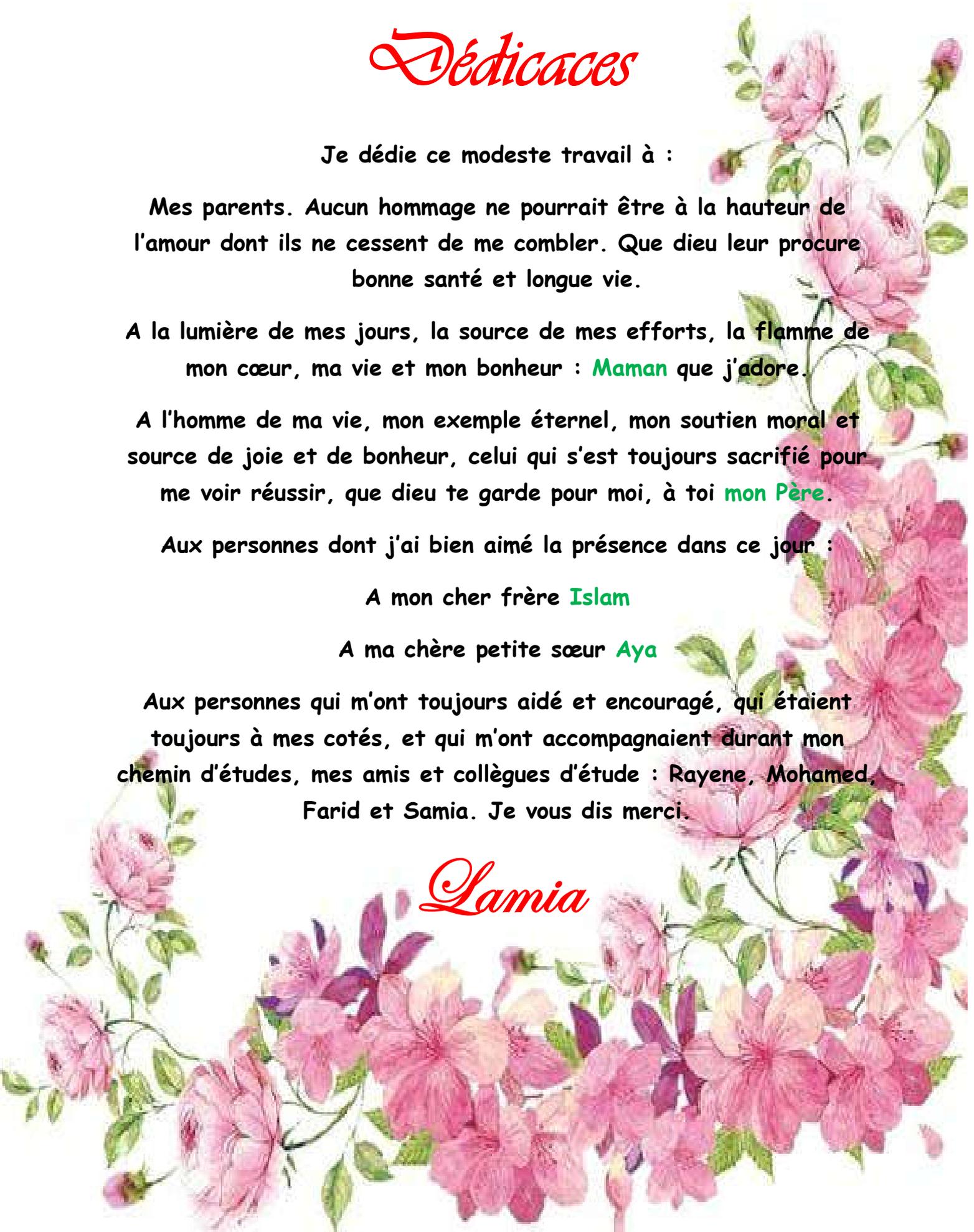
Aux personnes dont j'ai bien aimé la présence dans ce jour :

A mon cher frère **Islam**

A ma chère petite sœur **Aya**

Aux personnes qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes cotés, et qui m'ont accompagné durant mon chemin d'études, mes amis et collègues d'étude : **Rayene, Mohamed, Farid et Samia**. Je vous dis merci.

Lamia



Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A ma chère mère Ncera,

A mon cher père Abd El Hak,

Qui n'ont jamais cessé, de formuler des prières à mon égard, de me soutenir et de m'épauler pour je puisse atteindre mes objectifs.

A mon cher mari Mohamed Skander,

Qui m'a aidé et supporté dans les moments difficiles.

A ma chère sœur Nafissa et son mari mohamed,

Pour leur soutien moral et leurs conseils précieux tout au long de mes études.

A mes frère Naim et Selmane et ma petite sœur Amira

A ma chère amie Hdjer,

Pour son aide dans les moments difficiles.

A mes collègues Mohammed et Farid

A mon encadreur BOUTAGHANE NAIMA,

Pour son indéfectible soutien et son patience infinie.

A toute ma famille.

Nour El Houda



Remerciements

Avant toute chose nous remercions Allah le tout puissant de nous avoir accordé la force et les moyens afin de pouvoir réaliser ce travail.

Nous envoyons nos remerciements les plus dévoués aux membres de jury :
Dr. MOSBAH Asma et Dr **KHALFALLAH Assia** parce qu'ils nous ont honoré avec leur présence et leur participation à ce jury.

Au terme de ce travail nous adressons également nos sincères remerciements à:

Mme BOUTAGHANE Naima pour avoir dirigé ce travail et accepté de nous encadrer, pour ses conseils et ses orientations.

Mme KHALFALLAH Assia pour avoir nous suivre et dirigé pendant notre travail et pour ses conseils et ses orientations.

Mme KAABOUCHE Zahia qui nous a accueillis dans son laboratoire pour effectuer notre partie expérimentale.

Mr BENSUICI Chawki pour son accueil, son orientation et ses conseils pendant le stage du CRBT.

Mr Mehdi l'ingénieur de laboratoire de synthèse chimique du CRBT pour ses conseils et son accompagnement durant le stage.

Nous remercions également tous les enseignants de Département des Sciences de la nature et de la vie.

A tous les étudiants de Graduation « Master 2 » spécialité Biochimie fondamentale et appliquée.



Table des matières

❖ Introduction générale	1
-------------------------------	---

❖ Revue Bibliographique

Chapitre I : Aperçu bibliographique sur le Genre *Anthericum*

I.1. Famille des Liliacea	3
I.1.1. Description	3
I.1.2. Position systématique de la famille des Liliaceae	4
I.1.3. Répartition géographique.....	4
I.1.4. Utilisation	5
✚ Utilisation médicale	5
✚ Utilisation alimentaire	5
✚ Utilisation économique.....	5
✚ Utilisation pharmacologique	5
I.1.5. Quelques activités biologiques reconnues.....	6
I.2. Genre <i>Anthericum</i>	6
I.2.1. Présentation du genre	6
I.2.2. Position systématique du genre <i>Anthericum</i>	8
I.2.3. Principaux métabolites secondaires du Genre <i>Anthericum</i>	8

Chapitre II : Métabolites Secondaires

II.1. Flavonoïdes	10
II.1.1. Biosynthèse des flavonoïdes	10
II.1.2. Structures chimiques et classification.....	11
II.1.3. Propriétés des flavonoïdes	13
II.2. Saponosides.....	14

II.2.1.Généralité	14
II.2.2. classification des Saponosides	14
II.2.2.1.Saponosides a génines Triterpéniques.....	15
II.2.2.2.Saponosides a génines Stéroïdiques	15
II.2.2.3.Sucres	16
II.2.2.4.Acides Organiques	17
II.2.3.Distribution de saponines.....	18
II.2.4.Biosynthèse des saponosides.....	18
II.2.5. Propriété biologiques des saponines	18
✚ Activité Hémolitique	19
✚ Activités Cytotoxique et Antitumorale	19
✚ Activité immunomodulatrice	20

Chapitre III : Activités Biologiques et Antioxydants

III. 1. Généralités	22
III.2. Stress oxydant.....	22
III.2.1. Différents types des radicaux libres.....	22
III.2.1.1. Origine de production des ERO	23
III.2.1.2.Conséquences biologiques des espèces réactives oxygénées.....	23
III.2.2.Implications pathologiques du stress oxydatif.....	24
III.3. Antioxydants	25
III.3.1. Antioxydants enzymatiques	25
III.3.2. Antioxydants non enzymatiques	25
III.4.Méthodes de détermination de l'activité antioxydante.....	26
III.4.1. Test du 2,2-Di-Phényl-1-Picryl-Hydrazyl (DPPH)	26
III.4.2. Teste de l'activité antiradicalaire pour le radical ABTS+•.....	27
III.4.3. Test de la capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC)	27
III.4.4.Chélation des ions métalliques.....	28
III.4.5.Piégeage du radical superoxyde par la méthode de DMSO alcalin	28

Chapitre IV : Partie Expérimentale

IV.1. Aperçu et but de travail	30
IV.2. Matériel et méthodes	30
IV.2.1. Matériel végétal	30
IV.2.1.1. Récolte de la plante du genre <i>Anthericum</i>	30
IV.2.2. Méthodes d'analyses phytochimiques.....	31
IV.2.2.1. Méthodes Chromatographiques	31
IV.2.2.1.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)	31
IV.2.2.1.2. Chromatographie liquide sous vide (VLC)	31
IV.2.2.1.3. Chromatographie sur colonne ouverte (CC)	31
IV.2.3. Méthode physico-chimique	31
IV.2.3.1. Spectrophotométrie UV-visible	31
IV.2.3.2. Spectroscopie de RMN.....	32
IV.3. Etude phytochimique de la plante du genre <i>Anthericum</i>	32
IV. 3.1. Extraction par macération à froid	32
IV.3.2. Séparation et purification	33
IV.3.2.1. Séparation grossière de l'extrait brut.....	33
IV.4. Activité antioxydante	36
IV.4.1. Activité antiradicalaire (DPPH)	36
IV.4.2. Test de décoloration de radical cation ABTS+•.....	37
IV.4.3. Test de piégeage du radical superoxyde O ₂ ⁻ par la méthode DMSO alcalin.....	37
IV.4.4. Réduction cuprique (CUPRAC)	37
IV.4.5. Chélation des ions ferreux.....	38
IV.5. Analyse statistique.....	38

Chapitre V : Résultats et discussion

V.1. Rendement d'extrait brut	39
V.2. Séparation et purification.....	39
V.3. Identification structurale des composés isolés.....	39
V.3.1. Le composé AN1.....	39

V.3.2. Le composé AN3.....	44
V.4. Résultats et discussion de l'activité antioxydante.....	48
V.4.1. Test de l'activité scavenger du radical DPPH [•]	49
V.4.2. Activité antioxydante déterminée par la méthode d'ABTS ^{•+}	50
V.4.3. Test de l'activité scavenger du radical O ₂ ^{•-} (Méthode DMSO alcalin).....	52
V.4.4. Test de l'activité réductrice de l'ion cuprique (CUPRAC).....	53
✚ Conclusion générale	55
✚ Références bibliographiques.....	56

Liste des abréviations

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

BHA: Hydroxyanisole butylé.

BHT : butyl-hydroxy-toluène.

CC : Chromatographie sur colonne ouverte.

CCM : Chromatographie sur couche mince.

CHCl₃ : Chloroforme.

CL₅₀ : Concentration létale 50.

CLHP : Chromatographie liquide haute performance.

COSY: COrrrelated SpectroscopY

CUPRAC: Cupric Réduicing Antioxidant Capacity.

DMSO: Diméthylsulfoxyde.

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

EDTA : acide éthylène-Diamine-tétra-Acétique

EOA : Espèces oxygénées activées.

ERO : espèces réactives oxygénées.

HMBC: Heteronuclear Multiple Bonding Connectivity

HMQC: Heteronuclear Multiple Quantum Connectivity

IC₅₀: Concentration d'inhibition 50.

***J* (Hz)** : constante de couplage exprimée en Hertz

MeOH : Méthanol.

NBT : (nitrobluetetrazolium)

Ppm : parties par million.

RMN ¹³C : Résonance Magnétique Nucléaire du carbone.

RMN : Résonance magnétique nucléaire.

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire.

RMN1H : Résonance Magnétique Nucléaire du proton.

SOD : Superoxyde dismutase.

δ_C : Déplacement chimique du carbone en ppm.

δ_H : Déplacement chimique du proton en ppm.

UV : Ultra-Violet.

VLC : Chromatographie liquide sous vide

Liste des tableaux

Tableau 01 : Activités biologiques de différents principes actifs issus de plantes de la famille des Liliaceae	06
Tableau 02 : VLC sur C ₁₈ de l'extrait méthanolique des parties aériennes de <i>Anthericum</i>	32
Tableau 03 : données spectrales UV du composé AN1	39
Tableau 04 : Déplacements chimiques en RMN 1H (500 MHz) et RMN 13C (125 MHz) du composé AN1 dans CD ₃ OD	43
Tableau 05 : données spectrales UV du composé AN3	44
Tableau 06 : Déplacements chimiques en RMN 1H (500 MHz) et RMN 13C (125 MHz) du composé AN3 dans CD ₃ OD	48
Tableau 07 : Pouvoir d'inhibition IC ₅₀ des extraits et du standard utilisant le test du DPPH..	49
Tableau 08 : Pouvoir d'inhibition IC ₅₀ des extraits et du standard utilisant le test d'ABTS' ...	51
Tableau 09 : les différentes valeurs des IC ₅₀ de l'activité DMSO alcalin	52
Tableau 10 : Les différentes valeurs des A0.5 de l'activité CUPRAC	53

Listes des figures

Figure 01 : les différents composés des plantes de la famille des liliaceae.....	03
Figure 02 : carte de répartition de la famille des Liliaceae.....	04
Figure 03 : Différentes parties des plantes du genre <i>Anthericum</i>	06
Figure 04 : Carte de répartition du genre <i>Anthericum</i>	07
Figure 05 : Exemple des espèces appartenant au genre <i>Anthericum</i> (<i>Anthericumliliago</i> à droite et <i>Anthericumracemosum</i> à gauche).....	07
Figure 06 : structure chimique de kaempférol (à gauche)et de lutéoline (à droite).....	08
Figure 07 : Structures du 2-phényl chromane ou noyau flavane (à gauche) et du 2-phényl chromone (à droite).....	09
Figure 08 : Biogénèse de la chalcone.....	09
Figure 09 :Schéma récapitulatif de biogénèse des différentes classes de flavonoïdes.....	10
Figure 10 : Structures des flavones, flavonols, dihydroflavonols et flavanones.....	11
Figure 11 : Structures des flavan-3-ol et flavan-3,4-diols.....	11
Figure 12 : Structures des chalcones et auronnes.....	12
Figure 13 : Structures des squelettes stéroïdiques.....	14
Figure 14 : Structures des squelettes triterpéniques.....	15
Figure 15 : les différents monosaccharides rencontrés dans les saponosides.....	16
Figure 16 : les différents acides organiques rencontrés dans les saponosides.....	17
Figure 17 : Structure du 2,3-époxydosqualène.....	17
Figure 18 : Aperçu des espèces oxygénées activées (EOA) dérivant de l'oxygène et systèmes de protection permettant de limiter l'effet toxique de ces espèces. GSH : glutathion, Cl ⁻ : anion chlorure ; MPO : myéloperoxydase, SOD : superoxydedismutase, Se-GPx : glutathion peroxydase séléno-dépendante.....	22
Figure 19 :Les pathologies associées aux espèces réactives oxygénées.....	23
Figure 20 : La forme réduite DPPH et la forme radical DPPH [•]	26
Figure 21 : La forme réduite ABTS et la forme radicale de cation ABTS ^{•+}	26

Figure 22 : Réaction de CUPRAC par une molécule antioxydante.....	27
Figure 23 : structure chimique du Ferrozine.....	27
Figure 24 : Djebel El Ouahch Wilaya de Constantine.....	29
Figure 25 : Macération hydro-alcoolique (à gauche) et l'extrait méthanolique (à droite)..	31
Figure 26 : fractionnement de l'extrait brut par VLC (à gauche), profil CCM de l'extrait méthanolique (à droite).....	33
Figure 27 : Plaques CCM récapitulatives des fractions de la VLC.....	33
Figure 28 : chromatographie sur colonne de polyamide de la fraction F1-4.....	34
Figure 29 : chromatographie sur colonne de gel de silice de la sous fraction F18.....	34
Figure 30 : Série spectrale UV du composé AN1.....	40
Figure 31 : Structure de la lutéoline.....	40
Figure 32 : Spectre de RMN ¹ H du composé AN1.....	41
Figure 33 : Spectre COSY du composé AN1.....	42
Figure 34 : 5, 7, 3', 4'-tétra hydroxy flavone (lutéoline) AN1.....	42
Figure 35 : Structure de la lutéoline7-OR.....	44
Figure 36 : Série spectrale UV du composé AN3.....	45
Figure 37 : Spectre RMN ¹ H du compose AN3 (CD ₃ OD, 500 MHz).....	46
Figure 38 : Spectre RMN ¹³ C du compose AN3 (CD ₃ OD, 125 MHz).....	46
Figure 39 : Spectre COSY du compose AN3.....	47
Figure 40 : Spectre HMBC du compose AN3.....	47
Figure 41 : Lutéoline7-O-β-D-glucopyranoside (AN3).....	41
Figure 42 : Courbe de pourcentage d'inhibition du DPPH par l'extrait méthanolique et différentes fractions de la plante.....	49
Figure 43 : courbe de pourcentage d'inhibition de l'ABTS par les différents échantillons...50	50
Figure 44 : Courbe de pourcentage d'inhibition de DMSO alcalin par différents extraits de la plante.....	52

Figure 45 : Courbe d'absorbance en fonction de la concentration des différents échantillons.....53

Introduction Générale

◆ **Introduction générale**

A travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales pour objectif de vaincre la souffrance et d'améliorer la santé des hommes. Aujourd'hui encore, les deux tiers de la pharmacopée ont recours aux propriétés curatives des plantes et que les traitements à base de ces dernières reviennent au premier lieu car l'efficacité des médicaments décroît vu leurs effets secondaires sur la santé publique.

L'Algérie, par la richesse et la diversité de l'origine de sa flore, constitue un véritable réservoir phytogénétique, avec environ 3000 espèces et sous espèces de plantes médicinales, appartenant à plusieurs familles botaniques dont 15% sont endémiques [01] ce qui lui permet d'occuper une place privilégiée parmi les pays méditerranéens qui ont une longue tradition médicale et un savoir-faire traditionnel à base de plantes médicinales.

Il est impératif de donner beaucoup d'importance à cette catégorie d'espèces végétale d'une part, et d'autre part construire du savoir au tour des plantes médicinales et de réaliser de recherches phytochimiques et pharmacologiques sur cette ressource naturelle pour isoler des nouvelles biomolécules aux activités biologiques prometteuses. Cette thématique transversale s'intéresse donc à la substance naturelle support de l'activité biologique. La chimie et la biologie sont donc indispensables pour préciser la relation structure-activité des biomolécules, notamment celles d'intérêt thérapeutiques. Ces composés bioactifs sont vraisemblablement à l'origine du développement de l'industrie pharmaceutique.

Le présent travail, rentrant dans le cadre du programme de recherche de notre laboratoire (LOST), destiné à la valorisation de la flore du Nord algérien, par la recherche de nouveaux composés ou principes actifs à débouchés thérapeutiques. Pour cela, nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique et biologique de la plante médicinale *Anthericum* appartenant à la famille des Liliaceae.

L'objectif de notre travail vise à démontrer la richesse de cette plante en principes actifs (Saponosides, flavonoïdes et...) et à déterminer leur propriété antioxydante. Pour cela notre étude englobe deux aspects, dont le premier est d'ordre phytochimique. Le second aspect est consacré à une évaluation de l'activité antioxydante.

Notre travail sera présenté comme suit :

Le 1^{er} chapitre, consacré aux aspects botaniques inclus une présentation de la famille Liliaceae, et du genre *Anthericum*, leurs propriétés biologiques, puis les principaux résultats phytochimiques antérieurs réalisés.

Le 2^{ème} chapitre présentera les métabolites secondaires (flavonoïdes et saponosides) leur définition, leur classification, leur biosynthèse ainsi que leur intérêt thérapeutique.

Le 3^{ème} chapitre s'intéresse au stress oxydant, les différents systèmes antioxydant et une présentation générale de quelques tests de la capacité antioxydante.

Le 4^{ème} chapitre consacré à la présentation des méthodes d'extraction des parties aériennes de *Anthurium*, à l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité antioxydante de cette espèce.

Le 5^{ème} chapitre est consacré à la présentation des résultats obtenus suite à cette étude phytochimique et biologique.

Chapitre : 01

Revue Bibliographique

I.1. Famille des Liliaceae

I.1.1. Description

La famille des Liliaceae est l'une des plus grandes familles de plantes à fleurs. Elle comprend 280 genres et de 4000 à 6000 espèces qui sont des monocotylédones très largement distribuées. La plupart sont herbacées possèdent des bulbes, des cormes (bulbes formés d'une tige renflée entourée d'écaillés) ou des rhizomes. Un certain nombre d'espèces sont xérophytiques et quelques-unes sont charnues comme l'aloès. Les inflorescences sont généralement racémiques, mais les tulipes, par exemple, sont cémentaires. Les fleurs sont régulières et parfaites [02], et les feuilles sont simples, étroites et de forme linéaire toujours alternes, les tiges sont charnues pour la plupart et les racines sont généralement contractiles [03]. Le périanthe est à 6 divisions pétaloïdes disposées en 2 verticilles peu distincts, les divisions sont libres ou soudées 3 ou 6 étamines, l'ovaire est supère, Le fruit est une baie ou une capsule et le style est généralement unique mais des fois multiples [01] (**figure 01**). Cette famille tient une place importante dans la flore méditerranéenne et dans celle des régions steppiques des divers continents [04].

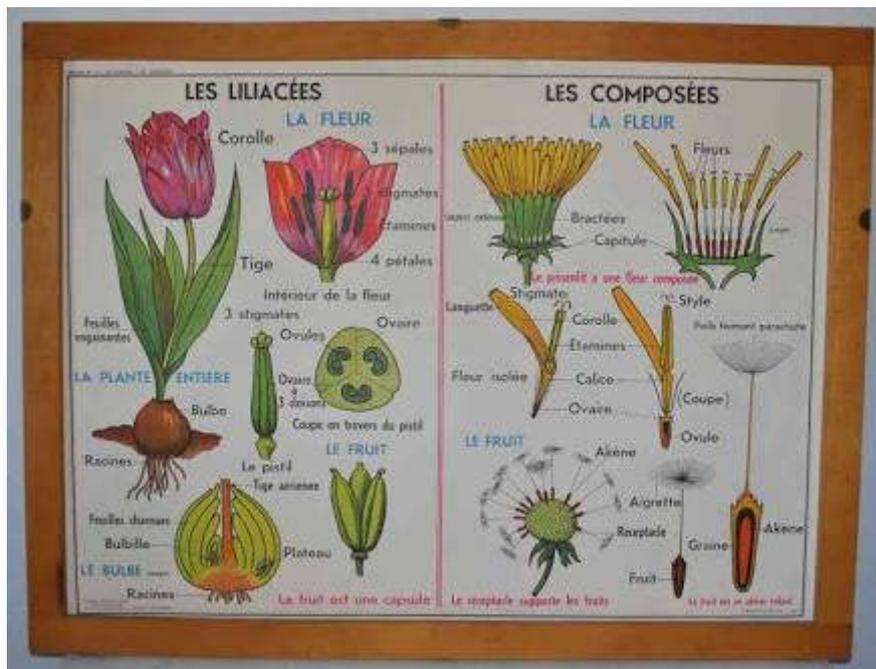


Figure 01 : les différents composés des plantes de la famille des liliaceae

I.1.2. Position systématique de la famille des Liliaceae

Selon la classification de Cronquist (1981), cette famille compte environ 280 genres et environ 5000 espèces. Elle regroupe toutes les Monocotylédones qui sont caractérisées par des fleurs avec des tépales pétaloïdes et 6 étamines [05]. Dont la position systématique est la suivante :

Règne : Plantae

Sous-règne : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Embranchement : Spermatophyta

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Liliopsida

Sous-classe : Liliidae

Ordre : Liliales

Famille : Liliaceae

I.1.3. Répartition géographique

Les plantes de la famille des Liliaceae sont largement distribuées à travers le monde, à l'exception des régions froides. Elles sont réparties dans les régions tempérées de l'hémisphère Nord [06] (**figure 02**), notamment dans les zones alpines. En général on trouve les Liliaceae à l'étage forestier, aux abords des forêts, dans les prairies alpines mais aussi, pour une grande partie, dans les steppes alors que d'autres sont plus fréquentes dans les zones marécageuses ou ailleurs dans les dunes de sable voire les régions arides [07].

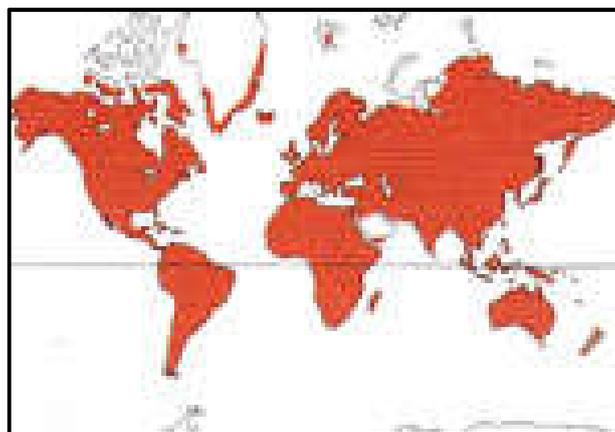


Figure 02 : carte de répartition de la famille des Liliaceae [08].

I.1.4. Utilisation

Les plantes de la famille des Liliaceae font partie des familles les plus importantes, et d'une grande diversité d'utilisations, leurs bulbes ont une importance économique notable notamment dans les domaines de la médecine. Beaucoup d'espèces sont ainsi utilisées comme nourriture et fréquemment comme médicament.

Utilisation médicinale

Certains bulbes du genre *Fritillaria* Liliaceae (environ 8 espèces) sont communément utilisés dans la pharmacopée chinoise. Différents bulbes du genre *Lilium*, *Gagea Tibetica*, *Amanaedulis* et *Cardiocrinum giganteum*, sont très utilisés dans le traitement de la toux ou des plaies et comme diurétiques et toniques [07]. L'Ail reste la plante la plus recherchée dans le domaine médicinal à cause de ses propriétés : antiagrégante des plaquettes sanguines, antimicrobienne, antifongique, vermifuge, hypoglycémiant, diurétique, stimulante thyroïdienne, hypotenseur, antiseptique pulmonaire et intestinal, ... Les graines et les bulbes de Colchique (*Colchicum*) sont utilisés contre la goutte [09].

Utilisation alimentaire

Certaines espèces de Liliaceae, notamment l'oignon, l'ail, l'échalote produisent des bulbes très appréciés en cuisine, qui interviennent dans de nombreuses recettes. Ces plantes comestibles fournissent lors de la digestion un grand nombre de fibres alimentaires (qui ne sont pas assimilées par l'intestin grêle) et nourrissent ainsi les bactéries amies de notre microbiote [10].

En Iran les bulbes d'*Amanaedulis* sont grillés et consommés. Un amidon de bonne qualité est extrait des bulbes d'*Erythronium japonicum* et de *Cardiocrinum cordatum*.

Utilisation économique

Toutefois la plus grande utilisation économique reste la culture ornementale principalement des genres *Lilium*, *Tulipa* et *Fritillaria* [07].

Utilisation pharmacologique

Les industries cosmétiques mettent en avant les traitements possibles de l'épiderme avec l'Aloevera pour ses caractéristiques: de stimulation de la production de collagène, dans le traitement des brûlures, accélération de la cicatrisation, contribution au métabolisme et la lutte contre le vieillissement [09].

I.1.5. Quelques activités biologiques reconnues

Tableau 01 : Activités biologiques de différents principes actifs issus de plantes de la famille des Liliaceae

Espèces	Parties utilisés	Principes actifs	Activités biologiques	Références
<i>Colchicum autumnale</i> L. (Liliaceae)	Tiges et Feuilles	Démécolcine	Immunomodulatrice	[11,12]
<i>Aloe barbadensis</i> Miller (Liliaceae)	Feuilles	Mannane acétylé	Anti-oxydante Anti-inflammatoire	[13,14,15]

I.2. Genre *Anthericum*

I.2.1. Présentation du genre

Anthericum est un genre de vivace qui se développe aux lieux humides et marais, et qui appartient à la famille des Liliaceae selon la classification classique, c'est un genre de plante herbacées à rhizome court couvert de fibres noirâtres et à racines fasciculées non ou peu tubérisées, leurs tiges sont nues ou avec quelques bractées sous l'inflorescence. Ces feuilles sont en rosette, atteignant 55 cm. Les tépales sont libres, blancs et tri-nerviés, de 1-3 cm de long. Les plante de ce genre possèdent six étamines plus courtes que le périanthe, ils sont inégaux dont les 3 internes sont plus longues; Ce sont des herbes à filet filiforme blanc et lisse, l'inflorescence est en grappe simple ou en panicule avec une capsule à valves non ridées transversalement et coriace à 3 loges et de 4 à 6 spermes. Les graines d'*Anthericum* sont anguleuses, ponctuées. Le Pâturages est clairières. [01, 16] (figure 03).

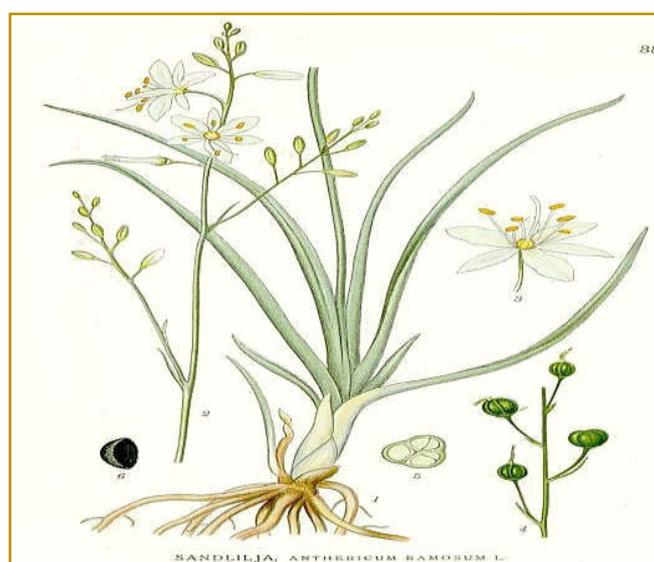


Figure 03 : Différentes parties des plantes du genre *Anthericum*.

Le genre *Anthericum* comprend environ **430 espèces** distribuées dans les continents de l'Afrique, Amérique, Europe et l'Asie (**figure 04**)



Figure 04 : Carte de répartition du genre *Anthericum* [17].

Parmi ceux-ci 7 sont des noms d'espèces acceptés : *Anthericum angustifolium* Hochst, *Anthericum baeticum* (Boiss.)Boiss, *Anthericum x confusum* Domin, *Anthericum corymbosum* Bker, *Anthericum jamesii* Baker, *Anthericum liliago* L, *Anthericum ramosum* L (figure 05). [17]



Figure 05 : Exemple des espèces appartenant au genre *Anthericum* (*Anthericum liliago* à droite et *Anthericum racemosum* à gauche).

I.2.2. Position systématique du genre *Anthericum*

Anthericum est un genre dans la famille des Liliaceae de l'Europe, l'Afrique du nord, et de l'Amérique tropicale dont la position systématique est la suivante (Cronquist, 1981) :

Règne : Plantae

Sous-règne : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Embranchement : Spermatophyta

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Liliopsida

Sous-classe : Liliidae

Ordre : Liliales

Famille : Liliaceae

Genre : *Anthericum*

I.2.3. Principaux métabolites secondaires du genre *Anthericum*

Les plantes du genre *Anthericum* ont fait l'objet de quelques investigations phytochimiques et pharmacologiques. Il ressort de ces investigations que les principaux métabolites secondaires de ce genre sont principalement les flavonoïdes. Une étude chimique a été réalisée sur deux espèces, *Anthericum algeriense* et *Anthericum liliago* a permis d'identifier un seul flavonoïde des feuilles pour chacune : le kaempférol (flavonol) et le Lutéoline (flavone) respectivement [18] (figure 06).

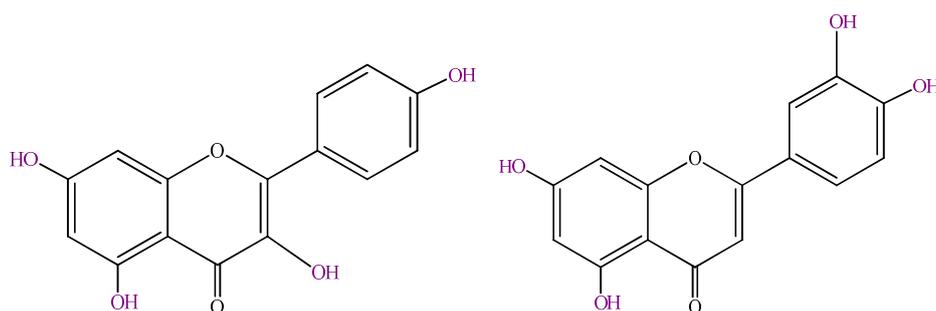


Figure 06 : structure chimique de kaempférol (à gauche) et de lutéoline (à droite).

Chapitre :02

Les métabolites Secondaires

II. Métabolites Secondaires

II.1. Flavonoïdes

Occupant une place prépondérante dans le groupe des phénols, les flavonoïdes sont des métabolites secondaires ubiquistes des plantes. A ce jour, plus de 6000 flavonoïdes naturels ont été décrits. On estime que 2 % environ du carbone organique photosynthétisé par les plantes, soit quelques 10^9 tonnes par an, est converti en flavonoïdes [19].

Les flavonoïdes sont des molécules en $C_6-C_3-C_6$ composés de deux cycles benzéniques reliés par un élément en C_3 . Ils ont une origine biosynthétique commune et possèdent la même structure de base à savoir l'enchaînement 2-phénylchromane (**figure 07**).

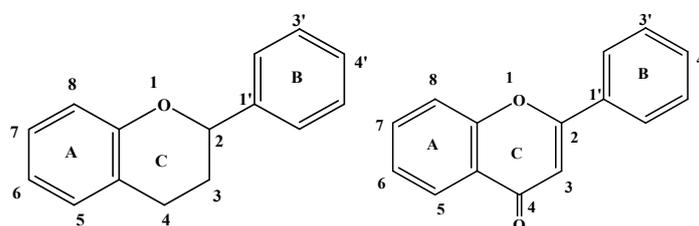


Figure 07 : Structures du 2-phényl chromane ou noyau flavane (à gauche) et du 2-phényl chromone (à droite).

II.1.1. Biosynthèse des flavonoïdes.

L'origine des flavonoïdes est inscrite en filigrane dans leur structure où elle apparaît bien dans celle des chalcones (**figure 08**) : condensation d'un triacétate, l'origine du cycle A (unité benzoyle), et d'un acide cinnamique, l'origine du cycle B (unité cinnamoyle). La cyclisation de ces deux unités engendre le cycle pyranique central C [20, 21].

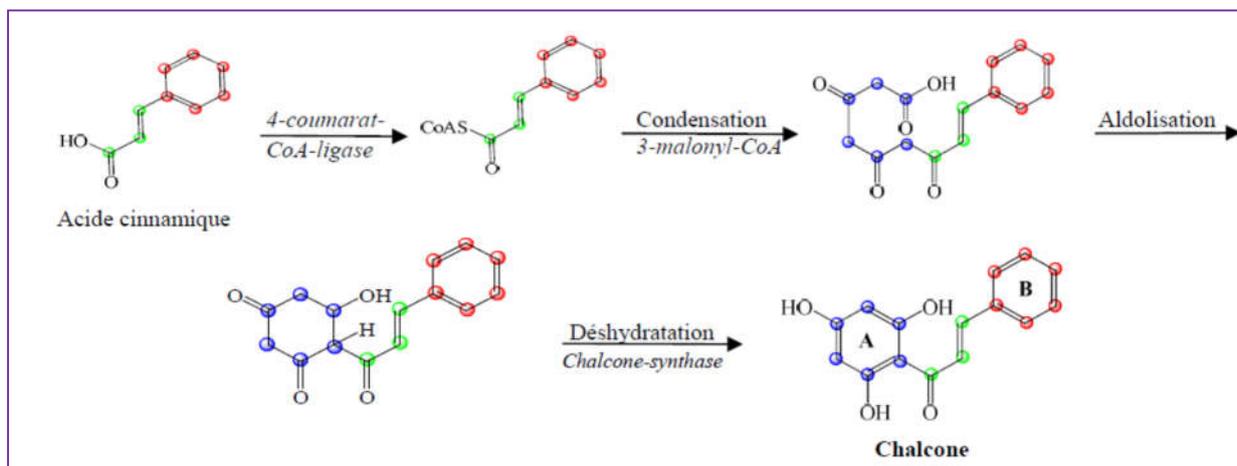


Figure 08 : Biogénèse de la chalcone.

Ainsi, les différentes classes des flavonoïdes sont issues de la chalcone qui subit ultérieurement des réactions catalysées par plusieurs types d'enzymes (**figure 09**) [22].

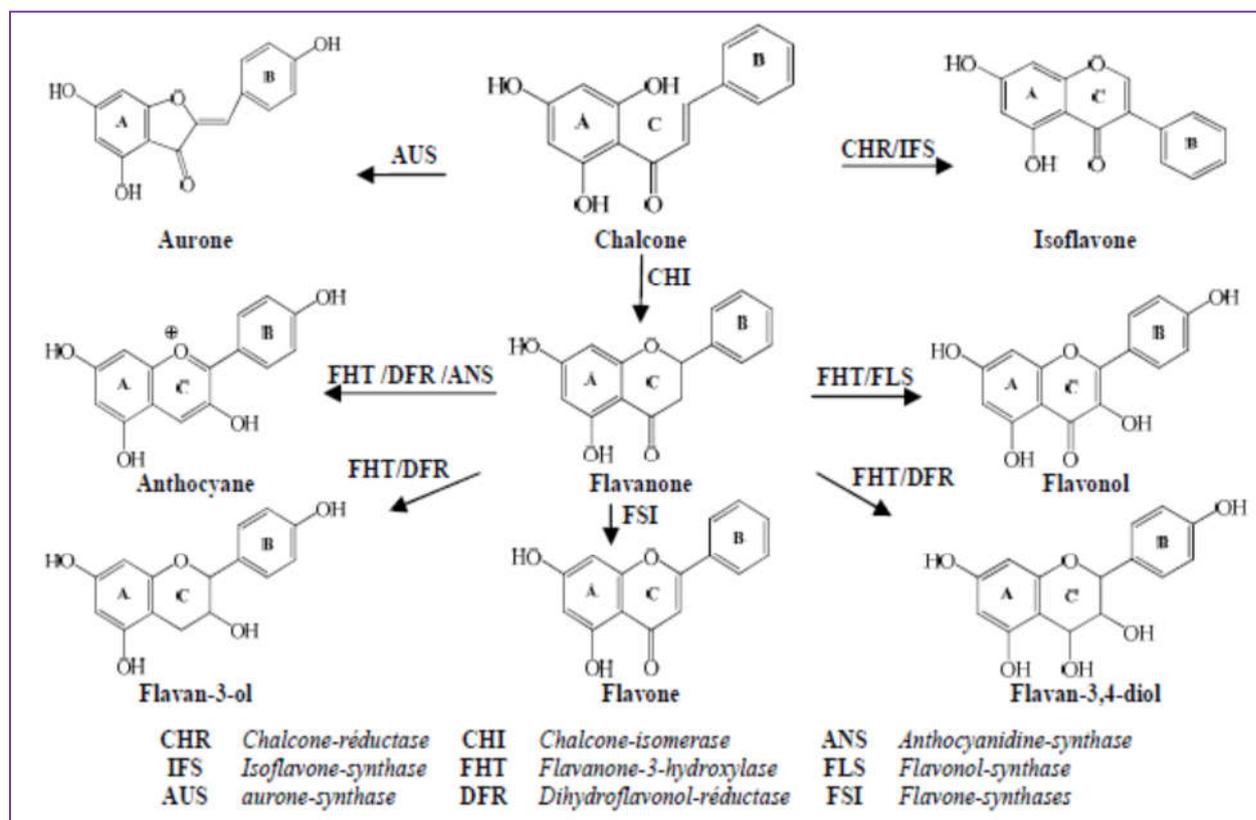


Figure 09 : Schéma récapitulatif de biogénèse des différentes classes de flavonoïdes.

II.1.2. Structures chimiques et classification

On distingue plusieurs classes de flavonoïdes :

✚ Dérivés du 2-phénylchromone

Cette classe regroupe les flavones, flavonols, flavanones et les dihydroflavonols. Chez ces molécules, le cycle A est dans la plupart des cas substitué par deux hydroxyles phénoliques en position 5 et 7 et le cycle B par un hydroxyle en position 4' ou deux hydroxyles en position 3' et 4' (**figure 10**). Les flavanones et dihydroflavonols sont caractérisés par l'absence de double liaison en position 2, 3 et par la présence de centres d'asymétrie. Chez les flavanones naturelles, le carbone C-2 est normalement de configuration 2*S* et chez les dihydroflavonols hydroxylés en position 3, la configuration est généralement *trans* (2*R*, 3*R*).

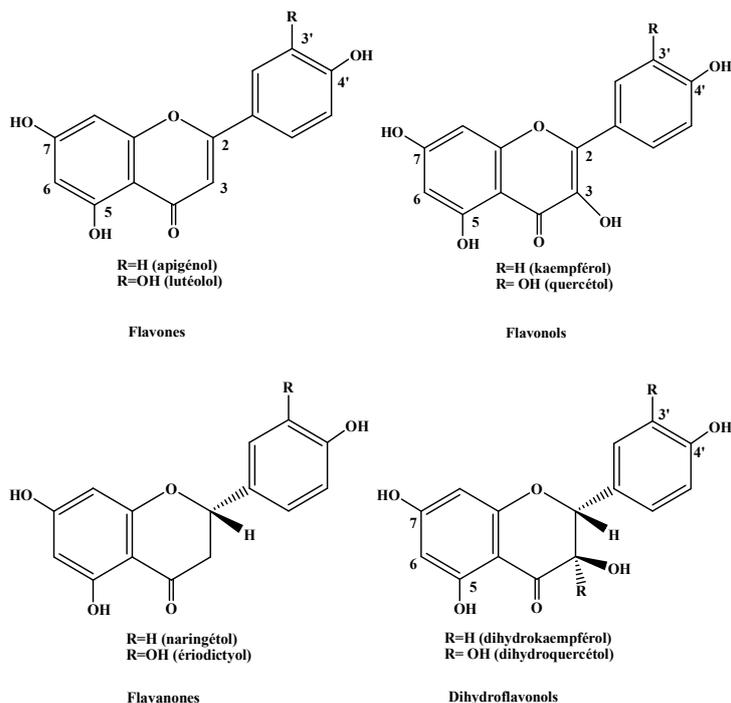


Figure 10 : Structures des flavones, flavonols, dihydroflavonols et flavanones.

✚ Dérivés du 2-phénylchromane

Les catéchols (flavan-3-ol) et les leucoanthocyanes (flavan-3,4-diols) ne possèdent pas de fonction carbonyle en position 4. Ils sont poly-hydroxylés de la même façon que décrite pour les dérivés du 2-phénylchromane (**figure 11**).

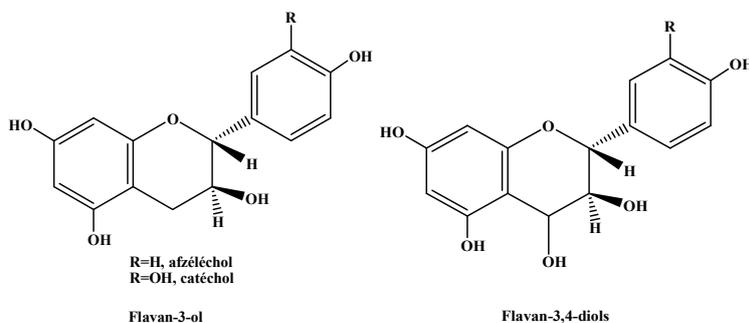


Figure 11 : Structures des flavan-3-ol et flavan-3,4-diols.

✚ Chalcones et aurones

Les chalcones sont dépourvues de l'hétérocycle central et sont caractérisées par la présence d'un chaînon tricarboné, cétonique, α , β -insaturé (. Les substitutions sur le noyau A sont le plus souvent identiques à celles des autres flavonoïdes mais le noyau B est assez fréquemment monosubstitué ou non substitué.

Les aurones sont des homologues des flavones mais à noyau C pentacyclique (**figure 12**).

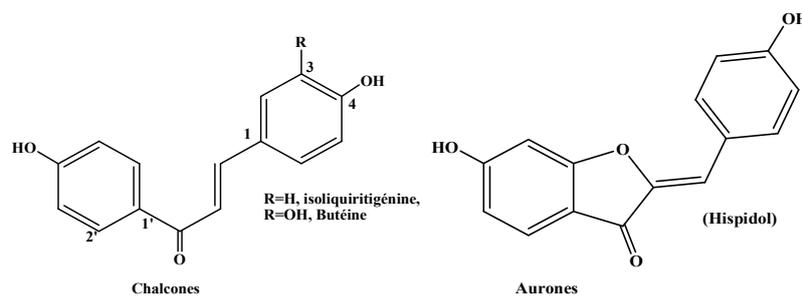


Figure 12 : Structures des chalcones et aurones.

II.1.3. Propriétés des flavonoïdes

✚ Rôle dans les plantes.

Les flavonoïdes sont les pigments colorés des fleurs. Par exemple, les couleurs orange, rouges et bleues des légumes, fruits, fleurs et tissus de stockage des plantes sont dues à des anthocyanes hydrosolubles (qui sont des flavonoïdes jaunes réduits). De ce fait, ils jouent un rôle important dans les interactions avec les insectes (attraction et rôle dans la pollinisation entomophile et la dispersion des graines). Ils sont impliqués dans les interactions plantes-microorganismes : dans les pathogénèses comme dans les symbioses (nodules des légumineuses). Ils agissent dans les systèmes de défense des cellules végétales en réponses à certains stress tels que les radiations ultraviolettes. Ce sont également des inhibiteurs d'enzymes, des agents chélatants des métaux nocifs aux plantes. De plus ils sont impliqués dans la photosensibilisation et les transferts d'énergie, la morphogenèse et la détermination sexuelle, la photosynthèse et la régulation des hormones de croissance des plantes [23,24].

Les flavonoïdes montrent d'autres propriétés intéressantes dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes en interagissant d'une manière complexe avec les diverses hormones végétales de croissance. Certains d'entre eux jouent également un rôle de phytoalexines, c'est-à-dire de métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries.

✚ Intérêt thérapeutique

Les flavonoïdes présentent un intérêt thérapeutique qui date de la découverte de la vitamine C par Szent Gyorgyi (prix Nobel, 1937), chercheur de l'université de Szeged (Hongrie).

Les flavonoïdes sont essentiellement des médicaments de l'insuffisance veineuse par action sur la microcirculation. Ils diminuent la perméabilité des capillaires sanguins et augmentent leur résistance. Cette action est appelée « vitaminique P ». Différents mécanismes sont évoqués pour expliquer cette activité :

-Des propriétés antioxydantes, piègeurs de radicaux libres.

-Des propriétés inhibitrices d'enzymes...

À côté de cette action principale « vitamine P », les flavonoides présentent plusieurs activités : anti-virales, anti-tumorales, anti-inflammatoires, anti-allergiques, anticancéreuses ainsi que d'autres activités particulières : diurétiques, et antispasmodique [25 ; 26 ; 27].

II.2. Saponosides

II.2.1. Généralités

Les saponosides ou saponines sont un groupe de métabolites secondaires hétérosidiques complexes à poids moléculaire élevé comprenant une partie hydrophile constituée d'oses liée à une partie lipophile qui est l'aglycone appelée génine ou sapogénine. La génine peut-être triterpénique en C-30 ou stéroïdique en C-27.

Le nom saponoside est dérivé du mot latin *sapo* qui veut dire savon, qui évoque le caractère moussant de leur solution aqueuse. Ce pouvoir tensio-actif est dû au caractère amphiphile des molécules, à la fois lipophile (la partie aglycone ou génine) et hydrophile (la partie osidique).

Les chaînes oligosaccharidiques greffées sur l'aglycone sont soit linéaires, soit branchées et peuvent renfermer jusqu'à 11 monosaccharides. La partie osidique est le plus souvent inactive, tout en exerçant un effet favorable sur la solubilité du glucoside et son absorption, voire son transport vers tel ou tel organe. L'effet thérapeutique est déterminé par la seconde partie. La partie sucre et l'aglycone sont normalement liées par une fonction éther ou ester.

Les plantes à saponines ont été très recherchées pour leurs propriétés détergentes [28], à l'instar de la Saponaire (*Saponaria officinalis* L.) qui a été largement employée pendant des siècles. Les saponines ont été aussi recherchées par l'industrie pharmaceutique parce qu'elles forment le point de départ pour l'hémi-synthèse des médicaments stéroïdiens [29]. Elles présentent plusieurs propriétés pharmacologiques et sont employées dans la phytothérapie et dans l'industrie cosmétique.

II.2.2. Classification des saponosides :

Au niveau structural, les saponines sont classées en deux groupes en fonction de la nature de leur génine pouvant être de type stéroïdique ou triterpénique [30]. Lorsque la génine est substituée par une seule chaîne osidique, les saponosides sont dits monodesmosidiques (liaison des sucres en C-3 ou en C-28 de l'aglycone) et lorsque la génine est substituée par deux chaînes osidiques, on parle de saponosides bidesmosidiques (liaison des sucres en C-3 et en C-28). Grâce à la performance des techniques chromatographiques et des techniques d'analyse, il a été mis en évidence durant ces dix dernières années des saponosides tridesmosidiques (trois chaînes) ou tétradesmosidiques (quatre chaînes) [31]. La partie osidique de certains saponosides ainsi que les fonctions hydroxyles libres des géniens peuvent être substituées par des acides aromatiques ou aliphatiques.

II.2.2.1. Saponosides à génines stéroïdiques

Ils sont presque exclusivement présents chez les angiospermes monocotylédones et possèdent un squelette de 27 atomes de carbone qui comporte habituellement six cycles, Ce sont des dérivés des squelettes furostane ou spirostane et les alcaloïdes stéroïdiques des squelettes solanidanes et les spirosolanes (**figure 13**).

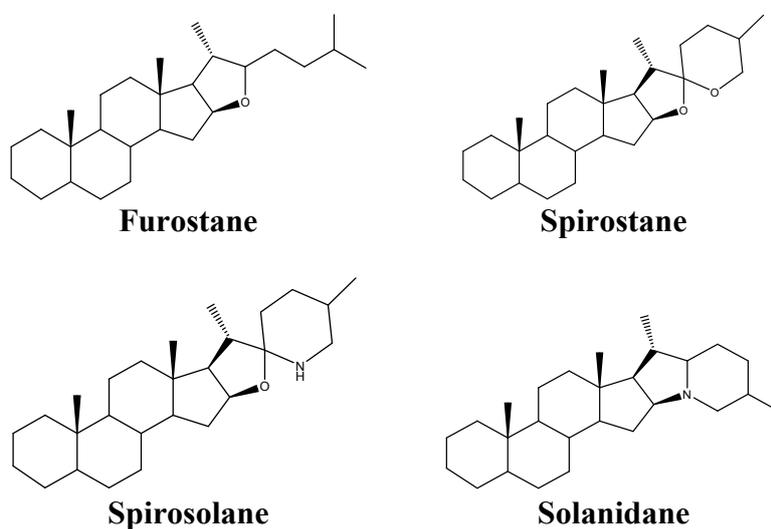


Figure 13 : Structures des squelettes stéroïdiques.

II.2.2.2. Saponosides à génines triterpéniques (squelette à 30 carbones)

Les saponosides triterpéniques sont rencontrés principalement chez les angiospermes Dicotylédones et quelques organismes marins tels que les étoiles de mer. Les sapogénines

triterpéniques sont soit tétracycliques (dammarane, cucurbitane, lanostane), soit pentacycliques (oléanane, ursane, lupane, friedelane, hopane, holostane) (**figure 14**). Leurs squelettes possèdent généralement un hydroxyle en position 3 et peuvent être diversement fonctionnalisés par des insaturations ou des hydroxyles. La formation de cycle supplémentaire est possible par étherification ou lactonisation [32, 33, 34].

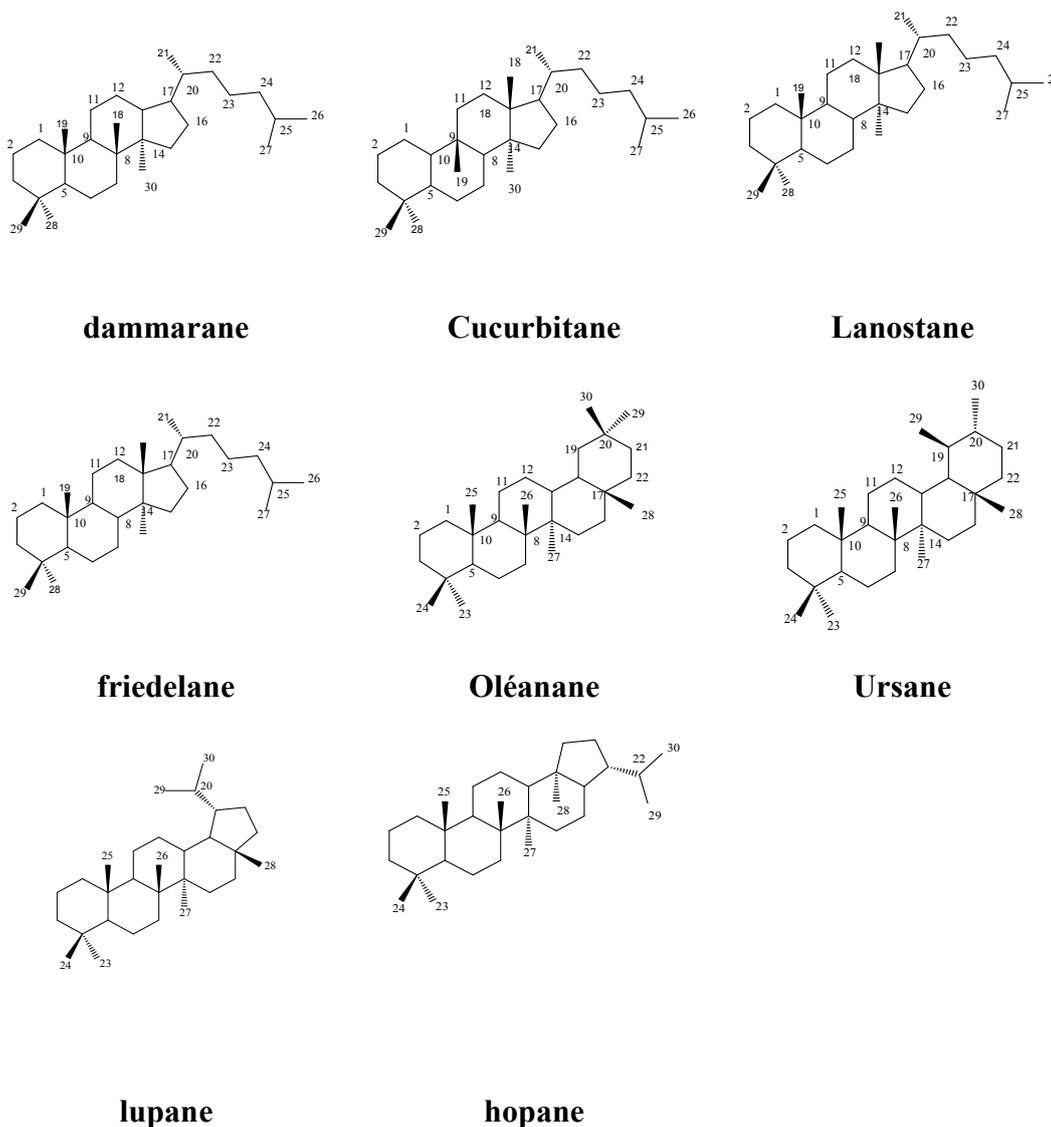


Figure 14 : Structures des squelettes triterpéniques.

II.2.2.3 Sucres

Le D-glucose, le D-galactose, le D-xylose, le D-fucose, le D-apiose, le L-arabinose, le L-rhamnose et l'acide D-glucuronique (**figure 15**) sont les oses les plus fréquemment rencontrés dans la structure des saponosides.

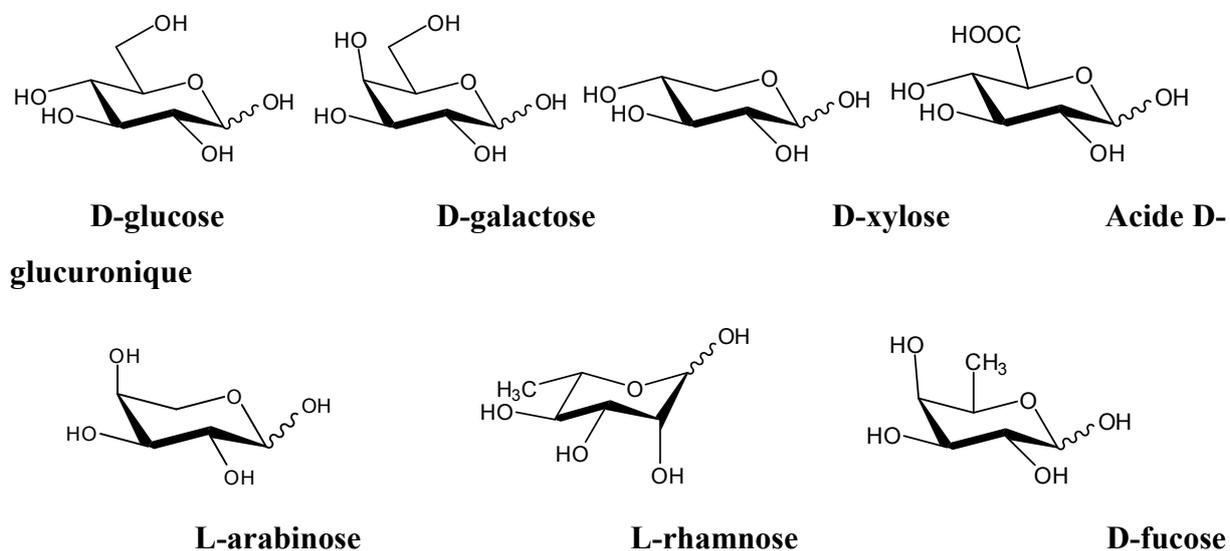


Figure 15 : les différents monosaccharides rencontrés dans les saponosides.

II.2.2.4 Acides organiques

Divers acides peuvent estérifier les saponosides au niveau de l'aglycone ou au niveau des sucres (**figure 16**). Ceux qui sont le plus fréquemment rencontrés sont les suivants [33] :

		R			
	Acide benzoïque	H			
	Acide salicylique	OH			
	Acide méthylnanthranilique	N- NH Me	R	R₁	R₂
	Acide cinnamique	H	H	H	
	Acide p-coumarique	OH	H	H	
	Acide méthoxycinnamique	4- OCH ₃	H	H	

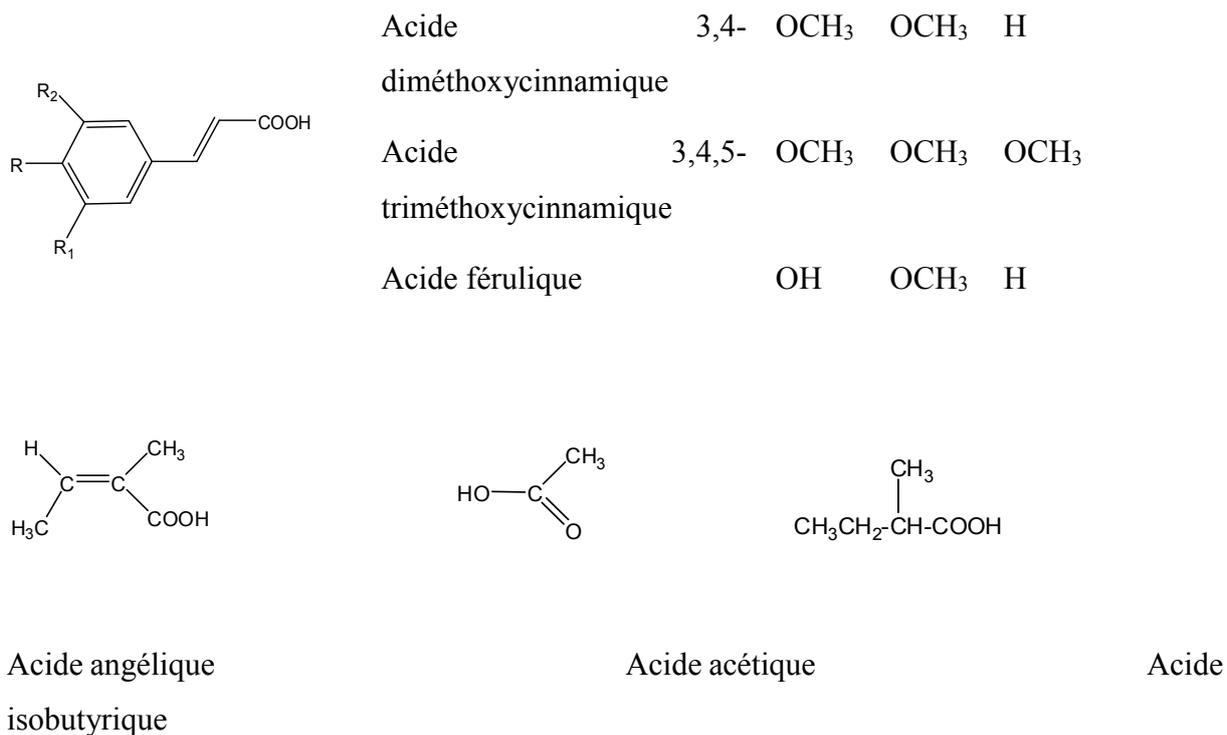


Figure 16: les différents acides organiques rencontrés dans les saponosides.

II.2.3. Distribution de saponines

Les saponines sont distribuées dans une large variété de produits alimentaires tels que l'asperge, les haricots, les mûres sauvages, les pois, les pommes de terre, la betterave sucrière et le thé et dans plusieurs familles de plantes Caryophyllaceae, Caryocaraceae et Fabaceae [35-38].

II.2.4. Biosynthèse des saponosides

La grande diversité structurale des saponines peut être expliquée par leurs origines biosynthétiques variées. En effet, à partir de l'oxydosqualène à 30 carbones (**figure 17**), la biosynthèse des génines triterpéniques et stéroïdiques est effectuée selon diverses voies métaboliques suivies de l'assemblage des différentes sections osidiques par des enzymes telles que les glycosyl transférases et les glycosidases. [39,33]

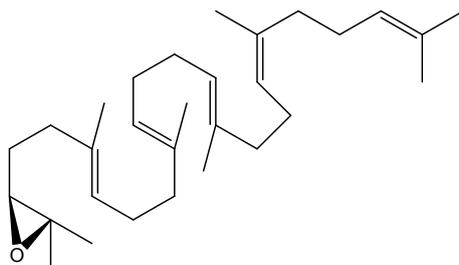


Figure 17: Structure du 2,3-époxydosqualène.

Par la suite, des modifications subséquentes peuvent avoir lieu sur la saponine dont, entre autres, des oxydations, réarrangements, méthylations et estérifications, ce qui augmente d'autant plus la possibilité de variations structurales à l'intérieur de cette classe de produits naturels.

II.2.5. Propriétés biologiques des saponosides

Reconnues pour avoir un fort potentiel pharmacologique, les saponines ont été intensivement étudiées au cours des dernières années. La communauté scientifique a démontré un intérêt marqué envers cette classe de métabolites secondaires afin d'accélérer le processus lié à leur développement biopharmaceutique. [40]. En effet, les saponines à génines stéroïdiques et triterpéniques exercent des activités biologiques très variées telles que : expectorante, anti-inflammatoire, anti-tumorale, chimiopréventive, antidiabétique, analgésique ainsi que des effets hépatoprotecteurs, neuroprotecteurs, antituberculeux [41] ou encore inhibiteurs de l'aggrégation plaquettaire [42].

Le nombre d'effets biologiques attribués aux saponosides ne fait qu'accroître d'année en année. Cependant, certaines propriétés mises en évidence dans le cas de certains saponosides, comme des propriétés immunoadjuvante, immunostimulante ou anti-cancéreuse [43,33,44] attirent particulièrement l'attention. En particulier, nous pouvons citer le cas des saponosides ayant des propriétés immunoadjuvantes rencontrées chez *Quillaja saponaria*. L'adjuvant est une substance ou un mélange de substances qui augmentent l'immunogénicité des antigènes. Ces molécules immunoadjuvantes pourraient alors être utilisées dans la formulation de nouveaux vaccins.

Nous limiterons donc notre étude bibliographique aux propriétés principales c'est-à-dire le pouvoir hémolytique, cytotoxique et immunomodulateur.

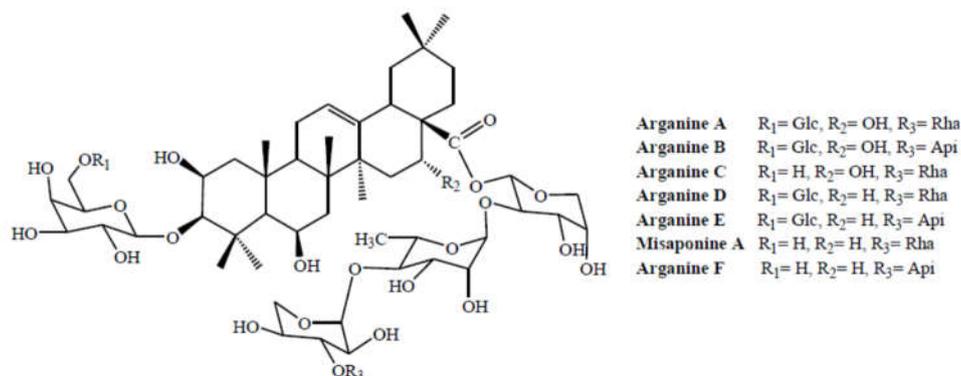
❖ **Hémolytique**

Depuis longtemps, les saponines sont réputées pour leur capacité à induire la formation de pores au travers des membranes cellulaires et ainsi entraîner l'hémolyse des globules rouges (érythrocytes). [45,46]

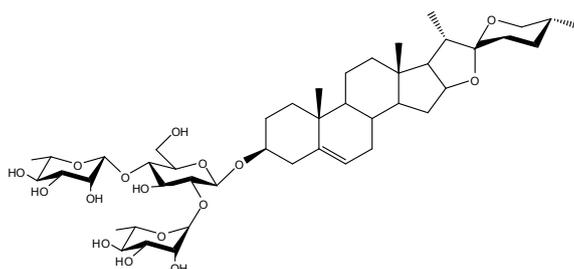
❖ **Cytotoxique et antitumorale**

De nombreuses études ont mis en évidence le caractère fortement cytotoxique, voir même antitumoral, de plusieurs saponines on y trouve :

- Les saponines d'*Argania spinosa* (Arganine A-F) ont une activité antiproliférative contre la lignée cellulaire PC3 (cancer de la prostate). [47]

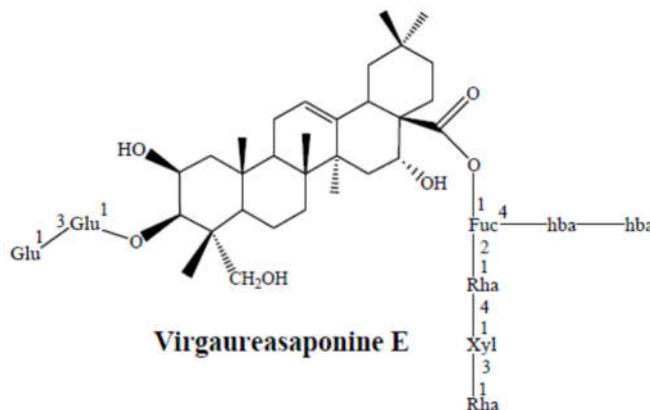


- La saponine stéroïdique, la dioscine, isolée d'un grand nombre de légumes et plantes de la médecine traditionnelle orientale exerce une activité antitumorale ainsi qu'un vaste spectre d'activités biologiques (antivirale, antifongique et anti-inflammatoire). [48]

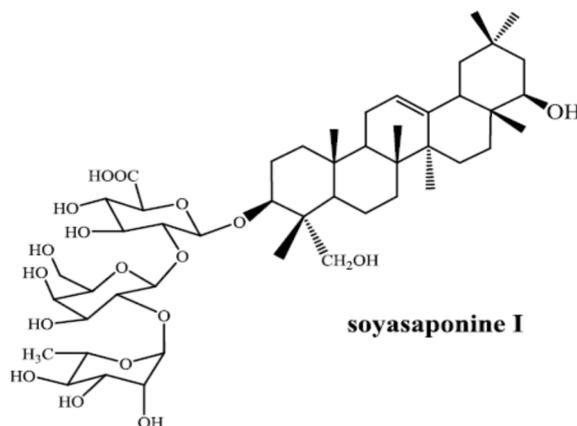


Dioscine

- Au niveau des saponines avec génine triterpénique, la Virgaureasaponine E exerce une activité anticancéreuse significative *in vivo* sur des souris porteuses d'un fibrosarcome. Dans cette expérience, la réduction de la taille de la tumeur est proportionnelle à la dose de la saponine administrée. [49]



- D'autres molécules inhibent l'activité d'enzymes particulières (sialyltransférases) impliquées dans le développement des métastases (cancer des poumons) comme la soyasaponine I. [50] Et plusieurs travaux ont suggéré que les saponines du soja présentent un effet protecteur vis-à-vis du cancer du côlon. [51]



❖ **Activité immunomodulatrice**

Actuellement, de nombreux nouveaux vaccins sont en cours de développement parallèlement à l'amélioration des vaccins déjà existants en vue de diminuer le nombre d'injections ainsi que les doses injectées. Il est donc nécessaire d'effectuer des recherches en vue de découvrir de nouvelles molécules qui auront un pouvoir immunostimulant plus important que leurs prédécesseurs. Parmi ces nouvelles molécules, les saponosides semblent être promis à un bel avenir. Nous citerons ici un rappel bibliographique sur les saponosides immunostimulants découverts [52].

Certains saponosides ont montré une activité immunostimulante sur divers types cellulaires. Ainsi, des auteurs ont mis en évidence le rôle immunostimulant *in vitro* des saponosides isolés de *Randia dumetorum*, qui augmente la prolifération *in vitro* de lymphocytes humains.

L'extrait brut de saponosides de *Q. saponaria*, la Quillayanine, Quil-A et l'acide glycyrrhizique ont tous montré la capacité à stimuler la prolifération des splénocytes de souris. Un effet sélectif a été mis en évidence sur les deux types cellulaires, les lymphocytes B et les lymphocytes T. Les saponosides isolés à partir des racines d'*Acanthophyllum squarrosum* ont montré un rôle immunomodulateur *in vitro* [53] et lymphoprolifératif sur cellules leucémiques humaines [54].

Chapitre :03

Activités Antioxydantes et Antioxydants

III.1. Généralités :

Nos cellules et tissus peuvent être soumis à une grande variété d'agression physiques (traumatisme, irradiation, hyper ou hypothermique), chimiques (acidose, toxines) et métaboliques (exposition à des xénobiotiques, privation d'un facteur hormonal ou facteur de croissance). La plupart de ces agressions débouchent sur une expression commune appelée stress oxydant, dû à l'exagération d'un phénomène physiologique, normalement très contrôlé, la production de radicaux dérivés de l'oxygène [55].

III.2. Stress oxydant

Le stress oxydatif, appelé aussi stress oxydant, se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les systèmes oxydants et les capacités antioxydantes de l'organisme en faveur des premiers, ce qui conduit à des dommages cellulaires irréversibles [56]. Le stress oxydatif est un fonctionnement de l'organisme qui est normal tant qu'il ne dépasse pas certaines limites. En effet, tous les organismes vivants qui consomment de l'oxygène produisent des radicaux libres qui sont de petites substances chimiques très oxydées par le contact avec l'oxygène, et dont nos cellules savent normalement très bien se débarrasser. Le stress oxydatif devient anormal lorsque les cellules sont soit dépassées par la quantité de radicaux libres à éliminer, soit ne disposent pas de ressources antioxydantes (vitamines, oligoéléments, enzymes) suffisantes pour les éliminer.

III.2.1. Différents types des radicaux libres :

Un radical libre est une espèce caractérisée par une instabilité et /ou un pouvoir oxydant fort, il se différencie par la présence d'un électron non apparié sur la couche électronique la plus externe. Parmi toutes les espèces réactives oxygénées (ERO) (**Figure 18**), on distingue un ensemble restreint de ces composés qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appelons les **radicaux primaires** à savoir : l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle ($\cdot OH$), le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}), le radical peroxyde (ROO^{\cdot}) et le radical alkoxyde (RO^{\cdot}). Les autres radicaux libres, dits **radicaux secondaires** telles que l'oxygène singulet 1O_2 , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le nitroperoxyde ($ONOOH$), se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule [57].

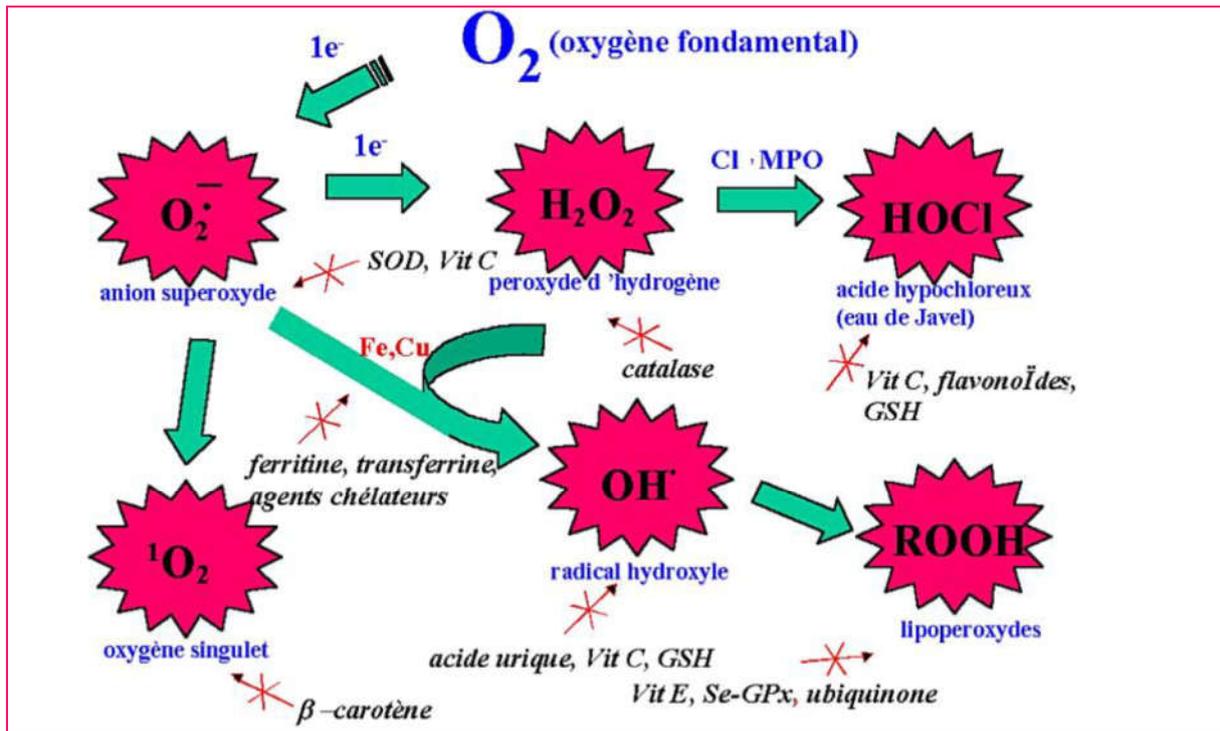


Figure 18 : Aperçu des espèces oxygénées activées (EOA) dérivant de l'oxygène et systèmes de protection permettant de limiter l'effet toxique de ces espèces. GSH : glutathion, Cl^- : anion chlorure ; MPO : myéloperoxydase, SOD : superoxyde dismutase, Se-GPx : glutathion peroxydase séléno-dépendante. [56].

III.2.1.1. Origine de production des ERO :

Les radicaux libres nocifs sont produits dans l'organisme au cours du métabolisme normal. Cette production augmente en rapport avec l'élévation de la consommation d'oxygène [58]. Plusieurs mécanismes et systèmes responsables de la production de radicaux libres ont été identifiés jusqu'à présent, parmi eux nous citons :

- ✚ Des fuites d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire de la mitochondrie [59].
- ✚ Des processus inflammatoires produits par les cellules phagocytaires activées [60 ;61]
- ✚ D'exposition à des agressions de l'environnement, comme les agents infectieux, la pollution, les UV, la fumée de cigarette et le rayonnement [62].

III.2.1.2. Conséquences biologiques des espèces réactives oxygénées

La surproduction des ERO est responsable des lésions directes des molécules biologiques ainsi que des lésions cytotoxiques et mutagènes par les produits libérés, notamment lors de l'oxydation des lipides.

L'anion radicalaire superoxyde comme le monoxyde d'azote ne sont pas très réactifs, mais constituent des précurseurs d'autres espèces plus réactives. Les radicaux hydroxyles sont au contraire les plus dommageables pouvant s'attaquer à toutes les molécules biologiques à savoir l'ADN, les protéines et les lipides [63 ;64]. En fait, Verdan et ses collaborateurs (2011) ont rapporté que la réaction de Fenton productrice de radicaux hydroxyles est la cause primaire de la mort cellulaire par l'endommagement de l'ADN.

Par ailleurs, la réactivité du peroxyde d'hydrogène réside dans sa capacité de traverser facilement les membranes cellulaires des organites dans le cytoplasme et par conséquent il oxyde un nombre élevé de composés et structures cellulaires [65].

III.2.2. Implications pathologiques du stress oxydatif

Le stress oxydatif est impliqué dans de très nombreuses pathologies (**figure 19**) comme facteur déclenchant ou associé à des complications [57]. Il peut être associé à l'athérosclérose, l'asthme, l'arthrite, la cataractogénèse, l'hyperoxie, l'hépatite, l'attaque cardiaque, les vasospasmes, les traumatismes, les accidents vasculaires cérébraux, les pigments d'âge, les dermatites, les dommages de la rétine, les parodontites et les cancers [66 ;67]. Néanmoins, la plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale des radicaux [57].

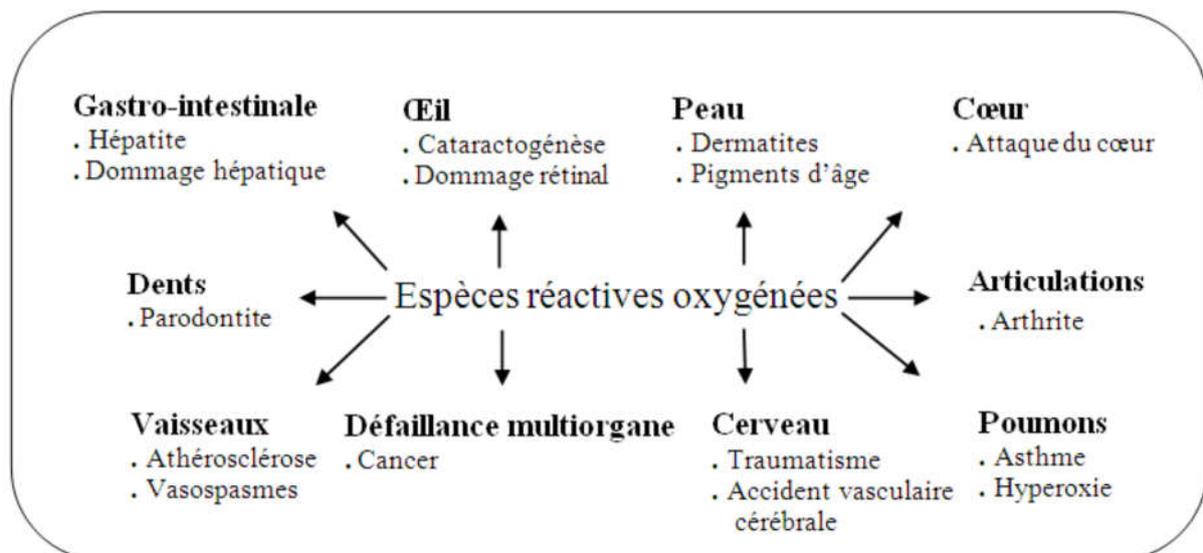


Figure 19 : Les pathologies associées aux espèces réactives oxygénées [68].

III.3. Antioxydants

Les antioxydants sont des agents de prévention, ils bloquent l'initiation en complexant les catalyseurs, en réagissant avec l'oxygène, ou des agents de terminaison capables de dévier ou de piéger les radicaux libres, ils agissent en formant des produits finis non radicalaires. D'autres en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation, en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puissent réagir avec un nouvel acide gras. Tandis que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singulet pour la transformer en chaleur. On peut distinguer plusieurs types d'antioxydants.

III.3.1 Antioxydants enzymatiques

Trois enzymes ont un rôle essentiel dans la détoxification des espèces réactives de l'oxygène. La superoxyde dismutase (SOD) catalyse la conversion de deux ions superoxydes et deux protons en peroxyde d'hydrogène et oxygène [69]. On la retrouve dans un grand nombre d'organismes vivants soulignant ainsi son importance [70].

La catalase transforme le peroxyde d'hydrogène en oxygène et eau, diminuant ainsi sa demi-vie et atténuant de ce fait la génération de radicaux hydroxyles. C'est un complexe tétramérique contenant un hème, localisé essentiellement dans les peroxysomes. La catalase est liée au NADPH qui la protège et améliore son activité [71].

La glutathion peroxydase catalyse l'oxydation du glutathion aux dépens du peroxyde d'hydrogène [72]. Elle peut aussi réagir avec d'autres substrats comme les lipides expliquant son rôle protecteur vis-à-vis de la peroxydation lipidique. Son site actif contient du sélénium et elle a besoin de glutathion réduit pour fonctionner. C'est une enzyme ubiquitaire. Dans la cellule, on la trouve essentiellement dans le cytosol et les mitochondries. C'est une des défenses antioxydantes les plus importantes de l'organisme [71].

III.3.2 Antioxydants non enzymatiques

Le glutathion est un tripeptide composé de cystéine, glutamine et glycine. C'est la plus importante des défenses antioxydantes en quantité et probablement en qualité. Il possède une activité antioxydante propre mais surtout en tant que cofacteur de la glutathion peroxydase. Une fois oxydé en glutathion disulfure, il est réduit par la glutathion réductase en présence de NADPH. Le couple glutathion disulfure/glutathion est le principal responsable thiol de la balance redox intracellulaire.

Les vitamines A, C et E ont aussi des propriétés antioxydantes. Les vitamines C et E permettent leur régénération mutuelle après oxydation (Article) [71]. En ce qui concerne les plantes médicinales bien connues et économiquement importantes, nous pouvons citer l'ail (*Allium sativum* L ; Liliaceae) et le ginkgo (*Ginkgo biloba* L ; Ginkgoaceae) qui sont utilisés dans le traitement des maladies cardio-vasculaires et circulatoires [73] pour leurs métabolites secondaires qui jouent le rôle d'antioxydant on peut citer comme exemple :

- Les polyphénols Plusieurs études épidémiologiques ont montré qu'il y a un rapport inverse entre la prise d'aliments riches en polyphénols (les fruits et les légumes) et le risque des maladies reliées à l'âge comme les maladies neurodégénératives [74 ;75] Cette relation est souvent attribuée aux puissantes activités anti-oxydantes des flavonoïdes et d'autres polyphénols associées à leurs propriétés redox permettant d'éliminer les effets d'espèces réactives de l'oxygène [76] ainsi que de chélater les différents métaux de transition [77]. Les flavonoïdes sont de puissants antioxydants vis-à-vis des radicaux libres dus à leur propriété de donation d'atomes d'hydrogène disponibles dans les substituants hydroxyles de leurs groupes phénoliques [78]. Leur capacité de donation d'hydrogène augmente avec l'augmentation de l'hydroxylation de leurs cycles phénoliques.
- Le glutathion est un tripeptide composé de cystéine, glutamine et glycine. C'est la plus importante des défenses antioxydantes en quantité et probablement en qualité. Il possède une activité antioxydante propre mais surtout en tant que cofacteur de la glutathion peroxydase. Une fois oxydé en glutathion disulfure, il est réduit par la glutathion réductase en présence de NADPH. Le couple glutathion disulfure/glutathion est le principal responsable thiol de la balance redox intracellulaire [71].
- Les vitamines A, C et E ont aussi des propriétés antioxydantes. Les vitamines C et E permettent leur régénération mutuelle après oxydation (Article) [71].

III.4. Méthodes de détermination de l'activité antioxydante

Il existe plusieurs méthodes qui ont été mises au point pour l'estimation *in vitro* du pouvoir antioxydant d'un échantillon, on citera les méthodes les plus utilisées :

III.4.1. Méthode du DPPH.

Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH.) est un radical stable et de couleur violette en solution, il fut l'un des premiers radicaux libres utilisés dans l'étude visant à déterminer la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques [79]. Le DPPH est réduit en présence d'une substance réductrice (antioxydante) pour donner la couleur jaune du

diphénylpicrylhydrazine. Cette réduction est suivie par spectrophotométrie UV, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517nm ; ce qui nous permet de mesurer le pouvoir antiradicalaires de l'échantillon testé (**Figure 20**).

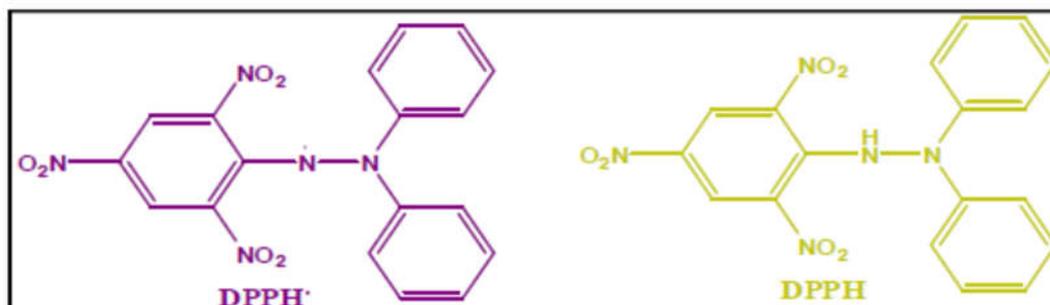


Figure 20 : La forme réduite DPPH et la forme radical DPPH•.

III.4.2. La décoloration ABTS, acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6- sulfonique) (ABTS^{•+})

L'ABTS^{•+} est un radical libre stable. Il est très utilisé pour évaluer le pouvoir antioxydant des fluides biologiques, des huiles essentielles, des extraits ou bien des composés purs [80]. Ce radical cation est facilement formé par oxydation en présence de persulfate de potassium pour donner une solution colorée en vert-bleu (**figure 21**). Le radical formé est stable avec des coefficients d'extinction molaire élevés à 416, 650 et 734 nm. La concentration de ce radical peut être déterminée en mesurant l'absorbance à ces longueurs d'onde [81].

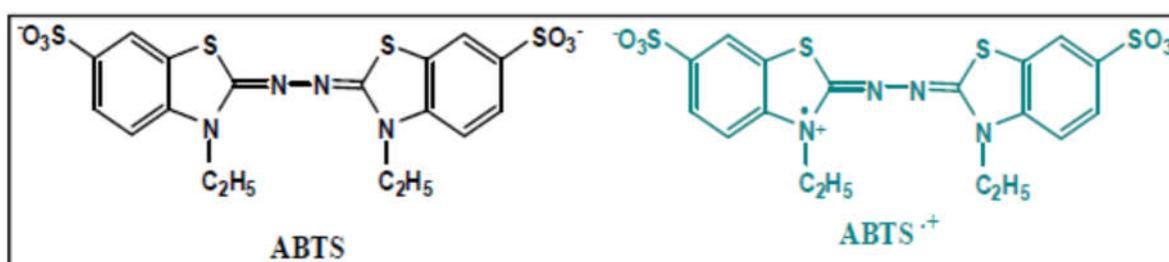


Figure 21 : La forme réduite ABTS et la forme radicale de cation ABTS^{•+}

III.4.3. Méthode du CUPRAC

La méthode CUPRAC (cupric ion Reducing Antioxidant Capacity) [82] est utilisée pour la réduction du Cu(II) et par le traitement du Cu(I) avec un réactif chromogène Néocuproïne (NC) (2,9 -diméthyl- 1,10-phénanthroline) [83]. Le principe de cette méthode est basé sur la

conversion des hydroxyles phénoliques en quinones par la réduction du complexe Cu^{+2} -Nc, produisant un complexe chromogène de Cu^{+2} -Nc qui absorbe à 450 nm (**Figure 22**).

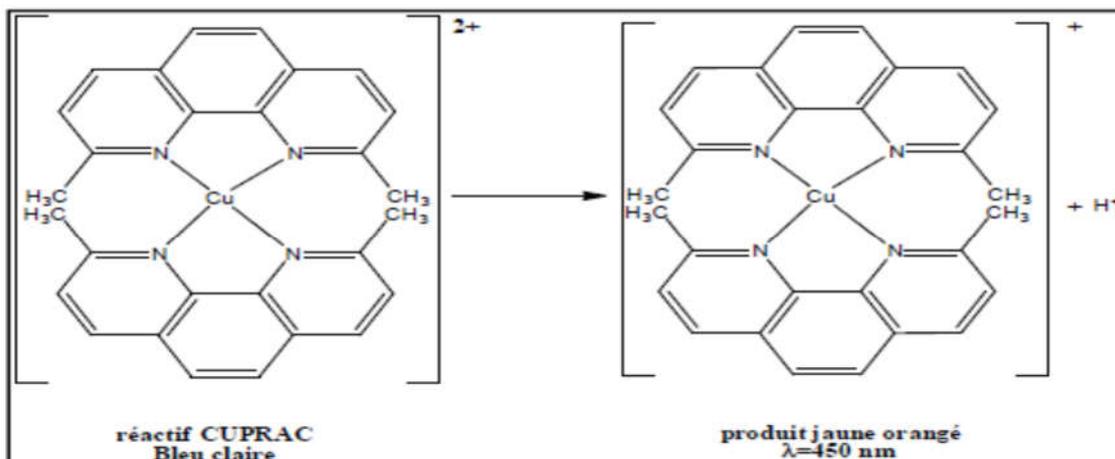
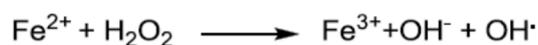


Figure 22 : Réaction de CUPRAC par une molécule antioxydante.

III.4.4. Chélation des ions métalliques

L'efficacité des ions ferreux (Fe^{2+}) permis la protection contre les méfaits oxydatifs par l'élimination du fer, ce dernier participe autrement à la génération du HO^\bullet dans la réaction Fenton (réaction d'oxydation aboutissant à la formation du radical hydroxyle) [84].



Cette méthode est basée sur la mesure d'absorbance de la formation du complexe Fe (II)-Ferrozine après le traitement des échantillons avec les ions Fe^{2+} , elle est déterminée selon la méthode de Decker et Welch [85]. Les ions libre Fe^{2+} et Ferrozine forment un complexe [Ferrozine - Fe^{2+}] qui donne un chromophore rouge qui absorbe à λ 562 nm [84].

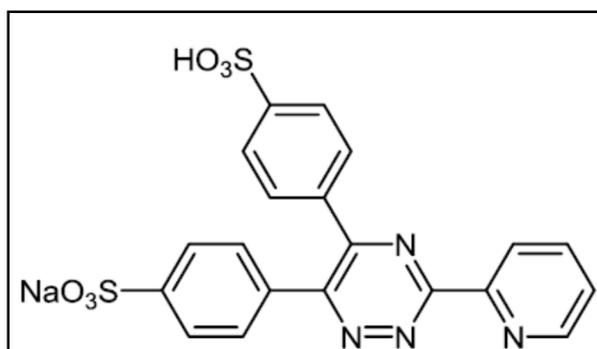


Figure 23 : structure chimique du Ferrozine.

III.4.5. Le piégeage du radical superoxyde par la méthode de DMSO alcalin

Dans la méthode DMSO alcalin, un radical superoxyde O_2 est généré par l'addition d'hydroxyde de sodium à l'air saturé DMSO. Le superoxyde généré reste stable dans la solution, qui réduit le nitro bleu tétrazolium (NBT) de couleur jaune en formazan de couleur pourpre qui absorbe à 560 nm à température ambiante [86].

Ainsi, un composé antioxydant capable de capturer l'anion superoxyde empêchera la formation du bleu de formazan et la solution restera jaune. Cependant, cette méthode ne convient pas aux réactions avec des constantes de vitesse lente et nécessite la présence d'un équipement approprié [87]. L'intérêt pour la capacité de piégeage de l'anion superoxyde est largement dû à son rôle dans la production du radical hydroxyle hautement réactif en présence d'ions métalliques. Cependant, ce n'est pas le seul mécanisme d'oxydation des lipides, et la capacité à piéger l'anion superoxyde n'est pas nécessairement efficace pour empêcher l'oxydation des lipides [88].

Chapitre : 04
Partie Expérimentale

IV.1. Aperçu et but de travail

Après l'extraction des parties aériennes, l'extrait brut d'*Anthericum* a été fractionné en utilisant la technique de chromatographie liquide sous vide ur phase inverse (VLC). Ce fractionnement, suivi de plusieurs étapes de séparation et purification chromatographiques, conduisant à l'isolement et l'identification de **2** flavonoides purs.

Notre étude a porté aussi sur le dépistage de l'activité antioxydante par 4 méthodes (DPPH^{*}, ABTS⁺, DMSO alcalin, et CUPRAC) de l'extrait brut méthanolique ainsi que des fractions chromatographiques provenant de cet extrait.

IV.2. Matériel et méthode

IV.2.1. Matériel végétale

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

Les parties aériennes d'*Anthericum* ont été récoltées dans la région de Djebel El Ouahch (une région montagneuse située à 7 Km l'Est de la ville de Constantine). (**Figure 24**) au mois de Mai 2017. La plante a été identifiée par Mr KABOUCHE Kamel. Après l'avoir séché dans un endroit sec, le matériel végétal est ensuite réduit en poudre fine à l'aide d'un broyage électrique.



Figure 24 : Djebel El Ouahch Wilaya de Constantine. [89]

IV.2.2. Méthodes d'analyses phytochimiques

IV.2.2.1. Méthodes chromatographiques

IV.2.2.1.1 Chromatographie sur couche mince (CCM)

Dans ce travail les analyses par chromatographie sur couche mince ont été effectuées sur des plaques prêtes à l'emploi à support en aluminium en phase normale Kieselgel 60 F254 Merck, 250 µm (20 x 20 cm). Après développement dans des cuves en verre, les plaques sont observées à la lumière et sous lampe UV à 254 et 365 nm dans une chambre noire. Les systèmes solvants utilisés (la phase mobile) sont choisis selon la polarité des molécules à séparer. Cette phase mobile est constituée d'un mélange binaire ou tertiaire de solvants selon le type de séparation souhaitée. L'observation des CCM s'effectue en lumière visible et sous UV (254 et 365 nm), avant la révélation par un révélateur à base de la vanilline sulfurique (1 g de la vanilline, dissous dans 100 mL de l'éthanol additionnée 2 mL d'acide sulfurique).

IV.2.2.1.2. Chromatographie liquide sous vide (VLC)

Cette technique a pour but d'obtenir un fractionnement grossier de l'extrait brut. Elle est rapide et elle permet de consommer moins de solvants que dans les méthodes de chromatographies classiques. La silice greffée Lichroprep RP-18 Merck, est mise dans un entonnoir cylindrique filtrant sur verre fritté n° 4. Ce dernier est fixé sur une fiole à vide dans laquelle les fractions sont rassemblées par application du vide à l'aide d'une pompe

IV.2.2.1.3. Chromatographie sur colonne ouverte (CC)

Les phases stationnaires utilisées dans cette étude pour la CC sont le gel de silice en phase normale (Kieselgel Merck® 70-230 mesh et le polyamide SC6. La taille et le diamètre de la colonne sont choisis en fonction de la quantité d'échantillon à purifier et de la résolution souhaitée. Le choix de la phase stationnaire, les dimensions de la colonne, les conditions d'élution, le débit, la pression et le volume des sous-fractions recueillies ont été établis sur la base d'analyse par CCM et la masse de l'échantillon à étudier.

IV.2.3. Méthode physico-chimique

IV.2.3.1. Spectrophotométrie UV-visible

Les spectres UV-visible des composés isolés sont enregistrés dans le MeOH sur un spectrophotomètre (NICOLET evolution 100). Grâce à son monochromateur le lecteur offre une grande sensibilité aux essais.

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

IV.2.3.2. Spectroscopie de RMN

Les spectres RMN sont enregistrés sous forme d'expériences monodimensionnelles et bidimensionnelles. Chaque expérience fournit des informations spécifiques à la détermination structurale des composés isolés.

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone (RMN ^1H et ^{13}C) ont été enregistrés à 500 et 125 MHz (Bruker Avance DRX-500) du laboratoire de pharmacognosie, Institut de Chimie Moléculaire de Reims ICMR (France), Le logiciel Topspin 3.2 est utilisé pour le traitement et l'exploitation des données spectrales.

Les échantillons ont été solubilisés dans le solvant deutéré CD_3OD dans des tubes analytiques de 5 mm de diamètre. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm et les constantes de couplage en Hz.

IV.3. Etude phytochimique de la plante du genre *Anthericum*

IV.3.1. Extraction par macération à froid

Le matériel végétal, sèche et broyé (300 g) a été macéré dans un mélange hydro alcoolique: Méthanol/Eau ; (80 : 20, (v/v), 6L), pendant 24 heures à température ambiante puis filtrée et concentrée sous pression réduite à 45°C (cette opération a été répétée trois fois). On obtient l'extrait brut hydrométhanolique qui est pesé et conserve (21 g) (**Figure 25**).



Figure 25 : Macération hydro-alcoolique (à gauche) et l'extrait méthanolique (à droite).

IV.3.2. Séparation et purification

IV.3.2.1. Séparation grossière de l'extrait brut

Une partie de l'extrait brut obtenu (10 g) a été soumis à une chromatographie liquide sous vide (**figure 26**) en phase inverse C₁₈ en utilisant un gradient H₂O-MeOH (70 :30, 60 :40, 40 :60, 20 :80), (tableau02). Des fractions de 200 ml (*3) sont recueillies pour chaque mélange.

Avant d'entamer la séparation chromatographique, nous avons procédé à des tests chromatographiques sur couche mince de gel de silice normale avec les systèmes 80/20 et 70:30:5 (CHCl₃ : MeOH : H₂O). Les CCM ont été examinées à la lumière UV et révélées à la vanilline sulfurique à 1% puis chauffées à 100 °C. Les fractions 70:30 (3) , 60:40 (1) , 60:40 (2) , 60:40 (3) (**figure 27**) ont été récoltées après rassemblement des fractions présentant des similitudes (**tableau 02**).

Tableau 02 : VLC sur C₁₈ de l'extrait méthanolique des parties aériennes de *Anthericum*

Eluant: MeOH – H ₂ O	Fractions collectées	Masse (g)
70-30	F1	2,2808
	F2	7,7879
	F3	1,1327
60-40	F1	0,1429
	F2	0,9529
	F3	0,2958
40-60	F1	1,9636
	F2	0,9424
	F3	0,4299
20-80	F1	2,084
	F2	0,3636
	F3	0,2356
100 :0	F1	/



Figure 26 : fractionnement de l'extrait brut par VLC (à gauche), profil CCM de l'extrait méthanolique (à droite).

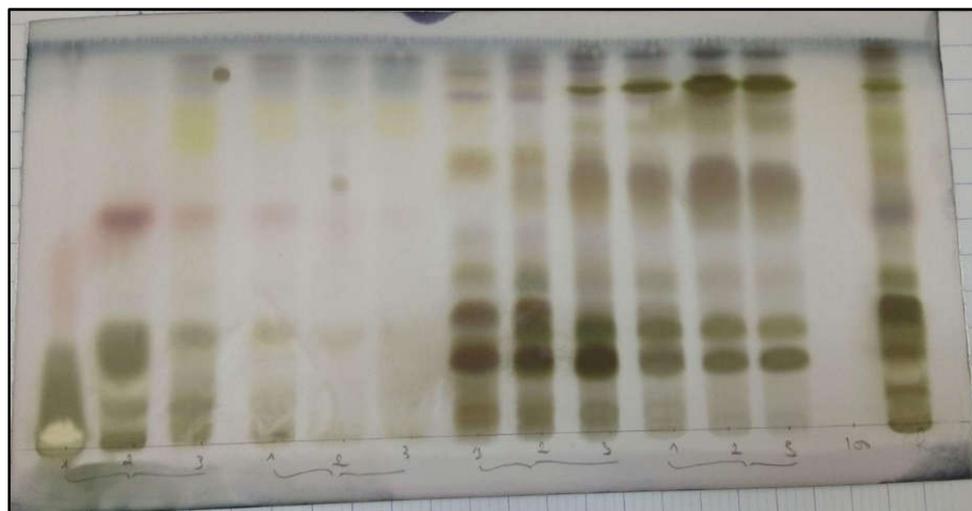


Figure 27 : Plaques CCM récapitulatives des fractions de la VLC.

Une grande similitude est observée entre le profil CCM les fractions : 70 :30 (3) =1,13 g, 60 :40 (1) =0,14 g, 60 :40 (2) = 0,95 g et 60 :40 (3) = 0,295 g, nous a permis de réunir ces 4 fractions pour donner la fraction F1-4.

Nous avons choisi à étudier cette dernière car le profil CCM a montré une richesse en polyphénols.

- **La fraction F1-4 :**

La fraction **F1-4** (2,5 g) a été soumise à une chromatographie sur colonne de polyamide (**figure 28**). L'élué est réalisé par le chloroforme puis par un mélange toluène/méthanol (100:0 à 70:30). Des fractions de 50 mL ont été recueillies, examinées par CCM avec le système

AcOEt /MeOH/H₂O (100:10 :5) comme éluant, pour être finalement rassemblées en 26 sous fractions.



Figure 28 : chromatographie sur colonne de polyamide de la fraction F1-4.

- **La sous fraction F18 :**

Le fractionnement de sous fraction f₁₈ (896 mg) a été mené sur une colonne de gel de silice en phase normale (**figure 29**), éluée par un mélange isocratique AcOEt /MeOH/H₂O (100:10 :5). L'analyse par CCM (éluant : AcOEt /MeOH/H₂O (100:20 :10)) des fractions obtenues a permis de les regrouper en 20 sous lots. Le sous lot 19 (30 mg) est mis à chromatographier sur une colonne de gel de silice normale. L'éluion réalisée par le système isocratique AcOEt /MeOH/H₂O (100:10 :5) a permis de recueillir les composés **AN1** (2 mg), **AN2** (xx mg) et **AN3** (6mg) à l'état pur.



Figure 29 : chromatographie sur colonne de gel de silice de la sous fraction F18.

IV.4. Activité anti-oxydante

L'étude de l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique et des différentes fractions de la VLC des parties aériennes d'*Antericum* est testée selon cinq essais complémentaires à savoir

- ◆ L'activité antiradicalaire pour le radical libre DPPH[•]
- ◆ L'activité antiradicalaire pour le radical-cation ABTS^{•+}
- ◆ L'activité antiradicalaire pour le radicale superoxyde O₂^{•-} par la méthode DMSO alcalin
- ◆ Le pouvoir réducteur de cuivre CUPRAC
- ◆ Métal chélate

Les résultats, sauf pour le dosage CUPRAC et pouvoir réducteur, ont été enregistrés à la concentration 50% d'inhibition (IC₅₀). L'activité antioxydante des extraits testés a été comparée à celles des standards (α -tocophérol, le BHA et de l'EDTA).

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

IV.4.1. Activité antiradicalaire DPPH

Cette activité est déterminée selon la méthode de Blois (1958) avec une légère modification [90]. Un volume de 40 μL de différentes concentrations de chaque échantillon ainsi que l'antioxydant standard (α -tocophérol, BHA), est déposé en triplicata sur une microplaque à 96 puits, en ajoutant sur chaque puits un volume de 160 μL d'une solution méthanolique de DPPH (0,4mM). Le contrôle négatif est préparé en parallèle, en mélangeant 40 μL du méthanol avec 160 μL d'une solution méthanolique de DPPH, à la même concentration utilisée.

Après incubation à température ambiante à l'obscurité pendant 30 min, la microplaque est insérée dans le spectrophotomètre pour mesurer l'absorption à 517nm. La capacité à piéger le radical DPPH a été calculée selon l'équation suivante :

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

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

IV.4.2. Test de décoloration de radical cation ABTS^{•+}

Le radical cation ABTS est généré en mélangeant 7 mM d'une solution aqueuse d'ABTS avec 2,45 mM de persulfate de potassium, le tout est conservé à l'abri de la lumière et à la température ambiante durant 16 h avant utilisation. Avant l'utilisation du radical ABTS^{•+}, la solution obtenue est diluée avec l'éthanol pour obtenir une absorbance de $0,7 \pm 0,025$ à 734 nm. 160 µl de cette solution fraîchement préparée sont ajoutés à 40 µl de différentes concentrations de chaque échantillon, ainsi que l'antioxydant standard α -tocophérol déposés déjà en triplicata sur une microplaque à 96 puits. Un blanc est parallèlement préparé suivant les mêmes volumes tout en mettant du méthanol à la place de l'échantillon testé. L'absorbance est ensuite mesurée à 734 nm après 10 minutes d'incubation [91].

La capacité de piégeage de L'ABTS^{•+} a été calculée en utilisant l'équation suivante:

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

IV.4.3. Test de piégeage du radical superoxyde O₂^{•-} par la méthode DMSO alcalin

L'activité Superoxyde DMSO alcalin est déterminée par la méthode établie par [92]. Brièvement, 40 µl de chaque échantillon et de standard sont mixés à 130 µl de DMSO alcalin puis à 30 µl de NBT dans chacun des puits de la microplaque. Après avoir soumis les mélanges réactionnels à une agitation, l'absorbance est mesurée à 560 nm. Il faut noter que chaque dépôt est triplé aussi bien pour les extraits que pour le blanc.

Le pourcentage de l'activité antiradicalaire est calculé selon la formule suivante :

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

IV.4.4. Réduction cuprique (CUPRAC)

La réduction du cuivre a été mesurée par la méthode CUPRAC décrite par Apak et al. 2004 [82]. Une solution de : 50 µL Cu (II) (10 mM), 50 µl neocuprine (7,5 mM), et 60 µL de solution tampon NH₄Ac (1 M, pH = 7,0) est préparée. Différentes concentrations d'extrait ont été ajoutées au mélange initial jusqu'à un volume final de 200 µL. Les microplaques de 96 puits ont été mises à l'abri de la lumière, et après 1 h, l'absorbance est mesurée à 450 nm. L' α -tocophérol et le BHT ont été utilisés comme standards. Les résultats ont été calculés à titre de A0.5 (µg / mL) correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance.

IV.4.5. Chélation des ions ferreux

L'activité de chélation des ions Fe²⁺ a été mesurée en utilisant le Ferrin [85]. La solution des extraits à différentes concentrations (40 µl) a été ajoutée à 40 µl EtOH, 40 µL FeCl₂ (0.2 mM) et 80 µL Ferène (0.5 mM). L'absorbance a été mesurée après 10 min à 562 nm. Les résultats ont été donnés en pourcentage d'inhibition et l'activité a été calculée en utilisant l'équation suivante:

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

IV.5. Analyse statistique

Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyennes ± déviation standard (SD). Les valeurs de IC₅₀/A_{0,5} ainsi que les représentations graphiques ont été réalisées par Excel. Plus elles sont petites, plus l'activité antioxydante des extraits est grande.

Chapitre : 05

Résultats et Discussion

V.1. Rendement d'extrait brut

Le rendement d'extraction correspond au pourcentage des principes actifs dissouts dans un solvant organique et/ou aqueux utilisé pour l'extraction. Il est déterminé à partir du poids de l'extrait sec par rapport au poids de la matière végétale sèche réduit en poudre [93]. Le rendement est exprimé en pourcentage massique par rapport à la quantité de matière sèche selon la formule :

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

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

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

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

Le processus de macération nous a permis d'extraire à partir de 300 g (M0) des parties aériennes de la plante du genre *Anthericum* une masse (M1) de 21 g de couleur marron foncée très visqueuse, qui donne un rendement à l'ordre de 7%.

V.2. Séparation et purification

Les fractions 70 :30 (3), 60 :40 (1,2 et 3) sont jugés intéressants au vu de leur profil CCM. Cette constatation nous a conduit à les choisir pour une investigation chimique approfondie. Les séparations et purifications des composés contenus dans ces fractions ont nécessité l'utilisation de différentes techniques chromatographiques (VLC, CC et CCM) et l'usage de deux phases stationnaires (gel de silice phase normale et polyamide), ainsi qu'une vaste gamme de solvants.

V.3. Identification structurale des composés isolés

L'identification structurale des composés isolés (AN1 et AN3) a été réalisée en employant diverses méthodes d'analyse spectroscopiques : RMN ¹H, RMN ¹³C, HSQC, COSY, HMBC, UV-VIS ainsi que par comparaison avec les données de la littérature.

V.3.1. Le composé AN1

Le composé AN1 se présente sous forme d'une poudre jaune et se révèle en jaune après révélation par une solution acide et chauffage à 100 °C. Sa fluorescence noire violette sous lampe UV à 365 nm est caractéristique d'une flavone ou d'un flavonol substitué en 3 (3-OR)

Cette hypothèse structurale est confirmée sur le spectre UV (**Figure 30**) enregistré dans le méthanol, par la présence de deux bandes d'absorption maximale à 347 nm (bande I) et 254 nm (bande II).

Un effet bathochrome, observe après l'ajout de NaOH ($\Delta\lambda = 55$ nm) avec une augmentation d'intensité, indique la présence d'un OH libre en position 4'. L'apparition d'une nouvelle bande dans le même spectre à 329 nm suggère la présence d'un OH libre en position 7.

L'addition de NaOAc a la solution méthanolique induit un effet bathochrome de la bande II de 16 nm confirmant ainsi la présence d'un OH libre en position 7.

L'addition de H₃BO₃, a la solution MeOH+NaOAc provoque un effet bathochromique de la bande I ($\Delta\lambda = 23$ nm), indiquant la présence d'un système 3',4'-ortho di-OH sur le cycle B, cela est confirmé par le déplacement hypsochrome de la bande I ($\Delta\lambda = -33$ nm) induit après l'ajout de HCl a la solution MeOH+AlCl₃.

L'effet bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = 73$ nm) observe sur le spectre enregistré dans MeOH+AlCl₃ par rapport au spectre enregistré dans MeOH indique la présence d'un Groupement OH libre en position 5 (tableau).

Les données relatives à la série spectrale UV sont rassemblées dans le tableau 03 :

Tableau 03 : données spectrales UV du composé AN1

Solvants-réactifs	λ_{\max}		
	Bande I (nm) cycle B	Bande II (nm) cycle A	Autres bandes
MeOH	347	254	
NaOH	402	267	329
AlCl ₃	420	271	
AlCl ₃ + HCl	387	274	
NaOAc	362	270	
NaOAc + H ₃ BO ₃	370	262	

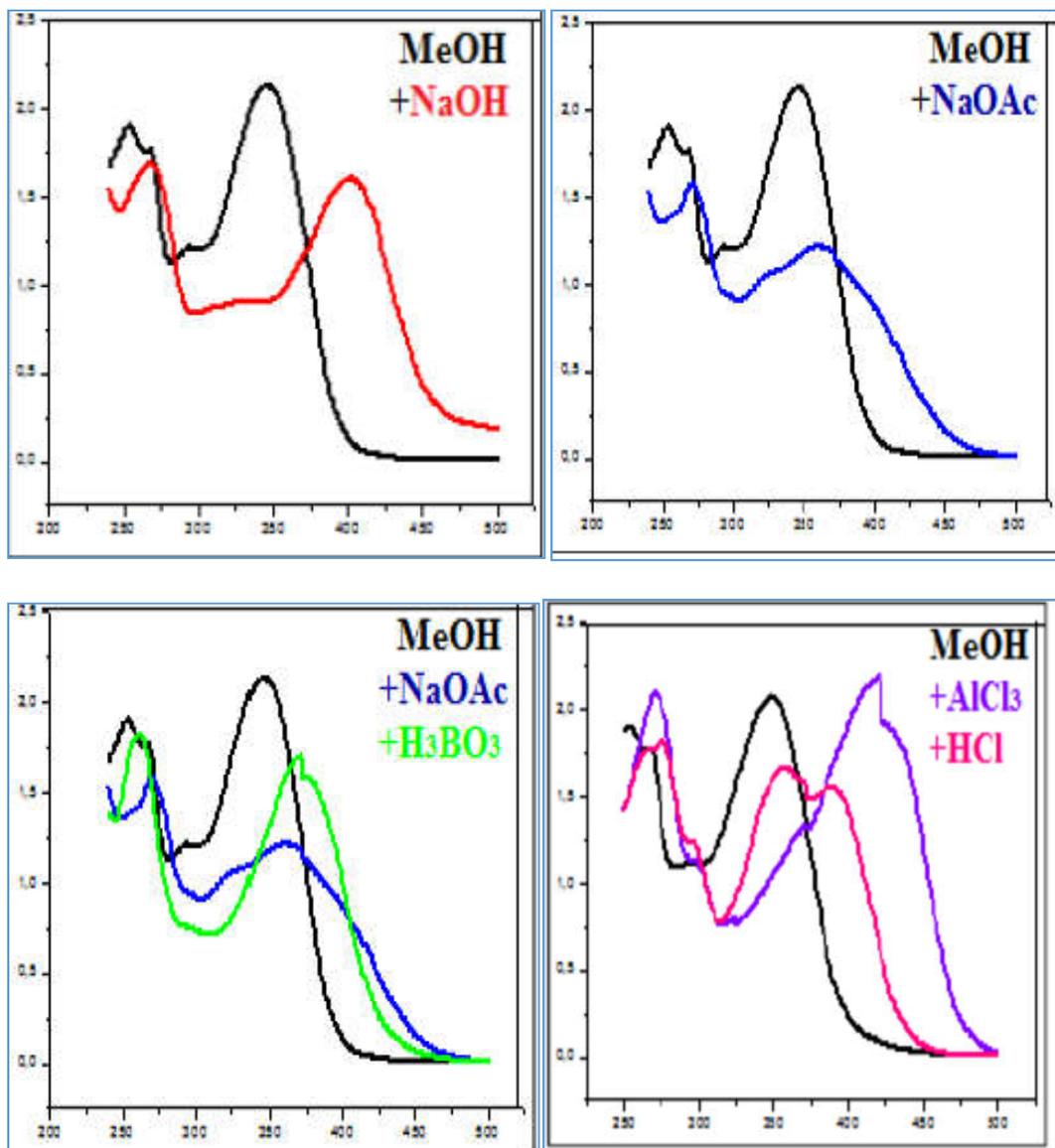


Figure 30 : Série spectrale UV du composé AN1.

Ces données spectrales UV sont en accord avec celles rapportées dans la littérature pour la Lutéoline (figure 31) [94].

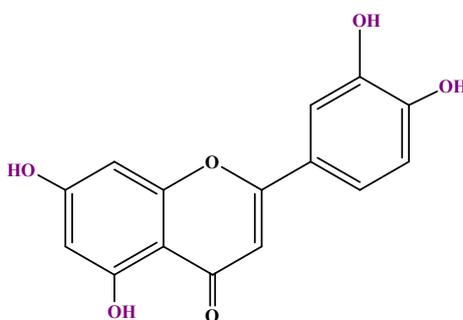


Figure 31 : Structure de la lutéoline.

L'examen du spectre RMN ^1H enregistré dans MeOH (**figure 32**) confirme le squelette de la lutéoline [95,96] caractérisé par :

- Un singulet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 6,57$ ppm attribuable à H-3.
- Deux doublets d'intégration 1H chacun à $\delta_{\text{H}} = 6,23$ ppm et $\delta_{\text{H}} = 6,47$ ppm avec une constante de couplage ($J = 2,0$ Hz) attribuable à H-6 et H-8 respectivement, confirmant ainsi l'hydroxylation des positions 5 et 7 du noyau A.
- Un signal à $\delta_{\text{H}} = 7,42$ ppm d'intégration 2H attribuable à H-2' et H-6', ce signal correspond en fait à deux signaux superposés l'un deux sous forme d'un doublet de double ($J=7,1$ Hz, $J=2,0$ Hz) caractérisant H-6' et l'autre sous forme d'un doublet ($J = 2,0$ Hz) caractérisant H-2', ce signal confirme l'hydroxylation des positions 3' et 4' du cycle B. par ailleurs, le signal sous forme de doublet qui apparaît à $\delta_{\text{H}} = 6,94$ ppm ($J = 8,9$ Hz) est attribuable à H-5'.

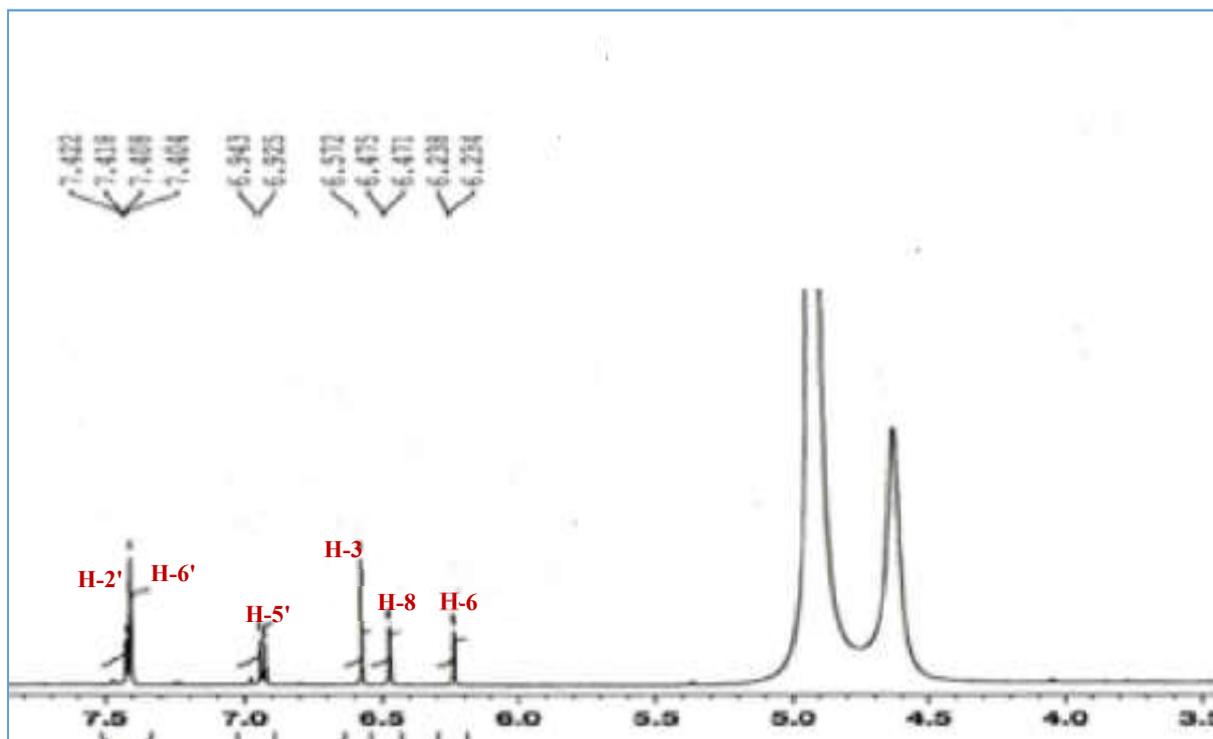


Figure 32 : Spectre de RMN ^1H du composé AN1.

Le spectre COSY du composé AN1 montre les corrélations entre H-6 et H-8, ainsi que celles entre H-6' et H-2', H-5' (**figure 33**).

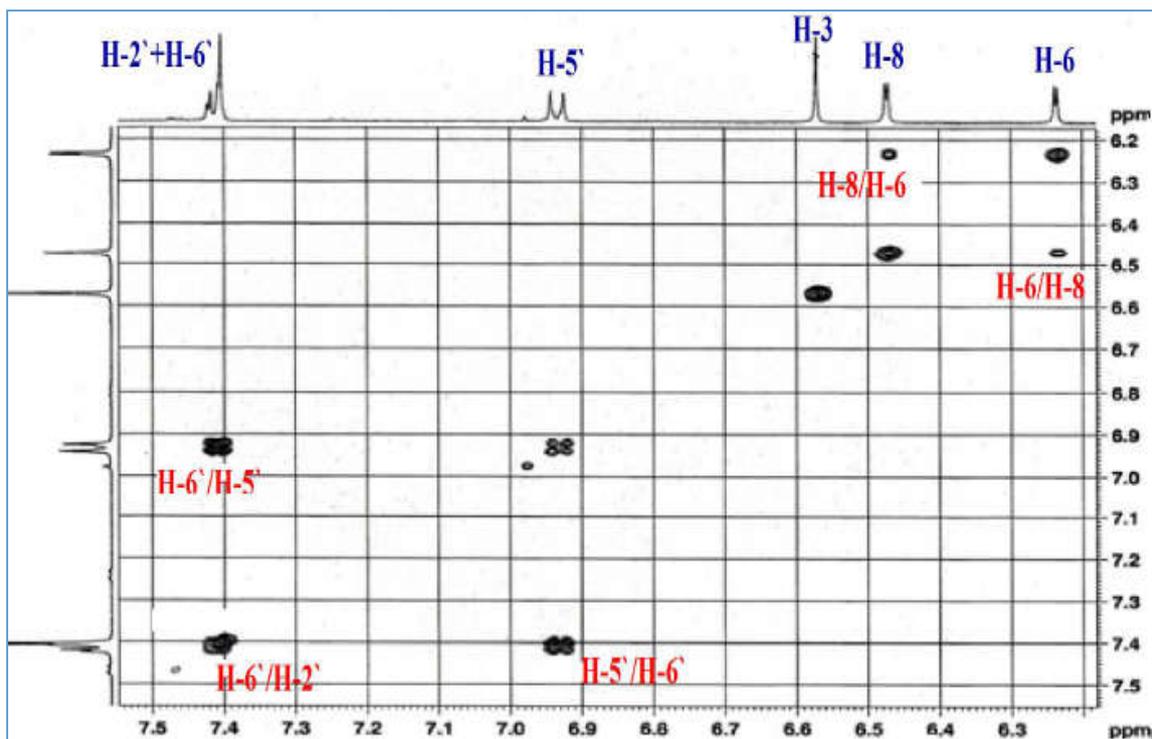


Figure 33 : Spectre COSY du composé AN1.

L'ensemble des données spectrales accumulées, et la comparaison avec les données de la littérature permettent d'assigner pour le composé AN1 la structure 5, 7, 3', 4'-tétra hydroxy flavone connu sous le nom de la lutéoline. Ce composé est très connu, il a été isolé de l'espèce *Anthericum* [18] (Figure 34).

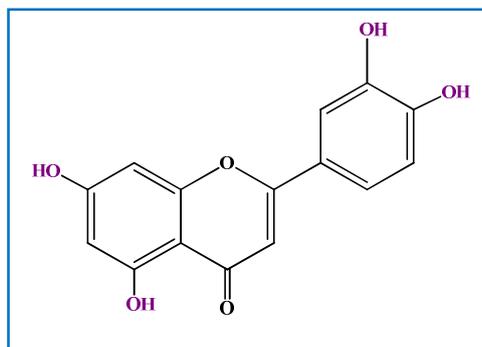


Figure 34 : 5, 7, 3', 4'-tétra hydroxy flavone (lutéoline) AN1.

Les déplacements chimiques des protons et carbones du composé AN1 sont rassemblés dans le tableau 04.

Tableau 04 : Déplacements chimiques en RMN 1H (500 MHz) et RMN 13C (125 MHz) du composé AN1 dans CD₃OD.

N°	δ_C	δ_H (m, J Hz)
2	164,8	-
3	102,4	-
4	182,5	-
5	161,7	-
6	98,8	6,23, d (2,0)
7	165,0	-
8	93,7	6,47, d (2,0)
9	158,0	-
10	103,9	-
1'	122,3	-
2'	112,8	7,42, d (2,0)
3'	145,6	-
4'	149,6	-
5'	115,4	6,94, d (8,9)
6'	118,9	7,42, dd (7,1 – 2,0)

V.3.2. Le composé AN3

Le composé AN3 se présente sous forme d'une poudre verte. Il donne une tache noire violette à la lumière UV à 365 nm et se révèle en jaune après révélation par une solution acide et chauffage à 100 °C. Ceci traduit une nature flavonoïdique de ce composé.

Le spectre UV de AN3 dans le méthanol présente deux bandes d'absorbance maximales : la bande I à 346 nm et la bande II à 256 nm, attestant de la présence d'un squelette flavone [97].

L'addition de NaOH provoque un déplacement bathochromique de 48 nm pour la bande I, avec une augmentation de son intensité lumineuse indiquant la présence d'un OH libre en position 4', l'absence d'une nouvelle bande dans le même spectre indique l'absence d'un OH libre en position 7.

L'addition de NaOAc ne provoque pas un déplacement bathochromique de la bande II par rapport au spectre MeOH confirmant ainsi l'absence d'un OH libre en position 7.

Le déplacement bathochromique de la bande I de 82 nm, observé lorsque le spectre UV est enregistré dans un milieu de MeOH+ AlCl₃ comparativement au spectre enregistré dans le MeOH neutre, atteste que ce flavonol porte un groupement hydroxyle libre aussi mais cette fois en position 5.

L'addition de H_3BO_3 a la solution $MeOH+NaOAc$ provoque un effet bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = + 36$ nm) indiquant la présence d'un système 3',4'-dihydroxy sur le cycle B, cette hypothèse est confirmée par le déplacement hypsochrome de la bande I ($\Delta\lambda = - 39$ nm), observe sur le spectre enregistré dans $MeOH+AlCl_3+HCl$, comparativement a celui enregistré dans la solution $MeOH+AlCl_3$.

Ces données nous permettent de proposer une structure partielle menant à la lutéoline substitué en position 7 (**figure 35**).

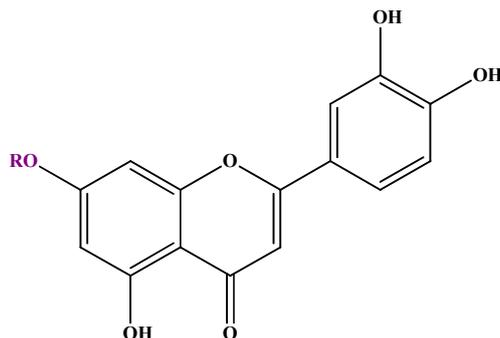


Figure 35 : Structure de la lutéoline7-OR.

Les données relatives à la série spectrale UV sont rassemblées dans le tableau 05 :

Tableau 05 : données spectrales UV du composé AN3

Solvants-réactifs	λ_{max}		
	Bande I (nm) cycle B	Bande II (nm) cycle A	Autres bandes
MeOH	346	257	
NaOH	394	266	
$AlCl_3$	428	273	
$AlCl_3 + HCl$	425	274	
NaOAc	389	252	
NaOAc + H_3BO_3	382	262	

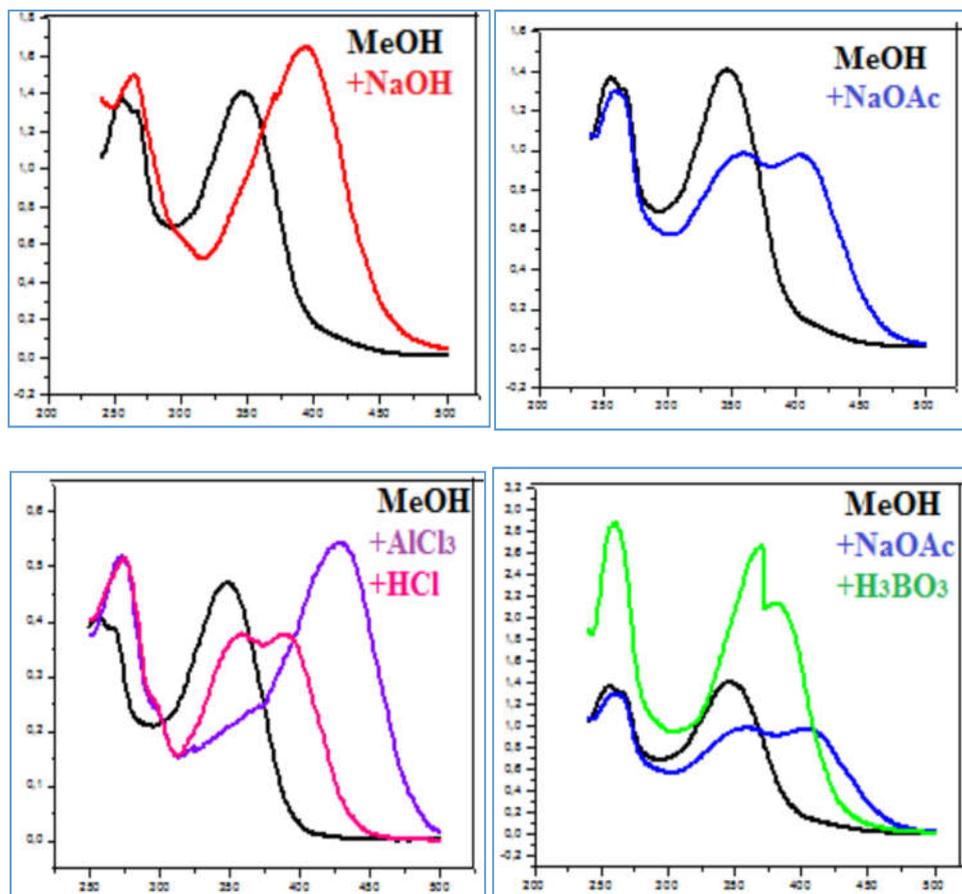


Figure 36 : Série spectrale UV du composé AN3.

Toutes ces données nous permettent de proposer une structure partielle menant à la lutéoline (**figure 36**).

Le spectre de RMN ^1H de composé **4** (**figure 37**) est très proche de celui du composé AN1. Nous retrouvons tous les signaux caractéristiques du composé **1**, les cinq protons aromatiques :

- les protons H-6 et H-8 (couplage méta : d , $J = 2,1$ Hz) du cycle A à 6,52 et 6,81 ppm,
- Un doublet résonne à $\delta_{\text{H}} = 7,45$ ppm ($J = 2,1$ Hz) et un doublet de doublet à $\delta_{\text{H}} = 7,42$ ppm ($J = 2,1$ et 8,2 Hz) respectivement dues aux protons H-2' et H-6', un doublet due à H-5' apparaissant à $\delta_{\text{H}} = 6,93$ ppm ($J = 8,2$ Hz). (**Tableau 06**).
- Un singulet observé à $\delta_{\text{H}} = 6,62$ ppm est dû à la résonance de H-3.
- L'apparition d'un doublet à $\delta_{\text{H}} = 5,09$ ppm ($J = 7,1$ Hz) caractéristique d'un proton anomérique et des signaux entre $\delta_{\text{H}} = 3,44$ ppm et $\delta_{\text{H}} = 3,96$ ppm indiquent la présence d'un ose. La constante de couplage ($J = 7,1$ Hz) observée pour le proton anomérique de AN3 suggère une liaison de configuration β entre le sucre et la lutéoline.

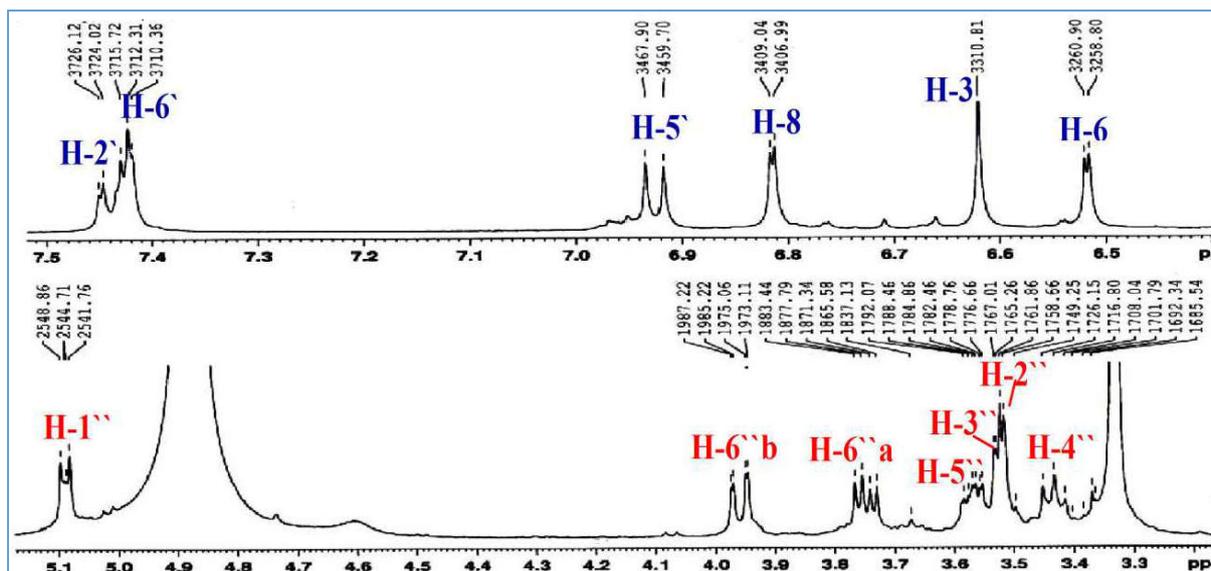


Figure 37 : Spectre RMN¹H du composé AN3 (CD₃OD, 500 MHz).

Le spectre RMN du ¹³C (figure 38), présente effectivement 21 signaux (15 pour la génine et 6 pour l'ose) (Figure 38).

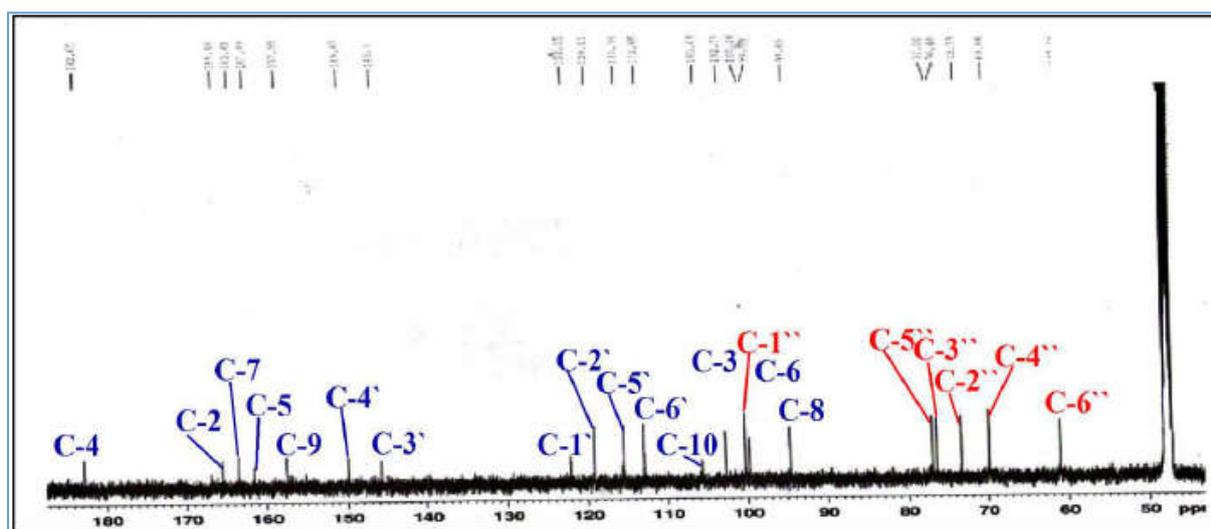


Figure 38 : Spectre RMN ¹³C du composé AN3 (CD₃OD, 125 MHz).

On observe dans le spectre COSY (figure 39) les sept protons du sucre qui couplent entre eux avec de grandes valeurs de constante de couplage (> 7 Hz). Leurs déplacements chimiques ainsi que les déplacements de leurs carbones (figure 40) sont caractéristiques d'un glucose.

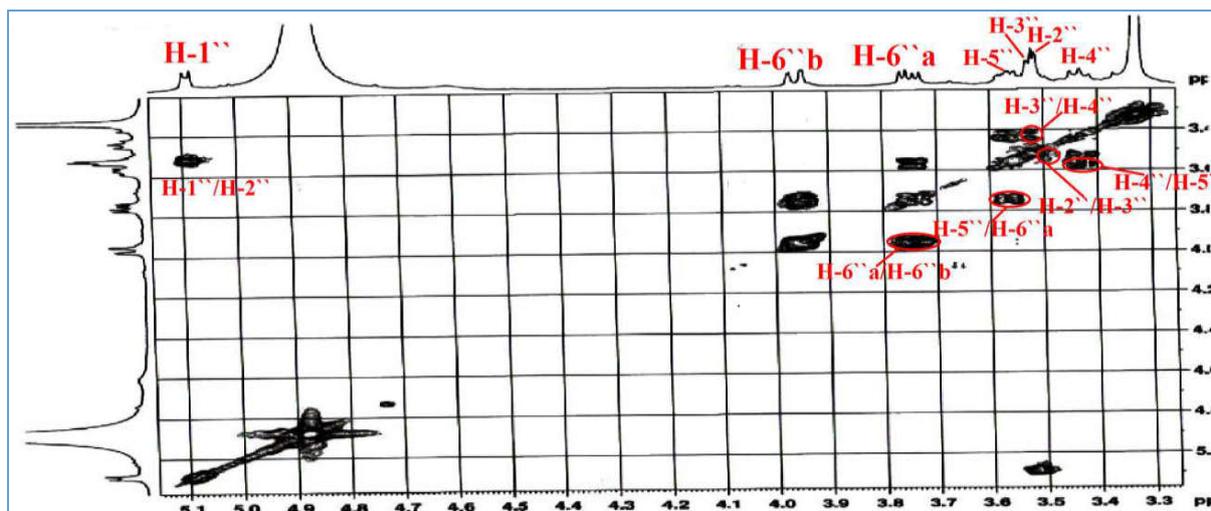


Figure 39: Spectre COSY du compose AN3.

La corrélation observée sur le spectre HMBC entre le proton anomérique H-1'' et le carbone C-7 confirme que le glucose est attaché à la génine en position 7 (figure 41).

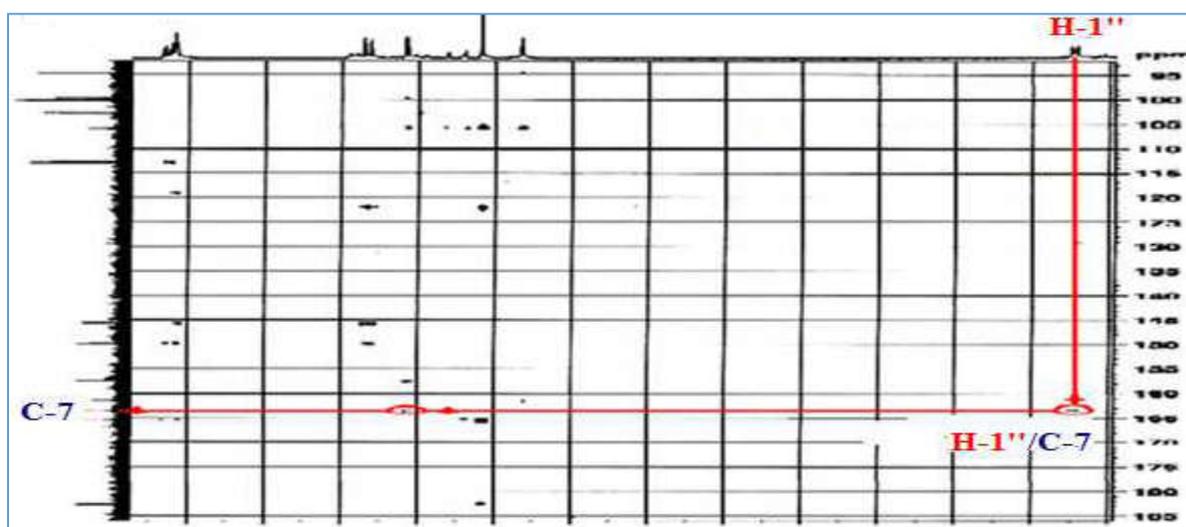


Figure 40 : Spectre HMBC du compose AN3.

L'analyse des spectres de RMN¹H, ¹³C, HSQC, HMBC de AN3 montre que ce composé est identique point par point au lutéoline-7-O-β-D-glucopyranoside (AN3) [98].

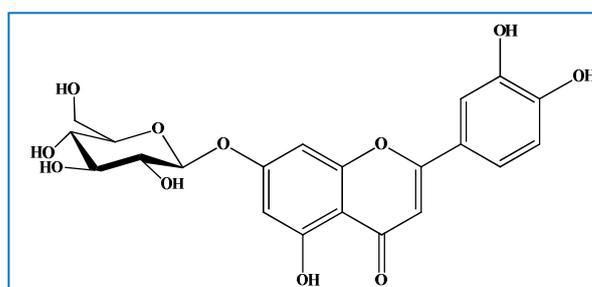


Figure 41 : Lutéoline-7-O-β-D-glucopyranoside (AN3).

Tableau 06 : Déplacements chimiques en RMN 1H (500 MHz) et RMN 13C (125 MHz) du composé AN3 dans CD₃OD.

N°	δ _C	δ _H (m, J Hz)	N°	δ _C	δ _H (m, J Hz)
2	165,5	-	3'	149,9	-
3	102,8	6,62, s	4'	145,7	-
4	182,7	-	5'	115,4	6,93, d (8,2)
5	161,5	-	6'	112,9	7,42, dd (8,2-2,1)
6	99,8	6,52, d (2,1)	Glucose		
7	163,4	-	1"	100, 3	5,09, d (7,1)
8	94,7	6,81, d (2,1)	2"	73,3	3,52, m
9	157,6	-	3"	76,5	3,53, m
10	105,7	-	4"	69,9	3,44, t (9,3)
1'	122,1	-	5"	77,0	3, 57, m
2'	119,1	7,45, d (2,1)	6"	61,1	3,75, dd (12,1 – 5,7), 3,96, dd (12,1-2,0)

V.4. Résultats et discussion de l'activité antioxydante

Il existe plusieurs méthodes pour évaluer le pouvoir antioxydant des extraits. La complexité chimique des extraits, la polarité et le comportement chimique, pourraient conduire à des résultats positifs, en fonction du test utilisé. Dans cette étude, l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique ainsi que des fractions 70/30 (3), 60/40 (1), 40/60 (1) a été déterminée par cinq méthodes il est bien claire qu'une seule méthode n'est pas suffisante pour caractériser le potentiel antioxydant d'un échantillon. Il nous a fallu donc une combinaison de cinq méthodes complémentaires basées sur deux mécanismes d'action un effet scavenger (DPPH, ABTS, DMSO Superoxyde) et une activité réductrice du cuivre (CUPRAC)

V.4.1. Test de l'activité scavenger du radical DPPH'

La capacité des extraits à donner un atome d'hydrogène est testée en utilisant le radical libre stable DPPH et elle est mesurée à 517 nm.

Le standard utilisé est le α -Tocopherol. Les résultats obtenus ont permis de tracer la courbe de pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations des extraits et de standard (Figure 42).

L'activité antioxydante est exprimée en IC_{50} , plus la valeur de IC_{50} est petite plus l'extrait est considéré comme un antioxydant puissant.

Les valeurs des CI_{50} exprimées en $\mu\text{g/mL}$, calculées graphiquement à partir des droites de régression obtenues, représentant les pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de l'extrait testé.

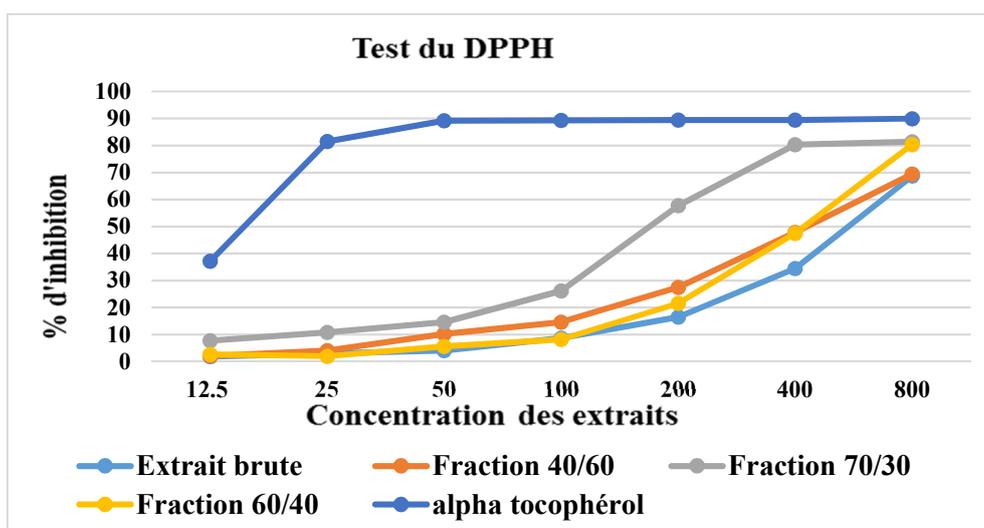


Figure 42 : Courbe de pourcentage d'inhibition du DPPH par l'extrait méthanolique et différentes fractions de la plante.

Les valeurs de l' IC_{50} de chaque extrait ainsi que celle de l' α tocophérol sont présentées dans le tableau 07 :

Tableau 07 : Pouvoir d'inhibition IC_{50} des extraits et du standard utilisant le test du DPPH

DPPH		IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Echantillons	Extrait méthanolique	570,20
	40/60	427,44
	70/30	183,52
	60/40	417,35
Le standard	α tocophérol	15,42

La figure 42 révèle que tous les échantillons testés ont une activité anti radicalaire dose dépendante vis-à-vis du DPPH \cdot . Parmi les échantillons testés, la fraction 70/30 (3) représente la fraction la plus active avec une IC₅₀ de l'ordre de 183,52 $\mu\text{g/ml}$, suivi par les fractions 60/40 et 40/60 avec des IC₅₀ de 417,35 et 427,44 $\mu\text{g/ml}$ respectivement.

En comparaison avec le standard, tous les échantillons testés s'avèrent moins actives, par exemple l'activité antiradicalaire de la fraction 70/30 (3) est 11 fois inférieure à celle du α tocophérol qui présente une IC₅₀ égale à 15,42 $\mu\text{g/ml}$, et 02 fois supérieure à celle de la fraction 60/40. Cependant, l'activité antioxydante de cette dernière est 27 fois inférieure à celle du standard.

V.4.2. Activité antioxydante déterminée par la méthode d'ABTS \cdot^+

L'activité scavenger des extraits est également étudiée en utilisant l'ABTS. Ce dernier réagit avec le persulfate de potassium pour donner le radical ABTS \cdot^+ . La génération du radical avant l'ajout des extraits est nécessaire afin d'éviter l'interférence des composés dans la formation du radical ce qui conduit à une surestimation de la capacité antioxydante [99]. L'ajout de l'extrait ou du BHA entraîne une décoloration de la solution indiquant l'existence d'une activité scavenger des échantillons.

Les résultats obtenus du test de mesure d'ABTS \cdot^+ nous ont permis de tracer les graphes de variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de chaque échantillons (figure 43).

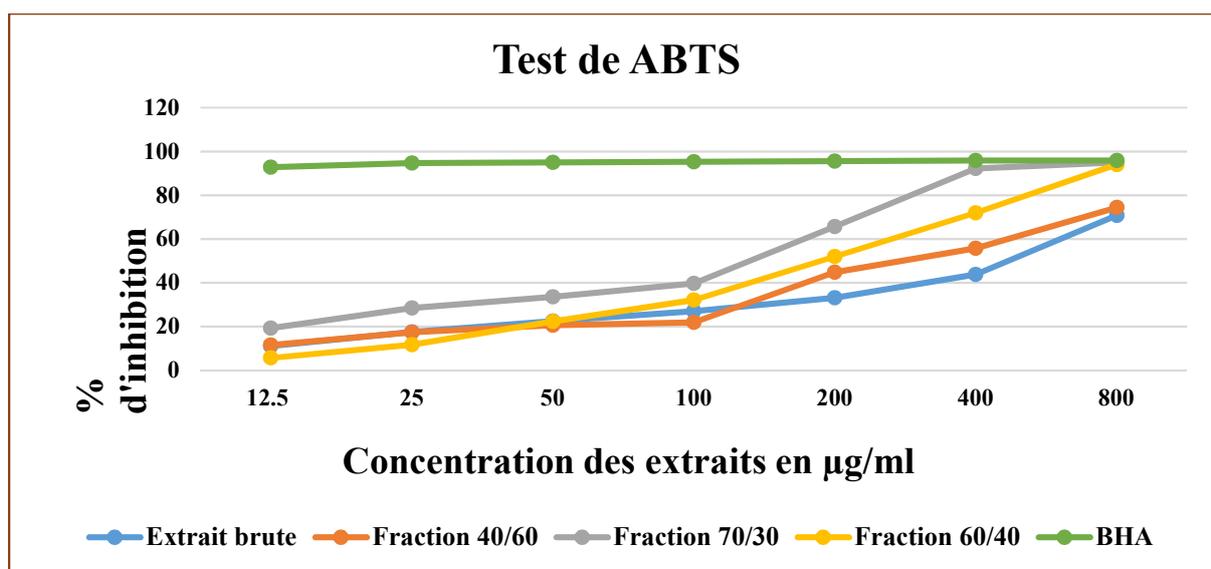


Figure 43 : courbe de pourcentage d'inhibition de l'ABTS par les différents échantillons.

Le tableau 08 présente les valeurs du pouvoir antioxydant (IC_{50}) des 4 échantillons ainsi que le standard BHA, calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés.

Tableau 08 : Pouvoir d'inhibition IC_{50} des extraits et du standard utilisant le test d'ABTS*

ABTS*		IC50 (µg/ml)
Echantillons	Extrait méthanolique	590,47
	40/60	297,89
	70/30	129,67
	60/40	183,72
Le standard	BHA	1,81

Les pourcentages d'inhibition et les valeurs des IC_{50} révèlent que les 2 fractions 70/30 et 60/40 possèdent une propriété antioxydante modérée par rapport aux 2 autres fractions (40/60 et extrait brute) qui ont une activité antioxydante faible, Toutefois l'activité de l'extrait 70/30 ($CI_{50} = 129,67 \mu\text{g/mL}$) et celle de 60/40 ($CI_{50} = 183,72 \mu\text{g/mL}$) est inférieure à celle du standard BHA ($CI_{50} = 1,81 \mu\text{g/mL}$).

Le BHA utilisé comme standard présente les pourcentages d'inhibition les plus importants de l'ordre de 90% pour les 7 concentrations.

V.4.3. Le test de l'activité scavenger du radical $O_2^{\bullet-}$ (Méthode DMSO alcalin)

Contrairement aux tests précédents (ABTS, DPPH), le pourcentage d'inhibition du radical superoxyde est calculé selon cette formule :

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

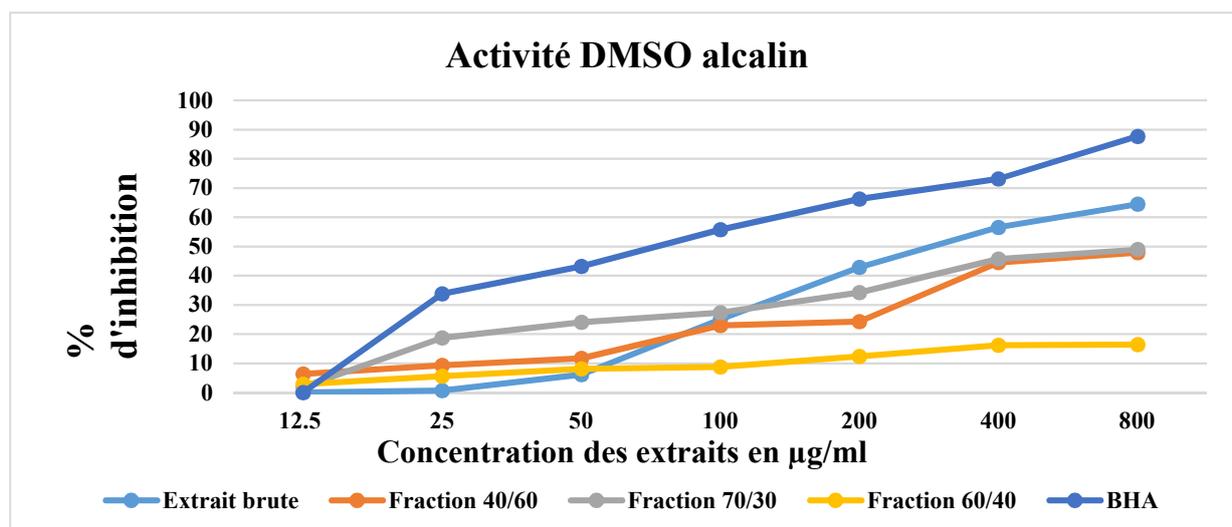


Figure 44 : Courbe de pourcentage d'inhibition de DMSO alcalin par différents extraits de la plante.

Tableau 09 : les différentes valeurs des IC_{50} de l'activité DMSO alcalin

DMSO alcalin		IC_{50} (µg/ml)
Echantillons	Extrait méthanolique	265,72
	40/60	/
	70/30	/
	60/40	/
Le standard	BHA	3,28

La représentation graphique (**Figure 44**) montre que les pourcentages d'inhibition du radical superoxyde sont proportionnels à la concentration des fractions, d'extrait brut et des standards. A partir de la figure 44 on peut déduire que les extraits : extrait brute, 40/60, 70/30 montrent un pouvoir plus important que celui d'extraits 60/40. Par comparaison au standard BHA. Les résultats d' IC_{50} montrent clairement que seulement l'extrait méthanolique possède une propriété antioxydante faible.

L'extrait méthanolique et les 3 fractions ont également été testées pour leur activité de chélation du métal, mais le résultat était négatif.

L'activité antioxydante des flavonoïdes dépend de [100,101].

- La présence de la double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo.
- La présence du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C2-C3.

- Du nombre et de la position des groupes hydroxylés.
- La présence d'un groupement catéchol sur le cycle B (ortho-dihydroxy).
- Glycosylation ou non des flavonoïdes.

L'activité antioxydante modérée de notre extrait méthanolique ainsi que les 3 fractions est probablement due à la présence des flavonoïdes et plus particulièrement les flavones comme la lutéoline isolé, en effet il possède les deux premiers critères qui influe sur la qualité de l'activité antioxydante.

V.4.4. Le test de l'activité réductrice de l'ion cuprique (CUPRAC)

C'est une méthode développée par Apak *et al.* En 2004. Elle est basée sur la mesure de l'absorbance à 450 nm, après la formation d'un complexe stable entre les ions néocuproïne et le cuivre (I). Ce complexe est produit par la réduction des ions du cuivre (II) par les composés potentiellement antioxydants. Les résultats sont résumés dans le tableau 10.

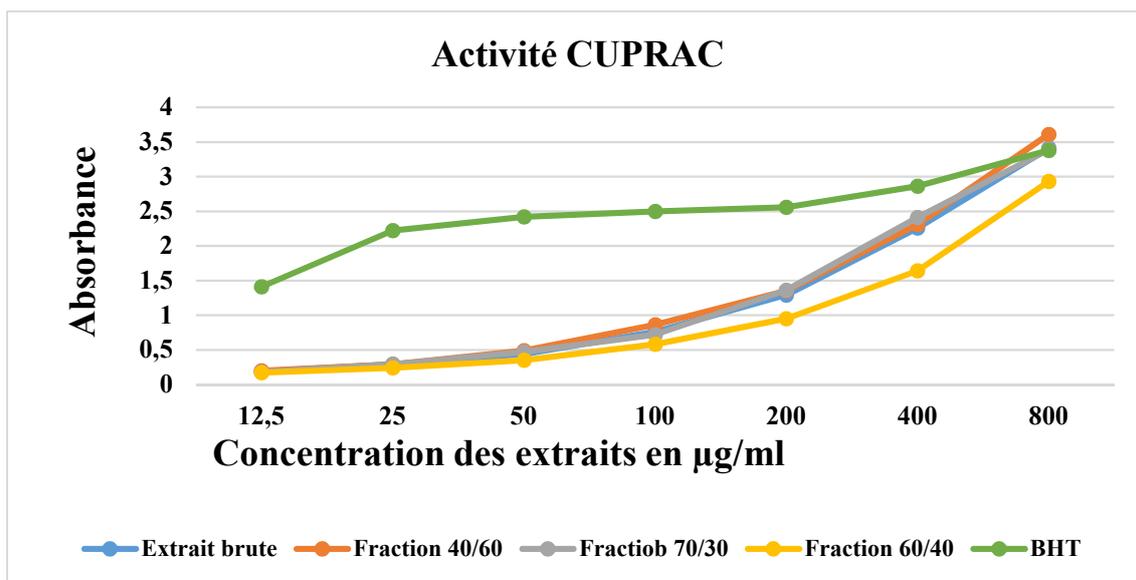


Figure 45 : Courbe d'absorbance en fonction de la concentration des différents échantillons.

Tableau 10 : Les différentes valeurs des IC50 de l'activité CUPRAC.

DPPH		A0.5
Echantillons	Extrait méthanolique	59,79
	40/60	59,79
	70/30	60,01
	60/40	84,14
Le standard	α tocophérol	8,97

La figure 45 présente les courbes d'absorbance en fonction de la concentration des standards et des extraits. L'extrait, méthanolique, la fraction 70/30 et 40/60 se sont tous révélés capables de réduire le cuivre. A partir de la figure 45 on peut déduire que l'extrait méthanolique, la fraction 40/60 et la fraction 70/30 montrent un pouvoir réducteur de cuivre plus important que celui de la fraction 60/40. Toutefois le BHT présente la plus forte activité réductrice de cuivre.

Conclusion Générale

◆ Conclusion générale

Le présent travail porte sur l'investigation chimique et biologique de la plante médicinale *Anthericum* appartenant à la famille Liliaceae Cette famille est connu par sa richesse en divers métabolites secondaires d'un grand intérêt biologique tels que les saponosides et les flavonoïdes.

L'étude chimique de l'extrait méthanolique des parties aériennes d'*Anthericum* a conduit à l'isolement trois flavonoides **AN1**, **AN2** et **AN3** et l'identification de deux seulement (**lutéoline et lutéoline-7-O-glucoopyranoside**).

L'isolement et la purification de ces composés a été essentiellement fondée sur l'utilisation conjointe des techniques chromatographiques (VLC, CC et CCM) utilisant deux supports (silice normale et polyamide).

La détermination des structures a été réalisée par les méthodes d'analyse spectroscopiques, RMN ¹D 1H, ¹³C, RMN 2D (COSY H-H, HSQC et HMBC), spectroscopies UV-visible et par la comparaison avec les données de la littérature.

L'activité antioxydante des différents échantillons testés a été évalué à différentes échèles par le test DPPH, ABTS, CUPRAC, ainsi que le test de chélation par des ions ferreux. Les échantillons testés ont montré une activité antioxydante modérée.

Références bibliographiques

- [01] **Quézel, P. et Santa, S. (1962)**. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tom 1, Ed. Centre National de la Recherche Scientifique, Paris. 189,196.
- [02] **Twentyman, L.R. et Ffhom, M.B. (1984)**. The Liliaceae. The *British Homoeopathic Journal*. 73, 125-131.
- [03] **Barthoux, J.C.** La famille des Liliacées (Liliaceae). <https://sologne-nature.org/index.php/la-sologne/nos-dossiers-naturalistes/la-flore/27-la-famille-des-liliacees-liliaceae> , (Visité le 12 /06/2018).
- [04] **Ozenda, P. (1977)**. Flore du Sahara. Ed. Centre national de la recherche scientifique, 15, quai Anatole-France, Paris. 360-361.
- [05] **Binard, F.** Liliaceae. <https://www.biologievegetale.be/index.php?rub=fiches-famille&idf=183#> , (Visité le 01/06/2018).
- [06] Liste taxonomique des genres de la famille Liliaceae. <https://www.aquaportail.com/taxonomie-famille-127-liliaceae.html> , (Visité le 03/05/2018).
- [07] **Urban, J. (2017)**. Famille : Liliaceae. <https://www.naturoscope.net/catalogue/liliaceae> , (Visité le 06/04/2018).
- [08] (11/12/2017). Famille des Liliaceae. https://www.plantes-botanique.org/famille_Liliaceae , (Visité le 03/05/2018).
- [09] Classification des angiospermes. <http://fsr.um5.ac.ma/cours/biologie/Faris/2017/cours%20s4%20partie%204%20monosulquees%202017.pdf> , (Visité le 20/05/2018).
- [10] **Murdoch, W. (11/11/2017)**. <http://hogwartsbobba.forumactif.com/t204-theme-3-les-familles-des-plantes-chapitre-3-liliacees> , (Visité le 04/05/2018).
- [11] **Fabricant, D.S. et Farnsworth, N.R. (2001)**. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives*. 109, 69-75.
- [12] **Soltani, E., Cerezuela, R., Charef, N., Mezaache-Aichour, S., Angeles Esteban, M. et Zerroug, M.M. (2017)**. Algerian propolis extracts: Chemical composition, bactericidal activity and in vitro effects on gilthead seabream innate immune responses. *Fish & Shellfish Immunology*. 62, 57-67.

- [13] **Prajapati, V.D., Maheriya, P.M., Jani, G.K., Patil, P.D. et Patel, B.N. (2014).** *Lepidium sativum* Linn.: A current addition to the family of mucilage and its applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 65, 72-80.
- [14] **Akaberi, M., Sobhani, Z., Javadi, B., Sahebkar, A. et Emami, S.A. (2016).** Therapeutic effects of Aloespp. in traditional and modern medicine: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 84, 759-772.
- [15] **Minjares-Fuentes, R., Rodríguez-González, V.M., González-Laredo, R.F., EIM, V., González-Centenoa, M.R. et Femenia, A. (2017).** Effect of different drying procedures on the bioactive polysaccharide acemannan from *Aloevera* (*Aloe barbadensis* Miller). *Carbohydrate Polymers*. 168, 327-336.
- [16] **Maire, R. (1958).** Encyclopédie biologique : Flore de l'Afrique du Nord. Ed. Paul Lechevalier, Rue de Tournon, 12 Paris Vie, volume V. 48.
- [17] Anthericum. <http://www.theplantlist.org/browse/A/Asparagaceae/Anthericum/> , (Visité le 30/03/2018).
- [18] **Williams, C.A. (1975).** Biosystematics of the monocotyledoneae—flavonoid patterns in leaves of the liliaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*. 3(4), 229-244.
- [19] **Agrawal, P.K. et Markham, K.R. (1989).** Introduction. In *Carbon-13 NMR of flavonoids*. Agrawal P.K. Ed. Elsevier. Amsterdam. 1-31.
- [20] **Hemingway, R. W., Laks, P. E. et Branham, S.J. (1992).** Plant polyphenols: Synthesis, properties, sinificance. *Springer Science & Busines Media, Germany*.
- [21] **Altman, A. et Hasegawa, P. M. (2011).** Plant biotechnology and agriculture: Prospects for the 21st century. *Academic Press, USA*.
- [22] **Rahman, A. U. (2005).** Studies in natural products chemistry: Bioactive natural products. *Part K, Elsevier, USA*.
- [23] **Di Carlo, G., Mascolo N., Izzo A.A. et Capasso F. (1999).** Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences*. 65(4), 337-353.
- [24] **Pietta, P. (2000)** Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products* 63(7), 1035-1042.

- [25] Narayana, K.R., Reddy, M.S., Chaluvadi, M.R. et Krishina, D.R. (2001). Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*. 33, 2-16.
- [26] Seyoum, A., Asres, K. et El-Fiky, F.K. (2006). Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Journal of phytochemistry*. 67, 2058-2070.
- [27] Middleton, E., Kandaswami, C. et Theoharidies, T.C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacological reviews*. 52, 673-751.
- [28] Sparg, S.G., Light, M.E. et Van Staden, J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*. 94, 219-243.
- [29] Mors, W.B., do Nascimen, M.C.L., Ruppelt Pereira, B.M. et Pereira, N.A. (2000). Plant natural products active against snake bite the molecular approach. *Phytochemistry*. 55, 627-642.
- [30] Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Ed. (3), Paris.
- [31] Kaipnazarov, T.N., Uteniyazov, K.K. et Saatov, Z. (2004). The structure of cyclostipuloside E from *tragacanthastipulosa* Boriss. *International conference on saponins. Phytochemistry and application of plant saponins*. Pulaway: Institute of soil science and plant cultivation. 82.
- [32] Bruneton, J. (2009). *Pharmacognosie-Phytochimie, Plantes médicinales, 4e éd.*, Tec & Doc-Editions médicales internationales, Paris
- [33] Hostettmann, K. et Marston, A. (1995). *Chemistry and Pharmacology of natural products Saponins*: Cambridge university press. 117.
- [34] Sparg, S.G., Light, M.E. et Van, S.J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal Of Ethnopharmacology*. 94, 219-243.
- [35] Dini, I., Tenore, G. C., Schettino, O. et Dini, A. (2001). New oleananesaponins in *Chenopodium quinoa*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49, 3976–3981.
- [36] Xia, Z. H., Zou, M. L., Sang, S. M., et Lao, A. N. (2004). Segetoside L, A New Triterpenoid saponin from *Vaccariasegetalis*. *Chinese Chemical Letters*. 15, 55–57.
- [37] Alabdul Magid, A. (2005). Étude chimique de deux Caryocar de Guyane et d'un Guioa de Nouvelle Calédonie. Thèse de doctorat, université de Reims Champagne-Ardenne.

- [38] Yalcin, F. N., Piacente, S., Perrone, A., Capasso, A., Duman, H. et Çalis, I. (2012). Cycloartane glycosides from *Astragalusstereocalyx* Bornm. *Phytochemistry*. 73, 119–126.
- [39] Haralampidis, K., Trojanowska, M. et Osborn, A. E. (2002). Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. 75, 31–49.
- [40] Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H. P. S. et Becker, K. (2002). The biological action of saponins in animal systems: a review. *British Journal of Nutrition*. 88, 587-605.
- [41] Wachter, G. A., Valcic, S., Franzblau, S. G., Suarez, E. et Timmermann B. N. (2001). Antitubercular activity of triterpenoids from *Lippiaturbinata*. *Journal of Natural Products*. 64, 37.
- [42] Zhang, J., Meng, Z., Zhang, M., Ma, D., Xu, S. et Kodama, H. (1999). Effect of six steroidal saponins isolated from *Anemarrhenaerhizoma* on platelet aggregation and hemolysis in human blood. *International Journal of Clinical Chemistry and Diagnostic Laboratory Medicine*. 289, 79.
- [43] Lacaille-Dubois, M. A. (2000). Biologically and Pharmacologically active saponins from plants: recent advances in Saponins in Food, Feedstuffs and Medicinal plants. Marston A. and Oleszek W., Ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 205.
- [44] Lacaille-Dubois, M. A., Hanquet, B., Cui, Z. H., Lou Z. C. et Wagner, H. (1999). A new biologically active acylated triterpene saponin from *Silenefortunei*. *Journal of Natural Products*. 62, 133.
- [45] Seeman, P., Cheng, D. et Iles, G. H. (1973). Structure of membrane holes in osmotic and saponin hemolysis. *Journal of Cell Biology*. 56, 519–527.
- [46] Vincken, J. P., Heng, L., De Groot, A. et Gruppen, H. (2007). Review Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*. 68, 275–297.
- [47] Drissi, A., Bennani, H., Giton, F., Charrouf, Z., Fiet, J. et Adlouni, A. (2006). Tocopherols and saponins derived from *Arganiaspinosa* exert, an antiproliferative effect on human prostate cancer. *Cancer investigation*. 24, 588–592.
- [48] Yu, B. et Tao, H. (2002). Glycosyl trifluoroacetimidates. 2. Synthesis of dioscin and Xiebai saponin. *The Journal of Organic Chemistry*. 67, 9099–9102.
- [49] Plohmann, B., Bader, G., Hiller, K. et Franz, G. (1997). Immunomodulatory and antitumoral effects of triterpenoid saponins. *Pharmazie*. 52, 953–957.

- [50] Chang, W., Yu, C. Y., Lin, T. W., Wang, P. H. et Tsai, Y. C. (2006). Soyasaponin I decreases the expression of alpha 2, 3- linked sialic acid on the cell surface and suppresses the metastatic potential of B16F10 melanoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 341, 614–619.
- [51] Ellington, A. A., Berhow, M., Singletary, K. W. (2006). Inhibitions of Akt signaling and enhanced ERK1/2 activity are involved in induction of macroautophagy by triterpenoid B-group soyasaponins in colon cancer cells. *Carcinogenesis*. 27, 298–306.
- [52] Lacaille-Dubois, M. A. (1999). Saponins as immunoadjuvants and immunostimulants. In: Wagner H, editor. *Immunomodulatory agents from plants*. Switzerland (Basel): BirkhäuserVerlag. 243-272.
- [53] Lacaille-Dubois, M. A., Hanquet B., Rustaiyan A. et Wagner H. (1993). Squarroside A, a biologically active triterpene saponin from *Acanthophyllum squarrosum*. *Phytochemistry*, 34, 489.
- [54] Gaidi, G., Miyamoto, T., Rustaiyan, A., Laurens V. et Lacaille-Dubois M. A. (2000). Two new biologically active triterpene saponins from *Acanthophyllum squarrosum*. *Journal of Natural Products*. 63, 1497.
- [55] Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J. and Gay, N.J. (1982). Distantly related sequences in the alpha-and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *The EMBO Journal*. 1(8), 945-51.
- [56] Pincemail J., Meurisse, M., Limet, R. et Defraigne, J.O. (1999). L'évaluation du stress oxydatif d'un individu: une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Coeur, Poumons*. 4 (5), 1-7.
- [57] Favier, A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*. 270, 108-115.
- [58] Gauche, E., Hausswirth, C. (2006). Stress oxydant, complémentation nutritionnelle en antioxydants et exercice. *Science & Motricité*. 58, 43-66.
- [59] Arousseau, B. (2002). Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage : conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. [Inra productions animales](#). 15 (1), 67-82.

- [60] **Milane, H. (2004)**. La quercétine et ses dérivés : Molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres; Etudes et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat en Sciences Domaine : Pharmacochimie, Université Louis Pasteur Strasbourg I.
- [61] **Van Antwerpen, P. (2006)**. Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique: Ciblage du système myeloperoxydase/peroxyde d'hydrogène/chlorure. Thèse de doctorat en Sciences Pharmaceutiques, Académie universitaire Wallonie-Bruxelles.
- [62] **Tamer Fouad, M.D. (2003)**. Free radicals, Types, sources and damaging reactions, *Internal Medicine Articles*. (<http://www.doctorslounge.com/primary/articles/>).
- [63] **Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z. et Jore, D. (2003)**. Espèces réactives de l'oxygène, Comment l'oxygène peut-il devenir toxique?. *L'actualité chimique*. 270, 91-96.
- [64] **Ahsan, H., Ali, A. et Ali, R. (2003)**. Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. *Clinical and Experimental Immunology*. 131, 398-404.
- [65] **Gião, M.S., Leitão, I., Pereira, A., Borges, A.B., Guedes, C.J., Fernandes, J.C., Belo, L., Santos-Silva, A., Hogg, T.A., Pintado, M.E. et Malcata, F.X. (2010)**. Plant aqueous extracts: Antioxidant capacity via haemolysis and bacteriophage P22 protection. *Food Control*. 21, 633-638.
- [66] **Cohen, J.H., Kristal, A.R. et Stanford, J.L. (2000)**. Fruit and vegetable intakes and prostate cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute*. 92, 61-68.
- [67] **Packer, L. et Weber, S.U. (2001)**. The role of vitamin E in the emerging field of nutraceuticals. In: Kramer, K., Hoppe, P.P. and Packer, L. Nutraceuticals in health and disease prevention. New York (Marcel Dekker). 27-43.
- [68] **Lee, J., Koo, N. et Min, D.B. (2004)**. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 3 (1), 21-33.
- [69] **Fridovich, I. (1995)**. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry*. 64, 97-112.
- [70] **Richier, S., Merle, P.L., Furla, P., Pigozzi, D., Sola, F. et Allemand, D. (2003)**. Characterization of superoxide dismutases in anoxia- and hyperoxia-tolerant symbiotic cnidarians. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1621, 84-91.

- [71] **Ichai, C., Quintard, H., Orban, J.C. (2011).** Désordres métaboliques et reanimation : De la physiopathologie au traitement. Ed 1, Springer-Verlag Paris. 427-439.
- [72] **Levrant, J., Iwase, H., Shao, Z.H., Vanden Hoek, T.L., Schumacker, P.T. (2003).** Cell death during ischemia: relationship to mitochondrial depolarization and ROS generation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 284, 549-58.
- [73] **Igor Passi, L.B. (2002).** Etude des activités biologiques de *Fagara zanthoxyloides* Lam. (Rutaceae). Thèse de doctorat en Pharmacie, Université de Bamako. 133.
- [74] **Hu, F.B. (2003).** Plant-based foods and prevention of cardiovascular disease: an overview. *American Journal of Clinical Nutrition*. 78, 544-551.
- [75] **Bubonja-Sonje, M., Giacometti, J. et Abram, M. (2011).** Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. *Food Chemistry*. 127, 1821-1827.
- [76] **Ketsawatsakul, U., Whiteman, M. et Halliwell, B. (2000).** A reevaluation of the peroxynitrite scavenging activity of some dietary phenolics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 279, 692-699.
- [77] **Gulcin, I., Huyut, Z., Elmastas, M. et Aboul-Enein, H.Y. (2010).** Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*. 3, 43-53.
- [78] **Sandhar, H.K., Kumar, B., Prasher, S., Tiwari, P., Salhan, M. et Sharma, P. (2011).** A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *Internationale Pharmaceutica Scientia*. 1(1), 25-41.
- [79] **Blois, M.S. (1958).** Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 181, 1199-1200.
- [80] **Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M. et Pridham, J. B. (1995).** The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*. 22, 375-383.
- [81] **Bartosz, G. (2003).** Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology*. 9, 5-21.
- [82] **Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M. et Karademir, S.E. (2004).** Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 7970–7981.

- [83] **Gouda**, A.A. et **Amin**, A.S., (2010). Copper (II)–neocuproine reagent for spectrophotometric determination of captopril in pure form and pharmaceutical formulations. *Arabian Journal of Chemistry*. 3, 159-165.
- [84] **Gülçin**, İ., **Elias**, R., **Gepdiremen**, A., **Taoubi**, K. et **Köksal**, E. (2009). Antioxidant secoiridoids from fringe tree (*Chionanthus virginicus*L.). *Wood Science and Technology*. 43, 195–212.
- [85] **Decker**, E.A., **Welch**, B. (1990). Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 38, 674-677.
- [86] **Kalpoutzakis**, E., **Aligiannis**, N., **Skaltsounis**, A. L. et **Mitakou**, S. (2003). Cis-clerodane type diterpenes from *Cistus monspeliensis*. *Journal of Natural Products*. 66, 316-319.
- [87] **Babu**, B.H., **Shylesh**, B.S. et **Padikkala**, J. (2001). Antioxidant and hepatoprotective effect of *Acanthus ilicifolius*. *Fitoterapia*. 72, 272-277.
- [88] **Boligon**, A.A., **Machado**, M.M. et **Athayde**, M.L. (2014). Technical Evaluation of Antioxidant Activity. *Medicinal Chemistry*. 4 (7), 517-522.
- [89] Google Maps. (2018). Djebel El Ouahch. <https://www.google.com/maps/place/Djebel+El+Ouahch,+Constantine/@36.3963383,6.6293041,8450m/data=!3m1!1e3!4m5!3m4!1s0x12f175df6dd0f293:0xc5dcba4fcbfd97f8!8m2!3d36.3970013!4d6.6584666> , "36°24'16.0"N 6°40'16.2"E", (Visité le 30/05/2018).
- [90] **Öztürk**, M. et **KOLAK**, U. (2011). Antioxidant and anticholinesterase active constituents from *Micromeria cilicica* by radical-scavenging. *Food Chemistry*. 126, 31-38.
- [91] **Re**, R., **Pellegrini**, N., **Proteggente**, A., **Pannala**, A., **Yang**, M. et **Rice-Evans**, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology And Medicine Journal*. 26, 1231–1237.
- [92] **Rao**, M.N.A. et **Kunchandy**, E. (1990). Oxygen radical scavenging activity of curcumin. *International Journal of Pharmaceutics*. 58, 237–240.

- [93] Abe, E., Delyle, S.G. et Alvarez, J.C. (2010). Extraction liquide-liquide : théorie, applications, difficultés., Liquid-liquid extraction : theory, applications and difficulties. *Annales de Toxicologie Analytique*. 22(2), 51- 59.
- [94] Jay, M. et Gonnet, J.F. (1974). Les flavonoides de deux Lentibulariacees: Pinguicula vulgaris et Utricularia vulgaris. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2, 47-51.
- [95] Harborne, J.B. (1994). The flavonoids Advances in research since 1986. Ed. Chapman & Hall. Cambridge.
- [96] Agrawal, P.K. (1989). Carbon-13 NMR of flavonoids. Series: Studies in organic chemistry, Elsevier Science.
- [97] Mabry, T.J., Markham, K.R., Thomas, M.B. (1970). The systematic identification of flavonoids. Springer- Verlag. Berlin.
- [98] Sevin, A. (1943). Comparative activity of different polyhydroxy derivatives of flavones on the capillary resistance of the normal and scorbutic guinea pig. *Comptes Rendus*. 216, 505-
- [99] Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T. et Jukic, M., (2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*, 94, 550–557.
- [100] Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. et Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933-956.
- [101] Pokorny, J., Yanishlieva, N. et Gordon, M.H. (2001). Antioxidants in food: practical applications. Cambridge: Woodhead Publishing Limited. New York, USA. 108-109.

Résumé

Ce travail est consacré à l'investigation phytochimique et biologique d'une plante médicinale du genre *Anthericum* qui appartient à la famille des Liliaceae. Les séparations et les purifications chromatographiques (VLC, CC, CCM) de l'extrait méthanolique des parties aériennes de cette plante ont permis l'isolement et l'identification de 2 flavonoïdes (luteoline et son dérivé luteoline-7-O-glucoside).

Les structures moléculaires des composés isolés ont été élucidées principalement par l'utilisation des techniques de RMN 1D et 2D ainsi que par la méthode spectroscopique UV-Visible.

Cinq méthodes ont été utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante: DPPH, ABTS, CUPRAC, DMSO alcalin et la méthode de chélation par des ions ferreux, cette dernière nous a donné des résultats négatifs pour toutes les fractions. L'extrait brute et les fractions de la VLC (40/60, 70/30, 60/40) ont montrés une activité antioxydante modérée. Dont la fraction 70/30 a donné la meilleure activité antioxydante par rapport aux autres extraits testés.

Mots clés : Liliaceae, *Anthericum*, Chromatographie, Flavonoïdes, RMN 1D et 2D, UV-Vis, Activité antioxydante

Abstract

This work is devoted to the phytochemical and biological investigation of the medicinal plant of the genus *Anthericum* which belongs to the Liliaceae family. The chromatographic separations and purifications (VLC, DC, CCM) of the methanolic extract of the aerial parts of this plant led to the isolation and identification of 2 flavonoids (luteolin and its derivative luteolin-7-*O*-glucoside)

The molecular structures of the isolated compounds have been elucidated mainly by the use of 1D and 2D NMR techniques as well as by the UV-Visible spectroscopic method.

5 methods were used to evaluate the antioxidant activity: DPPH, ABTS, CUPRAC, alkaline DMSO and the ferrous ion chelating method, these latter showed negative results for all fractions. The crude extract and VLC fractions (40/60, 70/30, 60/40) showed moderate antioxidant activity. The 70/30 fraction gave the best antioxidant activity compared to the other extracts tested.

Key words: Liliaceae, *Anthericum*, Chromatography, Flavonoids, 1D and 2D NMR, UV-Vis, Antioxidant activity

المخلص

خصص هذا العمل للدراسة الكيميائية والبيولوجية لنبتة الطيبة من جنس *Anthericum* الذي ينتمي لعائلة الزنبقيات. مكنت عمليات الفصل وتقنيات الكروماتوغرافيا (VLC، CC، CCM) للمستخلص الميثانولي للأجزاء الهوائية لهذا النبات من عزل وتحديد مركبين فلافونويدين (luteolin) ومشتقاته (luteolin-7-O-glucoside).

وقد تم تحديد التراكيب الجزيئية للمركبات المعزولة بشكل رئيسي من خلال استخدام تقنية الرنين النووي المغناطيسي أحادية وثنائية البعد. وكذلك من خلال طريقة التحليل الطيفي للأشعة فوق البنفسجية المرئية.

تم استخدام 5 طرق لتقييم النشاط المضاد للأكسدة: DPPH، ABTS، CUPRAC، DMSO، alcalin ، métal chélate أعطت هذه الأخيرة نتائج سلبية مع جميع المستخلصات. أظهر المستخلص الميثانولي وأجزاء VLC (40/60، 70/30، 60/40) نشاط مضاد للأكسدة معتدل. الجزء 30/70 أعطى أفضل نشاط مضاد للأكسدة مقارنة بالمستخلصات الأخرى التي تم اختبارها.

الكلمات المفتاحية: *Anthericum*, Liliaceae، الفلافونيدات، كروماتوغرافيا، للأشعة فوق البنفسجية المرئية، الرنين النووي المغناطيسي، النشاط المضاد للأكسدة.

Noms et Prénoms :

- DJEBLIA Lamia
- BELGHOSI Nour El Houda

Date de soutenance : 27/06/2018**Thème : Etude phytochimique et activité antioxydante d'une plante algérienne du genre *Anthericum* (Liliaceae)****Résumé :**

Ce travail est consacré à l'investigation phytochimique et biologique d'une plante médicinale du genre *Anthericum* qui appartient à la famille des Liliaceae. Les séparations et les purifications chromatographiques (VLC, CC, CCM) de l'extrait méthanolique des parties aériennes de cette plante ont permis l'isolement et l'identification de 2 flavonoïdes (luteoline et son dérivé luteoline-7-O-glucoside).

Les structures moléculaires des composés isolés ont été élucidées principalement par l'utilisation des techniques de RMN 1D et 2D ainsi que par la méthode spectroscopique UV-Visible.

Cinq méthodes ont été utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante: DPPH, ABTS, CUPRAC, DMSO alcalin et la méthode de chélation par des ions ferreux, cette dernière nous a donné des résultats négatifs pour toutes les fractions. L'extrait brute et les fractions de la VLC (40/60, 70/30, 60/40) ont montrés une activité antioxydante modérée. Dont la fraction 70/30 a donné la meilleure activité antioxydante par rapport aux autres extraits testés.

Mot clés : Liliaceae, *Anthericum*, Chromatographie, Flavonoïdes, RMN 1D et 2D, UV-Vis, Activité antioxydante**Laboratoires :**

Laboratoire d'obtention des substances thérapeutiques.

Jury d'évaluation :**Président du jury :** MOSBAH Asma

MCA. UFM Constantine 1

Rapporteur : BOUTAGHANE Naima

MCA. UFM Constantine 1

Examineur : KHALFALLAH Assia

MCA. UFM Constantine 1

Année universitaire : 2017/2018