



*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*



**Université Abbès Laghrou –Khenchela-**

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**

**Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire**

## **Mémoire**

**Présenté Pour l'Obtention du Diplôme de Master Académique**

**Filière : Science Biologique**

**Option : Biochimie Appliquée**

## **Thème**

**Etude photochimique et activités biologique de deux plantes  
médicinales de la région de Ghardaïa**

**Présenté par :**

**Kellil Soumia**

**Kellil Wahiba**

**Soutenu le : 15 /07/2021**

**Jury de Soutenance :**

<b>Président</b>	<b>Redhouane Takouachet</b>	<b>MCB</b>	<b>Univ. Khenchela</b>
<b>Promoteur</b>	<b>Abdelhak Djemel</b>	<b>MRB</b>	<b>URPM-CRBt. Constantine</b>
<b>Examineur</b>	<b>Abderrezak Bouchareb</b>	<b>MRB</b>	<b>URPM-CRBt. Constantine</b>

**Promotion : 2021**

# Remercîments

---

---

## Remerciements

*Tout d'abord, nous remercions, du plus profond de notre cœur **Dieu** le tout puissant de nous avoir donné le courage et la volonté d'achever ce travail.*

*Nous remercions, très chaleureusement **Dr Abdelhak Djemel**, Maitre de recherche classe B au centre de Recherche en Biotechnologie de Constantine (CRB<sub>t</sub>) notre encadrant, on tient vivement à lui exprimer notre profonde reconnaissance et notre gratitude pour sa disponibilité, sa patience et sa compréhension. Merci pour vos précieux conseils et votre soutien à tous les instants, et surtout merci pour vos qualités scientifiques et humaines qui resteront à jamais un bon exemple pour nous.*

*Je tiens tout particulièrement à remercier Monsieur **Dr Takouachet Redhoun**e, Maitre de conférences classe B) à Université Abbes Laghrour de Khenchela d'avoir participé à la réalisation de notre stage, son soutien et ces encouragements et pour m'avoir honoré en acceptant de présider ce jury de soutenance.*

*Je tiens à adresser mes vifs remerciements à **Dr Boucharab Abderrazak**, Maitre de recherche classe B au centre de Recherche en Biotechnologie de Constantine (CRB<sub>t</sub>), d'avoir accepté d'être examinateur de notre travail.*

*Nous remercions très sincèrement **Dr Bensouici Chaouki**., Directeur de laboratoire de Biochimie au Centre de Recherche en Biotechnologie de Constantine (CRB<sub>t</sub>).*

*On tient à lui exprimer notre sincère reconnaissance et notre plus profond respect. Pour son dévouement, son professionnalisme et pour tout le temps qu'il nous a consacré afin qu'on puisse mener à bien notre tâche.*

*De même, nos remerciements vont vers **Mme Maghboune Ibtisseme**, Ingénieure au laboratoire Qualité-Analyse pour tous ses conseils, ses encouragements et son enthousiasme. C'était un véritable plaisir de travailler ensemble.*

*Nous adressons nos remerciements à l'ensemble des **ingénieurs et techniciens** des laboratoires du CRB<sub>t</sub> pour leur aide.*

*Nous exprimons notre plus profonde gratitude à tous les enseignants, en particulier au **Dr Krim Meriem et Dr Kara Ali wahiba** du département de biologie qui a contribué à notre formation pendant les cours Universitaires.*



## Dédicace



Nous remercions **Dieu** tout – puissant pour notre courage, Patience et vol pour faire le travail.

Nous dédions ce travail qui est l'aboutissement de toutes les années d'études Ce qui n'est pas fini sans vos encouragements :

**A nos chers parents** qui nous ont toujours encouragés tout au long de notre vie Pour les études on n'oubliera jamais leurs sacrifices pour nous, on lui dit : **Nous dédions ce travail à notre défunte mère, que Dieu lui fasse miséricorde**

**Merci cher père Belkacem.** Qui peut être fier et trouver ici le résultat de nombreuses années de sacrifices et d'épreuves pour nous aider à avancer dans la vie. Que Dieu veuille que cette œuvre porte ses fruits. Merci pour vos valeurs nobles, votre éducation et votre soutien constant.

**Merci la femme de notre père.** Ton affection sans bornes était avec nous Pour la durée de ce travail. Nous ne pourrons jamais Merci.

**A nos frères** Soufian, Fethi, Laid, et **nos sœurs** Loubna, Hanna, Hamida, **surtout Hassiba qui** étudiait avec nous.

Les mots ne suffisent guère pour exprimer votre accomplissement et votre amour pour nous, et l'affection votre orientation

Il n'y a pas de sécurité mais la sécurité des parents, et il n'y a pas de lien sauf le soutien du frère. Il n'y a d'amour que l'amour des sœurs. Oh Dieu, protège notre famille pour la fin de nos vies.

**A la femme de notre cher frère Faiza** qui nous a soutenus dans notre cheminement scolaire

**A nos amies** avec lesquelles nous l'avons partagé les meilleurs moments de notre vie : Merwa, Kenza, Soundes, Khaoula, Fathila, Asala, et doctorante Nadjma.

Et enfin, nous remercions **notre chauffeur Mr. Sulaiman** pour l'intérêt que' il nous porte depuis notre parcours scolaire.

**Wahiba & Soumia**

---

## Table des matières

Liste des tableaux	I
Liste des figures	II
Liste des abréviations	III

### Introduction

## Chapitre I. La synthèse bibliographique

### Partie 01 .les plantes médicinales

<b>I.1. Présentation de la plante médicinale Cynodon dactylon (L).....</b>	<b>04</b>
I.1.1. La famille Poaceae, ou graminées.....	04
I.1.2. Le genre Cynodon.....	04
I.1.3. L'espèce Cynodon dactylon (L).....	04
I.1.4. Aspect botanique de l'espèce Cynodon dactylon (L) .....	05
I.1.5. Systématique de l'espèce Cynodon dactylon (L).....	06
I.1.6. Répartition géographique de l'espèce Cynodon dactylon (L).....	06
I.1.7. Usage traditionnelle de l'espèce Cynodon dactylon (L).....	07
<b>I.2. Présentation de la plante médicinale Androcymbium gramineum.....</b>	<b>07</b>
I.2.1. La famille Colchicaceae.....	07
I.2.2. Le genre Androcymbium.....	08
I.2.3. L'espèce Androcymbium gramineum.....	08
I.2.4. Aspect botanique de l'espèce Androcymbium gramineum.....	09
I.2.5. Systématique de l'espèce Androcymbium gramineum.....	09
I.2.6. Répartition géographique de l'espèce Androcymbium gramineum.....	10
I.2.7. Usage traditionnelle de l'espèce Androcymbium gramineum.....	11

## **Partie02. généralites sur les polyphénols**

<b>I.2. les polyphénols.....</b>	<b>11</b>
<b>I.2.1. Définition .....</b>	<b>11</b>
<b>I.2.2 Classification des polyphénols.....</b>	<b>11</b>
<b>I.2.2.1. Acides phénoliques .....</b>	<b>13</b>
➤ <b>Acide hydroxy-benzoïque.....</b>	<b>13</b>
➤ <b>Acide hydroxy-cinamiques.....</b>	<b>13</b>
<b>I.2.2.2. Flavonoïdes.....</b>	<b>14</b>
<b>I.2.2.3. Tanins.....</b>	<b>15</b>
➤ <b>Tanins hydrolysables .....</b>	<b>15</b>
➤ <b>Tanins condensés .....</b>	<b>16</b>
<b>I.2.3. Propriétés biologiques et applications industrielles des polyphénols .....</b>	<b>16</b>

## **Partie 03. Les maladies**

<b>I.3. Stress oxydatif.....</b>	<b>18</b>
<b>I.3.1 Les radicaux libres.....</b>	<b>18</b>
<b>I.3.2. Les antioxydants.....</b>	<b>20</b>
<b>I.3. 3. L'Alzheimer.....</b>	<b>21</b>
<b>I.3.4. Le diabète .....</b>	<b>21</b>

## **Chapitre II. Matériels et Méthodes**

<b>II.1. Matériel végétal.....</b>	<b>29</b>
<b>II.2. Méthodes d'extraction.....</b>	<b>29</b>
<b>II.2.1.préparation d'extrait hydrométhanoïque.....</b>	<b>29</b>
<b>II.2.2.préparation d'extraits aqueux.....</b>	<b>31</b>
<b>II.3.analyse phytochimique.....</b>	<b>32</b>
<b>II.3.1 Détermination du contenu total en polyphénols et la teneur des flavonoïdes....</b>	<b>32</b>

II.3.1.1 Estimation du contenu total en polyphénols (TPC).....	32
II.3.1.2 Estimation du contenu total en flavonoïdes (TFC).....	33
II.4. Activités biologiques.....	34
II.4.1.préparation des dilutions des extraits.....	34
II.4.2. Activités antioxydantes.....	35
II.4.2.1. Activité antiradicalaire au DPPH.....	35
II.4.2.2. Activité du piégeage du cation radical ABTS •+ .....	37
II.4.2.3Activité de réduction du complexe cuivre-néocuproïne (CUPRAC).....	38
II.4.2.4. Activité de réduction par la formation du complexe Fe +2 – phénantroline...39	
II.4.3. Activités Anti-enzymatiques.....	40
II.4.3.1 Evaluation de l'activité antidiabétique.....	40
II.4.3.2 Evaluation de l'activité anti-Alzheimer.....	41

### Chapitre III. Résultats et Discussions

III.1. Détermination du contenu total en polyphénols et la teneur des flavonoïdes et des tanins .....	45
III.2. les Activités biologiques.....	47
III.2.1.les Activités antioxydants.....	47
III.2.1.1.Activité anti-radicalaire au DPPH* .....	47
III.2.1.2.Activité du piégeage du cation radical ABTS <sup>•+</sup> .....	49
III.2.1.3. Activité de réduction du complexe cuivre-néocuproïne (CUPRAC).....	52
III.2.1.4. Activité de réduction par la formation du complexe Fe <sup>2+</sup> -Phénontroline.....	54
III.2.2 Activité enzymatique .....	56
III.2.2.1. Evaluation de l'activité antidiabétique.....	56
III.2.2.2Evaluation de l'activité anti-Alzheimer.....	59

**Annexe**

**Résumé**

**Abstract**

**الملخص**

## Liste des tableaux

Numéro	Titre	page
<b>Chapitre I</b>		
<b>Partie I</b>		
<b>Tableau I.01.</b>	<b>Position systématique de Cynodon dactylon(L)</b>	<b>05</b>
<b>Tableau I.02.</b>	<b>Position systématique d'Androcymbium gramineum</b>	<b>09</b>
<b>Partie II</b>		
<b>Tableau I.03.</b>	<b>Principales classes de composés phénoliques</b>	<b>12</b>
<b>Chapitre II</b>		
<b>Tableau II.04.</b>	<b>Préparation de la gamme d'étalon de l'acide gallique</b>	<b>33</b>
<b>Tableau II.05.</b>	<b>Préparation de la gamme d'étalon de la Quercétine</b>	<b>34</b>
<b>Chapitre III</b>		
<b>Tableau.III.06.</b>	<b>Le contenu total en polyphénols et la teneur des flavonoïdes des extraits de Androcymbium gramineum et Cynodon dactylon</b>	<b>45</b>
<b>Tableau.III.07.</b>	<b>Inhibition du radical DPPH par les extraits d' Androcymbium gramineum et Cynodon dactylon</b>	<b>48</b>
<b>Tableau.III.08.</b>	<b>Inhibition du cation radical ABTS.</b>	<b>50</b>
<b>Tableau.III.09.</b>	<b>Réduction du complexe néocoproïne par la méthode CUPRAC</b>	<b>52</b>
<b>Tableau.III.10.</b>	<b>Absorbance du complexe Fe<sup>+2</sup>- phénantroline des extraits d' Androcymbium gramineum , Cynodon dactylon</b>	<b>55</b>
<b>Tableau.III.11.</b>	<b>Inhibition de l'<math>\alpha</math>-amylase par les extraits d' Androcymbium gramineum , Cynodon dactylon.</b>	<b>58</b>
<b>Tableau.III.12.</b>	<b>Inhibition d'acétylcholinestérase par les extraits Androcymbium gramineum et Cynodon dactylon.</b>	<b>60</b>

## Liste des équations

Équation. 01.Equation de la courbe d'étalonnage d'acide gallique.....

Équation.02.Equation de la courbe d'étalonnage de la quercétine.

## Listes des figures

Numéro	Titre	Page
<b>Chapitre I</b>		
<b>Partie I</b>		
<b>Figure.I.01.</b>	<b>La plante Cynodon dactylon (L)</b>	<b>05</b>
<b>Figure I.02.</b>	<b>La carte géographique mondiale du Cynodon dactylon(L)</b>	<b>06</b>
<b>Figure I.03.</b>	<b>Répartition géographique de la plante Cynodon dactylon(L) en Algérie</b>	<b>07</b>
<b>Figure I.04.</b>	<b>La plante d'Androcymbium gramineum</b>	<b>08</b>
<b>Figure I.05.</b>	<b>La carte géographique mondiale de l'espèce Androcymbium gramineum</b>	<b>10</b>
<b>Figure I.06.</b>	<b>Répartition géographique de la plante d'Androcymbium gramineum en Algérie</b>	<b>10</b>
<b>Partie II</b>		
<b>Figure I.07.</b>	<b>Exemple de quelques acides phénoliques</b>	<b>13</b>
<b>Figure I.08.</b>	<b>Squelette de base des flavonoïdes</b>	<b>14</b>
<b>Figure I.09.</b>	<b>Différents types de flavonoïdes à partir du squelette flavane</b>	<b>15</b>
<b>Figure I.10.</b>	<b>Structure chimiques de : a) Tanins hydrolysable b) Tanins condensée</b>	<b>16</b>
<b>Figure I.11.</b>	<b>Activités biologique des polyphénols</b>	<b>17</b>
<b>Partie III</b>		
<b>Figure I.12.</b>	<b>voie métabolique de l'oxygène et des espèces réactives de l'oxygène (ERO)</b>	<b>19</b>
<b>Figure I.13.</b>	<b>Les conséquences du stress oxydant</b>	<b>19</b>
<b>Figure I.14.</b>	<b>Transfert d'électron entre l'antioxydant et le radical libre</b>	<b>20</b>
<b>Figure I.15.</b>	<b>Schéma d'une synapse et mécanismes de neurotransmission cholinergique</b>	<b>21</b>
<b>Figure I.16.</b>	<b>Effet inhibiteur de l'Acarbose sur l'enzyme alpha glucosidase</b>	<b>23</b>
<b>Chapitre II</b>		

<b>Figure II.17.</b>	<b>Broyage des plantes à l'aide d'un broyeur électrique.</b>	<b>29</b>
<b>Figure II.18.</b>	<b>Extraction par macération de matériel végétal</b>	<b>30</b>
<b>Figure II.19.</b>	<b>Evaporateur rotatif du solvant d'extraction</b>	<b>30</b>
<b>Figure II.20.</b>	<b>Protocole de préparation des extraits hydro-méthanoïques</b>	<b>30</b>
<b>Figure II.21.</b>	<b>Protocole de préparation des extraits aqueux</b>	<b>31</b>
<b>Figure II.22.</b>	<b>Préparation de la solution mère des extraits de plantes Androcymbium Gramineum et Cynodon dactylon (L)</b>	<b>35</b>
<b>Figure II.23.</b>	<b>Transformation du radical DPPH • en DPPH.</b>	<b>36</b>
<b>Figure II.24.</b>	<b>Formation et piégeage du radical ABTS •+ par un antioxydant donneur de H•</b>	<b>37</b>
<b>Figure II.25.</b>	<b>Réduction du complexe chromogène de Cu +2 -Nc 2</b>	<b>38</b>
<b>Figure II.26.</b>	<b>Formation du complexe Fe +2 -phénantroline</b>	<b>39</b>
<b>Figure II.27.</b>	<b>Formation du complexe amylose-iode en absence de α- amylase.</b>	<b>40</b>
<b>Figure II.28.</b>	<b>Mécanisme chimique de la méthode anti- acétylcholinestérase.</b>	<b>42</b>
	<b>Chapitre III</b>	
<b>Figure III.29.</b>	<b>dosage des polyphénols d'Androcymbium gramineum et Cynodon dactylon.(a) l'extraits hydro- méthanoïques,(b)l'extraits aqueux.</b>	<b>45</b>
<b>Figure III.30.</b>	<b>dosage des polyphénols d'Androcymbium gramineum et Cynodon dactylon.(a) l'extraits hydro- méthanoïques,(b)l'extraits aqueux.</b>	<b>46</b>
<b>Figure III.31.</b>	<b>Plaque de dosage de l'activité anti radicalaire (DPPH) des extraits d'Androcymbium gramineum et Cynodon dactylon.</b>	<b>47</b>
<b>Figure III.32.</b>	<b>Valeurs CI50 du test DPPH de l'extrait aqueux</b>	<b>48</b>
<b>Figure III.33.</b>	<b>Valeurs CI50 du test DPPH de l' extrait hydro- méthanoïque</b>	<b>48</b>
<b>Figure III.34.</b>	<b>La plaque de dosage de l'activité du piégeage du cation radical ABTS•+ des extraits d' Androcymbium gramineum et Cynodon dactylon.</b>	<b>50</b>

<b>Figure III.35.</b>	<b>Valeurs CI50 du test ABTS<sup>+</sup> de l'extrait hydro-méthanoïque.</b>	<b>51</b>
<b>Figure III.36.</b>	<b>Valeurs CI50 du test ABTS<sup>+</sup> de l' extrait aqueux</b>	<b>51</b>
<b>Figure III.37.</b>	<b>La plaque de dosage de l'activité de réduction du complexe cuivre-néocuproïne des extraits d' Androcymbium gramineum et Cynodon dactylon.</b>	<b>52</b>
<b>Figure III.38.</b>	<b>Valeurs des A0,50 du test CUPRAC pour l'extraits hydro-méthanoïque</b>	<b>53</b>
<b>Figure III.39.</b>	<b>Valeurs des A0,50 du test CUPRAC pour l'extraits aqueux.</b>	<b>53</b>
<b>Figure III.40.</b>	<b>La plaque de dosage de l'activité de réduction par la formation du complexe Fe<sup>+2</sup>- phénantroline par les extraits (a) aqueux ,(b) hydro-méthanoïque d' Androcymbium gramineum , Cynodon dactylon</b>	<b>54</b>
<b>Figure III.41.</b>	<b>Valeurs des A0.5 dans le test phénanthroline pour l'extrait hydro-méthanoïque.</b>	<b>55</b>
<b>Figure III.42.</b>	<b>Valeurs des A0.5 dans le test phénanthroline pour l'extrait aqueux.</b>	<b>55</b>
<b>Figure.III.43.</b>	<b>Plaques de dosage de l'activité inhibitrice d'alpha-amylase des extraits d'Androcymbium gramineum.</b>	<b>57</b>
<b>Figure.III.44.</b>	<b>Plaques de dosage de l'activité inhibitrice d'alpha-amylase des extraits de Cynodon dactylon .</b>	<b>57</b>
<b>Figure III.45.</b>	<b>Valeurs des CI50 du test d'inhibition de l'α-amylase pour l'extrait hydro-méthanoïque.</b>	<b>58</b>
<b>Figure.III.46.</b>	<b>Valeurs des CI50 du test d'inhibition de l'α-amylase pour l'extrait aqueux.</b>	<b>58</b>
<b>Figure.III.47.</b>	<b>La plaque de dosage de l'activité inhibitrice de l' acétylcholinestérase par les extraits d'Androcymbium gramineum et Cynodon dactylon.</b>	<b>60</b>
<b>Figure.III.48.</b>	<b>Valeurs des CI50 du test d'inhibition de l'α-amylase pour l'extrait hydro-méthanoïque.</b>	<b>61</b>
<b>Figure.III.49.</b>	<b>Valeurs des CI50 du test d'inhibition de l'α-amylase pour l'extrait aqueux.</b>	<b>61</b>

## Liste des abréviations

- + **A<sub>0,5</sub>** : Concentration indiquant 0,50 d'absorbance
- + **ABTS** : Sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)
- + **AChE** : Acétylcholinestérase
- + **ADN** : Acide désoxyribonucléique
- + **BHA** : Butylhydroxyanisole
- + **BHT** : Butylhydroxytoluène
- + **°C** : Degré Celsius
- + **CI<sub>50</sub>** : Concentration d'inhibition à 50%
- + **CUPRAC** : Complexe cuivre- néocuproïne
- + **DPPH** :  $\alpha,\alpha$ -diphényl- $\beta$ -picrylhydrazyl
- + **DTNB** : Acide 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoïque)
- + **EAG** : Équivalent de l'acide gallique
- + **EAQAG** : Extrait aqueux d'Androcymbium gramineum
- + **EAQCD** : Extrait aqueux d'Cynodon dactylon (L)
- + **EHMAG** : Extrait hydrométhanolique d'Androcymbium gramineum
- + **EHMCD** : Extrait hydrométhanolique d'Cynodon dactylon (L)
- + **EQ** : Équivalent de la quercétine
- + **g** : Gramme
- + **m** : Masse
- + **M** : Molaire
- + **mg** : Milligramme
- + **min** : Minute
- + **ml** : Millilitre
- + **mM** : Millimolaire
- + **MM** : Masse molaire
- + **mmol** : Millimole
- + **nm** : Nanomètre
- + **pH** : Potentiel hydrogène
- + **ppm** : Partie par million
- + **s** : Seconde
- + **TEAC** : Capacité antioxydante équivalente Trolox

- + **TFC** : Contenu total en flavonoïdes
- + **TPC** : Contenu total en polyphénols
- + **Trolox** : Acide 3,4-dihydro-6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthyl-2H-1-benzopyran-2-carboxylique
- + **U** : Unité
- + **UV** : Ultraviolet
- + **µg** : Microgramme
- + **µl** : Microlitre
- + **µmol** : Micromole

*Introduction*  
*Générale*

# Introduction générale

---

## Introduction générale

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

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

A travers le monde, la médecine traditionnelle constitue soit le mode principal de prestation de soins de santé, soit un complément à ce dernier, elle fournit des alternatives médicales ayant des propriétés pharmacologiques indiscutables. En effet, en 2002, l'OMS estime qu'environ 80% de la population africaine dépendent encore des médecines traditionnelles pour répondre à certains de leurs besoins au niveau des soins de santé primaire. Or, dans les pays industrialisés, c'est sous forme de thérapies complémentaires que les plantes sont aujourd'hui surtout utilisées. En Europe et en Amérique du Nord, plus de 50% de la population a eu recours au moins une fois à des compléments alimentaires à base de plantes. C'est encore beaucoup plus au Canada (70 %) et en Allemagne (90%).

## Introduction générale

---

Une des singularités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protéides, lipides et acides nucléiques), ils synthétisent également une foule importante d'autres métabolites indirectement essentiels à la vie des plantes, dits « métabolites secondaires ».

L'Algérie, grâce à sa situation géographique particulière, sa superficie étendue et son relief, bénéficie d'une gamme très variée de climats et de sols, favorisant le développement d'une flore riche et diversifiée. En effet, le territoire Algérien couvre d'importantes ressources végétales. Cette richesse et cette originalité font que l'étude présente un intérêt scientifique.

Notre travail s'est consacré à l'étude phytochimique et l'évaluation des activités biologiques de l'extrait hydro-méthanolique et aqueux de deux plantes médicinales très peu étudiées de la région de Ghardaïa. La première plante est *Androcymbium gramineum*, appartient à la famille *Colchicaceae* et la deuxième plante *Cynodon dactylon* (L.) appartient à la famille *Poaceae*. Ce manuscrit est structuré comme suit :

- Le premier chapitre est consacré à des généralités bibliographiques sur les familles des *Colchicaceae* et des *Poaceae*, ainsi que sur des généralités sur les polyphénols, le stress oxydatif, la maladie de diabète et la maladie d'Alzheimer.
- Le deuxième chapitre concerne la partie expérimentale comportant la description du matériel biologique, les méthodes d'extraction, et les méthodes d'évaluation in vitro des activités antioxydante, anticholinestérase et antidiabétique.
- Le troisième chapitre comprend les résultats et discussions de la composition chimique de l'extrait hydrométhanolique et aqueux de la plante *Androcymbium gramineum* et la plante *Cynodon dactylon* (L.) de la région de Ghardaïa, ainsi que les résultats des activités antioxydante, anticholinestérase, antidiabétique in vitro des extraits de la plante.

### Références bibliographiques

[1] Moraux, T., & Dorchy, H. (2005). Le poids de l'obésité dans le (pré) diabète de type 2 chez les enfants et adolescents : quand et comment le rechercher?. *Archives de pédiatrie*, 12(12), 1779-1784

[2] Villar, E., & Zaoui, P. (2010). Diabète et maladie rénale chronique : ce que nous apprend l'épidémiologie. *Néphrologie & thérapeutique*, 6(7), 585-590.

[3] Cummings, J. L., & Cole, G. (2002). *Alzheimer disease. Jama*, 287(18), 2335-2338

# *Chapitre I*

## *Recherche bibliographique*

## I.1. Présentation de la plante médicinale *Cynodon dactylon* (L)

### I.1.1. La famille Poaceae, ou graminées

Les *Poacées*, appelé *Poaceae* (anciennement connues sous le nom de *graminées*), sont une famille de plantes monocotylédones de l'ordre des *Poales*, qui comprend environ 12 000 espèces groupées en 780 genres, à répartition cosmopolite [1]. C'est, par le nombre d'espèces, la cinquième famille de plantes à fleurs, après les *Asteraceae*, *Orchidaceae*, *Fabaceae* et *Rubiaceae*. On y trouve la plupart des espèces appelées communément herbes et les céréales [1]. Ce sont généralement des plantes herbacées, plus rarement ligneuses (bambous), qui partagent des caractéristiques morphologiques qui les distinguent nettement des autres familles végétales : tiges (chaumes) cylindriques aux entrenœuds creux, feuilles alternes à disposition distique, au limbe linéaire à nervation parallèle, et dont la gaine enveloppe la tige, inflorescence élémentaire en épillets, fleurs réduites aux organes sexuels (étamines et ovaire), fruits dont le péricarpe est soudé à la graine (caryopses) [2]. C'est une famille cosmopolite qui présente un intérêt économique majeur, assurant une grande partie de l'alimentation de l'humanité. [3]. En Algérie, les *Poaceae* représentent l'une des espèces les plus communes familles importantes de plantes algériennes 286 espèces [4] et 29 genre [5].

### I.1.2. Le genre *Cynodon*

*Cynodon* est un genre de plantes monocotylédones de la famille *Poaceae* (graminées), sous-famille des *Chloridoideae*, originaire des régions tropicales et subtropicales, qui comprennent une dizaine d'espèces. Ce sont des plantes herbacées vivaces, rhizomateuses ou stolonifères aux tiges pouvant atteindre de 60 à 100 cm de long, et au aux inflorescences digitées ou subdigitées composées de racèmes spiciformes. Plusieurs espèces sont des mauvaises herbes des cultures. Certaines espèces sont utilisées comme plantes fourragères ou pour constituer des pelouses [6].

### I.1.3. L'espèce *Cynodon dactylon* (L)

C'est une herbe à croissance rapide qui se propage par graines et stolons, colonisant rapidement de nouvelles zones et se développant en nattes denses (**Figure I.1**). Comme beaucoup d'autres herbes africaines, *Cynodon dactylon* est tolérant à la sécheresse grâce à la survie des racines à la sécheresse induite par la dormance sur des périodes allant jusqu'à 7 mois. Après la dormance, il a la capacité de re-germer facilement à partir des racines et des coureurs de racines. Les

plantes récupèrent également rapidement après un incendie et peuvent supporter au moins plusieurs semaines d'inondations profondes [7].



*Figure.I.1. La plante Cynodon dactylon (L)*

**I.1.5. Systématique de l'espèce *Cynodon dactylon* (L)**

La plante *Cynodon dactylon* (L) appartient à la systématique suivante [8] :

*Tableau I.1. Position systématique de Cynodon dactylon(L)*

<b>Domaine</b>	Eucaryote
<b>Règne</b>	Planta
<b>Sous règne</b>	Viridiaeplantae
<b>Embranchement</b>	Spermatophyta
<b>Division</b>	magnoliophyta
<b>Classe</b>	Monocotyledonae
<b>Ordre</b>	Cyperales
<b>Famille</b>	Poaceae
<b>Genre</b>	Cynodon
<b>Espèces</b>	Cynodon dactylon

#### I.1.4. Aspect botanique de l'espèce *Cynodon dactylon* (L)

C'est une plante graminée vivace, très variable, à long stolons rampants à croissance rapide, enracinant aux nœuds, formant une touffe dense à la surface du sol, des coureurs parfois de 20 m de long; feuilles de 2,5-20 cm de long, 2-6 mm large, plat ou parfois plié ou convoluté. L'inflorescence sur les chaumes est de 15 cm à 1 m de hauteur composée de 2 à 12 épis disposés en étoile au sommet de la tige. Les épis sont de 2,5-10 cm de long avec de nombreux épillets, disposés en deux rangées sur une côté de la pointe. Les épillets plats sont entre 2-2,5 mm de long, sans arête, à une fleur ; glumes inégales, la partie supérieure plus longue de un tiers à trois quarts de longueur du fleuron [9].

#### I.1.6. Répartition géographique de l'espèce *Cynodon dactylon* (L)

*Cynodon dactylon* est originaire d'Afrique. Mais il est maintenant distribué dans le monde entier dans les régions tropicales et subtropicales, notamment l'Asie, l'Amérique du Nord, l'Amérique centrale et méridionale, les Caraïbes et les îles du Pacifique (**Figure I.2**). Elle est également répandue dans les régions tempérées d'Europe et d'Amérique du nord [10]. En Algérie, la distribution de *Cynodon dactylon* (L) est dans les endroits humides du désert Champs, bords de routes, monuments, lieux sablonneux dans les plaines et les basses montagnes, lieux humides et salés [11] (**Figure I.3**).



**Figure I.2.** La carte géographique mondiale du *Cynodon dactylon*(L)



Figure I.3. Répartition géographique de la plante *Cynodon dactylon*(L) en Algérie

### I.1.7. Usage traditionnelle de l'espèce *Cynodon dactylon* (L)

Traditionnellement, cette plante est utilisée partout dans le monde. Le jus de plante frais était utilisé comme adoucissant, astringent et dans le traitement de hydropisie, anasarque, ophtalmie catarrhale, syphilis secondaire, diarrhée chronique et dysenterie. Le jus frais exprimé de herbe a été utilisé dans hématuries, les vomissements et comme application dans l'ophtalmie catarrhale, et peut également être appliqué sur les coupures et blessures, et dans la diarrhée chronique et la dysenterie. Les décoctions de racine ont été utilisées dans le calcul vésical et secondaire syphilis, arrêt des saignements dus à des tas et irritation des organes urinaires [9 - 12].

## I.2. Présentation de la plante médicinale *Androcymbium gramineum*

### I.2.1. La famille *Colchicaceae*

Famille de 15 genres et 170 espèces originaires principalement d'Australie, d'Afrique du sud, d'Europe et Asie mineure, elle est issue de lys. Ce sont généralement des plantes vivaces tubéreuses ou bulbeuses. Les espèces de cette famille sont caractérisées par des fleurs hermaphrodites, triangulaires et pentagonales [13]. *Colchicaceae*, c'est une famille cosmopolite qui présente un intérêt pharmaceutique comme le *colchique* (*Colchicum autumnale*), qui est un poison mortel dont le principe actif est la *Colchicine*, c'est un antimétabolite puissant [13]. La *Colchicine* ( $C_{22}H_{25}NO_6$ ) est un médicament antimétabolite, qui arrête ou inhibe la division

cellulaire, en métaphase ou en anaphase. Elle a été utilisée traditionnellement pour le traitement de la goutte pour son action anti-inflammatoire. Elle est actuellement utilisée comme immunomodulateur et antifibrotique dans les maladies auto-immunes telles que la sclérodermie, la cirrhose biliaire primitive, etc. et d'autres maladies telles que l'amylose, la dermatite herpétiforme, la péricardite ou le pseudo goutte.

### I.2.2. Le genre *Androcymbium*

*Androcymbium* est un genre de la famille des *Colchicacées* que l'on trouve en Afrique et en Méditerranée [14]. Il existe environ 40 espèces et 13 d'entre elles se trouvent dans la province du Cap Floral. Les espèces de ce genre ont peu de fleurs dressées sur de courts pédicelles et ont généralement une tête surmontée de bractées vertes ou pétaloïdes.

### I.2.3. L'espèce *Androcymbium gramineum*

Cette plante appartient à la famille des *Colchicaceae* (ou, selon d'autres auteurs, les *Liliacées* au sens large). L'étude phytochimique faite par *Ellington et al*, a montré qu' *Androcymbium gramineum* contient 10 métabolites secondaires parmi lesquels révèle la présence de deux principaux alcaloïdes, la colchicine et la démécolcine alors que les graines contiennent de la colchicine et de la colchicoside, flavonoïdes, tanins, saponosides, hétérosides, stérols, triterpènes, mucilages, oses et holosides. [15].



*Figure I.4. La plante d'Androcymbium gramineum*

#### I.2.4. Aspect botanique de l'espèce *Androcymbium gramineum*

Herbe glabre pouvant atteindre environ 30 centimètres, qui forme un simple bulbe de 1 ou 2 cm, parfois 2 ou 3, coriace, de couleur brune. Tige souterraine courte, protégée par une membrane qui les entoure tous. Feuilles étroites, vertes et lustrées, linéaires ou lancéolées, jusqu'à 15 centimètres de long, traînant au sol, striées, plates ou légèrement incurvées, présentant des nervures parallèles. Il crée des inflorescences ombelliformes, avec 1 à 4 fleurs naissant du centre de la rosette foliaire, actinomorphes, hermaphrodites, de couleur blanche à rosâtre, avec des veines roses plus intenses. Il possède 6 étamines qui naissent de la base des tépales, avec un filet pouvant atteindre 1 cm et des anthères d'un peu plus de 1 mm. L'ovaire possède 3 carpelles et 3 loges. Le fruit est une capsule, d'environ 6 à 8 mm, qui, fragmentée à la base, libère 8 à 18 graines qui sont dispersées par le vent (**Figure I.4**) [16].

#### I.2.5. Systématique de l'espèce *Androcymbium gramineum*

D'après *Patrick Le Ménahèze*, la systématique de la plante *Androcymbium gramineum* est la suivante [17] :

*Tableau I.2. Position systématique d'Androcymbium gramineum*

<b>Domain</b>	Eukarya
<b>Régne</b>	Plantae
<b>Sous-règne</b>	tracheobionta
<b>Division</b>	Magnoliophyta
<b>Embranchement</b>	Tracheophyta
<b>Classe</b>	Liliopsida
<b>Ordre</b>	Liliales
<b>Familia</b>	Colchicaceae
<b>Genre</b>	Androcymbium
<b>Espèce</b>	<i>A. gramineum</i>

### I.2.6. Répartition géographique de l'espèce *Androcymbium gramineum*

*Androcymbium gramineum* se trouve dans la province d'Almeria, en Espagne et au Maroc (dans le désert du Sahara des deux côtés de et le long la chaîne de l'Atlas), avec des groupes trouvés dans tout l'Atlantique intérieur et côtier du Maroc et en Tunisie, en Algérie et en Mauritanie [18] (Figure I.5). En Algérie, cette espèce se localise beaucoup plus dans le désert entre Ghardaia et Jouleh, mais aussi à bécher, naâma et Tamanrasset [19] (Figure I.6).



Figure I.5. La carte géographique mondiale de l'espèce *Androcymbium gramineum*

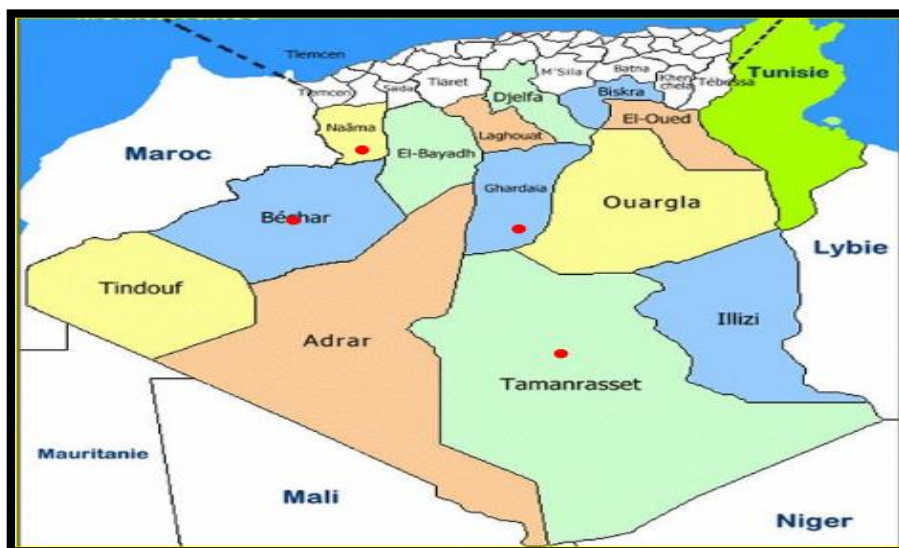


Figure I.6. Répartition géographique de la plante d'*Androcymbium gramineum* en Algérie

### I.2.7. Usage traditionnelle de l'espèce *Androcymbium gramineum*

Les feuilles et fleurs de cette plante contiennent de la *Colchicine*, sont utilisées pour le traitement de la goutte [20]. Les bulbes de cette plante sont aussi utilisés pour des applications thérapeutiques et traditionnelles locales, l'infusion du bulbe est utilisée pour régler la glycémie chez les personnes diabétiques, mais la toxicité de la plante n'y est pas ignorée, elle peut produire une hématurie, une congestion de la rate et des troubles pulmonaires. [21]

## I.3. Les polyphénols

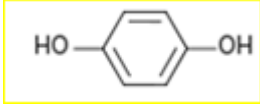
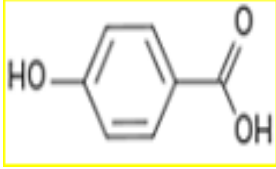
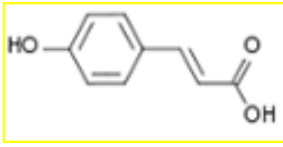
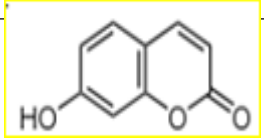
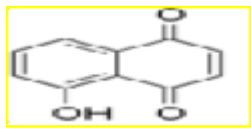
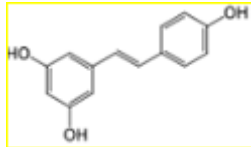
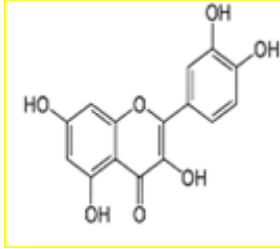
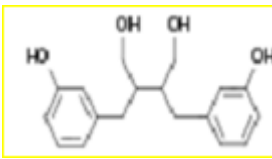
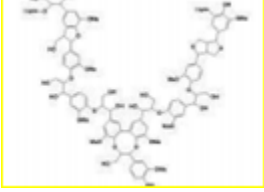
### I.3.1. Définition

Les polyphénols, dénommés aussi composés phénoliques, constituent un groupe important de substances naturelles de métabolites secondaires largement répandues dans le règne végétal [22, 23]. L'accumulation des polyphénols dans les plantes, varie quantitativement et qualitativement non seulement dans les différentes parties de la plante, mais aussi d'une espèce végétale à l'autre. Ils sont synthétisés par l'ensemble des végétaux et ils participent aux réactions de défense face à différents stress biotiques (agents pathogènes, blessures, symbiose) ou abiotiques (lumière, rayonnements UV, faible température, carences). Les polyphénols contribuent à la qualité organoleptique des aliments issus des végétaux (couleur, astringence, arôme, amertume) [24].

### I.3.2. Classification des polyphénols

La classification des polyphénols est basée essentiellement sur la structure, le nombre de noyaux aromatiques et les éléments structuraux qui lient ces noyaux. Les polyphénols sont caractérisés par la présence d'au moins un noyau benzénique, et un ou plusieurs groupes hydroxyles libres ou engagés dans une autre fonction : éther, ester ou hétéroside, en plus d'autres constituants [25]. Plus de 8000 structures ont été identifiées [26], allant de simples molécules comme les acides phénoliques à des substances hautement polymérisées comme les tanins. Ils sont communément subdivisés en acides phénoliques, coumarines, stilbènes, flavonoïdes, lignanes, lignines et tanins. Le **tableau I.3** regroupe les principales classes de polyphénols selon *Macheix et al.* [27]

Tableau I.3. Principales classes de composés phénoliques

Squelette carboné	Classe	Exemple	Forme	Origine
C6	Phénols simple	Hydroquinone		Busserole
C6-C1	Acides hydroxybenzoïque	Acides p-hydroxybenzoïque		Epices, fraise
C6-C3	Acides hydroxycinamiques	Acides p-coumariques		Pomme de terre, pomme citrus Carottes, coriandre
	Coumarines	Ombelliférone		
C6-C4	Juglone	Naphtoquinone		Noix
C6-C2-C6	Stibénoides	Trans-resvératrol		Raisins
C6-C3-C6	Flavonoïdes	Quercétine		Oignon
(C6-C3)2	Lignanes	Entérodiol		Bactéries intestinales
(C15) n	Tannin	Procyanidol		Raisin rouge

### I.3.2.1. Acides phénoliques

Les acides phénols, ou acides phénoliques, sont caractérisés par une fonction acide et plusieurs fonctions phénols. Ils sont incolores et plutôt rares dans la nature. Ils se divisent en deux catégories : ceux dérivés de l'acide benzoïque, et ceux dérivés de l'acide cinnamique (Figure I.7) [28].

#### ➤ Acide hydroxy-benzoïque

Ils sont dérivés de l'acide benzoïque, ils ont une formule de base de type C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>. Ils existent fréquemment sous forme d'esters ou de glucosides et peuvent être également intégrés dans des structures complexes comme certains tanins, leurs principaux représentants sont l'acide salicylique et l'acide gallique [25].

#### ➤ Acide hydroxy-cinamiques

Ils représentent une classe très importante dont la structure de base est C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> dérivée de celle de l'acide cinnamique [25]. Ils sont représentés principalement par : l'acide p-coumarique, l'acide caféique, l'acide férulique et l'acide sinapique. Ces acides sont rarement présents sous forme libres, ils sont en général combinés à d'autre molécule organique, contrairement aux acides hydroxybenzoïque qui se représente majoritairement sous forme libre [29].

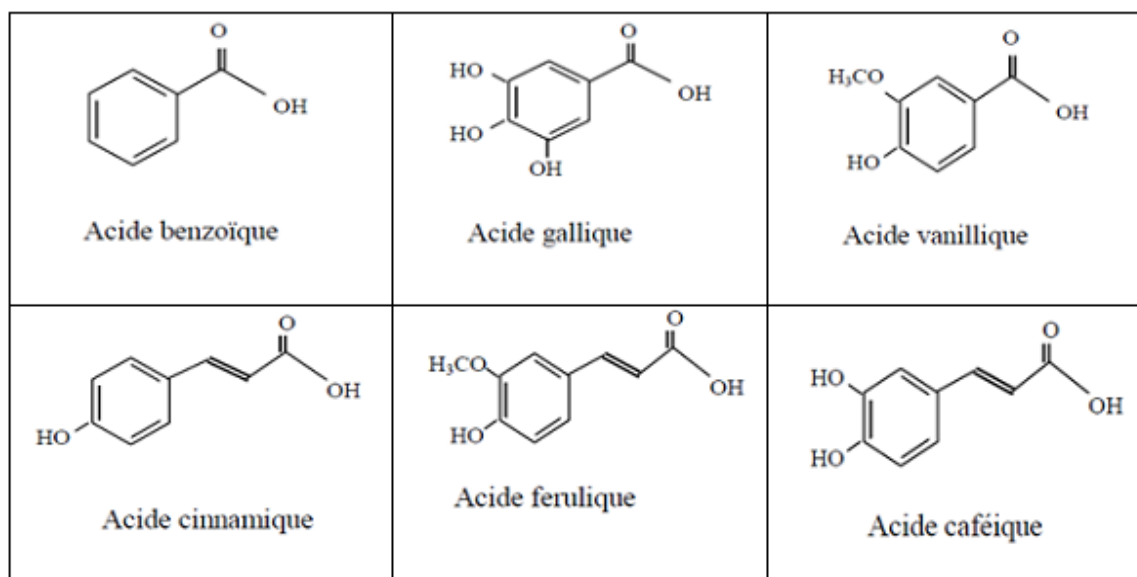
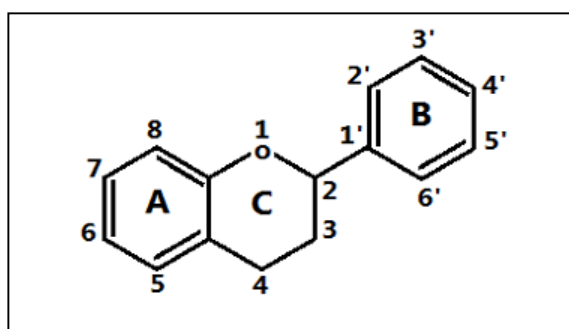


Figure I.7. Exemple de quelques acides phénoliques

### I.3.2.2. Flavonoïdes

Le terme flavonoïde rassemble une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols [30]. Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux, responsables de la pigmentation des plantes (fleurs, des fruits et parfois des feuilles) [24]. Ils interviennent dans les processus de défenses contre les rayonnements UV, les herbivores et les défenses microbiennes [31]. Tous les flavonoïdes possèdent le même élément structural de base ( $C_6-C_3-C_6$ ) : le noyau flavane, qui constitué de deux noyaux aromatiques A et B reliés entre eux par un hétérocycle oxygéné central C (**Figure I.8**).



*Figure I.8. Squelette de base des flavonoïdes*

Selon le degré d'oxydation et la nature des substituants portés sur le cycle, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules [32]. Les principales classes des flavonoïdes sont : les flavonols, les flavones, les flavanones, les flavan-3-ols, les isoflavones et les anthocyanes [33] (**Figure I.9**).

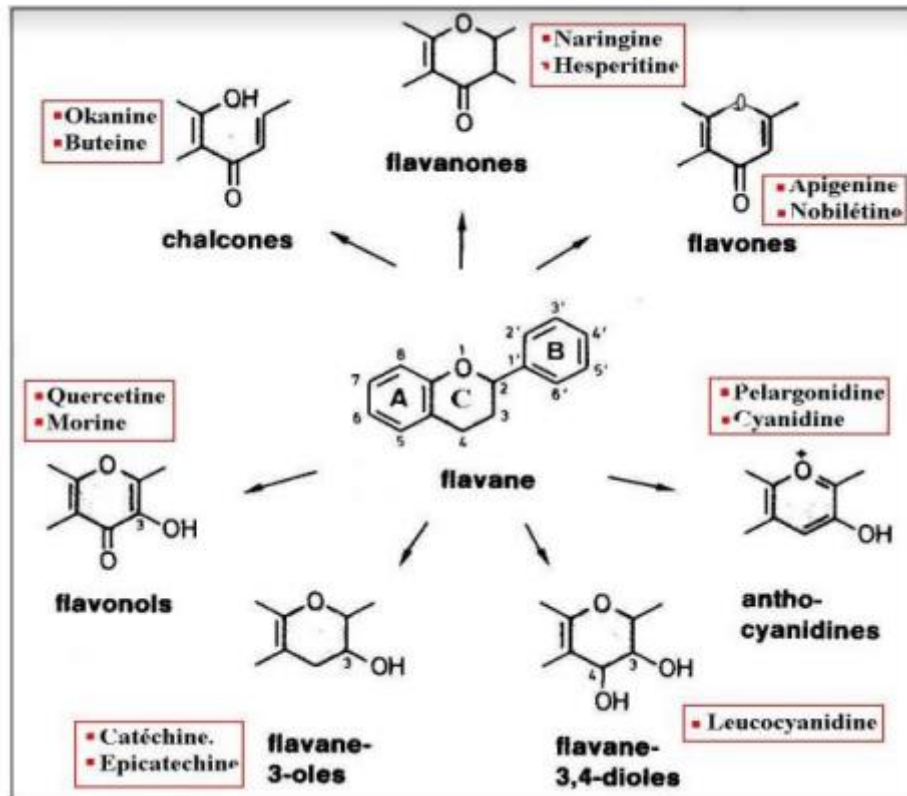


Figure I.9. Différents types de flavonoïdes à partir du squelette flavane

### I.3.2.3. Tanins

Les tanins sont définis comme des composés phénoliques hydrosolubles de structure variées, de masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 [34], ayant en commun la propriété de tanner la peau, c'est-à-dire de la rendre imputrescible. Ces substances ont en effet la propriété de précipiter la gélatine et d'autres protéines en solution et de se colorer par les sels ferriques [35]. Sont très répandus dans le règne végétal ils peuvent exister dans divers organes, mais on note une accumulation plus particulièrement dans les tissus plus âgés ou d'origine pathologique. Ils sont localisés dans les vacuoles, quelques fois combinés aux protéines et aux alcaloïdes. Sur le plan structural, les tanins sont divisés en deux groupes : hydrolysables et condensés (Figure I.10).

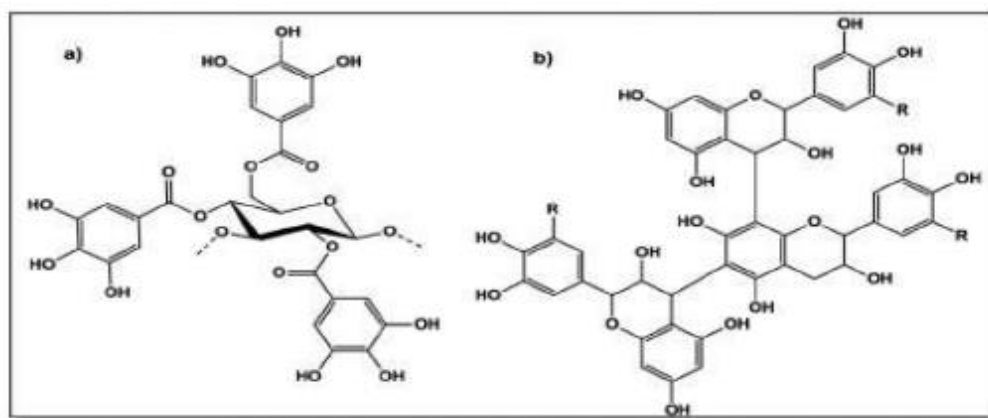
#### ➤ Tanins hydrolysables

Ce sont des hétéropolymères possédant un noyau central constitué d'un polyol. Il s'agit souvent d'un D-glucose sur lequel les groupements hydroxyles sont, en partie ou en totalité, estérifiés avec l'acide gallique ou un de ses dérivés (acide ellagique, chébulique ou valonique).

Comme leur nom l'indique, ces substances s'hydrolysent facilement en milieux acides et alcalins ou sous l'action d'enzymes (telle que la tannase), pour donner des glucides et des acides phénolique. [36].

➤ **Tanins condensés**

Tannins condensés ou tannins catechiques ou proanthocyanidols, qui se différent fondamentalement des tanins hydrolysables car ils ne possèdent pas de sucre dans leur molécule et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes. Il s'agit des polymères flaviniques constitués d'unité de flavan-3-ols liés entre eux par des liaisons carbone-carbone [24]. Ils sont résistants à l'hydrolyse enzymatique, seules les attaques chimiques fortes sont capables de les dégrader [37].

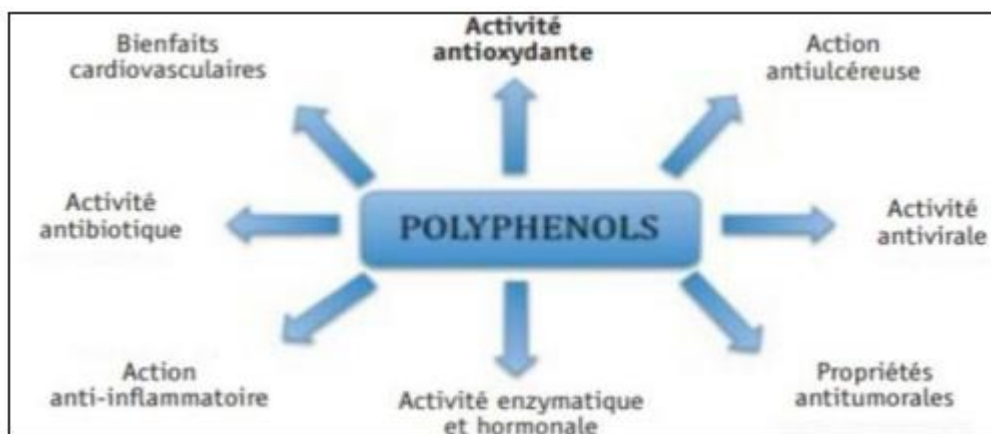


*Figure I.10. Structure chimiques de : a) Tanins hydrolysable b) Tanins condensée*

### I.3.3. Propriétés biologiques et applications industrielles des polyphénols

Les polyphénols en générale et les flavonoïdes en particulier attirent de plus en plus l'attention des chercheurs en raison de leurs nombreuses propriétés et effets bénéfiques sur la santé humaine. Des études épidémiologiques suggèrent que la consommation à long terme d'aliments riches en polyphénols, réduisent l'incidence et offrirait une protection pour limiter le développement de cancers, maladies cardiovasculaires, du diabète, des inflammations et d'autres pathologies [38] (**Figure I.11**). Ils agiraient en tant qu'antioxydants, qui est due à leurs propriétés redox en jouant un rôle important dans la protection des cellules contre les dommages oxydatifs, qui contribuent aux lésions des tissus dans le corps. Leurs mécanismes d'actions: soit par la neutralisation des radicaux libres (hydroxyles, uperoxydes, alkoxyles), piégeage de l'oxygène, ou décomposition des peroxydes; soit par chélation des métaux (le fer et le

cuire), qui sont d'importance majeure dans l'initiation des réactions radicalaires; soit l'inhibition des enzymes responsables de la génération des radicaux libres. Ces molécules sont décrites dans la littérature scientifique comme étant des antioxydants, anti-inflammatoires, des antimicrobiens, des allergènes, des neuroprotecteurs, antiviral [38].



*Figure I.11. Activités biologiques des polyphénols*

De telles propriétés ont donc été exploitées, et trouvent des applications dans de nombreux domaines industriels : en agroalimentaire, en cosmétique et dans l'industrie pharmaceutique. Grâce aux propriétés antimicrobiennes de certains polyphénols comme les flavan-3-ols, les flavanols et les tanins, il est désormais possible de développer des conservateurs alimentaires et de nouvelles thérapies dans de nombreuses maladies infectieuses en considérant la résistance microbienne face à certains traitements antibiotiques [39]. La capacité antioxydant de composés comme les polyphénols est utilisée dans l'alimentation pour lutter contre la peroxydation lipidique et ainsi permettre une meilleure stabilisation des denrées alimentaires. Ils sont également préconisés pour améliorer la stabilité de pigments de jus colorés (comme le jus de betterave), d'arômes alimentaires, et rentrent dans la composition de produits pharmaceutiques pour des utilisations par voie orale et des cosmétiques pour des applications locales [40]. Enfin, l'effet de certains flavonoïdes en médecine humaine est de plus en plus étudié dans le traitement de certaines maladies, et particulièrement pour le contrôle du virus de l'immunodéficience, principal responsable du SIDA [41].

#### I.4. Stress oxydatif

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO), sont des molécules prooxydantes qui se produites quotidiennement dans l'organisme. Certains radicaux libres sont utilisés par l'organisme comme médiateurs régulant les fonctions cellulaires comme la prolifération et la mort cellulaire programmée (apoptose), impliquant des modifications des voies de signalisation intracellulaires associées à une modulation de l'expression génique [42]. Ces dernières sont cependant contrôlées par les antioxydants. Un stress oxydatif survient lorsque l'équilibre est rompu en faveur des radicaux libres. Toutefois, une production excessive de ces molécules réactives ou une insuffisance des mécanismes antioxydants peut déséquilibrer la balance oxydant/antioxydant [43].

##### I.4.1 Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces chimiques, atomes ou molécules, possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur leur orbital externe [44] (**Figure I.12**). La présence des électrons confère souvent à ces molécules une grande instabilité, elles ont la possibilité de réagir avec de nombreux composés. Elles peuvent entraîner des lésions tissulaires en captant des électrons d'une molécule stable pour essayer d'apparier leurs propres électrons, laissant ainsi la molécule originale dans un état instable [45]. Ces radicaux libres sont généralement produit dans les mitochondries lors de la respiration [46][47], ou par les cellules phagocytaires (macrophages, neutrophiles...) lors de la flambée respiratoire, l'exposition de l'être l'humain aux rayonnements UV, l'inhalation d'oxyde d'azote NO et le dioxyde d'azote NO<sub>2</sub>, présents dans notre environnement (Ils sont à l'origine d'une auto-oxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI) des alvéoles pulmonaires) [48], l'ingestion d'alcool ou encore aussi certains médicaments anti-cancéreux antibiotiques. [49][50].

Réduction tétravalente de l'oxygène		$O_2 + 4e^- + 4 H^+ \longrightarrow 2 H_2O$
$O_2^{\cdot -}$	Anion superoxyde	$O_2 + 1e^- \longrightarrow O_2^{\cdot -}$
$H_2O_2$	peroxyde d'hydrogène	$O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} (+2H^+) \longrightarrow H_2O_2$
$\cdot OH$	Radical hydroxyle	$H_2O_2 + Fe^{+2} \longrightarrow \cdot OH + Fe^{+3} + OH^-$
		$H_2O_2 + H_2O_2 \longrightarrow 2 H_2O + O_2$
		$H_2O_2 + 2GSH \longrightarrow 2H_2O + GSSG$
$RO_2^{\cdot}$	Radical peroxyde	$R^{\cdot} + O_2 \longrightarrow RO_2^{\cdot}$
$RO_2H$	Hydroperoxyde	$RO_2^{\cdot} + RH \longrightarrow RO_2H + R^{\cdot}$
$RO^{\cdot}$	Radical alkoxyde	$RO_2H + Fe^{+2} \longrightarrow RO^{\cdot} + Fe^{+3} + OH^-$

Figure I.12. Voie métabolique de l'oxygène et des espèces réactives de l'oxygène (ERO) [9]

Le principal danger des radicaux libres vient des dommages qu'ils peuvent provoquer lorsqu'ils réagissent avec des composants cellulaires importants, tels que l'ADN [51] les lipides (peroxydation), les protéines etc [52]. Cette oxydation provoque des dommages sur tout l'organisme, accélérant le vieillissement (maladies cardiovasculaires et neuro-dégénératives, cancer, diabète) [53] et la dégradation des cellules et des tissus [54] (Figure I.13).

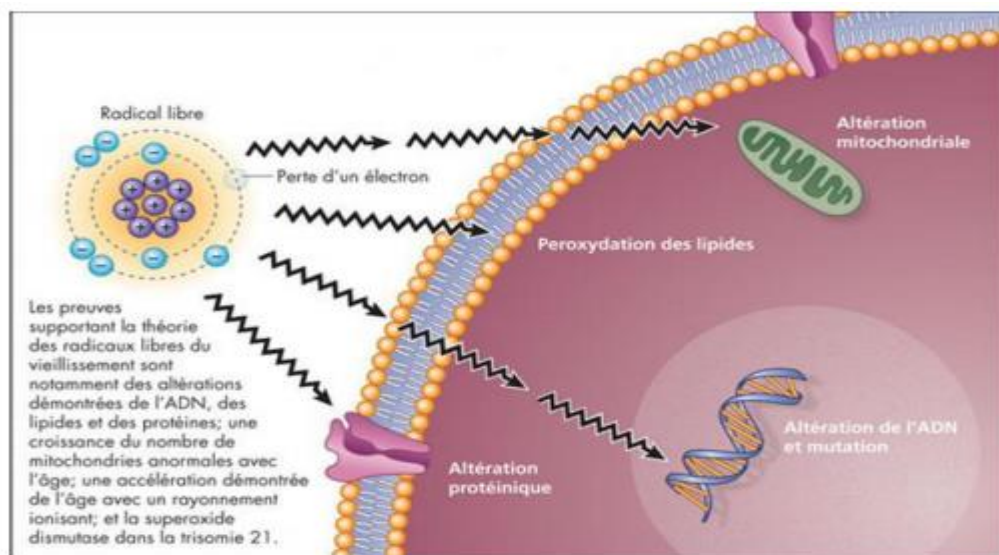


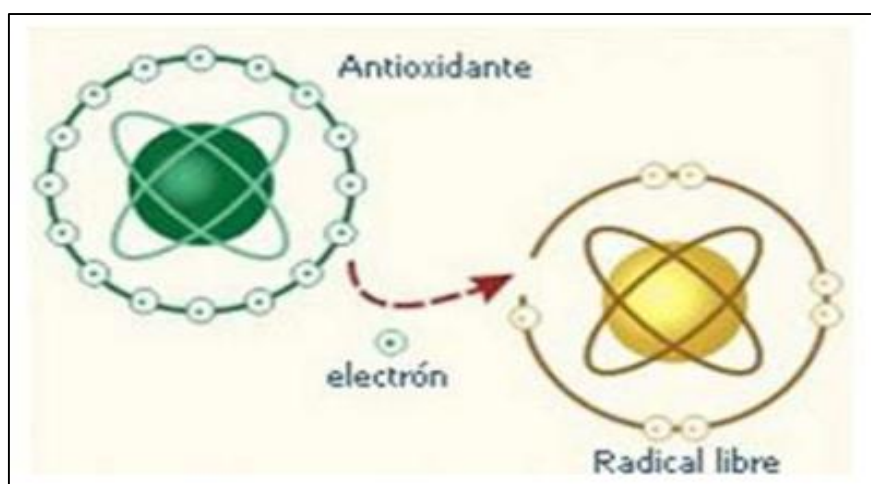
Figure I.13. Les conséquences du stress oxydant

#### I.4.2. Les antioxydants

Un antioxydant est une substance présente en faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable qui, de manière significative retarde ou empêche l'oxydation de ce substrat. [55]. Il

peut être de nature endogène (superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase, la catalase, et le glutathion) [56] ou exogènes (les vitamines C et E, les oligo-éléments, les médicaments, les caroténoïdes et des composés phénoliques) [57].

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulier, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, et la chélation des métaux de transition [58]. D'une manière générale, un antioxydant peut empêcher l'oxydation d'un autre substrat en s'oxydant lui-même plus rapidement que celui-ci. Un tel effet résulte d'une structure de donneurs d'atome d'hydrogène ou d'électrons souvent aromatiques (cas de dérivés du phénol). En plus leurs radicaux intermédiaires sont relativement stables du fait de la délocalisation par résonance et par manque de positions appropriées pour être attaqué par l'oxygène moléculaire. Les antioxydants sont en fait 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 singlet pour la transformer en chaleur [59]. L'équilibre entre les antioxydants et les oxydants est généralement appelé « équilibre d'oxydo-réduction » [60] (Figure I.14).

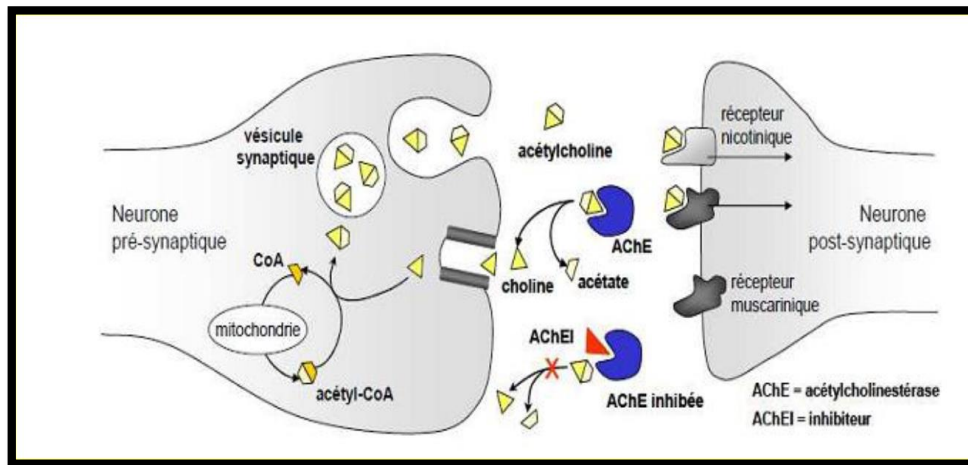


*Figure I.14. Transfert d'électron entre l'antioxydant et le radical libre*

### I.5. L'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est une pathologie neurodégénérative qui conduit à la mort progressive des neurones responsable d'une altération des fonctions cognitives, et plus particulièrement de la mémoire. L'acétylcholinestérase est l'enzyme qui dégrade le neurotransmetteur acétylcholine. Or, ce neurotransmetteur est très important pour le bon fonctionnement des neurones. En effet, la maladie d'Alzheimer engendre une perte continue d'acétylcholine. Les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase, empêchent la dégradation du neurotransmetteur. Ils permettent d'augmenter sa quantité au niveau du point de jonction entre deux neurones (la synapse) [61] (**Figure I.15**). Parmi les inhibiteurs du cholinestérase on trouve : Rivastigmine, Galantamine, Donepezil, Donépézil (Aricept) et la Rivastigmine (Exelon) [62].

D'autre part, plusieurs molécules naturelles ont montrés leurs capacités à inhiber l'acétylcholinestérase. Bien que la plupart des inhibiteurs connus de l'enzyme AChE soient des alcaloïdes, récemment, plusieurs études ont été faites pour identifier d'autres molécules naturelles pouvant avoir une activité anti-AChE importante. [63] des composés, autres que les alcaloïdes, présentent une grande capacité d'inhiber l'enzyme AChE tels que les terpenoïdes, les composés phénoliques, les flavonoïdes et les iso-coumarines.



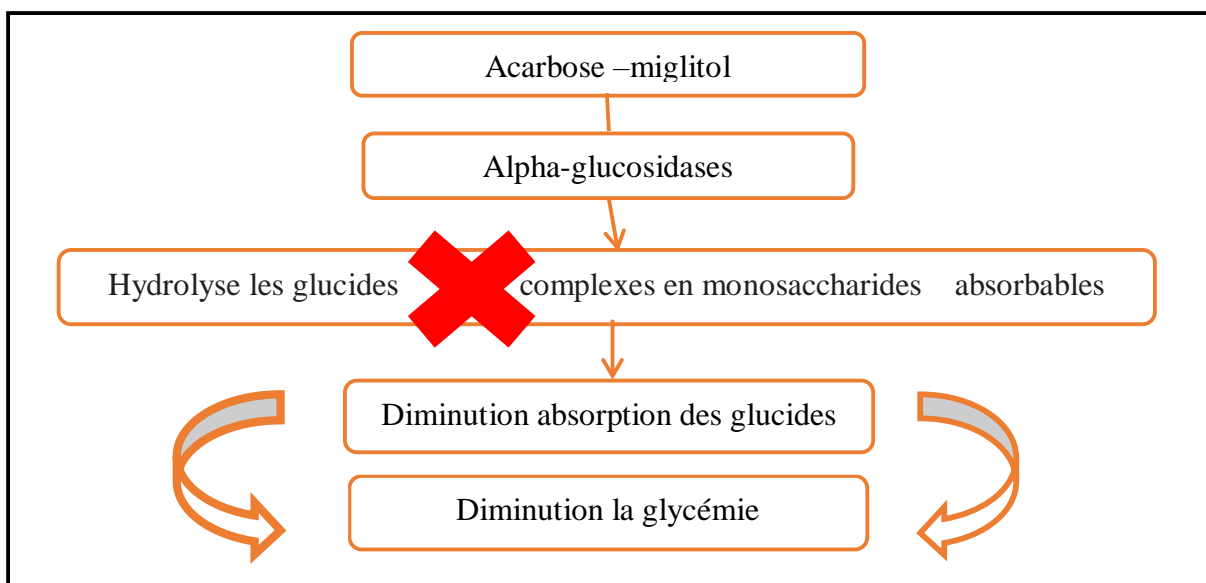
*Figure I.15. Schéma d'une synapse et mécanismes de neurotransmission cholinergique*

### I.6. Le diabète

Le diabète est défini comme une affection métabolique, caractérisée par une hyperglycémie (taux de sucre dans le sang trop élevé) liée à une déficience, soit de la sécrétion, soit de l'action de l'insuline, ou des deux. L'insuline est une hormone produite par le pancréas, indispensable à la pénétration du glucose sanguin dans les cellules. Lorsqu'elle fait défaut, le taux de sucre

augmente dans le sang, or l'organisme est très sensible à ces variations. L'hyperglycémie chronique est responsable de complications à long terme touchant de nombreux organes notamment les yeux, les reins, les nerfs, le cœur et les vaisseaux [64]. La grande majorité des cas de diabète se répartissent en deux catégories : le diabète de type 1 et le diabète de type 2, provoquent toutes les deux une hyperglycémie. L'unique traitement du diabète de type 1 est l'apport d'insuline par injections qui est indispensable à la vie. Le traitement de référence du diabète de type 2 est l'optimisation des habitudes de vie. Une perte de poids si nécessaire, une activité physique régulière, et une alimentation équilibrée peuvent être suffisants pour contrôler la glycémie dans un premier temps. En seconde intention, des antidiabétiques oraux et /ou injectables sont prescrits pour contrôler la glycémie [65]. Parmi ces dernier on trouve : inhibiteurs d'enzyme alpha amylase ou alpha glucosidases : ce sont des enzymes situées dans les intestins qui hydrolyse les glucides complexes en monosaccharides absorbables.

L'Acarbose est un médicament bien connu, utilisé comme inhibiteur de l'enzyme  $\alpha$ -amylase. (**Figure I.16**). Il retarde la digestion d'hydrate de carbone, et diminue le niveau postprandial de glucose plasmatique. Cependant, il possède des effets indésirables tels que la diarrhée, les hernies, l'ulcération. En effet, des inhibiteurs de l' $\alpha$ -amylase d'origine naturelle tels que les flavonoïdes et les composés phénoliques des plantes sont suggérés comme une approche alternative pour la prévention et le traitement de la maladie du diabète type 2 avec sans ou peu de risque d'effets secondaires [66].



**Figure I.16.** Effet inhibiteur de l'Acarbose sur l'enzyme alpha glucosidase

## Références bibliographiques

- [1] Site web : <https://fr.wikipedia.org/wiki/Projet:Poaceae>.
- [2] Site web: <http://ephytia.inra.fr/fr/C/11194/Hypp-encyclopedie-en-protection-des-plantes-Poaceae#:~:text=Hypp%20%3A%20encycl%C3%A9die%20en%20protection%20ds%20plantes%20%2D%20Poaceae&amp;text=Anciennement%20appel%C3%A9e%20gramin%C3%A9s%2C%20la%20famille,du%20sol%2C%20et%20appel%C3%A9es%20chaumes>.
- [3] Site web: <https://www.aujardin.info/plantes/famillepoeaceae.php>.
- [4] Site web: <http://www.fao.org/3/i3825e/i3825e0.pdf>.
- [5] N.Boulaacheb , B.Clément, Y.Djellouli, R.Gharzouli . (2010). Les orchidées du djebel Mégriss (nord de Sétif, Algérie). *Bulletin de la Société Française d'Orchidophilie de Langue d'oc*, n° 7, p. 11-12.
- [6] Site web : [https://fr.wikipedia.org/wiki/Cynodon\\_\(genre\\_v%C3%A9g%C3%A9tal\)#%C3%89tymologie](https://fr.wikipedia.org/wiki/Cynodon_(genre_v%C3%A9g%C3%A9tal)#%C3%89tymologie).
- [7] Site web : [https://www.mi-aime-a-ou.com/Cynodon\\_dactylon.php#haut\\_page](https://www.mi-aime-a-ou.com/Cynodon_dactylon.php#haut_page).
- [8] A.Kumar, HA.Sawarkar, VS.Deshmukh, KK.Mishra, M.Singh, T.Verma, P.Kashyap. (2011). *Cynodon dactylon* (L.) Pers: Pharmacological actions and medicinal applications. *International Journal of Herbal Drug Research*. 1(1): 1-7.
- [9] B.Auddy, M.Ferreira, F.Blasina, L.Lafon, F.Arredondo, F.Dajas, PC.Tripathi, T.Seal, B.Mukherjee (2003). Screening of antioxidant activity of three Indian medicinal plants traditionally used for the management of neurodegenerative.
- [12] CI. Jolly, P. Narayanan. (2000). *Pharmacognosy of aerial parts of Cynodon dactylon Pers. (Graminae)*. *ncient Science of Life; XIX (3&4): 1-6*.
- [13] Site web: <https://www.jardinalpindulautaret.fr/botanique/ressources-edagogiques/fiches-familles/colchicaceae>.
- [14] Site web: <https://www.pacificbulbsociety.org/pbswiki/index.php/Androcymbium>.
- [15] E.Ellington, J.Bastida, F.Viladomat, V.Slmanek , C.Codlna. (2003). Occurrence of colchicines derivatives in plants of the genus *Androcymbium*. *Biochemical systematics and ecology A*. 31(7) : 715–722.

- [16] K. Richter, PI EUR (1890) .*Libro rojo de la flora silvestre amenazada en Andalucía (Volumen I) .1 :188.*
- [17] Site web: <https://lepotagerdemesreves.fr/lpdmr/fichepdf.php?idu=2405%20%C2%AB%C2%A016%C2%A0%C2%BB>.
- [18] J.Caujapé castells, K. Robert jansen. (2003). The influence of the Miocene Mediterranean desiccation on the geographical expansion and genetic variation of *Androcymbium gramineum* (Cav.) McBride (Colchicaceae). *Molecular Ecology* .12(6):1515-25.
- [19] A. del hoyo ,J. pedrola-monfort. (2010) .Taxonomic clarification in W Mediterranean *Androcymbium* (Colchicaceae): *A. wyssianum* sunk in the synonymy of *A. gramineum* and *A. europaeum* restored. *willdenowia*. 40 (1):47-53.
- [20] Site web: [https://uses.plantnetproject.org/fr/Liliac%C3%A9es\\_\(Le\\_Floc%27h,\\_1983\)#Androcymbium\\_gramineum](https://uses.plantnetproject.org/fr/Liliac%C3%A9es_(Le_Floc%27h,_1983)#Androcymbium_gramineum).
- [21] J.Bellakhdar. (2006). *Plantes Médicinales au Maghreb et soins de base, précis de la phytothérapie Moderne. Éditions Le Fennec, Rabat, Maroc.*
- [22] S. ACHAT. (2013). Polyphénols de l'alimentation extraction, pouvoir antioxydant et extraction avec des ions métallique. *Thèse de doctorat. Université de A. MIRA. Béjaia.*
- [23] Z. HE, W. XIA, J. CHEN. (2008). Isolation and structure elucidation of phénolics compounds in Chinese olive (*Cnarium album* L.) fruit. *European Food Research and Technology*. 226:1191-1196.
- [24] J. BRUNETON. (1999). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. 3<sup>ème</sup> édition, Ed. TEC et DOC, Paris.
- [25] P.SARNI-MANCHADO, V. CHEYNIER. (2006). *Les polyphénols en agroalimentaire. Ed Tec et Doc Lavoisier. p : 02-11.*
- [26] M. Waksmundzka-Hajnos, J. Sherma. (2011). High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical ience. *Chromatographic Science Series*. p.477-478.
- [27] J. J. Macheix, A. Fleuriet, C. Jay-Allemand. (2005). Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolite secondaires d'importance économique. *Ed : 9 presses polytechnologiques et universitaires romandes. p4-5.*

- [28] J. BRUNETON. (2008). Acides phénols. In: Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. *Ed: Tec & Doc. Lavoisier, Paris. pp : 198-260.*
- [29] J.J. Macheix, A. Fleuriel . (1990). Fruit phenolics. Boca Roton, FL, CRC. Press.
- [30] D. Belakhder D. (1997). La pharmacopée Marocaine traditionnelle. *Ed. Ibis, press, France, 52- 58pp. France, p. 52 -58*
- [31] V. MICOL, N. CATURIA, L.PEREZ-FONS, V. MAS , L. PEREZ ,A. ESTEPA (2005). The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia Rhadovirus (VHSV). *Antiviral Research. 66: 12 9-136.*
- [32] P.-G. Pietta, (2000). Flavonoids as Antioxidants, *J. Nat. Prod., vol. 63, no7, p.1035 -1042.*
- [33] S. Sadasivam, B. Thayumanavan, Molecular host plant resistance to pests. *De Books in soils, plants and the environment., CRC Press., vol. 96.*
- [34] D.Roux, O.Catier. (2007). Botanique, pharmacognosie et phytothérapie. *Wolters Kluwer France édition. p74.*
- [35] K T Chung 1, T Y Wong, C I Wei, Y W Huang, Y Lin. (1998). Tannins and human health: a review. *Crit Rév Food Sci Nutr. Vol 38, p 421-464.*
- [36] E. Leinmüller, H. Steingass, K.H. Menke. (1991). Tannins in Ruminant feed stuff, *Institute of Animal Nutrition, University of Hohenheim, (Germany).*
- [37] K. Khanbabae, T.R. Ree. (2001). Tannins: Classification and Defenition. *Journal of Royal Society of Chemistry, 18: 641-649.*
- [38] K. Hanhineva, R. Törrönen, I. Bondia-Pons, J. Pekkinen, M. Kolehmainen, H. Mykkänen, H. Poutanen. (2010). Impact of Dietary Polyphenols on Carbohydrate Metabolism. *Int. J. Mol. Sci, 11: 1365-1402.*
- [39] M. Daglia. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology.; 23(2): 174-181.*
- [40] A. Moure, J. M. Cruz, D. Franco, J. Manuel Dominguez, J. Sineiro, H. Dominguez, M. J. Nunez, J. Carlos Parajo (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry 72(2): 145-171.*
- [41] A. Sartori-Thiel. (2003). Activités anti-microbiennes d'extraits végétaux enrichis en polyphénols. *Science et Agronomie ED 380 Doctorat : 177.*

- [42] J. Haddad John . (2002). Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors, *Cellular Signalling* ,14, 879–897.
- [43] Y. Okuno, A. Fukuhara, E. Hashimoto, H. Kobayashi, S. Kobayashi, , M. Otsuki, I. Shimomura. (2018). Oxidative stress inhibits healthy adipose expansion through suppression of SREBF1-mediated lipogenic pathway. *Diabetes*, db171032.
- [44] Afonso Valéry, Champy Romuald, Mitrovic Dragoslav, Collin Pascal, Lomri Abderrahim. (2007). Radicaux libres derives de l'oxygène et superoxydes dismutases: role dans les maladies rhumatismales,; 637-638.
- [45] E. Filaire, H. Toumi. (2012). Rôle de dérives réactives de l'oxygène et de l'exercice physique sur le métabolisme osseux: *Revue du Rhumatisme* 79(5), 341-346.
- [46] M. Valko, Cj. Rhodes, J. Moncol, M. M. Izakovic, et M. Mazur. (2006), Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chem. Biol. Interact.* 160,1 -40.
- [47] J. Pincemail, K. Bonjean, K. Cayeux, et J.-O. Defraigne. (2002). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante, *Nutr. Clin. Métabolisme*, 16, 233 -239.
- [48] A. Favier. (2003). Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique, *L'actualité chimique*, 108 -115.
- [49] Z. mohammedi . (2005) « Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et falvonoides de quelques plantes de la région du Tlemcen», *Thèse de magistère* ., *Université-Abou Bakr Belkaid, Telemcen*,.
- [50] Camille Migdal, Mireille Serres (2011).Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant Reactiveoxygenspecies and oxidativestress, Université Lyon 1, EA 41-69, Laboratoire de recherche dermatologique, pavillon R, Hôpital Édouard Herriot, 69437 Lyon Cedex 03, France ,27: 405-412.
- [51] J. Hadj Salem. (2009). Extraction, identification, caractérisation des activités biologiques de flavonoides de *Nitraria retusa* et synthèse de dérivés acyle de ses molécules par voie enzymatique. *Thèse de doctorat en Procédés Biotechnologiques et Alimentaires, Université Nancy de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, France* : 270.
- [52] L. Jacob. (2007). L'insuffisance rénale aiguë. *Edition Springer*, p 88.

- [53] J. Pincemail, K. Bonjean, K. Cayeux, et J.-O. Defraigne. (2002). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante, *Nutr. Clin. Métabolisme*, vol. 16, no4, p. 233 -239.
- [54] C. Bonnet, F. Alamigeon, P. Micheels . (2010). Guide complet des soins esthétiques : du coté de ma vie. *Edition Eyrolles*, p 14.
- [55] B. Halliwell, (1990). How to characterize a biological antioxidant, *Free Radic. Res. Commun.*, vol. 9, no1, p. 1 -32,
- [56] S. K. Powers, M. J. Jackson, (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production, *Physiol. Rev.*, vol. 88, no4,p. 1243 -1276.
- [67] H.A. Hamid, , A.N.M. Ramli, N. Zamri, M.M Yusoff. (2018). UPLC-QTOF/MS-based phenolic profiling of Melastomaceae, their antioxidant activity and cytotoxic effects against human breast cancer cellMDA- MB-231. *Food chemistry* 265, 253-259.
- [58] A. Favier. (2006). «Stress oxydant et pathologies humaines», in *Annales pharmaceutiques françaises*, 2006, vol. 64, p. 390 -396.
- [59] Z. Hellal. (2011) « Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*) », *Thesis, Université Mouloud Mammeri*.
- [60] S. K. Powers et M. J. Jackson, (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production, *Physiol. Rev.*, vol. 88, no4, p. 1243 -1276,
- [61] I. Orhan, B. Şener, M.I. Choudhary, A. Khalid. (2004). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 91, 57-60.
- [62] E. Arias, S. Gallego-Sandín, M. Villarroya . (2005). Unequal neuroprotection afforded by the acetylcholinesterase inhibitors in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*,; 315(3):1346-53.
- [63] a) K.W.Gordon, S. Lilienfeld , E.Gaens. (2000). Efficacy and safety of galanthamine in patients with mild to moderate Alzheimer's disease: multicenter randomized controlled trial. *British Medical Journal*, 321:1445-1478; b) K. Rhee, M. Van de Meent, K. Ingkaninan, R. Verpoorte. (2001). Screening for acetylcholinesterase

nhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *Journal of Chromatography A*, 915, 217-223.

[64] Executive Summary: Standards of Medical Care in Diabetes--2012. *Diabetes Care* 2011; 35: S4–10.

[65] L. Monnier, S. Halimi, C. Colette, C. (2018). L'efficience thérapeutique: une préoccupation importante, *Médecine des maladies Métaboliques*. vol. 12 - N°1. 36,37p.

[66] M. Khan, M.,A. Alam, K.M. Khan, U. Salar, S. Chigurupati, A. Wadood, F. Ali, J.I. Mohammad, M. Riaz, S. Perveen. (2018). Flurbiprofen derivatives as novel  $\alpha$ -amylase inhibitors: Biology-oriented drug synthesis (BIODS), in vitro, and in silico evaluation. *Bioorganic Chemistry*. 81, 157-167.

## *Chapitre II*

### *Matériels et Méthodes*

### II.1. Matériel végétal

La récolte de matériel végétal représenté par la partie aériennes de deux plantes médicinales d'*Androcymbium gramineum* et *Cynodon dactylon* (L) a été effectuée de la région Elchebka dans la Wilaya de Ghardaïa au sud de l'Algérie, au mois d'Avril 2021. Le séchage de ces plantes a été effectué dans un endroit sec, aéré et à l'abri des rayons solaires pendant quelques jours. Le broyage de deux plantes a été réalisé à l'aide d'un broyeur électrique (**Figure II.17**). La poudre des deux plantes a été conservée à température ambiante jusqu'à leur utilisation.



**Figure II.17.** Broyage des plantes à l'aide d'un broyeur électrique.

### II.2. Méthodes d'extraction

Dans notre étude et afin d'évaluer les activités biologiques d'*Androcymbium gramineum* et *Cynodon dactylon* (L), pour chaque de ces deux plantes, nous avons préparés deux types d'extrait, un extrait hydro-méthanoïque et un extrait aqueux.

#### II.2.1. Préparation des extraits hydrométhanoïques

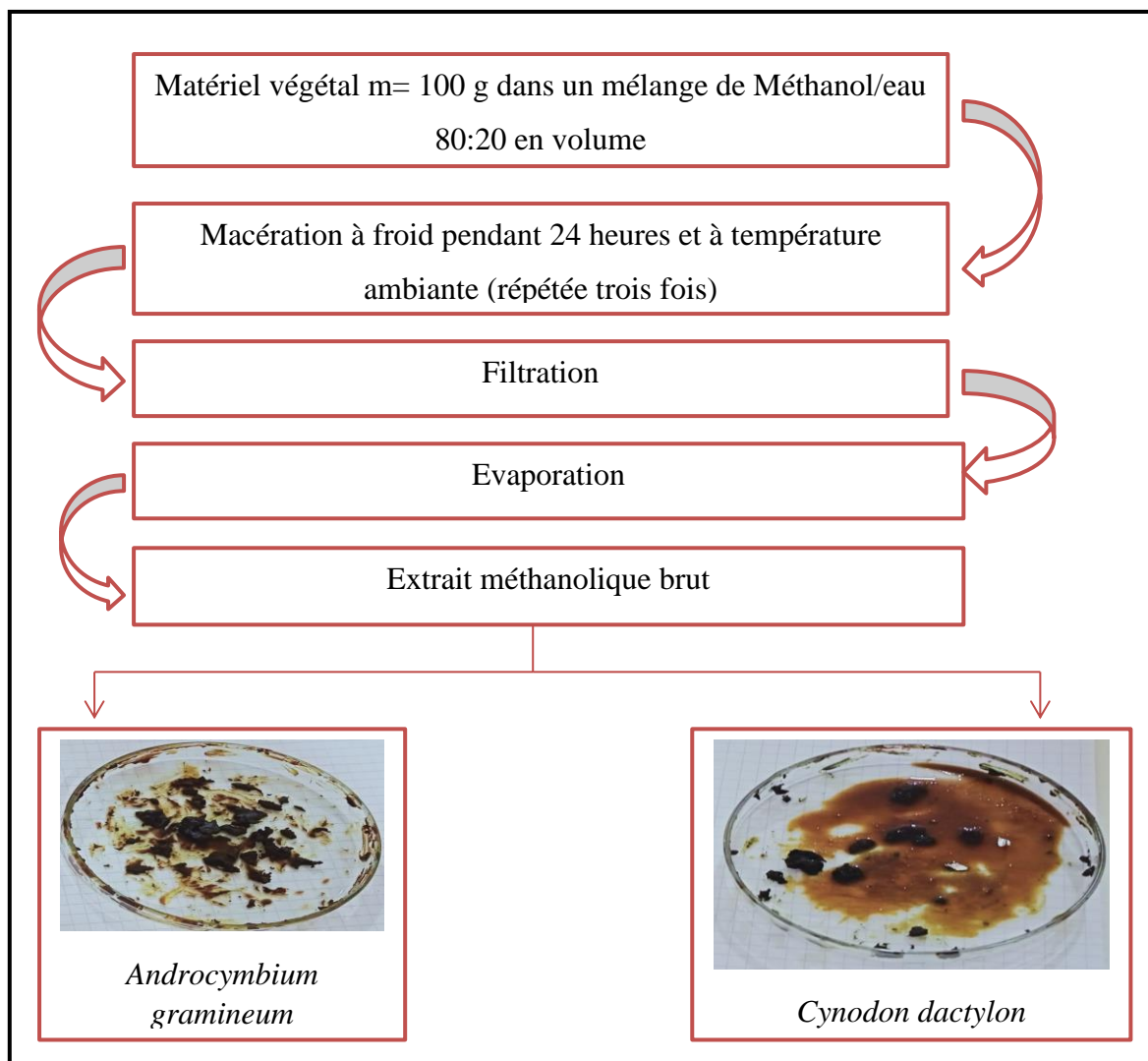
La matière végétale est mise à macération (**Figure II.18**). Cette étape consiste à émerger une quantité de matériel végétal de 100 g dans un système hydro-méthanoïque (MeOH/H<sub>2</sub>O 80:20 V:V) pendant 24 h du contact. L'opération est répétée trois fois avec renouvellement du solvant. Après chaque répétition, le mélange est filtré avec un papier filtre et concentrer au rotavap de marque BUCHI (**Figure II.19**) à 40°C. A la fin de cette étape, une fraction hydro-méthanoïque a été obtenue. Le protocole d'extraction est résumé dans la **figure II.20**.



*Figure II.18. Extraction par macération*



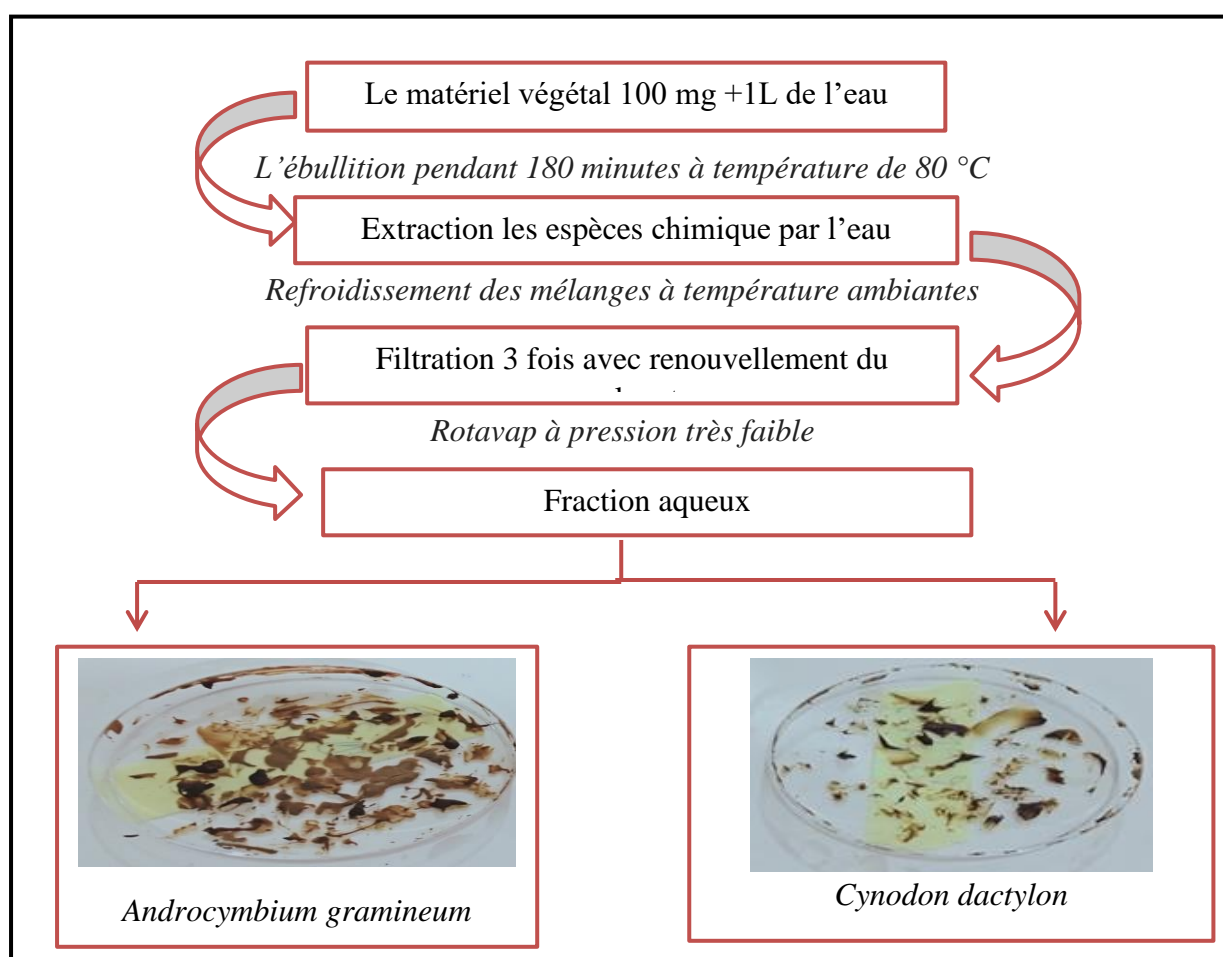
*Figure II.19. Evaporateur rotatif du solvant d'extraction*



*Figure II.20. Protocole de préparation des extraits hydro-méthanoïque*

### II.2.2. Préparation des extraits aqueux

La matière végétale est mise à la décoction. L'opération consiste à plonger le matériel végétal (100 mg) dans l'eau froide (1L) et on porte le mélange hétérogène à l'ébullition pendant 180 minutes dans une température de 80 °C. Les espèces chimiques contenues solubles dans l'eau chaude sont alors extraites. Après refroidissement du mélange à la température ambiante, une étape de filtration est nécessaire. L'opération est répétée trois fois avec renouvellement du solvant. Après chaque répétition, le filtrat est mis sous évaporation en utilisant un rotavap de marque BUCHI à pression très faible. A la fin de cette étape, une fraction hydro-méthanoïque a été obtenue. La **figure II.21** ci-dessous présente un organigramme d'extraction utilisée dans notre travail.



**Figure II.21.** Protocole de préparation des extraits aqueux

### II.3. Analyse phytochimique quantitative

Les mesures des absorbances ont été faites à l'aide d'un lecteur de microplaques à 96 puits de marque PerkinElmer (USA) avec son logiciel EnSpire au niveau du laboratoire de Biochimie au CRBt de Constantine.

#### II.3.1. Détermination du contenu total en polyphénols et la teneur des flavonoïdes

##### II.3.1.1. Estimation du contenu total en polyphénols (TPC)

###### ➤ Principe

Le contenu en polyphénols totaux est déterminé selon la méthode de dosage sur microplaque décrite par *Muller et al.*, [1] en utilisant le réactif de *Folin-Ciocalteu* (FCR) [2], constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ) de couleur jaune. Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des composés phénoliques par ce réactif, elle entraîne la formation d'un mélange d'oxydes de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ) de couleur bleu qui absorbe à 760 nm [3], le dosage de polyphénols est effectué à partir d'une courbe d'étalonnage obtenu par un étalon d'acide gallique de concentrations connues.

###### ➤ Procédure

20  $\mu$ l d'extrait de plante (1 mg d'extrait dissout dans 1 ml de méthanol) est ajouté à 100  $\mu$ l de réactif de *Folin-Ciocalteu* FCR dilué (1 ml de solution FCR concentré est dilué dans 9 ml d'eau distillée). On additionne 75  $\mu$ l d'une solution de  $Na_2CO_3$  à 7.5 % (une quantité de 7.5 g de  $Na_2CO_3$  est dissouts dans 100 ml d'eau distillée). Le mélange est laissé à l'obscurité pendant 2 heures à température ambiante. La coloration bleue produite est proportionnelle à la teneur en polyphénols totaux et possède une absorbance maximum au environ de 750-765 nm. Un blanc est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par le solvant utilisé (Méthanol). Une droite d'étalonnage est réalisé avec de l'acide gallique dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser. Une quantité de 1 mg d'acide gallique est dissoute dans 5 ml de méthanol pour obtenir la solution mère de concentration de 200  $\mu$ g/ml, les dilutions ont été préparées comme suit (**Tableau 4**) :

**Tableau II.4.** Préparation de la gamme d'étalon de l'acide gallique

<i>Volume de solution mère de l'acide gallique (µl)</i>	25	50	75	100	125	150	175
<i>Volume de méthanol (µl)</i>	<b>175</b>	<b>150</b>	<b>125</b>	<b>100</b>	<b>75</b>	<b>50</b>	<b>25</b>
<i>Concentration finale (µg/ml)</i>	25	50	75	100	125	150	175

### II.3.1.2. Estimation du contenu total en flavonoïdes (TFC)

#### ➤ Principe

Le dosage des flavonoïdes dans les extraits est basé sur la formation d'un complexe entre les ions  $Al^{+3}$  et les flavonoïdes. La coloration jaunâtre produite est proportionnelle à la teneur en flavonoïdes totaux et possède une absorption maximum aux 415 nm [1]. La méthode décrite par *Topçu et al.* [4] est utilisée et adaptée avec quelques modifications pour une détermination sur microplaque à 96 puits.

#### ➤ Protocole

Dans une microplaque à 96 puits, 50 µl d'extrait (Une masse de 1 mg d'extrait est dissoute dans un volume de 1 ml de méthanol) sont ajoutés à un mélange de 130 µl méthanol, 10 µl de la solution 1 (9.8 g de potassium acétate  $CH_3COOK$  sont dissouts dans 100 ml l'eau distillée) et 10 µl de solution 2 (10 g de nitrate d'aluminium  $Al(NO_3)_3$  sont dissous dans 100 ml d'eau distillée). Le tout a été incubé durant 40 min. l'absorbance a été mesurée à 415 nm. Pour la gamme d'étalon, la Quercétine est utilisé pour établir la courbe d'étalonnage (une quantité de 1 mg de la Quercétine est dissoute dans 5 ml de méthanol pour obtenir la solution mère de concentration de 200 µg/ml). Les dilutions ont été préparées comme suit (**Tableau II.5**) :

**Tableau II.5.** Préparation de la gamme d'étalon de la Quercétine





<i>Volume de solution mère de l'acide gallique (<math>\mu</math>l)</i>	25	50	75	100	125	150	175
<i>Volume de méthanol (<math>\mu</math>l)</i>	<b>175</b>	<b>150</b>	<b>125</b>	<b>100</b>	<b>75</b>	<b>50</b>	<b>25</b>
<i>Concentration finale (<math>\mu</math>g/ml)</i>	25	50	75	100	125	150	175

#### II.4. Activités biologiques

Les mesures des absorbances des activités biologiques ont été faites à l'aide d'un lecteur de microplaques à 96 puits de marque PerkinElmer (USA) avec son logiciel EnSpire au niveau du laboratoire de Biochimie au CRBt de Constantine.

##### II.4.1. Préparation des dilutions des extraits

Dans un eppendorf, on pèse 4 mg de l'extrait de plante, puis à l'aide d'une micropipette, on ajoute à la pesé 1 ml (de méthanol aux extraits hydro-méthanoïques) et (de l'eau aux extraits aqueux), on obtient la solution mère de concentration 4000 ppm pour chaque extrait (**figure II.22**). Ensuite, On prépare six solutions filles pour chaque extrait, et pour ce faire, six eppendorfs sont prélevés pour chaque extrait, et 500 ml de méthanol sont placés dans chacun d'eux ; on prend 500 ml de la solution mère et la met dans le premier eppendorf pour obtenir la première solution diluée, et de suit de la même manière jusqu'à la sixième solution diluée. Les concentrations finales des dilutions obtenues sont : 2000 ppm, 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 62,5 ppm.

Type d'extrait	Extrait hydro-méthanoïque		Extrait aqueux	
Les plantes	<i>Androcymbium Gramineum</i>	<i>Cynodon dactylon</i>	<i>Androcymbium Gramineum</i>	<i>Cynodon dactylon</i>
Protocole	4mg de la plantes +1ml méthanol		4mg de la plante + 1ml d'eau distillée	
Solution mère				

**Figure II.22.** Préparation de la solution mère des extraits de plantes *Androcymbium Gramineum* et *Cynodon dactylon* (L)

#### II.4.2. Activités anti-oxydantes

Les tests mesurant l'effet antioxydant donne un indice sur la capacité de des extraits naturels à lutter contre les espèces réactives connues sous le nom de pro-oxydants, à résister aux dommages oxydatifs et à lutter contre les maladies liées au stress oxydatif. L'étude de l'activité antioxydante des deux plantes *Androcymbium Gramineum* et *Cynodon dactylon* (L) a été testée selon quatre méthodes : Piégeage du radical libre DPPH<sup>\*</sup>, piégeage de l'ABTS<sup>•+</sup>, réduction du complexe cuivre-néocuproïne, réduction par la formation du complexe Fe<sup>+2</sup>-phénantroline.

##### II.4.2.1. Activité anti-radicalaire au DPPH

###### ➤ Principe

Le dosage au 2,2-diphényl-1 picrylhydrazyle (DPPH<sup>\*</sup>) est l'un des tests les plus couramment utilisés. Ce radical possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote [5]. L'analyse est basée sur la mesure de la capacité d'un antioxydant à réduire le radical

DPPH<sup>•</sup> initialement de couleur violette en 2.2 Diphenyl 1 picrylhydrazine de couleur jaune [6], en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par les antioxydants [7].

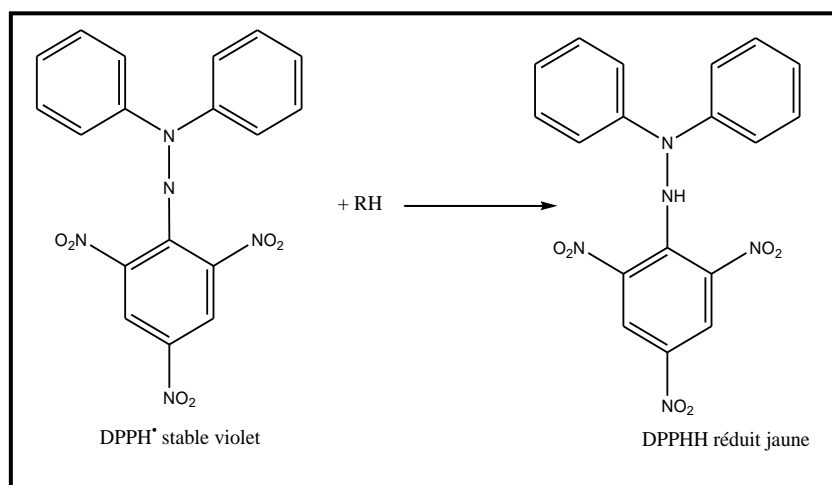


Figure II.23. Transformation du radical DPPH<sup>•</sup> en DPPHH.

### ➤ Procédure

Cette méthode a été développée par Blois en 1958 [8]. Après la préparation de la solution de DPPH<sup>•</sup> (6 mg de DPPH dans un volume de 100 ml de méthanol, dont l'absorbance est 0.5 nm à 517 nm. La solution de DPPH<sup>•</sup> est gardée à 4°C à l'abri de la lumière.), on prend notre microplaque à 96 puits et on ajoute 160 µl du DPPH<sup>•</sup> mélangé avec 40 µl de chaque extrait (préparée dans le méthanol) à différentes concentrations. Après 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance est lue à 517 nm contre un contrôle négatif (sans extrait). Le BHA est utilisé comme standard. Le pourcentage d'inhibition a été calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = \left[ \frac{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{extrait}}}{A_{\text{extrait}}} \right] \times 100$$

Où  $A_{\text{contrôle}}$  est l'absorbance du contrôle négatif, et  $A_{\text{extrait}}$  l'absorbance de l'extrait/standard.

II.4.2.2. Activité du piégeage du cation radical  $ABTS^{*+}$ 

## ➤ Principe

Le radical  $ABTS^{*+}$  préformé est généré par l'oxydation de la molécule stable d'ABTS avec le persulfate de potassium [9]. Cette oxydation se traduit par l'apparition d'une coloration vert bleu intense. En présence d'un donneur d'hydrogène (agent antioxydant), le passage du radical  $ABTS^{*+}$  à la forme non radicalaire s'accompagne de la disparition de cette coloration mesurée à une longueur onde de 734 nm. L'activité des composés est alors exprimée par la Capacité Antioxydante Equivalente Trolox (TEAC) qui correspond à la capacité antioxydante d'une solution de Trolox® (1 mM) (analogue hydrophile de la vitamine E). Ainsi, plus la valeur TEAC est élevée, plus l'antioxydant est efficace [10].

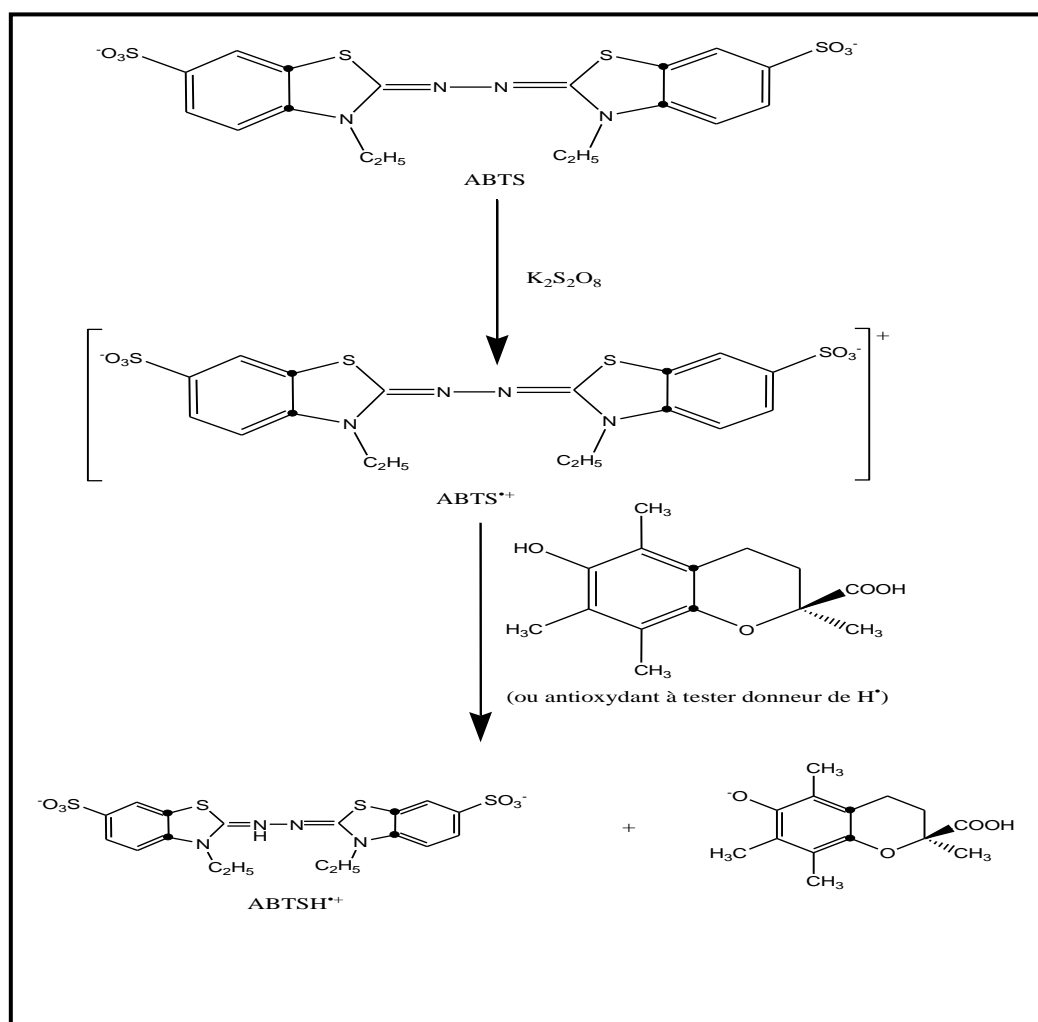


Figure II.24. Formation et piégeage du radical  $ABTS^{*+}$  par un antioxydant donneur de  $H^{\cdot}$ .

## ➤ Procédure

Le radical  $ABTS^{+}$  est produit par réaction entre une solution aqueuse d'ABTS (7 mM) et une solution aqueuse de persulfate de potassium ( $K_2S_2O_8$ , 2,45 mM), utilisé comme oxydant. Ce mélange est agité pendant 16h à l'obscurité puis dilué par le méthanol jusqu'à obtenir une absorbance à 734 nm de  $0,700 \pm 0,02$ . Sur une microplaque à 96 puits, une prise de 160  $\mu$ l de cette solution d' $ABTS^{+}$  est mélangée avec 40  $\mu$ l d'extrait à différentes concentrations. Après 10 mn d'incubation à température ambiante, l'absorbance du mélange est mesurée à 734 nm contre un blanc (contrôle négatif) et comparée à celle des antioxydants de synthèse comme le : BHT, BHA et TROLO (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthyl-chroman-2-carboxylique). L'activité  $ABTS^{+}$  a été exprimée en pourcentage et calculée par l'équation suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = \left[ \frac{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{extrait}}}{A_{\text{extrait}}} \right] \times 100$$

Où  $A_{\text{contrôle}}$  est l'absorbance du contrôle négatif, et  $A_{\text{extrait}}$  l'absorbance de l'extrait/standard.

## II.4.2.3. Activité de réduction du complexe cuivre-néocuprine (CUPRAC)

## ➤ Principe

La méthode CUPRAC (*Cupric ion Reducing Antioxidant Capacity*) est basée sur la mesure de l'absorbance du complexe cuivre-néocuproïne  $[Cu^{2+}-Nc_2]$  formé en raison de la réaction redox entre un antioxydant et le complexe cuivre-néocuproïne. En effet, en présence d'un agent antioxydant, le complexe cuivre-néocuproïne est réduit en produisant ainsi un complexe chromogène de  $Cu^+-Nc$  (Figure II.25), cette réaction est quantifiée spectrophotométriquement à une longueur d'onde de 450 nm [11].

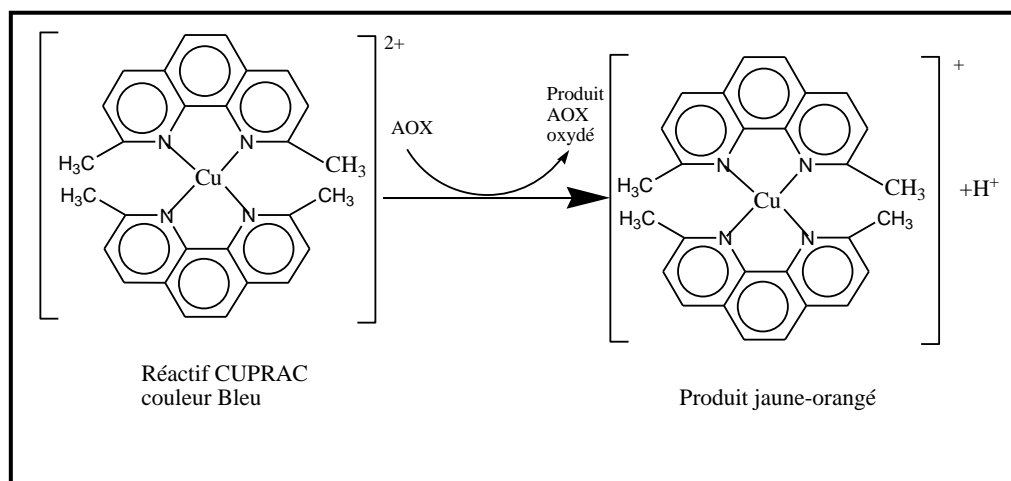


Figure II.25. Réduction du complexe chromogène de  $Cu^{2+}-Nc_2$

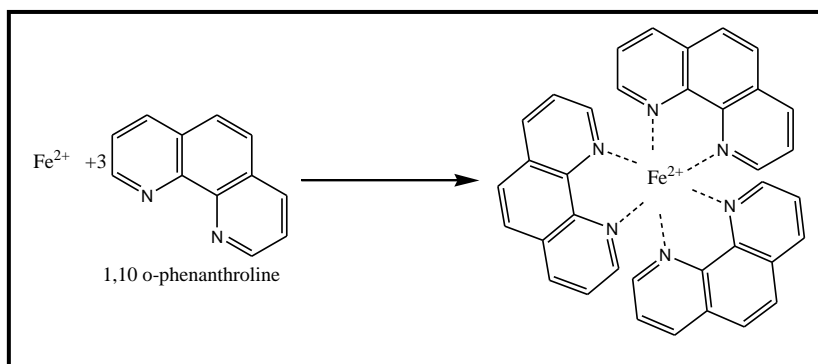
### ➤ Procédure

La capacité de réduction du complexe cuivre-néocuproïne (CUPRAC) a été déterminée selon la méthode d'*Apak et al.*, [11]. Sur une microplaque à 96 puits, un mélange réactionnel contenant 40  $\mu\text{l}$  d'extrait de différentes concentration, 60  $\mu\text{l}$  d'acétate d'ammonium (1,927 g d'acétate d'ammonium  $\text{ACNH}_4$  est dissout dans 25 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ), 50  $\mu\text{l}$  de chlorure de cuivre (0,043 g de  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  dissous dans 25 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ) et 50  $\mu\text{l}$  de néocuproïne (0,039 g de Neocupronin dissout dans 25 ml de méthanol), pour arriver à un volume total de 200  $\mu\text{l}$ . Après une heure d'incubation, l'absorbance a été mesurée à 450 nm Le BHA et le BHT sont utilisés comme standards. Les résultats ont été calculés à titre de  $A_{0,5}$  ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) correspondant à la concentration indiquant 0,5 d'absorbance.

#### II.4.2.4. Activité de réduction par la formation du complexe $\text{Fe}^{+2}$ - phénantroline

### ➤ Principe

En présence d'un antioxydant, le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) peut se réduire en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) suite à une réaction d'oxydoréduction (Figure 26). Ce dernier forme un complexe rouge-orangé stable et soluble avec la 1,10-phénanthroline en solution basique, qui peut être mesuré par spectrophotométrie à 510 nm (*Adhikamsetty et al.*, 2008).



**Figure II.26.** Formation du complexe  $\text{Fe}^{+2}$ -phénantroline (*Apak et al.*, 2007)

### ➤ Procédure

L'activité de réduction par la formation du complexe  $\text{Fe}^{+2}$ -phenanthroline des extraits a été mesurée selon la méthode décrite par *Szydlowska-Czerniaka* en 2008 [12]. Des extraits de différentes concentrations, de volume de 10  $\mu\text{l}$  ont été ajoutés à une solution de 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{FeCl}_3$

(0.2%), 30  $\mu\text{l}$  Phenanthroline (0.5%) et 110  $\mu\text{l}$  de méthanol. Le mélange a été agité vigoureusement et incubé pendant 20 min à l'étuve à température de 30°C. L'absorbance a été déterminée à 510 nm. Les résultats ont été calculés à titre de  $A_{0,5}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) correspondant à la concentration indiquant 0,5 d'absorbance.

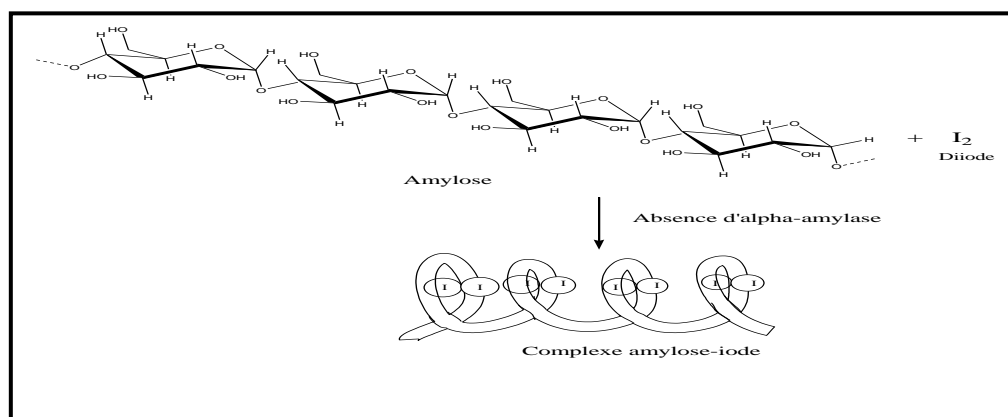
### II.4.3. Activités anti-enzymatiques

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques qui jouent un rôle important dans les réactions biochimiques nécessaires pour la croissance, la maturation et la reproduction des êtres vivants. Leur quantification par mesure de l'activité catalytique dans les échantillons biologiques est importante dans divers domaines [13].

#### II.4.3.1. Evaluation de l'activité antidiabétique

##### ➤ Principe

L'activité antidiabétique des divers extraits des plantes d'*Androcymbium gramineum* et *Cynodon dactylon* (L), a été testée selon la méthode d'inhibition de l'enzyme  $\alpha$ -amylase. Ce dernier est une enzyme digestive, produite par les glandes salivaires et les glandes pancréatiques, synthétisée également dans les fruits de plantes durant leur maturation. C'est l'un des endo-amylases les plus significatives qui hydrolyse les liaisons  $\alpha(1-4)$  glycosidiques à l'intérieur des chaînes de l'amidon pour donner des molécules de maltose (disaccharides de  $\alpha$ -glucose). Le principe de la méthode est basé sur la formation du complexe iode-maltose [14], ce qui indique la dégradation de l'amidon par l'enzyme  $\alpha$ -amylase. Ce complexe coloré peut être déterminé par spectroscopie à 630 nm. En présence d'un inhibiteur naturel, l'amidon ne sera pas dégradé et par conséquent, il n'y aura pas la formation de complexe iode-maltose.



**Figure II.27.** Formation du complexe amylose-iode en absence de l' $\alpha$ -amylase.

➤ **Procédure**

L'activité inhibitrice de l'alpha -amylase a été déterminée par la méthode de Zengin *et al.*, [15] avec quelques modifications. Sur une microplaque de 96 puits, un volume de 25 µl d'extrait à différentes concentrations est mélangé avec 50 µl d'une solution d'α-amylase (1U), puis incubé pendant 10 min à 37°C. Ensuite, 50 µl d'amidon (0,1%) sont additionnés. Le mélange est incubé une autre fois pendant 10 minutes à 37°C. Après incubation, 25 µl d'acide hypochlorique (1M) et 100 µl d'iodure de potassium iode sont ajoutés. La lecture de l'absorbance est réalisée à 630 nm. L'acarbose est utilisée comme standard. Le pourcentage d'inhibition de l' α-amylase a été calculé par la formule suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = 1 - \left[ \frac{(\text{Ac}-\text{Ae})-(\text{As}-\text{Ab})}{(\text{Ac}-\text{Ae})} \right]$$

**A<sub>c</sub>**=Absorbance [Amidon+IKI+HCl+Vol de solvant d'extrait+Vol tampon Enzyme]

**A<sub>e</sub>**=Absorbance [Enzyme+Amidon+IKI+HCL+ Vol de solvant d'extrait]

**A<sub>s</sub>**=Absorbance [Enzyme+Extrait+Amidon+IKI+HCl]

**A<sub>b</sub>**=Absorbance [Extrait+IKI+125 µl de tampon]

#### II.4.3.2. Evaluation de l'activité anti-Alzheimer

➤ **Principe**

L'activité anti-Alzheimer des divers extraits des plantes d'*Androcymbium gramineum* et *Cynodon dactylon* (L), a été testée selon la méthode d'inhibition de l'enzyme acétylcholinestérase (AChE). Ce dernier hydrolyse l'acétylcholine dans la région post-synaptique, ce qui diminue le taux de neurotransmetteur acétylcholine [16]. L'inhibition de cette enzyme va engendrer une augmentation de la concentration de l'acétylcholine, ce qui est considéré comme un traitement symptomatique de la maladie d'Alzheimer [17]. Le principe de la méthode est basé sur la réaction colorimétrique ente le thiocholine issu de l'hydrolyse de l'acétylcholine par l'enzyme acétylcholinestérase et l'acide 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoïque (DTNB) pour donner l'acide -5-thio 2-nitrobenzoïque (TNB) de couleur jaune (**Figure II.28**)

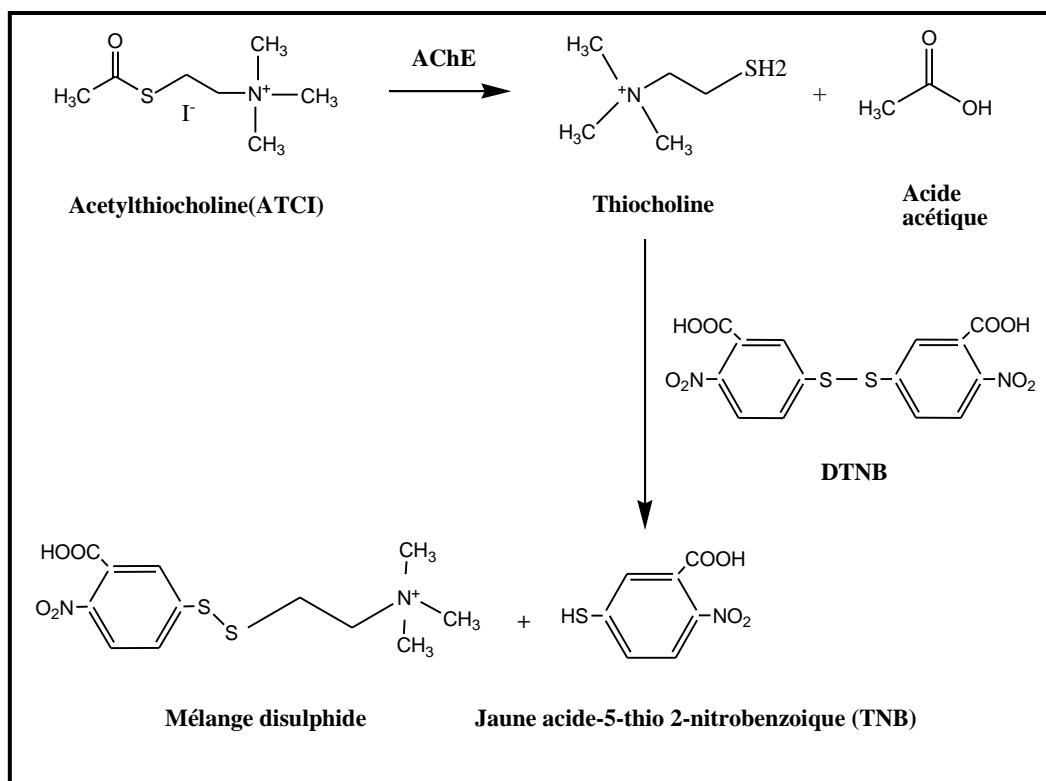


Figure II.28. Mécanisme chimique de la méthode anti-acétylcholinestérase.

### ➤ Procédure

L'activité inhibitrice de la butyrylcholinestérase (BChE) de divers extraits de la plante *Lavandula multifida* a été mesurée par la méthode spectrophotométrique développée par **Ellman et al.**, [18]. Un volume de 150  $\mu\text{L}$  de tampon phosphate de sodium à (pH = 8) sont ajoutés à 10  $\mu\text{L}$  d'extrait (solution dissous dans le méthanol à différentes concentrations). Ensuite, on additionne 20  $\mu\text{L}$  de la solution d'enzyme AChE ( $5.32 \times 10^{-3}$  U). L'ensemble est incubé à 25  $^{\circ}\text{C}$  pendant 15 mn, puis on ajoute 10  $\mu\text{L}$  de DTNB (0.5 mM) et 10  $\mu\text{L}$  de l'acétylthiocholine iodure (0.71 mM). La lecture de l'absorbance se fait à 412 nm. Le Galanthamine est utilisé comme référence. Le pourcentage d'inhibition de AChE a été déterminé en utilisant la formule suivante :

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

Où 'E' est l'activité de l'enzyme sans extrait, et 'S', est l'activité de l'enzyme avec l'extrait.

## Références bibliographiques

- [1] L. Müller, S.Gnoyke, A.M.Popken, V. BöhmV. (2010). Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT - Food Science and Technology*. 43:992– 999.
- [2] V.L. Singleton, J.A.Rossi. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16, 144-158.
- [3] J.J Macheix, A.Fleuret, C.Jay-Allemand.(2005). Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *Presses polytechniques et universitaires romandes*.
- [4] G. Topçu, Ay, M.Bilici, A.Sarıkürkcü, C.Öztürk,M., A.Ulubelen .(2007). A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry*. 103, 816-822.
- [5] C. Popovici, I. Saykova, et B. Tylkowski. (2010). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH.
- [6] B. S. Maataoui, A. Hmyene, et S. Hilali. (2006). Activites antiradicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie [*Opuntia ficus indica*], *Leban. Sci. J.*, vol. 7,no1, p. 3 -8,.
- [7] P. Molyneux. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Songklanakarin J Sci Technol*, vol. 26, no2, p.211 -219,.
- [8] M.S.Blois.(1958). Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*. 181, 1199-1200.
- [9] Re.R.Pellegrini, N.Protégente,A.Pannala A.Yang,M. and C.Rice-Evans. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26, 1231-1237.
- [10] Schlesier, K., Harwat, M., Böhm, V., and Bitsch, R. (2002). Assessment of Antioxidant Activity by Using Different In Vitro Methods. *Free Radical Research*. 36, 177-187.
- [11] R.Apak, K.Güçlü, M.Özyürek, S.E.Karademir. (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.

- [12] A. Szydłowski, C. Dianoczi, K. Recseg, K., Karlovits, E. Szlyk . (2008). Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta*. 76, 899-905.
- [13] Z.Glatz. (2006). Determination of enzymatic activity by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B*. 841, 23-37.
- [14] B. Boursier. (2005). Amidons natifs et amidons modifiés alimentaires. *Techniques de l'Ingénieur*. 33-38.
- [15] G.Zengin, C.Sarikurkcü, A.Aktumsek, R. Ceylan and Ceylan, O. (2014). A comprehensive study on phytochemical characterization of *Haplophyllum myrtifolium* Boiss. endemic to Turkey and its inhibitory potential against key enzymes involved in Alzheimer, skin diseases and type II diabetes. *Industrial Crops and Products*. 53, 244-251.
- [16] M.Bajda, K. Łątka, M.Hebda, J.Jończyk, B.Malawska. (2018). Novel carbamate derivatives as selective butyrylcholinesterase inhibitors. *Bioorganic Chemistry*. 78, 29-38.
- [17] I.Orhan, B.Şener , M.I. Choudhary, A. Khalid. (2004). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 91, 57-60.
- [18] G.L.Ellman, K.D. Courtney , V. Andres, , R.M. Featherstone. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. 7, 88-95.

## *Chapitre III*

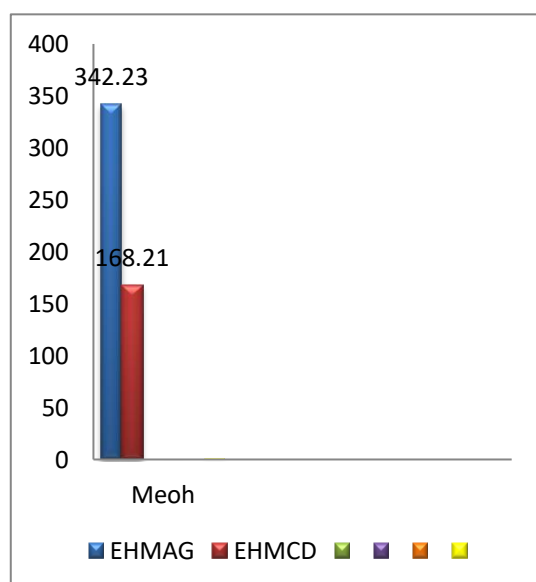
### *Résultats et Discussions*

### III.1. Détermination du contenu total en polyphénols et la teneur des flavonoïdes

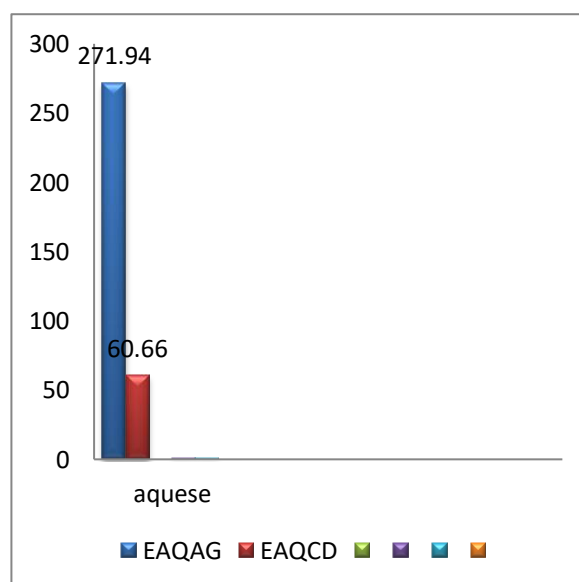
L'estimation du contenu phénolique et la teneur en flavonoïdes de deux plantes *Androcymbium gramineum* et *Cynodon dactylon* qui récoltée de la région Ghardaïa a été réalisé selon les deux méthodes de méthode de Folin-Ciocalteu méthode de nitrate d'aluminium  $Al(NO_3)_2$  respectivement. Les résultats de ces deux méthodes sont regroupés dans le **Tableau III.06** :

**Tableau. III.06.** Le contenu total en polyphénols et la teneur des flavonoïdes des extraits de *Androcymbium gramineum* et *Cynodon dactylon*

Extraits	Contenu total de polyphénoliques ( $\mu\text{g EAG/ mg d'extract}$ )	Teneur des flavonoïdes ( $\mu\text{g EQ/ mg d'extract}$ )
<b>EHMAG</b>	342,23± 11,74	125,90± 0,16
<b>EAQAG</b>	271,94± 11,22	81,17± 4,97
<b>EHMCD</b>	168,21±47,45	33,06±3,83
<b>EAQCD</b>	60,66±26,05	28,21±5,74

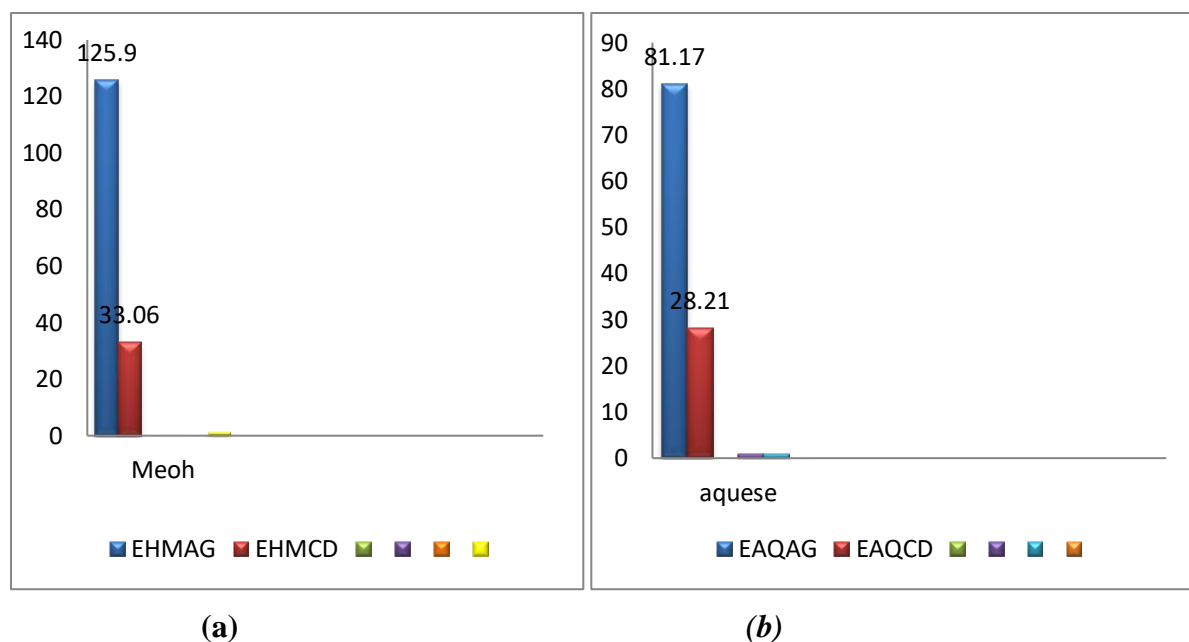


(a)



(b)

**Figure.III.29.** dosage des polyphénols d'*Androcymbium gramineum* et *Cynodon dactylon*. (a) l'extraits hydro-méthanoïque, (b) l'extraits aqueux.



**Figure.III.30.** dosage des polyphénols d'*Androcymbium gramineum* et *Cynodon dactylon*. (a) Extraits hydro-méthanoïques, (b) Extraits aqueux.

Le taux des polyphénols totaux calculé a révélé que *l'Androcymbium gramineum* présente une teneur importante en composés phénoliques pour l'extrait aqueux et l'extrait hydro-méthanoïque avec un taux très riche pour l'extrait aqueux ( $342,23 \pm 11,74$  mg EAG/g d'extrait), alors que l'extrait aqueux présente une teneur élevée en composés phénoliques avec un taux de ( $271,94 \pm 11,22$  mg EAG/g d'extraits). Tandis que l'extrait aqueux de *Cynodon dactylon* présente une teneur faible en composés phénoliques avec un taux de ( $60,66 \pm 26,05$  mg EAG/g d'extrait), comparés avec l'extrait hydro-méthanoïque présente une teneur en composés phénoliques avec un taux de ( $168,21 \pm 47,45$  mg EAG/g d'extrait).

Pour les flavonoïdes, le taux calculé a montré que l'extrait hydro-méthanoïque de la plante *Androcymbium gramineum* a la plus grande valeur ( $125,90 \pm 0,16$  mg EQ/g d'extrait) suivi par l'extrait aqueux ( $81,17 \pm 4,97$  mg EQ/g d'extrait) .par contre la plante *Cynodon dactylon* pour les deux extraits pauvres des polyphénols.

Ces résultats ont permis de classer les extraits selon leur richesse en composés phénoliques comme suit : Extrait hydro-méthanoïque > Extrait aqueux.

### III.2. Activités biologiques

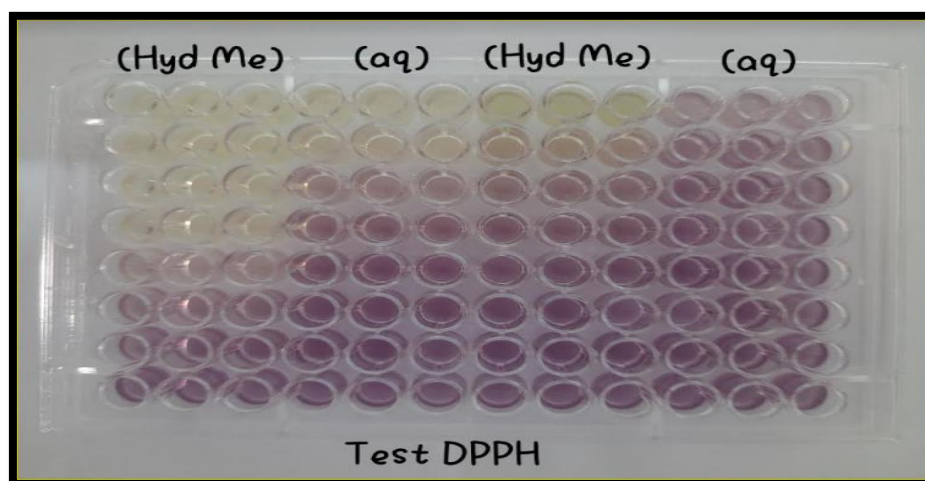
L'activité biologique d'*Androcymbium gramineum* et *Cynodon dactylon* récoltée de la région Ghardaïa a été réalisée par l'évaluation in vitro des activités antioxydantes, antidiabétique et anticholinestérase.

#### III.2.1. Activités antioxydants

L'évaluation de l'activité antioxydant des extraits : hydrométhanolique (EHMAG et EHMCD), aqueux (EAQAG et EAQCD) a été réalisée par l'utilisation de quatre méthodes.

##### III.2.1.1. Activité anti-radicalaire au DPPH'

Dans cette étude, l'activité anti radicalaire des différents extraits de *Cynodon dactylon* et *Androcymbium gramineum* a été évalué par la mesure des concentrations inhibitrices à 50 % (CI<sub>50</sub>) en utilisant une spectrophotométrie à 517 nm, en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune. Dans ce test les résultats ont été comparés aux étalons de référence (BHA). Les résultats sont présentés au-dessous :



**Figure III .31.** Plaque de dosage de l'activité anti radicalaire (DPPH') des extraits d'*Androcymbium gramineum* et *Cynodon dactylon*.

Les résultats du test DPPH' sont exprimés en IC<sub>50</sub>. Cette dernière est définie comme étant la concentration du substrat nécessaire à diminuer 50 % de l'absorbance de la solution initiale du DPPH'. Les IC<sub>50</sub> sont inversement proportionnelles à l'effet scavenger dont les valeurs faibles reflètent un effet anti-radicalaire important [1].

Tableau III.07. Inhibition du radical DPPH<sup>\*</sup> par les extraits d'*Androcymbium gramineum* et *Cynodon dactylon*.

Concentration Extrait (µg/ml) et standards	% d'inhibition							CI50 (µg/ml)
	12,5	25	50	100	200	400	800	
EAQAG	7,88±3,31	8,99±2,20	11,23±0,63	24,13±0,10	41,56±1,37	72,29±0,35	76,09±2,44	258,48±0,6
EHMCD	1,23±0,86	6,10±0,18	17,31±0,50	21,32±0,29	33,35±2,01	52,85±1,19	72,46±1,14	369,50±1,44
EAQCD	NA	2,26±0,46	5,21±0,37	8,28±0,48	14,91±0,19	23,74±2,91	46,07±0,12	>800
	<b>3,125</b>	<b>6,25</b>	<b>12,5</b>	<b>25</b>	<b>50</b>	<b>100</b>	<b>200</b>	<b>CI50 (µg/ml)</b>
EHMAG	3,04±	5,98±	11,13±	19,05±	36,31±	60,45±	82,79±	41,24±
BHA	22,21±1,24	31,73±1,22	54,89±3,60	67,60±1,13	76,77±0,54	78,67±1,31	79,01±0,89	5,73±0,41

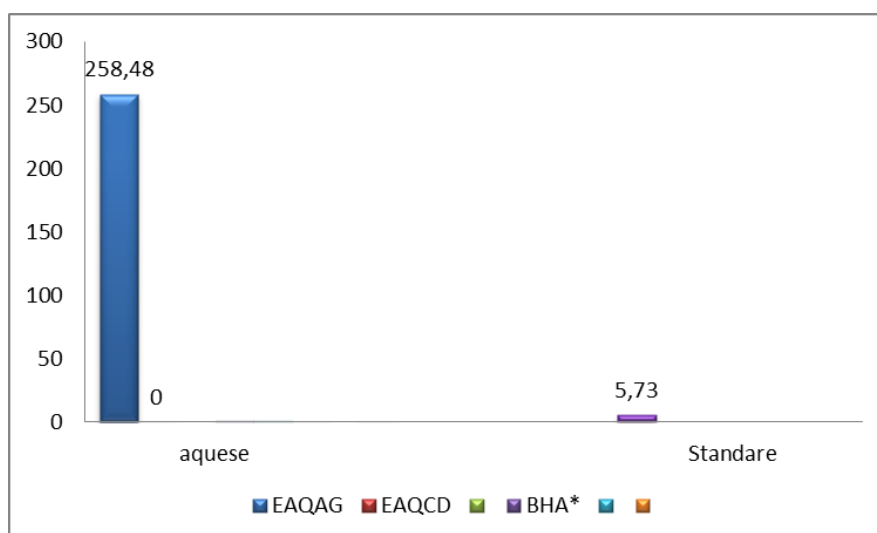


Figure III.32. Valeurs IC<sub>50</sub> du test DPPH<sup>\*</sup> des extraits aqueux

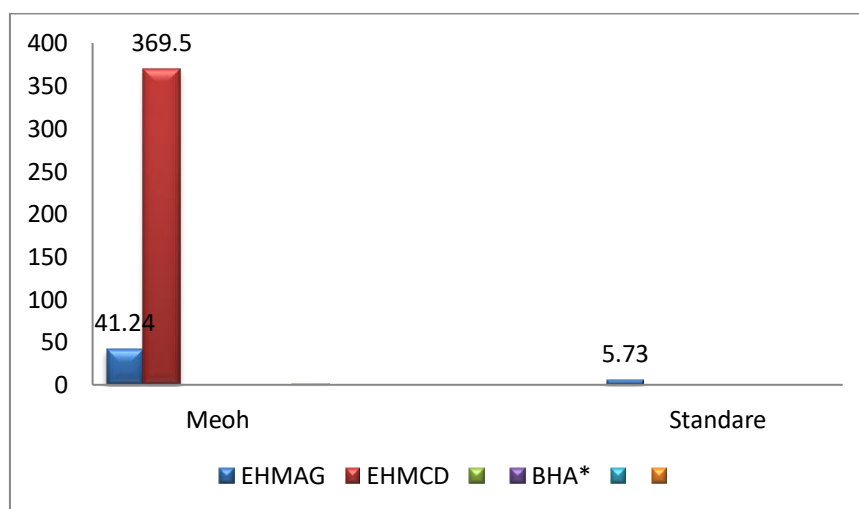


Figure III.33. Valeurs IC<sub>50</sub> du test DPPH<sup>\*</sup> des extraits hydro-méthanoïques

Les extraits hydro-méthanoïque et aqueux de la plante *Androcymbium gramineum* sont plus actifs par rapport aux extraits de la plante *Cynodon dactylon*.

Notamment pour le cas de la plante *Androcymbium gramineum* qui présente un ( $IC_{50} = 258.48 \pm 0.6 \mu\text{g/ml}$ ) cette activité est quarante-cinq fois que celle du BHA ( $IC_{50} = 5,73 \pm 0,41 \mu\text{g/ml}$ ), concernant les extraits hydrométhanolique qui présente grande activités anti- radicalaire avec un ( $IC_{50} = 41,24 \pm \mu\text{g/ml}$ ) cette activité est sept fois plus faible que celle du BHA ( $IC_{50} = 5,73 \pm 0,41 \mu\text{g/ml}$ ). Par contre la deuxième plante *Cynodon dactylon* qui présente un ( $IC_{50} = >800 \mu\text{g/ml}$ ), cette activité est cent trente-neuf fois que celle du BHA ( $IC_{50} = 5,73 \pm 0,41 \mu\text{g/ml}$ ) alors que l'extraits hydro-méthanoïque de la plante *Cynodon dactylon* qui présente un ( $IC_{50} = 369,50 \pm 1,44 \mu\text{g/ml}$ ), cette activité est soixante-quatre fois ( $IC_{50} = 5,73 \pm 0,41 \mu\text{g/ml}$ ). Malgré sa pauvreté en polyphénols [2]. Par le fait que l'activité inhibitrice du radical DPPH<sup>\*</sup> n'est pas dépendante du contenu total en polyphénols mais aux polyphénols qui ont des structures chimiques spécifiques. Autrement dit, par la haute sélectivité du DPPH<sup>\*</sup> car il ne réagit qu'avec les flavonoïdes contenant des groupes hydroxyles dans le cycle B [3], ainsi que les acides aromatiques comportant plus d'un groupe hydroxyle [4].

#### III.2.1.2. Activité du piégeage du cation radical ABTS<sup>+</sup>

L'ABTS (acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) est un composé organique stable utilisé dans l'évaluation de l'activité antiradicalaire, avec un pic d'absorption à 734 nm. L'antioxydant réagit avec ABTS<sup>+</sup> de couleur bleu/vert par transfert d'électrons pour redonner l'ABTSH<sup>+</sup> incolore. Cette transformation a été suivie par la mesure de l'absorbance et la détermination de la concentration inhibitrice des différents extraits en comparaison avec les standards BHA. Les résultats sont présentés dans la **Figure 34** et le **tableau 08** ci-dessous.

Tableau III.08. Inhibition du cation radical ABTS

Concentration Extraits (µg/ml) et standards	% d'inhibition							CI <sub>50</sub> (µg/ml)
	12,5	25	50	100	200	400	800	
<b>EAQAG</b>	8,45±0,48	16,29±0,49	33,13±0,22	67,90±3,87	88,26±1,41	90,98±1,46	90,93±0,19	70,00±1,88
<b>EHMCD</b>	11,00±1,74	21,07±0,75	42,43±1,19	60,84±0,36	70,58±0,51	90,82±0,60	91,71±0,19	75,20±0,53
<b>EAQCD</b>	5,61±0,67	10,11±0,19	24,97±0,75	31,77±0,75	41,02±0,03	79,36±0,33	90,54±0,92	228,92±0,65
	3,125	6,25	12,5	25	50	100	200	CI <sub>50</sub> (µg/ml)
<b>EHMAG</b>	3,91±2,01	8,06±0,10	16,68±1,30	29,14±0,20	36,98±2,42	64,85±2,54	90,21±1,51	71,35±0,80
<b>BHA</b>	22,21±1,24	31,73±1,2	54,89±3,	67,60±1,	76,77±0,	78,67±1,	79,01±0,	5,73±0,41 <sup>f</sup>

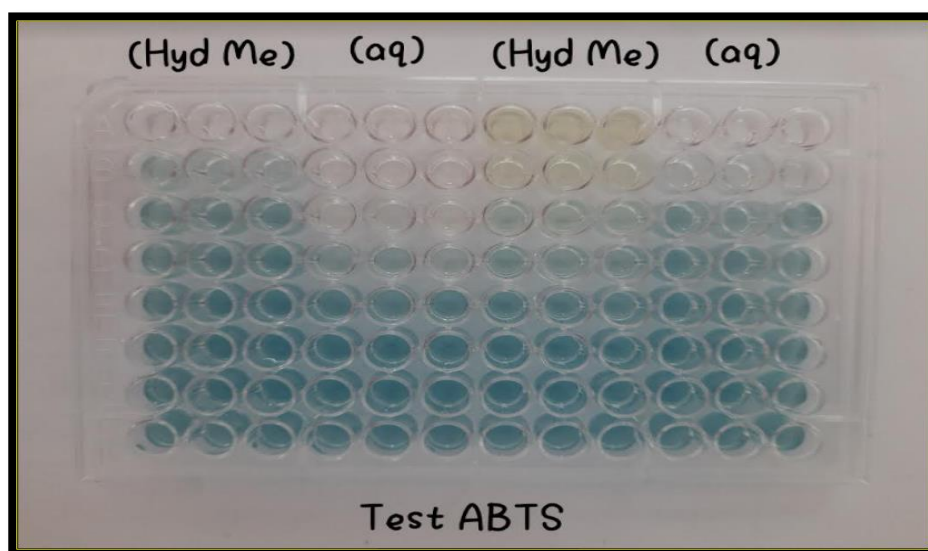


Figure III.34. La plaque de dosage de l'activité du piégeage du cation radical  $ABTS^+$  des extraits d'*Androcymbium gramineum* et *Cynodon dactylon*.

Dans ce test, on remarque que la capacité de piégeage des radicaux libres de la plante *Androcymbium gramineum* présentée les extraits aqueux et hydro-méthanolique est plus forte qui présente un ( $CI_{50} = 70,00 \pm 1,88 \mu\text{g/ml}$ ), ( $CI_{50} = 71,35 \pm 0,80 \mu\text{g/ml}$ ) est douze fois plus forte que le standards BHA ( $CI_{50} = 5,73 \pm 0,41 \mu\text{g/ml}$ ). Par contre que la capacité de piégeage des radicaux libre de la plante *Cynodon dactylon* présentée les extraits hydro-méthanoïque est plus forte que celle des extraits aqueux par ( $CI_{50} = 75,20 \pm 0,53 \mu\text{g/ml}$ ) est treize fois plus forte que le standards BHA ( $CI_{50} = 5,73 \pm 0,41 \mu\text{g/ml}$ ), alors que l'extraits aqueux qui présente un ( $CI_{50} = 228,92 \pm 0,65 \mu\text{g/ml}$ ) est trente-neuf fois plus forte que les standards BHA ( $CI_{50} = 5,73 \pm 0,41 \mu\text{g/ml}$ ).

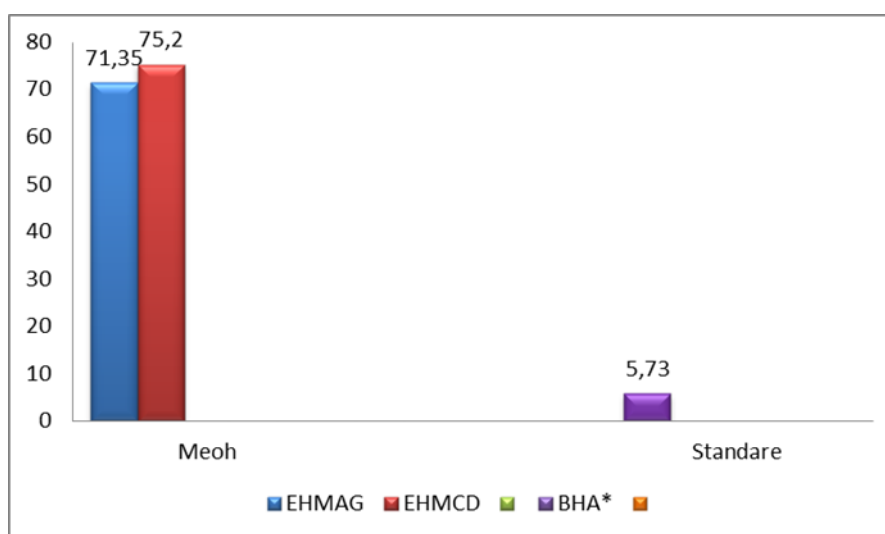


Figure III .35. Valeurs  $IC_{50}$  du test ABTS des extraits hydro-méthanoïques.

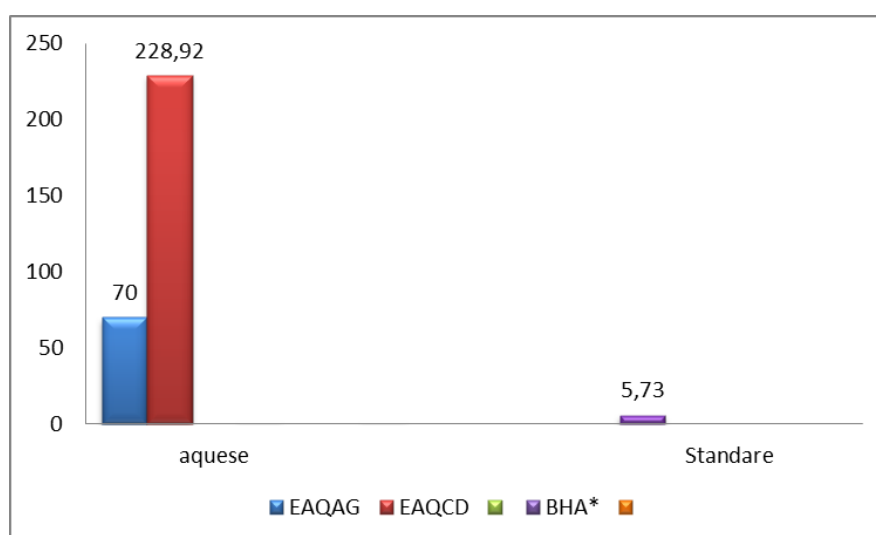


Figure III.36. Valeurs  $IC_{50}$  du test ABTS des extraits aqueux.

On conclure que les extraits hydro-méthanoïque et aqueux de la plante *Androcymbium gramineum* sont plus actifs par rapport à les extraits de la plante *Cynodon dactylon*. Dans cette activité, les extraits ont manifesté un pouvoir de piégeage des radicaux libres mieux que dans l'activité antiradicalaire au DPPH\* ceci peut être justifié par la capacité du radical cation ABTS<sup>•+</sup> d'être plus polyvalent que le DPPH\* parce qu'il est soluble dans l'eau et les solvants organiques, ce qui permet une évaluation d'activité antiradicalaire pour les composés hydrophiles et lipophiles. [5]

### III.2.1.3. Activité de réduction du complexe cuivre-néocuproïne (CUPRAC)

L'activité antioxydante par la méthode (CUPRAC) est basée sur la mesure de l'absorbance à 450 nm de la réduction en présence d'un antioxydant du complexe stable Neocuproïne-cuivre (II) de couleur bleu en complexe stable Neocuproïne-cuivre (I) de couleur orange. le dosage de cette réaction est mesuré a titre de valeurs  $A_{0,50}$  des extraits de *Cynodon dactylon* , *Androcymbium gramineum* et des standards BHA et BHT mentionnées ci-dessous:

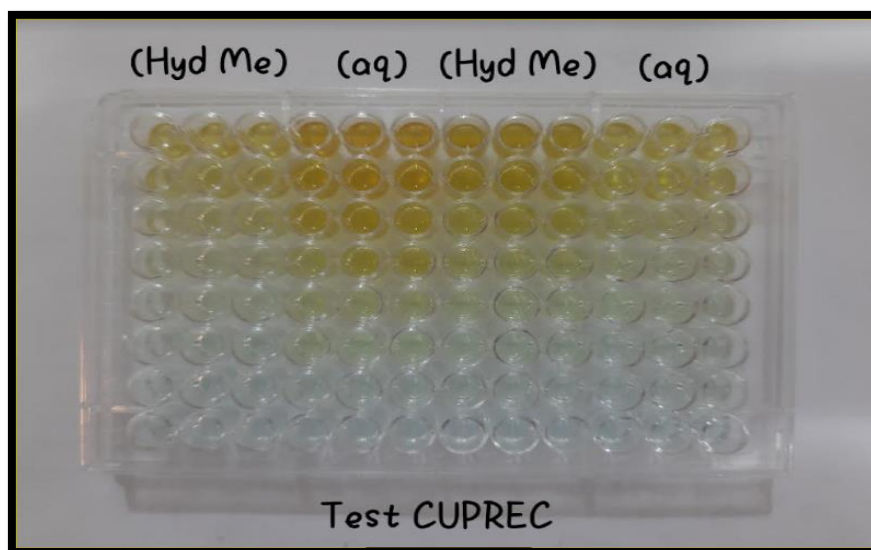


Figure III.37. La plaque de dosage de l'activité de réduction du complexe cuivre-néocuproïne des extraits d'*Androcymbium gramineum* et *Cynodon dactylon*.

Tableau III. 09. Réduction du complexe néocuproïne par la méthode CUPRAC.

Concentration Extraits (µg/ml) et standards	Absorbance							$A_{0,50}$ (µg/ml)
	12,5	25	50	100	200	400	800	
<b>EHMAG</b>	0,08±0,01	0,11±0,04	0,13±0,05	0,19±0,01	0,29±0,03	0,50±0,01	0,76±0,03	400±0,01
<b>EAQAG</b>	0,10±0,01	0,17±0,02	0,26±0,03	0,51±0,10	0,72±0,05	1,12±0,08	1,45±0,02	94,15±0,01
<b>EHMCD</b>	0,10±0,01	0,13±0,02	0,20±0,03	0,33±0,01	0,55±0,04	1,00±0,06	1,80±0,16	179,64±0,03
<b>EAQCD</b>	0,08±0,00	0,10±0,01	0,14±0,01	0,18±0,01	0,28±0,01	0,51±0,05	0,68±0,02	393±0,03
	<b>1,5625</b>	<b>3,125</b>	<b>6,25</b>	<b>12,5</b>	<b>25</b>	<b>50</b>	<b>100</b>	<b><math>A_{0,5}</math> (µg/ml)</b>
<b>BHT</b>	0,11±0,04	0,19±0,01	0,33±0,04	0,66±0,07	1,03±0,07	1,48±0,09	2,04±0,14	9,62±0,87
<b>BHA</b>	0,23±0,07	0,46±0,00	0,78±0,01	1,34±0,08	2,36±0,17	3,45±0,02	3,76±0,03	3,64±0,19

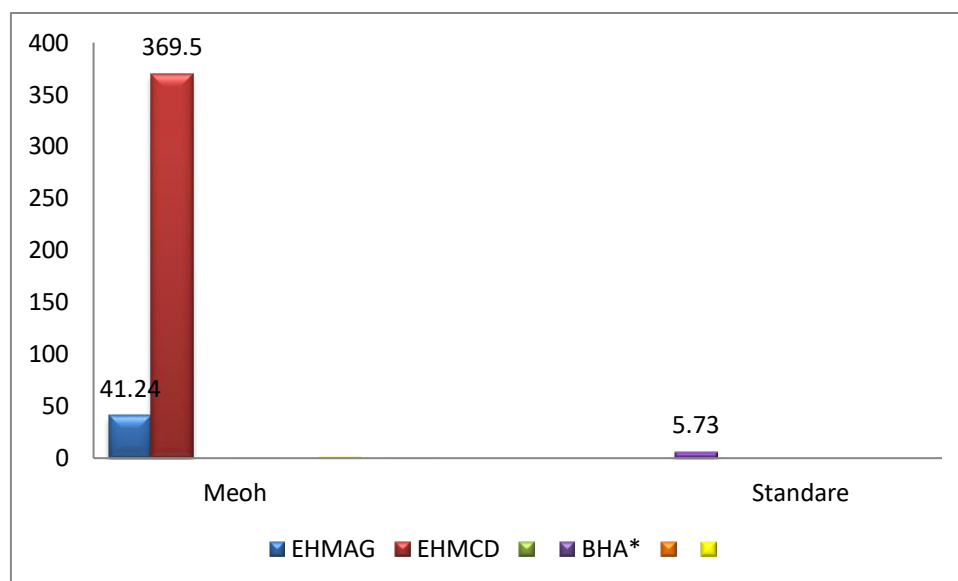


Figure III.38. Valeurs des  $A_{0,50}$  du test CUPRAC pour l'extraits hydro-méthanoïque

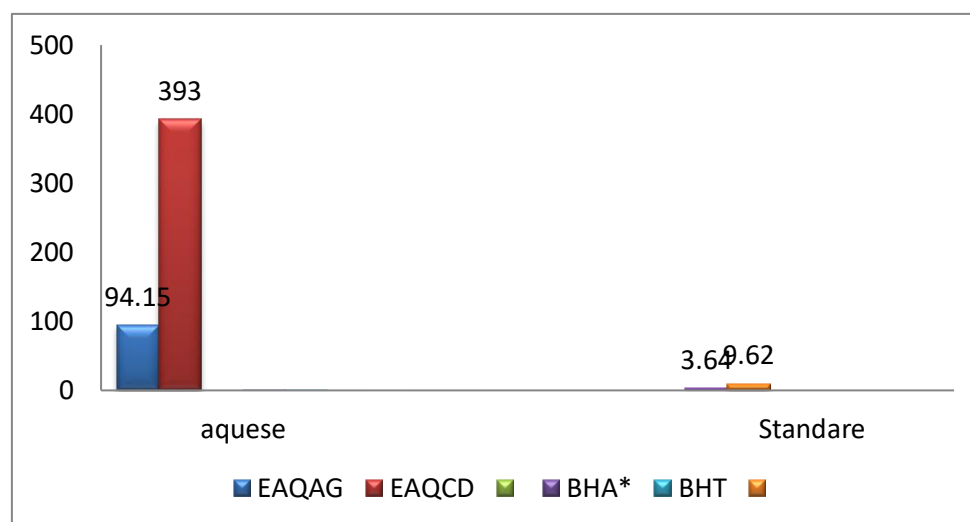


Figure III.39. Valeurs des  $A_{0,50}$  du test CUPRAC pour l'extraits aqueux.

La comparaison de l'extraits de la plante *Androcymbium gramineum* permet de constaté que l'extraits aqueux sont plus actifs que les extraits hydro-méthanoïque, par contre l'extraits de la plante *Cynodon dactylon* ermet de constaté que l'extraits hydro-méthanoïque sont plus actif que les extraits aqueux.

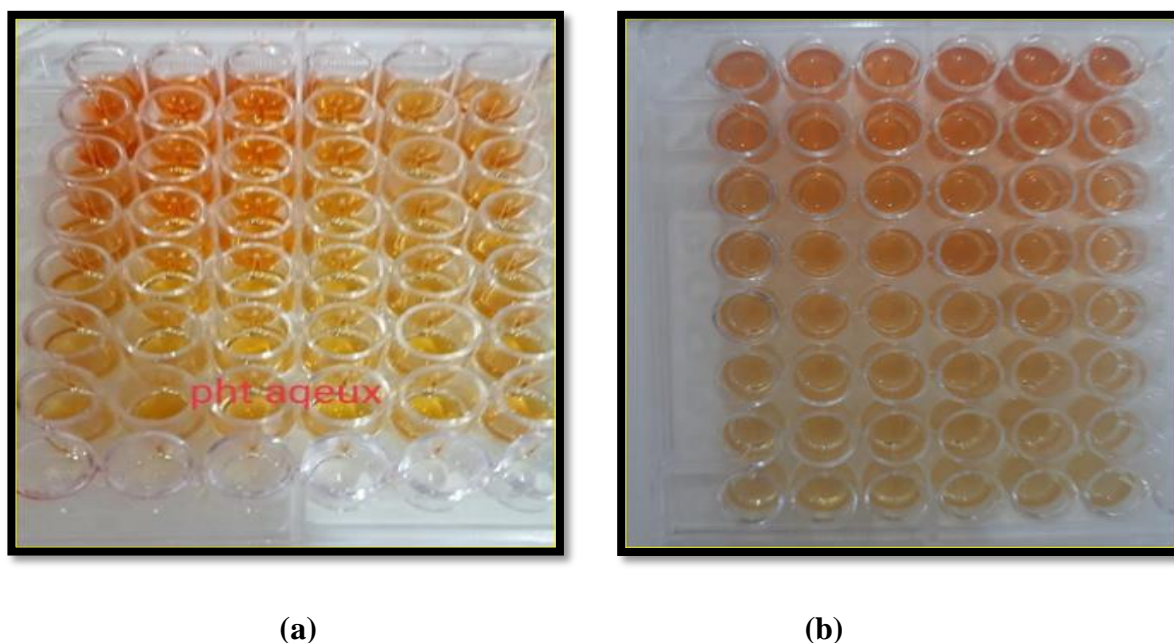
Notamment, la présente étude a montré que l'EAQAG ( $A_{0,50}= 94,15\pm 0,01 \mu\text{g/ml}$ ) possède une activité de réduction du complexe cuivre-néocuproïne par rapport au standard BHA ( $A_{0,50}=3,64\pm 0,19 \mu\text{g/ml}$ ). Cet extrait est vingt-cinq fois plus actif que celui de l'extrait EAQCD qui présente un ( $A_{0,50}= 393\pm 0,03 \mu\text{g/ml}$ ) est cent sept fois plus forte que les

standards BHA ( $A_{0,50}=3,64\pm 0,19 \mu\text{g/ml}$ ). Par contre, les extraits EHMAG et EHMCD ont manifesté une faible activité de réduction ( $A_{0,50}=400\pm 0,01 \mu\text{g/ml}$ ), ( $A_{0,50}=179,64\pm 0,03 \mu\text{g/ml}$ ) par rapport aux standards BHA et BHT.

Cette différence d'activité vis-à-vis au complexe cuivre-néocuproïne est due à plusieurs critères que possède les polyphénols tels que le nombre et la position (positions 3', 4' et 5') de groupes d'hydroxyle aussi bien que le degré de conjugaison de la molécule entière (double liaison C2-C3), le groupe carbonyle en position 4 (oxo) et la structure ortho-dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol) qui sont importants pour le transfert facile [6]

#### III.1.4. Activité de réduction par la formation du complexe $\text{Fe}^{2+}$ -Phénantroline

Suite à une réaction d'oxydoréduction, un complexe  $\text{Fe}^{2+}$ - phénantroline de couleur rouge-orangé est formé. Cette réduction est déterminée par la mesure de valeurs de  $A_{0,50}$  des extraits de la plante et celles des standards BHA et BHT ce qui a permis d'obtenir les résultats suivants :



**Figure III. 40.** La plaque de dosage de l'activité de réduction par la formation du complexe  $\text{Fe}^{2+}$ - phénantroline par les extraits (a) aqueux, (b) hydro-méthanoïque d'*Androcymbium gramineum* , *Cynodon dactylon* .

Tableau III .10. Absorbance du complexe Fe<sup>+2</sup>- phénantroline des extraits d'Androcymbium gramineum , Cynodon dactylon .

Concentration Extraits (µg/ml) et standards	Absorbance							A <sub>0.5</sub> (µg/ml)
	12,5	25	50	100	200	400	800	
EAQAG	0,31±0,02	0,33±0,01	0,39±0,02	0,54±0,02	0,67±0,13	0,93±0,07	1,28±0,15	86,25±0,02
EAQCD	0,33±0,01	0,36±0,02	0,43±0,03	0,72±0,21	0,80±0,04	1,24±0,06	2,03±0,16	58,54±0,25
EHMAG	0,27±0,01	0,28±0,02	0,32±0,00	0,43±0,07	0,50±0,12	0,75±0,29	0,83±0,04	200±0,1
EHMCD	0,27±0,01	0,28±0,02	0,29±0,01	0,31±0,02	0,35±0,01	0,44±0,02	0,50±0,06	800±0,06
	<b>0.78125</b>	<b>1.5625</b>	<b>3.125</b>	<b>6.25</b>	<b>12.5</b>	<b>25</b>	<b>50</b>	<b>A<sub>0.5</sub> (µg/ml)</b>
BHA	0,49±0,01	0,59±0,01	0,73±0,02	0,93±0,01	1,25±0,04	2,10±0,05	4,89±0,06	0,93±0,07 <sup>f</sup>
BHT	0,47±0,01	0,47±0,01	0,53±0,03	1,23±0,02	1,84±0,01	3,48±0,03	4,84±0,01	2,24±0,17 <sup>f</sup>

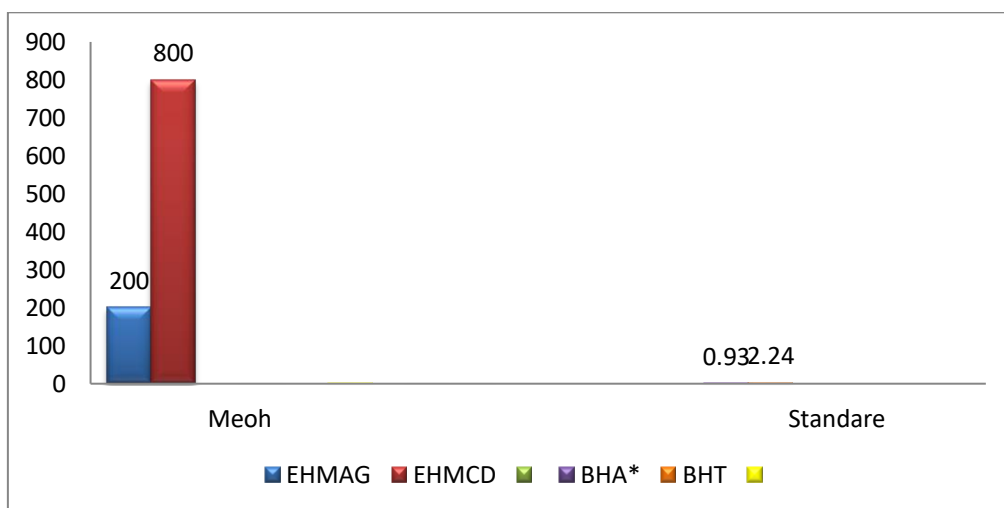
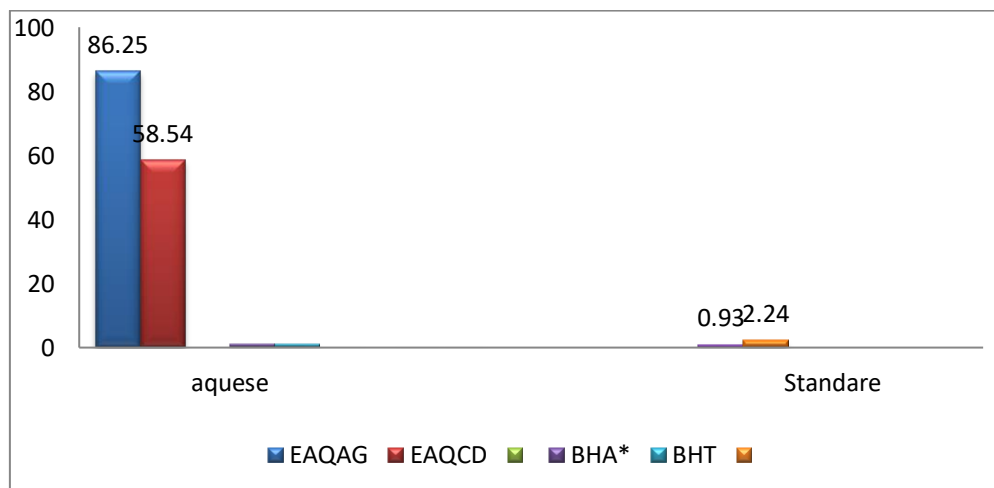


Figure III.41. Valeurs des A<sub>0.5</sub> dans le test phénanthroline pour l'extrait hydro-méthanoïque.



**Figure III .42.** Valeurs des  $A_{0.5}$  dans le test phénanthroline pour l'extrait aqueux.

Les résultats obtenus par cette activité montrent que tous les extraits sont révélés capables de réduire le fer et de former un complexe  $Fe^{+2}$ - phénanthroline. A partir du **Tableau 10** et la **Figure 40**, on peut déduire que l'extrait aqueux d'*Cynodon dactylon* (L) montre le pouvoir réducteur le plus important ( $A_{0.50}= 58,54\pm 0,25 \mu\text{g/ml}$ ) par rapport aux autres extraits. Ce dernier est vingt-six plus supérieur à celui d'extrait aqueux d'*Androcymbium gramineum* ( $A_{0.50}= 86,25\pm 0,02 \mu\text{g/ml}$ ). Toutefois, les deux standards le BHA et le BHT présentent les plus fortes activités réductrices ( $A_{0.50}=0,93\pm 0,07$  et  $2,24\pm 0,17 \mu\text{g/ml}$  respectivement).

Les résultats obtenus par notre extrait malgré l'existence de pouvoir réducteur et la formation de complexe mais sont très loin à comparé avec celle de BHA et BHT. Dans cette activité, la présence des réducteurs dans les extraits de la plante permet de réduire le  $Fe^{+3}$  en  $Fe^{+2}$ . Par conséquent, ce dernier forme un complexe stable avec la phénanthroline de couleur rouge orangé. Ce complexe  $Fe^{+2}$ - phénanthroline est révélé par la méthode spectrophotométrique, ce qui permet de doser les ions ferreux et donc de déterminer le pouvoir réducteur de l'antioxydant testé. Cette différence du pouvoir réducteur vis-à-vis au complexe  $Fe^{+2}$ - phénanthroline est due à la capacité réductrice des polyphénols en tant qu'antioxydants qui dépend du degré d'hydroxylation et du degré de conjugaison des composés phénoliques. Spécifiquement pour les flavonoïdes, il a été suggéré que la capacité d'élimination des radicaux libres augmente lorsque les conditions suivantes sont présentes : la présence d'une structure 3',4'-dihydroxy dans le cycle B, la présence d'une double liaison (C2-C3) en conjonction avec le groupe 4-oxo dans l'hétérocycle et la présence de groupes 3- et 5-hydroxyle dans le cycle A avec une fonction 4-oxo dans les cycles A et C. [7]

### III.2.2. Activité enzymatique

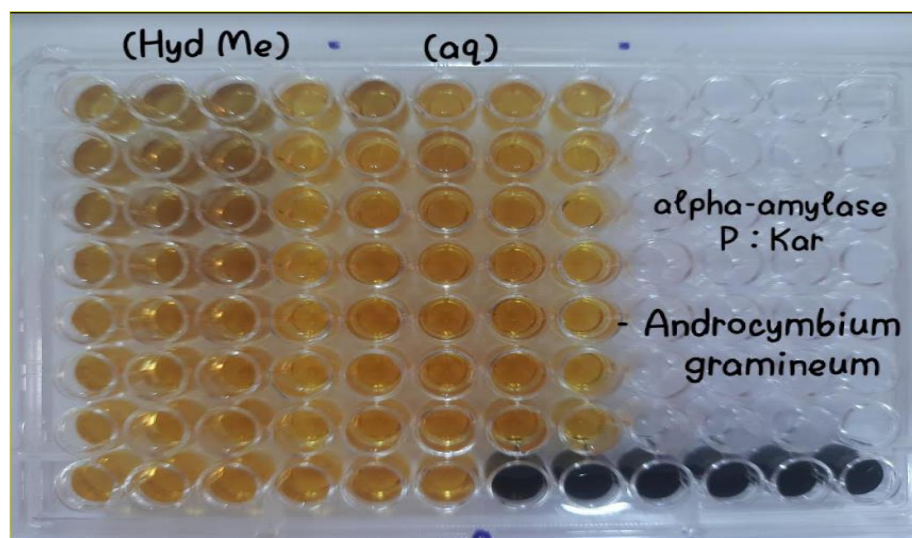
L'évaluation de l'activité enzymatique des extraits : hydr-méthanoïque (EHMAG et EHMCD), aqueux (EAQAG et EAQCD) a été réalisée par l'inhibition de deux enzymes.

#### III.2.2.1. Evaluation de l'activité antidiabétique

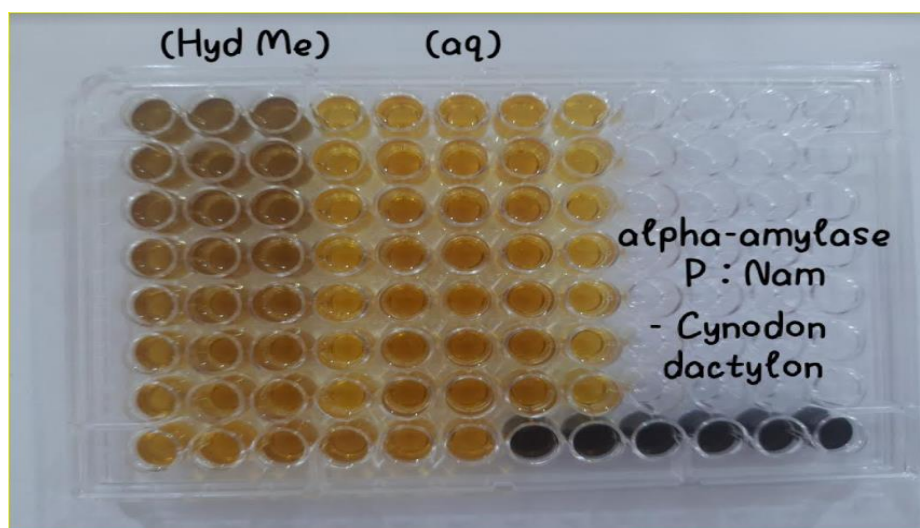
L'activité antidiabétique des extraits mère des deux plantes *Androcymbium gramineum*, *Cynodon dactylon* à été évaluée en mesurant leurs capacités à inhiber l'enzyme alpha-amylase.

## ✓ Inhibition de l'alpha amylase

Dans cette étude, l'activité inhibitrice de l'enzyme alpha-amylase des différents extraits de a été évaluée d'*Androcymbium gramineum*, *Cynodon dactylon*. Par la détermination des concentrations inhibitrices CI50 par rapport au standard l'acarbose en se basant sur la capacité d'une substance à inhiber cette enzyme. Les résultats sont présentés au-dessous :



*Figure.43. Plaques de dosage de l'activité inhibitrice d'alpha-amylase des extraits d'Androcymbium gramineum.*



*Figure.44. Plaques de dosage de l'activité inhibitrice d'alpha-amylase des extraits de Cynodon dactylon.*

Tableau III .11. Inhibition de l'α-amylase par les extraits d'Androcymbium gramineum, Cynodon dactylon.

Concentration Extraits (µg/ml) et standard	% d'inhibition							CI <sub>50</sub> (µg/ml)
	6,25	12,5	25	50	100	200	400	
<b>EHMAG</b>	2,36±0,57	2,75±0,46	3,84±1,04	6,19±1,61	8,75±2,17	9,15±1,91	9,94±2,27	>400
<b>EAQAG</b>	1,88±0,5	1,91±1,60	2,28±0,07	2,30±0,18	2,42±0,15	2,67±0,22	2,96±0,33	>400
<b>EHMCD</b>	9,18±0,79	11,14±0,21	14,06±0,85	19,10±1,07	21,45±0,43	24,02±0,22	31,14±0,63	>400
<b>EAQCD</b>	2,41±0,32	2,88±0,39	6,05±0,58	6,36±2,16	7,06±0,34	8,15±0,88	8,88±1,24	>400
	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>	<b>2000</b>	<b>4000</b>	
<b>Acarbose</b>	7,76±0,17	8,08±0,30	9,46±0,11	10,70±0,96	31,81±2,89	37,21±3,54	53,05±1,59	3650,93±10,70 <sup>a</sup>

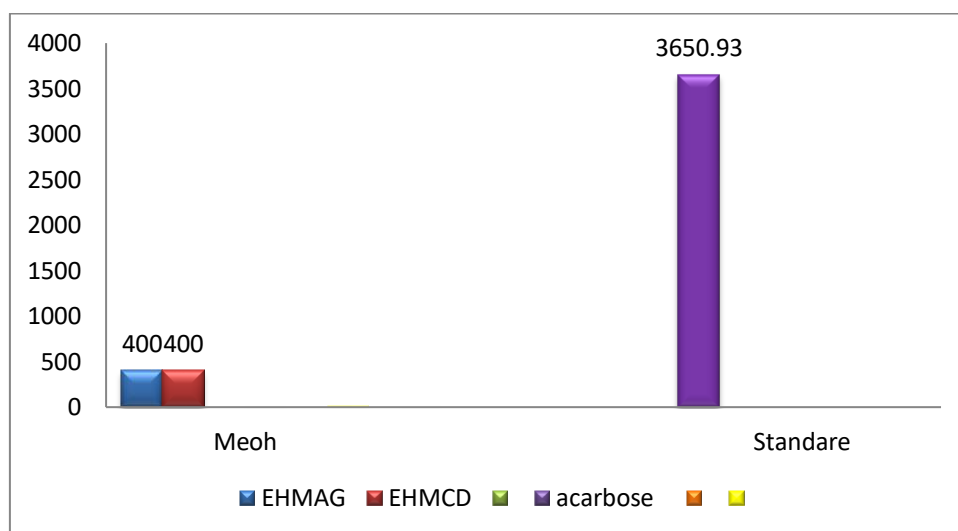


Figure III.45. Valeurs des CI<sub>50</sub> du test d'inhibition de l'α-amylase pour l'extrait hydro-méthanoïque.

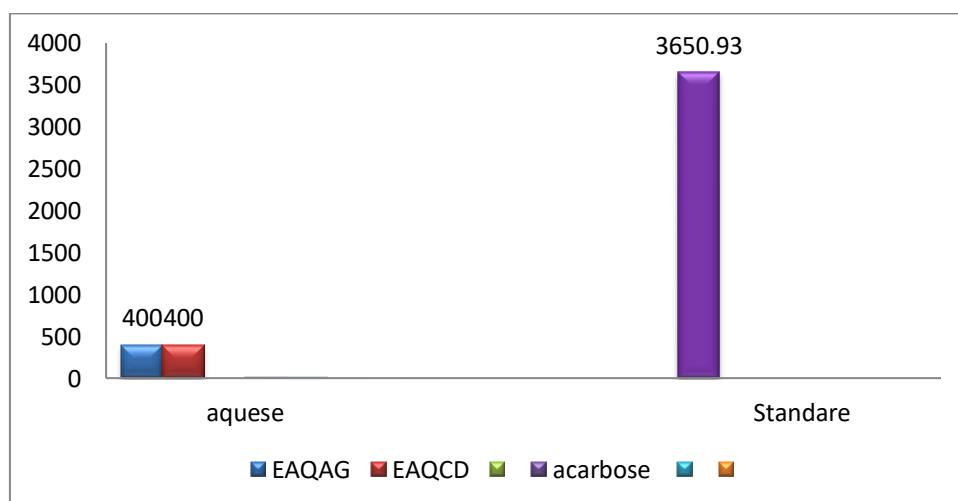


Figure III.46. Valeurs des CI<sub>50</sub> du test d'inhibition de l'α-amylase pour l'extrait aqueux.

Selon les résultats obtenus dans cette étude (**Tableau 11, Figure 44**), on constate que tous les extraits d'*Androcymbium gramineum*, *Cynodon dactylon* ont manifesté l'inhibition de l'enzyme très faible ( $CI_{50} >400 \mu\text{g/ml}$ ) comparé à celui du standard l'acarbose ( $CI_{50} = 3650,93 \pm 10.70 \mu\text{g/ml}$ ).

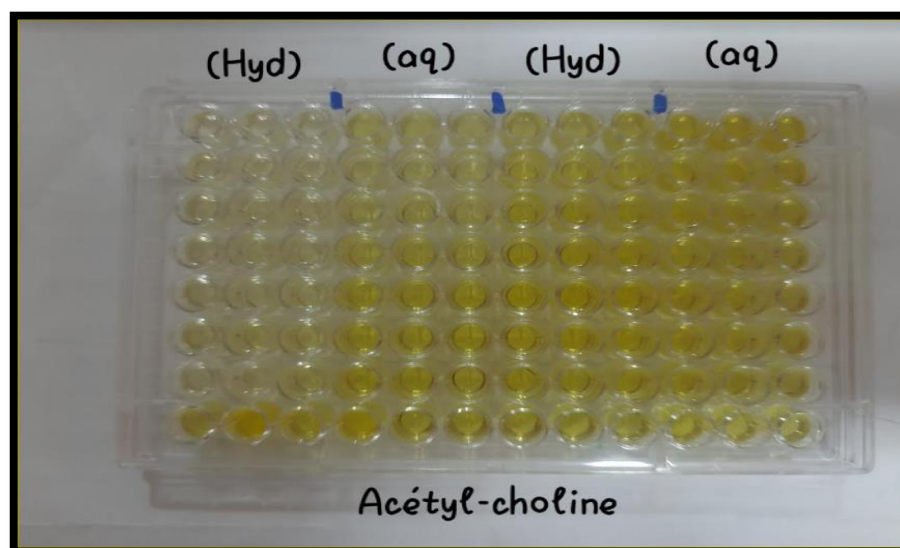
Cette différence d'activité inhibitrice de l'alpha-amylase peut être justifiée par la présence dans EHMCD d'une classe autre que les flavonoïdes car ces derniers ne représentent que 31,14% du contenu total en polyphénols. Cette classe est probablement les tanins, une des principales classes de composés phénoliques caractérisée par la présence des molécules inhibitrices non spécifiques de diverses enzymes hydrolytiques telles que les  $\alpha$ -amylases, les  $\alpha$ -glucosidases et les lipases. Cette inhibition est peut-être associée à leur capacité à se lier fortement aux protéines et aux glucides dont l'interaction entre les tanins et les protéines est le résultat de multiples liaisons hydrogènes et d'associations hydrophobes. À la suite de cette interaction, il se produit un blocage des sites catalytiques des enzymes et leur activité est donc inhibée. [8]

#### III.2.2.2. Evaluation de l'activité anti-Alzheimer

L'activité anti-Alzheimer des extraits mère des deux plantes *Androcymbium gramineum*, *Cynodon dactylon* à été évaluée en mesurant leurs capacités à inhiber l'enzyme alpha-amylase.

##### ✓ Inhibition de l'acétylcholinestérase

Le test d'Ellman est basé sur le clivage de l'acétylcholine par l'acétylcholinestérase pour produire de la thiocholine. Cette dernière va réagir avec le 5,5'-dithiobisnitrobenzoate (DTNB) pour former un anion de couleur jaune. [9]

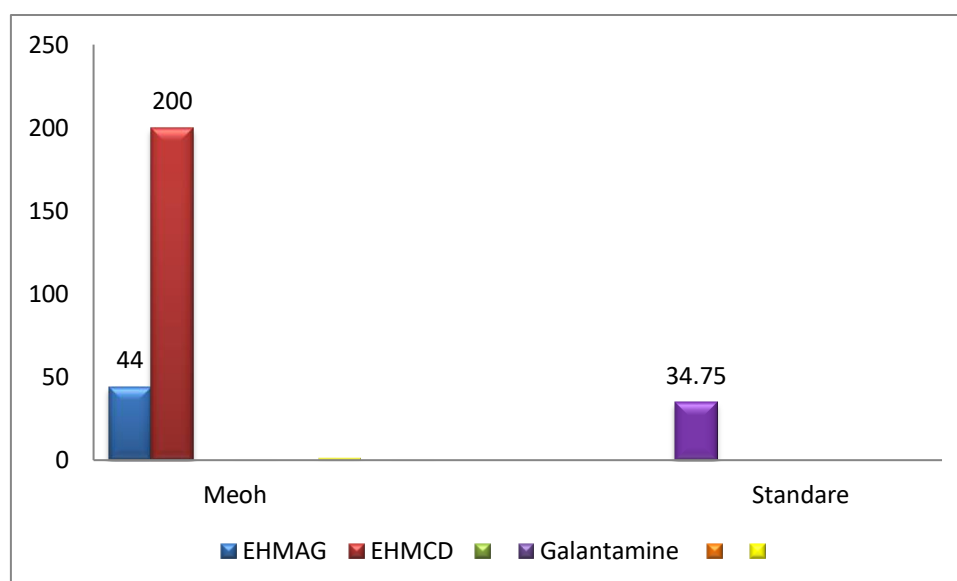


**Figure III. 47.** La plaque de dosage de l'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase par les extraits d'*Androcymbium gramineum* et *Cynodon dactylon*.

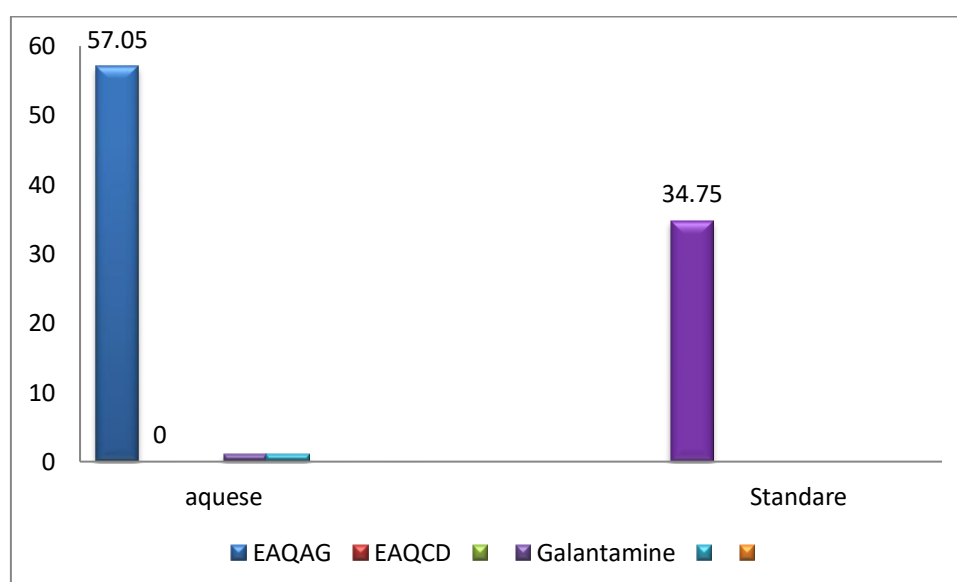
L'inhibition des cholinestérases est une stratégie largement pratiquée dans le traitement symptomatique d'Alzheimer. Plusieurs produits naturels, notamment des polyphénols, ont montré une activité inhibitrice de ces enzymes et par conséquent représentent une source des nouveaux traitements de cette maladie neurodégénérative. Nos résultats, exprimés en IC<sub>50</sub> des différents extraits en comparaison avec le standard la galantamine. Les résultats obtenus sont représentés ci-dessous, (**Tableau 12**)

**Tableau III.12.** Inhibition d'acétylcholinestérase par les extraits *Androcymbium gramineum* et *Cynodon dactylon*.

Concentration Extraits ( $\mu\text{g/ml}$ ) et standards	% d'inhibition							CI <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )
	3,125	6,25	12,5	25	50	100	200	
<b>EHMAG</b>	21,76 $\pm$ 1,	30,78 $\pm$ 1,6	33,22 $\pm$ 1,0	35,35 $\pm$ 4,8	59,86 $\pm$ 2,5	60,46 $\pm$ 2,54	74,08 $\pm$ 2,29	44 $\pm$ 2,51
<b>EAQAG</b>	24,57 $\pm$ 1,	26,05 $\pm$ 1,9	28,52 $\pm$ 1,2	41,29 $\pm$ 1,8	46,57 $\pm$ 2,3	63,29 $\pm$ 2,32	70,52 $\pm$ 4,11	57,05 $\pm$ 2,35
<b>EHMCD</b>	9,46 $\pm$	18,80 $\pm$	20,12 $\pm$	23,08 $\pm$	24,27 $\pm$	30,38 $\pm$	32,57 $\pm$	>200
<b>EAQCD</b>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<b>Galantamine</b>	3,26 $\pm$ 0,6	6,93 $\pm$ 0,62	24,03 $\pm$	45,13 $\pm$	63,87 $\pm$	73,57 $\pm$ 0,77	78,95 $\pm$ 0,58	34,75 $\pm$ 1,99 <sup>c</sup>



**Figure III .48.** Valeurs des  $CI_{50}$  du test d'inhibition de l' $\alpha$ -amylase pour l'extrait hydro-méthanoïque.



**Figure II.49 .** Valeurs des  $CI_{50}$  du test d'inhibition de l' $\alpha$ -amylase pour l'extrait aqueux.

A partir du Tableau 12 qui présente le pourcentage d'inhibition de l'acétylcholinestérase par les extraits de AG et CD, on remarque que l'extrait EHMAG a montré une activité modérée contre la AChE ( $CI_{50}=44\pm 2.51\mu\text{g/ml}$ ), qui est une fois que celle du standard la galantamine ( $CI_{50}=34,75\pm 1,99\mu\text{g/ml}$ ). Par contre l'extrait EAQAG ( $CI_{50}=57,05\pm 2.35\mu\text{g/ml}$ ) a faiblement inhibé l'activité de la AChE. Alors que l'extraits EHMCD ont manifesté une faible activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase ( $CI_{50}>200\mu\text{g/ml}$ ) et ils sont loin d'être comparés à la galantamine. Cependant, l'EAQCD était inactif pour les différentes concentrations.

D'après ces résultats, on peut dire qu'AG a présenté une activité modérée de l'inhibition de l'acétylcholinestérase par rapport à *Cynodon dactylon*. L'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase par la plante AG peut être due à la présence des polyphénols. Elle est également due aux alcaloïdes, terpènes, et coumarines, qui sont des composés possédants des propriétés anticholinestérasiques [10].

### References bibliographies

[1] Í.Gülçin. (2010). Antioxidant properties of resveratrol: A structure–activity insight. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 11, 210-218.

[2] Sánchez-Vioque, R. Polissiou, M. Astraka, K. Mozos-Pascual, M. de los, Tarantilis, P. Herraiz-Peñalver, D.Santana-Méridas. (2013). Polyphenol composition and antioxidant and metal chelating activities of the solid residues from the essential oil industry. *Industrial Crops and Products*. 49, 150-159.

- [3] Yokozawa, T., Chen, C.P., Dong, E., Tanaka, T., Nonaka, G.-I., and Nishioka, I. (1998). Study on the Inhibitory Effect of Tannins and Flavonoids against the 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Radical. *Biochemical Pharmacology*. 56, 213-222.
- [4] A.Von Gadow, E, Joubert, C.F. Hansmann. (1997). Comparison of the Antioxidant Activity of Aspalathin with That of Other Plant Phenols of Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*),  $\alpha$ -Tocopherol, BHT, and BHA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45, 632-638.
- [5] T. Yokozawa, C.P. Chen, E. Dong, T. Tanaka, G.-I. Nonaka, I. Nishioka (1998). Study on the Inhibitory Effect of Tannins and Flavonoids against the 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Radical. *Biochemical Pharmacology*. 56, 213-222.
- [6] R. Apak, K. Güçlü, M. Özyürek, S.E. Karademir. (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.
- [7] R. Pulido, L. Bravo, F. Saura-Calixto. (2000). Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols As Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48, 3396-3402.
- [8] Aparecida Braga, M.Silva de Abreu, T.Cardoso Trento, M.V.Henrique Andrade Machado, G. Lopes Silva Pereira, L.Assaid Simão, A.S.Marcussi,. (2019). Prospection of Enzyme Modulators in Aqueous and Ethanolic Extracts of *Lippia sidoides* Leaves: Genotoxicity, Digestion, Inflammation, and Hemostasis. *Chemistry & Biodiversity*.16.
- [9] G.L.Ellman, K.D Courtney, V. Andres, R.M. Featherstone. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. 7, 88-95.
- [10] R.Tundis, F.Menichini, F.Conforti, M.R.Loizzo, M. Bonesi, G.Statti, and F. Menichini. (2009). A potential role of alkaloid extracts from *Salsola* species (Chenopodiaceae) in the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 24,818-824.

*Conclusion*

*Générale*

## Conclusion générale

---

### Conclusion générale

Les plantes médicinales ont été utilisées depuis des milliers d'années à des fins thérapeutiques pour traiter naturellement toute une variété de maladies. Cette propriété a été confirmée par des recherches scientifiques modernes qui ont assuré l'efficacité de ces plantes grâce à leur richesse en polyphénols qui leur confèrent des propriétés biologiques diverses. Dans ce contexte nous nous sommes intéressés à effectuer des travaux d'étude phytochimique de deux plantes médicinales algérienne *Androcymbium gramineum* appartient à la famille *Colchicaceae* et *Cynodon dactylon* appartient à la famille *Poaceae* ainsi une évaluation *in-vitro* des extraits hydro-méthanoïque et l'aqueux pour les activités biologiques antioxydantes, anticholinestérase et antidiabétique de l'espèce *Androcymbium gramineum* et *Cynodon dactylon*.

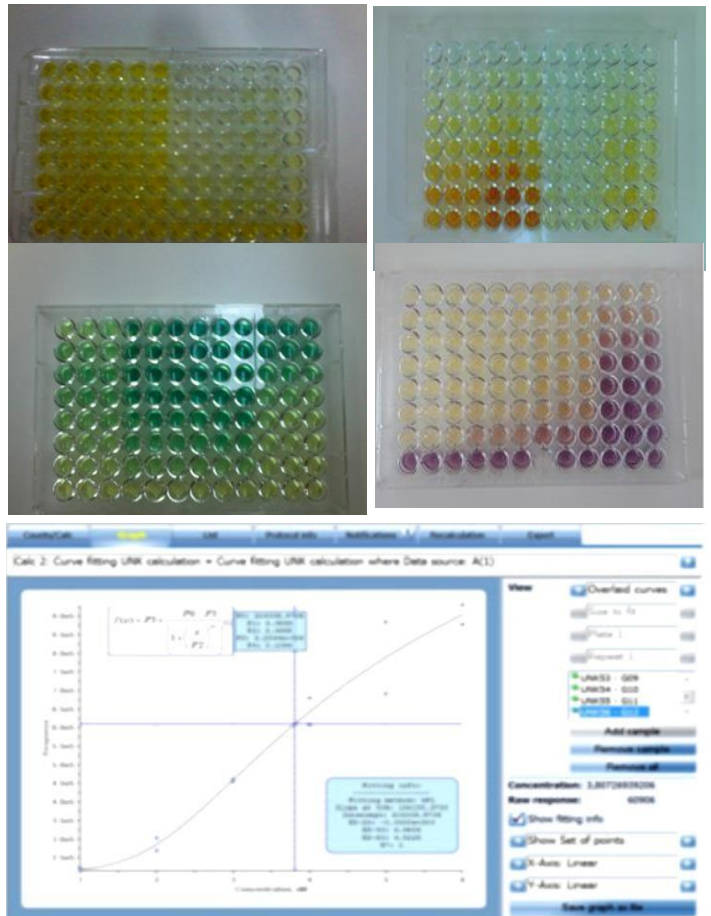
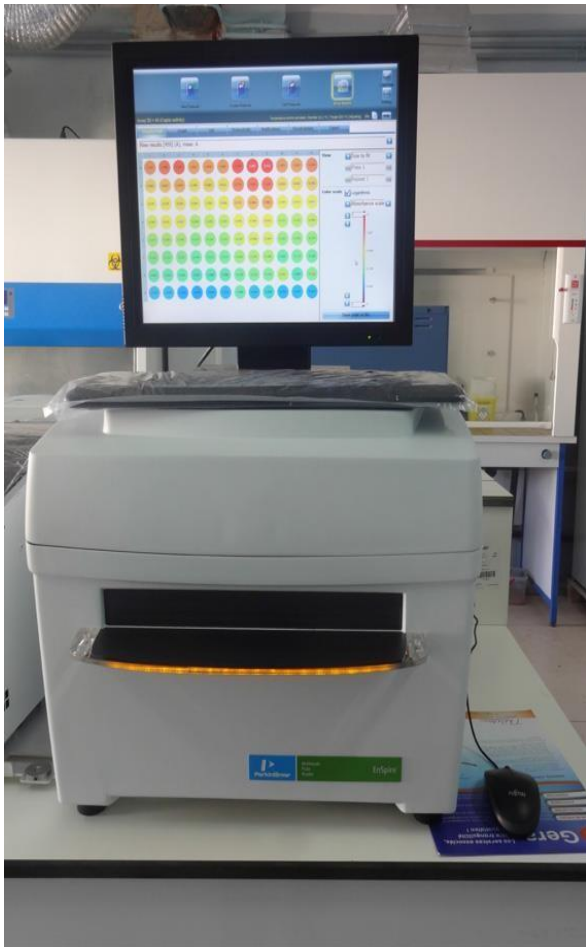
Nos résultats ont révélé des taux très importants en polyphénols totaux et flavonoïdes, surtout la plante *Androcumbium gramineum* de nos extraits aqueux, ce même extrait hydro-méthanoïque de l'espèces *Androcymbium gramineum* a exercé la plus forte activité antioxydante dans le test DPPH par contre les autre activités (ABTS, CUPRAC, phénoltroline) exerce une faible activité.

Les effets anti-enzymatiques des extraits ont été évalués contre deux enzymes, l'acétylcholinestérase et alpha-amylase. La première est responsable de la maladie d'Alzheimer, et a été inhibé par nos extraits. Ces résultats sont prometteurs pour l'utilisation de l'espèce *Androcymbium gramineum* dans l'aqueux pour les traitements symptomatiques de la maladie d'Alzheimer. Alors que l'activité antidiabétique remarquable, une faible activité Ces activités biologique est probablement liée à la richesse en polyphénols

# *Annexes*

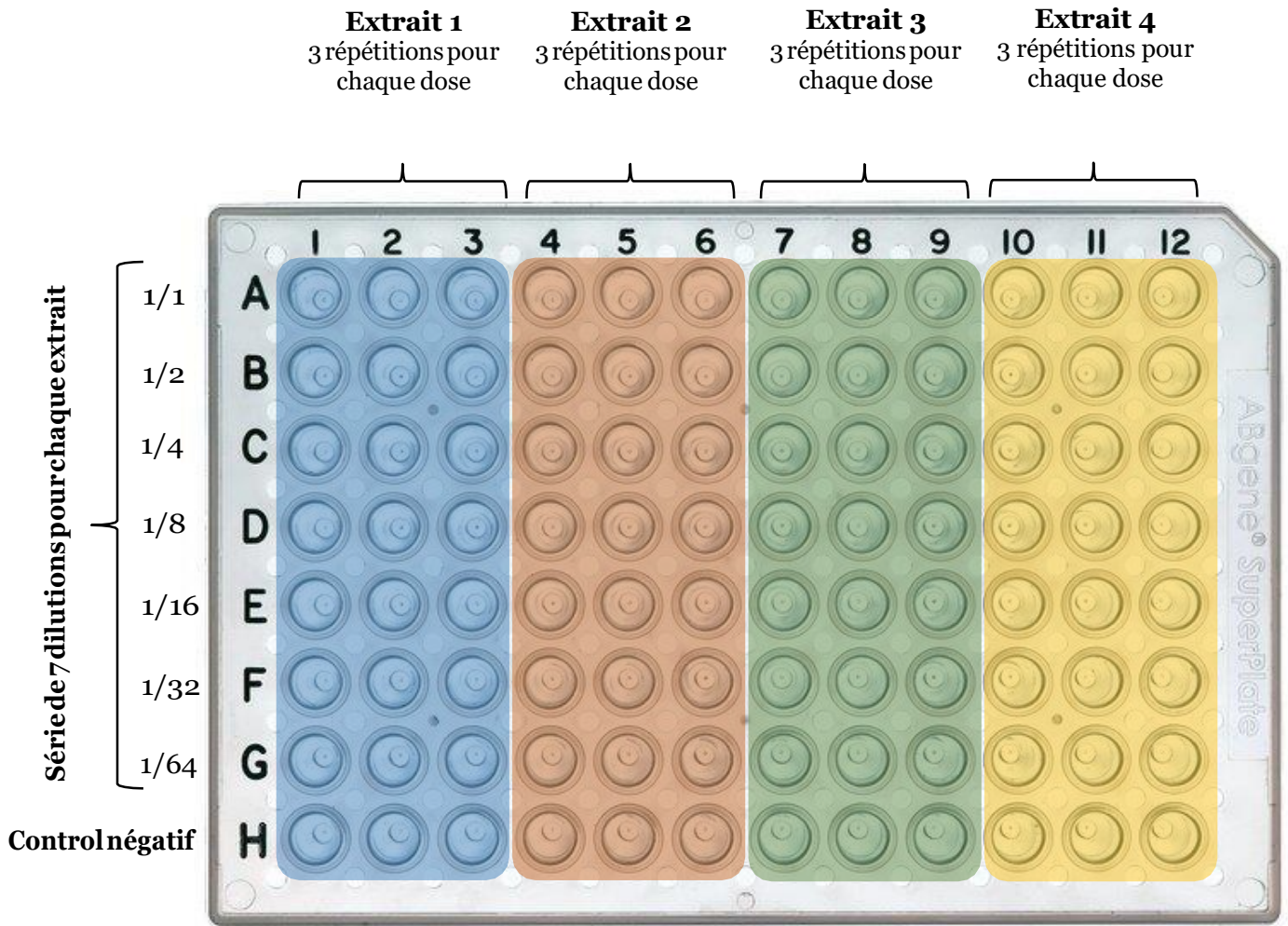
# Annexes

## Annexe 01 : lecteur des microplaques a 96 puits



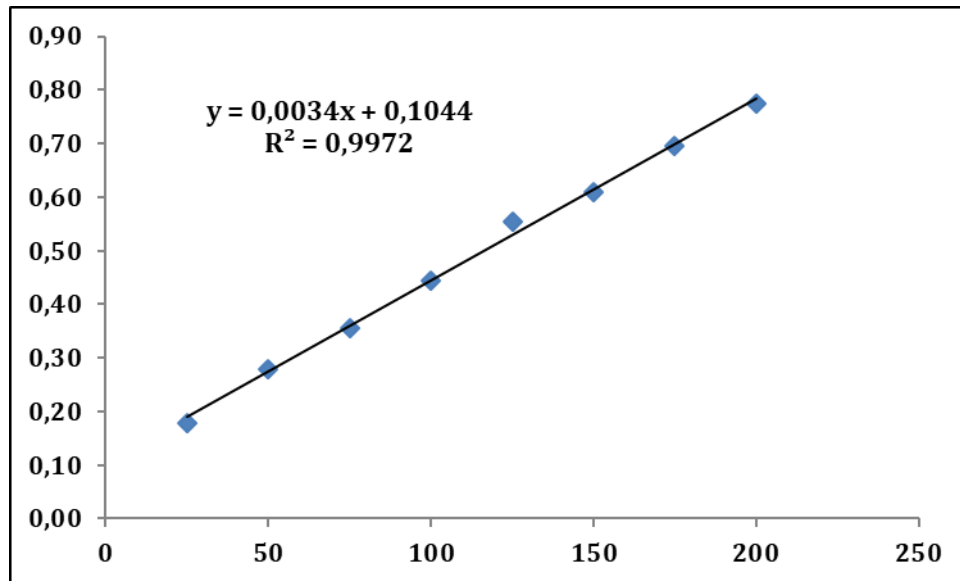
# Annexes

## Annexe 02 : organisation de la microplaque

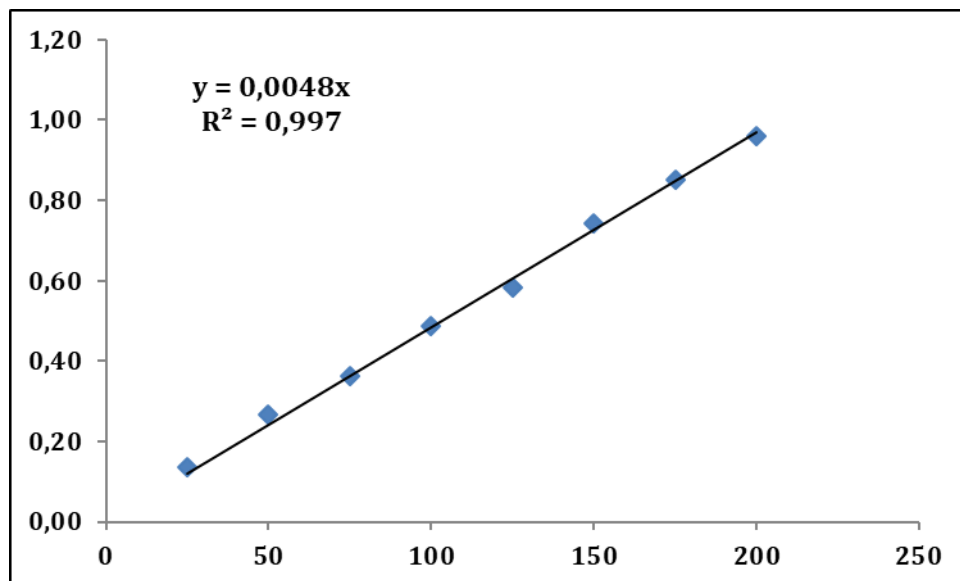


## Annexes

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



### Annexe 04 : courbe d'étalonnage de Quercétine



# *Résumé*

## Résumé

La région de Ghardaïa possède une variété florale intéressante dans ce contexte notre travail repose sur le choix des deux espèces *Androcymbium gramineum* et *Cynodon dactylon* qui appartiennent à la famille *Colchicaceae* et *Poaceae* respectivement. Ces deux plantes aromatiques ont des propriétés médicinales assez importantes dues à leur richesse en produit polyphénolique, de ce fait notre étude s'intéresse à une évaluation biologique en termes d'effets antioxydants et anti-enzymatiques de ses extraits hydro-méthanolique et aqueux.

Dans la présente étude, nous avons quantifié les polyphénols et les flavonoïdes totaux pour les deux extraits de plantes précitées par les méthodes de folin-ciocalteu et  $\text{AlCl}_3$  respectivement ; l'activité antioxydante des extraits a été estimée par l'utilisation des méthodes de DPPH, ABTS, CUPRAC et phénantroline.

Les résultats obtenus ont montré une très importante inhibition des radicaux libres avec des valeurs significatives proches à celles des standards. En ce qui concerne l'activité anti-enzymatique nous avons effectué des études des deux enzymes ( $\alpha$ -amylase, l'acétylcholinestérase) pour faire étudier l'activité antidiabétique et l'activité anti Alzheimer. Concernant l'activité antidiabétique on a été constaté que l'extrait hydro-méthanolique de *Cynodon dactylon* exerce une activité antidiabétique importante qui correspond à une inhibition maximale de 31,14%. Ce résultat confirme encore le rôle des composés polyphénoliques tels que les flavonoïdes et les tanins dans l'activité antidiabétique. Par contre l'activité anti Alzheimer exerce une activité anti-AChE très importante avec une  $\text{IC}_{50}$  de ( $57,05 \pm 2,35 \mu\text{g/ml}$ ) presque équivalente à celle du standard Galantamine ( $34,75 \pm 1,99 \mu\text{g/ml}$ ) à l'aide de l'extrait aqueux d'*Androcymbium gramineum* ; ces résultats confirment encore le rôle des polyphénols, bien que la qualité des produits existe dans l'extrait aqueux qui exerce un effet positif pour l'activité anticholinestérase.

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

### Mots clé :

*Androcymbium gramineum* (Colchicaceae), *Cynodon dactylon* (Poaceae). Polyphénols. Stress oxydatif, anti-oxydante, activité enzymatique.

## Abstract

The Ghardaïa region has an interesting floral variety in this context our work is based on the choice of the two species *Androcymbium gramineum* and *Cynodon dactylon* which belong to the family Colchicaceae and Poaceae respectively. These two aromatic plants have quite important medicinal properties due to its richness in polyphenolic product, therefore our study is interested in a biological evaluation in terms of antioxidant and anti-enzymatic effects of its hydro-methanoic and aqueous extracts.

The results obtained showed a very significant inhibition of free radicals with significant values close to those standards. Regarding the anti-enzymatic activity, we carried out our work with two enzymes ( $\alpha$ -amylase, acetylcholinesterase) to study the anti-diabetic and the anti-Alzheimer activities. Regarding the anti-diabetic activity, it was found that the hydro-methanoic extract of *Cynodon dactylon* exerts a significant anti-diabetic activity which corresponds to a maximum inhibition of 31.14%. This result further confirms the role of polyphenolic compounds such as flavonoids and tannins in anti-diabetic activity. On the other hand, the anti-Alzheimer's activity exerts a very important activity with an IC<sub>50</sub> of ( $57.05 \pm 2.35 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) almost equivalent to that of the Galantamine standard ( $34.75 \pm 1.99 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) for the aqueous extract of *Androcymbium gramineum*; these results further confirm the role of polyphenols, although the quality of the products exists in the aqueous extract which exerts a positive effect for anticholinesterase activity.

Our results justify the traditional use of the plant studied in Algeria, and enhance the biological and pharmacological effect of the extracts. They also open up multiple perspectives in the near future that will undoubtedly allow us to enrich the scientific weight of this work.

### Key words:

*Androcymbium gramineum* (Colchicaceae), *Cynodon dactylon* (Poaceae). Polyphenols. Oxidative stress, antioxydant, enzymatic activity.

## ملخص

تتميز منطقة غرداية بتنوع نباتاتها المثيرة للاهتمام في هذا السياق، يعتمد عملنا على اختيار النوعين *Androcymbium* و *gramineum* و *dactylon* اللذان ينتميان إلى عائلة *Colchicaceae* و *Poaceae* على التوالي. يتمتع هذان النباتان العطريان بخصائص طبية مهمة جداً بسبب ثرائهما في منتج البوليفينول ، لذلك تهتم دراستنا بالتقييم البيولوجي من حيث التأثيرات المضادة للأوكسدة والمضادة للأنزيم لمستخلصاته المائية والكحولية .

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها تثبيطاً جيداً للجذور الحرة بقيم جد قريبة من تلك المعاييرية. فيما يتعلق بالنشاط المضاد للأنزيمات، قمنا بعملنا باستخدام إنزيمين (acetylcholinesterase,  $\alpha$ -amylase) لدراسة الأنشطة المضادة لمرض السكر ومضاد الزهايمر. فيما يتعلق بالنشاط المضاد لمرض السكري، فقد وجد أن المستخلص الكحولي من *Cynodon dactylon* يمارس نشاطاً مهماً مضاداً لمرض السكري والذي يتوافق مع الحد الأقصى للتثبيط بنسبة 31.14%. تؤكد هذه النتيجة دور مركبات البوليفينول مثل الفلافونويد والتانينات في النشاط المضاد لمرض السكري. من ناحية أخرى، فإن النشاط المضاد لمرض الزهايمر يمارس نشاطاً مهماً للغاية مع  $IC_{50}$  ( $2.35 \pm 57.05$  ميكروغرام / مل) مكافئ تقريباً لمعيار Galantamine ( $1.99 \pm 34.75$  ميكروغرام / مل) للمستخلص المائي من *Androcymbium* و *gramineum* ؛ و تؤكد هذه النتائج دور البوليفينول ، و بالأخص بعض المنتجات موجودة في المستخلص المائي الذي له تأثير إيجابي على نشاط مضادات الكولين.

نتائجنا تبرر الاستخدام التقليدي للنباتات المدروسة في الجزائر، وتعزز التأثير البيولوجي والدوائي للمستخلصات. كما أنها تفتح وجهات نظر متعددة في المستقبل القريب ستسمح لنا بلا شك بإثراء الوزن العلمي لهذا العمل.

### الكلمات الرئيسية:

أندروسيميوم غرامينيوم (كولتشيثيساي)، سينودون داتيلون (بواسيا). البوليفينول. الإجهاد التأكسدي، مضاد الأوكسدة، النشاط الأنزيمي.