الجمهـــورية الجزائـــريـــة الديمقراطيـــة الشعبيـــــة

وزارة التعليـم العـالي والبحث العلـمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de Recherche Scientifique

جامعـــة قاصدي مربـــاح– ورقلـــة

UNIVERSITÉ KASDI MERBAH OUARGLA

FACULTÉ DES SCIENCES APPLIQUÉES

DÉPARTEMENT DE GÉNIE DES PROCÉDÉS

THÈSE

En vue de l'obtention du

Diplôme de Doctorat en Sciences

Spécialité : Génie des Procédés

Intitulé

Etude Structure Activité des Principes Actifs de la Plante *Anvillea radiata Asteraceae*

Présentée par

Mme SAOUD Née HAMADA Djamila

Le : 15/12/2016

Devant le jury composé de :

Président :	**SEKHRI Lakhdar**	**Pr.**	**UKMO**
Examinateur :	**DIBI Ammar**	**Pr.**	**U. Batna**
Examinateur :	**AKKAL Salah**	**Pr.**	**U. Constantine**
Examinateur :	**OUAHRANI M^{ed} Rédha**	**Pr.**	**U. El Oued**
Encadreur :	**LADJEL Segni**	**Pr.**	**UKMO**
Invité :	**BEN JANNET Hichem**	**Pr.**	**U. Monastir**

Année universitaire 2016

Remerciments

*A*vant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donnée la force et la patience.

*J*e tiens à remercier mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur **Segni LADJEL** de m'avoir accueillie dans son laboratoire et au sein de son équipe Je tiens vivement à lui exprimer ma profonde reconnaissance et gratitude pour sa disponibilité, sa patience, sa compréhension, ses qualités humaines et ses intérêts portés pour mon sujet de recherche.

*J*e remercie Monsieur **SAKHRI Lakhdar** professeur de la faculté de sciences appliquées, université d'Ouargla qui m'a fait l'honneur de présider le jury de cette Thèse, trouve ici l'expression de mon profond respect et toute ma reconnaissance.

*J*e remercie vivement les membres du jury qui mon honorer de juger ce travail :

- Monsieur **DIBBI Ammar** professeur à l'université de Batna
- Monsieur **AKKAL Salah** professeur à l'université de Constantine
- Monsieur **OUHRANI Med Ridha** professeur à l'université d'El Oued

*J*e tiens aussi à remercier Monsieur le Professeur **Hichem Ben Jannet**, Directeur du laboratoire de Chimie Hétérocyclique, Produits Naturels et Réactivité, Faculté des Sciences de Monastir - Tunisie, pour m'avoir accueillie chaleureusement dans son laboratoire et dans son équipe. Je lui suis extrêmement reconnaissante de l'intérêt qu'il a porté à mon travail, de sa grande disponibilité et de sa sympathie. J'adresse encore mes remerciements à tous les doctorants et les membres du laboratoire surtout, Docteurs **Assma AYEB** et **Malek BESBES** pour leur aide de réalisation d'une partie de mes travaux.

*J*e tiens également à remercier monsieur **Hocine Dendougui** professeur au département de chimie pour son aide et ses conseils

J'exprime mes vifs remerciements au professeur **saidi mokhtar** Directeur de laboratoire de VPRS pour son aide.

Je n'oublie pas de remercier vivement les membres de l'équipe de laboratoire de Génie des Procédés qu' ont contribuent par leur bonne humeur à créer un cadre de travail agréable, en particulier : **Siham Meflah, Souad Zigmi, Bilal Goudjil et Salah Eddine Bencheikh.**

Je remercie mes collègues pour leur soutien et plus précisément **Messouda Allaoui** et **Mebarka Bouzaiane** pour leur aide.

Je tiens aussi à remercier tous les enseignants, ingénieurs et administrateurs de la faculté de sciences de la matière et du département de génie des procédés qui m'ont aidé, guidé et encouragé, surtout le doyen de la faculté des sciences de la matière **Louannes Ali** et le chef département de génie de procédés **Tabchouche Ahmed.**

Je n'oublie pas nos techniciens : **Abbas Kadraoui, Hanane, Anissa, Assma.**

Finalement, je tiens à remercier mes très **chers parents**, mes **frères** et mes **sœurs.** Un grand merci à mon mari **Mohammed Saoud** pour sa sympathie chaleureuse, son appui inestimable, à mes Chers enfants et tous les membres de ma famille plus précisément **Med Bouaaga** pour leur soutient morale et physique.

Je remercie également toute personne qui m'a aidé de près ou de loin dans la réalisation de ma thèse.

Dédicaces

Cette thèse est dédiée à :

A mes chers parents

A mon mari

A mes chers enfants

A mes frères et sœurs et leurs familles

A toute la famille ***HAMADA*** *et* ***SAOUD***

A tous mes collègues et amis.

ملخــص

كرس هذا العمل للدراسة الفيتوكيميائية والبيولوجية لمستخلصات نبتة النقد (*Anvillea radiata*) المنتمية إلى العائلة المركبة، لأجل ذلك طبقنا عدة طرق منها: تقنية الكروماتوغرافيا، التنقية والفصل.

كما تم فصل ثلاث مركبات نقية، إثنين من السيسكيتربينات اللاكتونية وحمض فينولي عزل لأول مرة من النبتة.

لتحديد بنية هذه المركبات المفصولة أجرينا عدة طرق من التحليل الطيفي: مطيافية الرنين النووي المغناطيسي ومختلف تطبيقاته(RMN-^{1}H, RMN-^{13}C, DEPT , COSY, HECOOR et NOESY) مطيافية الكتلة (ES) ومطيافية الأشعة تحت الحمراء (IR).

تمت دراسة الفعالية المضادة للأكسدة باستعمال اختبار DPPH، ABTS تثبيط الأكسدة لـ β-كاروتين وإرجاع الحديد. قبل ذلك قمنا بتقدير كمية البوليفينولات والفلافونيدات بواسطة كاشف (Folin Ciocalteu) وثلاثي كلوريد الألمنيوم على التوالي. أظهرت النتائج أن مستخلص أسيستات الإثيل غني بهذه المركبات، قدرت الفينولات بـ 110 ±600.09 مغ مكافئ من حمض الغاليليك/غرام من المستخلص، أما الفلافونيدات قدرت بـ 1.49±132.20مغ مكافيء من الكارستين/غرام من المستخلص.

من جهة أخرى أظهر هذا المستخلص فعالية مضادة عالية للجذور الحرة، فبالنسبة للجذر DPPH قدرتIC_{50} بـ0.002±0.0026 مغ/مل. أما بالنسبة لـ ABTS قدرتIC_{50}بـ0.001±0.002مغ/مل، حيث كانت اكبر منها بالنسبة لـ BHT. كما ثبط مستخلص أسيتات الإثيل أكسدةβ كاروتين بقيم مغ/مل0.01 ±0.014=IC_{50} مقارنة بـ BHT حيث 0.001±0.04=IC_{50} . كما أظهر كل من مستخلصي أسيتات الإثيل والبيوتانول قدرة إرجاعية عالية مكافئة لحمض الأسكوربيك بقيم مغ/مل 0.05=EC_{50} .

أجريت الفعالية المضادة للبكتيريا بواسطة طريقة الانتشار على وسط صلب تجاه خمس أنواع من البكتيريا أظهرت النتائج أن مستخلص الكلوروفورم له فعالية كبيرة.

أعطت الفعالية المثبطة لإنزيم α-Glucosidase نتائج هامة بالنسبة لمستخلص الكلوروفورم وكذلك السيسكيتربينات اللاكتونية.

فعالية أليلوباتيك بينت أن كل من مستخلصي الكلوروفوم وأسيتات الإثيل لديهما فعل مثبط ضد انتاش ونمو نبتة الفجل.

الكلمات المفتاحية:

Anvillea radiata ، العائلة المركبة، التحليل الطيفي، الفعالية المضادة للأكسدة، الفعالية المضادة للبكتيريا، α-Glucosidase، Allélopathie.

Abstract

This work is dedicated on the phytochemical and biological study of *Anvillea radiata*, a medical plant from the *Asteraceae* family. Many methods have been used, such as chromatography, purification and isolation.

Three compounds have been isolated: two sesquiterpenes lactones (**9α-hydroxyparthenolide, 9β-hydroxyparthenolide**) and one phenolic acid (**Acide 3,5-*O*-Dicaffeoylquinic**) is isolated for the first time from specie. To determine the structures of the isolated products, we combined different spectroscopic methods, these include magnetic nuclear resonance, and its different functions (NMR-^{1}H, NMR -^{13}C, DEPT, COSY, HECOOR and NOESY). We also used Mass Spectroscopy (ES) and IR.

Antioxidant activity was evaluated using the DPPH, ABTS, β-carotene bleaching, power reducer tests. Firstly, polyphenols and flavonoids content was determined using the Folin Ciocalteu reagent and $AlCl_3$, respectively. Results showed that ethyl acetate extract is rich in polyphenols and flavonoids with values of (600.09 ± 11.0 mg EAG/g) and (132.20±1.49 mg EQ/g) respectively. The extract showed a very strong antiradical activity against DPPH radical, with IC_{50} values of (0.0026±0.002 mg/mL). ABTS showed an IC_{50} value of (0.001±0.002 mg/mL) which is much greater than that of BHT. The extract showed a strong inhibiting capacity of β- carotene bleaching with an IC_{50} values of (0.014±0.002 mg/mL) compared to BHT (0.04±0.001 mg/mL). Ethyl acetate and n-butanol extracts have a better reducing capacity as ascorbic acid (EC_{50}=0.05 mg/mL).

Antibacterial effect was evaluated by agar diffusion assay toward five bacterial strains. The results showed that the chloroform extract had a considerable antibacterial effect.

Anti-diabetic properties from the Anvillea radiata showed an important effect on the chloroform extract, and 2 lactone sesquiterpene C10 and C11, which inhibits the α-glucosidase enzyme.

Allelopathic activity showed that two chloroform and ethyl acetate extracts have an inhibiting effect on the germination and growth of radishes.

Keywords: *Anvillea radiata*, *Asteraceae*, spectroscopic characterization, antioxidant activity, antibacterial activity, allelopathy, a-glucosidase.

Résumé

Ce travail est consacré à l'étude phytochimique et biologique des extraits de la plante *Anvillea radiata* de la famille d'*Asteraceae*. Diverses méthodes sont appliquées tel que les techniques chromatographiques de purification et isolation.

Trois produits purs sont isolés, deux sesquiterpenes (**9α-hydroxyparthenolide, 9β-hydroxyparthenolide**) et un acide phénolique (**Acide 3,5-*O*-Dicaffeoylquinic**) est isolé pour la première fois dans le genre d'Anvillea. Pour déterminer les structures des produits isolés on a combiné les différentes méthodes d'analyses spectroscopiques telles que la résonance magnétique nucléaire et ces différentes applications (RMN-^{1}H, RMN-^{13}C, DEPT, COSY, HECOOR et NOESY) ainsi que la spectroscopie de masse (ES) et l'IR.

L'activité antioxydante est évaluée en utilisant les tests de DPPH, test d'ABTS, blanchissement du β-carotène, et le test du pouvoir réducteur. Dans un premier temps, la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes est effectuée par la méthode de Folin Cecaltau et $AlCl_3$ respectivement. L'extrait d'acétate d'éthyle a montré une richesse en polyphénols totaux et en flavonoïdes avec des proportions de l'ordre de (600.09 ± 11.0 mg EAG/g d'extrait) et (132.20±1.49 mg EQ/g d'extrait) respectivement. Par ailleurs, cet extrait a montré une très forte activité anti-radicalaire vis-à-vis du radical DPPH avec IC_{50} égale à (0.0026±0.002 mg/mL). Pour l'ABTS on a enregistré un IC_{50} égale à (0.001±0.002 mg/mL) même supérieure à celle du BHT. L'extrait a montré un pouvoir inhibiteur important du blanchiment du β-carotène avec un IC_{50} égale à (0.014±0.002 mg/mL) par rapport au BHT (0.04±0.001 mg/mL). Les deux extraits acétate d'éthyle et butanolique ont montré une meilleure capacité réductrice que l'acide ascorbique (EC_{50}=0.05 mg/mL).

L'effet antibactérien des extraits est évalué par le test de diffusion sur l'agar vis-à-vis de cinq souches bactériennes. Les résultats révèlent que l'extrait chloroformique a exercé un effet antibactérien considérable.

L'activité antidiabétique de l'*Anvillea radiata* a révélé un effet important de l'extrait chloroformique et des deux sesquiterpènes lactones de l'inhibition de l'enzyme d'α-glucosidase.

L'activité allélopathique a montré que les deux extraits chloroformique et acétate d'éthyle ont un effet inhibiteur sur la germination et la croissance de Radis.

Mots clés: *Anvillea radiata*, *Asteraceae*, caractérisation spectroscopique, activité antioxydante, activité antibactérienne, allélopathie, α-glucodidase.

Liste des Tableaux

Tableau I.1 Principales classes des flavonoïdes…….. 13

Tableau II.1 Classification des Asteraceae……. 30

Tableau III.1 Familles de composés chimiques issues de la plante *Anvillea radiata*…. 40

Tableau III.2 Rendements des extraits……. 43

Tableau III.3 Les résultats de la chromatographie sur couche mince des extraits d'*Anvillea radiata*…….. 44

Tableau III.4 Fractionnement chromatographique de l'extrait butanolique de la plante *Anvillea radiata*……. 49

Tableau III.5 Données structurales du composé C11…….. 58

Tableau III.6 Données structurales du composé C10…….. 63

Tableau III.7 Données structurales du composé P1……. 75

Tableau IV.1 La teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes des extraits d'*Anvillea radiata*……..... 86

Tableau IV.2 Valeurs des IC_{50} de l'activité anti-radicalaire testée par la méthode de DPPH……..... 89

Tableau IV.3 Valeurs des IC_{50} de l'activité anti-radicalaire testée par la méthode d'ABTS……. 92

Tableau IV.4 Valeurs des IC_{50} de l'activité antioxydante testée par la méthode de β-carotène……. 93

Tableau IV.5 Valeurs EC_{50} de pouvoir réducteur d'extrait d'*Anvillea radiata*…….. 95

Tableau IV.5 Provenance des germes étudiés…… 102

Tableau IV.6 Diamètres (mm) des zones d'inhibition des extraits de la plante *Anvilea radiata*…….. 104

Tableau IV.7 Valeurs des CMI des extraits de la plante *Anvillea radiata*……..... 106

Tableau IV.8 Les valeurs IC_{50} d'activité inhibitrice d' α-glucosidase……..... 111

Tableau IV.9 Effets des extraits de l'*Anvillea radiata* sur la cinétique de la germination des graines de Radis……. 120

Tableau IV.10 Effets des fractions de l'extrait chloroformique d'*Anvillea radiata* sur la cinétique de la germination des graines de Radis…….. 122

Liste des Figures

Fig.I.1 Structures de quelques oses…….. 7

Fig.I.2 Structure de quelque oside……. 7

Fig.I.3 Structure d'Amylose……..... 8

Fig.I.4 Structures de quelques acides gras saturés…… 9

Fig.I.5 Structures de quelques acides gras insaturés……. 9

Fig.I.6 Structure de base des tanins hydrolysables……..... 11

Fig.I.7 Structures de tanins condensés…….. 12

Fig.I.8 Squelette de base des flavonoïdes…….. 12

Fig I.9 Squelette de coumarine…….. 15

Fig.I.10 Structures de quelques anthraquinones……..... 16

Fig.I.11 Structures de quelques alcaloïdes……..……. 17

Fig I.12 L'isoprène…… 18

Fig.I.13 Structures des quelques sesquiterpènes……..... 19

Fig.I.14 Structures de quelques triterpène tétracycliques et pentacycliques……. 20

Fig II.1 Répartétion géographique de la plante *Anvillea radiata* en Algérie……..... 32

Fig II.2 *Anvillea radiata.*……..... 33

Fig.III.1 Protocole d'extraction de la partie aérienne de la plante *Anvillea radiata.*…... 42

Fig.III.2 Photo du chromatogramme résultant de l'analyse d'extrait chloroformique…. 45

Fig.III.3 Photo du chromatogramme résultant de l'analyse de deux extraits acétate d'éthyle et butanolique…… 45

Fig.III.4 Révélation de C10 et C11……... 48

Fig.III.5 Spectre RMN ^{1}H (300MHz; $CDCl_3$) du composé C11…….. 52

Fig.III.6 Spectre RMN ^{1}H (300MHz; $CDCl_3$) du composé C11…….. 52

Fig.III.7 Spectre RMN ^{13}C (300MHz; $CDCl_3$) du composé C11……. 53

Fig.III.8 Spectre Dept135 (300MHz; $CDCl_3$) du composé C11……... 54

Fig.III.9 Spectre Noesy (300MHz; $CDCl_3$) du composé C11…….. 55

Fig.III.10 Spectre de Masse ES du composé C11…… 56

Fig.III.11 Spectre RMN ^{1}H (300MHz; $CDCl_3$) du composé C10……..... 59

Fig.III.12 Spectre RMN ^{1}H (300MHz; $CDCl_3$) du composé C10…….. 59

Fig.III.13 Spectre RMN ^{13}C (300MHz; $CDCl_3$) du composé C10……. 60

Fig.III.14 Spectre Noesy (300MHz; $CDCl_3$) du composé C10……..... 61

Fig.III.15 Spectre de masse ES du composé C10…… 62

Fig.III.16 Spectre RMN ^{1}H (300MHz; MeOD) du composé P1…….. 65
Fig.III.17 Spectre RMN ^{1}H (300MHz; MeOD) du composé P1…….. 65
Fig.III.18 Spectre RMN ^{13}C (300MHz; MeOD) du composé P1……. 66
Fig.III.19 Spectre RMN ^{13}C (300MHz; MeOD) du composé P1……..... 66
Fig.III.20 Spectre XHcoor (300MHz; MeOD) du composé P1……..... 67
Fig.III.21 Spectre COSY (300MHz; MeOD) du composé P1…….. 68
Fig.III.22 Agrandissement de Spectre COSY (300MHz; MeOD) du composé P1…….. 68
Fig.III.23 Agrandissement de Spectre COSY (300MHz; MeOD) du composé P1…….. 69
Fig.III.24 Spectre NOESY (300MHz; MeOD) du composé P1…….. 69
Fig.III.25 Spectre NEOSY (300MHz; MeOD) du composé P1……... 70
Fig.III.26 Spectre Masse ES (300MHz; MeOD) du composé P1…… 71
Fig.III.27 Spectre IR du composé P1…… 72
Fig.IV.1 Structure chimique du radical libre DPPH• (2,2-diPhenylPicrylHydrazyle)….. 78
Fig. IV.2 Réduction du DPPH• par un antioxydant……... 79
Fig.IV.3 Réduction d'ABTS par un antioxydant……. 80
Fig.VI.4 Courbe d'étalonnage de la l'acide gallique……. 82
Fig.IV.5 Courbe d'étalonnage de la quercétine……. 83
Fig IV.6 Pourcentages d'inhibition du radical DPPH des antioxydants standards (Acide Ascorbique (1), BHA (2) et BHT) (3) …… 87
Fig.IV.7 Pourcentage d'inhibition du radical DPPH des extrais d'*anvillea radiata*……. 88
Fig.IV.8 Pourcentage d'inhibition du radical DPPH de produits impurs d'*anvillea radiata*……. 88
Fig.IV.9 Pourcentage d'inhibition du radical ABTS de produits impurs d'*anvillea radiata*…… 90
Fig.IV.10 Pourcentage d'inhibition du radical ABTS de produits impurs d'*anvillea Radiata.*…… 91
Fig.IV.11 Pourcentage d'inhibition du blanchiment du β-carotène en fonction des concentrations des extraits……..... 92
Fig.IV.12 Pourcentage d'inhibition du blanchiment du β-carotène en fonction des concentrations des produits……..……. 93
Fig.IV.13 pouvoir réducteur de l'Anvillea radiata par la méthode FRAP…… 94
Fig.IV.14 *klebsiella Pneumonie*……... 101
Fig.IV.15 *Staphylococcus aureus.*…….. 101

Fig.IV.16 *Pseudomonas aeruginosa*……. 101
Fig.IV.17 *Escherichia coli.*…… 101
Fig.IV.18 *Streptocoque*……. 101
Fig.IV.19 *Zones d'inhibition* des extraits d'Anvillea r. 1-E.Me 2-E.Cl 3-E.Acét 4E.But 105
Fig.IV.20 Diamètres (mm) des zones d'inhibition des extraits de la plante *Anvilea Radita.*……... 106
Fig.IV.21 Valeurs IC_{50} d'activité inhibitrice d' α-glucosidase des extraits et produits… 110
Fig.IV.22 Des graines de Radis traitées par l'extrait d'*Anvillea radiata*…….. 116
Fig IV.23 Chromatogramme des fractions de l'extrait chloroformique…… 117
Fig.IV.24 Mesure de la longueur de la racine et de la partie aérienne d'une plantule de *Radis* traitée par l'eau distillée…… 118
Fig.IV.25 Effet des extraits d'Anvillea radiata sur la germination de graines des Radis 119
Fig.IV.26 Effets des extraits de l'*Anvillea radiata* sur la cinétique de la germination des graines de Radis (concentration utilisée 6000 ppm)…… 120
Fig.IV.27 Effet des extraits d'*Anvillea radiata* sur la croissance de la racine et de la partie aérienne de Radis, exprimée en pourcent du témoin……. 122
Fig.IV.28 Effet des fractions d'*Anvillea radiata* sur la croissance de la racine et de la partie aérienne de Radis, exprimée en pourcent du témoin…… 123

Liste des abréviations

AcOEt : Acétate d'éthyle

ATCC: American Type Culture Collection

BuOH: Butanol

BHT: Butylated hydroxytoluene

BHA: Butylated hydroxyanisole

°C: degré Celsius

C : concentration

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

$CDCl_3$: Chloroforme deutéré

CD_3OD : Méthanol deutéré

cm : Centimètre

cm^{-1} : Unité de fréquence

COSY: COrrelation SpectroscopY

CHCorr: CH Correlation

1D : Monodimensionnelle

2D : Bidimensionnelle

DEPT : Distortionless Enhancement by Polarisation Transfert

DPPH: 2,2'-diphényle-1-picryl hydrazyl

d.i : diamètre intérieur

EP : Ether de pétrole

ES: Electrospray

EAG: Equivalents d'acide gallique

EQ: Equivalents de quercétine

EC_{50}: Concentration correspond à une absorbance 0,5

EOR : Espèces oxygénées réactives.

Fig: Figure

g : gramme

G.N : Gélose Nutritive

GC-MS: Gas chromatography – Mass pectroscopy

H: heure

HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HMQC: Heteronuclear Multiple Quantum Coherence

Hz: Hertz

IR: Infrarouge

IC_{50}: Concentration inhibitrice a 50%

J : Constante de couplage

L : Longueur

m: masse

multi : Multiplicité

- **s :** singulet
- **sl :** singulet large
- **d :** doublet
- **dd :** doublet dédoublé
- **ddt :** doublet dédoublé triplet
- **dl :** doublé large

MeOH : Méthanol

mg : milligramme

MHz : Mégahertz

mL : millilitre

mm : millimètre

min : minute

m/z : Rapport masse sur charge exprimée en Thomson

n*O*e : Interaction proton-proton à travers l'espace

NOESY: Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY

n°: numéro

p : page

ppm : partie par million

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RMN^{13}C :Résonance Magnétique Nucléaire du carbone 13

RMN^{1}H : Résonance Magnétique Nucléaire du proton

SOD: Superoxyde dismutase

TMS : Tétraméthylsilane

δ: Déplacement chimique

ν : Fréquence

µg : microgramme

Å : Angström

Lexique (Botanique)

Akène : fruit et indéhiscent ne contenant qu'une graine. Le nom peut aussi s'écrire achaine.

Angiospermes : sous-embranchement de plantes phanérogames (plantes supérieures différenciant des phanères bien visibles (fleurs) dont les graines sont enfermées dans un fruit.

Bilabié : qualifie une fleur dont la calice ou la corolle présente un limbe comportant deux divisions principales inégales, placées l'une au dessus de l'autre et dont la gorge reste ouverte.

Calice : Ensemble des pièces chlorophyllienne ou sépales

Corolle: Ensemble des pièces non chlorophylliennes, diversement colorées ou les pétales.

Dicotylédones : classe de plantes Angiospermes dont la graine contient une plantule à deux cotylédons (lobe charnu ou foliacé qui s'insère dans la graine sur l'axe de la plantule), présentant des feuilles généralement horizontales, aux nervures ramifiées, face différentes et des fleurs dont la symétrie est d'ordre 5.

Fugaces : qualifie une plante entière ou un organe qui ne persiste pas.

Inflorescences: c'est la disposition générale des fleurs sur les rameaux de la plante.

Pétale : partie de la fleur située entre les sépales et les organes reproducteurs. Les pétales composent la corolle.ils sont fixés au calice par un onglet.

Sessiles: Qualifie tout organe (feuille, fleur....) dépourvu de pétiole ou de pédoncule et qui s'insère directement sur l'axe.

Lexique (Biologique)

Aérobie: se dit des micro-organismes qui peuvent se développer qu'en présence d'air ou d'oxygène.

Allélopathie : C'est un phénomène où de nombreuses espèces végétales synthétisent des molécules capables d'agir sur le développement des plantes avoisinantes.

Antiseptique: qui détruit les bactéries et empêche leur prolifération.

Bacilles: bactérie, le plus souvent pathogène ayant la forme d'un bâtonnet.

Bactéricides: se d'une substance qui tue les bactéries.

Bénignes: sans conséquence grave.

Courbatures: douleurs musculaires, contracture due à la fatigue ou à une maladie.

Fongicides: se dit d'une substance propre à détruire les champignons, en particulier les champignons microscopiques.

Insulinopénie : Soit le pancréas fabrique toujours de l'insuline mais pas assez, par rapport à la glycémie.

Insulinorésistance : Soit l'insuline agit mal, on parle alors d**'**insulinorésistance.

Neurodégénérative : Une maladie neurodégénérative correspond à une pathologie progressive qui affecte le cerveau ou plus globalement le système nerveux, entraînant la mort des cellules nerveuses.

Neurotoxiques: se dit d'un produit toxique pour le système nerveux.

Pathogénicité: qui provoque la maladie.

Percutanée: qui se fait par absorption à travers la peau.

Sommaire

Introduction 1

Chapitre I. Les métabolites secondaires dans les plantes médicinales

I.1 Historique……4

I.2 Principales substances curatives des plantes médicinales……5

I.3.1 Composés du métabolisme primaire……6

I.3.1.1 Glucides……6

I.3.1.2 Amidon……8

1.3.1.3 Lipides……..8

I.3.2 Composés du métabolisme secondaire……..9

I.3.2.1 Composés phénoliques……9

I.3.2.1.1 Définition……9

I.3.2.1.2 Propriétés biologiques ……...10

I.3.2.2 Tanins……..10

I.3.2.2.1 Définition……10

I.3.2.1.2 Propriétés biologiques……10

I.3.2.3 Les flavonoïdes……...12

I.3.2.3.1 Définition……12

I.3.2.3.2 Classification……..13

I.3.2.3.3 Propriétés biologiques ……...14

I.3.2.4 Coumarines……15

I.3.2.4.1 Définition……15

I.3.2.4.2 Propriétés biologiques……15

I.3.2.5 Anthraquinones, anthracénosides et émodols……16

I.3.2.5.1 Définition……16

I.3.2.5.2 Propriétés biologiques……16

I.3.2.6 Alcaloïdes……...16

I.3.2.6.1 Définition……16

I.3.2.6.2 Propriétés biologiques ……...17

I.3.2.7 Les terpènes……17

I.3.2.7.1 Définition……17

I.3.2.7.2 Classification ……18

I.3.2.7.3 Propriétés biologiques ……...21
I.3.2.8 Les huiles essentielles…….21
I.3.2.8.1 Définition ……...21
I.3.2.8.2 Propriétés biologiques……22
Références…….....23

Chapitre II. Etude botanique

II.1 Caractères généraux des Astéraceae…….28
II.1.1 Appareil reproductif…….29
II.1.2 Classification des Asteraceae……...29
II.2 Caractéristiques botaniques de l'Anvillea……..30
II.3 Répartition géographique……....31
II.4 Usage thérapeutique……31
II.5 Situation botanique de la plante *Anvillea radiata*……...31
II.6 Zone d'étude……....32
II.7. Travaux antérieurs …….33

Chapitre III. Etude Phytochimique

III.1 Matériel végétal……...37
III.2 Tests phytochimiques préliminaires……..……..37
III.2.1 Produit végétal épuisé avec l'éthanol……..37
III.2.1.1 Flavonoïdes……37
III.2.1.2 Tanins ……37
III.2.1.3 Composés réducteurs…….37
III.2.1.4 Stérols et stéroïdes ……37
III.2.1.5 Alcaloïdes sels……..38
III.2.2- Produit végétal épuisé avec l'eau chaud……38
III.2.2.1- Saponosides ……..38
III.2.3-Produit végétal épuisé avec l'éther diéthylique……...39
III.2.3.1- Huiles volatiles …….39
III.2.3.2- Acides gras……39
III.2.4 Résultats et Discussions …….39
III.3 Préparation des extraits de la partie aérienne de la plante *Anvillea radiata*……40
III.4 Chromatographie analytique sur couche mince ……..43
III.5 Fractionnement chromatographique de l'extrait Chloroformique de la plante

Anvillea radiata……...46
III.5.1 Séparation des composés C10 et C11…….47
III.6 Fractionnement chromatographique de l'extrait butanolique de la plante *Anvillea radiata* …….. 48
III.6.1 Séparation du composé P1……. 49
III.6.2 Etude des fractions B9, B11, B12…….. 50
III.7 Etude structurale des composés isolés…….50
III.7.1 Techniques spectroscopiques utilisées …….. 50
III.7.2 Etude Structurale du composé C11…… 52
III.7.2.1 Structure du composé C11…….57
III.7.3 Etude Structurale du composé C10…… 59
III.7.3.1 Structure du composé C10……..63
III.7.4 Etude Structurale du composé P1……...…65
III.7.4.1 Structure du composé P1……....73

Chapitre IV. Activité Biologique

IV .a. Activité antioxydante……77
IV .a.1. Généralité……77
IV. a. 1.1. Effet scavenger du radical DPPH……78
IV. a. 1.2. Méthode de l'ABTS……79
IV.a.1.3. Blanchiment de β-carotène couplé à l'auto-oxydation de l'acide linoléique ……..80
IV. a.1.4 Réduction du fer : FRAP……...81
IV. a.2. Matériels et Méthodes……81
IV. a.2.1 Analyse quantitative des composés phénoliques ……...81
IV.a.2.2. Piégeage du radical libre DPPH……..83
IV.a.2.3. Test ABTS……...84
IV.a.2.4. Test de blanchiment de β-carotène……..84
IV.a.2.5 Réduction du fer……...85
IV.a.3. Résultats et discussions……...86
IV.a.3.1. dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes……...86
IV.a.3.2. Piégeage du radical libre DPPH……..86
IV.a.3.3. Méthode ABTS……..90
IV.a.3.4. Test de blanchiment de β-carotène……..92

IV.a.3.5 Réduction du fer……...94
IV.b. Activité antibactérienne……96
III.b.1. Introduction…….96
IV.b.2 Les bactéries utilisées……...97
IV.b.2.1 bactéries à gram négatif……...97
IV.b.2.1.1 Genre *Pseudomonas*……....97
IV.b.2.1.2 Famille des Entérobactéries……....98
IV.b.2.1.2.1 Le groupe K.E.S…….98
IV.b.2.1.2.2 Genre *Escherichia*……..98
IV.b.2.2 bactéries à gram positif……..99
IV.b.2.2.1 Genre *Staphylococcus*……..99
IV.b.2.2.2 Les Streptocoques…….99
IV.b.3 Matériels et méthodes ……102
IV.b.3.1 Provenance des germes……..102
IV.b.3.2 Techniques d'étude du pouvoir antimicrobien……..102
IV.b.3.2.1 Méthode de diffusion sur Agar (l'aromatogramme)…….102
IV.b.3.2.2 Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice ……103
IV.b.4 Résultats et discussion ……...104
IV.b.4.1 Mesure des zones d'inhibition……104
IV.b.4.2 Calcul des Concentrations Minimales Inhibitrices ……..106
IV.c Activité inhibitrice d' α-glucosidase……...108
IV.c.1 Introduction……108
IV.c.2 Classification du diabète sucré……...108
IV.c.2.1 le diabète de type 1…….108
IV.c.2.2 le diabète de type 2…….108
IV.c.2.3 Les diabètes dits "spécifiques"……...109
IV. c.2.4 Le diabète gestationnel……..109
IV. c.2.5 La classe "altération de l'homéostasie glucidique"……...109
IV.c.3 Les inhibiteurs de l' α-glucosidase……..109
IV.c.5 Mode opératoire……..110
IV.c.6 Résultat et discussion……..111
IV.d. Activité allélopathique……113
IV.d. 1- Introduction…….113

IV.d.2 Matériels et méthodes……..115
IV.d.2.1 L'activité allélopathique des extraits ……115
IV.d.2.2 L'activité allélopathique des fractions……..116
IV.d.2.3. Effet sur la germination……...117
IV.d.2.4 Effet sur la croissance……...117
IV.d.3 Résultats et discussions ……..119
IV.d.3.1 Effet des extraits……119
IV.d.3.1.1 Effet des extraits sur la germination ……119
IV.d.3. 1. 2 Effet des extraits sur la croissance …….121
IV.d.3.2 Effet des fractions…….122
IV.3.1.1 Effet des fractions sur la germination……..122
IV.3. 1. 2 Effet des fractions sur la croissance……...123
IV.d.4 Discussions ……..124
Références……...125
Conclusion……..131
Annexe……132

Introduction

Introduction

Depuis l'origine de l'humanité les plantes et toutes les matières naturelles ont été les seuls remèdes dont disposait l'être humain pour soigner ses maladies. Une thérapie basée sur le savoir empirique, ancestrale, sur l'usage traditionnel transmis oralement au cours des siècles. La thérapie par les plantes et leurs extraits reste prépondérante jusqu' à 1930. Les chimistes du XIX siècle firent de la phytothérapie un pas géant par les découvertes des véritables principes actifs. Depuis quatre-vingt ans, les progrès de la chimie d'extraction puis, la chimie de synthèse permettent d'obtenir les principes actifs à l'état pur **[1].**

Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches basées sur les cultures in vivo et in vitro de tissus végétaux. Ceci est notamment le cas des polyphénols végétaux qui sont largement utilisés en thérapeutique comme vasculoprotecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et anti radicalaires **[2].**

Le continent africain est classé parmi les continents disposants d'une biodiversité en plantes médicinales très riches dans le monde, avec un nombre très élevé de plantes utilisées comme herbes, comme aliments naturels et pour des buts thérapeutiques.

En Algérie, les médecins et les chimistes cherchent à mieux connaître le patrimoine des espèces utilisées en médecine traditionnelle. Leurs modes d'utilisation, leurs indications dans diverses pathologies ainsi les principes actifs sont étudiés depuis une vingtaine d'années **[3, 4, 5].**

C'est pourquoi nous nous sommes intéressé de faire une étude Phytochimique de la plante *Anvillea radiata* poussant à l'état spontané dans la région de Djelfa et à évaluer l'activité antioxydante, antibactérienne, antidiabétique et allélopathéque de leur extraits et produits isolés.

Notre travail est divisé en quatre chapitres, le premier chapitre intitulé: Plantes médicinales est consacrée à l'histoire de l'utilisation de plantes médicinales et métabolites secondaires et leurs propriétés biologiques.

Le second chapitre intitulé: Etude botanique est consacré à une étude bibliographique concernant la famille des Astéraceés et la systématique botanique de la plante *Anvillea radiata,*

Le troisième chapitre intitulé : Etude phytochimique dans ce chapitre nous traitons de toutes les étapes menant aux produits purs, l'extraction, la séparation sur colonne et sur plaques CCM, enfin la détermination structurale des substances isolées en interprétant les spectres RMN (proton, carbone 13, COSY, HXCOOR et NOESY) et les spectres IR et de Masse (ES).

Le quatrième chapitre intitulé : Activités biologiques est réservé aux études du pouvoir antioxydant par l'utilisation des tests de DPPH, ABTS, blanchissement du β-carotène, antibactériennes par le test de diffusion sur l'agar, antidiabétique et allélopathique.

Enfin, une conclusion générale qui porte sur une lecture attentive des différents résultats obtenus.

Références

[1] Amar nacer, (2009). Sesquiterpènes lactones et flavonoïdes extraits de deux plantes algériennes de la famille des Astéracées.Thèse de doctorat, university Mantouri Constantine.

[2] Bahorun, T. (1997). Substances Naturelles actives: La flore mauricienne une source d'approvisionnement potentielle. Université de Maurice. AMAS, Food and Agricultural Research Council, Réduit, Mauritius , p 83.

[3] Djebaili, S. (1984). Steppe algérienne. Phytosociologie et écologie. Ed. OPU, Ben-Aknoun, Alger, p177.

[4] Bouattoura, N. (1988). Les ressources phytogénétiques. Importance Préservation-Utilisation. Annales, INA, El Harrach-Alger, vol 12 (1), T 1: pp. 43-63.

[5] Maizak, K ; Brac, De La Perriere et Hammiche, V. (1993). Pharmacopée traditionnelle: Sahara septentrional. Actes du 2e colloque européen d'ethnopharmacologie, Heidelberg, p169-181.

Chapitre I
Les Plantes Médicinales

I. Les métabolites secondaires dans les plantes médicinales

I.1 Historique

Des plantes médicinales ont été employées pendant des siècles comme remèdes pour les maladies humaines parce qu'elles contiennent des composés de valeur thérapeutique. Récemment, l'acceptation de la médecine traditionnelle comme forme alternative de santé et de développement de la résistance microbienne à l'antibiotique disponible a mené des auteurs à étudier l'activité antimicrobienne des plantes médicinales **[1]** et en raison d'une conscience croissante des effets secondaires négatifs infligés par les drogues modernes, beaucoup de savons cherchent les remèdes sans effets secondaires et bien sur cout élevé de médecine conventionnelle **[2].**

Dans les civilisations chinoise, indienne (médecine ayurvédique) ou aztèque, on trouve la trace d'utilisations médicinales très anciennes. Le premier livre de matière médicale, le Shen Nung Ben Cao Jing (traité de plante médicinale de l'empereur de Shen Nung), fut rédiger vers 2900 avant J-C. avant 400 ans avant J-C.les populations babyloniennes et sumériennes utilisaient les plantes pour se soigner, 600 tablettes d'argiles mentionnent 1000 plantes pour leur vertus curatives et plus de 800 remèdes sont décrits par les Egyptiens **[3].** Le soin de la peau est a commencé 3000 ans avant naissance de Christ, quand les Egyptiens ont enregistré en forme hiéroglyphique le soin de la peau sur des peintures du mur de temple **[4]**

Les grands médecins grec, dont les plus célèbre est Eppocrate (5^{e} siécle av J-C) utilisaient couramment les narcotiques, les laxatifs ou les émétiques. Théophraste (370-285 av.J-C) classe les plantes dans son ouvrage Historia Plantarum **[3]**

A l'apogée de l'empire arabe (dont les frontières allaient de l'Inde à l'Espagne tous les documents écrits furent réunis à Bagdad dans la plus grande bibliothèque de l'époque (entre le 7^{e} -9^{e} siècle). les arabes avaient aussi leur spécialistes en médecine et en pharmacie Abu Bakr al Rasi (865-925), fus l'un des grand médecins de son temps et aussi le précurseur de la psychothérapie. Il fut suivi par Ibn Sina (980-1037) qui écrivit le(Canon de la médecine). Ce livre servira de base à l'enseignement de la médecine dans les universités de Louvain et de Montpellier jusqu'aux environs de 1650.Ibn al Baytar(1197-1248) rédigea le très complet Somme des Simple: ce livre contenait une liste de 1400 préparations et plantes médicinales dont un millier étaient connues des auteurs grecs **[3].**

Puis surviennent à partir des années 1940 et surtout 1950, les grandes découvertes des médicaments de synthèse. Les antibiotiques (Bactrim) et les anti-inflamatoires (Auranofine) qui ont sauvé la vie de millions de malades **[5]**. Une estimation réalisée en 1936 a montré que 45 % des médicaments utilisés à ce moment-là étaient d'origine végétale. Ce pourcentage a chuté avec l'apparition des antibiotiques d'origine microbienne et l'application industrielle de la chimie de synthèse. Bien qu'actuellement des médicaments de fermentation comme les pénicillines et les céphalosporines représentent jusqu'à 12 % des médicaments, il y a lieu de constater que les médicaments d'origine végétale occupent quand même jusqu'à 25 % de la place, bien que 95 % des plantes ne sont pas encore bien étudiées **[5].**

Aujourd'hui les principes actifs des plantes sont des composants essentiels d'une grande partie de nos médicaments et produits de soins **[6].** Malgré les multiples progrès de la médecine moderne, il y 'a un net regain d'intérêt vis-à-vis de la phytothérapie. Selon OMS (Organisation Mondiale de la Santé) plus de 80% de la population mondiale ont recours à la pharmacopée traditionnelle pour faire face aux problèmes de la santé **[7].** En effet sur les 300 000 espèces végétales recensées sur la planète plus de 200 000 espèces vivent dans les pays tropicaux d'Afrique ont des vertus médicinales **[8]**.

I.2 Principales substances curatives des plantes médicinales

L'action de la phytothérapie sur l'organisme dépend de la composition des plantes. Depuis le XVIII^{e}, au cours duquel des savants ont commencé à extraire et à isoler les substances chimiques qu'elles contiennent, on considère les plantes et leurs effets en fonction de leurs principes actifs **[9].**

Les plantes synthétisent les substances organiques à partir des éléments du sol et de l'atmosphère qu'elles absorbent par les racines et par les feuilles: l'eau, l'acide carbonique et les matières minérales et inorganiques. Le processus de base est l'assimilation photosynthétique du gaz carbonique, appelé simplement photosynthèse. Les premiers produits de la photosynthèse sont des substances appelées métabolites primaires: les saccharides (sucre), puis les acides gras, les acides aminés. Ensuite sont produits les métabolites spécialisés (secondaires) dont certains possèdent des vertus thérapeutiques. Parmi les métabolites primaires, les saccharides entrent dans la préparation des comprimés, servent de base aux mucilages. Certains acides aminés ne sont pas produits par l'organisme humain auquel ils sont pourtant indispensables et doivent donc être ingérés.les métabolites contenant de l'iode assurent le bon fonctionnement de la glande thyroïde.les plus complexes, comme

l'insuline, forment la base des hormones ainsi que les antibiotique. Les plus importants sont les protéines **[10].**

Parmi les métabolites spécialisés, les principaux sont: les flavonoïdes, la rutine, qui renforcent les parois des capillaires sanguins, les composés terpéniques (dérivés du terpène, parmi lesquels le menthol, le camphre…etc.). A noter que les composés terpéniques forment la base des stéroïdes qu'on retrouve dans de nombreuses vitamines. Les principes amers permettant la digestion des matières grasses, les saponines sont utilisées comme expectorants et diurétiques [**10].**

Les alcaloïdes à effets thérapeutiques nombreux mais ils peuvent être aussi des poisons mortels. L'énumération peut être prolongée: d'autre métabolites spécialisé agissent contre les allergies, l'hypertension, les maladies infectieuses et forment même la base de produits anticonceptionnels **[10].**

I.3.1 Composés du métabolisme primaire

I.3.1.1 Glucides

Les glucides sont appelés hydrates de carbones ou saccharides. Ce sont également des composés organiques carbonylés (aldéhydiques, cétoniques), constituant le groupe le plus important des éléments plastiques et énergétiques des végétaux. Ce sont aussi des composés qui apparaissent les premiers lors de la photosynthèse. On distingue deux classes :

-les oses : sont des petites molécules de 3 à 9 atomes, de formule générale $C_n(H_2O)_n$. Ils sont caractérisés par la présence d'une fonction aldéhydique (aldose), ou cétonique (cétose) et de plusieurs carbones asymétriques **[11]**

- les osides : sont des composés résultant de l'association de plusieurs molécules uniquement sucrées (holosides), ou plusieurs oses avec une partie non glucidique (hétérosides) **[11].**

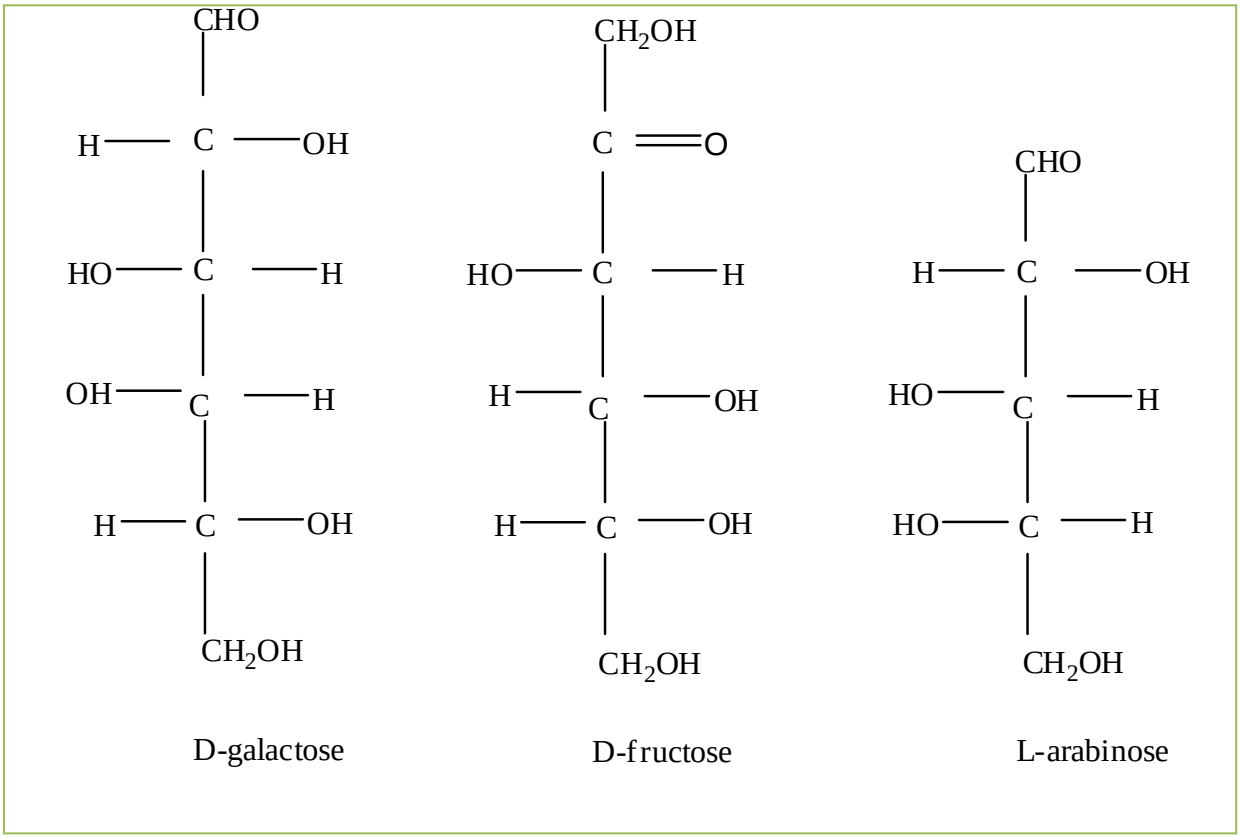


Fig.I.1 Structures de quelques oses

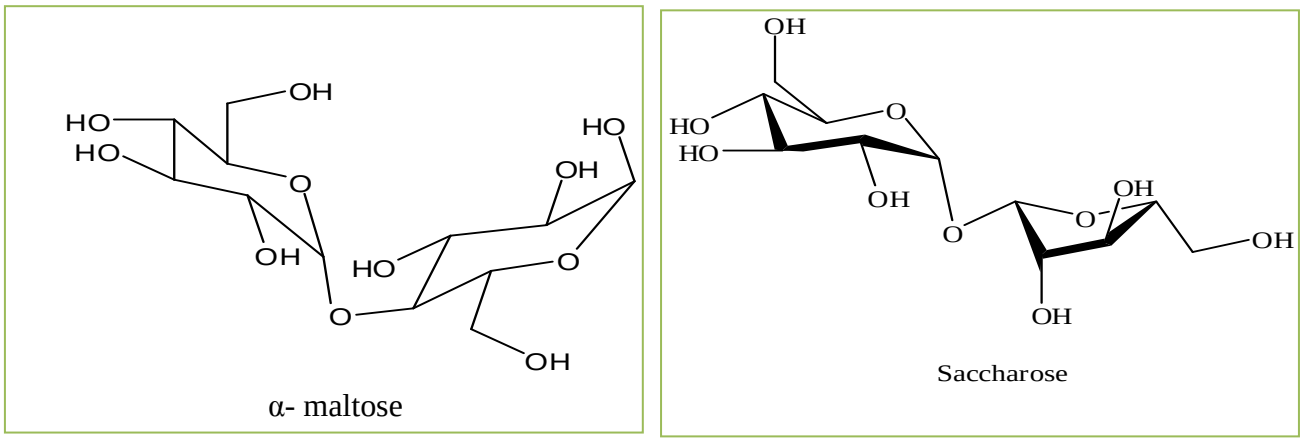


Fig.I.2 Structure de quelque oside

I.3.1.2 Amidon

L'amidon est la principale forme de réserve glucidique des végétaux. Il est présent dans toutes les parties de la plante et existe sous la forme d'une structure organisée correspondant à un homopolymère presque pur de D-glucose. Il sert comme adjuvant dans la préparation de tablettes et de comprimés, et conduit aussi à la synthèse de la vitamine C.

L'amidon résulte de l'association de deux polyosides homogènes par exemple ; l'amylose est une molécule linéaire constituée de 250 à 300 unités de α-D-glucopyrannose Associées par des liaisons **[11].**

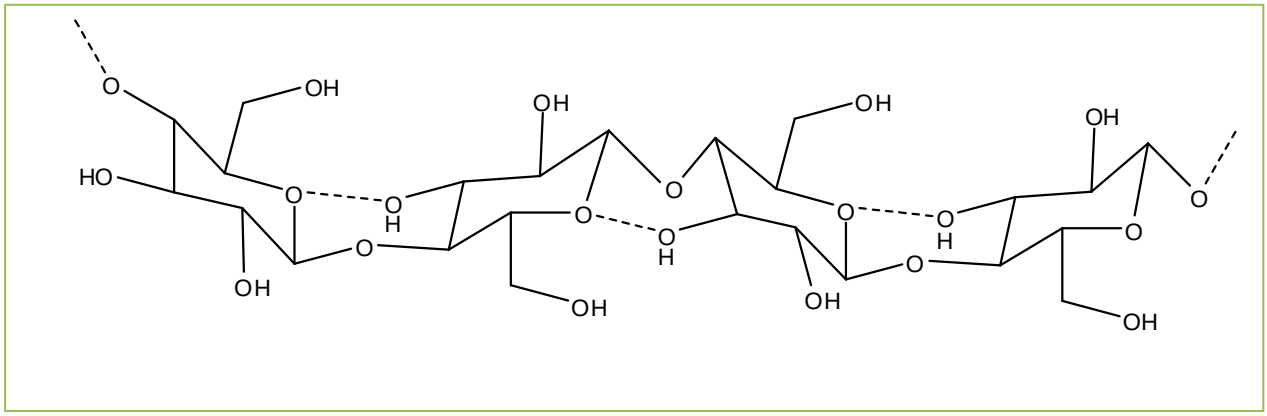


Fig.I.3 Structure d'Amylose

1.3.1.3 Lipides

Les lipides sont des esters d'alcools et d'acides gras ; ce sont des corps insolubles dans l'eau (hydrophobes), solubles dans les solvants organiques apolaires et ils ne sont pas volatils (huiles fixes). Selon la nature de l'alcool, on distingue :

-le glycérol, constitutif des triglycérides.
-les cérides, où l'alcool est aliphatique et à poids moléculaire élevé.
-les stérides, où l'alcool est un stérol.

Les plus intéressants sont les triglycérides qui sont des esters de glycérol et d'acides carboxyliques. Ces derniers se répartissent en deux groupes **[11, 12]** :

Acides gras saturés :

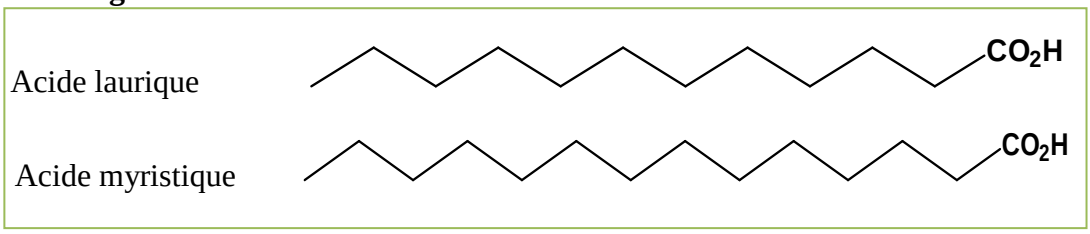


Fig.I.4 Structures de quelques acides gras saturés

acides gras insaturés :

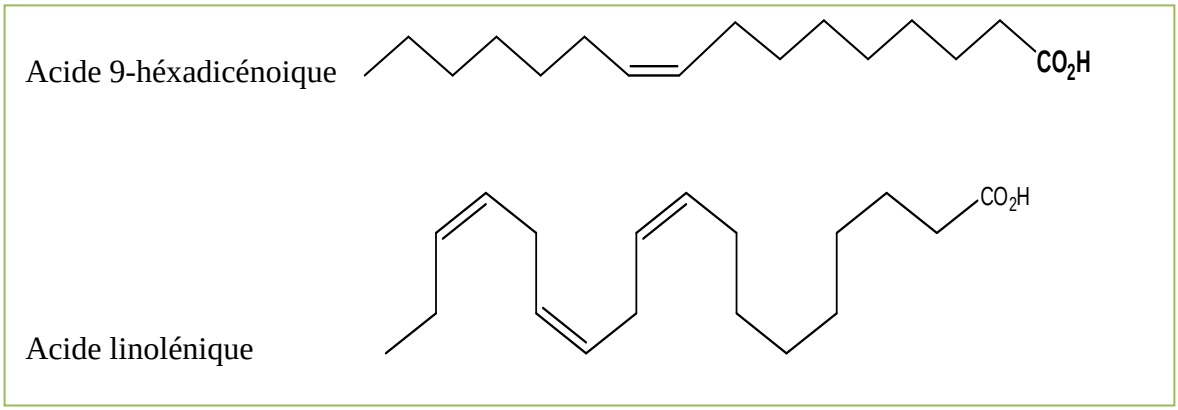


Fig.I.5 Structures de quelques acides gras insaturés

Certains des lipides ont une activité anti-inflammatoire, et anti-oedémateuse et d'autres actions pharmacologiques diverses, dont on cite, la diététique, la cosmologie, l'industrie (détergents, peinture, …) et l'alimentation (margarine). Les lipides constituent aussi la principale réserve d'énergie, leur métabolisme aboutissant à la combustion complète libère une grande quantité d'énergie **[11].**

I.3.2 Composés du métabolisme secondaire

I.3.2.1 Composés phénoliques

I.3.2.1.1 Définition

Les composés phénoliques sont des substances qui constituent une vaste famille, difficile à définir, et sont caractérisées par la présence d'au moins un noyau benzénique lié

directement par un groupe hydroxyde libre ou engagé dans une fonction : éther, ester, hétéroside **[13].**

I.3.2.1.2 Propriétés biologiques

Les composés phénoliques participent activement aux interactions de la plante avec son environnement en jouant soit le rôle des signaux de reconnaissance entre les plantes (Allélopathie), entre les plantes et les symbioses, ou bien lui permettant de résister aux diverses agressions vis-à-vis des organismes pathogènes. Ils participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux à des stress variés, donc ces composés jouent un rôle essentiel dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel **[14].**

D'un point de vue appliqué, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve chez les plantes médicinales, alliées à leur difficulté de production. Chez l'homme, ces molécules traces jouent un rôle important en agissant directement sur la qualité nutritionnelle des fruits et légumes et leur impact sur la santé des consommateurs (effet antioxydant, effet protecteur contre l'apparition de certains cancers...) **[14].**

I.3.2.2 Tanins

I.3.2.2.1 Définition

Les Tanins sont des composés phénoliques de structures variées, ayant une moléculaire de poids moléculaire compris entre 500 et 3000 g/mol **[15].**

Les tanins sont des corps généralement amorphes, solubles dans l'eau et l'alcool, et insolubles dans les solvants organiques apolaires. On les extrait généralement, par des mélanges hydro-alcooliques. Les tanins sont précipités par de nombreux réactifs, ils précipitent avec les sels de métaux lourds tels que le fer, le plomb, le zinc et le cuivre **[16].**

I.3.2.1.2 Propriétés biologiques

Les tanins possèdent surtout des propriétés astringentes en usage externe et interne. Ce sont des inhibiteurs enzymatiques. En outre, de nombreux tanins, particulièrement les tanins hydrolysables, inhibent la peroxydation des lipides induits par l'adénosine diphosphate (ADP) et l'acide ascorbique sur les mitochondries hépatiques du rat. Ils sont de bons contre–poisons des alcaloïdes et des métaux lourds **[11, 16]**.Les tanins favorisent la régénération des tissus en cas de blessures superficielles et de brûlures **[16]**.Ils sont utilisés comme anti-diarrhéiques et hémostatiques, mais surtout comme protecteur veineux dans le traitement des varices. En

cosmologie, les tanins sont des astringents très utilisés, sous forme de lotions. Ils sont largement employés dans l'industrie, notamment dans l'industrie du cuir, des vernis et de la peinture **[17].**

Les tanins sont divisés en deux groupes :

- **Les tanins hydrolysables**

Les tanins hydrolysables anciennement appelés tanins pyrogalliques, sont des polyesters de glucides et d'acide-phénols. Ils sont facilement scindés par les acides ou les enzymes (Tannases) en ose et en un acide-phénol. Selon la nature de ces tanins, on distingue les tanins galliques dans le cas d'acide gallique et les tanins ellagiques dans le cas d'acide ellagique.

L'acide ellagique résulte de la condensation de deux acides galliques.

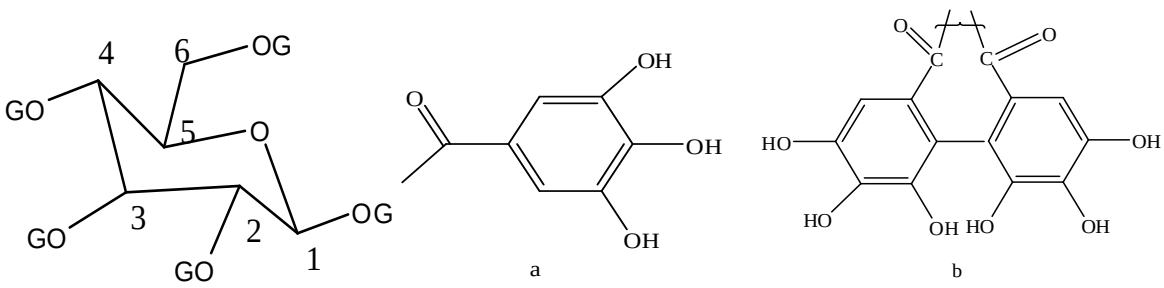
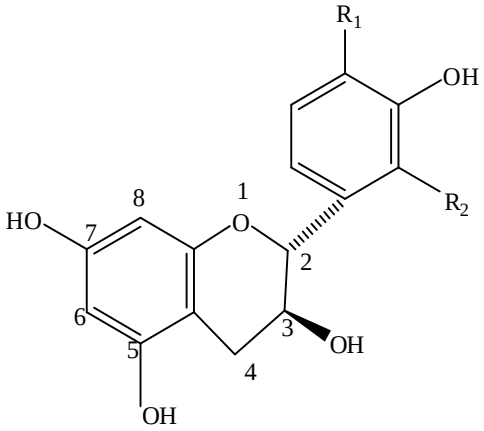


Fig.I.6 Structure de base des tanins hydrolysables
G = galloyl a ou b

- **Tanins condensés**

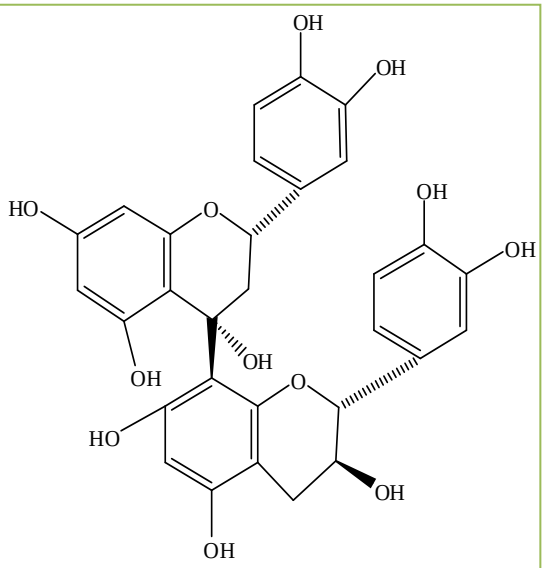
Les tanins condensés ou proanthocyanidols diffèrent fondamentalement, des tanins galliques et ellagiques. Leur structure est voisinede celle des flavonoïdes, ils ne possèdent pas de sucre dans la molécule. Ils sont formés de deux ou plusieurs molécules de flavan-3-ols, leur union se fait par des liaisons carbone-carbone, le plus souvent en position 4-8 ou 4-6, ce qui rend ces molécules difficilement hydrolysables **[18, 19].**



Serie 2R, 3S

R_1=R_2= H Afzelichol

R_1= OH, R_2= H Catéchol



Serie 2R, 3S (+catéchol)

Serie 2R, 3S (OH 3- α) **é**piafzeléchol, épicatéchol, épigallocatéchol

Fig.I.7 Structures de tanins condensés

I.3.2.3 Les flavonoïdes

I.3.2.3.1 Définition

Les flavonoïdes sont des composés polyphénoliques, presque toujours hydrosolubles et très répandus dans le règne végétal. Ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits, et parfois des feuilles. [13-20] Le plus souvent, ils sont sous forme d'hétérosides ou de flavonosides **[11]**

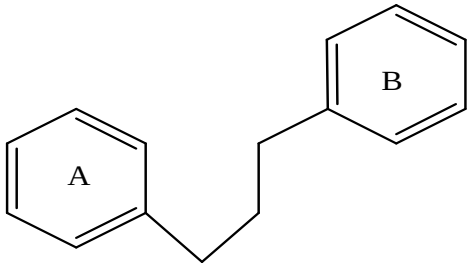
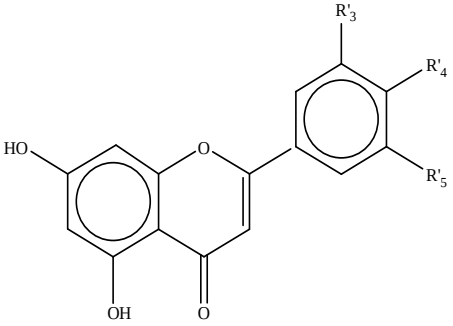
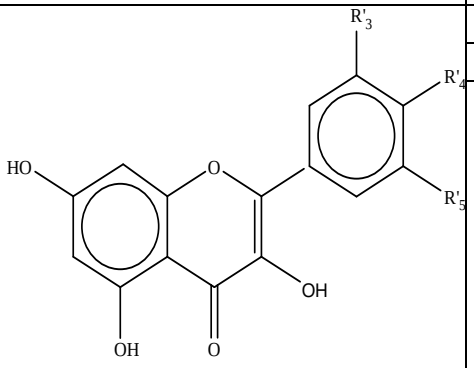
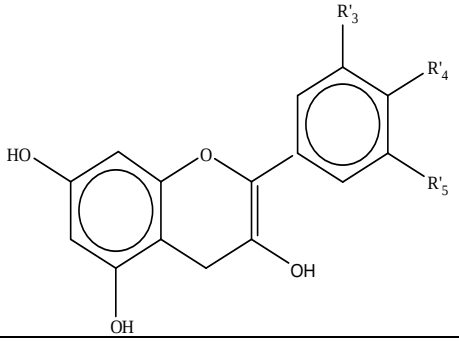


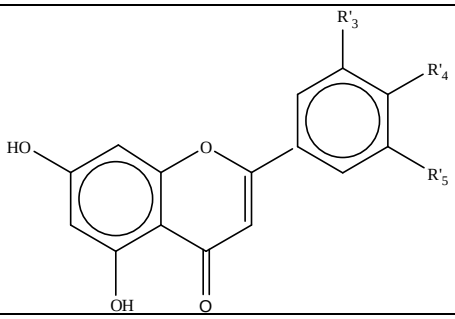
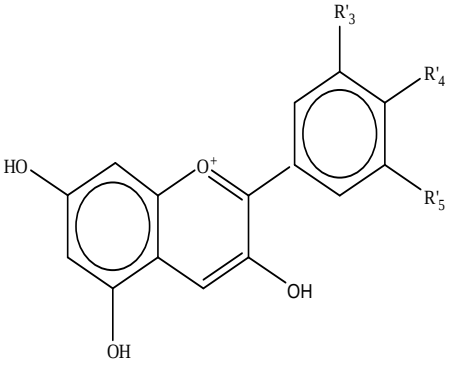
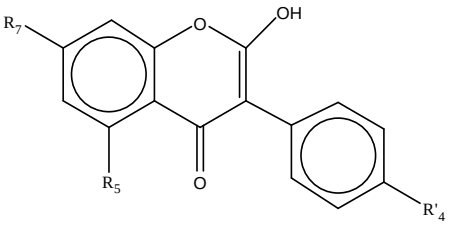
Fig.I.8 Squelette de base des flavonoïdes

Les flavonoïdes ont tous la même structure chimique de base, ils possèdent un squelette carboné de quinze atomes de carbones constitué de deux cycles aromatiques (A) et (B) qui sont reliés entre eux par une chaîne en C3 en formant ainsi l'hétérocycle (C) **[21].** Généralement, la structure des flavonoïdes est représentée selon le système C6-C3-C6 **[22]** en formant une structure de type diphényle propane dont des groupements hydroxyles, oxygènes, méthyles, ou des sucres peuvent être attachés sur les noyaux de cette molécule **[23].**

I.3.2.3.2 Classification

Tableau I.1 Principales classes des flavonoïdes **[23].**

Classes	Structures chimiques	R3'	R4'	R5'	Exemples
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH3	H	Diosmétine
Flavonols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myrecétine
Flavanols		OH	OH	H	Catéchine

Flavanones		H	OH	H	Naringénine
		OH	OH	H	Eriodictyol
Anthocyanidines		H	OH	H	Pelargonidine
		OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	Delphénidine
Isoflavones		R5	R7	R4'	
		OH	OH	OH	Genisteine
		H	O-Glu	OH	Daidezine

I.3.2.3.3 Propriétés biologiques

Les flavonoïdes sont l'un des plus grands groupes de métabolites secondaires qui jouent un rôle important dans les plantes. Ils interviennent comme des composés de défense ainsi que dans la signalisation de la reproduction, de la pathogenèse et de la symbiose **[24, 25]**. Les flavonoïdes végétaux sont impliqués dans le mécanisme d'intervention contre l'infection par des micro-organismes **[26]** ou l'attaque par les herbivores **[27].** Les flavonoïdes sont également impliqués dans la production de nodosités des racines comme un système de fixation de l'azote après l'infection par la bactérie Rhizobium dans une variété de plantes légumineuses **[28].** Ils sont des sources de pigments pour la coloration des composés de fleurs **[29]** et jouent un rôle important dans les interactions avec les insectes **[30].** Vu l'intérêt pharmacologique des flavonoïdes, de nombreux travaux semblent indiquer qu'ils possèdent des propriétés antioxydantes **[31, 32]**, anti-inflammatoires **[33, 34],** anti-VIH **[35, 36],** antitumorals spécialement lorsqu'ils sont utilisés conjointement avec d'autres agents chimiothérapeutiques **[37, 38]**, antiviraux **[39]**, antibactériens **[40]**, antiallergiques **[41].**

I.3.2.4 Coumarines

I.3.2.4.1 Définition

Les coumarines sont des substances naturelles connues, Il s'agit de composés à neuf atomes de carbone possédant le noyau benzo (2 H)-1 pyrannone-2. Ce composé dériverait de la cyclisation de l'acide cis cinnamique oxygéné en C-2 **[42]**. Les coumarines tirent son nom de *kumarú*, nom vernaculaire de la fève tonka *Coumarouna odorata* encore appelée *Disteryx odorata Willd*. Elles sont très largement distribuées dans le règne végétal. La coumarine et ses dérivés dont plus de 300 structures sont connues, se répartissent dans 9 familles de Monocotylédones et plus 70 familles Dicotylédones. Ils participent dans les racines des plantes symbiotiques hébergeant Rhizobium, à la formation des nodules. Elles sont responsables de l'odeur caractéristique de l'aspérule odorante et du mélilot desséché **[42].**

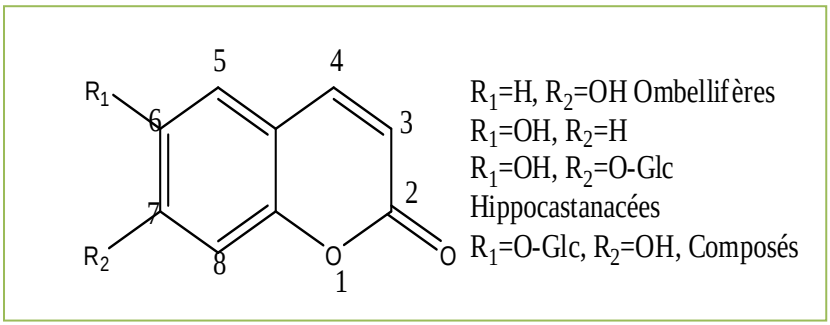


Fig I.9 Squelette de coumarine

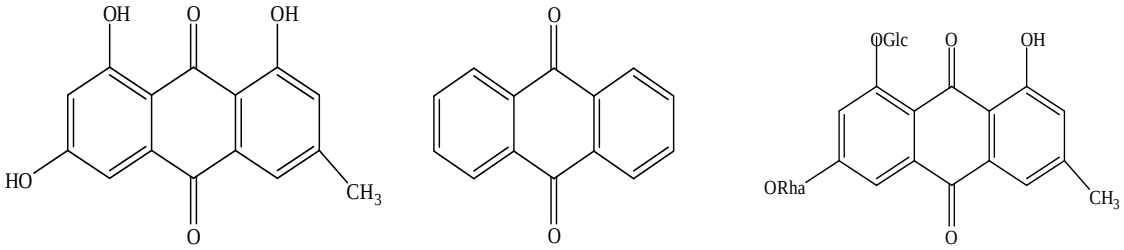
I.3.2.4.2 Propriétés biologiques

Les coumarines ont des propriétés antipyrétique, analgésique, sédative, antioedémateuses et anti convulsivante. Ils sont probablement responsables de l'effet anticonvulsivante **[43]**. Les coumarines ont indiquées dans les cas de lymphoedème du membre supérieur après traitement radiochirurgical du cancer du sein. Concernant les dérivés coumariniques, certains d'entre eux possèdent des activités pharmacologiques, principalement anticoagulantes. Les plus connus sont le dicoumarol et l'esculoside, tout deux veinotoniques et vasculoprotecteurs **[44].**

I.3.2.5 Anthraquinones, anthracénosides et émodols

I.3.2.5.1 Définition

Les anthraquinones sont les principaux constituants des plantes tels que le séné (Cassia senna) et la rhubarbe de Mongolie. Elles appartiennent à la famille des anthracénosides. Ce dernier regroupe tous les composés phénoliques, hétérosidiques et les émodols (dérivés hydroxyanthracéniques) **[11]**



Emodole Anthraquinone Glucofranguloside - A -

Fig.I.10 Structures de quelques anthraquinones

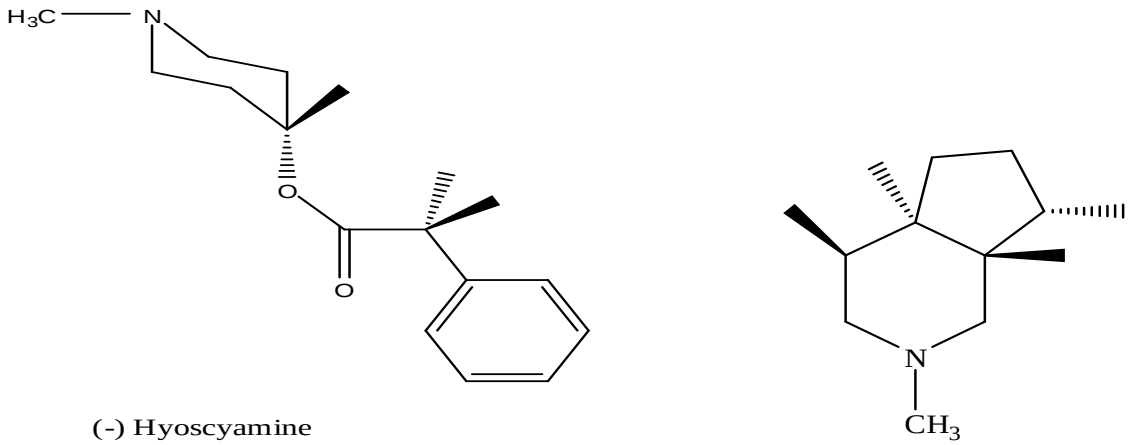
I.3.2.5.2 Propriétés biologiques

Le séné (Cassia senna) et la rhubarbe de la chine (Rheum palmatum) agissent sur la constipation. Ils ont un effet irritant et laxatif sur le gros intestin, provoquent des contractions des parois intestinales et stimulent les évacuations dix heures après la prise. Ils rendent les selles plus liquides, facilitant ainsi le transit intestinal **[11].**

I.3.2.6 Alcaloïdes

I.3.2.6.1 Définition

Les alcaloïdes sont des substances toxiques et parfois à faibles doses et qui ont des effets thérapeutiques connues. Ce sont des substances organiques azotées d'origine végétale, à caractère alcalin, de structure complexe. On trouve des alcaloïdes dans plusieurs familles des plantes et on en connait plus de mille. La morphine (1805), la strychnine (1818), la caféine, la quinine, la colchicine, le curare, l'atropine, ils passent très facilement dans les percolations. Ils agissent directement sur le système nerveux avec des effets sur la conscience et la motricité. L'action sur le système nerveux peut aller jusqu'à une action antispasmodique, et mydriatique, anesthésique locale ou analgésique et narcotique. Les alcaloïdes sont aujourd'hui nommés d'après la plante qui les a fournis avec une terminaison en «ine». D'une façon générale les alcaloïdes sont amers et utilisés comme apéritifs **[45].**



(-) Hyoscyamine

β – Skytantine

Fig.I.11 Structures de quelques alcaloïdes

I.3.2.6.2 Propriétés biologiques

Les drogues à alcaloïdes ont une importance considérable en thérapeutique. Certaines agissent au niveau central, d'autres sur le système nerveux autonome : sympatholytique (ergotamine) et d'autres ont des propriétés anesthésiques, anti-tumorales. Elles agissent à faibles doses, mais peuvent même être très toxiques à très faible dose **[45]**.

I.3.2.7 Les terpènes

I.3.2.7.1 Définition

Dans le règne végétal, les terpènes sont classés dans la catégorie des métabolites secondaires. Leur classification est basée sur le nombre de répétitions de l'unité de base isoprène (à 5 atomes de carbone) **[46, 47, 48]**. A ce jour, avec plus de 30 000 molécules identifiées, les terpènes constituent l'une des plus polymorphes et des plus grandes familles de composés naturels: hémiterpènes (C5), monoterpènes (C10), sesquiterpènes (C15), diterpènes (C20), sesterpènes (C25), triterpènes (C30), tetraterpènes,(C40) et polyterpènes.

I. 3.2.7.2 Classification

- **Hémiterpènes**

Dans la nature, il existe peu de composés naturels ayant une formule de C5 ramifiée; parmi certains composés naturels trouvés chez les plantes qui peuvent être considérés comme hémyterpène, seul l'isoprène à toutes les caractéristiques biogénétiques des terpènes **[49]**.

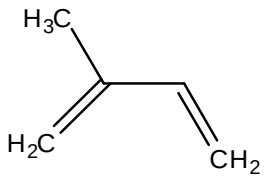


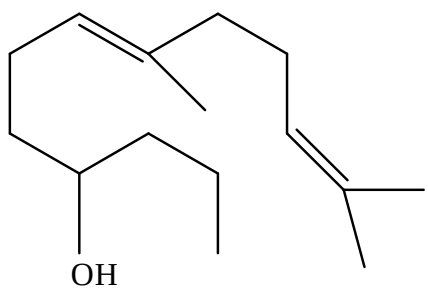
Fig I.12 L'isoprène

- **Monoterpènes**

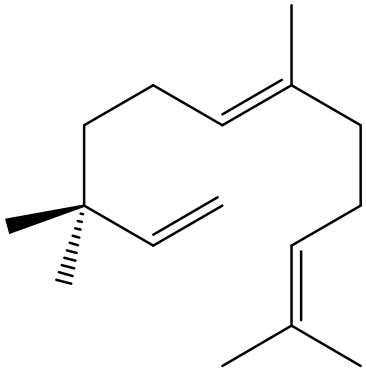
Les monoterpènes contiennent plus de 900 composés connus se trouvent principalement dans 3 catégories structurelles: les monoterpènes linéaires (acyclique), les monoterpènes avec un cycle unique (monocycliques) et ceux avec deux cycles (bicycliques). Ils résultent d'une fusion typique tête-à-queue des unités d'isoprène **[50].**

- **Sesquiterpene**

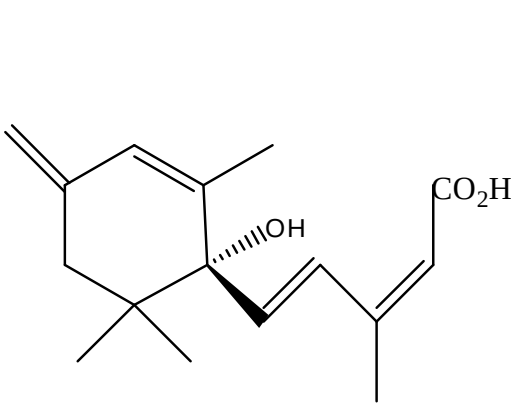
Sesquiterpenoids sont des composés de 15 carbone formée de 3 unités isopérene et comme formule moléculaire $C_{15}H_{24}$. Ils se trouvent principalement dans les parties ariennes des plantes. Comme les monoterpènes, une molécule de sesquiterpène peut être acyclique ou contenir 1 à 2 cycles (comme le polygodial), de très nombreuses combinaisons sont possibles. Les dérivés des sesquiterpènes obtenus par biochimie ou synthèse (oxydation ou réarrangement) sont appelé sesquiterpenoïdes. Les sesquiterpènes sont présent dans les essences végétales aromatique ou huiles essentielles, par exemple le farnésol dans l'huile essentielle de citronelle. Dans les plantes, ils ont le rôle d'agent de défense **[46, 47, 48].**



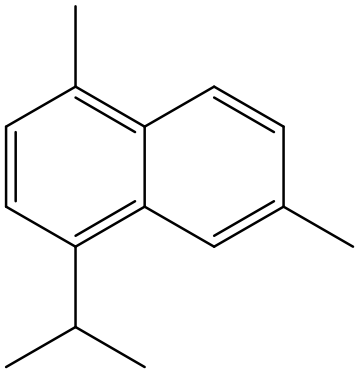
Farnésol



Nerolidol



Acide Abscisique



Cadalene

Fig.I.13 Structures des quelques sesquiterpènes.

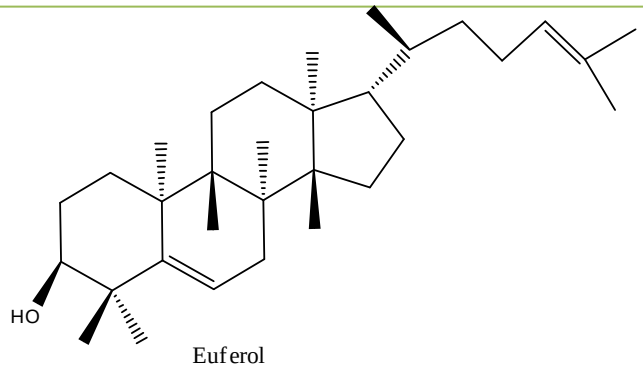
- **Diterpènes**

Les diterpènes sont des substances avec 20 atomes de carbone (C20) présentant une très grande variété structurale. Ces composés sont principalement présents dans les plantes supérieures dans les résines, ainsi que dans les champignons. Il existe environ 2700 diterpènes dans la nature dont la majorité est sous forme cycliques. Parmi les diterpènes cycliques, Le rétinol et le rétinal, deux formes de la vitamine A sont les plus connues dans cette famille **[46, 47, 48].**

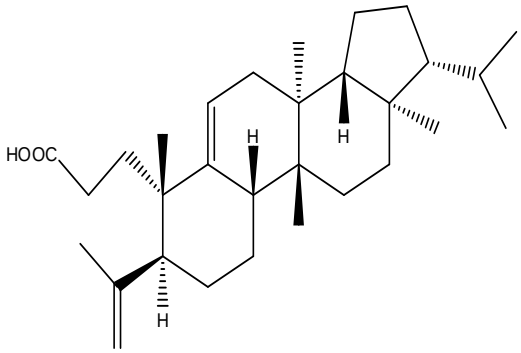
- **Triterpènes**

Les triterpènes contiennent plus de 4000 composés construits sur plus de 40 squelettes hydrocarbonés différents. Ce sont des composés en C-30 issus de la cyclisation du 3S-2,3-époxysqualène, ou plus rarement du squalène lui-même **[22, 23,24].** Ils sont presque toujours hydroxylés en position C-3 du fait de l'ouverture de l'époxyde. Les triterpènes présentent une très forte unité structurale, les différences majeures sont d'ordre stéréochimiques ayant trait à la conformation adoptée par l'époxysqualène avant la cyclisation initiale. Le cation formé lors de cette cyclisation peut ensuite subir une série de déplacement 1, 2 de protons et de méthyles

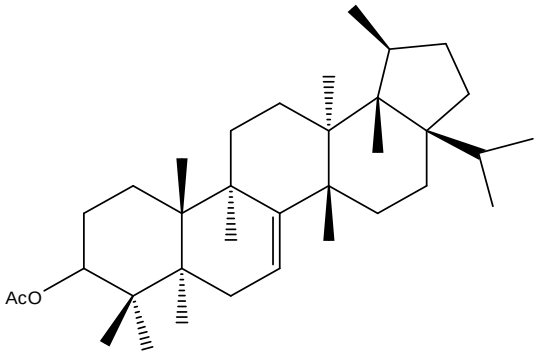
conduisant aux différents squelettes tétra- et pentacycliques qui caractérisent ce groupe de substances naturelles **[46, 47, 48].**



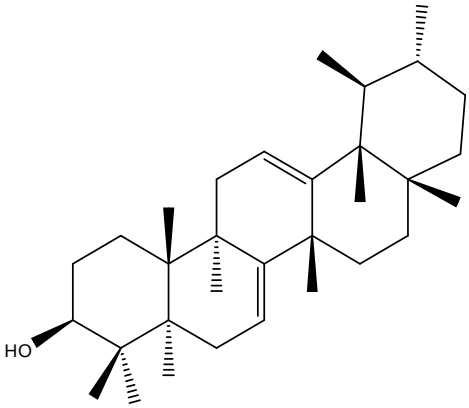
Euferol



acide 3,4-*seco*-8 β H-ferna-4(23) ,9(11)-dièn-3-oïque



Isomadeiranyl acétate



Taraxérone

Fig.I.14 Structures de quelques triterpène tétracycliques et pentacycliques.

- **Tetraterpènes**

Les caroténoïdes sont des tetraterpènes, les plus typiques étant les apocaroténoïdes, les diapocaroténoïdes, les mégastigmanes **[46, 47, 48].**

- **Polyterpènes**

Les polyterpènes ou polyisoprènes se composent de plus de 8 unités d'isoprène. Ces terpènes se trouvent souvent sous deux formes isomèriques cis- et trans. Le cispolyisoprène se

trouve dans le caoutchouc indien, alors que le polyisoprène-trans est la partie principale de gutta-percha. En plus Chicle représente un mélange de 1:2 de deux isomères cis- et trans-. Les prenylchoinones sont des polyterpènes comptant jusqu'à 10 unités d'isoprène, parmi eux, on rencontre les vitamines K1 et K2 et la vitamine E **[46, 47, 48].**

I.3.2.7.3 Propriétés biologiques

Beaucoup de terpènes servent comme des additifs dans les industries alimentaires et cosmétiques **[51]** et plusieurs d'entre eux possèdent des activités biologiques : Anti-microbienne, insecticide, anti-carcinogenique, anti-inflammatoire **[52]**, anesthésique et anti-histaminique (des mono et sesquiterpènes) diuréti que (β-eudesmol) **[53, 54]**, neuroprotective(α-terpinene, γ-terpinene, et trans-caryophyllene) **[55].** On peut citer également les propriétés anti-tumorales et cytotoxiques des diterpenes (taxol), et des activités anti-oxydantes attribuées surtout aux diterpenes phénoliques **[46].**

I.3.2.8 Les huiles essentielles

I.3.2.8.1 Définition

Les huiles essentielles sont des produits obtenus soit à partir des matières premières naturelles par distillation à l'eau, soit à partir des fruits de citrus par des procédés mécaniques et qui sont séparés de la phase aqueuse par des procédés physiques **[56].**

Dans la plante, les huiles essentielles peuvent être stockées dans divers organes : fleurs (origan), feuilles (citronnelle, eucalyptus), écorces (cannelier), bois (bois de rose, santal), racines (vétiver), rhizomes (acore), fruits (badiane) ou graines (carvi) **[57].** La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles, classées parm les métabolites secondaires, se font généralement au niveau des structures histologiques spécialisées, souvent localisées sur la surface de la plante **[58].**

Parmi les composants majoritaires des huiles essentielles, nous trouvons les terpénoïdes qui possèdent un rôle écologique lors des interactions végétales, comme agents allélopathiques, c'est-à-dire inhibiteur de la germination, mais aussi lors des interactions végétal-animal, comme agent de protection contre les prédateurs tels que les insectes. Ils interviennent également, par leurs odeurs caractéristiques, dans l'attraction de pollinisateurs **[59].**

I.3.2.8.2 Propriétés biologiques

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques. En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne. Cependant, elles possèdent également, des propriétés cytotoxiques qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens. Les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes ont montré une activité antimicrobienne plus élevée des terpènes oxygénés en comparaison des terpènes hydrocarbures a été observée **[60-61].**

Dans des préparations pharmaceutiques, les terpènes phénoliques, comme le thymol et le carvacrol, sont souvent utilisés comme antiseptiques antibactériens et antifongiques. Le thymol est très irritant, astringent et caustique **[62].**

Dans les domaines phytosanitaires et agro-alimentaires, les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires.

Les huiles essentielles peuvent aussi inhiber la synthèse de DNA, RNA, des protéines et des polysaccharides **[63].**

Références

[1] Nostro A. , Ggermano M.p., D'Angelo V., Marino A. et Cannetelli M.a.(2000). Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity.Lettres en microbiologie appliqué.30 (5), p379.

[2] Schnaubelt K. (1998). Advenced Aromatherapy.Vermont: Healing Arts Press.

[3] Fouché J. G., Marquet A. et Hambuckers A (2000). Les Plantes Médicinales, de la plante au médicament. Observatoire du Monde des Plantes Sart-Tilman, 89-100.

[4] Dweck A. C. (2002). Herbal Medicine for the Skin. Their Chemistry and Effects on Skin and Mucous Membranes.Personal Care Magazine.3 (2), 19-21.

[5] J. CRANCHER, (1997).. La plante médicinale de la tradition à la science. 1ème Congrès Intercontinental –Tunis de l'usage Empirique à la Phytothérapie Clinique.

[6] Hans W. K. (2007). 1000 plantes aromatiques et médicinales. Terre édition. P 6-7.

[7] Farnsworth N. R., Akerele O., Bingel A. S., Soejarto D. D. et Guo Z. (1986). Places des plantes médicinales dans la thérapeutique. Bulletin de l'organisation mondiale de la santé., 64 (2) : 159-164.

[8] Millogo H., Guisson I. P., Nacoulma O. et Traore A. S. 2005. Savoir traditionnel et médicaments traditionnels améliorés. Colloque du 9 décembre. Centre européen de santé humanitaire –Lyon.

[9] Simon Y. M, (1979). Source of antioxidant activity in soybeans, Journal of food science, Vol44, pp 1720-1722.

[10] D. Kassel (2003). Des hommes et des plantes, histoire de la pharmacie

[11] Bouhadjera K., (2005). Contribution à l'étude chimique et biologique de deux plantes médicinales sahariennes *Oudneya africana* R.Br. et *Aristida pungens* L,Thèse de doctorat, université de Telemcene.

[12] J. B. HARBORNE,(1973) Phytochemical Methods, A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis, Printed and bound in Great Britain by Fakenham Press.

[13] Bruneton, J. (1999). Pharmiognosie, phytochimie, plantes médicinales, 2eme édition, Paris :Editions médicales internationales, Tec et Doc Lavoisier, p 1120.

[14] Macheix J J., Fleuriet A. et Jay–Allemand C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed Presses polytechnologiques et universitaires romandes. p4-5.

[15] Cowan M. M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents.Clinical Microbiology Reviews. 12(4), 564-582.

[16] Read D. B., Bengough A. G. et Gregory P. J. (2003). Plant roots release Phospholipid surfactants that modify the physical and chemical properties of soil, New Phytologist, Février, Vol 157, No 2,pp 3115-326.

[17] Glombitza. K. et Gestberger. G., Phytochemistry,(1985). Vol 24, pp 573-551.

[18] Pencer. C. M., Cai. Y., Martin. R., Gaffney.S. H., Goulding. P. N., Magnolato. D., Lilley. H. T., Haslam. E., (1988) Phytochemistry, Vol 27, pp 2397-2410.

[19] Porter. L. J. (1989).Tannins in Methods in Plant Biochemistry (plant phenolics), Academic Press, London, Vol 1, pp 389-419.

[20] Brenda Winkel-Shirley, (Juin 2001). Flavonoid Biosynthesis. A Clorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, Plant Physiol, Vol 126, pp.485-493.

[21] W –Erdman J., Balentine J. D., Arab L., Beecher G., Dwyer J. T., Folts J., Harnly., Hollman J. P., L –Keen C.,. Mazza G., Messina M., Scalbert A., Vita J., WilliamsonG. et Burrowes J.(2007). Flavonoids and heart health : Proceeding of the ILSI North America flavonoids workshop, may 31-june 1, 2005, Washington. Journal of Nutrition., 137 (3 supp1) : 718 s-737 s.

[22] Emerenciano V. P., Barbosa K. O., Scotti M. T. et Ferriro M. J. P. (2007). Self organisating maps in chemotaxonomic studies of Asteraceae : a classification of tribes using flavonoid data. Journal of brazilian chemical society., 18 (5) : 891-899.

[23] Narayana K. R., Reddy M. S., Chaluvadi M. R. et Krishna D. R. (2001). Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. Indian journal of pharmacology., **33 :** 2-16.

[24] Maxwell C. A., Philips D. A. (1990). Plant Physiology 93, 1552.

[25] Barz W., Welle R., in: H.A. Stafford (Ed.). (1990). Flavonoid Metabolism CRC Press, Boca Raton, FL, USA, p. 139. 360.

[26] Middleton E. M., Teramura A. H. (1993). Plant Physiology 103 741.

[27] Wang C. Y., Huang H. Y., Kuo K.-L., Hsieh Y. Z. (1998). Journal of Chromatography A 802 225.

[28] Etherington J. R. (1983). Wetland Ecology, Studies in Biology No. 154 Edward Arnold Publishers, London.

[29] Goto T., Kondo T. (1991). Angewandte Chemie 30 17.

[30] Biggs D. R., Lane G.A. (1978). Phytochemistry 17 1683.

[31] Rice-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends Plant Science, 2 (4), 152–159.

[32] Van d. B. R., Haenen G., van d. B. H., van d. V.W., Bast A. (2000). The predictive value of antioxidant capacity of structurally related flavonoids using the Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. Food Chemistry 70 391.

[33] Read M. A. (1995). Flavonoids: naturally occurring anti-inflammatory agents Vascular. American Journal of Pathology 147(2), 235-237.

[34] Middleton E., Kandaswami C. (1992). Effects of flavonoids on immune and inflammatory functions. Biochemical Pharmacology 43, 1167-1179.

[35] Matsuda H., Morikawa T., Toguchida I., Harima S., Yoshikawa M. (2002). Chemical and Pharmaceutical Bulletin 50, 972.

[36] Hu C. Q., Chen K., Shi Q., Kilkuskie R. E., Cheng Y. C., Lee K. H. (1994). Journal of Natural Products 57 42.

[37] Shi R. X., Ong C. N., Shen H. M. (2005). Cancer Research 65 7815.

[38] Shi R. X., Ong C. N., Shen H. M. (2004). Oncogene 23 7712.

[39] Amaral A. C. F., Kuster R. M., Gonçalves J. L. S. and Wigg M. D. (1999). Fitotirapia 70 293-295.

[40] Mori A., Nishiro C. and Tawata S. (1987). Phytochemistry 18 (26), 2231-2234.

[41] Nijveldt R. J., van Nood E., van Hoorn D. E. C., Boelens P. G., van Norren K., van Leeuwen P. A. M. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of actions and

potential applications. American Journal of Clinical Nutrition 74 418.

[42] Gray A. I., and Waterman P. G. (1978). Phytochemistry, 17 845.

[43] Gupta M. B., Nath R. (1980). Anti inflammatory and antipyretic activities of sitosterol, Planta medica 39, 157-163.

[44] Hostettmann, K. (1997). Tout Savoir sur le Pouvoir des Plantes Sources de Médicaments. Editions Favre, Lausanne, pp. 93, 104, 135.

[45] Guignard J-L, Cosson L., Henry M. (1985). Abrégé de phytochimie, Masson, , p 193.

[46] Bruneton J. (1999) Pharmacognosie -Phytochimie, Plantes Médicinales, 3ème édition, Ed. Tec et Doc Lavoisier, 1120 p., Paris.

[47] Dey, P.M., Harborne, J.B. (1991). Methods in plant biochemistry. Volume 7, Terpenoids. Academic press.

[48] Manitto, P. (1981). Biosynthesis of natural products. John willey et sons. New york.

[49] Loomis, D., and R. Croteau. (1980). Biochemistry of Terpenoids: A Comprehensive Treatise. In: P. K. Stumpf and E. E. Conn (eds.) the Biochemistry of Plants. Lipids: Structure and Function No. 4. p 364-410. Academic Press, San Francisco.

[50] Allen, K. G., Banthorpe, D. V., and Charlwood B. V. (1977). Metabolic pools associated with monoterpene biosynthesis in higher plants. Phytochemistry 16, 79-83.

[51] Robles M., Aregullin M., West J., and Rodriguez E. (1995). Recent studies on the zoopharmacognosy, pharmacology, and neurotoxicology of sesquiterpene lactones. Planta Medica 61, 199-203.

[52] Cho J. Y., Baik U. K., Jung J. H., Park M. (2000). European Journal of Pharmacology 398 399-407.

[53] Li J., Wu Q. X., Shi Y. P., Zhu Y. (2004). A new sesquiterpene lactone from scorzonera austriaca. Chinese Chemical Letters 15(11), 1309-1310.

[54] Bryanskii O. V., Tolstikhina V. V., Zinchenko S. V., Semenov A. A. (1992). A sesquiterpene glucoside from cultivated cells. Khimiya Prirodnykh Soedinenii (6), 640-645.

[55] Zidorn C., Ellmerer-Muller E. P., Stuppner H. (2000). Sesquiterpenoids from Scorzonera hispanica L. Pharmazie 55(7), 550-551.

[56] Peyron L., Richard Hubert. (1992). L'extraction des épices et herbes aromatiques et les différents types d'extraits. Epices et aromates. Tec et Doc Lavoisier, APRIA., Paris.

[57] Leon R. H. O. (2005). Substitution de solvants et matieres actives de synthese par un combine « solvant/actif » d'origine vegetale. Thèse de l'institut national polytechnique de Toulouse, France.

[58] Brunechon J. (1987). Pharmacognosie, Ecole technique de documentation, Ed. Ravoilie.

[59] Langenheim J. H. (1969). Amber: a botanical inquiry. Science. 163(872), 1157-1169.

[60] Oh H. K., Sakai T., Jones M. B, and Longhurst W. M. (1967) Effects of various essential oils isolated from Douglas fir needles upon sheep and deer rumen microbial activity. Applied Microbiology 15, 777-784.

[61] Cox S. D., Mann C. M., and Markham J. L. (2001) Interactions between components of the essential oil of Melaleuca alternifolia. Journal of Applied Microbiology 91, 492-497.

[62] Lis-Balchin, M., Deans S. G., and H. S. (1996). Bioactivity of geranium oils from different commercial sources. Journal of Essential Oil Research 8, 281-290.

[63] Zani F., G. Massimo., Benvenuti S., Bianchi A., Albasini A., Melegari M., Vampa G., Bellotti A., and Mazza P. (1991), Studies on the Genotoxic Properties of Essential Oils with Bacillus subtilis rec-Assay and Salmonella/Microsome Reversion Assay. Planta Medica 57, 237-241.

Chapitre II
Etude Botanique

II. Etude botanique

II.1 Caractères généraux des Astéraceae

Le mot « Aster » du grec signifie étoile, en relation avec la forme de la fleur. Les Asteraceae (anciennement appelées Composées) sont une famille appartenant aux Dicotylédones comprenant plus de 1500 genres et plus de 25000 espèces décrites dont 750 endémiques, C'est une des familles la plus importante des Angiospermes. Ce sont presque toujours des plantes herbacées avec souvent des racines charnues : rhizomateuses, tubéreuses ou pivotantes **[1].**

Cette famille présente des caractères morphologiques divers : herbes annuelles ou vivaces, plus rarement des arbustes, arbres ou plantes grimpantes et quelques fois, plantes charnues **[2].** Bien que généralement ce soit des plantes herbacées à feuilles isolées **[1].**Plusieurs plantes de cette famille sont cultivées pour leur valeur alimentaire (le tournesol, le topinambour, la laitue, chicorée, la camomille, etc.) ou comme plantes ornementales (les dahlias, les asters, les rudbeckies, les gaillardes, etc.). L'aspect de l'appareil végétatif est trop variable pour caractériser les Asteraceae sur ce seul critère. En revanche, cette famille est très homogène au niveau de ses inflorescences très caractéristiques : le capitule.

La famille représente un type biologique encore jeune et en pleine évolution, et pour cette raison, très agressif et très envahissant. Les fruits, aigrettes d'un grand nombre d'espèces peuvent être portés par les vents à des centaines de milles, et leur distribution devrait, semble-t-il, être toujours très vaste ; nombre d'espèces sont néanmoins très locales. Le grand intérêt biologique des composées réside dans le capitule, qui est une inflorescence indéfinie, télescopée verticalement, et qui fonctionne comme une seule fleur ; ce pseudo fleur est entouré d'un groupe de bractées qui fonctionne comme un calice. Le capitule des composées complètes, schématiques si l'on peut dire, introduit dans le milieu ambiant une seule masse florale bien protégée contre les traumatismes, rendue voyante par les rayons corolles de la périphérie, aisément pollinose par le déplacement horizontal des insectes sur la surface plate du disque **[3].**

II. 1.1 Appareil reproductif

• L'inflorescence

L'inflorescence des Asteraceae est le capitule. Les capitules sont constitués du regroupement de fleurs sessiles sur un même réceptacle. Les fleurs sont de deux types : fleurs tubulées "tubuliflores" et fleurs ligulées "liguliflores". Le tout donnant à l'ensemble d'apparence d'une seule fleur **[2, 3].**

• La fleur

Les fleurs des Astéracées, appelées aussi fleurons, se présentent sous deux formes:
Des languettes, ou ligules, dans lesquelles les équivalents des pétales sont soudés, généralement par cinq, parfois par trois, reconnaissables seulement à la dent de la languette, et où un pétale prédomine, des tubes terminés par des lèvres imperceptibles ou s'ouvrant plus ou moins largement en cinq lobes **[2, 3].**

Les fleurs sont donc regroupées en capitules qui peuvent compter plusieurs centaines de fleurs. Les capitules sont parfois réduits à quelques fleurs (genre Achillea) voire, exceptionnellement à une seule fleur (genre Echinops) **[2].**

Les fleurs sont sessiles, axillées par une bractée mère. Le calice est très réduit à une couronne d'arêtes, de soies ou d'écailles. Ces fleurs, pétales soudées, peuvent être tubuleuses (on parle de fleurons) ligulées (on parle de demi-fleurons) ou très rarement bilabiées.
Il y a 5 étamines dont les anthères sont soudées entubes (androcée synanthérée).
L'ovaire, formé de 2 carpelles est uniloculaire et ne possède qu'un ovule **[2, 3].**

• Fruits

Ce sont des akènes (fruits secs indéhiscents uniséminés) possédant, le plus souvent, un pappus provenant du développement du calice après la fécondation.

Pour déterminer la plupart des plantes succulentes, principalement dans les genres Senecio et Othonna. D'autre sont connues pour le caractère allergène de leur pollen (genre Ambrosia) **[2,3].**

II.1.2 Classification des Asteraceae

On distingue quatre sous familles **[2]:**

• Tubuliflores ou carduacées
• Liguliflores ou chicoracées

• Labiactiflores

• Radiées ou corymbifére

Tableau II.1 Classification des Asteraceae **[4].**

SOUS-FAMILLE	TUBULIFLORES	LIGULIFLORES	LABIATIFLORES	RADIEES
Capitules	homogames	homogames	homogames ou hétérogames	hétérogames
Fleurs	Tubuleuses Fleurons	Ligulées à 5 dents Demi-Fleurons	Bilabiées en périphérie Tubuleuses au centre ou seulement Bilabiées	Ligulées à 3 dents à la périphérie, tubuleuses au centre
Libre interne	non	non	Non	non
Canaux sécréteur	Dans l'endoderme dédoublé	non	Non	Dans l'endoderme dédoublé
Lactifères	non	Articulés, en Réseau	non	non
Cellules sécrétrices isolée	Dans le liber de la tige	non	Non	Non
Canaux oléifère	oui	oui	oui	Oui

II.2 Caractéristiques botaniques de l'Anvillea

Anvillea radiata est arbuste très rameaux de 20-50 cm a tiges et rameaux ligneux à la base à feuilles en triangle allongé, atténuées à la base en pétiole, et à limbe fortement denté; capitule grand, de 4 à 5 cm de diamètre y compris les longues ligules, entouré de feuilles supérieures rayonnantes qui passes progressivement aux bractées, celles-ci coriaces; fleurs toutes jaune-orangé; paillettes de réceptacle tronquées au sommet et prolongées en une soie;

achaines prismatiques, ceux de la périphérie à trois angles, ceux de centre à quatre angles **[5, 6].**

- Fleur périphériques en longues ligules, atteignant jusqu'à 25 mm, type de l'espèce, commun dans tout le Sahara sept *Anvillea radiata*.

- Pas de ligules, variété Australis, sud de Sahara sept, Sahara centrale. Cette variété serait put être identique à *l'Anvillea garcini* **[5]**

Le nom vernaculaire est Nougd, Arfej, Herf , Ain Bagra et Karfej, en langues berbères :Tahtit et Aktkal **[7,8 et 9].**

II.3 Situation botanique de la plante *Anvillea radiata*

La plante *Anvillea radiata* (**Fig.II.1**, ci-dessous) est classée comme suit : **[5, 6].**

Embranchement	**:** Spermaphytes
Sous-Embranchement	**:** Angiospermes
classe	: Dicotylédones
Sous-classe	**:** Gamopétales
Série	**:** Gamopétales infère ovariés
Ordre	**:** *Asterales*
Famille	**:** *Composées*
Genre	**:** *Anvillea*
Espèce	***:*** *radiata*

II.4 Usage thérapeutique

Anvillea.radiata est utilisée dans la médecine traditionnelle comme pour le traitement de le refroidissement pulmonaire, indigestion **[8, 10]**, troubles gastriques-intestinal **[8, 11]** et a été rapporté comme plante a une activité hypoglycémique **[12, 13]**

II.5 Répartition géographique

Anvillea.radiata habite généralement les petites dépressions sablo-argileuses **[5],** distribué dans les steppes de l'Afrique du Nord particulièrement en Maroc et Algérie **[7, 12],** en particulier dans les régions de Ouargla **[8]**, El Delfa, Bechar **[14]** et El Golia **[12].**

II.6 Zone d'étude

La zone étudiée (Messâad) appartient à la steppe algérienne, et plus exactement aux steppes sud-algéroises dont l'extension est limitée au nord par les chaînes telliennes et au su par les vastes espaces sahariens. Elle est située à 70 km au Sud-est du chef lieu de la wilaya de Djelfa, et à une altitude moyenne de 800 m, elle est comprise entre 30° 10' de latitude Nord et 3°, 30' e longitude Est **[15].**

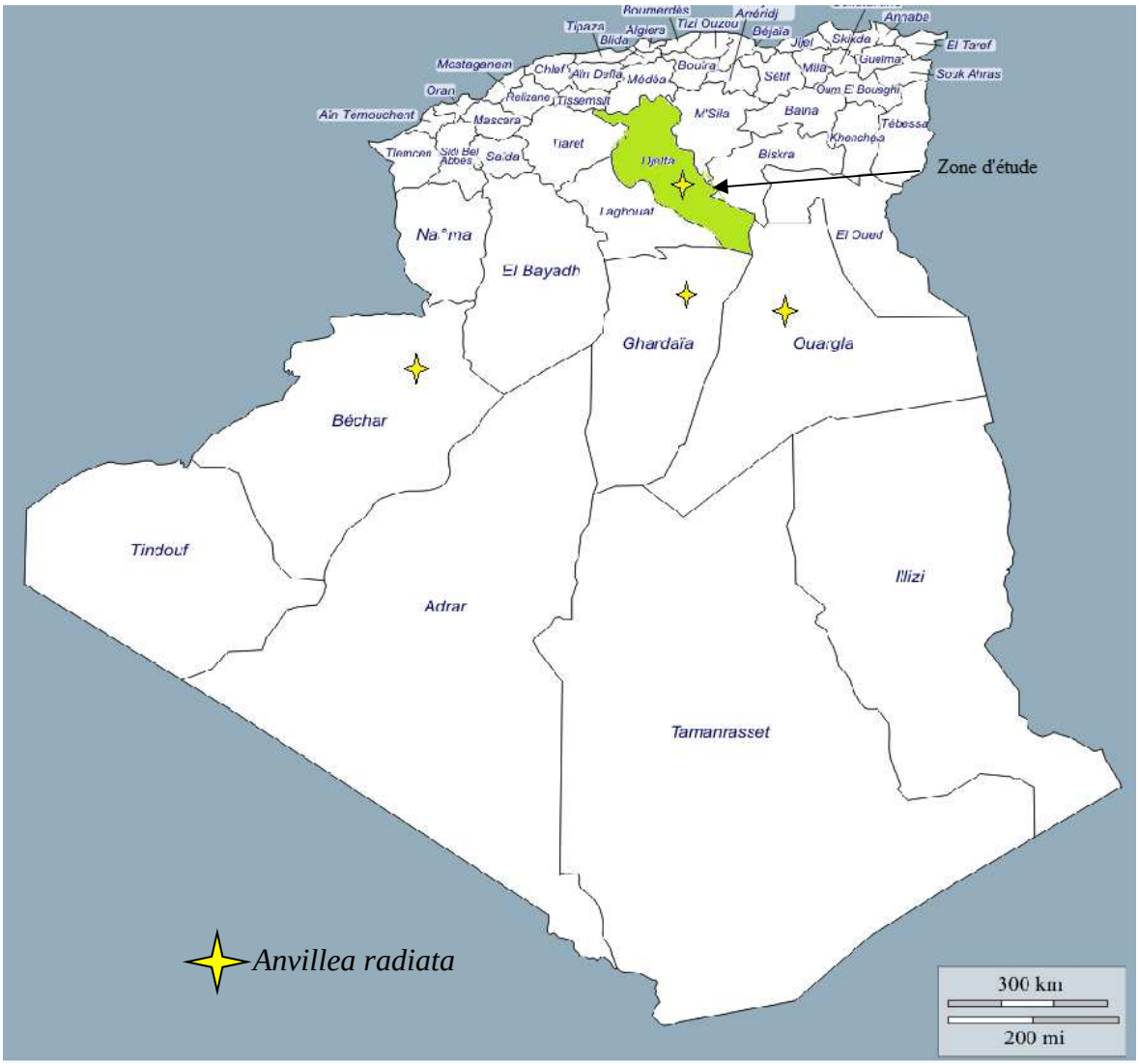


Fig II.1 Répartétion géographique de la plante *Anvillea radiata* en Algérie **[16]**

Fig II.2 *Anvillea radiata*

II.7. Travaux antérieurs

L'analyse phytochimique de différentes parties de la plante a été l'objet de quelques études **[14, 17]**, Ces auteurs ont mis en évidence la présence des flavonoïdes, des saponines, des alcaloïdes, des tannins, des acides gras, des terpènes et stéroïdes.

D'autre étude a montré la présence des 13 flavonoïdes chez l'*Anvillea radiata* quatre aglycones et neuf flavonols glycosidés, sont : hispiduline, népétine, jaceosidine, spinacetin, spinacetin 7-glucoside, patuletin 7-diglucoside, spinacetin 3-diglucoside, kaempferol 6-methylether 3-glucoside**,** quercetin 3-glucoside, patuletin 3-diglucoside, isorhamnetin 3-diglucoside, quercetin 3-rhamnoglucoside et quercetin 3-diglucoside 7- glucoside **[18]**. Des flavonols comme quercetin 3-rhamnoglucoside 30, 40dimethyl ether, 6-methoxykaempferol 3-galactoside, 6-methoxykaempferol 3-galactoside 7,4-dimethylether, kaempferol 3-rhamnoglucoside, spinacetin 3-rhamnoglucoside ont été isolés à partir de l'*Anvillea garcini* **[19].** certains auteurs ont pu isolés quelques germacranolides chez l'*Anvillea garcini* : 9α-hydroxy-1β,10α-epoxyparthenolide, 9β-hydroxyparthenolide, 9β-hydroxy-1β,10α epoxyparthenolide, cis-partenolid-9-one **[20, 21, 22, 23]**

L'Anvillea radiata est une source de sesquiterpène lactone 9α- hydroxyparthenolide **[24]**, qui a différentes activités : antibactérienne, cytotoxique, antitumoral et antifongique **[17,**

25] et anticancereuse **[26]**, des autres sesquiterpenes ont été ésolés : parthenolide-9-one, 8α,9α-Epoxyparthenolide **[24]** et 9β-hydroxyparthenolide **[26].**

La caractérisation de l'huile essentielle de l'anvillea radiata afait l'objet d'une seule étude **[27].**l'analyse chimique par GC/MS de cette huile rélève une prédominance en 6-oxocyclonérolidol (66.6%) et en 6-hydrocyclonérolidol (11.4%). Ces auteurs rapportent également que ces huiles essentielles possèdent une excellente activité antibactérienne vis-à-vis microorganismes testées.

Il n'y a pas de travaux consacrés sur l'étude des teneurs en polyphénols , flavonoides et les propriétés antioxydantes, antidiabétique et allélopathique de l'*Anvillea radiata.*

Références

[1] **Crete P. (1965).** Précis de botanique. Masson, Paris, édition 2, P 429.

[2] **Bonnier. (1934).** Flore complète de France, Suisse et Belgique. Édition 10, P 118.

[3] **M.C. Chalandre, (1999-2000).** Elements de Botanique UFR de Pharmacie et ingénieurie de la santé-Angers

[4] **Deysson G. (1964).** Organisation et classification des plantes vasculaire. SEDES Paris 2, P 434.

[5] **Ozenda, P., (1977)**. Flore du Sahara septentrional et central. 2nd Edn., Paris, p. 434.

[6] **Quezel, P., Santa, S., (1963)**. Nouvelle flore de l'Algerie et des regions desertiques meridionales. Editions du C.N.R.S. Paris, p. 949.

[7] **Mebarki, L., H.M. Kaid, L. Benlarbi, A. Rahmani and A. Sarhani, (2013)**, Phytochemical Analysis and Antifungal Activity of *Anvillea radiata*. World App. Sci. J., 26: 165-171.

[8] **Oueld El Hadj M. Didi, Hadj-Mahammed M., Zabeiro H., (2003),** Places des Plantes Spontanées Dans la Médecine Traditionnelle de la Région de Ouargla , Courrier du Savoir, N°03, pp. 47-51

[9] **Halimi Abd ElKader (1997).**. دليل النباتات الطبية في الجزائر , وزارة الفلاحة والصيد البحري

[10] **Maizak, K ; Brac, De La Perriere et Hammiche, V. (1993).** Pharmacopée traditionnelle: Sahara septentrional. Actes du 2e colloque européen d'ethnopharmacologie, Heidelberg, p 169-181.

[11] **Bellakhdar J. (1997).** La pharmacopee Marocaine traditionnelle. Ed Ibis press.

[12] **El Hassani, B., El Hanbali, F., Akssira, M., Mellouki, F., Haidour, A., Barrero, A.F., (2004).** Germacranolides from *Anvillea radiate*, Fitoterapia 75, 573.

[13] **Al-yahya MA, Al-Meshal IA, Mossa JS, Al-Badr AA, Tariq M.(1990).**Saudi Plants: A Phytochemical and Biological Approach. Riadh7 King Abdul Aziz City for Science and Technology (KACST).

[14] **Djellouli, M , M. Moussaoui , H. Benmehdi, L. Ziane, A. Belabbes, 2013.** Ethnopharmacological study and Phytochemical Screening of Three Plants (*Asterasea* Family) From the Region of South West Algeria. Asian J. Nat. & Appl Sci., 2: 159-165.

[15] Zakkar Elguada (2012) ،(*Anvillea radiata*) دراسة الفعالية البيولوجية و المضادة للأكسدة لنبتة النقد مذكرة ماجستير، جامعة قاصدي مرباح ورقلة.

[16] Site web: www.d-maps.com

[17] Mebarki, L., H.M. Kaid, L. Benlarbi, A. Rahmani and A. Sarhani, (2013), Phytochemical Analysis and Antifungal Activity of *Anvillea radiata*. World App. Sci. J., 26: 165-171

[18] Dendougui, H , M. Jay, F. Benayache, S. Benayache (2006); Flavonoids from *Anvillea radiata Coss. & Dur*. (Asteraceae). Biochem. Systematics and Ecol., 34: 718-720.

[19] Ulubelen, A., Mabry, T.J., Aynekdin, Y., 1979. J. Nat. Prod. 42, 624.

[20] Sattar, E.A., Mc Phail, A.T., 2000. J. Nat. Prod. 63, 1587.

[21] Sattar, E.A., Galal, A.M., Mossa, G.S., 1996. J. Nat. Prod. 59, 403.

[22] Rustaiyan, A., Dabiri, M., Jakupovitch, J., 1986. Phytochemistry 25, 1229.

[23] Tyson, R.L., Chang, C.J., Melaughin, J.L., Aynehchi, Y., Cassidy, J.M., 1981. Experientia 37, 441.

[24] B. El Hassany, F. El Hanbali, M. Akssira, F. Mellouki,A. Haidour, A.F. Barrero (2004). Germacranolides from Anvillea radiata, Fitoterapia 75 573– 576

[25] Mohamed Moumou, Ahmed El Hakmaoui , Ahmed Benharref , Mohamed Akssira (2012). Access to new sequiterpenoids by catalytic acid rearrangementof 9α-hydroxyparthenolide, Tetrahedron Letters 53, 3000–3003

[26] Mohamed Moumou, Abderrahman El Bouakher, Hassan Allouchi, Ahmed El Hakmaoui, Ahmed Benharref, Véronique Mathieu, Gérald Guillaumet, Mohamed Akssira (2014). Synthesis and biological evaluation of 9α- and 9β-hydroxyamino-parthenolides as novel anticancer agents, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 24, 4014–4018.

[27] El Hanbali F., El Hakmaoui F., ElRhaffari L., Akssira M.,(2007). Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of Anvillea radiata Coss Dur, natural product communication vol 2 n5 595-597.

Chapitre III
Etude Phytochimique

III. Etude Phytochimique

III.1 Matériel végétal

Anvillea radiata est récoltée durant le mois de Mai 2011 dans la région de Messâad, El Djelfa (Algérie). La récolte de la plante est effectuée très soigneusement de manière à ne pas détériorer les éléments organiques et minéraux présents.

III.2 Tests phytochimiques préliminaires

La partie aérienne de la plante *Anvillea radiata* est soumises aux tests phytochimiques. Au cours de ces tests, trois solvants de polarité différente (eau, éther diéthylique, éthanol) sont utilisés pour l'extraction des différentes familles de composés chimiques.

III.2.1 Produit végétal épuisé avec l'éthanol

Dans un ballon monocol, surmonté d'un réfrigérant, mettre 25 g de matériel végétal en présence de 150 ml d'éthanol. Porter l'ensemble à reflux pendant 1 heure. Filtrer le mélange, ensuite soumettre l'extrait éthanolique aux tests suivants:

III.2.1.1 Flavonoïdes

Traiter 5 ml d'extrait alcoolique avec quelques gouttes d'HCl concentré et 0.5 g de tournures de magnésium. La présence des flavonoïdes est mise en évidence si une couleur rose ou rouge se développe en l'espace de 3 minutes **[1].**

III.2.1.2 Tanins

A 1 ml de solution alcoolique, ajouter 2 ml d'eau et 2 à 3 gouttes de solution de $FeCl_3$ diluée. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue-noire, verte ou bleue - verte et un précipité, selon que les tanins sont cathéchiques, galliques ou ellagiques **[2,3].**

III.2.1.3 Composés réducteurs

Traiter 1 ml de l'extrait éthanolique avec 2 ml d'eau distillée et 20 gouttes de la liqueur de Fehling puis chauffer. Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge - brique **[2,3].**

III.2.1.4 Stérols et polyterpènes

Evaporer 10 ml d'extrait alcoolique, traiter le résidu obtenu avec 10 ml de chloroforme anhydre puis filtrer. Mélanger 5 ml de la solution chloroformique avec 5 ml d'anhydre acétique et ajouter quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. Agiter puis laisser reposer.

Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration violacée fugace virant au vert (maximum d'intensité en 30 minutes à 21°C.

III.2.1.5 Alcaloïdes sels

Deux essais ont été réalisés :

- évaporer 20 ml de la solution éthanolique. Ajouter 5 ml d'HCl (10%) au résidu et chauffer dans un bain-marie. Filtrer le mélange et l'alcaliniser avec quelques gouttes d'une solution de NH_4OH (10%) jusqu'au pH 9. Extraire la solution avec l'éther diéthylique ensuite concentrer à sec. Dissoudre le résidu dans du HCl (2%). Caractériser les alcaloïdes avec les réactifs de Mayer et de Wagner.

- évaporer 20 ml de la solution éthanolique à sec. Ajouter 5 ml d'HCl (2N) au résidu et chauffer dans un bain-marie. Filtrer le mélange puis diviser le filtrat en deux parties égales.

Traiter la première avec quelques gouttes du réactif de Mayer et la seconde avec le réactif de Wagner **[3].**

Observation : Présence de turbidité ou précipitation.

III.2.2- Produit végétal épuisé avec l'eau chaud

Dans un ballon surmonté d'un réfrigérant, mettre 10 g de racines en présence de 60 ml d'eau. Porter l'ensemble à reflux pendant 1 heure. Filtrer le mélange et soumettre l'extrait aqueux aux tests suivants :

III.2.2.1- Saponosides

Ajouter à 2 ml de la solution aqueuse un peu d'eau puis agiter fortement. Une écume persistante confirme la présence des saponosides. Abandonner le mélange pendant 20 minutes et évaluer la teneur en saponosides:

- pas de mousse = test négatif
- mousse moins de 1 cm = test faiblement positif
- mousse de 1-2 cm = test positif
- mousse plus de 2 cm = test très positif **[3].**

III.2.3-Produit végétal épuisé avec l'éther diéthylique

Dans un ballon surmonté d'un réfrigérant à reflux, mettre 25 g en présence de 150 ml d'éther diéthylique Porter l'ensemble à reflux pendant 1 heure. Filtrer le mélange et le soumettre aux différents tests suivants :

III.2.3.1- Huiles essentielles

Evaporer 20 ml de solution éthérique. Le résidu ainsi obtenu est dissout dans l'éthanol. La solution éthanolique obtenue est ensuite concentrée à sec. Un test positif est révélé par l'obtention d'un résidu arôme. Concernant le résidu gras, ce dernier est saponifié. En fin de réaction, ajouter un peu d'eau et extraire la solution avec l'éther diéthylique .

III.2.3.2- Acides gras

Acidifier la solution aqueuse alcaline, puis l'extraire avec l'éther diéthylique. La solution éthérique est ensuite concentrée à sec. Un test positif est révélé par l'obtention d'un résidu gras **[4].**

III.2.4 Résultats et Discussions

Les tests phytochimiques ont été réalisés sur différents extraits préparés à partir de la partie aérienne de la plante d'*Anvillea radiata* en utilisant des solvants de polarité différente et des réactifs spécifiques de révélation.

Les tests phytochimiques consistent à détecter les différentes familles de composés existantes dans la partie étudiée de la plante par des réactions qualitatives de caractérisation. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de composés.

Les résultats obtenus sont regroupés dans le Tableau III.1 montrent la présence des flavonoïdes, des tanins, des stérols et polyterpènes, acides gras, huiles essentiels et alcaloïdes avec des intensités variables.

Tableau III.1 Familles de composés chimiques issues de la plante *Anvillea radiata.*

Composés	Résultats obtenus
Tanins	(+) Apparition d'une coloration bleue noire et un précipité
Flavonoïdes	(+) Apparition d'une couleur rouge caractéristique des flavonoïdes
Stérols et polyterpènes	(+) Coloration violacée fugace virant au vert
Saponosides	(+) Formation de mousse
Acides gras	(+) L'apparition de la transparence sur papier filtre
Huiles essentielles	(+) Résidu arôme
Alcaloïdes	(+) Présence de turbidité
Composés réducteurs	(-)

- : Absence + : Présence

De même les tests phytochimiques réalisés par Mebarki et al, (2013) **[5]**, ont montré également que la plante *Anvillea radiata* contiennent des tanins, des flavonoïdes, des acides gras, des stérols et saponisides et ont montré l'absence de composés réducteurs et les alcaloïdes dans les fleurs.

III.3 Préparation des extraits de la partie aérienne de la plante *Anvillea radiata*

Après séchage dans un endroit sec et aéré, à l'abri de la lumière et l'humidité, les parties aériennes de la plante sont broyées par un mortier manuel, la poudre obtenue (1000g) est mise à macération dans un mélange hydroalcoolique (Méthanol / eau ; 70 / 30 ; V / V) pendant 48h sous agitation à température ambiante. Cette macération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant chaque 48 heure.

Après filtration et concentration sous vide (T<40°C), l'extrait méthanolique est dilué avec de l'eau distillée à raison de 50 ml pour 100 g de matière sèche, on laisse la solution en repos une nuit puis on filtre.

Après filtration, la solution a subi des extractions successives de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par l'Ether de pétrole puis le chloroforme puis l'acétate d'éthyle et enfin avec le n-butanol.

Chaque extraction est répétée trois fois sauf avec l'acétate d'éthyle. Notons que cette technique d'extraction permet d'obtenir des extraits peu complexes, de faciliter leurs études chromatographiques et de localiser l'activité recherchée. Le protocole d'extraction est résumé dans la Figure (III.1) :

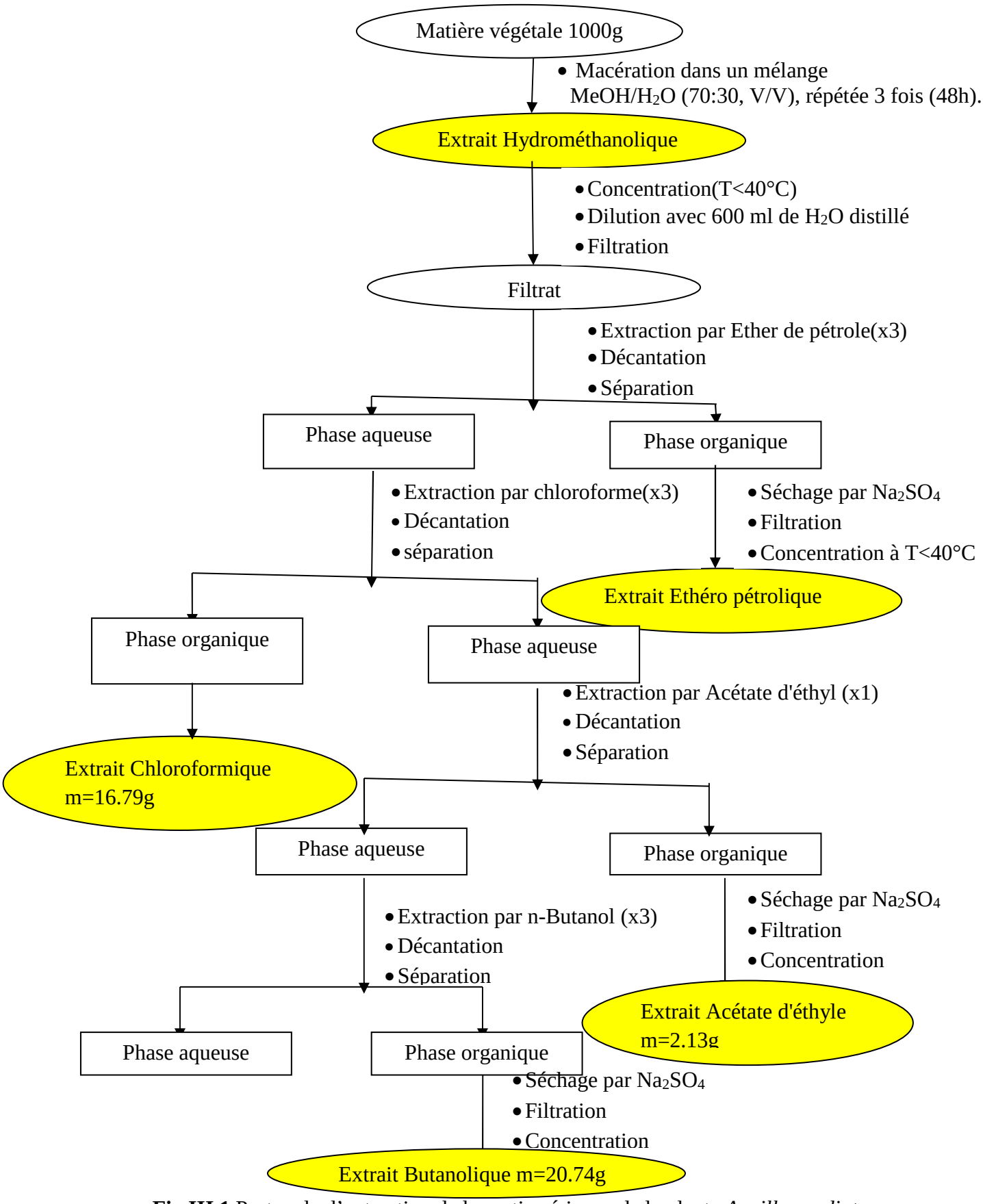


Fig.III.1 Protocole d'extraction de la partie aérienne de la plante *Anvillea radiata*

Les trois phases organiques ainsi obtenus (chloroforme, acétate d'éthyle, n-butanol) sont concentrés à sec sous pression réduite, pesées et les rendements sont donnés dans le tableau III.2

Tableau III.2 Rendements des extraits

Matière végétale	Extraits	Masse(g)	Rendement (%)
	Chloroforme	16.79	1.67
	Acétate d'éthyle	2.13	0.21
	n-Butanol	20.74	2.07

Les résultats obtenus montrent que parmi les différents extraits, l'extrait de n-Butanol représente le rendement le plus élevé (2.07%) par rapport au poids total de plante sèche, suivi par l'extrait Chloroformique (1.67 %), puis l'Acétate d'éthyle (0.21%).

Le rendement n'est que relative et semble être lié à l'origine géographique, aux conditions et à la durée de stockage de la récolte et aussi aux méthodes d'extraction appliquées.

En plus de ces aspects quantitatives, quelque soit la méthode d'extraction appliquée elle doit tenir compte de la qualité d'extrait, autrement dit de la bio-activité de ces principes actifs. Dans la présente étude, la méthode de macération sous agitation permet d'accélérer le processus d'extraction et de minimiser le temps de contact du solvant avec l'extrait tout en préservant la bio-activité de ses constituants. De même, le déroulement de cette extraction à température ambiante ainsi que l'épuisement du solvant à pression réduite permet d'obtenir le maximum des composés et de prévenir leur dénaturation ou modification probable dues aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction.

III.4 Chromatographie analytique sur couche mince

Pour avoir une idée sur la composition chimique des extraits, une chromatographie analytique sur couche mince a été réalisée en utilisant deux systèmes solvants, Ether de pétrole/Acétate d'éthyl : 1/1 pour la phase chloroformique et Acétate/MeOH/Eau :10/1/1 pour la phase d'acétate d'éthyle et butanolique . Sous lumière UV à 365 nm les différentes taches de produits qui se présentent sur les chromatogrammes ont été délimitées Fig.III.2 et 3.les observations et résultats sont regroupés au tableau III.3.

Les couleurs des spots et leurs Rf observés sous lampe UV à 356 nm suite à une analyse par chromatographie sur couche mince, nous ont permis de révéler la présence des différentes classes des métabolites secondaires, comme les flavonoids. La confirmation de la présence des flavonoides à été réalisée par l'ajout de Chlorure d'aluminium (AlCl3) à 2 % préparé dans le méthanol . Le chlorure d'aluminium provoque le changement de la couleur des taches obtenues.

Les spots jaunes peuvent être Flavonoles avec un 3-0H libre et avec ou sans 5-0H libre.

Les spots blues peuvent probablement être respectivement des Flavones et flavanones manque d'un 5-0H libre, flavonols manque un 5-0H libre avec 3-0H substitué ou isoflavones manque d'un 5-0H libre.

Les spots violet ou mauve Habituellement des flavones avec 5-0H 4'-OH ou 3-0H substitué ou flavonols avec 5-0H et 4'-OH. Certains 5-0H flavanones et 4'-OH chalcones manque des groupes hydroxyles à cycle B **[6].**

Tableau III.3 Les résultats de la chromatographie sur couche mince des extraits d'*Anvillea radiata*

Phase chloroformique		Phase d'acétate d'éthyle		Phase butanolique	
Spot coloré sous UV à 365 nm	Rf	Spot coloré sous UV à 365 nm	Rf	Spot coloré sous UV à 365 nm	Rf
Marron	0.81	Violet sombre	0.94	Violet sombre	0.97
Jaune	0.79	mauve	0.90	mauve	0.93
violet clair	0.76	Marron	0.80	Jaune	0.81
Orangé	0.51	Jaune	0.61	Marron foncé	0.72
Jaune	0.45	Marron foncé	0.48	Marron	0.55
Blue	0.35	Marron clair	0.22	Marron cair	0.2
mauve	0.24	Jaune	0.14	Marron	0.06
Marron clair	0.15	Blue fluorescent	0.06	Jaune marron	0.02
Jaune clair	0.06				

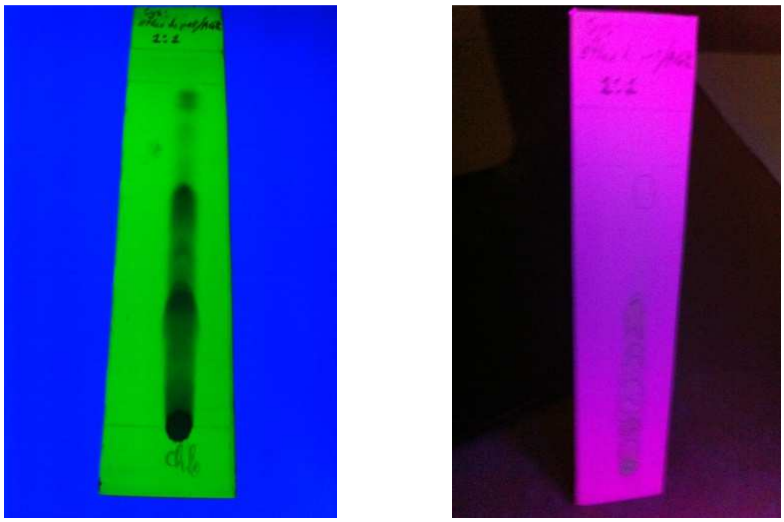


Fig.III.2 Photo du chromatogramme résultant de l'analyse d'extrait chloroformique par le système (éther de pétrole/chloroforme :1/1)

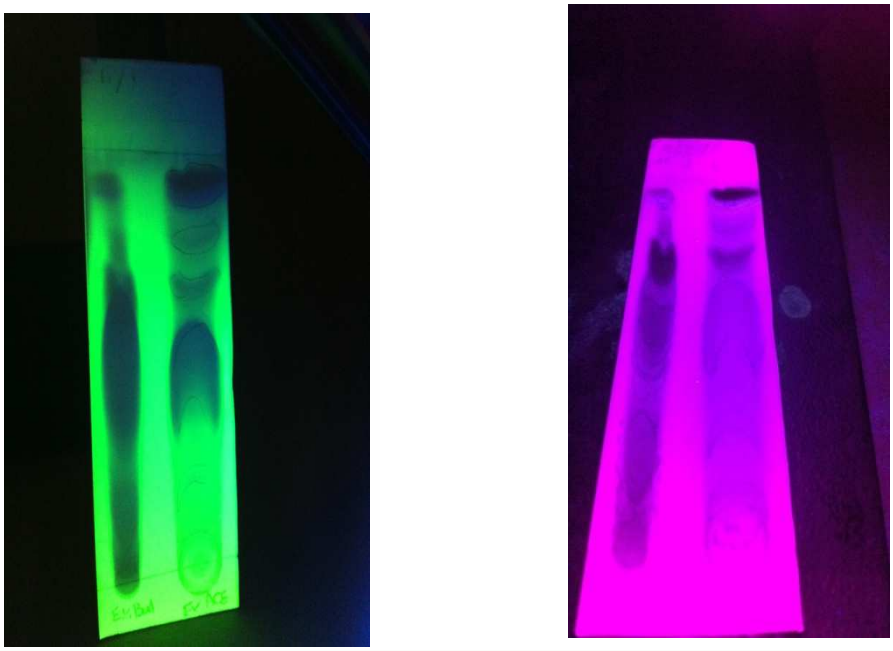


Fig.III.3 Photo du chromatogramme résultant de l'analyse de deux extraits acétate d'éthyle et butanolique par le système (AcOEt/MeOH/H_2O :10/1/1).

III.5 Fractionnement chromatographique de l'extrait Chloroformique de la plante *Anvillea radiata*

L'extrait chloroformique, qui a montré une activité allélopathique significative vis-à-vis des graines de (*Raphanus raphanistrum*), a été grossièrement fractionné sur une flash colonne chromatographique 1 de gel de silice, L'extrait chloroformique (2.6 g) dissout dans le méthanol, est mélangé à une petite quantité de gel de silice, l'ensemble est séché sous vide, puis pulvérisé jusqu'à obtention d'une poudre homogène. Cette dernière, est déposée sur une colonne de gel de silice, préparée dans la proportion 5/5 : chloroforme/ acètate d'éthyl , les fractions regroupées en 5 lots (F1 à F5) , utilisant comme système d'élution Chlor/AcOEt 5/5, 2/8, AcOEt, MeOH, Les fractions recueillies sont regroupées suivant la similitude de leur profil chromatographique sur couche mince de gel de silice, les plaques analytiques ont été développées avec différents systèmes, et visualisées sous lampe UV, à 254 et 365nm, puis révélées avec komarophsky.

Le schéma n° 1 suivant résume la simplification chromatographique grossière de l'extrait chloroformique de la partie aérienne de la plante *Anvillea radiata*

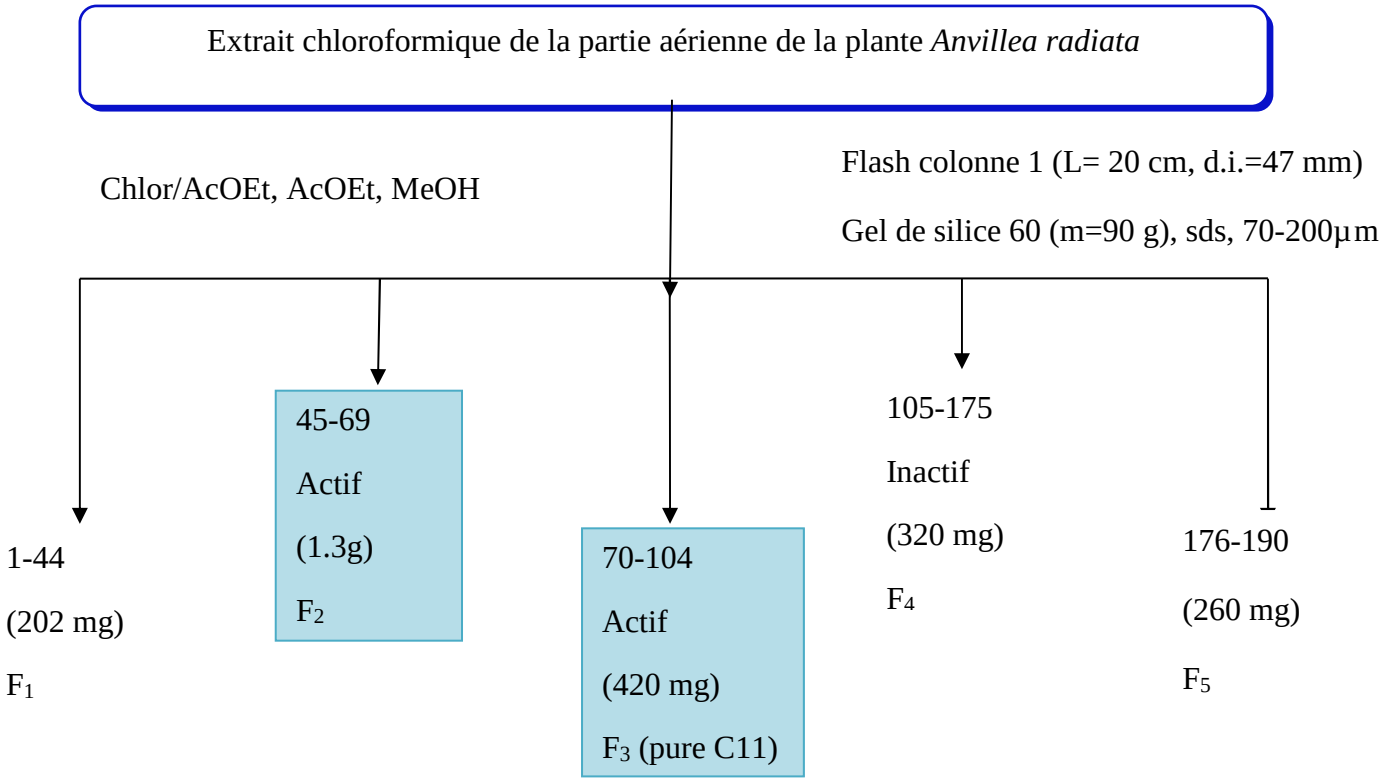
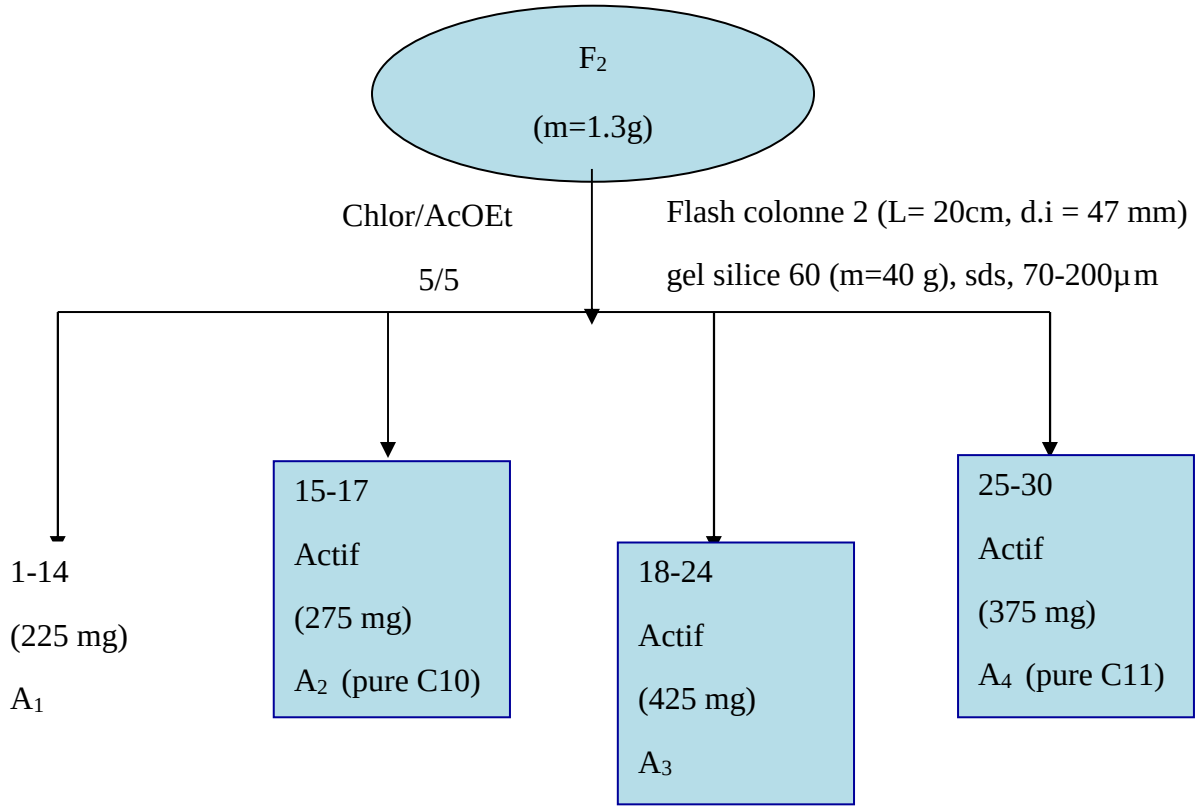


Schéma n° 2. Isolement des produits naturels C10 et C11.



III.5.1 Séparation des composés

- La fraction F_3 renferme un produit majoritaire (C11) soluble dans le chloroforme, Ce produit incolore sur plaque CCM de gel de silice donne une coloration noir après révélation à base de komarophsky.
- Le mélange de fractions 45 à 69 (F_2; 1.3 g) (schéma n°1) non complexe d'après son analyse sur plaque CCM a été simplifié sur une colonne 2 de gel de silice en 30 fractions de 20 mL chacune, regroupées en 4 lots : de A_1 à A_4, utilisant une phase mobile $CHCl_3$/AcOEt 5:5, qui a permet d'isoler deux produits purs: C10 (m=275mg), C11 (375 mg), ils apparaîent après révélation à base de vanilline sous forme d'un spot unique de coloration violette et noir avec komarophsky

.

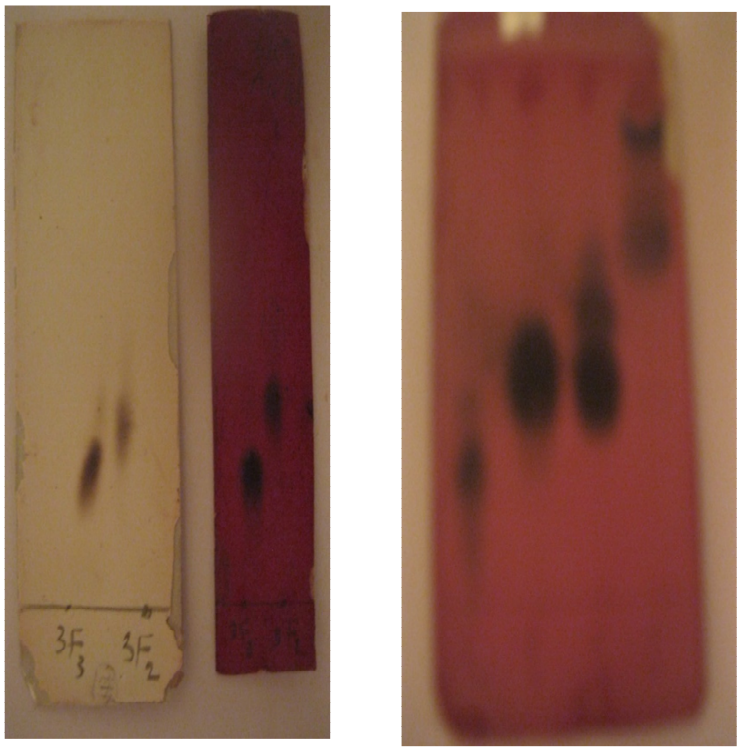


Fig.III.4 Révélation de C10 et C11

III.6 Fractionnement chromatographique de l'extrait butanolique de la plante *Anvillea radiata*

L'extrait butanolique, qui a montré une activité antioxydante significative, a été grossièrement fractionné sur une Flash colonne 3 de gel de silice, en 536 fractions de 20 ml chacune regroupées en 12 lots (B_1 à B_{12}) L'extrait butanolique (10 g) dissout dans le méthanol, est mélangé à 5g de gel de silice, l'ensemble est séché sous vide, puis pulvérisé jusqu'à obtention d'une poudre homogène. Cette dernière, est déposée sur une colonne de gel de silice, préparée dans le dichlorométhane et enrichi progressivement en méthanol. Les fractions recueillies sont regroupées suivant la similitude de leur profil chromatographique sur couche mince de gel de silice, les plaques analytiques ont été développées avec différents systèmes de phase mobile, et visualisées sous lampe UV, à 254 et 365nm.

Tableau III.4 Fractionnement chromatographique de l'extrait butanolique de la plante *Anvillea radiata*

Système d'élution		Lot de fractions	N° de la fraction	Poids (mg)
CH_2Cl_2 %	MeOH %			
95	5	1-15	B_1	473
90 **88**	10 12	16-45	B_2	285
86	14	46-59	B_3	381
84	16	60-73	B_4	245
82	18	74-88	B_5	231
80	20	89-104	B_6	436
78 à 60	22 à40	105-206	B_7	3117
60	40	206-218	B_8	334
55 à 35	45 à 65	219 -320	B_9	3055
30 à15	70 à 85	321-385	B_{10}	814
10 à 5	90 à 95	386-470	B_{11}	280
0	100	471-536	B_{12}	303

III.6.1 Séparation des composés

La fraction B9 contient un précipité blanc jaunâtre, ce produit est purifié par lavages successifs au méthanol. Il apparaît sous forme de deux spots de couleurs: marron et bleue sur plaque analytique de gel de silice sous lampe UV à 365 nm, il a subit une séparation sur plaques préparative de gel de silice, éluées par le système : AcOEt/méthanol (2/8), qui a permet d'isoler le composé **P1.** Purifie sur colonne 4, utilisant comme système d'élution AcOEt /MeOH: 3/7, 2/8, MeOH, conduisant à une produit pur **P1.** 143 mg de poids, il apparaît après révélation par $FeCl_3$ sous forme d'un spot unique de coloration grise.

III.6.2 Etude des fractions B9, B11, B12

Les fractions: B9, B11, B12 ont subit une séparation sur plaque préparative de gel de silice, éluées par le système : AcOEt/méthanol/eau : 6/4/1, qui a permet d'isoler quatre produits: ARM17, ARJ11, AZ17, AH11.

III.7 Etude structurale des composés isolés

III.7.1 Techniques spectroscopiques utilisées :

L'élucidation structurale des substances naturelles isolées a été établie en utilisant les techniques spectroscopiques telles que :

- RMN 1D (^{1}H et ^{13}C).
- RMN 2D avec ses expériences ^{1}H-^{1}H COSY, CHCorr, (HMQC,HMBC) et NEOSY.
- Spectrométrie de masse en mode ES.
- Spectroscopie infrarouge (IR).

Les spectres RMN 2D ils permettent une corrélation des fréquences de résonance de différents noyaux. On distingue des corrélations homos ou hétéronucléaires, selon F1 et F2 (les deux axes de fréquences) contiennent des fréquences de noyaux de même espèce ou d'espèces différentes **[7].**

***Expérience ^{1}H-^{1}H COSY (proton-proton COrrelation SpectroscopY) :**

Cette expérience permet la visualisation des taches de corrélation dites aussi signaux ou pics d'intersection hors diagonale indiquant les noyaux qui sont couplés entre eux. L'expérience permet à l'aide de ces pics d'intersection, de noter les corrélations entre protons géminés non équivalents et vicinaux et d'obtenir des informations sur la structure moléculaire (constante de couplage J_{H-H}).

***Expériences CHCorr (CHCorrelation) et HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) :**

Elles permettent de visualiser sur un spectre à deux dimensions (^{1}H-^{13}C) les taches de corrélation correspondant au couplage direct $\mathbf{1}J^{1}_{H\text{-}^{13}C}$ des protons avec les carbones qui les portent.

***Expérience HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) :**

Cette expérience permet de visualiser les taches de corrélation entre un noyau

^{13}C et un noyau ^{1}H via un couplage à longue distance **2***J*, **3***J* et parfois **4***J*. On peut observer les carbones quaternaires grâce aux protons se trouvant à des distances **2***J* ou **3***J*. Cette expérience permet de déterminer l'enchaînement du squelette carboné de la molécule étudiée.

***Expérience NEOSY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY):**

Les spectres NOESY ont le même aspect que le spectre COSY, on trouve le spectre 1D représenté sur la diagonale, les signaux observés hors diagonale sont dus aux interactions dipolaires ^{1}H-^{1}H de protons voisins dans l'espace, cette technique nous aide à étudier la stéréochimie d'un composé organique.

***Spectrométrie de masse ES (Ionisation par électrospray) [8]:**

L'électrospray se repose sur l'introduction d'une solution aqueuse du composé à analyser par un capillaire très fin portée à un haut potentiel. Cette tension crée des charges dans la solution et, à la sortie du capillaire, un spray de fines gouttelettes (1µ) se forme, souvent favorisé par une nébulisation pneumatique.

Dans la source à pression atmosphérique, ces gouttelettes rencontrent un flux d'azote chaud à contre courant qui conduit à l'évaporation progressive du solvant. Le premier effet est la diminution de la taille de la gouttelette ainsi que, corrélativement, l'augmentation de la densité de charges au sein de la solution. Lorsque la répulsion coulombienne excède la tension superficielle de la gouttelette, celle-ci explose en formant des gouttelettes de seconde génération, beaucoup plus petites. Après plusieurs étapes de désintégration, la densité de charge devient telle dans la gouttelette que le champ électrostatique local, très intense conduit à la désorption des ions par effet de champ. Cela se traduit par la production d'ions en phase gazeuse, physiquement intacts et pouvant porter plusieurs charges en raison de l'attachement de protons aux sites basiques des molécules. L'interface entre source et analyseur de masse est réalisée par une série de lentilles (cônes d'échantillonnage, "écumoire" ou *skimmer*) qui réalise, d'une part la désolvatation complète des ions et, d'autre part leur **activation par collision**, phénomène que l'on peut mettre au profit pour obtenir des ions fragments et donc des informations de structure.

III.7.2 Etude Structurale du composé C11

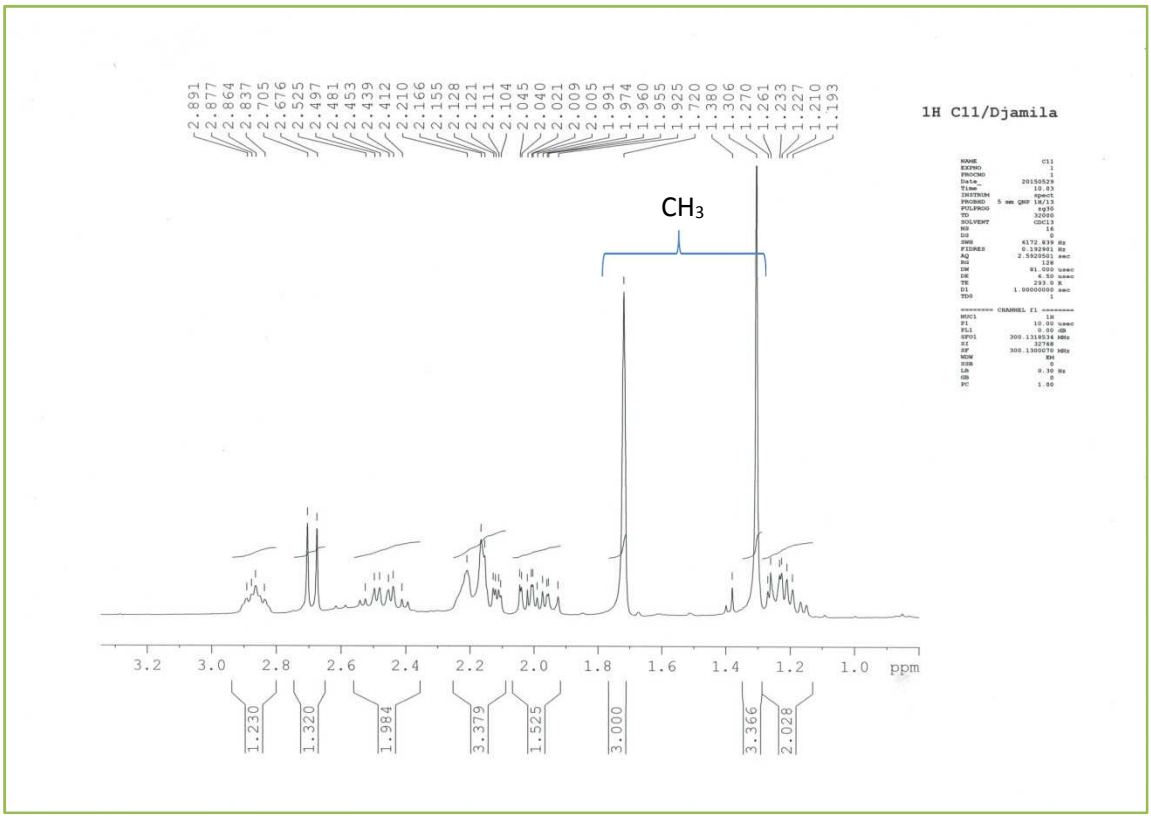


Fig.III.5 Spectre RMN ^{1}H (300MHz; $CDCl_3$) du composé C11

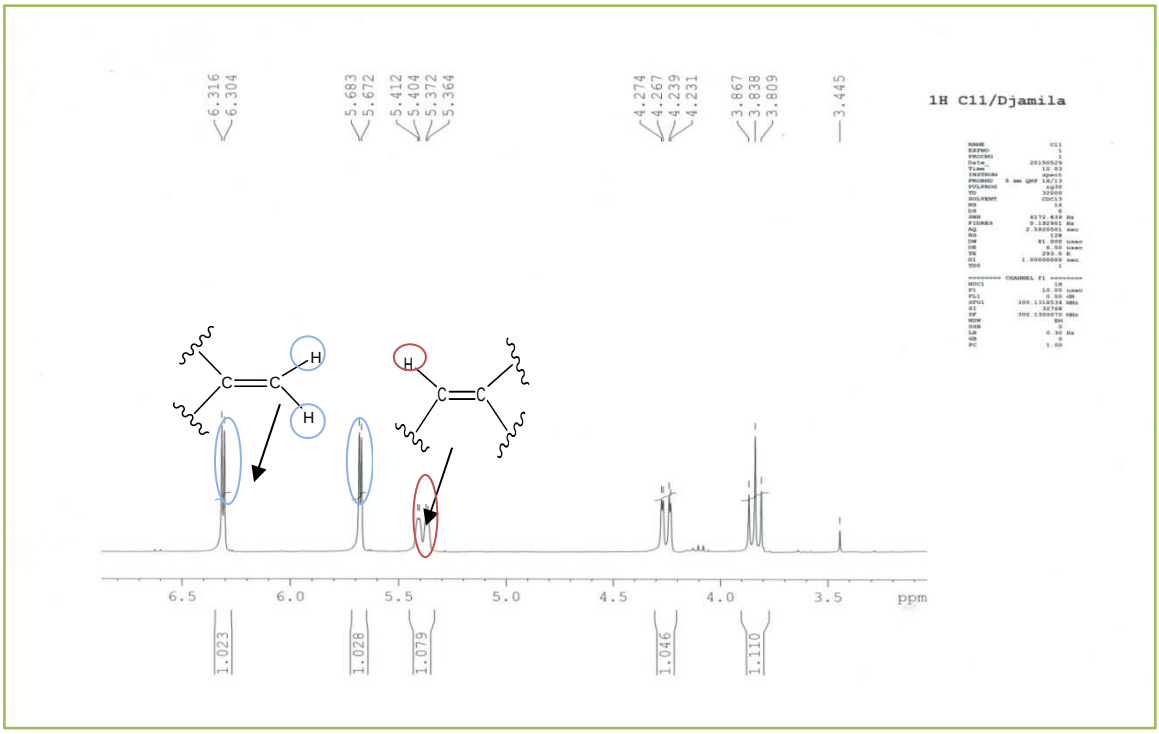


Fig.III.6 Spectre RMN ^{1}H (300MHz; $CDCl_3$) du composé C11

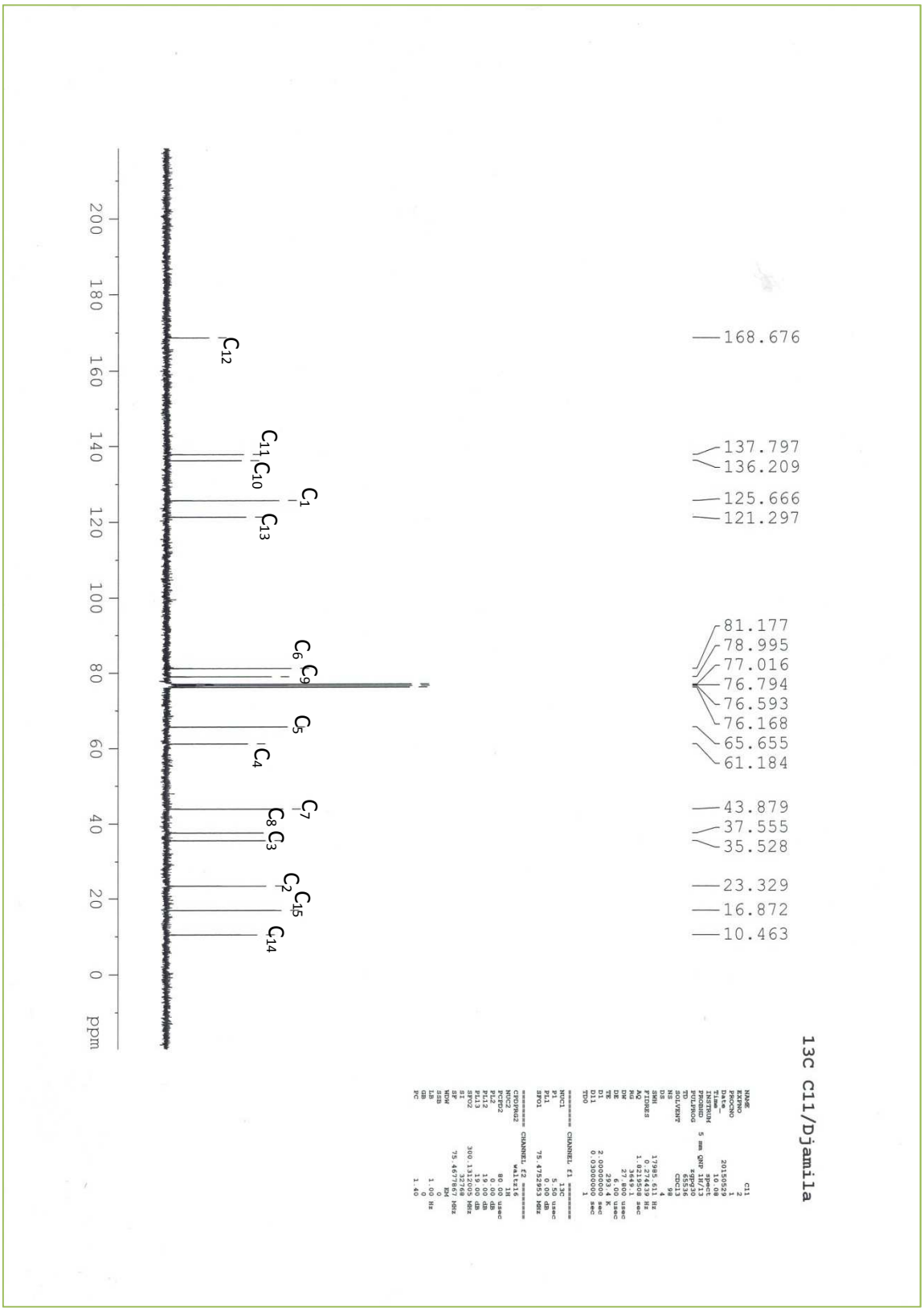


Fig.III.7 Spectre RMN ^{13}C (75 MHz; $CDCl_3$) du composé C11

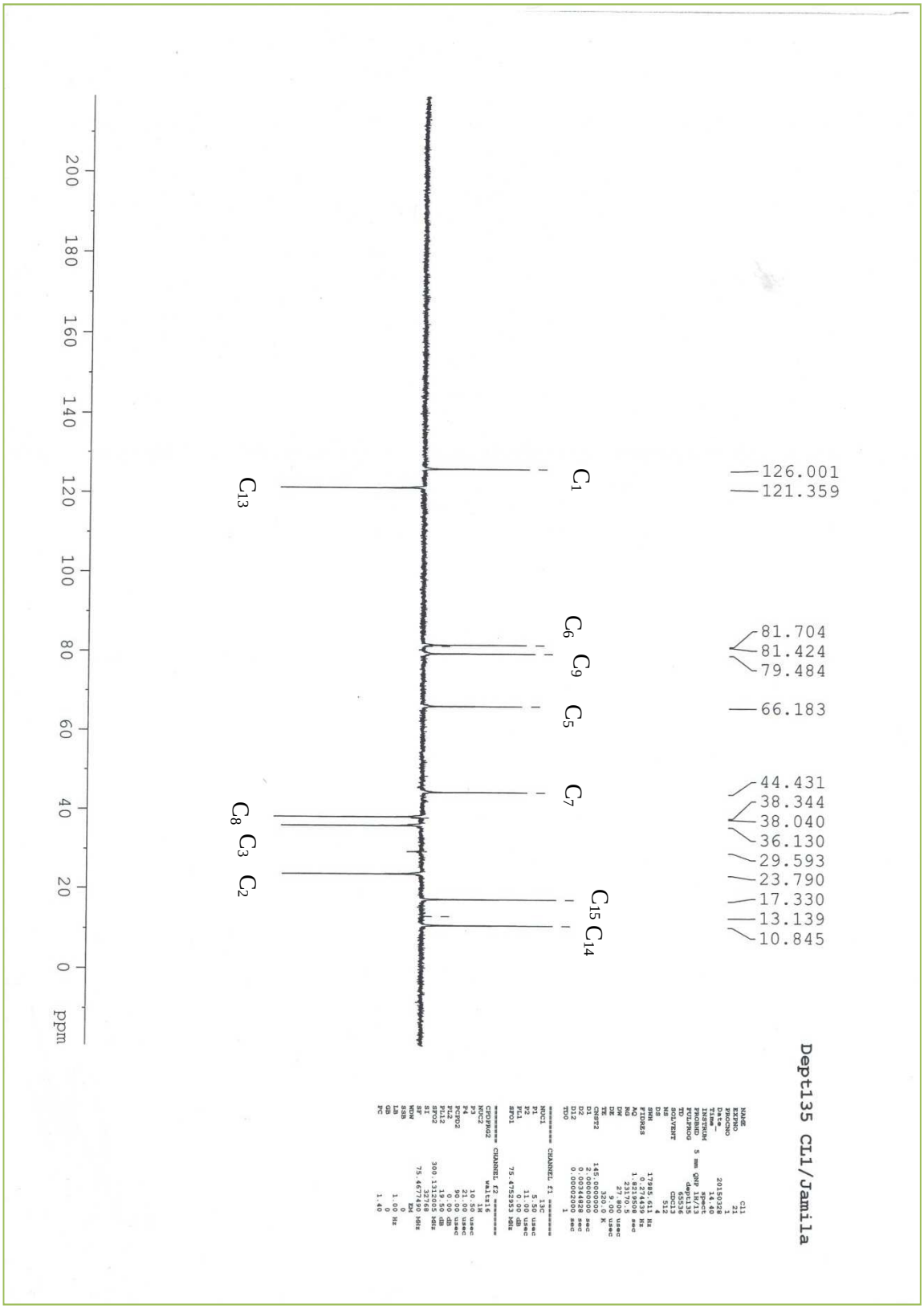


Fig.III.8 Spectre Dept135 (75 MHz; $CDCl_3$) du composé C11

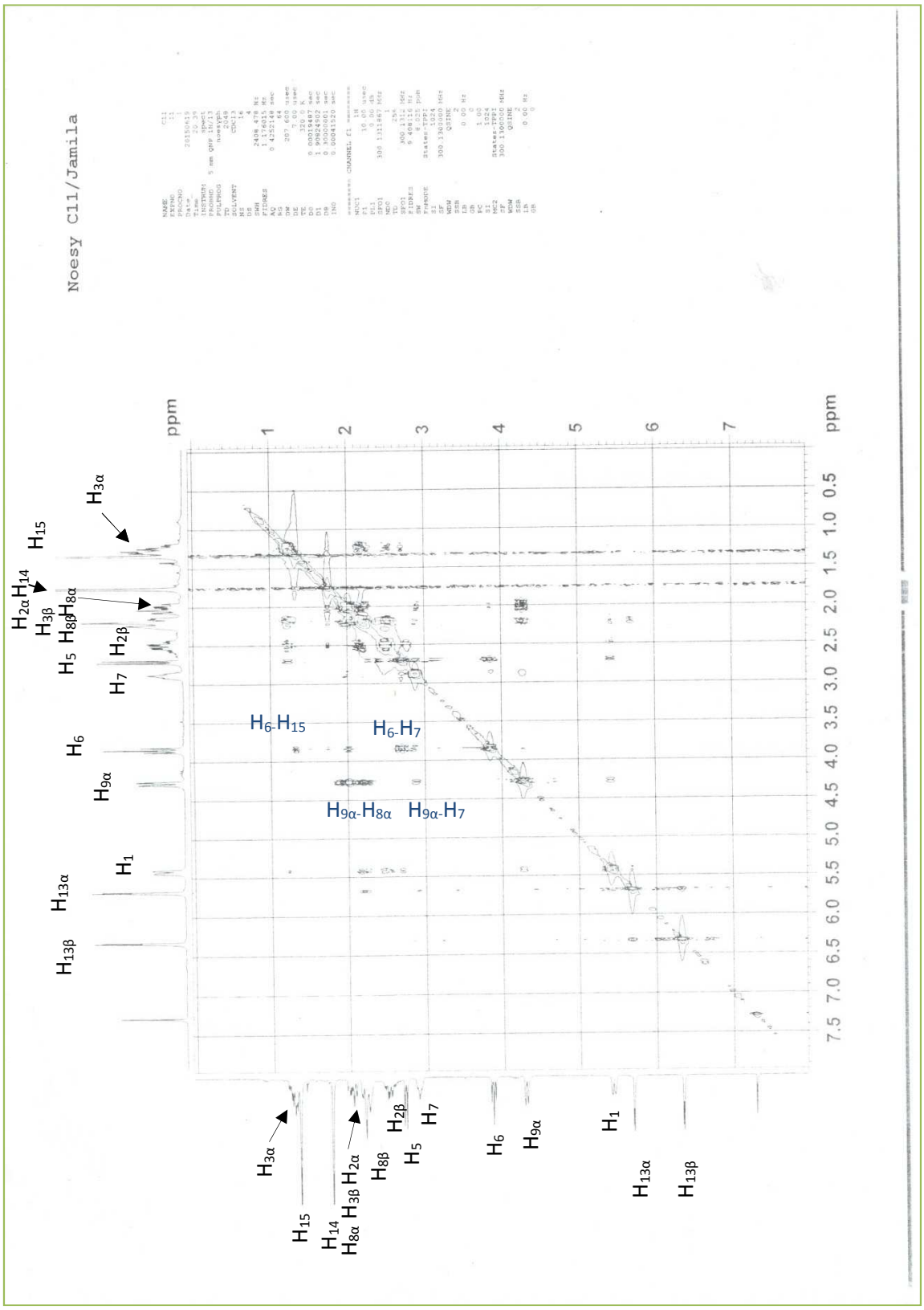
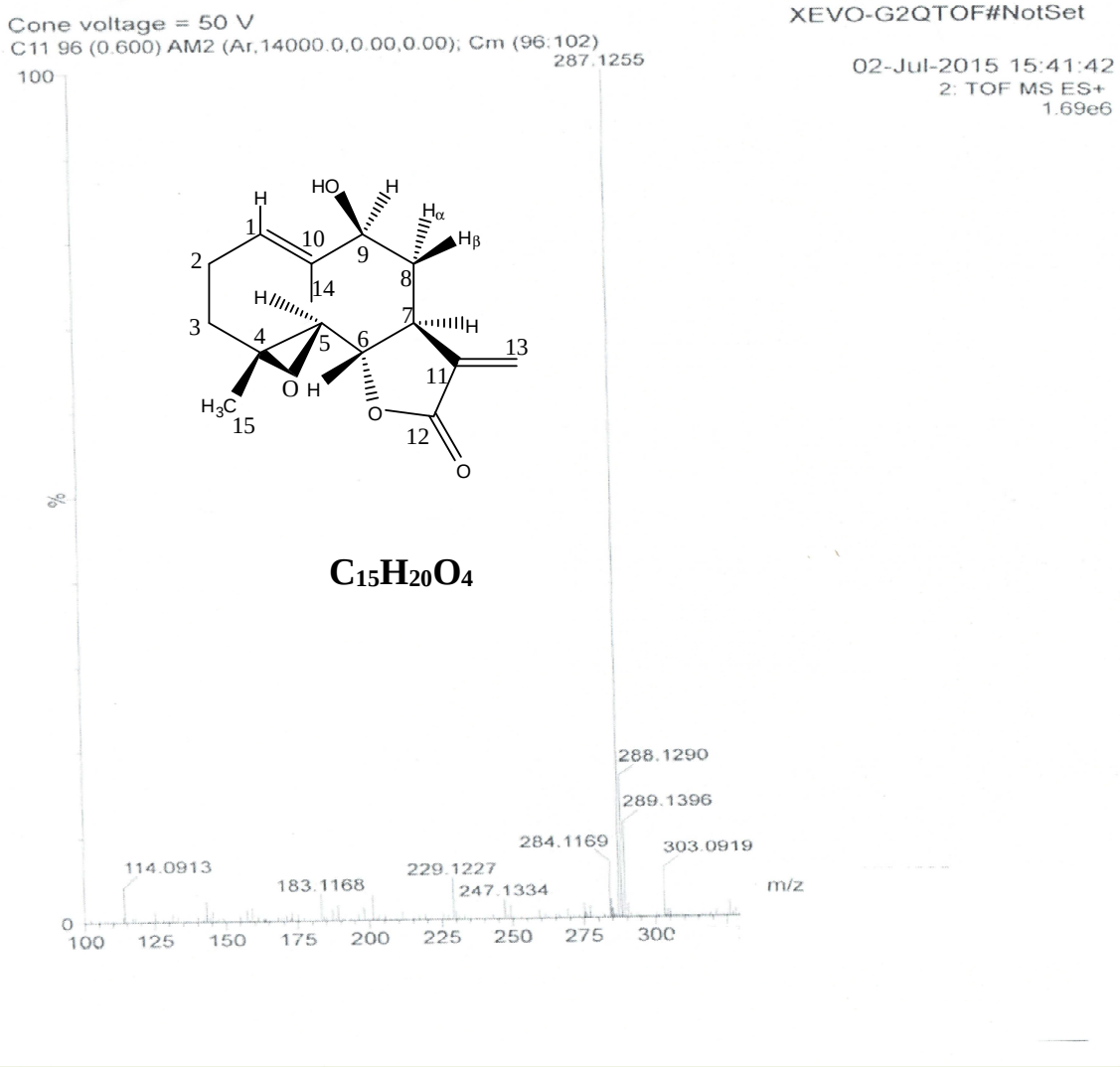


Fig.III.9 Spectre NEOSY (300 MHz; $CDCl_3$) du composé C11



$C_{15}H_{20}O_4$

Fig.III.10 Spectre de Masse ES du composé C11

III.7.2.1 Structure du composé C11

Le produit **C11** présent en spectroscopie de masse en ES (Fig.III.10) un pic ionique à *m/z* 287 attribuable à l'ion pseudomoléculaire $[M+Na]^+$ correspondant à la formule brute $C_{15}H_{20}O_4$ de poids moléculaire 264 g mol^{-1}.

En résonance magnétique nucléaire du proton, le spectre (Fig.III.5 et 6) comporte deux singulets de trois protons à 1.31 ppm et 1.72 ppm attribuables respectivement à des groupements méthyles.

- deux doublets dédoublés entre 5,68 et 6,31ppm relatifs à deux protons éthyléniques vicinaux.

- un doublet dédoublé à 5,36 ppm relatif à un proton éthylénique.

Le spectre de RMN ^{13}C (Fig.III.7) découplé totalement du proton, DEPT135 (Fig.III.8), enregistré à 300 *MHz* dans le $CDCl_3$: mettent en évidence la présence de :

-6 signaux dans la région allant de 10 à 44 ppm relatifs à des groupes CH, CH_2 et CH_3.

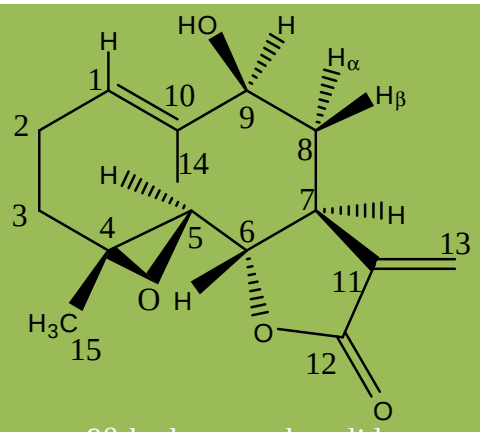
- quatre signaux dans la région allant de 61 à 81 ppm relatif à des carbones oxygénés

- quatre signaux sont aussi observés entre 121 et 138 ppm attribuables à des carbones hybridés Sp^2.

-un signal à 168.68 ppm relatif à un groupe carbonyle. Ce qui nous donne au total 15 carbones (Tableau n°3).

Le spectre de corrélation NOESY (Fig.III.9) montre d'une part une corrélation faible entre le proton H_6 et H_7, révèle un squelette de type héliangolane,confirmant ainsi que la lactone se boucle entre C_6-C_7 ,d'autre part montre des corrélations entre H_6, H_{8a} et H_{15} indiquant qu'ils se trouvent en position α par rapport au plan de la structure et d'autre part, on constate des corrélations entre le proton H_7 avec les protons H_{8b}, H_9, H_5 tous ces protons se trouvent en position β. l'ensemble de ces constatations nous mène à la structure de C11 : **9β-hydroxyparthenolide**

Tableau III.5 Données structurales du composé C11

composé C11				
$C_{15}H_{20}O_4$ PM :**264 g mol^{-1}** **Substance huileuse**		 9β-hydroxyparthenolide		
ES-MS **(mode ions positifs)** ***m/z* 287 [M+Na]$^+$**				
Atome	**δ ^{1}H**	**multi**	***J (Hz)***	**δ ^{13}C**
1	5.39	dd	12 ; 2.4	125.67
2α	2.18	m		23.33
2β	2.47	m		
3α	1.25	m		35.53
3β	2.1	m		
4	-	-		61.18
5	2.69	d	8.7	65.65
6	3.84	dd	8.7	81.18
7	2.86	m		43.88
8α	1.95	m		37.56
8β	2.22	m		
9α	4.25	dd	10.5 ; 2.1	79.00
10	-	-		136.20
11	-	-		137.80
12	-	-		168.68
13a	5.68	d	3.6	121.30
13b	6.31	d	3.6	
14	1.72	s	-	10.46
15	1.31	s	-	16.87

III.7.3 Etude Structurale du composé C10

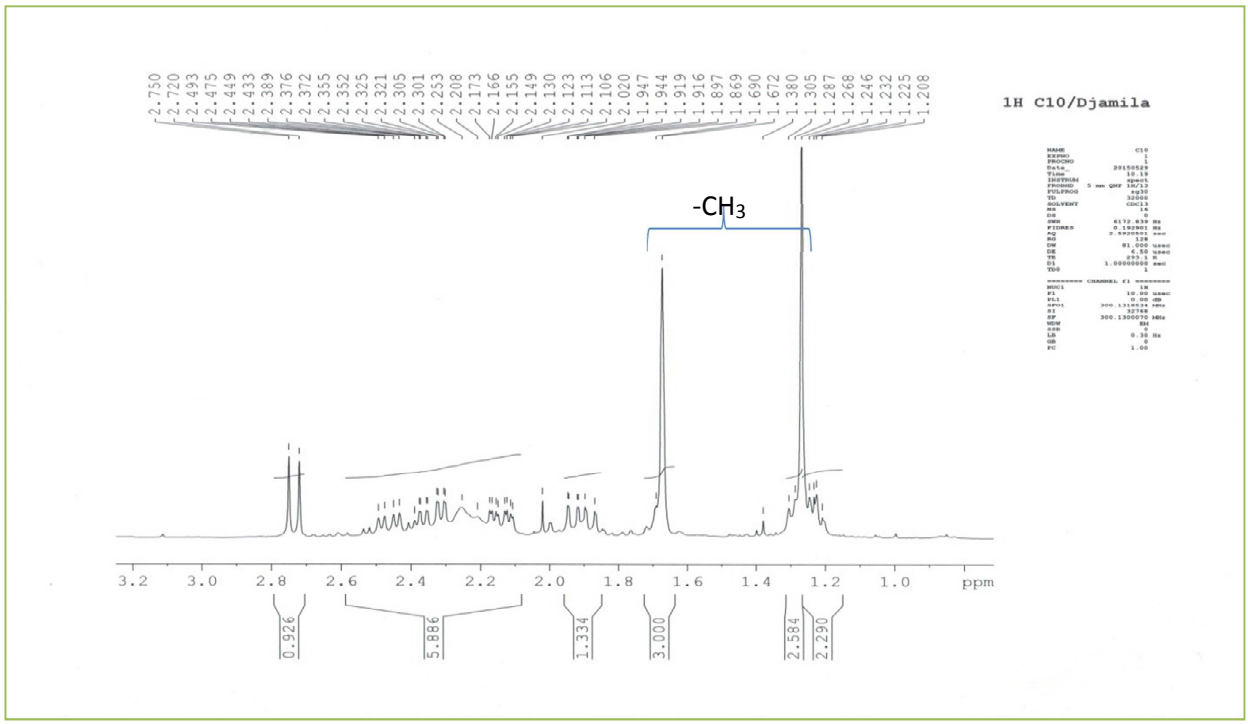


Fig.III.11 Spectre RMN ^{1}H (300MHz; $CDCl_3$) du composé C10

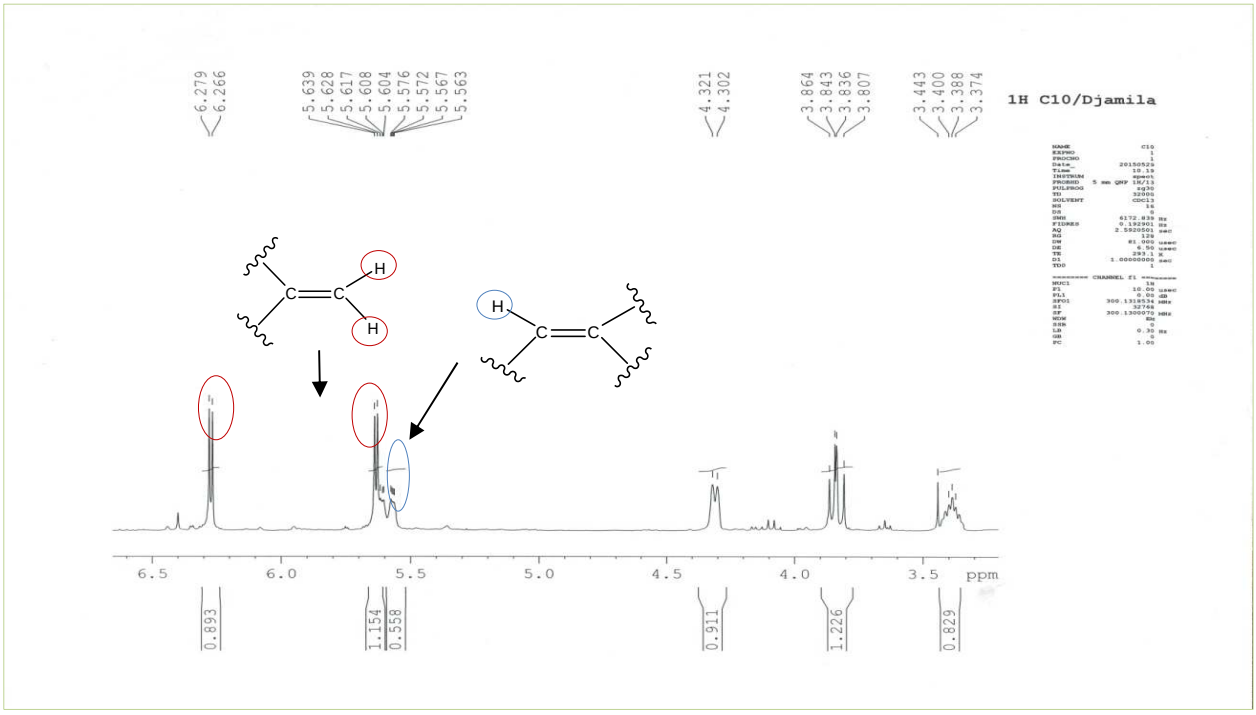


Fig.III.12 Spectre RMN ^{1}H (300MHz; $CDCl_3$) du composé C10

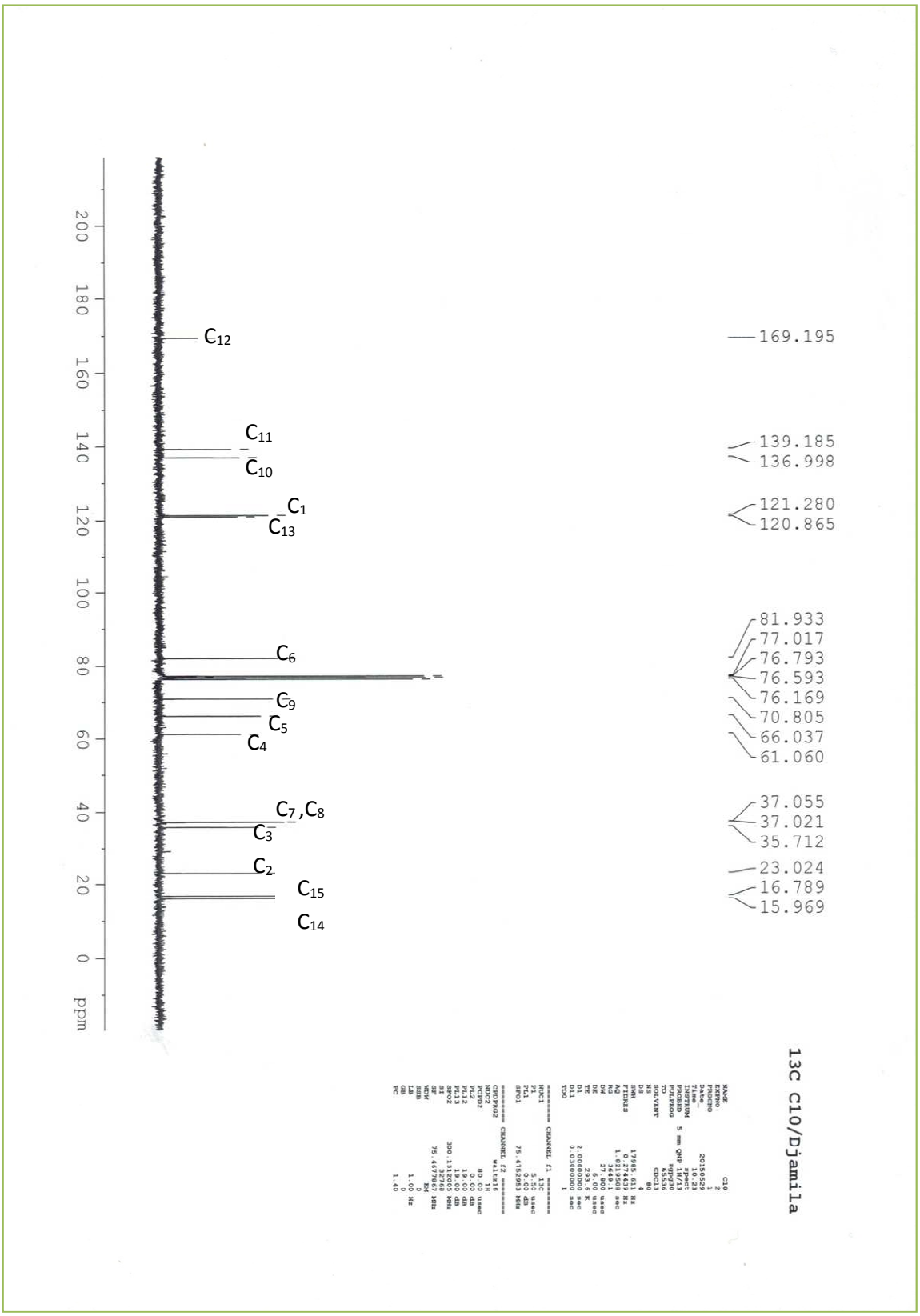


Fig.III.13 Spectre RMN ^{13}C (75 MHz; $CDCl_3$) du composé C10

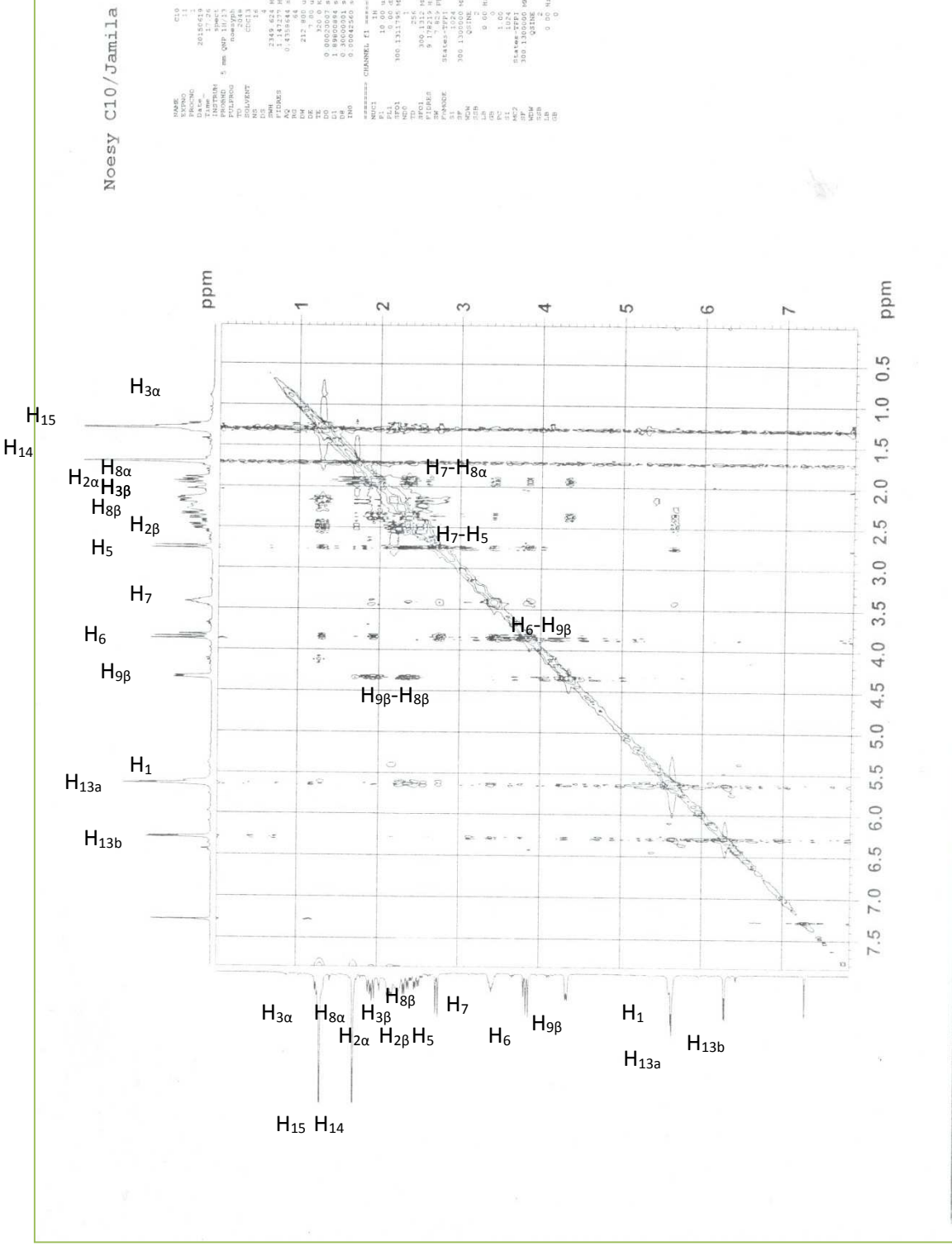


Fig.III.14 Spectre NEOSY (300MHz; $CDCl_3$) du composé C10

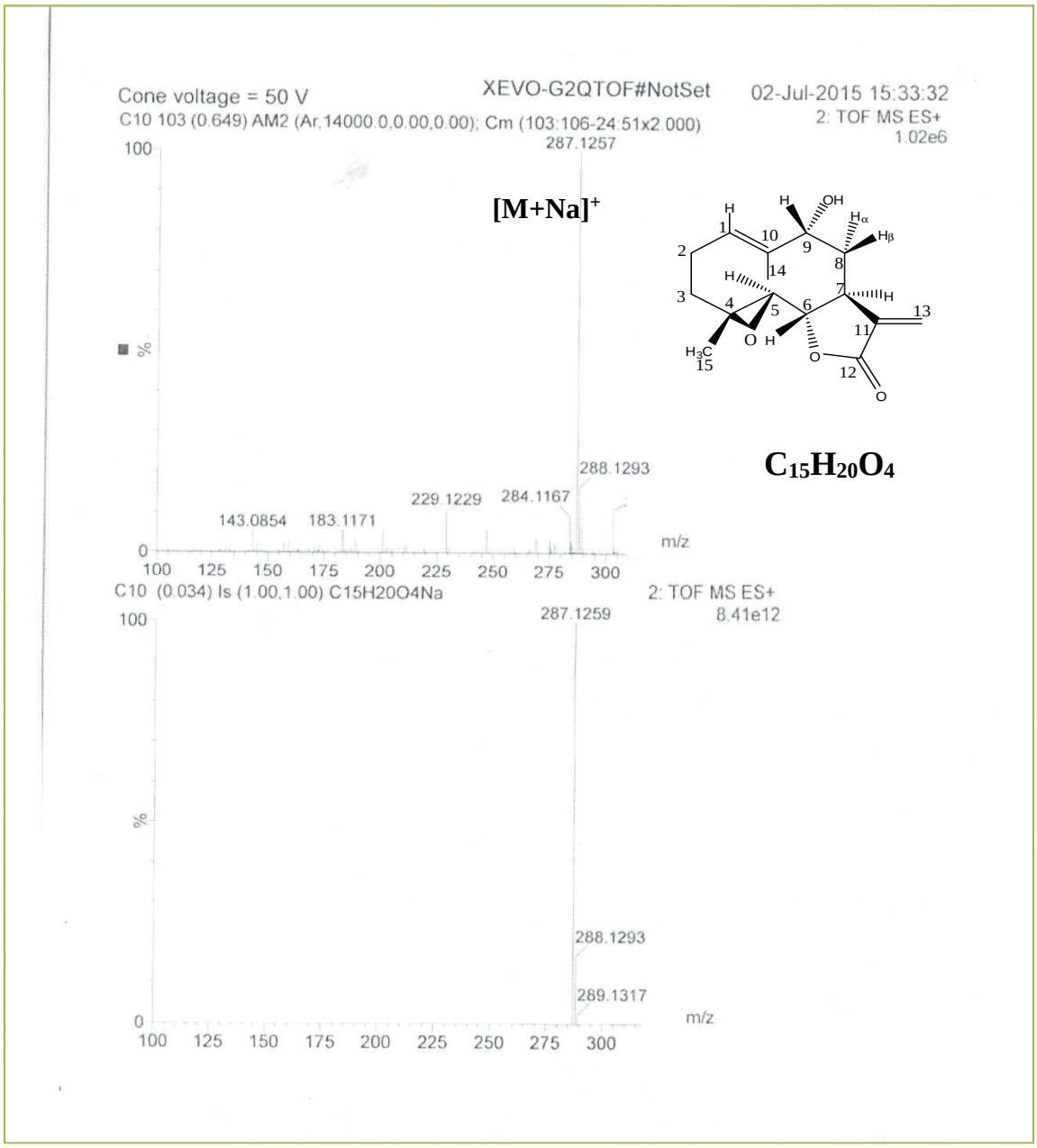


Fig.III.15 Spectre de masse ES du composé C10

III.7.3.1 Structure du composé C10

Le produit **C10** présent en spectroscopie de masse en ES (fig III.15) un pic ionique à *m/z* 287 attribuable à l'ion pseudomoléculaire $[M+Na]^+$ correspondant à la formule brute $C_{15}H_{20}O_4$ de poids moléculaire 264 g mol^{-1}.

En résonance magnétique nucléaire du proton (Fig.III.11 et12), le spectre comporte deux singulets de trois protons à 1.27 ppm et 1.67 ppm attribuables respectivement à des groupements méthyles.

- deux doublets dédoublés entre 5,63 et 6,27 ppm relatifs à deux protons éthyléniques vicinaux.
- un doublet dédoublé à 5,59 ppm relatif à un proton éthylénique.

Le spectre de RMN ^{13}C (Fig.III.13) découplé totalement du proton, enregistré à 300 *MHz* dans le $CDCl_3$: mettent en évidence la présence de :

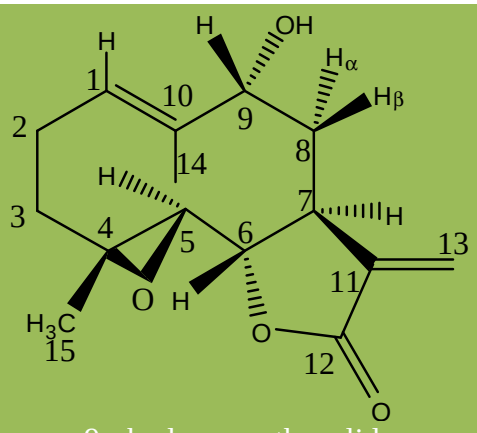
-6 signaux dans la région à allant de 15.9 à 37.05 ppm relatifs à des groupes CH, CH_2 et CH_3 de type Sp3.

- quatre signaux dans la région à allant de 61 à 81.93 ppm relatif à des carbones oxygénés
- quatre signaux sont aussi observés entre 121 et 139.2 ppm attribuables à des carbones hybridés Sp^2.

-un signal à 169.19 ppm relatif à un groupe carbonyle. Ce qui nous donne au total 15 carbones (Tableau III.5).

La structure de C10 est similaire à celle de C11 sauf en positon C_9 où la Fonction OH est en position α, sur le spectre RMN^{1}H montre que le proton H_7 est en position axial vue les constantes de couplage de15 ($H_{8\alpha}$) et 9Hz (H_5) indiquant que H_7 est axial (α) de même que H6 (β); le spectre de corrélation NEOSY (Fig.III.14) montre d'une part des corrélations entre H_6, H_9 et $H_{8\beta}$ indiquant qu'ils se trouvent en position β par rapport au plan de la structure et d'autre part, on constate des corrélations entre le proton H_7 avec les protons H_5, $H_{8\alpha}$ tous ces protons se trouvent en position α, l'ensemble de ces constatations nous mène à la structure de C10: **9α-hydroxyparthenolide**

Tableau III.5 Données structurales du composé C10

composé C10				
$C_{15}H_{20}O_4$ PM :**264 g mol^{-1}** **Substance huileuse**	 9α-hydroxyparthenolide			
ES-MS **(mode ions positifs)** ***m/z* 287 [M+Na]$^+$**				
atome	**δ ^{1}H**	**multi**	***J (Hz)***	**δ ^{13}C**
1	5.59	m	-	121.28
2α	2.18	m	-	23.02
2β	2.42	m		
3α	1.25	m	-	35.71
3β	2.15	m		
4	-	-	-	61.06
5	2.74	d	9	66.04
6	3.84	dd	6.3; 8.7	81.93
7	3.40	m	-	37.06
8α	1.90	ddd	15;8.4; 0.9	37.02
8β	2.32	ddd	15.3;6; 1.2	
9	4.31	dl	5.7	70.81
10	-	-	-	137.0
11	-	-	-	139.19
12	-	-	-	169.20
13a	5.63	d	3.3	120.87
13b	6.27	d	3.9	
14	1.67	s	-	16.0
15	1.27	s	-	16.79

III.7.4 Etude Structurale du composé P1

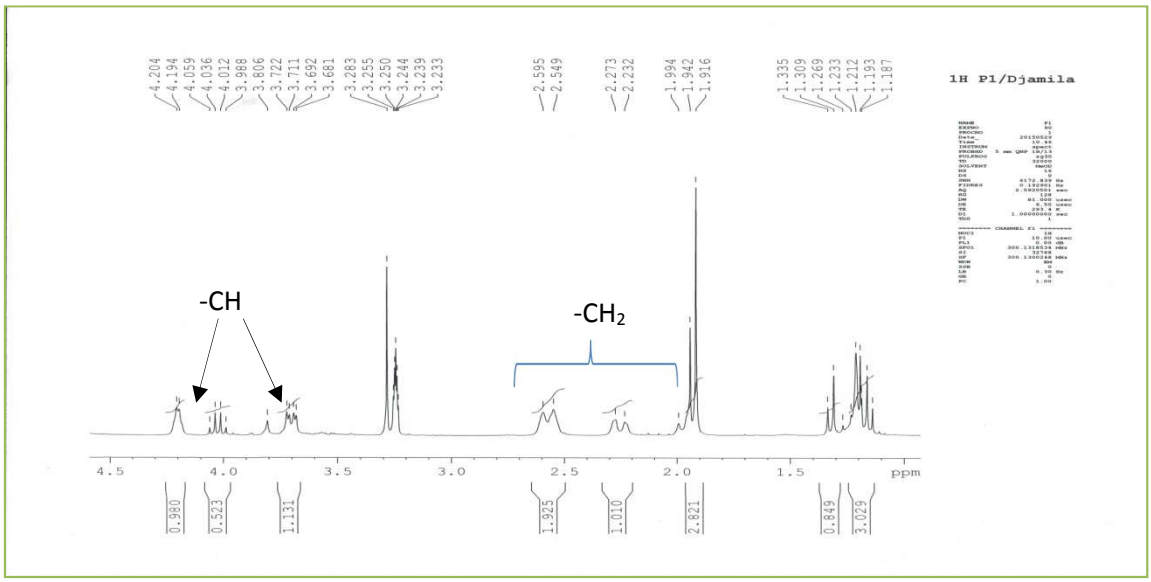


Fig.III.16 Spectre RMN ^{1}H (300MHz; MeOD) du composé P1

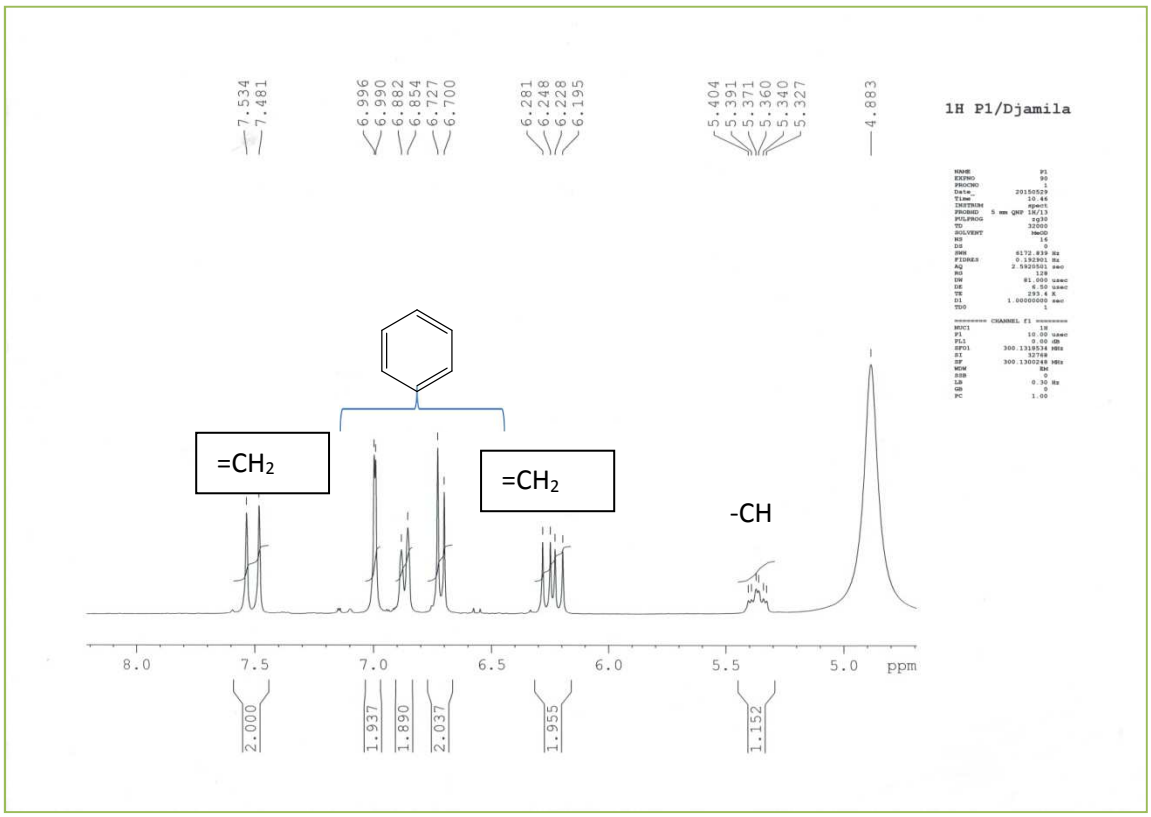


Fig.III.17 Spectre RMN ^{1}H (300MHz; MeOD) du composé P1

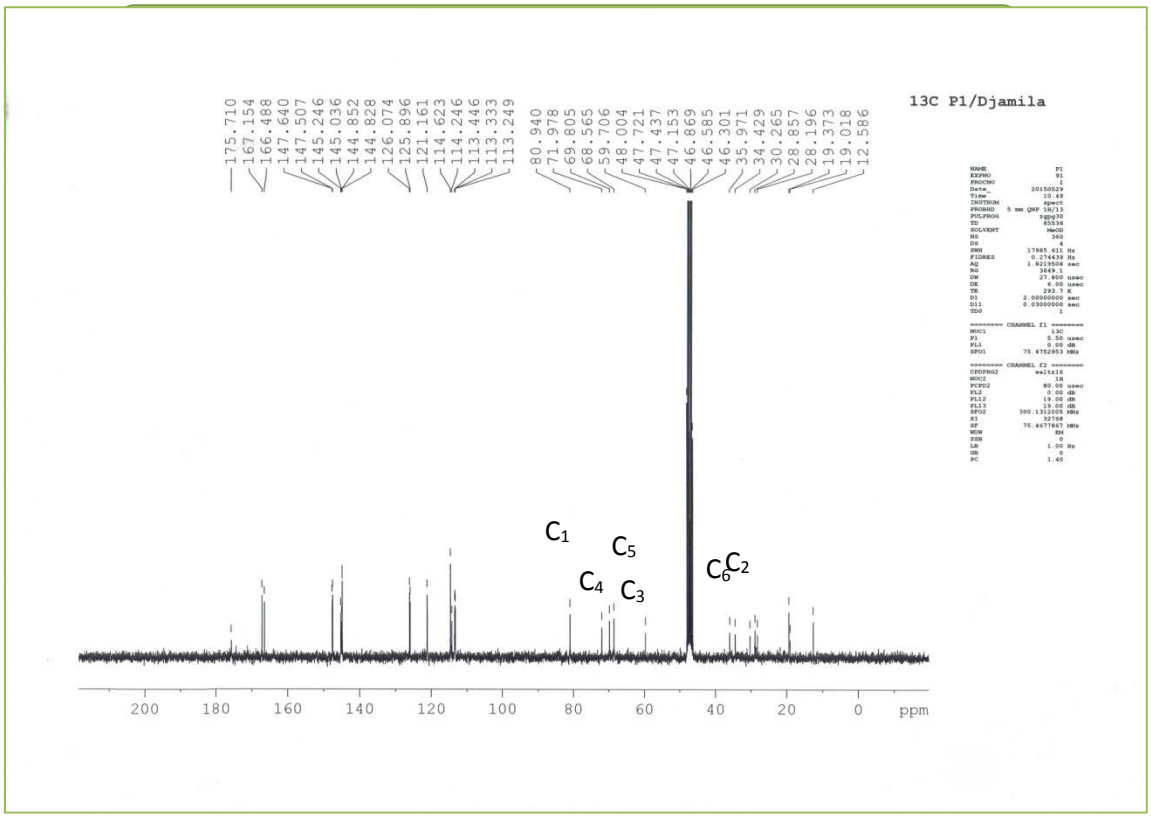


Fig.III.18 Spectre RMN ^{13}C (75 MHz; MeOD) du composé P1

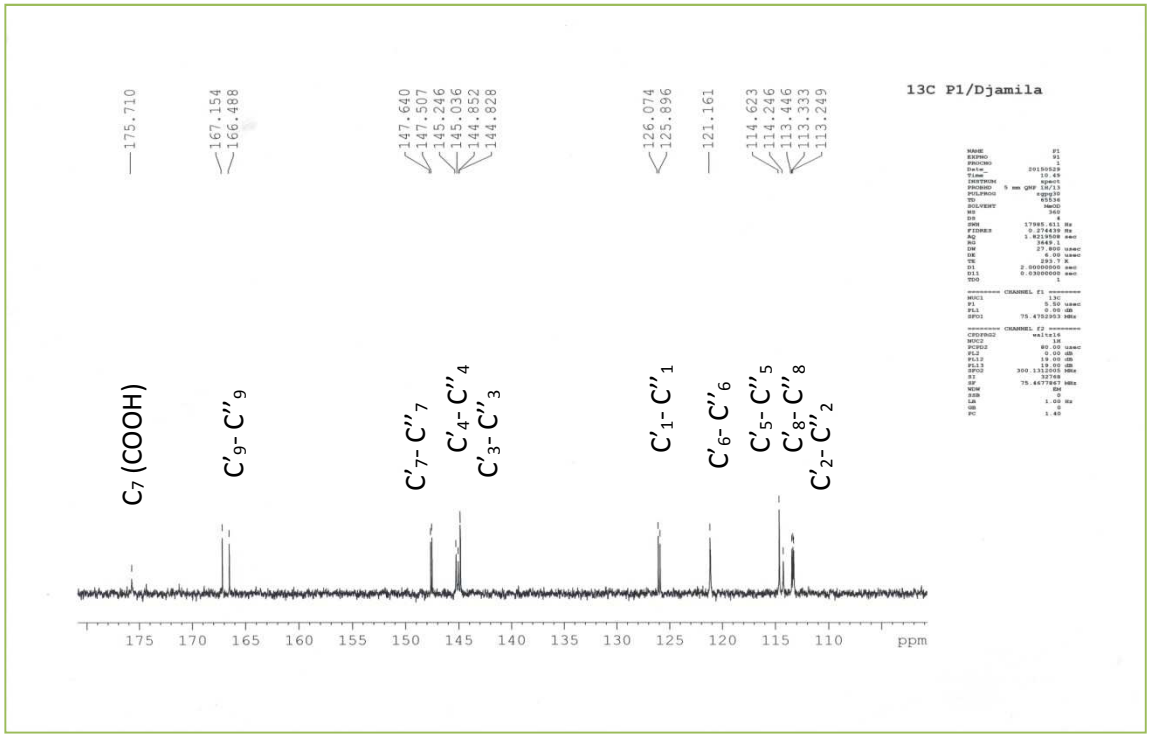


Fig.III.19 Spectre RMN ^{13}C (75 MHz; MeOD) du composé P1

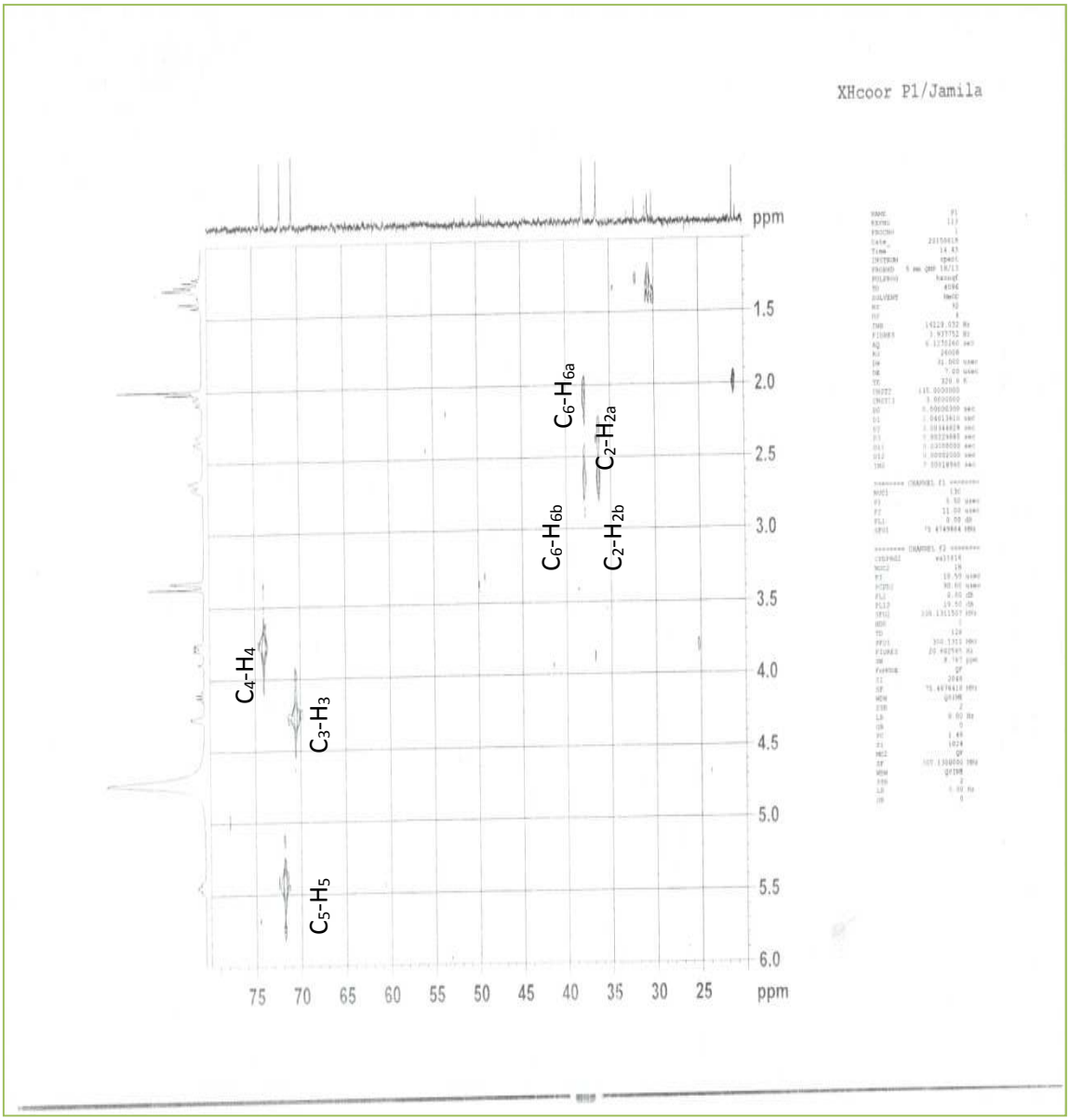


Fig.III.20 Spectre CHcoor (300MHz; MeOD) du composé P1

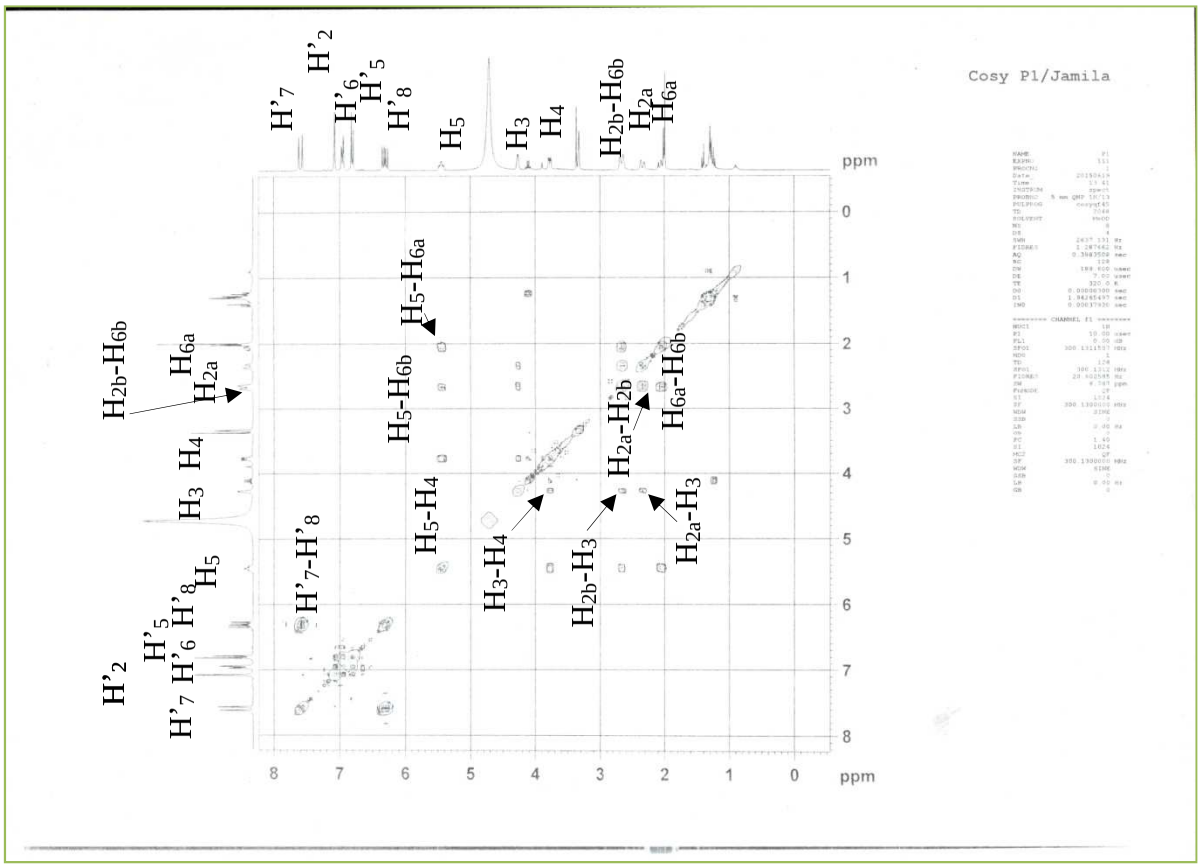


Fig.III.21 Spectre COSY (300 MHz; MeOD) du composé P1

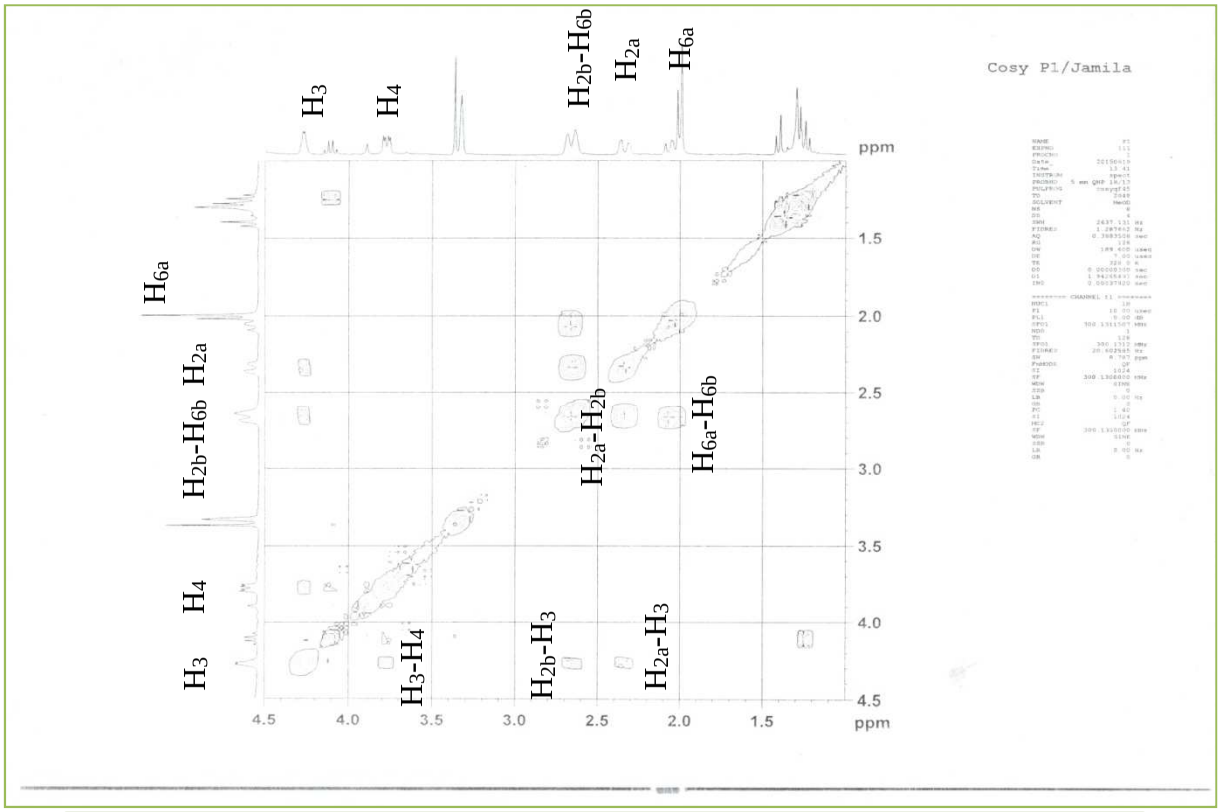


Fig.III.22 Agrandissement de Spectre COSY (300MHz; MeOD) du composé P1

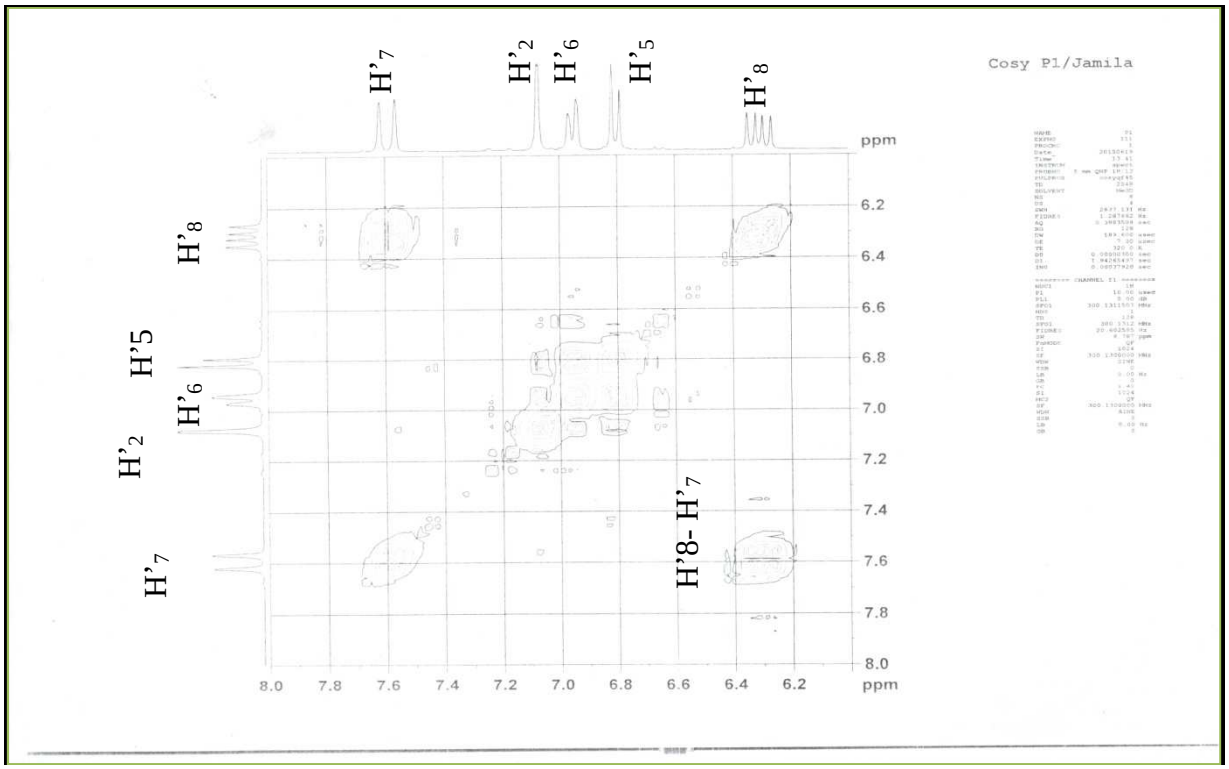


Fig.III.23 Agrandissement de Spectre COSY (300MHz; MeOD) du composé P1

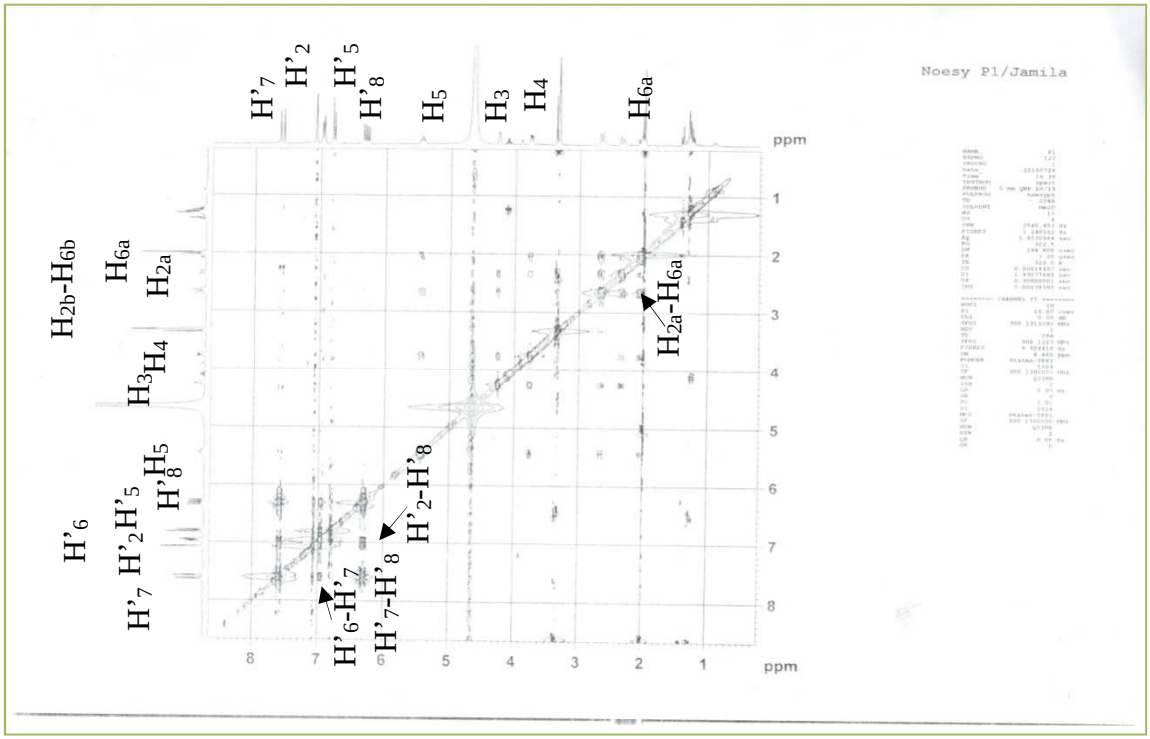


Fig.III.24 Spectre NEOSY (300MHz; MeOD) du composé P1

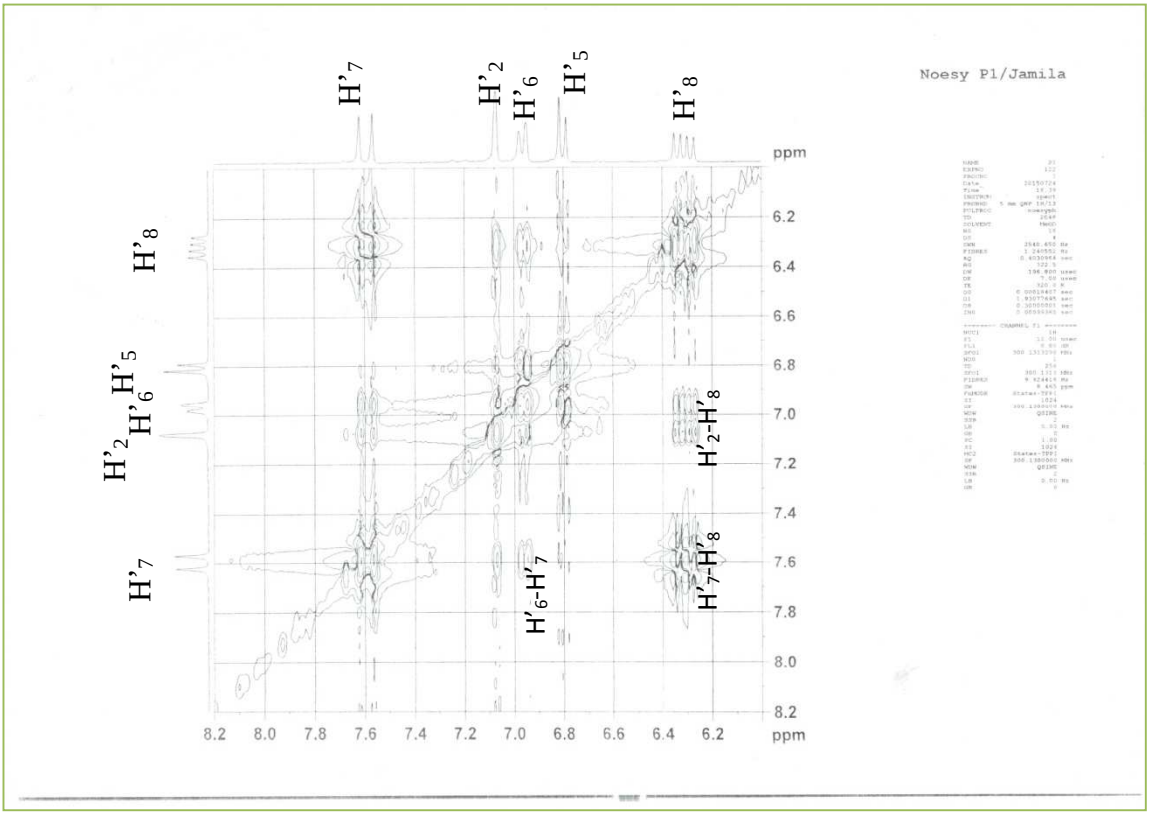


Fig.III.25 Spectre NEOSY (300MHz; MeOD) du composé P1

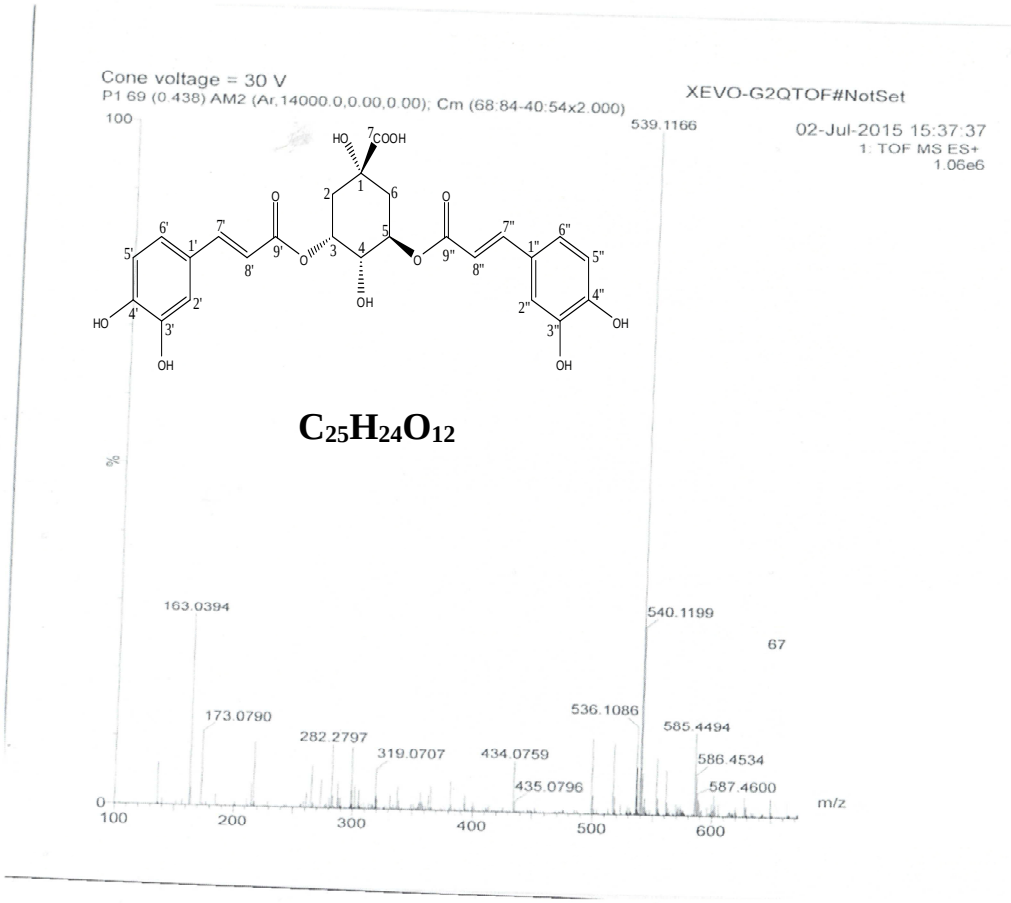


Fig.III.26 Spectre de Masse ES (300MHz; MeOD) du composé P1

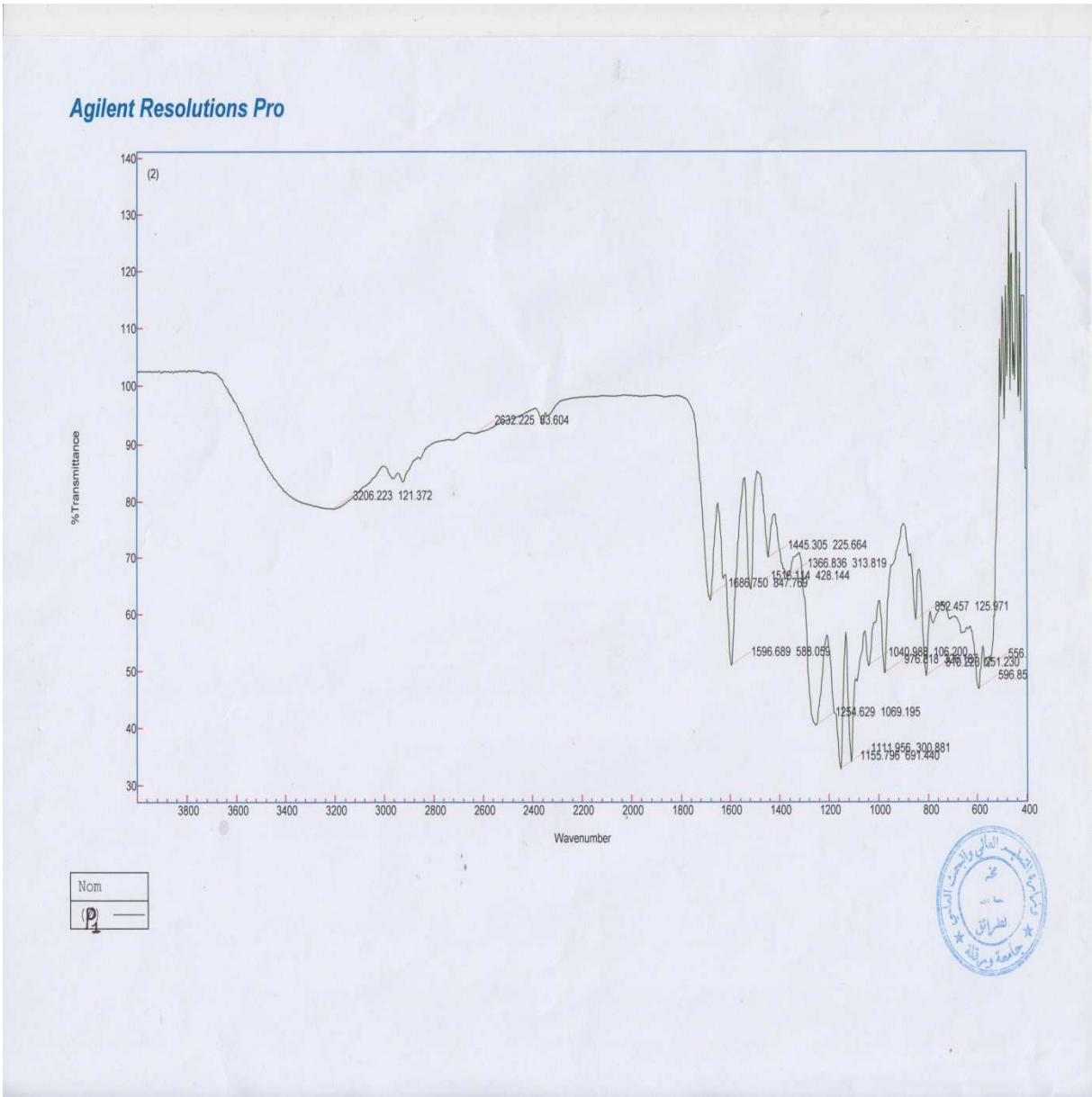


Fig.III.27 Spectre IR du composé P1

III.7.4.1 structure du composé P1

P1 a été isolé sous forme d'une poudre à partir de l'extrait butanolique de la partie aérienne de la plante *Anvillea radiata*

Le produit **P1** présent en spectroscopie de masse en ES (Fig.III.26) un pic ionique à *m/z* 539 attribuable à l'ion pseudomoléculaire $[M+Na]^+$ correspondant à la formule brute $C_{25}H_{24}O_{12}$ de poids moléculaire 516 g mol^{-1}.

L'analyse du spectre de RMN ^1H (Fig.III.16 et 17) du composé **P1** enregistré dans le $CDCl_3$ à 300 *MHz*, nous a permis d'observer en particulier :

- quatre signaux de1.92 à 2.57 ppm, correspondant à deux CH_2 (Sp3).
- trois signaux à 3.70, 4.20 et 5.37 ppm, correspondant à trois protons.
- deux doublets et un doublet large dans la région allant de 6.7 à 7 ppm attribuables à un noyau aromatique.
-deux autres doublets à 6.25 et 7.5 ppm respectivement attribuables à quatre protons éthyléniques.

Le spectre de RMN ^{13}C (Fig.III.18 et 19)mettent en évidence la présence de :

- Deux carbones secondaires à 34.4 et 36 ppm.
- Treize carbones tertiaires dont six à deux noyaux aromatiques chacun trois carbones à 113.3, 114.6 et 121.2 ppm, quatre de type éthylénique à113.4, 114.2, 147.5 et 147.6 ppm, trois attachés d'un oxygène à 68.6, 69.8 et 72 ppm.
- Dix carbones quaternaires dont deux de type carbonyle à166.5 et 167.2, un autre d'un fonction acide carboxylique à 175.7 ppm, six de type sp^2 attribuables à deux noyaux aromatique à 125.9, 126.1, 144.8, 144.9, 145 et 145.2 et un hybridé sp^3 à 80.90 ppm .

L'étude du spectre CHCorr (Fig.III.20) nous a permis de relier les protons aux carbones qui les portent par l'observation des corrélations directes $1J^1H$-^{13}C.

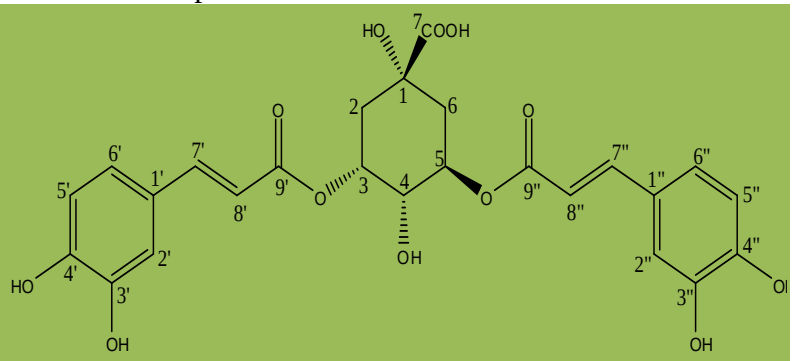
Spectre 1H-1H COSY (Fig.III.21, 22 et 23) ayant permis de préciser l'enchaînement du squelette hydrocarboné par l'observation des corrélations :H_{2a}-H_3 ; H_{2B}-H_3 ; H_4-H_3 ; H_4-H_5 ; H_{6a}-H_5 ; H_{6b}-H_5 ; H_{6b}-H_{2a} , ces corrélations confirment qu'il existe un cycle hexagonale.

Le spectre de NEOSY(Fig.III.24 et 25) permette de visualiser les interactions dipolaires ^1H-^1H à travers l'espace, les corrélations : H'_2-H'_8 ; H'_7-H'_8 ; H'_6-H'_7, confirment que l'attachement de cycles aromatiques en H'_7.

Le spectre IR (Fig.III.27) enregistré a montré, deux bandes d'absorptions attribuables aux vibrations d'élongation relatives au groupement hydroxyle (νOH 3206 cm^{-1}) et à la fonction cétone conjuguée (νCO 1686 cm^{-1}) renforçant ce qui a été explicité.

L'ensemble de ces constatations nous mène à la structure de P1: **Acide 3,5-*O*-Dicaffeoylquinic**

Tableau III.7 Données structurales du composé **P1**

composé P1	
$C_{25}H_{24}O_{12}$ PM :**516 g mol^{-1}** **Poudre blanche**	 Acide 3,5-*O*-Dicaffeoylquinic
ES-MS **(mode ions positifs)** ***m/z* 539 [M+Na]$^{+}$**	
IR **νmax 3364 cm^{-1} (OH) et 1662cm^{-1} (C=O Cétone conjuguée)**	

atome	**δ ^{1}H**	**multi**	***J (Hz)***	**δ ^{13}C**
1	-	-	-	80.90
2a	2.25	m	-	34.4
2b	2.57	m		
3	4.20	m	-	68.6
4	3.70	dd	9 ; 3.3	72.0
5	5.37	td	9.9 ; 3.9	69.8
6a	1.96	m	-	36.0
6b	2.57	m	-	
7	-	-	-	175.7
1’	-	-	-	125.9 / 126.1
2’	7.0	d	1.8	113.33 / 113.21
3’	-	-	-	144.8 / 144.9
4’	-	-	-	145.0/ 145.2
5’	6.71	d	8.1	114.6
6’	6.87	dl	8.4	121.2
7’	7.50	d	15.9	147.5/ 147.6
8’	6.25	d	15.9	113.4 /114.2
9’	-	-	-	166.5 / 167.2
1’’	-	-	-	125.9 / 126.1
2’’	7.0	d	1.8	113.25 / 113.33
3’’	-	-	-	144.8 / 144.9
4’’	-	-	-	145.0 / 145.2
5’’	6.71	d	8.1	114.6
6’’	6.87	dl	8.4	121.2
7’’	7.50	d	15.9	147.5 / 147.6
8’’	6.22	d	15.9	113.4 / 114.2
9’’	-	-	-	166.5 / 167.2

Références

[1] Paris , R ; et Moyse, H. (1969). Précis de matière médicinale. Paris : Masson.

[2] Trease, E; et Evans, W.C .(1987). Pharmacognosie, Billiaire Tindall. London 13 th Edition. P 61-62.

[3] N. Savithramma, M. Linga Rao and D. Suhrulatha (2011). Screening of Medicinal Plants for Secondary Metabolites, Middle-East Journal of Scientific Research 8 (3): 579- 584.

[4] GA Ayoola, HAB Coker, SA Adesegun, AA Adepoju-Bello, K Obaweya, EC Ezennia, TO Atangbayila (2008). Phytochemical Screening and Antioxidant Activities of Some Selected Medicinal Plants Used for Malaria Therapy in Southwestern Nigeria, Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 7 (3): 1019-1024.

[5] Mebarki, L., H.M. Kaid, L. Benlarbi, A. Rahmani and A. Sarhani, (2013), Phytochemical Analysis and Antifungal Activity of Anvillea radiata. World App. Sci. J., 26: 165-171.

[6] T. J. Mabry, K. R. Markham and M. B. Thomas (1970). The Systematic Identificationof Flavonoids, Springer-Verlag Berlin· Heidelberg . N ew Y ork.P 12-13.

[7] Eberhard Breitmaier, (**1993)**."Structure élucidation by NMR in Organique Chemestry" Johen Willey and Sons, New York.

[8] M. Hesse, M. Meier, B. Zeeh, (1997). « Méthodes spectroscopiques pour la chimie organique », Masson, Paris.

Chapitre IV
Activité Biologique

IV. Activité Biologique

IV.a Activité antioxydante

IV.a.1 Généralité

Les aliments lipidiques ne peuvent être stockés que pendant des périodes courtes à cause de la résistance insuffisante à l'oxydation par l'oxygène. L'oxydation des lipides est une cause majeure de la détérioration de la qualité des aliments contenant des matières grasses, d'où l'utilisation devenue de plus en plus fréquente des antioxydants **[1].**

Un radical libre est une molécule ou un atome dont un ou plusieurs électrons sont célibataires sur l'orbitale externe d'un ou plusieurs de ses atomes. Les radicaux libres sont des composés caractérisés par une structure électronique déséquilibrée qui leur conférée une grande réactivité sur les constituants organiques et sur les structures cellulaires. Ils se forment de façon inévitable en parallèlement le bon fonctionnement de l'organisme et la santé des mammifères, mais leur excès peut être néfaste. En dehors de toute situation pathologique, leur production est stimulée par toute situation de stress, en particulier par la manipulation maladroite ou brulable des animaux, par l'exercice physique, par le froid, par des niveaux d'alimentation excessifs ou par déséquilibres alimentaires. Elle peut alors atteindre des niveaux nuisibles pour les aspects quantitatifs et qualitatifs des productions animales **[2].**

L'ensemble des radicaux libres primaires est souvent appelé "espèces réactives de l'oxygène" (ROS). **[3],** Les espèces réactives oxygénées (ERO) incluant les radicaux libres comme le radical hydroxyle ($OH^{\bullet}$), radical superoxyde ($O_2^{\bullet}$) et sa forme protonnée ($HO_2^{\bullet}$), le radical pyroxyle ($RO^{\bullet}$) et les espèces non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'oxygène singlet ($^1O_2$) sont des molécules hautement réactives **[4]**.

Dans tous les systèmes vivants aérobies, ces espèces sont produites habituellement par voie endogène durant le métabolisme cellulaire **[5]**. Les ERO sont aussi produites dans des circonstances pathologiques intrinsèques telles que le dysfonctionnement de la mitochondrie et l'involution thymique favorisant l'inflammation chronique **[6]**. Des facteurs exogènes à savoir les polluants environnementaux, les radiations, les solvants organiques, le tabac ainsi que les agents pathogènes sont aussi incriminés dans la production des ERO **[7]**

Pour lutter contre ces radicaux libres nocifs, notre organisme possède des systèmes de défense antioxydants. Certains sont endogènes, alors que d'autres sont obtenus à partir de molécules apportées par l'alimentation (exogènes). Le système endogène est formé par des enzymes qui agissent en synergie, à savoir la glutathion peroxydase, la catalase et le superoxyde dismutase (SOD). En effet, la SOD transforme le superoxyde en peroxyde d'hydrogène tandis que la catalase métabolise ce dernier en une molécule d'eau et une autre d'oxygène.

A cause des agents externes comme les polluants de l'air, les radiations UV et l'alcool, les radicaux libres peuvent être produits en excès. De ce fait, notre système endogène de défense se trouve incapable de réduire toutes ces espèces réactives. Pour diminuer ces dommages oxydatifs, notre organisme a besoin d'une alimentation riche en antioxydants exogènes. Parmi ces antioxydants, on trouve les vitamines C, E et A, ainsi que les huiles essentielles et les flavonoïdes **[8].**

Le but d'évaluation de nos extraits et nos produits purs est de déterminer leurs potentiels antioxydants afin de tirer profit de cette propriété pour une valorisation dans le domaine biologique. Cette évaluation a été effectuée par quatre méthodes.

VI.a.1.1 Effet scavenger du radical DPPH

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (α,α-diphényl-β-picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (**Fig.IV.1**) **[9].**

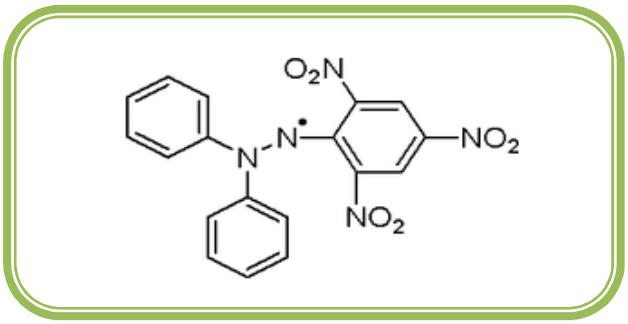
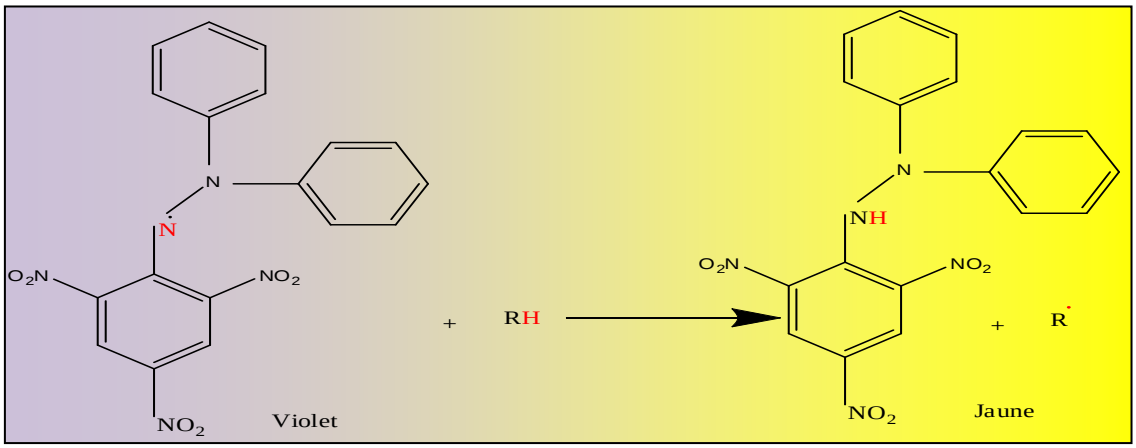


Fig. IV.1 Structure chimique du radical libre DPPH$^{\bullet}$ (2,2-diphénylPicryiHydrazyle)

Du fait de cette délocalisation, la molécule du radical ne forment pas des dimères, DPPH• reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire. La délocalisation provoque aussi la couleur violette bien caractéristique de la solution de DPPH•. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration violette, due à une recombinaison des radicaux DPPH•, mesurable par spectrophotométrie à 515-518 nm. (Fig. IV. 2) **[9].**



DPPH• + RH ⟶ **DPPH-H + R•**

Fig. IV.2 Réduction du DPPH• par un antioxydant

IV. a. 1.2. Méthode de l'ABTS

Ce test est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique $ABTS^{\bullet+}$. En réagissant avec le persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$), l'ABTS (acide 2,2'-azino-bis(3éthylbenz-thiazoline-6-sulfonique)) forme le radical $ABTS^{\bullet+}$, de couleur bleue-verte. En présence d'un donneur de H•, le passage du radical $ABTS^{\bullet+}$ à la forme non radicalaire ABTS s'accompagne de la disparition de cette coloration mesurée spectrophotométriquement à une longueur de 734 nm. Cette décoloration résulte d'une réaction entre le radical $ABTS^{\bullet+}$ et un donneur de H• (Fig.IV.a.3). **[10].**

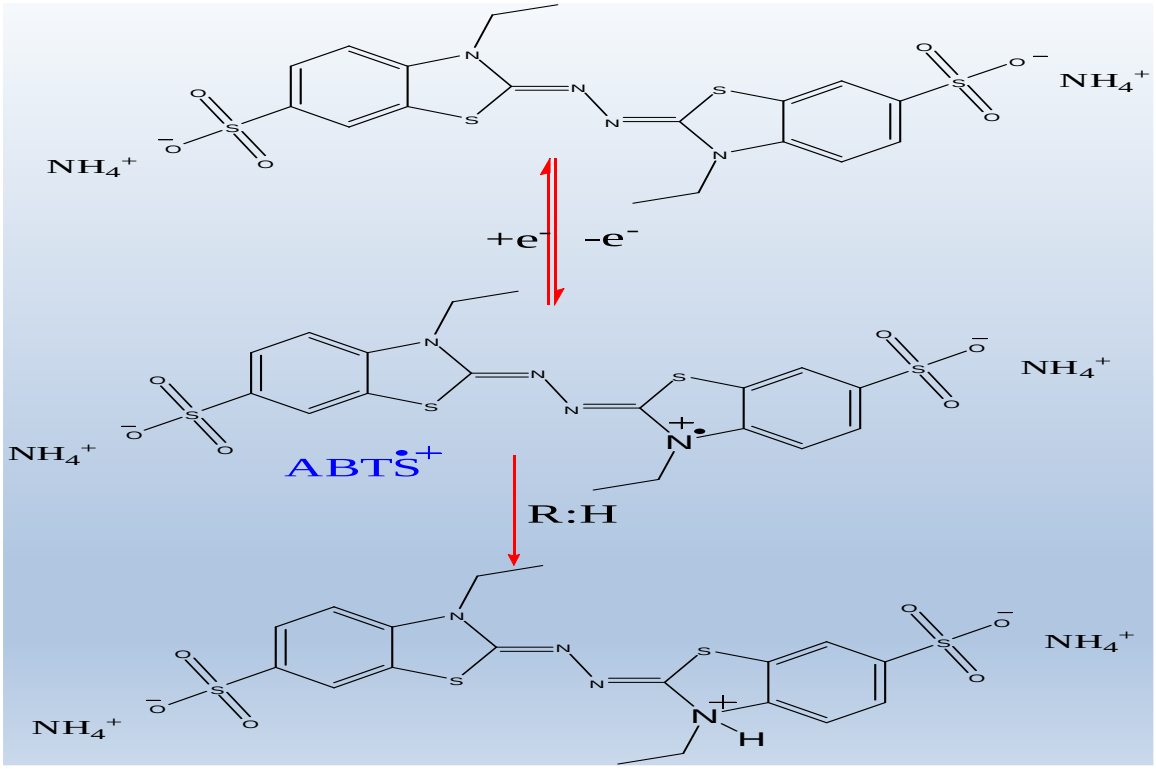


Fig.IV.3 Réduction d'ABTS par un antioxydant

IV.1.3. Blanchiment de β-carotène couplé à l'auto-oxydation de l'acide linoléique

Le β-carotène est physiologiquement un composé important reconnu par sa forte activité biologique. Dans l'industrie agro-alimentaire, il est utilisé dans les boissons comme un agent de coloration et sa décoloration indique la réduction de qualité de ces produits **[11,12].** Cependant, dans le test du blanchiment du β-carotène, la présence des 11 paires de doubles liaisons rend le β-carotène extrêmement sensible aux radicaux libres dérivés d'hydroperoxydes qui sont formés à partir de l'oxydation d'acide linoléique dans un système émulsion aqueuse en résultant le blanchiment du β-carotène **[11,13].**. La présence des antioxydants comme les polyphénols réduisent l'ampleur de la destruction du β-carotène en neutralisant les hydroperoxydes et d'autres espèces radicalaires formées à l'intérieur de ce système **[11].**

IV. a.1.4 Réduction du fer : FRAP (ferric reducing antioxydant power)

Ce test est découvre par Oyaizu 1986**[14]** .Ce test est considéré comme un test direct et rapide utilisé pour mesurer le pouvoir antioxydants non enzymatiques, et utiliser pour déterminer l'activité antioxydante des extraits étudies dans un milieu neutre.

Ce test est basé sur la réduction des ions $[Fe\ (CN)_6]^{3-}$ à des ions de $[Fe\ (CN)_6]^{4-}$ qui donne dans la présence des ions Fe^{3+} une coloration bleu clair, qui peut être mesurer leur absorbance à une longueur d'onde λ= 700 nm.

IV.a.2 Matériels et Méthodes

IV. a.2.1 Analyse quantitative des composés phénoliques

Cette analyse permet d'avoir une estimation sur la teneur en phénols totaux de l'échantillon .Le dosage des phénols totaux a été effectué par une méthode adaptée de Obiang-Obounou en utilisant le réactif de Folin-Siocalteu [15], tandis que les flavonoïdes ont été quantifiés par le dosage direct par le trichlorure d'aluminium d'après une méthode adaptée de Wang [16].

- **Dosage des polyphénols totaux**

Le contenu en polyphénols totaux des extraits aqueux d' Anvillea radiata est estimé par la méthode de Folin-Ciocalteu **[15]**, ce réactif est formé d'acide phosphomolybdique $H_3PMo_{12}O_4$ et d'acide phosphotungstique $H_3PW_{12}O_{40}$ qui est réduits par l'oxydation des phénols en oxydes bleus de tungstène W_8O_{23} et de molybdène Mo_8O_3.

Un volume de 100 µL des solutions d'extraits à différentes concentrations sont ajoutées à 1.5 ml de réactif de Folin-Ciolcalteu (10%). Après 5 min, 1.5 ml de carbonates de sodium (6%) sont additionnés. Le mélange est laissé réagir 90 min à température ambiante, puis la lecture est faite à 725 nm. L'acide gallique (0.03 -0.3 mg/ml) est le standard utilisé pour établir la courbe d'étalonnage **(Fig.IV.2)** à partir de laquelle la concentration des polyphénols totaux des extraits est calculée. Le résultat est exprimé en mg d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g).

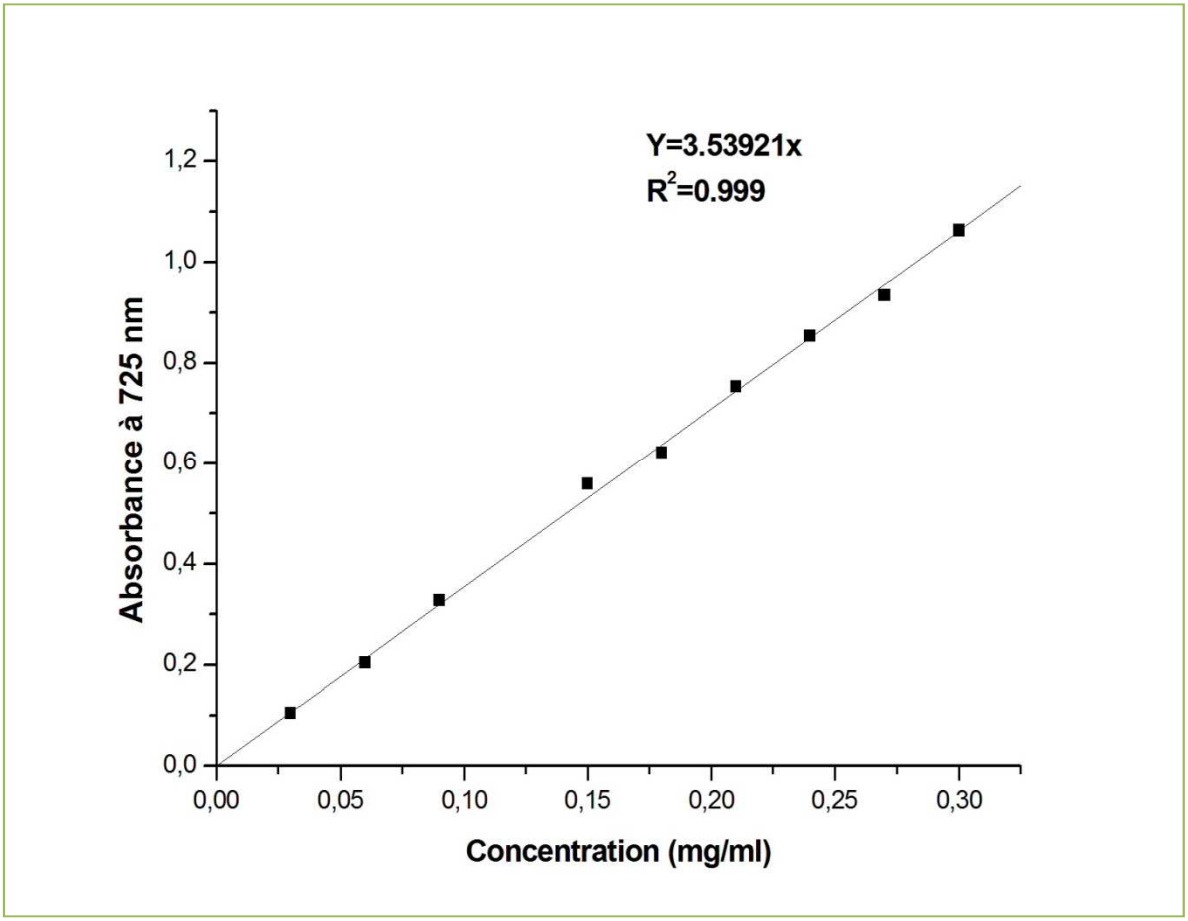


Fig.VI.4 Courbe d'étalonnage de la l'acide gallique

- **Dosage des flavonoïdes**

La méthode du trichlorure d'aluminium **[16, 17]** est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les extraits d'*Anvillea radiata*. Le chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) forme un complexe très stable avec les groupements hydroxydes OH des phénols. Ce complexe jaune absorbe la lumière visible à une longueur d'onde 415 nm. 0.5 mL de la solution d'$AlCl_3$ (2%) est ajouté à 0.5 ml de la solution de l'échantillon (extraits ou standard) contenant différentes concentrations. Le mélange est laissé réagir pendant 1h puis la lecture est faite à 420 nm. La concentration des flavonoïdes dans les extraits est calculée à partir de la gamme d'étalonnage établie avec la quércétine (0.01-0.1 mg/mL) et exprimée en milligramme d'équivalents de quércétine par gramme d'extrait (mg EQ/g d'extrait) **(Fig.IV.5).**

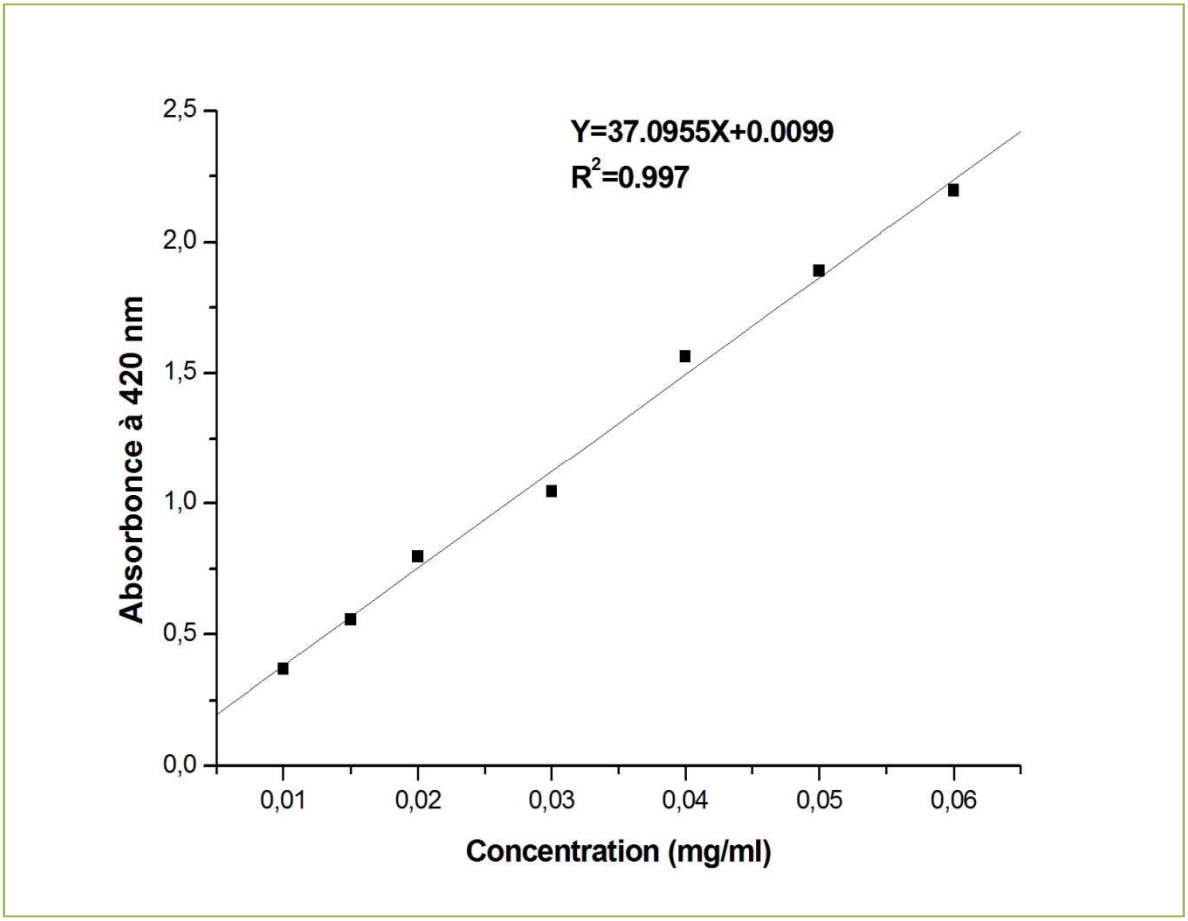


Fig.IV.5 Courbe d'étalonnage de la quercétine

IV.a.2.2. Piégeage du radical libre DPPH

Pour la mesure de l'activité antioxydante, une prise d'essai de 0,5 mL du produit testé à différentes concentrations (1 à $2{,}4.10^{-4}$ mg/mL) dans l'éthanol est ajouté à 0,5 mL d'une solution de DPPH (0,003%) dans l'éthanol. Le mélange est incubé pendant 30 mn à l'obscurité et à température 25 °C pour réagir. La mesure de l'absorbance est effectuée à 517 nm grâce à un spectrophotomètre UV/visible **[18]** Un mélange de 0,5 mL de solution $DPPH^{\cdot}$ et 0,5 mL d'éthanol a été prise comme blanc. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition, calculés suite à la diminution de l'intensité de la coloration du mélange selon la formule suivante:

$$\mathbf{I\% = (A_0 - A_e / A_0) \times 100}$$

Où

I% : Pourcentage d'inhibition

A_0 : Absorbance du DPPH sans échantillon

A_e : Absorbance de l'échantillon plus le $DPPH^{\cdot}$

Le traçage de la courbe de régression linéaire permet de déterminer la concentration de l'antioxydant correspondante à 50% d'inhibition (IC_{50}), plus la valeur d'IC_{50} est faible plus la molécule est active. Les mesures ont été répétées trois fois et les valeurs sont exprimées en IC_{50}±écart type. BHT est utilisée comme référence standard.

IV.a.2.3 Test ABTS

Les solutions de persulfate de potassium et ABTS ont été préparées selon Re et al. **[19]** Une prise de quantité égale a été alors préparée en mélangeant ces deux solutions et en leur permettant de réagir pour 12 heures à température ambiante dans l'obscurité. La solution obtenue a été alors diluée avec une solution saline tamponnée au phosphate (pH 7,4) pour donner une absorbance finale de 0,07 ± 0,02 à 734 nm.BHT est utilisée comme standard, les extraits et les fractions ont été préparées dans l'EtOH. 10 µL des extrait ou fraction sont ajoutés à 990 µL de la solution finalement préparée et l'absorbance a été mesurée à 734 nm après 5 minutes de réaction.

L'activité anti-radicalaire est estimée selon l'équation ci-dessous :

$$\mathbf{I\% = (A_0 - A_e / A_0) \times 100}$$

Où

I% : Pourcentage d'inhibition

A_0 : Absorbance du radical seul

A_e : Absorbance du radical après de contact avec l'antioxidant

IV.a.2.4 Test de blanchiment de β-carotène

Le test de blanchiment de β-carotène utilisé pour évaluer l'activité antioxydante des extraits de nos plantes est celui du Ikram et al. **[20].**

Une quantité de 1.5 mg de β-carotène est dissous dans 2.5 mL de chloroforme. On prélève 2 mL de cette solution dans une fiole contenant préalablement 200 µL Tween 20 et 20 µL d'acide linoléique. Cette solution est évaporée au rotavapor jusqu'à disparition de l'odeur du chloroforme. Puis, un volume de 50 ml de l'eau distillé est ajouté dans la fiole et le mélange résultant est agité vigoureusement. Dans des tubes à essaies, l'émulsion β-carotène/acide linoléique de 5 mL est additionnée à 500 µL des solutions méthanoliques de l'extrait, la fraction ou de l'antioxydant de synthèse BHA de différentes concentrations. Après une agitation proprement dite, l'absorbance est mesurée immédiatement à 470 nm ce qui

correspond à t = 0 min contre le blanc contenant l'émulsion sans β-carotène. Les tubes bien fermés sont placés dans un bain marie à 50°C pendant 120 min. Ensuite, l'absorbance de chaque extrait est mesurée à 470 nm à t = 120 min. Pour le control positif, l'échantillon est remplacé par le BHA. Le control négatif est constitué par 200 µL de méthanol au lieu de l'extrait où de l'antioxydant de synthèse. Tous les échantillons sont répétés en deux essais.

L'activité antioxydante (%) des extraits est évaluée en termes de blanchiment de β-carotène en employant la formule suivante :

Pourcentage d'inibition= $[A_{A(120)}-C_{C(120)}]/ [C_{c(0)}-C_{C(120)}]*100$

Où :

$A_{A(120)}$: représente l'absorbance en présence de l'extrait (antioxydants) à 120 min ;

$C_{C(120)}$: représente l'absorbance du contrôle à 120 min

$C_{c(0)}$: représente l'absorbance du contrôle à 0 min.

La valeur IC50 est définie comme la concentration des antioxydants correspondant à 50 % d'inhibition. Elle est calculée en traçant la courbe des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de l'extrait.

IV.a.2.5 Réduction du fer

Cette méthode est déterminée en utilisant la technique d'Oyaizu (1986)**[12].** Les différentes concentrations des extraits dans l'eau distillée (1 mL) sont mélangées avec 2.5 ml de la solution tampon phosphate (0.2 M, pH 6.6) et 2.5 mL de ferricyanure de potassium [K3Fe(CN)6] (1%). Les mélanges sont incubés à 50°C pendant 20 min. Après, 2.5 mL de l'acide trichloracétique (10%) est additionné. après une agitation vigoureuse, 2.5 ml du de chaque concentration est mélangé avec 2.5 mL de l'eau distillée et 0.5 ml de $FeCl_3$, 6 H_2O (0.1%). L'absorbance est mesurée à 700 nm.

L'augmentation de l'absorbance dans le milieu réactionnel indique l'augmentation de la réduction de fer. L'acide ascorbique, BHA et BHT sont utilisés comme contrôles positifs.

La valeur EC_{50} est la concentration de l'échantillon qui correspond à une absorbance égale à 0,5, est un indice utilisé pour comparer et exprimer la puissance des capacités réductrices des substances bioactive, et est calculée à partir du graphe de l'absorbance en fonction de la concentration de l'échantillon.

IV.a.3 Résultats et discussions

IV.a.3.1 dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes

La teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes des extraits d'*Anvillea radiata* est déterminée en utilisant les méthodes de Folin Ciocalteu, de trichlorure d'aluminium.

Tableau IV.1 La teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes des extraits d'*Anvillea radiata*

Extrait	Polyphénols [(a)]	Flavonoïdes [(b)]
Ex. MeOH	117.60±2.62	14.91±0.5
Ex. Cl	13.61±0.21	1.46±0.0002
Ex. Acét	600.09±11.0	132.20±1.49
Ex. But	514±7.27	49.10±1.51

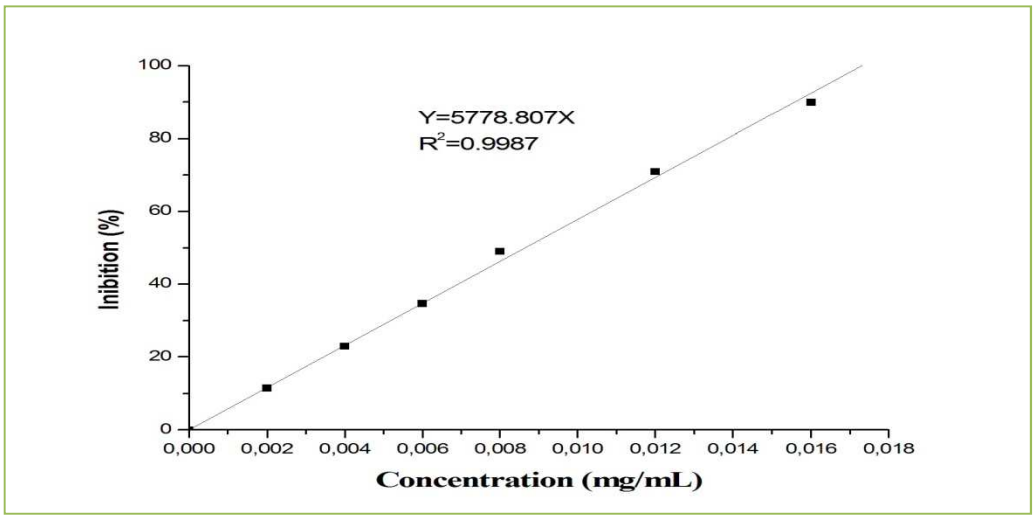
[(a)] mg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait.

[(b)] mg d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait.

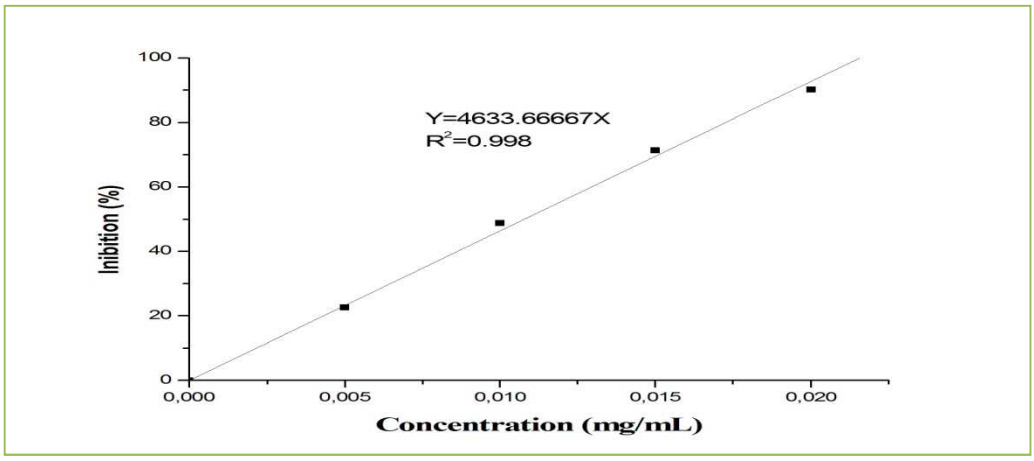
Les résultats montrent que les composés polyphénoliques sont abondants dans la partie aérienne de l'*Anvillea radiata*. Djeridane et ses collaborateurs **[21]** ont trouvé que cette abondance est caractéristique de la famille des astéracées. Cela pourrait être relié aux conditions climatiques dures des endroits ou elles poussent (température élevée, grande exposition au soleil, la sécheresse et la salinité) qui stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires comme les polyphénols **[22]**. L'extrait d'acétate d'éthyl est plus riche en polyphénols et en flavonoïdes de l'ordre de 600.09±11.0 et 132.20±1.49 mg EAG /g respectivement. **(TableauVI.1).**

IV.a.3.2. Piégeage du radical libre DPPH

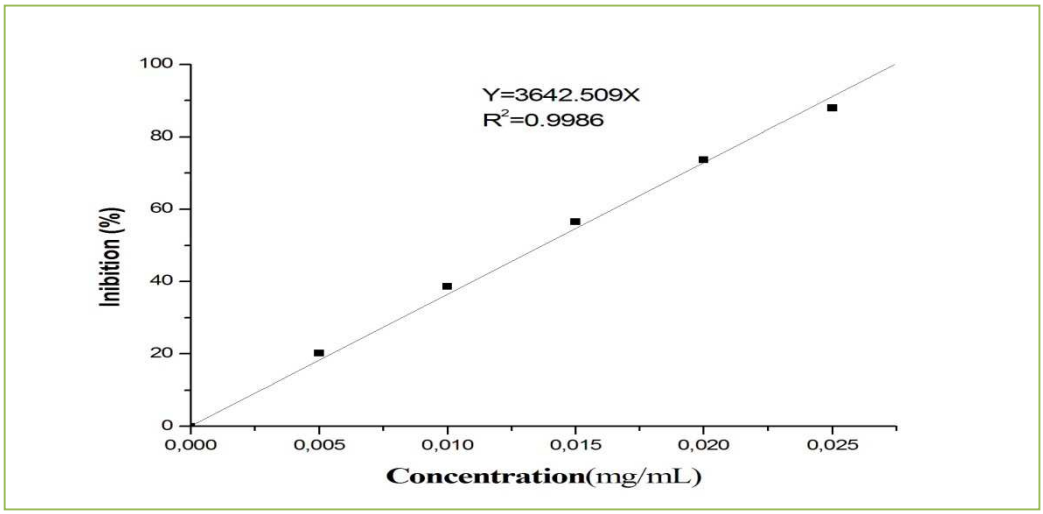
Afin de déterminer les valeurs d'IC_{50} de chaque extrait ou fraction, nous avons établie les courbes de la variation du pouvoir d'inhibition I% en fonction de la concentration (Fig.IV.6, 7 et 8)



(1)



(2)



(3)

Fig IV.6 Pourcentages d'inhibition du radical DPPH des antioxydants standards (Acid Ascorbique (1), BHA (2) et BHT) (3) .

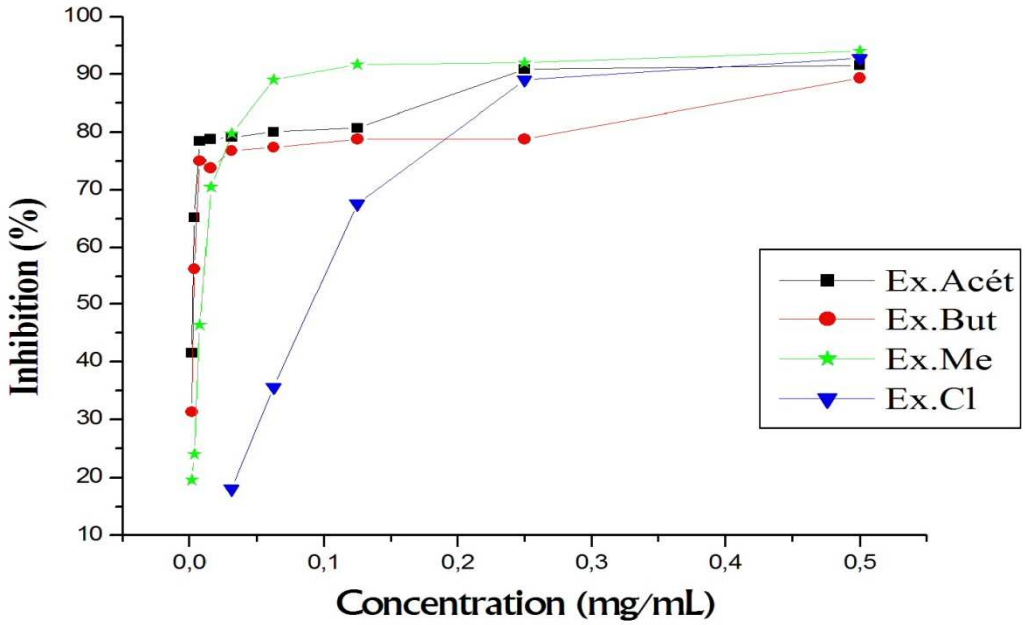


Fig.IV.7 Pourcentages d'inhibition du radical DPPH des extrais d'*anvillea radiata*

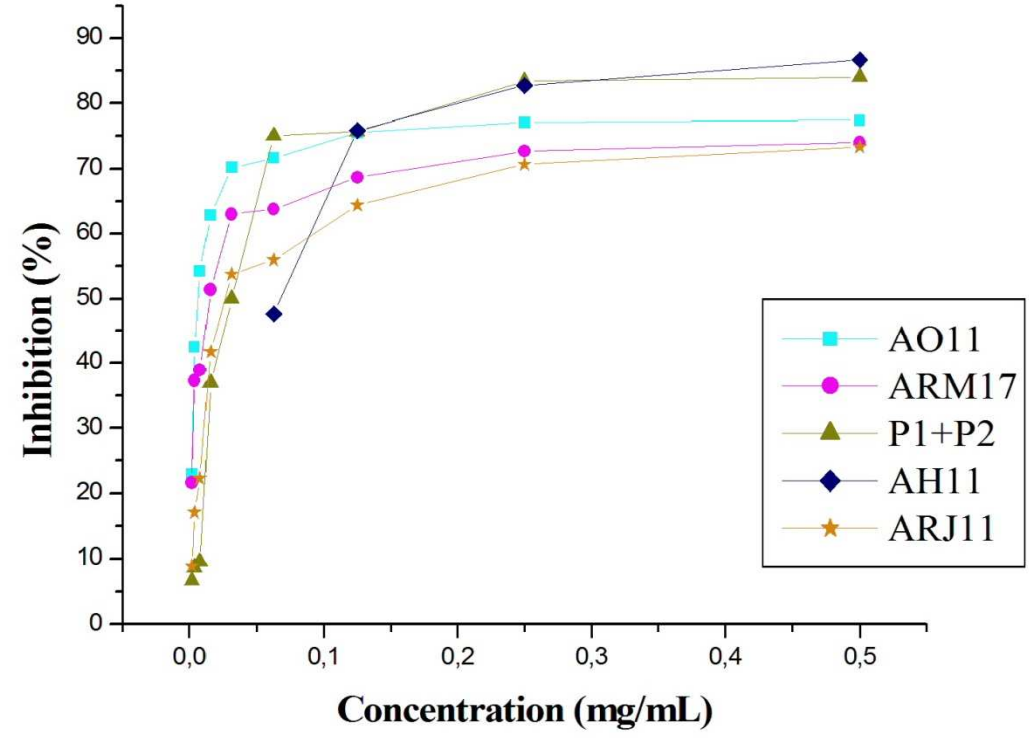


Fig.IV.8. Pourcentages d'inhibition du radical DPPH de produits impurs d'*anvillea radiata*

La capacité antioxydante de différents extraits a été déterminée à partir des valeurs IC_{50}.

Le tableau IV.2 suivant regroupe les résultats obtenus.

Tableau IV.2 Valeurs des IC_{50} de l'activité anti-radicalaire testée par la méthode de DPPH

Echantillons	IC_{50} (mg /mL)
Ex. Acét	0.0026±0.002
Ex. But	0.0034±0.002
Ex. Me	0.0089±0.006
Ex. Cl	0.09±0.01
AO11	0.006±0.002
ARJ11	0.026±0.006
ARM17	0.014±0.005
P1	0.031±0.02
AH11	0.065±0.09
BHT	0.014±0.01
BHA	0.011
A.Asc	0.008

Un effet antiradicalaire maximal de 92.5% est exercé par l'extrait d'acétate d'éthyle à de concentration de 0.25 mg/mL. L'acide ascorbique, BHA et BHT sont utilisés comme antioxydants standard à montré un effet maximal de 90%, 91% et 95% respectivement envers le radical DPPH à une concentration de 0.025 mg/mL.

Les résultats consignés dans le tableau ci-dessus montrent que tous les échantillons testés (extraits et produits) ont présenté des IC_{50} variant entre 0.0026 et 0.09 mg/mL.Pour les extraits: acétate d'éthyle , butanolique et méthanolique on remarque les valeurs d'IC_{50} trop faibles: 0.0026, 0.0034 et 0.008 mg/mL respectivement ce qui se traduit par d'excellents effets antiradicalaires. La comparaison de ces valeurs avec celles des antioxydants standards, montrent que les trois extraits sont actifs que le BHA (IC_{50}=0.011 mg/mL) et BHT (IC_{50}=0.014 mg/mL), l'extrait méthanolique a la même valeur que l'acide ascorbique (IC_{50}=0.008 mg/mL).

L'extrait chloroformique s'avère incapable de libérer facilement des radicaux hydrogène ce qui justifie la valeur élevée de son IC_{50}=0.09 mg/mL.

Pour les produits impur isolées de l'extrait butanolique on remarque que les deux produits: AO11et ARM17 ont IC_{50} très faibles donc activité antiradicalaire très importante, Sur cette base, nous proposons que les deux produit sont des flavonoids.

Ces résultats suggèrent que les extraits d'*Anvillea radiata* contiennent des agents piégeurs de radicaux libres agissant comme antioxydants primaires. L'action de ces antioxydants est supposée être due leur capacité de donation d'atomes d'hydrogène ou d'électrons dérivée principalement de l'hydroxyle du cycle A des flavonoïdes **[23].**

IV.3.3. Méthode ABTS

Pour déterminer les valeurs IC_{50}, nous avons tracé les courbes de variations de pourcentages d'inhibition (I%) avec les concentrations des extraits/produit impurs (Fig.IV.9 et Fig.10).

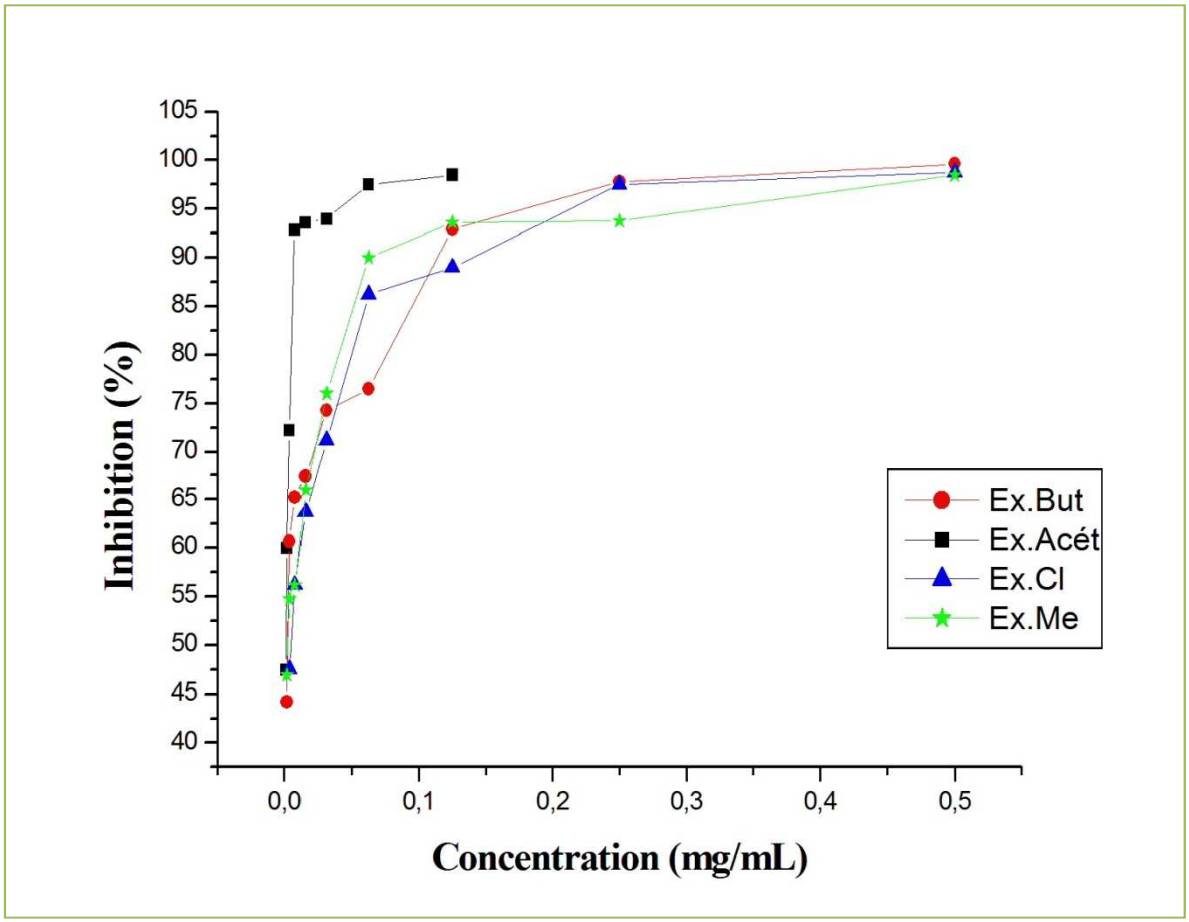


Fig.IV.9 Pourcentages d'inhibition du radical ABTS de produits impurs d'*Anvillea radiata*

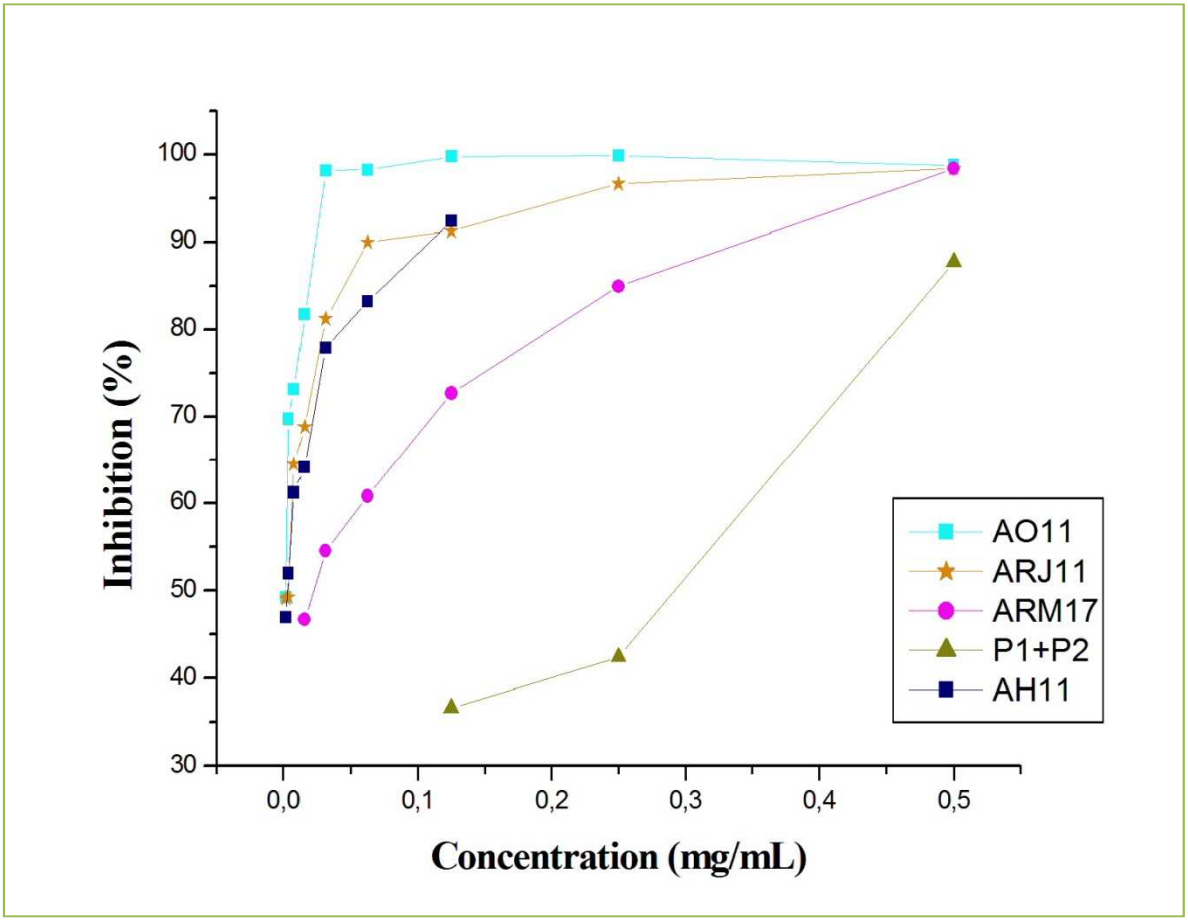


Fig.IV.10 Pourcentages d'inhibition du radical ABTS de produits impurs d'*Anvillea radiata*

Les valeurs IC_{50} calculées nous a permis d'évaluer et comparer l'efficacité des extraits (**Tableau IV.3**). Plus la valeur est petite, plus l'activité antiradicalaire est élevée

On remarque à partir de ces résultats que les valeurs d'IC_{50} sont comprises entre 0.001 et 0.29 mg/mL. Ces valeur indique que tous les extraits et les produits sont plus actifs que l'antioxydant standard BHT (0.05±0.01) sauf le produit impur P1+P2. L'extrait d'acétate d'éthyle constitue un bon piégeur des radicaux libres en comparant avec les autres extraits, sa concentration IC_{50} égale à 0.001±0.002 mg/ mL suivi par l'extrait butanolique (0.002±0.001 mg/ mL) et l'éxtrait méthanolique (0.0027±0.001 mg/ mL).

Tableau IV.3 Valeurs des IC_{50} de l'activité anti-radicalaire testée par la méthode d'ABTS

Echantillons	IC_{50} (mg /mL)
Ext Acét	0.001±0.002
Ext But	0.002±0.001
Ext Me	0.0027±0.001
Ext Cl	0.005±0.01
AO11	0.002±0.001
ARJ11	0.022±0.001
ARM17	0.022±0.01
P1	0.29±0.05
AH11	0.0031±0.001
BHT	0.05±0.01

IV.a.3.4. Test de blanchiment de β-carotène

A l'aide des courbes Fig.IV.11 nous avons pu déterminer l'IC_{50} de chaque échantillon.Le tableau IV.4 regroupe les résultats obtenus.

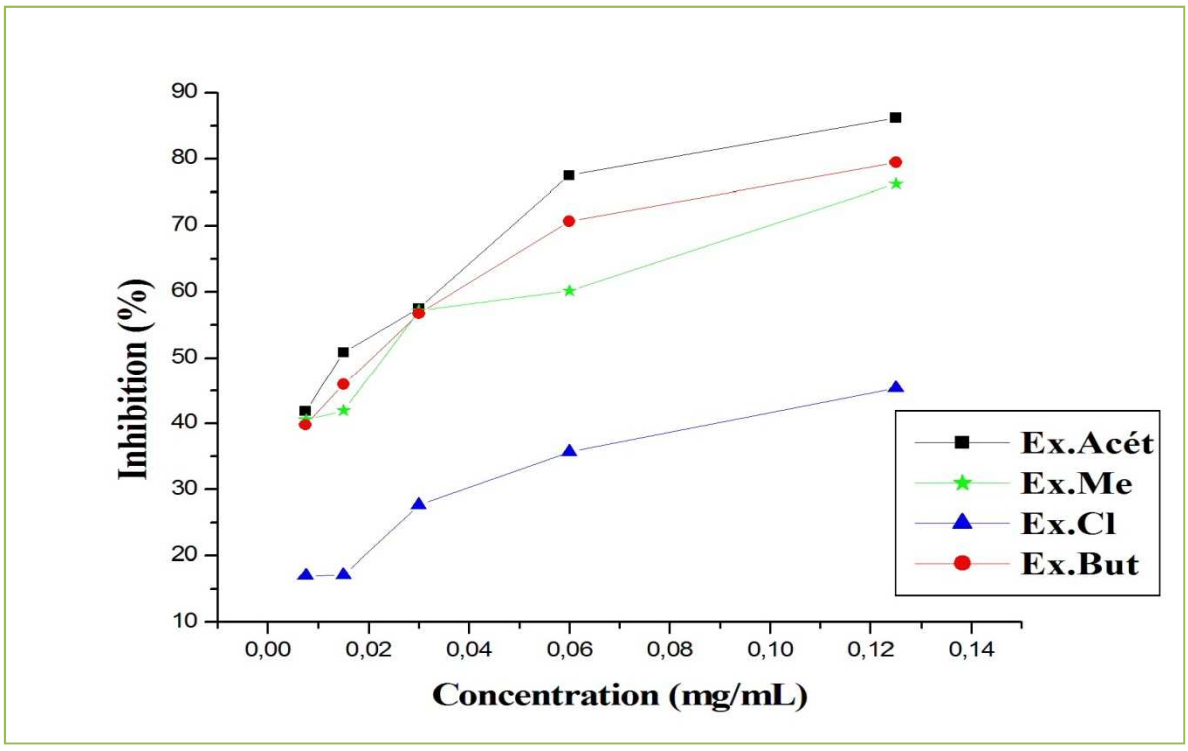


Fig.IV.11 Pourcentages d'inhibition du blanchiment du β-carotène en fonction des concentrations des extraits.

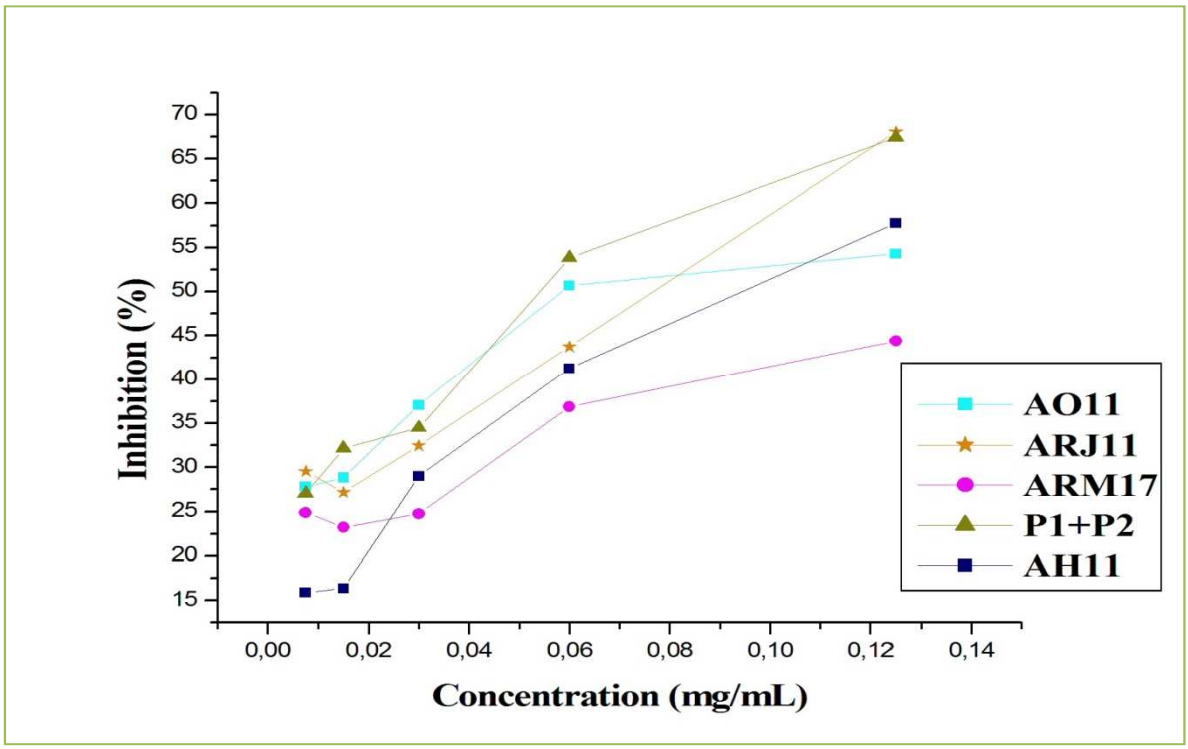


Fig.IV.12 Pourcentages d'inhibition du blanchiment du β-carotène en fonction des concentrations des produits.

Tableau IV.4 Valeurs des IC_{50} de l'activité antioxydante testée par la méthode de β-carotène

Echantillons	IC_{50} (mg /mL)
Ext Acét	0.014±0.01
Ext But	0.02±0.002
Ext Me	0.022±0.00
Ext Cl	0.209±0.00
AO11	0.058±0.01
ARJ11	0.076±0.01
ARM17	0.182±0.00
P1	0.054±0.02
AH11	0.09±0.002
BHT	0.04±0.001

Plus la valeur est petite, plus l'activité antioxydante à piéger les radicaux libres formés à partir de l'oxydation d'acide linoléique est élevée. Les extraits/produits de l'*Anvillea radiata*

ont montré une moyenne à élevée capacité antioxydante. La valeur la plus élevée a été trouvée avec L'extrait acétate d'éthyle (IC_{50} = 0.014±0.01 mg/ mL)**.**

IV.a.3.5 Réduction du fer

Les résultats obtenus lors de l'étude de l'activité antioxydante par la technique de réduction du fer « FRAP » sont enregistrés dans **Fig.IV.11**

Nous avons déterminé la concentration IC_{50} pour comparer l'activité réductrice des extraits, les résultats sont résumés dans le tableau IV.5

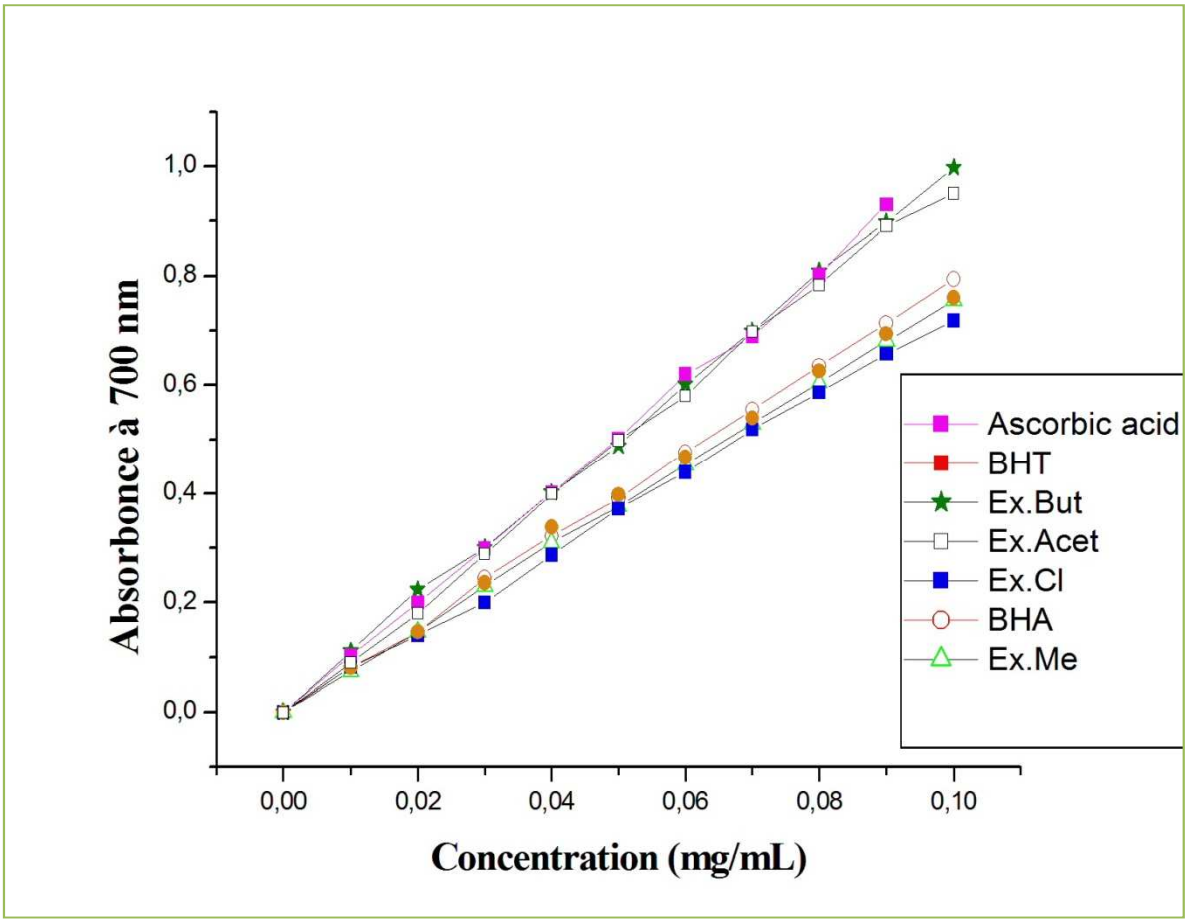


Fig.IV.13 pouvoir réducteur de l'Anvillea radiata par la méthode FRAP

Les résultats de tableau (IV.5) d'activité réductrice exprimée en EC_{50}, montrent clairement que tous les extraits ont un pouvoir réducteur important renferment des molécules ayant un potentiel réducteur donneur d'électron plus fort.

la capacité à réduire le fer est presque la même pour l'extrait d'cétate d'éthyle, l'extrait butanolique et l'acide ascorbique avec EC_{50} égale à (0.05±0.02) , (0.05±0.001) et (EC_{50}=0.05±0.002) mg/mL respectivement.

Nous pouvons classer la puissance de réduction de fer des différents extraits comme suit: extrait d'acétate d'éthyle > extrait butanolique> extrait méthanolique> extrait chloroformique.

Tableau IV.5 Valeurs EC_{50} de pouvoir réducteur d'extrait d'Anvillea radiata

Echantillons	EC_{50} (mg /mL)
Ex. Acét	0.05±0.02
Ex. But	0.05±0.001
Ex. Me	0.064±0.001
Ex. Cl	0.068±0.005
BHT	0.059±0.001
BHA	0.055±0.005
Acid Asc	0.05±0.002

La capacité de donation d'électrons dans une réaction d'oxydoréduction peut être aussi utilisée dans la mesure de l'activité antioxydante d'un composé. Cette capacité de donation d'électrons est appelée pouvoir réducteur.

Le pouvoir réducteur des extraits d'*Anvillea radiata* est mesuré dans cette étude par la réduction directe de Fe^{3+} $(CN^{-})_6$ en une forme ferreuse Fe^{2+} $(CN^{-})_6$ qui est déterminée par la détection spéctrophotométrique du complexe $(Fe^{3+})_4[Fe^{2+}(CN\text{-})_6]_3$ ayant une forte absorption à 700 nm (Le *et al*., 2007). La couleur jaune du milieu réactionnel change en vert dont l'intensité est en fonction du pouvoir réducteur de l'échantillon étudié

L'extrait acétate est doté d'une activité antioxydante encourageante. Cela montre qu'il y a une corrélation entre le contenu en polyphénols et l'activité antioxydante des extraits d'*Anvillea radiata*, et pourrait indiquer que les polyphénols sont responsables de cette activité. Cette corrélation a été rapportée par plusieurs auteurs **[22].**

IV.b Activité antibactérienne

IV.b.1 Introduction

L'homme vit dans un environnement peuplé d'un grand nombre de microorganismes qui sont présents dans l'air, dans le sol, dans les eaux douces, dans les eaux marines, à la surface de la peau et les muqueuses ainsi qu'au niveau du tube digestif, de l'arbre respiratoire et de l'appareil urinaire. Ces microorganismes sont constitués par les bactéries, les virus, les champignons et les parasites. Ils sont soit des hôtes naturels de l'homme et donc saprophytes (flore digestive par exemple), soit ils déterminent une infection et donc pathogènes **[24].**

Les infections bactériennes sont causées par différents micro-organismes et sont la cause des maladies les plus fatales et des épidémies les plus répandues. De nombreux antibiotiques sont développés pour les traiter, cependant leur utilisation abusive est à l'origine de l'apparition de la multirésistance bactérienne.

Un antibiotique est une substance antibactérienne produite par des micro-organismes (champignons et bactéries) ou de synthèse chimique capable d'inhiber la multiplication ou détruire les microorganismes **[25].** Les antibiotiques peuvent être classés selon l'origine, la nature chimique, le mécanisme d'action et le spectre d'action **[25].** La classification des antibiotiques selon leurs mécanismes d'action est cependant la plus répandue.

Les agents antimicrobiens détruisent les bactéries en s'attaquant directement à leurs structures essentielles (paroi cellulaire, ribosomes, membrane plasmique et ADN) et/ou en perturbant leurs métabolismes et par conséquent leurs fonctions **[26].**

Les qualités antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Les extraits aromatiques des plantes ont été utilisés dans différentes formulations, comme pour les médicaments et la parfumerie **[27].** Toutefois, il aura fallu attendre le début du 20ième siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser **[28].**

Les polyphénols sont doués d'activités antimicrobiennes importantes et diverses, probablement du à leurs diversités structurales. Les sites et le nombre des groupes hydroxyles sur les groupes phénoliques sont supposés être reliés à leur relative toxicité envers les microorganismes, avec l'évidence que le taux d'hydroxylation est directement proportionnel à

la toxicité **[29].** Il a été aussi rapporté que plus les composés phénoliques sont oxydés et plus ils sont inhibiteurs des microorganismes **[30].**

Dans le but de localiser un pouvoir antibactérien au niveau des extraits à partir de la plante choisies (*Anvillea radiata*) nous l' a testé envers quelques souches de bactéries pathogènes.

Au cours de cette étude biologique, nous avons utilisé les bactéries suivantes (Fig IV.14, 15, 16, 17 et 18): *Escherichia coli, Klebsiella pneumonie, Pseudomonas aeruginosa,, Staphylococcus aureus et Streptocoque.*

IV.b.2 Les bactéries utilisées

IV.b.2.1 bactéries à gram négatif

IV.b.2.1.1 Genre *Pseudomonas*

Ce genre appartient à la famille des *Pseudomonadaceae*. Les bactéries de cette famille sont des bâtonnets, mobiles par cils polaires, aérobies strictes. Les *Pseudomonas* cultivent facilement sur milieux usuels, en aérobiose, à la température de 30°C, certaines espèces comme *P.aeruginosa* sont capables à 41°C et même 43°C; ce caractère étant utilisé pour le diagnostic. La production d'un pigment est assez commune dans le genre. Deux sont particulièrement fréquents et utiles pour la reconnaissance des espèces: la pyocyanine, pigment phénazinique, soluble dans l'eau et le chloroforme, spécifique de l'espèce *P.aeruginosa*; la pyoverdine, ou pigment vert fluorescent, soluble uniquement dans l'eau et élaborée en particulier par *P.aeruginosa* et *P.fluorescens*. Ces bactéries sont capables d'utiliser une variété très large de substrats comme source de carbone et d'énergie. Ceux-ci comprennent les glucides, lipides, acides aminés, acides organiques, et aussi un grand nombre de corps aromatiques benzéniques, phénoliques, terpénique, des stéroïdes, etc.

Dans le genre *Pseudomonas* quelques espèces se signalent à l'attention, du fait de leur pouvoir pathogène opportuniste. *P.aeruginosa*, l'espèce type, est un germe ubiquiste communément rencontré dans le sol et plus encore dans les eaux, capable de se multiplier à 41°C contrairement à *P.fluorescens* et *P.putida*. Fréquemment isolé sur la peau et les muqueuses de l'homme ou de l'animal, il est aussi particulièrement résistant aux antibiotiques et même aux antiseptiques. En milieu hospitalier il est à l'origine de surinfections et de suppurations locales ou profondes, isolé essentiellement chez des patients présentant immunodéficience locale ou générale (brûlés, cancéreux, etc.), et très fréquemment impliqué

dans les infections nosocomiales (infections pulmonaires, cutanées…). De même qu'il est phytopathogène avec beaucoup d'autres espèces du même genre **[31].**

IV.b.2.1.2 Famille des Entérobactéries

Ce sont des hôtes du tube digestif de l'homme et des animaux, mais aussi de nombreuses souches de cette famille ont été isolées de l'environnement aquatique ou terrestre. Les bactéries de cette famille cultivent facilement sur milieux ordinaires et utilisent une très large variété de composés organiques simples comme source d'énergie: sucres, acides aminés, acides organiques. Elles sont anaérobies facultatives, bâtonnets, mobiles par cils péritriches ou immobiles, possédant des fimbriae appelés aussi pili communs, qui leur confèrent des propriétés hemagglutinantes, et dans certains cas, des propriétés d'adhésion aux cellules animales. La présence d'une capsule est parfois observée chez les *Klebsiella*. La plupart des Entérobactéries pathogènes se multiplient à la température optimale de 37°C **[31].**

IV.b.2.1.2.1 Le groupe K.E.S

C'est-à-dire *Klebsiella, Enterobacter* et *Serratia* ou groupe des acétoïne positive (un métabolite de leur fermentation). Il rassemble des espèces considérées depuis longtemps comme commensales, et actuellement responsables d'un grand nombre de complications infectieuses en milieu hospitalier. Les infections broncho-pulmonaires souvent dues à *K.pneumoniae* (1 à 5 % de toutes les pneumonies bactériennes) et plus rarement sont rencontrés *Enterobacter* et *Serratia*. Les bactéries K.E.S. provoquent 20 % des infections urinaires nosocomiales avec une prédominance de *K.pneumoniae*. Autres infections secondaires dues à des soins ou des gestes chirurgicaux: cutanées, vasculaires, péritonéales, vésiculaires ou des septicémies causées par un matériel souillé (la mortalité reste élevée malgré une antibiothérapie adapté **[31].**

IV.b.2.1.2.2 Genre *Escherichia*

Ce genre comprend 5 espèces, mais *E.coli* est la plus importante. Cette espèce est subdivisée en sérotypes sur la base des antigènes présents.

E.coli, un hôte commun de l'intestin de l'homme (108 / g de selles), et des animaux; elle est recherchée à ce titre, comme germe témoin de contamination fécale, dans l'eau et les aliments. A l'intérieure de l'espèce il y a des pathotypes souvent associés à des sérotypes particuliers. Certains de ces pathotypes sont responsables d'infections intestinales (gastroentérites et diarrhées), leur pouvoir pathogène est induit par des facteurs d'adhésion et/ou la production d'entérotoxines. *E.coli* entéropathogène (diarrhées infantiles), *E.coli* entérotoxinogène

(turista), *E.coli* entéroinvasif (invasion des cellules intestinales), *E.coli* entérohémorragique (diarrhées sanglantes), *E. coli* entéroadhérent (diarrhée du voyageur).

D'autres responsables de méningites néonatales, provoquent des infections du tractus urinaire, ou encore des septicémies qui correspondent à un nombre restreint de sérotypes **[31, 32].**

IV.b.2.2 bactéries à gram positif

IV.b.2.2.1 Genre *Staphylococcus*

Les staphylocoques sont des bactéries sphériques, qui se divisent sur plusieurs plans pour former des amas réguliers ou irréguliers en grappe de raisin, d'où leur nom (en grec staphylos), ils sont immobiles et cultivent sur des milieux contenant 5% de Na Cl et pour certains jusqu'à 10 et même 15%. Ils sont aérobies ou anaérobies facultatifs.

Les staphylocoques sont des germes ubiquistes largement distribués dans l'environnement naturel de l'homme, mais ils le sont plus fréquemment et en plus forte densité sur les surfaces cutano – muqueuses des mammifères. Il existe une certaine relation entre les espèces de staphylocoques et l'hôte qui les héberge. *S.epidermidis* est l'espèce la plus fréquente et la plus abondante sur les surfaces cutanées de l'homme. *S.aureus* est l'espèce prédominante chez l'homme et autres mammifères, la cavité nasale de l'homme est sa niche préférentielle.

Les staphylocoques ont un pouvoir pathogène opportuniste extrêmement large qui s'exerce avec une grande fréquence en milieu hospitalier. L'espèce *S.aureus*, responsable d'infections pyogènes de la peau et des muqueuses (furoncle, impétigo, staphylococcie maligne de la face, staphylococcies bulleuses, etc.), mais aussi osseuses (ostéomyélite), digestives (entérocolites post-antibiotiques), septicémiques. *S.epidermidis* un agent de plus en plus fréquent d'infections nosocomiales **[31, 32].**

IV.b.2.2.2 Les Streptocoques

Ils sont subdivisés selon les études phylogénétiques en trois genres majeurs: le genre *Streptococcus* correspondant aux espèces d'intérêt médical en particulier *S.pyogenes* (groupe pyogenes), et à celles de la cavité orale qui comprennent les espèces α – hémolytiques (groupe viridans), le genre *Enterococcus* qui rassemble les espèces de la flore intestinale de l'homme et de certains animaux (groupe entérocoques), et le genre *Lactococcus* propre aux espèces lactiques (groupe lactique).

Les Streptocoques sont des cellules ovoïdes, sphériques ou quelquefois allongées en fuseaux, se divisent sur un seul plan pour former des paires ou des chaînettes. Ce sont des anaérobies aérotolérantes c'est-à-dire incapables d'utiliser l'oxygène mais se multiplient en sa présence, se cultivent bien dans une atmosphère contenant du CO_2.

Les espèces du premier groupe, peuvent être responsables d'infections de gravité variable. *S.pyogenes* est un hôte inconstant du rhino-pharynx des individus en bonne santé et peut déterminer des infections aiguës, de la sphère ORL (angines érythémateuses, scarlatine, rhinites, sinusites, otites), de la peau et des muqueuses (érysipèle, impétigo, pyodermite), des complications non suppurées (rhumatisme articulaire aigu, glomérulonéphrite aiguë).

S.agalactiae est un pathogène pour le nouveau né ou le jeune enfant (méningite, pneumonie, conjonctivite, otite). Le deuxième groupe représente l'essentiel de la flore microbienne de la bouche et des voies respiratoires supérieures, *S.mutans* qui rassemble sept espèces dont le rôle dans la carie dentaire est discuté, *S.oralis* (huit espèces) certaines de ces espèces sont isolées au cours d'infections purulentes ou d'endocardites.

Les espèces du groupe des Entérocoques n'ont pas un rôle important dans les infections mais sont quelquefois isolées dans les endocardites et les infections urinaires. Ils sont recherchés aussi comme indicateurs de contamination fécale des eaux de consommation et des produits alimentaires **[31].**

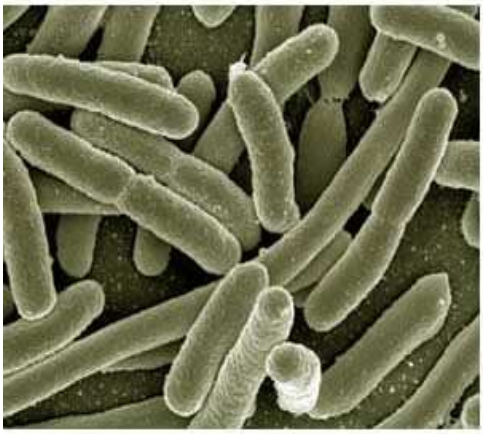


Fig.IV.14 klebsiella Pneumonie

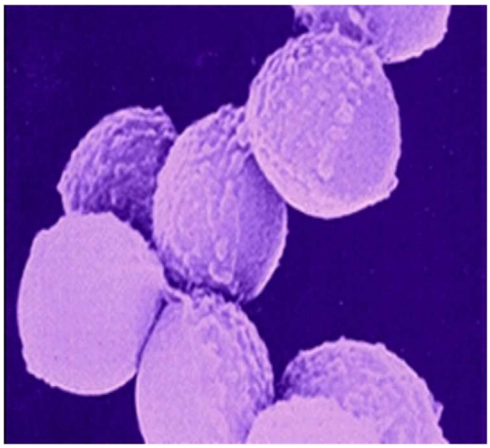


Fig.IV.15 Staphylococcus aureus

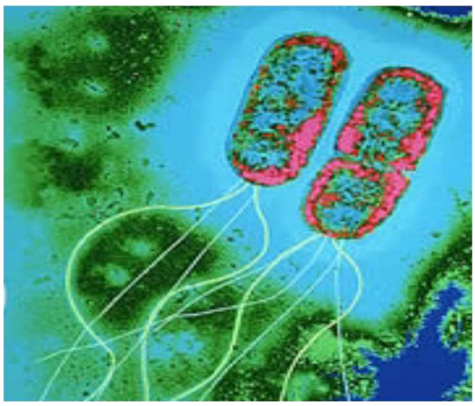


Fig.IV.16 Pseudomonas aeruginosa

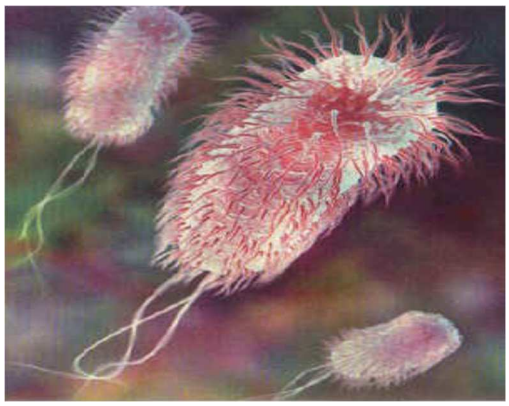


Fig.IV.17 Escherichia coli

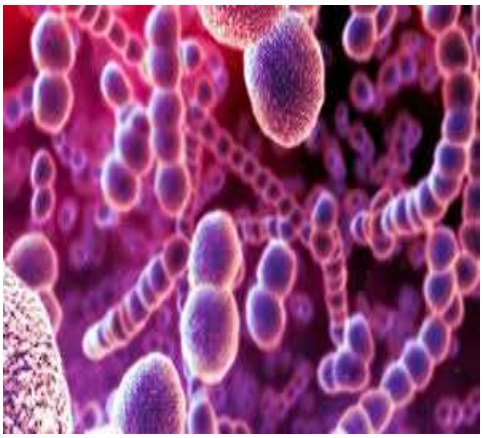


Fig.IV.18 *Streptocoque*

IV.b.3 Matériels et méthodes

IV.b.3.1 Provenance des germes

Les souches pathogènes utilisées sont largement rencontrées dans diverses pathologies chez l'homme. Elles sont indiquées dans le tableau IV.1.

Tableau IV.5 Provenance des germes étudiés

Souches utilisées	Origine
Bactéries à GRAM (-) : ***Echerichia coli ATCC25922*** ***klebsiella Pneumonie ATCC700603*** ***Pseudomonas aeriginosa ATCC 27853***	ATCC (American Type Culture Collection)
Bactéries à GRAM (+) : ***Staphylococcus aureus*** ***Streptocoque***	Laboratoire de microbiologie de l'hôpital de Boudiaf

IV.b.3.2 Techniques d'étude du pouvoir antimicrobien

Nous avons procédé techniques utilisées sont celles de la diffusion sur gélose ou méthode des disques et la technique sur milieu liquide.

IV.b.3.2.1 Méthode de diffusion sur Agar (l'aromatogramme)

Les extraits: méthanolique, chloformique, acétate d'ethylique et butanolique ont été dissous dans le diméthylsulfoxide (DMSO). 12 mg de chaque extrait ont été dissous dans 1 ml du solvant indiqué.

La méthode utilisée est celle de la diffusion sur milieu solide. Les différentes espèces bactériennes sont d'abord repiquées par la méthode des stries dans des boites de Pétri contenant le milieu Mueller Hinton, puis incubées à 37 °C pendant 24 h. Une ou plusieurs colonies de chaque culture pure bien isolée de chaque type de bactéries, prélevée à l'aide d'une anse chauffée, est reprise dans 10 mL d'eau physiologique stérile afin d'obtenir une suspension bactérienne dans chaque tube. Les tubes contenant les suspensions ainsi préparées, sont agités, puis les mélanges sont étalés dans des boîtes de pétri de gélose Mueller Hinton de façon à recouvrir presque entièrement la surface gélosée. Des mouvements de

rotation faits à la main accélèrent le recouvrement. Après l'inondation de toute la surface du milieu par la suspension bactérienne, le surnagent a été jeté par aspiration avec une pipette de transfert. Ces boîtes sont par la suite incubées à 37°C, pendant une demi-heure, pour la fixation de la souche bactérienne sur le milieu gélosé et la formation d'un tapis bactérien**.** Des disques stériles de 6 mm de diamètre, préalablement imbibés des solutions à tester à des concentrations bien déterminées, sont placés sur le tapis bactérien. Chaque boîte a reçu quatre disques déposés sur un numéro d'identification apposé sur la face inférieure de la boîte. Les milieux ont ensuite été incubés à l'étuve pendant 24 heures environ.

La mesure du diamètre des zones d'inhibition, dans le cas de sensibilité autour des disques de 6 mm de diamètre.

IV.b.3.2.2 Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

Cette technique consiste à faire agir en phase liquide des concentrations croissantes des extraits sur des microorganismes.

-A 18 mL de milieu de Muller-Hinton on ajoute 2mL de chaque extraits et homogénéiser le mélange par mouvements rotatoires,

-Mettre 10 mL de cette solution dans une boite de Pétri.

-préparer des doubles dilutions avec Muller-Hinton fondu de le reste des solutions : dose/2; dose/4;…

- homogénéiser le mélange par mouvements rotatoires.

-Mettre 10 mL de chaque mélange dans une boite de Pétri et laisser sécher.

- Ensemencer les boîtes de Pétri par le même inoculum préparé pour l'aromatogramme et de même façon.

-Enfin, incuber à 37°C pendant 18 à 24 heures.

-La lecture et l'interprétation des résultats c'est le calcul de la CMI qui est la concentration de l'extrait où il n'y a pas de culture visible (inhibition totale).

IV.b.4 Résultats et discussion

IV.b.4.1 Mesure des zones d'inhibition

L'activité antimicrobienne des extraits de la plante *Anvillea r.* a été évaluée *in vitro* contre ces cinq espèces bactériennes (Tableau IV.2).

Tableau IV.6 Diamètres (mm) des zones d'inhibition des extraits de la plante *Anvilea radiata*

Les bactéries	Les extraits			
	Ex.Me	Ex.Cl	Ex.AcEt	Ex.Bu
E. coli ATCC 25922	inactif	12.40	7.50	inactif
Klebsiella pneumonia ATCC700603	6.11	7.20	6.50	8.82
Pseudomonas aeruginosa	7.50	7.20	6.48	6.52
Staphylococcus aureus	9.20	15.90	9.48	8.34
streptocoque	16.48	21.68	11.36	inactif

Les diamètres des zones d'inhibitions sont représentées dans le tableau 6 et dans la figure IV.20 sous forme d'histogramme.

Tous les extraits montrent une inhibition de la croissance vis-à-vis de toutes les espèces avec des zones d'inhibition qui varient entre 6.11 et 21.68 mm à l'exception de celle de l'extrait butanolique et méthanolique.

-De même pour le germe pathogène *Echirichia coli*, on remarque l'absence d'une activité pour les deux extraits : méthanolique et butanolique.

-on remarque l'absence d'une activité pour l'extrait butanolique contre le germe pathogène *Streptocoque*

- Les bactéries à Gram positif ont été plus sensibles que celles à Gram négatif, particulièrement *Streptocoque*, qui était l'espèce la plus sensible de l'extrait chloroformique.

Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment publiés sur les germacranolides qui isolés de l'extrait chloroformique de *l'Anvillea radiata* **[33].**

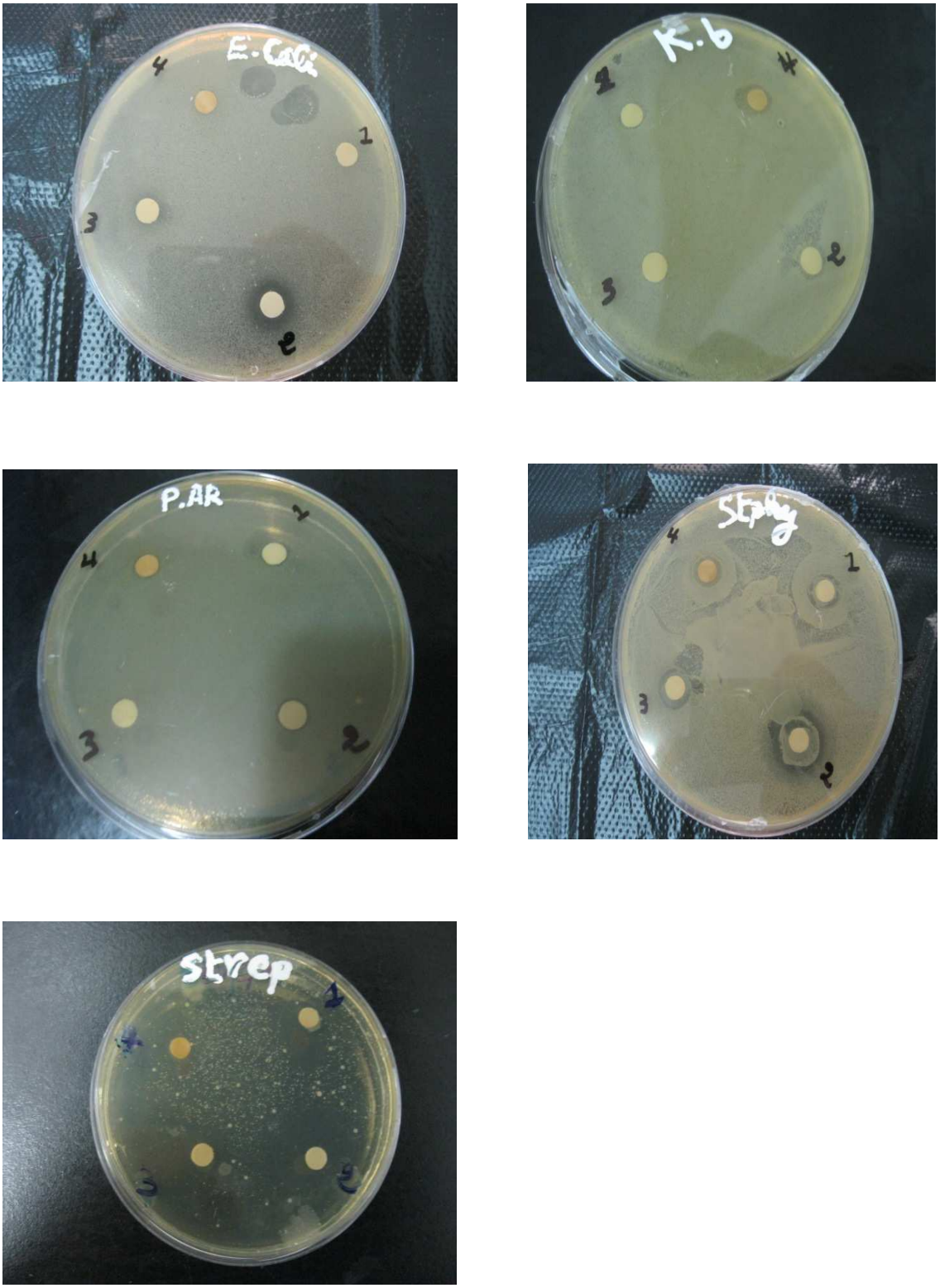


Fig.IV.19 *Zones d' inhibition* des extraits d'Anvillea r. 1-Ex.Me 2-Ex.Cl 3-Ex.Acét 4-Ex.But

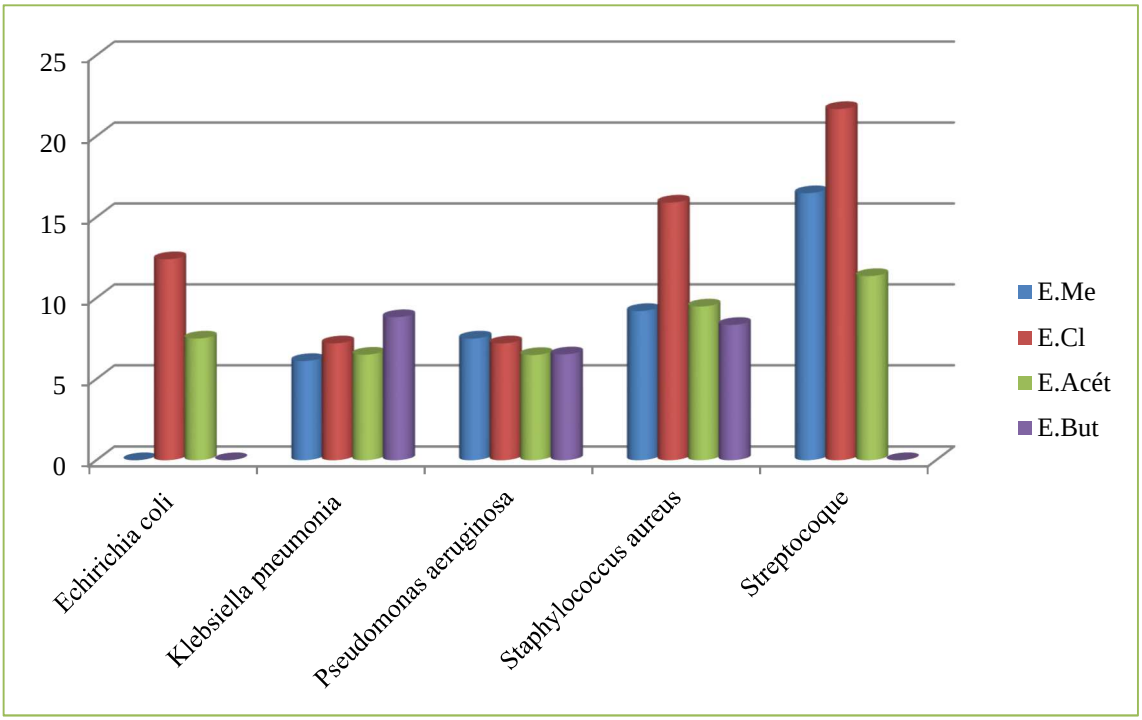


Fig.IV.20 Diamètres (mm) des zones d'inhibition des extraits de la plante *Anvilea radiata*

IV.b.4.2 Calcul des Concentrations Minimales Inhibitrices

Tableau IV.7 Valeurs des CMI des extraits de la plante *Anvillea radiata*

Les bactéries	Les extraits µg/mL			
	Ex.Me	Ex.Cl	Ex.AcEt	Ex.Bu
E. coli ATCC 25922	/	150	75	/
Klebsiella pneumonia ATCC700603	300	300	75	150
Pseudomona s aeruginosa	150	300	37.5	300
Staphylococcus aureus	75	150	37.5	75
Streptocoque	75	75	37.5	/

Les concentrations minimales inhibitrices obtenues varient de 37.5 à 300 µg/mL pour les bactéries à gram négatif et entre 37.5 à 150 µg/mL pour les bactéries à gram positif.

Streptocoque s'est avérée être sensible à toutes les concentrations utilisées, la CMI est évaluée inférieure à 37.5 µg/mL.

Les résultats obtenus dans le présent travail montrent que les extraits chloroformique et acétate d'éthyle ont un effet inhibiteur élevé envers la croissance de toutes les souches bactériennes testées paraport les extraits polaires (méthanolique et butanolique). Plusieurs études ont rapporté aussi que les extraits aqueux de différentes plantes de la famille des astéracées ne présentent aucune activité antibactérienne, alors que les extraits organiques et les huiles essentielles de ces plantes inhibent très significativement la croissance des souches testées **[34, 35].** Selon Candan et ses collaborateurs (2003), les substances hydrosolubles exercent un effet plus faible comparé à celui des substances non hydrosolubles. Cela réfère probablement à la capacité des molécules liposolubles de s'intercaler dans les membranes des cellules bactériennes et les endommager.

IV.c Activité inhibitrice d' α-glucosidase

IV .c.1 Introduction

Des milliers d'études scientifiques ont montré les propriétés thérapeutiques importantes de métabolites secondaires de plantes dans la prévention de nombreuses maladies chroniques, telles que les maladies neurodégénératives et le diabète sucré. Ces maux affectent les gens dans un rythme croissant et alarmant **[36, 37].**

Le diabète est un trouble métabolique dû à une insuffisance ou une mauvaise utilisation de l'insuline caractérisée par une glycémie à jeun supérieure à 1,26 g/L vérifiée à deux reprises **[38].**

La prédominance du diabète au cours des dernières décennies a considérablement augmenté dans le monde entier **[39]**. En effet, l'OMS souligne une incidence mondiale progressive du diabète. De 30 millions de diabétiques répertoriés en 1985, les chiffres sont respectivement passés à 135 millions en 1995, 177millions en 2000 et 347 millions en 2011. On estime que d'ici 2030, 438 millions d'individus en seront atteints **[38].** Sauf traitée rapidement, il peut conduire à des complications graves, y compris l'hyperglycémie, acidocétose diabétique, maladies cardio-vasculaires et l'insuffisance rénale chronique **[40].** Le réglage du niveau de sucre dans le sang est une approche très important et efficace pour contrôler le diabète. L'un des moyens de lutte contre ces maladies est l'inhibition d'enzymes avec des rôles critiques dans leur évolution Glucosidase, souvent situé sur la surface de la bordure en brosse des cellules intestinales, est crucial pour la digestion des oligosaccharides à des monosaccharides qui sont facilement absorbés par l'intestin **[41].**

IV.c.2 Classification du diabète sucré

Depuis 1997, une nouvelle classification du diabète sucré a été proposé par un groupe d'experts sous la responsabilité de l'Association Américaine du Diabète (ADA) remplace celle élaborée en 1979 par le "National Diabètes Data group" et entérinée en 1980 par l'OMS **[42].**

IV.c.2.1 le diabète de type 1

L'hyperglycémie est due à une carence absolue en insuline. Cette forme de diabète comprend les cas attribuables à un processus auto-immun conduisant à la destruction auto-immune des cellules β des îlots de Langerhans.

IV.c.2.2 le diabète de type 2

La carence en insuline est relative et l'hyperglycémie est liée à l'association, à des degré divers, d'une insulinorésistance hépatique et périphérique et d'une insulinopénie. Le diabète de type 2 concerne 85 à 95% des patients diabétiques **[43].**

IV.c.2.3 Les diabètes dits "spécifiques"

Secondaires à une maladie pancréatique, à une endocrinopathie, iatrogène ou encore liés à des anomalies génétiques.

IV. c.2.4 Le diabète gestationnel

Correspond à un trouble ou à une intolérance au glucose apparaissant entre la 24ème et la 28ème semaine de grossesse et disparaissant après l'accouchement.

IV.c.2.5 La classe "altération de l'homéostasie glucidique"

Correspond à des anomalies minimes de la régulation glycémique qui traduisent une augmentation du risque de diabète et de maladie cardiovasculaire **[44].**

IV.c.3 Les inhibiteurs de l' *α*-glucosidase

Sont orales médicaments antidiabétiques utilisés pour diabète sucré de type 2 qui fonctionnent en empêchant la digestion des glucides ingérés, conduisant ainsi à la suppression de la glycémie postprandiale **[45].**ce sont des inhibiteurs copétitifs et réversibles des alpha-glucosidases intestinales,enzymes de labordure en brosse des entérocytes hydrolysant les poly-, oligo- et di-saccharides en monosaccharides absorbables (glucose, fructose). Ces inhibiteurs jouent le role d'un faux substrat et retardent ainsi l'hydrolyse des glucides complexes (amidon, saccharose). Ceci a pour conséquence, un étalement dans le temps du passage sanguin du glucose avec réduction de l'hyperglycémie post prandiale sans entrainer une hyperinsulinémie [43]**.** Par conséquent, ces inhibiteurs sont prometteurs en tant qu'agents thérapeutiques pour le non-diabète sucré insulinodépendant **[46].** Cependant, l'inhibition du courant α-glucosidase tels que l'acarbose et le miglitol est pas satisfaisante et l'utilisation prolongée provoque souvent des effets secondaires nuisibles, y compris la diarrhée **[47],** la

douleur et la flatulence intestinale **[48].** Par conséquent, la recherche de nouveaux extraits naturels et composés inhibiteurs de α-glucosidase avère nécessaire.

L'carbose est constitué d'un cyclitol en C7 renfermant une double liaison éthylénique avec trois hydroxyles en 4, 5 et6 et une fonction alcool primaire en position allylique sur le carbone 3. Ce cyclitol est relié par son carbone 1 à l'azote d'un amino-sucré : le 4,6-désoxy-4 aminoglucose. L'esemble cyclitol etviosamine est appelé : Acarviosine cette dernière est liée par son C-1 hémiacétalique au C-4 d'un maltose **[43].**

Le Miglitol est un inhibiteur de l'alpha-glucosidase dérivé de lanojirimycine et de sa forme réduite, la 1 désoxynojirimycine.

IV.c.5 Mode opératoire

L'activité inhibitrice d' α-glucosidase a été déterminée comme précédemment décrite par Tao *et al*. **[49]** avec quelques modifications, comme précisé par Rengasamy *et al*. **[50]**. Le mélange réactionnel α- glucosidase contenait 2,5 mM de p-nitrophényl – α- D-glucopyranoside (pNPG), 250 µl d'extrait (diverses concentrations dans du DMSO) et 0,3 U / ml d'- α glucosidase dans un tampon phosphate, pH 6,9. Les tubes témoins contenaient seulement le DMSO, l'enzyme et le substrat, tandis que dans les témoins positifs L'acarbose a remplacé les extraits de plantes. L'absorbance de la p-nitrophenol résultant (PNP) a été déterminée à 405 nm et a été considéré directement proportionnelle à l'activité de l'enzyme.

Les extraits *d'Anvillea radiata* ont été testés pour l'activité inhibitrice de α-glucosidase à différentes concentrations (10 à 0,15 mg / ml). Chaque échantillon a été réalisé en triple. Le tableau IV.8 montre les valeurs IC_{50} des extraits/ produits.

Tableau IV.8 Les valeurs IC_{50} d'activité inhibitrice d' α-glucosidase.

Extrait/Produit	IC_{50}
Ex.Acét	0.92±0.01
Ex.But	0.81±0.03
Ex.Me	0.4±0.1
Ex.Cl	0.31±0.08
AO11	0.32±0.09
ARM17	0.48±0.04
ARJ11	0.49±0.2
AH11	0.24±0.07
P1	0.15±0.05
C11	0.09±0.01
C10	0.1±0.02
acarbose	0,07

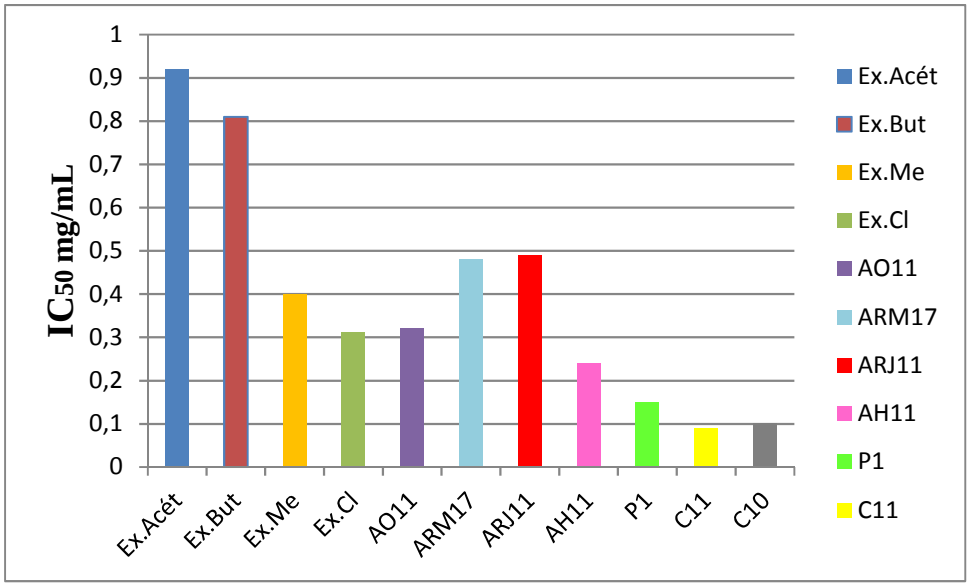


Fig.IV.21 Valeurs IC_{50} d'activité inhibitrice d' α-glucosidase des extraits et produits

IV.c.6. Résultat et discussion

L'activité inhibitrice de α-glucosidase des différents extraits et produits a été comparée sur la base de leurs valeurs IC_{50} l'acarbose a été utilisé comme témoin positif. Nos résultats

montrent que la valeur IC_{50} de l'acarbose était de 0,07 mg /mL, ce qui était 4 fois plus faibles que celle obtenue par Besbas *et al*.**[51]**

D'après les résultats on peut remarquer que l'extrait chloroformique est plus efficace que les autre extraits (0.31±0.08) mais à une faible teneur en composés phénoliques totaux (13.61 ± 0,21 mg / g d'extrait) et flavonoïdes (1.46±0.0002), cette activité est entrainé par des produits sesquiterpéniques lactones **C11** (0.09±0.01 mg/mL) et **C10** (0.1±0.02 mg/mL) et liée au groupe α-méthylène γ – lactone, Tandis que, les produits: P1 ARJ11, ARM17, AO11, AH11 présentent une activité antidiabétique importante, ces produits sont des flavonoïdes.

Certains flavonoïdes, tels que la rutine, myricetin, kaempférol et la quercétine, ont été signalés précédemment pour inhiber l'α-glucosidase et l'α-amylase. Ces flavonoïdes présentent à la fois hypoglycémique et antioxydant effets chez les animaux diabétiques **[52].** Les résultats de notre expérience semblaient être en accord avec cette conclusion **[53].**

Ces résultats justifiés les utilisations traditionnelles de l'espèce pour réduire les niveaux de glucose dans le sang.

Aucune référence n'a été trouvée pour l'activité inhibitrice α-glucosidase pour le genre *Anvillea*.

IV.d Activité allélopathique

IV.d.1 Introduction

Le phénomène de l'allélopathie est connu depuis plus de 2000 ans **[54].** Ce phénomène consiste à l'interférence chimique d'une espèce végétale avec la germination, la croissance ou le développement d'autres espèces de plantes.

Le terme allélopathie a été présenté pour la première fois par Molisch en 1937 **[55]**, comme étant l'interaction chimique entre les plantes comprenant les influences stimulatrices et inhibitrices. Ce terme est dérivé du mot grec «allelo» les uns des autres (Ang. of one another) et de «patheia» de souffrir (Ang. suffering) et indique l'effet préjudiciable de l'une sur l'autre, c'est à dire l'inhibition de la croissance d'une plante par une autre grâce à la production et la libération de substances chimiques toxiques dans l'environnement **[56].**

L'allélopathie est définie ultérieurement par Rice (1984) **[54]** comme tout effet direct ou indirect, positif ou négatif, d'une plante (micro-organismes inclus) sur une autre par le biais de composés biochimiques tels que les acides phénoliques, les flavonoïdes, les terpénoïdes et les alcaloïdes libérés dans l'environnement (atmosphère et sol). L'allélopathie est un phénomène complexe, il met en jeu, en plus des deux végétaux "producteur" et "cible", des molécules avec un intermédiaire qui est le sol, dont les caractéristiques abiotiques et biotiques (en particulier la microfaune) sont fondamentales pour l'expression de ce potentiel allélopathique. L'impact nuisible de l'allélopathie peut être exploité contre les parasites et les mauvaises herbes **[57].**

En 1996, la société internationale d'allélopathie (The International Allelopathy Society, IAS) défini l'allelopathie comme suit: «Tout processus impliquant des métabolites secondaires produits par les plantes, micro-organismes, virus et champignons qui ont une incidence sur la croissance et le développement de l'agriculture et les systèmes biologiques (à l'exclusion des animaux), y compris les effets positifs et négatifs » **[58]**.

Beaucoup d'auteurs **[59, 60, 61]** s'accordent pour définir l'allélopathie comme l'ensemble des phénomènes qui sont dus à l'émission ou à la libération de substances organiques par divers organes végétaux, vivants ou morts et qui s'expriment par l'inhibition ou la stimulation de la croissance des plantes se développant au voisinage de ces espèces ou leur succédant sur le même terrain.

Les molécules chimiques allélopathiques sont souvent des métabolites secondaires. Leur rôle ne semble pas nécessaire au niveau de la cellule car elles n'exercent pas de fonction directe dans les activités fondamentales du végétal: acides phénoliques, acide cinnamique et ses dérivés, flavonoïdes, terpénoïdes et alcaloïdes. Cependant, ces substances jouent un rôle important à l'échelle de la plante, car elles sont souvent capables d'inhiber la germination ou le développement des organismes alentour. Mais les conséquences des propriétés allélopathiques d'une plante peuvent être sélectives sur des plantes et pas d'autres et selon les doses, généralement les monocotylédones sont plus résistants que les dicotylédones **[62]**.

Dans les plantes, les molécules allélochimiques peuvent être présentes dans les feuilles, l'écorce, les racines, les exsudats des racines, les fleurs et les fruits. La livraison de ces molécules dans la rhizosphère est souvent produite par lessivage des feuilles et autres parties aériennes de la plante, par les émissions volatiles, par exsudation racinaire, et par la répartition de l'écorce et les feuilles mortes **[61]**.

L'effet de ces molécules peut être direct sur la plante cible, ou indirect par sa transformation dans le sol par les microorganismes.

La diversité des relations allélopathiques découverte chez les plantes, ouvre des perspectives d'utilisation importantes pour l'homme. Ces substances naturelles pourraient, à terme, solutionner les problèmes des mauvaises herbes qui doivent toujours être gérés par l'utilisation d'herbicides de synthèse. Si la majorité des problèmes d'adventices est maîtrisée à court terme par les produits chimiques, les effets néfastes à long terme ne doivent pas être occultés. On constate un appauvrissement de la flore dans les parcelles régulièrement désherbées, des résistances à certains herbicides sont apparues et les risques de pollution des eaux sont réels. Maîtriser l'usage des plantes et des substances allélopathiques en agriculture permettrait de disposer d'herbicides, de fongicides et d'insecticides naturels censés pouvoir préserver l'environnement. Ces dernières décennies il y a eu une hausse à la demande de composés allélopathiques naturels ayant une toxicité sélective sur les mauvaises herbes et qui peuvent être dégradés par les plantes ou les microorganismes du sol **[63]**.

L'utilisation des herbicides à un effet nocif sur l'environnement. Cet effet à poussé les recherches vers des méthodes biologiques (approches éco-friendly) afin de lutter contre les

mauvaises herbes. Dans cette optique, l'objectif de cette étude est de tester le pouvoir allélopathique des extraits de l'espèce *Anvillea radiata* sur la germination des graines de radis et le développement des plantules Les Tests d'allélopathie sont effectués dans le laboratoire selon un protocole *in vitro* classique cité dans la littérature **[64].**

IV.d.2 Matériels et méthodes

IV.d.2.1 L'activité allélopathique des extraits

Nous avons utilisé dix-huit boites de Pétri pour tester l'effet de quatre extrait sur la germination des graines de radis. Deux témoins ont été considérés, un en présence de l'eau distillée et l'autre en présence du méthanol. Les différents extraits ont été dissoutes de nouveau dans le méthanol 30 mg/2mL) pour estimer leur effets phytotoxiques . Du papier filtre placé dans des boîtes de Pétri, a été imbibé par l'eau distillée, le méthanol ou les différentes fractions organiques. Les solvants ont été évaporés pendant 1h à la température ambiante sous la haute. Après évaporation, 5 mL d'eau distillée ont été ajoutés (ce qui donne une concentration de 6000 ppm) et 20 graines imbibées ont été mises à germer pendant 7 jours.

Nous avons choisie des graines saines (sans anomalies) et qui ont presque la même taille (Fig IV.21).

Fig.IV.22 Des graines de Radis traitées par un extrait d'*Anvillea radiata*

IV.d.2.2 L'activité allélopathique des fractions

Après le fractionnement de l'extrait chloroformique (Fig.IV.22), nous avons utilisé vingt et un boites de Pétri pour tester l'effet de deux extrait (acétate d'éthyl, chloroforme) et trois fractions chloroformiques sur la germination des graines de radis. Deux témoins ont été considérés, un en présence de l'eau distillée et l'autre en présence du méthanol en vue d'éliminer l'effet du solvant organique. Les différents extraits ont été dissoutes dans le méthanol (10mg/2mL), 5 mL d'eau distillée ont été ajoutés (ce qui donne une concentration de 2000 ppm) .

Fig IV.23 Chromatogramme des fractions de l'extrait chloroformique

IV.d.2.3 Effet sur la germination

Le suivi de la germination a duré une semaine en dénombrant, tous les jours, les graines qui ont germé. Une graine est considérée germée quand la radicule atteint 2 mm **[65].** Le pourcentage de germination est calculé selon la formule :

$$PG = (NGG / NTG) * 100$$

Où :

PG : pourcentage de germination(%)

NGG : nombre de graines germées

NTG : nombre total de graines

IV.d.2.4 Effet sur la croissance

La croissance de la plantule commence lorsque la germination s'achève, elle se manifeste par la croissance de la radicule et la partie aérienne. Pour étudier l'effet des fractions sur la

croissance des plantules des espèces cibles, nous avons mesuré la longueur des racines et des parties aériennes, qui a été faite 7 jours après la germination sur un papier millimétrique (Fig.23) .

Les résultats ont été exprimés en pourcent du témoin selon la formule suivante :

Longueur (% du témoin)= (E/T) *100

E : longueur de l'organe sous l'effet de la fraction (extrait, composés)

T : longueur de l'organe témoin en présence d'eau distillée.

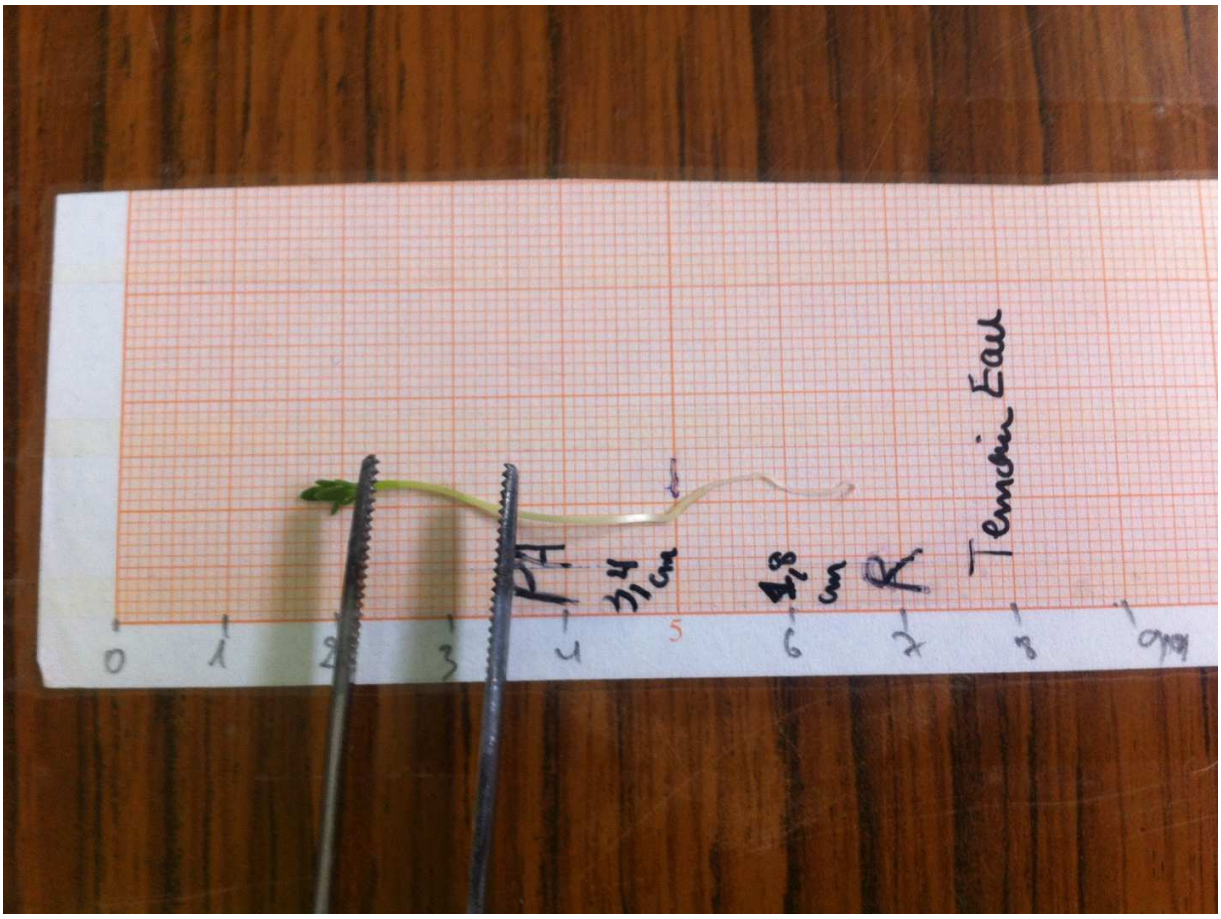


Fig.IV.23 Mesure de la longueur de la racine et de la partie aérienne d'une plantule de *Radis* traitée par l'eau distillée.

IV.d.3 Résultats

IV.d.3.1 Effet des extraits

IV.d.3.1.1 Effet des extraits sur la germination

Le tableau IV.9 présente la cinétique de la germination des graines de en présence des extraits de la plante *Anvillea radiata* (extrait Me, extrait Acét, extrait Cl, extrait But) à la concentration de 6000 ppm. Le témoin au méthanol a montré que ce solvant organique n'a pas eu d'effet sur la germination des graines et, par conséquent, les résultats enregistrés seraient tributaires aux allélochimiques présents dans les différents extraits.

D'après les résultats regroupés dans le tableau ci-dessous, il semble qu'une activité inhibitrice importante est observée à forte dose pour les extraits Cl et Acét (PG=0%) (Fig.24).

Fig.IV.24 Effet des extraits d'Anvillea radiata sur la germination de graines des Radis.

Tableau IV.9 Effets des extraits de l'*Anvillea radiata* sur la cinétique de la germination des graines de Radis (concentration utilisée 6000 ppm)

Jours / Echantillons	1	2	3	4	5	6	7
Témoin(Eau)	0	86.66	93.33	95	95	95	95
Témoin(MeOH)	0	86.66	90	93.33	95	96.66	96.66
Extrait Me	0	36.66	70	95	95	95	95
Extrait Cl	0	0	0	0	0	0	0
Extrait Acet	0	0	0	0	0	0	0
Extrait But	0	8.33	10	38.33	75	85	88.33

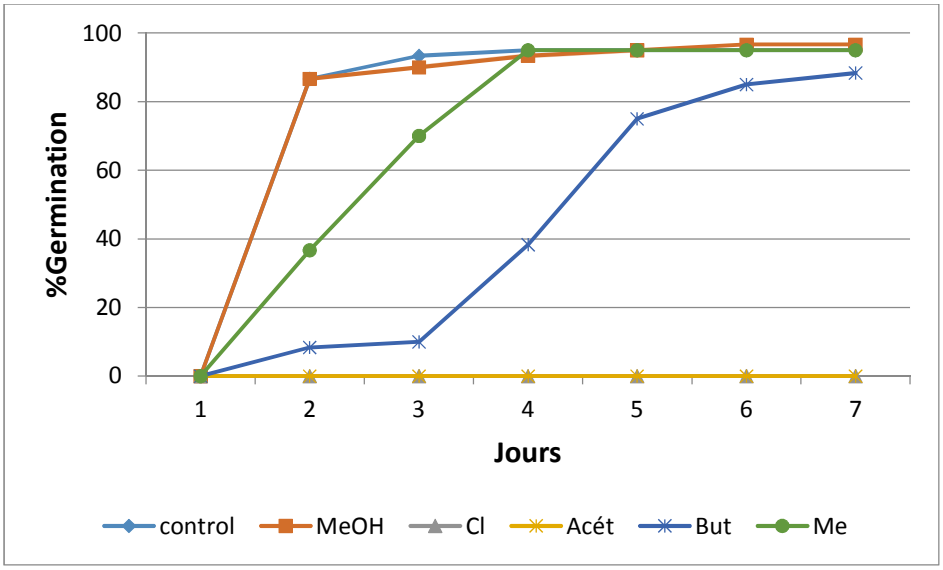


Fig.IV.25 Effets des extraits de l'*Anvillea radiata* sur la cinétique de la germination des graines de Radis (concentration utilisée 6000 ppm)

IV.3. 1. 2 Effet des extraits sur la croissance

La croissance des plantules cible sous l'effet de différentes extraits de *Anvillea Radiata* est illustrée par la figure IV.2.

La plus grande toxicité a été enregistrée avec les deux extraits Chloroformique et d'Acétate d'éthyl, nous avons observé une inhibition totale de la croissance des racines et des parties aériennes. De même pour les extraits Me et Bu l'inhibition a été respectivement de 3.88% et 10.35% pour les racines et de 48.59% et 42.44% pour les parties aériennes.

Nous constatons que la croissance de la racine a été beaucoup plus affectée que la partie aérienne.

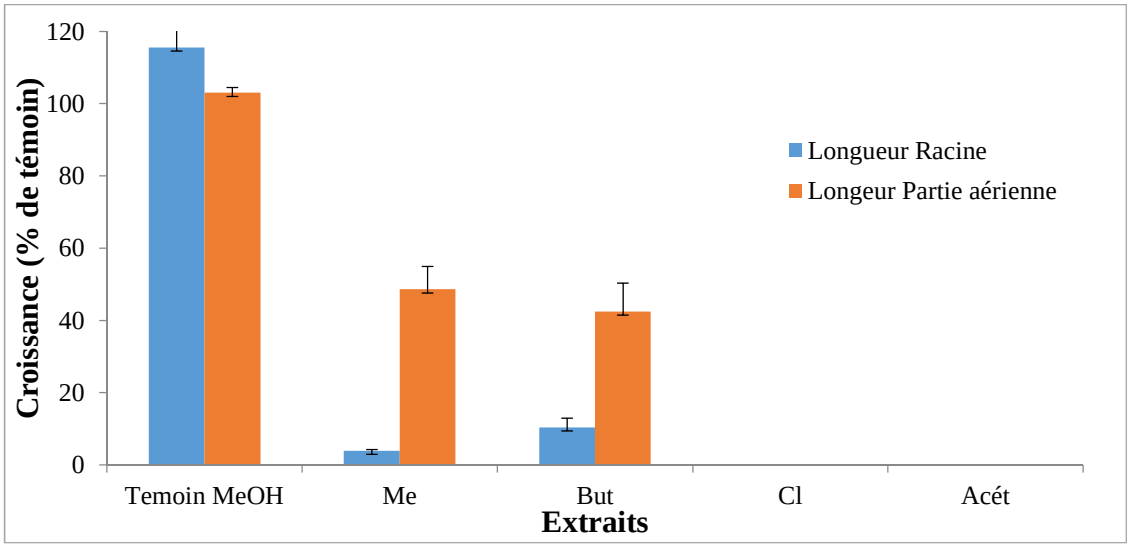


Fig.IV.26 Effet des extraits *d'Anvillea radiata* sur la croissance de la racine et de la partie aérienne de Radis, exprimée en pourcent du témoin.

IV.3.2 Effet des fractions

IV.3.2.1 Effet des fractions sur la germination

Le tableau IV.2 présente la cinétique de la germination des graines en présence des fractions de l'extrait chloroformique d' *Anvillea radiata* à la concentration de 2000 ppm. Les résultats enregistrés seraient tributaires aux allélochimiques présents dans les différentes fractions.

D'après les résultats regroupés dans le tableau ci-dessous, il semble qu'une activité inhibitrice importante est observée à forte dose pour les extraits Cl et Acét et les fractions F_2 et F_3 (PG=0%).

Tableau IV.10 Effets des fractions de l'extrait chloroformique d'*Anvillea radiata* sur la cinétique de la germination des graines de Radis (concentration utilisée 2000 ppm)

Jours / Echantillons	1	2	3	4	5	6	7
Témoin(Eau)	0	86.66	98.33	100	100	100	100
Témoin(MeOH)	0	86.66	90	93.33	95	96.66	96.66
Extrait Cl	0	0	0	0	0	0	0
Extrait Acét	0	0	0	0	0	0	0
F_2	0	0	0	0	0	0	0
F_3	0	0	0	0	0	0	0
F_4	0	78.33	90	98.33	100	100	100

IV.3. 2. 2 Effet des fractions sur la croissance

La croissance des plantules cible sous l'effet de différentes fractions d'*Anvillea Radiata* est illustrée par la figure IV.27.

La plus grande toxicité a été enregistrée avec les deux extraits Cloroformique et d'Acétate d'éthyl et avec les fractions F_1 et F_2 nous avons observé une inhibition totale de la croissance des racines et des parties aériennes. Mais la fraction F_4 à une inhibition très faible.

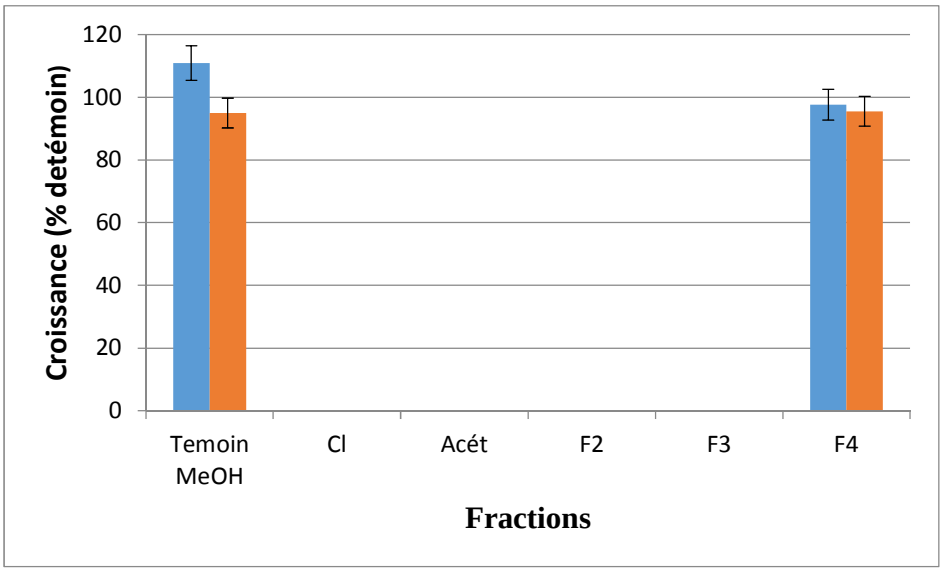


Fig.IV.27 Effet des fractions *d'Anvillea radiata* sur la croissance de la racine et de la partie aérienne de Radis, exprimée en pourcent du témoin.

IV.d.4 Discussions

Les résultats de notre étude ont montré que les extrais d'*Anvillea radiata* ont influencé la germination et la croissance de l'espèce cible *Raphanus sativus*. Ceci indique que ces extrais surtout les deux extraits: chloroformique et acétate d'éthyle sont riches en substances naturelles qui sont capables d'inhiber la germination et la croissance de certaines espèces végétales.

On pense que l'inhibition de la croissance des extraits est due probablement à la présence des composés allélochimiques tels que les polyphénols, flavonoïdes et sesquiterpènes dans ces extraits.

Plusieurs travaux ont démontré l'action toxique de diverses substances. Nombreuses lactones sesquiterpéniques de tournesols réduire les taux de germination de plantes d'autres familles pour réduire la concurrence dans local **[66].**

Quelques auteurs **[67],** ont rapporté que les sesquiterpènes de l'extrait de feuille de Magnolia grandiflora provoque l'inhibition de la germination du blé (Triticum aestivum), de la laitue (Lactuca sativa L), du radis (Rhaphanus sativus L) et de l'onion (Allium cepa). Les graines de laitue sont les plus sensibles par rapport aux graines de blé, radis et onion qui sont affectés par une forte concentration de sesquiterpènes.

Par ailleurs, des acides phénoliques des extraits aqueux de feuilles et de bulbes de l'Allium ursinum L. ont été testés sur plusieurs plantes **[68]** .Ces résultats ont montré que l'extrait de bulbes a un effet inhibiteur plus fort sur la germination que les extraits de feuilles, donc la teneur des substances allélopathiques joue un rôle important dans l'inhibition de la germination. En effet, des autres auteurs **[69],** ont démontré quel potentiel allélopathique peut changer avec les différentes parties de la plante, par la concentration d'extraits et les fractions extraites.

Une étude a également démontré que les substances allélopathiques d'extrait de feuille de l'orge ont un effet plus important que les racines **[70].**

Les différents tissus végétaux comme: tige, racine et graine et même les fleurs, peuvent libérer certains quantités d'allélochimiques dans l'environnement **[71].**

Références

[1] Branen, A.L. (**1975)** "Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylatedhydroxytoluene. Journal of the American Oil Chemists Society, *52*: 59-63.

[2] Sseau. B.,(2002). Les radicaux libres dans l'organisme des animlaux d'élevage : conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leur produits, INRA Prod. Anim., vol 15,pp 67-82.

[3] Favier A.,(2003). Le stress oxydant, Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique, l'actualité chimique.108-115.

[4] Chu W L, Lim Y W, Radhakrishnan A K and Lim P E (2010). Protective effect of aqueous extract from Spirulina platensis against cell death induced by free radicals. BMC Complementary and Alternative Medicine, **10** (53), 2-8.

[5] Kumari A and Kakkar P (2008). Screening of antioxidant potential of selected barks of Indian medicinal plants by multiple *in vitro* assays. Biomedical and environmental sciences, **21**, 24-29.

[6] Montagnier L (2009). Oxidative stress in preventive medicine. Free Radical Research, **43**, 27-97.

[7] Ansari K N (1997). The free radicals-the hidden culprits-an update. Indian Journal of Medical Sciences, **51**, 319-336.

[8] A. Sokol-Letowska, J. Oszmianski, A. Wojdylo, (2007), Food chemistry.*103*, 853-859.

[9] W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset, , (**1995).** Lebensmitel–Wissenschauft und Technologie, *28*, 25-30.

[10] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Free Radic Biol Med., 26, 1231.

[11] Belyagoubi B. Nabila, (2012). Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques

de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien.thèse de doctorat. Université de Telemcene.p51-52.

[12] Oyaizu, M. (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. Jpn. J. Nutr, 44: 307-315.

[13] Bougatef, A., Hajji, M., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., Nasri, M. (2009). Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. Food. Chem, 114: 1198-1205.

[14] Unten, L., Koketsu, M., Kim, M. (1997). Antidiscoloring activity of green tea polyphenols on β-carotene. J. Agr Food. Chem, 45: 2009-2019.

[15] Obiang-Obounou, P.W. and G.H. (2013) Ryu, The effect of feed moisture and temperature on tannin content, antioxidant and antimicrobial activities of extruded chestnuts. Food Chem., 141:1166-1170.

[16] Wang, H., X. Dong Gao, G.C. Zhou, L. Cai, W.B. Yao, (2008) . *In Vitro and in Vivo* Antioxidant Activity of Aqueous Extract from Choerospondias axillaris Fruit. Food Chem, 106: 888 895.

[17] Benaissa, O., A. Amrani, S. Bicha, D. Zama, F. Benayache, E. Marchioni et al., (2013). Free radical scavenging action of phenolic compounds from Limonium Bondueli (Plumbaginaceae). Scholars Research Library, 5: 234-240.

[18] Hatano, T., Kagawa, H., Yasuhara, T., Okuda, T., (1988). Two new flavonoids and otherconstituents inlicorice root; their relative astringency and radical scavengingeffects. Chem. Pharm. Bull. 36, 2090–2097.

[19] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice- Evans, C., (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorizationassay. Free Radical Bio. Med. 26, 1231–1237.

[20] Ikram, E.H.K., Eng, K.H., Jalil, A.M.M., Ismail, S., Idris, S., Aslan, A., Nazri, H.S.M.,Diton, N.A.M., Mokhtar, R.A.M., (2009). Antioxidant capacity and total phenol content of Malaysian underutilized fruits. J. Food Compos. Anal. 22,388–393.

[21] Djeridane M, Yousfi B, Nadjemi D, Boutassouna P and Stocker N (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. Food Chemistry, **97**, 654-660.

[22] Falleh H, Ksouri R, Chaieb K, Karray-Bouraoui N,Trabelsi N, Boulaaba M and Abdelly C. (2008). Phenolic composition of Cynara cardunculus L. organs, and their biological activities. Comptes Rendus Biologies, **331,** 372-379.

[23] Le K, Chiu F and Ng K. (2007). Identification and quantification of antioxidants in Fructus
lycii. Food Chemistry, **105**, 353-363.

[24] Khiati M. (1998). Guide des maladies infectieuses et parasitaires. OPU, Alger.

[25] Yala D, Merad A S, Mohamedi D and Ouar Korich M N. (2001). Classification et mode d'action des antibiotiques. Médecine du Maghreb, n° 91.

[26] Tortora G J, Funke B R and Case C L. (2003). Introduction à la Microbiologie. Editions du Renouveau Pédagogique. France.

[27] Heath, H.B. (1981). Source book of flavours. Ed. Springer, 1st edition.

[28] Essawi, T. et Srour, M. (2000). Screening of some palestinian medicinal plants for antibacterial activity. Journal Of Ethnopharmacology, 70: 343-349.

[29] Cowan M M (1999). Plant Products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews, **12** (4), 564-582.

[30] Scalbert A (1991). Antimicrobial properties of tannins. Phytochemistry, **30**, 3875-3883.

[31] Leclerc H, Gaillard J-L, Simonet M (1995) Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien. Doin Editeurs, Paris.

[32] A. Zardi-Berguaoui.(2006). Contribution à l'Etude Biologique et Chimique des Plantes : Echiochilon fruticosum, Matthiola longipetala, Anacyclus cyrtolepidioïdes, Opuntia lindheimeri var. linguiformis, Opuntia macrorhiza, Opuntia microdasys et Aloe vera poussant en TUNISIE. Thèse de doctorat

[33] B. El Hassany, F. El Hanbali, M. Akssira, F. Mellouki, A. Haidour, A.F. Barrero, (2004). Germacranolides from Anvillea radiata. Fitoterapia 75 573– 576.

[34] Candan F, Unlu M, Tepe B, Daferera D, Polissiou M, Sökmen A and Akpulat H A (2003). Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, **87**, 215-220.

[35] Sokmen A, Sokmen N, Daferera D, Polissiou M, Candan F, Unlu M and Akpulat A (2004). The in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil and methanol extracts of *Achillea biebersteini afan*. (Asteraceae). *Phytotherapy Research*, **18**, 451-456.

[36] G. Rea, A. Antonacci, M. Lambreva, A. Margonelli, C. Ambrosi, M.T. Giardi, U.S. Q3Springer, vol. 698, pp. 1–16 (Chapter 1).

[37] A. Corrado, F. D'Onofrio, N. Santoro, N. Melillo, F.P. C**(2006)** antatore, Minerva Med. 97495–509.

[38] Mathieu Ndomou, Patricia Kammegne Djidjou, Moise Ntah Ayong, Inocent Gouado, Clergé Tchiegang (2014), Evaluation de l'activite antidiabetique des extraits de feuilles de *Gnetum africanum* et *Gnetum bulchozzianum* (Gnétacées),15,60-65.

[39] J. Gorelick, A. Kitron, S. Pen, T. Rosenzweig, Z. (2011) Madar, J. Ethnopharmacol. 137 1245–1249.

[40] Z.P. Yu, Y.G. Yin, W.Z. Zhao, Y.D. Yu, B.Q. Liu, F. Chen, (2013). Food Chem. 129 1376–1382.

[41] S.D. Kim, (2013). Food Chem. 136 297–300.

[42] Rodier M., (2001). Définition et classification du diabète. Médecine Nucléaire vol.25 - n°2 :

91-93.

[43] Mbodj Ndeye Awa (2003), Etude de l'activité antidiabétique des extraits acétoniques, méthanoliques et hexaniques de Vernonia colorata (wild/ drake) Composées chez des rats wistar, thé de doctorat en pharmacie, Dakar

[44] Djrolo F., Durackova Z., Houngbe H., Avode G., Attoulou V., Addra B., Kodjoh N.,Avimadj M., (2008). Oxidants, Antioxidants and Oxidative stress. Mitochondrial medicine.Gvozdjakova A (ed). P :19-43.

[45] P.M. Heacock, S.R. Hertzler, J.A. Williams, B.W. Wolf, J. Am, (2005). Diet. Assoc. 10565–71.

[46] A.D. Baron,(1998). Diabetes Res. Clin. Pract. 40 51–55.

[47] H.E. Lebovitz, (1997). Endocrinol. Metab. Clin. North Am. 26 539–551.

[48] T. Fujisawa, H. Ikegami, K. Inoue, Y. Kawabata, T. Ogihara, (2005). Metabolism 54 387–390.

[49] T. Tao, Y. Zhang, Y. Cheng, Y. Wang, (2013). Biomed. Chromatogr. 27 148–155.

[50] R.R.K. Rengasamy, M. Aderogba, S.O. Amoo, W.A. Stirk, J. Van Staden, J. (2013). FoodChem. 141 1412–1415.

[51] Malek Besbes Hlila, Habib Mosbah, Kawther Majouli, Kamel Mssada,Hichem Ben Jannet, Mahjoub Aouni, Boulbaba Selmi. (2015). BIOMAC 4969 1–7.

[52] Kamalakkannan, N., & Prince, P. S. M. (2006). Rutin improves the antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic rat tissues. Molecular and cellular biochemistry, 293, 211–219.

[53] Xincheng Yao, Ling Zhu , Yuxin Chen , Jun Tian , Youwei Wang. (2013). In vivo and in vitro antioxidant activity and a-glucosidase, a-amylase inhibitory effects of flavonoids from Cichorium glandulosum seeds. Food Chemistry 139 59–66.

[54] E.L. Rice, (1984). Allelopathy 2 Edition, Academic Press, INC Orlando,Florida.

[55] H. Molish, (1937). Der Einfliss einer Pflanze auf die andere-Allelopathie, Edition Classic, Germany.

[56] Heisey, R. M. (1997). Allelopathy and the secret lif of Ailanthus altissima. Arnoldia 57(3):28- 36.

[57] M. F. Hernandez, P. L. V. Falé, M. E. M. Araùjo, M. L. M. Serralheiro, (2010). Food chemistry, , 120, 1076-1082.

[58] Torres, A., R. M. Oliva, D. Castellano and P. Cross.(1996). Proceedings of First World Congress on Allelopathy. A Science of the Future. SAI, University of Cadiz,Cadiz, Spain.p. 278

[59] DELABAYS.N et MERMILLOD.G., (2004).Phénomène d'allélopathie premières observations auchamp, Revue Suisse Agric.n°34.pp.213-237

[60] KRUSE, M., M. STRANDBERG and B. STRANDBERG, (2000). Ecological Effects of Allelopathic Plants: a Review. NERI Technical Report No. 315. National Environmental Research Institute, Silkeborg, Denmark. 66 p.

[61] Weir T.L., Park S.-W., Vivanco J.M., (2004). Biochemical and Physiological Mechanisms Mediated by Allelochemicals, Current Opinion in Plant Biology, 7, 472-479.

[62] Bhadoria P.B.S. (2011). Allelopathy: A Natural Way towards Weed Management, American Journal of Experimental Agriculture, 1, 7-20.

[63] Benzeggouta N., (2015). Evaluation des Effets Biologiques des Extraits Aqueux De PlantesMédicinales Seules et Combinées. Thèse de doctorat, Université Mentouri-Constantine.

[64] S. S. Narwal. (1999). Science Publishers, Enfield, N.H, 2, 203-254.

[65] J. Q. Hou, J.T. Romo, (1998). Seed Sci. Technol. , , 26, 9-163.

[66] Martin Chadwick , Harriet Trewin , Frances Gawthrop and Carol Wagstaff. . (**2013).** Sesquiterpenoids Lactones: Benefits to Plants and People. Int. J. Mol. Sci, 14, 12780-12805.

[67] Abdelgaleil S. et Hashinaga F., 2007 . Allelopathic potential of two sesquiterpene lactones from Magnolia grandiflora L. Bioc hemical Systematics and Ecology, 35: 737 - 742.

[68] Djurdjevic L., Dinic A., Pavlovic P., Mitrovic M., Karadzic B.,Tesevic V., 2004. Allelopathic potential of Allium ursinum L. Biochemical Systematics and Ecology 32: 533-544.

[69] Hao Z.P., Wang Q., Christie P. et Li X.L., (2007). Allelopathic potential of watermelon tissues and root exudates. Scientia Horticulturae,112: 315–320.

[70] Ben-Hammouda M., Ghorbal H., Kremer R.J., Oueslati O., (2002). Autotoxicity of barleyJ. Plant. Nutr,25: 1155–1161.

[71] Miller D.A., (1983). Allelopathic effects of alfalfa. J. Chem. Ecol. 9, 1059–1072.

Conclusion

Conclusion

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. Dans ce contexte nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique et biologique de la plante médicinale *Anvillea radiata* de la famille d'*Asteraceae.*

Les tests phytochimiques réalisés par les réactions de caractérisation ont permis de caractériser la présence des différentes familles de composés (flavonoides, saponosides, tanins, stérols, stéroïdes,…) en quantités variables dans la partie aérienne de la plante.

Nos études chromatographiques analytiques et préparatives guidées par des tests biologiques, nous ont permis d'isoler **3** substances naturelles à l'état pur, deux sesquiterpènes lactones de l'extrait chloroformique et un acide phénolique de l'extrait butanolique.

- 9α-Hydroxyparthenolide
- 9β-Hydroxyparthenolide
- Acide 3,5-O-dicaffeoylquinic

Les deux premiers sont fréquemment isolés du genre, le troisième est isolé pour la première fois dans le genre d'Anvillea, ces produits ont démontré divers activités notamment anti bactérienne, antioxydante et anti cancéreuse [1, 2, 3, 4].

Nous avons entrepris des études structurales en se basant sur la spectroscopie RMN 1D (^{1}H, ^{13}C, DEPT 135) et 2D (^{1}H, ^{13}C et ses expériences ^{1}H-^{1}H COSY ; CHCorr et NOESY), la spectrométrie de masse en technique ES ainsi que la spectroscopie IR et qui nous ont permis d'identifier les substances isolés

Le dosage des composés phénoliques contenus dans les extrais de la plante à révélé des teneurs considérables en polyphénols avec des quantités appréciables en flavonoïdes, avec la prédominance de ces derniers dans l'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait butanolique.

Tous les extraits ont révélé des réponses inhibitrices à différentes méthodes d'activité antioxydante à piéger les radicaux DPPH et ABTS, à réduire le fer et à protéger l'oxydation du β-carotène.

La fraction d'acétate d'éthyle de la plante *Anvillea radiata* a présenté une forte activité en comparaison avec tous les extraits bruts et parfois mieux que les contrôles de synthèse dans certaines techniques. Cette fraction a montré un fort piégeur des radicaux DPPH (IC50=

0.0026±0.002 mg/mL) par rapport aux l'acide ascorbique (0.008 mg/mL), BHA (0.011 mg/mL) et BHT (0.014 mg/mL) , un fort piégeur des radicaux ABTS (IC_{50}=0.001±0.002 mg/mL) par rapport à BHT(0.05±0.01 mg/mL) un meilleur pouvoir inhibiteur du blanchiment du β-carotène (IC_{50}=0.014±0.01) par rapport à BHT(0.04±0.001 mg/mL) une meilleure capacité réductrice que l'acide ascorbique (EC_{50}=0.05 mg/mL).

Par ailleurs, l'étude de l'activité antibactérienne sur les différentes souches pathogènes nous a montré que l'extrait chloroformique de la plante possède une bonne activité antimicrobienne.

L'activité antidiabétique de l'*Anvillea radiata* a révélé un effet important de l'extrait chloroformique et les deux sesquiterpènes lactones C10 et C11 de l'inhibition de l'enzyme de α-glucosidase avec un IC_{50} égale à (0.31±0.08 mg/mL), (0.1±0.02 mg/mL) et (0.09±0.01 mg/mL) respectivement par rapport à l'acarbose (0.07 mg/mL).

L'activité allélopathique de la plante Anvillea radiata montre que l'extrait d'acétate d'éthyle et chloroformique ont une activité allélopathique inhibitrice très importante, cette activité est liée à la présence de sesquiterpenes lactones.

Selon les résultats obtenus dans cette étude, nous pouvons dire que les extraits d'*Anvillea radiata* ont des bonnes activités biologiques en particulier la fraction acétate d'éthyle. Cette analyse trouve une importante application dans l'industrie pharmaceutique comme elle peut trouver aussi une application dans l'industrie alimentaire.

Références

[1] Mohamed Moumou, Ahmed El Hakmaoui , Ahmed Benharref , Mohamed Akssira (2012). Access to new sequiterpenoids by catalytic acid rearrangementof 9α-hydroxyparthenolide, Tetrahedron Letters 53, 3000–3003.

[2] B. El Hassany, F. El Hanbali, M. Akssira, F. Mellouki, A. Haidour, A.F. Barrero (2004). Germacranolides from Anvillea radiata, Fitoterapia 75, 573– 576.

[3] Mohamed Moumou, Abderrahman El Bouakher, Hassan Allouchi, Ahmed El Hakmaoui, Ahmed Benharref, Véronique Mathieu, Gérald Guillaumet, Mohamed Akssira (2014), Synthesis and biological evaluation of 9α- and 9β-hydroxyamino-parthenolides as novel anticancer agents, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 24, 4014–4018.

Annexe

ISSN: 0975-8585

Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences

Chemical Composition, In-Vitro Anti-microbial and Antioxidant Activities of the Methanolic Extract of *Anvillea Radiata Asteraceae.*

D Hamada*, and S Ladjel.

University Ouargla, Faculty of Applied Sciences, Lab. Processes Engineering, Ouargla 30000, Algeria.

ABSTRACT

Anvillea radiata Coss. (Asteraceae) is a wild plant endemic of North Africa (steppes of Algeria and Morocco).It is widely used by local people for its medicinal properties. Phytochemical tests applied for *Anvillea radiata* showed the presence of several families of chemical compound like flavonoïds, saponins, steroids, fatty acids and tannins. The antioxidant activity was evaluated by the DPPH (1,1-diphenyl-2-picrilhydrazyl) and Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. The methanolic extract of the plant showed significant DPPH radical scavenging activity comparable to butylated hydroxytoluene (BHT), Butylated hydroxyanisole (BHA) and Ascorbic acid, with an IC_{50} value of 23.16 mg/l. The reducing power was also found to be concentration dependent. The antibacterial bioassay was studied by disc diffusion and minimum inhibitory concentration procedures against 5 bacteria (both gram positive and gram negative).The results revealed that the methanolic extract is effective mostly against (Streptocoque Staphylococcus aureus, pseudomonas aeriginosa, klebsiella pneumonie, with MIC between 75 µg/ml and 300 µg/ml. Our results indicate that this plant would be able to promise sources of natural products with potential antibacterial and antioxidant activities.

Keywords: antibacterial activity, antioxidant activity, *Anvillea radiata*, methanolic extract.

Corresponding author

ISSN: 0975-8585

INTRODUCTION

Because of their therapeutic properties, medicinal plants are one way of investigation the most interesting image of the discovery of new drugs from plants used in traditional medicine for the treatment of discharged diseases (Djellouli1 et al., 2013). Majority of these plants have been used in extensive application against human and animal pathogens. However, drug resistance of human pathogenic bacteria has been documented globally and thus natural product from plant origin is heavily dependent by man for the treatment of diseases (Oyedemi and Afolayan, 2011). nowday, antioxydant agents of plant source have attracted special interested because they can protect human body from diseases induced by free radicals with little or no side effects (Oyedemi and Afolayan, 2011).

Several synthetic drugs, such as butylated hydroxytoluene (BHT) and butylated hydroxyl anisole (BHA) are commonly used as antioxidants, but they have been reported to cause tissue toxicity, cell damage, inflammation and atherosclerosis in both animals and humans. Recent findings clearly show that the consumption of plant foods and natural antioxidant supplements may be used to protect the body against various diseases, including cancer, cardiovascular and neurodegenerative diseases (Sen et al., 2013; Boulekbache et al., 2012).

Although hundreds of plant species have been tested for antimicrobial properties, the vast majority of them have not been adequately evaluated (Balandrin et all., 1985; Mebarki et all., 2013). In this context, Anvillea radiata Coss. (Asteraceae) (Quezel, 1963; Ozenda, 1958) Vernacular name (*Nogde*), that grows in the two Maghreb countries , Algeria and Morocco (Dendougui, 2006). It is widely used in traditional medicine for the treatment of dysentery, gastric-intestinal disorders, chest cold and has been agents and they are widely used in the human therapy (Mebarki et al., 2013), reported to have antioxidant and antibacterial activities.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany and Merck (Germany), Biochem, Chemopharma (Montreal, Quebec), Applichem Panreac (Barcelona, SPAIN), Sigma (USA), Aldrich (Milwaukee, USA), All chemicals and solvents used were of analytical grade.

Plant Material

At flowering stage, Fresh parts (leaves and flowers) of *Anvillea radiata* were collected at May 2011 from the area of Dhait Ben Saleh, El Djelfa (Algeria) .The harvested parts were shade dried. After drying, the plant materials were ground well in a mortar and transferred into airtight containers for future use.

Phytochemical screening

Phytochemical tests were performed on different extracts prepared from the dried plant materials and ground, using four solvents of different polarities: water, ethanol, diethyl ether and petroleum ether. Phytochemical analysis for major phytoconstituents of the plant extracts was undertaken using standard qualitative methods as described by various authors (Trease and Evans, 1989; Bruneton, 1999)

Preparation of plant extract

The powdered plant materials (250 g) were extracted with petroleum ether twice then three times with 70% MeOH (1.5 l) at room temperature 48h. The methanol extracts were combined and concentrate under reduced pressure on a rotary evaporator to dryness (Dendougui et al., 2006) and then lyophilized. The extract was stored at 4°C until tested (Ahmad et al., 2005).

Determination of phenolic composition

The amount of total phenolic in the extract was determined using the Folin–Ciocalteu reagent and Gallic acid as standard as described by (Obiang-Obounou, 2013). The total phenolic content (TPC) was

expressed as gallic acid equivalents (GAE) in mg per 100 g of dry weight. The concentration of phenolic compounds was calculated according to the following equation that was obtained from standard gallic acid graph.

Determination of total flavonoid content (TFC)

The total flavonoid content (TFC) was determined according to the aluminum chloride colorimetric method described of (Wang et al., 2008; Benaissa et al., 2013). Total flavonoid content was expressed as mg Quercetin equivalents (QE) per 100 g of dry weight. The concentrations of flavonoid compounds were calculated according to the following equation that was obtained from the standard Quercetin graph.

DPPH radical scavenging activity assay

Radical scavenging activity of plant extracts against stable DPPH (2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl hydrate) was determined spectrophotometrically by the slightly modified method of (Djeridane et al,2010), as described below. The solution of DPPH in methanol (250 µM) was prepared daily, before measurements. Various concentrations of 1 ml of sample solution diluted in Tris buffer solution (100 mM; pH = 7.4) were added to 1 ml of the DPPH radical solution. The mixture was then shaken vigorously and allowed to standart at room temperature in the dark for 30 min. The decrease in absorption was measured at 517 nm.

The radical scavenging activity (RSA) was calculated as a percentage of DPPH discoloration using the equation: IC_{50} amount of dry material, which causes 50% inhibition of DPPH radicals in reaction mixture.

Activity % = [(absorbance of control − absorbance of sample) / absorbance of control] × 100. (Arabshahi and Urooj, 2006).

The extract was compared with that of ascorbic acid, BHT and BHA.

Reducing power

The reducing power of the extract was determined according to the method of (Budrul Alam, 2012; Arabshahi and Urooj, 2007; Oyedemi and Afolayan, 2011) with some modifications. Methanolic extract, ascorbic acid, BHA and BHT were used at differing concentrations (0.01 to 0.1 mg/ml). One milliliter of either Methanolic extract, ascorbic acid, BHA or BHT was mixed with 2.5 ml of 0.2 M phosphate buffer (pH 6.6) and 2.5 ml of 1% potassium ferricyanide [$K_3Fe(CN)_6$]. The mixture was incubated at 50 °C for 20 min. A 2.5 ml of 10% TCA was added to the mixture, exactly 2.5 ml of the solution after vigorous shaking was mixed with distilled water (2.5 ml) and 0.5 ml of 1% $FeCl_3$. The absorbance was measured at 700 nm in a spectrophotometer. All determinations were carried out in triplicate.

Antibacterial bioassay (disc diffusion method)

The methanolic extract was tested against five microorganisms. Reference strains were*: escherichia coli* (ATCC 25922), klebseilla pneumonie (ATCC700603), pseudomonas aeriginosa(ATCC 9721). *staphylococcus aureus and streptocoque* were obtained from Boudif hopital laboratory of Ouargla.

The agar disc diffusion method was employed for the determination of antimicrobial activity (Changwei et all, 2008). 12 mg of the extract were dissolved in 1 ml of DMSO solvent. Sterile disc of 6 mm diameter (Whatman No.3) was impregnated with extract solution and placed on the previously inoculated agar. The plates were inverted and incubated for 24 h at 37°C. Clear inhibition zones around the discs indicated the presence of antibacterial activity. The assay was carried out in triplicates. A broth micro dilution method was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) (Changwei et al, 2008). Minimum inhibition concentration (MIC) was determined as described by (Changwei et al, 2008 and Zampini et al, 2005). Different concentrations (37.5-600 µg/ml) of extract were tested. 1 ml of each solution was mixed with 9 ml of Muller Hinton medium and poured into sterilized Petri plates. Immediately after solidification a suspension of the test microorganism (2×10^8 CFU/ml) was spread on the solid media plates. The inoculated plates were incubated at 37◦C for 24 h. The MIC values were determined as the lowest extract or standard concentration at which no growth was observed.

Statistical analysis

Data is expressed as Mean±SD. ANOVA was used to analyze the difference between. P-values of less than 0.05 were considered to be significant.

RESULTS

Phytochemical screening

The phytochemical screening of *Anvillea radiata* showed the presence of flavonoids, Sterols, Steroids, saponins , tannins, Fatty acids and Volatile oils , and the absence of alkaloids (Table1.).

The total phenolics content of the methanolic extract was 572.74±12.7 mg GAE/100g DW of plant with reference to Gallic acid standard curve (y = 3.539X, R^2 = 0.999). The total flavonoid content of the methanolic extract was 72.641± 2.45 mg/100g of Quercetin equivalent of dry weight respectively with reference to standard Quercetin curve (y =37.095X+0.0099, R^2=0.997).

These phytochemical compounds are known to be bioactive compounds and all play a role for antioxidant and antibacterial activities of *Anvillea radiata* extracts.

DPPH radical scavenging activity

DPPH scavenging activity of methanolic extract of *Anvillea radiata*, BHA, BHT and Ascorbic acid is shown in Figure 2.

The IC_{50} values were calculated by the linear regression method of plots of the percent of antiradical activity against the concentration of the tested compounds. The concentration of inhibitors has been calculated in g/l.

In the present investigation, methnolic extract of the *Anvillea radiata*, showed excellent inhibition of DPPH with an IC_{50} of (0.0231) g/l comparable to Ascorbic acid (0.0086), BHA (0.0107) and BHT (0.0137) g/l standard antioxidant drugs used in this study.

Reducing power assay

In the reducing power capacity assay, the extracts cause the reduction of the Fe^{+3} to Fe^{+2} was increased with increasing concentration.Figure2. shows concentration-response curves for the reducing power of the extract, ascorbic acid, BHA and BHT. The sequence for the reducing power was ascorbic acid >BHA >BHT>extract.

Antibacterial activity

Table2. presents diameters of inhibition zones exerted by the methanolic extract towards tested microorganisms. Methanolic extract was effective against the two Gram-positive strains (*S. aureus, Streptocoque*) but no activity was observed against the Gram-negative strain (*Escherichia coli*). Higher inhibition was detected against *Staphylococcus aureus* (Aligiannis et al., 2001) have proposed a classification of plant extract on the basis of their MIC values: strong inhibition: MIC < 500 µg/ml; moderate inhibition: 600 µg/ml < MIC < 1500 µg/ml and low inhibition: MIC > 1600 µg/ml. On the basis of this classification, the methanolic extract of *Anvillea radiata* exert a strong inhibitory activity on *Streptocoque* (MIC = 75 µg/ml).

DISCUSSION

The presence of flavonoids and tannins in *Anvillea radiata* plants is likely to be responsible for the free radical scavenging effects observed. Flavonoids and tannins are phenolic compounds, they are a major group of compounds that act as primary antioxidants or free radical scavengers (Polterait, 1997).

In the present study, the antioxidant activities were investigated by DPPH and FRAP methods in vitro. Free RSA were decreased in the following order: ascorbic acid >BHA> BHT>Methanolic extract. The methanolic

ISSN: 0975-8585

extract of *Anvillea. R* is strong radical-scavengers, indicating that active compounds of different polarity could be present in these plants. The high antioxidant activities of this plant might be due to their flavonoid and phenolic contents.

The presence of reductones in the plant extract have been reported in several studies to contribute significantly of the termination of free radical chain reactors as shown in this study (Duh, 1998; Oyedemi, 2011).

Results from this study suggest that phenolic compounds are responsible of the antibacterial activity of methanolic extract of *Anvillea radiata* . Methanolic extract of *Anvillea radiata* was effective against the two Gram-positive strains (S. aureus, *streptocoque*) but no activity was observed against the Gram-negative bacteria (E. *coli*). This is consistent with previous studies reporting that Gram-negative bacteria are more resistant to antimicrobials than Gram-positive microorganisms due to their outer lipopolysaccharide membrane (Khan et al., 2009; Al-Zoreky, 2009; Boulekbache, 2013).

Table 1: Phytochemical constituents of *Anvillea radiata.*: +++: important Presence, ++: average Presence, +: weak presence and -: absence

Composés	Résultats obtenus
Tanins	(+++) Appearance of dark blue color and a precipitate
Flavonoids	(++) Appearance of a red color characteristic aglycone flavones
Sterols et Steroids	(++) color changes from purple to blue or green
Saponins	(++) Appearance of foam shaken in for15 min
Fatty acids	(+) appearance of transparence on filter paper
Volatile oils	(+)
Alkaloids	(-) no precipitate

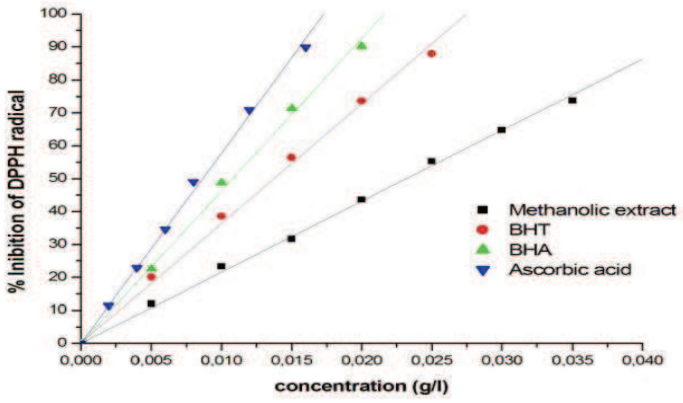
+++: important Presence, ++: average Presence, +: weak presence and -: absence

Table 2: Antibacterial activity of methanolic extract of *Anvillea radiata*: na: not active, (mean±SD, n = 3)

Bacteria	Gram (+/-)	Zone of inhibition	CMI (µg/ml)
Escherichia coli (ATCC25922)	-	na	na
Klebsiella Pneumonie ATCC70060	-	6.11	300
Pseudomonas aeriginosa ATCC9721	-	7.50	150
Staphylococcus aureus	+	9.20	150
Streptocoque	+	16.48	75

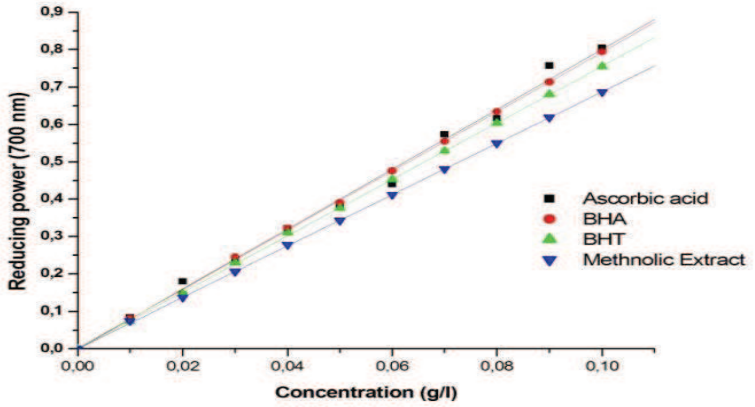
na: not active, (mean±SD, n = 3)

Figure 1: DPPH scavenging effect of Methanolic extract, BHT, BHA and Ascorbic acid. (mean±SD, n = 3)



ISSN: 0975-8585

Figure 2: Reducing power effect of Methanolic extract, BHA, BHT and Ascorbic acid. (mean±SD, n = 3)



CONCLUSION

Anvillea radiata has been used as traditional remedies for treatment of various diseases. In this study we report for the first time, the antioxidant and antibacterial activities of methanolic extract of this plant. It may be suggested that the methanolic extract tested possess antioxidant activity which renders them suitable as potential therapeutic. This extract exhibited also strong antibacterial activity against the two Gram-positive strains: *S. aureus* and *Streptocoque*.

REFERENCES

[1] Ahmad, R., A.M. Ali, D.A. Israf , N.H. Ismail, K. Shaari, N.H. Lajis, 2005. Antioxidant, radical-scavenging, anti-inflammatory, cytotoxic and antibacterial activities of methanolic extracts of some *Hedyotis* species. Life Sci, 76: 1953-1964.

[2] Aligiannis,N., E. Kalpotzakis, S. Mitaku, I.B. Chinou, 2001. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. J. of Agricultural and Food Chem. 49, 4168-4170.

[3] Arabshahi, D.S., A. Urooj, 2007. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica L.*) leaves. Food Chemistry, 102: 1233-1240.

[4] Balandrin,M.F., J.K. Klocke, E.S. Wurtele and W.H. Bollinger, 1985.Natural plant chemicals: Sources of Industrial and Medicinal materials. Sci., 228: 1154-1160.

[5] Benaissa, O., A. Amrani, S. Bicha, D. Zama, F. Benayache, E. Marchioni et al., 2013. Free radical scavenging action of phenolic compounds from *Limonium Bondueli* (Plumbaginaceae). Scholars Research Library, 5: 234-240.

[6] Boulekbache, M.L., S. Slimani, K. Madan, 2013. Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of fruits of *Eucalyptus globulus* cultivated in Algeria. Industrial Crops and Products, 41: 85-89.

[7] Bruneton, J., 1999. Pharmacognosie-Phytochimie, Plantes médicinales, Technique et documentation. 3rd Edn., Lavoisie, Paris, pp: 721-741.

[8] Budrul Alam, M.,M. Saifur Rahman, M. Hasan, M.Maruf Khan, Kamrun Nahar and Sheema Sultana,2012.Int. J. Pharmacol.,8:243-251.

[9] Changwei, A.O., L. Anping, A.E. Abdelnaser, D.X. Tran, T. Shinkichi, 2008. Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of *Ficus microcarpa L*. fil.extract. Food Control, 19: 940–948.

[10] Dendougui, H , M. Jay, F. Benayache, S. Benayache, 2006. Flavonoids from Anvillea radiata Coss. & Dur. (Asteraceae). Biochem. Systematics and Ecol., 34: 718-720.

[11] Djeridane,A , M. Yousfi , J.M. Brunel , P. Stocker,2010. Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from Cleome arabica in screening the in vitro antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. Food and Chem.Toxic.,48:2599-2606.

[12] Djellouli, M , M. Moussaoui , H. Benmehdi, L. Ziane, A. Belabbes, 2013. Ethnopharmacological study and Phytochemical Screening of Three Plants (*Asterasea* Family) From the Region of South West Algeria. Asian J. Nat. & Appl Sci., 2: 159-165.

[13] Duh, P. D., 1998. Antioxidant activity of burdock (Arctium lappa Linne): its scavenging effect on free radical and active oxygen. J. of the American Oil Chem. Soci., 75: 455-461.
[14] Khan, R., B, Islam, M. Akram, S. Shakil, A. Ahmad, A.S. Manazir et al., 2009. Antimicrobial activity of five herbal extracts against multi drug resistant (MDR) strains of bacteria and fungus of clinical origin. Molecules, 14: 586-597.
[15] Mebarki, L., H.M. Kaid, L. Benlarbi, A. Rahmani and A. Sarhani, 2013. Phytochemical Analysis and Antifungal Activity of *Anvillea Radiata*. World App. Sci. J., 26: 165-171. DOI: 10.5829/idosi.wasj.2013.26.02.12112.
[16] Oyedemi, S.O., A.J. Afolayan, 2011. Antibacterial and antioxidant activities of hydroalcoholic stem bark extract of *Schotia latifolia Jacq*. Asian Pacific J. Trop. Medic., 952-958.
[17] Ozenda, P., 1977. Flore du Sahara septentrional et central. 2nd Edn., Paris, p. 434.
[18] Obiang-Obounou, P.W. and G.H. Ryu, 2013. The effect of feed moisture and temperature on tannin content, antioxidant and antimicrobial activities of extruded chestnuts. Food Chem., 141:1166-1170.
[19] Polterait, O., 1997.Antioxidants and free-radical scavengers of Natural Origin. Current Org. Chem., 1: 415-440.
[20] Quezel, P. and S. Santa, 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques Méridionales, C.N.R.S. Edn., Paris, p. 949.
[21] Sen, S., B. De, N. Devanna, R. Chakraborty, 2013. Total phenolic, total flavonoid content, and antioxidant capacity of the leaves of *Meyna spinosa* Roxb., an Indian medicinal plant**.** Chinese J. Nat. Medic., 11: 0149-0157.
[22] Trease, GE. And W.C. Evans, 1989.Trease and Evans's Textbook of pharmacognosy. 13th Edn.,Cambridge University Press, London, pp:546
[23] Wang, H., X. Dong Gao, G.C. Zhou, L. Cai, W.B. Yao, 2008. In Vitro and in Vivo Antioxidant Activity of Aqueous Extract from *Choerospondias axillaris* Fruit. Food Chem, 106: 888 895.
[24] Zampini, I.C., M.A. Vattuone, M.I. Isla, 2005. Antibacterial activity of *Zuccagnia punctata Cav*. ethanolic extracts. J. Ethnopharmacol, 102: 450-456.