



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

Université Kasdi Merbah-Ouargla

Faculté des Mathématiques et des Sciences de la matière

Département de Chimie

N° d'ordre :

N° de série :

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION D'UN DIPLÔME DE DOCTORAT

3^{ème} Cycle (LMD)

Spécialité : Analyses Physico-Chimiques et Réactivité des Espèces

Moléculaires

Intitulé :

**Contribution à l'étude phytochimique,
Electrochimique et biologique des
extraits de *Cupressus sempervirens* (L)**

Présentée par :

Zineb RAHMANI

Soutenue publiquement le 22 Octobre 2020

Devant le jury composé de :

M. Mohammed HADJADJ	Professeur	Univ. Ouargla	Président
M. Mohamed YOUSFI	Professeur	Univ. Laghouat	Examineur
M ^{lle} Reguia MAHFOUDI	M.C.A	E.N.S Laghouat	Examinatrice
M. Mokhtar SAIDI	Professeur	Univ. Ouargla	Examineur
M. Ali DOUADI	Professeur	Univ. Ouargla	Rapporteur
M ^{lle} Zehour RAHMANI	M.C.A	Univ. Ouargla	Co-rapporteur

Année universitaire : 2019/2020

Remerciements

Je remercie tout d'abord ALLAH le tout puissant de m'avoir donné la santé la patience, la puissance et la volonté pour réaliser ce travail.

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Valorisation et Promotion des Ressources Sahariennes (**VPRS**) de l'université Kasdi Merbah Ouargla, au laboratoire de Valorisation et Technologie des Ressources Sahariennes (**VTRS**) de l'université Echahid Hamma Lakhdar El-Oued et au laboratoire de **CRAPC** à la wilaya de Tipaza et Ouargla, sous la direction de professeur **DOUADI Ali** et Dr. **RAHMANI Zehour**.

Je tiens particulièrement à remercier mon promoteur le professeur **DOUADI Ali** pour avoir accepté la charge d'être rapporteur de ce travail, je le remercie pour sa disponibilité, ses pertinents conseils et pour les efforts qu'il a consenti durant la réalisation de ce travail. Ce travail témoigne de sa confiance et de son soutien dans les moments les plus difficiles qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance et de mon respect.

Au même titre, je remercie ma sœur **RAHMANI Zehour**, enseignante à l'université Kasdi merbah Ouargla, qui a codirigé ce travail malgré ses nombreuses obligations, a accepté de m'encadrer et de me choisir un thème.

A cette même occasion je tiens à remercier les professeurs : **SAIDI Mokhtar, Mohamed YOUSFI, Mohamed HADJADJ**, et Dr. **MAHFOUDI Reguia** pour avoir accepté d'évaluer ce travail en dépit de leurs nombreuses autres obligations.

Je remercie le professeur **DENDOUGUI Hocine** et le docteur **BELGUIDOUM Mahdi** pour son aide à coté de séparation des produits et d'élucidation structurale. **J'aimerais également** exprimer ma gratitude à tous mes professeurs de graduation et de post-graduation de l'université de Ouargla, un grand merci pour vous mes professeurs : **BOUTARFAIA Ahmed, TIDJANI Mohamed El-khamis, HADJ M'HAMMED Mahfoud, BECHKI Djamel, BECHKI Lazher, ZEGHDI Saad, BELFAR Mohammed Lakhdar, HADEF Derradji, ATIA Salem, DEKMOUCHE Messaouda, SAMARA Ouanissa, ZENKHRI Louiza, RAHIM Oum Elkheir** et que dieu vous bénisse.

Je remercie le M. **LAICHI Yacine** ingénieur au laboratoire de **CRAPC** Tipaza, ainsi, le directeur de **CRAPC** Ouargla **BELKHALFA Hakim** et l'ingénieur **Rahmani Youcef**. Je remercie beaucoup M^{elle} **BENSSACI Chayma** ingénieur au laboratoire de **VPRS**, à tous les ingénieurs de laboratoire pédagogique de chimie, mes collègues dans le laboratoire de **VPRS** **TOUAHRIA Tatou, BENFERDIA Saida, BIRECH Kamilya, BELFAR Assia, BENCHEIKH Fatima Zohra, ABID Asma, MENAA Sabah, KADRI Mohamed** et **MESSAOUDI Abd Djabar**. **J'adresse, enfin et surtout, ma plus profonde gratitude à ma famille.**

Résumé

Notre travail porte sur l'étude des extraits de feuilles et des fruits d'une plante médicinale *Cupressus sempervirens* L. (*Cupressaceae*) cultivé dans la région de Ouargla. L'objectif du présent travail est la détermination des structures des composés isolés à partir de l'extrait d'acétate d'éthyle, ainsi que l'évaluation de l'activité biologique des extraits de cette plante.

L'analyse de ces extraits a révélé la présence de quelques groupes chimiques (polyphénols, flavonoïdes, tanins, terpènes, coumarines et résines). La teneur la plus élevée en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins a été enregistrée dans l'extrait brut pour les feuilles avec ($34,34 \pm 2,03$ mg EAG/g MS ; $0,546 \pm 0,04$ mg QE / g MS et $11,02 \pm 0,455$ mg CE/g MS respectivement).

L'activité antioxydante *in vitro* a été étudiée avec quatre méthodes différentes. Les résultats ont révélé que tous les extraits ont une meilleure activité réductrice de Mo (VI) à Mo (V) que le BHA avec des valeurs d'AEAC comprises entre $789,04 \pm 32,47$ et $28,18 \pm 3,09$ mM.

Les valeurs de CI_{50} d'inhibition de DPPH• variaient de $0,011 \pm 0,001$ à $0,561 \pm 0,042$ mg/ml. Le plus grand pourcentage d'inhibition d' $O_2^{\bullet-}$ a été enregistré avec l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles ($71,163 \pm 0,06$ %) par la méthode d'auto-oxydation de pyrogallol, le même extrait a enregistré la plus grande activité de piégeage d' $O_2^{\bullet-}$ avec une valeur de CI_{50} égale à $0,136$ mg/ml par la voltamétrie cyclique.

L'extrait brut des fruits a donné la plus grande inhibition de l' α -amylase avec un taux d'inhibition de 35,94%. L'inhibition de la fraction d'acétate d'éthyle d'extrait de tanins pour les feuilles est de type compétitif avec des valeurs de K_i de $1,852$ μ g / μ l.

Les différentes méthodes chromatographiques de séparation utilisées dans notre travail ont permis l'isolement de deux produits. La méthodologie de purification a été essentiellement fondée sur la combinaison de différentes méthodes chromatographiques solide-liquide sur différents supports (chromatographie sur couche mince (CCM), chromatographie sur colonne de silice, séphadex et polyamide).

La détermination structurale des métabolites secondaires isolés a été réalisée grâce à l'utilisation des techniques physicochimiques et spectroscopiques incluant la spectroscopie de résonance magnétique (RMN).

Mots clés: *Cupressus sempervirens* L., flavonoïdes, activité antioxydante, voltamétrie cyclique, α -amylase.

Abstract

This work focuses on the study of leaf and fruit extracts from a medicinal plant *Cupressus sempervirens* L. (*Cupressaceae*) cultivated from the Ouargla region. The target of this work is the determination of the structures of isolated compounds from the ethyl acetate fraction, and the evaluation of the biological activity of this plant's extracts.

Analysis of these extracts revealed the presence of some secondary metabolism (polyphenols, flavonoids, tannins, terpenes, coumarins and resins). The highest total phenolic, flavonoid and tannin contents were recorded in the crude extract for the leaves with ($34,34 \pm 2,03$ mg GAE / g DM; $0,546 \pm 0,04$ mg EQ / g DM and $11,02 \pm 0,455$ mg EC / g DM respectively).

The antioxidant activity *in vitro* has been studied with four different methods. The results revealed that all of the extracts have a high reducing activity of Mo (VI) to Mo (V) better than BHA with AEAC values between $789,04 \pm 32,47$ and $28,18 \pm 3,09$ mM.

The IC₅₀ values of inhibition of DPPH[•] ranged from $0,011 \pm 0,001$ to $0,561 \pm 0,042$ mg/ml. The greatest percentage of inhibition of O₂^{•-} was recorded by the ethyl acetate fraction of the leaves ($71,163 \pm 0,06$ %) with the auto-oxidation method of pyrogallol; the same fraction recorded the greatest scavenging activity of O₂^{•-} with the IC₅₀ value equal 0,136 mg / ml by cyclic voltammetry.

The crude fruit extract gave the greatest inhibition of α -amylase with an inhibition rate of 35,94%. The ethyl acetate fraction of leaf tannin extract was a competitive type of inhibition with K_i values of 1,852 μ g / μ l.

Various chromatographic techniques used in the experiment allowed the isolation of two products. The purification methodology was essentially based on the combination of different chromatographic methods (TLC, CC) using stationary phases such as silica gel, sephadex, and polyamide.

The structural determination of the isolated secondary metabolites was carried out using physicochemical and spectroscopic techniques including magnetic resonance spectroscopy (NMR).

Keywords: *Cupressus sempervirens* L., flavonoids, antioxidant activity, cyclic voltammetry, α -amylase.

ملخص

يرتكز عملنا على دراسة مستخلصات أوراق وثمار نبات طبي (*Cupressaceae*) *Cupressus sempervirens* L. () . الهدف من هذا العمل هو تحديد بنى مركبات

معزولة من مستخلص خلات الايثيل، بالإضافة إلى تقييم النشاط البيولوجي لمستخلصات هذه النبتة. تحليل هذه المستخلصات أظهر وجود بعض المجموعات الكيميائية (متعدد الفينول، الفلافونويدات، الدباغيات، التربينات، الكومارينات و الأصماغ). المحتوى الأعلى الفينولي، الفلافونويدي و الدباغي سجل بالمستخلص الخام للأوراق ($2,03 \pm 34,34$ مغ مكافئ حمض الغاليك/ غ كتلة النبات الجاف، $0,546 \pm 0,04$ مغ مكافئ الكرسيتين/ غ كتلة النبات الجاف و $0,455 \pm 11,02$ مغ مكافئ الكاتشين/ غ كتلة النبات الجاف على الترتيب).

النشاط المضاد للأكسدة درس مخبريا بأربعة طرق مختلفة. النتائج بينت أن كل المستخلصات تملك أعلى قدرة ارجاعية للمولبيدان (VI) إلى المولبيدان (V) مقارنة ب BHA مع قيم AEAC والتي تتراوح بين $32,47 \pm 789,04$ و $3,09 \pm 28,18$ ميلي مولاري.

قيم CI_{50} لتثبيط جذر DPPH• تراوحت بين $0,001 \pm 0,011$ و $0,042 \pm 0,561$ مغ/مل. أعلى نسبة تثبيط جذر $O_2^{\bullet-}$ سجلت في مستخلص خلات الايثيل للأوراق ($0,06 \pm 71,163$ %) وذلك بطريقة الأكسدة الذاتية للبيروغالول. نفس المستخلص سجل أعلى نشاط تثبيطي لجذر $O_2^{\bullet-}$ بقيمة CI_{50} مساوية ل $0,136$ مغ/مل بطريقة الفولطا متري الحلقي.

المستخلص الخام للثمار أعطى أعلى نسبة تثبيط انزيم الفا-اميلاز بنسبة تثبيط 35,94 % . كسر خلات الايثيل لمستخلص الدباغيات للأوراق أظهر نوع من التثبيط التنافسي مع قيم K_i بلغت 1,852 ميكروغرام/ميكرو لتر.

سمحت طرق الفصل الكروماتوغرافية المختلفة المستخدمة في عملنا بعزل مركبين. استندت منهجية التنقية أساسا على مزج الطرق الكروماتوغرافية المختلفة (كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة، كروماتوغرافيا عمود السيليكا، كروماتوغرافيا السيفادكس ومتعدد الاميد).

تم التحديد الهيكلي لمركبات الأيض الثانوي من خلال استخدام تقنيات فيزيوكيميائية وطيفية بما في ذلك التحليل الطيفي بالرنين المغناطيسي النووي (RMN).

الكلمات الدالة: *Cupressus sempervirens* L. الفلافونويدات، الفعالية المضادة للأكسدة، الفولطامتري الحلقي، -اميلاز.

Liste des figures

Figure		Page
Figure I.1 :	Dessin de <i>Cupressus dupreziana</i>	5
Figure I.2 :	Photo de <i>C. sempervirens</i> (Ouargla, Septembre 2019)	6
Figure I.3 :	Carte de distribution de l'espèce <i>Cupressus sempervirens</i> L	7
Figure I.4 :	Structures chimiques de différents diterpénoïdes isolés issus de <i>Cupressaceae</i>	10
Figure II.1 :	Biosynthèse des composés phénoliques par la voie de l'acide shikimique	25
Figure II.2 :	Structures génériques des principaux flavonoïdes	27
Figure II.3 :	Diagramme de la voie de biosynthèse des flavonoïdes.....	28
Figure II.4 :	Absorption de la bande II et bande I.....	30
Figure II.5 :	Groupes structuraux pour piégeage des radicaux	31
Figure II.6 :	Classification des tanins	32
Figure II.7 :	Exemples de tanins hydrolysables	33
Figure II.8 :	Structure de procyanidine B2	33
Figure II.9 :	Structure d'Acutissimin A	34
Figure II.10 :	Biosynthèse du 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- -D-glucopyranose	35
Figure II.11 :	Exemples de lignanes variés englobant différentes structures	36
Figure II.12 :	Structure de l' α -amylase humain	39
Figure II.13 :	Représentation de Linweaver – Burk (types d'inhibition)	42
Figure III.1 :	Carte représente le lieu de récolte.....	51
Figure III.2 :	Protocole d'extraction de différentes fractions	52
Figure III.3 :	Protocole d'extraction des tanins	55
Figure III.4 :	Réduction du radical libre DPPH.....	59
Figure III.5 :	Auto-oxydation du pyrogallol	60
Figure III.6 :	voltamogramme d'O ₂	61
Figure III.7 :	Electrodes utilisées dans l'étude électrochimique	62
Figure III.7 :	Oxydation des sucres réducteurs par DNSA.....	64
Figure III.8 :	Protocole de dosage de l'activité enzymatique	65
Figure III.9 :	Courbe d'étalonnage d'acide gallique	67
Figure III.10 :	Teneur phénolique des feuilles et des fruits	69
Figure III.11 :	Courbe d'étalonnage de quercétine	69
Figure III.12 :	Teneur des flavonoïdes pour les feuilles et les fruits	70
Figure III.13 :	Courbe d'étalonnage de catéchine	71
Figure III.14 :	Teneur des tanins pour les feuilles et les fruits	73
Figure III.15 :	Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique (vitamine C)	73
Figure III.16 :	Activité antioxydante totale des extraits de <i>C. sempervirens</i>	75
Figure III.17 :	Effet piègeur du radical DPPH [*] par des différents extraits	76
Figure III.18 :	Activité anti-radicalaire des extraits de <i>C. sempervirens</i> , BHA et VC	78
Figure III.19 :	Courbes de vitesse d'auto-oxydation du pyrogallol en présence d'antioxydant	79
Figure III.20 :	Pourcentage d'inhibition de radical anion superoxyde	80
Figure III.21 :	Voltamogramme de la réduction d'oxygène	81
Figure III.22 :	Voltamogramme de l'oxygène à la présence des différentes fractions étudiées	84
Figure III.23 :	Voltamogrammes de l'oxygène à la présence des composés standards	84

LISTE DES FIGURES

Figure III.24 :	Rapport de (i_{pa}^s / i_{pa}^0) en fonction de la concentration des fractions étudiées	86
Figure III.25 :	Effets d'inhibition de O_2^- par des différentes fractions de plante	87
Figure III.26 :	Valeurs de la CI_{50} pour l'inhibition des radicaux superoxydes	88
Figure III.27 :	Piégeage des espèces réactives de l'oxygène ($R\bullet$) par les flavonoïdes	90
Figure III.28 :	Taux d'inhibition de l'activité α -amylase en présence des différentes concentrations de chaque extrait	92
Figure III.29 :	Courbe d'étalonnage de maltose	92
Figure III.30 :	Vitesse d'inhibition d' α -amylase en absence d'inhibiteur	93
Figure III.31 :	Représentation de Lineweaver-Burk (sans inhibiteur)	93
Figure III.32 :	Vitesse d'inhibition d' α -amylase en présence et absence d'inhibiteur	94
Figure III.33 :	Représentation de Lineweaver-Burk en présence et absence d'inhibiteur	95
Figure IV.1 :	Protocole d'extraction	102
Figure IV.2 :	Suivi de la colonne mère par CCM	103
Figure IV.3 :	Suivi de fraction Fr 2 par CCM	104
Figure IV.4 :	Produits isolés	104
Figure IV.5 :	Suivi de fraction Fr 3 par CCM.....	105
Figure IV.6 :	Suivi des sous fractions (Fr 12 - 28) par CCM	105
Figure IV.7 :	Suivi des sous fractions (Fr 29-48) par CCM.....	106
Figure IV.8 :	Plaque CCM après 6 ^{ème} migration.....	106
Figure IV.9 :	Fractionnement et isolement des métabolites secondaires de l'extrait acétate d'éthyle	107
Figure IV.10 :	Spectre RMN 1H (400 MHz, CD_3OD) du composé A2	108
Figure IV.11 :	Spectre RMN ^{13}C (400 MHz, CD_3OD) du composé A2	109
Figure IV.12 :	Spectre DEPT 135 du composé A2	109
Figure IV.13 :	Spectre HSQC (400MHz, CD_3OD) du composé A2	110
Figure IV.14 :	Structure partielle de A2	111
Figure IV.15 :	Structure du composé A2 (catéchine)	111
Figure IV.16 :	Corrélations HMBC du composé A2	112
Figure IV.17 :	Spectre HMBC (400 MHz, CD_3OD) du composé A2	113
Figure IV.18 :	Spectre UV- Visible de composé A2	115
Figure IV.19 :	Spectre RMN 1H (400 MHz, CD_3OD) du composé A3	116
Figure IV.20 :	Spectre RMN ^{13}C (400 MHz, CD_3OD) du composé A3	117
Figure IV.21 :	Spectre DEPT 135 du composé A3	117
Figure IV.22 :	Spectre HSQC (400 MHz, CD_3OD) du composé A3	118
Figure IV.23 :	Spectre HMBC (400 MHz, CD_3OD) du composé A3	119
Figure IV.24 :	Spectre HMBC étalé du composé A3.....	120
Figure IV.25 :	Corrélations HMBC du composé A3	121
Figure IV.26 :	Corrélations NOESY du composé A3.....	121
Figure IV.27 :	Spectre NOESY étalé du composé A3.....	122
Figure IV.28 :	Série spectrale UV- Visible du produit A3.....	125

Liste des tableaux

Tableau		Page
Tableau I.1 :	Exemples des différents diterpénoïdes isolés de <i>Cupressaceae</i>	11
Tableau I.2 :	Diterpénoïdes à base d'Abieta-8,11, 13-triene isolés de la famille de <i>Cupressaceae</i>	11
Tableau I.3 :	Diterpénoïdes à base de labdane isolés de la famille de <i>Cupressaceae</i> et <i>Taxodiaceae</i>	12
Tableau I.4 :	Biflavones isolés de la famille de <i>Cupressaceae</i>	13
Tableau I.5 :	Flavones glycosides isolés de la famille de <i>Cupressaceae</i>	14
Tableau I.6 :	Composés phénoliques isolés de la famille de <i>Cupressaceae</i>	15
Tableau I.7 :	Structures chimiques des mono-terpènes et des sesquiterpènes de <i>Cupressus sempervirens</i> L.....	16
Tableau II.1 :	Classification des composés phénoliques	24
Tableau II.2 :	Différents méthodes pour évaluer les activités enzymatiques de l'alpha-amylase	40
Tableau III.1 :	Produits utilisés.....	53
Tableau III.2 :	Différentes métabolites secondaires qui ont été détecté dans la plante de <i>C. sempervirens</i>	66
Tableau III.3 :	Rendement des différentes fractions des fruits et feuilles	67
Tableau III.4 :	Quantité des phénols totaux dans les extraits en mg EAG/ g MS.....	68
Tableau III.5 :	Quantité des flavonoïdes totaux dans les extraits en mg EQ / g MS	70
Tableau III.6 :	Quantité des tanins totaux dans les extraits en mg EC/g MS.....	72
Tableau III.7 :	Valeurs AEAC pour toutes les fractions étudiées en mM équivalent d'acide ascorbique	74
Tableau III.8 :	Valeurs IC ₅₀ pour toutes les fractions étudiées en mg/ml	77
Tableau III.9 :	Pourcentages d'inhibition d'anions superoxydes	78
Tableau III.10 :	Résultats de CI ₅₀ obtenue pour les fractions étudiées	87
Tableau III.11 :	Effets d'inhibitions des radicaux par des différentes méthodes	88
Tableau III.12 :	Relations de corrélation entre les tenures des phénols, flavonoïdes, tanins et les activités anti-radicalaire	89
Tableau III.13 :	Différentes concentrations de fractions étudiées et leur taux d'inhibition ...	91
Tableau III.14 :	Paramètres cinétiques des fractions étudiées	95
Tableau IV.1 :	Résultat de l'extraction des feuilles	101
Tableau IV.2 :	Les tests préliminaires de system utilisé	103
Tableau IV.3 :	Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait d'acétate d'éthyle de <i>Cupressus sempervirens</i> L.....	104
Tableau IV.4 :	Déplacements chimiques en RMN ¹ H (400 MHz) et ¹³ C (400 MHz) dans CD ₃ OD du composé A2 (en ppm et J en Hz)	114
Tableau IV.5 :	Déplacements chimiques en RMN ¹ H (400 MHz) et ¹³ C (400 MHz) dans CD ₃ OD du composé A3 (en ppm et J en Hz)	123
Tableau IV.6 :	Données spectroscopiques UV-visible du produit A3.....	124

LISTE DES ABREVIATIONS

Liste des abréviations

IR_D	Pouvoir rotatoire
ADN	Acide Désoxyribo Nucléique
AEAC	Ascorbic Acid Equivalent Antioxidant Capacity
ATCC	American Type Culture Collection
BHA	Butylated hydroxyanisole
CD4	Cluster de Différenciation 4
CD8	Cluster de Différenciation 8
Ci	Réaction chimique irréversible
CI₅₀	Concentration inhibitrice à 50%
COSY	Correlation SpectroscopY
CFT	Concentration des flavonoides tautaux
CPT	Concentration des phénols tautaux
CTT	Concentration des tanins tautaux
Cup s 3	Cupressus sempervirens (un allergène du pollen de cyprès)
d	Doublet
	Déplacement chimique
dd	Doublet de Doublet
DEPT	Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer
DMF	N,N-diméthylformamide
DNSA	Acide 3,5-dinitrosalicylique
DPPH	Diphenylpicrylhydrazyl
E	Potentiel
E.C.3.2.1.1	Enzyme d' -amylase
E_{1/2}	Le potentiel de demi-pic
EAG	Equivalent d'Acide Gallique
EC 3.2.1.2	Enzyme de -amylase
EC 3.2.1.3	Enzyme de -amylase
ECS	Electrode au calomel saturé
Electrode CV	électrode charbon vitreux
EQ	Equivalent de quercitine
Er	réaction électrochimique réversible
ES	Complexe Enzyme-Substrat
ESI	Complexe Enzyme-Substrat-Inhibiteur
ET	écart-type
FAF	Fraction d'Acétate d'éthyle des fruits
FAT	Fraction d'Acétate d'éthyle d'extrait de tanins pour les feuilles
Fr	Fraction
GC-MS	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM)
GSH	Glutathion SH réduit
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HPLC	Chromatographie en Phase Liquide à Haute performance (CLHP)

LISTE DES ABREVIATIONS

HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HSV-1	Virus de l'herpès simplex de type 1
HTLV III B	Virus T-lymphotropique humain
Hz	Hertz
I%	Pourcentage d'inhibition
[I]	Concentration de l'inhibiteur
J	Constante de couplage
KI	Iodure de potassium
K_i	Constante d'inhibition
K_M	Constante de Michaelis – Menten
K_M^{app}	Constante apparente de Michaelis
m	Multiplet
MIC	Concentration inhibitrice minimale
MS	Matière sèche
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
PEP	Phosphoénolpyruvique
PMS-NADH	Méthosulfate de phénazine-nicotinamide adénine dinucléotide
PPM	Test de Phosphomolybdate
PR-5	Pathogenesis related group 5 (groupe 5 lié à la pathogenèse)
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
s	Singulet
[S]	Concentration du substrat
sans I	Sans inhibiteur
SARS-CoV	Corona virus du syndrome respiratoire aigu sévère
SOD	Super-Oxyde Dismutase
UDP-Glucose	Uridine Diphosphate Glucose
UI	Unité internationale
UV	Ultraviolet
V_{max}	Vitesse maximale
VC	Voltamétrie cyclique
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine

Sommaire

Remerciements	I
Résumé	II
Abstract	III
.....	IV
Liste des figures	V
Liste des tableaux	VII
Liste des abréviations	VIII
Introduction générale	1

Partie Bibliographique

Chapitre I : Aperçu bibliographique sur le genre *Cupressus*

I.1.	La famille des <i>Cupressacées</i>	3
I.1.1.	Présentation	3
I.1.2.	Intérêt commercial et pharmacologique	3
I.1.3.	Propriétés thérapeutiques et chimiques	3
I.2.	Étude Ethnobotanique de l'espèce <i>Cupressus sempervirens</i> L.....	4
I.2.1.	Description botanique	4
I.2.1.1.	Description morphologique	4
I.2.1.2.	Taxonomies et systématiques	4
I.2.1.3.	Nom botanique de la plante	5
I.3.	Histoire de la propagation et distribution géographique	6
I.4.	Utilisations en médecine traditionnelle	8
I.5.	Travaux antérieurs sur l'espèce <i>Cupressus sempervirens</i> L.....	8
I.5.1.	Les activités biologiques	8
I.5.2.	Travaux antérieurs phytochimique et les métabolites secondaires séparés de la famille <i>Cupressaceae</i>	10
I.5.2.1.	Diterpénoïdes	10
I.5.2.2.	Flavonoïdes et polyphénols	12
a.	Biflavones	12
b.	Les composés phénoliques et les flavonoïdes	14
I.5.2.3.	Mono-terpènes et sesquiterpènes	15
I.6.	Formes d'utilisations et posologies	17
I.7.	Contre-indications et effets indésirables	17
I.7.1.	Toxicité de la plante	17

I.7.2.	Effets indésirables	18
	Références.....	18

chapitre II : Les Metabolites secondaires et les activités biologiques

II.1.	Les composés phénoliques	23
II.1.1.	Classification des polyphénols	23
II.1.2.	Biosynthèse des polyphénols	24
II.1.2.1.	La voie de l'acide shikimique	24
II.1.2.2.	La voie de l'acétate	26
II.1.3.	Extraction des polyphénols	26
II.1.4.	Propriétés biologiques des polyphénols	26
II.2.	Flavonoïdes	26
II.2.1.	Classification des flavonoïdes	27
II.2.2.	Biosynthèse des flavonoïdes	28
II.2.3.	Extraction des flavonoïdes	29
II.2.4.	La structure chimique des flavonoïdes	29
a.	Spectroscopie Ultraviolet-Visible	29
b.	Spectroscopie de masse	30
c.	La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)	30
II.2.5.	Propriétés biologiques des flavonoïdes	31
II.3.	Tanins	32
II.3.1.	Classification des tanins.....	32
a.	Tanins hydrolysables	32
b.	Tanins condensés	33
c.	Tanins complexes	34
II.3.2.	Extraction des tanins	34
II.3.3.	Biosynthèse des gallotannines	34
II.3.4.	Propriétés biologiques des tanins	35
II.4.	Les lignanes	35
II.4.1.	Classification des lignanes	36
II.4.2.	Intérêt biologique des lignanes	36
II.5.	Diabète sucré	37
II.5.1.	Définition et diagnostic du diabète sucré	37
II.5.2.	Classification du diabète	37
II.5.2.1.	Le diabète insulino-dépendant (DID) Diabète de type 1.....	38
II.5.2.2.	Diabète non insulino-dépendant (DNID) Diabète de type 2	38
II.5.2.3.	Autres types de diabète	38

II.5.3.	L'enzyme d'amylase	38
II.5.3.1.	Types des enzymes d'amylase	39
II.5.3.1.1	L' -amylase	39
II.5.3.1.2.	La -amylase	39
II.5.3.1.3.	La -amylase	39
II.5.3.2.	Détermination de l'activité enzymatique	40
II.5.3.2.1.	Mode d'action de l' -amylase	40
II.5.3.2.2.	Cinétique enzymatique de l'alpha amylase	41
II.5.3.2.3.	Les différents types cinétiques de l'inhibiteur enzymatique	41
a.	Les inhibiteurs compétitifs	41
b.	Les inhibiteurs non compétitifs	41
c.	Les inhibiteurs incompétitifs	41
II.6.	Les antioxydants et les radicaux libres	42
II.6.1.	Définition du radical libre	42
II.6.2.	Production des radicaux libres	42
II.6.2.1	Méthodes physiques	43
II.6.2.2.	Méthodes chimiques	43
II.6.2.3.	Méthodes électrochimiques	43
II.7.	Les principaux types de radicaux libres	43
II.7.1.	Espèces réactives de l'oxygène (ERO)	43
II.7.1.1.	Radical anion superoxyde	43
II.7.1.2.	Radical hydroxyle (*OH)	43
II.7.1.3.	Peroxyde d'hydrogène H ₂ O ₂	44
II.7.2.	Espèces réactives d'azotés (ERN)	44
II.8.	Systèmes de défense anti-oxydants	44
II.8.1.	Systèmes enzymatiques	44
a.	Les superoxydes dismutases	44
b.	La catalase	45
c.	Glutathion peroxydase (GPx)	45
II.8.2.	Systèmes non enzymatiques	45
II.8.2.1.	Les anti-oxydants endogènes	45
II.8.2.2.	Les anti-oxydants exogènes	46
II.9.	La relation entre le diabète sucré et le stress oxydatif	46
	Références	47

Partie Expérimentale

Chapitre III : Analyse phytochimique et L'évaluation des Activités Biologiques

III.1.	Matériel végétal	51
III.1.1.	Préparation des extraits	51
a.	Extraction des polyphénols	51
b.	Procédé d'extraction des tanins	53
III.2.	Détection chimique à propos de certains métabolites secondaires	54
III.3.	Dosage des composés phénoliques, flavonoidiques et tanniques	56
III.3.1.	Dosage des phénols totaux (CPT).....	56
III.3.2.	Dosage des flavonoïdes totaux (CFT).....	57
III.3.3.	Dosage des tanins totaux (CTT).....	57
III.4.	Evaluation de l'activité anti-oxydante	58
III.4.1.	Application du test du Molybdate	58
III.4.2.	Évaluation de l'activité anti-radicalaire	59
III.4.3.	Évaluation de la capacité inhibitrice de l'anion superoxyde radicalaire	60
III.4.3.1.	Méthode chimique	60
III.4.3.2.	Méthode électrochimique	61
a.	Le milieu utilisé	62
b.	Comportement électrochimique du système ($O_2/O_2^{\cdot-}$)	62
c.	Comportement électrochimique du système ($O_2/O_2^{\cdot-}$) en présence des antioxydants	63
III.5.	Évaluation d'activité enzymatique des extraits de <i>C. sempervirens</i>	63
III.5.1.	Dosage de l'inhibition de l' -amylase	63
III.5.2.	L'étude cinétique de réaction d'inhibition d' -amylase et détermination des types d'inhibition	66
III.6.	Résultats et discussion	66
III.6.1.	Détection des métabolites secondaires	66
III.6.2.	Résultat de dosage	67
III.6.2.1.	Dosage des phénols totaux	67
III.6.2.2.	Dosage des flavonoïdes totaux	69
III.6.2.3.	Dosage des tanins totaux	71
III.6.3.	Evaluation de l'activité anti-oxydante	73
III.6.3.1.	Application du test du Molybdate	73
III.6.3.2.	Application d'activité antiradicalaire	75
III.6.3.3.	Évaluation de la capacité inhibitrice de l'anion superoxyde radicalaire	78

SOMMAIRE

III.6.3.3.1.	Évaluation par la méthode chimique	78
III.6.3.3.2.	Évaluation par la méthode électrochimique	80
III.6.4.	Evaluation d'activité enzymatique des extraits de <i>C. sempervirens</i> L. ...	91
III.6.4.1.	Dosage de l'inhibition de l' -amylase	91
III.6.4.2.	Etude cinétique de l'enzyme et détermination de type d'inhibition de L' -amylase par les extraits	92
	Références	96

Chapitre IV : Séparation, purification et élucidation structurale

IV.1.	Récolte et séchage du matériel végétal	101
IV.2.	Extraction	101
IV.3.	Séparation chromatographique et identification du produit isolé	101
IV.3.1.	Fractionnement de la fraction Fr 2	104
IV.3.2.	Fractionnement de la fraction Fr 3	105
IV.4.	Elucidation structurale des composés isolés	108
IV.4.1.	Composé A2	108
IV.4.2.	Composé A3	115
	Références	126
	Conclusion générale	128

Introduction
Générale

Introduction générale

Les plantes ont été utilisées à des fins médicinales bien avant la période préhistorique, les cultures indigènes telles que la Rome, l'Égypte, l'Iran, l'Afrique et l'Amérique ont utilisé des herbes dans leurs rituels de guérison, tandis que d'autres systèmes médicaux traditionnels développés comme la médecine chinoise dans lesquels les thérapies à base de plantes ont été utilisés systématiquement.

Au cours des dernières années, les plantes médicinales et aromatiques ont été connues comme une source inépuisable de composés bioactifs. La chimio-diversité trouvée dans les plantes, bien qu'elle ait évolué dans le cadre des mécanismes de défense et d'adaptation des plantes est une source riche pour le développement de nouveaux composés et produits d'importance médicale et économique, par exemple les médicaments, les arômes, les parfums, les insecticides et les colorants [1] tandis que plus d'un dixième des espèces végétales (plus de 50 000 espèces) sont utilisées dans les produits pharmaceutiques et cosmétiques[2]. Des recherches scientifiques se sont concentrées sur les antioxydants naturels comme traitement pour de nombreuses maladies plutôt que sur les drogues synthétiques qui ont des effets secondaires[3].

L'Algérie présente une richesse floristique remarquable qui est directement liée à sa diversité écosystématique et paysagère. Sa flore est estimée à 4000 espèces, le nombre de ceux endémiques est de 464 (387 espèces, 53 sous-espèces et 24 variétés), soit 11,61 % des plantes vasculaires algériennes[4]. La flore du Sahara algérien comprend plus de 960 espèces[5]. Les arbres et arbustes de *Cupressaceae* couvrent une grande partie du bassin méditerranéen, notamment en Algérie, en Tunisie et au Maroc.

En Algérie, le genre *Cupressus* se trouve, sauf quelques rares petites formations, à l'état d'arbre isolé ou arbre d'ornement ou d'alignement. Les espèces endémiques ou naturalisées de ce genre sont : le cyprès du Tassili (*Cupressus dupreziana* A. Camus), le cyprès de l'Atlas (*Cupressus atlantica* Gaussen), le cyprès toujours vert (*Cupressus sempervirens* L.)[6].

Le cyprès est un arbre résistant aux conditions naturelles difficiles, adaptés à une sécheresse extrême ou au moins à des étés secs et chauds, en Algérie est utilisé comme brise-vent et dans la médecine traditionnelle. Les études phytochimiques et pharmacologiques du genre *Cupressus* sont peu nombreuses par rapport à leur importance en usage médical.

C'est pourquoi nous sommes intéressés à faire une étude phytochimique et biologique de la plante *Cupressus sempervirens*, pour interpréter leur utilisation en médecine traditionnelle comme le traitement de diabète.

Ainsi, les objectifs de ce travail se résument à:

Dosage de contenu phénolique, flavonoïdique et tannique des extraits de *Cupressus sempervirens* aussi nous sommes intéressés à l'évaluation de l'activité antioxydante par différents tests.

Notre deuxième objectif visant la démonstration de l'inhibition d' α -amylase des extraits.

Le dernier objectif, de notre étude, est la séparation et l'élucidation de quelques métabolites secondaires.

Notre étude est divisée en deux parties, la première contient des recherches bibliographiques présentées en deux chapitres : la première est la recherche bibliographique et botanique d'espèce de cyprès et les travaux antérieurs, le deuxième est consacré aux métabolites secondaires, des généralités sur le diabète et l'activité antioxydante.

La deuxième est la partie expérimentale qui contient deux chapitres: Le troisième chapitre inclus les travaux personnels sur le dosage des phénols totaux, flavonoïdes et tanins ainsi que l'étude de l'activité antioxydante d'extraits par la méthode spectrophotométrique (DPPH, PPM et radical anion superoxyde) et la méthode électrochimique (voltamétrie cyclique) pour l'inhibition de l'anion superoxyde et en fin l'évaluation l'activité d'inhibition d' α -amylase et l'étude cinétique de cette enzyme.

Le quatrième chapitre est consacré à la séparation, purification et l'élucidation structurale des composés isolés à partir de la phase acétate d'éthyle de *C. sempervirens* L.

Références

1. Saxena, P.K., *Development of plant-based medicines: conservation, efficacy and safety*. 1st ed, 2001: Springer.
2. Jamshidi-Kia, F., Lorigooini, Z., and Amini-Khoei, H., *Medicinal plants: Past history and future perspective*. Journal of herbmed pharmacology, 2018. **7**(1).
3. Al-Waili, N., Al-Waili, H., Al-Waili, T., and Salom, K., *Natural antioxidants in the treatment and prevention of diabetic nephropathy; a potential approach that warrants clinical trials*. Redox Report, 2017. **22**(3): p. 99-118.
4. YAHI, N. and ABDELGUERFI, A., *Rapport sur l'Etat de l'Environnement (RNE 2011) Volet Biodiversité*, 2012.
5. Quézel, P., *Analysis of the flora of Mediterranean and Saharan Africa*. Annals of the Missouri Botanical Garden, 1978. **65**(2): p. 479-534.
6. Nichane, M., *Contribution à l'étude du dépérissement du Cyprès vert (*Cupressus sempervirens* L.) dans les monts des Traras Occidentaux (Wilaya de Tlemcen)*. Doctorat, 2015: Université de Tlemcen.

Partie

Bibliographique



CHAPITRE I :

Aperçu

bibliographique sur

le genre Cupressus

I.1. La famille des *Cupressacées* :

I.1.1. Présentation

Cupressaceae est une famille de plantes gymnospermes, elle contient environ 135 espèces d'arbres et d'arbustes et 19 genres [1], le genre comprend jusqu'à 25 espèces [2]. La famille des *Cupressacées* est la troisième en importance parmi les conifères, mais sa distribution est la plus large. C'est la seule famille présente sur tous les continents habitables et présente sur de nombreuses îles océaniques où les conifères se produisent naturellement [3]. *Cupressacées* sont répandues dans les deux hémisphères, principalement dans les climats froids à chaud-tempérés [4].

Le genre *Cupressus* (*Cupressaceae*) se compose de douze espèces réparties en Amérique du Nord, dans le bassin méditerranéen et en Asie subtropicale à haute altitude [5]. Dans le bassin méditerranéen, *Cupressus* est représenté par trois espèces indigènes et proches qui forment un groupe méditerranéen de cyprès, Ce sont : *C. sempervirens* (cyprès commun ou à feuilles persistantes) originaire de la région de la Méditerranée orientale, *C. atlantica* Gaussen endémique des montagnes de l'Atlas au Maroc et *C. dupreziana* A. Camus, endémique du Tassili Algérien "n'Ajjer" [6].

I.1.2. Intérêt commercial et pharmacologique

La famille du *Cupressaceae* joue des rôles écologiques fondamentaux contre la désertification où largement plantée comme brise-vent pour protéger le sol contre l'érosion éolienne, car elle est très résistante à la sécheresse [7, 8]. Aussi, cette famille présente des importances économiques et ornementales dans la région méditerranéenne, le bois des arbres de Cyprès (*Cupressaceae*) présente des caractéristiques intéressantes de haute durabilité et de rectitude naturelle. Là où il est utilisé dans de nombreuses industries [2].

I.1.3. Propriétés thérapeutiques et chimiques

Les plantes appartenant à la famille des *Cupressacées* sont des arbustes pérennes utilisés pour le traitement des névralgies, diurétiques dans la médecine traditionnelle [9]. On a découvert que plusieurs types d'extraits de ces plantes possèdent certaines bioactivités, telles que des propriétés antimicrobiennes, antitumorales [10]. Les études pharmacologiques antérieures ont révélé que certains *Cupressus* possédaient des agents antibactériens, antifongiques, antiviraux (l'activité antivirale contre le virus HSV-1) [11], antiparasitaires, insecticides, antioxydants, cicatrisants, anticancéreux, oestrogéniques, anticoagulants et bien d'autres effets [12]. Une étude chimique des plantes appartenant à la famille des

Cupressacées a montré la présence de plusieurs composés classés comme les flavones, les lignans et les terpènes....etc. [13]

I.2. Étude Ethnobotanique de l'espèce *Cupressus sempervirens* L.

Le nom scientifique donné à l'espèce est *Cupressus sempervirens* L. et le nom commun préféré est Cyprès Méditerranéen. Le nom de l'espèce *sempervirens* vient du latin toujours vert. D'autres synonymes connus sont *Cupressus sempervirens subspecies horizontalis* (Mill.) A. Camus ; *Cupressus sempervirens variety sphaerocarps* (Parl.) Parl ; *Cupressus sempervirens variety umbilicata* (Parl.) Parl. ; *Cupressus sempervirens forma stricta* (Aiton) Rehder ; *Cupressus sempervirens subspecies indica* (Parl.) Silba ; *Cupressus sempervirens variety atlantica* (Gaussen) Silba ; *Cupressus sempervirens variety dupreziana* (Camus) Silba ; *Cupressus sempervirens variety globulifera* Parl. ; *Cupressus sempervirens variety horizontalis* (Mill.) Loudon ; *Cupressus sempervirens variety indica* Parl. ; *Cupressus sempervirens variety numidica* Trab ; *Cupressus sempervirens variety pendula* (Endl.) A.Camus ; *Cupressus sempervirens variety stricta* Aiton [14, 15]

I.2.1. Description botanique

I.2.1.1. Description morphologique

Ce genre comprend des arbustes buissonnants et des arbres (habituellement de 15 à 20 m de hauteur mais peut atteindre 30 à 40 m) avec un tronc bien développé (environ 3 m de circonférence). Il grandit rapidement jusqu'à l'âge de 20 ans et peut vivre jusqu'à 500 ans.

Ses feuilles sont persistantes, vertes foncées, soit aciculaires (à un stade jeune), soit très petites, ressemblant à une écaille et se chevauchant à quatre rangs. Les fruits sont des cônes globuleux verts puis gris-brun, aux écailles épaisses s'écartant à maturité, contenant des graines à deux ails. Les cônes femelles sont globulaires (plus de 22 mm de large), brillants, avec 6-12 échelles inégales, opposées transversalement sur un axe court. Les écailles ovulifères portent de nombreux ovules. Les graines sont dentelées, brunes et étroitement ailées (64–240 par cône). La floraison a lieu au printemps: les cônes arrivent à maturité au printemps suivant [16-18].

I.2.1.2. Taxonomies et systématiques [19-21]

Règne : Plante

Embranchement : Spermaphytes

Sous-embranchement : Gymnospermes

Division : Coniferophyta

Classe : Pinopsida

Ordre : *Cupressales*

Famille : *Cupressaceae*

Genre : *Cupressus*

Espèce : *Cupressus sempervirens* L.

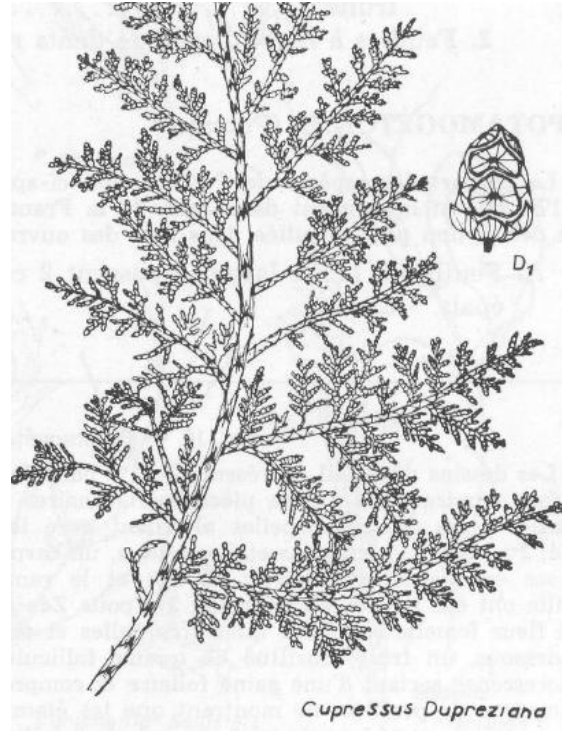


Figure I.1 : Dessin de *Cupressus dupreziana* [22]

I.2.1.3. Nom botanique de la plante

Nom scientifique: *Cupressus sempervirens* L. [21]

Anglais : Italian cypress, evergreen cypress; **Français** : Cyprès d'Italie, cyprès toujours vert [18]. **Arabe**: ; Nom vernaculaire: (sarwel) ; **Italien** : Cipresso comune [23]

Le nom *Cupressus* vient du latin où il désigne le genre, venant du Grec " Kuparessos" qui désigne l'espèce, certains auteurs pensent que cela viendrait plus tôt de Cyprus qui indique son origine Chypriote, sempervirens signifie toujours vert, persistant, mot qui vient du latin " semper " toujours et "virens " qui signifie vert [24].



Figure I.2 : Photo de *C. sempervirens* L. (Ouargla Septembre 2019)

I.3. Histoire de la propagation et distribution géographique

Depuis les temps anciens, des peuplements spontanés de Cyprès ont été découverts. Il existe une longue histoire d'exploitation remontant à l'époque des anciennes civilisations méditerranéennes. L'utilisation de *C. sempervirens* L. comme arbre d'ornement a conduit à de nombreuses introductions dans toute la Méditerranée, du depuis de l'époque romaine à nos jours, et plus récemment dans les régions tempérées subtropicales et chaudes du monde [25, 26].

La distribution naturelle de cette espèce n'est pas claire et a une distribution irrégulière en raison de sa longue histoire horticole dans la région méditerranéenne [27, 28]. Le genre *Cupressus* est présent dans l'ouest de l'Amérique du Nord (y compris le Mexique), en Europe (la Méditerranée), de l'Afrique du Nord à l'Iran et de l'Asie de l'Est jusqu'à l'Himalaya [29].

Le genre *Cupressus* en Europe, en Asie du Sud-Ouest et en Afrique du Nord est représenté par des taxons pouvant être adaptés à une sécheresse extrême ou au moins à des

étés secs et chauds. Les cyprès poussent dans les oueds ou dans les dépressions où il y a de l'eau sous terre. L'espèce de *C. sempervirens* est originaire du nord de la Perse, ainsi que de la Syrie, de la Turquie, de Chypre et de plusieurs îles grecques. Cependant, pendant l'empire romain, il a été introduit dans tous les pays méditerranéens, où il peut maintenant être considéré comme naturalisé [30]. Dans les habitats naturels, *C. sempervirens* est présent dans les climats méditerranéens avec des étés secs et chauds et des hivers pluvieux, ou dans les climats semi-arides à l'est et à l'intérieur de son aire de répartition. Deux taxons très isolés et très répétés ont été communément reconnus comme des espèces, mais ils sont en fait extrêmement similaires et pourraient même être considérés comme des sous-espèces ou des variétés de *C. sempervirens*. *Cupressus duprezian* var. *dupreziana* est présent dans le centre-ouest du Sahara, dans le Sud-Est de l'Algérie, sur le plateau du Tassili (Tassili n'Ajjer), au nord et au nord-ouest de l'oasis de Djanet [3].

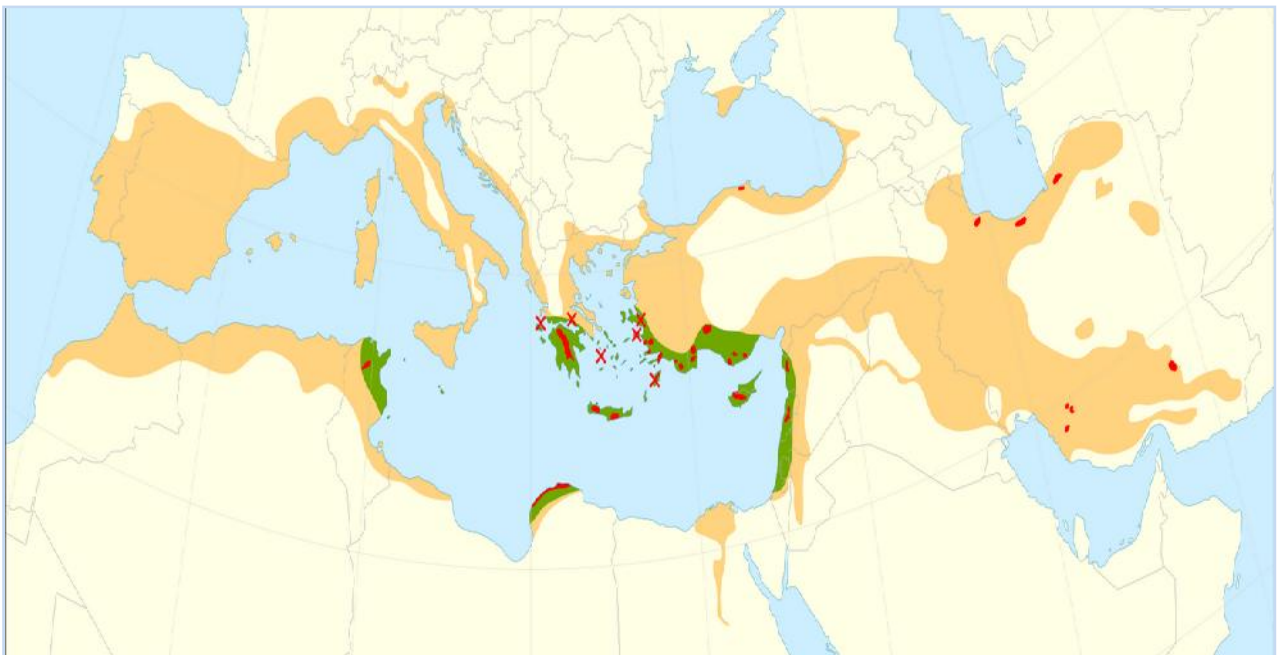


Figure I.3 : Carte de distribution de l'espèce *Cupressus sempervirens* L. (■ surface d'espèce comportant des secteurs synanthropique ■ surface indigène probable en bassin méditerranéen ■ t surface naturelle résiduelle) [31]

I.4. Utilisations en médecine traditionnelle

Les êtres humains ont dépendu des plantes pour leurs besoins en tant que sources de médicaments, abris, produits alimentaires, parfums, arômes et à travers les âges. Les populations locales utilisent cyprès dans la médecine traditionnelle en raison de ses multiples effets thérapeutiques.

Les parties aériennes de la plante sont largement utilisées en médecine traditionnelle depuis de nombreuses années [5].

Cupressus sempervirens est populairement connu sous le nom de "sarwel" ; ses feuilles sèches sont utilisées pour traiter les douleurs à l'estomac ainsi que pour traiter le diabète [32].

La résine de cyprès est utilisée par voie orale pour traiter la toux et les affections rhumatismales. En usage externe, il est utilisé contre les fissures, les crevasses et les ulcères du pied ; l'huile est appliquée sur les plaies pour traiter les cicatrices. En usage interne la bouillie de fruits est utilisée comme anti-diarrhée, antihémorragique et rhumes. [33, 34].

Les feuilles et les cônes ont été utilisés comme remède traditionnel dans de nombreux pays tels que antiseptique, antipyrétique, anthelminthique, astringent, antirhumatismal, anti-hémorroïdaire, anti-diarrhéique et vasoconstricteur [35, 36].

Cyprès est aussi décrit comme étant déodorant et diurétique, pour favoriser la circulation veineuse dans les reins et la vessie, pour améliorer le tonus de la vessie et comme co-adjurant dans le traitement de l'incontinence urinaire et de l'énurésie [37].

I.5. Travaux antérieurs sur l'espèce *Cupressus sempervirens* L.

I.5.1. Les activités biologiques

À la lumière des connaissances ethnopharmacologique et selon l'utilisation populaire répandue de l'espèce *Cupressus sempervirens* pour des raisons thérapeutiques, ceci a incité les chercheurs à effectuer de nombreux tests biologiques.

Les activités antioxydantes de l'extrait hydro-ethanolique des feuilles de *Cupressus sempervirens* ont été étudiées *in vitro*, ainsi que leur corrélation avec l'activité hépatoprotectrice *in vivo* dans le modèle de l'hépatotoxicité induite par le paracétamol chez le rat, en comparaison avec la silymarine comme agent de référence. *C. sempervirens* est considéré comme une source potentielle d'antioxydant naturel ayant une activité hépatoprotectrice [38, 39].

Les propriétés antibactériennes d'huile essentielle des feuilles et des cônes de *C. sempervirens* vis-à-vis de différentes souches bactériennes ont été mises en évidence tels que

Bacillus subtilis ATCC 9372, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 4157, et deux levures: *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 601, *Candida albicans* ATCC 24433, [40]. L'huile essentielle de feuilles de *C. sempervirens* L. montrant une activité antimicrobienne remarquable contre *Bacillus subtilis* à concentration inhibitrice minimale (MIC) 75%, cette huile essentielle a une activité antivirale significative. Où a été testée contre le virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1), les résultats ont montré une activité antivirale avec des pourcentages virucides de 68,0% et 53,2% aux concentrations de 1:32 et 1:64, respectivement. La fraction de CHCl_3 a montré une cytotoxicité significative contre les cellules HeLa. [35]. Les huiles essentielles ont été évaluées pour leur activité inhibitrice contre la réplication *in vitro* du SARS-CoV et du HSV-1 en évaluant visuellement l'effet cytopathogène induit par le virus après l'infection[41].

Des extraits à l'éthanol de *C. sempervirens* ont été utilisés dans des expériences pour tester leur activité antivirale sur les virus de l'herpès (HSV-1) et l'extrait de fruit apparue posséder la plus forte activité anti-HSV [11].

Une fraction de polymères pro-anthocyanidines (poids de 1500 à 2000 daltons) de *C. sempervirens* L. a montré une véritable activité antivirale *in vitro* contre deux rétrovirus, VIH et virus T-lymphotropique humain HTLV III B [42].

Les huiles essentielles extraites des feuilles de *C. sempervirens* ont été analysées par GC-MS et évaluées avec le *p*-cymène, l'un de leurs principaux constituants, pour leurs effets répulsifs et toxiques sur les insectes *Sitophilus zeamais* et *Tribolium confusum*. Les résultats suggèrent que l'huile essentielle de *C. sempervirens* pourrait être utilisée pour le stockage des céréales contre les insectes nuisibles [43]. Dans l'autre côté, les résultats d'essais *in vitro* antifongiques ont montré que l'huile inhibe de manière significative la croissance de 10 champignons phytopathogènes, Les effets herbicides des huiles sur la germination des graines, la vigueur des graines et la croissance des plantules de trois mauvaises herbes communes, *Sinapis arvensis* L., *Phalaris paradoxa* L. et *Raphanus raphanistrum* L. ont également été déterminés; l'huile a complètement inhibé la germination des graines et la croissance des plantules de toutes les mauvaises herbes [44].

Les extraits de *C. sempervirens* L. ont une activité anti inflammatoire induite par l'hépatite aiguë et les leucotriènes et un effet protecteur contre l'hépatotoxicité induite par le CCl_4 [36, 45]

Les extraits au dichlorométhane, l'acétone, l'acétate d'éthyle et le méthanol des cônes et des feuilles de *C. sempervirens* L. ont été étudiés pour leurs effets neurobiologiques *in vitro*, cette étude décrit les effets anti-cholinestérase et anti-tyrosinase des variétés de

C. sempervirens, la meilleure inhibition contre la butyrylcholinestérase a été provoquée par l'extrait acétonique de feuille de *C. sempervirens* var. *horizontalis* [46].

Les résultats des autres études suggèrent que les huiles essentielles extraites des rameaux et des fruits de *C. sempervirens* var. *horizontalis* possèdent des propriétés antioxydantes et, en particulier, anti-glycation. Pourrait inhiber la glycation de l'hémoglobine à toutes les concentrations testées. Où possible que de telles huiles puissent être utilisées pour la prévention des complications du diabète et d'autres troubles dans lesquels les produits finaux de glycation avancée sont étio-pathologiques [47].

I.5.2. Travaux antérieurs phytochimiques et les métabolites secondaires séparés de la famille *Cupressaceae*

D'après une étude approfondie de la littérature, il a été constaté que *C. sempervirens* avait une large gamme de composés, tel que des alcaloïdes, des monoterpènes, des diterpènes, des flavonoïdes glycosides et des composés biflavonoïdes saponines, tanins, phénols, huiles essentielles [48, 49].

I.5.2.1. Diterpénoïdes

La plupart des composés isolés à ce jour des espèces *C. sempervirens* sont des diterpénoïdes appelés acides *trans* communique (A1), lanost-8-en-1,3-dione (A2), acide sandracopimarique (A3), junepediol (A4), abieta-8,11,13-triene-20-ol (A5), 6 deoxytaxodione (A6), taxodione (A7) et ses structures illustrées ci-dessous (Figure I. 4) et dans le tableau I.1.

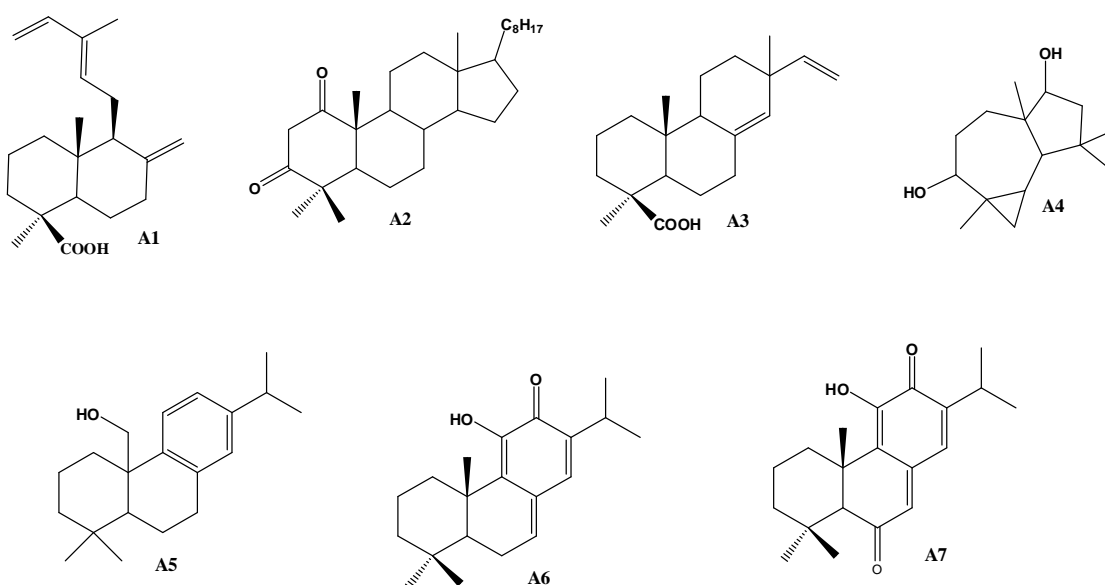


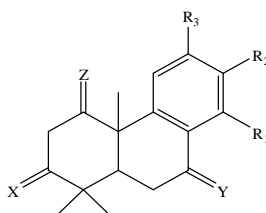
Figure I. 4 : Structures chimiques de différents diterpénoïdes isolés issus de *Cupressaceae*

Tableau I.1 : Exemples des différents diterpénoïdes isolés de *Cupressaceae*

Composé	Espèce	Réf
<i>trans</i> acide de communiqi (A1)	<i>C. sempervirens</i> L.	[5, 50]
	<i>Calocedrus formosana</i>	[51]
Abieta-8, 11, 13-triène-20-ol (A2)	<i>C. sempervirens</i>	[5]
	<i>Chamaecyparis Pisifera</i>	[52]
Acide sandracopimarique (A3)	<i>C. sempervirens</i> L.	[5]
	<i>Fritillaria thunbergii</i> MIQ. (<i>Liliaceae</i>)	[53]
Junépédiol (A4)	<i>C. sempervirens</i> L.	[5]
	<i>Juniperus formosana</i>	[54]
Lanost-8-en-1,3-dione (A5)	<i>C. sempervirens</i> L.	[50]
6-Deoxytaxodione (A6)	<i>C. sempervirens</i> L.	[55]

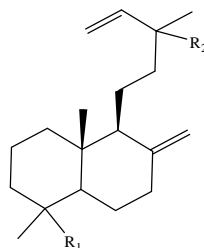
La famille de *Cupressaceae* a été étudiée plus loin. Dans plusieurs études rapportant l'isolement des diterpénoïdes d'abiétane connus tandis que deux diterpènes ont été isolés de la fraction d'éther de pétrole et d'extrait éthanolique de l'écorce de tige de *Cupressus gwentana* var. *Abramasiana*. Les diterpénoïdes isolés de la famille de *Cupressaceae* sont illustrées dans les tableaux des I.2 et I.3.

Tableau I.2 : Diterpénoïdes à base d'Abieta-8,11,13-triene isolés de la famille de *Cupressaceae*

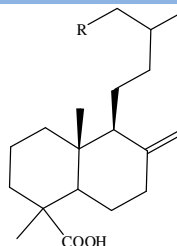


Composé	Z	X	R ₁	R ₂	R ₃	Y	espèce	Réf
Totarolone	H, H	O	CH(CH ₃) ₂	OH	H	H, H	<i>C. sempervirens</i> L.	[56]
Hinokione	H, H	O	H	CH(CH ₃) ₂	OH	H, H		
Hinokiol	H, H	OH, H	H	CH(CH ₃) ₂	OH	H, H	<i>C. dupreziana</i>	
Abieto-1,3-dione	O	O	CH(CH ₃) ₂	OH	H	H, H	<i>C. sempervirens</i> L.	[50]
Sugiol	H, H	H, H	H	CH(CH ₃) ₂	OH	O	<i>C. gwentana</i> var.	[57]
							<i>C. sempervirens</i> L.	[55]
Ferruginol	H, H	H, H	H	CH(CH ₃) ₂	OH	H, H	<i>Taiwania cryptomerioides</i>	[58]

Tableau I.3 : Diterpénoïdes à base de **labdane** isolés de la famille de *Cupressaceae* et *Taxodiaceae*



Composé	R ₁	R ₂	Espèce	Réf
acide Cupressique	COOH	OH	<i>C. sempervirens</i> L.	[50]
Manool	CH ₃	OH	<i>C. sempervirens</i> L.	[56]
Torulosal	CH ₂ OH	OH		
Torulosal	CHO	OH		
Monoacétate de torulosyle	CH ₂ OAC	OH	<i>C. dupreziana</i>	



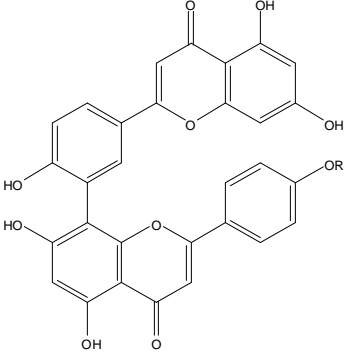
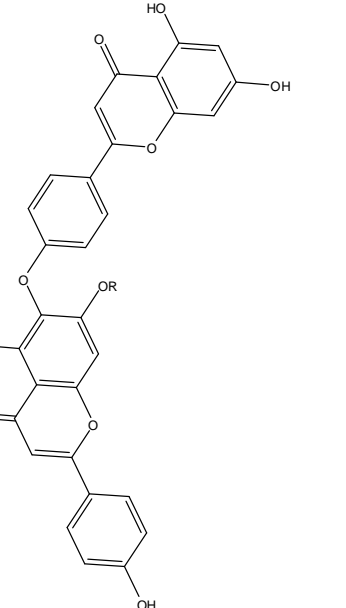
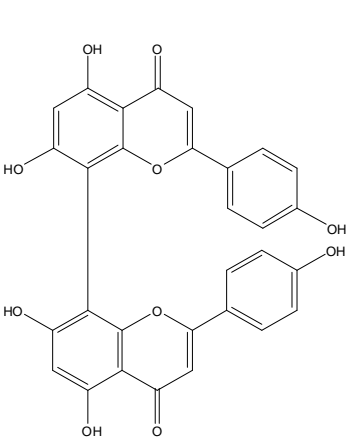
Composé	R	Espèce	Réf
Acide imbricatolique	CH ₂ OH	<i>C. sempervirens</i> L.	[5]
		<i>Cryptomeria Japonica</i>	[59]
Acide énantio-olévariique	COOH	<i>C. sempervirens</i> L.	[5, 60]
Acide acétoxyimbricatolique	CH ₂ OCOCH ₃	<i>Brickellia Glomerata</i>	

I.5.2.2. Flavonoïdes et polyphénols

a. Biflavones

Une enquête précédente a révélé que le genre *Cupressus* est riche en biflavones, en particulier en cupressuflavone. Il semble que ce soit la biflavone caractéristique de ce genre et qu'avec l'amentoflavone puisse servir de marqueur taxonomique utile. Précédemment, conclu que l'hinokiflavone est présente chez les *Cupressacées* sans exception. Cependant, dans l'étude de S. Natarajan, ce composé n'a pas pu être détecté dans deux échantillons de *C. sempervirens*. [61]; Les biflavones isolés de la famille de *Cupressaceae* sont illustrées dans le tableau I.4.

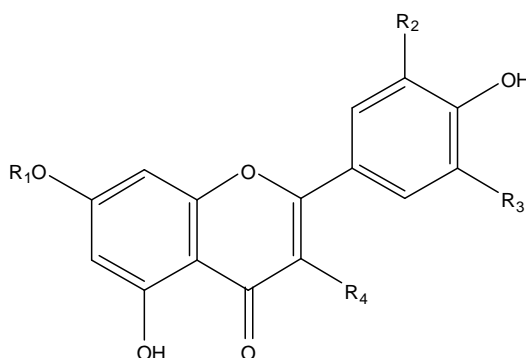
Tableau I.4 : Biflavones isolés de la famille de *Cupressaceae*

Structure de Composé	Nom de Composé	R	Espèce	Réf
	Amentoflavone	H	<i>C. cashmeriana</i> <i>C. sempervirens</i>	[62]
			<i>C. sempervirens</i> <i>C. torulosa</i>	[63]
			<i>C. sempervirens</i> L. var. <i>stricta</i> <i>C. glauca</i> <i>C. goveniana</i> <i>C. finebris</i> <i>C. torulosa</i>	[61]
	Podocarpusflavone A	CH ₃	<i>C. cashmeriana</i> <i>C. sempervirens</i>	[62]
			Hinokiflavone	H
	isocryptomerine	CH ₃	<i>C. finebris</i>	[61]
			Cupressuflavone	/
	Cupressuflavone	/	<i>C. cashmeriana</i> <i>C. sempervirens</i>	[62]

b. Composés phénoliques et les flavonoïdes

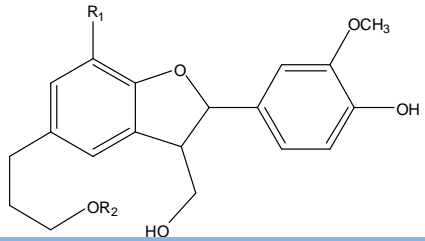
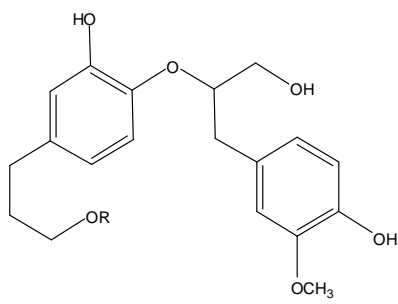
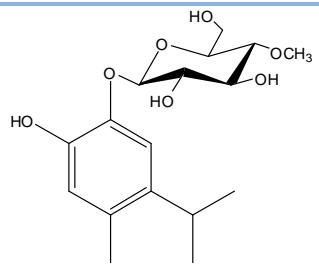
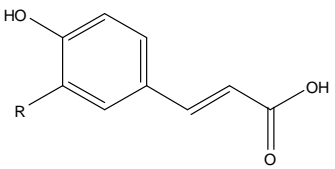
Des études sur les composés phytochimiques de *Cupressus sempervirens* L. ont révélé qu'il contenait des composants actifs tels que des flavonoïdes (rutine, quercitrine, quercétine et myricitrine), des composés phénoliques (anthocyanidine, catéchines flavones, flavonols et isoflavones, tannins et isoflavones) tanins (acide ellagique, acide gallique, phényl isopropanoïdes), acide caféique, acide coumarique, acide férulique, lignanes, catchol[64]. La fraction n-butanol a donné deux nouveaux glycosides phénoliques et cinq composés connus: la catéchine, l'épicatéchine, les néolignans, le 1-(4-hydroxy- 3-méthoxyphényl)-2- [4-(3-rhamnopyranoxypropyl)-2-hydroxyphénoxy]-1,3-propanediol) et le (1-(4-hydroxy phényl)-2-[4-(3-glucopyranoxypropyl)-2-méthoxyphénoxy]-1,3-propanediol) [5]. Les structures des composés isolés de la famille de *Cupressaceae* sont illustrées dans les tableaux des I.5 et I.6.

Tableau I.5 : Flavones glycosides isolés de la famille de *Cupressaceae*



Composés	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Espèce	Réf
Rutin	H	OH	H	O - glucorhamnosyl	<i>C. sempervirens</i>	[65]
Myricitrin	H	OH	OH	O -rhamnosyl	<i>C. sempervirens</i> <i>J. phoenicea</i>	[65]
Quercetin	H	OH	H	OH		
Cosmosiin	O -glucosyl	H	H	H	<i>C.sempervirens</i> , <i>C. funebris</i> , <i>C. glabra</i> , <i>C. goveniana</i> , <i>C. lusitanica</i> , <i>C. arizonica</i>	[66]
Quercitrin	H	OH	H	O -rhamnosyl		
kaempferol 3-O-rhamnoside	H	H	H	O -rhamnosyl	<i>C.sempervirens</i> , <i>C. funebris</i> , <i>C. glabra</i> , <i>C. goveniana</i> , <i>C. lusitanica</i> , <i>C. arizonica</i>	
Quercetin-3-O-(4 -methoxy)-a-L-rahmnoypyranosyl	H	OH	H	O-(4 -methoxy)-a-L-rahmnoypyranosyl	<i>C.sempervirens</i>	[5]

Tableau I.6 : Composés phénoliques isolés de la famille de *Cupressaceae*

Structure de Composé	Nom de Composé	R	Espèce	Réf	
	Neolignans	R ₁ : OH R ₂ : H	<i>C. sempervirens</i>	[5]	
		R ₁ : H R ₂ : α-L-rhamnopyranoside	<i>C. macrocarpa</i>	[67]	
		(1-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-(4-[3-rhamnopyranoxypopyl]-2-hydroxyphenoxy] - 1.3-propanediol	Rhamno-pyranosyl	<i>C. sempervirens</i>	[5]
		(1-hydroxyphenyl)-2-(4-[3-glucopyranoxypopyl]-2-methoxyphenoxy] - 1.3-propanediol	Glucopyranosyl		
	(2-hydroxy-5-isopropyl-4-methylphenoxy)-4-methoxy-β-D-glucopyranoside				
	Acide -coumarique	H	<i>C. sempervirens</i> <i>J. phoenicea</i>	[65]	
	Acide caféique	OH			

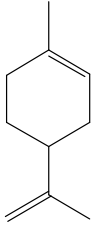
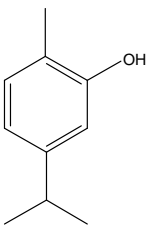
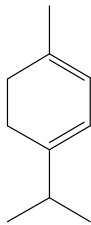
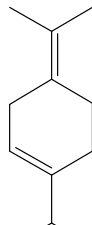
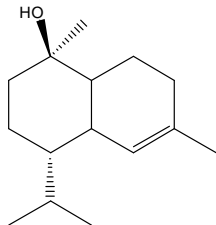
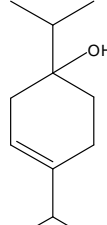
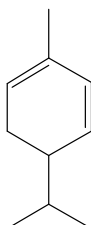
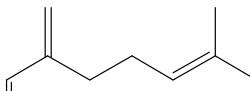
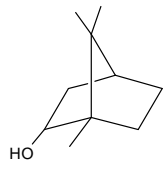
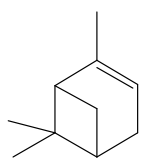
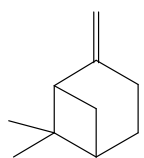
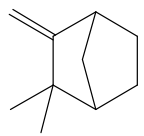
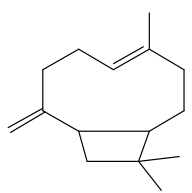
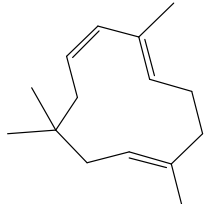
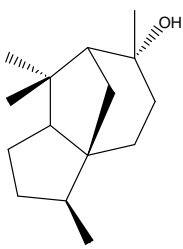
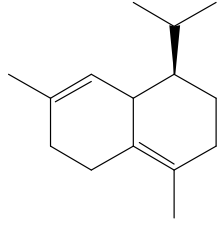
I.5.2.3. Mono-terpènes et sesquiterpènes

Comme indiqué dans plusieurs études, les huiles essentielles de cônes et de fruits contiennent principalement des mono-terpènes et des sesquiterpènes volatils.

Il est apparu que les huiles essentielles et volatiles de la plante différaient selon l'emplacement et la variété de la plante. 20 composés isolés de l'huile de cyprès de Méditerranée (*Cupressus sempervirens* L.), inclus tricyclène, -thujène, -pinène, camphène, sabinène, -pinène, myrcène, -3-carene p-cymène, limonène, -terpinène, -terpinolène, camphor, bronyl acetate, carvacrol, -caryophyllène, -humulène, germacrene-D, -cadinène

et -cedrol. 20 constituants représentant 98,1% d'huile ont été identifiés ; l' -pinène (48,6%), le -3-carène (22,1%), le limonène (4,6%) et l' -terpinolène (4,5%) constituaient les principaux composants, représentant 79,8% de l'huile. Une partie (1,9%) de la composition totale n'a pas été identifiée [68]. Les structures chimiques des mono-terpènes et des sesquiterpènes de *Cupressus sempervirens* L. sont illustrées dans le tableau I.7.

Tableau I.7 : Structures chimiques des mono-terpènes et des sesquiterpènes de *Cupressus sempervirens* L.

Structure de composé				
Nom de composé	Limonène	carvacrol	α -Terpinène	Terpinolène
Structure de composé				
Nom de composé	α -cadinol	l-terpinène	-phellandrène	Myrcène
Structure de composé				
Nom de composé	δ -Borneol	α -Pinène	-Pinène	camphène
Structure de composé				
Nom de composé	Caryophyllène	α -Humulène	cédroI	cadinène

I.6. Formes d'utilisations et posologies

Au fil des âges, les huiles essentielles et autres extraits de plantes ont suscité l'intérêt comme source de produits naturels. Ils ont été examinés pour leurs utilisations potentielles en tant que remèdes alternatifs pour le traitement de nombreuses maladies infectieuses. La phytothérapie inclut l'utilisation de plantes médicinales et aromatiques, qui constituent une source majeure de composés organiques naturels, pour soulager les maladies.

Le cyprès est utilisé comme vasoconstricteur, antiseptique, sédatif, antispasmodique, diurétique, la toux, le rhume, la bronchite, les varices, les crampes aux jambes.

L'huile essentielle est employée uniquement par voie externe, utilisé en aromathérapie pour le massage (10 gouttes dans 2 cuillerées à thé d'huile d'amande) [69].

Tisane : faire une décoction de 5 g dans 250 ml, laisser infuser 10 minutes, prendre 1 tasse avant les repas.

Teinture : 30 à 60 gouttes avant les repas de midi et du soir.

Extrait glycérine de plantes fraîches : 1 à 3 cuillerées à café par jour.

Extrait sec : correspondant à 10-15 g par jour de galbules (150 mg de nébulisat par gélule, 1 gélule 3 fois par jour) [23].

Médicaments à base de cyprès

Arterase® comprimés enrobés.

Nazinette du Dr Gilbert® pommade nasale.

Veinostase® solution buvable.

I.7. Contre-indications et effets indésirables

I.7.1. Toxicité de la plante

Les huiles essentielles possèdent des propriétés antibactériennes, antifongiques, antivirales, insecticides et antioxydantes [70, 71].

Ces composés naturels sont des produits complexes et volatils formés par les plantes aromatiques comme métabolites secondaires. Chimiquement, ces produits volatils et leurs composés oxygénés sont dérivés de terpènes [72, 73]. Chacun de ces composants contribue aux effets bénéfiques ou indésirables.

Cupressus sempervirens L. a un bon rendement en huiles essentielles où de nombreuses études antérieures ont prouvé son efficacité dans le traitement de nombreuses maladies microbiennes.

Dans une étude précédente, le profil de toxicité de l'huile avait été étudié chez des souris suisses et des rats albinos Wistar. L'étude de toxicité aiguë de l'huile de feuille de *Cupressus*

lusitanica sur des souris a montré une légère tolérance à la solution huileuse. Tandis que cette huile peut exercer des effets néfastes à fortes doses [74].

I.7.2. Effets indésirables

Le pollinose au cyprès touche près de 40 % de la population allergique méditerranéenne. Le cyprès peut être à l'origine d'allergies qui se manifestent par des rhinites saisonnières, associées la plupart du temps au classique rhume des foins printanier.

Dans une étude précédente, une approche visant à identifier un nouvel allergène du pollen de cyprès italien basé sur l'homologie et la réactivité croisée avec d'autres allergènes apparentés a été décrite. **Cup s 3**, un allergène du pollen de cyprès italien, a été identifié sur la base de sa réactivité croisée et de son homologie avec d'autres protéines de pollen **PR-5** [75].

Références

1. Evans, W., *Trease and Evans Pharmacognosy*. 15th ed, 2002: Sanders Co. Ltd. Singapore.
2. Jain, S.M. and Häggman, H., *Protocols for micropropagation of woody trees and fruits*. 2007: Springer Science & Business Media.
3. Farjon, A. and Filer, D., *An atlas of the world's conifers: an analysis of their distribution, biogeography, diversity and conservation status*. 2013: Brill.
4. Kramer, K.U. and Green, P., *The families and genera of vascular plants. Pteridophytes and Gymnosperms*. Vol. 1, 1990, New Yor: Berlin: Springer Verlag.
5. Rawat, P., Khan, M.F., Kumar, M., Tamarkar, A.K., Srivastava, A.K., Arya, K.R., and Maurya, R., *Constituents from fruits of Cupressus sempervirens*. *Fitoterapia*, 2010. **81**(3): p. 162-166.
6. Aboulaïch, N., Bouziane, H., El Kadiri, M., and Riadi, H., *Male phenology and pollen production of Cupressus sempervirens in Tetouan (Morocco)*. Grana, 2008. **47**(2): p. 130-138.
7. Bartel, J.A., *Cupressaceae Cypress Family*. *Journal of the Arizona-Nevada Academy of Science*, 1994. **27**(2): p. 195-200.
8. Cornelis, W.M., Gabriels, D., De Gryse, S., and Hartmann, R., *L'efficacité de brise-vent végétaux dans la lutte contre l'érosion éolienne: expérimentations sur modèles réduits*. *Science et changements planétaires/Sécheresse*, 2000. **11**(1): p. 52-7.
9. Hwang, G.S., Phuong, N.T., Park, K.R., Kim, Y.H., Kim, K.H., and Kang, J.S., *Distribution of (-)-yatein in Cupressaceae family analysed by high performance liquid chromatography*. *Archives of pharmacal research*, 2004. **27**(1): p. 35.
10. Ali, A., Mackeen, M., Intan-Safinar, I., Hamid, M., Lajis, N., El-Sharkawy, S., and Murakoshi, M., *Antitumour-promoting and antitumour activities of the crude extract from the leaves of Juniperus chinensis*. *Journal of ethnopharmacology*, 1996. **53**(3): p. 165-169.
11. Emami, S.A., Tayarani-Najaran, Z., Sabouri Ghannad, M., Khajeh Karamadini, P., and Khajeh Karamadini, M., *Antiviral activity of obtained extracts from different parts of cupressus sempervirens against Herpes Simplex Virus Type 1*. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 2009. **12**(3): p. 133-139.
12. Al-Snafi, A.E., *Medical importance of Cupressus sempervirens-A review*. *IOSR Journal of Pharmacy*, 2016. **6**(6): p. 66-76.

13. Topçu, G., Erenler, R., Çakmak, O., Johansson, C.B., Çelik, C., Chai, H.-B., and Pezzuto, J.M., *Diterpenes from the berries of Juniperus excelsa*. *Phytochemistry*, 1999. **50**(7): p. 1195-1199.
14. Skiewicz, K., Boratyńska, K., Dagher-Kharrat, M.B., Ok, T., and Boratyński, A., *Taxonomic differentiation of Cupressus sempervirens and C. atlantica based on morphometric evidence*. *Systematics and Biodiversity*, 2016. **14**(5): p. 494-508.
15. Farjon, A. *Cupressus sempervirens*. The IUCN Red List of Threatened Species 2013: e.T32518A2821211 2013.
16. Schulz, C., Knopf, P., and Stützel, T., *Identification key to the Cypress family (Cupressaceae)*. *Feddes Repertorium: Zeitschrift für botanische Taxonomie und Geobotanik*, 2005. **116**(1-2): p. 96-146.
17. Nicolas, J.-P., *Plantes médicinales du Nord de Madagascar: ethnobotanique Antakarana et informations scientifiques*. 2012, Madagascar: Jardins du monde.
18. Ghrabi, Z., *A guide to medicinal plants in north Africa*. 2005, Malaga Spain: IUCN Centre for Mediterranean Cooperation.
19. Monteuis, O., *Les cyprès*. *Informations Forêt*, 1985(262): p. 13-24.
20. Christenhusz, M.J., Reveal, J.L., Farjon, A., Gardner, M.F., Mill, R.R., and Chase, M.W., *A new classification and linear sequence of extant gymnosperms*. *Phytotaxa*, 2011. **19**(1): p. 55-70.
21. Farjon, A., *A Handbook of the World's Conifers*. Vol. 1, 2010, Leiden-Boston: Brill.
22. Ozenda, P., *Flor du Sahara*. 2nd ed, 1977, Paris: Centre National de la Recherche Scientifique.
23. Goetz, P. and Ghedira, K., *Phytothérapie anti-infectieuse*. 2012, Paris: Springer Science & Business Media.
24. Nichane, M., *Contribution à l'étude du dépérissement du Cyprès vert (Cupressus sempervirens L.) dans les monts des Traras Occidentaux (Wilaya de Tlemcen)*. Doctorat, 2015: Université de Tlemcen.
25. Caudullo, G. and de Rigo, D., *Cupressus sempervirens in Europe: distribution, habitat, usage and threats*. *European Atlas of Forest Tree Species*. Luxembourg: Publications Office of the European Union, pp. e01afb4, 2016.
26. Papageorgiou, A., Panetsos, K., and Hattemer, H., *Genetic differentiation of natural Mediterranean cypress (Cupressus sempervirens L.) populations in Greece*. *Forest Genetics*, 1994. **1**(1): p. 1-12.
27. Biswas, C. and Johri, B.M., *The gymnosperms*. 2013: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
28. Eckenwalder, J.E., *Conifers of the world: the complete reference*. 2009: Timber Press.
29. Iserin, P., *Larousse encyclopédie des plantes médicinales*. 2nd ed. Identification, Préparations, soins, 2001, Londres: Dorling Kindersley Limited.
30. Jain, S.M., Gupta, P.K., and Newton, R.J., *Somatic embryogenesis in woody plants*. Vol. 6, 2013: Springer Science & Business Media.
31. Caudullo, G., Welk, E., and San-Miguel-Ayanz, J. *Cupressus sempervirens chorology*. 2019 [cited 2019 01/08/2019]; Available from: https://figshare.com/articles/Cupressus_sempervirens_chorology/5101132.
32. Mascolo, N., Capasso, F., Menghini, A., and Fasulo, M.P., *Biological screening of Italian medicinal plants for anti-inflammatory activity*. *Phytotherapy research*, 1987. **1**(1): p. 28-31.
33. Bellakhdar, J., *Contribution à l'étude de la pharmacopée traditionnelle au Maroc: la situation actuelle, les produits, les sources du savoir (enquête ethnopharmacologique de terrain réalisée de 1969 à 1992)*. Doctorat, 1997: Metz.

34. Ye ilada, E., Sezik, E., Honda, G., Takaishi, Y., Takeda, Y., and Tanaka, T., *Traditional medicine in Turkey IX:: Folk medicine in north-west Anatolia*. Journal of Ethnopharmacology, 1999. **64**(3): p. 195-210.
35. Ibrahim, N., El-Seedi, H., and Mohammed, M., *Constituents and biological activity of the chloroform extract and essential oil of Cupressus sempervirens*. Chemistry of natural compounds, 2009. **45**(3): p. 309-313.
36. Toroglu, S., *In vitro antimicrobial activity and antagonistic effect of essential oils from plant species*. Journal of Environmental Biology, 2007. **28**(3): p. 551-559.
37. Mahmood, Z., Ahmed, I., Saeed, M.U.Q., and Sheikh, M.A., *Investigation of physico-chemical composition and antimicrobial activity of essential oil extracted from lignin-containing Cupressus sempervirens*. BioResources, 2013. **8**(2): p. 1625-1633.
38. Donya, S.M. and Ibrahim, N.H., *Antimutagenic potential of Cynara scolymus, Cupressus sempervirens and Eugenia jambolana against paracetamol-induced liver cytotoxicity*. Journal of American Science, 2012. **8**(1): p. 61-67.
39. Ali, Z.Y., Atia, H.A., and Ibrahim, N.H., *Possible hepatoprotective potential of Cynara scolymus, Cupressus sempervirens and Eugenia jambolana against paracetamol-induced liver injury: in-vitro and in-vivo evidence*. Nature and Science, 2012. **10**(1): p. 75-86.
40. Zouaghi, N., Bellel, C., Cavaleiro, C., Nadjemi, B., and Yousfi, M., *Identification of volatile compounds, antimicrobial properties and antioxidant activity from leaves, cones and stems of Cupressus sempervirens from Algeria*. African Journal of Microbiology Research, 2015. **9**(2): p. 83-90.
41. Loizzo, M.R., Saab, A.M., Tundis, R., Statti, G.A., Menichini, F., Lampronti, I., Gambari, R., Cinatl, J., and Doerr, H.W., *Phytochemical analysis and in vitro antiviral activities of the essential oils of seven Lebanon species*. Chemistry & biodiversity, 2008. **5**(3): p. 461-470.
42. Amouroux, P., Jean, D., and Lamaison, J.L., *Antiviral activity in vitro of Cupressus sempervirens on two human retroviruses HIV and HTLV*. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives, 1998. **12**(5): p. 367-368.
43. Taponjdjou, A., Adler, C., Fontem, D., Bouda, H., and Reichmuth, C., *Bioactivities of cymol and essential oils of Cupressus sempervirens and Eucalyptus saligna against Sitophilus zeamais Motschulsky and Tribolium confusum du Val*. Journal of Stored Products Research, 2005. **41**(1): p. 91-102.
44. Amri, I., Hanana, M., Gargouri, S., Jamoussi, B., and Hamrouni, L., *Comparative study of two coniferous species (Pinus pinaster Aiton and Cupressus sempervirens L. var. dupreziana [A. Camus] Silba) essential oils: chemical composition and biological activity*. Chilean journal of agricultural research, 2013. **73**(3): p. 259-266.
45. Ibrahim, N.A., El-Seedi, H.R., and Mohammed, M.M.D., *Phytochemical investigation and hepatoprotective activity of Cupressus sempervirens L. leaves growing in Egypt*. Natural product research, 2007. **21**(10): p. 857-866.
46. Tumen, I., Senol, F.S., and Orhan, I.E., *Evaluation of possible in vitro neurobiological effects of two varieties of Cupressus sempervirens (Mediterranean cypress) through their antioxidant and enzyme inhibition actions*. Turkish Journal of Biochemistry/Turk Biyokimya Dergisi, 2012. **37**(1).
47. Asgary, S., Naderi, G.A., Shams Ardekani, M.R., Sahebkar, A., Airin, A., Aslani, S., Kasher, T., and Emami, S.A., *Chemical analysis and biological activities of Cupressus sempervirens var. horizontalis essential oils*. Pharmaceutical biology, 2013. **51**(2): p. 137-144.

48. Hassanzadeh Khayyat, M., Emami, S.A., Rahimizadeh, M., Fazly-Bazzaz, B.S., and Assili, J., *Chemical constituents of Cupressus sempervirens L. cv. Cereiformis Rehd. essential oils*. Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2005. **1**(1): p. 39-42.
49. Khan, M., Ahamad, T., and Rawat, P., *Biomedicinal and chemical profile of Cupressus sempervirens: A Mini Review*. Insights Biomed, 2017. **2**: p. 3-16.
50. Mangoni, L. and Belardini, M., *The isolation and the structure of two dieterpene 1, 3-diones*. Tetrahedron Letters, 1964. **5**(37): p. 2643-2649.
51. Fang, J.-m., Hsu, K.-c., and Cheng, Y.-s., *Terpenoids from leaves of Calocedrus formosana*. Phytochemistry, 1989. **28**(4): p. 1173-1175.
52. Matsumoto, T., Endo, Y., and Okimoto, M., *The synthesis of (+)-pisiferol and (+)-pisiferal*. Bulletin of the Chemical Society of Japan, 1983. **56**(7): p. 2018-2022.
53. Kitajima, J., Komori, T., and Kawasaki, T., *Studies on the constituents of the crude drug "Fritillariae bulbus." III. On the diterpenoid constituents of fresh bulbs of Fritillaria thunbergii Miq.* Chemical and pharmaceutical bulletin, 1982. **30**(11): p. 3912-3921.
54. Kuo, Y.-H., Wu, T.-R., Cheng, M.-C., and Wang, Y., *Five new compounds from the heartwood of Juniperus formosana Hayata*. Chemical and pharmaceutical bulletin, 1990. **38**(12): p. 3195-3201.
55. Zhang, J., Rahman, A.A., Jain, S., Jacob, M.R., Khan, S.I., Tekwani, B.L., and Ilias, M., *Antimicrobial and antiparasitic abietane diterpenoids from Cupressus sempervirens*. Research and Reports in Medicinal Chemistry, 2012. **2**(1): p. 1-6.
56. Piovetti, L., Gonzalez, E., and Diara, A., *Diterpene composition of Cupressus dupreziana and Cupressus sempervirens*. Phytochemistry, 1980. **19**(12): p. 2772-2773.
57. Jolad, S.D., Hoffmann, J.J., Schram, K.H., Cole, J.R., Bates, R.B., and Tempesta, M.S., *A new diterpene from Cupressus goveniana var. abramasiana: 5-hydroxy-6-oxasugiol (cupresol)*. Journal of natural products, 1984. **47**(6): p. 983-987.
58. Wang, S.-Y., Wu, J.-H., Shyur, L.-F., Kuo, Y.-H., and Chang, S.-T., *Antioxidant activity of abietane-type diterpenes from heartwood of Taiwania cryptomerioides Hayata*. Holzforschung, 2002. **56**(5): p. 487-492.
59. Wen-Chiung, S., Jim-Min, F., and Yu-Shia, C., *Labdanes from Cryptomeria japonica*. Phytochemistry, 1994. **37**(4): p. 1109-1114.
60. Calderón, J.S., Quijano, L., Gómez-Garibay, F., Morán, M., and Ríos, T., *Labdane diterpenes from Brickellia glomerata*. Phytochemistry, 1987. **26**(9): p. 2639-2641.
61. Natarajan, S., Murti, V., and Seshadri, T., *Biflavones of some Cupressaceae plants*. Phytochemistry, 1970. **9**(3): p. 575-579.
62. Khabir, M., Khatoun, F., and Ansari, W., *Flavonoids of Cupressus sempervirens and Cupressus cashmeriana*. Journal of Natural Products, 1987. **50**(3): p. 511-512.
63. Murti, V., Raman, P., and Seshadri, T., *Cupressuflavone, a new biflavonyl pigment*. Tetrahedron, 1967. **23**(1): p. 397-404.
64. Koriem, K., *Lead toxicity and the protective role of Cupressus sempervirens seeds growing in Egypt*. Rev. Latinoamer. Quím, 2009. **37**(3): p. 230-242.
65. Ali, S.A., Rizk, M.Z., Ibrahim, N.A., Abdallah, M.S., Sharara, H.M., and Moustafa, M.M., *Protective role of Juniperus phoenicea and Cupressus sempervirens against CCl4*. World journal of gastrointestinal pharmacology and therapeutics, 2010. **1**(6): p. 123.
66. Romani, A., Galardi, C., Pinelli, P., Mulinacci, N., and Heimler, D., *HPLC quantification of flavonoids and biflavonoids in Cupressaceae leaves*. Chromatographia, 2002. **56**(7-8): p. 469-474.

67. Harraz, F.M., Hammouda, H.M., El-Hawiet, A., Radwan, M.M., Wanas, A.S., Eid, A.M., and ElSohly, M.A., *Chemical constituents, Antibacterial and Acetylcholine esterase inhibitory activity of Cupressus macrocarpa leaves*. Natural product research, 2018: p. 1-7.
68. Selim, S.A., Adam, M.E., Hassan, S.M., and Albalawi, A.R., *Chemical composition, antimicrobial and antibiofilm activity of the essential oil and methanol extract of the Mediterranean cypress (Cupressus sempervirens L.)*. BMC complementary and alternative medicine, 2014. **14**(1): p. 179.
69. Khare, C., *Indian Medicinal Plants-An Illustrated Dictionary*. Vol. 28, 2007, New Delhi, India: Springer-Verlag Berlin/Heidelberg.
70. Burt, S., *Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review*. International journal of food microbiology, 2004. **94**(3): p. 223-253.
71. Kordali, S., Kotan, R., Mavi, A., Cakir, A., Ala, A., and Yildirim, A., *Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of Artemisia dracunculoides and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish Artemisia absinthium, A. dracunculoides, Artemisia santonicum, and Artemisia spicigera essential oils*. Journal of agricultural and food chemistry, 2005. **53**(24): p. 9452-9458.
72. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., and Idaomar, M., *Biological effects of essential oils—a review*. Food and chemical toxicology, 2008. **46**(2): p. 446-475.
73. Mazari, K., Bendimerad, N., and Bekhechi, C., *Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Algerian Juniperus phoenicea L. and Cupressus sempervirens L.* Journal of Medicinal Plants Research, 2010. **4**(10): p. 959-964.
74. Teke, G.N., Elisée, K.N., and Roger, K.J., *Chemical composition, antimicrobial properties and toxicity evaluation of the essential oil of Cupressus lusitanica Mill. leaves from Cameroon*. BMC complementary and alternative medicine, 2013. **13**(1): p. 130.
75. Togawa, A., Panzani, R.C., Garza, M.A., Kishikawa, R., Goldblum, R.M., and Midoro-Horiuti, T., *Identification of Italian cypress (Cupressus sempervirens) pollen allergen Cup s 3 using homology and cross-reactivity*. Annals of Allergy, Asthma & Immunology, 2006. **97**(3): p. 336-342.

CHAPITRE II :
Les Métabolites
Secondaires et Les
Activités Biologiques

Les métabolites secondaires sont des produits chimiques produits par des plantes pour lesquels aucun rôle n'a encore été trouvé dans la croissance, la photosynthèse, la reproduction ou d'autres fonctions "primaires". Ces produits chimiques sont extrêmement divers, et sont généralement classés en fonction de leurs voies de biosynthèse. Trois grandes familles de molécules sont généralement considérées : les composés phénoliques, les terpènes et les alcaloïdes. Les composés phénoliques constituent un bon exemple de famille de métabolites répandues : ces molécules étant impliquées dans la synthèse de la lignine [1].

II.1. Composés phénoliques

Les phénols sont des composés de formule générale ArOH, où Ar est un phényle, un phényle substitué ou l'un des autres groupes aryle, par exemple naphthyle. Les phénols diffèrent des alcools par le fait que le groupe OH est lié directement à un cycle aromatique. L'hydroxybenzène, le membre le plus simple des phénols, est généralement appelé phénol [2].

II.1.1. Classification des polyphénols

Les phénols alimentaires ou polyphénols constituent l'un des groupes de produits naturels les plus nombreux et les plus largement distribués du règne végétal. On connaît actuellement plus de 10 000 structures des flavonoïdes identifiées [3]

La définition initiale de "polyphénols" s'est considérablement élargie au fil des ans pour inclure de nombreuses structures phénoliques beaucoup plus simples. Ils englobent plusieurs classes d'entités structurellement diverses qui sont essentiellement toutes biogénérées par les voies métaboliques secondaires shikimate / phénylpropanoïde ou acétate de "polycétide" / malonate [4].

La diversité et la large distribution des polyphénols dans les plantes ont conduit à différentes manières de catégoriser ces composés naturels. Les polyphénols sont couramment subdivisés en phénols simples, acides-phénols (dérivés de l'acide benzoïque ou cinnamique) et coumarines, en naphthoquinones, en stilbénoloïdes (deux cycles C₆ liés par 2C), en flavonoïdes, isoflavonoïdes et anthocyanes (structure C₆-C₃-C₆) et en formes polymérisées : lignanes, lignines, tanins condensés [5].

Le classement de ces composés en groupes est basé sur le nombre de carbones dans la molécule (Tableau II.1.) [6].

II.1.2. Biosynthèse des polyphénols

La biosynthèse des polyphénols se fait par deux voies principales qui sont :

II.1.2.1. Voie de l'acide shikimique

Comme tous les composés phénoliques, les acides phénoliques tels que l'acide gallique et l'acide cinnamique sont considérés comme des métabolites de la voie shikimate.

Tableau II.1 : Classification des composés phénoliques

Squelette carboné	Classe	Exemple
C ₆	Phénols simples	Hydroquinone
C ₆ -C ₁	Acides phénoliques	Acides hydroxybenzoïques
C ₆ -C ₂	Acétophénones et acides phénylacétiques	Gallacetophenone
C ₆ -C ₃	Acides cinnamiques, cinnamyl aldéhydes, alcools cinnamyliques	Acides hydroxycinnamiques
	Coumarines	Ombelliférone (7-hydroxycoumarine)
C ₆ -C ₄	Naphthaquinones	Juglone
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbénoides	trans-resvératrol
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes	Kæmpférol
	isoflavones	Daidzéine
	Anthocyanes	Delphinidol
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanes, neolignans	Dimères ou oligomères
(C ₆ -C ₃) _n	Lignines	
(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Tanins condensés	Procyanidol

La voie shikimate comprend sept étapes réactionnelles, commençant par une condensation de type aldol de l'acide phosphoénolpyruvique (PEP) de la voie glycolytique et

du D-érythrose-4-phosphate, du cycle du pentose phosphate, pour produire l'acide 2-céto-3-désoxy-7-phospho-D-glucoheptonique (Acide 3-désoxy-D-arabino-octulosonique 7-phosphate (DAHP)) [7]. La biosynthèse des composés phénoliques par la voie de l'acide shikimique illustrée dans la figure II.1.

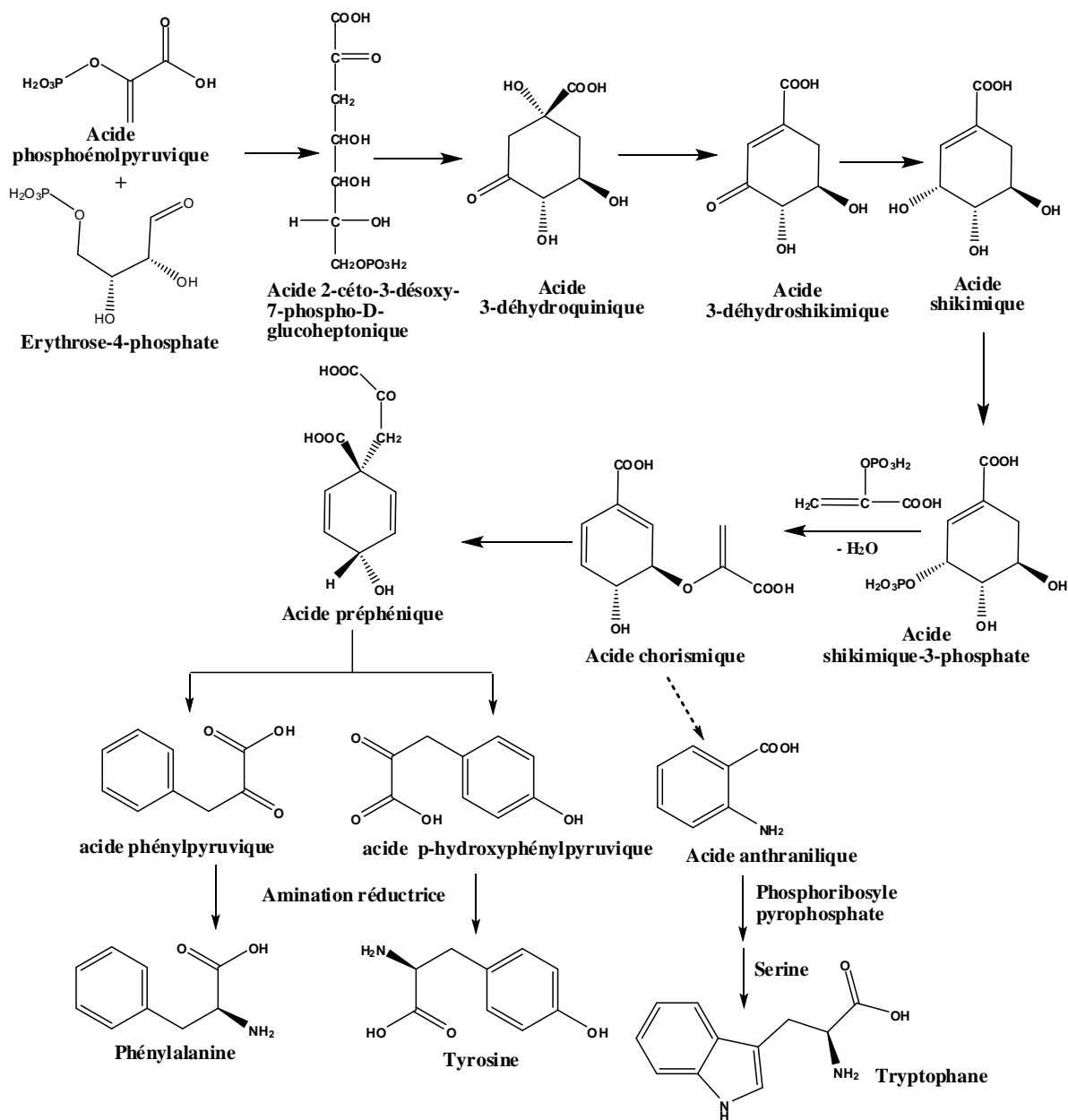


Figure II.1 : Biosynthèse des composés phénoliques par la voie de l'acide shikimique [8]

II.1.2.2. Voie de l'acétate

Les polyphénols sont aussi synthétisés à partir de la voie de l'acétate, qui conduit à des poly β -coesters (polyacétates) de longueur variable menant par cyclisation à des composés polycycliques tels que les dihydroxy-1,8-anthraquinones ou les naphthoquinones

De plus, la diversité structurale des composés poly-phénoliques, due à cette double origine biosynthétique est encore accrue par la possibilité d'une participation simultanée des deux voies dans l'élaboration de composés d'origine mixte ; les flavonoïdes [9].

II.1.3. Extraction des polyphénols

L'extraction des composés phénoliques dans les matières végétales est influencée par leur nature chimique, la méthode d'extraction employée, la taille des particules de l'échantillon, la durée et les conditions de stockage, ainsi que par la présence de substances interférentes.

La solubilité des composés phénoliques est régie par le type de solvant (polarité) utilisé, le degré de polymérisation des composés phénoliques, ainsi que par l'interaction des composés phénoliques avec d'autres composants alimentaires et la formation de complexes insolubles. Par conséquent, il n'existe pas de procédure uniforme ou totalement satisfaisante, adaptée à l'extraction de tous les composés phénoliques ou d'une classe spécifique de substances phénoliques dans les matières végétales. Le méthanol, l'éthanol, l'acétone, l'eau, l'acétate d'éthyle dans une moindre mesure, le propanol, le diméthylformamide et leurs combinaisons sont fréquemment utilisés pour l'extraction des composés phénoliques [10].

II.1.4. Propriétés biologiques des polyphénols

Les données actuelles soutiennent fortement une contribution des polyphénols dans la prévention des maladies cardiovasculaires, des cancers et de l'ostéoporose et suggèrent un rôle dans la prévention des maladies neuro-dégénératives et du diabète [11].

II.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés polyphénoliques à quinze atomes de carbone, avec deux cycles aromatiques reliés par un pont à trois carbones [12]. Ce sont des pigments hydrosolubles que l'on trouve dans les vacuoles des cellules végétales. Ils peuvent également être divisés en trois groupes : anthocyanes, flavones et flavonols. La plupart des flavonoïdes sont des composés jaunes et contribuent à la couleur jaune des fleurs et des fruits, où ils se présentent généralement sous forme de glycosides [2].

II.2.1. Classification des flavonoïdes

Les principales sous-classes de flavonoïdes sont les flavones, les flavonols, les flavan-3-ols, les isoflavones, les flavanones et les anthocyanidines (Figure II.2). Les autres groupes flavonoïdes, qui sont quantitativement des composants mineurs du régime alimentaire, sont les dihydroflavonols, les flavan-3,4-diols, les coumarines, les chalcones, les dihydrochalcones et les aurones.

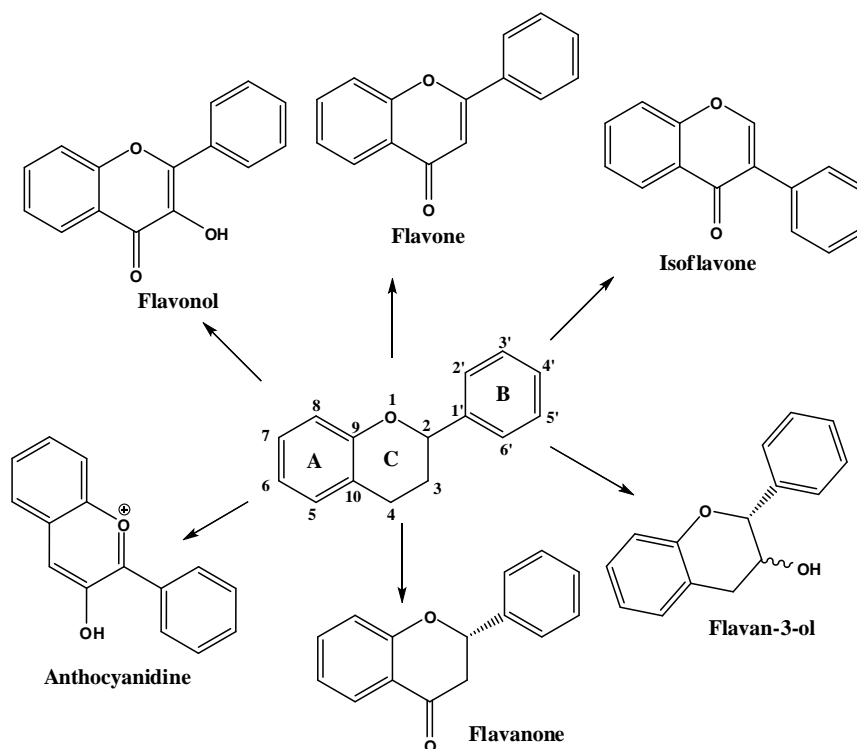


Figure II.2 : Structures génériques des principaux flavonoïdes

Le squelette flavonoïde de base peut avoir de nombreux substituants. Les groupes hydroxyles sont généralement présents aux positions 4, 5 et 7. Les sucres sont très communs avec la majorité des flavonoïdes existant naturellement sous forme de glycosides. Alors que les sucres et les groupes hydroxyle augmentent la solubilité dans l'eau des flavonoïdes, d'autres substituants, tels que les groupes méthyle et les unités isopentyle, rendent les flavonoïdes lipophiles [12]. Chez les flavones et les flavonols, le cycle A est, dans le près de 90 % des cas, substitué par deux hydroxyles phénoliques en C-5 et en C-7. Ces hydroxyles peuvent être libres ou étherifiés, l'un d'entre eux peut être engagé dans une liaison hétérosidique. Le cycle B est substitué dans 80% des cas en C-4' ou di-substitué en C-3' et C-4' par des groupements OH ou méthoxyles (OCH₃) [13].

II.2.2. Biosynthèse des flavonoïdes

La première étape de la biosynthèse de la plupart des flavonoïdes est la condensation d'une molécule de p-coumaroyl-CoA (dérivé du shikimate, cycle **B**) avec trois molécules de malonyl-CoA (origine polycétide, cycle **A**) pour donner de la chalcone (2',4',6',4-tétra hydroxychalcone). Cette réaction est réalisée par l'enzyme chalcone synthase (CHS). La chalcone est ensuite isomérisée par l'enzyme chalcone flavanone isomérase (CHI) en flavanone (Figure II.3). À partir de ces intermédiaires centraux, la voie diverge en plusieurs branches latérales, chacune donnant une classe différente de flavonoïdes [14].

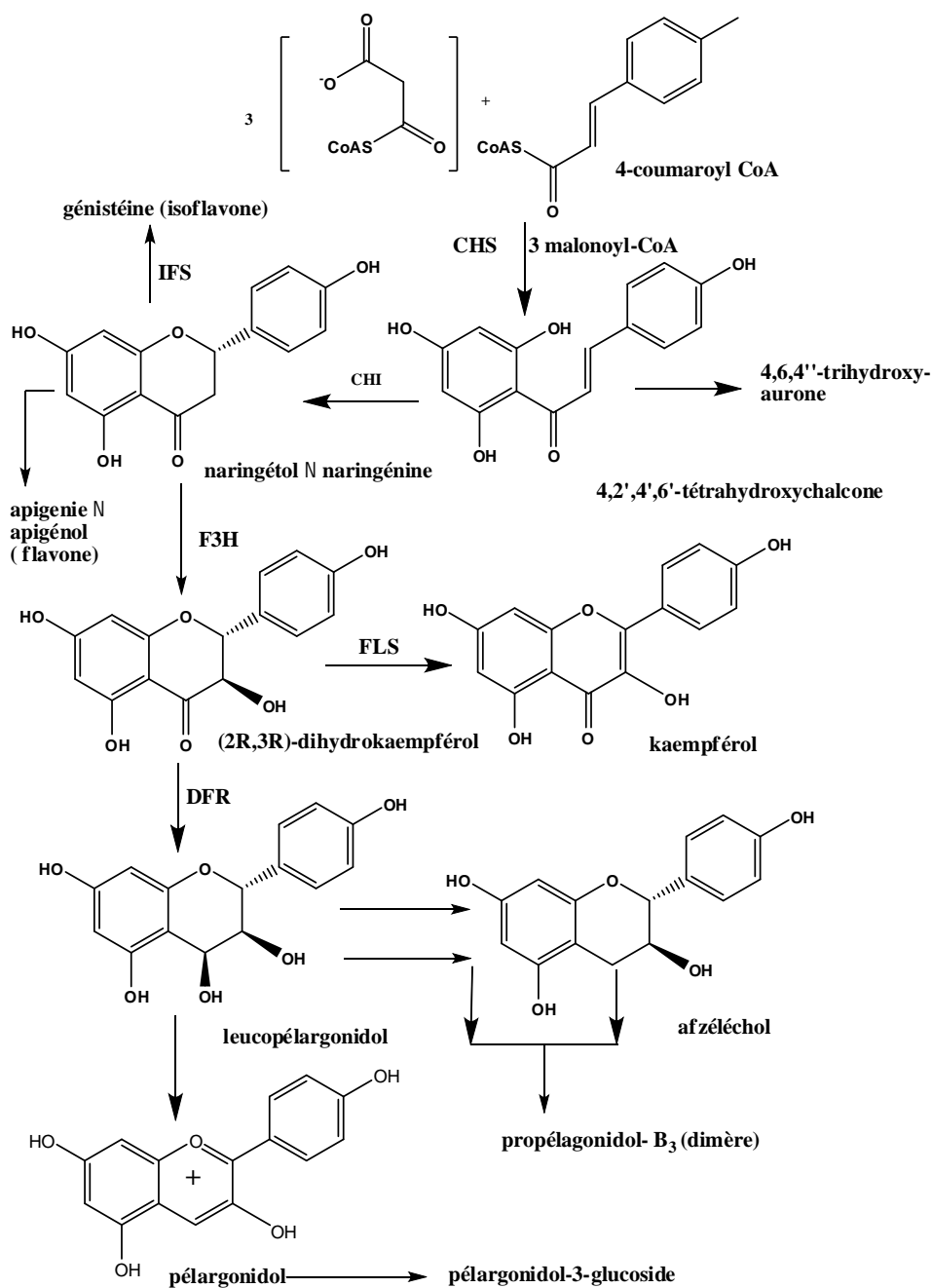


Figure II.3 : Diagramme de la voie de biosynthèse des flavonoïdes

Principales enzymes catalysant certaines réactions: **CHS** :chalcone synthase; **CHI** : chalcone flavanone synthase; **F3H** : la flavanone 3 -hydroxylase; **DFR** : dihydroflavonol 4-réductase; **FLS** : flavonol synthase; **IFS** :isoflavonoïde synthase [13, 15].

II.2.3. Extraction des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont généralement extraits de matières végétales avec du méthanol, de l'éthanol, de l'eau ou de leur combinaison, les solvants utilisés pour l'extraction sont choisis en fonction de la polarité des flavonoïdes, des traces d'acide sont parfois incorporées dans le solvant pour l'extraction des glycosides flavonoïdes [16].

Les extraits sont souvent traités avec du HCl afin d'hydrolyser les glycosides de flavonoïdes en aglycones. L'extrait est mélangé avec HCl 6 M (extrait : acide, 1: 4, v / v), l'échantillon est barboté d'azote pendant 40-60s. L'hydrolyse est réalisée dans un bain-marie à 90 °C pendant 2 h [17]

II.2.4. Structure chimique des flavonoïdes

La nature chimique des flavonoïdes varie en fonction de la position d'hydroxyle, de la conjugaison entre les cycles aromatiques, des fragments glycosidiques, des groupes méthoxy et d'autres substituant. Les flavonoïdes contiennent des doubles liaisons et des groupes (hydroxyle ou autres substituants) conjugués qui peuvent donner des électrons par résonance pour stabiliser les radicaux libres. Proviennent des spectres électroniques des flavonoïdes [14].

a. Spectroscopie Ultraviolet-Visible

La spectroscopie UV est l'une des techniques analytiques les plus populaires, en particulier à identifier le type de flavonoïde, pour définir le schéma d'oxygénation et pour déterminer les positions de substitution phénolique, par l'addition de réactifs (méthoxyde de sodium (NaOMe), acétate de sodium (NaOAc), acétate de sodium / acide borique (NaOAc / H₃BO₃), chlorure d'aluminium (AlCl₃) et chlorure d'aluminium / acide chlorhydrique (AlCl₃ / HCl) séparément à la solution alcoolique du flavonoïde induit des changements structuraux significatifs dans le spectre UV. Le spectre UV de la plupart des flavonoïdes comprend deux maxima d'absorption majeurs, l'un se situant dans la plage allant de 240 à 285 nm (bande II) et l'autre dans la plage allant de 300 à 400 nm (bande I), (Figure II.4). En termes généraux, l'absorption de la bande II peut être considérée comme provenant du système benzoylé à cycle **A** et la bande I du système cinnamoylé à cycle **B** [16].

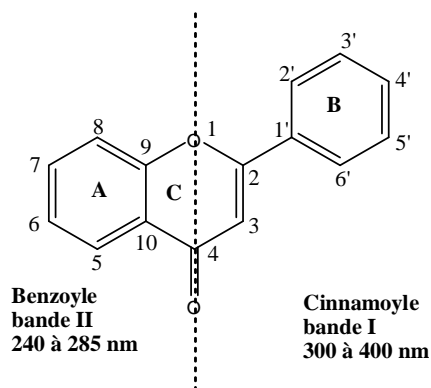


Figure II.4 : Absorption de la bande II et bande I. Adapté de la référence [18]

b. Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est l'une des méthodes les plus sensibles d'analyse moléculaire. En raison de son haut pouvoir de séparation en masse, de très bonnes sélectivités peuvent être obtenues. Les données spectrales de masse fournissent des informations structurales sur les flavonoïdes et sont utilisées pour déterminer les masses moléculaires et pour établir la distribution des substituants entre les cycles **A** et **B** [19].

La plupart des aglycones flavonoïdes produisent des pics intenses pour l'ion moléculaire (M^+) et c'est en fait souvent le pic de base. En plus de l'ion moléculaire, les flavonoïdes donnent généralement des pics majeurs pour $[M-H]^+$ et, lorsqu'ils sont méthoxylés, $[M-CH_3]^+$. Les fragments les plus utiles en termes d'identification des flavonoïdes sont peut-être ceux qui impliquent le clivage de fragments de cycle **A** et **B** intacts [16].

c. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

L'application de la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) à l'analyse structurale des flavonoïdes est maintenant bien établie [18]. C'est l'une des techniques les plus récentes et son application est limitée aux flavonoïdes naturels, dont la plupart sont des glycosides, en raison de leur faible solubilité dans la plupart des solvants organiques [20]. La technique la plus générale est la spectroscopie RMN 1H , mais compte tenu des progrès techniques récents et de la plus grande disponibilité de la spectroscopie RMN ^{13}C . Cette technique puissante, fournissant des informations sur le squelette carboné de la molécule, peut être considérée comme complémentaire à la spectroscopie RMN 1H puisqu'elle concerne davantage étroitement à l'environnement structural du noyau flavonoïde [21].

II.2.5. Propriétés biologiques des flavonoïdes

Les principales caractéristiques structurales des flavonoïdes nécessaires à l'activité anti-oxydante peuvent être déterminées par trois facteurs fondamentaux: 1- une structure 3',4-dihydroxy (catéchol) dans le cycle **B** favorise la délocalisation électronique (I), 2- une liaison 2-3 insaturée en conjonction avec un groupe 4-céto permet la délocalisation d'électrons à partir du cycle **B** (II) .3- Les groupes hydroxyles en positions 3 et 5 forment une liaison hydrogène intramoléculaire au groupe céto (III) (Figure II.5). Ces effets conduisent à des augmentations du balayage radicalaire par délocalisation d'électrons ou par donation d'hydrogène [22].

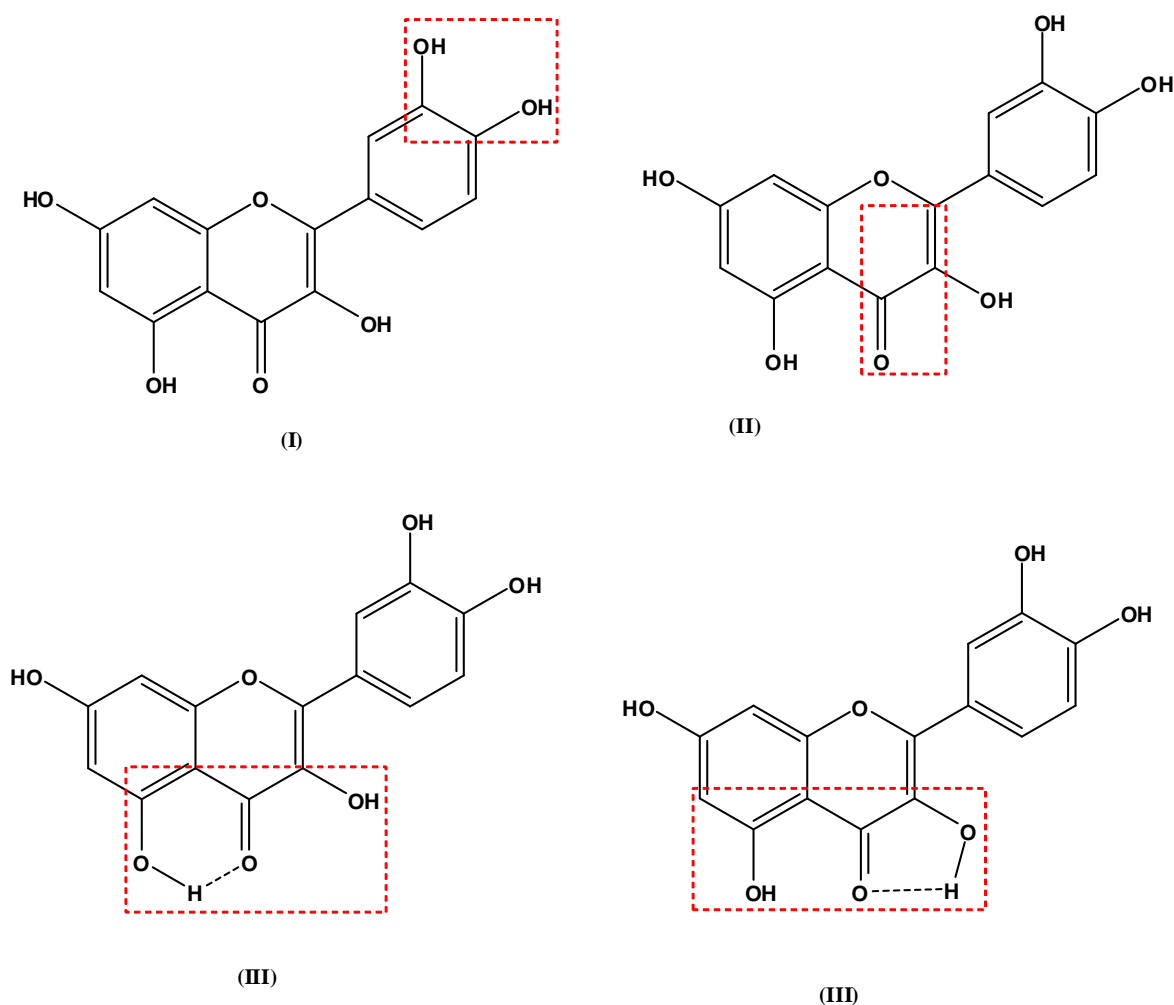


Figure II.5 : Groupes structuraux pour piégeage des radicaux

Le premier biflavonoïde isolé à été la gingétine, en 1929. On en connaît maintenant plus d'une centaine et diverses activités biologiques ont été rapportées.

Amentoflavone a une large distribution, par exemple des espèces de Ginkgo, Hypericum, Rhus et conjointement avec la robustaflavone, ont démontré une activité contre les virus influenza A, HSV-1 et HSV-2 [8].

II.3. Tanins

Les tanins représentent un grand groupe de composés polyphénoliques hydrosolubles de poids moléculaire élevé, ce sont largement répandus dans le règne végétal. Ils se distinguent par leur capacité à lier et à précipiter des protéines. Ce sont des esters de polyol (le plus souvent -D-glucose) avec de l'acide gallique (gallo-tanins) ou de l'acide hexahydroxy diphénique (ellagitanins) [23, 24].

II.3.1. Classification des tanins

Les tanins peuvent être classés en trois groupes : les tanins condensés, les tanins complexes et les tanins hydrolysables. Ces derniers sont regroupés en gallo-tannins et ellagitanins. Ces groupes peuvent ensuite être divisés, comme illustré dans la figure II.6 [6].

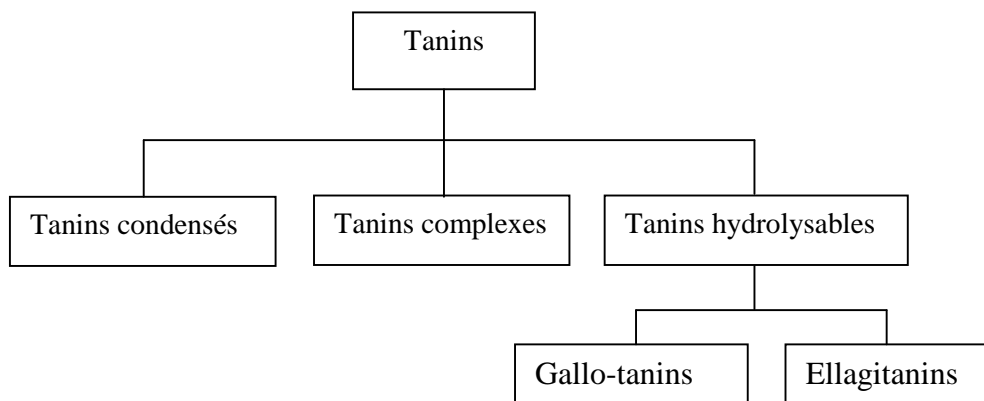


Figure II.6 : Classification des tanins

a. Tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables sont des composés contenant un noyau central de glucose ou d'un autre polyol estérifié avec de l'acide gallique, les deux principaux types de tanins hydrolysables sont les gallitanins et les ellagitanins, qui sont respectivement composés d'unités d'acide gallique et d'acide hexahydroxy-diphénique (Figure II.7). La grande variété dans la structure de ces composés est due aux nombreuses possibilités de formation de liaisons oxydantes [8, 25].

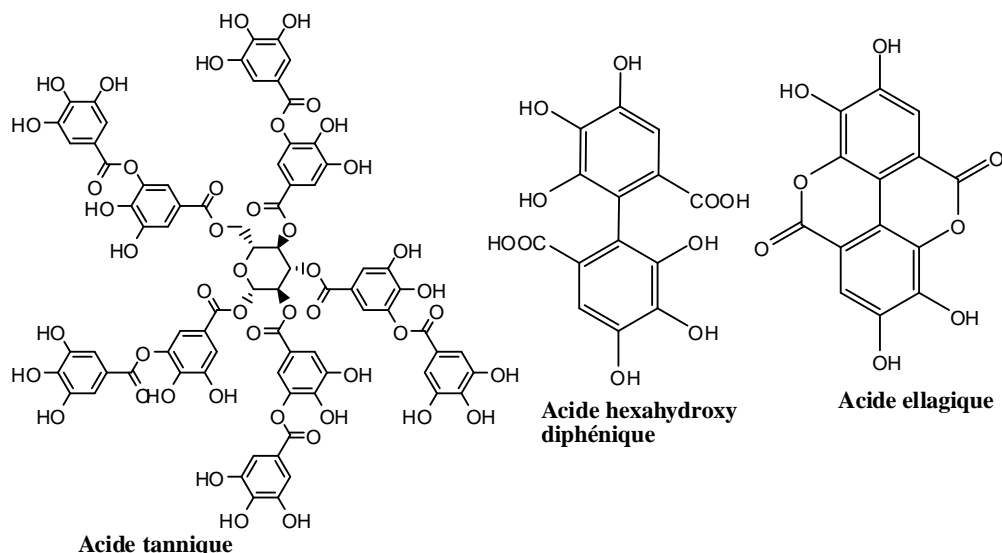


Figure II.7 : Exemples de tanins hydrolysables

b. Tanins condensés

Les tanins condensés sont également appelés proanthocyanidines. Ce sont des flavonoïdes oligomères ou polymères constitués d'unités de type flavan-3-ol (catéchine). L'hydrolyse dans des conditions difficiles, telles que le chauffage dans un acide, donne des anthocyanidines. Un exemple de tanin condensé est la procyanidine B2 (épi-catéchine- (4 8) – épi-catéchine ; Figure II.8.). Dans ce cas, la liaison interflavanyle se situe entre C4 de l'unité "inférieure" et C8 de l'unité "supérieure". La liaison peut aussi être entre C4 d'une unité et C6 de la deuxième unité [6].

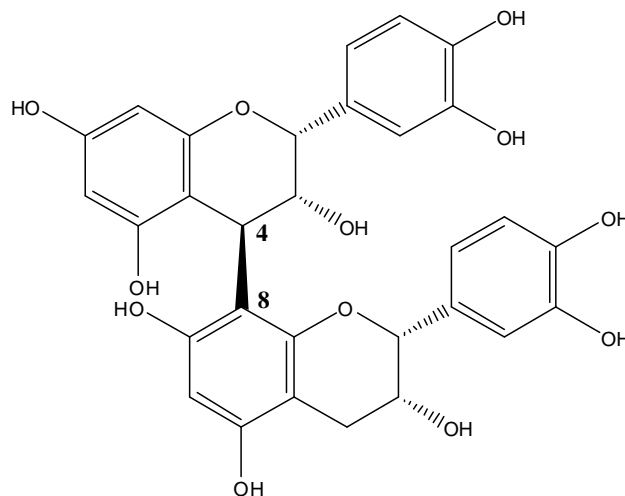


Figure II.8 : Structure de procyanidine B2

c. Tanins complexes

Les tanins complexes sont définis comme des tanins dans lesquels une unité catéchine est liée glycosidiquement à une unité gallotanine ou ellagitannique. Comme son nom l'indique, la structure de ces composés peut être très complexe. Acutissimin A (Figure II.9.) en est un exemple. Il s'agit d'une unité flavogallonyle liée de manière glycosidique à C1, avec trois liaisons ester hydrolysables supplémentaires à un polyol à chaîne ouverte dérivé de D-glucose [6].

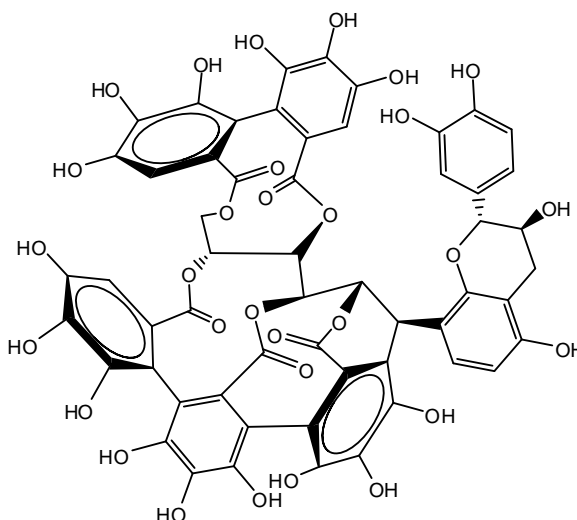


Figure II.9 : Structure d'Acutissimin A

II.3.2. Extraction des tanins

L'extraction des tanins est en règle générale, réalisée par un mélange d'eau et d'acétone (on évite le méthanol qui provoque la méthanolyse des depsides galliques). Après élimination de l'acétone par distillation, la solution aqueuse est débarrassée des pigments et des lipides par un solvant tel que le dichlorométhane, une extraction de cette solution aqueuse par l'acétate d'éthyle permet de séparer les proanthocyanidols dimères et la plupart des tanins galliques. Les proanthocyanidols polymères et les tanins galliques de masse moléculaire élevée restent dans la phase aqueuse [13].

II.3.3. Biosynthèse des gallotannines

Les gallotannins et les ellagitannins constituent les tanins hydrolysables et sont dérivés du 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- -D-glucopyranose. Les gallotannins contiennent 10 à 12 fragments d'acide gallique supplémentaires par molécule. C'est effectivement la continuation des réactions d'estérification qui ont conduit à la formation de pentagalloylglucose (Figure II.10) [6].

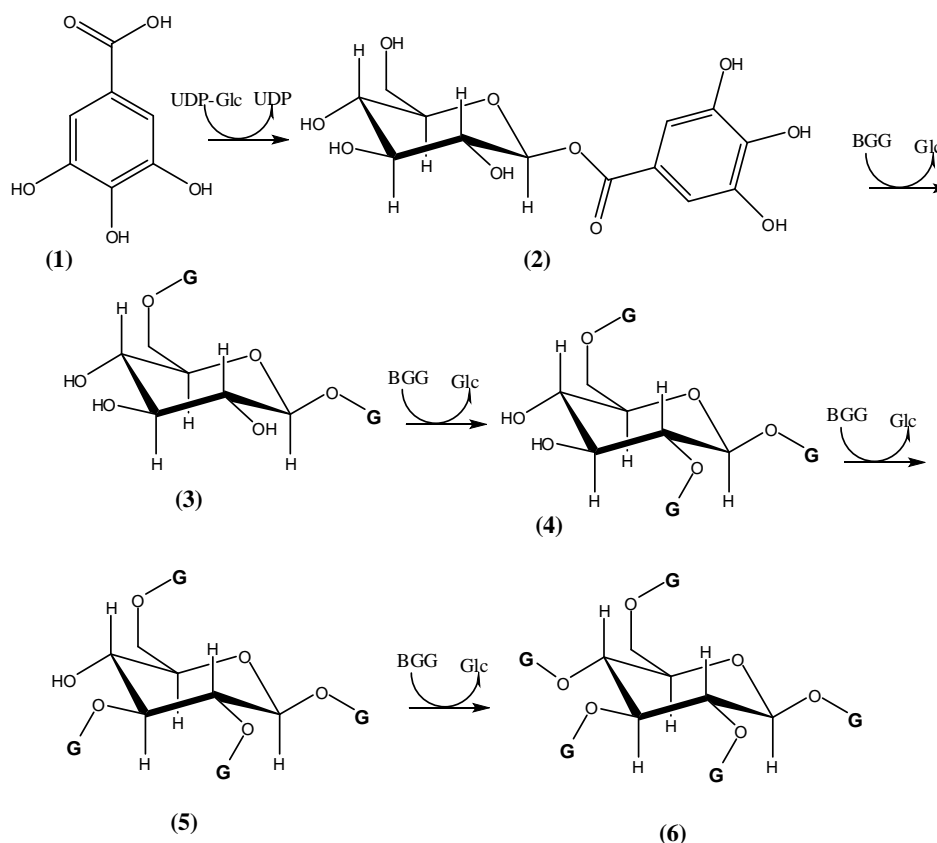


Figure I.10 : Biosynthèse du 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- -D-glucopyranose (6) à partir d'acide gallique (G; 1) et de l'UDP-Glucose.

Le dernier résidu d'acide gallique ajouté est indiqué par un G en gras. Les intermédiaires sont la -glucogalline (GG; 2), le 1,6-di-O-galloyl- -D-glucopyranose (3), le 1,2,6-tri-O-galloyl- -D-glucopyranose (4) et le 1,2,3,6-tétra-O-galloyl- -D-glucopyranose (5).

II.3.3. Propriétés biologiques des tanins

Les tanins sont des polyphénols largement présents dans les plantes. Les polyphénols étant connus pour démontrer une activité biologique, en particulier des propriétés antioxydantes. Les activités biologiques des tanins comprennent des activités marquées anti-tumorales, antivirales (anti-VIH), l'inhibition de la peroxydation des lipides et de l'activité de la plasmine, la médiation de la coupure de l'ADN, l'amélioration de l'insuffisance rénale et plusieurs autres [26].

II.4. Lignanes

Les lignanes sont des composés organiques synthétisés par les plantes et se caractérisent par l'union de deux résidus d'acide cinnamique par liaison sur le C-8 de chaque chaîne latérale du propyle. On les trouve dans les fougères, les gymnospermes et les angiospermes.

Ils sont localisés dans les tiges et les graines ligneuses et ont un effet dissuasif sur les insectes. Certains de ces composés ont des propriétés médicinales [6, 27].

II.4.1. Classification des lignanes

Les lignanes sont classés dans les huit sous-groupes suivants en fonction de la manière dont l'oxygène est incorporé dans le squelette et du schéma de cyclisation : furofurane, furane, dibenzylbutane, dibenzylbutyrolactone, aryltétraline, arylnaphtalène, dibenzocyclooctadiène et dibenzocyclooctadiène et dibenzylbutyrolactol (Figure II.11). Les lignanes de chaque sous-groupe varient substantiellement dans les niveaux d'oxydation des cycles aromatiques et des chaînes latérales propyle. Certaines lignanes de furanne, de dibenzylbutane et de dibenzocyclooctadiène ne contiennent pas d'oxygène en C-9 (C-9'), alors que certaines lignanes ont des groupes hydroxyle supplémentaires en C-7 (C7') ou en C-8 (C-8') [28].

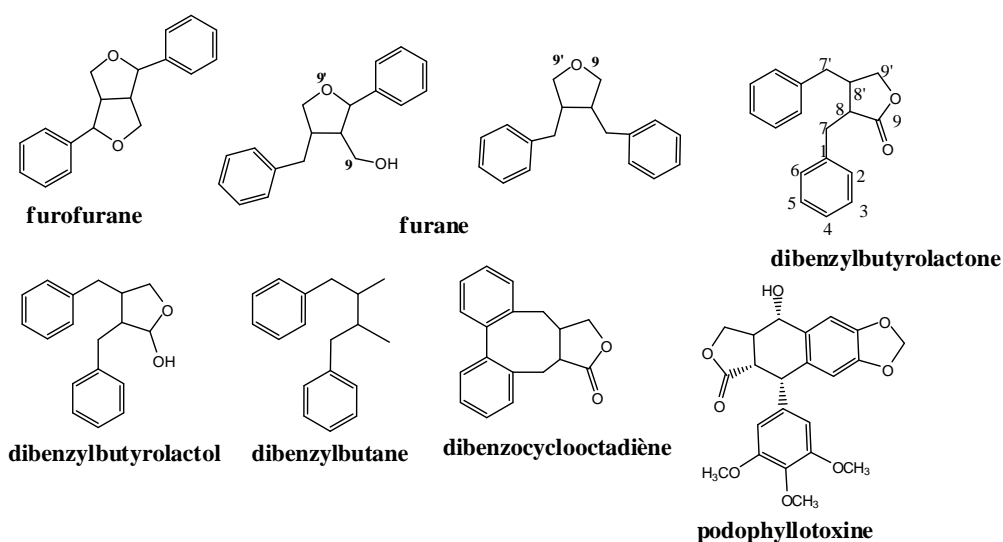


Figure II.11. Exemples de lignanes variés englobant différentes structures

II.4.2. Intérêt biologique des lignanes

Les lignanes exercent un certain nombre d'activités biologiques d'importance médicale, par exemple : propriétés antitumorales, antimétaboliques et antivirales. On pense que les lignanes jouent un rôle dans la défense de la plante contre les agents pathogènes et les parasites, car ils possèdent certaines propriétés antifongiques, antimicrobiennes, antivirales et même insecticides [27, 28].

II.5. Diabète sucré

Le diabète est une maladie chronique complexe et grave, source majeure de problèmes de santé dans le monde. Le nombre de personnes atteintes de diabète dans le monde a considérablement augmenté ces dernières années [29], pour que le diabète a augmenté d'environ 4,0 % en 1995 chez les adultes de 20 ans et plus et devrait augmenter de 5,4% en 2025 [30]. Une dégradation de l'équilibre oxydant / antioxydant entraîne un stress oxydatif dans de nombreuses conditions pathologiques, notamment le diabète, entraînant des lésions cellulaires. Des preuves croissantes dans les études expérimentales et cliniques suggèrent qu'il existe un lien étroit entre l'hyperglycémie, le stress oxydatif et les complications du diabète. L'augmentation du stress oxydatif chez les diabétiques contribue probablement à la pathogenèse de la néphropathie diabétique et à son évolution vers l'insuffisance rénale au stade terminal [31].

Actuellement, les remèdes à base de plantes suscitent un intérêt croissant en raison des effets secondaires associés aux agents thérapeutiques (hypoglycémisants oraux et insuline) pour le traitement du diabète sucré [30]. Dans certaines régions du monde, avant l'avènement des injections d'insuline et d'autres préparations pharmaceutiques, les guérisseurs s'appuyaient énormément sur les plantes et les plantes médicinales pour traiter le diabète [29].

II.5.1. Définition et diagnostic du diabète sucré

Le diabète sucré est un groupe de maladies métaboliques caractérisées par une hyperglycémie chronique résultant d'un défaut de la sécrétion de l'insuline ou de l'action de l'insuline ou de ces deux anomalies associées. L'hyperglycémie chronique est associée à terme avec des complications organiques spécifiques touchant particulièrement les yeux, les reins, les nerfs, le cœur et les vaisseaux [32].

Le diabète sucré est une combinaison de troubles hétérogènes présentant fréquemment des épisodes d'hyperglycémie et une intolérance au glucose, résultant d'un manque d'insuline, d'un défaut d'action de l'insuline, ou des deux. De telles complications résultent de perturbations dans les systèmes de régulation du stockage et de la mobilisation des énergies métaboliques, notamment du catabolisme et de l'anabolisme des glucides, des lipides et des protéines provenant d'une sécrétion d'insuline défectueuse, d'une action de l'insuline ou des deux [33].

II.5.2. Classification du diabète

Un certain nombre de types de diabète ont été identifiés, mais la plupart des communes sont des diabètes de type 1 et de type 2 et des diabètes gestationnels :

II.5.2.1. Diabète insulino-dépendant (DID) Diabète de type 1

Le diabète de type 1, connu auparavant sous le nom de diabète insulino-dépendant, est généralement observé dans le groupe d'âge le plus jeune, mais peut également survenir chez les personnes âgées. Cette définition de "insulino-dépendant" n'est plus valable car les patients diabétiques de type 2 à un stade ultérieur de la maladie peuvent également devenir dépendants de l'insuline. Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune qui signifie que les systèmes immunitaires des patients diabétiques reconnaissent mal les cellules β , situées dans les îlots de Langerhans, comme des corps étrangers et les détruisent progressivement à l'aide de cellules T tueuses de CD4 et CD8 et de macrophages. La destruction de ces systèmes producteurs d'insuline réduit naturellement ou arrête de manière significative la production d'insuline. Par conséquent, les patients diabétiques de type 1 commencent dès le début à devenir dépendants de l'insuline à administrer pour contrôler le diabète [34].

II.5.2.2. Diabète non insulino-dépendant (DNID) Diabète de type 2

Le diabète de type 2 est dû à la fois à une résistance à l'insuline et à une insuffisance relative d'insuline. La résistance à l'insuline accompagne l'obésité, un mode de vie sédentaire et l'âge avancé. Les facteurs pathogéniques des diabètes de type 1 et 2 se chevauchent chez de nombreux patients, l'obésité prévalant maintenant chez les enfants et les adultes. Le diabète gestationnel est spécifique à la grossesse et annonce le futur diabète de type 2. La cause du défaut de sécrétion d'insuline est probablement multifactorielle mais est généralement considérée comme métabolique et non auto-immune [35].

II.5.2.3. Autres types de diabète

Autres types spécifiques de diabète dus à d'autres causes, par exemple anomalies génétiques de la fonction des cellules β , anomalies génétiques de l'action de l'insuline, maladies du pancréas exocrine (telles que la fibrose kystique) et maladies induites par des médicaments ou des produits chimiques (comme dans traitement du VIH / SIDA ou après une transplantation d'organe). Diabète sucré gestationnel (diabète diagnostiqué pendant la grossesse qui n'est pas clairement déclaré)[36].

II.5.3. Enzyme d'amylase

Les amylases sont des enzymes hydrolases importantes largement utilisées depuis des décennies. Ces enzymes clivent de manière aléatoire les liaisons glycosidiques internes dans les molécules d'amidon pour les hydrolyser et donner des dextrans et des oligosaccharides [37]. L'amylase joue un rôle central dans le métabolisme des glucides des microorganismes, des plantes et des animaux[38].

II.5.3.1. Types des enzymes d'amylase

II.5.3.1.1. α -amylase

L' α -amylase (E.C.3.2.1.1) est une enzyme hydrolase qui catalyse l'hydrolyse des liaisons internes α -1, 4-glycosidiques dans l'amidon pour donner des produits comme le glucose et le maltose. C'est une métallo-enzyme de calcium, c'est-à-dire qu'elle dépend de la présence d'un co-facteur de métal pour son activité [37]. Les amylases peuvent être divisées en deux catégories, les endo-amylases et les exo-amylases. Les endo-hydrolases agissent à l'intérieur de la molécule substrat, alors que les exo-hydrolases agissent sur les extrémités non réductrices (Figure II.12) [39]. L'activité optimale de l' α -amylase s'est avérée être dans la gamme de pH de 4,5 à 7[40].

II.5.3.1.2. β -amylase

Les β -amylases (EC 3.2.1.2) sont des exo-enzymes qui coupent l'avant-dernière liaison α -1, 4) de l'extrémité non réductrice des chaînes polymères et libèrent le maltose disaccharide. La β -amylase, agissant seule, peut dégrader complètement l'amylose en maltose. Le pH optimal de l'enzyme varie de 4,0 à 5,5[41].

II.5.3.1.3. γ -amylase

La γ -amylase (EC 3.2.1.3) clive les liaisons α -1, 6) glycosidiques, en plus de cliver les dernières liaisons α -1, 4) glycosidiques à l'extrémité non réductrice de l'amylose et de l'amylopectine, contrairement aux autres formes d'amylase, donnant glucose. La γ -amylase est la plus efficace dans les environnements acides et a un pH optimal de 3 [37].

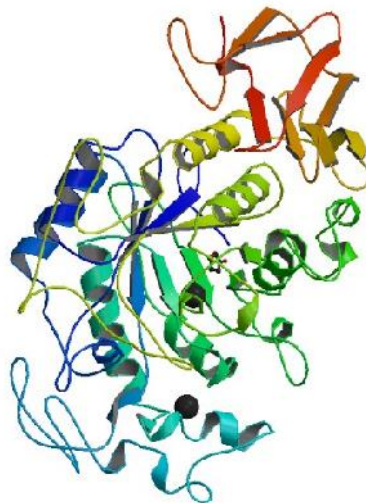


Figure II.12 : Structure de l' α -amylase humain [42]

II.5.3.2. Détermination de l'activité enzymatique

L'activité enzymatique est déterminée en mesurant les sucres réducteurs libérés à la suite de l'action de l' α -Amylase sur l'amidon. Une autre méthode consiste à mesurer l'étendue de l'hydrolyse en lisant l'absorbance du complexe amidon-iodé (Tableau II.2) [37].

Tableau II.2 : Différentes méthodes pour évaluer les activités enzymatiques de l' α -amylase

Méthode	Miller [43]	Nelson et Somogyi [44]	Détermination de l'activité à l'aide d'iode [37]	
			méthode de dextrinisation	Méthode de la pharmacopée indienne
Réactif	Acide 3,5-dinitrosalicylique	* Réactif de cuivre de Nelson * Réactif d'arséno-molybdate de Nelson	Iode (KI)	Iode (KI)
Durée d'incubation	1 ^{ère} incubation 10 min 2 ^{ème} incubation 5 min	1 ^{ère} incubation 10 min 2 ^{ème} incubation 40 min	10 min	60 min
Température d'incubation	1 ^{ère} incubation 50 °C 2 ^{ème} incubation 100 °C	1 ^{ère} incubation 50 °C 2 ^{ème} incubation 100 °C	92°C	40°C
Couleur du complexe	Rouge	Bleue	Bleue	Bleue
Absorbance	540 nm	610 nm	600 nm	600 nm

II.5.3.2.1. Mode d'action de l' α -amylase

La première étape implique l'attaque d'un nucléophile enzymatique au centre anomérique du sucre, ainsi qu'une catalyse acide générale pour faciliter la perte du groupe partant, conduisant à la formation d'un intermédiaire d'enzyme -D-glycosyle. Cet intermédiaire peut ensuite subir une hydrolyse dans une deuxième étape, avec une catalyse générale à base pour faciliter l'attaque de l'eau, entraînant le clivage de la liaison glycosidique avec rétention nette de configuration anomérique. Le site actif de ces enzymes contient un trio d'acides carboxyliques conservés. Probablement, un résidu fait fonctionner le nucléophile

catalytique, l'autre en tant qu'acide / base et le troisième permet éventuellement une stabilisation supplémentaire de la charge positive en développement ou module le comportement d'ionisation des autres résidus catalytiques [45].

II.5.3.2.2. Cinétique enzymatique de l' α -amylase

Les études cinétiques fournissent à l'investigateur des informations sur le mécanisme, le mode de régulation et les paramètres cinétiques qui sont essentiels pour comprendre la spécificité enzymatique et la fonction physiologique. Les enzymes sont des catalyseurs biologiques et, comme tous les catalyseurs, leurs propriétés sont étudiées en mesurant leur vitesse de réaction ou leur cinétique. Il a été reconnu à la fin du XIX^{ème} siècle que les enzymes et leurs substrats doivent se réunir pour former un "complexe" avant qu'une réaction ne puisse se produire [46].

II.5.3.2.3. Les différents types cinétiques de l'inhibiteur enzymatique

Bien qu'il existe de nombreux types d'inhibition observés avec les enzymes, il existe trois types les plus utilisés.

a. Inhibiteurs compétitifs

L'inhibition compétitive, dans laquelle une molécule inhibitrice, I, se combine uniquement avec l'enzyme libre, E, mais ne peut pas se combiner avec l'enzyme à laquelle le substrat est attaché, (ES). Un tel inhibiteur compétitif a souvent une structure chimique similaire au substrat, mais il n'est pas influencé par l'enzyme [47].

b. Inhibiteurs non compétitifs

Dans l'inhibition non compétitive, l'inhibiteur se lie à un autre site que le site actif. La liaison de l'inhibiteur à l'enzyme envoie un signal au site actif, vraisemblablement via un changement de conformation, qui provoque une diminution de l'activité enzymatique. Parce que l'inhibiteur se lie à un site qui est topologiquement distinct du site actif, la liaison peut être considérée comme étant de nature allostérique [46, 48].

c. Inhibiteurs incompétitifs

En inhibition incompétitive, l'inhibiteur se lie directement au complexe enzyme – substrat mais pas à l'enzyme libre. Il y a donc création d'un complexe (ESI) qui empêche l'activité enzymatique [46].

Les différents types cinétiques de l'inhibiteur enzymatique représenté dans les équations (1, 2 et 3) L'évolution de la cinétique enzymatique selon la représentation de Lineweaver-burk sont représentés dans la figure II.13.

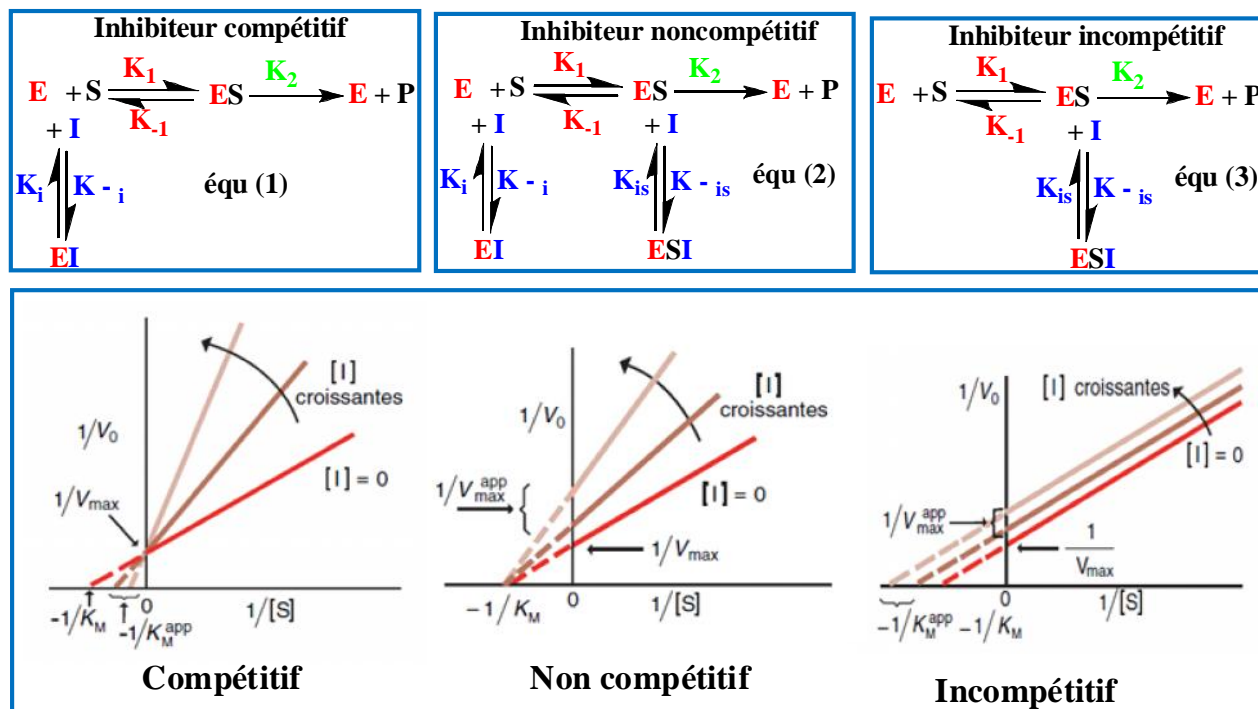


Figure II.13 : Représentation de Lineweaver-Burk (types d'inhibition) [49]

II.6. Antioxydants et les radicaux libres

II.6.1. Définition du radical libre

Le radical libre peut être défini comme une espèce chimique, un atome ou une molécule qui a un ou plusieurs électrons non appariés en orbitale de valence et est capable d'exister indépendamment. Comme les radicaux libres contiennent un nombre impair d'électrons, ce qui le rend instable, de courte durée et très réactif; par conséquent, il peut réagir rapidement avec d'autres composés, essayant de capturer l'électron nécessaire pour gagner en stabilité.

Généralement, les radicaux libres attaquent la molécule stable la plus proche, "volant" son électron. Lorsque la molécule attaquée perd son électron, elle devient elle-même un radical libre, amorçant une cascade de réactions en chaîne entraînant la perturbation d'une cellule vivante [50, 51].

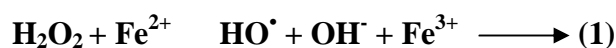
II.6.2. Production des radicaux libres

La principale voie de production des radicaux libres est la rupture homolytique d'une liaison covalente en deux entités possédant chacune un électron, les autres étant l'élimination ou l'addition d'un électron, les radicaux sont souvent instables.

Les méthodes utilisées pour produire des radicaux libres sont :

II.6.2.1. Méthodes physiques : Thermolyse, photolyse, radiolyse et sono-chimie.

II.6.2.2. Méthodes chimiques : L'oxydoréduction : l'exemple le plus important est la réaction de Fenton. En 1876, H. J. H. Fenton décrivit l'oxydation de l'acide tartrique par addition de fer (II) [52]. La génération chimique de $\cdot\text{OH}$ se produit classiquement par la réaction classique de Fenton (1) à travers un mélange de H_2O_2 et d'un sel de fer ferreux soluble, le soi-disant "réactif de Fenton" [53]



Réaction de Fenton

II.6.2.3. Méthodes électrochimiques :

La production du radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$) s'effectue par une réaction appelée Electro-Fenton. Elle consiste à réduire électro-chimiquement via des électrodes de mercure ou de graphite le fer ferrique en fer ferreux et l'oxygène en peroxyde d'hydrogène. Ce système permet de produire les deux espèces nécessaires à la réaction de Fenton [54].

II.7. Principaux types de radicaux libres

II.7.1. Espèces réactives de l'oxygène (ERO) :

Les espèces d'oxygène réactif (ERO) sont définies comme des radicaux d'oxygène chimiquement réactifs ainsi que des dérivés non radicalaires de l'oxygène.

II.7.1.1. Radical anion superoxyde

Le radical anion superoxyde est le ERO répandu le plus important formé par le processus enzymatique, la réaction d'auto-oxydation et par des réactions de transfert d'électrons non enzymatiques dans lesquelles un électron est transféré à l'oxygène moléculaire. Il est principalement produit dans les mitochondries et sa réactivité avec les biomolécules est faible. Les enzymes qui peuvent produire du superoxyde comprennent la xanthine oxydase, lipooxygénase, la cyclooxygénase et l'oxydase NADPH dépendante. Il peut exister sous deux formes telles que $\text{O}_2^{\cdot-}$ ou radical hydroperoxyde ($\text{HO}_2\cdot$) à faible pH [55].

II.7.1.2. Radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$)

Contrairement au radical superoxyde, qui n'est pas très réactif par rapport à la plupart des autres radicaux libres, le radical hydroxyle est une espèce oxydante extrêmement puissante. $\cdot\text{OH}$ est la forme neutre de l'ion d'hydroxyde [56]. Il est de courte durée ($\sim 10^{-9}$ s) mais réagit très rapidement avec presque chaque type de molécule trouvé en cellules vivantes : sucres, acides aminés, phospholipides, ADN, et acides organiques [57]

II.7.1.3. Peroxyde d'hydrogène H_2O_2

Le peroxyde d'hydrogène se forme in vivo dans une réaction de dismutation catalysée par l'enzyme superoxyde dismutase (SOD). Ce n'est pas un radical libre mais il peut endommager la cellule à une concentration relativement faible (10 μM), mais à des niveaux plus élevés, les enzymes productrices d'énergie cellulaire telles que la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase sont inactivées. Il peut facilement pénétrer les membranes biologiques. H_2O_2 n'a aucun effet direct sur l'ADN mais peut endommager l'ADN en produisant un radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$) en présence d'ions de métaux de transition. Les principales enzymes anti-oxydantes qui peuvent éliminer le H_2O_2 comprennent la catalase, la glutathion peroxydase et la peroxyrédoxine [55].

II.7.2. Espèces réactives d'azotés (ERN) :

L'oxyde azotique $\text{NO}\cdot$ est principalement produit par un système enzymatique, la $\text{NO}\cdot$ synthase, qui transforme l'arginine en citrulline en présence de la NADPH [54].

Le NO_2 est également une espèce de radicaux libres qui, contrairement au $\text{NO}\cdot$, est un oxydant assez puissant, E° pour le couple $\text{NO}_2 / \text{NO}_2^- = 1040$ mV. Il existe une variété de voies de réaction potentielles par lesquelles le NO_2 peut provoquer l'oxydation des molécules biologiques: abstraction des atomes d'hydrogène, ajout de liaisons insaturées et réactions de transfert d'électrons. $\text{NO}\cdot$ est un radical réactif abondant qui agit comme une molécule de signalisation biologique oxydative importante dans les processus physiologiques, y compris la neurotransmission, la régulation de la pression artérielle, les mécanismes de défense, la relaxation des muscles lisses ou la régulation immunitaire [57].

II.8. Systèmes de défense antioxydants

Lorsque des ERO commencent à s'accumuler dans la cellule, ils peuvent être neutralisés par des molécules de défense antioxydantes présentes dans la cellule comme le glutathion, les vitamines E et C, la bilirubine, l'acide lipoiïque, et des enzymes comme la catalase, la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase, les peroxyrédoxines [58].

II.8.1. Systèmes enzymatiques

Ces systèmes sont composés d'enzymes telles que le superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la peroxydase, capables d'éliminer les radicaux libres et d'autres espèces réactives [59].

a. Les superoxydes dismutases

Les superoxydes dismutases (SOD) sont un groupe d'enzymes clés fonctionnant comme la première ligne de défense antioxydant grâce à la capacité de convertir les radicaux superoxydes hautement réactifs (dismutation) en peroxyde d'hydrogène et oxygène moléculaire. Ils ont identifié quatre isozymes de superoxyde dismutase : (1) SOD1 est une métalloprotéine liant les ions cuivre et zinc qui sont localisés dans le cytosol de la cellule. (2) SOD2, localisée dans les mitochondries et associée aux ions manganèse ou fer. (3) SOD3, la localisation est extracellulaire et est également associée au cuivre et au zinc, bien qu'elle ait un poids moléculaire élevé et une affinité élevée pour l'héparine et les sulfates d'héparine. (4) SOD4, associée au nickel et présente dans diverses bactéries aérobies trouvées dans le sol de la classe des Streptomyces [60].

b. La catalase

La catalase (CAT) est une enzyme intracellulaire présente dans la plupart des cellules aérobies. Dans les tissus animaux, il est principalement localisé dans les peroxysomes et dans le cytoplasme. À l'exception des cellules myocardiques de rat, la CAT n'est pas détectée dans les mitochondries. Ce grand groupe d'oxydoréductases n'est pas homogène. Les catalogues sont divisés en trois groupes, en fonction de leurs propriétés physiques et biochimiques. Un groupe avec une activité peroxydante accrue est appelé catalase-peroxydases. Un autre sous-groupe avec du manganèse dans le centre actif sont les catalases non hémiques. Le troisième groupe sont les "vraies" catalases, c'est-à-dire les catalases monofonctionnelles de l'hème [61].

c. Glutathion peroxydase (GPx)

Cette enzyme peut exister sous deux formes: dépendante du sélénium et indépendante du sélénium, chacune avec différentes sous-unités et différents sites actifs, GPx catalyse la réduction de H_2O_2 ou de peroxyde organique (ROOH) en eau ou en alcool [60].

Le glutathion (GSH) est un réducteur intracellulaire et joue un rôle majeur dans la catalyse, le métabolisme et le transport. Il protège les cellules contre les radicaux libres, les peroxydes et autres composés toxiques [62].

II.8.2. Systèmes non enzymatiques**II.8.2.1. Antioxydants endogènes**

Les composés antioxydants protègent contre les dommages oxydatifs en utilisant quatre mécanismes principaux : (i) séquestration des ions de métaux de transition dans des complexes, (ii) piégeage ou extinction des radicaux libres et autres ERO et ERN, (iii) rupture des réactions en chaîne initiées par les radicaux libres et (iv) réparer les molécules endommagées. Parmi les molécules endogènes protégeant les cellules des dommages causés par les ERO et les ERN, on peut citer les suivantes: glutathion, acide alpha-lipoïque (acide thioctique), ferritine, acide urique, bilirubine, métallothionéine, L-carnitine et mélatonine [63]

II.8.2.2. Antioxydants exogènes

Ce sont ceux que nous consommons tous les jours dans notre régime alimentaire, notamment ceux contenus dans les fruits et légumes.

Les antioxydants exogènes jouent un rôle clé dans l'équilibre délicat entre les oxydants et les antioxydants dans les organismes vivants. Les organismes vivants ont un système de défense antioxydant (enzymatique et non enzymatique) comme la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GSH-Px), la GSH, la catalase (CAT) et la bilirubine ainsi que des antioxydants exogènes tels que la vitamine C et la vitamine E et caroténoïdes qui sont principalement basés sur l'alimentation. Comme dans le cas de la régénération de la vitamine E par GSH ou dans le cas de l'inhibition de la peroxydation lipidique par la vitamine C, les antioxydants endogènes et exogènes agissent en synergie pour fournir un équilibre redox, tandis que la vitamine E efface les radicaux lipidiques peroxyde (LOO). En tant que donneur d'hydrogène afin d'arrêter la réaction en chaîne des radicaux libres, l'acide ascorbique réduit rapidement le radical α -tocophérol et Les lipoprotéines de faible densité (LDL) en α -tocophérol dans les membranes et arrête probablement les dommages induits par les radicaux α -tocophérol [64].

II.9. Relation entre le diabète sucré et le stress oxydatif

Les antioxydants jouent un rôle important dans le métabolisme humain. Les réactions biochimiques qui ont lieu dans notre organisme produisent des radicaux libres initiant des réactions d'oxydation en chaîne qui ont une action néfaste sur les cellules de notre corps, en les abîmant et en accélérant le processus de vieillissement. Normalement, le corps humain maintient l'équilibre entre les antioxydants et les radicaux libres en produisant simultanément les deux types de substances dans le processus métabolique. Le déséquilibre entre ces deux types de composés conduit à un phénomène appelé stress oxydatif. L'initiation des

phénomènes de réactions d'oxydations en chaîne dans l'organisme humain peut conduire à des pathologies comme l'athérosclérose, le cancer, l'infarctus, les allergies, les rhumatismes et d'autres [65, 66]. On pense que l'hyperglycémie augmente la production de radicaux libres et d'espèces réactives de l'oxygène, des altérations des mécanismes de défense endogènes piégeant les radicaux libres peuvent conduire à un piégeage inefficace d'espèces réactives de l'oxygène, entraînant des lésions du tissu oxydant et des complications diabétiques telles que la néphropathie, la neuropathie, la rétinopathie et les troubles de la mémoire [67, 68].

On a également constaté que l'hyperglycémie favorise la peroxydation lipidique des lipoprotéines de basse densité par une voie super-dépendante entraînant la génération de radicaux libres. Une autre source importante de radicaux libres dans le diabète est l'interaction du glucose avec des protéines conduisant à la formation d'un produit Amadori, puis de produits de pointe de glycation [67].

Références

1. Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., and Gontier, E., *Production of plant secondary metabolites: a historical perspective*. Plant science, 2001. **161**(5): p. 839-851.
2. Satyajit, D. and Lutfun, N., *Chemistry for Pharmacy Students General, Organic and Natural Product Chemistry*. 2007, England: John Wiley & Sons Ltd.
3. Rudrapal, M. and Chetia, D., *Plant flavonoids as potential source of future antimalarial leads*. Systematic Reviews in Pharmacy, 2017. **8**(1): p. 13.
4. Cutillo, F., DellaGreca, M., Gionti, M., Previtiera, L., and Zarrelli, A., *Phenols and lignans from Chenopodium album*. Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques, 2006. **17**(5): p. 344-349.
5. Dewick, P.M., *The biosynthesis of shikimate metabolites*. Natural product reports, 1995. **12**(2): p. 101-133.
6. Vermerris, W. and Nicholson, R., *Phenolic compound biochemistry*. 2007: Springer Science & Business Media.
7. Santos-Sánchez, N.F., Salas-Coronado, R., Hernández-Carlos, B., and Villanueva-Cañongo, C., *Shikimic Acid Pathway in Biosynthesis of Phenolic Compounds*. Plant Physiological Aspects of Phenolic Compounds, 2019: IntechOpen.
8. Evans, W.C., *Trease and evans' pharmacognosy*. 16th ed, 2009: Elsevier Health Sciences.
9. Martin, S. and Andriantsitohaina, R., *Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium*. Annales de Cardiologie et d'Angéiologie, 2002. **51**(6): p. 304-315.
10. Naczki, M. and Shahidi, F., *Extraction and analysis of phenolics in food*. Journal of chromatography A, 2004. **1054**(1-2): p. 95-111.
11. Egbuna, C., Kumar, S., Ifemeje, J.C., and Kurhekar, J.V., *Phytochemistry: Pharmacognosy, Nanomedicine, and Contemporary Issues*. 1st ed. Vol. 2, 2018, New York: CRC Press.
12. Crozier, A., Clifford, M.N., and Ashihara, H., *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet*. 2006: Blackwell Publishing Ltd.

13. Jean, B., *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales* 4^{ème} ed, 2009, paris: Lavoisier.
14. Santos, E.L., Maia, B., Ferriani, A.P., and Teixeira, S.D., *Flavonoids: classification, biosynthesis and chemical ecology*. Vol. 6, 2017, croatia: InTech.
15. Koes, R.E., Quattrocchio, F., and Mol, J.N., *The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution*. BioEssays, 1994. **16**(2): p. 123-132.
16. Harborne, J.B., Mabry, T.J., and Mabry, H., *The flavonoids*. 1st ed, 1975: Chapman & Hall.
17. Mattila, P., Astola, J., and Kumpulainen, J., *Determination of flavonoids in plant material by HPLC with diode-array and electro-array detections*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000. **48**(12): p. 5834-5841.
18. Mabry, T.J., Markham, K.R., and Thomas, M.B., *The systematic identification of flavonoids*. 1st ed, 1970, New York: Springer-Verlag.
19. Andersen, O.M. and Markham, K.R., *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. 2006: CRC press.
20. Mabry, T.J., Kagan, J., and Rosler, H., *Nuclear Magnetic Resonance Analysis of Flavonoids*. 1964: University of Texas.
21. Harborne, J.B., *The flavonoids: advances in research since 1980*. 1988: Chapman and Hall.
22. Croft, K.D., *The Chemistry and Biological Effects of Flavonoids and Phenolic Acids a*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1998. **854**(1): p. 435-442.
23. Salminen, J.-P., Ossipov, V., Loponen, J., Haukioja, E., and Pihlaja, K., *Characterisation of hydrolysable tannins from leaves of Betula pubescens by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1999. **864**(2): p. 283-291.
24. Moosophin, K., Wetthaisong, T., Seeratchakot, L.-o., and Kokluecha, W., *Tannin extraction from mangosteen peel for protein precipitation in wine*. Asia-Pacific Journal of Science and Technology, 2010. **15**(5): p. 377-385.
25. Dai, J. and Mumper, R.J., *Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties*. Molecules, 2010. **15**(10): p. 7313-7352.
26. Ho, K., Huang, J., Tsai, C., Lin, T., Hsu, Y., and Lin, C., *Antioxidant Activity of Tannin Components from Vaccinium vitis-idaea L*. Journal of pharmacy and pharmacology, 1999. **51**(9): p. 1075-1078.
27. Yoder, S.C., Lancaster, S.M., Hullar, M.A., and Lampe, J.W., *Gut microbial metabolism of plant lignans: influence on human health*, in *Diet-Microbe Interactions in the Gut*, 2014, Elsevier. p. 103-117.
28. Umezawa, T., *Diversity in lignan biosynthesis*. Phytochemistry Reviews, 2003. **2**(3): p. 371-390.
29. Kambouche, N., Merah, B., Derdour, A., Bellahouel, S., Bouayed, J., Dicko, A., Younos, C., and Soulimani, R., *Hypoglycemic and antihyperglycemic effects of Anabasis articulata (Forssk) Moq (Chenopodiaceae), an Algerian medicinal plant*. African Journal of Biotechnology, 2009. **8**(20).
30. Kim, S.H., Hyun, S.H., and Choung, S.Y., *Anti-diabetic effect of cinnamon extract on blood glucose in db/db mice*. Journal of ethnopharmacology, 2006. **104**(1-2): p. 119-123.
31. Elmarakby, A.A. and Sullivan, J.C., *Relationship between oxidative stress and inflammatory cytokines in diabetic nephropathy*. Cardiovascular therapeutics, 2012. **30**(1): p. 49-59.
32. L'ADA, E., *Diagnostic et classification du diabète sucré les nouveaux critères*. Diabetes & Metabolism (Paris), 1999. **25**: p. 72-83.

33. Piero, M., Nzaro, G., and Njagi, J., *Diabetes mellitus-a devastating metabolic disorder*. Asian journal of biomedical and pharmaceutical sciences, 2015. **5**(40): p. 1.
34. Ahmad, S.I., *Diabetes: A Comprehensive Treatise for Patients and Care Givers*. 2013: Crc Press.
35. Genuth, S.M., Palmer, J.P., and Nathan, D.M., *Classification and diagnosis of diabetes*. Diabetes in America. Bethesda, MD: National Institutes of Health, 2017.
36. Diabetes, A.A., *Standards of medical care in diabetes--2014*. Diabetes care, 2014. **37**: p. S14.
37. Sundarram, A. and Murthy, T.P.K., *-amylase production and applications: a review*. Journal of Applied & Environmental Microbiology, 2014. **2**(4): p. 166-175.
38. Whitaker, J.R., Wong, D.W., and Voragen, A.G., *Properties of Extremophilic Enzymes and Their Importance in Food Science and Technology* Magnu's M. Kristija' nsson and Bjarni A' sgeirsson, in *Handbook of Food Enzymology*, 2002, CRC Press. p. 92-115.
39. Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., and Chauhan, B., *Microbial -amylases: a biotechnological perspective*. Process biochemistry, 2003. **38**(11): p. 1599-1616.
40. Yadav, J.K. and Prakash, V., *Stabilization of -amylase, the key enzyme in carbohydrates properties alterations, at low pH*. International journal of food properties, 2011. **14**(6): p. 1182-1196.
41. Caballero, B., Trugo, L.C., and Finglas, P.M., *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. 2003: Academic.
42. Ramasubbu, N., Paloth, V., Luo, Y., Brayer, G.D., and Levine, M.J., *Structure of human salivary -amylase at 1.6 Å resolution: implications for its role in the oral cavity*. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 1996. **52**(3): p. 435-446.
43. Gusakov, A.V., Kondratyeva, E.G., and Sinitsyn, A.P., *Comparison of two methods for assaying reducing sugars in the determination of carbohydrase activities*. International journal of analytical chemistry, 2011. **2011**.
44. Kobayashi, T., Kanai, H., Hayashi, T., Akiba, T., Akaboshi, R., and Horikoshi, K., *Haloalkaliphilic maltotriose-forming alpha-amylase from the archaebacterium Natronococcus sp. strain Ah-36*. Journal of bacteriology, 1992. **174**(11): p. 3439-3444.
45. McCarter, J.D. and Withers, S.G., *Unequivocal identification of Asp-214 as the catalytic nucleophile of Saccharomyces cerevisiae-glucosidase using 5-fluoro glycosyl fluorides*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(12): p. 6889-6894.
46. Fromm, H.J. and Hargrove, M., *Essentials of biochemistry*. 2012: Springer Science & Business Media.
47. Switzer, R.L. and Garrity, L.F., *Experimental biochemistry*. 1999: Macmillan.
48. Berg, J.M., Tymoczko, J.L., and Stryer, L., *Biochemistry*. 5th ed, 2012: WH freeman.
49. Weinman, S., *Toute la biochimie*. 2004, Paris: Dunod.
50. Milcent, R., *Chimie organique: stéréochimie, entités réactives et réactions*. 2007, France: EDP sciences.
51. Vishal-Tandon, M., Gupta, B., and Tandon, R., *Free radicals/reactive oxygen species*. JK Practitioner, 2005. **12**(3): p. 143-148.
52. Wardman, P. and Candeias, L.P., *Fenton chemistry: an introduction*. Radiation research, 1996. **145**(5): p. 523-531.
53. Oturan, N. and Oturan, M.A., *Electro-Fenton process: Background, new developments, and applications*, in *Electrochemical Water and Wastewater Treatment*, 2018, Elsevier. p. 193-221.

54. Bouguerne, B., *Conception et synthèse de dérivés phénoliques hautement fonctionnalisés et études de leurs propriétés biologiques vis-à-vis des maladies cardiovasculaires (athérosclérose)*. Doctorat, 2012: Université de Toulouse.
55. Phaniendra, A., Jestadi, D.B., and Periyasamy, L., *Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases*. Indian Journal of Clinical Biochemistry, 2015. **30**(1): p. 11-26.
56. McCord, J.M. Iron, free radicals, and oxidative injury. in *Seminars in hematology*. 1998.
57. Gutowski, M. and Kowalczyk, S., *A study of free radical chemistry: their role and pathophysiological significance*. Acta Biochimica Polonica, 2013. **60**(1).
58. Barouki, R., *Stress oxydant et vieillissement*. médecine/sciences, 2006. **22**(3): p. 266-272.
59. Rahmani, Z., *Etude de la relation structure-activité antioxydante et antihémolyse des érythrocytes humaines par quelques dithiolethiones et composés phénoliques*. Doctorat, 2015: Université d'Ouargla.
60. Aguilar, T.A.F., Navarro, B.C.H., and Pérez, J.A.M., *Endogenous antioxidants: a review of their role in oxidative stress*, in *A Master Regulator of Oxidative Stress-The Transcription Factor Nrf2*, 2016, IntechOpen.
61. Nohl, H., Kozlov, A.V., Gille, L., and Staniek, K., *Endogenous oxidant-generating systems*, in *Reactions, Processes*, 2005, Springer. p. 1-18.
62. Alam, M.N., Bristi, N.J., and Rafiquzzaman, M., *Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity*. Saudi Pharmaceutical Journal, 2013. **21**(2): p. 143-152.
63. Rizzo, A.M., Berselli, P., Zava, S., Montorfano, G., Negroni, M., Corsetto, P., and Berra, B., *Endogenous antioxidants and radical scavengers*, in *Bio-Farms for Nutraceuticals*, 2010, Springer. p. 52-67.
64. Koçyi it, A. and Selek, ., *Exogenous antioxidants are double-edged swords*. Bezmialem science, 2016. **2**: p. 70-75.
65. Mazari, K., Bendimerad, N., and Bekhechi, C., *Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Algerian Juniperus phoenicea L. and Cupressus sempervirens L.* Journal of Medicinal Plants Research, 2010. **4**(10): p. 959-964.
66. Teke, G.N., Elisée, K.N., and Roger, K.J., *Chemical composition, antimicrobial properties and toxicity evaluation of the essential oil of Cupressus lusitanica Mill. leaves from Cameroon*. BMC complementary and alternative medicine, 2013. **13**(1): p. 130.
67. Khabir, M., Khatoon, F., and Ansari, W., *Flavonoids of Cupressus sempervirens and Cupressus cashmeriana*. Journal of natural products, 1987. **50**(3): p. 511-512.
68. Togawa, A., Panzani, R.C., Garza, M.A., Kishikawa, R., Goldblum, R.M., and Midoro-Horiuti, T., *Identification of Italian cypress (Cupressus sempervirens) pollen allergen Cup s 3 using homology and cross-reactivity*. Annals of Allergy, Asthma & Immunology, 2006. **97**(3): p. 336-342.

Partie

Expérimentale



CHAPITRE III :
Analyse
phytochimique et
L'évaluation des

dichlorométhane, de l'acétate d'éthyle et du n-butanol selon le protocole d'extraction illustré à la figure III.2.

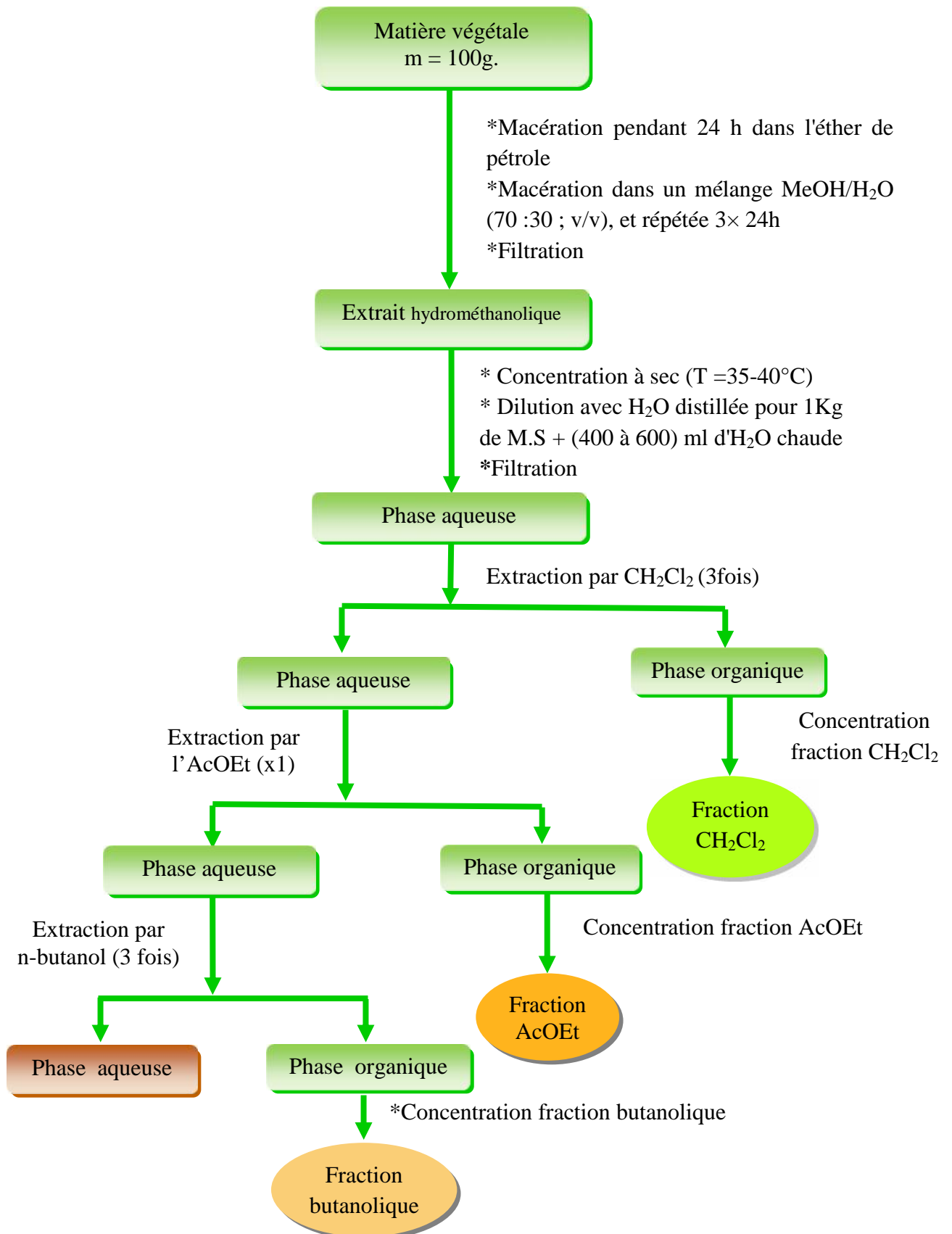


Figure III.2 : Protocole d'extraction de différentes fractions

Les extraits et la fraction aqueuse résiduelle ont été concentrés sous pression réduite puis pesés et dissouts avec un minimum de méthanol ou d'eau, puis conservés à 4 °C.

Les différents appareils utilisés pour nos analyses sont: Spectrophotomètre UV/VIS SpectroScan 80D/80DV, Évaporateurs rotatifs (ISOLAB GmbH, Rotavapor BUCHI), Potentiostat/Galvanostat PGZ 301.

Tableau III.1 : Produits utilisés

Produits	Entreprise de fabrication	Pureté
Réactif de Folin – Ciocalteu	Prolabo	99%
Acide gallique	Biochem Chemopharma	99%
Quercétine	Sigma-Aldrich	99%
Catéchine	Sigma-Aldrich	99%
Acide ascorbique	MERCK	99.7%
2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	Sigma-Aldrich	99%
Vanilline	Sigma-Aldrich	-
Hydroxyanisole butylé (BHA)	Sigma-Aldrich	98%
α -Amylase d'Aspergillus oryzae	Sigma-Aldrich	-
Molybdate d'ammonium ($H_{24}Mo_7N_6O_{24}$)	Biochem chemopharma	99%
Carbonate de sodium Na_2CO_3	Biochem chemopharma	99.8%
Chlorure d'aluminium ($AlCl_3, 6H_2O$)	Biochem chemopharma	97% 98%
Dihydrogénophosphate de sodium (NaH_2PO_4)	Biochem chemopharma.	99%
N,N-diméthylformamide (DMF) C_3H_7NO	Analar Normapur	99.9 %
Tetra-n-butylammonium tétrafluorobonate, [$CH_3(CH_2)_3$] $_4NBF_4$)	Alfa Aesar	99%
Acide sulfurique (H_2SO_4)	Biochem chemopharma.	99%
Pyrogallol	Sigma-Aldrich	99%

b. Procédé d'extraction des tanins

Le protocole d'extraction des tanins a été réalisé selon la méthode décrite par Shu-Yan Zhang [1]. Après la délipidation de la matière végétale sèche, on a réalisée l'extraction par un mélange d'acétone /eau (on évite le méthanol qui provoque la méthanolyse des depsides galliques) (70/30 : v/v) pendant 3 x 24 h à la température ambiante, après filtration et

élimination de l'acétone, la solution aqueuse est extraite par le dichlorométhane. On continue l'extraction par l'acétate d'éthyle qui permet d'extraire les proanthocyanidols dimères et la plupart des tanins galliques (Figure III.3).

III.2. Détection chimique à propos de certains métabolites secondaires

Le test préliminaire de screening phytochimique est nécessaire pour identifier les principales familles de composés existant dans certaines parties (feuilles, fruits, graines et branches) de la plante du *C. sempervirens* L. Des tests chimiques ont été effectués sur les extraits aqueuse et méthanolique pour identifier les constituants en utilisant des procédures standards décrites par (Soulama, S)[2], (Mace, M. E.)[3] (Biren N. Shah)[4] (S. Zeidan) [5] (Trease et Evans) [6].

*** Test des tanins et des phénols**

Test au chlorure ferrique : à 3 ml d'extrait, 3 ml de solution de chlorure ferrique à 2% p/v a été ajouté. La couleur bleue-noire indique la présence de tanins et de phénols.

*** Test des flavonoïdes**

Test Shinoda : on ajoute 0,5 g de magnésium à 2 ml d'extrait hydrométhanolique, puis on ajoute 5 gouttes d'acide chlorhydrique concentré avec prudence. L'apparition d'une couleur rouge foncée indique la présence de flavonoïdes.

*** Test pour les terpénoïdes et stéroïdes**

Test Salkowaski : à 2 ml d'extrait, on a ajouté 5 gouttes d'acide sulfurique concentré, secoué et laissé au repos. L'apparition d'une couleur bleue verdâtre indique la présence de triterpénoïdes.

Test Libermann burchard : à 2 ml de la solution à tester, 10 gouttes d'anhydride acétique concentré ont été ajoutées et bien mélangées. 5 ml d'acide sulfurique concentré ont été ajoutés sur les côtés du tube à essai. L'apparition d'une couleur bleue verdâtre indique la présence de terpénoïdes et stéroïdes.

*** Test d'alcaloïdes**

On ajoute 3 ml d'acide chlorhydrique dilué à 3 ml d'extraits, bien agités. Les tests suivants ont été réalisés avec le mélange.

Test de Mayer : à 3 ml de mélange, 1 ml de réactif de Mayer (iodure mercurique de potassium) a été ajouté. L'apparition d'un précipité blanc indique la présence d'alcaloïdes.

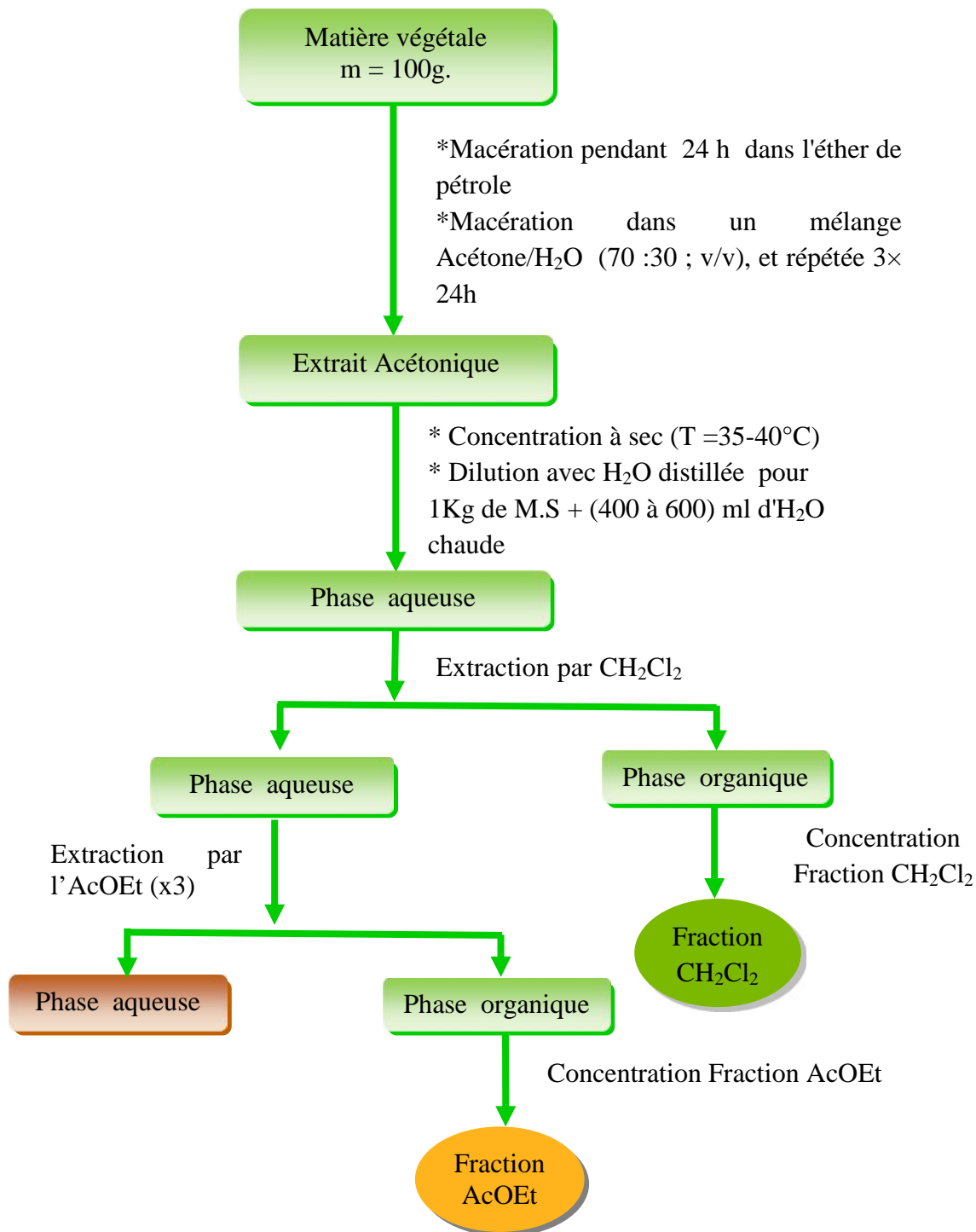


Figure III.3 : Protocole d'extraction des tanins

Test de Dragendorff : à 3 ml de mélange, 1 ml de réactif de Dragendorff (iodobismuthide de potassium) a été ajouté. L'apparition d'un précipité rouge brique indique la présence d'alcaloïdes.

*** Test pour les saponines**

Test de mousse : 2 ml d'extrait ont été vigoureusement agités avec 5 ml d'eau et observés pour une mousse persistante, ce qui indique la présence de saponines.

*** Test des coumarines**

L'extrait méthanoïque a été dilué de moitié avec de l'eau distillée et répartis dans 2 tubes à essai. Le premier a servi de témoin tandis que 0,5 ml de solution de NH_4OH titrée 10% a été ajoutée dans le deuxième tube. L'apparition d'une fluorescence bleue ou verte à la lampe UV à 365 nm indique la présence des coumarines.

*** Détection de résines**

10 ml d'extrait ont été ajoutés à 20 ml de HCl (4%). L'apparition de turbidité indique la présence des résines dans les extraits.

III.3. Dosage des composés phénoliques, flavonoidiques et tanniques

III.3.1. Dosage des phénols totaux

a. Principe

Le test Folin-Ciocalteu est la méthode la plus largement utilisée pour l'évaluation de la teneur en composés phénoliques totaux dans des extraits de plantes. Le réactif Folin-Ciocalteu consiste en un mélange oxydant d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique qui, une fois réduit, donne un chromophore bleu constitué d'un complexe phosphotungstique phosphomolybdène, où l'absorption maximale des chromophores dépend de la concentration des composés phénoliques. L'utilisation de la longueur d'onde de 760 nm, qui semblait être la mieux adaptée pour produire une absorption maximale du complexe phosphotungstique phosphomolybdène [7].

b. Procédure

La teneur totale en composés phénoliques a été déterminée avec le réactif Folin-Ciocalteu selon une méthode décrite par Singleton et Rossi [8]. 0,1 ml de l'échantillon a été

mélangé à 0,5 ml de réactif Folin – Ciocalteu dilué fraîchement préparé (1:10). Après 5 minutes, 2 ml de Na₂CO₃ (20%) ont été ajoutés, le mélange a été agité et a réagi pendant 30 minutes à température ambiante dans l'obscurité. L'absorbance a été lue à 760 nm. Un standard de calibration a été préparé en utilisant des solutions d'acide gallique de différentes concentrations de 0,03 jusqu'à 0,3 g/l. La quantité des polyphénols totaux est exprimée en équivalents milligramme d'acide gallique par gramme de la masse sèche de plante (mg EAG/g).

III.3.2. Dosage des flavonoïdes totaux

a. Principe

La méthode au chlorure d'aluminium a été largement utilisée pour l'estimation de la teneur totale en flavonoïdes. Cette méthode est basée sur la capacité des flavonoïdes à former un complexe stable avec des ions Al³⁺ dans une solution. La couleur du complexe dépend du rapport des ions Al³⁺ sur les molécules de flavonoïdes et du motif des groupements hydroxyles (OH) de ces dernières. Pour cette raison, les lectures spectrophotométriques utilisées dans cette méthode peuvent varier de 367 à 510 nm dans différentes procédures expérimentales [9].

b. Procédure

La concentration en flavonoïdes totaux a été estimée par la méthode colorimétrique au chlorure d'aluminium [10] avec une légère modification. 0,5 ml d'une solution d'éthanol AlCl₃ à 2% a été ajouté à 0,5 ml d'extrait. Le mélange réactionnel incube pendant 30 minutes à température ambiante, puis l'absorbance est lue à 430 nm. La quantité des flavonoïdes totaux est exprimée en équivalents milligramme quercitine par gramme de la masse sèche de plante (mg EQ / g).

III.3.3. Dosage des tanins totaux

a. Principe

Un certain nombre de méthodes colorimétriques qui varient dans le degré de discrimination contre les composés phénoliques non tanniques, autres que les tanins, également présents dans le matériel végétal, ont été utilisées pour estimer les tanins. Les Flavanols (tanins condensés, monomères, dimères, etc.), contrairement à la majorité des composés phénoliques naturels réagir avec la vanilline en milieu acide pour donner un produit coloré à un maximum d'absorbance à 500 nm [11].

Le dosage de la vanilline pour les pro-anthocyanidines est plus attirant et préféré en raison de sa sensibilité, sa spécificité et sa simplicité. Il est tout à fait spécifique à une gamme étroite de flavanols (monomères et polymères) et de dihydrochalcones qui ont une seule liaison en position 2,3 et des groupes hydroxy méta-orientés libres sur le cycle **B** [12].

b. Procédure

La concentration totale en extrait de *C. sempervirens* a été estimée en utilisant la méthode de la vanilline acidifiée [13]. 400 µL d'échantillon ont été ajoutés à 3 ml de solution de vanilline (4% dans l'éthanol) et à 1,5 ml d'acide chlorhydrique concentré. Après 15 minutes d'incubation, l'absorbance est lue à 500 nm. La quantité des tanins totaux est exprimée en équivalents milligramme de catéchine par gramme de la masse sèche de plante (mg EC/ g).

III.4. Evaluation de l'activité anti-oxydante

Pour la mesure du potentiel antioxydant on a utilisé les termes suivants: l'équivalence en Vitamine C (AEAC) et le pourcentage d'inhibition obtenu par spectroscopie UV-Visible ou par méthode électrochimique.

III.4.1. Application du test du Molybdate

a. Principe

Le test est basé sur la réduction du molybdène d'un nombre d'oxydation de (VI) à (V). Cette réduction se matérialise par la formation d'un complexe verdâtre (phosphate/ Mo (V)) à un pH acide. Le spectre UV / visible du complexe de phosphomolybdène avait un maximum caractéristique à 695 nm. On mesure la diminution de la coloration du complexe molybdène (VI) en présence d'antioxydant [14].

b. Protocole

Le test de Phosphomolybdate (PPM) a été réalisé selon la méthode décrite par Prieto et al. [15] qui consiste à introduire dans un tube 0,1 ml de différentes concentrations de l'extrait mélangé avec 1 ml de solution de réactif (H_2SO_4 (0,6 M), NaH_2PO_4 (28 mM) et molybdate d'ammonium (4 mM)). Les échantillons sont incubés à 95 °C pendant 90 minutes. Après avoir refroidi à température ambiante, l'absorbance de chacun est lue à 695 nm contre un blanc préparé de la même manière (sauf que l'extrait est remplacé par 0.1 ml d'eau).

Nous avons utilisé l'acide ascorbique comme antioxydant standard, dont la capacité antioxydant est exprimée selon un nouveau terme appelé AEAC (Ascorbic Acid Equivalent Antioxidant Capacity).

III.4.2. Évaluation de l'activité anti-radicalaire

a. Principe

Le test DPPH (diphenylpicrylhydrazyl) est une méthode largement utilisée dans l'analyse de l'activité anti-oxydante. En effet, le DPPH[•] se caractérise par sa capacité à produire des radicaux libres stables. Cette stabilité est due à la délocalisation des électrons libres au sein de la molécule de DPPH[•] de couleur violette réduit en un composé jaune en présence d'un composé antioxydant, qui peut fournir un atome d'hydrogène (H[•]) et il a une absorption maximale à 517 nm (Figure III.4) [16, 17].

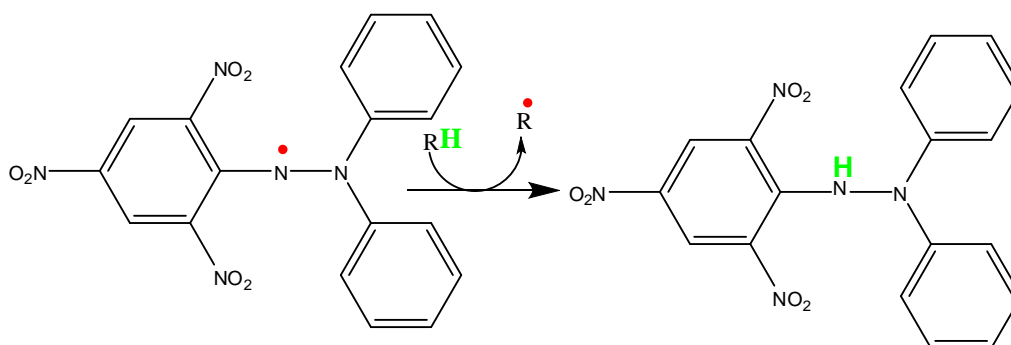


Figure III.4 : Réduction du radical libre DPPH[•]

b. Protocole

L'activité de piégeage des radicaux libres contre le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH[•]) a été évaluée en utilisant la méthode caractérisée par Kim et al.[18] avec de légères modifications, 1 ml de différentes concentrations de l'extrait a été ajouté à 1 ml d'une solution d'éthanol DPPH[•] 250 µM, à température ambiante et dans l'obscurité, le mélange est incubé pendant 30 min, l'absorbance des échantillons a été lue à 517 nm, le contrôle négatif (méthanol avec solution DPPH[•]), l'inhibition des radicaux libres DPPH[•] en pourcentage (I%) a été calculée de la manière suivante :

$$\text{Inhibition (I\%)} = \left[\frac{\text{Abs}_0 - \text{Abs}_1}{\text{Abs}_0} \right] \times 100$$

Où (Abs_0 ; Abs_1) sont l'absorbance à 30 min du contrôle négatif et de l'échantillon, respectivement. On établit la courbe $I\% = f(C)$, puis on calcule les valeurs de CI_{50} .

III.4.3. Évaluation de la capacité inhibitrice de l'anion superoxyde radicalaire

Les radicaux superoxydes sont générés par différentes méthodes comme la méthode électrochimique ou par voie chimique comme dans les systèmes PMS-NADH par oxydation du NADH ou par auto-oxydation au pyrogallol [19].

III.4.3.1. Méthode chimique

a. Principe

L'auto-oxydation du pyrogallol (ou benzène-1,2,3-triol) sera utilisée comme source d'anions ; cette manière dépend de l'inhibition de l'auto-oxydation des composés du catéchol tels que l'adrénaline, la 6-hydroxydopamine ou le pyrogallol. Leur forme anionique comme le phénolate en milieu alcalin est oxydée et donne de la quinone accompagnée d'une consommation d'oxygène. La réaction d'auto-oxydation peut être représentée comme un transfert de deux électrons des oxy-anions à l'oxygène moléculaire en deux étapes (Figure III.5) [20].

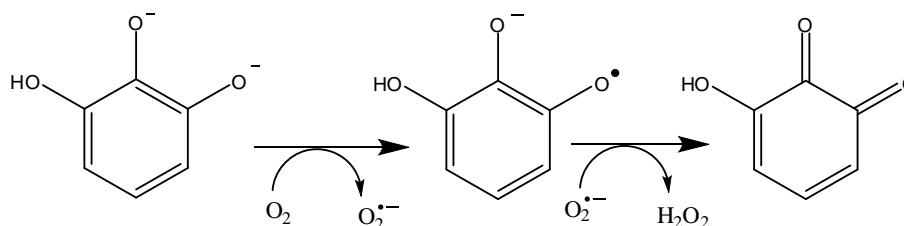


Figure III.5 : Auto-oxydation du pyrogallol

b. Protocole

L'activité d'élimination des anions superoxydes par les extraits de *C. sempervirens* a été évaluée par la méthode d'auto-oxydation du pyrogallol [21] ; 10 μ l de pyrogallol 45 mM mélangé avec 4,5 ml de solution saline tamponnée au phosphate PBS (pH 8,2) et 0,5 ml d'échantillon (1 μ g /ml) de l'extrait ou l'eau à 25 ° C. L'absorbance des échantillons a été lue à 320 nm toutes les 30 secondes pendant 5 min ; le pourcentage de réduction de l'auto-oxydation du pyrogallol est calculé par l'équation suivante :

$$\text{Inhibition (I\%)} = \left[\frac{\Delta A_0 - \Delta A}{\Delta A_0} \right] \times 100$$

Où

A_0 : La vitesse de l'auto-oxydation de pyrogallol en absence d'antioxydant

A: La vitesse de l'auto-oxydation de pyrogallol en présence d'antioxydant

III.4.3.2. Méthode électrochimique

La voltamétrie cyclique (VC) est considérée comme la technique la plus utilisée en électrochimie. C'est une méthode pour obtenir simplement et rapidement des informations sur les processus redox, la cinétique des réactions de transfert de charge ou la réversibilité du système électrochimique étudié. Cette méthode est également utilisée pour estimer le pouvoir antioxydant des produits végétaux [22, 23]. La voltamétrie cyclique fonctionne en balayant progressivement la tension d'une électrode de travail tout en enregistrant le courant anodique généré lorsque les substances sont oxydées à la surface de l'électrode de travail au cours du temps en effectuant des allers retours entre deux valeurs limitées [24], on obtient alors une voltamogramme cyclique, qui représente la réponse en courant, en fonction du potentiel appliqué (Figure III.6).

Le voltamogramme caractérisé par le pic cathodique I_{pc} et le pic anodique I_{pa} , le potentiel d'oxydation anodique (E_a) et le potentiel de réduction cathodique (E_c). La méthode de voltamétrie cyclique est réalisée selon Le Bourvellec et al [25]. La technique de voltamétrie cyclique est utilisée pour générer le radical anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ dans la couche de diffusion de l'électrode par la réduction de l'oxygène en un électron dans le DMF.

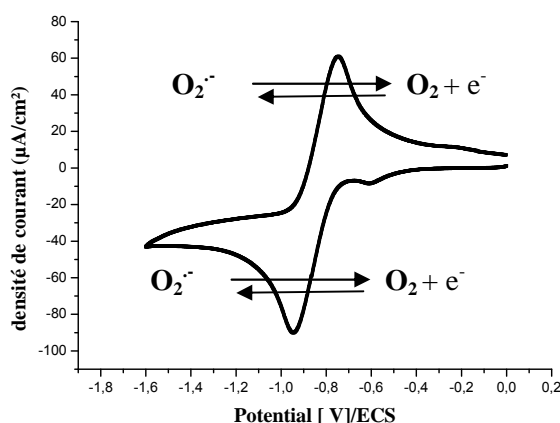


Figure III.6 : voltamogramme d' O_2

La réduction d' O_2 est une réaction réversible, et on sait que le radical $O_2^{\bullet-}$ est stable en milieu aprotique comme le DMF. Par conséquent, c'est un moyen pratique de générer de

$O_2^{\bullet-}$ sans systèmes enzymatiques et d'étudier sa réaction avec une molécule ou un extrait à condition que le substrat ne soit pas électro-actif dans le domaine de réactivité d'oxygène [25, 26].

Premièrement, nous appliquons cette méthode pour étudier le comportement électrochimique du radical $O_2^{\bullet-}$ puis nous étudions le comportement électrochimique de ce dernier en présence des extraits végétaux

Les voltamogrammes sont obtenus à l'aide d'un appareil Potentionstat-Galvanostat PGZ301 voltalab 40 piloté par un logiciel de travail voltamaster 4, connecté à une cellule électrochimique de 25 ml qui contient les électrodes :

1-Électrode de travail: une électrode de carbone vitreux de diamètre de 3 mm attaché à une tige. L'électrode a été polie mécaniquement par du papier abrasif 4000 de carbure de silicium. La qualité du polissage a été vérifiée avant chaque expérience en voltamétrie cyclique. Une désinfection à l'acétone a été effectuée avant chaque enregistrement.

2-Électrode auxiliaire : une électrode de Platine.

3-Électrode de référence : électrode au calomel saturé (ECS). Il a été conservé dans une solution de KCl saturée.

a. Le milieu utilisé

On utilise le DMF (99,9%) comme un milieu aprotique pour les raisons suivantes :

1- sa constante diélectrique élevée qui lui permet de dissoudre plusieurs sels de support.

2- la stabilité du radical $O_2^{\bullet-}$.

L'électrolyte support Tétra n-butylammonium-tétrafluoroborate ($nTBuNBF_4$) avec de concentration $C = 0,1$ M.

La désoxygénation des solutions est assurée par barbotage d'azote.

b. Comportement électrochimique du système ($O_2/O_2^{\bullet-}$)

Conditions expérimentales :

Electrode en carbone vitreux ; 25 ml de DMF / $nTBuNBF_4$ 0,1M ; 25 °C ; vitesse de balayage $0,1V.s^{-1}$, domaine d'électro-activité (0, -1,6 V). La solution est saturée par le barbotage dioxygène pendant 10 minutes.

c. Comportement électrochimique du système ($O_2/O_2^{\bullet-}$) en présence des antioxydants

On ajoute des volumes d'extraits à 25 ml de solution (DMF + électrolyte support), à chaque fois, puis les voltamogramme sont enregistrés après chaque ajout. Les extraits utilisés dans cette partie électrochimique sont : les fractions butanol et acétate d'éthyle pour les fruits et les feuilles en plus l'acide ascorbique et l'acide gallique ont été utilisés comme des standards.

Le pourcentage d'inhibition de radical anion superoxyde est calculé selon le l'équation suivante :

$$I\% = \frac{i_{pa}^0 - i_{pa}^s}{i_{pa}^0} \times 100 \rightarrow (1)$$

Où :

I% : Pourcentage d'inhibition

i_{pa}^0 : Densité de courant anodique en l'absence d'échantillon

i_{pa}^s : Densité de courant anodique en présence d'échantillon.

On établit la courbe $I\% = f(C)$, puis on calcule les valeurs de CI_{50} .

L'indice CI_{50} est défini par la concentration d'antioxydant capable d'inhiber 50% du $O_2^{\bullet-}$.

III.5. Évaluation d'activité enzymatique des extraits de *C. sempervirens*

L'activité enzymatique a été étudiée via l'inhibition de l'enzyme alpha amylase par différents extraits de *C. sempervirens*.

III.5.1. Dosage de l'inhibition de l' -amylase :**a. Principe de dosage**

La dégradation d'amidon par l' -amylase conduit au maltose ainsi qu'à des fragments des poids moléculaires petit et grand. Le maltose peut être déterminé par une méthode spectroscopique (UV-Vis). Le principe de cette méthode est basé sur la quantification des sucres réducteurs (aldéhyde libre et cétone) (équivalent maltose) résultant de l'hydrolyse de l'amidon par l' -amylase. Le pouvoir réducteur de ces sucres provient de leur groupe carbonyle, qui peut être oxydé en groupe carboxyle par des agents oxydants doux, tandis que l'acide 3,5-dinitrosalicylique de couleur jaune-orange (DNSA) est réduit en acide 3-amino-5-nitrosalicylique de couleur orange-rouge qu'il a une absorption maximale à 540 nm ; La

réaction est réalisée en milieu alcalin et chaud (Figure III.7). L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration de sucres [27].

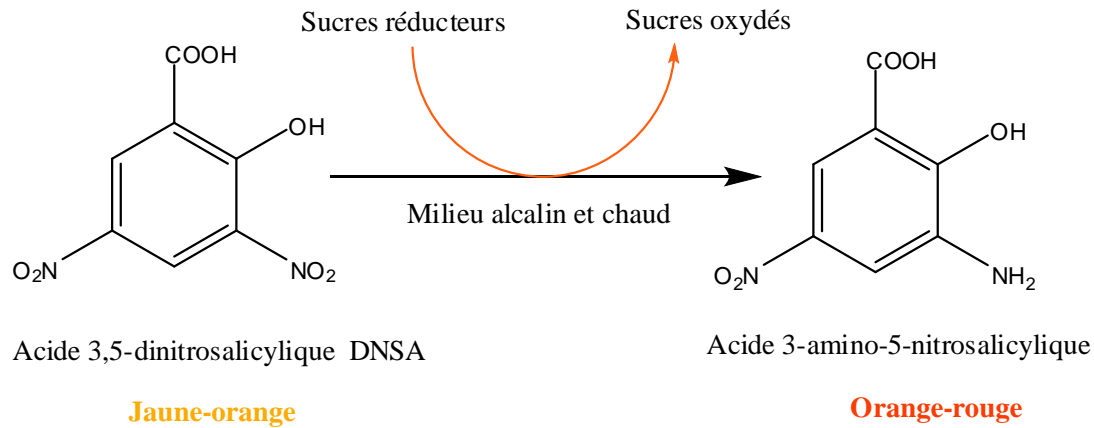


Figure III.7 : Oxydation des sucres réducteurs par DNSA

b. Préparation de réactif DNSA (acide 3,5-dinitrosalicylique)

Dans une fiole jaugée de 100 ml, on dissout 1 g de DNSA dans 40 ml d'eau distillée ; on ajoute à cette solution 30g de tartrate double de sodium et de potassium tétrahydraté ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) sous agitation puis l'addition de 20 ml d'une solution de NaOH 2N après cela, la couleur de réactif devient limpide avec une couleur orange, le volume obtenu est ajusté à 100 ml avec de l'eau distillée.

c. Procédure

L'activité de l' α -amylase est réalisée selon le protocole Ademiluyi avec une légère modification [28]. 0,5 ml d'amidon 1% (p / v) préparé dans un tampon phosphate de sodium 0,02 M (pH 6,9) ont été mélangés avec 0,5 ml de 1,3 UI / ml d' α -amylase d'*Aspergillus oryzae* (Enz-no : 3.2.1.1) préparé dans la même solution tampon (pH 6,9) et 50 μ l d'extrait de plante ; puis le mélange est incubé à 37 °C pendant 30 minutes. Après l'ajout de 1 ml de réactif de (DNSA) aux échantillons sont incubés pendant 10 min à 100 °C. Après refroidissement, il est dilué avec 10 ml d'eau distillée (Figure III.8). Un blanc a été défini sans extrait de plante et un autre sans enzyme, le remplacer par des quantités similaires de solution tampon (pH 6.9); ensuite l'absorbance est lue à 540 nm contre un blanc.

L'inhibition de l' α -amylase a été exprimée en pourcentage d'inhibition et est calculé par le l'équation suivante :

$$(I\%) = \left[\frac{Abs_c - Abs_s}{Abs_c} \right] \times 100$$

Où:

I% est le pourcentage d'inhibition d' α -amylase

Abs_C, Abs_S sont l'absorbance à 540 nm en absence et en présence d'inhibiteur, respectivement.

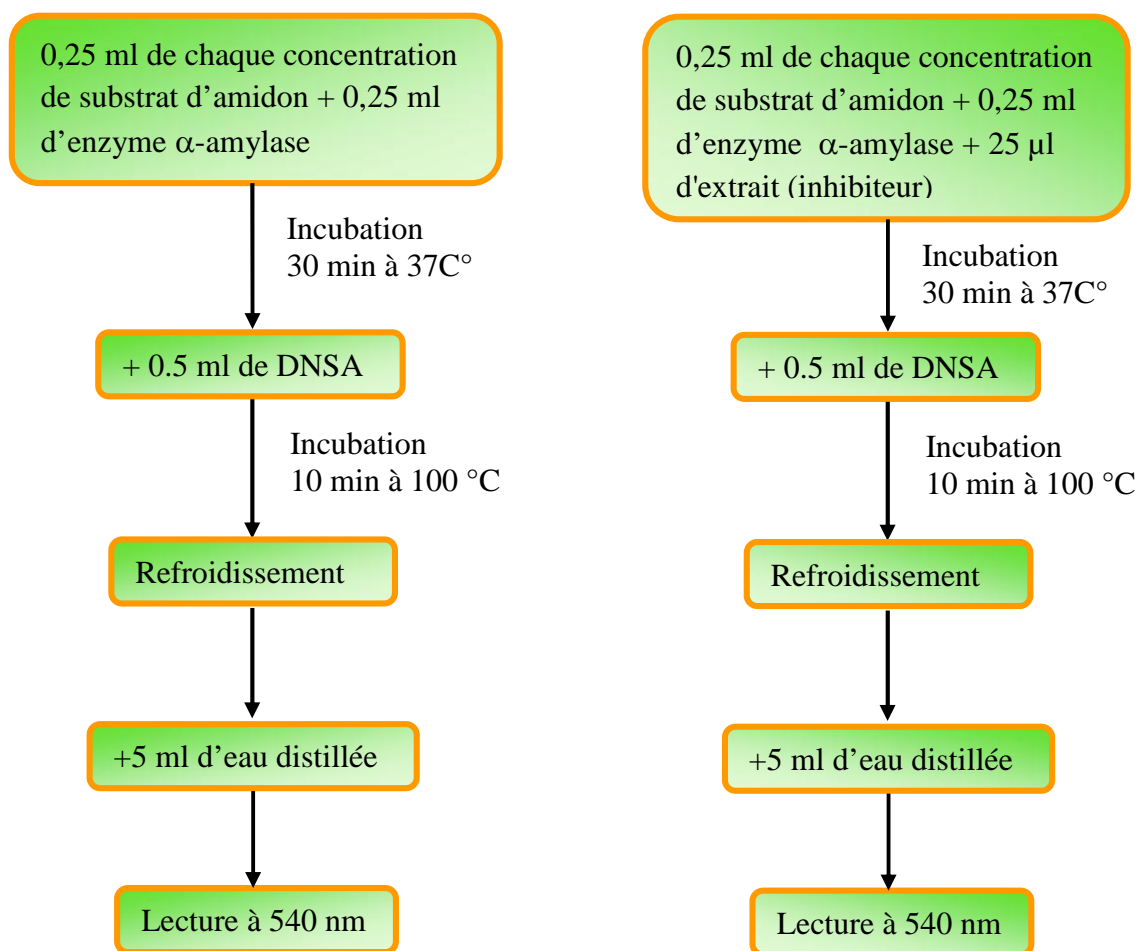


Figure III.9 : Protocole de dosage de l'activité enzymatique

III.5.2. L'étude cinétique de réaction d'inhibition d' -amylase et détermination des types d'inhibition

La détermination du type d'inhibition et l'étude cinétique de cette réaction sont effectuées selon le protocole décrit par Moein avec une légère modification [29] ; une série de dilutions (2,5 à 20 mg / ml) d'une solution d'amidon en tant que substrat a été examinée en présence et sans inhibiteur (extrait 0,5 mg / ml) avec les mêmes étapes précédentes (Figure III.8). Le sucre réducteur libéré de l'amidon a été estimé en utilisant la courbe standard de maltose et converti en vitesses de réaction. Le type d'inhibition des extraits sur l' α -amylase a été analysé par établir le courbe Lineweaver-Burk et en utilisant la cinétique de Michaelis-Menten [30].

Analyses statistiques :

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide des logiciels Origin Pro 8 et voltmaster 4. Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm écart-type (ET)

III.6. Résultats et discussion :**III.6.1. Détection des métabolites secondaires**

Le tableau III.2 illustre les métabolites secondaires les plus détectés dans différentes parties de la plante.

Tableau III.2 : Différents métabolites secondaires détectés dans la plante de *C. sempervirens*

Métabolites secondaires	Feuilles	Graines	Branches	Fruits
Tanins, phénols	+	+	+	+
Saponines	-	-	-	-
Flavonoïdes	+	-	+	+
Terpenoïdes	+	-	-	-
Alcaloïdes	-	-	+	-
Coumarines	+	+	+	+
Résines	+	-	+	+

Le rendement des différentes fractions des feuilles et fruits est illustré dans le tableau III.3.

Tableau III.3 : Rendement des différentes fractions des fruits et feuilles

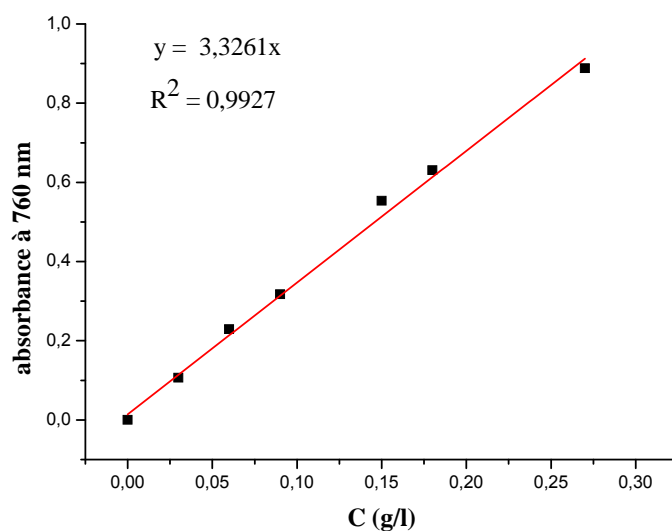
Extrait	Organe	
	Fruits %	Feuilles %
Brut	22,3	30,52
fraction dichlorométhane	0,057	0,0988
fraction acétate d'éthyle	0,213	0,1429
fraction n-butanol	3,73	4,06
fraction aqueuse	13,24	10,43
fraction dichlorométhane (extraction des tanins)	-	0,0752
fraction acétate d'éthyle (extraction des tanins)	-	0,9448

III.6.2. Résultat de dosage

III.6.2.1. Dosage des phénols totaux (CPT)

La figure III.9 montre la courbe d'étalonnage d'acide gallique obtenue pour le dosage des phénols totaux.

La linéarité de la courbe d'étalonnage a été testée à des gammes de concentrations (0,03 - 0,3 mg / ml) d'acide gallique en tant que solutions étalons de contenu phénolique total, l'équation obtenue à partir du graphique d'étalonnage linéaire des concentrations étudiées : $Y = 3,32X$ ($R^2 = 0,992$).


Figure III.9 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique

Le tableau III.4 montre les résultats obtenus par des différentes fractions. La teneur phénolique la plus élevée a été enregistrée dans l'extrait brut et la fraction aqueuse pour les

feuilles ($34,34 \pm 2,03$ et $23,81 \pm 0,865$ mg EAG / g MS respectivement), tandis que les valeurs plus élevées de CPT chez les fruits ont été enregistrées aux fractions butanoliques et aqueuses (Tableau III.4). La valeur de CPT de la fraction de dichlorométhane des fruits est $0,064$ mg EAG / g MS, tandis que à la même fraction pour les feuilles été presque la moitié de cette valeur (Tableau III.4).

Tableau III.4 : Quantité des phénols totaux dans les extraits en mg EAG/ g MS

Extrait / Fraction	Organe	
	Fruits	Feuilles
Brut	$21,54 \pm 0,478$	$34,34 \pm 2,039$
fraction dichlorométhane	$0,064 \pm 0,001$	$0,039 \pm 0,001$
fraction acétate d'éthyle	$2,420 \pm 0,025$	$3,096 \pm 0,084$
fraction n-butanol	$9,463 \pm 0,054$	$14,55 \pm 0,149$
fraction aqueuse	$8,035 \pm 0,282$	$23,81 \pm 0,865$

On a comparé la teneur des composés phénoliques chez les fractions des organes étudiés, on a trouvé que la teneur en composés phénoliques augmente avec la polarité du solvant; le contenu en phénols totaux pour les feuilles est classé selon l'ordre décroissant suivant : fraction aqueuse > fraction butanolique > fraction acétate d'éthyle > fraction dichlorométhane, mais chez les fruits l'ordre comme le suivant : fraction butanolique > fraction aqueuse > fraction acétate d'éthyle > fraction dichlorométhane. Autre part, on a comparé la teneur des composés phénoliques chez les extraits bruts pour les deux organes et nous avons trouvé que les feuilles enregistrent la quantité la plus élevée (Figure III.10).

Le dosage des polyphénols totaux par le test Folin-Ciocalteu est un dosage non sélectif vis-à-vis des polyphénols, car il est impliqué que toutes les molécules réductrices, comme les sucres réducteurs ou la vitamine C [31]

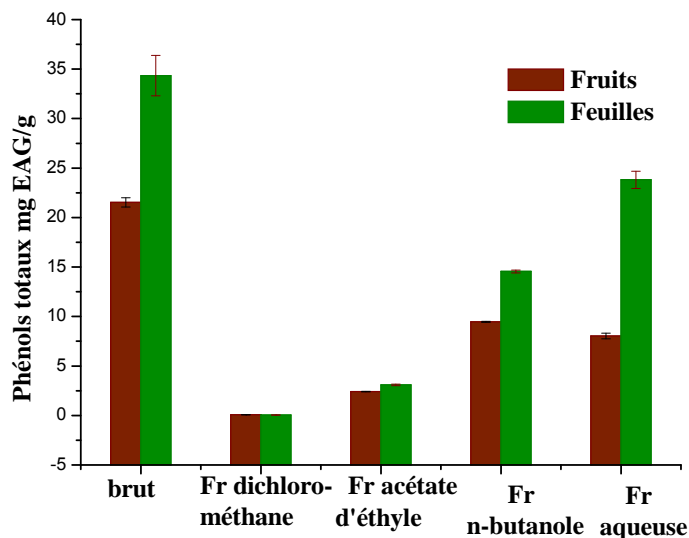


Figure III.10 : Teneur phénolique des feuilles et des fruits

III.6.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux (CFT)

La linéarité de la droite de régression de la courbe d'étalonnage a été évaluée en préparant des solutions standards de quercétine dans l'éthanol à des plages de concentration de 0,003 à 0,03 mg/ml pour la teneur totale en flavonoïdes. L'équation obtenue à partir du graphique d'étalonnage linéaire des concentrations étudiées $Y = 36,37X$ ($R^2 = 0,999$) où y représente la valeur de l'absorbance et X est la valeur de la concentration de Quercétine (Figure III.11).

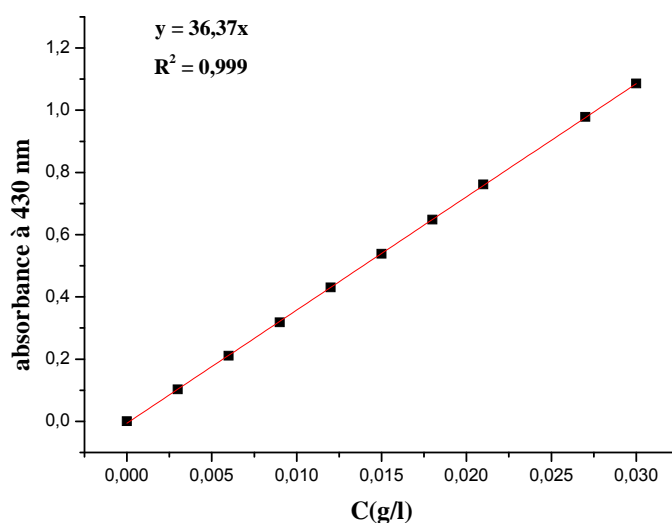


Figure III.11 : Courbe d'étalonnage de quercétine

La fraction aqueuse chez les deux parties feuilles et fruits enregistrent la même teneur de flavonoïde avec une valeur de 0,096 mg EQ / g MS. Dans la partie des fruits, les fractions butanoliques et acétate d'éthyle ont enregistré des valeurs plus élevée par rapport aux autres fractions. En général, nous observons une teneur plus élevées des flavonoïdes aux feuilles par rapport aux fruits.

Tableau III.5 : Quantité des flavonoïdes totaux dans les extraits en mg EQ / g MS

Extrait	Organe	
	Fruits	Feuilles
Brut	0,24 ± 0,0013	0,546 ± 0,040
fraction dichlorométhane	0,001 ± 0,000	0,004 ± 0,002
fraction acétate d'éthyle	0,016 ± 0,000	0,056 ± 0,000
fraction n-butanol	0,090 ± 0,001	0,177 ± 0,002
fraction aqueuse	0,096 ± 0,003	0,097 ± 0,000

D'après la figure III.12, nous remarquons que les feuilles sont plus riches en flavonoïdes par rapport aux fruits. Ces résultats montrent que les fractions de butanol feuilles et celles de brut feuilles sont les extraits les plus riches en flavonoïdes, où la teneur la plus élevée est constatée dans la fraction brut des feuilles, elle est de l'ordre de 0,546 ± 0,040 mg EQ /g, suivi par la fraction butanolique avec une teneur de 0,177 ± 0,002 mg EQ /g.

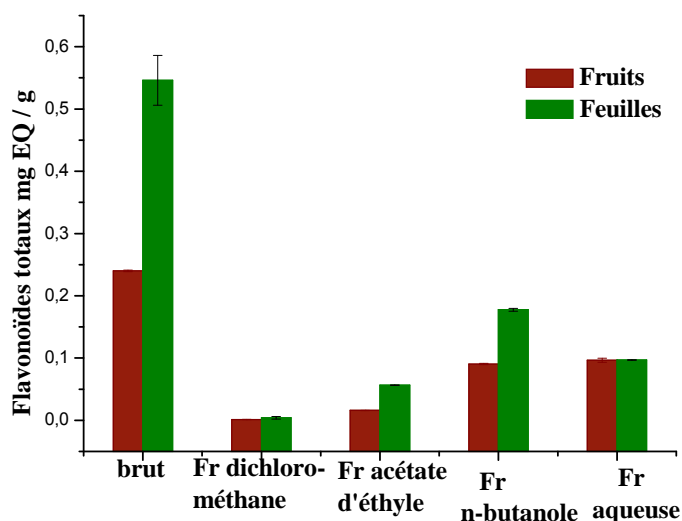


Figure III.12 : Teneur des flavonoïdes pour les feuilles et les fruits

Notons aussi, que la teneur en flavonoïdes d'extrait dichlorométhane fruits et dichlorométhane feuilles sont les plus pauvres en flavonoïdes, dont les teneurs sont de l'ordre de $0,001 \pm 0,000$ mg EQ /g et $0,004 \pm 0,002$ mg EQ /g respectivement.

III.6.2.3. Dosage des tanins totaux (CTT)

La linéarité de la droite de régression de la courbe d'étalonnage a été évaluée en préparant des solutions standards de catéchine à des gammes de concentration de 0,01 à 0,1 mg/ml pour la teneur totale en tanins. L'équation obtenue à partir de la courbe d'étalonnage linéaire des concentrations étudiées $Y = 4,378 X$ ($R^2 = 0,997$) (Figure III.13).

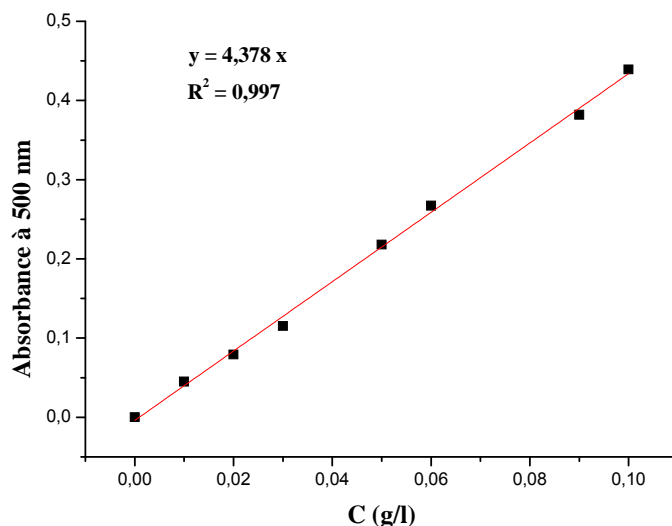


Figure III.13 : Courbe d'étalonnage de catéchine

La concentration des tanins totaux a été exprimée en équivalent catéchine par gramme de masse sèche (mg EC/g MS). D'après les résultats, on peut constater que toutes les fractions des échantillons étudiées, contiennent des tanins mais avec des quantités différentes.

Le contenu le plus élevé en tanins a été enregistré dans l'extrait brut des feuilles et la fraction d'eau ($11,02 \pm 0,455$ et $14,67 \pm 0,33$ mg EC/g MS respectivement). La teneur en tanins dans les différentes fractions des fruits varient entre $14,67 \pm 0,33$ et $0,003 \pm 0,000$ mg EC/g MS. La teneur en tanins dans la fraction butanolique des fruits enregistre une valeur supérieure à celle qui a été enregistrée dans les feuilles, tandis que, le contenu de tanins dans la fraction acétate d'éthyle presque était le même dans les organes (voir le tableau III.6).

Tableau III. 6 : Quantité des tanins totaux dans les extraits en mg EC/g MS

Extrait	Organe	
	Fruits	Feuilles
Brut	14, 67 ± 0,33	11,02 ± 0,455
fraction dichlorométhane	0,003 ± 0,000	0,002 ± 0,000
fraction acétate d'éthyle	0,463 ± 0,002	0,498 ± 0,253
fraction n-butanol	2,727 ± 0,102	2,410 ± 0,027
fraction aqueuse	3,274 ± 0,035	3,470 ± 0,089

Les teneurs en tanins (figure III.14), font apparaitre que la fraction aqueuse des feuilles et la fraction brut des feuilles sont les plus riches. La teneur la plus élevée est constatée dans la fraction brut des feuilles 11,02 ± 0,455 mg CE/g. Les teneurs en tanins dans les autres fractions fruits et feuilles sont presque les mêmes.

Des travaux publiés par Ahmed A. et al, [32] ont montré que la teneur des phénols dans les feuilles de *C. sempervirens*.(Fraction d'acétate d'éthyle non hydrolysée (pH 8 et 4)) est de l'ordre 10,31 et 112,41 mg EAG/ g MS respectivement et dans d'autres travaux la teneur des phénols totaux pour les feuilles fraîches était de 4,35 mg EAG/ g d'extrait) [33], les travaux de Kapil K. et al, [34] ont montré que la teneur totale en phénols et en flavonoïdes totaux dans différents extraits de *Cupressus Torulosa D.DON* est de l'ordre (0,227-0,467 mg EAG/ g MS) pour les phénol et (0,051-0,248 mg EQ/mg) pour les flavonoïdes. Mais ces teneurs apparaissent inférieures par rapport à nos résultats (pour les phénols 34,34 ± 2,03 et 23,81 ± 0,865 mg EAG / g MS dans l'extrait brut et la phase aqueuse respectivement et pour les flavonoïdes de 0,004 ± 0,002 mg EQ /g et 0,54 ± 0,04 mg EQ /g dans fraction dichlorométhane et l'extrait brut respectivement)

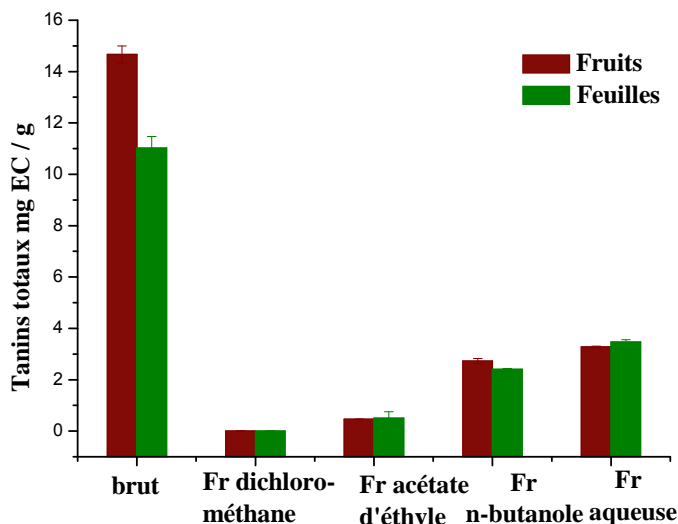


Figure III.14 : Teneur des tanins pour les feuilles et les fruits

L'analyse a révélé l'existence de flavonoïdes, terpénoïdes, résines, tanins, stéroïdes et phénols dans l'extrait brut et les fractions de *C. sempervirens*. Ces métabolites secondaires sont responsables de diverses activités biologiques. Par conséquent, une grande attention a été accordée aux produits naturels dérivés principalement des plantes [35-37].

III.6.3. Evaluation de l'activité antioxydante

III.6.3.1. Application du test du Molybdate

L'activité antioxydante est mesurée selon un terme appelé AEAC (Ascorbic Acid Equivalent Antioxidant Capacity, capacité antioxydante en équivalent d'acide ascorbique).

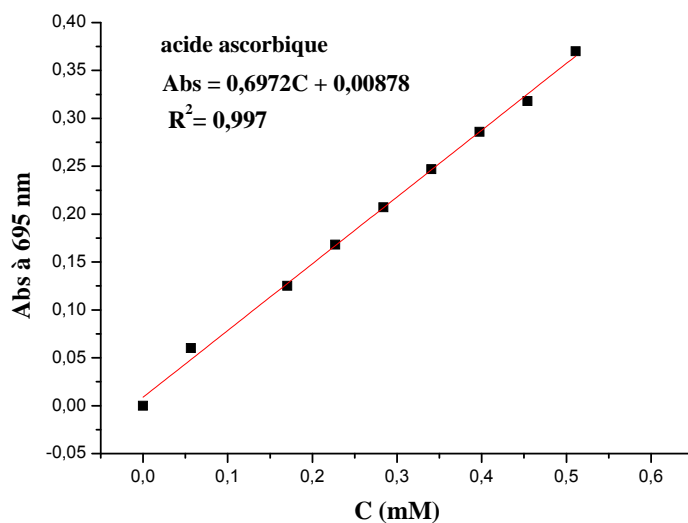


Figure III.15 : Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique (vitamine C)

Les valeurs d'AEAC sont calculées comme le suivant :

$$AEAC = \frac{\text{Pente de la courbe d'échantillon}}{\text{Pente de la courbe vitamine C}}$$

Nous avons tracé les courbes représentant la variation du pouvoir réducteur exprimée en absorbance en fonction de l'inverse de facteur de dilutions $1/n$. On résume les résultats des tests du pouvoir réducteur dans le tableau III. 7. Les résultats ont révélé que tous les extraits ont une activité réductrice élevée meilleure que BHA avec des valeurs d'AEAC comprises entre $789,04 \pm 32,47$ et $28,18 \pm 3,09$ mM (voir le tableau III. 7). Les valeurs d'AEAC les plus élevées ont été enregistrées dans la fraction aqueuse et l'extrait brut pour les feuilles ($789,046 \pm 32,473$ mM et $515,25 \pm 27,88$ mM respectivement), tandis que les effets les plus faibles ont été montrés par la fraction dichlorométhane pour les feuilles et les fruits ($28,186 \pm 3,09$ et $71,37 \pm 5, 2$ mM respectivement) (Tableau III. 7).

La fraction de butanol a montré la meilleure activité réductrice parmi toutes les fractions de fruits, puis la fraction d'acétate d'éthyle avec une valeur d'AEAC égale à $254,39 \pm 10,41$ mM.

Tableau III. 7 : Valeurs AEAC pour toutes les fractions étudiées en mM équivalent d'acide ascorbique

Extrait	Feuille	Fruits
Brut	$515,25 \pm 27,88$	$74,72 \pm 1,31$
fraction dichlorométhane	$28,186 \pm 3,09$	$71,37 \pm 5,20$
fraction acétate d'éthyle	$233,62 \pm 4,67$	$254,4 \pm 10,41$
fraction n-butanol	$508,21 \pm 41,48$	$395,1 \pm 17,24$
fraction aqueuse	$789,05 \pm 32,47$	$220,5 \pm 10,44$
BHA	$1,277 \pm 0,145$	

L'efficacité de la réduction du molybdène Mo (VI) est directement proportionnelle à la valeur d'AEAC, nos extraits ont montré une bonne activité réductrice qui était comparable à l'acide ascorbique et le BHA.

A partir de ces résultats, nous remarquons que les extraits butanol feuilles et aqueuse feuilles possèdent une capacité réductrice très importante (AEAC = $508,21$ mM et $789,05$ mM respectivement) par contre à l'extrait de dichlorométhane feuilles donne une faible activité réductrice où l'AEAC = $28,186$ mM.

Nous observons que la capacité réductrice est basée sur le potentiel rédox des antioxydants. En réalité, les groupes donneurs des électrons comme (OH, OCH₃) minimisent le potentiel rédox des polyphénols et augmente leurs capacités antioxydantes [38]. Dans ce travail nous avons isolé le **catéchine** (voir le chapitre IV) et nous rappelons que le potentiel de réduction de radical phénoxyde de catéchine déterminés dans une solution aqueuse à pH 7, 20 °C est de l'ordre 0,57 V [39]. Donc, la faible valeur de potentiel d'oxydoréduction facilite beaucoup la donation d'électron.

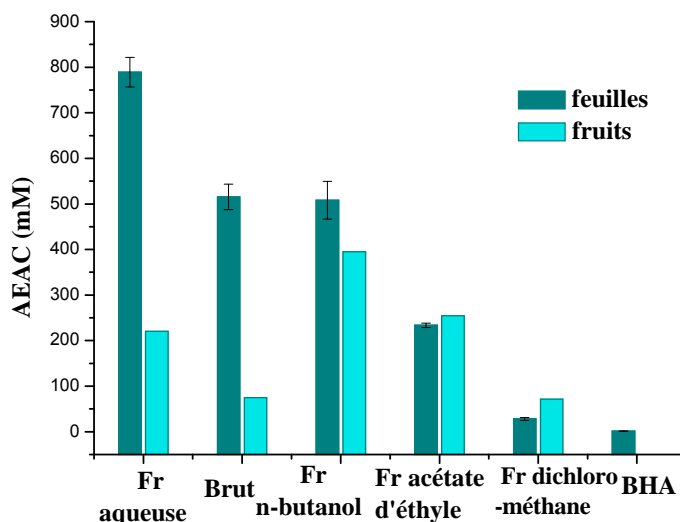


Figure III.16 : Activité antioxydante totale des extraits de *C. sempervirens*

Au cours de ce test, les électrons sont transférés du composé réducteur (antioxydant, extraits) au complexe oxydant (PPM). Ce transfert dépend du potentiel redox, du pH du milieu et de la structure du composé antioxydant [40].

Les résultats ont révélé que les extraits bruts, le butanol et les fractions aqueuses des feuilles de *C. sempervirens* ont enregistré des quantités élevées de flavonoïdes et de phénols car ces fractions présentaient des valeurs d'AEAC élevées des activités antioxydantes. En revanche, nous avons trouvé une bonne corrélation entre les valeurs d'AEAC et les teneurs en phénols, tanins et flavonoïdes, avec un facteur de corrélation $R^2 = 0,98- 0,974- 0,463$ respectivement.

III.6.3. 2. Application d'activité antiradicalaire:

Le DPPH[•], radical libre de couleur violette est réduit en un composé de couleur jaune en présence de composés antiradicalaires. L'intensité de la coloration, mesurée au

spectrophotomètre, est inversement proportionnelle à l'activité antiradicalaire des différents extraits dont on souhaite déterminer l'activité. La figure III.17 montre le pourcentage d'inhibition du radical DPPH[•] en fonction de concentration des extraits testés.

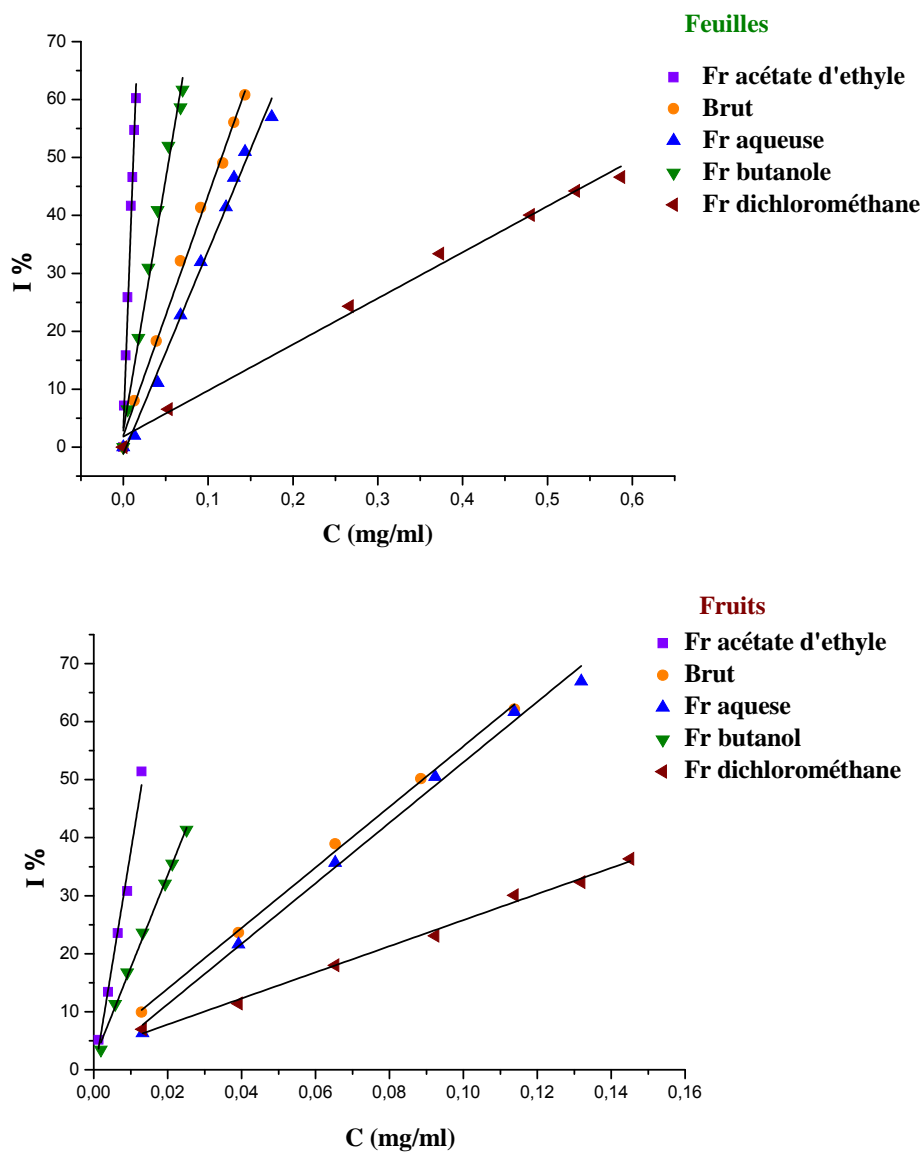


Figure III.17 : Effet piègeur du radical DPPH[•] par des différents extraits

Le tableau III.8 montre les valeurs de CI₅₀ pour les extraits étudiés. Les valeurs de CI₅₀ variaient de 0,011 ± 0,001 à 0,561 ± 0,042 mg/ml (voir le tableau III.8). L'activité de piégeage la plus élevée a été observée à la fraction d'acétate d'éthyle et à la fraction de n-butanol chez les feuilles et les fruits, tandis que l'activité de piégeage la plus faible a été enregistrée dans la fraction dichlorométhane chez les feuilles (0,561 ± 0,042 mg/ml). En général, les fractions de fruits ont montré une meilleure activité de piégeage que celles des feuilles.

Le CI_{50} est inversement proportionnel à la capacité antioxydante d'un composé car elle exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur de CI_{50} est petite, plus l'activité antioxydante pour fraction est grande.

Tableau III 8. : Valeurs CI_{50} pour toutes les fractions étudiées en mg/ml

Extrait /composé	CI_{50}	
	Feuilles	Fruits
Brut	0,117 ± 0,012	0,089 ± 0,001
fraction dichlorométhane	0,561 ± 0,042	0,206 ± 0,003
fraction acétate d'éthyle	0,011 ± 0,001	0,014 ± 0,001
fraction n-butanol	0,055 ± 0,004	0,030 ± 0,002
fraction aqueuse	0,140 ± 0,003	0,091 ± 0,003
BHA	0,011 ± 0,000	
Acide ascorbique (VC)	0,013 ± 0,001	

D'après la figure III.18, on peut classer le pouvoir du piégeage de $DPPH^{\bullet}$ par les fractions des feuilles et fruits en ordre décroissant comme suivant : fraction acétate d'éthyle > fraction butanolique > l'extrait brut > fraction aqueuse > fraction dichlorométhane.

Dans la présente étude, nous trouvons une faible et moyenne corrélation entre les quantités de composés phénoliques, flavonoïdes et tanins. Bien que les polyphénols possèdent de nombreuses propriétés antioxydantes en raison de la mobilité de l'hydrogène phénolique, ils sont donc capables de piéger les radicaux libres d'oxygène et en particulier les radicaux peroxydes [41] ; alors que la quantité totale de phénols, de tanins et de flavonoïdes chez les feuilles a montré une faible corrélation avec l'activité antiradicalaire $DPPH^{\bullet}$ avec des valeurs de coefficient de corrélation $R^2 = 0,17- 0,08- 0,118$ respectivement. Dans la présente étude nous remarquons que certaines fractions possèdent une faible capacité à piéger les radicaux $DPPH^{\bullet}$, bien que possèdent des contenus phénoliques et flavonoïdes considérables. Cette activité peut être dû à de nombreux antioxydants qui réagissent rapidement avec les radicaux peroxydes peuvent qui réagir lentement ou peuvent même être inertes avec la $DPPH^{\bullet}$, ils ne peuvent approcher au site radical et en raison de l'inaccessibilité stérique [42].

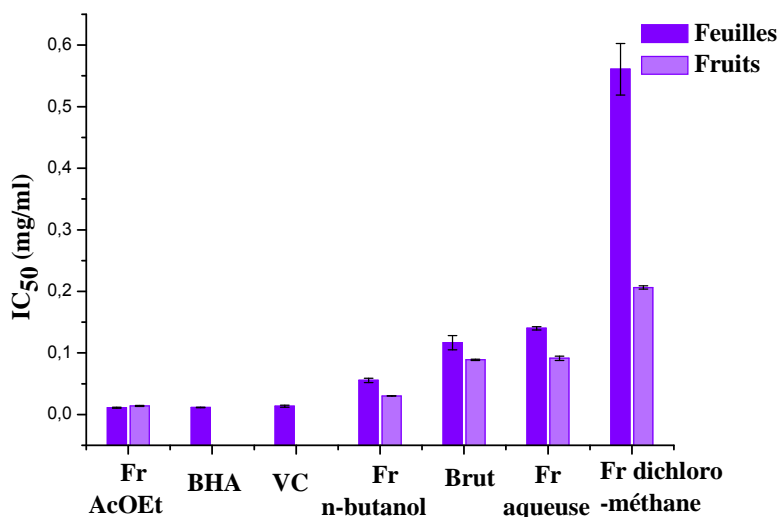


Figure III.18 : Activité anti-radicalaire des extraits de *C. sempervirens*, BHA et VC

III.6.3.3. Évaluation de la capacité inhibitrice de l'anion superoxyde radicalaire

III.6.3.3.1. Évaluation par la méthode chimique

La mesure de l'activité de piégeage des anions superoxydes par les extraits de *C. sempervirens* est estimée en utilisant la réaction d'auto-oxydation du pyrogallol se produisant dans des conditions alcalines. La figure III.19 représente les résultats de mesure la vitesse d'auto-oxydation du pyrogallol en présence de la même concentration de différents extraits. Les valeurs des pourcentages d'inhibition obtenues ont permis de tracer des courbes ayant une allure droite.

Tableau III. 9 : Pourcentages d'inhibition d'anions superoxydes

Extraits / composé	I % (Feuilles)	I % (Fruits)
Brut	18,577 ± 0,792	32,44 ± 0,61
fraction dichlorométhane	41,935 ± 0,176	17,24 ± 0,36
fraction acétate d'éthyle	71,164 ± 0,061	71,47 ± 0,45
fraction n-butanol	46,853 ± 0,061	39,64 ± 0,58
fraction aqueuse	66,810 ± 0,609	33,96 ± 0,12
BHA	31,767 ± 1,036	
acide ascorbique (VC)	57,365 ± 1,52	

Nous traçons l'absorbance en fonction du temps et à partir de ces courbes nous déduisons la pente qui exprime la vitesse de l'autoxydation du pyrogallol.

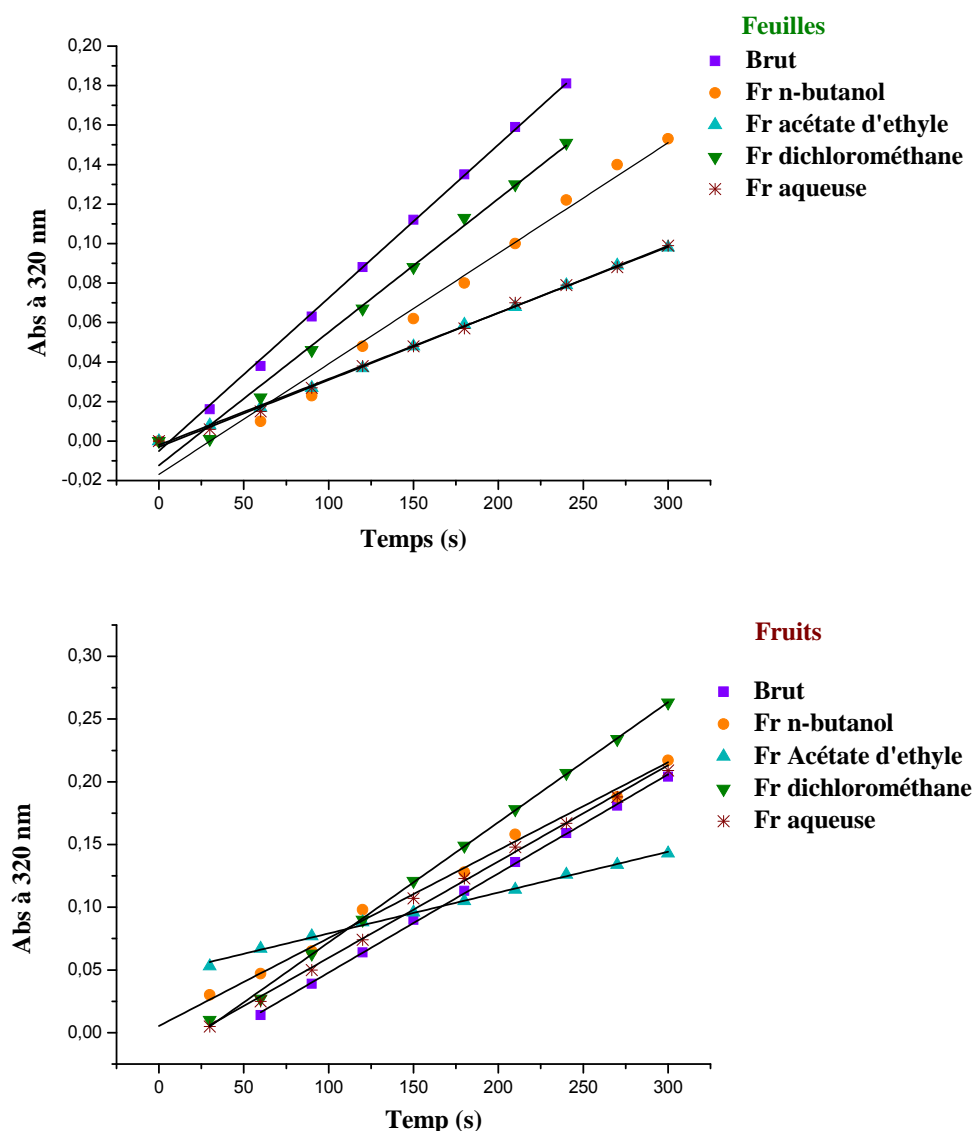


Figure III.19 : Courbes de vitesse d'auto-oxxydation du pyrogallol en présence d'antioxydant

Les pourcentages de piégeage des radicaux de tous les extraits variaient entre $(71,163 \pm 0,06 \%$ et $17,24 \pm 0,365 \%)$ (Tableau III. 9).

La figure III.20 montre les effets d'inhibition de différents échantillons aux mêmes concentrations (0,001 mg/ml). Les pourcentages d'inhibition les plus grands ont été enregistrés par les fractions acétate d'éthyle et aqueuse des feuilles ($71,163 \pm 0,06 \%$ et $66,810 \pm 0,606 \%$ respectivement), tandis que les pourcentages d'inhibition les plus faibles ont été enregistrés à l'extrait brut des feuilles et l'extrait dichlorométhane des fruits ($18,57 \pm 0,79 \%$ et $17,810 \pm 0,365 \%$ respectivement).

Pour les fruits, la fraction d'acétate d'éthyle enregistre la même valeur d'inhibition chez les feuilles, et les autres fractions des fruits a des valeurs inférieures à celles enregistrées dans les feuilles à l'exception de l'extrait brut des fruits qui enregistre une valeur plus élevée à celle enregistrée dans les feuilles.

En outre part, les extraits de la plante étudiés montrent des valeurs inhibitrices plus efficaces que les antioxydants standards.

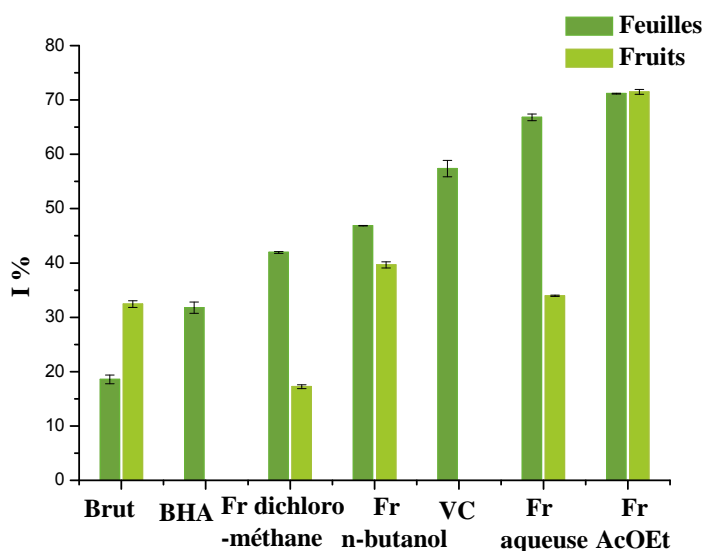


Figure.III.20 : Pourcentage d'inhibition de radical anion superoxyde par différents échantillons aux mêmes concentrations (0,001 mg / ml)

D'après la figure III.20, on peut classer l'efficacité de la fraction des feuilles en ordre décroissant : fraction acétate d'éthyle > fraction aqueuse > fraction butanolique > fraction dichlorométhane > l'extrait brut, et pour les fruits comme le suivant : fraction acétate d'éthyle > fraction butanolique > fraction aqueuse > l'extrait brut > fraction dichlorométhane.

III.6.3.3.2. Évaluation par la méthode électrochimique

Les voltammogrammes ont été enregistré à l'absence d'antioxydant, pour déterminer la valeur du courant I_{Pa}^0 comme courant anodique d'oxydation d' O_2^{*-} , I_{Pa}^0 est directement liée à la concentration d' O_2^{*-} à la surface de l'électrode et dépend de la solubilité de l'oxygène dans le DMF et les paramètres expérimentaux choisis.

Les voltammogrammes de la réduction de O_2 a été enregistrée en présence d'un antioxydant (extraits ou standards) en vue d'évaluer la capacité antioxydante de l'antioxydant à la recherche lors de sa réactivité envers O_2^{*-} . L'augmentation de la concentration du substrat antioxydant conduit à une diminution de concentration de O_2^{*-} qui correspondant une diminution de densité de courant anodique (i_{pas}) selon la relation de Randles-Sevcik [43]:

$$i_{pa} = 0.4463 \left(\frac{F^3}{RT} \right)^{1/2} \cdot n^{3/2} \cdot D_{Red}^{1/2} \cdot C_{Red} v^{1/2}$$

Ce qui donne à 25°C :

$$i_{pa} = (2.69 \times 10^5) \cdot n^{3/2} \cdot D_{Red}^{1/2} \cdot C_{Red} v^{1/2}$$

Où : D_{red} est le coefficient de diffusion de l'espèce Red, exprimé en $cm^2 \cdot s^{-1}$, R : la constante des gaz parfaits ($R = 8,314 J \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1}$), T : la température absolue (en K), n : le nombre d'électrons échangés au cours du transfert électronique, v : la vitesse de balayage en mV/s, F : la constante de Faraday ($F = 96500 C \cdot mol^{-1}$).

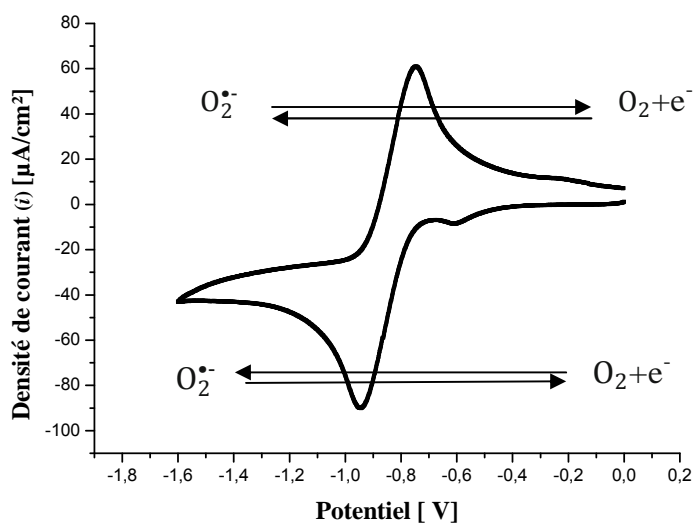


Figure III.21 : Voltammogramme de la réduction d'oxygène [milieu DMF ($nTbunBF_4$) 0,1 M; vitesse de balayage $0,1 V \cdot s^{-1}$]

Le potentiel de réduction (E_{pc}) d' $O_2/O_2^{\bullet-}$ est de $-0,93 V/ ECS$ et le potentiel d'oxydation d' $O_2^{\bullet-}/ O_2$ est de $-0,77 V/ ECS$.

De plus, le courant cathodique et anodique est d'ordre $67,61 \mu A/cm^2$ et $70,24 \mu A/cm^2$ respectivement. Nous avons obtenu une valeur (E) de $160 mV$, ce qui correspond à la réduction quasi réversible d'un électron de l'oxygène pour produire un radical anion superoxyde.

Dans le DMSO, le DMF et la pyridine, la ΔE est d'environ 100 à $200 mV$, quelle que soit la nature de l'électrode. Cette valeur, qui s'écarte des $60 mV$ "classiques" attendus pour un processus à un (1) électron, est attribuée à une cinétique de transfert de charge lente et à la différence des coefficients de diffusion de l'oxygène et de l'anion superoxyde [44].

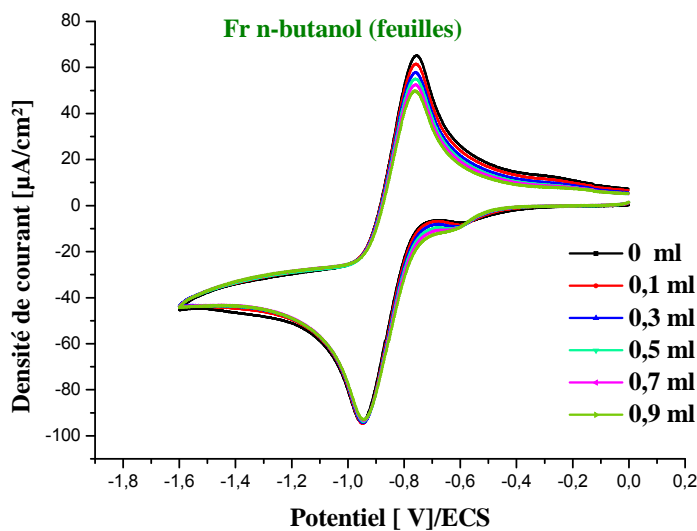
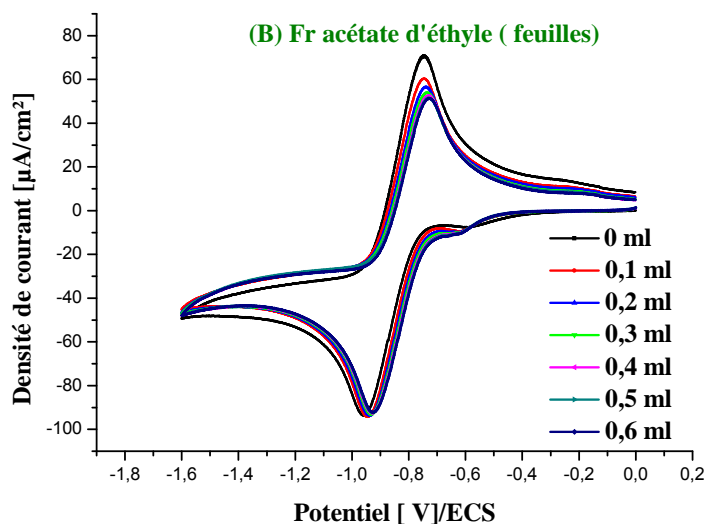
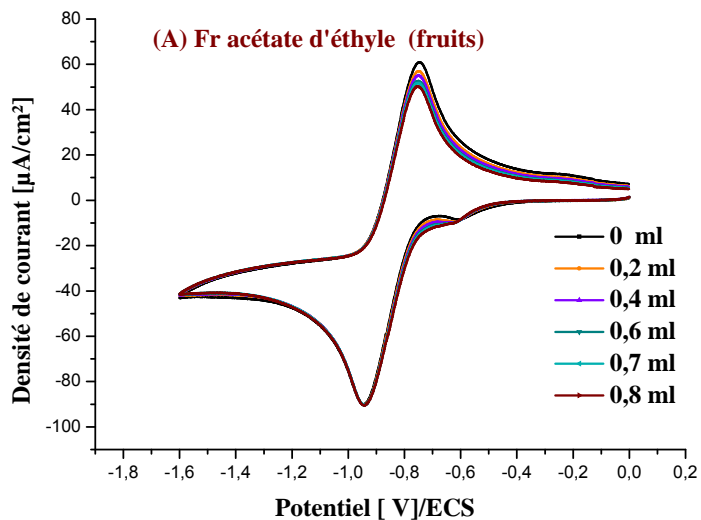
Dans notre travail, le potentiel de demi-pic ($E_{1/2}$) du couple redox $O_2^{\bullet-}/O_2$ dans le DMF et Bu_4NBF_4 est de -0,828 V/ECS. Certaines expériences ont été réalisées en utilisant différents sels de support et le DMF comme solvant également un électrode de carbone vitreux, les résultats montrent que les potentiels de $E_{1/2}$ restent identiques à 0,078 V. Par exemple, $E_{1/2}$ du couple redox $O_2^{\bullet-}/O_2$ dans Bu_4NClO_4 est de -0,78 V/ECS [45]. Une autre étude montre que, $E_{1/2}$ du couple redox $O_2^{\bullet-}/O_2$ dans Bu_4NPF_6 est de -0,75 V/ ECS [46].

Le potentiel de demi-pic $E_{1/2}$ dépend des coefficients de diffusion relatifs pour l'oxygène et l'anion superoxyde et de la cinétique de réaction. De plus, dans les solvants à haute permittivité, la nature de l'anion associé au cation $Bu_4N^+(ClO_4^-, PF_6^-$ ou $BF_4^-)$ et la concentration globale en sel jouent également un rôle mineur sur la première réduction de l'oxygène [47].

Le potentiel demi-pic de $O_2^{\bullet-}/O_2$ est un peu plus négatif dans Bu_4NBF_4 que dans Bu_4NClO_4 , montrant que les ions BF_4^- se solvate plus fortement dans DMF que ClO_4^- . En résumé, les données obtenues dans les électrolytes à base de Bu_4NClO_4 (-0,78V) et Bu_4NPF_6 (-0,75V) révèlent que l'anion affecte sur les processus redox.

Cette faible dépendance mais perceptible de la réduction de l'oxygène vis-à-vis du contre-ion est évidente par ces changements. La réaction de réduction de l'oxygène dans la solution de Bu_4NBF_4 est légèrement négative de 85 mV (Epc est -0,855 pour Bu_4NClO_4 [48], dans Bu_4NBF_4 est -0,93), indiquant que la réduction de l'oxygène en présence de tétrafluoroborate est dans une certaine mesure légèrement polarisée. Cela peut être dû en partie à la nature moins coordonnée du BF_4^- , permettant au plus grand ion tétrabutylammonium d'interagir avec l'oxygène dissous. Généralement, l'interface électrolyte / électrode est affectée par la nature du contre-ion.

Nous rappelons que les fractions utilisées dans cette partie électrochimique sont : l'acétate d'éthyle et n-butanol pour les fruits et les feuilles.



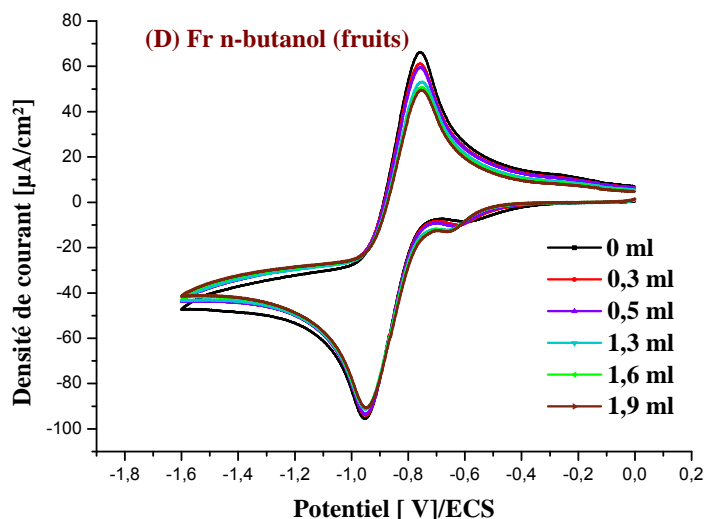


Figure III.22 : Voltammogramme d'oxygène à la présence des différentes fractions étudiées [milieu DMF nT_{Bu}NBF₄ 0,1 M; électrode CV; vitesse de balayage 0,1V.s⁻¹]

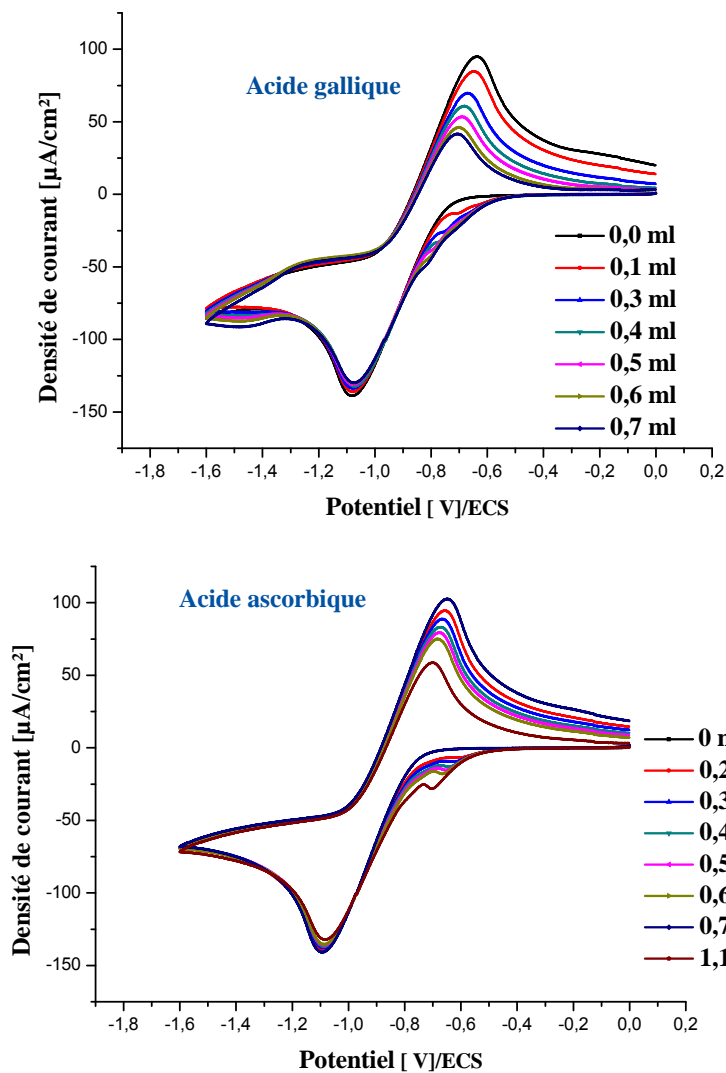
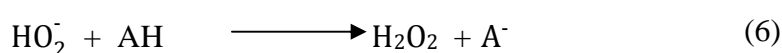
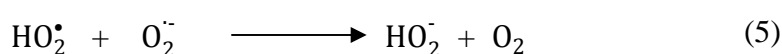
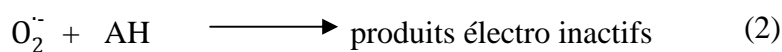
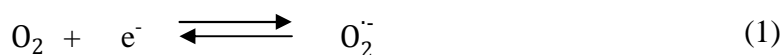


Figure III.23 : Voltammogrammes d'oxygène en présence des composés standards

L'augmentation de la concentration du l'extrait entraîne une diminution de la concentration de $O_2^{\bullet-}$ qui correspond à une diminution de la densité de courant anodique (I_{Pa}^S) alors que la densité de courant cathodique (I_{Pc}^S) n'est pas significativement modifiée (voir la figure III.22). La diminution du pic de densité de courant anodique de $O_2^{\bullet-}$ suggère que le substrat (extraits de plante) réagit de manière réversible avec $O_2^{\bullet-}$. Tous les substrats antioxydants ont démontré un effet similaire sur la réduction d' O_2 .

La fraction d'acétate d'éthyle de feuilles enregistre le meilleur résultat parmi les autres extraits étudiés. Le comportement électrochimique de l'oxygène peut être résumé par les équations suivantes. (1) - (3) où AH représente des extraits de plante ou un antioxydant standard (l'acide ascorbique, acide gallique). Après la réduction réversible de l'oxygène (1), l'anion superoxyde électro-généré réagit avec AH (2) conduisant à des produits qui ne sont pas électro-actifs dans la plage de potentiel balayée. Pour cette réaction, nous pouvons suivre l'hypothèse d'un transfert d'atomes H (3) conduisant au radical A^\bullet , qui peut être un radical phénoxy, et à la base conjuguée de peroxyde d'hydrogène [39, 49].



Le mécanisme du processus électrochimique global a été proposé comme $E_r C_i$. Ici E_r due la génération électrochimique réversible de $O_2^{\bullet-}$ qui a été suivi par (C_i) la réaction chimique irréversible entre les extraits et le radical. A l'ajout des extraits, les voltamogrammes ont montré une diminution du courant anodique indiquant l'irréversible suivant le processus chimique.

On établit les courbes (I_{Pa}^S / I_{Pa}^0) en fonction de concentration des fractions étudiées (C) (Figure III.24).

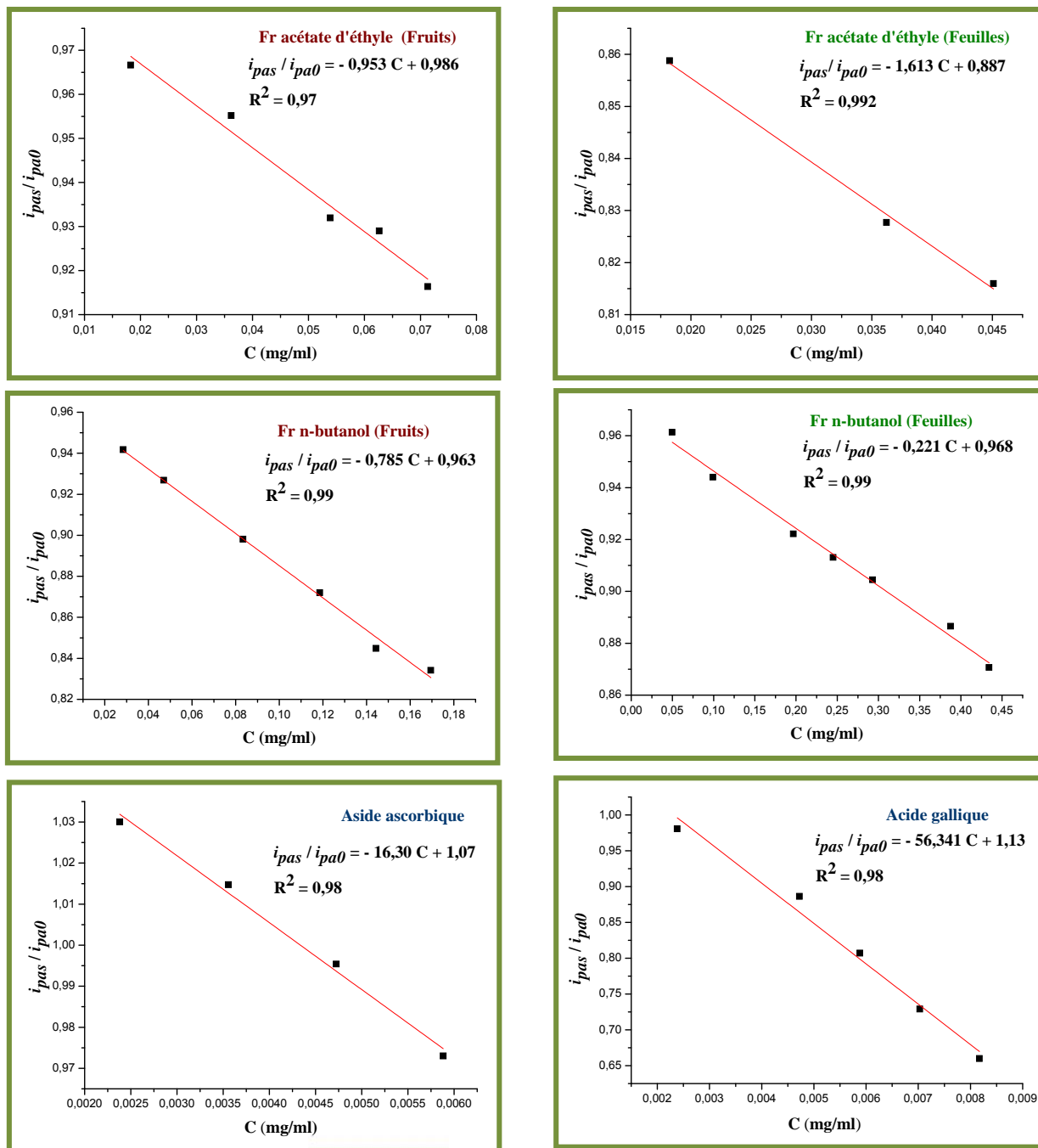


Figure III.24 : Rapport de (I_{Pa}^S / I_{Pa}^0) en fonction de la concentration des fractions étudiées

On établit les courbes I % en fonction de concentration des fractions étudiées (C), à partir de ces courbes on a calculé les valeurs de CI₅₀ (voir la figure III.25).

Selon les valeurs de CI₅₀ regroupés dans le tableau III.10 les fractions d'acétate d'éthyle de feuilles et des fruits ont enregistré la plus grande activité de piégeage d'O₂^{•-} avec les valeurs de CI₅₀, 0,136 et 0,427 mg/ml respectivement, tandis que les fractions de butanol chez les feuilles et les fruits ont enregistré une grande valeur de CI₅₀, ce qui donne une faible activité.

Tableau III. 10 : Résultats de CI₅₀ obtenues pour les fractions étudiées

Extrait	Valeur de CI ₅₀ (mg/ml)
Acide gallique	0,011
Acide ascorbique	0,030
fraction acétate d'éthyle feuilles	0,136
fraction acétate d'éthyle fruits	0,427
fraction n-butanol fruits	0,590
fraction n-butanol feuilles	2,130

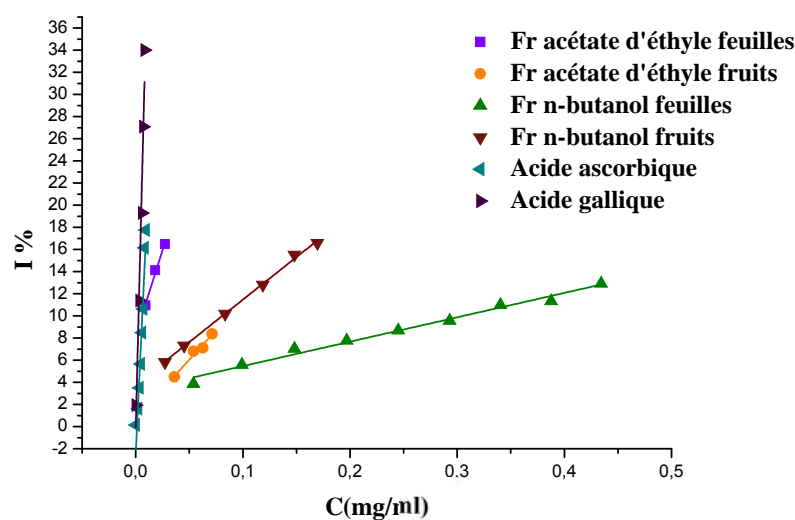


Figure III.25 : Effets d'inhibition de O₂^{•-} par des différentes fractions de plante

D'après la figure III. 26, on peut classer la capacité de piégeage d'O₂^{•-} de ces fractions selon l'ordre décroissant : fraction acétate d'éthyle des feuilles > fraction acétate d'éthyle des fruits > fraction butanolique des fruits > fraction butanolique des feuilles.

Quand, nous comparons les résultats obtenus des trois activités antiradicalaires qui ont été effectués dans cette étude ; nous avons constaté qu'ils sont compatibles les uns avec les autres, où l'acétate d'éthyle des fruits et des feuilles montrent l'activité la plus élevée.

D'autre côté, on a trouvé que les effets des fractions étudiées par la méthode électrochimique et le test de DPPH• est plus compatibles. Par contre, nous enregistrons une différence de classement des extraits entre la méthode chimique et électrochimique malgré que les deux méthodes traitent le même radical (O₂^{•-}) (tableau III. 11).

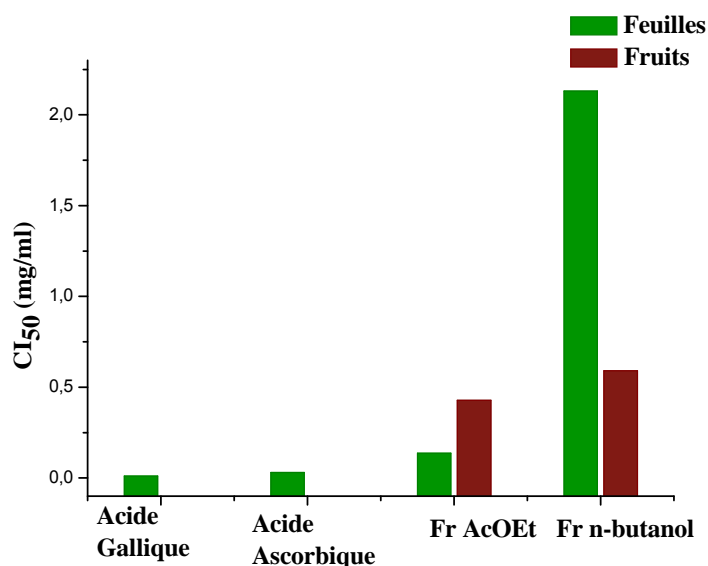


Figure III. 26 : Valeurs de la CI₅₀ pour l'inhibition des radicaux superoxydes par les extraits de *C. sempervirens*, l'acide gallique et l'acide ascorbique

Tableau III. 11 : Effets d'inhibitions des radicaux par des différentes méthodes

Test	Classification d'effet
Inhibition de radical DPPH•	Fr acétate d'éthyle des feuilles > Fr acétate d'éthyle des fruits > Fr butanol des fruits > Fr butanol des feuilles.
Inhibition d'O ₂ ^{•-} (méthode électrochimique)	Fr acétate d'éthyle des feuilles > Fr acétate d'éthyle des fruits > Fr butanol des fruits > Fr butanol des feuilles.
Inhibition d'O ₂ ^{•-} (méthode chimique)	Fr acétate d'éthyle des fruits > Fr acétate d'éthyle des feuilles > Fr butanol des feuilles > Fr butanol des fruits.

Les travaux antérieurs sur les tests antiradicalaires de *C. sempervirens* L. ont démontré que les fractions d'acétate d'éthyle et n-butanol possèdent une capacité plus importante de piégeage du radical libre DPPH• ce qui est comparable à nos résultats [50], tandis que nos résultats sont les meilleurs.

Dans notre étude pour évaluer les activités antiradicalaires des fractions acétate d'éthyle et n- butanol ; on a trouvé une bonne corrélation entre le contenu phénolique, flavonoïdique et des tanins et les trois tests étudiés et une bonne corrélation entre eux (tableau.III.12)

Tableau.III.12 : Les relations de corrélation entre les teneurs des phénols, flavonoïdes, tanins et les activités antiradicalaires

	Feuilles					
	CPT	CFT	CTT	Electrochimique O ₂ ^{•-}	DPPH [•]	Chimique O ₂ ^{•-}
CPT	1					
CFT	0,71	1				
CTT	0,84	0,94	1			
Electrochimique (O ₂ ^{•-})	0,80	0,81	0,38	1		
DPPH [•]	0,17	0,11	0,08	0,93	1	
Chimique(O ₂ ^{•-})	0,43	0,84	0,791	0,22	0,07	1

	Fruits					
	CPT	CFT	CTT	Electrochimique O ₂ ^{•-}	DPPH [•]	Chimique O ₂ ^{•-}
CPT	1					
CFT	0,96	1				
CTT	0,88	0,95	1			
Electrochimique (O ₂ ^{•-})	0,8	0,81	0,38	1		
DPPH [•]	0,26	0,15	0,14	0,93	1	
Chimique (O ₂ ^{•-})	0,18	0,17	0,12	0,22	0,95	1

Nous avons trouvé une faible corrélation entre la capacité d'inhibition du radical O₂^{•-} (méthode chimique et électrochimique) avec un coefficient de corrélation R² = 0,22.

Les fractions d'acétate d'éthyle des feuilles et des fruits sont les plus efficaces pour piéger les radicaux O₂^{•-} et DPPH[•] d'où ce pouvoir piégeur peut être attribué aux composés bioactifs trouvés dans ces parties malgré le fait que ces fractions ont une teneur en flavonoïdes et phénols inférieure à celle trouvée en fractions de butanol chez les deux organes étudiées. L'interaction des flavonoïdes avec de nombreux radicaux a été utilisée dans plusieurs études pour définir les principaux éléments de l'activité antioxydante par transfert d'hydrogène. Le radical aryle résultant (Flav-O[•]) peut réagir avec un autre radical libre pour former une

structure quinone stable (Figure III.27). De plus, le radical aroxyde peut interagir avec l'oxygène pour donner une quinone et un anion superoxyde. Par conséquent, la capacité des flavonoïdes à agir comme antioxydants dépend non seulement du potentiel redox de la paire Flav-O[•] / Flav-OH, mais également de la réactivité du radical aroxyde [51-53].

En général, la capacité des flavonoïdes à être des antioxydants efficaces dépend de trois facteurs : (1) le potentiel de chélation des métaux qui dépend fortement de l'arrangement des hydroxyles et du groupe carbonyle autour de la molécule, (2) la présence d'hydrogène / électron des substituants capables de réduire les radicaux libres, (3) la capacité du flavonoïde à délocaliser l'électron non apparié conduisant à la formation d'un radical phénoxyde stable. Les deux modes connues de l'action antioxydant, c'est-à-dire le mécanisme préventif et le mécanisme de rupture de chaîne, sont supposés être responsables de la forte activité des flavonoïdes [54].

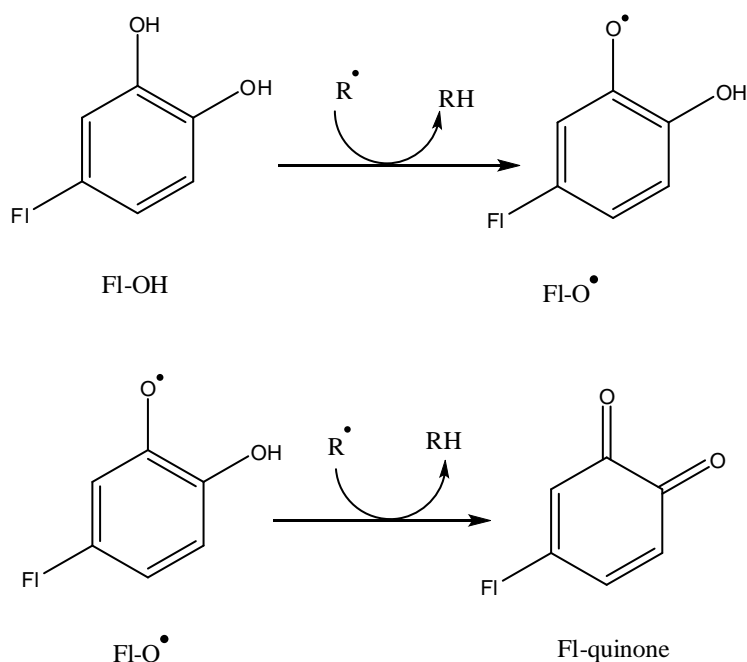


Figure III.27 : Piégeage des espèces réactives de l'oxygène (R[•]) par les flavonoïdes [55]

La capacité à céder un atome d'hydrogène peut également être prédite par le potentiel d'oxydoréduction. Tout composé qui a un potentiel redox plus faible que le potentiel de réduction d'un radical libre (ou d'une espèce oxydée) est capable de céder un hydrogène à ce radical tant que la réaction est possible.

En raison de potentiels redox plus faibles, les flavonoïdes (Fl-OH) ($0,23 < E_7 < 0,75$ V) (E_7 le potentiels à pH =7) sont capables thermodynamiquement de réduire les radicaux libres hautement oxydants avec des potentiels redox dans la plage de 2,13-1,0 V, tels que superoxyde, peroxyde, alcoxyde et radicaux hydroxydes qui cèdent un atome d'hydrogène [56].

Dans ce travail, on a étudié l'inhibition de radical DPPH[•], la réduction de Mo (IV) et l'inhibition de radical anion superoxyde O₂^{•-} par des extraits de *C. sempervirens*, laquelle contient des composés réducteurs. Où nous avons trouvé grâce au processus de séparation achevé dans cette étude, que la fraction d'acétate d'éthyle des feuilles contient des quantités importantes des flavonoïdes, alors que cette fraction a montré la meilleure activité. Cela peut confirmer que la présence d'un groupe donneur d'hydrogène de flavonoïdes provenant d'échantillons des feuilles de *C. sempervirens* pour inhiber le radical O₂^{•-}.

III.6.4. Evaluation d'activité enzymatique des extraits de *C. sempervirens*

IV.6.4.1. Dosage de l'inhibition de l' -amylase

Pour déterminer l'effet des sept extraits (feuilles et fruits) de l'espèce *Cupressus sempervirens* sur l'activité de l' -amylase *in vitro* ; une concentration d'amidon de 1% (p/v) a été utilisée comme substrat en présence et en l'absence d'inhibiteur à différentes concentrations de chaque extrait (Tableau III.13).

Tableau III.13 : Différentes concentrations de fractions étudiées et leur taux d'inhibition

Extrait	Feuilles		Fruits	
	C (mg/ml)	Taux d'inhibition %	C (mg/ml)	Taux d'inhibition %
Extrait brut EB	3,912	12,86	0,1894	35,94
butanol F B	3,38	13,88	1,867	39,6
Acétate d'éthyle F A	0,595	17,97	0,538	43,35
Acétate d'éthyle F A T (Tannin extrait)	0,616	35,43	-	-

L'inhibition la plus élevée à 0,538 et 0,1894 mg/ml a été observée dans la fraction d'acétate d'éthyle et l'extrait brut de fruits avec taux d'inhibition de 43,35 et 35,94% respectivement. Alors que l'inhibition la plus élevée dans les feuilles a été enregistrée à la fraction de tanin d'acétate d'éthyle avec 35,43% à 0,616 mg/ml (Figure III.28).

III.6.4.2. Etude cinétique de l'enzyme et détermination de type d'inhibition de l' α -amylase par les extraits

Pour définir le type d'inhibition des extraits contre l'activité α -amylase, nous avons choisi la fraction d'acétate d'éthyle de fruits (FAF) et la fraction d'acétate d'éthyle d'extrait de tanins pour feuilles (FAT) (qui a un pouvoir inhibiteur élevé).

On a réalisé une courbe d'étalonnage de maltose (Figure III.29). L'unité de l'enzyme est exprimée par la quantité de maltose libérée en μ mole par minute par ml de milieu.

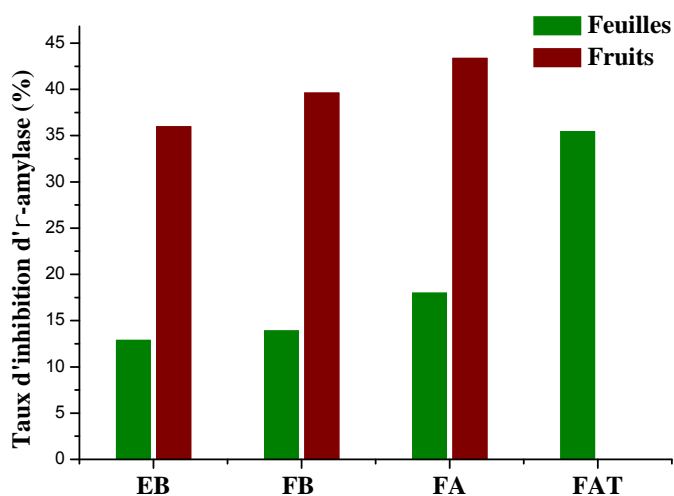


Figure III.28 : Taux d'inhibition de l'activité α -amylase en présence des différentes concentrations de chaque extrait

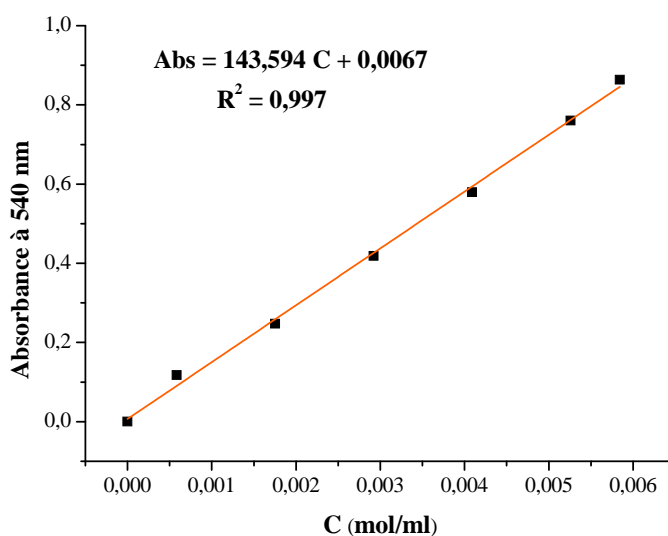


Figure III.29 : Courbe d'étalonnage de maltose

La figure III.30 montre que l'enzyme α -amylase suit une cinétique de Michaelis. Selon cette figure, la relation entre la concentration et la vitesse enzymatique est proportionnelle dans un domaine de linéarité qui s'arrête à une concentration d'amidon de 12 mg/ml où la courbe a une valeur constante qui est représentée par un plateau, ce qui signifie que le site actif d' α -amylase est saturé.

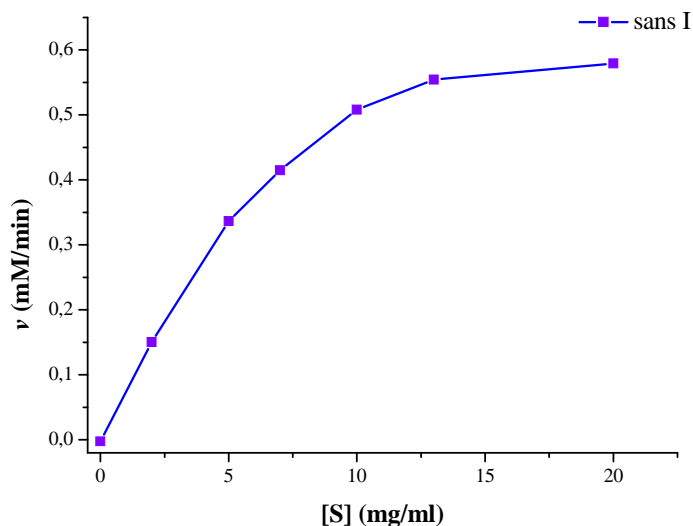


Figure III.30 : Vitesse d'inhibition d' α -amylase en absence d'inhibiteur

Ces résultats nous a permis à établir la représentation de Lineweaver-Burk $1/v = 1/[S]$ (Figure III.31), selon laquelle nous pouvons déduire des paramètres cinétique de l' α -amylase : la vitesse maximale v_{max} et la constante de Michaelis - Menten K_M .

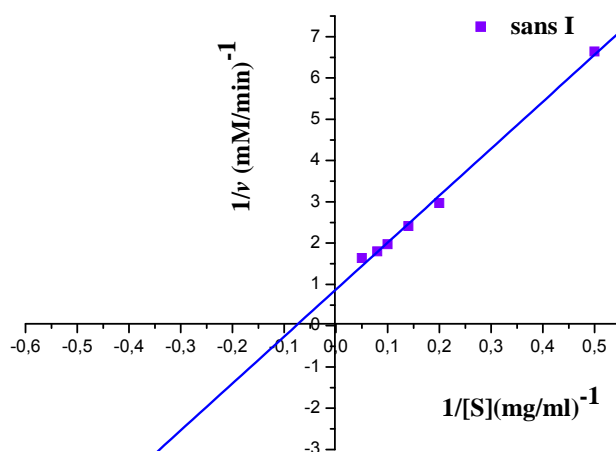


Figure III.31 : Représentation de Lineweaver-Burk (sans inhibiteur)

Pour étudier le comportement d'inhibition des extraits (FAT, FAF) sur l' α -amylase ; la cinétique de l'enzyme a été analysée par la courbe de Lineweaver-Burk ($1/v = 1/v_{max} + K_M/[S]$) (Figure III.32). Cette dernière a permis de déterminer les différents paramètres cinétiques de l' α -amylase : la vitesse maximale v_{max} et la constante de Michaelis-Menten K_M . Les valeurs de v_{max} et K_M sont ainsi obtenues par ajustement de courbe où le tracé résultant a une ligne droite avec une pente de K_M/v_{max} , une ordonnée à l'origine de $1/v_{max}$ et une ordonnée à l'origine de $(-1/K_M)$.

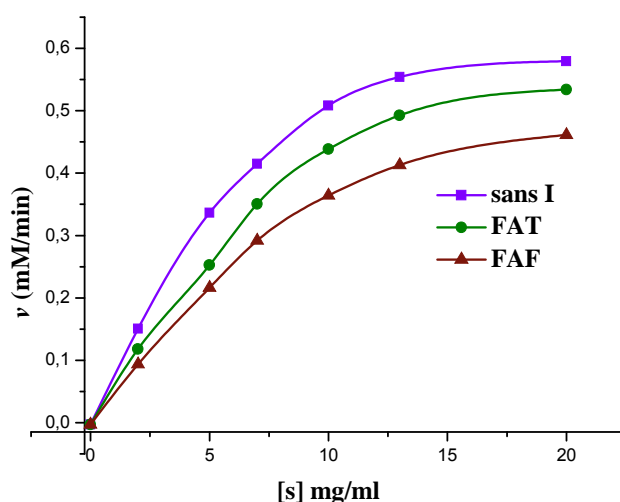


Figure III.32 : Vitesse d'inhibition d' α -amylase en présence et absence d'inhibiteur

Le représentation de Lineweaver-Burk nous a permis non seulement de déterminer le type d'inhibition, mais aussi les autres paramètres cinétiques à savoir la vitesse maximale (v_{max}) et la constante d'inhibition (K_i) des deux extraits (FAT, FAF) qui sont calculés à partir de la figure III.33 par la projection du point d'intersection des droites sur l'axe X selon l'équation (8), et les valeurs d' CI_{50} sont calculée selon l'équation (9), les valeurs des paramètres cinétiques sont indiquées au tableau III.14.

$$K_i = \frac{K_M \cdot [I]}{K_M^{app} - K_M} \rightarrow (8)$$

Où

[I]: Concentration de l'inhibiteur

K_i : Constante d'inhibition

K_M^{app} : Constante apparente de Michaelis

K_M : Constante de Michaelis – Menten

$$IC_{50} = \frac{K_i \cdot [S]}{K_M} + K_i \rightarrow (9)$$

Tableau III.14 : Paramètres cinétiques des fractions étudiées

Échantillon	K_M^{app} (mg/ml)	K_M (mg/ml)	v_{max} (mM.min ⁻¹)	[I] (mg/ml)	K_i (mg/ml)	CI_{50} (mg/ml)
FAT	17,289	12,975	1,14	0,616	1,852	3,27
FAF	22,15	12,975	1,14	0,538	0,760	1,34

La figure III.33 montre que l'inhibition l' -amylase d'*Aspergillus oryzae* par la fraction d'acétate d'éthyle des fruits (FAF) et la fraction d'acétate d'éthyle d'extrait de tanins pour les feuilles (FAT) est de type d'inhibition compétitif avec des valeurs de K_i de 0,760 ; 1,852 µg / µl respectivement. L'inhibition -amylase de FAF est le mieux que celle de FAT.

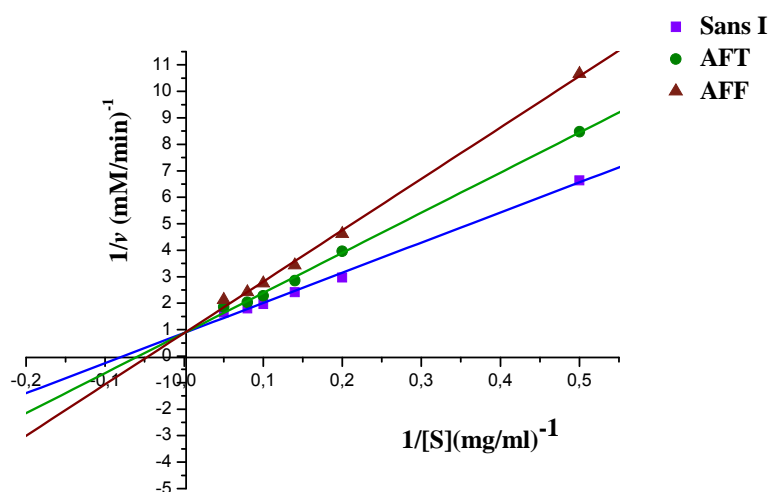


Figure III.33 : Représentation de Lineweaver-Burk en présence et absence d'inhibiteur

Le test de comparaison a montré que les extraits (FAT, FAF) contiennent des composés inhibiteurs d' -amylase, cela résulte en cas d'absence d'inhibiteur et jusqu'à l'activité enzymatique pour chaque échantillon (sans inhibiteur, FAT et FAF). Cette activité est peut-être due à la grande quantité de polyphénols, de flavonoïdes et de tanins et également à la nature chimique de ces composés, alors que l'on constate que certains flavonoïdes naturels agissent comme des inhibiteurs de l' -amylase humaine [57].

Certaines études indiquent également qu'il existe une forte corrélation entre les niveaux d'inhibition enzymatique et la teneur en tanins. Le type compétitif d'inhibition peut s'expliquer

par le fait que les deux extraits étudiés ont des composés portant des groupements hydroxyles proches de ceux du substrat, qui l'ont éloigné du site actif de l'enzyme. Ces inhibiteurs sont capables d'occuper le site actif de l' α -amylase [58, 59]. Cette étude a révélé que les extraits de *C. sempervirens* ont des teneurs élevées en flavonoïdes et en phénols où Tadera et al. ont testé plusieurs composés flavonoïdes pour leur activité inhibitrice contre l' α -amylase [60]. En outre, Lo Piparo et al. ont découvert que l'inhibition de l'enzyme α -amylase par les flavonoïdes est corrélée avec le nombre de groupes hydroxyles dans leur cycle **B**. Ces composés inhibent l' α -amylase par la formation de liaisons hydrogènes entre ses groupes hydroxyle et les résidus du site actif de cette enzyme et la formation d'un système conjugué qui stabilise l'interaction avec le site actif [57]. Une étude antérieure a évalué les activités antidiabétiques des flavonoïdes *in vivo* et *in vitro* dans lesquelles il a été constaté qu'il a un fort effet inhibiteur [61].

Lili Kandra et al. ont montré que les tanins sont des inhibiteurs efficaces de l' α -amylase comme l'acarbose et présentent une stabilité plus élevée pour le complexe enzyme-inhibiteur que le complexe enzyme-substrat-inhibiteur (ESI); les tanins se lient aux α -amylases ; l'interconnexion peut avoir lieu sur le site secondaire ou le site actif de l'enzyme, ces liaisons générant des complexes de type inhibiteur enzymatique, car les tanins agissent comme des inhibiteurs compétitifs des α -amylases [62]. Cela explique l'efficacité des extraits de cyprès dans l'inhibition de l' α -amylase car ils contiennent des quantités importantes des tanins.

Références

1. Zhang, S.-Y., Zheng, C.-G., Yan, X.-Y., and Tian, W.-X., *Low concentration of condensed tannins from catechu significantly inhibits fatty acid synthase and growth of MCF-7 cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008. **371**(4): p. 654-658.
2. Soulama, S., Nacoulma, O.G., Meda, R.N., Boussim, J.I., and Millogo-Rasolodimby, J., *Teneurs en coumarines de 15 ligneux fourragers du Burkina Faso*. International Journal of Biological and Chemical Sciences, 2013. **7**(6): p. 2283-2291.
3. Mace, M., *Histochemical localization of phenols in healthy and diseased banana roots*. Physiologia plantarum, 1963. **16**(4): p. 915-925.
4. Shah, B.N., *Textbook of pharmacognosy and phytochemistry*. 2012: Elsevier India.
5. Zeidan, S., Hijazi, A., Rammal, H., Kobaissi, A., and Badran, B., *Extraction of phenolic compounds and flavonoids from Eryngium creticum L. by conventional and non-conventional extraction techniques*. World Journal of Pharmaceutical Sciences, 2014. **3**(17): p. 1889-1898.

6. Evans, W., *Trease and Evans' Pharmacognosy E-Book*. 16th ed, 2009: Elsevier Health Sciences.
7. Blainski, A., Lopes, G., and de Mello, J., *Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from Limonium brasiliense L*. *Molecules*, 2013. **18**(6): p. 6852-6865.
8. Singleton, V.L. and Rossi, J.A., *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents*. *American journal of Enology and Viticulture*, 1965. **16**(3): p. 144-158.
9. Tiwari, B.K., Brunton, N.P., and Brennan, C., *Handbook of plant food phytochemicals: sources, stability and extraction*. 1st ed, 2013: John Wiley & Sons.
10. Wang, H., Gao, X.D., Zhou, G.C., Cai, L., and Yao, W.B., *In vitro and in vivo antioxidant activity of aqueous extract from Choerospondias axillaris fruit*. *Food Chemistry*, 2008. **106**(3): p. 888-895.
11. Broadhurst, R.B. and Jones, W.T., *Analysis of condensed tannins using acidified vanillin*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1978. **29**(9): p. 788-794.
12. Sun, B., Ricardo-da-Silva, J.M., and Spranger, I., *Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998. **46**(10): p. 4267-4274.
13. Rebaya, A., Belghith, S.I., Baghdikian, B., Leddet, V.M., Mabrouki, F., Olivier, E., Cherif, J., and Ayadi, M.T., *Total phenolic, total flavonoid, tannin content, and antioxidant capacity of Halimium halimifolium (Cistaceae)*. *Journal of applied pharmaceutical science*, 2014. **5**(1): p. 52-57.
14. Prieto, P., Pineda, M., and Aguilar, M., *Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E*. *Analytical biochemistry*, 1999. **269**(2): p. 337-341.
15. Kasangana, P., Haddad, P., and Stevanovic, T., *Study of polyphenol content and antioxidant capacity of Myrianthus arboreus (Cecropiaceae) root bark extracts*. *Antioxidants*, 2015. **4**(2): p. 410-426.
16. Hartmann, T., *From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism*. *Phytochemistry*, 2007. **68**(22-24): p. 2831-2846.
17. Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Maamri, S., Djireb, F., and Stocker, P., *Phenolic extracts from various Algerian plants as strong inhibitors of porcine liver carboxylesterase*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2006. **21**(6): p. 719-726.
18. Kim, H.-J., Chen, F., Wu, C., Wang, X., Chung, H.Y., and Jin, Z., *Evaluation of antioxidant activity of Australian tea tree (Melaleuca alternifolia) oil and its components*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004. **52**(10): p. 2849-2854.
19. Shareef, M.I., Reddy, P.J.M., Gopinath, S., Dayananda, K., Ajay, R.S., and Mandal, P.K., *Superoxide anion scavenging activity of Carthamustinctorius flower*. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, 2014. **3**(3): p. 10101-10104.
20. Ramasarma, T. and Rao, A.V., *Catalytic activity of superoxide dismutase: A method based on its concentration-dependent constant decrease in rate of autoxidation of pyrogallol*. *Current science*, 2007. **92**(11): p. 1481-1482.
21. Li, H.M., Guo, P., Hu, X., Xu, L., and Zhang, X.Z., *Preparation of corn (Zea mays) peptides and their protective effect against alcohol-induced acute hepatic injury in NH mice*. *Biotechnology and applied biochemistry*, 2007. **47**(3): p. 169-174.
22. Evans, D.H., O'Connell, K.M., Petersen, R.A., and Kelly, M.J. *Cyclic voltammetry*. *Journal of Chemical Education*, 1983. **60** (4), 290

23. Naik, G., Priyadarsini, K., Satav, J., Banavalikar, M., Sohoni, D., Biyani, M., and Mohan, H., *Comparative antioxidant activity of individual herbal components used in Ayurvedic medicine*. *Phytochemistry*, 2003. **63**(1): p. 97-104.
24. Mittal, A., Göke, F., Flint, R., Loveday, B.P., Thompson, N., Delahunt, B., Kilmartin, P.A., Cooper, G.J., MacDonald, J., and Hickey, A., *The redox status of experimental hemorrhagic shock as measured by cyclic voltammetry*. *Shock*, 2010. **33**(5): p. 460-466.
25. Le Bourvellec, C., Hauchard, D., Darchen, A., Burgot, J.-L., and Abasq, M.-L., *Validation of a new method using the reactivity of electrogenerated superoxide radical in the antioxidant capacity determination of flavonoids*. *Talanta*, 2008. **75**(4): p. 1098-1103.
26. Araki, T. and Kitaoka, H., *The mechanism of reaction of ebselen with superoxide in aprotic solvents as examined by cyclic voltammetry and ESR*. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 2001. **49**(5): p. 541-545.
27. Garriga, M., Almaraz, M., and Marchiaro, A., *Determination of reducing sugars in extracts of *Undaria pinnatifida* (harvey) algae by UV-visible spectrophotometry (DNS method)*. *Actas De Ingenieria*, 2017. **3**: p. 173-179.
28. Ademiluyi, A.O., Oboh, G., Boligon, A.A., and Athayde, M.L., *Effect of fermented soybean condiment supplemented diet on α -amylase and α -glucosidase activities in Streptozotocin-induced diabetic rats*. *Journal of Functional Foods*, 2014. **9**: p. 1-9.
29. Moein, S., Pimoradloo, E., Moein, M., and Vessal, M., *Evaluation of antioxidant potentials and α -amylase inhibition of different fractions of labiatae plants extracts: as a model of antidiabetic compounds properties*. *BioMed research international*, 2017. **2017**: p. 1-8.
30. Koolman, J. and Röhm, K.-H., *Color atlas of biochemistry*. 2nd ed, 2005, New York: Thieme Stuttgart.
31. Fukushima, Y., Ohie, T., Yonekawa, Y., Yonemoto, K., Aizawa, H., Mori, Y., Watanabe, M., Takeuchi, M., Hasegawa, M., and Taguchi, C., *Coffee and green tea as a large source of antioxidant polyphenols in the Japanese population*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009. **57**(4): p. 1253-1259.
32. Salman, A.A., El-Aleem, A., Ibrahim, M., Rahman, A.-E., Ahmed, A., Elhusseini, T.S., and El-Hadary, A.A.E., *Protective impacts of *Cupressus sempervirens* leaves extracts against paracetamol hepatotoxicity*. *Benha Veterinary Medical Journal*, 2017. **32**(1): p. 41-49.
33. Al-Snafi, A.E., *Medical importance of *Cupressus sempervirens*-A review*. *IOSR Journal of Pharmacy*, 2016. **6**(6): p. 66-76.
34. Khulbe, K., Verma, U., and Pant, P., *Determination of phytochemicals and in vitro antioxidant of different extracts of himalyan cypress (*cupressus torulosa* d. don) needles*. *Advanced Biological Sciences*, 2016. **6**(2): p. 259-266.
35. Chaudhary, H.J., Shahid, W., Bano, A., Ullah, F., Munis, F., Fahad, S., and Ahmad, I., *In vitro analysis of *Cupressus sempervirens* L. plant extracts antibacterial activity*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2012. **6**(2): p. 273-276.
36. Ben Nouri, A., Dhifi, W., Bellili, S., Ghazghazi, H., Aouadhi, C., Chérif, A., Hammami, M., and Mnif, W., *Chemical composition, antioxidant potential, and antibacterial activity of essential oil cones of Tunisian *Cupressus sempervirens**. *Journal of Chemistry*, 2015. **2015**: p. 1-8.
37. Chaitra, S., Kumar, N.N., Shalini, P., Sindhu, R., and Raj, K.S., *Phytochemical analysis and antibacterial activity of *dalbergia paniculata* roxb.* *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2015. **6**(2): p. 712-716.

38. Rahmani, Z., *Etude de la relation structure-activité antioxydante et antihémolyse des érythrocytes humaines par quelques dithiolethiones et composés phénoliques*. Doctorat, 2015: université d'Ouargla.
39. Jovanovic, S.V., Steenken, S., Tosic, M., Marjanovic, B., and Simic, M.G., *Flavonoids as antioxidants*. Journal of the American Chemical Society, 1994. **116**(11): p. 4846-4851.
40. Muanda, F., Koné, D., Dicko, A., Soulimani, R., and Younos, C., *Phytochemical composition and antioxidant capacity of three malian medicinal plant parts*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2011. **2011**: p. 1-8.
41. Ojeil, A., El Darra, N., El Hajj, Y., Mouncef, P.B., Rizk, T.J., and Maroun, R.G., *Identification et caractérisation de composés phénoliques extraits du raisin chateau KSARA*. Lebanese Science Journal, 2010. **11**(2): p. 117-131.
42. Prior, R.L., Wu, X., and Schaich, K., *Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(10): p. 4290-4302.
43. Barus, C., *Etude électrochimique de molécules antioxydantes et de leur association en milieux homogène et biphasique-Application aux produits dermocosmétiques*. Doctorat, 2008: Université de Toulouse.
44. Zimmermann, M., *Oxygen reduction reaction mechanism on glassy carbon in aprotic organic solvents*. Doctorat, 2015: Université Grenoble Alpes.
45. Vasudevan, D. and Wendt, H., *Electroreduction of oxygen in aprotic media*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 1995. **392**(1-2): p. 69-74.
46. Jain, P. and Lal, S., *Electrolytic reduction of oxygen at solid electrodes in aprotic solvents-the superoxide ion*. Electrochimica Acta, 1982. **27**(6): p. 759-763.
47. Izutsu, K., *Electrochemistry in nonaqueous solutions*. 2002: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
48. Laoire, C.O., Mukerjee, S., Abraham, K., Plichta, E.J., and Hendrickson, M.A., *Elucidating the mechanism of oxygen reduction for lithium-air battery applications*. The Journal of Physical Chemistry C, 2009. **113**(46): p. 20127-20134.
49. Hu, J., Calomme, M., Lasure, A., De Bruyne, T., Pieters, L., Vlietinck, A., and Berghe, D.V., *Structure-activity relationship of flavonoids with superoxide scavenging activity*. Biological trace element research, 1995. **47**(1-3): p. 327-331.
50. Rguez, S., Essid, R., Adele, P., Msaada, K., Hammami, M., Mkadmini, K., Fares, N., Tabbene, O., Elkahoui, S., and Portelli, D., *Towards the use of Cupressus sempervirens L. organic extracts as a source of antioxidant, antibacterial and antileishmanial biomolecules*. Industrial crops and products, 2019. **131**: p. 194-202.
51. Rice-Evans, C., *Flavonoid antioxidants*. Current medicinal chemistry, 2001. **8**(7): p. 797-807.
52. Khoudali, S., Essaqui, A., Zertoubi, M., Azzi, M., and Benaissa, M., *Étude de l'activité antioxydante et de l'action anti corrosion de l'extrait méthanolique des feuilles du palmier nain (chamaerops humilis l.) du maroc*. Materials and Environmental Science, 2014. **5**(3): p. 887-898.
53. de Gaulejac, N.S.-C., Glories, Y., and Vivas, N., *Free radical scavenging effect of anthocyanins in red wines*. Food Research International, 1999. **32**(5): p. 327-333.
54. Shahidi, F. and Ambigaipalan, P., *Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review*. Journal of Functional Foods, 2015. **18**: p. 820-897.
55. Procházková, D., Boušová, I., and Wilhelmová, N., *Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids*. Fitoterapia, 2011. **82**(4): p. 513-523.

56. Pietta, P.-G., *Flavonoids as antioxidants*. Journal of natural products, 2000. **63**(7): p. 1035-1042.
57. Lo Piparo, E., Scheib, H., Frei, N., Williamson, G., Grigorov, M., and Chou, C.J., *Flavonoids for controlling starch digestion: structural requirements for inhibiting human α -amylase*. Journal of medicinal chemistry, 2008. **51**(12): p. 3555-3561.
58. Zajácz, Á., Gyémánt, G., Vittori, N., and Kandra, L., *Aleppo tannin: structural analysis and salivary amylase inhibition*. Carbohydrate research, 2007. **342**(5): p. 717-723.
59. Barrett, A., Ndou, T., Hughey, C.A., Straut, C., Howell, A., Dai, Z., and Kaletunc, G., *Inhibition of α -amylase and glucoamylase by tannins extracted from cocoa, pomegranates, cranberries, and grapes*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013. **61**(7): p. 1477-1486.
60. Tadera, K., Minami, Y., Takamatsu, K., and Matsuoka, T., *Inhibition of α -glucosidase and α -amylase by flavonoids*. Journal of nutritional science and vitaminology, 2006. **52**(2): p. 149-153.
61. Icoz, U.G., Orhan, N., Altun, L., and Aslan, M., *In vitro and in vivo antioxidant and antidiabetic activity studies on standardized extracts of two Bidens species*. Journal of food biochemistry, 2017. **41**(6): p. e12429.
62. Kandra, L., Gyémánt, G., Zajácz, Á., and Batta, G., *Inhibitory effects of tannin on human salivary α -amylase*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004. **319**(4): p. 1265-1271.

CHAPITRE IV :
Séparation,
Purification et
Élucidation
Structurale

IV.1. Récolte et séchage du matériel végétal

L'espèce de *C. sempervirens* a été récoltée en avril 2018 dans la région d'Ouargla. Le matériel végétal fraîchement récolté est séché, broyé et conservé à l'abri de la lumière, de l'humidité et de la chaleur.

IV.2. Extraction

Nous avons procédé à l'extraction des principes actifs de 1,165 Kg de la plante sèche (les feuilles) par macération avec l'éther du pétrole (3L) afin d'éliminer les graisses, les cires et les chlorophylles. Après la filtration et le séchage, la plante à macérer dans un mélange méthanol/eau (70/30 : V/V) pendant 4 x 24 heures. L'extrait obtenu est concentré puis dilué avec l'eau distillée (400-600 ml pour 1 Kg de matière sèche). Après filtration, la solution aqueuse est épuisée successivement par l'éther de pétrole, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et enfin par le n-butanol selon le protocole ci-dessous (Figure IV.1).

Les résultats d'extraction de chaque partie de la plante sont enregistrés dans le tableau IV.1.

Tableau IV.1 : Résultat de l'extraction des feuilles

Matériel végétal	Extrait	Masse (g)	Rendement (%)
Feuilles de <i>C. Sempervirens</i> (1163.8 g)	CH ₂ Cl ₂	1,0145	0,087
	AcOEt	3,437	0,295
	n-BuOH	40	3,437

IV.3. Séparation chromatographique et identification du produit isolé

Nous avons trouvé dans la plupart des activités réalisées dans ce travail que la fraction d'acétate d'éthyle est la plus efficace, donc cette partie a été choisie pour séparer ses composés actifs.

Nous avons effectué plusieurs tests sur différents systèmes de solvants, en utilisant le gel de silice comme phase stationnaire pour chercher un système d'élution convenable, à la fin de cette procédure le système de CH₂Cl₂/CH₃OH a été choisi (tableau IV.2).

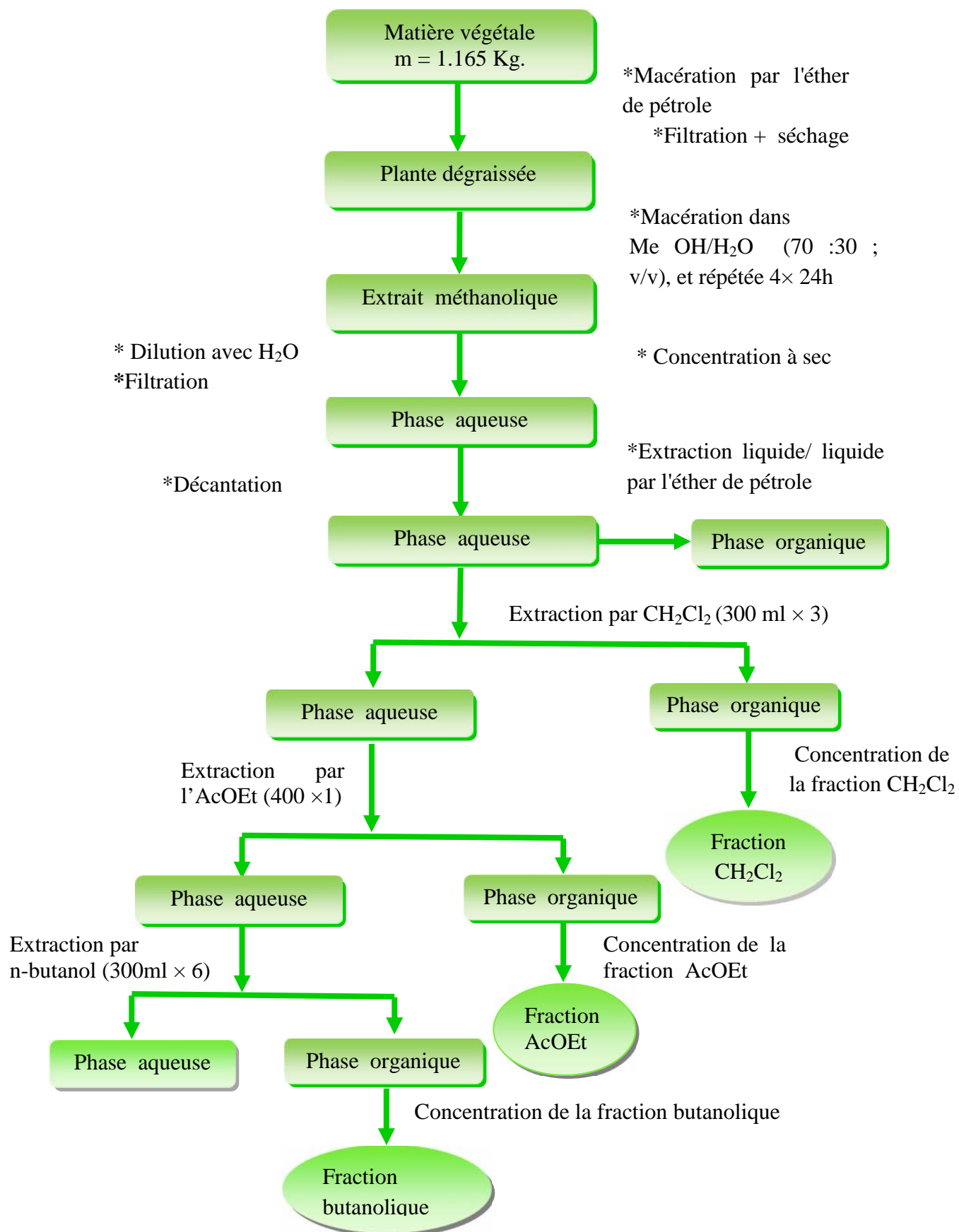


Figure IV.1 : Protocole d'extraction

Tableau IV.2 : Tests préliminaires de système utilisé

systèmes		Nombre de spot
Ether de pétrole / acétate d'éthyle / acide formique	40/60/1	4
Toluène / acétone / acide formique	30/25/5	3
Chloroforme / méthanol / acide acétique	90/10/1	5
Acétate d'éthyle / acide acétique	20/4	2
Toluène / acétone / acide formique	30/60/10	2
Chloroforme/ acétate d'éthyle / acide acétique	50/60/1	4

L'extrait d'acétate d'éthyle est soumis à des fractionnements successifs par différentes méthodes chromatographiques conduisant à l'isolement des produits purs. Dans cette première étape, nous avons soumis cet extrait à une chromatographie d'adsorption sur colonne de gel de silice 60 (70-230 mesh), préparée dans le dichlorométhane.

3,437 g de l'extrait sont dissous dans le CH₃OH puis additionnés à quelques grammes de gel de silice puis évaporé à sec afin d'obtenir un solide sous forme de poudre. Le mélange est déposé sur une colonne de gel de silice, éluée avec le dichlorométhane et un gradient croissant CH₃OH jusqu'à 100%.

Des fractions de 15 ml sont recueillies et analysées par chromatographie sur couche mince CCM, les plaques sont examinées sous UV (Figure IV.2). Les fractions similaires sont réunies, évaporées et pesées, donnant ainsi 3 fractions.

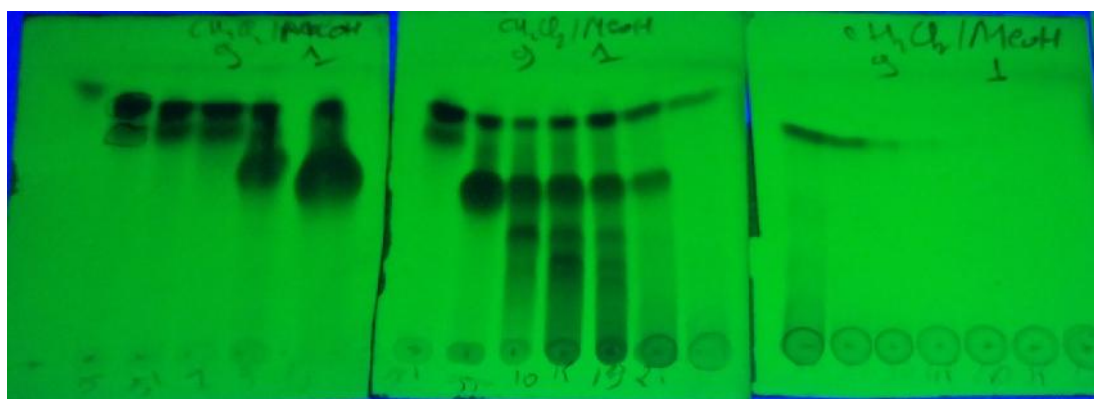


Figure IV.2 : Suivi de la colonne mère par CCM

Les résultats de l'opération sont regroupés dans le tableau IV.3.

Tableau IV.3 : Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait d'acétate d'éthyle de *Cupressus sempervirens* L.

Fractions collectées	Nom de la fraction	Eluant : CHCl ₃ /MeOH	Masse (mg)	Observations
1-2	Fr1	90/10-85/15	248,2	Deux taches
3-6	Fr 2	80/20-70/30	299,6	Mélange séparable
7-30	Fr 3	75/25-30/70	892,9	Mélange séparable

IV.3.1. Fractionnement de la fraction Fr 2

Cette fraction soumise à une chromatographie sur colonne de gel de silice, l'élution a été réalisée par le dichlorométhane et un gradient croissant CH₃OH jusqu'à 100%. Les sous fractions collectées sont testées par CCM (Figure IV.3).

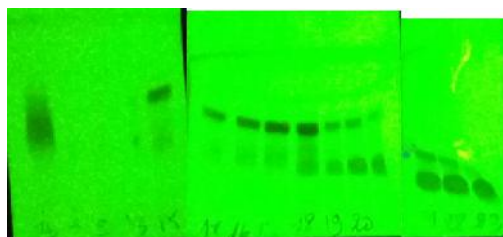


Figure IV.3 : Suivi de fraction Fr 2 par CCM.

Les sous fractions **15 à 17** (27,6 mg) combinées et séparées sur colonne en polyamide en utilisant comme éluant le système de solvant Toluène /MeOH. Les deux sous fractions (**15-24**) (111,2 mg) et (**25-29**) (84,4 mg) sont purifiées avec une colonne en séphadex LH20. La séparation a donné les produits suivants : **A1** (m=9,4 mg) et **A2** (m= 84,3 mg), le premier composé c'est un poudre à couleur jaune et l'autre à cristaux blancs qui donne avec le révélateur (Solution de vanilline à 0,5% (p / v) préparée dans HCl à 4% (p / v)) un couleur cramoisi (figure IV.4.)



Figure IV.4 : Produits isolés

IV.3.2. Fractionnement de la fraction Fr 3

La fraction **Fr 3** c'est une fraction très complexe, elle est composée de deux produits isolés précédemment à partir de **Fr 2** (A1-A2) et d'autres produits.

Fr 3 (m=892,9 mg) ont été mis à séparer sur colonne en gel de silice en utilisant un gradient de solvant composé de dichlorométhane et un gradient croissant CH₃OH jusqu'à 100%. Les sous fractions collectées sont testées par CCM (Figure IV.5).

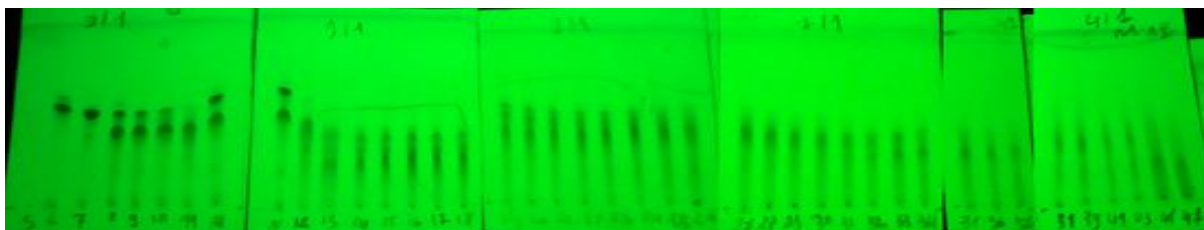


Figure IV.5 : Suivi de fraction **Fr 3** par CCM

Les sous fractions (**Fr 6-7**) ont été combinées et purifiées en donnant le produit (**A1**) et les sous fractions (**Fr 8-11**) ont été combinées et purifiées en donnant de deux produits (**A1**), (**A2**).

Les sous fractions (**Fr 12 - 28**) combinées et séparées sur colonne en gel de silice en utilisant un gradient de solvant composé d'AcOEt et MeOH avec les proportions suivantes: 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1 5:1, 1:1. Les sous fractions collectées sont testées par CCM (Figure IV.6).

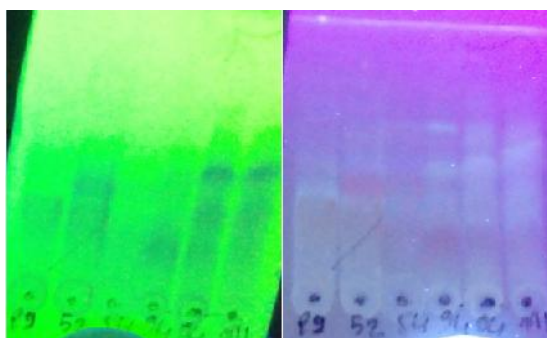


Figure IV.6 : Suivi des sous fractions (**Fr 12 - 28**) par CCM

Les sous fractions (**Fr 94-119**) (**56,9 mg**) sont purifiées avec une colonne en séphadex LH-20 pour obtenir le produit (**A4**) (**13,3mg**).

Pour les sous fractions (**Fr 29-48**) combinées et séparées sur colonne en gel de silice en utilisant un gradient de solvant composé de CH_2Cl_2 et AcOEt avec les proportions suivantes : 30 : 1, 25 : 1, 20 : 1, 15 : 1, 10 : 1, 5 : 1, 1 : 1, 1 : 2, 1 : 3, 1 : 4 et 100% AcOEt puis par AcOEt et MeOH avec les proportions suivantes : 15 : 1, 10 : 1, 5 : 1 et 1 : 1. Les sous fractions collectées sont testées par CCM (Figure IV.7).

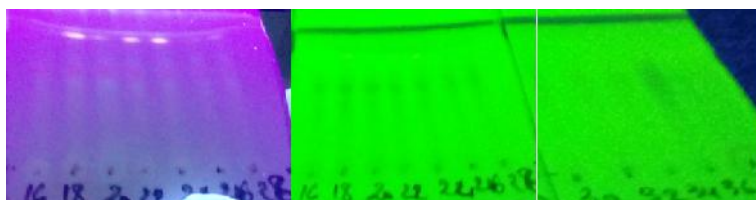


Figure IV.7 : Suivi des sous fractions (**Fr 29-48**) par CCM

Les sous fractions (**Fr 16-28**) sont purifiées avec une colonne en séphadex pour obtenir le produit (**A3**).

En plus, pour obtenir la plus grande quantité de composé (**A3**), nous avons utilisé la méthode de séparation sur une plaque CCM préparative à partir des autres sous fractions qui contiennent ce composé, l'éluion a été réalisée par un système composé de (CH_2Cl_2 /AcOEt/MeOH avec la proportion suivante (5:5:1), on a répété la migration 7 fois jusqu'à l'observation sous la lampe UV, des bandes bien séparées (Figure IV.8).

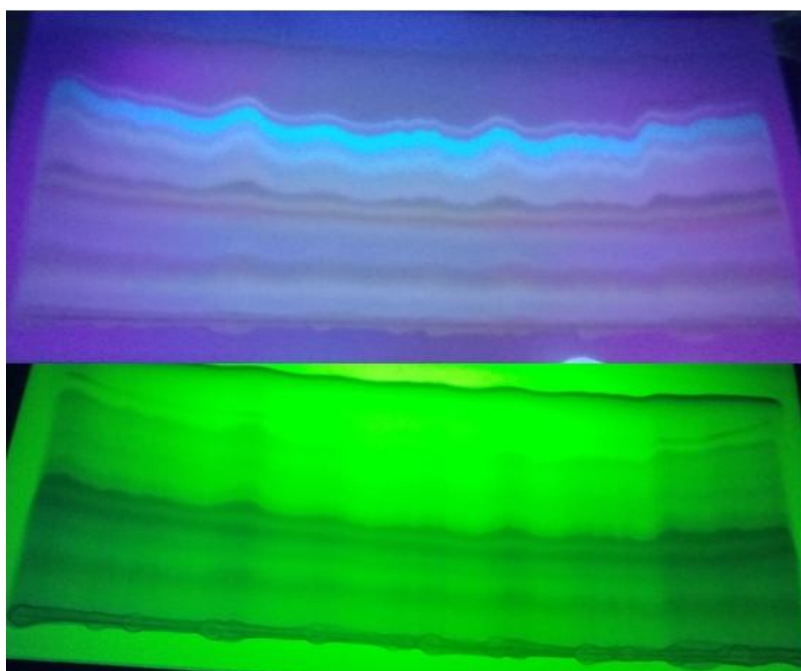


Figure IV.8 : Plaque CCM après 6^{ème} migration

La figure IV.9 illustre les différentes étapes de séparation la fraction acétate d'éthyle.

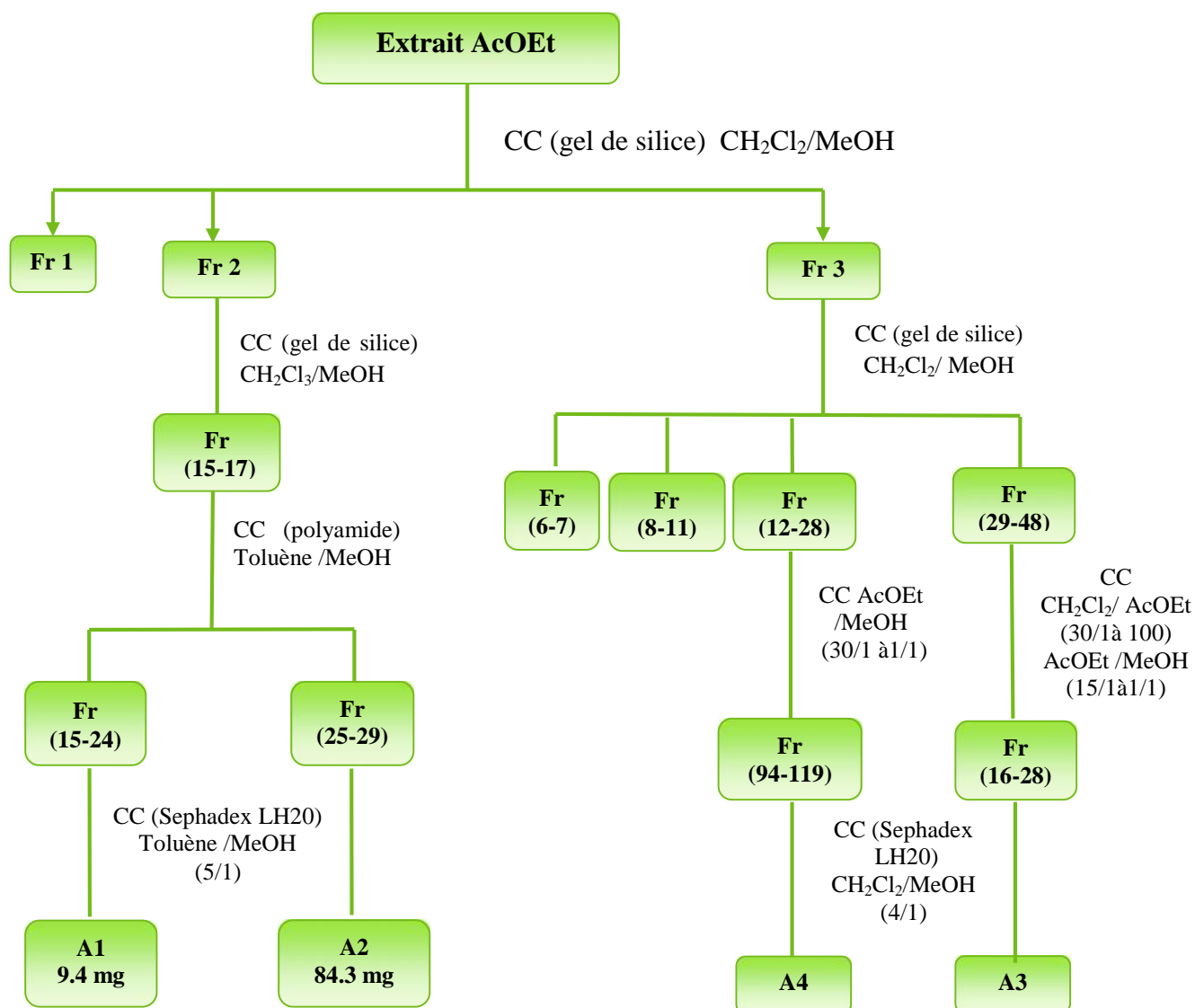


Figure IV.9 : Fractionnement et isolement des métabolites secondaires de l'extrait acétate d'éthyle

IV.4. Elucidation structurale des composés isolés

IV.4.1. Composé A2 :

Le composé A2 se présente sous forme de cristaux blancs soluble dans le méthanol. Le spectre RMN proton enregistré avec le CD₃OD à 400 MHz (Figure IV.10) montre six signaux. Les signaux caractéristiques, pour les protons du cycle aromatique d'un flavonoïde à faible champ.

* Les signaux de protons aromatiques méta-couplés à 5,95 ppm (*d*, $J = 2,0$ Hz, H-8) et 5,88 ppm (*d*, $J = 2,0$ Hz, H-6) indiquant la bi-substitution du cycle "A".

* Des signaux aromatiques à 6,86 ppm (*d*, $J = 1,6$ Hz, H-2), 6,78 ppm (*d*, $J = 8$ Hz, H-5) et 6,73 ppm (*dd*, $J = 8,4, 1,6$ Hz, H-6) correspondant à un anneau "B".

* La présence d'un pic sous forme de doublet à 4,47 ppm (*d*, $J = 6,4$ Hz, H-2) et un pic sous forme multiplet à 3,88 ppm (*m*, $J_{3,4b} = 5.2$ Hz, $J_{3,2} = 7,6$ Hz, $J_{3,4a} = 8$ Hz H-3), les pics sous forme doublet de doublet à 2,75 ppm (*dd*, $J = 16,4-5,6$ Hz, H-4a) et 2,49 ppm (*dd*, $J = 16,4- 8,4$ Hz, H-4b) attribuable au cycle "C".

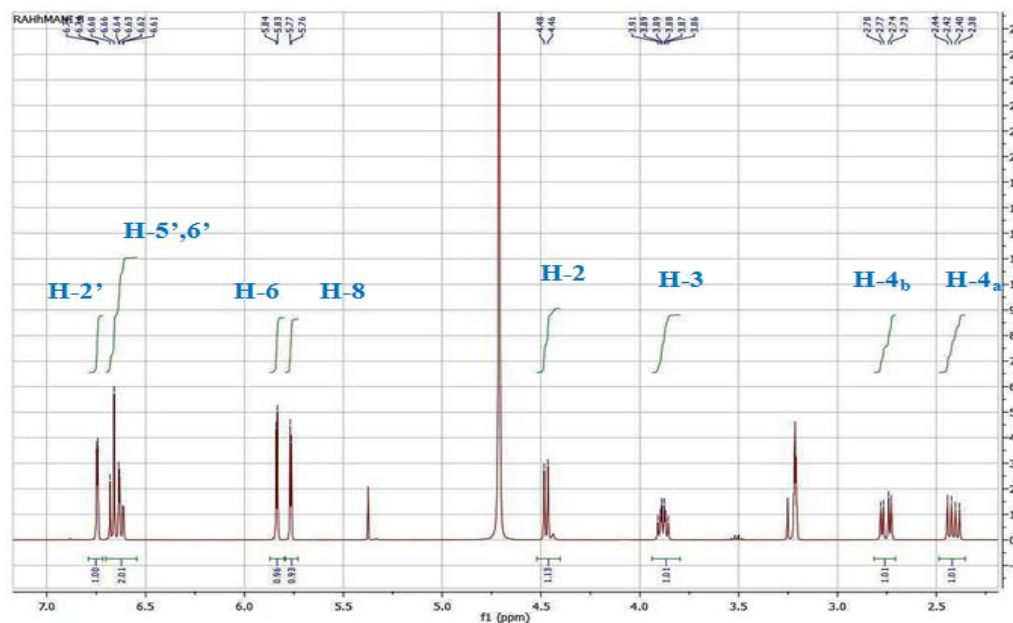


Figure IV.10 : Spectre RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) du composé A2

D'après le spectre RMN ¹³C (Figure IV.11) on distingue 15 signaux de carbones comme les suivants :

δ 81,49 ppm (C-2), 67,42 ppm (C-3), 27,1 ppm (C-4), 155,5 ppm (C-5), 94,94 ppm (C-6), 156,4 ppm (C-7), 94,17 ppm (C-8), 156,16 ppm (C-9), 99,47 (C-10), 130,83 ppm

(C-1), 113,89 ppm (C-2), 144,86 ppm (C-3), 144,82 ppm (C-4), 114,75 ppm (C-5) et 118,68 ppm (C-6).

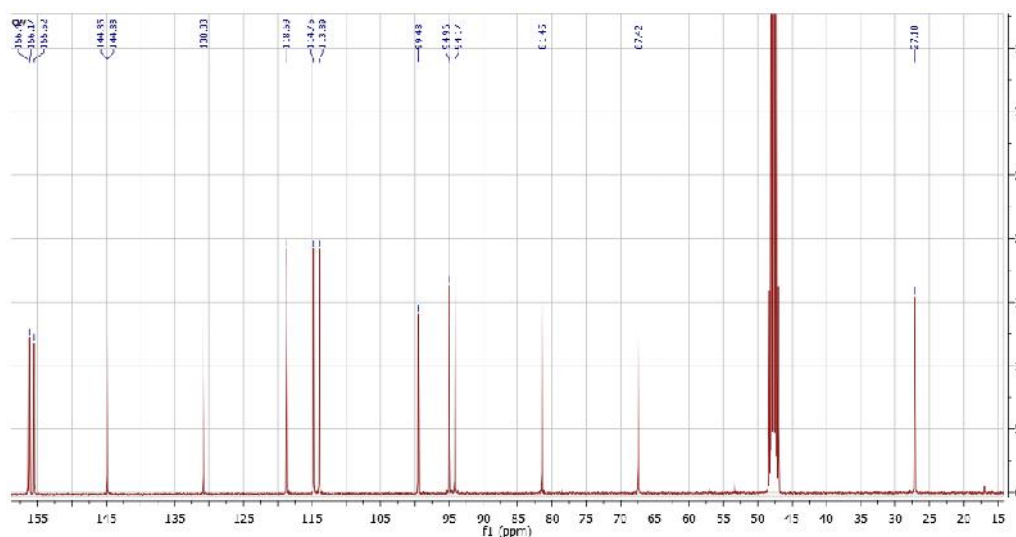


Figure IV.11 : Spectre RMN ^{13}C (400 MHz, CD_3OD) du composé A2

Le spectre DEPT 135 (Figure IV.12) permet de recenser :

La présence d'un seul (CH_2) et sept groupements (CH) et sept groupements (C). Ce qui fait en tout 15 carbones.

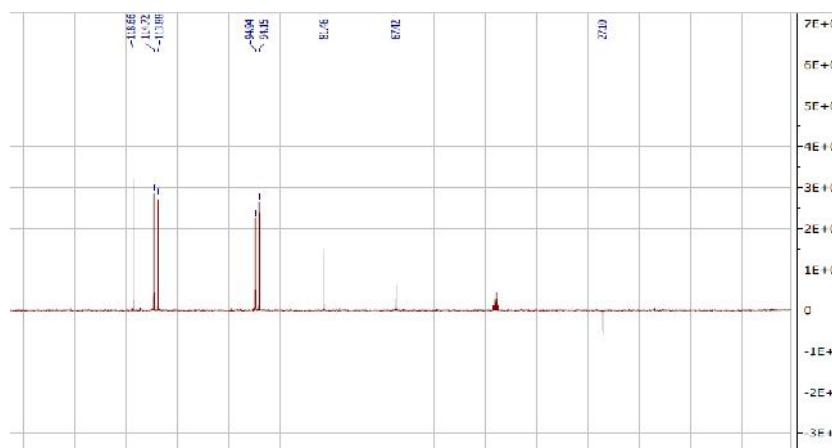


Figure IV.12 : Spectre DEPT 135 du composé A2

Selon l'expérience HSQC (Figure IV.13), on attribue pour chaque carbone son proton correspondant :

- entre C-2 (81,48 ppm) et H-2(4,47 ppm)
- C-3 (67,42) et H-3 (3,88)
- C-4 (27,1) et H-4(2,75- 2,49)
- C-6 (94,94) et H-6 (5,88)
- C-8 (94,17) et H-8(5,95)
- C-2' (113,89) et H-2' (6,86)
- C-5' (114,75) et H-5'(6,78)
- C-6' (118,68) et H-6'(6,73)

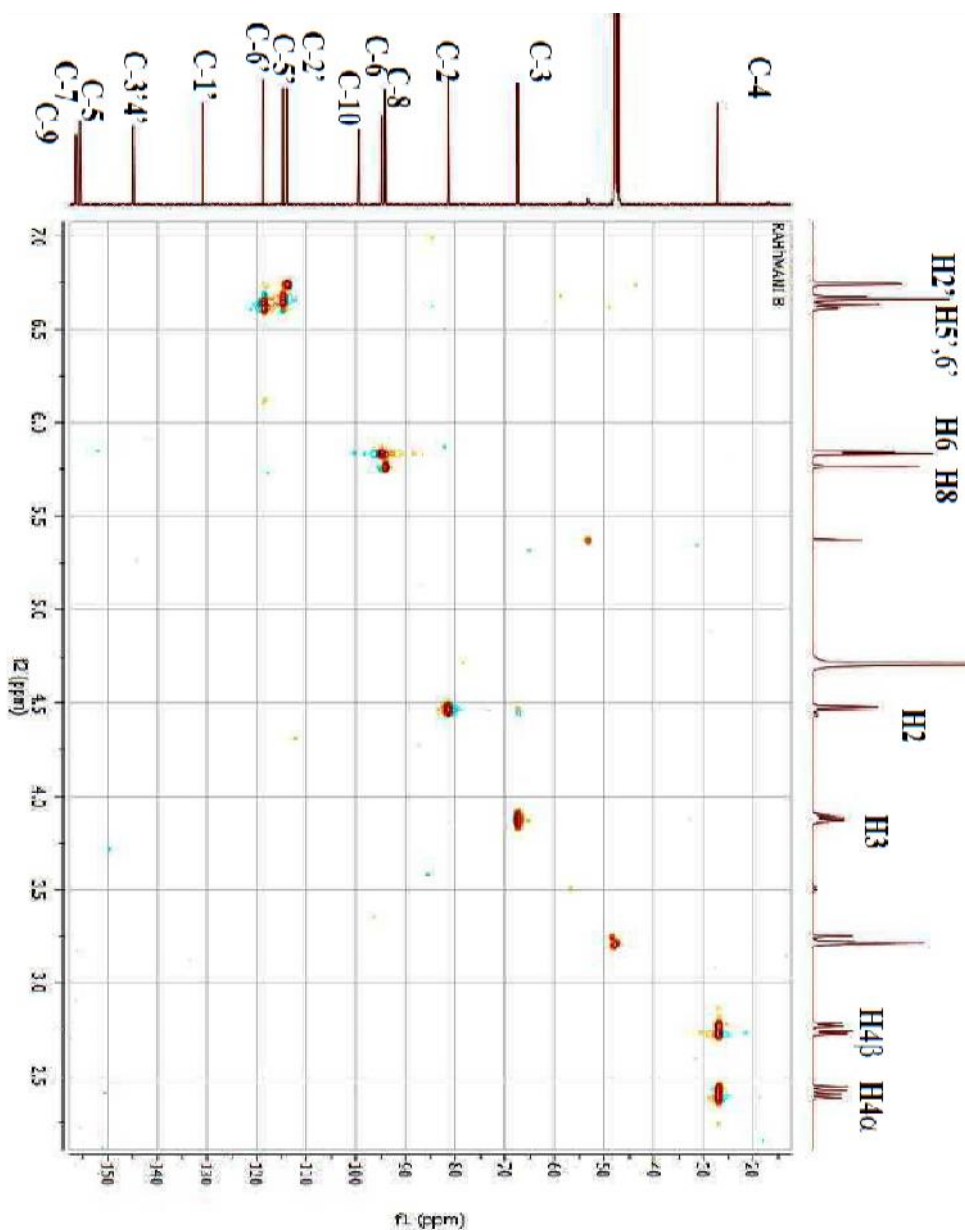


Figure IV.13 : Spectre HSQC (400MHz, CD₃OD) du composé A2

En assemblant tous ces données, on obtient la structure partielle représentée dans la figure IV.14 :

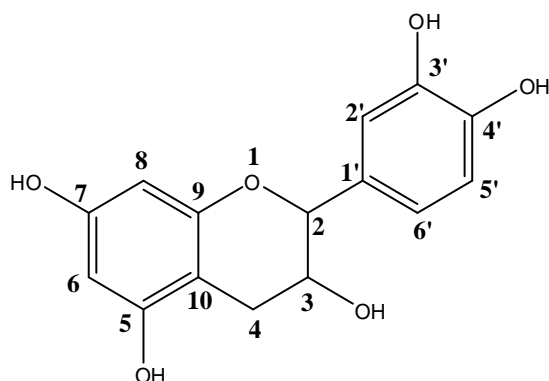


Figure IV.14 : Structure partielle de A2

D'après la littérature le composé A2 est identifié comme étant catéchine (Figure IV.15). On confirme la structure d'A2 d'après le signal de H-2 qui apparaît sous forme doublet à 4,47 ppm (d , $J = 6,4$ Hz, H-2), tandis que chez l'épicatéchine ce signal est apparait sous forme d'un singulier à 4,86 ppm (s) [1].

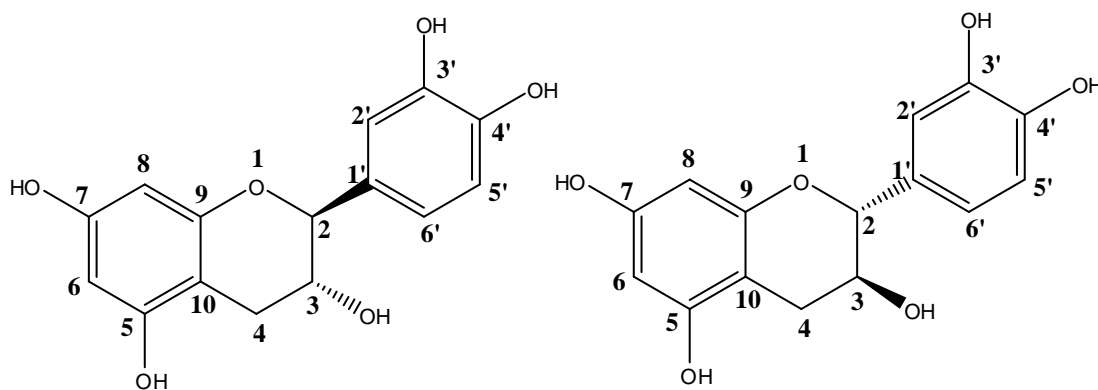


Figure V.15 : Structure du composé A2 (catéchine)

L'expérience HMBC (Figure IV.16 et 17) présente les corrélations suivantes :

C-2 (81,48 ppm) montre quatre taches de corrélations avec

- H-4b et H-4a (2,47 ppm et 2,75 ppm).
- H-3 (3,88 ppm).
- H- 6' (6,73 ppm).
- H- 2' (6,86 ppm).

C-3 (67,4 ppm) montre deux taches de corrélations avec

- H-4b et H-4a (2,47 ppm et 2,75 ppm).
- H-2 (4,47 ppm).

C-4 (27,1 ppm) montre deux taches de corrélations avec

- H-2 (4,47 ppm).
- H-3 (3,88 ppm).

C-6 (94,94 ppm) montre une tache de corrélations avec

- H-8 (5,95 ppm).

C-8 (94,17 ppm) montre une tache de corrélations avec

- H-6 (5,88 ppm).

C-2' (113,89 ppm) montre deux taches de corrélations avec

- H-4 (4,47 ppm).
- H-6' (6,73 ppm).

C-5' (114,75 ppm) montre une tache de corrélations avec

- H-6' (6,73 ppm).

C-6' (118,68 ppm) montre trois taches de corrélations avec

- H-2 (4,47 ppm).
- H-5' (6,78 ppm).
- H-2' (6,86 ppm).

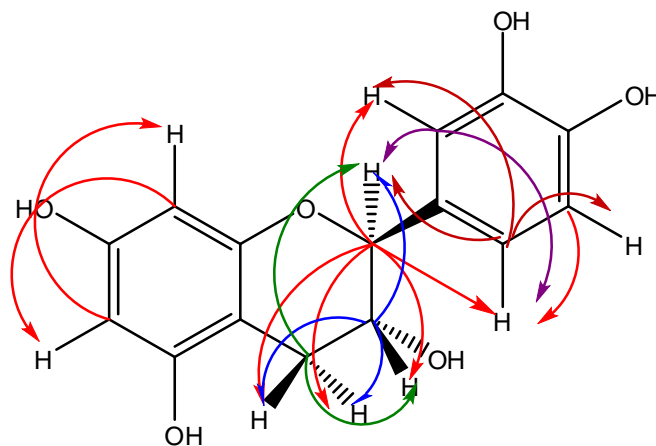


Figure IV.16 : Corrélations HMBC du composé A2

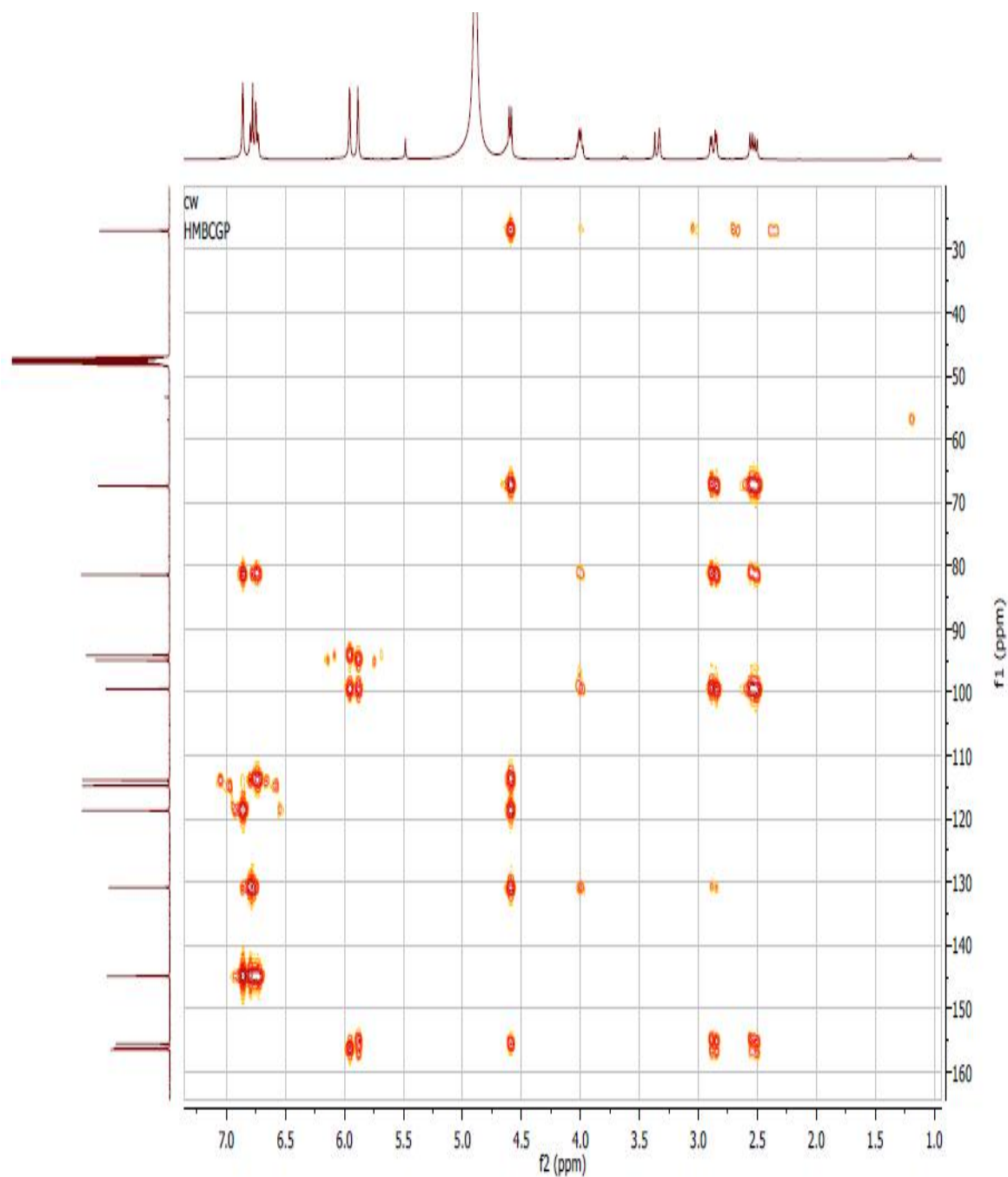


Figure IV.17 : Spectre HMBC (400 MHz, CD₃OD) du composé A2

Les valeurs de déplacement chimique du RMN ¹H et du RMN ¹³C (tableau IV.4) sont identiques avec celles trouvées dans la littérature [1-4].

Tableau IV.4 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (400MHz) et RMN ^{13}C (400 MHz) dans CD_3OD du composé A2 (en ppm et J en Hz)

position	(C) ppm	(H) ppm J Hz	DEPT
2	81,49	4,47 d 6,4	CH
3	67,42	3,88 m 5,2- 7,6- 8	CH
4	27,1	2,75 dd 16,4-5,6	CH ₂
		2,49 dd 16,4- 8,4	
5	155,5		C
6	94,94	5,88 d 2	CH
7	156,4		C
8	94,17	5,95 d 2	CH
9	156,16		C
10	99,47		C
1'	130,83		C
2'	113,89	6,86 d 1,6	CH
3'	144,86		C
4'	144,82		C
5'	114,75	6,78 d 8	CH
6'	118,68	6,73 dd 8,4-1,6	CH

D'après les informations obtenues des différents spectres RMN, le composé A2 est proposé d'être la catéchine. Elle présente deux centres chiraux, donc la possibilité de (+) ou (-) catéchine est présente.

La mesure du pouvoir rotatoire du composé A2 a fourni $[\alpha]_D = +14,33$, cette valeur est compatible avec celles trouvées dans la littérature [1, 2, 5]. A partir de ces résultats, nous pouvons être confirmé que le composé A2 est la (+) catéchine¹

1

Spectroscopie UV- Visible d'A2

Les flavonoïdes présentent deux pics d'absorption majeurs, la bande I (328 à 385 nm) et la bande II (240 à 280 nm). Ces bandes sont associées respectivement au système cinnamyle du cycle "B" qui résulte de la conjugaison du groupement carbonyle avec la double liaison C2-C3 et le noyau "B", elle donne donc, des renseignements sur les variations structurales du cycle "B" et l'hétérocycle "C" et au système benzoyle du cycle "A" qui dérive de la conjugaison du groupement carbonyle avec le noyau "A" et donne des informations sur les variations structurales des cycles [6]

La fluorescence mauve foncé du produit A2 sous la lumière UV-Visible (365nm), indique que ce composé est une flavanole.

Les flavanols présentent une absorbance maximale à des longueurs d'onde non spécifiques comprises entre 270 et 290 nm [7]. A la lumière de cet information, nous peut interpréter le spectre UV de l'A2 qui a été obtenu en solution alcoolique, ce spectre comprend une seule bande à 280 nm qui est attribuée à la bande II, ce qui indique l'absence de groupe carbonyle dans le composé A2 qui est différent des structures flavonols et des flavones (Figure IV.18)

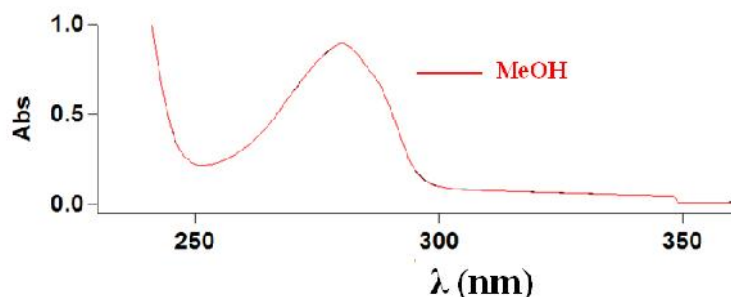


Figure IV.18: Spectre UV- Visible de composé A2

IV.4.2. Composé A3 :

Le composé A3 a été obtenu sous forme des cristaux Jaunes pâles. Son spectre RMN ^1H (Figure IV.19), enregistré dans CD_3OD , montre des signaux dans la région aromatique correspondants à des protons de squelette glycoside flavonoïde :

- L'apparition d'un signal sous forme d'un doublet d'intégration 1 H à $\delta = 4,95$ ppm ($J = 6,8$ Hz) attribuable au proton anomérique du sucre H-1''.
- La présence d'un pic sous forme de singulet dans la région faible à $\delta = 6,58$ ppm attribuable au H-3 du cycle "C"
- Des pics à $\delta = 6,82$ ppm (2H, d , $J = 8,8$ Hz, H-3', H-5'), $\delta = 7,79$ ppm (2H, d , $J = 8,8$ Hz, H-2', H-6') sont assignables à quatre protons aromatiques caractéristiques pour un anneau "B" 4-substitué.
- Deux signaux à $\delta = 6,41$ (1H, d , $J = 2$ Hz, H-6) et $\delta = 6,73$ ppm (1H, d , $J = 2$ Hz, H-8), indiquant la bisubstitution du cycle "A".
- L'apparition des signaux entre $\delta = 3,84$ et $3,2$ ppm indiquent la présence d'un sucre lié à la 5,4'-dihydroxyflavone par le carbone 7.

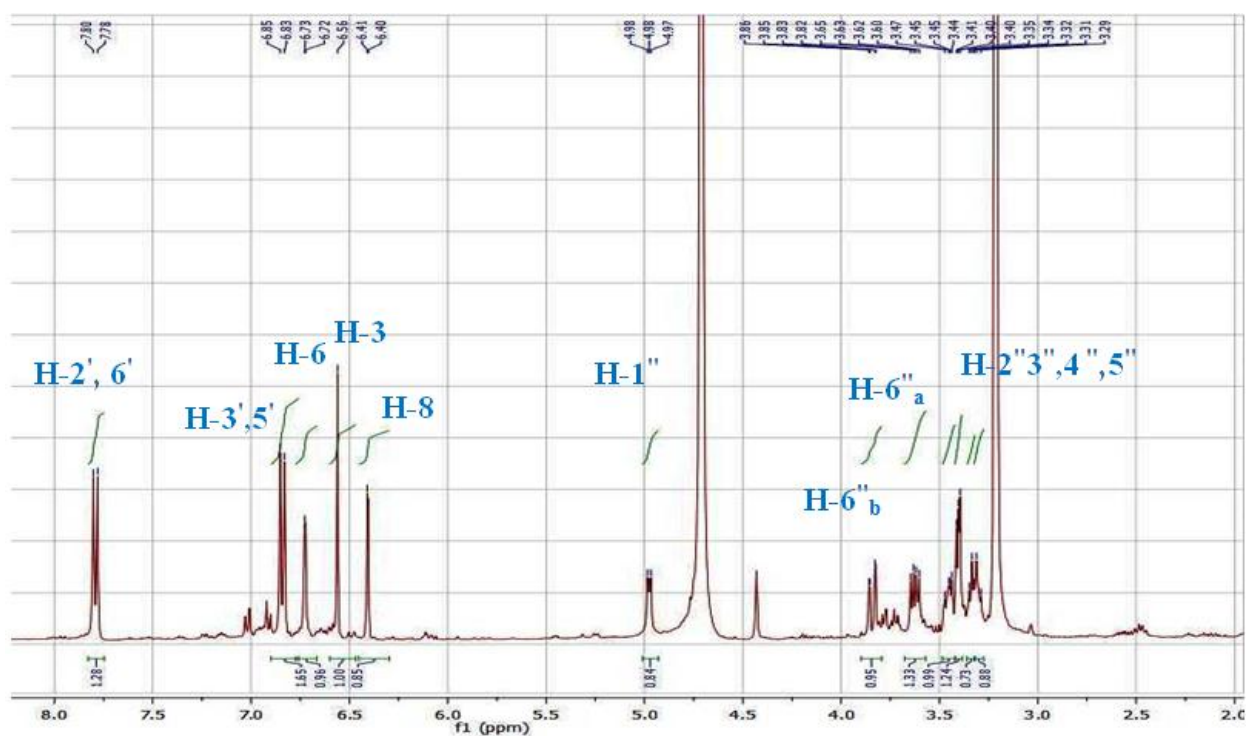


Figure IV.19 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) du composé A3

Le spectre RMN ^{13}C (Figure IV.20) a démontré 19 signaux de carbones suivants :

- Les pics à $\delta = 100,27$ ppm (C-1'') et à $73,35$ ppm (C-2''), $77,01$ ppm (C-3''), $69,9$ ppm (C-4'') ppm, $76,48$ ppm (C-5'') et à $61,097$ ppm (C-6'') correspond au glucose.
- Les pics $\delta = 94,7$ ppm (C-8) et à $99,81$ ppm (C-6) qui ont été attribuées au cycle "A".
- Les signaux apparaissent à $\delta = 115,65$ ppm (C-3',5') et $128,23$ ppm (C-2',6') ont été attribués au cycle "B".
- Le signal observé à $\delta = 102,76$ ppm (C-3) correspond au cycle "C".
- Les pics à $\delta = 105,7$ ppm (C-10), $121,72$ ppm (C-1'), $157,59$ ppm (C-9), $161,50$ ppm (C-4'), $161,52$ ppm (C-5), $163,43$ ppm (C-7), $165,39$ ppm (C-2) et $182,7$ ppm (C-4) qui ont été attribuées au les carbones quaternaires.

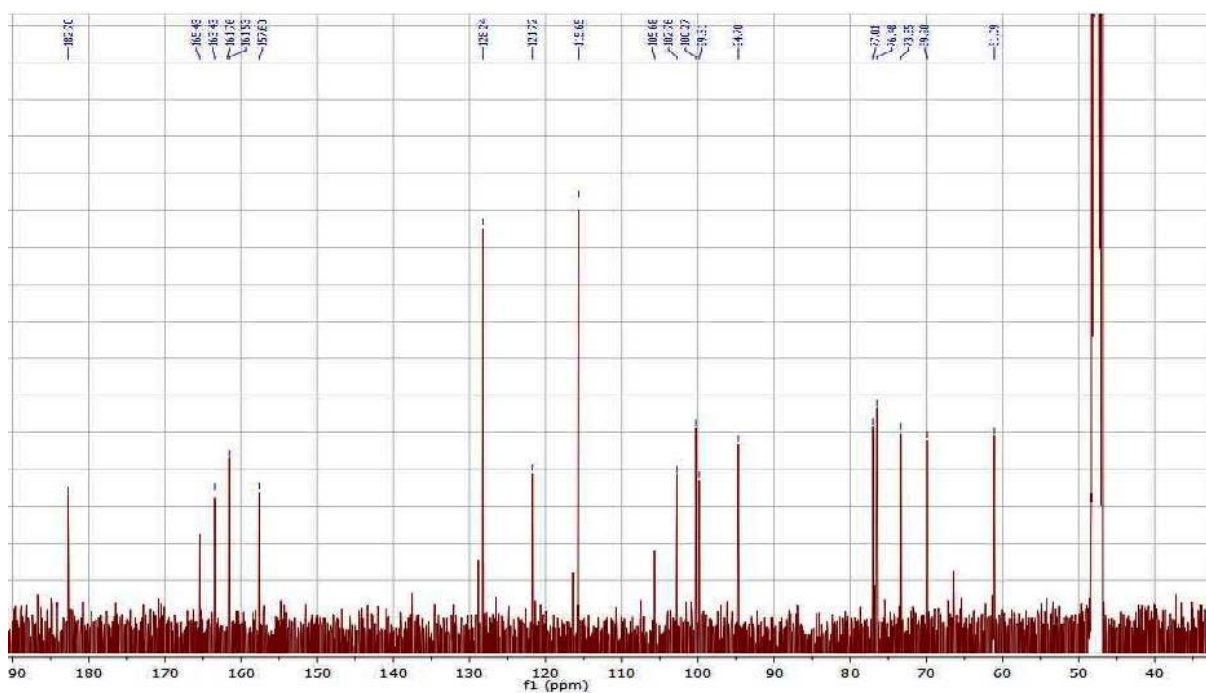


Figure IV.20 : Spectre RMN ^{13}C (400 MHz, CD_3OD) du composé A3

Les séquences DEPT (Figure IV.21) permettent de recenser :

L'apparition d'un seul (CH_2) et dix groupements (CH) et huit groupements (C). Ce qui fait en tout 19 carbones.

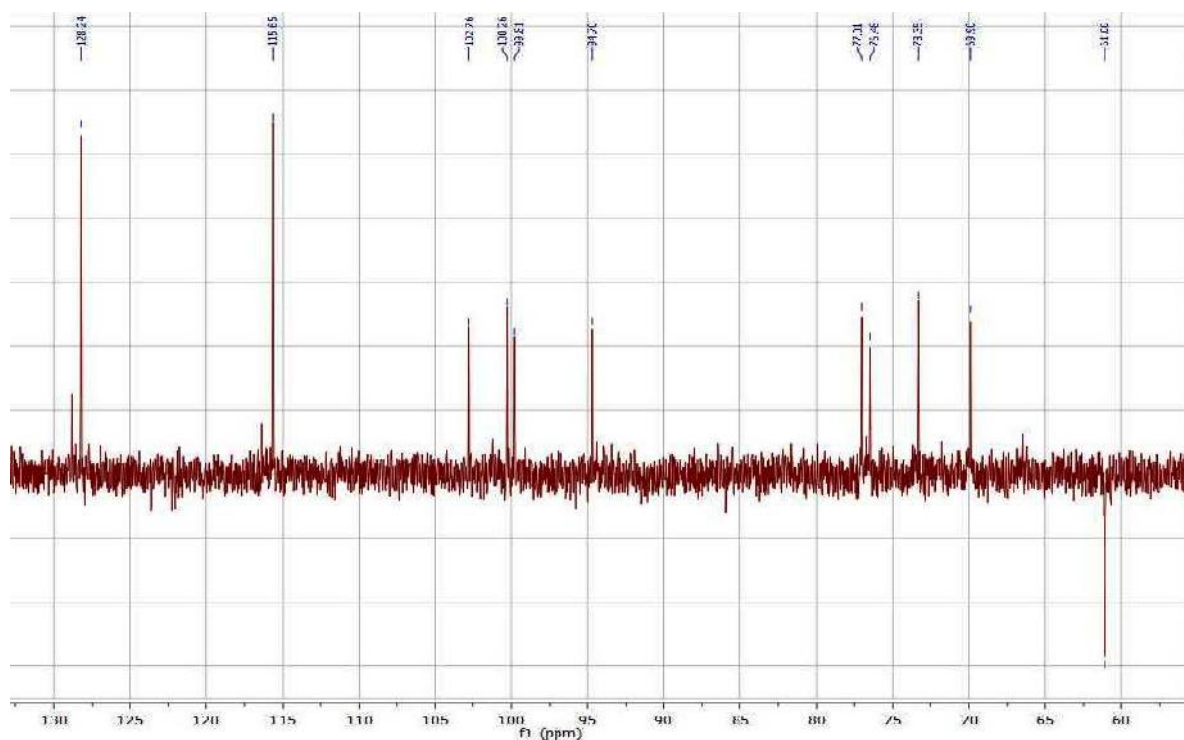


Figure IV.21 : Spectre DEPT 135 du composé A3

Selon l'expérience HSQC (Figure IV.22), on attribue pour chaque carbone son proton correspondant :

- entre C-3 (102,76) et H-3 (6,58)
- C-6 (99,81) et H-6 (6,4)
- C-8 (94,7) et H-8(6,71)
- C-2', 6' (128,23) et H-2', 6' (7,8)
- C-5', 3' (115,65) et H-5',3' (6,82)
- C-1'' (100,27) et H-1''(4,95)
- C-2'' (73,35) et H-2''(3,39)
- C-3''(77,013) et H-3''(3,45)
- C-4''(69,9) et H-4''(3,32)
- C-5''(76,48) et H-5''(3,4)
- C-6''(61,097) et H-6''(3,62)

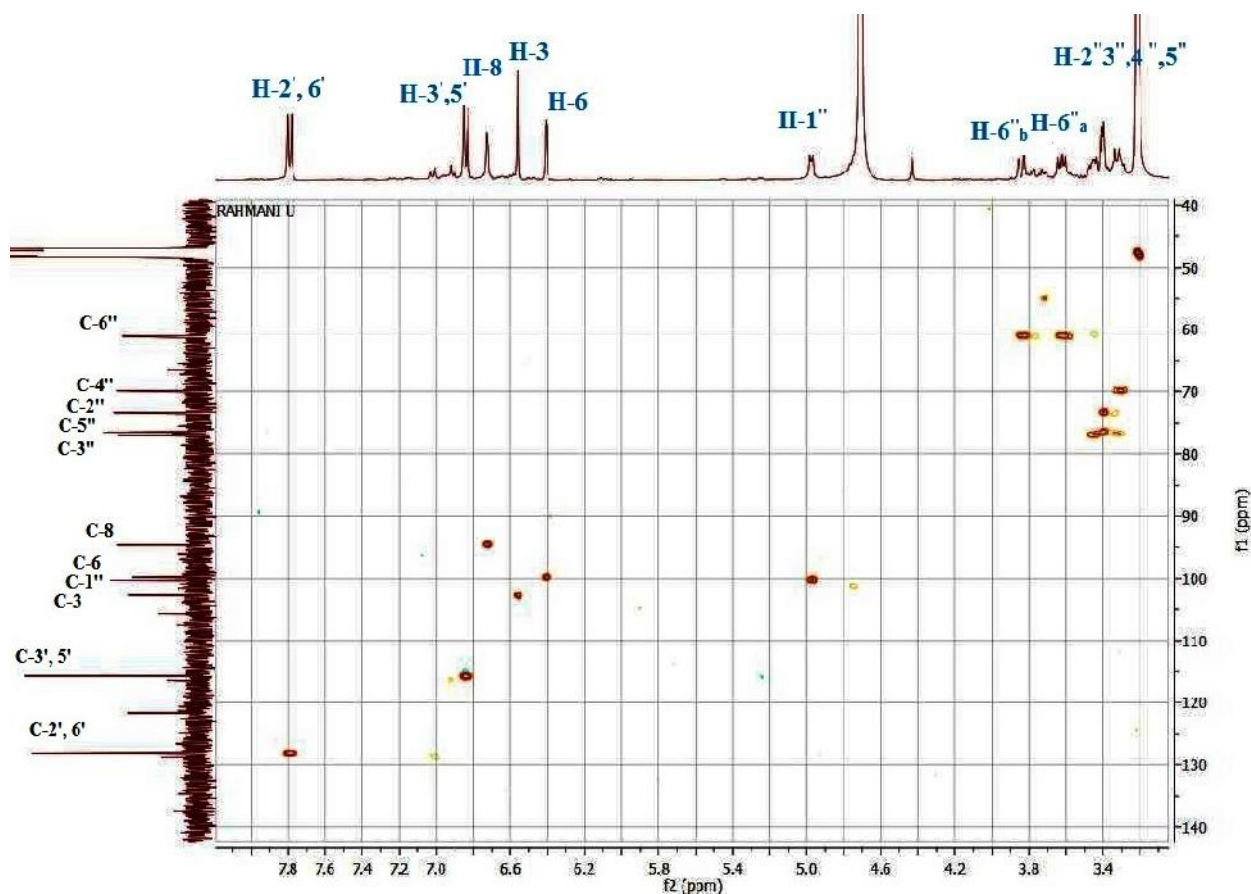


Figure IV.22 : Spectre HSQC (400 MHz, CD₃OD) du composé A3

Les taches de corrélations détectées dans les spectres HMBC (Figure IV.23, 24 et 25) sont:

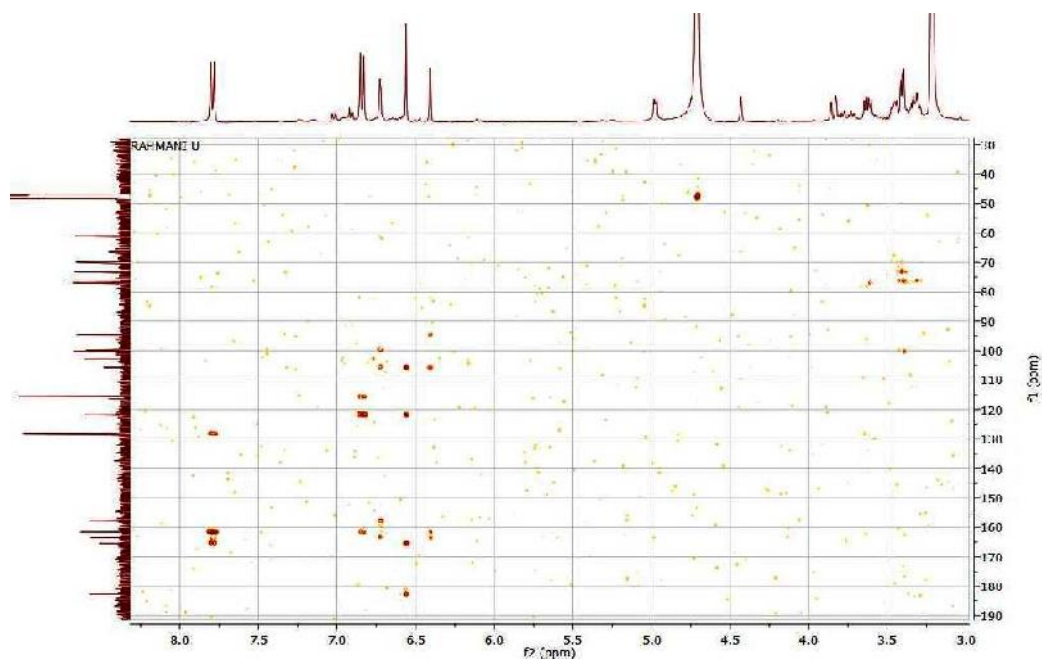


Figure IV.23 : Spectre HMBC (400 MHz, CD₃OD) du composé A3

H-3 (= 6,58 ppm) montre quatre taches de corrélations avec

- C-10 (105,7 ppm).
- C-2 (165,39 ppm).
- C-1' (121,71 ppm).
- C-4 (182,7 ppm).

H-6 (= 6,4 ppm) montre quatre taches de corrélations avec

- C-8 (94,7 ppm).
- C-10 (105,7 ppm).
- C-5 (161,52 ppm).
- C-7 (163,43 ppm).

H-8 (= 6,7 ppm) montre quatre taches de corrélations avec

- C-6 (99,8 ppm).
- C-10 (105,7 ppm).
- C-9 (157,59 ppm).
- C-7 (163,43 ppm).

H-3', 5' (= 6,8 ppm) montre deux taches de corrélations avec

- C-1' (121,71 ppm).
- C-4' (161,50 ppm).

H-2', 6' (7,8 ppm) montre deux taches de corrélations avec

- C-2 (165,71 ppm).
- C-4' (161,50 ppm).

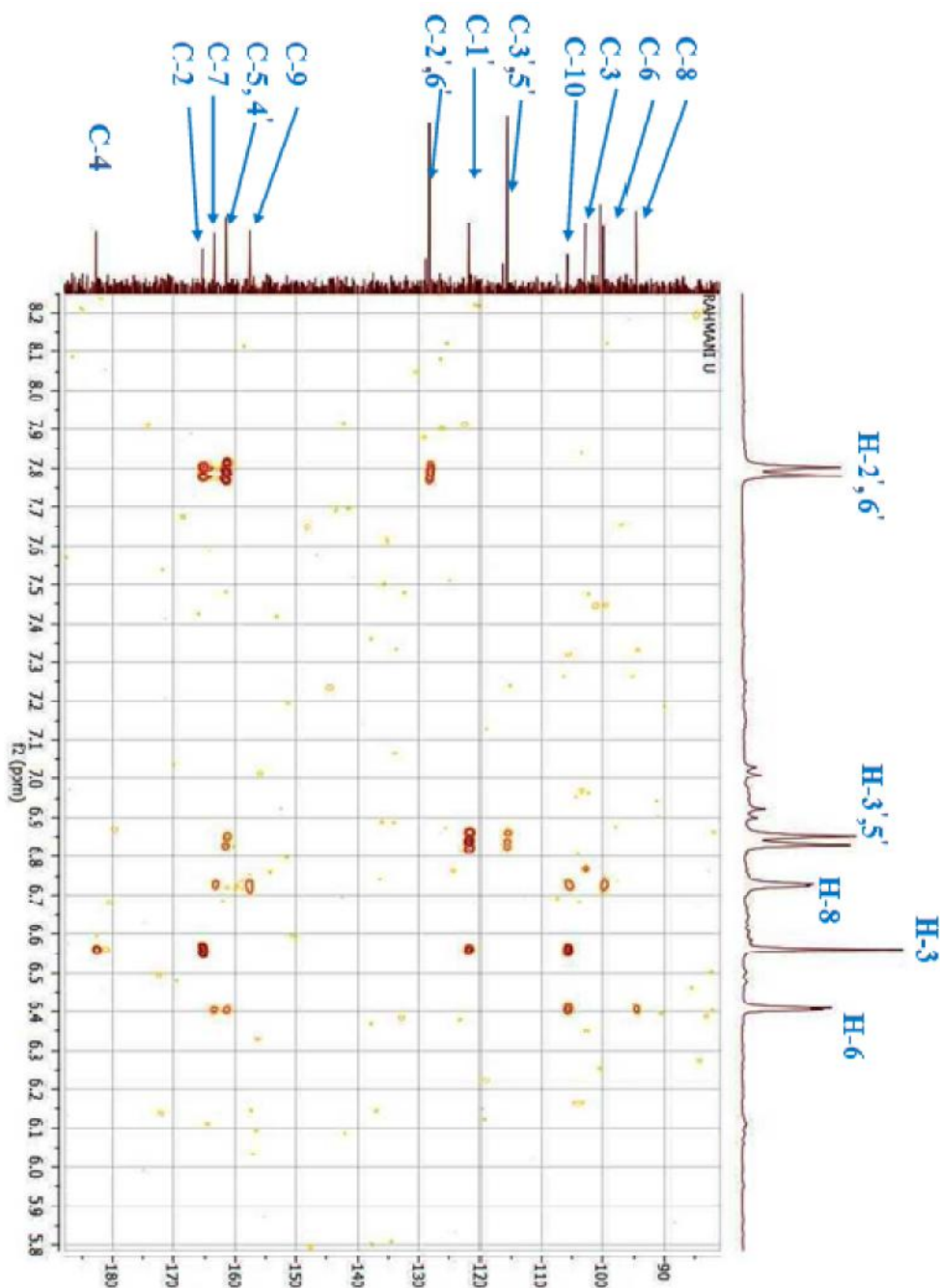


Figure IV.24 : Spectre HMBC étalé du composé A3

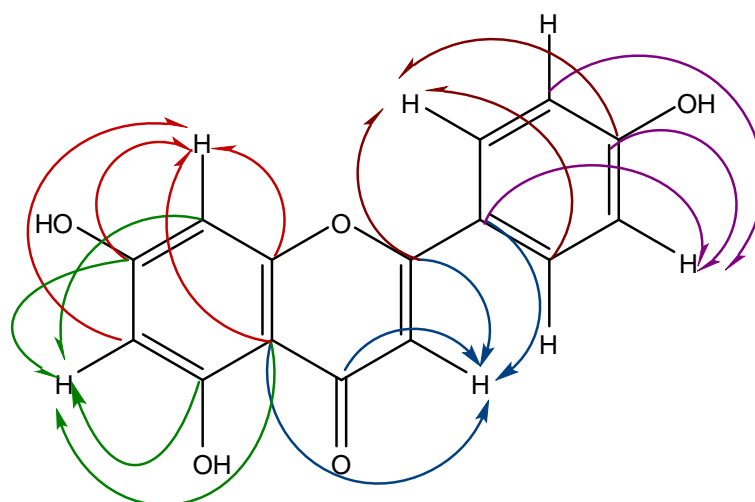


Figure IV.25 : Corrélations HMBC du composé A3

Les spectres RMN NOESY (Figure IV.27) suggèrent une association NOE entre le proton anomérique (H-1'') de la partie glucoside et le proton (H-8) sur le cycle A de l'aglycone, confirmant la fixation de l'unité sucre sur le groupe fonctionnel (7-OH). En plus, la liaison glycosidique au C-7 de l'aglycon a été vue à partir du décalage de champ vers le haut de déplacement chimique de C (C-7) par rapport à l'apigénine, ce qui peut être déduit de l'existence de C à 100,2 ppm (C-1'') (Tableau IV.5, Figure IV.26). La grande constante de couplage H-1'' de 6,8 Hz entre H-1'' et H-2'' indique un glucose couplé [8].

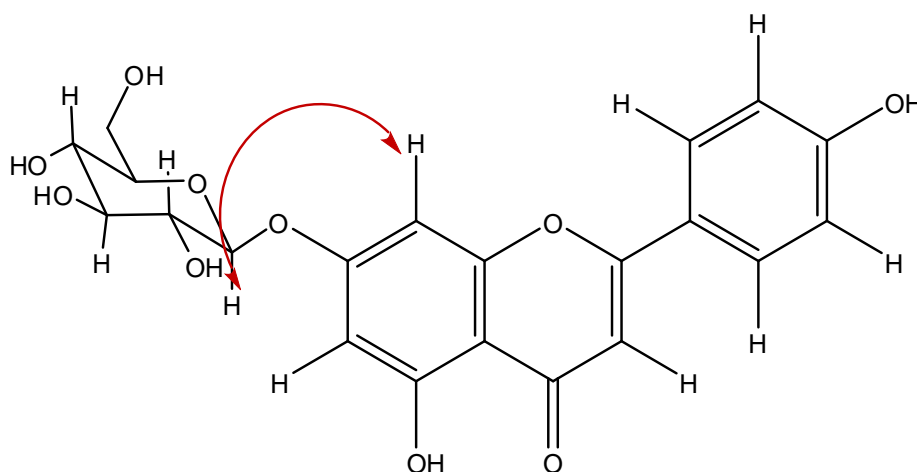


Figure IV.26 : Corrélations NOESY du composé A3

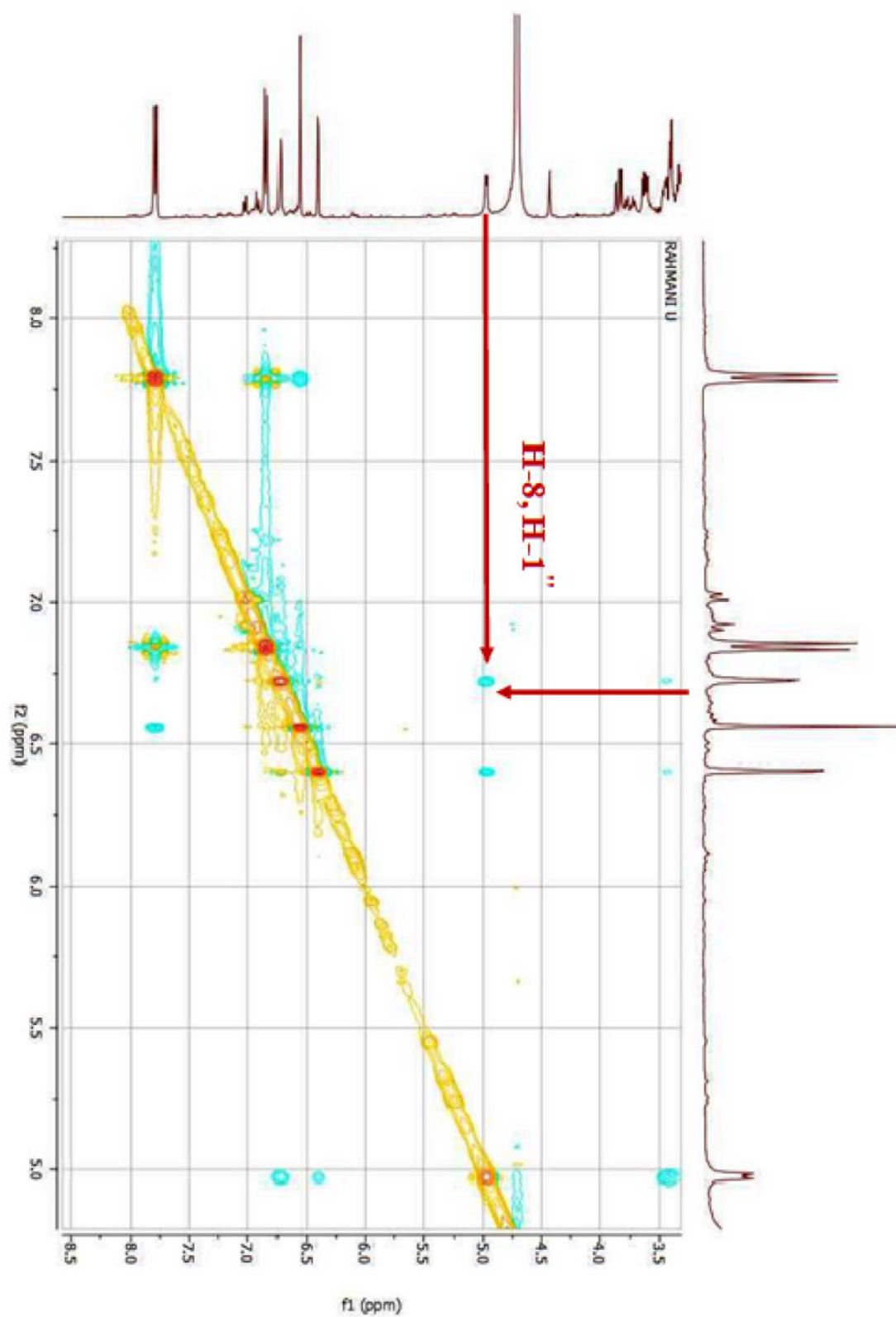


Figure IV.27 : Spectre NOESY étalé du composé A3

Par conséquent, la structure du composé A3 a été déterminée comme étant un Apigenin-7-O- β -D-glycoside. Les données RMN ^1H et ^{13}C , récapitulées dans le tableau IV.5, sont en accord avec la littérature [9-11].

Tableau IV.5 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (400 MHz) et ^{13}C (400 MHz) dans CD_3OD du composé A3 (en ppm et J en Hz)

position	(C) ppm	(H) ppm J Hz	DEPT	
2	165,39		C	
3	102,76	6,58 <i>s</i>	CH	
4	182,7		C	
5	161,5		C	
6	99,81	6,4 <i>d</i> 2	CH	
7	163,43		C	
8	94,7	6,71 <i>d</i> 2	CH	
9	157,59		C	
10	105,7		C	
1'	121,72		C	
2'	128,23	7,8 <i>d</i> 8,8	CH	
3'	115,65	6,82 <i>d</i> 8,8	CH	
4'	161,5		C	
5'	115,65	6,82 <i>d</i> 8,8	CH	
6'	128,23	7,8 <i>d</i> 8,8	CH	
Glucose	1''	100,27	4,95 <i>d</i> 6,8	CH
	2''	73,35	3,39 <i>d</i> 5,2	CH
	3''	77,013	3,45 <i>m</i>	CH
	4''	69,9	3,32 <i>d</i> 9,2	CH
	5''	76,48	3,4 <i>m</i>	CH
	6''	61,097	3.62 <i>dd</i> 11,6- 5,6	CH ₂

Spectroscopie UV- Visible d'A3

- La fluorescence violette sombre du produit A3 sous la lumière UV-Visible (365nm), indique que ce composé est une flavone, le spectre UV effectué dans le méthanol permettant d'observer deux bandes d'absorption, l'une à $\lambda_{\text{max}} = 268$ nm et l'autre à $\lambda_{\text{max}} = 332$ nm.
- La série spectrale du composé A3 a été effectuée par la Spectrophotométrie UV-visible (Agilent Technologies Cary 100 uv-vis) en utilisant des réactifs caractéristiques (Tableau IV.6)

- L'addition du réactif NaOH, conduit à un déplacement bathochrome ($\lambda_{\text{max}} = + 56 \text{ nm}$) de la bande I ce qui indique que la position 4 est occupée d'un groupement OH libre, L'absence d'une nouvelle bande entre 320 et 335 nm montre la présence d'un OH substitué en 7.
- L'ajout de la base faible (NaOAc) n'induit pas de déplacement bathochrome de la bande II, ce qui signifie que c'est le groupe hydroxyle en position 7 qui est glycosylé.
- L'addition du réactif AlCl_3 conduit à un déplacement bathochrome ($\lambda_{\text{max}} = 52 \text{ nm}$) de la bande I par rapport au spectre enregistré dans le méthanol, indique la présence d'un groupement OH libre en 5.
- L'absence d'un effet hypsochrome après addition de HCl au système (MeOH + AlCl_3) suggère l'absence d'un système 3,4 -dihydroxy sur le cycle "B". Ceci est confirmé par l'absence d'effet bathochrome de la bande II, après addition de H_3BO_3 au système (MeOH + NaOAc) (Figure IV.26).

Tableau IV.6 : Données spectroscopiques UV-visible du produit A3

Réactif de déplacement	λ_{max} (nm)			
	Bande I	Bande II	Déplacement	
MeOH	332	268	-	
NaOH (base forte)	388	267	56	OH libre en 4 OH substitué en 7
AlCl_3	347, 384	275, 299	52	OH libre en 5
$\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$	341, 383	276, 299	51	Absence de 3,4 -di-OH sur le cycle B
NaOAc (base faible)	333	268	-	en 7 qui est glycosylé
NaOAc / H_3BO_3	332	268	-	Absence de 3,4 -di-OH sur le cycle B

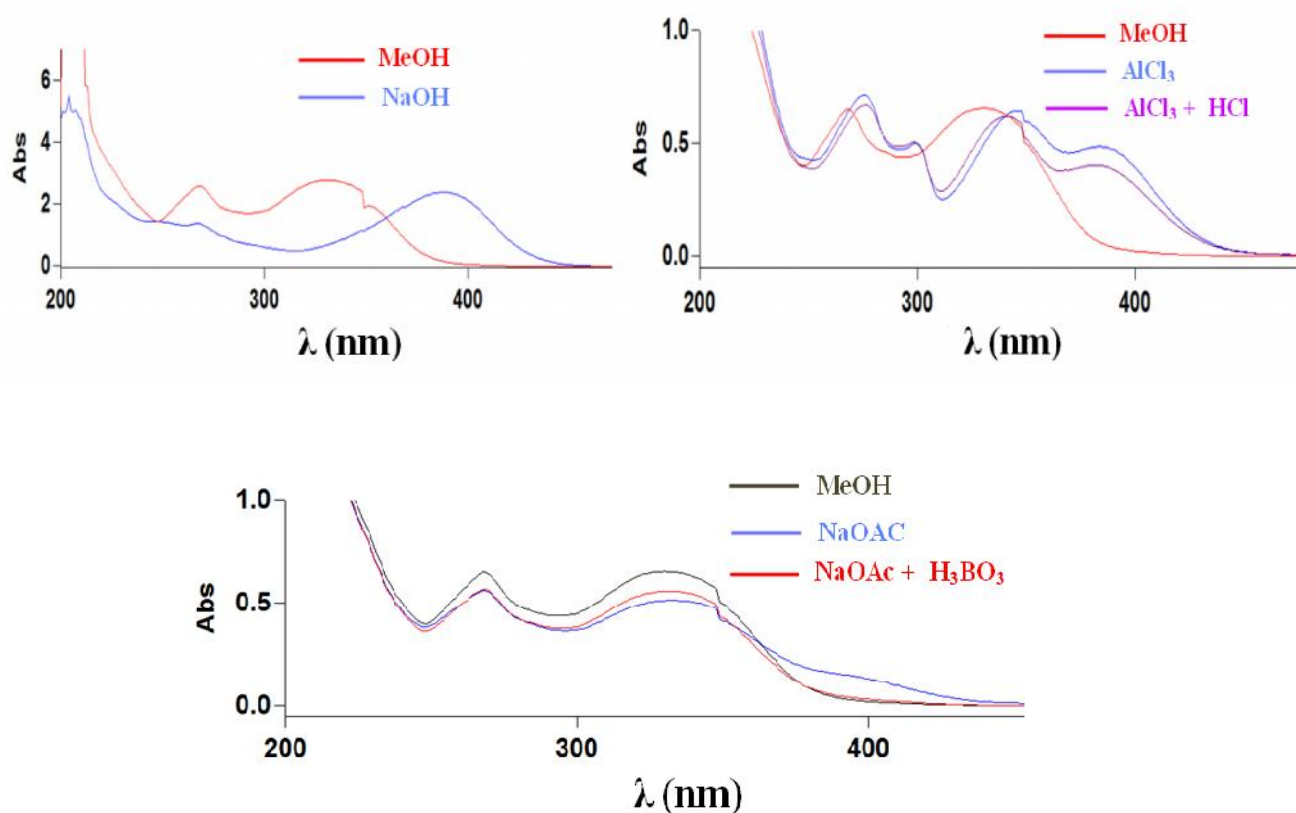


Figure IV.28 : Série spectrale UV- Visible du produit A3

Les résultats de l'étude phytochimique concernant l'espèce *Cupressus sempervirens* ont révélé la richesse de cette dernière en métabolites secondaires ainsi que leur diversité structurale.

L'extraction liquide-liquide des feuilles de l'espèce *Cupressus sempervirens* et les séparations chromatographiques successives ont permis d'isoler 4 composés. En faisant appel aux différentes méthodes modernes d'analyse spectroscopiques, particulièrement les techniques de RMN 2D (COSY, HMBC, HSQC, NOESY) nous avons pu identifier 2 composés comme étant :

- (+) Catéchine
- Apigenin-7-O- -D-glycoside

D'après ces résultats, nous avons trouvé que les feuilles de *Cupressus sempervirens* L. sont très riches en flavonoïdes comme la catéchine qui a été isolé pour la première fois de la fraction d'acétate d'éthyle des feuilles dans cette espèce [12].

Plusieurs études ont rapporté le rôle important de catéchine dans le traitement des nombreux maladies tel que le cancer, les maladies inflammatoires de l'intestin....etc. [13, 14]

Dans la nature, l'apigénine se produit également liée par des liaisons C-C ou C-O-C de formes dimériques tel que le bi-apigénine (biflavonide) [15]. Ce travail ajoute comme nouveauté la séparation et l'élucidation structurale d'Apigenin-7-O- -D-glycoside qui a isolé pour la deuxième fois du *Cupressus sempervirens* L. sous le nom de cosmosiin [16].

Un grand nombre d'études menées ont indiqué que l'apigénine a de nombreuses activités pharmacologiques intéressantes et un potentiel nutraceutique. A titre d'exemple, ses propriétés en tant qu'antioxydant sont bien connues, et il peut également être un agent thérapeutique pour surmonter des maladies telles que l'inflammation, les maladies auto-immunes, neurodégénératives et même plusieurs types de cancers. En raison de la variété des activités pharmacologiques de l'apigénine et de son importance pour la santé humaine, une connaissance approfondie de son mécanisme d'action serait de la plus haute importance pour d'éventuelles applications nutraceutiques [15].

Références

1. Seto, R., Nakamura, H., Nanjo, F., and Hara, Y., *Preparation of epimers of tea catechins by heat treatment*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 1997. **61**(9): p. 1434-1439.
2. Nonaka, G.-I., Ezaki, E., Hayashi, K., and Nishioka, I., *Flavanol glucosides from rhubarb and Rhabdialepis umbellata*. Phytochemistry, 1983. **22**(7): p. 1659-1661.
3. Davis, A.L., Cai, Y., Davies, A.P., and Lewis, J., *¹H and ¹³C NMR assignments of some green tea polyphenols*. Magnetic resonance in Chemistry, 1996. **34**(11): p. 887-890.
4. Hsue-Fen, C., Tanaka, T., Nonaka, G.-I., Fujioka, T., and Mihashi, K., *Phenylpropanoid-substituted catechins from Castanopsis hystrix and structure revision of cinchonans*. Phytochemistry, 1993. **33**(1): p. 183-187.
5. Harborne, J.B., *The flavonoids: advances in research since 1980*. 1988: Springer.
6. Harborne, J.B., Marby, H., and Marby, T., *The flavonoids*. 1st ed, 1975: Springer.

7. Tsimogiannis, D., Samiotaki, M., Panayotou, G., and Oreopoulou, V., *Characterization of flavonoid subgroups and hydroxy substitution by HPLC-MS/MS*. *Molecules*, 2007. **12**(3): p. 593-606.
8. Peng, H.-y., Zhang, X.-h., and Xu, J.-z., *Apigenin-7-O- -D-glycoside isolation from the highly copper-tolerant plant Elsholtzia splendens*. *Journal of Zhejiang University-Science B*, 2016. **17**(6): p. 447-454.
9. El-Hawiet, A.M., Toaima, S.M., Asaad, A.M., Radwan, M.M., and El-Sebakhy, N.A., *Chemical constituents from Astragalus annularis Forssk. and A. trimestris L., Fabaceae*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2010. **20**(6): p. 860-865.
10. Ersöz, T., Harput, Ü. ., Saraco lu, ., Çalı , ., and Ogihara, Y., *Phenolic compounds from Scutellaria pontica*. *Turkish Journal of Chemistry*, 2002. **26**(4): p. 581-588.
11. Švehliková, V., Bennett, R.N., Mellon, F.A., Needs, P.W., Piacente, S., Kroon, P.A., and Bao, Y., *Isolation, identification and stability of acylated derivatives of apigenin 7-O-glucoside from chamomile (Chamomilla recutita [L.] Rauschert)*. *Phytochemistry*, 2004. **65**(16): p. 2323-2332.
12. Rawat, P., Khan, M.F., Kumar, M., Tamarkar, A.K., Srivastava, A.K., Arya, K.R., and Maurya, R., *Constituents from fruits of Cupressus sempervirens*. *Fitoterapia*, 2010. **81**(3): p. 162-166.
13. Yang, C.S. and Wang, H., *Mechanistic issues concerning cancer prevention by tea catechins*. *Molecular nutrition & food research*, 2011. **55**(6): p. 819-831.
14. Fei-Yan, F., Li-Xuan, S., and Jiang, M., *Catechins and Their Therapeutic Benefits to Inflammatory Bowel Disease*. *Molecules*, 2017. **22**(3): p. 484.
15. Salehi, B., Venditti, A., Sharifi-Rad, M., Kr giel, D., Sharifi-Rad, J., Durazzo, A., Lucarini, M., Santini, A., Souto, E.B., and Novellino, E., *The therapeutic potential of apigenin*. *International journal of molecular sciences*, 2019. **20**(6): p. 1305.
16. Ibrahim, N.A., El-Seedi, H.R., and Mohammed, M.M.D., *Phytochemical investigation and hepatoprotective activity of Cupressus sempervirens L. leaves growing in Egypt*. *Natural product research*, 2007. **21**(10): p. 857-866.

Conclusion
Générale

Conclusion générale

Dans le présent travail, on a tenté de contribuer à la valorisation d'une plante très utilisée en médecine traditionnelle algérienne pour ces vertus thérapeutiques en consistant une étude phytochimique de la plante médicinale *Cupressus sempervirens* L. et en établissant une relation entre sa composition chimique et ses activités biologiques.

Le screening phytochimique a mis en évidence divers métabolites secondaires dans la plante *Cupressus sempervirens* L. : Tanins, terpènes, alcaloïdes, flavonoïdes, coumarines, résines et polyphénols.

La plante a été soumise à une méthode d'extraction des composés phénoliques ; la macération dans des solvants à polarité croissante. Chaque extrait a été caractérisé par sa couleur et son rendement par rapport à la drogue sèche.

L'analyse quantitative des phénols totaux, des flavonoïdes et des tannins des extraits phénoliques a été réalisée par colorimétrie. Celle-ci nous a permis de confirmer que la plante est riche en composés phénoliques.

Dans un deuxième temps, étant donné la nature multiple de l'activité antioxydante, nous avons cherché à rationaliser les résultats antioxydants à travers des tests d'activité piègeur des radicaux : DPPH[•], O₂^{•-} et le test de Phosphomolybdate dont l'essentiel des résultats sont les suivants :

L'extrait aqueux des feuilles possède une capacité réductrice très importante AEAC = 789,05 mM.

La plus élevée activité de piégeage de DPPH[•] a été observée dans la fraction d'acétate d'éthyle chez les feuilles avec CI₅₀ = 0,011 ± 0,001 mg/ml.

L'inhibition de radical anion superoxyde est réalisée par deux méthodes: la méthode chimique qui donne un pourcentage d'inhibition 71,47 ± 0,45 à la fraction d'acétate d'éthyle chez les fruits, et la méthode électrochimique par la voltamétrie cyclique avec CI₅₀ = 0,136.

Une bonne corrélation existe entre le contenu phénolique, flavonoïdique et des tanins et les trois tests d'antioxydant ont une bonne corrélation entre eux.

Le test biologique effectué dans ce travail a montré un effet antidiabétique remarquable des différents extraits obtenus à partir des parties aériennes de la plante étudiée, la plus élevée inhibition dans les feuilles a été enregistrée à la fraction de tanins d'acétate d'éthyle avec 35,43% à 0,616 mg/ml.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Nos travaux d'extraction des parties aériennes de l'espèce étudiée, suivis de séparations chromatographiques successives (CC, CCM), nous ont permis d'isoler et identifier, grâce aux techniques d'analyses spectroscopiques (RMN), deux flavonoïdes :

- (+) **catéchine**

- **Apigenin-7-O- -D-glycoside**

En fin, nous espérons que ce travail constitue une modeste contribution dans la mise en valeur de la flore algérienne méconnue jusqu'à ce jour.

Ainsi, de nombreuses perspectives peuvent être envisagées : Concernant l'identification et la purification d'autres composés chez *Cupressus sempervirens* L. qui n'ont pas été ciblés dans le présent travail à ce jour et à notre connaissance, n'ont jamais été caractérisés quant à leurs activités biologiques.

- ✓ Identification des molécules responsables de l'activité biologique.
- ✓ Elargir le panel des activités antioxydantes *in vitro* et *in vivo* et pourquoi pas d'autres tests biologiques: antiurolithiasique et anti-inflammatoire.
- ✓ L'investigation phytochimique, pharmaceutique et ethnobotanique des autres plantes médicinales du Sahara algérien.