

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE KASDI MERBAH – OUARGLA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES



Mémoire En vue de l'obtention du diplôme de MASTER académique

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

Présenté par : ZENKHRI Zineb

Thème :

**Activités biologiques de deux plantes médicinales :
Anagallis arvensis et *Hibiscus sabdariffa***

Soutenu publiquement

Le : 22/ 06 / 2023.

Devant le jury

Melle. MIMOUNI Yamina	MCA	Présidente	UKM Ouargla
Melle. TELLI Alia	MCA	Encadreur	UKM Ouargla
Melle. BENCHEIKH Manal	Doctorante	Co-encadreur	UKM Ouargla
Melle HADJADJ Soumia	MCA	Examineur	UKM Ouargla

Année Universitaire : 2022/2023

Remerciements

Tout d'abord je tiens à remercier dieu le tout puissant, de m'avoir donnée la force la patience et le courage pour réaliser ce travail.

*Je tiens à remercier très vivement mon encadreur Madame **TELLI Alia** Maître de conférences A à l' Université Kasdi Merbah Ouargla, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Département de Biologie, d'avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'il m'a accordé pour réaliser ce travail.*

Mes remerciements s'adressent également aux membres du jury pour l'honneur qu'ils m'ont fait en jugeant ce travail :

*^{Melle} **MIMMOUNI Yamina** et ^{Melle} **HADJADJ Soumia** Maîtres de conférences A au Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Kasdi Merbah Ouargla d'avoir accepté à examiner ce travail.*

Je remercie également tous les enseignants qui m'ont appris dans mon parcours académique.

En fin Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réussite de ce travail.

ZENKHRI Zineb

Dédicace

*A l'aide de Dieu tout puissant, qui a tracé le chemin de ma vie j'ai pu
réaliser ce travail que Je dédie a :*

A mes parents qui m'ont soutenu tout au long de mes études

A mes frères

A mes sœurs

A tous les membres des deux familles

« Zenkhri » « Hadji »

ZENKHRI Zineb

Activités biologique de deux plantes médicinales : Anagallis arvensis et Hibiscus sabdariffa

Résumé

Cette étude vise à évaluer l'activité anti-oxydante et anti-cholinestérase des extraits de deux plantes médicinales cultivées, il s'agit de *Hibiscus sabdariffa* et *Anagallis arvensis*. L'activité anti-acétylcholinestérase a été évalué dans le but de testé le potentiel des extraits des deux plantes à ralentir la dégradation de l'acétylcholine, ce qui permet de maintenir des niveaux plus élevés de ce neurotransmetteur dans le cerveau, cela peut aider à atténuer les symptômes de la maladie d'Alzheimer. L'extraction des molécules bioactifs est effectuée par macération à froid en utilisant deux solvants l'eau et l'éthanol. Le criblage phytochimique est réalisé afin de mettre en évidence la présence de quelques métabolites dans les extraits obtenus. La quantification de quelques classes des composés phénoliques et des saponines est faite selon des méthodes colorimétriques. Deux tests sont utilisés pour évaluer l'activité anti-oxydante (DPPH et ABTS). Les résultats obtenus ont montré que les rendements d'extraction les plus élevés sont enregistrés pour les extraits aqueux qui sont de l'ordre de (39.17±0,70%) et (21.53± 6.56%) pour *Hibiscus sabdariffa* et *Anagallis arvensis* respectivement. Le criblage phytochimique révèle la richesse des extraits des deux plantes en différents métabolites secondaires (tanins, flavonoïdes, alcaloïdes, coumarines, quinones libres...etc.). En ce qui concerne le dosage des composés phénoliques, les teneurs en polyphénols totaux les plus importantes sont enregistrées pour les extraits hydro-éthanolique des deux plantes avec des taux de (34.53±2.10 mg EAG/g PSMV) pour *H. Sabdariffa* et (32.54±3.10 mg EAG/g PSMV) pour *A. arvensis*, cette dernier a enregistré des concentrations élevées en flavonoïdes et en acides phénols (9.79±0.1 mg ER/g PSMV et 1.00±0.02 mg EAC/g PSMV respectivement), alors que la meilleure teneur en tanins condensés est obtenu avec l'extrait hydroéthanolique d'*H. sabdariffa* qui est de l'ordre de (4.5±0.21 mg EC/g PSMV). L'extrait aqueux d'*A. arvensis* est le plus riche en saponines (0.69±0.00 mg EA/g PSMV) en comparaison avec celui de *H. sabdariffa*. Les extraits hydroéthanoliques d'*A. arvensis* (IC₅₀=29.28±1.60 µg/ml) et *H. sabdariffa* (IC₅₀=35.39±1.97) ont les pouvoirs antiradicalaires les plus puissants en comparaison avec l'acide gallique (IC₅₀ = 46.65±1.35µg/ml). A l'opposé, l'extrait hydroéthanolique de *H. sabdariffa* présente excellente capacité inhibitrice de radical cation ABTS⁺ (IC₅₀=1.40±0.26 µg/ml) en comparaison avec celle de l'extrait hydroéthanolique d'*A. arvensis* (IC₅₀=4.24±0.059 µg/ml) et l'acide gallique (IC₅₀=42.15±3.99 µg/ml). Les extraits hydroéthanoliques des deux espèces étudiées ont une activité inhibitrice d'AchE très remarquables et comparables à celle de galentamine qui présente la valeur la plus importante (IC₅₀= 18.12 ± 1.73 µg/ml) suivit par *A.arvensis* (IC₅₀= 32.65 ± 0.68 µg/ml) et finalement *H.sabdariffa* (IC₅₀=48.29 ± 2.9 µg/ml). Cette étude suggère que les extraits des calices de l'*H.sabdariffa* et les parties aériennes de l'*A.arvensis* pourraient être prometteurs dans la recherche future sur les antioxydants et les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase pour la gestion des troubles neurodégénératifs de la maladie d'Alzheimer.

Mots clé : *Hibiscus sabdariffa*, *Anagallis arvensis*, extrait, métabolites secondaire, composés phénoliques, activité anti-oxydante, activité inhibitrice d'AchE.

Biological activities of two medicinal plants: Anagallis arvensis and Hibiscus sabdariffa.

Abstract

This study aims to evaluate the antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of extracts from two cultivated medicinal plants, namely *Hibiscus sabdariffa* and *Anagallis arvensis*. The anti-acetylcholinesterase activity was assessed to test the potential of the extracts from both plants to slow down the degradation of acetylcholine, which can help maintain higher levels of this neurotransmitter in the brain and alleviate the symptoms of Alzheimer's disease. The bioactive molecules were extracted through cold maceration using water and ethanol as solvents. Phytochemical screening was conducted to identify the presence of various secondary metabolites in the obtained extracts. Quantification of specific classes of phenolic compounds and saponins was carried out using colorimetric methods. Two tests, DPPH and ABTS, were employed to evaluate antioxidant activity. The results showed that the highest extraction yields were obtained with the aqueous extracts, with values of approximately $39.17 \pm 0.70\%$ for *Hibiscus sabdariffa* and $21.53 \pm 6.56\%$ for *Anagallis arvensis*. Phytochemical screening revealed the abundance of secondary metabolites such as tannins, flavonoids, alkaloids, coumarins, and free quinones in both plant extracts. The hydroethanolic extracts of both plants exhibited significant levels of total phenolic compounds, with values of 34.53 ± 2.10 mg GAE/g DW for *H. sabdariffa* and 32.54 ± 3.10 mg GAE/g DW for *A. arvensis*. *A. arvensis* exhibited high concentrations of flavonoids and phenolic acids (9.79 ± 0.1 mg RE/g DW and 1.00 ± 0.02 mg EAC/g DW, respectively), while the hydroethanolic extract of *H. sabdariffa* showed the highest content of condensed tannins, approximately 4.5 ± 0.21 mg EC/g DW. The aqueous extract of *A. arvensis* exhibited the highest richness in saponins (0.69 ± 0.00 mg EA/g DW) compared to *H. sabdariffa*. The hydroethanolic extracts of *A. arvensis* ($IC_{50} = 29.28 \pm 1.60$ μ g/ml) and *H. sabdariffa* ($IC_{50} = 35.39 \pm 1.97$ μ g/ml) demonstrated potent antiradical activities compared to gallic acid ($IC_{50} = 46.65 \pm 1.35$ μ g/ml). On the other hand, the hydroethanolic extract of *H. sabdariffa* exhibited excellent inhibitory capacity against the ABTS \cdot^+ cation radical ($IC_{50} = 1.40 \pm 0.26$ μ g/ml) compared to the hydroethanolic extract of *A. arvensis* ($IC_{50} = 4.24 \pm 0.059$ μ g/ml) and gallic acid ($IC_{50} = 42.15 \pm 3.99$ μ g/ml). Both hydroethanolic extracts of the studied species showed remarkable acetylcholinesterase inhibitory activity, comparable to that of galantamine, with the highest value observed for *A. arvensis* ($IC_{50} = 32.65 \pm 0.68$ μ g/ml), followed by *H. sabdariffa* ($IC_{50} = 48.29 \pm 2.9$ μ g/ml). This study suggests that extracts from the calyxes of *H. sabdariffa* and the aerial parts of *A. arvensis* could be promising in future research on antioxidants and acetylcholinesterase inhibitors for the management of neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease.

Key words: *Hibiscus sabdariffa*, *Anagallis arvensis*, extract, secondary metabolites, phenolic compounds, antioxidant activity, acetylcholinesterase inhibitory activity.

الأنشطة البيولوجية لنباتين طبيين: لبن المر (*Anagallis arvensis*) و الكركدية (*Hibiscus sabdariffa*)

ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم الأنشطة المثبطة لمضادات الأكسدة والأسيتيل كولينستريز لمستخلصات نباتين طبيين مزروعتين، وهما الكركدية (*Hibiscus sabdariffa*) و لبن المر (*Anagallis arvensis*) تم تقييم نشاط مضادات الأسيتيل كولينستريز لاختبار إمكانات المستخلصات من كلا النباتين لإبطاء تحلل الأسيتيل كولين، والذي يمكن أن يساعد في الحفاظ على مستويات أعلى من هذا الناقل العصبي في الدماغ وتخفيف أعراض مرض الزهايمر. تم استخلاص الجزيئات النشطة بيولوجيًا من خلال النقع باستخدام الماء والإيثانول كمذيبات. تم إجراء فحص كيميائي نباتي لتحديد وجود مستقبلات ثانوية مختلفة في المستخلصات التي تم الحصول عليها. تم إجراء القياس الكمي لفئات معينة من المركبات الفينولية والصابونين باستخدام طرق القياس اللوني. تم استخدام اختبارين، DPPH و ABTS، لتقييم نشاط مضادات الأكسدة. أظهرت النتائج أنه تم الحصول على أعلى إنتاجية من المستخلصات المائية، حيث بلغت قيمها حوالي $39.17 \pm 0.70\%$ للكركدية (*sabdariffa*) و $21.53 \pm 6.56\%$ في لبن المر (*A. arvensis*). كشف الفحص الكيميائي النباتي عن وفرة المستقبلات الثانوية مثل التانين والفلافونويد والقلويدات والكومارين والكينون الحر في كلا المستخلصات النباتية. أظهرت المستخلصات المائية الإيثانولية لكلا النباتين مستويات كبيرة من المركبات الفينولية الكلية، بقيم 34.53 ± 2.10 مجم / GAE لـ *A. arvensis* و 32.54 ± 3.10 مجم / GAE لـ *H. sabdariffa* الكركدية. أظهر لبن المر (*A. arvensis*) تركيزات عالية من الفلافونويد والأحماض الفينولية (9.79 ± 0.1 مجم / RE ج DW) و (1.00 ± 0.02 مجم / EAC ج DW)، على التوالي، بينما أظهر مستخلص الهيدروإيثانول من الكركدية *H. sabdariffa* أعلى محتوى من العفص المكثف، تقريبًا (4.5 ± 0.21 مجم / EC ج DW) أظهر المستخلص المائي لـ لبن المر (*A. arvensis*) أعلى ثراء في الصابونين (0.69 ± 0.00 مجم / EA ج DW) مقارنة مع الكركدية (*H. sabdariffa*). أظهرت المستخلصات المائية الإيثانولية لـ (29.28 ± 1.60 IC50 = 29.28 ميكروغرام / مل) لبن المر (*A. arvensis*) و (35.39 ± 1.97 IC50 = 35.39 ميكروغرام / مل) نشاطًا قويًا مضادًا للشيخوخة مقارنة بحمض الغاليك (ميكروغرام / مل 46.65 ± 1.35 IC50 = 46.65). من ناحية أخرى، أظهر المستخلص المائي الإيثانولي لـ الكركدية (*H. sabdariffa*) قدرة مثبطة ممتازة ضد ABTS + جذور الكاتيون (4.24 ± 0.26 IC50 = 1.40 ميكروغرام / مل) مقارنة بالمستخلص المائي الإيثانولي لـ (*A. arvensis*) لبن المر (4.24 ± 0.26 IC50 = 1.40 ميكروغرام / مل) وحمض الغال (42.15 ± 3.99 IC50 = 42.15 ميكروغرام / مل). أظهر كلا المستخلصين المائيين من النوعين المدروسين نشاطًا مثبطًا لأسيتيل كولينستراز ملحوظًا، مقارنةً بمستخلص الجالانتامين، مع أعلى قيمة لوحظت لـ لبن المر (*A. arvensis*) (32.65 ± 0.68 IC50 = 32.65 ميكروغرام / مل)، يليه (*H. sabdariffa*) الكركدية (48.29 ± 2.9 IC50 = 48.29 ميكروغرام / مل). تقترح هذه الدراسة أن المقطفات من كؤوس (*H. sabdariffa*) الكركدية والأجزاء الهوائية من لبن المر (*A. arvensis*) يمكن أن تكون واعدة في الأبحاث المستقبلية حول مضادات الأكسدة ومثبطات أستيل كولينستراز لإدارة الاضطرابات التنكسية العصبية مثل مرض الزهايمر.

الكلمات المفتاحية: الكركدية (*Hibiscus sabdariffa*) ، لبن المر (*Anagallis arvensis*)، مستخلص، مستقبلات ثانوية ، مركبات فينولية ، نشاط مضاد للأكسدة ، نشاط مثبط لأسيتيل كولينستراز.

Liste des tableaux

Tableau I : Résultats de test de criblage phyto-chimique des extraits aqueux et hydroéthanolique des deux plantes <i>H.Sabdariffa</i> et <i>A.Arvensis</i>	40
Tableau II : IC ₅₀ de piégeage du DPPH par les extraits hydroéthnologiques d'Ang et d'Hib.	54
Tableau III : IC ₅₀ de piégeage de l'ABTS+ par les extraits hydroéthnologiques d'Ang et d'Hib.	55
Tableau IV : IC ₅₀ d'inhibition d'acétylcholinestérase par les extraits hydroéthnologiques d'Ang et d'Hib et Galentamine.	58

Liste des figures

Figure 1 : <i>Hibiscus sabdariffa</i>	16
Figure 2 : A : calices B : fleur d' <i>Hibiscus Sabdariffa</i>	17
Figure 3 : <i>Anagallis arvensis</i>	20
Figure 4 : Carte géographique de la région de Bouamer wilaya d'Ouargla	24
Figure 5 : Matière végétale sèche. A : partie aérienne d' <i>A. arvensis</i> ; B : calices d' <i>H. Sabdariffa</i>	Error! Bookmark not defined.
Figure 6 : matière végétale broyer A : poudre d' <i>A. arvensis</i> B : poudre d' <i>H. Sabdariffa</i>	25
Figure 7 : extraction par macération et filtration	26
Figure 8 : Photos de matériels utilisés. A : évaporateur rotatif B lyophilisateur	27
Figure 9 : structure de l'ABTS et son radical cation ABTS*+	32
Figure 10 : Structure du radical DPPH [•] et DPPH réduit	33
Figure 11 : Rendement d'extraction des quatre extraits des deux plantes <i>Anagallis arvensis</i> et <i>Hibiscus sabdariffa</i>	Error! Bookmark not defined.
Figure 12 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	44
Figure 13 : Teneurs en polyphénols totaux des extraits aqueux et hydroéthanolique de Hib et Ang.	44
Figure 14 : courbe d'étalonnage de la rutine	46
Figure 15 : Teneurs en flavonoïdes des extraits aqueux et hydroéthanolique de Hib et Ang.	46
Figure 16 : courbe d'étalonnage de l'acide caféique	48
Figure 17 : Teneurs en acides phénols dans les extraits aqueux et hydroéthanolique de Hib et Ang	49
Figure 18 : courbe d'étalonnage de la catéchine	50
Figure 19 : Teneurs en Tanins condensés dans les extraits aqueux et hydroéthanolique de Hib et Ang	50
Figure 20 : courbe d'étalonnage d'ascéine	51
Figure 21 : Teneurs en saponines dans les extraits aqueux de Hib et Ang	52
Figure 22 : % d'inhibition du DPPH en fonction de concentrations de l'acide gallique	53
Figure 23 : % d'inhibition du l'ABTS en fonction de concentrations de l'acide gallique	55
Figure 24 : Evolution de pourcentage de l'inhibition d'AchE en fonction de concentration d'Ang, Hib et de standard la Galentamine	57

Liste des abréviations

ABTS : L'acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)

AcH Ach : acétylcholine

AchE : acétylcholinestérase

ADMA : A disintegrin and metalloprotease

APP : Amyloid Precursor Protein

CDK5 : Cyclin-dependent kinase 5

COX-1 : cyclo-oxygénase 1

Cox-2 : cyclo-oxygénase 2

DNF : dégénérescence neurofibrillaire

DPPH : (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

Ext ED Ang : extrait aqueux *d'Anagallis arvensis*

ExtED Hib : extrait aqueux *d'Hibiscus Sabdariffa*

ExtOH Ang : extrait hydroéthanolique *d'Anagallis arvensis*

ExtOH Hib : extrait hydroéthanolique *d'Hibiscus Sabdariffa*

GSK-3 : glycogen synthase kinase-3

IC50 : Concentration inhibitrice 50%

LCS : liquide céphalorachidien

MA : Maladie d'Alzheimer

Mg EAC/g PSMV: milligramme équivalent d'acide caféique par gramme du poids sec de la matière matériel végétal sèche

Mg EAG/g PSMV: milligramme équivalent d'acide gallique par gramme de la matière végétal sèche

Mg EC/g PSMV : milligramme équivalent de la catéchine par gramme de la matière végétal sèche

Mg ER/g PSMV: milligramme équivalent de la rutine par gramme de la matière végétal sèche

Protéine AB : protéine béta amyloïde

Protéine tau : unité associée à la tubuline

SNC : système nerveux centrale

SNP : system nerveux périphérique

TREM2 : Triggering receptor expressed on myeloid cells 2

| *Table des matières*

Table des matières

Remerciement	
Dédicace	
Résumé	
Abstract	
ملخص	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction :	1

Chapitre I : Partie expérimentale

I.1. Monographie des plantes	16
I.1.1. Hibiscus sabdariffa L.	16
I.1.1.1. Noms vernaculaires	16
I.1.1.2. Systématique	16
I.1.1.3. Description botanique de la plante	16
I.1.1.4. Origine et répartition géographique	17
I.1.1.5. Ecologie	17
I.1.1.6. Usage et propriétés thérapeutiques	18
I.1.1.6.1. Usage traditionnel et courant	18
I.1.1.6.2. Propriétés thérapeutique	19
I.1.1.7. Toxicité et précautions d'emploi	19
I.1.2. Anagallis arvensis L.	20
I.1.2.1 Noms vernaculaires	20
I.1.2.2 Systématique	20
I.1.2.3 Description botanique de la plante	20
I.1.2.4 Origine et répartition géographique	20
I.1.2.5 Ecologie	21
I.1.2.6 Usages et propriétés thérapeutique	21
I.1.2.6.1 Usage traditionnel et courant	21
I.1.2.6.2 Propriétés thérapeutiques	21
I.2 Matériel et méthodes	23
I.2.1 Matériel biologique (Matériel végétal)	23

I.2.1.1	Choix des espèces	23
I.2.1.2	Récolte et Identification	24
I.2.1.3	Séchage	24
I.2.1.4	Broyage	25
I.2.1.5	Conservation	25
I.2.2	Méthodes	26
I.2.2.1	Extraction liquide-solide (macération)	26
I.2.2.2	Concentration et lyophilisation des extraits obtenus	26
I.2.2.3	Détermination de rendement d'extraction	27
I.2.2.4	Criblage phyto-chimique	27
I.2.2.4.1	Tanins	28
I.2.2.4.2	Flavonoïdes	28
I.2.2.4.3	Anthocyanes	29
I.2.2.4.4	Coumarines :	29
I.2.2.4.5	Quinones libres :	29
I.2.2.4.6	Alcaloïdes :	29
I.2.2.4.7	Saponosides : test de mousse	29
I.2.2.4.8	Stéroïdes :	30
I.2.2.4.9	Sucres réducteurs	30
I.2.2.5	Quantification de quelques métabolites secondaires	30
I.2.2.5.1	Dosage	30
des polyphénols totaux		30
I.2.2.5.2	Dosage des flavonoïdes :	30
I.2.2.5.3	Dosage des acides-phénols	31
I.2.2.5.4	Dosage des tanins condensés	31
I.2.2.5.5	Dosage des saponines	31
I.2.2.6	Evaluation des activités Biologiques :	32
I.2.2.6.1	Activité antioxydante	32
I.2.2.6.2	Activité anti-cholineesterase	34
I.2.3	Analyse statistique	35
II.	Résultats et discussion	Error! Bookmark not defined.
	<i>Chapitre 02 Résultats et discussion</i>	
II.1.	Rendement d'extraction	Error! Bookmark not defined.
II.2.	Criblage phyto-chimique	39
II.3.	Quantification des composées phénoliques et des saponines	42

II.3.1.Teneurs en polyphénols totaux	43
II.3.2.Teneurs en flavonoïdes	46
II.3.3.Teneurs en acides phénols	47
II.3.4.Teneurs en tanins condensés	49
II.3.5.Teneurs en saponosides	51
II.4.Activités biologiques :	53
II.4.1.Activité anti-oxydante	53
II.4.1.1.Piégeage du radical DPPH	53
II.4.1.2. Inhibition de radical cation ABTS ^{·+}	54
II.4.2.Activité anti-cholinestérase	57
III .Conclusion et perspective :	59
IV. Références bibliographiques :	61
V. Annexes :	70

| *Introduction*

Introduction

Le vieillissement est défini par l'Organisation Mondiale de la Santé comme « un processus graduel et irréversible de modifications des structures et des fonctions de l'organisme résultant du passage du temps **(WHO, 1994)**, et de l'influence des facteurs génétiques, sociaux et environnementaux auxquels est soumis l'organisme tout au long de sa vie **(Sablonnière, 2022)**. Durant le vieillissement normal de nombreuses capacités cognitives se détériorent légèrement. Il s'agit, par exemple, de la mémoire à court et à long terme, des capacités de résolution des problèmes, de la capacité à planifier et à exécuter logiquement des tâches, ainsi que de la vitesse et de la flexibilité de la pensée, du raisonnement et du traitement de l'information **(Rosenberg, 2020)**.

Parallèlement à cette perte de fonction, il se produit une augmentation de susceptibilité de développer diverses maladies liées au vieillissement. Cela est dû aux changements physiologiques qui provoquent l'accumulation des dommages cellulaires et tissulaires, qui entraînent le déclin de certaines fonctions de l'organisme et y compris les fonctions cognitives. Il est donc essentiel de distinguer le processus de vieillissement et les diverses pathologies pouvant y être associées **(Bellavance, 2018 ; Rosenberg, 2020)**.

Au cours de la sénescence cellulaire, il y a une accumulation de composants cellulaires endommagés (acides nucléiques, lipides, protéines) dont l'élimination et/ou la réparation semble ne plus être aussi efficace que celle assurée par la cellule jeune, **(Friguet, 2003)** ce sont ces dommages qui vont augmenter le risque de développer des comorbidités associées au vieillissement **(Bellavance, 2018)**.

On parle de vieillissement pathologique lorsque les changements sont plus prononcés et plus rapides que ce que l'on peut attendre d'un vieillissement normal. Parmi les comorbidités associées au vieillissement les plus fréquentes est la démence **(Rosenberg, 2020)**.

La démence est un terme utilisé pour décrire différents troubles cérébraux qui ont en commun la perte des fonctions cérébrales **(Cayton, 2008)**. elle peut être définie comme une perte progressive des fonctions cognitives et autres fonctions intellectuelles "supérieures" résultant d'une maladie organique du cerveau **(Terry et Davies, 1980)**. Plus de 57 millions de personnes dans le monde vivaient avec une démence en 2019, et le nombre de patients est estimé à augmenter à 152,8 millions en 2050. **(Nichols et al., 2022)**

Les personnes atteintes de démence ont des problèmes particuliers avec leur mémoire à court terme. Elles oublient constamment les choses qu'elles viennent de dire ou de faire, alors qu'elles peuvent souvent se souvenir clairement des événements qui se sont produits il y a plusieurs années. Leur sens du temps et de lieu est généralement perdu. Ces personnes peuvent développer des problèmes pour trouver les mots et il devient de plus en plus difficile pour eux d'apprendre de nouvelles informations. Avec le temps, les personnes atteintes de démence ont besoin d'aide pour effectuer les tâches les plus élémentaires de la vie quotidienne, comme se laver, s'habiller manger, etc. **(Cayton, 2008)**

Classiquement, il est possible de distinguer les démences dégénératives, conséquence d'une dégénérescence des cellules nerveuses, des démences non dégénératives, dues à des pathologies d'ordre vasculaire, infectieux, traumatique, toxique ou tumorale (Annexe 01) **(Lapre, 2010)**.

La maladie d'Alzheimer (MA) est la forme de démence la plus répandue, qui constitue de 60 à 80 % des cas chez les personnes âgées. **(Gibbs, 2022)**. C'est une affection neurodégénérative progressive du cerveau qui associe des troubles prédominants de la mémoire, des troubles cognitifs et/ou du comportement ayant un retentissement sur la vie quotidienne des patients. L'étiologie de la maladie non encore élucidée, semblant dépendre à la fois de facteurs génétiques et environnementaux. **(El Kadmiri *et al.*, 2013)**.

Il en existe deux formes de la MA en fonction de l'origine génétique, la première forme dite « familiale » héréditaire a transmission autosomique dominante, beaucoup plus rare constituant moins de 5% des cas. Cette forme de MA a une origine génétique déterminée, elle affecte généralement des personnes plus jeunes entre 30 et 50 ans. La seconde forme de la MA la plus fréquente et aussi la plus connue est la forme sporadique non familiale qui constitue la majorité des cas 90 % à 95% Celle-ci survient de façon spontanée, sans cause connue, et généralement après l'âge de 65 ans, à partir duquel le risque d'occurrence augmente d'années en années. **(Folliot, 2021 ; El Kadmiri *et al.*, 2013 ; Tanzi et Bertram, 2005)**

Cette maladie est caractérisée par une longue phase asymptomatique qui commence au moins 10 à 20 ans avant les premiers signes de la maladie et une phase clinique qui peut

varier d'une personne à l'autre, mais en général, elle dure en moyenne de 8 à 10 ans (**Dhenain, 2021**).

La maladie a été décrite pour la première fois par le psychiatre et anatomopathologiste allemand, Aloïs Alzheimer en 1906, à travers le cas de l'un de ses patients nommé Auguste Deter âgée de 51 ans. (**Lapre, 2010**). Aloïs Alzheimer l'examina alors qu'elle présentait une incroyable quantité de symptômes allant d'une compréhension et d'une mémoire réduites, jusqu'à l'aphasie, la perte du sens de l'orientation, des comportements imprévisibles, de la paranoïa, des hallucinations auditives et un délabrement psychosocial avancé. Elle présenta ainsi une dégradation des facultés cognitives et une inaptitude psychosociale. (**Maurer et al., 1997**).

Auguste Deter rend l'âme en 1906 et, ayant appris sa mort, Alzheimer effectua une demande spéciale auprès de l'hôpital de Francfort pour réaliser une autopsie afin d'examiner son cerveau. Il constata, dans un premier temps, une grande atrophie cérébrale, particulièrement du cortex impliqué dans la mémoire, le langage, le jugement et la pensée en général. De plus, recourant à la technique d'imprégnation argentique pour colorer les coupes de tissu cérébral qu'il a faites, il découvre les deux anomalies caractéristiques : une dégénérescence des neurones (la dégénérescence neurofibrillaire) et un dépôt anormal d'une protéine à l'extérieur des neurones (les plaques séniles) (Annexe 02) (**Folliot, 2021**). Cette description est confirmée lors de l'essor de la neuroscience au 20^{ème} siècle (**Delacourte, 1997**).

Les neurosciences regroupent un ensemble des disciplines qui étudient le fonctionnement de cerveau et de system nerveux (SN) (**Keller, 2018**). Le cerveau est composé d'un ensemble de structures anatomiques qui comporte au moins 100 milliards de cellules spécialisés, les neurones. (**Orsini et Pellet ,2005**).

Les cellules de SN peuvent être divisées en deux grandes catégories les cellules nerveuses (neurones) et les cellules de soutien appelées cellules gliales (névroglie). Les neurones se distingue nettement des autres cellules par leurs spécialisation dans la transmission des signaux électriques à long distance et la communication intercellulaire, par contre les cellules gliale sont incapable d'emmètre des signaux électrique. (**Augustine et al., 2015**).

La plupart des neurones comprennent trois parties : le corps cellulaire ou soma qui représente le centre des fonctions vitales du neurone (expression génétique, production de protéines, production d'énergie) ; les dendrites qui forment un arbre plus ou moins complexe dont le rôle est de capter les signaux provenant d'autres neurones via les synapses et l'axone et l'arborisation terminale qui conduisent les potentiels d'action vers les autres neurones ou des cellules musculaires dans le cas des neuro-moteurs. **(Cappy, 2020).**

Dans le cerveau, le nombre des cellules gliales dépasse celui des neurones. En dépit de leur supériorité numérique, elles ne participent pas directement aux interactions synaptiques ni à la production de signaux électriques, bien que leurs fonctions de soutien contribuent à délimiter les contacts synaptiques et à maintenir les neurones en état d'émettre des signaux. Il a été prouvé que ces cellules jouent des rôles dans la préservation de l'environnement ionique des neurones, la modulation de la fréquence de propagation des signaux, la modulation de l'action synaptique par contrôle de l'absorption des neurotransmetteurs au niveau ou à proximité de la fente synaptique, etc. **(Augustine et al., 2015).**

Il y a trois types de cellules gliales dans le système nerveux central adulte : les astrocytes, les oligodendrocytes et les microglies. Les astrocytes localisées dans le SNC la fonction essentielle de ces cellules est de maintenir par divers moyens un environnement chimique adéquat pour la production des signaux nerveux **(Augustine et al., 2015).**

Les oligodendrocytes qui ne se retrouvent eux aussi que dans le système nerveux central (SNC), déposent autour de certains axones mais pas de toute une enveloppe feuilletée riche en lipide la myéline qui a des effets importants sur la vitesse de conduction de potentielle d'action. Dans le système nerveux périphérique (SNP) les cellules qui élaborent la myéline sont les cellules de Schwann **(Augustine et al., 2015).**

Les cellules de la microglie dérivent de cellule précurseur hématopoïétique certaines pouvant toutefois dériver directement de cellule précurseur neuronale. Elles ont beaucoup de propriétés en commun avec les macrophages localisés dans d'autres tissus. Ce sont essentiellement des éboueurs qui enlèvent les résidus de cellules lors d'une lésion cellulaire ou de remplacement cellulaire normal. La microglie comme les macrophages sécrètent des molécules de signaux notamment une grande variété de cytokines, agissent sur les inflammations locales et influencent la survie ou la mort cellulaire. Lors d'atteintes cérébrales,

le nombre des cellules de la microglie augmente considérablement à l'endroit de la lésion. **(Augustine et al., 2015).**

Les neurones se regroupent pour la plupart dans le SNC ou névraxe composé de l'encéphale et la moelle épinière. Tous les organes et viscères de notre corps sont reliés au SNC grâce à un vaste réseau de nerfs ou SNP. **(Orsini, et Pellet, 2005).** (Annexe 03).

Le SNC est constitué de l'encéphale contenue à l'intérieure de la boîte crânienne et de la moelle épinière contenue dans le canal vertébral. Il est en effet parcouru par une cavité appelée canal central, tapissée par une membrane unicellulaire la membrane épendymaire. Au niveau de l'encéphale ce canal en se délatant donne naissance aux quatre ventricules cérébraux. L'encéphale est subdivisé en cinq parties le télencéphale, diencéphale, mésencéphale, métencéphale, myélocéphale. **(Maillot, 2002)**

Le télencéphale ((cerveau)) est constitué de deux hémisphères cérébraux (gauche et droit) relié entre eux au niveau de corps calleux. La couche la plus externe de la partie la plus dominante du cerveau est appelé cortex cérébral (substance grise) et la couche inférieure constitué de substance blanche. Des renflements et des sillons subdivisent le cortex cérébral en quatre lobes externes : frontale, pariétale temporale et occipitale et deux lobes internes : limbique et l'insula. L'hippocampe appartient aux structures internes du lobe temporal il joue un rôle déterminant dans le mémoire. (Annexe 04) **(Kabeya, 2014).**

Le system nerveux assure la perception de notre environnement et élabore des réponses adaptées permettant le bon fonctionnement de l'organisme, comme la coordination des mouvements musculaire, ou le contrôle de l'activité cardiorespiratoire, mais aussi des activités cognitives (langage, mémoire, attention, perception prise de décision résolution de problème ...) et les fonctions exécutives (inhibition, flexibilité mental ...). La liaison entre les neurones constitue les synapses à travers lequel le message nerveux est conduit. **(Bogliotti, 2017).**

Ces neurones communiquent entre eux par des messagers chimiques appelés neurotransmetteurs. Toute altération de l'activité de ces derniers à des répercussions profondes et souvent spécifiques sur notre comportement **(Balthazart, 2010).** De nombreuses anomalies cérébrales en neurotransmetteurs ont été démontrés dans la MA, le déficit en acétylcholine (Ach) est le plus constant et le plus net. **(Hauw, 1999).**

L'atrophie cérébrale qui se produisant lors de la MA induit une dilatation du système ventriculaire, pertes neuronale et synaptique, un agrandissement des espaces péri vasculaires et un élargissement des sillons corticaux. Des lésions microscopiques sont présentes en grande quantité dans le cortex cérébral et l'hippocampe (**Dhenain, et al., 2002**). Par conséquent, le poids du cerveau diminue au cours de la MA (200 à 300 g, soit 15 à 25 % selon la plupart des auteurs) (Annex 05) (**Dhenain, et al., 2002**)

Des études montre que le taux annuels d'atrophie cérébrale globale dans le cas de la MA sont d'environ 2% à 3% contre 0.2% à 0.5% chez les témoins sains (vieillesse normale). (**Fox et Schott, 2004**). (Annex06)

Dans toute cause de troubles neurocognitifs dégénératifs, il y a un dysfonctionnement synaptique et un mécanisme d'accumulation et d'agrégation de protéines mal conformées dans le tissu cérébral. (**Quadrio, 2021**).

Ces protéines impliquées sont physiologiquement présentes chez les personnes saines sous forme de monomères solubles. Elles vont subir dans certaines circonstances pathologiques un changement conformationnel (oligomères) entraînant leur agrégation en polymères insolubles. Ce changement conformationnel concerne la structure secondaire, tertiaire et quaternaire des protéines et définit ce que l'on appelle une « protéinopathie » c'est le cas de la MA (**Quadrio, 2021**).

Sur le plan physiopathologique, la MA est caractérisée par la présence d'une double protéinopathie, causant deux types de lésions cérébrale observés en histologie : les plaques bêta-amyloïdes (ou plaques séniles) constituées de dépôts inter-neuronaux de protéines beta amyloïde (A β) mal conformées, et les dégénérescences neurofibrillaires (DNF) constituées d'inclusions intra-neuronales de protéines tau hyperphosphorylées et agrégées. L'association de ces deux lésions va être responsable d'un dysfonctionnement et d'une mort neuronale, qui semble plus étroitement liée aux lésions de dégénérescence neuro-fibrillaire, du fait qu'elles sont les principales lésions microscopiques (Annexe 07) (**Leroy et al., 2015 ; Pasquesoone et al., 2022**).

Plusieurs hypothèses physiopathologiques ont été proposées, qui font intervenir les radicaux libres ou certains composés réactifs de l'oxygène qui peuvent jouer un rôle dans la

neurotoxicité de la protéine amyloïde, la formation des enchevêtrements neurofibrillaires et la mort cellulaire (Desport *et al.*, 2002).

Trois gènes majeurs ont été identifiés comme impliqués dans les formes familiales précoces de MA, ils sont liés au métabolisme du peptide A β : le gène de la Préséniline 1 PSEN 1 situé sur le chromosome 14 ; le gène de l'*Amyloid Protein Precursor* APP situé sur le chromosome 21 ; le gène de la Préséniline 2 PSEN 2 chromosome 1. (Quadrio, 2021).

Pour la forme sporadique, un certain nombre de facteurs de risque de développement de la maladie ont été identifiées. L'âge est le facteur qui intervient en premier lieu, après l'âge le facteur le mieux documenté pour le développement de la MA est associés à l'apolipoprotéine E (Apo E), qui aide normalement à transporter les cholestérols dans le sang, y compris la protéine amyloïde. (Tison, 2022 ; Barlow *et al.*, 2016). Le gène d'Apo E existe dans le chromosome 19 (Quadrio, 2021), sous trois allèles APO ϵ 2, APO ϵ 3, et APO ϵ 4. L'expression de cet dernier augmente considérablement le risque de développer une forme sporadique de la MA. Ainsi, les individus possédant deux copies APO ϵ 4 (homozygote) ont en moyenne un risque 15 fois plus élevé de développer une forme sporadique de la MA que ceux qui ne portent pas ces allèles. Le risque pour les individus portant un seul allèle APO ϵ 4 (hétérozygote) diminue d'environ 3 fois. (Tison, 2022). L'APO ϵ 4 interfère avec la clairance des peptides amyloïdes (A β) et provoque une désinhibition du mécanisme de *signalling* de la cyclophiline A. (Quadrio, 2021).

L'axone du neurone est composé de microtubules (Hayez *et al.*, 2019) qui sont des protéines qui s'assemblent pour former des fibres jouant un rôle essentiel dans la physiologie et la morphologie du neurone notamment dans le transport des protéines et des organelles intracellulaire, la division cellulaire, et le transport axonaux rapides antérograde et rétrograde (Tison, 2022). Certaines protéines peuvent stabiliser les microtubules entre elles contre leur désassemblage, de manière à former l'exosquelette de l'axone. Ces protéines appelées MAPs (*Microtubules Associated Proteins*) sont liées le long des microtubules. (Hayez *et al.*, 2019).

La protéine *tau* (*tubulin associated unit*), fait partie de la famille de protéines associées aux microtubules (Hayez *et al.*, 2019). Principalement exprimée dans les neurones et plus spécifiquement dans le compartiment axonal du neurone. Elle a été également décrite dans le compartiment somato-dendritique, dans les astrocytes et dans une moindre mesure dans les oligodendrocytes. La forme humaine de la protéine tau est codé par le gène MAPT

(Microtubule associated protein Tau) contient 16 exon et localisé sur le chromosome 17, **(Tison, 2022 ; Dujardin et al., 2008)**.

Les microtubules sont composés de sous unités α -tubuline et β -tubuline la protéine tau se fixe à l'interface de ses deux sous-unités, permettant la stabilisation du microtubule. **(Tison, 2022)**. Elle joue donc un rôle directe dans la modulation de la stabilité des microtubules des axones et également leur flexibilité et permet la croissance de l'axone et des dendrites en permettent la survie des extrémités cellulaires. (Annexe 09) **(Hayez, et al., 2019)**.

La protéine *tau* subit de nombreuses modifications post traductionnelle parmi elles l'état de phosphorylation qui a été particulièrement étudiée **(Tison, 2022)**. Car l'affinité de *tau* pour les structures microtubulaire est finement régulée par le degré de phosphorylation de la protéine. **(Afect, 2011)**.

Dans le cas normale, dix site de phosphorylation ont été mis en évidence sur la protéine *tau* soluble dans les extraits de cerveau de patients sains, alors qu'environ 45 sites phosphorylés qui ont été identifiés dans la MA **(Tison, 2022)**. Cette hyperphosphorylation pathologique empêche la protéine *tau* d'exercer son rôle de polymérisation et de stabilisation des microtubules du cytosquelette neuronal **(Dhenain, 2021)**. Ce déséquilibres de processus de phosphorylation de la protéine *tau* seraient dû à un déséquilibre de l'activité kinase et phosphatase dans le neurone. **(Tison, 2022)**.

Il a notamment été démontré que l'augmentation d'activité des protéines kinase telle que *Fyn* de la famille des tyrosines kinases *Src*, la protéine kinase II dépendante de la Ca^{2+} /calmoduline (Ca MKII), la CDK5, la GSK-3, ou plus récemment la caséine kinase 2 pourraient jouer un rôle essentiel dans l'hyperphosphorylation *tau* qui peut être également due à la diminution de l'activité des phosphatases. Parmi toutes les phosphatases, la protéine phosphatase 2A (PP2A) est la principale phosphatase cérébrale et représente 70% de l'activité phosphatase de *tau* dans le cerveau humain. Dans le cas de la MA, l'activité de la PP2A est réduite de 20 % à 40%. Cette réduction peut être due à une diminution de l'expression de la protéine PP2A ou l'augmentation d'inhibiteurs endogènes de la PP2A. **(Tison,2022)**.

Les DNF présentent une structure en feuillets β . Morphologiquement les DNF sont décrits comme de nombreuses paires de filaments hélicoïdaux (deux filaments axialement opposés d'un diamètre de 10 nm). Grâce au différentes technique biochimique immunohistochimie et le séquençage protéique, des études ont démontrés la présence dans les

DNF de différents composés : éléments du cytosquelette incluant la protéine *tau* des neurofilaments, des protéines associées aux microtubules (MAP2) les protéines vimentine et tropomyosine et des éléments du protéasome, des molécules inflammatoires et des molécules issue de stress oxydatif, etc. Il est largement accepté que la protéine *tau* est l'élément protéique majeur des DNF. **(Tison,2022).**

Les plaques séniles, aussi appelées «plaques amyloïdes», sont des dépôts extracellulaires de substance amyloïde de forme sphérique. Cette substance amyloïde est constituée d'amas de filaments de protéine A β , de microglies activées, d'astrocytes réactifs et de radicaux libres...etc. **(Govaerts et al., 2007).**

Le peptide (A β), qui est l'origine des plaques amyloïdes, provient d'un clivage d'une glycoprotéine membranaire appelée «*Amyloid Precursor Protein*» (ou APP). (Annexe 10) L'APP est une protéine transmembranaire très répandue dans l'organisme, jouant plusieurs rôles dans différents types de cellules et dans le SNC, en particulier. C'est une molécule d'interaction cellule-cellule, un récepteur de surface et un facteur de croissance (formation du cytosquelette, régulation du calcium intracellulaire, formation des synapses, modulation des cholinestérases, etc.) **(Govaerts et al., 2007).**

A partir de la séquence en acide aminés du peptide β -amyloïde le gène de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) a été cloné et localisé sur le chromosome 21. **(Tison, 2022).**

La région A β se situe au niveau de la partie membranaire de la protéine APP. Elle est composée des 28 acides aminés jouxtant le domaine trans-membranaire et des 12 à 14 résidus voisins faisant partie du domaine extra-membranaire. **(Govaerts, et al., 2007) (Annexe 07)**

Dans la cellule, l'APP peut être clivée pour produire différents fragments solubles sécrétés, transmembranaires et cytosoliques. Le double clivage de l'APP s'effectue de façon séquentielle par la combinaison de deux des trois principales enzymes responsables du clivage de l'APP en position α ou β dans sa portion extracellulaire, puis en position γ , à l'intérieur du domaine transmembranaire de l'APP. Ainsi, la protéine APP peut subir deux types de clivage endoprotéolytique bien distincts, soient : le clivage non amyloïdogénique ne menant pas à la production de peptide A β ou le clivage amyloïdogénique produisant le peptide A β et étant problématique dans la MA. **(Brodeur, 2013).** (Figure 07 Annexe 01)

Dans la voie non amyloïdogénique, aussi appelé clivage α , la portion extracellulaire de l'APP est clivée en premier lieu par l' α -sécrétase membranaire, une métalloprotéinase au zinc transmembranaire de type I de la famille ADAM. Ce premier clivage s'effectue à l'intérieur de la séquence du peptide $A\beta$ que contient l'APP et entraîne la production d'un fragment aminoterminal soluble l'APP α (APP α s), libéré dans le milieu extracellulaire (**Brodeur, 2013**). Ce dernier est considéré comme une protéine neuroprotectrice qui peut être impliquée dans la formation des synapses et dans la survie neuronale (**Tison, 2022**). Ainsi que celle du fragment transmembranaire C-terminal, CTF α (*C-terminal fragment α*) ou C83. (Annexe 07)

Le fragment CTF α subit ensuite un second clivage par l' γ -sécrétase membranaire, à l'intérieur de son domaine transmembranaire, soit juste à l'extrémité C-terminale de la séquence de l' $A\beta$. De cette manière, un peptide $A\beta$ tronqué n'ayant aucune propriété neurotoxique. (**Brodeur, 2013**). Un fragment aminoterminal soluble (P3) et un fragment C-terminale liée à la membrane appelé domaine AICD (*APP intracellular cytosolic domain*) (CD59 /57) sont produits. Les γ -sécrétases sont des complexes multienzymatiques dans lesquels la préséniline 1 ou 2 joue le rôle de sous unité catalytique. (**Tison, 2022**). (Annexe 07)

Pour le clivage amyloïdogénique aussi appelé clivage B implique la β -sécrétase membranaire BACE1 (B-site APP cleaving-enzyme 1) une aspartyl-protéase transmembranaire de type I. Cette dernière effectue le clivage de l'APP dans sa région extracellulaire, soit à l'extrémité N-terminale de la séquence du peptide AB . Ce clivage produit le fragment aminoterminal APP β soluble (APPBs), qui est libéré dans le milieu extracellulaire et le fragment transmembranaire C terminal B, (CTFB) (*C-terminal fragment B*) ou C99. Ce dernier est ensuite clivé à l'intérieur de son domaine transmembranaire par la γ -sécrétase, pour permettre la libération de l'extrémité C-terminale du peptide B-amyloïde soluble ainsi que celle du fragment cytosolique AICD. Cette voie de clivage B, menant à la production de l'AB (**Brodeur, 2013**). (Annexe 07)

Après sa production et sa libération dans l'espace extracellulaire les peptides $A\beta$ sont éliminés par plusieurs mécanismes potentiels. La principale voie d'élimination dans le cerveau est la transcytose à travers la barrière hémato-encéphalique vers la lumière vasculaire. Une deuxième voie d'élimination de peptide $A\beta$ et la dégradation protéolytique impliquant des enzymes. La troisième voie impliquerait les cellules immunitaires du SNC, la microglie qui pourrait phagocyter via un récepteur TREM2 les peptides B-amyloïdes, pour être ensuite

dégradé. Ce processus est facilité par la liaison des peptides *AB* avec des apolipoprotéine incluant Apo E. Des variants des principaux gènes impliqués dans cette cascade (TREM2, ApoE.) ont également été associés à l'apparition de formes sporodiques de la MA. **(Tison, 2022)**.

Les mécanismes qui mènent à l'agrégation des peptides *AB* sont encore mal connus, mais l'augmentation locale de la concentration de peptide *AB* non soluble y joue un rôle déterminant. *Aβ* est un petit peptide qui se décline sous deux formes principales : *Aβ40* et *Aβ42*. La forme *Aβ42* de l'amyloïde bêta a une tendance nettement plus forte à s'auto-agréger et favorise donc l'apparition de plaques amyloïdes. **(Govaerts et al., 2007)**. (Annexs 09)

Le peptide bêta amyloïde présente une structure amphiphile constitué d'un domaine hydrophile en amino-terminal et d'un domaine hydrophobe en carboxy-terminal.

Les filaments du peptide β-amyloïde sont une forme ultra-structurée insoluble et stable, constitués de longues fibres non ramifier caractérisé par une structure quaternaire à feuillets β croisés. Ces fibres vont s'accumuler pour former des plaques séniles. **(Tison, 2022)**. (Annexe 09)

Le diagnostic des troubles neurologique cognitives dégénératifs tel que la MA est complexe et repose sur un faisceau d'arguments cliniques, radiologiques, neuropsychologiques et biologiques. **(Quadrio.2021)**.

Le diagnostic clinique de MA n'est porté le plus souvent qu'au stade de démence, c'est-à-dire lorsque les déficits cognitifs sont déjà installés et marqués. Mais les lésions neuropathologiques typiques de la MA sont exprimées dans le cerveau à des stades précoces, bien avant le stade clinique de démence. **(Semah, et al., 2016)**.

Déférentes technique de diagnostic para-clinique sont mises en pratique, ces techniques permettent d'identifier des biomarqueurs d'affections neurodégénératives lentement progressives dont le diagnostic était basé antérieurement sur des arguments essentiellement cliniques et neuropsychologiques **(Démonet, 2013)**.

Un biomarqueur peut être considéré comme une caractéristique qui peut être mesurée et évaluée indépendamment comme un indicateur des processus biologiques normaux, des

processus pathogènes ou de la réponse pharmacologique à une thérapeutique. (Amdouni, 2017) Le liquide céphalorachidien, (LCS) et le liquide dans lequel baigne notre cerveau, il est en contact indirect avec le liquide interstitiel du parenchyme cérébral. Toutes les modifications biochimiques de ce dernier y sont donc potentiellement reflétées. (Leroy *et al.*, 2021).

Relativement facile d'accès par la ponction lombaire de la moelle épinière, le LCS a très tôt été identifié comme une source potentielle de biomarqueurs de maladies neurodégénératives. (Leroy *et al.*, 2021). Ces biomarqueurs sont divisés en deux catégories : biomarqueurs de pathologie amyloïde et biomarqueur de taupathie.

La première catégorie des biomarqueurs est la détection des dépôts $A\beta$ dans (LCS), une diminution de concentration du peptide $A\beta_{42}$ et plus particulièrement le ratio entre le peptide $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ est un signe de progression de la maladie. (Leroy *et al.*, 2021 ; Guyon, 2021)

La diminution $d'A\beta_{42}$ serait liée à son caractère très hydrophobe, prompt à s'agréger en feuillet bêta. Cette caractéristique physicochimique entraînerait sa captation rapide par les dépôts amyloïdes dès lors qu'ils se forment, et une diminution de sa libération dans le liquide interstitiel et le LCS. (Leroy *et al.*, 2021).

L'hypothèse derrière cette diminution serait que le peptide $A\beta_{42}$ commencerait à être séquestré dans le cerveau et ce peptide serait plus difficilement détectable dû à son agrégation. On peut également réaliser une tomographie par émission de positrons contre l'amyloïde (« positron emission tomography » ou PET), utilisant le composant B de Pittsburg (« Pittsburg Coumpound B » ou PiB). Ce composant est injecté par voie sanguine et va pouvoir traverser la barrière hématoencéphalique pour se fixer aux fibrilles $A\beta$, et les rendre visualisables par imagerie. (Leroy *et al.*, 2021).

La deuxième catégorie de marqueurs vise à déterminer si le cerveau du patient commence à dégénérer. Pour cela, on peut quantifier la protéine Tau dans le (LCS) de la même manière que pour $A\beta$ (Guyon, 2021). Une concentration de Tau qui augmente est un indice de dégénérescence. (Leroy *et al.*, 2021).

On peut également utiliser une version du PET, le PET fluodeoxyglucose 18F ou FDG-PET, qui va quantifier la consommation du glucose cérébral, donnant un bon indice des régions qui pourraient ou qui ont commencé à s'atrophier en cas de diminution d'absorption. On dispose aussi de l'imagerie à résonance magnétique (IRM) pour observer le volume du cerveau et là aussi pour détecter une atrophie. **(Guyon, 2021)**.

Aujourd'hui aucun traitement n'est disponible sur le marché pour traiter la maladie d'Alzheimer de façon curative. Ceci est dû au fait que la physiopathologie n'est pas encore complètement déterminée, mais également que la maladie est diagnostiquée de façon trop tardive à un stade où les lésions irréversibles sont déjà présentes. **(Marfai, 2013)**.

Les stratégies actuelles de traitement sont principalement symptomatiques n'empêchent pas la progression de la maladie et leur but est d'améliorer temporairement les symptômes de la MA. **(Mouffouk, 2019)**.

Parmi les angles d'approche de développement d'un traitement pour Alzheimer, on peut citer le premier « vaccin » historique contre l'A β en 1996. L'idée était de présenter le peptide A β comme un antigène, poussant le système immunitaire à attaquer les dépôts dans le cerveau. Cette approche avait fonctionné *in vivo* sur des modèles de souris, mais avait également mis en lumière l'importance de traiter précocement, le traitement ne réagissant pas sur les plaques séniles. **(Guyon, 2021)**.

L'étude clinique du vaccin débutée en Décembre 1999 a rapidement été interrompue en 2002 car 6% des patients développaient des méningo-encéphalites dues à la réaction immunitaire violente contre l'A β cérébral. Les compagnies pharmaceutiques ont longtemps voulu inhiber la coupure d'APP par la protéine BACE1 en développant des inhibiteurs mais aucun des essais cliniques n'a été concluant, car inhiber BACE1 déclenche des effets adverses, étant donné son implication dans plusieurs voies métaboliques. **(Guyon, 2021)**.

Actuellement, il y a 132 études cliniques en cours qui testent pour la majorité des petites molécules ou des anticorps monoclonaux sur des voies métaboliques impliquées dans la MA.

Le souci majeur que l'on peut observer à travers toutes ces études, ce n'est qu'aucune propose réellement de guérir la maladie mais uniquement d'inhiber certains symptômes. Détruire de la plaque amyloïde ne l'empêchera pas de s'accumuler à nouveau. De

plus, le développement de petites molécules ou de l'immunothérapie implique une prise régulière du traitement et est donc synonyme d'inconfort et de dépense. **(Guyon, 2021)**.

Les lésions de la MA touchent principalement les voies cholinergiques mais d'autres systèmes sont également atteints. Il en résulte une diminution parfois massive des taux de neurotransmetteurs circulant dans le cerveau. Le déficit cholinergique peut atteindre jusqu'à 90 % dans les stades sévères de la maladie et concerne le néocortex, l'hippocampe, le noyau basal de Meynert, le striatum et le thalamus. **(Barré et al., 2007)**.

Un des très grands critères de la maladie est le manque d'acétylcholine présent chez les patients, C'est pourquoi sur quatre médicaments disponibles sur le marché, trois sont des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (« Acetylcholinesterase inhibitor » ou AChEI). **(Guyon, 2021)**. La stratégie de ces traitements est de bloquer l'action de cette enzyme afin de limiter la diminution de la concentration d'acétylcholine au niveau cérébral et donc d'améliorer les fonctions cérébrales chez les patients. **(Marfai, 2013)**.

L'acétylcholinestérase est une enzyme clé pour la neurotransmission qui permet aux neurones cholinergiques de retrouver leur état de repos en hydrolysant l'acétylcholine (Ach).

L'Ach est libéré par le neurone présynaptique sous l'effet d'un potentiel d'action et diffuse dans la synapse pour se fixer à un récepteur cholinergique. Le potentiel d'action est ainsi transmis au neurone postsynaptique. A ce moment, l'AchE hydrolyse rapidement l'Ach, interrompant la transmission de l'influx nerveux. **(Kwasnieski, 2010)**.

Toute une série de molécules visant à inhiber cette enzyme ont été développés afin de réduire cette dégradation physiologique et renforcer ainsi la transmission synaptique cholinergique chez les patients atteints d'Alzheimer.

Plusieurs inhibiteurs synthétiques sont utilisés cliniquement mais ils présentent une efficacité limitée, des problèmes de biodisponibilité et certains effets secondaires (troubles gastro-intestinaux, nausées, vomissements et diarrhées) **(Colovic et al., 2013)** . La tacrine est le premier médicament utilisé pour le traitement de la maladie. Elle a été retirée du marché pour sa toxicité hépatique. Le donépézil (Aricept1), la galantamine (Réminy11) et la rivastigmine (Exelon1) sont actuellement sur le marché pour le traitement de la maladie.). **(Barré et al., 2007)**

Pour toutes ces raisons, la recherche de nouveaux inhibiteurs de l'AchE à partir de sources naturelles représente un domaine d'investigation prometteur. (**Mukherjee *et al.*, 2007 ; Murata *et al.*, 2015 ; Braidy *et al.*, 2017**).

Actuellement, les scientifiques favorisent le développement d'une nouvelle génération de molécules à activité anti-acétylcholinestérase d'origine végétale pour remplacer celles de synthèse qui présente des effets secondaires indésirables.

A cet effet, des études scientifiques s'intéressent à la phyto-chimie et aux activités biologiques des extraits des plantes, dans le but d'élargir les perspectives de valorisation des produits naturels.

Dans ce cadre, l'objectif de notre travail vise à étudier les activités biologiques, anti acétylcholinestérase et antioxydant de l'extrait de deux plantes médicinales cultivées *Hibiscus sabdariffa* et *Anagallis sventis*. Dans le but de trouver des molécules d'intérêt qui présentent un potentiel inhibiteur d'acétylcholinestérase et qui peut atténuer les symptômes de la maladie d'Alzheimer.

- ✚ La première partie de ce document est consacrée à une synthèse bibliographique sous forme d'une introduction générale, qui comporte une vue globale sur la maladie d'Alzheimer.
- ✚ La seconde partie (la partie expérimentale) comportant la description du matériel biologique, les méthodes d'extraction, et les méthodes d'évaluation *in vitro* des activités antioxydante, anticholinestérase, ainsi que les résultats obtenus et leurs discussions.
- ✚ En dernier lieu, une conclusion sera donnée pour restituer les principaux résultats obtenus et les perspectives voulues pour pouvoir compléter et améliorer cette étude.

Chapitre I

Partie expérimentale

| *I.1. Monographie des plantes*

I.1. Monographie des plantes

I.1.1. *Hibiscus sabdariffa* L.

I.1.1.1. Noms vernaculaires

Arabe : الكركدية (Karkadé)

Anglais : Red sorell , Rozelle

Français : Oseille de Guinée,
Thé rose d'Abyssinie, Roselle

I.1.1.2. Systématique

Règne : Plantae

Embranchement : Tracheophyta

Sous Embranchement : Angiospermophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Malvales

Famille : Malvaceae

Sous famille : Malvoideae

Genre : *Hibiscus*

Espèce : *Hibiscus sabdariffa* L. (<https://www.catalogueoflife.org/data/taxon/3LK87>)



Figure 1 : *Hibiscus sabdariffa* (photo original)

I.1.1.3. Description botanique de la plante

Plus des 500 espèces d'*Hibiscus* sont connus dans le monde. La majorité des variétés sont utilisées comme plantes ornementales à l'exception du type *sabdariffa* dont deux variétés ont été identifiées. Il s'agit d'*Hibiscus sabdariffa* variété *altissima* et d'*Hibiscus sabdariffa* variété *sabdariffa* L. (Cisse, 2009)

Hibiscus Sabdariffa var. *sabdariffa* fait partie de la famille des Malvaceae, c'est une grande plante annuelle herbacée qui peut atteindre 1.5 m de hauteur. La tige robuste porte des feuilles ovales, longuement pétiolées, palmatilobé en 3, 5 ou 7. (Figure : 01)

A l'aisselle des feuilles naissent des fleurs jaunes pales (figure : 02) portée par un pédicelle d'environ 2 cm de long, tachetées sur fond brun qui sont constituées par un calice à 5 sépales étroits, linéaires qui, à maturité, sont charnus est plus ou moins colorés en rouge brunâtre, elle est hermaphrodite. Ces sépales entourent l'ovaire et persistent tandis que les

pétales minces disparaissent. Le fruit est une capsule à 5 loges entourée du calice entier. (Pousset, 2004).

I.1.1.4. Origine et répartition géographique

Hibiscus sabdariffa était cultivé à l'origine en Afrique, puis elle a été introduite dans de nombreux pays (Inde, Sri Lanka, Thaïlande, Malaisie et Java, etc.). De nos jours, la Roselle est présente dans toutes les régions tropicales et subtropicales, surtout en Afrique. (Spichiger., et a 2002).

I.1.1.5. Ecologie

Hibiscus se développe bien dans la plupart des sols. Elle aime les climats tropicaux humides. Les graines ont besoin d'une température minimale de 10°C pour germer mais la température optimale pour le développement de la plante se situe entre 20 et 35°C, avec des précipitations mensuelles de 130 à 260 mm pendant les 3 à 4 premiers mois de croissance. Le pH optimum du sol, pour un bon développement, est de 5-6, et les meilleurs sols sont sablonneux ou de type terreux. En général, la meilleure période pour planter l'*Hibiscus sabdariffa* est au printemps. (Endrias, 2006).



Figure 2 : A : calices B : fleur d'Hibiscus Sabdariffa (photos originaux)

I.1.1.6. Usage et propriétés thérapeutiques

Les différentes parties d'*Hibiscus sabdariffa* (feuilles, calices, graines,) sont utilisées dans l'alimentation humaine, en pharmacopée, et l'industrie agro-alimentaire. Les calices constituent la partie la plus importante de la plante du point de vue économique. Ils contiennent des protéines, des vitamines, des polyphénols, des pectines, du carotène, des fibres, des minéraux. La présence de tous ces éléments explique l'utilisation de l'hibiscus dans divers domaines (Ndiaye *et al.*, 2015 ; Endrias., 2006).

I.1.1.6.1. Usage traditionnel et courant

a. Calices

- ✚ Les calices interviennent dans la production de boissons. Ces boissons sont toutes élaborées à partir d'un extrait aqueux obtenu après trempage des calices dans de l'eau chaude ou à température ambiante. Cette boisson largement répandue en Afrique et en Asie est connue sous plusieurs appellations.
- ✚ La production de confiture, gelée et dessert à partir des calices est aussi largement répandue. Les confitures d'*H. sabdariffa* sont appréciées aux États-Unis, en Australie, au Sénégal, dans les Caraïbes et en Asie.
- ✚ Les extraits de calices sous forme de concentré ou de poudre séchée sont utilisés comme colorant naturel dans les industries alimentaires (pâtisserie, jus de fruits, boissons, etc.) et pharmaceutiques (Cisse, 2009).
- ✚ En Egypte, les préparatifs des calices ont été utilisés pour traiter les maladies cardiaques et nerveuses. En Afrique du Nord, les préparations de calices sont utilisées pour traiter les maux de gorge et la toux, ainsi que des problèmes génitaux, etc. (Da-Costa-Rocha *et al.*, 2014).

b. Graines

Les graines de *H. sadariffa* permettent la fabrication d'huile qui est traditionnellement utilisée en cuisine. Elle peut entrer également dans la fabrication de savon et de produits cosmétiques (Cisse, 2009).

c. Feuille :

Grâce à leurs qualités et à leur valeur nutritive, en Afrique occidentale, les feuilles d'*Hibiscus* sont consommées comme des légumes en soupe ou en salade, mélangées avec d'autres légumes (Endrias, 2006) .

Les feuilles sont utilisées pour le traitement des plaies externes et des abcès. Dans la médecine traditionnelle chinoise, il est utilisé pour traiter les troubles du foie et d'hypertension artérielle (Da-Costa-Rocha et al., 2014).

I.1.1.6.2. Propriétés thérapeutique :

L'espèce *H. sabdariffa* aurait de nombreuses propriétés thérapeutiques : laxatif diurétique, anti-hypertensif et effet cardio-protecteur, anti-bactérien et anti-fongique, pouvoir fortifiant et purificateur du sang. Les préparations à base de feuilles soignent les plaies et les ulcères, ayant une action anti-inflammatoire, adoucissante, antiasthénique et antispasmodique (Cisse 2009).

Elle est utilisée dans la médecine traditionnelle par différentes populations dans le monde. Néanmoins, seul un nombre limité de ces propriétés médicinales a fait l'objet d'études cliniques menées pour la majeure partie sur les animaux. Deux études cliniques, l'une en Iran et l'autre au Mexique, réalisées respectivement sur 54 et 75 patients, ont mis en évidence que la consommation journalière d'extrait d'*H. Sabdariffa* diminuerait de manière significative la tension artérielle chez les sujets hypertendus (Cisse, 2009).

I.1.1.7. Toxicité et précautions d'emploi

Malgré sa popularité et l'utilisation fréquente de cette plante dans le domaine de la pharmacologie, on dispose à nos jours de peu d'informations toxicologiques sur la Roselle. Mais la plupart des études antérieures portant sur le sujet s'accordent sur le fait que sa consommation, même quotidienne, à des doses raisonnables demeure sans danger pour la santé humaine (Guindo, 2019).

I.1.2. *Anagallis arvensis* L.

I.1.2.1 Noms vernaculaires

Arabe : عشب العلق ، لبين المروج

Anglais : scarlet pimpernel, Sheperd's weather-glass

Français : mouron rouge, Mouron des champs

I.1.2.2 Systématique

Règne : Plantae.

Embranchement : Tracheophyta

Sous Embranchement : Angiospermae

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Ericales

Famille : Primulaceae

Sous famille : Myrsinoideae

Genre : *Anagallis*

Espèce : *Anagallis arvensis* L. (<https://portal.wiktrop.org/fr/species/show/25>)



Figure 3 : *Anagallis arvensis* (photo originale)

I.1.2.3 Description botanique de la plante

Anagallis arvensis est une petite plante (Couplan, 1994) herbacée annuelle de 10 à 30 cm de hauteur. Elle a des tiges glabres souples et très rameuses. Les feuilles simples opposées, ovales ou pointues, sont ponctuées de noir en dessous. Les fleurs solitaires de couleur rouge brique, portés par des pédoncules, ont des corolles à tubes presque nul et des pétales rouges vermillon avec le centre pourpre dont les bords sont poilus et finement crénelés. Les fruits sont des capsules contenant de nombreuses graines qui s'ouvrent en boîte à savon (Ducarf, 2010). (Figure : 03)

I.1.2.4 Origine et répartition géographique

Anagallis arvensis est originaire des régions Méditerranéo-Irano-Touranien-Euro-Sibériennes. Elles se trouvent généralement dans les régions tempérées de l'hémisphère nord, moins fréquemment dans les montagnes tropicales (Spichiger *et al.*, 2002 ; Saleem *et al.*, 2022).

I.1.2.5 Ecologie

Anagallis arvensis a la capacité de s'adapter en fonction du climat (**Yasmeen et al., 2020**). Elle pousse bien dans les habitats humides, les sols alluviaux lourds, les rives des canaux et aussi comme mauvaise herbe commune en culture (**Kawashty et al., 1998**).

I.1.2.6 Usages et propriétés thérapeutique

I.1.2.6.1 Usage traditionnel et courant

A. arvensis est utilisée traditionnellement pour traiter l'arthrite, l'œdème, les douleurs, les infections des voies urinaires, la dépression, la tuberculose, la diphtérie, l'épilepsie, la goutte et la rage (**Saqib et al., 2021**). Elle a des propriétés diurétiques, nerveuses, l'épilepsie et stimulantes. Dans les utilisations vétérinaires, *A. arvensis* est utilisé pour guérir la mammite en raison de ses propriétés anti-inflammatoires et émoullientes. Chez les humains ainsi que chez les animaux, la plante est utilisée pour des applications de guérison des plaies. *A. arvensis* est largement utilisé pour les maladies de la peau (**Akerreta et al., 2007**), et pour traiter les infections fongiques en Argentine (**Saleem et al., 2022**)

Les démangeaisons cutanées et les verrues peuvent être traitées par une formulation homéopathique à base d'*A. arvensis*. (**Saleem, et al 2022**). Dans la médecine indienne, cette plante est utilisée pour les troubles menstruels. De même, dans le système de médecine homéopathique, elle est utilisée dans le traitement des éruptions cutanées, des verrues et des infections des voies urinaires (**Gruenwald, 2000**).

I.1.2.6.2 Propriétés thérapeutiques

Les recherches scientifiques sur la plante ont démontré son efficacité dans la cicatrisation des plaies (**Akerreta et al., 2007**), en tant qu'anti-inflammatoire (inhibition de COX-1 et COX-II), antioxydant (capture des superoxydes) (**Lopez et al. 2011**). De plus, il a montré un potentiel pour traiter la constipation, les infestations de ténia et d'autres helminthes, les infections topiques et systémiques causées par des bactéries (la diphtérie) ainsi que des champignons (**Gruenwald et al., 2000 ; Masood et al., 2010**). Cette espèce a aussi une activité antivirale contre (l'herpès, la polio et d'autres virus) (**Amoros et al., 1987**).

De plus une étude menée par **Saqib., et al. (2021)**, a prouvé que l'extrait éthanolique brut d'*Anagallis arvensis* possède également des activités bronchodilatatrices, vasodilatatrices et hypotensives.

I.1.2.7. Toxicité et précautions d'emploi

Selon **Couplan (1994)**, le mouron rouge n'est guère dangereux pour l'homme, mais il passe pour être toxique auprès de divers animaux, poissons et oiseaux surtout. La racine était parfois utilisée en inde pour empoisonner les poissons et les pêcher facilement. Quel que gramme de mouron rouge peut tuer un lapin (**Ducerf, 2010**).

En médecine traditionnelle, le mouron rouge n'est utilisé qu'en homéopathie. (**Schauenberg et al., 2005**), méthode thérapeutique qui consiste à traiter les maladies par des doses infinitésimales (**Demougin et al., 1996**).

| I.2. Matériel et méthodes

La partie expérimentale a été réalisée au niveau des laboratoires pédagogiques de la faculté des sciences de la nature et de la vie et au niveau de centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico- Chimiques (CRAPC) Ouargla.

I.2 Matériel et méthodes

I.2.1 Matériel biologique (Matériel végétal)

I.2.1.1 Choix des espèces

Le matériel végétal utilisé est constitué de la partie aérienne de la plante d'*Anagallis arvensis* et des calices des fleurs de l'*Hibiscus sabdariffa*.

Le choix des deux espèces a été justifié par leur utilisation répandue dans la médecine traditionnelle pour traiter diverses affections, telles que celles mentionnées dans la partie monographie des plantes, selon la médecine traditionnelle les deux plantes ont des effets sur le système nerveux. *Anagallis arvensis* est utilisé pour traiter l'épilepsie (**Saqib et al., 2021**) et *Hibiscus sabdariffa* est utilisé pour traiter les maladie nerveuses (**Da-Costa-Rocha et al., 2014**). Ces deux plantes médicinales présentent un intérêt particulier en raison de leurs propriétés supposées bénéfiques pour la santé.

Malgré le manque d'intérêt économique, des études plus approfondies sur *Anagallis arvensis* pourraient révéler des propriétés intéressantes ou des utilisations potentielles. Encourager la recherche scientifique sur cette plante afin d'explorer ses caractéristiques chimiques, sa pharmacologie, ses propriétés médicinales éventuelles ou d'autres aspects qui pourraient susciter un intérêt. En revanche la plante *Hibiscus sabdariffa* présente un intérêt économique bien établi et nous avons mentionné certains d'entre eux dans partie monographie des plantes.

En sélectionnant ces deux plantes médicinales, notre objectif est d'explorer leur potentiel en termes d'activités anti-oxydantes et inhibitrice de l'acétylcholinestérase dans le contexte de prévenir ou et atténuer les symptômes de la MA, en utilisant des sources naturelles.

I.2.1.2 Récolte et Identification

Les deux plantes, *Anagallis Arvensis* et *Hibiscus Sabdariffa*, ont été récoltées dans la région de Bouamer, située dans la wilaya d' Ouargla. La récolte a été effectuée au mois de Mars 2023 pour *Anagallis Arvensis* et au mois d'Octobre 2022 pour *Hibiscus Sabdariffa*. La récolte des deux plantes à des moments spécifiques peut permettre d'obtenir des niveaux optimaux de composés actifs dans les parties utilisées, ce qui est essentiel pour évaluer leurs activités biologique. **(Figure 04).**

L'identification botanique des deux espèces, a été réalisée à l'aide de différents guides botaniques, notamment les guides d'Ozenda (2004) et de Quezel et Santa (1962). Et avec l'aide de plusieurs botaniste et spécialiste des plantes et agriculteurs.

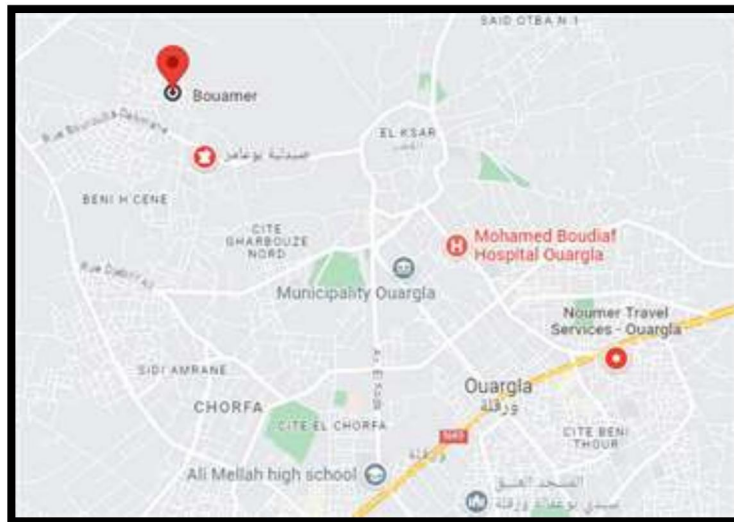


Figure 4 : Carte géographique de la région de Bouamer wilaya d’Ouargla (Google maps)

I.2.1.3 Séchage

Après la récolte, la partie aérienne d'*Anagallis arvensis* (feuilles, tige) et les calices d'*Hibiscus Sabdariffa* sont soigneusement rincés avec de l'eau du robinet pour éliminer toute impureté. Ensuite séchés en utilisant des papiers absorbants pour enlever l'excès d'humidité et placées dans un endroit bien aéré, à l'abri de la lumière, et soumises à un séchage naturel à température ambiante pendant une période de 2 à 3 semaines **(Figure 05).**



Figure 05 : Matière végétale sèche. A : partie aérienne d'*A. Arvensis* ; B : calices d'*H. Sabdariffa* (photos originales)

I.2.1.4 Broyage

Une fois la partie aérienne d'*Anagallis Arvensis* et les calices d'*Hibiscus Sabdariffa* sont complètement séchés le matériel végétal est ensuite réduit en poudre fine à l'aide d'un broyeur électrique. (**Figure 06**)

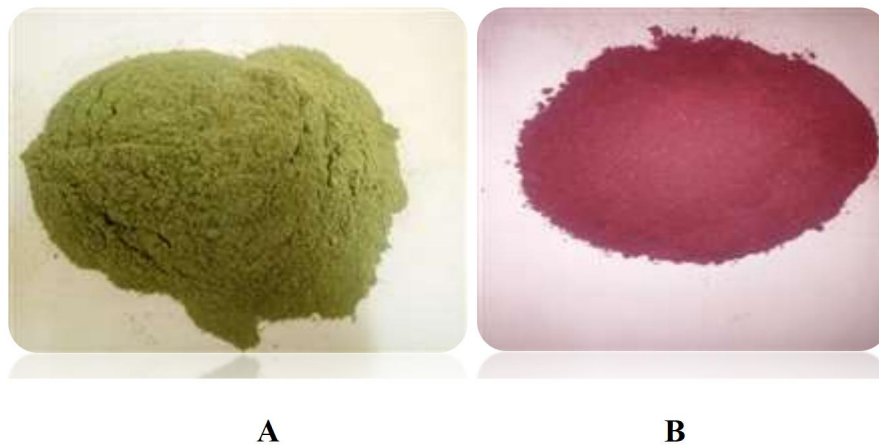


Figure 06 : matière végétale broyer (photos originaux) A : poudre d'*A.arvensis* B : poudre d'*H.Sabdariffa*

I.2.1.5 Conservation

Après avoir réduit le matériel végétal en poudre fine, celle-ci est conservée dans des flacons en verre fermés hermétiquement à l'abri de l'humidité et de la lumière et de toute contamination extérieure jusqu'à son utilisation ultérieure.

I.2.2 Méthodes

I.2.2.1 Extraction liquide-solide (macération)

L'extraction des principes actifs d'*Hibiscus Sabdariffa* et d'*Anagallis Arvensis* est effectuée par macération à température ambiante en utilisant deux solvants : l'eau ou l'éthanol. Un poids de 50 g de chaque poudre végétale des deux plantes est mélangé avec 500 ml de l'eau distillée et laisser macérer pendant 24 heures à température ambiante. Le mélange est filtré à l'aide d'un papier filtre Wattman N°1. L'extraction est refaite trois fois avec renouvellement du solvant afin d'épuiser le matériel végétal.

Pour l'extrait hydro-éthanolique, 50 g de la poudre de matériel végétal de chaque plante est mélangée avec 500 ml de solvant éthanol/eau (80 :20 v/v), est laissé macérer à température ambiante. Après 24 heures, le mélange est filtré en utilisant un papier filtre Wattman N°1. L'extraction est refaite trois fois avec renouvellement du solvant afin d'épuiser le matériel végétal. **(Figure : 07)**



Figure 07 : extraction par macération et filtration

I.2.2.2 Concentration et lyophilisation des extraits obtenus

Les volumes totaux obtenus des extraits hydro-éthanolique et des extraits aqueux des deux plantes sont ensuite concentrés par le rotavapor à 35°C pour les extraits hydroéthanolique à 47°C pour les extraits aqueux.

Les extraits hydro-éthanolique concentrés sont conservés dans des flacons sombres et bien fermés à +4 °C. Alors que les extraits aqueux des deux plantes subissent un processus

supplémentaire avant d'être conservés. Ils sont d'abord congelés, puis soumis à la lyophilisation en utilisant lyophilisateur Les poudres obtenues sont conservé dans des flacons sombres et hermétiquement fermé à +4°C. 5 (**Figure : 08**)



Figure 08 : Photos de matériels utilisés. A : lyophilisateur B évaporateur rotatif

I.2.2.3 Détermination de rendement d'extraction

Le rendement d'extraction correspond au pourcentage de la matière dissoute dans un solvant organique et/ou aqueux utilisé pour l'extraction. Le poids de l'extrait sec est déterminé par la différence entre le poids du verre de montre plein (après évaporation) et le poids du verre de montre vide (avant évaporation) (**Mohammedi, 2006**). Cette méthode est appliquée pour l'extrait aqueux et l'extrait hydroéthanolique.

Le rendement d'extraction est calculé par la formule de **Folo Lisele (2014)** :

$$R (\%) = [((M1 - M2))/E] \times 100$$

R : rendement d'extraction en %;

M₁ : est la masse de l'extrait après évaporation du solvant en g

M₂ : est la masse de verre de montre vide en g.

E : pois de la poudre utilisée pour l'extraction.

I.2.2.4 Criblage phyto-chimique

La première étape d'une étude phyto-chimique est de mettre en évidence la présence des grandes classes de composés chimiques dans les extraits des plantes étudiées. En effet, le criblage phyto-chimique consiste à réaliser une analyse chimique qualitative basée sur des

réactions de coloration et/ou précipitation ou floculation plus ou moins spécifiques à chaque classe de principes actifs (**Kanfou, et al., 2018**).

Le criblage phyto-chimique des extraits aqueux et éthanolique des deux plantes a été réalisée en utilisant les techniques analytiques de référence décrites dans les travaux de Godin, (1954), Ladiguina et al. (1983), Georgievskii (1990), Dawson et al. (1991), Wagner et Bladt (1996), Dekker (2002), Chaaib (2004), Lagnika (2005), Békro et al. (2007) et Mamyrbékova-Békro et al. (2008), afin de mettre en évidence la présence ou l'absence des différents métabolites primaires et secondaires dans les quatre extraits obtenus à savoir : Tanins (catéchiques et galliques), flavonoïdes, coumarines, quinones libres, alcaloïdes, terpénoïdes, stéroïdes, saponines, composées réducteur, etc.

I.2.2.4.1 Tanins

La mise en évidence de la présence des tanins a été effectuée par le test de **Trease et Evans (1987)**. Un volume de 2 ml de chaque extrait des deux plantes est mélangé avec quelques gouttes d'une solution de FeCl₃ (1%). Le mélange est incubé dans un bain marie pendant 15 min à 50°C. La présence des tanins est indiquée par une coloration verdâtre ou bleu-noire.

La différenciation des tanins cathéchiques des tanins galliques est obtenue grâce au réactif de Stiasny. Sur 30 ml d'extrait aqueux on ajoute 15 ml de réactif de Stiasny, ensuite la solution est chauffée à reflux au bain marie pendant 15 à 30 minutes. L'apparition d'un précipité de couleur rose claire montre la présence des tanins catéchiques (**Mibindzou et Mouellet, 2004**).

I.2.2.4.2 Flavonoïdes

Les flavonoïdes ont été recherchés par la réaction à la cyanidine. À 5ml de différents extraits, on ajoute 5 ml d'éthanol chlorhydrique ensuite quelques copeaux de magnésium sont ajoutés ainsi qu'un ml d'alcool isoamylique. L'apparition d'une coloration sur la couche surnageant d'alcool isoamylique indique la présence des flavonoïdes libres (génine) :

- Une coloration rose-orangée indique la présence des flavones.
- Une coloration rose-violacée indique la présence des flavanones.
- Une coloration rouge indique la présence des flavonols et des flavanonols. (**Mibindzou et Mouellet, 2004**).

I.2.2.4.3 Anthocyanes

A 2 ml de chaque extrait des deux plantes on ajoute 2 ml d'HCl (2N) puis 2 ml d'hydroxyde d'ammonium (NH₄OH). Une coloration bleue violacée en milieu basique témoigne de la présence d'anthocyanes (**Ribereau-Gayon, 1968**).

I.2.2.4.4 Coumarines

La révélation de la présence des coumarines est effectuée en ajoutant 3 ml de NaOH (10%) à 2 ml de chaque extrait des deux plantes. Après agitation de la solution, l'apparition d'une couleur jaune indique la présence de coumarines (**Diallo, 2000**).

I.2.2.4.5 Quinones libres

Les quinones ont été recherchées à partir de 5 ml d'extrait plus quelques gouttes de NaOH (1%), le développent d'une couleur qui vire au jaune, rouge ou violet, révèle la présence des quinones libres (**Dohou, 2004**).

I.2.2.4.6 Alcaloïdes

Les alcaloïdes ont été caractérisés par l'utilisation des deux réactifs Mayer et de Wagner. Un volume de 5 ml d'acide chlorhydrique à 1% sont ajouté à 1 ml de chaque extrait, le mélange est chauffé au bain marie puis on divise chaque extrait en deux volumes égaux. Un volume est traité par 5 gouttes de réactif de Mayer l'autre par 5 gouttes de réactif de Wagner. La formation d'un précipité blanc ou brun révèle la présence des alcaloïdes (**Benzahi, 2001**).

I.2.2.4.7 Saponosides (test de mousse)

Dans un tube à essai, on introduit 10 ml de l'extrait aqueux, après agitation vigoureuse pendant 15 secondes, on laisse déposer le tube pendant 15 minutes. Une hauteur de mousse persistante supérieur à 1 cm indique la présence de saponosides. (**Farnsworth, 1966 ; Bidie et al., 2011 ; Yadav et Agardala, 2011**).

I.2.2.4.8 Stéroïdes

La recherche des stéroïdes a été réalisée par le test de **Harborne (1998)**. Un volume de 5 ml d'anhydride acétique est ajouté à 5 ml des extraits aqueux et hydro-éthanolique, qui sont repris dans des tubes à essai dans lequel sont ajoutés 0,5 ml de H₂SO₄ concentré. L'apparition d'une coloration violette qui vire au bleu puis au vert indique une réaction positive (**Tiwari et al 2011**).

I.2.2.4.9 Sucres réducteurs

Le test de détection des composés réducteurs consiste à traiter 1 ml des différents extraits avec 2 ml d'eau distillée et 2 ml de la liqueur de Fehling puis les tubes sont chauffés au bain marie à 40°C. Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge-brique. (**Yadav et Agarwala, 2011**).

I.2.2.5 Quantification de quelques métabolites secondaires**I.2.2.5.1 Dosage des polyphénols totaux**

L'estimation de la teneur en composés phénoliques totaux a été réalisée par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu, décrite par Singleton et Rossi (1999) avec quelques modifications. Chaque extrait (0.2 ml) ou l'acide gallique (0-800 µg/ml) est mélangé avec 1,3 ml de réactif Folin-Ciocalteu (dilué 10 fois avec de l'eau distillée). Après un repos de 5 min, 1ml de la solution de Na₂CO₃ (7,5 %) est ajouté au mélange. Après une homogénéisation vigoureuse puis un repos de 60 min à l'obscurité, à température ambiante, l'absorbance est mesuré à 765 nm par un spectrophotomètre UV-Visible. Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique EAG/g (PSMV) de poids sec de matériel végétal (**Shui et Leong, 2006**).

I.2.2.5.2 Dosage des flavonoïdes

La méthode utilisée pour l'estimation des taux de flavonoïdes dans les quatre extraits est celle décrite par **Kim et al. (2003)**. Un volume de 1 ml de l'extrait est dilué avec 4 ml de l'eau distillée. Ensuite, 0,3 ml de solution de nitrite de sodium NaNO₂ (5%) est ajouté. Après 5 min, 0,3 ml de solution de chlorure d'aluminium AlCl₃ (10%) est ajouté. Le mélange est

laissé au repos pendant 5 min, puis 2 ml de solution d'hydroxyde de sodium NaOH (1 M) sont additionnés. Le volume de ce mélange est complété à 10 ml avec de l'eau distillée. Après agitation, l'absorbance est mesurée immédiatement à 510 nm un spectrophotomètre UV-Visible. La gamme étalon est préparée avec la rutine (0 – 500 µg/ml) et les résultats sont exprimés en mg équivalent de rutine ER/g de poids sec de matériel végétal.

I.2.2.5.3 Dosage des acides-phénols

La détermination de la teneur en acides-phénols est effectuée selon la méthode d'Arnov (**Szafer-Hadjrych, 2004**). Un volume de 1 ml d'échantillon est mélangé à 5 ml de l'eau distillée, puis 1 ml d'HCl (0,5 M), 1 ml de réactif d'Arnov (solution aqueuse de molybdate de sodium 10 (p/v) et nitrite de sodium 10% (p/v)) et 1 ml d'hydroxyde de sodium (1 M) ont été additionnés. Le volume du mélange réactionnel est complété à 10 ml avec de l'eau distillée. La lecture de l'absorbance est faite à 490 nm par un spectrophotomètre UV-Visible. L'acide caféique a été utilisé comme référence pour la préparation de la courbe d'étalonnage avec des concentrations allant de 0 à 500 µg/ml. Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide caféique EAC/g de poids sec de matériel végétal.

I.2.2.5.4 Dosage des tanins condensés

Le dosage des tanins condensés a été réalisé par la méthode de la vanilline-HCl décrite par **Sun et al. (1998)**. Le dosage est effectué pour les extraits aqueux des calices et la partie aérienne d'*A. arvensis*, à 0,2 ml de l'extrait, 1 ml de la solution fraîchement préparée de vanilline 1% (p/v) en acide acétique glacial et HCl (98:2, v/v) est ajouté. Après incubation à 30 °C pendant 20 min, l'absorbance est mesurée à 510 nm par un spectrophotomètre UV-Visible. L'étalonnage est réalisé avec de la catéchine (de 0 à 800 µg/ml) et le taux des tanins condensés est calculé en mg en équivalent de catéchine EC/g de poids sec de matériel végétal.

I.2.2.5.5 Dosage des saponines

La détermination de la teneur totale en saponines a été réalisée selon la méthode de dosage vanilline/acide sulfurique, décrite par **Hiai et al. (1976)** et modifiée par Le et al. (2018). Dans cette méthode modifiée, 25 µL d'extrait de la plante ou de blanc réactif ont été incubés avec 0,5 mL de vanilline à 4 % (p/v) dans de l'éthanol et 2,5 mL d'acide sulfurique à

72 % (v/v) pendant 15 minutes à 60 °C dans un bain-marie. Après refroidissement à température ambiante pendant 5 minutes, l'absorbance a été mesurée à 560 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis. la courbe d'étalonnage a été réalisé avec de l'aescine (0-500 µg/ml) La teneur en saponines a été calculé et exprimée en mg équivalent d'aescine par gramme de poids sec du matériel végétal. Mg EA/g PSMV.

I.2.2.6. Evaluation des activités Biologiques

I.2.2.6.1. Activité antioxydante

Le pouvoir antioxydant de nos extraits a été mesuré par les méthodes spectrophotométrie en utilisant deux tests à savoir le piégeage du radical DPPH· et l'inhibition du radical cation ABTS^{•+}.

I.2.2.6.1.1 Méthode à l'ABTS

Cette méthode introduite par (Re et al., 1999) est basée sur la capacité des antioxydants à neutraliser le radical cation ABTS^{•+} (sel d'ammonium de l'acide 2,2'- azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (Figure 09).

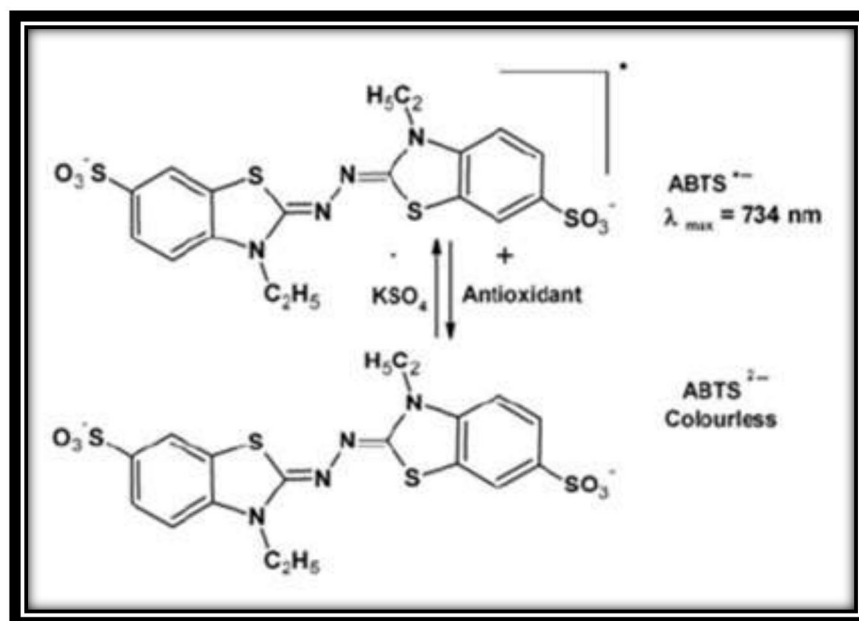


Figure 09 : structure de l'ABTS et son radical cation ABTS^{•+}

(Moore et Yu, 2008)

La solution du radical cation ABTS^{•+} est obtenue en mélangeant l'ABTS (7 mM) avec un oxydant le persulfate de potassium (2,45 mM) qui donne une solution d'une couleur bleue intense. L'activité anti-oxydante est déterminée par la mesure de la capacité des composés testés à diminuer l'intensité de la coloration obtenue à partir de l'ABTS^{•+} en la comparant avec un antioxydant de référence.

Le mélange est incubé à 23 °C pendant 12 à 16 heures, à l'obscurité. La solution d'ABTS^{•+} est diluée avec l'éthanol (80%) jusqu'à l'obtention d'une absorbance égale à $0,700 \pm 0,020$ à 734 nm (Cai *et al.*, 2004). Un volume de 3,9 ml de cette solution est mélangé avec 0,1 ml de l'échantillon testé, préparé à différentes concentrations (10-150 µg/ml). Le mélange est agité vigoureusement. Après un repos de 6 min à 23 °C, l'absorbance est mesurée à 734 nm. la courbe d'étalonnage est établie avec de l'acide gallique a différente concentration (0 – 100 µg/ml).

I.2.2.6.1.2 Piégeage de radical DPPH[•]

Le test DPPH[•] est une méthode largement utilisée dans l'analyse de l'activité anti-radicalaire. Cette méthode est basée sur le principe que le DPPH[•] accepte un atome d'hydrogène (H) à partir d'une molécule par exemple un antioxydant, résultant une réduction du DPPH[•] en DPPH-H, (Figure 10) et un changement de la couleur violette en jaune, avec une diminution de l'absorbance à 517 nm. Le degré de changement de la couleur est proportionnel à la concentration et à la puissance des antioxydants (Pereira Nunes, 2012).

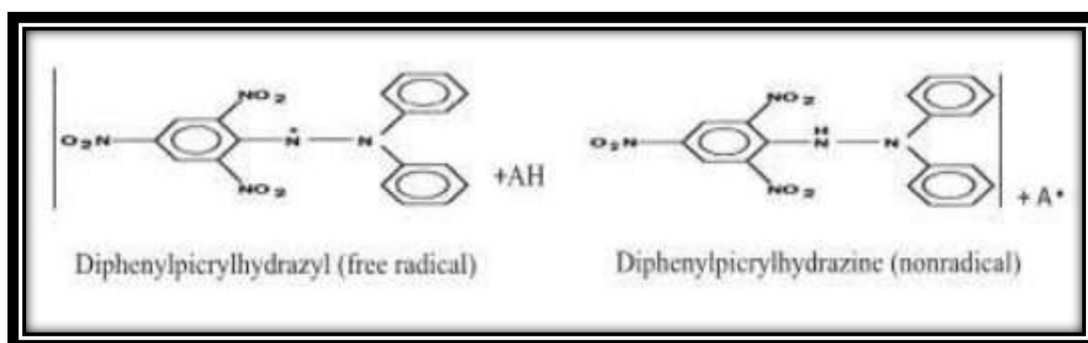


Figure 10 : Structure du radical DPPH[•] et DPPH réduit

(Alam *et al.*, 2013).

L'activité anti-oxydante des échantillons est mesurée par la détermination de la capacité des différents extraits à piéger le radical de DPPH[•] comme décrit par Brand-Williams *et al.*, (1995) avec quelques modifications. Un volume de 0,1 ml des différents

extraits à différentes concentrations (10-150 µg/ml) et un volume de 0.1 ml de différente concentration en acide gallique (0- 100 µg/ml) est mélangé avec 3,9 ml d'une solution éthanolique de DPPH[•] (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) à 63,4 µM. l'absorbance est mesurée à (517 nm).

Expression des résultats

- Calcul des pourcentages d'inhibition :

Le pourcentage de réduction des radicaux libres DPPH[•] et ABTS^{•+} sont exprimé par la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(Abs\ c - Abs\ t)/(Abs\ c)] \times 100$$

Absc: Absorbance du contrôle,

Abs t : Absorbance de l'échantillon testé (**Boubekeur, 2019**).

Les résultats sont exprimés par la moyenne de trois mesures. La capacité de piégeage des extraits a été exprimée en IC₅₀ obtenue par régression linéaire (**Boubekeur, 2019**).

I.2.2.6.2. Activité anti-cholinestérase

L'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase (AChE) a été mesurée par méthode spectrophotométrique décrite par **De Torre et al. (2022)** avec quelques modifications. Les extraits ont été dilués dans l'eau pour donner un stock solution de 200 µg/mL et 7 solutions en série ont été préparées (10-120 µg/mL). Un volume de 500 µL de chaque solution ont été ajoutés à 250 µL d' l'iodure d'acétylthiocholine (ATCI) 15 mM, 500 µL d'acide 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoïque (DTNB) 3 mM, 250 µL de l'acétylcholinestérase et 350 µL de tampon phosphate de sodium 0,1 mM (pH 8,0) dans des tubes à essais et incubés 15 min à 37 °C. L'hydrolyse de l'iodure d'acétylthiocholine a été contrôlée par la formation de l'anion jaune 5-thio-2-nitrobenzoate à la suite de la réaction du DTNB avec la thiocholine, catalysée par l'enzyme. L'absorbance a été lue à une longueur d'onde de 405 nm. Le galantamine dissout dans le méthanol a été utilisé comme contrôle positif. Le pourcentage (%) d'inhibition de l'AChE est calculé en utilisant la formule suivante : (**De Torre et al., 2022**)

$$\% = [(A_{max} - A_{ext} / A_{max})] \times 100 \quad \text{Où :}$$

A_{max}: absorbance mesurée de l'activité enzymatique sans extrait

A_{ext}: absorbance mesurée de l'activité enzymatique avec l'extrait

(Torre *et al.*, 2022)

I.2.3. Analyse statistique

Les expériences ont été répétées trois fois et les résultats sont exprimés en (moyen ± écart type). L'analyse de variance a été réalisée afin de montrer la significativité des différences enregistrées pour les paramètres étudiés des différents extraits testés. La régression linéaire a été utilisée comme modèle afin de déterminer IC₅₀. La corrélation entre les concentrations en composés phénoliques et les activités biologiques est effectuée par la mesure de coefficient de corrélation de Pearson. Toutes ces analyses ont été réalisées en utilisant XLSTAT 2022 version d'évaluation XLSTAT 2022.5.1 (1393).

Chapitre II

Résultats et discussion

II. Résultats et discussion

II.1. Rendement d'extraction

La détermination de rendement d'extraction est effectuée afin de quantifier la quantité de composés bioactifs extraits des plantes. Ce processus permet d'évaluer l'efficacité de l'extraction et d'obtenir une estimation de la concentration des substances d'intérêt dans les extraits.

Les résultats de rendement d'extraction des différents extraits aqueux et hydro-éthanolique des deux plantes ont été calculés et représentés dans la (**Figure : 11**).

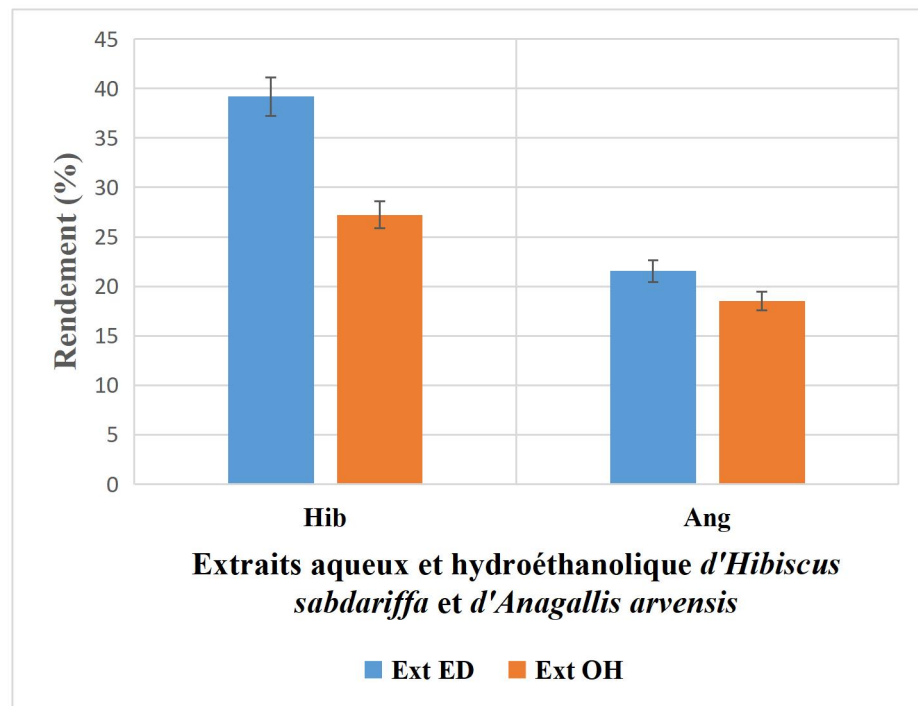


Figure 11 : Rendement d'extraction des quatre extraits des deux plantes *Anagallis arvensis* et *Hibiscus sabdariffa*

D'après les résultats de la (**figure 11**), il apparaît que les rendements les plus élevés sont enregistrés pour les extraits aqueux et hydroéthanolique *d'Hibiscus sabdariffa* qui sont de l'ordre de $39,16 \pm 0,70\%$ et $27,22 \pm 6,56\%$ respectivement, alors que les extraits *Anagallis arvensis* présentent des rendements faibles en comparaison avec ceux des extraits *d'Hibiscus*

sabdariffa en particulier l'extrait hydroéthanolique qui un taux égal à $18.52 \pm 0.88\%$ (**Figure : 11**). Cela suggère que l'utilisation de l'eau comme solvant d'extraction est plus efficace pour ces deux plantes, en termes de rendement d'extraction.

Nous pouvons également souligner que l'*Hibiscus Sabdariffa* a montré des rendements d'extraction les plus élevés par rapport à *Anagallis Arvensis*, que ce soit avec l'extraction aqueuse ou l'extraction hydro-éthanolique. Cela indiquant une plus grande solubilité de ses composés dans ces conditions d'extraction. (**Pant et al., 2017 ; Sindi et al., 2014**).

Plusieurs conditions peuvent influencer le rendement d'extraction. D'après **Bachiri et al. (2016)**, le rendement d'extraction varie en fonction de l'espèce végétale et de son contenu en métabolites, la période de récolte de la partie de végétale ou l'organe utilisé dans l'extraction, et des conditions de séchage. De plus, les espèces végétales n'ont pas toutes le même potentiel ; certaines familles botaniques offrant des rendements plus élevés que d'autres (**Smallfield, 2001**)

Le rendement d'une extraction dépend de nombreuses paramètres tel que : le solvant utilisé pour l'extraction, la température, le temps d'extraction, ainsi que le pH et de la composition de l'échantillon. (**Quy Diem Do et al., 2014**), Dans notre cas, les deux paramètres : temps d'extraction et température sont identiques, le solvant et la composition de l'échantillon sont considérés comme des paramètres les plus importants et qui ont un effet remarquable sur le rendement des deux plantes.

La différence de rendement entre les deux extraits peut aussi être justifiée par la différence de polarités des deux solvants utilisés. L'éthanol a une polarité de l'ordre de 5.2 tandis que celle de l'eau est égale 9.0. L'eau présente une polarité élevée lui permet d'extraire un nombre élevé des composées (**Bourgou, 2016**).

En effet, selon l'étude de **Quy Diem Do et al., 2014**, l'utilisation combinée d'eau et d'un solvant organique (éthanol dans notre étude) peut faciliter l'extraction des substances chimiques qui sont solubles dans l'eau et/ou dans le solvant organique.

La macération à température ambiante, permet d'extraire le maximum des composants en prévenant leurs dénaturations ou modification probable. La température élevée provoque l'inactivation des composés phénoliques, la diminution de leur extractibilité dans le solvant, et affecte aussi leur quantification (**Hagermann et al., 2000**)

L'analyse statistique effectuée en utilisant logiciel Xlstat montre qu'il n'y a aucune différence significative entre les quatre extraits des deux plantes ($P \geq 0,05$; $\alpha < 0,05$). (Annexe 11)

II.2.Criblage phyto-chimique

Le screening phyto-chimique a été effectué et les résultats sont illustrés dans le tableau (Annexes 10).

Les études menées sur la partie aérienne d'*Anagallis arvensis* et les calices d'*Hibiscus sabdariffa* ont révélé une diversité moléculaire en ce qui concerne les métabolites secondaires (flavonoïdes, tanins, terpenoïdes, saponosides, composés réducteursect.) (Tableau I).

Les flavonoïdes, de structure générale C₁₅ (C₆-C₃-C₆), constituent un groupe de plus de 8 000 composés, largement distribués dans le règne végétal et sont couramment consommés quotidiennement sous forme de fruits, légumes... Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux. (Ghedira, 2005 ; Macheix *et al.*, 2005).

Les anthocyanes constituent une sous-famille de flavonoïdes importante car ce sont, avec les chlorophylles et les caroténoïdes, les principaux pigments végétaux. Les colorants rouges, bleus, violets des fleurs et des fruits sont très souvent des anthocyanes. Ce sont elles qui sont responsables des couleurs éclatantes de certains fruits (raisins rouges, framboises, cerises). (Dangles *et al.*, 1994). Les résultats de criblage montre la richesse des extraits aqueux et hydro-éthanolique d'*Hibiscus Sabdariffa* en anthocyanes leur mise en évidence a été justifiée par le changement de la coloration en bleu violacée par contre on remarque leurs absences dans les extraits d'*Anagallis arvensis*.

La mise en évidence des flavonoïdes libres a été faite par la réaction à la cyanidine (test de Shinoda). Cette réaction est basée sur la réduction de noyau flavonoidique par les métaux (Mg) en milieu acide (HCl) (Aiyegoro et Okoh., 2010 ; Sheikh *et al.*, 2013).

La réaction à la cyanidine indique la présence des flavonoïdes libres dans les différents extraits où il a été remarqué l'apparition d'une coloration rose orangée dans l'extrait aqueux d'*Anagallis Arvensis* indique la présence des flavones, alors que l'extrait hydroéthanolique a révélé la présence des flavanols cela est mis en évidence par l'apparition d'une coloration violette sur la couche surnageant d'alcool iso-amylique.

Tableau I : Résultats de test de criblage phyto-chimique des extraits aqueux et hydro-éthanolique des deux plantes *Hibiscus Sabdariffa* et *Anagallis Arvensis*. + : présence /- absence

Résultats					
<i>Hibiscus Sabdariffa</i>			<i>Anagallis Arvensis</i>		
		Ext OH	Ext ED	Ext OH	Ext ED
Flavonoïdes	Anthocyanes	+	+	-	-
	R.cyanidines F.libre	+	+	+	+
	R.cyanidines Leucoanthocynes	+	+	-	-
	R.cyanidines catéchols	-	-	-	-
Tanins	FeCl ₃	+	+	+	+
	<u>R.Stiasny</u>	Différentiation des Tanins			
	Tanins gallique	+	+	+	+
	Tanins catéchique	+	-	+	-
Téropénoïdes	Test de Liebermann	+	-	+	-
	Chloroforme	-	+	-	+
Alcaloïdes	Réactif de Mayer	-	-	+	-
	Réactif de Wagner	-	-	+	-
Coumarines	NaOH (10%)	+	+	-	+
Quinines libres	NaOH (1%)	+	+	+	-
Saponosides	-----	-	+	-	+++++
Stéroïdes	H ₂ SO ₄ /C ₄ H ₆ O ₃	-	-	+	-
Sucres réducteurs	Liqueur de Fehling	+	+	+	+

Pour les deux extraits d'*Hibiscus Sabdariffa* on remarque l'apparition d'une coloration rouge sur la couche surnageant révèle la présence des flavonols et des flavanols. La réaction à la cyanidine sans ajouter de magnésium a permis de confirmer la présence des leucoanthocyne dans les deux extraits de Roselle (Mibindzou, 2004)

Les tanins sont des composés phénoliques hydrosolubles. On distingue habituellement deux groupes de tanins : tanins hydrolysables et tanins condensés. Les tanins hydrolysables

qui sont des oligo ou des polyesters d'un sucre, très généralement le glucose et d'un nombre variable de molécules d'acide phénol : tanins gallique (polymère d'acide gallique) ou tanins éllagique (polymère d'acide éllagique) Les tanins condensés sont des polymères flavaniques (**Jean, 2009**). La présence des tanins dans les quatre extraits des deux plantes a été confirmée par le test de chlorure de fer. La présence des tanins est indiquée dans les extraits aqueux et hydrohythanolique d'*Anagallis arvensis* par l'apparition d'une coloration verdâtres. Alors qu'une coloration bleu noir est apparue au niveau des deux extraits d'*Hibiscus Sabdariffa*. (**Trease et Evans, 1987**)

La différenciation des tanins gallique et catéchiques est effectué par le réactif de Stiasny, là où nous avons constaté l'absence de précipité rose cela indique l'absence des tanins catéchique dans les extraits aqueux mais leur présence dans les extraits éthanoliques des deux espèces étudiées (**Mibindzou, 2004**).

Les terpénoïdes, également désignés sous la nomination d'isoprénoïdes, constituent une vaste famille de substances naturelles. Le squelette carboné de ces composés est formellement constitué d'un élément de base commun à squelette ramifié, à cinq atomes de carbone et dérivé de l'isoprène (hémiterpène) : le 2-méthylbuta-1, 3-diène (**Connolly et Hill, 1991**).

Les résultats de test de Libermann-Burchard révèle un test positive pour les terpenoïdes dans les extraits hydroéthanolique des deux plantes leurs présences sont confirmés par l'apparition d'une couleur mauve violette. Par contre le test de chloroforme a prouvés que les extraits aqueux contiennent des terpenoïdes et cela a été confirmé par l'apparition d'une couleur marron à l'interphase.

Les alcaloïdes sont des substances naturelles et organiques provenant essentiellement des plantes à caractère alcalin et qui contiennent au moins un atome d'azote dans leur structure chimique. Les alcaloïdes peuvent se trouver dans toutes les parties de la plante, mais selon l'espèce de la plante, ils s'accumulent uniquement dans les écorces, dans les racines, dans les feuilles (**Maur.2006**). Selon les résultats de (**tableau I**), nous constatons que la présence des alaloïdes dans l'extrait hydroethanolique d'*A.arvensis* est révélée seulement par le test de Wagner.

Les coumarines, de différents types, se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses. Le terme coumarine désigne la classe des composés phénoliques dérivés de la molécule, la 2H-1-benzopyran-2-ones (a-benzopyrone) (**Tahouo,**

2016). Un test positif est observé pour tous les extraits à l'exception de l'extrait hydroethanolique *d'A.arvensis*, cela est confirmé par l'apparition de la couleur jaune (**Diallo, 2000**).

Les quinones sont des substances colorées et brillantes, en général rouges, jaunes ou orange et possédant deux fonctions cétones. On trouve les quinones dans les végétaux, les champignons, les bactéries. Ce sont des composés oxygénés qui correspondent à l'oxydation de dérivés aromatiques (**Tahouo, 2016**). D'après les résultats obtenus, la présence des quinones libre est mise en évidence pour les extraits aqueux et hydro-éthanolique *d'H.Sabdariffa* et l'extrait aqueux *d'A.arvensis*. Cela est confirmé par l'apparition des couleur violet et jaune respectivement dans les trois extraits (**Dahou, 2004**)

Sucres réducteurs, tels que le glucose et le fructose, ainsi que dans une moindre mesure le lactose et le galactose, sont des types de sucres simples qui agissent comme donneurs d'électrons dans une réaction d'oxydo-réduction (**Bruneton, 1999**). Selon les résultats de test de liqueur de Fehling les quatre extraits des deux plantes contiennent des sucres réducteurs, un précipité rouge brique est apparu au fond des tubes, cela nous a permis de qualifier le test comme positif (**Trease et Evans, 1987**)

Saponosides ou les saponines sont des substances abondamment répandues dans le règne végétal et qui doivent leur nom au fait que leur solution aqueuse mousse abondamment. Au point de vue chimique, ce sont des hétérosides dont les aglycones (saponines) sont soit de structure stéroïdienne, soit de structures terpéniques (**Folo, 2014**). Le test de mousse a été effectué sur les extraits aqueux des deux plantes et nous avons remarqué une hauteur de mousse persistante de 10 cm pour l'extrait *d'A.arvensis* et d'environ 1.5 cm pour l'extrait *d'H.Sabdariffa* cela indique un test positif pour les deux plantes mais aussi la richesse de l'extrait *A.arvensis* par les saponosides (**Dahou et al., 2003**)

Les stéroïdes peuvent être considérés comme des triterpénoïdes ayant perdu au maximum 3 méthyles. Ces composés sont rencontrés fréquemment dans les plantes et les animaux et comptent parmi les plus importants produits naturels (**Folo, 2014**). Un test positif est remarqué seulement pour l'extrait hydroéthanolique *d'A.arvensis* une coloration bleu vert est apparue (**Harbone, 1998**).

II.3. Quantification des composés phénoliques et des saponines

Les composés phénoliques constituent l'une des grandes familles de molécules largement répandues dans le règne végétal. Ils regroupent un vaste ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique et un ou plusieurs groupements hydroxyles. (Kabran, 2014). Les composés phénoliques sont en principe solubles dans les solvants organiques polaires. Les formes hétérosidiques de ces composés sont, classiquement, solubles dans l'eau (Bruneton, 1993).

Sur l'ensemble des résultats obtenus, nous remarquons que les plantes étudiées sont plus ou moins riches en métabolites secondaires. Les tests phytochimiques réalisés nous ont permis d'avoir une idée générale sur la composition chimique des plantes étudiées.

II.3.1. Teneurs en polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux des extraits bruts aqueux et hydro-éthanolique de la partie aérienne d'*A.arvensis* et des calices d'*H.Sabdariffa*, ont été calculés à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (0-500 µg/ml) et sont exprimées en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche.

La quantification de la teneur en polyphénols dans les extraits aqueux lyophilisés et reconstitués (10 mg/10 ml de l'eau distillée) et les extraits hydro-éthanoliques dilués 10 fois.

Les analyses quantitatives des polyphénols totaux, ont été déterminées à partir de l'équation de la régression linéaire déduite de la courbe d'étalonnage tracée en utilisant une solution mère de l'acide gallique (10mg/10ml) comme standard qui a donné l'équation suivante : $y=0.0046x$ (Figure : 12) avec un coefficient de détermination égal à $R^2= 0.9819$. Les valeurs obtenues sont exprimées en mg EAG/g du poids sec de matériel végétal.

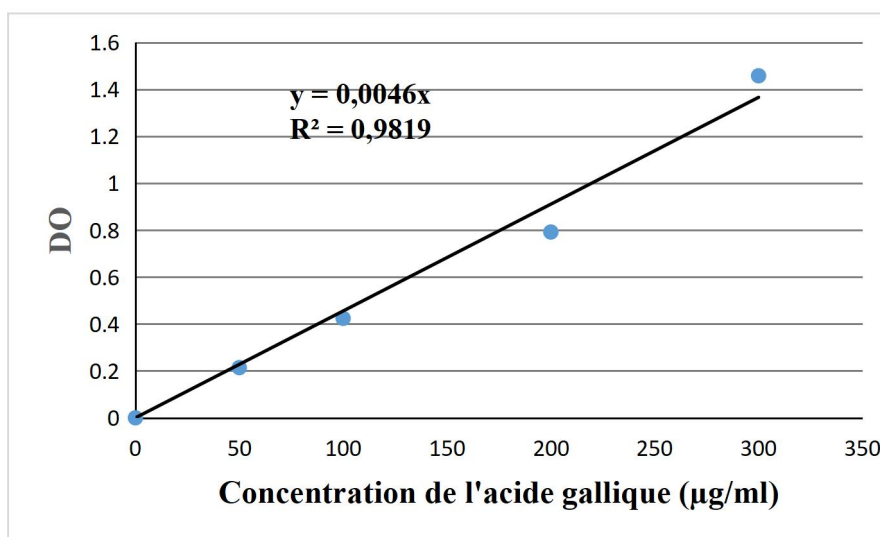


Figure 12 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Les résultats de dosage des polyphénols totaux des différents extraits sont représentés dans la (Figure : 13).

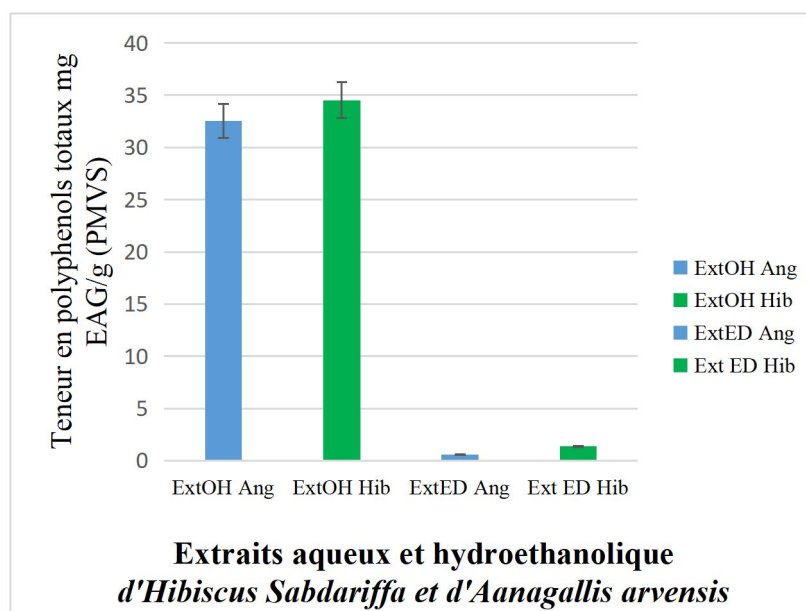


Figure 13 : Teneurs en polyphénols totaux des extraits aqueux et hydroéthanolique de Hib et Ang.

Les résultats révèlent la richesse des deux extraits hydro-éthanolique des deux plantes en polyphénols totaux. L'extrait hydroéthanolique d'Hib a la teneur la plus élevée en polyphénols totaux (34.53 ± 2.1 mg EAG/g PSMV), suivie par celle de l'extrait hydroéthanolique d'Ang (32.54 ± 1.31 mg EAG/g). Cependant, les extraits aqueux des deux espèces étudiées ont les teneurs les plus faibles en PPT, notamment celui d'Ang (0.57 ± 0.01 mg/EAG/g PSMV).

L'analyse statistique des résultats de dosage des polyphénols totaux dans les quatre extraits des deux plantes effectuée montre qu'il y a une différence très hautement significative entre les quatre extraits des deux plantes ($P \leq 0.0001$; $\alpha < 0.001$). (Annexe 11)

Les polyphénols sont des composés dont les teneurs et la solubilité dépendent de plusieurs facteurs. Le nombre de groupements hydroxyles, le poids moléculaire, la longueur de la chaîne carbonique du squelette de base et le degré de polymérisation sont des

caractéristiques importantes. De plus, les différences de polarité des solvants utilisés pour l'extraction jouent également un rôle majeur. **(Falleh *et al*, 2008 ;Mohammedi et Atik, 2008)**

L'extraction à l'éthanol permet d'obtenir les meilleurs rendements en polyphénols. En effet, ces composés, qui sont plutôt hydrosolubles, sont principalement extraits par des solvants de polarité moyenne ou forte. Cela explique donc la forte teneur en polyphénols dans l'extrait éthanolique. **(Falleh *et al*, 2008)**

Cependant, il convient de noter que la quantification précise des polyphénols n'est pas toujours facile en raison de la faible spécificité du réactif de Folin-Ciocalteu, qui est extrêmement sensible à la réduction de tous les groupes d'hydroxyles, ce qui inclut non seulement les composés phénoliques, mais aussi certains sucres et protéines. De plus, nos travaux sont réalisés sur l'extrait brut, ce qui signifie que le solvant d'extraction peut également extraire des substances non phénoliques, telles que des sucres, des acides aminés et des colorants, qui peuvent interférer lors de l'évaluation des polyphénols. **(Tawaha *et al*, 2007 ; Djeridane *et al*, 2007 ; Gomez-Caravaca *et al*, 2006 ; Vuorela, 2005).**

II.3.2. Teneurs en flavonoïdes

Les taux de flavonoïdes dans les quatre extraits des deux plantes sont exprimés en se référant à une courbe d'étalonnage établie avec différentes concentrations de la rutine.

La quantification des flavonoïdes, a été déterminée à partir de l'équation de la régression linéaire déduite de la courbe d'étalonnage de la rutine (**Figure : 14**) ($y = 0,0024x$; $R^2=0,9954$). Les valeurs obtenues sont exprimées en mg ER/ g PSMV.

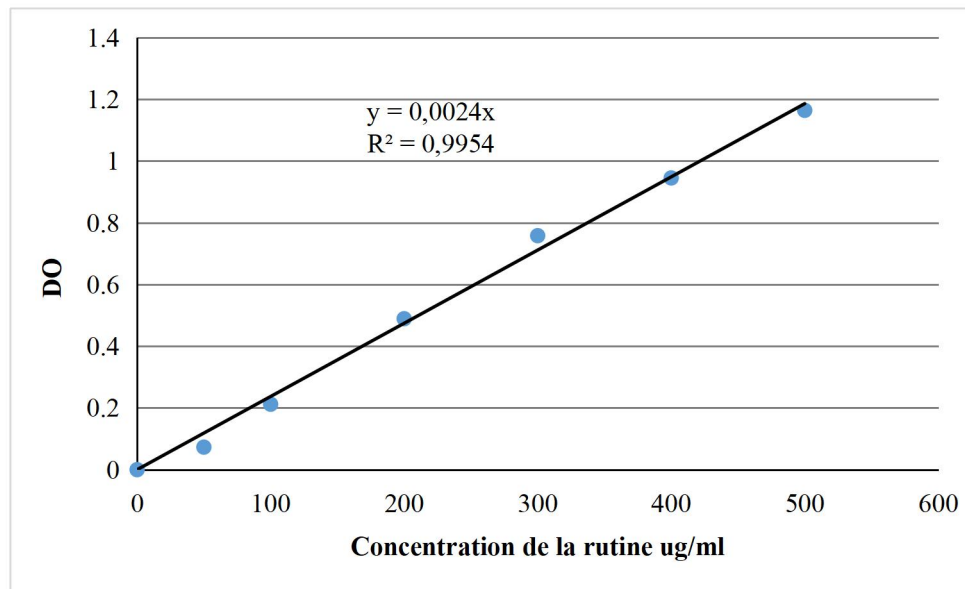


Figure 14 : courbe d'étalonnage de la rutine

La (**Figure : 15**) illustre les concentrations des flavonoïdes des différents extraits des plantes étudiées.

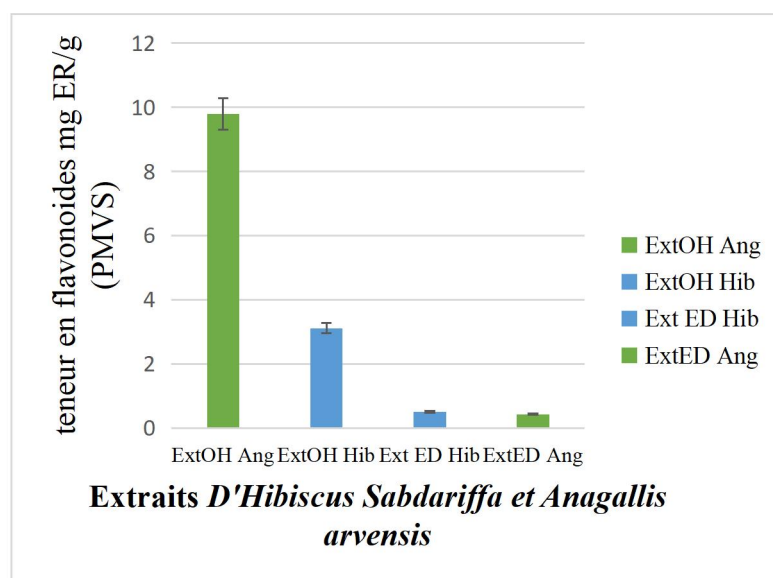


Figure 15 : Teneurs en flavonoïdes des extraits aqueux et hydroéthanolique de Hib et Ang.

Les teneurs les plus élevées en flavonoïdes sont remarquée dans les deux extraits hydro-éthanolique des deux plantes choisies avec des concentrations de 9.79 ± 0.15 mg ER/g PSMV (Ang) et 3.12 ± 0.07 mg ER/g PSMV (hib), tandis que les extraits aqueux de ces espèces sont pauvres en flavonoïdes avec des taux allant de 0.43 ± 0.00 mg ER/g PSMV pour Ang à 0.5 ± 0.02 mg ER/g PSMV pour Hib.

Le principe utilisé pour l'extraction des flavonoïdes est basé sur le degré de solubilité des flavonoïdes dans d'extraction utilisé, c'est pourquoi, **Bruneton (2009)** et **Stanković (2011)** ont signalé que les hétérosides de flavonoïdes sont solubles dans les solvants polaires comme l'eau et éthanol, alors que pour les génines (partie aglycone des flavonoïdes) sont solubles dans les solvants apolaires. Dans ce dosage, on a utilisée des solvants polaire cela révèlent que les flavonoïdes dosées sont des des flavonoïdes glycosylés avec des concentrations élevées surtout dans l'extrait hydro-éthanolique.

L'analyse de variance des résultats de dosage des flavonoides des quatre extraits des deux plantes étudiées montre qu'il y a une différence très hautement significatif entre les quatre extrait des deux plantes (**$P \leq 0.0001$; $\alpha < 0.001$**). (**Annexe 11**)

II.3.3. Teneurs en acides phénols

La quantification des acides phénols dans les extraits bruts des deux plantes a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage en utilisant l'acide caféique à différentes concentration. Les résultats sont exprimés en μg d'équivalent de l'acide caféique par gramme de matière sèche.

La quantification des acides phénols, ont été déterminées à partir de l'équation de la régression linéaire déduite de la courbe d'étalonnage de l'acide caféique ($y = 0.0022x$; $R^2 = 0.9861$) (**Figure 16**).

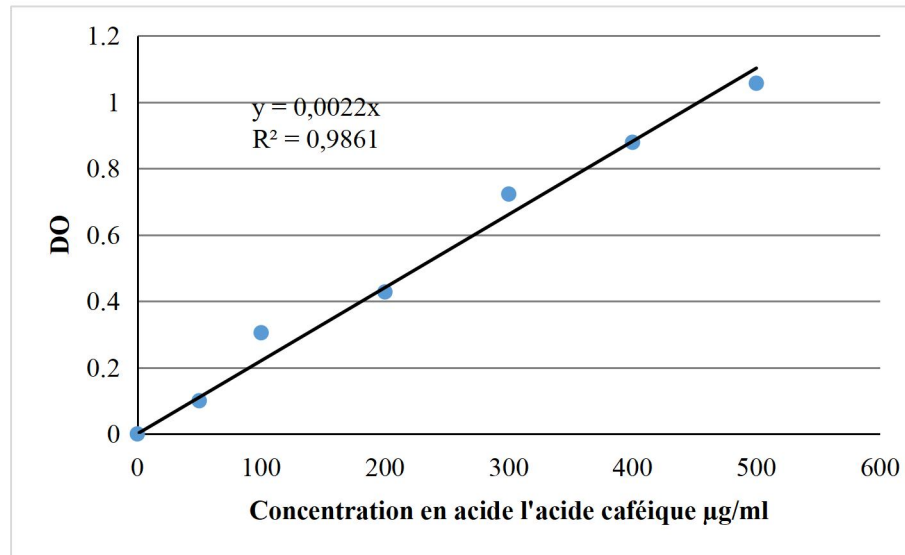


Figure 16 : courbe d'étalonnage de l'acide caféique

Les résultats de dosage des acides phénols dans les extraits sont représentés dans la **(Figure : 17)** :

Les résultats révèlent la richesse des deux extraits hydro-éthanolique des deux plantes en acide phenols la teneur la plus élevés est remarqué dans l'extrait d'Anagallis avec une valeur égale à $1,00 \pm 0.02$ mg EAC/g PSMV suivie par l'extrait d'Hibiscus 0.67 ± 0.01 mg EAC/g PSMV.

Pour les extraits aqueux la teneur la plus élevés est remarquée également pour l'extrait d'Hibiscus 0.60 ± 0.01 mg EAC/g PSMV suivie par Anagallis 0.34 ± 0.00 mg/EAC/g PSMV.

Statistiquement, les différences enregistrées dans les teneurs en acides phébnols des différents extraits deux plantes étudiées sont très hautement significatif ($P \leq 0.0001$ $\alpha < 0.001$). **(Annexe 11)**

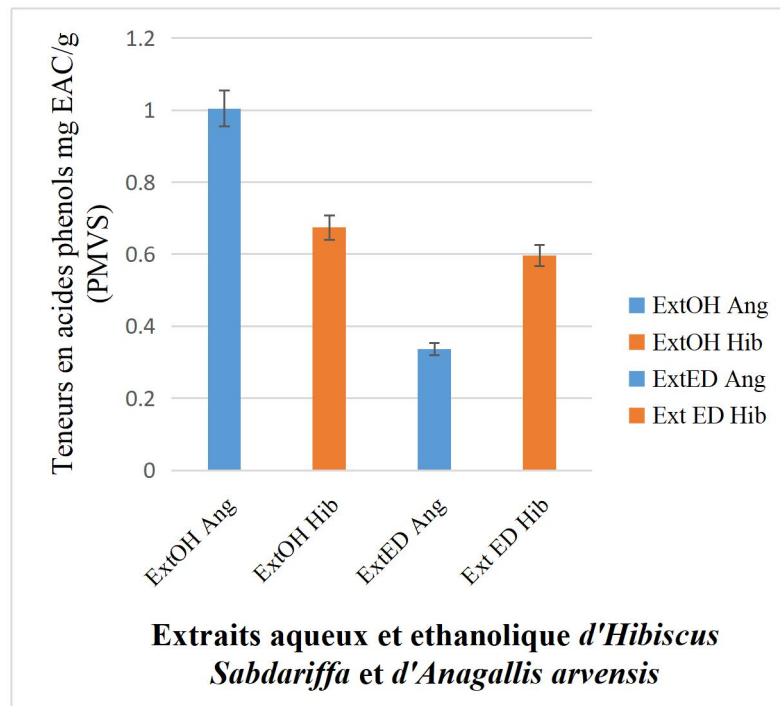


Figure 17 : Teneurs en acides phénols dans les extraits aqueux et hydroéthanolique de Hib et Ang

La concentration des acides-phénols dans les extraits des plantes, dépend de la polarité des solvants utilisés dans la préparation des extraits. Ainsi que le nombre de groupements hydroxyles. Cela est en accord avec nos résultats nous avons obtenu des concentrations considérables en acides phénols dans les quatre extraits en utilisant les deux solvants polaires eau et mélange eau éthanol. (Fertout-mouri, 2016).

II.3.4. Teneurs en tanins condensés

Les teneurs en tanins condensés ont été déterminées à partir de l'équation de la régression linéaire ($y = 0.0006x$, $R^2 = 0.8611$) déduite de la courbe d'étalonnage (Figure : 18) Les concentrations obtenues des tanins condensés sont exprimées en mg EC/ g PSMV.

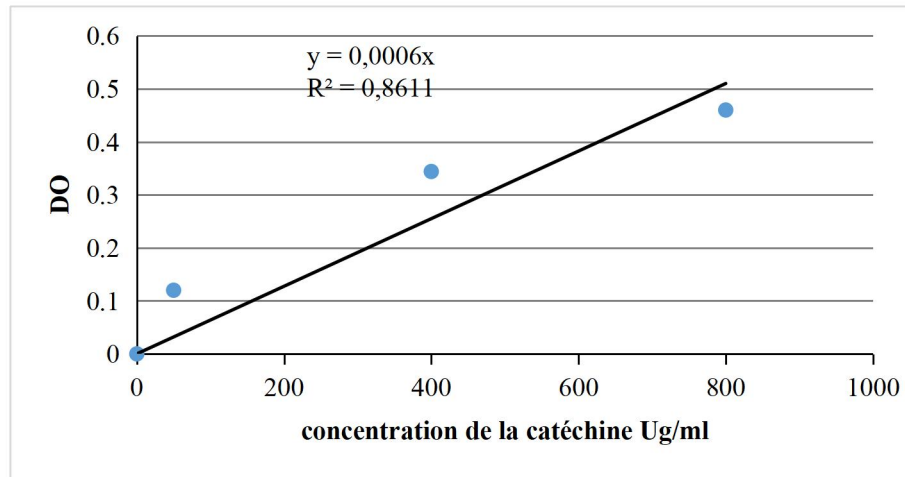


Figure 18: courbe d'étalonnage de la catéchine

Les résultats de dosage des tanins condensés des extraits des deux espèces étudiées sont représentés dans la (figure : 19).

Les teneurs les plus élevées en tanins condensés sont remarquée dans les deux extraits hydro-éthanolique des deux plantes. *Hibiscus* représente les concentrations les plus élevées 4.50 ± 0.21 mg EC/g PSMV suivie par l'extrait d'*Anagallis* 2.32 ± 0.33 mg EC/g PSMV.

Pour les extraits aqueux la concentration la plus élevée est remarquée pour l'extrait d'*Hibiscus* 4.16 ± 0.19 mg EC/g PSMV suivie par *Anagallis* 0.76 ± 0.04 mg EC/g PSMV.

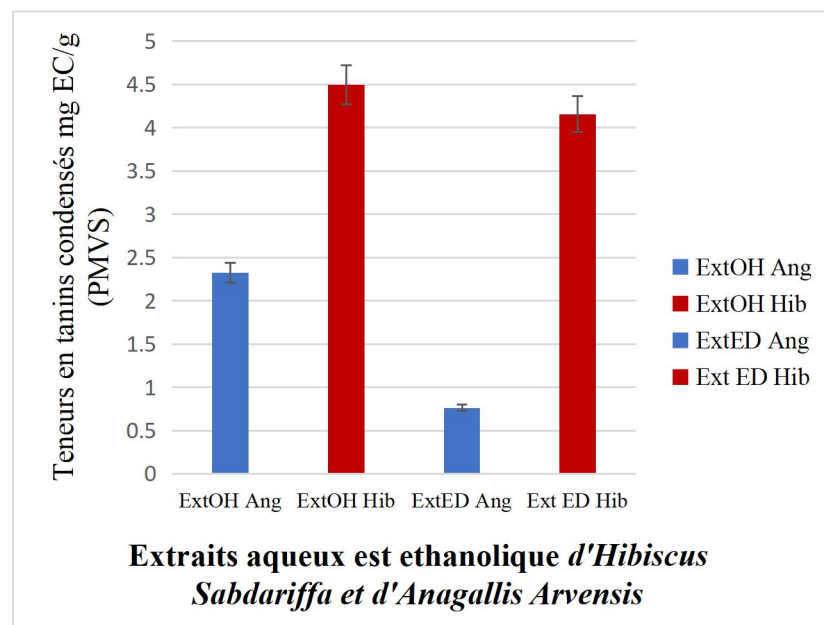


Figure 19 : Teneurs en Tanins condensés dans les extraits aqueux et hydroéthanolique de Hib et Ang

L'analyse de variance des résultats de dosage des tanins condensés montre qu'il ya une différence très hautement significatif entre les quatre extrait des deux plantes ($P \leq 0.0001$ $\alpha < 0.001$). (Annexe 11)

L'extraction des tanins condensés dépend de leur nature chimique, du solvant utilisé et des conditions opératoires (Mahmoudi, 2013). Les tanins condensés ou les proanthocyanidines sont faiblement solubles dans l'éthanol contrairement à l'eau qui possède la capacité de les solubiliser (Rosales, 1999). Mais dans notre cas les résultats montrent une teneur plus élevés en ces composés dans les extraits des solvants hydro-éthanolique laissant suggérer des tanins libres. (Kouamé, .2021).

II.3.5.Teneurs en saponosides

Les teneurs en saponines ont été déterminées à partir de l'équation de la régression linéaire ($y = 0.0012x$; $R^2 = 0.9894$) déduite de la courbe d'étalonnage d'asceine (Figure : 20). Les valeurs obtenues sont exprimées en mg EA/ g PSMV.

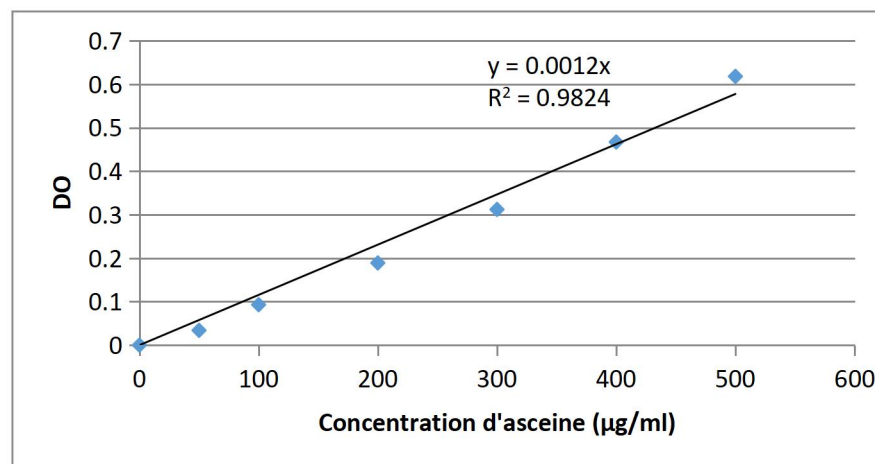


Figure 20 : courbe d'étalonnage d'asceine

Les résultats de dosage des saponines dans les extraits aqueux des espèces choisies sont représentés dans la (Figure : 21).

La teneur la plus élevée en saponines est obtenue avec l'extrait aqueux d'*Anagalis arvensis* qui est de l'ordre de 0.69 ± 0.04 mg EA/g PSMV en comparaison avec celle de l'extrait aqueux d'*Hibiscus Sabdariffa* (0.39 ± 0.004 mg EC/gPSMV) (Figure : 21).

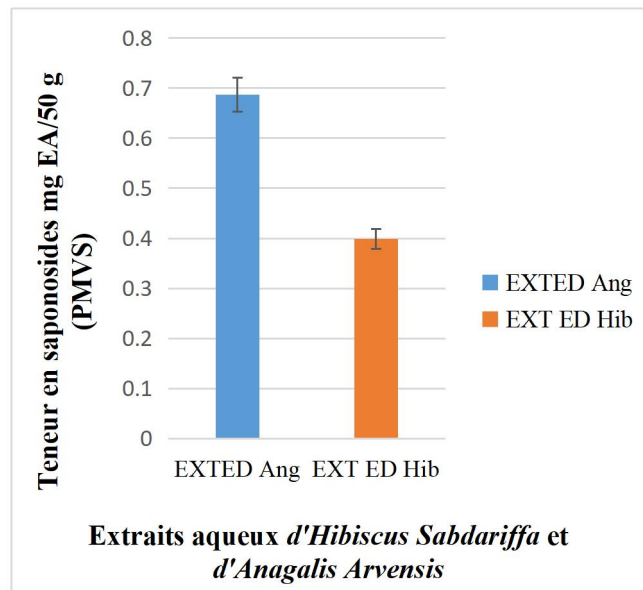


Figure 21 : Teneurs en en saponines dans les extraits aqueux de Hib et Ang

L'analyse de variance des résultats de dosage des saponines montre qu'il y a une différence très hautement significatif entre les deux extrait aqueux des deux plantes étudiées ($P \leq 0.000$; $\alpha < 0.001$). (Annex 11)

Les saponosides (ou saponines) sont des hétérosides à génine stéroïdique ou triterpénique, caractérisés principalement par leurs propriétés tensioactives. Ces propriétés se traduisent notamment par la formation de mousse par agitation dans l'eau (pouvoir aphrogène). Les saponosides sont des composés, pour la plupart, très polaires. Les hétérosides sont solubles dans l'eau et dans l'alcool dilué et insolubles dans les solvants organiques apolaires. Les sapogénines sont, en général, insolubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques apolaires (Paris *et al.*, 1981).

Les métabolites secondaires sont très inégalement répartis chez les végétaux, quelquefois entre des espèces très voisines ou même entre différentes sous espèces ou variétés à l'intérieure d'une même espèce (Macheix, 2005). Selon Fadlia *et al* (2017), les facteurs environnementaux tels que : la température, la géographie, la durée du jour et les éléments nutritifs, influencent fortement sur la biosynthèse et l'accumulation des métabolites secondaires de la plante.

Le rôle des composées phénoliques est maintenant reconnu dans différents aspes de la vie de la plante est dans l'utilisation que fait l'homme des végétaux. Ils peuvent en effet intervenir : dans certains aspects de la physiologie de la plante, dans la protection de l'homme

vis-à-vis de certaines maladies en raison de leur interaction possible avec de nombreuses enzymes et de leurs propriétés anti-oxydante...ect. (Macheix,, 2005).

II.4.Activités biologiques

II.4.1.Activité anti-oxydante

II.4.1.1.Piégeage du radical DPPH

L'évaluation du potentiel anti-radicalaire des extraits est effectué par le calcul de L'IC₅₀ (Concentration inhibitrice 50%), qui est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% des radicaux DPPH'.

Le piégeage de DPPH par différentes concentrations d'acide gallique a été effectué et les résultats sont présentés dans la (Figure : 22).

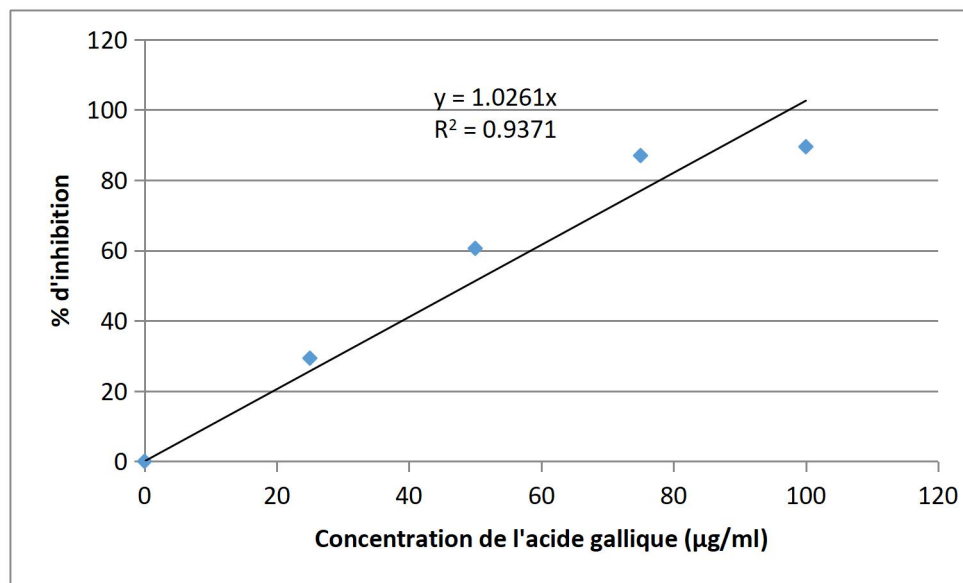


Figure 22: % d'inhibition du DPPH en fonction de concentrations de l'acide gallique.

Il est à noter que le pourcentage (%) de piégeage du DPPH par l'acide gallique est dose dépendante, c'est-à-dire plus la concentration est élevée plus l'inhibition est importante.

En ce qui concerne les extraits hydroéthanoliques des deux espèces étudiées dans ce travail, les IC₅₀ de piégeage du DPPH ont été calculées et les résultats sont résumés dans le (tableau II.)

Tableau II : IC₅₀ de piégeage du DPPH par les extraits hydroéthnologiques d'Ang et d'Hib.

Extrait / standard	IC ₅₀ (µg/ ml)
Ext OH Ang	29.28 ± 1.6 µg /ml
Ext OH Hib	35.39 ±1.97 µg /ml
Acide gallique	46.65 ± 1.35 µg /ml

Selon les résultats de tableau II les extraits hydro-éthanolique des deux plantes *Anagallis arvensis* et *Hibiscus Sabdariffa* ont une capacité antioxydante très puissante dans le piégeage de radical DPPH où les valeurs d'IC₅₀ sont de de l'ordre de 29.28 et 35.39 µg/ml respectivement et qui sont relativement inférieures à celle de standard utilisé (acide gallique ; IC₅₀=46.65 µg/ml)

En effet, l'analyse de la variance (ANOVA) a montré que les différences sont très hautement significative (P <0.0001; α <0.001). (Annexe 11)

Le test de corrélation a été effectué pour mettre en évidence la participation des différents métabolites recherchés et dosés dans le piégeage de radical DPPH. Les résultats obtenus ont montré qu'il y a une corrélation positive entre l'activité anti-radicalaire par le test de DPPH et les teneurs en métabolites secondaire (saponines, flavonoïdes ,acide phenols ...).

l'extrait d'*H. sabdariffa* a révélé une corrélation positive pour ce test avec tous les métabolites secondaire (0.226<R<0.990 ;P > 0.05) à l'exception des flavonoïdes (R = - 0.901 ;P<0.05) ce qui suggère que les molécules quantifiées dans cette étude pour l'extrait hydroethanolique d'*H.Sabdariffa* ont une influence sur l'inhibition de radical DPPH. Par contre les résultats de corrélation pour l'extrait hydroéthanolique d'*A.arvensis* a révélé une corrélation négative pour tous les métabolites quantifié (R< -1 ;P <0.05) à l'exception des flavonoïdes qui présente une corrélation positive (R= 0.990 ; P > 0.05) on peut conclure que les flavonoïdes sont responsable de l'inhibition de DPPH pour cet extrait. (Annexe 11)

II.4.1.2. Inhibition de radical cation ABTS^{•+}

La deuxième méthode choisie pour l'évaluation de l'activité anti radicalaire de nos extraits hydro-éthanolique est la méthode l'ABTS^{•+}.

L'évaluation du potentiel anti-radicalaire des extraits est effectuée par le calcul de l'IC₅₀ (Concentration inhibitrice 50%), qui est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% des radicaux ABTS[•].

Le piégeage de radical ABTS[•] par différentes concentrations d'acide gallique a été effectué et les résultats sont présentés dans la (Figure : 23).

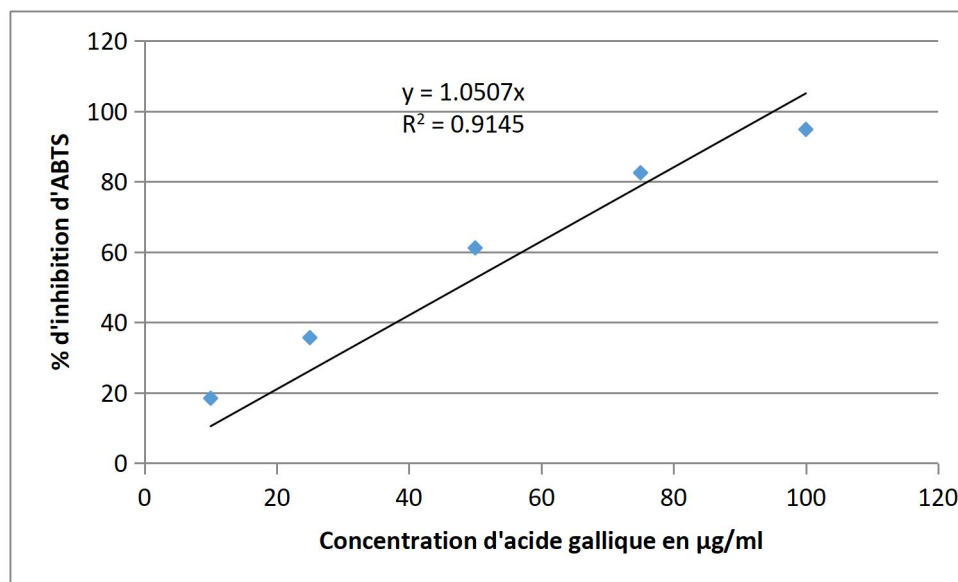


Figure 23: % d'inhibition de l'ABTS en fonction de concentrations de l'acide gallique.

Le pourcentage (%) de piégeage du radical ABTS[•] par l'acide gallique est également dose dépendante, c'est-à-dire plus la concentration est élevée plus l'inhibition est importante.

En ce qui concerne les extraits hydroéthanoliques des deux espèces étudiées dans ce travail, les IC₅₀ de piégeage d'ABTS ont été calculées et les résultats sont résumés dans le (tableau III.)

Tableau III : IC₅₀ de piégeage de l'ABTS[•] par les extraits hydroéthanoliques d'Ang et d'Hib.

Extrait / standard	IC ₅₀ (µg / ml)
Ext OH Ang	4.24 ± 0.059 µg /ml
Ext OH Hib	1.44 ± 0.26 µg /ml
Acide gallique	42.15 ± 3.99 µg /ml

Les résultats obtenus révèlent que les extraits hydro-éthanolique des deux plantes *Anagallis arvensis* et *Hibiscus Sabdariffa* sont dotés d'un pouvoir antioxydant très important, leurs IC₅₀ est de 4.24 ± 0.059 ug/ml et de 1.44 ± 0.26 ug/ml et nettement inférieure à celle de standard utilisé l'acide gallique dont la valeur est de l'ordre de 42.15 ± 3.99 µg/ml.

L'analyse de la variance (ANOVA) a montré que les différences sont très hautement significative ($P < 0.0001$; $\alpha < 0.001$). (**Annexe 11**)

Le test de corrélation a été effectué pour mettre en évidence la participation des différents métabolites recherchés et dosés (saponines, flavonoïdes, acide phénols ...). dans le piégeage de radical ABTS.

L'extrait hydroéthanolique d'*A.arvensis* a révélé une corrélation négative pour ce test avec tous les métabolites secondaire doser ($-0.995 < R < -0.044$; $P < 0.05$) à l'exception des tanins qui présente une corrélation très faible ($R = 0.035$; $P < 0.05$) ce qui prouve que les molécules quantifiées dans cette étude n'ont pas une influence sur l'inhibition d'ABTS⁺.

Par contre les résultats de corrélation pour l'extrait hydroéthanolique d'*H.Sabdariffa* a révélé une corrélation positive pour tous les métabolites quantifié ($0.5 < r < 0.788$; $P > 0.05$) à l'exception des acides phénols qui présente une corrélation négative ($r = -0.990$; $P > 0.05$) on peut conclure que les tanins, les polyphénols totaux, et les flavonoïdes ont une influence dans l'inhibition de radical cation ABTS⁺ pour l'extrait hydroéthanolique d'*Hibiscus Sabdariffa*. (**Annexe 11**)

L'activité antioxydante des métabolites secondaires des plantes, en particulier des composés phénoliques, est basée sur leur capacité à donner un atome d'hydrogène ou des électrons, chélater des ions métalliques ou piéger les radicaux libres (**Rakić et al. 2014**) Dans les systèmes biologiques, les espèces d'oxygène réactives (ERO) peuvent oxyder des acides nucléiques, des protéines, ou lipides et s'ensuivre dans l'amorce de nombre de maladies dégénératives (**Hussain et al., 2018**).

Dans notre travail l'activité antioxydante de nos extraits est évaluée en utilisant les tests anti radicalaire. L'activité antiradicalaire des deux extraits hydroéthanolique des deux plantes *Hibiscus Sabdariffa* et *anagallis arvensis* pourrait être attribuée à la présence de composés polyphénoliques (flavonoides, acide phenols ..) et saponines. Il a déjà été exposé que les composés polyphénoliques sont responsables de l'activité antiradicalaire, dû à la facilité de leur donation de l'atome de l'hydrogène à un radical libre actif. Des études

concernant les tests ABTS et DPPH montrent que les extraits contiennent des molécules antioxydantes qui ont la capacité de céder l'hydrogène et par conséquent réduisant et décolorant les deux radicalux (Bougandora *et al* 2013 ; Sonboli *et al.*, 2010).

II.4.2. Activité anti-cholinestérase

Les extraits hydroéthanolique bruts des deux plantes *H.sabdariffa* et *A.arvensis* ont été testé pour évaluer leurs activités inhibitrices de cholinestérase *in vitro*. Selon la méthode spectrophotométrique décrite par De Torre *et al.*, (2022)

Selon Vinutha et ses collaborateurs (2007), les extraits sont classés comme inhibiteurs puissants de l'AChE s'ils ont la capacité d'inhiber plus de 50 % de l'enzyme, l'activité inhibitrice de l'AChE est modérée si l'extrait provoque l'inhibition de 30 à 50 % et faible si l'extrait inhibe moins de 30 %.

Il ressort de la (figure : 24) que les extraits hydro-ethanolique des deux plantes ont une capacité inhibitrice qui dépasse 50 % donc on peut les qualifier comme des inhibiteurs puissants.

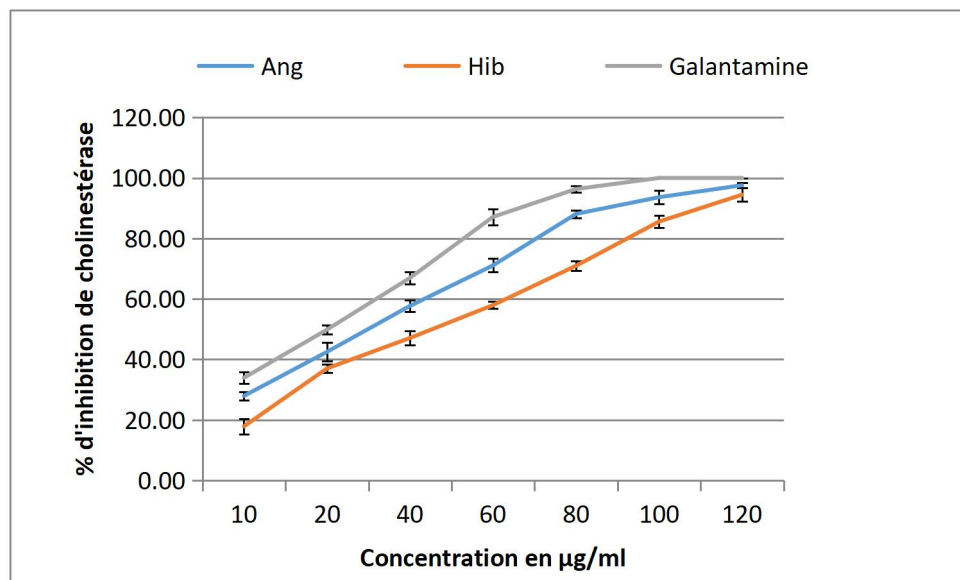


Figure 24 : Evolution de pourcentage de l'inhibition d'Aché en fonction de concentration d'Ang, Hib et de standard la Galentamine

Les concentrations inhibitrices de 50% d'Aché ont été déterminées et les résultats sont illustrés dans le (tableau IV) :

Tableau IV : IC₅₀ d'inhibition d'AchE par les extraits hydroéthnologiques d'Ang et d'Hib et de standard (Galentamine).

Extrait / standard	IC ₅₀ (µg/ ml)
Ext OH Ang	32.65 ± 0.68 µg /ml
Ext OH Hib	48.29 ± 2.9 µg /ml
Galentamine	18.12 ± 1.73 µg /ml

Au vu des résultats de tableau IV, il apparaît que les deux extraits hydroéthnologiques *d'H.Sabdariffa* et *d'A.arvensis* ont des IC₅₀ égales à IC₅₀ = 48.29 ± 2.9 µg /ml et IC₅₀ = 32.65 ± 0.68 µg /ml respectivement qui sont supérieures à celle de standard utilisé dans cette étude la galantamine qui a une IC₅₀ = 18.12 ± 1.73 µg /ml. Les résultats de concentration inhibitrice 50 révèlent que le standard galanthamine présente le pouvoir inhibitrice le plus élevé avec une IC₅₀ la plus faible de 18.12 ± 1.73 µg/ml. Suivis par *A.arvensis* avec une IC₅₀ de 32.65 ± 0.68 µg/ml et finalement *Hibiscus sabdariffa* qui présente la capacité inhibitrice la plus faible 48.29 ± 2.9 µg/ml.

L'analyse de la variance (ANOVA) a montré que les différences enregistrées sont très hautement significativement (P <0.0001 α <0.001) (**Annexe 11**)

La corrélation entre l'activité anticholinestérase et les teneurs en métabolites secondaire (saponines, flavonoïdes, acide phenols ...) est effectué pour les deux extraits hydroéthanolique *d'Hibiscus sabdariffa* et *Anagalis arvensis*.

Les résultats de test de corrélation pour l'extraits *d'A'arvensisa* révèle une corrélation positive pour tous les métabolites secondaire doser (0.457<R<1 ; P>0.05) à l'exception des tanins et acide phénols (R = -0.458 ; R = -0.387 ; P <0.05) respectivement qui présente une corrélation négative.

Cela suggère que les métabolites secondaires polyphénols totaux flavonoïdes contenant dans l'extrait hydroéthanolique *d'A.arvensis* sont responsables de l'inhibition de cet enzyme.

Par contre les résultats de corrélation pour l'extrait hydroéthanolique d'H.Sabdariffa a révélé une corrélation négative pour tous les métabolites quantifié (-0.971<R<0.-0.2 ;

P<0.05) à l'exception des flavonoïdes qui présente une corrélation positive (R= 0.942 ; P > 0.05)

On peut conclure que les flavonoïdes de l'extrait hydroéthanolique *d'Hibiscus Sabdariffa* ont une influence dans l'inhibition de l'enzyme AchE. **(Annexe 11)**

| *Conclusion et perspective*

III .Conclusion et perspective

Dans le présent travail, on s'est intéressé aux propriétés biologiques (antioxydante et anticholinestérase) de la partie aérienne de la plante *Anagallis arvensis* et des calices des fleurs d'*Hibiscus Sabdariffa*.

L'activité anti-acétylcholinestérase est évaluée dans le but de tester le potentiel des extraits des deux plantes à ralentir la dégradation de l'acétylcholine, ce qui permet de maintenir des niveaux plus élevés de ce neurotransmetteur dans le cerveau. Cela peut aider à atténuer les symptômes de la maladie d'Alzheimer, L'activité antioxydante peut aider à neutraliser les radicaux libres et réduire le stress oxydatif, protégeant ainsi les cellules cérébrales contre les dommages et les dégénérescences.

L'extraction des principes actifs par macération a permis d'obtenir les rendements les plus élevés dans les extraits aqueux des deux plantes, qui sont de l'ordre de 39.17% et 21.53% pour *Hibiscus sabdariffa* et *Anagallis arvensis* respectivement. Les extraits hydro-éthanolique présente également des rendements non négligeables.

Le criblage phytochimique effectué a permis de montrer la richesse des différents extraits en diverses classes des métabolites secondaires (flavonoïde, coumarine saponines,etc.).

Le dosage des quelques classes des composés phénoliques et des saponines ont montré que les teneurs les plus élevés en flavonoïdes, acide phénols, et saponines, sont remarqué pour l'extrait d'*Anagallis arvensis* 9.79 ± 0.1 ER mg/g PMVS, 1.00 ± 0.02 EACmg/g PMVS, 0.69 ± 0.004 EAmg/g PMVS respectivement .Alors que les teneurs les plus élevés en tanins et polyphénols totaux sont remarqué dans les extraits d'*Hibiscus sabdariffa* 4.5 ± 0.21 ECmg/g PMVS pour les tanins et 34.53 ± 2.1 EAG mg/g PMVS pour les polyphénols totaux.

Le potentiel anti-radicalaire a été testé *in vitro* en utilisant les deux tests d'inhibition de radical libre DPPH⁺ et ABTS⁺. Les résultats obtenus ont prouvé que les extraits hydroéthanoliques des deux espèces choisies sont très puissants dans l'inhibition des deux radicaux utilisés dans cette étude avec des valeurs d'IC₅₀ inférieures à celle de l'acide gallique. Il apparait que le total des métabolites trouvés dans ces extraits participe dans ce pouvoir antioxydant remarquable.

Concernant l'inhibition de l'AchE, il est trouvé que les extraits hydroéthanoliques de *d'Hibiscus Sabdariffa* ($IC_{50}=48.29 \pm 2.9 \mu\text{g g/ml}$) et *Anagallis arvensis* ($IC_{50}=32.65 \pm 0.68 \mu\text{g /ml}$) ont des capacités inhibitrices de l'AchE très remarquable et comparable à celle de la galantamine ($IC_{50}=18.12 \pm 1.73 \mu\text{g/ml}$). En se basant ces résultats, ces deux espèces peuvent être considérées alternative prometteuse dans le traitement de la MA.

Aussi, ces résultats obtenus *in vitro* peuvent être considérés comme très prometteurs et justifient la poursuite des recherches afin d'évaluer le potentiel antioxydant on utilisant d'autre tests pour avoir une indication plus affinée sur la capacité antioxydant des échantillons testés *d'Hibiscus Sabdariffa* et *Anagallis arvensis*. Aussi évaluer d'autres activités biologiques et atteindre la structure exacte des molécules responsable des activités biologiques en utilisant des techniques instrumentales les plus sophistiqués.

| *Références bibliographiques*

IV. Références bibliographiques :

1. **Afect. (2011).** Traité de chimie thérapeutique Volume 7 : Médicaments actifs sur le système nerveux central. Lavoisier.
2. **Akerreta, S., Caverro, R. Y., López, V., & Calvo, M. I. (2007).** Analyzing factors that influence the folk use and phytonomy of 18 medicinal plants in Navarra. *Journal of ethnobiology and ethnomedicine*, 3, 1-18.
3. **Alam Md. N. Bristi N.J. & Rafiquzzaman Md., 2013.** Review on in vivo and in vitro methods of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21: 143-152.
4. **Amdouni, E. (2017).** Représentation sémantique des biomarqueurs d'imagerie dans le domaine médical (Doctoral dissertation, Rennes 1).
5. **Amoros, M., Fauconnier, B., & Girre, R. L. (1987).** In vitro antiviral activity of a saponin from *Anagallis arvensis*, Primulaceae, against herpes simplex virus and poliovirus. *Antiviral research*, 8(1), 13-25.
6. **Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W., Lamantia, A. S., Purves, D., & White, L. (2015).** Neurosciences. De Boeck Supérieur.
7. **Bachiri, L., Echchegadda, G., Ibijbijen, J., & Nassiri, L. (2016).** Etude phytochimique et activité antibactérienne de deux espèces de Lavande Autochtones Au Maroc:«*Lavandula stoechas* L. et *Lavandula dentata* L.». *European Scientific Journal*, 12(30), 313-333.
8. **Balthazart, J. (2010).** Biologie de l'homosexualité: on naît homosexuel, on ne choisit pas de l'être (Vol. 6). Editions Mardaga. P36.
9. **Barlow, D. H., Durand, V. M., & Gottschalk, M. (2016).** Psychopathologie: une approche intégrative. De Boeck supérieur.
10. **Barré, L., Gourand, F., Levacher, V., & Marsais, F. (2007).** Maladie d'Alzheimer: inhibiteur de l'acétylcholinestérase, nouveau concept de médicament, apport de l'imagerie TEP. *Médecine Nucléaire*, 31(9), 490-492.
11. **Bellavance, C. R. (2018).** Génétique du vieillissement-Étude du rôle du gène R148. 3 dans le processus de vieillissement chez l'organisme modèle *Caenorhabditis elegans*.
12. **Benzahi K., 2001.** Contribution A L'étude Des Flavonoïdes Dans La Plante *Cynodon dactylon* -L « Chiendent ». Mémoire De Magister. Université D'ouargla, Algérie.
13. **Bernard sablonnière (2022).** *Medicine moléculaire . collégé nationale de biochimie et biologie moléculaire et médicale , 2ème édition P 56.*

14. **Bhatia, H., Manhas, R. K., Kumar, K., & Magotra, R. (2014).** Traditional knowledge on poisonous plants of Udhampur district of Jammu and Kashmir, India. *Journal of Ethnopharmacology*, 152(1), 207-216.
15. **Bidie, A. P., N'guessan, B. B., Yapo, A. F., N'Guessan, J. D., & Djaman, A. J. (2011).** Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne. *Sciences & Nature*, 8(1-2), 1
16. **Bogliotti, C. (2017).** Atypies langagières chez l'enfant, l'adulte et la personne âgée: Apport de la psycholinguistique et des neurosciences cognitives. De Boeck Supérieur. P152.
17. **Boubekeur, H. (2019).** Activités biologiques d'*Helichrysum stoechas* (Doctoral dissertation).
18. **Bourgou, S., Beji, R. S., Medini, F., & Ksouri, R. (2016).** Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'*Euphorbia helioscopia*. *Journal of New Sciences*, 28.
19. **Braidy N., Poljak A., Jayasena T., Sachdev P. (2017).** Natural Plant-Derived Acetylcholinesterase Inhibitors: Relevance for Alzheimer's Disease. *Natural Products*
20. **Braidy, N., Poljak, A., Jayasena, T., & Sachdev, P. (2017).** Natural Plant-Derived Acetylcholinesterase Inhibitors: Relevance for Alzheimer's Disease. *Natural Products Targeting Clinically Relevant Enzymes*, 297-318.
21. Brands-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C., 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebens Wiss. Technol.*, 18: 25-30.
22. **Brands-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C., 1995.** Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebens Wiss. Technol.*, 18: 25-30.
23. **Brodeur, J. (2013).** LRP10 (LDL-related protein 10), un nouveau régulateur du trafic et du clivage de la protéine APP (amyloid precursor protein), est réduit dans la maladie d'Alzheimer. *Library and Archives Canada= Bibliothèque et Archives Canada, Ottawa.*
24. **Bruneton J(2009),** Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales, 4e éd., revue et augmentée, Tec & Doc - Éditions médicales internationales, Paris, 1288
25. **Bruneton, J. (1993).** Pharmacognosie: phytochimie plantes médicinales (No. 581.634 B7).
26. **Cappy, A. (2020).** Traitement neuro-inspiré de l'information. ISTE Group. P 70.
27. **Cayton, H. (2008).** *Alzheimers and Other Dementias.* Class Publishing Ltd.

28. Cisse, M., Dornier, M., Sakho, M., Ndiaye, A., Reynes, M., & Sock, O. (2009). Le bissap (*Hibiscus sabdariffa* L.): composition et principales utilisations. *Fruits*, 64(3), 179-193..
29. Colovic M.B., Krstic D.Z., Lazarevic-Pasti T.D., Bondzic A.M., Vasic V.M. (2013). Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Current neuro pharmacology*. 11(3), 315-335.
30. Connolly, J. D., & Hill, R. A. (1991). Triterpenoids. In *Second Supplements to the 2nd Edition of Rodd's Chemistry of Carbon Compounds* (pp. 555-596). Elsevier.
31. Couplan, F. (1994). *Guide des plantes sauvages comestibles et toxiques*. Delachaux et Niestlé.
32. Da-Costa-Rocha I., Bonnlaender B., Sievers H., Pischel I., Heinrich M. (2014). *Hibiscus sabdariffa* L. – A phytochemical and pharmacological review. *Food Chemistry*. 165 : 424-443.
33. Dangles, O., & Deluzarche, M. (1994). Flavonoïdes et anthocyanes. *Bulletin de l'Union des Physiciens*, 88(768), 1609-1617.
34. De La Santé, O. M. (1994). *Classification internationale des maladies, dixième révision*. Genève: OMS.
35. De Torre, M. P., Caverro, R. Y., & Calvo, M. I. (2022). Anticholinesterase Activity of Selected Medicinal Plants from Navarra Region of Spain and a Detailed Phytochemical Investigation of *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare*. *Molecules*, 27(20), 7100.
36. Delacourte A. (2007) - *Revue Maladie d'Alzheimer : Physiopathologie, Médecine thérapeutique*, 1997 ; 3 (5) : 369-76. De Wouters N. - *Ateliers d'art thérapie: une nouvelle approche pour les personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer et troubles apparentés* - Oplinter Kluwer,
37. Delacourte, A. (1998). Les diagnostics de la maladie d'Alzheimer. *Annales de Biologie Clinique*, 56, 133-42.
38. Démonet, J. F. (2013). Diagnostic de la maladie d'Alzheimer. In *Traité sur la maladie d'Alzheimer* (pp. 3-27). Springer, Paris.
39. Demougin, J., Neefs, H., & Mével, J. P. (1996). *Dictionnaire Hachette encyclopédique illustré* p 905.
40. Desport, J., & Couratier, P. (2002). Stress oxydant et maladies neurodégénératives. *Oxydative stress in neurodegenerative diseases. Nutrition clinique et métabolisme*, 16, 253-259.

41. **Dhenain, M. (2021).** Transmission iatrogène des protéines β -amyloïde et tau: importance clinique et pour la recherche biomédicale sur la maladie d'Alzheimer. Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine, 205(7), 792-799.
42. **Dhenain, M., Lehéricy, S., & Duyckaerts, C. (2002).** Le diagnostic: de la neuropathologie à l'imagerie cérébrale. médecine/sciences, 18(6-7), 697-708.
43. **Diallo, D., 2000.** Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Mali and phytochemical study of four of them: *Glinus oppositifolius* (Aizoaceae), *Diospyros abyssinica* (Ebenaceae), *Entada africana* (Mimosaceae), *Trichilia emetica* (Meliaceae). *Dioscorea* species of Meghalaya, North East India. *J Med Plants Studies* 1:62–9.
44. **Do QD, AE Angkawijaya, PL Tran-Nguyen, LH Huynh, FE Soetaredjo., 2014.** *Journal of food and drug analysis* 296-302.
45. **Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., & Ju, Y. H. (2014).** Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of food and drug analysis*, 22(3), 296-302.
46. **Ducerf, G. (2010).** Guide de diagnostic des sols. In *L'Encyclopédie des plantes bio-indicatrices alimentaires et médicinales (Vol. 1)*. Promonature imprint.
47. **Dujardin, K., & Lemaire, P. (2008).** Neuropsychologie du vieillissement normal et pathologique. (DEPRECIATED). Elsevier Masson PP 19-23.
48. **Duke, J. A. (2002).** Handbook of medicinal herbs. CRC press.
49. **El Kadmiri, N., Hamzi, K., El Moutawakil, B., Slassi, I., & Nadifi, S. (2013).** Les aspects génétiques de la maladie d'Alzheimer (Revue). *Pathologie Biologie*, 61(6), 228-238.
50. **Endrias, A. (2006).** Bio-raffinage de plantes aromatiques et médicinales appliqué à l'*Hibiscus sabdariffa* L. et à l'*Artemisia annua* (Doctoral dissertation).
51. **Fadlia Awatif, K. L. (2017).** Contribution à l'étude des partenaires symbiotiques des espèces légumineuses du genre *Scorpiurus* et *Hedysarum*.
52. **Farnsworth N. R., 1966.** Biological and phytochemical screening of plants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55(3): 225-276.
53. **Fertout-Mouril N., Latreche A., Mehdadi Z., 2016.** Activité antibactérienne de quatre extraits de *Teucrium polium* L. du mont de Tessala (Algérie occidentale). *Bulletin de la Société royale des Sciences de Liège*, Vol. 85, 2016, p. 253 – 262.

54. **Folliot, C. (2021)**. La maladie d'Alzheimer au fil des siècles. *Revue de Biologie Médicale/N*, 363(59).
55. **Folo Lisele J., 2014**. Screening Chimique, Extraction Et Caracterisation Des Groupes Phytochimiques Des Plantes Traitant Les Maladies Cutanees Dans La Region De La Tshopo p12.
56. **Folo, L. J. (2014)**. Screening chimique, extraction et caractérisation des groupes Phytochimiques des plantes traitant les maladies cutanées dans la région de la tshopo. Cas de: Carica papaya, Nicotiana tabacum, Vermonia senegalensis et Rauwolfia vomitoria, universite de kisangani departement de chimie faculte des sciences. *Chimie analytique*.10-16pp.
57. **Fox, N. C., & Schott, J. M. (2004)**. Imaging cerebral atrophy: normal ageing to Alzheimer's disease. *The Lancet*, 363(9406), 392-394.
58. **Friguet, B. (2003)**. Le vieillissement moléculaire et cellulaire et ses futurs enjeux. *Actualite Chimique*, (11/12), 103-107.
59. **Ghedira, K. (2005)**. Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 3(4), 162-169.
60. **Gibbs, D. M. (2022)**. Alzheimer's dementia or Alzheimer's disease-what's the difference and why should we care?. *Ageing Research Reviews*, 101779-101779.
61. **Govaerts, L., Schoenen, J., & Bouhy, D. (2007)**. Pathogénie de la maladie d'Alzheimer: les mécanismes moléculaires et cellulaires. *Revue Médicale de Liège*, 62(4).
62. **Guindo, M. (2019)**. Contribution à la détermination des éléments de contrôle de qualité botanique et phytochimique de quatre plantes du Mali, sources de colorants utilisés dans les formulations médicamenteuses (Doctoral dissertation, USTTB).
63. **Guyon, A. (2021)**. Insertion d'une mutation protectrice pour la maladie d'Alzheimer dans le gène de la protéine précurseur de l'amyloïde via le système CRISPR/Cas9 (Doctoral dissertation, Université Laval).
64. **Hagerman A. & Harvey-Muller., Makkar I., Harinder., 2000**. Quantification of tannins in tree foliage- A laboratory manual 537. 4-7.
65. **Hauw, J. J. (1999)**. La maladie d'Alzheimer. John Libbey Eurotext. P153.
66. **Hayez, J. Y., Delbrouck, M., Consoli, S., Pomerleau, G., & Guédénéy, N. (2019)**. Psychopathologie: Manuel à l'usage du médecin et du psychothérapeute. De Boeck Supérieur.

67. **Hiai, S., YOKOYAMA, H., OURA, H., & YANO, S. (1979).** Stimulation of pituitary-adrenocortical system by ginseng saponin. *Endocrinologia Japonica*, 26(6), 661-665.
68. **Hussain, P. R., Rather, S. A., & Suradkar, P. P. (2018).** Structural characterization and evaluation of antioxidant, anticancer and hypoglycemic activity of radiation degraded oat (*Avena sativa*) β -glucan. *Radiation Physics and Chemistry*, 144, 218-230.
69. **Jean, B. (2009).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.). Lavoisier.
70. **Kabeya, P. K. (2014).** Développer les compétences des apprenants dès l'école. *libreriauniversitaria. it Edizioni*. P 58.
71. **Kabran, G. R. M., Mamyrbekova-Bekro, J. A., Pirat, J. L., Bekro, Y. A., Sommerer, N., Verbaere, A., & Meudec, E. (2014).** Identification de composés phénoliques extraits de deux plantes de la pharmacopée ivoirienne. *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie*, (038), 57-63.
72. **Kanfon, R. E., Gnawe, M., Dossa, C. P. A., Yedomonhan, H., Wotto, D. V., & Sohounhloue, C. D. (2018).** Caractérisation physico-chimique et évaluation de l'activité antiradicalaire des extraits de sept morphotypes de gombo (*Abelmoschus* spp.) cultivés au Bénin. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 12(3), 1447-1458.
73. **Kawashty, S. A., El-Garf, I. A., & El-Negoumy, S. I. (1998).** Chemosystematics of *Anagallis arvensis* L.(Primulaceae). *Biochemical systematics and ecology*, 26(6), 663-668.
74. **Keller, M. (2018).** Les animaux et le sexe: 60 clés pour comprendre. *Les animaux et le sexe*, 1-112. P 14.
75. **Kim D., Jeong S., Lee C., 2003.** Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*. 81. 321-326.
76. **Kolb, B., Whishaw, I. Q., & Teskey, G. C. (2019).** Cerveau et comportement. De Boeck Supérieur.
77. **Kouamé, T. K., Siaka, S., Kassi, A. B. B., & Soro, Y. (2021).** Détermination des teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et tanins de jeunes feuilles non encore ouvertes de *Piliostigma thonningii* (Caesalpiniaceae). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 15(1), 97-105.
78. **Kovacic P., Weston W. (2017).** Phenolic antioxidants as drugs for Alzheimer's disease: oxidative stress and selectivity. *Novel Approaches in Drug Designing and Development*. 2(5), 555598.

79. **Kryscio R.J., Abner E.L., Caban-Holt A., Lovell M., Goodman P., Darke A.K., Schmitt F.A. (2017).** Association of antioxidant supplement use and dementia in the prevention of Alzheimer’s disease by Vitamin E and Selenium Trial (PREADVISE). *JAMA neurology*. 74(5), 567-573.
80. **Kwasnieski, O. (2010).** Etude théorique de la réactivation de l’AChE inhibée par le tabun (Doctoral dissertation, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI).
81. **Lapre, E. (2010).** Maladie d’Alzheimer et thérapies non médicamenteuses: évaluation de la stimulation cognitive et de l’activité physique sur le fonctionnement exécutif (Doctoral dissertation, Bordeaux 2).
82. **Leroy, K., Ando, K., Héraud, C., & Brion, J. P. (2015).** Plaques amyloïdes et pathologie tau: modélisation de leur interaction dans des modèles murins développant les lésions de la maladie d’Alzheimer. *Morphologie*, 99(326), 97-98.
83. **Leroy, M., Vaudran, L., Deramecourt, V., Pasquier, F., Chen, Y., Schraen, S., & Lebouvier, T. (2021).** Biomarqueurs du liquide cébrospinal. *Pratique Neurologique-FMC*, 12(2), 165-179.
84. **Lopez, V., Jager, A.K., Akerreta, S., Caverro, R.Y., Calvo, M.I., 2011.** Pharmacological properties of *Anagallis arvensis* L. (“scarlet pimpernel”) and *Anagallis foemina* Mill. (“blue pimpernel”) traditionally used as wound healing remedies in Navarra (Spain). *J. Ethnopharmacol.* 134 (3), 1014–1017.
85. **Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d’importance économique. PPUR presses polytechniques.
86. **Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d’importance économique. PPUR presses polytechniques.
87. **Mahmoudi, S., Khali, M., & Mahmoudi, N. (2013).** Etude de l’extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d’artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature & Technology*, (9), 35.
88. **Maillot, C. (2002).** Encéphale et moelle épinière: Anatomie macroscopique et fonctionnelle. Springer Science & Business Media P 4.
- 89.
- Marfai, L. (2013).** les difficultés rencontrées lors du développement de nouvelles molécules thérapeutiques dans l’indication de la maladie d’Alzheimer. Université de Lorraine. France.

90. **Masood, A., Akbar, S., Masood, A., Ganai, B., 2010.** Medicinal and Aromatic Plants from Kashmir Himalayas. Books on Demand, Germany, pp. 34–84.
91. **Maurer K., Volk S., Gerbaldo H.(1997).** - Des archives retrouvées par hasard révèlent les symptômes de la malade Auguste d. première patiente du docteur Alzheimer- La recherche, 1997 ; 303:58-60.
92. **Mauro, N. M. (2006).** Synthèse d'alcaloïdes biologiquement actifs: la (+)-anatoxine-a et la (±)-camptothécine. Autre. Université Joseph-Fourier-Grenoble I. France.
93. **Mibindzou Mouellet A., 2004.** Screening phtochimique de deux espèces de plantes : *Crotalia retusa* L (papilionaceae) et *Hallea ciliata* Aubrev & Pellegr (rubiaceae) récoltées au Gabon. Thèse de doctorat. University de Bamako, Mali.p58.
94. **Mohammedi Z. (2006)** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. M.
95. **Moore J. & Yu L (2008).**, methods for antioxidant capacity estimation of wheat and wheat-based food products in wheat antioxidants. Ed. John Wiley & Sons, (Inc., Hoboken, New Jersey, 2008).
96. **Moore J. & Yu L.(2008)**, methods for antioxidant capacity estimation of wheat and wheat-based food products in wheat antioxidants. Ed. John Wiley & Sons, (Inc., Hoboken, New Jersey, 2008).
97. **MOUFFOUK, C. (2019).** Evaluation des activités biologiques et étude de la composition chimique de la plante *Scabiosa stellata* L (Doctoral dissertation, Université de Batna 2).
98. **Mukherjee P.K., Kumar V., Mal M., Houghton, P.J. (2007).** Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*. 14(4), 289-300.
99. **Ndiaye, N. A., Dieng, M., Kane, A., Cisse, M., Montet, D., & Toure, N. C. (2015).** Diagnostic et caractérisation microbiologique des procédés artisanaux de fabrication de boissons et de concentrés d'*Hibiscus sabdariffa* L au Sénégal. *Afrique Science: Revue Internationale des Sciences et Technologie*, 11(3), 197-210.
100. **Nichols, E., Steinmetz, J. D., Vollset, S. E., Fukutaki, K., Chalek, J., Abd-Allah, F., ... & Liu, X. (2022).** Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted
101. **Orsini, J. C., & Pellet, J. (2005).** Introduction biologique à la psychologie. Editions Bréal. P 331.
102. **Ozenda, Paris (2004).** Flore et végétation du Sahara, P. *Ecologia Mediterranea*, 30(2), P 329, P 362

103. **Pant, D. R., Pant, N. D., Yadav, U. N., & Khanal, D. P. (2017).** Phytochemical screening and study of antioxidant, antimicrobial, antidiabetic, anti-inflammatory and analgesic activities of extracts from stem wood of *Pterocarpus marsupium* Roxburgh. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 6(2), 170.
104. **Paris, M., Hurabielle, M., & Paris, R. R. (1981).** Abrégé de matière médicale: Monographies (2. Partie): plantes actives sur le système nerveux, sur l'appareil digestif, plantes cardiotoniques, plantes antiparasitaires, plantes insecticides, antibiotiques et antitumoraux d'origine végétale. Masson. P 339
105. **Pereira Nunes X, Souza Silva F., Alneida J R G. (2012).** Biological Oxidations and Antioxidant Activity of Natural Products. Chapter1. In “phytochemicals as Nutraceuticals Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health”. Venketeshwer Rao Edit. 1-20. *Phytochemistry*. 67: 984–987.
106. **Pousset, J. L. (2004).** Plantes médicinales d'Afrique: Comment les reconnaître et les utiliser. (No Title).
107. prevalence in 2050: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet Public Health*, 7(2), e105-e125.
108. **Quadrio, I., Hay-Lombardie, A., Perret-Liaudet, A., & Bigot-Corbel, E. (2021).** Marqueurs biologiques et maladie d'Alzheimer. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2021(534), 18-27.
109. **Quezel, P. et Santa, S1962 .—**Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I., Editions du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris. *Revue d'Écologie (La Terre et La Vie)*, 16(4), p 624,p726.
110. **Rakić, S., Janković, S., Marčetić, M., Živković, D., & Kuzevski, J. (2014).** The impact of storage on the primary and secondary metabolites, antioxidant activity and digestibility of oat grains (*Avena sativa*). *Journal of Functional Foods*, 7, 373-380.
111. **Raunkiær C., 1934.** The Life Forms of Plants and Statistical Plant Geography, being the collected papers of C. Raunkiær. Translated by H. Gilbert-Carter, A. Fausbøll, and A. G. Tansley. Oxford University Press, Oxford. Reprinted 1978 (ed. by Frank N. Egerton), Ayer Co Pub., in the "History of Ecology Series".
112. **Re R., Pellegrini N., Pannala A., Yang M. & Rice-Evans C., (1999).** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical action decolorization Assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(9/10): 1231-1237.

113. **Re R., Pellegrini N., Pannala A., Yang M. & Rice-Evans C., 1999.** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical action decolorization Assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(9/10): 1231-1237. *ciences et Nature*, vol. 8 N° 1 :1-11.
114. **Ribereau-Gayon P., 1968.** Les composés phénoliques des végétaux. Editions Dunod, Paris p 254 .
115. **Rosenberg, A. (2020).** Dementia prevention in at-risk individuals: focus on selection and engagement of target populations (Doctoral dissertation, Itä-Suomen yliopisto).
116. **Saleem, H., Khurshid, U., Tousif, M. I., Anwar, S., Ali, N. A. A., Mahomoodally, M. F., & Ahemad, N. (2022).** A comprehensive review on the botany, traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicity of *Anagallis arvensis* (L.): A wild edible medicinal food plant. *Food Bioscience*, 102328.
117. **Saqib, F., & Janbaz, K. H. (2021).** Ethnopharmacological basis for folkloric claims of *Anagallis arvensis* Linn.(Scarlet Pimpernel) as prokinetic, spasmolytic and hypotensive in province of Punjab, Pakistan. *Journal of Ethnopharmacology*, 267, 113634.
118. **Schauenberg, P., & Paris, F. (2005).** Guide des plantes médicinales: analyse, description et utilisation de 400 plantes. Delachaux et Niestlé.
119. **Semah, F., Deberdt, W., & Ceccaldi, M. (2016).** Diagnostic de la maladie d'Alzheimer: apport de l'imagerie au florbétapir et autres radiopharmaceutiques de la plaque amyloïde. *Médecine Nucléaire*, 40(5), 364-381.
120. **Shui G. & Leong L., 2006.** Residue from star fruit as valuable source for functional food ingredients and antioxidant nutraceuticals. *Food Chemistry*. 97. 277-284.
121. **Sindi, H. A., Marshall, L. J., & Morgan, M. R. (2014).** Comparative chemical and biochemical analysis of extracts of *Hibiscus sabdariffa*. *Food chemistry*, 164, 23-29.
122. **Smallfield, B. M., van Klink, J. W., Perry, N. B., & Dodds, K. G. (2001).** Coriander spice oil: effects of fruit crushing and distillation time on yield and composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(1), 118-123.
123. **Smith M.A., Rottkamp C.A., Nunomura A., Raina A.K., Perry G. (2000).** Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 1502(1), 139-144 .
124. **Sonboli, A., Mojarrad, M., Ebrahimi, S. N., & Enayat, S. (2010).** Free radical scavenging activity and total phenolic content of methanolic extracts from male

inflorescence 33 of *Salix aegyptiaca* grown in Iran. Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR, 9(3), 293.

125. **Spichiger, R. E., Savolainen, V. V., Figeat, M., & Jeanmonod, D. (2002).** Botanique systématique des plantes à fleurs. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes. Francia.

126. **Stanković, M. S., 2011** Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity of *Marrubium peregrinum* L. extracts, Kragujevac J. Sci., 33 63-72.

127. **Sun B. Ricardo-Da-Silva J. M., Spranger I., 1998.** Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. J Agric. Food Chem, 46 (10), 4267-4274.

128. **Szafer-Hajdrych M., Goślińska O., 2004.** The quantitative determination of phenolic acids and antimicrobial activity of *Symphoricarpos albus* (L.) Blake. Jan-Feb;61(1):69-74.

129. **Tahouo, S. F. (2016).** Procédures d'extraction globale des composés phytochimiques pour l'évaluation analytique des médicaments à base de plantes (Doctoral dissertation, Thèse de docteur en pharmacie, université d'UFR sciences pharmaceutiques et biologiques).

130. **Tanzi, R. E., & Bertram, L. (2005).** Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. Cell, 120(4), 545-555.

131. **Terry, R. D., & Davies, P. (1980).** Dementia of the Alzheimer type. Annual review of neuroscience, 3(1), 77-95.

132. **Tison, F. (2022).** Les maladies neurodégénératives et maladies apparentées en pratique. Elsevier Health Sciences.

133. **Tiwari P., Kaur M., Kaur G. & Kaur H., 2011.** Phytochemical screening and extraction: A review. International Pharmaceutica Scientia, 1(11): 98-106.

134. **Treaser E., Evans W.C., 1987.** Pharmacognosie, Billiaire Tindall. 13th edition. London 61-62.7.

135. **Vinutha B., Prashanth D., Salma K., Sreeja S.L., Pratiti D., Padmaja R., Deepak M (2007).** Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity Journal of Ethnopharmacology. 109(2), 359-363.

136. **Wang X., Wang W., Li L., Perry G., Lee H.G., Zhu X. (2014).** Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Molecular Basis of Disease. 1842(8), 1240-1247.

137. **Yadav R.N.S. and Agarwala M., 2011.** Phytochemical analysis of some medicinal plants. Journal of Phytology, 3(12): 10-14

138. **Yasmeen, Z., Basit, A., & Tahir, S. (2020).** Traditional uses and pharmacological effects of anagallis arvensis: A review: anagallis arvensis: a review. *The International Journal of Frontier Sciences*, 4(2), 97-100.

| *Annexes*

V. Annexes :

Tableau I : démences dégénératives et non dégénératives (Kolbb,et al, 2019)

Démences Dégénérative	Maladie d'Alzheimer
	Syndromes extrapyramidaux (ex. paralysie supranucléaire progressive)
	Maladie de Wilson
	Maladie (ou chorée) de Huntington
	Maladie de Parkinson
	Dégenerescence de lobe frontotemporal
	Dégenerescence corticobasal
	Démence liées a une infection par un prion (ex de maladie de Kreutzfeld – jacob)
	Leucodystrophies (ex adénoleucodystrophie)

Démences non dégénératives	Demence vasculaire (ex AVC)
	Démence infectieuse (ex maladies liées au VIH)
	Neurosyphilis
	Démence liées à une lésion cérébrale traumatique

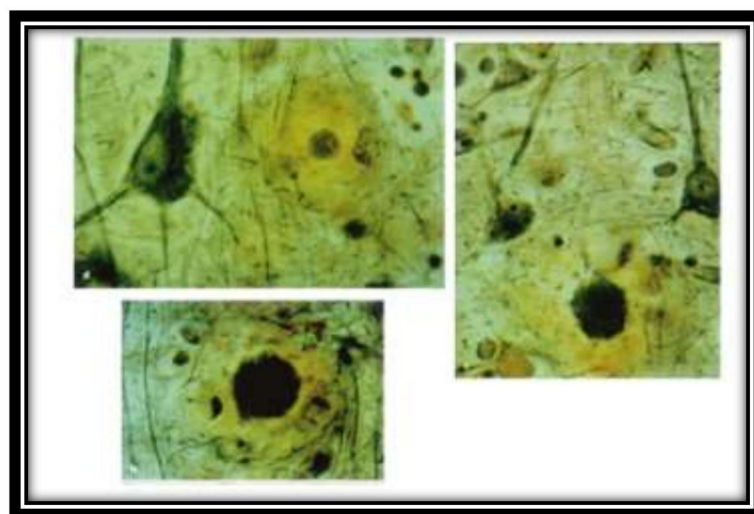


Figure 01 : Marqueurs histopathologie aux sels d'argents d'Alois Alzheimer sur le cortex cérébral de l'une de ses patients. (Valverde, A. 2020).

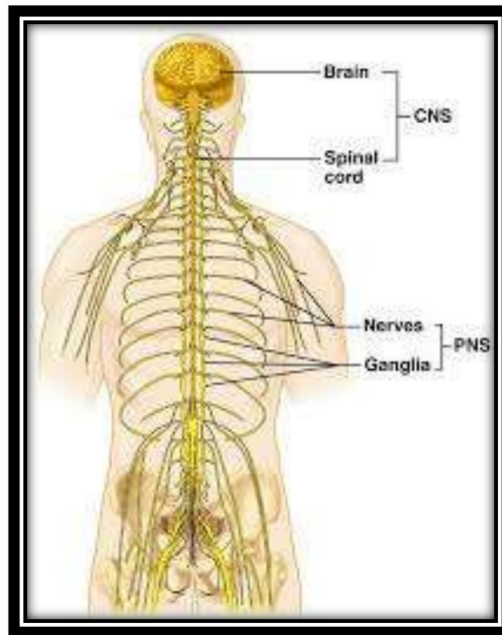


Figure 02 : système nerveux central et system nerveux (<http://www.ifsidijon.info/v2/wp-content/uploads/2017/09/NeuronesSN-MZ-IFSI-Dijon-sept-2016-n108.pdf>)

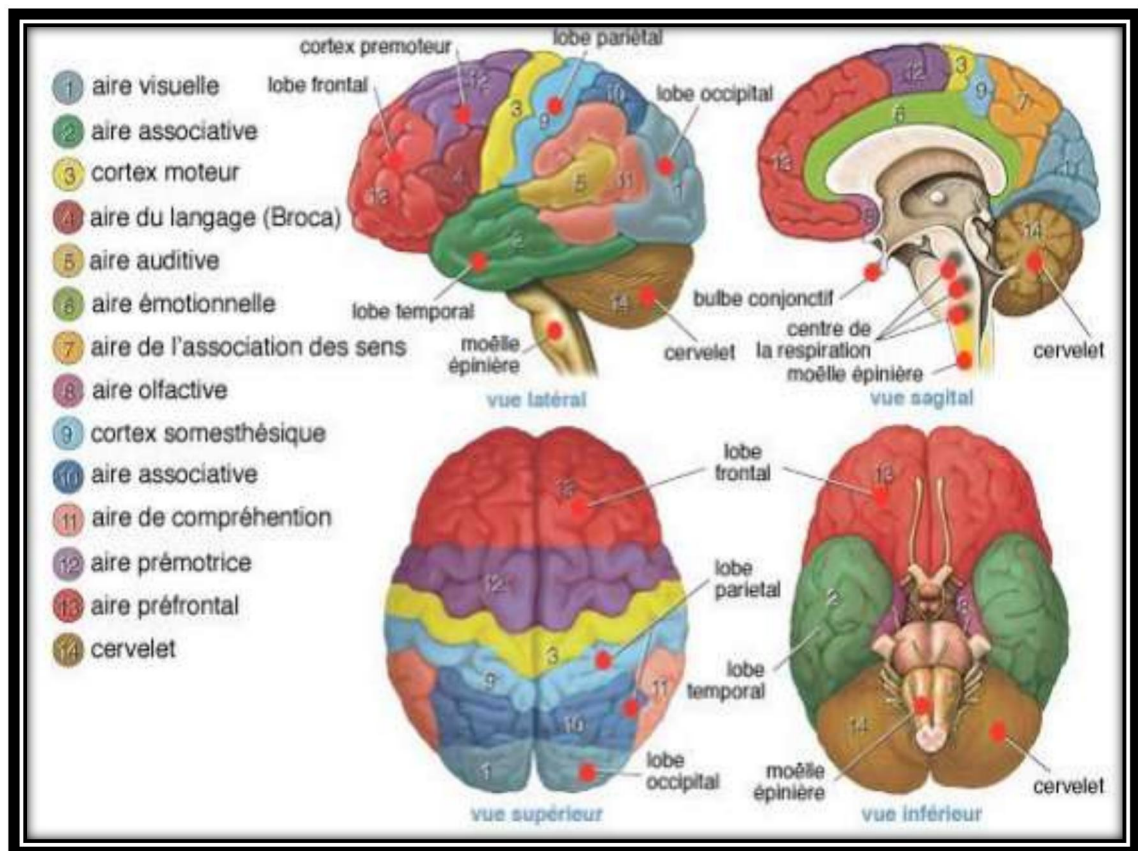


Figure 03 : structure et différentes partie et lobes du cerveau (Marcel Tappaz., 2016)

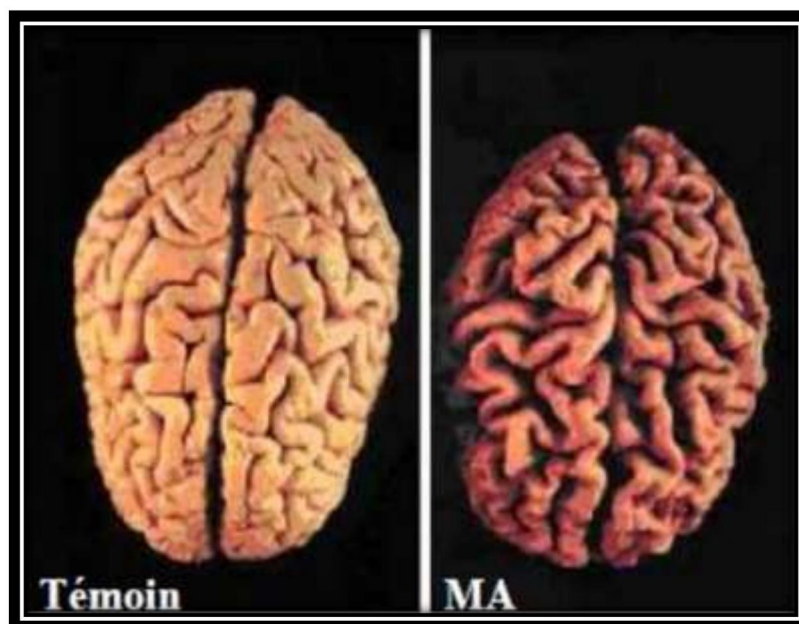


Figure 04 : Vues supérieures de cerveaux provenant d'un témoin et d'un patient atteint de MA chez lequel l'atrophie des circonvolutions cérébrales conduit à l'élargissement des sillons corticaux. (Hubbard et al., 1981).

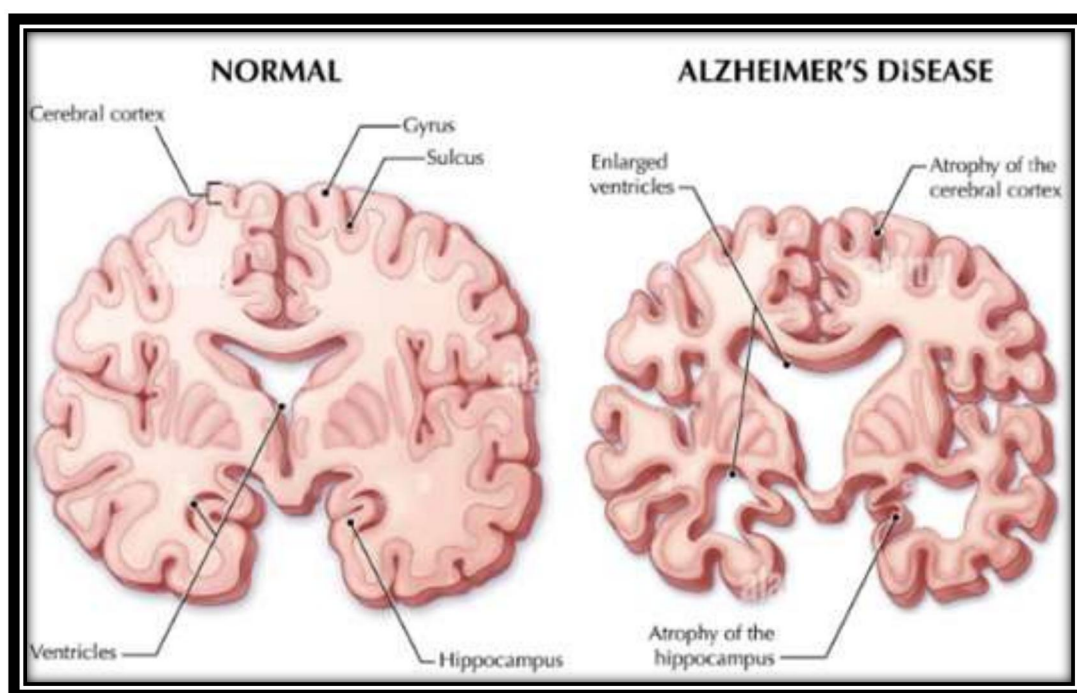
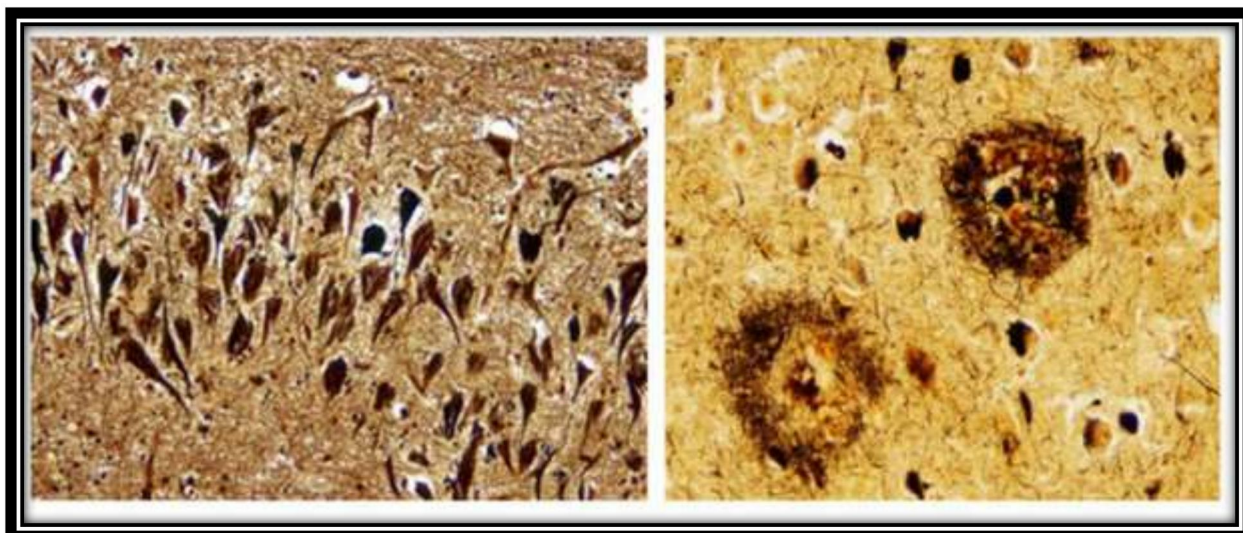


Figure 05 : la différence entre cerveau sain et cerveau atteint d'Alzheimer (Marcel Tappaz., 2016).



Dégénérescences neurofibrillaires

Plaques séniles (B)

(A)

Figure 06 : (a) les plaques séniles (b) les dégénéscences neurofibrillaire (J.M. Dorey, 2022)

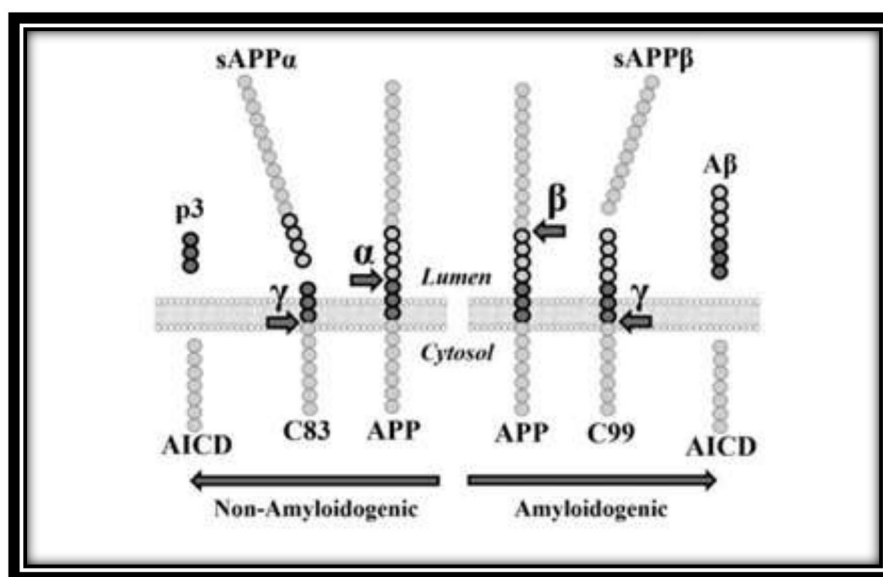


Figure 07 : Métabolisme protéolytique de la protéine APP et production de peptide AB (Guyon et al , 2020)

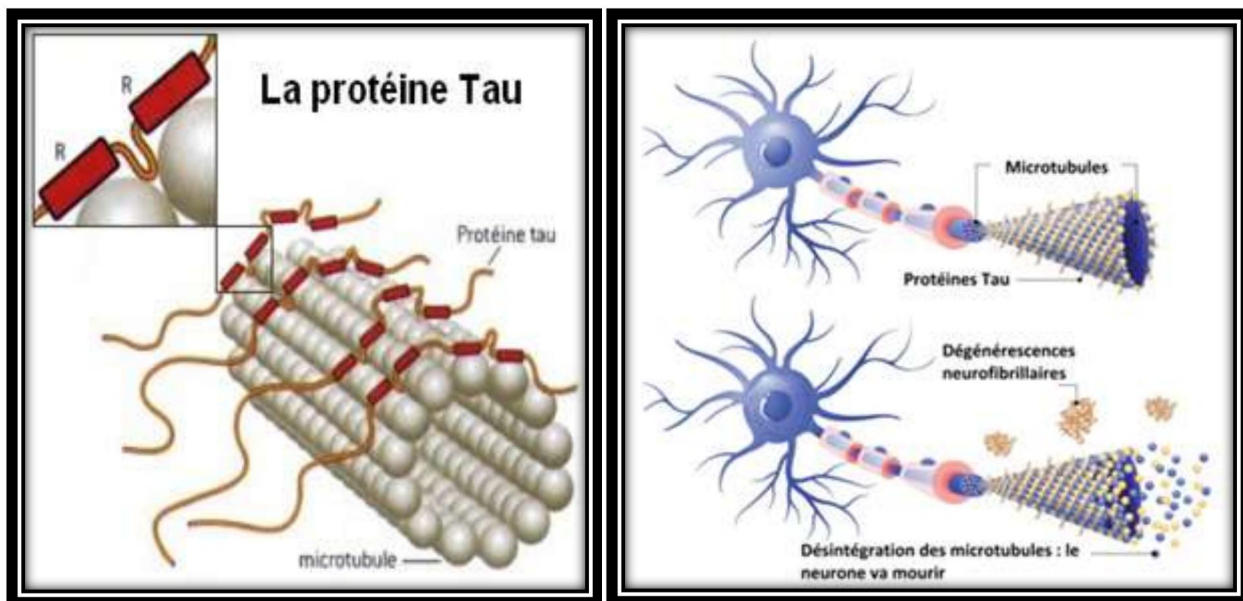


Figure 08 : association microtubule protéine tau (Hayez, ., et al,2019).

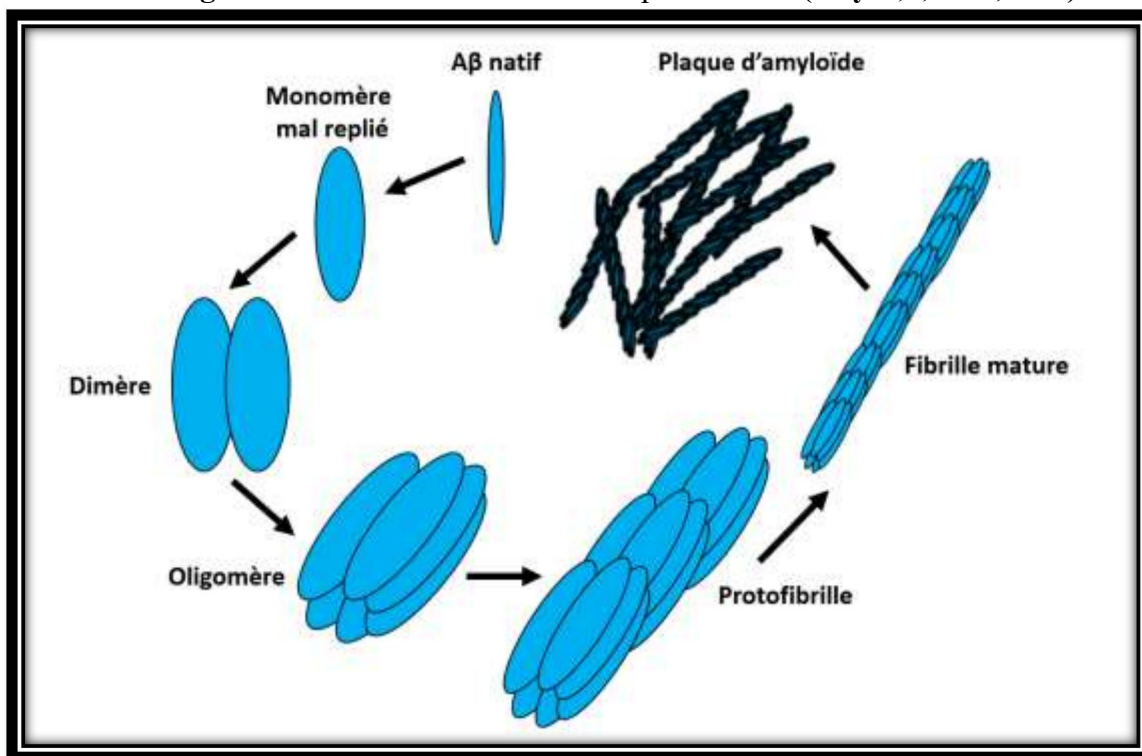
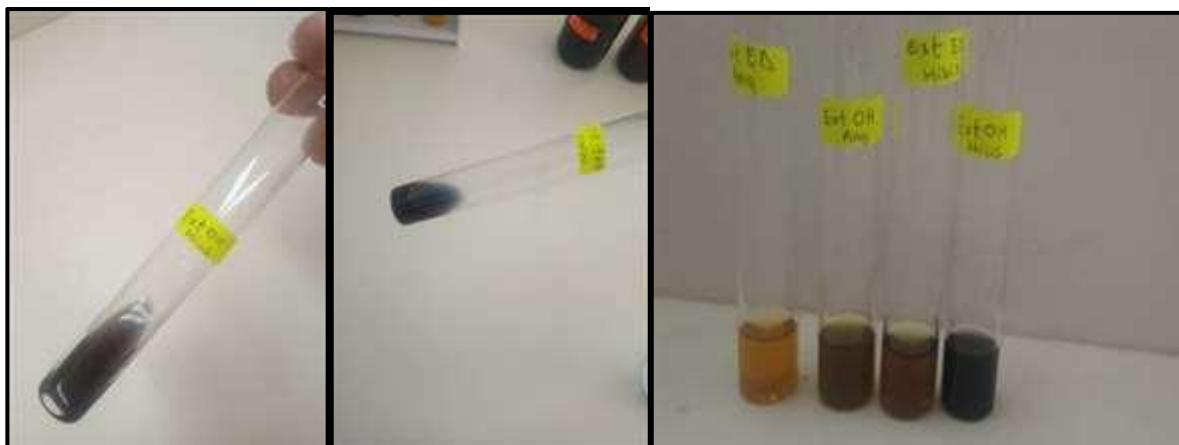
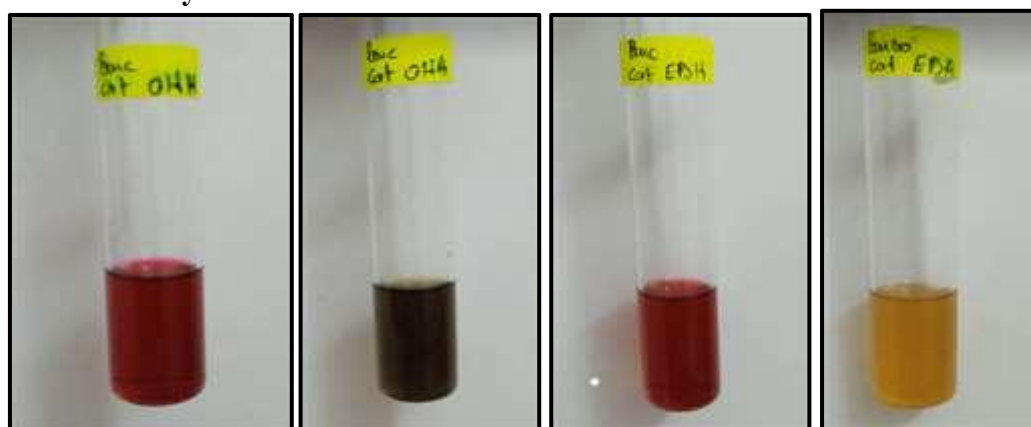


Figure 09 : Agrégations du peptide bêta (Guyon et al, 2020)

Annexe 10

Résultats de criblage phytochimique

1-Flavonoides**1-1- Anthocyanes****1-2- Réaction a la cyanidine****1-3- Leucoanthocyanes- catéchols**

2- Tanins :

2-1- Test de chlorure de fer :



2-2- Différenciation des tanins :

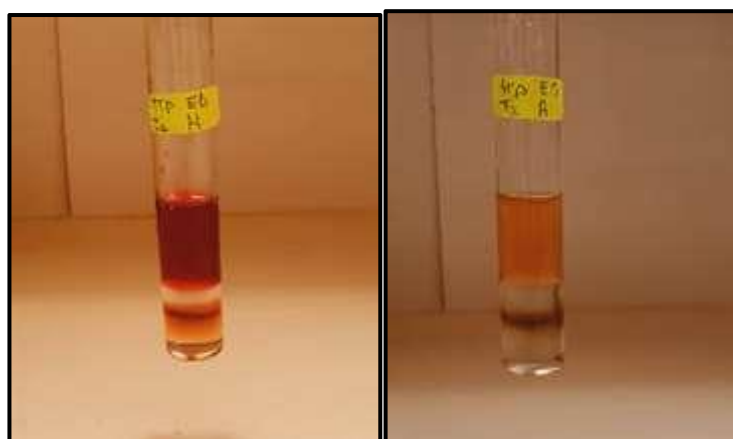


3- Terpenoides

3-1- Test de Libermann



3-2- Test de chloroforme

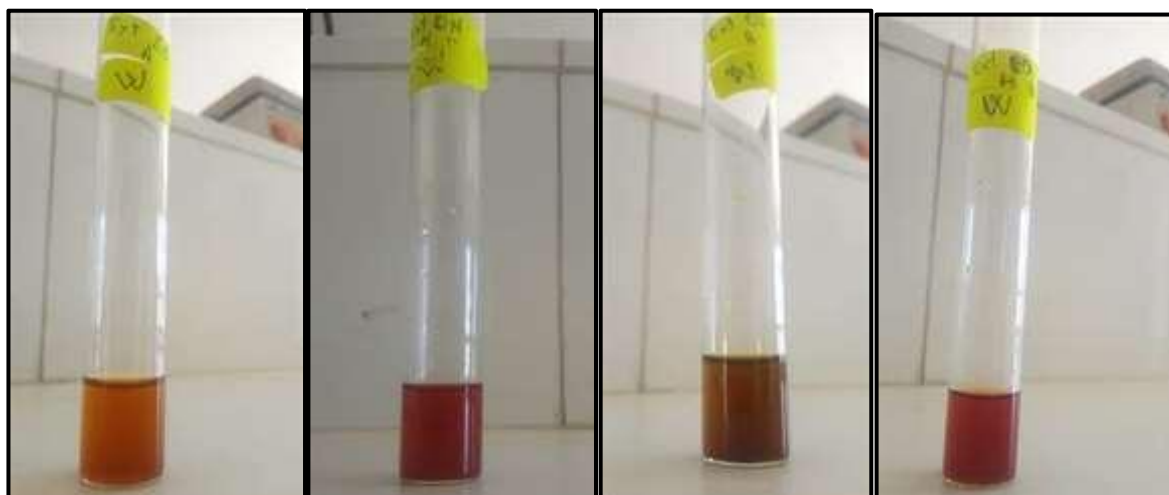


4- Alcaloïdes :

4-1- Réactif de Mayer :



4-2- Réactif de Wagner :



5- Les coumarines :



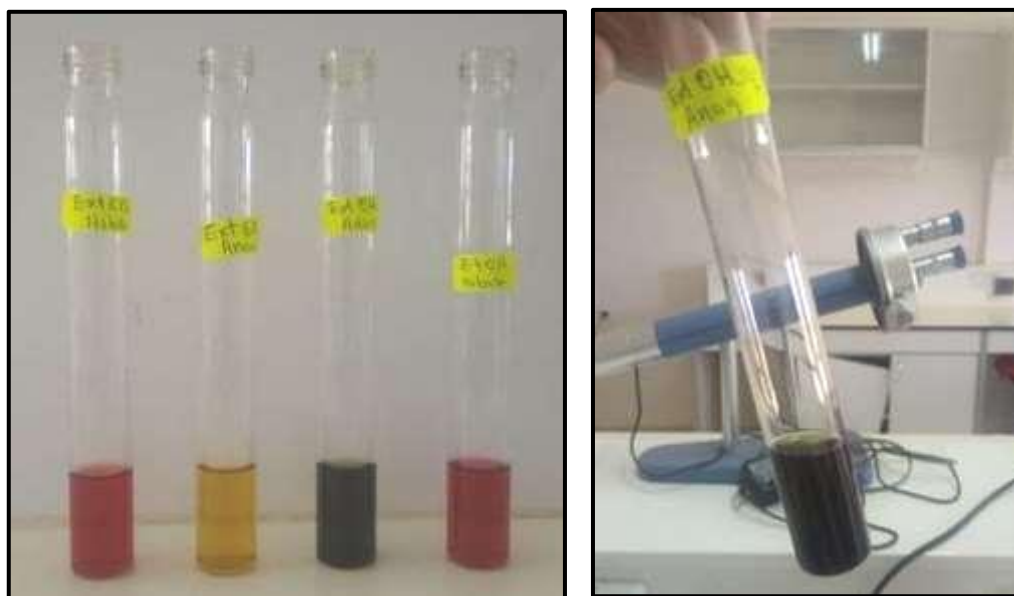
6- Quinones libres :



7- Saponosides :



8- Stéroïdes :



9- Sucres réducteurs :



1- Dosage des composés phénolique :

1-1- Dosage des saponosides dans les extrais aqueux :



1-2- Dosage des acides phénols dans les quatre extraits :



1-3- Dosage des polyphénols totaux



1-4- Dosage des flavonoïdes :



1- Activités antioxydant : Test de DPPH

1-1- Mélange solution, acide gallique DPPH :



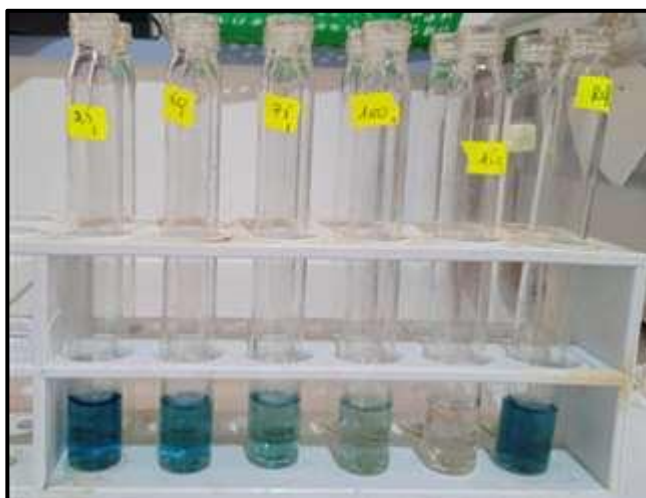
1-2- Mélange solution DPPH extrait hydroethanolique d'*Hibiscus sabdariffa*

1-3- Mélange Solution DPPH extrait hydroethanolique d'*Anagallis arvensis*

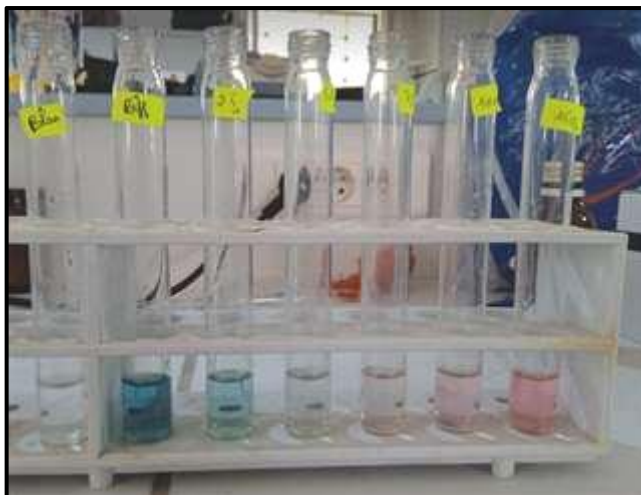


2- Activité anti-oxydante (Test de l'ABTS)

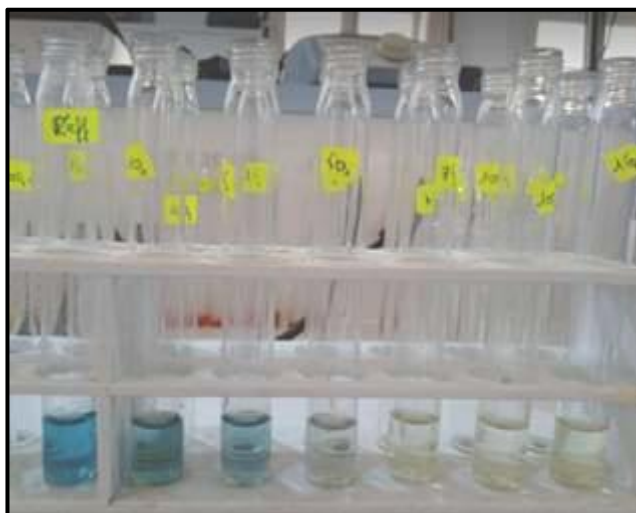
2-1- Mélange ABTS acide gallique



2-2- Mélange solution ABTS extrait hydro-éthanolique d'*Hibiscus sabdariffa*



2-3- Mélange solution ABTS extrait hydro-éthanolique d'*Anagallis Arvensis*



Annexes 11 :

Résultats des tests Anova

Analyse de la variance (Y) :

Rendement d'extraction

Analyse de la variance (Y) :						
Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F	Codes de significatio
Modèle	2,000	117,135	58,568	3,867	0,083	.
Erreur	6,000	90,873	15,146			
Total corrigé	8,000	208,008				
Calculé contre le modèle $Y = \text{Moyenne}(Y)$						
Codes de signification : $0 < *** < 0.001 < ** < 0.01 < * < 0.05 < . < 0.1 < ^\circ < 1$						

Acides phenols

Analyse de la variance (Y) :						
Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F	Codes de significatio
Modèle	2,000	0,251	0,126	1112,532	<0,0001	***
Erreur	9,000	0,001	0,000			
Total corrigé	11,000	0,252				
<i>Calculé contre le modèle Y=Moyenne(Y)</i>						
<i>Codes de signification : 0 < *** < 0.001 < ** < 0.01 < * < 0.05 < . < 0.1 < ° < 1</i>						

Tanins condensés

Analyse de la variance (Y) :						
Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F	Codes de significatio
Modèle	2,000	34,124	17,062	627,801	<0,0001	***
Erreur	9,000	0,245	0,027			
Total corrigé	11,000	34,369				
<i>Calculé contre le modèle Y=Moyenne(Y)</i>						
<i>Codes de signification : 0 < *** < 0.001 < ** < 0.01 < * < 0.05 < . < 0.1 < ° < 1</i>						

Polyphenols totaux

Analyse de la variance (Y) :						
Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F	Codes de significatio
Modèle	2,000	3004,537	1502,269	1020,905	<0,0001	***
Erreur	9,000	13,244	1,472			
Total corrigé	11,000	3017,781				
<i>Calculé contre le modèle Y=Moyenne(Y)</i>						
<i>Codes de signification : 0 < *** < 0.001 < ** < 0.01 < * < 0.05 < . < 0.1 < ° < 1</i>						

Les flavonoides

Analyse de la variance (Y) :						
Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F	Codes de significatio
Modèle	2,000	18,745	9,373	5066,970	<0,0001	***
Erreur	9,000	0,017	0,002			
Total corrigé	11,000	18,762				
<i>Calculé contre le modèle Y=Moyenne(Y)</i>						
<i>Codes de signification : 0 < *** < 0.001 < ** < 0.01 < * < 0.05 < . < 0.1 < ° < 1</i>						

Les saponines

Analyse de la variance (concentration) :						
Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F	Codes de significatio
Modèle	1,000	0,126	0,126	125,210	0,000	***
Erreur	4,000	0,004	0,001			
Total corrigé	5,000	0,130				
<i>Calculé contre le modèle Y=Moyenne(Y)</i>						
<i>Codes de signification : 0 < *** < 0.001 < ** < 0.01 < * < 0.05 < . < 0.1 < ° < 1</i>						

Test ANOVA DPPH

Analyse de la variance (Y) :						
Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F	Codes de significatio
Modèle	1,000	452,955	452,955	208,170	0,000	***
Erreur	4,000	8,704	2,176			
Total corrigé	5,000	461,658				
<i>Calculé contre le modèle Y=Moyenne(Y)</i>						
<i>Codes de signification : 0 < *** < 0.001 < ** < 0.01 < * < 0.05 < . < 0.1 < ° < 1</i>						

Test ANOVA ABTS

Analyse de la variance (Y) :						
Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F	Codes de significatio
Modèle	1,000	2156,191	2156,191	1221179,311	<0,0001	***
Erreur	4,000	0,007	0,002			
Total corrigé	5,000	2156,198				
<i>Calculé contre le modèle Y=Moyenne(Y)</i>						
<i>Codes de signification : 0 < *** < 0.001 < ** < 0.01 < * < 0.05 < . < 0.1 < ° < 1</i>						

Test ANOVA activité ant-acétylcholinésterase

Analyse de la variance (Y) :						
Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F	Codes de significatio
Modèle	1,000	316,862	316,862	182,566	0,000	***
Erreur	4,000	6,942	1,736			
Total corrigé	5,000	323,804				
<i>Calculé contre le modèle Y=Moyenne(Y)</i>						
<i>Codes de signification : 0 < *** < 0.001 < ** < 0.01 < * < 0.05 < . < 0.1 < ° < 1</i>						